

氏名(本籍)	しら 白	さわ 澤	けん 健	た 太
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 5 4 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	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			
論文審査委員	(主 査)	教 授	西 尾	剛
	(副 査)	教 授	前	忠 彦
		教 授	池 上	正 人

論文内容要旨

緒言

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のゲノム配列解読が完了した。農業上有用な遺伝子の単離・機能解明は、ポスト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-インド型品種間における量的形質 (QTL)解析がなされ、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。しかし、日本型-インド型品種間での形質評価が困難な農業形質に関わる遺伝子の単離には、日本型品種間での連鎖解析が望ましい。ところが、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、日本型イネ品種間のDNAマーカーの作成 (第一章)、簡易DNA多型検出技術の開発 (第二章)及びそれらを利用したQTL解析 (第三章)を行った。

第一章 日本型品種間の DNA 多型の探索

第一節 PCR-RF-SSCP 分析による遺伝子領域内の SNPs 解析

一塩基多型 (SNPs)はゲノム中に豊富に存在するため、近縁種のDNAマーカーとして利用が可能である。また、遺伝子領域のSNPsは、遺伝子機能に影響を及ぼす可能性がある。したがって、日本型品種の遺伝子領域のSNPsを解析することは、単に多数のDNAマーカーの作成を可能にするだけでなく、遺伝子機能を推定するうえで必要な情報を得るための非常に有効な手段となる。

PCR-RF-SSCP分析により、無作為に選んだ1,710遺伝子断片のSNPs解析を行い、日本型品種間では平均83.3遺伝子で、インド型品種間では平均1022.7遺伝子で、日本型-インド型品種間では平均1164.1遺伝子で多型を検出した (Figure 1, Table 1)。ほとんどの遺伝子座で、遺伝子多型は品種の系譜に従って遺伝していた (Figure 2)。45遺伝子 (50対立遺伝子)の塩基配列を解析し、142個のSNPsと32個の挿入・欠失変異 (Indels)を同定した (Table 2)。完全長cDNA配列の情報から、エキソンにDNA変異を持つ28遺伝子のうち、1個の対立遺伝子でフレームシフト変異を、15個の対立遺伝子でミスセンス変異を見出した (Table 3)。日本型品種は、極めて少数の遺伝子変異を利用して育成されてきたことが示唆された。

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

AFLP法はゲノム中のSNPsやIndelsを効率良く検出できる技術であるが、操作が煩雑であるため、多検体の分析には不向きである。解読されたイネゲノム配

列情報を用いることで、全てのAFLPマーカ―をPCRマーカ― (SCARマーカ―、CAPSマーカ―及びPCR-RF-SSCPマーカ―)に変換することが可能になる。

日本型品種を用いてAFLP分析を行った。多型を検出したDNA断片の塩基配列を決定し、イネゲノム配列情報を用いることで、その塩基配列を挟み込むPCRマーカ―に変換した (Figure 3)。作成したDNAマーカ―により、高い効率で日本型品種間のDNA多型を検出できることを示した (Table 4)。さらにゲノミックサザンブロット分析により、日本型品種間に数百塩基対以上に渡る品種特異的な配列が存在することを明らかにした (Figure 4)。

第二章 簡易 DNA 多型検出技術の開発

第一節 ミスマッチ切断酵素による DNA 多型検出

DNAのヘテロ二本鎖のミスマッチ部位をミスマッチ切断酵素で切断する方法は、操作が簡便であるため、SNPs分析技術として有用である。海外では、ミスマッチ切断酵素を用いてEMS誘導突然変異体の逆遺伝学的な同定が進められている。

既知のSNPsの検出を行ったところ、約2 kbのDNA断片長を用いた解析において明瞭なバンドを検出することができ、1:7以上1:15未満の混合DNAが多型検出限界であった。基準品種とした日本晴と8品種の混合DNA、日本晴と別の8品種の混合DNA、及び日本晴のゲノムDNAを試料とした。ミスマッチ切断酵素によるSNPs解析の結果、複数の遺伝子で多型が検出されたため、多型を示す品種を調査したところ、PCR-RF-SSCP分析の結果と一致した (Figure 5)。本法は操作が簡易で安価であるため、多検体を対象とするSNPs分析に適した技術である。また、物理的変異原あるいは化学的変異原により誘発された点突然変異の逆遺伝学的な同定にも応用が可能である。

