

【解説】

スギ高密度基盤連鎖地図を用いた雄性不稔遺伝子近傍 DNA マーカーの開発

森口 喜成^{*1}・伊原 徳子²・内山 憲太郎²・二村 典宏²・斎藤 真己³・

上野 真義²・松本 麻子²・谷 尚樹⁴・平 英彰⁵・篠原 健司²・津村 義彦²

はじめに

スギは日本の主要造林樹種であるが、春にアレルギーを含む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(堀口・斎藤 1964)、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(平ら 1993)、一対の劣性遺伝子に支配されていることが明らかにされた(Taira et al. 1999)。現在までに、7県から計23個体が選抜され(斎藤 2010)、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¹⁾(*ms-1*、*ms-2*、*ms-3*、*ms-4*)が同定されている(Taira et al. 1999; 吉井・平 2007; 宮嶋ら 2010; 斎藤 2010)。近交弱勢を避け、優良な無花粉スギの実生苗を効率的に生産するには、より多くの無花粉スギや雄性不稔遺伝子をヘテロ接合体で持つ個体の選抜が必要となる。しかし、無花粉スギの選抜には膨大な労力と時間がかかるため、DNA分析による識別手法の開発が望まれている。

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[marker-assisted selection (MAS)]が行われている(Xu and Crouch 2008)。しかし、ゲノム²⁾が複雑で情報が少なく、連鎖不平衡が保たれる領域が短い針葉樹でMASを行うのは難しい(Neal and Savolainen 2004)。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だけで

(Devey et al. 1995; Wilcox et al. 1996; Kondo et al. 2000; Hayashi et al. 2004; Liu et al. 2006)、MASは実用化されていない。

スギでは、森林総合研究所によって、大規模収集した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、基盤連鎖地図³⁾、BACライブラリー⁴⁾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、スギ雄性不稔遺伝子に密接に連鎖したDNAマーカーの開発には、既存の基盤連鎖地図(Tani et al. 2003)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。

近年、トウヒ属で、GoldenGate法による一塩基置換(single nucleotide polymorphism; SNP)ジェノタイプングによって高密度連鎖地図が構築された(Pavy et al. 2008)。この方法は大量のSNPを必要とするが、スギでは先述の通り、多様な組織に由来するEST情報のデータベースが既に作成されているため、直ちにSNP探索を行うことができる。

本研究では、GoldenGate法によるSNPジェノタイプングによってスギ基盤連鎖地図の高密度化を行い、その情報を利用して雄性不稔遺伝子(*ms-1*)を連鎖地図上に位置づけた。そして、富山不稔1号の雄性不稔家系を使用して*ms-1*近傍の部分連鎖地図を構築し、*ms-1*に密接に連鎖したDNAマーカーを開発した。本稿では、BMC Genomics誌に掲載された論文(Moriguchi et al. 2012)を改変して紹介する。

*E-mail: chimori@agr.niigata-u.ac.jp

¹ もりぐち よしなり 新潟大学大学院自然科学研究科

² いはら とくこ、うちやま けんたろう、ふたむら のりひろ、うえの さねよし、まつもと あさこ、しのはら けんじ、つむら よしひこ 森林総合研究所

³ さいとう まき 富山県農林水産総合技術センター森林研究所

⁴ たに なおき 国際農林水産業研究センター

⁵ たいら ひであき 元新潟大学大学院自然科学研究科

スギ基盤連鎖地図の高密度化

スギ高密度基盤連鎖地図の構築には YI 家系 (YI 38 × YI 96) ; 図-1) 150 個体を用いた。本研究では、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 (Uchiyama et al. 2012)] を既存の基盤連鎖地図 (Tani et al. 2003) に加えた。連鎖地図は、Joinmap 3.0 を使用し、LOD = 8.0、集団タイプ CP の条件で作成した。

