

氏 名 (本 国 籍)	中 野 道 治 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 502 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Molecular Genetic Studies of Polyembryony in Citrus (カンキツ多胚性に関する分子遺伝学的解析)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 大 村 三 男 副査 静岡大学 教授 露 無 慎 二 副査 岐阜大学 教授 向 井 譲 副査 信州大学 教授 南 峰 夫 副査 静岡大学 准教授 本 橋 令 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

カンキツ類の広範な種・品種に認められる多胚性は、植物に特有なアポミクシス現象であり、カンキツ類の育種、繁殖、組織培養に関わるため古くから高い関心が寄せられている。そのため、遺伝解析が行われ 1 つの優性遺伝子の関与が明らかにされているが、その遺伝的実体は明らかにされていない。多胚形成に関与する遺伝的機構解明は、カンキツばかりでなく、広く植物の繁殖システム及び不定胚形成の理解につながると期待される。そのため本研究では、カンキツにおける多胚性の分子機構を明らかにすることを目的に、近年蓄積されてきているゲノム解析の手法及び資産を用いて一連の研究を行ったものである。

論文は、カンキツの多胚性原因遺伝子の同定及び関連遺伝子群の単離のため、主としてポジショナルクローニング法及び遺伝子発現解析法からの解析による 2 つの研究により成り立っている。

1. 多胚性遺伝子座に関するゲノム解析

(1) 多胚性遺伝子座のマッピング

カンキツ類の多胚性の制御に関して、今までの遺伝学的解析により単一の優性遺伝子座の存在が示唆されていた。そこで、ポジショナルクローニングの基盤として複数の交雑集団間の遺伝地図を共通の DNA マーカー座位を比較することで、原因遺伝子座近傍の連鎖地図の詳細化を行った。

まず、‘清見’ (単胚性) × ‘宮川早生’ (多胚性) 由来分離集団を用いて RAPD 法によるバルク化連鎖解析を行った。その結果、‘宮川早生’ K-9 連鎖群上に単一の遺伝子座が検出された。この領域について高密度のマーカーをもつ既存の連鎖地図との対応を調べたところ、カンキツ基本連鎖地図の第 1 連鎖群上に原因遺伝子座が位置すると考えられた。そ

のため、第1連鎖群上のマーカーを用いて、F180（単胚性）×‘はるみ’（多胚性）由来分離集団においてマッピングを行ったところ、多胚性遺伝子座は、マーカーMf0086と完全連鎖し、Lp0211とKs9001の間5 cMの領域に検出された。この領域を挟むマーカーは、‘宮川早生’、‘はるみ’に共通であり、多胚性遺伝子座領域が2品種に共通のゲノム構造を持つと考えられた。

(2) 多胚性遺伝子座領域の物理地図作成

連鎖分析で検出された多胚性遺伝子座領域について、ウンシュウミカン‘宮川早生’由来BACライブラリーを用いて物理地図作成を行った。近傍に位置づけられたマーカーを指標に染色体ウォーキングによってBACコンティグを作成した結果、多胚性遺伝子座に完全連鎖するマーカーMf0086を含む単一のコンティグが構築された。このコンティグは、多胚性遺伝子座の両端に位置付けられたマーカーLp0211及びKs9001を含むことから、多胚性の原因遺伝子はコンティグ内部に位置すると考えられた。コンティグ内に新たに設計したマーカーを用いて候補領域の絞込みを行った結果、原因遺伝子座の候補領域は300kb程度の範囲にあると推察された。

(3) カンキツ品種を用いた多胚性の関連分析

多胚性遺伝子座の候補ゲノム領域についてさらに絞り込むため、カンキツ60品種を用いて多胚性表現型と候補領域内に検出されたSNP型との関連を解析した。多胚性遺伝子座候補領域の、特に100-150kbの間にあるSNP型との間に極めて強い関連($p < 0.0001$)が検出された。この結果より、多胚性遺伝子座の候補領域は100-150kb程度の領域に限定されるとともに、この領域の遺伝子座が多様なカンキツ種に共通する可能性が考えられた。

(4) 多胚性遺伝子座候補領域の塩基配列決定

多胚性に関して強い関連が示されたゲノム領域を含むBACクローンについて塩基配列決定を行った。3つのBACクローンの塩基配列をアセンブルした結果、389 kbのコンティグが得られた。決定された塩基配列には、PPR、MADS、Receptor Kinase等の胚形成への関与が想定される遺伝子配列が認められ、多胚発現への関与が想定された。

