

学 位 論 文 題 名

Genetic studies of quantitative traits
in rice (*Oryza sativa* L.) by using DNA markers

(DNA マーカー利用によるイネの量的形質に関する遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

量的形質の遺伝学的基礎としては、効果が小さく、環境の影響を受けやすい、多くの量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci; QTL) が関与していると考えられている。DNA マーカーを利用した量的形質遺伝解析 (QTL 解析) は、それ以前の古典的な統計遺伝学による量的形質遺伝解析と比べて、遺伝子座の位置を意識した解析であるという点で大きく異なる。個々の QTL の染色体上での位置が明らかになることで、既報の主働遺伝子や QTL との異同、多面発現や密接連鎖について座乗位置からの判断が可能になった。このことは DNA マーカーを用いて希望の遺伝子型を持った組み換え個体を積極的に選抜、淘汰するという DNA マーカー選抜育種 (marker-assisted selection; MAS) が質的形質だけでなく量的形質に関しても理論的に可能であることを意味している。また密接連鎖した DNA マーカーを起点にした QTL 関与遺伝子の単離 (map-based cloning) も理論的に可能であることを意味している。

著者はイネにおいて QTL のマーカー選抜育種や関与遺伝子の単離への足がかりをつくることを目的に本研究を開始した。対象形質としては、実用農業形質でありかつ生物学的にも重要な形質である出穂性 (第 2~4 章、第 6 章) と稈形質 (第 5、6 章) に着目し、その遺伝的基礎を明らかにすることを試みた。

解析集団は農林水産省農業生物資源研究所で養成された日本型イネ品種日本晴とインド型イネ品種 Kasalath の戻し交雑後代集団を主に用いた。日本晴と Kasalath の F_2 集団は Harushima et al.(1998) が 2275 個の RFLP マーカーからなる高密度連鎖地図を作成し、また、Yano et al. (1997) がその遺伝子型情報を利用して出穂性に関する QTL 解析を行った集団である。

第 2 章では、 F_2 集団の QTL 解析で検出された出穂期関連 QTL, *Hd1*, *Hd2*, *Hd3* について RFLP 連鎖地図上への位置づけを試みた。日本晴を反復親にして Kasalath との間で BC_3F_1 または BC_3F_2 集団を作成した。その中から RFLP マーカーを用いて対象とする QTL 周辺領域がヘテロ、かつ他の染色体領域ができる限り日本晴型ホモの個体を選抜した。これらの個体を各 QTL に関する F_1 個体と考え、 F_2 集団で RFLP マーカーの遺伝子型と出穂日の調査、 F_3 系統で出穂性に関する後代検定を行った。その結果、*Hd1*, *Hd2*, *Hd3* の遺伝子型の判定が可能となり、通常の連鎖分析によってそれぞれ第 6 染色体動原体付近、第 7 染色体長腕末端および第 6 染色体短腕に主働遺伝子としてマッピングすることができた。すなわち QTL を推定領域ではなく連鎖地図上の一つの

点として同定した。

第3章では、各 QTL に関する準同質遺伝子系統 (QTL-NIL) を MAS により作出し、自然条件下および日長を制御した条件下で反復親である日本晴とともに栽培した。その結果 *Hd1*, *Hd2*, *Hd3* は日長条件によって発現程度が変化する感光性遺伝子座であることを明らかにした。また各 QTL-NIL 同士を交雑した F_2 集団の QTL 解析や QTL 集積系統の比較栽培により、*Hd1* は *Hd2* および *Hd3* に対して、また *Hd2* は *Hd3* に対して上位的に働くことが明らかとなり、出穂期関連 QTL 間の相互作用を統計的にではなく表現型の違いから証明した。

日本晴と Kasalath の戻し交雑後代の一集団において、 F_2 集団の QTL 解析では検出されなかった新たな出穂期関連 QTL が検出された。第4章ではこの QTL (*Hd6*) について調査を行った。*Hd6* は F_2 集団のような *Hd1* や *Hd2* が分離する条件下では統計的に有意差が認められず QTL として検出できなかったが、一部の戻し交雑後代集団のように、これら QTL が分離しない条件下では主働遺伝子並の強い作用力を示した。第1章と同様のマッピングを行い、*Hd6* を第3染色体長腕に主働遺伝子として位置づけた。また QTL-NIL の比較栽培により *Hd6* についても感光性遺伝子であることを明らかにした。さらに *Hd6* が F_2 集団で検出されなかった主要因は、感光性遺伝子 *Hd2* との間の相互作用に起因することを明らかにした。*Hd6* についての一連の実験から、いわゆる primary population の QTL 解析のみでは量的形質の遺伝変異を全て説明しきれない危険性を示し、戻し交雑後代の QTL 解析の重要性を示した。

