

ささき かずひろ

氏名（本籍地）	佐々木 和浩
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第128号
学位授与年月日	平成20年3月25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	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	イネ（ <i>Oryza sativa</i> L.）種子寿命の多様性を支配する遺伝子に関する研究
博士論文審査委員	（主査）准教授 佐藤 雅志 教授 高橋 秀幸 准教授 菅野 明 教授 東谷 篤志

論文内容の要旨

開花そして受精後、形成された植物の種子は、休眠期間を経て環境が整えば発芽出来る状態になる。環境が整わない条件下に置かれた種子は、期間が長くなるに伴い老化が進行し、その生命力を失う。種子寿命とは、種子形成の後、発芽活性を維持し次世代を産出可能な期間である。種子寿命には、種間や種内系統間において多様性が認められている。

栽培イネ (*Oryza sativa* L.) の種子寿命は遺伝的多様性に富んでおり、熱帯地域に栽培されてきたインド型イネは、温帯や比較的高い地域で栽培されてきた日本型イネに比べて、種子寿命が長いことが報告されている (Miura et al. 2003)。種子寿命の多様性に関わる遺伝子は、シロイヌナズナとイネを材料とした連鎖解析により、座乗する染色体領域が明らかにされている (Bentsink et al. 2000; Miura et al. 2002; Clerks et al. 2004)。しかし、イネ種子寿命に関わる遺伝子は単離されておらず、生理要因も明らかにされていない。本研究では、栽培イネにおける種子寿命の多様性を支配する遺伝子の特定および機能の解析を目的とした。さらに、栽培イネのコアコレクションを用いて、種子寿命の多様性に認められる種内分化への候補遺伝子の寄与に関して考察した。

1. 種子寿命の多様性を支配する遺伝子座の連鎖解析

種子寿命が長いインド型イネ“密陽 23 号”と種子寿命が短い日本型イネ“アキヒカリ”との組換え近交系統 (recombinant inbred lines: RILs) 191 系統を用いて、種子寿命の多様性に関わる量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) を検出した。1 年から 5 年の間保存した RILs の種子寿命を評価し、24 個の種子寿命に関わる QTL を検出した (Table 1)。検出された QTL 領域は、第 5 および 7 染色体上に 1 領域ずつ (*qLG-5* および *qLG-7*)、第 9 染色体上に 2 領域 (*qLG-9-1* および *qLG-9-2*) であった。全ての QTL において密陽 23 号の対立遺伝子が種子寿命を延ばす働きがあった。複数年にわたって検出された *qLG-7*、*qLG-9-1* および *qLG-9-2* の効果を、アキヒカリを遺伝背景に持ち QTL を含む領域が密陽 23 号に置換している染色体部分置換系統 (substitution line: SL) を用いて確認した。

2. *qLG-9* の高精度連鎖解析

寄与率の大きい第 9 染色体の *qLG-9* の特定を目的として、日本晴と SL36 の交配 F2 集団 193 個体を用いて高精度連鎖地図を作成した。SL36 は *qLG-9* を含む領域が Kasalath に置換している系統であり、日本晴の発芽率が 0% まで低下した保存状況下においても、

80%以上の高い発芽率を維持しており、Kasalath 型の *qLG-9* が種子寿命を延ばすことを確認できた系統である。Advanced backcross QTL 解析の結果、R79 と R49 の間に QTL のピークが検出された。F3 に結実した種子の寿命を評価し、その表現型分離から F2 の表現型を決定し、高精度連鎖解析した。その結果、*qLG-9* は CAPSb から 0.3cM と CHPa12 から 0.3cM の間に位置づけることができた。CAPSb と CHPa12 の間の物理距離は約 30 Kbp であり、The Rice Annotation Project Database の遺伝子予測プログラムの結果、トレハロース合成系の遺伝子のトレハロース 6 リン酸脱リン酸化酵素をコードする遺伝子 (trehalose-6-phosphate phosphatase: TPP) と、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子 (Conserved hypothetical protein: CHP) の合計 2 つの遺伝子が予測された (Figure 1)。

