学位論文題名

Genetic differentiation at the *wx* locus
in wild and cultivated rice(野生および栽培イネにおける *wx* 座の遺伝的分化)

学位論文内容の要旨

一般に農業形質の発現は複雑なものが多く、遺伝解析すら困難なものが多いことから、対象となる形質とそれに関与する遺伝子との対応を明らかにすることは重要な課題である。イネの *Wx* 遺伝子は情報量の少ないイネの形質発現の調節変異についての知見が得られる興味深い対象である。またイネの *Wx* 遺伝子には対立遺伝子が複数存在し、アミロース含量の多様性を生み出している。特に *Wx* タンパク質の量的な変異は栽培種に特徴的であり、人為的選抜に起因する遺伝的多様性機構を解析できる数少ない遺伝子と考えられる。このことは、遺伝的多様化を促進させようとする育種操作を考える上でも、重要な知見を与えるものと期待される。本研究の概要は以下の通りである。

1) イネオパーク突然変異の遺伝とその発現制御

Wx 遺伝子座には、オパーク胚乳を支配する突然変異が栽培イネの一部に見られる。IRRI より分譲された系統から作製した準同質遺伝子系統 (NIL) を用いて、イネオパーク突然変異の遺伝子発現調節機構について調査を行った。オパーク変異体は、モチ同様の種子外観をもつにも関わらずアミロースを約 10% 含み、ヨード反応で青紫色を呈することから見いだされてきた。これまで *Wx* 座は胚乳と花粉と同様に発現すると考えられてきたが、オパーク変異体の花粉のヨード反応を調査した結果、モチ花粉同様に赤褐色を呈し、*Wx* 遺伝子発現の組織特異性が変化している可能性が示唆された。そこで *Wx^{op}* の発現をタンパク質レベルで調査するため、イムノブロット分析を行った。その結果、*Wx* タンパク質は胚乳のみで発現し、花粉では殆ど発現しないことが明らかになり、タンパク質の発現レベルからも *Wx^{op}* では組織特異的な発現様式が変化していることが明らかになった。

2) イネの *Wx* 遺伝子発現に及ぼす遺伝背景について

Wx 遺伝子発現調節については、従来日本型の遺伝的背景で調査が進められ、インド型の遺伝的背景の影響については不明な点が多い。そこで、遺伝的背景の効果について 2 つの観点から実験を行った。胚乳デンプンのアミロース含量を低下させる遺伝子には複数の *du* 遺伝子が報告されている。本実験に使用した EMS 誘発変異体は微量のアミロースを生成し、胚乳はモチと区別できない。この変異は単因子によって支配されるが、*wx* 変異体との F₂ で 9 : 7 の分離を示した。既存の *du* 系統と相補性検定を行ったところ、この変異遺伝子は *du2* と同座であることが判明し *du2-2* と名付けた。この *du2-2* を T65 に導入後 (T65*du2-2*)、T65*Wx^{op}* と交雑したところ、雑種 F₂ で *du2* ホモ個体が期待比の 3 : 1 ではなく 15 : 1 に分離し、*du2-2* ホモ型が *Wx^{op}* の発現を低下させないことが示唆された。そこで後代から *Wx^{op}du2-2* 個体を選抜し

発現を比較した結果、*du2-2*は Wx^d に対するほどではないが Wx^e の発現も抑制した。その抑制程度は低いので、アミロース含量は T65 より高くオパーク様胚乳は示さないものと考えられた。次に異なる遺伝的背景下で Wx 対立遺伝子の発現を比較するため、戻し交雑によって Wx^d を IR36 (インド型) に導入した。既に得られた T65 の NIL と反復親の 4 系統を比較したところ、 Wx^d は Wx タンパク質・アミロース含量共に Wx^e より低い値を示したが、T65 背景下的の方がアミロース含量が低い傾向が見られた。この傾向は Wx^d 及び Wx^e の発現だけでなく Wx^{ep} においても認められ、発現を高める要因が日本型背景下に存在することが強く示唆された。

