

【第5回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

スギにおける雄花着花性の遺伝性と雄花形態形成に関する研究

坪村 美代子\*,1

はじめに

この度は森林遺伝育種学会奨励賞という荣誉ある賞を頂き、誠にありがとうございます。ご推薦頂き、またこれまで研究を指導して下さった九州大学の渡辺敦史先生、ご推薦頂いた林木育種センター育種部長比呂志部長、選考のために労して下さった皆様に厚くお礼申し上げます。また、受賞対象となった研究を行うために、研究を支えて下さった林木育種センターの多くの方々に感謝申し上げます。本稿では、スギの雄花着花性の遺伝性を評価した Tsubomura et al. (2012)、関東育種基本区のスギ雄花着花量の再評価を行った坪村ら (2013)、およびスギの雄花形態形成過程を定義付けた Tsubomura et al. (2016) について紹介いたします。

研究の背景

スギ花粉症は大きな社会的問題となっていることから、林木育種においてもスギ花粉症対策が進められてきた。これまで、「花粉の少ないスギ (少花粉スギ) 品種」は、全国の検定林、採種園での雄花の自然着花量を指数化して評価し、複数年、複数箇所でのデータを基に、平成 28 年度までに 142 品種が選抜されている (林木育種センター 2017)。花粉を全く放出しない「無花粉スギ (雄性不稔スギ)」は富山県で最初に発見され、その後スギ林において花粉の有無の調査が進められ、全国で 20 個体以上が探索されており (斎藤 2010)、林木育種センターでは平成 29 年度までに 4 品種を開発している。

これらの花粉症対策品種はさし木苗あるいは実生苗により普及が進められているが、検討すべき事項がいくつか存在する。少花粉スギは主に実生で普及されるため、雄花着花量が少ないという形質がどの程度遺伝するのかを評価する必要がある。また、従来から雄花着花は、

自然着花による着花を、樹体を上部、中部、下部に分けて指数評価し、その結果を基に評価している (林野庁 1996) が、これらの評価は調査者の主観に依存する可能性が考えられた。雄性不稔スギについては、雄性不稔形質が発現する過程が異なるいくつかのタイプが存在し、各系統において花粉の観察が行われている (斎藤 2010)。今後も新たな雄性不稔スギが開発される可能性を考えると、スギの雄花の発達過程を明確に定義づける必要がある。

スギ雄花着花性の遺伝性

林木育種センター構内に植栽されていたスギ精英樹 6 クローンのフルダイアレル交配 20 家系を用いて、狭義の遺伝率の推定を行った。2004 年、2006 年、2007 年に各個体の枝 3 本にジベレリン処理 (強制着花処理) を行い、着生した雄花の房の数を計測、3 本の枝の平均値を各個体の値とした。2006 年、2007 年は交配親についても 1~3 ラメートを用いて同様の処理、計測を行った (図-1)。親クローンの房数は 50 以下から 250 以上まで着花量の異なるものが網羅されていた。交配家系の着花量は親クローンの着花量を強く反映しており、3 年間とも、少ないクローン同士の交配家系では房数は少なく、多いクローン同士の交配家系では多いという結果になった (図-1)。房数を log 変換して狭義の遺伝率を推定したところ、 $0.777 \pm 0.339$  (標準誤差) から  $1.050 \pm 0.346$  と非常に高い値を示した。分散成分における一般組み合わせ能力の寄与は 24.1% から 35.6% と高い値を示し、ジベレリン処理による雄花着花量の遺伝性は非常に高いことが示された。本研究において、2007 年のジベレリン処理による着花量と無処理の枝の着花量の順位相関係数は  $0.596$  ( $p < 0.001$ ) であり、自然着花においても同様の傾向であることが示唆された。

