

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14489

研究課題名(和文) サクラ属における受精後の雑種不和合性を引き起こす遺伝子およびそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of genes and their functions involved in post-zygotic hybrid inviability in Japanese flowering cherries

研究代表者

鶴田 燃海 (TSURUTA, Momi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：90809740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精後に起こる雑種不和合(Hybrid incompatibility: HI)の理解に向け、サクラ属の雑種実生で見られた生育不全と関連した遺伝子の探索および、発現遺伝子の網羅的解析による生育不全メカニズムの推定を行なった。詳細マッピングによりHIに関与するゲノム領域を同定し、その中からHIの候補遺伝子を決定した。さらに、生育不全実生で特異的にアップまたはダウンレギュレートされる遺伝子群を同定することで、植物の病原体への防御反応と関連した遺伝子が過剰発現することにより、雑種実生の生育不全が引き起こされたと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種分化は最も根本的な生物学的な興味の一つである。本課題の成果は、「近縁種の分布がしばしば重なり、受精前の生殖隔離機構を持たないサクラ属などの植物種では、なぜ種分化が維持されるのだろうか」との問いに対して、受精後に起こる雑種不和合性の重要性とそれを引き起こすメカニズムの一端を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To understand post-zygotic hybrid incompatibility (HI), we explored genes associated with the lethal growth failure of hybrid cherry seedlings and inferred the mechanism of weak growth by comprehensive expressed gene analysis. The fine-mapping approach allowed us to determine the genomic regions involved in HI and candidate genes for HI. Furthermore, genes that are specifically up or down-regulated in the seedlings were identified. Finally, we concluded that the growth failure of seedlings was caused by the high expression of genes associated with plant defense responses to pathogens.

研究分野：植物繁殖生態学

キーワード：雑種不和合性 サクラ属 詳細マッピング トランスクリプトーム 植物防御反応 自己免疫反応 染井吉野

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

桜(バラ科サクラ属)は日本で古くから親しまれてきた樹木の一つである。これまでに300を超える園芸品種が作られてきた背景には、人工交配によって比較的容易に種間雑種ができることが挙げられる。このため、サクラ属は受粉から受精までの種間交雑の障壁が小さな分類群といえる。この形質は一方で、緑化などで植栽された近縁種または園芸品種とその地域に自生する野生種個体群との間で頻繁な交雑を可能にし、野生種の遺伝的な特徴が消失または大きく改変されてしまうこと(遺伝子攪乱)が懸念されている。サクラ属野生種の遺伝的多様性の保全のためには、交雑の頻度とそれに影響する要因を明らかにすることが重要となる。加えて、サクラ属のように受精までの種間交雑の障壁の低い分類群では、雑種実生やその後代で起こる不和合性や弱勢(雑種崩壊と呼ばれる)の影響、雑種個体の繁殖への貢献の可能性などを明らかにすることが必要不可欠となる。しかし、受精後の雑種不和合の影響やそのメカニズムについては、これまでに理解が十分に進んでいない。

これまでに、最も有名な桜品種‘染井吉野’(*Cerasus* × *yedoensis* ‘Somei-yoshino’)と複数のサクラ属の野生種間で人工交配を行ってきた過程で、‘染井吉野’にエドヒガン(*Cerasus spachiana*)を交配すると、得られた実生において致命的な生育不全の形質が表出することが明らかになった(図-1)。「染井吉野」はエドヒガンとオオシマザクラ(*Cerasus speciosa*)の雑種と考えられている。このため、この交雑家系は種レベルの戻し交雑家系といえ、雑種実生で観察された生育不全は、エドヒガンとオオシマザクラの種間の雑種崩壊とみなすことができる。この生育不全を引き起こす遺伝子およびそのメカニズムが明らかになれば、受精後の雑種不和合の理解が深められ、例えば、どのような遺伝子を持った野生種個体群ではより種間交雑が進みやすいかを推測し、遺伝子攪乱のリスク評価につなげられるのではないかと考えた。



