

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 古 田 智 敬

論 文 題 目

「 Utilizing wild rice species for breeding and discovering domestication genes 」

(野生イネの育種利用と栽培化形質遺伝子の同定)

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	芦 莉	基 行
委 員	名古屋大学教授	北 野	英 己
委 員	名古屋大学教授	服 部	東 穂
委 員	名古屋大学准教授	土 井	一 行

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、野生イネ *Oryza rufipogon* 由来染色体断片をエリート栽培イネ *Oryza sativa* cv. Koshihikari に導入した染色体断片置換系統群 (CSSLs) の作出と評価について、そして、それらの表現型調査により同定された栽培化形質遺伝子座について報告した。

野生イネ *O. rufipogon* は、栽培イネ *O. sativa* の祖先野生種であるが、近年報告された多系統の *O. rufipogon* と *O. sativa* を用いたゲノムワイドな遺伝学的解析によって、栽培化によって多くの遺伝的多様性が失われていることが示された。つまり、*O. rufipogon* の遺伝資源としてのポテンシャルを評価することで、新規有用遺伝子の発見に繋がる可能性がある。そこでまず、*O. rufipogon* Acc. W0106 と *O. sativa* cv. Koshihikari を交配して次世代を得て、この F<sub>1</sub> に対して *O. sativa* cv. Koshihikari を繰り返し戻し交雑を行った。これによって、*O. sativa* cv. Koshihikari の遺伝背景に、部分的に *O. rufipogon* の染色体断片が置換した染色体断片置換系統群 (RSLs) が作出された。33 系統から構成される RSLs では、*O. rufipogon* ゲノムの 95% 以上を *O. sativa* cv. Koshihikari 遺伝背景に導入することに成功した。この RSLs に対して、出穂期、稈長、穂長、一次枝梗数、一穂粒数、粒長、粒幅、粒厚、100 粒重、稔実率について表現型の評価を行った。Koshihikari が示した表現型値に対して、有意な差を示した系統が保持する *O. rufipogon* 染色体断片には、その形質を制御する量的形質遺伝子座 (QTL) が存在すると考えられる。表現型調査および統計解析の結果、全 10 形質に対する評価において合計で 99 個の QTL を見出すことが出来た。この 99 個の中でも、表現型に大きな影響を与えるものを検出するため、ボックスプロットを作成した。各 CSSLs が示した表現型の平均値をプロットしたときに、外れ値として検出されたものを、効果の大きな QTL を保持する系統であると判断し、解析を行った。その結果、99 個の QTL のうち 15 個が効果の大きな QTL であった。これら 15 個の QTL のうちで、形質を農業的に改善しうる QTL として、一穂粒数を 45% 以上増加させる効果の大きな QTL が見出された。この一穂粒数 QTL は、10 番染色体のおよそ 14.5 Mb から 17.56 Mb の間に座乗しており、過去の QTL 解析で同定されていない新規 QTL であることが判明した。

今回、表現型調査によって得られたデータにおいて、形質どうしの相関関係を解析したところ、いくつかの形質の間に相関関係があることが示された。興味深いことに、弱いながらも稈長と粒厚、稈長と 100 粒重の間に正の相関関係が見られた。粒厚は、粒幅や粒長と異なり、種子におけるデンプン充填量によって大きく変動すると思われる。100 粒重もまたデンプン量に影響される形質であり、粒厚の変化が直接的に影響する形質である。すなわち、これらのことから、稈長、粒厚、100 粒重の 3 つの形質に共通する生理的な因子として、炭素同化産物量が考えられる。一方で、3 つの形質が多面的な機能を持つ因子によって、遺伝的に共通して制御される可能性もまた考

えられる。RSLsのうち、RSL-6とRSL-15がこの相関関係を良く反映した表現型を示しており、今後詳細な解析を行うことでどのような要因により相関が現れているのかを明らかに出来ると考えている。

また、100粒重と種子サイズのパラメータ（粒長、粒幅、粒厚）にそれぞれ相関が見られる一方、種子サイズのパラメータ間では有意な相関が見られなかった。そこで、種子サイズから100粒重を予測するモデル式を重回帰分析により推定した。各変数の寄与率を算出したところ、粒厚が最も100粒重に影響を与えるパラメータであることが判明した。これらのことから、粒厚が、100粒重に対して最も直接的で大きな影響を与えるパラメータであることが示された。今回の結果から粒厚を指標としたソース能や種子におけるでんぷん充填に関与するQTLの同定できる可能性が示唆された。

