

氏 名 清水 健太郎
 学位(専攻分野) 博士(理学)
 学位記番号 理博第2523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 理学研究科生物科学専攻
 学位論文題目 シロイヌナズナとその近縁種を用いた有性生殖の研究

論文調査委員 (主査) 教授 岡田 清孝 教授 西村 いくこ 助教授 荒木 崇

論文内容の要旨

植物の有性生殖の特徴は、半数体である配偶体が中心的な役割を果たすことである。被子植物では、花粉管ガイダンスによって、雄性配偶体である花粉管が長距離はなれた雌性配偶体まで誘引され、重複受精が起こる。有性生殖過程について、細胞レベルでの観察は長年の蓄積があるが、分子レベルでのメカニズムはほとんど分かっていない。そこで、分子遺伝学のモデル植物シロイヌナズナを用いて、配偶体と花粉管ガイダンスを中心に有性生殖過程を研究した。

第一部では、まず、雌性配偶体の突然変異体の単離法を開発した。突然変異体スクリーニングの基準に、さやの中で種子が半数になるという半不稔性を利用した。この結果、雌性配偶体発生に異常を示す突然変異体 *magatama* (*maa*) を4つ単離した。*maa3* 突然変異体雌性配偶体は、発生が遅延して極核の融合が起こらず、また核小体が小型であった。Inverse PCR 法で *MAA3* 遺伝子を単離したところ、出芽酵母の *Sen1* 遺伝子のシロイヌナズナにおけるオースログ4つのうちの1つであった。出芽酵母の *Sen1* 遺伝子産物は、様々な RNA の代謝に関わる RNA ヘリカーゼであり、欠損すると致死となる。植物の配偶体は半数体であるために遺伝子を1コピーしか持たず、生存に必要な遺伝子が欠損すると致死になると考えられる。*maa1* 雌性配偶体は、*maa3* と非常に類似していた。*maa2* 雌性配偶体は、発生が遅延し、核小体は逆に大型化していた。

第二部では、第一部で単離した *maa1*, *maa3* 突然変異体を利用して、花粉管ガイダンスの遺伝学的な解剖を行った。雌性配偶体の発生が遅延している *maa1*, *maa3* 突然変異体で花粉管の観察を行った。すると、花粉管は雌性配偶体へ向かって珠柄上を伸長していくが、珠孔に入る直前になって道を失ったかのようにランダムに迷走していた。また、突然変異体では、花粉管が二本誘導される率が上昇していた。雌性配偶体は花粉管を珠柄ガイダンスと珠孔ガイダンスの二段階で誘引し、ついで多精拒否を行うという単婚モデルを提唱した。野生型での花粉管経路の詳細な観察もこれを支持した。また、拡散性物質の濃度勾配による花粉管ガイダンスのメカニズムについて論じた。単婚モデルの多精拒否を進化生態学的に解釈すると、遺伝子の半数を共有して近縁度の高い雌性配偶体同士は、協力戦略を採っていると考えられる。

第三部では種間交配を行った。有性生殖の機能は、適切な雄を導くだけでなく、他種の雄を排除することにもあると考えられる。シロイヌナズナの近縁種を収集して分子系統樹を作成した。そして13種の花粉をシロイヌナズナの雌しべに交配し、ガイダンスや種子形成を調べた。すると、系統が遠いほど早い段階で拒絶されるという傾向が見つかった。特に、花粉管ガイダンス活性は、系統が離れるほど弱まっていた。このことは、花粉管ガイダンス分子が Ca^{2+} のような低分子であるという説よりも、動物のようにタンパク性の分子からなり、時間とともにアミノ酸置換が蓄積したことを示唆する。また、種間交配で珠柄ガイダンスと珠孔ガイダンスが種によって別々に影響を受けていることから、雌性配偶体は花粉管を二段階で誘引するという第二部の結論が支持された。系統と生殖隔離の段階に相関が見られることは、異所的種分化モデルに適合する。

第四部では、種間雑種を利用して、形態進化を起こした塩基配列変異を同定した。材料として、第三部の種間交配で F1 雑種を得ることができた *Arabidopsis lyrata* subsp. *kamchatica* (ミヤマハタザオ) と *Arabidopsis halleri* subsp. *gem-*

mifera (ハクサンハタザオ) を用いた。前者の Daisen 系統と、後者の Ohara 系統は葉面のトライコーンを欠く。F1 雑種を利用した種間での相補性検定により、*GL1* 遺伝子座の変異によって毛が喪失したことを示した。塩基配列を解析したところ、Ohara 系統では、アデニン 1 塩基の欠失によりフレームシフト突然変異が起きて遺伝子が破壊されていた。四倍体の Daisen 系統では、*GL1* 遺伝子が二つあるが、両者にフレームシフト突然変異があった。これらが形態進化を起こした DNA 変異そのものだと考えられる。これらに基づき、遺伝子重複と遺伝子喪失のダイナミクスによる多様性の進化について論じた。

論文審査の結果の要旨

本研究ではユニークな突然変異体単離法を確立し、雌性配偶体発生の突然変異体 *maa* を 4 つ単離した。また、*maa3* 突然変異体から原因遺伝子を単離した。従来の研究では、雌性配偶体発生の体系的な単離は行われておらず、原因遺伝子の単離されているものはわずかであった。有性生殖の中心的な器官である雌性配偶体に対し、シロイヌナズナを用いて分子遺伝学的な解析を行った点は評価に値する。

花粉管ガイダンスは、長年にわたり多くの研究者が取り組んできた問題だが、メカニズムは明らかになっておらず、走化性物質が存在するかどうかといったことなど論争が続いている点も多い。まず、野生型の花粉管の詳細な観察により、走化性物質が存在することを支持する結果を得た。また、単離した *maa* 突然変異体を利用することで、雌性配偶体が二段階の花粉管ガイダンスを行っていることを示した。また、雌性配偶体が二番目以降の花粉管を排除するという「多精拒否」を行うことを明らかにした。動物と同様に植物でも多精拒否が見られるというのは有性生殖を考える上で重要な知見である。近年になり、*in vitro* 花粉管ガイダンス型でも、雌性配偶体が花粉管ガイダンスを行っていること、また雌性配偶体が多精拒否を行っていることが支持された。本研究は多くの論文や総説で引用されている。

これまでモデル生物の近縁種を利用した研究は、ショウジョウバエやトウモロコシでしか進んでいなかった。本研究では、シロイヌナズナ近縁種を、東アジアに特有な種を含めて 13 種収集した。このユニークな材料を活かし、種間交配を行った。これにより、花粉管の誘引が二段階で行われていることを支持する結果を得た。また、雌性配偶体と花粉管が直接接してから相互作用という段階を同定した。この実験は、生殖隔離と種の問題についても重要な知見をもたらした。ユニークな材料で有性生殖に関する知見を深めたことは評価できる。

さらに、近縁種のうちミヤマハタザオとハクサンハタザオは、シロイヌナズナとの間に種間雑種が育つことを明らかにした。これを利用して、種間で分子遺伝学的な解析を行うことができる実験系を確立した。この手法を用いて、4 倍体であるミヤマハタザオの Daisen 系統でトライコーンが欠失しているのは、二つある *GL1* 遺伝子の両方にフレームシフト突然変異が入ったことによることを明らかにした。形態進化を起こした変異を塩基配列レベルで同定した初めての例である。

まとめると、本研究は、シロイヌナズナを利用して植物有性生殖の細胞・分子レベルの研究を開拓し、とくに花粉管ガイダンスについて多くの知見をもたらした。これらは今後の有性生殖の研究の礎になるものと期待される。

よって審査の結果、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認め、論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。