

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02981

研究課題名(和文) トウガラシの種間雑種不和合性を司るエピスタシス遺伝子と打破遺伝子の特定

研究課題名(英文) Identification of epistatic and breaking genes responsible for interspecific hybrid incompatibility in pepper

研究代表者

細川 宗孝 (Hosokawa, Munetaka)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40301246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：トウガラシ(Capsicum)では5つの栽培種が存在する。本研究では種間交雑での座止を引き起こす原因を明らかにすることを目的とし、原因遺伝子の探索を行った。交雑分離集団を用いてQTL-seqを行った結果、座止は2つの優性補足遺伝子によって発現するエピスタシス現象であることが分かった。これら2つの遺伝子をそれぞれA(a)遺伝子、B(b)遺伝子とし、それぞれは第7染色体、第10染色体に座乗することが分かった。またB(b)遺伝子の候補領域を約266 Kbpに絞ることができ、自己免疫に関わる特定の遺伝子がB(b)遺伝子の候補遺伝子として考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トウガラシの種間交雑は長年、研究されてきたがその原因は不明のままであった。現象から自己免疫反応が関わっていることは予想されていたが、どのようなエピスタシス経路があるのかは興味の対象となっている。我々は独自の交雑分離集団を用いて、ほぼ一つの遺伝子座を特定することができた。この研究は、植物の生殖隔離の進化などの学術的な研究に発展しうる。園芸学的には、Capsicumの種間雑種によるHybrid vigorの獲得や、香りや光合成の性質を改変した新たな品種育成などの応用研究につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：There are five cultivated species of Capsicum (Capsicum annum). In this study, we searched for the genes responsible for inactivation in interspecific hybrids. QTL-seq on the cross segregants revealed that crosstalk is an epistatic phenomenon expressed by two dominant genes. These two genes were designated as A(a) gene and B(b) gene, respectively, and were found to be located on chromosomes 7 and 10, respectively. The candidate region of the B(b) gene was narrowed down to about 266 Kbp, and among the genes present in the candidate region, a specific gene related to autoimmunity was considered as a candidate gene for the B(b) gene.

研究分野：園芸学

キーワード：エピスタシス 種間雑種 座止

1. 研究開始当初の背景

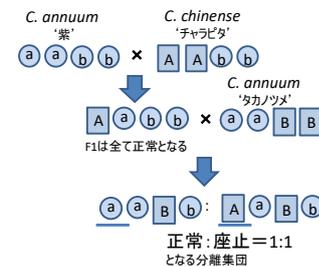
トウガラシ属には *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum* などの栽培種が存在しており、*C. annuum* は野菜としての特性、香辛料としての特性に優れていることから、ピーマンやシトウ、または‘タカノツメ’など、我が国でも栽培面積が大きい。*C. chinense* は香りの強いトウガラシであり、南米やアフリカでは栽培面積が大きい。これはヤギ肉など臭みの強い食材とセットになっているためであろう。これらの種を交雑して新しい品種を育成することはトウガラシの品種育成手段として有効であるが、ほとんど行われていない。

‘タカノツメ’ (*C. annuum*) × ‘チャラピタ’ (*C. chinense*) で得た実生は正常に成長しない。これは茎頂分裂組織が成長を停止 (座止) するためである。一方で、‘紫’ (*C. annuum*) × ‘チャラピタ’ (*C. chinense*) では全ての種子が正常に発芽し成長する。一般に、種間交雑の不和合性には2つの遺伝子座の相互作用 (エピスタシス) が関与することが報告されている。すなわちエピスタシスに関与する2座の遺伝子を A, B (劣性遺伝子を a, b) とすると、交雑後代において2つの遺伝子が共に優性 (AB) となった場合に不和合性 (座止) となるというモデルである (BDM モデル: H. A. Orr. Genetics 144.)。

