

論文要約

DNA マーカーによるクリの早期選抜法
の開発と遺伝資源の評価

西尾 聡悟

まえがき

クリはブナ科クリ属の落葉果樹で、世界で経済栽培されている種は、ニホングリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.), チュウゴクグリ (*C. mollissima* Bl.), ヨーロッパグリ (*C. sativa* L.) の3種である。この中でニホングリの日本におけるクリの歴史は非常に古く、約 5500 年前～4000 年前の集落跡である青森県の三内丸山遺跡からクリの果実や柱が出土しており、また古事記 (712 年) や日本書紀 (720 年) においてクリの栽培が奨励されていた。最も古いクリの産地は、現在の大阪府、兵庫県、京都府の県境付近に該当する丹波地方とされており、その歴史は 1500 年以上とされている。丹波地方のクリは外観、品質が良好で豊産性であり、これらが丹波地方から全国に運ばれて、クリの栽培が広がったと考えられている。

現在の国内におけるクリの育種目標は、易渋皮剥皮性、良食味、大果、裂果および虫害果の割合の減少に重点が置かれている。2007 年には渋皮剥皮性がチュウゴクグリ並に優れる‘ぼろたん’が育成されており、異なる収穫期の易渋皮剥皮性品種をシリーズ化することが、クリ育種の重要な目標となっている。クリの育種の効率化には、早期選抜を可能とする DNA マーカーと形質の適切な評価法の開発、および有用形質を集積させるための多様な遺伝資源の利用が必要である。そこで本研究では、ゲノムリソースの充実していないクリにおいて大規模に SSR マーカーを開発するとともに、重要形質の遺伝率の推定、分子遺伝学的なクリの遺伝資源の評価、さらには渋皮剥皮性の DNA マーカーの開発を行うこととした。

第 1 章 ニホングリのゲノムおよび EST 由来の SSR マーカーの作成

SSR マーカーは共優性であること、および遺伝子座あたりで検出可能な対立遺伝子数が多いことから、連鎖地図の作成や遺伝的多様性の研究に広く用いられている。しかし、ニホングリで利用可能とされている SSR マーカーは 50 に満たず、ニホングリの標準地図は作成されていなかった。また、世界のクリ育種ではクリの種間交雑が盛んであるが、クリ種間で利用可能なマーカーも十分に整備されていない。そこで第 1 章では、ニホングリのゲノムおよび EST に由来する SSR マーカーを大規模に作成することを目的とした。

第 1 節 ゲノミック SSR マーカーの作成

‘ぼろたん’の DNA から (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ATG)₁₀, (TAGA)₈ の 4 種類の繰り返し配列をプローブとして SSR 濃縮ライブラリーを作成し、2,112 個のクローンをシーケンシングした。これらの SSR に対して 536 組のプライマーを設計したところ、220 組で‘ぼろたん’のゲノム DNA において予想されるサイズにバンドの増幅が認められた。(ATG)₁₀, (TAGA)₈ 由来の SSR 濃縮ライブラリーにはほとんど SSR が

含まれていなかったため、220 個のゲノミック SSR マーカーのうち、211 のマーカーは 2 塩基反復をもつこととなった。遺伝子座あたりの対立遺伝子数の平均は 5.73 で、 H_0 と H_E の平均値はそれぞれ 0.63 と 0.68 であった。また、220 個のマーカーのうちチュウゴクグリ、ヨーロッパグリ、アメリカグリにおいて増幅が認められたマーカーの個数は、それぞれ 205 (93.2%)、185 (84.1%)、178 (80.9%) であった (Table 1)。

