

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	蝦名 真澄
題 目	<p>ギニアグラス (<i>Panicum maximum</i> Jacq.) の遺伝的多様性ならびにアポミクシス形質に関する分子遺伝学的研究            (Molecular genetics study on genetic diversity and apomixis trait in guineagrass (<i>Panicum maximum</i> Jacq.))</p>
<p>ギニアグラスは暖地型イネ科牧草で最も収量性、品質および環境適応性に優れた牧草の1つである。我が国は先駆的な遺伝資源探索によって世界的にも充実したギニアグラスのコレクションを有している。また、有性生殖系統‘農一号’の開発により、新たな展開が望める状況となってきている。そのため、遺伝資源の遺伝的な背景を含めた特性を的確にとらえ、交配による優れた農業形質の集積を行っていくことが重要であると考えられる。まず、ギニアグラス遺伝資源の特性の解明および、農業利用上の主要特性として収量性と消化性について検討した。その結果、主要な品種と遺伝資源の系統関係が明らかとなり、ギニアグラスの収量性と消化性は相反する形質であることが示唆された。また、遺伝資源の遺伝的背景をより客観的にとらえるため SSR マーカーを開発し、ギニアグラスの遺伝的変異が近縁野草種や種内の倍数性の異なる有性生殖との自然交雑により変異が作出されているという仮説を裏付けた。</p> <p>ギニアグラスは農業上重要な牧草であると同時に、アポミクシスという育種学的に非常に重要でかつ興味深い特性を持っている。遺伝解析によってアポミクシスの責任遺伝子は優性主動遺伝子支配であることが示唆されていた。そのため、アポミクシスを対象とする分子遺伝的解析を行った。まず、アポミクシスの検定手法として未熟花を利用した細胞学的な判定技術が開発されていたが、熟練を要する技術であるため、RAPD 解析による簡易な後代検定法を開発した。ギニアグラスでは三倍体系統でアポミクシスが観察された事例は報告がなかったが、この簡便法を利用して三倍体系統のアポミクシス発現を確認した。RAPD の高い多型判別能が明らかとなったため、RAPD ならびに AFLP を用いたギニアグラスのアポミクシスを含む連鎖解析を行った。その結果、現在まで得られているアポミクシス連鎖マーカーのなかで、最も密度の高い、マーカー数の多い連鎖地図を作成することができた。さらに遺伝子単離に向けアポミクシスの大規模遺伝分離集団と BAC による物理地図の作成を試みた。最終的な目的遺伝子の単離には至っていないが、1cM 以内の近傍のアポミクシス連鎖マーカーを含む BAC スーパープールを特定することが可能となった。また、アポミクシスは遺伝的には優性主動遺伝子による制御であることが強く示唆されているが、機能的には未知の部分が多い。そのため、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的な探索を行った。その結果、系統別部位別にアポミクシス系統の未熟花特異的に発現していると考えられる 58 の遺伝子群を探索することができた。これらのうち、配列から機能が推定される遺伝子について、アポミクシス発現に至る遺伝子の役割を推定した。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Masumi Ebina
題 目	<p>Molecular genetics study on genetic diversity and apomixis trait in guineagrass (<i>Panicum maximum</i> Jacq.)            (ギニアグラス (<i>Panicum maximum</i> Jacq.) の遺伝的多様性ならびにアポミクシス形質に関する分子遺伝学的研究)</p>
<p>Guineagrass (<i>Panicum maximum</i> Jacq.) belonging to the family Poaceae, subfamily Panicoideae, and tribe Paniceae, forms an agamic complex with other two species, <i>P. infestum</i> Anders and <i>P. trichocladum</i> K. Schum. Guineagrass is one of the major forage grasses in tropical and semi-tropical regions because of its high productivity and forage quality. Guineagrass is also characterized as an apomictic species. Apomixis in guineagrass has been classified as gametophytic aposporous type. Recently, tetraploid sexual lines were generated through colchicine chromosome doubling method, in order to utilize them efficiently for breeding programs. Therefore, for the efficient improvement on guineagrass breeding, it is important to estimate the genetic relationships among accessions and to discriminate germplasms based on their genetic relatedness. The assessment of digestibility and several major characteristics were performed with genetic resources and cultivars of Guineagrass. Cluster analysis of the accessions was successfully performed with several major characteristics, indicating the relatedness of the genetic resources and major cultivars of Guineagrass. It was suggested that digestibility was ambivalence to forage productivity. Furthermore, in order to estimate the genetic relationships, simple sequence repeat (SSR) markers were developed and assessed to the genetic resources of Guineagrass. The wide distribution of the Guineagrass accessions strongly supports the assumption of intercrossing with the diploid sexual materials in natural habitat.