

学 位 論 文 題 名

Studies on genetic recombination
in wide hybridization of rice

(イネの遠縁交雑における遺伝的組換えに関する研究)

学位論文内容の要旨

作物の育種は、遺伝的組換えを促進し多数の組換え個体の中から目的に合った遺伝子組み合わせをもつ個体を選抜することである。したがって、選抜技術が育種の中核となってきたが、遺伝的組換えは交配相手とは無関係に無作為に起こることを前提としてきた。ところが、この前提となる組換え頻度の遺伝制御については詳細な比較解析がなされていないのが現状であった。最近、分子マーカーを利用して野生種から有用遺伝子を利用しようとする試みが活発に行われているが、交雑相手によって組換え頻度が大きく変動する可能性が示唆されている。本研究はイネの遠縁交雑における組換え頻度を比較するために、類縁程度の異なる系統間雑種を作成し、第6染色体上に座する遺伝子の連鎖関係を調査するとともに、*wx* 座については座内とその周辺領域の組換え頻度を調査した。得られた結果を要約すると、次のごとくである。

1) 遺伝的組換えの生物学的意義は、進化的にみると、集団内に大きな変異を保有し、かつ環境の変化に応じて新しい遺伝子組み合わせをもつ個体の出現を可能にすることであることが多くの研究から推察される。また、染色体のセントロメア周辺やヘテロクロマチン領域では組換えが抑制されることが知られているが、類縁程度の異なる雑種において組換え頻度がどのように変化するかについては良く判っていない。分子マーカーの利用によって、雑種後代の組み換え頻度を詳細に比較することが可能となっているが、有用遺伝子を交雑によって利用しようとする育種法では遺伝的組換え頻度変化の有無が育種の正否に重要であるにも拘わらず、殆ど研究がなされていないことから本実験が計画された。

2) 栽培イネの日印交雑から第6染色体の分子マーカー地図を作成した。T65*wx*（日本型）とIR36（インド型）のF₂ 165個体について、コーネル大学・農水省イネゲノム研究チーム・北大農学部植物育種学研究室で作成された分子マーカーを用いて制限酵素断片長多型（RFLP）分析を行い連鎖関係を調査した。異なる研究室の分子マーカーの統合地図により、従来報告された第6染色体上の種々の量的形質の分離情報を今後統一的に解釈できると考えられる。T65*wx* × IR36 F₁ は雑種不稔を示し、この現象には雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子が第6染色体のC遺伝子（アントシアニン着色遺伝子）近傍に存在することが報告されている。調査した分子マーカーは両親型とヘテロ型が全てメンデル遺伝から期待される分離様式を示し、雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子の存在をしめす結果は得られなかった。トウモロコシのアントシアニン着色遺伝子*C1*のイネホモログ*OsC1*を作成した地図上にマップした結果、その座上位置から*OsC1*がC遺伝子の候補遺伝子であると推定された。

3) T65*wx* × IR36 F₁ に雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子が存在する場合、F₁ に

T65wx の花粉で戻し交雑すると雑種不稔遺伝子近傍のマーカには著しい分離の歪みが出るのが期待される。F₁ 個体には高度の不稔現象が認められたが、戻し交雑によっても分離の歪みは検出されなかった。この結果は、雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子の存在を否定した。T65wx と IR36 間の雑種不稔現象を三島と札幌で比較調査したところ、雌雄両器官とも札幌で高い不稔を示した。T65wx × IR36 F₂ 世代では雌雄両配偶子での組換え頻度が調査されるが、戻し交雑では単性配偶子での組換え頻度が調査できる。両者の連鎖地図の比較から、一部の領域で連鎖強度に違いのあることが推察された。

4) W593A は *O. sativa* の野生祖先種 *O. rufipogon* (W593) から第 6 染色体を戻し交雑によって T65wx に導入した準同質遺伝子系統である。T65wx × W593AF₂ の 99 個体を調査して、第 6 染色体短腕領域の連鎖地図を作成した。W593 の第 6 染色体上には、雌雄両配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子（配偶子キラー遺伝子）が存在することが報告されている。配偶子キラー近傍では T65wx 由来のマーカは後代に伝達しないことが期待され、実際に R111 など T65wx 由来のマーカの頻度は極度に低かった。このことから、配偶子キラー S6 は第 6 染色体セントロメア近傍に位置することが明かとなった。T65wx × W593AF₂ の連鎖地図は、T65wx × IR36 F₂ のものと比較して一部に違いはあるものの概ね一致した連鎖関係が認められた。このことは、栽培および野生イネ系統では遺伝的組換え頻度に差はないものと考えられた。さらに、この実験結果は雑種不稔遺伝子は組換え頻度の推定には障害にならないことを示唆している。