第 2 節 次世代シーケンサーを利用した EST の解読と EST-SSR の作成

‘ぼろたん’の幼葉、幼果、渋皮、成熟果から RNA を抽出し、GS FLX による大規模解読によって 155,740 個の EST 配列が得られ、1,155 個のコンティグが作成された。この中から見出された SSR に対して 239 組のプライマーを設計し、増幅を確認することによって、146 個の EST-SSR マーカーが作成された。EST-SSR では、2 塩基が 37 個、3 塩基が 45 個、4 塩基が 6 個、5 塩基が 10 個、6 塩基が 48 個と多様なモチーフの反復配列が得られた。遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数は 3.44 で、 H_0 と H_E の平均値は両方とも 0.47 であった。また、146 個のマーカーのうち、チュウゴクグリ、ヨーロッパグリ、アメリカグリにおいて増幅が確認されたマーカーの個数は、それぞれ 144 (98.6%)、140 (95.9%)、140 (95.9%) であった (Table 1)。第 1 章において、合計で 366 個のニホングリの SSR マーカーが作成された。また、2 つの異なる手法を用いてマーカー開発を行ったため、多型性および汎用性に優れた SSR マーカーを開発することができた。

第 2 章 ニホングリ育種における重要形質の広義の遺伝率および環境分散の推定

育種において、選抜が有効に行われているかどうかの指標となるのは広義の遺伝率である。また、同一の栽培条件下で正確に環境分散が推定されると、同じ栽培条件であれば、年や樹の反復数にかかわらず、その環境分散を利用することができる。そこで、重要形質である収穫期、果実重、裂果発生率、虫害果発生率の広義の遺伝率と環境分散を推定し、これらの形質の適切な選抜条件を推定することとした。8 品種 3 樹 6 年の反復データの形質値を基に二元配置分散分析を行い、遺伝子型、年、遺伝子型と年の交互作用、樹、残差分散をそれぞれ推定した。樹および年の反復がない場合、広義の遺伝率は収穫期、果実重、裂果発生率、虫害果発生率でそれぞれ 0.84、0.27、0.48、0.17 と推定された (Table 2)。樹の反復なしで 2 年間の評価を行った場合、これらはそれぞれ 0.91、0.40、0.62、0.29 に増加した。また年の反復なしで 2 樹の反復を行った場合、それぞれ 0.86、0.35、0.57、0.22 に増加した。以上より、年および樹の反復を行った場合、広義の遺伝率は収穫期、果実重、裂果発生率、虫害果発生率でそれぞれ増加するが、年の反復の方が樹の反復と比較して遺伝率を効果的に上昇させることが明らかとなった。また、樹の反復は、広大な面積を必要と

し、長期間樹を管理し続けることになるのでコストが非常に大きい。一方、年の反復は樹を管理する期間を一年延長させるだけで行うことができるため、樹の反復と比較して効率が良い。したがって、実際の育種においてはよりコストの小さい年の反復を優先して行うべきである。本研究で得られた環境分散は交雑実生の選抜を行う上で重要な指標となる。すなわち、環境分散から各形質の信頼区間を求めることにより、環境による誤差を推定し、誤って目的の遺伝子型を淘汰してしまう確率を減少させることができる。

第3章 クリ遺伝資源の遺伝的類縁関係の整理

果樹研究所では、200以上のクリの遺伝資源が新品種の育成や先端技術の開発を進めること目的として保存されており、各遺伝資源の特性の調査結果が蓄積されている。しかしながら、これらのデータは取得した年次や人が異なることや、3~5程度の名義尺度または順序尺度で記録されていることから、品種の類縁関係を整理する情報としては不十分である。また、果樹の遺伝資源は一般に多くの同一遺伝子型の品種を含むが、クリにおいてこれらは十分に整理されていない。近年、分子遺伝学的手法やバイオインフォマティクスの発展により、親子解析や Structure 解析等の遺伝資源の評価のための様々な解析手法の開発が進められている。そこで、本章では分子遺伝学的手法を用いてクリ遺伝資源の類縁関係を整理することを目的とした。

