別紙１－１

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※　　第　　号

氏　　名　REYES Vincent Pamugas

論　文　題　目

Application of next-generation sequencing technology for genetic analysis and pre-breeding of rice
（イネの遺伝解析および育種素材開発における次世代シーケンシング技術の利用）

論文審査担当者

主査　名古屋大学准教授　土井　一行

委員　名古屋大学教授　　近藤　始彦

委員　名古屋大学教授　　村瀬　潤

委員　名古屋大学教授　　芦苅　基行

委員　名古屋大学助教　　西内　俊策

別紙１－２

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

イネの収量を劇的に増加させた 1960 年代の「緑の革命」の後、イネの収量は伸び悩んでいる。2050 年までに世界の人口は 90 億人を超えると考えられており、イネの収量増加は喫緊の課題である。そのためには、品種改良、栽培技術の開発、灌漑施設の整備などさまざまなアプローチが考えられる。品種改良の面では、次世代 DNA シーケンス（next generation sequencing、NGS）技術により有用遺伝子の同定が迅速に行われるようになり、さらなる発展が期待されている。本論文において、申請者は NGS 技術を用いたイネの遺伝子型決定（genotyping-by-sequencing、GBS）の育種現場での活用を目指し、収量の遺伝解析および新規遺伝資源・育種材料の遺伝子型決定を行い、その有用性を評価した。

GBS とは、制限酵素の隣接配列のみを解読するなどして、サイト数を減らしてゲノム解読を行うことで、より多検体の DNA 塩基配列を解読する手法を指す。自殖性作物においては、染色体あたり 200 個程度の DNA マーカーがあれば遺伝解析および選抜には十分である。本論文において使用した GBS の実験系は、バーコードと呼ばれる検体認識用の配列を持つアダプターに制限酵素 *Kpn*I と *Msp*I により切断した検体 DNA をライゲーションし、その産物をまとめて PCR 増幅する手法であり、NGS 用ライブラリの作成法としては簡便であり、さらに事前の DNA 多型情報が不要であるという利点があり、育種の現場での活用に適している。

申請者はまず、イネの収量に関与する量的形質遺伝子座（QTL、quantitative trait loci）解析を行うために、*indica* 背景を持つ高収量品種である「北陸 193 号（H193）」と *japonica* である「台中 65 号（T65）」の交雑に由来する組換え自殖系統を作出し、その遺伝子型の決定に GBS を適用し、十分な遺伝子型情報を得た。H193 は、T65 よりも高い収量を示し、シンク形質では 1 穂粒数・穂数、ソース形質ではバイオマス・茎葉重、転流関連では 2 次枝梗の種子稔性で T65 よりも大きな値を示した。また、収穫指数も H193 の方が高い値を示した。本研究のマッピング集団においては雑種不稔によると思われる稔実率の低下が多くの系統で見られ、この不稔には染色体 9 と染色体 12 の 2 箇所の QTL の相互作用が関与していると考えられたため、これらの領域は収量に関与するとみなさないこととした。2020 年の標準肥料区において、穂重に関する有意な QTL は検出されなかったが、LOD 値が 2 を越える 4 箇所の suggestive QTL が存在し、いずれにおいても H193 アレルが穂重を増加させていた。これらのうち、染色体 1 の新規 QTL はバイオマスおよび茎葉重の QTL の位置と、染色体 10 の新規 QTL は 2 次枝梗上の穎花の種子稔性の QTL の位置と一致し、いずれにおいても H193 が有用なアレルを有していた。1 穂粒数においては 5 箇所の suggestive QTL が検出され、そのうち 3 箇所で H193 が有用アレルを持っていた。その 3 箇所のうち 2 箇所は既知の *Gn1* 座および *APO1* 座と一致し、染色体 4 の 1 箇所は新規の QTL であった。染色体 4 の *SPIKE* 座近傍の QTL においては H193 ア

別紙１－２

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

レルが 1 穂粒数を減少させる一方で穂数を増加させており、1 穂粒数と穂数のトレードオフに関与していた。このように、H193 の高収量を特徴付ける要因である 1 穂粒数、バイオマス、および二次枝梗の種子稔性に関与する新規 QTL の検出に成功した。

イネ新規 nested association mapping（NAM）集団の遺伝子型決定においては、既存の GBS の方法を基本として用い、さらにイルミナ社 NGS で利用可能なインデックス配列を組合せる方法を開発した。NAM 集団の遺伝子型決定にこの手法を適用し、1365 検体をひとつの NGS ライブラリで解析し、十分な量と精度の遺伝子型を得た。この系では最大で 12 交配組合せ、2304 検体をまとめて解析でき、育種現場における GBS の適用範囲を広げることが示された。

WISH（Wonder rice Initiative for food Security and Health）プロジェクトは名古屋大学の研究者が中心となって行われてきたプロジェクトで、組織的な交配と DNA マーカー選抜により、*Grain number 1a*（*Gn1a*）や *Wealthy farmer's panicle*（*WFP*）の 1 穂粒数増加アレルを世界の品種に導入する戻し交雑育種が進められてきた。申請者は WISH プロジェクトで育成された材料（BC_3F_4 世代）について、形質調査を行った。調査した系統の多くで 2 次枝梗数が増加する *Gn1a* アレルの効果や 1 次枝梗数が増加する *WFP* アレルの効果を確認した。また、*Gn1a* と *WFP* の両座で粒数増加アレルを導入した系統においてはその両方の効果が見られた。ほとんどの系統が、1 穂粒数以外の形質では反復親と同等の形質を示したが、*WFP* の導入により穂数は減少するため、収量の増加についてはトレードオフを考慮する必要があることが明らかとなった。さらに、BC_3F_5 世代において、GBS による全ゲノム遺伝子型の決定を行った。その結果、*Gn1a* や *WFP* が正しく導入されていることを確認した。さらに、反復親ゲノムの回復割合（recurrent parent genome recovery）を推定した結果、ほとんどの系統で 85%以上が反復親型になっており、表現型と遺伝子型の両方において、WISH 系統が反復親の遺伝的背景を持つことが示された。

以上のように、申請者は GBS 法の改善を行った上で幅広い材料に適用し、新規遺伝資源の構築、遺伝解析、および交雑育種における選抜における GBS の有用性を評価した。その結果、QTL 解析だけでなく、たとえば戻し交雑育種の現場において各世代で GBS による全ゲノム選抜を行うことや、集団育種法においてゲノム選抜（genomic selection）を適用することが現実に可能であり、効率的育種システム実現のために GBS が有用であることを示した。本論文で示されたイネ高収量に関与する QTL の発見、GBS 法の適用範囲拡大などの成果は遺伝育種学分野の学術研究に大きく貢献するものである。よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものとして認め、合格と判定した。