

学 位 論 文 題 名

クロマツの虫害抵抗性育種における
DNA マーカーの利用に関する研究

学位論文内容の要旨

クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) は本州、四国、九州の海岸沿いを中心に広く自生し、韓国にも分布する。本種は、古くから建築用材、加工品などに利用されてきたばかりでなく、祝賀を表現するものとして尊ばれるなど、日本人の文化と密接な関係がある。また、潮風に対する抵抗力もあるので、防風・防潮林として植えられることが多く、国土保全上必要な機能を有するものとして重要である。ところが、マツクイムシ、マツバノタマバエ等の害虫が年次変動はあるものの、マツ林に対して被害を及ぼしつづけているため、マツ林は存続の危機に瀕している。したがって今後、虫害抵抗性を有するマツの需要が増加するものと予想される。

また、林木は永年生の植物であるため、育種に非常に長い年月を要することが現段階での最大の問題の1つである。さらに、遺伝情報がごく限られていることが林木育種を一層困難にしている。したがって、森林に対し多様化する国民のニーズに応じ、さまざまな品種を育成していくには、育種年限を短縮する技術の開発が望まれている。

育種年限の短縮に資する方法の1つとして、目的形質遺伝子と強く連鎖したマーカーを選抜基準とした個体選抜 (MAS: Marker-Assisted Selection) が挙げられるが、林木では MAS に利用するために有用遺伝子と連鎖した DNA マーカーを検出した例は非常に少なく、わが国においては未だ報告されていない。マツバノタマバエ抵抗性は1個の優性遺伝子に支配されていることが明らかにされていたことから、抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーの検出は理論的には容易であり、わが国において MAS の研究の端緒を開くためにはマツバノタマバエ抵抗性が最適と考えた。本研究が成功すれば、他の有用形質、例えばマツノザイセンチュウ抵抗性等の MAS による育種を考えるうえで、弾みにもなると期待される。さらに、連鎖地図は、量的形質に関わる遺伝子の位置や数、遺伝効果の大きさ等の遺伝様式を明らかにし、MAS を可能にするための基盤になるものであるため、今後林木育種を進める上で必要不可欠である。しかし、ゲノム全体をカバーする高密度のクロマツ連鎖地図は未だ作成されていない。一方、テーダマツ、ラジアータマツなどにおいては、多くの遺伝子情報が集積されており、この遺伝情報を利用して、外国産マツの連鎖地図とクロマツの連鎖地図を比較検討することによって、連鎖地図上にあるマーカーや遺伝子の情報を相互に利用することが可能になると考える。

そこで、本研究では、以下の内容を課題として研究を行い、品種の開発に長い年月を要するクロマ

ツの育種を、これまでより効率化する技術の基盤を築こうと試みた。

- ①クロマツにおけるマツバノタマバエ抵抗性と連鎖した DNA マーカーの検出、
- ②連鎖したマーカーの抵抗性個体での保有状況およびマーカーの利用方法の検討、
- ③連鎖した DNA マーカーの SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) マーカー化、
- ④クロマツの連鎖地図の作成と、他のマツ樹種の連鎖地図との統合の可能性の検討、

