

エリートツリーの開発と特定母樹による普及

育種部長 高橋 誠

エリートツリー（第2世代以降の精英樹の総称）は、平成23年度に関東育種基本区で18系統のスギエリートツリーが最初に開発されました。それを皮切りにスギ、ヒノキ、カラマツ、トドマツ等、主要な林業樹種で開発が進み、令和4年度末現在、全国で1,145系統のエリートツリーが開発されるまでに至りました。

今後の健全な森林整備のためには、遺伝的に多様な優良種苗を用いることが重要であり、このような遺伝的多様性の確保という観点から全国の各地域（育種基本区）で、多数のエリートツリーの開発が進んでいます。

また、エリートツリーの普及にあたっては、間伐等特措法に基づき特定母樹の指定が進められています。現在、エリートツリー等の中から、特定母樹の指定基準を満たす優良な系統506系統（令和5年9月現在）が特定母樹に指定されています。

エリートツリーや特定母樹の優れた成長性が、林業の収支改善や二酸化炭素の吸収・固定にプラスの効果をもたらすと期待されています。「みどりの食料システム戦略」（農林水産省）や「森林・林業基本法」（林野庁）といった国の施策にもその活用が位置付けられ、普及が加速しつつあります。

これらのエリートツリーを主体とする特定母樹の更なる普及促進のためには、エリートツリー等の優

れた特性について森林・林業関係者に理解を深めていただくことが重要です。このため、特定母樹に指定されたエリートツリーの実際の林地における生育状況を確認し、従来の苗木の成長等と比較できる展示林の整備を進めています。

また、特定母樹から生産した種子や穂木（種穂）からの苗木（特定苗木）の生産が進むためには、事業的な規模で種穂を生産するための採種園や採穂園への特定母樹系統の導入が進むことが重要です。一方で、特定母樹は指定されている系統数が多く、どの系統を選定すべきか判断に迷うことがあるとお聞きします。

このため、各地域において採種園や採穂園に導入する系統を選定する際の一助として特定母樹に指定されたエリートツリー等の特性表の作成・公表を進めており、最初の特性表を今年度公表するべく準備を進めています。

展示林の整備にあたっては、展示林の設定に適した用地の確保や設定後の適切な保育が、特性表の作成・公表にあたっては、そのベースとなる特性データを幅広く集積する必要があります。このため、林木育種センターでは、都道府県や森林管理局等の森林・林業関係機関・関係者と連携を図りながら必要となる調査・研究等を進めていきます。

【紙面紹介】

深層学習を用いたスギ花粉の発芽率測定効率化
..... 2～3
コウヨウザンの産地試験の設定.....4
都道府県等への技術指導について.....5

高精度・制御可能な改良型ゲノム編集技術について
.....6
林木育種事情調査
台湾の森林・林業事業及びテリハボクの共同研究状況
..... 7～8



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 Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute

深層学習を用いたスギ花粉の発芽率測定の高効率化

1. はじめに

林木育種センターで進めている林木ジーンバンク事業では、有用な育種素材として林木育種に貢献するもの、ニーズが高く早期に新たな需要が見込まれるもの、生息域内の保存のみでは種または集団の絶滅のリスクが高いものを対象として「生物資源」として成体や種子、花粉での保存を行っています。収集した花粉は、発芽検定により発芽率を測定し、その結果をデータベースに記録し、同時に含水率を調整した後、-80℃で長期保存し、将来の利用に備えます。花粉の発芽検定では、発芽培地に花粉を蒔き、発芽に適した条件に置いた後、顕微鏡下で直接または取得した画像上で、発芽した花粉の数、発芽しなかった花粉の数を数え、その割合を発芽率として求めています。花粉の発芽の有無は人の目で判断しており、時間がかかる作業です。ジーンバンク事業を継続的に運営していくためには、このような作業を高効率化していく必要があります。

