

RFLP(制限酵素DNA断片長多型)を利用したイネの連鎖 地図作成に関する研究

出田, 収
九州大学農学研究科遺伝子資源工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3110821>

出版情報：九州大学，1995，博士（農学），課程博士
バージョン：
権利関係：



RFLP(制限酵素DNA断片長多型)を利用した
イネの連鎖地図作成に関する研究

田 中 公 次

1996

①

RFLP(制限酵素DNA断片長多型)を利用したイネの連鎖地図作成に関する研究

出田 収

1996

目次

	頁
緒言	1
第1章 トリソミックスを利用したRFLPクローンの座乗染色体決定ならびにRFLP分析による異数体の染色体構造の決定	4
第1節 トリソミックスを利用したRFLPクローンの座乗染色体決定	5
第1項 日印交雑トリソミックF ₁ を利用したRFLPクローンの座乗染色体決定	5
材料および方法	5
結果および考察	8
第2項 RFLPを示さないDNAクローンの座乗染色体決定	14
材料および方法	14
結果および考察	15
第2節 RFLPを利用した異数体の染色体構造の推定	19
第1項 一次トリソミックスの交雑後代に出現した二次トリソミックス様植物について	19
材料および方法	20
結果および考察	20
第2項 染色体11に関する4型のトリソミックスのRFLP分析	24
材料および方法	25
結果および考察	25
第2章 従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との統合	29
第1節 標識遺伝子とRFLPマーカーとの連鎖分析による統合連鎖地図の作成	30
材料および方法	30

結果および考察	32
第2節 インド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑後代 に観察された遺伝子の分離の歪みについて	54
材料および方法	55
結果および考察	55
第3章 総合考察	62
摘要	68
謝辞	71
引用文献	72
英文摘要	78
附図・附表	83

緒言

メンデルの遺伝の法則は優劣の法則，分離の法則，独立の法則からなる．このうち，独立の法則についての例外が連鎖と呼ばれる現象である．これは遺伝子が染色体上で線状に配列していることによるもので，逆に，遺伝子間の連鎖を見出すことによって，遺伝子を線状に配列した地図を作成することができる．これを連鎖分析という．1900年にメンデルの法則が再発見されて以来，イネにおいても連鎖分析が行なわれるようになり，1963年にはNagao and Takahashi が主に形態形質，着色形質，生理形質を標識遺伝子として，イネ($2n=24$)に期待される12の連鎖群を試作した．その後，この12の連鎖群と染色体との対応関係を決定するために，相互転座やトリソミックスを用いた分析が行なわれるようになり，連鎖群の改廃や新連鎖群の発見がなされ，現在，イネの12の染色体にそれぞれ対応する連鎖群または標識遺伝子群が明らかにされている(総説 Iwata 1986)．

一方，近年の分子生物学的手法の進歩により，DNAの多型を容易にかつ多数検出することが可能になった．このDNA多型はRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)と呼ばれ，なかでも，核DNAのRFLPはメンデルの法則に従って遺伝するので，標識遺伝子と同じように，連鎖分析のマーカーとして利用できる．

RFLPを連鎖分析のマーカーに利用する場合，従来の標識遺伝子と比較すると，次のような特徴がある．まず，標識遺伝子よりも容易に多数のマーカーが得られる．次に，標識遺伝子は一般に完全劣性であるものが多く， F_2 でヘテロ型の遺伝子型を判別できるものは少ないが，RFLPマーカーは，大部分のものが共優性を示すので， F_2 でヘテロの遺伝子型を判別でき，精度の高い組換え価が算出できる．さらに，標識遺伝子の場合，形質が胚乳や幼苗で発現するものから成熟個体に達しないと発現しないものまであり，評価すべき時期

が限られているものが多い。また、表現型が生育環境の影響を受け、形質が正確に評価できなくなる可能性がある。一方、RFLPマーカーは、DNAの塩基配列の違いを認識するものなので、DNAさえ得られれば、どの生育段階においても評価が可能である。また、生育環境に左右されずに、正確に遺伝子型を把握できる。

このような特徴をもつRFLPは、充実した連鎖地図を作成するのに適していると考えられる。既に、いくつかの植物種において、RFLPを利用した連鎖地図が作成され、育種学的、遺伝学的あるいは分類学的な応用が期待されている(総説 Tanksley *et al.* 1989)。イネにおいても McCouch *et al.* (1988), Saito *et al.* (1991), Causse *et al.* (1994) および Kurata *et al.* (1994) がそれぞれRFLPを利用した連鎖地図を作成している。

今後、連鎖地図を基盤とした遺伝・育種学的な研究を進めるに当たっては、形態形質などをマーカーとした従来の連鎖地図とRFLPをマーカーとしたRFLP連鎖地図との両方の情報を利用することが望まれる。それには、従来の連鎖地図(Classical linkage map)とRFLP連鎖地図(RFLP linkage map)とを統合した連鎖地図、すなわち、統合連鎖地図(Integrated linkage map)の作成が必要である。既に、シロイヌナズナでは125の標識遺伝子と350のRFLPマーカーとから成る統合連鎖地図が作成されている(Hauge *et al.* 1993)。また、トマトにおいては染色体1(Balint-Kurti *et al.* 1995)および染色体6(Weide *et al.* 1993)について統合連鎖地図が作成され、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較が行なわれた。イネにおいても、Kishimoto *et al.* (1992)やYu *et al.* (1995)はいくつかの標識遺伝子とRFLPマーカーとの対応づけを行ない、また、Abenes *et al.* (1994)は染色体11について、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との方向づけを行なっている。さらに、Causse *et al.* (1994)は様々な連鎖分析の結果に基づき、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との対応づけを試みた。しかし、イネにおいては、全染色体にわたっての従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との統合は

まだなされていない。今後、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図とが統合されて充実した連鎖地図が作成されれば、イネの遺伝・育種学の基礎的、応用的研究に資するところは大であると考えられる。

そこで、本研究では、まず、農林水産省と九州大学農学部育種学教室との共同研究によるRFLP連鎖地図を完成させるために、トリソミックスを利用して、RFLP連鎖群とイネの12の染色体との対応づけを行なった。ついで、標識遺伝子とRFLPマーカーとの連鎖分析を行ない、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との統合を試みた。

なお、本論文では、従来の連鎖地図とは九州大学農学部育種学教室で作成されてきたイネの連鎖地図(Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b) (Appendix 1 参照)を指し、RFLP連鎖地図とは Saito *et al.* (1991) (Appendix 2 参照)のRFLP連鎖地図を指すこととする。また、Saito *et al.* (1991)のDNAクローンは番号にNpbを付して表し、そのクローンに由来する連鎖地図上の座位あるいはマーカーは番号にXNpbを付して表した。同一のクローンに由来する複数の座位あるいはマーカーは枝番号で示した。例えば、XNpb68-1(染色体8)とXNpb68-2(染色体6)とはともにNpb68に由来する。さらに、染色体1, 3, 4, 5, 8, 9および12については、川崎ら(1991)および野々村ら(1994および未発表)が染色体腕と連鎖群との対応関係が明らかにしているので、短腕側が左側もしくは上側になるように連鎖地図の作図を行なった。

第1章 トリソミックスを利用したRFLPクロンの座乗染色体決定ならびに

RFLP分析による異数体の染色体構造の推定

正常植物に比べ染色体を1本過剰にもつ植物をトリソミックスという。イネ ($2n=24$) においても12種類のトリソミックスのシリーズが作出されている (Iwata and Omura 1984)。トリソミックスを利用して行なう遺伝分析をトリソミックス分析という。従来、主として標識遺伝子について、トリソミックスとの交雑後代における分離の様式から、その座乗染色体を同定する分析が行なわれてきた。現在、イネの12の染色体のそれぞれに対応する連鎖群または標識遺伝子群が明らかにされているが、トリソミックス分析がイネの連鎖地図作成に果たした役割は大きい(総説 Iwata 1986)。

さらに近年、トリソミックスはRFLPクロンの座乗染色体を決定することにも使われるようになった。Saito *et al.* (1991)は、トリソミックスの交雑後代におけるRFLPマーカーの分離比がダイソミックスの交雑後代における分離比と異なることを利用して、RFLPクロン4個の座乗染色体を決定した。また、Young *et al.* (1987)はトマトで、McCouch *et al.* (1988)ならびにSaito *et al.* (1991)はイネで、それぞれトリソミックスの遺伝子量効果を利用して、RFLPクロンの座乗染色体を決定した。

また、一旦、RFLP連鎖地図が構築されれば、RFLPマーカーを使って染色体の重複・欠失を遺伝子量効果により検出し、二次トリソミックス、三次トリソミックス、あるいは、アクロトリソミックスなどの異数体の染色体構造を推定することも可能である。

本研究では、トリソミックスの遺伝子量効果を利用して、いくつかのRFLPクロンの座乗染色体を決定した。また、RFLP連鎖地図上に位置づけられたRFLPマーカーを利用して、若干の異数体で遺伝子量効果を検出し、その過剰染色体の染色体構造を推定した。本章ではこれらの結果について述べる。

第1節 トリソミックスを利用したRFLPクロンの座乗染色体決定

Saito *et al.* (1991)はイネのRFLP連鎖群作成の際、まず、イネに期待される12の連鎖群を試作した。そのうちの6群は、RFLPマーカーと座乗染色体既知の標識遺伝子やアイソザイムマーカーとの連鎖を指標にして、対応する染色体が決定された(Kishimoto *et al.* 1989)が、残りの6群は染色体との対応関係が不明であった。そこで、本研究では、トリソミックスの遺伝子量効果を利用して、RFLP連鎖群と染色体との対応関係を調査した。

第1項 日印交雑トリソミックF₁を利用したRFLPクロンの座乗染色体決定

McCouch *et al.* (1988)は、イネのRFLP連鎖地図作成の際、インド型イネのトリソミックスにジャワ型イネを交配して得たトリソミックF₁の遺伝子量効果を利用して、RFLP連鎖群と染色体とを対応づけた。本実験でもこれに準じた分析を行なった。

材料および方法

(1)供試イネ

日本型品種日本晴由来のトリソミック・シリーズ(Iwata and Omura 1984)にインド型品種IR24を交配して得られたトリソミックF₁のシリーズを用いた。また、インド型品種IR24のトリソミックス(小川ら 未発表)に日本型品種トヨニシキを交配して得られた9型のトリソミックF₁も用いた。この9型のトリソミックF₁はそれぞれ染色体1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11および12を過剰染色体とするものであった。

(2)DNAクローン

Saito *et al.* (1991)がRFLP連鎖地図作成に用いたクローンの中から，日本晴とIR24との間，または，IR24とトヨニシキとの間で適当な多型を示したものを56個選んで用いた．さらに，RFLP連鎖地図に位置づけられていない若干のクローン（斎藤ら 未発表）も用いた．これらはクローンの番号にNpbを付して表した．また，インド型品種IR24のゲノムDNAに由来する新たなクローン（吉村ら 未発表）についてもいくつかを本実験に供した．これらはクローンの番号にKyを付した．以上を一括してTable 1-1-1に示した．

(3)サザンハイブリダイゼーション

供試イネからのDNA抽出は，CTAB(臭化セチルトリメチルアンモニウム)を利用した方法(Murray and Thompson 1980, Rogers and Bendich 1988)に準じて行なった．抽出したDNAは，9種類の制限酵素*Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sac*I, *Sca*Iおよび*Xba*Iのいずれかによって消化した後，各レーン2 μ gずつ0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ，ナイロンメンブランに固定した．プレハイブリダイゼーション処理には4 $\times$ SSPE, 1%SDS, 0.5%スキムミルク, 0.5mg/ml Herring DNA, 50%ホルムアミドを含む緩衝液を用いた．処理温度は42 $^{\circ}$ C, 処理時間は2時間ないし一晚とした．プレハイブリダイゼーション後，ランダムプライマー法(Feinberg and Vogelstein 1983)により 32 P-dCTPで標識したDNAクローンをプローブとして，ハイブリダイゼーション処理を行なった．処理温度は42 $^{\circ}$ C, 処理時間は6時間ないし一晚とした．ハイブリダイゼーション後の洗浄は，42 $^{\circ}$ Cの0.2%SDSを含む6 $\times$ SSCで30分2回, 0.2%SDSを含む2 $\times$ SSCで60分1回とした．ただし，オートラジオグラム上でのシグナルの弱いプローブを用いた場合には，0.2%SDSを含む2 $\times$ SSCでの洗浄を省いた．また，逆に，シグナルの強いプローブを用いた場合には，0.2%

Table 1-1-1. Chromosomal assignment of RFLP clones by trisomic gene dosage analysis

Chromosome	RFLP clone (Npb) ¹⁾						
1	54	96	130	147	252	314	80 ²⁾ Ky3 ³⁾
2	42	58	223	227	250	349	
3	48	51	173	249	392		
4	114	120	203	311			72 ²⁾ Ky4 ³⁾
5	105	139	292	297			
6	12	135	172	209	342		83 ²⁾ Ky11 ³⁾
7	20	22	117	338			50 ²⁾
8	126	278	397	398			68 ⁴⁾
9	13	36	47	108			Ky7 ³⁾
10	37	127	291	333			68 ⁵⁾ 89 ⁶⁾
11	44	52	78	183	189		
12	88	124	148	193	336		

¹⁾ RFLP clones mapped on the RFLP linkage map (Saito et al. 1991).

²⁾ Unmapped clone (Saito et al. unpublished).

³⁾ New clone (Yoshimura et al. unpublished).

⁴⁾ By dosage analysis in Nipponbare hybrid trisomics alone.

⁵⁾ By dosage analysis in IR24 hybrid trisomics alone.

⁶⁾ Indica allele of IR24 hybrid trisomics for chromosome 10 was missing probably due to deletion of a DNA segment.

SDSを含む2×SSCで30分2回および60分1回の洗浄を行なった。洗浄後のナイロンメンブランはオートラジオグラム用のカセットに増感紙、X線フィルムとともに装填し、 -80°C で3日ないしは1, 2週間感光させてオートラジオグラムをとった。

(4) 遺伝子量効果の検出

日本型品種日本晴由来のトリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたトリソミックF₁の場合、過剰染色体部分では、日本晴由来のDNAとIR24由来のDNAとが2:1の割合で存在する。従って、その過剰染色体に座乗するRFLPクローンを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なうと、オートラジオグラム上の日本晴型のバンドとIR24型のバンドとのシグナル量の比が2:1になると期待される。一方、RFLPクローンが過剰染色体に座乗しないときに期待される日本晴型のバンドとIR24型のバンドとのシグナル量の比は1:1である。そこで、この日本晴型のバンドのシグナル量の相対的な差をオートラジオグラム上に見出すことにより、RFLPクローンの座乗染色体を決定した。インド型品種IR24のトリソミックスに日本型品種トヨニシキを交配して得たトリソミックF₁を用いた場合も同様にした。

結果および考察

本研究で用いたDNAクローンは、主として、Saito *et al.* (1991)がインド型品種Kasalathと日本型標識遺伝子系統FL134との間にRFLPを見出して連鎖地図作成に利用したものである。本研究では、インド型品種にIR24を用い、また、日本型イネには様々の品種および系統を用いたので、実験に先立って、日本型品種日本晴とインド型品種IR24との間のRFLPの検出を行なった。Saito *et al.* (1991)のクローンのうち、172個を供試したところ、147個につい

ては日本晴とIR24との間でも多型が見出されたが、残り25個では見出されなかった。本項では、RFLPの見出された147個のクローンの中から、主として、シングルコピーのものを56個選んで用いた。

本項の結果の一例をFig. 1-1-1に示した。これは日本晴、IR24、ダイソミックF₁、および、日本晴のトリソミックスにIR24を交配して得られた12型のトリソミックF₁のDNAを制限酵素 *EcoRV* で消化して各レーンに配し、RFLPクローンNpb126をプローブとしてハイブリダイズさせて得られたオートラジオグラムである。本例では、染色体8を過剰染色体とするトリソミックF₁のレーンにおいて、日本晴型のバンドのシグナルの量がIR24型に比べて増加していた。よって、RFLPクローンNpb126は染色体8に座乗すると同定された。同様にし、各染色体ごとに4個から6個、合計56個のRFLPクローンについて座乗染色体を同定した。結果はFig. 1-1-2にまとめて示した。

本実験により、染色体1, 5, 7, 8, 9, 10に対応するRFLP連鎖群が新たに判明した。また、標識遺伝子等を指標にして、対応する染色体が決定または推定されていたRFLP連鎖群についても、その結果を再確認することができた。以上の結果により、イネの12の染色体のそれぞれに対応する連鎖群がすべて明らかになった。さらに、RFLP連鎖地図上に位置づけられていないNpb50, Npb72, Npb80, Npb83, Ky3, Ky4, Ky7およびKy11の合計8個のクローンについても座乗染色体をそれぞれ推定することができた。

本実験の目的は、Kishimoto *et al.* (1989)の試作した12のRFLP連鎖群とイネの12の染色体との対応関係を明らかにすることであった。これら12のRFLP連鎖群のうち、6群については、座乗染色体既知の標識遺伝子やアイソザイムマーカーを指標にして、染色体2, 3, 4, 6, 11, 12との対応関係が決定されていた(Fig. 1-1-2 参照)が、本実験の結果、染色体4の連鎖群は染色体7の連鎖群と誤り結ばれて、1連鎖群を形成していたことが明らかになった。また、染色体との対応関係の決定されていなかった6群のうち、5群は本実験でそれぞ



Fig. 1-1-1. An autoradiogram showing the gene dosage effect in Nipponbare hybrid trisomics. An RFLP clone Npb126 was assigned to chromosome 8 as indicated by the increased signal for the Japonica allele in triplo 8. DNAs were digested with *EcoRV*. P1: Japonica diploid parent, Nipponbare, P2: Indica diploid parent, IR24, D: a hybrid disomics as the control. Each figure represents the extra chromosome of hybrid trisomics (lanes 1-12).