第二節 ドットプロット分析による DNA 多型検出

第一項 Indels の検出

ドットプロット分析は、電気泳動の必要がないため、一度に多検体を扱う分析に適した技術である。しかしながら、ドットプロット分析には、品種特異的なDNA断片あるいは品種間で多型に富む遺伝子がプローブとして必要である。本研究で明らかになった品種特異的なDNA断片は、ドットプロット分析のプローブとして有効である。

種々の方法で葉から抽出したゲノム DNA を試料としたドットプロット分析で、特異的なシグナルを検出した (Figure 6a)。精米から抽出したゲノム DNA を試料とした場合、シグナルは特異的であるものの、強度が不十分であったが、PCR 増幅することで十分な強度のシグナルを得た (Figure 6b)。鎖長が 50 bp 以下の品種特異的な DNA 配列は、オリゴヌクレオチドをプローブとしたドットプロット分析により、検出が可能であった (Figure 6c)。品種識別も可能であり、本研究で用いた 31 品種は、10 マーカーの分析で全て識別できた (Figure 7)。日本型品種とインド型品種間には多数の Indels が存在するため、本法はそれらを用いた連鎖解析や育種の際の DNA マーカーとして有用である。

第二項 SNPs の検出

ゲノム中に豊富に存在する SNPs を DNA マーカーとして利用するためには、多検体を一度に扱える分析方法が望ましい。マイクロアレイ分析は、特殊な実験装置が必要であり、一回の分析も高価なため、多検体の解析には適さない。ドットプロット法による SNPs 分析技術は、多検体を一度に扱えるうえに、安価で簡易に分析を行える技術である。

5' 末端を標識した中央に SNPs を持つオリゴヌクレオチドをプローブとして用いた。非特異的なシグナルの検出を防ぐために、対立遺伝子の SNPs を持つ非標識のオリゴヌクレオチドを競合的にハイブリダイズさせた。競合させるオリゴヌクレオチドの濃度は、プローブの濃度の 2~10 倍が最適であった (Figure 8)。品種識別も可能であり、本研究で用いた 43 品種は、8 マーカーの分析で全て識別できた (Figure 9)。野生型の *Wx* 遺伝子を持つウルチ品種と変異型の *Wx-mq* 遺伝子を持つ低アミロース品種の交雑に由来する育種系統の遺伝子型は、本法で分析が可能であった (Figure 10)。一度に多検体の遺伝子変異を検出できるため、従来の DNA マーカー育種に比べて精度の高い DNA 選抜育種に貢献できる。

第三章 登熟期の高温ストレス耐性に関する QTL 解析

近年の夏の異常高温により引き起こされる、白色未熟粒の増加に伴う玄米の外観品質の低下が米の生産上問題となっている。玄米品質の低下の程度には品種間差があるため、遺伝的な制御が可能であると考えられる。したがって、高温ストレス耐性遺伝子やその連鎖マーカーが同定されれば、マーカー選抜育種により高温ストレス耐性品種の育成の効率化が期待される。

高温ストレスが稔実率と玄米の外観品質に最も大きな影響を与えるステージを調査した。その結果、稔実率は出穂中の、玄米の外観品質は出穂完了後5~10日目の高温ストレスにより最も低下した (Figure 11)。そして、出穂完了後5~10日目の高温ストレス処理により、高温ストレス耐性品種である「こころまち」と感受性品種である「東北168号」の玄米品質低下に関する品種間差異を検出した。「東北168号/こころまち」の交雑に由来する108個体の組換え自殖系統群を、それぞれ開花後5~10日目に高温ストレス処理し、玄米の外観品質を調査した。玄米の外観品質の低下は背白米の発生率の差として表れ、背白米の発生率は「東北168号」と「こころまち」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%に分布した (Figure 12a)。102個のDNAマーカーを用いたQTL解析より、背白米の発生率に関するQTLを、第1、6、11染色体にそれぞれ1ヶ所ずつ検出した (Table 5)。この他に、組換え自殖系統群の出穂期、一穂粒数及び草丈を評価し、それぞれのQTLを検出した (Figure 12b~d, Table 5)。日本型品種間の連鎖解析により、これまで困難であった農業形質に関わるQTLの検出が可能であることを示した。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を組み合わせた育種システムの連鎖解析により明らかにできると期待される。

