

学 位 論 文 題 名

Melilotus 属の種間差異に関する遺伝学的研究

学位論文内容の要旨

マメ科牧草の一種であるスイートクローバを含む *Melilotus* 属は *Eumelilotus* と *Micromelilotus* の 2 亜属に大別され、特にスイートクローバの属する *Eumelilotus* 亜属の種間には種々の生殖的な隔離が発達しており、相互転座の存在も明らかにされている。*Eumelilotus* 亜属の全 9 種はいずれも染色体数が $2n=16$ で、種の分化は染色体の構造的差異と遺伝子レベルの分化によると考えられる。本研究では、*Eumelilotus* の 9 種間の染色体の構造差を解明し、含まれる 2 種の転座の同定を行うと共に生殖と深い関わりをもつ遺伝子が転座染色体に座乗することを明らかにした。一方、タンパク質レベルでも種間の遺伝的差異を調べて、種の類縁関係を明らかにした。

I *Eumelilotus* の 9 種間における細胞学的関係

Eumelilotus の 9 種は生殖的隔離と染色体の構造差から 4 群 (*M. alba*, *M. officinalis* 群 (4 種), *M. dentata* 群 (3 種), および *M. altissima*) に分けられている。これまでこれらの群間には部分的に生殖的隔離が発達しているため、細胞学的関係を明らかにすることが極めて困難であった。そこで最初に、*M. alba* と *M. officinalis* 群、*M. alba* と *M. dentata* 群間において F_1 雑種が得られることを利用して、これらの群間における (*M. officinalis* 群 $\times$ *M. alba*) $F_1 \times$ *M. dentata* 群 という三系交雑を行った。このような三系交雑においては、雑種致死や幼苗の黄白化を生じたものの、12 種の交雑からできた 140 個体が開花にまで到達した。これらの F_1 個体の減数分裂を観察した結果、相互転座ヘテロ型 1 に対して相互転座ホモ型あるいは正常型のみが 1 という割合で生じた。この結果から、*M. alba* と *M. officinalis* 群間にある相互転座と *M. alba* と *M. dentata* 群間にある相互転座は同一起源によることが同定された。

一方、*M. altissima* と他種間の交雑においては雑種種子が得られるものの、発芽後に強度の葉緑素異常を生じ枯死に至った。このような雑種致死を克服するため行った試験管内での無菌的栽培により、*M. alba* $\times$ *M. altissima* の F_1 3 個体と *M. altissima* $\times$ *M. taurica* の F_1 2 個体を開花まで生育させることに成功した。得られた F_1 個体について花粉稔性と減数分裂を観察し

た結果、*M. alba* と *M. altissima* 間には 1 個の相互転座が見出された。一方、*M. altissima* × *M. taurica* の F_1 では花粉稔性が低かったものの、減数分裂における染色体対合などは正常で、両種の染色体間には構造差がないと判定された。同様な試験管内栽培により *M. officinalis* 群と *M. dentata* 群間の交雑で得られた *M. suaveolens* × *M. wolgica* の F_1 でも、葉緑素異常が回復し 2 個体が開花にまで至った。これらの個体の花粉稔性は低かったものの、減数分裂における染色体行動は正常であった。したがって、*M. suaveolens* と *M. wolgica* との間には染色体の構造差はなかった。以上の結果から、*Eumelilotus* 亜属の 9 種間では、*M. alba* だけが他の 8 種と 1 個の相互転座で異なることが明らかにされた。

II 転座染色体の同定と昆虫訪花に関する遺伝子の座位

M. alba × *M. suaveolens* の F_1 およびその両親を用いて、ギムザ分染 (G 分染) 法により染色体を識別して、転座染色体の同定を試みた。その結果、SDS 法による G 分染で前中期の染色体において動原体付近に明瞭なバンドがみられた。核型の比較から、両種ともに付随体染色体が最も短く、その大きさと長腕の長さに差があった。さらに、付随体染色体以外に 2 種の染色体にも差異がみられた。 F_1 と両親の核型の比較によって、*suaveolens* 型の 5 S と 8 S の長腕の端部に切断が起こって相互転座を生じ、それぞれ *alba* 型の 7 A と 8 A になったものと推定された。このことは、*M. alba* × *M. suaveolens* の F_1 における減数分裂の太糸期で十字型の染色体を生じ、その一端が仁に付着していることから裏付けられた。さらに、昆虫の訪花を支配するネクターガイド遺伝子 (*Ncg*) が転座点と $9.5 \pm 5.3\%$ の組換え価で連鎖することを見出した。また、*Ncg* 遺伝子は S 型付随染色体の長腕上にあると推定された。

