

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04605

研究課題名(和文)南アメリカのナス科ペチュニア属植物における自家和合性進化の遺伝的背景に関する研究

研究課題名(英文) A study on the genetic background of autologous evolution in plants of the genus *Petunia* in South America

研究代表者

上原 浩一 (Uehara, Koichi)

千葉大学・大学院国際学術研究院・教授

研究者番号：20221799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ナス科植物ペチュニアの自家和合性進化を明らかにするためアルゼンチン、ウルグアイ、ブラジルの調査を行い、自家不和合性関連遺伝子の解析と次世代型DNAシーケンサーを用いたMIG-seq法による系統解析を行なった。自家不和合性関連遺伝子の解析ではS-RNaseのコーディング領域の配列を決定し、自家和合性の獲得は亜種の分岐(35,000-107,000年前)よりも前であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

美しい花を咲かせる南アメリカ原産の園芸植物ペチュニアは有用植物が多く含まれるナス科のモデル植物である。ペチュニアはブラジルに自家不和合種が、アルゼンチンに自家和合種が分布しており、自家不和合性のメカニズムがシロイヌナズナを含むアブラナ科と異なるなど自家不和合性の進化研究にも有効である。そこでアルゼンチン、ウルグアイを中心に現地調査を行いアルゼンチンに分布する自家和合種の詳細な遺伝解析を進め、ペチュニア自家和合性進化の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the evolution of self-incompatibility of the Solanaceae plant *Petunia*, we conducted a survey of Argentina, Uruguay, and Brazil, analyzed self-incompatibility-related genes, and performed phylogenetic analysis by the MIG-seq method using a next-generation DNA sequencer. Analysis of self-incompatibility-related genes revealed that we sequenced the coding region of S-RNase and that acquisition of self-incompatibility preceded subspecies divergence (35,000-107,000 years ago).

研究分野：生態遺伝学

キーワード：自家不和合性 進化 *Petunia* S-RNase

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

植物には、近親交配を防ぐため、自分の花粉とめしべの受粉を妨げ、種子を作らないしくみ (自家不和合性) がある。しかし、すべてがそうではなく、自分の花粉とめしべで受粉し種子を作る種も存在する (自家和合性)。

表 1. 採集地点

系統	種	南緯	西経
A122	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	38° 00'13"	65° 37'40"
A285	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	37° 21'24"	59° 10'17"
B663	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	31° 09'37"	54° 21'29"
B801	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	31° 05'36"	54° 27'29"
B924	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	30° 12'10"	52° 27'37"
U1	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i>	34° 45'48"	56° 13'14"
A188	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>parodii</i>	31° 09'45"	59° 43'35"
B810	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>parodii</i>	29° 05'14"	56° 1'40"
U27	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>parodii</i>	no data	no data
A231	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>subandina</i>	25° 49'24"	64° 59'06"
A124	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>subandina</i>	34° 35'15"	65° 18'44"
A200	<i>P. axillaris</i> ssp. <i>subandina</i>	24° 36'20"	65° 22'36"
A109	<i>P. occidentalis</i>	24° 36'21"	65° 71'58"

美しい花を咲かせる園芸植物ペチュニアは、食用植物が多く含まれるナス科に属し、南米のブラジル、ウルグアイ、アルゼンチンを中心に分布する。有用植物ナス科のモデル植物として注目され、ゲノム解析や分子遺伝学の研究が進んだ。近年、ペチュニアの自家不和合性のメカニズムが解明され、モデル植物シロイヌナズナを含むアブラナ科とはしくみの異なる、特異な自家不和合システムを持つことが明らかになった (Kubo *et al.* 2015, *Nature Plants*)。

また、南米のペチュニアは、ブラジル南部を中心に自家不和合種が分布するのにに対し、アルゼンチンには自家和合種の多くが広域に分布することや、ウルグアイでは両者が混在していることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究はペチュニア自家和合種の分布域のほぼ全域、アルゼンチン、ウルグアイを中心に、ブラジルおよびパラグアイの一部でペチュニア属植物の調査を行う。自家不和合性の祖先から、どこで、どのように自家和合性を獲得し、分布を拡大していったかについて、安藤・國分らが蓄積した分布域を網羅するペチュニア属集団の GPS による位置情報と、各集団の生殖様式などの情報を元に、次世代型 DNA シークエンサー技術を活用した最新の遺伝子解析により明らかにする。



