

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06803

研究課題名（和文）劇的な染色体基本数変化に伴ったゲノムサイズ進化：シダ類での検証

研究課題名（英文）Genome size evolution with drastic chromosome basic number change in ferns

研究代表者

海老原 淳（Ebihara, Atsushi）

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：20435738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シダ類における染色体基本数は、過去には進化過程を客観的に推定する手がかりとして用いられた。現在では分子系統学的な仮説と組み合わせることが可能になった結果、近縁でありながら大きく異なる染色体基本数を示す種群の存在が明確になった。それらを材料に用いてDNA含量を計測した結果から、染色体基本数は大きく異なっていながら、DNA含量は大きく変化していない事例が見出された。このことは、特にコケシノブ属では染色体の結合が進化過程で顕著に起こったことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シダ類はゲノムサイズが大きいことが知られる生物で、それに加えて倍数体が高い頻度で存在するため、ゲノム解読が遅れている生物である。そのため、シダ類の進化の解明のためにはそのゲノムの構成に関する情報を得ることが大変重要である。本研究では、コケシノブ科シダ類の二倍体レベルで見た場合に、ゲノムサイズ(1C value)は染色体数とは連動せず、ほぼ一定になる傾向を初めて見出した。また、分子系統解析結果との統合により、染色体数は減少する方向に進化しており、それにもかかわらずゲノムサイズがあまり変化していないことから、染色体の結合が頻繁に起こった可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Chromosome basic numbers in ferns were used as a clue to infer evolutionary processes. By combining those with molecular phylogenetic hypotheses, it became possible to clarify the existence of lineages consisting of closely related species with quite different basic chromosome numbers. The results of DNA content measurements on these materials revealed cases with greatly different basic chromosome numbers, but no significant changes in DNA content. This suggests that chromosome fusion has occurred repeatedly during the evolutionary process, especially in the genus Hymenophyllum.

研究分野：植物分類学

キーワード：シダ類 ゲノムサイズ 系統 染色体基本数

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シダ類(孢子繁殖を行う維管束植物現生種のうち、小葉類を除いた系統)では、その系統関係を推定する手がかりとして、現在に至るまで多数の種で染色体数が報告されてきた。近縁群(属あるいは科)内で観察された染色体数の最大公約数を「基本数」とみなし、それを基にした3倍体以上の倍数体が自然界に高頻度で存在することが示唆されている。一方、染色体基本数自体が、種子植物のそれと比べて著しく大きい傾向が認められ、最小  $x = 11$ 、最大  $x = 720$ 、平均では  $x = \text{約 } 30$  である。しかしながら、1科内あるいは1属内で複数の異なる染色体基本数を想定しなくては辻褄が合わない例が珍しくない。例えばコケシノブ科では  $x = 11$  から 36 まで基本数に大きく幅があることが知られているが、これらが真に異数性の関係にあるのか否か(基本数が大きい個体が本当に倍数体でないのか)は、確実ではなかった。

一方、シダ類の「1C-value」(=ゲノムサイズ÷倍数性)については、非倍数体(孢子体の場合2倍体、配偶体の場合1倍体)と考えられる個体において、種子植物の非倍数体よりDNA含量が多い傾向が知られている(被子植物の平均値0.63Gbに対して、シダ植物では10Gb以上)。大きすぎる1C-valueが技術的障害となり、全ゲノムが解読された種は依然としてごく少数である。ゲノム解読が実現性が高い、小さい1C-valueを持つ植物種を特定することがシダ類では喫緊の課題であるが、C-valueデータベースに現時点で登録済みのシダ類の計測結果は研究開始時点ではわずか95種101件にすぎなかった。また、染色体観察と1C-valueは、別の研究で行われている場合が多く、同一個体由来するデータが限られることで、染色体数とゲノムサイズの関係性を議論することが困難であることも課題であった。

### 2. 研究の目的

シダ類のゲノムサイズ(1C-value)の系統進化を、特に染色体基本数の進化と関連付けて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

上記研究目的を達成するため、同倍数性の近縁種間でゲノムサイズの差異を検証可能かつ、現在の染色体基本数進化仮説の妥当性をゲノムサイズから検証可能な対象種群を選定した。そのスクリーニングの過程では、現時点で想定されている染色体基本数を見た場合に、近縁系統内において染色体基本数が劇的に変化する群を優先した。フローサイトメーターを用いたゲノムサイズ測定には生材料が不可欠であるため、国内に自生しているか、栽培株を保有あるいは入手可能な種群を対象とした。

対象種群の系統関係が解明されていることが最初に必要であるため、葉緑体DNAマーカー・核DNAマーカーを用いた分子系統解析を最初に行った。使用するマーカーは材料ごとに選定したが、特に複雑な網状進化を起こしていることが予想される分類群では、新規の核DNAマーカーを開発する必要性が生じた。また、塩基配列に多型が存在する場合にはSSCP法によって多型を分離し、切り出したゲルから再度DNA断片を増幅した後に配列を決定した。得られた塩基配列は一般的な方法で系統樹を構築した。

