

| | |
|---------|--|
| 称号及び氏名 | 博士（農学）尾川 武史 |
| 学位授与の日付 | 平成18年3月31日 |
| 論文名 | 「ヒガンバナ属の核型進化に関する分子細胞遺伝学的研究」 |
| 論文審査委員 | 主査 原田 二郎 副査 山口 裕文 副査 森 源治郎 副査 森川 利信 |

論文要旨

ヒガンバナ (*Lycoris*) 属はヒガンバナ科の比較的小さなグループで、約 20 種で構成されている。中国から韓国や日本にかけての東アジアの温暖な照葉樹林帯に分布し、インドシナ半島の北部やネパールにも生育している。ヒガンバナ属植物は球根による栄養繁殖によって観賞用に用いられている。交雑育種等において、適切な育種計画を立て、適切な交配親を選択するには、遺伝的背景や有用形質の遺伝に関する情報は重要となる (Le Nard and De Hertogh 1993)。種分化過程は一般に種間の隔離機構と関わるので育種基盤情報として極めて重要である。ヒガンバナ属植物の種分化に関しては、これまで花器の形態学的分析や核型分析による細胞遺伝学的手法によって研究されてきた (Hsu *et al.* 1994)。Kurita (1986) はヒガンバナ属植物の染色体をサイズや動原体の位置などの特徴から主に M (Metacentric) 型、T (Telocentric) 型、A (Acrocentric) 型染色体に分類し、ヒガンバナ属植物の種分化について言及している。しかし、同型の染色体の識別は非常に困難で、種の成立過程や類縁関係については未だ不明な部分が多く、染色体の面から種分化を考察するには、染色体を識別するために新たな手法が必要である。

本研究では、分子細胞遺伝学的手法である *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH、GISH) と DAPI 染色法、CMA 染色法、および C バンド法を用いて、分子レベルで染色体の構造を解析し、ヒガンバナ属における核型進化とゲノム構成の解明を試みた。その結果からヒガンバナ属の種分化について考察した。

第1章 染色体特異的マーカーによる染色体の構造解析

ヒガンバナ属植物の染色体が 3 つの型に分化した過程については、統一した見解がない。Inariyama (1951) は 2 本の I 型 (Kurita (1986) の T 型、A 型にあたる) 染色体の結合

により V 型 (M 型) が形成されたという結合説を報告し、Kurita (1986) は、M 型染色体が動原体部分で切断されて 2 本の T 型が形成された後、T 型染色体の動原体付近の逆位によって A 型が生じたという切断説を提唱している。そこで、染色体特異的マーカーを用いてヒガンバナ属 14 種の染色体の構造を解析し、染色体を同定し、核型進化について考察した。DAPI 染色法では特異的な DAPI バンドが一部の M 型と T 型染色体で観察され、A 型染色体では観察されず、*L. incarnata* (タヌキノカミソリ) の T 型染色体には、特徴的な二重のバンドが現れ、DAPI 染色法は M 型と T 型の染色体をさらに識別するのに有効であった。コムギ (*Triticum aestivum*) の 18S-5.8S-26S rDNA をプローブに用いた FISH では、すべての T 型と一部の A 型染色体でシグナルが観察され、M 型では観察されなかったため、18S-5.8S-26S rDNA は A 型の染色体をさらに識別するマーカーとして有効であった。また、すべての T 型染色体の動原体側末端に rDNA サイトがみられたので、この部位は M 型染色体の動原体部分が切断されて生じた T 型染色体のテロメア配列を持たない動原体側の末端を保護する役割を担っていると推察された。rDNA 配列によるテロメア配列機能の代用は、ヒガンバナ属と比較的近縁なネギ属などでも報告されており (Pich *et al.* 1996)、これは、T 型染色体が M 型染色体の動原体部分での切断によって形成されたという考えを支持した。