最近では深層学習（ディープラーニング）が発展し、様々な分野で利用されるようになっていきます。深層学習は、人工知能（AI）の一つである機械学習に含まれる手法の一つです。従来の機械学習においては、例えば画像の分類を行う場合、画像の着目すべき場所（これを特徴量と呼びます）を事前に決めて、これを数値化し

ておく必要があります。例えば花粉の発芽であれば、花粉の画像から花粉の形や模様などを数値化する必要があります。この特徴量の数値化が多くの場合困難で、画像に従来の機械学習の手法を適用するのは簡単ではありませんでした。しかし、深層学習においては特徴量の抽出まで自動で行うことができるため、画像の分類といった従来は簡単にはできなかった作業が可能となります。特に、人の目でみれば判断できる画像の分類には有効であり、花粉の発芽試験にも利用可能であると考え、その試行を行いました。本記事は武津ら（2023、関東森林研究）で報告した内容を紹介したのになります。

2. 材料と方法

深層学習による画像認識技術にはいくつかの種類があります。最も簡単なものは画像分類で、例えば花粉の画像が与えられた場合に発芽した花粉なのか、発芽していない花粉なのかを分類するために用います。しかし、実際には花粉の画像は一つずつ撮影するわけではなく、図1のように複数の花粉が含まれる画像を取得します。この画像内で複数花粉について、発芽しているか発芽していないかを認識する必要があります。このような技術を物体検出と呼びます。物体検出を行うことのできるプログラムは多く公開されています。今回は、Yolov5 (<https://github.com/ultralytics/yolov5>) というプログラムを用いました。

深層学習により物体検出を行うためには、正解となるデータを使用してモデルを作成します。そのためには、目的とする物体をあらかじめラベリングした注釈データを準備する必要があります。これは、実際に画像のどの場所に目的とする物体（今回の場合は発芽した花粉と発芽していない花粉）があるかを手作業で印をつけていく作業となります。今回は、東北育種基本区でそれぞれ異なる遺伝子型をもつ42個体

