

無花粉スギの育種年限の短縮にむけた分子遺伝学的研究

森口喜成（新潟大学大学院自然科学研究科）

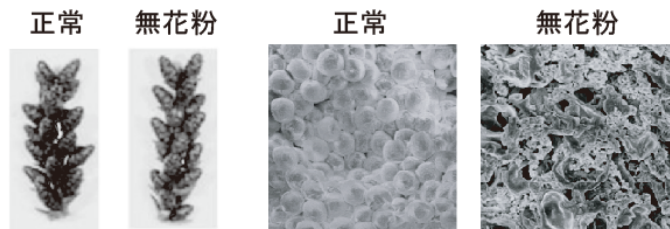
chimori@agr.niigata-u.ac.jp

はじめに

スギは日本の主要造林樹種であるが、春に花粉を大量に飛散させる。スギ花粉症は 1964 年に日光市で初めて報告され、それ以来患者数は増加を続け、深刻な社会問題となっている。そのため、花粉を飛散させない雄性不稔スギ（無花粉スギ）の利用に向けた取り組みが各地で進められている。無花粉スギは 1992 年に富山県で初めて発見され（図-1）¹⁾、一对の劣性遺伝子（雄性不稔遺伝子）に支配されていることが明らかにされた²⁾。現在までに、7 県から計 23 個体が選抜され³⁾、様々な組み合わせで人工交配を行った結果、4 つの雄性不稔遺伝子（*ms-1*、*ms-2*、*ms-3*、*ms-4*）が同定されている²⁻⁵⁾。無花粉スギは雄花が着生しないと識別ができず、雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で保有する個体は人工交配を行って子供を判定しなければ識別できないため、これらの選抜には膨大な労力と時間、スペースが必要となる。

作物では、目的遺伝子に密接に連鎖した DNA マーカーを利用した選抜（MAS : marker-assisted selection）が行われている。しかし、ゲノムが複雑で情報が少なく、他殖性の針葉樹で MAS を行うのは難しい⁶⁾。実際、針葉樹では、病虫害抵抗性に関する優性遺伝子近傍の RAPD マーカーがいくつか報告されているが実用化されていない⁷⁻¹¹⁾。

無花粉スギの識別用 DNA マーカーを開発できれば、雄花を着生していない芽生えの段階で DNA マーカーによって雄性不稔遺伝子を保有するかどうかを判定することが可能となるため、樹木では育種年限の短縮・効率化に非常に有効である。



<図-1> スギの雄花（左：吉井エリ博士提供）と電子顕微鏡写真（右：斎藤真己博士提供）

スギ高密度基盤連鎖地図

スギでは、森林総合研究所によって、EST（Expression Sequence Tags ; 発現遺伝子の塩基配列断片）のデータベース（ForestGEN）、様々な DNA マーカー、連鎖地図、BAC ライブラリーなど分子育種を行うための基盤が整備されてきた。そのため、無花粉スギの識別マーカーを開発するには、既存の基盤連鎖地図¹²⁾の高密度化を行い、その情報を利用するのが効率的である。