第1節 クリ遺伝資源の同一遺伝子型品種の整理

在来品種、シダレグリやトゲナシグリ等特異な形質を有するニホングリの品種群や外国のクリ種を含む216品種を12個のSSRマーカーでジェノタイプングしたところ、48品種が単一の遺伝子型をもたず、同一遺伝子型の21グループに分類された (Table 3)。この中で、‘筑波’の枝変わりと考えられていた‘雲竜’は‘筑波’と同一遺伝子型を示した。残りの46品種は20の遺伝子型に分類されたことから、2~4の異名同品種が存在することが推定された。これらの中にはニホングリの変種であるシダレグリやトゲナシグリも含まれており、‘枝垂栗岐阜’と‘枝垂栗馬頭院’、‘無刺’と‘無刺青森’はそれぞれ同一遺伝子型を示した。また、朝鮮半島から導入したニホングリ13品種の中で、6品種がニホングリの在来品種と遺伝子型が一致した。同一遺伝子型の品種の重複を除いた189のクリ品種において樹形図を作成したところ、クリの種と対応した3つのグループが見出された。シバグリや朝鮮半島から導入された品種、11のシダレグリはいずれもグループを形成せずに、ニホングリのグループの中で散在していた。異なる県や国に由来する多くの同一遺伝子型のグループが発見されたことから、地理的な情報を基本として遺伝資源を整理することは必ずしも適切ではないことが明らかとなった。一方、クラスター解析で、種により明

確なグループが形成されたことから、種の整理は概ね適切であると考えられた。

第2節 ニホングリ在来品種の遺伝的類縁関係

60 の在来品種の遺伝的関係と遺伝的構造を階層的クラスタリング (Fig. 1A) と Structure 解析 (Fig. 1B) により推定した。階層的クラスタリングにより、60 の品種はクラスター I とクラスター II の2つのクラスターに分類された。クラスター I は丹波地方に由来する品種を多く含み、クラスター II は丹波地方以外の品種を多く含んでいた。Structure 解析においては、丹波地方の品種が多く含まれる灰色、丹波地方以外の品種が多く含まれる黒色、宮崎県の在来品種である‘飫肥早生’の白色にクラスタリングされた。灰色の遺伝的構造と黒色の遺伝的構造はそれぞれ階層的クラスタリングにより分類されたクラスター I とクラスター II と概ね対応していたが、例外もみられ、生まれた土地から接ぎ木や種子により人為的に伝搬された可能性が考えられた。また、‘飫肥早生’は他のニホングリ在来品種がもたない特異的な対立遺伝子を多くもっていたが、第1節の12個のマーカーによる樹形図でニホングリのグループにクラスタリングされ、形態的特性も他のニホングリに類似している。これらのことから、‘飫肥早生’は他の在来品種と異なるニホングリ野生集団から選抜された可能性が考えられた。親子推定ソフト MARCO により、60 の在来品種の親子関係を解析した結果、9 品種において片親のみが、8 品種において両親が推定された (Table 4, Table 5)。これらの中で丹波地方の主要品種である‘銀寄’は、5つの地方品種を含む6つの在来品種の親と推定された。このことから、丹波地方の品種が地方へ伝搬され、地方品種の成立において重要な役割を担っていたことが推測された。親子や同一遺伝子型の品種の解析結果と古い文献の記録より推定された在来品種の伝搬を、Fig. 2 に示した。丹波地方の品種が地方に伝わっていることを分子遺伝学的に示すことによって、従来の仮説を初めて実証した。

第4章 ニホングリの渋皮剥皮性に連鎖する DNA マーカーの開発

ニホングリは果実が大きく収量性が高いが、チュウゴクグリやヨーロッパグリと比較して渋皮が剥きにくい欠点がある。2006年にチュウゴクグリ並に渋皮剥皮性が優れるニホングリ品種として‘ぼろたん’が登録され、その後の遺伝解析から、ニホングリの易渋皮剥皮性は劣性の主動遺伝子に支配されることが明らかとなった。結実まで長い幼若期間を要する果樹において、果実形質に関する DNA マーカーが開発されれば、幼苗段階で実生の選抜が可能になり、育苗にかかる時間、費用、労力が大幅に削減される。そこで、クリの育種を効率化させるために、幼苗段階で渋皮剥皮性の選抜が可能な DNA マーカーを開発することとした。また、‘ぼろたん’の祖先品種において、開発したマーカーを用いて渋皮剥皮性遺伝子座近傍のハプロタイプ解析を行い、易渋皮剥皮遺伝子の由来を推定した。