結語

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とドットプロット分析による多検体の分析に適した簡易DNA多型検出技術を確立した。これらの技術を利用した日本型品種を用いたQTL解析により、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、日本型品種による連鎖解析と、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。

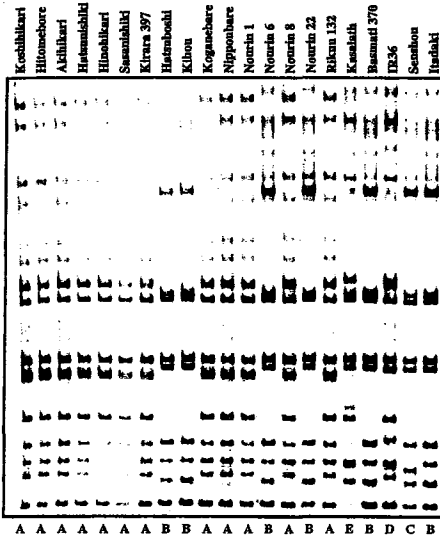


Figure 1. PCR-RF-SSCP analysis of the 21 rice cultivars using the primers of S13157. Allele names are shown under the picture.

Table 1. Number of different alleles between rice cultivars identified by PCR-RF-SSCP analysis

	Nipponbare	Akihikari	Hatsuboshi	Hatsunishiki	Hinohikari	Hitomebore	Itadaki	Kihou	Kirara 397	Koganebare	Koshihikari	Nourin 1	Nourin 6	Nourin 8	Nourin 22	Rikuu 132	Sasanishiki	Senshou	Basmati370	IR66	Kasalath	
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					
Basmati370	950	948	947	958	950	950	954	943	958	948	957	953	950	953	954	947	953	951				
IR66	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	1289	1306	1305	1304	1304	1307	1308	1302	1304	1223	1068	948		

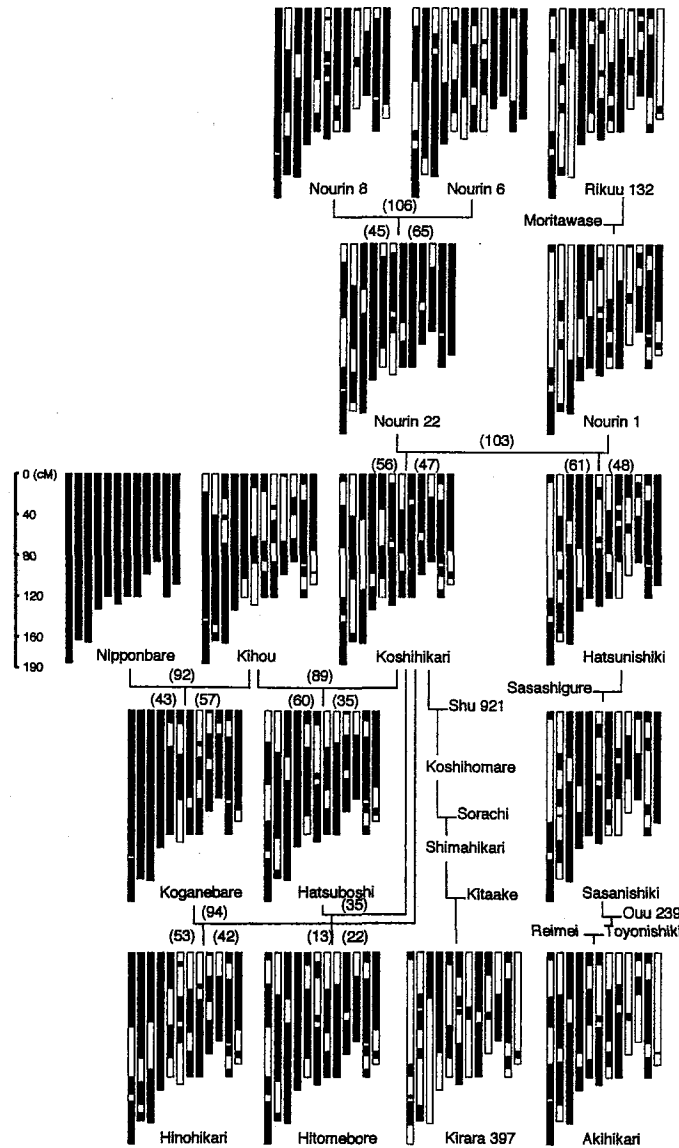


Figure 2. Genealogy and graphical genotyping of the japonica paddy-rice cultivars. The chromosomal regions with A allele are shown by red boxes, those with B allele by yellow, those with C allele by blue, those with D allele by light blue, and those with E allele by green. The number in parenthesis between the cultivars indicates the number of different alleles between them.

