

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Giri Prasad Joshi
論文題目	Cytological and genomic analysis of gametocidal induced rearrangements of barley chromosome 2H in the genetic background of common wheat（パンコムギの遺伝的背景において配偶子致死作用により誘発されたオオムギ2H染色体の細胞遺伝学及びゲノム解析）		
（論文内容の要旨）			
オオムギ（<i>Hordeum vulgare</i>, 2n=2x=14, HHゲノム）は世界的に栽培されている穀類であるだけでなく、パンコムギ（2n=6x=42, AABBDD）の育種においても農業上有用な遺伝子の有望な供給源である。オオムギの7種類の染色体（1H～7H）及び染色体腕は別々にパンコムギに導入され、染色体添加系統として確立されている。しかし、1本のオオムギ染色体のDNA量は膨大であり、しかも多数の反復配列を含んでいる。そのため、全ゲノムのDNA配列を解読してそれらを染色体腕ごとに配置することはできても、正確に整列することは極めて困難であることが予想される。そこで、オオムギゲノムのDNA配列を正しく整列するためには、各染色体をさらに小さな領域に断片化し、その個々の断片を持つ系統の育成が必要になる。 パンコムギには遺伝的に染色体構造変異を誘発するシステム（配偶子致死システム）がある。このシステムの分子的なメカニズムは未だ不明であるが、コムギ近縁野生種由来の配偶子致死遺伝子がヘテロ接合のとき、配偶子致死遺伝子を持つ配偶子は正常であり、この遺伝子を持たない配偶子には染色体切断が生じて配偶子は致死になるか、受精して子孫に染色体構造変異を生じさせる。本研究では、この配偶子致死システムを利用して、パンコムギに添加されているオオムギ2H染色体を断片化して同定・選抜した後、個々の異なる断片を保有するパンコムギ系統を育成すること、及び、それらの系統を2H特異的なEST（expressed sequence tag）マーカーを用いてPCR（polymerase chain reaction）分析し、オオムギ2H染色体の細胞遺伝学的地図を作製することを目的とした。本研究では、配偶子致死遺伝子の座乗している染色体として、コムギ近縁野生種の<i>Aegilops cylindrica</i>（2n=4x=28, CCUU）由来の2C染色体、及び、<i>Ae. cylindrica</i>（2n=4x=28, CCUU）由来の3C^{SAT}染色体を用いた。 配偶子致死染色体の2C及び3C^{SAT}添加パンコムギ系統を2H染色体添加パンコムギ系統と交配し、その雑種に2H染色体添加パンコムギ系統を戻し交配した子孫から、パンコムギに2H染色体が1対、配偶子致死染色体が1本添加された個体（2n=45）を選抜した。この2n=45個体に正常パンコムギを交配し、その子孫の合計1853個体、及び、既に予備選抜の終わっていた23系統（各10個体以上）から2H染色体の構造変異をfluorescence in situ hybridization（FISH）とgenomic in situ hybridization（GISH）による蛍光顕微鏡による細胞遺伝学的観察により選抜し、個別の2H染色体断片を保有する合計66のパンコムギ系統を育成した。この66系統のDNA使用して、115のESTマーカーについてPCR分析を行い、その結果に基づいて2H染色体の細胞遺伝学的地図を作製した。この染色体地図では、2H染色体は34の領域に分割され、ESTマーカーの密度は動原体近傍では低く、末端領域では有意に高く、特にマーカー頻度の高い領域、いわ			

ゆるGene rich region、が存在することが明らかになった。

本研究で使用した115のESTマーカーの内44マーカーは、既報の研究の連鎖（遺伝学的）地図作製でも使われていたので、この44マーカーについての細胞遺伝学的地図と連鎖染色体地図を比較した。その結果、マーカーの順序は末端領域ではほとんど同じであったが、動原体近傍で矛盾があり、連鎖地図に間違いがあることが明らかになった。また、末端領域における遺伝学的距離（cM:centimorgan）は実際の物理的距離と比較して過小に評価され、逆に、動原体近傍ではcMは過大に評価されていることが明らかになった。これらの知見は、現在、集積されているオオムギゲノムの膨大な配列情報を染色体の狭い領域に配置することを可能にし、最終的には、オオムギゲノムの全配列の統合に役立つものと期待される。

本研究の配偶子致死システムで用いた2C染色体は、減数分裂の後の配偶子形成過程の体細胞分裂で高頻度に染色体の切断を誘発することが知られているが、DNA塩基レベルでの異常も誘発するかどうかは明らかでなかった。そこで、FISH/GISHの選抜では正常な2Hを持つと判定された植物個体の内、81個体について、2H特異的なESTマーカーを染色体全長に亘り18選び、PCRにより合計約9 kbの領域を増幅し、塩基配列を解読して解析を行った。その結果、塩基レベルでの置換や欠失・重複は全く検出されず、2C染色体は染色体の切断は起こすが、塩基レベルでの変異は起こさないことが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

オオムギは世界的に栽培されている穀類であるだけでなく、コムギの育種においても農業上有用な遺伝子の有望な供給源である。本研究では、パンコムギに導入されているオオムギの7種類の染色体(1H~7H)の内、2H染色体について、配偶子致死システムを利用して断片化し、個別の2H染色体断片を保有するパンコムギ系統を育成した。次に、それらの系統と2H染色体特異的ESTマーカーを用いて2H染色体の細胞遺伝学的染色体地図を作製し、既報の2H染色体の遺伝学的地図と比較研究を行った。さらには、配偶子致死システムが染色体の切断だけでなく、塩基レベルでの変異も誘発するかどうかの研究を行った。本研究の評価できる点は、以下の4点である。

1. 2H染色体断片パンコムギ系統の育成：2000個体を超えるパンコムギの染色体構造変異を蛍光顕微鏡で同定・選抜し、2H染色体の異なる断片を保有する系統を66系統育成したことは、今後のオオムギゲノムの統合的解析とパンコムギの育種に有用な遺伝資源を供給した。
2. 2H染色体の細胞遺伝学的染色体地図作製：2H染色体断片パンコムギ系統を用いて115のESTマーカーを2H染色体の34領域に区分し、細胞遺伝学的染色体地図によりDNA配列を染色体上に配列できることを明らかにすると同時に、領域によりESTマーカー(遺伝子)の密度が異なることを明らかにしたことは、今後のオオムギゲノムの統合的解析に有用な知見を与えた。
3. 2H染色体の細胞遺伝学的染色体地図と連鎖地図の比較研究：同じESTマーカーを用いて作製方法の異なる二つの染色体地図を比較し、染色体の領域により、乗換え頻度が異なること、すなわち、連鎖地図の歪みを明らかにしたことは、今後のオオムギゲノムの統合的解析に有用な知見を与えた。
4. 配偶子致死システムの塩基レベルでの変異誘発の調査：約700 kbの領域のDNA塩基配列の解析から、配偶子致死システムでは塩基レベルでの変異は起こっていないことを示唆したことは、配偶子致死システムの分子メカニズムの解明の端緒となる知見を与えた。

以上のように、本論文は、多数の2H染色体断片系統を育成し、PCR分析により2H染色体の細胞遺伝学的地図を作製した研究であり、植物遺伝学並びに植物育種学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 24年 1月 19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降