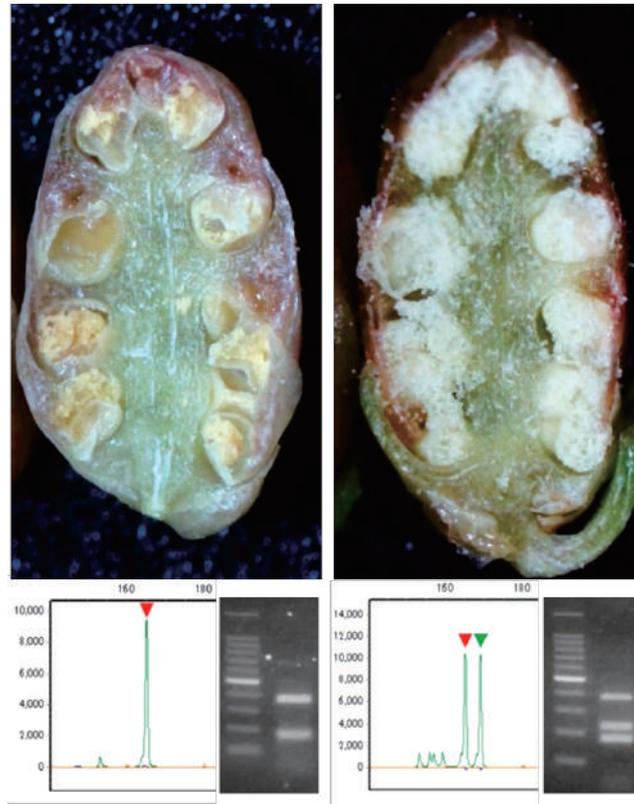


スギの雄性不稔遺伝子 *MS1* 判別マニュアル

version 1.2

2024年10月4日版



国立研究開発法人 森林研究・整備機構

森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute

森林総合研究所 第5期中長期計画成果9（森林環境－3）

**A manual to genotype male sterility gene (*MS1*) mutations in
Cryptomeria japonica D. Don**

【表紙写真】 雄性不稔（無花粉：左）と可稔（右）のスギ雄花の断面（上段）および遺伝子判別の一例（下段左：フラグメント解析、下段右：ING マーカー分析）

【裏表紙】 遺伝解析実験室のイメージ

【画像提供】 丸山毅・上野真義・森口喜成・鶴田燃海



はじめに

毎年春先になると花粉飛散予報がニュースになります。国民の 25%以上がスギ花粉症であるとの報告もあります。スギは湿潤な日本列島に適応した我が国の固有種で、花粉を風に乗せて雌花に運んで受精を行う風媒花です。林業生産や育種においては、花粉を大量に生産し良質な子孫を多く残す個体が重要です。しかしスギ花粉症による経済損失が数千億と試算され、社会問題になっています。そのため林業分野からの花粉発生源対策として、花粉飛散量の少ないスギを活用することが求められています。とくに花粉を全く飛散しないスギは無花粉スギとも呼ばれ、無花粉スギを活用することによって春先の空中花粉量が激減すると期待されます。

無花粉スギでは、雄花において花粉ができる過程に異常（雄性不稔）があるため、成熟した花粉ができず、結果として花粉が飛散しません。雄性不稔は自然界に存在する多様性の一つで、スギにおいては雄花の調査中に偶然見つかりました。花粉を飛散しないというわかりやすい性質と先人の弛まない探索により自然界から 20 系統以上の無花粉スギが見つかり、無花粉スギの育種や生産の基盤（育種素材）になっています。

雄性不稔のメカニズムは、人工交配実験によってある一つの遺伝子が原因であることが予想されていましたが、その実態（具体的な遺伝子やその DNA 塩基配列）は不明でした。近年、DNA 塩基配列解読技術が飛躍的に進歩した結果、雄性不稔の原因遺伝子（*MSI*）と、それを引き起こす異常な DNA 塩基配列（変異したタイプ）がようやく明らかになりました。その変異したタイプを DNA 鑑定の方法で同定することで、個々のスギが無花粉スギであるか、無花粉スギの育種に活用できる個体なのかを、雄花の調査をすることなく迅速に判定することが可能になりました。この方法は人工交配家系だけでなく天然林に由来する個体に対しても適応可能であるため、新たな育種素材の探索にも威力を発揮します。

このマニュアルは、DNA 鑑定の方法をスギの雄性不稔遺伝子（*MSI*）に応用し、無花粉スギの育種効率の向上に寄与することを目的として作成しました。一般に木本植物からの DNA 抽出は煩雑な手順が必要な場合が多くありますが、本稿では *MSI* の DNA 鑑定に的を絞り、簡易な抽出方法を記載しました。また、現在では DNA 鑑定の方法が多様化していますが、ゴールドスタンダードである PCR 法とキャピラリー電気泳動法を中心に、アガロースゲル電気泳動法、LAMP 法やクロマトグラフ法にもとづく判定方法についても記載しました。雄性不稔遺伝子（*MSI*）を活用した無花粉スギの DNA 鑑定による最新情報を取りまとめた本マニュアルが、無花粉スギの品種開発と普及に貢献することを願っています。

執筆者を代表して 上野真義



目次

はじめに	iii
1. スギの雄性不稔遺伝子 <i>MS1</i> (<i>MALE STERILITY 1</i>)	1
2. InstaGene による DNA の簡易抽出法.....	2
2. 1. はじめに	2
2. 2. 準備するもの	3
2. 3. 抽出の手順.....	3
コラム 1 改変 <i>CTAB</i> 法によるスギ針葉からの DNA 抽出	4
2. 4. その他注意事項等.....	5
3. DNA シーケンサーを使用した <i>MS1</i> 遺伝子型の判定	5
3. 1. はじめに	5
3. 2. PCR とフラグメント解析による <i>MS1</i> 遺伝子型の判定.....	6
3. 3. 応用例：バルク DNA を用いた <i>MS1</i> のマーカー利用選抜	7
コラム 2 バルク DNA.....	8
4. <i>MS1</i> 遺伝子型判定の簡易化	10
4. 1. はじめに	10
4. 2. 準備するもの	10
4. 3. PCR とアガロースゲル電気泳動による <i>MS1</i> 遺伝子型の判定手順	11
4. 4. その他注意事項等.....	11
コラム 3 <i>STH-PAS</i> による <i>MS1</i> 遺伝子型の判定方法.....	12
コラム 4 <i>LAMP</i> による <i>MS1</i> 遺伝子型の判定方法.....	13
おわりに	14
謝辞.....	14
引用文献	14
関連特許	15

執筆者一覧

- 上野真義 (森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 チーム長)
鶴田燃海 (森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 主任研究員)
森口喜成 (新潟大学大学院自然科学研究科 准教授)
長谷川陽一 (森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 主任研究員)

1. スギの雄性不稔遺伝子 *MS1*(*MALE STERILITY 1*)

