

イネ 4 倍体への放射線照射による
誘発突然変異に関する研究

福 岡 浩 之

①

イネ 4 倍体への放射線照射による誘発突然変異に関する研究

Studies on the mutation induced by γ -irradiation in tetraploids of rice(*Oryza sativa* L.)

農学研究科農業生物学専攻

平成元年度博士課程進学 福岡 浩之

指導教官 東京大学教授 武田 元吉

目 次

第1章 緒論	4
第2章 2倍体様復帰個体の獲得とその後代における 可視形質の変異の解析	7
2.1 緒言	7
2.2 2倍体様復帰個体の誘導	8
2.2.1 材料および方法	8
2.2.2 結果	8
2.3 2倍体様系統の可視形質における変異	9
2.3.1 材料および方法	9
2.3.2 結果	12
(1) Ty86I, II, III	12
(2) Ty87I	13
(3) Ty88I	15
(4) Ty86 α	15
(5) Ty87 α	24
2.4 核型観察	27
2.4.1 材料および方法	27
2.4.2 結果	28
2.5 考察	28
2.5.1 得られた変異系統の可視形質における変異	28
(1) Ty86I, II, III, Ty87I, Ty88I	28
(2) Ty86 α , Ty87 α	30
2.5.2 核型観察	32

第3章 RFLP分析による変異系統のゲノムの解析	————	34
3.1 緒言	————	34
3.2 ランダムゲノミッククローンによる RFLP 分析	————	35
3.2.1 材料および方法	————	35
(1) 供試系統	35	
(2) イネゲノミックDNAの抽出	35	
(3) プローブ断片のクローニング	38	
(4) RFLP 分析	40	
3.2.2 結果	————	40
3.3 単一コピー配列クローンによる RFLP 分析	————	45
3.3.1 材料および方法	————	45
(1) プローブ断片の由来及び調製	45	
(2) RFLP 分析	48	
3.3.2 結果	————	50
3.4 他の変異作出法による変異体の RFLP 分析	————	56
3.4.1 材料および方法	————	56
3.4.2 結果	————	58
3.5 考察	————	58
第4章 変異系統のゲノムにおける反復DNAの変異の解析	————	65
4.1 緒言	————	65
4.2 変異系統のゲノムにおける反復DNAのコピー数の変異	————	66
4.2.1 材料および方法	————	66
(1) 反復配列のクローニング	66	
(2) スロットハイブリダイゼーション	68	
4.2.2 結果	————	69

4. 3	変異系統のゲノムにおける反復DNAの RFLP 分析	74
4.3.1	材料および方法	74
4.3.2	結果	74
4. 4	変異系統のゲノムにおける rDNA の Intergenic spacer (IGS) 領域の構造変異の解析	74
4.4.1	材料および方法	76
4.4.2	結果	79
	(1) 制限酵素地図の作成	79
	(2) 変異 IGS 領域の塩基配列	79
4. 5	考察	90
第 5 章	変異系統の収量形質に関する変異様式の解析	97
5. 1	緒言	97
5. 2	材料および方法	98
5. 3	結果	98
5. 4	考察	104
第 6 章	総合考察	108
6. 1	変異誘発法	108
6. 2	変異系統のゲノム構造の変異	109
6. 3	4 倍体照射法による可視形質および農業形質における 変異誘発様式の多様性	112
摘要		114
引用文献		119
謝辞		127

第1章 緒論

近年、分子生物学の知見および技術はめざましい発展をとげており、高等植物においてもさまざまな遺伝子の構造や発現調節機構が、物質レベルに還元されて論じられるようになってきている。作物育種の分野においても細胞培養技術の発達とともに、目的形質に与する遺伝子をクローン化されたDNA断片の形で細胞に導入するという形質転換の利用が現実のものとなってきている(Gasser and Fraley, 1989)。しかし、この技術は種の壁を越えた遺伝子の導入が可能である半面、現在のところ少数の遺伝子によって発現する形質に限って有効であり、複雑に絡み合ったネットワーク構造を介して多数の遺伝子が関与していると考えられる多くの農業形質にこれを適用することは非常に困難であろうと思われる。

従来の突然変異育種は主に主動遺伝子の劣性突然変異を利用したものであり、着目する形質が少数の因子に支配されているという点では形質転換と共通点がある。しかもその多くが半矮性または熟性の突然変異利用で占められている(田中, 1983)ことから考えても、交雑育種法に比べ、必ずしも変異幅の拡大という点で有利であるとは言い難いのが現状であろう。

生物は生育過程を通して常にその生物種としての制約を受けており、この制約から逸脱した変異作出は不可能である。既存の育種法による変異幅の拡大に厳然とした限界があるのもこのためであると考えられる。この制約を打破するためにはその生物種が持つ遺伝的体制に何らかの方法で手を加え、これを再構築することが必要であろう。

生物は系統進化の過程を通して多くのゲノムの再配列を受けてきたと推定されている(Rumper and Dutrillaux, 1981)。ゲノムの再配列がどのように種分化に影響したかについ

てはさまざまな解釈があるが、染色体の構造変化によって生殖隔離が生じること (King, 1987)、遺伝因子の混合による遺伝背景の多彩なコンビネーションが生じること (Dutrillaux and Rumper, 1987)、遺伝子発現の調節機構の再構築 (Britten and Davidson, 1969; Wilson *et al.*, 1974; 1975) などが要因となって種の分化が生じたと考えられており、ゲノムの再配列と遺伝的体制の変更とが密接に関係していることが示唆されている。

オオノ(1977)は、遺伝子重複により生じた余分なコピーのみが淘汰圧からのがれて変異を蓄積することができ、これが新しい機能を持った遺伝子を作り出すための唯一の方法であるとして、進化における遺伝子重複の重要性を主張した。ここから示唆されるように、既存のネットワークシステムの機能を保持したままその構造を再構築するためには、そこに冗長性を与えることが不可欠であると考えられる。系統進化と核DNA量の変化と結び付け、体制が複雑化する際にはDNA量の飛躍的増加が起り、この体制のなかでの進化ではその冗長なシステムを再整理しつつDNA量が漸減してきた(Hinegardner, 1976; Nagato, 1988)と推定されていることも遺伝的体制の大幅な変化における遺伝的冗長性の重要性を裏付けている。

1978年より東京大学農学部育種学研究室では山元皓二博士を中心に、冗長性を持たせたゲノムの再配列(genome rearrangement)を通じた既存の遺伝子発現ネットワークの再構築をねらって、イネの同質4倍体に累代的に γ 線照射を行い、ゲノムの再配列を人為的に誘発することを試みていた。本研究は4倍体の累代照射による変異誘発法が形質やゲノム構造にどのような変異を誘発しうるのか、またこの方法が突然変異育種の新手法としてどのような特質を持つのかについての基礎的知見を得ることを目的とし、このような放射線処理後代より得られた2倍体様系統の形質の変異とゲノム構造の変異の解析を試みた。

まず第2章では得られた2倍体様系統の可視形質および核型の変異を検索し、その変異

の様相を概観した。第3章ではRFLP分析により、また第4章では反復DNAに着目して、変異系統のゲノムDNA構造を分子生物学的に解析し、ゲノムの変異の規模や機作を明らかにした。第5章では変異系統の収量形質を原品種と比較調査し、発育過程を通して働く遺伝子発現のネットワークの変異を調査した。以上を通し、4倍体の累代照射法と既存の変異誘発法との変異様式の相違を明らかにし、形質の変異幅拡大に関する育種手法としての有用性について考察を加えた。

第2章 2倍体様復帰個体の獲得とその後代における可視形質の変異の解析

2.1 緒言

本研究で用いた変異作出法のねらいは、ゲノムの再配列によって遺伝子発現ネットワークの再構築を伴った形質の大規模な変異を誘発することにある。しかし、一般にゲノムを構成する染色体の大幅な変異は生存能力の低下を伴い、特にイネのような2倍性の種においてはコムギ等の異質倍数性のものに比べ、その程度は著しい(渡辺、1982)。したがって、2倍体に直接放射線を照射して染色体異常を誘発した場合、照射個体は著しい生活力の減退や不稔性を示し、後代へ染色体の変異が伝えられる確率はかなり低いものになると予想される。異質倍数種が染色体変異をゲノム中に保持する能力が高い理由は同祖ゲノム間の相補作用によるものと考えられ、したがって2倍性作物において染色体の構造変異を保持しつつ生存可能な遺伝的体制の再構築を誘発するためにはまず遺伝的冗長性を作り出すことが必要であろう。

本研究の変異誘発過程の出発材料に同質4倍体を用いたことは以上のような理由に基づく。すなわち、同質4倍体の遺伝的冗長性を利用することによって、生物としての基本的な機能を保持させたまま遺伝システムの各部分を変更し、再構築することが可能になると考えたのである。

このような観点から、イネ人為4倍体を供試材料とし、その集団に変異誘発処理として累代的に放射線照射を行った。本章では、その過程で照射4倍体集団から復帰してきた2倍体様の形態と稔性を持つ個体を得、その後代の形態の変異および染色体の構成を調査して2倍体様復帰系統の遺伝的変異について考察した。

2. 2 2倍体様復帰個体の誘導

2. 2. 1 材料および方法

供試材料にはイネ(*Oryza sativa* L.)の品種日本晴を用いた。種子を水に浸漬後72時間から96時間まで0.05%のコルヒチンで処理し、同質4倍体を数個体育成した。そのうちの1個体から採種し、翌年増殖した後、その翌年より γ 線照射を開始した。東京大学原子力センター生物用照射装置を用い、播種後40日目の幼苗に対し ^{137}Cs - γ 線を照射した。照射線量は0.25KR、0.5KR、1.0KR、2.0KRの4処理とし、これらをそれぞれ2分間で照射した。照射した個体は慣行にしたがって栽培し、収穫期にはそれぞれの個体からなるべく稔性の良い穂を1穂ずつ採取した。そして、翌年も同様の方法で照射、栽培を行った。

なお、この方法による累代照射は東京大学農学部育種学研究室において1981年より開始されたものである。

2. 2. 2 結果

上記の方法により継代照射を繰り返してきたところ、1984年に1.0KR照射区より4倍体の形態を持ちながら稔性の良い1穂を持つ個体が得られた。その穂についた種子を翌1985年に播種し照射を行わずに栽培したところ、1個体だけ2倍体様の形態をしたものが現われた。また、同年、0.25KR照射区から2倍体様の形態を持ち稔性も正常に近い個体が2個体得られ、以後1986年に0.5KR照射区から、1987年には2.0KR照射区から、それぞれ1個体ずつ2倍体様の形態を持つ個体が分離してきた。

4倍体集団から分離してきたこれらの2倍体様個体5個体は、その復帰当代においてはどれもみな日本晴と形態的に類似しており、草丈が大きいことを除いて際立った変異は見られなかった。復帰当代の個体は穂ごとに1系統として翌年より栽培し維持した。

1つの2倍体様復帰個体に由来する系統の集団を系統群とし、各々の系統群は系統栽培を始めた年度によりTY86I、TY86II、TY86III、TY87I、TY88Iという記号で表す。TY86については、0.25KR照射区から得られた2系統群をIおよびII、1.0KR照射区より得られた1系統群をIIIとした。加えて、1986年にTY86IIを展開中、ふ先が赤く草丈の高い1個体が分離したが、この後代からなる系統群をTY86 α 、またこれを翌年展開中の集団からさらに分離した、ごく稔実不良の1個体の後代集団をTY87 α という記号で表す。TY87 α は分離当代の個体の稔実率が非常に悪かったので穂ごとに系統とせず、次代をまとめて1つの集団とし、その各個体の後代をそれぞれ系統とした。

以上のような経緯で人為4倍体集団の γ 線照射により7つの2倍体様系統群を得た。図2-1にその概略を示す。

2. 3 2倍体様系統の可視形質における変異

2. 3. 1 材料および方法

系統群TY86I、II、III、TY87I、TY88Iの5系統群の形質について日本晴と比較調査した。4倍体集団から出現した復帰個体は分離の翌年、実験用コンクリート水田に1穂を1系統として栽培した。その年の秋に形質を調査し、日本晴から変異していると思われる系統は、翌年東京大学附属多摩農場で供試個体数を増やして追試験した。TY86I、II、IIIに属する系統については、コンクリート水田における調査、および多摩農場における追試に加え、3年目には環境条件が均一になるように1/5000aのポットで栽培し、調査した。

TY86 α はTY86IIをコンクリート水田で系統栽培中に特異な形質を伴って分離してきた1個体由来する系統群である。その個体の後代50個体をコンクリート水田に移植して栽培し、調査した。そしてその翌年、個体ごとに1系統として多摩農場で栽培し、形質の分

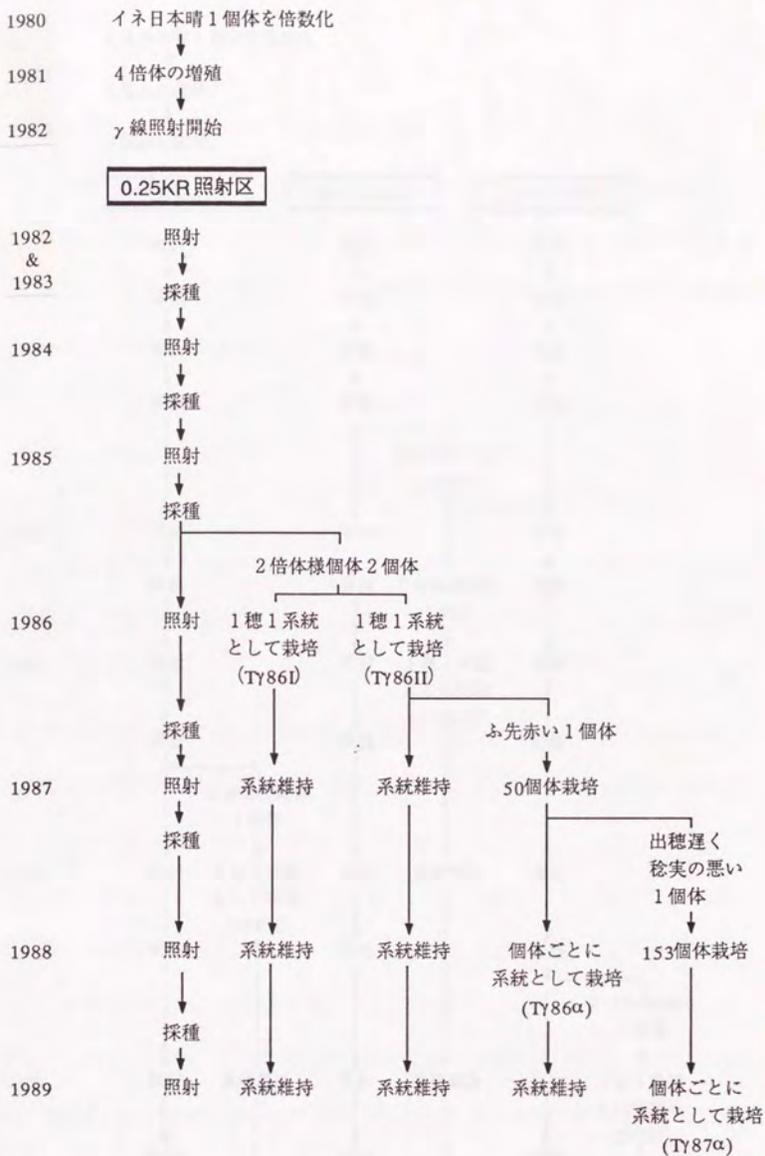


図 2-1 2 倍体様系統の系譜

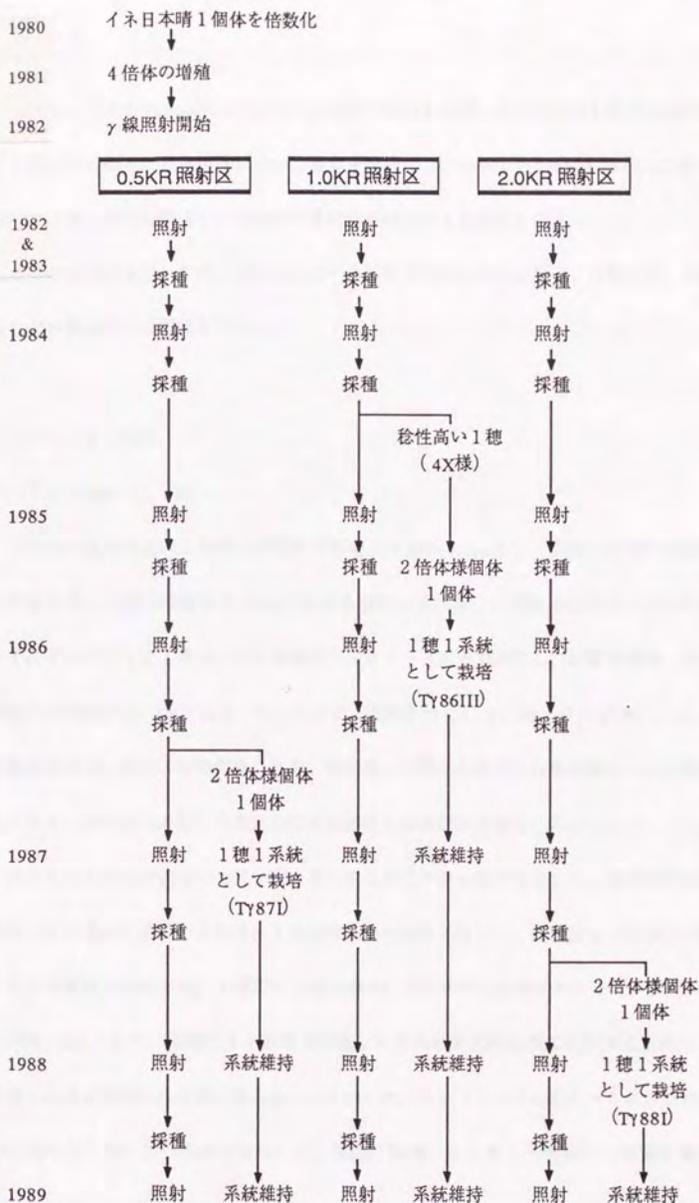


図 2-1 (続き)

離を調べた。

TY87αは前述のTY86αをコンクリート水田で栽培した際、さらに分離した1個体由来する個体群である。この個体について粒を全粒播種し、153の後代個体を得た。この153個体につき、形質を調査し、各個体の後代をそれぞれ1系統とした。

各々の栽培にあたっては、対照としてイネ品種日本晴を同時に用い、播種時期、施肥条件などの栽培条件は慣行に従った。

2. 3. 2 結果

(1) TY86I, II, III

これらの復帰当代の3個体は草丈が日本晴より10~15cm高く、穂数・粒数はTY86IIがやや少なく、1穂平均粒数は10ないし20%増加していることが認められた。この3個体をそれぞれ穂ごとに1系統として実験用コンクリート水田で栽培し、形質を調査した。復帰個体の穂数が17、13、19本であったので、系統群TY86I、II、IIIはそれぞれ17、13、19系統からなる。草丈、平均穂長、茎数、百粒重、1穂平均粒数、粒着密度について調査したところ、日本晴との間に有意差を示す形質をもつ系統が認められた。

認められた変異が安定に次代以降も遺伝するかどうかを確かめるため、各系統群から5系統、計15系統を選び、各反復に2系統相当の日本晴を加えた、17区画×3反復のブロックを多摩農場で栽培した。1区画は1列20個体、6列の計120個体からなり、株間15cm、列間30cmとした。環境による影響を考慮して各系統を試験区内に無作為に配列し、日本晴2区画は試験区の片側に偏らないようにした。サンプリングにあたっては、それぞれの区画の中央部から21個体を採取して、穂数、穂重、百粒重、一穂重の4形質を調査した。

日本晴との比較調査の結果、15系統のそれぞれが前年度の調査において有意差を示した形質、およびその変異の方向性は保存されていないことが明らかになった。たとえば、TY86III系統群からは百粒重が有意な増加を示した系統を選んだが、翌年はすべての系統が負方向に有意差を示した。また、その他にも有意差を示していた系統の差異が消失したり、有意差のなかった系統に有意差が現われたしていた。

2回の調査で安定した変異が認められなかったので、88年度はさらに系統数を限って、ポット栽培による調査を行なった。1/5000aのワグナーポットに1個体ずつ、各系統10個体を栽培した。各個体間は50cmほど開け、個体間の相互作用をできるだけ排除するよう努めた。このポット栽培による結果とあわせ、計3回の検定結果を表2-1に示す。

ポット栽培の結果、原品種と有意差のある形質は供試したすべての系統において認められず、結局3回の調査を通じて同じ変異を示した系統および形質は見いだされなかった。

(2) TY87I

この系統群の復帰当代個体は、13本の完全な穂をもっていた。これを1穂1系統として、1年目は実験用コンクリート水田で、2年目は多摩農場でそれぞれ栽培し、その形質を調査した。供試個体は2回の調査とも10個体ほどであるが、1年目は1列7個体として1系統2列を割り当て、ボーダーの4個体以外をすべて供試した。一方、2年目は1列40個体で1系統あたり3列とし、中央部から10個体をサンプリングして調査した。

87年の調査においては13系統中12系統で草丈がおよそ5cm程有意に大きく、また、穂数も7系統において有意に多いことが認められた。しかし、88年の調査では草丈について有意差を示す系統数は4系統と前年の1/3に減り、かつ、そのうちの1系統は前年に有意差を示さなかった系統であった。有意差を示した系統TY87I-4、9、12、13においては、その値は日本晴に比べ約3~5cm大きい。また、穂数にみられた正の有意差は2年目の調

表2-1 Ty86I、II、III系統群の諸形質

系統 調査年度	供試個体数			草丈(cm)		穂数			百粒重(g)		全穂重(g)		一穂平均重(g)	
	86	87	88	86	88	86	87	88	86	87	87	88	87	88
Ty86I-4	16	63	nt	98.1	nt	5.8	10.8	nt	1.88 ⁻	2.13 ⁻	26.1	nt	2.43	nt
6	16	63	nt	97.7	nt	5.2	11.2	nt	1.92	2.08 ⁻	27.5	nt	2.45	nt
9	16	63	nt	99.6	nt	5.3	11.4	nt	1.95	2.08 ⁻	29.4	nt	2.60	nt
13	15	63	nt	98.2	nt	7.1 ⁺	10.8	nt	1.93	2.14	26.3	nt	2.44	nt
15	16	63	nt	95.8	nt	8.4 ⁺	11.4	nt	2.01 ⁺	2.12	28.0	nt	2.44	nt
Ty86II-1	15	63	nt	94.9	nt	5.3	10.9	nt	1.87 ⁻	2.13	27.0	nt	2.46	nt
4	15	62	8	93.9 ⁻	89.5	5.7	12.2 ⁺	11.5	1.84 ⁻	2.12	29.8 ⁺	28.0	2.46	2.44
5	11	62	9	92.5 ⁻	89.9	5.2	11.2	10.4	1.86 ⁻	2.07 ⁻	27.5	24.2	2.47	2.32
6	15	63	nt	94.0 ⁻	nt	5.1	11.8	nt	1.87 ⁻	2.08 ⁻	29.7	nt	2.53	nt
9	15	62	10	94.2 ⁻	88.5	4.5	11.4	11.3	1.87 ⁻	2.08 ⁻	29.1	28.6	2.57	2.54
Ty86III-15	12	63	8	99.7	89.0	7.3 ⁺	11.5	11.5	2.05 ⁺	2.11 ⁻	27.7	26.4	2.46	2.33
16	12	63	nt	98.2	nt	6.5	11.2	nt	2.01 ⁺	2.10 ⁻	27.7	nt	2.51	nt
17	16	62	nt	95.8 ⁻	nt	4.4	11.2	nt	2.02 ⁺	2.10 ⁻	26.4	nt	2.36 ⁻	nt
18	16	63	10	94.5	91.3	4.4	10.4	11.9	2.08 ⁺	2.06 ⁻	25.5	29.0	2.42	2.43
19	15	63	10	95.2 ⁻	90.5	6.4	11.4	11.3	2.08 ⁺	2.11	28.1	28.2	2.46	2.51
日本晴	46	126	10	98.1	90.7	5.3	10.5	12.9	1.95	2.17	26.2	29.2	2.50	2.33

* +は正方向、-は負方向に日本晴と比較して有意差が認められたことを示す（有意水準1%）
nt : not tested.

