

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380020

研究課題名(和文) クリにおけるゲノム研究基盤の構築と選抜マーカーの開発

研究課題名(英文) Genomic research and their utilization for selection marker development in Japanese chestnut

研究代表者

井上 栄一 (Inoue, Eiichi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：90292482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：果樹の品種改良では、交配後に優れた果実をつける個体を選び出すのに長い年月、費用および労力を必要とする。近年、DNAマーカー(DNAの目印のこと)を用いて良い個体を効率よく選び出す方法が開発されている。しかし、ニホングリ(栗)では、その技術を使うための知識基盤が整備されていない。そこで本課題では、ニホングリと野生のチュウゴクグリ(甘栗)の雑種を材料として、DNAマーカーを開発し、果実の品質、樹の生育速度、そして開花に関する性質などの重要な形質との関係を調査研究した。この研究結果を礎として、将来、優良なクリの個体を選ぶためのDNAマーカーの実用化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the fruit breeding, shortening the selection period is very important because long years, considerable costs, and labor are needed for the selection.

Nowadays, the breeding efficiency could be improved by using the marker-assisted selection (MAS) according to the genomic information. However we had no enough genomic information about chestnuts. In this research we constructed genomic basis for realizing MAS in Japanese chestnut.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：クリ ゲノム SSRマーカー DNAマーカー 連鎖地図 QTL解析 種間雑種

1. 研究開始当初の背景

果樹の育種では、果実形質等の有用形質の選抜に長い年月と費用および労力を要する。したがって、その効率化が重要な課題となっている。近年、DNA 解析技術の発達により DNA マーカーを指標として有用形質の早期選抜を行う DNA Marker Assisted Selection (MAS) が脚光を浴びている。落葉果樹においては、バラ科のリンゴやナシ等において詳細な DNA マーカーの連鎖地図が作製され、耐病性等の有用形質について早期選抜が可能となってきた (林, 2005)。一方、本研究で材料としたブナ科落葉果樹のクリ (*Castanea*) においては、欧米の研究者によって、ヨーロッパグリ (*C. sativa*) 等の遺伝学的連鎖地図が作製され (Kubisiak et al., 1997; Barreneche et al., 2004)、ブナ科樹木との間での比較ゲノム研究が行われてはいるが (Casasoli et al., 2006)、日本における主要な栽培種であるニホングリ (*C. crenata*) においては、詳細な遺伝学的連鎖地図の報告は無く、ゲノム研究もほとんど進展していない。また、ニホングリに限らず、クリ属栽培種については国内外において多数の育種プロジェクトが遂行されているにもかかわらず、いまだに有用形質を選抜するための有効な DNA マーカー開発の報告はない。したがって、クリにおいて詳細な遺伝学的連鎖地図を構築し、DNA マーカーを利用した早期選抜の実用化に向けた研究や、発現遺伝子情報を蓄積し、有用遺伝子の同定や単離のための研究基盤を構築することは、国内外を問わず緊急の課題であり、極めて独自性の高い研究である。また、応用面においても、有用な選抜マーカーの開発や有用遺伝子の単離の礎として、将来的にも有効利用が期待できる。

研究代表者らは、既にニホンナシやニホングリにおいて、種々の遺伝子マーカーを開発し、選抜マーカーや遺伝資源の詳細な分類に応用している (Inoue et al., 2006; Ning et al., 2006; Inoue et al., 2007; 井上ら, 2008)。さらに、本課題の主要な植物材料であるニホングリ (*C. crenata*) とモーパングリ (*C. seguinii*) の種間交雑由来の F_1 分離集団の作出には平成 17 年から着手しており、既に必要とされる個体数の作出を完了し (寧ら, 2006)、野生種モーパングリの持つ灌木状樹形、連続着果性および早期開花性などの特徴的な形質がニホングリとの種間 F_1 世代において分離することも確認している。したがって、クリのゲノム研究を効率的に推進するための、基本技術および植物材料の準備が整っている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が育成したニホングリとクリ野生種モーパングリの種間交雑由来の F_1 集団を用いて、共優性マーカーである SSR マーカーを随所に配置した詳細な遺伝学的連鎖地図を作製した。同時に新規の各種 DNA マーカーを開発し、順次連鎖地図上に配置することにより、マーカー密度を飽和させた基準連鎖地図の開発した。さらに、 F_1 集団において、遺伝分離を確認した諸形質についての詳細な評価と数値化し、形質値を制御する量的形質遺伝子座 (QTL) の連鎖地図での位置を推定した。さらに、詳細なマッピングを行うことで、それらの形質を選抜するための DNA マーカーの開発を実証した。一方、発現遺伝子の解析では、片親であるチュウゴクグリ野生種モーパングリに特徴的な、早期開花形質に関わると推察される花成関連遺伝子について、ニホングリからの単離を試みるとともに、その発現の変動と開花との関わりを詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) DNA マーカーの開発と利用