Table 2. SNPs and indels in the genes having DNA polymorphism between the japonica paddy-rice cultivars

marker name	Chr.	cM	sequence		truncation			missense	synonymous	3' UTR	Intron	unassigned region**
			allele	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)	-
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 TTTTITG

Table 3. Differences of the deduced amino-acid sequences of the alleles

Marker	Chr.	cM	Clone name	Accession No.	Genes having highest similarity in BlastX*	Allele
S13157	1	5.6	J013046E24	AK066041	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> (F84874)	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 Lau-223-Gln Arg-78-Cys Ala-194-Val Ser-19-Asn
S10844	2	98.2	J013145E21	AK072178	probable retroelement pol polyprotein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (F84811)	B Gln-327-Lys His-541-Gln Asp-573-Glu Arg-881-His Lau-692-Pro Ala-209-Val Asp-573-Glu Lau-692-Pro
C12187	2	99.6	J013066F17	AK066386	CER1-like protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T02536)	B Tyr-367-Ile
C12409	2	157.9	J033050K07	AK101576	oligopeptidase A-like protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T49885)	B Lau-82-Phe
R1862	3	49.3	001-033-H05	AK060813	probable pre-mRNA splicing factor RNA helicase - <i>Arabidopsis thaliana</i> (H84912)	B Met-166-Thr
C1272	6	13.5	J023022E12	AK069490	probable receptor protein kinase F14G9.24 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (G96602)	B Ile-506-Met Arg-607-His Val-633-Ala Leu-635-His
C1467	7	73.2	001-036-C07	AK105037	GOS2 protein - rice (S21636)	B Lys-93-Arg
R80	8	73.2	J013058G09	AK066237	beta-1,3-glucanase homolog F10M23.170 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (T04806)	B Gly-345Arg
C148	10	17.9	J023031K22	AK069792	protein integral membrane protein F25P22.12 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (B96764)	B Asp-329-Gly Ala-374-Ser

* PIR ACCESSION was in parenthesis.

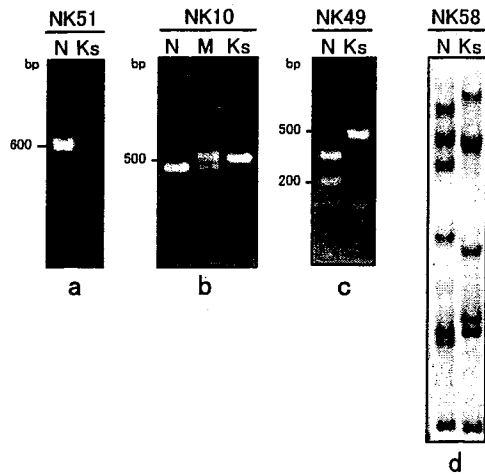


Figure 3. DNA polymorphism of SCAR, CAPS, and PRS markers between 'Nipponbare' (N) and 'Koshihikari' (Ks). a: a dominant SCAR marker; b: a codominant SCAR marker; c: a CAPS marker; d: a PRS marker. M: DNA mixture of 'Nipponbare' and 'Koshihikari' (1:1)

Table 4. Number of different alleles between rice cultivars identified by PCR markers derived from AFLP analysis

	Nipponbare	Koshihikari	Kokoromachi	Tohoku 168	Akihikari	Hitomebore	Kirara 397	Sasanishiki	Taichung 65
Koshihikari	46								
Kokoromachi	33	22							
Tohoku 168	43	29	41						
Akihikari	37	34	26	19					
Hitomebore	41	7	19	30	27				
Kirara 397	36	19	28	34	34	14			
Sasanishiki	29	29	21	26	21	24	34		
Taichung 65	29	39	36	26	28	32	32	33	
Senshou	38	35	34	40	35	32	29	38	34

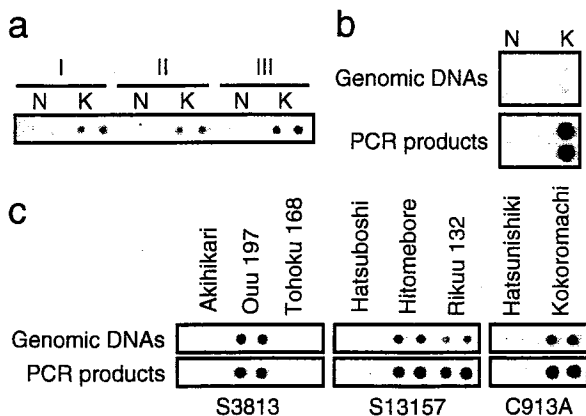


Figure 6. Dot-blot analysis of rice genomic DNA and PCR-amplified DNA

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.

