

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850116

研究課題名(和文) 無花粉スギの分子育種基盤の構築とそれを用いた識別DNAマーカーの開発

研究課題名(英文) Construction of basis of molecular breeding for male sterile trees in *Cryptomeria japonica* and development of selection markers

研究代表者

森口 喜成 (Moriguchi, Yoshinari)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60644804

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)：スギ高密度連鎖地図の情報を利用して、雄性不稔遺伝子ms2, ms3, ms4がそれぞれ第5連鎖群、第1連鎖群、第4連鎖群に座乗することを明らかにした。そして、それぞれの雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図を構築した。また、4つの交配家系(T013S, S3T67, F1N4, T5)について、ms1を含む領域の部分連鎖地図を作成した。これらの家系では、近傍マーカーを用いることにより、約96%以上の精度で無花粉スギを識別することができた。さらに、T013S家系において、無花粉スギを識別するための簡易DNAマーカーを開発した。

研究成果の概要(英文)：Using information from this high-density map of *Cryptomeria japonica*, we newly located three male-sterile genes (ms2, ms3 and ms4) on the 5th, 1st and 4th linkage groups, respectively, and constructed partial linkage maps around these loci. In addition, we have constructed partial linkage maps surrounding a male sterility gene (ms1) in four families (T013S, S3T67, F1N4 and T5). In all four families, the accuracy with which male-sterile trees could be identified using the closest markers was more than 96.0%. We also developed an allele-specific PCR marker for identifying male-sterile trees in the T013S family from which male-sterile seedlings are produced.

研究分野：林木遺伝育種学

キーワード：連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

我が国の大きな社会問題の一つになっているスギ花粉症の対策として、花粉を飛散させない雄性不稔個体(無花粉スギ)が利用されている。無花粉スギは単一の核内劣性遺伝子で決定され、*msms* 型は無花粉スギ、*MsMs* 型と *Msms* 型は正常な花粉のスギとなる。現在までに日本各地で無花粉スギの選抜が行われ、青森県、福島県、新潟県、富山県、茨城県、神奈川県、三重県の 7 県から計 23 個体が選抜された(斎藤 2010)。様々な組み合わせで人工交配を行った結果、4 種類の雄性不稔遺伝子 (*ms1*、*ms2*、*ms3*、*ms4*) が発見されている(Taira et al. 1999、吉井・平 2007、宮嶋ら 2010)。4 種類の雄性不稔遺伝子すべてについての識別用 DNA マーカーを開発することにより、花粉稔性を評価することなく無花粉スギを識別できれば、遺伝的に多様な無花粉スギの効率的な種苗生産や育種年限の短縮が可能となる。

これまでの研究の結果、雄性不稔遺伝子 *ms1* が第 9 連鎖群に位置することを明らかにし、*ms1* 近傍の遺伝子地図を構築した(Moriguchi et al. 2012)。

<引用文献>

- ・斎藤(2010)スギ花粉症対策品種の開発. 日林誌 92: 316-323
- ・Taira H, Saito M, Furuta Y (1999) Inheritance of the traits of male sterility in *Cryptomeria japonica*. J. For. Res. 4: 271-273
- ・吉井・平(2007)「新大1号」「新大5号」におけるスギ雄性不稔性の発現過程と遺伝的特性. 日林誌 89: 26-30
- ・宮嶋・吉井・細尾・平(2010)スギ雄性不稔新大8号の細胞学的・遺伝的特性. 日林誌 92: 106-109
- ・Moriguchi Y, Ujino-Ihara T, Uchiyama K, Futamura N, Saito M, Ueno S, Matsumoto A, Tani N, Taira H, Shinohara K, Tsumura Y (2012) 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 [(オンライン版): 印刷物で 13 頁相当]

2. 研究の目的

本研究では、スギ基盤連鎖地図の情報を利用して雄性不稔遺伝子 *ms2*、*ms3*、*ms4* の連鎖地図上の位置を明らかにする。そして、雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図を作成し、無花粉スギの識別用 DNA マーカーを開発する。

