

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02535

研究課題名(和文) Capsicum属の交雑不親和性を打破する核および細胞質遺伝子の特定

研究課題名(英文) Identification of nuclear and cytoplasmic genes for overcoming crossing incompatibility of the Capsicum genus

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) 34,910,000円

研究成果の概要(和文)：B(b)遺伝子座は第10染色体上に座乗していると考えられた。また、A(a)遺伝子座は第7染色体上にあることがわかった。これらの結果を踏まえ、2遺伝子座A(a)およびB(b)において両方が優性遺伝子を保有した場合には座止が起こる、という仮説が検証された。また、CAPsマーカーによって、B(b)遺伝子座の推定座乗位置まで2,445,537塩基まで狭めることができた。リシークエンスの結果得られた第10染色体上に座乗するB(b)候補遺伝子168個のうち、座止個体の茎頂分裂組織において遺伝子発現が上昇していた遺伝子は12個で、ほとんどが病害抵抗性に関与する遺伝子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

園芸学は品種の拡大を通じて、食の多様化に貢献してきた。一方で品種育成の目指すべきポイントは徐々に細かな形質変化に向けられており、大きな変革は起こしにくくなっている。これを打破するための一つの手段として種間交雑が挙げられる。種間交雑を行うためにはその遺伝的障壁を打破する必要がある。この研究では、トウガラシの種間交雑障壁が2遺伝子で決まっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The B (b) locus was thought to be located on chromosome 10. The A (a) locus was found to be on chromosome 7. Based on these results, the hypothesis that a plant has two loci A (a) and B (b) both carrying dominant genes grows abnormally. In addition, using CAPs markers candidate gene for B gene was supposed to locate within 2,445,537 bases. Among them, 12 genes highly expressed in shoot apical meristems of abnormal individuals, and most of which were involved in disease resistance.

研究分野：園芸学

キーワード：トウガラシ 種間交雑障壁 エピスタシス NGS CAPsマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交雑育種は現在の品種改良の主流であり、両親の優れた形質を併せ持つ新品種を得ることを目的に行われる。交雑育種を行うためには生殖隔離が生じていない両親を選択する必要がある。交雑不親和性は育種の幅を狭める要因であり、様々な植物において多様なフェーズでの交雑不親和性が確認されている(Futuyama, 2005)。接合前にみられる交雑不親和性の例としては花粉伸長阻害および受精阻害が挙げられ、接合後にみられる交雑不親和性の例としては胚崩壊および発芽後の生長阻害が挙げられる。1種類の交雑不親和のみが起こっているか、あるいは、複数の交雑不親和が起こっているか、ということも、植物種あるいは品種により様々である。

ピーマンやトウガラシが属する *Capsicum* 属の育種は、欧米を中心に150年以上の歴史があり、日本においては、洋風料理や中華料理の普及に伴って、1960年代より独自の品種改良が進められてきた。日本において栽培されるほとんどの品種は *Capsicum annuum* であるが、世界には野生種を含め、十数種が存在する。広瀬ら(1960)は、*C. annuum* 以外の種がもつ辛味性や耐暑性に着目し、品種交雑を試みている。その報告では、複数の親の組み合わせにおいて結実し稔実種子を得ることができるものの、発芽不良が起こることが明らかとなっている。矢澤ら(1989, 1990)および Inai ら(1991)の報告においても同様の傾向が観察されており、交雑による生育不良現象は種子親の一部の *C. annuum* を用いた場合には生じない。なお、矢澤らは、この生育不良現象を座止と呼んでいる。

これらの報告を鑑みると、座止は2つの核遺伝子のエピスタシスが関与することが予想された。また、Bateson ら(1909)、Dobzhansky ら(1937)および Muller ら(1942)の報告も参考にし、我々は第2図のような仮説を立て、エピスタシス現象に関わると予想される2遺伝子を A(a)遺伝子および B(b)遺伝子と名付けた。つまり、A(a)遺伝子および B(b)遺伝子が共に劣勢であった場合および A(a)遺伝子および B(b)遺伝子の片方のみが優勢であった場合には発芽および植物体の成長が正常に起こるが、A(a)遺伝子および B(b)遺伝子が共に優性であった場合には座止が発現する、という仮説である。