本研究によって得られた成果の概要は、以下のとおりである。

1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) 分析において 1160 個のランダムプライマー、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) 分析において 1024 個のプライマー組合せをバルク法で検討した結果、マツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した 7 個の DNA マーカーを検出することに成功し、マツバノタマバエ抵抗性遺伝子近傍の連鎖地図を作成した。その結果抵抗性遺伝子は、ACGT/CCCGC₂₅₀ と ACCC/CCTTT₁₉₀、OPC06₃₈₀ の間に位置づけられた。ACCC/CCTTT₁₉₀、OPC06₃₈₀ は抵抗性遺伝子に最も近くに位置し、抵抗性遺伝子との地図距離は 6.6 cM だった。
2. これらの連鎖マーカーの抵抗性遺伝子に対する相(phase)を、複数の抵抗性個体で調査した。この結果、OPC06₃₈₀ を除いて、抵抗性個体により各連鎖マーカーの相は変化し、ホモ接合あるいは保有しない場合もみられた。したがって、連鎖マーカーを用いて抵抗性個体の選抜を行う際には、その相を考慮に入れる必要があることが明らかになった。抵抗性遺伝子と最も連鎖の強い OPC06₃₈₀ は、常に抵抗性遺伝子と相引の関係にあり、現段階ではもっとも広く利用可能であると考えられた。
3. マツバノタマバエ抵抗性と連鎖した 2 個の RAPD マーカーの DNA 断片をクローニングし、塩基配列を明らかにした。塩基配列にもとづいて、断片の両端にプライマーを設計し、増幅反応でのアニーリング温度条件を最適化することで RAPD マーカーを SCAR マーカーへ変換することができた。ここで開発した SCAR マーカーは、RAPD よりも長いプライマーを用いるとともに、より高いアニーリング温度条件で検出するため、再現性が高いと考えられる。したがって、このマーカーは、今後育種の現場で利用するのに RAPD マーカーよりも適している。
4. 151 個の AFLP、48 個の RAPD、6 個の EST および 2 個の CAPS が座乗する、20 連鎖群、3 連鎖対の連鎖地図を作成した。その全長は 2092.8 cM、平均マーカー間距離は 11.4 cM であった。マツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーは、すべて第 1 連鎖群上に存在することがわかった。クロマツ連鎖地図のそれぞれ第 2、10 連鎖群の *PuIFG9044*、*PuIFG8898* は、それぞれテーダマツの連鎖地図の第 6、4 連鎖群にあり、今後両連鎖地図を連結することができると考えられた。

以上、本研究で見出されたマツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを、今後抵抗性の簡易な確認方法として用いることによって抵抗性育種の効率化に貢献できる。また、本研究で作成されたクロマツの連鎖地図を基盤として、多数の有用遺伝子やマーカーを組み込み、より正確で精度の高い連鎖地図を作成することにより、QTL などの遺伝情報が明らかになるであろう。さらに、テーダマツの連鎖地図と連結が進めば、他のマツの情報を利用できるといえる。こうして、有用形質遺伝子に関わる領域が明らかになれば、時には検定に数十年要する林木育種のサイクルを、DNA マーカーを利用して大幅に短縮することが可能となり、付加価値の高い優れた品種を創出できると期待される。このような品種を創出できれば、衰退する林業の再生

を支える一つの要因になるとともに、枯れて失われつつある日本のマツ林を再生させ、日本の国土、文化を守る手段となると考える。

学位論文審査の要旨

主査	教授	寺沢	実
副査	教授	高橋	邦秀
副査	教授	矢島	崇
副査	助教授	玉井	裕
副査	外部研究者	河原	孝行 (森林総合研究所)

学位論文題名

クロマツの虫害抵抗性育種における DNA マーカーの利用に関する研究

クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) は本州、四国、九州の海岸沿いを中心に広く自生し、韓国にも分布する。本種は、建築用材、加工品などに利用されてきたばかりでなく、祝賀を表現するものとして尊ばれるなど、日本人の文化と密接な関係がある。また、耐潮性があるため、防風・防潮林として植えられることが多く、国土保全上必要な機能を有するものとして重要である。ところが、マツクイムシ、マツバナタマバエ等害虫がマツ林に対して被害を及ぼしつづけているため、マツ林は存続の危機に瀕している。したがって今後、虫害抵抗性を有するマツの需要が増加するものと予想される。また、林木は永年生の植物であるため、遺伝情報がごく限られており、林木の育種には非常に長い年月がかかる。したがって、さまざまな品種を効率的に育成していくには、育種年限を短縮する技術の開発が強く望まれている。

