

農林水産研究推進事業委託プロジェクト研究  
脱炭素・環境対応プロジェクト  
気候変動に適応した花粉発生源対策スギの作出技術開発  
令和2年度 最終年度報告書

個別課題番号	16781353
個別課題名	気候変動に適応した花粉発生源対策スギの作出技術開発

研究実施期間	平成28年度～平成32年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター
研究開発責任者	高橋 誠
研究開発責任者 連絡先	TEL : 0294-39-7000
	FAX : 0284-39-7306
	E-mail : makotot@affrc.go.jp
共同研究機関	国立大学法人 九州大学農学研究院
	岡山県 森林研究所
	愛媛県 林業研究センター
	宮崎県 林業技術センター
普及・実用化 支援組織	

<別紙様式3>最終年度報告書

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	28	29	30	1	2	機関	研究室
1. 環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価 (1) 大規模データの統合による環境変動に対する系統の応答性の評価	← 系統の環境応答性の評価 →					林木育種センター	育種第一課、育種第二課、北海道育種場、東北育種場、関西育種場、九州育種場
(2) 環境応答を評価する新たな表現型評価手法の開発	← 表現型評価手法の開発 →					林木育種センター	育種第一課、育種第二課、九州育種場
2. 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立 (1) 環境適応性マーカー開発のためのストレス環境が表現型に与える影響評価	← 環境ストレスの影響評 →					九州大学 森林バイオ研究センター 林木育種センター	農学研究院 森林バイオ研究室 育種第一課、育種第二課
(2) ストレス応答等関連遺伝子の収集と解析に関する研究開発	← 遺伝子発現情報基盤の構築 →					九州大学 森林バイオ研究センター	農学研究院 森林バイオ研究室
(3) ストレス応答関連遺伝子の発現解析と環境適応性マーカーの開発	← 環境適応性マーカーの開 →					森林バイオ研究センター 林木育種センター 九州大学	森林バイオ研究室 育種第一課 農学研究院
3. 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発 (1) 環境変化が雄花着花性に与える影響評価	← 雄花着花性への影響評価 →					林木育種センター 九州大学 森林バイオ研究センター	育種第一課 農学研究院 森林バイオ研究室
(2) 花粉発生源対策に資するマーカーの開発	← 雄花着花性等のマーカー開 →					林木育種センター 九州大学 森林バイオ研究センター	育種第一課 農学研究院 森林バイオ研究室
4. 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出 (1) 新規植栽試験による育種素材に対する適応性の系統評価	← 適応性の実証試 →					宮崎県 岡山県 愛媛県 林木育種センター	林業技術センター 林業研究センター 森林研究所 関西育種場、九州育種場
(2) 気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術の開発	← 作出技術の開発育種素材の作出 →					林木育種センター 森林バイオ研究センター	育種第一課、九州育種場 森林バイオ研究室

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究開発責任者	森林総合研究所林木育種センター	育種部	◎ 星比呂志 (~2019.3)	10
			◎ 高橋 誠 (2019.4~)	10
1. 環境要因がスギの生育与える影響の解明と系統評価	森林総合研究所林木育種センター	育種研究室	○ 山野邊太郎 (~2019.3)	10
		基盤技術研究室	○ 松下通也 (2019.4~)	20
(1) 大規模データの統合による環境変動に対する系統の応答性の評価	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	△ 松下通也	前出
(2) 環境応答を評価する新たな表現型評価手法の開発	森林総合研究所林木育種センター	育種研究室	△ 高島有哉	10
2. 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立	九州大学	農学研究院	○ 渡辺敦史	25
(1) 環境適応性マーカー開発のためのストレス環境が表現型に与える影響評価	九州大学	農学研究院	△ 渡辺敦史	前出
(2) ストレス応答等関連遺伝子の収集と解析に関する研究開発	九州大学	農学研究院	△ 渡辺敦史	前出
(3) ストレス応答関連遺伝子の発現解析と環境適応性マーカーの開発	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	△ 能勢美峰 (~2019.7)	10
			△ 永野聡一郎 (2019.8~)	10
3. 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	○ 三嶋賢太郎	15
(1) 環境変化が雄花着花性に与える影響評価	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	△ 三嶋賢太郎	前出
(2) 花粉発生源対策に資するマーカーの開発	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	△ 三嶋賢太郎	前出
4. 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	○ 平岡裕一郎 (~2019.3)	20
			○ 松下通也 (2019.4~)	前出
(1) 新規植栽試験による育種素材に対する適応性の系統評価	宮崎県林業技術センター	育林環境部	△ 上杉基	10
(2) 気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術の開発	森林総合研究所林木育種センター	基盤技術研究室	△ 松下通也	前出

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

### 1-3 研究開発の目的

I P C C（気候変動に関する政府間パネル）第5次評価報告書（平成26年11月公表）においては、気候システムの温暖化は疑う余地はなく、最も厳しい温室効果ガスの削減努力を行った場合にも想定される気候変動に対処するため、短期的対応だけでなく、中長期的な適応が必要とされた。政府の「気候変動の影響への適応計画」（平成27年11月策定）「農林水産省気候変動適応計画」（同年8月策定）を踏まえ、将来の気候変動が我が国の農林水産業に及ぼす悪影響を最小限に留めるため、森林・林業分野における人工林の生産性と健全性を維持する観点から気候変動に適応し、花粉発生源対策に資するスギを作出するための育種技術の開発に取り組む。

このため、本研究では、

1. 環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価
2. 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立
3. 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発
4. 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出

により、高温や乾燥に強く、成長に優れた花粉発生源対策スギ品種を開発するための育種素材を作出することを目標とする。このプロジェクト研究の推進の結果、

1. 系統ごとの環境応答性を解明し、将来の育種に適用できる有用な育種素材を作出。
  2. 育種技術の開発により、今後環境変動に適応した林木育種の推進が可能。
  3. 遺伝子基盤情報の構築等により、スギのストレス応答等に関する研究の高度化。
  4. 気候変動の影響が想定される地域での試験により、有望系統の早期普及の可能性。
- といった波及効果が期待される。

## I-4. 研究方法

### (1) 環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価

気候変動による環境変動への適応性を評価するために、スギの生存や成長における環境変動への応答性について明らかにする。このため、系統の環境変動に対する応答性の全国の多数のスギ試験地（検定林等）を対象に環境測定を行いミクロな環境情報の収集を進めるとともに、国土数値情報等からのメッシュ気候値データをマクロな環境情報とし、これらを検定林における成長データと地理情報システム（GIS）により統合して研究開発基盤を構築し、系統の環境応答性を定量化する新たな育種統計手法を開発する。この手法を用いてスギの環境変動への応答性について解析するとともに、それに基づく系統評価を行う。また、気候変動による高温化および乾燥化を想定し、人工制御環境下において育成したスギ苗の環境応答性を定量化する新たな表現型評価手法を開発する。開発された手法を多数の系統に適用し、高温及び乾燥への耐性の系統評価を行う。

### (2) 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立

環境ストレスに対して耐性のあるスギ系統について、遺伝学的な情報を用いたより効率的な選抜を行うためには、季節性に応じた様々な環境ストレス下（温度・水分ストレス等）での形態的变化と遺伝子の発現動態との関連性を明らかにする必要がある。そこで、人工制御環境下において異なるストレス環境が及ぼすスギ系統の時系列的な形態変化の差異を明らかにし、環境適応性マーカーを開発するための表現型レベルでの基盤を整備する。

また、針葉樹類におけるストレス等に関連する遺伝子群に関する情報収集については、特に環境適応等において重要と考えられる転写調節因子に関する情報も含め、世界的にも不十分である。そこで、様々な環境ストレス下（温度・水分ストレス等）におけるスギの生体内の変化をより高精度に評価するために、環境ストレス下で発現している遺伝子の情報（塩基配列情報）を収集するとともに、バイオインフォマティクス（生物学的情報処理技術）を用いることでスギのゲノム情報基盤を構築し、大規模な遺伝子発現解析が可能なマーカーを開発する。

さらに、大規模な遺伝子発現解析が可能なマイクロアレイチップを利用し、様々な環境ストレス下（温度・水分ストレス等）で育成した複数のスギ系統について遺伝子発現解析を行い、環境ストレスに応答するスギの遺伝子発現制御を明らかにする。また、それらの遺伝子発現制御の情報をもとにスギの環境適応性マーカーの開発を行う。

### (3) 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発

環境変化が雄花着花性に与える影響評価では、雄花着生量の異なる複数のスギ系統を対象とし、ジベレリン処理による着花に至る過程の遺伝子発現機構を明らかにする。その情報を基盤とし、人工制御環境下において温度等の変化に対する着花量の評価と発現遺伝解析を複数系統で実施し、環境要因と着花過程の遺伝子挙動の関連性を明らかにする。それと並行して、産地の異なる複数の系統が全国に植栽された多環境試験地を用いて、各試験地の環境データと系統の着花量に対する環境の及ぼす影響を評価する。

また、花粉発生源対策に資するマーカー開発にあたり、少花粉と無花粉を対象形質とし、複数のマッピング集団を用いて、少花粉・無花粉に関わるQTL（量的遺伝子座）を明らかにし、マーカー化を行う。無花粉については、マーカーが開発された段階で、そのマ

ーカーを用いて、雄性不稔遺伝子をヘテロで保有する系統を全国の精英樹集団からスクリーニングし、雄性不稔遺伝子保有系統のリソースを整備する。

#### (4) 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出

育種素材に対する適応性の系統評価として、一般造林地において、環境応答性の評価を目的とした新たなスギ植栽試験地を設定する。設定地域は、気候変動により乾燥化が懸念される瀬戸内地域の内、中国地方（岡山県）と四国地方（愛媛県）、さらに温暖化が顕著にあらわれると懸念される九州地方（宮崎県）とする。試験地の選定に際しては、GIS技術で得られる環境データに基づき、適地判断を行う。植栽する系統として、(1)～

(3) で対象としたものを含めることで、系統評価の実証可能な試験地とする。試験地設定後、環境データおよび生育データ等を収集し解析することで、植栽系統における環境応答性の実証的評価を行う。

また、気候変動適応策と花粉症発生源対策に向けた新たなスギ育種素材の作出に向けて、(1) で実施される系統ごとの環境応答性評価と、(2) 及び(3) で整備される遺伝子情報を総合して、気候変動適応策と花粉発生源対策に資する育種素材を3系統以上作出する。

### I-5. 研究結果

#### (1) 環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価

マクロおよびマイクロ環境データと、これまで蓄積された成長データを統合的に解析する新たな育種統計手法の開発を進め、水分指標に対する応答性を多数系統について評価可能とする育種統計モデルを開発した。このモデルを用いて、九州から東北までの全国356系統について、乾燥に対する成長の応答性評価を完了した。またポット植栽苗を用いた人工制御環境下でのストレス試験では、土壌乾燥に対する各系統のストレス応答性を評価する手法を開発し、成長速度、蒸散速度および葉の生理活性に関して、全国252系統について評価した。

#### (2) 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立

環境適応性マーカーの開発を目標としてスギの表現型に影響を与える環境シグナルや環境ストレスの条件を人工環境制御下において明らかにするとともに、遺伝子基盤情報を整備した。これらの基盤情報をもとに網羅的遺伝子発現解析によって抽出した環境適応性候補遺伝子について、中規模から小規模へ絞り込みを進め、遺伝子発現量が水分ストレスの指標として機能することを確認した。環境適応性マーカーとして目的によって使い分けが可能なマーカーセットを開発した。

#### (3) 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発

環境変化が雄花着花性に与える影響評価では、人工環境下での遺伝子発現解析と雄花着花量の関係について、高温および乾燥による環境条件が雄花着花量を増加させることを明らかにし、雄花着花に至る過程の遺伝子の発現動態を明らかにした。また、自然条件下における多環境試験地からは、環境が異なっても系統間の着花性は変動しないことが明らかになり、GxE 交互作用は支持されなかった。また、環境指標と雄花着花量を使ったモデルからは、ジベレリン処理前の乾燥・高温が雄花着花量に影響していることが示唆され、人工環境下の解析と整合性のある結果が得られた。不稔個体・不稔遺伝子座を潜在的に保有するヘテロ個体を識別するマーカーを用いてヘテロリソースを完成すると共に、爽春型と類似するものの異なる別の変異に基づく無花粉スギに

連鎖するマーカーを開発し、約 30 のヘテロ個体を検出した。これらの個体について随時交配による確認作業を進める。また、雄花着花量に関するマーカー開発については、実際の育種の単位となる育種区単位でマーカー開発を行った。

#### (4) 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出

日本全国のスギ分布域の中から特に降水量が少なく気温の高い地域を選定して、気候変動による乾燥・高温化に対する環境応答性の評価に適する新規試験地を岡山・愛媛・宮崎に設定し、本プロジェクトを通じて開発した評価手法を植栽試験地に適用したところ、多数系統の環境応答性を評価できることを確認した。

また、小課題1での大規模フィールドデータをもとに評価した山での成長の乾燥適応性やさし木苗を用いた乾燥試験にもとづく乾燥適応性、さらに遺伝子情報も活用した上記2の課題における環境適応性や3の課題における雄花着花性に関する系統評価手法を総合して、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術を体系化し、作出技術を開発した。開発した作出技術を用いた系統評価で、乾燥適応性のいずれかの評価項目で特段優れた特性を示したものは19系統存在し、これらを本プロジェクトで作出した育種素材とし、3系統以上という当初目標を達成した。

