

氏 名 水多 陽子

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1345 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Analysis of a pair of genes, *DOPPELGANGER 1 (DPL1)*  
and *DOPPELGANGER 2 (DPL2)* responsible for  
reproductive isolation between two rice subspecies

論文審査委員 主 査 准教授 高野 敏行  
教授 角谷 徹仁  
教授 広海 健  
教授 荒木 弘之  
准教授 金澤 章 (北海道大学)

Identification of genes responsible for barriers to gene flow between two species provides insight into molecular mechanisms of reproductive isolation and relationships between evolution of barrier genes and species diversification. To investigate the molecular mechanism of reproductive isolation and the status of evolutionary differentiation, Asian cultivated rice, *Oryza sativa* L., is an ideal species due to its population structure and genetic diversity. *O. sativa* has diverged subspecies, *indica* and *japonica*. Inter-subspecific cross between them exhibits various hybrid incompatibilities, but the mechanisms are still largely unknown. Cross between *indica* cultivar (cv.) Kasalath and *japonica* cv. Nipponbare showed almost no abnormal F<sub>1</sub> hybrid, although 33 reproductive barriers were mapped along whole chromosomes in their F<sub>2</sub> population. In these barriers, a prominent interactive barrier locus was detected on rice chromosomes 1 and 6. Based on the analysis of reciprocal backcrosses progenies, this interaction occurs only in the male gametophyte, pollen.

To identify the causal genes at each locus, map-based cloning of a pair of reproductive barrier genes has been done. Using more than 10,000 individual plants, responsible genes were mapped within regions of 59 kb on Nipponbare chromosome 1 and 11 kb on Nipponbare chromosome 6. A pair of genes, one from each region shared a high degree of homology with each other, and both genes have different sequences between Nipponbare and Kasalath. These homologous genes were regarded as primary candidates, and these were designed as *DOPPELGANGER1* (*DPL1*) and *DOPPELGANGER2* (*DPL2*), respectively. Hybrid pollen carrying both alleles on Kasalath chromosome 1 (*DPL1-K*) and Nipponbare chromosome 6 (*DPL2-N*) together became non-functional, and did not germinate.

*DPL* genes encode plant specific protein with unknown functions, which are highly conserved among angiosperms. Sequence analysis of the Nipponbare and Kasalath genomes and their transcripts suggested that alleles on Nipponbare chromosome 1 (*DPL1-N*) and Kasalath chromosome 6 (*DPL2-K*) had the same coding sequence structure. In contrast, alleles on Kasalath chromosome 1 (*DPL1-K*) and Nipponbare chromosome 6 (*DPL2-N*) had structural differences from the above two alleles. *DPL1-K* had an insertion of a predicted transposable element (TE) in the coding sequence and the transcript could not be detected in any tissues. The transcript of *DPL2-N* was a read through product of the second intron generating a premature stop codon. Higher expression of *DPLs* in pollen was also observed in *in situ* hybridization experiments. Anti-DPL antibodies recognized proteins of *DPL1-N* and *DPL2-K* in extracts from Nipponbare and Kasalath mature anthers, respectively. However, *DPL2-N* protein was not detected in extracts from Nipponbare. The lack of *DPL1-K* transcript and the absence of *DPL2-N* protein suggested that both *DPL1-K* and *DPL2-N* were loss of function alleles. Phenotype observation also indicated that *DPL1-K* and *DPL2-N* were loss of function alleles, due to the hybrid pollen carrying both of them became non-functional, and did not germinate.

The relatively high expression of both *DPL1-N* and *DPL2-K* were observed in pollen at the late stage of pollen development. Both *DPL1-N* and *DPL2-K* were thought to have normal functions, because they were normally transmitted to progenies. Complementation tests of *DPLs* using near isogenic lines

also indicated that *DPLs* are responsible genes for this reproductive isolation, and either *DPL1-N* or *DPL2-K* are necessary for pollen transmission. These results clearly showed that a functional *DPL1-N* or *DPL2-K* allele is essential for pollen transmission, whereas *DPL1-K* and *DPL2-N* are loss-of-function alleles that act as a pair of reproductive barrier genes by their combination in hybrid pollen.

In this study, the molecular mechanism of male gametophytic reproductive isolation by the combination of disrupted *DPLs* in rice was identified. After gene duplication of *DPL*, an ancestral population seems to have diverged forming the Kasalath ancestral population, which subsequently lost the function of *DPL1* by TE insertion, and the Nipponbare ancestral population, which lost the function of *DPL2* by means of a splicing defect. When they met again by crossing, hybrid pollen having the loss of function alleles together became non-functional and failed to transmit themselves to the next generation. This is a typical case of the Dobzhansky-Muller model for barrier formation by genetic incompatibility between species.

