

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05988

研究課題名(和文)植物の種間・倍数性交雑において種子発育不全が誘発する子房落下現象の分子機構解明

研究課題名(英文) Analysis on ovary abscission caused by seed abortion in interspecific and interploidy crosses in plants

研究代表者

手塚 孝弘 (Tezuka, Takahiro)

大阪公立大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号：20508808

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)：植物の種間交雑で認められる生殖隔離は遠縁交雑育種の妨げとなる障害であり、それを回避・克服する技術が求められている。そのような技術を開発するためには、生殖隔離を引き起こすメカニズムを解明する必要がある。本研究では、タバコの種間交雑で認められる生殖隔離である雑種種子発育不全および子房落下を対象に解析を行った。オーキシン処理によって子房落下を抑制する実験から、種子発育不全が子房落下を引き起こすことを明らかにした。また、これらの現象には複数の遺伝子が関与していることを明らかにし、発現量が異なる多数の遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠縁交雑育種は、遺伝子組換えやゲノム編集を行わずに、野生種等から栽培種に有用形質を導入できる育種法である。しかし、遠縁の植物種間では、種の独立性を維持するための機構である生殖隔離がしばしば認められ、遠縁交雑によるF1雑種作出やその後代の育成が困難あるいは不可能であることが多く、育種上の問題となっている。本研究では、生殖隔離である雑種種子発育不全および子房落下を解析し、これらの生殖隔離の関係性を明らかにするとともに、関与する遺伝子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Reproductive isolation observed in interspecific hybridization of plants is an obstacle to wide hybridization breeding. To develop techniques to overcome it, it is necessary to elucidate the mechanisms underlying reproductive isolation. In this study, I analyzed hybrid seed abortion and ovary abscission, which are reproductive isolation observed in interspecific hybridization of tobacco. Through experiments inhibiting pistil abortion with auxin treatment, I revealed that seed abortion triggers ovary abscission. Furthermore, several genes were suggested to be involved in these phenomena and many genes with differential expression levels were identified.

研究分野：植物育種学

キーワード：雑種種子発育不全 子房落下 生殖隔離 種間交雑育種 倍数性 タバコ

1. 研究開始当初の背景

遠縁交雑育種は、遺伝子組換えやゲノム編集を行わずに、野生種等から栽培種に有用形質を導入できる育種法である。この方法を利用することで、同じ種の品種間・系統間交雑のみでは育成することができない多様な新品種を育成することが可能となる。野生種がもつ有用形質を栽培種に導入するための他の技術として、遺伝子組換えやゲノム編集などが存在するが、目的に応じて多彩な育種法を選択できるようにしておくことは重要であると考えられる。しかし、遠縁の植物種間では、種の独立性を維持するための機構である生殖隔離がしばしば認められ、遠縁交雑による F₁ 雑種作出やその後代の育成が困難あるいは不可能であることが多い。したがって、多様な植物資源を用いた遠縁交雑育種を成功させるために、生殖隔離を回避・克服する技術が求められている。そのような技術を開発するためには、生殖隔離を引き起こすメカニズムを解明する必要がある。

これまでに、私は多数のタバコ属植物を用いて生殖隔離に関する研究を進めてきた。その中で、特定の種間交雑組合せ (*Nicotiana suaveolens* PI 555565 × *N. tabacum* など) において、受粉後に肥大した子房 (未熟果実) が発達途中で落下することを独自に見出した。この子房落下現象は、交雑種子を採種できないことから植物の遠縁交雑育種における重要な問題であるにもかかわらず、これまでに詳細な解析が行われてこなかった。また、*N. suaveolens* × *N. tabacum* の交雑において、片親として使用する *N. suaveolens* の系統によっては雑種種子発育不全 (種子発達時の異常により正常に発芽する雑種種子が得られない現象) が生じることを明らかにした。種子発育不全についてはいくつかの植物種で研究が進められており、両親間の倍数性の違いなどによって生じることが知られているが、メカニズムの解明には至っていない。

そこで、私は *N. suaveolens* の 2 系統、PI 555561 と PI 555565 に着目して比較研究を進めてきた。これらの系統はどちら 8 倍体であること、*N. tabacum* (異質 4 倍体) との交雑において PI 555565 のみが子房落下を生じ、PI 555561 では発芽しない種子が得られることを明らかにした (He *et al.* 2019)。さらに、PI 555561 × *N. tabacum* の交雑だけではなく、PI 555565 × *N. tabacum* の交雑においても種子発育不全が生じていることを明らかにしたが、興味深いことに、胚乳や胚の発育異常の様子は 2 つの交雑組合せで完全に異なっていることが組織学的観察により明らかとなった。*N. tabacum* との交雑において PI 555561 に生じる種子発育不全をタイプ A、PI 555565 に生じる種子発育不全をタイプ B とした。親系統の倍数性を人為的に操作して交雑実験を行ったところ、2 つのタイプの種子発育不全は密接な関係にあり、父親ゲノムに対して母親ゲノムの比率が増加するほど種子発育不全が深刻になり、ついには子房落下に至ることを示した。また、PI 555565 と PI 555561 は同じ倍数性であるが、種子発育に係るゲノム内因子の影響力が異なることで子房が落下するかないかの差を生じることが示唆された。加えて、父親側 (*N. tabacum*) の倍数性を 8 倍性に増加させると、いずれの生殖隔離も起こらなくなることも明らかにした。さらに、これらの生殖隔離は種間交雑だけではなく、親系統の倍数性を操作することで種内交雑においても生じることを明らかにしていた。以上のように、私はこれまで未解明であった種子発育不全と子房落下の関係性を明らかにしてきたが、具体的にどのような遺伝子がこれらの生殖隔離にかかわっているのかは依然として不明であり、生殖隔離のメカニズムを明らかにするためにも分子遺伝学的な解析を行う必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、*N. tabacum* との交雑においてタイプ A 種子発育不全を生じる PI 555561、およびタイプ B 種子発育不全と子房落下を生じる PI 555565 を用い、これら現象に関与する原因・関連遺伝子を網羅的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タイプ A 種子発育不全および子房落下の遺伝解析

