

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

Analysis of gamma ray-induced sweet sorghum mutants

論文題目 (ガンマ線によって誘起されたスイートソルガム突然変異体の解析)

氏名 ORDONIO Reynante Lacsamana

論文内容の要旨

スイートソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) は稈に高濃度の糖を蓄積する高糖性ソルガムの系統であり、重要なエネルギー作物と考えられている。ソルガムについての遺伝学研究は少なく、また主に子実型ソルガムで行われてきたことなどから、これまでスイートソルガムの研究はあまり行われていなかった。遺伝学、分子遺伝学研究において、突然変異体は新規遺伝子の単離及びその機能解析に非常に役立つことから、突然変異体ライブラリーは重要な研究材料である。私はスイートソルガムの突然変異体ライブラリーを作製するため、スイートソルガム品種 (SIL-05) の種子に 175~250Gy のガンマ線を照射することで M₁ 種子を作製し、これを自殖することで 5,000 系統以上の M₂ 種子を作製した。そして、この M₂ 系統において形態的特徴を示す突然変異体を幼苗期及び出穂期に大規模スクリーニングを行った。5,466 系統の突然変異体をスクリーニングした結果、669 系統において特有の表現型を示し、その表現型は 11 のカテゴリー(発芽、生長、葉色、葉形態、草丈、病害応答、分蘖、稈形態、出穂期、穂形態、その他)に分類された。このなかでも、草丈に関わる変異体は非常に多く同定されたことから、このうち 6 つの極矮性変異体、3 つの徒長変異体、1 つの半矮性変異体を詳細に解析した。

5 つの極矮性変異体については、稈が異常に屈曲する表現型も同時に示したことから、それぞれ *bdw1* (*bending dwarf 1*), *bdw2*, *bdw3-1*, *bdw3-2*, *bdw4* と名付けられた。*bdw* 変異体は、幼苗期には極矮性の表現型のみが認められ稈の屈曲性は認められなかったが、その後、育成を継続すると稈の屈曲性が現れることが明らかとなった。*bdw3-1* の屈曲した稈を組織学的に解析した結果、節間における屈曲部の内側と外側での細胞数が大きく異なることがわかった。この細胞増殖が不均一であることが稈の屈曲性の原因であると考えられた。次に、*bdw* 変異体の重力応答性を明らかにするために、幼苗期と栄養成長期の重力屈性を調べた。幼苗期において変異体の地上部は重力刺激に応答したが、野生株に比べるとその反応は弱かった。これは稈の伸長が阻害されているためと考えられた。変異体では栄養成長期における地上部の重力応答も弱かった。また幼苗期における変異体の根も重力に応答した

が、野生株に比べはるかに遅かった。これらのことは *bdw* 変異体では重力応答性が低下していることを強く示唆した。

bdw3 変異体の原因遺伝子を決定するため、*bdw3-1* 変異体と別品種である *bmr-6* との交配を行ったのち、その雑種 F₂ 集団を用いたマッピングを行い、結果として候補領域を約 4Mb に狭めた。この領域にはジベレリン (GA) 合成遺伝子である *SbK01* が座乗し、変異体ではこの遺伝子領域を含む 45kb の領域が欠失していることがわかった。他の *bdw1*, *bdw2*, *bdw3-2*, *bdw4* 変異体でも *SbCPS1*, *SbKS1*, *SbK01*, *SbKAO1* (全て GA 合成遺伝子) 遺伝子内に、タンパク質コード領域を含む 16kb 領域、第 3 エキソンで 1 塩基欠失によるフレームシフト変異、タンパク質コード領域を含む 17kb、第 2 エキソンで 5 塩基欠失によるフレームシフト変異がそれぞれ確認された。また、アグロバクテリウム法により、これらソルガムの野生型遺伝子をイネの GA 合成遺伝子の変異体に導入したところ表現型が回復したことから、変異体で欠失した遺伝子が GA 合成遺伝子として機能していることが確認された。さらに、変異体に GA を処理すると、変異体の稈の屈曲や矮性は GA 濃度依存的に緩和された。逆に GA 合成阻害剤であるユニコナゾールを野生株に処理すると、濃度依存的に変異体に類似した稈の屈曲及び短縮という表現型を示した。このことは、ソルガムの稈が屈曲せず真直ぐ生育するためには GA が重要な役割を担っていることを示している。

