

論文の内容の要旨

論文題目 体細胞変異に寄与するトランスポゾンに関する研究
氏名 百瀬 眞幸

作物の育種における遺伝変異の創出には、交配などによる遺伝情報の取り込みおよび組換えと、遺伝情報の機能破壊を含む機能改変が利用される。栄養繁殖性の作物では、体細胞変異による遺伝情報の機能改変は有用な育種的手段として用いられてきた。体細胞変異の原因として、DNAレベルでは塩基置換、挿入、欠失、メチル化、脱メチル化、染色体レベルでは挿入、欠失、転座などがあげられる。このような遺伝情報の変化を引き起こす要因のひとつとしてトランスポゾンの関与が考えられる。

各種生物のゲノムが解読され、植物、動物を問わず真核生物ゲノムの大きな部分を多数のトランスポゾンが占めていることが明らかとなり、トランスポゾンはゲノムの構成要素としても着目されている。なぜこのように多くのトランスポゾンに由来する塩基配列がゲノムを構成しているのかは明らかになってはいないが、ゲノムや個々の遺伝子の進化や新たな遺伝子の創出に影響を与えてきたと示唆されている。このようにトランスポゾン様配列は真核生物種に広くかつ数多く存在するが、ほとんどのトランスポゾン様配列はゲノム中での転移能力を失っており、転移活性をもち体細胞変異に寄与するトランスポゾンは限られていると考えられる。また、どのようなトランスポゾンが育種の場面で利用されてきたのかについて議論するには知見が少ない。

そこで本研究では、栄養繁殖性作物で実際に品種育成に用いられた体細胞変異(枝変わり、培養変異)および変異遺伝子を解析することにより転移能を有するトランスポゾンをそれぞれ同定し、トランスポゾンの遺伝情報破壊への関与を検証した。

1. カーネーションの枝変わり変異を誘発する hATトランスポゾン

栄養繁殖性作物の品種育成において重要である枝変わりの原因について、カーネーションでは頻繁に枝変わりが利用されるにも関わらず、ほとんど知見がない。本研究では、紫から濃ピンクへの花色の枝変わりを解析することにより、*Tdic101* と命名した可動な hATトランスポゾンの転移が枝変わりを誘発することを見出した。花色の変異は、紫色色素の生合成を司る *flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)* 遺伝子の第 2 イントロンに *Tdic101* が挿入すること起因していた。そして、変異体に部分的に起こる紫花色への先祖返りでは、このトランスポゾンがフットプリント配列を残し脱離していた。フットプリント配列は残っているがイントロンであるため *Tdic101* の脱離により *F3'H* が復帰し、紫色への先祖返りが起こったと結論した。*Tdic101* はその塩基配列からトランスポゼースをコードする自律性因子と考えられた。また、*Tdic101* に類似するがトランスポゼースを内部にコードしない非自律性トランスポゾンである *dTdic102* も変異体では転移していることが明らかとなった。*dTdic102* の転移は、例えば *Tdic101* など他のゲノム上の位置に存在するトランスポゼースにより引き起こされたと考えられる。以上、カーネーションの枝変わり変異の一因としてトランスポゾンが関与することが明らかとなった。

2. トランスポゾン脱離により復帰したカーネーション花色の濃淡を決める遺伝子の解析

カーネーションのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子 *DcGSTF2* が花色の濃淡に関わり、ナンセンス変異を持つ *DcGSTF2mu* とトランスポゾン *dTac1* が第 1 イントロンに挿入した *DcGSTF2-dTac1* の 2 つの機能しない遺伝子が明らかとなっている。本研究では、*dTac1* には転移活性があり、これが脱離することにより *DcGSTF2* 遺伝子が復帰することを示した。淡ピンク花色の品種 *Daisy* は機能しない 2 種の遺伝子を持ち、*Daisy* から偶発的に得られた濃花色の変異体 *Daisy-VPR* では、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が消失していた。*dTac1* の脱離により復帰した *DcGSTF2rev1* が生じ、濃色への花色変化がおこったことが示された。次に、淡花色の系統 06-LA と濃花色の品種 *Spectrum* の交雑後代について *DcGSTF2* 遺伝子の分離を解析した。濃色の後代のみが *Spectrum* 由来の機能する *DcGSTF2rev2* を持ち、淡色の後代では両親由来の機能のない *DcGSTF2mu* と *DcGSTF2-dTac1* を有していたことから、*DcGSTF2rev2* が機能する遺伝子であることが示された。*DcGSTF2rev2* には *dTac1* が挿入していた場所にフットプリント配列が存在することから、*dTac1* の脱離により生じたと考えられた。さらに、6 品種の *DcGSTF2* 遺伝子を調査したところ、*DcGSTF2rev1* および *DcGSTF2rev2* はカーネーションの育種に利用され、後者は半世紀以上にわたり利用されてきたことが明らかとなった。