図 1. *P. axillaris* ssp. *axillaris*

アルゼンチンを中心に分布するペチュニア自家和合性系統群が、一度の自家和合性進化により生じたのか、種ごと、亜種ごとに別個に自家和合性が獲得されたのかという設問で研究をおこない、どこで、どのような環境要因で自家和合性の進化が引き起こされ、分布を拡大していったのか、ペチュニアの自家不和合システムの進化 (他種→自殖) の全貌を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

ペチュニアの自家和合種が、どこでその形質を獲得し、どのように分布拡大していったかを明らかにする。考えられる要因は、比較的温暖な地域では自家不和合性だったものが、南米大陸南部の寒冷な環境や、内陸の乾燥した厳しい環境下で自家和合性を獲得し、分布拡大した可能性である。

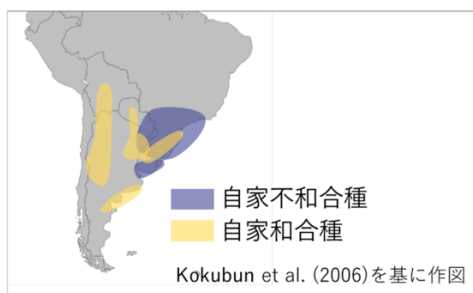


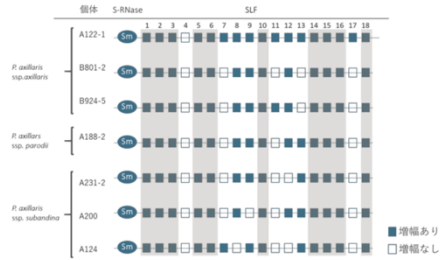
図 2. ペチュニア属植物の分類群

ペチュニア自家和合系統群が、共通祖先で 1 回の自家和合性進化により成立したのか、進化の過程で種ごとに、あるいは集団・地域レベルで異なる、複数の突然変異が起こっているのか、自家和合性進化のプロセスを明らかにするため、各系統・集団で、自家和合性・不和合性集団における S 遺伝子の機能的変異をスクリーニングする。同じ集団を用いて自家不和合性/自家和合性に直接関与する S 遺伝子座上の遺伝子を PCR により増幅後、塩基配列決定し、その遺伝子や機能の変化を検出する。スクリーニングの結果、自家不和合システムがどのように不活性化しペチュニア各種が自家和合性を獲得したのか、どのような突然変異が関与しているか、自家和合性が独立に進化したと考えられる場合起こっているのか、領域や機能が異なる突然変異が起こっているのか、個々の自家和合性進化プロセスと、ペチュニア属の自家和合性進化の全貌を明らかにする。

## 4. 研究成果



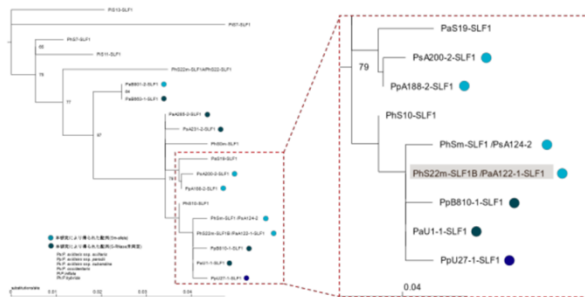
図 5. *SLF* の genotyping 結果 数字はそれぞれ *SLF1*~*SLF18* を示している。



*SLF16*, *SLF18* は Sm-allele の *S-RNase* をもつ 7 系統全てで検出された (図 5). *SLF14* も同様に 7 系統全てで検出されたが, A285-2 の *SLF14* にはフレームシフトが生じていた. その一方で, *SLF4* は 4 系統 (A122, A188, A231, A200), *SLF7* は 2 系統 (A122, A124), *SLF8* は 2 系統 (A231, A200), *SLF9* は 6 系統 (A122, B801, B924, A188, A231, A200), *SLF11* は 3 系統 (A122, A188, A124), *SLF12* は 5 系統 (A122, B924, A188, A231, A200), *SLF13* は 5 系統 (A122, A188, A231, A200, A124)

のみから検出された (図 5). このうち B801-2 の *SLF9* には premature termination codon が, A124-2 の *SLF13* にはフレームシフトがそれぞれ確認された. また, 各 *SLF* の塩基配列をアライメントしたところ, 多くの個体でヘテロサイトが存在することがわかった. さらに, 得られた配列を基に各タイプの *SLF* の対立遺伝子の系統樹を作成したところ, S ハプロタイプごとのまとまりを示さなかった

図 6. 本研究により得られた *SLF1* 配列及び既知の *SLF1* 配列を用いた最尤系統樹



(図 6)

### ペチュニア野生系統の S-allele の同定

自生地から採集された 13 系統に対して 18 対の特異的プライマー (表 3) を用いて *S-RNase* の genotyping を行ったところ, Sm プライマーは 7 系統, S22 プライマーは 7 系統, S19 プライマーは 12 系統で増幅が確認された (表 2).

