

令和元年9月9日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19265

研究課題名(和文) サクラ属植物における種間交雑障壁の特性化と打破

研究課題名(英文) Characterization of interspecific cross incompatibility in the genus Prunus

研究代表者

赤木 剛士 (Akagi, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50611919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウメ・スモモ間の交雑を対象として、種間交雑時に生じる交雑不稔性の原因究明を目指した。この種間交雑においては後代系統において雄性不稔性を生じるため、本研究では、ウメ品種「地蔵梅」スモモ品種「ソルダム」とその交雑系統であるスモモウメ一号をモデルとして、葯の経時的形態観察、トランスクリプトーム解析およびメチローム解析を行った。スモモウメ一号では両親系統では見られないタペート層の生育異常が見られ、花粉稔性に必須であるタペート層の崩壊が生じなかった。この原因として、オルガネラゲノムの発現バランス異常、および非相加的調節遺伝子の発現が関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新規品種育成において種内多様性の枠を超え、種間での形質のやり取りを考慮するうえで必須の「種間交雑障壁」の打破に寄与する知見である。種間交雑における雄性不稔性の出現は広く知られた現象であり、本研究はその現象に対しての分子生物学的な基礎知見を得ることができた。今後は、この分子機作に対して人為的な制御を可能とする技術の開発が求められる。さらに本研究では、種間交雑の際に、エピジェネティックな再編成が生じることによって両親ゲノム・発現情報から予測できない「非相加的」な遺伝子発現が生じることを明らかにしており、この成果は種間交雑における新規形質獲得機構の基礎的な知見として重要である。

研究成果の概要(英文)：We attempted to unveil the molecular mechanism to cause inter-crossing male sterility, with a cross of Japanese apricot and Japanese plum. In this study, we performed morphological observation with microscope, transcriptome and methylome analyses, using anthers from a representative cross of Japanese plum cv. Soldam x Japanese apricot cv. Jizo-ume, and its offspring sel. Sumomo-ume no. 1. The inter-crossed sel. Sumomo-ume no. 1 showed specific irregularity in tapetum development and no degradation of tapetum layers, which is indispensable for pollen fertility. Transcriptome analysis suggested that expression imbalances between nuclei genome and organelle genome, and some non-additive regulatory genes, which showed unexpected expression patterns from those in the parents, involved the male sterility in this inter-specific crossing.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：種間交雑 交雑障壁 雄性不稔 サクラ属 トランスクリプトーム メチローム 非相加的調節遺伝子  
DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

異種間の交雑は新たな植物種・品種を成立させる重要なステップである。しかし、多くの場合、受精における不親和性や胚発生の異常、植物体の生育不全・不稔などの障壁が存在し、これらを打破しない限り異種間交雑は成功しない。バラ科サクラ属には非常に多くの実用種が含まれるが、いずれの種も、その利用において種特異的な課題を有している。これに対して、種間交雑によって解決できる課題は多く、また、例えば「プルオット(スモモとアズキ交雑体)」や「スモモウメ」のように、両親種の良形質を併せ持つだけでなく、新形質を発現して「新しい作物」として受け入れられた種間交雑例もある。しかし、未だに多くの組み合わせにおいて交雑が成立せず、その交雑障壁の原因も特定されていなかった。このサクラ属植物における種間障壁は系統学的な遠近には完全に依存しない形で、受精・胚発生・植物体生育の様々な段階で生じることが示唆されている。また、申請者らの予備的調査によって交雑の方向性によっても交雑障壁の有無や生じる段階・表現形質が異なることが明らかになっており、その分子機構の解明は応用面における新しい作物の作出という枠を超えて、基礎植物学的にも大きな寄与が期待できるものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、異種間交雑において生じる様々な交雑障壁因子を特性化・打破するための知見を得るために、多様な作物種を含み、多様な交雑障壁反応を示すサクラ属果樹に着目しており、上記の研究背景を踏まえて、属内多様性を広くカバーするウメ・スモモ・モモ間の種間交雑において、その障壁の生理学的理解と関与する遺伝的因子の同定を目指す。具体的にはウメ・スモモ間の種間交雑、ウメ・モモ間の種間交雑の二つを対象として扱い、以下の点を目的としている。1. ウメ・スモモ間において得られる種間交雑後代では、一般に雄性不稔性が生じ、この葯における生理学的・形態学的原因を究明することを目的とする。2. ウメ・モモ間の交雑では受精前あるいは初期胚発生において異常が生じ、正常な植物体を得られないことが分かっており、この生理学的なメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 交雑前/交雑後障壁の分類

これまでの調査から、ウメ-スモモ間では交雑後に正常に植物体が生育するが、雄性不稔性を生じ、他方、ウメ-モモ間の種間交雑パターンでは受精の成立可否および交雑後障壁の有無が特定されていない。交雑前障壁では、正逆交雑および同種間交雑との比較によって、花粉管の停止機構を特定し、局所的サンプリングを行った。交雑後障壁に関しては、ウメ・モモ間の交雑では胚発段階の経時的調査を行い、ウメ・スモモ間の交雑では、交雑後代において雄性不稔性を生じる葯の経時的な顕微鏡観察を行った。