\* E-mail: mtsubo@affrc.go.jp

1 つばむらみよこ、森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター

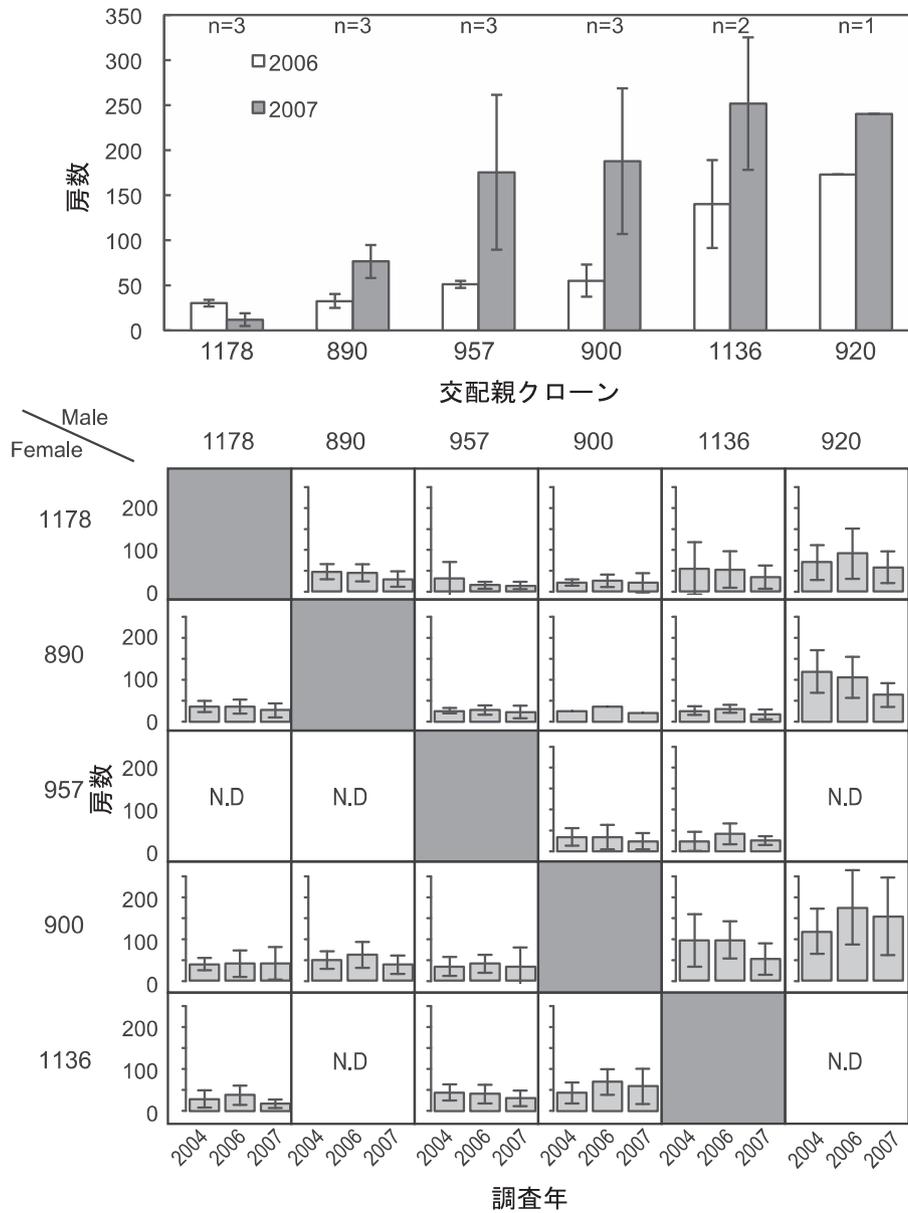


図-1 交配親6クローンと人工交配家系のジベレリン処理により着花した雄花の房数  
 交配親クローンは2006,2007年の2年間、人工交配家系は3年間調査を行った。  
 Tsubomura et al. (2012) を改変した。

### 関東育種基本区精英樹クローンの雄花着花量再評価

関東育種基本区の精英樹クローンについては、林野庁の定めた「雄花着花性に関する調査実施要領」(林野庁1996)に準じて過去に自然着花による調査が行われてきた(千田・近藤1998)。しかし、前述のように指数評価には調査者の主観が影響する可能性があり、評価手法の検討が必要であると考えられた。また本研究では、研究の精度を高めるために、すべての調査クローンについてDNAによるジェノタイプングを行った上で研究