‘丹沢’ × ‘ぼろたん’ の F₁ 集団においては 5 個のマーカーが (Fig. 3A), 550-40 × ‘丹沢’ の F₁ 集団においては 10 個のマーカーがそれぞれ易渋皮剥皮性遺伝子の近傍にマッピングされた (Fig. 3B). その結果, 2 つのマッピング集団において, 合計 11 個の SSR マーカーが易渋皮剥皮性遺伝子と連鎖するマーカーとしてマッピングされた. 最も易渋皮剥皮性遺伝子に近い位置にマッピングされたマーカーは 550-40 と ‘丹沢’ の統合連鎖地図において, PRD52 と PEB62 であり, 易渋皮剥皮性遺伝子との距離はそれぞれ 3.2cM と 1.1cM であった. これらの距離はマーカー選抜に有効であると考えられることから, 渋皮剥皮性の早期判定が可能となった. さらに, 易渋皮剥皮性遺伝子の由来を明らかにするために, ‘ぼろたん’ の祖先品種・系統と ‘ぼろたん’ において, この 11 個の SSR マーカーを用いた渋皮剥皮性遺伝子座近傍のハプロタイプ解析を行った. その結果, ‘ぼろたん’ においてホモ化した易渋皮剥皮性遺伝子は両方とも ‘乙宗’ に由来すること, および ‘国見’ に由来する易剥皮剥皮性遺伝子座近傍で組み換えが生じていたため ‘ぼろたん’ の 2 つのハプロタイプの構造が異なっていたことが明らかとなった (Fig. 4).

まとめ

本研究によって, クリのゲノム研究の基盤となる SSR マーカーが整備され, 遺伝資源の評価と渋皮剥皮性の DNA マーカーの開発が行われた. また, 重要形質の遺伝率と環境分散が推定され, 効率的な形質調査の反復を行うことが可能となった. さらに第 3 章と第 4 章の結果に基づいて, 易渋皮剥皮性遺伝子の由来や本遺伝子をヘテロで有する品種が推定され, 有用品種の開発に資する結果が得られた. 開発された渋皮剥皮性と連鎖する DNA マーカーを用いて遺伝子型の判定を行うことで, 易渋皮剥皮性個体を早期に選抜することができる. これまでは, 果実を収穫して渋皮剥皮性を評価するには, 播種後 3 年以上の期間が必要であった. 現在では, 種子の一部から簡易に DNA を抽出し, 播種前に遺伝子型を判定し, 易渋皮剥皮性の個体のみを植栽している. 果樹研究所における 2012 年と 2013 年の 6 ないしは 8 の交雑組み合わせでは, 2,158 の種子から 1,510 個体が DNA マーカーによって淘汰され, 646 の易渋皮剥皮性個体が得られている. このように本研究で得られた成果はすでに利用されており, 育種の効率化に寄与している.

Table 1. Summary of genomic SSR and EST-SSR developed in this study.

	Genomic SSR	EST-SSR
Average number of alleles	5.73	3.44
Average observed heterozygosity	0.63	0.47
Average expected heterozygosity	0.68	0.47
Rate of usable markers in <i>C. mollissima</i> (%)	93.2	98.6
Rate of usable markers in <i>C. sativa</i> (%)	84.1	95.9
Rate of usable markers in <i>C. dentata</i> (%)	80.9	95.9

Table 2. Broad-sense heritability (h_B^2) of nut traits using eight cultivars/selections, with three trees per genotype for six years.

Broad-sense heritability	NHD ^z	NW ^z	PS ^z	II ^z
h_B^2 based on 1 tree and 1 year of evaluation	0.84	0.27	0.48	0.17
h_B^2 based on 1 tree and 2 years of evaluation	0.91	0.40	0.62	0.29
h_B^2 based on 2 trees and 1 year of evaluation	0.86	0.35	0.57	0.22
h_B^2 based on 2 trees and 2 years of evaluation	0.92	0.50	0.71	0.36

^zNHD = nut harvesting date. NW = nut weight. PS = pericarp splitting. II = infestation by insect.

Table 3. Chestnut cultivars with identical SSR genotypes (i.e., synonym groups, Syn) among the 12 SSR markers.