3. *qLG-9* 候補領域の遺伝子発現解析

登熟期における予測された遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した結果、20 日から 40 日にかけて SL36 においてのみ CHP の発現が検出された (Figure 2)。CHP のゲノム領域には、転写開始点の異なる 2 つの cDNA が存在していたので、CHP1, CHP2 とし、それぞれに特異的なプライマーで RT-PCR を行い、CHP1 が発現している事確かめた。CHP1 についてゲノム領域の塩基配列、転写領域の塩基配列、アミノ酸配列を用いて相同性検索を行った結果、イネでは CHP2 と、コムギでは AL818839 と高い相同性があることが分かった。細胞内局在は細胞質に存在し、膜貫通タンパクではない可能性が示された。モチーフ予測プログラムの BLOCKS では、Protein of unknown function DUF81、15 Kir3.4 inward rectifier K⁺ channel signature、Photosystem II phosphoprotein、Ephrin receptor, ligand binding 51、S-adenosylmethionine synthetase、Late embryogenesis abundant protein 3 等が予測された。CHP1 が登熟後期に発現したことから、*qLG-9* が Kasalath 型の対立遺伝子に置換された SL 系統を用いて登熟時期の環境が種子寿命に与える影響を解析した。出穂から 35 日後以降に収穫した NIL の種子では、日本晴と比較して寿命が有意に長く、Kasalath 由来の *qLG-9* の効果が認められた。しかし、30 日目で収穫した種子では認められなかった。これは、出穂から 30 日以前の種子では CHP1 の蓄積が不十分であったため種子寿命に影響しなかったと考えられた。さらに、高温 (昼 32℃/夜 24℃) 環境下で登熟した SL の種子は、保存 1 ヶ月目から発芽率の低下が見られ、発芽が確認できなくなる 6 ヶ月目までの発芽率の推移に日本晴と有意な差が認められなかった。登熟時期の高温処理は、様々な遺伝子の発現を変動させるため、CHP1 も高温処理により発現が抑制された可能性が考えられる。

4. 世界の栽培イネコアコレクションを用いた候補領域における塩基多型の連鎖解析

世界の栽培イネコアコレクション (Kojima et al. 2005) から選抜した栽培イネ 24 品種を用いて、候補領域の塩基多型と種子寿命に関して、連鎖解析を行った。候補領域内の 7 つの多型と 2 つの近傍マーカーを調査し、日本晴型を Japonica type、Kasalath 型および密陽 23 号型を Indica type として解析した。その結果、4 マーカーに有意な差が認められ、それらのなかでも CHPa12 では種子寿命の平均値に差が大きく、*qLG-9* の原因多型に強く連鎖している可能性が示唆された (Figure 3)。

以上の研究結果から、種子寿命を支配する *qLG-9* の候補遺伝子は CHP1 であり、登熟期間に発現し種子寿命の延伸に寄与するタンパク質を蓄積している可能性が示唆された。また、*qLG-9* が他のイネ品種の種子寿命にも広く関与していることが示唆された。

Table 1. Location and effect of QTL for germination and normal seedling growth seeds.