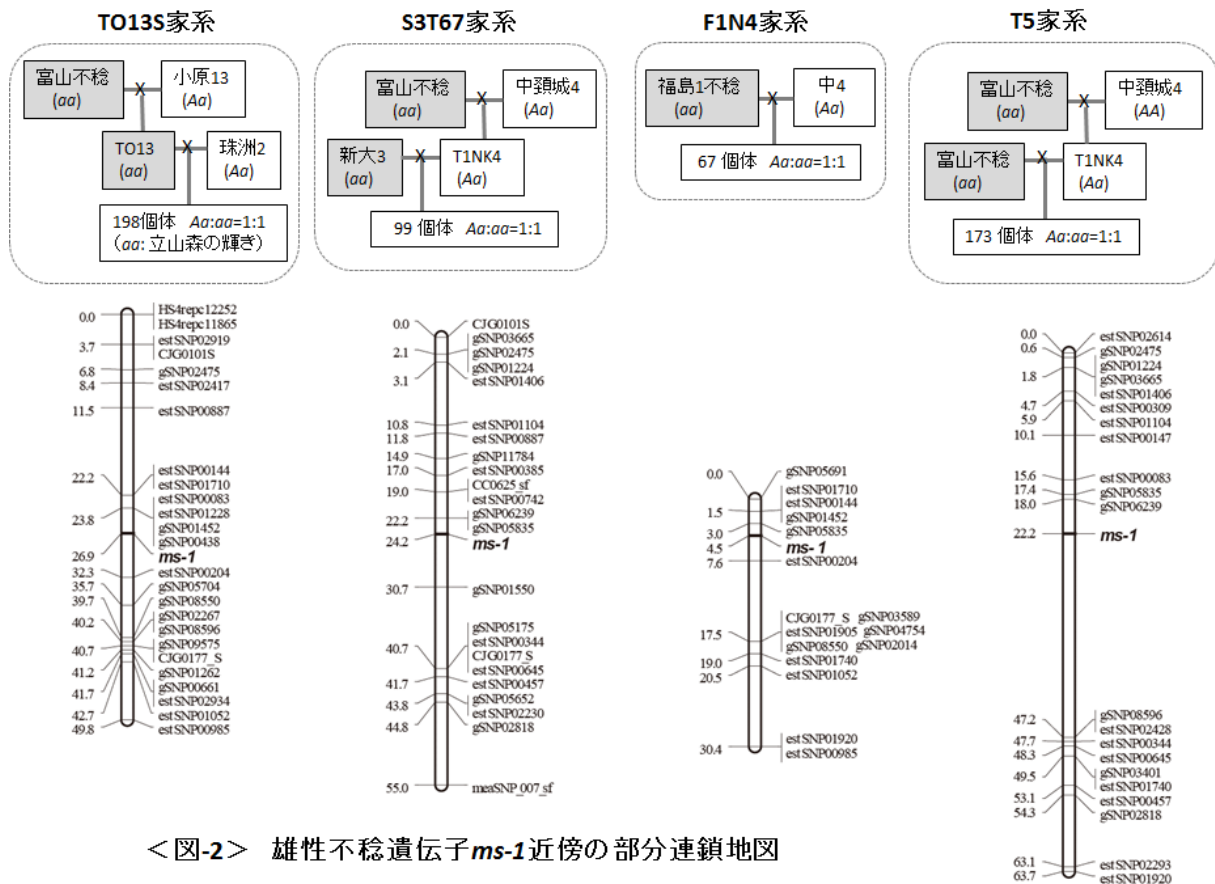
スギ高密度基盤連鎖地図の構築には YI 家系（YI 38 × YI96）150 個体を用い、EST データベース（ForestGEN）から作成した SNP マーカー（主に GoldenGate 解析用の SNP マーカー）を既存の基盤連鎖地図に加えた。解析の結果、2,703 遺伝子で構成されるスギ高密度連鎖地図（総地図距離 1,425 cM、平均マーカー間距離 0.53 cM）を作製した。これは、世界の針葉樹の連鎖地図の中で最もマーカー数が多い連鎖地図の一つで非常に高い情報量を有しており、今後のスギのゲノム研究の基盤となるため有用である。

<表-1> 針葉樹で報告されている高密度連鎖地図

| 樹種 | マーカー数 | 連鎖群数 | 総地図距離 離 (cM) | 出典 |
|---|------------------|------------|------------------|---|
| フランスカイガンショウ (<i>Pinus pinaster</i>) | 1,838 | 12 | 1,712 | Plomion et al. 2014 ¹³⁾ |
| クロトウヒとシロトウヒのコンセンサスマップ (<i>Picea mariana</i> , <i>Picea glauca</i>) | 2,270 | 12 | 2,083 | Pavy et al. 2012 ¹⁴⁾ |
| テーダマツ (<i>Pinus taeda</i>) | 2,466 | 12 | 1,476 | Martínez-García et al. 2013 ¹⁵⁾ |
| テーダマツ (<i>Pinus taeda</i>) | 2,841 | 12 | 1,637 | Neves et al. 2014 ¹⁶⁾ |
| スギ (<i>Cryptomeria japonica</i>) | 2,703 (1,261) | 11 (11) | 1,425 (1,405) | 最新データ (Moriguchi et al. 2012 ¹⁷⁾) |

雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図

スギ高密度基盤連鎖地図に散在する多型性の高いマイクロサテライト DNA マーカーを用いて連鎖解析を行い、*ms-1* が第 9 連鎖群¹⁷⁾、*ms-2* が第 5 連鎖群¹⁸⁾、*ms-3* が第 1 連鎖群に位置することを明らかにした。そして、スギ高密度基盤連鎖地図の各連鎖群に座乗する DNA マーカーを使用し、無花粉スギの交配家系について雄性不稔遺伝子を含む領域の詳細な連鎖地図を作製した。雄性不稔遺伝子近傍の DNA マーカーを用いることにより、これらの交配家系内では 96% の精度で無花粉スギを識別することができた。

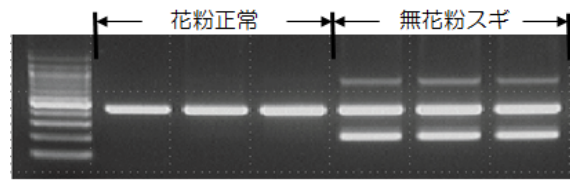


<図-2> 雄性不稔遺伝子 *ms-1* 近傍の部分連鎖地図

優良無花粉スギ『立山森の輝き』を識別する DNA マーカーの開発

図-2 の TO13S 家系は、優良無花粉スギ『立山森の輝き』として富山県で 2012 年秋から実生苗を作出している家系である。*ms-1* に最も近いマーカーの一つであった gSNP00438 を対象として『立山森の輝き』を識別する簡易 PCR マーカーの開発を行った。開発したマーカーを使用する

ことにより、『立山森の輝き』の家系内選抜をほぼ確実に行うことができた (図-3)¹⁹⁾。この結果から、スギ基盤連鎖地図の情報をを用いて家系ごとに雄性不稔遺伝子座近傍の部分連鎖地図を作成すれば、どのような無花粉スギにおいても家系内選抜用の簡易 PCR マーカーを作成することが可能であることが明らかになった。



<図-3> 『立山森の輝き』を識別するDNAマーカー

今後の研究展開

今後は、*ms-4* の連鎖地図上の位置を特定し、*ms-4* 近傍の部分連鎖地図を構築するとともに、これまでに開発した無花粉スギ識別用 DNA マーカーを用いて、複数の雄性不稔遺伝子を併せ持つ品種の作出を行う予定である。本研究によって、DNA マーカーによる無花粉スギの家系内選抜が可能となったが、天然集団や育種集団における無花粉スギの選抜を可能にするため、将来的には雄性不稔遺伝子の単離を行う必要があると考えている。

