

学 位 論 文 題 名

イネ縞葉枯ウイルスのゲノム構造および
イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究は、イネ縞葉枯ウイルス（RSV）の2つの主要タンパク質遺伝子のコーディング様式を明らかにし、またインド型イネ Modan に由来するイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* のポジショナルクローニングを目指して、染色体上座乗位置を特定し、さらにその物理地図上における抵抗性遺伝子座を限定したものである。

1. イネ縞葉枯ウイルスゲノムの解析

1) RSV の外被タンパク質と感染特異タンパク質のアミノ酸部分配列を決定した。外被タンパク質は純化ウイルス粒子から、感染特異タンパク質はイネ感染組織からそれぞれ精製し、プロテナーゼ処理により生じたペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、外被タンパク質についてはカルボキシル末端を含む8ペプチドと感染特異タンパク質については11ペプチド（うち3ペプチドは重複）のアミノ酸配列を明らかにした。

2) 外被タンパク質および感染特異タンパク質のアミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチドプローブを用いてウイルスゲノム RNA に対してハイブリダイゼーションを行い、それぞれのタンパク質をコードする分節 RNA を特定した。その結果、外被タンパク質は RSV の第3分節 RNA にアンチセンスでコードされ、また、感染特異タンパク質は、第4分節 RNA にセンスでコードされ、それぞれ異なる極性でコードされていた。このことから、RSV のコーディング様式はアンビセンスであると考えられた。

2. イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析

1) グラフィカルジェノタイプによる座乗領域の推定をした。インド型イネ Modan に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種と感受性品種のゲノム DNA を抽出し、イネ染色体上に分布する322個の RFLP マーカーの RFLP 分析を行い、グラフィカルジェノタイプを明らかにした。それによると、抵抗性品種の Modan 由来の染色体領域は日本型イネとの交配が進むに伴って第11染色体上の特定領域に収束した。この染色体領域は縞葉枯病抵抗性に関与するものと考えられた。抵抗性品種星の光では4個の RFLP マーカー（gmZ410、XNpb220、XNpb257、XNpb254）、むさしこがねでは2個の RFLP マーカー（gmZ410、XNpb220）がインド型イネの遺伝子型を示し、抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は第11染色体上約28~36cM の領域内に存在する可能性が高いことを明らかにした。

2) 抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の座乗すると考えられる第11染色体上の新規の24個の RFLP マーカーを用い、コシヒカリ（感受性）と朝の光（抵抗性）間で多型を検出できるマーカーの探索を行った。供試24個の RFLP マーカーのうち、8個の RFLP マーカーが多型を示した。また、

800 種の 10 塩基のオリゴヌクレオチドプライマーによる RAPD 分析を行い、約 2,200 の増幅 DNA 断片のうち、コシヒカリと朝の光間で多型を示す 5 断片を得た。これら 5 断片を RFLP マーカーとして検討したところ、1 断片が多型を示し、これを RFLP マーカー ST10 とした。したがって、コシヒカリと朝の光間で多型を示す新規の 9 個の RFLP マーカーを得た。コシヒカリと朝の光間で多型を示すマーカーは、前項の 4 個の RFLP マーカーと合わせて 13 個になった。

3) *Stvb-i* 遺伝子の座乗位置を特定した。コシヒカリ／朝の光の F2 を用いて、交配親間で多型を示す 13 個の RFLP マーカーとイネ縞葉枯病抵抗性の連鎖解析を行った。F2 の 120 個体からそれぞれ DNA を抽出し、RFLP マーカーを用いて各個体の遺伝子型を得た。その F3 系統を用いて縞葉枯病抵抗性検定を実施し、F2 個体の抵抗性程度を評価した。検定の結果、供試した F2 集団は 26 : 56 : 38 (感受性型 : 中程度抵抗性型 : 抵抗性型) に分離し、期待された 1 : 2 : 1 に適合していた。各 F2 個体の遺伝子型と抵抗性反応結果との連鎖解析の結果、抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は XNpb220 と XNpb254/257 に挟まれる 1.8cM の領域内にあり、RFLP マーカー ST10 と 0.0cM で連鎖していることが明らかとなった。

