

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450223

研究課題名(和文)花粉を飛散しないスギ品種を高精度で判定する技術の開発

研究課題名(英文) Development of genetic markers closely-linked to a male sterility locus in *Cryptomeria japonica*

研究代表者

上野 真義 (Ueno, Saneyoshi)

国立研究開発法人 森林総合研究所・森林遺伝研究領域・チーム長

研究者番号：40414479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：花粉の形成に異常があるために、正常な花粉を生産できないスギ(雄性不稔スギもしくは無花粉スギ)を利用して交配家系を作成し、家系の各個体について正常なスギ(可稔)なのか無花粉スギ(不稔)なのかを調べ、さらに可稔と不稔の個体間で特定のDNA配列を比較することで、個体の不可稔性を高精度で識別できるDNAマーカーの作成を行った。その結果、一つのマーカーは交配家系の99%について不可稔性を正しく判定できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Male sterility locus (*ms1*) in sugi (*Cryptomeria japonica*) was mapped using a back-cross family, where 85 fertile and 88 sterile individuals were included. SNP markers were developed from RNA-Seq and ddRAD-Seq approach. One of the markers developed in the present study was located at 0.6 cM apart from *ms1*. Phenotypes regarding to the *ms1* was correctly estimated by the genotype of the marker for 99 % of offspring in the family.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：遺伝マーカー 針葉樹 表現型 ゲノム バイオインフォマティクス 花粉症

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は春先のスギ花粉の飛散に伴い発症するアレルギー疾患です。現在では国民の25%以上が花粉症と言われています。林業分野におけるスギ花粉症対策は、花粉発生源を減少させることです。花粉発生源対策として、広葉樹への樹種転換、少花粉スギや雄性不稔スギ(無花粉スギ)の利用が解決策として考えられています。

雄性不稔スギは全国各地でさまざまな系統が選抜されています。雄性不稔は単一の遺伝子により支配され、メンデルの法則により遺伝することが明らかにされています。この雄性不稔スギとの交配による精英樹(材質が優れ病気にもなりにくいスギ)の改良も進められています。しかしながら、雄性不稔スギを出荷するためには、2~3年間、種苗を育てた後、薬剤(植物ホルモンのジベレリン)により雄花を着花させて、実際に花粉の有無を確認する検定作業が必要となっています。なぜならばメンデルの法則により、交配の結果できた次世代のうちの、半数だけが不稔になるためです。効率的に雄性不稔の新品種を開発して種苗を供給するには、スギ雄性不稔の原因遺伝子の特定と、DNA情報を利用した簡便な鑑定技術が必要とされています。

2. 研究の目的

花粉を飛散しない雄性不稔スギと正常なスギとの間の遺伝子の違い(遺伝的変異)を多量に検出します。さらに、交配家系を用いて、雄性不稔に関連する変異を解析することで雄性不稔の原因遺伝子を染色体上に位置づけ、雄性不稔となるスギを高精度で簡易識別できる技術を開発します。

3. 研究の方法

(1) 材料は雄性不稔スギの交配家系で雄性不稔遺伝子(MALE STERILITY 1:MS1)について戻し交配となっています(図1)。この交配家系(T5)は新潟県森林研究所で育成されたものです。

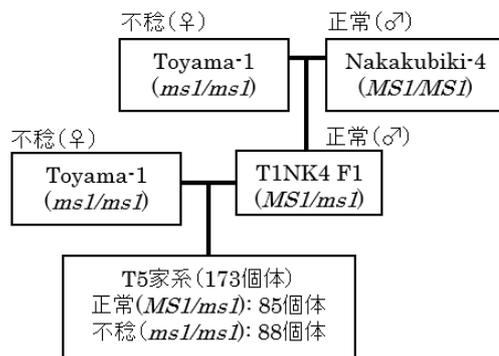
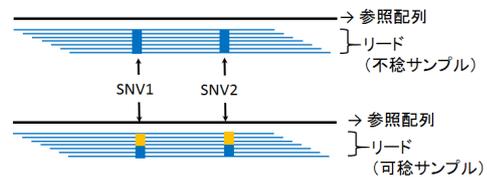


図1 研究対象とした雄性不稔家系(T5)