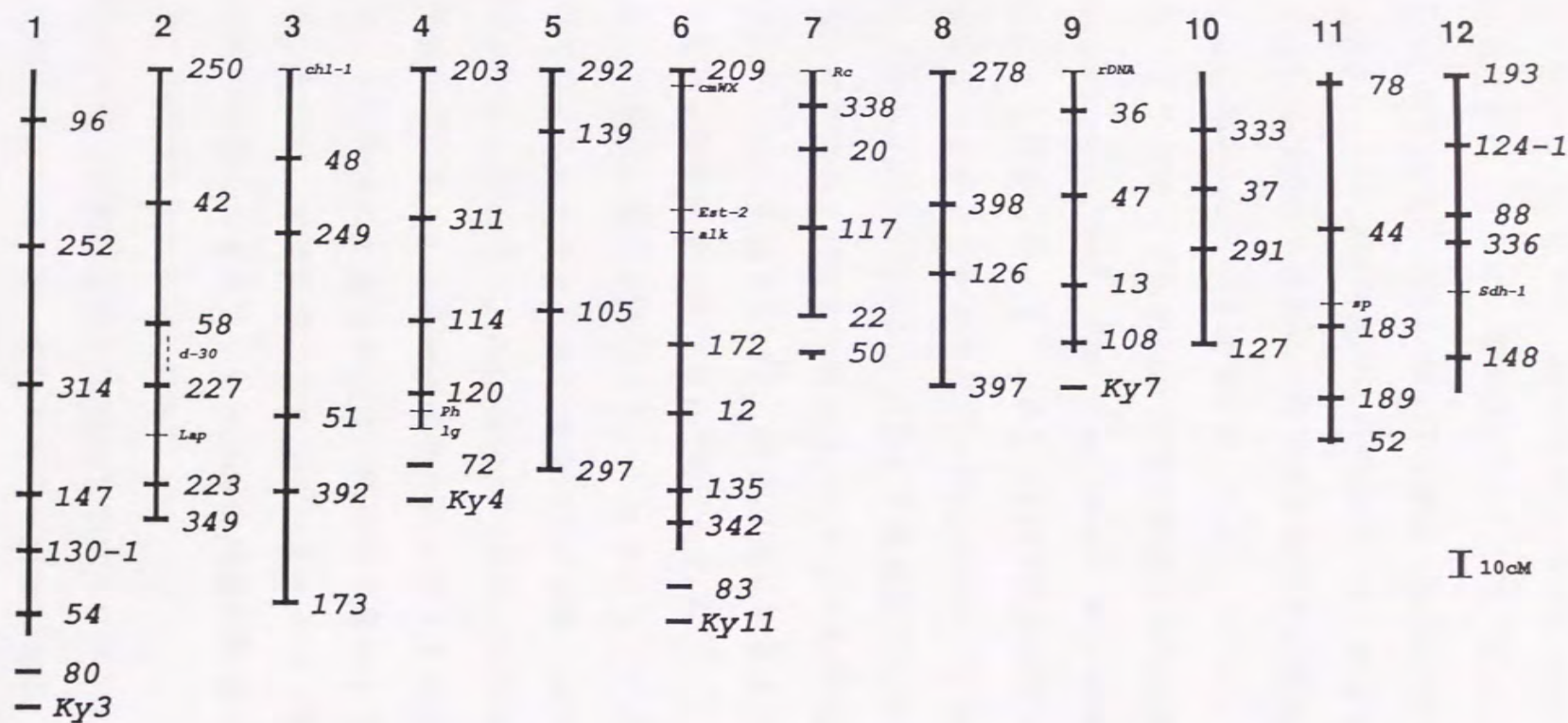


Fig. 1-1-2. RFLP markers assigned to their respective chromosomes by trisomic gene dosage analysis. The prefix *XNpb* are omitted. 50, 72, 80 and 83 are unlocated clones (Saito et al. unpublished). Ky3, Ky4, Ky7 and Ky11 are new genomic clones (Yoshimura et al. unpublished).

れ染色体1, 5, 8, 9, 10に対応づけられたが, 残りの1群は染色体4に対応することが分かった. 従って, 染色体4には独立の2RFLP連鎖群が対応していたことが判明した. さらに, 染色体7については, Saito *et al.* (1991)の連鎖群とは独立に, *XNpb50-XNpb178*なる連鎖群 (斎藤ら 未発表) が見出された. 以上のことから, RFLP連鎖地図は多数のマーカーを有するものの, 連鎖関係のみに依存した連鎖群の形成には限界があること, また, RFLP連鎖地図にまだ拡充の余地のあることが推察された.

近年, イネにおいても組換え自殖系の集団によるRFLP連鎖地図が整備され (Tsunematsu *et al.* 1993, Xiao *et al.* 1995), 新たなRFLPクローンの座位を決定することも容易になった. しかし, RFLP連鎖地図がイネのゲノム全領域に対応できているかどうかはまだ明らかでないので, 既存の連鎖地図に位置づけられているRFLPクローンとの間に連鎖の検出されないRFLPクローンの見出される可能性はまだ残されている. このようなRFLPクローンの座乗染色体を決定するのに, 本項で述べた, 遠縁交雑によるトリソミックF₁の遺伝子量効果を利用した方法は有用であると考えられる.

なお, 日本型品種日本晴のトリソミック・シリーズにインド型品種IR24を交配して作出したトリソミックF₁のシリーズは, いずれも日本晴のトリソミックスよりも生育旺盛で, DNA抽出用の成葉の採取は容易であった. これは遠縁交雑後代に見られる雑種強勢であると考えられた. また, 過剰染色体の種類による植物体の形態的特徴は, 概ね日本晴のトリソミックスのシリーズに一致したので, 分離集団からのトリソミックスの選抜はこれによった. 過剰染色体の種類によるトリソミックスの形態的特徴は, 日印交雑によっても, 基本的には変化しないと考えられた.

本研究では, 日本型品種日本晴のトリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたトリソミックF₁のシリーズとともに, インド型品種IR24のトリソミックスに日本型品種トヨニシキを交配して得られた9型のトリソミック

F₁を利用した。これら両方のトリソミックF₁を用いて座乗染色体の決定を行なった際に、いくつかのRFLPクローンについては、以下に述べるような相違が見出された。

染色体1では、Npb96, Npb252, Npb147およびNpb54の4クローンについて、日本型品種日本晴のトリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたトリソミックF₁のシリーズ、ならびに、インド型品種IR24のトリソミックスに日本型品種トヨニシキを交配して得られた9型のトリソミックF₁の両方を用いて、座乗染色体の決定を行なった。日本晴のトリソミックスにIR24を交雑して得られたトリソミックF₁を用いた場合には、4クローンともに、染色体1に関して遺伝子量効果が検出されたが、IR24のトリソミックスにトヨニシキを交雑して得られたトリソミックF₁を用いたときには、Npb96とNpb252とで遺伝子量効果が検出されなかった。これはIR24の染色体1のトリソミックスの過剰染色体に欠失が起こっているためであると考えた。

染色体11では、Npb78およびNpb44について、IR24のトリソミックスにトヨニシキを交雑して得られたトリソミックF₁を3個体用いて遺伝子量効果の検出を行なったが、この中の1個体は、Npb44をプローブとした場合に、遺伝子量効果が検出されなかった。これはIR24の染色体11に関するトリソミックスに欠失のある過剰染色体を有するものが存在するためであると考えられた。

また、Npb68については、日本晴のトリソミックス由来のトリソミックF₁を用いた場合は染色体8に、IR24のトリソミックス由来のトリソミックF₁を用いた場合は染色体10に、それぞれ遺伝子量効果が検出された。IR24の染色体8に関するトリソミックスの過剰染色体に欠失があり、その一方で、染色体10に関するトリソミックスの過剰染色体に染色体8の一部が転座していたとすれば、このような結果の得られる可能性がある。

さらに、IR24の染色体10に関するトリソミックス由来のトリソミックF₁は、染色体10に座乗するNpb89をプローブとした場合に、IR24型のバンドがオー

トラジオグラム上に現れなかった。これは、染色体10に関するIR24のトリソミックスの染色体から、Npb89に相当するDNA配列が欠失しているためであると考えられた。

第2項 RFLPを示さないDNAクローンの座乗染色体決定

Young *et al.* (1987) はトマトのRFLP連鎖地図を作成するためのDNAクローンの座乗染色体を純系のトリソミックスを用いて決定した。その際、トリソミックスの遺伝子量効果を検出するために、以下のような方法をとっている。すなわち、別の染色体に座乗し、かつ、オートラジオグラム上でのバンドの位置の異なるクローンを数個、同時にサザンハイブリダイゼーションに供し、あるDNAクローンに由来するバンドのシグナル量の変化を、別のDNAクローンに由来するバンドのシグナル量を指標にして見出す方法である。本項では、この方法に準じ、前項で述べたトリソミックスF₁の両親である日本型品種日本晴あるいはトヨニシキとインド型品種IR24との間で多型を示さないDNAクローンについて、座乗染色体の決定を行なった。

材料および方法

(1)供試イネ

インド型品種IR24のトリソミックス(小川ら 未発表)に日本型品種トヨニシキを交配して得られた9型のトリソミックF₁を用いた。この9型のトリソミックF₁はそれぞれ染色体1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11および12を過剰染色体とするものであった。

(2)DNAクローン

IR24とトヨニシキとの間でRFLPの検出されなかったクローンあるいは制限酵素とクローンとの組合せを利用した。いずれも、オートラジオグラム上のバンドの位置が互いに重ならないようにクローンを2個選択し、これを混合して標識し、サザンハイブリダイゼーションに供した。

(3)サザンハイブリダイゼーションは前項に準じた。

(4)遺伝子量効果の検出

イネは二倍体であるので、あるDNAクローンに相当するDNA量を2とすると、トリソミックスの過剰染色体に座乗するDNAクローンに相当するDNA量は3である。従って、トリソミックスよりDNAを抽出し、DNAクローンをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった場合、そのDNAクローンが過剰染色体に座乗するならば、オートラジオグラム上に期待されるバンドのシグナル量は3、座乗しないならば2である。そこで、オートラジオグラム上で、選択した2個のDNAクローンに由来する2種類のバンドのシグナル量を同一レーン内で相互に比較し、バンドのシグナル量の相対的な差を見出すことにより、トリソミックスの過剰染色体に起因する遺伝子量効果を検出した。

結果および考察

本項の結果の一例をFig. 1-1-3に示した。これはIR24、トヨニシキ、および、IR24のトリソミックスにトヨニシキを交配して得た9型のトリソミックF₁のDNAを制限酵素*Hind*IIIで消化して各レーンに配し、DNAクローンNpb25(上)とNpb27(下)とを併せてプローブとして、ハイブリダイズさせて得られたオートラジオグラムである。本例では、Npb25とNpb27とのバンドのシグナル量の

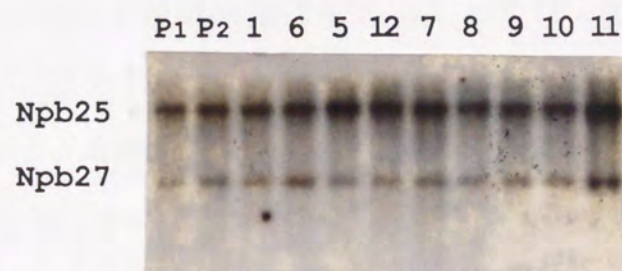


Fig. 1-1-3. An autoradiogram showing the gene dosage effect in IR24 hybrid trisomics. DNA clones Npb25 and Npb27 were assigned to chromosomes 5 and 6 respectively as indicated by the increased signals. DNAs were digested with *HindIII*. P1: Indica diploid parent, IR24, P2: Japonica diploid parent, Toyonishiki. Each figure represents the extra chromosome of hybrid trisomics.

比をレーンごとに比較すると、染色体5を過剰染色体とするトリソミックF₁のレーンにおいて、Npb25のバンドのシグナル量に増加が認められた。よって、Npb25は染色体5に座乗することが判明した。また、Npb27は染色体6を過剰染色体とするトリソミックF₁のレーンにシグナル量の増加が認められ、染色体6に座乗することが判った。同様にして、Npb121およびNpb88も、それぞれ染色体1および染色体12に座乗することが確認された(Table 1-1-2)。

これまで、イネのRFLP連鎖地図作成に当たっては、RFLPを検出しやすいように日印交雑の後代を用いているが、それでも、ゲノミックライブラリーから選抜したクローンの中には、RFLPの検出されないものが多く含まれる。Yano *et al.* (1990) は、*Pst* Iゲノミックライブラリーから選抜したクローンについて、日本型標識遺伝子系統FL134およびインド型品種KasalathのDNAと4種類の制限酵素との組合せでRFLPの検出を行なった結果、オートラジオグラム上にバンドの現れる472クローンの内、210クローンがRFLPを示さなかったと報告している。現在のところ、このようなクローンは連鎖地図作成に用いることができないが、近年、栽培稲と野生稲との交雑後代を用いたRFLP連鎖地図(Huang and Kochert 1994, Jena *et al.* 1994, Causse *et al.* 1994)が作成されているように、連鎖地図作成の材料も多様化しているので、今後、日印間でRFLPの見られないクローンでも、栽培稲と野生稲とでは新たにRFLPが見出され、連鎖地図作成のマーカーたり得ることも考えられる。このような場合には、本項で述べた方法でクローンの座乗染色体を決定することが有効である。なお、異数性半数体やテトラソミックス等の遺伝子量効果の大きい異数体を利用すれば、RFLPを示さないクローンの座乗染色体を更に簡明に決定することができる(Wang *et al.* 1995)。また、RFLPが不要であるので、純系の異数体において遺伝子量効果を検出し、その染色体の重複・欠失を推定する際にも、この方法は有効であると考えられる。

Table 1-1-2. Chromosomal assignment of monomorphic clones by trisomic gene dosage analysis identified by "within-lane" comparison between the hybridization signals of different size derived from respective DNA clones

Chromosome	Clone (Npb)
1	121
5	25
6	27
12	88

第2節 RFLPを利用した異数体の染色体構造の推定

第1節では，トリソミックスの遺伝子量効果を利用してRFLPクローンの座乗染色体を決定し，RFLP連鎖群と染色体との対応関係を明らかにしたが，一旦，RFLP連鎖地図が構築されれば，逆に，RFLPマーカーを使って染色体の重複・欠失を遺伝子量効果により検出し，異数体や染色体構造変異体の染色体構造を推定することも可能であると考えられる．本節では，若干の異数体について，RFLPを利用した分析を行なったので，それについて述べる．なお，本節では，二次トリソミックス等，他の種類のトリソミックスとの区別を明確にするために，これまで単にトリソミックスと称してきたものについて，一次トリソミックスの語を用いることにする．

第1項 一次トリソミックスの交雑後代に出現した二次トリソミックス様植物について

染色体8を過剰染色体とする日本型品種日本晴の一次トリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたF₁個体群の中に，染色体8の一次トリソミックF₁とは形態のやや異なる変異体が1個体出現した．一次トリソミックF₁に比べ草丈は低く，穂は小さく，粒はやや小さく，全体的に見てやや小型であった．また，葉の捲き方の程度がやや大きく，種子稔性は一次トリソミックF₁が約38%であったのに対し，変異体は約6%であった．そこで，この変異体について，減数分裂第一中期における染色体観察を行なうとともに，RFLP分析を行なって遺伝子量効果を検出し，通常の一次トリソミックF₁と比較した．

材料および方法

(1)供試イネ

染色体8を過剰染色体とする日本型品種日本晴の一次トリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたF₁に出現した変異体，および，同交配で得られた一次トリソミックF₁を供試した。