材料に供し、評価の客観性を高めるために、複数人による指数評価の妥当性を検討した。

林木育種センター構内に植栽されていた関東育種基本区精英樹765クローン(1クローンあたり1~3ラメット)のうち745クローンについて、9人の評価者により、ジベレリン処理による雄花の着花量を目視による指数(全く着花していないか、非常に少ないものを指数1、非常に多いものを5とする5段階評価)で評価し、その平均値をクローンの値とした。9人の評価者による雄花着花指数クローン平均値は指数3を極大とした山形の分布を示し、平均値は3.06(最小値1.00~最大値4.92)、

標準偏差は0.886であった。9人の評価者ごとのクローンの雄花着花指数は評価者間で異なり、特に着花調査未経験者の値が全体の平均と大きく乖離していることが示された(図-2)。クローンと評価者を要因とした二元配置の分散分析を行った結果、クローンと評価者の交互作用は有意( $p < 0.001$ )となり、評価者によりクローンの評価値が異なることが示唆された。このことから、単一の評価者による評価、特に調査経験が少ない者の評価は不安定である可能性が示され、また複数者の評価により信頼性の高い評価値が得られると考えられた。信頼性の高い評価に必要な人数を検討するため、評価者の評価経験および評価人数と、9人の評価者による値を最も信頼性が高いと仮定した場合の評価値の推定精度について試算を行った(図-3)。順位相関係数は4人以上の評価で安定しており、評価未経験者を含んでいても、4人以上の評価者が参加することで、信頼性の高い評価値が得られると考えられた。

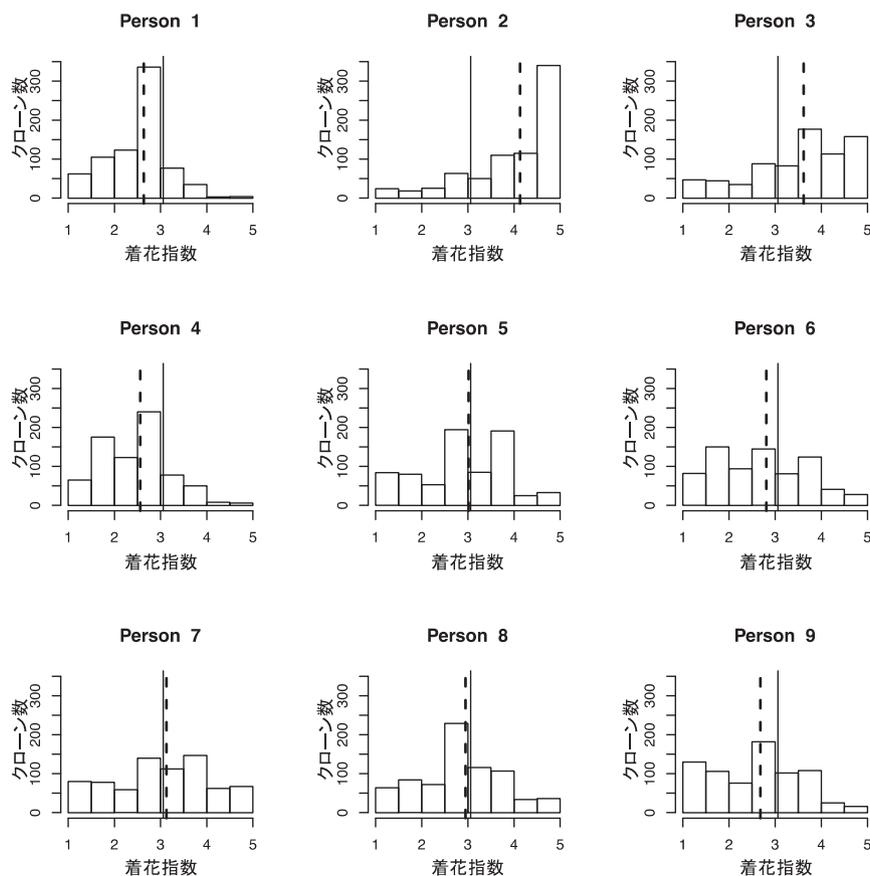


図-2 9人の評価者のクローン平均値の頻度分布

各評価者の評価値をクローンごとに平均し、評価者ごとの頻度分布を示す。実線は9人の評価者の平均値を基にした全クローンの平均値を、点線は各人の評価者を基にした全クローンの平均値を示す。評価者1と2は評価未経験者、評価者3~9は経験者。坪村ら(2013)より引用した。

