

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24710270

研究課題名(和文) 絶滅危惧植物プリムラ属における異型花柱性遺伝子を用いた花型比のモニタリング

研究課題名(英文) Monitoring of the ratio of floral morph in endangered plant Primula genus using the heterostylous gene

研究代表者

吉田 康子 (YOSHIDA, YASUKO)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50582657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧植物であるサクラソウの長期的な存続は、集団内の種子生産の確保が不可欠である。異型花柱性を示す自家不和合性のため、種子生産には集団内の花型(短花柱花と長花柱花)の割合が重要となる。絶滅の危険性のある集団の花型比を定期的にモニタリングすることを目指し、従来の目視による花型識別ではなく、調査時期や開花個体などの制限を受けないDNAマーカーの作成を試みた。その結果、長花柱花の雌蕊で高発現している遺伝子が多いことから、短花柱花の雌蕊では転写量の抑制を受ける遺伝子が多い可能性が示された。さらに、短花柱花に特異的な塩基多型が検出され、今後はこれらの情報を用いてDNAマーカーの作成を目指す。

研究成果の概要(英文)：Primula sieboldii, a perennial clonal herb, is distributed in Japan and eastern Asia. Overexploitation and destruction of its habitats and horticultural collection are threatening wild populations with extinction, and the species has become endangered in Japan. Seed production is limited in small populations in which the ratio of the two morphs (long-styled and short-styled) is imbalanced; this ratio is very important for reproductive success. The aim in this study was to develop molecular markers associated with the two morphs in a distylous wild population. These markers are likely to be useful tools for monitoring the ratio of morphs in a population containing the non-flowering ramets or during seasons when the ramets are not flowering. The result of RNA sequencing, specific single-nucleotide polymorphisms were detected in short-styled morph. Using these informations, developing molecular markers are aim for morph identification.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：異型花柱性 絶滅危惧種 サクラソウ モニタリング RNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

野生植物集団の長期的な存続には、集団内における健全な種子生産の確保が必要である。特に他殖性の植物種では、集団中に異なる自家不和合性遺伝子を持つ交配相手が不可欠であるが、なかでも異型花柱性を示す植物種は、一般的に集団内に存在する異なる花型間での虫媒受粉によって交配が行われる。従って、異型花柱性の自家不和合性植物種は、同型花柱性の自家不和合性植物種に比べて交配相手が限られることから交配効率が低く、種子繁殖による世代更新には集団内の花型の割合が重要な要因となる。しかし、近年では集団の分断化などによる小集団化の結果、集団内の花型比が顕著に偏った野生集団が増加している。集団内の花型比の偏りは、交配相手の減少を意味し、種子生産の低下だけでなく、同時に近交弱勢や遺伝的多様性の減少も引き起こす。著しい花型比の偏りが生じる前に、集対策を行うことが必要であり、状況に応じた保全策を講じることを目的とした順応的管理を行うためにも、絶滅の危険性のある集団の花型比を定期的にモニタリングすることが保全には不可欠である。そのためには従来の目視による花型識別ではなく、調査時期や開花個体などの制限を受けない DNA マーカーによる花型の識別方法を開発することが望ましい。

異型花柱性 (heterostyly) とは、個体によって柱頭と葯の位置関係が異なる現象であり、柱頭が葯より高い位置にある長花柱花と柱頭が葯より低い位置にある短花柱花の2つの花型が存在する。これまで、多くの研究が進められてきた結果、異型花柱性は主に自家不和合性に関する遺伝子と形態 (花粉サイズ・雄蕊や雌蕊の高さなど) に関する 3~9 の遺伝子が強く連鎖したスーパーゼノン (S-locus) であると推定されている (Dowrick 1956, Richards 1997)。2000 年以降、*Primula vulgaris* (Li et al. 2007) や *Turnera* 属 (Labonne et al. 2009) などの植物種で、異型花柱性に関与する遺伝子の特定を目的とした研究がなされているが、S-locus を構成する遺伝子の特定はなされておらず、花型識別のための DNA マーカー作成に役立つ情報も得られていない。

サクラソウの異型花柱性を制御する遺伝子を単離・同定し、識別マーカーを作成することは、プリムラ属を含む異型花柱性植物種の集団の保全のためのモニタリング手法を大きく改善するばかりでなく、長花柱花と短花柱花の遺伝子構造の比較による異型花柱性のメカニズムの解明を可能にし、異型花柱性の生殖様式の進化研究の基盤となると考えられる。

