

氏 名	釜 森 保 志
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 73 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	ゲノムの多様性に関する研究 —レトロトランスポゾン <i>ninja</i> とアルカリ性ホスファターゼ遺伝子 について—
審 査 委 員	(主査) 教 授 渡 邊 隆 夫 教 授 宗 川 吉 汪 教 授 古 澤 壽 治 助教授 山 本 雅 敏

論 文 内 容 の 要 旨

生命の多様性は、その遺伝的多様性に大きく依存している。本研究は生物のゲノム構造 (DNA 配列) の多様性に注目し、昆虫遺伝子の分子生物学的解析を行なった。第一章ではオナジショウジョウバエ (*Drosophila simulans*) の転移性遺伝因子レトロトランスポゾン *ninja* の種内および種間における多様性を、第二章ではカイコ (*Bombyx mori*) の酵素遺伝子アルカリ性ホスファターゼ (ALP) に注目し、遺伝子発現調節の多様性について調査した。

近縁種間のゲノムに含まれるトランスポゾンは、種類も量も大きく異なる。レトロトランスポゾン *ninja* は、*D.simulans* のある系統 (w^{mky}) では 25 - 30 コピー含まれるが、他の *D.simulans* の野生系統や実験室系統では 5 コピー以下である。レトロトランスポゾンの両端には LTR と呼ばれる同方向の反復配列が存在しており、これがレトロトランスポゾンの特徴である。一方、*D.melanogaster* のレトロトランスポゾン *aurora* は *D.simulans* の *ninja* と LTR の配列が 92.4% 相同であり、類縁配列と考えられている。*ninja* と *aurora* の進化関係を推測するために、*aurora* コピーの塩基配列を決定し、それぞれの種に含まれる *ninja* と相同を示す配列 (*ninja* ホモログ) の *aurora* を調査した。*aurora* コピーには *ninja* と比較して 4 カ所の欠損領域 (100bp-1kb) と 1 カ所の転移配列的 (20bp) な変異が存在し、欠損領域にはトランスポゾン活性に重要な逆転写酵素領域も含まれていた。*D.melanogaster* の 5 系統を用いた PCR 解析から、この領域を持たないコピーが主流であることが分かり、*D.melanogaster* の *ninja* ホモログは、機能的に障害のために“動けない”状況にあると推測された。*ninja* と *aurora* の LTR の塩基配列 (約 300bp) は、おおまかに 14 カ所で異なっており、両レトロトランスポゾンの内部領域の相同性 (約 96%) よりも低い。そこで、両種合わせて 31 の LTR 領域を含むクローンの塩基配列を比較し、両種の *ninja* ホモログの関係を調査した。その結果、*ninja* の特徴を多く含む配列 (*ninja*-type) と、*aurora* の特徴を残す配列 (*aurora*-type) の 2 つに大別できた。*ninja*-type は、*D.simulans* だけに存在し、*aurora*-type は、*D.simulans*、*D.melanogaster* 両種から検出された。

両種に近縁の 4 種 (*D.mauritiana*、*D.sechellia*、*D.teissieri*、*D.yakuba*) の *ninja* ホモログを同様に調査したところ、*aurora*-type は 4 種すべてに存在したが、*ninja*-type は全く検出されなかった。すなわち、*ninja*-type は *D.simulans* 種のみで多様化したことを示唆する。*D.simulans* の w^{mky} 系統は特異的にコピー数増加されたものと考えられる。また、*ninja* ホモログをもとに作製した 6 種の系統樹は、既知の系統樹 (タンパク質の二次元泳動像による) とほぼ一致し、6 種に近縁な第 7 番目の種 *D.erecta* には *ninja* ホモログが含まれていなかったことから、*ninja* ホモログは *D.erecta* と分岐した後の *D.simulans* の近縁

6種の共通祖先種に侵入したと推察された。

第二章では、*B.mori*のゲノム内に存在する遺伝子として、ALP遺伝子に注目し、系統間における多型を調査した。*B.mori*の消化管には膜結合型の酵素 (membrane-bound ALP, mALP) と遊離型の酵素 (soluble ALP, sALP) の2種類のアイソザイムが報告されている。電気泳動の活性染色 (ザイモグラム) 後、酵素分子をいくつかのタイプに分けた。

まず、sALPのcDNAを単離し、すでに得られているmALPのcDNAをプローブとしてDNA解析・RNA解析により両ALPの電気泳動多型の原因を調査した。その結果、遺伝子構造には多型が存在したが転写産物の大きさには系統間の差はなく、また遺伝子多型と電気泳動多型に相関は認められなかった。これらは両酵素の調節には、転写、翻訳レベルの調節が深く関わっていることを示す。続いて、cDNAをプローブとしてmALP遺伝子とsALP遺伝子のそれぞれの単離を試みた。その結果、両遺伝子は同一染色体上のきわめて近接して座乗する (遺伝子間の距離は6 kb以内) ことが明らかになり、*B.mori*の両ALP遺伝子は最近遺伝子重複により生じ、現在、遺伝子の発現・構造の両面において機能分化 (多様性獲得) の途上にあると推測された。

論文審査の結果の要旨

申請論文はショウジョウバエのトランスポゾン *ninja* の多様性と、カイコの酵素遺伝子ALPの発現調節の多様性を、分子生物学的手法を用いて論じたものである。

ninja はオナジショウジョウバエの多変異系統のみで発見されたレトロトランスポゾンであるが、そのホモログが同種の正常系統や近縁種群にも、*aurora* として発見された。*ninja* はハエのゲノム内で動く (変異を誘発する) が、*aurora* は動かない (死んだトランスポゾン) と考えられる。塩基配列を比較した結果、この動く・動かないを支配する遺伝子が *aurora* では欠失していることが判明し、それが種の進化とともにハエのゲノム内に保存されてきたものと考えられた。トランスポゾンの機能と構造を明確にした点が発見である。

一方、カイコのALPには、遺伝子の重複によるm型とs型の2種類のアイソザイムがある。電気泳動の活性染色 (ザイモグラム) の変異が遺伝子構造に起因するのか、あるいは転写・翻訳レベルの調節によるのかを調べたところ、ザイモグラムの欠失バンドには構造に起因する場合 (sALP) と調節に起因する場合 (mALP) があり、両遺伝子が機能分化 (多様性獲得) の途上にあると推測された。

以上のように、申請論文は遺伝子の多様性とその起因に関する、最新でしかも精密な調査研究であり、遺伝学・進化学の分野で高く評価されるものと判断する。なお、本研究は、2編の論文として以下の通り印刷中である。

1. Molecular identification of the active *ninja* transposon and the inactive *aurora* element in *Drosophila simulans* and *D.melanogaster*, Kanamori, Y., Hayashi, H. and Yamamoto, M.-T., Genes and Genetic Systems Vol.73 (in press).
2. Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori*, Itoh, M., Kanamori, Y., Takao, M. and Eguchi, M. Insect Biochemistry and Molecular Biology Vol.28 (in press).