今から 30 年前の 1992 年 3 月、スギの開花調査で花粉を飛散しないスギ個体が富山県で初めて見つかりました (平ら 1993)。雄花の花粉を観察すると正常な花粉が見られないことから、雄性不稔という性質を示すスギであることが判明しました。この個体 (「富山不稔 1 号」) から得られた自然交配実生の一部も雄性不稔を示したことから、遺伝的な要因で雄性不稔になると予想され (平 1994)、人工交配実験から核にコードされる遺伝子の変異であると考えられました (Taira et al. 1999)。当時はその遺伝子の実態は不明でしたが、花粉形成に関与する遺伝子で雄性不稔を引き起こすことから、概念的に雄性不稔遺伝子と呼ばれました (斎藤ら 2005)。雄性不稔スギ¹は富山県以外の新潟県や日本海側の地域を中心に発見され、「富山不稔 1 号」を母樹として交配試験を行うことで同じ雄性不稔遺伝子の変異を持っているかどうかを検定されました。その結果、「富山不稔 1 号」が保有する雄性不稔遺伝子とは異なる雄性不稔遺伝子も見つかってきました (吉井・平 2007)。これらの雄性不稔遺伝子は見つかった順に *MS1*、*MS2*、*MS3* のように命名されていますが、最初に見つかった *MS1* の変異型アレル (*ms1*) を保有するスギ個体を対象にした研究が盛んに行われてきました。

遺伝マーカーとのゲノム上の位置関係を表す詳細な連鎖地図も、*MS1* 近傍を対象に作成されました (Hasegawa et al. 2018; Moriguchi et al. 2012; Ueno et al. 2019)。これと並行して、花粉形成に関与する遺伝子を直接探索する試みも行われていました。これは塩基配列を読み取る装置 (DNA シーケンサー) の性能が向上したことで可能になった方法で、雄花で発現する遺伝子の配列を網羅的に収集し、塩基配列情報の解析が行われました (Futamura et al. 2008; Ueno et al. 2012)。Wei ら (2021) は同様の方法で、スギの雄花で発現する約 5 万個の遺伝子に着目し、正常な花粉を生産する野生型のスギと雄性不稔スギとの間で発現量や塩基配列を一度に比較しました。その結果、脂質輸送に関連する機能を持つと考えられる *CJt020762* という識別番号の遺伝子では、雄性不稔スギにおいて必ず 4 塩基の欠失が見られることが分かりました (図 1-1)。この遺伝子は、雄花において発現量が多いものの、雄性不稔スギの雄花では発現量が低下していることが示唆されました。さらに *CJt020762* は連鎖地図上において *MS1* と同じ場所に位置する遺伝子であることも明らかになりました (Hasegawa et al. 2021)。この遺伝子の塩基配列を国内のスギの天然林由来の個体、*ms1* を保有する育種素材や交配家系で比べたところ、同様の 4 塩基の欠失が見つかるとともに、この遺伝子の別の箇所に 30 塩基の欠失がある場合もやはり雄性不稔の原因となることが分かりました (図 1-1)。

雄性不稔スギの発見から 30 年、これらのことから雄性不稔遺伝子 *MS1* の実体が *CJt020762* であることがほぼ明らかになりました。現在、ゲノム編集技術を活用して *CJt020762* の機能が欠損したスギを育成中です。このゲノム編集スギが雄性不稔を示すことがわかれば、*MS1* の実体が *CJt020762* であることが完全に証明されたこととなります。

¹ 雄性不稔スギという用語に代えて無花粉スギという言葉が一般的なわかりやすさから使用されることがありますが、無花粉スギといった場合、単に雄性不稔の性質を持ったスギを指す場合と、雄性不稔という性質を持ちなおかつ林業用種苗として適しているスギ (品種) を指す場合とがあります。

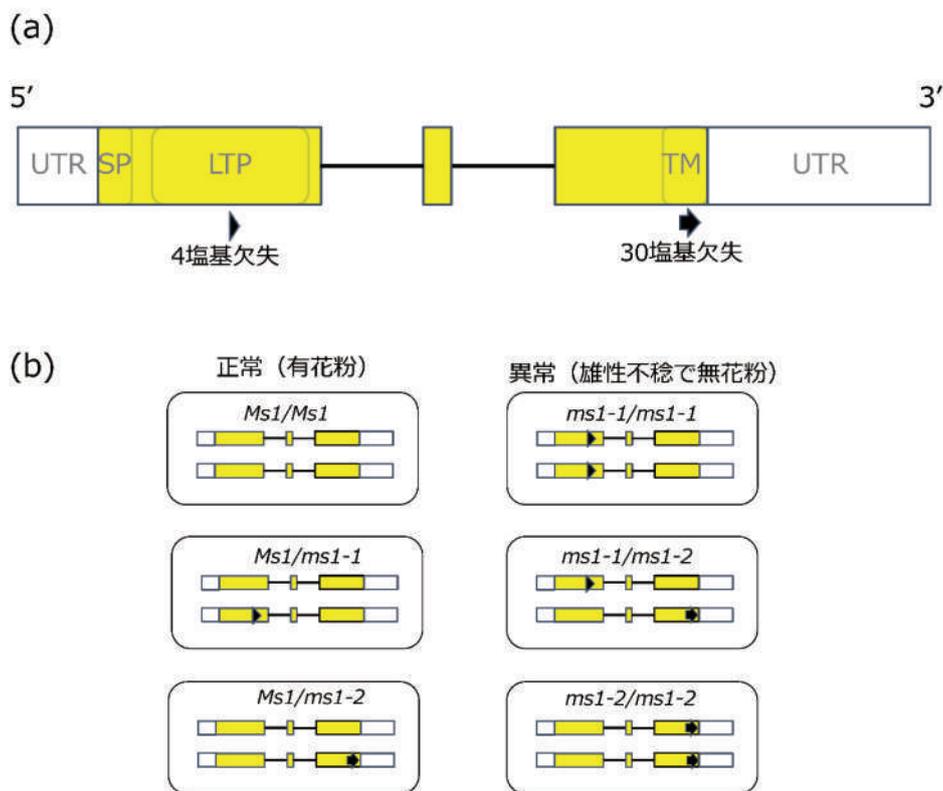


図 1-1 雄性不稔遺伝子 *MS1*(*CJt020762*) の構造(a)と雄性不稔の関係(b)

雄花で機能する遺伝子を網羅的に調べた結果、*CJt020762* という識別番号を持つ遺伝子の配列に異常 (塩基配列の欠失) があると雄性不稔になると推定されました。図では長方形の部分エクソンと呼ばれ、成熟した mRNA を構成します。その前後から UTR と呼ばれる部分を除いた黄色の部分がタンパク質に翻訳される配列です。タンパク質の機能に重要な領域として 3 箇所 (SP、LTP および TM) が推定されています。雄性不稔を引き起こす変異したタイプ (アレル: allele) として LTP に 4 塩基の欠失があるアレル (*ms1-1*) と TM に 30 塩基の欠失があるアレル (*ms1-2*) が知られています。正常なアレル (*Ms1*) が少なくとも 1 つあれば有花粉となります (*ms1-2/ms1-2* となる個体も無花粉スギになると推定されますが、現時点では見つかっていません)。なお本マニュアルでは用語「アレル」を使用しますが、これは「対立遺伝子」とも呼ばれています。遺伝子記号 (*MS1*, *Ms1*, *ms1*, *ms1-1*, *ms1-2* などの表記規則) については森林遺伝育種学会誌の解説 (林木遺伝子記号標記法委員会 2016) を参照してください。