第5章では、日本晴と Kasalath の戻し交雑後代の一集団において、主働遺伝子様の表現型分離が観察された株開帳性に関して調査した。同集団の親個体のグラフ遺伝子型においてヘテロ型を示す染色体領域について、集団内の RFLP マーカーと表現型の分離を調査し株開帳性に関わる遺伝子のマッピングを試みた。その結果、株開帳性遺伝子 *Spk(t)* は第9染色体長腕に位置づけられ、親品種 (Kasalath) や F_2 集団で明瞭でない草型関連形質についても主働遺伝子支配の例を見出した。

第6章では、日本の基幹品種であるコシヒカリの遺伝的背景に Kasalath 染色体断片を導入した BC_1F_3 集団 187 個体について 116 の RFLP マーカーを用いて連鎖地図を作成した。出穂期、稈長、穂長および節間長の QTL 解析を行い、出穂期については4個、稈長については6個、穂長については4個、節間長については上位節間 (第1、2節間) と下位節間 (第3、4、5節間) でそれぞれ6個、11個の QTL ($P < 0.001$) を検出した。既報の QTL と座乗位置および作用の方向を比較した結果、異なる品種間で検出される共通の QTL の存在を示唆した。また出穂期関連 QTL と下位節間伸長に関わる QTL のように、形質間で相関を示し、かつ一部の QTL が連鎖地図上でクラスターを形成する例を見だし、節間伸長の発育機構についての考察を行った。

本研究における一番の工夫は量的形質の遺伝解析を効率よく進めるために、戻し交雑後代集団を育成し、DNA マーカーを用いて遺伝的背景を積極的に均一化したことである。量的形質の遺伝解析の成否を決定づける最も重要なポイントは形質の評価方法および評価に耐えられる解析材料の養成であると考えたからである。イネの出穂性および稈形質については、戻し交雑後代の解析を行うことによって QTL の本質に迫ることができ、当初の目的であった QTL のマーカー選抜育種や関与遺伝子単離のための有用な情報および材料を提供することができた。形質によって困難度合いは異なるだろうが、結論として、DNA マーカー利用による QTL 解析が、単なる表現型領域の推定手

段のみではなく、未知の遺伝子の本質に迫っていく手段として有用であることが証明できた。

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 studies of quantitative traits in rice (*Oryza sativa* L.) by using DNA markers

(DNA マーカー利用によるイネの量的形質に関する遺伝学的研究)

本論文は、図22、表6、107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。

農業上重要な形質の多くは量的形質である。一般に量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci; QTL) は、個々の遺伝子座の効果は小さく、環境の影響を受けやすい。DNAマーカーを利用した量的形質遺伝解析 (QTL解析) は、動植物の複雑な遺伝形質を理解するために有効であることが明らかとなってきた。このことはDNAマーカーを用いて希望の遺伝子型を持った組換え個体を積極的に選抜・淘汰するというDNAマーカー選抜育種が量的形質に関しても理論的に可能であり、また密接連鎖したDNAマーカーを起点にしたQTL関与遺伝子の単離も可能であることを意味する。本研究は、イネにおいてQTLのマーカー選抜育種や関与遺伝子の解明を目的とし、実用農業形質である出穂性 (第2～4章、第6章) と稈形質 (第5、6章) に着目し、その遺伝的基礎を明らかにした。

第1章では、RFLPマーカーを用いた作物連鎖地図の展開およびその育種学的利用について最近の動向を概説した。イネでは、日本晴とKasalathのF₂集団において2275個のRFLPマーカーからなる高密度連鎖地図が農林水産省農業生物資源研究所で作成され、その遺伝子型情報を利用して多様な育種形質の詳細な解析が可能となった。本研究は、複雑な遺伝構成をもつ形質の解析精度を高めるために、日本型イネ品種日本晴とインド型イネ品種Kasalathの戻し交雑後代集団を主に用いて解析を行った。

