

1 **【短報】 スギ雄性不稔遺伝子座 *MS1* における新たな雄性不稔対立遺伝子 *ms1-3* の発見**

2 **Discovery of a New Male-sterile Allele, *ms1-3*, at *MALE STERILITY 1* Locus in *Cryptomeria japonica***

3

4 <簡略表題, ランニングタイトル ; 25 字以内, 和文のみ>

5 新たなスギ雄性不稔対立遺伝子 *ms1-3* の発見

6

7 渡部 大寛^{1,2}・竹石雄高^{3,4}・上野 真義⁵・長谷川 陽一⁵・森口 喜成^{*3}

8 Masahiro Watanabe^{1,2}, Yutaka Takeishi^{3,4}, Saneyoshi Ueno⁵, Yoichi Hasegawa⁵, Yoshinari Moriguchi^{*3}

9

10 ¹新潟大学大学院自然科学研究科 〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8050

11 ²現所属：住友林業株式会社コーポレート本部筑波研究所 〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-2

12 ³新潟大学農学部 〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8050

13 ⁴現所属：新潟県森林研究所 〒958-0254 新潟県村上市鵜渡路 2249-5

14 ⁵国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の
15 里 1

16

17 ¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050 Ikarashi 2-Nocho, Nishi-ku Niigata 950-2181, Japan

18 ²Current Address: Tsukuba Research Institute, Corporate Division, Sumitomo Forestry Co., Ltd., 3-2 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki,
19 300-2646, Japan

20 ³Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Niigata University, 8050 Ikarashi 2-Nocho, Nishi-ku Niigata 950-2181, Japan

21 ⁴Current Address: Niigata Prefectural Forest Research Institute, 2249-5 Unotoro, Murakami, Niigata 958-0264, Japan

22 ⁵Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato,
23 Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

24

25 *連絡先著者(Corresponding author), 森口 喜成 E-mail: chimori@agr.niigata-u.ac.jp ORCID: 0000-0002-8535-1517

26 <連絡先著者以外の ORCID 記載希望の場合> 上野 真義 ORCID: 0000-0001-5571-0622

27

1 <和文要旨>

2 近年、スギ雄性不稔遺伝子 *MS1* の原因遺伝子 *CJt020762* が同定され、これまでに2つの雄性不稔対立遺伝子 (*ms1-*
3 *1* および *ms1-2*) が発見されている。本研究では、*CJt020762* のイントロンを含む全コード配列を PCR 増幅して増
4 幅断片の長さの違いを識別する PCR プライマーセット (DNA マーカー) を開発し、日本各地の育種素材 1,500 個
5 体を対象にマーカー選抜を実施した。その結果、岩手県で新たにコード配列に 4 塩基の欠失変異をヘテロ接合型
6 で持つ 2 個体を選抜し、この対立遺伝子を *ms1-3* と命名した。後代検定の結果、*ms1-1* および *ms1-3* を共に保有す
7 る個体 (*ms1-1/ms1-3*) は雄性不稔であり、*ms1-3* が無花粉スギの育種に利用できることが示された。*ms1-3* を持つ
8 個体は岩手県でしか見つからなかったことから、岩手県周辺に局所的に存在すると考えられる。また、イントロ
9 ン内に生じた変異は雄性不稔の原因とならないことも示された。

11 <英文要旨>

12 Recently, a candidate gene (*CJt020762*) for *MALE STERILITY 1 (MS1)* was identified in *Cryptomeria japonica*, and two male-
13 sterility alleles (*ms1-1* and *ms1-2*) have been found at the *MS1* locus. In this study, we developed a PCR primer set (DNA markers)
14 that amplifies the entire coding sequence of *CJt020762* including introns and identifies differences in the length of the amplified
15 fragments. We also conducted marker-assisted selection (MAS) on 1,500 breeding materials collected throughout Japan. As a result,
16 we selected two heterozygous trees with a new four-nucleotide deletion mutation in the coding sequence in Iwate Prefecture. We
17 named this new male-sterility allele *ms1-3*. Furthermore, artificial crossing revealed that individuals carrying both *ms1-1* and *ms1-3*
18 (*ms1-1/ms1-3*) were male-sterile, indicating that *ms1-3* can be used for the breeding of male-sterile *C. japonica*. Because trees with
19 *ms1-3* were found only in Iwate Prefecture, they are probably localized around Iwate Prefecture. In addition, it was shown that
20 mutations occurring within an intron does not cause male-sterility.

22 <和文キーワード> 雄性不稔; MAS; 無花粉; スギ; 花粉症

23 <英文キーワード> male-sterility; MAS; pollen free; *Cryptomeria japonica*; pollinosis

1 <本文>

2 I. はじめに

3 スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) は、成長量や通直性、木材の加工性に優れていることから日本で最も重要
4 な造林樹種であるが、近年、スギ花粉症が深刻な社会問題となっている。スギ花粉症の罹患率が年々増加する中、
5 花粉を飛散しない雄性不稔スギ（無花粉スギ）の利用は、効果的な花粉発生源対策の一つとして期待されている。
6 これまでに見つかっているスギの雄性不稔は、常染色体上の単一の潜性遺伝子（雄性不稔遺伝子）により決定さ
7 れる形質である（Taira et al. 1999）。これまでに行われた花粉発達過程の顕微鏡観察や後代検定の結果から、5 種
8 類の雄性不稔遺伝子 *MALE STERILITY 1*～5 (*MS1*～5) の存在が指摘されている（Taira et al. 1999；吉井・平 2007；
9 宮嶋ら 2010；斎藤 2010；Turisaki et al. 2024）。雄性不稔遺伝子 *MS1*～*MS5* の対立遺伝子は、モデル植物の遺伝子
10 記号表記法（例えば McCouch et al. 2008）に従い、潜性対立遺伝子を *ms1*～*ms5*、顕性対立遺伝子を *Ms1*～*Ms5* の
11 ように表記する（林木遺伝子記号標記法委員会 2016）。