第2章 ヒガンバナ属のゲノム構成に関する研究

ヒガンバナ属のすべての染色体は、M 型あるいは I 型 (T、A 型) からの染色体構造変異によって分化したと考えられてきた (Inariyama 1951 ; Kurita 1987)。そのため、核型の変異や倍数性の変化は起こったが、ゲノムは分化しなかったと考えられてきた。しかし、ヒガンバナ属の二倍体種には *L. aurea* ($2n = 13, 9M+4T$) のように M 型と T 型染色体で構成されるグループと *L. sprengeri* (ムラサキキツネノカミソリ、 $2n = 22, 22A$) のように A 型染色体のみで構成されるグループとがあり、ゲノム分化の可能性が示唆されるので、ゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (GISH) 法を利用して両グループのゲノム構成を分析した。

両グループの中間的核型をもつとされる異質三倍体種 *L. incarnata* ($3M+5T+20A+1M'+1m$) について、*L. aurea* ($9M+4T$) の全 DNA を蛍光プローブとし、*L. sprengeri* ($22A$) の全 DNA をブロックングとして GISH を行った。*L. incarnata* の染色体は、 $[3M+5T]$ と $[20A+1M'+1m]$ とに分染された。*L. incarnata* を種子親とし、*L. sprengeri*、*L. radiata* var. *pumila* (コヒガンバナ) および *L. sanguinea* var. *sanguinea* (キツネノカミソリ) を花粉親として作出した四倍体 F_1 雑種 ($3M+5T+31A+1M'+1m$) についても同様に GISH を行った。雑種の染色体は、いずれも $[3M+5T]$ と $[31A+1M'+1m]$ とに分染された。以上のことは、ヒガンバナ属の染色体は M+T 型と A 型の異質なゲノムに分化していることを示している。また、 M' (small metacentric) 型と m (very small metacentric) 型染色体は、A 型染色体と同様に分染されたことから、それぞれ、2 本の A 型染色体の長腕同

士と短腕同士のロバートソン結合によって生じたことが確認された。さらに、*L. incarnata* ではMあるいはT型染色体からA型染色体への1回のゲノム間染色体転座が起こっていることが確認された。

第3章 ヒガンバナ属における倍数性進化

ヒガンバナ属は、二倍体と三倍体で構成されていて、四倍体が存在しない。一般に三倍体植物は二倍体と四倍体との交雑によって形成されるが、ヒガンバナ属の三倍体種は二倍体種の正常な配偶子と非還元配偶子との融合によって生じたと推定されている (Hsu *et al.* 1994 ; Kurita 1987 ; Roh *et al.* 2002)。この倍数性進化の過程を検証するために、種間交雑および人為的自殖の後代について、FISH法による18S-5.8S-26S rDNA座の数と染色体上の位置を調査し、倍数性進化について検討した。

第2章でゲノム構成を調査した四倍体F₁雑種と両親の染色体についてFISH分析した。これら3つの雑種は、*L. incarnata*のもつ8個のrDNAサイトの全数と、花粉親のもつ2~4個のrDNAサイトの半数を受け継いでおり、種子親の非還元配偶子と花粉親の正常な配偶子との融合によって生じたと推定された。また、*L. sprengeri* ($2n = 22, 22A$)では2個のrDNAサイトが観察され、これを人為的に自殖して得られた三倍体(33A, 31A+1M')では3個のrDNAサイトが観察されたので、非還元配偶子と正常な配偶子との融合によって生じたと推定された。実験的な種間交雑と自殖により三倍体と四倍体が非還元配偶子の形成によって生じたので、自然界でも同様の現象によりヒガンバナ属の倍数性進化が起こっていると推定された。

