

氏名	土屋 大
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第2718号
学位授与の日付	平成16年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Cytogenetic study of the mitotic chromosomes in <i>Cochliobolus heterostrophus</i> ( <i>Cochliobolus heterostrophus</i> 体細胞染色体の細胞遺伝学的研究)
論文審査委員	教授 多賀 正節    教授 鎌田 堯    教授 沓掛 和広

### 学位論文内容の要旨

近年、糸状菌で染色体の構造的、あるいは数的変異が高頻度で生じることが明らかになり、糸状菌ゲノムを研究する上で細胞遺伝学的なアプローチの必要性が高まってきた。しかし、糸状菌の染色体は微小であるために観察は困難であるとされ、その観察・解析手法は古典的手法を除けばほとんど確立されていないのが現状である。そこで、相互転座や過剰染色体などについて細胞遺伝学的に興味深い現象が知られ、菌類の遺伝学的研究のモデル材料でもあるトウモロコシごま葉枯病菌 *Cochliobolus heterostrophus* を材料に用い、特に体細胞染色体を対象とした新しい細胞遺伝学的実験手法の確立を試みた。

本研究では、基幹技術として、体細胞染色体の標本作製、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)、走査電子顕微鏡(SEM)の各手法を取り上げた。主要な結果は以下の通りである。1) 発芽管破裂法による染色体標本作製法を確立し、*Cochliobolus* 属菌の3種の染色体数を決定した。2) プラスミドクローンをプローブとしたFISHを確立し、体細胞分裂時のrDNA領域クロマチン構造の動的変化を明らかにした。さらに、染色体末端付近のRFLPマーカーを用いて染色体相互転座を細胞学的に明らかにした。3) 染色体ペインティング法を確立し、B染色体を細胞学的に検出した。また、パルスフィールドゲル電気泳動で同一バンドとして分離する染色体数を細胞学的に決定した。さらに、3色ペインティング法により、間期核内で各染色体が特定の領域内に存在することを確認した。4) fiber-FISH法を確立し、rDNA転写単位の高解像度解析を行うことにより、rDNA転写単位のコピー数を細胞学的に決定した。また、RFLPマーカー間の物理的距離の決定と未知のコスミドクローンのマッピングも実施した。5) 電解放射型SEM用の染色体試料作製法を確立し、糸状菌体細胞染色体を構成する主要なクロマチン繊維(30-50 nm)の存在を明らかにした。以上の手法のうち、fiber-FISHとSEMは酵母を含めて菌類では初めての適用例である。

ここで確立した体細胞染色体の観察・解析手法は、染色体構造変異や過剰染色体獲得による糸状菌のゲノム再編に関する細胞遺伝学的解析、さらに染色体内における転移因子やDNAメチル化部位の動態解析に有用である。また、コンティグの作成や、遺伝子またはマーカーの物理マッピングなどの分子遺伝学的な研究領域にも応用可能であり、本研究は糸状菌の細胞遺伝学の進展に大きく寄与すると考える。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は、糸状菌の細胞遺伝学のための新しい体細胞染色体観察・解析手法の確立を試みたものである。

著者は、基幹的手法として、体細胞染色体の標本作製法、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH)、走査電子顕微鏡(SEM)観察法の3手法を取り上げ、トウモロコシごま葉枯病菌 *Cochliobolus heterostrophus* を材料にして研究を行った。その結果、それらの手法を確立するとともに、核型や染色体構造に関する細胞遺伝学的新知見を得ることに成功した。特に、**fiber-FISH**法と**SEM**観察法については、糸状菌のみならず酵母類を含めた菌類全体でみても本研究が初めての適用例であり、その先進性は高く評価される。本論文で取り扱われている手法は、菌類の細胞遺伝学や分子遺伝学の分野の解析に有用であり、菌類遺伝学の発展に少なからず貢献するものと期待される。

本学位論文は、専攻する分子細胞学に関して筆者が博士号取得に値する学識を有することを十分示している。また、その成果は、海外の国際誌に5編の原著論文として発表されており、世界的なレベルで客観的評価に耐えうることは明らかである。

以上のことから、当学位審査委員会は当該論文が学位論文として合格に値する内容であると判断する。