

学 位 論 文 題 名

北海道におけるイネ穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析

学位論文内容の要旨

水稻中間母本農 8 号（中母農 8）は北海 241 号を反復親とする戻し交雑育種によってインドネシア原産の熱帯ジャポニカ品種 Silewah から穂ばらみ期耐冷性遺伝子を導入した耐冷性品種である。本研究では DNA マーカーを用いることにより、中母農 8 の穂ばらみ期耐冷性に関する量的形質遺伝子座（QTL）の遺伝解析を試みた。

中母農 8 の細胞質は Silewah に由来している。そこで、まず、細胞質遺伝因子と耐冷性との関連を調べるために、正逆交雑の F_1 個体について穂ばらみ期耐冷性を比較したが、交雑間での耐冷性の差は小さかった。したがって、細胞質は穂ばらみ期耐冷性に関わっていないと考えられた。

つぎに、Silewah から中母農 8 へ導入された染色体領域を明らかにするために、制限酵素断片長多型（RFLP）マーカーを用いて中母農 8 のグラフィカルジェノタイプ分析を行った。その結果、第 1, 3, 4 および 8 染色体に Silewah 由来の染色体領域を見出した。中母農 8 と姉妹系統で耐冷性が中母農 8 にやや劣る北海 PL4 についても RFLP 分析を行ったところ、北海 PL4 では第 1 および 4 染色体の導入領域は中母農 8 と同様に Silewah 由来だったが、第 3 および 8 染色体の導入領域は北海 241 号由来となっていた。このことから中母農 8 の主要な耐冷性遺伝子座は第 1 または 4 染色体に座乗する可能性が高いと考えられた。

耐冷性遺伝子が座乗する導入領域を明らかにするために、導入領域と耐冷性の関連を分離集団を用いて調べた。1993 年の冷害発生時に育種圃場で栽培されていたきらら 397／中母農 8／／きらら 397 の BC_1F_4 個体 43 個体について稈実率と導入領域の RFLP 遺伝子型を調査した。その結果、第 3 と第 4 染色体の導入領域は耐冷性と関連していることが示された。第 8 染色体の導入領域は耐冷性とは関連していなかった。第 1 染色体については RFLP マーカーが中母農 8 ときらら 397 の間で多型を示さなかったために評価を行うことができなかった。さらに、きらら 397／中母農 8／／きらら 397 の BC_1F_5 系統 92 系統について耐冷性検定と RFLP 遺伝子型の調査を行った。耐冷性検定は中期冷水灌漑法によって行い、稈実率で耐冷性を評価した。第 3 と第 4 染色体のマーカーについては、中母農 8 型の系統の平均稈実率がきらら 397 型の系統の平均稈実率よりも有意に高かった。一方、第 8 染色体については中母農 8 型の系統ときらら 397 型の系統の平均稈実率に差がなかった。これらの結果から、第 3 および 4 染色体の導入領域が耐冷性と関連していることがわかった。

導入染色体領域と穂ばらみ期耐冷性の関連について北海 241 号と中母農 8 の F_9 系統でも評価を行った。503 個のマイクロサテライトマーカーについて北海 241 号と中母農 8 のパターンを比較したところ、第 1, 3 および 4 染色体上のマーカーで多型が検出された。第 1 染色体のマーカーについて中母農 8 型の系統の平均稈実率は北海 241 号型の系統の平均稈実率よりも 8.5%高かった。第 4 染色体のマーカーについては中母農 8 型の系統が北海 241 号型の系統に比べて 17.7%高かった。しかし、第 3 染色体のマーカーについては中母農 8

型と北海 241 号型の系統で平均稔実率に差がなかった。したがって、北海 241 号と中母農 8 の分離集団では第 1 染色体と第 4 染色体の導入領域が耐冷性と関連していた。

穂ばらみ期耐冷性に対する効果が最も大きかった第 4 染色体の QTL を詳細にマッピングするために、中母農 8 へきらら 397 を連続戻し交配して得た分離集団で耐冷性の区間マッピングを行った結果、対数尤度スコアは導入染色体領域の中央部から動原体側で比較的高かった。この分離集団より耐冷性遺伝子座領域での組換え固定系統を育成した。これらの組換え固定系統について遺伝子型と穂ばらみ期耐冷性を比較した結果、導入染色体領域の中央部と動原体側の 2 カ所に耐冷性の QTL が存在すると考えられた。そこで、中央部の QTL を *Ctb1*、動原体側の QTL を *Ctb2* と名付けた。*Ctb1* と *Ctb2* の遺伝距離は最小で 5.6 cM、最大で 17.2 cM だった。