査においては消失してしまった。

また、1年目の調査の際、この系統群に属する系統はいずれも若干止葉が長いように思われたが、2年目の調査時にはその特徴は認められなかった。

(3) TY 881

前述の4系統群と同様に、この系統群の復帰当代個体も1穂1系統として14系統を実験用コンクリート水田に栽培し、その形質を調査した。この系統群中2つの系統中に、それぞれ3個体および5個体、明らかに葉身や葉鞘の緑色が薄い個体が認められた。この特徴は生育とともに失われたが、栄養生長期を通して草勢がやや弱く、分けつも少なかった。これらの個体を除いた他の供試個体は系統の別なく均一な草姿を示し、系統間の差異はないと思われたため、はじめに系統として区別した各列の中央部から2個体、計27個体（1個体は欠株）をサンプリングして草丈および穂数を調査し、日本晴と比較した。その結果、草丈は日本晴の94.8cmに対して98.4cm、穂数は6.2本に対して6.5本と、どちらの形質においても日本晴との間に有意差は認められなかった。

幼苗期に葉の緑色が薄かった個体から採種した種子を翌年播種したところ、この形質が固定していることが確認された。そこで、そのうちの1個体の後代種子をその翌年、通常の栽培と同様に4月下旬に露地条件、および温室内、気温15℃の恒温条件にした自然光下の人工気象室内の3条件で栽培した。播種後2週間ほどの植物体を観察したところ、露地条件および人工気象室で栽培した幼苗は葉色が明らかに薄かったのに対し、温室内で育てた苗は対照の日本晴と全く同様の葉色を示した（図2-2）。これはこの変異が温度感受性のものであることを示唆している。

(4) TY 86α

前述した5つの系統群はいずれもほぼ日本晴と似た草型を示し、際立った変異は認めら

a



b



図2-2 Ty881から分離した低温感受性葉緑素欠乏突然変異体

- a. 温室で栽培したもの b. 露地栽培したもの（5月上旬）
 c. 自然光下、気温15℃の人工気象室で栽培したもの
 中央の2列は低温感受性葉緑素欠乏変異体系統。
 そのすぐ左の列は日本晴。その他はその形質について固定していない兄弟系統

C



図2-2 (続き)

れなかったが、この系統群Ty86αは形態的に著しい分離を示した。すでに2倍体様の形態に復帰したTy86IIの1年目の系統栽培集団中から分離した個体がこの系統群の由来であり、この点が前述の5系統群とは異なる。この個体からランダムに100粒ほど播種したところ、幼苗の第1葉基部が赤く着色している個体と無色の個体がほぼ1:1に分離した。図2-3に着色個体と非着色個体の幼苗期の形態を示す。着色個体と非着色個体を各々25個体ずつコンクリート水田に移植して栽培し、形質を調査した。なお、これら50個体のうち、幼苗期に非着色個体と判断したものをW1~W25、着色個体と判断したものをR1~R25という個体番号で表す。翌年それぞれの個体の後代を1系統として栽培した際にはこの番号をそのまま系統番号とした。

1年目に調査した50個体から、2、3で述べた出穂が1ヵ月以上遅く稔実率のきわめて低かったTy87αの親個体を除いた、計49個体について主に穀粒の形質に注目して調査した。

図2-4に49個体の玄米の粒長と粒幅を示す。粒長は個体により約4.6mmから5.6mmまで日本晴をはさんで正負両方向に変異しており、一方、粒幅は主に減少する方向に変異していることが認められる。粒長と粒幅との間に相関は認められない。粒形は個体群全体としては主に長幅比の大きい方向、すなわち細長い方に変異していることがわかる。玄米粒重は、粒形を測定したのと同じ粒を1粒ずつ測定し、その平均を算出した。その値は約24mgから16mgまで、対照の21mgと比較して主に減少する方向に変異していることが認められたが、同時に粒長×粒幅×粒厚の値と高い相関($r=0.91$)を示し、粒大の変異と平行していることが示唆された。粒形に関する形質の変異の著しいものの例を図2-5 aに示す。

その他、穀粒形質に関する変異として、ふ毛を欠くかあるいは極めて疎である個体(図2-5 b)、著しい脱粒性を呈する個体がそれぞれ15および2個体出現した。



図2-3 Ty86αに見られる幼苗の着色

左の個体と中央の個体とは着色の程度に違いが見られる。
右端の個体は日本晴

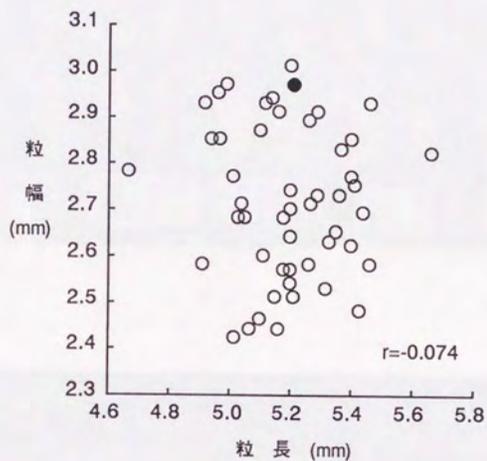


図2-4 Ty86α49個体の粒長と粒幅

●は日本晴の値を示す。各個体の値は10粒の平均値。

a



b



図2-5 Ty86αにおける変異

a. 粒形の変異 CONT: 日本晴.

b. ふ毛の変異. 左端は日本晴. 中央・右端は変異体

これらの形質が次代にどのように遺伝するか、その分離を調べるため各個体の後代を各々1系統としてそれぞれ約40個体を多摩農場で栽培した。粒形については、系統内で分離していると思われるものが大部分を占め、一部、ほぼ均一と思われる系統が散見されたが、個々の系統の粒形の計測、分析は供試個体数が多すぎて今回はできなかった。そのため後代の形質の分離は、脱粒性、ふ先色、およびふ毛の有無について調査した。

脱粒性およびふ毛を欠く形質に関する遺伝子は、脱粒性は sh 、無毛は $gl-1$ および $gl-2$ という劣性の遺伝子が報告されており、それぞれ第8、第6+9、第4連鎖群に分類されている(Kinoshita 1987)。ここで得られた変異がこの遺伝子の突然変異であると仮定すると優性形質を表現型にもつ親の後代は3:1あるいは1:0に分離すると期待される。親が劣性の表現型の場合、後代の分離は0:1のみである。ふ先色は色原素とその発色を支配するアクティベーターの共存(それぞれ、第1連鎖群に属する C および第3連鎖群に属する A という優性因子の支配を受ける)下において発現する形質である(高橋 1963)。これをそのまま適用すると優性の表現型の親の後代は1:0、3:1、9:7のいずれかの分離比を示し、劣性形質をもつ親からは劣性の表現型をもつ後代のみが出現すると期待される。観察された分離比を χ^2 検定したところ、期待された分離比から大きく外れた比を示す形質をもった系統が現われた。また、赤い着色の程度が2年目の栽培の際に著しく増加した系統が散見され、類全体が紫色を呈するもの、葉鞘の上部まで濃く色づくものが認められた。加えて、脱粒性、ふ毛の分離についてもいくつかの系統で上述の仮定に適合しない分離が認められた。これらの形質の分離を表2-2に示す。

草丈については、分散が日本晴と比べて有意差を示さず、ほぼ固定していると思われる系統が13系統見いだされた。そのうち有意差を示した9系統の平均値は対照の98.0cmに対し、87.1cmから112.1cmの幅に分布していた。また、それぞれの系統の親個体の草丈と、

表 2-2 系統群Ty86αにおける形質の分離

系統	脱粒性		ふ先色		ふ毛		
	親個体の形質	非脱粒性：脱粒性	親個体の形質	着色：無色	親個体の形質	有：無	
W	1	-	26:15	-	0:41	+	30:11
	2	-	0:37	-	1:36	+	30:7
	3	-	0:37	-	26:13	+	39:0
	4	-	19:21	-	0:40	+	0:40
	5	-	0:41	-	0:41	+	39:2
	6	-	39:0	+	32:7	+	39:0
	7	-	8:28	-	1:35	+	29:7
	8	-	28:9	-	21:16	+	9:28
	9	-	29:10	-	2:37	+	39:0
	10	-	9:29	-	4:34	+	33:5
	11	-	18:19	-	12:25	+	31:6
	12	-	24:17	-	2:39	-	0:41
	13	-	13:24	-	0:37	+	36:1
	14	-	38:0	+	30:8	+	27:11
	15	-	12:23	+	27:8	+	30:5
	17	-	8:30	-	17:21	+	31:7
	18	-	33:6	-	23:16	+	8:31
	19	-	24:9	-	21:12	+	29:4
	20	-	5:36	-	0:41	+	24:17
	21	-	2:38	-	0:40	-	0:40
	22	-	26:14	-	12:28	+	36:4
	23	-	0:39	-	35:4	+	23:16
	24	-	7:32	+	39:0	+	28:11
	R	1	-	24:14	+	33:5	+
2		+	1:39	+	39:1	+	39:1
3		-	0:36	-	22:14	+	36:0
4		-	20:12	+	27:5	+	24:8
5		-	0:40	+	30:10	+	40:0
6		-	0:40	+	38:2	+	36:4
7		-	29:11	+	40:0	+	40:0
8		-	25:15	+	27:13	+	40:0
9		-	4:34	+	38:0	+	32:6
10		-	14:26	+	32:8	+	0:40
11		-	29:1	+	30:0	+	0:30
12		-	2:28	+	25:5	+	30:0
13		-	20:19	+	39:0	-	0:39
14		-	7:33	+	40:0	+	8:32
15		-	0:40	+	40:0	+	40:0
16		-	1:39	+	36:4	+	40:0
17		-	25:9	-	25:9	+	24:10
18		+	0:39	+	28:11	+	30:9
19		-	0:29	+	29:0	+	29:0
20		-	20:18	+	22:16	+	25:13
21		-	15:25	+	24:16	+	0:40
22		-	20:11	+	30:1	+	25:6
23		-	0:30	+	23:7	+	26:4
24		-	8:23	+	20:11	+	22:9
25		-	31:8	+	30:9	+	26:13:

+は脱粒性、ふ先着色、ふ毛が認められたことを、-は認められなかったことを示す。

系統の平均値との間には図2-6に示すとおり有意な相関が認められ、草丈について変異を固定し得ることが示唆された。

(5) Ty87α

この個体群の親個体は、系統群Ty86α育成のため栽培した50個体中からさらに分離してきたものである。この個体は草丈116cm、茎数21本と非常に旺盛な草型を示し、葉鞘の上部や葉身の先端、柱頭にも赤い着色が認められ、柱頭が開花時に穎の外に露出するという形質をもっていた。この個体についた粒を、全粒穂別に1系統として栽培したが、草姿に著しい分離を生じ、系統内での共通性が全く認められなかったため穂別系統にする意味がないと判断し、得られた153個体を1つの個体群として扱うことにした。

この個体群は他の6つの系統群と草型が異常に分離しているという点で異なっている。草丈は59.2cmから132cm、茎数も3から24と広範囲に分布し、葉身の幅の広いもの、茎の太いもの、細いもの、止葉が極端に長いものなどが混在し非常に雑駁な遺伝構成を示唆している。分離した草型の例を図2-7に示す。加えて、これらの個体は脱粒性、ふ先色、ふ毛の有無といった形質についても分離を示していたが、その分離はすでに報告されている標識遺伝子に関する知見から期待される比に適合していると思われた。

また、この個体群は稔性についても分離を示し、ほぼ完全に不稔の個体から完全な稔性を持ったものまでが混在していた。翌年各個体の後代を系統とし、親個体がほぼ不稔であった系統、および稔性がおよそ30ないし50%であった系統について、穂ばらみ期以降温室で加温栽培したが、稔性の向上は見られず、稔性不良は出穂期の遅れによる低温条件のためだけによるものではないことが確かめられた。

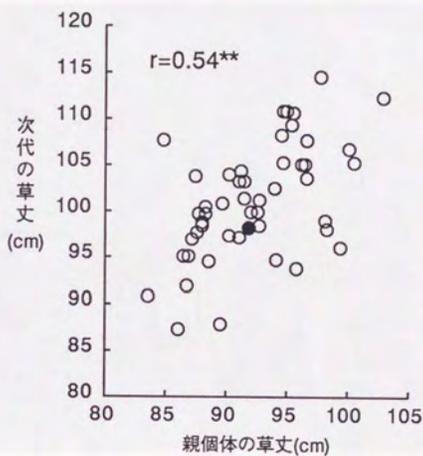


図 2-6 Ty86α系統とその親個体の草丈の相関
●は日本晴の値を示す。系統の草丈は平均値。



図 2-7 Ty87 α の草型の分離
右端の個体は日本晴

2. 4 核型観察

2. 4. 1 材料および方法

得られた2倍体様系統群のうち、系統内で形態的形質がほぼ固定していると思われるTy86I、II、III、Ty87I、Ty88Iについてはそれぞれから1系統を選んで供試した。用いる系統はTy86I-5、Ty86II-4、Ty86III-15、Ty87I-5、Ty88I-1とした。Ty86 α についてはW1、W5、W6の3系統を用い、88年の系統栽培で得られた個体のうち1個体についての粒のみを供試した。Ty87 α については88年に得られた153個体のうちから5個体を無作為に選んだ。

プレパラートは、Kurataら(1978)の方法を改変した以下のような手順で作成した。

供試個体の穂についた粒を27-28℃の人工気象器のなかで発芽させた。種子根が2-3 cmに伸長したとき、2 mM 8-hydroxyquinoline 溶液中に試料を浸して20℃で4時間前処理し、水洗後3:1エタノール-酢酸で30分固定した。その後固定液を換えてパラフィルムで密封し、4℃で1晩以上保存した。固定された試料を水洗し、種子根を1 cmほどに切って、1N-HClでpH4.0に調整した酵素液(4%セルラーゼOnozuka RS、1%ベクトリアーゼY-23、7.5mM KCl、7.5mM Na-EDTA)中で40分処理した。細胞壁の消化された根端約1 mmをスライドグラスにのせ、固定液を1滴滴下してピンセットで組織を磨砕し、細胞をスライドグラス上に広げた。そのまま風乾し、焔火乾燥は行なわなかった。このようにして作成したプレパラートはデシケーター内で保存し、染色にはギムザ法より微細構造の解析に適していると報告のある(Fukui 1982)、1.5%酢酸オルセイン(Sigma社製)を用いた。

2. 4. 2 結果

供試した個体の根端細胞における染色体数はいずれも24であり、異数性、倍数性は認められなかった。

個々の染色体構造の変化を解析しようと試みたが、技術的な問題により満足すべき結果は得られなかった。2次狭窄および付随体の部位は例外的に容易に判別できる部位であるが、TY87 α -79では付随体が2個縦列しているような染色体像が得られた。その様子を図2-8に示す。姉妹染色分体のそれぞれの付随体および2次狭窄部位が昆虫の触角のように2本に分かれて並列している染色体像はときおり系統を限らず散見されるが、このように縦列したものはこの個体に特徴的である。この構造は同じプレバラート中に複数個みられ、アーティファクトではないものと思われる。この染色体像により付随体および2次狭窄部位の重複が示唆される。

2. 5 考察

2. 5. 1 得られた変異系統の可視形質における変異

(1) TY86I, II, III, TY87I, TY88I

TY86I, II, III, TY87I, TY88Iの5系統群について、日本晴と比較してその形態的な特徴を調べたところ、ほぼ対照と同じであるという結果が得られた。統計的な解析からは有意差があると認められた系統もそれぞれの系統群中に散見されたが、複数回の調査を通じて同じ変異を呈した系統は、TY87Iに属する草丈に正の変異を示す3系統(TY87I-4,12,13)のみであった。現品種との間に有意差がない、あるいは調査年次によって結果が振れてしまうという結果におわった系統は、計測した形質についてはほとんど日本晴と違いがないといってよいのではないと思われる。



図 2-8 T γ 87 α -79の核型
矢印は付随体の構造変異部位を示す。

しかし、これらの系統群がすべて日本晴と全く同じ遺伝背景を持つものであるということとはできない。実験用コンクリート水田におけるTy87Iの調査で観察された草丈および穂数の有意差は多摩農場における追試では多くが失われてしまったが、これは日本晴の値が変異系統に比べて大きく上昇したことによるところが大きい。実験用コンクリート水田における栽培ではTy87Iは対照より明らかに旺盛な成長を示した。一般に多摩農場において栽培した植物体は実験用コンクリート水田において栽培されたものに比べ旺盛な生育状態を呈することから、コンクリート水田における栽培は多摩農場における栽培に比べ、土壌の状態、栽植密度等の点で植物体にとってストレスが多いと考えられる。このような条件をなんらかの形で緩衝する能力がTy87Iに付与されていることも考えられる。このような環境条件に対する反応性の変異についても今後調査することにより新しい変異形質が認められる可能性は残されている。

また、Ty88Iからは低温感受性の葉緑素欠乏を呈する系統が得られた。イネにおける温度感受性の葉緑素突然変異としては高温(35℃)栽培条件による葉緑素欠乏の報告があるが(矢頭、1991)、今回得られたものはこれと逆に低温感受性のものである。この形質は穂別系統にしたTy88I後代系統において系統内で分離を呈したため、おそらく核ゲノム上に座乗する遺伝子によるものと考えられる。

(2) Ty86a、Ty87a

Ty86a、Ty87aは草丈、粒形、ふ先色、ふ毛、脱粒性などに著しい変異を示した。芒の長い系統も出現している。この系統群に見られる高い変異性は、この変異系統が大幅な遺伝的背景の変更を受けたことを示していると考えられる。また、これらの系統が一見原品種と比べあまり変異形質の認められないTy86IIの展開中に分離してきた個体由来することからは、形態上の変化が認められないことが必ずしも遺伝的背景に変更がないことを

示さないこと、および、その後の変異拡大の可能性を否定しないことがわかる。復帰当代個体に認められなかった着色、草型の変異などの変異形質を持つ個体が遅れて分離してきたのは、ゲノムが安定しておらず2倍性への復帰以降も遺伝子発現ネットワークが分化したためかもしれないし、相同染色体の組み換えにより特定の因子が集積したゲノムが構成されたことによるものかもしれない。

一方、これらの変異形質のうち、脱粒性、ふ先色、ふ毛について形質の分離様式を調査した結果、これらの形質が既存の連鎖地図上に報告のある標識遺伝子の変異のみでは説明できないことが示された。本章では2元分類したものの、脱粒性、ふ毛の有無についてはさまざまな程度の差異が認められ、たとえばふ毛に関してW8,W18,R14で+と判断したものはいずれも-にかなり近い中間型である。ふ先色についてはその分離様式からおそらく優性変異であろうと考えられるが、これも明らかに着色の色調に系統間および系統内ではらつきがある。また、親個体より明らかに着色の程度が甚だしくなり、着色する部位も広がった系統の存在も興味深い現象である。ひとつの可視形質が発現するには、現在までに遺伝分析が行われ記載された遺伝子以外の多くの遺伝子が関与していると考えられる。変異系統においてこれらの形質の分離様式が単純ではなかったことは、その発現過程にかかわる幾つかの因子もしくはそのネットワークの構造になんらかの変異が生じたことを意味するものと考えられる。

Ty86αおよび87αの着色形質に関してさらに検討しなければならないのは、どのような機構で優性形質であるふ先色をもつ最初の1個体がTy86IIから分離してきたかということであろう。4倍体から分離してきたTy86IIの復帰当代個体には着色が認められなかった。したがってこの個体では赤色を呈するメカニズムは働いていなかったことになる。その後代は13系統に穂別系統として栽培され、個体の総数は230個体であったが、そのなか

ら1個体だけが赤いふ先色と10cmほど高い草丈をもって分離してきたのである。この問題に関しては、一般的に4倍体集団から2倍体様個体が復帰する際の機構、および着色を及ぼすメカニズムが日本晴ではどのように抑制されていて、それがTy86 α 、87 α 系ではどのように発現されているかを知ることが不可欠であり、今後に残された重要な課題であると思われる。着色形質の標識遺伝子系統を用いた相補性検定も行って本変異系統における着色形質の発現機構の相異を明らかにする必要があると思われる。

また、有芒に関しては第2連鎖群に属する*An-1*をはじめ、いくつかの優性の主動遺伝子の記載がある。しかし、芒の長さおよび1本の穂のなかの芒を付けた穎花の頻度は計量形質的な変化をし、芒の有無、長短と穎花発育の穂内における順序は密接に関係している(高橋 1983)と報告されているように、この形質も多くの遺伝子に支配されている。また、4倍体は有芒になる傾向がある。したがって、Ty86 α 、87 α 系に有芒の系統が散見されることは、芒形成に関係する遺伝子系の部分的重複が起こり、Burnham(1956)が育種に取り入れることを提案している segmental tetrasomics のような遺伝子量効果が現われたことによる可能性を示唆している。

2. 5. 2 核型観察

今回の核型観察においては染色体数の確認および2次狭窄部位の変異と思われるものの検出に至ったのみであった。染色体数がどの系統においても通常の2倍体イネと同じ24本であったことは、期待されたような大幅なゲノム構造の再構築が少なくとも染色体の基本数レベルでは誘発できなかったことを示す。

イネの染色体はごく小さく、かつては核型分析は困難であった。Kurata *et al.*(1978)は、酵素処理および焰火乾燥により、それまで押しつぶし法では困難であった詳細な核型分析

を可能にし、また、この後を受けIwata *et al.*(1984)は三染色体植物や相互転座系統を用いた解析によって連鎖群と各染色体の対応を明らかにした。また、最近になって福井ら(1988)はイネ品種日本晴の前中期の染色体像の画像解析を行ない、かなり再現性のある核型分析に成功している。この方法によれば、かなりの熟練を要する染色体の識別・同定に客観性のある情報を得ることができると期待され、非常に有力な手法であると思われる。

本章の核型の観察においては技術的な制約により、変異系統のゲノム構造について非常に限られた情報しか得ることができず、今後試みるべき技術的項目は多岐にわたって残されている。

第3章 RFLP 分析による変異系統のゲノムの解析

3.1 緒言

DNAを制限酵素で切断したとき、特定の配列と相補的な断片の長さが個体間で異なることがある。これは、その断片長に関する制限酵素の認識部位に塩基置換が生じているか、もしくはその断片内の欠失、転移、挿入などによって生じる多型であり、これを制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) と呼ぶ。RFLPは染色体上のDNA断片の長さをひとつの形質としてとらえるものであるから、1座位における変異に数の制限がなく、染色体の全領域に存在し得ること、検出の際に生物体の age や部位の制限が少ないこと、安定に遺伝し、多くの場合共優性的に検出できることなど遺伝分析に利用する上で都合のいい原則的特徴を備えている。そのため、これを従来の標識遺伝子と同様に連鎖分析することにより詳細な染色体の連鎖地図を構築することが可能になる(Beckmann and Soller, 1986)。RFLP マーカーを利用した染色体地図はヒトの様々な遺伝病の解析に非常に重要な役割を演じた(White and Lalouel, 1988)が、近年ではイネ(McCouch *et al.*, 1988; Saito *et al.*, 1991)、トウモロコシ(Helentjaris *et al.*, 1986)等を始めとする高等植物でも同様の RFLP 地図が作成されている。作物育種においても、特定の遺伝子と強く連鎖する RFLP マーカーによる交配後代の選抜の効率化(Young and Tanksley, 1989)、計量形質の選抜マーカー(Osborn *et al.*, 1987)などの用途に応用されつつある。

一方、RFLP分析の手法はゲノムDNA配列の未知の変異を直接簡便にスクリーニングし、検出することを可能にする。そのため、マウスにおける pink-eye 表現型に関する genome scanning (Brilliant *et al.*, 1991) の例にみられるように、分子生物学的な情報が乏しく、通

常用いられるクローニングの手法が適用し難い場合にもその突然変異にかかわる遺伝子を直接に単離することが可能である。また、従来、限られた数の遺伝子（およびDNAフラグメント）の塩基配列、アミノ酸配列あるいはアイソザイムパターンを比較して分子進化が論じられてきたが、RFLPパターンから得られる情報を用いればゲノム全体に広くアプローチすることができる。このような視点から、*Brassica* 属(Song *et al.*, 1988)や *Lycopersicon* 属(Miller and Tanksley, 1990)などにおいて、RFLP分析から得られた情報を基に系統分化が論じられている。このように、特定の遺伝子に注目するのではなく、ゲノムを総合的に捉えた視点からその構造変異を解析し、その変異規模を推定する場合にもRFLP分析の手法は有効であると思われる。そこで、本章ではランダムにクローニングしたイネのゲノミックDNAプローブ、およびRFLP連鎖地図上にマッピングされたマーカーDNAプローブを用いて各変異系統の核ゲノムにおけるRFLPの検索を行い、ゲノム変異の程度やその変異様式を解析することを試みた。また、通常の放射線照射法により誘発された突然変異系統および培養細胞由来の再分化個体について同様の解析を行い、本研究に用いた4倍体照射法による変異と従来の照射法による変異やカルスからの再分化個体との相違を検討した。

3. 2 ランダムゲノミッククローンによる RFLP 分析

3. 2. 1 材料および方法

(1) 供試系統

用いた系統は表3-1に示す。このうち、日本晴由来の7系統群25系統は2. 2に述べた経緯で得られたものである。また、フクニシキ由来の系統群FTY86は、フクニシキの同質4倍体を、幼穂分化期から登熟期の約2か月間にかけて約120 R/日の線量率で γ 線

表3-1 供試系統

原品種	系統群	系統番号	特性
日本晴	Ty86I	15	ほぼ正常
		5	ほぼ正常
	Ty86III	18	ほぼ正常
		4	ほぼ正常
	Ty87I	12	ほぼ正常
		1	ほぼ正常
	Ty88I	7	ほぼ正常
		15	ほぼ正常
	Ty86α	CM1	低温感受性葉緑素欠乏
		CM2	低温感受性葉緑素欠乏
		W3	短稈 ふ先色
		W5	脱粒性 大粒
		W13	細粒
		W17	短稈 小粒 無毛
		R3	ふ先色 脱粒性
		R14	ふ先色 無毛
		R19	脱粒性 ふ先色 丸粒
		R22	ふ先色 無毛
	Ty87α	16	ほぼ不稔
		31	短稈
		46	長稈 半稔性
		47	ほぼ不稔 多蘖
54		短稈 多蘖 ほぼ不稔	
79		長稈 ふ先色	
120		長稈 ふ先色 多蘖	
フクニシキ	FTy86	123	長身
		133	細身 ふ先色
		214	長身
		371	長身
		338	細身
		302	短身
		438	長身 ふ先色
		404	短身
		519	長身 ふ先色 有芒
		569	中身
		641	長身 ふ先色
		601	短身
		740	短身
815	短身		

照射を行って得られた系統群である。この放射線照射は1979年から開始され、奇数年は照射、偶数年は無照射で増殖するというサイクルを繰り返した。そして1985年に1個体の復帰個体が得られた。この系統群は4倍体集団からの復帰個体の次代（これをDp2世代とよぶ）8個体をそれぞれ展開したもので、系統番号の1桁目はその8個体を表す。この系統群中には芒性、ふ先の着色性、粒の澱粉特性等にさまざまな変異が認められ（Yamamoto *et al.*, 1988, 1989）、また、胚乳の形成不全と胚の巨大化を併せもつ特異な突然変異系統もその後代から得られている（Kageyama *et al.*, 1991）。また、これらの系統は4つの明らかに異なる草型を分離した。このうち、フクニシキと同じかやや旺盛な草姿を示すものを長身、葉や穎が細く、稔性の悪いやや貧弱な草姿を示すものを細身、主稈の形態はほぼ原品種と変わらないが分蘗が極めて少ないものを中身、草丈が極めて低く、大黒型矮性に似た草姿を示すものを短身とよぶ。

この系統群から、Dp2世代8個体それぞれに由来する系統を供試した。上述した草型について分離したものについては、Dp2世代8個体の由来ごとにそれぞれの草型に固定したと思われた系統を供試した。

