

氏 名	なか やま しげ き 中 山 繁 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2485 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Study on the plant chromosomal structure by fluorescence <i>in situ</i> hybridization and imaging methods. (蛍光 <i>in situ</i> ハイブリッド法と画像法による植物の染色体構造に関する研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 大 山 莞 爾	教 授 佐 藤 文 彦	教 授 關 谷 次 郎
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

染色体構造の解析には染色体の識別と同定が不可欠であり、これに基づいて物理地図の構築などが行われる。ヒト染色体で用いられる染色体分染法の多くは植物染色体に適用できないため、染色体の識別と染色体構造の記載は主として染色体の各部分の長さにより行われてきた。

本論文は、蛍光 *in situ* ハイブリッド (FISH) 法による遺伝子の可視化、画像法を用いた染色体形態の定量的解析により、これまでの長さを中心に記載されてきた植物染色体構造をより詳細に解析したものである。

以下に本論文の要約を記す。

第一章では、連続染色法と画像解析法を組み合わせ、オオムギ染色体において姉妹染色分体交換の位置を直接的に決定する手法を新たに開発した。まず、オオムギ染色体の同一染色体に対して姉妹染色分体分染法と植物において良く用いられる C-バンド分染法を連続して適用している。これにより、姉妹染色分体交換の位置と C-バンド法により可視化されたヘテロクロマチンの位置を同一染色体上で明らかにしている。これらの位置関係を明らかにするため、画像法を用いて姉妹染色分体交換と C-バンドの位置を直接比較することを試みている。これは、① C-バンド染色体画像を画像解析装置に取り込み、染色体領域を決定する、② C-バンド染色体画像から得た染色体領域の輪郭線に沿って、姉妹染色分体分染した染色体画像を取り込む、③ C-バンド染色体画像から C-バンド領域を抽出し、姉妹染色分体分染画像に重ね、姉妹染色分体交換の位置を決定する、の 3 つの過程により構築している。オオムギ染色体において、突然変異源で処理しない自発的な姉妹染色分体交換は C-バンドで可視化されるヘテロクロマチン領域とは無関係に発生していることを明らかにしている。

第二章では、画像法を用い、小型植物染色体の体細胞分裂前中期に見られる凝縮パターンに基づいた定量的染色体地図を構築する手法を新たに開発している。これには、アブラナ科のクロガラシ (*Brassica nigra*) 染色体を用い、これまでの手法とは異なり、画像法のみを用いて染色体地図を構築している。この画像法は、①画像の取り込み、②核版間の露光補正、③凝縮プロファイルの測定、④相同染色体間の露光補正、⑤長さの補正、⑥しきい値の設定によるイデオグラムの構築の 6 つの過程からなる。これまでの画像法による染色体地図の構築においては、③凝縮プロファイルの測定以降の補正は数値計算により行っていた。しかし、本論文では数値データを画像に変換し、これに対して画像処理を行い、処理後の画像を数値データに変換する、一連の手法を構築している。この方法により、全ての過程を画像法のみにより行うことが可能になり、異なる染色体数を持つ広範な種に対応することができることを明らかにしている。

第三章では、FISH 法を用い、雌雄間においてその構造が大きく異なるゼニゴケ性染色体の構造を解析する手法を新たに開発している。その結果、X 染色体の片腕に 45S rDNA の大きな遺伝子座が存在するのに対し、Y 染色体上には rDNA の遺伝子座が存在しないこと、常染色体上の遺伝子座は雌雄間で同じであることを明らかにしている。さらに、45S rDNA とともにリボソームを形成する 5S rDNA の遺伝子座を FISH 法により解析し、X 染色体の片腕に 5S rDNA の大きな遺伝子座が存在することを明らかにしている。この 2 種類の rDNA の X 染色体上の遺伝子座の関係を二色 FISH 法により用いて解析したところ、X 染色体上の 5S rDNA 遺伝子座は 45S rDNA 遺伝子座と重なっていること、常染色体上の 7 つの 5S

rDNA 遺伝子座も全て 45S rDNA 遺伝子座と重なっていることを述べている。X 染色体の片腕に雌特異的な構造変異を含む 5S rDNA と 45S rDNA からなる大きな rDNA 遺伝子座が存在するのに対し、Y 染色体上には rDNA の遺伝子座が存在しないことから、これらの性染色体特異的な配列は、XY 間で構造が異なるゼニゴケ性染色体の分化に深い関わりがあると述べている。

論文審査の結果の要旨

植物染色体構造の解析は顕微鏡下における観察が主であり、構造解析に不可欠な染色体の同定は、染色体を構成する短腕及び長腕の長さに基づいて行われることが多い。これは、植物染色体において、分染法により特徴的な構造を呈することが少ないためである。

本論文は蛍光 *in situ* ハイブリッド法 (FISH) 法による遺伝子の可視化、画像法を用いた染色体形態の定量的解析法を開発し、オオムギ染色体とクロガラシ染色体、さらにゼニゴケ性染色体を詳細に解析した一連の研究をまとめたものである。評価できる主要な成果は以下の通りである。

1. 連続染色法と画像解析法を用い、オオムギ染色体において姉妹染色分体交換の位置を直接的に決定する手法を新たに開発した。本研究においてはこれまで異なる染色体に対して行われてきた 2 種類の分染法を染色体に対して行うだけでなく、2 種類の分染法の結果を画像法により直接比較するというこれまでにない解析を行っている。また、これにより、染色体を構成するヘテロクロマチンと姉妹染色分体交換が無関係に起こっていることを明らかにしている。

2. 画像法を用い、染色体の凝縮パターンに基づいた染色体地図を構築する手法を新たに開発した。それまでの画像法による染色体地図の構築においては、決められた染色体数や核版数にしか対応できなかったが、新たに構築した手法では、全ての過程を画像法のみから構築し、異なる染色体数を持つ広範な種に対応できるようにしている。実際に、ブラシカ属の様々な種に対して今回開発した手法を用いて染色体地図を構築し、物理地図の基礎としている。

3. FISH 法を用い、ゼニゴケ性染色体の構造を解析する手法を新たに開発し、X 染色体の片腕に雌特異的な構造変異を含む rDNA の大きな遺伝子座が存在するのに対し、Y 染色体上には rDNA の遺伝子座が存在しないことを明らかにした。さらに、ゼニゴケ X 染色体の片腕に雌特異的な構造変異を含む 5S rDNA と 45S rDNA からなる大きな遺伝子座が存在することを示し、これまでのゼニゴケ Y 染色体の構造に加え、X 染色体の構造を明らかにしている。

以上のように、本論文は、蛍光 *in situ* ハイブリッド法と画像法を用い、植物染色体構造をより詳細に明らかにしたものであり、分子生物学、分子遺伝学、分子細胞育種学の発展に寄与するところが多い。

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15年2月18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。