

氏 名	伊 藤 秀 臣
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1393 号
学位授与の日付	平成 16 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 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Molecular and cytological analysis of centromeric repeats in Gramineae species (イネ科植物におけるセントロメア領域反復配列の分子遺伝学的及び細胞遺 学的解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 遠 藤 隆 教 授 大 西 近 江 教 授 谷 坂 隆 俊

論 文 内 容 の 要 旨

セントロメア (動原体) は分裂期染色体で一次狭窄として観察できる構造をとり、細胞分裂時における姉妹染色分体の正確な分離に不可欠な働きを担っている。しかし、この重要な役割に反してセントロメア領域に存在する DNA の一次構造は生物種間で多様であり、植物においてはセントロメア機能を担う DNA 一次構造の解析は始まったばかりである。本論文は穀物として重要なイネ科の植物を用いてセントロメア領域を構成する DNA 配列の単離と構造解析を行ったものである。

第一章 オオムギ特異的散在型反復配列の単離

本研究はオオムギのセントロメアに局在する反復配列の単離を目的とした。イネ科植物のセントロメア領域に存在する Ty3/gypsy 型レトロトランスポゾン配列中に設計したプライマーを用いて、オオムギのゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応を行った。オオムギ、コムギ、ライムギのゲノム DNA をプローブとしたサザン分析において、PCR 増幅産物中にオオムギ特異的な反復配列が検出され、FISH (fluorescence in situ hybridization) 分析の結果この反復配列はオオムギの染色体に特異的な散在型反復配列であることが示された。この反復配列の塩基配列を決定した結果、3つのタイプに分けることができた。第一のタイプは Ty1/copia 型レトロトランスポゾンと、第二のタイプは Ty3/gypsy 型レトロトランスポゾン配列と相同性を示した。第三のタイプは相同性検索でどの既知の反復配列とも相同性を持たなかった。

第二章 コムギ染色体セントロメア領域に局在する反復配列の単離と解析

本研究では、二倍体コムギの BAC (bacterial artificial chromosome) ライブラリーを用い、コムギ染色体セントロメア領域に特異的に局在する反復配列の単離を行った。その結果コムギの Ty3/gypsy 型レトロトランスポゾンの LTR (long terminal repeat) 配列の中に 192bp の反復配列が存在し、FISH 分析によりコムギのセントロメアに局在することが明らかになった。この配列の FISH シグナルの強さは六倍体コムギの同祖染色体群間で差があり、Aゲノム染色体で最も強く、Bゲノム染色体が中程度、Dゲノム染色体が最も弱いシグナルであった。このシグナル強度の差は六倍体コムギの祖先種間でこの配列のコピー数の差と相関しており、Aゲノム祖先種が一番多く、次にBゲノム祖先種、Dゲノム祖先種という順であった。塩基配列を決定した結果、この配列は種特異的に保存されたレトロトランスポゾン配列と考えられ、四倍体コムギやコムギ祖先種に存在する 192bp ファミリーから得られた DNA 塩基配列情報の進化遺伝学的な分析を行った結果、六倍体コムギに存在する 192bp 配列は祖先種と考えられている二倍体コムギに由来したと結論された。

第三章 イネ染色体セントロメア領域の構造解析

本研究では細胞遺伝学的アプローチによりイネのセントロメア領域の DNA 構造解析を行った。まず、イネの BAC ライブラリーからセントロメア領域をカバーするような BAC コンティグを作成した。FISH 法により減数分裂パキテン期の染色体上にセントロメア反復配列と BAC クローンを物理的にマッピングした結果、2つの BAC コンティグが第3染色体の両腕をカバーしていることが明らかになった。さらに、セントロメア反復配列と BAC クローンをプローブとした DNA fiber-FISH 分析を行うことで、セントロメア領域の大きさや構成要素など詳しいセントロメア領域の1次構造を明らかに

した。次に、第3染色体にマッピングされたBACコンティグから短腕、長腕それぞれにおける仮想分子を作成し、セントロメア領域近傍における反復配列の分布を解析した。その結果、セントロメアに局在するレトロトランスポゾンとその他のトランスポゾン様配列では顕著な分布の違いが見られた。さらに、これらの仮想分子内に存在する遺伝子の分布及び発現遺伝子の解析を行った。その結果、予測される遺伝子が均一に分布しているのに対して、発現遺伝子の分布はセントロメア近傍で抑制されていることが示唆された。セントロメア近傍に存在する単一遺伝子の発現を調べた結果、セントロメア近傍では実際に遺伝子発現が抑制されていることが確認された。

論文審査の結果の要旨

セントロメア（動原体）は細胞分裂時の姉妹染色体の正確な分離に不可欠で重要な働きを担っている。しかし、この重要な役割に反してセントロメア領域に存在するDNA一次構造は生物種間で多様である。近年、酵母やヒトなどでセントロメア機能を担うDNA配列の研究が盛んに行われているが、植物のセントロメアDNA一次構造の解析はまだ始まったばかりである。本論文は、穀物として重要なイネ科植物を用いセントロメア領域を構成するDNA配列の単離と構造解析を行ったもので、評価すべき点は以下の通りである。

1. オオムギ、コムギは穀物として重要な植物であり有用遺伝子の導入によるコムギ-オオムギ転座系統が多数得られている。その中で染色体セントロメア領域を介した転座（ロバートソン型転座）系統におけるセントロメア領域の構造解析を行うためオオムギ、コムギのセントロメアに局在する反復配列の単離を試みた。その結果、コムギの染色体セントロメア領域に局在する反復配列を単離することができた。

2. イネのセントロメア領域には、他の生物に広く見られるように反復配列が広範囲にわたって存在し、現在のDNA塩基配列決定技術では全長を解読できず、その詳しい一次構造は明らかでなかった。イネのセントロメア領域構造を解明することは、生物学的な意義に留まらず穀物として重要な植物であるイネの染色体構造を把握する上で重要である。本研究ではFISH法の技術を用い、細胞遺伝学的アプローチによりイネセントロメア領域のDNA構造解析を行った。その結果、セントロメア領域の大きさや構成要素など従来のDNA塩基配列決定では得ることのできなかった詳しいセントロメア領域の一次構造が明らかになった。

3. イネのセントロメア領域にマッピングされたBACコンティグから仮想分子を作成し、セントロメア領域近傍における反復配列の分布を解析した。その結果、セントロメアに局在するレトロトランスポゾンとその他のトランスポゾン様配列では顕著な分布の違いが見られ、セントロメア領域付近ではセントロメアヘテロクロマチン様の分布が明らかになった。

4. 真核生物のセントロメア領域には反復配列が存在しており、一般的に遺伝子発現は抑制されていることが知られている。その領域付近の仮想分子内に存在する遺伝子の分布及び発現遺伝子の解析を行った結果、セントロメア近傍では実際に遺伝子発現が抑制されていることが示唆された。

以上のように、本論文は、イネ科植物のセントロメア領域の分子構造を明らかにしたもので、植物遺伝子学ならびに育種学の分野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16年1月15日、論文なら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。