(2) RNA-Seq 法による配列データの収集とSNV(一塩基変異)の探索

T5 家系の中から雄性不稔個体と正常な可

稔個体をそれぞれ約 50 個体から、花粉の形成が行われる 10 月に雄花を採集し、遺伝子の転写産物である RNA を抽出しました。これらの転写産物の塩基配列を Illumina 社の新型シーケンサーによって収集しました(RNA-Seq)。収集した配列(リード)は不稔サンプルと可稔サンプルから、それぞれ 23Gb で、総計で約 46Gb です。リードから低品質な配列を除いた後、スギの遺伝子カタログ(完全長 cDNA 配列の 22,539 個の配列)にリードを並べて、配列の相違を比較することで、遺伝的変異(塩基置換に由来する一塩基変異:SNV)の候補を探索しました。SNV は不稔と可稔のサンプルでそれぞれ別々に検出し、SNV と雄性不稔遺伝子との関連性の指標値(D、図2)を計算しました。この指標値の絶対値は、戻し交雑の家系において、雄性不稔とSNVの関連性が強い場合は0.5になると期待されます。また関連性の指標値(D)はSNVが参照配列あたり2個以上、50bp以上離れて検出されたときに計算しました。



$$\bar{D} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{Sx_i}{Sx_i + Sy_i} - \frac{Fx_i}{Fx_i + Fy_i} \right)$$

仮定1: 戻し交雑の家系

仮定2: 不稔(Xx)と可稔(XY)の遺伝子の発現量はリードの本数に比例

Sx: 不稔のX対立遺伝子を支持するリード本数

Sy: 不稔のY対立遺伝子を支持するリード本数

Fx: 可稔のX対立遺伝子を支持するリード本数

Fy: 可稔のY対立遺伝子を支持するリード本数

n: 参照配列に含まれるSNVの数(図では2個)

参照配列と不可稔性との関連が強ければ \bar{D} は0.5もしくは-0.5と期待される(逆は必ずしも真ではない)

図2 不可稔性とSNVとの関連性の指標値(D)

(3) RAD-Seq 法による配列データの収集とSNV(一塩基変異)の探索

T5 家系の中から雄性不稔個体(8個体)と正常な可稔個体(12個体)および両親を対象に ddRAD-Seq 法(double digest Restriction-site associated DNA)により配列を収集しました。ddRAD-Seq 法では2種類の制限酵素を使用してゲノムDNAを切断し、断片の両端の配列を新型シーケンサーで収集します。収集した配列(リード)は不稔サンプルと可稔サンプルから、それぞれ2.3Gbと2.8Gbで、総計で約5.1Gbです。リードから低品質な配列を除いた後、同じ遺伝子座に由来するリード配列をまとめて、ddRADの参照配列としました。スギでは参照配列として利用できるゲノム配列がないため、ddRAD-Seq 法で収集した配列から参照配列(コンティグ)を作成するしか方法がないためです。この参照配列に不稔と可稔のリード

を並べて、配列の相違を比較することで、遺伝的変異（塩基置換に由来する一塩基変異：SNV）の候補を探索しました。各参照配列に対して、SNV と雄性不稔遺伝子との関連性の指標値（D、図2）を3(2)のRNA-Seqの場合と同様に計算しました。

(4) 雄性不稔に連鎖するマーカーの開発と連鎖解析

雄性不稔遺伝子との関連性の指標値（D）の絶対値が0.3以上の参照配列からマーカー候補を選択しました。RNA-Seq 法および ddRAD-Seq 法のそれぞれに由来する SNV 候補を48個ずつ選択し、T5家系（173個体）についてEP1システム（Fluidigm社）で各個体の遺伝子型を決定しました。連鎖解析は、JoinMapソフトウェア（Kyazma社）をもちいて行い、雄性不稔遺伝子（*ms1*）近傍の連鎖地図を作成しました。

4. 研究成果

(1) SNV（一塩基変異）の探索

RNA-Seq法で収集したリード（46Gb）を参照配列（22,539個の完全長cDNA配列）に整列させたところ、可稔サンプルおよび不稔サンプルともにリードの約68%が参照配列に対して整列しました。その結果、参照配列の各塩基は、平均で508本のリードによってカバーされたこととなります。SNVの候補は19,123本（84.8%）の完全長cDNA配列から検出されました。雄性不稔遺伝子との関連性の指標値（D）の絶対値が0.3以上の参照配列は80本ありました。

ddRAD-Seq法で収集したリード（5.1Gb）からは、16,455本の参照配列（合計で約3.5Mbのコンティグ）が作成されました。可稔サンプルおよび不稔サンプルともに収集したリードの約22%が16,455本のコンティグに対して整列し、コンティグの各塩基は、平均して不稔サンプルでは129本および可稔サンプルでは154本のリードによりカバーされました。SNVの候補は9,138本（55.5%）のコンティグから検出され、雄性不稔遺伝子との関連性の指標値（D）の絶対値が0.3以上のコンティグは262本ありました。