12 近年、*MS1* と *MS4* の原因遺伝子が同定された（Wei et al. 2021；Hasegawa et al. 2021；Kakui et al. 2023）。*MS1* の
13 原因遺伝子 CJt020762 のゲノム配列（全長 2,556 塩基）には 3 つのコード配列（CDS；Coding Sequence）が含まれ
14 ている（Hasegawa et al. 2021）（図-1）。各 CDS の塩基配列長は 334 塩基、42 塩基、227 塩基である（本研究では
15 それぞれのコード配列を CJt020762_CDS1, CJt020762_CDS2, CJt020762_CDS3 と表記する）。これまでに選抜さ
16 れた *ms1* を持つスギには、CJt020762_CDS1 内に 4 塩基の欠失（雄性不稔対立遺伝子 *ms1-1* と定義）または
17 CJt020762_CDS3 内に 30 塩基の欠失（雄性不稔対立遺伝子 *ms1-2* と定義）があり、いずれの欠失も遺伝子の機能
18 に異常をきたす（Hasegawa et al. 2021）。これらの雄性不稔対立遺伝子を両親から受け継いだ個体（*ms1-1/ms1-1*,
19 *ms1-1/ms1-2*, *ms1-2/ms1-2*）はすべて雄性不稔となる（Hasegawa et al. 2021）。一方、*MS4* は花粉壁の生成に関わる
20 酵素を合成する遺伝子（*TKPR1*）であり、この遺伝子のコード配列内の 1 塩基置換が雄性不稔を引き起こす
21 （Kakui et al. 2023）。

22 無花粉スギの品種改良や苗木生産には、一般的に、これまでに最も多く選抜された *ms1* を持つスギが利用され
23 ている（斎藤 2008；Takahashi et al. 2023）。*MS1* については、先述の 2 つの欠失変異に基づく識別マーカーが開発
24 され（Hasegawa et al. 2020），これらの識別マーカーを用い、全国各地から 17 個体の *ms1* を持つスギが選抜され
25 た（Moriguchi et al. 2020；Watanabe et al. 2022）。識別マーカーの開発によって 2 つの欠失変異を極めて効率的に選
26 抜することが可能となった一方で、苗木の遺伝的多様性の確保、病虫害や気象害に対する抵抗性および気候変動
27 への適応性の向上といった多様なニーズに応えるためには、日本各地から雄性不稔遺伝子を持つスギを出来るだ

1 け多く選抜し、無花粉スギの育種素材として活用する必要がある。Hasegawa et al. (2020) が開発したマーカーで
2 は *ms1-1* および *ms1-2* の変異サイト付近にプライマーを設計して欠失変異を検出しており、CJt020762 の全コード
3 配列を対象としているわけではない。そのため、CJt020762 の全コード配列を増幅できるようにプライマーを設
4 計して増幅断片の長さの違いを調べるマーカーとして使用すれば、これまでとは異なる種類の挿入・欠失変異を
5 検出できる可能性がある。

6 そこで本研究では、CJt020762 の全コード配列を増幅するように PCR プライマーを設計し、日本各地の育種素
7 材を対象にマーカー選抜 (MAS ; Marker-Assisted Selection) を実施した。また、検出された個体の交配試験と不
8 可稔判定を行った。その結果、新たな雄性不稔対立遺伝子 (*ms1-3* と呼称) を発見したので報告する。

9

10 II. 材料と方法

11 1. 供試個体と DNA 抽出

12 本研究では、Watanabe et al. (2024) で使用された育種素材のうち全国 20 都県の合計 1,500 個体 (岩手県 ; 81 個
13 体、宮城県 ; 28 個体、秋田県 ; 92 個体、山形県 ; 163 個体、福島県 ; 285 個体、群馬県 ; 19 個体、埼玉県 ; 47 個
14 体、千葉県 ; 25 個体、東京都 ; 11 個体、神奈川県 ; 102 個体、新潟県 ; 223 個体、石川県 ; 59 個体、長野県 ; 49
15 個体、静岡県 ; 34 個体、愛知県 ; 25 個体、三重県 ; 82 個体、和歌山県 ; 36 個体、鳥取県 ; 70 個体、広島県 ; 61
16 個体、熊本県 ; 8 個体) を MAS に供試した。DNA は、改変 CTAB 法 (Hasegawa et al. 2021) で抽出した。