謝辞

本研究は、森林総合研究所樹木遺伝研究室、富山県農林水産総合技術センター森林研究所、新潟県森林研究所と新潟大学の共同研究で実施したものです。本研究を遂行するにあたり、森林総合研究所の津村義彦博士には終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、心より感謝申しあげます。また、平英彰博士 (元新潟大教授)、斎藤真己博士 (富山森林研)、伊藤信治研究員・樋口有未研究員 (元新潟森林研)、岩井淳二研究員・宮嶋大介研究員 (新潟森林研)、松本麻子博士・伊原徳子博士・上野真義博士・内山憲太郎博士・二村典宏博士 (森林総研)、篠原健司博士 (元森林総研) など、一連の研究を遂行するにあたりご協力いただいたすべての皆さまに、深くお礼申しあげます。最後に、本賞にご推薦頂きました日本森林学会の関連の諸先生方に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 平英彰・寺西秀豊・劔田幸子 (1993) スギの雄性不稔個体について. 日本林学会誌 75: 377-379
- 2) Taira H, Saito M, Furuta Y (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. Journal of Forest Research 4:271-273
- 3) 斎藤真己 (2010) スギ花粉症対策品種の開発. 日本森林学会誌 92: 316-323
- 4) 吉井エリ・平英彰 (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. 日本森林学会誌 89: 26-30
- 5) 宮嶋大介・吉井エリ・細尾佳宏・平英彰 (2010) スギ雄性不稔新大 8 号の細胞学的・遺伝的特性. 日本森林学会誌 92: 106-109
- 6) Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. Trends in Plant Science 9:325-330
- 7) Devey ME, Delfino-Mix A, Kinloch BB Jr, Neale DB (1995) Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America 92: 2066-2070
- 8) Wilcox PL, Amerson HV, Kuhlman EG, Liu BH, O'Malley DM, Sederoff RR (1996) Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. Proceeding of

the National Academy of Sciences of the United State of America 93:3859-3864

- 9) Kondo T, Terada K, Hayashi E, Kuramoto N, Okamura M, Kawasaki H (2000) RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). Theoretical and Applied Genetics 100: 391-395
- 10) Hayashi E, Kondo T, Terada K, Kuramoto N, Kawasaki S (2000) Identification of AFLP markers linked to a resistance gene against pine needle gall midge in Japanese black pine. Theoretical and Applied Genetics 108: 1177-1181
- 11) Liu JJ, Ekramoddoullah AKM, Hunt RS, Zamani A (2006) Identification and characterization of random amplified polymorphic DNA markers linked to a major gene (*Cr2*) for resistance to *Cronartium ribicola* in *Pinus monticola*. Phytopathology 96: 396-399
- 12) Tani N, Takahashi T, Iwata H, Yuzuru M, Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Yoshimura K, Yoshimaru H, Murai M, Nagasaka K, Yoshihiko T (2003) A consensus linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees, based on microsatellites and expressed sequence tags. Genetics 165:1551-1568.
- 13) Plomion C, Chancerel E, Endelman J, Lamy JB, Mandrou E, Lesur I, Ehrenmann F, Isik F, Bink MC, van Heerwaarden J, Bouffier L (2014) Genome-wide distribution of genetic diversity and linkage disequilibrium in a mass-selected population of maritime pine. BMC Genomics 15: 171
- 14) Pavy N, Pelgas B, Laroche J, Rigault P, Nathalie I, Bousquet J (2012) A spruce gene map infers ancient plant genome reshuffling and subsequent slow evolution in the gymnosperm lineage leading to extant conifers. BMC Biology 10:84
- 15) Martínez-García PJ, Stevens KA, Wegrzyn JL, Liechty J, Crepeau M, Langley CH, Neale DB (2013) Combination of multipoint maximum likelihood (MML) and regression mapping algorithms to construct a high-density genetic linkage map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Tree Genetics & Genomes 9: 1529-1535
- 16) Neves LG, Davis JM, Barbazuk WB, Kirst M (2012) A high-density gene map of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) based on exome sequence capture genotyping. G3(Genes Genomes Genetics) 4: 29-37
- 17) 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 SNPmarkers that are tightly linked to a nuclear-recessivemajor gene formale sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. BMC Genomics 13:95
- 18) Moriguchi Y, Ueno S, Higuchi Y, Miyajima D, Ito S, Futamura N, 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
- 19) Moriguchi Y, Ueno S, Saito M, Higuchi Y, Miyajima D, Ito 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.

Molecular genetic study to reduce the breeding time for male-sterile trees in *Cryptomeria japonica*

Yoshinari Moriguchi (Niigata University, Graduate School of Science and Technology)

chimori@agr.niigata-u.ac.jp