

博士論文

日本型イネ品種の一塩基多型分析とその QTL 解析への応用に関する研究
(Studies on SNPs of *japonica* rice cultivars and their application to QTL analysis)

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

白澤 健太

指導教員 西尾 剛 教授

目次

省略語一覧	2
序論	3
第一章 日本型品種内の DNA 多型の探索	
第一節 PCR-RF-SSCP 分析による遺伝子領域内の一塩基多型解析	8
第二節 ゲノム情報を利用した AFLP マーカーの PCR マーカーへの変換	25
第二章 簡易 DNA 多型分析技術の開発	
第一節 ミスマッチ切断酵素による日本型品種の一塩基多型解析	38
第二節 ドットプロット分析による DNA 多型検出技術の開発	
第一項 ドットプロット分析による挿入・欠失変異の検出	44
第二項 ドットプロット分析による一塩基多型の検出	56
第三章 登熟期の高温ストレス耐性に関する QTL 解析	72
総合論議	83
摘要	86
謝辞	87
引用文献	88

省略語一覽

AFLP	amplified fragment length polymorphism
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	complementary DNA
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
dCAPS	derived CAPS
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
EDTA	ethylenediamine-N, N, N, N-tetraacetic acid
EMS	ethyl methanesulfonate
EST	expressed sequence tag
Indel	insertion/deletion
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RF-SSCP	PCR-restriction fragment-SSCP
QTL	quantitative trait loci
RDA	representational difference analysis
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RGP	Rice Genome Research Program
SCAR	sequence characterized amplified region
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	single strand conformation polymorphism
SSR	simple sequence repeat
STS	sequence tagged site
TBE	tris-borate EDTA
TILLING	targeting induced local lesions in genomes
UTR	untranslated region

序論

イネゲノム研究

イネは、重要な農作物の一つであるだけでなく、研究用の単子葉のモデル植物でもある。インド型品種の 93-11 と日本型品種の日本晴のゲノムのドラフト配列が公開された (Yu *et al.* 2002, Goff *et al.* 2002) のに引き続き、国際プロジェクトとして進められていた日本晴のゲノム配列の高精度解読が終了し、ゲノムサイズが 389 Mb であり、遺伝子数が 37,544 個であると予測された (International Rice Genome Sequencing Project 2005)。さらに、イネではゲノム研究のための手法や材料も蓄積している。例えば、日本型品種の日本晴とインド型品種のカサラスの 186 個体の F₂ 集団を用いた 2,275 個の RFLP (restriction fragment length polymorphism) マーカーの連鎖解析から、全長 1521.6 cM の高密度連鎖地図が作成された (Harushima *et al.* 1998)。6,591 個の EST (expressed sequence tag) クローンが染色体上に位置付けられ (Wu *et al.* 2002)、28,469 個の完全長 cDNA (complementary DNA) クローンの塩基配列が解読されたことで (The Rice Full-Length cDNA Consortium 2003)、ゲノム上の遺伝子の位置が明らかになった。また、培養条件下で転移活性を持つレトロトランスポゾン *Tos17* が見出され (Hirochika *et al.* 1996)、これを用いた挿入変異系統の *Tos17* 挿入位置が染色体上の 20,458 座に位置付けられた (Miyao *et al.* 2003)。この挿入変異体を用いた研究から、多くの遺伝子の機能が明らかにされている (Sato *et al.* 1999, Morita *et al.* 2005, Tabuchi *et al.* 2005)。RFLP マーカーに比べて分析が簡単な 2,240 個の SSR (simple sequence repeat) マーカーが開発され (McCouch *et al.* 2002)、連鎖解析に必要な戻し交雑自殖系統群 (Lin *et al.* 1998) や染色体部分置換系統群 (Kubo *et al.* 2002) も養成されている。これにより、QTL (quantitative trait loci) 解析やマップベースクローニングによる遺伝子の同定が急速に進展し、農業形質に関わる遺伝子も数多く同定された (*Xa21*: Song *et al.* 1995; *Hd1*: Yano *et al.* 2000; *sdl*: Sasaki *et al.* 2002; *Gn1*: Ashikari *et al.* 2005; *SKC1*: Ren *et al.* 2005)。

しかしながら、ここで述べた QTL 解析やマップベースクローニングにより同定された遺伝子は、日本型品種とインド型品種の特性の差を説明する遺伝子である。日本では普通、イネの育種は日本型品種同士の交配により行われるため、日本型品種とインド型品種との雑種集団を用いた連鎖解析から同定された遺伝子を育種に利用できる可能性は低い。日本型品種同士の雑種集団を用いた連鎖解析により遺伝子が同定されれば、速やかな育種への応用が可能となる。

しかし、日本型品種同士の雑種集団を用いた連鎖解析は、DNA 多型の検出頻度の低さから、穂ばらみ期耐冷性に関する QTL 解析 (Takeuchi *et al.* 2001) など、実施例が数例あるに過ぎない。今後、イネゲノム情報を実用面で活用するためにも、日本型品種間で多型を検出できる DNA マーカーの作成と、その QTL 解析への応用が望まれる。

SNP 分析の意義

生物の表現型の多様性は、ゲノムの塩基配列の差によるところが大きい。事実、メンデルに端を発した突然変異遺伝子の研究により、古典遺伝学は発展を遂げた。そして、近年の分子遺伝学的研究により、古典遺伝学的に同定されていた突然変異遺伝子が、DNA の塩基配列の違いとして同定されるに至った (Bhattacharyya *et al.* 1990, Lester *et al.* 1997)。このような塩基配列の違い (DNA 多型) は、RFLP 分析 (Bernatzky & Tanksley 1986, Harushima *et al.* 1998)、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 分析 (Konieczny & Ausubel 1993)、SSR 分析 (Saghai Maroof *et al.* 1994)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分析 (Vos *et al.* 1995) などにより検出できる。これらの技術で検出できる DNA 多型は連鎖マーカーとして利用することが可能で、マップベースクローニングにより多くの突然変異遺伝子が同定されている (Ashikari *et al.* 1999, Yamamuro *et al.* 2000)。しかし、表現型の多様性の原因となる遺伝子の DNA 多型は、ほとんどが一塩基の置換、挿入、及び欠失による点突然変異 (single nucleotide polymorphism; SNP) であると考えられるため、これらの DNA 多型検出技術で原因遺伝子そのものを検出できる可能性は低い。突然変異の原因遺伝子を直接検出するためには、SNP 解析が有効である。遺伝子の突然変異を直接検出できれば、マップベースクローニングに頼らない、表現型と遺伝子型の対応付けによる遺伝子機能の推定が可能になるかもしれない。さらに、SNP はゲノム中に数多く含まれているため、近縁種間の DNA マーカーとしての利用価値もある。従来 DNA 多型分析技術では DNA 検出頻度の低さが懸念される日本型品種間においても、SNP 解析により、QTL 解析やマップベースクローニングに十分な数の DNA マーカーが作成できると期待される。

化学変異原である EMS (ethyl methanesulfonate) や物理変異原であるガンマ線により、ゲノム中に一塩基置換や数塩基の欠失が誘発されることが報告されている (Greene *et al.* 2003, Naito *et al.* 2005)。そのため SNP 解析は、これらの誘発

突然変異体の逆遺伝学的なスクリーニングにも利用できる。現在、セロリから抽出したミスマッチ切断酵素 CEL I (Till *et al.* 2004)を用いた SNP 分析である TILLING (targeting induced local lesions in genomes)法で EMS 誘発突然変異体の逆遺伝学的なスクリーニングが様々な生物種で行われている (Gilchrist & Haughn 2005)。TILLING 法は、コムギの育種 (Slade *et al.* 2005)や、シロイヌナズナのエコタイプ間の DNA 多型の検出 (Comai *et al.* 2004)にも利用されている。

SNP は個体識別、作物の場合は品種識別にも利用が可能である。現在のところ、個体識別は検出できる多型頻度の高さから SSR マーカーが使われている場合が多い (Saghai Maroof *et al.* 1994)。しかし、突然変異育種により育成された品種は、SSR マーカーでは識別することができない。例えば、半矮性品種のレイメイは、フジミノリのガンマ線誘発突然変異体であり、*Sd1* に SNP のある *sd1-r* を持つ (Sasaki *et al.* 2002)。また、低アミロース品種であるミルキークイーンは、コシヒカリの MNU (N-methyl-N-nitrosourea)誘発突然変異体で、*Wx* に SNP のある *Wx-mq* を持つ (Sato *et al.* 2002)。このような突然変異体が品種として登録され、あるいは育種素材として育種に用いられるため、SNP による品種識別は種苗管理の面からだけでなく、米の市場流通の面からも、今後ますます需要が高まると考えられる。

SNP 分析技術

一般にイネの系統育種では、数千系統が扱われる (松永 2004, 佐々木 2004)。これら全ての系統から有用遺伝子を持つ系統を DNA マーカーで選抜するためには、労力、時間、及び費用が無視できない問題となり、簡便で低コストの DNA 分析法が求められる。現在、DNA マーカー育種は SSR マーカーを利用するものが多い (Li J *et al.* 2004)。しかし、DNA マーカー育種では、DNA マーカーと目的とする遺伝子との間での組換えが選抜のミスを引き起こす原因となる。そこで、目的の遺伝子を選抜する精度を上げるため、SNP である場合が多いと予測される有用遺伝子の変異そのものを選抜できる技術の確立が求められる。

これまでに、種々の SNP 分析法、例えば DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)法 (Fischer & Lerman 1983)、SSCP (single strand conformation polymorphism)法 (Orita *et al.* 1989)、dCAPS (derived CAPS)法 (Michaels & Amasino 1998, Neff *et al.* 1998)、ミスマッチ切断によるヘテロ 2 本鎖 DNA の切断による SNP 分析法 (Till *et al.* 2004)、MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption

ionization-time of flight-mass spectrometry)による質量分析法 (Ross *et al.* 1997, Stoerker *et al.* 2000)、マイクロアレイ法 (Wang *et al.* 2005)、蛍光標識した ddNTP (dideoxynucleoside triphosphate)を用いた一塩基伸長法 (Nasu *et al.* 2002, Jain *et al.* 2003)、アレル特異的 PCR (polymerase chain reaction)法 (Latorra *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2004)等が開発されている。しかしながら、DGGE 法、SSCP 法、dCAPS 法、ミスマッチ切断による SNP 分析法は、電気泳動を必要とする技術であり、多検体を扱う DNA 分析には適していない。質量分析法やマイクロアレイ法は特殊な実験設備が必要であり、一塩基伸長法は一試料当たりの費用が高いため、これらも多検体の分析には不向きな技術である。アレル特異的 PCR 法は、操作が簡単であるため、SNP の検出技術として多く用いられ、DNA マーカー育種にも利用されている (Hayashi *et al.* 2004)。この方法では、試料 DNA の精製度が PCR による DNA の増幅効率に大きく影響する。育種系統のような非常に膨大な数の試料を扱う分析では、手間や時間を省く目的で、DNA 抽出は簡易な方法で行われることが多い。試料 DNA の精製度の低さから、PCR による DNA の増幅ミスが起りやすく、遺伝子型を誤って判定しかねない。

労力、時間、及び費用がかからず、かつ、信頼性の高い結果が得られる SNP 分析技術の開発が、育種系統の選抜だけでなく、連鎖解析や品種識別のような多検体を扱う解析に必要である。

日本型品種同士の雑種集団を用いた連鎖解析

近年、夏期の異常高温が登熟期のイネに高温ストレスとして作用し、玄米の外観品質を低下させることが、米の生産上深刻な問題となっている。玄米の外観品質の低下程度には品種間差があることが知られているため、この問題の解決策の一つとして、遺伝的な改良が考えられる。登熟期の高温ストレス耐性を育種目標にする場合、全ての育種系統の高温ストレス耐性検定は労力がかかり、また選抜ミスも起りやすく効率的ではない。高温ストレス耐性遺伝子、あるいは連鎖マーカーの利用が可能になれば、簡単に高温ストレス耐性を持つ系統の選抜が行える。

イネの特性を決める遺伝子の探索には、DNA マーカーを利用した連鎖解析が多く行われている。DNA マーカーの多型頻度が高いことから、従来から日本型品種とインド型品種の交雑集団が連鎖解析に用いられてきた。例えば、出穂期の決定に関する遺伝子がマップベースクローニング法により単離されている

(*Hd1*; Yano *et al.* 2000、*Hd3a*; Kojima *et al.* 2002、*Hd6*; Takahashi *et al.* 2001)。しかし、このような組合せの後代では、雑種不稔、雑種弱勢あるいは脱粒性個体の出現が連鎖解析の障害となる。また、出穂期が異なる場合、出穂期の環境条件の違いにより形質が大きく変化する穂ばらみ期耐冷性、食味・品質、収量などの評価は困難になることが予想される。さらに、本研究で解析の対象とする玄米は、日本型品種とインド型品種で形態、成分、品質などが異なるため、正しい評価が行えない可能性もある。したがって、これらの形質の連鎖解析には日本型品種同士の雑種後代を用いることが必要であると考えられる。日本型品種同士の雑種後代を用いた連鎖解析で明らかになった遺伝子、あるいは連鎖マーカーは、速やかに育種へ応用することができるという利点もある。

本研究では、PCR-RF-SSCP (PCR-restriction fragment-SSCP)分析による日本型品種間の DNA 多型の検出と SNP の同定、及び AFLP 分析で検出した DNA 多型の PCR マーカーへの変換を行い (第一章)、ミスマッチ切断酵素による簡易 DNA 多型検出技術、及びドットプロット分析による Indel (insertion/deletion)と SNP の簡易検出技術を開発した (第二章)。そして、これらを利用することで、日本型品種同士の雑種後代を用いた登熟期の高温ストレス耐性に関する QTL 解析を行った (第三章)。

第一章 日本型品種内の DNA 多型の探索

第一節 PCR-RF-SSCP 分析による遺伝子領域内の一塩基多型解析

<緒言>

様々な生物種において、任意に選んだゲノム領域の塩基配列の解読による SNP の探索が行われている (The International SNP Map Working Group 2001, Wade *et al.* 2002, Nasu *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2002)。この方法は、莫大な時間と費用がかかるため、効率的ではない。例えば、日本型品種の日本晴とコシヒカリとの間では SNP 検出率は極めて低く (Nasu *et al.* 2002)、日本型-インド型品種間のような遠縁品種間の解析に比べて時間も費用もかかる。しかし、一般的な育種は近縁品種間の交雑により行われるため、遠縁品種間の SNP 情報よりも、主要品種やその素材となった品種間における遺伝子領域の SNP 情報が求められる。

イネゲノムの塩基配列の解読が完了し (International Rice Genome Sequencing Project 2005)、28,469 個の完全長 cDNA クローンの塩基配列も決定されている (The Rice Full-Length cDNA Consortium 2003)。遺伝子の数は、37,544 個であると推定されており、農業形質関連遺伝子も単離されている (Song *et al.* 1995, Wang *et al.* 1999, Yano *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2002)。しかし、ほとんどの遺伝子の機能は不明である。全ての遺伝子の SNP が同定できれば、農業上重要な形質に関わる遺伝子多型が明らかにできると期待される。

イネの *Wx* 遺伝子の点突然変異が PCR-RF-SSCP 分析により明らかにされている (Sato & Nishio 2002)。この方法は簡単で低コストで行えるため、遺伝子の SNP 探索に適している。本研究では、日本型主要品種やその素材となった品種、インド型品種を用いて、PCR-RF-SSCP 分析による SNP 探索を行った。

<材料・方法>

ゲノム DNA の抽出

日本型 17 品種 (日本晴、アキヒカリ、初星、ハツニシキ、ヒノヒカリ、ひとめぼれ、いただき、喜峰、きらら 397、黄金晴、コシヒカリ、農林 1 号、農林 6 号、農林 8 号、農林 22 号、陸羽 132 号、ササニシキ)、インド型 3 品種 (バスマティ 370、IR36、カサラス)、及び陸稲 1 品種 (戦捷) を材料とした。日本晴、コシヒカリ、アキヒカリ、いただき、カサラス、及び戦捷の 6 品種の種子は (独) 農業生物資源研究所の矢野昌裕博士より、他の 15 品種の種子は宮城県古川農業試験場の永野邦明氏より分譲を受けた。各品種の葉から、CTAB

(cetyltrimethylammonium bromide)法 (Murray & Thompson 1980)によりゲノム DNA を抽出した。

プライマーの作成

RGP (Rice Genome Research Program)のウェブサイトで公開されている STS (sequence tagged site) 、 及び CAPS マーカール (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/caps/index.html>)のうち、550 bp から 4,500 bp の遺伝子断片を増幅させる 245 組のプライマー対を使用した。RGP のウェブサイトで公開されている EST 配列情報 (Wu *et al.* 2002; <http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/estmap2001/index.html>)を RiceBLAST プログラム (<http://RiceBLAST.dna.affrc.go.jp/>)で検索し、得られたイネゲノム配列情報 (International Rice Genome Sequencing Project 2005)をもとに、約 2 kb の遺伝子の 3' UTR (untranslated region)を含む転写される領域を増幅させる 2,532 組のプライマー対を作成し、合計 2,777 組のプライマー対で解析を行った。プライマーの設計には、Primer3 プログラム (Rozen & Skaletsky 2000; <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>)を使用した。分析する遺伝子は、ゲノム上の偏りがないよう、マップ情報を考慮して無作為に選択した。

PCR-RF-SSCP 分析

20 ng のゲノム DNA に 0.5 μ l の 20 μ M フォワードプライマーと 20 μ M リバースプライマー、1 μ l の 10 \times Ex *Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) (タカラバイオ社製)、0.8 μ l の 2.5 mM dNTP (deoxynucleoside triphosphate) Mixture (タカラバイオ社製)、0.05 μ l の 5 U/ μ l *Taq* ポリメラーゼ (*TaKaRa Ex Taq*; タカラバイオ社製)を加え、滅菌水で 10 μ l とした。PCR は、94°C で 1 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒、62°C で 30 秒、72°C で 1 分 30 秒の反応を 40 回行い、最後に 72°C で 3 分間伸長させる条件で行った。PCR 産物を 5 μ l ずつに分け、それぞれに 0.05 μ l の制限酵素 (タカラバイオ社製)とその推奨緩衝液を加え、滅菌水で 10 μ l とした。制限酵素は四塩基認識の *Afa*I、*Aha*I、*Hae*III、*Hha*I、*Mbo*I、及び *Msp*I (いずれもタカラバイオ社製)の中から、PCR 産物を SSCP 分析に適した 100~500 bp 程度の DNA 断片に切断するものを、イネゲノム配列から推定し用いた。37°C で 2 時間以上反応させた後、2 つの試料 DNA を 40 μ l のホルムアミド変性液 (96% [v/v] ホルムアミド、0.1% [w/v] キシレンシアノール、0.1% [w/v] プロモフェノールブルー)に混合した。試料溶液を 96°C で 5 分間熱変性させた後、氷上で急冷した。5% グリセロールを添加した 6%ポリアクリルアミドゲルを用いて、0.5 \times TBE (44.5

mM Tris-borate, 1 mM EDTA (ethylenediamine-N, N, N, N-tetraacetic acid))泳動バッファ、温度 10~18°C、300~400 V の条件で電気泳動を行った。ゲルを GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Cambrex 社製)を用いて染色後、Molecular Imager FX (BIO-RAD 社製)でバンドを検出した。

塩基配列分析

日本型品種で多型を検出した DNA 断片の塩基配列は、ダイレクトシーケンシング法により、蛍光 DNA シークエンサー (ABI PRISM 310; Applied Biosystems 社製、及び CEQ2000; Beckman Coulter 社製)を用いて決定した。一部の DNA 断片の塩基配列は、(株)植物ゲノムセンターの門奈理佐博士により決定された。完全長 cDNA クローンの塩基配列 (The Rice Full-Length cDNA Consortium 2003; <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)とイネのゲノム配列を SIM4 プログラム (Florea *et al.* 1998; <http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php/>)で比較し、エキソンとイントロンの位置を推定した。予測アミノ酸配列から、膜貫通領域、細胞内局在性、及び保存配列を、それぞれ MEMSAT プログラム (Jones DT *et al.* 1994; <http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html>)、PSORT プログラム (Nakai *et al.* 1999; <http://psort.nibb.ac.jp/>)、及び InterPro プログラム (Mulder *et al.* 2003; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)で推定した。

<結果・考察>

PCR-RF-SSCP 分析により検出された遺伝子領域の DNA 多型

2,777 組のプライマー対を用いて PCR を行った結果、日本晴で予測されたサイズの DNA が単一で増幅したのは 1,710 組 (61.6%)であった。そのうち、1,305 マーカー (76.3%)で日本晴-カサラス間の多型を検出し、日本晴-コシヒカリ間では 85 マーカー (5.0%)で多型を検出した (Figure 1.1, Table 1.1)。日本品種間では最少の初星-ひとめぼれ間の 13 マーカー (0.8%)から、最多のきらら 397-農林 6 号間の 145 マーカー (8.5%)までの、平均 83.3 マーカー (4.9%)で多型を検出した。インド型品種内では、平均 1,022.7 マーカー (59.8%)で多型を検出した。日本型品種-インド型品種間では平均 1,164.1 マーカー (68.1%)で、日本型品種-陸稲間では平均 492.9 マーカー (28.8%)で、インド型品種-陸稲間では平均 1,116.3 マーカー (65.3%)で多型を検出した。

日本型 17 品種内では、全染色体上の 242 マーカー (14.2%)で DNA 多型を検出した (Table 1.2)。このうち、224 遺伝子 (92.6%)では対立遺伝子の数が 2 個で

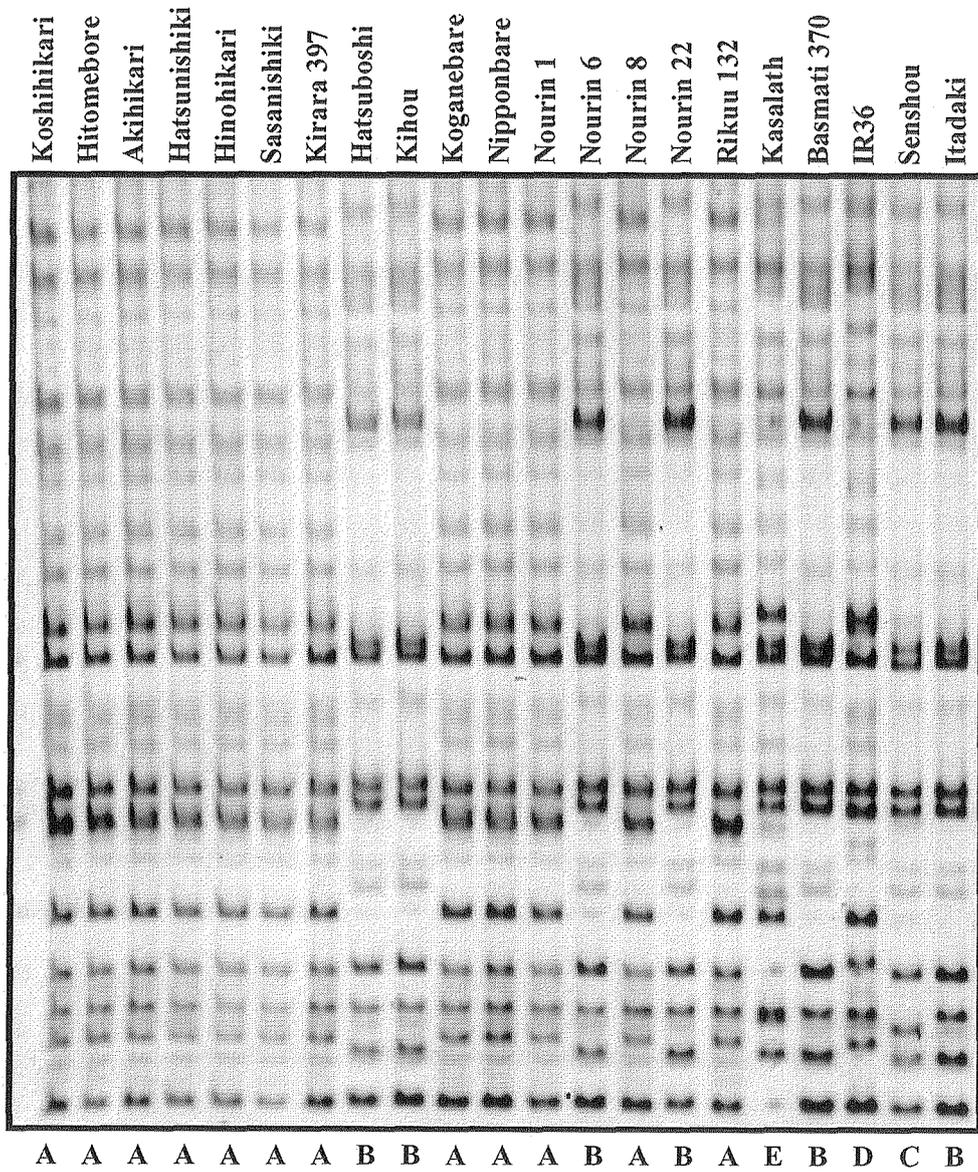


Figure 1.1 PCR-RF-SSCP analysis of the 21 rice cultivars using the primers of S13157. Allele names are shown under the picture.

Table 1.1 Number of different alleles between rice cultivars identified by PCR-RF-SSCP analysis using 1,710 markers

	Nippobare	Akihikari	Hatsuboshi	Hatsunishiki	Hinohikari	Hitomebore	Itadaki	Kihou	Kirara 397	Koganebare	Koshihikari	Nourin 1	Nourin 6	Nourin 8	Nourin 22	Rikuu 132	Sasanishiki	Senshou	Basmati 370	IR36
Akihikari	113																			
Hatsuboshi	90	75																		
Hatsunishiki	95	88	74																	
Hinohikari	76	89	47	86																
Hitomebore	85	72	13	63	44															
Itadaki	102	84	57	73	75	56														
Kihou	92	91	60	116	63	71	91													
Kirara 397	133	121	105	109	112	100	100	132												
Koganebare	43	92	80	111	53	81	93	57	129											
Koshihikari	85	83	35	57	42	22	56	89	94	94										
Nourin 1	113	86	66	48	79	55	69	102	95	117	47									
Nourin 6	78	128	97	96	82	90	114	94	145	91	88	113								
Nourin 8	56	86	80	80	72	73	91	87	124	68	71	94	106							
Nourin 22	59	98	69	61	61	62	92	89	128	76	56	103	65	45						
Rikuu 132	111	84	71	78	89	61	81	112	82	113	69	49	119	94	103					
Sasanishiki	90	73	71	56	82	64	81	109	128	98	71	71	100	77	70	78				
Senshou	495	491	489	500	496	489	496	496	487	495	494	484	501	494	502	474	497			
Basmati 370	950	948	947	958	950	950	954	943	958	948	957	953	950	953	954	947	953	951		
IR36	1242	1237	1235	1234	1238	1236	1228	1239	1235	1244	1235	1237	1236	1236	1235	1235	1239	1175	1052	
Kasalath	1305	1303	1303	1309	1306	1304	1304	1302	1299	1306	1305	1304	1304	1307	1308	1302	1304	1223	1068	948