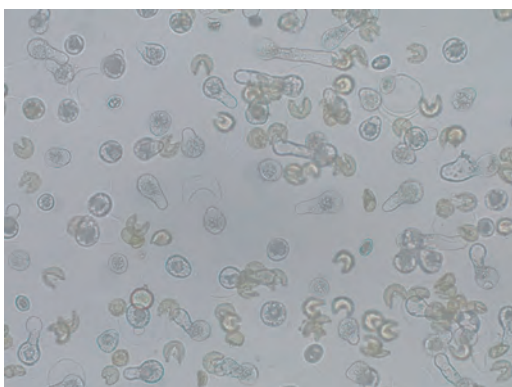


図1 発芽検定に用いた画像の一例

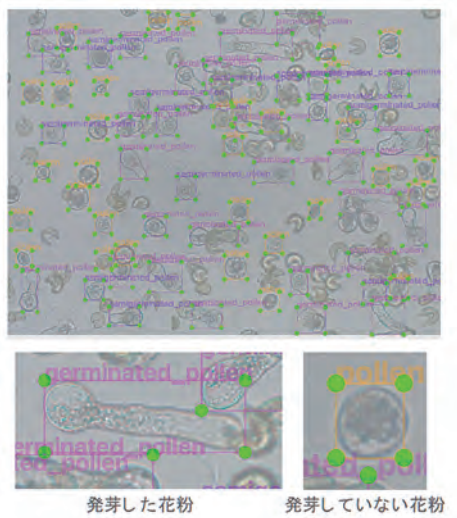


図2 注釈データ作成の様子

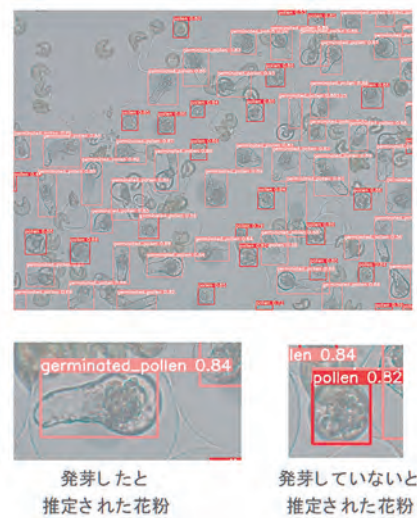


図3 作成されたモデルによる検出の例

から収集されたスギ花粉42サンプルを、通常の方法で発芽培地上で発芽させ、顕微鏡下で撮影して画像を取得しました。124枚の画像から画像から発芽した花粉を合計1,346箇所、発芽していない花粉を合計4,361箇所ラベリングしました。ラベリング作業には、ソフトウェアLabelImg (Tzutalin 2015) を用いました(図2)。

注釈データを学習データセット、検証データセット、テストデータセットに分割し、学習データセットおよび検証データセットを用いてYolov5によりモデルを作成しました。作成されたモデルをテストデータセットに適用し、目で実測した発芽率と予測された発芽率とを比較しその精度を検証しました。

3. 結果

作成されたモデルをテストデータセットの画像に適用し、物体検出を行った例を図3に示しました。1枚の画像内の多数の場所に物体が検出されています。これらの検出された物体について、画像上の位置と推定されたラベル(今回は発芽した花粉と発芽しなかった花粉)がデータとして得られます。得られたデータから発芽率(%)を計算した結果を図4に示しました。誤差はあるものの、ある程度の精度で発芽率が予測されていることがわかります。予測の精度を示す指標の一つである二乗平均平方根誤差を

発芽率(%)について計算したところ、約5ポイントとなり、平均発芽率に対する誤差率約11%で発芽率が推定されることがわかりました。また、細かくみていくと、花粉が重なっている部分ではうまく推定されないなど、モデルの改善の余地があることもわかりました。

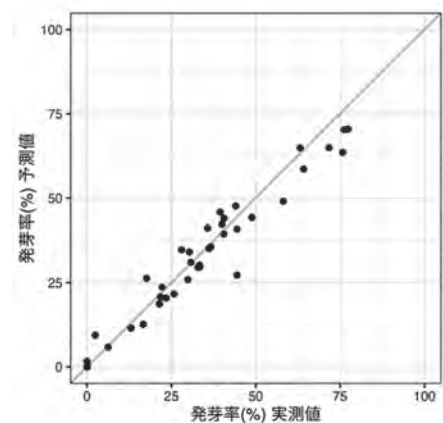


図4 発芽率の実測値と予測値の関係

4. おわりに

本記事では、ジーンバンク事業の効率化に向けて、発芽検定作業の一部について深層学習を用いた自動化の試行について紹介しました。実際に事業に利用していくためには、モデルの改良・他樹種への展開に加えて、顕微鏡下でリアルタイム推定により画像を取得する手間を省くといった工夫が今後必要となります。

(遺伝資源部 探索収集課 武津英太郎)

コウヨウザンの産地試験の設定

1. はじめに

コウヨウザンは、中国・台湾原産のヒノキ科コウヨウザン属の常緑針葉樹で、中国では中南部における最重要造林樹種の一つです。わが国には寺社を中心に江戸時代以前から導入され、単木ではなく林分としての植栽は、県有林、植物園、大学演習林、国有林等にみられます。林木育種センターでは、2015年から公的試験研究機関や民間企業とともに、国内の過去に造成された林分を対象に、コウヨウザンの利活用に関する調査・研究を進めてきました。その結果、コウヨウザンの成長や材質などの特性、製品としての利用価値を示すと同時に、優良個体を選抜することができました(コウヨウザンの特性と増殖マニュアル、https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/documents/koyozan_manual.pdf)。



写真 コウヨウザン林分 (25年生 日立市)

