

海産紅藻スサビノリ (紅色植物門、ウシケノリ目) の オルガネラゲノムの遺伝に関する分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、紅色植物門 (Rhodophyta)、紅藻綱 (Rhodophyceae)、原始紅藻亜綱 (Bangiophycidea)、ウシケノリ目 (Bangiales)、ウシケノリ科 (Bangiaceae)、アマノリ属 (*Porphyra*) に属する海藻である。スサビノリの生活環は室内培養において、2~3ヶ月の短期間で完結され、染色体数は3本 ($n=3$) と少なく、ゲノムサイズも 260 Mbp と比較的小さい。さらに、アクチンや elongation factor 1 α (*EFl* α) 遺伝子等の発現解析のスタンダードとして用いることのできる遺伝子の塩基配列も決定されている。また、EST 情報の収集とそれを用いた配偶体と孢子体における遺伝子発現プロファイルの比較、Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) マーカーを用いた DNA 多型解析、一過性遺伝子発現システムの構築や酵母の栄養要求株を用いた相補性解析も行われるなど、分子生物学における基盤技術の構築が進められている。以上のことから、スサビノリは、産業種としてだけでなく、海洋のモデル植物としても注目されている。

産業的には、定着性、多収性、栄養繁殖性、病害抵抗性、早晩性のような産業的に重要な形質を制御する分子機構の解明は、アマノリ属の研究における重要課題である。一部の農産物 (トウモロコシ、ダイズ、イネなど) においては、上に述べたような形質と葉緑体やミトコンドリア (以下オルガネラ) との相互関係に焦点をあてた研究がなされているが、藻類、特に紅藻類に関しては、形態学的な研究は十分に行われている一方で、分子生物学的手法を用いた研究は非常に少ない。これは、主に分子遺伝学的解析を行う上で必須な、適度な遺伝距離と交雑可能という両条件を満たす株がこれまで得られなかったことに起因する。以前、筆者が所属する研究グループは TU-2 (緑色変異型) と KGJ (野生型) と名づけた日本と韓国のスサビノリ株を用いて両者の交雑実験を行い、交雑糸状体を得ることに成功した。そこで、本研究ではこれらの糸状体を用いて、CAPS 解析により、ミトコンドリアと葉緑体の両オルガネラゲノムの遺伝様式を解析した。材料としては TU-2 株を母方、KGJ 株を父方の親株とした交雑実験で得られた 44 個の糸状体コロニーを用いた。

まず、分子マーカーを作成するため、両オルガネラのゲノムの配列の一部を比較し、CAPS マーカーとして使える多型の検出を行った。その結果、葉緑体ゲノムにおいては、carbonyl phosphate synthase small subunit gene (*carA*) の断片を *Apa*I で、また、ミトコンドリアゲノムにおいては ribosomal protein S11 gene (*rps11*) と small subunit ribosomal RNA gene (*rns*) の間のスペーサー領域を *Dra*I でそれぞれ消化することにより、CAPS マーカーとして用いることができることがわかった。これらのマーカーを用いて前述の 44 糸状体コロニーからゲノム DNA を抽出し、解析を行ったところ、葉緑体とミトコンドリアの DNA マーカーのパターンは完全に一致し（すなわち、葉緑体が母型のパターンを示したものは、ミトコンドリアでも母型のパターンが確認された）、38 個の糸状体コロニー (86.4%) は母型 (TU-2 型) のパターンを、5 コロニー (11.4%; コロニー番号#3, 5, 14, 25, 27) は両親型のパターンを、1 コロニー (2.2%; コロニー番号#48) は父型 (KGJ 型) のパターンを示した。以上の結果から、スサビノリでは、葉緑体、ミトコンドリアとも母性遺伝する可能性が高いことが示された。また、前述の両親型のパターンを示した 5 コロニーに関しては、KGJ の自家受精糸状体の混入が推測された。また、父型のパターンを示した 1 コロニーに関しては、実験の操作中に偶発的に逆の組み合わせの配偶子による交雑糸状体、つまり TU-2 の精子が KGJ の造果器と受精したものが混入していることが示唆された。

これらの結果を受け、次に、両親型と父型の遺伝パターンを示した 6 糸状体コロニーから糸状体断片を単離・培養し、DNA の抽出後核・葉緑体・ミトコンドリアの 3 種類の CAPS マーカーを用いて再度解析を行った。その結果、オルガネラにおいて母型のパターンを示したものはコロニー番号#3 番の糸状体断片では 10 個の糸状体断片中 9 個、#14 番の糸状体断片では 15 個中 8 個、#27 番糸状体断片では 10 個すべてであった。これらのゲノムはすべてヘテロ (両親型) であった。一方、#3, #14, #27 番の残りの糸状体、および、#5 番、#25 番、#48 番のすべての糸状体断片は父型のパターンを示した。これらについても同様に核の分子マーカーを用いて CAPS を行ったが、すべて父型のパターンが得られ、KGJ 株が自家受精した糸状体であることが示された。これらの結果を総合すると、核の DNA マーカーにおいて両親型のバンドパターンを示したものは母型のオルガネラを持っているものに限られていた。以上のことから、スサビノリの両オルガネラは母性遺伝することが明らかになった。

本研究では、今後同種を用いて分子遺伝学的研究、特に交雑実験を行う際に非常に重要となる知見を得ることができた。これまで、スサビノリの交雑実験の多くは、色彩で交雑確認ができる色素変異体に依存してきた。しかし、このことは色彩の異なる変異体を用いることができないと、交雑可否の確認が困難であることを意味している。近年、種々の分子マーカーが開発されており、スサビノリにおいて

