

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20380096

研究課題名（和文） スギ雄花着花量を制御する遺伝子の解明

研究課題名（英文） Genetic analysis genes that regulates male flower abundance of *Cryptomeria japonic*

研究代表者

伊原 徳子（IHARA TOKUKO）

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・主任研究員

研究者番号：40353594

研究成果の概要（和文）：

雄花の多いスギに由来する交配家系の277個体を用い、複数年に渡ってゲノム上の遺伝子塩基配列の違い（多型）と雄花着生量との関連を調べ、調査年の違いに関わらず雄花着生量と多型との高い関連が検出されるゲノム領域を複数明らかにした。これらのゲノム領域内の遺伝子多型と雄花着生量との関連について、さらに関東精英樹150個体に対象を広げて調べ、雄花着生量を制御する主要な遺伝子がある可能性の高い領域を絞り込み、該当のゲノム領域断片を単離した。

研究成果の概要（英文）：

Using cross-family derived from CR46, which bears abundant male strobili every year, association between DNA polymorphism and male strobili abundance was investigated. Stable and strong quantitative trait loci (QTLs) were detected. Association between genotype of markers in the detected QTL region and male flower abundance were further investigated using 150 plus-trees selected from Kanto region. Significant association was detected for one locus, and genomic clone including this locus has been isolated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	0	0	0
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学、森林科学

キーワード：スギ雄花、遺伝解析

1. 研究開始当初の背景

スギ雄花着生量については、多くの研究により遺伝的な効果が大きく選抜による花

粉飛散量低減が期待できる事が示され、雄花の少ない品種の選抜が行われている。しかし、雄花の着生（花成誘導）や量を制御

する遺伝子の特定には至ってはならず、その分子的なメカニズムの解明は未だ進んでいなかった。本研究で用いた非常に雄花着生量の多いスギ CR46 を花粉親とする交配家系の雑種第 2 世代では、幼齢時から雄花の多い個体と雄花をつけない個体が観察された。この交配家系を用い、個体間のゲノムの塩基配列の違いと雄花着生量との関連を解析することで、スギ雄花着生の鍵となる制御遺伝子を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

(1) 雄花着生量の多いスギ CR46 で変異していると予想される、雄花着生を抑制する機構に関わる遺伝子を明らかにし、普通スギでの遺伝子配列と比較してどの部分に変異があるかを調べ、雄花の着生制御に関与する多型を明らかにする。

(2) スギ個体 CR46 の後代では、雄花を着生する個体間でも量にばらつきがあり、(1) の遺伝子以外にも各個体の持つ対立遺伝子の組み合わせ（遺伝子型）が雄花着生量の決定に大きく寄与していることから、連鎖地図構築及び QTL (Quantitative Trait Loci) 解析を行って他の雄花着生量の制御遺伝子座を明らかにする。

(3) (1)、(2) で特定された雄花の量を制御する遺伝子について、雄花の少ない品種と多い品種での遺伝子配列の多様性を比較し、雄花の量と関連する遺伝子多型やその組み合わせを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄花着生量の調査

CR46 由来の雑種第 2 世代の A, B, C の 3 家系それぞれ 74、93、110 個体の雄花着生量を 5 段階で評価した。2002 年~2005 年は茨城県つくば市森林総合研究所構内、2006 年~2008 年は現かすみがうら市千代田苗畑に植栽されたラメット（同一クローンからの反復個体）を用いた。2006 年~2008 年は、最大 4 反復のラメットについて調査した。ラメット間の着生量には相関があったので、同一クローンのラメットの平均値を用いた。個体サイズの指標として根元径を測定した。2007 年に 2 反復について着生した全雄花を採取し、着花数を測定した。

林木育種センターに植栽された関東精英樹について、2009 年にジベレリン処理下での雄花着生量を 5 段階で評価した。

(2) 雑種第 2 世代個体の遺伝子型決定
スギ基盤連鎖地図 (11連鎖群) を約 10cM 間隔でカバーする DNA マーカーを選んだ。また、被子植物の花成遺伝子、花やおしべの数の異常を引き起こす遺伝子に高い類似性を持つ遺伝子をスギの EST データベースより取得した。これらの DNA マーカー（遺伝子）について交配家系の親間で塩基配列の違いを調べ、主に HRM (High Resolution Melting) 法により雑種第 2 世代の遺伝子型を決定した。