Table 1.2 DNA fragments showing polymorphism between japonica rice cultivars

Marker name	Chr.	cM	5' primer sequence	3' primer sequence	Nipponbare	Akihikari	Hatsuboshi	Hatsunishiki	Hirohikari	Himebore	Itadaki	Kirara 397	Koganebare	Koshihikari	Nourin 1	Nourin 6	Nourin 8	Nourin 22	Rikuu 132	Sasanishiki	Senshou	Basmati370	IR36	Kasaleth			
S13157	1	5.6	GCATGCATTCATACAGATGAAG	ATGCAACTCAACTCCACAC	A	A	B	A	A	B	B	A	A	A	A	B	A	B	A	A	F	B	E	C			
S0063	1	5.6	AGTTAACCGCCAGGCTTACA	CCCGTCTAACGAAGCTAAC	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	A	A	C	B	A		
C60656	1	10.9	TAAGTTGACGACAGAGGAGCAA	GGAGAAGGAAATGAGAGTGAAGC	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	B	B	C	A	B		
E1919	1	25.4	AGCTGCTCGAAGTGAAGGAG	CCAAACTCAAGTGTCTGGA	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	C	A	B		
C30013	1	25.4	TAGACTAATCGAGTGATGTC	ATGCTTCAGAAATGCTTTGTTCC	A	B	B	A	B	B	A	B	B	A	B	B	A	A	B	B	B	B	C	D	B		
C30013	1	25.4	CTGGACCTGATCATAGAAATACCC	CTCCCTCTCTCTGTGTTCC	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	B	C	D		
C0668	1	25.4	TCACATCTGGTGGTTTTGA	CTCCAATCCAGCTCAACCT	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	A	D	B		
C0101	1	25.4	CTCCATCTCCATCCAGGTA	CTACTGCCGAGCACAATTCA	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	A	C	A		
S10077	1	26.8	AGGCTATTGACTGGCAACC	TTGCAAGGAGACCGGTATTT	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	A	D	E		
S4655	1	32.8	TATCCGGCACTGTGTTGTAC	TGCTGGATGCTTATCACAAC	A	B	A	A	A	A	B	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	B	A	C	D		
C10106	1	45.4	AAGTGCACAAAACGGAAGA	AACAGAGTCTGGCTCTGCTG	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	C		
E60165	1	69.0	GGCAGCTAAAAGGAAGTCAACTC	GAATACAAGTGTGAGCAGATGG	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	E	D	C	
S3813	1	95.7	CCTCTTTAGTACCCTCGACAG	GGGTTCAAACTTACTCTTCT	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	E	D	D		
C1456	1	102.3	TTGGGTTTAGGGCACTCAC	TAGTTTTCCCGTCCGTC	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	C	B	C	C		
C0122	1	113.3	GAGTACTGCGGCTTGTCT	CCAGTCAAAAGCTGGAGAGG	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	B	C	B	B		
S13155	1	118.9	GGATGCCTATGACCAACAGGT	ATGGTTGATTTCCAAGCGTGG	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	B	A	B	B	A	B	C	D		
S10045	1	122.6	GAGAGTGTCTTGCAGATTACCAG	CTGTGCGAGTACACAACGAAAG	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	D	D		
C63366	1	123.2	ATGTCCTTGGGAAGTAGCA	CTCCAGCAAAATCAATGGACA	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	D	D	D		
R0655	1	134.7	GGATATGACGGGAAGAGTAGGTC	ACCTCCTTGAAGTCTGCTGTCT	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	C	D	D	E		
C63989	1	135.8	AACAGCTAGACTAACTCGTGGA	GGTTTAAAGTGGTTTTGCTC	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	E	D	C	C		
S6575	1	139.1	GTCCATAATGACCTGGCTTATC	ATCATACTACACGCCACACAA	A	B	B	B	B	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	A	D	E	C	
S13781	1	139.9	AGTTGAGCATTGTCTTTGT	ACTGTGTCTGTAGTAAAGTAA	A	A	B	B	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	A	B	B	A	D	C	C		
S10925	1	142.9	TGCTCTGTTATGGCGA	TACAACAAGTAGTTACAATCACA	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	C	C	C	
R1464	1	145.3	AGTACAGAGAAATTTGGTCC	GGAGTAGTAAGTACTCAAGTG	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	-	D	
C727A	1	145.3	CAAAACCCCAACTCTCCTA	AGTAACCCCAACTAAAAAC	A	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	
S4284	1	146.4	TGCATGAGGTGCTCAACATC	ATACGCTTAATATGTAGGTAC	A	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C	
C86	1	146.4	GTGAGCCTTAATGTACCAC	ACCAGCTTAATAGTAAGC	A	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C	
C62963	1	147.2	CCATCCAGATTTTACCCTATCG	AGACACTGCTGGAGAAGATCAG	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C	D		
C30021	1	150.7	CTAAGTTCCTGGGCGACAA	AACTGAAGGGTGAACAACCC	A	B	B	B	B	C	A	B	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	D	C	C	
C11876	1	154.6	GTATTCAAGTGGCTAGATGGC	GTGATCCCAAGTGTACTCTAC	A	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	C	
R3203	1	159.6	GCAAGGGATTCATCAAGGA	CCAAGCACAACCACTTCTTT	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C	C	
E2819	1	167.2	AATTCGGGTTTTGCCCTAAC	GAGGGTTCAAGCCGAATACA	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	B	
S13151	1	181.8	GATTTGGCCATGCTCGTACC	CAGAGTGTAACTAAGCTTGAAC	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	D	C	C		
C112	1	181.8	TTCTTTCTGCTTTTCTCA	TACAGGCACTCACACTCA	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	C	C	
S13049	2	13.4	CGAGAAGGCTGCTACACTCC	TAGGACAAGCCAGGAAGGA	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	E	D	D	
C60715	2	13.4	ACACACAACCGTGGTTCA	GATACCACAAGGCGCAATGTTA	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C	C	
R0910	2	15.0	TATGCGTGTCTGCATGTCAA	TCGTCTTACGACCATTGAA	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	A	C	
R2542	2	28.0	GTTGCAAGATACAGTCCCTC	AACTGCTGTCTTCACTGTGTC	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
R2542	2	28.0	CGATCTCCTCAACATCTCAGTC	ACTCCCTTCCCAAGTATCTCAGT	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C	A	A	
E50103	2	33.6	TGCAAGGAAACACTCGCAA	GAAATTTGGAACGATGTGAGC	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	A	C	B	
E0488	2	52.2	GGACTGGATCGTGAATAGTT	GGACTAGTCAACTTCTCATA	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	C	
E61832	2	54.6	CTGTTGGAGATATAGTGGCTGGT	CATAGGTGGGAGTACAAGAAAG	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A
R1989	2	56.0	AGCTCTGCTTATGATCACCTC	AAAGCTGGCTAAGAGTCTGGAAG	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	A	B	A	C	-	A	-	C	
E2971	2	57.3	GACTATTGGAGTCAAGTCAAGTATG	CCGCCATCTACTGCTGCTCCT	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	B	B	
E10780	2	57.3	GGACTGAGGTGAGAGATCTTGAG	CGAGGAGTATCAGACGAGTGTG	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	B	C	
C53722	2	57.3	TGGTGGCAGTATGGAACA	TAATGGGCAGATCACGAGG	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	B	-	
R1843	2	57.6	TGCTGCTCATTGTCTCTG	GCCTATTTATCTTTGACATCG	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	
E31894	2	57.6	ACCACCCCGTGTGCTACTT	AAAAAGTCTGGGCTTTGAC	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	B	A	B	A	B	D	B	E	C	C		
E60475	2	57.9	GGTCTAGTGTCTACCAGCTTTT	CCAAGTAAAGGTAAGTCTGTC	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C	C	
C777	2	59.2	GCTGCTGCTGACCAATGAA	CACCTTCTTCTTTCTCCTC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	B	
S20768	2	95.2	GATGTTGGCTTAGCAGCACTTAC	CACCACCTACACATAAGCATCC	A	B	A	C	A	A	C	A	A	C	A	A	C	B	C	A	C	B	C	A	C	C	
S20768	2	95.2	CCTAGGAATCTTGTGAGTCACT	CCTGCAAAGCAGAAGTGTGTA	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	C	
C63726	2	95.2	CAGATTTGCTTTGACATCTGG	CCGAAAAGCCAAACAGAGC	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	D	A	D	C	C		
R1906	2	96.6	GCCGCTCTCGCTCTC	CCTTGATCCCACTCTGTG	A	D	C	E	B	C	E	C	E	AC	B	E	A	B	B	E	D	C	C	G	F		
S10844	2	98.2	CTCTTCTAGCCAGGTTCCAA	CCCCATTCATTTCTCCTCA	A	D	B	C	A	B	C	AB	A	C	A	A	C	D	B	E	F	D	-	-	-		
R2559	2	99.6	GCAATTTGCTTATACCGAG	CATGCTTGGGGCTTTCTG	A	B	A	C	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	B	E	C	C	
E4169	2	99.6	AGCAATCCATCACTCGGTA	CGGGAATGCTTTTCAACAGT	A	C	B	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	E	B	D	D		
C12187	2	99.6	ACTGTGCTCTCATGACTTATC	TACAGTACTTGGGTGATCAT	A	C	B	C	B	B	B	C	AB	C	C	C	C	C	C	C	B	F	G	E	C		
E3295	2	101.2	ACGTACGTACACAACATCTGTC	GCTGTCTTATATGGTATCTGTC	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	D	C	C	
E1834	2	105.8	CATCTGCTGCTTCACTACTGTC	GAGGTGATTCCTCAACAGATTCTC	A	A	B	B	A	B	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	C	C	C	C	C	
E3928	2	125.6	TTGCTGATCCATCCAACAAC	TGATCAATGTCAATGGGAGA	A	B	A	B	A	-	A	A	A	B	A	A	A	A	A	F	D	E	C	-	-		
S13017-5'	2	131.8	AGCTATGGAACGCTCTTAAA	ATTCTACCGGTTCAAGTCTGTC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	D	E	C	-	-		
S13818	2	138.0	ACTGGCTTGAATGCTTTCT	TGCTACAGAGACTGGCACT	A	A	B	A	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B	A	B	A	D	C	C	C	
E4176	2	146.9	CAGACCAGATCGATCACATAGAAG	CTCTTCCCTGATTTGAGAAGCTC	A	B	A	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	A	B	D	E	C	-	-	
R2702	2	156.3	AGGATTTCTTCAACGGCA	CTCCCAAGCAATTTCTCA	A	B	B	A	B	B	A	B	B	A	B	B	A	B	B	B	B	C	A	A	A	A	
C12409	2	157.9	GGGACAATCGAGCATGAGTTAT	CTTCCAAATAGCCCTGTTGCTTA	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	C	D	A	A	
C12409	2	157.9	CTACCTCAGGAAAGTCAATAAG	GTTTGGTCTGACAAATCTGC	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	C	B	A	A	
C52236	3	10.9	CGAGCTGTATACCTGTAGCGAGT	AGTAGGCAATGGCCCTTTTCC	A	B	C	C	C	C	C	A	C	A	C	A	A	C	C	A	-	-	-	-	-	-	

C52909	8	70.1	TTAGCCTGCTGTTCTGTTG	TGATGCGACAGTCAAACACA	A	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	C	A	F	C	E	D
R80	8	73.2	GGTGTTCAGGCAGAGACC	CAGTGTGTTCTGTCCAGC	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	E	D	A	C
R2382	8	92.2	CATGCTAGGGTTACGACTAATG	AGGAGAAGCTGCAGAAGCTAGAC	A	A	A	B	A	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	C	C	C
E4152	8	102.1	TTCCAGTAAAGACACACCTGGAG	CTCACACTCTACAATCCATACCG	A	A	B	A	A	B	B	B	A	A	B	A	A	A	A	F	D	E	C	
E4156	8	119.9	GTCTACACTGCAGGCTAACATC	AGAGGGTCTAGGCAGGGTATTAT	A	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	B	B	C	C	
E31501	9	0.5	GCATCTAAAGCACCAGATATCCA	AGATGTGCCCTCTCTCTCTAT	A	A	A	B	A	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	C	C	
E31281	9	0.8	TATTCTGTCTCCGTTTCAATG	GTTCCTACTGGGTAACTAGTG	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	B	B	B	B	D	C	C	
E20434	9	0.8	GCCCTTGAAGGCTAACTTATT	CCGAGGATTTATCACCTGTACT	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	D	C	
E1141	9	30.6	AACAGAGCAGTAGAGGGAGGAGT	AGTGCCTTACTTTTGACCACAC	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	D	-	C	B
C30007	9	40.1	CTCTCTATCCCTTTGTTGTTG	TCACGGTAAAATAGGCCACTCT	A	B	A	B	A	B	B	B	A	B	A	B	A	B	A	B	B	B	C	
C30515	9	55.3	CCTTCTCTCACTGATCTGAGC	ACTATTACCTTGGTCCGAAGAGC	A	B	A	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
S19745	9	55.9	TTGTTGCGCTCCGCTTCTTC	CTCTCCCACTAGGCAATGT	A	B	A	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	B	B	C	
S11615	9	55.9	CTGCAGCAAACTCACTACTCTA	ATCTGGAAGCCATGACCCTAT	A	B	A	B	A	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	C	
E0349	9	60.8	CAAGCAGGATTGTTGAAGCA	TCCACAAATCCTGGGAGAAG	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C
E60732	9	63.5	GAAAACACCATGCGCTGGAGCAG	GTTAGGACAGGCTCATCATTATG	A	A	B	B	B	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	D	E	C
S16383	9	65.1	CATGAACCGCAACATCTCAG	CATGCTCCGCTGCAACTAT	A	B	A	B	A	B	A	A	B	B	A	B	A	B	A	B	A	C	C	
C2598	9	65.1	ACCACCACCCTCCACCGAT	GGTTCAACATCCCACTGCGCA	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	B	B	C	D	C	
E50836	10	5.5	GTACACACCGCTGCTGTTCTT	CTTATACACTCATGACTCGCTTCC	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	A	E	D	C	C		
C0428	10	10.1	GAGAGATGCGGATCAGCACCTTA	GCCTAAGGGAACCTCAAACAT	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	B	C	A	C		
C913A	10	10.9	CGATGTGTGCTGCTCAGATG	AGAACACGCAAGCTCAGAAG	A	B	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	B		
S0065	10	15.7	GTGGGATGGGACTCAAAC	GGTAGTGGCTGTAGCAGA	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	E	C	D
R2194	10	15.7	TGAAGCTTGGTTGTCGATG	TATTTGTTGGCCATACACCA	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	A	A	B	B	A	B	-	C	C	
C148	10	17.9	TTCATTCGAGATGTTGTGCG	GATGATCTGGTGAGAGATGGG	A	B	B	A	B	B	B	B	B	A	A	B	B	A	B	D	C	B	C	
C0961	10	26.1	CTATACATCTGCCGATGACCTTC	GGACAAATAGGCTAACAGATGC	A	B	A	B	A	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	D	C		
E50590	10	30.2	TCATGTGCCAAAGCCAGTAG	ATGTCCTTTTGCGCTTCATCCG	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	A	D	C	
E30409	10	30.2	ACTGTGGGAGGAACAAACATA	TACTACTACATCGCCCTCTCTC	A	A	B	A	B	A	B	A	B	B	A	A	B	B	B	C	A	C		
E2439	10	30.2	ACCGTTTCCACATCTCCGAAC	GCCATGGTGTGTTTGGCTCTA	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	D	C	
C51269	10	44.6	CCGGCTCAAGGTGAAATAA	GTAGGTTTTGCTGCACACGA	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	C	D			
S21707	10	48.4	ACCAAGCAGAGAGGGGATT	CCGAACATAGGCTAACAGAT	A	B	A	B	A	B	A	A	B	A	A	A	B	B	B	B	D			
S20925	10	53.9	CGTAGGACCTCAGCTTCTTGATA	GAGAAGCACATGCCAACTTGT	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	
S11430	10	53.9	GGGAAGAATCCAATCCAGGT	CGAGCACAGATGTTCCAGA	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	
C16	10	71.4	ACATCTTGAGGATTGGGAGC	TTATGATCAGATGATGCAG	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	D	C	
R0835	10	72.8	TCAAACACTGTCTGGTGTGAC	CCGTACGTAAGGATTCCTTTGG	A	A	A	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	D	C	
S14938	11	0.0	TCTGCACTCCCTCCAAAAC	CGCTTGTGCTGCTTAAATA	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	D	C		
C562	11	0.0	CGGACCAAGCTCTACATCT	GTTTAGCCATTCCTGCTCA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	C	D	C	
E11325	11	10.3	ACAGTGAATGGCTATCTCTC	CTTCTAATATCCGCTAGGCTCGT	A	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	F	D	E	C	
S10616	11	20.3	ATCCCTGCATTTGCTCCAGG	GTATCAAGATCAACACTGCAGC	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	A	C	C			
C496	11	30.5	GTGAGATCTTTGGAGGAGG	TCATCATTACCCCAAGGCGAG	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	C	B	
E0935	11	49.6	TACAGCCATTTGACTCCCTA	AATCTTGTGCTGCAACTCTTC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	B	C	B		
E0935	11	49.6	TTGCAAGAATCCCTGAT	GGTTGCTTTTCACTCCGTTTTC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	B	C	A	B		
E30139	11	57.3	CTGCCTGAAGGAGTTACTTGTG	GAGACTAAAATCAGTCCGCTGA	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	E	D	C	
E31523	11	64.8	GCTCCTTAATGCACACACGA	CACCCATTTTCACTCCCAAT	A	B	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	F	D	E	C	
S5016	11	78.8	GGGGCATTGGATTATTCTT	TACGACATGCTCCTCCCTGT	A	A	B	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	E	A	D	C	
C50	11	89.0	GCAAAAAGCAACTGGAAACAT	GAAAAACATACGGCGAGTGC	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	E	D	C	
R2664	11	91.4	ACTGGGACACACGCTACAAGATA	ACATTTAGAGTAGCCCGAAGGTC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	-	-	C	A		
E3876	11	91.4	AGCATTTGGCTCGTAGCAAT	AACCCTTGGTGAGCTTGTG	A	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A	B	A	B	C	-	C			
C52513	11	91.4	CACCGATAAGACGAGCCTTC	GGCTGCCATATCTTGACCAT	A	A	B	B	B	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	A	
C11589	11	91.4	CGGAAGTGTGTTGGATATCTG	GGTCAGCTATATGCATCAGGGTA	A	B	C	C	C	C	A	B	A	C	C	C	C	B	C	B	A	D	A	
C12965	11	99.2	TCCTGGAATGTGACTTGA	CTTGGCAACATTGCCAGATA	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	C	C			
E50658	11	112.9	TGAGGATTCTATCACTGAAATCC	CATGTACATGGTTAATAGGGTGA	A	A	B	B	B	A	B	A	B	A	A	B	A	B	A	A	B	C		
E3191	11	115.1	GGTGGTACACTGATAGAAGACC	ACGAGGAGTACGTCGAGAAGAAG	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	B	D		
C10855	11	116.2	CCACTTTCCAATGCAAAACA	GGTGATGACTAGCCGTTGGT	A	B	A	B	B	B	C	B	B	A	B	A	B	C	C	-	-			
C10295	11	117.3	GGGTCAACCAGATCTTACGGTAG	CACCGTTGACTCTTATGACGGT	A	B	-	-	-	-	B	A	-	-	-	A	-	B	C	C	-	-		
E4420	11	117.9	TGATTCTTGTGTTGCTGGA	GCACATCGATTAACCCATCA	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	B	A	B	B	B	D	E	C		
S20454	12	29.2	TTTTGGCCCACTAGTITCT	CAGTTCACACCAGGCGATAA	A	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B	C		
E30254	12	29.2	GACAAGGTGTTCCGCTCGCC	TGTAGAGTTGGATGTACATCCC	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	F	D	E	C	
E10970	12	30.0	GCAGACCTGAGCATCTGTAAC	CCAGAGGTAAGTCCCACT	A	B	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	A	C	C		
E10037	12	49.3	ATTATACGTGACCAGCGATTCC	GTCACAAACAAGAGGGGATGT	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	C	D	C	
E60142	12	61.6	ACTCACATGTTGGATCTTCAAG	CTTATCATTCAGGTGAECTCC	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	C		
R1709	12	91.4	ATGTGCGTCTTTGTTTG	GACTGCTCATTCGCAACTT	A	B	A	B	B	B	B	A	B	B	A	A	B	A	B	-	-			
S21125	12	100.9	GCACATCATATGAAGAGTTCAC	GACCTTAAATGCTACTCTGATC	A	B	A	A	A	B	A	B	A	A	B	A	A	A	B	C	C			
E60101	12	100.9	CATCCATCTCTCCAAAGTTGG	TTACCCATAAAGAACAGCATGC	A	B	A	A	A	B	A	B	A	A	B	A	A	B	A	A	B	C	C	
E60010	12	100.9	GTCTACCATTGAGAACTTGG	ACCTCTACAGCCGAAGCTCA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	C	A	
S14134	12	107.4	CAGCGACACCTAGTATTCACAT	CCCAGATGATAGACTGATGAGTTG	A	C	B	A	B	B	C	B	B	B	A	B	A	B	A	C	E	B	E	
S21168	12	108.2	GCATCATCATCTCACTCTGT	CAACATGGCTCACTCTAGTGGTT	A	B	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	A	B	D	C		
E60843	12	108.2	CTAGTTGGAGGCCACTGTAAA	GAAAAGTGGATGGGTTAGGAGAC	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	D	D	C		

あり、対立遺伝子の数が3個、4個、及び5個のものは、それぞれ15遺伝子(6.2%)、11遺伝子(0.4%)、及び1遺伝子(0.4%)見出された。品種によってPCRでDNAが増幅しない対立遺伝子を持つものが、3個(1.2%)存在した。この3遺伝子(R1464、E1141、C10295)のうち、2遺伝子では対立遺伝子数が2個であった。

PCR-RF-SSCP分析によるSNPの検出効率は、1種類の制限酵素を用いた場合、約70%であると見積もられている(Sato & Nishio 2003)。本研究では、2種類の制限酵素でそれぞれ切断したDNA試料を分析に用いたため、SNPの検出効率は約90%であると推定される。日本型品種内、インド型品種内、及び日本型品種-インド型品種間のPCR-RF-SSCP分析によるDNA多型検出頻度は、それぞれ4.9%、59.8%、及び68.1%であった。したがって、DNA多型が存在するDNA断片は、日本型品種内、インド型品種内、及び日本型品種-インド型品種間で、それぞれ5.4%、66.4%、及び75.7%であると推計できる。

ゲノム上の1つの遺伝子領域の平均長は、3 kbの転写領域と1 kbの転写調節領域を合せた4 kbであると考えられる。本研究では、遺伝子の3'領域の約2 kbをPCR-RF-SSCP法で分析した。遺伝子の5'領域の多型頻度は、3'領域の多型頻度と大きく変わらないと考えられるため、日本型品種内、インド型品種内、及び日本型品種-インド型品種間の4 kbの遺伝子領域の多型頻度は、10.5%、88.7%、及び94.1%であると推定できる。日本型品種で最も多型頻度の低かったひとめぼれ-初星間では1.8%の遺伝子に多型が存在すると推定され、イネの遺伝子数が38,000と予測されている(International Rice Genome Sequencing Project 2005)ことから、684遺伝子が2品種間で多型を示すと見積もられる。

本研究で用いた日本型17品種中には親子関係にある3品種の組が7組含まれている(Figure 1.2)。このうち、農林1号と農林22号の子のコシヒカリとコシヒカリと初星の子のひとめぼれの2組合せについては、両親間で多型を示す遺伝子のうちのどちらかの対立遺伝子が、子の品種に受け継がれていた。他の5組では、両親品種の持っていない対立遺伝子を子の品種が持っていたり、両親間で多型を示す対立遺伝子を子の品種がヘテロ接合体で持っていたりした。イネは、通常F₁₀世代で品種登録されるため、その時点では両親間で異なる対立遺伝子のうち1/512がヘテロの状態のままである可能性がある。また、育種システムの養成には、世代が早い段階で交配親に使用される場合も多く、これらがイネ品種の親子関係の不一致を引き起こす原因であると考えられる。

日本型品種内のDNA多型の同定

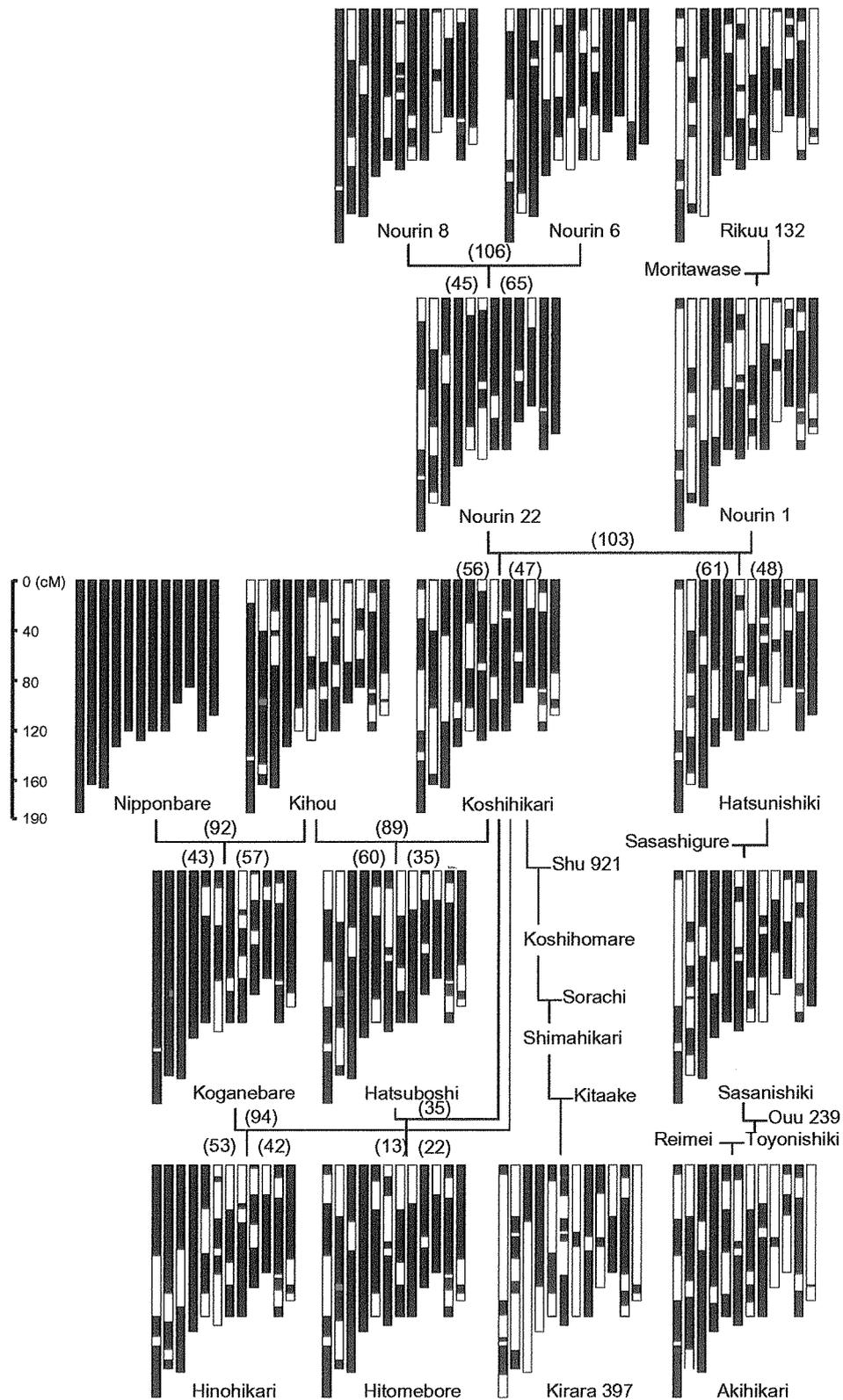


Figure 1.2 Genealogy and graphical genotyping of the *japonica* paddy-rice cultivars. The chromosomal regions with A allele are shown by red boxes, those with B allele by yellow, those with C allele by blue, those with D allele by light blue, and those with E allele by green. The number in parenthesis between the cultivars indicates the number of different alleles between them.

36 遺伝子 (41 対立遺伝子)の PCR 産物の完全長の塩基配列と、9 遺伝子 (9 対立遺伝子)の PCR 産物の部分的な塩基配列を決定し、本研究で決定した日本晴の対立遺伝子の塩基配列と比較した。これら 50 対立遺伝子の塩基配列中に、142 個の SNP と 32 個の挿入・欠失変異を見出した (Table 1.3、Table 1.4)。

完全長 cDNA の塩基配列情報が得られた 41 遺伝子の 46 対立遺伝子には、149 個の DNA 変異のうち 71 個 (47.7%)がエキソンに、78 個 (52.3%)がイントロンに存在することが明らかになった。これら 46 対立遺伝子のエキソンとイントロンの平均塩基配列長は、それぞれ 889.5 bp と 840.7 bp であり、エキソンには 12.5 bp に一つの頻度で、イントロンには 10.7 bp に一つの頻度で DNA 変異が存在した。エキソンに見出された 71 個の DNA 変異のうち、33 個 (46.5%)が指定するアミノ酸の非同義置換を引き起こすミスセンス変異であった。その他の 21 個 (29.6%)は指定するアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であり、残り 17 個 (23.9%)は遺伝子の 3' UTR に存在した。

46 対立遺伝子のうち、エキソンに変異を持つ対立遺伝子は 28 個であった。このうち、S13157 はエキソンの 1 塩基欠失に伴うフレームシフト変異を、15 対立遺伝子はミスセンス変異を持っていた。ナンセンス変異やスプライス部位の変異は見出されなかった。残り 12 個は、同義置換変異や 3' UTR に変異を持つ対立遺伝子であった。

フレームシフト変異とミスセンス変異を持つ 16 対立遺伝子 (13 遺伝子)について、BlastX プログラムによる既知のタンパク質に対する相同性検索を行った。Table 1.5 に示した推定アミノ酸の変異を見出し、予測される遺伝子機能の差異について以下に述べる。

S13157 は、イネの受容体キナーゼタンパク質に相同性を示した。膜貫通領域が 3 ヶ所あり、膜局在性のタンパク質であると予測された。細胞内のキナーゼは、15 個の保存アミノ酸 (Hanks *et al.* 1988)を持つセリン・スレオニン型タンパク質キナーゼである。日本晴型の対立遺伝子に対して多型を示す対立遺伝子では、キナーゼ領域に 1 塩基の欠失によるフレームシフト変異が存在し、保存された 15 個のアミノ酸のうちの 1 個のアミノ酸を含むカルボキシル基末端の 105 アミノ酸が別の 5 アミノ酸に置換していた。細胞外領域の受容体部分は、浸透圧ストレスに関わるタバコの NiC7 (Tamura *et al.* 2003)や、病害抵抗性に関わるシロイヌナズナの PR5K (Wang *et al.* 1996)に相同性を示した。この遺伝子は浸透圧ストレスや病害抵抗性の品種間差異を説明する遺伝子であるかもしれな

Table 1.3 SNPs and indels in the genes having DNA polymorphism between the *japonica* paddy-rice cultivars

marker name	Chr.	cM	allele	sequence		truncation			missense	synonymous	3' UTR	intron	unassigned region**
				analysis*	frame shift	nonsense	splice junction						
S13157	1	5.6	B	F/1469	Del (1)***	-	-	-	SNP (2)	SNP (1)	-	SNP (1)	-
C60656	1	10.9	B	F/1785	-	-	-	-	SNP (1)	SNP (1)	-	In (1)	-
S4655	1	36.9	B	F/1844	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	-
S3813	1	95.7	B	F/1750	-	-	-	-	-	-	-	-	In (1), Del (2), SNP (10)
S13781	1	139.9	B	F/2157	-	-	-	-	SNP (1)	-	-	-	-
S10925	1	142.9	B	F/1786	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
C112	1	181.8	B	F/2226	-	-	-	-	SNP (2)	SNP (1)	-	Del (1), SNP (4)	-
R2542	2	28.0	B	896/1925	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	-
R1843	2	57.6	B	F/2715	-	-	-	-	-	-	-	-	In (3), SNP (6)
S20768	2	95.2	B	F/1753	-	-	-	-	-	-	-	In (1), SNP (2)	-
R1906	2	96.6	B	F/1461	-	-	-	-	-	-	-	In (1), SNP (2)	-
			C	F/1461	-	-	-	-	SNP (2)	-	SNP (1)	In (1)	-
			D	F/1461	-	-	-	-	SNP (1)	-	SNP (1)	In (1)	-
			E	F/1461	-	-	-	-	-	SNP (1)	Del (1)	In (1), Del (1)	-
S10844	2	98.2	B	F/1814	-	-	-	-	SNP (5)	SNP (7)	SNP (1)	-	-
			C	F/1814	-	-	-	-	SNP (3)	-	SNP (1)	-	-
			D	F/1814	-	-	-	-	SNP (4)	-	SNP (2)	-	-
R2559	2	99.6	B	737/1947	-	-	-	-	-	-	SNP (2)	SNP (2)	-
C12187	2	99.6	B	F/1762	-	-	-	-	SNP (1)	SNP (1)	-	SNP (2)	-
C12409	2	157.9	B	F/1826	-	-	-	-	SNP (1)	SNP (1)	-	-	-
R1862	3	49.3	B	F/1634	-	-	-	-	SNP (1)	-	-	-	-
R2376	4	111.0	B	498/1582	-	-	-	-	-	-	-	SNP (2)	-
S0994	5	95.8	B	F/1861	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
C1272	6	13.5	B	897/1952	-	-	-	-	SNP (4)	-	-	Del****, SNP (4)	-
C235	6	54.1	B	F/1633	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
R1804	7	11.0	B	439/1752	-	-	-	-	-	-	-	In (1)	-
C1467	7	73.2	B	612/1941	-	-	-	-	SNP (1)	-	SNP (1)	SNP (6)	-
R2394	7	80.5	B	F/1927	-	-	-	-	-	SNP (2)	-	In (2), SNP (1)	-
R2561	7	81.1	B	F/1293	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	-
C847	7	91.7	B	F/2562	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	Del (5), SNP (9)	-
E50066	8	25.2	B	F/1938	-	-	-	-	-	-	-	-	SNP (2)
C166	8	26.3	B	F/829	-	-	-	-	-	-	-	Del (1)	-
S20045	8	58.1	B	F/1625	-	-	-	-	-	-	-	SNP (2)	-
C347	8	58.4	B	F/1284	-	-	-	-	-	-	-	SNP (3)	-
C52335	8	58.4	B	F/1730	-	-	-	-	-	-	-	SNP (3)	-
R80	8	73.2	B	F/1526	-	-	-	-	SNP (1)	-	-	-	-
C30007	9	40.1	B	F/1762	-	-	-	-	-	-	-	Del (1)	-
C30515	9	55.3	B	F/1720	-	-	-	-	-	SNP (3)	-	-	-
S1974S	9	55.9	B	F/1825	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
C913A	10	10.9	B	504/3593	-	-	-	-	-	-	In (1)	-	-
C148	10	17.9	B	F/1751	-	-	-	-	SNP (2)	-	-	In (1), SNP (1)	-
E50590	10	30.2	B	531/1841	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
C16	10	71.4	B	F/1878	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	-
S10616	11	20.3	B	F/1880	-	-	-	-	-	SNP (1)	-	-	-
C50	11	89.0	B	F/1406	-	-	-	-	-	-	-	In (2), Del (1)	-
E50658	11	112.9	B	F/1911	-	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)
E60142	12	61.6	B	F/1899	-	-	-	-	-	SNP (1)	SNP (2)	SNP (2)	-
R1709	12	91.4	B	695/3665	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
E60101	12	100.9	B	F/1941	-	-	-	-	-	-	-	SNP (1)	-
S21125	12	100.9	B	F/1921	-	-	-	-	-	-	-	SNP (2)	-

* Sequenced length/Length of Nipponbare fragment, F: Full length was sequenced.

