

学 位 論 文 題 名

AFLP マーカーを用いたスサビノリ
(紅色植物門, ウシケノリ目) の遺伝連鎖地図

学位論文内容の要旨

海産紅藻アマノリ属植物は重要な水産植物であり、高品質株や病害抵抗性株の作出など、育種へのニーズが高まっているが、海藻類の遺伝育種に関する研究は、魚介類等他の水産生物と比較して十分ではなく、その基盤技術の確立は緊急の課題である。近年、DNA マーカーは多くのモデル生物で遺伝地図作成の際のランドマークとして利用されており、多くの家畜、農作物、水産生物の遺伝育種研究にもその威力を発揮している。アマノリ属植物においても、効率的な遺伝地図作成のため、DNA マーカーの研究開発が強く望まれる。DNA マーカーの 1 つである AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーは、DNA を 2 つの制限酵素で切断し、その断片に付加塩基のアダプターを接合し 2 回の PCR によって DNA 多型を検出する方法であり、分離型は主として優性を示す。AFLP マーカーは、1 回のスクリーニングで多重座位や多くの多型を検出可能である。また、コストも低いこと、迅速に解析可能であることから、多くの生物で AFLP を用いた遺伝地図の作成、または、集団遺伝学や系統解析などに多く用いられている。

本論文は、5 つの章より構成され、第 1 章では、全体における緒言を示し、第 2 章において海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) の遺伝地図作成の一環として純系株を作出し、AFLP による DNA 多型解析を行なった。第 3 章および第 4 章では、純系 2 株の交配実験を行い、得られた交配家系の AFLP マーカーによる遺伝地図を作成した。第 5 章では、研究の総括を行い、遺伝地図作成における今後の課題ならびに研究方針について論じた。

第 2 章において、スサビノリの純系株の作出を行い、この純系株 TUH-25 は野生型純系株 TU-1 と比較すると、赤色型の色素変異体であり、成長速度は速く、単胞子の放出量は同様であった。葉状体は縁辺が激しく波打つ形態を呈した。本研究で作出された純系株 TUH-25 と以前に純系化が行われていた TU-1, TU-2 の 3 株を用い、各々の DNA を抽出し、AFLP による DNA の多型解析を行なった。その結果、総バンド数は 227 本検出され、3 株間において多くの DNA 多型が見られた。このため、自殖や単胞子による増殖以外の他殖（他家受精）が起きていることが示唆された。

第 3 章において、スサビノリの純系株 TU-1 および TU-2 の葉状配偶体を用いて性成熟を誘導し、交配実験を行なった。TU-2 の未受精卵形成細胞（造果器）と TU-1 の雄性細胞

である精子嚢（造精器）部分を切り出し、最適な交配期間を特定するために 3 日、5 日、7 日間の通気培養による交配実験を行なった。その後、糸状胞子体の色彩および多型解析から交配株を単離し、殻胞子放出誘導を行なった。殻胞子放出後、発生したキメラ葉状体の色彩を指標に分割を行い、分割した葉状体から単胞子を放出させた。この単胞子世代 20 株の純系化を行なうと共に、表現形質の確認および凍結保存も行なった。この結果、スサビノリの交配に關しての効率化を行うことが可能になり、受精は、通気培養 5 日目に関りやすいことが示唆された。

第 4 章において、第 3 章により作出されたスサビノリ TU-1（父）および TU-2（母）の交配家系 20 個体（野生型 10 個体：緑色型 10 個体）を用いて、遺伝連鎖地図の作成を行なった。この純系株の表現形質や DNA マーカーを用いて連鎖解析を行うことで遺伝形質を特定し、遺伝子座を決定することが可能になる。DNA マーカーには、AFLP マーカーを用いて行なった。電気泳動結果より、母型・父型優性に現れたバンドと色彩の形質を振り分けた。また、電気泳動図から父型・母型バンドが近接的に存在し、相同なパターンを示したものを単一遺伝子座と判断した。連鎖解析の結果、父型（TU-1）の 144 マーカーと母型（TU-2）の 143 マーカーによる 2 つの遺伝連鎖地図が作成された。作成された遺伝地図は、3 つの連鎖群により構成され、スサビノリ染色体の本数は同じであった。また、父型と母型のマーカー数に違いが現れ、それぞれの連鎖群の距離においても違いが現れた。父型、母型ともに連鎖群 1 は主に父型のパターンが多く、単一遺伝子座と判断したものが 1 つ存在し、連鎖群 2 には色彩遺伝子座が載っており、連鎖群 3 には単一遺伝子座の数が多いもので構成されていた。父型の連鎖群 1 の地図距離の全長は 113.5 cM となり、母型は 68.3 cM であった。父型の連鎖群 2 の地図距離の全長は 509.6 cM となり、母型は 122.1 cM であった。父型の連鎖群 3 の地図距離の全長は 187.6 cM となり、母型は 529.3 cM であった。父型の 1 連鎖群あたりの地図距離の平均は 270.2 cM となり、母型は 239.9 cM であった。父型の全連鎖群には、5.6 cM に 1 つのマーカーが存在し、母型の全連鎖群では、5.0 cM に 1 つのマーカーが存在した。父型と母型の 1 連鎖群あたりの地図距離の平均は 255.1 cM であった。連鎖解析により、色彩の形質は父型 TU-1 由来のマーカーと多く連鎖し、母型 TU-2 由来の連鎖したマーカーは少ない結果となった。これは色彩遺伝子座が、TU-1 染色体由来であることが予想され、TU-2 の色彩に關する遺伝子は、何らかの影響により、欠損または欠失し、劣性遺伝した結果であると考えられる。