‘タカノツメ’ (*C. annuum*) を aaBB、‘チャラピタ’ (*C. chinense*) を AAbb とすると F1 は全て AaBb となり座止となる。一方で、‘紫’ (*C. annuum*) は aabb と考えられ、AAbb の‘チャラピタ’との F1 は Aabb となり、b 座が劣性となるために F1 は全て正常型となる。そこで、第1図のように‘紫’ × ‘タカノツメ’の F1 (遺伝子型は aaBb) に‘チャラピタ’を交配すると、正常個体 (Aabb) と座止個体 (AaBb) は実際に 1:1 に分離し、上述の BDM モデルに合致する。これらの分離集団を RAD-seq で解析すると第10染色体に B (b) 遺伝子が座乗していることが明らかになった。また、第2図のように‘紫’ × ‘チャラピタ’の F1 (遺伝子型は Aabb) に‘タカノツメ’を交配すると正常個体 (aaBb) と座止個体 (AaBb) が 1:1 に分離し、これも BDM モデルに合致する。これらの分離集団を RAD-seq で解析すると第7染色体に A (a) 遺伝子が座乗していることが明らかになった。このような解析からトウガラシ属の種間雑種不和合性を決定する遺伝子が別々の染色体に座乗するエピスタシス遺伝子であることが証明された。

申請者らによって自家授粉を繰り返され固定された *C. annuum* 10 品種のうち 6 品種が *C. chinense* (‘チャラピタ’) との F1 が座止となる aaBB 型であり、残りの 4 品種が *C. chinense* (‘チャラピタ’) との F1 が正常となる aabb 型品種であることがわかった。ただし、この結果は全て *C. annuum* を母親にして *C. chinense* と交雑した場合の結果である。*C. chinense* を母親にした場合には、aabb 型の *C. annuum* 品種を用いても座止となるか、成長しても縮葉形質となり、正常に成長しない (第2図)。これは、細胞質も交雑和合性に関与することを示唆している。

ところが、*C. annuum* で aabb 型の品種である‘カリフォルニア・ワンダー’は *C. chinense* を母親にして交雑しても F1 は正常に育つ。すなわち、‘カリフォルニア・ワンダー’は種間雑種不和合性を打破する遺伝子 (C とする) を持っているものと推定できる。以上をまとめると以下の



第1図 A遺伝子の特定のための分離集団
この分離集団を用いてA(a)遺伝子が第7染色体に座乗していることを明らかにした。



第2図 本来は正常に育つ組み合わせであっても *C. chinense* が母親になると座止あるいは縮葉となる

通りとなる。

1. *C. annuum* の細胞質を持つ場合には、BDM モデルに従い第 7 および第 10 染色体に座乗する 2 遺伝子座の遺伝子型で交雑和合性が決まる。

2. *C. chinense* の細胞質を持つ場合には、核の遺伝子型によらず座止（縮葉形質）となる。

3. *C. annuum* ‘カリフォルニア・ワンダー’ の遺伝子は核型や細胞質型によらず座止を抑制する。

Capsicum 属の交雑和合性・不和合性を明らかにするために、以上の 3 点に関わる遺伝子を特定する必要がある。

2. 研究の目的

①第 7 および第 10 染色体に座乗する 2 つのエピスタシス遺伝子を特定する

②細胞質の違いによる遺伝子発現および不和合性に関与する細胞質遺伝子の特定

③ ‘カリフォルニア・ワンダー’ が持つ交雑不和合性打破遺伝子の特定

3. 研究の方法

本研究においては目的にある①をまず、行い、その結果を起点として②、③へと進むこととした。②と③については材料（集団）の作成が中心になったため、本報告書では主に①についてのみ述べる。

ゲノムリファレンス情報の構築

まず、‘タカノツメ’ のリファレンスとして *takanotsume10X*, *takanotsume HiFi* を作成し、利用してきたが、これらリファレンスにおける推定領域の遺伝子情報が、作成した CAPs マーカーと一致しないことから、新たに本研究で用いられる精密なリファレンスである *Can1.2* (Shirasawa et al. 2023) を作成した。