Trait	Storage period	Chr.	Interval ^a	Position ^b (CM)	LOD	R ² ^c (%)	A ^d	
Germination	1 year	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	2.8	6.7	6.4	
	2 years	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	3.9	9.6	9.6	
	2 years	9	<u>XNpb40</u> / XNpb315	0.0	4.3	10.8	10.2	
	2 years	9	<u>XNpb317A</u> / XNpb160	47.4	5.3	12.5	10.9	
	3 years	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	3.3	8.5	6.2	
	3 years	7	<u>XNpb117</u> / NASL15	62.6	3.6	9.4	6.5	
	3 years	9	<u>XNpb40</u> / XNpb315	0.0	4.4	11.3	7.2	
	3 years	9	<u>XNpb401</u> / XNpb385	53.4	5.4	12.8	7.6	
	3 years	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	5.1	11.9	12.9	
	3 years	9	<u>XNpb40</u> / XNpb315	0.0	4.7	14.6	14.3	
	3 years	9	<u>XNpb103</u> / XNpb160	45.2	7.7	20.6	17.0	
	4 years	7	C507 / XNpb379	77.9	2.7	6.3	2.5	
	4 years	9	<u>XNpb160</u> / XNpb317A	47.4	2.9	6.7	2.5	
	5 years	5	C128 / XNpb255	47.5	2.9	6.9	4.1	
	5 years	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	2.5	6.8	4.1	
	5 years	9	<u>XNpb401</u> / XNpb385	53.4	5.5	12.7	5.5	
	Normal Seedling	2 years	7	<u>XNpb33</u> / XNpb91	46.7	4.7	11.2	7.9
		2 years	9	<u>XNpb40</u> / XNpb315	0.0	4.7	11.8	8.1
		2 years	9	R1164 / <u>XNpb103</u>	38.6	5.4	17.3	9.8
		3 years	9	<u>XNpb401</u> / XNpb385	53.4	3.6	8.5	3.0
3 years		7	C451 / XNpb117	59.1	4.6	12.7	12.9	
3 years		9	<u>XNpb40</u> / XNpb315	0.0	4.7	12.0	12.5	
3 years		9	<u>XNpb317A</u> / XNpb401	47.3	9.2	20.8	21.3	
4 years		7	C507 / XNpb379	77.9	1.9	4.4	0.4	

^a The nearest RFLP marker to the QTL is underlined

^b Distance from the terminal of short arm chromosome

^c Proportion of the phenotypic variability explained by the nearest marker of QTL.

^d Additive effect of the allele from Milyang23 compared with Akihikari.

* Putative QTLs with significant LOD scores on 1,000 permutations tests at the 5% level.

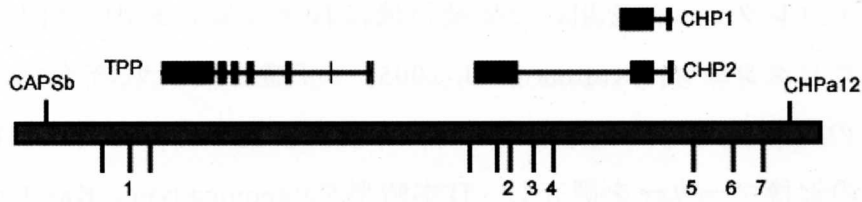


Figure 1. Predicted genes in candidate region of *qLG-9*.

Two genes predicted as trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) and conserved hypothetical protein (CHP). In CHP region, two cDNAs registered in KOME. Wide boxes in each gene indicate exon. Bars under predicted genes indicate polymorphisms between Nipponbare and Kasalath. I detected polymorphism among cultivars with numbered polymorphisms.

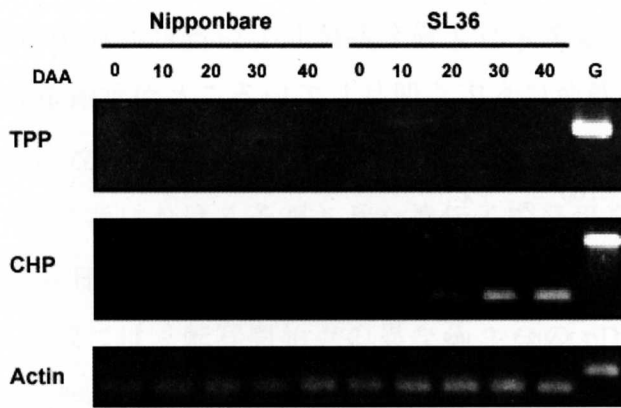


Figure 2. Predicted gene expression in candidate region of *qLG-9*

RT-PCR analysis using specific primer for each gene. On the top of lane, The numbers indicate day of sampling after anthesis (DAA). Nipponbare genome DNA was used in G lane.