### I-6. 今後の課題

環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価では、複数の表現型に着目して環境(乾燥)応答性の多数系統評価を進めたが、表現型間の関連性や、その内的なメカニズムについて解明する取り組みが必要である。また、気候変動に対抗可能なスギを見出すための多数系統評価を、知見を随時取り込みつつ進めていくとともに、ビッグデータを活用するためのデータベース整備や大規模データセットを高速に計算するためのAI等の新たな統計手法の活用等の技術導入を図る必要がある。

環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立では、環境適応性マーカーとして遺伝子発現マーカーを実際の育種の現場でより効果的に使用できる場面を想定すると、サンプルのハンドリング方法や分析コストの改良について今後も検討する必要がある。

雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発では、近年の異常気象による影響が雄花着生量やGAの処理時期にどのように関係するのかといった課題を研究するために、引き続き複数年度の環境指標と雄花着生量のモニタリングが必要である。無花粉および無花粉遺伝子をヘテロで保有する個体の判定できるマーカーについては、ヘテロソースを構築し、既に一部で事業的利用を開始している一方で、ヘテロ系統が検出されない地域も見られる。今後の無花粉スギの育種・普及を進める上では、各地域の優良な精英樹のヘテロ化を進めるといったことが必要となるため、種苗生産の主体となる都道府県と連携したヘテロソースの拡充・無花粉スギ育種の取り組みが重要である。

気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の作出では、今後、スギの次世代育種集団において気候変動適応性を好ましい形で集積し、より優れたスギを作出していく育種を進めるため、次世代系統を対象とした系統評価を引き続き推進していくとともに、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギを効率的に作出可能な次世代育種戦略の構築、AI等の新たな統計手法の活用等の技術導入を図っていく必要がある。

小課題番号	111	小課題 研究期間	平成28～令和2年度
小課題名	1 環境要因がスギの生育に与える影響の解明と系統評価		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	森林総合研究所林木育種センター・育種研究室・松下通也		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

スギの成長等における環境変動への応答性を明らかにするため、全国に設定された試験地（検定林等）を対象に、マイクロ環境情報の収集を進める。このデータに加えて、国土数値情報等からのメッシュ気候値データをマクロな環境情報と位置づけ、マクロ及びマイクロな環境情報を、検定林から得られる成長データとともに地理情報システム（GIS）により統合し、研究開発基盤を構築する。これらの研究開発基盤を基に、系統の環境応答性を定量化する新たな育種統計手法を開発し、スギの環境変動への応答性と系統評価を行う。また、気候変動による高温化および乾燥化を想定し、人工制御環境下において育成したスギ苗の環境応答性を定量化する新たな表現型評価手法を開発する。開発された手法を多数の系統に適用し、高温及び乾燥への耐性の系統評価を行う。

### 2) 研究方法

#### (1) 大規模データの統合による環境変動に対する系統の応答性の評価

大規模フィールドデータを活用し、スギの成長における環境応答性の多数系統評価を可能とする新たな育種統計手法の開発を以下の3段階のステップで進めた。第1ステップでは、機械学習法を用いて解析を進め、マクロ・マイクロ環境変数のうち成長に対して重要度の高い環境因子の絞込みを行った。第2ステップでは、多系統評価に頑健な解析法であるベイズモデルを用いた解析により、第1ステップの解析で重要度の高かったマイクロおよびマクロ環境的な水分指標に対する複数系統の環境応答性評価を試みた。この第2ステップの解析で、水分指標への応答性を複数系統について同時的に評価する統計手法を確立でき、第3ステップでは、全国4つの育種基本区約350系統（クローン）の成長における環境応答性を評価した。

#### (2) 環境応答を評価する新たな表現型評価手法の開発

人工制御環境下において育成したスギ苗の環境応答性を定量化するための表現型として、環境ストレスに対する気孔応答、伸長成長応答、および葉の生理応答について検討した。評価手法は、多数系統評価のためにハイスループット化が重要であるため、気孔応答に関しては赤外線サーモグラフィ、葉の生理応答に関してはクロロフィル蛍光法（電子伝達速度；ETRおよび最大量子収率；Fv/Fm）が、環境ストレス条件下でのスギ苗において適用可能か検討した。赤外線サーモカメラ（CPA-T630sc、FLIR Systems）により測定した葉面温度から算出される気孔コンダクタンス指数（Jones 1999）は、ガスチャンバー法（LI-6400、LI-COR）による気孔コンダクタンスの実測値と比較することで、その適用性を検討した。

環境ストレス応答性に関する多数系統評価は、全国から収集したスギ第1世代精英樹等の挿し木クローンを用いて、4年間にわたり約250系統について実施した。さし木増殖した苗木をポットに移植し温室内において灌水条件下で順化した後、灌水を継続する対照区と灌水を停止する乾燥区を設定し、1週間おきに表現型値を測定した。対象とした表現型は、赤外線サーモグラフィによる気孔コンダクタンス指数、伸長速度、ETRおよび生存率とした。各表現型値は、対照区の系統平均値に対する乾燥区の個体値の比として算出し、3年間の環境ストレス試験データを用いて、個体の表現型値を応答変数、個体の土壌水分値を固定効果、系統の効果を変量効果とする非線形混合モデルにより統合して解析することにより、各系統のストレス応答性を評価した。

### 3) 研究結果

#### (1) 大規模データの統合による環境変動に対する系統の応答性の評価

第1ステップの機械学習を用いた解析では、系統当たりサンプル数が豊富で、共通系統を多様な環境をカバーするよう設定された地域差検定林をモデルデータセットとして、マクロ・マイクロ環境変数のうちスギの成長に重要度の高い環境因子抽出を行った。その結果、マイクロ環境の説明変数である地形的水分指標および斜面方位の重要度が全系統とも共通して高く、乾燥した場所でスギの成長が低下する傾向が確認された(図1)。またマクロ環境変数では、多くの系統において気温や日照に比べて降水量の重要度が高いという傾向が得られた。以上のことから、スギの成長影響を及ぼす因子として特に乾燥ストレスの重要性が高いと考えられた。このため、本プロジェクトにおいては乾燥ストレス応答性に着目してスギの系統評価を行うこととした。

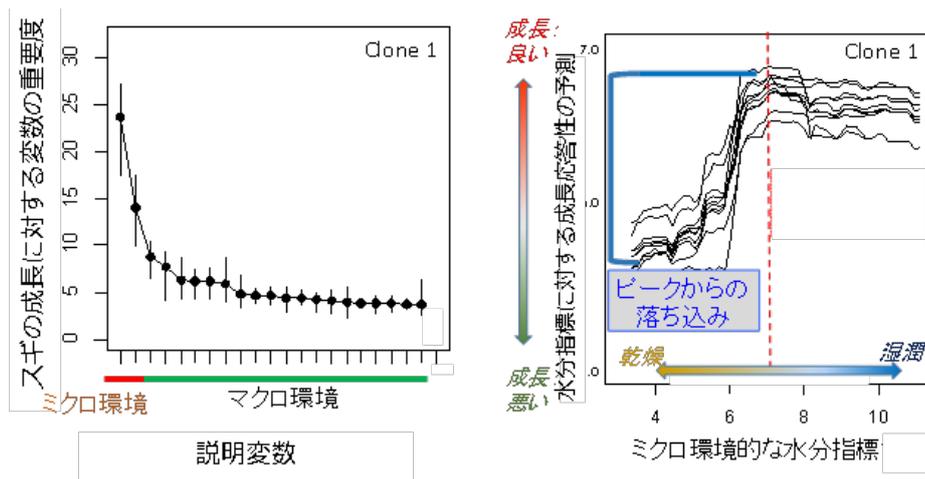


図1 [左] 機械学習によるスギの成長に対するマクロ・マイクロ環境変数の重要度。  
[右] ミクロ環境の水分指標に対する樹高の応答性予測。

第2ステップの解析では、まず第1ステップの解析において重要度が高かった地形的水分指標と降水量をもとに、マクロ・マイクロ両面を考慮した新たな水分指標を算出して、少数サンプルに対しても比較的頑健かつ柔軟なベイズモデルを用いて、水分指標に対するモデル12系統の成長応答カーブの推定を試みた。成長ピークを示す水分指標推定値、またピーク成長条件下での成長に対する乾燥条件下での成長の相対的低下といったパラメータを本手法により推定できることを確認し、乾燥条件下での相対的成長鈍化という環境応答性を多数系統に対して柔軟に評価可能とする統計手法を開発した。

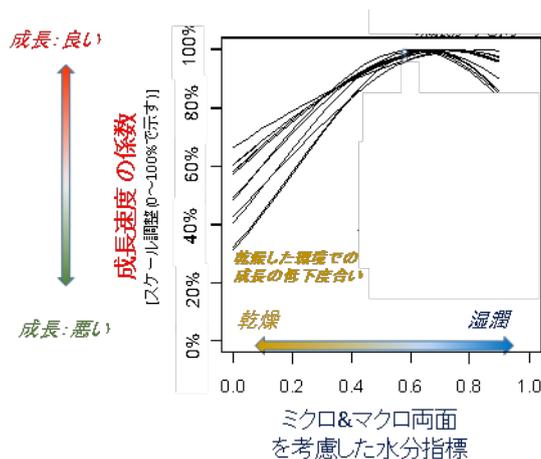


図2 マクロ・ミクロ両面を考慮した水分指標に対するスギ系統の成長応答を推定した曲線。

第3ステップでは、第2ステップで開発した統計手法を全国4つの育種基本区（関東・関西・九州・東北）に設定されている89カ所のクローン試験地（さし木苗により造成された検定林）のデータセットに展開して解析を実施し、多数系統の水分指標に対する応答性評価を完了した（図3）。成長応答の地域性について解析したところ、九州育種基本区では系統特性として成長良好なクローンほど乾燥条件下での相対的な成長低下が顕著な傾向であり、成長鈍化の著しい20系統は乾燥条件下で60%以上成長低下すると推定された。一方、関東では、ピーク時の成長に対する乾燥条件下での成長の程度は、解析した系統のうち約1/3では成長鈍化の度合いが10%以下と推定されたのに対して、成長鈍化の著しい10系統では、乾燥条件下で成長が20%以上低下すると推定された。プロジェクトを通じて開発した本評価手法を用いることで、こういった環境に植栽された場合、各スギ系統の樹高成長の期待値はどの程度かを検討できることとなった。

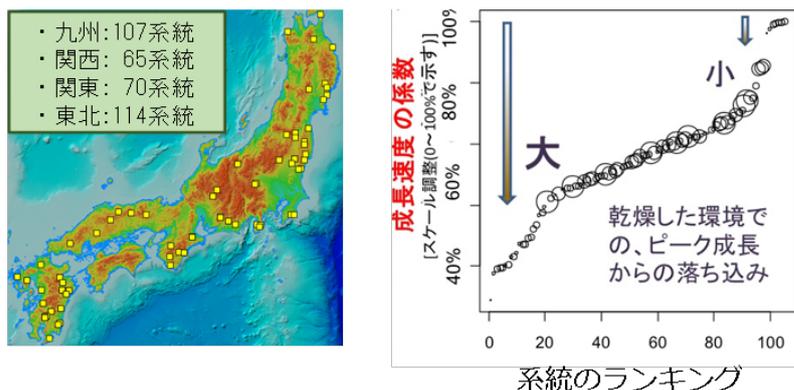


図3. [左] 解析対象とした全国各地の試験地(検定林)と育種基本区ごとの系統数。

[右]九州育種基本区のスギ系統を対象とした解析における乾燥条件下での成長のランキング。

## (2) 環境応答を評価する新たな表現型評価手法の開発

環境ストレスに対して応答する気孔コンダクタンスを赤外線サーモグラフィにより評価できるか検証するために、赤外線サーモグラフィにより測定した葉面温度から算出した気孔コンダクタンス指数とガスチャンバー法で測定した気孔コンダクタンスを比較した（図4）。その結果、有意な正の相関が認められたため、乾燥ストレス下で育成したモデル4クローンの1年生の挿し木苗に実際に適用することで、環境ストレスに対する気孔応答を評価可能か検証した。同時に、伸長成長およびクロロフィル蛍光法による葉の生理活性を測定し、これらの手法の有用性についても検討した。

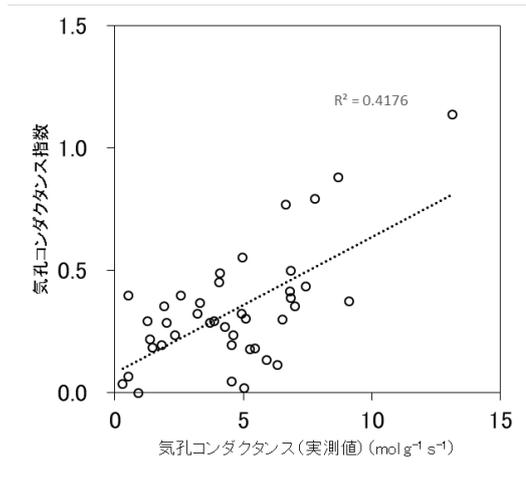


図4. 赤外線サーモグラフィーで測定した葉面温度から算出した気孔コンダクタンス指数と、ガスチャンパー法による気孔コンダクタンスとの比較 (Takashima et al. 2021 より描く)。

土壤水分量に応じて変化する気孔コンダクタンス指数比、伸長速度比、およびETR比を図5に示す。いずれの表現型についても、土壤水分が減少するに伴い表現型値は小さくなる傾向を示し、赤外線サーモグラフィーやクロロフィル蛍光法を用いることで、乾燥ストレスに対する各表現型の応答を適切に評価可能であることが明らかになった。さらに表現型値を応答変数とし、過去にさかのぼって土壤水分値を積算した積算土壤水分値を固定効果、系統の効果を変量効果とする線形/非線形混合モデルを用いて、過去にさかのぼる日数を変化させて最も説明力の高くなるモデルの選択を行ったところ、最適な積算日数は表現型により異なり、気孔コンダクタンス指数で最適積算日数は最も短く、伸長速度、ETRでは積算期間が長くなった。このことから、過去の土壤水分状態を考慮することができる積算土壤水分値を利用することで、任意時点の瞬間的な土壤水分値を用いるよりも、適切に系統の表現型評価が行えることが示された。

