

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成13年度博士課程 入学
氏名 徐 建 紅
指導教員 横田 明

論文題目

Phylogenetic analysis of rice strains of the *Oryza* genus by insertion polymorphism of SINEs

(レトロポゾン SINE の挿入の多型を利用したイネ属系統の解析)

イネ属 *Oryza* は世界各地に分布しており、2 種類の栽培種と 20 種類の野生種からなる。イネ属は、細胞遺伝学的な形質、ゲノム DNA 交雑法、遺伝子の配列によって、6 種類の二倍体(AA、BB、CC、EE、FF および GG)と 4 種類の四倍体(BBCC、CCDD、HHJJ および HHKK)に分類されている。そのうち、AA ゲノムを持つ種は、アジア栽培種(*Oryza sativa*)、アフリカ栽培種(*Oryza glaberrima*)、および五つの野生種(*O. rufipogon*, *O. barthii*, *O. glumaepatula*, *O. longistaminata* および *O. meridionalis*)である。栽培種 *O. sativa* は、それと最も近縁な野生種 *O. rufipogon* から由来したと推定されているが、*O. sativa* の二つの生態型(インディカとジャポニカ)と *O. rufipogon* の三つの生態型(一年生、多年生と中間型)の間の関係に関しては未だ不明瞭な部分がある。また、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きたが、研究者によって異なった説が提唱されている。そのため、AA ゲノムを持つ種の種名が頻繁に変更されるといった混乱も生じていた。これらの種間の系統関係の解明は、栽培種の起源を明らかにするだけでなく、野生種の有用遺伝子の利用にも大変重要である。

レトロポゾンである SINE(short interspersed elements)は、RNA を経由し、逆転写により生じた cDNA がランダムにゲノムに挿入することによって転移する。そのため、SINE はある遺伝子座に一度入ったら切り出されることはなく、全く同じ遺伝子座へ独立に挿入することもない。これらは系統分類のマーカーとして優れた特徴である。*p-SINE1* は我々の研究室で植物で初めて見いだされたイネの SINE であるが、それ以来、種々の方法を用いて、*O. sativa* から数多くの *p-SINE1* メンバーを同定し、これらのメンバーの各座における存在の有無を調べることによって、*O. sativa* とその祖先種と思われる *O. rufipogon* の系統関係を解析してきた。その結果、*O. sativa* と *O. rufipogon* の系統間で挿入の有無の多型を示すメンバーが存在すること、そのほとんどが RA (Recently Amplified)というサブファミリーに属すること、*O. sativa* の系統は複数の起源を持つこと、などが示された。

しかし、これらの解析に用いた *p-SINE1* メンバーは *O. sativa* の系統から単離したもののみであり、*O. rufipogon* の系統からは *p-SINE1* のメンバーを同定していなかったため、*O. rufipogon* の種内の系統関

しかし、これらの解析に用いた *p-SINE1* メンバーは *O. sativa* の系統から単離したもののみであり、*O. rufipogon* の系統からは *p-SINE1* のメンバーを同定していなかったため、*O. rufipogon* の種内の系統関係は必ずしも明らかにはなっていなかった。また、*O. sativa* と *O. rufipogon* 以外の AA ゲノムを持つ種からも多くの *p-SINE1* メンバーを同定し、AA ゲノムを持つ種の系統関係の解析がなされてきたが、AA ゲノム以外の種を含むイネ属内のより広い種間の関係は解析されてはこなかった。

本研究ではまず、*O. rufipogon* から SINE メンバーを分離し、種内で挿入の有無に関して多型を示すメンバーを数多く同定し、これらのメンバーの存在の有無のパターンに基づいて *O. rufipogon* の種内の系統関係を明らかにし、*O. sativa* の系統関係と対照することによってその起源を推定することを目的としたものである。また、AA ゲノム以外の種から多数の SINE メンバーを単離し、それらを用いてイネ属内の種の系統関係を明らかにすることを目的としたものである。本研究で得られた結果は、*O. rufipogon* とされていたオーストラリアのいくつかの系統が実際には AA ゲノムを持つ異なる種 *O. meridionalis* であるという予期しなかった結果などを含めて、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* の起源と野生種 *O. rufipogon* の系統関係の解析