(2)DNAクローン

Saito *et al.* (1991)のRFLP連鎖地図で染色体8の連鎖群に所属するRFLPクローンを12個用いた。配列順にこれを示すと，Npb278，Npb68，Npb330，Npb38，Npb41，Npb104，Npb369，Npb398，Npb126，Npb187，Npb56およびNpb397である。

(3)サザンハイブリダイゼーション，(4)遺伝子量効果の検出は本章第1節第1項に準じた。

(5)染色体観察

アセトカーミン押し潰し法によった。

結果および考察

まず，今回出現した変異体，および，染色体8を過剰染色体とする一次トリソミックF₁の減数第一分裂中期における染色体観察を行なった。その結果はTable 1-2-1 にまとめた。変異体は染色体数が25であったので，トリソミックスの一種であると考えられた。また，染色体8を過剰染色体とする一次トリソミックF₁と同じく，11II+1III，および，12II+1Iの二通りの接合像が観察され

Table 1-2-1. Chromosomal configuration at metaphase I in the hybrid primary trisomics for chromosome 8 and a related variant: a secondary-trisomic like plant

	Chromosome configuration at metaphase I		Number of cells observed
	11II + 1III	12II + 1I	
Primary trisomics	27 (52%)	25 (48%)	52
Variant	13 (32%)	28 (68%)	41

たが、その頻度には違いが見られた。すなわち、一次トリソミックF₁では11III+1IIIが52%、12II+1Iが48%であったが、変異体ではそれぞれ32%、68%であって、三価染色体の形成頻度が低く、一価染色体の形成頻度が高くなっていた。このことから、今回出現した変異体では、過剰染色体の構造に何らかの変化の生じていることが推察された。

次に、この変異体についてRFLP分析を行なった。結果は Fig. 1-2-1 にまとめて示した。右側に示したオートラジオグラムは、日本晴、IR24、ダイソミックF₁、染色体8に関する一次トリソミックF₁ならびに今回出現した変異体を各レーンに配し、RFLPクローンNpb369およびNpb398をプローブとして得たサザンハイブリダイゼーションの結果である。

Npb369をプローブとした場合、一次トリソミックF₁のレーンでは日本晴型のバンドのシグナル量に増加が認められたが、変異体のレーンでは、日本晴型のバンドのシグナル量が、一次トリソミックF₁に期待されるシグナル量よりも、著しく増加していた。これと同様の結果がNpb278, Npb68, Npb330, Npb38, Npb41およびNpb104についても得られた。

一方、Npb398をプローブとした場合、一次トリソミックF₁のレーンではNpb369の場合と同じく、日本晴型のバンドのシグナル量に増加が認められたが、変異体のレーンではこのようなシグナル量の変化は認められず、ダイソミックF₁と同じ結果であった。これと同様の結果がNpb126, Npb187, Npb56およびNpb397についても得られた。

以上の結果から、今回出現した変異体の過剰染色体には、重複と欠失とが存在すると考えられた。これをRFLP連鎖地図上で表すと、重複部分はXNpb278-XNpb68-1-XNpb330-XNpb38-XNpb41-XNpb104-XNpb369の領域であり、欠失部分はXNpb398-XNpb126-XNpb187-XNpb56-XNpb397の領域である。よってこの変異体は、染色体8に関する同腕染色体を過剰染色体とする二次トリソミックス様植物であると考えられた。

8

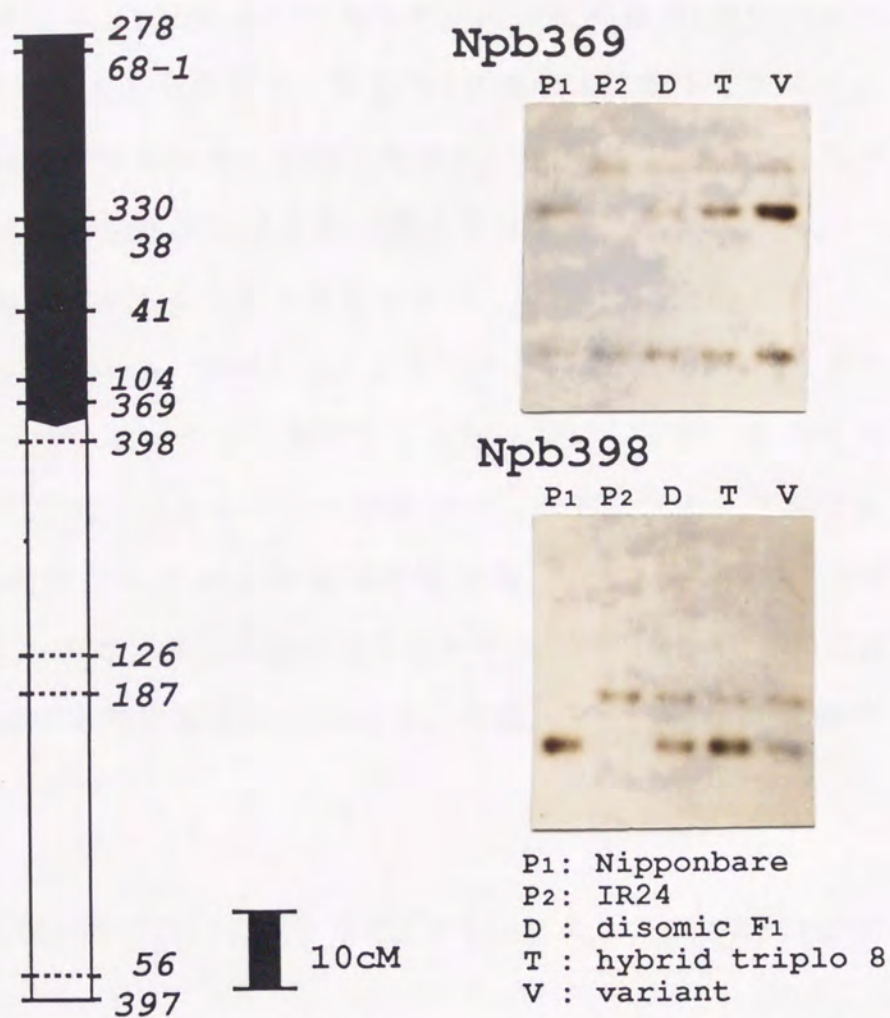


Fig. 1-2-1. RFLP gene dosage analysis of a variant: a secondary-trisomic like plant for chromosome 8. RFLP clones used in this study are shown by the locus name without *XNpb*.

□ : no dosage effect

■ : more increased dosage effect

今回出現した染色体8に関する二次トリソミックス様植物は、同染色体に関する日本型品種日本晴の一次トリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたF₁に偶発したものであった。その後、同様の交配を行なって反覆実験を試みたところ、116個体のF₁の中に同様の変異体が1個体出現した。これのRFLP分析を行なったところ、染色体8に関する二次トリソミックス様植物に一致する結果が得られた。このことから、染色体8に関する二次トリソミックス様植物は、同染色体に関する一次トリソミックスの後代に、一定の割合で出現する可能性があることが考えられた。

Belling and Blakeslee (1924)は、シロバナヨウシュチョウセンアサガオにおいて、一次トリソミックスの後代より二次トリソミックスを得ているので、今回出現した二次トリソミックス様植物が二次トリソミックスである可能性は高い。二次トリソミックスには特異的な染色体対合像が知られている(Khush 1973)ので、今回出現した二次トリソミックス様植物が二次トリソミックスであることを確認するためには、今後、染色体対合像の観察が必要である。

第2項 染色体11に関する4型のトリソミックスのRFLP分析

Iwata *et al.* (1970)は、日本型イネを用いて、同質三倍体ならびに相互転座ヘテロ個体の後代より、イネに期待される12型のトリソミックスを成熟期の形態的特徴によって分離・同定し、それぞれにアルファベットの一字を冠してA~L型と名づけた。しかし、その後、Kurata *et al.* (1981)はこれらのトリソミックスの過剰染色体の同定を行ない、G型、I型、J型およびK型の4型が、いずれも染色体11を過剰染色体としていることを見出した。しかし、同一の染色体を過剰に有しながら形態的特徴が異なる理由については不明であった。そこで、本実験ではこれら4型のトリソミックスについてRFLP分析を

行ない、遺伝子量効果を検出することによって過剰染色体の構造を調査した。ここで、Iwata *et al.* (1970)の記載に従って、G型、I型、J型およびK型の4型のトリソミックスの形態的特徴を述べれば、以下のようである。

G型：やや濃緑葉，出穂晩，籾やや粗剛，輝黄色粒，脱粒易，高稔性でダイソミックスからの判別困難。

I型：草丈低，出穂晩。

J型：やや細稈，黄褐着色稈，出穂後葉身に褐斑を生ずる。

K型：草型ほぼ正常でダイソミックスからの判別困難，出穂やや晩。

材料および方法

(1)供試イネ

日本型品種愛国の同質三倍体に由来する，G型，I型，J型およびK型の4型のトリソミックスにインド型品種IR24を交配して得られたそれぞれの型のトリソミックF₁を供試した。

(2)DNAクローン

Saito *et al.* (1991)のRFLP連鎖地図で染色体11の連鎖群に所属するRFLPクローンのうち，愛国とIR24との間で適当な多型を示した10個を用いた。連鎖地図での配列順にこれを示すとNpb389，Npb78，Npb85，gmZ410，Npb202，Npb44，Npb183，Npb205，Npb189およびNpb52であった。

(3)サザンハイブリダイゼーションは第1章に，(4)遺伝子量効果の検出は本章第1節第1項に準じた。

結果および考察

愛国, IR24, ダイソミックF₁および2個体ずつのG型, I型, J型, K型の各トリソミックF₁を各レーンに配し, RFLPクローンNpb78, Npb202およびNpb44をハイブリダイズして得た結果を Fig. 1-2-2に示した. 以下, クローン毎に結果を述べる.

(1)Npb78

G型のレーンでは, 一次トリソミックスに期待される遺伝子量効果が検出されたが, I型およびK型では検出されなかった. さらに, J型では一次トリソミックスに期待されるよりも過剰な遺伝子量効果が検出された. Npb389, Npb85およびgmZ410でも同様の結果が得られた.

(2)Npb202

G型のレーンでは, 一次トリソミックスに期待される遺伝子量効果が検出されたが, 残りのI型, J型およびK型では検出されなかった. Npb202以外に同様の結果の得られたクローンはなかった.

(3)Npb44

G型, I型およびK型のレーンでは, 一次トリソミックスに期待される遺伝子量効果が検出されたが, J型では検出されなかった. Npb183, Npb205, Npb189およびNpb52でも同様の結果が得られた.

以上の結果をまとめると以下のようなになる(Fig.1-2-2). G型は供試したクローンすべてで, 一次トリソミックスに期待される遺伝子量効果が検出された. よって, G型は染色体11に関する一次トリソミックスであると考えられた. I

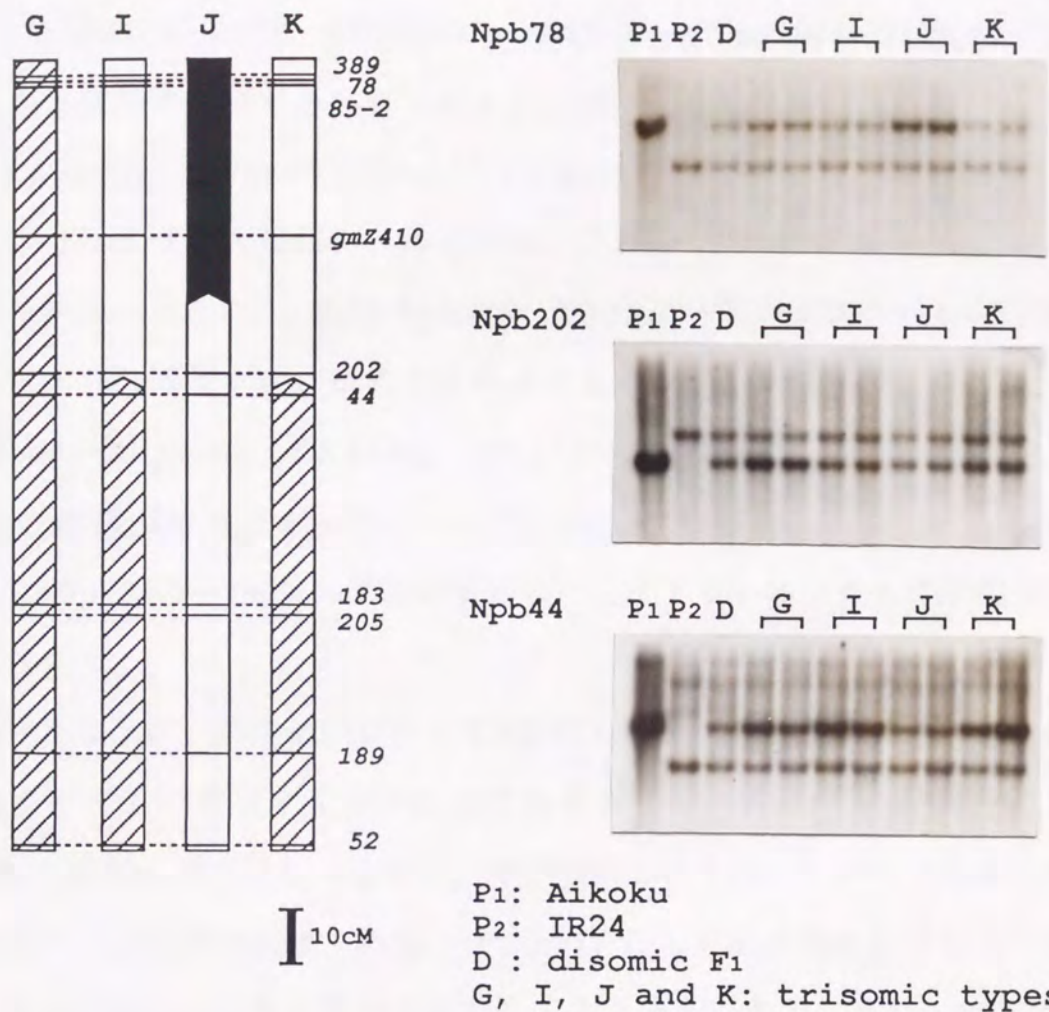


Fig. 1-2-2. RFLP gene dosage analysis of 4 types of trisomics, G, I, J and K, having chromosome 11 as an extra chromosome. RFLP clones used in this study are shown by the locus name without *XNpb*.

□: no dosage effect
 ▨: trisomic gene dosage effect
 ■: more increased dosage effect

型およびK型は，ともに， $XNpb44-XNpb183-XNpb205-XNpb189-XNpb52$ の領域で，一次トリソミックスに期待される遺伝子量効果が検出されたが， $XNpb389-XNpb78-XNpb85-2-gmZ410-XNpb202$ の領域ではダイソミックF₁と同様の結果であった．よって，I型およびK型は，ともに，過剰染色体の $XNpb389-XNpb78-XNpb85-2-gmZ410-XNpb202$ 部分の欠失したアクロトリソミックス様植物，あるいは，テロトリソミックス様植物であると考えられた．さらに，J型は $XNpb389-XNpb78-XNpb85-2-gmZ410$ の領域で一次トリソミックスに期待されるよりも過剰な遺伝子量効果が検出され， $XNpb44-XNpb183-XNpb205-XNpb189-XNpb52$ の領域ではダイソミックF₁と同様の結果であった．よって，J型は過剰染色体の $XNpb389-XNpb78-XNpb85-2-gmZ410$ 部分の重複した二次トリソミックス様植物であると考えられた．

以上述べたように，染色体11に関して4型のトリソミックスが存在するのは，過剰染色体に生じた重複・欠失のためであると考えられた．I型とK型とでRFLP分析の結果が同じであったのは，今回供試したRFLPクローンだけでは検出されないほどの狭い領域，あるいは，RFLP連鎖地図の包含していない領域での，過剰染色体の欠失あるいは重複によると考えられる．また，Npb202の結果は，I型，J型およびK型の過剰染色体に起こっている欠失が原因であると考えられる．これらの結果については更なる検討が必要である．

なお，本実験で用いたG型，I型，J型およびK型のトリソミックF₁のそれぞれの植物体の形態的特徴は，交配親である日本型品種愛国のG型，I型，J型およびK型のトリソミックスの形態的特徴に概ね一致した．過剰染色体の種類や重複・欠失による形態的特徴は，遠縁交雑を行なった場合でも，基本的には変化しないと考えられた．

第2章 従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との統合

イネの連鎖分析は古くから行なわれ、現在では、12の染色体すべてについて、形態形質、葉緑体形質、着色形質、生理形質等の標識遺伝子から成る連鎖地図(従来の連鎖地図, Classical linkage map)が作成されている(Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b). 一方、近年に至って、DNAの多型をマーカーとした連鎖地図(RFLP連鎖地図, RFLP linkage map)がイネにおいてもいくつか作成されている(McCouch *et al.* 1988, Saito *et al.* 1991, Kurata *et al.* 1994, Causse *et al.* 1994).