17 2. DNA 解析

18 1) フラグメント解析

19 Hasegawa et al. (2021) が報告した *MS1* の候補遺伝子 CJt020762 の全塩基配列をもとに、Primer3 ver. 0.4.0
20 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いて 3 つのコード配列 (CJt020762_CDS1, CJt020762_CDS2,
21 CJt020762_CDS3) をそれぞれ挟む 3 つのプライマー組を設計し、コード配列に含まれる挿入・欠失変異を探索し
22 た (図-1, 表-1)。PCR は、5 ng/μL の鋳型 DNA 1 μL, 2×Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) 5 μL, *MS1_cds1* の
23 各プライマー 0.04 μM, *MS1_cds2* の各プライマー 0.02 μM, *MS1_cds3* の各プライマー 0.06 μM を含む PCR 反応液
24 10 μL で、Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して行った。PCR 条件は、95°C15 分の後、94°C30 秒、60°C90 秒、
25 72°C60 秒を 30 サイクル、最後に 60°C30 分とした。その後、PCR 産物 1 μL と Hi-Di・LIZ600 ミックス 8 μL (Hi-Di
26 ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific) : GeneScan LIZ 600 サイズスタンダード (Thermo Fisher Scientific) =8 : 0.2)
27 を混合し、キャピラリー電気泳動用サンプルを調製した。これを POP-7 ポリマー (Thermo Fisher Scientific) を使

1 用した ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。遺伝子型の決定には GeneMarker ver. 2.4.0 (Soft
2 Genetics) を用いた。

3 2) シーケンス解析による変異サイトの特定

4 本研究で使った 3 つのマーカー (MS1_cds1, MS1_cds2, MS1_cds3) の作成では、先述のとおり全コード配
5 列を増幅するようにプライマーを設計した。しかし、増幅に適したプライマーを設計するために、増幅する塩基
6 配列に CJt020762 のイントロン領域の一部が含まれている (図 1)。そのため、これらのマーカーで検出された
7 変異がコード配列内に存在するかを確認する必要がある。そこで本研究では、後述の変異があると判定された全
8 ての個体を対象に、サンガー法により変異が検出された領域付近の塩基配列を決定した。サンガー法による配列
9 決定には、Hasegawa et al. (2021) が設計したプライマー組を使用した (附表-1)。PCR は、5 ng/μL の鋳型 DNA
10 1.5 μL, 5×KAPA2G Buffer A (1.5 mM MgCl₂ at 1×を含む) 3 μL, 25 mM MgCl₂ 0.3 μL, 10 mM KAPA dNTP 0.3 μL,
11 プライマーF 0.2 μM, プライマーR 0.2 μM, 5 U/μL KAPA2G Fast DNA Polymerase (KAPA2G Fast PCR kit ; KAPA
12 Biosystems) 0.15 μL を含む PCR 反応液 15 μL で、Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して行った。PCR 条件は、
13 95°C3 分の後、95°C15 秒, 60°C15 秒, 72°C1 秒を 35 サイクル, 最後に 72°C1 分とした。その後の解析手順は、
14 Hasegawa et al. (2021) と同様の方法で実施した。

15 3) マイクロサテライトマーカーによるクローン識別

16 選抜された育種素材の名称が類似していたため (結果参照: 耐寒風 37 号, 耐寒風 95 号), ラベルの誤記等に
17 よる取り違えの可能性を考慮して、マイクロサテライト (別名 SSR ; Simple Sequence Repeats) マーカーを使用し
18 て 2 個体のクローン識別を行い、別個体であることを確認した。SSR 遺伝子型の決定には、Cjgssr77 (Moriguchi et
19 al. 2003), および CS1219, CJS0520, CS1364, CS1525, CJS0333, CS2169 (Tani et al. 2004) の 7 座の核 SSR マー
20 カーを用いた。PCR は 5 ng/μL の鋳型 DNA 1 μL, 2×Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) 3 μL, 附表-2 に示すプ
21 ライマーミックスを加えた PCR 反応液 6 μL で、Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して行った。PCR 条件は、
22 95°C15 分の後、94°C30 秒, 57°C1 分 30 秒, 72°C1 分間を 30 サイクル, 最後に 60°C30 分とした。遺伝子型の決定
23 は先述の方法で実施した。

24 3. 交配試験

25 2022 年 3 月, 新大 3 号 (ms1-1/ms1-1) を母樹, MAS で選抜された耐寒風 37 号, 耐寒風 95 号, 飯南 6 号をそれ
26 ぞれ花粉親とした人工交配を行なった (S3-TK37 家系, S3-TK95 家系, S3-I6 家系)。同年 11 月に球果を採取し、
27 種子を精選した後、水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレに播種した。24°C の室内で発芽を促進させ、発芽した実

生はミズゴケを詰めた 128 穴プラグトレーに植え付けて育苗を行った。これらの個体を 2023 年 4 月上旬にビニールポットに植え替え、屋外で育苗した。2024 年 6~7 月に 100ppm のジベレリン水溶液（住友化学）を散布し、雄花の着花を促進させた。2024 年 12 月~2025 年 1 月に、採取した雄花をカミソリで縦に 2 等分し、実体顕微鏡（SZ 1145TR ; Olympus）を用いて不可稔判定を実施した。正常な花粉粒が確認できた個体を可稔、塊状化し正常な花粉粒が確認できなかった個体を不稔と判定した。雄花が着生しなかった個体および花粉の有無を明確に観察できなかった個体を除外した。観察個体数は、S3-TK37 家系は 11 個体、S3-TK95 家系は 30 個体、S3-I6 家系は 20 個体であった。各家系の期待分離比（可稔個体数：不稔個体数=1：1）との適合度は R ver. 4.3.2（R Core Team 2023）を用いてカイ二乗適合度検定により検定した。