Ctb1 座の精密マッピングを行うために 1,255 個体の分離集団より *Ctb1* 座の両側に位置するマーカー間での組換え個体の選抜と系統化を行った。このうち 27 系統について耐冷性検定および遺伝子型の調査を行った結果、*Ctb1* 座は RFLP マーカー *XNpb264* 近傍にあると考えられた。*XNpb264* 周辺の塩基配列情報を基に simple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを作成した。これらのマーカーによる組換え固定系統の遺伝子型分析の結果、*XNpb264* の動原体側近傍のマーカー *BAC1* と *SCAB11* の間に関して遺伝子型が分離している系統を見出した。そこで、この領域に関する 2 つの準同質遺伝子系統を育成し、耐冷性を比較した結果、*Ctb1* は *BAC1* と *SCAB11* の間に座乗すると考えられた。*Ctb1* 領域を狭めるために、さらに 753 個体の分離集団について組換え個体の選抜を行い、*BAC1* と *SCAB11* の間で組換えを起こしている組換え固定系統計 10 系統について SSLP マーカー遺伝子型の分析を行った。これらの組換え固定系統について耐冷性検定を行った結果、*Ctb1* は SSLP マーカー *BAC1* と *BAC22* の間に座乗すると考えられた。*BAC1* と *BAC22* の物理距離は約 56 kb だった。

56 kb の *Ctb1* 領域には 7 個のオープンリーディングフレーム (ORF) があり、そのうちの 2 個はシグナル伝達経路に関係するタンパク質リン酸化酵素をコードしていた。他の 2 つは F-box を持っていた。F-box はユビキチン-プロテアソーム経路に関係している。もう 1 つの ORF は BAG ドメインとユビキチンドメインを持ち、Hsc/Hsp シャペロンとユビキチン-プロテアソームを結合させる機能を持つと考えられる。残りの 2 つについては機能は不明だった。

葯長はその中に含まれる花粉の量と相関することから、穂ばらみ期耐冷性に影響を与える要素の一つと考えられている。そこで、中母農 8 の耐冷性遺伝子座と葯長の関係を調べた。中母農 8 の葯長は 2.85 mm で、北海 241 号の葯よりも 0.72 mm 長かった。葯長と耐冷性との関係を調べるために、両品種の F_7 系統について葯長を調査したところ、第 4 染色体の導入領域は葯長と有意に関連していた。そこで、第 4 染色体長腕に座乗する耐冷性の QTL と葯長の関係を調べるために、区間マッピングに用いた組換え固定系統の葯長を測定した。*Ctb1* または *Ctb2* を持つ系統の葯は両耐冷性遺伝子を持たない系統の葯よりも長かったことから、*Ctb1* と *Ctb2* は共に葯長と関係している可能性が示された。

以上の研究により、中母農 8 の穂ばらみ期耐冷性遺伝子座は第 1, 3 および 4 染色体に座乗することが明らかになった。第 4 染色体長腕には 2 つの連鎖する耐冷性遺伝子座が存在していた。両耐冷性遺伝子は葯長と関連する可能性が示され、また、一方の耐冷性遺伝子については 7 個の候補遺伝子が同定された。今後は、これらの結果を利用した耐冷性育種の進展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 喜多村 啓 介

副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

北海道におけるイネ穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析

本論文は、93 ページからなる和文で、別に5編の参考論文が添えられている。

ゲノム解析法の飛躍的发展により、ゲノム情報を利用した効率的育種法の開発は世界的に育種の最重要課題の一つとなっている。本研究は、従来の育種選抜に分子マーカーを利用して改良を進めることを目的として行われた。育種上の重要形質の多くは量的形質であり、分子マーカーの利用によって、複数の遺伝子による個々の遺伝的効果の検出、正確な位置およびそれら遺伝子の環境反応や相互作用の解析を通して、選抜効率を高めることが期待される。本実験では、寒冷地イネ栽培に重要な耐冷性を高めるために分子マーカーを利用した。得られた結果は以下のように要約される。