コウヨウザンを新たな造林樹種として利用していくためには、当面は国内の林分を採種源として苗木生産を行う必要があります。一方DNA分析により、日本各地のコウヨウザン林分は、中国中南部、中国東部、台湾に起源があることが推測されており、それらの地域を由来とする国内コウヨウザン林分の中で、造林地の環境で良い活着・成長を示す系統・産地を明らかにすることは、今後のコウヨウザンの種苗生産において重要なことと考えられます。そこで造林地に合った系統・産地に関する知見を得るため、複数の国内コウヨウザン林分から採取した種子を用いて苗木を育成し、その苗木を用いて各地に試験地を造成しました。

2. 試験地の設定について

植栽系統は、全国のコウヨウザン林分から優良個体を選抜した6林分を含む茨城県、千葉県、京都府、熊本県、及び高知県からそれぞれ1か所、静岡県から2か所の合計7産地から採取した種子を用いました。試験地の設定は、林野庁、大学、公的試験研究機関、民間企業等と連携し、

令和4年度に気候、標高等の環境の異なる千葉県、岐阜県、広島県、大分県及び鹿児島県の5地域に合計7か所設定しました(図1)。

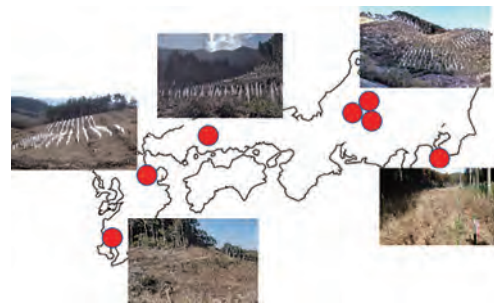


図1 設定したコウヨウザン広域産地試験地の位置
※設定箇所は赤丸のところ

3. 植栽後1年の状況

7試験地のうち、植栽後一成長期経過した6試験地の平均苗高は、60～70cmの範囲にあり(図2)、南に設定した試験地で樹高が大きくなる傾向にありました。分散分析の結果、統計的に有意な試験地間差と産地間差が認められました。各産地の平均苗高の試験地間の相関係数を算出したところ、6試験地のうち1試験地を除き、統計的に有意な正の相関関係があったことから、植栽後一成長期後の苗高は、概ねどの試験地においても産地間の成長の順位は同じであることが示唆されました。

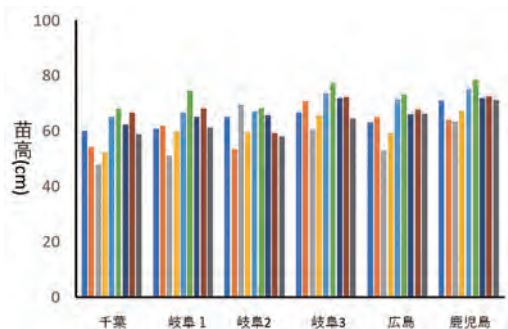


図2 各試験地におけるコウヨウザン系統の苗高

※同一色は同じ系統。大分県内の試験地は植栽直後のため図示していない。

今後もコウヨウザン植栽試験地の成長や発生する被害等について調査を継続し、造林地の環境にあった系統・産地に関する情報を発信できるようにしたいと考えています。

(遺伝資源部 保存評価課 倉本 哲嗣)

都道府県等への技術指導について

林木育種センターでは、都道府県等からの要請等に応じて、種苗の増殖や採種園等の造成改良に関する技術指導を行っています。本年度のこれまでに実施した技術指導について紹介します。