育種利用に向けた表現型調査に加えて、今回、野生種由来染色体断片を導入したCSSLsを作成したことで、栽培化関連形質の一つである「のげ」の形成に関わる遺伝子座を同定することにも成功した。のげとは、種子において外穎の先端から伸びる棘状の器官で、種子の拡散や食害防除に寄与していると考えられている。RSLsの表現型観察においてRSL-11でのみ、のげの形成が確認された。RSL-11は、4番染色体に*O. rufipogon*染色体断片を保持していることから、この領域にのげ形成遺伝子が存在することが示唆された。また、同時に*O. sativa*が栽培化の過程でこののげ形成遺伝子に変異が導入されることでのげを失った可能性が示された。さらに、*O. rufipogon*の近縁種である*O. nivara*の染色体断片が、*O. sativa* cv. Koshihikari 遺伝背景に導入されたCSSLsであるWBSLsにおいて、表現型観察を行った。すると、WBSL-10とWBSL-18の2系統でのげが観察された。WBSL-10は、RSL-11と共通する4番染色体上の領域に*O. nivara*染色体断片を保持していたが、WBSL-18においては、8番染色体が置換されていた。これらの結果から、*O. sativa*は、栽培化の過程で4番染色体と8番染色体に座乗するのげ形成遺伝子に変異を持つことで、のげを失ったことが示唆された。4番染色体と8番染色体ののげ形成遺伝子をそれぞれ*AWN4*、*AWN8*と名づけた。

イネの栽培種はアジアの*O. saiva*とアフリカの*O. glaberrima*の2種が存在し、これらは異なる時期に独立して栽培化されたことが分かっている。アフリカの栽培イネ*O. glaberrima*ものげを形成しないが、はたして、のげの消失は*AWN4*、*AWN8*に起因するのだろうか？これを検証するため、*O. glaberrima*染色体断片が*O. sativa* cv. Koshihikari 遺伝背景に導入されたGLSLsにおいて表現型を観察した。その結果、GLSL-13とGLSL-26の2系統がのげを形成した。GLSL-13は、RSL-11やWBSL-10と共通する4番染色体上の領域に*O. glaberrima*染色体断片を保持していた。一方、GLSL-26は、WBSL-18と同様に8番染色体に置換断片を保持していた。以上の結果から*O. glaberrima*では、*AWN4*、*AWN8*は機能型で保持されており、ゲノム中に存

在する別ののげ形成遺伝子 *AWN4* に変異を持つことでのげを消失していることが示された。

これら 3 つののげ形成遺伝子のファインマッピングを行ったところ、*AWN4* は、4 番染色体の中央付近およそ 60 kb の領域にマップされた。*O. sativa* と *O. glaberrima* のゲノム配列を比較したところ、*O. glaberrima* のこの領域には 2 遺伝子のみが存在した。一方、*AWN8* は、8 番染色体の長腕端付近およそ 80 kb の領域にマップされた。この領域には 11 遺伝子がアノテーションされており、いくつかの遺伝子でミスセンス変異やフレームシフト変異が確認された。*AWN6* については、*O. sativa* が機能型アリアルであると考えられたため、*O. glaberrima* と *O. sativa* の F<sub>1</sub> に対して、*O. glaberrima* を戻し交雑することで、*AWN4* と *AWN8* を機能型 (*O. glaberrima* 型) で保持し、*O. sativa* 断片の導入により のげを形成する系統を作出し、マッピングを行った。その結果、*AWN4* は 6 番染色体長腕端付近 290 kb の領域に座乗することが明らかになった。*AWN4* の候補遺伝子はわずか 2 遺伝子であったことからこれらについて相補性試験を行い原因遺伝子の同定を試みた。その結果、*AWN4* は、*Os04g0350700* としてデータベースに登録されている bHLH ドメインを持つ転写因子であることが判明した。*AWN4* タンパク質の細胞内局在を確認したところ核に局在することが示された。また、発現解析を行ったところ、のげや穎花において発現が確認された。のげを形成する GLSL-13 とのげを形成しない Koshihikari の外穎において、*AWN4* 発現量を比較したところ、GLSL-13 で有意に高発現していることが示された。以上の結果から、*O. sativa* では、変異の導入によって *AWN4* の発現量が低下することでのげが形成されなくなった可能性が示唆された。*AWN4* は、*O. rufipogon* を用いた解析によって最近報告されたのげ形成遺伝子 *An-1* と同じ遺伝子であった。このことは、GLSL-13 と RSL-11 におけるのげの形成は同じ遺伝子に起因していることを強く支持している。

3 組の CSSLs における表現型比較によって、アジアにおける *O. sativa* の栽培化過程では、*AWN4* と *AWN8* が両方とも機能を失うことでのげの消失が達成されている一方、アフリカの *O. glaberrima* 栽培化過程では、*AWN6* が機能を失うことでのげが消失したことが示された。これは、イネにおいて、異なる栽培種間での同様な表現型の獲得が、異なる遺伝子における変異に起因することを示した初めての報告である。

以上のように、本論文では、野生イネの利用は育種的にも分子生物学的にも有用であり、近縁野生種である *O. rufipogon* は十分な遺伝資源としてのポテンシャルを持つことが示された。

以上の結果より本論文は博士 (農学) の学位論文として十分価値を有するものと認め、論文審査に合格と判定した。