3. 研究の方法

スギ雄性不稔遺伝子 *ms2*、*ms3*、*ms4* 近傍の部分連鎖地図の作成には、それぞれ S1-2 家系 128 個体、S5HK7 家系 167 個体、S8HK5 家系 122 個体を用いた(図 1)。S1-2 家系は新大 1 号 (*ms2ms2*) に新大 1 号 (*ms2ms2*) と中

頸城 4 号 (*MS2MS2*) の F1 を戻し交配、S5HK7 家系は新大 5 号 (*ms3ms3*) に新大 5 号 (*ms3ms3*) と東蒲原 7 号 (*MS3MS3*) の F1 を戻し交配、S8HK5 家系は新大 8 号 (*ms4ms4*) に新大 8 号 (*ms4ms4*) と東蒲原 5 号 (*MS4MS4*) の F1 を戻し交配で作成した家系を使用した。

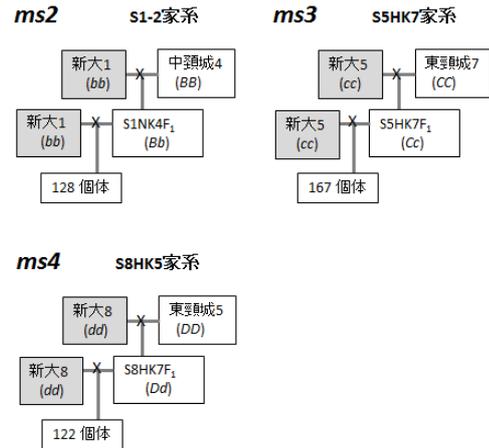


図1 *ms2*-*ms4* 近傍の連鎖地図作成に用いた家系

まず、スギ雄性不稔遺伝子 *ms2*、*ms3*、*ms4* の連鎖地図上の位置を明らかにするため、スギ基盤連鎖地図に散在するマイクロサテライトマーカーを各連鎖群から選出し、連鎖解析に使用した(S1-2 家系では 33 マーカー、S5HK7 家系では 32 マーカー、S8HK5 家系では 35 マーカー)。

次に、スギ基盤連鎖地図の雄性不稔遺伝子 *ms2*、*ms3*、*ms4* が座乗することが明らかになった第 5 連鎖群、第 1 連鎖群、第 4 連鎖群のマーカーのうち(研究成果参照)それぞれ S1-2 家系、S5HK7 家系、S8HK5 家系の親間で多型を示したマーカーを使用し、各雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図を作成した。連鎖地図の作成には、Joinmap 4.1 を使用し、LOD = 8.0 の条件で連鎖地図を作成した。そして、雄性不稔遺伝子の最も近傍に位置するマーカーを使用した際に、連鎖地図を構築した家系での無花粉スギの選抜精度を算出した。

雄性不稔遺伝子近傍のマーカーが家系ごとに異なることを確かめるため、雄性不稔遺伝子 *ms1* を対象に、4 つの交配家系 (TO13S 198 個体、S3T67 99 個体、FIN4 67 個体、T5 173 個体) について、スギ雄性不稔遺伝子 *ms1* 近傍の部分連鎖地図を作成した(図 2)。TO13S 家系は富山不稔 (*ms1ms1*) と小原 13 号 (*MS1ms1*) の F1 と珠洲 2 号 (*MS1ms1*) との人工交配、FIN4 家系は福島不稔 (*ms1ms1*) と中 4 号 (*MS1ms1*) との人工交配、T5 家系は富山不稔 (*ms1ms1*) に富山不稔 (*ms1ms1*) と中頸城 4 号 (*MS1MS1*) の F1 を戻し交配で作出したものである。

最後に、無花粉スギを識別するための簡易 DNA マーカーの開発を行った。本研究では、

TO13S 家系を使用した。

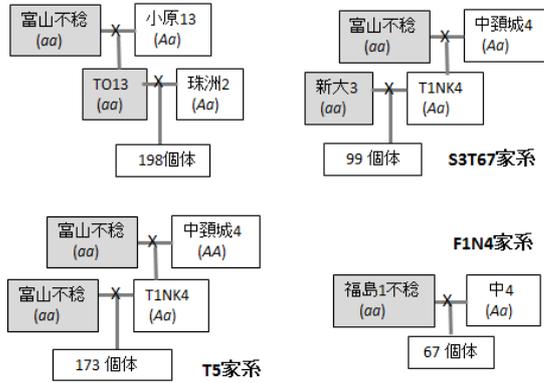


図2 *ms1* 近傍の連鎖地図作成に用いた家系

4. 研究成果

スギ基盤連鎖地図に散在するマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析の結果、雄性不稔遺伝子 *ms2*, *ms3*, *ms4* がそれぞれ第5連鎖群、第1連鎖群、第4連鎖群に座することが明らかとなった。そして、それぞれの雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図を構築した(図3)。