2. 多胚性関連遺伝子群の発現解析

多胚品種では開花初期の胚珠において珠心組織が不定胚形成を行うという従来の組織学的知見に基づき、不定胚形成の開始・発達に関与する遺伝子の同定を試みた。多胚品種としてダイダイ・ナツダイダイ、単胚品種としてヒュウガナツ・ハッサクを用い、開花当日の胚珠から得た全RNAを用いて、cDNAサブトラクション解析及びマイクロアレイ解析を行った。サブトラクションにより得られたクローンから、多胚・単胚品種のいずれかに共通して高発現を示すクローンを選抜し、異なる発育ステージの胚珠での発現変動を調べた。その結果、多胚品種においてRhodanese domain、Serine carboxyl peptidaseに相同性を示す遺伝子断片が、単胚品種においてBet v1 family proteinに相同性を示す遺伝子断片がそれぞれ胚性特異的に高発現を示した。これらの遺伝子が多胚発現に関与する可能性が示唆されたが、マッピング解析から多胚性の原因遺伝子とは異なる関与をするものと推察された。

近年、様々な植物種でアポミクシスの分子機構解明を目指した研究が行われているが、その実体は明らかにされていない。本研究においては、アポミクシスの原因遺伝子に対して、その遺伝的実体には到達していないが、主としてポジショナルクローニングにより

100-150kb のゲノム配列に原因遺伝子が存在する確証を得た。本研究を通じて、各種植物におけるアポミクシス研究の中で、原因遺伝子に最も接近すること、その単離・同定の基盤を築くことができたと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員、教員や学生の出席のもと、平成 21 年 1 月 23 日（金）午後 1 時 30 分より静岡大学農学部 B 棟 206 号室において実施された。

本論文は、カンキツの育種、繁殖に深く関わっている多胚種子形成に関わる分子機構の解明をめざして一連の研究を行ったものであり、多胚性の原因遺伝子の同定及び関連遺伝子群の単離に向けて、ポジショナルクローニング及び遺伝子発現解析からの 2 つの解析研究から構成されている。

ポジショナルクローニングでは、比較マッピング手法による解析を行い、‘宮川早生’、‘はるみ’の 2 品種に共通する多胚性遺伝子座を連鎖地図上に検出した。検出された遺伝子座について、ウンシュウミカン ‘宮川早生’ BAC ライブラリーを用いて候補領域をカバーする物理地図を作成した。候補ゲノム領域から一塩基多型マーカーを設計し、カンキツ 60 品種を用いて胚性との関連分析を行った結果、最も高い関連が 100-150kb 程度の領域で認められたため、この候補領域を含む 3 種の BAC クローンについて塩基配列を決定した。解析の結果、候補領域を含む約 400kb 程度の配列が決定され、ORF 構造の予測が行われた。

遺伝子発現解析では、多胚性品種と単胚性品種の胚珠における発現プロファイリングを cDNA サブトラクション解析及びオリゴマイクロアレイ解析により行った。開花当日の胚珠から得た全 RNA を用いて、各手法により胚性特異的発現遺伝子を同定し、相同性検索による機能推定を行うと共に、ポジショナルクローニングにより決定されたゲノム配列との比較により原因遺伝子座領域との関連を考察した。また、cDNA サブトラクションから得られたクローンについて、異なる発育ステージの胚珠及び不定胚形成過程での発現パターンを調べ、多胚発現への関与を推定した。

近年、様々な植物種でアポミクシスの分子機構解明を目指した研究が行われているが、その実体は明らかにされていない。本研究においては、アポミクシスの原因遺伝子に対して、主としてポジショナルクローニングにより解析を行い、候補領域のゲノム配列を明らかにした。原因遺伝子の同定には至っていないが、各種植物におけるアポミクシス研究の中で原因遺伝子に最も接近したことを示す研究であり、その単離・同定の基盤を築くことができたと評価される。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Nakano, M., T. Shimizu, T. Kuniga, H. Nesumi and M. Omura. 2008. Mapping and haplotyping of the flanking region of the polyembryony locus in *Citrus unshiu* Marcow.. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 77: 109-114.
2. Nakano, M., T. Shimizu, H. Fujii, T. Shimada, T. Endo, H. Nesumi, T. Kuniga and M. Omura. 2008. Marker enrichment and construction of haplotype-specific BAC contigs for the polyembryony genomic region in *Citrus*. Breeding Science 58: 375-383.