## 2. 研究の目的

異型花柱性の自家不和合性を示す他殖性植物種において、集団中の花型比の偏りやそれに伴う種子生産の低下が認められる野生

集団においては、状況に応じた保全策を講じるために集団内の花型比を定期的にモニタリングする必要がある。しかし通常、花型の識別は目視によって行われるため、開花時期や開花個体に限定される。これまで、絶滅危惧植物のサクラソウ (*Primula sieboldii*,  $2n=24$ ) では、異型花柱性に関連する花器形質 (花筒長、葯高、柱頭高、葯長) の QTL (Quantitative Trait Loci) を明らかにされており、連鎖地図にて S-locus の位置が推定された (Yoshida et al 2011)。S-locus から 1cM 以内にある 4 つのマイクロサテライト (SSR) マーカー遺伝子座の遺伝子型を用いて花型識別を行ったところ、野生個体の 7 割の花型を識別されたが、残りの 3 割は Null 対立遺伝子や S-locus と遺伝子座間で生じた組換えにより花型を識別することができなかった。SSR マーカーなどではなく、DNA 配列から検出された塩基多型やより S-locus に近傍のマーカーを用いることで、花型識別が可能になる可能性が考えられる。

一方で、マーカー間での組換えがなく、また Null 対立遺伝子も検出されない、遺伝子領域の多型を直接検出できるマーカーを用いることが望ましい。一般的に SSR マーカーやイントロン領域から作成されたマーカーは多型性に富んでいる反面、塩基配列の置換や挿入、欠失が起こりやすいことから、花型の識別が難しいことから、遺伝子領域そのものを対象とした DNA マーカーを作出することが望ましい。遺伝子の発現領域であれば、その配列種間での保存性および汎用性が高いことが期待できることから、将来的にはサクラソウだけでなくプリムラ属内他種でも花型を識別する可能性も期待できる。

本研究は、(1) S-locus 近傍遺伝子座による花型識別の可能性を検討するため、RAD-seq を用いたより詳細な連鎖地図作成、および (2) 異型花柱性に関連すると考えられている自家不和合性と花粉サイズの QTL 解析を試みる。また、(3) サクラソウの異型花柱性遺伝子のひとつとされている雌蕊の 2 つの花型花型間の発現領域内の塩基多型を用いて、未開花個体および開花期間外での簡易な花型識別を可能にする DNA マーカーの作出も試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) RAD-seq による交雑家系の遺伝子型決定と連鎖地図作成

交雑家系 192 ジェネットと両親 2 ジェネットの DNA は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、20ng/uL にそろえた。次世代シーケンサーを用いた RAD-seq を行うにあたり、両親個体の配列データが非常に重要であることから、両親個体をあつく読むためそれぞれ 2 サンプル供試し、交雑家系はジェネットあたり 1 サンプルとした。制限酵素は EcoRI-HF と Bgl-II の 2 種類を用いた。

両親間で多型が検出された領域において、交雑家系の遺伝子型を決定後、これまでに作成された既存の連鎖地図 (Yoshida et al., 2011) に加えて、新たな連鎖地図を作成した。JoinMap4.1 を用いて、Haldane's function の regression mapping によって連鎖地図を作成した。また LOD スコアを 5 とした。

### (2)自家不和合性および花粉サイズの QTL 解析

2012 年および 2013 年に、花粉媒介昆虫による他殖を防ぐため網室内で、交雑家系および野生個体の開花後 3 日後の小花に自家受粉と他家受粉を行い、それぞれの結実種子数を調査した。さらに、アブラナ科などの植物では開花からの時間が経過するほど自殖が起こりやすいとの報告があるため、各ジェネットのすべての小花の開花日を記録し、人工授粉 (自家受粉および他家受粉) を行った。そして回収した種子数を調査し、第一花開花からの時間の経過と自家不和合性との関連を調べた。

さらに 2012 年に交雑家系 192 ジェネットの花粉サイズを 1 ジェネットあたり 2 回 (1 回あたり 15~20 粒測定) し、それらの平均値を QTL 解析に用いた。測定には、digital microscope (VH-5000、Keyence) を用いた。

### (3)RNA-seq を用いた 2 つの花型の雌蕊間の発現量解析と SNPs の検出

遺伝的背景のばらつきを抑えるために、供試個体は交雑家系から各花型 1 ジェネットずつ選抜した。また解析には各ジェネット (各花型) 3 反復行うため、それぞれのジェネットの雌蕊を 1 サンプルあたり約 30~40 本採取し、それぞれ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。株式会社マクロジェンジャパンに外部委託し、Illumina シークエンサーを用いた短花柱花および長花柱花の雌蕊由来の RNA sequencing (RNA-seq) を実施した。得られた de novo トランスクリプトームアセンブリを対象にして、2 つの花型の雌蕊間での発現量解析および SNPs 検出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) RAD-seq による交雑家系の遺伝子型決定と連鎖地図作成

