

論文内容の要旨

論文題目 Molecular Genetic Study on Evolutionary History of Asian Rice

(アジア栽培イネの進化史に関する分子遺伝学研究)

氏名 熊谷 真彦

農耕・牧畜の獲得はヒトの歴史において非常に重要である。穀物の栽培化により安定した栄養源の確保が可能となり、それにより人口増がおこり文明の発達に繋がってきた。アジア地域においてはイネが主要な穀物の一つとして栽培されてきた。イネは現在、世界人口の半数以上の人々の栄養源となっている。アジアの栽培イネ *Oryza sativa* の栽培化は約 1 万年前に始まったと考えられている。この栽培イネの歴史はヒトの農耕文化および食物利用の歴史の観点から人類学的に非常に興味深い。特に東アジアにおける稲作農耕の起源、伝播の歴史は大きな注目を集めている。また同時に、栽培種の進化史を研究することは生物進化を考える上でも重要である。

O. sativa は *japonica* と *indica* の 2 亜種に大別される。近年、様々な中立的な分子マーカーを用いた研究から、*japonica* と *indica* は野生祖先種 *O. rufipogon* の異なる地域の遺伝子プールを起源とすることが示唆され、両者の分岐は少なくとも 20 万年以上前に遡ると推定されている。しかし両者は栽培化に関する遺伝子で同じ allele を共有しており、またゲノムワイドなマイクロサテライトの解析から祖先系統の部分的な共有、もしくは近年の遺伝子交流が示唆されている。このように両者の栽培化は完全に独立ではなかった可能性も指摘され、現在も議論が続いている。

他方、アジアの様々な地域の遺跡から古代のイネ遺存体“炭化米”が出土している。この炭化米 DNA を分析することが出来れば、栽培化過程をより直接的に明らかにすることができる。すなわち、過去のいつ、どこに、どのようなイネがあったのかという情報を得る

ことが出来ればヒトのイネ利用の歴史、およびイネの進化史について時間的、空間的に理解することができる。損傷を負っている古 DNA 分析には多コピーである葉緑体 DNA が有用であるが、リファレンスとなるイネの葉緑体 DNA に関するデータは非常に貧弱であるという問題点がある。また、先行研究で用いられた DNA マーカーでは炭化米の亜種 (*japonica*, *indica* もしくは野生イネ) を信頼性高く同定することはできない。そこで本研究ではアジアにおけるヒトのイネ利用の歴史および栽培イネの進化史の一端を明らかにすることを目的とし、現生の野生イネ、栽培イネを用いて炭化米 DNA 分析のためのリファレンスデータを作成し、その結果を基に開発した新規 DNA マーカーを用いて炭化米の DNA 分析を行った。また最近、栽培化に関連した形質の原因遺伝子の同定が進んでいる。これらの栽培化関連遺伝子を用いた系統地理的解析を行うことでも栽培化過程に関する知見を得られることが期待されている。そこで、核 DNA コードの栽培化関連遺伝子 *Rc*、*qSW5* を用いた系統地理的解析を行った。

1. 葉緑体多変異領域の分子系統解析 (1章・2章)

葉緑体 DNA は進化速度が核の約 1/10 と遅い。したがって、非常に近縁な種間や種内の系統解析を効率的に高解像度で行うためには進化速度の速い領域を用いる必要がある。そこで、公共データベースに登録された *japonica*、*indica* および *O. rufipogon* の葉緑体ゲノム配列の比較解析を行った。その結果、葉緑体ゲノム中で変異の多数蓄積している領域を発見した。まずこれらの領域のうち、最も変異の蓄積の見られた 3

