

論文審査の結果の要旨

氏名 杉山 立志

本論文は3章からなり、第1章は、雌雄異株植物ヒロハノマンテマ(*Silene latifolia*)のBACライブラリーの構築とY染色体由来クローンのスクリーニング、第2章は、Y染色体由来クローン MS2-9d12 の塩基配列決定とORF解析について、第3章は、Y染色体上に存在するCCLS96.1 遺伝子について述べている。

雌雄異株植物のモデル植物としてヒロハノマンテマが用いられてきた。性決定に関わる遺伝子は発現解析から探索され、これまでに117の遺伝子が報告され、そのうち4つがY染色体上に存在していた。しかし、これら4つの遺伝子は雄花特異的な発現を示さず、相同な遺伝子がX染色体に存在し、性決定には関わっていない。本論文では、ヒロハノマンテマを用いて、BACライブラリーを構築し、Y染色体断片をスクリーニングすることで、直接、Y染色体上の遺伝子とその周辺構造について明らかにしている。

本論文で構築したBACライブラリーは32,640クローンからなり、全ゲノム情報の74%カバーしている。Y染色体マーカーを用いてライブラリーの一部をスクリーニングし、7つのY染色体由来クローンを同定した。7つのY染色体由来BACクローンをを用いたゲノミックサザン解析により、Y染色体特異的領域の含有率を評価した。すべてのクローンは雌雄に関係無くスメアなシグナルを示した。Y染色体STSマーカーの周辺領域であっても、X染色体・常染色体と共通な繰り返し配列を多数保持しているというY染色体の特色を明らかにした。

雌雄でシグナルの差を示した3クローンのうち、シグナル強度の差が雌雄で最も大きかったMS2-9d12Fクローンを選び、ショットガンシーケンス解析を行っている。およそ1,800リード、インサートの7倍のシーケンスを行い、109,500 bpの塩基配列を決定した。ヒロハノマンテマのY染色体の塩基配列決定としてこのような広い範囲を初めて明らかにした。ORF検索の結果、100アミノ酸残基以上連続するものは47個存在した。そのうち22個はレトロトランスポゾンの配列と高い相同性を示した。また3つのORF(ORF128a, ORF150, ORF211)は既存のORFとの相同性を示した。残りの22個は相同性を示さない。ORFについてPCRを用いて発現を確認した。雌雄の葉と蕾のmRNAを用いたRT-PCRの結果、発現を確認できたのはORF128a, ORF211, ORF223a, ORF347の4つであった。4つのORFはすべて、雌雄の葉と蕾で発現しており、ハウスキーピング的であることを明らかにした。発現を確認した4

つの ORF についてゲノミックサザン解析によってコピー数を検定した。ORF128a はゲノム内に 6 コピーあり、Y 特異的なシグナルは確認できていない。ORF211 は Y 特異的な 2 つのバンドと雌雄共通な 2 つのバンドが見られた。ORF223a と ORF347 は雌雄のゲノムにスメアなバンドがみられ多コピーであるが、雌雄の差は無かった。

MS2-9d12F クローンには、ORF 以外に、遺伝子断片としてサブトラクション法によって薬特異的に発現していると報告のある CCLS96.1 (Barbacar *et al.* 1997)が存在していた。CCLS96.1 は Nakao *et al.* (2002) によって報告されている 8 kb の Y 染色体断片にもコードされ、Y 染色体上で重複している可能性があった。一方、Y 染色体断片を用いたノザン解析と半定量的 RT-PCR 解析により CCLS96.1 は雌雄の葉でも発現していることを明らかにした。CCLS96.1 の全長を単離するため RACE 解析を行い、複数の発現産物があることを示した。全長を決定した 10 の CCLS96.1 は共通の ORF をもたず、内部領域に多数のストップコドンをもつ。CCLS96.1 はタンパク質をコードしていない non-coding RNA の可能性を明らかにし、さらに、ゲノミックサザン解析からゲノム内に多数 CCLS96.1 が存在することを明らかにしている。

本論文では、110 kb の Y 染色体断片を解析することで、Y 染色体上に存在する遺伝子の多くが、常染色体・X 染色体に相同な遺伝子をもつことを明らかにしている。ヒロハノマンテマの Y 染色体は進化的に新しく、X 染色体より 40%も大きいものの、遺伝子としては特異的な配列の獲得が進んでいないことを考察している。

なお、本論文第 3 章は、風間裕介・宮沢豊・松永幸大・河野重行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。