

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850103

研究課題名(和文) スギ雄性不稔原因遺伝子の単離 - 多様な無花粉スギリソース整備に向けて -

研究課題名(英文) Investigation of the male-sterile gene in Japanese cedar -for development of the various male-sterile Japanese cedar resources-

研究代表者

坪村 美代子 (Tsubomura, Miyoko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所林木育種センター・主任研究員

研究者番号：70415040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マーカー開発を目的として雄性不稔スギ「爽春」の原因遺伝子の探索を行った。遺伝子発現解析の結果、爽春の原因遺伝子は雄花発達過程の中で減数分裂期以前に発現する遺伝子であることが示唆された。次世代シーケンス解析、連鎖解析およびQTL解析より、無花粉形質と一致する一塩基変異(SNP)が検出された。これらのSNP情報を基にSNPマーカーを開発、爽春の複数の交配家系に適用したところ、無花粉個体だけでなくヘテロ個体の検出も可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The causative gene of a male-sterile Japanese cedar 'Sosyun' was investigated to develop a molecular marker for identifying male-sterile trees. The result of transcriptome analysis suggested that the causative gene of Sosyun has expressed at the meiosis stage or at the former stages. From the RNA sequencing data, the linkage analysis and QTL analysis, several SNP (Single Nucleotide Polymorphism)s tightly linked with the male-sterile trait were selected. We developed the SNP markers using these selected SNPs and applied them to the progeny of Sosyun. One SNP marker was able to detect not only the male-sterile individuals but also the heterozygous ones.

研究分野：林木育種学

キーワード：スギ 雄性不稔 花粉症対策 マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症問題が常態化し、森林整備や林業用品種の面から対策が行われている。花粉を飛散しない無花粉(雄性不稔)スギは、花粉の少ないスギ品種と共に花粉症対策品種として普及が進められているが、雄性不稔スギについては品種数の少なさや生産方法の特殊性から普及が進んでいない。地域で求められる特性も多様であり、本格的に雄性不稔スギを林業的に活用するためには、様々な形質を考慮した雄性不稔スグリソース(育種素材)を整備する必要がある。

雄性不稔スギ品種「爽春」と正常型のスギを交配した場合、第二世代( $F_1$ )の雄花は花粉を放出する(可稔)が、 $F_1$ を「爽春」に戻し交配した場合には1/2の個体が無花粉(不稔)となり、 $F_1$ 同士を交配した第三世代( $F_2$ )では1/4の個体が不稔となる。これらのことから、「爽春」の雄性不稔形質は一对の対立遺伝子に支配されており、劣性ホモになることで、その個体は雄性不稔となると考えられている。これまでに雄性不稔原因遺伝子の特定は行われておらず、不稔形質を確定するには交配後、実生個体に着花促進(ジベレリン)処理を行い、形成された雄花内の花粉の有無を目視により確認する必要があった。これらの形質調査には苗木育成等多大な労力が費やされ、その期間やコストが課題となっており、早期に判定できる遺伝マーカーの開発が望まれている。

森林総合研究所林木育種センターでは、「爽春」と様々な精英樹(成長、材質等が優れているクローン)を交配させ、雄性不稔スグリソースを整備してきた。しかし従来型手法では、交配等材料整備に時間がかかることに加えて、交配の段階で得られるヘテロ個体は可稔であることから形質により識別することはできない。原因遺伝子の特定あるいは近傍の強度に連鎖する遺伝マーカーを開発することができれば、交配の段階で得られるヘテロ個体の特定だけでなく、ヘテロで雄性不稔遺伝子を保有する精英樹を特定できることから多様な無花粉スギ作出を加速化できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的手法と遺伝学的解析に基づいて雄性不稔スギ品種「爽春」の原因遺伝子あるいは近傍の遺伝子を特定し、雄性不稔形質を持つ個体の判定を行うマーカーの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

組織観察および遺伝子発現解析より、爽春において雄花発達過程の中で花粉形成に異常が生じる時期を特定する。さらに、爽春戻し交雑家系を用いて、正常個体と不稔個体間の遺伝子発現解析およびESTの配列を比較し、候補遺伝子を絞り込む。絞り込まれた遺伝子についてアソシエーションおよび連鎖解析

を行い、マーカーを開発する。

(1) マイクロアレイによる遺伝子発現解析  
爽春において花粉形成に異常が生じる時期を特定する前段階として、組織観察および遺伝子発現解析によりスギの雄花の発達過程のステージングを行った。野生型クローン碓氷2号および爽春について、ジベレリン処理を行い、雄花形成初期から花粉飛散時期まで経時的に雄花を採取した。採取した雄花はFAA固定液にて固定後、凍結切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色した後顕微鏡による組織観察を行い、雄花の発達段階を区分した。また、決定されたステージに基づき、雄花から抽出したRNAをマイクロアレイ解析に供した。スギESTデータベース ForestGENの雄花ライブラリー由来の18,130ESTおよびスギ雄花 SSH ライブラリー由来の1,129ESTを用いて作成されたマイクロアレイチップ(Roche Nimblegen)を用いた。

