

# 主論文の要約

## Utilizing wild rice species for breeding and discovering domestication genes

論文題目 (野生イネの育種利用と栽培化形質遺伝子の同定)

氏名 古田 智敬

現在までに、世界では様々な植物が栽培化され、食料として利用され続けている。中でも穀物は、人類が消費する総カロリーの50%を供給している。そして、数ある穀物の中でもイネは、最も多くのカロリーを人類に供給しており、特にアジアにおいては、世界で生産されたコメの9割以上が消費され、非常に重要な地位を占めている。このように、人類にとって欠かせない存在となっているイネであるが、それは、長い時間をかけて野生種から栽培種へと栽培化が行われた賜物である。栽培化の過程では、種子サイズや草型をはじめ、様々な形質が栽培に適したものへと変化してきた。その際、幾多の交雑を繰り返しながら、農業的に有用な形質を導く遺伝子が選抜され、逆に不要な形質を示す遺伝子は排除されることで、現在の栽培イネが育種されたと考えられている。その結果、現行の栽培イネは、祖先野生種と比較して格段に収量が向上し栽培も容易になっている。しかし、増え続ける食料需要に応えるため、さらなる増産と栽培の安定化が求められている。そこで、栽培イネの収量増加や栽培可能な地域の拡大、生産の安定化に資する新規有用遺伝子を同定し育種利用するため、野生イネが遺伝資源として注目されている。栽培イネの祖先野生種を含め、野生種のゲノム中には、過去の栽培化過程では選抜されず利用されていない有用遺伝子が存在する可能性が期待される。実際、様々な野生種から病虫害抵抗性遺伝子が単離され、育種利用された経緯がある。世界の様々な環境にそれぞれ適応進化した野生イネを育種利用することで、人類が直面する食糧問題を解決する一助となると考えられる。さらに、野生イネと栽培イネを比較することによって、イネの栽培化に関わった遺伝子の同定など、進化生物学的な研究も促進されることが期待できる。このように、野生イネは、育種的にも科学的にも非常に有用な遺伝資源であると言える。

そこで、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する。

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考えられる。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 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。以上の結果から、粒厚を指標としたシンク - ソースバランスに関与する QTL の同定が可能であり、収量増加や安定化を目指した育種において有効であ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. sativa* 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 *AWN<sub>X</sub>* 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、*AWN<sub>X</sub>* 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. saiva* 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。今後、様々な種やアクセッションを利用して CSSLs などの材料が作出されることで、栽培イネの品種改良や進化生物学的研究がより一層促進されると期待できる。