PI 555561 と PI 555565 を正逆交雑し、F₁ および F₂ を作出した。これらを *N. tabacum* と交雑することで種子発育不全および子房落下の分離を調査した。そして、QTL 解析に向けて GRAS-Di 法を行った。

(2) RNA シーケンス (RNA-Seq) による雑種種子発育不全関連遺伝子の網羅的な同定

雑種種子発育不全に関与する遺伝子を明らかにするために、PI 555561 × *N. tabacum* と PI 555565 × *N. tabacum* を用いて RNA-Seq 解析を行った。

(3) 雑種種子発育不全および子房落下の普遍性の解析

雑種種子発育不全と子房落下の関係性はタバコで見出したものであり、他の植物種でも同様の現象がみられるのかは不明である。そこで、シロイヌナズナを用いて倍数性を操作し、雑種種子発育不全と子房落下の関係性がシロイヌナズナでも認められるのかを調査することとした。

4. 研究成果

(1) タイプ 種子発育不全および子房落下の遺伝解析

正逆 F_1 およびそれらに由来する 2 つの F_2 集団を用い、各個体を *N. tabacum* と交雑することで遺伝解析を行った。種子の組織学的観察から、 F_1 の果実内において種子発育不全の程度が分離していることを確認した。一方、 F_2 では種子発育不全の程度が F_1 よりも広い範囲に分布した。 F_2 の全個体について種子の組織学的観察を行うのは困難であったため、種子発育不全に関連した形質である子房落下の分離を調査した。その結果、 F_2 では子房落下の発生頻度が連続的に分布しており、種子発育不全および子房落下には複数の遺伝子が関与していることが示唆された。そのため、これらに関与している遺伝子を明らかにするために、QTL 解析を実施する必要があると考えられた。両親として使用した *N. suaveolens* の系統は 8 倍体であり、利用できるゲノム情報も存在しなかった。そこで、多数のマーカーを解析可能な GRAS-Di 解析を実施した。本研究では数十個体の F_2 を解析した。今後は QTL を同定するためにさらに個体数を増やして解析する必要がある。

器官脱離は植物ホルモンであるオーキシンによって抑制されていることが知られている。そこで、倍数性が異なる種間での交雑において生じる子房落下についてもオーキシンで抑制できるのかどうかを調査した。PI 555565 × *N. tabacum* の交雑後、果柄基部に IAA または NAA を処理したところ、子房落下が抑制され、種子を得ることができた。しかし、種子は発芽しなかった。種子を組織学的に観察した結果、オーキシン処理によって種子の発達異常は改善されていないことが明らかとなった。したがって、PI 555565 × *N. tabacum* の交雑では、種子発育不全が生じた結果、子房落下が引き起こされることが示唆された。このことから、 F_2 の遺伝解析において、子房落下の発生頻度によって種子発育不全の程度を推定することは妥当であると考えられた。

(2) RNA シーケンス (RNA-Seq) による雑種種子発育不全関連遺伝子の網羅的な同定

PI 555561 × *N. tabacum* と PI 555565 × *N. tabacum* を用いて RNA-Seq 解析を行い、GO 解析および KEGG 解析を行った。その結果、種子発育不全に関連することが示唆される多数の遺伝子が検出された。今後は各遺伝子について、種子発育不全および子房落下との関係を詳細に調査していく必要がある。

(3) 雑種種子発育不全および子房落下の普遍性の解析

シロイヌナズナの倍数体を作成するために、コルヒチン処理を実施した。フローサイトメトリ分析により倍数体を選別した結果、2 倍体から 4 倍体を作成することには成功した。しかし、4 倍体のコルヒチン処理では 8 倍体を得られたものの、生育が著しく阻害され、その後代を得ることはできなかった。これは“high-ploidy syndrome”によるものと推察され、シロイヌナズナで倍数体間の交雑を検証するためにはこの問題に対処する必要があると考えられた。

