

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 SHEA DANIEL JOHN  
 学位 博士 ( 農学 )  
 学位記番号 新大院博 ( 農 ) 第 180 号  
 学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 博士論文名 Genome analysis of *Brassica* crops: The development of bioinformatic tools and materials, and their application to the characterization of response to cold treatment.  
 (ブラシカ作物のゲノム解析：バイオインフォマティクス・ツールと研究材料の開発および植物の低温処理反応解析への応用)

論文審査委員 主査 教授・岡崎 桂一  
 副査 教授・西村 実  
 副査 教授・伊藤 紀美子  
 副査 准教授・佐野 義孝  
 副査 助教・深井 英吾

博士論文の要旨

シロイヌナズナでは、花芽形成には一定期間の連続した低温に遭遇する必要がある、春化要求性という。植物体が低温に遭遇すると開花抑制遺伝子 *FLC* の発現が抑制され開花に至る。その後、生殖細胞系を経ると *FLC* の発現抑制はリセットされ次世代で再び発現するが、ブラシカ属作物の春化が同様な機構で行われているのかどうか不明である。ブラシカ属植物には種子春化(ハクサイ)と緑体春化(キャベツ)を示す種が同一属内、セイヨウナタネでは同一種内にあり春化機構を研究するうえで優れた材料である。そこで、本研究では種子春化型ハクサイ (*Brassica rapa*) × 緑体春化型キャベツ (*B. oleracea*) の交雑後代を用い、春化習性を決定する遺伝機構の解明を目的に実験を行った。

まず、*B. rapa* (A ゲノム) × *B. oleracea* (C ゲノム) の F1 に *B. rapa* を連続戻し交雑し、その後代における C ゲノム染色体の分離パターンを詳細に分析するとともに、種々の C ゲノム添加染色体を持つ後代植物の春化特性を調査し、どの C ゲノム染色体が *B. rapa* (A ゲノム) へ添加されると、春化特性が変化するか調査した。また、開花抑制遺伝子 *BrFLC2* を含む領域を *B. oleracea* の *BoFLC2* 領域に置き換えた *B. rapa* の異種染色体部分置換系統 (Chromosome Segment Substitution Line, CSSL) を作製した。*B. rapa* の子葉展開実生は 4 週および 8 週間の低温処理で開花に至るが、*BoFLC2* 領域を導入した *B. rapa* の CSSL の実生は、4 週間の処理では開花せず 8 週間の処理ではじめて花芽誘導できた。次に、*B. rapa* の CSSL の生育ステージと低温処理の関係を調査したところ、*B. rapa* の CSSL の春化特性は *B. oleracea* に匹敵するような age-dependent な緑体春化でなく、ハクサイとキャベツの中間型であることが示唆された。

親および *B. rapa* の CSSL の *FLC* の RT-qPCR の結果、*B. rapa* の CSSL では *FLC* は 4-8 週間の低温処理で下方制御されたが、*B. rapa* の CSSL の *BoFLC2* (移入交雑で置換されたもの) は 4 週間では一旦は下方制御されたものの、低温処理後の常温生育条件で再び発現が上昇した。一方、8 週間の低温処理では下方制御され、常温生育に戻した後も発現は上昇しなかった。この結果は、*B. rapa* の CSSL が 4 週間の低温処理で開花に至らず、開花には 8 週間の低温処理が必要であったことと符合した。4-8 週間の低温処理で開花しない *B. oleracea* の *BoFLC2* は、4, 8 週間の低温処理ともその後の常温栽培で再び発現が上昇

しており、*BoFLC2*が*B. oleracea*の緑体春化機構と関連していることが示唆された。これらの結果から、*B. rapa*へ*B. oleracea*の緑体春化機構を付与するには、*BoFLC2*に加え、協働して作用する他の分子メカニズムが必要であることが示唆された。

上記の研究では、*B. rapa* × *B. oleracea* の F1 に *B. rapa* を連続戻し交雑し、*BrFLC2* を含む領域を C ゲノムの *BoFLC2* 領域に置き換えた *B. rapa* (A ゲノム) の異種染色体部分置換系統 (CSSL) を育成した。CSSL の育成過程においては従来法では、異種置換ゲノム領域を同定するため、受容親と供与親より得たゲノム次世代シーケンサー (NGS) データ間のアライメント解析に基づき variant call を行い、リファレンスに対して相同性の低い領域を置換ゲノムとして決定する手間と時間がかかる煩雑な方法が必要であった。そこで、我々は、育成した CSSL の A ゲノム染色体のどこに C ゲノム染色体が移入されているか簡便に同定するため、シグナルプロセッシング技術を NGS データに適用することにより CSSL をスクリーニングするためのバイオインフォマティクスツールである“Intromap”を開発した。我々が開発した新規アルゴリズムを用いた“Intromap”ではコンピューターで自動計算ができ、かつ遺伝子移入領域の検出の精度を向上させることができる。

一方、品種間または近交系統間の一塩基多型をゲノム全体で解析するため、本研究では、市販一代雑種品種“W77”の両親系統の全ゲノムリシーケンス解析を行い、それぞれの親に存在する一塩基多型やインデルをゲノム全体で同定し分類するパイプラインを作成した。これを用いることで、両親系統において、それぞれ約 1,500 個の機能が喪失していると予測される遺伝子を同定した。

#### 審査結果の要旨

これまでにブラシカ作物の *FLC* 対立遺伝子を外来 *FLC* 対立遺伝子で置き換える異種染色体部分置換系統 (CSSL) を育成する試みはなかった。また、種子春化・緑体春化機構、すなわち juvenile-adult の相転換機構の分子メカニズムはどのようなものか明らかになっていない。このような中、A ゲノムバックグラウンドに C ゲノムの *FLC2* を導入した *B. rapa*-CSSL を育成し、その育成経過を詳細に報告するとともに、その系統の栽培特性および *FLC2* 遺伝子の発現解析を行った。これらの結果から、*B. rapa* へ *B. oleracea* の緑体春化機構を付与するには、*BoFLC2* に加え、協働して作用する他の分子メカニズムが必要であることを示したほか、ハクサイ (*B. rapa*) の冬期作型栽培において、従来のハクサイより花芽形成が遅い不時抽台しにくい新奇の育種材料を育成した。さらに、CSSL に移入された異種ゲノム領域を同定するバイオインフォマティクス・ツール“Intromap”を開発した。

以上、本研究は、春化機構を解析するうえで、有効な情報を与え、実際のハクサイの品種改良に新奇の育種素材を提供するなど有益な情報・材料を与えるものであった。また、NGS データの解析に有効なバイオインフォマティクス・ツールを新規に開発した。本論文の結果の一部は、BMC Genetics に 1 報、Breeding Science に 2 報受理されている。

よって、本論文は博士 (農学) の博士論文として十分であると認定した。