

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	RANA MD. Masud	
学位	博士 (農学)	
学位記番号	新大院博 (農) 第 196 号	
学位授与の日付	令和元年 9 月 20 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
博士論文名	Rapid breeding, genome-wide characterization and morpho-physiological evaluation of a salt tolerant rice (耐塩性イネの迅速育種、ゲノムワイドな特徴付けおよび形態生理学的評価に関する研究)	
論文審査委員	主査	教授・三ツ井 敏明
	副査	教授・伊藤 紀美子
	副査	教授・末吉 邦
	副査	教授・原田 直樹
	副査	助教・金古 堅太郎

博士論文の要旨

土壌塩分は将来の食料生産にとって大きな脅威であり、全陸地面積の 6%以上に影響を及ぼしている。塩はイネの代謝、成長に影響し、世界における米生産性を制限する。本研究では、既知の耐塩性遺伝子 *hst1* (*OsRR22*) をイネ品種「海神」(耐塩性)から高収量品種「ゆきん子舞」(塩感受性)に導入し、耐塩性を有する新しいイネ遺伝資源が開発された。方法論的には、標的遺伝子の導入と世代サイクルの短縮のため、SNP マーカーを利用した選別と迅速育種を組み合わせた方法が用いられた。3 回の戻し交配の後、標的遺伝子についてホモ接合体を選別し、全 DNA 配列、そして SNP の遺伝子型を決定して、反復親とのゲノム類似性が調べられた。新たに開発されたイネ系統の耐塩性は、環境制御条件下で植物成長期および出穂期の一連の形態生理学的パラメータを調べることによって評価された。

世代サイクルを加速するために、バイオトロン迅速育種システムを使用した。栄養成長を促進するために、最初の 30 日間、長日条件 (14/10 時間の明/暗) を用い、続いて短日条件 (10/14 時間の明/暗) に移し、生殖誘導、分けつ除去、そして種子成熟期間短縮のための胚救済を行った。これらの手法を用いることにより、6 世代 17 ヶ月で目的の対立遺伝子のホモ接合体を保有する BC₃F₃ 集団 (YNU31-2-4) を作出することができた。

本育種系統を特徴付けるために全ゲノムシーケンシング (WGS) を行い、そしてゲノム回収率および推定表現型を明らかにした。WGS による高解像度ジェノタイピングは、BC₃F₂ ゲノムが WT と 93.5%の類似性を有し、ドナー親対立遺伝子の 2.7%のみを含むことを明らかにした。118,454 SNP/インデルのうち農業形質に関わる遺伝子は 4 つのみであった。出穂関連遺伝子である Os09g0356200 における非同義的な変化は機能損失を引き起こすフレームシフト欠失であった。

通常の条件下での圃場評価の結果から、「YNU31-2-4」系統と「ゆきん子舞」WT の出穂期の違いが見いだされた。「YNU31-2-4」系統の他の形態学的特徴は WT のそれと類似していた。さらに、BC₃F₃ (YNU31-2-4) 集団の出穂期は、出穂関連遺伝子 Os09g0356200 の遺伝子型と関連付けられた。高解像度ジェノタイピングデータと圃場調査の結果は、*hst1* 遺伝子の存在による「YNU31-2-4」における明らかな収量減は起こらないことを示している。実際、「YNU31-2-4」系統では、1 植物あたりの穂数と千粒重の増加のため、ドナー親

である「海神」より収量が約 11%上昇した。

本遺伝子導入系統における *hst1* の実用的有用性を評価するために、イネ幼植物体を 75 mM および 125 mM の塩ストレス処理を行った。その結果、125 mM 塩ストレスの下で、「YNU31-2-4」植物体は「ゆきん子舞」WT よりも高い植物成長、水分状態、クロロフィル、プロリン含有量を維持し、有意に高い生存率、幼芽および根のバイオマスを有することが明らかになった。生殖成長期に塩ストレスを受けた「YNU31-2-4」系統の最終収量は「ゆきん子舞」WT より 45%高かった。

塩存在下で処理したイネ幼芽と根の Na⁺と K⁺含有量を測定した。定量および局在性の結果は、「海神」と同様に、「YNU31-2-4」植物は塩ストレス下で幼芽および根の両方において非常に低い Na⁺/K⁺比を維持したことを示している。*hst1* ドナー親と同様に、「YNU31-2-4」葉におけるより軽いストレス症状は、組織中の高い K⁺含有量および低い Na⁺含有量と相関した。幼芽における高親和性 K⁺トランスポーター (*OsHKT1; 1*) 転写物の相対的発現レベルを解析した。その結果、*OsHKT1; 1*が「海神」および「YNU31-2-4」の幼芽組織において有意に上方制御されていることが明らかになった。したがって、「YNU31-2-4」の耐塩性は、組織内の Na⁺/K⁺恒常性の維持における *OsHKT1; 1* の機能と関連すると考えられる。

審査結果の要旨

本学位論文では、SNP マーカーを利用した選別と改良型バイオトロン育種システムがイネの単一形質を改善するための迅速で効果的な方法であることが証明された。*hst1* の遺伝子導入は、栄養成長期および生殖成長期における塩ストレスに適応し、収量性が改善された「YNU31-2-4」系統の作出をもたらした。「YNU31-2-4」系統における耐塩性は、*hst1* ドナー親「海神」と同様に、高い葉水分、クロロフィル、プロリン含量、光合成能、および組織内の Na⁺/K⁺恒常性の維持における *OsHKT1; 1* の発現と相関した。改良された耐塩性系統「YNU31-2-4」は実用的な育種価値を有し、そして重要な遺伝資源として利用されると期待される。「YNU31-2-4」系統は、耐塩性が著しく改善された新しいイネ品種の潜在的候補であり、気候変動下における穀物収量の維持に貢献するものと思われる。

本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として以下の論文に掲載済みである。

- (1) Md Masud Rana, Takeshi Takamatsu, Marouane Baslam, Kentaro Kaneko, Kimiko Itoh, Naoki Harada, Toshie Sugiyama, Takayuki Ohnishi, Tetsu Kinoshita, Hiroki Takagi and Toshiaki Mitsui: Salt Tolerance Improvement in Rice through Efficient SNP Marker-Assisted Selection Coupled with Speed-Breeding. 2019, *International Journal of Molecular Sciences* Vol. 20 (10), 2585, pp.1-22.
- (2) Md Masud Rana, Murat Aycan, Takeshi Takamatsu, Kentaro Kaneko, Toshiaki Mitsui and Kimiko Itoh: Optimized Nuclear Pellet Method for Extracting Next-Generation Sequencing Quality Genomic DNA from Fresh Leaf Tissue. 2019, *Methods and Protocols* Vol. 2 (2), 54, pp1-11.

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。