

平成30年6月16日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18715

研究課題名(和文) 千島系・樺太系グイマツの系統的ルーツの解明と育種利用の評価

研究課題名(英文) Evaluating phylogenetic lineages of *Larix gmelinii* var. *japonica* (Chishima-, or Karafuto-type) and their availabilities for *Larix* breeding

研究代表者

石塚 航 (Ishizuka, Wataru)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・森林研究本部林業試験場・研究主任

研究者番号：80739508

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)：針葉樹グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) は北海道の主要導入樹種として林業利用されるが、そのルーツははっきりとしない。そこで、育種利用されるグイマツの来歴を調べるとともに、分子遺伝学的解析によって系統的ルーツを探った。本研究により、グイマツ全家系の遺伝資源情報の整理、および、グイマツ葉緑体全ゲノム配列の決定ができた。また、網羅的な遺伝変異の探索によって、これまで推定されていた2系統は正しく遺伝的系統(千島系統、樺太系統)を反映していないこと、育種利用に系統的な偏りがあることがわかり、今後のグイマツ育種にとって重要な情報を提示した。

研究成果の概要(英文)： *Larix gmelinii* var. *japonica* is one of the major introduced coniferous species in Hokkaido, Japan, although the genetic origin of this species remains unknown. We searched for the origin and history of the specific families of *Larix gmelinii* var. *japonica* that were used in breeding programs, and evaluated the phylogenetic lineage. This study successfully made the catalog of *Larix gmelinii* var. *japonica* that contained information of genetic resources for all of the breeding families and determined the draft chloroplast genome of this species. The cpDNA-wide comparisons among species and among *Larix* genus also found that the two genetic lineages were not consistent with the previously assumed lineages, and the proportion of the families was uneven among lineages. These insights would be informative for future breeding programs of *L. gmelinii*.

研究分野：森林遺伝育種

キーワード：遺伝解析 ゲノム解析 葉緑体 系統地理 林木育種 カラマツ属

1. 研究開始当初の背景

北方系針葉樹の1種グイマツ (カラマツ属 *Larix gmelinii* var. *japonica*) の分布は寒冷圏の環境に限られており、現在は地理的に隔離した千島列島とサハリン (樺太) の2地域のみで自生地が認められている。北海道では、最終氷期にはグイマツが分布していたものの、地域絶滅したために現在は分布していない。その一方、林業用樹木として自生地から北海道へとグイマツが導入された経緯があり、北海道では優良なグイマツ家系が同属のニホンカラマツとの交雑育種材料として用いられ、普及しつつある。グイマツ交雑育種を今後さらに発展させるためにも、グイマツの遺伝的改良や適応力向上が期待されるものの、用いられているグイマツの系統的ルーツが不確かであることが課題となっている。

これまででは、地理的分布を反映した2系統 (千島系・樺太系グイマツ) が、その形態的特徴やわずかな来歴情報から推定されて用いられてきたが、近年発展した分子遺伝学的な解析技術、統計学的な解析手法を駆使することによって、その系統的ルーツを明らかにすることができると考えられる。これによって、今後の育種的应用を目指して、育種利用度に系統的なルーツによる差異があるかについても検証ができるだろう。

2. 研究の目的

本研究では、まず、大規模塩基配列解析によってグイマツ葉緑体ゲノムの解読を行う。続いて、北海道において交雑育種に用いられているグイマツ全クローン (106 精英樹, 3 遺伝資源木等) の遺伝資源情報の整理を行うとともに、それらの一部や、同属の近縁種を対象として、葉緑体ゲノム全領域にわたる網羅的な変異探索と精度の高い遺伝解析を実施し、想定されるグイマツ2系統がいつ分化したどのような歴史の変遷を辿ったか、その系統的ルーツの復元を試みる。また、グイマツの育種利用度に系統的偏りがあるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体ゲノム解読

針葉を用いたインタクト葉緑体の効率的な単離手法をあらかじめ確立させる。来歴が既知のグイマツ3家系 (千島列島由来; 2家系、サハリン由来; 1家系) を選定し、確立した葉緑体単離手法を用いて得た葉緑体から DNA を抽出する。次世代シーケンサー (Illumina HiSeq 2000) を用いて大規模塩基配列を取得し、De novo アセンブリによって新規にグイマツの葉緑体ゲノムを構築する。また、既存のDBを活用し、遺伝子情報のアノテーションを行う。

(2) グイマツの遺伝資源情報の収集・整理

北海道のグイマツ精英樹全 106 家系を対象に、精英樹台帳や過去の調査結果から来歴情報を整理する。同時に、一部の家系を対象に開葉、黄葉フェノロジーの調査を行い、形態

