

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	竹内 貴規
論文題目	Establishment and application of forward genetics platforms in the diploid tobacco ancestor <i>Nicotiana sylvestris</i> for gene discovery toward improvement of cultivated tobacco (タバコ二倍体祖先種 <i>Nicotiana sylvestris</i> における順遺伝学解析基盤の構築と、栽培タバコ改良に向けた遺伝子探索への応用)		
(論文内容の要旨)			
タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) は世界的に栽培される重要な特用作物である。タバコは遺伝学的には異質倍数体 ($2n = 4x = 48$, SSTT) であり、同祖遺伝子と呼ばれる機能的に重複した遺伝子対を多数有している。この遺伝的冗長性は、特に潜性変異の同定を目的とする順遺伝学解析において大きな障害となる。本研究では、倍数体特有のゲノム複雑性の問題を回避するため、栽培タバコの母系祖先種である二倍体野生種 <i>Nicotiana sylvestris</i> を利用し、タバコにおける順遺伝学解析基盤の構築とその実効性の検証を目的とした。 第1章では、<i>N. sylvestris</i>を用いた順遺伝学解析を可能にするための基盤整備を行った。エチルメタンスルホン酸 (EMS) を用いて化学変異誘発処理を実施し、5,045系統から成るM₂世代変異体集団を作製した。そのうち4,316系統に関して、各系統8個体の混合DNAを調製し、変異体ライブラリーとして整備した。アンプリコンシーケンス法により変異頻度を評価した結果、1系統あたり平均53.7 kbに1箇所の変異が確認された。これは、ゲノム全体では約11 bpに1箇所の変異に相当し、本変異体集団が高密度に変異を持つことが明らかとなった。また、次世代シーケンサーのショットガンショートリード配列からDenovoMAGICアルゴリズムを用いて参照ゲノム配列を構築し、16種類の組織・発生段階のRNA-seqデータを用いて34,208個の遺伝子をアノテーションした。以上のゲノム・トランスクリプトーム資源は、原因遺伝子の同定を可能とする研究基盤となるものである。 第2章では、ニコチン含量をモデル形質として、第1章で構築した解析基盤の有効性を検証した。4,202系統の変異体を対象にスクリーニングを実施した結果、7系統の低ニコチン変異体を単離した。相補性検定およびMutMap解析を行ったところ、原因遺伝子としてAO2およびERF199が同定された。これらはいずれもニコチン生合成に関与することが知られている遺伝子であり、根特異的発現を示すものであった。さらに栽培タバコにおいてao2変異体を作出した結果、両二倍体ゲノム由来の同祖遺伝子を同時に変異させた二重変異体のみでニコチン含量が低下し、単独変異体では野生型と同等の含量を示した。以上の結果は、<i>N. sylvestris</i>を用いた順遺伝学解析基盤が、多倍体タバコでは検出が困難な潜性変異の同定に有効であることを実証するものである。 第3章では、タバコの香味および防御応答に関与する二次代謝産物ソラベチボンを対象に、新規遺伝子の探索を行った。3,289系統の変異体をスクリーニングした結果、野生型の200倍以上のソラベチボンを蓄積する変異体を単離した。この変異体は疑似病変表現型を示し、恒常的な免疫応答の活性化が示唆された。MutMap解析により原因遺伝子としてCa²⁺-ATPase1 (CAL) を同定し、栽培タバコのcal変異体でも同様の高蓄積表現型が確認された。さらにカルシウム蛍光指示タンパク質を用いた解析から、cal変異体では細胞質Ca²⁺濃度が上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、Ca²⁺恒常性の破綻が免疫応答の活性化を介してソラベチボンの過剰蓄積を引き起こすことが示され、ソラベチボン生合成に関する新たな制御機構が明らかとなった。			

以上のように本研究では、*N. sylvestris*をモデルとした順遺伝学解析基盤を構築し、その有効性を二つの重要形質で実証した。本研究で整備した変異体ライブラリーおよびゲノム資源は、栽培タバコの遺伝的改良を加速する強力なツールとなるとともに、タバコ属植物における機能ゲノミクス研究の発展に大きく寄与するものである。

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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

タバコ (*Nicotiana tabacum*) は世界的に重要な特用作物であるが、異質倍数体であり、多くの遺伝子が共通祖先に由来する機能的に重複する同祖遺伝子として存在する。この遺伝的冗長性は、潜性変異の表現型解析を中心とする順遺伝学研究の大きな障害となってきた。本研究は、栽培タバコの母系祖先種である二倍体野生種 *Nicotiana sylvestris* をゲノム複雑性低減の橋渡しモデル植物として活用することにより、この課題を克服し、タバコにおける順遺伝学解析基盤の構築とその実用的応用を目指したものである。評価すべき点は以下の4点に集約できる。

1. EMS変異誘発により5,000系統規模の大規模変異体ライブラリーを構築し、変異頻度の定量的評価を通じて高密度変異集団であることを明らかにした。また、高品質な参照ゲノム配列の構築および包括的トランスクリプトーム解析を実施し、順遺伝学研究に必要な基盤資源を体系的に整備した点は、タバコ研究分野において極めて重要な貢献である。

2. ニコチン含量をモデル形質とした解析により、MutMap法を活用してAO2およびERF199という既知のニコチン生合成関連遺伝子を原因遺伝子として同定し、本研究で構築した解析基盤の実効性を実証した。さらに、栽培タバコにおける同祖遺伝子の二重変異体解析を通じて、四倍体である栽培タバコでは検出が困難な潜性変異の同定における本解析スキームの優位性を明確に示した。

3. ソラベチボン高蓄積形質を対象とした解析では、 Ca^{2+} -ATPase1 (CA1) を新規原因遺伝子として同定し、カルシウム恒常性の破綻が免疫応答の活性化とソラベチボン過剰蓄積を引き起こすことを明らかにした。これはタバコにおける二次代謝制御機構の新たな理解をもたらす独創的成果であり、香味品質改良への応用可能性を示した点で高く評価される。

4. 本研究は、*N. sylvestris*を用いた順遺伝学的アプローチが、栽培タバコの遺伝的改良に有効であることを体系的に示した最初の総合的な研究であり、今後のタバコ育種および機能ゲノミクス研究の発展に向けた強力な研究プラットフォームを提供した。

以上のように、本論文はタバコ研究における基礎および応用の両面で顕著な成果を挙げたものであり、植物育種学、品質科学および植物分子遺伝学の発展に大きく寄与するものである。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、令和8年1月22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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2026年 4月 1日以降（学位授与日から3ヶ月以内）