

氏名	SOBIR		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	学	術	
学位授与番号	博甲第2062号		
学位授与の日付	平成12年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Molecular genetical studies on the region surrounding the <i>Tm-2</i> locus in tomato (トマトの <i>Tm-2</i> 遺伝子座周辺領域の分子遺伝学的研究)		
論文審査委員	教授 本吉 總男	教授 野田 和彦	教授 玉田 哲男

学位論文内容の要旨

The present studies are divided into two parts; one aiming at providing most confidential DNA markers tightly linked to the *Tm-2* locus to use for breeding tomato for tomato mosaic virus resistance as well as molecular biological studies of the gene; and the other aiming at developing a method for finding a transcript from *Tm-2* locus.

DNA fragments of several RAPD markers tightly linked with the *Tm-2* locus in tomato were successfully cloned and sequenced. Then the 24-mer oligonucleotide primer pairs of the SCAR markers corresponding to the RAPD markers were designed based on the 5'-endmost sequences. A fragment of the same size corresponding to a SCAR marker was amplified in the ToMV-susceptible tomato line with no *Tm-2*, but the digests of the PCR fragments by *AccI* exhibited polymorphism in fragment length between the two lines. In this study three SCAR markers and three RAPD markers tightly linked to *Tm-2* locus were chosen and examined whether fragments of the same-size corresponding to these markers are present also in other three lines carrying *Tm-2a* or one of the other *Tm-2* alleles. The fragments homologous in nucleotide-sequence to the three SCAR markers were present in all of three lines, but the other markers (three RAPDs) were absent in one or two lines, suggesting that the three SCAR markers are closer to *Tm-2* than the other markers.

Using two near-isogenic tomato lines (NILs), one without *Tm-2* and the other with *Tm-2*, differential display was performed to identify cDNAs of the transcripts from the region surrounding the *Tm-2* locus. Among the 150 combinations of three anchor primers and fifty arbitrary primers, 10 combinations generated cDNA polymorphic bands. Out of them, only one combination exhibited restriction fragment length polymorphic band CA6, and a genetic experiment showed that the CA6 locus tightly linked to the *Tm-2* locus. The CA6 fragment also hybridized to genomic DNA fragments from a tomato line carrying *Tm-2a*, a line of *L. peruvianum* from which *Tm-2a* originated, and a tomato line carrying another *Tm-2*-like gene. A northern hybridization experiment suggested that the gene was constitutively transcribed. A part of the amino acid sequence deduced from the sequence of the CA6 fragment had high similarities to the corresponding parts of the kinase domains of human EDD1 and *Aquifex aeolicus* StpK, respectively, suggesting that the CA6 locus encodes a protein kinase.

論文審査結果の要旨

本研究はトマトの主要病原体であるトマトモザイクウイルス(ToMV)に対する抵抗性育種に最も有用な抵抗性遺伝子 *Tm-2* に関係するものであり、内容は2つの部分に分かれている。*Tm-2* 遺伝子座とその周辺 DNA 領域は、トマト属野生種 *Lycopersicon peruvianum* の染色体に由来する。したがって、あるトマト系統と *L. peruvianum* に由来する領域のみが異なる準同質系統間の DNA 配列多型の大部分はこの領域に存在する。このことを利用して、この領域を標識する多数の RAPD マーカーを同定されていた。しかし、RAPD マーカーは、検出が不安定であり、より信頼度の高いマーカーへの改良が望まれていた。本研究の第1部では、RAPD マーカーのいくつかを SCAR マーカーに変換し、また、他の *Tm-2* 型対立遺伝子 (いずれも *L. peruvianum* 由来) をもつトマト3系統におけるそれぞれの RAPD または SCAR マーカーの存在を検証するというユニークな方法で、*Tm-2* 遺伝子座に最も近接する SCAR マーカーを選び、上記各系統における相同配列の塩基配列の比較を行い、信頼度の高い3つの SCAR マーカーを得た。

第2部では、上記準同質2系統を用いて、転写産物の cDNA プールのディファレンシャルディスプレイを行い、多型が生じることを確認している。さらに、多型を示した cDNA 配列の一つについて、詳細な分析を行い、これが *Tm-2* 座と緊密に連鎖する遺伝子の転写産物に由来すること、一種のプロテインキナーゼをコードすることを確認し、この手法が *Tm-2* 自体およびその周辺の遺伝子単離に利用できる可能性を示した。

以上の研究成果は、今後トマトの ToMV 抵抗性と品質改良のための育種および抵抗性の分子遺伝的機構の研究に重要な手掛かりを与えるものであり、博士の学位に価するものと判定する。