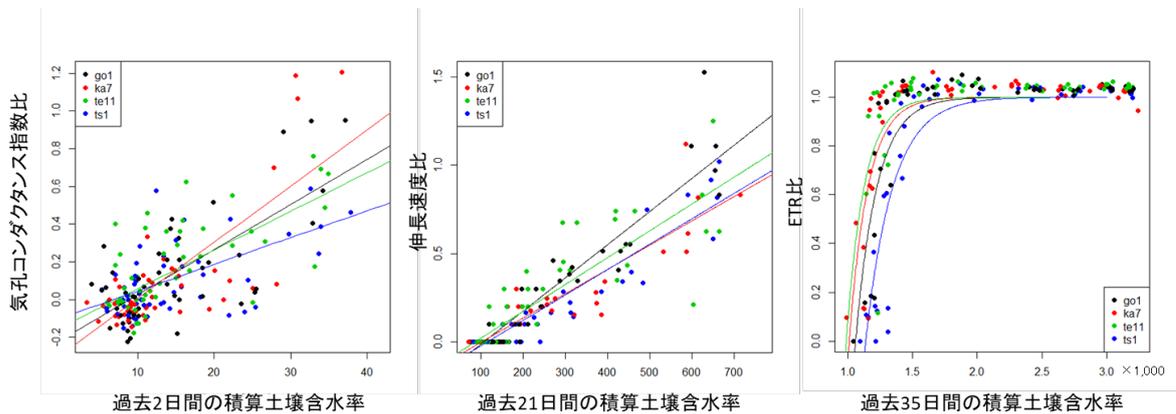


図5 土壤乾燥(横軸)に対する気孔コンダクタンス指数比(左)、伸長速度比(真中)およびETR比の関係(右) (Takashima et al. 2021 より描く)

これら開発された評価手法および統計解析手法を、全国から収集されたスギ多数系統に適用した結果について、乾燥ストレスに対する主軸の伸長速度比およびETR比の応答を示す(図6)。対照区に対する乾燥区でのETR比の応答の早さと生存率との間には負の相関が認められ、乾燥ストレスに対するETR比の応答が遅い系統ほど生存率が高いことが示された。したがって乾燥ストレスが進行してもETR比を維持できる系統(図6 赤の曲線)が乾燥耐性の高い系統であると考えられた。同様のストレス応答性解析を伸長速度など他の表現型につ

いても実施し、乾燥ストレス応答に関する多数系統の評価値を取得した。乾燥ストレスによる伸長速度比の低下程度などの各系統の評価値を、小課題2における環境ストレス応答メーカー開発の際の評価値として供試すると共に、小課題4における育種素材作出のための系統特性評価値として提供した。

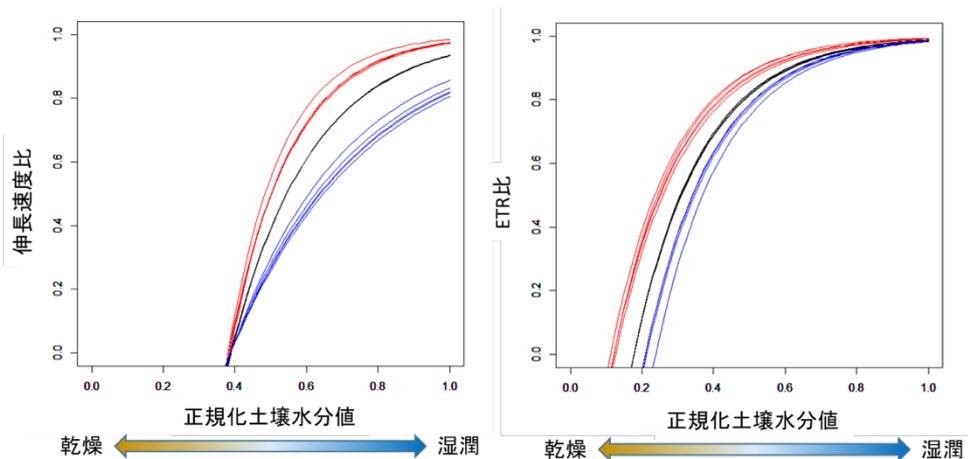


図6. 乾燥ストレスに対する伸長速度比およびETR比の応答。

試験した系統のうち、乾燥ストレスに対する応答の遅かった系統、平均的だった系統、早かった系統の各5系統について、赤、黒、青の曲線でそれぞれ示す。

#### 4) 成果活用における留意点

本小課題で開発した評価手法をもとに乾燥ストレスに対するスギの応答性を多数系統についての的確に評価するためには、検定回数が多く・乾燥ストレスに対する強さ・弱さ等の特性がある程度安定して信頼できる既知の系統を”対照系統”として複数系統を供試し、新規に検定する系統の評価結果を見定めるべきである。

#### 5) 今後の課題

本小課題では、複数の表現型に着目して環境（乾燥）応答性の多数系統評価を進めたが、表現型間の関連性や、その内的なメカニズムについてはまだ不明な点も多い。それらメカニズム等を学術的に解明する取り組みと並行して、進行する気候変動に対抗可能なスギを見出すための多数系統評価を、知見を随時取り込みつつ進めていくことが重要と考える。ビッグデータを活用するためのデータベース整備や大規模データセットを高速に計算するためのAI等の新たな統計手法の活用、また日進月歩で開発されるであろうハイスループットな表現型測定機器等の技術導入を図り、多数系統評価を迅速に実施可能とすることも重要と考える。

#### <引用文献>

Jones, H.G. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling. *Agri. For. Meteorol.* 1999, 95:139–149.

Takahima, Y., Hiraoka, Y., Matsushita, M., Takahashi M. Evaluation of responsivity to drought stress using infrared thermography and chlorophyll fluorescence in potted clones of *Cryptomeria japonica*. *Forests* 2021, 12(1), 55.

小課題番号	121	小課題 研究期間	平成28～令和2年度
小課題名	2 環境ストレス応答に関する遺伝子基盤の確立		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	九州大学・大学院・農学研究院・渡辺敦史		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

スギの表現型に影響を与える環境シグナルや環境ストレスの条件を人工環境制御下において明らかにするためには、生育ステージと季節性を考慮した上で、温度や水分条件等の様々な環境条件下で育成試験を行い、スギの形態的变化に関する情報を収集することが不可欠である。そこで、本課題では生育ステージと季節性を考慮しつつ、人工環境制御下において様々な環境条件の検討を行うと共に、実際にそれらの環境条件下において複数のスギ系統の時系列的な形態変化について情報を収集し、スギの環境応答に関する基盤情報を構築する。

また、ストレス環境がスギの表現型に与える影響評価と連動して、時系列による形態変化や季節性に応じて環境ストレス下で発現する遺伝子の情報を収集し、バイオインフォマティクス（生物学的情報処理技術）を用いることでスギの環境ストレス応答関連遺伝子を含むスギの遺伝子情報基盤を構築するとともに、その基盤情報をもとに大規模な遺伝子発現解析が可能なマイクロアレイチップや次世代シーケンサーを利用した遺伝子発現解析手法を開発する。

また様々な環境ストレス下で育成した複数のスギ系統に対して開発した遺伝子発現解析を適用し、環境シグナルや環境ストレス応答に関係するスギの遺伝子発現制御を明らかにする。最終的には、遺伝子発現パターンや遺伝子発現量について各系統間で比較・分析することで候補となる遺伝子を抽出し、スギの環境適応性マーカーの開発を行う。

### 2) 研究方法

#### (1) 環境適応性マーカー開発のためのストレス環境が表現型に与える影響評価

乾燥ストレスや高温ストレスといった環境ストレスがスギの表現型に与える影響の程度を明らかにするために、水分および温度条件が異なる環境下で複数のスギ系統を育成し、それらの環境ストレスが表現型に与える影響について基礎的情報を収集した。乾燥ストレス条件においては、週3回灌水を行う対照区と灌水を停止する処理区、さらに圃場用水量50%を維持する処理区と3～4週間毎に灌水する処理区の4つの生育環境を温室内に設定し、それらの条件下において複数系統の育成試験を行うことで、表現型の影響評価を行った。表現型の測定は、伸長成長、赤外線サーモグラフィによる気孔コンダクタンス指数、およびクロロフィル蛍光法による電子伝達速度（ETR）について実施した。高温ストレス条件に関して、人工環境調節室を用いて昼夜の温度を15℃から35℃の範囲において段階的に設定し、それらの生育環境における複数系統について育成試験を行うことで、伸長成長およびETRへの影響評価を行った。最終的には、本小課題および小課題111での多数系統試験

で収集した様々な環境ストレス下での表現型情報を統合して解析し、環境応答に関する基盤情報を構築した。

#### (2) ストレス応答等関連遺伝子の収集と解析に関する研究開発

スギの環境ストレス応答関連遺伝子を含むスギの遺伝子情報基盤の構築について、乾燥ストレスおよび高温ストレス条件下で育成したスギの苗木（針葉部）から発現遺伝子（転写産物）を抽出し、第三世代シーケンサーを利用してストレス応答等関連遺伝子の情報を収集した。スギ精英樹として郷台1号に対し、乾燥ストレス環境については灌水停止後3時間、2週目、4週目、6週目、8週目の針葉をサンプリングし、高温ストレス環境では32℃一定の高温条件下において、処理前、処理後3時間、1日目、1週目、3週目、6週目、10週目の針葉をサンプリングし、その全RNAを抽出した。抽出した全RNAをもとにシーケンスライブラリーを作成し、4段階のサイズセレクション（1-2 kbps, 2-3 kbp, 3-4 kbp, 4-10kbp）を行った後、第三世代シーケンサーRSII（PacBio社）を利用してアイソフォームを含む全転写産物の塩基配列の決定を行った。収集した塩基配列情報、バイオインフォマティクスによりその特性を評価するとともに、現有の34,731 EST (Expressed Sequence Tag) 情報と統合することにより、スギの遺伝子情報を網羅する情報基盤を構築した。また大規模な遺伝子発現解析手法の開発については、複数の解析プログラムを組み合わせることで次世代シーケンスデータを利用した大規模な遺伝子発現解析が可能な解析パイプラインを構築した。

#### (3) ストレス応答関連遺伝子の発現解析と環境適応性マーカーの開発

乾燥ストレスや高温ストレス等の環境ストレスがスギの形質に与える影響について、すでに開発済みのスギのマイクロアレイチップ（Nose *et al.* 2020）を用いて解析を行い、環境ストレス下における発現解析に適した時系列を評価するためのスクリーニングを行なった。この結果をもとに環境ストレス応答関連遺伝子を含むスギの遺伝子基盤情報を利用し、RNA-Seqによる網羅的な遺伝子発現解析手法を用いて乾燥ストレス環境下と高温ストレス環境下でそれぞれ育成した代表的な4系統のスギ系統について遺伝子発現解析を行った。これらの解析結果を基に、環境ストレスに応答する遺伝子群をスクリーニングし、乾燥ストレス下での遺伝子発現レベルの応答が解析可能なAmpliSeqトランスクリプトームによる中規模なマーカーセットを開発するとともに、その後追加実験を行い、さらに遺伝子発現解析が可能な小規模なマーカーセットを構築した。これらの中規模および小規模なマーカーセットについて、小課題1で評価した複数のスギ系統を対象に適用性の検証を複数年行い、スギの環境適応性マーカーの実用性を検証した。

### 3) 研究結果

#### (1) 環境適応性マーカー開発のためのストレス環境が表現型に与える影響評価

本実行課題で4ヵ年にわたり実施してきた環境ストレスに対する詳細な表現型情報と、その情報に基づき試験設計された小課題1での多数系統を用いた乾燥試験の結果を統合して解析した。供試個体数は、のべ291系統2,565個体であり、供試データ数は、各表現型につき、それぞれ1万点以上である。これらのデータを用いて解析した乾燥ストレスに対する表現型応答における系統間差の推移から、環境適応性マーカー開発に適するストレス強度・タイミングおよび対象形質（表現型）を決定した。

赤外線サーモグラフィにより推定した気孔コンダクタンス比の広義の遺伝率は、土壌水ポテンシャルが-30 kPa付近で最も高く (0.3~0.4)、その後、乾燥が進行すると遺伝率は低下し、-100 kPa以降は0.1以下で推移した。

土壌水分に応じた伸長成長速度比の広義の遺伝率の変化を図1に示す。土壌水分が最も湿潤な状態では成長速度比の遺伝率は0.12であったが、乾燥ストレスが増加するに伴い遺伝率は増大し、土壌における水ポテンシャルが-30 kPa程度で最も高い遺伝率 (0.41) を示した。さらに乾燥ストレスが進行すると、遺伝率は再び低下し、土壌水ポテンシャル-300~-620 kPaでは、遺伝率は0.06~0.07となった。

