

(論文内容の要旨)

プラスチドは、光合成機能や多様な生体分子の代謝の場として植物を特徴づけるオルガネラである。プラスチドには、固有の DNA (ptDNA) と独自の遺伝子発現系が存在する。本研究では、陸上植物の発生や環境応答の基本システムをもつ苔類ゼニゴケを用いて、モデル植物としてのプラスチド分子遺伝学研究の技術的基盤の確立と、それに基づく ptDNA の遺伝と複製様式の解析を行った。

ゼニゴケ培養細胞と植物体の ptDNA を標的とする形質転換系を確立した。遺伝子導入と選抜条件の検討を行い、選抜培地からスクロースを除きプラスチドへの依存性を高めることによって、形質転換体の選抜効率を劇的に向上することを見出した。さらに、植物体のプラスチド形質転換体の獲得には線状の形質転換ベクターを導入することが有効であった。培養細胞では一般的なタバコの系と比較して形質転換効率が約 10 倍高かった。胞子から発芽させた幼植物体を用いた系では選抜直後にホモプラスティックな形質転換体の樹立が可能であった。

これらの技術基盤を用いて、ptDNA に組込んだ薬剤耐性遺伝子を指標に、ゼニゴケ ptDNA の遺伝様式を解析した。プラスチド形質転換体と野生株を交配した場合、ptDNA は雌性配偶子のみから遺伝し、ゼニゴケ ptDNA は母性遺伝することが示された。また、各組織や発生段階の ptDNA コピー数を定量した結果、父方 ptDNA は精子形成時にコピー数を激減し、受精後から胞子形成の間に完全に消失して、母性遺伝となることが示唆された。

ptDNA の遺伝や維持には、DNA の複製制御が重要である。ptDNA の複製機構を明らかにするため、塩基配列上の機能配列や複製中間体の解析を行った。増殖が盛んなゼニゴケ培養細胞から抽出した ptDNA 複製中間産物の構造を、中性アガロースゲル二次元電気泳動法で網羅的に解析した。その結果、培養細胞系の ptDNA 上には定位置で恒常的に機能する複製起点は存在しないこと、逆位反復配列 (IR) の内部に、SSC 側から進行する複製フォークの通過を特異的に妨げる複製フォーク障壁 (RFB) が存在することを見いだした。この RFB は rRNA 遺伝子オペロンの下流に位置し、真核生物の RFB と同様に、転写装置と複製装置の正面衝突の防止機能をもつ可能性がある。また、原核生物の環状 DNA は RFB に挟まれた領域で DNA 複製を終結させると考えられていることから、環状の ptDNA は不特定の位置から複製を開始し、RFB に挟まれた領域内で複製を終結するモデルを提唱した。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、苔類ゼニゴケの効率的なプラスチド形質転換系の確立、導入遺伝子を用いたプラスチドの遺伝情報の母性遺伝性の明示と過程の追跡、プラスチド DNA の複製過程における複製フォーク障壁 (RFB) の存在とシス配列の解析を行い、ゼニゴケをモデル植物とするプラスチドの分子遺伝学の基礎の確立と今後の研究領域の展望を示したものである。評価できる点は次の通りである。

1) ゼニゴケの高効率なプラスチド形質転換系を確立した。実験方法や選抜条件の綿密な検討を行い、選抜培地からの炭素源除去がプラスチド形質転換系統の選択圧を高めること、植物体の場合は線状の形質転換ベクターを導入することで形質転換効率を飛躍的に向上させることを見いだしている。なかでも、短期間でホモプラスティックな形質転換系統を確立できる実験系は、従来の高等植物で問題であった系統獲得までの時間を大幅に短縮する点で優れている。この研究の過程では、ゼニゴケの生殖成長移行条件を確立し、実験室条件下で胞子を大量に調製することを可能としている。また、未成熟葉状体を用いた直接 DNA 導入によって核形質転体を得る系も開発している。これらは ptDNA の遺伝と複製を研究する上で有効な系であることにとどまらない研究領域全体の発展へ大きな貢献をしたといえる。

2) プラスチド形質転換株と野生株の交配で得た胞子の薬剤耐性を指標として、ゼニゴケ ptDNA が母性遺伝することを明示した。また、精子形成段階で ptDNA コピー数が激減し、受精から胞子形成の間に父方の ptDNA が消失することで母性遺伝となることを示唆した。これによって雄性配偶子に精子をもつ植物の ptDNA 遺伝様式に関する知見が与えられた。

3) ゼニゴケ ptDNA の複製中間産物の構造を網羅的に解析した。これにより培養細胞系の ptDNA 複製起点や複製フォークの通過を阻害する RFB に関する知見を蓄積している。RFB が生じる領域のステムループ構造がシス配列として重要であることをプラスチド形質転換法による破壊株の解析から示唆している。環状の ptDNA がランダムあるいは複数の複製起点から複製を開始させ、RFB に挟まれた領域で複製を終結させる ptDNA の複製モデルが提唱された。

上記の内容のように、本論文で述べられた成果と研究領域への貢献は高く評価できるものであり、本論文は学位論文として価値があるものと認める。なお、平成 21 年 2 月 3 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、博士 (生命科学) の学位の授与に値する学力が十分あるものと認めた。