** The position of SNP or indel was not assigned because of no full-length cDNA sequence data.

*** Del: deletion, In: insertion; Number of different nucleotides was shown in parenthesis.

**** Deletion with nucleotide change from AAAAATTA to TTTTTTG

Table 1.4 Positions of SNPs identified in *japonica* cultivars

marker name	Chr.	cM	allele	SNPs and Indels
S13157	1	5.6	B	GTATTGTAGT(C/T)TCGTCATGCT ACAAGTCATT(A/T)CAGAGACAAG TGCGACTCGT(C/G)GGGTTCTGCT CTGAAGAAAT(A/G)AGAAGAGCGC CCAGGCATAC(T/-)AT(CCATCACGAGTGTACCGTCAGCTGACCC/-)GACAAGAAAC TGCAATCTCC(-/GAG)GAGGA(G/A)GA(A/C)GA(C/G)GAGAGTATCA AGTATCACTG(A/G)GTTGAATTAG TTGAATTAGC(-/TAG)TAG(T/G)A(C/G)TAGCAAGTAT TAGCAAGTAT(G/A)GTGTGTTGAT AGGTTGTGCT(C/G)AAGCCTGTGA GTAGACAGTC(A/G)CACAGATGCA AGTTTCTATG(C/A)TCCTA(T/C)TCCTATATTC
C60656	1	10.9	B	ACGAGCCAAG(T/C)TCTCAAAATC GAACATGACA(-/A)TTTTCTTGAA GGTCGGGTAG(T/C)GGAATGTAAA
S4655	1	36.9	B	GTGAGACATC(A/G)TGCAACTATC
S3813	1	95.7	B	AGCTCGCCTA(C/T)CCTGCCTCGC GCGAGAGCCT(G/T)T(A/T)ACCCAAGCGG GGGGCACTAA(A/-)GGTGGCTGCG GGCCGGAGGG(G/A)CTTTGGCGAA GTGAGGCTGG(-/G)CTTCACAGAG TAACTGAAA(TATCAAATACGCGTACAGCTGAAA/-)AGACATCTTC TTACAAATAA(T/A)TTTTGTCATT TAATCATTTC(T/C)AACTTTCTAT TAAGCTAATA(T/C)TTGAAGAGTG TTCTGCATGT(G/A)CTGCTGCGGT GGCAATGTCA(G/A)CCCCATGGAA GTACTTTTGT(T/C)TTGTCAACGT
S13781	1	139.9	B	TTATGACAAT(A/T)TAAGCCAAT
S10925	1	142.9	B	TAAAAC TAGA(G/A)TTCAAGTAAA
C112	1	181.8	B	TACTCCCTCC(C/G)TCCTTAAACA TCATCTTATT(T/C)AAAAATTTA AAAATTTTTT(A/G)AATAAGACAA GCATCAAATA(T/G)TTAGGGACGG GAAAAAAAAA(A/-)GGAATTTTAT TCCGGTGACC(T/A)CCGGCATTGG CTTTGAGACA(C/T)TGAACCCAAC GCTGCGAAGC(T/A)AATAGGAATG
R2542	2	28.0	B	CTAGCACAGC(A/G)ATTGACTGGT
R1843	2	57.6	B	CTCTCTCTCT(-/CT)AGCATATTGT GATATGATTG(C/T)CAGAATCATT CTTAGTACGC(G/A)GTATGGAATT TCAATTCTAC(T/C)AGGATCTTTT CTTAAAATCT(-/CT)GTCTGCCAGA CACGTAAGTA(-/TAGTAAAACACTAAGTA)ATTTTCACTT CAAAATATTC(G/A)ATGTTCTTAG GGGTAAGTTC(G/T)CACCTTAGTA TGATTGGTTC(T/C)TACGGTTGCT
S20768	2	95.2	B	GTTTTTTTTT(-/T)CTTCGCAACT GATCTGTACC(A/T)TGGTAAATTG GTGGCATATG(A/G)TTTTAGCAGC
R1906	2	96.6	B	AACCCTAGCT(-/TT)CTCTTATTAG CCTTTTGCGT(T/A)ACCCTTAGTA ATAAGCTCGT(T/C)ACTGCCATA
			C	AACCCTAGCT(-/TT)CTCTTATTAG TGACAAGTTA(C/T)GTCCTAGAAC CAAGCTCTGG(C/T)GACCATGTGC

				TAGTGCAATA(T/G)GCATCTTTGA
			D	AACCCTAGCT(-/TT)CTCTTATTAG
				CCTGCCGCCA(G/A)CCGCCATGGT
				GATTTTTATA(C/G)GAGAGATTTG
			E	AACCCTAGCT(-/TT)CTCTTATTAG
				TGGATGCTTT(TCCCTTTT/-)GCGTTACCCT
				CCACAGTTCT(T/C)GAGTGCATGA
				AAAATGTTGG(G/-)AATTATGAGA
S10844	2	98.2	B	ATTTCAATGA(C/T)GATGAACCTT
				CTACATCTCG(C/T)GCTCCTGTTG
				TGGCAGGCAG(C/A)AAGCCTTGCA
				TCAAGATTCA(T/A)GCAGATGAGG
				GGCCAAAGTC(A/T)CCTACGTCTG
				AGGTTGATCG(T/G)GAGAGGAACC
				GTGCTGCTGA(T/A)GCTATTGAGG
				CTTTTTCAAG(A/G)AAGAGTGGGG
				GGATGGCTAG(C/T)CGGCAACGAT
				CGCGTGGTGA(C/T)TCTACAGACA
				ATGCTGCAGC(G/A)CTCACAGAAC
				CCTCCGGGCC(T/C)GAGGCCGAG
				TAGTAGGTCA(G/A)TAGTGCAGTA
			C	TGCAGTAGAG(C/T)TGTGGAGATC
				GTGCTGCTGA(T/A)GCTATTGAGG
				CCTCCGGGCC(T/C)GAGGCCGAG
				TAGTAGGTCA(G/A)TAGTGCAGTA
			D	TCCAAGTCAC(C/T)ATCGAGAAGC
				TGCAGTAGAG(C/T)TGTGGAGATC
				GTGCTGCTGA(T/A)GCTATTGAGG
				CCTCCGGGCC(T/C)GAGGCCGAG
				TAGTAGGTCA(G/A)TAGTGCAGTA
				TCAAGTCAAG(G/C)ATGCGGTA
R2559	2	99.6	B	CAATATGTGG(T/C)TGGGTT(A/G)GCCCTAGTTG
				TACTGACTGG(T/C)TGAGTAAGAT
				AGTATGTGTC(G/A)AATTTTTACT
C12187	2	99.6	B	GAAGAGGTTT(C/T/A)TTGATGTCG(T/C)ATATTTTCAG
				AGGAGTGGAT(A/G)TTCTTCATTT
				TATCTTGGTA(A/T)TGCCCATGTT
C12409	2	157.9	B	GCAACAGGAA(G/A)CCTGACAGGT
				AATATGGATC(G/A)AAGTAGAAAT
R1862	3	49.3	B	CGCACGGTCA(T/C)GGATATCCGT
R2376	4	111.0	B	AGTGATCATA(C/T)GCTTGATACC
				TTGTTTCTGT(T/A)TTTTCTGTCA
S0994	5	95.8	B	TACTATAGTA(C/A)CAGGAGTAGT
C1272	6	13.5	B	GCTTCGTTTT(T/C)CGTGCCGACG
				TTTCAAAGT(A/G)AAACGGTGCG
				AAACGGTGCG(C/T)TTTTTTGCAA
				TTTTGAAAAA(AAAAATTA/TTTTTTG)GCAAATACTT
				TTGGTAACCT(T/G)CATATGCGAA
				GAACAAACAT(A/G)CCTGAGCTCT
				TGTATTCCAC(G/A)CAATGGAAC
				CCCCCTCCTG(T/C)GGCGC(T/A)TACATCAAGG
C235	6	54.1	B	AAATGTAATT(T/G)CAGAGGAACC
R1804	7	11.0	B	AGAGAGAGAG(-/AG)TAAATGATAA
C1467	7	73.2	B	GAGAGCTCTA(T/C)GGAAATGAAA
				AATAAAGTAC(A/G)(T/G)TTGTTTGGTC
				GAAATTCATG(A/G)AAACAGTTAT
				TTTATTAGCT(T/C)TCACCCCTTC
				GAAAGTCTGG(C/T)ATGAACTGTC
				ATCAGAGGAA(A/G)AACGTATCAA
				ATGCTTGTTA(C/T)CCGTGTGTTG

R2394	7	80.5	B	TGAAGAAGAA(-/GAA)AAAAC TAGCA CCATTTTTTT(-/T)CCCAAAATTT CCTCTTCTAC(T/C)GAAAGATGCT CATTTGGAGC(C/T)TTCTTAATGT TCAGAACCAC(C/A)ACATTTTCAA
R2561	7	81.1	B	CCATTCCTTT(G/T)CTGGATCATT
C847	7	91.7	B	GTACAATAGT(T/C)GCAAACATCT TGATTTCCA(A/G)CTCATTTTCT CTGGTAGTGT(AT/-)GTGTGCTGTG ATGCTTTTTG(C/T)AGGTGTAAC TTTTGGCTAA(G/T)GGTTGCATTA ATACCTCCAC(T/C)GAATTTTGG GTAATGTTT(G/A/G)AAGTTCTCAC AGAGTTCCA(G/A)CTCACCCCTC TCTCTTTTTC(T/C)GCGCGCATGT TGTGTTTTT(T/-)GCAAAAAGTT AAAAAAAAAA(A/-)GTAAACTTT GTGTTTAGTT(C/T)ACGCCAAAAT TGAAAAGTT(A/G)GAAGTTTGTG TGGAAGTTT(GTGTGTAGGAATGTTTTCATGTGATGAAAAGTTGGAAGTTG/-)AAGAAAAGT AGTTTGAAT(CTTTATAGGTCACATTTCTTTGTGAATTGCAGTTGCCCTGAAAT/-)ATGTTACTTT
E50066	8	25.2	B	TCTACTCCCC(A/G)TTAATTCCTA TAAGGCTTAG(C/G)GCTAACTTCA
C166	8	26.3	B	TTTTTTTTT(T/-)ATGGACTGTG
S20045	8	58.1	B	CTTAAAAGAT(G/A)TGGAGGAAGT TAAAATTATA(G/T)ATATGTTTGT
C347	8	58.4	B	TTTGGTAAGA(T/A)TAGTATGGTT GATGAGTGAT(A/C)TGACTCATGC TCTTTTTGA(C/A)TTTGTGCTC
C52335	8	58.4	B	GAGCAACAAA(G/T)TCAAAAAGA GCATGAGTCA(T/G)ATCACTCATC AAAAACAATA(T/G)ATGCATGAGC
R80	8	73.2	B	CGAGAAGCCT(G/A)GGCCAGCCAT
C30007	9	40.1	B	TTGTTGTTGT(TGT/-)GAATTTTCTG
C30515	9	55.3	B	GTCCTCCACC(A/G)TCCGTTAGAG CATGAACAGG(C/T)CTAGCTGCTT ATTTGACAGC(A/T)ACCATCACTC
S1974S	9	55.9	B	GGTTTGATT(C/A)TCCAAGCTAG
C913A	10	10.9	B	CTGTCTTAC(-/AAAACCCATGCACACAACAGTGGGCATGAACCGCATGATATTCAC)CATCAAGTTT
C148	10	17.9	B	TTAGTGTGCT(-/ATATT)TACCTCCTT AGGTAGAATG(C/A)AAGCAGAACA TGGTTGTGAA(C/G)TTGTGATTCA GAAAGATATG(T/C)CGAGAATCGG
E50590	10	30.2	B	AAATAAAAAA(G/T)AAAAGAGACA
C16	10	71.4	B	CATGTATGGA(A/G)AAGTTAATGG
S10616	11	20.3	B	ACGATCCGCT(G/A)ACGGAGGGGC
C50	11	89.0	B	TATATACTGT(-/T)ATAAGCGGCC ATAAGCGGCC(C/-)AACATGGAAA GTAAATGGAA(-/A)TTATTTGAAA
E50658	11	112.9	B	CAACAAGAAT(A/T)AGAATGATAC
E60142	12	61.6	B	AATACTTGAT(T/C)GAGCTCGAAG GCTTGTGAA(T/A)CAATACCAA GTCCAATGGC(C/T)GGTGTCCGA TCTGAATTCT(A/G)AAAGACCC(A/G)TTTGCAGATA
R1709	12	91.4	B	TTAGAGAGAT(G/A)CAAAATGCAA
E60101	12	100.9	B	TGCATTTTCT(T/C)GTTCTGAAGG
S21125	12	100.9	B	ACATATTAAT(T/C)GCACC(T/C)GCATGTCATC

Nucleotide differences are shown in parentheses. The left of the slash is the nucleotide of A allele, and the right is that of the B, C, D, or E allele.

Table 1.5 Differences of the deduced amino-acid sequences of the alleles

name	Chr. cM	Clone name	No.	Genes having highest similarity in BlastX*	Allele
S13157	1	5.6 J013046E24	AK0666041	receptor-like protein kinase - rice (T03027)	B Tyr-360-Phe Ile-426-Met Tyr-573-frame shift
C60656	1	10.9 001-045-F12	AK062139	probable AAA-type ATPase - <i>Arabidopsis thaliana</i> (F84674)	B Asn-121-Ser
S13781	1	139.9 J013038F20	AK065721	hypothetical protein F24G24.160 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T04051)	B Ile-45-Leu
C112	1	181.8 J033133D12	AK103593	probable hydrolase - <i>Arabidopsis thaliana</i> (E84729)	B Ser-31-Thr
R1906	2	96.6 J023108N22	AK071805	probable chloroplast protein import component - <i>Arabidopsis thaliana</i> (B85042)	C Leu-223-Gln Arg-78-Cys Ala-194-Val
S10844	2	98.2 J013145E21	AK072178	probable retroelement pol polyprotein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (F84811)	D Ser-19-Asn B Gln-327-Lys His-541-Gln Asp-573-Glu Arg-681-His Leu-692-Pro Ala-209-Val Asp-573-Glu Leu-692-Pro His-173-Tyr Ala-209-Val Asp-573-Glu Leu-692-Pro Tyr-367-Ile Leu-82-Phe Met-168-Thr Ile-506-Met Arg-607-His Val-633-Ala Leu-635-His Lys-93-Arg Gly-345-Arg Asp-329-Gly Ala-374-Ser
C12187	2	99.6 J013066F17	AK066386	CER1-like protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T02536)	B
C12409	2	157.9 J033050K07	AK101576	oligopeptidase A-like protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T49985)	B
R1862	3	49.3 001-033-H05	AK060813	probable pre-mRNA splicing factor RNA helicase - <i>Arabidopsis thaliana</i> (H84912)	B
C1272	6	13.5 J023022E12	AK069490	probable receptor protein kinase F14G9.24 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (G96602)	B
C1467	7	73.2 001-036-C07	AK105037	GOS2 protein - rice (S21636)	B
R80	8	73.2 J013058G09	AK066237	beta-1,3-glucanase homolog F10M23.170 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T04806)	B
C148	10	17.9 J023031K22	AK069792	protein integral membrane protein F25P22.12 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (B96764)	B

* PIR ACCESSION was in parenthesis.

い。

C1272 は、受容体タンパク質に相同性を示す、7 回繰り返しのロイシンリッチリピート (LRR)と、1 ヶ所の膜貫通領域を持つタンパク質であると予測された。このような遺伝子には、トマトの *Cladosporium fluvum* 抵抗性遺伝子 (Cf-2; Dixon *et al.* 1996、Cf-9; Jones DA *et al.* 1994)やシロイヌナズナの成長点の分化に関わる遺伝子 (CLAVATA2; Jeong *et al.* 1999)が存在する。日本晴型の対立遺伝子に対して多型を示す対立遺伝子では、LRR 間と膜貫通領域にアミノ酸変異が存在した。この遺伝子は病害抵抗性の品種間差異を説明する遺伝子であるかもしれない。

R80 は、 β -1,3-グルカナーゼ (*Gns1* から *Gns14*)に相同性を示した。イネでは、異なる器官と条件で誘導される *Gns2* から *Gns14* が、4 つのサブファミリー (A から D)に分類されており (Romero *et al.* 1998)、R80 はサブファミリーD に属する。サブファミリーA は病害抵抗性に、B、C、及び D は成長制御に関与するとされている (Romero *et al.* 1998)。しかし、サブファミリーA に属する *Gns1* の過剰発現体は病害抵抗性を獲得するが、形態的な変化は示さない (Nishizawa *et al.* 2003)。日本晴型の対立遺伝子に対して多型を示す対立遺伝子では、 β -1,3-グルカナーゼに保存されているアミノ酸に変異が存在した。この遺伝子は病害抵抗性や成長制御の品種間差異を説明する遺伝子である可能性がある。

C12187、C148、R1906、及び C1467 は、4 ヶ所の膜貫通領域とステロール不飽和化酵素のヒスチジンリッチ部位を持つ CER1 様タンパク質、10 ヶ所の膜貫通領域と multiantimicrobial extrusion 部位を持つ膜内在性タンパク質、5 ヶ所の膜貫通領域を持つ葉緑体膜の輸送複合体を構成するタンパク質、及び 1 ヶ所の膜貫通領域を持ち翻訳開始因子 SUI 領域を持つ GOS2 とそれぞれ相同性を示した。日本晴型の対立遺伝子に対して多型を示す対立遺伝子のアミノ酸変異は、遺伝子機能に関わるものではないと考えられる。日本型品種で 4 つの対立遺伝子が検出された S10844 は、レトロトランスポゾン様の遺伝子であった。他の C60656、C12409、及び R1862 は、完全長 cDNA の塩基配列情報から予測したタンパク質のアミノ基末端側や保存領域が欠失しており、日本晴型の対立遺伝子においても正常な遺伝子機能を喪失していると考えられた。

第二節 ゲノム情報を利用した AFLP マーカーの PCR マーカーへの変換 <緒言>

AFLP 分析 (Vos *et al.* 1995)は、任意に選んだ 2 系統間の DNA 多型を効率良く検出できる技術である。AFLP 分析は、ゲノム全体を対象に解析が可能で、電気泳動分析の際、ゲルの 1 レーンあたりに多数のバンドが検出できるため、DNA 多型の検出効率が高い。また、ゲノム配列情報が必要なく、PCR に用いるプライマーの組合せを変えることで、多数の DNA マーカーを作成できる。その反面、再現性のある結果を得るためには、高純度な試料 DNA が必要であり、また、分析自体にも労力がかかる。AFLP 分析で検出した DNA 多型を、手間がかからず、安価に、再現性良く検出するために、塩基配列特異的な PCR マーカーに変換することが望まれる。

AFLP マーカーを塩基配列特異的な PCR マーカーに変換する試みは、多数報告されている (Shan *et al.* 1999, Parker & Langridge 2000, Sardesai *et al.* 2002, Evans & James 2003, Stracke *et al.* 2003, von Stackelberg *et al.* 2003)。ほとんどの場合、AFLP 分析で検出したバンドの塩基配列からプライマーを設計している。このようなプライマーを用いた PCR では、プライマーに挟まれた領域に存在する DNA 多型しか検出できないため、AFLP マーカーの塩基配列特異的な PCR マーカーへの変換効率は低くなる (Shan *et al.* 1999)。AFLP 分析で検出した制限酵素部位とその近傍の SNP を含むようにプライマーが設計できれば、それぞれ CAPS 分析 (Konieczny & Ausubel 1993)と PCR-RF-SSCP 分析 (Sato & Nishio 2002)によりそれらの SNP の検出も可能になる (Figure 1.3)。

本研究では、日本型品種である日本晴とコシヒカリを用いて AFLP 分析を行った。公開されたイネゲノム配列情報を利用して、AFLP 分析で多型を示した DNA 断片の染色体上の位置を決め、その領域を挟み込むようにプライマーを設計した。このプライマーを用いた PCR により、SCAR (sequence characterized amplified region)マーカー、CAPS マーカー、及び PCR-RF-SSCP マーカーを作成した。また、本法を異なる品種の組合せ (東北 168 号-こころまち)にも適用した。

<材料・方法>

ゲノム DNA の抽出

イネ 10 品種 (日本晴、コシヒカリ、こころまち、東北 168 号、アキヒカリ、

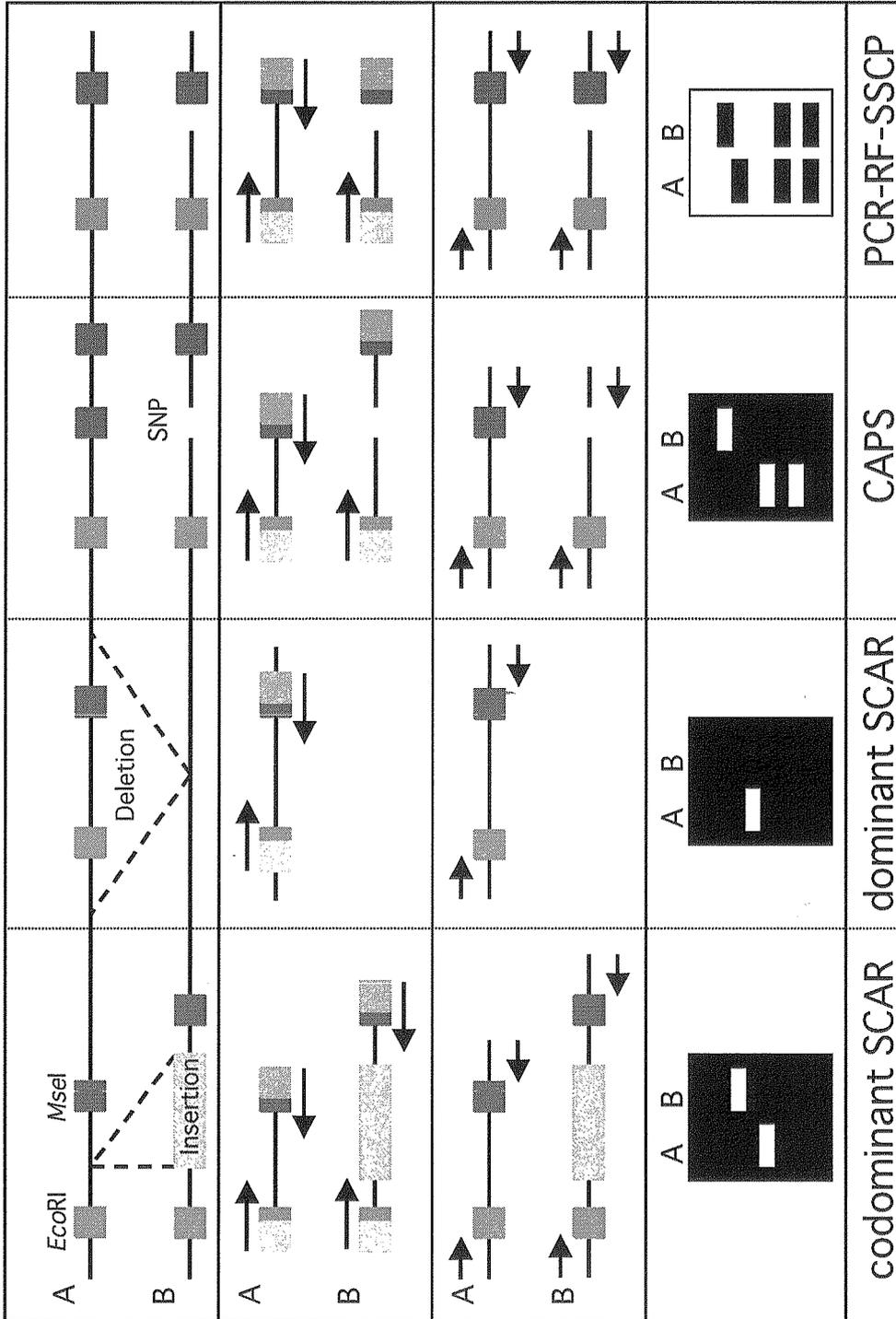


Fig 1.3 A Scheme of the production of the sequence specific markers converted from AFLP markers.

ひとめぼれ、きらら 397、ササニシキ、台中 65 号、戦捷)を材料とした。日本晴、コシヒカリ、アキヒカリ、及び戦捷の 4 品種の種子は(独)農業生物資源研究所の矢野昌裕博士より、他の 6 品種の種子は宮城県古川農業試験場の永野邦明氏より分譲を受けた。ゲノム DNA の抽出は第一節に従った。

AFLP 分析

AFLP 分析は Vos *et al.* (1995)の方法を改変して行った。250 ng のゲノム DNA を *EcoRI* と *MseI* で切断し、*EcoRI* アダプターと *MseI* アダプターを結合させた (AFLP Core Reagent Kit; Invitrogen 社製)。非選択的な 1 次 PCR には、*EcoRI*-0 プライマー (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') と *MseI*-0 プライマー (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3')を用い、選択的な 2 次 PCR には、3'末端に 3 塩基を付加したプライマー (例えば、*EcoRI*-CAA プライマー; 5'-GACTGCGTACCAATTCCAA-3')を用いた。5%変性ポリアクリルアミドゲルを用いて、300 V の条件で電気泳動を行った。ゲルを GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Cambrex 社製)を用いて染色後、Molecular Imager FX (BIO-RAD 社製)でバンドを検出した。多型を示した DNA 断片を抽出する場合は、シルバーステインキット (ATTO 社製)によりバンドを検出した。

塩基配列分析

多型を示した DNA 断片を、Nicod & Largiader (2003)の方法に従いゲルから抽出し、*EcoRI*-0 プライマーと *MseI*-0 プライマーを用いて PCR で増幅した。塩基配列は、ダイレクトシークエンス法により、あるいは pGEM-T Easy Vector (Promega 社製)に挿入し、蛍光 DNA シークエンサー (CEQ2000; Beckman Coulter 社製)で決定した。決定した塩基配列を RiceBLAST プログラムで検索し、その塩基配列を挟み込むようにプライマーを作成した。

SCAR、CAPS、及び PCR-RF-SSCP マーカー分析

20 ng のゲノム DNA に 1 μ l の 20 μ M フォワードプライマーと 20 μ M リバースプライマー、2.5 μ l の 10 \times Ex *Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) (タカラバイオ社製)、2 μ l の 2.5 mM dNTP Mixture (タカラバイオ社製)、0.1 μ l の 5 U/ μ l *Taq* ポリメラーゼ (*TaKaRa Ex Taq*; タカラバイオ社製)を加え、滅菌水で 25 μ l とした。PCR は、94 $^{\circ}$ C で 1 分間熱変性させた後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、58 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 1 分の反応を 40 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸長させる条件で行った。5 μ l の PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。

アガロースゲル電気泳動で多型を示さなかった PCR 産物を CAPS 分析に供試した。試料 DNA を 10 μ l ずつに分け、それぞれに 0.05 μ l の *Eco*RI (タカラバイオ社製)と *Mse*I (NEW ENGLAND BioLabs 社製)とそれらの推奨緩衝液を加え、滅菌水で 20 μ l とした。37°C で 2 時間以上反応させた後、それぞれ 10 μ l を 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。CAPS 分析で多型を示さなかった残りの 10 μ l の試料 DNA を PCR-RF-SSCP 分析に供試した。PCR-RF-SSCP 分析は、第一節に示した方法に従った。

ゲノミックサザンプロット分析

2 μ g のゲノム DNA を *Eco*RI、*Hind*III、及び *Xho*I (いずれもタカラバイオ社製)で切断後、1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜 (Nytran; Schleicher & Schuell 社製)に転写した。ナイロン膜に、PCR DIG Labeling Mix (Roche 社製)により DIG (digoxigenin)標識された DNA プローブを、65°C で 1 晩ハイブリダイズさせた。ナイロン膜を 0.1 \times SSC/0.1% SDS により 65°C で 20 分、2 回洗浄した。ハイブリダイゼーションとシグナルの検出は、DIG キットのマニュアル (Roche 社製)に従った。

<結果>

日本晴とコシヒカリを用いた AFLP 分析

日本晴とコシヒカリを用いて、360 組のプライマー対による AFLP 分析を行った。1 組のプライマー対で、約 20 本のバンドを 50 bp~700 bp の範囲に検出した。多型を検出した 84 個のバンドのうち、29 個の日本晴由来のバンドと 44 個のコシヒカリ由来のバンドから DNA を抽出し、塩基配列を決定した。このうち、10 個のコシヒカリ由来のバンドの塩基配列は、日本晴ゲノム配列に相同性を示さなかった。6 個の日本晴由来のバンドは、それぞれ塩基配列を決定した 6 個のコシヒカリ由来のバンドの対立遺伝子であった。11 個の塩基配列は、日本晴ゲノム中に複数コピー存在する配列であった。したがって、46 個のバンドについて、イネゲノム情報を利用することで、それぞれの塩基配列を挟み込むようにプライマーを設計した。

SCAR、CAPS、及び PCR-RF-SSCP マーカー分析

作成した 46 組のプライマー対を用いて PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動した。日本晴で予測されたサイズの DNA が単一で増幅したのは 44 組であ

った。8 組では日本晴でのみバンドが増幅したため、これらを優性 SCAR マーカーとした (Figure 1.4a, Table 1.6)。6 組では 2 品種間で異なるサイズの DNA が増幅したため、これらを共優性 SCAR マーカーとした (Figure 1.4b, Table 1.6)。

多型が検出されなかった 30 組について、CAPS 分析を行った。CAPS 分析で *EcoRI* を用いた場合は 5 組で、*MseI* を用いた場合は 7 組で多型を検出した。1 組では、*EcoRI* と *MseI* のどちらでも多型を検出した。したがって、これらを CAPS マーカーとした (Figure 1.4c, Table 1.6)。

残り 17 組について、PCR-RF-SSCP 分析を行った。*EcoRI* を用いた場合は 2 組で、*MseI* を用いた場合は 2 組で多型を検出した。8 組では、*EcoRI* と *MseI* のどちらでも多型を検出した。*EcoRI* と *MseI* を用いた場合でも多型を検出できなかった 5 マーカーのうち 1 マーカーは、*MboI* を用いたときに多型を検出した。したがって、これらを PCR-RF-SSCP マーカーとした (Figure 1.4d, Table 1.6)。

優性 SCAR マーカーをプローブとしたサザンプロット分析

8 個の優性 SCAR マーカーについて、これらをプローブとして日本晴とコシヒカリを用いたゲノミックサザンプロット分析を行った。NK14、NK32、及び NK52 の 3 マーカーでは、日本晴でのみ単一バンドを検出した (Figure 1.5a)。NK11、NK22、及び NK48 の 3 マーカーでは、2 品種でスミアなシグナルを検出した (Figure 1.5b)。NK23 では、2 品種でサイズの異なる単一バンドを検出した。NK51 では、2 品種で共通のバンドの他に、日本晴に特異的なバンドを検出した。合計 4 個の日本晴特異的な塩基配列を見出した。

このことから、日本晴ゲノムに相同性を示さなかった 10 個の AFLP マーカーについても、これらをプローブとして同様にゲノミックサザンプロット分析を行った。その結果、8 マーカーでコシヒカリ特異的な単一バンドを検出した (Figure 1.5c)。他の 1 マーカーでは、2 品種で共通のバンドとコシヒカリに特異的なバンドを検出し、残り 1 マーカーでは 2 品種でシグナルが検出されなかった。これらのコシヒカリ特異的な塩基配列は、RFLP マーカーとして利用できる。

PCR マーカーに変換できなかった AFLP マーカーの解析

CAPS 分析や PCR-RF-SSCP 分析で日本晴-コシヒカリ間で多型が検出されなかった 4 マーカーについて、コシヒカリの DNA 断片の塩基配列を解析した。予想に反して、これらは日本晴ゲノムの塩基配列と同一であった。AFLP 分析を繰り返しても、これらの 4 マーカーは多型を示したため、塩基配列以外の多

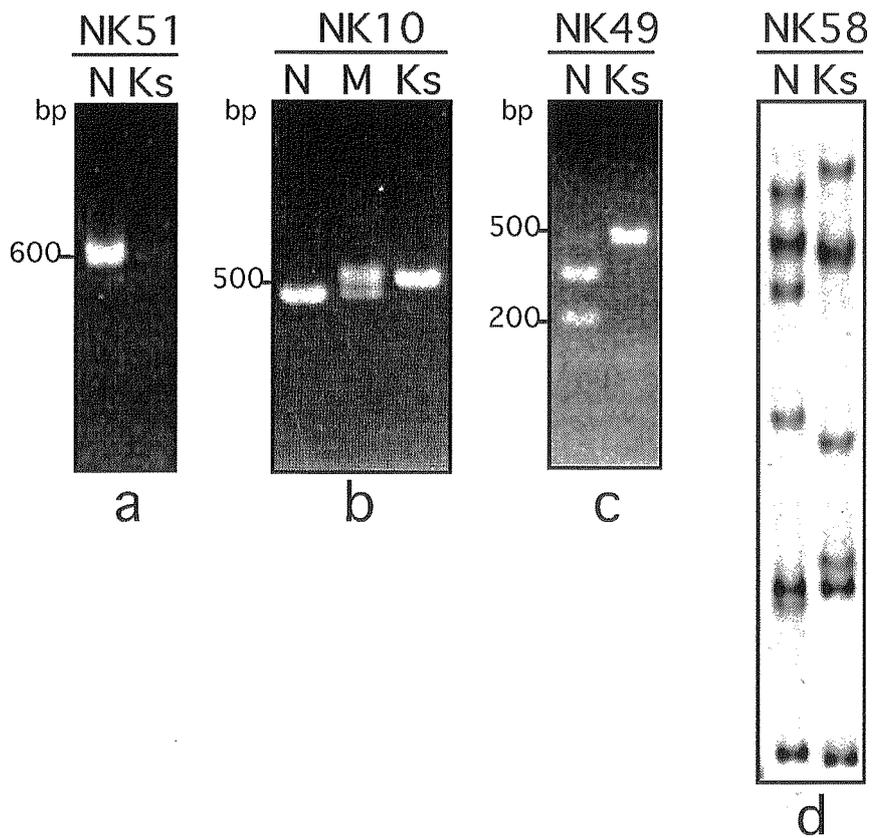


Figure 1.4 DNA polymorphism of SCAR, CAPS, and PCR-RF-SSCP markers between 'Nipponbare' (N) and 'Koshihikari' (Ks). a: a dominant SCAR marker; b: a codominant SCAR marker, c: a CAPS marker; d: a PCR-RF-SSCP marker. M: DNA mixture of 'Nipponbare' and 'Koshihikari' (1:1)