クリにおける DNA マーカーの充実と高度利用を目指して、核および葉緑体の SSR マーカーを用いて、クリ遺伝資源の遺伝学的分類およびマーカー連鎖地図の作製を行った。

核 SSR マーカーの新規開発

チュウゴクグリ '浅刺' の SSR 濃縮ゲノムライブラリーを用いて、SSR 領域を増幅するプライマー対を設計した。遺伝子座の検出は、蛍光ラベルしたプライマーを用いて Genetic analyzer で行った。

葉緑体 SSR マーカーの応用

Sebastiani ら (2003) がヨーロッパグリの葉緑体ゲノム情報を利用して開発した葉緑体 SSR マーカー (以降 cpSSR マーカーと表記) を用いて、クリ属 9 種を用いて詳細に遺伝子座の変異を解析した。

ヨーロッパグリ SSR マーカーの応用

Marinoni ら (2003) による 12 種類の CsCAT マーカーおよび Buck ら (2003) による 8 種類の EMCs マーカーを用いた。

(2) 種間 F_1 集団を用いた遺伝形質評価および量的形質の数値化

有用形質の連鎖解析とマッピングおよび QTL 解析を行うための準備として、圃場で育成した F_1 世代における遺伝形質の詳細な評価および量的形質の数値化を行った。

ニホングリ '石鎚' × モーパングリの種間

F₁ 世代を用いて、樹高、樹勢、萌芽期、開花期、収穫期などの形質を調査し、量的形質については数値化することで精密に評価した。

(3) 種間 F₁ 集団における連鎖地図の構築

ニホングリ‘石鎚’およびモーパングリの種間 F₁ 集団を用いて、DNA マーカー連鎖地図を作製した。使用する DNA マーカーとしては、核 SSR マーカーに加えて、AFLP マーカーを用いる。JoinMap3.0 ソフトウェアを用いてダブルシュードテストクロス法 (LOD=5.0) により遺伝学的連鎖地図を構築した。

(4) 種間 F₁ 集団の連鎖地図を用いた遺伝形質の連鎖解析とマッピング

本研究で構築したクリの連鎖地図を用いて、種間 F₁ 分離集団において 3 年間に渡り、1 年生から 3 年生樹の表現型を調査した。遺伝解析と QTL 解析は、萌芽時期、葉脈数、葉面積、樹高、花粉稔性、果実重、収穫期および樹皮色についてそれぞれ評価したデータを用いて、MapQTL5.0 ソフトウェアで行った。

(5) 花成関連遺伝子の単離と解析

クリにおける開花制御に関わる遺伝的機構についての基礎的知見を得るため、花成関連遺伝子の単離と解析を行った。

シロイヌナズナにおいて花成誘導に関わっていることが報告されている *FLOWERING LOCUS T (FT)* および *APETALA1 (AP1)*、そしてイネなどにおいて FT タンパク質の受容体とされる 14-3-3 の遺伝子ホモログの部分配列をニホングリで単離した。さらに、リアルタイム PCR 法により、これら 3 種類の遺伝子ホモログについて、ニホングリとモーパングリにおける発現パターンを明らかにした。

4. 研究成果

(1) クリにおける DNA マーカーの開発

核 SSR マーカーの新規開発

濃縮ゲノムライブラリーから SSR 領域を含む多数のクローンの塩基配列を得た。それらの内 25 座に関しては、ニホングリ 42 品種およびチュウゴクグリ 22 品種を用いて、有用性を詳細に検討した。チュウゴクグリ 22 品種においては、座あたり 2~13 (平均 7.96) の対立遺伝子が検出された。ヘテロ接合性の期待値は 0.00~0.87 (平均 0.71)、同観察値は 0.00~0.91 (平均 0.69)、そして PI 値は 0.05~1.00 (平均 0.22) だった。一方、ニホングリ 42 品種においては、座あたり 2~21 (平均 7.48) の対立遺伝子が検出された。ヘテロ接