Bateson ら(1909)、Dobzhansky ら(1937)および Muller ら(1942)の報告を参考にし、エピスタシス現象に関わると予想される2遺伝子を A(a)遺伝子および B(b)遺伝子と名付けたトウガラシで特定することを目的とした。つまり、A(a)遺伝子および B(b)遺伝子が共に劣勢であった場合および A(a)遺伝子および B(b)遺伝子の片方のみが優勢であった場合には発芽および植物体の成長が正常に起こるが、A(a)遺伝子および B(b)遺伝子が共に優性であった場合には座止が発現する、という仮説である。

2. 研究の目的

本研究では A(a)遺伝子座の調査で用いた品種の交雑順を変更して B(b)遺伝子探索用の集団を作成し、交雑実験、発芽試験および遺伝子解析を行った。さらに、B(b)遺伝子特定に向け、交雑集団作成、ジェノタイピング、リシークエンスおよび RNA-seq から B(b)遺伝子の候補領域を調査した。

また、座止症状を表す個体において茎頂分裂組織が存在するのかという疑問を解決するため、正常個体および座止個体の茎頂部分の観察を行った。

3. 研究の方法

植物材料および交雑実験

C. annuum ‘紫 MS’、‘タカノツメ’および *C. chinense* ‘Charapita’を供試した。矢澤ら(1989)の研究結果から‘紫’および‘紫 MS’は aabb 型、‘タカノツメ’は aaBB 型、‘Charapita’は AAbb 型と予想することができた。交雑を行い、(‘紫’×‘タカノツメ’)×‘Charapita’、(‘タカノツメ’×‘紫’)×‘Charapita’および{(‘紫 MS’×‘Charapita’)×‘タカノツメ’}×‘Charapita’の種子を多数得た。なお、緒言において述べた仮説に従うと、これらの種子を発芽させた植物体の形質の個体数の比率は、いずれも Aabb(正常) : AaBb(座止) = 1 : 1 に分離すると予想できる。

RAD-seq

(‘タカノツメ’×‘紫’)×‘Charapita’の正常個体および座止個体を供試した。DNA を抽出した後、制限酵素で切断した DNA 断片をシークエンスして得た RAD リードを *C. annuum* のリファレンス配列 (Pepper.v.1.55, Zunla-1_v2.0 および *Capsicum annuum*_UCD10X_v1.0) を取得し、これに RAD リードをマッピングして SNP を検出した。さらに、R を用いて遺伝子型と表現型の相関解析を行った。

CAPS マーカーによるジェノタイピングおよび組み換え系統のリシークエンス

(‘タカノツメ’×‘紫’)×‘Charapita’および{(‘紫’×‘Charapita’)×‘タカノツメ’}×‘Charapita’の種子を用意した。ジェノタイピングによって見出された組み換え系統のうち、形質が正常・ジェノタイプが座止と判定された2系統については、DNeasy(Qiagen)を用いて DNA 抽出し、リシークエンスに供試した。リファレンス配列は *Capsicum annuum*_UCD10X_v1.0 を用いた。また、‘タカノツメ’の 10X ライブラリーを構築し、シークエンスを行い、本研究で用いることができる精密なリファレンスを作成した。組み換え系統のリシークエンスデータ、梅林(2018)で行った親系統(‘紫’および‘Charapita’)のリシークエンスデータ、およびタカノツメ 10X リファレンスデータを比較し、候補領域を推定した。

茎頂部のレジン切片作成および茎頂分裂組織の観察

(‘タカノツメ’×‘紫’)×‘Charapita’の正常個体および座止個体を供試した。サンプルをプラスチック型に向きに注意して入れ、置換用レジン液：Hardner II = 6 : 1~9 : 1 に調整した包埋用レジ

ン液を素早く流し込んだ。その後、サンプルの向きを再調整し、包埋用レジジン液が表面まで完全に固まった後、全自動回転式マイクローム(Leica RM2155)を用いて厚さ 5 μ m の切片を作成した。これをスライドガラスに貼り付け、0.05%(w/v)トルイジンブルーで 1 分染色し、その後流水で 10 分間洗い流し、乾燥後にカバーガラスで覆った。これをデジタルマイクロスコープ(BX53, OLYMPUS)で観察した。

発芽温度および生育温度を変化させた雑種後代の生育の観察

{('紫'×'Charapita')×'タカノツメ'}×'Charapita'の種子を用意した。35 あるいは 30 のインキュベーター(CCFL ライト)において発芽させた(35 処理, 30 処理)。子葉展開後に正常個体と座止個体を判別し、フェノタイプ正常:フェノタイプ座止の割合を調査した。播種から 1 ヶ月後、正常個体の一部を 25 のインキュベーター(LED ライト)に移動させた。その他の個体については、継続して 35 で栽培した。なお、最高最低温度計で計測した温度条件は以下の通りであった。