Cultivar genotype	Cultivar name
Syn-1	Chuutan A, Ginrei
Syn-2	Enanishiki, Jangangea
Syn-3	Ganne, Shougatsu, Yangju 20
Syn-4	Ginyose, Hamyanggea, Geungsan 1
Syn-5	Hayadama, Nakatetanba, Wasechoubei, Chuuwase
Syn-6	Hokugin, Toyogin
Syn-7	Houji 360, Houji 23, Miyazakishinaguri, Yunba 1 gou
Syn-8	Houji 377, Houji 480
Syn-9	Inasabonguri, Higan
Syn-10	Jungbu 8, Jungbu 18
Syn-11	Kanotsume, Daabgea B
Syn-12	Kinshuu, Kannabe
Syn-13	Konishiki, Gora
Syn-14	Moriwase, Kairyoutoyotama
Syn-15	Riheiguri, Tanabeguri
Syn-16	Shichifukuwase, Boseongyul
Syn-17	Shidareguri-Gifu, Shidareguri-Batouinn
Syn-18	Tamanishiki, Ishizuka
Syn-19	Togenashi, Togenashi-Aomori
Syn-20	Waseginzen, Bonguri ibaraki
Bud-1	Tsukuba, Unryuu (bud sport)

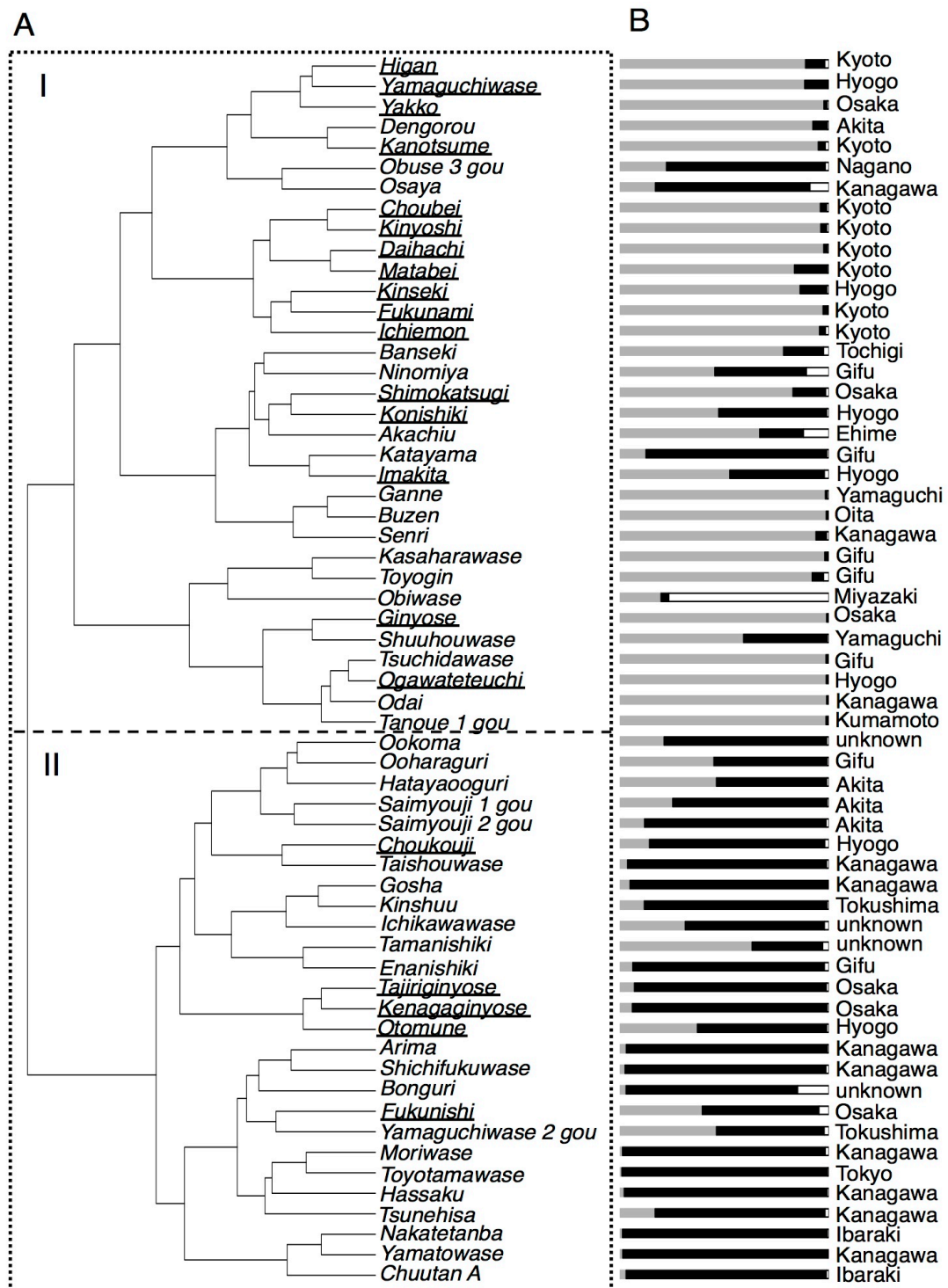


Fig. 1. Estimated genetic structure of a set of 60 native Japanese chestnut cultivars. The genetic structure was estimated using Ward clustering based on simple allele-sharing distance (A) and by Bayesian clustering (B). In the Bayesian clustering, each cultivar is shown as having genetic contributions from up to three hypothetical subpopulations (represented by black, gray, and white shading) based on its population membership coefficients. Underlines in A indicate cultivars from the Tanba region. Origins of native cultivars are listed in B.

Table 4. Putative parent–offspring pairs.

Parent–offspring pair	
Toyotamawase	Moriwase
Enanishiki	Tamanishiki
Yamatowase	Nakatetanba
Chuutan A	Nakatetanba
<u>Choubei</u>	<u>Kinyoshi</u>
<u>Kanotsume</u>	<u>Yakko</u>
Dengorou	<u>Kanotsume</u>
<u>Tajiriginuose</u>	<u>Kenagaginyose</u>
Senri	Ganne

Cultivars originated in the Tanba region are underlined.

The MARCO program cannot determine which member of each pair represents the parent.

Table 5. Putative parent–offspring trios.

Offspring	Parent 1	Parent 2
Buzen	Ganne	<u>Ginyose</u>
<u>Daihachi</u>	<u>Kinyoshi</u>	<u>Matabei</u>
<u>Ogawateteuchi</u>	<u>Ginyose</u>	Kasaharawase
<u>Otomune</u>	<u>Higan</u>	<u>Tajiriginuose</u>
Shuuhouwase	<u>Ginyose</u>	Taishouwase
Tanoue 1 gou	<u>Ginyose</u>	Kasaharawase
Tsuchidawase	<u>Ginyose</u>	Kasaharawase
Odai	<u>Ginyose</u>	Kasaharawase

Cultivars originated in the Tanba region are underlined.