Table 1.6 Sequence-specific markers converted from the AFLP markers for Nipponbare and Koshihikari

Marker name	PCR primer set (5'-3')	Chr.	cM	Restriction enzyme
Dominant SCAR markers				
NK11	GTTTTAGTCCCTGATCGACCC ACTGTGTCAACAGTAGCAGAC	12	108.2	
NK14	CGGTTTAGCACGATCTATCAAG TAGAGAGGAAGATTTCAAGTGG	2	96.6	
NK22	CCCTATAAAGGTGGGCAGGAG GGCTTCTGTATTATCCTCGGTTA	11	117.0	
NK23	AAACAACAGTGCCACCATGTAG CAAGTCGGTCATGTATCAAACAG	7	6.4	
NK32	CAGAGAATCTGTGGAAAACCTGA TACAGTGCTCTGCTATGTGAACC	12	40.6	
NK48	TTAGTCCAAAACCTCAATCCAAA CAGGTGTTGTTCTGTGATATTTGA	7	6.4	
NK51	GGTTTGACTGAATCAGAAAATAGTGC GATAACATTGAATTGGGAACATCA	8	13.1	
NK52	ATTTCAATTCTCCCATTTCTCCTC CCCCTGTAGAGTGGCAAATAATA	2	96.6	
Codominant SCAR markers				
NK10	CGAGGTTCCCTAATGACCAA CTTGTACTTCGCCCTCTTG	7	80.5	
NK19	CAAGAAACATAGGCGAGGTCG GTCGGTTTGATGAAAGATTCG	11	106.8	
NK28	CCTGACAGCTTGTTCCTTTGTC GGAGGCGTAATAGATTGACTTGA	7	6.4	
NK31	CGCGAGCTCTAAGTCTAACCTG GATGATGCTGTCATTCAACCAT	11	115.1	
NK41	CATACTTGCACTCCACATGA CTTAATTTCTCCCGGTCAACTA	11	115.1	
NK55	TCCTCAGAGACACCTTTCTCATC CAACTTCAGATGAAAGAGGCAAA	11		
CAPS markers				
NK01	TGATAGGTGTTCAGAACTTCAG AACTACAGTGACCACCAGAGC	8	72.2	<i>Mse I</i>
NK03	TAATTTTAATGGGCATGAGAG CCTCTTCACACATTTGAAGTTG	4	23.3	<i>Mse I</i>
NK06	AAGGTGGCAGGTTTACCAA AGGTCGGTAAGGAAGCGACT	4	10.0	<i>Mse I</i>
NK15	TGGTGGAGACAAAAGGTTCCGAG TGGTGGGTGTGTTGATGATGG	10	21.2	<i>Eco RI</i>
NK16	GTAGATTAGTCCTTATGATGGC GCGTATCTCATGTATACGTTG	4	9.4	<i>Mse I</i>
NK18	GATGATAGACACAGCTTGACG AGCTGGTGGGGATTTAAACGG	10	14.4	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK27	ATTCTACTCCAAACACCCCAAGA CGTCAGGTA AAAAGCATCAAGAG	4		<i>Eco RI</i>
NK37	AATTTGTTGCATGTGGGTGTAG CACGCTCTTCGCTTTATCACTT	1	98.5	<i>Mse I</i>
NK38	ATACGTGTGCACATTTGTTGCT GTCCCTTAGATCAGGGGATTAGT	10	68.6	<i>Mse I</i>
NK43	AGATGGAGGCTAGATATCATTGG CCATGTATCACAATTACGCTGTG	4		<i>Mse I</i>
NK45	TGCATGCTGATATATTTTGGT GGATGTTATAGCTTCTTATCCAA	3	2.5	<i>Eco RI</i>
NK49	TATGGTCACGCCTATCATAACA GGCTCAATACCTTTTGCATCTA	2	91.8	<i>Eco RI</i>
NK59	TCCTTGTTCTAGAGCACAATCAAT GGAGGTAGGAAAAGGACCAGTTA	11	117.0	<i>Eco RI</i>
PCR-RF-SSCP markers				
NK21	TCTGCAAGTACTATATGGCCTAGAA ATTATGGGTCAAAGGGAGCTCAG	8	40.2	<i>Eco RI</i>
NK26	CGATTAATTTGGTGTCAACAGG CTGTCTCGGACGATTTGCAT	1	8.7	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK29	TTACTCACAATATGCCACGTCAG GCCCTCTCCCTCTATCTTTCTCT	1	98.5	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK30	TGAGACATGAATGAAGAATTGAGT TGAGTTGTGTCAGGAAGGCTAAT	4	9.4	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK34	TTTGGTGTGTGTAGATGTTGCT GCGGAAATTTTATGGTGAAGAC	2	15.0	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK35	GAGGATTGCGAGAGAAGGATAC GTTAGCCAAGAGGCTTAGGGATA	7	80.5	<i>Mse I</i>
NK36	GATCGAAAAACTCAGGGAAGC CTGTACCATCTCCAATAGCCAAA	3	50.8	<i>Mse I</i>
NK40	GTGTTGAAGAGCTCCAGATGATG CGCCACACCACTCTATATTTTA	7	99.6	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK42	TGGGGACTATATGTATAGAGTTGTTTT TTCTTTTTCTATCATTTGATTCATTG	8	13.1	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK47	TTACCGAGTCGCAGGTAATATC AAGGAGAGAAAATCTAGAACCACA	10	4.4	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK50	TCTTCTTATTATCCTCATGCAA TGTAAGCTCCTCTCCATCTCTT	3	130.7	<i>Mbo I</i>
NK58	TGTTACAGTGCCTGTACATATCA TGAGCAGAACATATGAAATTTTGG	11	97.3	<i>Eco RI, Mse I</i>
NK60	TAGCCGATTGGAGGTTAGATAGC GTAAAGAGCCATCTGTGACGGG	12		<i>Eco RI</i>

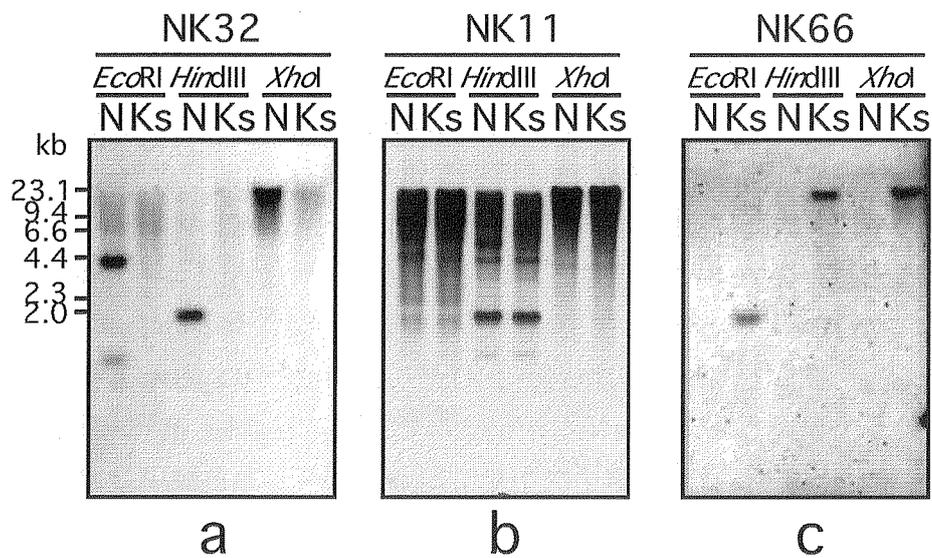


Figure 1.5 Southern-blot analysis of the genomic DNA of ‘ Nipponbare’ (N) and ‘ Koshihikari’ (Ks) using dominant SCAR markers and a ‘Koshihikari’-specific sequence as probes.

a: a probe of a dominant SCAR marker from ‘ Nipponbare’ (NK32) which detected a single DNA fragment of ‘ Nipponbare’. b: a probe of a dominant SCAR marker from ‘ Nipponbare’ (NK11) which detected multiple DNA fragments in the rice genome. c: a probe of a ‘ Koshihikari’-specific sequence (NK66) which detected a single DNA fragment of ‘ Koshihikari’.

型を検出した可能性が考えられた。しかし、これら 4 マーカーをプローブとして、*EcoRI* と *MseI* を用いたゲノミックサザンブロット分析を行った結果、いずれの場合も 2 品種間で多型は検出されなかった。

変換した PCR マーカーの相同性検索

多型を検出した 40 マーカーについて、BlastX プログラムによる相同性検索を行った。8 マーカーが 50 以上のスコアで、レトロトランスポゾン、ジンクフィンガータンパク質、ATPase、受容体様タンパク質、及び機能不明のタンパク質に相同性を示した。他の 32 マーカーは遺伝子領域と相同性を示さず、AFLP 分析で検出される大部分の DNA 多型は、非遺伝子領域であると考えられた。

こころまち-東北 168 号間での PCR マーカー作成

日本晴-コシヒカリ間の AFLP 分析で使用した 360 組のプライマー対とは異なる 312 組のプライマー対を用いて、こころまち-東北 168 号間で AFLP 分析を行った。54 個の多型を示すバンドが検出され、43 個のバンドの塩基配列を決定した。13 個の日本晴ゲノム中に複数コピー存在する配列、3 個の日本晴ゲノム配列に相同性を示さなかった配列、及び 1 個の塩基配列を決定したバンドの対立遺伝子を除く 26 個のバンドについて、イネゲノム情報を利用することで、それぞれの塩基配列を挟み込むようにプライマーを設計した。

作成した 26 組のプライマー対を用いて PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動した。7 マーカーでこころまちでのみバンドが増幅し、3 マーカーで東北 168 号特異的にバンドが増幅した。これらをそれぞれこころまち特異的優性 SCAR マーカーと東北 168 号特異的優性 SCAR マーカーとした。2 マーカーでは 2 品種間で異なるサイズのバンドが増幅したため、これらを共優性 SCAR マーカーとした。残り 14 マーカーのうち、2 マーカーを CAPS マーカーに、9 マーカーを PCR-RF-SSCP マーカーに変換した (Table 1.7)。

CAPS 分析や PCR-RF-SSCP 分析で、日本晴-コシヒカリ間で多型が検出されなかった 3 マーカーについて、こころまちと東北 168 号の DNA 断片の塩基配列を決定したが、両品種間で塩基配列に差異はなかった。

変換した PCR マーカーによる日本型品種の DNA 多型解析

日本晴-コシヒカリの解析で作成した 40 マーカーとこころまち-東北 168 号の解析で作成した 23 マーカーを用いて、10 品種の DNA 多型解析を行った (Table 1.8)。18 個の優性 SCAR マーカーのうち、NK22 は日本晴でのみ DNA が増幅するマーカーであったが、他の 17 マーカーは複数の品種で DNA 増幅が見られた。

Table 1.7 Sequence-specific markers converted from the AFLP markers for Kokoromachi and Tohoku 168

Marker name	PCR primer set (5'-3')	Chr.	Restriction cM enzyme
Kokoromachi specific dominant SCAR markers			
KT02	GGGCATACAAGGTAAGTACTAGTTG	11	32.1
KT04	TTGTTTCTCCTGATGTAGATCG	2	77.8
KT05	TCTGAAACCGTCTGTCATGAAC	11	32.1
KT12	TCTTCACTATATATGGGGTGAG	11	97.3
KT74	ACCGGACTAGTCTTTTAGGGAGA	7	80.8
KT84	GACGCAACGCTTGAGGTAAG	11	97.3
KT87	AGGACGGAGGGAATAGTTTACAG	11	101.9
Tohoku-168 specific dominant SCAR markers			
KT75	TTCGCCACATAAGTGTGCAT	9	0.5
KT77	GGTTTAACAGACCACGCTGTTT	1	73.7
KT86	AGGGCATGAGAGTTTAGGAGACT	4	5.1
Codominant SCAR markers			
KT76	ATGGACTACTTTTCGGTCCAAG	1	87.1
KT78	TATGCCTCAGCAACTGCATAGT	4	
CAPS markers			
KT72	ATTTAGTGCTGCTTGGGGTTC	10	<i>Eco</i> RI, <i>Mse</i> I
KT88	GTTTCACGTTGGACCAGTAAGC	11	114.4 <i>Mse</i> I
PCR-RF-SSCP markers			
KT07	CGATTATGATGGTCTGAATTAATC	11	97.3 <i>Eco</i> RI
KT09	CGACAACAGCGTCAACACCAAC	2	142.5 <i>Hae</i> III
KT13	TTGGCCTATGTTACGGTGTG	1	166.9 <i>Eco</i> RI, <i>Mse</i> I
KT79	TAGTTGTGGGCCTTTACCTTAC	1	71.2 <i>Mse</i> I
KT81	TCAAATCCTAGTGGGATCATGC	10	<i>Eco</i> RI, <i>Mse</i> I
KT82	TATTTACCAGAGGAGGAGGGTTG	4	5.4 <i>Eco</i> RI, <i>Mse</i> I
KT83	CTCATGGTGTGTTCTTCAAGGT	6	95.4 <i>Mse</i> I
KT85	AATGTGATGGGGAGGTTTGA	4	62.6 <i>Mse</i> I
KT89	ACTGTTATCCAGCTGAGTTTG	3	83.3 <i>Eco</i> RI, <i>Mse</i> I

Table 1.8 DNA polymorphism of the sequence-specific markers in 10 *japonica* rice cultivars

Marker name	Nipponbare	Koshihikari	Kokoromachi	Tohoku 168	Akihikari	Hitomebore	Kirara 397	Sasanishiki	Taichung 65	Senshou	Marker name	Nipponbare	Koshihikari	Kokoromachi	Tohoku 168	Akihikari	Hitomebore	Kirara 397	Sasanishiki	Taichung 65	Senshou	
Dominant SCAR markers											CAPS markers											
NK11	A	-	A	-	-	-	-	A	-	-	NK01	A	B	A	B	B	B	B	B	B	B	A
NK14	A	-	-	A	A	-	-	A	-	-	NK03	A	B	B	A	B	B	B	B	B	A	A
NK22	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NK06	A	B	B	A	A	B	B	A	A	B	
NK23	A	-	-	-	-	-	A	-	A	-	NK15	A	B	A	B	B	B	B	A	B	C	
NK32	A	-	-	-	-	-	-	-	A	-	NK16	A	B	B	A	A	B	B	A	A	B	
NK48	A	-	-	-	-	-	-	-	A	-	NK18	A	B	A	B	A	B	B	B	A	B	
NK51	A	-	A	-	A	A	A	A	A	A	NK27	A	B	B	B	B	B	B	B	B	A	
NK52	A	-	-	A	A	A	A	A	A	-	NK37	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	
KT02	A	A	A	-	-	A	A	-	A	A	NK38	A	B	B	A	B	B	B	A	A	A	
KT04	A	A	A	-	A	A	A	A	-	A	NK43	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	
KT05	A	A	A	-	-	A	A	-	A	A	NK45	A	B	A	A	A	B	B	B	A	B	
KT12	A	A	A	-	-	A	-	A	-	-	NK49	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	
KT74	A	-	A	-	A	-	-	A	-	A	NK59	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	
KT75	A	A	-	A	-	A	A	-	A	A	KT72	A	B	A	B	A	B	B	B	A	B	
KT77	A	-	-	A	A	-	-	A	A	-	KT88	A	A	A	B	B	A	A	A	A	-	
KT84	A	A	A	-	-	A	-	A	-	-	PCR-RF-SSCP markers											
KT86	-	-	-	A	-	-	-	-	A	A	NK21	A	B	A	A	B	B	B	A	A	B	
KT87	A	A	A	-	-	A	A	-	-	-	NK26	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	
Codominant SCAR markers											NK29	A	B	B	B	B	B	B	B	A	C	
NK10	A	B	A	B	A	B	B	A	B	A	NK30	A	B	A	A	A	B	B	A	A	B	
NK19	A	B	A	B	B	B	B	A	B	B	NK34	A	B	B	B	B	B	B	B	-	-	
NK28	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	NK35	A	B	A	B	A	B	B	A	B	A	
NK31	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	NK36	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	
NK41	A	B	B	B	B	B	C	B	B	C	NK40	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	
NK55	A	B	B	B	B	B	A	B	B	B	NK42	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	
KT76	A	B	A	B	B	B	A	B	B	A	NK47	A	B	B	A	A	B	A	B	C	C	
KT78	A	B	B	A	A	B	B	A	A	B	NK50	A	B	B	B	A	A	A	B	A	A	
											NK58	A	B	B	B	B	B	A	A	C	C	
											NK60	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	
											KT07	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	
											KT09	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	
											KT13	A	A	A	B	B	A	A	A	A	C	
											KT79	A	A	B	A	B	A	A	A	B	B	
											KT81	A	A	A	B	B	A	A	A	-	-	
											KT82	A	A	A	B	A	A	B	A	B	B	
											KT83	A	B	C	B	C	B	A	B	A	C	
											KT85	A	A	B	A	A	A	B	B	B	A	
											KT89	A	A	B	A	B	B	A	B	B	B	

8 個の共優性 SCAR マーカーのうち、NK41 は 3 つの対立遺伝子を検出した。15 個の CAPS マーカーのうち、NK15 も 3 つの対立遺伝子を検出した。KT88 では戦捷の DNA を増幅しなかった。22 個の PCR-RF-SSCP マーカーのうち、5 マーカーで 3 つの対立遺伝子を検出した。NK34 では戦捷の DNA が、KT81 では台中 65 号と戦捷の DNA が増幅しなかった。PCR-RF-SSCP 分析の多型検出能の高さが、他の分析法に比べて 3 つの対立遺伝子を高頻度で検出する原因であると考えられた。

<考察>

AFLP 分析により、Indel と SNP の 2 種類の DNA 多型を検出することができる。100 bp 以上の大規模な Indel は優性 SCAR マーカーに、100 bp 以下の小規模な Indel は共優性 SCAR マーカーに変換でき、*EcoRI* と *MseI* の認識部位の一塩基多型は CAPS マーカーに、その近傍の SNP は PCR-RF-SSCP マーカーに変換できた。AFLP 分析で多型を示した塩基配列を挟み込むように設計したプライマーによる CAPS 分析と PCR-RF-SSCP 分析により、AFLP マーカーを高い効率で PCR マーカーに変換することが可能であった。

AFLP 分析で多型を示した塩基配列の隣接領域は、逆 PCR を用いる方法 (Bensch *et al.* 2002) や Genome Walker Kit (Clontech 社製) によるサプレッション PCR を用いる方法 (Brugmans *et al.* 2003) により単離されており、AFLP マーカーを PCR マーカーに変換する効率を向上させている (Brugmans *et al.* 2003)。PCR マーカーの分析には、種々の制限酵素を用いた CAPS 分析や dCAPS 分析 (Michaels & Amasino 1998, Neff *et al.* 1998) が用いられている。dCAPS 分析には、一塩基多型部位に制限酵素認識配列を作り出すための特殊なプライマーが必要であるが、PCR-RF-SSCP 分析は CAPS 分析に用いたプライマーを利用することが可能である。

優性 SCAR マーカーによるゲノミックサザンプロット分析から、日本型品種には品種特異的な塩基配列が、多数存在することが示された。トランスポゾンの *mPing* が日本型 5 品種のゲノム中の異なる領域に挿入されていることが明らかになっている (Kikuchi *et al.* 2003)。本研究で見出した品種特異的な塩基配列はトランスポゾンである可能性があるが、それらのほとんどはゲノム中に 1 コピーで存在し、既知のトランスポゾンと相同性を示さなかった。これらの配列は、片方の品種で保持されているものの、もう片方の品種では欠失した配列で

あると考えられる。

7個の AFLP マーカーが、塩基配列に差異がないため PCR マーカーに変換されなかった。塩基配列が同一であるにも関わらず AFLP 分析で多型が検出された原因の一つに、DNA のメチル化状態の違いの可能性が挙げられる。しかし、*EcoRI* や *MseI* を用いたゲノミックサザンブロット分析では多型は検出されなかった。この問題について本論文ではこれ以上の言及は避けるが、今後の解明すべき点になるだろう。

イネではこれまでに、日本型品種とインド型品種との雑種集団を用いた遺伝子マッピングのために、多数の RFLP マーカーが作成されている (Harushima *et al.* 1998)。しかし、これらの RFLP マーカーのうち日本型品種間で DNA 多型が検出できるのは、僅か 10%程度である (Takeuchi *et al.* 2001, Zenbayashi *et al.* 2002)。この DNA 多型の検出効率の低さが、日本型品種間の雑種集団による連鎖解析を困難にしている。イネでは、18,828 個の SSR マーカーが作成されており (International Rice Genome Sequencing Project 2005)、日本型品種間でも DNA 多型が検出できる多数の SSR マーカーが見出されている (河野ら 2000)。本研究では、AFLP 分析は日本型品種の DNA 多型を効率良く検出でき、塩基配列に差異のある AFLP マーカーを全て PCR マーカーに変換できることが示された。AFLP マーカー、あるいは AFLP マーカーを変換した PCR マーカーを、SSR マーカーと共に用いることで、日本型品種間のような近縁品種間の雑種集団を用いた遺伝子マッピングが可能になると期待される。また、AFLP マーカーの PCR マーカーへの変換にはゲノム情報を利用することが有効である。現在、ゲノム情報の解読がマメ科 (Young *et al.* 2005) やナス科 (Mueller *et al.* 2005) などでも進行中であり、それらが利用可能になれば、本法は多くの種に応用できる技術となる。

第二章 簡易 DNA 多型分析技術の開発

第一節 ミスマッチ切断酵素による日本型品種の一塩基多型解析

<緒言>

ヘテロ二本鎖核酸 (DNA 対 RNA、RNA 対 RNA、あるいは DNA 対 DNA) のミスマッチ切断による DNA 多型検出技術は操作が簡便であるため、SNP を含めた DNA 多型の検出に広く用いられている (Myers *et al.* 1985, Goldrick *et al.* 1996, Oleykowski *et al.* 1998)。DNA 対 DNA の二本鎖 DNA を切断するミスマッチ切断酵素は、アルファルファ、アスパラガス、リョクトウ、セロリ、レタス、パセリ、ブロッコリー、キャベツ、カリフラワー、トマトなどの植物体から抽出されている (Oleykowski *et al.* 1998)。

TILLING 法は、蛍光標識したプライマーを用いた PCR により DNA 断片を増幅させ、ヘテロ二本鎖 DNA をセロリから抽出した CEL I で切断後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で SNP を検出する技術であり、様々な生物種の突然変異体選抜に利用されている (Gilchrist & Hanghn 2005)。また、TILLING 法はコムギの育種 (Slade *et al.* 2005) や、シロイヌナズナのエコタイプ間の自然突然変異検出に応用されている (Comai *et al.* 2004)。

本研究では、ミズナから抽出した粗タンパク質をミスマッチ切断酵素として利用し、日本型品種の DNA 多型を検出した。

<材料・方法>

ミスマッチ切断酵素の抽出

ミズナからのミスマッチ切断酵素の抽出は、Till *et al.* (2004) の方法を改変して行った。50 g のミズナの葉柄を液体窒素中で乳棒と乳鉢を用いて粉碎し、30 ml の抽出液 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 μ M PMSF (phenylmethylsulfonyl flouride)) で懸濁した。2,600 \times g で 20 分間遠心分離した後、上清に硫酸アンモニウムを 25% 飽和になるよう加え、4°C で 30 分間振盪した。13,000 \times g で 40 分間遠心分離した後、上清に硫酸アンモニウムを 80% 飽和まで加え、再び 4°C で 30 分間振盪した。13,000 \times g で 60 分間遠心分離した後、沈殿に 2 ml の抽出液を加え、完全に溶解した。得られたタンパク質溶液を 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中で透析し、回収した溶液をミスマッチ切断酵素とした。

切断 DNA 断片の検出

日本型品種のゲノム DNA から、PCR 法で遺伝子断片を増幅した。使用した

プライマーは S13781 (3)、R2561 (135)、R2394 (324)、及び C12965 (1886) (Table 1.1) であり、PCR 条件は第一章・第一節に従った。ヘテロ二本鎖 DNA の作成は、Matsubara & Kure (2003)の方法に従った。ミスマッチ切断酵素によるミスマッチ切断は、Till *et al.* (2004)の方法に従った。45°C で 30 分間反応させた試料 DNA を 2%アガロースゲル、または 6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。

<結果>

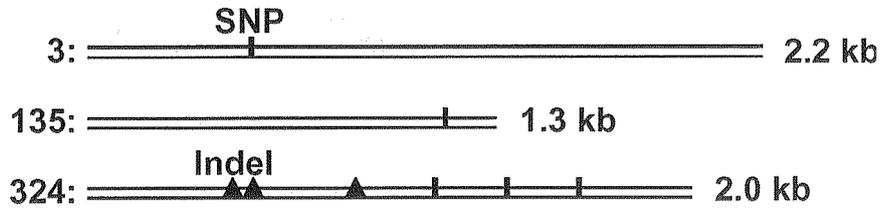
切断 DNA 断片の検出条件の検討

多型検出が可能な DNA 断片長を調べた。Table 1.1 に示した通り、S13781、R2561、及び R2394 は、日本晴-コシヒカリ間の DNA 多型を検出するマーカーであり、それぞれ約 2.2 kb、1.3 kb、及び 2.0 kb の DNA 断片を増幅させる。各マーカーで増幅する DNA 断片には、それぞれ 1 ヶ所の一塩基多型、1 ヶ所の一塩基多型、及び 3 ヶ所の一塩基多型と 3 ヶ所の挿入・欠失変異が存在する。分析の結果、いずれの場合でも予測されたサイズのバンドを検出し (Figure 2.1)、約 2 kb の DNA 断片の多型解析が可能であることが明らかになった。次に、多型の検出が可能な DNA 混合比を検討した。コシヒカリのゲノム DNA に日本晴のゲノム DNA が 0、1/2、1/4、1/8、1/16、及び 1/32 の濃度比で混合した試料を、上記の 3 マーカーで分析した。その結果、いずれの場合も混合した DNA の濃度比が 1/8 以上 1/16 未満が、切断 DNA 断片の検出限界であった (Figure 2.2)。

日本型品種の DNA 多型解析

第一章・第一節に示した日本型 17 品種のうち日本晴を除く 16 品種を 2 つの群 (品種群 1: コシヒカリ、アキヒカリ、ヒノヒカリ、きらら 397、喜峰、農林 6 号、農林 22 号、いただき; 品種群 2: ひとめぼれ、ハツニシキ、ササニシキ、初星、黄金晴、農林 1 号、農林 8 号、陸羽 132 号)に分け、C12965 で DNA 多型分析を行った。日本晴と品種群 1 の混合試料、及び日本晴と品種群 2 の混合試料において、切断断片が検出された (Figure 2.3)。多型を示す品種を特定するために、1 品種ずつゲノム DNA を日本晴のゲノム DNA に混合し、再度分析を行った。その結果、アキヒカリ、ササニシキ、農林 6 号、農林 8 号、農林 22 号、及び陸羽 132 号の 6 品種で多型を検出した (Figure 2.3)。この結果は、PCR-RF-SSCP 分析の結果と一致した (Figure 2.3)。

A



B

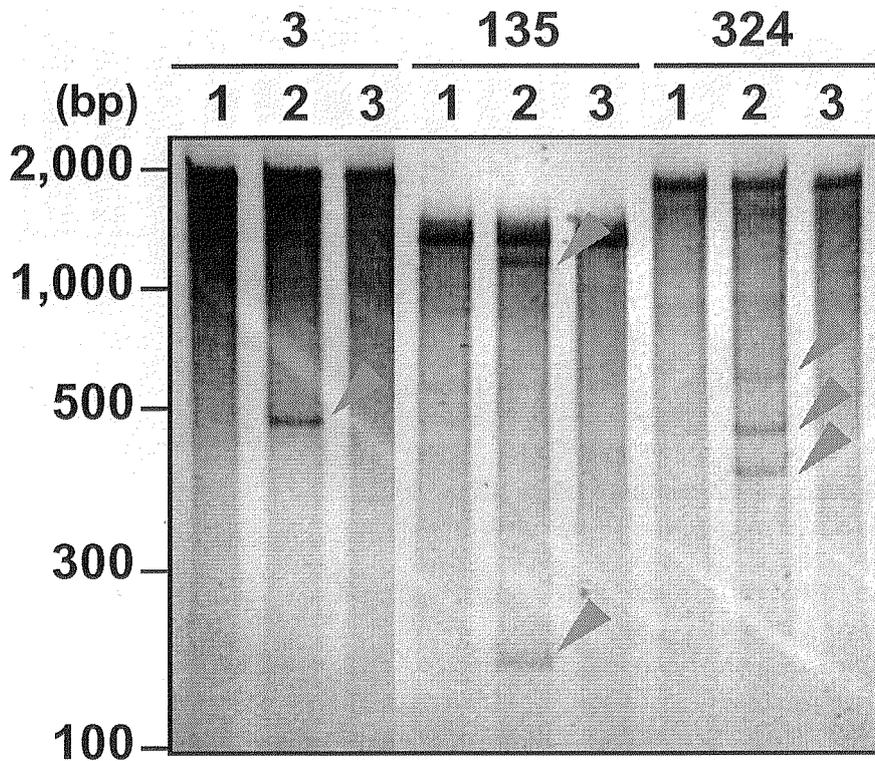


Fig 2.1 SNPs analysis by mismatch cleavage using *Brassica* petiole extract.

A. DNA fagments of 3, 135, and 324 have 1 SNP, 1 SNP, and 3 SNPs/3 Indels between Nipponbare and Koshihikari. B. Cleaved bands were detected in a mixture of Nipponbare and Koshihikari DNAs (2), but not in Nipponbare DNA (1) or Koshihikari DNA (3).

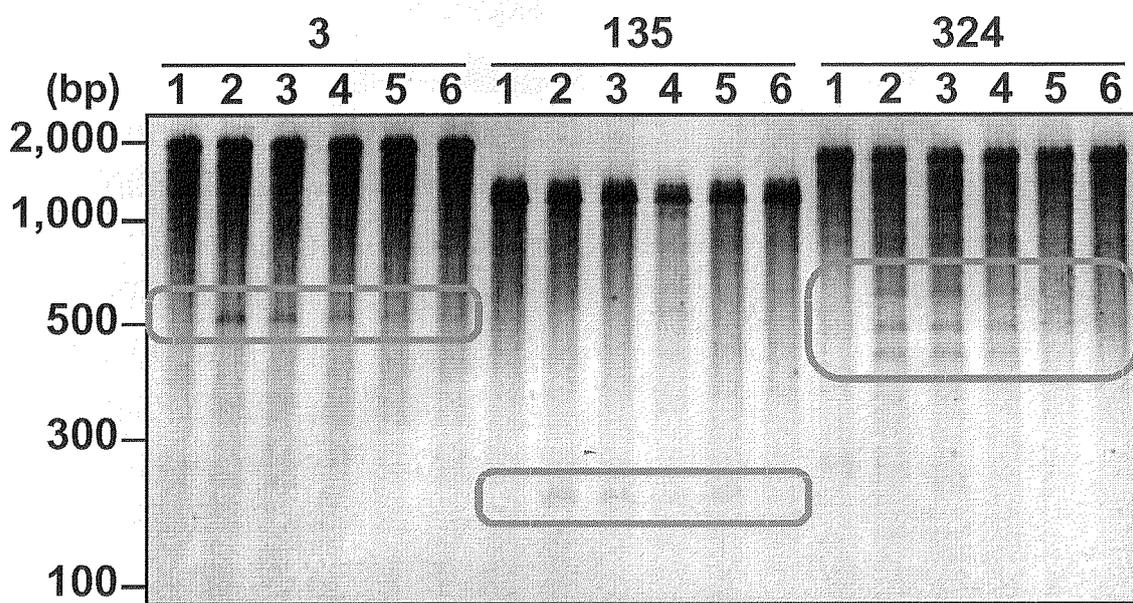


Figure 2.2 Signal detection under the various ratios of Koshihikari DNA to Nipponbare DNA.