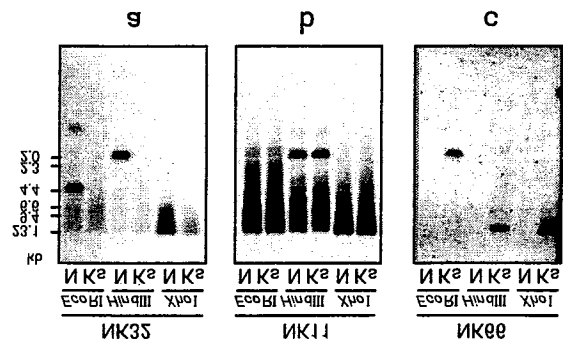


Figure 4. Southern-blot analysis of the genomic DNA of 'Nipponbare' (N) and 'Koshihikari' (Ks) using dominant SCAR markers and a 'Koshihikari'-specific sequence as probes. a: a probe of a dominant SCAR marker from 'Nipponbare' (NK32) which detected a single DNA fragment of 'Nipponbare'. b: a probe of 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'.

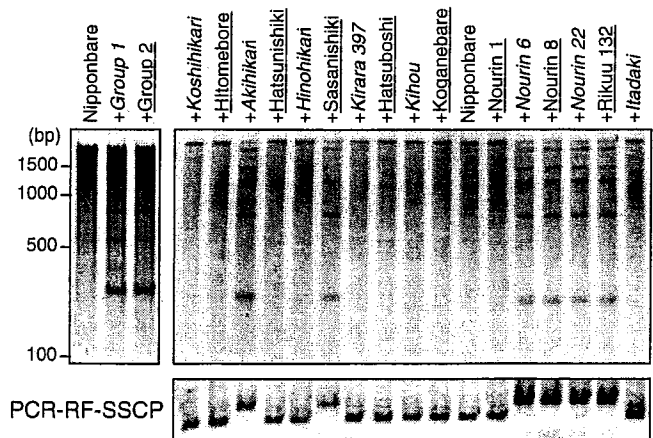


Figure 5. SNPs analysis by mismatch cleavage of bulked samples (Group 1, 2), which contained Nipponbare and the cultivars indicated in italics and by underline in right picture, respectively, and Nipponbare (left). The same analysis of each cultivars (right). SNPs analysis by PCR-RF-SSCP of each cultivars (down).

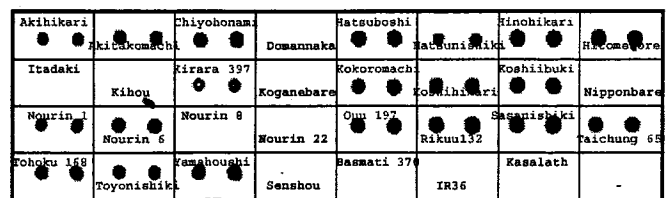


Figure 7. Dot-blot analysis of 31 rice cultivars using the NK68 probe.

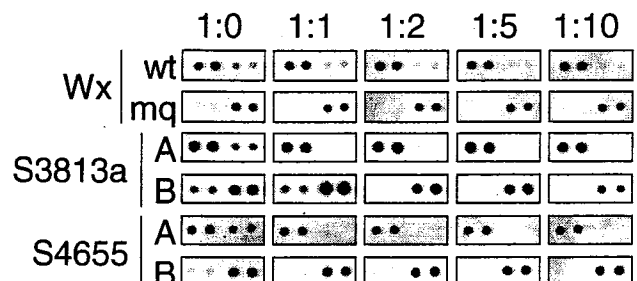


Figure 8. Effect of competitive hybridization on background signals in dot-blot-SNP analysis.