To discuss when this reproductive isolation mechanism was established, the duplications and disruptions of *DPLs* were also investigated along with flowering species differentiation. *DPL* was highly conserved among 43 angiosperms. Database search indicated that not only rice, but also other four angiosperms, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Glycine max* and *Medicago truncatula* have two *DPL* orthologs. Using syntenic information of them, it was suggested that the duplication of *DPL* occurred at least three times, twice in Poaceae and once in Leguminosae. The syntenic conservation around the region of the *DPL2* on rice chromosome 6 among grass species suggested that *DPL2* is the most ancient in Poaceae.

In the genus of *Oryza*, all examined 42 accessions or varieties belonging to eight closely related species had both *DPL1* and *DPL2*. To investigate relationships between the disruption of *DPLs* and *Oryza* differentiation, it was investigated when the disruptions of *DPLs* occurred in these species including both *O. sativa* and its ancestral species, *O. rufipogon*. Based on the nucleotide variations in the coding region of *DPLs*, *O. sativa* and *O. rufipogon* accessions or varieties could be classified into following four groups; group I, tropical and temperate *japonica* and *O. rufipogon*; group II, *indica* and *O. rufipogon*; group III, *indica* and *O. rufipogon* and group IV, *O. rufipogon*. The insertion of TE in *DPL1* was only observed both *indica* and *O. rufipogon* belonging to group III, whereas the read through product of *DPL2* was only observed in *japonica* cultivars belonging to group I. *DPL1-K* was only observed in the partial *indica* varieties, suggesting the loss-of-function of *DPL1* in *indica* and that of *DPL2* in *japonica* occurred after *japonica-indica* differentiation. Reproductive isolation by the combination of disrupted *DPL1* and *DPL2* was not initially act as barriers between *indica* and *japonica*, due to the occurrence of these disruptions after the *japonica-indica* differentiation. Probably this isolation reinforced the population integrity of *japonica* and *indica* in group III, when the populations came into contact with each other. Our results also suggested that *indica* rice is polyphyletically domesticated from the different ancestors of *O. rufipogon*, whereas *japonica* rice is monophyletic population. Other gene disruptions of *DPLs* also occurred at least three times independently in rice.

These findings showed the molecular mechanisms of reproductive isolation by the combination of disrupted *DPLs*, and a comprehensive story of the evolution of *DPLs* in plant. It remains unknown

whether duplications and disruptions of *DPL* genes resulted from adaptive selection or random drift in plant speciation. Further studies of *DPL* function and analyses of reproductive isolation events in *Oryza* will provide fundamental understanding of molecular functions in plant reproduction and the mechanisms of species diversification.

## 博士論文の審査結果の要旨

水多さんは栽培イネの日本型品種 (japonica cultivar Nipponbare) とインド型品種 (indica cultivar Kasalath) との雑種異常の遺伝学的解析と原因遺伝子の同定, およびその進化解析を行った. 生殖隔離という普遍的な現象に対し, その分子実体については驚くほど理解が進んでいない. そのため生殖隔離遺伝子そのものの進化研究も大きく遅れているのが現状である. また, 実体を明らかにすることで障害を乗り越える手立てもでき, 新たな遺伝子間相互作用や表現型の発見につながる可能性もある. さらに殊にイネの場合, 栽培種固有の進化過程についての理解も深められると期待される.

japonicaとindicaの2品種間には多くの雑種不適合がF2世代の分離の歪みとして検出されている. このうち, 水多さんは第1染色体上でKasalathのホモ接合が第6染色体上でNipponbareのホモ接合の頻度が有意に低下する染色体間の相互作用を解析した. まず, 遺伝学的解析によってこの分離の歪みの原因が雄性配偶体, 花粉にあることを明らかにした. これに基づき約10,000個体のスクリーニングによって, 同時に2カ所の相互作用する遺伝子の同定を試みた. その結果, 1番染色体の59kb領域, 6番染色体上の11kbの領域にそれぞれ責任領域を絞り込んだ. 水多さんは各責任領域に含まれる複数の遺伝子の中からパラログと考えられる相同性の高い遺伝子ペアを見出し, 第1染色体上の遺伝子を *Doppelganger1* (*Dpl1*), 第6染色体の遺伝子を *Doppelganger2* (*Dpl2*) と命名した. これらを候補遺伝子として解析し, 以下のように品種間で異なる重複遺伝子座の機能喪失がゲノム間不適合の原因であることを突き止めた.