L. radiata var. *radiata* (ヒガンバナ、33A)と*L. radiata* var. *pumila* (22A)には、それぞれ6個と4個rDNAサイトがあり、これは非還元配偶子が関与した倍数化を暗示している。また、*L. sprenger*と*L. radiata* var. *pumila*との種間雑種である*L. haywardii* (22A)のrDNAサイトは3個あるが、両親の*L. sprengeri*の2個と*L. radiata* var. *pumila*の4個からそれぞれ半数を受け継いでいた。rDNAサイトは種分化過程で保存的であることが確認された。*L. incarnata* (3M+5T+20A+1M'+1m)は、A型とm型染色体に3つのrDNAサイトをもっていた。このことから、*L. incarnata*のA型染色体の供与種は[20A+1M'+1m]のゲノムをもつ*L. radiata* var. *pumila*と*L. sprengeri*の種間雑種に由来すると示唆された。一方、[3M+5T]のゲノムをもつ親は、T型染色体上に特徴的な二重のDAPIバンドをもつ*L. squamigera* (ナツズイセン)の片親と共通する可能性が示唆された。また、*L. squamigera*は1本のA型染色体にrDNA座をもっており、A型染色体の供与種は*L. sprengeri*であると推定された。

以上のように、本研究により、ヒガンバナ属の種分化には主要な3つの現象、すなわち染色体の構造変異、ゲノム分化、および非還元配偶子による三倍体の形成が大きく影響したと示唆された。もともと*Lycoris*属の染色体は、M型のみで構成されていた。その後、

染色体腕の切断による構造変異により T 型が形成され、さらに A 型が生じた。M と T 型ゲノムは、なおゲノムとしての相同性を保っているが、A 型ゲノムは染色体の核型だけでなく異なるゲノムへ大きく分化した。M と T 型のゲノムグループと A 型のゲノムグループは、それぞれ、亜熱帯気候域と温帯気候域に分かれて分布している (Kurita 1988)。これは、染色体の構造変異が起こった後、地理的に隔離されたグループ内で分化が生じ、その後のグループ間の交雑によって現在の多様性が形成されたと推定される。本研究の結果は、ヒガンバナ属植物の育種において重要な基盤となる。

審査結果の要旨

ヒガンバナ属植物は、観賞用として珍重され、主に種間交雑と栄養繁殖育種法によって改良されている。しかし、ヒガンバナ属植物の育種をすすめるには遺伝資源の戦略的な導入と変異の拡大のための遺伝学的な情報が不可欠である。とくに遺伝的多様性を形作った種分化過程の理解は種間の交雑親和性を知る上での基盤情報として重要である。

本論文は、分子細胞遺伝学的手法である *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH、GISH) と DAPI 染色法、CMA 染色法および C バンド法を用いて、核型と染色体ゲノムを分析し、ヒガンバナ属における核型進化と種分化との関係について考察したものである。得られた成果の概要は以下の通りである。

ヒガンバナ属の染色体はサイズと動原体の位置によって M (Metacentric) 型、T (Telocentric) 型および A (Acrocentric) 型染色体に分類されている。第 1 章では、本属 14 種の植物の染色体構造を染色体特異的マーカーにより解析した。その結果、DAPI 染色法では、特異バンドは A 型染色体では観察されなかったが、M 型染色体と T 型染色体の一部で観察され、DAPI 染色法は M 型染色体と T 型染色体をさらに詳細に識別し得ることを明らかにした。また、*L. incarnata* (タヌキノカミソリ) の T 型染色体には特徴的な二重バンドが認められた。FISH 法で 18S-5.8S-26S rDNA をマーカーとして用いると、シグナルは、M 型染色体では観察されず、全ての T 型染色体で観察されたが、A 型染色体では一部の染色体でのみ観察されたので、この rDNA マーカーは A 型染色体をさらに詳細に識別するのに有効であった。また、全ての T 型染色体の動原体側末端に rDNA サイトがみられたことから、この部位は T 型染色体のテロメア配列をもたない動原体側の末端を保護していると推定した。以上の結果を総合して、T 型染色体は M 型染色体の切断により形成されたものと推定した。

ヒガンバナ属では種分化の過程で染色体の数や構造の変異は生じたが、ゲノムは分化しなかったとされてきた。第 2 章では、異質三倍体種 *L. incarnata* (3M+5T+20A+1M'+1m) の染色体について、*L. aurea* (9M+4T) の全 DNA を蛍光プローブとし *L. sprengeri* (ムラサキキツネノカミソリ、22A) をブロッキングとして、GISH 法で分析した。その結果、*L.*