図-1. 発芽からおよそ2週間後の‘染井吉野’とエドヒガンとの交雑家系の実生では、健全な形質(左)および生育不全(致命的)の形質(右)とがおよそ1:1の割合であられる(Tsuruta et al. 2022の図を改変)。

2. 研究の目的

本課題では、‘染井吉野’とエドヒガンの交雑家系の実生においてみられた生育不全を、**1. どのような遺伝子によって引き起こされているのか、2. どのようなメカニズムにより生育不全となるのか、**の2つの点から明らかにすることを目的とした。

生育不全を引き起こす遺伝子の探索は、複数家系の‘染井吉野’とエドヒガンとの交雑から得られた多数の実生を用いた連鎖解析(詳細マッピング)および、近年解読が進むゲノム配列情報を利用することで行った。また同時に、健全な実生と生育不全の実生で発現する遺伝子の網羅的解析(トランスクリプトーム解析)を行うことで、生育不全のメカニズムを解明した。

3. 研究の方法

(1) 詳細マッピングによる雑種不和合と関連する候補領域の同定

詳細マッピングは次の3ステップで行った。①ゲノム全体にわたる探索: ‘染井吉野’とエドヒガンとの交雑家系(2家系)151個体の実生において、既報の‘染井吉野’の連鎖地図に座上した30個のSSRマーカーの分離比を調べ、生育不全と関連する染色体領域をおおまかに探索した。②関連が示された染色体内の探索: サクラ属で第4染色体に座上することが報告されている9個のSSRマーカーを用い、5家系356個体の雑種実生の分離を調べて連鎖解析を行い、生育不全の候補領域を狭めた。③ゲノム配列を基に開発したマーカーによる詳細な探索: 狭めた領域に対応するモモ(*Prunus persica*)のゲノム配列を参照し、同領域に新たに8つのSSRマーカーを設計した。このマーカーの分離を、これまでの交配で得られた534個体の実生のうち同領域で組換えの見られた実生(16個体)および非組換え型の実生(14個体)において調べ、生育不全の候補領域を決定した。

(2) 雑種不和合性候補遺伝子の決定とサクラ属野生種における配列および発現解析

詳細マッピングにより決定された候補領域において予測される発現遺伝子配列を、モモおよびオウトウ (*Cerasus avium*) のゲノム配列において同定した。遺伝子の機能を BLAST、InterPro 等で探索し、生育不全と関連が予測される候補遺伝子を決定した。候補遺伝子の配列を複数のサクラ属野生種で決定し、またそれらが実生において発現していることを RT-PCR で確認した。

(3) トランスクリプトーム解析による生育不全のメカニズムの解明

‘染井吉野’ とエドヒガンとを交雑させて得られた種子および対照として野生種のヤマザクラ (*Cerasus jamasakura*) から採取した種子を、無菌の育苗ポットで生育させた。発芽からおよそ2週間後、健全な実生、生育不全の実生およびヤマザクラ実生、各3個体からそれぞれ total RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより全 mRNA の配列を取得した。モモ、オウトウ、および‘染井吉野’ ゲノムをリファレンスとし、発現遺伝子およびその量を解析した。処理間で発現の異なる遺伝子 (DEG) を同定し、それらの機能を BLAST、InterPro、Gene Ontology (GO) により調べた。また、GO enrichment 解析等を行うことで、生育不全のメカニズムを推測した。さらに生育不全の実生3個体から部位 (葉・子葉・下胚軸) ごとに RNA を抽出し、同様に発現解析を行った。

4. 研究成果

ゲノム全体にわたる解析結果から、雑種実生の生育不全は‘染井吉野’の第4染色体に座上する遺伝子座によって引き起こされることが明らかとなった。5家系を用いた連鎖解析により、生育不全と関連する領域を EMPaS13 および UCD-CH17 の2つのマーカー間 (3.8 cM) に決定した。生育不全の形質と最も連鎖したマーカーは、EMPaS13 (0.7 cM) であった。新たにゲノム配列を基に開発したマーカーを用いることで、候補領域を Pp04C001 と Pp04C007 の間にまで狭めることができた (図-2)。候補領域はモモのゲノムでおよそ 240 Kb に相当し、この値は樹木において数少ない目的とする形質の遺伝子同定 (map based cloning) の期待が高い成果となった。