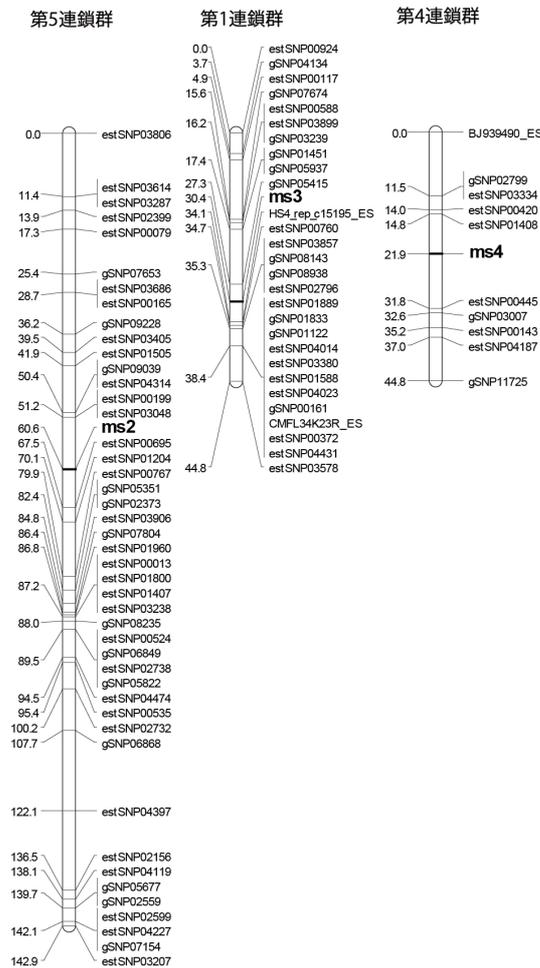


図3 雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図

それぞれの雄性不稔遺伝子に最も強く連鎖したマーカーを用いることにより、連鎖地図を構築した家系では、約94%、約97%、約98%の精度で無花粉スギを識別することができた。

一方、4つの交配家系(TO13S 198 個体, S3T67 99 個体, FIN4 67 個体, T5 173 個体)について、*ms1* を含む領域の部分連鎖地図を作成した。これらの家系では、近傍マーカーを用いることにより、約96%以上の精度で無花粉スギを識別することができた(図2)。

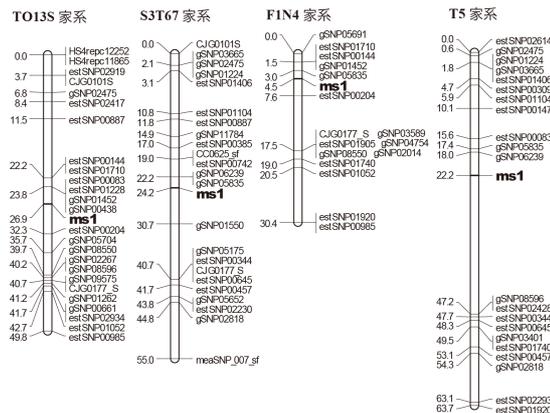


図4 *ms1* 近傍の部分連鎖地図

さらに、TO13S 家系において、無花粉スギを識別するための簡易 DNA マーカーを開発した(図5)。芽生えから抽出した DNA を鋳型に PCR 増幅を行い、アガロースゲルで電気泳動した結果、TO13S 家系の無花粉スギを明確に識別することができた。本研究で構築した雄性不稔遺伝子近傍マーカーの探索とその簡易マーカー化の技術を芽生えからの高速 DNA 抽出法と組み合わせることにより、どのような無花粉スギ品種においても芽生え段階での家系内選抜を行うことができると考えられた。