4) *Stvb-i* 遺伝子座領域における物理地図を作製した。*Stvb-i* 遺伝子と連鎖する 3 つの RFLP マーカー (XNpb220、ST10、XNpb257) をプローブとして YAC ライブラリー (日本晴由来) から 6 個のクローンを選抜した。同様に XNpb220、ST10、XNpb254 の 3 つの RFLP マーカーと YAC クローン Y4366 の切断断片をプローブとして、BAC ライブラリー (シモキタ由来) から 18 個のクローンを得た。各クローンの挿入 DNA 末端断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションおよび制限酵素断片の泳動パターンから BAC クローンの相互関係を調べ、18 クローンを整理化した。これにより、*Stvb-i* 遺伝子座を含む 1.8cM の領域を 18 の整理化 BAC クローンによりカバーすることができた。また、XNpb220-XNpb254/257 間 (遺伝距離で 1.8cM) は物理距離にして約 620kb に相当していた。

5) *Stvb-i* 遺伝子座領域を限定した。物理地図の作成に用いた BAC クローンの挿入 DNA 末端断片およびサブクローンから 34 の分子マーカー (2 SCAR、32 RFLP) を開発した。また、既存の RFLP マーカー XNpb220 および ST10 とをそれぞれ SCAR マーカーに変換し、計 36 個の分子マーカーを得た。これらの分子マーカーを用い、連鎖解析に供試した F2 集団の中で XNpb220-XNpb254/257 間で組換えを生じていた 4 個体と抵抗性品種むさしこがねについて *Stvb-i* 座領域における遺伝子型を調べた。その結果、*Stvb-i* 座は SCAR マーカー 7L と 21R との間、約 286kb に限定された。さらに、リコンビナントインブレッドライン (黄金晴／月の光) から選抜された *Stvb-i* 座近傍での組換え系統を用いた解析から、*Stvb-i* 遺伝子は約 120kb の領域内に存在することが明らかとなった。以上の結果、*Stvb-i* 遺伝子のクローニングの基盤が整った。

6) DNA マーカーによりイネ縞葉枯病抵抗性個体を選抜した。抵抗性遺伝子と密接に連鎖する SCAR マーカー ST10 による縞葉枯病抵抗性個体の選抜の可能性を検討した。国内で育成された Modan に由来する抵抗性品種・系統はすべて SCAR マーカーによる DNA 断片の増幅が認められた。また、F2 集団 (コシヒカリ／朝の光) 120 個体について検討したところ、DNA 断片の増幅が認められた個体は、抵抗性型もしくは中程度抵抗性型であり、増幅のみられなかった個体はすべて感受性であった。SCAR マーカーによる判定と生物検定による判定は一致し、Modan に由来する縞葉枯病抵抗性個体・系統の選抜効率は極めて高く、DNA マーカー選抜による育種へ応用ができるものと認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

イネ縞葉枯ウイルスのゲノム構造および

イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究

本研究は、図 3 7、表 8 引用文献 1 0 3 を含み、6 章からなる総頁数 1 0 4 の和論文である。他に参考論文 1 1 編が添えられている。

イネ縞葉枯病は、昭和 3 0 年代後半から現在まで日本のイネウイルス病としてもっとも重要である。本研究は、イネ縞葉枯病に対する抵抗性イネ作成の基礎知見を得るために、ウイルス遺伝子とイネの抵抗性遺伝子を解析したものである。その内容は以下のように要約される。