(3) 雄花着生量を制御する遺伝子の単離
DNA マーカーの分離データと、雄花着生量の表現型データを用いて QTL 解析を行い、雄花着生量に大きな効果を持つ染色体上の領域（連鎖地図上の位置）を決定した。さらにこの領域上にある DNA マーカーを用い、関東精英樹 150 個体について、2009 年に調査した雄花着生量データ・1992 年~1994 年のジベレリン処理下の雄花着生量（乾重）・1991 年~1993 年自然条件下の雄花着生量（5 段階評価）を用いて多型の関連を解析し、QTL の原因遺伝子の存在する領域の絞り込みを行った。

雄花量と遺伝子型の関連が有意になったマーカーについては、平均 130 キロ塩基長のスギのゲノム DNA が挿入された BAC ライブラリーから、該当のマーカー領域を含むゲノムクローンを 2 段階の PCR により探索した。得られたクローンの一部について、ゲノム断片の塩基配列を解読した。

4. 研究成果

(1) 交配家系後代に置ける雄花着生量

スギの高密度連鎖地図を基に、各連鎖群をカバーし、簡便にタイピングが行える DNA マーカーを作成した。また、花成遺伝子のホモログをスギ EST データベースから検索し、DNA マーカーを作成した。塩基多型の検出方法は高解像度融解曲線分析 (HRM 法) を用い、スギでの解析条件の最適化を行った。

2002 年から 2008 年まで、つくば市及び千代田市で個体の反復を含む雑種第 2 世代個体の雄花着生量を調べた。クローンの雄花着生量は年次ごとに変動するが、年次や植栽地に関わらず着生量には一貫した傾向があり

(Kendall 's coefficient of concordance, $p < 0.01$)、雄花着生量には遺伝的な効果が大きいことが裏付けられた。また、本研究に用いた材料では個体サイズと雄花着生量との相関は認められなかった。

(2) 雑種第2世代個体を用いた QTL 解析
CR46 を花粉親とする3つの半兄弟家系の第2世代個体の遺伝子型を、それぞれ 189、148、108 マーカーについて決定した。

表現型データと遺伝子型データを用い、1 遺伝子座毎に比較する Kruskal-Wallis テスト及び複数座の効果と同時に考慮するベイズ回帰モデルによる QTL 解析を行った。2つの手法による解析結果はおおむね一致し、第5連鎖群に異なる年次に共通する QTL を検出した。また、有意性はやや低いが、第6、9、11連鎖群 ($p < 0.005$) のマーカーについても複数年で共通して QTL が検出された(表1)。2007年に実測した雄花数を用いた場合でも、これらの QTL は検出され、5段階評価の妥当性が裏付けられた。各個体の調査期間内の平均の雄花量を用いて計算したところ、ベイズ回帰モデルにより検出された QTL は用いた3つの家系の表現型分散の 29、30、45%を説明した。

第5連鎖群の QTL は(以降 Qms1 と呼ぶ)、先行研究においてジベレリン処理下で検出された雄花量の QTL と一致していた(図1)。先行研究に用いられた交配家系の親は九州の在来品種であり、本研究に用いた親(関東以北由来)とは遺伝的に異なる。

Qms1 は、2つの解析で共に高い有意性を示したことで、異なるサイトや年次を通じて安定して検出されたこと、別の交配家系を用いた解析でも検出されていることから、スギの雄花着生量の制御に重要な遺伝子とその背景にあると期待される。Qms1 の原因遺伝子の単離のため、主に花成や花の数に関わる植物ホルモンの合成・シグナル伝達に関わる遺伝子のホモログから新たなマーカーを作成し、連鎖地図へのマッピングを進めた。