1) 耐冷性を示す水稻中間母本農8号(中母農8)は、熱帯ジャポニカ品種 Silewah から穂ばらみ期耐冷性遺伝子を導入した耐冷性品種である。正逆交雑個体について穂ばらみ期耐冷性を比較したところ、正逆交雑間で有意な差は認められず、耐冷性は核支配の形質と考えられた。つぎに、Silewah から導入された染色体領域を制限酵素断片長多型 (RFLP) マーカーを用いて調査した。その結果、中母農8では第1、3、4および8染色体に、姉妹系統である北海 PL4 では第1および4染色体に Silewah からの導入領域を検出した。

2) 1993年の冷害発生時に、きらら397と中母農8の BC_1F_4 個体43個体について稔実率と RFLP 遺伝子型を調査した結果、第3と第4染色体の導入領域が耐冷性に関連することが示された。さらに、 BC_1F_5 系統92系統についても同様の調査を行ったところ、第3と第4染色体のマーカーにおいて、耐冷性に有意な差が検出された。一方、第8染色体については有意な差が認められなかったことから、第3および4染色体の導入領域が耐冷性に関連していることがわかった。

3) 多数の分子マーカーを用いて、北海241号と中母農8を比較したところ、第1、3および4染色体上のマーカーで多型が検出された。第1染色体のマーカーに

ついて中母農8型の系統の平均稔実率は北海241号型の系統の平均稔実率よりも8.5%高かった。第4染色体のマーカーについては中母農8型の系統が北海241号型の系統に比べて17.7%高かった。第3染色体のマーカーについては差が認められなかったので、北海241号と中母農8の分離集団では第1と第4染色体の導入領域が耐冷性と関連するものと考えられた。

4) 耐冷性効果の大きかった第4染色体のQTLを区間マッピング法で解析した。その結果、対数尤度スコアは導入染色体領域の中央部から動原体側で高かった。この候補領域での組換え固定系統を選抜し、遺伝子型と穂ばらみ期耐冷性を比較した。その結果、導入染色体領域の2カ所に耐冷性の量的遺伝子座(QTL)が検出され、*Ctb1* および *Ctb2* と命名した。両座は5.6–17.2 cMで連鎖していた。

5) 1,255個体を用いて *Ctb1* 座の精密マッピングを行った。組換え個体の選抜と系統化を行い、27系統について耐冷性検定および遺伝子型を調査した。*Ctb1* 座は *XNpb264* 近傍に位置するので、周辺の塩基配列情報を基に新たに分子マーカーを作成した。*XNpb264* 近傍マーカーBAC1とSCAB11間の組換え個体から、組換え型に関する同型接合体を選抜して耐冷性を比較したところ、*Ctb1* はBAC1とSCAB11の間に座乗すると考えられた。さらに、753個体の分離個体から組換え固定系統計10系統を選抜し耐冷性検定を行った結果、*Ctb1* はBAC1とBAC22の間に座乗すると結論された。BAC1とBAC22の物理距離は約56 kbであり、この領域には、7個のオープンリーディングフレーム(ORF)が認められた。

6) 葯長は花粉の量と相関し、穂ばらみ期耐冷性に影響を与える形質の一つである。中母農8の葯長は2.85 mmで、北海241号の葯よりも0.72 mm長かった。 F_7 系統について葯長を調査したところ、第4染色体の導入領域は葯長と有意に関連していた。そこで、区間マッピングに用いた組換え固定系統の葯長を調査した。*Ctb1* または *Ctb2* を持つ系統の葯は両耐冷性遺伝子を持たない系統の葯よりも長かったことから、*Ctb1* と *Ctb2* は共に葯長を支配すると考えられた。

以上のように、本研究で得られた穂ばらみ期耐冷性遺伝子の解析は、複雑な量的育種形質を明らかにした、他に事例のない研究として高く評価される。本実験結果は、自然界に存在する適応形質の理解に多大の貢献をなし、育種的利用に道を開くものとして期待される。よって審査員一同は、齋藤 浩二が博士(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。