RAD-seq より得られた 38819 本の contig のうち、両親間で多型が検出された contig 数は 6465 であった。このうち、交雑家系 150 ジェネット以上で遺伝子型が得られた 627 本の contig を連鎖解析に用いた。既存のマーカー 174 座 (SSR マーカー 124 座、EST マーカー 16 座、SNP マーカー 34 座) を加えて、JoinMap ver.4.1 を用いて連鎖地図を作成した結果、418 座から 13 個の連鎖群をもつ全長 968.2cM の連鎖地図が得られた (図 1)。連鎖地図に用いられなかった 383 座のうち

229 座が 1% の有意水準において分離比に歪みが見られた。別の遺伝子座と全く同じ遺伝子型を示した 3 座を除外し、残りの 151 座はどの遺伝子座とも有意な連鎖関係が認められなかった。局所的に遺伝子座が密集する傾向がみられたが、遺伝子座が増やしたことで、既存の連鎖地図に比べて 360cM 以上長い連鎖地図が得ることができた。

これまで連鎖群 7 に座上する S-locus に最も近い遺伝子座との距離は 0.64cM であったが、本研究では S-locus と 0.47cM の距離に座上する遺伝子座が見つかった。この遺伝子座が花型を識別するマーカーになりうるかを調べるため、交雑家系の遺伝子型と花型の関連を調べた結果、192 ジェネットのうち 2 ジェネットの組み換え個体が発見された。連鎖地図の拡充による花型識別マーカーを得ることができなかったが、QTL 解析の精度向上に役立つ連鎖地図を得ることができた。今後 RAD-seq から得られたデータの解析精度をさらに向上させ、より精度の高い連鎖地図を目指す。

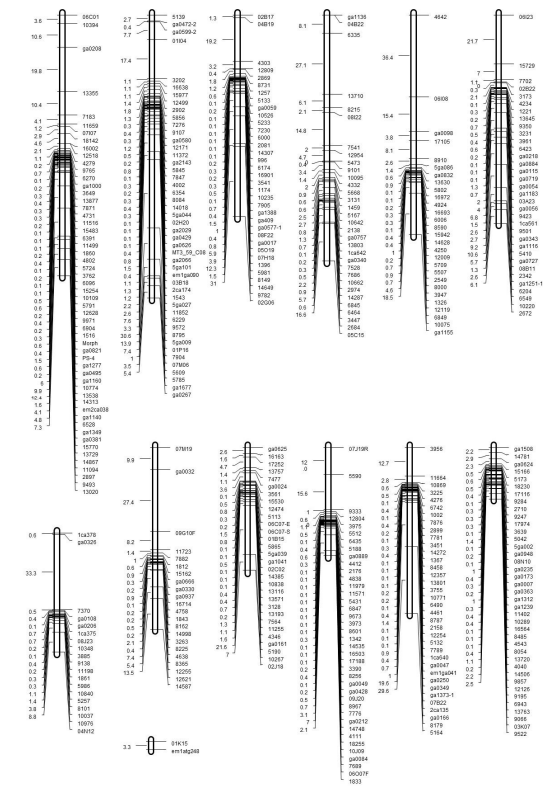


図 1 作成された連鎖地図

### (2)自家不和合性および花粉サイズの QTL 解析

2012 年と 2013 年に花粉媒介昆虫による他殖を防ぐため網室内で自家受粉および他家受粉を行ったところ、2012 年は網室内で大量発生したヨトウガの食害により子房および果実が一部欠損したため、2013 年のデータを解析した。自家受粉による結実種子数をサクラソウの「自家不和合性の程度」としたところ、交雑家系では十分な結実が確認され

なかった。自家受粉によって、無処理に比べて一部子房が膨らむことや、未熟種子が確認されたが、他家受粉による結実種子は得ることができなかった。しかし、自家受粉によって交雑家系のジェネット間で子房や果実の違いが見られたため、種子数だけでなく違うパラメーターで自家不和合性の程度の違いを評価していきたい。一方で、野生個体では、埼玉集団で自殖可能なジェネットが複数確認された。この集団は先行研究(Washitani et al. 1991)で自殖ジェネットの存在が明らかになっている。自殖可能なジェネットは、どれも柱頭と葯の位置が同じ位置にある等花柱花であったが、開葯しない葯多く、花粉数が非常に少なく、自殖率はジェネットによって異なった。また、どちらの花型の花粉でも結実することが示された。これらのジェネットは今後異型花柱性の解明に役立つものと期待される。

交雑家系における花粉サイズは、長花柱花が短花柱花よりも小さく、二峰分布を示した(図2)。また花型内でもそれぞれ連続的な分布が見られた。QTL解析の結果、すでに先行研究の4つの花器形質(花筒長、葯高、柱頭高、葯長)と同様、連鎖群7にあるS-locusの近傍に寄与率が90%以上の非常に大きなQTLが検出された。一方、それぞれの花型でも長花柱花ではQTLが1つ、短花柱花では2つ検出され、これらの形質には、S-locus以外にも複数のQTLが関与していることが示唆された。