2. InstaGene による DNA の簡易抽出法

2.1. はじめに

植物からの DNA 抽出には、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 溶液を使った手法が広く用いられてきました。私たちの研究グループでは、これを改良した抽出方法 (改変 CTAB 法) によりスギの成葉から DNA 抽出を行っており、十分な収量かつ質の高い精製 DNA が得られています (コラム 1)。しかしこの手法では液体窒素を用いた試料の破碎が必要で、手順

も煩雑であること、有毒なクロロホルム等の薬品を使用するためドラフトが設置された実験室で実施する必要があるなど、遺伝実験の設備が整っていない機関では実施の敷居が高くなっていました。近年、カラムを用いて容易に DNA が抽出可能なキットなど、様々な市販のキットが利用できるようになりました。本マニュアルでは、InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD 社) を用いたさらに簡易で迅速な DNA 抽出手法を紹介します。

この簡易手法は、試料をキレート樹脂 (Chelex[®]) の入った溶液に浸けて加熱することで、組織から DNA を溶出させると同時に樹脂で溶液に含まれる粗雑物を吸着させ、PCR 用の DNA 溶液を得ます。動物の血液や培養細胞、細菌からの DNA 抽出に用いられてきましたが、近年、植物にも適用可能であることが示されました (HwangBo et al. 2010)。ここでは HwangBo らの手法を基に、スギの成葉から DNA を抽出する手順を説明します。同様の手法を用いることで、著者らはスギのカルス (Tsuruta et al. 2021) や花粉、内樹皮からの DNA 抽出・PCR 増幅に成功しています。ただし、脂肪やデンプンを多く貯蔵する不定胚や種子では、抽出は少し困難になります。

2. 2. 準備するもの

<試料>

- ・スギ成葉 (図 2-1)

<試薬>

- ・InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD 社)

<実験機器> *2

- ・マグネットスターラー・ボルテックスミキサー・遠心機
- ・98℃まで加熱できる恒温機または湯せん用の鍋とコンロ



図 2-1 針葉の使用量の目安

2. 3. 抽出の手順

- ① 200 μ L の InstaGene Matrix を 1.5 mL マイクロチューブに移します*3 (図 2-2)。

↓

- ② 針葉の先端 5 mm ほどをハサミ等で切って*4、チューブに入れます。重さの目安は 5~10 mg ほどで、試料をなるべく少量に抑えることが成功のコツです。



図 2-2 溶液の吸い取りと移した樹脂の様子

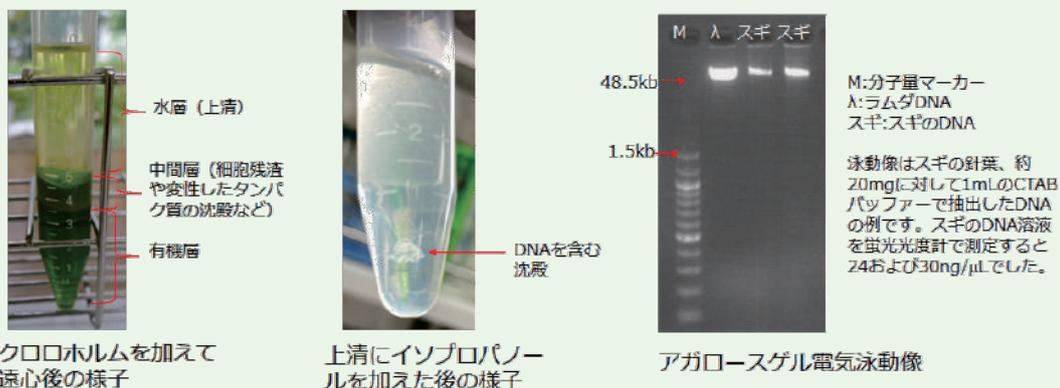
² 私たちのラボでは恒温機にアルミブロックのドライバスを使用しています。遠心機は卓上遠心機でも可能です。またボルテックスミキサーとマグネットスターラーも必須ではありません。

³ InstaGene Matrix を吸う際は口の大きなチップ (1000 μ L 用、いわゆるブルーチップ) のついたマイクロピペッターを用い、Chelex 樹脂が沈殿しないようマグネットスターラー等で攪拌しながら行います。スターラーバーは、InstaGene Matrix のボトル内に入っています。

⁴ 切断面から DNA が抽出されるため、成葉なら図 2-1 のように 2 回ほど切ります。試料をつぶすと粗雑物も多く抽出されてしまうためか、上手いかないことが多いようです。

コラム1 改変 CTAB 法によるスギ針葉からの DNA 抽出

InstaGene による DNA 抽出は簡便ではあるものの、抽出された DNA を長期間安定して冷蔵保存することはできません。ヌクレアーゼのような DNA を分解する酵素を完全に除去できていない（精製されていない）ために、DNA が徐々に分解されてしまうためではないかと考えられます。InstaGene 以外に様々な DNA 抽出キットが市販されているので、それらを使用することも可能ですが、多糖やポリフェノールのような DNA 抽出を阻害する物質を多く含む組織（例えばスギの針葉）から DNA 抽出を行う場合は、キットを使用する前にこれら阻害物質を洗い流すような前処理が必要となります。一方で CTAB 溶液を用いる方法は、CTAB や CTAB 溶液に加えた 2-メルカプトエタノールが様々な酵素の活性を失活させ、さらに CTAB が高塩濃度（1.4 M の塩化ナトリウム存在）下で効率よく多糖類を沈殿させることができる特性があるために（Murray and Thompson 1980）、比較的簡単な操作で、安定した品質の DNA を抽出することができます。この CTAB 溶液を粉碎したサンプルに加えると、細胞に含まれている物質が溶出します。そこにクロロホルム^{#1}を加えて遠心し、上清を回収することで、変性した蛋白質や脂質などの脂溶性物質や多糖類から DNA を含む溶液を分離することができます。次に回収した溶液にアルコール（イソプロパノール）を加えると、DNA を含む物質が白色の沈殿として回収できます（上野ら 2016）。沈殿は 70%エタノールで洗浄した後、軽く乾燥してエタノールを完全に気化させます。最後に沈殿を TE バッファーに溶解させると、PCR などで使用可能な DNA 溶液となります。



^{#1} 通常、クロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の割合で混合したものを使用します。クロロホルム単独で使用すると泡が発生し、DNA を含む上清を回収することが難しくなります。イソアミルアルコールをクロロホルムに加えることで、泡の発生を防ぐことができます。

- ↓
- ③ ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌します。
- ↓
- ④ 98°C で 4~8 分間加熱または煮沸します*⁵。
- ↓
- ⑤ 再びボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌を行います。

⁵ 内容物が膨張してチューブの蓋が開いてしまうことがあります。試料の紛失、火傷に注意してください。

- ↓
- ⑥ 最後に室温で1分間遠心分離 (13,000 rpm) します (図 2-3)。



図 2-3 攪拌(10 秒)、98°Cの加熱(8 分)、再度攪拌(10 秒)、遠心分離(1 分)による DNA 抽出

- ↓
- ⑦ 上澄み 1 μ L を PCR に使用します。
- ↓
- ⑧ 残りは試料と樹脂が入ったまま、すぐに冷凍保存してください。再度 PCR に使う際は、解凍後に 10 秒の攪拌と 1 分の遠心分離を行い、上澄みを得ます。