3. ばれいしよ体細胞変異を誘発する Stowaway MITE

Miniature inverted-repeat transposable element (MITE) は真核生物のゲノムに数多く存在するが、ほとんどが転移する活性をもたないと考えられている。植物には、*Tourist* と *Stowaway* と呼ばれる 2 つの主要な MITE が存在する。MITE がイネで可動であることは報告されているが、双子葉植物で可動な

MITE の報告はない。本研究により、ばれいしよで *Stowaway* に属する MITE が可動であり、塊茎皮色の変異を引き起こすことが明らかとなった。赤皮のばれいしよ品種では、*dTstu1* と命名した *Stowaway* に属する MITE が紫色素の生合成に関与する *flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)* 遺伝子の第 1 エクソンに挿入することで遺伝子の機能を喪失させていた。この赤皮品種の葉肉プロトプラスト由来の紫皮体細胞変異体では、*F3'5'H* から *dTstu1* がフットプリントを残して消失していた。このことから赤から紫への塊茎色の変異が、*F3'5'H* に挿入する *dTstu1* の脱離によることが示された。変異体では *dTstu1* と塩基配列がほぼ同じ *dTstu1-2* が新たなゲノム上の位置に挿入していることも明らかとなった。これらのことから *Stowaway* MITE が少なくとも組織培養という条件下で転移能を有することが示され、双子葉植物でも MITE が可動であることが明らかとなった。

本研究により、栄養繁殖性作物で実際に育種に利用された枝変わり変異、変異遺伝子、プロトプラスト培養によるソマクローナル変異がクラス 2 (DNA 型) のそれぞれ *hAT*、*CACTA*、*Stowaway* MITE に属する転移活性のあるトランスポゾンにより引き起こされたことが示された。これまでに、クラス 1 トランスポゾン (RNA 型) が、ブドウやカーネーションの遺伝子機能喪失の原因であることが報告されており、育種における遺伝子機能の改変にはクラスあるいは種類を問わずトランスポゾンが寄与してきたと考えられる。

トランスポゾンによる変異を育種に利用する場合、遺伝子あるいはその近傍への挿入しやすさおよび変異遺伝子が安定であることが重要である。コピー&ペーストにより転移するクラス 1 のトランスポゾンは、転移の促進が可能であれば安定性の観点からは有利であると考えられる。カット&ペーストにより転移するクラス 2 トランスポゾンでは、転移の活性化および不活性化の制御が重要となる。クラス 2 トランスポゾンでは、トランスポゼース遺伝子を内部にコードする自律性因子より他の遺伝子座にトランスポゼース遺伝子をもつ非自律性因子のほうが交雑によりトランスポゾンとトランスポゼース遺伝子を分離することができるので転移を制御しやすいと考えられる。しかし、栄養繁殖性作物では交雑せずに変異を誘発することが求められるので、トランスポゼース遺伝子の一過的発現は有効な手段になり得る。トランスポゾンが遺伝子プロモーター、エクソンやエクソン-イントロン境界に挿入し変異が誘発された場合には、脱離の際にフットプリント配列を残すことを利用し自律性、非自律性を問わず挿入箇所からさらに脱離を促すことにより変異の安定化を図ることが可能である。しかし、イントロンにトランスポゾンが挿入した変異体では、安定変異体を育成するためにはトランスポゾン自体の転移制御が必要となる。転移の制御について明らかにしていくためにはそれぞれのトランスポゼースの同定が次の課題となる。

人為的な力とそれによる大きなバイアスがかかってはいるが、作物育種は進化のモデルになり得る。栽培化を含めた作物進化にトランスポゾンは大きな役割を果たしてきたと考えられている。育種の過程で遺伝子の機能改変にトランスポゾンが利用されてきたならば、作物には変異を誘発するトランスポゾンが集積していると考察される。

近年開発された人工ヌクレアーゼは、目的的な遺伝子変異誘発手法として効率的な育種を実現す

るための主要なツールとなっていくと予想され、トランスポゾンを用いた変異誘発は育種技術としての有用性は小さくなるかもしれない。しかし、これまでにどのような変異が育種に利用されそれらがどのように誘発されたのかを知ることは、育種の標的となる遺伝子およびその改変の機構を把握する上で重要であると考えられる。また、栽培化や作物の進化、植物の進化あるいはゲノムの進化のメカニズムを知るためには、トランスポゾンの果たした役割を正確に把握し評価することが必要であると考えられる。現存生物のゲノムの大きな部分がトランスポゾン由来配列により構成されていることは、トランスポゾンが少なくともゲノムの進化に寄与してきたことを物語っている。