

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25660125

研究課題名(和文)雌雄異株樹木の性判別のためのDNAマーカーの開発と野生個体群への適用

研究課題名(英文)Development and application of sex-linked DNA markers in a natural population of a dioecious tree

研究代表者

名波 哲(NANAMI, Satoshi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70326247

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)：雌雄異株樹種ナギの未開花個体の性を判別するDNAマーカーを開発した。まず、雄7個体、雌6個体にRAD-Sequence法を適用し、100塩基からなるリードの配列が1個体につき平均25万本得られた。この中から雌のみに見つかる配列は見つからなかったが、雄のみに見つかる配列が5本見つかった。これらに対してプライマーを設計し、奈良県御蓋山の4箇所において、1箇所につき32～45本の実生の性判別を行った。雄の割合は場所によって0.465～0.600となり、性比の偏りや場所による差は見られなかった。したがってナギでは、実生段階の性比は場所によらず1:1ということが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Five sex-linked DNA markers were developed in *Nageia nagi* (Podocarpaceae), a dioecious tree, using genome-wide RAD sequence data. We got 250,000 DNA sequence leads (100 bp) per individual in average. Although no female-specific sequences were found from these leads, 5 male-specific sequences were obtained. For the 5 sequences, PCR primer pairs were designed to identify sex of non-reproductive individuals. For the assessment of sex ratio of non-reproductive seedlings, 148 seedlings from 4 sites in a natural population were analyzed on Mt. Mikasa, Nara Prefecture, Japan. The number of analyzed seedlings in a site ranged from 32 to 45, and the proportion of males in a site varied from 0.465 to 0.600. No significant deviations of sex ratio from 1:1 were detected in any sites, and sex ratios were not significantly different among 4 sites. In the natural population of *N. nagi*, expected sex ratio at seedling stage was considered as 1:1 in any sites.

研究分野：植物生態学

キーワード：雌雄異株植物 性判別 DNAマーカー 性比 森林

1. 研究開始当初の背景

植物は種によって多様な性表現を持つ。その中で雌雄の花が別々の個体につく雌雄異株植物は、個体レベルで性機能を分業している。これまで、多くの雌雄異株植物において、様々な性差があることが明らかになっている。一般的には、雄株のほうが小さいサイズで開花し、成長が速く、長命である (Nanami et al. 2005)。また、個体間の競争が激しい場合、雄株の生存率のほうが高い (Onyekwelu & Harper 1979)。これらの原因は、雌株は開花後も枝上で種子を成長させるという、繁殖コストを負っているためだと考えられている。これらの性差は、雌雄異株植物の個体群構造に影響する。一方の性(多くの場合、雄株)に偏った性比が生まれたり (Nanami et al. 1999, Nanami et al. 2005)、雄株が劣悪な環境条件の立地に、雌株が好適な条件の立地にと、雌雄間で生育場所の分離 (Dawson & Ehleringer 1993) が起きることがある。これらの構造が形成されるプロセスとして、考えられる1つ目は、種子集団の性比は1:1であり、開花個体集団の性比の偏りは、一方の性の早熟性や生存率の高さから生じるというものである。2つ目は、性比は出生時から偏っており、その偏りが開花個体集団において顕在化するというものである。多くの研究では前者を前提として説明が試みられてきたが、推測の域を出ない。また、上記の性差が雌雄異株植物の一生のどの段階で現れるのかについては、ほとんど分かっていない。繁殖コストの性差が原因であれば、成長量等の性差は、開花サイズに達してから現れると予想される。しかし、稚樹段階から性差が検出された例 (Nicotra 1999) もあり、未知の点が多い。性比の偏りや雌雄間の生育場所の分離については、種子や稚樹の段階で既に生じているのか、成長の過程で徐々に形成されるのか、まったく分かっていない。

2. 研究の目的

雌雄異株樹木の性を判別するための DNA マーカーを開発する。現在、一部の例外を除き、花の観察が唯一の性判別の手段であるが、DNA マーカーを用いることにより、種子を含む未開花個体の性判別が可能となる。また開花期に縛られず、任意の季節に性判別を行える。開発には、次世代シーケンサーを活用し、RAD RAD-Sequence 解析を使い、性判別 DNA マーカーの新しい開発方法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 調査対象種

奈良県御蓋山の優占種であるナギ (マキ科) を対象とする。ナギは、雌雄異株の高木であり、御蓋山において、雄株に偏った性比や雌雄間の空間分布の分離が観察されている (Nanami et al. 2005)。

(2) 性判別 DNA マーカーの開発

御蓋山において、開花調査によって既に性が判別している雄株 7 個体、雌株 6 個体から葉を採集し、CTAB 法により DNA を抽出した。この DNA 溶液に対し、次世代シーケンサーによる RAD-Sequence 解析を使い、塩基配列情報を得た。その結果、100 塩基からなるリードの配列が、1 個体につき平均 25 万本得られた。この中で、雄株のみに見つかるリードが 56 本、雌株のみに見つかるリードが 8 本確認された。これらのリードに対してプライマーを設計し、雌雄それぞれ 24 個体に対して PCR を行い、個体数を増やしても雌雄の一方だけで増幅されるリードを探索した。