現在のところ、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図とは、それぞれ独立に存在しているが、これらの連鎖地図が統合されれば、イネの遺伝子連鎖地図が充実するだけでなく、RFLPマーカーを指標とした有用形質の間接選抜や染色体歩行による遺伝子の単離等、遺伝・育種学上の基礎的・応用的研究の発展に寄与するところは大であると考えられる。

イネにおいては、これまでに、Saito *et al.* (1991) や Kishimoto *et al.* (1992)がいくつかの標識遺伝子とRFLPマーカーとの連鎖分析を行っており、さらに、Yu *et al.* (1995)は近似同質遺伝子系統を用いて、標識遺伝子とRFLPマーカーとを対応づけている。また、Abenes *et al.* (1994)は染色体11について標識遺伝子とRFLPマーカーとの配列を明らかにし、Causse *et al.* (1994)は様々な連鎖分析の結果に基づいて、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との対応づけを試みた。しかしながら、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との全染色体にわたる対応づけは未だになされていない。

そこで、第1節では、九州大学農学部育種学教室で作成されてきた従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b)(Appendix 1 参照)とSaito *et al.* (1991)のRFLP連鎖地図(Appendix 2 参照)との統合を試みた。分離集団にはインド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑F₂あるいはF₃を用いたが、

日印交雑の後代では遺伝子が異常な分離を示すことがあるので、遺伝子の分離の歪みについて、第2節で考察を加えた。なお、Appendix 3には、本章で用いた標識形質の写真を示した。

第1節 標識遺伝子とRFLPマーカーとの連鎖分析による統合連鎖地図の作成

本節では、イネの従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b)に位置づけられている標識遺伝子と、Saito *et al.* (1991)のRFLP連鎖地図に位置づけられているRFLPマーカーとの、連鎖分析による統合連鎖地図の作成について述べる。始めに、材料と連鎖分析の方法とについてまとめ、次いで、染色体ごとに結果および考察を述べた。

材料および方法

(1)供試イネならびに標識遺伝子

インド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑F₂集団を用いた。交雑組合せならびに標識遺伝子は一括して Table 2-1-1 に示した。これらのF₂集団を常法に従って栽培し、適宜、標識形質の分離を調査した。また、出穂期頃に成葉を採取、凍結保存してDNA抽出に供した。ただし、IR24 / 88F₁₂₆の交雑組合せについてはF₂各個体よりF₃系統を育成して標識形質の調査や成葉の採取を行なった。

(2)RFLPマーカー

Saito *et al.* (1991)がRFLP連鎖地図に位置づけたRFLPマーカーの中から、日本晴とIR24との間で適当な多型の得られたものを81個選んで用いた。さらに、RFLP連鎖地図に位置づけられていないRFLPマーカー(斎藤ら 未発表)に

Table 2-1-1. F₂ populations observed for linkage analysis

Chromosome	Cross combination	Marker genes tested
1	IR24 / FL293	<i>d-18</i> , <i>fs-2</i>
	IR24 / 88F126 ¹⁾	<i>eg</i> , <i>spl-6</i> , <i>rl-2</i>
	IR24 / FL150	<i>d-2</i>
2	IR24 / FL274	<i>bl-1</i> , <i>tri</i>
	IR24 / FL235	<i>spl-2</i>
3	FL303 / IR24	<i>chl-1</i> , <i>fc-1</i> , <i>spl-3</i>
	IR24 / 90F1023	<i>dl</i> , <i>st</i> (t) (CM120) ²⁾
4	IR24 / FL151	<i>lg</i> , <i>d-11</i> , <i>Ph</i>
5	IR24 / 89F92	<i>spl-7</i> , <i>nl-1</i> , <i>st</i> (t) (CM37) ³⁾
	IR24 / 89F920	<i>d-1</i>
6	IR24 / FL314	<i>dp-1</i> , <i>spl-4</i>
	IR24 / 90F1023	<i>dp-1</i> , <i>Cl</i>
7	IR24 / 90F93	<i>v-11</i> , <i>d-6</i> , <i>g-1</i> , <i>spl-5</i>
8	IR24 / 90F1211	<i>v-8</i> , <i>sug</i>
9	IR24 / FL260	<i>Dn-1</i> , <i>drp-2</i> , <i>dp-2</i>
	FL303 / IR24	<i>I-Bf</i>
10	IR24 / 89F921	<i>pgl</i> , <i>spl-10</i>
11	IR24 / 90F1036	<i>z-2</i> , <i>v-9</i>
12	IR24 / 89F919	<i>spl-1</i>
	89F424 / IR24	<i>rl-1</i>

¹⁾ F₃ lines derived from F₂ individuals were used.

²⁾ Assigned to chromosome 3 in this study.

³⁾ Assigned to chromosome 5 by trisomic analysis
(Sato et al. unpublished).

についても2個を用いた。供試したRFLPマーカーは一括して Table 2-1-2 に示した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

第1章に準じて行なった。ただし、若干のF₂集団のDNA抽出には酢酸カリウムを利用した方法(Dellaporta *et al.* 1983)を用いた。

(4) 連鎖分析

F₂集団におけるRFLPマーカーの分離の一例を Fig. 2-1-1 に示した。これは、インド型品種IR24、日本型標識遺伝子系統FL293、および、これらの交雑F₂集団のDNAを制限酵素 *EcoRV* で消化して各レーンに配し、RFLPクローン Npb96をプローブとして、ハイブリダイズさせて得られたオートラジオグラムである。このバンドのパターンによって、F₂各個体の遺伝子型が種子親型か花粉親型かあるいはF₁型かを判定した。また、標識遺伝子についても、F₂各個体について、表現型の観察を行なった。組換え価(%)の算出は、F₂集団におけるRFLPマーカーおよび標識遺伝子の分離成績に基づき、最尤法(Allard 1956)によって行ない、その結果によって、標識遺伝子とRFLPマーカーとの配列関係を求めた。また、Saito *et al.* (1991)のRFLP連鎖地図は座位間の距離を地図距離(cM)で表示してあるので、本実験の結果と Saito *et al.* (1991) のRFLP連鎖地図とを比較する場合には、組換え価をKosambi (1944)の地図関数で地図距離に変換した。

結果および考察

連鎖分析の結果をFig. 2-1-2 に示し、分離成績をAppendix 4にまとめた。また、Fig. 2-1-3 では、各染色体について、本研究の結果を中央に示し、従来の

Table 2-1-2. RFLP markers used for linkage analysis

Chromosome	RFLP marker (XNpb) ¹⁾												
1	96	97	130-1	147	174	216	252	269	314	346	359	368	
2	42	45	57	132	223	227	250	349					
3	15	51	173	164	182	249	348						
4	49	72 ²⁾	114	120	203	237	311						
5	81	105	139	292	297	387							
6	135	165-1	170	172	209	233	386						
7	20	22	50 ²⁾	85-1	117								
8	126	187	278	369	397								
9	36	47	108	293	385	404							
10	37	127	133	291	333								
11	44	52	78	181	183	189	202	389	gmZ410				
12	88	124-1	148	193	198	402							

¹⁾ RFLP markers mapped on the RFLP linkage map (Saito et al. 1991).

²⁾ Unmapped RFLP marker (Saito et al. unpublished).

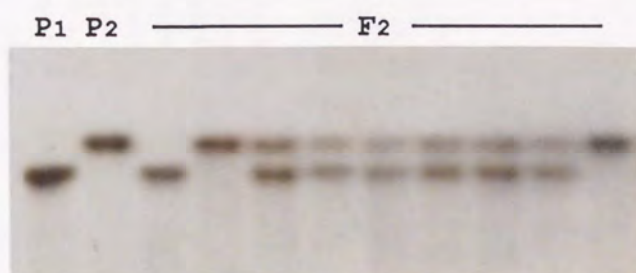
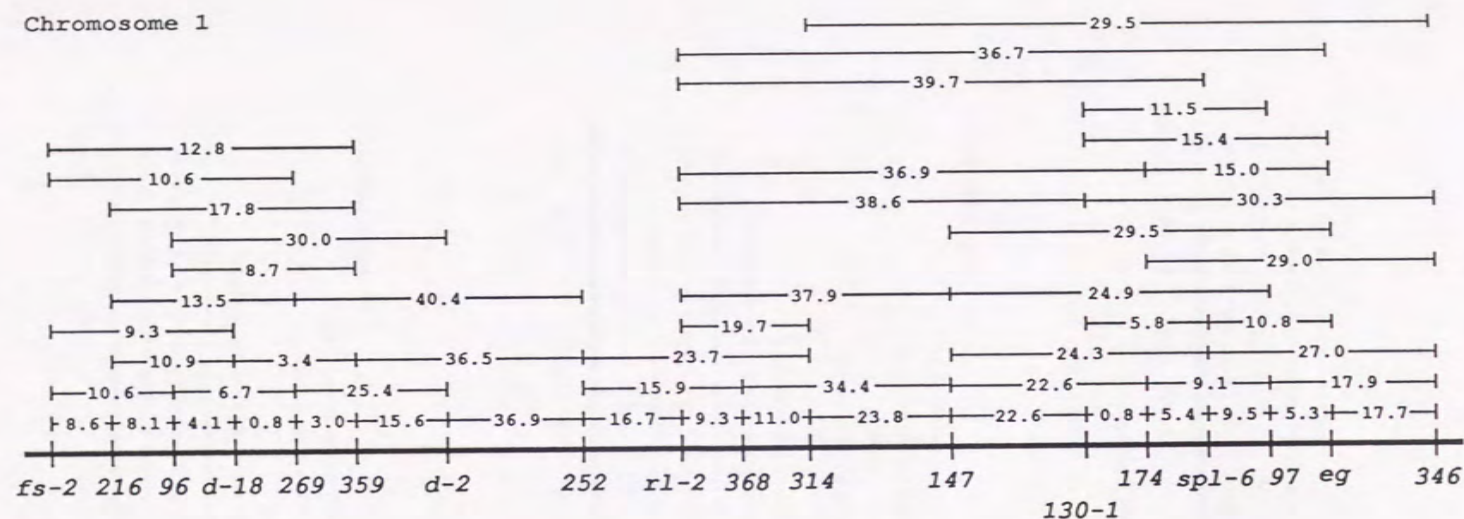


Fig. 2-1-1. F2 segregation of an RFLP marker *XNpb96*. An RFLP clone *Npb96* was probed onto *EcoRV* digested DNAs from F2 plants and their parents. P1: an Indica variety, IR24, P2: a Japonica marker line, FL293.

Chromosome 1



Chromosome 2

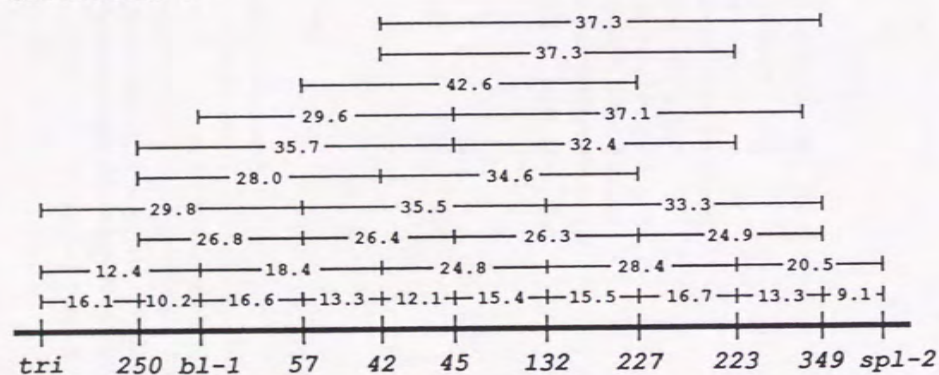
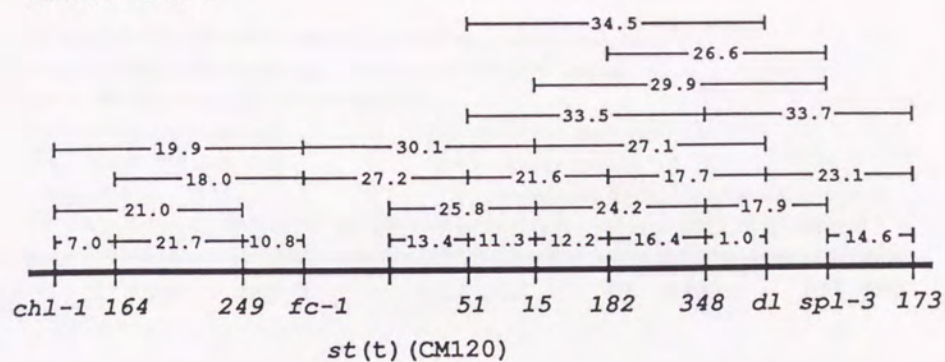
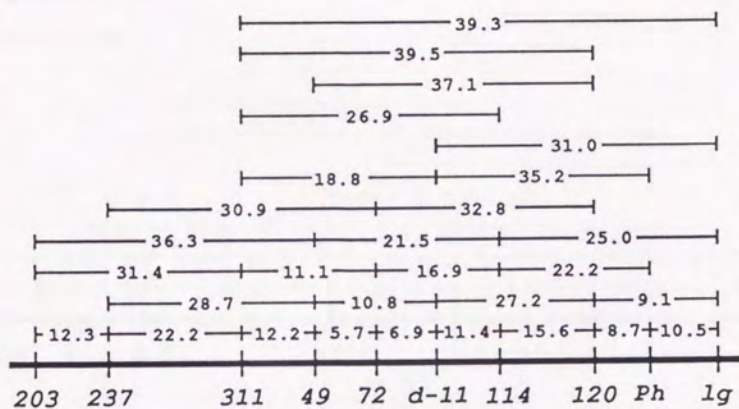


Fig. 2-1-2. A classical/RFLP integrated linkage map in rice. The prefix of RFLP markers, XNpb, is omitted. The recombination values are shown in %.

Chromosome 3



Chromosome 4



Chromosome 5

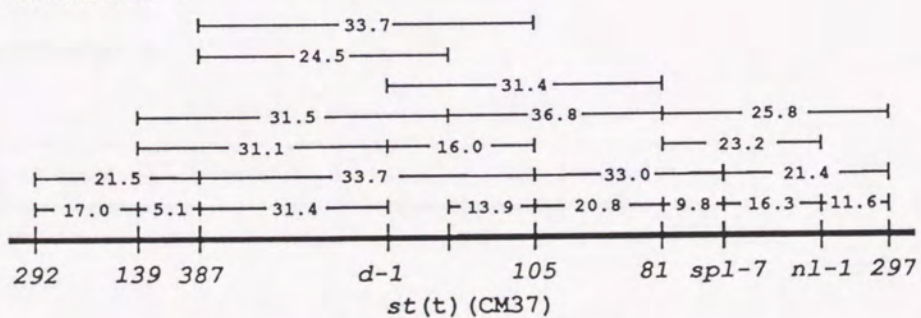
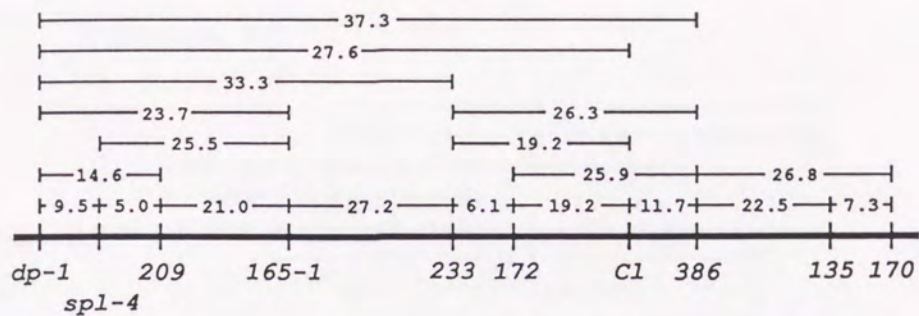
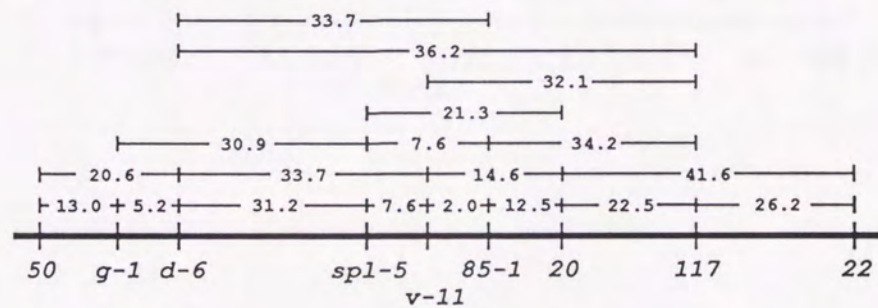