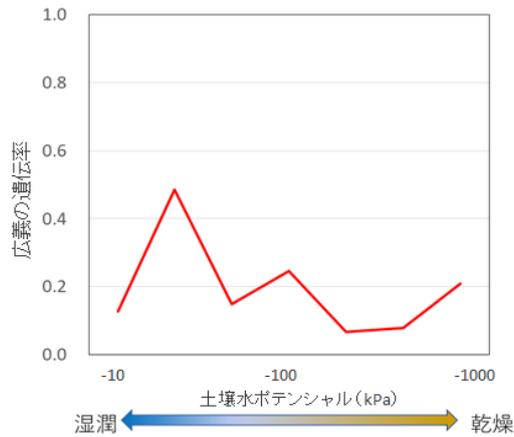


図1 伸長速度比における土壌水ポテンシャルに応じた広義の遺伝率の変化

土壌水分に応じた電子伝達速度 (ETR) の広義の遺伝率の変化を図2に示す。土壌が最も湿潤な状態での広義の遺伝率は0.37であり、伸長成長速度比の湿潤状態での遺伝率より高い値であった。乾燥状態が進行すると、遺伝率はおよそ0.1~0.3の間で推移し、土壌水ポテンシャル-300 kPa程度から急激に上昇し、-620 kPa以上での遺伝率は、0.77であった。したがって、このことは、土壌水ポテンシャル-300 kPa以上の乾燥ストレス下における個体を評価することで、乾燥ストレスに対する生理活性応答の系統間差を効率的に解析することができる。

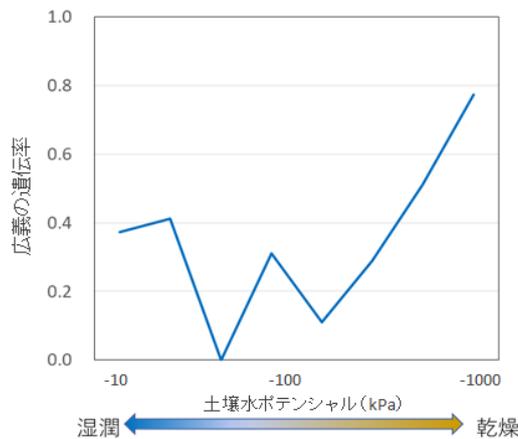


図2 電子伝達速度比における土壌水ポテンシャルに応じた広義の遺伝率の変化

さらに、乾燥に伴って0.8近い高い広義の遺伝率を示したことから、電子伝達速度を指標

とする方が気孔コンダクタンス比や伸長速度比を用いるよりも、乾燥応答の系統間差を明確に検出可能であるということが示唆された。これらの成果を、スギの環境応答に関する基盤情報として整備した（表1）。

表1 表現型情報をもとにした乾燥ストレス応答に関する基盤情報

形質	測定手法	系統間差の検出に適する		系統間差
		期間	土壌水ポテンシャル(kPa)	
気孔応答	赤外線サーモグラフィ	1~2日	~-30程度	中
伸長成長	実測	14~21日	-30 ~ -100程度	中
電子伝達速度	クロロフィル蛍光法	21日~	-300程度以下	特大

(2) ストレス応答等関連遺伝子の収集と解析に関する研究開発

第三世代シーケンサーを利用したシーケンス解析により乾燥ストレス条件下及び高温ストレス条件下から、それぞれ58,469遺伝子及び46,252遺伝子を取得した。取得した遺伝子群に対して現有の34,731 ESTの塩基配列情報 (Mishima *et al.* 2018)との比較解析(相同性検索)を行った結果、乾燥ストレス条件下では769遺伝子、高温ストレス条件下では847遺伝子が新規の遺伝子であった(図3)。それらの新規遺伝子群について遺伝子機能解析(GO解析; Gene Ontology解析)を行った結果、生物学的プロセス(Biological Process)における両ストレス間の遺伝子構成には明確な違いが見られなかったものの、細胞の構成要素(Cellular Component)および分子機能(Molecular Function)では発現している遺伝子の構成に違いが認められ、特に高温ストレス条件下で単離した遺伝子群にはより特異的な機能(例えば、channel activityやnucleolusなど)に分類される遺伝子群が含まれていた。

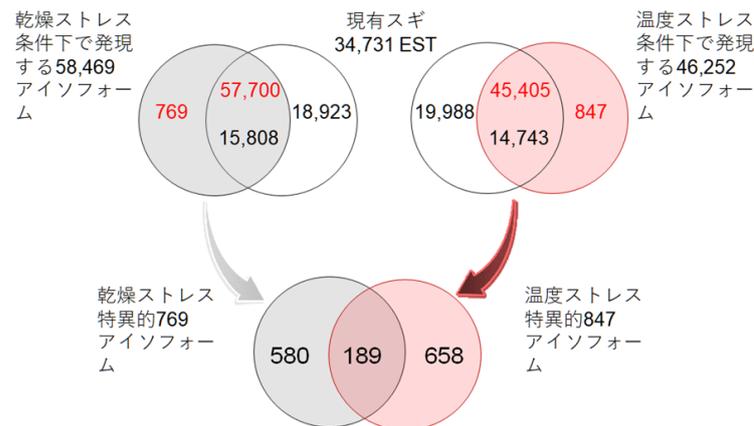


図3 各ストレス条件下で取得した遺伝子情報と現有スギEST情報との比較

さらに上記の環境ストレス条件下で取得した遺伝子情報と現有のEST情報との比較・統合を行うことで、単一遺伝子化(Uni-gene化)を行い、スギ遺伝子情報基盤の構築を行った。その結果、47,154遺伝子が単一のユニークな遺伝子として特定でき、さらに現有の34,731EST情報の塩基配列情報とのクラスタリングを行うことで、のべ62,632遺伝子を単一のユニークな遺伝子情報として再構築した(表2)。

表2 本実行課題で構築したスギ遺伝子基盤情報の概要

	(a) 現有のスギEST	(b) 本課題で取得した遺伝子	(a)及び(b)を統合した遺伝子
遺伝子数	34,731	47,154	62,632
最小塩基長 (bp)	59	311	75
最大塩基長 (bp)	20,196	10,320	20,196
平均塩基長 (bp)	1,722	2,571	2,297

構築したスギの発現遺伝子情報の網羅性は、BUSCOプログラム (Felipe *et al.* 2015) を用いて植物種の主要構成遺伝子との比較解析を行うことで評価した。本課題で構築したスギの62,632遺伝子は植物種における代表遺伝子 (1,440遺伝子) のうち、1,122遺伝子 (78.0%) を網羅しているデータセットであった (表3)。サトウマツ (*Pinus lambertiana*) においても複数の組織や器官から網羅的に発現遺伝子の情報が収集されており (Gonzalez-Ibeas *et al.* 2016)、本実行課題で収集した遺伝子情報の網羅性と類似した値 (約78%) を示していたことから、本課題で構築したスギの62,632遺伝子のデータセットは針葉樹種の中でも高い網羅性を示す遺伝子データセットであると考えられる。一方で、本小課題において遺伝子発現解析において供試するRNA-Seqデータを実際にスギの遺伝子情報基盤 (62,632遺伝子) にマッピングすることでも、遺伝子の網羅性を検証した。その結果、62,632遺伝子へのマッピング率は92.13%を示し、現有のスギEST情報へのマッピング率が88.39%であったことと比較すると、本課題で構築したスギの遺伝子情報基盤の網羅性は高い。

表3 本実行課題で構築したスギ遺伝子の網羅性

	(a) 現有のスギEST	(b) 本課題で取得した遺伝子	(a)及び(b)を統合した遺伝子
網羅している遺伝子数/ 植物種における代表遺伝子数	1,088/1,440	996/1,440	1,122/1,440
遺伝子の網羅性 (%)	75.50%	69.10%	78.00%
単一遺伝子数	968	578	564
重複遺伝子数	120	418	558
断片化している遺伝子数	67	80	79
検出されていない遺伝子数	285	364	239

遺伝子発現解析手法の開発においては、大規模な塩基配列情報が収集可能なHiSeq4000 (Illumina社) またはNovaSeq6000 (Illumina社) で取得したショートリードの塩基配列情報について、①Trimmomaticプログラム (Bolger *et al.* 2014) によるアダプター配列および低クオリティ配列のトリミング、②Bowtie2プログラム (Langmead and Salzberg, 2012) を用いたりファレンス遺伝子配列に対するマッピング、③HTSeqプログラム (Anders *et al.* 2015)

による参照配列にマップされたリード数のカウント、④Rを用いた遺伝子発現解析が可能な数値データ（FPKM値もしくはTPM値）の計算とedgeRパッケージ（Robinson *et al.* 2009）による標準化、以上4つの解析プログラムを組み合わせることで大規模な遺伝子発現解析が可能な解析パイプラインを構築した。

### （3）ストレス応答関連遺伝子の発現解析と環境適応性マーカーの開発

既存のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、灌水を停止し乾燥ストレスを与え始めてから、1ヶ月以上にわたって段階的にスギの遺伝子発現に変化が現れることが明らかになった。この時系列毎のサンプリングによる評価結果を経て、郷台1号・上都賀7号・天竜11号・筑波1号の合計4クローンについて、灌水停止後0、7、14、21、35、49日目に遺伝子発現解析用の当年性シュートのサンプリングを行った。RNA-Seqによる大規模な遺伝子発現データを用いて主成分分析を行った結果、乾燥の進行に伴い第一主成分のプラス方向へ遺伝子発現の全体像が移行することが明らかになった（図4）。乾燥によるプラス方向への遺伝子発現の全体像の移行の程度は、クローンによって異なっており、筑波1号が他のクローンに比べ遺伝子発現が大きく変化していた。

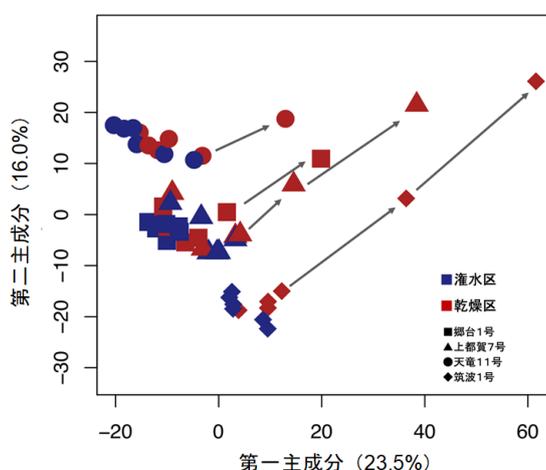


図4 網羅的遺伝子発現解析による乾燥に伴う遺伝子発現の全体像の変化

主成分分析により第一主成分への寄与率の高い遺伝子群を抽出した。例えば図5に示したガラクチノール合成酵素遺伝子は乾燥ストレスによって発現量が増加した。GO解析の結果、乾燥によって発現量が増加する遺伝子には、様々なストレス関連遺伝子群（アブシジン酸、サリチル酸、エチレンなどストレスホルモン関連の遺伝子や、塩、低温、傷害などのストレスに関わる遺伝子など）が、一方、発現量が減少する遺伝子には成長や光合成関連の遺伝子群が有意に多く含まれていた。

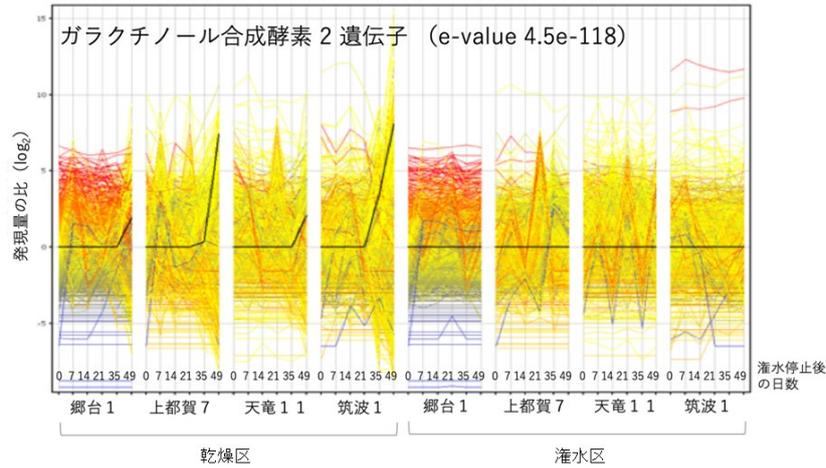


図5 乾燥によって発現量が増加する遺伝子の4クローンにおける遺伝子発現量

クローン毎の主成分分析の結果をもとに、第一主成分への寄与率の高い遺伝子を各クローン120遺伝子、合計359個を乾燥応答遺伝子群として抽出した。それらの乾燥応答遺伝子群についてプライマーを設計し、特定の中規模な遺伝子発現解析が可能なAmpliseqトランスクリプトーム (Thermo Fisher Scientific社) による遺伝子発現解析を行った。材料として小課題1で平成31年度に解析した全国の45クローンの挿し木苗から遺伝子発現解析用のサンプルを継続的に採取し、その中の24クローンについて灌水条件と乾燥条件での遺伝子発現を解析した。その結果、第一主成分のマイナス方向への遺伝子発現の全体像の移行が観察され、中規模に絞り込んだ遺伝子でも十分に乾燥への応答性を評価できていることが示唆された (図6)。