9

10 III. 結果

11 1. MAS

12 日本各地の育種素材 1,500 個体についてフラグメント解析を行なった結果、岩手県の 2 個体（耐寒風 37 号、耐
13 寒風 95 号）の MS1_cds3 に野生型のピークと、そこから 4 塩基短いピークが 1 本ずつ検出された（図-2 C）。次
14 に、耐寒風 37 号と耐寒風 95 号について CJt020762_CDS3 付近の塩基配列を決定した結果、CJt020762_CDS3 の 168
15 塩基目の位置（コード配列内）に新たな 4 塩基の欠失（c.544_547delTTAC）が確認された（図-1, 図-3）。なお、
16 変異の表記は、HGVS（Human Genome Variation Society）の命名規則（den Dunnen et al. 2016）に準拠した（以下も
17 同様）。また、この 2 個体についてマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型の決定を行なった結果、耐寒
18 風 37 号と耐寒風 95 号は異なるクローンであった（附表-3）。

19 一方、新潟県の 2 個体（岩船 5 号、南蒲原 1 号）、群馬県の 1 個体（多野 2 号）、埼玉県の 1 個体（秩父 1
20 号）、千葉県の 1 個体（鬼冨 6 号）、静岡県 of 1 個体（安倍 6 号）、三重県の 1 個体（飯南 6 号）、鳥取県の 1
21 個体（天東 9 号）、広島県の 1 個体（佐伯 123 号）の MS1_cds2 に野生型のピークと、それより 3 塩基長いピー
22 クが 1 本ずつ検出された（図-2 D）。この 9 個体について CJt020762_CDS2 付近のシーケンス解析を行った結果、
23 CJt020762_CDS2 の上流 31 塩基目の位置（イントロン内）に 3 塩基の重複（c.335-34_335-32dupTTG）が確認され
24 た（図-1, 図-4）。

25 2. 後代検定

26 本研究に用いた新大 3 号（ms1-1/ms1-1）×耐寒風 37 号（S3-TK37 家系）、新大 3 号×耐寒風 95 号（S3-TK95 家
27 系）、新大 3 号×飯南 6 号（S3-I6 家系）では、母樹である新大 3 号が ms1-1 をホモ接合型で持つことから、耐寒

1 風 37 号, 耐寒風 95 号, 飯南 6 号が *ms1* をヘテロ接合型で持つ場合, 可稔個体と不稔個体は 1 : 1 に分離すると期
2 待される。3 家系から得られた実生苗の花粉稔性を評価した結果, S3-TK37 家系では可稔が 8 個体, 不稔が 3 個
3 体 ($\chi^2 = 2.27$, $p = 0.13$), S3-TK95 家系では可稔が 15 個体, 不稔が 15 個体 ($\chi^2 = 0$, $p = 1.00$), S3-I6 家系では可
4 稔が 20 個体, 不稔が 0 個体 ($\chi^2 = 20$, $p < 0.001$) であった (表-2)。

5

6 IV. 考察

7 *MS1* 原因遺伝子 CJt020762 の全コード配列を対象とするマーカーを用いて日本各地の育種素材 1,500 個体を対象
8 に MAS を実施した結果, CJt020762_CDS3 内に新たな 4 塩基 の欠失 (c.544_547delTTAC) をヘテロ接合型でもつ
9 個体 (耐寒風 37 号と耐寒風 95 号) を岩手県に由来する個体から見出した。この欠失変異は Hasegawa *et al.* (2021)
10 では報告されていない新規の変異であった。新たな 4 塩基の欠失が検出された CJt020762_CDS3 のコード配列に
11 は膜貫通ドメイン (TMD ; transmembrane domain) が含まれ, スギの花粉生産に不可欠である (Hasegawa *et al.*
12 2021)。先行研究で報告された 30 塩基の欠失変異と同様に, 4 塩基の欠失 (c.544_547delTTAC) に起因するフレ
13 ームシフトによって膜貫通ドメインの機能が失われると考えられる。耐寒風 37 号と耐寒風 95 号の花粉をそれぞ
14 れ新大 3 号 (*ms1-1/ms1-1*) に交配して得られた 2 家系 (S3-TK37 家系, S3-TK95 家系) の花粉稔性を評価した結
15 果, S3-TK37 家系から得られた実生苗では調査数が少なかったため不稔個体がやや少なくなったものの, 両家系
16 とともに期待分離比 1 : 1 から有意な隔たりは検出されなかった ($p = 0.13$, $p = 1.00$)。以上の結果から, 耐寒風 37
17 号と耐寒風 95 号は新たな種類の雄性不稔対立遺伝子 *ms1-3* をヘテロ接合型で持つことが示された。*ms1-3* を持つ
18 個体は岩手県でのみ検出されたことから, 岩手県周辺に局所的に分布する可能性が高い。フィッシャーの正確確
19 率検定 (片側検定) では, 岩手県とそれ以外の地域との間で有意な頻度差が認められた ($p = 0.0029$)。また, 本
20 研究の交配試験の結果, *ms1-1* および *ms1-3* を共に保有する個体 (*ms1-1/ms1-3*) が雄性不稔であり, *ms1-3* も *ms1-*
21 *1* および *ms1-2* と同様に無花粉スギの育種に利用できることが示された。