しかし、現在までのところ Qms1 領域にマッピングされた候補遺伝子はない。

連鎖群*	位置* (cM)	P 値*							r ²	
		2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年		
家系 A										
Qms1	5	7.05-34.96	0.0006	0.0015	0.0011	0.0028	0.0002	9e-06	0.0001	0.71
Qms4	11	68.74	0.0390	0.2796	0.0985	0.0221	0.0815	0.6697	0.7842	0.41
家系 B										
Qms1	5	0-23.30	0.0002	2e-06	4e-09	4e-05	0.0259	0.0009	0.0001	0.58
Qms2	6	43.99-52.0	0.0040	0.0298	0.1512	0.0003	0.0534	0.0336	0.0095	0.26
家系 C										
Qms1	5	7.05-34.96	9e-09	7e-08	2e-05	0.0077	7e-07	9e-05	4e-05	0.76
Qms2	6	23.19	0.0759	0.0039	0.0864	0.0496	0.5276	0.071	0.0248	0.60
Qms3	9	7.74-18.73	0.0223	0.0041	0.0004	0.0050	0.0416	0.0728	0.0230	nd
Qms4	11	68.74	0.0038	0.0003	0.0019	0.0243	0.0006	0.0047	0.0089	nd

a. 基盤連鎖地図 (Tani et al. 2003) における位置。
b. QTL 領域内のマーカーで最も小さい P 値を示す。
アスタリスク(*)は Bonferroni correction によるゲノムレベルでの有意性を示す。
c. ベイズ回帰での事後確率の平均

(3) 雄花着生量を制御する遺伝子の単離
スギはゲノムサイズが大きい、連鎖地図上の距離と物理的な距離との対応は一樣でないため、スギでの染色体ウォーキングの可能性を検討した。ゲノムサイズと基盤連鎖地図の総距離からは、1cM が 100 万塩基対前後と予想される。

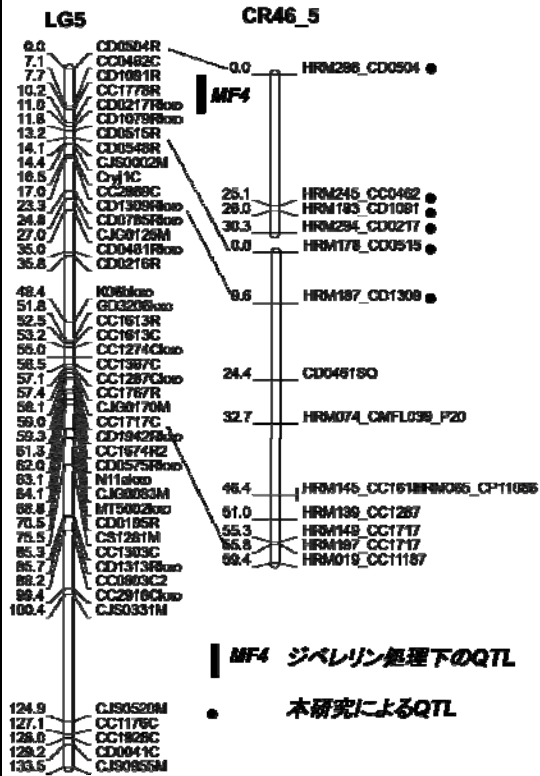


図1. 主要な QTL の連鎖地図上の位置

第5連鎖群の QTL に対応する DNA マーカーを使って BAC クローンを単離して一部について塩基配列を決定し、物理的な距離と遺伝距離との対応を調べた結果、基盤連鎖地図で 1 cM の距離にマッピングされた2つのマーカー間の距離はおおよそ 200Kbp であった。さらに多数の個体を用いた家系や、複数のマーカー間で検討する必要があるが、スギでも領域によっては染色体ウォーキングができる可能性がある。一方で、スギゲノム中には同一の塩基配列が非常に高い頻度で反復して散在することも明らかになった。この反復配列のためスギゲノム断片の末端の配列のみによるウォーキングは困難であり、個々の BAC クローンに含まれるゲノム断片全体の塩基配列を解読し、反復配列をさけたマーカーの作成がウォーキングを進めるために必要であることがわかった。

交配家系で得られた QTL について、スギ全般における雄花量への効果を見るため、また交配家系よりも連鎖不平衡の低い材料を用いて雄花着生量に関わる遺伝子の存在する領域を絞るため、関東精英樹を用いた関連解析を行った。