1. イネ縞葉枯ウイルスゲノムの解析

イネ縞葉枯ウイルス (RSV) のコーディング様式がアンビセンスであることを明らかにした。まず、RSV の外被タンパク質についてはカルボキシル末端を含む 8 ペプチド、また感染特異タンパク質については 11 ペプチド (うち 3 ペプチドは重複) のアミノ酸配列を明らかにした。そして、アミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチドプローブを用いてウイルスゲノム RNA に対してハイブリダイゼーションを行い、それぞれのタンパク質をコードする分節 RNA を特定した。その結果、外被タンパク質は RSV の第 3 分節 RNA にアンチセンスでコードされ、また、感染特異タンパク質は、第 4 分節 RNA にセンスでコードされ、それぞれ異なる極性でコードされていた。

2. イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析

1) インド型イネ Modan に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種と感受性品種のゲノムについて、RFLP 分析を行ったところ、抵抗性品種の Modan 由来の染色体領域は日本型イネとの交配が進むに伴って第 11 染色体上の特定領域に収束した。抵抗性品種星の光では 4 個の RFLP マーカー (gmZ410、XNpb220、XNpb257、XNpb254)、むさしこがねでは 2 個の RFLP マーカー (gmZ410、XNpb220) がインド型イネの遺伝子型を示し、抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は第 11 染色体上約 28~36cM の領域内に存在する

可能性が高いことを明らかにした。さらに、コシヒカリ（感受性）と朝の光（抵抗性）間で新規に多型を検出できる RFLP マーカーを ST10 を含め 9 個得た。コシヒカリと朝の光間で多型を示すマーカーは、前項の 4 個の RFLP マーカーと合わせて 13 個になった。

2) これら 13 個の RFLP マーカーとイネ縞葉枯病抵抗性の連鎖解析を行い、*Stvb-i* 遺伝子の座乗位置を特定した。コシヒカリ／朝の光の F₂ の 120 個体について、RFLP マーカーを用いた各個体の遺伝子型解析と抵抗性程度の評価を行った。遺伝子型と抵抗性反応結果との連鎖解析の結果、抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は XNpb220 と XNpb254/257 に挟まれる 1.8cM の領域内にあり、RFLP マーカー ST10 と 0.0cM で連鎖していた。

3) *Stvb-i* 遺伝子座領域における物理地図を作製した。 *Stvb-i* 遺伝子と連鎖する 3 つの RFLP マーカー (XNpb220、ST10、XNpb257) と YAC クローン Y4366 の切断断片をプローブとして、BAC ライブラリー（シモキタ由来）からクローンを得て、これらを整列化した。これにより、*Stvb-i* 遺伝子座を含む 1.8cM の領域は物理距離にして約 620kb に相当していた。

4) *Stvb-i* 遺伝子座領域を限定した。 物理地図の作成に用いた BAC クローンの挿入 DNA 末端断片およびサブクローンから 34 の分子マーカー（2 SCAR、32 RFLP）を開発し、また既存の RFLP マーカー XNpb220 および ST10 とをそれぞれ SCAR マーカーに変換し、計 36 個の分子マーカーを得た。これらの分子マーカーを用い、*Stvb-i* 座近傍での組換え系統の解析から、*Stvb-i* 遺伝子は約 120kb の領域内に限定した。以上の結果、*Stvb-i* 遺伝子のクローニングの基盤が整った。

5) 抵抗性遺伝子と密接に連鎖する SCAR マーカー ST10 による縞葉枯病抵抗性個体の選抜の可能性を検討した。SCAR マーカーによる判定と生物検定による判定は一致し、Modan に由来する縞葉枯病抵抗性個体・系統の選抜効率は極めて高く、DNA マーカー選抜による育種へ応用ができるものと認められた。

以上のように、本論文は、ウイルス遺伝子のコーディング様式を明らかにして、外被タンパク質で形質転換した抵抗性イネ作出を可能にした。さらに、インド型イネ Modan に由来するイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-I* の、物理地図上における抵抗性遺伝子座を限定して、この遺伝子を塩基配列レベルで解析出来るようにした。これらの研究成果は、関連学会で学術上高く評価されている。

よって、審査員一同は、齋藤 由里子氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。