ソルガムにおいて、GA の欠乏は矮性と稈の屈曲を同時に引き起こしたことから、GA 関連変異はソルガムの育種では用いられなかった可能性が示唆された。事実、これまで行われてきたソルガムの稈長の QTL 解析やアソシエーション解析では、ソルガム矮性遺伝子 *dw1* を除いた他の矮性遺伝子座は GA 関連遺伝子座と一致しなかった。*dw1* 遺伝子座の近傍には GA 代謝酵素をコードする *GA-2ox* 遺伝子が存在したが、tall white sooner millo (*Dw1Dw1*) とその準同質遺伝子系統である dwarf white milo (*dw1dw1*) のゲノム DNA 配列解析及び RNA-seq 解析の結果、この *GA-2ox* 遺伝子においてはゲノム配列に変異もなく、また発現レベルも変わらないことが明らかとなったことから、GA 関連変異はソルガムの矮性育種では用いられなかったと考えられた。

別の極矮性変異体は、ねじれた奇形の葉を持つことが特徴であり、イネで知られているブラシノステロイド (BR) 関連変異体に類似していた。ソルガムの野生型は暗所で育成するとメソコチルの伸長が起きたが、この変異体はイネの変異体同様にメソコチルが伸長しないという異常な暗所形態形成を示した。この変異体の表現型は BR の一種であるブラシノライド処理により回復した。これらの結果は、この変異体では BR レベルが低下していることを示唆した。そこで、この変異体における BR 合成遺伝子の配列を調べた。その結果、BR 合成系の遺伝子の一つ、*BR6ox* の第 1 エキソンにおいて、変異体にはナンセンス変異があることがわかった。また、ソルガム野生株由来の *BR6ox* 遺伝子をイネの *br-6ox* 変異体に形質転換したところ、表現型が回復したことから、この遺伝子が BR-6ox としての機能をもつ酵素をコードしていることが明らかとなった。

前述の変異体同様に、3 つの徒長変異体はイネの *slr1* 変異体と非常に類似していた。

このイネの変異体では GA シグナルの負の抑制因子として機能する DELLA タンパクが機能欠失している。そこでソルガムの徒長型変異体の *SLR1* 遺伝子をシーケンスしたところ、二つの変異型アレルが同定された。この二つのアレルは共に、*SLR1* 遺伝子の転写抑制領域をコードする領域に 2bp の欠失によるフレームシフト変異が生じていた。この変異によって変異体は恒常的な GA 応答を起こし、徒長型の表現型を示したと考えられた。このソルガムの野生型遺伝子をイネ野生株に形質転換したところ、草丈の短縮が起こったことから、この遺伝子は GA シグナル抑制因子をコードしていると考えられた。

また、ソルガムでは農業上重要な半矮性遺伝子の一つとして *dw3* が使われており、*dw3* 変異を持つ品種では共通した程の短縮パターンを示すことが知られている。この *Dw3* に変異を持つ新たな半矮性スイートソルガム変異体を同定した。その変異は、第 1 エキシソンの 5bp の欠失によるフレームシフト変異であり、これまでの復帰変異が起こりやすく不安定なグレイソルガムの重複変異と異なり、変異が安定であることから農業上重要であると考えられた。

本研究によって、スイートソルガムのガンマ線によるシステムチックな突然変異の誘起が、新規遺伝子同定や有用遺伝子単離において有用であることが示された。本研究で得られた形態学的、遺伝学的知見はデータベース化され、世界中のソルガム研究者にとって有益なデータベースとして役立つであろう。