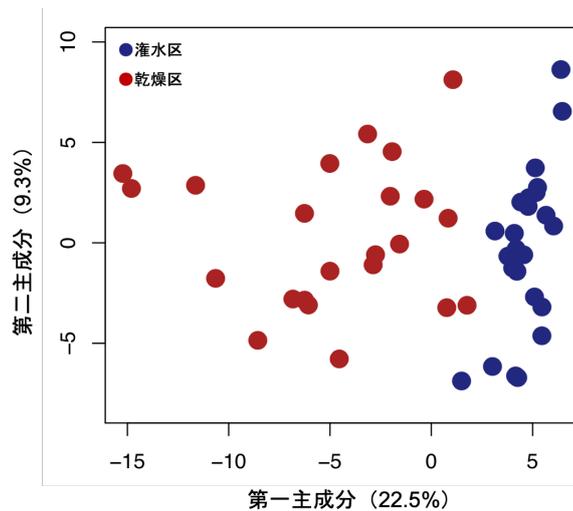


図6 中規模マーカーセットを用いた遺伝子発現解析による遺伝子発現の全体像

中規模なマーカーセットの遺伝子発現データを用いて、359遺伝子の中から線形回帰と機械学習を用いてさらに小規模な40遺伝子へと候補遺伝子を絞り込み、小課題1の令和元年度の乾燥試験によって取得した22系統の遺伝子発現解析用サンプルについて、リアルタイムPCRを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、乾燥処理を行うことで第一主成分に沿って遺伝

子発現の全体像は第一主成分のマイナス方向へと移行することを確認した（図7）。このことは、比較的少数の遺伝子の発現量を定量的に評価することで乾燥処理へのスギの応答を評価することが可能なことを示唆している。

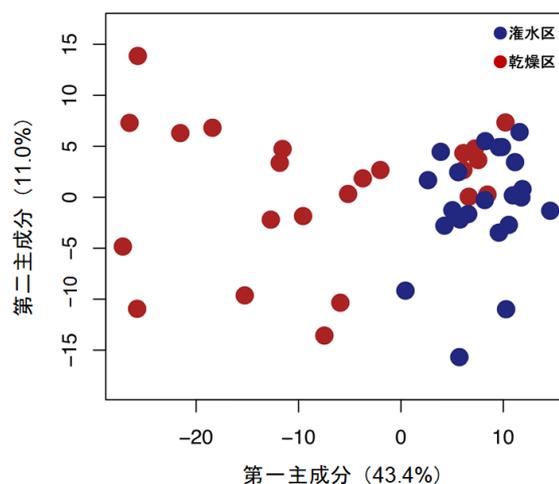


図7 小規模マーカーセットを用いた遺伝子発現解析による遺伝子発現の全体像

一方、高温ストレス環境下で生育した4クローンの遺伝子発現解析の結果、高温応答性はクローンごとに特徴的な遺伝子発現にマスクされ、4クローンの総体的な結果としては乾燥応答ほどには顕著ではなかった（図8）。代表的なクローンとして上都賀7号で抽出された高温応答性の遺伝子に着目すると、個体ごとの高温応答性を評価できることが明らかになったが、マーカー化は乾燥応答性よりも困難であると考えられた。

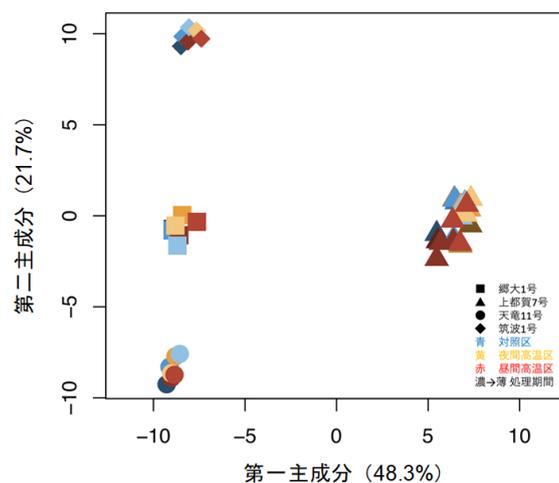


図8 網羅的遺伝子発現解析による温度応答に関わる遺伝子発現の全体像

#### 4) 成果活用における留意点

本小課題で開発した評価方法をもとに環境ストレス（乾燥ストレス）に対するスギ系統の応答性を的確に評価するためには、用土の選択、灌水方法、毎回の表現型値の測定時刻を揃えること等が重要である。

## 5) 今後の課題

環境適応性マーカーとして遺伝子発現マーカーを実際の育種の現場でより効果的に使用できる場を想定すると、サンプルのハンドリング方法や分析コストの改良について今後も検討する必要がある。環境適応性マーカーの利用に際してサンプリングから遺伝子発現解析までに至る多数の行程と分析にかかるコストが課題である。本小課題において特定した候補遺伝子群を含め、遺伝子多型が発現に影響を与える領域（発現量の形質遺伝子座 **Expression quantitative trait loci: eQTLs**）をゲノム上で特定し、マーカーとしてのハンドリングがより容易であり、コスト削減も可能なDNAマーカーへの転換に向けた検討が必要である。

また遺伝子発現マーカーとして発現する遺伝子の種類や発現量の調節の他に、スプライシングバリエーションなどの転写後制御も環境応答性に寄与する可能性がある。それらの変異を検出し、マーカーとしての可能性を示すためにはスギのさらに多くのシステムを利用し、アイソフォームを含む転写産物を包括的に収集した上で、比較・検出していく必要があり、eQTLと同様のアプローチとしてsQTL (splicing QTL) のようなゲノム上の変異との関連性を検出していくアプローチも今後検討する必要がある。

環境適応性マーカーの生物学的裏付けとして、選抜した乾燥ストレス関連遺伝子群の機能やそれらの遺伝子群の上流・下流のカスケード、および代謝経路を含む表現形質との関連性については、遺伝子組換えによるアプローチを含む分子生物学的な検証が必要であり、その検証のためにはさらに時間を必要とする。

## <引用文献>

- Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq - a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015,31:166–169.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014,30:2114–2120.
- Gonzalez-Ibeas D, Martinez-Garcia PJ, Famula RA, Delfino-Mix A, Stevens KA, Loopstra CA, et al. Assessing the Gene Content of the Megagenome: Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). *G3* 2016,6:3787–802.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 2012,9:357–359.
- Mishima, K., Hirao, T., Tsubomura, M., Tamura, M., Kurita, M., and Nose, M et al. Identification of novel putative causative genes and genetic marker for male sterility in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D.Don). *BMC Genomics* 2018,19:277.
- Nose M., Kurita M., Tamura M., Matsushita M., Hiraoka Y., Iki T., et al. Effects of day length- and temperature-regulated genes on annual transcriptome dynamics in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don), a gymnosperm indeterminate species. *PLOS ONE* 2020,15(3): e0229843.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2009, 26, 139–140.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 2015,31, 3210–3212.

小課題番号	131	小課題 研究期間	平成28～令和2年度
小課題名	3 雄花着花関連の判定に向けたマーカー開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	森林総合研究所林木育種センター・基盤技術研究室・三嶋賢太郎		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

雄花着生量の異なる複数のスギ系統を対象とし、ジベレリン処理による着花に至る過程の遺伝子発現機構を明らかにする。その情報を基盤とし、人工制御環境下において温度等の変化に対する着花量の評価と遺伝子発現解析を複数系統で実施し、環境要因と着花プロセスに応じた遺伝子挙動の関連性を解析する。並行して産地の異なる複数の系統が全国に植栽された多環境試験地を用いて、各試験地の環境データと系統の着花量に対する環境の及ぼす影響を評価する。また、花粉発生源対策に資するマーカー開発にあたり、少花粉と無花粉を対象形質とし、複数のマッピング集団を用いて、少花粉・無花粉に関わる遺伝子座を明らかにし、マーカー化を行う。無花粉については、雄性不稔を判定できるマーカー開発を行い、そのマーカーを用いて、雄性不稔遺伝子をヘテロで保有する系統を全国の精英樹集団からスクリーニングし、雄性不稔遺伝子保有系統のリソースを整備する。

### 2) 研究方法

#### (1) 環境変化が雄花着花性に与える影響評価

ジベレリン処理による着花に至る過程の遺伝子発現機構の解明では、マイクロアレイチップおよびRNAシーケンス法を用いて、自然条件下で、ジベレリン処理前から処理後6週間まで経時的にサンプリングし(0時間、3時間、6時間、6日後、6日後、1週間後、2週間後、4週間後、6週間後)、RNA抽出を行い、各サンプルにおける遺伝子発現動態を明らかにした。自然条件下でジベレリン処理を行ったサンプルによる遺伝子発現動態を明らかにした後、雄花着生量の少ない精英樹および多い精英樹(以下、少花粉系統および多花粉系統という)を用い、遺伝子発現動態における差異の検討を行った。本実験では、既に得られていた自然条件下でのジベレリン処理後の遺伝子発現の結果から、明確な発現挙動が見られた3時間後、10日後のサンプルを少花粉系統と多花粉系統を14クローンずつ用いてRNA抽出を行い、遺伝子発現動態を明らかにした。また、環境を制御する施設において、雄花着生時期に高温(昼30℃/夜30℃)・低温処理(昼25℃/夜15℃)を行い、それぞれの条件と上記の方法と同様の遺伝子発現動態および雄花着花量を調査した。さらに、雄花着生時期に乾燥区(土壌含水量20%)と湿潤区を設け、同様の実験を行った。自然条件下では、同じ系統セットが共通して植栽されている全国5箇所の多環境試験地を用いて、気温、湿度、地温、土壌水分、水ポテンシャル等の環境センサーを設置し、データを収集すると共にジベレリン処理を行い雄花着生量を4段階の着花指数によって調査し、それらのデータを用いてモデルを構築し、環境指数と雄花着花量の関連性を解析した。

## (2) 花粉発生源対策に資するマーカーの開発

花粉発生源対策に資するマーカー開発では、雄性不稔を対象としたマッピング集団([爽春×東加茂7]×[爽春×鯉沢6])を用いて、Axiom genotyping systemにより約7万SNPをタイピングし、連鎖地図の構築およびQTL (Quantitative Trait loci) 解析 (連鎖解析)を行うことで、雄性不稔形質と強く連鎖する領域を特定し、その領域に基づいて不稔個体を判別可能な変異 (一塩基多型) を同定した。また、その一塩基多型を検出できるSNaPshotマーカーおよび簡易な装置で検出できるマーカーシステムを開発し、全国のスギ精英樹を含む育種素材をタイピングし、得られた遺伝子型情報に基づいて判定を行った後、交配による確認も行い、全国のスギ無花粉遺伝子を保有するヘテロ系統のリソース構築を行った。雄花着生量のマーカー開発では、少花粉系統を用いた着花形質の分離集団であるマッピング集団およびジベレリン処理による着花量が明らかとなっている全国の第一世代精英樹系統をAxiom genotyping systemによりタイピングし、QTL解析およびGWAS/GP (Genome-wide association analysis/Genomic prediction) を行うことで、マーカーの開発を行った。

## 3) 研究結果

### (1) 環境変化が雄花着花性に与える影響評価

自然条件下においてジベレリン処理による雄花誘導による雄花着生量と遺伝子発現解析をとともに解析することで、無処理に比べ、ジベレリン処理後の約1週間 (1w) 以降に雄花誘導に関与すると推定される花芽形成関連遺伝子群の遺伝子動態を明らかにし (図1) (Kurita et al. 2020)、また、多花粉系統および少着花系統において異なる発現挙動をする遺伝子群を明らかにした。さらに、環境制御室を用いて異なる温度条件下で上記の実験を行い、高温下において、低温下よりも雄花着生量が増加することが明らかとなり、それに伴い花芽形成関連遺伝子群の遺伝子発現量も増加することが明らかになった。なお、この実験のサンプルには、多花粉系統と少花粉系統を用いたが、雄花着生量が増加する高温下においても各系統の特性が維持されることも明らかになった。同様に、乾燥条件下においても実験を行い、乾燥条件が厳しいほど、雄花着生量および遺伝子発現量が増加することが明らかになった。

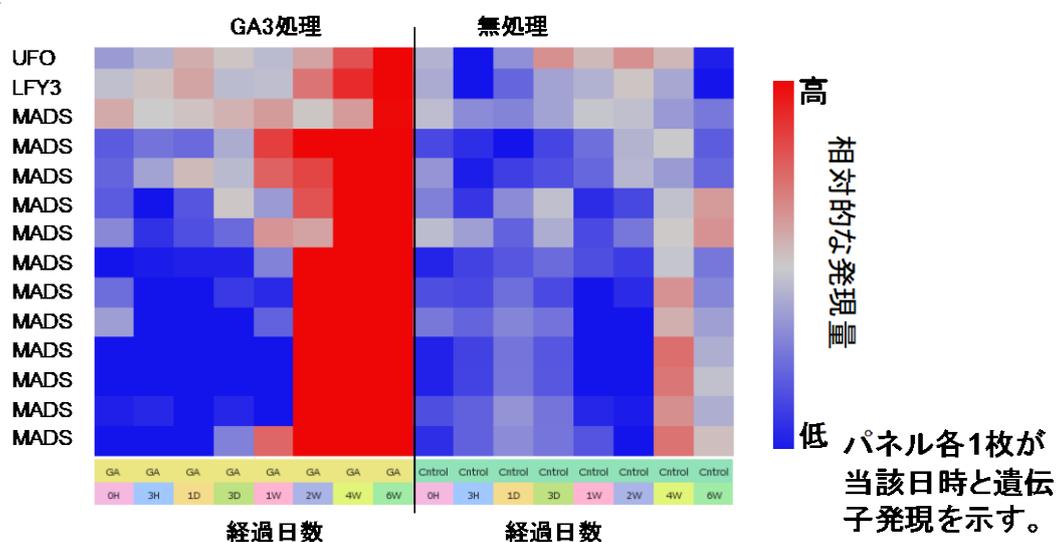


図1 ジベレリン処理後の花関連遺伝子の発現動態

多環境試験地を用いて、自然条件下における様々な環境指標（気温、土壤水分条件等）と雄花着生量の関係を解析した結果、異なる環境下においても各系統の雄花着生量のランキングは異なることが明らかになった。また、得られた環境指標と雄花着生量データを用いて、どの環境指標がより雄花量に影響しているかについてモデル選択により解析したところ、ジベレリン処理前の最高気温および乾燥の影響が大きいと示唆され、高温条件でより雄花着生量が増すことが示唆された。なお、有意なG×E交互作用は検出されなかった。