cDNA配列からNipponbareの *Dpl1* 遺伝子, Kasalathの *Dpl2* 遺伝子は相同性の高いタンパク質をコードしていることを確認した. 一方, Nipponbareの *Dpl2* 遺伝子はスプライシング異常の突然変異をもち, 正常なタンパク質が産生されない. また, Kasalathの *Dpl1* 遺伝子はトランスポゾンと予想される518bpの挿入配列をもっていて, mRNAの発現が認められない機能喪失型アレルであった. したがって, Kasalathの第1染色体とNipponbareの第6染色体をもった配偶子には機能のある *Dpl* 遺伝子が存在しない. 実際, 減数分裂後の成熟過程の花粉において *Dpl* 遺伝子の発現上昇が観察された. ただし, Kasalathの *Dpl1* 遺伝子, Nipponbareの *Dpl2* 遺伝子をもった準同質遺伝子系統 (NIL 系統) の花粉の形態異常は観察されない. 障害は花粉の発芽率にあった. 純系とくらべ上記の準同質遺伝子系統の培養培地上での発芽率は半分近くまで低下していた. 最終的な証拠を得るため, トランスジーンを用いた相補性テストを行っている. Nipponbareの *Dpl1* 遺伝子, Kasalathの *Dpl2* 遺伝子のいずれのトランスジーンも機能喪失型のKasalathの *Dpl1* 遺伝子, Nipponbareの *Dpl2* 遺伝子の組合せの花粉を救済することができた. これらの結果は, *Dpl1*, *Dpl2* のいずれか少なくとも1コピーの機能的な *Dpl* 遺伝子が花粉の正常な発芽には必要であり, Nipponbareの *Dpl2* 遺伝子, Kasalathでは *Dpl1* 遺伝子が機能喪失型に突然変異しており, この両者の組合せをもった花粉が正常に発芽, 受精できず, F2世代の分離の歪みを生じたと結論される.

雑種不適合を生じた *Dpl* 遺伝子の遺伝子重複とその後の機能喪失について時期を特定するため他の植物種とイネ属の42の野生, 栽培品種を解析した. データベースから *Sorghum bicolor* (モロコシ), *Zea mays* (トウモロコシ), *Glycine max* (ダイズ), *Medicago*

*truncatula* (ウマゴヤシ) がいずれもイネと同様、2つの *Dp1* 遺伝子をもつこと、一方でイネにより近縁な *Brachypodium distachyon* (ヤマカモジ) は1コピーしか *Dp1* 遺伝子をもっていないことを見出した。これら *Dp1* 遺伝子近傍の遺伝子領域を調査し、*B. distachyon*, *S. bicolor*, *Z. mays* とシンテニイがみつかった *Dp12* 遺伝子が祖先型で、*B. distachyon* と分岐後、イネ属で重複したことが示唆された。さらにDPLアミノ酸配列の相同性と領域の保存性から少なくとも2回、*S. bicolor* と *Z. mays* の系統、*Glycine* と *Medicago* の系統それぞれで遺伝子重複が起きたと考えられた。調査したすべてのイネ品種は重複をもっていたが、イネ属のなかで遺伝子破壊は少なくとも5回、*Dp11* 遺伝子で4回、*Dp12* 遺伝子で1度、起きていた。このうち、*japonica* 品種で生じた *Dp12* 遺伝子の機能破壊を除いて、*Dp11* 遺伝子の機能破壊はすべて野生種において起こっていた。頻繁に起こる遺伝子重複とその後の遺伝子破壊は機能遺伝子の位置変化を起こし、*japonica* と *indica* の2品種間で観察されたようなゲノム間不適合を生む可能性を常に秘めている。

一般に、生殖的隔離は複数の遺伝子の相互作用が原因と予想されているが、実際に関与する複数の遺伝子を同時に同定しようとはされていない。ほとんどの場合、労力面での制限から相互作用相手を未定のまま、1遺伝子ごとに探索されている。この点でも、水多さんの研究戦略は特徴的で、同時に2つの領域を解析することで、遺伝子同定までの時間を大きく短縮することに成功している。一見、労力の分散にみえる戦略が実は、有効な候補遺伝子の絞り込みにつながることを示したもので、今後の同様の解析の見本となるものである。

水多さんの学位論文は *japonica* と *indica* ゲノム間の雑種不適合を引き起こす相互作用の実体を解明した優れたものである。一部の研究成果は筆頭著者として既に英語雑誌に発表済みである。学位論文も英語で書かれていて、公開発表会の発表、質疑応答もすべて英語でこなした。十分なプレゼン、コミュニケーション能力があることも確認した。審査委員全員一致で水多さんに学位を与えるにふさわしいと判断した。