DNA含量(ゲノムサイズ)については、フローサイトメーターをDAPIあるいはPI染色によって、相対値を原則3回反復で測定した。生材料以外も、乾燥標本を試料として利用できることを検証した。

染色体数は、研究協力者の中藤成実が、主に根端細胞を用い、体細胞分裂時の像を観察することにより計数した。この際、可能な限りDNA含量を測定したのと同じ材料で染色体も観察することを目指した。得られた染色体数と、過去に報告された基本数を総合して、各個体の倍数性を推定した。また、雑種性個体の識別を目的に、必要に応じて孢子の顕微鏡観察も行った。

DNA含量を倍数性で割ることにより、1C-valueを算出した。分子系統樹上に1C-valueをマッピングした上で、ゲノムサイズの進化傾向および、染色体基本数との関係性を検討した。

### 4. 研究成果

先行研究で報告された染色体数や材料の入手可能性等を検討した結果、本研究では(1)ハナヤスリ科Ophioglossaceae、(2)ホングウシダ科エダウチホングウシダ属*Lindsaea*、(3)コケシノブ科Hymenophyllaceaeの3群を主な研究材料として選択した。いずれも近縁種群(科または属)内において、既知の染色体基本数に大きな変化が見出されているシダ類であり、ハナヤスリ科

(最小基本数  $x=44$ 、最大基本数  $x=130$ )、ホングウシダ科エダウチホングウシダ属(最小基本数  $x=34$ 、最大基本数  $x=47$ )、コケシノブ科(最小基本数  $x=11$ 、最大基本数  $x=36$ )の 3 群を主な材料として選択した。各対象について、バックボーンとなる系統関係の解明(異質倍数体の認識も含む)、DNA 含量の測定、染色体数カウントを行って、データを得た。

ハナヤスリ科については、本科を含む真囊シダ類では採集から数十年程度が経過した胞子においても DNA 含量を計測可能な例があることが示唆されたため、実際に博物館に収められた標本を用いて、採集困難な希少種を含めてデータを得た。1C-value としては、ナガホノナツノハナワラビで最小の 6Gb から、最大の種ではその 20 倍以上であることが判明した。これらのゲノムサイズの解釈については未だ検討の余地が残されるが、現在二倍体とみなしている個体が実は四倍体であると解釈すると、1C-value の振れ幅が小さくなる例が多く、倍数体起源の系統の基本数の見直しの必要性が示唆された。

ホングウシダ科エダウチホングウシダ属については、特に日本周辺で多様性が高く、過去の染色体数の報告も  $x=43$  から  $x=47$  まで幅があるエダウチホングウシダ類を重点対象とした。しかしながら、新規に材料を収集して染色体数を正確に観察し直した結果、従来報告されていたよりも染色体基本数の変化が小さく、いずれの種も  $x=43$  または  $x=44$  の染色体をもっていることが明らかになった。本研究の目的を達成するための材料としては適さなくなった部分があるが、一方で染色体基本数の異なる個体間の雑種や異質倍数体の存在が確認された。また、染色体基本数の異なる個体間で 1C-value の有意な差は検出されなかった。

コケシノブ科については、科内で最も染色体基本数に顕著な変化を示すコケシノブ属 *Hymenophyllum* を主対象に解析を行った。日本に産する 11 種には、基本数  $x=36$ 、 $x=28$ 、 $x=21$  の少なくとも 3 基本数が含まれており、これらを材料として使用した。得られた染色体数、DNA 含量を解析した結果、本属の 1C-value は概ね 15 から 25pg 前後で安定しており、染色体基本数との相関は見られないことが明らかになった。系統関係と総合すると、本属では染色体が  $x=36$  から  $x=21$  まで減少する方向での進化が急速に起こった可能性が高いことが示唆され、つまり染色体の結合が何度も起こった可能性が高いことになる。系統 - 1C-value - 染色体基本数の三者を統合して議論できる初めてのデータが得られたことは、シダ類のゲノムサイズ進化解明の上でも大きな一歩と言える。また、染色体を減少させる方向への進化することの意義についても、今後より詳細な検討が必要であると言える。

本研究の副産物として、従来染色体数未報告であった種におけるカウントや、新サイトタイプの発見の成果も多数得られた。特に新サイトタイプ(倍数体)の発見は、本研究の目的に直接寄与するものではないが、種の実体を把握する上で重要な情報であり、本研究の重要な成果であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuo, L.-Y., S. K. Tang, T.-T. Kao, A. Ebihara, S. Fawcett, M.-C. Hsiao, W. Shinohara & B. Dauphin	4. 巻 9
2. 論文標題 A dormant resource for genome size estimation in ferns: C-value inference of the Ophioglossaceae using herbarium specimen spores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applications in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 e11452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/aps3.11452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海老原淳・中藤成実
2. 発表標題 国内に親が見つからない雑種性不稔シダ類の謎
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海老原淳・梶原秀高・中藤成実
2. 発表標題 日本産エダウチホングウシダ属倍数体の再検討
3. 学会等名 日本植物分類学会第22回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中藤 成実  (Nakato Narumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
その他の国・地域	National Tsing Hua University			