ターゲットシーケンスによる A, B 候補領域の濃縮

B 遺伝子: *C. annuum* ‘伏見甘長’, ‘山科’, ‘三重みどり’, ‘伊勢ピーマン’, ‘昌介’, ‘魁’, ‘石井みどり’, ‘園研甘長’, ‘ちぐさ’, ‘タカガミネ’, *C. chinense* ‘Charapita’ の種子を供試した。これらの種子を JA ニッピ園芸培土 1 号（日本肥糧（株））を充填したポットに播種し、蛍光ランプ FL40SBRN(東芝ライテック(株))で $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (PPFD), 25°C(12 h/12 h)条件の植物工場において栽培を行った。発芽 2 か月以上経った後に近畿大学農学部の圃場に移植し、夏から秋の間 *C. annuum* の 10 品種それぞれを種子親とし、‘Charapita’ を交雑させ、種子を得た。これらの種子を同様に蛍光灯下で発芽させ、発芽後の形質と分離比を確認した。

‘伏見甘長’, ‘山科’, ‘三重みどり’, ‘伊勢ピーマン’, ‘昌介’, ‘石井みどり’, ‘園研甘長’, ‘ちぐさ’, ‘タカガミネ’の本葉を供試した。これら 10 品種の葉から DNA を抽出し, SQK-LSK114 キット (Oxford Nanopore Technologies) でライブラリを作成した。FLO-PRO114M フローセル (Oxford Nanopore Technologies) を使用し, PromethION シークエンサー (Oxford Nanopore Technologies) を用いたロングリードシーケンスによるターゲットシーケンスを行った。ターゲットシーケンスによって得られたリードを ‘タカノツメ’ のリファレンスである *Can1.2* (Shirasawa et al. 2023) にマッピングし, vcf を作成した。

発現比較と GO 解析

‘山科’×‘Charapita’, ‘昌介’×‘Charapita’, ‘伏見甘長’×‘Charapita’, ‘魁’×‘Charapita’, ‘ちぐさ’×‘Charapita’, ‘園研甘長’×‘Charapita’, の種子を供試した。種子を JA ニッピ園芸培土 1 号（日本肥糧（株））を充填したポットに播種し、インキ

インキュベーター(日立製作所, LED ライト)内で発芽させた. 発芽後, 茎頂または子葉を, 剃刀を用いて摘出し, すぐに -80°C で保存した. また茎頂は複数個体を1つのサンプルとした. FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit (チヨダサイエンス)を用いてバルク RNA を抽出し, これを RNA-seq に供試した. RNA-seq データを Can1.2 (Shirasawa et al. 2023) にアライメントし, RNA-seq を行った. RNA-seq による解析は‘山科’×‘Charapita’, ‘昌介’×‘Charapita’, ‘伏見甘長’×‘Charapita’をそれぞれ zashi_1, zashi_2, zashi_3, ‘魁’×‘Charapita’, ‘ちぐさ’×‘Charapita’, ‘園研甘長’×‘Charapita’をそれぞれ seizyo_1, seizyo_2, seizyo_3 として行った. RNA-seq のデータから differentially expression genes (DEGs) を抽出して, EggNogMapper で GO term を付与した後, GO enrichment 解析を行った.

DAB 染色およびトリパンブルー染色

(‘紫 MS’×‘Charapita’)×‘タカノツメ’の種子を供試した. 種子は, JA ニッピ園芸培土 1 号 (日本肥糧 (株)) を充填したポットに播種し 20°C (12h/12h) に調整したインキュベーターにて発芽させた. 発芽後形質を判別し, 座止個体と正常個体の子葉を用いて DAB 染色およびトリパンブルー染色を行った. また対照区として Na_2HPO_4 による染色後, 脱色液 (エタノール: 酢酸: グリセロール = 3:1:1) による脱色を行った.

