

論文内容の要旨

申請者氏名 森藤 暁

本研究では、イネ(*Oryza sativa* L.)新規 RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーメンバーである *OsRAD* を単離し、解析を行った。*OsRAD* は、N-region と I-region という RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーに保存されているヌクレアーゼドメインを持っている。データベースサーチや系統樹より、*OsRAD* は class 4 の RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリー属しており、*OsRAD* ホモログは動物および高等植物に存在しているが、個体レベルでの機能解析は行われていない。そこで、申請者は、*OsRAD* の機能解析を目的として、RNAi コンストラクトを導入した *OsRAD* 遺伝子の発現抑制形質転換イネの作製や組換え *OsRAD* タンパク質の活性測定などの解析を行なった。*OsRAD* 遺伝子の発現が抑制されたイネは、小孢子初期の生育異常により、雄性不稔になった。GFP 融合 *OsRAD* タンパク質は核に局在し、*OsRAD* プロモーター活性は、薬特異的であった。組換え *OsRAD* タンパク質は、flap エンドヌクレアーゼ活性と 1 本鎖および 2 本鎖 DNA 結合活性を持っていた。以上の結果から、*OsRAD* 遺伝子は、イネの小孢子の初期生育に重要な機能を持ち、小孢子生育に必要な何らかの核 DNA 代謝に関与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森藤 暁

本申請者は、RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーに属するイネ新規 **OsRAD** 遺伝子について解析を行った。RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーは、これまで主に酵母や哺乳類で非常に活発に解析が行われおり、DNA修復、DNA複製、遺伝的組換えなどに重要な機能をもつヌクレアーゼである。しかし、**OsRAD** はヒトやシロイヌナズナなど多細胞の動植物にホモログが存在しているにもかかわらず、これまでほとんど解析の行われてこなかった **class 4** サブファミリーに属し、興味深い遺伝子であることが考えられた。

イネにおける **OsRAD** 遺伝子の個体レベルでの機能を明らかにするため、RNAiコンストラクトを導入した **OsRAD** 遺伝子発現抑制形質転換体を作製したところ、小胞子の初期生育に異常が見られ、雄性不稔になった。このことから、**OsRAD** はイネにおいて、小胞子の初期生育に必須の遺伝子であることが示唆された。レポーター遺伝子 **gus** を用いた形質転換体の作製により、**OsRAD** 遺伝子のプロモーター活性は葯において特異的に検出され、発現抑制個体での小胞子の生育異常が見られた時期に対応して **OsRAD** 遺伝子の発現が誘導されていることがわかった。一過的な発現による GFP 融合 **OsRAD** タンパク質の細胞内局在の解析で、**OsRAD** タンパク質は核に局在することが示唆され、組換え **OsRAD** タンパク質は、flap エンドヌクレアーゼ活性と1本鎖および2本鎖 DNA 結合活性を持っていた。これらの結果から、**OsRAD** 遺伝子は、イネの小胞子の初期生育に重要な機能を持ち、小胞子生育に必要な何らかの核 DNA 代謝に関与している可能性が示唆された。今後の課題として、**OsRAD** タンパク質が葯の中のどの細胞で機能することが小胞子の生育にとって重要なのか、実際の生体内における **OsRAD** タンパク質の基質 DNA は何であるか、どういった DNA 代謝の過程に機能しているかなどのより詳細な分子機構の解明があげられる。

以上のように、本論文は RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーの **class 4** に属するイネ新規 **OsRAD** 遺伝子について個体レベルおよび組換えタンパク質の活性などの機能解析を行ったもので、**OsRAD** 遺伝子がイネの小胞子の初期生育に重要な機能を持ち、植物ではほとんど明らかになっていない小胞子生育に必要な核 DNA 代謝への関与を明らかにした点で新規性の高い研究である。また、本研究で得られた知見は、イネ育種において、核遺伝子型の雄性不稔を利用したハイブリッドライスの作製など、将来バイオサイエンスへの応用においても貢献する可能性が高いと考えられた。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。