

## 学位論文題名

*Malus* 属および *Glycine* 属植物における  
ミトコンドリアゲノムの変異機構の分子的解析

## 学位論文内容の要旨

本研究では、*Malus* 属植物および *Glycine* 属植物における系統分化および栽培型の進化を細胞質ゲノムの観点から解明するため、*Malus* 属植物では新旧栽培品種や近縁野生種を、また、*Glycine* 属植物においては、*Soja* 亜属のダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) とその祖先野生種とされるツルマメ (*G. soja* Sieb. et Zucc.) を供試し、RFLP 分析によるミトコンドリアゲノム多型を調べるとともにその変異機構を検討した。

1. *Malus* 属植物におけるミトコンドリアゲノム多型の解析

*Malus* 属植物のミトコンドリアゲノムの多様性を明らかにするために、75 種のリンゴ新旧品種および台木株ならびに 8 種 11 系統の近縁野生種について、ミトコンドリアゲノムに関する RFLP 分析を試みた。その結果、供試遺伝子型のミトコンドリアゲノムは、A ~ J の 10 型に分類することができた。4 型に分類されている葉緑体ゲノムの内、I 型、II 型、III 型はミトコンドリアゲノム A 型、B 型、C 型にそれぞれ対応し、IV 型は D ~ J の 7 群に細分された。他の植物種における事例と同様、*Malus* 属においてもミトコンドリアが葉緑体より大きいゲノム変異を示した。ヨーロッパの *Malus* 属自生種より育成された台木株には、*Malus* 属栽培品種におけるのと同様のミトコンドリアゲノムの分化が見いだされた。この結果は、異なるミトコンドリアゲノムを有する複数の祖先型から、多元的系譜を辿って *Malus* 属栽培種が出来上がったことを示唆している。

ミトコンドリアゲノム A 型および C 型をそれぞれ代表する「ゴールデンデリシャス」および「デリシャス」の *atp9* 領域をクローン化し、それらの構造を比較解析した。「デリシャス」由来の *atp9* 遺伝子は 246 塩基対からなり、同じストランドの下流に *nad5* エキソン a と b が同定され、両遺伝子は共転写されることを明らかにした。また、*atp9* ORF 中の 8 箇所 C→U エディティングが起り、そのうちの 7 箇所のエディティングはアミノ酸変化を伴う。残り 1 箇所では終止コドンが形成されるため、実際に合成されるポリペプチドは、ゲノム DNA に基づいて推定される配列に比べて 8 アミノ酸残基短くなる。「ゴールデンデリシャス」由来の *atp9* 座におい

ては、「デリシャス」の対応域と比較して、5'隣接域に4箇所の塩基置換が認められた。

「ゴールデンドリシャス」のミトコンドリアゲノムに存在する *atp9* 偽似コピー配列の構造を解析した。この領域に含まれる *atp9* 配列においては、翻訳開始コドンに始まる N 末端配列は保存されているものの、開始コドンから 92 bp 目より *atp9* 配列との相同性が失われ、偽遺伝子化していた。この  $\psi$  *atp9* - 1 配列の上流には、さらに *rps12* および  $\psi$  *nad3* が配置されている。「ゴールデンドリシャス」のミトコンドリアゲノム上には、インタクトな *nad3*-*rps12* アレンジメントが別に存在する。

「ゴールデンドリシャス」由来の  $\psi$  *nad3*-*rps12* -  $\psi$  *atp9* - 1 アレンジメントの生起機構を次のように推定した。すなわち、祖先型のミトコンドリアゲノム上に、*nad3* および *atp9* 遺伝子コード域内に含まれる数 bp ~ 数十 bp の配列が反復して存在し、進化の過程で、この反復配列を介した相同組換えがそれぞれの遺伝子領域で起こり、 $\psi$  *nad3*-*rps12* アレンジメントと  $\psi$  *atp9* - 1 が産み出され、さらに、*rps12* 下流域と  $\psi$  *atp9* - 1 上流域において反復配列を介した相同組換えが起こることにより、 $\psi$  *nad3*-*rps12*- $\psi$  *atp9* - 1 アレンジメントが生じた。

「デリシャス」と「ゴールデンドリシャス」が共有する *atp9* 配列の構造を解明するために、「ゴールデンドリシャス」より対応域をクローン化し、構造解析を行った。その *atp9* 配列は、エディティングによって実際には翻訳終止暗号となる CGA コドンから上流 171 bp とその下流 3 bp のみを保存する *atp9* 偽似コピー ( $\psi$  *atp9* - 2) であった。また、 $\psi$  *atp9* - 2 配列の上流には *nad5* エキソン c が、下流には *rpl5* および  $\psi$  *rps14* が配置されていた。