Sm プライマーで増幅した配列は既知の Sm-allele の *S-RNase* とほぼ一致したが, S22 プライマー及び S19 プライマーで増幅した配列は既知の *S-RNase* と相同性が

低かった. 従って, 13 系統のうち *S-RNase* を検出することが出来たのは, Sm-allele の *S-RNase* をもつ 7 系統のみであった. 残りの 6 系統において *S-RNase* を検出することが出来なかった理由として (i)自家和合性獲得の過程で *S-RNase* を失った(ii)全く新規の S-allele をもつ の 2 つが考えられる. アブラナ科のモデル植物シロイヌナズナでは, 自家和合性の S ハプロタイプが複数存在することが知られており (Tsuchimatsu et al. 2010), RNA seq などの解析を行うことで新規の自家和合性 S-allele が検出される可能性があると考えられる.

### 亜種間を超えた S-RNase の共有

Sm-allele の *S-RNase* は, *P. axillaris* 種群間で共有されていることが明らかになった. このことは亜種の分岐以前に自家和合性の獲得が起こったことを示唆している. *P. axillaris* 種群における亜種の分化は 35,000~107,000 年前であると推定されており (Caroline et al. 2014), 自家和合性の獲得はそれ以前であると考えられる.

Sm-allele は栽培品種である *P. hybrida* において検出されていたが (kubo et al. 2015), 野生系統においても広く分布していることが本研究により明らかになった. 3 自家和合性獲得の要因となった遺伝的変異自家和合性獲得の要因としては(i)雌性因子 *S-RNase* の機能喪失(ii)自己を認識する *SLF* の獲得(iii)修飾因子への変異が考えられる.

Sm-allele の *S-RNase* において, コーディング領域の塩基配列を決定したところ, 非同義置換を伴う SNP は確認されたが, premature termination codon やフレームシフトは生じていないことが明らかになった.

### SLF の genotyping, sequencing

*S-RNase* の genotyping に用いたものと同じ系統 (*P. axillaris* ssp. *axillaris* 6 系統, *P. axillaris* ssp. *parodii* 3 系統, *P. axillaris* ssp. *subandina* 3 系統, *P. occidentalis* 1 系統) に対して 18 対の *SLF* 特異的プライマーを用いて genotyping を行った. その結果, 系統ごとに多様な *SLF* の保有パターンが確認された. *SLF1*, *SLF2*, *SLF3*, *SLF5*, *SLF6*, *SLF10*, *SLF15*, *SLF16*, *SLF18* は Sm-allele の *S-RNase* をもつ 7 系統全てで検出された (図 5). *SLF14* も同様に 7 系統全てで検出されたが, A285-2 の *SLF14* にはフレームシフトが生じていた. その一方で, *SLF4* は 4 系統 (A122, A188, A231, A200), *SLF7* は 2 系統 (A122, A124), *SLF8* は 2 系統 (A231, A200), *SLF9* は 6 系統 (A122, B801, B924, A188, A231, A200),



*SLF11* は 3 系統 (A122, A188, A124), *SLF12* は 5 系統 (A122, B924, A188, A231, A200), *SLF13* は 5 系統 (A122, A188, A231, A200, A124) のみから検出された (図 5). このうち B801-2 の *SLF9* には premature termination codon が, A124-2 の *SLF13* にはフレームシフトがそれぞれ確認された. また, 各 *SLF* の塩基配列をアライメントしたところ, 多くの個体でヘテロサイトが存在することがわかった. さらに, 得られた配列を基に各タイプの *SLF* の対立遺伝子の系統樹を作成したところ, S ハプロタイプごとのまとまりを示さなかった (図 6)

