

学 位 論 文 題 名

MOLECULAR CYTOGENETICAL STUDIES ON THE
GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS *ORYZA*

（イネ属植物における遺伝的多様性に関する分子細胞遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

本研究は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いて、イネ属植物の系統分類関係を分子細胞学的観点から解析したものである。FISH 法は新しい分子細胞学的手法のひとつであり、標識された DNA 断片（プローブ）を染色体上に直接分子交雑し、蛍光色素で検出するものである。核より抽出した全ゲノムDNA、45S および 5S リボソーム遺伝子(45S rDNA, 5S rDNA)の3種のプローブを種々のイネ属植物染色体上に位置づけた。また FISH 法を用いて遺伝子のコピー数あるいは長さを定量化する手法を開発した。材料には蛍光の強いオオムギ染色体の FISH 像を用い、光量子を定量した。

1. GISH 法を用いたゲノム同定法の開発

O. officinalis (CC) より抽出した全ゲノム DNA をプローブに用いたジェノミック *in situ* ハイブリダイゼーション(GISH)法を CCDD ゲノムを有する複2倍体種 *O. latifolia* に適用し、各々の染色体の所属ゲノムを明らかにした。極めて小さい染色体を有するイネ属植物での GISH 法の適用はこれまでに報告がなく、本研究が最初の報告例である。微細な蛍光を正確に解析するため、画像解析法の導入をはじめとする様々な工夫を行った。その結果、未だ2倍体種が発見されていない D ゲノム由来の染色体を CCDD ゲノム中に同定した。GISH 法は D ゲノム由来の染色体についての情報を得るための唯一の方法であり、本研究において十分にその効果が認められたといえる。

2. GISH 法によるイネゲノム間の類縁性の解析

イネ B, C, D ゲノム間の類縁程度を解析するために、全ゲノム DNA を *O. officinalis* (CC)より抽出してプローブに用いた GISH を *O. latifolia* (CCDD)および *O. minuta* (BBCC)

に適用し、得られた蛍光シグナルの相対強度を各ゲノム間で比較した。その結果、相対蛍光強度から推定された分子雑種形成程度からは、CゲノムとDゲノムはCゲノムとBゲノムの間より類縁程度が高いことが推察された。また最近、従来報告のあるAからFまでのイネのゲノムに加えてG、HおよびJで表される新しいゲノムを有する種が全ゲノムDNAをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションにより報告されている。これらの新しく認められたゲノムの個々の染色体からみた特徴付け、類縁度をGISH法により推定する事はイネ属植物の系統分類関係に関する新たな知見を今後加えるものとして考えられる。

3. GISH 法の利用による塩基 DNA レベルでの多様性解析

イネ属植物における GISH 法の確立により、全ゲノム DNA の染色体との分子雑種形成程度という新たな視点でゲノムの特徴を明らかにする可能性が開かれた。本手法をレーザーダイセクション法と組み合わせることにより、GISH 法により同定された D ゲノム由来の染色体のみを回収してダイレクトクローニング、シークエンスを行うことも可能である。

今後はゲノム特異的 DNA の単離などを通じて GISH 法により塗り分けられたゲノムの特徴を塩基 DNA レベルで解析するなど次のステップへの利用を計ることが重要になってくると考えられる。

4. 5S rDNA 遺伝子座の物理的マッピングによる多様性解析

AA、BB、CC、EE および FF ゲノムを有する 2 倍体種の染色体上に 5S rDNA を物理的にマッピングした。5S rDNA 座は *O. australiensis* (EE) および *O. brachyantha* (FF) を除く全ての供試材料において第 1 1 染色体上の短腕の動原体近傍に検出された。一方、*O. australiensis* および *O. brachyantha* については第 7 染色体の短腕の動原体近傍に位置していた。すなわち、5 種イネ属植物間で遺伝子座の位置についての若干の多様性が検出されたが、遺伝子座の数については極めてよく保存されていると結論できる。

