

論文審査の結果の要旨

氏名 加賀美 弥生

本論文は3章からなり、第1章はレーザースキャニングサイトメトリーによるゲノムサイズの定量、第2章はマイクロサテライト遺伝子座の単離、第3章は葉緑体ゲノムの多型を用いた葉緑体遺伝マーカーの作製と、葉緑体遺伝様式の解析、接合子の葉緑体核様体の蛍光顕微鏡観察について述べられている。

海産の大型緑色藻類であるアオサ属 (*Ulva*) は、有性生殖において、相補的交配型の+と-株の混合が必要であり、ヘテロタリックである。有性生殖様式は同形配偶性だが、種によっては異形配偶化の傾向があることが知られており、同形配偶から異形配偶への中段階階にいると考えられている。本論文提出者の加賀美弥生はアオサ属の一種 *Ulva compressa* (ヒラアオノリ) を用いて、配偶子の異形化の程度は、系統によって異なっており、配偶子の相対的な大きさの違いによる性の区別は、交配型の差異を表わす確実な指標とはならないこと、葉緑体 DNA (cpDNA) は交配型に依存して片親遺伝することを明らかにした。このことは、配偶子の大小によらず、cpDNA の遺伝によって性を定義できることを示しており、雌雄性の進化を解明するうえで極めて重要な知見である。

第1章ではヒラアオノリのゲノムサイズを、レーザースキャニングサイトメーター法を用いて調べている。愛媛系統 MGEC-1 配偶子の核と、ゲノムサイズが既知の酵母とシロイヌナズナの核を、ヨウ化プロピジウムで染色し蛍光量を比較することで測定した。ヒラアオノリのゲノムサイズは 135 Mbp で、ゲノムサイズが既知のアオサ属のなかで最も小さいことが示された。

第2章ではマイクロサテライトマーカーを単離している。(CA)₁₅, (CT)₁₅, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀ の4種のオリゴヌクレオチドを用いた選択的ハイブリダイゼーションによって、富マイクロサテライトライブラリを作成した。コロニーハイブリダイゼーションでのスクリーニングを経て、マイクロサテライトを含む配列を単離し、9個のマイクロサテライト遺伝子座を得た。続いて、愛媛、長崎、岩手で採集された6株の配偶体について多型を調べた。4遺伝子座では、マイクロサテライト長のみでなく、2箇所マイクロサテライトには含まれた配列の有無による、系統間・系統内での多型が見られた。得

られたマイクロサテライト遺伝子座には多様性があり、遺伝学的解析に有用であることが示唆された。

第3章では、愛媛と岩手で採集された、それぞれ相反する交配型の配偶体：愛媛由来の MGEC-1 (mating-type plus, mt^+) と MGEC-2 (mating-type minus, mt^-)、岩手由来の MGEC-5 (mt^+) と MGEC-6 (mt^-)を用いて、配偶子の雌雄性と葉緑体遺伝様式について調べている。これらの相対的な配偶子の大きさ（細胞の体積）はそれらの交配型に対応しておらず、MGEC-6 > MGEC-1 > MGEC-5 > MGEC-2であった。次に、葉緑体ゲノムの遺伝子群を標的とした PCR 法によって、愛媛系統と岩手系統を識別する 2 つのマーカーを見つけた。二つの系統間で配偶子を掛け合せ(MGEC-1 × MGEC-6 と MGEC-2 × MGEC-5)、マイクロサテライト遺伝子座での多型を利用した核マーカーによる検査を行って、それぞれ 42 個体、38 個体が孢子体であることを確認した。孢子体の葉緑体遺伝子型を調べると、どちらの掛け合わせでも、 mt^+ 配偶子と同じパターンを示した。このことから、cpDNA は片方の親から受け継がれ、それは配偶子の大きさではなく交配型に依存することがわかった。*Chlamydomonas reinhardtii* の定義に従って、ヒラアオノリの交配型は、 mt^+ が「葉緑体 DNA を子孫へ伝える側」、 mt^- が「伝えない側」と定義された。続いて、MGEC-1 と MGEC-2 を掛け合わせて、接合直後から 6 時間後まで、1 時間ごとに接合子を回収し、DNA 特異的蛍光色素 DAPI で DNA を染色して、葉緑体核様体の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、接合後 3-4 時間後の、6 %の接合子で、 mt^- の配偶子に由来する cpDNA が消失していた。遺伝マーカーの結果と、光学顕微鏡による接合子の観察結果から、 mt^- 配偶子の cpDNA の選択的な消化が、cpDNA の片親遺伝をもたらしている可能性が示唆された。

なお、本論文第1章は、藤下まり子、芹澤（松山）和世、山本真紀、桑野和可、嵯峨直恆、河野重行との共同研究、第2章は、新井達、茂木祐子、桑野和可、河野重行との共同研究、第3章は、茂木祐子、新井達、山本真望、桑野和可、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（生命科学）の学位を授与できると認める。