#### ペチュニア野生系統の S-allele の同定

自生地から採集された 13 系統に対して 18 対の特異的プライマー (表 3) を用いて *S-RNase* の genotyping を行ったところ, Sm プライマーは 7 系統, S22 プライマーは 7 系統, S19 プライマーは 12 系統で増幅が確認された (表 2). Sm プライマーで増幅した配列は既知の Sm-allele の *S-RNase* とほぼ一致したが, S22 プライマー及び S19 プライマーで増幅した配列は既知の *S-RNase* と相同性が低かった. 従って, 13 系統のうち *S-RNase* を検出することが出来たのは, Sm-allele の *S-RNase* をもつ 7 系統のみであった. 残りの 6 系統において *S-RNase* を検出することが出来なかった理由として (i)自家和合性獲得の過程で *S-RNase* を失った(ii)全く新規の S-allele をもつ の 2 つが考えられる. アブラナ科のモデル植物シロイヌナズナでは, 自家和合性の S ハプロタイプが複数存在することが知られており (Tsuchimatsu et al. 2010), RNA seq などの解析を行うことで新規の自家和合性 S-allele が検出される可能性があると考えられる.

#### 亜種間を超えた S-RNase の共有

Sm-allele の *S-RNase* は, *P. axillaris* 種群間で共有されていることが明らかになった. このことは亜種の分岐以前に自家和合性の獲得が起こったことを示唆している. *P. axillaris* 種群における亜種の分化は 35,000~107,000 年前であると推定されており (Caroline et al. 2014), 自家和合性の獲得はそれ以前であると考えられる. Sm-allele は栽培品種である *P. hybrida* において検出されていたが (kubo et al. 2015), 野生系統においても広く分布していることが本研究により明らかになった.

#### 自家和合性獲得の要因となった遺伝的変異

自家和合性獲得の要因としては(i)雌性因子 *S-RNase* の機能喪失(ii)自己を認識する *SLF* の獲得 (iii)修飾因子への変異が考えられる. Sm-allele の *S-RNase* において, コーディング領域の塩基配列を決定したところ, 非同義置換を伴う SNP は確認されたが, premature termination codon やフレームシフトはどの系統においても生じていないことが明らかになった. このことは Sm-allele の *S-RNase* が未だ機能的であることを示唆しており, *SLF* 側の変異もしくは修飾因子の変異により自家和合性が獲得された可能性が示された. ここで Sm ハプロタイプの *SLF* は他ハプロタイプと同一クレードを形成したことを考慮すると, ペチュニア属植物の自家和合性系統は他ハプロタイプと交配し, Gene conversion により自己認識 *SLF* を得て自家和合性を獲得してきた可能性が考えられる. これまでペチュニア属植物の S 遺伝子座は動原体近傍に存在し組み換えが抑制されていると考えられていた (Entani et al. 1999, Talbert et al. 2010). しかし異なる S ハプロタイプが DNA レベルにおいて全く同一の *SLF* を保有する例が複数確認されており, 比較的最近まで S ハプロタイプ間での *SLF* の交換が行われていたことが示された (Kubo et al. 2015). このことは本研究における結果とも一貫している. *SLF* の genotyping の結果, *SLF1*, *SLF2*, *SLF3*, *SLF5*, *SLF6*, *SLF10*, *SLF14*, *SLF15*, *SLF16*, *SLF18* は Sm-allele の *S-RNase* をもつ 7 系統全てで検出され, うち *SLF1*, *SLF2*, *SLF3*, *SLF5*, *SLF6*, *SLF10*, *SLF15*, *SLF16*, *SLF18* ではフレームシフトや premature termination codon が生じていないことが確認された. このうちのいずれかの *SLF* が Sm-allele の *S-RNase* と相互作用し, 自己の *S-RNase* を解毒している可能性が考えられる.

ペチュニア属植物の野生系統 13 系統を用いて *S-RNase* の genotyping, sequencing を行った結果, 7 系統において Sm-allele の *S-RNase* が検出された. Sm-allele の *S-RNase* は亜種間で共有されていたことから, 自家和合性の獲得は亜種の分岐 (35,000~107,000 年前) よりも前であることが示唆された. Sm-allele の *S-RNase* 検出された 7 系統全てにおいて, *S-RNase* のコーディング領域の塩基配列を決定した結果, premature termination codon やフレームシフトは生じておらず, 自家和合性の獲得は *SLF* 側の変異によるものである可能性が示された. さらに Sm ハプロタイプの *SLF* は保有パターンが系統間で多様であり, *SLF* において遺伝子重複や遺伝子交換が生じやすいことが示唆された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	國分 尚 (Kokubun Hisashi) (20282452)	千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授  (12501)	
研究分担者	渡辺 洋一 (Watanabe Yoichi) (30763651)	千葉大学・大学院園芸学研究科・助教  (12501)	
研究分担者	土松 隆志 (Tsuchimatsu Takashi) (60740107)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授  (12601)	

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