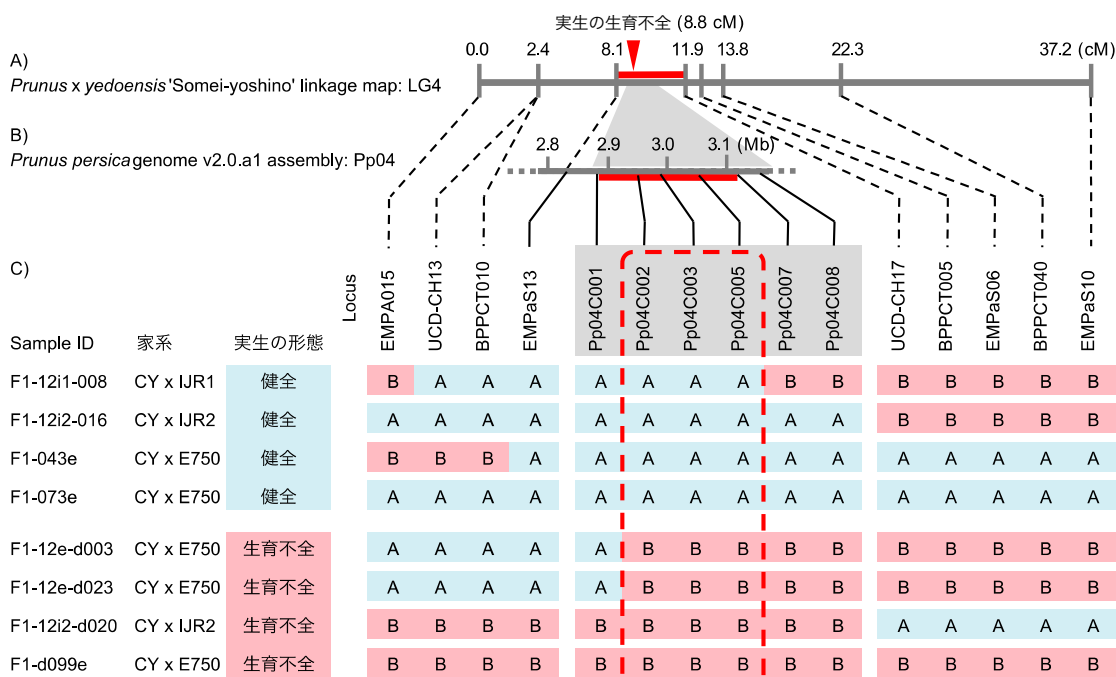


図-2. ‘染井吉野’の連鎖地図 (A)、モモのゲノム配列 (B)、および新たに開発した SSR マーカーの遺伝子型と実生の形質の比較 (C) において推定された、雑種実生の生育不全の候補領域 (赤色)。候補領域において、B で示されたゲノム領域を‘染井吉野’から受け継いだ実生は生育不全となった (破線)。(Tsuruta and Mukai 2019 の図を改変)

詳細マッピングで決定した候補領域には、モモのゲノムで45個、オウトウのゲノムで85個の発現遺伝子が存在した。この中から、Arabidopsis 等で胚軸の成長に関与することが指摘される ALOG と同源性の高い遺伝子が見つかった。また同領域には、leucine rich repeat (LRR) や receptor-like protein kinase (RLK) のドメインを持つ遺伝子が複数存在することも明らかになった。LRR や RLK は植物の病原菌に対する防御反応と関連し、これらの過剰発現は生育不全を引き起こすことも知られている。このため、ALOG および防御関連遺伝子を、雑種実生の生育不全を引き起こす候補遺伝子とした。