## スギ雄花形態形成のステージング

スギの雄花の発達過程を詳細に調査した例は少なく、個々の雄性不稔個体の研究において組織観察が行われているのみである(Saito et al. 1998; 吉井・平 2007; 三浦ら 2011)。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナの報告(Sanders et al. 1999)を参考に、組織観察および遺伝子発現解析を基にスギの雄花形態形成のステージングを行い、ステージにもとづいて雄性不稔スギ「爽春」の形態および遺伝子発現解析を行った。

スギ精英樹クローン「碓氷2号」、実生個体、雄性不稔スギ「爽春」の枝にジベレリン処理を行い、2011年8月~2012年3月までの雄花サンプルを採取した。実生個体の雄花が成熟するまで、凍結切片による組織観察を行い、ステージングを行った。また、各ステージにおいて、碓氷2号の雄花よりRNAを抽出し、19,259 ESTを使用したマイクロアレイチップを用いて遺伝子発現解析を

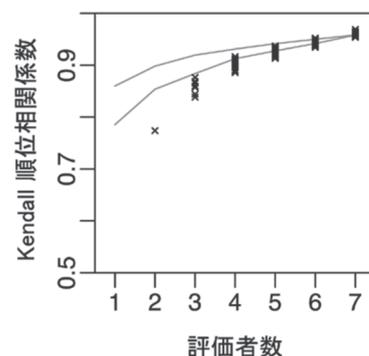


図-3 評価者の人数を変化させた場合の雄花着花調査経験の有無により生じる雄花着花量クローン評価値の推定精度

評価者の人数  $n$  について、9人から  $n$  人を選んだ組合せの評価値のクローン平均値と、最も信頼性が高いと仮定した値(9人の評価者のクローン平均値)との順位相関係数を全組合せ( ${}^9C_n$ )について算出した。着花量調査未経験の者を必ず2人含む場合を示す。灰色線は、経験者のみから  $n$  人を選んだ場合の順位相関係数の最大値と最小値を示す。坪村ら(2013)より引用した。

行った。

組織観察結果より、スギの雄花の発達過程は10ステージに分けられた(図-4)。雄花の鱗片の原基が確認されるステージ1から始まり、ステージ2において孢子形成細胞が確認され、花粉母細胞とタペート組織がステージ3で確認される。その後減数分裂(ステージ4)を経て花粉四分子が形成され(ステージ5)、遊離した小孢子が葯内に放出される(ステージ6)。タペート細胞が分解され(ステージ7)、フィブラスバンドと呼ばれる構造が表れる(ステージ8)。二核期(ステージ9)を経て、花粉の飛散が確認される(ステージ10)。各ステージにおいて遺伝子発現解析を行った結果、ステージ間で約8,000のESTの発現量が異なることが示された。これらの遺伝子の発現量を基に主成分分析を行った結果、ステージ1~3、ステージ4~7、ステージ8、ステージ9~10の4区分に分けられた。発現量を基にクラスタリング解析を行った結果、特徴的な8つのクラスターが抽出され、雄花の各発達ステージで発現する遺伝子の特定を行うことができた。また、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて特定されている葯形成に関わる遺伝子(Huang et al. 2011; Parish and Li 2010)と相同性の高いESTの発現パターンを精査したところ、シロイ

ヌナズナと同様の発現パターンを示すものも多く見られた。これらの結果から、針葉樹であるスギにおいても、雄花、葯内の発達に関わる遺伝子の発現については被子植物であるシロイヌナズナと類似性の高い機構が働いている可能性が示された。