2. 4. その他注意事項等

抽出された DNA はごく微量かつ精製されていないため、分光光度計などによる定量や電気泳動による確認はできません。抽出の可否は PCR の成否から判断します。成葉や内樹皮を抽出素材とする場合、抽出液の色が判断材料になります (なるべく色づかないように)。十分な増幅産物が得られないときは、抽出液を 2~10 倍に希釈し PCR をしてみる、抽出の時間を 4~12 分の間で調整する等が必要です。いずれにせよ、PCR 目的の DNA 抽出と割り切り、増幅の阻害となる粗雑物等の混入を抑えるよう、試料をなるべく少量使うことを心掛けてください。

3. DNA シーケンサーを使用した *MS1* 遺伝子型の判定

3. 1. はじめに

この章では、キャピラリー-DNA シーケンサーを使用した *MS1* 遺伝子型の判定法について紹介します。この方法は 4 塩基欠失と 30 塩基欠失の各領域を挟み込む合計 4 つのプライマー (表 3-1、Hasegawa et al. 2020) を使用したマルチプレックス PCR を行い、その PCR 産物の断片長をシーケンサーで解析する方法 (フラグメント解析) です。一度の PCR で *msl-1* と *msl-2* を同時に解析できる点と明確なピークで判別できる点、アガロース電気泳動にかかる労力が要らない点が長所です。しかし、解析に高額なシーケンサーを必要とするため、シーケンサーを保有していない機関ではフラグメント解析は外注しなければなりません。また使用する DNA は、改変 CTAB 法 (コラム 1) で抽出した DNA が推奨されます。

原理は大変シンプルで、欠失領域を挟み込むように設計されたプライマー (図 3-1) で PCR

を行い、増幅断片長を解析します。正常型のアレルに比べて変異したアレル（不稔型）では、塩基が欠失している長さだけ増幅断片長が短くなります。表 3-1 のプライマーを用いることで、*ms1-1* では 165 塩基対、*ms1-2* では 255 塩基対の長さの断片が増幅されます。4 塩基欠失と 30 塩基欠失のプライマーで蛍光の色を変えることで、より明瞭にシーケンサーで解析することができます。ここでは、Forward 側プライマーの 5'末端をそれぞれ FAM と HEX で蛍光標識しています*6（表 3-1）。

表 3-1 フラグメント解析に用いる 4 つのプライマー

ターゲット領域	プライマー名	プライマー配列 (5' → 3')	雄性不稔アレルの断片長
4 塩基欠失	CJt020762_ms1-1_F	[HEX]-GCTATAGACTGCACCCGACCC	165 塩基対
	CJt020762_ms1-1_R	AGCCCAGAAAATCGTCCCTG	
30 塩基欠失	CJt020762_ms1-2_F	[FAM]-GAATCCACCGCCACGACTAT	255 塩基対
	CJt020762_ms1-2_R	TGAACTCTGTTCCATGGCA	

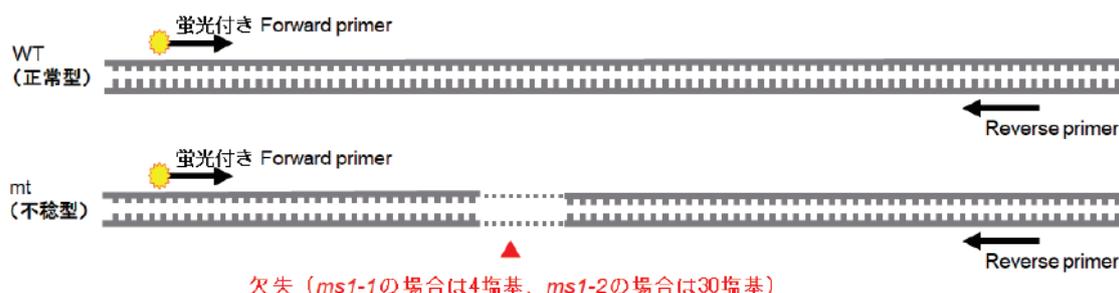


図 3-1 キャピラリー・DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析の概念図

3. 2. PCR とフラグメント解析による MSI 遺伝子型の判定

3. 2. 1. 準備するもの

本マニュアルでは、Kapa Biosystems 社の KAPA2G Fast PCR キット、Thermo Fisher Scientific 社の GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard を用いた手法を記載します。

<試薬>

- ・ KAPA2G Fast PCR キット ・ プライマー（表 3-1） ・ 滅菌水
- ・ GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard ・ Hi-Di™ Formamide（Thermo Fisher Scientific 社）

<実験機器>

- ・ サーマルサイクラー ・ キャピラリー DNA シーケンサー

3. 2. 2. PCR 増幅とフラグメント解析の手順

① 表 3-2 を参考に、PCR 反応液を 0.2 mL PCR チューブに調整します。PCR の試薬類はすべて

*6 ここでは安価に合成できる FAM と HEX で蛍光ラベルを行っています。他の蛍光色素でラベルすることもできます。

アイスバスを準備するなどして氷上で取り扱ってください。

↓

↓ **表 3-2 PCR 反応液の組成**

↓ KAPA2G Fast DNA Polymerase (5 U / μ L)	0.1 μ L	} 9 μ L 分注
↓ 5 \times KAPA2G Buffer A (1.5 mM MgCl ₂ を含む) ※キットに付属	2.0 μ L	
↓ 25 mM MgCl ₂ ※キットに付属	0.2 μ L	
↓ dNTP Mix (10 mM each) ※キットに付属	0.2 μ L	
↓ 5 μ M CJt020762_ms1-1_F	0.4 μ L	
↓ 5 μ M CJt020762_ms1-1_R	0.4 μ L	
↓ 5 μ M CJt020762_ms1-2_F	0.2 μ L	
↓ 5 μ M CJt020762_ms1-2_R	0.2 μ L	
↓ 滅菌水	5.3 μ L	
↓ DNA (5 ng / μ L)	1.0 μ L	
↓ Total	10 μ L	

↓

- ① 表 3-3 の条件で PCR を行います。

表 3-3 PCR 反応条件

サイクル数	温度	時間
1	95 °C	3 分
35	94 °C	15 秒
	60 °C	15 秒
	72 °C	1 秒
1	72 °C	1 分
	4 °C	∞

- ↓
- ② 8 μ L の Hi-Di Formamide と 0.2 μ L の GeneScan 600 LIZ dye Size Standard の混合液を作り (サンプル数+ α)、その溶液 8 μ L に PCR 産物 1 μ L を加えます。

- ↓
- ③ 95°C で 2 分間インキュベートし、直ちに氷上に移して 5 分以上静置します。

- ↓
- ④ キャピラリーDNA シーケンサーで解析します。

- ↓
- ⑤ Peak Scanner™ などのソフトウェアを使用して、*MSI* 遺伝子型を判定します (図 3-2)。

3. 3. 応用例: バルク DNA を用いた *MSI* のマーカー利用選抜

スギ雄性不稔アレル (*ms1*) の自然界における頻度は低いことから、DNA シーケンサーを使用した *MSI* 遺伝子型の判定法を、バルク DNA サンプル (コラム 2) を用いて行うことで、効率的に *ms1* アレルを探索することができます。DNA をバルクにする方法は 2 通りあります。先に採取した葉を等量ずつ混ぜて一度に DNA を抽出する方法と、それぞれのサンプルの DNA を個別に抽出してからそれらを等量ずつ混ぜる方法です。ここでは、より低コストになる前者の方法を紹介します (Watanabe et al. 2022)。

