

氏 名	こ もり とし ゆき 小 森 俊 之
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2532 号
学位授与の日付	平 成 16 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Application of DNA marker technology to hybrid breeding and development in rice (<i>Oryza sativa</i> L.) (ハイブリッドイネの育種・開発への DNA マーカー技術の応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 山 田 利 昭 教 授 遠 藤 隆

論 文 内 容 の 要 旨

ヘテロシスを利用したハイブリッド育種は、収量性を向上させるための有効な方法である。ハイブリッドイネの育成には、細胞質雄性不稔と稔性回復遺伝子 (*Rf-1*) を利用する三系法が汎用されているが、雄性不稔系統、稔性回復系統、維持系統の作出・維持・選択あるいはハイブリッド種子の純度維持など、その手順はきわめて煩雑である。近年、DNA マーカー技術は著しい進展をみせており、これを利用することによって、従来煩雑であったイネハイブリッド品種の育成および開発の効率は飛躍的に向上するものと期待される。また、ハイブリッドイネ育種の刷新技術の開発には、稔性回復遺伝子の単離と、細胞質雄性不稔およびその回復に関する分子機構の解明が不可欠である。このような観点から、本研究では以下の実験を行った。

1. アラビドプシスにおいて一塩基多型を検出できる dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) 法について検討し、この方法がアラビドプシスの 4 倍のゲノムサイズをもつイネの遺伝解析用 PCR マーカーの作出に有効であることを確認した。また、dCAPS プライマーを設計する際のミスマッチ塩基の配置法について有用な知見を得た。
2. MITE (miniature inverted-repeat transposable element) は、植物ゲノムに多数存在するトランスポゾン様配列である。MITE 領域および非 MITE 領域における塩基配列多型を、品種「あそみのり」と「IR24」を用いて調査したところ、MITE 領域の方がはるかに高い多型頻度を示すこと、また、MITE 領域においては欠失/挿入の頻度が著しく高いことが明らかになった。また、イネゲノムの公開データベースから、*Wanderer* (MITE の一種) と高い相同性を示す塩基配列を 6 個選び、それら領域に関して品種間 (上記 2 品種間) 多型の有無について調査したところ、いずれの領域においても明らかな多型が検出された。これらの結果に基づいて作成した計 20 個の PCR マーカーは、いずれも連鎖地図上の位置が決定された。これらのことから、MITE は遺伝解析や育種上有用な PCR マーカーの効率的作成に有効であると結論した。
3. *Rf-1* 遺伝子は、BT 型 (インディカ型) 細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子である。このため、ジャポニカハイブリッド品種の育成には、本遺伝子をジャポニカ型の回復系統に導入する必要がある。上記 1 および 2 の知見を利用して、*Rf-1* が座乗する染色体 10 に 17 個の PCR マーカーを作出し、稔性回復系統の染色体 10 グラフ遺伝子型を作成するとともに、*Rf-1* 座に関する連鎖分析を行った。その結果、同座が S12564 *Tsp509I* 座と C1361 *MwoI* 座との間に密接に連鎖して座乗することが明らかになり、稔性回復系統の DNA マーカー選抜が可能になった。
4. *Rf-1* 遺伝子を単離するために、*Rf-1* 座に密接に連鎖する、S12564 *Tsp509I* 座を起点とする染色体歩行を行った。歩行した領域について、一連の相補性試験を行い、*Rf-1* 遺伝子を含むゲノム断片を同定した。当該ゲノム断片に対応する cDNA クローンを単離・解析したところ、*Rf-1* はミトコンドリアに移行する PPR (pentatricopeptide repeat) タンパク質をコードする遺伝子であることが明らかになった。また、劣性遺伝子 *rf-1* は、コード領域の塩基欠失に起因するフレームシフトのために、不完全なタンパク質をコードすると推定された。
5. ジャポニカハイブリッド品種およびその親系統の種子純度管理を効率的に行うために、3 個の PCR マーカー (M1, M2, M3) を作出した。M1 は、ジャポニカ細胞質に特異的に存在する配列、M2 および M3 は、それぞれ稔性回復系統の

Rf-1 遺伝子近傍の配列および維持系統の *rf-1* 遺伝子近傍の配列を検出するのに有効であることが明らかになった。これらのマーカーは、バルク検定において、少なくとも精米500粒中に含まれる1粒の混入を検出できることが示された。

論文審査の結果の要旨

ハイブリッドイネ品種の育成と開発には、自殖性品種の育成とは異なる複雑な過程が要求される。本論文は、DNA マーカー技術を応用することにより、従来煩雑であった育成過程の効率化を図るとともに、現行ハイブリッドシステムの刷新に資する、稔性回復遺伝子 (*Rf-1*) の単離およびその機能解析についてまとめたものであり、評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) 法により作成した PCR マーカーが、イネ遺伝解析に有効であることを示すとともに、dCAPS プライマーの設計に関する重要な技術的知見を得た。
2. MITE (miniature inverted-repeat transposable element) は、植物ゲノムに多数散在するトランスポゾン様配列であり、イネのゲノムの4%を占めると推定されている。本論文では、MITE とその周辺配列において、塩基配列多型が高頻度で観察されることを明らかにするとともに、MITE を利用することによって遺伝解析や育種に有用な PCR マーカーを効率的に作成できることを実証した。
3. *Rf-1* 座に関する詳細なマッピングを行い、高密度連鎖地図上における *Rf-1* 座の座乗位置を正確に同定した。これにより、DNA マーカーによる効率的な回復系統の育成が可能になった。また、*Rf-1* 座と S12564 *Tsp509I* 座とが密接に連鎖していることを見出し、*Rf-1* 遺伝子を単離するための染色体歩行が可能であることを示した。
4. *Rf-1* 座近傍の詳細な遺伝地図および物理地図を作成した後、網羅的に相補性試験を行い、*Rf-1* を含むゲノム断片を同定した。その後、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、*Rf-1* 遺伝子を単離することに成功した。また、この *Rf-1* はミトコンドリアに移行する PPR (pentatricopeptide repeat) タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにした。これらの結果は、他の稔性回復遺伝子の単離および稔性回復機構の分子レベルでの解明につながるものと期待される。
5. ジャポニカハイブリッド品種およびその親系統を簡便に識別できる PCR マーカーを作成した。これらのマーカーは、精米のバルク検定において、感度がきわめて高かったことから、ハイブリッドの種子純度管理にきわめて有効であると結論した。

以上のように本論文は、ハイブリッドイネ品種の育成と開発に資する重要な知見を得たものであり、育種学、遺伝学、栽培学の分野に寄与するところが大い。

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16年4月22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。