

氏名(本籍)	おおしままさお 大嶋雅夫(埼玉県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第6128号		
学位授与年月日	平成24年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Study for the Regulating Mechanisms of the Structure and Inheritance of Two DNA Species, Main Genome and Plasmid, Present in Rapeseed Mitochondria (ナタネミトコンドリアに存在する2つのDNA分子種、メインゲノム及びプラスミドの構造と遺伝性の制御機構に関する研究)		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(農学)	半田裕一
副査	筑波大学教授	農学博士	奥野員敏
副査	筑波大学教授	農学博士	大澤良
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村達人

論文の内容の要旨

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー代謝に関わる重要な細胞内小器官の一つであり、核や葉緑体と同様に独自のゲノムDNAを保持している。しかし、ミトコンドリアの多くの機能は核ゲノムの制御下に置かれており、それは生理的な機能だけにとどまらず、ミトコンドリアゲノム自体の安定保持にも関わっている。本研究では、核遺伝子によるミトコンドリアDNA分子の安定性制御を明らかにするために、ナタネ (*Brassica napus* L.) を材料に、ミトコンドリアゲノムの組換え制御及びミトコンドリアプラスミドの父性遺伝制御という二つの視点から研究を実施した。

細胞質雄性不稔 (CMS) は機能のある花粉ができない形質で、一般的にその原因遺伝子はミトコンドリアに存在している。本研究では、ナタネ品種 Westar とコセナ CMS ダイコン (*Raphanus sativus* L.) との非対称細胞融合によって作られ、ダイコンから導入された CMS 原因遺伝子 *orf125* をミトコンドリアに保持している CMS ナタネ系統を用いた。CMS ナタネの *orf125* 周辺領域の配列解析の結果、*orf125* 周辺領域は 63 bp の反復配列を介し、*nad1C/ccmFN1* 領域と *orf125/orfB* 領域との組換えにより生じたことが明らかとなった。CMS ナタネ、コセナダイコン、ナタネを用いた詳細な配列比較により、CMS ナタネ中の *orf125* 領域は、コセナ CMS ダイコンが *orf125/orfB* 領域と *nad1C/ccmFN1* 領域の両方を保持しているのにもかかわらず、コセナダイコンの *orf125/orfB* 領域とナタネの *nad1C/ccmFN1* 領域との種間組換えからなることが示された。*orf125* 周辺領域には、63 bp 反復配列を含む隣接した3種の反復配列が見つかったが、互いに隣接しているにもかかわらず、異なる組換え活性をもっていることが明らかとなった。これらの結果は、ミトコンドリアゲノムの組換えは遺伝的、生理的な細胞状態に応じて、個々の反復配列で異なる制御が行われていることを示している。

ナタネ及び *B. rapa* の一部系統のミトコンドリアには、線状のプラスミド分子の存在が明らかとなっている。このプラスミドはミトコンドリアに存在するにもかかわらず、花粉を通した後代へ伝達するという特徴を

もっている。プラスミドの父性からの伝達率は、核ゲノム背景により異なることが知られており、プラスミドの後代への伝達や後代での安定性は、核遺伝子により制御されていることを示している。本研究では、父性からのプラスミド伝達率が異なる二つのナタネ品種、農林16号(78.8%)とWestar(27.5%)を用いて制御遺伝子に関するQTL解析を行った。F₁は60%の父性伝達率を示し、F₂では0%から100%、平均68.2%の伝達率を示した。遺伝子地図作成にはF₂集団102個体を用い、175個のマーカーにより22の連鎖群が得られ、それぞれナタネの19本の染色体に関連づけられた。遺伝子地図は1374.7 cMをカバーし、マーカー間平均距離は7.9 cMを示した。解析の結果、A5、C2、C9染色体に1つずつQTLが存在することが明らかとなり、それぞれ*qPpt1*、*qPpt2*、*qPpt3*と名付けた。それぞれのLOD値は4.97、3.45、3.35であり、寄与率は25.0%、22.2%、37.1%を示した。また、3つのQTL間に明らかなエピスタシスはみられなかった。これらの結果は、ミトコンドリアプラスミドの父性遺伝は独立した比較的少数の核遺伝子により制御されていることを示している。

本研究で得られた結果は、核とミトコンドリアの遺伝的な相互作用を理解するために有用であり、*orf125*領域の分子組換えの解析は核による組換え制御がこれまで考えられていたものよりも厳密なものであることを示し、また、プラスミドの父性遺伝に関与する3つのQTLが明らかとなり、プラスミドの父性遺伝という極めてユニークな特性を明らかにするための情報を与えた。

ミトコンドリアは重要な細胞機能を担う細胞内小器官であり、独自のゲノムをもつため、その機能改良には遺伝子導入が有効であると考えられている。しかし、ミトコンドリアゲノムの形質転換法はいまだ確立されていない。本研究の対象であるナタネミトコンドリアプラスミドは植物ミトコンドリア形質転換のツールとして、また、ミトコンドリア分子の組換え制御はミトコンドリアゲノムへのDNA分子の挿入制御法として利用が可能であり、ゲノム育種工学的な応用も期待できる。

審査の結果の要旨

本学位論文では、重要な細胞内小器官であるミトコンドリア中に存在するDNA分子に対する核ゲノムによる安定性制御の解明に取り組むとともに、ミトコンドリアゲノムに対する今後のゲノム育種工学的手法の開発について言及している。ミトコンドリアDNA分子の安定的な保持はミトコンドリアの機能維持のための重要な基盤であり、本論文は、ミトコンドリアゲノムの組換え制御とミトコンドリアプラスミドの父性遺伝性を通して核ゲノムによる制御機構を解明しようとし、特にプラスミドの父性遺伝性を制御するQTLを明らかにするなど、この分野に対して基礎的知見を与えた優れた研究成果であると評価した。また、これらの成果を基に、これまで積極的な遺伝的改良が行われてこなかったミトコンドリアに対するゲノム育種工学への可能性を切り拓き、オルガネラゲノムの改変による新たな育種技術開発へのシーズを提供した点を高く評価した。

平成24年1月26日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。