(3) 野外における未開花個体の性判別

御蓋山の 4 箇所において、1 箇所につき 32 ~ 45 本、合計 148 本の実生 (図 1) から DNA を抽出し、開発した性判別プライマーによる PCR 法およびアガロースゲルへの電気泳動により、性判別を行った。

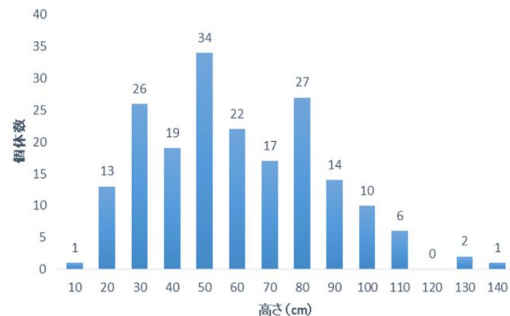


図 1. 性判別の対象としたナギの実生のサイズ分布。

(4) PCR スケジュールと電気泳動

各個体から抽出した DNA 溶液中の DNA 濃度を高感度フルオロメーター (DyNA Quant200, Amersham Biosciences 社) によって測定し、滅菌水で 3ng/μL に希釈した。PCR にはサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System9700, Applied Biosystems 社) を使用した。各プライマー溶液の濃度は、10pmpl/μL に調整した。0.2mL チューブに作成した PCR 反応液を 9μL (1.0μL の 10×FastBuffer I (Mg2+Plus), 0.8μL の dNTP Mixture (2.5mM each), 0.3μL の Forward primer (10pmpl/μL), 0.3μL の Reverse primer (10pmpl/μL), 0.05μL の SpeedSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa), 6.55μL の滅菌水) ずつ分注し、実生の DNA 溶液をそれぞれ 1.0μL 加えた。PCR の温度条件は、熱変性 98°C 2 分の後、(1) 熱変性 98°C、2 分、(2) アニール 59°C、5 秒、(3) 伸張反応 72°C、3 秒、これら (1) ~ (3) を 35 サイクル繰り返した後、伸張反応 72°C、5 分とした。PCR 産物は、2% アガロースゲルにアプライして 100V で 30 分間泳動し、10,000 倍に希釈したエチジウムブロマイド溶液で 15 分間染色し、UV 光をあてて 100 bp のバンドの有無を調べた。

4. 研究成果

(1) RAD-Sequence 解析結果、100塩基からなるリードの配列が1個体につき平均25万本得られた。この中で、雄株のみに見つかるリードが56本、雌株のみに見つかるリードが8本確認された。これらのリードに対してプライマーを設計し、雌雄それぞれ24個体に対してPCRを行い、個体数を増やしても雌雄のどちらかだけで増幅されるリードを探索した。その結果、雄株だけで増えるプライマーペアが5組見つかった(表1, 図1)。ナギは雄株が特異的な性染色体をもつとされており(仲里ら1997)、これらの配列は性染色体上の配列である可能性がある。一方、雌株だけに見つかる配列は見つからなかった。

表1. ナギの雄株だけで100 bpのPCR産物が増幅される5ペアのプライマー。アニーリング温度はすべて59°Cである

Locus	Primer sequence (5'-3')
N_26186	F: CCTCATCAATATTATCTTCTTGATCTT R: AGACCCATAGACATAATGAGTAAACAA
N126997	F: CAAGCTGTCTCCTTGAACACTTAT R: CTACTTGTGGATTACAAATAAGTTTATCC
N205357	F: CATGCCTTCTCATAICTATCAG R: CCCTTAGTGTGTACCAAGGTATG
N215844	F: CAAAACCTCCTAATATTATAGTATTGATGC R: CACTAAGGGTAAAGGATACATCTACC
N235904	F: CAAGGGTCAATATCCTGAGAGTTT R: ACTTGAAATAAGCTCTTTGAGG

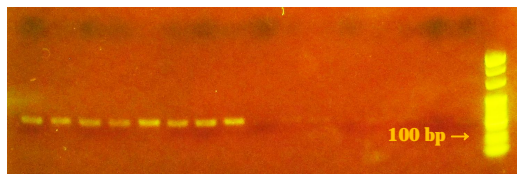


図1. DNA マーカーによるナギの性判定。左8個体(100 bpのバンド)が雄株、右8個体が雌株、右端はサイズマーカー。

(2) これまで、未開花個体の性判別に成功した数少ない例として、染色体観察によるイチヨウ(Nakao et al. 2005)、アイソザイム法によるイチヨウ(岩崎1980)、ナツメヤシ(菅沼・岩崎1983)、ホホバ(菅沼1999)がある。ただし、これらの方法は、観察に適した細胞や採取サンプルの状態に限られ、簡便性や調査可能個体数の面で制約がある。これらの問題点を克服したDNAマーカーによる性判別の成功例としては、アサ(Török et al. 2002)などがある。DNAマーカーを使う利点は、DNAが比較的安定的な分子であるため、長期保存されていたり劣化したサンプルであっても、しばしば調査可能であること、熟練的なテクニックをそれほど必要としないことである。ただし、これまでの成功例では、RAPD法(Török et al. 2002)やAFLP法(Terauchi & Kahl 1999)が用いられている。