栽培種 *O. sativa* 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、一年生の W1681、中間型の W2007、多年生の W1943、W120 および W593 の *O. rufipogon* の各系統から Adaptor-Ligation based PCR (ADL-PCR) また Inverse PCR (IPCR) で多数の *p-SINE1* メンバーを単離した。その中で 21 個のメンバーが *O. rufipogon* の種内で挿入の有無の多型を示したが、その全ては以前 *O. sativa* から単離されたメンバーと同様、RA サブファミリーに属するものであった。それらのメンバーと以前に *O. sativa* から分離された計 44 個の RA サブファミリーメンバーの塩基配列をアラインメントしたところ、RA サブファミリーの中に二つのグループ RA α と RA β があることが分かった。RA サブファミリーのコンセンサス配列と比較すると、RA α は三つ、RA β は二つの共通の塩基置換変異を持っていた。

O. rufipogon、*O. sativa* 及びその他の AA ゲノムを持つ種の計 108 系統について、RA サブファミリーメンバーを含む 51 個の *p-SINE1* メンバーを用いてそれらの存在の各座における有無を調べ、そのパターンに基づいて系統樹を作成した。その結果、*O. rufipogon* の系統は 3 つのグループに分けられることが分かった。そのひとつは一年生の系統、ひとつは主に中国由来の多年生の系統、もうひとつは多年生と中間型の系統からなるグループであった。*O. sativa* の系統は明らかに二つのグループに分けられ、それぞれがインディカとジャポニカに対応していた。インディカの系統は *O. rufipogon* の一年生の系統と同じグループに属し、ジャポニカの系統は中国由来の系統を多く含む多年生の *O. rufipogon* と同じグループに属していた。これらの結果は、インディカ系統が一年生の *O. rufipogon* の系統、ジャポニカ系統が中国由来

の多年生の *O. rufipogon* の系統と同じ祖先から由来することを強く示唆しており、以前の Cheng (2003) らの結果と一致する。*O. sativa* のインディカの系統と *O. rufipogon* の一年生の系統からなるグループは、さらに三つのサブグループに分けられた。そのうちのひとつには、一年生の系統の大部分と小数のインディカの系統が含まれていた。この結果は、それらのインディカの系統は例外的に一年生の *O. rufipogon* から直接起源したことを示唆する。他の二つのサブグループは主にインディカの系統からなっていたが、そのうちのひとつは研究所で人工的に多年生の系統またはジャポニカの系統と交雑して作られたインディカの系統を多く含んでいた。

一方、*O. sativa* のジャポニカの系統は明らかに二つのサブグループに分けられ、それぞれが熱帯ジャポニカと温帯ジャポニカに対応していた。この結果は熱帯ジャポニカと温帯ジャポニカが、互いに異なる集団であり、SINE の挿入の有無によってはっきり区別できることを示す。*O. rufipogon* の多年生と中間型の系統のグループは *O. sativa* の系統を含まないが、他の AA ゲノムを持つ種の系統を含み、ほとんど全ての SINE メンバーを持たない仮想的な祖先種にも近いものであった。さらに、そのグループ内で中間型の系統はひとつのサブグループを形成していた。このサブグループは仮想的な祖先種に最も近いものであったことから、多年生や一年生の *O. rufipogon* は中間型から由来することが示唆される。

2. オーストラリアの野生稲 *Oryza meridionalis* における一年生と多年生の二つの生態型の存在

これまでの形質による分類では、AA ゲノムを持つオーストラリアの野生稲 *Oryza meridionalis* は全て一年生の系統であり、多年生の系統はないと考えられていた。AA ゲノムを持つオーストラリアの野生稲で *O. rufipogon* または *O. meridionalis* と分類されていた多くの系統について、AA ゲノムを持つ各種に特異的ないくつかの *p-SINE1* メンバーを遺伝的マーカーとして、それらの存在の有無を PCR で調べた。その結果、*O. rufipogon* とされていたいくつかの多年生の系統は *O. meridionalis* 特異的な *p-SINE1* メンバーを特定の座位に持っていたが、*O. rufipogon* 特異的なメンバーは持っていないことが分かった。従って、これらの系統が多年生の *O. rufipogon* とされていたのは分類の間違いであり、実際は *O. meridionalis* であることが分かった。この結果は *O. meridionalis* にも多年生の系統が存在することを示すものである。*O. meridionalis* と *O. rufipogon* は全く異なる種であるにもかかわらず、それぞれに一年生と多年生の生態型があることは、生態型の分岐がそれぞれの種で独立して起こっていることを示唆する。