## 2. *Glycine* 属 *Soja* 亜属におけるミトコンドリアゲノム多型域の構造解析

*Glycine* 属 *Soja* 亜属のミトコンドリアゲノムの分化および進化過程を解明するために、*coxII* および *atp6* 遺伝子域の構造多型に注目し、代表的な 5 型のミトコンドリア DNA の多型域をクローン化して、制限酵素切断地図の作成および塩基配列分析を行った。

ミトコンドリアゲノム IVb 型と I 型、II 型、III 型および V 型との間で *coxII* クローンの制限酵素切断地図を比較すると、*coxII* コード領域および 3' 隣接域については、5 種のクローン間で差異が認められなかった。これに対して、5' 上流域には著しい構造変異が見いだされたため、*coxII* 座 5' 端ならびにその上流域の塩基配列を決め、IVb 型の対応域と比較した。その結果、IVb 型の *coxII* 遺伝子上流に配置された tRNA<sup>Met</sup> 遺伝子は、II 型、III 型および V 型においても対応領域に保存されており、特に II 型と III 型では、組換えサイトが tRNA<sup>Met</sup> 遺伝子配列のそれぞれ 78 bp および 7 bp 上流に位置した。I 型では *coxII* 座の ATG 開始コドンより数えて 28 bp 目から IVb 型との相同性が失われるため、tRNA<sup>Met</sup> 遺伝子が *coxII* 上流域に存在しない。

*atp6* 配列を含む領域をクローン化し、分子構造を解析した。III 型から単離された 2 種の *atp6* クローンは、IVb 型の *atp6* copy 1 および copy 2 とそれぞれ全く区別できなかった。I 型において、*atp6* プローブとの RFLP 分析で検出された、5.0 kbp BamHI 断片の制限酵素切断地図は、IVb 型の *atp6* copy 1 の地図と一致した。V 型に含まれる 2 種の *atp6* 配列のうち copy 1 は、IVb 型の *atp6* copy 1 と同一の 5' 隣接域を有するが、3' 隣接域の構造は異なった。copy 2 は 3' 下流域に関しては copy 1 と区別がつかないが、5' 側は著しく相違した。II 型には、V 型の *atp6* copy 1 と同一の 3' 隣接域を有し、5' 隣接域の構造が異なる copy 1A と、copy 1A の ORF 内で再編成が生じ、偽遺伝子化した copy 1B が見いだされた。

制限酵素切断地図の比較とサザンブロット分析を通じて、II 型を特徴づける *coxII* 上流域の配列は、ミトコンドリアゲノム I 型、III 型、IVb 型 および V 型よりクローン化された *atp6* copy 1 上流域と相同性の高いことが見いだされた。一方、II 型の *atp6* 上流域については、ORF の 5' 端を含む 4 種類の HindIII クローン (1.6 kbp、4.0 kbp、6.1 kbp、8.6 kbp) が単離されたが、これらのうち、4.0 kbp および 6.1 kbp クローンは IVb 型 および V 型の *coxII* 5' 隣接域と、1.6 kbp クローンは III 型の *coxII* 5' 隣接域と相同な配列をそれぞれ持っていた。II 型の *atp6* 5' 隣接域においては、IVb 型の *atp6* copy 1 (Grabau *et al.* 1988)、*coxII* (Grabau 1987)、および II 型の *coxII* の 3 者の 5' 上流域に共通する 328 bp の配列のうち、5' 側の 299 bp と 3' 側の 23 bp が、706 bp の由来不明配列によって隔てられて存在した。

これらの分析結果をもとに、*Glycine* 属 *Soja* 亜属の *coxII* および *atp6* 遺伝子上流域における構造変異の生起機構を次のように考察した。II 型の祖先型ゲノムにおいて、*coxII*、*atp6* 両遺伝子上流域に共通する 23 bp 配列間で相同組換えが生じ、I 型、III 型、IVb 型あるいは V 型に見られる *atp6* copy 1 のアレンジメントが産み出されたと考えられる。これとは別に、299 bp の相同配列を介した組換えが、II 型の祖先型のミトコンドリアゲノムの *coxII* および *atp6* 上流域間で起こり、その結果、IVb 型と V 型、または III 型の *coxII* 上流域が生じた。また、*coxII* 上流配列が、*atp6* copy 1 上流域以外の領域にも反復して存在することが示された。*Glycine* 属 *Soja* 亜属のミトコンドリアゲノムの進化過程において、*coxII*、*atp6* 両遺伝子の 上流域をはじめミトコンドリアゲノム上に散在する反復配列を介した組換えが生じることにより、*coxII*、*atp6* 両遺伝子域に多様な構造変異がもたらされるものと考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 本 義 也  
副 査 教 授 佐 野 芳 雄  
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

