

氏 名	曾 根 岳 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1065 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Molecular cytological analyses toward the clarification of the sex determination and differentiation mechanisms in a dioecious liverwort, <i>Marchantia polymorpha</i> L (雌雄異株苔類ゼニゴケの性決定・分化機構解明にむけた分子細胞学的解析)
	(主査)
論文調査委員	教授 大山莞爾 教授 佐藤文彦 教授 關谷次郎

論 文 内 容 の 要 旨

動物においては、性染色体による性決定のメカニズムが比較的良好に研究されているのに対して、明瞭な性染色体をもつ雌雄異株の植物が少ないこととも相まって、植物における性染色体による性決定のメカニズムの研究は遅れている。

本論文は、雌雄異株苔類ゼニゴケのX・Y性染色体がどちらも、半数体あたり9本の染色体のうち最も小さいことに着目し、細胞学的な観察により雌雄のゼニゴケの性染色体の定量的解析を行うとともに、ゼニゴケのY染色体由来のゲノムクローンを単離し、その一部の塩基配列を決定してY染色体の構造に関する考察を試みたものである。その主な内容は以下の通りである。

第1章では、雌雄の葉状体、長期間継代維持した雌雄の培養細胞と新たに脱分化させた雌雄葉状体由来の培養細胞の6系統を用いて、核ゲノムDNA量を測定し、ゼニゴケの半数体あたりのゲノムサイズが、植物としては比較的小さい約280Mbであると述べている。また、染色体観察の結果とリボソームRNA遺伝子のコピー数を測定した結果から、細胞の由来の違いによるゲノムサイズの変化は、染色体の倍加や異数化、繰り返し配列のコピー数の変化などにより、説明できることにも言及している。さらに、蛍光染色による各染色体の相対的DNA量の測定から、X染色体とY染色体のサイズはそれぞれ約10Mbと約5Mbであると決定し、現在知られている植物の性染色体としては最も小さい部類に属すると報告している。

第2章では、45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション法による解析と蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法による解析から、ゼニゴケでは45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子が同一領域に存在する可能性を述べている。また、塩基配列決定をおこない、ゼニゴケでは実際に45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子が同じ繰り返し単位にコードされていることを報告している。

第3章では、ゼニゴケの雌雄葉状体由来PAC (PI-derived artificial chromosome) ゲノムライブラリーを作製し、このライブラリーより雄ゲノムに特異的なクローンpMM4G7を単離している。また、pMM4G7がY染色体に由来することを蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法によって示している。さらに、このpMM4G7の40kbのインサートDNAの一部の塩基配列を決定し、500塩基対以上にわたり非常に高い相同性をもつ配列が、少なくとも6コピー存在していたと報告している。このことから、pMM4G7はY染色体に特異的な反復配列に富む領域のクローンであると考察している。また、pMM4G7から、STS (sequence tagged site) マーカーや制限酵素地図に基づいて重なりと考えられるクローンを複数選抜し、Y染色体の部分的コンティグマップを作製し、pMM4G7からのY染色体の染色体歩行が可能であると述べている。

論文審査の結果の要旨

多くの植物は、雄性生殖器官と雌性生殖器官を同一の個体にもつ雌雄同株であるが、メランドリウムやスイバなど明瞭な性染色体をもつ雌雄異株の植物も存在している。しかし、性染色体における性決定遺伝子が明らかになっている動物に対して、植物においては、性染色体による性決定に関わる具体的な遺伝子については未だに見つかっていない。本論文は、雌雄異株苔類ゼニゴケのX、Y性染色体がどちらも、半数体あたり9本の染色体のうち最も小さいことに着目し、細胞学的な観察により雌雄のゼニゴケの性染色体の定量的解析を行うとともに、ゼニゴケのY染色体由来のゲノムクローンを単離し、その一部の塩基配列を決定してY染色体の構造に関する考察を試みたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. フローサイトメトリー法により、核ゲノムDNA量の測定から、ゼニゴケの半数体あたりのゲノムサイズが約280Mbであることを明らかにした。
2. 蛍光染色法による各染色体の相対的DNA量の測定から、X染色体とY染色体のサイズはそれぞれ約10Mbと約5Mbであると決定し、現在知られている植物の性染色体としては最も小さい部類に属することを明らかにした。
3. 45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション法と蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法により、ゼニゴケでは45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子が同一領域に存在することを示した。さらに、塩基配列決定をおこない、ゼニゴケでは45SリボソームRNA遺伝子と5SリボソームRNA遺伝子が同じ繰り返し単位にコードされていることを明らかにした。
4. ゼニゴケの雌雄葉状体由来PACゲノムライブラリーを作製し、このライブラリーより雄ゲノムに特異的なクローンpMM4G7を単離した。さらに、pMM4G7がY染色体に由来することを蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法によって明らかにした。
5. pMM4G7の40kbのインサートDNAの一部分の塩基配列を決定し、内部に500塩基対以上にわたり非常に高い相同性をもつ配列が、少なくとも6コピー存在していたことから、pMM4G7がY特異的な反復配列に富む領域のクローンであることを明らかにした。
6. また、pMM4G7から、STSマーカーや制限酵素地図に基づいて重なりと考えられるクローンを複数選抜し、Y染色体の部分的コンティグマップを明らかにした。以上のように本論文は、雌雄異株苔類のゼニゴケの性染色体について、初めて蛍光染色法と顕微鏡観察に基づく細胞学的解析とクローニングと塩基配列決定による分子生物学的解析をしたものであり、特に約40kbという他の植物の性染色体研究では例を見ないほど長い性染色体特異的DNA断片を得ることに成功するなど、植物分子生物学、細胞生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。