Lane 1 contains only Koshihikari DNA. Lane 2, 3, 4, 5, and 6 have Koshihikari DNA mixed with 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, and 1/32 amount of Nipponbare DNA, respectively.

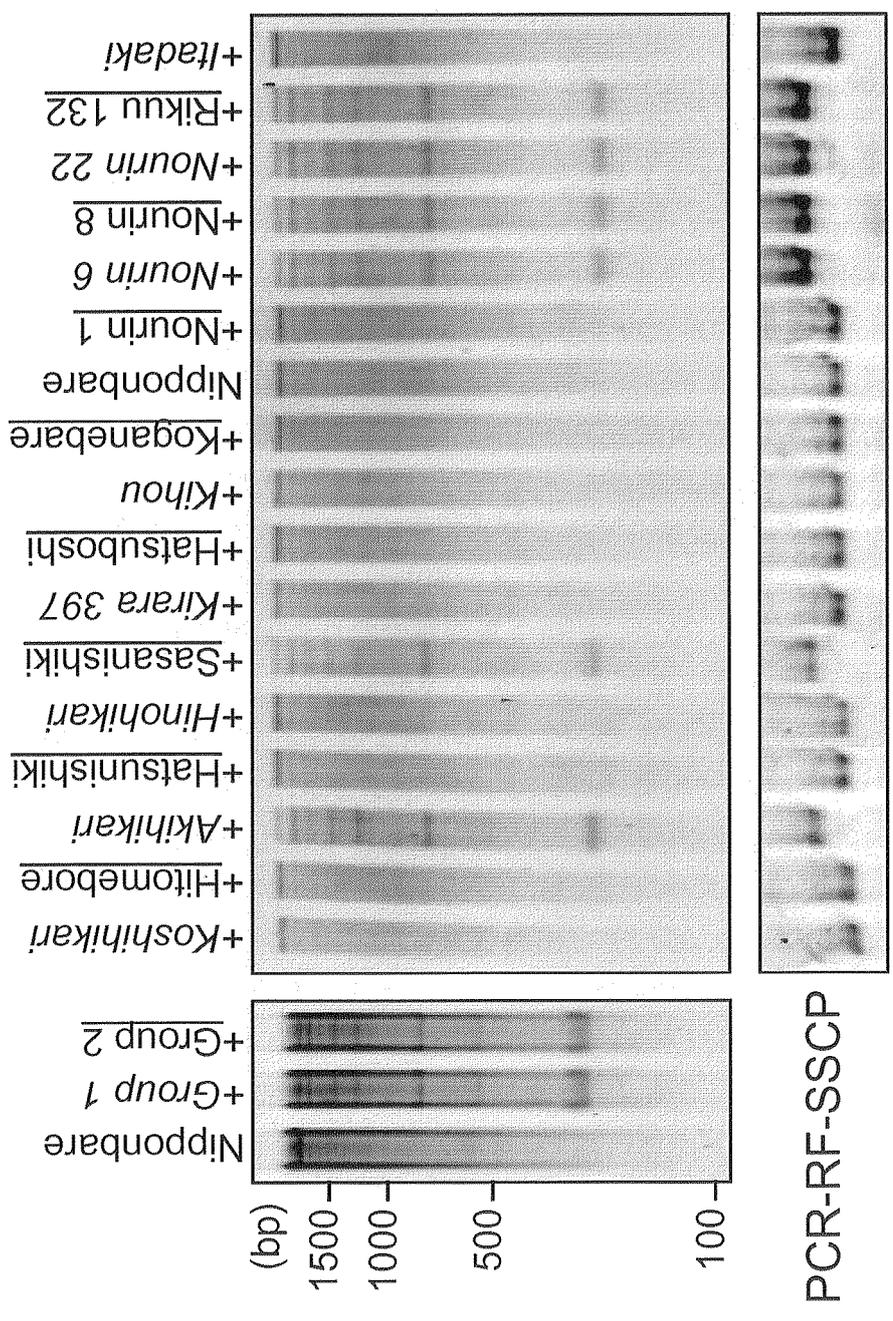


Figure 2.3 SNP analysis of bulked DNA samples by mismatch cleavage. Left: Group 1 contained Nipponbare and the cultivars in italics in the right picture. Group 2 contained Nipponbare and the cultivars underlined. Right: Mismatch cleavage analysis of 1:1 mixture of each cultivar with Nipponbare. Lower: SNP analysis by PCR-RF-SSCP of each cultivar.

<考察>

ミズナから抽出したミスマッチ切断酵素を用いたヘテロ二本鎖 DNA の切断により、日本型品種の DNA 多型検出が可能であった。ミスマッチ切断酵素は、50 g の植物体から塩析・透析操作のみで、数千試料を分析するのに十分な量が得られるため、極めて安価に多検体の DNA 多型が分析できる。第一章・第一節に示した PCR-RF-SSCP 分析は、約 2 kb の長さの DNA 断片中の多型を検出できる (Sato & Nishio 2003)が、ゲルの 1 レーンに 1 試料しか電気泳動できない点と、電気泳動分析にポリアクリルアミドゲルを用いる点で、多検体の DNA 多型分析に労力がかかる。ミスマッチ切断酵素による DNA 多型分析で分析可能な DNA 断片長は約 2 kb であり、その点では PCR-RF-SSCP 分析と同等であったが、ゲルの 1 レーンで 8 品種以上 16 品種未満の混合 DNA の多型検出が可能であることから、PCR-RF-SSCP 分析に比べて多検体の DNA 多型分析が可能で優れていた。また、アガロースゲルによる電気泳動分析でも切断 DNA 断片の検出は可能であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる PCR-RF-SSCP 分析に比べて、実験操作は簡便であった。

本研究ではイネ品種間の自然突然変異を検出したが、誘発突然変異の検出にも応用が可能である。EMS 誘発突然変異体を逆遺伝学的な手法で同定する TILLING 法は、様々な生物種で用いられている (Gilchrist & Hanghn 2005)。TILLING 法では、切断 DNA を蛍光 DNA シークエンサー (LI-COR 4300: LI-COR Biotechnology 社製)によるポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出する (Till *et al.* 2003)。本研究での電気泳動分析にはアガロースゲルを用い、切断 DNA 断片はエチジウムブロマイド染色により検出している。本法の切断 DNA 断片の検出感度は、混合試料中の変異 DNA の検出限界が 1/8 以上 1/16 未満であるため、TILLING 法の 1/16 (8 個体分のゲノム DNA 中には、16 セットのゲノム DNA が含まれるため) (Till *et al.* 2003)には劣る。しかし、本法による DNA 多型分析は特殊な実験装置を必要としないため、1 試料当たりの解析にかかる費用、時間、及び労力は TILLING に優ると考えられる。

第二節 ドットプロット分析による DNA 多型検出技術の開発

第一項 ドットプロット分析による挿入・欠失変異の検出

<緒言>

PCR を利用する DNA 多型検出技術には、SSR、CAPS、AFLP、PCR-RF-SSCP 分析などがある。RFLP 分析はサザンブロット法に基づいて DNA 多型を検出する。これらの分析法に必須なゲル電気泳動には時間や労力がかかる。ドットプロット分析法はゲル電気泳動分析や、時には PCR が不要であるため、分析に必要な時間や労力、費用を軽減することができる。これまでに、ドットプロット分析は、ラットの遺伝地図の作成 (Yamashita *et al.* 2000)、アブラナ科植物の *S* 遺伝子型の判定 (Fujimoto & Nishio 2003)、デンドロビウムの種の判定 (Li TX *et al.* 2004)などに利用されている。ドットプロット分析には遺伝子型や品種を識別できる特異的な DNA 配列がプローブとして必要であり、Fujimoto & Nishio (2003)は、アブラナ科植物で多様性に富む遺伝子 *SP11* をプローブとして、*S* 遺伝子型や F_1 ハイブリッド品種の識別を行った。イネでは、*SP11* の様な多様性に富む遺伝子は同定されていないため、品種特異的な DNA 断片を見出すことがドットプロット分析に必須となる。大きな DNA 断片の Indel は、ドットプロット分析のプローブとして利用が可能である。*Tos17* (Hirochika *et al.* 1996)や *mPing* (Kikuchi *et al.* 2003)は大きな DNA 断片の Indel ではあるが、イネゲノム中に複数コピー存在するため、ドットプロット分析のプローブとして利用することはできない。

第一章に示したように、PCR-RF-SSCP 分析と AFLP 分析により品種特異的な DNA 断片が見出された。これらの DNA 断片は、イネのドットプロット分析のプローブとして利用が可能であると考えられる。本研究では、これらの DNA 断片を用いたドットプロット分析により、日本型品種の識別や組換え自殖系統群の遺伝子型判定を行った。

<材料・方法>

ゲノム DNA の抽出

日本型 27 品種 (アキヒカリ、あきたこまち、チヨホナミ、どまんなか、初星、ハツニシキ、ヒノヒカリ、ひとめぼれ、いただき、喜峰、きらら 397、黄金晴、こころまち、コシヒカリ、こしいぶき、日本晴、農林 1 号、農林 6 号、農林 8 号、農林 22 号、奥羽 197 号、陸羽 132 号、ササニシキ、台中 65 号、東北 168

号、トヨニシキ、ヤマホウシ)、インド型 3 品種 (バスマティ 370、IR36、カサラス)、陸稲 1 品種 (戦捷)、コシヒカリの遺伝的背景にカサラスの染色体の一部を導入し、カサラスの全ゲノムをカバーしている 23 系統の染色体部分置換系統群 (Ebitani *et al.* 2005)、及び東北 168 号/こころまち由来の 93 系統の組換え自殖系統群 (F₇ 世代)を材料とした。各品種と組換え自殖系統群の種子は宮城県古川農業試験場の永野邦明氏より、染色体部分置換系統群の種子は (独) 農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターより分譲を受けた。ゲノム DNA は、葉からは Dellaporta *et al.* (1983)、Edwards *et al.* (1991)、及び Doyle & Doyle (1990)の方法を改変して、種子からは Edwards *et al.* (1991)と大坪ら (1999)の方法を改変して抽出した。0.1 g の葉または精米を粉碎し、それぞれの方法の DNA 抽出液で懸濁した。得られた沈殿を 0.2 mg/ml の RNase A を含む 10 µl の 0.2×TE に溶解した。DNA の濃度は、DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences 社製)で測定した。

プローブの作成

第一章・第二節に示したサザンブロット分析により明らかになった 10 個の品種特異的 DNA 断片を DIG 標識した。DNA 断片の DIG 標識は、第一章・第二節に示した方法に従った。PCR の条件は、Table 2.1 に示した。

第一章・第一節と第一章・第二節に示した塩基配列分析により明らかになった 4 個の短い挿入配列の検出には、5'末端を DIG 標識した合成オリゴヌクレオチド (日本遺伝子研究所社製)をプローブとして用いた。プローブの塩基配列は、Table 2.2 に示した。

ドットブロット分析

ドットブロット分析は、Fujimoto & Nishio (2003)の方法を改変して行った。試料混合液 (200 ng/ µl の試料 DNA、10 mM EDTA、0.4N NaOH)をマルチピンプロッター (ATTO 社製)を用いてナイロン膜 (NytranN; Schleicher & Schuell 社製)にドットブロットした。ハイブリダイゼーションの条件は、Table 2.1 と Table 2.2 に示した。ナイロン膜を 0.1×SSC/0.1% SDS により 68°C で 20 分、2 回洗浄した。合成オリゴヌクレオチドをプローブに用いた場合は、60°C で洗浄した。ハイブリダイゼーションとシグナルの検出は、DIG キットのマニュアル (Roche 社製)に従った。

サザンブロット分析

第一章・第二節に示した方法に従った。

Table 2.1 Primer sequences and amplification conditions of cultivar-specific sequences

Marker name	Chr.	cM	Primer sequence (5'-3')	Cultivar of PCR template	Annealing temperature (°C)	Amplified fragment length (bp)	Hybridization condition
NK14	2	96.6	CGGTTTAGCACGATCTATCAAG	Nipponbare	58	407	45°C with 50% formamide
NK32	12	40.6	CAGAGAATCTGTGGAAAACCTCTGA	Nipponbare	58	466	45°C with 50% formamide
NK52	2	96.6	ATTTTCATTCTCCATTCTCCTC	Nipponbare	58	563	45°C with 50% formamide
NK61	11	57.3-97.3	TAACAATCCCATCCGAGATGAAG	Koshihikari	60	132	68°C
NK63	11	79.9-117.0	CGTACGAAATCATCACAATTGC	Koshihikari	60	103	68°C
NK64	3	88.4-159.5	GTAGGCAGTAGATAATTACAGC	Koshihikari	60	102	68°C
NK66	11	79.9-117.0	AATTCGTGTGCAGGCCAACATTG	Koshihikari	60	154	68°C
NK67	12	100.9	GAATTGAAACTACCTGCGAAC	Koshihikari	60	297	45°C with 50% formamide
NK68	8	57.2-118.8	AATCCAGGGCAGACATGAGCAC	Koshihikari	60	459	68°C
KT90	11	27.8	CTGGAAGGATTACAATGATGGTG	Nipponbare	60	254	68°C

Table 2.2 Sequences of digoxigenin-labeled oligonucleotides used as probes

Marker name	Chr.	cM	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Hybridization condition	Primer sequence ¹⁾
NK10	7	80.5	Dig-CAGCGTGAGATGTTTGAGCAATTTCGCTTCCTTGAATAAGCAT	42	60°C	A
C913A	10	10.9	Dig-AAACCCATGCACACAACAGTGGCATGAACCCGATGATATTCAC	45	60°C	B
S3813	1	95.7	Dig-TATCAAATACCGTGCGTACAGCTGAAA	28	60°C	B
S13157	1	5.6	Dig-CCATCACCAGGTGTACCGTCAGCTGACCC	28	60°C	B

¹⁾ A: Table 1.6, B: Table 1.2

塩基配列分析

6 個のコシヒカリ特異的な DNA 断片の塩基配列は、pGEM-T Easy Vector (Promega 社製)に挿入後、3 つのコロニーの大腸菌からそれぞれプラスミドを抽出し (QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAGEN 社製)、蛍光 DNA シークエンサー (CEQ2000; Beckman Coulter 社製)で決定した。

<結果>

DNA 抽出法とハイブリダイゼーション条件の検討

0.1 g の葉から、Dellaporta *et al.* (1983)、Edwards *et al.* (1991)、及び Doyle & Doyle (1990)の方法により、ゲノム DNA がそれぞれ約 3.6 μg 、4.7 μg 、及び 4.6 μg 抽出できた。疑陽性のシグナルを防ぐために、各試料は 2 つずつドットプロットした。これら 3 つの方法で抽出したゲノム DNA で、品種特異的なシグナルが検出された (Figure 2.4a)。

10 粒の精米から、Edwards *et al.* (1991)と大坪ら (1999)の方法により、ゲノム DNA がそれぞれ約 3.6 μg と 4.7 μg 抽出でき、どちらの場合でも品種特異的なシグナルを検出した (Figure 2.4b)。しかし、検出されたシグナルは、葉から抽出したゲノム DNA を用いた場合に比べ、非常に微弱であった。精米 1 粒からは、ドットプロット分析に必要な量のゲノム DNA が抽出されていないと考えられた。1 粒の精米から抽出したゲノム DNA を鋳型に、Table 2.1 に示したプライマーを用いて PCR で増幅した DNA は、品種特異的なシグナルを検出するのに十分であった (Figure 2.4b)。

DIG 標識したオリゴヌクレオチドを、28 bp~45 bp の挿入配列の検出に用いた。ゲノム DNA と PCR 産物のいずれをドットプロットした場合にも、品種特異的なシグナルを検出した (Figure 2.4c)。

品種判定

NK68 を用いたドットプロット分析では、31 品種のうち 20 品種でシグナルを検出した (Figure 2.5)。これら 31 品種は、本研究で作成した 14 マーカーによる分析で全て判別することができ (Table 2.3)、品種の同定には 10 マーカーの分析で十分であった。

ドットプロット分析の結果は、NK52 を除いて、Table 2.1 に示したプライマーを用いた PCR により増幅した DNA の電気泳動分析の結果と一致した。NK52 をプローブとして、全 31 品種のゲノミックサザンブロット分析を行った。ゲ

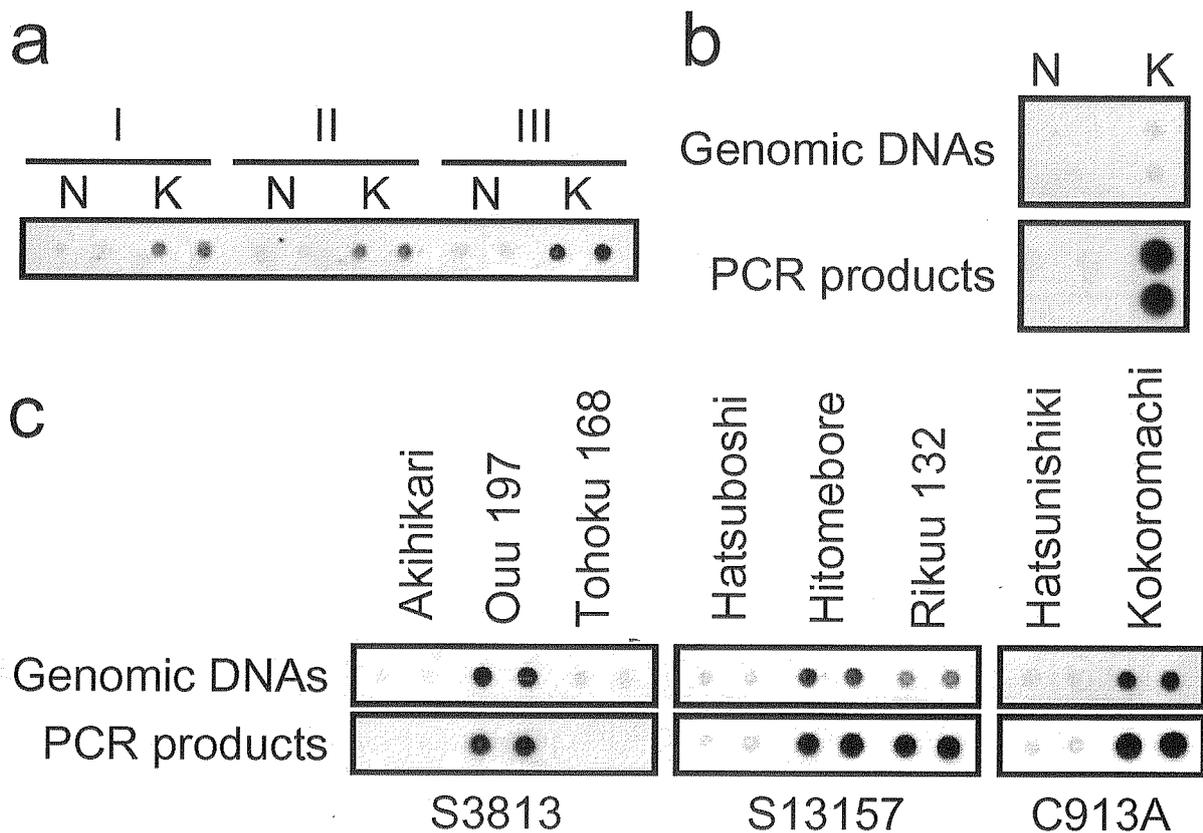


Figure 2.4 Dot-blot analysis of rice genomic DNA and PCR-amplified DNA

a. Dot-blot analysis of genomic DNA prepared from rice leaves by Doyle and Doyle (1990) (I), Dellaporta *et al.* (1983) (II), and Edwards *et al.* (1991) (III). The probe was NK68. N: Nipponbare, K: Koshihikari

b. Dot-blot analysis of genomic DNA prepared from rice grains and PCR products amplified from rice grain DNA with specific primers. The probe was NK68.

c. Dot-blot analysis using oligonucleotide probes. Genomic DNA prepared from rice leaves and PCR products amplified with their specific primers were dot-blotted. The probes were S3813, S13157, and C913A.

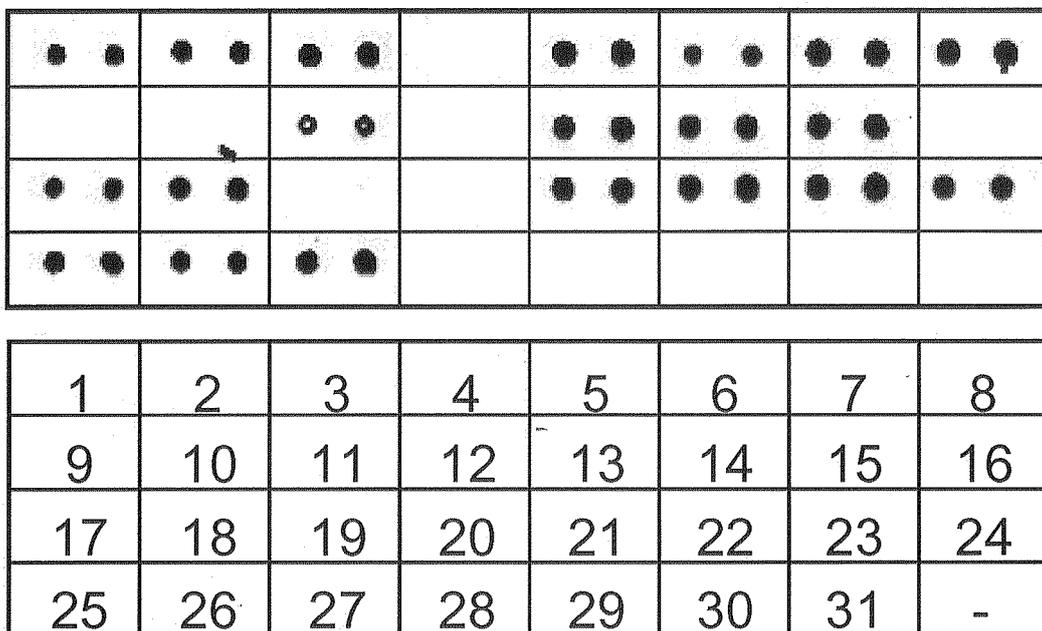


Fig. 2.5 Dot-blot analysis of 31 rice cultivars using the NK68 probe. The numbers, corresponding to the numbers of the cultivars shown in Table 2.3, indicate the positions of genomic DNAs blotted on the membrane.

Table 2.3 Presence (+) or absence (-) of signals detected by dot-blot analysis

No. Cultivars	Markers													
	NK14	NK32	NK52	NK61	NK63	NK64	NK66	NK67	NK68	KT90	NK10	C913A	S13157	S3813
<i>japonica</i> paddy-rice														
1 Akihikari	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
2 Akitakomachi	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
3 Chiyohonami	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
4 Domannaka	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
5 Hatsuboshi	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6 Hatsunishiki	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
7 Hinohikari	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
8 Hitomebore	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9 Itadaki	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
10 Kihou	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
11 Kirara 397	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
12 Koganebare	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
13 Kokoromachi	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
14 Koshihikari	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15 Koshiibuki	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 Nipponbare	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
17 Nourin 1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
18 Nourin 6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
19 Nourin 8	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
20 Nourin 22	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
21 Ouu 197	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
22 Rikuu 132	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
23 Sasanishiki	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
24 Taichung 65	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
25 Tohoku 168	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
26 Toyonishiki	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
27 Yamahoushi	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
upland rice														
28 Senshou	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>indica</i> paddy-rice														
29 Basmati 370	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
30 IR36	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
31 Kasalath	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

ノミックサザンプロット分析によるシグナルの有無は、ドットプロット分析の結果と一致した (Figure 2.6)。サザンプロット分析では 6 種類のサイズのバンドが検出され、NK52 のゲノム領域は非常に多型に富んだ領域であることが示唆された。

品種特異的 DNA 断片のマッピング

本研究で決定した 6 マーカー (NK61、NK63、NK64、NK66、NK67、NK68) の塩基配列は、日本 DNA データバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に登録した (アクセッション番号: AB188138-AB188143)。これら 6 マーカーについて、BlastX プログラムによる相同性検索を行った。3 マーカーがトランスポゾンに相同性を示したが、残り 3 マーカーは既知の遺伝子に相同性を示さなかった。

大規模な挿入を検出するための 10 マーカーのうち、NK14、NK32、NK52、及び KT90 は、第一章・第二節に示した通り、日本晴ゲノム情報を利用してイネゲノム上の位置を明らかにした。残り 6 マーカーは日本晴ゲノムに相同性を示さない塩基配列であるため、日本晴ゲノム情報を利用して染色体上の位置を決定することができない。NK67 は、カサラスの BAC クローン末端の塩基配列に対する BlastN 検索 (Katagiri *et al.* 2004; <http://rgp.dna.affrc.go.jp/blast/runblast.html>) により、第 12 染色体の短腕から 100.9 cM に位置付けられた (Table 2.1)。NK63、NK64、及び NK68 はカサラスではシグナルが検出されないことから、23 系統の染色体部分置換系統群を利用してイネゲノム上に位置付けた。また、NK66 はドットプロット分析ではコシヒカリとカサラスではシグナルを検出したが、特異的なプライマーによる PCR ではカサラスで DNA が増幅しなかったため、NK66 も同様に 23 系統の染色体部分置換系統群を利用してイネゲノム上に位置付けた。NK64 は、第 3 染色体の 30.0 cM-165.2 cM がカサラスの染色体領域に置換している系統である SL208 以外の染色体部分置換系統群でシグナルを検出した。一方、第 3 染色体の 1.9 cM-73.5 cM がカサラスの染色体領域に置換している SL207 では NK64 によりシグナルが検出された。したがって、NK64 は第 3 染色体の 88.4 cM-165.2 cM に位置することが明らかになった (Table 2.1)。同様な解析の結果、NK63、NK66、及び NK68 は、それぞれ SL235、SL235、及び SL224 でのみシグナルが検出されなかった。したがって、NK63、NK66、及び NK68 は、それぞれ第 11 染色体の 79.9 cM-117.0 cM、第 11 染色体の 79.9 cM-117.0 cM、及び第 8 染色体の 57.2 cM-118.8 cM に位置付けられた (Table 2.1)。NK61 は、東北 168 号とところまの交雑に由来

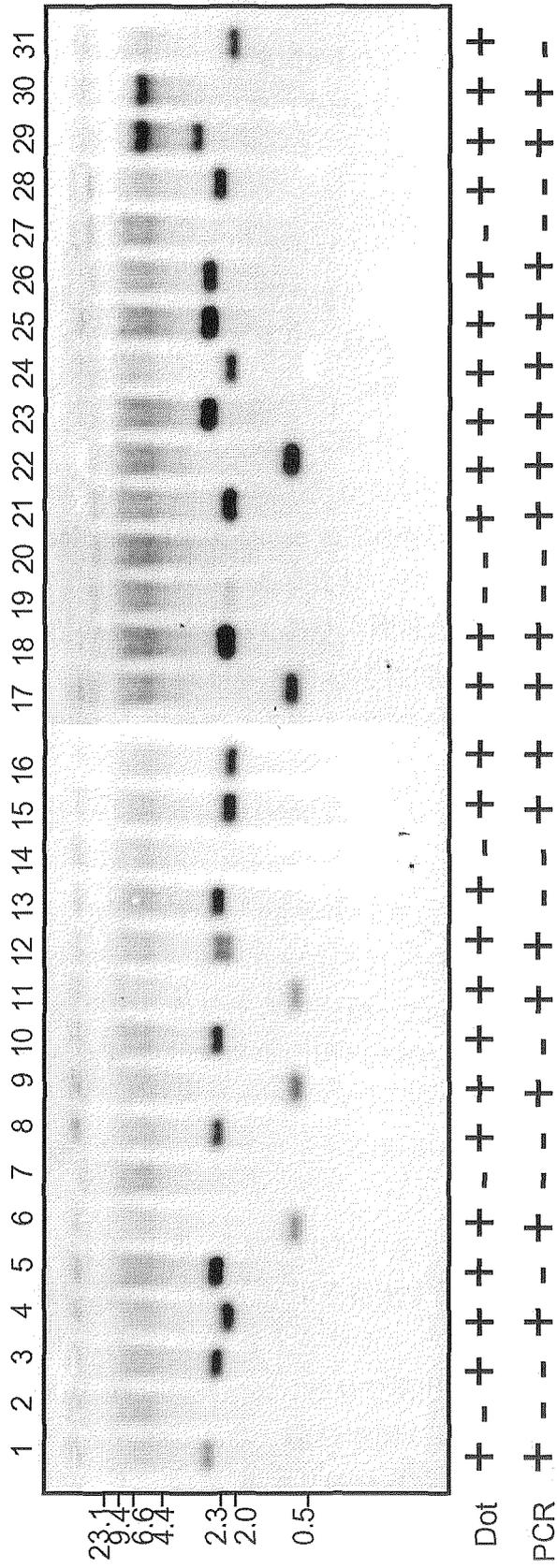


Figure 2.6 Genomic Southern-blot analysis of 31 rice cultivars with NK52 probe. The numbers, corresponding to the numbers of the cultivars shown in Table 2.3, indicate the lanes of genomic DNAs blotted on the membrane. The results of dot-blot analysis and PCR analysis are indicated under the picture.

