

氏 名	ハーク イブラヒム ラシッド イスマエル Hag Ibrahim, Rashid Ismael
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1646 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 地 域 環 境 科 学 専 攻
学位論文題目	Sequencing and Analysis of the Chloroplast Genome from Cotton (<i>Gossipium barbadense</i> L.) (ワタ (<i>Gossipium barbadense</i> L.) 葉緑体 DNA の塩基配列の決定と解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 東 順 一 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 遠 藤 隆

論 文 内 容 の 要 旨

ワタはアオイ科、ワタ属の繊維植物であり、その種子毛（綿毛）は紀元前より今日に至るまで再生可能な天然繊維原料として人類に利用されている。また、綿毛の主要構成成分であるセルロースは地球上で最も多量に生産される天然高分子であり、生分解性で環境への負荷が小さく、炭素源からみた地球上の物質循環の根幹をなしている。ワタの葉緑体はこのセルロースを生産するためのグルコースをショ糖として供給する重要な器官である。本論文は、ワタを改良し綿毛の生産性の向上に繋がると考えられる葉緑体遺伝子工学の基礎を構築することを目的として、約50種あるワタの中で最も長い綿毛を有し、繊維が繊細で絹様の光沢を有するため栽培上重要なエジプト綿 (*Gossipium barbadense* L.) の完全長葉緑体ゲノムの塩基配列を決定してその遺伝子構成を解析するとともに、得られた塩基配列を利用して栽培品種の同定が可能であることを示したものである。主な研究成果は以下のように要約される。

第1章では、繊維植物としてのワタの重要性に注目し、従来のゲノム解析について現在栽培されているワタの重要な種は二倍体の旧世界綿2種 (*G. arboreum* L. と *G. herbaceum* L.) と複二倍体の新世界綿2種 (*G. hirsutum* L. と *G. barbadense* L.) の4種であり、旧世界綿はAゲノム、新世界綿はADゲノム構成であることを含めて概説している。次いで、本研究でエジプト綿と呼ばれる *G. barbadense* L. とその葉緑体を取り上げた背景と目的について述べるとともに、本研究で取り上げた課題について従来の研究動向を概説している。

第2章では、*G. barbadense* L. の完全長葉緑体ゲノムの塩基配列を決定し、これをもとに葉緑体ゲノム解析を行っている。葉緑体ゲノムは160,317bpの長さの環状DNAで、25,591 bp からなる一組の逆位反復配列領域を含んでいた。また、この領域は88,841 bp のラージシングルコピー領域と20,294 bp のスモールシングルコピー領域で区切られていた。遺伝子として132個同定され、そのうちユニークな遺伝子が117個あり、そのうち17個は逆位反復配列領域に存在していた。全体の構造は比較として用いた他の8種の双子葉植物の葉緑体と似ているが、*G. barbadense* L. では長さがやや長く、その原因は主としてラージシングルコピー領域とスモールシングルコピー領域中の遺伝子間領域とイントロンに認められることを示している。さらに、ほぼ同時に決定されたリクチ綿やアメリカ綿と呼ばれる *G. hirsutum* L. の完全長葉緑体ゲノムの塩基配列 (160,301 bp の長さ) と比較し、スモールシングルコピー領域と二箇所の遺伝子間領域 (*petN* (*ycf6*) と *psbM* 間及び *psbZ* (*ycf9*) と *trnG* (GCC) 間) に差が認められることをも示している。

第3章では、前章で決定した *G. barbadense* L. 及び既報の *G. hirsutum* L. の葉緑体DNAの塩基配列を利用して、ワタ葉緑体ゲノムを網羅する約1～15 kb の鎖長域 (重複域を含む) をカバーする24対のプライマーをデザインしている。次いで、これらのプライマーを用いてローリングサークル増幅 (RCA) 法を適用することにより、個々の葉緑体を単離することなく全ゲノムDNAを材料として効率的で短時間に葉緑体DNAの情報を得ることを可能としている。さらに、制限酵素を併用することによりAゲノムを含む4種の栽培ワタ (*G. barbadense* L., *G. hirsutum* L., *G. arboreum* L. 及び *G. Nanking Meyen*) の種間差を検出することの可能性を検討している。