1. カラマツ採種園管理の技術指導について

吾妻森林管理署、群馬県林業試験場、林木育種センターの3機関共同で吾妻森林管理署管内のカラマツ田代第一採種園を活用して安定的な種子を確保する取組を行っており、6月上旬に翌年の着花を促進するための環状剥皮や施肥を実施しました。実施に当たって、その目的や実際の剥皮方法を実演して理解を深めてもらいました。同月下旬には今年の球果の着生を確認するために、双眼鏡を使って3方向から確認し、5段階での指数評価を実施しました。その後、8月上旬に着果が見られた個体の球果を実際に採取し、球果を切断して白い胚乳の数を数えて種子の充実を調査しました(写真1)。この調査では、これまで胚乳を肉眼で見えていたが、今回からスマートフォン等で撮影して、切断部を拡大した画面にすることにより、スピーディーかつより正確に確認できるようになりました。本年度は、例年より少し多めの着生が見られましたが、種子の確保ができる見込みのあった個体はわずかでした。一方、本採種園(群馬県)から浅間山を挟んだ浅間山国有林内(長野県)にある清方採種園とその周囲のカラマツでは沢山の球果が見受けられましたので、本採種園については来年度以降に期待したいと



写真1 種子の充実率の判定調査

思います。

2. スギミニチュア採種園の管理技術等について

6月に、岐阜県白鳥林木育種事業地において、岐阜県の担当者、現場管理者及び作業員を対象にスギミニチュア採種園の管理技術、ヒノキのミニチュア仕立ての剪定、アカマツ採種木の剪定について、講習を行いました。スギミニチュア採種園については、施業サイクル(整枝剪定による萌芽枝育成→着花促進処理→採種)や樹形誘導に関する講義を行い、その後、採種園において実技を実施しました。スギの整枝剪定については、1回目は着花促進前に採種木から種子採取など作業がしやすい高さ調整を、2回目は球果採取後に枝の長さや間引きなどによる骨格決めを、3回目以降は球果採取後に樹形維持と採種量を確保するための萌芽枝の育成を主目的として行うことを説明しました。今回は1回目と2回目で行う断幹や剪定の仕方を中心に実演しながら理解を深めてもらいました(写真2)。また、剪定やジベレリン処理後は採種木の樹勢が衰えるため、施肥による樹勢回復も重要であることを併せて説明しました。



写真2 整枝剪定の技術指導の様子

3. おわりに

今後も、各都県や認定特定増殖事業者に対して、採種園からの安定的な種穂供給に向けて支援していきたいと考えていますので、ご要望があれば各都県の担当者を通じてご連絡をお願いいたします。

(指導普及・海外協力部 指導課 藤原 優理)

高精度・制御可能な改良型ゲノム編集技術について

1. はじめに—ゲノム編集技術の欠点—

狙った領域の塩基配列だけを改変する「ゲノム編集技術」の原理は、狙った領域の2本鎖DNAを人工制限酵素で切断し、その修復時に起きるエラーにより、塩基の欠失・付加・置換を引き起こすものです(詳細は林木育種情報No.20をご参照ください)。ここで問題となるのは、標的領域の改変様式が制御できず、どのような改変が起きるのかは「運任せ」であるということです。その結果、標的領域以外の重要な塩基配列まで欠失してしまうといった、後の利用に支障がでる大規模改変もまれに起きてしまいます。今回は、そのような欠点を克服した高精度・制御可能な改良型ゲノム編集技術について紹介します。

2. DNA2本鎖を“切らない”塩基置換技術

この改変様式の不確定さはDNA2本鎖の切断が引き起こすものであるため、DNA2本鎖を切らないゲノム編集技術が必要となります。去る2016年、米国・日本でDNA2本鎖を切らない塩基置換技術が相次いで発表されました。ここでは日本で開発された「Target-AID」(Nishida *et al.*, *Science* 353, aaf8729 (2016)) について紹介します。Target-AIDは従来のCRISPR/Cas9を基盤とし、DNA切断活性を弱めたCas9、塩基を置換する脱アミノ化酵素(シチジンデアミナーゼ)、そして脱アミノ化された塩基が修復されるのを阻害するウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤(UGI)を融合したもので構成されています(図1)。標的領域の認識にはCRISPR/Cas9と同じくガイドRNAがその役割を担います。シチジンデアミナーゼにより標的シトシンは一旦ウラシルに変換された後、チミンに置換されます。変換された塩基は通常元の塩基に修復されますが、UGIにより阻害されます。