全体の流れを図 3-3 に示しました。まず、図 3-4 のような葉を各個体から採取し、数個体分を混ぜたサンプルから改変 CTAB 法 (コラム 1) でバルク DNA を抽出します (10 個体のバルクまでは解析可能)。PCR 増幅とフラグメント解析は、1 個体から抽出した DNA を用いた解析

と同じ手順で行い、図3-5のように目的のアレルのピークが検出された場合は、そのバルク DNA を構成する個体を個別に解析し、雄性不稔アレル (*ms1*) を持つ個体を特定します。

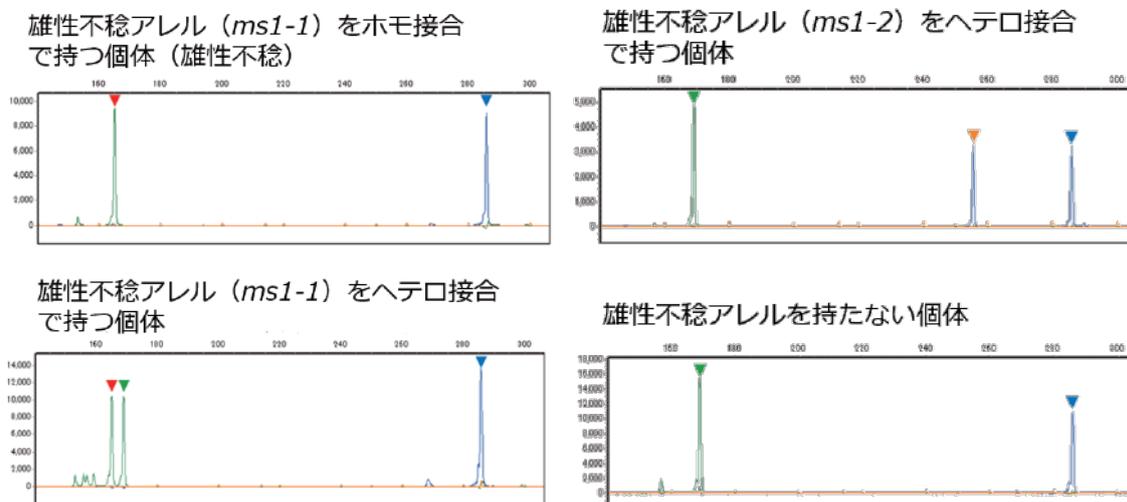


図 3-2 キャピラリーDNA シーケンサーを用いたフラグメント解析の結果

横軸は断片長、縦軸は蛍光シグナルの強度（増幅量）を表します。緑の波形は 4 塩基の欠失を検出するマーカーによる蛍光で、緑三角のピークは欠失がないアレル、赤三角のピークは 4 塩基欠失のアレル (*ms1-1*) を示しています。青の波形は 30 塩基の欠失を検出するマーカーの蛍光によるもので、青三角のピークは欠失なしのアレル、橙三角のピークは 30 塩基欠失のアレル (*ms1-2*) を示します。ピークは PCR の際の酵素の働きによって二山になることもあります (図 3-5 参照)。

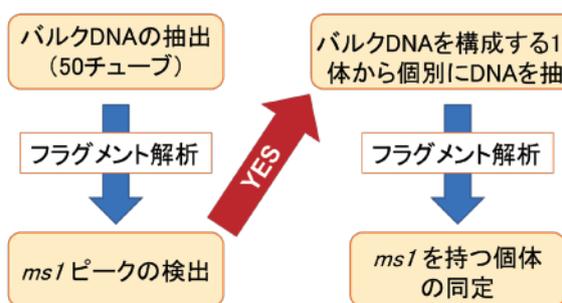


図 3-3 バルク DNA を用いた雄性不稔遺伝子を持つ個体の判定の流れ
500 個体について 10 個体のバルク DNA (50 チューブ) で解析を行う場合

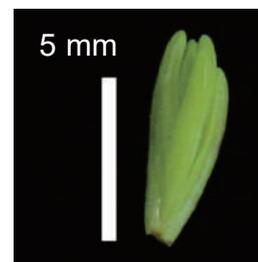


図 3-4 DNA 抽出に用いる 1 個体あたりの葉

コラム2 バルク DNA

複数のサンプルを混合して一つのサンプルとしたサンプルをバルク (bulk) もしくはプール (pool) と呼びます。今回のサンプルは DNA であるのでバルク DNA (bulk DNA) や DNA バルク (DNA bulk) などと呼ばれます。多数のサンプルを効率よく分析するには、混合するサンプル数をできるだけ増やせば良いのですが、何個体をまとめてバルクにするのが適切なのかは、いくつかの要因を検討して決めることになります。具体的には、DNA 抽出のし易さ、分析の際のシグナル・ノイズ比 (S/N 比)、さらにターゲットとするアレルの頻度です。今回の実験では 2 mL チューブで 10 個体からバルク DNA を抽出しましたが、10 個体より多くの個体を混合すると高