(2) 雄性不稔に連鎖するマーカーの開発と連鎖解析

雄性不稔遺伝子との関連性の指標値（D）の絶対値が0.3以上となった参照配列（コンティグ）から96個（RNA-Seqに由来する48個とddRAD-Seqに由来する48個）を選択してSNV解析用のPCRプライマー（マーカー）を設計しました。EP1システム（Fluidigm社）によりT5家系の173個体の遺伝子型を解析した結果、49個のマーカーで95%以上の個体の遺伝子型を決定しました。これらのマーカーの大部分は、戻し交配家系で期待される遺伝子型の分離比にも適合していました（ $p > 0.001$ ）。T5家系において連鎖解析を行っ

た結果、7個のマーカーが雄性不稔遺伝子（*ms1*）と同じ連鎖群（染色体）にあると考えられました。特に*ms1*遺伝子と最近傍のマーカーは*ms1*から0.6cMの距離だけ離れた場所に存在すると考えられ、T5家系の173個体のうち171個体（99%）においては不稔個体と可稔個体を遺伝子型から判定することが可能でした。



図3 雄性不稔遺伝子（*ms1*）近傍の部分連鎖地図（左側の数字は連鎖群での各マーカーの位置を表す。単位はcMである。）

本研究で開発されたマーカーは今後の雄性不稔遺伝子の同定や雄性不稔スギの育種において利用できると期待されます。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- (1) Moriguchi Y, Uchiyama K, Ueno S, Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Iwai J, Miyajima D, Saito M, Sato M, Tsumura Y (2016) A high-density linkage map with 2,560 markers and its application for the localization of the male-sterile genes *ms3* and *ms4* in *Cryptomeria japonica* D. Don, Tree Genetics and Genomes, 印刷中, doi:10.1007/s11295-016-1011-1 (査読有)
- (2) Moriguchi Y, Ueno S, Saito M, Higuchi Y, Miyajima D, Ito S, Tsumura Y (2014) A simple allele-specific PCR marker for identifying male-sterile trees: Towards DNA marker-assisted selection in the *Cryptomeria japonica* breeding program, Molecular Breeding, 10, 1069-1077, doi: 10.1007/s11295-014-0743-z (査読有)
- (3) Moriguchi Y, Ueno S, Saito M, Higuchi Y, Miyajima D, Ito S, Tsumura Y (2014) A simple allele-specific PCR marker for identifying male-sterile trees: Towards DNA marker-assisted selection in the *Cryptomeria japonica* breeding program. Tree Genetics & Genomes 10:1069-1077, DOI:10.1007/s11295-014-0743-z (査読有)

〔学会発表〕（計 5 件）

- (1) 森口喜成、内山憲太郎、上野真義、松本麻子、伊原徳子、岩井淳治、戸塚聡子、

津村義彦、DNA マーカーを用いた無花粉スギのピラミッディング育種、第 127 回日本森林学会、2016 年 3 月 29 日、日本大学

- (2) 内山憲太郎、加藤珠理、上野真義、鈴木節子、須貝杏子、松本麻子、樹木種のゲノムワイド解析に向けたマーカー整備、第 127 回日本森林学会、2016 年 3 月 28 日、日本大学
- (3) Saneyoshi Ueno, Yoshinari Moriguchi, Kentaro Uchiyama, Tokuko Ujino-Ihara, Norihiro Futamura, Asako Matsumoto, Yoshihiko Tsumura、Sugi genome resources、ProCoGen final open conference、2015 年 11 月 29 日、Orleans (France)
- (4) 内山憲太郎、加藤珠理、上野真義、松本麻子、森林樹木種における効率的なゲノムワイドマーカーの開発、森林遺伝育種学会第 4 回大会、2015 年 11 月 6 日、東京大学
- (5) 森口喜成、内山憲太郎、上野真義、伊原徳子、松本麻子、斎藤真己、岩井淳治、宮嶋大介、樋口有未、伊藤信治、佐藤雅哉、津村義彦、スギ雄性不稔遺伝子(ms-1~ms-4)の連鎖地図上の位置の特定、日本育種学会第 128 回講演会、2015 年 9 月 12 日、新潟大学

〔その他〕

スギゲノムデータベース

<https://www.ffpri.affrc.go.jp/labs/cjgenome/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 真義 (UENO Saneyoshi)

国立研究開発法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・チーム長

研究者番号：40414479

(2) 研究分担者

二村 典宏 (FUTAMURA Norihiro)

国立研究開発法人森林総合研究所・生物工学研究領域・室長

研究者番号：80343804

(3) 連携研究者

森口 喜成 (MORIGUCHI Yoshinari)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60644804