</p> <p>Guineagrass is not only an important forage grass but also an interesting apomixis plant for epoch-making improvement of plant breeding technology. The inheritance of the apomixis gene has been observed as major dominant gene by crossing between a natural sexual tetraploid line and apomictic line. At first, an improvement of apomixis assay was performed with RAPD analysis using progeny test. Apomictic progeny displayed totally identical RAPD banding patterns, which clearly discriminated between the each apomictic line and each sexual plant. Three progeny of a triploid hybrid also had identical RAPD banding patterns, suggesting that the triploid hybrid was apomixis. On using the RAPD and AFLP analyses, a genetic linkage map of Guineagrass was constructed by using an intraspecific population developed from a cross between an obligate sexual autotetraploid cv. 'Noh PL 1' and an aposporous autotetraploid cv. 'Natsukaze'. The results provided an AFLP and RAPD-based linkage map of Guineagrass, as well as the identification of molecular tags strongly associated with the aposporous locus. In order to isolate of apomixis gene, a large scale segregation population of apomixis was constructed by same crossing method. Four AFLP markers discovered to be co-segregated also in the large scale population, indicating several flanking markers in at least 1 cM. BAC library were also constructed, and super-pools harboring of the co-segregated AFLP markers were identified. A microarray analysis for survey of apomixis embryo development was performed and 58 kinds of expressed genes were characterized. One of the characterized genes was expressed in only apomictic cv. 'Natsukaze' and cv. 'Natsuyutaka', never in sexual plants of cv. 'Noh PL 1'. A schematic hypothesis of the apomixis embryo development was constructed.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	蝦名 真澄
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川 本 康 博
	副査 鹿児島 大学 教授 富 永 茂 人
	副査 鹿児島 大学 教授 日 高 哲 志
	副査 佐賀 大学 教授 尾 野 喜 孝
	副査 佐賀 大学 准教授 鈴 木 章 弘
審査協力者	宮崎 大学 教授 明 石 良
題 目	ギニアグラス ( <i>Panicum maximum</i> Jacq.) の遺伝的多様性ならびにアポミクシス形質に関する分子遺伝学的研究 [Molecular genetics study on genetic diversity and apomixis trait in guineagrasses ( <i>Panicum maximum</i> Jacq.)]
<p>ギニアグラスは暖地型イネ科牧草の中でも収量性、品質および環境適応性に優れた牧草である。また、ギニアグラスはその生殖様式がアポミクシスであるため、育種学的に非常に特異な繁殖特性を有しており、その遺伝様式および関連する遺伝子の同定は育種開発を行う上で重要課題である。我が国では、先駆的な遺伝資源探索・収集が行われ、世界的にも充実した遺伝資源を有している。これまでに収集系統の中から、有性生殖系統を見出し、‘農一号’として品種育成を行い、本種における新たな育種法の展開が示された。しかしながら、収集された多くの系統の飼料特性等の農業的特性は十分に把握されておらず、また、遺伝的多様性についても評価されていない。</p> <p>本研究はギニアグラスを対象として、その遺伝資源における生育と飼料特性、さらにはギニアグラス由来のDNAマーカーを開発すると共に、それを用いて遺伝的多様性を評価し、育種学的見地から考察を行った。また、分子マーカーを用いて、アポミクシス遺伝子の連鎖解析を行い、本遺伝様式について調査し、分子遺伝学的観点から考察した。</p> <p>得られた結果は以下の通りである。</p> <p>1) 遺伝資源系統や交雑後代系統を用いて、消化率および形態特性を検討し、刈取り期の消化率</p>	