### *Malus* 属および *Glycine* 属植物における ミトコンドリアゲノムの変異機構の分子的解析

本論文は、図30、表6、引用文献83を含み、4章からなる総頁数108の和文論文である。別に、参考論文6編が添えられている。

高等植物は、核、ミトコンドリアおよび葉緑体の3種のゲノムに、遺伝情報を分散して収容している。その内、ミトコンドリアおよび葉緑体のゲノムにコードされている遺伝情報は、被子植物の大多数において母性遺伝に従う。それゆえ、ミトコンドリアおよび葉緑体のゲノムの構造変異を解析することによって、特定の植物種の起源を母系の系譜をたどって推定することが可能であり、野生植物から栽培植物への進化とその機構を解明するための有用な知見が得られる。

本研究は、*Malus* 属および *Glycine* 属植物におけるミトコンドリアゲノムの多型をRFLP分析により明らかにし、そのゲノムの変異機構の分子的解析を行い、両属植物における系統分化および栽培種成立の過程を細胞質ゲノムの情報から解明することを目的とした。

*Malus* 属植物のミトコンドリアゲノムの多様性を明らかにするために、リンゴの品種、在来種、台木株およびその近縁野生種について、ミトコンドリアゲノムに関するRFLP分析を行った結果、供試植物のミトコンドリアゲノムをA～Jの10型に分類することができた。他の植物種における事例と同様、*Malus* 属植物においてもミトコンドリアにおいて葉緑体より大きいゲノム変異が観察された。また、異なるミトコンドリアゲノムを有する複数の祖先種が観察され、現在のリンゴの栽培種は多元的に成立したことが示唆された。

ミトコンドリアゲノムA型およびC型をそれぞれ代表する「ゴールデンデリシャス」および「デリシャス」の *atp9* 領域をクローン化し、それらの構造を比較解析した。「デリシャス」由来の *atp9* 遺伝子は246塩基対からなり、同じストランドの下流に *nad5* エキソンaとbがコードされていることをつきとめ、さらに、両遺伝子は

共転写されていること明らかにした。「ゴールデンデリシャス」由来の *atp9* 遺伝子においては、「デリシャス」におけるその対応域と比較して、5' 隣接域に4箇所の塩基置換が認められた。「ゴールデンデリシャス」のもう一方の *atp9* 配列においては、翻訳開始コドンに始まる N 末端配列は保存されているものの、開始コドンから 92 bp 目より *atp9* 配列との相同性が失われ、偽似コピー配列の構造を持つことを明らかにした。この *atp9* 偽似コピー配列の生起機構は、反復配列を介した相同組換えによって説明された。

次に、*Glycine* 属のミトコンドリアゲノムの系統分化および栽培種の進化過程を解明するために、*Glycine* 属 *Soja* 亜属のダイズ (*G. max* (L.) Merr.) とその祖先野生種とされるツルマメ (*G. soja* Sieb. et Zucc.) を供試し、*coxII* および *atp6* の両遺伝子域の構造多型に注目し、代表的な 5 型のミトコンドリア DNA の多型域をクローン化して、制限酵素切断地図の作成および塩基配列分析を行った。その結果、これらの多型は、塩基置換に起因するものではなく、いずれもゲノム上の相同配列を介した再編成によって生じたことを明らかにした。

制限酵素切断地図の比較とサザンブロット分析を通じて、*Soja* 亜属のミトコンドリアゲノムの II 型を特徴づける *coxII* 上流域の配列は、I 型、III 型、IVb 型 および V 型よりクローン化された *atp6* copy 1 上流域と相同性の高いことが見いだされた。一方、II 型の *atp6* 上流域には、III 型、IVb 型 および V 型の *coxII* 5' 隣接域と相同な配列が存在した。*Glycine* 属 *Soja* 亜属のミトコンドリアゲノムの進化過程において、*coxII* と *atp6* の両遺伝子上流域をはじめ、ミトコンドリアゲノム上に散在する反復配列を介した組換えが生じることにより、*coxII* と *atp6* の両遺伝子域に多様な構造変異がもたらされたものと考えられる。

本研究は、*Malus* 属および *Glycine* 属におけるミトコンドリアゲノムの多型を明らかにし、その変異機構を分子的に明らかにした。この成果は、学術上の貢献が大きく、学会においても高く評価されており、また、両属における栽培種の成立過程の分子生物学的解明の端緒を開いた。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 加藤澄恵は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。