これらの方法が用いられる理由は、一度の泳動で多数のバンドが検出されるためであるが、例えばRAPD法では、莫大な時間を費やして数百個ものプライマーを試し、数千本のバンドを雌雄間で比較して、性判別に有効なバンドが、ようやく1, 2個見つまっているというのが、実状である(見つからず、公表に至らなかった例も多くあると想像される)。

これに対し、本研究で用いたRAD-Sequence解析は、一度の解析で大量の配列情報が得られるため、雌雄異株植物の一方の性に特異的にもつ配列情報を探索するために有効であると考えられる。

(2) 雄株の割合は場所によって異なるものの、0.465~0.600となった。性比の偏りや場所による差は見られなかった。したがって、雌雄異株植物の研究で前提とされてきた「出生時の性比は場所によらず1:1」という条件がナギでは支持された。本研究では、これまで推測の域を出なかった雌雄異株植物の未開花個体の性判別を野生個体群に適用し、世界的にも稀有な成果を得ることができた。

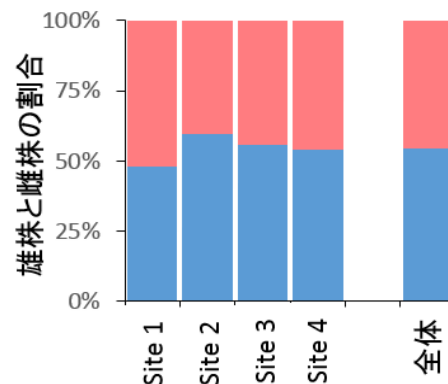


図2. 奈良県御蓋山におけるナギの実生の4箇所での性比。■♂, ■♀。いずれの場所でも性比の1:1からの偏りは見られず、サイト間の性比の差も見られなかった。

<引用文献>

- Dawson, T.E., Ehlerringer, J.R. Gender-specific physiology, carbon isotope discrimination, and habitat distribution in boxelder, *Acer negundo*. Ecology, 74, 1993, 798-815.
- 岩崎文雄 ザイモグラムによるイチヨウの雌雄性の判別. 農業技術, 35, 1980, 312-313.
- Nakao, Y., Taira, T., Horiuchi, S., Kawase, K., Mukai, Y. Chromosomal difference between male and female trees of *Ginkgo biloba* examined by karyotype analysis and mapping of rDNA on the chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 74, 2005, 275-280.
- 仲里長浩, 長野克也, 戸田義弘 マキ科樹木の染色体に関する研究(III) ナギの染色体について. 日本森林学会論文集, 108, 1997,

263-264.

Nanami, S., Kawaguchi, H., Yamakura, T. Dioecy-induced spatial patterns of two codominant tree species, *Podocarpus nagi* and *Neolitsea aciculata*. *Journal of Ecology*, 87, 1999, 678-687.

Nanami, S., Kawaguchi, H., Yamakura, T. Sex ratio and gender-dependent neighboring effects in *Podocarpus nagi*, a dioecious tree. *Plant Ecology*, 177, 2005, 209-222.

Nicotra, A.B. Sexual dimorphic growth in the dioecious tropical shrub, *Siparuna grandiflora*. *Functional Ecology*, 13, 1999, 322-331.

Onyekwelu, S.S., Harper, J.L. Sex ratio and niche differentiation in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Nature*, 282, 1979, 609-611.

菅沼浩敏・岩崎文雄 ザイモグラムによる雌雄異株植物の雌雄判別法—ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera* L.) について— . *熱帯農業*, 27, 1983, 75-78.

菅沼浩敏 ザイモグラムによるホホバの雌雄判別法 . *熱帯農業*, 43, 1999, 103-106.

Terauchi, R., Kahl, G. Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome*, 99, 1999, 42, 752-762.

Törjek, O., Bucherna, N., Kiss, E., Homoki, H. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. *Euphytica*, 127, 2002, 209-218.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

名波哲, 神丸千明(大阪市立大学・理), 永野惇(龍谷大学・農, JST さきがけ, 京都大学生態学研究センター), 手塚 あゆみ(龍谷大学・農), 伊東明(大阪市立大学・理). 雌雄異株樹種ナギの雌雄判別 DNA マーカーの開発. 第63回日本生態学会全国大会. 2016年3月24日, 仙台, 宮城県 .

名波哲, 大田明咲奈, 神丸千明(大阪市立大学・理), 永野惇(龍谷大学・農, JST さきがけ, 京都大学生態学研究センター), 手塚あゆみ(龍谷大学・農), 伊東明(大阪市立大学・理). 雌雄異株樹種ナギにおける DNA マーカーを用いた実生の性比の判別. 第64回日本生態学会全国大会. 2017年3月16日, 東京, 東京都 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

名波 哲 (NANAMI, Satoshi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：70326247

(2)研究分担者

伊東 明 (ITO, Akira)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40274344