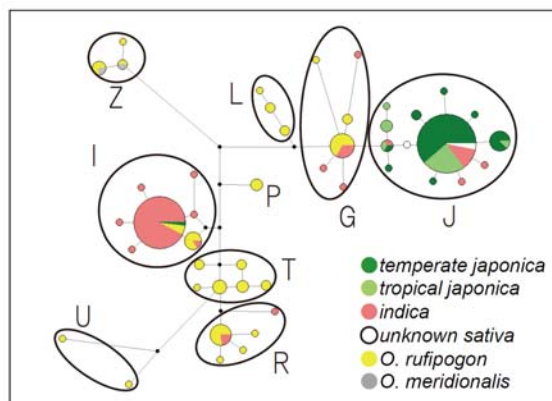


図 1. 葉緑体多変異領域約 5700bp を用いて作成した系統ネットワーク。塩基置換と InDel データを基に作成した。

領域約 1800bp の配列を用いて、*Oryza* 属全体の 21 種について分子系統解析を行った。次にこの領域にさらに 3 領域を加えた約 5kb を用いて現生イネ *japonica*、*indica*、*O. rufipogon* 214 系統について分子系統解析を行ったところ、十分な解像度で系統関係が得られた (図 1)。これにより、炭化米 DNA 分析を信頼性高く行うためのリファレンスが作成された。作成した系統ネットワークで *japonica* は単系統性を示し 99% がクラスター J に属した。他方、*indica* は多系統性 (クラスター G, I, J と R) を示し多様な母系祖先を持つことが明らかとなった。*japonica*、*indica* と *O. rufipogon* の地域集団、すなわち東アジア、南アジア、東南アジア大陸部、東南アジア島嶼部の集団について、遺伝的な分化を示す *Fst* 値を求め、その値から neighbor-joining 法により系統樹を作成した。その結果、*japonica* は非常に大きく分化していたが東アジア集団と近縁関係を示し、*indica* はその他の集団と近縁であった。これは核の中立遺伝子を用いた先行研究の結果を支持するものである。

2. 炭化米 DNA 分析 (3 章)

1. で得られた葉緑体 DNA リファレンスデータから、99% の *japonica* が属するクラスター J および、72% の *indica* が属するクラスター Ia を決定する 2 サイトを用いて炭化米 DNA 分析を試みた。試料は日本の中世の陣ヶ峯遺跡、弥生時代の唐古・鍵遺跡、朝鮮半島の楽浪郡(BP2200-2000)、泗川里遺跡 (BP2800-2700) から出土した炭化米を用いた (図 2、表 1)。炭化米 1 粒ずつから DNA を抽出し、PCR ダイレクトシーケンシング法により配列を得た。その結果、陣ヶ峯遺跡、唐古・鍵遺跡ではクラスター J および、J 以外が、楽浪郡では Ia と J 以外、泗川里では J が見られた。このことから、日本では中世、弥生時代共に *japonica* と *japonica* 以外 (*indica*?) の系統を栽培、もしくは交易により得ていたことが示唆された。日本では赤米と呼ばれる品種を栽培していた記録が飛鳥時代 (BP1500) まで遡れる。赤米には *japonica* と *indica* 系統両タイプがあるが、弥生時代に *indica* 系統の赤米を栽培していた可能性も十分考えられる。また、朝鮮半島では中部の楽浪郡ではクラスター J は検出されず、Ia が見られた。他方約 600 年遡った南部の泗川里からは 1 粒のみではあるが、クラスター J がみられた。現在は日本、朝鮮共に *japonica* を主に栽培しているが、過去には *japonica* と同時に異なる品種、おそらく *indica* も利用していたことが強く示唆された。



図 2. 炭化米 DNA 分析を行った遺跡

表 1. 炭化米 DNA 分析の結果. 遺跡名下の括弧内は分析を試みた試料数を示した。

	No.	Cluster J	Cluster I	Cluster
		G14169A	T56524C	
陣ヶ峯 (305粒)	1	A	T	J
	2	A	-	J
	3	A	-	J
	4	A	-	J
	5	A	-	J
	6	A	-	J
	7	A	-	J
	8	A	-	J
	9	G	-	not J
	10	G	-	not J
	11	-	T	not Ia
	12	-	T	not Ia
	13	-	T	not Ia
	14	-	T	not Ia
	15	-	T	not Ia
	16	-	T	not Ia
	17	-	T	not Ia
唐古・鍵 (119粒)	1	A	-	J
	2	A	-	J
	3	A	-	J
	4	G	-	not J
	5	-	T	not Ia
楽浪 (40粒)	1	G	-	not J
	2	G	-	not J
	3	-	C	Ia
泗川里 (8粒)	1	A	-	J

3. 栽培化関連遺伝子 *Rc* および *qSW5* を用いた系統地理 (4 章)

近年、栽培化関連遺伝子が多数同定されてきている。本研究では先行研究において *japonica* の栽培化の初期に栽培型変異 (機能欠失型) が獲得されたと考えられている遺伝子 *Rc* と *qSW5* に着目し、前述のサンプルセットを用いて系統地理的解析を行った。*Rc* 遺伝子は米の白色化に関わっている。bHLH ドメインを持つタンパク質をコードするこの遺伝子の exon 6 に生じた 14bp の欠失が bHLH ドメインを壊し、機能を失わせることにより米が白色になる。また、同じ exon 6 に未成熟終止コドンを生じさせる C→A の SNP を持つ allele も米を白色化することが知られている。*qSW5* 遺伝子は米粒の幅に関連している。ORF を含む領域に生じた 1.2kb の欠失は包穎の細胞数を増加させることにより、米粒の幅が広がり、収量が増加する。