(2) イネゲノミックDNAの抽出

日本晴の幼苗のゲノミックDNAを Dellaporta *et al.* (1984)の方法を一部改変した以下の方法で抽出した。組織1gを液体窒素中で乳鉢・乳棒で粉碎し、抽出バッファー(100mM Tris·HCl pH8.0, 50mM EDTA pH8.0, 500mM NaCl, 10mM 2-メルカプトエタノール) 15mlに懸濁し、20% SDS 1mlを加えて混合した後65℃で10分間保温した。その後5M酢酸カリウム溶液5mlを加えて混合し、水中で20分静置した反応物を4℃、25000×gで20分間遠心し、上清を Miracloth フィルターで濾過した後、イソプロパノール10mlを加えて緩やかに混合し、室温に30分間放置した。次いで4℃ 15000×gで15分間遠心した後上清を捨て、

沈殿を500 μ lのTEバッファー(10mM Tris·HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0)に溶解し、10mg/ml RNaseA溶液10 μ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間保温した。これをTE飽和フェノール、25:24:1(v/v) TE飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液、24:1(v/v)クロロホルム・イソアミルアルコール混合液各500 μ lでそれぞれ2回抽出し、最終的に回収された水層に1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)と2倍量のエタノールを加え、穏やかに混合した後水中に30分間静置した。これを室温、15000 \times gで10分間遠心し、上清を捨て、沈殿を70%エタノールで洗浄した後、クリーンベンチ内で軽く風乾した。得られたDNAの沈殿は適当量のTEバッファーに溶解し、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

なお、本論文においてとくに明記しない分子生物学的実験手法は、すべてManiatis *et al.* (1982)の実験書によった。

(3) プローブ断片のクローニング

上記の方法で得たイネゲノミックDNAを制限酵素 *Bam* HI および *Pst* I で切断してプラスミド pHSG399 の *Bam* HI サイトおよび *Pst* I サイトにライゲーションし、この反応物で大腸菌 JM109 株のコンピテントセル (宝酒造製) を形質転換した。4% X-Gal 40 μ l および 0.1M IPTG 25 μ l を表面に塗布した培地上で白色を呈したコロニーは Sekar (1987) の方法により予備的にスクリーニングし、数百 bp 以上のインサート DNA がクローニングされたプラスミドを持つコロニーのみを選抜した。このようにして得られたゲノミックライブラリーから重複を省くため、まずインサートの分子量をアガロースゲル電気泳動によって測定し、サイズ別に分類した。その後、ほぼ同じ分子量を示したクローンは 3 種類の 4 塩基認識の制限酵素 *Hha* I, *Hae* III, *Msp* I で切断し、その泳動パターンを相互に比較することによって分類した。このようにして独立なゲノミッククローン 43 種を得、これを RFLP 分析のためのプローブとして用いることとした。得られたクローンの性状を表 3-2 に示す。

表3-2 得られたゲノミッククローン

クローン*	フラグメント長(kb)	クローニング部位
pNB27	7.3	<i>Bam</i> HI
pNB36	3.8	<i>Bam</i> HI
pNB70	3.6	<i>Bam</i> HI
pNB92	0.90	<i>Bam</i> HI
pNB119	2.40	<i>Bam</i> HI
pNB121	1.40	<i>Bam</i> HI
pNB122	1.05	<i>Bam</i> HI
pNB123	1.00	<i>Bam</i> HI
pNP3	0.63	<i>Pst</i> I
pNP4	0.90	<i>Pst</i> I
pNP5	0.67	<i>Pst</i> I
pNP11	0.64	<i>Pst</i> I
pNP14	1.08	<i>Pst</i> I
pNP15	1.08	<i>Pst</i> I
pNP17	1.08	<i>Pst</i> I
pNP25	0.90	<i>Pst</i> I
pNP26	0.64	<i>Pst</i> I
pNP28	0.54	<i>Pst</i> I
pNP34	0.78	<i>Pst</i> I
pNP40	0.64	<i>Pst</i> I
pNP45	0.63	<i>Pst</i> I
pNP46	0.75	<i>Pst</i> I
pNP47	0.79	<i>Pst</i> I
pNP48	1.15	<i>Pst</i> I
pNP51	0.88	<i>Pst</i> I
pNP53	1.27	<i>Pst</i> I
pNP55	0.58	<i>Pst</i> I
pNP56	0.52	<i>Pst</i> I
pNP57	0.53	<i>Pst</i> I
pNP58	0.82	<i>Pst</i> I
pNP59	0.52	<i>Pst</i> I
pNP60	1.25	<i>Pst</i> I
pNP65	0.40	<i>Pst</i> I
pNP66	2.05	<i>Pst</i> I
pNP67	0.48	<i>Pst</i> I
pNP68	2.25	<i>Pst</i> I
pNP71	1.47	<i>Pst</i> I
pNP72	0.53	<i>Pst</i> I
pNP73	3.30	<i>Pst</i> I
pNP79	2.00	<i>Pst</i> I
pNP80	0.98	<i>Pst</i> I
pNP83	0.67	<i>Pst</i> I

*: pNBは *Bam*HI、pNPは *Pst*Iフラグメントのクローンを示す。

(4) RFLP分析

供試系統の成葉約5gより、(2)と同様の方法により核DNAを抽出した。得られたDNAはさらに塩化セシウム平衡密度勾配遠心により精製し、260nmにおける吸光度を測定し、 $A_{260}=1.0$ を50ng/ μ lとして定量した。このようにして調製したDNAサンプル5 μ gをEcoRI、EcoRV、XbaIの3種の制限酵素で完全消化し、1 \times TAバッファー(4.844g Tris base, 2.7216g 酢酸ナトリウム、744.8mg EDTA \cdot 2Na、1.744ml 氷酢酸/1000ml)、0.1ng/ml臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲル電気泳動によって分離した。そして、このゲルを正荷電を負荷したナイロンメンブレン Hybond N+ (Amersham)に0.4M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてキャピラリー法によりアルカリプロットングした。

プローブDNAは前節でショットガンクローニングしたイネゲノミッククローンのインサートを1.5%アガロースゲル電気泳動でベクターフラグメントと分離してゲルを切り出して回収し、Gene Clean II(BIO 101社)によって精製したものをを用いた。プローブフラグメントの標識および検出にはAmersham社のECL Gene Detection Kitを用い、ハイブリダイゼーションやプロットの洗浄における条件は同社のプロトコールに従った。なお、このキットに採用されている原理は、プローブを西洋ワサビパーオキシダーゼで酵素標識し、これが検出試薬中のルミノール酸化反応を触媒することによってプロット上のプローブの結合した部位で蛍光が発せられ、これをX線フィルムで検出するというものであり、 32 Pを用いた系とほぼ同等の感度を持つ(高橋・Proudfoot, 1989)。

3. 2. 2 結果

プローブとして用いたランダムゲノミッククローンをMcCouch *et al.* (1988)の方法に従って単一コピー配列(single copy sequence; s.c.)、複数コピー配列(multiple copy sequences;

m.c.)、反復配列(repeated sequence; rep.)の3つのカテゴリーに分類したものを表3-3に示す。McCouch *et al.* (1988)は、's.c.'をほぼ9割以上のシグナルがはっきりした1本もしくは2本のバンドとして検出されるもの、'rep'をレーン上にみられるシグナルがスメアー状になりはっきりしたバンドが認められないか、あるいはスメアー中にバンドを形成しているシグナルがシグナル全体のほぼ20%に満たないもの、'm.c.'をそのどちらにも分類されないものとしているが、ここでは、極めて強いシグナルが1本もしくは数本のバンドを形成して検出されるものは直列反復配列(tandem repeat; t.r.)として別に分類した。それぞれのカテゴリーに属するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果の例を図3-1に示す。

RFLP分析の結果、原品種と比較して多型を示した系統は供試した8系統群39系統のうちTY86 α 、TY87 α 、TY88I、FTY86の4系統群に属する18系統であった。合計129のプローブ制限酵素の組み合わせのうち22において少なくとも一系統がRFLPを示した。また、多型を検出したプローブは43種中11種であった。検出されたRFLPおよび各系統における変異を検出したプローブの頻度を表3-4に示す。

変異を検出したプローブの頻度が最も高かった系統はTY87 α -31であり、23.3%(10/43)のプローブにおいて多型が認められた。検出された多型は系統群TY87 α に集中しており、他の系統群では1ないし2種類のプローブのみで多型が認められるにとどまっている。しかし、スメアーなパターンの中に多くのバンドが認められるような反復配列をプローブに用いた場合、ハイブリダイゼーションパターンから多型に関する情報を得ることは難しく、このようなプローブがおよそ35%(15/43)に昇ったことを考慮すると、多型率はTY87 α 以外の系統群においても必ずしも低いとは言えない。

また、変異を検出した11種のプローブのうち6種は、同じDNAサンプルの2つ以上の制

表 3-3 得られたゲノミッククローンの分類

カテゴリー		クローン								
単一コピー配列 (s.c.)	pNB	119	123							
	pNP	15	26	48	53	55	56	60	65	67
		71	72	80						
複数コピー配列 (m.c.)	pNB	27	121	122						
	pNP	5	11	17	25	57	58	68	71	
反復配列 (rep.)	pNB	70								
	pNP	3	4	14	28	34	40	45	46	47
		51	59	66	79	83				
直列反復配列 (t.r.)	pNB	36	92							
	pNP	73								

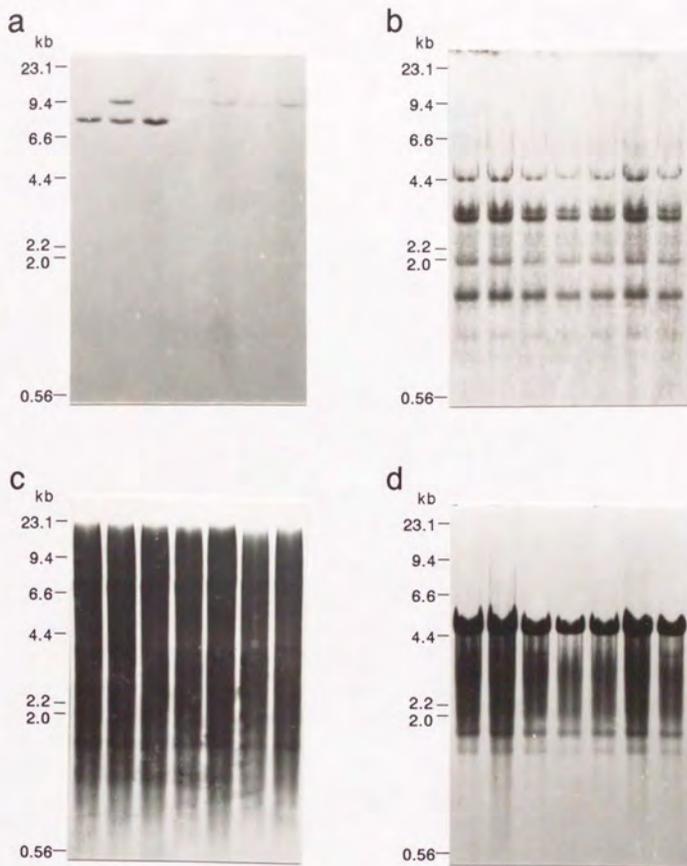


図3-1 4種のカテゴリのプローブによるサザンハイブリダイゼーションパターン

- a. 単一コピー (s.c.) 型 (pNP72) b. 複数コピー (m.c.) 型 (pNP58)
 c. 反復配列 (rep.) 型 (pNB121) d. 直列反復 (t.r.) 型 (pNB92)

表3-4 検出された RFLP

ブローブ	変異系統																	
	Ty86α			Ty87α						Ty881			FTy86					
	W17	R3	R22	16	31	46	47	54	79	120	CM15	123	133	404	438	519	601	641
NB36	X1	X1	X1	X2	X2	X2		X2	X2	X2			X3	X3	X3	X3	X3	X3
	E1	E1	E1	E2	E2	E2		E2	E2	E2			E3	E3	E3	E3	E3	E3
	V1	V1	V1	V2	V2	V2		V2	V2	V2			V3	V3	V3	V3	V3	V3
NB122					E			E	E	E								
NB123					E	E		E	E	E								
NP11					X	X	X		X	X	X							
NP25		X1			X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2							
					E	E	E		E	E	E							
					V													
NP48					E	E	E	E		E								
NP55					X		X	X	X									
					E	E	E	E	E		E							
					V		V	V										
NP65					X					X		X	X			X	X	
										E		E	E			E	E	E
					V				V	V		V	V			V	V	
NP68											X							
											E							
											V							
NP71					X			X	X	X	X							
NP72					X	X	X	X	X	X	X							
					E	E	E	E	E	E	E							

多型を検出したブローブの頻度(%)

2.3 4.7 2.3 18.6 23.3 14.0 11.6 14.0 16.2 20.9 2.3 2.3 4.7 2.3 2.3 4.7 4.7 4.7

*E、X、V、はそれぞれ多型を検出した制限酵素 *EcoRI*、*XbaI*、*EcoRV* を表し、後置した数字はフラグメントのサイズの相違を示す。

制限酵素消化物に対して共通して多型を示した。このことはその検出された多型が酵素認識部位の塩基置換や微小な欠失等によるものではなく、プローブに相補的な配列を含む制限酵素断片の比較的大きな領域に挿入、欠失、転座等が生じたことによるものであることを示唆している。従って、単純に計算すると、供試系統のゲノムのうち、25.6%(11/43)の領域は1系統以上でなんらかの変異を受けており、そのうちの約半分に当たる14%(6/11)の領域に比較的大規模な構造変化が生じていることになる。この結果は、次節でさらに多数のs.c.型のプローブのみを用いた実験により検証する。

供試したプローブのうち3種はt.r.型の配列のクローンであったが、そのうちのNB36は3つの系統群において多型が認められ、直列反復配列の反復単位の急速な分化が明らかになった。この多型については第4章で詳しく検討する。

3. 3 単一コピー配列クローンによる RFLP 分析

3. 3. 1 材料および方法

(1) プローブ断片の由来および調製

用いたプローブは農林水産省農業生物資源研究所で作成されたイネ RFLP 地図にマッピングされたクローンのうち、イネ品種日本晴のゲノミッククローン74個とトウモロコシのゲノミッククローン1個の計75クローンについて譲渡を受けたものである。表3-5にその名称および性状を示した。また、各クローンの連鎖地図を図3-2に示す。なお、以下の記述においては簡単のために表3-5に示した記号を用いて表すこととする。これらのクローンはpUC系プラスミドベクターに *Bam*HI もしくは *Hind*III フラグメントとして挿入されており、エタノール沈殿の形で譲渡を受けたものを大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセル(Bethesda Research Laboratories社製)に形質転換して保管した。実験にプローブ

表3-5 イネ RFLP 地図上にマッピングされたマーカー

クローン	記号*	フラグメント長(bp)	クローニング部位	クローン	記号	フラグメント長(bp)	クローニング部位
Chromo 1				Chromo 7			
GpNpb0054	1/1	700	<i>Pst</i> I	GpNpb0338	7/1	650	<i>Pst</i> I
GpNpb0370	1/2	1730	<i>Pst</i> I	GpNpb0020	7/2	990	<i>Pst</i> I
GpNpb0393	1/3	1290	<i>Pst</i> I	GpNpb0099	7/3	710	<i>Pst</i> I
GpNpb0302	1/4	1400	<i>Pst</i> I	GpNpb0379	7/4	800	<i>Hind</i> III
GpNpb0270	1/5	850	<i>Pst</i> I	Chromo 8			
GpNpb0165-2	1/6	1200	<i>Pst</i> I	GpNpb0056	8/1	1200	<i>Pst</i> I
GpNpb0317	1/7	2000	<i>Pst</i> I	GpNpb0187	8/2	1500	<i>Pst</i> I
GpNpb0359	1/8	680	<i>Hind</i> III	GpNpb0192	8/3	1180	<i>Pst</i> I
GpNpb0107	1/9	1050	<i>Pst</i> I	GpNpb0104	8/4	900	<i>Pst</i> I
Chromo 2				GpNpb0278	8/5	1250	<i>Pst</i> I
GpNpb0275	2/1	2300	<i>Pst</i> I	Chromo 9			
GpNpb0057	2/2	1000	<i>Pst</i> I	GpNpb0095	9/1	560	<i>Pst</i> I
GpNpb0039	2/3	1100	<i>Pst</i> I	GpNpb0036	9/2	630	<i>Pst</i> I
GpNpb0045	2/4	980	<i>Pst</i> I	GpNpb0103	9/3	1000	<i>Pst</i> I
GpNpb0132	2/5	1250	<i>Pst</i> I	GpNpb0385	9/4	1130	<i>Pst</i> I
GpNpb0243	2/6	980	<i>Pst</i> I	GpNpb0123	9/5	800	<i>Pst</i> I
GpNpb0357	2/7	780	<i>Hind</i> III	GpNpb0295	9/6	2400	<i>Pst</i> I
GpNpb0365	2/8	560	<i>Pst</i> I	Chromo 10			
Chromo 3				GpNpb0089-2	10/1	650	<i>Pst</i> I
GpNpb0164	3/1	720	<i>Pst</i> I	GpNpb0333	10/2	710	<i>Pst</i> I
GpNpb0232	3/2	1600	<i>Pst</i> I	GpNpb0037	10/3	580	<i>Pst</i> I
GpNpb0249	3/3	1500	<i>Pst</i> I	GpNpb0291	10/4	1900	<i>Pst</i> I
GpNpb0362	3/4	630	<i>Pst</i> I	GpNpb0323	10/5	980	<i>Pst</i> I
GpNpb0144	3/5	600	<i>Pst</i> I	GpNpb0127	10/6	800	<i>Pst</i> I
GpNpb0062	3/6	840	<i>Pst</i> I	Chromo 11			
GpNpb0055	3/7	1290	<i>Pst</i> I	GpNpb0181	11/1	1600	<i>Pst</i> I
GpNpb0175	3/8	3250	<i>Pst</i> I	GpMaz0111	11/2	600	<i>Pst</i> I
Chromo 4				GpNpb0044	11/3	710	<i>Pst</i> I
GpNpb0124-2	4/1	980	<i>Pst</i> I	GpNpb0320	11/4	980	<i>Pst</i> I
GpNpb0271	4/2	1050	<i>Pst</i> I	GpNpb0189	11/5	1000	<i>Pst</i> I
GpNpb0151	4/3	650	<i>Pst</i> I	GpNpb0024	11/6	600	<i>Pst</i> I
GpNpb0282	4/4	1900	<i>Pst</i> I	Chromo 12			
GpNpb0162	4/5	650	<i>Pst</i> I	GpNpb0148	12/1	800	<i>Pst</i> I
GpNpb0177	4/6	2150	<i>Pst</i> I	GpNpb0402	12/2	840	<i>Hind</i> III
Chromo 5				GpNpb0261	12/3	1700	<i>Pst</i> I
GpNpb0396	5/1	710	<i>Hind</i> III	GpNpb0124-1	12/4**	980	<i>Pst</i> I
GpNpb0387	5/2	1400	<i>Pst</i> I	GpNpb0193	12/5	2000	<i>Pst</i> I
GpNpb0260	5/3	2100	<i>Pst</i> I	Chromo 6			
GpNpb0366	5/4	560	<i>Pst</i> I	GpNpb0030	6/1	680	<i>Pst</i> I
GpNpb0081	5/5	1220	<i>Pst</i> I	GpNpb0200	6/2	1100	<i>Pst</i> I
GpNpb0188	5/6	1630	<i>Pst</i> I	GpNpb0294	6/3	4400	<i>Pst</i> I
Chromo 6				GpNpb0122	6/4	1200	<i>Pst</i> I
GpNpb0030	6/1	680	<i>Pst</i> I	GpNpb0012	6/5	1050	<i>Pst</i> I
GpNpb0200	6/2	1100	<i>Pst</i> I	GpNpb0329	6/6	1180	<i>Pst</i> I
GpNpb0294	6/3	4400	<i>Pst</i> I	GpNpb0342	6/7	1220	<i>Pst</i> I
GpNpb0122	6/4	1200	<i>Pst</i> I	* 以下の記述ではこの記号を用いて各クローンを表す			
GpNpb0012	6/5	1050	<i>Pst</i> I				
GpNpb0329	6/6	1180	<i>Pst</i> I	** 4/1と12/4は同じクローンであり、相同部位が2つの染色体上にある			
GpNpb0342	6/7	1220	<i>Pst</i> I				

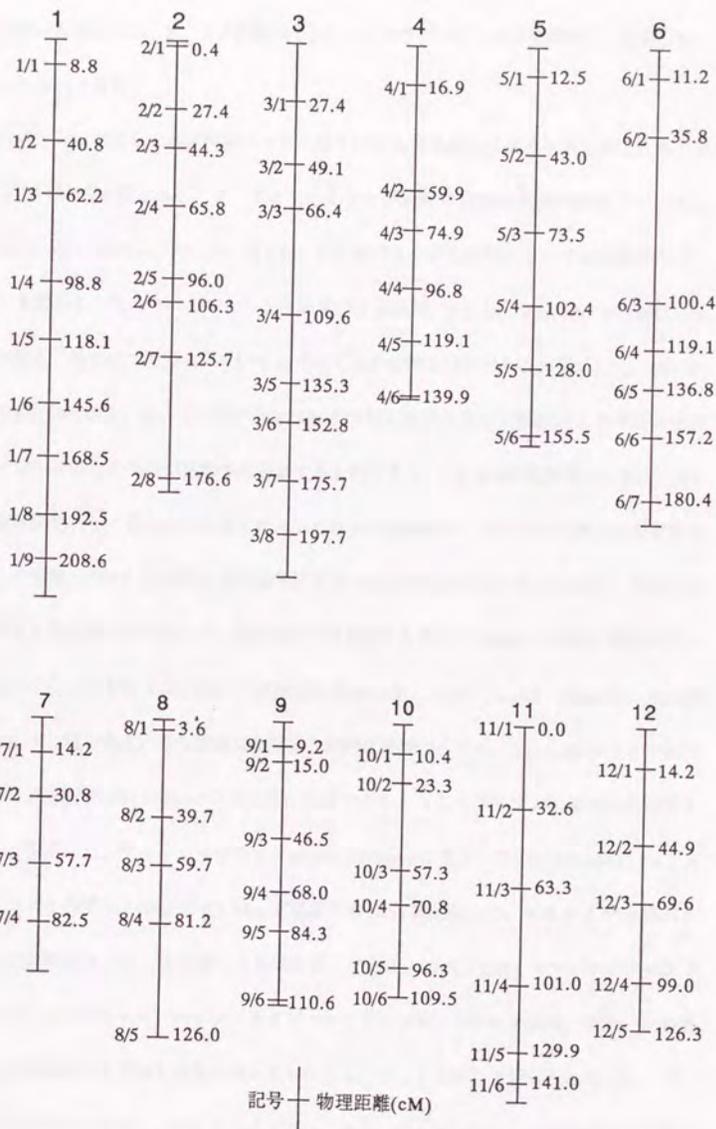


図3-2 用いたRFLPマーカーの連鎖地図
Rice RFLP Mapping group (1991)より改変。

として用いる際には3. 2. 1と同様にインサートフラグメントのみを精製して使用した。

(2) RFLP分析

RFLP分析に供試した系統は表3-6に示す17の変異系統およびその原品種日本晴、フクニシキの計19系統である。3. 2より、1つの系統群に複数の多型が混在していることがなかったことから、TY86 α 、TY87 α 、FTY86の3つの系統群については系統数を3. 2よりも減らし、代わりに、フクニシキ由来の3系統群 (FTY85、FTY89I、FTY89II) を新たに加え、現在までに得られている11の全ての系統群を供試できるようにした。FTY85およびFTY89IIは3. 2. 1で述べたFTY86と同様に減数分裂期に緩照射した同質4倍体集団中から分離した2倍体様個体由来のものであり、FTY89Iは乾燥種子に毎代12KRの γ 線照射を行って得られたものである。これらの系統群は、それぞれ復帰個体を穂別系統として展開したが、系統間に可視形質に大きな違いが認められなかったため、それぞれ系統番号1番の系統を供試した。供試系統の植物体からのゲノムDNAの抽出、精製は3. 2. 1と同じ方法で行った。用いた制限酵素は*Bam*HI、*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*III、*Eco*RV、*Xba*Iの6種である。電気泳動は多検体を同時に処理するため、3.5mm幅のウェル58個の列が3列平行する計174レーンを同時に泳動できるようなサブマリン型電気泳動装置を特注して使用した。ゲルトレイのサイズは300×300mmであり、ここに600mlの0.8%アガロースゲルを作成し、およそ0.7V/cm定電圧で約14時間泳動した。ゲルおよび泳動バッファーの組成は3. 2. 1に記したものと同一である。また、DNAのフィルターメンブレンへのトランスファー、ハイブリダイゼーション、プロットの洗浄条件、プローブの調製と検出等に関する手順と条件についても全て3. 2. 1に準じて行った。ただし、ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、およびプロットの洗浄に際してはハイブリダイゼーションオープンを用いて回転するガラスボトル中で行ったため、それぞれ

表3-6 供試系統

原品種	系統群	系統番号	特性	
日本晴	Tγ86I	15	ほぼ正常	
	Tγ86II	5	ほぼ正常	
	Tγ86III	18	ほぼ正常	
	Tγ87I	4	ほぼ正常	
	Tγ88I	1	ほぼ正常	
	Tγ86α	R3		ふ先色 脱粒性
		R19		脱粒性 ふ先色 丸粒
		R22		ふ先色 無毛
		31		短稈
	Tγ87α	79		長稈 ふ先色
148			ふ先色 多稜	
フクニシキ	FTγ85	1	短稈 部分不稔	
		123	長身	
	FTγ86	36804	細身 ふ先色	
		44903	短身	
		FTγ89I	1	ほぼ正常
	FTγ89II	1	部分不稔	

の実験操作段階に用いられるバッファのメンブレン面積当りの液量はAmersham社のプロトコルに記載されているものより少なくなっている。この変更によるバックグラウンドの増加やシグナル強度の低下等の目立った支障は認められなかった。

3. 3. 2 結果

前述した76種のプローブを用いた RFLP 分析の結果、39のプローブが変異系統のゲノムにおける多型を検出した。表3-7に多型を検出したプローブ-制限酵素-系統の組み合わせ、変異が検出された7系統群13系統における多型率、および多型を検出したプローブ1つあたりの多型を検出した酵素の数の平均を示す。多型率は次式

$$\text{多型率} = (\text{変異を検出したプローブ数}) / (\text{供試プローブ数})$$

で計算した。ひとつの系統群から複数の系統を供試したものについては、系統間の顕著な多型率の違いは認められない。系統群ごとに見ると、3. 2. 2の結果と同様、TY87aが他の系統群からかけ離れて大きい多型率を示し、それに次いでTY86a、FTY86が高い多型率を示している。3. 2においてRFLPが検出されなかったTY86II、TY86III、TY87Iの3つの系統群にも数種のプローブで多型が認められた。TY86I、および新たに供試したフクニシキ由来の3系統群FTY85、FTY89I、FTY89IIにおいてはRFLPは検出されなかった。また、検出されたRFLPの数が限られている系統群についてははっきりと結論することは難しいが、本節の結果に関する限り、特定の連鎖群における変異の集中は認められず、ゲノム全体に変異が平均的に分布しているといえよう。