## (2) 花粉発生源対策に資するマーカーの開発

スギ雄性不稔系統「爽春」を用いて雄性不稔遺伝子座の特定を行い、その遺伝子座領域の塩基配列情報に基づいたマーカー開発に成功した(Mishima et al. 2018, 坪村ら, 2019)。開発したマーカーは、不稔個体・不稔遺伝子座を潜在的に保有するヘテロ個体を識別可能であることが明らかとなった(図2)。開発したマーカーを用いて全国のスギの育種対象となる精英樹を含む約4,000個体の育種素材のタイピングを実施し、ヘテロリソースの構築を行ってきた。その結果、東北育種基本区では2系統、関東育種基本区では7系統、関西育種基本区10系統、九州育種基本区2系統の合計21系統の不稔遺伝子座を潜在的に保有するヘテロ個体を明らかにできた(表1)。なお、これらのマーカーで判定されたヘテロ個体について、交配による確認も行い11系統についてはブロック会議等を通じて公表している。さらに、開発当時からマーカー化した不稔遺伝子座の近傍に爽春型とは異なる変異箇所があることを認識し、当該変異に基づくマーカーの開発も進めてきた。開発したマーカーによるタイピング結果および交配による確認を進め、このマーカーからも不稔遺伝子座を潜在的に保有するヘテロ個体を識別することができることを明らかにした。このため、爽春型および爽春型と類似するものの異なる別の変異に基づく無花粉系統を検出可能なマーカーの開発を進め、同様に約4,000個体の育種素材のタイピングを実施し、その結果28系統がヘテロ個体であると判定された。これらについては、今後の交配による確認実験を進めていく。また、爽春型および爽春型と類似するものの異なる別の変異を検出できる両マーカーを同時に検出できるマーカーシステムの開発を進め、特異性の高いPCRプローブ、BHQplex CoPrimers (LGCバイオリサーチテクノロジーズ社製)を作成し、リアルタイムPCRによって迅速かつ低いコストで検出可能なマーカーシステムを開発した。

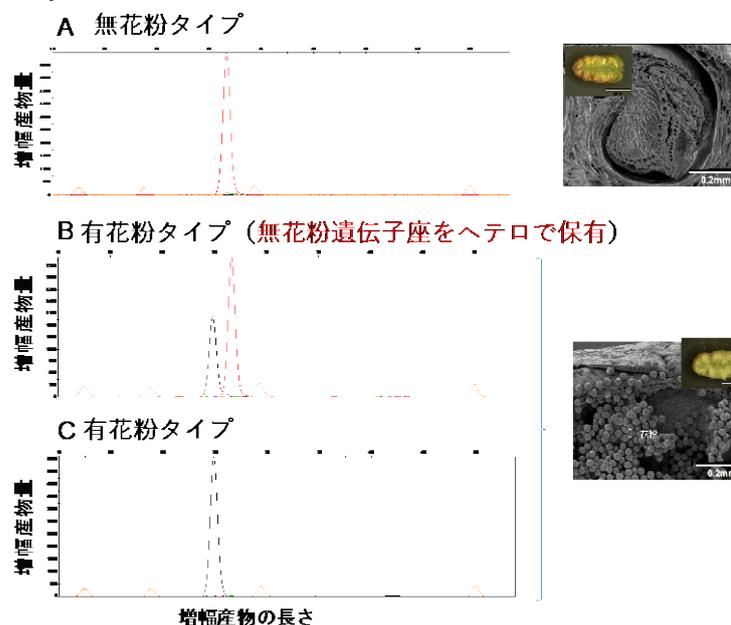


図2 開発したマーカーによる泳動像と無花粉の判定

表1 公表済みの無花粉遺伝子を保有するスギ精英樹

育種基本区	育種区	系統名	選抜都県	公表年	
東北	東部	耐寒風青森30号	青森県	令和2年	
関東	関東平野	西多摩8号	東京都	平成30年	
		中4号	神奈川県	平成30年	
		箱根4号	神奈川県	平成30年	
		片浦6号	神奈川県	平成30年	
			丹沢2号	神奈川県	令和元年
	中部山岳	奈良井4号	長野県	平成30年	
	東海	天竜11号	静岡県	平成30年	
		大井7号	静岡県		
関西	日本海岸西部	大原1号	島根県	令和2年	
九州	北九州	県神埼1号	佐賀県	平成30年	
九州	中九州	県大分1号	大分県	令和2年	

雄花量に関するマーカー開発については、実際の育種事業の実施単位となる育種基本区単位でGWASおよびGPを行った。GWASによって得られたSNPごとの形質への寄与を考慮して選抜したSNPでマーカーセットを構築し、GPを施行した。その結果、32,036の全SNPによる予測精度は、東北育種基本区では0.4を下回ったが、関東、関西、九州の各育種基本区において0.5程度あるいはそれを上回った。推定精度（全SNPを用いて予測した場合の予測精度の8割以上）および運用上のコストの面から、東北、関東、関西の各育種基本区では約500、九州育種基本区で約250のマーカーが最適であると考えられた。前年度のQTLベースのマーカーの2つを加え、これらのマーカーを事業的に運用するため、これのマーカーを統合してシークエンスベースのタイピングプラットフォームであるAmpliseq用の1,335マーカーを開発した。

#### 4) 成果活用における留意点

無花粉および無花粉遺伝子をヘテロで保有する個体の判定については、開発したマーカーは原因遺伝子と強く連鎖しているものと考えられるものの、2つのタイプ（爽春およびそれとは異なる変異）の異なる変異箇所であることが今回の結果から示唆されたことや、原因遺伝子は未だ確定していないことなどから、マーカーでの判定後に、交配による確認を行うことが推奨される。

#### 5) 今後の課題

花粉量と環境指標の関係では、GA前的高温・乾燥が雄花着生量に影響していることが示唆された。今後は、雄花着生量の経年推移（多く雄花をつけた個体の翌年の雄花着生量等）の特性を詳細に明らかにすることに加え、近年の異常気象による影響が雄花着生量やGAの処理時期にどのように関係するのかといった課題を研究するために、引き続き複数年度の環境指標と雄花着生量のモニタリングが必要である。遺伝子発現との関連においては、花関連遺伝子だけではなく環境ストレスに関する遺伝子の遺伝子発現動態も網羅的に調べ、考慮する必要がある。

ある。

無花粉および無花粉遺伝子をヘテロで保有する個体の判定できるマーカーについては、ヘテロリソースを構築し、既に一部で事業的利用を開始している一方で、ヘテロ系統が検出されない地域も見られる。今後の無花粉スギの育種・普及を進める上では、各地域の優良な精英樹のヘテロ化を進めるといったことが必要となるため、種苗生産の主体となる都道府県と連携したヘテロリソースの拡充・無花粉スギ育種の取り組みが重要である。また、無花粉およびヘテロ個体を得るための交配によって多くの種苗が生産され、さらにそれらの成長や材質も考慮する必要があるため、マーカーを使用するタイミング（植栽前なのか成長形質を明らかにした後等）等の効果的なMAS (Marker assisted selection) の育種体系についても検討を進める必要がある。

#### <引用文献>

- Manabu Kurita, Kentaro Mishima, Miyoko Tsubomura, Yuya Takashima, Mine Nose, Tomonori Hirao and Makoto Takahashi. Transcriptome Analysis in Male Strobilus Induction by Gibberellin Treatment in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Forests* 2020, 11(6), 633
- Kentaro Mishima, Tomori Hirao, Miyoko Tsubomura, Miho Tamura, Manabu Kurita, Mine Nose, So hanaoka, Makoto Takahashi, Atsushi Watanabe. Identification of novel putative causative genes and genetic marker for male sterility in Japanese cedar. *BMC genomics*. 2018, 19, 277

小課題番号	141	小課題 研究期間	平成28～令和2年度
小課題名	4 気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギ育種素材の 作出		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	森林総合研究所林木育種センター・育種研究室・松下通也		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

一般造林地において、環境応答性の評価を目的とした新たなスギ植栽試験地を設定する。設定地域は、気候変動により乾燥化が懸念される瀬戸内地域の内、中国地方(岡山県)と四国地方(愛媛県)、さらに温暖化があらわれると懸念される九州地方(宮崎県)とする。試験地の選定に際しては、GIS技術で得られる環境データに基づき、適地判定を行う。植栽する系統として、小課題1～3で対象としたものを含めることで、系統評価の実証可能な試験地とする。試験地設定後、環境データおよび生育データ等を収集し、植栽系統における環境応答性の実証的评价を行う。また、小課題1で実施される系統ごとの環境応答性評価と、小課題2及び3で整備される遺伝子情報を総合して、気候変動適応策と花粉発生源対策に資するスギを迅速かつ高い確度で作出する技術を開発するとともに、育種素材を作成する。

### 2) 研究方法

(1) GIS技術を活用し日本全国におけるスギの分布域の中から特に降水量が少なく気温の高い地域を選定し、気候変動による乾燥・高温化に対する環境応答性の評価に適する新規試験地を設定する。供試する植栽材料は、小課題1～3で対象とした複数の系統を新規試験地にも植栽することで、小課題間で連携して本プロジェクトを通じて開発した評価手法の適用性等を検討することとした。試験地の環境条件として、環境モニタリングセンサーを設置しての気温や土壌含水率等の継時継続測定と、各苗木植栽位置での土壌含水率の測定、UAV空撮に基づく地形情報の収集を実施した。苗木個体の形質測定として、樹高や根元径等を植栽から3～4年次まで毎年度実施した。また開発した系統評価技術を新規植栽地において適用することによって、多数系統の環境応答性評価を実施した。

(2) スギの林木育種における従来の評価技術では、環境適応性あるいは花粉発生源対策に資する系統の作出には、評価精度を確保するために検定に長期間の年月を要し、かつ大量の検定データが必要であった。現在進行形で進捗する気候変動に対抗して、迅速かつ確度の高い系統作出を可能とするため小課題4では、小課題1～3を通じて新たに開発する表現型評価手法による系統評価および関連形質に寄与する遺伝子の情報を統合することによって、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術を体系的に開発するとともに、その技術により気候変動適応育種素材の作出を行った。

### 3) 研究結果

(1) 新規植栽試験による育種素材に対する適応性の系統評価

国土数値情報の気候平年値および植生3次メッシュデータをGISにより統合し、日本全国のスギ分布域の環境条件における岡山、愛媛、宮崎の3県の位置づけを行った。また気温と降水量の関係性の散布図から各県内におけるスギ分布域の位置づけを視覚化し、日本国内のスギ造林地域の中でも特に乾燥したあるいは気温の高い地域として、岡山県備前市伊部、愛媛県松山市食場町、宮崎県日南市星倉を試験地設定箇所として選定した(図1)。そして、岡山県には平成29年2月に、愛媛県および宮崎県の試験地には、平成30年1月と2月にそれぞれ試験苗木を植栽した(表1)。

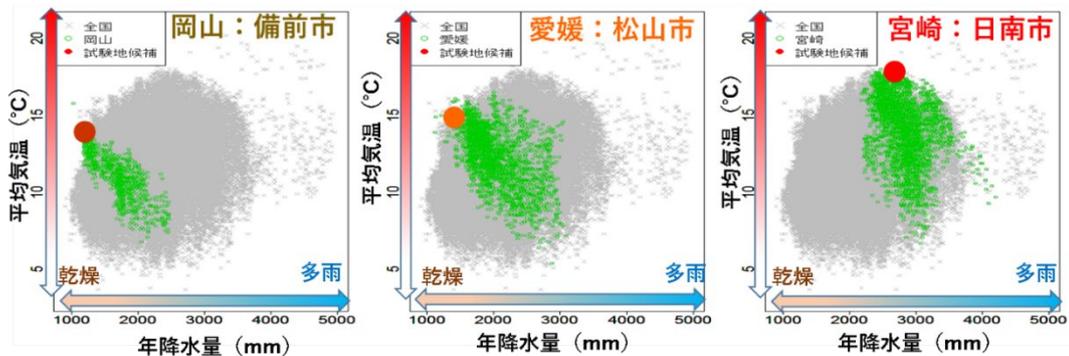


図1 年降水量(横軸)と年平均気温(縦軸)の散布図にプロットした全国のスギ林分布域(灰色)、岡山(左)・愛媛(中央)・宮崎(右)におけるスギ分布域(緑色)と、試験地設定箇所(赤色)の関係。

表1 岡山、愛媛、宮崎の3県の試験地に植栽したさし木苗木の数量

県	系統・本数	育種基本区 ( ) 内は花粉症対策で内数				合計
		東北	関東	関西	九州	
岡山	系統	2(0)	9(6)	28(0)	13(3)	52(9)
	本数	5(0)	81(54)	173(0)	106(26)	365(80)
愛媛	系統	7(6)	7(4)	62(25)	9(2)	85(37)
	本数	40(37)	67(37)	486(193)	113(20)	706(287)
宮崎	系統	7(6)	9(6)	30(23)	38(6)	84(41)
	本数	42(38)	67(37)	257(173)	353(74)	719(322)

