

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成11年度博士課程 入学

氏 名： 程 朝陽

指導教官名： 大坪 栄一

論文題目

Phylogenetic studies of cultivated and wild rice strains by insertion polymorphism of retroposon *p-SINE1*

(レトロポゾン *p-SINE1* の挿入の有無に基づいた栽培稲と野生稲の系統の解析)

イネ属は、世界各地に分布している2種類の栽培種と20種類の野生種からなる。これらの種間の系統関係の解明は、栽培稲の起源の解明だけではなく、野生稲の有用遺伝子の利用にも、大変重要である。イネ属は、細胞遺伝学的な形質やゲノム DNA 交雑法によって、六種類の二倍体 (AA, BB, CC, EE, FF および GG) と三種類の四倍体 (BBCC, CCDD および HHJJ) に分けられている。そのうち、AA ゲノムを持つ種は、アジア栽培種 (*Oryza sativa*) とアフリカ栽培種 (*O. glaberrima*)、および地理的あるいは生殖的に隔離している五つの野生種 (*O. rufipogon*, *O. barthii*, *O. glumaepatula*, *O. longistaminata* および *O. meridionalis*) に分けられている。栽培種 *O. sativa* と *O. glaberrima* は、それぞれ野生種 *O. rufipogon* と *O. barthii* にもっとも近縁であるため、それぞれ *O. rufipogon* と *O. barthii* から由来したと推定されている。栽培稲の起源を解明するために、これまでに AA ゲノムの種間および種内の系統関係が、形態や生理的形質および各種の分子マーカーで調べられているが、決定的な結論はまだ出ていない。未解決の主な問題点は：(1) 種間の系統の近縁関係はどうか、(2) 七つの種は独立に進化して来たかどうか、(3) *O. sativa* の祖先種と考えられる *O. rufipogon* には一年生と多年生の亜種の分化があるが、それぞれ別の種と考えられるかどうか、(4) *O. sativa* の二つの亜種 *indica* と *japonica* は *O. rufipogon* から独立に由来したかどうか、という点である。

レトロポゾン *p-SINE1* は、イネの *waxy* 遺伝子のイントロン内で挿入配列として見出されたものであり、植物では始めて見つかった SINE (short interspersed elements) である。SINE は、RNA を経由し、逆転

写によってランダムにゲノムに挿入する。SINEは同じ遺伝子座に二度挿入されることはなく、一旦ゲノムに挿入されると、ふたたび切り出されるということもない。そのため、SINEの挿入の有無のパターンは、進化の研究の非常に良いマーカーと考えられる。実際、特定の遺伝子座におけるSINEの挿入の有無を解析することによって、ヒトを含む霊長類や鯨を含む他の哺乳類の進化が研究され、多くの論争が解決されつつある。我々の研究室では、*p-SINE1*の発見以来、inverse PCR (IPCR)あるいはゲノムスクリーニングなどの方法を用いて、栽培稲から数多くの*p-SINE1*メンバーを同定し、AAゲノムを持つ種の系統関係、および栽培種*O. sativa*とその祖先種と思われる*O. rufipogon*の種間および各種内の系統関係を解析してきた。しかし、種間および種内の系統において挿入の有無に関して多型を示すメンバーが少なかったため、系統関係がまだよく解明されていなかった。

本研究ではAAゲノムを持つ栽培稲と野生稲に存在する*p-SINE1*メンバーを分離し、*p-SINE1*の挿入の有無に関して種内および種間の系統の各遺伝子座で多型を示すメンバーを数多く同定した。これらの*p-SINE1*メンバーの有無のパターンに基づいて、AAゲノムを持つ種の系統関係および栽培種*O. sativa*の起源を推定することができた。結果は、以下の様に要約できる。

1. *p-SINE1*の挿入の有無による栽培種*O. sativa*の起源の解析

栽培種*O. sativa*とその祖先種と考えられている*O. rufipogon*の系統関係を調べるためには、*O. sativa*と*O. rufipogon*の系統内で*p-SINE1*の挿入の有無に関して多型を示すメンバーが必要である。しかし、これまで栽培種の系統間で挿入の多型を示すものは三つしかなかった。そこで、IPCRとADL-PCR (Adaptor-ligation based PCR)を用いて、*O. sativa*からさらに多くの*p-SINE1*メンバーを分離し、*O. sativa*と*O. rufipogon*の系統でのそれぞれのメンバーの存在の有無をPCRで調べた。その結果、新たに系統間で挿入の多型を示すメンバーを三つ見出した。

*O. sativa*と*O. rufipogon*の系統間で、挿入の多型を示す六つのメンバーは、*p-SINE1*のコンセンサス配列と比較して異なる三カ所に共通の塩基置換変異を持つことを見出した。そこで、*O. sativa*ゲノムからADL-PCRで、同じ変異を持つ他の16個のメンバーを新たに単離し、AAゲノムを持つ各種の系統における*p-SINE1*の有無をPCRで調べた。その結果、これらのメンバーの大部分が*O. sativa*と*O. rufipogon*以外の種の系統には存在していないこと、さらに*O. sativa*と*O. rufipogon*に属する各系統間で挿入の多型を示すことが分かった。この結果は、共通の塩基置換を持つメンバーが最近増幅したものであり、サブファミリーを形成していることを示唆する。そこで、このサブファミリーをRA (recently amplified) サブファミリーと名付けた。