3. 2. 2で述べたように、ある1種の制限酵素を用いて多型が検出された系統-プローブの組み合わせにおいて、他の制限酵素によっても同様に多型が生じる場合、その変異体ゲノム上のプローブに相同な領域を含むDNA断片上には比較的大きな変異が生じている

表3-7 単コピー配列クローンにより検出されたRFLP

変異系統

ブローブ	Ty86II	Ty86III	Ty87I	Ty88I	Ty86α		Ty87α		Ty86				
					R3	R19	R22	31	79	148	123	36804	44903
1/2								DE	DE	DE			
1/3					BDEHX*			B	B	BE		BDE	
1/8							BDEHX	BDEHX		BDEHX			
1/9								V					
2/2									BD				
2/3									BV				
2/6			BEHVX							V			
2/8													
3/1				BDEHVX					BDEHVX	BDEHVX		BDEHVX	
3/5													
3/6					BDEHVX				BDEHVX	BDEHVX			
4/1	BDEHVX								DEHVX	HX			
4/2								HX	HX	HX			
4/6						BDEHVX		DV	DV	DV			
5/4								H	H	H			
5/5										V			
5/6	BDEHVX								B	B			BDEHVX
6/1													
6/3									DEHVX	DEHVX			
6/4								DEHVX	BDEHVX	BDEHVX			
6/5								B	B	B			
6/7			BDEHVX						EHVX	EHVX	BDEHV		BDEHV
7/2													

表3-7 (続き)

グループ	変異系統										FTy86 36804	
	Ty86II	Ty87I	Ty88I	R3	Ty86α R19	R22	31	79	Ty87α 148	123		
81												
82	Ty86III											
85												
92												
93												
94												
95	BDEHVX											
101												
102												
105												
106												
111												
113												
114												
115												
121												
122												
125												
多型を示した クローン(%)	3.9	2.6	1.3	5.3	6.6	6.6	25.0	34.2	36.8	2.6	2.6	2.6
多型を示した 酵素数の平均	6.0	5.0	5.5	5.25	4.6	4.4	3.0	3.1	2.9	3.0	4.5	5.5

*B,D,E,H,V,Xは多型を示した酵素を示す。B:BamIII, D:DraI, E:EcoRI, H:HindIII, V:EcoRV, X:XbaI

ことが示唆される。表3-7に示すように、あるプローブがRFLPを検出した際の、多型を検出し得た制限酵素数の平均は、変異が認められた系統すべてにおいておよそ3以上の値となった。また、系統群-プローブの組み合わせのうち多型が検出された57において、RFLPを検出した制限酵素数(1から6)とそれに対応したプローブの数の関係を図3-3aに示した。1つの系統群に属する複数の系統間で、同じプローブに対して多型を検出し得た制限酵素数が異なる場合には最も多い数をその系統群における値としたが、そのような場合は表3-7に示すとおりTy87αとプローブ1/3、9/2、10/1、11/5との4つの組み合わせのみであった。ただ1つの制限酵素によってのみ多型が検出されたプローブ-系統群の組み合わせは13認められたが、そのうち11(約85%)は系統群Ty87αで見られたものであり、系統群Ty87αを除くと、多くの制限酵素で多型を示すようなプローブほど数が多くなるという傾向を示した(図3-3b)。このことは、系統群Ty87αにおいては制限酵素認識部位の微小な変異と挿入・欠失等の関与する変異とが混在していること、その他のRFLPを示した系統群において検出されたRFLPは、その多くがゲノムのある程度幅を持った領域の変異によるものであることを示すものと思われる。

検出された多型のなかに、そのサザンハイブリダイゼーションのパターンが直接プローブと相補的な領域の重複や欠失を示すものも散見された。図3-4aは *Xba*I で消化したDNAプロットをクローン8/1をプローブに用いて検出されたパターンを示している。Ty86IIIにおいて、明らかに他の系統に比べてコピー数の多い濃いバンドが検出されており、これはこの領域の重複によるものと思われる。図3-4bは *Bam*HI で消化したDNAプロットをクローン11/1をプローブに用いて検出されたRFLPであるが、Ty86α、Ty87α-の2つの系統群ではバンドが全く認められず、これは欠失によるものと考えられる。

以上の結果から、本章で供試した変異系統はゲノム全体に多くのRFLPを示すこと、系

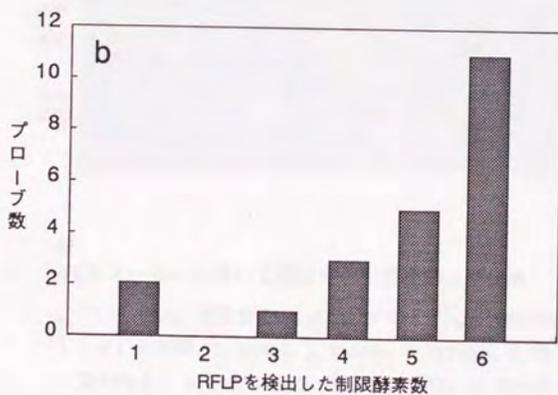
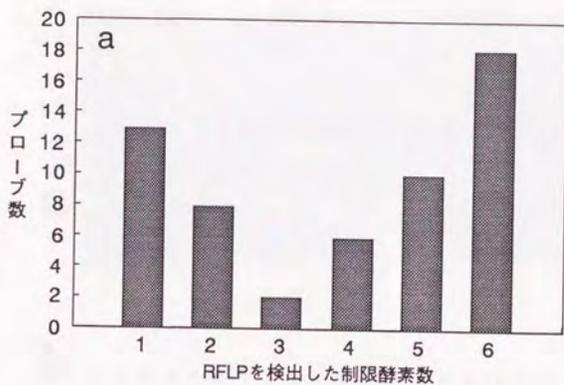


図3-3 RFLPを検出した酵素数とプローブの数

a. 供試したすべての系統群における度数

b. Ty87αを除いた6系統群における度数

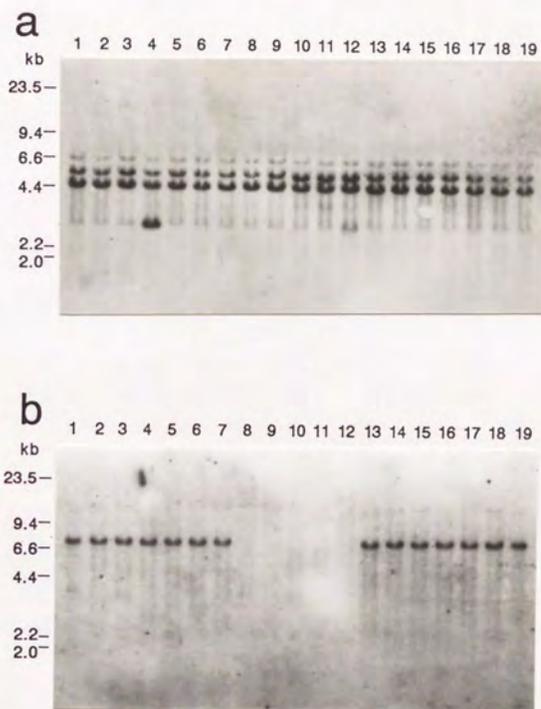


図3-4 RFLP マーカーを用いて検出された重複および欠失

a. プロープ8/1、制限酵素 *Xba*I. b. プロープ11/1、制限酵素 *Bam*HI.
 レーン1. 日本晴、2. TY86I、3. TY86II、4. TY86III、5. TY87I、6. TY88I
 7. TY86 α -R3、8. TY86 α -R19、9. TY86 α -R22、10. TY87 α -31、11.
 TY87 α -79、12. TY87 α -148、13. フクニシキ、14. FTY85、15. FTY86-123
 16. FTY86-36804、17. FTY86-44903、18. FTY89I、19. FTY89II

統群によって変異が主にDNA断片の重複、欠失、挿入などによるものと、それらに加え、塩基の置換、欠失等の微小な変異を併せもつものがあることが示唆された。

3. 4 他の変異作出法による変異体の RFLP 分析

3. 4. 1 材料および方法

本研究において作出された4倍体照射法による変異体のゲノム構造の変異の規模を従来の変異誘発法による変異体のゲノム変異と比較するため、通常の放射線照射法により誘発された変異系統および培養細胞由来の再分化個体をRFLP分析に供試した。

供試した放射線突然変異系統は農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場より譲渡された農林8号を原品種とする10系統である。表3-8に供試した系統の系統番号、主要特性、誘起処理法、選抜年度を示す。これらの変異系統はいずれも1回の照射を受けた個体の後代から育成されたものである。

再分化個体は東京大学農学部育種学研究室において維持されているイネ品種亀の尾の胚盤由来の懸濁培養カルスから藤井(1991)の方法に従って再分化させたものである。用いた懸濁培養カルスは、種子を30日間2ppmの2,4-Dを含む固形MS培地上で培養して誘導されたものを2ppmの2,4-Dを含むR2液体培地中で継代したもので、カルス誘導から約180日後にカイネチン0.5ppm、NAA1ppmを含むN6再分化培地に置床して個体を再分化させた。再分化した個体は1つのカルスから1個体ずつ茎葉部が約15cmに成長したところでポットに移植し、慣行にしたがって栽培した。これらの個体の中には葉身や茎が細いもの、芒やふ先着色が消失したもの、稔性が低いものなど可視形質に変異を示した個体が散見されたが、再分化当代個体であるためこれらの形質が遺伝変異によるものであるのかどうかは不明である。

表 3-8 供試した放射線突然変異系統

系統番号	主要特性	誘起処理	選抜年度
M-14	早生・短稈・小粒	150R/day	1964
M-34	早生・小粒	10KR	不明
M-41	短稈・小粒	10KR	1962
M-50	短稈・早生	10KR	1962
M-56	長穂・早生・大粒・有芒	150R/day	1964
M-99	長穂・小粒・細葉	80R/day	1965
M-125	長稈・長穂・多蘖・ネクローシス	40R/day	不明
M-130	長稈・長穂・有芒	90R/day	1965
M-142	長穂・小粒	450R/day	1965
M-150	長稈・多蘖・無葉舌	300R/day	1965

ゲノムDNA抽出のためのサンプルは放射線突然変異系統については成葉を、再分化個体については個体がキメラであることを考慮して、1個体から1次分葉1本のみを10個体からサンプリングして供試した。ゲノムDNAの抽出、RFLP分析に関する実験操作は3.3.1と同様に行い、ゲノムDNAを消化する制限酵素も3.3.1と同じ6種を用いた。プローブは3.3.1に述べたs.c.型のゲノミッククローンから連鎖群に偏りのないように選んだ26種に加え、後述する第4章において変異の大きかったl.r.型の3クロノンの計29種を用いた(表3-9)。

3.4.2 結果

供試したプローブ-制限酵素の174の組み合わせによるRFLP分析の結果、放射線突然変異系統10系統において唯一認められた多型は、放射線突然変異系統M-14での10/1-*Dra*Iの組み合わせによって検出されたもののみであった(図3-5)。この多型は*Dra*Iによってのみ認められ、他の5つの制限酵素を用いて消化した場合には原品種と同様のパターンを示したことから、おそらくは*Dra*Iの認識部位における塩基置換のような微小な変異によるものと思われる。

培養系からの再分化個体10個体ではRFLPは全く検出されなかった。したがって、この再分化個体では少なくともゲノムの大きな再配列は生じていないものと考えられる。

3.5 考察

ゲノム構造の変異をRFLP分析を用いてスクリーニングしようと試みる場合、RFLP地図の作成を目的とする場合とは異なり、用いるプローブは必ずしも単一コピーのフラグメントである必要はなく、むしろゲノム全体に散在しているような配列の方が多型を検出す

表3-9 RFLP分析に用いたクローン

分類	クローン		
単一コピー(s.c.)型	1/2	1/8	1/9
	2/3	2/6	2/8
	3/3	3/5	
	4/1	4/6	
	5/1	5/4	
	6/4	6/5	
	7/1	7/2	
	8/1	8/5	
	9/2	9/5	
	10/1	10/3	
	11/3	11/5	
	12/1	12/5	
直列反復(t.r.)型	RS1	HC8	NP73

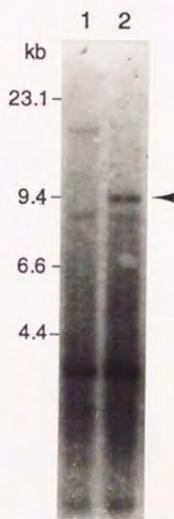


図3-5 放射線突然変異系統M-14で認められた RFLP

プローブ10/1、制限酵素 *Dra*I. レーン1. 農林8号、2. M-14.

る確率は高いと考えられる。また、できるだけ染色体上にランダムに座乗しているフラグメントをプローブとして用いることが望ましいと考えられるが、その意味でも構造遺伝子に相同なフラグメントのみを用いることは偏りを生じる危険性がある。そこで、cDNAクローンではなく、ゲノミックDNAのショットガンクローニングを行い、これをプローブとした。

クローニングされたフラグメントのうちs.c.型のものおよびm.c.型のはあわせて60%であり、約35%が、スミアー中に非常に多くのバンドが検出されるようなrep型のパターンを示した。本研究と同様に *Pst*I フラグメントをランダムに用いて RFLP 地図を作成したMcCouch *et al.*(1988)の報告によれば、ハイブリダイゼーション後のプロットを0.5×SSC、65℃で洗浄した場合、22%がrep型のパターンを示したが、洗浄バッファーを0.05×SSCに変更すると、そのほとんどがs.c.型またはm.c.型のパターンになったという。今回使用した非放射性の遺伝子検出キットでは、酵素標識を用いているため42℃でプロットの洗浄を行う必要があり、洗いのストリンジェンシーのコントロールが難しいという欠点がある。洗浄バッファー中のSSC濃度は0.5倍で、ストリンジェンシーを高めるため高濃度(6M)の尿素が含まれているが、このような変則的な洗浄バッファーを用いなければならないことが、ストリンジェンシーの程度を常法を用いた場合と比較することを難しくしている。おそらく、通常の放射性ラベルを用いた場合に比べ、相当緩やかな洗浄条件であったと思われ、これがクローン中のrep型の割合を高めた原因になっていると思われる。ごく最近改訂されたキットのプロトコールによれば、0.1倍から0.5倍のSSCおよび0.4%SDSのみを含むバッファーを用いて55℃で10分程度の短時間洗浄することで6M尿素、42℃の条件と同等の結果が得られるという。この条件はDNAフィンガープリンティング法などで行われているような条件に近く、rep型以外のプローブを用いた場合、今回採用したブ

ロトコールは本研究の目的にむしろ適していたということもできる。

ランダムゲノミッククローンを用いた実験はプローブの連鎖関係が不明であり、供試したプローブ制限酵素の組み合わせの数も十分ではなかったため、その変異の頻度、染色体上の位置などについては十分な知見が得られず、また、認められた多型の多くがDNA断片の挿入・欠失などによるものであるということをおおよそ推定できたに過ぎなかったが、RFLP地図のマーカーフラグメントを用いたRFLP分析によって、ゲノムの変異程度や変異の構造についてある程度数量的に考察することが可能になった。

系統群による多型性の違いの程度は、RFLPマーカーを用いた分析においてもランダムゲノミッククローンを用いた実験結果とほぼ同様の傾向を示した。変異の頻度については、RFLPが検出された7系統群における多型率が1.3%から44.7%であり、これは用いたプローブの座乗位置がゲノム上に点在していることを考慮すると、ほぼゲノム全体の平均多型率を示す値と考えられ、かなり大きいものと言える。また、カルス培養由来の再分化個体や通常の放射線照射法による変異体のゲノムにおいてほとんどRFLPが認められなかったことは、4倍体の累代照射法が従来の変異誘発法に比べ、ゲノムの構造変異を有意に高い頻度で誘発できることを示すものといえる。

より多くの制限酵素で多型を示すプローブの頻度が高く、また、明らかに領域の重複や数kbの欠失が生じている領域も認められたことは、多くの変異が挿入・欠失・重複などかなりの範囲のDNA断片の再配列によるものであることを示唆している。また、今回供試したマーカーフラグメントは、通常のイネゲノムにおける連鎖地図上に座乗しているが、変異系統にこの連鎖関係をそのまま適用する限り、RFLP地図の特定の連鎖群における変異の偏在は認められなかった。このことは、この変異誘発法による変異がゲノム全体におよぶものであることを示しているといえよう。

一方、本研究において供試した系統群のうち、TY87 α は他の系統群に比べて数倍の多型性を示している。多型を検出した34のプロープのうち半数以上(19/34)が1つまたは2つの制限酵素との組み合わせでしか多型を示さないものであったことも他の6系統群とは異なる特徴である。この点については第2章、第4章の結果と合わせ、第6章で論ずる。

近年、様々な培養系からの再分化個体について、RFLP分析の手法を用いたゲノム変異の解析に関する報告がある。Müller *et al.* (1990)は、イネ未熟胚からカルスを誘導し、そこから再分化した個体について actin 遺伝子および ATP/ADP translocator 遺伝子をプローブとして RFLP 分析を行い、カルス誘導培地上での培養期間に比例して RFLP の規模が増大すること、真核生物のゲノムには通常認められないアデニンのメチル化が再分化個体の核DNAにのみ認められること、塩基のメチル化とDNA配列のリアレンジメントが同じ locus に生じていることなどを報告している。また、Brown *et al.* (1990)は、イネのプロトプラストから再分化した個体について、8種の遺伝子のクローンをプローブとした同様の解析を行い、高率の変異性(2.5%から100%)をこれらのゲノムで見いだしている。本研究で供試した再分化個体は180日継代されたカルスから得られたものであり、Müller *et al.* (1990)のケースと継代期間の長さは大差ないにもかかわらず全く多型性を示さず、前述した2つの報告とはかなり様相が異なるが、このことはカルス誘導の過程が変異性に大きく影響している可能性を示唆している。岩田(1991)は最高102日培養した胚起源カルスについて本研究と同様に RFLP 地図にマッピングされたマーカーフラグメントをプローブに用いて RFLP 分析を行ったが、多型は見いだせなかったと報告している。また、Brown *et al.* (1990)は検出された多型がどのようなゲノム構造の変異によるものであるのかについては検討しておらず、本研究で明らかになったような構造変異の傾向がプロトプラスト培養からの再分化系にも存在するかどうかは興味深い問題である。

本章において、供試した変異系統のゲノム DNA は数多くの変異を全域にわたって受けていること、その変異のうちかなり大きな領域の再配列が高率で含まれていること、その変異性は通常の放射線照射法やカサスの継代培養操作により誘発されるものよりも大きいことが明らかになった。この結果はゲノムの冗長化と放射線照射という細胞の内的要因と外的要因の相乗効果がゲノム構造の大幅な変異を誘発する上で既存の変異誘発法に比べて効果的であることを示唆するものと考えられる。

第4章 変異系統のゲノムにおける反復DNAの変異の解析

4.1 緒言

真核生物のゲノムDNA中には、ポリペプチドあるいはRNAをコードしている遺伝子以外に、大量の非遺伝子性の反復DNAが存在している。高等植物ではゲノムのかなりの部分が反復DNAであると考えられ(Flavell, 1986)、イネではおよそ50%が反復DNAであると報告されている(Deshpande and Ranjekar, 1980; Zhou, 1986)。

反復配列の機能についてはまだ明らかになっていないことが多い。しかし、近年高等植物の反復配列の構造、量、染色体上の分布等についてイネ(Zhao *et al.*, 1989; De Kochko *et al.*, 1991)、オオムギ(Gupta *et al.*, 1989)、ライムギ(Bedbrook *et al.*, 1980)、トウモロコシ(Rivin *et al.*, 1986)等、多くの植物において研究がなされており、反復配列は系統間、近縁種間で変異に富み、進化の過程で急速に変化していることが示されている。反復配列はゲノム中の大部分を占めているため、その構造変異は直接に染色体の構造に大きく影響する。Flavell(1982)はこのような反復配列の変異による染色体の構造変異が高等植物の進化、種分化に大きく寄与していると推測している。また、遺伝子発現ネットワークの調節機構の進化に中度反復配列が関与しているとする報告もある(Britten and Davidson, 1969)。

上述した研究の多くは進化過程で生じた反復配列の変異の結果について研究したものであり、その変異のプロセスそのものにアプローチした例は少ない。近年、主に培養細胞を用いた実験系でいくつか反復配列の増減が観察され、急速な配列の変異がとらえられ始めている(Landsmann and Uhrig, 1985; Kikuchi *et al.*, 1987; Cuzzoni *et al.*, 1990)。

本章では、4倍体集団の累代照射により得られた2倍性変異系統のゲノムがどのようなDNAの再配列を受けているかを調査する目的で、イネゲノム中の各種反復配列のクロー

ニングと、その変異系統のゲノム中でのコピー数および構造の変異の検出を試みた。また、前章のランダムゲノミッククローンを用いた RFLP 分析で明らかになったクローン NB36 に相同な直列反復配列構造の変異について、その解析を行った。

4. 2 変異系統のゲノムにおける反復DNAのコピー数の変異

4. 2. 1 材料および方法

(1) 反復配列のクローニング

変異系統の核ゲノムにおける反復配列の変異を検出するためのプローブとして利用するために、まずイネゲノム中の各種反復配列のクローニングを行った。イネ品種日本晴のゲノミックDNAを3. 2. 1と同様の方法によって抽出し、これを制限酵素 *Bam*HI で完全に消化した。このDNA断片をプラスミドベクター pUC19 の *Bam*HI サイトに挿入し、ライブラリーを作成した。形質転換により生じたコロニーのなかから組み換えプラスミドを持つもの約200個を新しいプレートに移植し、ナイロンメンブレン *Biodyne* A に転写して、コロニーハイブリダイゼーションを行った。プローブには *Bam*HI で完全消化した日本晴の全ゲノミックDNAをdigoxigenin-dUTP を用いてランダムプライマー法によりラベルしたものをを用いた。プローブの検出にはdigoxigenin抗体-アルカリフォスファターゼコンジュゲートとその基質AMPPD(*Tropix*社)を用いた化学蛍光法によった。ハイブリダイゼーションの結果強いシグナルを生じたコロニーを拾い、3. 2. 1と同様にクローンの重複を除いた結果、12種の独立なクローンが得られた。このうちから特に強いシグナルを呈した4種を選び、3. 2. 1において既にクローニングしていた3種のクローンを加えた計7種の反復配列クローンを以降の解析に用いることとした。表4-1aに用いた反復配列クローンの性状を示す。

表 4-1 供試した反復配列クローンと変異系統

a. クローン

クローン	フラグメント長	クローニング部位
pRS1	4.25kb	<i>Bam</i> HI
pHC8	1.1kb	<i>Bam</i> HI
pHC21	5.4kb	<i>Bam</i> HI
pHC37	8.2kb	<i>Bam</i> HI
pHC52	5.9kb	<i>Bam</i> HI
pNB92	0.9kb	<i>Bam</i> HI
pNP73	3.1kb	<i>Pst</i> I

b. 供試系統

原品種	系統群	系統番号	
日本晴	Ty 87I	4	
	Ty 88I	1	
	Ty 86 α		R3
			R19
			R22
	Ty 87 α		31
		79	
		148	
フクニシキ	FTy 85	1	
		123	
	FTy 86	36804	
		44903	
	FTy 89I	1	
	FTy 89II	1	

(2) スロットハイブリダイゼーション

供試した変異系統を表4-1bに示す。これらの系統の幼苗からゲノミックDNAを3. 2. 1と同様の方法により抽出し、塩化セシウム平衡密度勾配遠心により精製した。このDNAサンプルを波長260nmにおける吸光度を測定することにより定量し、アガロースゲル電気泳動により全てのサンプルが十分に高い分子量をもち、品質に差異がないことを確認した。このようにして調製したゲノミックDNAサンプルそれぞれ500ngを *Bam*HI で完全消化した後、Zhao *et al.* (1989)の方法により変性、中和の後スロットプロッターを用いてナイロンメンブレン Hybond N+ に固定した。このメンブレンを前述したイネ反復配列クローンをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。プローブは3. 2. 1と同様にクローン断片を分離精製し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でランダムプライマー法によりラベルしたものをを用いた。プローブの濃度条件は、予備的に10mlのハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC, 5×Denhardt溶液, 0.5%SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ サケ精子DNA, 50%ホルムアミド)に対し、比活性 $5.5 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ のプローブ断片 $1 \times 10^7 \text{cpm}$ (約20ng)を添加したもの、およびそれにさらに未標識プローブ断片500ngを加えたものの2種類の条件の定量性を比較したところ、どちらも同様の結果を示したため、前者の条件を用いることとした。ハイブリダイゼーションの後、ナイロンメンブレン上のスロット部分を切り出し、シンチレーションバイアル中で市販の液体シンチレーター ACSII(Amersham社) 約5mlに浸し、ゲノミックDNAにハイブリダイズしたプローブの量を液体シンチレーションカウンターで定量した。ハイブリダイゼーションの条件およびメンブレンの洗浄条件は以下のとおりである。

プレハイブリダイゼーション	4時間	42℃
ハイブリダイゼーション	18時間	42℃

フィルターの洗浄

1. 2×SSC, 0.1%SDS 5分 室温
2. 2×SSC, 0.1%SDS 30分 室温
3. 1×SSC, 0.1%SDS 60分 68℃
4. 0.1×SSC, 0.1%SDS 60分 68℃

定量は変異体DNAサンプルの計数値を原品種DNAサンプルにおける計数値で割った相対値をもって測定値とし、独立な3枚のメンブレンについて測定した平均値を算出することによって行った。

4. 2. 2 結果

各供試系統のDNAサンプルにハイブリダイズした放射性プローブ量の、原品種DNAサンプルに対する相対値を表4-2に示す。プローブとして用いた反復DNAクローン全てについて、1つ以上の変異系統がコピー数の変異を示し、また、供試した14系統のうちFTY86-44903を除く13系統において、反復配列の有意な増減が認められた(有意水準5%)。最も大きいコピー数の増加を示した配列はRS1であり、Ty86α-R3で原品種日本晴の260%に増幅されていた。また、最大の減少を示した配列はHC37であり、この配列はFTY86-123においてフクニシキの40%に減少していた。

検出された有意な変異は27であり、そのうち20は増加方向へ、残り7は減少方向への変異であった。このうち、HC37およびNP73の2つの配列は減少方向への変異のみが有意であり、HC8は日本晴由来の変異系統のゲノムにおいては増幅され、フクニシキ由来の変異系統においては失われる傾向にあった。

また、変異系統別に各反復配列の動態を比較すると、反復配列のコピー数において変異が認められた13系統のうち、配列の有意な増加のみが認められたものが6系統、有意な減少のみが認められた系統が3系統、増加、減少両方向の変異を示すものが4系統であっ

表4-2 変異体ゲノムにおける各種反復配列のコピー数の原品種に対する相対量 (±s.e.)