3. Target-AIDを利用したスギの塩基置換技術の構築

我々はTarget-AIDに着目し、スギへの適用を試みました。標的遺伝子として、塩基置換により除草剤耐性が付与されるアセト乳酸合成酵素(ALS)を選びました。ALSの塩基置換に成功すると、除草剤が存在していても枯死し

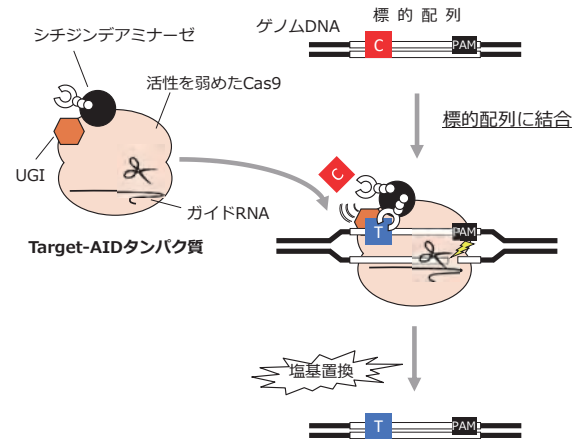


図1 Target-AIDによる標的配列の塩基置換

ガイドRNAにより標的配列に誘導されたTarget-AIDタンパク質は、標的シトシン(C)をチミン(T)に変換する。本図は七里(2022)森林遺伝育種11:181-186を一部改変した。

ないため、塩基置換の成否が目視により確認できます。遺伝子組換えにより、Target-AID発現遺伝子をスギに導入したところ、除草剤耐性を示す系統が複数得られました(図2)。塩基配列解析の結果、期待通りALS遺伝子において狙った塩基置換が起きていました。このことから、スギにおいても塩基置換による点変異の導入が可能であることがわかりました。

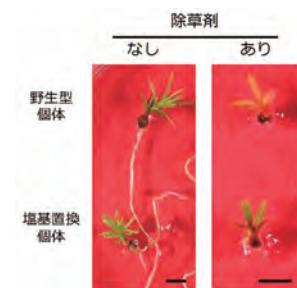


図2 塩基置換幼苗の除草剤耐性能

左、通常培地での生育。右、除草剤添加培地での生育。野生型個体では除草剤により枯死しているのに対して、塩基置換個体は除草剤に耐性を示す。スケールバー、5 mm。

4. 今後の課題および展望

今回スギ遺伝子の塩基置換に成功したものの、効率の低さという課題が残りました。効率向上のため、現在発現遺伝子の改良や、他の塩基置換システムの利用により、スギでの効率的な精密ゲノム編集系の確立を目指しています。

本研究の一部は農林水産研究推進事業委託プロジェクト研究「炭素貯留能力に優れた造林樹種の効率的育種プロジェクト」の支援のもと実施しました。

(森林バイオ研究センター 七里 吉彦)

林木育種事情調査

台湾の森林・林業事業及びテリハボクの共同研究状況

1. はじめに

林木育種センターは2011年に台湾林業研究所と対塩性にすぐれ防風林に活用されているテリハボクの共同研究「防風効果の高いテリハボクの育種研究」を実施しています。今回、2014年より実施しているテリハボクの生育状況及び台湾固有樹である台湾ヒノキ林の視察を目的に台湾林業研究所他を訪問しました。

2. 台湾林業研究所の状況

台湾林業研究所(以下「TFRI」という。)は、樹木、果樹、ヤシ、竹、特用林産物を対象に、樹木の調査、特用林産物の利活用等を研究しています。研究対象地は森林限界に至る山地から都市街路樹までの幅広い場所を対象としています。

