

氏名(本籍)	むい <sup>ゆする</sup> 向井 讓 (奈良県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 乙 第 1,137 号		
学位授与年月日	平成 7 年 12 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	スギにおける RFLP 分析を利用した遺伝マーカーの開発と連鎖地図作成に関する研究		
主 査	筑波大学教授	農学博士	大 庭 喜八郎
副 査	筑波大学教授	理学博士	猪 川 倫 好
副 査	筑波大学教授	農学博士	高 柳 謙 治
副 査	筑波大学教授	農学博士	生 井 兵 治
副 査	筑波大学助教授	農学博士	荒 木 眞 之

## 論 文 の 要 旨

本論文は、わが国の主要造林樹種であるスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) について遺伝・育種の研究および育種実行上の基礎データをえるため、RFLP 検出法の確立と遺伝マーカーの探索、RFLP マーカーを利用した連鎖地図の作成、RFLP マーカーならびに連鎖地図の利用性およびトリソミックスの利用による連鎖群と座乗染色体との対応付けの 4 項目に関する研究結果をとりまとめたものである。

スギにおける RFLP 検出法を確立するため、多糖類が多量に含まれ DNA の単離を困難にしているスギの針葉について、枝葉の伸長成長の初期で多糖類の含有量が低下している 4 月下旬から 5 月上旬に採取した若芽を試料とすれば Murray and Thompson (1980) の方法で効率よく DNA を単離できることを示し、多型が検出されたゲノム DNA クローン 38 個と cDNA 286 個の合計 324 個の DNA クローンを検出した。これらの DNA クローンを利用し、スギの在来さし木品種のクモトオシとオキノヤマスギの交雑 3 世代家系を用いて遺伝分析を行い、RFLP 分析において 116 座 (ゲノム DNA クローン 5 座, cDNA クローン 111 座)、RAPD において 26 座、アイソザイムにおいて 2 座、矮性形態形質について 1 座の合計 145 座で連鎖関係を見いだした。スギの染色体の基本数は  $n=11$  であるが、145 座で構成される 14 連鎖群 (3 座以上) と 6 連鎖対を同定した。3 座以上で構成された 14 連鎖群のうち 13 連鎖群 (91 遺伝子座) については Haldane (1919) の地図距離を用い位置を確定した。この地図距離の合計は 145 座では 1,190 centiMorgan (cM)、13 連鎖群の 91 座では 887.3 cM となった。また、6 連鎖群で偏った分離比を示す遺伝子座がクラスターを形成していることを確認し、それぞれ両親由来のホモあるいはヘテロの座の頻度に差があることから、これらの遺伝子座の近傍に劣性致死遺伝子が存在することを示唆した。

本研究で作成した RFLP マーカーのスギ全体での利用性を検討するため、連鎖地図に位置づけられた 21 個の cDNA をプローブとしてスギ精英樹、在来さし木品種など 49 個体の RFLP 分析を行った。用いたすべての cDNA プローブにおいて多型が観察され、本研究で検出した RFLP マーカーはスギ全体に適用できることが判明した。さらにクローン識別における RFLP マーカーの有効性を検討するため、連鎖地図の作成において検出した 13 遺伝子座を用い、前述の 49 個体の RFLP 遺伝子型を決定し、遺伝子型によるクローン識別を行ったところ、41 個体 (83.3%) が別クローンと識別された。これは、同じ個体群をアイソザイム遺伝子座で識別した場合より高い識別率であった。

前述の13連鎖群とスギの染色体 ( $n=11$ ) との対応付けをはかるため、三倍体のスギ精英樹 2 個体から分離した 7 個体の 1 過剰染色体固体 (トリソミックス,  $2n=22+1$ ) を用い cDNA のサザン・ハイブリダイゼーションによる DNA バンドの濃度定量をした。すなわち、トリソミックスでは 1 本の過剰染色体に対応する連鎖群に属する cDNA と相補性を示すバンド数の変化あるいはバンド濃度が二倍体と比較すると 1.5 倍に増加することを指標として解析した。その結果、供試したトリソミックス 7 個体のうち、3 個体で第 5 連鎖群、1 個体で第 9 連鎖群、3 個体で第 10 連鎖群に対応する染色体がそれぞれ過剰になっていることを確認した。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、わが国の重要造林樹種のスギについて、遺伝・育種の研究および育種実行の基礎データをえるため、RFLP 検出法の確立と遺伝マーカーの探索、RFLP マーカーを利用した連鎖地図の作成、RFLP マーカーならびに連鎖地図の利用性およびトリソミックスの利用による連鎖群と座乗染色体との対応づけに関する 4 項目の研究結果をとりまとめたものである。従来、スギの主働遺伝子の遺伝分析は白子・黄子・淡緑色苗などの色素変異、針葉よれ・矮性の形態変異などで行われ、ついでアイソザイムで 20 遺伝子座が検出されたが、検出された遺伝子座数が少ないこと、当該形質の分離に係わる多数の 3 世代家系育成の困難性などのため本格的な連鎖地図は作成できなかった。本研究では、スギについて DNA の的確な単離法を確立し、324 個の DNA クローン (遺伝子座) をえた。これらの多数の RFLP マーカーをえたこと自体が大きな成果である。さらに、RFLP 116 座、RAPD 26 座、アイソザイム 2 座、矮性 1 座の合計 145 座で構成される 14 連鎖群と 6 連鎖対を同定することによって、91 遺伝子座からなる 13 連鎖群の遺伝子密度が比較的の高い連鎖地図を初めて作成した。また、作成した RFLP マーカーについて、それらの遺伝分離をスギ精英樹、在来さし木品種など 49 個体において確かめ、クローン同定、集団遺伝学解析にも適用できることを明らかにした。さらに、スギのトリソミックス個体について、1 過剰染色体と相同染色体の DNA 量をサザン・ハイブリダイゼーションの手法で定量し、3 連鎖群に対応したトリソミックスの過剰染色体を同定する成果をあげた。これらの RFLP マーカーの作成、RFLP 連鎖地図の作成と RFLP マーカーを利用した研究開発の成果は、わが国では初めてのもので、スギの遺伝および育種の研究の基礎ならびに応用の両面から高く評価されるものである。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。