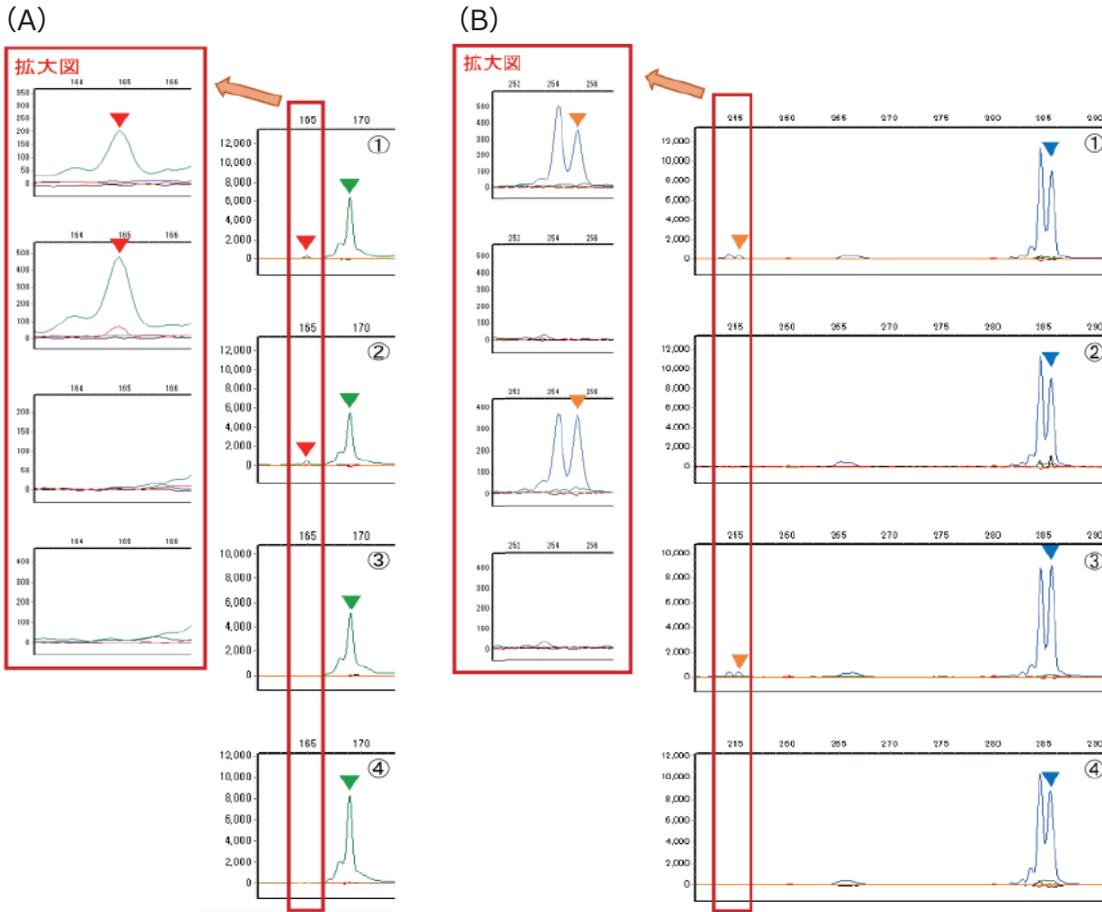


図 3-5 10 個体のバルク DNA での解析結果: 4 塩基の欠失を検出するマーカー(A)および 30 塩基の欠失を検出するマーカー(B)

図の見方は図 3-2 と同じです。4 つのバルク DNA (①~④) は下記の構成となっています。

- ① *msl-1* をヘテロ接合型で持つ個体 (1 個体)、*msl-2* をヘテロ接合型で持つ個体 (1 個体)、野生型個体 (雄性不稔アレルを持たない個体) (8 個体)
- ② *msl-1* をヘテロ接合型で持つ個体 (1 個体)、野生型個体 (9 個体)
- ③ *msl-2* をヘテロ接合型で持つ個体 (1 個体)、野生型個体 (9 個体)
- ④ 野生型個体 (10 個体)

(コラム 2 続き)

品質な DNA が得られなくなることが分かりました。10 サンプルのバルク (変異型アレルと野生型アレルの比が 1 : 19 となるサンプル) で算出した変異型アレルのピークの S/N 比は、*msl-1* および *msl-2* でそれぞれ 4.6 および 13.3 と計算されました。一般に S/N 比は 3 を下回ると検出限界とされることから、10 サンプルのバルクは十分な精度で変異型アレルを検出できていると考えられました。最後にアレル頻度についてですが、図 3-3 ように 500 個体を 10 個体のバルク DNA (50 チューブ) にして解析する場合、変異型アレルの頻度 (任意交配集団とした場合の頻度) が 0.06 より高くなると、500 回以上の DNA 抽出が必要になるため、個別に DNA 抽出を行った方がむしろ効率は良くなるようです (Watanabe et al. 2022)。

4. MSI 遺伝子型判定の簡易化

4.1. はじめに

本章では、DNA シーケンサーを使わずに MSI 遺伝子型を決定する簡易手法を紹介します。*msl-1* の判定には、1 度の PCR と電気泳動で遺伝子型を決定できる one step indel genotyping (ING) マーカー (Tsuruta et al. 2021) を、*msl-2* には前章でも用いられた増幅断片の長さで判別する allele length polymorphism (ALP) マーカー (Hasegawa et al. 2020) を用います。

ING マーカーは、4 塩基欠失の変異サイトにおける *Msl* と *msl-1* にそれぞれ特異的な 2 つのプライマーと、外側に設計された共通の Forward と Reverse プライマーからなります (図 4-1 A)。これにより、それぞれのアレル特異的な増幅産物および、共通プライマーによる増幅産物が得られます。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分画することで、遺伝子型が決定できます (図 4-1 B)。このとき共通プライマーによる増幅産物は、PCR 反応が成功したかを判断するコントロールバンドとなります。*msl-2* の原因となる 30 塩基の欠失は、ALP マーカーで変異サイトを含む領域を PCR 増幅してアガロースゲルで電気泳動をすれば、増幅産物の長さの違いから *Msl* と *msl-2* の判別が可能です (図 4-1 C)。

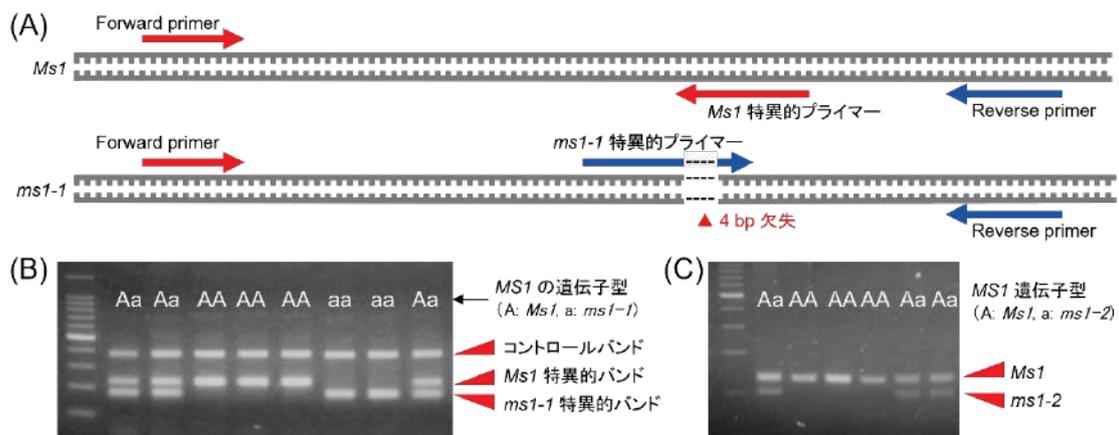


図 4-1 ING マーカーの概念図(A)、電気泳動像による *msl-1*(B)および *msl-2*(C)の遺伝子型判定

4.2. 準備するもの

<試薬>

- ・ QIAGEN® Multiplex PCR Kit (QIAGEN)
- ・ オリゴ DNA プライマー (表 4-1) *⁷
- ・ 滅菌水
- ・ TAE buffer
- ・ アガロース
- ・ Midori Green Xtra (日本ジェネティクス) など染色液
- ・ 6× loading dye
- ・ サイズマーカー (100 bp ladder)

<実験機器>

- ・ サーマルサイクラー
- ・ 電気泳動装置
- ・ ゲル撮影装置

⁷ あらかじめ、各プライマーの濃度が 2 μM となるよう、ING マーカーについては 4 種類、ALP マーカーでは 2 種類のプライマーを混合した Primer mix を調整し、冷凍保存しておきます。