次に、雄性不稔スギ「爽春」について、花粉崩壊が見られる時期について組織観察および遺伝子発現解析を行った。爽春の雄花においては四分子期であるステージ5までは正常個体である確氷2号と比較して明確な違いは見られなかった(図-5)。小孢子期であるステージ6においては、染色液(ヘマトキシリン、エオジン)に染まらない物質が多く分泌され、四分子が遊離していなかった。この物質が葯内に充満することで小孢子的形成が阻害され、花粉崩壊につながっていると考えられた。爽春の遺伝子発現解析結果においては、ステージ4から確氷2号と異なる発現パターンを示すESTが多く認められ、表現型で異常が表れるよりも前のステージから遺伝子発現においては変化が見られることが示された。

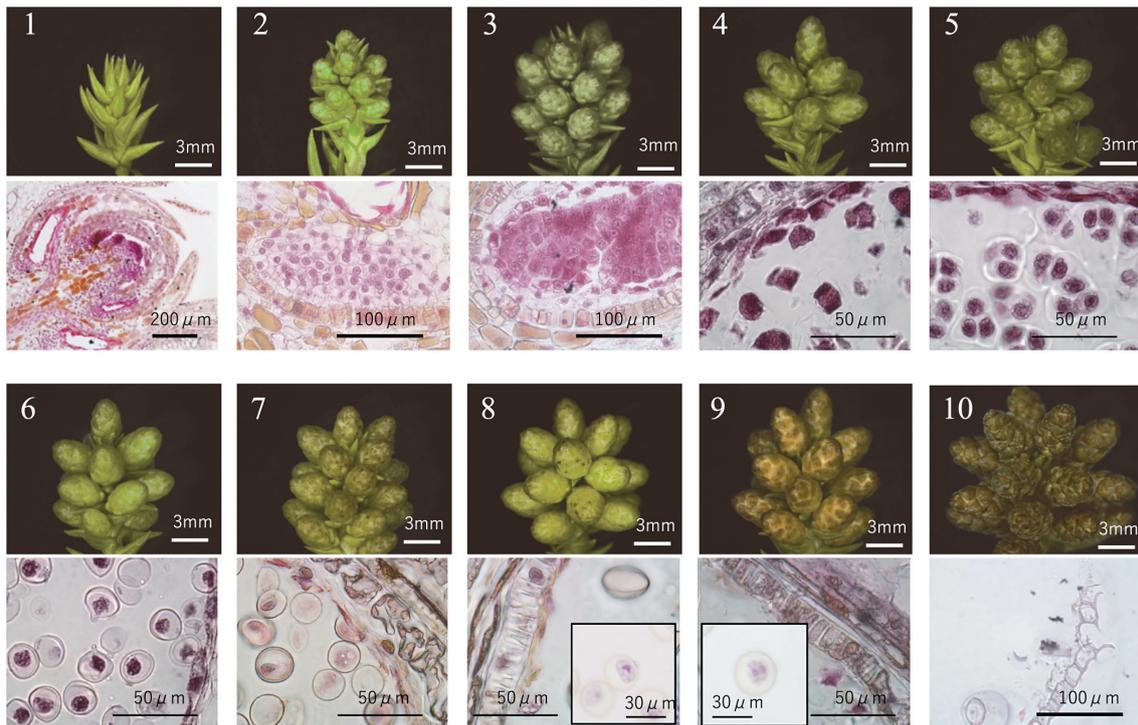


図-4 スギの雄花および花粉の発達ステージ

スギ実生個体の枝にジベレリン処理を行い、雄花形成から花粉飛散まで約8ヶ月の雄花を採取し、切片を作成した。シロイヌナズナとの比較より、10ステージに分けられた。Tsubomura et al. (2016) を改変した。