の減衰の原因は主に葉部割合の減少と穂の消化率の減衰によるものであること、消化率と収量性には形態特性からは逆相関があることを示し、併せて、遺伝資源の多様性と交雑による変異作出についても考察した。

2) ギニアグラスのSSRマーカーを開発し、77系統の遺伝資源の系統解析を行った結果、分子マーカーによる遺伝的多様性は原産地ごとに特徴づけられることを明らかにし、主成分解析によって既存品種の特徴を推察した。

3) これまでの熟練を必要とした未熟花を利用する細胞学的な観察によるアポミクシスの判定技術に替え、簡易なRAPD解析による後代検定法を開発し、これまでのギニアグラスにおいては観察されていなかった三倍体系統のアポミクシス発現についても確認した。

4) RAPD解析による高い多型判別能が明らかとなったことから、RAPDならびにAFLPを用いたギニアグラスのアポミクシスを含む連鎖解析を行った結果、360の分子マーカーによる1,700cMのギニアグラス連鎖地図を構築すると共に、第8連鎖群にアポミクシス遺伝子座を特定し、近傍を含めた24の分子マーカーを特定した。

5) 遺伝子単離に向け1,200個体からなるアポミクシスの大規模遺伝分離集団と45,000クローンからなるBACライブラリーを構築し、BACクローンによる物理地図の作成を試みた。その結果、1cM以内の近傍のアポミクシス連鎖マーカーが特定され、これらのマーカーを含むBACスーパープールを特定することを可能にした。

6) アポミクシスは遺伝的には優性主動遺伝子による制御であることが強く示唆されているが、機能的には未知の部分が多いため、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的な探索を行った。その結果、系統別部位別にみてアポミクシス系統の未熟花に特異的に発現していると考えられる58の遺伝子群を特定し、アポミクシス発現に関与する機能を推定した。

以上の結果から、本研究は遺伝資源および交雑育種による後代系統の特性比較とギニアグラスのDNAマーカーの開発、ならびにこれを基にした遺伝資源の系統解析、およびアポミクシスの簡易検定法の確立とアポミクシス連鎖地図の作成、さらにはアポミクシス遺伝子単離に向けた手法を開発すると共に、今後のギニアグラスにおける交雑育種の方向性を示した。

本研究の成果は、ギニアグラスにおけるDNAマーカーを用いた効率的な育種法の開発およびアポミクシス遺伝子単離の基盤研究となるものと考えられる。

このように、本論文はギニアグラス、さらにアポミクシスを有する数種の暖地型牧草の交配育種の展望および特定遺伝子の探索技術に関して貴重な新知見を提示したものであり、審査員一同は本論文が学位論文として十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	蝦名 真澄
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島 大学 教授 富永 茂人
	副査 鹿児島 大学 教授 日高 哲志
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 佐賀 大学 准教授 鈴木 章弘
審査協力者	宮崎 大学 教授 明石 良
実施年月日	平成 19年 8月 10日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答) (筆答)</span>	
<p>主査、副査並びに審査協力者の6名は、平成19年8月10日の公開審査会において、学位論文申請者に対し学位申請論文についての説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、筆記による外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	蝦名 真澄
[質問 1]	ギニアグラスのアポミクシス関連遺伝子として知られているASG1や、アラビドプシスで見つかっている単為発生遺伝子などと、本研究で得られたアポミクシス遺伝子座に座乗しているであろうアポミクシス遺伝子とはどのような関連性があるのか。また、どのように関連性を確認するのか。
[回答 1]	ギニアグラスのアポミクシス遺伝子との関係は、連鎖解析を通じて、これらの遺伝子または、高い相同性をもつ遺伝子が、同じ遺伝子座に座乗するかどうかを調べることで関連性を確認することができると考えられます。そのため、本研究で得られた連鎖解析の結果を用い、今後検討していく予定です。
[質問 2]	イネ科牧草のアポミクシスは、共通のメカニズムを持っていると考えられるのかどうか。また、イネ科だけでなく、他の植物でも共通のメカニズムを持っているのか。共通のメカニズムであると考えられるなら、それはなぜか。
[回答 2]	細胞学的な観察から得られている形態的見地からは、イネ科だけでなく他の科でも同様に高い共通性があると考えられます。これは、アポミクシスが藻類、コケ類、シダ類などの植物でも発見されていることから、起源の古い形質で、系統が分離してからもアポミクシスを保持し続けることが優位に働く系統には依然として存在し、有性生殖や栄養繁殖など他の繁殖特性が有利であった系統はアポミクシスを失ってしまったためだと考えられます。
[質問 3]	ギニアグラスではアポミクシスと有性生殖のどちらの成立年代が古いのか。また、アポミクシス系統を育種材料として利用する場合の妥当性を述べよ。
[回答 3]	原産地では有性生殖とアポミクシスが混在して自生している状況となっています。本研究で明らかにしたように、アポミクシス系統に広い遺伝的変異が確認されているので、一旦、有性生殖が優先し、広い地域に適応したギニアグラスが変異を広げ、何らかの原因でアポミクシスが優位に働く機作が生じたため、多くの遺伝資源系統がアポミクシスとなっていると考えられます。そのため、アポミクシス系統の遺伝的変異は育種材料として十分に幅広く、育種材料として適切なものであると考えられます。
[質問 4]	イネなどの遺伝子配列情報が詳しく検討されている材料とのシntenニーを利用して、アポミクシス遺伝子座について詳しい検討を行えないか。
[回答 4]	アポミクシスを持つ植物は遺伝解析が十分に進んでいない材料が多く、それぞれの種毎に遺伝解析が行われてきました。そのため、得られた遺伝情報をそのままイネなどの遺伝子情報として直ぐにシntenニー解析を行える情報は得られていません。また、イネやトウモロコシのマーカ―を利用して、連鎖解析している研究事例もありますが、アポミクシス遺伝子座付近に密度の高い情報が精度良く得られている状況ではありません。
[質問 5]	単離したBACクローンの現在までの状況を説明せよ。また、マイクロアレイで発現確認をした遺伝子をBACクローンから、再度単離し詳しい情報を得ること