する組換え自殖系統群を用いた連鎖解析により、第 11 染色体の 57.3 cM-97.3 cM に位置することが明らかとなった (Table 2.1)。

<考察>

品種特異的な DNA 断片をプローブとしたドットプロット分析により、日本型品種の判別と組換え自殖系統群の遺伝子型判定が可能であることを示した。このドットプロット分析は、多数の試料を一度に扱え、電気泳動や、場合によっては PCR も不要な技術であるため、時間や労力のかからない、安価な DNA 分析法である。ドットプロット分析で最も労力がかかるのは、ゲノム DNA の抽出である。Fujimoto & Nishio (2003)や Li TX *et al.* (2004)は、ゲノム DNA を CTAB 法 (Murray & Thompson 1980; Doyle & Doyle 1983)により抽出している。CTAB 法は、ゲノム抽出に手間がかかるうえに、クロロホルム等の有機溶媒を用いるためドラフトなどの設備が必要であり、廃液の処理が煩わしいという点に問題がある。本研究では、有機溶媒を使わずに簡単にゲノム DNA が抽出できる Edwards *et al.* (1991)の方法が、ドットプロット分析に適用できることを示した (Figure 2.4a)。

イネの品種判別は、種苗管理に必要な技術であるが、品種は米の食味にとって重要な要因でもあるため、米の流通市場での需要もあり、精米 1 粒を用いた DNA 判定技術が必要とされる。10 粒の精米から抽出したゲノム DNA を用いたドットプロット分析では、葉から抽出した同量のゲノム DNA をプロットしても、微かなシグナルでしか検出されなかった。精米から抽出したゲノム DNA の精製度が、葉から抽出した場合に比べて低いためであると考えられる。さらに、精米 1 粒からは、十分な量の DNA が抽出できなかったが、PCR により DNA を増幅させることで、ドットプロット分析を行うことが可能になった (Figure 2.4b)。

10 マーカーの分析により、本研究で用いた 31 品種は完全に判別できた (Table 2.3)。さらに品種特異的な DNA 断片を見出すことで、日本国内で栽培されている品種の判別が可能になると考えられる。ラットでは、RDA (representational difference analysis)法 (Lisitsyn *et al.* 1993)で見出した 466 個の Indel をプローブとしたドットプロット分析により、連鎖地図が作成されている (Yamashita *et al.* 2000)。イネにおいても、RDA 法で品種特異的な DNA 断片を含む 13 個の RFLP マーカーが作成されている (Kajiya *et al.* 1996)。日本型品種に存在する大きな

Indel は数が限られていると推測されるが、小さな Indel は多数同定されると考えられる。第一章・第二節で示した AFLP 分析では、44 個の AFLP マーカーのうち 4 個が大きな Indel であったのに対して、7 個が小さな Indel であった。

公開された日本型品種とインド型品種のゲノム配列情報を比較することで、多数の Indel が見出されている (Shen *et al.* 2004)。これらの配列や、本研究で見出した品種特異的な DNA 断片は、日本型品種とインド型品種との交雑に由来する雑種集団のドットプロット分析による連鎖解析に利用できると期待される。また、これらのマーカーを用いたドットプロット分析により、日本型品種にインド型品種の特定の遺伝子を導入する連続戻し交雑育種の際の DNA マーカーとして利用が可能である。

第二項 ドットプロット分析による一塩基多型の検出

<緒言>

SNP 分析は、個体識別に利用できる。作物では、SNP 分析による品種識別が可能である。これまで個体あるいは品種識別には、多様性の高さから SSR 分析が多く利用されている (Saghai Maroof *et al.* 1994)。しかし、突然変異体とその原品種の識別は SSR 分析では不可能である。例えば、イネの半矮性品種レイメイは、フジミノリの突然変異体であり、ジベレリン合成に関する遺伝子 *Sd1* に SNP を持つ (Sasaki *et al.* 2002)。低アミロース品種ミルキークイーンは、コシヒカリの突然変異体であり、アミロース合成に関する遺伝子 *Wx* に SNP を持つ (Sato *et al.* 2002)。このような突然変異体は育種に利用されているので、全ての品種を判別するためには、SNP 分析が必要である。

マップベースクローニングは、信頼性が高く、遺伝子の同定に広く用いられている手法である。多くの重要な育種目標となる量的形質を支配する遺伝子は、QTL 解析によりマッピングされる (Yano *et al.* 2000)。QTL 遺伝子の同定には、密に連鎖した DNA マーカーによるファインマッピングが必須である。遺伝子のマッピングに様々な DNA マーカーが利用されている中、SSR マーカーが、分析が簡単でデータの信頼も高いという理由で、多く用いられている (Li J *et al.* 2004, Tamiya *et al.* 2005)。イネゲノムには 18,828 ケ所 (1 Mb 当たり 51 ケ所) の SSR が同定されている (International Rice Genome Sequencing Project 2005) が、日本型品種間のような任意の 2 系統間で DNA 多型を検出できる SSR マーカーは数に限りがあると考えられる。

ヒトの HLA-DQ α 遺伝子型と DR β 遺伝子型判定のために、アリル特異的オリゴヌクレオチドを用いたドットプロット分析が報告されている (Saiki *et al.* 1986)。この方法は、簡単で多検体を扱う場合にも低コストで分析が行えると考えられるが、植物のゲノム研究には利用されていない。本研究では、競合ハイブリダイゼーションにより、このドットプロット分析による SNP 検出の精度を改善した。また、この方法が日本型品種の識別と育種系統の選抜に応用可能であることを示した。

<材料・方法>

ゲノム DNA の抽出

日本型 39 品種 (アキヒカリ、アケボノ、あきたこまち、あさひの夢、ちゆ

らひかり、どまんなか、どんとこい、ふくひびき、ふさおとめ、五百万石、ゴロピカリ、はえぬき、ハナエチゼン、ヒノヒカリ、ひとめぼれ、ほしのゆめ、いただき、金南風、キヌヒカリ、きらら 397、コシヒカリ、こしいぶき、まなむすめ、祭り晴、めんこいな、むつほまれ、ななつぼし、日本晴、レイメイ、ササニシキ、染分、台中 65 号、トヨニシキ、つがるロマン、月の光、山田錦、ヤマホウシ、ゆめあかり、夢つくし)、インド型 2 品種 (ハバタキ、カサラス)、及び陸稲 2 品種 (オワリハタモチ、戦捷) を材料とした。育種系統は、岩南 25 号/越南 190 号に由来する F₃ 個体を母本に、新青矮 1 号/Ta Hung Ku に由来する F₄ 個体を父本とする 382 個体からなる F₄ 集団を用いた。各品種の種子はそれぞれの育成試験場 (Table 2.4) より、育種系統の種子は (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センターの山口誠之氏より分譲を受けた。各品種の葉から、Edwards *et al.* (1991) の方法によりゲノム DNA を抽出した。

プローブの作成

1 マーカー当たり二組の 17 塩基長のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いた。一組は、5' 末端を DIG 標識した日本晴型の SNP を中央に持つオリゴヌクレオチドと、変異型の SNP を中央に持つ無標識のオリゴヌクレオチドからなり、日本晴型の対立遺伝子を検出するプローブである。もう一組は逆に、5' 末端を DIG 標識した変異型の SNP を中央に持つオリゴヌクレオチドと、日本晴型の SNP を中央に持つ無標識のオリゴヌクレオチドからなり、変異型の対立遺伝子を検出するプローブである。第一章・第一節で見出した遺伝子領域の SNP のほか、日本型品種で検出された非遺伝子領域の SNP (Nasu *et al.* 2002) と既知の遺伝子変異 (*sd1*: Sasaki *et al.* 2002; *Wx-mq*: Sato *et al.* 2002; *Ehd1*: Doi *et al.* 2004; *OsPHR*: Teranishi *et al.* 2004; *SSIIa*: Umemoto *et al.* 2004) をマーカーとした。

ドットプロット分析

20 ng のゲノム DNA に 1 μ l の 10 μ M フォワードプライマーと 10 μ M リバースプライマー、1 μ l の 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) (タカラバイオ社製)、0.8 μ l の 2.5 mM dNTP Mixture (タカラバイオ社製)、0.05 μ l の 5 U/ μ l *Taq* ポリメラーゼ (*TaKaRa Taq*; タカラバイオ社製) を加え、滅菌水で 10 μ l とした。PCR は、94°C で 1 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 30 秒の反応を 40 回行い、最後に 72°C で 1 分間伸長させる条件で行った。PCR 産物のドットプロットは、第一項に示した方法に従った。ハイブリダイゼーションは 50°C で 1 晩行なった。ナイロン膜を 0.1 \times SSC/0.1% SDS により 50°C で 20 分、2 回洗浄

した。ハイブリダイゼーションとシグナルの検出は、DIG キット (Roche 社製) に従った。

<結果>

ドットプロット SNP 分析の改良

SNP が同定されている 3 遺伝子 (Wx、S3813a、S4655) について、ドットプロット SNP 分析を行った。PCR 産物を 0.4 N NaOH で変性させた後、メンブランにドットプロットした。日本晴型の SNP を持つプローブのみでハイブリダイズを行うと、変異型の SNP を持つ試料にも非特異的なシグナルが検出された (Figure 2.7)。変異型の SNP を持つ非標識のオリゴヌクレオチドを競合オリゴヌクレオチドとして加えると、非特異的なシグナルは検出されなくなった。プローブに対する競合オリゴヌクレオチド濃度比を 1:0、1:1、1:2、1:5、及び 1:10 で検討した結果、競合オリゴヌクレオチドをプローブの 2 から 10 倍量混合したときに、特異的なシグナルを検出した (Figure 2.7)。そのため、5 倍量の競合オリゴヌクレオチドを混合したプローブを標準的なプローブ溶液とした。

ドットプロット分析による挿入変異の検出は第一項で述べた通りであるが、その方法では欠失変異は検出できない。挿入と欠失の両方の変異を検出するために、ゲノム配列と挿入配列の境目をプローブとして用いた。プローブの塩基配列と後半部分は同一の配列で、前半部分の配列が異なる競合オリゴヌクレオチドをプローブの 5 倍量加えた競合ハイブリダイズにより、特異的なシグナルを検出した (Figure 2.8a)。

半矮性の原因遺伝子 *Sd1* は、野生型の対立遺伝子 (*Sd1*) では特異的なシグナルを検出したのに対して、レイメイ型の対立遺伝子 (*sd1-r*) ではシグナルが検出されなかった。レイメイ型の対立遺伝子を検出するプローブには、8 塩基の回文構造が含まれており、これが分子内アニーリングしてしまうことが、その原因であると考えられた。分子内アニーリングを防ぐため、ハイブリダイズの温度を 65°C に上げることで、特異的なシグナルを検出した (Figure 2.8b)。95 個の SNP 検出マーカー、4 個の Indel 検出マーカー、及び 1 個の 2 塩基欠失検出マーカーの、合計 100 マーカー (200 プローブ) を用いて、材料・方法で示した条件で DNA 多型の検出を行い、154 プローブについて、特異的なシグナルを得た。洗浄液を 1×SSC/0.1% SDS に変更すると 19 プローブで、洗浄液と温度を 1×SSC/0.1% SDS、40°C に変更すると 3 プローブで、特異的なシグナルを検出

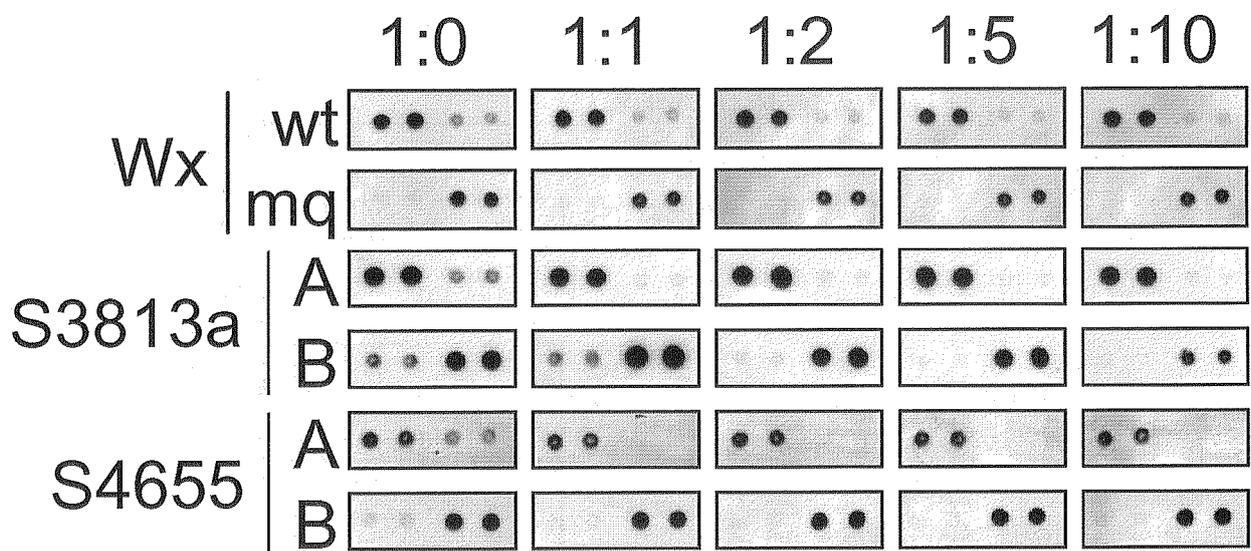


Figure 2.7 Effect of competitive hybridization on background signals in dot-blot-SNP analysis. Three genes having SNPs, *Wx*, S3813a, and S4655, were analyzed by dot blotting with or without competitive hybridization. Two dots were blotted for each allele. Addition of two-, five-, and ten-fold amounts of competitive oligonucleotides reduced the background signals, and clear allele-specific signals were detected.

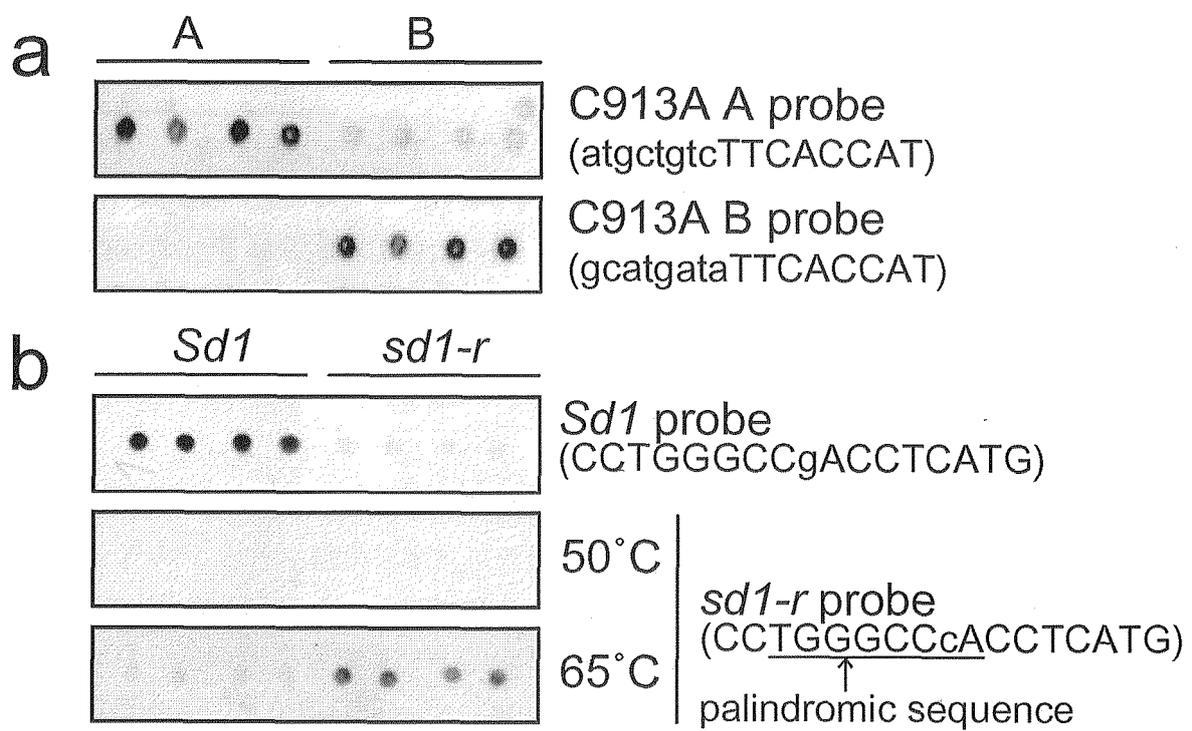


Figure 2.8 Dot-blot-SNP analyses of C913 having indel (a) and *Sd1* (b). Both alleles of the gene having indel were detected in an allele-specific manner. Signals of the *sd1-r* allele were detected by raising the hybridization temperature to 65°C.

した。ハイブリダイズの温度を 40°C にし、洗浄を 1×SSC/0.1% SDS で 40°C あるいは 50°C の条件で行うと、それぞれ 18 と 1 プローブで、特異的なシグナルを検出した。プローブの塩基配列中に、11 個の GC 塩基を持つ 1 プローブと、2-3 個の GC 塩基を持つ 2 プローブは、それぞれ 60°C あるいは 30°C でのハイブリダイズにより、特異的なシグナルを検出した。2 塩基の欠失を検出する C11876 は、プローブの 10 倍量の競合オリゴヌクレオチドを混合することで、特異的なシグナルを検出した。本研究で作成した 100 マーカー (200 プローブ) は、ハイブリダイズと洗浄の条件を最適化することで、全てのプローブで特異的なシグナルを検出した (Table 2.5)。

品種識別への応用

作成した 100 個のマーカーで、43 品種の識別を行った (Figure 2.9)。8 マーカー (E30565、E50658、R1709、R2171、R2394、S3813a、S10091、S10844) の分析により、全 43 品種の識別が可能であった (Table 2.4)。これらのマーカーはいずれも、43 品種をおよそ半分に分けるマーカーであった。この 8 マーカーを含めた 23 マーカーは、43 品種を約半分に分けた。その他 21、23、28、及び 5 マーカーが、43 品種をそれぞれ 3~4:7~6、2~3:8~7、1~2:9~8、及び 0~1:10~9 に分けた。

S723 と C1172 は、インド型品種 モダンに由来するイネ穂いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* とイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* に連鎖する DNA マーカーである (Fujii *et al.* 2000, Hayano-Saito *et al.* 1998)。あさひの夢、ゴロピカリ、祭り晴、及び月の光の 4 品種は S723 と C1172 による分析で、モダン型の対立遺伝子を持つことが明らかになり、*Pb1* と *Stvb-i* を持つ品種であることが示唆された。出穂期の決定に関わる *Ehd1* は、台中 65 号では一塩基置換によるアミノ酸変異が原因で機能を失っている (Doi *et al.* 2004)。この塩基置換は、台中 65 号以外の 42 品種では見出されなかった。どんとこい、いただき、キヌヒカリ、夢つくし、及びハバタキは、第 1 染色体長腕の C727A、C62963、C11876、及び *sd1-d* による分析で、インド型品種の対立遺伝子を持つことが明らかになった。これら 5 品種は、いずれも *sd1-d* を持つ IR8 に由来する (Sasaki *et al.* 2002)。これら 5 品種に C727A、C62963、C11876、及び *sd1-d* を含む染色体領域が、IR8 から伝わっていることが示唆された。*OsPHR* のササニシキ型の対立遺伝子は UV-B 耐性を向上させる (Teranishi *et al.* 2004) が、この変異は日本型品種内に高頻度に存在した。

Table 2.5 Sequences of primer pairs and oligonucleotide probes of SNP markers and the conditions of PCR, hybridization and washing

Marker name	Chr.	cM	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Probe sequence of Nipponbare allele (5'-3')	Probe sequence of variant allele (5'-3')	(annealing temperature)	Hybridization temperature	Second washing buffer	Washing temperature
Dot-blot-SNP markers used for genotyping of the breeding lines										
Wx-mq			GTTCCTGATCATCGCATTTGG							
sd1-r			GCACTACCCGGACTTCACTG							
Dot-blot-SNP markers used for identification of the 43 cultivars										
S13157a	1	5.6	GCATGCATTTCACAGATGAAG	AAGCTCTGCATCGTTGGATT	CATCTGTGtGACTGTCT	CATCTGTGtGACTGTCT	56	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S13157b ^a	1	5.6	GCATGCATTTCACAGATGAAG	CGAATGGCGAGAAATCAAGC	GCATACtatcatcac	GCATACtatcatcac	58	50	1×SSC/0.1%SDS	50
C60636	1	10.9	GTTCGAGCGCAAGTTCTC	GCTGTACAAAGCCGCGATA	TCGGGTAGtGGAAATGTA	TCGGGTAGtGGAAATGTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C30013	1	25.4	AGGAACCTAGCCACATGAC	CTCCCTCTCTCTCTTTGTTCC	CATCCAAAGCCGCAAA	CATCCAAAGCCGCAAA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S4655	1	36.9	TATCCGCACTGTTTGTCC	GCCTCATAAAGCCGCGATA	GAGACATCatGCAACTA	GAGACATCatGCAACTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S3813a	1	95.7	CCTCTTTAGTACCACCTCGACAG	CGAGAGCCGTGTTATCCTTC	CTGGCTAcCCTGCCTC	CTGGCTAcCCTGCCTC	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S3813b ^a	1	95.7	CCTCTTTAGTACCACCTCGACAG	CTGCAAGACAGTTTGTGTACC	AACTGAAAtatcaaat	AACTGAAAtatcaaat	58	40/50 ^b	1×SSC/0.1%SDS	50
S13155	1	118.9	ACATGCTGGTGGATCTCTT	ATGGTTGATTTCCAAGGGTGG	CAATCTGAaCTTGACGC	CAATCTGAaCTTGACGC	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S13781	1	139.9	AGTTGAGCATTTGCTTTTGT	CAAGCAACAATAATGACAGCAG	ATGACAATaTAAGCCCA	ATGACAATaTAAGCCCA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S10925	1	142.9	TATTCGGGACATTCACAAA	GGTACTGCCAGGATTTGCAAT	AAACTAGAGTTCAAGTA	AAACTAGAGTTCAAGTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C727A	1	145.3	CCAAACACCAACCTCTCTA	CAGATCGTTGTGAGGGGAAT	TCCTCATTtCTTTGCTA	TCCTCATTtCTTTGCTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C62963	1	147.2	GACAACTTCCCTCTGCTG	TTCAGGCTTTTCTCTCTCTGC	ATCACACA-GCTATATGT	ATCACACA-GCTATATGT	58 ^b	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
R3203	1	159.6	GCAAGGATTTCACTAAGGA	CCTCGATCTGGCTGTAGA	AACTTCTCaAGGACTGG	AACTTCTCaAGGACTGG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C112	1	181.8	CCTTGTGACACGCTGTATCCG	AGTTCATCTGCTGTAGAGG	CGGTGACcCCGGCATT	CGGTGACcCCGGCATT	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S0633	2	15.0	ACGAAGCAAGAGGAGCAAC	ACGGGAGATTTCAAGGATT	ATTCTCTcTgACATG	ATTCTCTcTgACATG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
R2542	2	28.0	ACTCATGACATGAGGAAGCA	CATAGGCACAaGATGGTTTAT	AGCACGCaATTGACTG	AGCACGCaATTGACTG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C53722	2	57.3	GACGGCTCAGATTTCTTT	TAATGGCAGATCAAGACAG	GAGGGCAaGAGCTGGA	GAGGGCAaGAGCTGGA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
R1843	2	57.6	CACGTAATGCAATTTTACCAGC	GCCTGTCACAATCATCTCTTC	AAATAITCgATGTTCTT	AAATAITCgATGTTCTT	58	40	1×SSC/0.1%SDS	40
S20768	2	95.2	CCTGTACCTCGAAGAGTCAA	TAGCTGATGTGCCACGTGAA	TCTGTACcCTGGTAAAT	TCTGTACcCTGGTAAAT	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C63726	2	95.2	TTGGTCACTTGGGTCCTA	TGGATCGTACGAGCAACCT	TTACCCTTTTAAAGC	TTACCCTTTTAAAGC	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
R1906	2	96.6	CCTTGCATCCCCACTCTTGT	GCAACTGGAATCCAAGCATTTG	GTGCAATaGcATCTTT	GTGCAATaGcATCTTT	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S10844	2	98.2	CTCTTACGCCAGGTTCCAA	GCACAGTAACCCAGATCAACAG	CAGTAGAGcTGTGGAGA	CAGTAGAGcTGTGGAGA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
R2559	2	99.6	ACTAATCTTGCAGGCCAGTG	GAGCTTCTGCTTTGGTAACAGG	ATATGgCtGGGTTAg	ATATGgCtGGGTTAg	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
E4169	2	99.6	ACTAATCTTGCAGGCCAGTG	CGGAAATGCTTTTCAACAGT	ATGTATGtTTGCTTTA	ATGTATGtTTGCTTTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C12187	2	99.6	AAGTAAAGAACTCCACACTGA	TACAGTACTCTGCTGGTACAT	TCTTGGTAAtGCCCATG	TCTTGGTAAtGCCCATG	58	40	1×SSC/0.1%SDS	40
E3295	2	101.2	ACGTACGTACACAACATCTGTC	GCTGCAGTTCGTGATATGGA	TGCAAGCCgCTGCTGA	TGCAAGCCgCTGCTGA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C12409	2	157.9	GCAGGTGTACAACATCTCA	CTTCGAATAGCCCTGTTGCTTA	AAAGGAAgCCTGACAG	AAAGGAAgCCTGACAG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S0040	3	20.3	TCTGCTCCTCTGCACATAC	CAAAAGCAACCAGAGCCAAAT	AGTACTAGtCAGTCTT	AGTACTAGtCAGTCTT	58	50	1×SSC/0.1%SDS	50
R1862	3	49.3	GCACGAGGGAAAATTAATAAGAT	CGTCAAGATAAACAGGTTGGTA	GGATATCCgTGACCCTG	GGATATCCgTGACCCTG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S0279	3	61.6	AGCACAGAATCGTACTTCT	GCGAAGATCAAGTCAACA	ACGAAGATgAGTGGATG	ACGAAGATgAGTGGATG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S14262	3	101.6	CCTCACTGCTAGTACCA	CAGTGAACtATGGAACACAG	AAITCTGTaTACAAGT	AAITCTGTaTACAAGT	56	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C11223	3	149.1	ATTGACCTGACGATCGAA	CTGTCTTCCAGACAGAAGACC	CGCTTGAGcGTGAATGG	CGCTTGAGcGTGAATGG	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S0738	4	30.8	AGCTGTACGGCTGATCAAGC	GGGAGCATATTCCCAAGTTG	CATAAGGGatTGAGGTA	CATAAGGGatTGAGGTA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C62054	4	57.5	TATGTCACCTCTCAATTA	TGTTGGAAGGAAcATGCTCA	AAACTTgACCAATGA	AAACTTgACCAATGA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
C11882	4	108.2	ATTGTGATGTCCAGGAACT	CACAGTCACTATGCAATTC	TGACAAAATGAGAACT	TGACAAAATGAGAACT	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
E30585	4	108.2	GTTGGAGAAAATGAGTGTATCC	TGGCTATGCTGGTATGTTA	ATATTTTAAaACGAAGA	ATATTTTAAaACGAAGA	58	40	1×SSC/0.1%SDS	40
R2376	4	111.0	GGCTGCTTGGTGTAGT	GACTAGGTAAaAGACGGCCAAAG	TGATCATaGcCTTGATA	TGATCATaGcCTTGATA	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50
S0703	5	20.6	TGGATCACTCTGCTTATCC	CACCACCCATCCAATTTCA	CTCAATTTGtTTGCTGAT	CTCAATTTGtTTGCTGAT	58	50	0.1×SSC/0.1%SDS	50

S10091	5	50.2	CGACAATGTGATGCCAACAT	ACCAAAACAATGGCAGCTA	GTACCATTGCATCTGG	GTTACCATGTCATCTGG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0994	5	95.8	GGATTGCCAAACAACCAACG	TGGAGTCTACAGCTGGCTA	CTATAGTACAGGAGTA	CTATAGTAAcAGGAGTA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C1272	6	13.5	TGCGTGAATTTGAAACTTGAC	TGTTGCACTCTTCATGTCG	GGTAACCTGCATATGGG	GGTAACCTGCATATGGG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C62866	6	13.5	CTCGTCACTGTAACTTCCCTTC	CGCACCCGTACTACATCT	TCTAAATTTAACAAATG	TCTAAATTTAACAAATG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C0226	6	13.5	GCACAGTCGCAAGCTAGCTC	CATCAGTACAGGGAGAACATCC	CAGCAGACGCCAGAA	CAGCAGACGCCAGAA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
SSlla	6	37.8	TGCGGGTCTCGGTGAAGAT	GGGACACGGTCTCTCAC	GGGACACGATGTCGGGG	GGGACACGATGTCGGGG	58 ^b	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
R2171	6	51.0	GCACATTTGGCAITACACAAGTAG	ATGTAGACCTGCTTTTCTGACC	CTTTACAATATGTAGT	CTTTACAAGTATGTAGT	58	40	1xSSC/0.1%SDS	40
C235	6	54.1	AGCCAGGATCAAGGAG	TGATGCACAATCTGCAAAACC	ATGTAATTTGAGAGGAA	ATGTAATTTGAGAGGAA	58	40/50 ^c	1xSSC/0.1%SDS	40
S0567	6	79.0	CTTTTGAACCTGGGGCATCTA	TGTCGGCAAGCAAAAGTGTAG	CGGCTACAATAGTACCG	CGGCTACAATAGTACCG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0497	6	100.0	AAGATGTTGGGTTGCTTCCAC	CCTATCATCCGAGTGGCCATT	GGGCTACAATAGTACCG	GGGCTACAATAGTACCG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0500	7	0.8	TTTAGCAAAACGAGGTGGT	GGCGTTAACTCTCGAAAAC	GTGTGATGAGACAAAT	GTGTGATGAGACAAAT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
R565	7	24.2	TCTCCAGATGGAATGTTTC	AATGGCCAAATCGAGATAG	ATCTTAATTTCAAATCC	ATCTTAATTTCAAATCC	58	40	1xSSC/0.1%SDS	40
E31015	7	24.8	AAAGGAGCAGCTCCAGTAGG	CACACTGATACCGTGTTCACCT	GAATGATGgCAAGAAT	GAATGATGgCAAGAAT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C60064	7	35.7	CTACAAGCTTGCAGCATCA	TCCAGAACACCACTCGTGAAG	TGCTGGCCeTTATTTGA	TGCTGGCCeTTATTTGA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C1467	7	73.2	CAATCGTCTGGAGCTCTATG	AAGCAATCGGAAGACAGG	AAATCATGbaAAACAGTT	AAATCATGbaAAACAGTT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
R2394	7	80.5	CTACTATTGAAAAGCCATAGTTAGG	GCITGAAAATGTGGTGGTTC	TTTTGAGCCTCTTTAAAT	TTTTGAGCCTCTTTAAAT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
NK10 ^a	7	80.5	CGAGTTCCCTAATGACCA	CTTGACTTGGCCCTCTTG	agaaagagcTGTGTG	catctcaecCTGTGTG	58	50	1xSSC/0.1%SDS	50
R2561	7	81.1	ACATCCGCTTATCAGGCAAGTA	CTAAAGCAGTTGGGAGGG	ATTCCTTTgCTGGATCA	ATTCCTTTCTGGATCA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C847	7	91.7	GAAAGGATCGAGTACAATA	CTGCAAAAGCATACCCACA	ATTTCCCAAbCTCAITTT	ATTTCCCAAbCTCAITTT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E50066	8	25.2	ATCGAGCAGTTTAGCATGA	CTGAAGACCAGGGGATAGG	AAAGTTAGGCTTAAGCCT	AAAGTTAGGCTTAAGCCT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E61986	8	44.6	AAGCAACAATGTGTGGCTGT	CTCTCAAGGCTAGAAATACCAC	TTGGCTAGAGGTTAAATA	TTGGCTAGAGGTTAAATA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S20045	8	58.1	TATTTCCCTCTACTTCTCC	GTATCGAATTGATCGGTGTGCAC	TAAAAGATgTGGAGAA	TAAAAGATgTGGAGAA	58	40	1xSSC/0.1%SDS	40
C52335	8	58.4	CCCATCATATCACCCATCCC	AAGCCCTTGTTCCTTATCCAAC	AAACAATATATGCAATGA	AAACAATATATGCAATGA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
R80	8	73.2	GGAGTTCCGACGCTCCGCCCT	ACTTGTCTTGTGGGGCAAG	AGAAGCCTGGCCAGCC	AGAAGCCTgGCCAGCC	56	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0641	8	106	CAGCTCAGCAAAATGTCA	GGCCTCATCGGATGTTCTAA	TTAAAATTTCTATCGT	TTAAAATTTCTATCGT	58	40	1xSSC/0.1%SDS	40
S1872	9	6.8	CCATCAGCTCCAATTTGTCT	AGCTAGAAGTCCCCAAAC	TAATATgGgACACGCT	TAATATgGgACACGCT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0313	9	30.6	GGTGAATTCATGGCACTGGT	GGAAACGATGTGAGGAAAG	AAITTCATgTATGCT	AAITTCATgTATGCT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S1580	9	33.0	GGCTCCCCACTTATATCT	CGCCGTATAGGACACCAATG	CGGCCACAGTCCATCA	CGGCCACAGTCCATCA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C30515	9	55.3	CCTGCAAGAAACACCTGATG	ACTATTACCTTGGTCGGAAGAC	TTGACAGCAACCATCAC	TTGACAGCAACCATCAC	58	50	1xSSC/0.1%SDS	40
S11615	9	55.9	CTGAGAAACTCACTCACTTA	ACAACTACTGCTGGGGCTTC	AGCACAGgAGTCCCTCT	AGCACAGgAGTCCCTCT	58	60/50 ^c	1xSSC/0.1%SDS	40
S19745	9	55.9	TGTTGGCTCGGCTTCTC	AAAACCCTTCCCCAAATTC	TTTTGATTCCTCAAGCT	TTTTGATTCCTCAAGCT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0708	9	93.5	GTTAGCATGCATCGGTAATTC	GCCATGCTGTTTTCAACAGT	ATATATATgTCTAGATT	ATATATATgTCTAGATT	58	50/40 ^c	1xSSC/0.1%SDS	40
E50836	10	5.5	GTACACACGGTGCCTGCTT	TGGCTGCTTTTTCTTCACT	CATCACAGGGGGCCGA	CATCACAGGGGGCCGA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
O6PHR	10	10.9	GTTTCGAAATGTGACGGT	CCTGCATTCGAAAGATTTCCA	GCTGGTCGgCGGCTTGG	gctGGTCGgCGGCTTGG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C913A ^a	10	10.9	GTTTCGAAATGTGACGGT	AGAACGCAAGCTCAGAAC	atgetgtctTTCACCAT	gcatgrataTTCACCAT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C148	10	17.9	CCTGCAAAAGTGAAGACAA	CAACGAGGAAAGTTGTGA	AAGATATgTCGAGAATC	AAGATATgTCGAGAATC	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
Ehd1	10	44.3	GAGGATCGAAGACTGAGCA	CTTTTGGAACTGGCTCTGC	GCCCAATAGCTAATAATA	GCCCAATAGCTAATAATA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S20925	10	53.9	TGGTCCAAATCTGGAATACCT	GAGAAAGCAGTCCCACTTGT	TGTATGGAAAGTTAAT	TGTATGGAAAGTTAAT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C16	10	71.4	ACATCTTGGAGATTGGGAGC	GAGCGTCTTCTGGCAATCT	TAAACCTAcTATTAAT	TAAACCTAcTATTAAT	58	30	1xSSC/0.1%SDS	40
R0835	10	72.8	GTCCGTCGGGTATCAAGAGT	ACGGATAAAATCAGCCACA	ACCACCTCgAGAAAGAC	ACCACCTCgAGAAAGAC	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S10616	11	20.3	CACCCTTTGGTTCACACTTG	CGGTAAACACAGGTTCTAT	GATCCGCTgACGGAGGG	GATCCGCTgACGGAGGG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E30139a	11	57.3	TCAATAGTGGCTGGTCTGAT	GAGACTCAAACATGTCGGGTA	GGCATGAAcTTTTTGTG	GGCATGAAcTTTTTGTG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E30139b	11	57.3	TCAATAGTGGCTGGTCTGAT	GGTGCACAACCTATGACAACT	ACATACGACCAATTTG	ACATACGACCAATTTG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S723	11	85.7	GTGGGATTTAGGAGGACAAG	AGGCTGTATGTGCCAATCG	GTGTTGCGgAAACAAGCA	GTGTTGCGgAAACAAGCA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C1172	11	85.7	CAGGAAGCTCTGGCAATTGAG	GTAAGAAGAACCCGGCTGTG	TATCTATATgTCAGCAAG	TATCTATATgTCAGCAAG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
C11589	11	91.4	TCTTGAGGTTCACTACAAGCAT	GGTCAAGTATATGCAATCAGGTA	GAATTCAAgCAACAGGC	GAATTCAAgCAACAGGC	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E3876	11	91.4	AGCAITTTGGCTCGTAGCAAT	ACAAAGTCCGCTCCAATATGC	TCCTGAGCgACAAGCCT	TCCTGAGCgACAAGCCT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50

