

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	許 冲
論文題目	イネ転移因子 <i>mPing</i> の収量関連形質に対する変異誘発効果		
(論文内容の要旨)			
<p>イネの<i>miniature-Ping (mPing)</i> は非自律性転移因子MITEに分類される430bpのDNA断片であり、イネ品種銀坊主ゲノムでは、1,000コピー数以上存在し活発に転移している。銀坊主種子へのγ線照射より得られた細粒突然変異系統IM294は、ユビキチン様タンパク質<i>Rurml</i>への<i>mPing</i>挿入による機能喪失変異体であり、細粒形質以外にも様々な生育弱勢を示す。IM294の自殖後代では変異した<i>Rurml</i>からの<i>mPing</i>の正確な切り出しによって粒形が正常粒に復帰する個体が分離する。復帰個体の中には粒形が野生型に回復するだけでなく、農業形質に関する変異を伴う個体がしばしば分離する。イネの収量関連形質に対する転移因子<i>mPing</i>の変異誘発効果を明らかにできれば、<i>mPing</i>転移を利用したイネの生産性向上が期待できる。本論文では、IM294の復帰変異体の後代系統に分離する収量関連形質に対して誘発された変異と<i>mPing</i>転移との関係を調査した。</p> <p>細粒突然変異系統IM294の自殖後代において<i>Rurml</i>遺伝子への<i>mPing</i>挿入の切り出しによって分離する復帰型個体の中には原品種の銀坊主よりも旺盛な生育を示す生育強勢個体 (Vigorous Growing IM294、VGI) も分離する。過去の研究から、VGIでは<i>mPing</i>転移頻度が顕著に上昇していることが判明しているが、<i>mPing</i>転移とVGIとの対応は未解明である。誘発変異の原因遺伝子を特定するため、IM294系統に分離した1個体のVGIの自殖後代個体 (VG-15) と日本晴との交雑によって得られたF₂系統を用いて、生育強勢に関係する遺伝的因子が座乗する染色体領域を決定した。まず、VG-15と日本晴との間の<i>mPing</i>挿入多型を利用して遺伝地図を作成し、一穂穎花数、有効分げつ数、一次枝梗数、二次枝梗数、百粒重、地上部乾物重、粒面積、粒長および粒幅の9形質に関するQTL解析を行った。この結果、7形質に関して9個のQTLが検出された。百粒重に関するQTLはChr.1 (<i>qHSW1</i>)、Chr.3 (<i>qHSW2</i>) およびChr.5 (<i>qHSW3</i>) に見出されたが、粒形に関するQTLと同じ位置には粒幅に関するQTLはChr.5に座乗する (<i>qGWH</i>) だけが認められた。したがって、Chr.1 (<i>qHSW1</i>) およびChr.3 (<i>qHSW2</i>) は粒形変化に伴う二次的なものではなく、登熟に関するQTLと考えられた。粒長 (<i>qGLH</i>) と粒面積 (<i>qSAG</i>) のQTLがChr.8の同じ位置に確認されたが、粒長の増大による百粒重の増加は認められなかった。このことから、粒大増加の効果が稔実不良などによって打ち消される場合があると考えられた。一穂穎花数 (<i>qNSF</i>) および二次枝梗数 (<i>qNSB</i>) に関するQTLがChr.2の同じ位置に見出され、二次枝梗数の増加に伴う一穂穎花数が増加を確認できた。また、一穂穎花数と二次枝梗数に関して検出されたQTLの位置には、過去に報告されたQTLはなかった。以上の結果から、VGIでは複数の染色体領域に同時多発的に変異が生じていると考えられた。したがって、VGIに観察される生育強勢にも同時多発的に誘発された複数個の変異が関係していると考えられた。この点を確認するためには、さらに誘発変異の原因遺伝子を特定して変異遺伝子における新規<i>mPing</i>挿入の有無を明らかにする必要がある。</p> <p>IM294の派生系統の自殖後代で分離した復帰個体型個体 (R₁) の個体別自殖系統群を複数系統群育成することにより、<i>mPing</i>の転移によって誘発された突然変異遺伝子を含むと想定される複数の<i>mPing</i>タグライン (R₄) が育成されている。<i>mPing</i>タグラインにおいては、出穂期、粒形、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、分げつ数などイネの収量関連形質を含む複数の農業形質に分離が確認されている。収量関連形質に誘発され</p>			

