

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15524

研究課題名（和文）野生グリと栽培グリの遺伝的関係の解明と栽培化関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Genetic relationship between wild and cultivated chestnut population and identification of the genes related to chestnut domestication

研究代表者

西尾 聡悟（Nishio, Sogo）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：30507596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：日本全国に分布する野生グリを収集し、栽培グリとともに遺伝的構造解析を行なった。九州の野生グリはその他の地域の野生グリから遺伝的に大きく離れていることが明らかになった。さらに、本州の野生グリは西日本と関東地方と東北で緩やかに遺伝的に分かれた。関東では品種と野生グリの双方向で遺伝子流動が認められたが、丹波地方（関西）では栽培グリから野生グリのみの遺伝子流動が検出された。関東の栽培グリは野生グリから比較的少ない世代で栽培化されたのに対し、丹波地方の栽培グリは複数の地域からの持ち込みや複数回の人為選抜等、複雑な栽培化過程が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本全国を網羅する野生グリを収集し、栽培グリとともに遺伝的関係を明らかにした。一部の収集した野生グリは農研機構ジーンバンクに登録しており、研究や育種目的に利用することができる。農研機構のクリ育種においても、遺伝的多様性の拡大や温暖地域への栽培適応を目的として、収集した九州の野生グリを交雑利用している。

また、一部の野生グリは栽培グリからの遺伝子流動により遺伝的構造が変化していることから、生息域内保存だけでなく、ジーンバンク等の生息域外保存が重要であることが示唆された。

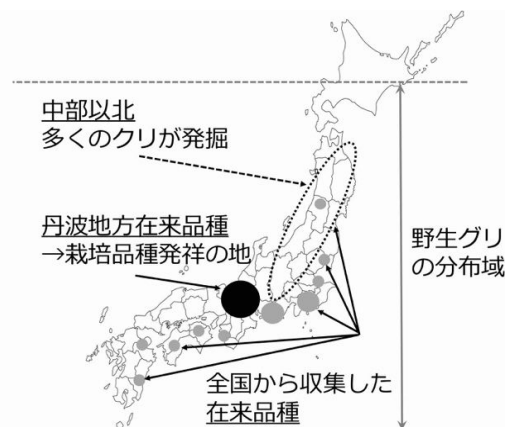
研究成果の概要（英文）：We collected wild chestnut populations distributed all over Japan. Genetic structure analysis was conducted using wild and cultivated chestnut populations. The wild populations in Kyushu were genetically distant from other populations, and the populations other than Kyushu were gradually differentiated among northeastern, Kanto and southwestern Japan. The bi-directional gene flow between cultivars and wild individuals were detected in Kanto region, whereas only direction from cultivars to wild populations was confirmed in Tanba region. Those results suggested cultivars in Kanto were selected from wild individuals in Kanto region, whereas cultivars in Tanba may be affected by genotypes introduced from other regions, several human selection steps, and complex domestication process.

研究分野：園芸学

キーワード：遺伝的多様性 遺伝資源 遺伝的構造解析 クリ 栽培化

## 1. 研究開始当初の背景

ニホングリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) は鹿児島県の屋久島から北海道中部にまで分布している温帯落葉果樹である。有史以前から人々に利用されており、縄文時代の中部以北の遺跡から多くの果実や木材が出土している (第1図)。一方で、在来品種や栽培技術が確立したのは江戸時代の丹波地方 (大阪府、京都府、兵庫県) とされており、丹波地方から優良品種が全国に伝わりクリ栽培が広がったと考えられている。このように、ニホングリは野生の個体が日本全国に広く分布することに加え、長い歴史の中で選抜されてきた在来品種が存在するため、国内に多様な遺伝資源を有している。しかしながら、在来品種や近代品種については遺伝的な分類研究や遺伝解析が進められているものの、野生グリの遺伝的な研究はほとんど行われておらず、野生グリと栽培グリの遺伝的な関係は不明である。これを明らかにすることで、遺伝資源の収集と保存を計画的に行う事が可能になり、クリ栽培の歴史を科学的に検証することができる。また、野生グリと栽培グリの遺伝的な関係と有用遺伝子を明らかにし、遺伝的に離れている野生グリ個体の遺伝子移入を進めることは、クリ育種において遺伝的多様性を拡大する上で有意義である。



第1図 日本全国に分布する遺伝資源の概要

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、野生グリと在来品種の遺伝的多様性を評価し、両者の遺伝的な関係明らかにすることである。古くから存在する文献記録と遺伝的な解析を検証し、ニホングリの栽培化の歴史を推定する。さらに、栽培グリと野生グリの全ゲノム解析をすることで栽培化に関連した遺伝子を同定する。本解析を行うことで日本のクリ遺伝資源の解析を網羅することになり、野生グリおよび栽培グリの適切な保全計画を策定することが可能となる。また、栽培化に関わる遺伝子座や、多様な野生グリを遺伝資源として利用することで、クリの育種の効率化を進めることが可能である。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生グリ遺伝資源の収集