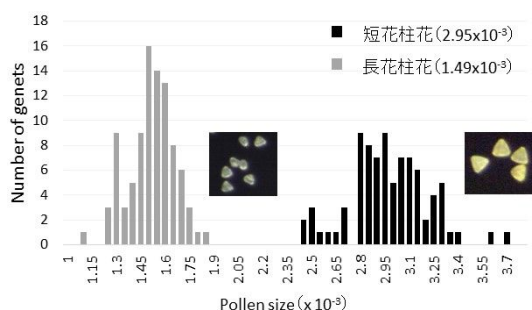


図2 花粉サイズの頻度分布 (写真同じ倍率で撮影した花粉を示す)

### (3)RNA-seq を用いた2つの花型の雌蕊間の発現量解析とSNPsの検出

Illumina シークエンサによるRNA-seq を利用し、短花柱花および長花柱花の雌蕊のトランスクリプトームを比較した。短花柱花個体および長花柱花個体の雌蕊から3反復でRNAを抽出し、RNA-seqを実施した。短花柱花個体からは総数24.4 Gbp、長花柱花個体からは総数26.7 Gbpからなる配列群を得ることができた。これらの配列を1つにまとめ、CLC genomic workbenchを用いてde novoアセンブリを行い、120,965本のcontig (>100 bp)を得ることに成功した。これをリファレンス配列に用いて、各RNA-seqデータをそれぞれマッピングし、二型花の雌蕊間で

の発現量解析を行った。その結果、長花柱花の雌蕊と比べて短花柱花の雌蕊で有意(FDR < 0.05)かつ3倍以上で高発現していた転写産物(contig)が465個見つかり、また逆に短花柱花の雌蕊と比べて長花柱花の雌蕊で有意(FDR < 0.05)かつ3倍以上で高発現していたcontigが1,005個見つかった。長花柱花の雌蕊で高発現している遺伝子がより多く見られることから、短花柱花の雌蕊においては転写量の抑制を受ける遺伝子がより多い可能性が示された。

次に日本国内の野生集団から得られた27個体の短花柱花個体の雌蕊および25個体の長花柱花個体の雌蕊をそれぞれバルクし、RNA-seqを行った。短花柱花個体からは総数20.6 Gbp、長花柱花個体からは総数17.2 Gbpからなる配列群を得ることができた。得られた2種のバルク配列を短花柱花個体から得られたde novoアセンブリにマッピングし、短花柱花個体のバルクでヘテロと判定され、長花柱花個体でホモと判定されるサイトを探すことにより、短花柱花個体特異的なSNPsを探し出した。その結果、298本のcontigに座乗する376個のSNPsを発見できた(1 contigあたり1.3個SNPs)。今後、これらのSNPsデータに基づいてPCRプライマーを設計することにより、日本国内に自生するサクラソウの花型を簡便に識別できるマーカーを作成していく。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

吉田康子, 小玉昌孝, 本城正憲, 大澤良. 埼玉県荒川水系江川下流域に自生するサクラソウ野生集団における遺伝的多様性の維持・回復のための保全遺伝学的研究. 保全生態学研究, 17巻2号 2013 211-219, 査読有

[学会発表](計5件)

吉田康子. 絶滅危惧種サクラソウ野生集団の遺伝的多様性と適応分化, 第55回日本雑草学会若手の会, 2016.3.28, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都)

知識亜果音, 日下石碧, 吉田康子. 広島県に自生するサクラソウのポリネーターの探索, 第63回日本生態学会, 2016.3.22, 仙台国際センター(宮城県)

吉田康子, 中澤宏介, 本城正憲, 大澤良. 高山市における絶滅した集団由来のサクラソウ個体の探索, および由来推定に重要な条件, 第63回日本生態学会 2016.3.21, 仙台国際センター(宮城県)

吉田康子, 小玉昌孝, 本城正憲, 大澤良.



埼玉県に自生するサクラソウ野生集団の  
遺伝的多様性の維持・回復を目的とした保  
全遺伝学的な試み,第61回日本生態学会,  
2014.3.17, 広島国際会議場(広島県)

吉田康子,上野真義,大澤良.SSRマーカ  
ーを用いたサクラソウの花型識別の試み,  
第60回日本生態学会,2013.3.7,静岡コ  
ンベンションアーツセンター(静岡県)

[図書](計1件)

VAUGHAN Duncan, YOSHIDA Yasuko,  
TAKEYA Masaru, TOMOOKA Norihiko.  
Collecting the wild relatives of crops in  
the tropics. *In*: Conservation of Tropical  
Plant Species. (M.N. Normah, H.F. Chin,  
Barbara M. Reed, eds), Springer, 2013,  
p.15 (pp.27-41)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 康子 (YOSHIDA, Yasuko)  
神戸大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号: 50582657