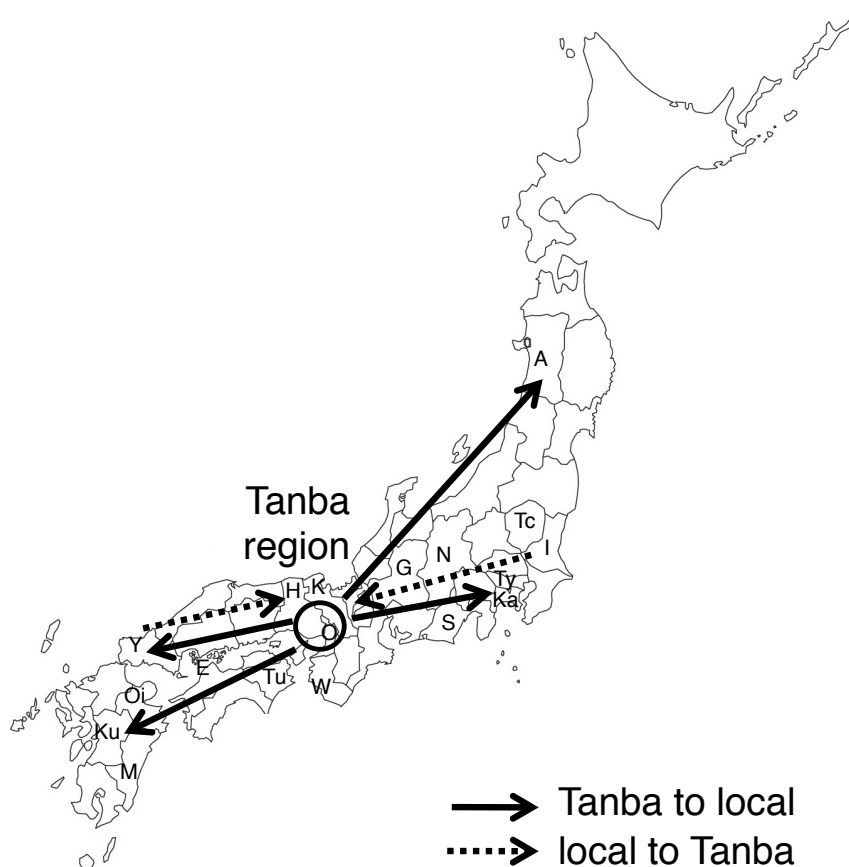


Fig. 2. The putative process of spread of native Japanese chestnut cultivars. A = Akita. E = Ehime. G = Gifu. H = Hyogo. I = Ibaraki. Ka = Kanagawa. Ku = Kumamoto. N = Nagano. O = Osaka. Oi = Oita S = Shizuoka. Tc = Tochigi. Tu = Tokushima. Ty = Tokyo. W = Wakayama.

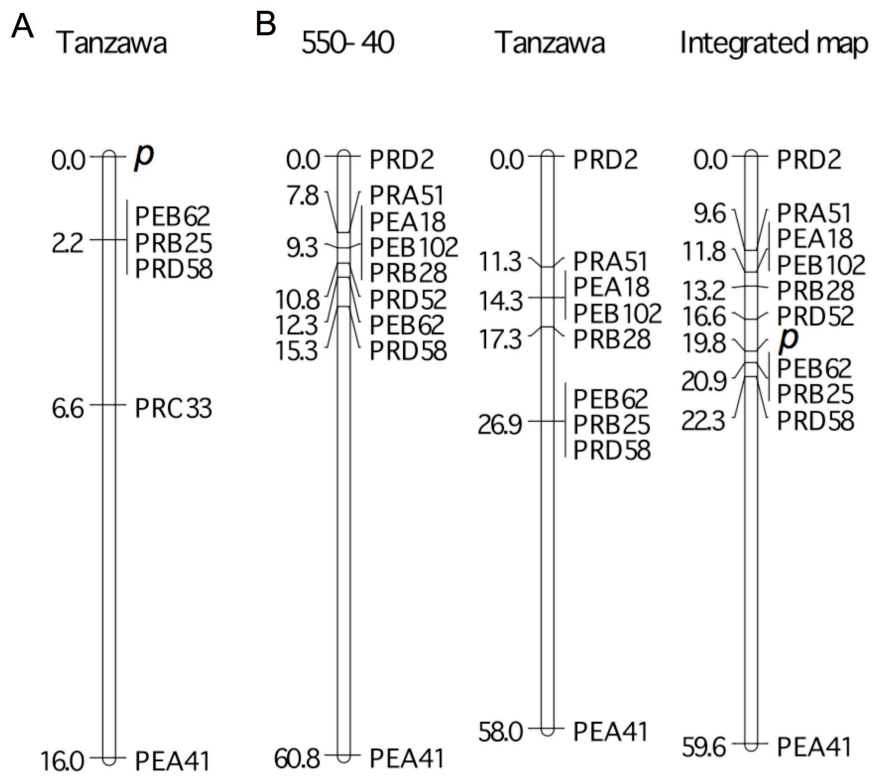


Fig. 3. Genetic linkage maps of the genomic region around the easy peel pellicle locus p . **A:** The map for ‘Tanzawa’ was obtained using the ‘Tanzawa’ \times ‘Porotan’ population. **B:** The maps for 550-40, ‘Tanzawa’, and an integrated map were obtained from the 550-40 \times ‘Tanzawa’ population. Map distances are indicated in centimorgans.