5. 45S rDNA 遺伝子座の物理的マッピングによる多様性解析

A から F ゲノムを有する 2 倍体種の染色体上に 45S rDNA の物理的マッピングを行

った。その結果、数、位置および蛍光シグナル強度から推定されるコピー数が 5S rDNA 遺伝子座とは対照的に極めて変異に富むことが明らかになった。栽培イネ *O. sativa* (AA)の亜種であるインド型および日本型種においてもそれぞれ第9および第10染色体の2ヶ所および第9染色体の1ヶ所に遺伝子座が検出され多様性が認められた。

野生イネに関して、*O. punctata* (BB), *O. australiensis* および *O. brachyantha* においては第9染色体の1ヶ所に検出された。以上の第9, 第10染色体では、45S rDNA 座は全て短腕の端部に検出された。一方、Cゲノムを有する *O. eichingeri* および *O. officinalis* においては、第4, 9および11染色体上の3ヶ所の45S rDNA 座が検出された。その位置は第4および9染色体については短腕端部であったが、第11染色体については短腕の動原体近傍であり、5S rDNA 遺伝子座の間近に位置していた。

6. rDNA 遺伝子座の多様性とその機構

上述の結果は、種々のイネ科植物において遺伝子の配列が高度に保存されている事実とは極めて対照的であり、rDNA がブロックとして種分化の過程でゲノム内を活発に移動しているシンテニーの例外的存在であるということを示唆している。種により位置、数が異なるなど rDNA の転移がイネ属植物の遺伝的多様性あるいはゲノムの安定性に関して重要な役割をはたしている可能性も示唆されることから、今後、ゲノムの大部分をしめる様々な反復 DNA の分布状況を染色体の構造と併せて探ることはイネ属植物の進化・分化の機構を解明する上で重要なアプローチとなると考えられる。

7. フォトンカウンティング法を用いた蛍光シグナルの定量法の開発

rDNA をプローブに用いた FISH から得られる蛍光シグナルの強度からコピー数を明らかにし、イネ属植物の多様性を遺伝子のコピー数から推定するために、フォトンカウンティング法の開発に取り組んだ。本来は生物発光などの微量な光子を検出するために開発されたフォトンカウンティングカメラシステムを蛍光シグナルに適用可能にするために減光フィルターの設置など測定条件の調整、工夫を行った。この手法の有効性を確認するために、4つの異なる蛍光強度をもつ集団で構成されている蛍光ビーズを無作為に測定した結果、その測定値は蛍光ビーズの特性をほぼ反映したものとなった。

8. 蛍光シグナルの定量と多様性解析における利用

オオムギ染色体の rDNA 座より発せられる蛍光シグナルをフォトンカウンティング法を用いて解析した結果、2つの NOR 染色体の相対的なコピー数の違いを定量的に表すことが可能となった。これにより、これまでのスロットプロット ハイブリダイゼーションのようにメンブレン上の DNA とのハイブリダイゼーションの程度から目的 DNA のコピー数を算定する方法に比べて、目的 DNA の染色体 DNA との直接的なハイブリダイゼーションの程度から位置情報と遺伝子のコピー数との情報が同時に得られるためより詳細な多様性解析に関する有用な情報が取得できる。

以上、本論文で開発した GISH 法、フォトンカウンティング法又それに加えて FISH 法を用いて明らかにされたイネ属植物の遺伝的多様性に関する新知見を土台にして、今後さらに新しい手法を取り入れ、イネ属植物の系統分類関係及び進化・分化の過程が解明されることを期待したい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 三 上 哲 夫

副 査 研究室長 福 井 希 一 (農林水産省北陸農業試験
場イネ育種工学研究室)

学 位 論 文 題 名

MOLECULAR CYTOGENETICAL STUDIES ON THE GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS *ORYZA*

(イネ属植物における遺伝的多様性に関する分子細胞遺伝学的研究)

本論文は総頁数 90 頁の英文で、表 3、図 14、引用文献 99 を含む、6 章から構成されている。別に、参考論文 4 編が添えられている。

核ゲノムの遺伝情報は、可視的に観察できる染色体上に記載されている。染色体の構造が生物種特有であることから、染色体研究はゲノム分化の主要な研究領域を形成してきたといえる。従来、染色体の分化は形態と減数分裂時の染色体対合から調査されてきたが、分子生物学的手法の導入によって、ゲノム分化を分子レベルで比較することが可能になってきた。染色体微細部位を可視化する技術は、他の種から有用遺伝子を導入する場合にも有効な育種手法になると期待されている。本研究では、染色体分化を分子レベルで明らかにする目的で、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を応用してイネ (*Oryza*) 属植物の染色体を解析した。得られた結果は以下のように要約される。