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 tenfold amounts of competitive oligonucleotides reduced the background signals, and clear allele-specific signals were detected.

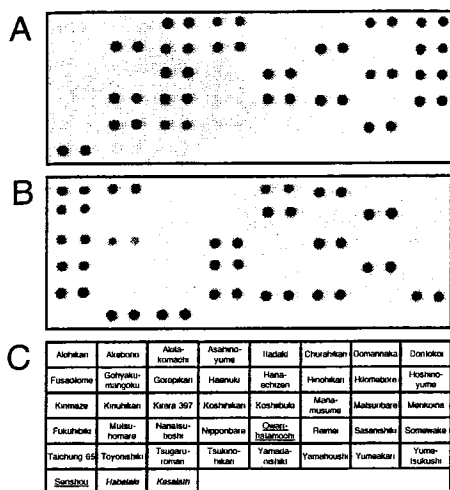


Figure 9. Dot-blot-SNP analysis of 43 rice cultivars. The probe was S1974S of mutant allele (A) and Nipponbare allele (B). The cultivars indicated by underline were upland varieties and those in italics were *indica* cultivars (C).

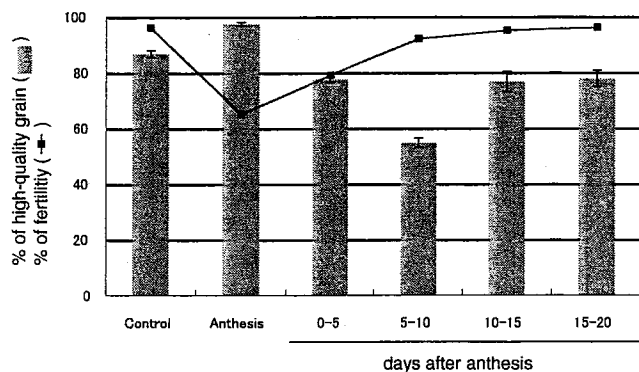


Figure 11. Percentages of high-quality grain (bar) and fertility (line) after the high-temperature stress treatment.

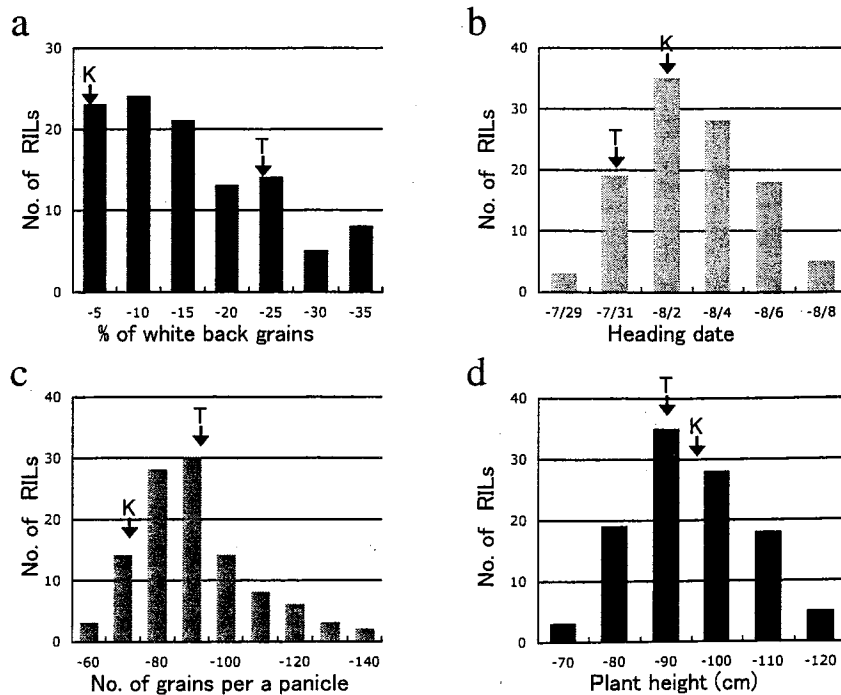


Figure 12. Histograms for heat sensitivity (a), heading date (b), grain number (c) and plant height (d) of the recombinant inbred lines derived from a cross of Tohoku 168 and Kokoromachi. K and T indicate the values of Kokoromachi and Tohoku 168, respectively.