表 4-1 ING および ALP プライマーの配列

マーカー	プライマー名	プライマー配列 (5' → 3')	引用文献
ING	WT+leftPrimer_2_F	GACGTCTTCTGCAACAACAATGG	Tsuruta et al. 2021
	WT+leftPrimer_2_R	ACCCTGCGTGGGTGTTGATG	
	Mt+rightPrimer_2_F	CTCACTGGCCACAGTCACAC	
	Mt+rightPrimer_2_R	TGCAGGCAACTTATAATTAAGCAC	
ALP	CJt020762_F107.F	ACCTCCGGTGTATCAAACCTTCAA	Hasegawa et al. 2020
	CJt020762_F107.R	ATTGCGCCCTTTCCAAATGTTAGC	

4. 3. PCR とアガロースゲル電気泳動による MSI 遺伝子型の判定手順

ING、ALP それぞれのマーカーについて、以下の手順で反応を行います。

- ① 表 4-2 を参考に、それぞれのマーカーごとに PCR 反応液を調整します*⁹。
↓
- ② 表 4-3 の条件で PCR を行います*¹⁰。
(2 時間ほどかかります)
↓
- ③ PCR 終了後、チューブに 6× loading dye を 2 μL 加え、サイズマーカーとともに 1.5%アガロースゲルで電気泳動します。
↓
- ④ ゲル撮影装置で泳動像を撮影し、MSI 遺伝子型を判断します。

表 4-2 PCR の反応液組成

2× QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5 μL
Primer mix (2 μM of each primer)	1 μL
滅菌水	3 μL
DNA テンプレート (1~10ng 以下) * ⁸	1 μL
Total	10 μL

表 4-3 PCR の反応条件

サイクル数	ING マーカー		ALP マーカー	
	温度	時間	温度	時間
1	94 °C	15 分	94 °C	15 分
	94 °C	15 秒	94 °C	15 秒
35~38	60 °C	30 秒	60 °C	45 秒
	72 °C	45 秒	72 °C	15 秒
1	72 °C	5 分	72 °C	-
	4 °C	∞	4 °C	∞

4. 4. その他注意事項等

Msi1 と *msi1-1* のヘテロ接合体の場合、ING マーカーのコントロールバンドは長さが 4 塩基異なる 2 本のバンドから構成されますが、アガロースゲルの電気泳動では分画できず、実際には重なって 1 本のバンドに見えます。このコントロールバンドの有無により容易に PCR 反応の成否が判断できるため、ING マーカーは 2 章の InstaGene 抽出のように濃度が薄くクールドな DNA テンプレートに対しても安心して適用することができます。

⁸ InstaGene 抽出液なら、上澄み 1 μL をそのまま DNA テンプレートにします。

⁹ PCR の試薬類はすべて、アイスバスを準備するなどして氷上で取り扱ってください。

¹⁰ 増幅産物が少ないようなら、サイクル中の 60°C の時間を 90 秒、72°C の伸長反応時間を 60 秒まで伸ばすなど調整をしてください。一方、改変 CTAB 法で精製された DNA や抽出が容易なカルスや花粉から InstaGene で抽出された DNA がテンプレートなら、サイクル中の伸長反応の時間を 15 秒にする、サイクル数を減らすなどして、さらに時間短縮が可能です。

コラム3 STH-PASによるMSI 遺伝子型の判定方法

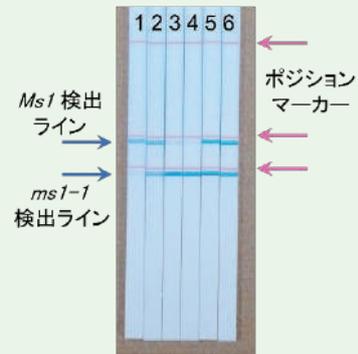
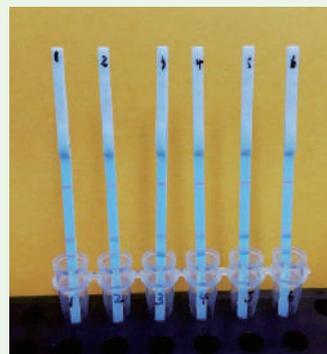
アガロースゲルによる電気泳動は簡易ですが、ゲルの作成、泳動、場合によっては後染め染色、泳動像の撮影と、いくつもの手順が必要になります。またそれ以上に、DNA の染色に用いる変異原性のあるエチジウムブロマイドの扱いには、大変気を遣わなければなりません（もちろん代替のより安全な染色試薬もあります）。これら染色が不要で、目視で PCR 結果が判定できる泳動システム、single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip (STH-PAS、TBA 社) を利用した MSI 遺伝子型の簡易判定法を紹介します (Tsuruta et al. 2022)。STH-PAS は、ゲルの代わりにメンブレンストリップに PCR 産物を展開させ、メンブレン上に固相化された相補タグ DNA と PCR 産物とが結合することでライン状に呈色します。詳しい原理は、TBA 社のウェブサイト (<https://www.t-bioarray.com/contents/technology.html>) 等を参照ください。

第4章のINGのプライマーに、タグ配列（アレル特異的プライマー^{#2}にそれぞれ異なるタグ）またはビオチン（共通のプライマー^{#3}）を付加したプライマーを用い、同様にPCRを行います。PCR増幅産物と、ラテックス着色液を加えた展開液を混ぜ合わせます。この溶液に、プライマーに付加したタグに対応する相補タグが固相化されたC-PASを立てます。PCR増幅産物がC-PAS上に展開されると、目的のPCR増幅産物がPAS上の相補タグにトラップされ、15分ほどでバンド状に呈色します。結果は目視で確認でき、紫外線やLEDをあててゲル撮影する必要もないので、アガロースゲル電気泳動よりも迅速に結果を判断することができます。

- 1: 大井7 (MS1/ms1-2)
- 2: 珠洲2 (MS1/ms1-1)
- 3: SSD-018 (ms1-1/ms1-1)
- 4: SSD-100 (ms1-1/ms1-1)
- 5: FO7-141 (ms1-1/ms1-2)
- 6: FO7-144 (ms1-1/ms1-2)



STH-PAS のキットに含まれる試薬類

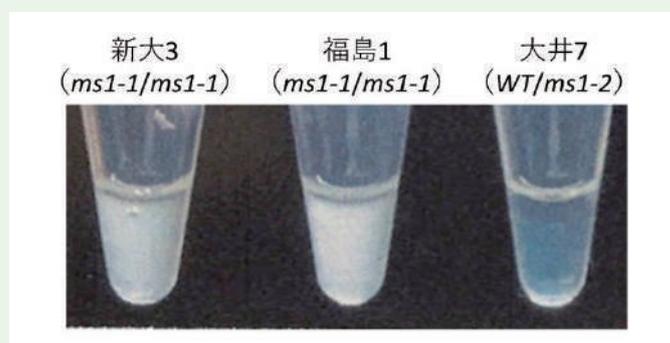


^{#2} WT+leftPrimer_2_R および Mt+rightPrimer_2_F

^{#3} WT+leftPrimer_2_F および Mt+rightPrimer_2_R

コラム4 LAMPによるMSI 遺伝子型の判定方法

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) は、日本の栄研化学株式会社が特許を持つ DNA 増幅方法で、試薬を 65°C 付近の一定温度で保温することで DNA が増幅できます。温度の正確な上げ下げを何度も繰り返す PCR と違い、簡素な保温器具で DNA 増幅を行うことができます^{#4}。詳しい原理は、栄研化学のウェブサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>) 等を参照ください。この LAMP を用いて、MSI 遺伝子の遺伝子型を判定する手法が開発されています (Hasegawa et al. 2020)。*msl-1* のアレルに合わせて作成された 4 種類のプライマーと、調べたいスギの DNA、および LAMP 反応用試薬を混ぜた 25 μ L の溶液を PCR 反応用のチューブに入れて、65°C 付近で 1 時間ほど保温します。DNA が増幅されると溶液が白濁し、この溶液の色の変化で *msl-1* アレルを持つかを判定できます。現在、より判定ミスの少ないプライマーの設計および温度条件の検証と、*msl-2* の遺伝子型の判定システムの開発も進めています。



