

氏 名 石 川 直 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第558号

学位授与の日付 平成13年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 The transposable element *Tip 100* and genome rearrangements in the common morning glory

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	長谷部 光泰
	教授	堀内 嵩
	教授	飯田 滋
	教授	西村 幹夫

The common morning glory (*Ipomoea purpurea*), a native in Central America, is a common weed in the southeastern United States. The plant was introduced to Europe probably in the 17th century and to Japan in the 18th century. The cultivars with purple, red and white flowers were already recorded in the 18th century, and the most extensively characterized mutant displaying white flowers with pigmented spots and sectors was recorded in the early 19th century. The early genetic studies on the variegated flower line, named *flaked*, were conducted by Barker (1917) in the United States and followed by Imai and Tabuchi (1935) in Japan. The *flaked* mutation, also called *anthocyaninflaked* (*aflaked* or *af*), was recently shown to be caused by the insertion of the transposable element *Tip100* into the *CHS-D* gene for anthocyanin biosynthesis. The 3.9 kb *Tip100* element belonging to the *Ac/Ds* family contains an open reading frame encoding a polypeptide of 808 amino acids. The patterns of the flower variegations in the mutable *flaked* (*af*) lines are determined by the frequency and timing of the excision of *Tip100* from the *CHS-D* gene. In addition to the mutable *af* allele, there is a leaf variegation mutation *yellow-green leaf^{mutable}*, or *yg^{lm}*, conferring dark green spots and sectors on a yellow green background. A plant carrying the two alleles, *af* and *yg^{lm}*, tends to show a peculiar similarity in both timing and frequency of the variegations in flowers and leaves, and the patterns of the flower and leaf variegations are also generally heritable. Based on the observation, it has been proposed that there must be another genetic element termed *Modulator* acting on both *af* and *yg^{lm}* alleles and that the timing and frequency of the variegations in flowers and leaves are determined by the heritable state of the *Modulator*.

As an initial step to understand the complicated flower and leaf variegation system in the common morning glory, she examined whether *Tip100* is an autonomous element carrying an active transposase gene within the element. *Tip100* and its internal deletion derivative *dTip100* were introduced into tobacco (*Nicotiana tabacum*), and their capability to transpose in the transgenic tobacco plants was examined. The introduced *Tip100* element was able to transpose from the integrated vector into the tobacco genome whereas *dTip100* was not. The defective *dTip100* could be transposed by introduction of *Tip100*, indicating that *Tip100* is the first autonomous element characterized in *Ipomoea* species. Based on these results, she speculated the nature of the putative *Modulator* element affecting flower and leaf variegations in various mutable lines.

To characterize whether many different mutant alleles in the *CHS-D* gene are present in the common morning glory producing either white flowers or white flowers with pigmented spots and sectors, the structures of the *CHS-D* gene regions in the mutants grown as a weed in the southeastern United States. All of the mutants examined were found to be derivatives of the *af* mutant previously characterized, and some of them carry additional DNA rearrangements associated with *Tip100*. Based on the results, she concluded that there had been a "founder" mutation in the *CHS-D* gene and that subsequent DNA rearrangements mediated by *Tip100* and other mobile genetic elements had occurred in some of the geographically spread mutants

originated from the founder. She also discussed a possible evolutionary process to generate variants and mutants carrying sequence alterations in the *CHS-D* gene region of the common morning glory.

