

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	門田 有希
論文題目	Understanding the Other Big Bang; How Transposable Element Amplification Associates with Genome Evolution in Rice (転移因子の増殖がイネのゲノム進化に及ぼす効果を理解する)		
(論文内容の要旨)			
<p>転移因子は生物ゲノムの大部分を占める要素であるが、その多くは転移が抑制され不活化状態にある。不活化された転移因子は、培養などのストレスにより一時的に転移活性が回復する場合もあるが、コピー数が増えると再び不活化されるため100コピー以上増幅して活性状態を保つ事例は観察されない。このため真核生物ゲノム内で観察される転移因子の中に1万コピー以上に達するものが存在する理由は不明であった。最近、600コピー以上でも高い活性を示す転移因子<i>mPing</i>がイネ品種銀坊主で見出された。大半のジャポニカイネ品種の<i>mPing</i>は50コピー以下で不活化されていることから、銀坊主は<i>mPing</i>が転移抑制を回避した極めて稀な事例であり、この回避機構の解明は転移因子とゲノム進化との繋がりを知る上で極めて重要であることを示している。本研究は、このような背景に基づいて、銀坊主における<i>mPing</i>の転移活性化の要因ならびに転移因子の増幅が生物のゲノム進化および多様性に及ぼす影響を解明しようとしたものである。その主な内容は以下の通りである。</p>			
1. 一般に転移因子はDNAのメチル化を介した機構により転移が抑制される。 <i>mPing</i> が転移・増幅できる理由を明らかにするために、まず <i>mPing</i> 転移に必要な因子を供給する自律性因子 <i>Ping</i> および <i>Pong</i> のメチル化程度および転写量を銀坊主と <i>mPing</i> 転移活性をもたないジャポニカ品種日本晴との間で比較した。 <i>Pong</i> は両品種において転写量が非常に低く、転移に必要な因子をコードするORF領域およびそのプロモーター領域が高度にメチル化されていた。一方、 <i>Ping</i> は両品種とも全生育期間を通じて転写が確認され、そのプロモーター領域は両品種ともほとんどメチル化されていなかった。両品種は <i>Ping</i> コピー数に関して大きく異なり、銀坊主が7コピーであるのに対して日本晴は1コピーであった。銀坊主×日本晴の組換え自殖系統(RIL)の中から <i>Ping</i> のコピー数が異なる系統を選んで、 <i>Ping</i> のコピー数と <i>mPing</i> 転移頻度との関係を調査した。その結果、 <i>Ping</i> を3コピー以上もつ系統では <i>mPing</i> の転移頻度が顕著に上昇した。以上のことから、銀坊主における <i>mPing</i> の高い転移活性は <i>Ping</i> の量的効果よると結論した。			
2. QTL解析やmarker assisted selection(MAS)には、多数のDNAマーカーの開発とそれらを用いた高密度連鎖地図の作成が不可欠である。イネの場合、遠縁関係にあるインディカ品種とジャポニカ品種との間では利用できるDNAマーカー数は多いが、近縁関係にあるジャポニカ品種間では極めて少ない。このことが、ジャポニカ品種間の交雑後代を用いたQTL解析およびMASを困難にしている。本研究では <i>mPing</i> のコピー数が銀坊主において、とりわけ多いことに着目して、 <i>mPing</i> の挿入多型に基づくマーカー(<i>mPing</i> SCARマーカー)を開発するため、日本晴×銀坊主のRILs190系統(F5)を用いた。銀坊主に特異的な <i>mPing</i> 挿入箇所を増幅するプライマーを設計し、150の <i>mPing</i> SCARマーカーと47のSSRマ			

ーカーとを用いて、全長1,779cM、平均マーカー間距離9cMの連鎖地図を作成した。この連鎖地図における*mPing*SCARマーカーは遺伝子座の多い染色体領域に偏りなく分布しており、QTL解析およびMASにおける利用価値が高いと考えられた。さらに、この連鎖地図を用いて銀坊主と日本晴との交雑後代において出穂期および草丈に関するQTL解析を行った結果、作用力の小さい遺伝子でも容易に同定することができた。以上のことから、*mPing*SCARマーカーは、ジャポニカ品種間における遺伝解析に非常に有用であることを示した。