- ・35 インキュベーター(日本医科器械製作所, TG-280CCFL-5LD-SZ): 最高温度 36.5 , 最低温度 35

- ・30 インキュベーター(日本医科器械製作所, TG-280CCFL-5LD-SZ): 最高温度 32 , 最低温度 29.5

- ・25 インキュベーター(日立製作所, CRB-32L): 最高温度 26 , 最低温度 26

また、発芽した個体の葉から DNA を抽出し、プライマー8 および制限酵素を用いてジェノタイプピングを行い、ジェノタイプ正常:ジェノタイプ座止の割合を調査した。

茎頂部分の RNA-seq

{('紫'×'Charapita')×'タカノツメ'}×'Charapita'種子を用意し、発芽させた。実生の分離比が概ね 1:1 になったことを確認したのち、正常個体と座止個体にサンプリングした。フェザー剃刀を用いて、正常個体および座止個体の実生から茎頂分裂組織を切断した。なお、正常個体は既に本葉が展開しているため、本葉部分は丁寧に切り除き茎頂部分のみを摘出した。正常個体から切断した茎頂部分 20 個および座止個体から切断した茎頂部分 41 個をそれぞれチューブにまとめて入れ、RNeasy(QIAGEN)を用いてバルク RNA を抽出した。これを RNA-seq に供試し、シーケンスタータを取得した。

4. 研究成果

交雑実験および発芽試験による後代の形質判別およびその分離比

{('タカノツメ'×'紫')×'Charapita'の種子において、正常個体数は 102 個体、座止個体数は 97 個体であった。また、('紫'×'タカノツメ')×'Charapita'の種子において、正常個体数は 33 個体、座止個体数は 38 個体であった。これらの P 値は、それぞれ、0.43 および 0.51 であり、後代の分離比は期待値と有意に異ならなかったことから、第 3 図のような遺伝様式である可能性は高いと考えられた。よって、以降、'紫 MS'は aabb 型、'タカノツメ'は aaBB 型、'Charapita'は AAbb 型と想定して解析を行った。

正常個体と座止個体を比較すると、子葉の形状、大きさおよび色の違いの他にも、根の量および主茎の長さが異なることが観察できた。正常個体と比較して、座止個体は、子葉のサイズが小さく波打っている様子がみられ、濃緑色であった。また、主茎の長さは短く、根は本数が少なく短かった。

SNPs と形質の相関解析による B(b)遺伝子の座乗染色体特定および仮説の検証

SNPs および形質の相関解析をあらわすマンハッタンプロット図において、第 10 染色体の一部において $-\log P$ 値のピークがみられた。第 1 から第 12 染色体上のいずれの染色体にも当てはめることができなかった SNPs を第 0 染色体上の SNPs として分類しており、この一部においてもピークが検出された。 $-\log P$ 値は、概ね、5 以上であれば相関があるとされており、第 10 染色体上のピーク部分はいずれのも 5 以上を示すことから、このピーク部分は形質と SNPs が有意に相関があると考えられた。よって、B(b)遺伝子座は第 10 染色体上に座乗していると考えられた。また、梅林(2018)の交雑実験および遺伝子解析より、A(a)遺伝子座は第 7 染色体上にあることがわかっている。これらの結果を踏まえ、2 遺伝子座 A(a)および B(b)において両方が優性遺伝子を保有した場合には座止が起こる、という仮説が検証された。

ジェノタイプピングおよびリシークエンスによる B(b)遺伝子候補領域の推定

正常個体および座止個体 177 個体について、7 種類の CAPS マーカーを用いてマーカー選抜を行ったところ、作成したマーカーのリファレンス配列における位置が第 10 染色体の端に近いほど組換え価が小さく、目的遺伝子と距離が近いことが示唆された(第 1 表)。これらの結果から、QTL-seq による予測範囲の外側、つまり、UCD219223145 からテロメア側に遺伝子の位置を予測することができた。さらに、プライマー7 よりも外側で作成したプライマー8 を用い 1091 個体についてマーカー選抜を行ったところ、組換え系統が 5 個体確認できた。また、プライマー8 における組換え価は 0.46% であり、プライマー1 から 7 の組換え価と比較して小さかった。よって、B(b)遺伝子はリファレンス配列におけるプライマー8 の位置よりも外側にあることが示唆