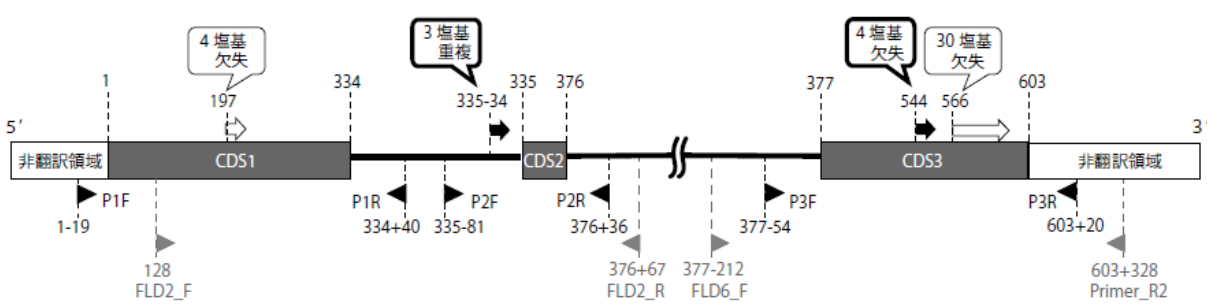
22 一方, 本研究では, CJt020762_CDS2 の上流 31 塩基の位置 (イントロン内) に 3 塩基の重複 (c.335-34_335-
23 32dupTTG) を保有する個体を 9 個体検出した。このうちの 1 個体である飯南 6 号の花粉を新大 3 号に交配して得
24 られた家系 (S3-I6 家系) の花粉稔性を評価した結果, 予想どおり不稔個体は出現しなかった。このことから,
25 イントロン内の重複は雄性不稔の原因とならないことが明らかになった。

26 本研究のフラグメント解析により, これまで雄性不稔対立遺伝子が 2 種類と考えられていた *MS1* 遺伝子座に,
27 新たな雄性不稔対立遺伝子が同定された。今後も, さらに新たな雄性不稔対立遺伝子 (例えば *ms1-4*) が同定さ

1 れる可能性は否定できない。しかし、それらは *ms1-1* や *ms1-2* のように広範囲に分布してはならず、*ms1-3* のよう
 2 に非常に低頻度で限られた地域にのみ分布していると考えられる。フラグメント解析は PCR 産物の断片長の違
 3 いを識別する手法であるため、この方法で検出できる変異は挿入（重複を含む）または欠失である。*MS4* 遺伝子
 4 座では、1 塩基置換が雄性不稔を引き起こすことが明らかになっており（Kakui et al. 2023），*MS1* 遺伝子座のコー
 5 ド配列内でもミスセンス変異またはナンセンス変異を起こす塩基置換が存在すれば、雄性不稔を引き起こす可能
 6 性がある。次世代シーケンサーを使用したアンプリコンシーケンス解析を大規模に行うことで、コード配列内に
 7 塩基置換を持つ個体が検出される可能性もある。今後も全国各地から雄性不稔遺伝子を持つ個体の選抜を行うこ
 8 とで、多様なニーズに応える無花粉スギの品種開発がさらに加速すると期待される。

9

10 <図-番号>



11

12 図-1. Cj020762 内の変異サイトと使用したプライマーの模式図

13 灰色と白色のボックスはそれぞれ CDS（コード配列）と非翻訳領域，CDS 間の実線はイントロンを表す。CDS
 14 内の数字は開始コドンの最初の A を 1 とした塩基番号（イントロンを除く）を示し，非翻訳領域やイントロンの
 15 数字は近傍の CDS の塩基番号とそこから増減する塩基数を示す。黒三角はマーカー選抜用に設計したプライマ
 16 ー（P1F， *MS1_cds1_F_FAM*；P1R， *MS1_cds1_R*；P2F， *MS1_cds2_F_VIC*；P2R， *MS1_cds2_R1*；P3F，
 17 *MS1_cds3_F_NED*；P3R， *MS1_cds3_R*）（表-1），灰色三角はシーケンス解析に使用したプライマー（附表-1）
 18 を表す。黒矢印は本研究で新たに発見された変異サイト，白矢印は先行研究（Hasegawa et al. 2021）で発見された
 19 変異サイトを表す。

