

論文審査の結果の要旨

氏名 三角 修己

本論文は3章から構成され、第1章はクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の形質転換体の作製と葉緑体核 (核様体) に関する突然変異体の単離、第2章は葉緑体核に関する変異株 *moc* の表現型の細胞学的解析、第3章ではその遺伝子の単離に向けた分子生物学的な解析について述べられている。

葉緑体は光合成を行う分化した色素体であり、独自の DNA を保持しながら半自立的に細胞内で分裂増殖している。しかしながら、その DNA の分配を伴う分列増殖の分子メカニズムや制御機構については未だ不明な点が多い。単細胞緑藻クラミドモナスは、二本の鞭毛を持ち、一つの細胞核、8-10 個程度の分散した葉緑体核と一つのピレノイドを含んだ葉緑体からなる単純な体裁で、その生活環において葉緑体核のダイナミックな動態が明瞭に観察できることから、植物細胞一般における葉緑体核の分散や分配の機構を解析するのに適したモデル生物であるといえる。更に近年、葉緑体やミトコンドリアに加え、細胞核の形質転換法 (タギング法) も確立し、遺伝学的、分子生物学的、生化学的手法をオルガネラの研究に応用できるのも大きな特徴である。葉緑体の遺伝情報の維持や機能発現の分子機構をその核に注目し、様々な手法が利用できるクラミドモナスを材料に用いて形質転換体を単離し、解析するという発想は、葉緑体のバイオジェネシスの研究においてこれまでにない独創性の高いものである。

第1章では蛍光色素 DAPI を用いて DNA を染色し、細胞を1つ1つ観察することによって多数の形質転換体を選抜し、そこで得られた様々な興味深い変異体に関する表現型の報告を行っている。およそ 8,000 の独立した形質転換体コロニーについて葉緑体核 (DNA) の形態や局在を検討した結果、新規に葉緑体核の形態に変異を持つ株を3種類7系統単離することに成功した。藻類・高等植物を含め、これまでに葉緑体遺伝子の複製・転写・分配が行われる葉緑体核に関する変異株については全く報告がないことから、これらの株を解析することによって葉緑体核の形態形成や複製・分配機構に関して新たな知見が得られるものと考えられる。

第2章では葉緑体核の分散や分配の機構を解析する為に、3種得られた葉緑体核の変異体の中でも葉緑体核が分散せずに1つにまとまった変異株5系統に注目し、*monokaryotic chloroplast (moc)* と名付け、細胞学的な解析を詳細に行っている。まず対数増殖期に経時的観察を行い、*moc* 株では細胞の分裂周期を通して葉緑体核の分散が認められず、葉緑体が分裂する際、1つの大きな葉緑体核が娘細胞にきわめて不均等に分配されるという現象を見出した。更に、同時に顕微測光装置を用いて葉緑体の DNA 量について定量を行い、野生株では娘葉緑体に葉緑体 DNA が約 40 コピーではほぼ均等に分配されるのに対して、*moc* 株ではおよそ 60 : 2.5、と

いうきわめて不均等な量で DNA が分配されることを明らかにした。この結果は、多くの植物の葉緑体に見られる葉緑体核の分散が、葉緑体 DNA の均等な分配に役割を果たしていることを示唆するものである。また興味深いことに *moc* 株では、増殖期において葉緑体 DNA の分配が少なかった細胞も次の分裂前までに活発に DNA の複製を行い、DNA 量を野生株と同等までに回復させることを見だし、光合成を行う葉緑体の機能維持には一定量（40 コピー程度）の葉緑体 DNA が必要なことも言及している。更に、これらの現象について電子顕微鏡観察を行い、その原因が葉緑体核と膜系との結合の異常であることを示唆している。次に DNA の複製活性が低下した定常期の細胞について観察を行い、*moc* 株では葉緑体 DNA の分配量が少ない細胞の老化が選択的に進行する現象を発見した。このことから、葉緑体 DNA の複製とその後の均等分配が植物の生存にとって非常に重要な意味を持つことが示された。

第3章では、遺伝子タギング法で得られた *moc* 株より、その原因となった遺伝子の単離を試みている。まず5系統の *moc* 株について親株との戻し交配を行い、表現型とタギングに用いた外来 DNA との連鎖を四分子解析で確認した。その結果、3系統では表現型と外来 DNA が連鎖していないことが判明したが、残りの連鎖が認められた2系統を用いて解析を進め、そのうちの1系統よりタギング領域を同定した。更に、野生株の BAC ライブラリーより原因遺伝子が含まれていると考えられるクローンを7つ単離し、制限酵素処理で共通する領域の塩基配列の解析並びに、各 BAC クローンによる変異体の相補実験を行った。その結果、共通領域上にはクラミドモナスの EST クローンと合致する2つの遺伝子が存在していることが明らかとなり、また、相補実験では少なくとも1つのクローンで表現型が相補されることが確認された。

本論文で葉緑体核の変異株として初めて単離された *moc* 株は、DNA の複製と分配を行い、分裂リングによって植物細胞内で絶えず増殖している葉緑体の核の分散と分配の分子機構を解明するのに適したモデルである。葉緑体は光合成により二酸化炭素を取り込み酸素を放出し、デンプンを合成するなど生物界にとっても重要な機能を果たしていることから、DNA の複製と分配を含めた葉緑体増殖機構の解明はきわめて重要な意味を持つ。更に、この *moc* 株を解析して得られた知見は、将来的にはオルガネラ工学などによる有用な植物細胞の産出に応用される可能性も考えられる。以上のことから、本論文は葉緑体の遺伝情報の伝達機構の視点から葉緑体の増殖の仕組みを考察した先導的な論文であると結論できる。

尚、本論文第2章は、鈴木玲奈、西村芳樹、酒井敦、河野重行、黒岩晴子、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実験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。

従って、博士（理学）の学位を授与出来ると認める。