

# 論文審査の結果の要旨

氏名 西村 芳樹

本論文は2章から構成され、第1章では1つの細胞から明らかにされた葉緑体 DNA の母性遺伝機構について、第2章では葉緑体母性遺伝の直接の担い手となるヌクレアーゼの生化学的解析について述べられている。

葉緑体やミトコンドリア遺伝子の母性遺伝現象は、ヒトを含む多くの動植物に共通する現象である。しかし現象の基盤となる分子機構に関しては、未だ殆ど明らかにされていない。本研究は、生活環が短く、遺伝学、分子生物学的解析に解析が容易な単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) をモデルとし、母性遺伝機構の解明を目標として進められた。

クラミドモナスでは、接合 50 分後における雄葉緑体核様体(雄葉緑体 DNA-蛋白質複合体)の消失が細胞学的に観察されてきた。しかし生化学的解析では、この時点において雄葉緑体 DNA の減少が検出されないことから、核様体消失の分子レベルでの意義は不明確であった。

第1章ではまず、サイバークリーン I 生体染色法を用いることで、生きた細胞における雄葉緑体核様体の消失過程を観察することに初めて成功した。その結果、個々の接合子における雄葉緑体核様体の消失が、開始から僅か 10 分ほどで完了する非常に急激な現象であることを明らかにした。

次に論文提出者は、細胞学的に観察される雄葉緑体核様体消失現象の分子解析に向けて、接合子の雌雄の葉緑体 DNA をパーティクルガンによる葉緑体形質転換法によって標識し、接合子の成熟に伴う雌雄の葉緑体 DNA の変化を分子レベルで追跡することを可能とした。更に、最新の光技術の一つである光ピンセット法を導入し、独自のマイクロチャンバーを用いて、狙った1個の細胞やオルガネラを選択的に試験管に回収する技術の開発に成功した。回収した僅か 1 個の細胞を分子解析するためには、超高感度の遺伝子検出法の開発が必要となった。この問題は、nested-PCRを応用することにより解決された。以上の一連の工夫の結果、論文提出者は細胞学的に観察した僅か一つの細胞を直接回収して分子解析に持ち込む「光ピンセット-遺伝子解析法」の確立に成功した。そしてこの技術を用いて、接合子における雌雄葉緑体 DNA の変化を、1 細胞から詳細に解析し、雄の葉緑体 DNA は葉緑体核様体の急激な消失に伴って完全に分解され、この時点において葉緑体の母性遺伝が決定付けられることを解明した。

第2章では、雄葉緑体 DNA の分解を引き起こし、母性遺伝の直接の担い手となるヌクレアーゼの解析が行われた。ヌクレアーゼの解析法としてまず用いられたのは、プラスミド分解法であった。この方法により、雌雄配偶子間でのヌクレアーゼ活性を比較したところ、カルシウムイオン存在下で雌配偶子により強いヌクレアーゼ活性が検出された。更に詳細な解析のために、SDS-PAGE によるヌクレアーゼ活性のゲル内アッセイ法が導入され、雌雄配偶子、接合子におけるヌクレアーゼ活性の比較が行われた。しかしこの実験では、雌雄配偶子間、あるいは接合子成熟過程における、い

かなるヌクレアーゼ活性の変化も検出されなかった。

SDS-PAGE によるゲル内アッセイ法は、蛋白質の変性、再生という過程を経るために、生体内におけるヌクレアーゼの活性化状態を正確に反映できていない可能性があった。そこで論文提出者は、新たに非変性条件でのヌクレアーゼ活性ゲル内アッセイ法を考案し、この手法により配偶子誘導、接合子成熟過程におけるヌクレアーゼ活性の変化を解析した。その結果、配偶子誘導と共に雌の細胞でのみ活性化され、接合子の成熟と共に不活性化されるという、非常に興味深い挙動を示すヌクレアーゼ活性(雌特異的ヌクレアーゼ)の検出に成功した。このヌクレアーゼは、その活性化、維持のために細胞核遺伝子の発現を必要とするものであり、従来の様々な阻害剤実験の結果を矛盾無く説明できるものであった。

さらに、接合子の葉緑体内における雌特異的ヌクレアーゼ活性の変化を検討するため、接合子からの葉緑体単離法が工夫された。新たに開発された葉緑体単離法は、エアブラシによって細胞を噴霧することで、非常に穏やかな細胞破碎を可能とするものであった。この手法によって、接合後の様々な時点で単離した葉緑体についてヌクレアーゼ活性の解析を行ったところ、接合 60—90 分後におけるヌクレアーゼ活性の上昇が認められた。この活性化の時期は、雄葉緑体核様体消失の時期と重なり、この雌特異的ヌクレアーゼ活性の母性遺伝への関与を濃厚に示唆するものであった。今後、変異株の解析、雌特異的ヌクレアーゼの精製などを通し、母性遺伝の分子機構を更に詳細に明らかにしていけるものと考えられる。

本研究を特徴付けるのは、研究の過程において生じた問題を解決するにあたっての、新技術導入への柔軟さと、新規開発能力の高さである。本研究の中で次々と生み出された技術の中には、「光ピンセット—遺伝子解析法」、「非変性条件でのゲル内アッセイ法」、「エアブラシ葉緑体単離法」など、医学・農学研究でも極めて応用性が高いと考えられるものがあり、今後の大きな発展が期待できる。

また、本研究の対象とされた受精前後におけるオルガネラ核様体の消失現象は、クラミドモナスに限らず、コケ、シダ、高等植物における雄性配偶子形成、更には哺乳類の精子形成においても観察される。本研究において得られた母性遺伝機構に関する知見は、真核生物全般の母性遺伝機構を理解していく上でも、非常に重要であると考えられる。

なお、本研究の第 1 章は、三角修己、東山哲也、松永幸大、横田明徳、黒岩常祥との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。