Fig. 2-1-2. Continued

Chromosome 6



Chromosome 7



Chromosome 8

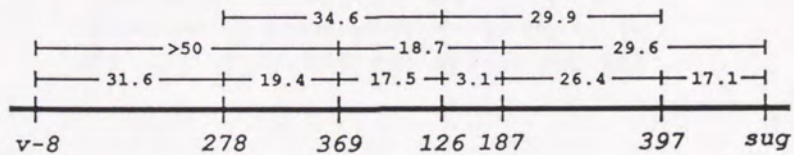
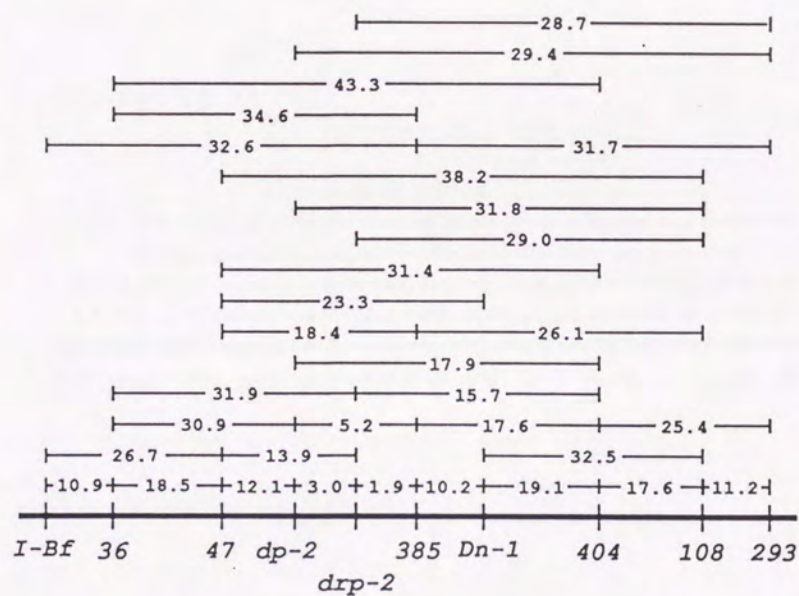


Fig. 2-1-2. Continued

Chromosome 9



Chromosome 10

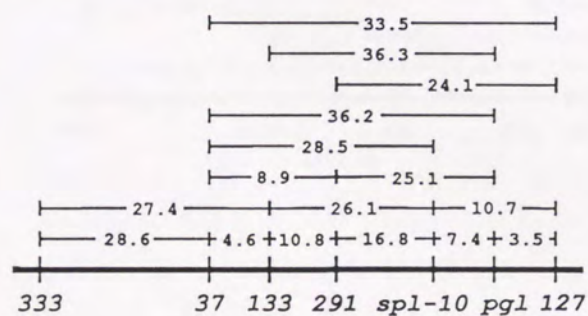
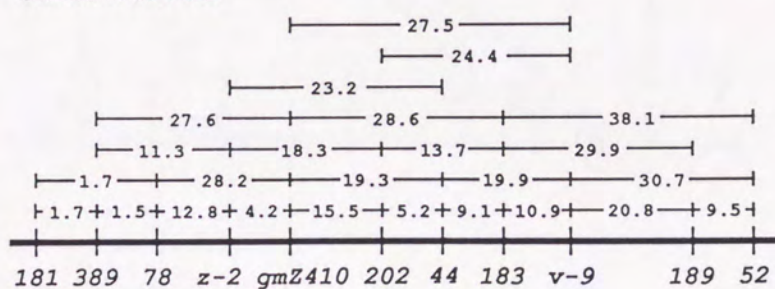


Fig. 2-1-2. Continued

Chromosome 11



Chromosome 12

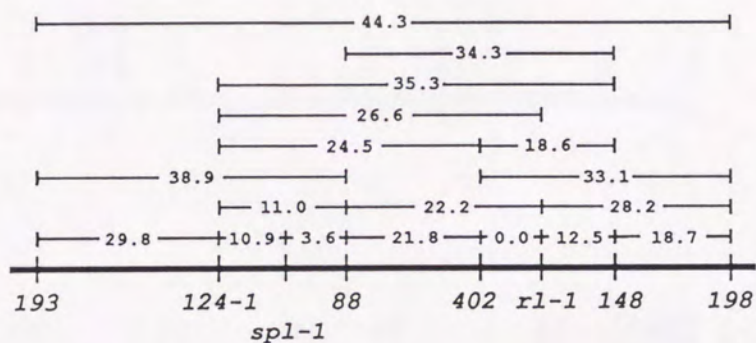


Fig. 2-1-2. Continued

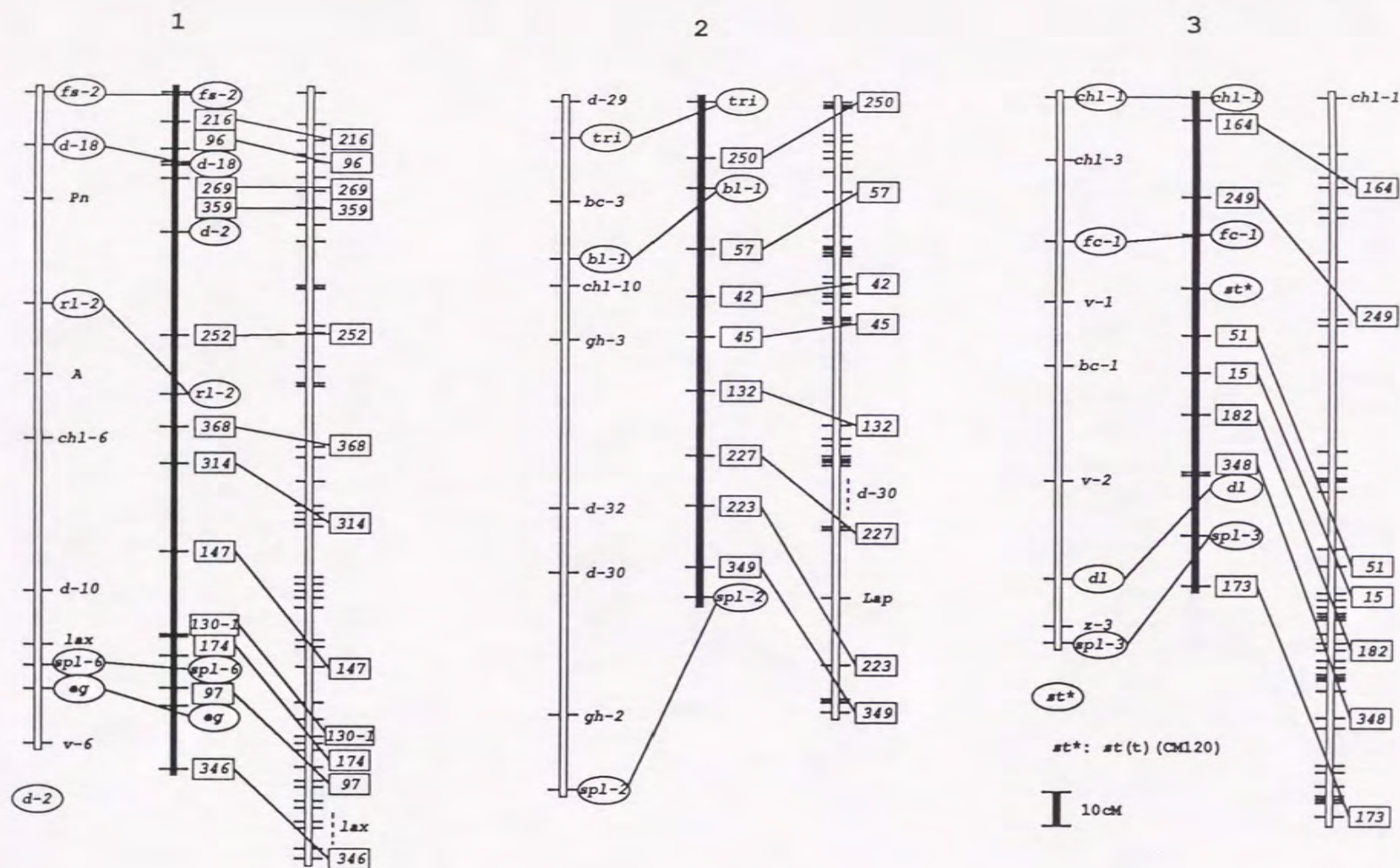


Fig. 2-1-3. An integrated linkage map of rice. The classical linkage map is shown on the left and the RFLP linkage map on the right. Numbers at the top indicate chromosomes. The prefix of RFLP markers, *XNpb*, are omitted in this figure. The loci in ellipses are classical markers used in this study, and those in boxes are RFLP markers.