収集済みの野生グリに加えて、北海道、四国、太平洋沿岸の野生グリの収集を行い、日本全土を網羅する野生グリ集団のコレクションを作成する。果実および樹の形質データを取得し、野生グリと栽培グリの比較を行う。

### (2) ニホングリ「銀寄」のリファレンスゲノムの作製

遺伝的構造解析やゲノムワイドアソシエーション解析を効率的に行うために、ニホングリ「銀寄」のリファレンスゲノムを作製した。PacBioによりロングリードを取得し、contigを作成した。ddRAD法により「Bouche de Bétizac」と「Madonna」の交雑実生用いて連鎖地図図を作製し、contigの位置情報を決定し、染色体ベースのリファレンスゲノムを構築した。

### (3) 野生グリと栽培品種の遺伝的構造解析

収集した野生グリと栽培品種についてDNAを抽出し、MIG-seq法によりジェノタイピングを行った。得られたジェノタイピングデータを元にヘテロ接合度や近交係数等から、遺伝的多様性を評価するとともに近隣接合法による樹形図を作製し、各集団の詳細な遺伝的な関係を明らかにする。遺伝的構造解析や移住率の推定およびコアアレル解析を行い、栽培グリと各野生グリ集団の遺伝子流動の方向性や推定祖先集団の分岐時期を推定する。これらの結果と考古学的知見や文献を合わせて、クリの栽培化の歴史について、科学的な根拠を示す。

### (4) 野生グリと栽培品種の比較全ゲノム解析

遺伝的な分類を行った野生グリ集団から、代表的な個体を抽出し、在来品種と合わせて、各個体で7Gb (クリのゲノムサイズの10×相当) の全ゲノムリシーケンス解析を行う。作製した「銀寄」のリファレンスゲノムに次世代シーケンサーにより得られた配列をマッピングし、栽培グリに特異的な領域を同定し、栽培品種特有の栽培化に関連した遺伝子の推定を行う。また、野生グリおよび栽培品種について、果実重、収穫期等のクリ生産上重要な形質について、ゲノムワイドアソシエーション解析を行い、有用形質を制御する遺伝子を推定する。

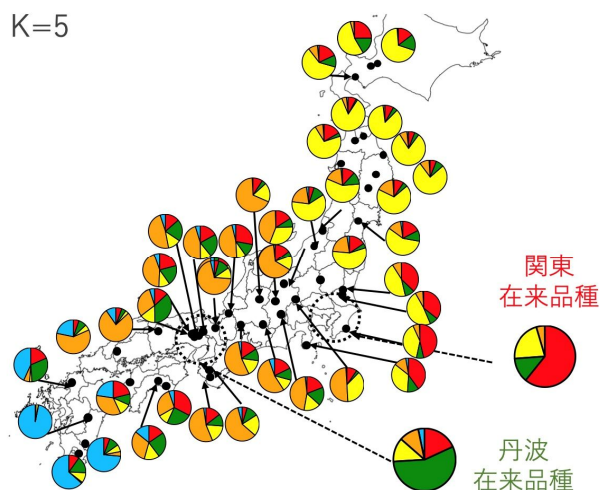
#### 4. 研究成果

(1) 2020-2021 年にかけて、北海道、四国、太平洋沿岸九州北部等の野生グリを収集し、全国を網羅する 41 集団からなる野生グリ個体を収集した。さらに品種の成立において重要である関東地方と丹波地方を含む栽培グリ 4 集団を整理し、野生グリ集団とともに DNA の抽出を行なった(第 2 図)。重要形質の調査を行なったところ、果実重で野生グリと栽培グリで明確な違いがみられ、栽培グリでは平均で 21.6g に対し、野生グリは平均で 3.9g であった。

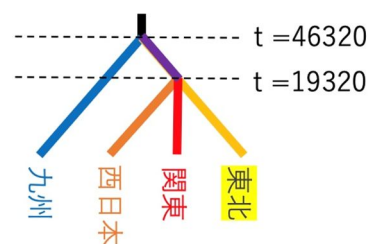
(2) 「銀寄」から得られたロングリードをアセンブルし、全長で 721.1Mbp からなる 781 のコンティグが得られた。交雑実生用いて作製した連鎖地図から contig の位置関係を推定し、683.8Mbp の 12 染色体に対応するリファレンスゲノムを構築した。ニホングリのリファレンスゲノムについては本研究が最初の報告であり、これを用いて、遺伝的構造解析やリシーケンス解析を高精度で行うことが可能となった。

