

学 位 論 文 題 名

Rice chromosomes studies by fluorescence *in situ*
hybridization with special reference
to physical mapping and chromosome structure

（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いたイネ染色体物理的地図作製
ならびに染色体構造の解析に関する研究）

学位論文内容の要旨

本研究では、イネ染色体において、遺伝子およびDNA配列を直接染色体上へ位置づけ、可視的にそれらを検出する蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法の開発を行なうとともにその手法を用いてイネ染色体の構造解析を行った。まず17S・5.8S・25SリボゾームRNA遺伝子（45S rDNA）を用いて、イネの染色体上にその遺伝子を位置づけをして、十分に再現性のあるFISH法とした。ここでは（1）非特異的ノイズの除去の為に細胞壁分解酵素処理、タンパク質分解酵素処理、酢酸による洗浄、RNA分解酵素処理を組み合わせた「後処理法」の導入、（2）独自に改良したサーマルサイクラーによる厳密な温度条件の管理、（3）画像解析法による遺伝子からの蛍光シグナルの明確化の3点に絞って改良を試みた。その結果、イネにおいて初めてFISH法により45S rDNA遺伝子を明瞭に同定することに成功した。

次にこの改良FISH法を用いて、イネ属の8種の近縁野生種について45S rDNAの遺伝子座を調べ、種により45S rDNA遺伝子数に変異を認めた。すなわち、日本や中国に分布する日本型イネ品種ではrDNA遺伝子座は1対で、熱帯、亜熱帯に分布するインド型品種あるいはジャワ型品種では2対の遺伝子座が存在していた。また野生稻の*Oryza punctata*（Bゲノム）および*O. officinalis*（Cゲノム）では、45S rDNAについて第3の遺伝子座を検出した。この発見には改良FISH

法による貢献が大きかった。また栽培種の起源とされている野生種の*O. rufipogon*では、栽培種内にある1および2対の45S rDNA遺伝子座がすでに存在していたので、*O. rufipogon*内で45S rDNA遺伝子座に分化を生じ、栽培イネに伝ったと考えられる。この事実は栽培種の起源を考える上で重要である。

さらに45S rDNA遺伝子座を有する染色体は蛍光シグナルの強度の順により染色体9および11にあることがインド型の第1次トリソミックシリーズによる分析から判明した。また2種の野生稻にみられた最も微弱な蛍光シグナルを発する第3の遺伝子座も、染色体の形態から染色体10の長腕の介在部に位置していた。

次にイネの反復配列 (T r s A) を染色体上へ位置づけることを試みた。サザンハイブリダイゼーションの結果、T r s AはAゲノムに高頻度で存在する配列であることが示された。T r s Aは3種の遺伝子座 (t r s A 1、t r s A 2、t r s A 3) に含まれ、そのDNA構成にはT r s Aおよびその上流域のA T含量の多い特定の領域とG C含量が多い特定の領域とが存在し、G C領域にはヒトの染色体で認められるミニサテライト様配列が存在し、染色体の末端配列に接続していたことから、このT r s A配列は染色体の次端部に存在する。また*O. sativa* 内の2系統および*O. glaberrima*においてこの3種の遺伝子座中のT r s Aの存在様式が異なっていた。P C R法を用いて日本晴、I R 3 6、*O. glaberrima*についてt r s A 1およびt r s A 3の遺伝子座におけるT r s Aの有無を調べたところ、3系統のすべてでt r s A 1遺伝子座においてT r s Aは存在していたが、*O. glaberrima*ではt r s A 3遺伝子座においてT r s Aを欠失していた。

改良F I S H法によりT r s Aを染色体上に位置づけたところ、複数の染色体の長腕部の末端部 (テロメア) に座乗していることが判明した。T r s Aはコシヒカリでは染色体6および12に、I R 3 6では染色体5、7、8、9、10、11に、*O. glaberrima*では染色体5、6、7に存在した。興味深いことにT r s Aはすべて、染色体の長腕のテロメア近傍にあった。DNA塩基配列およびF I S H法による解析結果より、T r s Aは転移因子としての機能を有し、染色体の様々な位置に挿入や欠失を起こしており、染色体上ではサブテロメア領域に局在していた。

西アフリカの栽培稻である*O. glaberrima* についてアジアの栽培種、*O. sativa*

との染色体構造の違いを詳細に比較するため、体細胞分裂前中期の染色体に特徴的に現れる凝縮型に基づく核型分析およびFISH法による解析を行った。ギムザ染色により、個々の染色体に現れる凝縮型に基づいて識別・同定と、画像解析法によって染色体の相対長および腕比を測定した。その結果、*O. glaberrima* の染色体は *O. sativa* とほぼ同一であったが、いくつかの染色体については若干の形態的な相違点を認めた。

O. glaberrima 染色体上における遺伝子構成を調べるために、*O. glaberrima*の細胞核より直接クローニングおよび直接標識法によって45S rDNAおよび5S rDNAをそれぞれ別の非放射性物質（ビオチン、ディゴキシゲニン）で標識し、それらをプローブとしてマルチカラーFISH（McFISH）法を行った。その結果、*O. glaberrima*の染色体上での45S rDNA遺伝子座は染色体9の短腕の付随体部に、5S rDNA遺伝子座は染色体11の短腕の動原体近傍でそれぞれ検出した。すなわち、これら2種のrDNA遺伝子の染色体上の位置は、*O. sativa*の場合と同一であった。従って、*O. sativa*と*O. glaberrima*はほぼ同様の染色体を有し、かつ2種類のリボゾーム遺伝子の位置関係も同一で、両種は同様な染色体編成を有することが判った。