次に、RAサブファミリーのメンバーを用いて、合計106個の*O. sativa*と*O. rufipogon*の系統につい

て、*p-SINE1*の有無を調べ、それぞれのパターンに基づいて、系統樹を作成し、系統関係を推定することを試みた。その結果、*O. sativa*の系統は明らかに二つのグループに分けられ、それぞれインディカとジャポニカに対応することが分かった。*O. rufipogon*の系統もいくつかのグループに分けられ、そのひとつは一年生の系統であり、その他は多年生の系統であることが分かった。この結果は、一年生の系統が多年生の系統から由来することを示唆している。また、*O. sativa*のインディカ系統は*O. rufipogon*の一年生の系統のグループに属し、ジャポニカ系統は*O. rufipogon*のいくつかの多年生の系統のグループの一つに属することが分かった。この結果は、インディカ系統が一年生の*O. rufipogon*の系統、ジャポニカ系統が多年生の*O. rufipogon*の系統と祖先を同じにすることを強く示唆する

栽培稲および野生稲に共通の祖先種では、すべての遺伝子座に*p-SINE1*が挿入されていないと考えられる。そのような仮定の祖先種を加えて系統樹を作ると、多年生の系統のグループの一つが仮定の祖先種に近いことが分かった。この結果は、*O. sativa*と*O. rufipogon*の祖先種は、多年生のエコタイプを持つものであることを強く示唆している。以上の解析によって、RA サブファミリーのメンバーが、栽培稲の系統分類と起源の研究に優れたマーカーであることが明らかになった。

2. *p-SINE1*の挿入の有無によるAAゲノムを持つ種の系統関係の解析

今までに、*O. sativa*から同定した*p-SINE1*メンバーの中に、AAゲノムを持つ種の系統間で*p-SINE1*の挿入の有無に関して多型を示すいくつかのメンバーが見い出された。これらのメンバーは、*O. sativa*と他の野生種との近縁関係を解明するための優れたマーカーになると思われた。そこで、AAゲノムを持つ他の種の系統関係を調べるため、四つの野生種*O. barthii*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis*と*O. longistaminata*からも、合計25個の新規の*p-SINE1*メンバーを同定した。PCRで各種の系統における*p-SINE1*の存在の有無を調べたところ、21個のメンバーが多型を示すことが分かった。これらのメンバーの内、あるメンバーは一つの種にしか存在しないが、他のメンバーは二つあるいはそれ以上の種において存在していることが分かった。

AAゲノムを持つ種の系統関係を解明するため、合計72個の栽培稲と野生稲の系統において、これまで同定した種間に多型を示す合計35個の*p-SINE1*メンバーの存在の有無を調べた。その結果、野生稲の各種の系統がユニークな存在の有無のパターンを示すことが分かったが、アジア栽培種*O. sativa*と野生種*O. rufipogon*、アフリカ栽培種*O. glaberrima*と野生種*O. barthii*は良く似たパターンを示すことが分かった。

*p-SINE1*の有無のパターンに基づいて、系統樹を作成したところ、野生稲の五つの種の系統がそれぞれ独立のクラスターを成すが、*O. sativa*と*O. rufipogon*、*O. glaberrima*と*O. barthii*は同一のクラスターを成すことが分かった。*O. longistaminata*の系統と*O. meridionalis*の系統は遠い関係にあり、またこれらの二

つの種のそれぞれの系統と *O. rufipogon*、*O. barthii* と *O. glumaepatula* の系統は遠い関係を示すことが分かった。*O. rufipogon*、*O. barthii* と *O. glumaepatula* の系統は互いに近い関係を示したが、中でも *O. barthii* と *O. glumaepatula* の系統はもっとも近縁であることが分かった。また、すべての遺伝子座に *p-SINE1* が挿入されていない仮定上の祖先種を加えて、系統樹を作成して見ると、*O. longistaminata* と *O. meridionalis* が仮定の祖先種と近いが、他の種は遠い関係を示すことが分かった。これらの結果は、1) 本研究で同定した *p-SINE1* のメンバーが、種の系統の識別と分類に有用なマーカーであること、2) AA ゲノムを持つ五つの野生種が独立に進化してきたことを示しており、栽培種 *O. sativa* と *O. glaberrima* は *O. rufipogon* と *O. barthii* からそれぞれ由来したこと、3) *O. longistaminata* と *O. meridionalis* は古い時期に分岐したが、*O. barthii* と *O. glumaepatula* は最近分岐したことを示唆する。

3. *p-SINE1* の一メンバー内で挿入配列として見出された新規転移性遺伝因子 *Tnr8*

p-SINE1 メンバー-r32 は初めに *O. sativa* から分離されたが、*O. glaberrima* の r32 の場合には 418 bp の配列が挿入していることが分かった。この配列は、六つの 30 bp のタンデム重複配列を含む末端逆向き配列を持ち、9bp の標的配列を重複していることから、転移性遺伝因子と考えられ、*Tnr8* と名付けた。*Tnr8* は 418bp しかないため、非自律性因子と考えられる。相同性解析したところ、*Tnr8* はイネのゲノムに高コピーで存在し、メンバー間に様々な変異が存在することが分かった。AA ゲノムを持つ各種の系統における *Tnr8* メンバーの存在の有無を調べたところ、あるメンバーは多型を示すことが分かったが、この結果は、*Tnr8* が種に分岐の途中に転移したことを示している。*Tnr8* の持つ構造的特徴は、*Drosophila* で見いだされている foldback transposable element (FB 因子) とよく似ているが相同性は全くないことが分かった。しかし、*Tnr8* は、FB 因子と同様、イネのゲノムの再編成に関与していることを示唆する結果を得た。