20

21

22

23

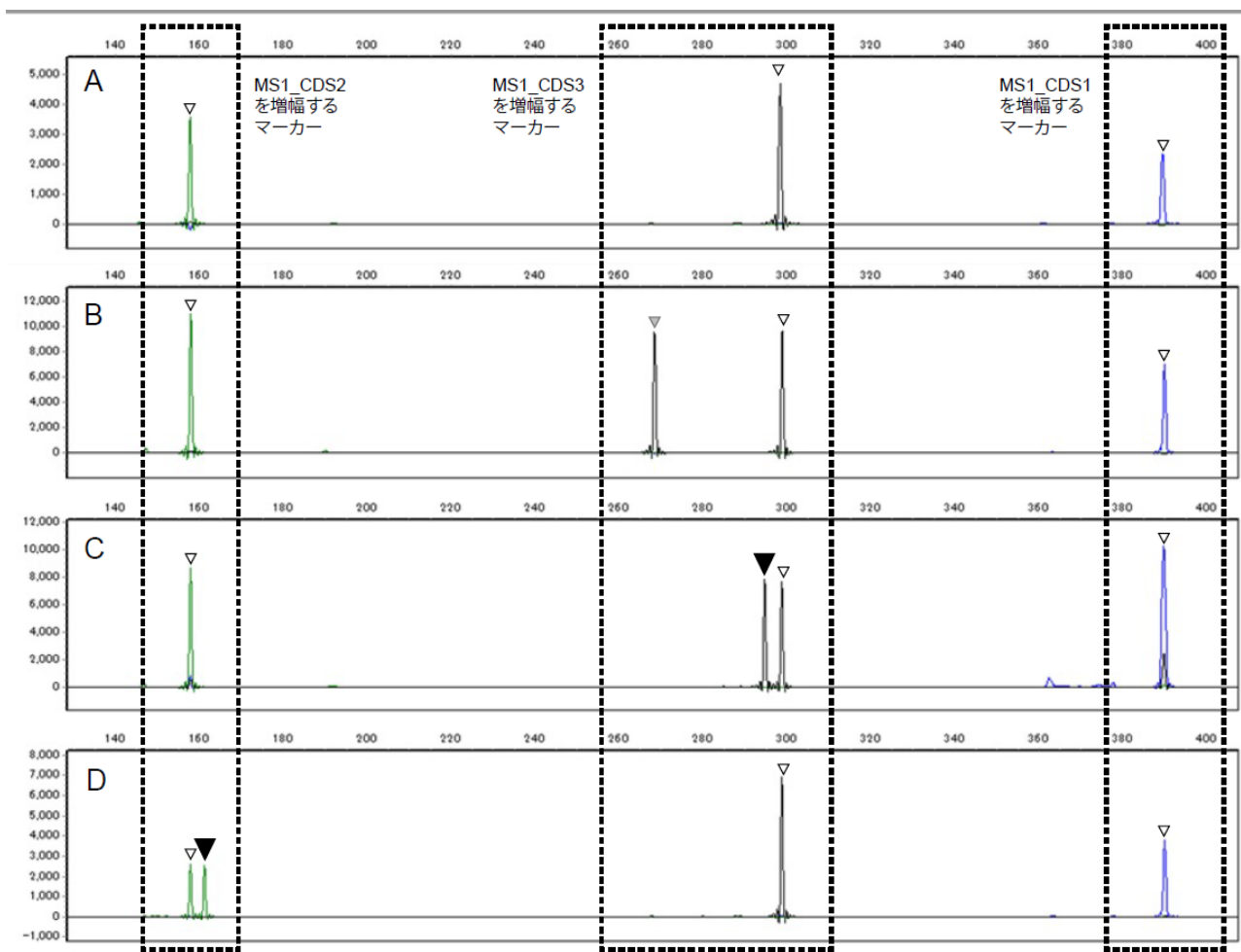


図-2. フラグメント解析により検出された *MS1* 遺伝子座の新たな変異

左は *MS1_CDS2* を増幅するマーカー（白三角は野生型対立遺伝子 *Ms1* のピーク，黒三角は *MS1_CDS2* 付近に 3 塩基の重複を持つ対立遺伝子のピーク），中央は *MS1_CDS3* を増幅するマーカー（白三角は野生型対立遺伝子 *Ms1* のピーク，灰色三角は *MS1_CDS3* 内に 30 塩基の欠失を持つ対立遺伝子 (*ms1-2*)，黒三角は *MS1_CDS3* 内に 4 塩基の欠失を持つ対立遺伝子 (*ms1-3*)），右は *MS1_CDS1* を増幅するマーカー（白三角は野生型対立遺伝子 *Ms1* のピーク）を表す。A, 中頸城 4 号 (*Ms1/Ms1*) ; B, 大井 7 号 (*Ms1/ms1-2*) ; C, 耐寒風 37 号 (*Ms1/ms1-3*) ; D, 飯南 6 号 (*Ms1/Ms1*)。

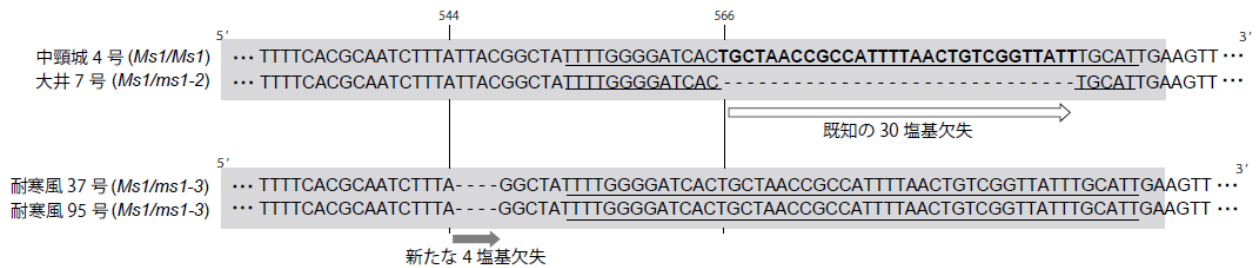


図-3. 野生型個体（中頸城 4 号）および Cj020762_CDS3 内に欠失を持つ個体（大井 7 号，耐寒風 37 号，耐寒風 95 号）のゲノム DNA 塩基配列の一部
 灰色部分はコード配列 Cj020762_CDS3（227 塩基）の一部，数字は塩基番号（開始コドンの最初の A を 1 とする），白矢印は既知の 30 塩基欠失（c.566_595del），灰色矢印は新たに検出された 4 塩基欠失（c.544_547del），下線は膜貫通ドメイン（TMD）を示す。