的特徴によるこれまでの系統推定の定量的評価を行う。

(3) 網羅的な変異探索と遺伝解析

先に用いたグイマツの代表3家系に加えて、グイマツ精英樹等約30家系と、比較対象としてカラマツ属他種約5家系を選定する。これらについても葉緑体単離とDNA抽出、大規模塩基配列解析によって葉緑体全ゲノム配列を取得する。続いて、葉緑体ゲノム全領域にわたる網羅的な変異探索を行う。得られた変異情報のうち、一塩基変異 (SNP) を用いた遺伝解析によって、分岐年代や系統推定を行う。

(4) 育種利用度の評価

グイマツ精英樹における遺伝的系統の偏りを集計するとともに、育種利用度の系統間差異について評価する。

4. 研究成果

(1) 葉緑体ゲノム解読

針葉樹を対象とした最新の葉緑体分画法が研究開始前年度に報告されたため (Vieira et al. 2014)、その手法を応用し、パーコール濃度勾配液を用いた葉緑体分画実験の最適化を図った。同時に、DNA抽出段階における試薬処理時間等の調整を行った。最終的に、生重5gのグイマツ針葉から50mgの葉緑体を得、1μgのインタクト葉緑体DNAを安定して抽出する手法を確立した。

代表3家系のそれぞれの葉緑体全ゲノムについて大規模塩基配列解析を実施し、それぞれで配列を決定することができた。その結果、*Larix gmelinii* 種においては初めて完全長の葉緑体ゲノムを得ることができ、環状構造、122,553-122,598 bpの配列長であること、111遺伝子と7偽遺伝子が推定されることを示した (図1)。

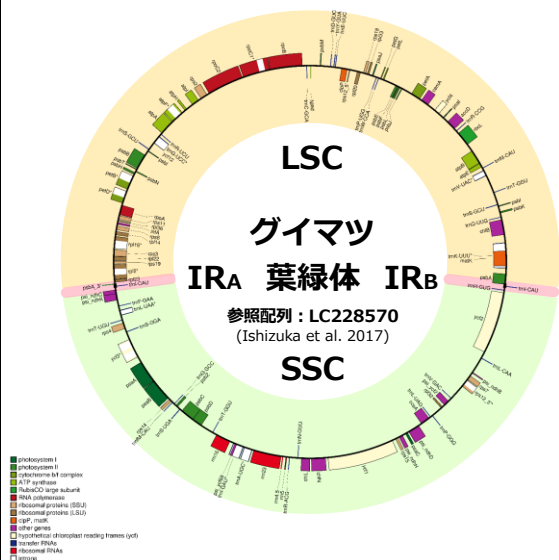


図1 グイマツ葉緑体地図の概観
葉緑体は環状構造で示され、そこに色付き四角で示した遺伝子が座する。背景色で葉緑体の4領域を区分して示す。

解読した代表3家系について葉緑体ゲノムについて、種内変異を特定したところ、ゲノム変異は19ヵ所に見つかり、内訳は11一塩基変異 (SNV)、1多塩基変異 (MNV)、2挿入/欠失 (In/Del)、5単純反復配列 (SSR) だった。用いた3家系は推定される両系統を含むように選定したが、推定される2系統間にみられるゲノムの違いのほうが、系統内のサンプル間のそれよりも大きいことがわかった。

(2) グイマツの遺伝資源情報の収集・整理
過去の台帳整備と形態形質情報の収集を行い、整理したところ、これまでに推定されていた2系統 (推定千島系統、推定樺太系統) の間で、明瞭なフェノロジーの違いがあることが定量的に確認された。また、これまでの推定によれば、7割の精英樹が推定2系統のいずれかに仕分けられるということが把握できた (内訳; 推定千島系統 19%、推定樺太系統 53%、不明 28%)。推定樺太系統が量的に多かったものの、家系内訳からは、盛んに育種利用の進む家系は推定千島系統に属していたことを明らかにした。

(3) 網羅的な変異探索と遺伝解析
グイマツについては計29家系、カラマツ属他種は計13家系 (このうち3家系はDB上の登録配列を利用) の葉緑体全配列を取得した。これらの比較によって網羅的な遺伝変異情報を収集し、系統とその歴史的動態を推定したところ、グイマツの中に大きく4つのクレードを認めることができ、色丹島 (千島) にルーツを持つクレードが2つ (クレード1、3)、サハリン (樺太) にルーツを持つクレードが2つ (クレード2、4) あると推定された (図2)。

