

氏 名 ^{なが い じゅん いち} 長 井 純 一
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 農 博 第 1100 号
 学位授与の日付 平 成 12 年 3 月 23 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 農 芸 化 学 専 攻
 学位論文題目 Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from female-sexual-organ
 cDNA library of a liverwort, *Marchantia polymorpha*
 (ゼニゴケ雌性生殖器官 cDNA ライブラリーから得られた Expressed Sequence
 Tags (ESTs) の解析)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 大 山 莞 爾 教 授 關 谷 次 郎 教 授 佐 藤 文 彦

論 文 内 容 の 要 旨

近年、動物においては、性決定・分化の分子生物学的機構の解明が進み、それに関与している遺伝子も多数単離されている。しかしながら、植物においては、その性の表現形式が雌雄同花のものから雌雄異株のものまで非常に多様であることが大きな要因となり、性決定・分化に直接的に関わっている遺伝子はいまだ明らかになっていない。

ゼニゴケは、雌雄異株の半数体 ($N=9$) の苔類であり、常染色体と比較して非常に小さなサイズの雌雄異型の性染色体を有している。したがって、雌雄の遺伝子構成の違いは、雌雄の表現型の違いに直接的に反映されていることが期待できる。本論文は、ゼニゴケの形態学的な雌雄の差異は生殖器官にのみ観察されることに着目し、未熟雌性生殖器官特異的な遺伝子発現様式を明らかにするとともに、ゼニゴケの性分化・決定に関与している遺伝子の単離を試みたものである。その主な内容は、以下の通りである。

第1章では、未熟雌性生殖器官 cDNA ライブラリーより 970 クローンの EST (Expressed Sequence Tag) を単離し、その分類と解析を行っている。まず、全てのクローンの部分塩基配列を決定し、これらのクローンは塩基配列の重複しない 717 種の配列に分けられることを示している。そして、相同性検索を行った結果、そのうちの 219 種が植物由来の既知配列と、83 種が植物以外の生物由来の既知配列と有意な相同性を有していたと述べている。次に、既知配列と有意な相同性を示したクローンを予想される遺伝子の機能に基づき分類した結果、遺伝子の転写や翻訳に関わる遺伝子群の発現レベルが非常に高いことを明らかにし、未熟雌性生殖器官に特異的に見られる遺伝子発現様式について考察を行っている。また、特に 6 種類のクローンについては、他の生物で有性生殖に関与している遺伝子と高い相同性を示したという非常に興味深い事実を報告している。さらに、アミノ酸配列レベルと塩基配列レベルでの相同性の違いをもとにゼニゴケに遺伝子ファミリーが多数存在する可能性についても初めて言及している。すなわち、単離した EST クローンの中に 12 グループの遺伝子ファミリーを見出し、その中でも、*rbcs* (リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ小サブユニット) 遺伝子のファミリーを形成している 4 種の配列については 3' 非翻訳領域において配列に大きな違いあることを具体的に明らかにしている。加えて、翻訳領域が明瞭である 61 種の配列における 7,333 個のコドンの詳細な解析を行い、ゼニゴケ核ゲノムではコドン使用頻度に偏りがあることと、翻訳領域の GC 含量が 3' 非翻訳領域に比べて高いことを報告している。

第2章では、未熟雌性生殖器官で特異的に発現し、ゼニゴケの性分化・決定に関与している遺伝子の単離を試みている。まず、cDNA-RDA (cDNA Representational Difference Analysis) 法に基づく cDNA サブトラクション法を下等植物における組織特異的な遺伝子の単離に初めて応用し、葉状体 cDNA ライブラリーには存在せず未熟雌性生殖器官 cDNA ライブラリーにのみ存在する cDNA クローンを 3 種類単離したと述べている。そして、cDNA ドットハイブリダイゼーション法による遺伝子発現レベルの解析を行い、クローン pMF 001 は極微量だけ葉状体でも発現し、pMF 002 と pMF 003 は葉状体で

はほとんど発現していないことを報告している、また、これらのクローンの全塩基配列を決定して相同性検索を行い、その配列は既知配列に対して有意な相同性を示さない新奇なものであることを報告している。一方、RAP (RNA fingerprinting by Arbitrarily primed PCR) 法を用いた解析においては、未熟雌性生殖器官と葉状体の間で多型を示す遺伝子断片を多数検出しており、多くの未熟雌性生殖器官特異的な遺伝子が存在する可能性を明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

植物の性決定・分化に関与する遺伝子は、その性の表現形式が雌雄同花のものから雌雄異株のものまで非常に多様であることが大きな要因となり、いまだに単離されていない。ゼニゴケは、雌雄異株の半数体 ($N=9$) の苔類であり、常染色体と比較して非常に小さなサイズの雌雄異型の性染色体を有していることから、植物の性決定・分化の分子生物学的機構を解明するのに適している。本論文は、ゼニゴケの形態学的な雌雄の差異は生殖器官にのみ観察されることに着目し、未熟雌性生殖器官特異的な遺伝子発現様式を明らかにするとともに、ゼニゴケの性分化・決定に関与している遺伝子の単離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. ゼニゴケ未熟雌性生殖器官 cDNA ライブラリーより単離し部分塩基配列を決定した 970 クローンの EST の相同性検索を行った結果、これらのクローンは 717 種の配列に分けられ、そのうちの 219 種が植物由来の既知配列と、83 種が植物以外の生物由来の既知配列と有意な相同性を有していることを明らかにした。また、特に 6 種類のクローンは他生物で有性生殖に関与している遺伝子と高い相同性を示すことを明らかにした。さらに、既知配列と有意な相同性を示したクローンを予想される遺伝子の機能に基づき分類した結果、未熟雌性生殖器官特異的に見られる遺伝子発現様式を明らかにした。

2. 単離した EST クローンの中に 12 グループの遺伝子ファミリーを見出し、ゼニゴケに遺伝子ファミリーが多数存在する可能性を初めて示した。特に、*rbcS* 遺伝子のファミリーを形成する 4 種の配列について 3' 非翻訳領域において配列に大きな違いあることを明らかにした。

3. 翻訳領域が明瞭である 61 種の配列における 7,333 個のコドンの詳細な解析を行い、ゼニゴケ核ゲノムではコドン使用頻度に偏りがあることと翻訳領域の GC 含量が高いことを明らかにした。

4. cDNA-RDA 法に基づく cDNA サブトラクション法により未熟雌性生殖器官特異的に発現すると推測される cDNA クローンを 3 種類単離した。また、その塩基配列は既知配列に対して相同性を持たない新奇な配列であることを明らかにした。

5. RAP 法により未熟雌性生殖器官と葉状体の間で多型を示す遺伝子断片を多数検出し、多くの未熟雌性生殖器官特異的な遺伝子が存在する可能性を明らかにした。

以上のように、本論文はゼニゴケ未熟雌性生殖器官で発現している遺伝子について EST 解析、cDNA サブトラクション法、及び RAP 法により分子生物学的に解析したものであり、特に、970 クローンという多数の組織特異的な EST を下等植物で初めて単離し、解析するなど、植物分子生物学、植物細胞生物学に寄与するところが多い。

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12年1月20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。