小課題1における大規模フィールドデータを活用した系統評価手法開発の成果より、ミクロ環境での乾燥指標として地形的水分指標の重要性が確認されたため、地形的水分指標の階級ごとの生存率および成長傾向を確認した(図2)。その結果、地形的水分指標が高く湿潤な階級ほど、3試験地のいずれにおいても生存率が高く、特に降水量の少ない瀬戸内地域の岡山、愛媛においてその傾向がより明瞭であった(図2左)。成長についても、地形的水分指標が高い階級、すなわち湿潤条件ほど平均樹高が高かった(図2中央)。

若齢時の苗木成長におけるフィールドでの乾燥応答性評価に適する地形的水分指標の算出について検討した結果、UAV空撮画像からの高精細DEMのメッシュ解像度と、個体周囲の平均化範囲の組み合わせを変化させ、各系統の乾燥応答性を捉えるのに適するメッシュ解像度等の条件探索をする手法を開発した。また小課題1で開発された水分指標に対する環境応答性評価モデルを本小課題における若齢時の苗木個体のデータに適用し、乾燥した環境での樹高成長における系統間の差異を抽出できることを確認した(図2右)。

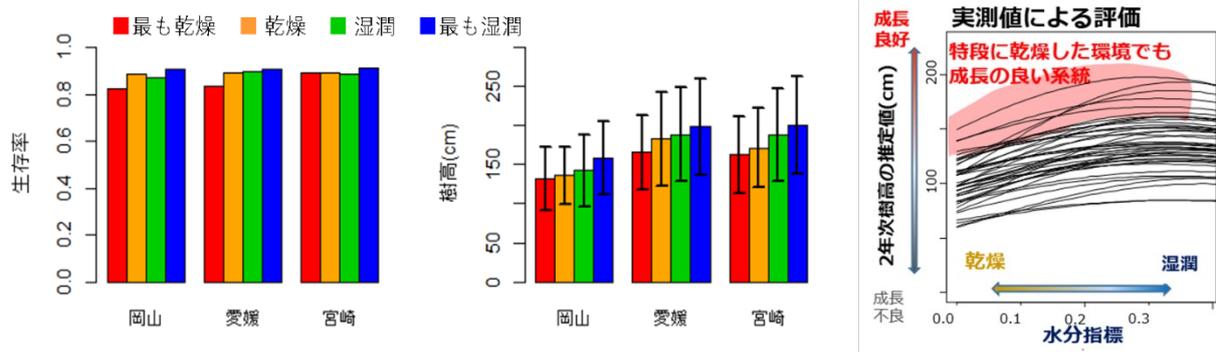


図2 岡山・愛媛・宮崎における地形的水分指標階級ごとの生存率(左)と樹高(中央)の平均値、および小課題1で開発した環境応答性評価手法を本小課題の試験地に適用した結果(右)。

(2) 気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術の開発

大規模SNP遺伝子型データとして、多数のスギ精英樹系統の遺伝子型情報の取得を完了した(表2)。また大規模SNP遺伝子型データを活用し、小課題3で選定した九州から東北までの全国4育種基本区におけるスギ精英樹の雄花着花量を推定するためのマーカー情報に基づいてゲノム予測精度の評価を行い、マーカーセットの有効性を確認し、各育種基本区における雄花着花性のためのゲノム予測用マーカー整備を完了した。

表2 全国のスギ精英樹を対象として実施した遺伝子型情報の収集

精英樹の遺伝子型情報を収集	
集団(育種基本区等)	Axiom Genotyping 実施クローン数
北関東	181
南関東	159
九州	136
関西	165
東北	164

Affymatrix: Axiom Genotyping

GWASやゲノミック予測に利用 → 小課題1 小課題2 小課題3

また小課題1の乾燥試験で実施した多数系統についての表現型解析モデルで得られた特性評価値と大規模遺伝子型情報を用いて、苗木段階での乾燥適応性に関するゲノム予測モデルの構築を試行した。その結果、ゲノム予測の有効性が確認されたため、寄与度の高かったSNPのデータから乾燥適応性を予測して素材候補を早期に予備抽出するためのマーカーセットとした。この苗木を用いた乾燥試験でのモデル予測精度は、大量のスギ系統群の中から詳細な乾燥試験の本試験に供する候補系統を選定する際の、予備スクリーニングとして有効と考えられる。

小課題1での大規模フィールドデータをもとに評価した山での成長の乾燥適応性やさし木苗を用いた乾燥試験にもとづく乾燥適応性、さらに遺伝子情報も活用した小課題2における環境適応性や小課題3における雄花着花性に関する系統評価手法を総合して、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術を体系化し、これをもって本委託プロジェクトでの作出技術開発を達成した(図4)。この作出技術体系において、人工環境試験での乾燥耐性等の系統ごとの評価値について、全試験系統のうちランキング上位2%相当以上を得点5、上位2~4%を得点4といった形で評価項目ごとスコア化して集計して総合得点を算出した。乾燥ストレス下において葉の生理活性の低下が緩やかである、あるいは再灌水後の伸長回復に優れるといった乾燥適応性のいずれかの評価項目において特段優れた特性を示したものは19系統存在し、これらを本プロジェクトで作出した育種素材とし、今後の気候変動適応育種に活用することとした。その中には、九州~東北の4育種基本区選抜の精英樹がそれぞれに複数系統含まれており、成長に優れ、現在の種苗生産事業にも反映されている特定母樹や花粉発生源対策に資する少花粉品種・無花粉遺伝子を保有する系統なども含まれていた。また、各個別の乾燥適応性の項目ではこれらに準ずる性能であったものの、総合得点が高く且つ成長に特段優れた系統や、総合得点が高く且つ少花粉性・無花粉性を有する系統など、複合的観点から有益性が見込まれる系統についても、各地域における今後の品種開発の持続性を確保するための遺伝的多様性を損ねぬよう気候変動適応育種に活用したいと考える。

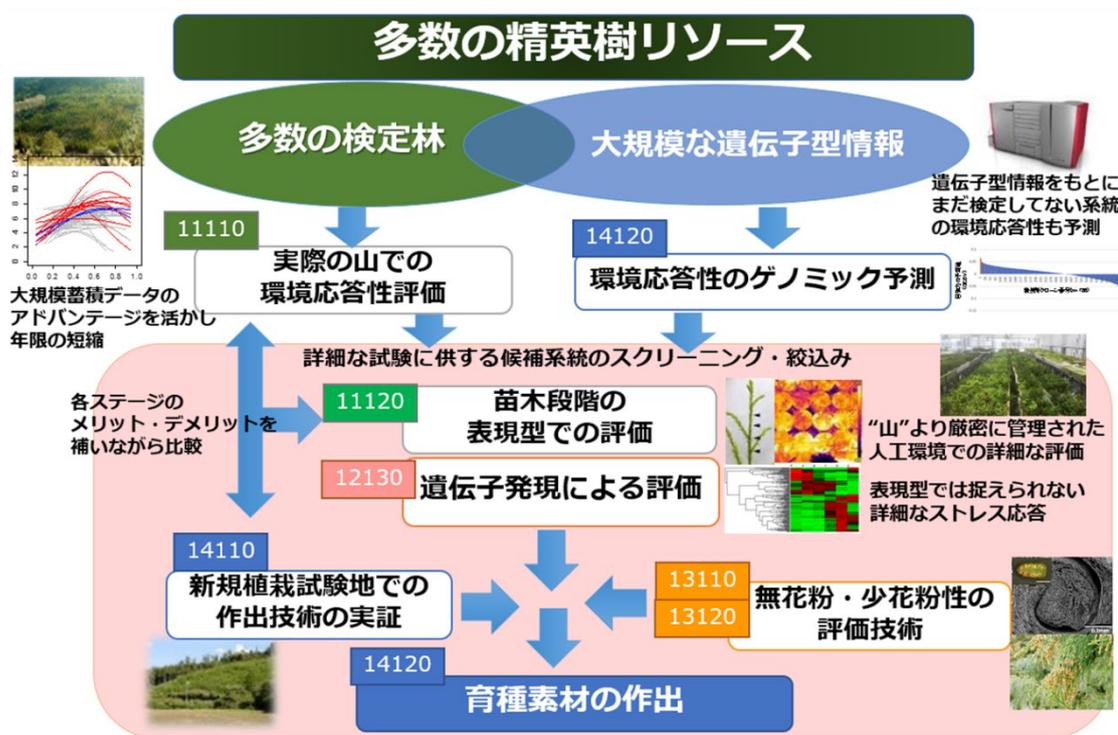


図3 本プロジェクト成果を総合し体系化した、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギの作出技術のフロー図

#### 4) 成果活用における留意点

本小課題における新規植栽試験地を活用した環境御応答性評価を実施する際には、検定対象となる各系統について、降水量や地形等の環境条件が十分なレンジをカバーして検定でき

るようにGIS情報等を活用して試験設計を立案することが重要である。

また一連の評価手法を用いて、多数の系統についての確に環境応答性を評価するためには、環境応答性の特性が既知であり、検定回数が多い系統を対照系統として試験に供試することが信頼性の高い系統評価を行う上で重要である。

## 5) 今後の課題

本プロジェクトでは、これまでの林木育種事業により系統特性情報が充実している第一世代精英樹等を中心として、クローン増殖により反復を設けることができ評価の頑健性が期待できるさし木苗を用いて、評価手法開発と系統評価を進めた。小課題4では第二世代系統も活用した実証試験に取り組み、第一世代と同様に評価手法を適用できることが確認できた。今後、事業的観点では、スギの次世代育種集団において気候変動適応性を好ましい形で集積し、より優れたスギを作出していく育種を進めるうえでも、次世代系統を対象とした系統評価を引き続き推進していく必要がある。

また、今後の研究という観点では、小課題1等で開発した手法を用いて評価した乾燥ストレスに対する系統特性が、次世代にどのように遺伝するのかといった遺伝様式についても、ストレス応答関連形質の表現型や遺伝子発現レベルの解析等も行いつつ解明し、気候変動適応策と花粉症発生源対策に資するスギを効率的に作出可能な次世代育種戦略の構築に向けた研究を進めていくことが重要である。本プロジェクトを通じて、我が国で初となる気候変動適応策に資する造林木の育種素材作出技術をスギに関して体系的に開発することができた。ここで得られた知見を活用しつつ、ビッグデータを活用するためのデータベース整備や大規模データセットを高速に計算するためのAI等の新たな統計手法の活用、また日進月歩で開発されるであろうハイスループットな遺伝子解析技術や表現型測定機器等の技術導入を図り、国土の約70%が森林である我が国の気候変動適応策をより一層強化していくことも今後の新たな展開の可能性を拓ける上で重要であろう。

### Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

課題番号 16781353

中課題名 気候変動に適応した花粉発生源対策スギの作出技術開発

#### 成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		PCT 出願	報道件数	普及しうる成果	発表会の主催	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得					
16781353	2	6	31	4	6	0	0	0	0	0	2	0	1	13

注1)「学術論文」や「学会等発表」等の件数は直接本事業の成果を含むものに限定してカウントすること。

注2)特許権等のカウントは直接本事業の研究成果によるものに限定すること。

注3)特許権等について、出願公開前で知財マネジメント上、公表することが望ましくない場合に限り、「非公表」の様式に計上し記入すること。

～に上記集計表の明細を記載する。）

#### 学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻	掲載ページ
1	①	Identification of novel putative causative genes and genetic marker for male sterility in Japanese cedar	Mishima,K.ら	国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	BMC Genomics	<a href="https://doi.org/10.1186/s12864-018-4581-5">https://doi.org/10.1186/s12864-018-4581-5</a>	2018	4	19	277
2	①	Potential of genome-wide studies in unrelated plus trees of a coniferous species, Cryptomeria japonica	Hiraoka,Y.ら	国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター、九州大学	Frontiers in Plant Science	<a href="https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01322">DOI: 10.3389/fpls.2018.01322</a>	2018	9	9	1322
3	①	スギ精英樹のさし木苗における根系形質の遺伝的変異および地上部初期成長との関連性	福田有樹ら	国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	日本森林学会誌	<a href="https://doi.org/10.4005/jifs.100.218">https://doi.org/10.4005/jifs.100.218</a>	2018	12	100	218-223
4	①	雄性不稔スギ「爽春」の雄性不稔原因遺伝子を持つ個体を検出する簡易DNAマーカーの開発	坪村美代子ら	国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	日本森林学会誌	<a href="https://doi.org/10.4005/jifs.101.155">https://doi.org/10.4005/jifs.101.155</a>	2019	8	101	155-162

5	①	Effects of day length- and temperature-regulated genes on annual transcriptome dynamics in Japanese cedar ( <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don), a gymnosperm indeterminate species.	Nose,Mら	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	PLOS ONE	<a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229843">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229843</a>	2020	2	15	e0229843.
6	①	Transcriptome Analysis in Male Strobilus Induction by Gibberellin Treatment in <i>Cryptomeria japonica</i> D.Don.	Kurita,Mら	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター	Forest	<a href="https://doi.org/10.3390/f11060633">https://doi.org/10.3390/f11060633</a>	2020	6	11	633
7	①	SNP genotyping with target amplicon sequencing using a multiplexed primer panel and its application to genomic prediction in Japanese cedar, <i>Cryptomeria japonica</i> (D. Don)	Nagano,Sら	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター	Forest	<a href="https://doi.org/10.3390/f11090898">https://doi.org/10.3390/f11090898</a>	2020	7	11	898
8	①	Evaluation of Responsivity to Drought Stress Using Infrared Thermography and Chlorophyll Fluorescence in Potted Clones of <i>Cryptomeria japonica</i>	Takashima,Yら	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター	Forest	<a href="https://doi.org/10.3390/f12010055">https://doi.org/10.3390/f12010055</a>	2021	1	12	55