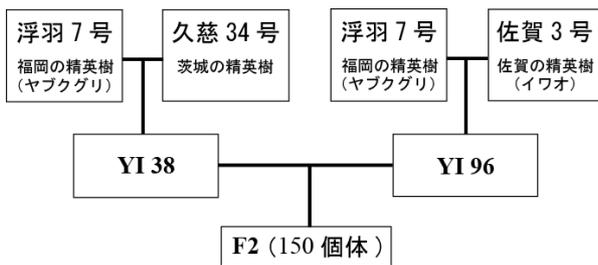


図-1 スギ基盤連鎖地図の作成に使用した YI 家系

解析の結果、合計で 1,262 マーカーが座乗するスギ基盤連鎖地図を構築することができた (表-1 ; 総マップ長 1,405.2 cM、平均マーカー間地図距離⁵⁾ 1.1 cM)。連鎖地図にマーカーがランダムに分布しているかを Kang et al.

(2010) に従って検定した結果、*Picea mariana* と同様に有意に偏っていた ($P < 0.001$)。これは、セントロメア⁶⁾ 近傍などの組み換えが抑制された領域でのマーカーの集中 (Qi et al. 1998) や大きなゲノムを持つ種における遺伝子の非ランダム分布 (Feuillet and Keller 2002) に起因すると思われる。本研究では主に EST 由来のマーカーで連鎖地図を構築しているので、転写されないゲノム領域のマーカー (AFLP など) を加えることで連鎖地図のギャップを埋められるかもしれない。

これまでに針葉樹で構築された地図を表-1 に示す。今

回構築したスギの基盤連鎖地図には、これまでに報告された他の針葉樹の連鎖地図と比べてより高密度にマーカーがマッピングされており、しかも大部分が EST 由来のマーカーであるため、非常に高い情報量を持つという特徴を持つ。この情報は、遺伝子の単離、量的形質遺伝子座 (QTL)⁷⁾ マッピング、比較ゲノム⁸⁾ 研究などに利用することができる。

雄性不稔遺伝子近傍の部分連鎖地図の構築

ms-1 近傍の部分連鎖地図作成には、TO-S 家系 [富山不稔 1 (不稔 *ms-1/ms-1*) × 小原 2 (正常 *MS-1/MS-1*) の F₁ (正常 *MS-1/ms-1*) × 珠洲 2 (正常 *MS-1/ms-1*)] 207 個体を使用した (図-2)。珠洲 2 号は石川県の精英樹で、*ms-1* をヘテロ接合体で保有する (吉井 2007)。

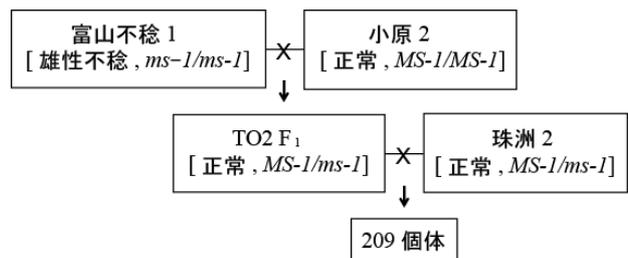


図-2 *ms-1* 近傍の部分連鎖地図作成に使用した TO-S 家系

ms-1 の座乗する連鎖群⁹⁾を調べるため、まず、TO-S 家系の不稔 48 個体を対象に、基盤連鎖地図に散在するマイクロサテライトマーカー 19 座について、期待分離比からの隔たりをカイ二乗検定で調べた。その結果、第 9 連鎖群の *Cjgssr0101S* と *Cjgssr0177_S* が有意に隔たっていたため、*ms-1* は第 9 連鎖群に位置することが明らかとなった。