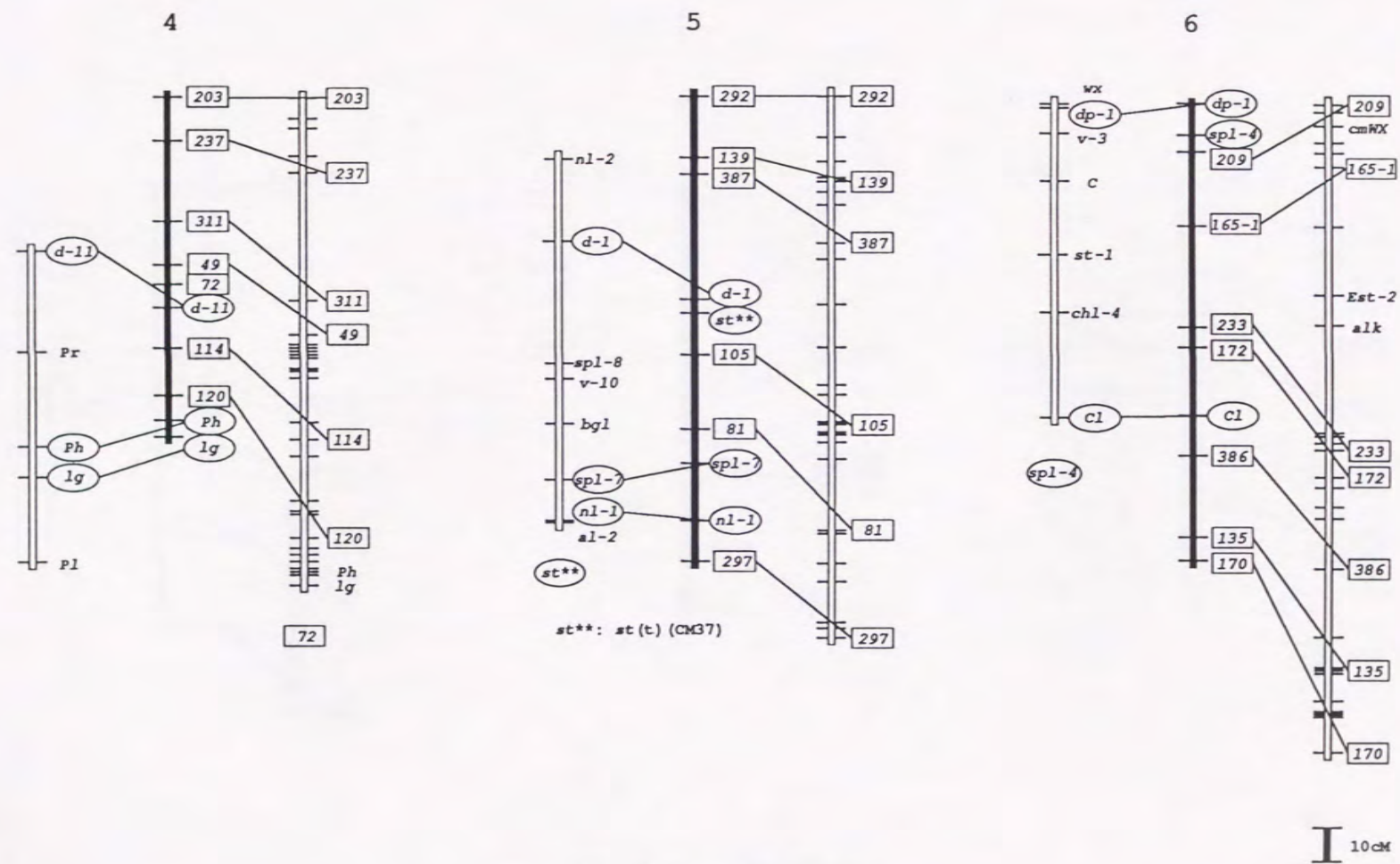


Fig. 2-1-3. Continued

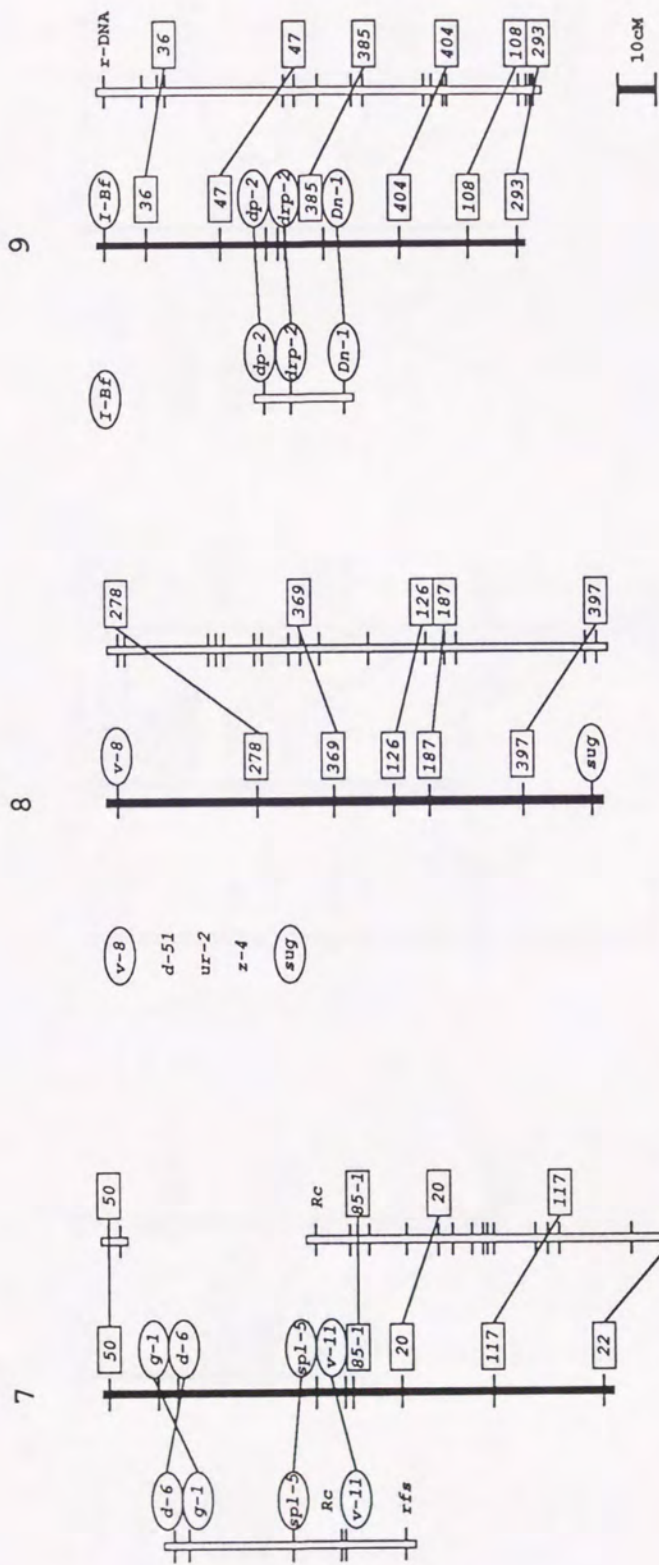


Fig. 2-1-3. Continued

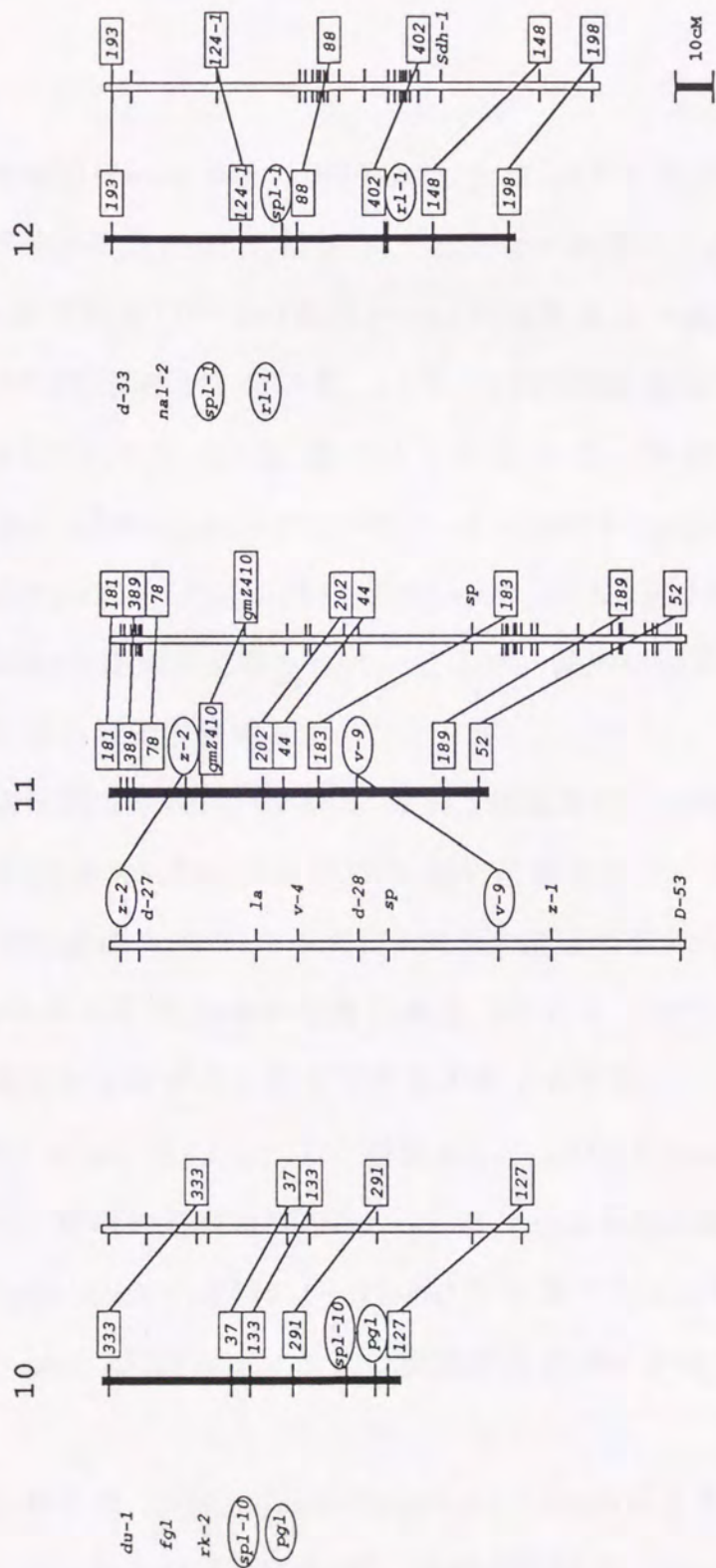


Fig. 2-1-3. Continued

連鎖地図(Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b)を左に, RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)を右に配して三者を比較した. 以下, 染色体ごとに考察を述べる.

(1)染色体1

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1989a)は, *fs-2*(かすり縞-2)–*d-18*(小丈玉錦型矮性)–*Pn*(茎葉節紫色)–*rl-2*(捲葉-2)–*A*(アントシアニン活性化)–*chl-6*(黄緑葉-6)–*d-10*(畸型晩神力)–*lax*(疎穂)–*spl-6*(病斑葉-6)–*eg*(過剰穎)–*v-6*(緑変白苗-6)なる配列を骨格としている. 一方, RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)には51個のRFLPマーカーが位置づけられている. 本研究の結果, *fs-2*–*XNpb216*–*XNpb96*–*d-18*–*XNpb269*–*XNpb359*–*d-2*–*XNpb252*–*rl-2*–*XNpb368*–*XNpb314*–*XNpb147*–*XNpb130-1*–*XNpb174*–*spl-6*–*XNpb97*–*eg*–*XNpb346*なる配列が得られた. そこで, 従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた.

従来の連鎖地図で末端の*fs-2*およびRFLP連鎖地図で末端の*XNpb212*は, それぞれ*XNpb216*から8.7cMおよび17.7cMの位置にあり, また, もう一方の末端では, 従来の連鎖地図の*v-6*およびRFLP連鎖地図の*XNpb346*が, それぞれ*eg*から16.4cMおよび18.5cMの位置にある. このことから, RFLP連鎖地図と従来の連鎖地図とはほぼ同じ長さであると考えられた.

また, Saito *et al.* (1991)は*lax*の座位を*XNpb97*と*XNpb346*との間に推定しているものの, 従来の連鎖地図の*lax*–*spl-6*–*eg*なる配列関係から考えると*lax*の座位は*XNpb147*–*XNpb130-1*–*XNpb174*近傍であると考えられ, 配列に矛盾が生ずる. *lax*とRFLPマーカーとの配列順序についてはなお検討が必要である.

さらに, これまで, Nagao and Takahashi (1963)により染色体4の連鎖群に属するとされていた*d-2*(夷型矮性)が, 本研究の結果, *XNpb359*と*XNpb252*との間に位置づけられた. 本研究で*d-2*を染色体1のRFLPマーカーとの連鎖分析

に供したのは、*d-2*の座乗染色体がトリソミック分析の結果(Table 2-1-3)から染色体4でないと判明したこと、ならびに、*d-2*が染色体1と4とに関する相互転座系統の転座点と連鎖していた(岩田・大村 1971)ことにより、*d-2*が染色体1に座乗すると推定されたためである。*d-2*座のある $XNpb359$ と $XNpb252$ との間は、従来の連鎖地図では*d-18*と*rl-2*とに挟まれた領域である。この領域には*Pn*が位置づけられているので、従来の連鎖地図での*d-2*の座位は、*Pn*の近傍であると推定される。ただ、Nagao and Takahashi (1963)によると、*d-2*と*Pn*とは独立である。これについては今後の検討が必要である。

(2)染色体2

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1989b)における標識遺伝子の配列は、*d-29*(短第1節間型矮性)－*tri*(三角朮)－*bc-3*(鎌不要-3)－*bl-1*(褐斑葉-1)－*chl-10*(黄緑葉-10)－*gh-3*(穎節間黄金色-3)－*d-32*(矮性九大-4)－*d-30*(矮性白笹型)－*gh-2*(穎節間黄金色-2)－*spl-2*(病斑葉-2)である。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)には、RFLPマーカー37個およびアイソザイムマーカー*Lap*が位置づけられ、*d-30*の座位が推定されている。本研究の結果、*tri*－ $XNpb250$ －*bl-1*－ $XNpb57$ － $XNpb42$ － $XNpb45$ － $XNpb132$ － $XNpb227$ － $XNpb223$ － $XNpb349$ －*spl-2*なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

従来の連鎖地図で末端の*d-29*および*tri*は、RFLP連鎖地図で末端の $XNpb250$ よりも外側に座位があり、もう一方の末端では、従来の連鎖地図の*spl-2*がRFLP連鎖地図の $XNpb349$ よりも外側に座位がある。このことから、RFLP連鎖地図は従来の連鎖地図を完全には包含していないと考えられた。

また、Saito *et al.* (1991)は*d-30*の座位を $XNpb132$ と $XNpb227$ との間の領域に推定している。これは従来の連鎖地図と比較して矛盾のない位置であると考えられる。

Table 2-1-3. Disomic segregation for $d-2$ in the F₂ from the cross with trisomics for chromosome 4

Portion of population	Observed number			χ^2 (3:1)
	+	$d-2$	Total	
2x	91	35	126	0.05
2x+1	46	12	58	0.58
Pooled	137	47	184	0.03
2x ¹⁾	167	59	226	0.15

¹⁾ F₂ from a disomic F₁ plant.

(3)染色体3

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)は*chl-1*(黄緑葉-1)–*chl-3*(黄緑葉-3)–*fc-1*(細稈-1)–*v-1*(緑変白苗-1)–*bc-1*(鎌不要-1)–*v-2*(緑変白苗-2)–*dl*(垂れ葉)–*z-3*(ゼブラ斑葉-3)–*spl-3*(病斑葉-3)なる配列を骨格とする。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー49個および*chl-1*が位置づけられている。本研究の結果、*chl-1*–*XNpb164*–*XNpb249*–*fc-1*–*st(t)*(CM120)–*XNpb51*–*XNpb15*–*XNpb182*–*XNpb348*–*dl*–*spl-3*–*XNpb173*なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

*chl-1*は従来の連鎖地図およびRFLP連鎖地図で、ともに末端に位置づけられており、*chl-1*側の末端では、従来の連鎖地図の方がRFLP連鎖地図よりも充実していると考えられた。もう一方の末端では、RFLP連鎖地図の*XNpb173*が従来の連鎖地図の*spl-3*よりも外側に座位があるので、RFLP連鎖地図の方が従来の連鎖地図よりも充実していると考えられた。

本研究で、新たに*fc-1*と*dl*との間に位置づけられた*st(t)*(CM120)は、日本型品種金南風のメチルニトロソウレア(MNU)処理によって誘発された単劣性の縦縞遺伝子である(佐藤ら 未発表)。ただ、従来の連鎖地図では、*fc-1*と*dl*との間に位置する*bc-1*の近傍に、縦縞遺伝子*st-3*の座位が知られている(岩田ら 1979)。今後、*st(t)*(CM120)と*st-3*との同座性検定が必要である。

(4)染色体4

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)における標識遺伝子の配列は、*d-11*(信金愛国型矮性)–*Pr*(穎全面紫色)–*Ph*(フェノール反応)–*lg*(無葉舌)–*Pl*(葉身葉鞘紫色)である。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー33個と*Ph*および*lg*とが位置づけられている。本研究の結果、*XNpb203*–*XNpb237*–*XNpb311*–*XNpb49*–*XNpb72*–*d-11*–*XNpb114*–*XNpb120*–*Ph*

-lgなる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

従来の連鎖地図で末端に位置づけられている*d-11*は、*XNpb49*と*XNpb114*との間に位置づけられた。*XNpb49*と*XNpb114*とはともにRFLP連鎖地図の中央部に座位があるので、*d-11*の座位はRFLP連鎖地図では中央部に当たる位置であると推定された。従って、*d-11*側の末端では、RFLP連鎖地図の方が従来の連鎖地図よりも充実していると考えられた。また、もう一方の末端はRFLP連鎖地図ではlgであるが、従来の連鎖地図ではlgより外側に位置づけられている*Pl*である。よって、RFLP連鎖地図は従来の連鎖地図のlg-*Pl*領域を包含していないと考えられた。

なお、*XNpb49*と*d-11*との間に位置づけられた*XNpb72* (斎藤ら 未発表)は、第1章第1節の結果、染色体4に座乗することの分かった、新たなRFLPマーカーである。

(5)染色体5

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)は、*nl-2*(穂首苞葉-2)-*d-1*(大黒型矮性)-*spl-8*(病斑葉-8)-*v-10*(緑変白苗-10)-*bgl*(鮮緑色葉)-*spl-7*(病斑葉-7)-*nl-1*(穂首苞葉-1)-*al-2*(白苗-2)なる配列を骨格とする。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー26個が位置づけられている。本研究の結果、*XNpb292*-*XNpb139*-*XNpb387*-*d-1*-*st(t)*(CM37)-*XNpb105*-*XNpb81*-*spl-7*-*nl-1*-*XNpb297*なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

従来の連鎖地図で末端の*nl-2*は*d-1*から24.0cMの位置にあるが、RFLP連鎖地図で末端の*XNpb292*は、*d-1*から36.9cMの位置にある*XNpb387*よりも更に離れた位置にある。また、従来の連鎖地図のもう一方の末端では、*al-2*が*nl-1*より1.1cM外側の位置にあるが、RFLP連鎖地図で末端の*XNpb297*は*nl-1*の座

位より11.8cM外側の位置にある。よって、RFLP連鎖地図は従来の連鎖地図を完全に包含していると考えられた。

本研究で、新たに*d-1*と*XNpb105*との間に位置づけられた*st(t)*(CM37)は、日本型品種金南風のメチルニトロソウレア(MNU)処理によって誘発された単劣性の縦縞遺伝子である(佐藤ら 未発表)。染色体5には*d-1*と連鎖する縦縞遺伝子*st-2*が知られている(Nagao and Takahashi 1963)。今後、*st(t)*(CM37)と*st-2*との同座性検定が必要である。

(6)染色体6

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)における標識遺伝子の配列は*wx*(糯性)－*dp-1*(内穎発育不全-1)－*v-3*(緑変白苗-3)－*C*(アントシアニン色原素)－*st-1*(縦縞-1)－*chl-4*(黄緑葉-4)－*Cl*(小穂叢生)である。また、*spl-4*(病斑葉-4)の座位も*wx*と*dp-1*との近傍に知られている。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー29個、アイソザイムマーカー*Est-2*および生理形質アルカリ崩壊性(*alk*)が位置づけられている。本研究の結果、*dp-1*－*spl-4*－*XNpb209*－*XNpb165-1*－*XNpb233*－*XNpb172*－*Cl*－*XNpb386*－*XNpb135*－*XNpb170*なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

従来の連鎖地図で末端の*wx*より内側に位置づけられている*dp-1*ならびに*spl-4*が、ともに、RFLP連鎖地図で末端の*XNpb209*よりも外側に位置づけられたことから、RFLP連鎖地図は、従来の連鎖地図の*wx*－*dp-1*領域を包含していないと考えられた。

また、従来の連鎖地図でもう一方の末端である*Cl*は*XNpb172*と*XNpb386*との間に位置づけられたが、*XNpb172*と*XNpb386*とは、ともに、RFLP連鎖地図の中央部に座位があるので、*Cl*の座位はRFLP連鎖地図では中央部に当たる位置であると推定された。従って、*Cl*側の末端ではRFLP連鎖地図の方が従来

の連鎖地図よりも充実していると考えられた。

なお、従来の連鎖地図で *wx* は *dp-1* より外側の末端に座位を有するが、RFLP連鎖地図で *wx* に比定されたトウモロコシの糯性遺伝子由来の *cmWX* は、*dp-1* より内側の *XNpb209* よりもさらに内側に座位がある。よって、*cmWX* が *wx* に比定されるとすれば、配列関係に矛盾が生ずる。今後、*wx* と *XNpb209* および *XNpb165-1* との配列関係を求めること、ならびに、*wx* と *cmWX* との関係を解明すること、あるいは、*dp-1-spl-4-XNpb209-XNpb165-1* なる配列関係を再検討することが必要である。

(7) 染色体7

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)における標識遺伝子の配列は、*d-6*(短稈白笹型矮性)–*g-1*(長護穎-1)–*spl-5*(病斑葉-5)–*Rc*(種皮褐色)–*v-11*(緑変白苗-11)–*rfs*(霜降り捲葉)である。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)には、RFLPマーカー17個と *Rc* とが位置づけられている。本研究の結果、*XNpb50-g-1-d-6-spl-5-v-11-XNpb85-1-XNpb20-XNpb117-XNpb22* なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

XNpb50 (斎藤ら 未発表)は第1章第1節の結果、染色体7に座乗することの分かった新たなRFLPマーカーであり、*XNpb178* と組換え価3.2%で連鎖して小さな連鎖群を形成する(斎藤ら 未発表)。本研究の結果、*XNpb50-XNpb178* なる連鎖群と Saito *et al.* (1991)の染色体7のRFLP連鎖群とは *g-1-d-6-spl-5-v-11* を介して連結することが明らかになった。よって、RFLP連鎖地図は従来の連鎖地図を完全には包含しておらず、末端に位置づけられている *Rc* より *XNpb50* までの約50cMは伸長する可能性がある。

また、従来の連鎖地図でもう一方の末端の *rfs* は *spl-5* より30.8cMの位置にある。本研究の結果では、*spl-5* より30.8cMの位置は *XNpb20* と *XNpb117* との間

の領域である。XNpb20とXNpb117とは、ともに、RFLP連鎖地図の中央部に座位があるので、*rfs*の座位もRFLP連鎖地図の中央部に相当する領域にあると推定される。よって、*rfs*側の末端ではRFLP連鎖地図の方が従来の連鎖地図よりも充実していると考えられた。ただ、現在、*rfs*より外側の領域にも、*ge*(巨大胚)(佐藤・岩田 1990)や*esp-1*(胚乳貯蔵蛋白質-1)(佐藤 1990)の座位が推定されているので、今後、従来の連鎖地図も伸長することが期待される。なお、本研究の結果では*d-6*と*g-1*との配列順序が従来の連鎖地図と異なったが、これについてはなお検討が必要である。

(8)染色体8

Iwata *et al.* (1984)によると、染色体8には、配列こそ決定されていないものの、トリソミック分析によって、*d-51*(矮性九大-8)、*sug*(甘味胚乳)、*ur-2*(枝梗彎曲-2)、*v-8*(緑変白苗-8)および*z-4*(ゼブラ斑葉-4)なる5個の標識遺伝子の座乗することが明らかにされている。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー16個が位置づけられている。本研究の結果では*v-8*—XNpb278—XNpb369—XNpb126—XNpb187—XNpb397—*sug*なる配列が得られた。*v-8*および*sug*の座位がそれぞれRFLP連鎖地図で末端に位置づけられているXNpb278およびXNpb397よりも外側に位置づけられたことから、RFLP連鎖地図はまだ飽和していないと考えられた。