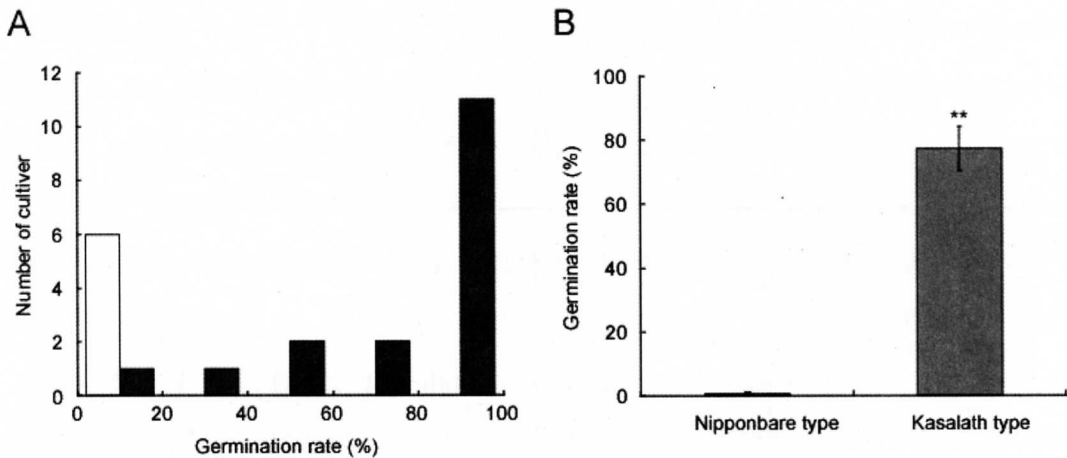


Figure 3. Association of CHPa12 polymorphism with seed longevity.

(A) Frequency distribution of seed longevity in 24 cultivars. White and black boxes indicate genotype of Nipponbare and Kasalath, respectively. (B) Statistical analysis of the association of seed longevity with genotype. The statistical difference was determined by Mann-Whitney's *U* test. Difference with $P < 0.05$ was considered significant

論文審査結果の要旨

イネは、その進化や育種の過程で様々な遺伝変異の集積と組み換えを繰り返すことによって、多様な環境下での栽培が可能な品種（遺伝子型）が形成されてきた。すなわち、イネ遺伝子型を形成する遺伝変異を明らかにすることは、様々な環境への適応に関わる遺伝生理機構を解明する一つの手段であるといえる。発芽活性を維持し次世代を産出可能な期間である種子寿命には、種間や種内系統間において多様性が認められている。熱帯地域に栽培されてきたイネは、温帯や比較的高い地域で栽培されてきたイネに比べて、種子寿命が長いことが報告されている。種子寿命の多様性に関わる遺伝子の座乗する染色体領域は、シロイヌナズナとイネで明らかにされているが、種子寿命に関わる遺伝子は単離されておらず、生理要因も明らかにされていない。

そのような背景のなかで、本学位申請者である佐々木和浩氏は、栽培イネにおける種子寿命の多様性を支配する遺伝子の検出、特定および機能の解析をおこない、種子寿命の多様性に関わる候補遺伝子の示唆に成功した。なかでも特筆すべき内容は、1) イネの種子寿命の多様性に関わる複数の量的形質遺伝子座(QTL; quantitative trait loci)を検出したこと、2) それらの中でも寄与率の高い第9染色体上の QTL に着目し、高精度連鎖解析により種子寿命の多様性に関わる遺伝子が座乗している染色体領域を物理距離で 30Kbp までに特定したこと、3) 遺伝子の発現解析および世界の栽培イネコアコレクションを用いた候補領域における塩基多型の解析により、この領域に座乗している機能未知の遺伝子が種子寿命の多様性を支配する候補遺伝子であることを示唆したことである。これらの研究成果は、イネの種子寿命に関わる遺伝生理機構の解明およびその育種学的応用に大きく貢献するとともに、分子レベルでの解明に発展させることで全ての植物における有用性を含めた可能性が示された。

これらのことは、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、佐々木和浩氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。