3. SINE の挿入の有無によるイネ属の種の系統関係の解析

これまでに同定した *p-SINE1* メンバーのうち、二つが AA 以外のゲノムを持つ種の系統に存在していることが分かっている。このようなメンバーは、イネ属の種間の系統関係を解明

するための優れたマーカーになると思われた。そこで、さらに、AA 以外のゲノムを持つ種の系統から *p-SINE1* 及び次に述べる新たなイネの SINE (*p-SINE2* と *p-SINE3*) の 10 個の新規のメンバーを同定した。また、*O. sativa* のゲノム DNA データベースからも AA 以外のゲノムを持つ種の系統にも存在する 12 個の SINE メンバーを新たに同定した。

様々なゲノムタイプを持つ 53 系統において、これまでに同定した *p-SINE* メンバーの存在の有無を PCR を用いて調べた。これらのメンバーは、FF、GG および HHJJ ゲノムを持つ種の系統には存在していなかったため、これらの種は他とは遠い関係にあると考えられた。各 *p-SINE* の有無に基づいて、上記以外のゲノムタイプを持つ種の系統の系統樹を作成した。その結果、AA ゲノムを持つ 7 種の系統はひとつのグループを形成した。BB ゲノムを持つ種の系統と BBCC ゲノムを持つ四倍体の種の系統はひとつのグループになり、CC ゲノムを持つ種の系統と BBCC または CCDD を持つ四倍体の種の系統はひとつのグループになった。また、CCDD ゲノムを持つ種の系統は二倍体の EE ゲノムを持つ種の系統とひとつのグループになった。これらの結果は、四倍体の種の系統においては BB、CC、あるいは EE ゲノムの中の二つに同時に分類されることを示す。また、系統樹において、AA、BB および CC ゲノムを持つ種の系統は最も近い関係にあることから、これらの三つのゲノムは互いに近縁であることが示唆された。また CCDD ゲノムを持つ三つの種 (*O. latifolia*、*O. alta* と *O. grandiglumis*) の系統の関係から、これらの CC ゲノムは互いに非常に近い関係にあるが、DD ゲノムは *O. latifolia* のものが他の二つの種のものとは離れた関係にもあることが分かった。*Adh1* 遺伝子の Exon3~Exon7 の塩基配列の解析からもこの結果は支持された。

4. 新規二種類のイネ SINE (*p-SINE2* 及び *p-SINE3*) の同定

これまでに分離した *p-SINE1* のメンバーの中に配列が他と大きく異なるものが存在することを見出した。データベース解析から、これらが二つのファミリーを成すことが分かった。これらのコンセンサス配列と *p-SINE1* のコンセンサス配列と比べると、5' 末端側の RNA ポリメラーゼ III のプロモーターが存在する領域では塩基配列の相同性が高く (>80%)、3' 末端側では低い (<40%) ことが分かった。そこで、それらをそれぞれ *p-SINE2* と *p-SINE3* と命名した。*O. sativa* のゲノムには、*p-SINE2* のメンバーは 18 個、*p-SINE3* は 24 個存在しており、それぞれのメンバーは 12 本の染色体上に分散して存在していることが分かった。様々なゲノムタイプを持つ各種の系統において、これらのメンバーの存在の有無を PCR を用いて調べた。その結果、*p-SINE2* は AA から EE までのゲノムを持つ全ての種の系統に存在するが、*p-SINE3* は AA ゲノムを持つ種の系統にのみ存在することが分かった。次に、*p-SINE1*、*p-SINE2*、*p-SINE3* の関係を調べるために、52 個の *p-SINE1*、18 個の *p-SINE2*、24 個の *p-SINE3* を選び、それぞれのファミリー内での遺伝的距離を計算した。その結果、*p-SINE3* の遺伝的距離が最も小さく(0.0595)、*p-SINE1* が最も大きい(0.1514)ことが分かった。このことは、*p-SINE3* が最も若く、*p-SINE1* が最も古いファミリーであることを示唆する。