本研究により開発された AFLP 解析による遺伝連鎖地図は、大型藻類では世界に先駆けたものであり、スサビノリの遺伝学の発展に大いに貢献するであろう。また、AFLP 等の DNA マーカーを利用した遺伝連鎖地図は他の有用海藻類でも育種を進める上で有望であると思われる。スサビノリは、日本産でありながら国際的に通用する初のモデル植物となる可能性を秘めており、水産植物の研究領域にモデル植物という強力な実験系を導入することにより、その益々の活性化が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆

副 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 原 彰 彦

副 査 助 教 授 安 井 肇

学 位 論 文 題 名

AFLP マーカーを用いたスサビノリ

(紅色植物門, ウシケノリ目) の遺伝連鎖地図

海産紅藻アマノリ属植物は重要な水産植物であり、高品質株や病害抵抗性株の作出など、育種へのニーズが高まっているが、海藻類の遺伝育種に関する研究は、魚介類等他の水産生物と比較して十分ではなく、その基盤技術の確立は緊急の課題である。近年、DNA マーカーは多くのモデル生物で遺伝地図作成の際のランドマークとして利用されている。アマノリ属植物においても、効率的な遺伝地図作成のため、DNA マーカーの研究開発が強く望まれる。DNA マーカーの 1 つである AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーは、DNA を 2 つの制限酵素で切断し、その断片に付加塩基のアダプターを接合し 2 回の PCR によって DNA 多型を検出する方法であり、1 回のスクリーニングで多重座位や多くの多型を検出可能である。

本論文は、5 つの章より構成され、第 1 章では、全体における緒言を示し、第 2 章において海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) の遺伝地図作成の一環として純系株を作出し、AFLP による DNA 多型解析を行なった。第 3 章および第 4 章では、純系 2 株の交配実験を行い、得られた交配家系の AFLP マーカーによる遺伝地図を作成した。第 5 章では、研究の総括を行い、遺伝地図作成における今後の課題ならびに研究方針について論じた。

第 2 章において、スサビノリの純系株の作出を行い、この純系株 TUH-25 は野生型純系株 TU-1 と比較すると、赤色型の色素変異体であり、成長速度は速く、単胞子の放出量は同様であった。葉状体は縁辺が激しく波打つ形態を呈した。本研究で作出された純系株 TUH-25 と以前に純系化が行われていた TU-1, TU-2 の 3 株を用い、各々の DNA を抽出し、AFLP による DNA の多型解析を行なった。その結果、総バンド数は 227 本検出され、3 株間において多くの DNA 多型が見られた。このため、自殖や単胞子による増殖以外の他殖 (他家受精) が起きていることが示唆された。

第3章において、スサビノリの純系株 TU-1 および TU-2 の葉状配偶体を用いて性成熟を誘導し、交配実験を行なった。TU-2 の未受精卵形成細胞（造果器）と TU-1 の雄性細胞である精子嚢（造精器）部分を切り出し、最適な交配期間を特定するために3日、5日、7日間の通気培養による交配実験を行なった。その後、糸状胞子体の色彩および多型解析から交配株を単離し、殻胞子放出誘導を行なった。殻胞子放出後、発生したキメラ葉状体の色彩を指標に分割を行い、分割した葉状体から単胞子を放出させた。この単胞子世代 20 株の純系化を行なうと共に、表現形質の確認および凍結保存も行なった。この結果、スサビノリの交配に関しての効率化を行うことが可能になり、受精は、通気培養 5 日目に関わりやすことが示唆された。

第4章において、第3章により作出されたスサビノリ TU-1 (父) および TU-2 (母) の交配家系 20 株を用いて、遺伝連鎖地図の作成を行なった。連鎖解析の結果、父型 (TU-1) の 144 マーカーと母型 (TU-2) の 143 マーカーによる 2 つの遺伝連鎖地図が作成された。作成された遺伝地図は 3 つの連鎖群により構成され、スサビノリ染色体の本数と同じであった。色彩の形質は父型 TU-1 由来のマーカーと多く連鎖し、母型 TU-2 由来の連鎖したマーカーは少ない結果となった。これは TU-2 の色彩に関する遺伝子は、何らかの影響により、欠損または欠失し、劣性遺伝した結果であると考えられた。

主論文は平成 15 年 1 月 29 日 14 時から 15 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教官 8 名および一般聴講 18 名出席のもと発表された。一般聴講においては、交配の株の選定理由について質疑・応答がなされた。また、審査員および関連教官においては、父型・母型の連鎖地図の違い、交配の定義や今後の展望について質疑・応答がなされた。スサビノリの遺伝連鎖地図は、大型藻類では世界に先駆けたものであり、スサビノリの遺伝学の発展に大いに貢献すると判断し、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。