C12965	11	99.2	TCTGTTACGCAGGTTCCAG	CTTGCCAACATTGCCAGATA	TACAATTTGATGCGTG	TACAATTTGATGCGTG	58	50	1xSSC/0.1%SDS	50
E50658	11	112.9	TGAGGATTTCTATCACTGAAATCC	GAAAGACCAAAGTCCGCAAC	ACAAGAATaAGAAATGAT	ACAAGAATaAGAAATGAT	58	40	1xSSC/0.1%SDS	40
C10295	11	117.3	GGGTCAACAGATCTTACGGTAG	GGATTGTGAAAATGCTGACC	CATGTATTgAAATCAGT	CATGTATTgAAATCAGT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S0479	12	27.6	CGAGCAATTTGCCTCAATTC	CGTTACATGGCTACAAGGTCA	TGAGACCTgTAAAGGCTG	TGAGACCTaTAAAGGCTG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S	12	29.2	TCTGCTCGATGTGGATCTG	ACATGCGCAGGTACTACTCTC	ATTCATTTgGGCAAGTT	ATTCATTTgGGCAAGTT	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E	12	49.3	GCATCCTATATCCGGGTTT	GTCAACAAACAAGAGGGGATGT	ACTTAAAAGGCTTAAGC	ACTTAAAAGGCTTAAGC	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E60142	12	61.6	CGTATATCCTGCTCGGGTTC	CTTATCATTCAAGTGAACCTCC	AAAGACCCaTTTGCAGA	AAAGACCCgTTTGCAGA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
R1709	12	91.4	ATGTGCGTCTTTGTTTG	CAAATCGTTTTCCACACCTACAAG	AGAGAGATgCAAAATGC	AGAGAGATaCAAAATGC	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E60101	12	100.9	ACAAAACCCAAAGGATGG	CAGGATGCTTAAGTGAACAACG	CATTTTCTgTTCTGAA	CATTTTCTgTTCTGAA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S21125	12	100.9	GATGCATATTCAAACGTCCAGA	TGGGTACCAGATTTTGTG	ATATTAAATgCCACCgC	ATATTAAATgCCACCgC	58	50	1xSSC/0.1%SDS	50
S14134	12	107.4	GAAGAGCCCTAAAAGGCAGA	CCCAGATGATAGACTGATGATTTG	TTGATCTAcTATCAGTG	TTGATCTAaTATCAGTG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
S21168	12	108.2	GCATCATCATCCTCACTCTGT	CTATAAATTGTGCCCTACAGTTCA	GTGCAGCCaTGAAGCA	GTGCAGCCgTGAAGCA	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50
E60843	12	108.2	CTAGTTGTGGAGCCACTGTAAA	CCTTTCCCTCCGATAGGTTTC	ACAACCCAgGAATCAAG	ACAACCCAgGAATCAAG	58	50	0.1xSSC/0.1%SDS	50

^a<100 bp indel (Shirasawa et al. 2005).

^bDMSO was added to the PCR reaction mixture (5% DMSO).

^cThe left of the slash is the hybridization temperature of Nipponbare-allele probe, and the right is that of variant-allele probe.

^dThe ratio of the competitive probe to the Dig-labeled probe is 10:1.

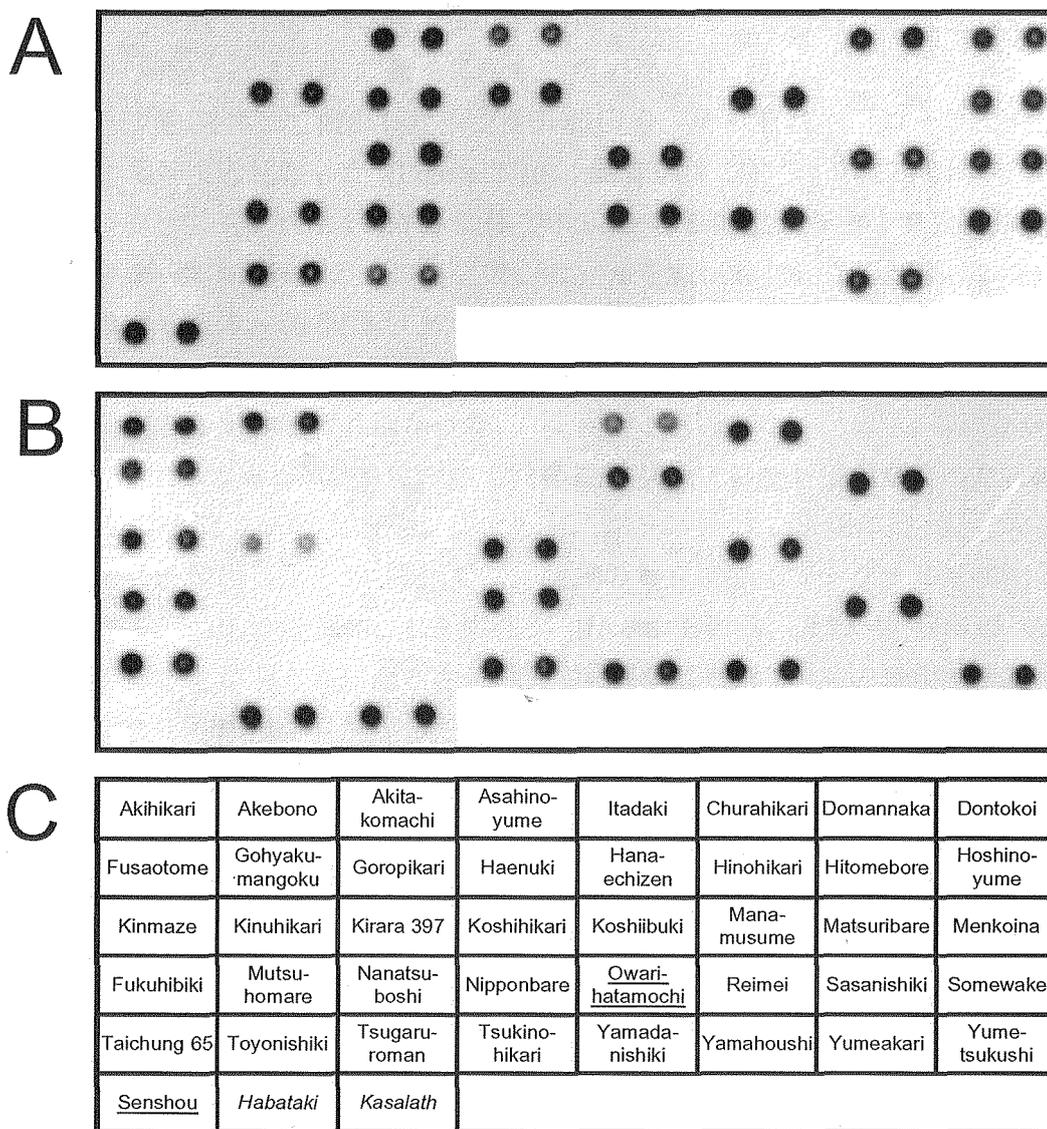


Figure 2.9 Dot-blot-SNP analysis of 43 rice cultivars. The probe was S1974S of mutant allele (A) and Nipponbare allele (B). The cultivars underlined were upland varieties and those in italics were *indica* cultivars (C).

育種系統の DNA 選抜への応用

越南 190 号は低アミロース品種であるミルキークイーンの *Wx-mq* を持つため、382 個体の集団の *Wx* 遺伝子について、DNA 選抜を行った。ゲノム DNA 抽出にかかる労力を省くため、Wang *et al.* (1993)の方法でゲノム DNA を抽出した。PCR により増幅した DNA の量を見積もるために、*Wx* 検出プローブと *Wx-mq* 検出プローブを混合して検出したシグナル強度を、それぞれのプローブで検出したシグナル強度と比較した (Figure 2.10)。調査個体の約 3/4 の 228 個体で *Wx* 特異的なシグナルを、約 1/4 の 119 個体で *Wx-mq* 特異的なシグナルを検出した。382 個体中 39 個体で両方のプローブでシグナルを検出した。この結果、249 個体が *Wx* のホモ個体、80 個体が *Wx-mq* のホモ個体、及び 39 個体がヘテロ個体であることが明らかになった。残り 14 個体は、PCR による DNA 増幅が十分ではなく、シグナルが検出できなかった。

岩南 25 号に由来する *sd1-r* について同様にドットプロット分析を行った。約半数の 159 個体で *Sd1* 特異的なシグナルを、残り半分の 218 個体で *sd1-r* 特異的なシグナルを検出した。39 個体では、両方の対立遺伝子でシグナルを検出した。120 個体が *Sd1* ホモ個体、179 個体が *sd1-r* ホモ個体、及び 39 個体がヘテロ個体であることが明らかになった。残り 44 個体は増幅 DNA の量が不十分であり、シグナルを検出できなかった。

<考察>

ドットプロット SNP 法の有用性

分析した SNP や Indel などの全ての DNA 多型は、本法で判定が可能であった。したがって、本技術は任意の遺伝子の多型検出に応用ができると考えられる。このドットプロット SNP 法は、Matsubara & Kure (2003)により報告された CASSOH (competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization)法に基づいている。彼らの方法は、高度な技術を要せず、短時間で結果が得られる点で優れているが、免疫クロマトグラフィーに費用がかかる欠点がある。この他に報告されている SNP 検出技術も、費用や労力がかかる (Nasu *et al.* 2002, Jain *et al.* 2003)、特殊な実験装置が必要 (Ross *et al.* 1997, Stoerker *et al.* 2000, Wang *et al.* 2005)といった点で、多検体の解析には適さない。ドットプロット SNP 法は、8 cm×12 cm のメンブランに 864 試料をドットプロットできるため、多検体を扱う場合にも労力がかからない。コストの面では、PCR による DNA の増幅に最

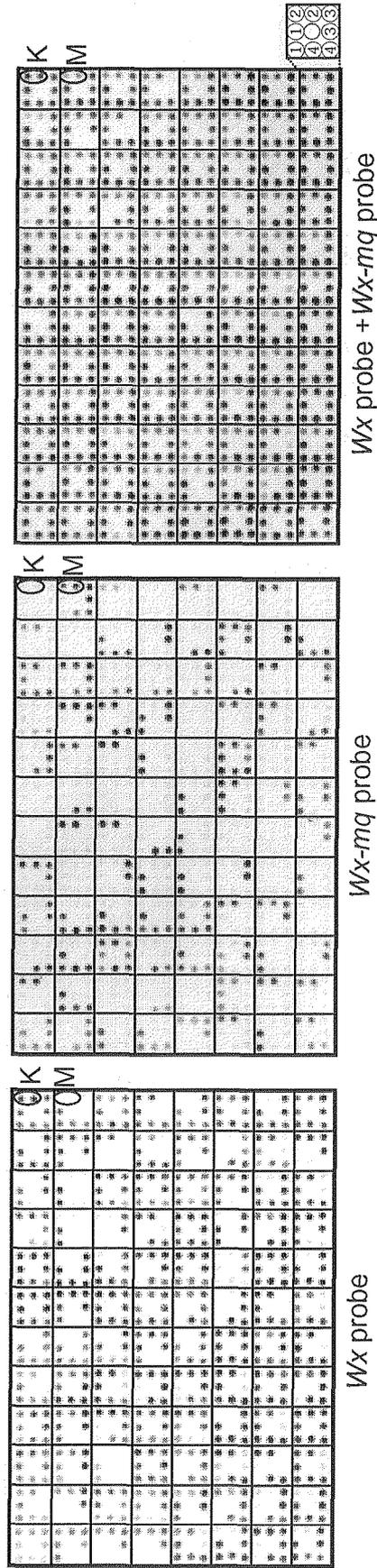


Figure 2.10 Dot-blot-SNP analysis of the *Wx* alleles in F_4 plants of a crossbreeding program. Two dots were blotted for each plant as shown in the picture at the right. PCR products of ‘Koshihikari’ (K) having *Wx* and ‘Milky Queen’ (M) having *Wx-mq* were blotted as positive and negative controls at the upper right corner of each membrane. The pictures show hybridization with the labeled *Wx* probe and the unlabeled *Wx-mq* probe (A), with the labeled *Wx-mq* probe and the unlabeled *Wx* probe (B), and with a mixture of the labeled *Wx* probe and the labeled *Wx-mq* probe (C).

も費用がかかる。しかし、本分析には PCR 溶液が 1 μ l あれば十分である。多数のプライマー対を用いるマルチプレックス PCR で 10 種類程度の DNA 断片を増幅すれば、本方法の費用と労力を低減させるうえで非常に効果的であると考えられる。

データの高い信頼性も、ドットプロット SNP 法の利点である。アリル特異的プライマーによる PCR での SNP 解析は非常に簡単で広く用いられている技術である (Latorra *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2004)。しかし、PCR による DNA の増幅効率率は、鋳型に用いる DNA の精製度に依存する。多検体を扱う解析では、時間や労力の節減のため、簡単な DNA 抽出法を用いる結果、PCR により DNA が増幅しないことがしばしば起こり、解析結果を誤る原因となる。ドットプロット SNP 分析では、PCR による DNA の増幅が不十分であると、野生型検出用プローブと変異型検出用プローブのいずれにおいてもシグナルが検出されないため、解析結果の誤りは回避できる。

品種判別と育種系統の選抜への応用

イネの主要品種は、食味・品質等は異なるものの、外観での判別が困難であるため、種苗管理の面だけでなく、流通市場でも品種判別技術は必須の技術である。本研究では、43 品種が 8 マーカーの分析で識別できた。全ての品種は SNP により識別可能であるため、ドットプロット SNP 法は品種識別の上でも有効である。さらに、米 1 粒での分析も可能であるため、種子の混入やブレンド米中の品種の混合割合も推定可能である。本法による品種判別は、検出感度が高すぎるという問題が危惧される。普通、育種場から公開される新しい品種は F_9 ないし F_{10} 世代の系統であるため、一部の遺伝子座がヘテロである可能性がある。そのため、異なる地域で増殖した種子は、同一品種でありながら異なる遺伝子型を持つ可能性がある。その様な誤認を防ぐために、本研究で行ったように、育成地から分譲を受けた原原種を用いて SNP 解析を行い、ヘテロ接合であることを検出した遺伝子座は品種識別に用いないようにすることが重要である (Table 2.4)。

重要形質に連鎖した DNA マーカーにより選抜を行うマーカー選抜育種法は、様々な作物の交雑育種で利用されている。しかし、重要形質を支配する遺伝子と連鎖マーカー間でおこる組換えにより、目的の遺伝子（形質）を取りこぼす可能性がある。この問題を解消するために、目的遺伝子の変異そのものを DNA マーカーとする必要がある。*Wx* や *sd1* に加え、現在までに様々な農業上重要な

遺伝子が同定されている (Song *et al.* 1995, Yano *et al.* 2000, Ashikari *et al.* 2005)。従ってドットプロット SNP 法は、目的遺伝子の変異そのものを選抜できる新しい育種法の可能性を示すものである。

第三章 登熟期の高温ストレス耐性に関する QTL 解析

<緒言>

近年の夏期の異常な高温による玄米の外観品質の低下が、米の生産上問題となっている。イネの開花期から登熟期にかけての高温ストレスは、雄性器官の障害による不稔 (Satake & Yoshida 1978)を引き起こしたり、呼吸量の増加 (山本 1954)、あるいはデンプン合成酵素の量や活性の低下 (Asaoka *et al.* 1985、Umemoto *et al.* 1995)による登熟不良を引き起こしたりする原因となる。この時期の玄米の外観品質の低下程度には品種間差があるため、遺伝的な改良が可能であると考えられる。玄米の外観品質の低下の品種間差は、主に背白米と基白米の発生率の差によるものであり (西村ら 2000、飯田ら 2002)、背白米と基白米の発生率の変異分布は異なる遺伝様式を示すことが報告されている (田畑ら 2005a)。登熟期の高温ストレス耐性の品種間差、背白米と基白米の発生率の差をもたらす遺伝子あるいは連鎖マーカーが解明できれば、高温ストレス耐性品種を短期間で育成することが可能になる。このような、日本型品種で差のある形質の解析には、日本型品種同士の雑種後代を用いた QTL 解析が有効である。本研究では、イネの登熟期高温ストレス耐性の検定方法の確立と、日本型品種同士の交雑に由来する雑種集団を用いた連鎖分析による登熟期高温ストレス耐性の品種間差をもたらす QTL の検出を行った。

<材料・方法>

植物材料

高温感受性の高い時期の調査にはササニシキを用い、品種間差の検出には東北 168 号とこころまちを用いた。QTL 解析に用いた 108 系統の組換え自殖系統群は、東北 168 号/こころま치의交配に由来する F₅ 世代の集団である。東北 168 号、こころまち、及び組換え自殖系統群の種子は、宮城県古川農業試験場の永野邦明氏より分譲を受けた。

栽培条件と高温ストレス処理

28°C で 2 日間の催芽を行った種子を播種し、1 ヶ月後に 1/12,500 a のポット (窒素、リン酸、カリウムが各 8% の化成肥料 2.4 g と各 10% の緩効性肥料 0.48 g) に移植した。その 1 ヶ月後に昼/夜温が 25/20°C の温室に移し登熟完了まで生育させた。移植 2 ヶ月後に窒素、リン酸、カリウムが各 8% の化成肥料 0.15 g を追肥として与えた。高温処理は、出穂中 (Te 区)、出穂完了後 0-5 日目 (T0 区)、5-10

日目 (T5 区)、10-15 日目 (T10 区)、15-20 日目 (T15 区)のそれぞれ 5 日間、35/27°C のファイトトロンで行った。登熟完了後水分含量が約 15%になるまで 14 日間乾燥させた。各個体から出穂日の揃った 2-3 本の穂を抽出し、玄米の外観品質を評価した。

DNA マーカー分析と QTL 解析

第一章と第二章に示した DNA マーカーのうち、こころまちと東北 168 号との間で DNA 多型を検出できる 19 個の SCAR マーカー、15 個の CAPS マーカー、15 個の PCR-RF-SSCP マーカー、及び 27 個のドットプロット SNP マーカーを使用した。DNA マーカーの充実を図るため、101 個の SSR マーカー (McCouch *et al.* 2002)から選抜した東北 168 号とこころまちとの間で多型を検出できる 26 個の SSR マーカーを加え、合計 102 マーカーで組換え自殖系統群の遺伝子型を決定した。DNA マーカーの連鎖地図は、MAPMAKER v3.0 プログラム (Lander *et al.* 1987; <http://www.broad.mit.edu/ftp/distribution/software/mapmaker3/>)を用いて作成した。QTL 解析は、Windows QTL Cartographer v2.0 プログラム (Basten *et al.* 2001; <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)による複合区間マッピングで行い、LOD 値が 3.0 以上を示す領域を QTL とした。

<結果・考察>

高温ストレス感受性の高い時期

稔実歩合については、Te 区で 65%、T0 区で 79%であり、対照区の 96%に対して有意に低い値を示した (Figure 3.1)。また、Te 区は T0 区より有意に低い値であった。一方、T5 区、T10 区、T15 区では稔実歩合がそれぞれ 92、95、96%であり、対照区と有意差はなかった。このことから、出穂中から出穂完了後 5 日目まで、特に出穂中の高温が稔実歩合を低下させると言える。この時期における高温による稔実歩合の低下は、これまでに、開花直前、中、直後 (佐藤ら 1973)、開花期 (Satake & Yoshida 1978)、先端穎果の開花後 1-5 日目 (森田 2000)であると報告されている。本研究では出穂完了日を基準にこの時期のステージ分けを行った。この時期の不稔は、主に雄性器官の障害によるもので、花粉へのデンプン蓄積不足、開葯の抑制 (佐藤ら 1973)、花粉飛散の不良、柱頭上での花粉発芽不良 (Satake & Yoshida 1978)が要因であるとされている。品種により主要因に差はある (Satake & Yoshida 1978)が、日本型品種の場合、35°C で葯の

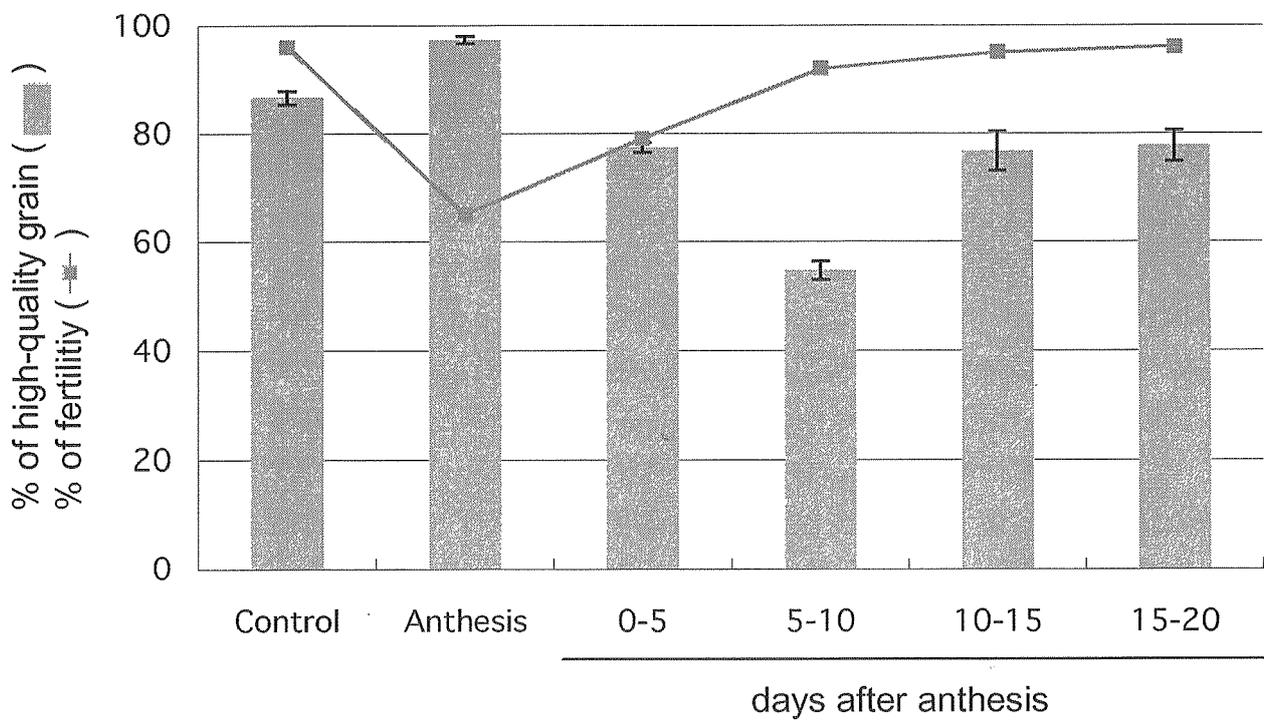


Figure 3.1 Percentages of high-quality grain (bar) and fertility (line) after high-temperature stress treatment.

裂開が、40°C で花粉発芽が阻害されることが報告されている (諸隈・田尾 1999)。本研究における不稔は、これらが原因であると考えられる。

整粒歩合については、T5 区、T10 区、T15 区で対照区に比べて 5%水準で有意に低い値を示し、その中でも T5 区がとりわけ低い値を示した (Figure 3.1)。逆に、Te 区では対照区に比べて有意に高い値を示した。このことから、出穂完了後 0-20 日目まで、特に出穂完了後 5-10 日目の高温が玄米の外観品質を低下させると言える。出穂完了後 5-10 日目はアミロプラストが分化し発達する時期にあたり (星川 1968)、高温により粒の成長・充実は促進される (長戸・江幡 1965)。また、この時期の高温は呼吸量を増加させ、植物体の炭水化物量を減少させる (山本 1954)。このことから、穂の養分要求の最も旺盛な時期に高温による養分需給の不均衡が生じ、粒の充実が不十分となった可能性が考えられる。高温により子実のデンプン合成関連の酵素活性が低下することがコムギ (Hawker & Jenner 1993, Keeling *et al.* 1993)、トウモロコシ (Keeling *et al.* 1994) で認められており、イネの場合も結合型デンプン合成酵素量や酵素活性、アミロース含量が低下することが報告されている (Asaoka *et al.* 1985, Umemoto *et al.* 1995)。高温下では茎葉に炭水化物が多く残留し、茎葉よりも穂を高温にした場合に玄米 1 粒重と外観品質が低下する (佐藤ら 1973)。このことから、高温による玄米の外観品質の低下の原因として、穂における炭水化物の受入れ能力の低下が示唆される。Te 区で整粒歩合が高かった原因としては、稔実歩合が低かったことが挙げられる。シンクのサイズに対するソースの能力が相対的に高まることで、1 粒に対するデンプンの蓄積が充実にし、結果として整粒歩合が向上したものであると考えられる。同様の現象は佐藤ら (1973) や森田 (2000) によっても報告されている。本研究の結果からも、稔実粒数の減少により炭水化物の供給が十分維持できたことが示唆された。

品種間差異の検出

2002 年から 2005 年に東北 168 号とこころまちを用いて高温ストレス検定を行った。こころまちの整粒歩合は 86.5%であったのに対し、東北 168 号の整粒歩合は 49.9%であった (Table 3.1)。出穂完了後 5 から 10 日目の高温処理により、品種間差が検出できることが示された。

背白米と基白米の発生率の変異分布は異なる遺伝様式を示す (田畑ら 2005a) ため、玄米の外観品質を整粒、腹白米、心白米、乳白米、背白米、及び基白米に分類して評価した。高温登熟条件下での玄米品質の品種間差は、主に背白米

Table 3.1 Percentages of high-quality grains of Kokoromachi and Tohoku 168 after high-temperature treatment at 5-10 day-after-anthesis

	High quality	White belly	Core white	Milky white	White back	Basal white	The other
Tohoku 168	49.9±13.2	1.7±1.3	0.1±0.1	1.0±0.4	17.5±2.1	29.0±10.8	0.8±0.3
Kokoromachi	86.5±5.2	2.4±2.4	0.6±0.3	0.4±0.2	1.0±0.3	6.1±3.1	2.9±1.5

Each value is given as mean ± standard error (n=3).

と基白米の発生率の差に表れた。これは、高温処理による背白米と基白米の発生率が高温耐性品種の判定基準になりうるという西村ら (2000)と飯田ら (2002)の報告を支持するものであった。デンプンが玄米中に蓄積する順序は、登熟初期は胚乳の全周囲の珠心から中心部に向かって炭水化物が流入し、中心部から周辺部に向かってデンプンが蓄積されること、乳熟期からは背部維管束からの炭水化物の流入が多くなること、及び胚乳周辺部では背側よりも腹側で先にデンプン粒が発達することが知られている (星川 1968)。このことから、腹白米、心白米、乳白米、背白米、及び基白米は、登熟期間中のそれぞれ特定の時期にデンプン蓄積が不良となったために発生することが推察されている (長戸・江幡 1965)。つまり、背部維管束周辺が白濁する背白米は、登熟中から登熟後期の高温でデンプン蓄積が阻害されて発生し、玄米基部の背部維管束周辺が白濁する基白米は、さらに登熟後期にデンプン蓄積が不良になることで発生したと考えられる。

組換え自殖系統群の形質

背白米の発生率は東北 168 号とところまちでそれぞれ 21.3%、0.9%であり、組換え自殖系統群内では 0.0%から 79.6%の分布を示し (Figure 3.2)、基白米の発生率は東北 168 号とところまちでそれぞれ 40.3%、7.4%であり、組換え自殖系統群内では 0.0%から 34.8%の分布を示した。出穂到達日は東北 168 号とところまちでそれぞれ 97 日、99 日で、組換え自殖系統群内では 94 日から 105 日の分布を示し、草丈は東北 168 号とところまちでそれぞれ 91.0 cm、93.5 cm で、組換え自殖系統群内では 69 cm から 117 cm の分布を示し、一穂粒数は東北 168 号とところまちでそれぞれ 85.4 粒、65.0 粒で、組換え自殖系統群内では 43.0 粒から 132.0 粒の分布を示した (Figure 3.2)。

DNA マーカー分析と QTL 解析

102 個の DNA マーカーを用いて組換え自殖系統群の遺伝子型を決定した。ドットプロット SNP マーカーは電気泳動を必要としないため、SSR マーカーや PCR-RF-SSCP マーカーによる分析に比べ、はるかに効率的であった。第 5 染色体を除く 11 本の染色体に対応する 17 個の連鎖群を作成した (Figure 3.3)。連鎖群の遺伝距離の合計は 718.4 cM であり、日本晴とカサラスの F₂ 集団を用いて作成された高密度連鎖地図 (Harushima *et al.* 1998)の、47.2%をカバーした。

背白米の発生率に関する QTL は、第 1、6、11 染色体の 3 ヶ所に検出され、それぞれの座の寄与率は 12.5%、21.9%、8.6%であった (Table 3.2)。第 6、11

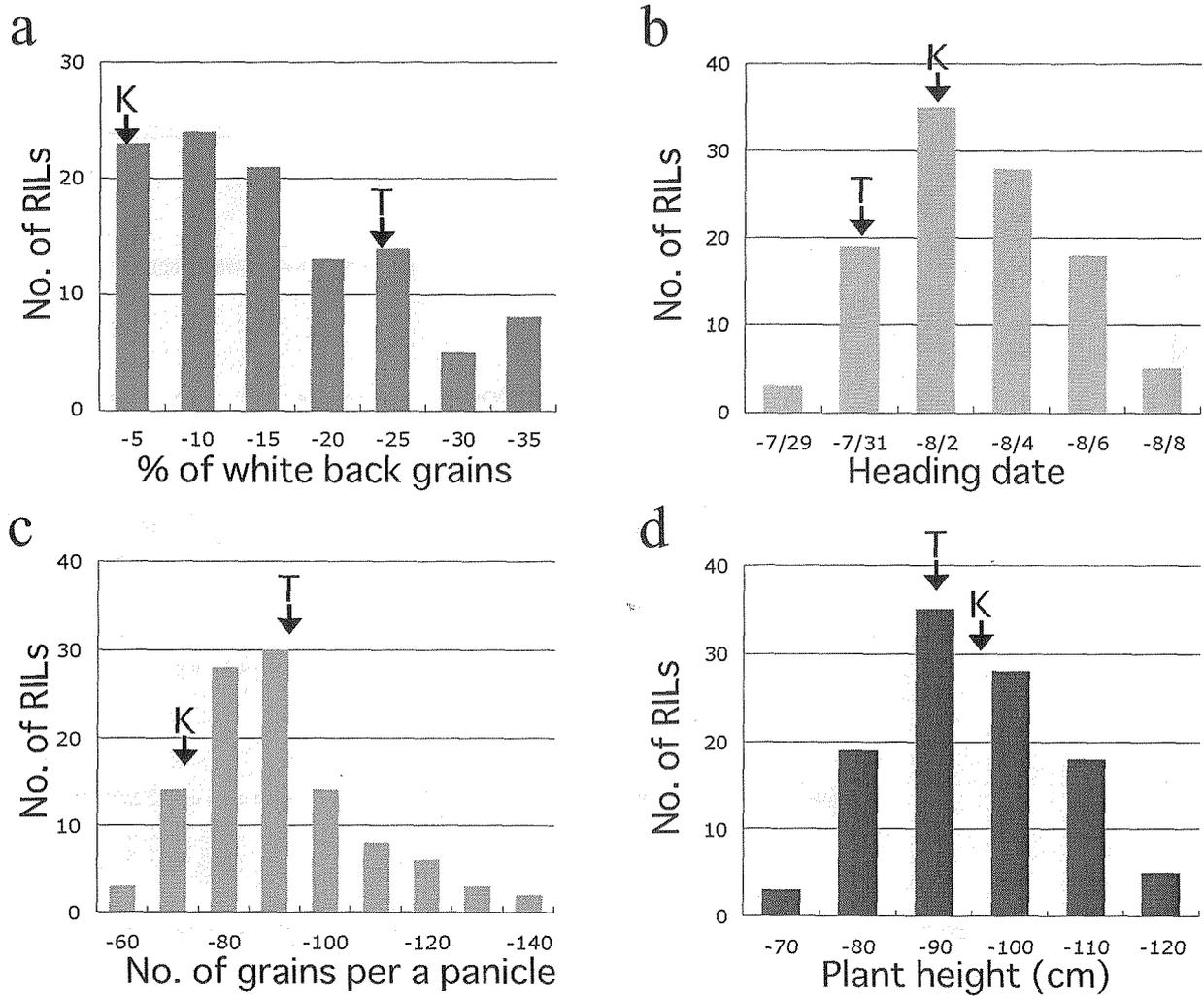


Figure 3.2 Histograms for heat sensitivity (a), heading date (b), grain number (c) and plant height (d) of the recombinant inbred lines derived from a cross between Tohoku 168 and Kokoromachi. K and T indicate the values of Kokoromachi and Tohoku 168, respectively.