系統	プローブ						
	pRS1(rDNA)	pHC8	pHC21	pHC37	pHC52	pNB92	pNP73
日本晴	1.00±0.29	1.00±0.06	1.00±0.24	1.00±0.23	1.00±0.17	1.00±0.08	1.00±0.01
Ty 87I	1.35±0.40	1.37±0.08*	1.50±0.09	1.39±0.06	1.33±0.10	1.32±0.07*	0.92±0.05
Ty 88I	2.07±0.14*	1.25±0.03*	1.26±0.01	0.99±0.24	1.22±0.08	1.07±0.11	0.87±0.05
Ty 86α-R3	2.57±0.09*	1.14±0.06	0.97±0.19	0.85±0.16	1.07±0.14	0.87±0.09	0.77±0.00*
Ty 86α-R19	2.25±0.12*	1.43±0.11*	1.23±0.21	1.33±0.04	0.92±0.21	1.26±0.05*	1.08±0.03
Ty 86α-R22	2.26±0.27*	1.20±0.16	1.12±0.09	1.22±0.08	1.22±0.01	1.12±0.20	0.79±0.03*
Ty 87α-31	2.02±0.17*	1.50±0.04*	1.19±0.12	1.23±0.11	1.32±0.05	1.25±0.03*	0.79±0.03*
Ty 87α-79	1.57±0.42	1.57±0.04*	1.65±0.06	1.20±0.33	1.23±0.22	1.40±0.17	0.91±0.05
Ty 87α-148	1.18±0.49	1.81±0.07*	1.86±0.10*	0.66±0.15	1.82±0.13*	1.63±0.14*	0.60±0.06*
フクニシキ	1.00±0.33	1.00±0.06	1.00±0.28	1.00±0.02	1.00±0.13	1.00±0.28	1.00±0.05
FTy 86-123	1.17±0.36	0.60±0.02*	0.67±0.02	0.39±0.11*	0.71±0.05	0.84±0.04	1.13±0.02
FTy 86-36804	1.47±0.14	0.68±0.04*	0.66±0.03	0.59±0.04*	0.65±0.02	0.86±0.08	0.78±0.03*
FTy 86-44903	1.82±0.12	0.93±0.04	0.91±0.03	0.94±0.07	0.93±0.06	1.22±0.26	0.95±0.06
FTy 85	1.61±0.01	0.93±0.08	0.90±0.01	0.87±0.02*	0.91±0.03	1.42±0.06	0.89±0.04
FTy 89I	2.30±0.08*	1.16±0.03	0.89±0.04	0.99±0.07	0.97±0.02	1.36±0.00	0.88±0.04
FTy 89II	2.22±0.18*	1.23±0.04*	0.74±0.12	1.02±0.10	1.10±0.05	1.55±0.18	1.05±0.05

*有意水準5%で原品種との間に差が認められたことを示す。

た。日本晴由来の系統においては有意なコピー数の変異はその多くが増加方向の変異であった。配列の減少のみが生じているものではなく、増減両方向の変異を合わせ持つものは NP73 のコピー数の減少が生じた系統に限られている。それに対して、フクニシキ由来の系統においては FTy85 および FTy86 の 2 つの系統群では有意な変異は減少方向のみに起こっており、FTy89I および FTy89II においては有意な変異は増加方向に生じている。

次に、各反復配列のコピー数の増減が、それぞれ独立に生じるのか、あるいは同調性を示すのかを明らかにするため、日本晴由来の 8 系統 (Ty 系統) とフクニシキ由来の 6 系統 (FTy 系統) について、各反復配列間のコピー数の相関を調べた。その結果、各配列間の組み合わせ 21 のうち、Ty 系統においては 10、FTy 系統においては 9 の組み合わせ間に有意な相関関係が認められた (表 4-3)。このように、配列間にコピー数の相関があることは配列の増減が配列ごとに独立に起こるのではなく、同調的に生じていることを示している。しかし、Ty 系統と FTy 系統とで共通して有意な相関関係のある配列の組み合わせは 3 通り (RS1-HC8, RS1-HC52, HC8-NB92) のみであり、相関の正負も一致していたのは HC8 と NB92 の 1 組み合わせのみであった。また、図 4-1 に示すように、Ty 系統においては HC8 と HC21, NB92 間には有意な正の相関があるのに対し FTy 系統では HC8 と HC21 の間には相関関係がない、Ty 系統では RS1 とその他の配列間の有意な相関関係は全て負相関であるのに対し FTy 系統においては全て正の相関関係である、というように各反復配列間のコピー数の増減に関する相関関係は複雑であった。

以上の結果から、本章で供試した変異系統のゲノムは反復配列のコピー数に変異が生じていること、各配列のコピー数の増減に同調性が認められ、その配列の組み合わせはさまざまに変わりうるが、それぞれの組み合わせにおいて、同調的に配列の増減をコントロールする機構が存在することが示された。

表 4-3 各系統における反復配列間のコピー数の相関

a. Ty lines

	pHC8	pHC21	pHC37	pHC52	pNB92	pNP73
pRS1	-0.78*	-0.95**	0.09	-0.77*	-0.88**	0.26
pHC8		0.86**	-0.25	0.70	0.95**	-0.29
pHC21			-0.23	0.74*	0.92**	-0.26
pHC37				-0.55	-0.07	0.78*
pHC52					0.71	-0.79*
pNB92						-0.20

b. FTy lines

	pHC8	pHC21	pHC37	pHC52	pNB92	pNP73
pRS1	0.96**	0.50	0.91*	0.85*	0.81	-0.14
pHC8		0.54	0.94*	0.95*	0.93*	-0.02
pHC21			0.73	0.58	0.64	-0.24
pHC37				0.90*	0.91*	-0.21
pHC52					0.95*	0.21
pNB92						0.02

*, **: それぞれ5%, 1%で有意

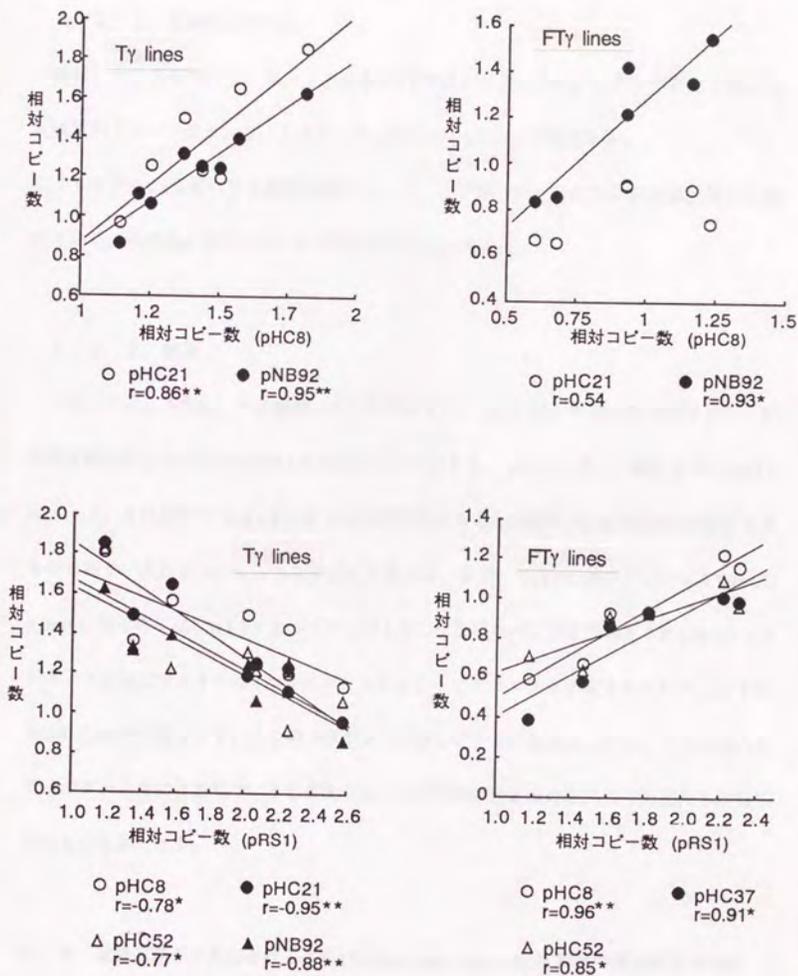


図4-1 各系統群における反復配列のコピー数の相関

*,** : それぞれ5%、1%で有意

4. 3 変異系統のゲノムにおける反復DNAの RFLP

4. 3. 1 材料および方法

供試した変異系統は 3. 3. 1 とおなじ 17 系統である。また、プローブとして用いた反復配列クローンは 4. 2. 1 と同一の、表 4-1a に示す 7 種である。

ゲノミック DNA を消化する制限酵素は 3. 3. 1 で用いたものと同じ 6 塩基認識の 6 種類である。その他の分析に関する手法は同節と同一である。

4. 3. 2 結果

プローブとして供試した 7 種類の反復配列のうち、RS1 および NP73 の 2 クローンが変異系統のゲノムにおいて RFLP を検出した。このうち、RS1 によって検出された RFLP は 3. 2. 4 において NB36 によって検出されたものと同様に rDNA の IGS の多型によるものであり、これについては次節で詳しく論ずる。また、Ty87 α -79 のゲノミック DNA の *Bam*HI 消化物には、NP73 とハイブリダイズして主要なバンドを形成する約 12 kb のフラグメントの他にマイナーな 4.7 kb のバンドを生じるフラグメントが含まれていることが明らかになった (図 4-2)。このフラグメントはシグナルの強度から少なくとも複数のコピーがゲノム中に存在していると考えられ、反復配列の分子種の変換の中間段階を示しているものと思われる。

4. 4 変異系統ゲノムにおける rDNA の Intergenic spacer (IGS) 領域の構造変異の解析

3. 2 の RFLP 分析によって検出された多型のうち NB36 にハイブリダイズするフラグメントの長さの多型は rRNA 遺伝子のコード領域のクローン pRY18 (Sano, 1989) によって

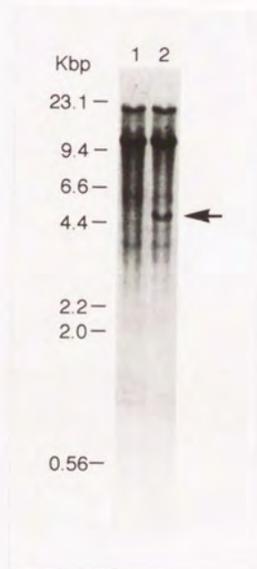


図 4-2 Ty87 α -79において認められたNP73に相同な新フラグメント
 1. 日本晴 2. Ty87 α -79 の *Bam*HI 消化物のpNP73 をプローブに用いた
 サザンハイブリダイゼーション。 矢印は新しいフラグメントを示す。

再現され、NB36は日本晴ゲノムのrRNA遺伝子のコード領域のクローンであることが示唆された。pRY18はイネ品種台中65号のrRNA遺伝子のコード領域のほとんどに相当する3.8kbの *Bam*HI フラグメントを pUC13 に挿入したゲノミッククローンである。また、pNB36 および pRY18 は *Bam*HI で消化した変異体ゲノムDNAのサザンプロットにおいては主要な3.8kbのバンドに多型を示さず、*Eco*RI、*Eco*RV、*Xba*I で消化したサザンプロットにおいてはおよそ8kbの主要なバンドに多型を示す。染色体上においてイネのrDNAはpRY18にクローニングされた3.8kbのフラグメントとコード領域の間に介在する intergenic spacer (IGS) 領域を含む約4~6kbの2つの *Bam*HI フラグメントが交互に直列にならんだタンデムリピートを形成しているとの報告があるが (Sano and Sano, 1990)、このことから、pNB36 および pRY18 によって検出された多型はrDNAのIGS領域の多型によるものと予想された。そこで台中65号のIGS領域を含む4.5kbの *Bam*HI フラグメントのクローンである pRY12 (Sano, 1989) をプローブとし、TY86 α -R3、TY87 α -79、FTY86-51903 のゲノミックDNAの *Bam*HI 消化物に対するサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、これらの変異系統のゲノム中において、RY12 とハイブリダイズする *Bam*HI フラグメント、すなわち rDNAのIGS領域の長さに多型が生じていることが明らかになった (図4-3)。

そこで、これらの変異系統のゲノムにおいて誘発されたタンデムリピート構造の再配列の機構を調べるため、ゲノミックDNAよりこの領域をクローニングし、その構造解析を行った。

4. 4. 1 材料および方法

クローニングに際して3. 2. 2においてNB36に対して多型を示したTY86 α -R3、

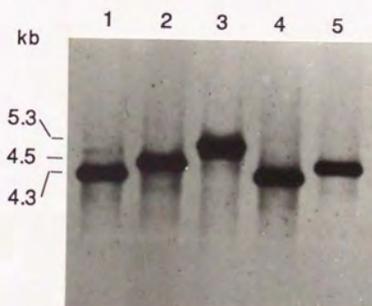


図4-3 変異系統のrDNAのIGS領域の多型

プローブ pRY12, 制限酵素 *Bam*HI.

レーン1. 日本晴 2. TY86 α -R3 3. TY87 α -79 4. フクニシキ
5. FTY86-51903

TY87 α -79、FTY86-51903の3つの変異系統およびその原品種日本晴およびフクニシキの5系統を供試した。これら5系統の成葉からゲノミックDNAを3. 2. 1に示した方法により抽出し、各DNAサンプル50 μ gに*Bam*HIを35単位加えて1時間反応させ、部分消化した。これを5-25%塩化ナトリウム濃度勾配遠心法によって分子量で分画し、平均鎖長10-20kbの画分を回収した。これをラムダファージベクター λ EMBL3の*Bam*HIアームにライゲーションし、*in vitro*パッケージングの後大腸菌P2392を宿主菌としてプレATINGグし、小規模なゲノミックライブラリー（ブランク数10⁵）を作成した。

組み換え体のスクリーニングはナイロンメンブレンHybond N+を用いたブランクハイブリダイゼーション法によって行い、プローブとして用いたpRY12はインサートを分離、精製後、3. 2. 1に示したECL法により標識、検出した。

ブランクハイブリダイゼーションの結果5つのライブラリーそれぞれから陽性ブランクを得た。そのブランクからファージDNAを抽出、精製した後、*Bam*HIで完全消化したところ、それぞれ予想された鎖長のフラグメントが存在し、さらにサザンハイブリダイゼーションによってそのフラグメントがRY12とハイブリダイズすることを確認した。クローニング中に欠失の生じたクローンを拾ってしまう危険を避けるため、各組み換えファージDNAをクローニングの材料として用いたイネ各系統のゲノミックDNAと混合して*Bam*HIで消化し、RY12をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションを行った結果、全ての単離した組み換えファージは対応するイネ系統のゲノムDNA中のIGS領域を完全に保持していることを確認した。このようにしてそれぞれの組み換えファージ内にクローニングしたイネrDNAのIGS領域のクローンはプラスミドベクターpUC19にサブクローニングし、以降の分析に用いた。

4. 4. 2 結果

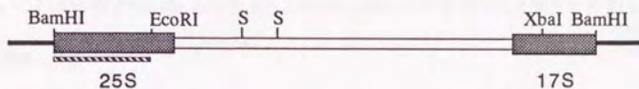
(1) 制限酵素地図の作成

日本晴、TY86 α -R3、TY87 α -79、フクニシキ、FTY86-51903の5系統から得たrDNAのIGS領域のクローンをそれぞれpRS1、pRS2、pRS3、pRS4、pRS5とする。これらのクローンを *Bam*HI、*Eco*RI、*Xba*I の3つの制限酵素で消化しその切断パターンを解析したところ、その3つの制限酵素に関し図4-4に示すような物理地図が得られた。栽培イネの系統間に見られるIGSの長さの多型はその内部に存在する制限酵素 *Sal*I のサイトを両端に持つ約250bpのサブリピートの反復数によるとの報告 (Sano and Sano, 1990)に従い、各クローンの *Bam*HI 完全分解物を *Sal*I で部分分解したものを1.3%アガロースゲルで電気泳動し、図4-4の *Bam*HI - *Eco*RI フラグメントに当たる断片をpRY12から単離したものをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、エンドラベルマッピングを行った。その結果、図4-4に示すように、変異系統におけるIGSの長さの多型は栽培イネの系統間に見られるものと同様に250bpの *Sal*I サブリピートの反復数が、日本晴およびフクニシキの2コピーからTY86 α -R3およびFTY86-51903では1コピー、TY87 α -79では3コピー、それぞれさらに増加していることによるものであることが明らかになった。

(2) 変異IGS領域の塩基配列

変異系統のrDNAのIGS領域における多型がその内部に存在する約250bpの *Sal*I リピートの反復数の増加によるものであることが示されたので、その領域の構造をさらに詳しく解析するために、塩基配列の決定を行った。まず、5種類のpRSクローンを *Sal*I で部分消化し、アガロースゲル電気泳動によってpUC19の配列にIGS配列がそれぞれの *Sal*I サイトで切断されたものが連結しているフラグメントを分離精製した。これをそれぞれセルフライゲーションさせた後大腸菌DH5 α 株に導入した。さらに、各クローンを制限酵

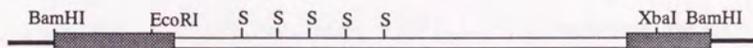
pRS1 (Nipponbare)



pRS2 (Ty 86 α -R3)



pRS3 (Ty 87 α -79)



pRS4 (Fukunishiki)



pRS5 (FTY 86-519)

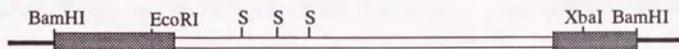


図 4-4 変異系統およびその原品種のrDNAのIGS領域のクローンの物理地図

▨ : エンドラベルマッピングに使用したプローブ領域
▬ : ベクター(pUC19)の配列 S : Sallの切断部位

素 *EcoRI* および *HindIII* で二重消化し、得られたIGS領域のデリーションフラグメントを
ファージベクター M13mp18 のマルチクローニングサイトの*EcoRI-HindIII* 部位に挿入し
た。この組み換えDNAを大腸菌 DH5 α F' 株に導入して得られたプラークから 1 本鎖DNA
を調製した。

得られたデリーションクローンのシリーズは pRSクローンのそれぞれの *SaII* 部位が
M13mp18 の *SaII* 部位と連結し、その部分より17S-rRNA遺伝子側の領域を欠失した構造
になっている (図4-5)。このクローンを用いて、各 *SaII* リピートの塩基配列を決定
した。

各々のクローンの 1 本鎖DNAをテンプレートとし、dideoxy法によりサンプルを合成し
た。トウモロコシ (Toloczki and Feix 1986)、コムギ (Barker *et al.* 1988)のrDNAのIGS領
域の塩基配列データより、この領域はGC含量が高く、分子内で2次構造をとりうる配列
が含まれていることが予想されたので、相補鎖合成には通常よく用いられている修飾 T7
DNAポリメラーゼの代わりに高温、低塩濃度条件でDNA伸長反応を行うことができる
TaqDNAポリメラーゼを使用し、電気泳動時の圧縮現象を回避するためにdGTPのアナロ
グであるdC⁷GTPを反応に用いた。プライマーには18merのM13プライマー-d(TGTA AAC-
GACGGCCAGT) を4種の蛍光色素で標識したものをを用いた。反応産物は50%尿素、1 \times
TBEバッファーを含む6%ポリアクリルアミドゲルにアプライし、30W定電力条件で電気
泳動した。データの取り込みおよび生データの解析と塩基配列の決定には Applied
Biosystems社の373A型DNAシーケンサーを用いた。

得られた各*SaII*リピートの塩基配列を図4-6に示す。各クローンにおける*SaII*リピー
トは25SrRNA遺伝子に近いほうからrep1、rep2、rep3、rep4、rep5とし、その前に元のク
ローンを示すRS1からRS5という記号をつけて表す。日本晴とフクニシキから得られた

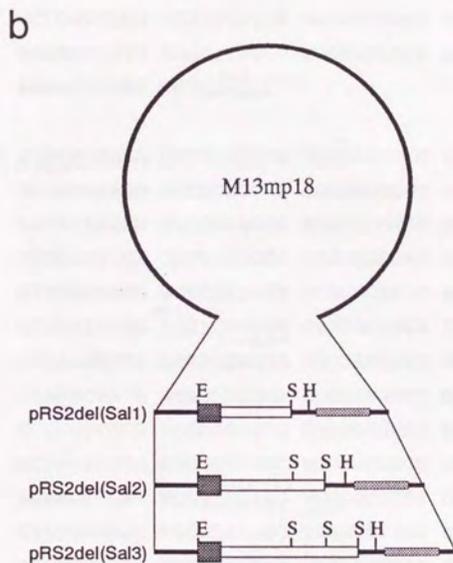
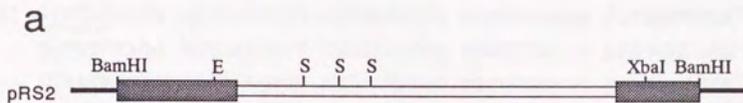


図 4-5 シークエンスのためのデリーションクローン

a. pRS2 b. デリーションクローンの物理地図

—— はベクターの配列、 ■■■■ はプライマーのアニーリング部位を示す。

RS1 GTTCGGTCCA CGTCCGCTCG CCCAGCTCC CGAGCGAAAA CCGTGTGCGA⁵⁰
 |_{rep1}→
 GCTGTGAAGG GCTGGACGCT AGGGGTGCGT GGGGCTGGCT ATGGCCACG¹⁰⁰
 ACTATAGTAG GGGGGAAGGG ATGGCCGGG TGCCACGCGC ACGGCACCCG¹⁵⁰
 GTTCGGTCCA CGTTCGGTCG CCGGGCCGAC CGACCGGCAA CCGTGC GCGA²⁰⁰
 GTTGGGAAGG GCTGGCTCGT GCAGCCACCC ACCGGCCGAC CGACCGAAAA²⁵⁰
 CCCGATTCGG ^{SalI}TCGACGTTTCG |_{rep2}→ GTCCGCCGGG CGACCGGCCG AAAACTGTGT³⁰⁰
 GCGAGCTGTG AAGGGCTGGA CGCTAGGGGT GCGTTGGGCT GGCTATGGCC³⁵⁰
 CTAGACTATA GTAGGGGGGA AGGGATGGCC GGGCTGCCAC GCGCACGGCA⁴⁰⁰
 CCCGTTTCGG TCCACGTTTCG GGC GCCGGGC CGACCGACCG GCACCCGTGC⁴⁵⁰
 GCGAGTTGGG AAGGGCTGGC TCGTGCAGCC ACCCACC GGC CGACCGACCG⁵⁰⁰
 AAAACCCGAT TCGGTCGAC⁵¹⁹ ^{SalI}

RS2 GTTCGGTCCA CGTCCGCTCG CCCAGCTCC CGAGCGAAAA CCGTGTGCGA⁵⁰
 |_{rep1}→
 GCTGTGAAGG GCTGGACGCT AGGGGTGCGT GGGGCTGGCT ATGGCCCTAG¹⁰⁰
 ACTATAGTAG GGGGGAAGGG ATGGCCGGG TGCCACGCGC ACGGCACCCG¹⁵⁰
 GTTCGGTCCA CGTTCGGGCG CCGGGCCGAC CGACCGGCAC CCGTGC GCGA²⁰⁰
 GTTGGGAAGG GCTGGCTCGT GCAGCCACCC ACCGGCCGAC CGACCGAAAA²⁵⁰
 CCCGATTCGG ^{SalI}TCGACGTTTCG |_{rep2}→ GTCCGCCGGG CGACCGGCCG AAAACTGTGT³⁰⁰
 GCGAGCTGTG AAGGGCTGGA CGCTAGGGGT GCGTTGGGCT GGCTATGGCC³⁵⁰
 CTAGACTATA GTAGGGGGGA AGGGATGGCC GGGCTGCCAC GCGCACGGCA⁴⁰⁰
 CCCGTTTCGG TCCACGTTTCG GGC GCCGGGC CGACCGACCG GCACCCGTGC⁴⁵⁰
 GCGAGTTGGG AAGGGCTGGC TCGTGCAGCC ACCCACC GGC CGACCGACCG⁵⁰⁰
 AAAACCCGAT TCGGTCGACG ^{SalI}TTTCGGTCCG |_{rep3}→ CCGGCGACCG GCCGAAAAC⁵⁵⁰
 GTGTGC GAGC TGTGAAGGGC TGGACGCTAG GGGTGC GGTG GGCTGGCTAT⁶⁰⁰
 GGCCCTAGAC TATAGTAGGG GGAAGGGAT GGCCGGGCTG CCACGCGCAC⁶⁵⁰
 GGCACCCGGT TCGGTCACG TTCGGGCGCC GGGCCGACCG ACCGGCACCC⁷⁰⁰
 GTGCGC GAGT TGGGAAGGGC TGGCTCGTGC AGCCACCCAC CGGCCGACCG⁷⁵⁰
 ACCGAAAACC CGATTCGGTC ^{SalI}GAC⁷⁷³