4. 研究成果

C. annuum×*C. chinense* の後代の分離比

10 品種の *C. annuum* と *C. chinense* ‘Chatapita’ をそれぞれ交雑し, 後代の形質から分離比を確認した結果, ‘伏見甘長’, ‘三重みどり’, ‘伊勢ピーマン’, ‘昌介’を種子親として ‘Charapita’ と交雑したとき, 不明個体を除くと後代の形質はすべて座止を発現した. また, ‘魁’, ‘石井みどり’, ‘園研甘長’, ‘ちぐさ’, ‘タカガミネ’, を種子親として ‘Charapita’ と交雑したとき, 不明個体を除くと後代の形質はすべて正常型となった. ‘山科’を種子親として交雑したとき, 1 個体のみ正常の形質を示したが, これは自殖してしまったことによって得られた可能性が高い. また, 発芽後に種皮を覆っていたことで形質が判別できなかった個体はあったものの, ‘タカノツメ’, ‘紫’, ‘Charapita’ の三系交雑によって得られた交雑後代の個体のような正常個体または座止個体が判別できない個体は本実験では見られなかった. これらの結果より, ‘伏見甘長’, ‘山科’, ‘三重みどり’, ‘伊勢ピーマン’, ‘昌介’は aaBB 型, ‘石井みどり’, ‘園研甘長’, ‘ちぐさ’, ‘タカガミネ’は aabb 型の遺伝子型であると考えられた.

C. annuum×*C. chinense* 後代の形質調査

10 品種の *C. annuum* それぞれを種子親とし, *C. chinense* ‘Charapita’ を交雑し, 後代の播種後 28 日の形質を調査した. (‘タカノツメ’×‘紫’)×‘Charapita’ の後代の形質と同様に, 座止個体では正常個体に比べ, 本葉の展開が確認されず, また子葉が縮葉となり, 根の本数が少なく短かった. また座止個体では, これまで子葉が小さいものが多かったが, ‘伏見甘長’を種子親として交雑した時では, 発芽直後は他の座止個体と同様に子葉は小さかったが, その後子葉が伸長し, 子葉の大きさが比較的大きくなることが確認できた. これは, 用いる *C. annuum* の品種によって座止の程度が異なる可能性が考えられる. 矢澤ら (1989) の報告においても, ごくまれに ‘伏見甘長’を種子親として *C. chinense* と交雑し得られた後代から, 2 年 6 か月もの長期間栽培を続けることで側枝が正常に発育し, 結実することが確認されている.

ターゲットシーケンスおよび RNA-seq による B(b) 遺伝子の候補領域の特定

C. annuum の aaBB 型 5 品種と aabb 型 5 品種のターゲットシーケンスリードを用いた vcf

の結果から, aaBB 型と aabb 型で配列が異なる領域 (SNP が存在する領域) が大きく分けて 3 か所確認できた. これらの領域で座止個体と正常個体間で一貫して SNP がある遺伝子 18 個を確認できた (データ略). また, 3 か所の領域のうち, B(b)遺伝子の候補領域と重なる領域があった. このことから,推定した B(b)遺伝子の候補領域が正しい可能性が高いと考えられる. 18 個の遺伝子のうち 10 個は SNP 情報から候補遺伝子であった. これら候補遺伝子のうち blast 検索を行った結果 3 つの遺伝子が同様の機能を持つ遺伝子であると予測された. また, GO enrichment 解析の結果, 本研究で扱っている座止反応の原因として, 自己免疫反応が関わっていることが示唆された.以上のことから一つの遺伝子を B(b)遺伝子と仮定し, 実験を進めた.

高温条件下における座止個体の形質

‘タカノツメ’ × ‘Charapita’ を高温条件下で発芽させ, 栽培することで, 子葉が大きく伸長することが確認できた. しかし, 高温により伸長した子葉は, 室温条件に移動させると数分後に萎れることが確認された. そのためアグロインフィльтраーション法で用いるためには素早く接種を行う必要がある. また, 高温条件下で栽培した ‘タカノツメ’ × ‘Charapita’ は 20°C 条件に移動後, 少し成長しその後すぐに生育が停止することが確認された. また予備実験として, 20°C 条件で播種し, 発芽数日後に 35°C 条件下に移動しても, 本葉を展開し生育が進むことが確認された. (‘紫 MS’ × ‘Charapita’) × ‘タカノツメ’ の後代における正常個体では DAB 染色およびトリパンブルー染色では着色が確認されなかった. 座止個体では DAB 染色による着色が見られたが, トリパンブルー染色による着色は確認されなかった. このことから座止個体の子葉では活性酸素種が発現していることが示唆され, 植物の自己免疫反応と類似していることが考えられた.

