

論文内容の要旨

申請者氏名 安田 晋輔

植物の自家不和合性における自他識別は *S* 遺伝子座の複数のハプロタイプにより制御されている。アブラナ科植物 *Brassica rapa* の花粉側因子 *SP11* 対立遺伝子間の発現には、Class-I (S_8, S_9, S_{12}, S_{52}) > Class-II ($S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$) という複雑な優劣性関係が確認されている。これまで、Class-I/Class-II 間の優劣性については、Class-I *S* ハプロタイプから生産される低分子 RNA (sRNA) *Smi* が Class-II *SP11* プロモーターのメチル化を誘導して、その発現を数万分の一にまで強く抑制することが示唆されている。しかし、この sRNA を介した優劣性制御機構の普遍性や *Smi* による *SP11* の強力な発現抑制機構の詳細は不明であり、本研究ではそれらの解明を目的とした。

第 1 章では *B. rapa* の Class-II 間における直線的な優劣性の解明を目指した。 S_{44} 、 S_{60} 、 S_{40} 、 S_{29} ハプロタイプのゲノム配列を決定し、新たな逆位反復配列 (*SMI2*) を見出した。Stem-loop RT-PCR 解析および sRNA 網羅的解析より、最劣性の S_{29} 以外の *SMI2* 領域から 24 塩基長の sRNA (*Smi2*) の産生が確認され、各 *Smi2* は自己よりも劣性の *SP11* プロモーターに対してより高い相同性を持つことが mispair score による解析から示された。さらに、 S_{60} -*SMI2* ゲノム領域を劣性の S_{40} 、 S_{29} ホモ株に導入したときにのみ特異的に *SP11* プロモーター領域のメチル化と強力な発現抑制が誘導された。以上の結果から Class-II 間の直線的な優劣性は *Smi2* により制御されることが明らかとなり、sRNA 産生に関わる逆位反復配列とその標的の多型性獲得により複雑な優劣性関係が進化しうるとする新たな進化モデルを提示することが出来た。

第 2 章では他のアブラナ科植物 *Arabidopsis lyrata* の *SP11* 対立遺伝子間の優劣性 Class-IV (S_{50}, S_{39}, S_{20}) > Class-III (S_{13}, S_{16}) > Class-II (S_{18}, S_{14}) > Class-I (S_1) について解析した。 $S_{20}S_{13}$ 個体の葯の sRNA 解析を行い、4 つの Class 間の優劣性を制御しうる 2 種類の sRNA (*AlSmi1*、*AlSmi2*) を同定した。アブラナ科植物では、sRNA と標的の配列多型性獲得により複雑な優劣性が普遍的に進化していることが示唆された。

第 3 章では *Smi* による強力な *SP11* 発現抑制機構の解明を目指した。 S_{60} -*SP11* の 1.2 kb 上流にはメチル化プロモーター領域と相同性の高い 3 回繰り返し配列 (REP) の存在が確認されており、 $S_{52}S_{60}$ 株で同様にメチル化されていることが確認された。REP を含まない S_{60} -*SP11* プロモーター領域と、REP を含むプロモーター領域を $S_{52}S_{60}$ 株に導入する比較実験では、前者が 5-70 分の 1 程度の弱い発現抑制しか認められなかったのに対し、後者では数百分の 1 の強い発現抑制が認められ、*Smi* による *SP11* の強い発現抑制には REP を含む広範囲のゲノム構造が関与することが強く示唆された。

本研究により、アブラナ科植物の花粉側対立遺伝子間の優劣性制御に sRNA を介した発現制御機構が普遍的に関与することが明らかとなった。また、その強力な発現制御には標的配列周辺のゲノム構造が関わる可能性を明らかにすることができた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 安田 晋輔

有性生殖により生まれる個体は、両親より 1 組ずつ遺伝子セットを受け継ぐため、両親の形質を合わせ持つことが期待されるが、いずれか一方の親の形質のみが現れる場合が多くみられる。これは優劣性としてメンデルの時代から知られる現象であるが、分子機構の詳細は不明な場合が多い。これまで唯一知られてきたのが酵素などをコードする劣性側対立遺伝子の機能欠損であり、片方の対立遺伝子からの発現量で十分な機能が賄えるため野生型が優性になると説明されてきた。一方、申請者が所属する研究室では、アブラナ科植物 *Brassica rapa* の自家不和合性を制御する花粉因子 *SP11* 複対立遺伝子間の複雑な優劣性 Class-I (S_8, S_9, S_{12}, S_{52}) > Class-II ($S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$) について解析を進め、Class-I/Class-II ヘテロ体では、Class-I *S* ハプロタイプ由来の低分子 RNA (sRNA) *Smi* によって Class-II *SP11* の発現が数万分の一に抑制されるという新規の優劣性制御機構を発見してきた。しかし、この機構が Class-II *S* ハプロタイプ間の直線的優劣性や他のアブラナ科植物でも機能する普遍的なものかどうか、またこの非常に強い発現抑制がどの様な機構で誘導されているのかは不明であった。

申請者は、まず第 1 章において Class-II *S* ハプロタイプ間の直線的優劣性について詳細な解析を行い、これらが *Smi2* と命名した多型性の低分子 RNA により制御されていることを分子生物学実験、形質転換実験により明らかにした。また、多数の *S* ヘテロ体の解析から、sRNA と標的 *SP11* 対立遺伝子間の相同性が一定の *mispair score* 値以下を示す際に、標的 DNA のメチル化と発現抑制が起きることを明らかにした。続く第 2 章では、他のアブラナ科植物 *Arabidopsis lyrata* の *SP11* 複対立遺伝子間の優劣性について解析を行い、*B. rapa* の場合と同様に 2 種類の多型性 sRNA によって複雑な優劣性制御が説明できることを示した。申請者が見出した sRNA は、1920 年代に Ronald A. Fisher が存在を予言した *dominance modifier* に相当する。こうした優劣性を制御する分子が進化するかどうかについては長らく議論が成されてきたが、種内に複数の複対立遺伝子が長期間維持され優劣性が有利に作用する環境下では、sRNA が *dominance modifier* として普遍的に進化しうることを示唆する研究成果として注目されている。さらに、第 3 章では、sRNA による発現抑制機構について解析を行い、*SP11* 遺伝子の 5' 上流に位置する標的と相同な繰り返し配列 (REP) が強力な発現抑制に必要であることを示し、全体のゲノム構造の制御における重要性を明らかにした。

以上のように、本論文は sRNA を介したエピジェネティックな優劣性制御機構が普遍的に進化しうることを明らかにすると共に、強力な発現抑制に関する分子機構解明に向けて重要な手掛かりを与えるのであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。