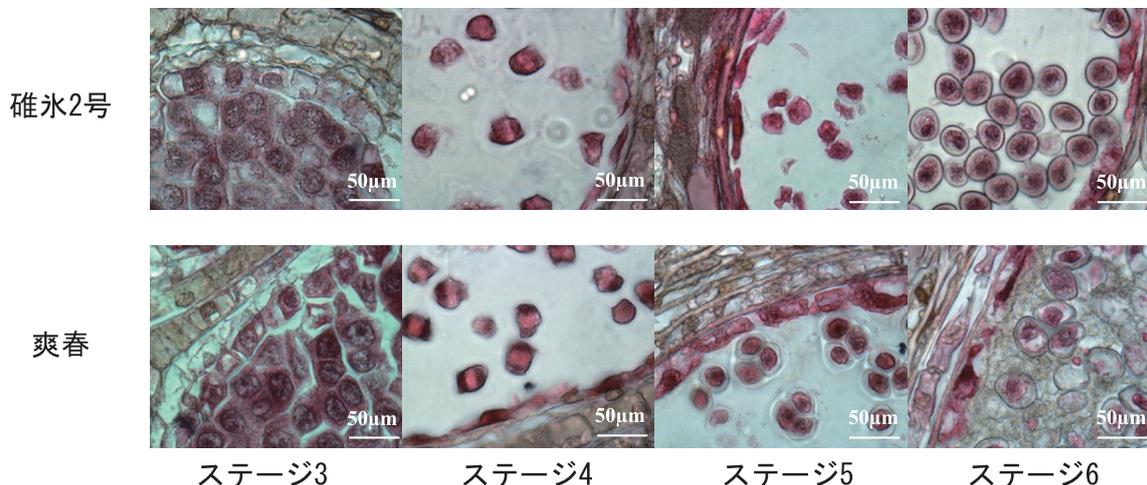


図-5 雄性不稔スギ「爽春」および碓氷2号のステージ3から6までの雄花の葯内  
ステージ6において葯内に不定形物質が認められる。Tsubomura et al. (2016) を改変した。

### 終わりに

今回の一連の研究はスギの雄花着花形質の基礎的知見を得ることを目的に行ってきた。スギの雄花着花量は非常に遺伝性が高い形質であることが示されたことから、少花粉スギの品種化および普及を進めるための基礎情報が得られたと考えられる。今後は、雄花着花量が多い、少ないという形質の違いの背後にあるメカニズムの解明に向けてさらなる基盤情報の蓄積が必要であると考えている。少花粉スギや雄性不稔スギ等の花粉症対策品種はこれからさらに需要が高まると予想され、本研究がそれらの開発・普及の一助となれば幸いである。

### 引用文献

Huang MD, Hsing YIC, Huang AHC (2011) Transcriptomes of the anther sporophyte: availability and uses. *Plant and Cell Physiology* 52: 1459–1466

三浦沙織・行田正晃・山本 格・五十嵐正徳・平 英彰 (2011) 四分子期に異常が発生するスギ雄性不稔4系統の発現過程. *日本森林学会誌* 93: 1–7

Parish RW, Li SF (2010) Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Science* 178: 73–89

林木育種センター (2017) 花粉症対策品種の開発. <https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/documents/kafunsyo201706.pdf> (2018年2月25日アクセス)

林野庁 (1996) 雄花着花性に関する調査報告書. 東京

Saito M, Taira H, Furuta Y (1998) Cytological and genetical studies on male sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Journal of Forest Research* 3: 167–173

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

Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu YC, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RB (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11: 297–322

千田雅一・近藤禎二 (1998) 関東育種基本区のスギ精英樹のクローン集植所における雄花着花性. *林木育種センター研究報告* 15: 1–30

Tsubomura M, Fukatsu E, Nakada R, Fukuda Y (2012) Inheritance of male flower production in *Cryptomeria japonica* (sugi) estimated from analysis of a diallel mating test. *Annals of Forest Science* 69: 867–875

坪村美代子・武津英太郎・渡辺敦史 (2013) 関東育種基本におけるスギ精英樹クローン雄花着花量の評価. *日本森林学会誌* 95: 156–162

Tsubomura M, Kurita M, Watanabe A (2016) Determination of male strobilus developmental stages by cytological and gene expression analyzes in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Tree Physiology* 36: 653–666

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