

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 青木 大輔
学位授与の日付	平成21年3月31日
論文名	葉緑体 DNA および核 DNA の塩基配列に基づく東アジア産ヒエ属植物の分子系統学的研究
論文審査委員	主査 山口 裕文 副査 大門 弘幸 副査 小田 雅行

## 論文要旨

ヒエ属 *genus Echinochloa* 植物は世界中の温帯から熱帯にかけて広く分布している資源植物学上重要な種群である。東アジアに分布する一年生のタイヌビエ（四倍体）、イヌビエ（六倍体）およびコヒメビエ（六倍体）は、水田や畑作の強害雑草であるほか、それぞれに近縁の栽培種がある。ヒエ属植物は生態的および形態的に連続的で幅広い変異を示し、その種間差異が不明瞭なため、学名の不統一や混乱があり、種群の取り扱いに問題を残している。ヒエ属植物の雑草としての防除や飼料用あるいは穀物として適正な利用のためには、種群の遺伝的関係についての理解が重要である。東アジア産ヒエ属植物の種間関係は細胞遺伝学的に研究され (Yabuno 1966)、いくつかの種について交配親和性と系図の一部はわかっているものの、ゲノム関係や自然交雑をともなう倍数性進化における両親種に関する知見は極めて少ない。本論文では、葉緑体 DNA の非コード領域 *trnT-L-F*、核 DNA の ITS 領域および *sh4* 相同遺伝子の塩基配列に基づいて東アジア産ヒエ属植物について分子系統学的解析を行い、それらの遺伝的類縁関係と種の成立過程を考察した。

### 第1章 葉緑体 DNA 領域 *trnT-L-F* および ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統

タイヌビエ群（タイヌビエ野生種およびモソビエ）、イヌビエ群（イヌビエおよびヒエ）およびコヒメビエ群（コヒメビエおよびインドビエ）、東南アジア産の浮性多年生種の *E. stagnina* と *E. picta*、アメリカ大陸産種、オーストラリア産種、二倍体種を

含むアフリカ産種の計 9 種 43 系統について葉緑体 DNA *trnT-L-F* と ITS 領域の塩基配列を解析した。1 系統 1 個体から抽出した全 DNA を鋳型として対象領域を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。一部の系統についてはクローニングにより塩基配列を決定した。葉緑体 DNA と ITS 領域の塩基配列データを用い、それぞれアライメントした後、最節約法により厳密合意樹を作成した。クレードの精度は 1,000 回のブートストラップによって推定した。

葉緑体 *trnT-L-F* 領域の全長 1,550bp について 6 つの挿入欠失情報を含む 1,484 形質を用いて系統解析した。1 個の最節約系統樹が得られ、樹長 116 , 一致指数 0.97, 保持指数 0.98 であった。ITS 領域から 585bp の塩基配列では、挿入欠失を除いた 574 形質を用いて系統解析した。92 個の最節約系統樹から得た厳密合意樹は、樹長 215, 一致指数 0.82, 保持指数 0.82 であった。葉緑体 DNA の系統樹では、アフリカ産 3 種は東アジア産種と明瞭に異なった。イヌビエ群、タイヌビエ群およびコヒメビエ群はそれぞれ明瞭に異なるクレードを形成した。タイヌビエ群と *E. stagnina* が一つのクレードを形成し、イヌビエ群とアメリカ大陸産種の *E. crus-pavonis* が近縁であった。ITS 領域の系統樹では、アフリカ産種が基部で多分岐したが、葉緑体 DNA の系統樹同様にアジア産種とは明瞭に区別された。コヒメビエ群は葉緑体 DNA の結果と同様に明瞭な群であった。イヌビエ群とタイヌビエ群、*E. stagnina*, *E. turneriana* は一つのクレードを形成し、イヌビエ群とタイヌビエ群には同一の塩基配列を示す系統もみられた。また、葉緑体 DNA の系統樹では近縁であったイヌビエ群とアメリカ大陸産種の *E. crus-pavonis* は異なるクレードに属した。ITS 領域のハプロタイプネットワークによりイヌビエ群とタイヌビエ群を解析したところ、同じ核ゲノムをもつと推定される系統は 9 ステップ変異内にまとめられ、新大陸産の系統は遠縁であった。

一年生種のイヌビエ群、タイヌビエ群およびアメリカ大陸産種の *E. crus-pavonis* の 3 種の関係は、母系の系譜を表す葉緑体 DNA の系統樹と父母両系の核 DNA の系譜を表す ITS 領域の系統樹において一致しなかった。ITS 領域は、倍数体種では協調進化により均一化するため、両親種のいずれかの二倍体ゲノムの系譜を示したと考えられる。

## 第 2 章 *sh4* 相同遺伝子の塩基配列に基づく分子系統

東アジア産種について、イネ脱粒性遺伝子 *sh4* の相同遺伝子の塩基配列を決定し、二倍体ゲノムに対応する同祖遺伝子座の塩基配列を系統解析した。イヌビエ群、タイヌビエ群、コヒメビエ群、アメリカ大陸産 *E. crus-pavonis* および多年生 *E. stagnina* の 26 系統を供試した。