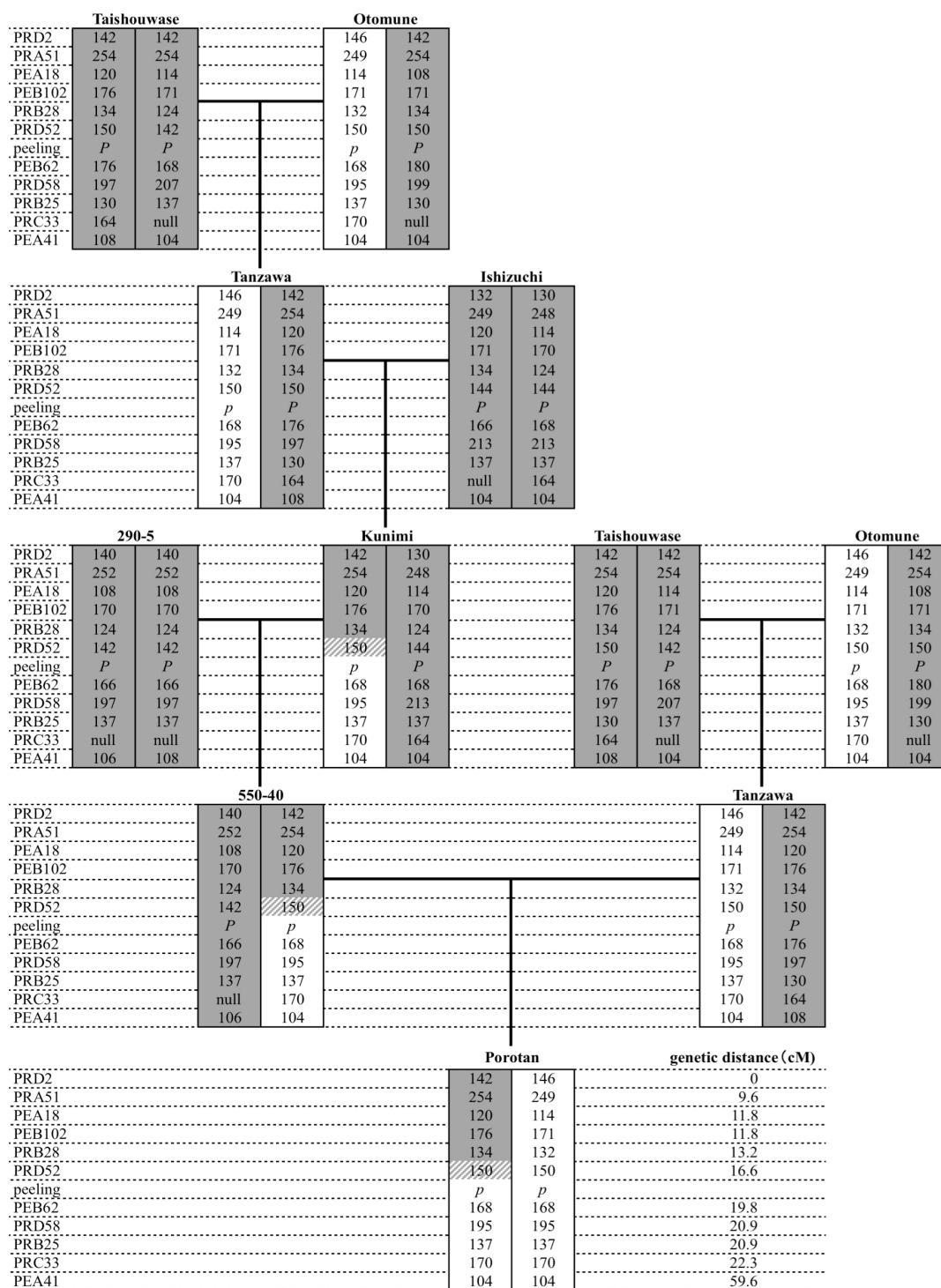


Fig. 4. Graphical genotyping around the *p* genes in ancestors in the pedigree of ‘Porotan’. Allele sizes for each SSR marker are shown in base pair. The haplotype linked in coupling phase to the *p* allele from ‘Otomune’ is indicated in white and other haplotypes are shown in gray. The linkage phases of the cross-hatched alleles of PRD52 were not determined because the genotype of PRD52 was homozygous in ‘Tanzawa’. The orders of PEA18 and PEB102 and of PRD58 and PRB25 were not determined because they co-segregated.