LAMPによる *msl-1* アレルの検出 左, 中: *msl-1* のホモ接合の個体。右: *msl-1* を持たない個体。

#4 ブロックヒーター、保温が可能な調理機器や魔法瓶でも反応が進むことを確認しています。

おわりに

この判別マニュアルは現時点で最新のプロトコルを掲載していますが、改変 CTAB 法による DNA 抽出と DNA シーケンサーによる判定が最も確実な判定方法です。第 2 章や 4 章の簡易化された方法は経験を要するところもあるため、初めて実験に取り組む方には判定が難しいことがあるかもしれません。すでに遺伝子型が明らかになっている個体を使用した実験を同時に行うことで、予想通りの結果が得られていることを確認しながら進めるとよいでしょう。簡易な方法は、高額な機器が必要ないため、教育現場や生産現場で広く活用されるようになることを期待しています。マニュアルは技術の進展に合わせて今後もアップデートを行う予定ですので、詳細は問い合わせ窓口もしくは cj-genome@ffpri.affrc.go.jp にお問い合わせください。なお本マニュアルで特定のメーカーの商品名を示しているのは、それらの使用を推奨しているものではなく、実施条件を明らかにする目的のためです。

謝辞

この判別マニュアルは、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 (28013BC) の支援により行われた研究成果の一部です。雄性不稔（無花粉）スギおよび関連する研究材料は、新潟大学、新潟県森林研究所、静岡県森林・林業研究センターおよび神奈川県自然環境保全センターから提供を受けました。第 3 章の実験では新潟大学大学院自然科学研究科の渡部大寛氏に多大な協力をいただきました。関係者の皆様にお礼申し上げます。

引用文献

- Futamura, N., Totoki, Y., Toyoda, A., Igasaki, T., Nanjo, T., Seki, M., et al. (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* 9: 383.
- Hasegawa, Y., Ueno, S., Matsumoto, A., Ujino-Ihara, T., Uchiyama, K., Totsuka, S., et al. (2018) Fine mapping of the male-sterile genes (*MS1*, *MS2*, *MS3*, and *MS4*) and development of SNP markers for marker-assisted selection in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *PLoS ONE* 13: e0206695.
- Hasegawa, Y., Ueno, S., Wei, F.J., Matsumoto, A., Uchiyama, K., Ujino-Ihara, T., et al. (2021) Identification and genetic diversity analysis of a male-sterile gene (*MS1*) in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Scientific reports* 11: 1496.
- Hasegawa, Y., Ueno, S., Wei, F.J., Matsumoto, A., Ujino-Ihara, T., Uchiyama, K., et al. (2020) Development of diagnostic PCR and LAMP markers for *MALE STERILITY 1 (MS1)* in *Cryptomeria japonica* D. Don. *BMC Research Notes* 13: 457.
- HwangBo, K., Son, S.H., Lee, J.S., Min, S.R., Ko, S.M., Liu, J.R., et al. (2010) Rapid and simple method for DNA extraction from plant and algal species suitable for PCR amplification using a chelating resin Chelex 100. *Plant Biotechnology Reports* 4: 49–52.
- Moriguchi, Y., Ujino-Ihara, T., Uchiyama, K., Futamura, N., Saito, M., Ueno, S., et al. (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.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321–4325.
- 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.
- 斎藤真己・古賀由美子・古田喜彦・平英彰 (2005) 採種園産実生個体からの雄性不稔スギの選抜. 日本森林学会誌 87: 1–7.
- 平英彰 (1994) スギ雄性不稔個体から得られた自然交配苗の特徴. 日本森林学会誌 76: 598–600.
- 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.
- Tsuruta, M., Maruyama, T.E., Ueno, S., Hasegawa, Y., Moriguchi, Y. (2021) Marker-assisted selection for pollen-free somatic plants of sugi (Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*): A simple and effective methodology for selecting male-sterile mutants with *ms1-1* and *ms1-2*. Frontiers in Plant Science 12: 748110.
- Tsuruta, M., Ueno, S., Maruyama, T.E., Hakamata, T., Moriguchi, Y. (2022) Application of STH-PAS, a novel chromatographic visualization system of PCR products for rapid screening of male-sterile lines in *Cryptomeria japonica*. Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute 21: 223–227.
- Ueno, S., Moriguchi, Y., Uchiyama, K., Ujino-Ihara, T., Futamura, N., Sakurai, T., et al. (2012) A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSR markers for a conifer, *Cryptomeria japonica*. BMC Genomics 13: 136.
- 上野真義・大谷雅人・吉丸博志 (2016) 模擬実験を目的とした樹木からの DNA 抽出方法の改良と実施. 森林総合研究所研究報告 15: 161–163.
- Ueno, S., Uchiyama, K., Moriguchi, Y., Ujino-Ihara, T., Matsumoto, A., Wei, F.J., et al. (2019) Scanning RNA-Seq and RAD-Seq approach to develop SNP markers closely linked to *MALE STERILITY 1 (MSI)* in *Cryptomeria japonica* D. Don. Breeding Science 69: 19–29.
- Watanabe, M., Ueno, S., Hasegawa, Y., Moriguchi, Y. (2022) Efficient low-cost marker-assisted selection of trees with *MALE STERILITY 1 (MSI)* in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) using bulk DNA samples. Tree Genetics & Genomes 18: 29.
- Wei, F.J., Ueno, S., Ujino-Ihara, T., Saito, M., Tsumura, Y., Higuchi, Y., et al. (2021) Construction of a reference transcriptome for the analysis of male sterility in sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) focusing on *MALE STERILITY 1 (MSI)*. PLoS ONE 16: e0247180.
- 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.

関連特許

上野真義, 長谷川陽一, 魏甫錦, 松本麻子, 伊原徳子, 内山憲太郎, 森口喜成, 笠原雅弘, 藤野健, 重信秀治, 山口勝司, 尾納隆大, "LAMP プライマーセット及びプライマー対", 特許第 7488519 号, 登録日 2024 年 5 月 14 日.



スギの雄性不稔遺伝子 *MSI* 判別マニュアル

A manual to genotype male sterility gene (*MSI*) mutation in *Cryptomeria japonica* D. Don

2022年 2月 初版第1刷発行

2024年 10月 初版第3刷発行

編集：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

発行：国立研究開発法人森林研究・整備機構
森林総合研究所 広報普及科編集刊行係
〒305-8687 茨城県つくば市松の里 1

電話 029-829-8373

E-mail kanko@ffpri.affrc.go.jp

印刷：朝日印刷株式会社

※ 本誌掲載内容の無断転載を禁じます



国立研究開発法人 森林研究・整備機構
森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。