(9)染色体9

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)における標識遺伝子の配列は、*dp-2*(内穎發育不全-2)—*drp-2*(濡れ葉-2)—*Dn-1*(密穂-1)である。また、これとは独立に、*I-Bf*(穎縦筋褐色抑制)も染色体9に座乗することが明らかにされている(Iwata *et al.* 1984)。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)には、リボゾームDNA(rDNA)マーカー1個を含む21個のRFLPマーカーが位置づけられている。

本研究の結果、*I-Bf-XNpb36-XNpb47-dp-2-drp-2-XNpb385-Dn-1-XNpb404-XNpb108-XNpb293*なる配列が得られた。そこで、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた。

*I-Bf*と*XNpb36*との間の距離は11.1cMであり、一方、RFLP連鎖地図で末端の*rDNA*と*XNpb36*との間の距離は15.0cMであるので、*I-Bf*の座位は*rDNA*の座位の近傍であると推定された。また、*dp-2-drp-2-Dn-1*の連鎖群は*XNpb47*と*XNpb404*との間に位置づけられた。*XNpb47*と*XNpb404*とはRFLP連鎖地図のほぼ中央部に位置するので、*dp-2-drp-2-Dn-1*の連鎖群もRFLP連鎖地図のほぼ中央部に位置すると推定された。さらに、従来の連鎖地図については、*I-Bf*と*dp-2-drp-2-Dn-1*なる連鎖群との位置関係が、*XNpb36*と*XNpb47*とを介することにより、*I-Bf-dp-2-drp-2-Dn-1*であることが明らかとなった。

(10)染色体10

Iwata *et al.* (1984)によると、染色体10には、配列こそ決定されていないものの、トリソミック分析によって、*du-1*(曇り胚乳-1)、*fgl*(退色葉)、*pgl*(淡緑葉)、*Rf-1*(花粉稔性回復-1)および*rk-2*(扁平粒-2)なる5個の標識遺伝子の座乗することが明らかにされている。これらの標識遺伝子のうち、*fgl*、*pgl*および*Rf-1*については、Shinjo (1975)が*pgl-Rf-1-fgl*なる配列を決定している。本研究ではこのうち*pgl*を用いた。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカー9個が位置づけられている。本研究の結果では*XNpb333-XNpb37-XNpb133-XNpb291-spl-10-pgl-XNpb127*なる配列が得られた。*pgl*とともに*XNpb291*と*XNpb127*との間に位置づけられた*spl-10*は日本型品種金南風のメチルニトロソウレア(MNU)処理によって誘発された単劣性の病斑葉遺伝子(Ideta *et al.* 1993)である。

(11)染色体11

従来の連鎖地図(Iwata *et al.* 1984)の標識遺伝子の配列は, *z-2*(ゼブラ斑葉-2) - *d-27*(分蘖稲) - *la*(もつれ) - *v-4*(緑変白苗-4) - *d-28*(長茎大黒) - *sp*(短穂) - *v-9*(緑変白苗-9) - *z-1*(ゼブラ斑葉-1) - *D-53*(矮性九大-3)である. 一方, RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)には, RFLPマーカー29個および*sp*が位置づけられている. 本研究の結果, *XNpb181* - *XNpb389* - *XNpb78* - *z-2* - *gmZ410* - *XNpb202* - *XNpb44* - *XNpb183* - *v-9* - *XNpb189* - *XNpb52*なる配列が得られた. そこで, 従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との比較を以下のように試みた.

従来の連鎖地図で末端の*z-2*は*XNpb78*と*gmZ410*との間に位置づけられたので, *z-2*の座位は, RFLP連鎖地図の末端である*XNpb181*より内側にあると推定された. 従って, *z-2*側の末端では, RFLP連鎖地図の方が従来の連鎖地図よりも充実していると考えられた.

また, 従来の連鎖地図のもう一方の末端である*D-53*は, *v-9*より32.6cM外側の位置にあり, 一方, RFLP連鎖地図で末端の*XNpb344*より1.5cM内側にある*XNpb52*は, *v-9*より35.7cM外側の位置にある. よって, *D-53*側の末端では, RFLP連鎖地図と従来の連鎖地図とがほぼ同じ長さであると考えられた.

なお, RFLP連鎖地図の*XNpb44*と*XNpb183*の間には*sp*が位置づけられているが, *XNpb44*と*XNpb183*とはどちらも*z-2*と*v-9*との間に位置し, *sp*も*z-2*と*v-9*との間に位置するので, RFLP連鎖地図上の*sp*の座位は従来の連鎖地図と比べて矛盾のない位置であると考えられた.

(12)染色体12

Iwata *et al.* (1984)によると, 染色体12には, 配列こそ決定されていないものの, トリソミック分析によって, *d-33*(盆栽稲), *nal-2*(細葉-2), *rl-1*(捲葉-1)および*spl-1*(病斑葉-1)なる4個の標識遺伝子の座乗することが明らかにされている. ただ, Ishikawa *et al.* (1992)によれば*d-33*と*rl-1*とは複対立遺伝子であ

る。また、*du-4*(曇り胚乳-4)も染色体12に座乗することが見出されている(Yano *et al.* 1988)。一方、RFLP連鎖地図(Saito *et al.* 1991)にはRFLPマーカ-23個とアイソザイムマーカ-*Sdh-1*が位置づけられている。本研究の結果では*XNpb193-XNpb124-1-spl-1-XNpb88-XNpb402-rl-1-XNpb148-XNpb198*なる配列が得られた。*spl-1*は*XNpb124-1*と*XNpb88*との間に、*rl-1*は*XNpb402*と*XNpb148*との間に位置づけられたが、*XNpb124-1*、*XNpb88*、*XNpb402*および*XNpb148*はいずれもRFLP連鎖地図の中央部に座位を有するので、*spl-1*および*rl-1*もRFLP連鎖地図の中央部に相当する領域に座位を有すると推定された。

第2節 インド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑後代に観察された遺伝子の分離の歪みについて

イネの日印交雑の後代では、遺伝子の分離に歪みの見られることのあることが、古くから知られている。Nakagahra (1972)やNakagahra *et al.* (1974)は、染色体3および染色体6に座乗する若干の標識遺伝子に見られる分離の歪みが、配偶体遺伝子との連鎖によるものであることを明らかにしたが、その他にも、日印交雑の後代で、歪みの見られる標識遺伝子はいくつか知られている。本研究では、インド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑F₂を用いて、標識遺伝子とRFLPマーカ-との分離を調査したが、その際、いくつかの標識遺伝子とRFLPマーカ-との分離に歪みが見られた。そこで、本節ではインド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑後代に観察された遺伝子の分離の歪みについて、考察を試みることにした。

材料および方法

材料にはインド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑F₂集団を用いた。交雑組合せならびに標識遺伝子は一括して Table 2-2-1 に示した。これを常法に従って栽培し、適宜、標識遺伝子の分離を調査した。また、本章第1節でRFLPマーカ―を連鎖分析に用いたF₂集団においては、標識遺伝子とともにRFLPマーカ―の分離も調査した。RFLPマーカ―およびサザンハイブリダイゼーションについては、本章第1節に述べた。

結果および考察

各標識遺伝子ならびに各RFLPマーカ―の分離の状況を、染色体ごとにまとめて、Appendix 5に示した。RFLPマーカ―の多くは共優性を示し、ヘテロの遺伝子型を区別できるので、インド型と日本型との対立遺伝子の頻度をそれぞれ算出することも可能であるが、本研究では、劣性の標識遺伝子に準じて、日本型ホモの遺伝子型の頻度を調査した。日本型ホモの遺伝子型の頻度と各遺伝子座の座位との関係をグラフに表したのが Fig. 2-2-1である。なお、このグラフでは、日本型の対立遺伝子の方が優性である遺伝子座、ならびに、RFLP分析に供しなかったF₂集団に分離した標識遺伝子については、記載を省いた。

Appendix 5および Fig. 2-2-1に示したように、染色体1、染色体2、染色体3、染色体11および染色体12で、比較的広い領域にわたって、日本型ホモの遺伝子型が5%水準で有意に減少していた。

染色体1では $fs-2-XNpb216-XNpb96-d-18-XNpb269-XNpb359-d-2$ の領域で日本型ホモの遺伝子型が有意に減少していた。これは中川原(1970)が $d-18$ に観察したのと同じ領域での分離の歪みと考えられる。なお、中川原

Table 2-2-1. F₂ populations of which frequencies of Japonica/Japonica alleles were observed

Cross combination	Markers assayed
IR24 / FL293	<i>d-18</i> , <i>fs-2</i> , RFLPs
IR24 / 88F126	<i>eg</i> , <i>spl-6</i> , <i>rl-2</i> , RFLPs
IR24 / FL150	<i>d-2</i> , RFLPs
IR24 / FL163	<i>d-10</i> , <i>lax</i>
IR24 / FL274	<i>bl-1</i> , <i>tri</i> , RFLPs
IR24 / FL235	<i>spl-2</i> , RFLPs
FL303 / IR24	<i>chl-1</i> , <i>fc-1</i> , <i>spl-3</i> , <i>I-Bf</i> , RFLPs
IR24 / FL151	<i>lg</i> , <i>d-11</i> , <i>Ph</i> , RFLPs
IR24 / FL244	<i>lg</i> , <i>nal-1</i>
IR24 / 89F92	<i>spl-7</i> , <i>nl-1</i> , <i>st</i> (t) (CM37) , RFLPs
IR24 / 89F920	<i>d-1</i> , RFLPs
IR24 / 89F928	<i>v-10</i> , <i>spl-7</i>
IR24 / FL314	<i>dp-1</i> , <i>spl-4</i> , RFLPs
IR24 / 90F1023	<i>dp-1</i> , <i>Cl</i> , <i>dl</i> , <i>st</i> (t) (CM120) , RFLPs
IR24 / FL317	<i>v-3</i>
IR24 / 90F93	<i>v-11</i> , <i>d-6</i> , <i>g-1</i> , <i>spl-5</i> , RFLPs
IR24 / 90F1211	<i>v-8</i> , <i>sug</i> , RFLPs
IR24 / FL260	<i>Dn-1</i> , <i>drp-2</i> , <i>dp-2</i> , RFLPs
IR24 / 89F921	<i>pg 1</i> , <i>spl-10</i> , RFLPs
IR24 / 90F1036	<i>z-2</i> , <i>v-9</i> , RFLPs
IR24 / FL323	<i>la</i> , <i>v-4</i> , <i>sp</i>
IR24 / 89F919	<i>spl-1</i> , RFLPs
89F424 / IR24	<i>rl-1</i> , RFLPs

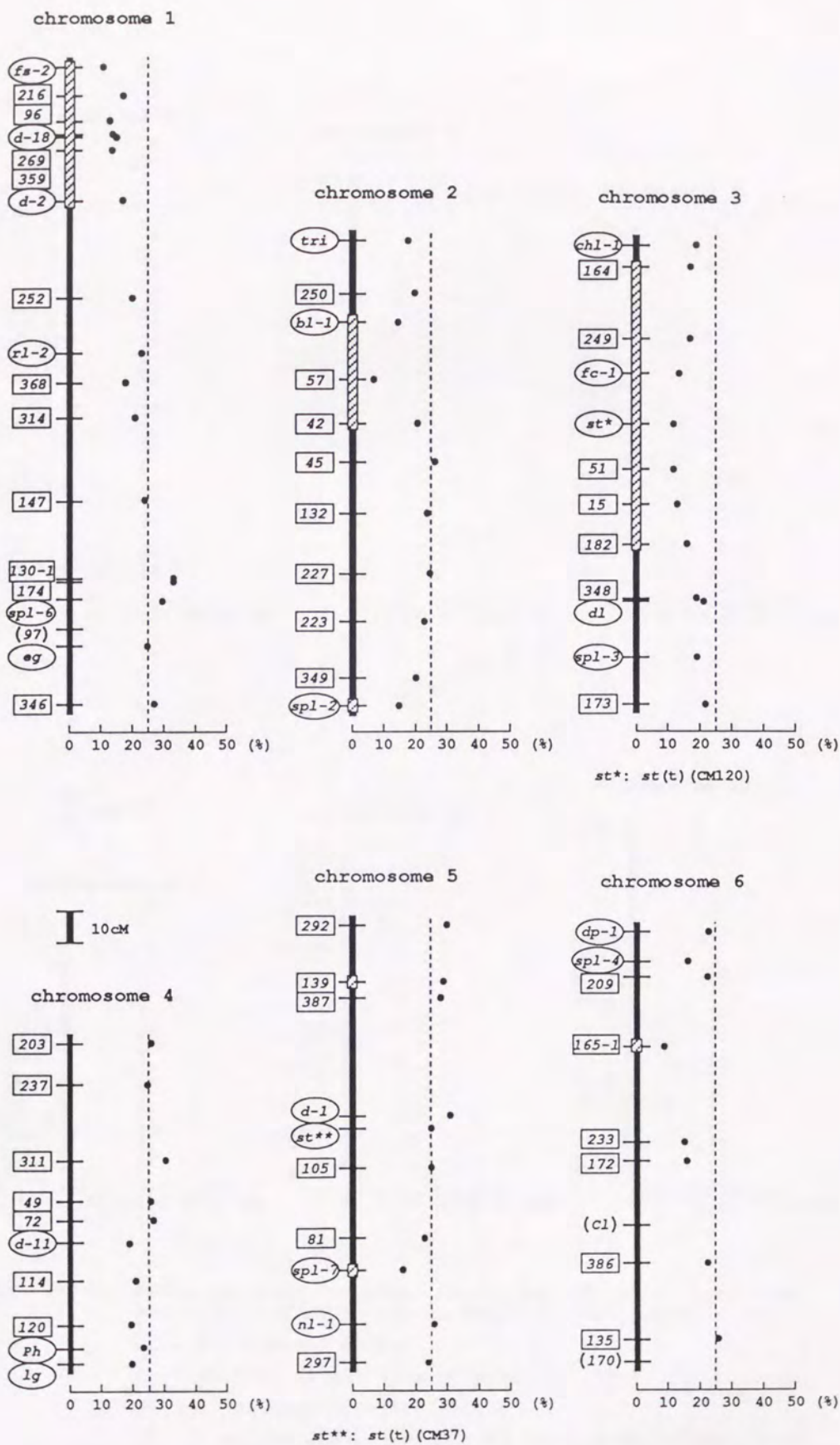


Fig. 2-2-1.

(continued on page following)

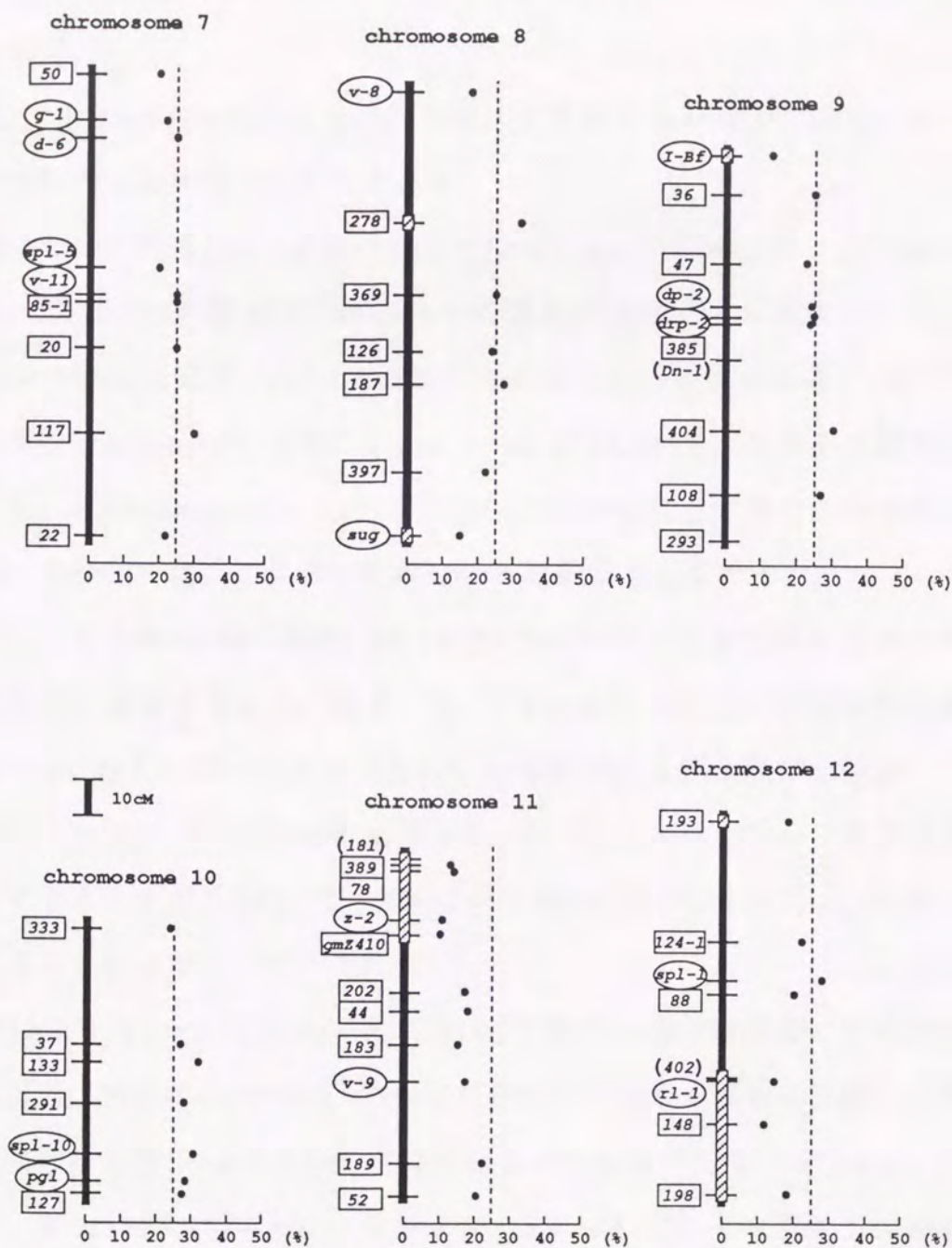


Fig. 2-2-1. Relationships between classical or RFLP loci and segregation frequencies of Japonica/Japonica alleles.