(4) その他の研究成果

育種の問題となっている他の生殖隔離についても研究を進め、いくつかの新知見を得て論文等で発表した。雑種種子と雑種実生に生じる発育不全の知見を取りまとめ、それら発育不全の相違点と共通点を論じる総説を発表した。

<引用文献>

He, H., T. Iizuka, M. Maekawa, K. Sadahisa, T. Morikawa, M. Yanase, S. Yokoi, M. Oda and T. Tezuka (2019) *Nicotiana suaveolens* accessions with different ploidy levels exhibit different reproductive isolation mechanisms in interspecific crosses with *Nicotiana tabacum*. J. Plant Res. 132: 461-471.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 -
2. 論文標題 Abnormalities in juvenile to adult transition are associated with hybrid weakness in chili pepper (<i>Capsicum</i>)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Breeding	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbr.13174	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 -

1. 著者名 Takahiro Tezuka, Shota Nagai, Chihiro Matsuo, Toshiaki Okamori, Takahiro Iizuka, Wataru Marubashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Genetic cause of hybrid lethality observed in reciprocal interspecific crosses between <i>Nicotiana simulans</i> and <i>N. tabacum</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25021226	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 Hai He, Kumpei Shiragaki, Takahiro Tezuka	4. 巻 14
2. 論文標題 Understanding and overcoming hybrid lethality in seed and seedling stages as barriers to hybridization and gene flow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1219417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1219417	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

1. 著者名 Hai He, Kumi Sadahisa, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 13
2. 論文標題 Parental genome imbalance causes hybrid seed lethality as well as ovary abscission in interspecific and interploidy crosses in <i>Nicotiana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 899206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.899206	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

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Shonosuke Seko, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 17
2. 論文標題 Capsicum annuum with causal allele of hybrid weakness is prevalent in Asia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0271091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271091	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 Kenji Kawaguchi, Yuichiro Ohya, Maho Maekawa, Takahiro Iizuka, Akira Hasegawa, Kumpei Shiragaki, Hai He, Masayuki Oda, Toshinobu Morikawa, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 11
2. 論文標題 Two Nicotiana occidentalis accessions enable gene identification for Type II hybrid lethality by the cross to N. sylvestris	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96482-6	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

1. 著者名 Takahiro Tezuka, Naoto Kitamura, Sae Imagawa, Akira Hasegawa, Kumpei Shiragaki, Hai He, Masanori Yanase, Yoshiyuki Ogata, Toshinobu Morikawa, Shuji Yokoi	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic mapping of the HLA1 locus causing hybrid lethality in Nicotiana interspecific hybrids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 2062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10102062	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

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Hajime Furukawa, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 134
2. 論文標題 Temperature-dependent sugar accumulation in interspecific Capsicum F1 plants showing hybrid weakness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01340-1	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 -

1. 著者名 Takahiro Tezuka, Naoto Kitamura, Masanori Yanase, Toshinobu Morikawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of crossability between <i>Nicotiana benthamiana</i> and <i>Nicotiana excelsior</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 2583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy11122583	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 Hai He, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 4
2. 論文標題 A high maternal genome excess causes severe seed abortion leading to ovary abscission in <i>Nicotiana interploidy interspecific crosses</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.257	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

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Rie Nakamura, Shigeki Nomura, Hai He, Tetsuya Yamada, Wataru Marubashi, Masayuki Oda, Takahiro Tezuka	4. 巻 37
2. 論文標題 Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds are related to hybrid lethality in the cross <i>Nicotiana suaveolens</i> × <i>N. tabacum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 327 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0606a	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 該当する

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka	4. 巻 6
2. 論文標題 Phylogenetic analysis and molecular diversity of <i>Capsicum</i> based on rDNA-ITS region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/horticulturae6040087	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井翔大・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 Bulked segregant RNA-Seqを用いたタバコ雑種致死原因遺伝子HLA1の遺伝的マッピング
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 世故捷之助・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 SSRマーカーを用いたトウガラシ属の系統解析および種間交雑における雑種弱勢をはじめとする生殖隔離機構の調査
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Xu Tianying, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka
2. 発表標題 Production and identification of an interspecific hybrid between <i>Artemisia princeps</i> and <i>A. vulgaris</i>
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木田茉奈美・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ異倍数性種間交雑に生じる種子発育不全および子房落下の遺伝学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西出七虹・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ種間交雑における雑種致死原因遺伝子HLA1の起源の探索
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永井翔大・松本果歩・川口謙二・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ致死性種間交雑 (<i>Nicotiana amplexicaulis</i> × <i>N. tabacum</i>) において高頻度で出現する生存雑種で見出された雑種致死原因遺伝子HLA1周辺領域の欠失
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永井翔大・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ雑種致死原因遺伝子HLA1周辺領域のハプロタイプ解析
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白柿薫平・古川一・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ属種間交雑で生じる雑種弱勢における温度感受性および糖蓄積
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白柿薫平・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ雑種弱勢における系統地理学的解析
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学大学院 農学研究科 遺伝育種学研究グループ ホームページ
<https://www.omu.ac.jp/agri/breeding-genetics/>

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		
中国	Sun Yat-sen University		