はできないか。また、このような研究の世界的状況について紹介して欲しい。

[回答 5] 本研究で得られた情報をもとに行った最近の研究で、AFLP連鎖マーカーのうちで、2つのマーカーの配列を持っているBACクローンをFISH解析によって、染色体上に可視化して表示することができました。また、マイクロアレイを通じて単離した遺伝子については、現在、BACクローンからの再単離を目指し研究を行っているところです。APOSTARTやBBMとよばれるアポミクシスとの関連が示唆される幾つかの遺伝子について、世界的に同様の研究が行われています。

[質問 6] 暖地型牧草でアポミクシス形質を持つ種と持たない種を想定した場合、それぞれのグループ間に何らかの相違点があるか。

[回答 6] 想像の域を出ませんが、シバ型で匍匐形態を持つ暖地型牧草にはアポミクシス形質を併せ持つものが少ない傾向にあります。これは、匍匐して面積を覆い繁殖していく形態の種ではアポミクシス種子による繁殖のメリットが少ないからではないかと考えることができます。また、匍匐する種であっても、厳しい気候条件が繰り返されるような条件があった場合には、アポミクシス種子を埋没種子としておくことにメリットが生じるような場合もあるかと思えます。

[質問 7] 細胞学的な観察では染色体数は32となっており、本研究で得られている連鎖地図のグループは39となっている。連鎖地図の精度を含めて説明せよ。

[回答 7] 染色体上の部分的な連鎖関係のみしか地図にすることができなかった複数の領域があるため、染色体数より多くの連鎖地図となっています。より多くのマーカーを解析することで、32のグループの連鎖地図とすることは可能と考えられますが、アポミクシス遺伝子座の特定という観点から、十分な密度のマーカーが得られましたので、このような結果となっています。

[質問 9] 有性生殖との交配を通じて優良な形質をアポミクシスで固定することが可能となっている。また、本研究では優良形質の選抜についても方向性が示され、分子マーカーなどアポミクシスを判定するツールの開発も行うなど、多くの成果が上がっている。今後のギニアグラスの育種方向をこれらとの関連で述べよ。

[回答 9] 初期生育、耐湿性、サイレージ適性、採種性など本研究で取り上げた消化性と同様に育種改良していく必要の高い形質が数多く残されています。これらの育種目標を設定した場合、本研究の成果を生かし、さらにギニアグラスの育種を進めて参りたいと考えています。

[質問 10] ギニアグラスの遺伝子導入研究の現状を述べよ。

[回答 10] 残念ながら、効率的な遺伝子導入が可能な現状ではありません。遺伝子の機能確認のためにも必要不可欠な基本研究であり、現在培養適性の高いパニカム属の別種で検討しております。

[質問 11] ギニアグラスの突然変異誘導を利用した研究の現状を述べよ。

[回答 11] アポミクシス遺伝子のみならず、消化性や採種性の改良のためにも現在研究を進めています。本年度1,500個体のガンマ線照射M1世代を圃場に展開して解析を行っています。また、キク科のヒエラシウム属では新たな研究手法を開発した報告もあります。ギニアグラスではさらに遺伝子そのものに迫る解析を行いたいと考えています。