Table 3.2 QTL analyses of heat sensitivity, grain number, heading date, and plant height

Traits	The nearest marker	Chr.	LOD of peak	Additive effect ^a	Variance explained (%)
Heat sensitivity in grain filling stage (% white back grain)					
	sd1	1	3.8	8.3	14.3
	NK6002	6	8.3	-9.8	25.4
	NKI9	11	3.1	-5.2	7.8
Heading date (day)					
	NK3060	3	14.7	1.4	35.6
	RFT1	6	6.6	0.9	14.1
Grain number per panicle					
	S20768	2	5.0	-6.9	16.1
Plant height (cm)					
	sd1	1	18.1	8.0	34.6
	NK3060	3	5.2	-3.3	8.0

^aAdditive effect of the Kokoromachi allele.

染色体に検出された QTL は東北 168 号の対立遺伝子が、第 1 染色体に検出された QTL はこころまちの対立遺伝子が、それぞれ背白米を増加させる作用を持っていた。基白米の発生率に関する QTL は検出されなかった。コシヒカリを遺伝背景とするカサラスの染色体部分置換系統群を用いた解析では、第 2、5、8 または 10 染色体がカサラスの染色体に置換した系統で、背白米と基白米が増加している (蛭谷ら 2003)。日本型水稻同士の雑種集団を用いた解析では、ハナエチゼン (耐性品種) と新潟早生 (感受性品種) の F₂ 集団を用いた解析から、第 6、11 染色体に 1 ヶ所ずつ (鮎ら 2004)、越路早生 (耐性品種) とチヨニシキ (感受性品種) の組換え自殖系統群を用いた解析から、第 1 染色体に 2 ヶ所、第 2、8 染色体にそれぞれ 1 ヶ所ずつ (田畑ら 2005b)、背白米の発生に関わる QTL が検出されている。本研究で検出した 3 つの QTL は、これら 3 つの集団を用いた解析結果のいずれかと同じ領域に検出されたが、遺伝子の異同は不明である。

草丈を決定する寄与率の大きな QTL は第 1 染色体の長腕に検出され、東北 168 号の対立遺伝子が草丈を短くする作用を持っていた (Table 3.2)。この領域には緑の革命に貢献した *sd1* が座乗する (Sasaki *et al.* 2002)。東北 168 号はレイメイ型の対立遺伝子 *sd1-r* を持つことから、検出した QTL は *sd1* であると考えられる。

出穂期を決定する QTL は第 3、6 染色体に検出され、いずれもこころまちの対立遺伝子が出穂を遅らせる作用を持っていた (Table 3.2)。日本晴とカサラスの雑種後代を用いた解析からも、これらの領域に QTL が検出され (*Hd3a*、*Hd3b*、及び *Hd6*; Yano *et al.* 2001)、*Hd3a* と *Hd6* は遺伝子が同定されている (Kojima *et al.* 2002、Takahashi *et al.* 2001)。また、*Hd3a* 近傍の染色体領域に座乗する *RFT1* も開花制御に関与している (Izawa *et al.* 2002)。これらの領域には、コシヒカリとアキヒカリの半数体倍加系統群、日本晴とコシヒカリの戻し交雑自殖系統群を用いた解析からも QTL が検出されている (Takeuchi *et al.* 2001、河野ら 2005)。*Hd3a*、*Hd6*、及び *RFT1* について、東北 168 号、こころまち、アキヒカリ、コシヒカリ、及び日本晴との間で PCR-RF-SSCP 分析を行い、多型を検出した *Hd3a* と *RFT1* についてはシーケンス解析を行ったが、どちらの遺伝子にも機能に差異をもたらすと考えられる多型は検出されなかった。東北 168 号とこころまちとの間での出穂期の差異は、*Hd3a*、*Hd6*、及び *RFT1* とは異なる遺伝子により制御されていると考えられる。

一穂籾数を決定する QTL は第 2 染色体に検出され、東北 168 号の対立遺伝

子が一穂籾数を増加させる作用を持っていた (Table 3.2)。ササニシキとハバタキの雑種後代を用いた解析から、サイトカイニンの分解に関するサイトカイニン酸化還元酵素遺伝子 (*OsCKX2*)が一穂籾数を決定する QTL として報告されているが、本研究で検出したこの QTL 領域には *OsCKX2* やその相同遺伝子 *OsCKX1*, *3~11* は座乗していない (Ashikari *et al.* 2005)。検出した一穂籾数に関する QTL は *CKX* ではないことが示唆された。

総合論議

ゲノム研究における SNP 解析の意義

マップベースクローニング法は生物の表現型の多様性の原因となる遺伝子を同定するための有効な手段である。ゲノム配列の解読が完了したイネでは、多数の SSR マーカーが公開され (McCouch *et al.* 2002、International Rice Genome Sequencing Project 2005)、マップベースクローニングに利用されている (Li J *et al.* 2004)。しかし、表現型の多様性の原因となる遺伝子の DNA 多型のほとんどが SNP であると考えられたため、原因遺伝子を同定するためには遺伝子領域の SNP 分析が必要である。PCR-RF-SSCP 分析は、ゲノムの任意の領域の DNA 多型を検出できる技術であるため、原因遺伝子の同定に有効な技術である。PCR-RF-SSCP 分析で多型を検出した遺伝子の塩基配列を決定することで、遺伝子機能の推定が可能となった。また、SNP は SSR に比べてゲノム中に高頻度で存在し (International Rice Genome Sequencing Project 2005)、マップベースクローニングの際のより有効な DNA マーカーとして利用が可能である。

自由に交雑集団を得られないヒトで、アフリカ、アジア、及びヨーロッパをそれぞれ起源とする複数の集団から DNA 試料を収集し、100 万個以上の SNP マーカーの遺伝子型、頻度、ハプロタイプを解析して、ゲノム全体にわたる塩基配列多型性パターンの地図 (ハップマップ) が作成された (The International HapMap Consortium 2005)。これにより、連鎖不均衡を考慮した少数の SNP 解析でゲノム全体のハプロタイプの推定が可能となり、ありふれた病気に関与する DNA 多型を見出せるようになると期待されている。ヒトゲノム中の連鎖不均衡の程度は数 kb から数十 kb の領域である (Goldstein *et al.* 2001)。それに対してイネでは、イネ白葉枯れ病抵抗性遺伝子 *xa5* 領域に約 100 kb にわたる連鎖不均衡が見出されており、ヒトに比べて広い領域で連鎖不均衡が認められる原因として、自殖であることと選抜が加えられていることが挙げられている (Gariss *et al.* 2003)。今後、イネでもゲノムワイドな SNP 分析が行われ、ハップマップが作成できれば、交雑集団を利用するマップベースクローニング法によらない、自然集団あるいは品種群を用いた解析から、遺伝子の同定ができるようになると思われる。

イネでは、レトロトランスポゾン *Tos17* (Hirochika *et al.* 1996) を利用した挿入変異システムを用いた逆遺伝学的な手法により、多くの遺伝子の機能が明らかにされている (Sato *et al.* 1999, Morita *et al.* 2005, Tabuchi *et al.* 2005)。挿入変異体中の

Tos17 のゲノム上の挿入位置は、染色体上の 20,458 座に位置付けられているが、挿入箇所には偏りがある (Miyao *et al.* 2003)。全ての遺伝子破壊系統を得るためには、*Tos17* 以外の変異原を利用する必要がある。化学変異原である EMS や物理変異原であるガンマ線により誘発した SNP (Greene *et al.* 2003, Naito *et al.* 2005)は、ミスマッチ切断酵素によるヘテロ二本鎖 DNA の切断により探索することができるため、新しい逆遺伝学的な手法として利用が可能になる (Sato *et al.* 投稿中)。すでに同様の研究が、蛍光 DNA シークエンサー (LI-COR 4300: LI-COR Biotechnology 社製)を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動による TILLING 法として行われている (Gilchrist & Haughn 2005)が、本研究で行った手法は簡単な実験装置のみで分析を行えるため、安価で簡単に突然変異体の選抜に利用できる技術である。

SNP の育種への利用

農業上重要な遺伝子に連鎖した DNA マーカーは、DNA マーカー育種において有用である。イネでは、病害抵抗性遺伝子の連鎖マーカーが報告されている (Blair *et al.* 2003, Conaway-Bormans *et al.* 2003)。このような DNA マーカーは、イネ白葉枯れ病抵抗性遺伝子や食味・品質に関する NILs の育成に用いられている (Singh *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2003)。しかし時として、目的遺伝子と連鎖マーカーとの間での組換えにより、選抜ミスを起こすことがある。このような問題を避けるために、目的遺伝子そのものを DNA マーカーとして選抜する必要がある。本研究で示した *Wx* と *sd1* の他にも、様々な農業上有用な遺伝子が同定されている (Song *et al.* 1995, Yano *et al.* 2000, Ashikari *et al.* 2005)。本研究で開発したドットプロット SNP 分析法は、多検体を扱う分析でも操作が簡便で安価なため、新しい「DNA 選抜育種」に適した技術である。これにより、遺伝子が明らかにされている農業上重要な形質は SNP 分析により選抜が行われ、最終的な生産性や適応性試験のみを行うことで育種が可能となり、育種の際の労力、費用、及び時間を軽減させることができると期待される。

日本型品種同士の雑種集団を用いた連鎖解析

登熟期の高温ストレス耐性は、今後の重要な育種目標となると考えられる。すでに、登熟期の高温ストレス耐性品種として、こしいぶきやてんたかくが育成されているが、今後の新品種の育成の効率化には、登熟期の高温ストレス耐

性遺伝子の DNA マーカー化が望まれる。登熟期の高温ストレス耐性以外にも、出穂期、食味・品質などは重要な育種目標であり、これらの形質についても DNA マーカーの利用による育種の効率化が求められる。

いもち病真性抵抗性遺伝子を導入したササニシキ BL 系統 (阿部 2002)、トビイロウンカ抵抗性遺伝子を導入した関東 IL2 号、出穂期に関わる遺伝子を導入した関東 IL3 号などのように、日本型品種とインド型品種との雑種集団を用いた連鎖解析により明らかにされた有用遺伝子が、戻し交雑育種法により日本型品種へ導入されて始めている。交雑育種において、インド型品種や野生イネの病虫害抵抗性遺伝子を利用することは有効であるが、ストレス耐性、出穂期、食味・品質は日本型品種内でも多様性があるため、日本型品種同士の交雑で改良が可能である。インド型品種 IR8 に由来する半矮性遺伝子 *sd1-d* は、キヌヒカリ、夢つくし、どんとこい、いただきなどの日本型品種の育成に利用されているが、いずれの品種も 9.3 cM 以上の IR8 由来と考えられる染色体領域を保持している (Table 2.4)。インド型品種や野生イネを育種に利用する場合、目的遺伝子に連鎖した劣悪遺伝子が問題となる場合がある。DNA マーカーを利用して組換え個体を探索すれば、劣悪遺伝子の排除は可能であろうが、日本型品種同士の交雑による育種に比べて労力や費用がかかる。したがって、日本品種内に多様性のあるストレス耐性、出穂期、食味・品質などの形質は、日本型品種同士の交雑による改良が望ましいと考えられる。

日本型品種間で利用できる有用形質連鎖マーカーは、現在までに数例の報告 (Takeuchi *et al.* 2001)があるのみである。今後、日本型品種間で多型検出可能な DNA マーカーの利用により、日本型品種間で利用できる有用遺伝子、あるいは連鎖マーカーが、実際の育種集団を用いた連鎖解析から明らかにされることと、日本型品種同士の交雑育種が効率化することを期待する。

摘要

単子葉のモデル植物であり農業上重要な作物でもあるイネにおいて、全ゲノム配列の解読が完了した。農業上有用な遺伝子の単離と機能解明は、ポストゲノムシーケンス研究の重要な課題の一つである。これまでに、日本型とインド型の品種間の雑種後代を用いた QTL 解析が数多くなされ、出穂期、病害抵抗性、収量などに関わる遺伝子がマップベースクローニングにより単離されている。一方で、日本型-インド型品種間雑種後代での形質評価が困難な食味・品質などの農業形質に関わる遺伝子の単離には、日本型品種間雑種後代を用いた連鎖解析が必要である。しかし、日本型品種間で利用できる DNA マーカーは、十分に整備されていない。

本研究では、PCR-RF-SSCP 分析と AFLP 分析により、日本型品種間で多型を示す多数の DNA マーカーを作成し、遺伝子領域の多型頻度と品種に特異的な配列を明らかにした。また、ミスマッチ切断酵素を用いた日本型品種間の簡易 DNA 多型検出法と、多検体の分析に適したドットプロット分析による Indel と SNP の簡易検出技術を確立した。これらの技術を利用して、日本型品種同士の雑種集団を用いた QTL 解析を行い、登熟期の高温ストレス耐性、草丈、出穂期、及び一穂粒数に関する QTL を検出した。

本研究の成果から、米の生産上重要であるが形質評価が困難な各種ストレス耐性、食味・品質、あるいは収量に関する QTL が、実際の育種に利用される日本型品種同士を組み合わせた育種系統の連鎖解析により明らかにできると、遺伝子変異そのものを選抜する新しい育種技術の可能性を示した。

謝辞

本研究室教授の西尾剛先生と助手の岸谷幸枝先生、及び本研究科教授（元・本研究室助教授）の鳥山欽哉先生には、本研究を行う機会を与えていただき、また多大なる御指導を賜りました。宮城県古川農業試験場の永野邦明氏、(独)生物農業資源研究所の矢野昌裕博士、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センターの山口誠之氏、及び各農業試験場の方々には、植物材料の養成と分譲をしていただきました。(株)植物ゲノムセンターの門奈理佐博士、元・本研究室実験補佐員の杉山裕子さん、及び本研究室後輩の汐海沙知子さんには、研究支援をしていただきました。本研究室のメンバーを含め、本研究の遂行に携わってくださりました全ての方々に感謝いたします。本研究の一部は、(独)日本学術振興会の特別研究員制度（課題名「イネ登熟期の高温ストレス耐性遺伝子の単離」）の支援を受けました。

引用文献

- 阿部眞三 (2002) イネいもち病抵抗性検定方法の改善と真性抵抗性同質遺伝子系統の育成. 東北大学大学院農学研究科博士論文
- Asaoka M, Okuno K, Fuwa H (1985) Effect of temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of waxy and nonwaxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L.). *Agric. Biol. Chem.* **49**: 373-379
- Ashikari M, Wu J, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A (1999) Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 10284-10289
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, *et al.* (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**: 741-745
- 鮑根良, 小林麻子, 富田桂 (2004) イネの玄米品質に関する QTL 解析. 育種学研究 **6 (別 1)**: 237
- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2001) QTL Cartographer, Version 2.0. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, U. S. A.
- Bensch S, Akesson S, Irwin DE (2002) The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Mol. Ecol.* **11**: 2359-2366
- Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* **112**: 887-898
- Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis TH, Hedley C, Martin C (1990) The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* **60**: 115-122
- Blair MW, Garris AJ, Iyer AS, *et al.* (2003) High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **107**: 62-73
- Brugmans B, van der Hulst RG, Visser RG, Lindhout P, van Eck HJ (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Res.* **31**: e55
- Comai L, Young K, Till BJ, *et al.* (2004) Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J.* **37**: 778-786
- Conaway-Bormans CA, Marchetti MA, Johnson CW, McClung AM, Park WD (2003) Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z* in rice for use in

- marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 1014-1020
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Repr.* **1**: 19-21
- Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, et al.** (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* **84**: 451-459
- Doi K, Izawa T, Fuse T, et al.** (2004) *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev.* **18**: 926-936
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15
- 蛭谷武志, 矢野昌裕, 表野元保, 山本良孝** (2003) 染色体断片置換系統群を用いた水稲玄米外観品質に関する QTL 解析. *育種学研究* **5 (別 2)**: 359
- Ebitani T, Takeuchi Y, Nonoue Y, et al.** (2005) Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of *indica* rice cultivar 'Kasalath' in a genetic background of *japonica* elite cultivar 'Koshihikari'. *Breed. Sci.* **55**: 65-73
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1349
- Evans KM, James CM** (2003) Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* mildew resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1178-1183
- Fischer SG, Lerman LS** (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 1579-1583
- Florea L, Hartzell G, Zhang Z, Rubin GM, Miller W** (1998) A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome. Res.* **8**: 967-974
- Fujii K, Hayano-Saito Y, Saito K, et al.** (2000) Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, *Pb1*, in rice. *Breed. Sci.* **50**: 183-188
- Fujimoto R, Nishio T** (2003) Identification of *S* haplotypes in *Brassica* by dot-blot analysis of *SP11* alleles. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1433-1437
- Garris AJ, McCouch SR, Kresovich S** (2003) Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* **165**: 759-769

- Gilchrist EJ, Haughn GW** (2005) TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 211-215
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, et al.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92-100
- Goldrick MM, Kimball GR, Liu Q, et al.** (1996) NIRCA: a rapid robust method for screening for unknown point mutations. *Biotechniques* **21**: 106-112
- Goldstein DB** (2001) Islands of linkage disequilibrium. *Nat. Genet.* **29**: 109-111
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, et al.** (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics* **164**: 731-740
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, et al.** (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol. Genet. Genomics.* **270**: 315-323
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, et al.** (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* **148**: 479-494
- Hawker JS, Jenner CF** (1993) High temperature affects the activity of enzyme in the committed pathway of starch synthesis in developing wheat endosperm. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**: 197-209
- Hayano-Saito Y, Tsuji T, Fujii K, et al.** (1998) Localization of the rice stripe disease resistance gene, *Stv-bⁱ*, by graphical genotyping and linkage analyses with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 1044-1049
- Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I** (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 1212-1220
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M** (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 7783-7788
- 星川清規 (1968) 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究 第 10 報 胚乳澱粉粒の発達について. *日作紀* **37**: 97-106
- 飯田幸彦, 横田国夫, 桐原俊明, 須賀立夫 (2002) 温室と高温年の圃場で栽培

- した水稻における玄米品質低下程度の比較. *日作紀* **71**: 174-177
- International Rice Genome Sequencing Project** (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800
- Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, et al.** (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev.* **16**: 2006-2020
- Jain M, Thorstenson YR, Faulkner DM, et al.** (2003) Genotyping African haplotypes in ATM using a co-spotted single-base extension assay. *Hum. Mutat.* **22**: 214-221
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE** (1999) The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**: 1925-1934
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD** (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**: 789-793
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM** (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**: 3038-3049
- Kajiya H, Shimano T, Monna L, Yano M, Sasaki T** (1996) Effective production of RFLP markers between closely related varieties of rice by genomic subtraction. *Breed. Sci.* **46**: 387-391
- Keeling PL, Bacon PJ, Holt DC** (1993) Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta* **191**: 342-348
- Keeling PL, Banisadr R, Barone L, Wasserman BP, Singletary GW** (1994) Effect of temperature on enzyme in the pathway of starch biosynthesis in developing wheat and maize grain. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**: 807-827
- Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano HY** (2003) The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* **421**: 167-170
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, et al.** (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1096-1105
- Konieczny A, Ausubel FM** (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**: 403-410

- 河野いづみ, 竹内善信, 島野公利, 佐々木卓治, 矢野昌裕 (2000) DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. *育種学研究* **2**: 197-203
- 河野いづみ, 松原一樹, 野々上慈徳, 山本伸一, 矢野昌裕 (2005) イネ日本型品種日本晴とコシヒカリの BC₁F₁ 集団を用いた出穂期の QTL 解析. *育種学研究* **7**(別 1・2): 275
- Kubo T, Aida Y, Nakamura K, et al.** (2002) Reciprocal chromosome segment substitution series derived from *japonica* and *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* **52**: 319-325
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al.** (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181
- Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM** (2003) Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* **22**: 79-85
- Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB** (1997) Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 β -hydroxylase. *Plant Cell* **9**: 1435-1443
- Li J, Thomson M, McCouch SR** (2004) Fine mapping of a grain-weight quantitative trait locus in the pericentromeric region of rice chromosome 3. *Genetics* **168**: 2187-2195
- Li TX, Wang J, Bai Y, Sun X, Lu Z** (2004) A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification. *Nucleic Acids Res.* **32**: e45
- Lin SY, Sasaki T, Yano M.** (1998) Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date using backcross inbred lines in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 997-1003
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M** (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**: 946-951
- Matsubara Y, Kure S** (2003) Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip. *Hum. Mutat.* **22**: 166-172
- 松永和久 (2004) イネ穂ばらみ期耐冷性の高精度検定法「恒温深水法」の確立と耐冷性遺伝子集積による高度耐冷性品種の育成. 東北大学大学院農学研究科博士論文
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, et al.** (2002) Development and mapping of 2240

- new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* **9**: 199-207
- Michaels SD, Amasino RM** (1998) A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.* **14**: 381-385
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, et al.** (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* **15**: 1771-1780
- Morita R, Kusaba M, Yamaguchi H, et al.** (2005) Characterization of *chlorophyllide a oxygenase* (*CAO*) in rice. *Breed. Sci.* **55**: 361-364
- 森田敏 (2000) 高温が水稻の登熟に及ぼす影響 -人工気象室における温度処理実験による解析-. *日作紀* **69**: 391-399
- 諸隈正裕, 田尾桂子 (1999) 開花期の高温処理が日本型水稻品種の稔実に及ぼす影響. *日作紀* **68** (別 1): 246-247
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, et al.** (2005) The SOL Genomics Network: a comparative resource for *Solanaceae* biology and beyond. *Plant Physiol.* **138**: 1310-1317
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, et al.** (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res.* **31**: 315-318
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid. Res.* **8**: 4321-4325
- Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T** (1985) Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* **313**: 495-498
- 長戸一雄, 江幡守衛 (1965) 登熟期の高温が穎果の発達ならびに米質に及ぼす影響. *日作紀* **34**: 59-66
- Naito K, Kusaba M, Shikazono N, et al.** (2005) Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with gamma-rays and carbon ions. *Genetics* **169**: 881-889
- Nakai K, Horton P** (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 34-36
- Nasu S, Suzuki J, Ohta R, et al.** (2002) Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res.* **9**: 163-171
- Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE** (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in

- Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**: 387-392
- Nicod JC, Largiader CR** (2003) SNPs by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non-model organisms. *Nucleic Acids Res.* **31**: e19
- 西村実, 梶亮太, 小川紹文 (2000) 水稻の玄米品質に関する登熟期高温ストレス耐性の品種間差異. *育種学研究* **2**: 17-22
- Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, et al.** (2003) Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol. Biol.* **51**: 143-152
- Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT** (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4597-4602
- 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一, 他 (1999) RAPD 法による国内産精米の品種判別. *食科工* **46**: 117-122
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T** (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 2766-2770
- Parker GD, Langridge P** (2000) Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* **6**: 169-174
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, et al.** (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* **37**: 1141-1146
- Romero GO, Simmons C, Yaneshita M, et al.** (1998) Characterization of rice endo- β -glucanase genes (*Gns2-Gns14*) defines a new subgroup within the gene family. *Gene* **223**: 311-320
- Ross PL, Lee K, Belgrader P** (1997) Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 4197-4202
- Rozen S, Skaletsky H** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**: 365-386
- Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW** (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 5466-5470
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1986) Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific

- oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166
- Sardesai N, Kumar A, Rajyashri R, Nair S, Mohan M** (2002) Identification and mapping of an AFLP marker linked to *Gm7*, a gall midge resistance gene and its conversion to a SCAR marker for its utility in marker aided selection in rice. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 691-698
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, et al.** (2002) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701-702
- 佐々木武彦 (2004) 水稻の穂ばらみ期耐冷性の遺伝子源の解明と耐冷・良質・良食味品種「ひとめぼれ」の育種. 東北大学大学院農学研究科博士論文
- Satake T, Yoshida S** (1978) High temperature-induction sterility in *indica* rice at flowering. *Jpn. J. Crop. Sci.* **41**: 6-17
- Sato H, Suzuki Y, Sakai M, Imbe T** (2002) Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* **52**: 2131-2135
- 佐藤庚, 稲葉健五, 戸沢正隆 (1973) 高温による水稻の稔実障害に関する研究. 第 1 報 幼穂形成期以降の生育時期別高温処理が稔実に及ぼす影響. *日作紀* **42**: 207-213
- Sato Y, Sentoku N, Miura Y, et al.** (1999) Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. *EMBO J.* **18**: 992-1002
- Sato Y, Nishio T** (2002) Efficient detection of DNA polymorphisms in cabbage and rice cultivars by PCR-RF-SSCP (PRS). *Plant Cell Rep.* **21**: 276-281
- Sato Y, Nishio T** (2003) Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 560-567
- Sato Y, Shirasawa K, Takahashi Y, Nishimura M, Nishio T**: Selection of mutants from M₂ plants of gamma-ray-irradiated rice by DNA mismatch cleavage using *Brassica* petioles extracts. 投稿中
- Shan X, Blake TK, Talbert LE** (1999) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 1072-1078
- Shen YJ, Jiang H, Jin JP, et al.** (2004) Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol.* **135**: 1198-1205
- Singh S, Sidhu JS, Huang N, et al.** (2001) Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into *indica*

- genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into *indica* rice cultivar PR106. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 1011-1015
- Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D** (2005) A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat. Biotechnol.* **23**: 75-81
- Song WY, Wang GL, Chen LL, et al.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804-1806
- Stoerker J, Mayo JD, Tetzlaff CN, et al.** (2000) Rapid genotyping by MALDI-monitored nuclease selection from probe libraries. *Nat. Biotechnol.* **18**: 1213-1216
- Stracke S, Schilling AG, Forster J, et al.** (2003) Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1184-1190
- 田畑美奈子, 飯田幸彦, 大澤良 (2005a) 水稻の登熟期の高温条件下における背白米および基白米発生率の遺伝解析. *育種学研究* **7**: 9-15
- 田畑美奈子, 平林秀介, 竹内善信, 他 (2005b) 水稻の登熟期の高温条件下における背白米発生率に関する QTL 解析. *育種学研究* **7** (別 1・2): 282
- Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, et al.** (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant J.* **42**: 641-651
- Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, Yano M** (2001) *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 7922-7927
- Takeuchi Y, Hayasaka H, Chiba B, et al.** (2001) Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate *japonica* rice. *Breed. Sci.* **51**: 191-197
- Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, et al.** (2005) Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 2305-2321
- Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H** (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* **131**: 454-462
- Teranishi M, Iwamatsu Y, Hidema J, Kumagai T** (2004) Ultraviolet-B sensitivities in Japanese lowland rice cultivars: cyclobutane pyrimidine dimer photolyase activity and gene mutation. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1848-1856

- The International HapMap Consortium** (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**: 1299-1320
- The International SNP Map Working Group** (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**: 928-933
- The Rice Full-Length cDNA Consortium** (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science* **301**: 376-379
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, et al.** (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* **13**: 524-530
- Till BJ, Burtner C, Comai L, Henikoff S** (2004) Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2632-2641
- Umemoto T, Nakamura Y, Ishikura N** (1995) Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* **40**: 1613-1616
- Umemoto T, Aoki N, Lin H, et al.** (2004) Natural variation in rice *starch synthase IIa* affects enzyme and starch properties. *Func. Plant Biol.* **31**: 671-684
- von Stackelberg M, Lindemann S, Menke M, Riesselmann S, Jacobsen HJ** (2003) Identification of AFLP and STS markers closely linked to the *def* locus in pea. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1293-1299
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414
- Wade CM, Kulbokas EJ 3rd, Kirby AW, et al.** (2002) The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**: 574-578
- Wang H, Qi M, Cutler AJ** (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4153-4154
- Wang HY, Luo M, Tereshchenko IV, et al.** (2005) A genotyping system capable of simultaneously analyzing >1000 single nucleotide polymorphisms in a haploid genome. *Genome Res.* **15**: 276-283
- Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M** (1996) The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 2598-2602
- Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, et al.** (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* **19**: 55-64
- Wu J, Maehara T, Shimokawa T, et al.** (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* **14**: 525-535

- 山本健五 (1954) 水稻の成熟現象に関する研究. III. 夜温の高低と登熟期間に於ける呼吸量及び炭水化物の変化. *農及園* **29**: 1425-1427
- Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, et al.** (2000) Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**: 1591-1606
- Yamashita S, Yoshida Y, Kurahashi A, Sugimura T, Ushijima T** (2000) Construction of a high-throughput rat genetic mapping system with 466 arbitrarily primed-representational difference analysis markers. *Mamm. Genome* **11**: 982-988
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al.** (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**: 2473-2484
- Young ND, Cannon SB, Sato S, et al.** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **137**: 1174-1181
- Yu J, Hu S, Wang J, et al.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79-92
- Yu SB, Xu WJ, Vijayakumar CH, et al.** (2003) Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the International Rice Molecular Breeding Program. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 131-140
- Zenbayashi K, Ashizawa T, Tani T, Koizumi S** (2002) Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 547-552
- Zhou GH, Shirakura H, Kamahori M, et al.** (2004) A gel-free SNP genotyping method: bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER) directly from double-stranded PCR products. *Hum. Mutat.* **24**: 155-163
- Zhou PH, Tan YF, He YQ, Xu CG, Zhang Q** (2003) Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 326-331
- Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, et al.** (2003) Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics* **163**: 1123-1134