1. 複 2 倍体種が保持する異なるゲノムの可視的検出

O. latifolia は南米原産の CCDD ゲノムをもつ 複 2 倍体 ($2n=48$) であるが、D ゲノムをもつ 2 倍体種の存在は報告されていない。根端分裂細胞を用いて、C ゲノムの全 DNA をプローブとしてゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (GISH) 法を行ったところ、CCDD ゲノムの中から 24 本の C ゲノム染色体だけを標識することができた。このことは、未知の D ゲノム染色体を始めてスライド上で同定できたことを意味している。ゲノム間の類似度を比較するために、CCDD および BBCC ゲノムをもつ 2 種の複 2 倍体を供試して同様の GISH 法を行った。相対的な分子雑種形成を蛍光シグナル強度に基づいて推定した結果から、C ゲノムが B ゲノムより D ゲノムと高い類似度をもつと結論できた。本結果に基づく新しいゲノムの特徴付けは、イネ属植物のゲノム研究に新たな知見を加えるものと考えられる。

2. ライボソーマルRNA遺伝子クラスターの転移

5S rRNAと45S rRNA遺伝子は共に染色体の特定部位にクラスターを形成して存在する多重遺伝子族である。異なるゲノムを有する2倍体種を供試して、5S rRNAの染色体座乗部位をFISH法によって調査した。A、BおよびCゲノムを有する種では、5S rRNA遺伝子が第11染色体上の動原体近傍にクラスターとして位置していた。一方、EおよびFゲノムを有する種では、5S rRNA遺伝子クラスターが第7染色体の動原体近傍に位置することが判った。

次に、45S rRNA遺伝子クラスターについて同様の比較を行った結果、クラスターの数、位置および蛍光シグナル強度から推定されるコピー数が同一ゲノムをもつ系統間でも著しく異なることが明らかになった。すなわち、Aゲノムを有するアジア栽培イネはインド型および日本型品種群に大別されるが、インド型品種では45S rRNA遺伝子クラスターが第9および第10染色体の短腕端部2ヶ所に、日本型品種では第9染色体の短腕端部にのみ存在した。Bゲノム、EゲノムおよびFゲノムを有する2倍体野生種において、45S rRNA遺伝子クラスターはいずれも第9染色体の短腕端部1ヶ所に検出された。一方、Cゲノムを有する2倍体野生種においては、45S rRNA遺伝子クラスターが3ヶ所で検出され、その座乗位置は第4および9染色体の短腕端部と第11染色体短腕の動原体近傍であった。

これらの結果は、イネ科植物における遺伝子の配列が高度に保存されているという最近の分子遺伝学的知見とは極めて対照的であり、多重遺伝子族が種分化の過程で染色体間を動的に転移しており、イネ属植物のゲノム分化の1要因となることを示している。

3. ライボソーマルRNA遺伝子のコピー数の推定

FISH法を用いて45S rRNA遺伝子のコピー数を定量化するため、蛍光の強いオオムギ染色体を用いたフォトン計測法を開発した。生物発光などの微量な光子を検出するために開発されたフォトン計測カメラを利用して、蛍光シグナル強度を測定するために減光フィルターの設置条件の調整、工夫を行った。オオムギでは、45S rRNA遺伝子が2ヶ所の仁形成部位にクラスターとして存在していた。考案した本方法により、45S rRNA遺伝子クラスターから発する蛍光シグナルを測定した結果、2ヶ所の仁形成部位に存在するコピー数の相対的違いを定量的に表すことが可能となった。本実験手法では、染色体上の相同配列を分子雑種形成によって鋭敏に検出でき、位置情報と遺伝子数の情報を同時に得ることができるので、今後有効な染色体解析法になると期待できる。

以上のように、本研究はイネ属植物のゲノム分化を分子細胞遺伝学的に明らかにしたものであり、その成果は学術および応用の両面で高く評価できる。

よって、審査員一同は矢野理恵子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。