

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 シュラッタ ロイ

本論文は、葉緑体遺伝子の核ゲノムへの転移と置換について、2種の遺伝子(*rps16*, *rpl32*)に注目して、さまざまな植物種の核ゲノムおよび葉緑体ゲノムの構造と転写産物を比較することにより、進化の過程で起こった変化を示しメカニズムの一端を明らかにしたものである。

第1章では、緒言として細胞内共生説とオルガネラゲノムの進化に関するこれまでの知見を概説し、「葉緑体遺伝子の転移」および「葉緑体遺伝子の置換」が具体的な遺伝子を例にして定義されている。原始真核細胞に α プロテオバクテリアの祖先種が取り込まれ共生することでミトコンドリアを持つ真核細胞が成立し、その後さらにラン藻の祖先種が取り込まれて共生することで葉緑体となり植物細胞が成立した。進化の過程で、ラン藻が持っていた遺伝子の多くは葉緑体から脱落し、一部は原始真核細胞由来の遺伝子産物が葉緑体で機能するようになった。また、一部の葉緑体の遺伝子は核ゲノムに移行しその遺伝子産物が葉緑体に輸送されて機能するようになった。このように、葉緑体ゲノムから遺伝子が核ゲノムに移行し、葉緑体ゲノムからその遺伝子が欠失して「葉緑体遺伝子の転移」が完了する。また、核ゲノム上の原始真核細胞由来あるいはミトコンドリア由来のオルソログの産物が葉緑体で機能するようになり、対応する葉緑体ゲノム上の遺伝子が欠失することで、「葉緑体遺伝子の置換」が完了する。

第2章では、*Arabidopsis* 属およびその近縁種における *rps16* 遺伝子の置換について、比較ゲノム解析を中心とした研究結果が示されている。葉緑体のリボソームタンパク質 S16 をコードする遺伝子(cp *rps16*)は、多くの植物ではグループIIイントロンにより分割された2個のエクソンからなる遺伝子として葉緑体ゲノムに存在する。ところが、*Medicago truncatula* と *Populus alba* では、葉緑体ゲノムからは *rps16* が欠失し、ミトコンドリアから核ゲノムへ転移した *rps16* がミトコンドリアと葉緑体の双方に輸送され機能していることが報告された。イネおよびシロイヌナズナではミトコンドリア由来の核遺伝子の産物である RPS16 が同様に葉緑体へ輸送されているが、葉緑体ゲノムには *rps16* の配列が保持されていた。以上のことは、被子植物の種分化の早い段階でミトコンドリアから核に遺伝子転移した *rps16* の遺伝子産物が葉緑体でも機能するようになったが、葉緑体ゲノムに残った *rps16* は、種間でその存否に違いがあることを示していた。そこで、本研究では、シロイヌナズナを含む *Arabidopsis* 属とその近縁の19種の植物における葉緑体ゲノム上の *rps16* の構造の解析をおこなった。その結果、*Arabis hirsuta*, *Aethionema grandiflorum*, *Draba nemorosa*, *Lobularia maritima* の4種についてはコーディング配列内の塩基の欠失や第2エクソンの欠落、ストップコドンの挿入などの変異が認められ、偽遺伝子化していることが分かった。また、RT-PCR 産物と葉緑体ゲノムの塩基配列を調べたところ、*Arabidopsis thaliana*, *Olimarabidopsis. pumila* ではイントロンが正常にスプライシングされいないことが判明した。

これらの結果は、葉緑体遺伝子の置換に伴う葉緑体ゲノム上の *rps16* の偽遺伝子化が、*Arabidopsis* 属内で種ごとに独立して進んでおり、偽遺伝子化のメカニズムはコーディング配列の変異だけではなく、グループIIイントロンのスプライシング異常によっても起こりうることを示している。

第3章では、キントラノオ目に属する8種の植物種について、葉緑体リボソームタンパク質L32をコードする遺伝子(*rpl32*)の遺伝子転移の比較ゲノム解析が行われた。多くの植物では、*rpl32* は葉緑体ゲノム上の *ndhF* と *trnL* の間に座乗している。しかし、キントラノオ目に属する *Bruguiera gymnorrhiza*, *Populus alba*, *Populus trichocarpa* では、葉緑体ゲノムから核ゲノム上の Cu-Zn superoxide dismutase 遺伝子(*sod-1*)の第7イントロンに転移していることが先行研究により明らかとなっていた。*B. gymnorrhiza* では、この遺伝子はオルタナティブスプライシングにより機能的な SOD と RPL32 タンパク質が翻訳され、両者ともに葉緑体に輸送されている。また *P. alba* および *P. trichocarpa* では、転移した遺伝子が重複した後、エクソンの欠失を経て SOD, RPL32 をコードする遺伝子がそれぞれ分化したと考えられていた。本研究では、キントラノオ目の他の8種の植物 (*Passiflora citrina*, *Euphorbia sieboldiana*, *Calophyllum inophyllum*, *Acalypha hispida*, *Hypericum erectum*, *Viola mandshurica*, *Manihot esculenta*, *Ochna serrulata*) について、核ゲノムおよび葉緑体ゲノム上の *rpl32* のゲノム配列を比較するとともに、それらの転写産物を解析した。*O. serrulata*, *H. erectum*, *E. sieboldiana* の3種は、*P. alba* や *P. trichocarpa* と同様に、葉緑体ゲノムから遺伝子が完全に脱落していた。一方、*C. inophyllum*, *M. esculenta*, *V. mandshurica*, *P. citrina* は、葉緑体ゲノムに *rpl32* 配列を保持していた。ただし、*V. mandshurica*, *P. citrina* の2種については、ゲノム配列内に塩基置換や欠失挿入が認められ、偽遺伝子化していた。核ゲノム側の *rpl32* についても同様の比較をおこなった。その結果、調べられたすべての種において、*sod-1* の第7イントロンへの挿入とオルタナティブスプライシングによる転写産物が確認された。また、*C. inophyllum*, *E. sieboldiana* では、遺伝子が重複しており、*C. inophyllum* の片方のコピーは偽遺伝子化していた。さらに、*M. esculenta* では、オルタナティブスプライシングに異常が認められ、機能的な RPL32 が翻訳されないことが示唆された。以上の結果から、以下のことが推察された。キントラノオ目の共通祖先において、*rpl32* は葉緑体ゲノムから核の *sod-1* の第7イントロンに移行し、オルタナティブスプライシングによって機能的な RPL32 が産生されるようになった。その後、*rpl32* の挿入を持つ *sod-1* の重複と偽遺伝子化あるいは機能分化がそれぞれの種で起こり、それに対応して葉緑体側に残された *rpl32* 配列の偽遺伝子化や脱落が起こった。*M. esculenta* においては、核側で機能的に発現していた *rpl32* がオルタナティブスプライシングの異常によって機能を失い、葉緑体ゲノム上に無傷のまま残存していた *rpl32* に依存することとなった。*M. esculenta* は、結果的には祖先型の構成に戻ったことになる。

以上要するに、本論文は葉緑体遺伝子の転移および置換が現在も種ごとに独立して進行中であり、スプライシング異常が偽遺伝子化のメカニズムになりうること、また、遺伝子転移および置換には想像されていた以上の時間を要することを明らかにした。これらの知見は、作物ゲノムの進化や環境適応機構を解明するための基盤となることから、学術的価値が高い。したがって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。