- : a classical marker
- : an RFLP marker without prefix of *XNpb*
- () : a dominant Japonica allele
- ▨ : a region where segregation distortion was detected (significant at 5% level)

(1981)は*d-10*および*lax*に増加分離型の歪みを観察しているが、本研究ではこれらの分離に異常は見出されなかった。これは交雑組合せによる相違であると考えられる。

染色体2で*bl-1-XNpb57-XNpb42*の領域に見出された減少分離型の歪みはこれまでに報告のない新たなものである。

染色体3では*XNpb164-XNpb249-fc-1-st(t)(CM120)-XNpb51-XNpb15-XNpb182*の領域で日本型ホモの遺伝子型が有意に減少していた。これは従来の連鎖地図では*chl-1*と*dl*との間に相当する領域である。*chl-1*と*dl*との間に座位のある*bc-1*にはNakagahra *et al.* (1972)が分離の歪みを観察している。なお、Nakagahra *et al.* (1972)は*chl-1*および*dl*にも分離の歪みを観察しているが、本研究では、これらに分離の歪みは観察されなかった。

染色体11では*XNpb389-XNpb78-z-2-gmZ410*の領域で日本型ホモの遺伝子型が有意に減少していた。また、*la*、*v-4*および*sp*についても減少分離が見られた。*la*と*sp*とについては中川原(1970)も減少分離型の歪みを観察している。ただし、本章第1節の結果(Fig. 2-1-3)で、*la*、*v-4*および*sp*に相当する領域であると考えられた*XNpb202-XNpb44-XNpb183*の領域では、分離の歪みは検出されなかった。

染色体12では*rl-1-XNpb148-XNpb198*の領域に減少分離型の歪みが見られた。中川原(1978)は*rl-1*に加えて*spl-1*でも減少分離型の歪みを観察しているが、本研究の結果では*spl-1*の分離が減少しているとはいえなかった。

その他、染色体6では*XNpb165-1*および*v-3*に日本型ホモの遺伝子型が有意に減少する歪みが見られた。同染色体においては岩田ら(1964)が*wx*と*C*とに分離の歪みを見出しているが、これらの歪みの関係については、更に検討が必要である。

なお、以上に述べたもののほかにも分離に歪みの見られる遺伝子座がいくつか散見された。染色体2の*spl-2*、染色体5の*spl-7*、染色体8の*sug*および染色

体9の*I-Bf*は分離が有意に減少していたが、これはF₂個体における表現型の見間違い、あるいは、これらの遺伝子に関して劣性ホモである個体の枯死による可能性がある。また、染色体5の*XNpb139*、染色体8の*XNpb278*および染色体12の*XNpb193*でも分離に歪みが検出されたが、これについても今後の検討が必要である。

本研究の結果をみると、日印交雑後代での分離の歪みが新たに見出された遺伝子座がある一方、これまで日印交雑によって分離が歪むことが知られていて、今回、異常分離の見られなかった遺伝子座も存在する。中川原(1970)は、染色体8, 10および12を除いた9本の染色体にわたる24個の標識遺伝子について、複数のインド型イネとの交雑を行ない、その後代における分離を調査した。これによれば、同じ標識遺伝子でも、交雑に用いたインド型イネの系統によって、分離の歪む場合と歪まない場合とのあることが観察されている。本研究では、インド型イネとの交雑はIR24を片親にしたものに限られるので、今回、分離が正常であった遺伝子座についても、交雑に用いるインド型イネによっては、後代で新たに分離に歪みの生ずる可能性がある。

本研究で分離比の歪みが検出されたいくつかの領域では、ほとんどの場合、日本型の対立遺伝子のホモ型が有意に減少していた。また、歪みの検出されなかった遺伝子座についても、多くは日本型の対立遺伝子のホモ型の減少する傾向が見られた。岡(1955)も日印交雑後代においてはインド型の遺伝子の頻度の増加する傾向がかなり一般的に存在する可能性に言及しており、これは日印交雑後代に広く見られる現象と考えられた。ただ、本研究では染色体8の*XNpb278*は日本型の対立遺伝子のホモ型が有意に増加しており、その他にも、有意ではないものの、同様の傾向のある遺伝子座が散見された。中川原(1970, 1981)もいくつかの標識遺伝子について、日印交雑の後代で、分離が有意に増加することを観察している。従って、日印交雑後代でも遺伝子座によっては日本型の遺伝子の頻度が増加することがあるものと考えられる。

ただ、以上に述べてきた本節の結果は、ほとんどが個体数100あるいは200前後の小さな分離集団から得られたものである。十分な大きさの分離集団を用いれば、本研究では分離の有意な増減が検出されなかった遺伝子座についても、明確な結果が得られるものと期待される。

第3章 総合考察

イネの連鎖分析は古くから行なわれ、これまでに、12の染色体各々に対応する連鎖群または標識遺伝子群を明らかにした従来の連鎖地図 (Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b) が作成され、一方、DNA多型をマーカーとしたRFLP連鎖地図 (McCouch *et al.* 1988, Saito *et al.* 1991, Causse *et al.* 1994, Kurata *et al.* 1994) も作成されている。現在、これらはそれぞれ独立に存在しているが、今後、従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図とが統合され、形態マーカーとDNAマーカーとの位置関係が同一の連鎖地図上に明らかになれば、従来の連鎖地図だけ、あるいは、RFLP連鎖地図だけでは十分にできなかった、有用形質の遺伝分析や有用遺伝子の単離などへの足掛かりが得られると期待される。

そこで、本研究では従来の連鎖地図 (Iwata *et al.* 1984, 1989a, 1989b) とRFLP連鎖地図 (Saito *et al.* 1991) との統合を試みた。本章ではこの結果に基づき、イネの連鎖地図について若干の考察を試みた。

(1) RFLP分析を行なうための遠縁交雑について

イネにおいてRFLPを利用した遺伝分析を行なう場合、効率よくこれを行なおうとすれば、遠縁交雑によらねばならない。日本型イネとインド型イネとの交雑もその一つである。日印交雑を行なった場合には交雑の組合せによってF₁に様々な程度の不稔が現れることが知られている。Saito *et al.* (1991) はRFLP連鎖地図の作成にインド型品種Kasalathと日本型標識遺伝子系統FL134との交雑後代を用いたが、この両系統間の雑種のF₁では87.5%の稔性を得ている。本研究では、インド型品種IR24と日本型標識遺伝子系統との交雑F₁における種子稔性を個別に調査することはしなかったが、IR24と日本型品種日本晴との交雑F₁での稔性は約60%であり、IR24と標識遺伝子系統との交雑F₁

でもほぼ同様の稔性が得られた。これはその後代を得て遺伝分析を行なうのに十分な稔性であると考えられた。また, Saito *et al.* (1991)のRFLPクローンを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった際, IR24と日本型イネとの間に多型の見られないものが散見され, その割合は調査した172クローン中25クローン, 約15%であった。遺伝分析に供するための交雑の組合せが異なれば, RFLP連鎖地図に位置づけられているマーカーといえども, そのすべてを利用できるわけでないことには注意すべきである。

(2) RFLP連鎖地図の充実度について

日本型標識遺伝子系統FL134とインド型品種Kasalathとの交雑F₂を用いて作成された Saito *et al.* (1991) のRFLP連鎖地図は, 347の遺伝子座を有し, 全長は1836cMで, 従来の連鎖地図よりもかなり充実していると考えられる。ところが, 本研究で, RFLP連鎖地図と従来の連鎖地図との対応関係を明らかにして両者を比較をすると, 染色体2, 4, 6, 7および8においては, RFLP連鎖地図上に従来の連鎖地図上の標識遺伝子の座位がすべて包含されるとはいえなかった。特に, 染色体7では, 従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図とで, 互いに重なり合う部分がそれぞれの地図の全長の半分以下であると推定された。

さらに, 近年, Kurata *et al.* (1994) は日本型品種日本晴とインド型品種Kasalathとの交雑F₂を用いて遺伝子座数が Saito *et al.* (1991) の約4倍の RFLP連鎖地図を作成した。これにはSaito *et al.* (1991)のRFLPマーカーがいくつか位置づけられているので, これを指標に, Kurata *et al.* (1994) の RFLP連鎖地図と従来の連鎖地図とを, 本研究の結果を介して比較すると, 染色体7ではRFLP連鎖地図が Saito *et al.* (1991) よりも約50cM伸長し, 従来の連鎖地図をほぼ包含できるようになったと推定されたが, 染色体2, 4, 6および8ではさほどの伸長は見られず, なお, RFLP連鎖地図は従来の連鎖地図を完全には包

含していないと推察された。

従来の連鎖地図よりも多数のマーカーが位置づけられているRFLP連鎖地図に、標識遺伝子の座位を包含していないと推定される領域が存在する理由は不明であるが、このような領域については、その領域に由来するDNAクローンでRFLPを得ることが困難であったために、RFLP連鎖地図が作成されていない可能性がある。

RFLPマーカーの給源であるDNAライブラリーの中には、RFLPが検出されなかったために、RFLP連鎖地図作成に用いられなかったDNAクローンが多数存在する。Yano *et al.* (1990)は *Pst* I ゲノミックライブラリーから選抜したクローンについて、日本型標識遺伝子系統FL134およびインド型品種KasalathのDNAと4種類の制限酵素とを用いてRFLPの調査を行ない、オートラジオグラム上にバンドの現れた472クローンの内、210クローンがRFLPを示さなかったと報告した。また、Kurata *et al.* (1994)は cDNAクローンについて、日本型品種日本晴およびインド型品種KasalathのDNAと8種類の制限酵素との組合せでRFLPの調査を行ない、シングルコピーであった670クローンの中に、RFLPを示さなかったクローンが210あったと報告している。

RFLPを示さないこれらのクローンの中には、新たな交雑組合せを用いることによって多型が見出され、RFLP連鎖地図が作成されていない領域に位置づけられるものも含まれている可能性がある。今後、RFLP連鎖地図を充実させるためには、いろいろな品種間の交雑、ならびに、野生稻も含めた種間交雑を利用した連鎖分析も有効であると思われる。

(3) *d-2*の座位について

*d-2*座は、Nagao and Takahashi (1963)により、*Ph*, *lg*および*Pl*とともに染色体4に対応する連鎖群に属するとされてきたが、本研究では染色体1に位置づ

けられた。d-2がこれまで染色体4の連鎖群に属するとされてきた理由については、以下のことが考えられる。

Nagao and Takahashi (1963)によれば、d-2-lg間およびd-2-Ph間の組換え価はいずれも50%内外であり、これらは互いに独立であると考えられるものの、d-2-Pl間には組換え価 $38.1 \pm 2.8\%$ で緩い連鎖が認められている。長尾・高橋(1952)の記述から、この交配組合せは $AAPlld-2d-2 / A^+A^+Pl^+Pl^+d-2^+d-2^+$ であると考えられるので、d-2-Pl間の組換え価と称されてきたものは、染色体1に座乗するAとd-2との間の組換え価であった可能性がある。この場合、d-2と染色体1に座乗するA、rl-2、Pn、d-18およびfs-2とについて、以下のような考察が可能である。まず、A-d-2間の組換え価が38.1%、A-Pn間の組換え価が29.9% (Nagao and Takahashi 1963)であるから、これらの配列はA-Pn-d-2であり、組換え価の差からPn-d-2間の組換え価は10%前後であると推察される。また、Iwata *et al.* (1989a) によると A-rl-2-Pn-d-18-fs-2 なる配列が明らかで、Pn-d-18間の組換え価は15.8%である。よって、d-2はPnとd-18との間に位置すると推定され、A-rl-2-Pn-d-2-d-18-fs-2なる配列が考えられる。本研究の結果でも、d-2はRFLPマーカーとの連鎖分析によって、rl-2とd-18との間に位置づけられた(Fig. 2-1-2)。d-2-Pl間の組換え価と称されてきたものがd-2-A間の組換え価であった可能性は高い。

(4) イネの連鎖地図上における動原体の位置について

イネにおいては、動原体の位置がまだ連鎖地図上で明らかにされていないが、本研究では、染色体8に関する二次トリソミックス様植物や染色体11に関する4型のトリソミックスのRFLP分析の結果に基づき、以下のように考察を試みた。

染色体8については、本研究で分析を行なった二次トリソミックス様植物が

真に二次トリソミックスであるならば、動原体の位置はRFLP連鎖地図上の *XNpb369* と *XNpb398* との間である (Fig. 1-2-1). 野々村ら(未発表)も三次トリソミックスを使った分析で *XNpb369* と *XNpb398* とを含む領域に動原体の位置を推定している.

染色体11については4型のトリソミックスのRFLP分析の結果、2型はテロトリソミックス、1型は二次トリソミックスである可能性があるので、動原体はRFLP連鎖地図上の *gmZ410* - *XNpb202* - *XNpb44* の領域にあると考えられる (Fig. 1-2-2). ところで、本研究の結果から推測すると、この領域は従来の連鎖地図の *la-v-4* の領域に相当する (Fig. 2-1-3). *la-v-4* 間の組換え価は日日交雑では11.6% (Omura *et al.* 1978) であるが、本研究で用いた日印交雑では0.5%であり(出田ら 未発表), 組換え価が日日交雑よりも日印交雑で減少した可能性が考えられた. Rick (1972) は栽培トマト *Lycopersicon esculentum* と野生トマト *Solanum pennellii* との交雑後代で得られた組換え価を、栽培トマト間での交雑による組換え価と比較し、動原体付近に位置する標識遺伝子間の組換え価が遠縁交雑によってかなり減少することを報告している. 本研究で得られた *la-v-4* 間の組換え価が日日交雑で得られた組換え価よりも減少していたものであったとすれば、これは *la* と *v-4* とが動原体の近くに座乗することによる可能性がある.

(5) 統合連鎖地図の利用

本研究により、イネの従来の連鎖地図とRFLP連鎖地図との対応関係が明らかになり、従来の連鎖地図上の遺伝子座とRFLPマーカーとの関係が効率よく推定できるようになった. 分子マーカーと連鎖する遺伝子の単離については既に方法論が確立し (Wicking and Williamson 1991), イネにおいても白葉枯病抵抗性遺伝子 (Yoshimura *et al.* 1995) などいくつかの遺伝子について分子マ

ーカーとの連鎖を利用した単離が試みられている。ただ、RFLP連鎖地図には従来の連鎖地図上の遺伝子座を包含していない領域やマーカー間の距離の大きい部分が見られる。今後、このような領域にもDNAマーカーを位置づけることが必要である。RFLP連鎖地図を充実させるために、Kurata *et al.* (1994) は多数のRAPDマーカーを供している。また、新たなDNAマーカーとして、Wu and Tanksley (1993) は microsatelliteマーカーの利用を試みた。さらに、Kawase (1994) はイネの品種の分類に RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning)なる分子マーカーを用いたが、ハツカネズミにおいては、RLGSを利用した連鎖地図がすでに作成されている (Hayashizaki *et al.* 1994) ので、イネの連鎖地図作成にRLGSを応用することも可能であると思われる。今後、このような分子マーカーを利用した連鎖地図の充実化が望まれる。