も、核にコードされる遺伝子を用いたCAPSマーカーが開発された。しかし、これは前述のように同色でかつ遺伝子型が異なる交雑体の判別はできない。しかし、本研究を通じて得られたオルガネラのDNAマーカーを色彩、核のDNAマーカーとあわせて用いれば、交雑糸状体を完全に区別することができる。このことから、本研究はスサビノリにおけるより精度の高い分子遺伝学の確立に大きく寄与するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嗟 峨 直 恆
副 査 教 授 阿 部 周 一
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 准教授 三 上 浩 司

学 位 論 文 題 名

海産紅藻スサビノリ（紅色植物門、ウシケノリ目）の オルガネラゲノムの遺伝に関する分子生物学的研究

本研究で対象としたスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、産業種として重要なだけでなく、海洋のモデル植物としても注目され、近年種々の基盤的研究が行われている。産業的には、定着性、多収性、病害抵抗性のような重要な形質を制御する分子機構の解明が、ノリの研究における重要課題である。一部の農産物においては、上に述べたような形質とオルガネラとの相互関係に焦点をあてた研究がなされているが、藻類、特に紅藻類に関しては、形態学的な研究は十分に行われている一方で、分子遺伝学的手法を用いた研究は非常に少ない。そこで、本研究では本種の TU-2 株を母方、KGJ 株を父方の親株とした交雑実験により得られた 44 個の糸状体コロニーを用いて、CAPS 解析によりミトコンドリアと葉緑体の両オルガネラゲノムの遺伝様式を解析した。

まず、分子マーカーを作成するため、両オルガネラのゲノムの配列の一部を比較し、CAPS マーカーとして使える多型の検出を行った。その結果、葉緑体ゲノムにおいては、*carA* 遺伝子の断片を *ApaI* で、またミトコンドリアゲノムにおいては *rps11* と *rns* 遺伝子間のスペーサーを *DraI* でそれぞれ消化することによりマーカーとして用いることができることがわかった。これらを用いて前述の 44 糸状体コロニーに対し解析を行ったところ、葉緑体とミトコンドリアの DNA マーカーのパターンは完全に一致し、38 個の糸状体コロニー (86.4%) は母型のパターンを、5 コロニーは両親型のパターンを、1 コロニーは父型のパターンを示した。以上の結果から、スサビノリでは、葉緑体、ミトコンドリアとも母性遺伝する可能性が高いことが考えられた。なお、前述の両親型のパターンを示した 5 コロニーに関しては、KGJ の自家受精糸状体の混入が推測され、父型のパターンを示した 1 コロニーに関しては、実験の

操作中に偶発的に逆の組み合わせの配偶子による交雑糸状体、つまり TU-2 の精子が KGJ の造果器と受精したものが混入していることが予想された。

次に、これらの結果を受け、上述の 6 糸状体コロニーから糸状体断片を単離・培養し、核・葉緑体・ミトコンドリアの 3 種類のマーカーを用いて再度解析を行った。その結果、オルガネラにおいて母型のパターンを示したものは全て核のマーカーでは両親型のパターンを示した。一方、オルガネラにおいて父型のパターンを示したものはすべて核のマーカーでは父型のパターンが得られ、KGJ 株が自家受精した糸状体であることが示された。これらの結果を総合すると、核の DNA マーカーにおいて両親型のバンドパターンを示したものは母型のオルガネラを持っているものに限られていた。以上のことから、スサビノリの両オルガネラゲノムは母性遺伝することが明らかになった。

本研究では、今後同種を用いて分子遺伝学的研究、特に交雑実験を行う際に非常に重要となる知見を得ることができた。これまで、スサビノリの交雑実験の多くは、色彩で交雑確認ができる色素変異体に依存してきた。しかし、このことは色彩の異なる変異体を用いることができないと、交雑可否の確認が困難であることを意味している。近年、種々の分子マーカーが開発されており、スサビノリにおいても、核にコードされる遺伝子を用いた CAPS マーカーが開発された。しかし、これでは前述のように同色でかつ遺伝子型が異なる交雑体の判別はできない。しかし、本研究を通じて得られたオルガネラの DNA マーカーを色彩、核の DNA マーカーとあわせて用いれば、交雑糸状体を完全に区別することができる。このことから、本研究はスサビノリにおけるより精度の高い分子遺伝学の確立に大きく寄与するものと思われる。

主論文は平成 21 年 1 月 22 日 15 時から 16 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員及び関連教員 22 名および一般聴講 29 名出席のもと発表された。一般聴講においては、両オルガネラ DNA における多型性の数量の問題、交雑糸状体断片の自家受精体混入の有無の問題、褐藻のオルガネラの遺伝様式の知見についての質疑応答がなされた。また、審査員および関連教員においては、原始紅藻と真性紅藻におけるミトコンドリアと葉緑体の起源に関する知見、接合様式とオルガネラ遺伝様式の関連性、本研究の遺伝資源の保存等の応用への展望、オルガネラの遺伝様式と雌雄同株である本種の遺伝子発現の様式に関連する諸問題について質疑応答がなされた。また、本研究は今後進められる水産植物学に関する種々の研究の基礎的な知見として十分な価値があり、また、本研究で得られた知見や技術を遺伝・育種についての研究を進めることで海藻の増養殖産業の更なる振興に寄与できるなどのコメントがなされた。得られた結果は本種に関わる基礎生物学の充実のみならず、今後の海藻類、特に紅藻類の応用研究の発展におおいに寄与するものと評価できる。従って、審査委員一同は、申請者が博士（水産科学）

の学位を授与される資格のあるものと判定した。