図4-6 変異体および原品種のrDNAIGSのサブリピート部位の塩基配列

RS3 GTCCGGTCCA CGTCCGCTCG CCCGAGCGAG AACCGTGC GC GAGCTGTGAA⁵⁰
 |_{rep1}→
 GGGCTGCACG CTAGGGGTGC GTGGGGCTGG CTATGGCCCA CGACTATAGT¹⁰⁰
 AGGGGGGAAG GGATGGCCGG GCTGCCACGC GCACGGCACC CGGTTCCGGTC¹⁵⁰
 CACGTTCCGG CGCCGGGCCG ACCGACCGGC AACCGTGC GC GAGTTGGGAA²⁰⁰
 GGGCTGGCTC GTGCAGCCAC CCACCGGCCG ACCGACCGAA AACCCGATTC²⁵⁰
GGTCGACGTT CGGTCCGCCG GGCACCGGC CGAAAAGTGT GTGCGAGCTG³⁰⁰
 |_{rep2}→
 TGAAGGGCTG GACGCTAGGG GTGCGTGGGG CTGGCTATGG CCCTAGACTA³⁵⁰
 TAGTAGGGGG GAAGGGATGG CCGGGCTGCC ACGCGCACGG CACCCGGTTC⁴⁰⁰
 GGTCACGTT CGGGCGCCGG GCCGACCGAC CGGCAACCGT GCGCGAGTTG⁴⁵⁰
 GGAAGGGCTG GCTCGTGCAG CCACCCACCG GCCGACCGGC CGAAAACCCG⁵⁰⁰
 |_{rep3}→
 ATTCGGTCGA CGTTCGGTCC ACCGGCGCAC CGGCCGAAAA CTGTGTGCGA⁵⁵⁰
 |
 GCTGTGAAGG GCTGGACGCT AGGGGTGCCT TGGGCTGGCT ATGGCCCTAG⁶⁰⁰
 ACTATAGTAG GGGGGAAGGG ATGGCCGGGC TGCCACGCGC ACGGCACCCG⁶⁵⁰
 GTTCGGTCCA CGTTCGGTGC CCGGGCGCAC CGACCGGCAA CCGTGC CGCA⁷⁰⁰
 GCTGTGAAGG GCTGGCTCGT GCAGCCACCC ACCGGCCGAA AACCCGATTC⁷⁵⁰
 |_{rep4}→
GGTCGACGTT CGGTCCGCCG GGCACCGGC CGAAAAGTGT GTGCGAGCTG⁸⁰⁰
 |
 TGAAGGGCTG GACGCTAGGG GTGCGTGGGG CTGGCTATGG CCCACGACTA⁸⁵⁰
 TAGTAGGGGT GAGCGGATGG ACGGGCTGCC ACGCGCACGG CACCCGGTTC⁹⁰⁰
 GGTCACGTT CGGTCGCCGG GGCACCGCAC CGGCAACCGT GCGCGAGCTG⁹⁵⁰
 TGAAGGGCTG GCTCGTGCAG CCACCCACCG GCCGAAAACC CGATTCGGTC¹⁰⁰⁰
 |
GACGTTCCGGT CCGCCGGGCG ACCGGCCGAA AACTGTGTGC GAGCTGTGAA¹⁰⁵⁰
 |_{rep5}→
 GGGCTGGACG CTAGGGGTGC GTTGGGCTGG CTATGGCCCA CGACTATAGT¹¹⁰⁰
 AGGGGTGAGC GGATGGACGA GCTGCCACGC GCACGGCACC CGGTTCCGGTC¹¹⁵⁰
 CACGTTCCGG CGCCGGGCCG ACCGACCGGC AACCGTGCAC GTGTTGTGAA¹²⁰⁰
 GGGCTGGCTC GTGCAGCCAC CCACCGGCCG ACCGACCGAA AACCCGATTC¹²⁵⁰
 |
GGTCGAC¹²⁵⁷

図4-6 (続き)

RS4 GTTCGGTCCA CGTCCGCTCG CCCAGCTCC CGAGCGAAAA CCGTGTGCGA⁵⁰
 ↓_{rep1}→
 GCTGTGAAGG GCTGGACGCT AGGGGTGCGT GGGGCTGGCT ATGGCCCACG¹⁰⁰
 ACTATAGTAG GGGGAAGGG ATGGCCGGGC TGCCACGCGC ACGGCACCCG¹⁵⁰
 GTTCGGTCCA CGTTCGGTCG CCGGGCCGAC CGACCGGCAA CCGTGC GCGA²⁰⁰
 GTTGGGAAGG GCTGGCTCGT GCAGCCACCC ACCGGCCGAC CGACCGAAAA²⁵⁰
 CCCGATTTCGG ^{SalI}TCGACGTTTCG GTCCGCCGGG CGACCGGCCG AAAACTGTGT³⁰⁰
 ↓_{rep2}→
 GCGAGCTGTG AAGGGCTGGA CGCTAGGGGT GCGTTGGGCT GGCTATGGCC³⁵⁰
 CTAGACTATA GTAGGGGGGA AGGGATGGCC GGGCTGCCAC GCGCACGGCA⁴⁰⁰
 CCCGGTTCGG TCCACGTTTCG GGCGCCGGGC CGACCGACCG GCACCCGTGC⁴⁵⁰
 GCGAGTTGGG AAGGGCTGGC TCGTGCAGCC ACCCACGGGC CGACCGACCG⁵⁰⁰
 ↓_{SalI}→
 AAAACCCGAT TCGGTCGAC⁵¹⁹

RS5 GTTCGGTCCA CGTCCGCTCG CCCAGCTCC CGAGCGAAAA CCGTGTGCGA⁵⁰
 ↓_{rep1}→
 GCTGTGAAGG GCTGGACGCT AGGGGTGCGT GGGGCTGGCT ATGGCCCACG¹⁰⁰
 ACTATAGTAG GGGGAAGGG ATGGCCGGGC TGCCACGCGC ACGGCACCCG¹⁵⁰
 GTTCGGTCCA CGTTCGGTCG CCGGGCCGAC CGACCGGCAA CCGTGC GCGA²⁰⁰
 GTTGGGAAGG GCTGGCTCGT GCAGCCACCC ACCGGCCGAC CGACCGAAAA²⁵⁰
 CCCGATTTCGG ^{SalI}TCGACGTTTCG GTCCGCCGGG CGACCGGCCG AAAACTGTGT³⁰⁰
 ↓_{rep2}→
 GCGAGCTGTG AAGGGCTGGA CGCTAGGGGT GCGTTGGGCT GGCTATGGCC³⁵⁰
 CTAGACTATA GTAGGGGGGA AGGGATGGCC GGGCTGCCAC GCGCACGGCA⁴⁰⁰
 CCCGGTTCGG TCCACGTTTCG GGCGCCGGGC CGACCGACCG GCACCCGTGC⁴⁵⁰
 GCGAGTTGGG AAGGGCTGGC TCGTGCAGCC ACCCACGGGC CGACCGACCG⁵⁰⁰
 ↓_{SalI}→
 AAAACCCGAT TCGGTCGACG TTTCGGTCCG CCGGCACCG GCCGAAAAC⁵⁵⁰
 ↓_{rep3}→
 GTGTGCGAGC TGTGAAGGC TGGACGCTAG GGGTGC GTG GGCTGGCTAT⁶⁰⁰
 GGCCCTAGAC TATAGTAGGG GGAAGGGAT GGCCGGGCTG CCACGCGCAC⁶⁵⁰
 GGACCCGGT TCGGTCCACG TTCGGGCCGC GGGCCGACCG ACCGGCACCC⁷⁰⁰
 GTGCGCGAGT TGGGAAGGGC TGGCTCGTGC AGCCACCCAC CGGCCGACCG⁷⁵⁰
 ↓_{SalI}→
 ACCGAAAACC CGATTTCGGTC GAC⁷⁷³

図 4 - 6 (続き)

2つのクローンの *SalI* リピート部位RS1-rep1とRS4-rep1、RS1-rep2とRS4-rep2の塩基配列は完全に一致した。また、RS1、RS2、RS5の各*SalI* リピートの塩基配列を比較したものを図4-7に示す。RS1-rep1とRS1-rep2は全く同じではなく、25SrRNA遺伝子側末端部に欠失(あるいは挿入)や塩基置換の集積している領域が1つあり、その他に5ヶ所の配列に塩基置換が認められる。RS2、RS5の各リピートの塩基配列をみると、RS2-rep2、RS2-rep3、およびRS5-rep2、RS5-rep3はRS1-rep2およびRS4-rep2と100%相同であり、この2つの変異IGSはこの254bpの配列がそのまま重複したものであることが明らかになった。さらに、RS2-rep1においては+81のGまではRS1-rep1と相同であるが、+98のT以降はRS1-rep2と相同である。このことは、Ty86 α -R3のゲノムが構築される過程で野生型rep1のこの+82から+97までの領域においてrep2、もしくはrep3との組み換えが起こったことを示唆する。即ち、RS5ではrDNAのIGSのrep2の直列重複が生じ、RS2ではそれに加え、rep1とrep2またはrep3との組み換えも起きている。

RS3はさらに複雑な塩基配列の変異を内包していた。RS1とRS3の各*SalI* リピートの塩基配列を比較したものを図4-8に示す。市販の塩基配列解析プログラム DNASIS を用いて計算したところ、RS3-rep1においては+28から+35までの8塩基の欠失など合計14塩基がRS1-rep1と異なっており、相同性は94% (251/265) に低下していた。また、RS3-rep2からrep5の4つの配列にも様々なユニークな変異があり、全く同じ配列を持った *SalI* リピート単位は存在しなかった。この4つの配列間の相同性は、91%から97%であった。

RS3の5つのリピートがどのようにして形成されたかを推定するため、塩基の差異の数を配列間の距離として、分子系統樹作成に用いられる方法の適用を試みた。図4-9aはRS1-rep1、RS2-rep1、RS3-rep1、RS1-rep2、RS3-rep2、RS3-rep3、RS3-rep4、RS3-rep5の8つの配列について、変異のある部位のみを示したものである。また、図4-9bに、

```

          10          20          30          40
RS1-rep1  GTTCGGTCCAGCTCCGCTCGCCCCAGCTCCCGAGCGAAACCGTG
RS2-rep1  *****
RS5-rep1  *****
RS1-rep2  *****--*--*GG*-----*--C-CG--*C-----*T***
RS2-rep2  *****--*--*GG*-----*--C-CG--*C-----*T***
RS5-rep2  *****--*--*GG*-----*--C-CG--*C-----*T***
RS2-rep3  *****--*--*GG*-----*--C-CG--*C-----*T***
RS5-rep3  *****--*--*GG*-----*--C-CG--*C-----*T***

          50          60          70          80          90
RS1-rep1  TCGGAGCTGTGAAGGGCTGGACGCTAGGGGTGCGTGGGGCTGGCT
RS2-rep1  *****
RS5-rep1  *****
RS1-rep2  *****T*****
RS2-rep2  *****T*****
RS5-rep2  *****T*****
RS2-rep3  *****T*****
RS5-rep3  *****T*****

        100         110         120         130
RS1-rep1  ATGCCCCACGACTATAGTAGGGGGAAGGGATGGCCCGGCTGCCA
RS2-rep1  *****TA*****
RS5-rep1  *****TA*****
RS1-rep2  *****TA*****
RS2-rep2  *****TA*****
RS5-rep2  *****TA*****
RS2-rep3  *****TA*****
RS5-rep3  *****TA*****

        140         150         160         170         180
RS1-rep1  CGCGCACGGCACCCGGTTCGGTCCACGTTCCGGTCGCCGGGCCGAC
RS2-rep1  *****G*****
RS5-rep1  *****G*****
RS1-rep2  *****G*****
RS2-rep2  *****G*****
RS5-rep2  *****G*****
RS2-rep3  *****G*****
RS5-rep3  *****G*****

        190         200         210         220
RS1-rep1  CGACCGGCAACCGTGC CGGAGTTGGGAAGGGCTGGCTCGTGCAGC
RS2-rep1  *****C*****
RS5-rep1  *****C*****
RS1-rep2  *****C*****
RS2-rep2  *****C*****
RS5-rep2  *****C*****
RS2-rep3  *****C*****
RS5-rep3  *****C*****

        230         240         250         260         265
all      CACCCACCGGCGGACCGACCGAAAACCCGATTCGGTTCGAC

```

図4-7 RS1、RS2、RS5の各リピートの塩基配列の比較

*はRS1-rep1と同じ塩基であること、-はDNASISにより最大相同性を得るために挿入されたスペースを示す。

```

                10         20         30         40
RS1-rep1  GTTCGGTCCACGTCCTCCGCTCGCCCCAGCTCCCGAGCGAAAACCGTG
RS3-rep1  **C*****-----*****G*****

RS1-rep2  GTTCGGTCC--G-CCGGCG---A-C-CG-GC-CGAAAACCTGTG
RS3-rep2  *****_*_*****_---*_**_*_******
RS3-rep3  *****_A-*****_---*_**_*_******
RS3-rep4  *****_**_******_---*_**_*_******
RS3-rep5  *****_**_******_---*_**_*_******

                50         60         70         80         90
RS1-rep1  TGCAGCTGTGAAGGGCTGGACGCTAGGGGTGCCTGGGGCTGGCT
RS3-rep1  C*****C*****C*****

RS1-rep2  TGCAGCTGTGAAGGGCTGGACGCTAGGGGTGCCTGGGGCTGGCT
RS3-rep2  *****G*****
RS3-rep3  *****
RS3-rep4  *****
RS3-rep5  *****

                100        110        120        130
RS1-rep1  ATGCCACGACTATAGTAGGGGGAAGGGATGGCCGGGCTGCCA
RS3-rep1  *****

RS1-rep2  ATGCCCTAGACTATAGTAGGGGGAAGGGATGGCCGGGCTGCCA
RS3-rep2  *****
RS3-rep3  *****
RS3-rep4  *****AC*****T*GC*****A*****
RS3-rep5  *****AC*****T*GC*****A*A*****

                140        150        160        170        180
RS1-rep1  CGCGCACGGCACCCGGTTCGGTCCACGTTTCGGTCGCCGGGCGCAG
RS3-rep1  *****G*****

RS1-rep2  CGCGCACGGCACCCGGTTCGGTCCACGTTTCGGTCGCCGGGCGCAG
RS3-rep2  *****
RS3-rep3  *****T*****C***
RS3-rep4  *****T*****C***
RS3-rep5  *****

                190        200        210        220
RS1-rep1  CGACCGCAACCGTGCAGAGTTGGGAAGGGCTGGCTCGTGCAGC
RS3-rep1  *****

RS1-rep2  CGACCGCACCCGTGCAGAGTTGGGAAGGGCTGGCTCGTGCAGC
RS3-rep2  *****A*****
RS3-rep3  *****A*****C**T*****
RS3-rep4  *****A*****C**T*****
RS3-rep5  *****A*****A**T**T*****

                230        240        250        260        265
RS1-rep1  CACCCACCGGCCGACCGACCGAAAACCCGATTCGGTCGAC
RS3-rep1  *****

RS1-rep2  CACCCACCGGCCGACCGACCGAAAACCCGATTCGGTCGAC
RS3-rep2  *****G*****
RS3-rep3  *****G*****
RS3-rep4  *****G*****
RS3-rep5  *****

```

図 4-8 RS1 と RS3 の各サブリピートの塩基配列の比較

*はRS1-rep1またはrep2と同じ塩基であること、
 -はDNASISにより最大相同性を得るために挿入されたスペースを示す。

a

塩基番号	3	10	11	12	13	17	18	21	22	23	24	25	26	27	28	30
RS1-rep1	T	A	C	G	T	C	T	C	C	C	C	A	G	C	T	C
RS2-rep1	T	A	C	G	T	C	T	C	C	C	C	A	G	C	T	C
RS3-rep1	C	A	C	G	T	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C
RS1-rep2	T	-	-	G	-	G	G	-	-	-	-	A	-	-	-	G
RS3-rep2	T	-	-	G	-	G	G	-	-	-	-	A	-	-	-	G
RS3-rep3	T	-	-	A	-	G	G	-	-	-	-	A	-	-	-	G
RS3-rep4	T	-	-	G	-	G	G	-	-	-	-	A	-	-	-	G
RS3-rep5	T	-	-	G	-	G	G	-	-	-	-	A	-	-	-	G

塩基番号	31	33	34	38	42	46	65	75	81	98	99	114	117	118	125	128
RS1-rep1	C	A	G	A	C	T	G	G	G	A	C	G	A	G	C	G
RS2-rep1	C	A	G	A	C	T	G	G	G	T	A	G	A	G	C	G
RS3-rep1	C	A	G	G	C	C	C	C	G	A	C	G	A	G	C	G
RS1-rep2	-	C	-	A	T	T	G	G	T	T	A	G	A	G	C	G
RS3-rep2	-	C	-	A	T	T	G	G	G	T	A	G	A	G	C	G
RS3-rep3	-	C	-	A	T	T	G	G	T	T	A	G	A	G	C	G
RS3-rep4	-	C	-	A	T	T	G	G	T	A	C	T	G	C	A	G
RS3-rep5	-	C	-	A	T	T	G	G	T	A	C	T	G	C	A	A

塩基番号	168	176	190	197	200	202	205	231	232	233	234	235	236	237	238	243
RS1-rep1	T	C	A	G	A	T	G	A	C	C	G	G	C	C	G	A
RS2-rep1	G	C	C	G	A	T	G	A	C	C	G	G	C	C	G	A
RS3-rep1	G	C	A	G	A	T	G	A	C	C	G	G	C	C	G	A
RS1-rep2	G	C	C	G	A	T	G	A	C	C	G	G	C	C	G	A
RS3-rep2	G	C	A	G	A	T	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G
RS3-rep3	T	G	A	G	A	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	G
RS3-rep4	T	G	A	G	A	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	G
RS3-rep5	G	C	A	A	T	T	T	A	C	C	G	G	C	C	G	A

b

	RS1-rep1	RS2-rep1	RS3-rep1	RS1-rep2	RS3-rep2	RS3-rep3	RS3-rep4
RS2-rep1		4					
RS3-rep1	14		16				
RS1-rep2	22		18	20			
RS3-rep2	21		19	19	3		
RS3-rep3	33		33	33	15	14	
RS3-rep4	34		38	34	20	19	7
RS3-rep5	27		29	25	11	12	22 15

図4-9 rDNAIGSのサブリピート塩基配列の変異

- a. 変異のあった部位のみをとりだしたもので、-は欠失を示す。
 b. 各配列間で差の見られた塩基数

この8配列の間での差異の見られた塩基数を示す。このマトリクスを作成するに当たっては、欠失は1塩基当たり1つの差異とした。図4-10はこの差マトリクスを基に、UPG (Unweighted Pair-Group Clustering)法 (館野 1984)を用いて系統樹を作成し、これよりRS3のIGSの形成過程を推定したものである。ここから明らかなように、同じ変異が2箇所で起きている。即ち、塩基番号98、99、114、117、118、125が rep4 とrep5 を生じる2本の枝で、また塩基番号243が rep2とrep3+rep4 を生じる2本の枝で、それぞれ重複して変異している。これが同じ変異が2箇所で独立に生じたことによるとは確率論的に考え難く、おそらくサブリピート配列の塩基置換、重複、組み換えが複合的に起こったことを示唆するものと考えられる。また、日本晴の2つのサブリピートの間においても差異がある塩基番号81、98、99、168、197において変異が生じている場合は、RS3-rep1ではRS1-rep2と、RS3-rep2からrep5においてはRS1-rep1と、それぞれ相同になっている。このように起源の異なる配列が各サブリピートに混在していることは、各IGS間での組み換えが頻繁に起こったことを意味している。以上のように、変異系統Tγ87αのゲノムにおいてrDNAのタンデムリピート構造が再構築される過程では塩基置換や欠失が他の変異系統群よりも高頻度で生じていたこと、および各IGS間での組み換えが複雑に起こっていたことが示唆された。

以上の結果から、変異系統のrDNAのIGS領域においてサブリピートの直列重複による長さの多型が生じていたこと、変異IGSが変異系統のゲノム中で増幅され、原品種の配列は失われていたこと、この構造が形成される過程には塩基置換、欠失、および配列間の組み換えが関与し、その程度には変異系統によって違いがあることが明らかになった。

4. 5 考察

変異体におけるゲノムの再配列の様相を知るための1つのアプローチとしてゲノム中の

各種反復配列のコピー数を測定し、その変異を調査した。今回の実験ではそれぞれの変異体においてゲノムサイズに違いがあることが予想されることから、単位核DNA量あたりのコピー数を原品種との相対値と比較することにした。定量には液体シンチレーションカウンターの用いたが、これは予備実験の結果、ECL法やDig-ELISA法で検出したX線フィルム上のシグナルをデンシトメーターで定量する方法に比べ、かなり定量性に優れていたためである。また、予備実験において、最も計数値の生データの大きかった配列においても原品種の10倍のコピー数までは計数値とコピー数の間に正確な直線関係があり、本実験で得られた値は変異系統ゲノム中のコピー数の原品種に対する相対値を定量的に示すと考えた。

供試した8系統群14系統のうち、1系統を除くすべての系統で反復配列のコピー数の有意な変異が認められた。第3章で述べたRFLP分析の結果と比較すると、系統群による変異性の偏りはなく、得られた変異系統のゲノムにおける反復配列の変異は普遍的に認められた。また、増減の規模は原品種の260%から40%と、比較的小規模なものであった。各種反復配列のコピー数がイネにおいて品種のレベルでも変異が認められることについてはいくつかの報告があり(Zheng *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 1989)、本実験においても原品種として供試した日本晴とフクニシキとの間ではほぼ2倍程度のコピー数の違いのある配列も散見された。今回認められた変異の幅もほぼ品種間で認められるものと同じ程度であり、恐らく、反復配列のコピー数はゲノム構造に関する諸形質の中でも変異しやすいものであろうと思われる。Cullis and Cleary (1986²)は肥料条件等の環境条件を変えて育成することによって遺伝変異を誘発したアマ(*Linum usitatissimum*)の変異系統 (genotrophs)において反復配列のコピー数の変異を見だしているが、やはり、その変異の幅は品種間に認められるものとはほぼ同じ程度のものであったと報告している。

反復配列のいくつかの分子種の間にはコピー数の増減に関して同調関係が認められた。しかし多くの場合、その相関関係には日本晴由来の系統群とフクニシキ由来の系統群との間で違いが認められ、同じ2つの配列のコピー数の間で、一方で有意な相関関係が認められるにもかかわらず他方ではそれが認められなかったり、相関が一方では正、他方では負であったりしていた。これが原品種の遺伝的背景の差異によるものであるのか、また、種子、幼苗、減数分裂期という放射線照射を受けたステージの違いによるものであるのかは明らかではない。しかし、日本晴由来の系統群とフクニシキ由来の系統群ともに特定なくつかの2反復配列間にコピー数の増減パターンに有意な相関関係が認められたことは、ゲノム中の反復配列の増減は配列ごとに独立に起こるのではなく、異なった反復配列の増減を同調的に引き起こすような遺伝的システムが存在することを示唆する。今回供試した変異系統の変異誘発過程において、ゲノムの冗長化と放射線照射とのいずれか、あるいは双方が起因となってこのシステムが活性化され、コピー数の変異を誘発したものと考えられる。

DNA配列のコピー数の変異、特に配列の増幅についてはアフリカツメガエルの卵母細胞におけるrDNAの増幅に関する古典的な報告(Hourcade *et al.* 1973)を始め、様々な報告がある。ある種の突然変異的なDNAの構造変異としては、哺乳類の培養細胞系における薬剤耐性獲得にかかわるメカニズムがよく研究され、ゲノムのダイナミックな挙動が明らかにされている(Giulotto *et al.* 1986; Debatisse *et al.* 1986, 1988; Godkov *et al.* 1987; Saito *et al.* 1989)。この系では薬剤存在下で培養されると耐性遺伝子を含む領域の増幅が起こり、さらに強い耐性を獲得してゆく際にはDNAの再配列によって生じた新しいフラグメントの選択的増幅とこれまで増幅された領域の消失が起こることが明らかになっている。

植物の培養細胞においても、ジャガイモのプロトプラストからの再分化個体

(Landsmann and Uhrig, 1985)、アマの茎由来のカルスの再分化個体(Cullis and Cleary, 1986)等において種々の反復配列のコピー数の変異が報告されているのを始め、80年代前半から様々な植物種についてゲノム内の反復配列の増減に関する報告がある。また、培養中の反復配列の動態をとらえたものとしては、Kikuchi *et al.*(1987)が脱分化・再分化特異的にコピー数を変える配列の存在を報告したものがあつた。また、Zheng *et al.* (1987)はカルス化に伴い急速に増幅される反復配列を多数クローニングし、同じグループのCuzzoni *et al.* (1990)は、そのうちの少なくとも1種の配列は染色体外の環状分子として増幅されていることを明らかにしている。

これらの報告はゲノムが種々の外因に反応してDNAの一次構造を変えうる可塑性を持つことを示唆しているが、本章で認められた反復配列の増減においても、ゲノムが本来持つ潜在的変異性が発現したことが考えられる。

本章で明らかになつたrDNAのIGS領域の多型は物理地図の上ではイネの各系統間で認められた多型(Sano and Sano, 1990)と同様にIGS領域の内部に存在する約250bpの *Sa*I サブリビートの反復数の変異によるものであることが確かめられた。一般にrDNAのIGS領域の長さ(spacer length; s_1)は系統間、近縁種間で変異に富み、IGS内部のサブリビートの反復数の変異が s_1 の多型の要因となっていることが明らかになっている。この領域の塩基配列を解析したところ、大きく分けて2つの変異様式が明らかになつた。1つは系統群Ty 86 α およびFTy 86において認められたもので、これらの変異IGS領域においては数回の不等交叉により、タンデムリビート構造を形成する最初の変異反復単位を形成し得うる。もう1つは系統群Ty 87 α におけるものであり、この変異IGS構造にはいくつかの塩基置換や欠失が起こっている。加えて、この構造が形成される過程ではさまざまな中間型IGSが形成され、それらの変異サブリビート間で多くの組み換えが生じることが必要であつたと

推定される。このような系統群Ty87aにおける変異性の大きさ、とくに塩基置換率の高さはRFLP分析で得られた知見と一致する。サブリピートの反復数の変異はIGS間の不等交叉によるものと考えられているが、ソラマメでは個体の各器官における変異からこれが体細胞分裂時にも頻繁に生じていることが示唆されている(Rogers and Bendich, 1987)。イネにおいてはこのような報告はなく、おそらくソラマメほどの変異性はないと思われるが、本章で明らかになった多型がおよそ10世代のうちに生じたことは本研究で供試した変異系統がゲノムの動態に変異を生じていることを示唆するものと思われる。