第2章では、日本晴とKasalathのF₂集団のQTL解析で検出された出穂期関連QTL, *Hd1*, *Hd2*, *Hd3* についてRFLP連鎖地図上への位置づけを試みた。日本晴を反復親にしてKasalathとの間でBC₃F₁またはBC₃F₂集団を作成した。その中からRFLPマーカーを利用して対象とするQTL周辺領域がヘテロで、それ以外の染色体領域ができる限り日本晴型ホモの個体を選抜した。これらの個体の後代から、RFLPマーカーの遺伝子型と出穂日を調査して出穂期関連QTLの解析を行った。

その結果、*Hd1*, *Hd2*, *Hd3*の遺伝子型を明瞭に判定することが可能となり、それぞれ第6染色体動原体付近、第7染色体長腕末端および第6染色体短腕部に主働遺伝子としてマッピングすることができた。すなわちQTLを推定領域ではなく連鎖地図上の一つの点として同定した。

第3章では、各QTLに関する準同質遺伝子系統（QTL-NIL）をRFLPマーカーを利用して作出し、自然条件下および日長を制御した条件下で反復親である日本晴とともに栽培した。その結果 *Hd1*, *Hd2*, *Hd3* は日長条件によって発現程度が変化する感光性遺伝子座であることを明らかにした。また各QTL-NIL同士を交雑したF₂集団のQTL解析やQTL集積系統の比較栽培により、*Hd1* は*Hd2*および*Hd3*に対して、また*Hd2*は*Hd3*に対して上位的に働くことが明らかとなり、出穂期関連QTL間の相互作用を統計的にではなく表現型の違いから証明した。

第4章では、日本晴とKasalathの戻し交雑後代の一集団において、F₂集団のQTL解析では検出されなかった新たな出穂期関連QTLが検出されたので、このQTL(*Hd6*)について調査を行った。*Hd6*はF₂集団のような*Hd1*や*Hd2*が分離する条件下では統計的に有意差が認められずQTLとして検出できなかったが、QTL(*Hd6*)は、他のQTLが分離しない条件下では主働遺伝子並の強い作用力を示した。*Hd6*を第3染色体長腕に主働遺伝子として位置づけるとともに、QTL-NILの比較栽培により*Hd6*についても感光性遺伝子であることを明らかにした。また、*Hd6*がF₂集団で検出されなかった主要因は、感光性遺伝子*Hd2*との間の相互作用に起因することを明らかにした。*Hd6*についての一連の実験から、F₂集団のQTL解析のみでは量的形質の遺伝変異を全て説明しきれない危険性を示し、戻し交雑後代のQTL解析の重要性を示した。

第5章では、日本晴とKasalathの戻し交雑後代の一集団において観察された単純劣性遺伝する株開帳性について遺伝解析を行った。分離集団において、RFLPマーカーと表現型を調査し株開帳性に関わる遺伝子のマッピングを試み、株開帳性遺伝子*Spk(t)*が第9染色体長腕に位置づけられることを見い出した。親品種(Kasalath)やF₂集団では、明瞭な草型変異が観察されなかったため、草型関連形質についても戻し交雑後代の解析が重要であることが判った。

第6章では、日本の基幹品種であるコシヒカリの遺伝的背景にKasalath染色体断片を導入した187個体からなるBC₁F₃集団を作成し、116のRFLPマーカーを用いて連鎖地図を作成した。出穂期、稈長、穂長および節間長のQTL解析を行い、出穂期については4個、稈長については6個、穂長については4個、節間長については上位節間（第1、2節間）と下位節間（第3、4、5節間）でそれぞれ6個、11個のQTLを検出した。既報のQTLと座乗位置および作用の方向を比較した結果、異なる品種間で共通のQTLが存在することを示唆した。また、出穂期関連QTLと下位節間伸長に関わるQTLのように、形質間で相関を示し、かつ一部のQTLが連鎖地図上でクラスターを形成する事例を見い出し、節間伸長の発育機構についての考察を行った。

以上のように、分子マーカーに基づく高密度連鎖地図を利用して、イネの出穂性および稈形質に関するQTLを明らかにし、QTLのマーカー選抜育種や関与遺伝子単離のための有用な情報を得た。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、山本敏央が博士（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。