表-1 これまでに他の針葉樹で報告されている高密度連鎖地図との比較

樹種	マーカー数	連鎖群数	総地図距離 (cM)	平均マーカー間距離 (cM)	出典
フランスカイガンショウ (<i>Pinus pinaster</i>)	1,182	12	1,994	1.7	Ritter et al. (2002)
ドイツトウヒ (<i>Picea abies</i>)	755	12	2,035	2.6	Achere et al. (2004)
シロトウヒ (<i>Picea glauca</i>)	821	12	2,304	2.8	Pavy et al. (2008)
クロトウヒ (<i>Picea mariana</i>)	1,111	12	1,914	1.7	Kang et al. (2010)
スギ (<i>Cyptomeria japonica</i>)	1,261	11	1,405	1.1	Moriguchi et al. (2012)

そこで、基盤連鎖地図の第9連鎖群のマーカーのうち、TO-S家系の親間で多型を示したマーカーを使用し、基盤連鎖地図と同じ条件で*ms-1*近傍の部分連鎖地図を構築した。また、Golden Gate法によるSNPタイピングの結果、*ms-1*に連鎖していると判断されたSNPマーカーも加えた。TO-S家系におけるSNPマーカーの解析には、FR48.48 Dynamic Array (Fluidigm)を使用した。解析の結果、*ms-1*近傍の部分連鎖地図には、42マーカーを座乗させることができた [図-3；マーカー名はMoriguchi et al. (2012) 参照]。

最も*ms-1*に近いマーカーは*hmsNP970_sf*で*ms-1*との地図距離は0.5 cMであった。*ms-1*近傍の2つのマーカー (*hmsNP970_sf*と *gSNP01452*)をTO-S家系の無花粉スギの選抜に使用した結果、正解率は96.6%であった。

今後は、育種母集団や人工林における無花粉スギのMASを可能にするため、*ms-1*の単離が期待される。目的遺伝子を特定する方法の一つに、BACライブラリーを使用したゲノムウォーキング¹⁰⁾がある。スギではBACライブラリーがすでに作成されているが、今回得られた*ms-1*の最近傍マーカー (0.5 cM) は、スギのゲノムサイズ¹¹⁾ (約 10.8 Gb) から単純計算すると物理的距離¹²⁾で約 3.8 Mbも*ms-1*と離れており、ゲノムウォーキングはまだ非効率的だと考えられる。このことから、*ms-1*により密接に連鎖したマーカーを得るため、*ms-1*近傍の部分連鎖地図の高密度化を進める予定である。

用語説明

- 1) 雄性不稔遺伝子：花粉が正常に発育しない現象 (雄性不稔) を引き起こす原因遺伝子。この遺伝子は劣性であるため、父親と母親の双方から受け継がないかぎり子供は無花粉スギとならない。

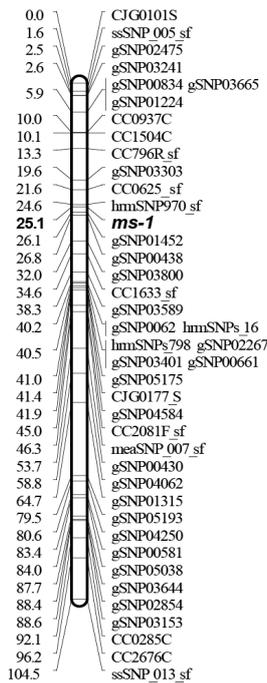


図-3 *ms-1* 近傍の部分連鎖地図
Moriguchi et al. (2012)