3. イネは2004年に日本晴の全ゲノム塩基配列が解読され、ゲノム情報を利用した遺伝子の同定および機能解析が著しく容易になった。さらに、次世代シーケンサーを用いた大規模配列解読による比較ゲノム解析も実現しつつある。本研究では転移因子*mPing*の増幅がゲノム構造に及ぼす影響を観察するために、銀坊主のゲノム解読を行なった。75bp~100bpの短いリードを参照となる日本晴ゲノムに整列化して数bp単位の短い欠失および挿入(short indel)を検出するだけでは、数kb単位で生じる欠失、挿入、逆位などのゲノム構造変異は検出できないので、銀坊主について500bpのpair-end libraryおよび3kbのmate pair libraryを作成してシーケンス解析を行った。まず、得られた配列を日本晴のゲノム配列にマッピングして約12万箇所(SNP(1塩基多型)および約4万3千箇所のshort indel)を同定した。次に、BreakdancerおよびD-indel等のソフトウェアを用いて数百bp~百kbにおよぶ大きな構造変異を同定した。最後に、SOAPdenovoソフトウェアを用いて銀坊主のゲノム情報から新たにコンティグを作成してde novo assemblyを行い、観察された構造変異を検証した。日本晴ゲノムとの比較により銀坊主において確認できた大きな構造変異の70%は転移因子配列の切り出しもしくは挿入であった。しかしながら、これらの転移因子の大部分は*mPing*が関与するものではなく、ゲノム内の多様な転移因子が構造変異に貢献していた。また、イネ近縁品種間であっても膨大かつ多様なゲノム構造変異が認められ、これらの変異が進化的には極めて短い期間に進んだことを示している。以上のように、近縁品種間で綿密なゲノムの比較解析を行うことによって、転移因子がイネのゲノム進化に貢献している全体像を初めて明らかにした。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

近年の塩基配列解読技術の進展によって、作物ゲノム解読とそれを利用した有用形質遺伝子の同定は急速に進んでいる。その結果、生物種ゲノムの3～8割は転移因子によって構成されていること、転移因子が生物進化に及ぼす影響が大きいことが明らかにされてきた。本論文は、イネ品種銀坊主において高い転移活性を示す*mPing*を中心に解析を行い、転移因子がゲノムの転移抑制機構を回避する機構の一端を明らかにするとともに、転移因子の挿入多型はDNAマーカーに利用できることを示した。さらに、次世代シーケンサーを用いた銀坊主のゲノム解読により、転移因子が関与するゲノム改変の全容を初めて明らかにした。評価される主な点は以下の通りである。

1. *mPing*の自律性因子*Pong*がDNAのメチル化を介した機構により不活化された後、個々の転移効率は高くはない自律性因子*Ping*のコピー数が増えるにしたがって転移頻度が上昇することを示した。この結果から、転移効率が低い自律性因子はメチル化による抑制を受けにくいこと、このような自律性因子のコピー数増加が転移活性の維持に働くことを明らかにした
2. 品種銀坊主がジャポニカ品種のなかで特異的に*mPing*のコピー数が多いことから、銀坊主特異的な*mPing*挿入箇所を分子マーカーとして利用できることを示し、この分子マーカーシステムがジャポニカ品種間の遺伝子同定に極めて有効であることを明らかにした。
3. ゲノム解読されたイネ品種日本晴 (*mPing*不活性) と銀坊主のゲノムとを比較することにより、*mPing*転移がゲノム進化に及ぼす効果を詳細に観察した。その結果、遺伝的に極めて近い関係にあるにもかかわらず、多様な転移因子の挿入および欠失によるゲノム改変が両品種の間に極めて高い頻度で生じていることを確認した。この結果、転移因子がゲノム進化に及ぼす効果を初めて具体的に観察することに成功した。

以上のように、本論文はイネにおける転移因子がゲノム内で転移活性を維持する機構ならびにイネゲノムの進化に転移因子が貢献する様子を初めて明らかにしたものであり、育種学、作物学並びに遺伝学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。
なお、平成24年 2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 25年 1月 1日以降