

氏名	こにし たけ ひこ 小西武彦
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1534号
学位授与の日付	平成18年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	Development of microsatellite markers and their application to the study on the origin of common buckwheat (マイクロサテライトマーカーの開発と栽培ソバの起原に関する研究への応用)
論文調査委員	(主査) 教授 大西近江 教授 遠藤 隆 教授 谷坂隆俊

論 文 内 容 の 要 旨

栽培ソバの起原に関して、これまで、アロザイム、RAPD、AFLPといった分子マーカーを用いることにより、野生祖先種が自生する中国西南部のいわゆる三江地域で栽培ソバが起原し、世界各地に伝播したことが明らかとなった。しかし、研究が進んでいく中で、先にあげたような分子マーカーでは解決するのが難しい問題(遺伝的多様性中心地の同定、栽培集団間のより詳細な遺伝的類縁関係、栽培集団と野生祖先種集団の間の遺伝子交流など)が出てきた。マイクロサテライトマーカーは、ゲノム中に多数存在するサテライトDNAを利用した分子マーカーであり、短い塩基配列の繰り返し数の違いを多型として検出する。RAPDやAFLPと違い共優性を示し、また、共優性のアロザイムと比べても多くの対立遺伝子を検出できる利点があることから、多くの作物でマイクロサテライトマーカーが開発され、集団の多様性の遺伝学的研究や品種同定、QTL分析などの育種学的研究に用いられてきた。ソバでは、これまでに少数(5個)のマーカーしか開発されていなかったため、本研究ではより多くのマーカーを開発することを目的とした。

本論文は3つの章からなっている。第1章では、ソバにおいて180個のマイクロサテライトマーカーを開発したことを述べている。植物ゲノムに多く存在する(GA)反復と(GT)反復が豊富に含まれるマイクロサテライト濃縮ライブラリーを作成し、2785クローンについて塩基配列を決定した。マイクロサテライトを含むユニークなクローンが352個得られ、そのうち、237個についてプライマーを作成することができた。237組のプライマーに対して、実際にPCRによりマイクロサテライト領域が増幅されるかどうかを調べたところ、180組でPCR産物が観察され、マイクロサテライトマーカーとして利用できることが明らかとなった。180組のうち54組では、予想されるサイズのバンド1個を検出し、集団の多様性の遺伝学的研究に用いることができることが明らかとなった。残りの126組では、予想されるサイズ以外にもバンドが見られた。複数のバンドが検出された場合、どのバンドとどのバンドがオルソログスなのか分からないので、遺伝学的研究に用いることは難しいが、品種同定や連鎖地図作成といった育種学的研究に用いることができる。

第2章では、開発したマイクロサテライトマーカーを3つの側面から評価したことを述べている。まず、1個のバンドを検出する54マーカーについて、各マーカーがどの程度の遺伝的変異を検出できるかを、世界中の栽培ソバ34系統から1個体ずつを集めた人為的集団を用いて調べたところ、マーカーあたり平均12.2個の対立遺伝子を検出することができた。多型情報指標値(PIC値)は0.79であり、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝学的研究が行われている他の作物のPIC値より大きな値であった。このことから、今回開発したマーカーがソバ集団の変異を十分検出でき、遺伝学的研究に用いることができると考えられる。次に、同じ54マーカーについて、各マーカーがソバ属内の7つの近縁種でも利用できるかを調べた。ソバ野生祖先種では全てのマーカーが利用できることが明らかとなった。ソバ属のもう一つの栽培種であるダットンソバにおいても63.0%のマーカーが利用できることが分かり、開発したマーカーが育種が遅れているダットンソバの育種に新しい道を開く可能性を示している。最後に、各マイクロサテライトマーカーがゲノム中にどのように分布しているのかを調べるために、残りの126マーカーも合わせた180マイクロサテライトマーカーとAFLPマーカーを用いて連鎖解析を行った。

その結果、マイクロサテライトマーカーはソバのもつ8組すべての染色体に分布していることが明らかとなった。このことから、他の近縁種でも利用できることと考え合わせると、開発したマーカーは比較マッピングなどをするのに都合よいと考えられる。先に述べた54マーカーもすべての染色体に分布しており、ゲノム全体にわたる遺伝学的研究が可能であることも明らかとなった。