5) PS7 はアフリカの栽培種 *O. glaberrima* (W025) から第 6 染色体を戻し交雑によって T65wx に導入した準同質遺伝子系統である。T65wx × PS7F₂ の 51 個体を調査して、第 6 染色体短腕領域の連鎖地図を作成した。W025 の第 6 染色体上にも、雌雄両配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子（配偶子キラー遺伝子）が wx 座近傍に存在することが報告されている。配偶子キラー近傍では T65wx 由来のマーカは後代に伝達しないことが期待され、実際に Wx や RZ516 では T65wx 由来のマーカの頻度は極度に低かった。このことから、配偶子キラー S1 は RZ516 近傍に位置することが明かとなった。しかしながら、T65wx 由来のマーカの頻度は S6 で観察された時より高く、T65wx 背景下では花粉キラーに近い発現をすると考えられた。T65wx × PS7F₂ の連鎖地図は、T65wx × IR36 F₂ のものと比較して異なり、組換えが著しく抑制されていた。各分子マーカの領域で組換え頻度の比較から、この組換え抑制は S1 とは独立に起こることが明かとなった。このように、異なるイネ栽培種間では遺伝的組換え頻度が著しく異なる場合があると考えられた。

6) Wx 遺伝子は花粉で発現し、その発現を容易にヨード反応によって観察できるので、遺伝子座内の組換え頻度を容易に調査することができる。多数の人為誘発モチ突然変異体と自然モチ突然変異体を供試して、座内の変異部位の遺伝地図を作成した。座内の最大組換え率は 0.12 cM と推定できた。自然モチ突然変異体でも異なる領域に変異部位が検出され起源の異なる系統が混在していた。人為誘発モチ突然変異体については、塩基配列の比較から既に変異部位が明らかとなっており、その物理的距離との対応から組換えは 23.2 kb/cM で起こると推定できた。この頻度はイネゲノム全体の平均より 10 倍以上高い頻度であった。

7) Wx 遺伝子近傍の 300 kb の領域の物理地図が作成されている。T65wx × IR36 F₂ 546 個体を 7 つの分子マーカを用いて、195 kb の領域で起こる組換え頻度を調査した。領域によって 6.7 kb/cM から >689 kb/cM と著しい差異のあることが判った。さらに組換え頻度の変動は、その領域に含まれる反復配列や転写領域と関連していなかった。195 kb の領域にもこのような遺伝的組換え頻度の変化が存在することは、従来知られておらず異種から有用遺伝子を導入する交雑育種にあたっても重要な情報を与えるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

Studies on genetic recombination in wide hybridization of rice

(イネの遠縁交雑における遺伝的組換えに関する研究)

本論文は、図 26、表 18、104 ページからなる英文で、別に 5 編の参考論文が添えられている。

作物の育種は、遺伝的組換えを促進し多数の組換え個体の中から目的に合った遺伝子組み合わせをもつ個体を選抜することである。したがって、選抜技術・選抜理論が育種の中心課題とされてきたが、遺伝的組換えは交配相手とは無関係に無作為に起こることを前提としてきた。最近、分子マーカーを利用して他の種から有用遺伝子を導入する試みが活発に行われているが、交雑相手によって組換え頻度が大きく変動する可能性が示唆されている。本研究はイネの遠縁交雑における組換え頻度を比較するために、類縁程度の異なる系統間で雑種集団を作成し、第6染色体上に座する遺伝子の連鎖関係を調査するとともに、遺伝子座内とその周辺領域の組換え頻度を比較調査した。得られた結果を要約すると、次のごとくである。

1) 栽培イネの日印交雑から第6染色体の分子マーカー地図を作成した。T65wx (日本型) と IR36 (インド型) の F_2 165 個体について、異なる研究グループで作成された分子マーカーを用いて制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析を行い連鎖関係を調査した。T65wx x IR36 F_1 は雑種不稔を示し、この現象には雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子が第6染色体の C 遺伝子 (アントシアニン着色遺伝子) 近傍に存在することが報告されている。調査した分子マーカーは両親型とヘテロ型が全てメンデル遺伝から期待される分離様式を示し、雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子の存在をしめす結果は得られなかった。また、トウモロコシのアントシアニン着色遺伝子 *CI* のイネホモログ *OsCI* を作成した地図上にマップした結果、その座上位置から *OsCI* が C 遺伝子の候補遺伝子であると推定した。