注1) 和文、欧文の順で記載。発行年は発行年月とする。

注2) 区分①の原著論文は、謝辞等に本事業予算の支援を受けたことが明記されていること。また、論文は直接本事業の成果を掲載したものに限定して記載すること。

注3) 「機関名」は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

注4) 論文のDOIを登録している場合は、そのDOIを記載する。登録がない場合は「なし」と記載する。

学会等発表

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	スギにおけるジベレリン処理から雄花着花までの遺伝子発現プロファイル	三嶋賢太郎、栗田学、坪村美代子、平尾知士、能勢美峰、高島有哉、大平峰子	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会	2016	11
2	赤外線サーモグラフィーによるスギの蒸散速度評価手法の検討	高島有哉、平岡裕一郎、松下通也、山野邊太郎、大平峰子、三嶋賢太郎、高橋 誠、平尾知士、栗田 学、武津英太郎、花岡 創	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会	2016	11
3	異なる温度条件下で育成したスギの形質評価	高島有哉、三嶋賢太郎、大平峰子	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第128回日本森林学会大会	2017	3
4	スギの成長と試験地内微小環境との関係性の解析 -九州育種基本区の事例-	武津英太郎、松下通也、栗田学、倉本哲嗣、平岡裕一郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第128回日本森林学会大会	2017	3
5	Accuracy of Genomic Prediction Based on the Plus-Tree Populations in <i>Cryptomeria japonica</i>	平岡裕一郎、平尾知士、三嶋賢太郎、田村美帆、武津英太郎、井城泰一、坪村美代子、能勢美峰、大平峰子、花岡創、栗田学、高橋誠、星比呂志、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	Plant and Animal Genome XXV Conference	2017	1
6	Putative causative genes discovery and marker development for male sterility aiming at marker assisted selection using high-density linkage map based QTL analysis in Japanese cedar.	三嶋賢太郎、坪村美代子、平尾知士、田村美帆、栗田学、能勢美峰、花岡創、大平峰子、高島有哉、武津英太郎、井城泰一、三浦真弘、平岡裕一郎、高橋誠、星比呂志、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	Plant and Animal Genome XXV Conference	2017	1
7	乾燥ストレスに対するスギの遺伝子発現動態	平尾知士、高島有哉、三嶋賢太郎、能勢美峰	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第6回大会	2017	11
8	土壌の乾燥に対するスギ生理的応答性クローン間変異	高島有哉、平岡裕一郎、松下通也、山野邊太郎、大平峰子、三嶋賢太郎、坪村美代子、高橋誠、平尾知士、花岡創、栗田学、武津英太郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第6回大会	2017	11
9	スギの複数器官における遺伝子発現の統合解析	三嶋賢太郎、能勢美峰、栗田学、坪村美代子、平尾知士、平岡裕一郎、花岡創、井城泰一、大平峰子、高島有哉、松下通也、高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第6回大会	2017	11
10	スギにおけるジベレリン処理による雄花着花量に関与するQTLの検出とジベレリン処理による雄花形成過程における遺伝子発現プロファイリング	三嶋賢太郎、坪村美代子、栗田学、平尾知士、能勢美峰、高島有哉	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	育種学会第133回講演会	2017	3

11	林木育種の次世代化にむけて	高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	林木育種事業60周年記念シンポジウム	2017	2
12	マクロ・ミクロ環境に対するスギの樹高成長の応答性における系統間差	松下通也、武津英太郎、花岡創、平岡裕一郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第129回日本森林学会大会	2018	3
13	少降水量地域におけるスギ精英樹と花粉症対策品種の植栽当年の成長	三浦真弘、牧本卓史、中岡圭一、木村光男、上杉基、武津英太郎、栗田学、倉本哲嗣、平岡裕一郎、高橋誠、星比呂志	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、岡山県農林水産総合センター森林研究所、愛媛県農林水産研究所林業研究センター、宮崎県林業技術センター	第129回日本森林学会大会	2018	3
14	遺伝子発現レベルからみたスギの乾燥ストレス応答のクローン間差	能勢美峰、高島有哉、永野総一郎、平尾知士	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第7回大会	2018	11
15	スギさし木苗における根系形質に関する遺伝的特性評	福田有樹、平岡裕一郎、大平峰子、高橋誠、井城泰一、三浦真弘、栗田学、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	森林遺伝育種学会第7回大会	2018	11
16	Reconstruction of a full-length transcriptome of Cryptomeria	Hrao T., Nagano S., Nose M.	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	Plant and Animal Genome XXVII	2019	1
17	気候変動に適応したスギ優良品種の開発に向けた取組	平岡裕一郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	平成30年度林木育種成果発表会	2019	2
18	スギにおける無花粉形質に関するマーカーの開発とそれを活用した育種素材の選抜	三嶋賢太郎、平尾知士、坪村美代子、田村美帆、栗田学、能勢美峰、花岡創、大平峰子、平岡裕一郎、倉本哲嗣、高橋誠、星比呂志、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	日本植物育種学会	2019	3
19	遺伝子発現プロファイルからみたスギの乾燥応答の種内変異	能勢美峰、高島有哉、永野総一郎、松下通也、平岡裕一郎、平尾知士	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	日本植物育種学会	2019	3
20	気候変動に適応したスギ育種素材の作出技術開発の取り組み	松下通也	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第130回日本森林学会大会	2019	3
21	「雄花着花量の異なるスギクローンのジベレリン処理後の遺伝子発現解析」	坪村美代子、三嶋賢太郎、平尾知士、永野総一郎、平川英樹	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、かずさDNA研究所	第130回日本森林学会大会	2019	3

22	土壌乾燥ストレスに対するスギの成長及び生理的応答の評価手法の開発	高島有哉、平岡裕一郎、松下通也、山野邊太郎、大平峰子、三嶋賢太郎、平尾知士、田村明、坪村美代子、井城泰一、三浦真弘、栗田学、武津英太郎、高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第130回日本森林学会大会	2019	3
23	気候が異なる西南日本の3地域におけるスギ精英樹の初期成長	三浦真弘、牧本卓史、中岡圭一、木村光男、上杉基、武津英太郎、栗田学、久保田正裕、倉本哲嗣、平岡裕一郎、高橋誠、星比呂志	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、岡山県農林水産総合センター森林研究所、愛媛県農林水産研究所林業研究センター、宮崎県林業技術センター	第130回日本森林学会大会	2019	3
24	宮崎県に植栽したスギ精英樹の初期成長に影響する微小環境指標の検討	武津英太郎、栗田学、久保田正裕、三浦真弘、松下通也、平岡裕一郎、倉本哲嗣、上杉基、井上万希、小田三保、三樹陽一郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、宮崎県林業技術センター	森林遺伝育種学会第8回大会	2019	11
25	スギ第一世代精英樹の水分指標に対する成長応答性の多数系統評価	松下通也、平岡裕一郎、武津英太郎、花岡創	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第8回大会	2019	11
26	スギの高温環境応答の遺伝子発現プロファイリング	永野聡一郎、能勢美峰、高島有哉、松下通也、三嶋賢太郎、平尾知士	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第8回大会	2019	11
27	スギの高温環境下における成長および光合成活性応答のクローン間変異	高島有哉、能勢美峰、松下通也、三嶋賢太郎、高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	森林遺伝育種学会第8回大会	2019	11
28	岡山・愛媛・宮崎に共通植栽したスギ精英樹の初期成長	三浦真弘、新原一海、坪田幸徳、木村光男、上杉基、武津英太郎、栗田学、高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、岡山県農林水産総合センター森林研究所、愛媛県農林水産研究所林業研究センター、宮崎県林業技術センター	森林遺伝育種学会第8回大会	2019	11
29	Extraction of Differential Expressed genes in high temperature environmental response of Japanese cedar, <i>Cryptomeria japonica</i> .	永野聡一郎、能勢美峰、高島有哉、松下通也、三嶋賢太郎、平尾知士	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	Plant and Animal Genome Conference XXVIII	2020	1
30	西南日本の3地域におけるスギ精英樹の植栽2年後の成長	三浦真弘、新原一海、坪田幸徳、木村光男、上杉基、武津英太郎、栗田学、高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、宮崎県林業技術センター	第131回日本森林学会大会	2020	3

31	高温環境下におけるスギの発現変動遺伝子群の系統間比較	永野聡一郎、能勢美峰、高島有哉、松下通也、三嶋賢太郎、平尾知士	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第131回日本森林学会大会	2020	3
32	スギの生育および雄花着花に影響を与える環境要因の解明とその評価	永野聡一郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第132回日本森林学会大会	2021	3
33	人工環境下におけるスギ苗の環境応答性評価技術の開発と多数系統評価	高島有哉	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第132回日本森林学会大会	2021	3
34	大規模データから明らかにするスギの成長における環境応答性	松下通也	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第132回日本森林学会大会	2021	3
35	高温・乾燥がスギ雄花着花量に与える影響の評価	坪村美代子	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	第132回日本森林学会大会	2021	3

注1)「機関名」は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

#### 出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	④	気候変動に適応するためのスギの育種技術開発	高橋誠	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター		2017	1
2	④	「爽春」の無花粉遺伝子を高い精度で判定できるDNAマーカーの開発	三嶋賢太郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター		2017	7
3	④	新たな無花粉スギ品種の開発と今後の品種改良を促進するDNAマーカーの開発	大平峰子、三嶋賢太郎、坪村美代子、平岡裕一郎、加藤一隆、高橋誠、星比呂志、平尾知士、栗田学、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学		2017	7

4	④	成長の優れた無花粉スギ品種の早期開発のためのマーカー支援選抜の事業化	大平峰子、三嶋賢太郎、坪村美代子、平岡裕一郎、加藤一隆、高橋誠、星比呂志、平尾知士、栗田学、渡辺敦史	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立大 学法人九州大学	2019	1
5	④	無花粉スギ苗木普及促進のための技術マニュアル	大平峰子、斎藤大剛、斎藤己、高橋誠、田中功二、坪村美代子、中村健一、袴田哲司、福田拓実、山田晋也、山野邊太郎、山本茂弘、渡部公一	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立大 学法人九州大学、神 奈川県、富山県、青森	2020	3
6	④	スギ無花粉遺伝子をヘテロで保有する精英樹系統のリソースの構築とその利用	三嶋賢太郎	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター	2020	10

注1) 機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

注2) 複数機関ある場合は著者名の順番と合わせる。

#### 国内特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日
		「該当無し」						

注1) 複数の機関による共同出願の場合は、主となる出願人の下に行を追加し、共同出願人の情報を記載する。

#### 国際特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日	出願国
		「該当無し」							

注1) 複数の機関による共同出願の場合は、主となる出願人の下に行を追加し、共同出願人の情報を記載する。

注2) 特許協力条約に基づく出願の場合は、出願国に「PCT」と記載し、当該様式冒頭の「成果等の集計数」欄には1件として記載する。

報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載年月日	備考
1	①	無花粉スギ「爽春」の無花粉遺伝子を有したスギを高い精度で検出できるDNAマーカーを開発	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学		2017/2/13	
2	①	雄性不稔遺伝子をヘテロで保有する精英樹系統のリソースを構築	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学		2020/3/16	

注1)「機関名」は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

注2)「掲載誌、放送社名等」には同様の記事が複数社で報道された場合は全ての社名を記載する。

注3)Web上に掲載している場合は、「備考」にURL等を記載すること。

普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの。

整理番号	区分	成果の名称	機関名	普及年月	主な利用場面	普及状況
		「該当無し」				

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

発表会の主催の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者数	備考
1	気候変動適応育種の可能性を探る—大規模データと分子データから明らかにするスギのストレス応答—	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター	東京大学弥生講堂 一条ホール	2020/2/14	40	

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

注2)概要等をWeb上に掲載している場合は、「備考」にURL等を記載すること。

アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者数	主な参加者	備考
1	①	林木育種事業60周年記念シンポジウムにおいて、本プロジェクトで得られた成果について説明。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	木材会館	2018/2/16	247	林野庁、都道府県、大学、林業関係者ほか	
2	③	平成30年度林業研究・技術開発推進関東・中部ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター、国立大学法人九州大学	農林水産省	2018/9/27	55	林野庁、都県	

3	③	平成30年度林業研究・技術開発推進九州ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	九州森林管理局	2018/10/10	43	林野庁、県、大学	
4	③	令和元年度林業研究・技術開発推進北海道ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	かでの2・7	2019/9/25	43	林野庁、道、大学	
5	③	令和元年度林業研究・技術開発推進東北ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	森林総合研究所東北 支所	2019/10/15	41	林野庁、県、大学	
6	③	令和元年度林業研究・技術開発推進関東・中部ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	農林水産省	2019/9/19	55	林野庁、都県	
7	③	令和元年度林業研究・技術開発推進近畿・中国ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	近畿中国森林管理局	2019/10/2	50	林野庁、府県	
8	③	令和元年度林業研究・技術開発推進九州ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	九州森林管理局	2019/10/9	47	林野庁、県、大学	
9	③	令和2年度林業研究・技術開発推進北海道ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	WEB開催	2019/9/24	43	林野庁、道	

10	③	令和2年度林業研究・技術開発推進東北ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	WEB開催	2020/10/6	41	林野庁、県	
11	③	令和2年度林業研究・技術開発推進関東・中部ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	WEB開催	2019/9/14	55	林野庁、都県	
12	③	令和2年度林業研究・技術開発推進近畿・中国ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	WEB開催	2020/9/29	50	林野庁、府県	
13	③	令和2年度林業研究・技術開発推進九州ブロック会議育種分科会において、本プロジェクトで得られた成果について情報提供。	国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所林木 育種センター、国立 大学法人九州大学	WEB開催	2020/10/14	47	林野庁、県、大学	