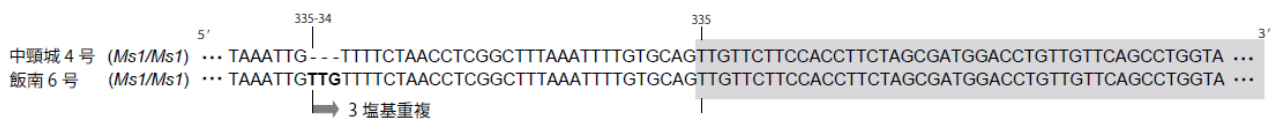


図-4. 野生型個体（中頸城 4 号）および Cj020762_CDS2 付近に 3 塩基重複を持つ個体（飯南 6 号）のゲノム DNA 塩基配列の一部
 灰色部分はコード配列 Cj020762_CDS2（43 塩基）の一部，数字は塩基番号（開始コドンの最初の A を 1 とする），灰色矢印は新たに検出された 3 塩基重複（c.335-34_335-32dupTTG）の箇所を示す。

1 <表-番号>

2 表-1. 本研究で開発したフラグメント解析用 DNA マーカーの概要

マーカー名	プライマー名	蛍光ラベル	プライマー配列 (5'→3')	増幅断片長 (bp)
MS1_cds1	MS1_cds1_F_FAM	FAM	GACGTCTTCTGCAACAAC	389/385 ^{*1}
	MS1_cds1_R	–	GCAAACAATGCAGGCAAC	
MS1_cds2	MS1_cds2_F_VIC	VIC	AAACCCTTGACCTTGAAAAATG	158
	MS1_cds2_R	–	CCGGAAATGGAAAACGAAG	
MS1_cds3	MS1_cds3_F_NED	NED	ACGTTTTACACCGTTGATG	298/268 ^{*2} /294 ^{*3}
	MS1_cds3_R	–	AACCTCCGGTGTATCAAAC	

3 ^{*1}4 塩基短い増幅断片長は雄性不稔対立遺伝子 *ms1-1* を識別する。

4 ^{*2}30 塩基短い増幅断片長は雄性不稔対立遺伝子 *ms1-2* を識別する。

5 ^{*3}4 塩基短い増幅断片長は本研究で新たに発見された雄性不稔対立遺伝子 *ms1-3* を識別する。

6

7

8

9 表-2. 本研究で用いた 3 つの家系における花粉稔性評価の結果

家系名	交配組み合わせ	個体数		期待値	χ^2	<i>p</i> 値
		可稔	不稔			
S3-TK37	新大 3 号×耐寒風 37 号	8	3	1 : 1	2.27	0.13
S3-TK95	新大 3 号×耐寒風 95 号	15	15	1 : 1	0	1
S3-I6	新大 3 号×飯南 6 号	20	0	1 : 1	20	< 0.001

10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

附表-1. 本研究のシーケンス解析で使

遺伝子座	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
MS1_CDS2	FLD2_F	CTTACATGACGAGATCAGCCAAG
	FLD2_R	AAAAGATGTCTCGAAGAAAGATTTTCAG
MS1_CDS3	FLD6_F	TTAGCACTCAAGCCCTAGTTTTG
	Primer_R2	AGCCGTCACATTAGATAATACGTGGT

プライマーは Hasegawa et al. (2021) を参照した。

6 7 8 9 10 11 12 13

附表-2. 本研究のクローン識別で使

マーカー名	蛍光ラベル	モチーフ	蛍光付きF側プライマー		非蛍光F側プライマー		非蛍光R側プライマー		参考文献
			プライマー配列 (5'→3')	終濃度 (μM)	プライマー配列 (5'→3')	終濃度 (μM)	プライマー配列 (5'→3')	終濃度 (μM)	
CS1525	VIC	(CA)18	ATGAAGTGCCTTGGTTTGT	0.2	ATGAAGTGCCTTGGTTTGT	0.3	ATCGCCTCCTCTTTTATCCT	0.5	Tani et al. 2004
CS1219	FAM	(GT)10	AAGGTGTTGTTTTAAGGAGG	0.1	AAGGTGTTGTTTTAAGGAGG	0.4	CAGCCATCTATTATTGTGC	0.5	Tani et al. 2004
CJS0520	FAM	(TG)18	TCCCTTTTGGTATTTTACAC	0.2	TCCCTTTTGGTATTTTACAC	0.3	ACTCAAATTGCGATAATCTC	0.5	Tani et al. 2004
CS1364	FAM	(AC)7	TGATTATGGTCGGTGGTCTT	0.2	TGATTATGGTCGGTGGTCTT	0.3	GTGATGTGGTGTATCTTGT	0.5	Tani et al. 2004
CS2169	PET	(GA)9	GTAGAGGAGGGATATAGAGT	0.3	GTAGAGGAGGGATATAGAGT	0.2	TCCTTGTCCTCTCTCTTTA	0.5	Tani et al. 2004
Cjgssr77	NED	(CT)10	CCTTGACACCTATTGTACCT	0.2	CCTTGACACCTATTGTACCT	0.3	AGGGAGGAGAAATAGACAT	0.5	Moriguchi et al. 2003
CJS0333	NED	(GA)26	AGGAGATTAGGATGGTGGG	0.2	AGGAGATTAGGATGGTGGG	0.3	GGTTTGCCTCTTCTATGAG	0.5	Tani et al. 2004

10 11 12 13

附表-3. 本研究で選抜した個体の核マイクロサテライトマーカー7座の遺伝子型

選抜した県	クローン名	MS1の 遺伝子型	マイクロサテライトマーカーの遺伝子型													
			CS1219		CJS0520		CS1364		CS1525		Cjgssr77		CJS0333		CS2169	
岩手県	耐寒風37号	MS1/ms1-3	100	100	188	188	320	322	186	207	152	158	245	264	156	156
岩手県	耐寒風95号	MS1/ms1-3	100	104	184	188	292	322	186	232	123	158	225	251	156	156

