

氏名(本籍)	岡部佳弘(茨城県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第6129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	Development of a Mutant Library and Reverse Genetic Tool of the Model Tomato Variety Micro-Tom for Efficient Isolation of Novel Mutants (モデルトマト品種・マイクロトムの新規変異体を効率的に単離するための変異体ライブラリーと逆遺伝学的手法の開発)			
主査	筑波大学教授	博士(農学)	江面	浩
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
副査	筑波大学准教授	博士(生命科学)	浅水	恵理香

論文の内容の要旨

トマトは果実発達および成熟研究のモデルとして広く利用されており、それらの研究から多くの知見が得られている。現在、トマトのゲノム解読の大部分が完了し、データベースを通してそのゲノム情報を取得することが可能となっている。我々は、ゲノム解読後の機能ゲノミクス研究を推進することを目的として、矮性品種マイクロトムをトマト研究のモデル品種と位置づけ、EMSおよびガンマ線照射により誘発した変異体リソースの整備を行ってきた。TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) は、近年 EMS 等の化学変異原による突然変異誘発と点変異を検出するシステムを組み合わせた有効な逆遺伝学的ツールとして様々なモデル生物・作物種に広く適用されている。本研究ではマイクロトム EMS 変異体ライブラリーを用いた逆遺伝学的手法として TILLING プラットフォームを構築し、果実成熟に深く関連するエチレン受容体遺伝子の変異体スクリーニングを試み、分子育種の観点から構築したツールの有効性を評価した。

はじめに、0.5%および1.0%のEMS変異体リソース3052系統に由来するDNAプールを作製し、トマトエチレン受容体遺伝子(*SlETR1-SlETR6*)を含む10遺伝子についてTILLINGによるスクリーニングを行った。変異集団の変異誘発頻度は、EMS 0.5%および1.0%の集団において、それぞれ1/1710 kb、1/737 kbであり、全体では1/1237 kbと推定された。各標的遺伝子について1から6変異アレルが同定され、標的領域1 kbのスクリーニングあたり平均2.5変異アレルの獲得が可能であることを示し、マイクロトムのTILLINGプラットフォームが標的遺伝子の新規変異アレルを同定するために有効であることを明らかにした。

次に、トマトエチレン受容体遺伝子のスクリーニングにより同定した変異アレルの解析を通してTILLINGの有効性を評価した。同定した変異アレルの中で膜貫通領域にアミノ酸置換が存在する*SlETR1*の変異アレル2系統(*Sletr1-1*, *Sletr1-2*)について、エチレン関連表現型を詳細に解析した。各変異アレルにおけるエチレン応答を調べた結果、*Sletr1-1*は完全なエチレン非感受性を示すこと、*Sletr1-2*はその弱いアレルであることが明らかとなった。変異アレルとエチレン非感受性表現型の相関を確認するためにF₂集団を作出し、遺

伝解析を行った結果、共に優性形質として遺伝することが明らかになり、変異と表現型の間に相関が見られた。それらの果実の成熟特性は、エチレン感受性の程度に依存した表現型を示すとともに、野生型と比較して果実日持ち性が劇的に向上した。一方、果実のカロテノイド含量を測定した結果、*Sletr1-1*では、顕著なカロテノイド含量の減少が見られたが、*Sletr1-2*では野生型と同程度であった。これらのことより、*Sletr1-2*が果実日持ち性改良のための有望な育種素材であることが示唆された。従って、マイクロトムの TILLING プラットフォームが有用な育種素材を単離するための有効な手法であることが実証された。

最後に、*Sletr1-1* および *Sletr1-2* がエチレン非感受性を付与することを分子生物学的に確認するために、相補性試験を行った。各変異型エチレン受容体遺伝子を過剰発現する形質転換体を作成し、各遺伝子についてそれぞれ 2 および 3 系統の独立した形質転換体を解析した。T₁ 世代の形質転換体のエチレン感受性レベルは、*Sletr1-1* 形質転換体では変異体と同じく、2 系統の形質転換体は共に完全なエチレン非感受性を示した。対照的に *Sletr1-2* 形質転換体では、独立した 3 系統のエチレン感受性はバリエーションを示した。これにより、*Sletr1-1* および *Sletr1-2* が異なるレベルでエチレン非感受性を付与することが証明された。一方で、果実成熟表現型は、形質転換体のエチレン感受性レベルから予測されるものとは異なり、*Sletr1-1* および *Sletr1-2* の形質転換体は、すべて果実成熟の遅延を伴いオレンジ色果実を示した。形質転換体では、エチレン非感受性を付与する能力の異なる遺伝子を導入した場合でも、遺伝子型による果実成熟表現型の明確な差が現れないことが明らかになった。この結果からエチレン受容体を利用した果実日持ち性の分子育種において、表現型程度の多様な変異を生み出す点で、TILLING がより有効であることが示唆された。品種開発では、対象形質の変異を効率的に生み出すことが重要なポイントとなる。マイクロトム変異体ライブラリーと TILLING の利点を組合せた本研究は、従来の突然変異育種を効果的に活用した新たなトマト育種技術の一つになると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文では、果実の発達及び成熟研究の実験植物として優れた利用特性を有する矮性トマト品種マイクロトムにおいて TILLING により標的遺伝子の変異体を効率的に選抜するプラットフォームを開発し、さらに果実の重要形質に関連した変異体を実際に選抜・解析し、開発したプラットフォームのトマトの育種ツールとしての有効性を立証した。本研究で開発したマイクロトムの TILLING プラットフォームを活用することで、トマト機能ゲノミクス研究が急速に進展することが期待され、学術研究として極めて意義のある研究であると判断された。一方、果実成熟という果実発達に関連した重要形質の変異体が選抜できたことは、トマトの新たな育種ツールとしての可能性も示すことができ、技術開発としても重要な研究であると判断された。

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。