その他

A 遺伝子の特定

第 1 図の通り作成した分離集団を用いた HRM 解析で可能な限り範囲を狭めている. *C. chinense* には劣性型は見つかっていないため, *C. chinense* の品種間での A 推定領域の比較は難しい. すなわち, B 遺伝子の特定とは異なり, A 遺伝子は *C. annuum* (a を持つ) と *C. chinense* (A を持つ) の間で比較する必要があり, 現在進行中である. ‘チャラピタ’ の 10X Chromium ライブラリーを作成し, すでに作成した *C. annuum* ‘タカノツメ’ の *de novo* アセンブル情報と比較する.

また, 座止は茎頂分裂組織の反応であることを確認しており, 正常個体と座止個体の茎頂分裂組織から抽出した RNA を用いた発現比較を行う. また, 実験がうまく進まなかった時のために, AaBb 型で座止型となる種子 (‘タカノツメ’ (*C. annuum*) × ‘チャラピタ’ (*C. chinense*)) を EMS 処理することで正常個体を得る. EMS による正常個体は aaBb あるいは Aabb となると考えられ, 推定領域の遺伝子配列から A, B 遺伝子の特定が可能となる. 特定した遺伝子についてはウイルスベクターによる RNA サイレncing によって確認する.

細胞質の違いによる遺伝子発現および不和合性に関する細胞質遺伝子の特定

ミトコンドリア遺伝子のアセンブルを行っている最中である.

‘カリフォルニア・ワンダー’ が持つ交雑不和合性打破遺伝子の特定

集団の作成は完了しているが, 表現型の分離が予想とは異なり, C 遺伝子の存在にあやしさがあったため, 別系統を準備し, 集団の作成をやり直している.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenta Shirasawa, Munetaka Hosokawa, Yasuo Yasui, Atsushi Toyoda, and Sachiko Isobe	4. 巻 30
2. 論文標題 Chromosome-scale genome assembly of a Japanese chili pepper landrace, <i>Capsicum annuum</i> 'Takanotsume'	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DNA Res.	6. 最初と最後の頁 dsac052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsac052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎彬・細川宗孝・白澤健太・中野龍平・中崎鉄也
2. 発表標題 トウガラシの高温下での花粉発芽率に関連する第3染色体と第6染色体上の2遺伝子座の相互作用
3. 学会等名 園芸学会近
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上賢治・田淵翔大・柄折真澄・細川宗孝
2. 発表標題 シントウの低辛味形質の遺伝
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 崎 彬・白澤健太・山田寛子・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシのRNA分解活性を制御するRNase MC-like遺伝子の同定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岸麻理奈・白澤健太・倉田大地・山崎彬・細川宗孝
2. 発表標題 Capsicum 種間交雑で生育異常を引き起こす C. annuum 側の候補遺伝子の特定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本を代表するトウガラシ「鷹の爪」の全ゲノムを解読～多様なトウガラシを生み出すための基盤に～ https://www.kindai.ac.jp/news-pr/news-release/2023/01/037703.html 日本を代表するトウガラシ「鷹の爪」の全ゲノムを解読～多様なトウガラシを生み出すための基盤に～ https://www.kazusa.or.jp/news/pr20230111/ 日本を代表するトウガラシ「鷹の爪」の全ゲノムを解読～多様なトウガラシを生み出すための基盤に～ https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-01-12-2</p>
--

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
研究分担者	白澤 健太 (Shirasawa Kenta) (60527026)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員 (82508)	
研究分担者	安井 康夫 (Yasui Yasuo) (70293917)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

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