1992年に台湾は国内の天然林の伐採禁止にしていることから、近年の森林の伐採面積は年間200ヘクタール未満との説明を受けました。

亜熱帯の台湾の家屋は台風害の予防のためコンクリート製の家屋が中心です。そのため、木材は床材、窓枠等の内装材、小規模の家具等に活用しています。これらの木材は外国からの輸入材が大半を占めており、ニュージーランド、カナダ、日本からラジアータマツ、ダグラスファー、杉等の針葉樹を輸入し、インドネシア、アフリカ諸国より、鉄木などの広葉樹を輸入しています。

3. 台湾ヒノキ林視察

台湾ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*)は、日本のひのき(*Chamaecyparis obtusa*)より香りが強いのが特徴です。台湾国内では1500m以上の高山帯に存在しています。

TFRIの案内で、首都台北の南東に位置する錫蘭山(Cilan Mountain) 棲蘭山檜木林(Cilan Mountain Cypress Forest)の天然

下種更新林を視察しました。棲蘭山は、標高1,200mから2,000m至る全景10万ヘクタールに達する森林で、1970年から1991年まで胸高直径1m以上の台湾ヒノキ、台湾スギ等の天然林伐採を退役軍人の団体に委託し架線集材で伐採・搬出を行っていて、伐採した後は、雲霧林地帯(標高1,200-1,500m)では日本の杉を、高地林地帯(標高1,500m-2,000m)では台湾ヒノキ、台湾ベニヒノキ(*Chamaecyparis formosensis*)等を植林していたとの説明を受けました。

今回、視察した場所は、TFRIが日本の京都大学と森林計画を共同設計した場所です。計画から30年以上経過した結果、伐採時に残した母樹からの天然下種更新により発生した、樹高20m近くの台湾ヒノキや台湾ベニヒノキ等が確認できました。



棲蘭山檜木林

この場所はポドゾル土壌で表土が15cm程度の浅い地層のため栄養分が乏しいことから、屋久杉のように伐採後の根株や倒木から発芽する台湾ヒノキが観察されました。

また、研究及び森林学習のため、TFRIは遊歩道及び案内看板を設置しています。この場所では、自然のままの状態を保っているため、間伐・除伐を行われていません。



根株から種子生長した台湾ヒノキ木

4. テリハボク林の視察

2011年共同研究を締結した後、2014年に当センターの西表熱帯育種技術園から送られたテリハボク種子について、TFRIは台湾島の南北2箇所で複数のプロットで植林を行い、管理しています。

台北から100km程離れた宜蘭市 (Yilan City) に設置している3プロットのうちの1プロットを視察しました。TFRIでは、この試験

地の樹高、胸高直径等を毎年調査し、西表熱帯林育種技術園と情報交換しています。

視察したテリハボク植林地のプロットは、7mぐらいの樹高であることを視認しましたが、隣接する2プロットは台風の風害被害を受けたとの説明でした。

4. さいごに

台湾は九州の2倍の面積ですが、わが国と同様に様々な樹木が標高に応じて存在しています。TFRIに隣接する植物園の一部を訪れたところ、台湾の植物分類学に尽力された早田文蔵京都大学名誉教授の功績をたたえる記念館があり、国内外の研究者の功績を評価していることに感動しました。

わが国の固有種と近縁の樹木が多いことから、他の樹種についても当センターと何らかの共同研究の可能性が期待されます。

(指導普及・海外協力部 海外協力課
山下 正輝、飯塚 樹)



テリハボク試験プロット内



植物園の標高別森林帯の説明文

表紙タイトル写真

2023年3月日本製紙株式会社との連携にて設定されたスギエリートツリー等展示林見学会にて。



林木育種情報 No. 44 令和5年11月30日発行
 国立研究開発法人 森林研究・整備機構
 森林総合研究所林木育種センター
 〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師 3809-1
 TEL : 0294-39-7000 (代)
 FAX : 0294-39-7306
 ホームページ <https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/index.html>