3) 栽培イネにおける Wx 座の遺伝的分化

モチ遺伝子座の分子遺伝学的研究から、食味の主因をなすアミロース含量の差異がアミロース合成酵素をコードする Wx 遺伝子の転写レベルに起因し、転写レベルの差は第一イントロンのドナーサイトにおける点突然変異 (GT→TT) に起因することが見いだされてきた。また日本型とインド型及び野生型系統との間で認められる著しいアミロース含量の差異は、この点突然変異遺伝子 (Wx^d) が日本型イネに特異的に分布することにより説明されている。栽培イネ品種には、 Wx 遺伝子座の対立遺伝子の分化 ($Wx^e \cdot Wx^d \cdot wx \cdot Wx^h \cdot Wx^{ep}$) によって、野生型イネには見られない Wx タンパク質の生成量とアミロース含量の多様性が見られる。イネの栽培化という短期間の進化の中で、 Wx 遺伝子の発現制御の多様化を生み出してきた分子的基礎を検討するため、約 60 系統の栽培及び野生イネを用いて Wx 遺伝子の塩基配列を決定すると共に Wx タンパク質の発現量を調査し、 Wx 遺伝子の形質進化と分子進化の情報を融合させ、 Wx 座遺伝子の多様な発現制御について検討した。NJ 法により系統樹を作成した結果、 Wx^d 及び Wx^h をもつ多くの日本型及びジャワ型系統は明瞭なクラスターを形成したのに対し、インド型品種は多様な突然変異を保持し、野生系統と混在して分布した。また Wx^h 及び Wx^{ep} のドナーサイトは Wx^e 同様 GT であり、 Wx^d から起源した対立遺伝子であることが示唆された。更に Wx^d 、 Wx^h 及び wx は日本型及びジャワ型イネ、 Wx^e 及び Wx^{ep} はインド型イネの栽培化過程で、野生型祖先種がもつ Wx^e 型の Wx 遺伝子から分化した対立遺伝子であること、日本型イネだけでなくインド型イネにも低アミロース系統が分布していることが初めて明らかになった。

4) Wx 座に連鎖するイネ基本着色遺伝子 C 候補領域の遺伝的多様性

イネのアントシアニン色素の着色は、着色部位や色調に多様な変異が認められること、その多様性は Wx 座と同様に栽培種に特異的に認められることから、栽培イネに見られる遺伝的多様性を理解する上で重要であるが分子的知見は殆ど得られていない。そこでイネアントシアニン基本着色遺伝子 C 座に関する分子的知見を得る目的で本実験を行った。分子マーカーを利用したシンテニーマップの比較より、トウモロコシのアントシアニン合成に関わる *myb* タイプの転写制御遺伝子 *cl* 遺伝子とイネ C 遺伝子の座乗位置が類似した領域に位置することが判明したことから、既に報告のあるトウモロコシ *cl* と相同なイネ遺伝子 *OsCI* の cDNA の塩基配列をもとに、ふ先着色系統 (T65wx) 及びふ先無着色系統 (868, IR36) の塩基配列を決定し比較した。その結果、ふ先無着色系統では、エキソン 3 に 10-bp の欠失が存在することが判った。更に T65wx x IR36 F₂ 164 個体を用い連鎖分析を行った結果、推定された *OsCI* の座乗位置は従来イネ第 6 染色体短腕に報告されている C 遺伝子の座乗位置と良く一致し、*OsCI* が C の候補遺伝子であることが強く示唆された。次に、栽培型及び野生型イネ 25 系統で *OsCI* の塩基配列を比較した結果、アジア栽培系統では全ての変異がエキソン 3 に分布し、しかもアミノ酸置換を伴う変異であることが判り、*OsCI* 領域の変異が表現型の多様性に関与していることが示唆された。

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

Genetic differentiation at the *wx* locus in wild and cultivated rice

(野生および栽培イネにおける *wx* 座の遺伝的分化)

本論文は、図 26、表 26、132 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。

Wx 遺伝子はイネの遺伝学研究で最も古くから知られるもので、最近になってこの遺伝子がアミロース合成酵素をコードしており、その遺伝子発現量が食味の重要な決定要因のひとつであることが判ってきた。その遺伝子発現量の制御には複数の制御因子が関与し、シス因子の多様性は *wx* 座内の複対立遺伝子の分化として認められる。本研究は、栽培イネに見られる *Wx* 遺伝子の多様性の育種的意義とその遺伝的多様性の進化的由来を明らかにする目的で行ったものである。得られた結果は、以下のごとく要約される。

1) イネの *Wx* 複対立遺伝子の発現制御

オペク変異体は、モチ同様の種子外観をもつがアミロースを含み、*wx* 座の複対立遺伝子の一つ *Wx^{op}* により決定される。熱帯産品種に分布するオペク系統から *Wx^{op}* を戻し交雑により標準系統に導入した準同質遺伝子系統を作成し、遺伝子発現を比較調査した。従来、*Wx* 座は胚乳と花粉で同様に発現すると考えられてきたが、ヨード反応で調査したところ、胚乳で発現する *Wx^{op}* が花粉では発現しない可能性が示唆された。そこでイムノブロット分析を行った結果、*Wx* 遺伝子の産物である *Wx* タンパク質は胚乳のみで検出され、花粉では発現しないことが判った。この結果から、*Wx^{op}* では組織特異的な発現様式が変化しているものと考えられた。