た変異遺伝子の特定を目的として、4個体のR₁個体の自殖後代R₂個体から単粒系統法により育成された4系統群の*mPing*タグライン (ML) を解析した。まず、4系統のダグラインにおける収量構成要素に関する分離を調査した。4個体のR₁個体由来する4ML群RA (130系統)、RK (101系統)、RV (121系統) およびRL (133系統) のR₆個体と各R₆個体の自殖次代系統 (R₇) を供試した。まず、R₆個体の粒形質を調査した後、各R₇系統の到穂日数、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、一穂穎花数、粒長、粒幅、粒面積、粒円周長、粒長/粒幅および真円度を調査した。RKおよびRV系統群では粒長に関して高いR₆-R₇親子回帰が認められ、遺伝的分離が確認できた。これに対して、RL系統群では出穂期および二次枝梗数に関する明瞭な分離が認められた。以上の結果から、RL系統群には出穂日と二次梗数に対して誘発された変異が分離していると判断された。変異体特異的な*mPing*挿入を抽出するため、出穂日に関しては晩生系統および早生系統を各5系統、二次枝梗数に関して最小数と最大数の各4系統からDNAを抽出して次世代シーケンス分析の材料とした。

銀坊主集団において*mPing*に隣接する配列を次世代シーケンサーの利用により効率的に検出するDNA調整法が構築されている。この調整法を用いて、RL系統群内に分離した表現型変異と関連する*mPing*新規挿入箇所の特性を試みた。上記のように選んだ18系統のDNAサンプルを用いて次世代シーケンサー分析を行った。表現型の分離から、出穂日に関しては晩生が、二次枝梗数に関しては増加が新たに誘発された表現型であると推定されたので、早生系統および二次枝梗の増大と関連する可能性が高い*mPing*の新規挿入を探索した。この結果、表現型と関連する6箇所の*mPing*挿入を検出した。しかし、次世代シーケンスの結果から推定された*mPing*挿入の多くは変異系統から改めて抽出したDNAにおいて確認することができず、原因遺伝子の特定には至らなかった。使用したDNA調整法では最初にランダムプライミングを行ったあと、*mPing*内部配列を用いた2nd・PCRを行うが、この時のプライマーが*mPing*とは無関係の配列と分子雑種を形成する可能性がある。このことが、原因遺伝子の特定に至らなかった主な要因と推定された。したがって、*mPing*新規挿入箇所を効率的に濃縮できるようDNA調整法を改善する必要がある。

以上のことから、細粒突然変異系統IM294の復帰突然変異個体の後代では、収量に関連する二次枝梗数の増加による一穂粒数の増加および粒形変異による百粒重の増加などの収量関連形質に関する有用変異の誘発効果が確認できた。今後は、次世代シーケンスを利用して、新規*mPing*挿入と原因遺伝子の機能変異との解明を効率的に進めることが重要である。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

イネの*miniature-Ping (mPing)* は非自律性転移因子MITEに分類される430bpのDNA断片であり、イネ品種銀坊主ゲノムでは、1,000コピー数以上存在し活発に転移している稀有な転移因子である。さらに、銀坊主種子へのガンマ線照射より得られた細粒突然変異系統IM294は、ユビキチン様タンパク質*Rurml*への*mPing*挿入による機能喪失変異体であり、細粒形質以外にも様々な生育弱勢を示す。IM294の自殖後代では変異した*Rurml*から高い頻度(約1%)で*mPing*が切り出されて粒形が正常粒に復帰する復帰個体が分離する。分離する復帰個体の中には、銀坊主よりも旺盛な生育を示す生育強勢個体(VGI)が少数含まれる。過去の研究から、*mPing*転移頻度は銀坊主よりもIM294が高く、さらにIM294よりもVGIで顕著に上昇することが判明している。本論文は、*mPing*転移とVGIの表現型との対応ならびに、VGIの後代に分離する収量関連形質の変異を解明するため、VGIの自殖後代と日本晴との交雑F₂を供試して生育強勢に関係する変異の座乗染色体領域を特定するとともに、復帰個体の後代で分離する収量関連する形質の変異と*mPing*転移との関係の解明を試みたものである。評価できる点は以下の2点である。

1) VGIの後代で生育強勢を示す個体を用いて遺伝解析した結果、同時多発的に複数個の変異が誘発されていた。このことから、VGI個体が示す生育強勢にも同時に誘発される複数個の変異が関与する可能性を認めた。

2) 復帰型個体の後代において、粒大の増大および一穂当穎花数と密接に関連する二次枝梗数の増加に関わる変異を確認した。原因遺伝子と*mPing*新規挿入との関連を明らかにできなかったが、IM294から分離する復帰個体に収量に関連する形質に対して有用変異が誘発されていることを明らかにした。

以上のように、本論文はIM294の自殖後代に分離する復帰個体ならびにVGIの後代に複数の変異が同時に誘発されていること、復帰に伴って誘発される変異には収量性に直結する変異が含まれることを明らかにしたものであり、育種学、作物学、植物遺伝学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年 1月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、当該学生は、本学博士課程教育リーディングプログラム「グローバル生存学大学院連携プログラム」を履修し、平成30年 1月23日に同プログラムにおける学修内容と提出学位論文との関連性等に関する事項について試問を行い、同プログラムの修了要件基準を満たしていることを確認し、次いで、平成30年 2月23日に本学博士課程教育リーディングプログラム運営委員会において、上記と同様の基準を満たしていることを確認し、それぞれ合格と認められていることを併せて報告する。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)