6 系統の DNA を用いて *sh4* 相同遺伝子の下流域の配列とコード領域の上流に位置する推定遺伝子領域の塩基配列を決定し、相同遺伝子の全コード領域を増幅するプライマーを設計した。*sh4* 相同遺伝子の下流域の配列をゲノムウォーキング法により決定し、コード領域下流のプライマーを設計した。種ごとに *sh4* 相同遺伝子のコード領域の上流に位置する推定遺伝子領域の塩基配列をクローニングにより決定してそれぞれの同祖遺伝子座を特異的に増幅するプライマーを設計した。設計したプライマーを用いた PCR 増幅では、イヌビエ群とコヒメビエ群で 3 種類、タイヌビエ群、*E. stagnina* および *E.*

*crus-pavonis* で 2 種類の、長さ約 5~6kb の PCR 増幅産物が得られた。この増幅産物の約 2kb のコード領域の塩基配列を決定し、比較したところ、それぞれの断片は同祖遺伝子座に対応すると考えられた。次に、全供試系統から得られた増幅断片（コピー）の塩基配列をアライメントし、最節約法により系統解析した。系統樹のクレードの精度は 1,000 回のブートストラップによって推定した。

全てのコピーにイネ *sh4* 遺伝子と同じ 2 個のエクソンと DNA 結合ドメインを確認した。コード領域には非同義置換や挿入欠失はみられたがフレームシフト変異や DNA 結合ドメインのアミノ酸のモチーフ配列には変異はみられず、同祖遺伝子座のアミノ酸配列はヒエ属植物において高度に保存されていた。

得られた最節約系統樹は、樹長 260、一致指数 0.91、保持指数 0.97 で、12 種類のコピーは 7 つのクレードを形成した。タイヌビエ群の 2 つのコピーとイヌビエ群の 2 つのコピーがそれぞれクレードを形成し、イヌビエ群のもう 1 つのコピーは独立したクレードを形成した。アメリカ大陸産種の *E. crus-pavonis* の 2 つのコピーは、タイヌビエ群とイヌビエ群の 2 つのクレードに含まれたが、更に派生的であった。*E. stagnina* の 1 つのコピーは、タイヌビエ群、*E. crus-pavonis*、イヌビエ群の 1 つのコピーと 1 つのクレードを形成したが、もう 1 つのコピーは独立していた。コヒメビエ群の 3 つのコピーはそれぞれ明瞭に異なる独立したクレードを形成した。

この結果は、タイヌビエ群とイヌビエ群が 2 つの同祖遺伝子座を共有し、タイヌビエと *E. stagnina* が 1 つの同祖遺伝子座を共有し、コヒメビエの同祖遺伝子座は他種とは独立していることを示した。

### 第 3 章 総合考察

イヌビエはタイヌビエと同一の 2 つのゲノムを共有するが (Yabuno 1966)、*sh4* 相同遺伝子の結果はこのゲノムに対応していた。イヌビエとタイヌビエの間で ITS 領域は核 DNA の系譜の共有を示し、葉緑体 DNA は異なった母系を示したことから、四倍体のタイヌビエは六倍体のイヌビエの父親であると推定される。また、葉緑体 DNA と *sh4* 相同遺伝子の結果からタイヌビエと *E. stagnina* は母系に同一のゲノムを持つと推定される。一方、コヒメビエは他のアジア産種とは明瞭に異なる系譜からなると推定される。

本研究は、分子系統学的解析によって東アジア産ヒエ属植物の詳細な遺伝的関係と倍数性進化の過程を明らかにし、母系と父系に対応した種固有の特徴を明示した。核ゲノムに対応した *sh4* 相同遺伝子の同定は、ヒエ属植物における学術上の混乱の解消に貢献する。本研究で得られた重要な雑草種や雑穀であるヒエ属植物についての遺伝情報は、資源植物としての管理や活用において有用と考えられる。

## 審査結果の要旨

資源植物や雑草の適正な利用のためには、対象とする種群の遺伝的関係の理解が重要である。ヒエ属 *Echinochloa* 植物は世界中の温帯から熱帯にかけて広く分布し、東アジアの一年生のタイヌビエ（四倍体）、イヌビエ（六倍体）およびコヒメビエ（六倍体）は水田や畑地の強害雑草であり、それぞれに近縁の栽培種は飼料や雑穀とされる。これらは生態的および形態的に幅広い変異を示し、種群の認識や学名の取り扱いに問題を残している。これらではゲノムの関係や倍数性進化の実相が良くわかっていない。本論文は、第1章において葉緑体 DNA の非コード領域 *trnT-L-F* と核 DNA の ITS 領域の塩基配列を分析し、第2章では *sh4* 相同遺伝子の塩基配列を分析し、分子系統学的解析によって、対象種の遺伝的類縁関係と種の成立過程を考察している。