合性の期待値は 0.05~0.93 (平均 0.59)、同観察値は 0.00~0.93 (平均 0.57)、そして PI 値は 0.02~0.71 (平均 0.33) だった。これらのマーカー情報を用いることで、用いた全ての品種を識別することが可能であった。

葉緑体 SSR マーカーの応用

増幅された 10 種類の cpSSR 遺伝子座においては座あたり 2~7 種類の増幅断片長の変異が確認された。これら 10 遺伝子座における各断片長の組み合わせから、新たに 8 種類のハプロタイプが発見され、全遺伝子型が 16 のハプロタイプに分類された。種ごとにみると、今回用いたクリ属 9 種はそれぞれ別のハプロタイプに分類し、なかでもチュウゴクグリ他 4 種には種内に複数のハプロタイプが存在した。このようにクリ属の cpSSR 座は種および亜種レベルでの変異に富んでおり、クリの遺伝資源の分類、種の同定に極めて有効に利用できることが明らかとなった。cpSSR 遺伝子座のアリル情報に基づいて各ハプロタイプから 32 遺伝子型を選んで樹形図を作成したところ、ニホングリのみが含まれる 2 種類のハプロタイプが最も離れたクレードに単独でクラスターを形成した。このことは、ニホングリ種の分化の過程を推察するうえでの新規の情報であると考えられる。今後、ニホングリ野生種の遺伝子型を追加してより詳細に検討を加える必要がある。

ヨーロッパグリ SSR マーカーの応用

ヨーロッパグリ由来 SSR マーカー 20 座を用いた結果、15 座が明瞭な対立遺伝子を示した。そのうち、CsCAT 17 および EMCs15 の 2 座は多型を検出しなかった。また、CsCAT41 と EMCs4 の 2 座はマルチローカスを検出し、CsCAT1 と CsCAT14 の 2 座が Null 対立遺伝子を検出した。残りの 11 座について、1 遺伝子座の分離を示した。今回、遺伝子座が位置付けられたことから、これらは連鎖群の対応関係の評価する上で有用であると考えられた。

(2) 種間 F₁ 集団を用いた遺伝形質評価および量的形質の数値化

QTL 解析のために、1 年生から 3 年生樹に至る期間において種間 F₁ 分離集団の様々な表現型を調査し遺伝様式を推定した。その結果、樹皮色においては、赤褐色および黄緑色の個体が 1:1 に分離していたが、それ以外のほとんどの表現形質では連続的な変異が観察された。

(3) 種間 F₁ 集団における連鎖地図の構築

DNA マーカーの連鎖解析とマッピングの結果、ニホングリ‘石鎚’では 139 座のマーカー (7 SSR および 132 AFLP) が座乗し、2 つのマイナーな連鎖群を含む合計 13 の連鎖群からなる全長 629cM の連鎖地図が構築された。一方、モーパングリでは 133 座のマーカー (10 SSR および 123 AFLP) が座乗し、3 つのマイナーな連鎖群を含む合計 13 の連鎖群からなる 764cM の連鎖地図が構築された。さらに、双方の地図に座乗した 4 座の共優性インタークロス SSR マーカーに着目して連鎖群を整理した結果、‘石鎚’の連鎖群 I-6 および I-12 とモーパングリの連鎖群 M-12, I-8 と M-8, および I-2 と M-2 の対応関係が明らかとなった。

(4) 種間 F₁ 集団の連鎖地図を用いた遺伝形質の連鎖解析とマッピング

QTL 解析を行った結果、ニホングリ‘石鎚’においては、果実重に関する寄与率の大きい QTL が検出された。一方、モーパングリにおいては、樹高、葉面積、葉脈数、果実重、花粉稔性、萌芽期に関する 8 つの効果の大きい QTL が検出された。そのうち、複数年の樹高、萌芽期、葉脈数および葉面積の 5 つの QTL が連鎖群 M-12 のほぼ同じ位置に検出された。この QTL クラスターの近傍の AFLP マーカーは AT/CTG-202 であった。なかでも 2 年生時に測定した樹高では LOD 値が 37.69 と非常に高い値であった。このことから、AT/CTG-202 は若木における初期生育の選抜マーカーとして利用出来る可能性が示唆された。一方、萌芽時期に関する QTL は年次間で異なる連鎖群 M-8 と M-12 に各々検出された。同じブナ科のヤナギ属においても、同様に 4 つの萌芽に関する QTL が全て異なる連鎖群に検出されていることから (Tsarouhas et al., 2003), 萌芽時期を制御する要因は複数あり、それらの寄与率については年次変動が激しいと推察された。また、双方の地図において果実重に関する QTL が各々検出されたが、近傍に適切な SSR マーカーが存在しないことから連鎖群の対応関係は評価出来なかった。