第 1 表 ジェノタイプピングに用いたプライマー、調査個体数、組換え系統数および組換え価

プライマー番号	調査個体数	組換え系統数	組換え価 (%)
1	177	22	12.4
2	177	22	12.4
3	177	17	9.6
4	177	16	9.0
5	177	16	9.0
6	177	1	0.6
7	177	1	0.6
8	1091	5	0.5

された。26 プライマーはすでにテロメア付近であるが、テロメアまでは 2,445,537 塩基(約 2Mb) があることが予想された。

さらに、形質が正常・ジェノタイプが座止と判定された 2 系統のリシーケンスから、さらに、候補領域は約 1.3Mb に狭められた。また、リファレンス配列 Zunla-1_v2.0 における候補領域内遺伝子は 168 個存在しており、これらのうちのいずれかの遺伝子が B(b)遺伝子の候補遺伝子であると考えられた。

茎頂分裂組織の観察

正常個体および座止個体は、いずれも茎頂分裂組織が存在していた。よって、座止個体においては、茎頂分裂組織がないというわけではなく、成長が停止していることが示唆された。また、座止個体において、*CLV3* の発現量が変動していない可能性が示唆され、茎頂分裂組織形成後の細胞分裂および伸長に異常があると考えられた。トルイジンブルー染色は、特に核、粗面小胞体およびリボソームを濃く染色する方法であり、茎頂分裂組織のような分裂能が高い組織の染色性が高いことが知られている。正常個体において、茎頂分裂組織および葉原基の先端において特に濃く染色されているが、これと比較すると、座止個体においては、茎頂分裂組織および葉原基の染色性が低いことが観察された。よって、座止個体の茎頂分裂組織および葉原基における細胞分裂活性が低く、その結果本葉が形成されないことが示唆された。

発芽温度および生育温度を変化させた雑種後代の生育の観察

35 処理においてはフェノタイプ正常：フェノタイプ不明 = 7 : 1, ジェノタイプ正常：ジェノタイプ座止 = 2 : 5 であった。30 処理においてはフェノタイプ正常：フェノタイプ不明 = 15 : 2, ジェノタイプ正常：ジェノタイプ座止 = 7 : 10 であった。全ての個体の実生について、子葉展開時にはそのサイズおよび色が正常個体のように見え、うねりも観察されなかった。フェノタイプピングでは正常生育を示したがジェノタイプピングでは座止と判定された個体は、35 処理において 10 個体、30 処理において 8 個体みられた。よって、25 条件では座止症状を示す個体(AaBb 型)を高温条件で発芽させると、座止症状が打破されたと考えられた。これは、タバコにおける Marubashi・Kobayashi(2002)の報告と類似していた。30 条件でさらに栽培を続けたところ、播種 47 日後の測定において、フェノタイプ正常・ジェノタイプ座止個体の草丈および葉の枚数はフェノタイプ正常・ジェノタイプ正常個体と比べ低く、明らかな生育遅延がみられた。その後も、30 条件でフェノタイプ正常・ジェノタイプ座止個体の観察を続けたところ、播種約 180 日時点において、草丈は約 5-7 cm 程度であり、開花および結実は起こらなかった。よって、30 条件での栽培は生育初期における実生の茎頂分裂組織の活性化には有効であるものの、その後の生育への効果は薄いことが考えられた。

播種 1 か月後に、フェノタイプ正常・ジェノタイプ座止個体を 35 条件および 30 条件から 25 条件へ移動させ、47 日後に観察を行ったところ、高温条件で栽培を続けたフェノタイプ正常・ジェノタイプ座止個体と比較して本葉の大きさおよび葉柄の長さが短かった。よって、高温処理した実生を 25 条件で栽培すると、生育が遅延あるいは停止した可能性が考えられた。

高温発芽および栽培実験では、座止の完全な打破には至らなかったものの、25 条件におけるジェノタイプピング座止個体では起き得ない本葉の出現を観察することができた。これは、高温という外部要因が茎頂分裂組織の遺伝子発現に影響を与えているものと示唆され、それによって茎頂部での分裂伸長、葉原基発生および本葉の成長が起こったと考えられた。

茎頂分裂組織の RNA-seq

リシーケンスの結果得られた第 10 染色体上に座乗する B(b)候補遺伝子 168 個のうち、logFC が 2 以上のものを遺伝子発現に変動がある遺伝子としてピックアップした。座止個体の茎頂分裂組織において遺伝子発現が上昇していた遺伝子は 12 個、正常個体の茎頂分裂組織において遺伝子発現が上昇していた遺伝子は 14 個存在した(第 2 表および第 3 表)。座止個体の茎頂分裂組織において遺伝子発現が上昇していた遺伝子に関しては、病害抵抗性に関与する遺伝子が多く見られた。