さらに、遺伝的背景が類似している爽春戻し交雑家系(不稔2個体、可稔3個体)および爽春の雄花を採取、RNAを抽出し、マイクロアレイによる可稔・不稔個体間の遺伝子発現の比較を行った。マイクロアレイ解析にはスギの形成層、頂端、シュート、雄花から収集されたNGSデータ(Mishima *et al.* 2018)を基に22,194ESTを用いて作成されたマイクロアレイチップ(Agilent Technologies)を使用した。

(2) 次世代シーケンス解析による個体間の遺伝子情報の比較

爽春、碓氷2号、爽春戻し交雑家系(不稔2個体、可稔4個体)について、組織観察結果より不稔個体において異常が確認される発達ステージを含む4ステージのサンプルよりRNAを抽出し、次世代シーケンス解析に供した。爽春と碓氷2号についてはRoche 454 GS-FLXを、爽春戻し交雑家系についてはIllumina HiSeqを用いてシーケンスデータを取得した。得られた配列を基に可稔・不稔個体で異なる配列部位、SNP(一塩基変異)の探索を行った。

(3) SNPマーカーの開発および連鎖解析

次世代シーケンス解析より得られたSNP、および、様々な器官のEST配列より得られた約7万のSNPを搭載したAxiom genotypingにより開発された、雄性不稔遺伝子と強く連鎖していると考えられるSNPマーカー(Mishima *et al.* 2018)を基に、フリーダタイム社製SNPジェノタイピングシステムep1に適用できるep1マーカーを作成した。爽春と精英樹の $F_1$ 同士を交配した $F_2$ 家系(爽春×東加茂7)×(爽春×鯉沢6)190個体の葉よりDNAを抽出し、これらのep1マーカーを用いてSNPジェノタイピングを行った。 $F_2$ 家系についてはジベレリン処理後、雄花内の花粉の有無を調査し、形質を確認した。ジェノタイピング

データ、形質データを用いて連鎖解析および QTL 解析を行った。さらに、それぞれ異なる精英樹と交配した爽春 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、戻し交雑家系についても、絞り込まれたマーカーを用いて SNP ジェノタイピングを行った。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる遺伝子発現解析  
スギの雄花の発達段階をモデル植物であるシロイヌナズナの雄花発達過程と比較したところ、10のステージに区分された。これらのステージに基づき、遺伝子発現解析結果について主成分分析を行ったところ、前期、中期、後期に分けられた(図-1)。爽春においては、組織観察結果からはステージ4(減数分裂期)までは正常個体と比較して異常は認められなかったが、ステージ5(四分子期)～ステージ6(小孢子期)において、四分子が遊離せず、葯内が不定形物質に覆われるという異常が見られた(図-2)。また、遺伝子発現解析結果からは爽春においてステージ4(減数分裂期)から発現量が下がる遺伝子が多く見られた。

決定された雄花発達ステージより、爽春および戻し交雑家系の遺伝子発現解析には、花粉の発達異常が見られる時期を含むステージ2～6のサンプルを用いた。ステージングの結果より、ステージ5～6は発現に大きな差が見られないため、ステージ5のサンプルは使用しなかった。マイクロアレイに搭載されたESTのうち、低発現のもの、全サンプルにおいて発現量にほぼ変化がないものを除いた10,841ESTについて解析を行った(図-3)。各ステージにおいて可稔-不稔間で2倍以上発現量が異なるEST数を表に示した。組織観察において花粉の発達異常が確認できるステージ6においては可稔・不稔間で発現量の異なるESTが多く見られた。これらのESTは不稔個体において正常な花粉が形成されなくなったことにより発現量が変化した遺伝子群であると考えられた。また、ステージ4から発現量が変化するESTが多く見られ、原因遺伝子はステージ4かそれより前のステージで発現する遺伝子であることが示唆された。