1 **謝辞**

2 本研究を実施するにあたり，岩手県，宮城県，秋田県，山形県，福島県，群馬県，埼玉県，千葉県，東京都，神
3 奈川県，新潟県，石川県，長野県，静岡県，愛知県，三重県，和歌山県，鳥取県，広島県，熊本県の林業試験場
4 には育種素材をご提供いただいた。阿部祐実氏，駒田美帆氏，小林翔氏には実験や補助データの収集にご協力い
5 ただいた。伊藤由紀子氏，蓬田英俊氏，山中豪氏には花粉の収集，人工交配作業，育苗管理を行っていただいた。
6 本研究は，農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業（課題番号：28013BC）」，科研
7 費 21K05666 の支援を受けて実施した。ここに記して深く御礼申し上げます。

8

9 <利益相反>

10 開示すべき利益相反はない。

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 **引用文献**

- 2 den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE,
3 Taschner PE (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. Hum Mutat 37:564–569
- 4 Hasegawa Y, Ueno S, Wei FJ, Matsumoto A, Ujino-Ihara T, Moriguchi Y, Kasahara M, Fujino T, Shigenobu S, Yamaguchi K, Bino
5 T, Hakamata T (2020) Development of diagnostic PCR and LAMP markers for *MALE STERILITY 1 (MS1)* in *Cryptomeria*
6 *japonica* D. Don. BMC Res Note 13: 457
- 7 Hasegawa Y, Ueno S, Wei FJ, Matsumoto A, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Hakamata T, Fujino T, Kasahara M, Bino T, Yamaguchi
8 K, Shigenobu S, Tsumura Y, Moriguchi Y (2021) Identification and genetic diversity analysis of a male-sterile gene (*MS1*) in
9 Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Sci Rep 11: 1496
- 10 Kakui H, Ujino-Ihara T, Hasegawa Y, Tsurisaki E, Futamura N, Iwai J, Higuchi Y, Fujino T, Suzuki Y, Kasahara M et al. (2023) A
11 single-nucleotide substitution of *CjTKPR1* determines pollen production in the gymnosperm plant *Cryptomeria japonica*.
12 PNAS Nexus 2: pgad236
- 13 McCouch SR, Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, Rice Genetics Cooperative (2008) Gene
14 nomenclature system for rice. Rice 1:72–84
- 15 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．日林誌 92: 106-
16 109
- 17 Moriguchi Y, Iwata H, Ujino-Ihara T, Yoshimura K, Taira H, Tsumura Y (2003) Development and characterization of microsatellite
18 markers for *Cryptomeria japonica* D.Don. Theor Appl Genet 106: 751-758
- 19 Moriguchi Y, Ueno S, Hasegawa Y, Tadama T, Watanabe M, Saito R, Hirayama S, Iwai J, Konno Y (2020) Marker-assisted selection
20 of trees with *MALE STERILITY 1* in *Cryptomeria japonica* D. Don. Forests 11: 734
- 21 林木遺伝子記号標記法委員会（2016）林木の遺伝子記号の標準化の改訂．森林遺伝育種 5: 134-137
- 22 斎藤真己（2008）無花粉スギの開発状況と今後の展望．森林科学 54: 17-20
- 23 斎藤真己（2010）スギ花粉症対策品種の開発．日林誌 92: 316-323
- 24 Taira H, Saitou M, Furuta Y (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. J For Res 4: 271-273
- 25 Takahashi M, Miura M, Fukatsu E, Hiraoka Y, Kurita M (2023) Research and project activities for breeding of *Cryptomeria japonica*
26 D. Don in Japan. J Res 28: 83–97
- 27 Tani N, Takahashi T, Ujino-Ihara T, Iwata H, Yoshimura K, Tsumura Y (2004) Development and characteristics of microsatellite

1 markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. Ann For Sci 61: 569-575

2 Tsurisaki E, Nameta M, Shibata S, Hirayama S, Iwai J, Ohashi R, Otani M, Ito Y, Moriguchi Y (2024) Cytological Analysis of Male-
3 Sterile *MS5* Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) and Comparison with Other Male-Sterile Mutants. J Plant Biol 67:
4 11–23

5 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と遺伝的特性．日林誌 89:
6 26-30

7 Watanabe M, Ueno S, Hasegawa Y, Moriguchi Y (2022) Efficient low-cost marker-assisted selection of trees with *MALE STERILITY*
8 *1* (*MS1*) in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) using bulk DNA samples. Tree Genet Genomes 18: 29

9 Watanabe M, Ueno S, Hasegawa Y, Hirayama S, Iwai J, Kakui H, Moriguchi Y (2024) Development and application of a KASP
10 marker for marker-assisted selection against the male-sterile gene *MALE STERILITY 4* (*MS4*) in Japanese cedar (*Cryptomeria*
11 *japonica* D. Don). New Forests 55: 1349-1362

12 Wei FJ, Ueno S, Ujino-Ihara T, Saito M, Tsumura Y, Higuchi Y, Hirayama S, Iwai J, Hakamata T, Moriguchi Y (2021) Construction
13 of a reference transcriptome for the analysis of male sterility in sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) focusing on *MALE*
14 *STERILITY 1* (*MS1*). PLoS ONE 16: e0247180