

氏 名	たけ なか みず き 竹 中 瑞 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1180 号
学位授与の日付	平成 13 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Isolation and analysis of a DNA-tagged mutant of <i>Marchantia polymorpha</i> with abnormal air chamber patterning (DNA タギングによるゼニゴケ気室形成パターン異常株の単離とその解析)
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

苔類の一種であるゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は最初の陸上植物と考えられており、葉緑体、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定されるなど、モデル植物として利用されてきた。しかし、他のモデル植物で行われているような、変異株を用いた遺伝子機能解析の例は報告されていなかった。その大きな理由の一つとしてゼニゴケでは形質転換系が確立されていなかった点が挙げられる。

本論文では、ゼニゴケにおいて形質転換系の確立、その手法を用いた DNA タギングによる形態変異株の単離、及び得られた変異株の解析を試みたものである。主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、パーティクルガンを用いてゼニゴケの葉状体に遺伝子を導入する方法を確立している。ハイグロマイシンを選択薬剤として用い、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (*hpt*) を利用している。薬剤耐性細胞の選抜を効率よく行うために液体培地、寒天培地の二段階で行っている。この際、ゼニゴケでは高等植物で薬剤耐性遺伝子を導入した細胞から植物体を再生させるために必要な植物ホルモン処理は、必要なかった。また導入した薬剤耐性遺伝子をもつプラスミドがゲノム中にランダムに挿入され、またその挿入は無性芽を経た子孫でも安定して保持されていることを示している。

第 2 章では、第 1 章で確立した形質転換法を用いて実際に 2100 系統の DNA タグラインを作成している。これらの DNA タグラインの中から著しく形態が異常になった株を複数単離している。この結果は、この方法で単離された遺伝子破壊株がゼニゴケの遺伝子機能解析の有望な素材であることを示している。

第 3 章では、植物の器官形成パターンに注目し、DNA タグラインから苔類に特有な器官である気室 (air chamber) の形成パターンが野生株と異なりモザイク状になる *ichimatsu* 変異株, *ich1*, を単離し、その解析を行っている。まず光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で *ich1* 株の葉状体表面を観察し、*ich1* 株では個々の気室は野生株と同様、正常に形成されているものの、その数及び形成パターンが異常になっていることを示している。またこの *ich1* 株ゲノム中への DNA タグの挿入が一ヶ所であることを示し、タグ挿入部分付近の約 8.5kb の塩基配列を決定している。決定した配列を既知の遺伝子配列と相同性検索を行い、この領域の一部に植物、動物、酵母で広く保存されているタンパク質と高い相同性をもつ遺伝子がコードされていることを明らかにしている。またこの遺伝子の cDNA の全塩基配列を決定し、この遺伝子が 7 つのエクソンからなることを示している。この遺伝子の予想される翻訳産物のアミノ酸配列には高い疎水性部位が多数存在することを示し、このタンパク質が膜タンパク質であることを示唆している。さらにノザン解析を行い、この遺伝子の発現が *ich1* 株では野生株に比べ著しく低下していることを明らかにしている。これらの結果に基づき、*ich1* 株の表現型とこの遺伝子の発現低下との関係を述べている。

論文審査の結果の要旨

ゼニゴケは植物の進化上重要な位置を占めている。ゼニゴケにおける様々な生命現象に関与する遺伝子の機能を解析することで植物機能に関する基本的分子機構を明らかにできると期待されるため、近年モデル植物として利用されている。しかし、形質転換系が確立されていなかったため、変異株を用いた遺伝子機能解析の例は報告されていない。本論文では変異株を用いた遺伝子機能解析に必要不可欠である形質転換系をゼニゴケで確立し、DNA タグgingによる変異株の単離、及びその変異株の変異原因遺伝子の解析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. ゼニゴケの形質転換系を確立した。薬剤による選抜を液体培地、寒天培地の二段階で行うことにより効率良く形質転換体を得られることを示した。また形質転換された植物体の再生には高等植物で必要な植物ホルモン処理は必要ないことを明らかにした。

2. ゼニゴケに導入したプラスミド DNA はゲノム中にランダムに挿入され、またその挿入は無性芽を経た子孫でも安定して保存されていることを明らかにした。このことによりこの形質転換法は DNA タグラインの作成に利用可能であることを示した。

3. 2100系統の DNA タグラインを作成した。また複数の形態異常株を単離した。DNA タグライン中の変異株を解析することで、ゼニゴケの遺伝子機能を明らかにすることが可能であることを示した。

4. ゼニゴケの気室形成パターン異常変異株 *ich1* を単離した。葉状体表面を観察し、個々の気室の形態は野生株と同じであるが、その形成パターンが異常になった変異株であることを示した。

5. 変異株のタグ DNA 挿入部位近傍には植物、動物、酵母で広く保存されている遺伝子配列と高い相同性をもつ遺伝子がコードされていることを示した。またこの遺伝子の cDNA 全長の配列を決定した。この遺伝子の翻訳産物は高い疎水性領域を多数保有することを示し、膜タンパク質である可能性を示唆した。また *ich1* 株におけるこの遺伝子の発現が野生株と比較して著しく低下していることを明らかにし、この遺伝子産物が野生株における正常な気室のパターン形成に関わっている可能性を示唆した。

以上のように本論文はゼニゴケの形質転換系を確立し、ゼニゴケにおいて変異株を用いた遺伝子機能解析を可能にしたものであり、植物分子生物学、植物分子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があるものと認める。

なお、平成13年2月14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。