論文の審査結果の要旨

マルバアサガオ (*Ipomoea purpurea* または *Pharbitis purpurea*) は中央アメリカ原産で、主に欧米で園芸化され、また米国南東部では種々の花色変異体が雑草として繁殖しており、そのような集団の生態学的・集団遺伝学的研究も行なわれている。また、マルバアサガオには白地に有色のスポットやセクターの花を咲かせる易変性条斑変異体が存在する。この変異は花卉で主に発現するアントシアニン色素生合成系の *CHS-D* 遺伝子のイントロン内に *Tip100* と名付けられた *Ac/Ds* 系のトランスポゾンが挿入した変異であり、花卉形成時に *Tip100* が体細胞転移により脱離した体細胞復帰変異により、不活性化されていた *CHS-D* 遺伝子が再活性化した結果、白色地に有色のスポットやセクターが生じる絞り模様となる。この絞り模様の激しさは *Tip100* が *CHS-D* 遺伝子から体細胞転移する際の頻度とタイミングにより決まると考えられ、多くの場合は次世代に伝達されるが、時に変化した後代も得られ、また絞り模様の激しさの異なる系統も多く分離されている。さらに、黄緑地に濃緑色のスポットやセクターの葉が生じる変異との2重変異体では、花と葉の絞り模様の激しさが連動するので、葉に絞り模様を賦与する変異も *Tip100* 類縁のトランスポゾンの挿入変異であり、*Tip100* とその類縁因子に作用して体細胞脱離の頻度とタイミングを決める遺伝因子 *Modulator* の存在が想定されている。それ故、この2重変異体の中で、白色花で黄緑葉の系統は *Modulator* の活性が低下したためと考えられている。

先ず申請者は、この絞り模様形成の分子機構を解明すべく、易変性条斑変異の *Tip100* が自律性因子であるか否かを検証した。即ち、*Tip100* とその内部欠失変異体を異種植物であるタバコに導入し、(1) *Tip100* は転移するが、内部欠失変異体は転移できないこと、(2) 内部欠失変異体も *Tip100* の共存下では *Tip100* のコードする転移酵素により転移しうること、(3) *Tip100* の転移脱離の際に生じるフットプリントや再挿入により生じる標的重複は、形質転換タバコの場合もマルバアサガオの場合と変わらないこと、を明らかにして *Tip100* は活性な転移酵素遺伝子をもつ自律性因子であると結論した。次に申請者は、米国南東部で雑草として繁殖しているマルバアサガオ集団中の白色花や白色地に有色の絞り模様を生じる個体に着目し、その *CHS-D* 遺伝子領域のゲノム構造の解明を行った。その結果、(4) 調べた米国南東部の白色花と白色地に有色の絞り模様を生じるマルバアサガオは全て *CHS-D* 遺伝子のイントロン内に *Tip100* が挿入した易変性条斑変異体か、もしくは挿入した *Tip100* により2次的に欠失などの DNA 再編成が惹き起こされた変異体であることを明らかにし、(5) 米国南東部の集団中の白色花マルバアサガオは *Modulator* 活性が低下して *CHS-D* 遺伝子内の *Tip100* が体細胞脱離できなくなった変異体と考えられると結論し、(6) 白色地に有色の絞り模様を生じるマルバアサガオは園芸種も米国南東部の集団もその大部分は、*CHS-D* 遺伝子のイントロン内に *Tip100* が挿入した単一の 'founder' 変異に由来するものと推定した。

本研究は、マルバアサガオの易変性条斑変異に関わる *Ac/Ds* 系のトランスポゾン *Tip100* が活性な転移酵素遺伝子をもつ自律性因子であることを明らかにすると共に、米国南東部で雑草として繁殖している集団中の白色花と白色地に有色の絞り模様を生じるマルバアサガオの変異の実体を解明し、その由来を論じたもので、審査委員会は学位論文として十分な内容をもつものと判定した。

学位論文として提出された研究成果について申請者による口頭発表後、審査員が論文の内容、次いで関連研究分野の一般的知識とその背景となる基礎的知識について口頭試問により審査を行った。これらの試問に対し申請者は的確な応答を行った。これらの結果をもとに、審査委員会は

申請者が学位取得に足りうる学識と研究遂行能力を持つものと判定した。

英語の能力に関しても、英文で書かれた学位論文及び、その内容の一部が国際専門誌に受理されていることなどから博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。