

氏名	やま おか しょう へい 山 岡 尚 平
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1352 号
学位授与の日付	平 成 15 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Molecular genetic analysis of a <i>Marchantia polymorpha</i> mutant with constitutive development of sexual organs (生殖器官を恒常的に形成するゼニゴケ変異体の分子遺伝学的解析)
論文調査委員	(主 査) 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

有性生殖器官の形成は、栄養生長から生殖生長への転換を意味し、陸上植物の生活環において最も重要な位置を占める現象のひとつである。種子植物の花芽形成については、その制御に関わる約80の遺伝子座と約40の遺伝子がこれまでに同定され、それらが複雑な制御ネットワークを構成していることが明らかにされている。一方、コケ、シダ植物の生殖器官形成の制御機構については、分子レベルでの知見はほとんど得られていない。

雌雄異株の苔類ゼニゴケは、適切な環境のもとで生殖器官を葉状体上に形成する。この形成に必要な環境因子として日長や光質などが過去の研究で報告されている。一方、定温、連続蛍光灯光による培養を行うと生殖器官は形成されることが観察されている。

本論文では、生殖生長への転換に関わるゼニゴケの変異体を単離し、変異表現型と遺伝的に連鎖するゲノム領域の構造解析を行うことを試みている。その主な内容は以下の通りである。

第1章では、生殖生長への転換に関わるゼニゴケの変異株の単離と解析について述べている。定温、連続蛍光灯光による培養では生殖器官が形成されないことから、パーティクルガン法によるタグ DNA の導入によって、この条件のもとでも生殖器官を形成する変異株 *hpt2040* を得ている。そしてこの変異体は環境条件によらず恒常的に生殖器官を形成することを示している。その生殖器官は野生株と同様の形態を示し、精子を形成し、これを用いた野生株雌株との交配実験で F<sub>1</sub> 世代株が得られることを明らかにして、*hpt2040* の稔性は正常であることを示している。また F<sub>1</sub> 子孫株のなかに雌生殖器官を恒常的に形成する株を見出し、*hpt2040* は雌雄両方の生殖器官形成に関わる変異であることを示している。以上の結果に基づき、*hpt2040* の変異は生殖器官の発生そのものに関わる変異ではなく、生殖生長への転換のみに関わる変異であることを指摘している。またこの変異は性染色体とは遺伝的に独立な常染色体上の変異であり、生殖生長への転換のメカニズムは雌雄で共通の部分があることを明らかにしている。さらに F<sub>1</sub> 子孫株の分離比から、この変異は 1 遺伝子座の変異によるものであることを示している。

第2章では、*hpt2040* の変異表現型と遺伝的に連鎖するゲノム領域の構造解析について述べている。タグ挿入変異体の場合、タグ DNA の挿入箇所近傍のゲノム領域の構造解析によって、変異の原因となった遺伝子を明らかにすることができると考えられる。ただしパーティクルガン法による導入では、タグ DNA の分断やマルチコピー化、また挿入箇所でのゲノム DNA の再構成を伴うことが知られている。そこで変異株 *hpt2040* のゲノム中のタグ DNA を調べ、挿入が複数であり、そのうちの近接した2つのタグ DNA 断片の挿入が変異表現型と関わっていることを示している。またゲノミックサザン解析により、この挿入のある領域が複雑なゲノム構造をもつことを示唆している。そして *hpt2040* のタグ DNA 挿入領域のゲノミッククローンを単離するとともにコンティグを作製し、この挿入領域について野生株とのゲノム構造の比較を行っている。その結果、この領域にはタグ DNA 断片の挿入とともに大規模なゲノム DNA の再構成が生じており、それに伴って3箇所ゲノム DNA の欠失が生じていることを明らかにしている。さらに F<sub>1</sub> 子孫株に対する連鎖解析を行い、この3箇

所の欠失は *hpt2040* の変異表現型と連鎖しており、これらの欠失の近傍領域が変異の原因となった遺伝子座に含まれることを示している。また RT-PCR 解析によりこれらの欠失部位に存在する遺伝子を探索し、野生株では3つの遺伝子が発現しており、それらが変異株では発現していないことを明らかにしている。またそのうちの2つについて転写産物の全長を明らかにし、それらが新奇遺伝子であることを示している。そして、これらの遺伝子の発現の喪失によって *hpt2040* の変異が生じていることが考えられることから、この変異は機能喪失 (loss-of-function) 型の変異であり、ゼニゴケの栄養生長から生殖生長への転換はこれらの遺伝子の1つ、もしくは複数によって抑制されているというモデルを提唱している。

## 論文審査の結果の要旨

生殖器官形成のタイミングを植物がいかに決めているかという問題は、生物学の極めて重要なテーマである。種子植物の花芽形成については、シロイヌナズナをモデルとして多数の遺伝子が同定されており、それらが複雑な制御経路を構成していることが明らかとなっている。しかしより単純な制御機構をもつモデル植物が必要であり、原始的なコケ植物に対する期待は大きい。本研究はゼニゴケを材料として、未開拓である形質転換系や遺伝学の基盤を開拓するとともに、生殖器官形成の制御機構の分子レベルでの解析に挑むものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 生殖器官を恒常的に形成する苔類ゼニゴケの変異株 *hpt2040* を単離している。*hpt2040* の形成する生殖器官は稔性をもっており、この変異は生殖器官の発生そのものには影響せず、生殖生長への転換の機構にのみ異常をもたらすものであることを明らかとした。
2. 交配実験により雌生殖器官を恒常的に形成する F<sub>1</sub> 子孫株が得られることから、この変異は雌雄両方の生殖器官形成に関わるものであることを示し、その制御経路の一部は雌雄共通であることを指摘した。また、この変異は常染色体上のものであると結論づけている。
3. さらに、交配実験により得られた F<sub>1</sub> 子孫株の表現型の分離比から、この変異は1遺伝子座の変異であることを推測した。
4. 変異株 *hpt2040* のゲノムの解析から、このゲノムにはタグ DNA が複数挿入されていることを明らかとしている。さらに、変異表現型に関わっている断片のみをもつ F<sub>1</sub> 子孫株を単離し、その解析をより単純化している。さらに、この F<sub>1</sub> 子孫株を用いて、タグ DNA 挿入領域をカバーするゲノミッククローンを変異株から単離している。野生株との比較から、この領域ではタグ DNA 断片の挿入とともに大規模なゲノム DNA の再構成とそれに伴う欠失が生じていることを明らかとしている。この結果は外来 DNA の挿入のメカニズムについて新たな知見をもたらしたものである。
5. タグ DNA 挿入により生じた変異のうち、3つの DNA 領域の欠失が変異表現型と連鎖していることを明らかとし、これらの欠失の近傍領域が変異の原因となった遺伝子座に含まれることを示している。
6. 欠失部位に対応する野生株の領域について遺伝子を探索し、3つの遺伝子の存在と、それらが変異株では発現していないことを明らかにしている。またそのうちの2つについて転写産物の全長を明らかとし、それらが新奇遺伝子であると結論づけている。

以上のように本論文は、コケ植物の栄養生長から生殖生長への転換について、その分子生物学的研究の端緒を開いたものであり、植物分子生物学、植物分子遺伝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のあるものと認める。

なお、平成15年2月18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。