

氏名	ふじ さわ まさ き 藤 澤 雅 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1278 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	Representational difference analysis for isolation of sex chromosome-specific DNA markers in a liverwort, <i>Marchantia polymorpha</i> (RDA 法を用いた苔類ゼニゴケ性染色体特異的 DNA マーカーの単離)
論文調査委員	(主 査) 教授 大山 莞爾 教授 佐藤 文彦 教授 廣瀬 正明

論 文 内 容 の 要 旨

生物が有性生殖を行う際には、個体あるいは生殖器官において性の決定および分化がなされる必要があり、雌雄異株型植物では、性染色体が雌性または雄性生殖器官分化の制御に重要な役割をもつことが示唆されている。しかし、植物では性染色体上に存在し、性決定および性分化を制御する遺伝子は未だ同定されていない。

苔類のゼニゴケは、雌雄生殖器官が別々の株に形成される雌雄異株型植物であり、また雄株は Y 染色体のみを、雌株は X 染色体のみを性染色体として有することから、性染色体上に性決定遺伝子の存在が示唆されている。既に、Y および X 染色体の一部については、Y 特異的の反復配列、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) がそれぞれ高度に蓄積した領域が存在することが報告されているが、その他の領域についての知見は得られていない。

本論文では、苔類ゼニゴケを性染色体ゲノム研究のモデル植物とし、その性染色体 X および Y に特異的な DNA マーカーの単離、および性染色体特異的 DNA マーカーの近傍領域について、その一次構造を明らかにすることを試みている。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、近縁の 2 個体間でのゲノム DNA の相違を検出する手法である representational difference analysis (RDA) 法を用いた、ゼニゴケ X および Y 染色体特異的 DNA マーカーの単離について述べられている。まず、RDA 法によりゼニゴケ雄株、雌株それぞれに特異的な制限酵素断片を選択的に増幅し、その中から遺伝学的解析により Y 染色体に特異的な断片を 6 個、X 染色体に特異的な断片を 2 個同定している。これらの断片についての塩基配列解析から、特に、X 染色体特異的な断片の一つ rbf62 は 5S リボソーム RNA 遺伝子を含んでおり、X 染色体に特有の rDNA 配列が存在することを示唆している。また、もう一つの X 染色体特異的な断片である rhf73 は、ゼニゴケ雌株の未熟生殖器官に由来する expressed sequence tag (EST) の配列を含み、X 染色体に特異的な配列をもつ遺伝子の存在を示している。さらに、Y 染色体特異的な断片 rbm27 を用いて、Y 染色体の一部について実際に物理地図を作製し、RDA 法により得た性染色体特異的な断片の DNA マーカーとしての有用性を示している。

第 2 章では、Y 染色体特異的な断片 rbm27 により選抜した PAC クローン PMM23-104E4 を用いて、Y 染色体特異的な反復配列の存在しない Y 染色体新規領域の構造、および rbm27 近傍領域の一次構造の解析について述べられている。蛍光 *in situ* hybridization (FISH) による染色体マッピングから、このクローンが Y 染色体上の新規領域に由来し、また、この新規領域は、X 染色体と共通する配列、およびゲノム中に散在する配列を含むことを明らかにしている。さらに、この散在配列は、レトロトランスポゾン様配列を含むことを示している。次に、pM23-104E4 の全塩基配列 (134kb) を決定し、Y 染色体に特異的な遺伝子 M104E4.1 を rbm27 近傍領域に見出している。さらに、この遺伝子が雄株生殖器官および葉状体の両方で発現を示すことを明らかにし、また高等植物やシダ植物の光屈性における青色光受容体 NPH1 に見られる LOV ドメインを含むタンパク質をコードすることを示している。

第 3 章では、ゼニゴケ X 染色体特異的な rDNA 反復単位同定、およびその進化について述べられている。第 1 章で単離

した X 染色体特異的断片 rbf62 をマーカーに用いて、ゼニゴケ雌株に存在する、X 染色体および常染色体の rDNA 反復単位を同定し、その比較から、X 染色体の rDNA 反復単位の一次構造上の特徴、および X 染色体特異的配列 X615 の存在を明らかにしている。この結果に基づき、X 染色体の rDNA 反復単位が、Y 染色体を含む他の染色体との組換えを行わないことによって、独自に進化し、常染色体のものとは異なる配列を有する反復単位として蓄積した可能性を指摘している。

論文審査の結果の要旨

性染色体を有する雌雄異株型植物では、個体の性は性染色体により遺伝的に決定されており、この性染色体上に生殖器官の性決定および性分化を制御する遺伝子の存在が示唆されている。しかし、植物における性決定・分化の分子機構に関わる遺伝子は、いずれの植物種においてもその単離には至っておらず、性決定・分化機構を理解するための、性染色体の一次構造についての説明が待たれている。

本論文では、雌雄異株型植物の一種であり、雌雄株で異なる性染色体を有する苔類のゼニゴケをモデルとして用い、性染色体の一次構造解析に向け、性染色体 X および Y のそれぞれに特異的な DNA マーカーの単離、性染色体新規領域の一次構造の特徴、DNA マーカー近傍領域に存在する性染色体上の遺伝子の単離、およびその構造についての説明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. RDA 法および遺伝学的解析により、Y 染色体に特異的な DNA 断片を 6 個、X 染色体に特異的な DNA 断片を 2 個単離・同定することに成功した。
2. X 染色体特異的断片 rbf62, rbf73 が、それぞれ 5S rRNA 遺伝子、ゼニゴケ雌株未熟生殖器官由来 EST 配列を含んでいることを示し、これらが X 染色体に特異的な配列をもつ遺伝子の一部であることを示した。
3. Y 染色体特異的断片の一つ rbm27 を用いて、Y 染色体の一部について、実際に物理地図を作製し、RDA 法により得た性染色体特異的断片が、DNA マーカーとして有用であることを証明した。
4. Y 染色体特異的断片 rbm27 により選抜した PAC クローン pMM23-104E4 が Y 染色体特異的反復配列領域以外の新規領域に由来することを示し、さらにこの新規領域が X 染色体と共通する配列、およびゲノム中に散在する配列を含むことを明らかにした。
5. PAC クローン pMM23-104E4 の全塩基配列 134kb を決定し、rbm27 近傍領域の Y 染色体一次構造を明らかにした。さらに、ゼニゴケゲノム中に散在する配列は、レトロトランスポゾン様配列を含むことを示した。
6. Y 染色体の rbm27 近傍領域から、Y 染色体に特異的であり、雄株生殖器官および葉状体の両方で発現を示す遺伝子 M104E4.1 を見出し、この遺伝子が高等植物やシダ植物の光屈性における青色光受容体 NPH1 に見られる、LOV ドメインを含むタンパク質をコードすることを示した。
7. ゼニゴケ雌株より、X 染色体の rDNA 単位の一次構造上の特徴を明らかにし、X 染色体 rDNA 単位が、他の染色体との組換えを行わないことによって、常染色体のものとは独自に進化し、異なる配列を有する単位として蓄積した可能性を示唆した。

以上のように本論文は、性染色体物理地図の作製手法の確立、および性染色体上の遺伝子の単離に成功しており、植物における性染色体についての理解を大幅に前進させたものであり、植物分子生物学、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14年2月21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。