Wx 遺伝子の発現については、従来、日本型の遺伝的背景下で詳細な調査が進められてきたが、インド型の遺伝的背景の影響については不明な点が多い。そこで、遺伝的背景の効果について2つの観点から実験を行った。まず、*Wx* 遺伝子の発現を抑制する単純劣性の *du2-2* 遺伝子を用い、インド型品種が保持する *Wx^a* と日本型品種が保持する *Wx^b* に対する *du2-2* 遺伝子の効果を調査した。その結果、*du2-2* の両対立遺伝子に対する抑制作用が著しく異なることを明らかにした。次に、異なる遺伝的背景下で *Wx* 対立遺伝子の発現を比較した。*Wx^b* の発現は *Wx^a* より低い傾向にあるものの、T65 背景下より IR36 背景下で発現

が低い傾向を示した。この傾向は Wx^a 及び Wx^b の発現だけでなく Wx^{op} においても認められた。これらの結果は、インド型・日本型背景での Wx 遺伝子の発現制御の違いを初めて明らかにしたものである。

2) 栽培イネにおける Wx 座の遺伝的分化

胚乳のアミロース含量は、 Wx 遺伝子の転写産物量によって制御され、第一イントロンの点突然変異により転写レベルが減少する。また、イネ品種間で認められるアミロース含量の著しい差異は、この点突然変異が日本型イネに特異的に高頻度に分布することから説明できる。栽培イネ品種では、 Wx 遺伝子座の対立遺伝子の分化 ($Wx^a \cdot Wx^b \cdot wx \cdot Wx^{in} \cdot Wx^{op}$) によって、野生型イネには見られない Wx タンパク質の生成量とアミロース含量の多様性が認められる。本実験では、イネの栽培化過程で、 Wx 遺伝子発現の多様化を生み出してきた分子的基礎を検討した。約 60 系統の栽培及び野生イネを用いて Wx 遺伝子の塩基配列を決定すると共に遺伝子産物の発現量を調査し、 Wx 遺伝子の形質進化と分子進化の情報を融合させ、栽培化過程での Wx 遺伝子の多様化について検討した。NJ 法により系統樹を作成した結果、 Wx^b をもつ日本型及び Wx^{in} をもつジャワ型系統は明瞭なクラスターを形成したのに対し、インド型品種は多様な突然変異を保持し、野生系統と混在して分布した。また、 Wx^{in} 及び Wx^{op} の塩基配列から、両遺伝子が Wx^a から起源した対立遺伝子であることを明らかにした。さらに、 Wx^b, Wx^{in} 及び wx は日本型及びジャワ型イネの栽培化過程で、 Wx^{op} はインド型イネの栽培化過程で、いずれも Wx^a から分化したものであると結論付けた。日本型イネだけでなくインド型イネにも低アミロースを引き起こす突然変異が独立に選抜されたことも初めて明らかになった。

3) wx 座に連鎖するイネ基本着色遺伝子 C 候補領域の遺伝的多様性

本実験では、 Wx 座に連鎖する着色基本遺伝子 C 座の複対立遺伝子の分化に関する分子的基礎と染色体領域での多様化を理解することを目的とした。着色の多様性は栽培種特異的であるが、イネでは分子的知見は殆ど得られていない。トウモロコシの cl 遺伝子とイネ C 遺伝子の座乗位置は類似しているので、 cl と相同なイネ遺伝子 $OsCl$ の塩基配列を決定し、着色及び無着色系統を比較した。その結果、無着色系統では、エキソン 3 に 10-bp の欠失が存在することが判った。さらに、RFLP 分析の結果、 $OsCl$ と C 遺伝子の座乗位置はよく一致し、 $OsCl$ が C の候補遺伝子であることが示された。また、栽培型及び野生型イネ 25 系統の塩基配列を比較し、変異がエキソン 3 に集中し、しかも非同義置換変異であることが判り、これらの変異が表現型多様性に関与していると考えられた。

以上のように、栽培イネに存在する遺伝的多様性の要因となる対立遺伝子の分化について、その分子的基礎と進化的様相を明らかにしたことは、遺伝的多様性を利用する育種にとって重要な分子的知見を与えるものである。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、三上一保が博士（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。