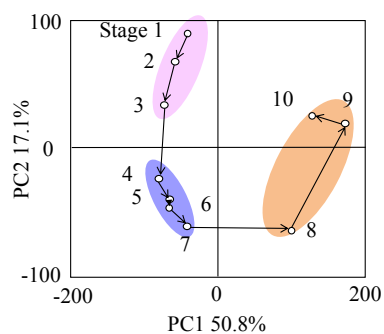


図-1 スギ雄花の10の発達ステージの遺伝子発現解析結果(主成分分析)。前中後期に分けられる。

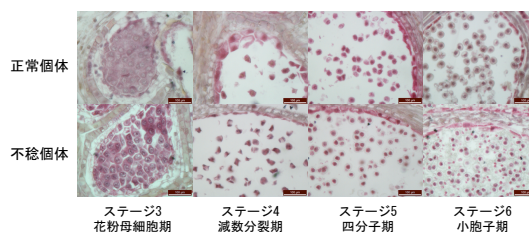


図-2 正常個体と不稔個体の雄花発達ステージ3～6の葯内。不稔個体ではステージ6において小孢子が遊離しない。

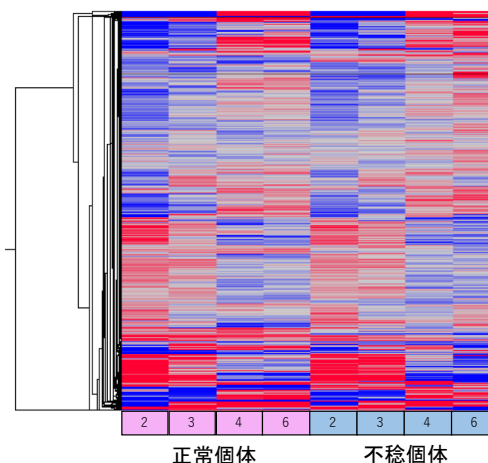


図-3 各ステージの正常個体、不稔個体の遺伝子発現解析結果。赤色が高発現、青色が低発現を示す。

表 各ステージで2倍以上発現量に差があるEST数

	ステージ2	ステージ3	ステージ4	ステージ6
可稔>不稔	29	23	59	311
可稔<不稔	48	48	82	241

#### (2) 次世代シーケンス解析による個体間の遺伝子情報の比較

次世代シーケンス解析の結果、碓氷2号：約16万リード、爽春：約13万リードが得られ、爽春戻し交雑家系においては可稔個体：約1億1500万リード、不稔個体：約1億リードが得られた。これらの配列を、雄花、シュート、頂端、形成層、根から収集されたスギESTデータベース(Mishima *et al.* 2018)にマッピングを行い、不稔個体と可稔個体間で異なるSNPを探索した結果、爽春-碓氷2号間では約7,500、爽春戻し交雑家系間では約12万のSNPが検出された。

#### (3) SNPマーカーの開発および連鎖解析

次世代シーケンス解析の結果得られたSNPのうち、不稔個体でホモ型を示し、不稔個体で異常が見られるステージ6以降で発現する遺伝子を除外する等、遺伝子発現結果より絞り込みを行い、652セットのep1マーカーを開発した。これらのマーカーおよびAxiom genotypingにおいて原因遺伝子近傍にある

と推測された 48 セットの ep1 マーカーを爽春 F<sub>2</sub>家系 190 個体に適用し、連鎖地図を作成した。QTL 解析の結果、Axiom genotyping 結果同様、EST reCj19250 の SNP において高いピークが見られ、劣性ホモ型となる不稔 42 個体全ての識別が可能であった。この ep1 マーカーをそれぞれ異なる精英樹と交配した爽春 F<sub>1</sub>家系 15 個体、F<sub>2</sub>家系 25 個体、戻し交雑家系 5 個体計 45 個体に適用したところ、不稔 22 個体は全て不稔型を示し、F<sub>1</sub>個体は全てヘテロ型を示した。これらの結果から、この ep1 マーカーは爽春の雄性不稔個体、ヘテロ個体を検出するマーカーとして利用可能であると考えられた。

#### 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 2 件)

①Mishima K, Hirao T, Tsubomura M, Tamura M, Kurita M, Nose M, Hanaoka S, Takahashi M, Watanabe A(2018) Identification of novel putative causative genes and genetic marker for male sterility in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don), BMC Genomics, 19:277, 査読有  
doi:10.1186/s12864-018-4581-5

②Tsubomura M, Kurita M, Watanabe A(2016) Determination of male strobilus developmental stages by cytological and gene expression analyses in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*), Tree Physiology, 36(5):653-666, 査読有  
doi:10.1093/treephys/tpw001

[学会発表] (計 1 件)

①Mishima K, Hirao T, Tsubomura M, Tamura M, Kurita M, Nose M, Hanaoka S, Ohira M, Fukatsu E, Takashima Y, Iki T, Miura M, Hiraoka Y, Takahashi T, Hoshi H, Watanabe A(2017) Putative causative genes discovery and marker development for male sterility aiming at marker assisted selection using high-density linkage map based QTL analysis in Japanese cedar. Plant and Animal Genome XXXV Conference, P0586

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪村 美代子 (TSUBOMURA, Miyoko)  
国立研究開発法人森林研究・整備機構・  
森林総合研究所林木育種センター・主任研究員

研究者番号：70415040