*incarnata*の染色体は 3M+5Tの染色体と 20A+1M'+1mの染色体とに分染された。また、*L. incarnata*に、*L. sprengeri*、*L. radiata* var. *pumila*（コヒガンバナ）および*L. sanguinea* var. *sanguinea*（キツネノカミソリ）を人為的に交配した四倍体 F₁ 雑種（3M+5T+31A+1M'+1m）の染色体は、いずれも 3M+5Tの染色体と 31A+1M'+1mの染色体とに分染された。以上より、ヒガンバナ属のゲノムはM+T型の染色体とA型の染色体からなる異質のゲノムに分化していることが明らかとなった。また、M'（small metacentric）型染色体とm（very small metacentric）型染色体は、A型染色体と同じく分染されたので、2本のA型染色体の長腕同士と短腕同士のロバートソン結合によって生じたと推定した。

ヒガンバナ属は二倍体種と三倍体種で構成されており自然界には四倍体種が存在しない。そこで、本属の倍数性進化の過程を検証するために、第3章では、第2章で用いた種間交雑種、および人為的自殖の後代について、FISH法による18S-5.8S-26S rDNA座の数と染色体上の位置を調査した。その結果、人為四倍体F₁雑種は*L. incarnata*のもつ8個のrDNAサイトの全数と、花粉親のもつ2ないし4個のrDNAサイトの半数を受け継いでおり、種子親の非還元配偶子と花粉親の正常な配偶子との融合によって生じたと推定された。また、*L. sprengeri*（22A）の人為自殖三倍体（33Aまたは31A+1M'）は3個のrDNAサイトをもっていたので、非還元配偶子と正常な配偶子との融合によって生じたと推定した。以上、ヒガンバナ属の倍数性進化には非還元配偶子の形成が関わっていることを明らかにした。

以上で得られた染色体特異的マーカーによる情報を総合して、本属の種分化過程について考察した。すなわち、*L. radiata* var. *radiata*（ヒガンバナ、33A）と*L. radiata* var. *pumila*（コヒガンバナ、22A）の染色体には、それぞれ、6個と4個のrDNAサイトがみられ、この3倍体種の成立には非還元配偶子による倍数化が関与していると考えられた。また、いずれも22Aの核型をもつ*L. sprengeri*と*L. radiata* var. *pumila*との種間雑種である*L. haywardii*（園芸種、22A）の染色体ではrDNAサイトは3個であったが、両親種のrDNAサイト数は*L. sprengeri*が2個、*L. radiata* var. *pumila*が4個であり、両親種からそれぞれ半数を受け継いだと考えられた。以上より、rDNAサイトは種分化過程で保存的であると推定された。*L. incarnata*（3M+5T+20A+1M'+1m）では、A型染色体に1個、m型染色体に2箇所の計3個のrDNAサイトがみられたので、*L. incarnata*のA型染色体は、20A+1M'+1mの核型をもつ*L. radiata* var. *pumila*と*L. sprengeri*の種間雑種に由来すると推定した。一方、*L. incarnata*の3M+5T染色体供与種は、T型染色体上に*L. incarnata*にも認められた特徴的な二重のDAPIバンドをもつ*L. squamigera*（ナツズイセン）の片親と共通する可能性が考えられた。さらに、*L. squamigera*のA型染色体供与種は、本種が1本のA型染色体のみにrDNA座をもつことから、同じく1個のrDNAサイトしかもたない*L. sprengeri*であると推定された。

本研究は、ヒガンバナ属の種分化過程にはM型染色体からT型染色体を経てA型染色体へ至る構造変異、ゲノム分化および非還元配偶子による三倍体の形成が大きく関与したこと

を示すものであり、ヒガンバナ属植物の実際の育種における遺伝資源の戦略的な活用に貢献するだけでなく、細胞遺伝学や育種学に関する学術基盤を形成すると考えられる。よって、最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。