(3) 在来品種と野生グリを含む 847 個体は、 $K=5$  を祖先集団として、九州地方、西日本地方、東北地方の野生グリの 3 つのクラスターと、関東の在来品種と一部の関東の野生グリ、丹波地方の在来品種がそれぞれ優勢な 2 つの在来品種のクラスターに分類された(第 2 図)。関東の在来品種および丹波地方の在来品種集団について、各野生グリ集団と遺伝子流動解析を行ったところ、関東の在来品種については在来品種から関東の野生グリ、関東の野生グリから在来品種の両方向の遺伝子流動が検出された。一方で丹波地方の在来品種については、在来品種から関西の野生グリへの一方向のみへの遺伝子流動が検出された。このことから、関東の栽培グリは関東の野生グリから比較的少ない世代で栽培化されたのに対し、丹波地方の在来品種は丹波地方の野生グリから栽培化されていない可能性が示唆された。

上記 5 つのクラスターのうち、九州地方の野生グリ、西日本地方の野生グリ、東北地方の野生グリ、および関東の在来品種と野生グリの 4 つの主要なクラスターからそれぞれクラスター率が 0.8 以上の個体を取り出し、コアレセント解析に用いた。文献情報や地理的情報から様々な分岐や混合のモデルを作製し、適切なモデルを推定したところ、まず西日本、関東、東北の 3 つのクラスターが同時期に合着し、その後九州のクラスターが合着したと推定された。最初の合着は 943 世代前(95%信頼区間;222-1605)、次の合着は 2356 世代前(95%信頼区間;1066-3748)と推定された(第 2 図)。世代の推定値の信頼区間は非常に広く、また世代時間 20 年は大胆な見積りとなるが、最終氷期極大期以前の約 46320 年前に九州と本州で分岐があり、最終氷期極大期の約 19320 年前に 3 集団が分岐した可能性が考えられた。以上より、丹波地方の在来品種と関東地方の在来品種は別々に栽培化されたこと、祖先集団の野生グリは少なくとも 2 回の分岐を経たことが示唆された。丹波地方の在来品種と同様のクラスターを優勢する野生グリ集団の存在が確認できないため、丹波地方の在来品種は関東の在来品種のように特定の地域から単純な栽培化で成立したものではなく、複数の地域からの持ち込みや複数回の人為選抜によるボトルネックなど複雑な栽培化過程を経ている可能性が考えられた。

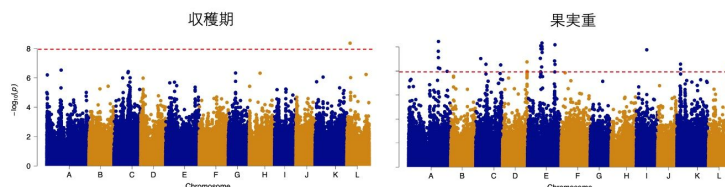


第 2 図 サンプルしたグリ集団と遺伝的構造



第 3 図 コアレセント解析により推定された最適なモデル

(4) 主要な在来品種と野生グリを 36 個体ずつ含む 72 個体について、全ゲノムシーケンスを行い、321、063 の SNP を得た。収穫期と果実重について、ゲノムワイドアソシエーション解析を行なったところ、収穫期については 1 つの有意な SNP が検出されたが、果実重については複数の有意な SNP が検出された。



第 4 図 収穫期と果実重のゲノムワイドアソシエーション解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishio Sogo, Takada Norio, Terakami Shingo, Takeuchi Yukie, Kimura Megumi K., Isoda Keiya, Saito Toshihiro, Iketani Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic structure analysis of cultivated and wild chestnut populations reveals gene flow from cultivars to natural stands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80696-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishio Sogo, Ruan Shuan, Sawamura Yutaka, Terakami Shingo, Takada Norio, Takeuchi Yukie, Saito Toshihiro, Inoue Eiich	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic evidence that Chinese chestnut cultivars in Japan are derived from two divergent genetic structures that originated in China	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shirasawa Kenta, Nishio Sogo, Terakami Shingo, Botta Roberto, Marinoni Daniela Torello, Isobe Sachiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Chromosome-level genome assembly of Japanese chestnut ( <i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.) reveals conserved chromosomal segments in woody rosids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsab016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsab016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishio Sogo, Hayashi Takeshi, Shirasawa Kenta, Terakami Shingo, Takada Norio, Takeuchi Yukie, Imai Atsushi, Saito Toshihiro	4. 巻 306
2. 論文標題 Detecting a novel locus associated with pellicle peelability in Japanese chestnut populations preselected for a major peelability gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 111446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2022.111446	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾聡悟、高田教臣、竹内由季恵、今井篤、池谷裕幸
2. 発表標題 遺伝子流動とコアレセント解析から紐解くニホングリ栽培化の歴史
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------