もうひとつの興味ある知見はこの変異IGSのコピーがゲノム中で増幅し、以前の野生型IGSの直列反復配列構造が失われてしまっていることである。系統間、近縁種間でIGS領域に多型が見られる種においても、ひとつのrDNAのlocusにおける直列反復構造の反復単位は均一である(Appels & Dvorak 1982)。このような協調進化は不等交叉、転移、遺伝子変換等の機構が複合的に働くことによって起こると考えられる(河田 1989)。最近では偏向した遺伝子変換(biased gene conversion)によってrDNAの協調進化が起こったことを強く示唆する知見も得られている(Hills *et al.*, 1991)。本研究で明らかになったrDNAのIGSの多型がどのようにして変異系統のゲノム中で広がったのかは現在のところ不明である。塩基配列を調査したクローンはそれぞれ1つのみであるから、ゲノム中に他の塩基配列を持ったIGSが存在する可能性は否定できないが、少なくともサザンハイブリダイゼーションの結果を見る限り、IGS構造の均一性は示されている。反復配列のコピー数の増加にかかわる機構と同様な機構が選択的に変異IGSに働いたことも考えられるが、全く独立した現象であるかも知れない。

本章ではrDNAの他に1つの反復配列が構造の変異を生じ、少なくとも複数コピーに増幅されていることをRFLP分析によって見いだした。この知見を各種反復配列のコピー数

の変異、rDNAのIGS領域の変異と合わせて考えると、本実験で誘発された突然変異体のゲノムは、そのダイナミクスに大きな変異を生じていたことが強く示唆される。薬培養由来のコムギ double haploid 系統の RFLP 分析により、rDNAのIGS領域が数世代のうちに構造変異を生じたことが報告されている(Rode *et al.*, 1987)。この系もゲノム構成の不均衡を含む点で本研究の変異誘発系と類似点があり、この報告はゲノムのダイナミクスの変異が既存ゲノム構成の変化による内的要因と変異原処理 (Rode *et al.*(1987)の報告においては培養操作がこれに当たるといえよう) という外的要因との相互作用によって引き起こされることを示す一つの傍証になるものと考ええる。

第5章 変異系統の収量形質に関する変異様式の解析

5.1 緒言

第2章から第4章において、誘発された照射4倍体集団からの2倍性復帰個体はその後で様々な変異形質の分離を示し、1個体に多くの変異が集積していたことを示した。また、その核ゲノムDNAにもその構造およびダイナミクスに関する変異が誘発されていることを明らかにした。しかし、その一方で、この変異誘発法によって誘発された個体レベルの変異が、互いに独立した遺伝子の変異によるものか、あるいは植物の発育過程を通して働く遺伝子発現ネットワークそのものに及んでいるのかどうか、また、既存の変異誘発法による変異と比較して、表現型においてどのような特質をこの変異系統が持っているのかについては十分な情報が得られていない。

草姿および収量はイネの一生における最終結果であり、それが決定される過程においては多数の遺伝子がネットワークを形成して発現するものと思われる。したがって、このような形質の発現様式を原品種と比較調査することは、遺伝子発現ネットワークを理解しその変異を展望することにつながるといえよう。また、穂長、粒着密度、一株穂数等の収量構成要素間には一定のパターンを示すような相互作用が認められるが、それらの発現パターンの変異はそれに関与する遺伝子発現ネットワークの変更を反映したものと考えられる。そこで、本章では本研究で得られた変異体の形質、なかでも草姿および収量構成要素に関する諸形質について原品種と比較調査を行い、その変異の規模、および変異様式について考察し、既存の変異との相違を明らかにすることを試みた。

5. 2 材料および方法

本実験に供試した系統はフクニシキ由来の系統群FTY86に属する8系統である。これらの系統は照射4倍体集団からの復帰個体の2世代後代に当たる一個体(365)をさらに2世代展開して得られたものである。今回この系統を供試した理由は、これらの系統の由来変異個体365がその次代に、一見してわかる長幅比の小さい粒を付けるものや明らかに穂の長い個体を分離していたため(影山、1990)、おそらく多くの遺伝変異を内包しているものと考えたためである。

これらの系統を一本植えて株間20cm、列間30cmとして1系統当たり20個体6列を慣行にしたがって多摩農場で栽培し、境界の2列および各列の両端各4個体を除くブロックの中央部から10個体を供試した。系統によっては鳥害のため、10個体の完全なサンプルが得られなかったものが生じたが、これについては被害を受けていない株のみを、やはりブロックの中央部からサンプリングした。

サンプリングした各個体について、草丈、主稈穂長、主稈の穂の全額花数、1株穂数、1株穂重、主稈の穂首直径、初および玄米の長さ、幅、厚さを測定した。穂は圃場でサンプリングしたのち、重量を測定する際に茎を穂首節の3cm下方で切りそろえた。初および玄米は主稈の穂の2次枝梗を持つ一次枝梗のうち最も穂先に近いものの先端から3つめの1小穂について測定し、その個体の値とした。また、穂首の直径は穂首節の直下で最短の径を測定し、茎の断面を円に近似して断面積を計算した。

5. 3 結果

変異系統およびその原品種フクニシキの各形質の平均値を表5-1に示す。調査したほとんどの形質についてフクニシキとの間に有意な差が認められた。すべての系統で草丈、

表5-1 FTy86-365系統の形質

系統	草丈 (cm)	穂数	主稈穂長 (cm)	主稈穎花数	全穂重 (g)	粒着密度 (cm ⁻¹)	穂首断面積 (mm ²)
1T5	109.1**	9.3	23.0**	165.2**	24.2**	7.18**	2.56**
3T9	89.9**	3.6**	21.5**	109.1	7.6**	5.08**	1.97**
4T3	107.6**	9.0**	24.4**	174.0**	24.9**	7.12**	3.47**
5T2	114.4**	10.6	24.9**	200.3**	31.5**	8.02**	2.85**
5T4	107.0**	9.0**	23.1**	182.5**	25.7**	7.91**	2.36*
6T10	115.5**	9.3*	23.7**	175.2**	26.0**	7.40**	2.25**
10T4	94.5**	10.0	21.9**	117.2**	17.6**	5.34*	2.44**
12T6	121.9**	7.6**	24.2**	203.2**	17.2**	8.38**	2.75**
フクニシキ	86.8	10.0	18.4	105.4	16.3	5.74	2.08

系統	初長 (mm)	初幅 (mm)	初厚 (mm)	玄米粒長 (mm)	玄米粒幅 (mm)	玄米粒厚 (mm)
1T5	7.69*	3.49**	2.16**	5.45	2.93**	1.97**
3T9	7.86**	3.53**	2.10	5.62**	2.73**	1.90*
4T3	7.63	3.63**	2.18**	5.40*	3.08**	1.96**
5T2	7.65	3.64**	2.36**	5.29**	3.02**	2.08**
5T4	7.26**	3.47**	2.27**	5.04**	2.93**	2.04**
6T10	7.66*	3.41	2.26**	5.33**	2.82	1.98**
10T4	7.70	3.38	2.18**	5.44*	2.86	1.96**
12T6	7.78	3.50**	2.32**	5.28**	2.88*	2.01**
フクニシキ	7.68	3.41	2.10	5.52	2.86	1.88

*, **: それぞれ5%、1%の有意水準でフクニシキとの間に差が認められたことを示す。

主稈穂長が増大し、植物体が大型化していることがわかる。また、粒着密度の増加している系統も多い。一株の穂数には系統3T9を除いて、大きな変化は認められず、若干減少している程度である。したがって、個体の穂数は若干減少しているが、それ以上に穂が大型化し、着粒数が増加しているため、個体の生産力を表す一株当りの穂重は系統5T2における最大93%の増加をはじめ、ほとんどの系統で増加した。図5-1に系統5T2とフクニシキそれぞれ1個体の穂の様子を示す。また、第2章で粒重と極めて強い相関のあることが示された粒長×粒幅×粒厚の値はほぼフクニシキと同じ値から最大11%増までの範囲に分布している。このように、変異系統は収量に関する多くの形質においてフクニシキとの間に有意な差を示した。

そこで、これらの形質間でどのような発現パターンが存在するのかを明らかにするため、変異系統における各形質間の相関を調べたところ、いくつかの形質間で有意な相関が認められた(表5-2)。これは供試した系統が1個体由来のためと考えられるが、各系統における形質の変異がランダムに起こったのではなく、形質間の一定の発現パターンにしたがって変異したことを示している。さらに、変異系統における形質間の発現パターンがフクニシキと異なっているかどうかを明らかにするため、各形質の組み合わせについて詳しく検討した。図5-2a、bは主稈の穂長と穎花数および粒着密度の間の関係を示したものである。変異系統における回帰直線はフクニシキから大きく外れている。即ち、これらの形質の発現パターンはフクニシキでの発現パターンとは明らかに異なっている。

図5-2cは草丈と穂長の関係を図示したものである。草丈と穂長の間には正の相関が認められ、変異系統において認められた穂長の増大は草丈の増大と密接に関係していることが明らかである。また、これらの形質間においても変異系統の回帰直線からフクニシキの値は明らかに外れている。図5-2dは草丈と草丈に占める穂長の割合との間の相関関



図5-1 変異系統FTY86-36505T2と原品種フクニシキの穂

左. フクニシキ 右. FTY86-36505T2

表5-2 FTy86-365系統の形質間相関

	草丈	穂長	穎花数	着粒密度	穂首面積	粒大†	一穂重	穂長/草丈
穂長	0.855**							
穎花数	0.942**	0.911**						
着粒密度	0.935**	0.847**	0.990**					
穂首面積	0.424	0.735*	0.515	0.431				
粒大	0.371	0.729*	0.501	0.413	0.836**			
1穂重	0.597	0.722*	0.740*	0.728*	0.352	0.493		
穂長/草丈	-0.923**	-0.593	-0.803*	-0.843**	-0.118	-0.023	-0.435	
1株穂数	0.466	0.550	0.492	0.472	0.465	0.609	0.396	-0.342

**,* : それぞれ1%、5%で有意

† : 粒長×粒幅×粒厚の値

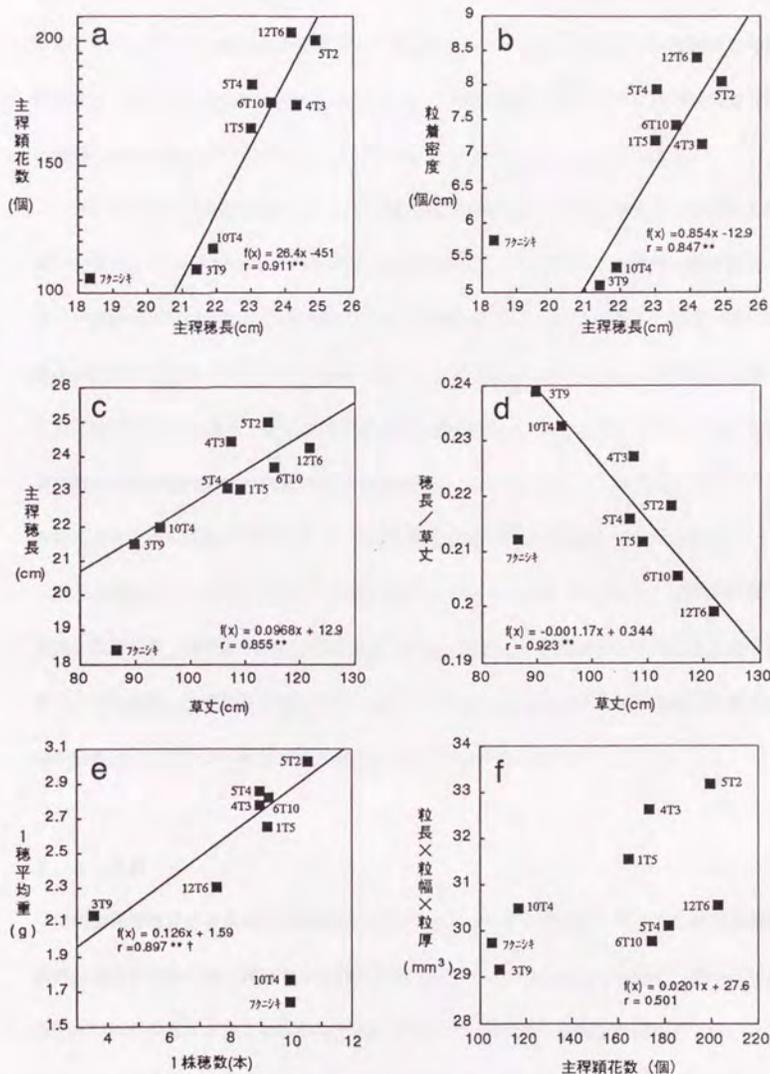


図5-2 変異系統群FTγ86-365における形質間の相関

** : 有意水準1% † : 10T4を除いた値

係を示したものである。変異系統のこれらの値の間には負の相関が認められ、草丈が増大するにつれて穂長の占める割合は低下する傾向が認められるが、フクニシキの値はこの相関直線から明らかに外れている。したがって、これらの変異系統においては栄養器官と穂の相対生長のパターンがフクニシキとは異なったものに変異したと考えられる。

一方、予想される相関関係と異なった関係を示す形質の組み合わせがいくつか認められた。図5-2eは一株穂数と一穂重の間の関係を示したものである。穂数型、穂重型というイネ品種の草型の分類が存在することからも予想されるように、穂数と一穂重の間には負の相関関係があることが予想される。しかし、ここに示したように、系統10T4を除く変異系統において穂数と一穂重の間には正の相関が認められる。また、図5-2fは主稈穎花数と粒長×粒幅×粒厚の値との間の相関を示したものであるが、穎花数が増えるにつれ粒も大きくなってゆく傾向を示し、予想される関係とは逆の関係を示している。

以上の結果から、本章で供試した変異系統群FTY86-365の多くの系統は、主稈穎花数、粒大、粒着密度、草丈、草丈に占める穂長の割合、穂長などの形質がそれぞれ正方向に変異し、その結果、一株穂重の増加を示したこと、しかもその穂重の増加は収量構成要素間の既知の発現パターンの変更によるものであることが示唆された。

5.4 考察

突然変異育種による多収性の代表的品種としてはレイメイがある。レイメイは不完全劣性の一遺伝子突然変異に起因する短稈突然変異系統であり(Futsuhara 1968)、極めて高い多肥多収性を発揮する。この多収性は穂数の増加と、その割に登熟歩合が低下しないことによる(橋本ら、1971)。このように突然変異による多収性の育種は、収量構成要素の正方向への変化と、要素間の相互関係の変化の2つを必要とする。

本章で供試した変異系統群FTY86-365は草姿、収量形質に多くの変異を含んでいたことが明らかになった。今回の試験栽培は小規模なものであり、系統ST2が示したフクニシキの193%の1株穂重をそのまま収量性と同列に扱うことはできないが、少なくともこの系統群が収量性において大きな正方向の変異を含むことは明らかであると思われる。

収量構成要素間にはおおむね負の相関が存在する。Kawai (1986)はイネ品種農林8号由来の突然変異系統80系統についてそれらの形質を調査した結果より、1株穂数、1穂粒数、千粒重各形質間には互いに負の相関があり、これを打破することは非常に困難であると述べている。また、図5-3aに示すように、既存の品種においても1株穂数と1穂重の間には負の相関が認められる。しかし、本章で解析した変異系統の1株穂数と1穂重の間には正の相関関係が認められ、既存品種間に認められるものとは全く異なる発現パターンが形成されていることが明らかになった。1株穂重の決定過程においてはまず穂数が決定され、次いで1穂粒数、1粒重が決定されて1穂重が決定される。変異系統において認められた穂数と1穂重の間の正相関は、その2形質、または穂数および穎花数という、形態形成過程の異なったステージに影響する遺伝子発現ネットワークの改変を示唆する。また、主程穎花数と粒長×粒幅×粒厚の値との間の正相関も同様にこの変異系統における変異の特殊性を示唆している。

これらの相関関係の逆転とは異なるが、いくつかの形質間の発現パターンの変異も認められた。図5-3bに示すように、フクニシキを含む既存品種の草丈と草丈に占める穂長の割合との関係は1つの回帰直線で表される。しかし、この回帰直線は図5-2dに示した変異系統における回帰直線とは異なっており、これらの変異系統では既存の品種間に認められる形質間のバランスそのものが変化したといえることができる。

本章において、4倍体集団の放射線累代照射による変異誘発法がDNAレベルだけでは

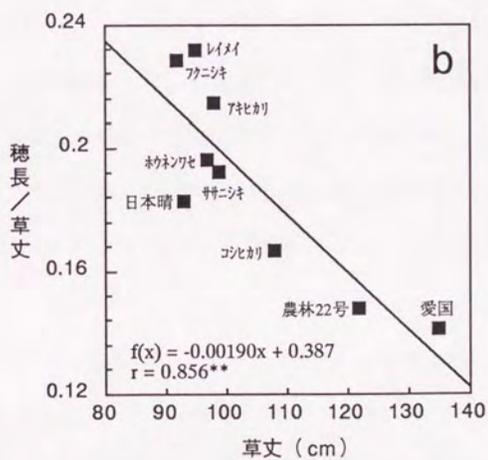
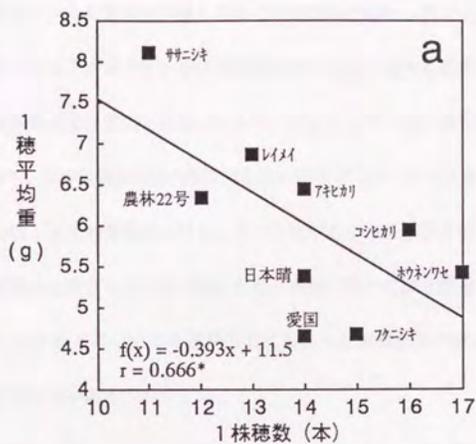


図5-3 既存品種における形質間相関

北陸農業研究資料No.4「内外稲品種の特性解析 第2報」
(1978)のデータより作成。

*, **: それぞれ5%, 1%で有意

なく、個体レベルでの形質の変異をも誘発し、しかも既存の品種の形質間に存在する発現パターンを変更するような変異を誘発し得ることが明らかになった。上述した収量構成要素のような数多くの因子が関与する形質間の発現パターンにおける変異が確認されたことは、供試した変異系統では遺伝子発現ネットワークそのものが原品種とは異なっていることを示唆しており、この変異誘発法の特殊性を見いだすことができたと考えられる。また、同時にこのことは、従来の育種法に対し、この方法が1つの新手法となり得る可能性を示唆している。今回主に注目した収量形質とは別の形質、たとえば千粒重と蛋白含量間の負相関（東ら、1974）などについても通常法とは異なった変異様相が得られる可能性があり、今後検討する必要がある。

第6章 総合考察

イネは現在ほぼコムギと同じ生産水準に達し、世界の穀物生産の1/4を越えるシェアを占める主要作物である。また、本邦を初めとして、各地域で古くから育種努力が続けられ、現在全世界に10万種を越す品種があるとされている。

本研究は我が国の主要作物であるイネを材料とし、そのゲノムの再配列を介した変異幅の拡大の可能性を探る目的で同質4倍体の累代照射を行い、得られた2倍性の変異系統の形質およびゲノム構造の変異様式について考察したものである。本章では本研究によって得られた知見をまとめ、今後の課題について考察する。

6.1 変異誘発法

本研究で用いた変異誘発法は遺伝的冗長性を利用してゲノムの再配列を誘発し、遺伝子システムの再構築を伴う大幅な形質の変異誘発をねらったものである。遺伝子重複が生物の進化において重要な役割を演じたという議論は現在広く受け入れられている(オオノ1977)が、生物としての機能を保持したまま既存の遺伝子システムを改変するためには、まずその複製を作成し冗長性を増したうえでなければ不可能であると考えられる。このような観点から、遺伝的冗長性を増すためにコルヒチンによる倍数化を行った。同質倍数体が容易に維持できることはイネを実験材料に用いることの有利な点のひとつといえる。

同質4倍体はゲノムの全遺伝因子が重複しているため、互いが協調的に機能する際の量的不均衡が生じない代わりに、減数分裂時に染色体分配が不正確になり、高い不稔性を示す。この、遺伝的冗長性を獲得したゲノムを再構築し、新しい遺伝子ネットワークシステムを持った変異体を誘発するために、本研究では γ 線照射を行った。倍加した染色体の構造異

常の誘発を通して遺伝子ネットワークを構成する個々の因子の変異とその再ネットワーク化を行う手段として、放射線照射を用いたのである。このゲノムの倍加と放射線の累代照射を組み合わせた方法を本章では4倍体照射法と呼ぶことにする。この方法は比較的簡便であること、生殖の過程を通しており、その意味で生物としての基本的原理から逸脱していない系であるという点の特徴であるといえる。

遺伝的冗長性の付加という点で今後試みる価値があろうと思われるものに異種ゲノムとの融合があろう。これには近縁種との交配の他、細胞融合などの方法も考えられる。さらには動物、植物を問わず全く異種の生物の全ゲノムDNAを用いた形質転換も可能であろう。これと重なり合うが、冗長なゲノムの再構築を引き起こす変異原として、細胞培養系の適用も試みる価値があろう。ソマクローナル変異は育種上の変異幅拡大の手法として近年利用されるようになってきており、イネにおいても有用な変異誘発の例が出てきている(Ogura *et al.*, 1989、西川ら、1989)。第3章および第4章で述べたように、細胞培養系がゲノム構造の変異を引き起こすことも最近報告されてきている。この系は変異ゲノムを持つ植物体の再分化効率、およびその稔性等の点に障害が予想されるが、放射線照射とは異なる変異誘発メカニズムを持つ可能性があり、検討する価値があると思われる。

6. 2 変異系統のゲノム構造の変異

第3章および第4章に述べたように、本研究で誘発された変異系統はそのゲノムDNAにさまざまな変異を有していた。RFLP分析の結果からは、この変異が多くは挿入、欠失、重複などゲノムDNAのかかなりの範囲の再配列によるものであることが示唆された。また、多型を示したプローブの頻度も数%から40%と、系統群によって差があるものかなり高い値を示した。このことを通常の放射線照射により誘発された変異系統やカルスからの再

分化個体ではほとんど RFLP が検出されなかったことと合わせて考えると、4 倍体照射法はゲノムの再配列を誘発するうえで他の変異誘発法に比べてかなり効果があるということができよう。また、反復配列のコピー数、および反復単位の構造の変異が誘発されたことも、この変異誘発法のゲノム構造に与える変異性の高さを示している。

近年、ゲノム DNA の構造変化に関してさまざまな研究が報告され、基本的に不変であると考えられていたゲノムのダイナミズムに関する認識は急速に代わりつつある。高等植物においても培養細胞やその再分化個体を用いた実験系において、ゲノム DNA が動的に構造変化を起こしていることが明らかになってきている。また、染色体レベルの急速な変化を自然集団で見いだした例としてタデ科の雌雄異株の植物である *R. acetosa* の Island population に関する研究 (Parker and Wilby, 1989) がある。それによれば、過去 10 年の間に集団の崩壊を経験し、わずかな個体から再生した群落においては、地理的隔離により近交を強制する環境圧が生じた結果、高頻度の染色体の再配列が数年の間に集団中にもたらされたことが認められている。

McClintock (1984) はゲノムの再配列を誘発するさまざまな要因を "genome shock" と総称している。上述のゲノムの急速な変化もそれぞれの系に特有な "genome shock" によるものといえよう。4 倍体照射法によるゲノムの倍加は内的な、放射線の累代照射は外的な "genome shock" としてそれぞれゲノムに働き、その「ダブルショック」効果が変異系統に認められた高率なゲノム構造の変異をもたらしたものと考えることができよう。

一方、本研究において認められたゲノム DNA 構造の変異様式から、いくつかの課題が新たに提起された。1 つはこのゲノム構造の変異が表現型の変異とどのように関係しているのかということである。これに明確な解答を与えるためには変異形質と個々の遺伝子の変異およびゲノムの遺伝子ネットワークの変異とを直接結び付けて論じなければならず、

現段階ではあまりに情報が不足している。遺伝子ネットワークのコントロールに関するモデル(Britten and Davidson, 1969)はゲノム構造の変異と遺伝子ネットワークの変異との関連性を示唆する。また、ホメオティック遺伝子に関する一連の研究のように、個々の遺伝子がどのように形態形成を制御しているのかを解明し、さらにそれに関する遺伝子がどのように進化してきたのかを探る研究は盛んになりつつある。このような知見がさらに蓄積してゆくことによって、ゲノムの再配列と遺伝子ネットワークの改変、および形態形成との間に明確なつながりが付けられるものと思われる。

第2の問題点はこのようなゲノム構造の変異がどのような機構によって生じたのかという点である。系統群Ty 86IIからTy 86αを経てTy 87αが育成される過程、すなわち2倍性に復帰し、放射線照射を受けずに展開されてゆく間にDNA構造の変異が増大していったことは興味を引く現象である。特にTy 86αからTy 87αが分離する過程では、数多くの塩基の変異やrDNAのIGS領域の大幅な再配列が生じていることが示唆されている。このことは、4倍体照射法による変異誘発処理によってゲノムのダイナミズムに関与するメカニズムが活性化されたこと、そしてこれがゲノムの変異様式にある方向づけを行い、2倍性に復帰した後もその方向への変異が起り続けるというような変異誘発機構が形成されたことを示しているのかも知れない。この機構の制御にいくつかの因子が関与し、その集積によってゲノムの変異性が高まり、Ty 86αやTy 87αが分離してきたことも考えられる。一方、反復配列のコピー数の変異についてTy 86αやTy 87αは他の系統群と同じ程度の変異性しか示していない。このことは誘発された系統群のゲノムが反復配列の変異に関しては共通の機構による変異を受けていたことを示唆する。種々の反復配列のコピー数の間に増減の相関関係が認められたこと、その相関関係に系統群によって正負の2つの逆方向の関係があることは、配列の増減に関してもある種の変異の方向づけがフレキシブルに行われ、その後

にはその方向にのみ変異が起こるということを意味しているといえることができる。

ゲノムの再配列に関する研究は主に系統分化を研究する立場から、その結果を解析したものが多く、本研究で示唆された変異誘発の継続性およびその方向づけがどのような機構によってもたらされているのかは未知であるが、今後、前述したような急速なゲノムの再配列に関する研究が進み知見が蓄積してゆくにつれ、生物進化や個体発生上の諸問題とゲノムの可塑性を持ったダイナミックな動態との関係が明らかにされてゆくことと期待される。