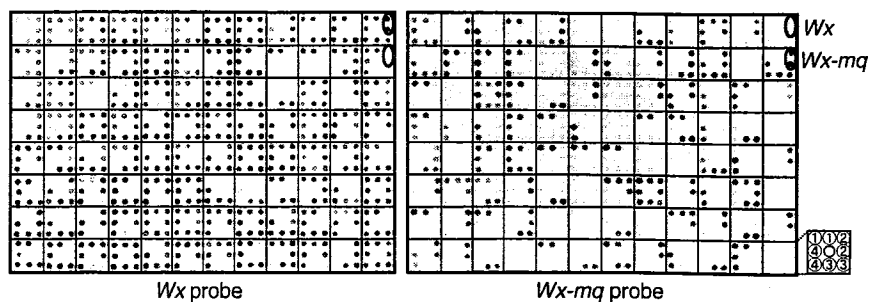


Figure 10. Dot-blot-SNP analysis of the *Wx* alleles in F_4 plants of a crossbreeding program. Two dots were blotted for each plant as shown in the picture at the right. PCR products of 'Koshihikari' (K) having *Wx* and 'Milky Queen' (M) having *Wx-mq* were blotted as positive and negative controls at 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).

Table 5. QTL analyses of heat sensitivity, plant height, heading date and grain number

Traits	The nearest marker	Chr.	LOD of peak	Additive effect*	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
	KT19	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

*Additive effect of the Kokoromachi allele.

論文審査結果要旨

イネのゲノムの全塩基配列が解読され、その情報を利用した実用的な成果が求められており、その中で最も期待されるのが解明された遺伝子情報を利用した有用品種の育成である。しかし、育種の場面で重視される農業特性に関わる遺伝子の解明はあまり進んでいない。このような遺伝子の解明には、各品種の特性（品種間差）を決定している遺伝子の解析がなされる必要がある。本研究は、日本型イネ品種間の DNA 多型の探索と簡易 DNA 多型検出技術の開発を行い、それを登熟期高温耐性の QTL 解析に利用しようとしたものである。

作付け面積が大きい日本型品種 17、インド型品種 3、陸稲品種 1 を材料とし、一塩基多型 (SNP) を効率良く検出できる PCR-RF-SSCP 法を用いて、約 2kb の 1710 遺伝子断片の多型を分析し、日本型品種間では平均 83 遺伝子で、日印間では平均 1164 遺伝子で多型を検出した。日本型品種間で多型が見られた 45 遺伝子について塩基配列を決定し、142 の SNP を同定し、遺伝子機能に影響しうる変異を明らかにした。

AFLP 法は 2 系統間の多数の DNA 多型を検出する方法として優れているが、操作が煩雑であるため、多数試料の分析には適さない。ゲノム情報を利用することにより、AFLP マーカー全てを PCR マーカー (SCAR, CAPS, 及び PCR-RF-SSCP マーカー) に変換できることを明らかにし、日本晴とコシヒカリ間で多型を検出できる PCR マーカーを多数作成した。

SNP 分析法はほぼ全ての遺伝的変異の検出を可能とすることから、DNA 多型分析法として期待されているが、これまで開発された方法の多くは、経費がかかるあるいは操作が煩雑であったので、新たな方法の開発を行った。イネの挿入配列の検出を、ドットプロット法により多数の試料で一度に分析できることを見出した。この方法を改良し、SNP が検出できる方法を開発した結果、供試した日本型品種間の 100 の SNP を全て判別できた。この方法は、極めて低コストで多数試料を扱えるため、育種における個体の選抜に利用できることを示した。

本研究で作成した日本型品種の DNA 多型を検出できる SCAR, CAPS, PCR-RF-SSCP, 及び SNP マーカーを利用し、近年米の生産上大きな問題となっている登熟期の高温障害に対して耐性の QTL 解析を行った。登熟期高温障害感受性の品種と登熟期高温耐性の品種、及びその雑種後代を用い、高温ストレス処理を行い、障害によって生じる背白米の率を調査し、DNA 多型分析を行って、高温耐性に関わる QTL を第 6 染色体の Wx 遺伝子の近傍に見出した。

以上のように本研究は、日本型イネ品種の DNA 多型を多数同定し、その簡易分析法を開発することによって日本型品種の品種間差に関わる QTL を解析可能とするとともに、育種現場で利用できる SNP 分析法を開発し、将来のゲノム情報を利用した育種技術の発展に貢献したと考えられることから、審査員一同は本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。