第1章では、タイヌビエ群（タイヌビエとモソビエ）、イヌビエ群（イヌビエとヒエ）およびコヒメビエ群（コヒメビエとインドビエ）のほか東南アジア産の *E. stagnina* と *E. picta* など世界の計9種43系統について葉緑体 DNA *trnT-L-F* と ITS 領域の塩基配列をイレクトシーケンス法によって解析している。全長 1,550bp の葉緑体 *trnT-L-F* 領域では6つの挿入欠失情報を含む 1,484 形質を用いて系統解析し、樹長 116 , 一致指数 0.97, 保持指数 0.98 の最節約系統樹を得ている。585bp の ITS 領域の塩基配列では、挿入欠失を除いた 574 形質を用いて系統解析し、92 個の最節約系統樹から樹長 215, 一致指数 0.82, 保持指数 0.82 の厳密合意樹を得ている。葉緑体 DNA の系統樹では、アフリカ産3種は東アジア産種と明瞭に異なり、イヌビエ群、タイヌビエ群およびコヒメビエ群は明瞭なクレードを形成した。タイヌビエ群と *E. stagnina* は近縁で、イヌビエ群とアメリカ大陸産種の *E. crus-pavonis* は近縁であった。ITS 領域の系統樹では、アフリカ産種は基部で多分岐したが、葉緑体 DNA の系統樹と同様にアジア産種とは明瞭に区別され、コヒメビエ群は明瞭に異なっていた。イヌビエ群とタイヌビエ群、*E. stagnina* および *E. turneriana* は一つのクレードを形成し、イヌビエ群と *E. crus-pavonis* は異なるクレードを形成した。また、ITS 領域のハプロタイプネットワークは、9 ステップ変異内でのアジアのイヌビエ群とタイヌビエ群のまとまりを示し、新大陸産の系統の遠縁を明らかにした。イヌビエ群、タイヌビエ群および *E. crus-pavonis* の系譜は母系と両親系で一致しなかった。ITS 領域が倍数体種でも協調進化により均一化したため、単一種の系譜を示したと結論している。

第2章では、東アジア産イヌビエ群、タイヌビエ群、コヒメビエ群、*E. crus-pavonis* および *E. stagnina* の 26 系統を供試し、イネ *sh4* に相同な遺伝子の下流域と上流にプラ

イマーを設計し、イヌビエ群とコヒメビエ群 3 種類、タイヌビエ群、*E. stagnina* および *E. crus-pavonis* 2 種類の PCR 増幅産物について約 2kb のコード領域の塩基配列を決定して、最節約法により系統解析している。全てのコピーにイネ *sh4* 遺伝子と同じ 2 個のエクソンと結合ドメインがみられ、コード領域でみられた非同義置換や挿入欠失にかかわらずフレームシフト変異やアミノ酸のモチーフ配列には変異はなく、同祖遺伝子座がヒエ属植物においても保存されていることを認めている。

得られた樹長 260、一致指数 0.91、保持指数 0.97 の最節約系統樹は、12 種類のコピーについて 7 個のクレードを示し、タイヌビエ群の 2 つのコピーとイヌビエ群の 2 つのコピーはそれぞれ別のクレードを形成し、イヌビエ群のもう 1 つのコピーは独立したクレードを形成した。*E. crus-pavonis* の 2 つのコピーは、タイヌビエ群とイヌビエ群の 2 つのクレードに含まれ、更に派生的であった。*E. stagnina* の 1 つのコピーは、タイヌビエ群、*E. crus-pavonis*、イヌビエ群の 1 つのコピーと同じクレードを形成したが、もう 1 つのコピーは独立していた。コヒメビエ群の 3 つのコピーはそれぞれ明瞭に異なる独立したクレードを形成した。この結果から、タイヌビエ群とイヌビエ群が 2 つの同祖遺伝子座を共有し、タイヌビエと *E. stagnina* が 1 つの同祖遺伝子座を共有し、コヒメビエの同祖遺伝子座は他種とは独立していると結論した。

総合考察では、イヌビエとタイヌビエが核 DNA の系譜を共有し、葉緑体 DNA が示す母系が異なっていたことから、四倍体のタイヌビエは六倍体のイヌビエの父親であると結論し、*sh4* 相同遺伝子の結果からタイヌビエと *E. stagnina* は母系に同一のゲノムを持つと結論し、イヌビエ属植物における複 2 倍体化による進化を明らかにした。

本研究は、これまで不確かであった東アジア産ヒエ属植物のゲノム関係と倍数性進化における両親種を特定し、ヒエ属植物における学術上の混乱を解消する基盤情報を与えている。本研究で得られた成果は、資源植物学および雑草学、植物分類学、保全生態学など植物バイオサイエンス領域の発展に広く貢献すると考えられ、最終試験の結果と併せて申請者に博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。