第 2 表 座止個体の茎頂分裂組織において発現が上昇していた遺伝子

Gene ID	Description	logFC
Capana10g002397	disease resistance protein RPS2-like	1.84
Capana10g002398	disease resistance protein At4g27190-like	2.40
Capana10g002404	probable disease resistance protein At4g27220	4.60
Capana10g002413	U-box domain-containing protein 4-like	5.57
Capana10g002424	thioredoxin-like 3-1, chloroplastic isoform X1	2.00
Capana10g002439	Jacalin-related lectin 3	3.77
Capana10g002442	glutamate dehydrogenase	2.23
Capana10g002468	Sigma factor binding protein 1, chloroplastic	3.00
Capana10g002474	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8-like isoform X1	2.43
Capana10g002483	cytochrome P450 98A2-like	9.21
Capana10g002485	cytochrome P450 98A2-like	5.40
Capana10g002491	calmodulin-binding protein 25-like	1.82

第 3 表 正常個体の茎頂分裂組織において発現が上昇していた遺伝子

Gene ID	Description	logFC
Capana10g002377	transcript variant X6	2.84
Capana10g002379	squamosa promoter-binding-like protein 9	3.72
Capana10g002384	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 1, chloroplastic-like	2.30
Capana10g002419	DNA-directed RNA polymerase III subunit 2-like	2.60
Capana10g002443	putative H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1	2.13
Capana10g002444	putative H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1	2.01
Capana10g002454	calmodulin-interacting protein 111	2.36
Capana10g002455	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like	7.29
Capana10g002459	probable auxin efflux carrier component 1b	2.19
Capana10g002486	DNA (cytosine-5)-methyltransferase DRM2-like	3.67
Capana10g002500	probable disease resistance protein At4g27220	1.97
Capana10g002502	probable protein S-acyltransferase 1	1.58
Capana10g002516	inactive protein RESTRICTED TEV MOVEMENT 2-like	3.57
Capana10g002529	DNA-directed RNA polymerase III subunit 2-like	3.80

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 Yamazaki A and Hosokawa M	4. 巻 243
2. 論文標題 Increased percentage of fruit set of F1 hybrid of Capsicum chinense during high-temperature period	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 421-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.049	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山崎 彬・白澤健太・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシ（Capsicum chinense）の高温期における花粉発芽率の改善に関わる候補遺伝子領域
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅林綾香・安井康夫・白澤健太・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシの葉が持つ強力なRNase活性を制御する遺伝子座の特性
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 彬・白澤健太・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシ（Capsicum chinense）の高温期における着花率に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 彬・白澤健太・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシ(<i>Capsicum chinense</i>)の高温期における着果率に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会近畿支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅林綾香・白澤健太・安井康夫・山崎 彬・細川宗孝
2. 発表標題 <i>Capsicum</i> 属の種間交雑不親和性を引き起こすエピスタシス遺伝子の座乗染色体の特定
3. 学会等名 園芸学会近畿支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 彬・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシ(<i>Capsicum chinense</i>)雑種第一代で見られる花粉媒介昆虫の非存在下での自家受粉
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A.Yamazaki and M.Hosoakwa
2. 発表標題 "Autonomous Fruit Set" in an F1 hybrid of <i>Capsicum chinense</i> . Yamazaki A, Hosokawa M.
3. 学会等名 30th International Horticultural Congress (IHC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueno M, Hosokawa M, Doi M, Ohno S.
2. 発表標題 Analysis of a gene inducing unstable anthocyanin biosynthesis in pepper.
3. 学会等名 29th International Conference on Polyphenols (ICP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iraklis B, Miyashita E, Onda M, Hosokawa M.
2. 発表標題 Digestion of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) by leaf extracts of Capsicum chinense attributes to strong RNase activity.
3. 学会等名 16th Eucarpia Capsicum and Eggplant Meeting P4-03 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山崎 彬・細川宗孝
2. 発表標題 トウガラシ (Capsicum chinense) の雑種第一代で現れる自動着果機構の解明
3. 学会等名 平成29年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学農学研究科蔬菜花卉園芸学研究室公式ホームページ
<http://www.hort.kais.kyoto-u.ac.jp/>

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	大野 翔 (Ohno Sho) (10722001)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	
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)	