これらの遺伝子について、機能を変える多型 (FNP) サイトを含む約 2kb の領域の塩基配列を決定し、系統ネットワークを作成した (図 3a, 4a)。 *O. rufipogon* の各地域集団におけるハプロタイプおよびハプロタイプクラスターの頻度 (図 3b-e, 4b-e) を見ると、 *Rc* の栽培型 allele の祖先ハプロタイプを含むクラスター A は東アジア地域でのみ見られ、かつ高頻度であった。したがって *Rc* の栽培型 allele は *japonica* の栽培化過程で東アジアの野生イネ集団由来の allele に変異が生じたことにより獲得されたと考えられる。他方、 *qSW5* では栽培型 allele (J) の祖先ハプロタイプ K は東アジア集団では見られず、南アジアと東南アジア大陸部で見られた。ハプロタイプ K とその派生形ハプロタイプ I は *indica* において高頻度 (28%、39%) で見られたことから、 *indica* もしくはその祖先集団の持っていた allele (K) が遺伝子交流により *japonica* にもたらされた後に栽培型変異が生じ *japonica* 集団中に広まったと考えられる。

本研究では現生イネ葉緑体 DNA の詳細な分子系統解析を行い、炭化米 DNA 分析に必須であるリファレンスデータを作成した。このデータを基に作成した DNA マーカーを用いて炭化米の DNA 分析に成功し、亜種を判別することができ、古代に利用されていたイネについての知見を得ることができた。特に日本と朝鮮半島の両方で *japonica* 以外の系統の利用が示唆されたことは興味深い。また、栽培化関連遺伝子 *Rc* と *qSW5* の系統地理的な解析から両遺伝子の進化過程を明らかにし、栽培化過程の初期における *japonica* と *indica* 間での遺伝子交流が示唆された。今後さらに多くの時代、地域の炭化米を分析することにより、ヒトのイネ利用の歴史およびイネの進化史が明らかになることが期待される。

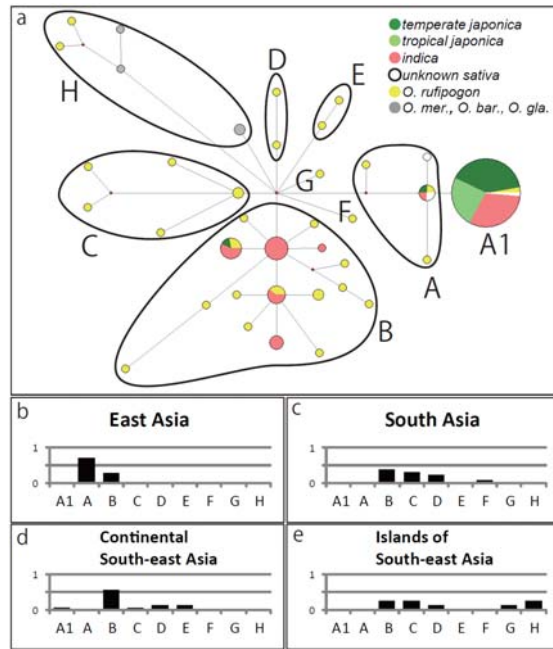


図 3. a *Rc* 遺伝子の exon 6 と intron 6 約 2000bp を用いて作成した系統ネットワーク。塩基置換と InDel データを基に作成した。b-e a で示したハプロタイプおよびハプロタイプクラスターの *O. rufipogon* 地域集団における頻度。

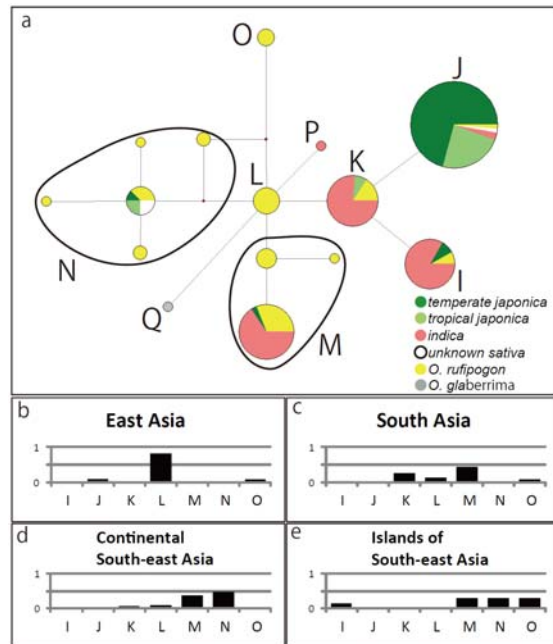


図 4. a *qSW5* 遺伝子の ORF の一部および上流配列から作成した系統ネットワーク。塩基置換と InDel データを基に作成した。b-e a で示したハプロタイプおよびハプロタイプクラスターの *O. rufipogon* 地域集団における頻度。