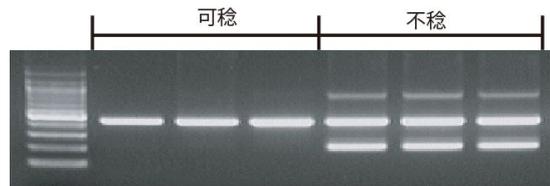


図5 簡易識別マーカーで得られたアガロース電気泳動像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Moriguchi Y, Uchiyama K, Ueno S, Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Iwai J, Miyajima D, Saito M, Sato M, Tsumura Y (2016) A high-density linkage map with 2,560 markers and its application for the localization of the male-sterile genes *ms3* and *ms4* in *Cryptomeria japonica* D. Don. Tree Genetics & Genomes in press. (査読有)

- DOI: 10.1007/s11295-016-1011-1
- (2) Moriguchi Y, Ueno S, Higuchi Y, Miyajima D, Itoo S, Futamura N, Shinohara K, Tsumura Y (2014) Establishment of a microsatellite panel covering the sugi (*Cryptomeria japonica*) genome, and its application for localization of a male sterile gene (*ms-2*). *Molecular Breeding* 33: 315-325. (査読有)
- DOI: 10.1007/s11032-013-9951-8
- (3) Moriguchi Y, Ueno S, Saito M, Higuchi Y, Miyajima D, Itoo S, Tsumura Y (2014) A simple allele-specific PCR marker for identifying male-sterile trees: Towards DNA marker-assisted selection in the *Cryptomeria japonica* breeding program. *Tree Genetics & Genomes* 10: 1069-1077. (査読有)
- DOI: 10.1007/s11295-014-0743-z

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 森口喜成・内山憲太郎・上野真義・松本麻子・伊原徳子・岩井淳治・戸塚聡子・津村義彦 (2016) DNA マーカーを用いた無花粉スギのピラミディング育種. 第 127 回日本森林学会、2016 年 3 月 29 日、2016 年 3 月 29 日、日本大学
- (2) Ueno S, Moriguchi Y, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Futamura N, Matsumoto A, Tsumura Y (2015) Sugi genome resources. ProCpGen Conifer Genomics Conference, 2015 年 11 月 29 日、Orleans (France)
- (3) 森口喜成・内山憲太郎・上野真義・伊原徳子・松本麻子・斎藤真己・岩井淳治・宮嶋大介・樋口有未・伊藤信治・佐藤雅哉・津村義彦 (2015) スギ雄性不稔遺伝子 (*ms-1 ~ ms-4*) の連鎖地図上の位置の特定, 第 128 回日本育種学会, 2015 年 9 月 12 日, 新潟大学
- (4) 佐藤雅哉・森口喜成・松本麻子・岩井淳治・宮嶋大介・津村義彦 (2014) 雄性不稔遺伝子 *ms-4* のマッピング. 第 3 回森林遺伝学会, 2014 年 11 月 7 日, 東京大学
- (5) 森口喜成・上野真義・松本麻子・伊原徳子・岩井淳治・宮嶋大介・津村義彦 (2014) スギ高密度基盤連鎖地図を利用した雄性不稔遺伝子 (*ms-3*) のマッピング. 第 125 回日本森林学会, 2013 年 3 月 28 日, 大宮ソニックシティ
- (6) 森口喜成・上野真義・斎藤真己・樋口有未・宮嶋大介・伊藤信治・津村義彦 (2013) DNA マーカーを用いて芽生えの段階で無花粉スギの家系内選抜を簡単に行う手法の開発. 第 2 回森林遺伝学会, 2013 年 11 月 8 日, 東京大学
- (7) 森口喜成・伊原徳子・内山憲太郎・上野真義・松本麻子・二村典宏・斎藤真己・樋口有未・伊藤信治・宮嶋大介・篠原健司・津村義彦 (2013) スギ高密度連鎖地図情報を利用した雄性不稔遺伝子と連鎖する DNA マーカーの開発. 第 124 回日

本育種学会、2013 年 10 月 13 日、鹿児島大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
森口 喜成 (MORIGUCHI Yoshinari)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号：60644804

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：