(5) 花成関連遺伝子の単離と解析

ニホングリの葉由来の cDNA をテンプレートとして用いた RT-PCR の結果、ニホングリにおける FT 様遺伝子の 245bp の部分配列および AP1 様遺伝子の 493bp の部分配列を取得した。これら両遺伝子配列を BLAST 解析したところ、シロイヌナズナや木本植物における

両遺伝子ホモログとの高い相同性が確認された。このことから、ニホングリより新規に単離した 2 つの遺伝子配列は、クリにおける FT および AP1 様遺伝子であると推定された。さらに、これらの部分配列を用いてクリ FT 様遺伝子と AP1 様遺伝子の発現解析を行った結果、FT 様遺伝子は、3 月の萌芽直前の茎部と 7 月の結果枝および発育枝において発現量が増加していた。高発現がみられた直後の 8 月には‘石鎚’において初めて花芽分化が観察されたことから、FT 様遺伝子の開花誘導への関与が示唆された。一方、AP1 様遺伝子は、‘石鎚’において 3 月、5 月よりも 9 月の結果枝および発育枝で発現が高かった。このことから、FT 様遺伝子による 7 月頃の開花誘導によって、9 月の AP1 様遺伝子の高発現が誘導されたと推察された。一方、四季咲き性のモーパングリでは、FT および AP1 様遺伝子の発現量に極端な季節変動はみられなかった。FT 様遺伝子は、部位に関係なく常に高発現しており、AP1 様遺伝子は、茎部や花芽において常に高発現であった。

一方、14-3-3 では、368bp の部分配列が得られた。このクリ 14-3-3 ホモログはヨーロッパナヤバラ科のナシおよびリンゴの同遺伝子との相同性が高かった。また、発現解析を行ったところ、‘石鎚’では、発育枝と比べて結果枝の茎頂において 14-3-3 の強い発現がみられ、また 3 月における発現量が 5 月における発現量よりも大きかった。一方、モーパングリでは、5 月においては発育枝と結果枝の間で発現量に大きな差はみられず、‘石鎚’の発育枝と比較しても全ての部位で発現量は極めて低かった。しかし 3 月の発育枝茎頂において強く発現していることが分かった。

以上の結果より、今回新規にニホングリより単離した FT および AP1 様遺伝子は、クリにおける開花誘導に関わっていることが示唆された。今後は、単離した FT および AP1 様遺伝子の発現解析をより詳細に行っていくとともに、種間雑種における多様な表現型と FT および AP1 様遺伝子発現との関係を明らかにすることによって、クリにおける開花の分子機構の解明が期待される。

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 4 件)

井上栄一・本間貴司・佐々木道康・郷内武・霞正一、花粉遮断試験によるクリ品種間における自家結実性の評価と

SSR マーカーを用いた自家結実実生の遺伝解析, 園芸学研究, 園芸学会, 11, 199-203, 2012, 査読有.

本間貴司・原弘道・阮樹安・陳喜忠・王志運・井上栄一・月橋, クリ果実における糖とデンプン含有量の品種間差並びに加工グリの不良品発生要因, 全球視角下の当代農業問題研究, 中国農業科学技術, 2, 41-54, 2011, 査読有.

Inoue, E., L. Ning, H. Hara, S. Ruan and H. Anzai, Development of SSR Markers in Chinese chestnuts and their characterization in diverse chestnuts cultivars, Journal of the American Society for Horticultural Science, 134, 1-8, 2009, 査読有.

霞正一・郷内武・井上栄一・眞部徹・佐久間文雄, ニホングリとモーパングリの種間雑種の特性, 茨城県農業総合センター生物学研究所研究報告, 11, 33-44, 2009, 査読有.