第3章では、開発したマイクロサテライトマーカーの栽培ソバの起原に関する研究への応用例を述べている。これまでの AFLP を用いた研究により、ソバ野生祖先種集団は2つのグループに分かれ、中国南西部の三江地域の野生祖先種集団が栽培集団と遺伝的に近縁であり、直接の野生祖先種集団であると考えられた。しかし、遺伝的に近縁であるのはこの地域の野生集団と栽培集団間の遺伝子交流によるものではないかという意見もあった。つまり、三江地域における遺伝子交流の程度が他の地域よりも大きいために、野生祖先種集団と栽培集団が遺伝的に近いという考えである。開発したマイクロサテライトマーカーを用いてソバ栽培集団と野生祖先種集団の間における遺伝子交流の程度を調べたところ、三江地域とそれ以外の地域で同じ程度であり、三江地域の野生祖先種集団の遺伝子組成が栽培集団のものと類似しているのは、三江地域の集団が直接の野生祖先集団であるためと判断された。これにより、これまで主張されてきたように、三江地域が栽培ソバの起原地であるとの結論に達した。

論文審査の結果の要旨

マイクロサテライトマーカーは共優性であり、リピート数の変異に基づく対立遺伝子の変異が大きく集団遺伝学をはじめとする遺伝学的研究や QTL に代表される育種学的研究の分子マーカーとして非常に優れており、多くの作物で開発され有効に利用されている。本論文は、ソバでは少数しか開発されていなかったマイクロサテライトマーカーを多くの労力と時間をかけて多数のマーカーを開発し、その有効性を確認する実験を行い、あわせて栽培、野生ソバ集団の集団構造と遺伝子交流の解析に応用し、栽培ソバの起原地が中国西南部の三江地域であるかどうかを検証する研究をとりまとめた論文である。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. これまで5個しか開発されていなかったソバにおいて、マイクロサテライト濃縮ライブラリーを作成し3000近くのクローンについて塩基配列を決定し、250組以上のプライマーを設計し、最終的に180個という他の作物と比較しても遜色ない多数のマイクロサテライトマーカーを開発した。
2. 開発したマーカー（特に1個のバンドのみを生じる54のマーカー）はソバ栽培集団内の変異の検出に有効であることを示し、それらマーカーはもう一つの栽培ソバであるダツタンソバを含むソバ属の他の種でも有効に働くことを示した。また、これらマイクロサテライトマーカーはソバの8対の染色体上にまんべんなく分布しており、開発したマイクロサテライトマーカーによる遺伝学的、育種学的分析はソバのゲノム全般にわたる解析となっていることを明らかにした。この研究結果は、将来、開発されたマーカーを用いて研究しようとする者にとって極めて有用な結果である。
3. 開発したマーカーの多くが栽培ダツタンソバでも有効であることは、ルチン含量が高いなどの点で近年注目を浴びていながら、適当なマーカーが無いためにほとんど育種がされていなかったダツタンソバにも実用的育種の道を開いた。
4. マイクロサテライトマーカーを用いて、三江地域、四川省塩源県の栽培、野生ソバの集団構造と遺伝子交流について分析し、栽培集団と野生集団の間の遺伝子交流は三江地域でも四川省でも低く、かつ三江地域では栽培集団と野生集団の遺伝子組成が四川省にくらべ類似していることを指摘し、これまで AFLP やアロザイムに関する研究からの結論、『栽培ソバ集団に最も近縁な野生集団は三江地域の集団である』との結論が正しいことを証明した。従って、ソバ栽培の起原地は三江地域であるとの結論を得た。

以上のように本論文はソバにおいて多数のマイクロサテライトマーカーを開発し、開発したマーカーの有効性を証明し、さらには栽培ソバの起原に関する問題に応用してソバ栽培の起原地が中国西南部の三江地域であることを明らかにしたものであり、栽培植物起原学、植物遺伝学、植物育種学及びソバ、ダツタンソバの実用的育種に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年11月30日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。