候補遺伝子として挙げられた ALOG 遺伝子の理解を深めるため、近縁種のゲノム配列から ALOG と相同性の高い配列を探索した。サクラ属には 8 種類のパラログが存在し、このうち候補の ALOG は *Pru_ALOG7* と名付けた。これらの遺伝子の配列を 6 種のサクラ属野生種において塩基配列を解読したところ、見つかった変異のほとんどは同義置換であった。アミノ酸配列はどの遺伝子においても保存性が極めて高く、機能的な制約が予測された。RT-PCR からは、これらの遺伝子が実生の各部位で発現していることが示された。

モモのゲノムをリファレンスとしたトランスクリプトーム解析では、合計 22,218 遺伝子がいずれかのサンプルで発現していた。健全な実生と生育不全とを比較したところ、1,856 遺伝子が DEG として同定され、このうち 661 遺伝子は生育不全実生において発現が高く（アップレギュレート）、1,195 遺伝子は発現が低下していた（ダウンレギュレート）。生育不全実生において最も発現が高くなった DEG は、*Arabidopsis* の basic pathogenesis-related protein 1 と相同性が高く、防御反応との関連が示された。この他にもアップレギュレート DEG の上位には、LRR、RLK を含む、防御反応と関連した遺伝子が複数含まれていた。これらの傾向は、オウトウや‘染井吉野’ゲノムをリファレンスとしたときも同様であった。

防御反応と関連する遺伝子のアップレギュレートは、GO enrichment 解析においても示された。防御反応 (defense response, GO:0006952) は、一貫して生育不全実生におけるアップレギュレート DEG で有意に濃縮されていた (図-3A)。一方で生育不全の実生では、光合成と関連した遺伝子等の発現が低下することが示された (図-3B)。さらに実生の部位ごとに解析すると、防御反応と関連した遺伝子の高発現は主に実生の胚軸において顕著に見られた。また、細胞サイクル、細胞の成長や分裂に関与する遺伝子の発現が、生育不全実生の葉 (茎頂部位が含まれる) において低下することが示された。