[学会発表](計16件)

Eiichi Inoue, Michiyasu Sasaki 『QTL Analysis for Nuts Qualities in Interspecific Chestnut Population』, The 29th International Horticultural Congress 2014, 2014年8月17~22日, ブリスベン, (オーストラリア)

Eiichi Inoue, Tsunoda Suzuna, Takashi Kodama, Yasumasa Takatsu and Hisao Higashio 『Isolation and characterization of the flowering-related genes in chestnut』, ISHS Symposium "Physiological Principles and Their Application to Fruit Production", 2014年3月25~28日, ジェネーバ(アメリカ)

岡部慎也, 井上栄一, 他, 『ニホングリとモーパングリの種間雑種における堅果形質の変異』, 日本育種学会第123回講演会, 2013年3月27~28日, 東京農業大学

角田鈴奈, 井上栄一, 他, 『クリにおける開花関連遺伝子の単離と解析』, 園芸学会平成25年度春季大会, 2013年3月23~24日, 東京農工大学.

岡部慎也, 井上栄一, 他, 『クリ種間雑種におけるヨーロッパグリ由来SSRマーカーの遺伝』, 平成24年度果樹バイテク研究会, 2012年10月1~2日, 弘前商工会議所会館.

Eiichi Inoue, 『Genetic mapping and QTL analysis in interspecific chestnut population』, 2012 American Society for Horticultural Science, 2012年7月31日~8月3日, マイアミ(アメリカ)

角田鈴奈, 井上栄一, 他, 『クリにおけるAP1様遺伝子の単離と発現解析』, 園芸学会平成24年度春季大会, 2012年3月29日, 大阪府立大学.

角田鈴奈, 井上栄一, 『ニホングリ「石鎚」とモーパングリの種間雑種における諸形質の解析』, 茨城県園芸談話会, 2011年11月21日, 茨城県農業総合センター.

角田鈴奈, 井上栄一, 他, 『ニホングリ「石鎚」とクリ野生種モーパングリの種間雑種における形態及び開花特性の変異』, 園芸学会平成23年度秋季大会, 2011年9月25日, 岡山大学.

井上栄一, 他, 『クリにおける遺伝学的連鎖地図の構築とQTL解析』, 平成23年度果樹バイテク研究会, 2011年7月11日, 沖縄県庁北部合同庁舎

佐々木道康, 井上栄一, 他, 『ニホングリとモーパングリの種間雑種を用いた遺伝学的連鎖地図の構築』, 園芸学会平成23年度春季大会, 2011年3月20日, 宇都宮大学農学部.

Eiichi Inoue, 他, 『Nuclear and Chloroplast Microsatellite Diversity in Chestnuts』, The 28th International Horticultural Congress 2010, 2010年8月24日, リスボン, (ポルトガル)

Eiichi Inoue, 『Genetic Comparison of Chestnuts and the Related Species in Fagaceae by cpSSR markers』, 2010 American Society for Horticultural Science, 2010年8月5日, パームデザート(アメリカ)

井上栄一, 他, 『茨城県特産果樹のゲノム研究基盤の整備について』, シンポジウム 次世代シーケンサーとDNA塩基配列情報の農業研究への展開, 2010年2月26日, 茨城大学農学部.

井上栄一, 倉林樹, 他, 『アジアのクリの遺伝学的分類(第10報)クリ種間および種内における葉緑体SSR遺伝子座の変異』, 園芸学会平成21年度秋季大会, 2009年9月26日, 秋田大学.

Eiichi Inoue, 他, 『Interspecific Hybridization for Genetic Mapping in Chestnuts』, ISHS Symposium "Molecular Markers in Horticulture", 2009年7月29日, オレゴン(アメリカ)

[その他]

シンポジウム開催

『次世代シーケンサーとDNA塩基配列情報の農業研究への展開-果樹ゲノム研究から品種識別まで-』, 茨城大学農学部研究推進委員会, 2010年2月26日, 茨城大学農学部.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 栄一 (INOUE EIICHI)
茨城大学・農学部・准教授
研究者番号：90292482

(2)研究分担者

安西 弘行 (ANZAI HIROYUKI)
茨城大学・遺伝子実験施設・教授
研究者番号：20323214

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

霞 正一 (KASUMI MASAKAZU)
茨城県農業総合センター・生物工学研究
所・室長 (協力時)

高津 康正 (TAKATSU YASUMASA)
茨城県農業総合センター・生物工学研究
所・室長 (協力時)