

氏名	よし 吉	かわ 川	たけし 毅
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	農博第911号		
学位授与の日付	平成9年3月24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	農学研究科水産学専攻		
学位論文題目	渦鞭毛藻類における塩基性核タンパク質 HCc と葉緑体型フェレドキシンの遺伝子構造に関する研究		
論文調査委員	(主査) 教授 内田有恆	教授 中原紘之	教授 大山莞爾

論文内容の要旨

本論文は、赤潮原因種として、また麻痺性貝毒の産生種としての水産業の分野で重要視されている渦鞭毛藻類について、その塩基性核タンパク質 HCc および葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定を行い、渦鞭毛藻類の遺伝子構造ならびに分子系統に関して解析すると共に、渦鞭毛藻類の核構造、染色体構造、さらには葉緑体構造との関連性について考察したものである。

第二章において、渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* の塩基性核タンパク質 HCc をコードする遺伝子 *hcc1* の遺伝子構造について検討している。*C. cohnii* の全 DNA から PCR 法、inverse PCR 法を用いて *hcc1* を増幅し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列を既に報告のある cDNA の配列と比較することにより、*hcc1* が4ヶ所にイントロン様の介在配列を有すること、*hcc1* がゲノム DNA 上に複数コピー存在し、タンデムに並んで gene family を形成していることを明らかにした。*hcc1* のイントロンにはスプライセオソームイントロンで指摘されている保存性領域が認められない一方、エクソンとの境界領域にイントロンのスプライシングへの関与が予想される direct repeat の存在が確認された。このことから *hcc1* のイントロン構造が特殊であること、イントロンスプライシング機構が他の真核生物とは異なることを示した。また、プロモーター領域についてプロモーターモチーフ配列を検索した結果、真核生物に一般的に存在するボックス配列が認められず、プロモーター構造における *hcc1* の特殊性を指摘した。

第三章においては、葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列から見た渦鞭毛藻類の真核生物内における分子系統的位置と、葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子 *fedQ* の遺伝子構造、葉緑体へのタンパク質輸送シグナルであるトランジット配列について検討を行っている。*Peridinium* 属、*Alexandrium* 属、*Gonyaulax* 属の渦鞭毛藻類数種より PCR 法、TAIL-PCR 法を用いて *fedQ* を増幅し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列から予想されるアミノ酸配列を他の真核生物と比較することにより分子系統樹を構築した結果、渦鞭毛藻類は単独でクラスターを形成すること、渦鞭毛藻類がゼニゴケや一部の緑藻類と近縁であることを明らかにした。この結果は、リボゾーム RNA の塩基配列や葉緑体の色素組成によ

る分類とは異なるため、渦鞭毛藻類の進化的位置を決定するにはさらに多くの分子進化の指標を用いた解析の必要性をも指摘している。また、プロモーター領域についてプロモーターコンセンサス配列を検索した結果、ハウスキープ遺伝子に一般的に存在する GC ボックス様配列は認められたものの、真核生物に共通して見出されるモチーフは認められなかった。第二章での *hcc1* のプロモーター領域の解析の結果も含め、渦鞭毛藻類におけるプロモーター配列の特殊性は、渦鞭毛藻類の転写制御機構の特殊性、ひいては転写制御に関与しているとされる染色体高次構造の特殊性に由来する可能性を指摘している。また、葉緑体型フェレドキシンはその発現が光により制御されていることから、光転写制御に関与するシス因子を検索した。その結果、G ボックス、I ボックス、GATA ボックスが認められ、渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンが光による転写制御を受ける可能性が示された。更に、葉緑体型フェレドキシンを細胞質から葉緑体内へと輸送するためのシグナルであるトランジット配列について解析した結果、そのアミノ末端にシグナル配列が存在すること、トランジット配列のアミノ酸組成、疎水性プロフィールなどが他の真核生物とは異なる性状を示すことを明らかにしている。この特殊な構造は渦鞭毛藻類の葉緑体の起源が真核光合成生物であることによる葉緑体膜構造の特殊性に由来する可能性を指摘した。

以上、塩基性核タンパク質 HcC、葉緑体型フェレドキシンを用いた分子系統解析、遺伝子構造解析を行った。葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列からは渦鞭毛藻類と緑藻類が共通の祖先に由来することを示したが、リボゾーム RNA を指標にした分子系統樹からは渦鞭毛藻類が緑藻類よりはむしろアピコンプレクサや繊毛虫類と近縁であるという報告や、緑藻類、アピコンプレクサや繊毛虫類の何れも渦鞭毛藻類に見られるような特殊な遺伝子の高次構造を示さないという報告もあり、結論として、渦鞭毛藻類の進化系統関係を明確にするためには、遺伝子構造やより多くの遺伝子の塩基配列情報からの多面的な解析が必要であると指摘している。

論文審査の結果の要旨

渦鞭毛藻類は赤潮原因種、麻痺性貝毒産生種を含むことから、水産増養殖業において注目されている。また、その核構造、染色体構造が極めて特殊であることから、進化系統的位置についても議論されてきた。本論文は、渦鞭毛藻類の遺伝子構造と分子系統について明らかにし、核構造、染色体構造の特殊性との関連、さらには葉緑体構造について考察したものである。評価すべき点について以下に挙げる。

1. 渦鞭毛藻類数種から塩基性核タンパク質 HcC、葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子 *hcc1*、*fedQ* を PCR 法、inverse PCR 法、TAIL-PCR 法を用いて増幅し、その塩基配列を決定した。

2. *hcc1* の遺伝子構造について解析した結果、*hcc1* はゲノム DNA 上に複数コピー存在し、タンデムに並んで gene family を形成することを初めて明らかにした。また、4ヶ所にイントロン様介在配列の挿入が認められたが、その何れにも一般的な真核生物に認められるコンセンサス配列が存在しないことを示した。また、*hcc1*、*fedQ* 各遺伝子についてプロモーター領域の解析を行った結果、真核生物に共通なコンセンサスモチーフが認められないことも示し、このような特殊な遺伝子構造が染色体構造の特殊性に起因する可能性について指摘した。*fedQ* に関しては、光による転写制御に機能するシス因子様配列がプロモーター領域に確認され、渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンが光発現制御を受けている可能性を示し

た。

3. *fedQ* より推測される葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列を指標に、渦鞭毛藻類の進化系統について解析し、ゼニゴケと一部の緑藻類に近縁であることを示した。この結果は葉緑体の色素組成に基づく分類体系、リボゾーム RNA の塩基配列を指標にした分子系統樹とは異なるものであり、渦鞭毛藻類の進化系統関係に関してはより多くの遺伝子を用いた総合的な解析が必要であることを指摘した。

4. *fedQ* についてはさらに、葉緑体への移行シグナルであるトランジット配列を解析し、アミノ末端にシグナル配列が付加されていること、他の葉緑体タンパク質には認められない性状を有すること、またこれらの特性は、渦鞭毛藻類の葉緑体が光合成真核生物に起源を持つことに由来する、特異な膜構造に起因する可能性を指摘した。

以上のように、本論文は渦鞭毛藻類の遺伝子構造と分子進化系統の特殊性をタンパク質をコードする遺伝子を解析することにより明らかにした論文であり、海洋分子微生物学、海洋微生物生態学ならびに藻類学の発展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9年1月22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。