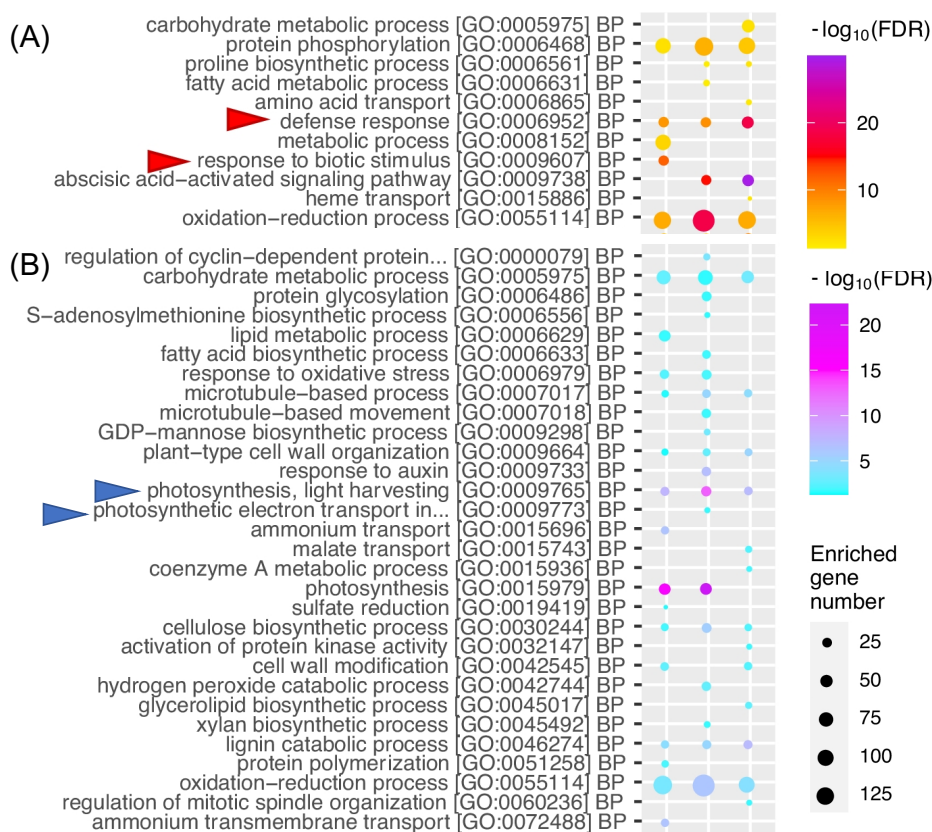


図-3. 生育不全の雑種実生で有意にアップレギュレートされた DEG (A) およびダウンレギュレートされた DEG において濃縮が見られた生物学的プロセスの GO。発現が上昇した遺伝子として防御関連遺伝子 (赤矢印) が挙げられ、一方で光合成関連の遺伝子等は発現が低下した (青矢印)。(Tsuruta et al. 2022 の図を改変)

これらの結果から、サクラ属における雑種実生の生育不全は、防御関連の遺伝子の過剰発現により茎頂分裂細胞を含む主軸の成長が妨げられることで引き起こされたと考察した。病原体に対する防御反応は生存に不可欠で、多くの植物に共通して備わる機能である。また、雑種の生育不全と防御反応の高発現は、様々な分類群の植物種で報告されつつある。本課題の成果は、防御反応を介した雑種崩壊が植物に広く共通したメカニズムであるとの示唆を強く与えることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuruta Momi, Lian Chunlan, Mukai Yuzuru	4. 巻 18
2. 論文標題 Upregulation of defense-related gene expressions associated with lethal growth failure in the hybrid seedlings of Japanese flowering cherry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tree Genetics & Genomes	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11295-022-01552-z	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 -
1. 著者名 Tsuruta Momi, Lian Chunlan, Mukai Yuzuru	4. 巻 -
2. 論文標題 Hybrid breakdown as a result of up-regulated expression of defense-related genes in the hybrid seedlings of Japanese flowering cherry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of International Symposium on a Recent Progress in Forest Ecology and Management 2021	6. 最初と最後の頁 47-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Tsuruta Momi, Mukai Yuzuru	4. 巻 69
2. 論文標題 Fine mapping of a locus presumably involved in hybrid inviability (HIs-1) between flowering cherry cultivar <i>Cerasus</i> × <i>yedoensis</i> 'Somei-yoshino' and its wild relative <i>C. spachiana</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 658-664
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19078	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 -
1. 著者名 鶴田 燃海	4. 巻 9
2. 論文標題 サクラ属における遺伝基盤の整備と雑種不和合性関連遺伝子の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 森林遺伝育種	6. 最初と最後の頁 65-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32135/fgtb.9.2_65	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsuruta Momi, Lian Chunlan, Mukai Yuzuru
2. 発表標題 Hybrid breakdown as a result of up-regulated expression of defense-related genes in the hybrid seedlings of Japanese flowering cherry
3. 学会等名 International Symposium on a Recent Progress in Forest Ecology and Management 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴田燃海・練春蘭・向井讓
2. 発表標題 サクラの生育不全実生で見られた防御関連遺伝子の高発現
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会（2021年3月：オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴田燃海・向井讓・練春蘭
2. 発表標題 RNA-seq を用いたサクラ属の生育不全実生で特異的に発現する遺伝子の探索
3. 学会等名 131回日本森林学会大会（2020年3月：名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴田燃海・桐原奏子・向井讓
2. 発表標題 サクラ属における組織分化の制御に関するALOG gene familyの配列比較
3. 学会等名 130回日本森林学会大会（2019年3月：新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桐原奏子・向井謙・片畑伸一郎・鶴田燃海
2. 発表標題 サクラ属における雑種実生の生育不全候補遺伝子の発現特性と塩基配列の変異
3. 学会等名 130回日本森林学会大会（2019年3月：新潟）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------