育種年限の短縮に資する方法の 1 つとして、目的形質遺伝子と強く連鎖したマーカーを選抜基準とした個体選抜 (MAS: Marker-Assisted Selection) が挙げられる。マツバナタマバエ抵抗性は 1 個の優性遺伝子に支配されていることが明らかにされていたことから、抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーの検出は理論的には容易であり、わが国において MAS の研究の端緒を開くためにはマツバナタマバエ抵抗性が最適と考えた。本研究が成功すれば、他の有用形質、例えばマツノザイセンチュウ抵抗性等の MAS による育種を考えるうえで、弾みにもなると期待される。さらに、連鎖地図は MAS を可能にする基盤になるものであるため、林木育種を進める上で必要不可欠である。しかし、ゲノム全体をカバーする高密度のクロマツ連鎖地図は未だ作成されていない。一方、外国のマツには、多くの遺伝子情報が集積されており、この遺伝情報を利用して、連鎖地図上にあるマーカーや遺伝子の情報を相互に利用することが可能になると考える。

本研究は、マツバノタマバエ抵抗性育種に実際に利用可能な DNA マーカーを開発するとともに、連鎖地図を作成することにより、今後 DNA マーカーを用いた虫害抵抗性育種の基盤を築こうと試みた。

第一の成果として、マツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した 7 個の DNA マーカーを検出することに成功し、マツバノタマバエ抵抗性遺伝子近傍の連鎖地図を作成した。*ACCC/CTTT*₁₉₀, *OPC06*₅₈₀ は抵抗性遺伝子に最も近くに位置し、抵抗性遺伝子との地図距離は 6.6 cM だった。第二に、これらの連鎖マーカーの抵抗性遺伝子に対する相(phase)を、複数の抵抗性個体で明らかにした。*OPC06*₅₈₀ を除いて、抵抗性個体により各連鎖マーカーの相は変化し、ホモ接合あるいは保有しない場合もみられることから、抵抗性個体の選抜を行う際には、その相を考慮に入れる必要があることが明らかになった。*OPC06*₅₈₀ は、常に抵抗性遺伝子と相引の関係にあり、現段階ではもっとも広く利用可能であると考えられた。第三に、マツバノタマバエ抵抗性と連鎖した 2 個の RAPD マーカーをより再現性の高い SCAR マーカーへ変換した。このマーカーは、RAPD マーカーよりも簡便で再現性が高いため、育種の現場で利用するのに適している。第四に、207 個の AFLP, RAPD 等による、20 連鎖群、3 連鎖対の連鎖地図を作成した。その全長は 2092.8 cM、平均マーカー間距離は 11.4 cM であった。マツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーは、第 1 連鎖群上に存在していた。クロマツの連鎖地図の第 2, 10 連鎖群に座乗した EST は、それぞれテーダマツの連鎖地図の第 6, 4 連鎖群にあることが明らかにされており、今後マーカーを増やすことによって両連鎖地図を連結する可能性が示された。

本研究で見出されたマツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを、抵抗性の簡易な確認方法として用い、抵抗性育種の効率化に貢献できる。また、作成されたクロマツの連鎖地図を基盤として、多数の有用遺伝子やマーカーを組み込み、より正確で精度の高い連鎖地図を作成することにより、QTL などの遺伝情報が明らかになる期待される。さらに、テーダマツの連鎖地図と連結し、遺伝情報を相互に利用する道が開かれたといえる。有用形質遺伝子に関わる領域が明らかになれば、長期を要する林木育種のサイクルを、DNA マーカーを利用して大幅に短縮することができる。こうして優れた品種を効率的に創出できれば、衰退する林業の再生を支える一つの要因になるとともに、枯れて失われつつある日本のマツ林を再生させ、日本の国土、文化を守る手段となると考えられる。本研究は、先端的林木育種技術の開発の端緒を開くものであり、クロマツの育種の推進において重要な成果をあげたといえる。

よって審査員一同は、林 英司が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。