2) T65wx x IR36 F_1 に雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子が存在する場合、 F_1 に T65wx の花粉で戻し交雑すると雑種不稔遺伝子近傍のマーカーには著しい分離の歪みが出ることが期待される。 F_1 個体には高度の不稔現象が認められたが、戻し交雑によっても分離の歪みは検出されなかった。この結果は、雌配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子の存在を否定した。T65wx x IR36 F_2 世代では雌雄両配偶子での組換え頻度が調査されるが、戻し交雑では単性配偶子での組換え頻度が調査できる。両者の連鎖地図の比較から、一部の領域で連鎖強度に違いのあることが推察された。

3) W593A は *O. sativa* の野生祖先種 *O. rufipogon* (W593) から第 6 染色体を戻し交雑によって T65wx に導入した準同質遺伝子系統である。T65wx x W593AF₂ の 99 個体を調査して、第 6 染色体短腕領域の連鎖地図を作成した。W593 の第 6 染色体上には、雌雄両配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子（配偶子キラー遺伝子）が存在することが報告されている。配偶子キラー近傍では T65wx 由来のマーカーは後代に伝達しないことが期待され、実際に R111 など T65wx 由来のマーカーの頻度は極度に低かった。このことから、配偶子キラー S6 は第 6 染色体セントロメア近傍に位置することが明かとなった。T65wx x W593AF₂ の連鎖地図は、T65wx x IR36 F₂ のものと比較して一部に違いはあるものの概ね一致した連鎖関係が認められた。このことは、栽培および野生イネ系統では遺伝的組換え頻度に差はないものと考えられた。

4) PS7 はアフリカの栽培種 *O. glaberrima* (W025) から第 6 染色体を戻し交雑によって T65wx に導入した準同質遺伝子系統である。T65wx x PS7F₂ の 51 個体を調査して、第 6 染色体短腕領域の連鎖地図を作成した。W025 の第 6 染色体上にも、雌雄両配偶子を退化させる雑種不稔遺伝子（配偶子キラー遺伝子）が wx 座近傍に存在することが報告されている。配偶子キラー近傍では T65wx 由来のマーカーは後代に伝達しないことが期待され、実際に Wx や RZ516 では T65wx 由来のマーカーの頻度は極度に低かった。このことから、配偶子キラー S1 は RZ516 近傍に位置することが明かとなった。しかしながら、T65wx 由来のマーカーの頻度は S6 で観察された時より高く、T65wx 背景下では花粉キラーに近い発現をすると考えられた。T65wx x PS7F₂ の連鎖地図は、T65wx x IR36 F₂ のものと比較して異なり、組換えが著しく抑制されていた。各分子マーカーの領域で組換え頻度の比較から、この組換え抑制は S1 とは独立に起こることが明かとなった。

5) Wx 遺伝子は花粉で発現し、その発現を容易にヨード反応によって観察できるので、遺伝子座内の組換え頻度を容易に調査することができる。人為誘発モチ突然変異体 10 系統を供試して、座内の変異部位の遺伝地図を作成した。座内の最大組換え率は 0.12 cM と推定できた。供試した 10 系統では、塩基配列の比較から既に変異部位が明らかとなっており、その物理的距離との対応から組換えは 23.2 kb/cM で起こると推定できた。この頻度はイネゲノム全体の平均より 10 倍以上高い頻度であった。

6) Wx 遺伝子近傍の 300 kb の領域の物理地図が作成されている。T65wx x IR36 F₂ 546 個体を 7 つの分子マーカーを用いて、195 kb の領域で起こる組換え頻度を調査した。領域によって 6.7 kb/cM から >689 kb/cM と著しい差異のあることが判った。さらに組換え頻度の変動は、その領域に含まれる反復配列や転写領域と関連していなかった。これらの結果は、異種から有用遺伝子を導入する交雑育種にあたっても重要な情報を与えるものと考えられる。

以上のように、本研究は情報の少なかった遺伝的組換えが交雑相手や領域によって大きく変動することを明らかにし、異種から有用遺伝子を導入する交雑育種にあたっても重要な知見を与えている。この成果は、学術的・実用的に高く評価される。よって審査員一同は、Khin Thidar 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。