6. 3 4倍体照射法による可視形質および農業形質における変異誘発様式の多様性

第2章で述べたように、4倍体照射法は1復帰個体中にさまざまな形質の変異を誘発しており、草型、玄米粒形の変異やふ先色の分離に見られるように、その変異は連続的かつ複雑な様相を呈していた。このことはゲノムDNAの構造変異が高率に、しかもゲノム全体に生じていたこととおそらく無関係ではないものと思われる。これらの変異形質の遺伝様式を詳細に調査し、その発現を解析することは今後に残された重要な課題である。また、系統群Ty88I内で得られた低温感受性の葉緑素欠乏や系統群FTy86内で見いだされた単因子劣性の遺伝様式を示す無胚乳突然変異などの特殊な変異形質は、これが単純な点変異によるものであるのか、あるいは染色体の再配列によるものであるのかを検討する際に他の形質に比べ分子生物学的アプローチが比較的適用しやすいものと思われ、その意味で研究材料としても興味深い変異であると思われる。

第5章で認められた形質間の相関関係の変異は、本研究で得られた変異系統がその遺伝子発現ネットワークに変異を生じていることを示唆した。この結果は従来困難であるとされていた形質間相関の打破を人為突然変異によって達成し得る可能性を示すものである。

変異系統に認められたこのような形質間の発現パターンの変異がどのような遺伝様式を示すかを調査することは、このような変異の品種育成上の有用性を評価するために必要だと考えられる。収量形質について著しい増大を示した系統については規模を大きくした生産力検定試験を行い、その収量性を評価する必要がある。また、本研究においては主に収量構成要素となる形質についてその発現の最終結果を解析するに留まったが、さらに発育遺伝学的観点からのその成立過程についての検討を進めると同時に、光合成能や肥料反応性などの生理学的観点からの研究を行うことによって、4倍体照射法の変異誘発法としての特質がさらに明らかになるものと思われる。

本研究の結果により、4倍体照射法によって誘発された変異系統のゲノムに、ゲノムDNAの1次構造および動態に関する変異が誘発されていることが明らかになり、4倍体照射法がゲノムの再配列を誘発するうえで効果的な手法であることが示唆された。また、この変異系統にさまざまな形質の変異およびその発現を制御する遺伝子発現ネットワークの変異が誘発され、変異幅を拡大する上で育種上有用な手法となり得ることが示された。以上、本研究により4倍体照射法のゲノム構造および表現形に与える遺伝育種学的な基礎的知見を得、その誘発突然変異の特殊性および作物育種上の有用性を明らかにできたものと考えられる。

摘要

生物はその生育過程を通して常に固有の遺伝子発現ネットワークからの制約を受けており、作物育種においては、この制約を無視した変異作出は不可能である。この制約を変更するためにはその生物種が持つ遺伝的体制に手を加え、これを再構築することが必要であろう。本研究は、冗長性を持たせたゲノムの再配列を誘発することにより既存の遺伝子発現ネットワークに変更を加え、表現型の変異幅を拡大することの可能性を探る目的で、人為的に倍数化したイネ同質4倍体に累代的に γ 線照射を行い、得られた2倍体様の変異系統の形質の変異とゲノム構造の変異を解析したものである。結果の概要は以下のとおりである。

1. 2倍体様復帰個体の後代における可視変異

イネ品種日本晴の同質4倍体集団への γ 線累代照射により、集団中から2倍体様の形態と稔性を持った個体5個体が得られた。これらの個体に由来するそれぞれの系統群を、Ty86I、Ty86II、Ty86III、Ty87I、Ty88Iと表す。また、Ty86IIを展開中に得られた、ふ先に着色があり草丈の高い1個体に由来する系統群をTy86 α 、これを展開中に分離した、さらに草丈が高く極晩生の1個体に由来する系統群をTy87 α と表す。

これらの変異系統には草姿、玄米の粒形等の計量形質の著しい変異に加え、器官各部への着色性、芒性、脱粒性を始めとする多くの形質に優性変異を含む様々な変異が生じているものが認められた。その後代における変異形質の分離の複雑さからは、可視形質に関する数多くの遺伝子の変異が一復帰個体に集積していたことが示唆された。また、核型観察の結果からはいずれの系統においても染色体数の変異は認められなかった。

2 RFLP 分析による変異体ゲノムの構造解析

2-1. ランダムゲノミッククローンをプローブとした RFLP 分析

イネ品種日本晴の核DNAより得た43種のランダムゲノミッククローンをプローブとし、3種類の制限酵素を用いて変異系統のゲノムDNAのRFLP分析を行った。その結果、TY86 α 、TY87 α 、TY88I、およびフクニシキを原品種として同様の方法で育成されたFTY86、の4つの系統群に属する18系統においてRFLPが認められた。129の制限酵素-プローブの組み合わせのうち、22においていずれかの系統が原品種との間に多型を示した。また、その多型を検出したプローブは43種中11種であった。1つのプローブが、用いた3種の制限酵素のうち平均して2種において多型を検出したことは、検出された多型の多くが比較的大きな領域の挿入・欠失等によるものであることを示唆する。また、用いたプローブのうち直列反復配列のクローン1種により、TY86 α 、TY87 α 、FTY86の3つの系統群において直列反復配列の反復単位の分化が明らかになった。

2-2. 単一コピー配列クローンをプローブとした RFLP 分析

前述した実験により示唆された変異体ゲノムの構造変異の規模とその様相をさらに確認するため、RFLP連鎖地図作成に用いられた単一コピー型のクローン75種を用いたRFLP分析を行った。現在までに得られているすべての系統群（日本晴由来7、フクニシキ由来4）から計17系統を供試し、制限酵素は6種を用いた。その結果TY87 α において25-37%のプローブがRFLPを検出し、TY86 α 、FTY86においてそれに次ぐ頻度で多型が検出された。前項で多型が検出されなかったTY86II、TY86III、TY87Iの3系統群にもいくつかのRFLPが検出された。また、特定の連鎖群への変異の偏在は認められなかった。

多型を検出したプローブにおいて、多型を示し得た制限酵素の割合はRFLPが認められた変異系統すべてにおいてほぼ50%を越す値となった。より多くの制限酵素で多型を示す

プローブほど頻度が高く、また、サザンハイブリダイゼーションのシグナルパターンから重複や数kbの欠失が生じていることが明らかである領域も認められた。このことは、多くの変異が挿入・欠失・重複などかなりの範囲のDNA断片の再配列によるものであることを示唆している。さらに、系統群Ty87αにおいてはおよそ1/3の変異が塩基置換等の制限酵素認識部位の点変異と考えられるものであった。以上の結果から、得られた変異系統中に多くのゲノム構造の変異があること、挿入・欠失等が主要な変異の要因である系統群とそれに加え微小な変異を多数生じている系統群とが存在することが示唆された。

2-3. 他の変異誘発法による変異体のゲノム構造の変異

イネ品種農林8号由来のγ線照射による突然変異系統10系統、および180日間継代培養したイネ品種亀の尾の胚盤由来カルスから誘導した再分化個体10個体について、26種の単一コピー配列および3種の直列反復配列をプローブに用いた同様のRFLP分析を行った。その結果、検出された多型は放射線突然変異系統1系統における1つのみであり、これらの変異誘発法によるものと比較して4倍体の累代照射法によるゲノム構造の変異性は極めて高いことが示された。

3. 変異系統のゲノムにおける反復配列の変異

3-1. 各種反復配列のコピー数および構造の変異

高等植物のゲノムはその大部分が反復配列によって占められており、その変異はゲノムの構造に大きく影響する。そこで、変異系統のゲノムにおける反復配列の変異様式を明らかにするため、イネ品種日本晴のゲノムDNAのBamHIライブラリーからクローニングした7種の反復配列クローンをを用いて、各変異系統のゲノムにおけるコピー数の変異およびRFLPの検索を行なった。

用いた反復DNAクローン全てについて、1つ以上の変異系統がコピー数の変異を示し、反復配列の有意な増減（原品種の0.4倍~2.6倍）が認められた。多くの配列はゲノム中で増加する傾向にあったが、減少方向にのみ有意な変異が認められる配列も存在した。また、他の系統群が全体的に反復配列のコピーを増加させているのに対し、系統群 FTY86 は原品種に比べ、多くの配列が減少している傾向にあった。さらに、コピー数の増減に関して、有意な相関関係がいくつかの配列間で認められた。以上の結果から、本章で供試した変異系統のゲノムは反復配列のコピー数に変異が生じていること、変異の方向は一定ではないが、それぞれの系統群においていくつかの配列の増減を同調的にコントロールする機構が存在することが示された。

一方、これら7種の反復配列クローンをプローブとしたRFLP分析の結果から系統群 Ty87 α において新しいフラグメントの存在が認められ、分子種の変換の中間段階を示している可能性が示唆された。

3-2. 変異系統におけるrDNAのintergenic spacer (IGS)領域の構造

2-1で明らかになった 直列反復配列の多型はrDNAのIGS領域の多型であることが既にクローニングされていたイネrDNA断片により確かめられた。多型を示した3系統群に属する系統、およびその原品種からrDNAのIGS領域をクローニングし、物理地図を作成したところ、変異体のIGS領域において *Sal*I部位を両端に持つ約250bpのサブリピートの反復数が、原品種より増加していることが明らかになった。そのサブリピート部位の塩基配列を解析した結果、変異系統の多型は原品種のサブリピートの塩基置換や重複・欠失と、それによって生じた種々の変異IGS間の組み換えによって生じたこと、さらに、生じた変異分子はゲノム中で増幅され新しい直列反復構造を形成したことが示唆された。

4. 変異系統における収量形質の変異

4倍体集団の累代照射法により得られた変異系統が有用形質において、従来の変異誘発法とは異なった特質を持つか否かを明らかにするため、収量形質について調査した。供試した系統はフクニシキ由来のFTγ86系統群に属し、4倍体集団から分離後3世代目の1個体由来する8系統である。形質調査の結果、変異体の穂は長くなる方向に連続的に変異するとともに粒着密度も増加する傾向があった。主稈の穂の着粒数は最大の系統で原品種のおよそ2倍に達し、個体当りの穂重は原品種の1.5倍から2倍の値を示した。また、穂数と一穂重、粒数と粒大の間に正相関があること、穂の長さや草丈との間には正の相関があるが、変異系統の値から得られる回帰直線は原品種の値から非常に離れており、草丈に比べて穂長が大きく増加していること等、草型のバランスの明らかな変異が認められた。この結果から、既存の遺伝子発現ネットワークを改変し、従来困難であるとされていた形質間相関の打破を人為突然変異によって達成し得る可能性が示された。

以上を要するに、本研究はイネ照射4倍体集団からの復帰2倍性系統における形質およびゲノム構造の変異を解析することによってその特質についての基礎的知見を得、既存の誘発突然変異に対する特殊性および有効性を結論したものである。

引用文献

- Appels R. and J. Dvorak 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region : its structure and variation in populations and among species. *Theor. Appl. Genet.* 63: 337-348.
- Barker, R. F., N. P. Harberd, M. G. Jarvis, and R. B. Flavell 1988. Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *J. Mol. Biol.* 201: 1-17.
- Beckmann, J. S. and M. Sollar 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
- Bedbrook, J. R., M. O'Dell, and R. B. Flavell 1980. Amplification of rearranged repeated DNA sequences in cereal plants. *Nature* 288: 133-137
- Brilliant, M. H., Y. Gondo, and E. M. Eicher 1991. Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning. *Science* 252: 566-569.
- Britten, R. J. and E. H. Davidson 1969. Gene regulation for higher cells : a theory. *Science.* 165: 349-357.
- Brown P. T. H., J. Kyojuka, Y. Sukekiyo, Y. Kimura, K. Shimamoto, and H. Löhrz 1990. Molecular changes in protoplast-derived rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 223: 324-328.
- Burnham, C. R. 1956. Chromosomal interchanges in plants. *Bot. Rev.* 22: 419-552.
- Cullis, C. A. and W. Cleary 1986¹. DNA variation in flax tissue culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 247-251.
- Cullis, C. A. and W. Cleary 1986². Rapidly varying DNA sequences in flax. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 252-259.
- Cuzzoni, E., L. Ferretti, C. Giordani, S. Castiglione, and F. Sala 1990. A repeated chromosomal DNA sequence is amplified as a circular extrachromosomal molecule in rice (*Oryza sativa* L.) *Mol. Gen. Genet.* 222: 58-64.

- De Kochko, A., M. C. Kiefer, F. Cordesse, A. S. Reddy, and M. Delseny 1991. Distribution and organization of a tandemly repeated 352-bp sequence in the oryzae family. *Theor. Appl. Genet.* 82: 57-64.
- Debatisse M., I. Saito, G. Buttin, and G. R. Stark 1988. Preferential amplification of rearranged sequences near amplified adenylate deaminase genes. *Mol. Cell. Biol.* 8: 17-24.
- Debatisse M., O. Hyrien, E. Petit-Koskas, B. R. de Saint-Vincent, and G. Buttin 1986. Segregation and rearrangement of coamplified genes in different lineages of mutant cells that overproduce adenylate deaminase. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1776-1781.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks 1984. Maize DNA miniprep. *In* "Molecular biology of plants" Cold Spring Harbor Laboratory(ed.), Cold Spring Harbor, New York. 36-37.
- Deshpnade, V. G., and P. K. Ranjekar 1980. Repetitive DNA in Three *Gramineae* species with low DNA content. *Hoppe-Seylar's Z. Physiol. Chem.* 361: 1223-1233.
- Dutrillaux, B. and Y. Rumper 1987. The role of chromosomes in speciation: a new interpretation. *In* "Chromosomes Today, volume 9" Stahl A., M. Luciani, and A.M. Vagner-Capodano (eds.), George Allen & Unwin, London. 75-90.
- Dutrillaux, B., J. Couturier, E. Viegas-Pequignot 1981. Chromosomal evolution in primates. *In* "Chromosomes Today, volume 7" Bennett, M.D., M. Bobrow, and G.M. Hewitt (eds.), George Allen & Unwin, London. 176-191.
- Flavell, R. 1982. Sequence amplification, deletion and rearrangement: Major sources of variation during species divergence. *In* "Genome evolution" Dover, G. A. and R. B. Flavell (eds.), Academic Press Inc., London. 301-323.
- Flavell, R. B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 321: 227-242.
- 藤井省吾 1991. イネ培養細胞における不定胚及び不定芽の再分化とその比較研究. 東京大学大学院農学系研究科修士論文.

- Fukui, K. 1982. Comparison between Giemsa and orcein staining methods in rice chromosomes. *La chromosomo* II-43-44: 1398-1404.
- 福井希一・飯島加奈子・掛田克行 1988. 染色体情報の解析・利用に関する研究. 20. イネ染色体の核型. 育種38(別1): 474-475.
- Futsuhara, Y. 1968. Breeding of a new rice variety Reimei by gamma-ray irradiation. *Gamma Field Symposia* 7: 87-109.
- Gasser, C.S. and R.T. Fraley 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*. 244: 1293-1299.
- Giulotto E., I. Saito, and G. R. Stark 1986. Structure of DNA formed in the first step of CAD gene amplification. *EMBO J.* 5: 2115-2121.
- Godkov, A. V., O. B. Chernova, A. R. Kazarov, and K. P. Kopnin 1987. Cloning and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant Djungarian hamster and mouse cells. *Somatic Cell. Mol. Genet.* 13: 609-619.
- Gupta, P. K., G. Fedak, S. J. Molnar, and R. Wheatcroft 1989. Distribution of a *Secale cereale* DNA repeat sequence among 25 *Hordeum* species. *Genome* 32: 383-388.
- Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Shaefer, and J. Nienhuis 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72: 761-769.
- 東 正昭・櫛淵欽也・伊藤隆二 1974. 高蛋白米品種の育種に関する基礎的研究. I. 玄米蛋白含有率の品種間差異および諸形質とくに収量との関係について. 育種24: 88-96.
- Hills, D. M., C. Moritz, C. A. Porter, and R. J. Baker 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251: 308-310.
- Hingardner, R. 1976. Evolution of genome size. In "Molecular evolution" Ayala, F. J. (ed.), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. 179-199.

- Hourcade, D., D. Dressler, and J. Wolfson 1973. The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 2926-2930.
- Iwata, N., H. Sato, and T. Omura 1984. Relationship between the twelve chromosomes and the linkage groups. (Studies on the trisomics on rice plants (*Oryza sativa* L.) V.). Japan. J. Breed. 34: 314-321.
- 岩田伸夫 1991. イネのカルスおよび再生植物における核DNAの RFLP 検出. "生物工学的的手法によるイネの新しい機能開発に関する研究. (課題番号63304011) 昭和63~平成2年度科学研究費(総合研究A)研究成果報告書" 山縣弘忠編. 62-67.
- Kageyama, Y., H. Fukuoka, K. Yamamoto, and G. Takeda 1991. The rice plant bearing endospermless grains: a novel mutant induced by gamma-irradiation of tetraploid rice (*Oryza sativa* L.). Japan. J. Breed. 41: 341-345.
- 影山 泰 1990. イネ4培体より誘発された一つの2倍体系統にみられる変異の多様性. 東京大学大学院農学系研究科修士論文.
- Kawai, T. 1986. Radiation breeding—25 years and further on. Gamma Field Symposia 25: 1-36.
- 河田雅圭 1989. 進化論の見方. 紀伊国屋書店, 東京.
- Kikuchi, S., F. Takaiwa, and K. Oono 1987. Variable copy number DNA sequences in rice. Mol. Gen. Genet. 210: 373-380.
- King, M. 1987. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. Heredity. 59: 1-6.
- Kinoshita, T. 1987. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature, and linkage groups. Rice Genet. Newslett. 4: 3-51.
- Kurata, N., N. Iwata, and T. Omura 1978. Karyotype analysis in rice. I. A new method for identifying all chromosome pairs. Japan. J. Genet. 53: 251-255.

- 橋淵欽也・中川宣興・金澤俊光・竹村達男・小山田善三 1971. レイメイならびに近縁系統の耐肥性. 1.耐倒伏性と登熟性について. 育雑21(別2): 90-91.
- Landsmann, J. and H. Uhrig 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theor. Appl. Genet.* 71: 500-505.
- Maniatis, T., E. F. Fritsh, and J. Sambrook 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory(ed.), Cold Spring Harbor, New York.
- McClintock, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- McCouch, S. R., G. Kochert, Z. H. Yu, Z. H. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman, and S. D. Tanksley 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.
- Miller, J. C. and S. D. Tanksley 1990. RFLP analysis of phylogenic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Müller, E., P. T. H. Brown, S. Hartke, and H. Lörz 1990. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80: 673-679.
- Nagato, Y. 1988. Variation of DNA content and its implication on plant evolution. *Genet. (Lif Sci. Adv.)* 7: 185-191.
- 西川 晶・山本俊哉・辻 誠一・広原日出男 1989. 水稲新品種「スミライス2号」「スミライス3号」の育成 育雑39(別2): 360-361.
- オオノ, S. 1977. 遺伝子重複による進化. 山岸秀夫・梁 永弘訳, 岩波書店, 東京.
- Ogura, H., J. Kyojuka, Y. Hayashi, and K. Shimamoto 1989. Yielding ability and phenotypic traits in the selfed progeny of protoplast-derived rice plants. *Japan. J. Breed.* 39: 47-56.
- Osborn, T. C., D. C. Alexander, and J. F. Fobes 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato

- fruit. *Theor. Appl. Genet.* 73: 350-356.
- Parker, J. S. and A. S. Wilby 1989. Extreme chromosomal heterogeneity in a small-island population of *Rumex acetosa*. *Heredity* 62: 133-140.
- Rice RFLP mapping group 1991. Acquisition of the available rice RFLP probes. *In* "RFLP Link" A. Saito and Rice RFLP mapping group (eds.), National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba. 1-7.
- Rivin, C. J., C. A. Cullis, and V. Walbot 1986. Evaluating quantitative variation in the genome of *Zea mays*. *Genetics* 113: 1009-1019.
- Rode, A., C. Hartmann, A. Benslimane, E. Picard, and F. Quetier 1987. Gametoclonal variation detected in the nuclear ribosomal DNA from doubled haploid lines of a spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. 'César'). *Theor. Appl. Genet.* 74: 31-37.
- Rogers S. O. and A. J. Bendich 1987. Ribosomal RNA genes in plants : variation in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
- Saito A., M. Yano, N. Kishimoto, M. Nakagahara, A. Yoshimura, K. Saito, S. Kuhara, Y. Ukai, M. Kawase, T. Nagamine, S. Yoshimura, O. Ideta, R. Osawa, Y. Hayano, N. Iwata, and M. Sugiura 1991. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Japan. J. Breed.* 41: 665-670.
- Saito, I., R. Groves, E. Giulotto, M. Rolfe, and G. R. Stark 1989. Evolution and stability of chromosomal DNA coamplified with the CAD gene. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2445-2452.
- Sano, Y. 1989. Molecular cloning of ribosomal RNA genes from the two cultivated rice species, *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Mishima*, 39: 112-113.
- Sano, Y. and R. Sano 1990. Variation of the intergenic spacer region of ribosomal DNA in cultivated and wild rice species. *Genome* 33: 209-218.
- Sekar, V. 1987. A rapid screening procedure for the identification of recombinant bacterial clones. *BioTechniques* 5: 11-13.

- Song, K. M., T. C. Osborn, and P. H. Williams 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* 75: 784-794.
- 高橋万右衛門 1983. 日本稲と外国稲の遺伝子および連鎖群の同定. "育種学最近の進歩, 第4集." 日本育種学会編集, 養賢堂, 東京. 3-14.
- 高橋成人 1983. 栽培稲生態型間にみられる穀粒諸特性の変異の解析. "イネ穀粒特性の多様化に関する育種学的基礎研究. 昭和55年~57年度文部省科学研究費総合研究A(00536001)による研究成果報告書" 木下俊郎編. 19-28.
- 高橋豊三・L. Proudfoot 1989. 増強化学発光法による遺伝子検出システム(3). *バイオインダストリー* 6: (5)45-52.
- 田中幸彦 1983. 突然変異利用の成果—直接利用による育成品種. "突然変異育種" 渡辺好郎, 山口彦之監修, 養賢堂, 東京. 9-13.
- 館野芳雄 1984. 分子系統樹の作り方とその評価. "分子進化学入門" 木村資生編, 培風館, 東京. 164-184.
- Toloczki, C., and G. Feix 1986. Occurrence of 9 homologous repeat units in the external spacer region of a nuclear maize rRNA gene unit. *Nucl. Acid Res.* 14: 4969-4986.
- 渡辺好郎 1982. 異数性とその利用. "育種における細胞遺伝学" 養賢堂, 東京.
- White, R. and J. M. Lalouel 1988. Chromosome mapping with DNA markers. *Scientific American* 258: (2)20-28.
- Wilson, A. C., G. L. Bush, S. M. Case, and M.-C. King 1975. Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 3028-3030.
- Wilson, A. C., V. M. Sarich, and L. R. Maxson 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence for studies on rate of chromosomal, protein, and anatomical evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 3028-3030.

- Yamamoto, K., H. Fukuoka, Y. Kageyama, and G. Takeda 1988. Variations in visible characters of diploid-like plants derived from gamma-irradiated tetraploids in rice (*Oryza sativa* L.). Japan. J. Breed. 38: 470-473.
- Yamamoto, K., H. Fukuoka, Y. Kageyama, and G. Takeda 1989. Variations in characters of diploid-like plants derived from gamma-irradiated tetraploids in rice (*Oryza sativa* L.). Proc. of 6th Internatl. Congr. of SABRAO: 769-772.
- 矢頭 治 1991. 稲の温度感受性葉緑突然変異の選抜 育種41(別2): 88-89.
- Young, N. D. and S. D. Tanksley 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. Theor. Appl. Genet. 77: 353-359.
- Zhao, X., T. Wu, Y. Xie, and R. Wu 1989. Genome-specific repetitive sequences in the genus *Oryza*. Theor. Appl. Genet. 78: 201-209.
- Zheng, K. L., S. Castiglione, M.G. Biasini, A. Biroli, C. Morandi, and F. Sala 1987. Nuclear DNA amplification in cultured cells of *Oryza sativa* L. Theor. Appl. Genet. 74: 65-70.
- Zhou, G. Y. 1986. Distantly related hybridization and genetic engineering of crops. In "Rice genetics. Proc. Internatl. Rice Genetics Symp." IRRI, Island Publishing House Inc., Manila. 867-876.

謝 辞

本研究「イネ4倍体への放射線照射による誘発突然変異に関する研究」を行うにあたり、終始適切な指導を賜わり、本論文の校閲の労をお執り下さいました東京大学農学部教授武田元吉博士に慎んで感謝の意を表します。また、本研究の骨子である4倍体照射法に関する研究を展開され、研究の糸口を与えて下さった上、終始研究計画から実験、考察全般にわたり親身にご教示頂きました長岡技術科学大学工学部教授山元皓二博士に満腔の謝意を表します。また、論文の取り纏めをはじめ考察の細部にわたりご指導いただきました東京大学農学部助教授長戸康郎博士に深く感謝いたします。また、研究を行うにあたりご助力を頂き、さまざまな示唆を与えてくださった茨城大学農学部教授丹羽勝博士、東京大学農学部助手吉田薫博士に深く感謝いたします。

また、東京大学農学部農業生物学科育種学研究室の先輩、同輩、後輩の諸氏には日々の研究遂行に欠かせない有形、無形のご指導やご助力を頂きました。ここに厚く感謝いたします。

国立遺伝学研究所助教授佐野芳雄博士にはイネ rDNA のクローン pRY12、pRY18 を快くご分譲頂き、rDNA の進化についてさまざまなご教示を頂きました。また、農林水産省農業生物資源研究所イネ RFLP マッピンググループよりイネ RFLP マーカーを、同放射線育種場の西尾剛、矢頭治両博士より放射線突然変異系統を、それぞれ快くご分譲頂きました。ここに記して感謝の意を表します。

最後に、本研究を行うにあたり、実験材料の栽培、管理に関してお世話になりました松崎昭夫助教授、町田寛康技官をはじめとする東京大学農学部附属多摩農場の皆様に感謝いたします。

1991年12月

福岡 浩之