第4章では、前章で作成した24対のプライマーを用いて4種の栽培ワタ (*G. barbadense* L., *G. hirsutum* L., *G. arboreum* L. 及び *G. Nanking* Meyen) の葉緑体 DNA 断片を前章で適用した RCA 法により PCR 増幅して AFLP 解析するとともに、7種の制限酵素 (*Eco*R1, *Hind*III, *Mfe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Bgl*II 及び *Nco*I) で処理して RFLP 解析し、種間の差の検出を試みている。増幅した断片を解析した結果、S-UGA と fM-CAU のコード域で *G. barbadense* L. において 1,739 bp の領域をカバーするプライマーを用いることにより上記の4種の識別が可能であることを見出すとともに、シナ綿やナンキン綿と呼ばれる *G. Nanking* Meyen とインド綿やアジア綿と呼ばれる *G. arboreum* L. 間に差が認められず、前者が後者の栽培種であることを裏付けることができた。一方、RFLP 解析では、得られた555個余のフラグメントの内16個のフラグメントで種間差が認められ、特に *rpoB* と *psbD* のコード域で *G. barbadense* L. において 8,742 bp の領域をカバーするプライマーと *Hind*III を用いることにより複2倍体種と2倍体種間で差が認められたことから、*G. barbadense* L. と *G. hirsutum* L. とが分かれる以前に切断サイトが生じたことを示し、ワタの進化とその葉緑体の進化の関連性について新知見を得ている。

論文審査の結果の要旨

化石系資源由来の合成繊維の多用に起因する地球環境の悪化を防止するため、生分解性を有し再生産が可能な天然繊維の利用が望まれている。本論文では、地球上で最も多量に生産されるセルロースを綿毛として生産するワタに注目し、ワタを改良し綿毛の生産性向上に繋がると期待される葉緑体遺伝子工学の基礎を構築することを目的に、栽培上重要なエジプト綿 (*Gossypium barbadense* L.) の完全長葉緑体ゲノムの塩基配列を決定してその遺伝子構成を解析するとともに、得られた塩基配列を利用して栽培品種の同定が可能であることを見出したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *G. barbadense* L. の葉緑体ゲノム全長の塩基配列を決定し、鎖長が 160,317 bp の環状 DNA で、25,591 bp からなる一組の逆位反復配列領域を含んでおり、この領域が 88,841 bp のラージシングルコピー領域と 20,294 bp のスモールシングルコピー領域で区切られていることを明らかにした。

2. *G. barbadense* L. の葉緑体ゲノムの遺伝子として132個を同定し、そのうちユニークな遺伝子が117個あり、そのうち17個は逆位反復配列領域に存在していること、他の双子葉植物のゲノムと比較して長さがやや長く、その原因が主としてラージシングルコピー領域とスモールシングルコピー領域中の遺伝子間領域とイントロンにあることを明らかにした。

3. ワタ葉緑体ゲノムを網羅するプライマーをデザインし、これらを用いてローリングサークル増幅 (RCA) 法を適用することにより、個々の葉緑体を単離することなく全ゲノム DNA を材料として効率的で短時間に葉緑体 DNA の情報を得ることを可能とした。

4. 得られた葉緑体 DNA の塩基配列を利用して、4種の栽培ワタ (*G. barbadense* L., *G. hirsutum* L., *G. arboreum* L. 及び *G. Nanking* Meyen) の DNA 断片を増幅することにより種間の差を検討し、ワタの進化とその葉緑体の進化の関連性について新知見を得ている。

以上のとおり、本論文は栽培上重要な *G. barbadense* L. の葉緑体 DNA の全塩基配列を決定し、他の種を含めた種の同定の可能性を示したものであり、森林生化学、育種学並びに遺伝学の発展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19年2月14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。