

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	吉原 亮平
審 査 委 員	<p style="text-align: center;">主 査 滝本 晃一 (印)</p> <p style="text-align: center;">副 査 松井 健二 (印)</p> <p style="text-align: center;">副 査 田中 淨 (印)</p> <p style="text-align: center;">副 査 古賀 大三 (印)</p> <p style="text-align: center;">副 査 柴田 均 (印)</p>
題 目	<p style="text-align: center;">Newly developed system for analyzing in vivo mutation in higher plants and characterization of spinach CPD photoreactivation (高等植物の in vivo 突然変異解析システムの開発とホウレンソウの DNA 傷害光回復の特性)</p>
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>DNA 紫外線傷害修復系である光回復は植物では有効に作用していることが推測される。にもかかわらず研究は限られている。申請者は本研究に先がけて、アミノ酸配列からシクロブタン型ピリミジン 2 量体 (CPD) 光回復遺伝子と推測される配列をホウレンソウから単離していた。そこでこの遺伝子についてさらに研究を進めた。cDNA を発現ベクターにつないで CPD 光回復欠損大腸菌に導入したところ、大腸菌は光回復機能を回復した。また、CPD 光回復欠損大腸菌の DNA 上に紫外線照射によって生じた CPD の可視光線照射による減少の程度を ELISA 法で測定したところ、遺伝子導入菌で顕著であった。以上の事実から、本遺伝子を CPD 光回復遺伝子と断定し GenBank に登録した。ゲノム配列解析の結果 8 つのイントロンから成り、ショウジョウバエ、オポッサム、シロイヌナズナなど高い相同性がみられた。器官ごとの本遺伝子の発現状況を雄株雌株について調べたところ、いずれでも葉や花で高い発現がみられ、根での発現は極めて低かった。</p> <p>低い頻度ではあるが DNA 合成の際のエラーや DNA に生じた傷害が原因で遺伝情報の一部が変わってしまい、突然変異として次世代に受け継がれていくことがある。DNA 傷害要因はその頻度を増やす。突然変異の分子レベルでの研究のために大腸菌などではいくつもの解析システムが知られ、さらにマウスに変異解析の標的遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスも開発されており多くの知見が得られている。一方、太陽紫外線を浴び続け土壌など環境変異原に曝されている高等植物では、変異スペクトルが得られるような適当なシステムがなく研究は限られている。そこで、植物の変異誘発機構や DNA 修復機構を明らかにするため、また環境評価のための有力な手段として変異解析システムの開発を行った。</p> <p>本システムでは、よく用いられてきている大腸菌 rpsL 遺伝子を変異解析のための標的遺伝子として使い、rpsL 遺伝子をプラスミドレスキュー法で回収し大腸菌でアッセイする。マウスなどと同じ遺伝子で変異を比較することができ、さらに検出に抗生物質によるポジティブセレクションが可能でアッセイが容易であるということである。アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入した。自家受精を繰り返してホモ形質転換体を得、計画通りに標的遺伝子回収ができることを確かめてシステムの確立に成功した。種子を ethylmethanesulfonate (EMS) 処理して発芽させ、30~40 日間生育させた後 DNA 抽出を行い、標的遺伝子を回収してアッセイ大腸菌に入れ、ストレプトマイシンを含む培地で変異 rpsL を検出した。変異をもつものは生育してコロニーを形成できる。変異の頻度は自然変異に</p>	

比べて約 20 倍高かった。塩基配列を解析したところ、自然変異では、塩基置換の他に frameshift、deletion、sequence substitution がみられたが、EMS 処理種子では 1 回の frameshift の他は GC 塩基対での塩基置換であり、ほとんど全てが G : C → A : T トランジションであった。O₆-エチルグアニンが原因傷害と考えられる。また、すでに報告されているように塩基置換は 5' -PuG-3' 部位で 7 割以上起こっていた。しかし、他とは違って 5' -Pu はアデニンであることが多く、植物特有なのかもしれない。植物に特徴的であったのは sequence substitution がみられたことである。

高等植物の変異解析システムは他に TILLING と呼ばれるものがあるが、変異を容易にかつ全ての型の変異を検出できるのは本システムが最初である。高等植物の DNA 修復や変異誘発機構の研究に大きく寄与するとともに、土壌汚染など環境変異原の評価にも有用となる。光回復は植物にとって最も有な DNA 修復機構であり、本研究から多くの重要な知見が得られ、植物の環境応答機構解明のみならず、環境耐性植物作出の際にも大きく寄与する。従って、審査委員会は本研究が博士学位論文に十分に値するものと判定した。