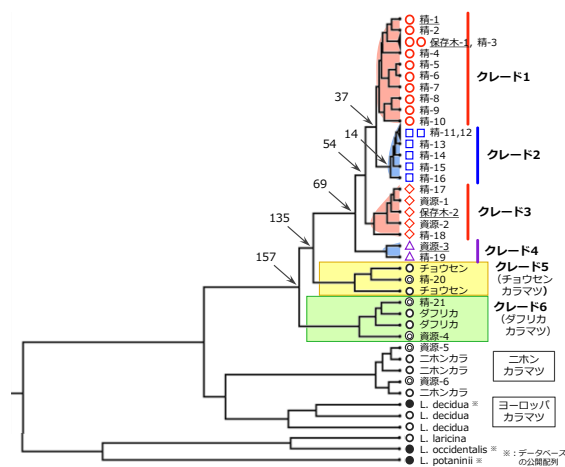


図2 遺伝的系統と分岐年代推定
系統樹末端のサンプル情報は、「精」がグイマツ精英樹、「資源」がグイマツ遺伝資源、「保存木」がグイマツ保存木を指し、他種は和名もしくは種名を記載。枝の数字が推定分岐年で単位は万年。

なお、推定されたグイマツの4つのクレード間の遺伝的分化は浅く、約70万年前以降であること、ならびに、色丹島ルーツのクレードが派生的であることが分かった。さらに、グイマツ精英樹や遺伝資源の中には、別変種や別種としてまとめられるチョウセンカラマツやダフリカカラマツに分類されるものがあることが新たに分かった。そのため、これら3種を1つの複合種 (*Larix gmelinii* complex) とする分類の妥当性を指摘できるものと考えられた。

(4) 育種利用度の評価
これまで精英樹台帳やフェノロジーなどの表現型に基づいて2系統 (推定千島系統、推定樺太系統) が推定されている。クレード3、4に含まれる精英樹の推定系統には矛盾がなかったが、クレード1、2では推定系統がそのルーツを正しく反映していないことが明らかになった。また、クレード1に属する精英樹が最も多く、育種利用度に系統的な偏りが存在することが指摘できた。

現在、北海道ではグイマツ精英樹の次世代化に取り組んでおり、第2世代精英樹候補木が選抜されている。その親情報を収集して評価したところ、精英樹数の多いクレード1のみでなく、クレード4に含まれる精英樹についても次世代精英樹親として大きく寄与していることがわかった。そのため、今後は遺伝的情報を踏まえたうえで、例えば積極的なクレード間の交配など効率的な育種プログラムの推進が望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Ishizuka Wataru, Tabata Azusa, Ono Kiyomi, Fukuda Yoko, and Hara Toshihiko (2017) Draft chloroplast genome of *Larix gmelinii* var. *japonica*: insight into intraspecific divergence, *Journal of Forest Research*, 22 (6), 393-399. doi:10.1080/13416979.2017.1386019. 査読あり

2. 石塚航 (2017) 北海道内のグイマツの遺伝資源情報, 北海道林業試験場研究報告, 54, 23-29. 査読あり,
<http://www.hro.or.jp/list/forest/research/fri/kanko/kenpo/pdf/kenpo54-4.pdf>

[学会発表] (計4件)

1. 石塚航 (2018) 適応進化を考慮した林業の展開と挑戦, 第65回 日本生態学会大会 シンポジウム「進化を考慮した応用生態学の展開: 理論と実践」.

2. 石塚航・田畑あずさ・小野清美・福田陽子・原登志彦 (2017) グイマツ育種材料の系統評価ー葉緑体全ゲノム情報を用いてー, 森林遺伝育種学会第6回大会.

3. 石塚航・田畑あずさ・小野清美・福田陽子・原登志彦 (2017) 地理的隔離する北方樹木グイマツ 2 系統の復元ーゲノム情報を用いて, 第 64 回 日本生態学会大会.

4. 石塚航・田畑あずさ・小野清美・福田陽子・原登志彦 (2016) グイマツ葉緑体の完全長ゲノム配列の解読と構造変異の推定, 森林遺伝育種学会第 5 回大会.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

DDBJ 配列登録

(1) LC228570 (*Larix gmelinii* var. *japonica* chloroplast DNA, complete genome, strain: LgCh01) URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC228570>

(2) LC228571 (*Larix gmelinii* var. *japonica* chloroplast DNA, complete genome, strain: LgCh02) URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC228571>

(3) LC228572 (*Larix gmelinii* var. *japonica* chloroplast DNA, complete genome, strain: LgKa01) URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC228572>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 航 (ISHIZUKA, Wataru)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構

森林研究本部林業試験場・研究主任

研究者番号：80739508