

氏名(本籍)	小 ^お 川 ^{がわ} 慎 ^{しん} 志 ^じ (京都府)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第1,633号		
学位授与年月日	平成9年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Molecular Analyses of Group I Introns in the <i>cox1/2</i> Gene of <i>Dictyostelium discoideum</i> . (細胞性粘菌 <i>cox1/2</i> 遺伝子中に存在するグループIイントロンの分子生物学的研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男
副査	筑波大学助教授	理学博士	漆原秀子

論文の内容の要旨

グループIイントロンはセルフスプライシングするリボザイムの一種で、真核生物の核ゲノムやオルガネラゲノム中だけでなく、原核生物やバクテリオファージの遺伝子中にも発見され、生物界を通じて広く存在することが明らかとなっている。これらのことから、現存するグループIイントロンは、生物の共通の祖先にも存在していた分子であると考えられているが、その起源や進化については現在も不明な点が多い。

細胞性粘菌(以下粘菌) *Dictyostelium discoideum* は発生分化や細胞運動の研究の優れたモデル系となっている原生物である。原生物では、今までにミトコンドリアゲノム中のグループIイントロンについての解析が行われていなかった。本研究はこの生物のミトコンドリアDNA(約55kb)中のグループIイントロンについて、その構造と機能を明らかにすることを目的としている。

この生物のミトコンドリアDNA中のシトクロームオキシダーゼサブユニット1/2遺伝子(*cox1/2*)を含む13.5kbの塩基配列を決定し、その遺伝子の中に4個のグループIイントロンを見つけた。粘菌の*cox1*遺伝子には終止コドンが存在せず、下流の*cox2*遺伝子と融合し、1つの遺伝子(*cox1/2*)として転写されていた。これは、今までにない、新しいタイプの発現様式である。この4つのグループIイントロンのうち、第2イントロンは互いに相同性のある2個のORF(ai2a, 309アミノ酸残基; ai2b, 262アミノ酸残基)を持つという、今までに報告されているグループIイントロンには見られない特徴を有していた。また、第2、第3イントロンは他生物(菌類、植物、藻類)の*cox1*遺伝子中のグループIイントロンと同じ場所に挿入されており、それぞれのイントロンORFにも相同性があった。これらの結果と分子系統樹を用いた解析から、これらのグループIイントロンには、共通の祖先型が存在していたことが明らかとなった。

次に、第2イントロンにコードされる2つのORFに注目し、これらの生化学的な解析を行った。これら2つのORFを大腸菌内で発現させると、ai2aタンパク質は大腸菌の増殖を阻害し大腸菌のゲノムDNAを切断した。そこで、ai2aタンパク質はイントロンホーミングという現象に関わる、DNAエンドヌクラーゼではないかと考え、予想される標的配列(イントロンのないエキソン配列)を基質にして*in vivo*における活性を調べたところ、Dd ai2aタンパク質は今までにない1本鎖DNAを切断活性を示した。一方、粘菌の生殖型には有性、無性を含めて4つの型が知られているが、PCR法を用いた解析によって有性生殖を行う株でのみイントロンとそのORF

が保存されていたことから、ai2aがイントロンやイントロン ORF の保持に寄与していることが考えられる。また、粘菌のグループ I イントロンの *in vitro* でのスプライシング活性を測定したところ、他のイントロンがセルフスプライシングする条件でも第 2 イントロンはセルフスプライシングを行わなかった。このことから、第 2 イントロンは生体内で何らかのタンパク質因子の補助を受けて、スプライシング反応を行っていると予想される。そこでイントロン ORF にスプライシングの補助活性があるかどうかを、大腸菌で発現させたこれらのタンパク質を精製して調べたが、イントロン ORF がスプライシング補助活性を持つことを示す証拠は得られなかった。粘菌ミトコンドリア内では複数のタンパク質因子がスプライシング反応に関わっているのではないかと考えられる。このように、粘菌のイントロンやイントロン ORF にみられるこれらの特徴は今までに報告されているグループ I イントロンにはみられないものであった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

粘菌は生物の発生分化や細胞運動の研究の優れたモデル系であるばかりでなく、生物進化の面からも興味深い原生生物である。本研究は、この興味深い生物のミトコンドリア DNA 中のグループ I イントロンの構造と機能それに進化的な側面を中心に解析し、以下に示す重要で新しい発見をしたことで、高く評価できる。1) シトクロームオキシダーゼサブユニット 1 と 2 の遺伝子が融合していること、2) その遺伝子の中の 4 個のグループ I イントロンの内、1 つが、互いに相同性のある 2 個の ORF を持っていたこと、3) その内の 1 つの ORF は、今までに報告されていない、2 本鎖 DNA の片方の鎖のみを切断する活性を有することを証明したこと。これらの知見は、グループ I イントロンの構造と機能それに進化に関して新しい視点を与えるものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。