III アイソザイムや種子タンパク質による種間の遺伝的差異

6 種のアイソザイム (LAP, PGM, EST, IDH, PGI および POX) で種間に変異がみられたものの、LAP を除いて *Eumelilotus* 亜属 9 種におけるアイソザイムの変異は少なく、クラスター分析の結果から *M. suaveolens*, *M. wolgica* および *M. taurica* についてのみ明瞭に区別できた。一方、SDS-PAGE 電気泳動法による種子タンパク質を分析した結果、*Eumelilotus* 亜属の 9 種 51 系統において総数 54 本のバンドが検出され、種間に大きな変異がみられた。共通バンドを除いた 49 バンドについてのクライスター分析によると、種内における類似度が高かった。しかし、*M. alba* だけは種内でさらに 3 群に分かれ、そのうちの I 群は *M. officinalis* 種と近縁であった。また、いずれの結果からも、*M. suaveolens* だけは明瞭に一つのクラスターを形成し、独自の進化経路をたどったものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 俊 郎

副 査 教 授 中 世 古 公 男

副 査 教 授 島 本 義 也

マメ科牧草の一種であるスイートクローバは *Melilotus alba* Med. と *M. officinalis* Med. に属し、環境条件の劣悪な所でもよく生育する重要な二年生の牧草種である。また、家畜に有害なクマリンを無毒化するために必要な遺伝子を近縁種から導入したことで有名である。

本研究では、*Melilotus* 属の1つの亜属である *Eumelilotus* の9種間において、交雑不和合性による生殖的隔離を種々の方法により克服してから、種間における染色体の構造差や系統分化に関する機構を明らかにした。特にタンパク質レベルでの種間の遺伝的差異を明らかにして、種間交雑育種の基礎となる知見を提供した。

本論文は5章より成り、117頁で表42と図27を含む。主な内容は下記の如く要約される。

- (1) *Eumelilotus* 亜属では *M. altissima* を除いた8種が3群に分けられている。栽培種の *M. alba* と他の2群7種間にはこれまで2個の相互転座が見出されているが、これまで *officinalis* 群と *dentata* 群の間にある交雑不和合性のために2個の転座の同定が不能であった。そこで、この交雑不和合性を打破するために両群と和合関係にある *M. alba* を橋渡し種に用いて、(*M. alba* × *M. officinalis*) F_1 × *M. dentata* なる三系交配を行い、初めて140個体を開花まで生育させた。減数分裂における染色体対合型を調べることにより、*M. alba* と *M. officinalis* 間にある相互転座が *M. alba* と *M. dentata* 間の相互転座と同一の転座とみなしてよいことを実証した。
- (2) *M. alba* × *M. altissima* の F_1 では通常高度の葉緑素異常により幼苗致死を生じる。 F_1 種子を試験管内で無菌培養することにより葉緑素異常を回復せしめて、開花まで育てることに成功した。 F_1 個体の減数分裂太糸期における染色体対合では、1個の相互転座の存在を検出した。一方、*M. altissima* × *M. taurica* の F_1 などについても同様な方法により F_1 個体を育てて減数分裂を観察したが、いずれの種間とも染色体の構造差がないことを確かめた。その結果、栽培種の *M. alba* だけが同じ亜属の近縁種8種と1個の相互転座により異なっていることを明らかにした。

- (3) *M. alba*, *M. suaveolens* および両種の交雑の F_1 個体の染色体について、ギムザ染色法により核型を調べたところ、付随体染色体を含む少なくとも3種の染色体をバンド型から明確に識別できた。 F_1 と両親の比較から、*suaveolens* 種の5Sと8Sの長腕端部には切断によって相互転座を生じ、*alba* ではこれが7Aおよび8Aに相当することがわかった。また、付随体染色体に転座を生じていることは F_1 の減数分裂における転座染色体の仁付着からも明らかとなった。
- (4) 花卉の色調を紫外線写真により区別するならば、昆虫の眼による識別と一致しており、蜜を求めて訪花するガイドとなることが知られている。このネクターガイドが *M. alba* と *M. suaveolens* で異なることから両者の交雑の F_2 集団を用いて、ネクターガイド遺伝子 (*Ncg*) を分析し、それが転座点と $9.5 \pm 5.3\%$ の組換え価により連鎖することを見出した。また、*Ncg* は *suaveolens* 由来の付随体染色体の長腕部に位置することがわかった。
- (5) 6種のアイソザイム遺伝子について種間差を調べ、クラスター分析を行った結果、*Eumelilotus* 亜属の9種中で *M. suaveolens*, *M. wolgica* および *M. taurica* の3種を明らかに識別できた。
- (6) 種子タンパク質について SDS-PAGE 電気泳動法により種間で比較を行った。総計54本のバンドが検出され、その内の共通バンドを除いた49種についてクラスター分析により種間差を検討した。その結果、栽培種の一つの *M. alba* だけは種内でさらに3群に分けられ、そのうちの1種は別の栽培種 *M. officinalis* と近縁であった。さらに、*M. suaveolens* だけは明確に1つのクラスターを形成していた。このように栽培種の進化経路についての有用な知見を得た。

以上の研究成果は、*Melilotus* 属の系統分化に対する従来からの疑問点の解消に役立ったばかりでなく、*Eumelilotus* 亜属中の種間の細胞学的機構や近縁種からの有用遺伝子の導入のための基礎となる遺伝的に有用な知見を提供している。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者の哈 森は博士（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。