

氏名	あおの なお き 青野直樹
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2627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	理学研究科化学専攻
学位論文題目	ボルボックスのミトコンドリアゲノムおよび有性生殖の進化に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 井上 丹 教授 伊藤 維昭 教授 藤井 紀子

論文内容の要旨

真核生物は細胞内小器官としてミトコンドリアを保有している。ミトコンドリア内には独自のDNAが存在し、ゲノムサイズが非常に小さいこと、生物種間で保持している遺伝子に大差のないことから、同DNAの比較による系統進化の研究が数多くなされている。ボルボックスと近縁であるクラミドモナスのミトコンドリアDNAは特徴的な構造を数多く含む。同様の性質が近縁のボルボックス目の生物にも伝わっていると考えられるため、申請者は、ボルボックスからミトコンドリアDNAを単離、塩基配列を解析し、ボルボックスのミトコンドリアDNAがどのように変化しているかを調べた。その結果、ミトコンドリアDNAにコードされると予想される遺伝子の一部を含む断片を9種類得た。それらにはセルフプライミングをおこなうイントロンの一部も含まれ、その中に配列の類似している palindromic repetitive element が異なるイントロン内で見つかった。そこでミトコンドリアDNA断片をさらに解析し、イントロン内のクラスターを構成している各エレメントに類似している palindromic repetitive element を多数確認した。また *V. carteri* の近縁種である *V. aureus* についても同様の解析を行い *V. aureus* と *V. carteri* が分岐する以前に *cob* 遺伝子内にグループIイントロンが挿入され、各生物に分岐した後にイントロン内に palindromic repetitive element が挿入されたことを示唆する結果を得た。

ボルボックスの雌の有性生殖個体が親の細胞外へと放出される時期には、精子との接合が可能であるとされており、特異的遺伝子が多く発現していると考えられる。申請者はこの時期に特有に発現するRNAを検出することを試みた。その結果有性生殖個体で発現量が増加していた6種の *SEF1*~6 (Sexual Female gene) を得、これらは性誘導時特異的に発現する遺伝子群であることを示した。また申請者は、性誘導因子の存在は *SEF* 遺伝子の発現そのものに必須ではなく性誘導因子の存在はおそらく転写活性を最大限に引き起こすのに必要、もしくはその後の転写産物の安定性に寄与していること、また、それらはおもに卵細胞内でのメカニズムであり、体細胞内では、胚発生で有性生殖個体が形成され、有性生殖特異的遺伝子発現のスイッチがONの状態になると性誘導因子は必要ないと考察した。また得られたcDNA断片の中に他の遺伝子と相同性のあるクローンが2種含まれていた。どちらもボルボックスでファミリーを形成しているECMの構成成分の一つである pherophorin と相同性があった。性誘導因子の各遺伝子発現に及ぼす影響に関する解析から、卵細胞は性誘導因子に感受性があるのに対し、体細胞では性誘導因子の影響はうけないことがあきらかである。しかしながら卵細胞は個体内部に留まっており、直接性誘導因子に接することはない。したがって有性生殖個体は性誘導因子の存在をなんらかのシグナルとして内部の卵細胞に伝える必要がある。そこで申請者は、各細胞間はECMで満たされていることから、このシグナルとしての機能を pherophorin が担っている可能性を指摘した。

論文審査の結果の要旨

現存するすべての生物は、共通の祖先から種分化をおこし、多様な生物界へと発展を遂げた。その中で高等生物へと進化するに至った重要な出来事として単細胞からの多細胞化とそれに伴う細胞の分化さらには生殖様式の変化がある。このよう

な生物の進化やそれに伴うゲノム構造の分子進化を研究する上で、クラミドモナス目、ボルボックス目に属する一群の緑藻類は興味深く、とくにボルボックスは個体としての進化、細胞内に含まれる分子の分子進化を研究する上で有用な生物である。

この生物のミトコンドリア DNA の研究は、この生物の分子進化について重要な情報を提供する可能性がある。しかし、申請者の研究以前に、このミトコンドリア DNA の分子進化を研究した例はなかった。そこで、申請者はボルボックスからミトコンドリア DNA を単離、その塩基配列を解析し、ボルボックスのミトコンドリア DNA がどのように変化しているかを調べた。その結果、ボルボックスのミトコンドリア DNA には、クラミドモナスにはみられない特殊なリピート構造が多存在することが明らかとなった。これらが触媒能を有するセルフスプライシングイントロン中に見いだされたことから、リピート構造は、ゲノムの組み換えだけではなく機能性 RNA 分子の進化にも関わっている可能性が示唆された。

申請者は、続いてボルボックス有性個体成熟がどのような分子メカニズムにより制御されているかを、あきらかにすることを目的に、分子レベルでの解析を、有性個体特異的遺伝子を単離、解析することによりおこなった。手法としては cDNA サブトラクション法を用いて濃縮したライブラリーを作製し、有性生殖個体特異的に発現している遺伝子のクローニングを試みた。その結果、申請者は 6 種類の新規遺伝子を単離することに成功し、それぞれが異なる発現様式を示すことをあきらかにした。また塩基配列解析の結果、ボルボックスの ECM 成分の一である pherophorin family に属するとみられる遺伝子の存在が示された。よって、この研究により、様々なタイプの pherophorin がボルボックスに存在し、その個体の進化に大きく関わっている可能性があることがあきらかとなった。

以上のことから、この申請論文は当該分野の研究の進展に寄与し、博士（理学）の学位論文として価値あるものと判定した。なお申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関する研究分野について試問し、合格と認めた。