- 2) ゲノム：生物が持つ遺伝情報の1セット。
- 3) 連鎖地図：DNAマーカーの染色体上の順番や間隔を示す地図 (遺伝子地図)。
- 4) BACライブラリー：ゲノムDNAを断片化し、BAC (人工染色体) に組み込んだもの。
- 5) 地図距離：組換え価から計算した乗換え頻度に基づいて求められる連鎖地図上のマーカー (遺伝子座) 間の相対的距離を表す尺度。同一染色体上の2遺伝子座間で平均1回の乗換えが生じる時、その2座間の距離を1モルガン (M) という。1 M = 100 cM。
- 6) セントロメア：染色体の長腕と短腕が交差するくびれた部位。
- 7) 量的形質遺伝子座：植物の草丈や葉大きさなどの量的な形質を支配している遺伝子座。
- 8) 比較ゲノム：生物間でゲノムの構造や機能を解明し、進化的な研究を行うこと。
- 9) 連鎖群：スギの連鎖地図は半染色体数と同じ数のグループから成る。そのグループを連鎖群とよぶ。スギの連鎖群番号はTani et al. (2003) に基づく。
- 10) ゲノムウォーキング：BACなどのゲノムライブラリーから目的遺伝子近傍マーカーを含むDNA断片を探し出し、この配列に基づいて新しいマーカーを作り、さらに新しいDNA断片を探し出すという作業を繰り返しながら、目的遺伝子までたどっていく方法。
- 11) ゲノムサイズ：DNA量から求められる半染色体 (n) あたりの塩基数。
- 12) 物理的距離：2つの遺伝子座間の塩基数。1塩基の場合は1 b。1 Gb = 1,000 Mb = 10⁶ Kb = 10⁹ b。

謝辞

本研究では、農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センターの技術支援で GoldenGate の解析を実施した。また、東京大学の岩田洋佳准教授および中央農研の林武司博士には、連鎖解析について有益な助言をいただいた。ここに厚くお礼申し上げる。なお、本研究は、林野庁受託事業「遺伝子組換えによる花粉発生制御技術等の開発事業」および生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「スギ優良個体の選抜のためのゲノムワイドアソシエーション研究」の支援を得た。ここに感謝の意を表す。

引用文献

- Acheré V, Faivre-Rampant P, Jeandroz S, Besnard G, Markussen T, Aragonés A, Fladung M, Ritter E, Favre JM (2004) A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1602-1613
- 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
- 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
- 堀口申作・斎藤洋三 (1964) 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis の発見. *アレルギー* 13: 16-18
- Kang BY, Mann IK, Major JE, Rajora OP (2010) Near-saturated and complete genetic linkage map of black spruce (*Picea mariana*). *BMC Genomics* 11:515
- 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
- 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
- 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
- Moriguchi Y, Ueno S, Ujino-Ihara T, Futamura N, Matsumoto A, Shinohara K, Tsumura Y (2009) Characterization of EST-SSRs from *Cryptomeria japonica*. *Conservation Genetics Resources* 1:373-376
- 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
- Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science* 9:325-330
- Pavy N, Pelgas B, Beauseigle S, Blais S, Gagnon F, Gosselin I, Lamothe M, Isabel N, Bousquet J (2008) Enhancing genetic mapping of complex genomes through the design of highly-multiplexed SNP arrays: application to the large and unsequenced genomes of white spruce and black spruce. *BMC Genomics* 2008, 9:21
- Pelgas B, Bousquet J, Beauseigle S, Isabel N (1995) A composite linkage map from two crosses for the species complex *Picea mariana* × *Picea rubens* and analysis of synteny with other Pinaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1466-1488
- Ritter E, Aragonés A, Markussen T, Acheré V, Espinel S, Fladung M, Wrobel S, Faivre-Rampant P, Jeandroz S, Favre JM (2002) Towards construction of an ultra high density linkage map for *Pinus pinaster*. *Annals of Forest Science* 59: 637-643
- 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
- Taira H, Saito M, Furuta Y (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. *Journal of Forest Research* 4:271-273
- 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
- Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Ueno S, Taguchi Y, Futamura N, Shinohara K, Tsumura Y (2012) Single nucleotide polymorphisms in *Cryptomeria japonica*: their discovery and validation for genome mapping and diversity studies. *Tree Genetics & Genomes* 8: 1213-1222
- 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
- 吉井エリ (2007) スギ雄性不稔性の特徴とその利用に関する研究. *新潟大学自然科学研究科博士論文*
- 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
- Xu Y, Crouch JH (2008) Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science* 48: 391-407