本研究では、FISH法により遺伝子および反復配列をイネ染色体上に位置づけると共に、さらに技術的に改良したMcFISH法により、2種類の遺伝子座の同時検出を行なうことに成功した。またそれらの新手法によりrDNA遺伝子座をイネ染色体地図上に位置づけた。このように、イネ染色体の構造を染色体・遺伝子レベルで解析することは、イネ属植物の種分化、種内および種間変異の解析に新知見を加えた。

FISH法を用いたイネゲノム研究の今後の方向として、従来の核型分析の改良に加えて生化学的遺伝子の位置づけによる新しい分子細胞遺伝学の展開が考えられる。また、本研究によりイネ染色体物理地図作製の端緒が開かれ、さらに総合的なゲノム解析によりイネの遺伝育種学の発展に応用できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 俊 郎

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

Rice chromosomes studies by fluorescence *in situ*
hybridization with special reference
to physical mapping and chromosome structure

(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いたイネ染色体物理的地図作製
ならびに染色体構造の解析に関する研究)

イネの染色体上へ直接に遺伝子およびDNA配列を位置づけ、可視的にそれらを検出する蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) 法の開発を行なった。更にその手法を用いてイネ染色体の構造解析を試みた。

本論文は6章より成り、76頁で表4と図18を含む。

まずリボゾームRNA遺伝子(45S rDNA)を用いて、FISH法に対して、(1)非特異的ノイズの除去の為に細胞壁分解酵素処理、タンパク質分解酵素処理、酢酸による洗浄、RNA分解酵素処理を組み合わせた「後処理法」の導入、(2)独自に改良したサーマルサイクラーによる厳密な温度条件の管理、(3)画像解析法による遺伝子からの蛍光シグナルの明確化の3点についての改良を加えた。その結果、イネにおいて初めて45S rDNA遺伝子の明瞭でかつ再現性のある同定に成功した。

次にこの改良FISH法を用いて、イネ属8種の近縁種について45S rDNAの遺伝子座に関する種間変異を調べ、日本や中国に分布する日本型イネ品種では遺伝子座が1対であるのに対して、熱帯、亜熱帯に分布するインド型品種あるいはジャワ型品種では2対の遺伝子座が存在すること、また野生種の*Oryza punctata*および*Oryza officinalis*では、いずれも新たに第3の遺伝子座を検出した。また、栽培イネの祖先種である*O. rufipogon*ではすでに1および2対の45S rDNA遺伝子座が分化していることを見出した。第1次トリソミックシリーズを用いたFISH法により、この第3の遺伝子座は、染色体10の長腕介在部に位置することを明らかにした。

イネの反復配列 (TrsA) はAゲノム種中に高頻度で存在していて、3種の遺伝

子座 (*trsA1*、*trsA2*、*trsA3*) から成る。PCR法を用いて栽培イネの2系統および*O. glaberrima*において*TrsA*の有無を調べたところ、3系統のすべてで*trsA1*遺伝子座において*TrsA*が存在していたが、*O. glaberrima*では*trsA3*遺伝子座において*TrsA*を欠失していた。

改良FISH法により染色体上へ*TrsA*を位置づけたところ、複数の染色体の長腕部の末端部（テロメア）に座乗していた。*TrsA*は品種「コシヒカリ」では染色体6および12に、「IR36」では染色体5、7、8、9、10、11に、*O. glaberrima*では染色体5、6、7にあった。したがって、*TrsA*は転移因子としての機能を有し、染色体の様々な位置に挿入や欠失を起こしており、染色体上ではサブテロメア領域に局在していた。

西アフリカの栽培イネである*O. glaberrima*の染色体構造について、ギムザ染色による画像解析法によって詳細な核型分析を行ったところ、各染色体の凝縮型、相対長および腕比等の特徴は*O. sativa*の場合とほぼ同一であったが、いくつかの染色体について若干の相違がみられた。

*O. glaberrima*の細胞核より45S rDNAおよび5S rDNAを直接クローニングして、それぞれ別の非放射性物質（ビオチン、ディゴキシゲニン）により標識し、それらをプローブに用いてマルチカラーFISH (McFISH) 法を行った。その結果、*O. glaberrima*の染色体の1つの画像で45S rDNA遺伝子座が染色体9の短腕付随体部に、5S rDNA遺伝子座は染色体11の短腕動原体の近傍に存在することを確認できた。

本研究では、FISH法の改良により遺伝子および反復配列を染色体上に位置づけると共に、さらにMcFISH法により、2種類の遺伝子座の同時検出にも成功した。このように、イネゲノムの染色体構造を遺伝子レベルで解析して種分化や種内および種間変異に関する新知見を加えたことにより、イネ遺伝育種学へ大きな貢献をした。

よって審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者近江戸伸子は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。