交配家系で雄花着生量との関連が統計的に有意であったマーカー(花成関連遺伝子3つを含む)の6つについて塩基配列を決定し、関東精英樹において雄花量との関連が有意になる塩基が存在するかを検定した。その結果、第5連鎖群のマーカー-CC0462の多型が複

数年においてジベレリン処理下の雄花量と有意な関連を示した (Kruskal-Wallis テスト, $p < 0.05$)。自然条件下での雄花着生量と有意な関連を示す多型はなかった。本研究で用いた交配家系で検出された QTL は、自然条件下の雄花着生量によるものであったが、他の材料においてはいずれもジベレリン処理下での雄花着生量と Qms1 内の DNA マーカーの多型に関連が検出された。これらの結果から、Qms1 の原因遺伝子はジベレリンによる花成制御に関わる可能性が高いと考えている。CC0462 にコードされる遺伝子は CBL-interacting serine/threonine protein kinase に高い類似性を持つが、この遺伝子ファミリーが直接花の数の制御に関わるという報告はまだない。近傍に真の原因遺伝子がある可能性を考慮し、スギの BAC ゲノムクローンライブラリより CC0462 を含むクローンを単離し、現在塩基配列を解読中である。

研究期間内に遺伝子の単離に至る事はできず、当初計画にあった遺伝子の多型を用いた雄花着生量の予測モデルの構築には至らなかった。しかし、針葉樹で初めて雄花着生量の制御に関わる主要な遺伝子に迫る、重要な成果をあげることができた。今後は Qms1 の原因遺伝子し、その遺伝子を利用した雄花着生量制御メカニズムの解明を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Ujino-Ihara T, Iwata H, Taguchi Y and Tsumura Y. Identification of QTLs associated with male strobilus abundance in *Cryptomeria japonica*. TREE GENETICS & GENOMES 8: 1319-1329 (2013) 査読有

② Moriguchi Y, Ujino-Ihara T (他 9 名)、The construction of a high-density linkage map for identifying SNP markers that are tightly linked to a nuclear-recessive major gene for male sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. BMC Genomics. 13:95 (2013) 査読有

③ Iwata H, Hayashi T, Tsumura Y. Prospects for genomic selection in conifer breeding: a simulation study of *Cryptomeria japonica*. Tree Genetics & Genomes. Tree Genetics and Genomes 7: 747-758 (2011) 査読有。

④ Ujino-Ihara T, Taguchi Y, Moriguchi Y, Tsumura Y. An efficient method for developing SNP markers based on EST data

combined with high resolution melting (HRM) analysis.

BMC Research Notes. 3:51 (2010) 査読有。

⑤ Ujino-Ihara T, Tsumura Y. Screening for genes specific to coniferous species. Tree Physiology 28:1325-1330 (2008) 査読有。

[学会発表] (計 3 件)

① 伊原 徳子、森口 喜成、内山 憲太郎、坪村 美代子、岩田 洋佳、渡辺 敦史、津村 義彦、スギ雄花着生量に関与する遺伝子座の遺伝解析、日本森林学会第 123 回大会、宇都宮大学、2012. 3. 27

② Iwata H, Hayashi T, Tsumura Y. Prospect for genomic selection in forest tree breeding. Eucarpia XIV meeting of the Biometrics in Plant Breeding Section. Dundee, UK. 2009. 9. 2

③ 伊原徳子、スギ雄花着生量を制御する遺伝子を探る～遺伝子型から表現型へ・ゲノム育種の林木における可能性～、第 120 回日本森林学会大会、京都大学、2009. 3. 27

[その他]

ホームページ等

[http://www. ffpri. affrc. go. jp/ labs/ cjgenome/ indexj. html](http://www.ffpri.affrc.go.jp/labs/cjgenome/indexj.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊原 徳子 (IHARA TOKUKO)

森林総合研究所・森林遺伝研究領域・主任研究員

研究者番号：40353594

(2) 研究分担者

岩田 洋佳 (IWATA HIROYOSHI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：00355489

坪村 美代子 (TSUBOMURA MIYOKO)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター・研究員

研究者番号：70415040

渡辺 敦史 (WATANABE ATSUSHI)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター・室長

研究者番号：10360471

辞退：平成 24 年 9 月 3 日