#### 2. ウメ・モモ間種間交雑に関する胚培養および遺伝子型決定

ウメ・モモ間種間交雑に関して、ウメ「南高」、モモ「オキナワ」を用いて交雑後代を取得し、胚の経時的な観察および初期胚の培養を行った。得られた胚に関しては、いくつかの分子マーカーを用いて、遺伝子型を決定し、交雑を確認した。

#### 3. ウメ・スモモ間種間交雑に関する経時的なトランスクリプトーム解析

ウメ・スモモ間種間交雑に関して、ウメ「地蔵梅」、スモモ「ソルダム」およびそれらの交雑後代である「スモモウメ一号」の葯を経時的( stage1-4 )に採取し、total RNAを抽出してmRNA-Seqライブラリを構築した。Illumina HiSeq4000によってシーケンス解析を行い、3反復のトランスクリプトームデータを得た。

得られたトランスクリプトームデータはウメ全ゲノム・全遺伝子情報にマッピングを行い、ステージ間および、両親と種間交雑後代間における発現プロファイリングのため、主成分分析(PCA)を行った。また、雄性不稔性発言に特異的な発現遺伝子を検出するため、同ステージの両親・後代間でDESeq解析を行い、発現変動遺伝子(FDR < 0.0001)を抽出した。さらに、両親の発現リードからSNPs情報を抽出し、多型性を有する場所にマップされたリード情報を用いて、両親アレルを区別した発現バランスを特性化した。種間交雑において発現差異や発現インバランスを示す遺伝子群については、GO/PATHWAY解析によって、その機能的繋がりや機能の階層構造を調査した。

#### 4. ウメ・スモモ間種間交雑に関するメチローム解析

上記で用いたウメ・スモモおよびその後代系統において、全ゲノムワイドメチローム解析を行った。葯内構造において顕著な形態学的差異を示した stage-2 (タバート層崩壊期・崩壊直前期)において葯からのDNA抽出を行い、bisulfite-Seqライブラリを構築した。Illumina HiSeq4000によってシーケンス解析を行い、Kawakatsu et al. 2016, Cellの方法に従って、マッピング、DNAメチル化解析を行った。

得られたDNAメチル化データから、特に遺伝子のgene body、転写開始点上流1-2kb、転写停止点下流1-2kbのDNAメチル化レベルの推移を検出した。また、上記のトランスクリプトーム解析において同定された非相加的調節遺伝子に関して遺伝子領域周辺のDNAメチル化状態を、両

親・種間交雑系統間で比較した。

#### 4. 研究成果

##### 1. サクラ属植物における種間交雑障壁の分類・形態的特性化

本研究で取り扱った種間交雑組み合わせのうち、ウメ x モモに関しては、ウメを花粉親としたときには受精が可能であり、胚発生初期段階までは交雑個体を維持可能であることが明らかになった。しかし、正常な植物体へは展開できず、胚培養においてのみ個体は維持可能であった。

ウメ・スモモ間の交雑においては、ウメを花粉親として用いたときのみ、受精は可能であり、これによって正常な植物体を得ることが可能である。しかし、生育した個体は一般に雄性不稔を有していることが明らかになっている。スモモ・ウメの両親および種間交雑後代（スモモウメ）における葯の経時的顕微鏡観察の結果、種間交雑でのみ、葯内のタペート生育異常・およびタペート層の崩壊異常が生じており、これによって雄性不稔が発生すると考えられた。

##### 2. スモモウメの雄性不稔性に関わる分子機作

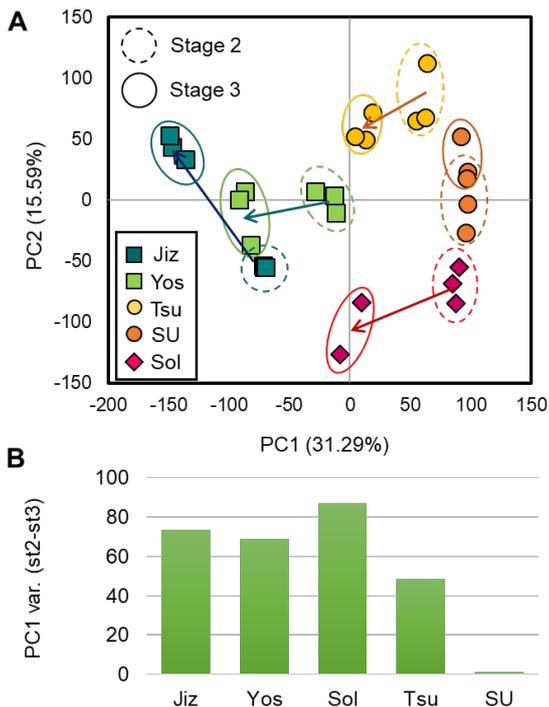
葯におけるトランスクリプトームデータから全体的な発現傾向をプロファイリングするためにPCAを行った結果、種間交雑後代であるスモモウメでは、葯の発達ステージの推移を反映する第一主成分（PC1）においてステージ中期の変化が見られず、両親（ウメ・スモモ）に対して、葯発達の同期性に異常を生じている可能性が示唆された（第1図）。

この結果は葯の経時的形態調査とも一致しており、スモモウメにおいては葯発達中期（タペート層崩壊直前期）であるstage 2以降において著しく葯構造の発達および花粉稔性に必須であるタペート層の崩壊が遅延している傾向が観察された。

この著しい差異が見られたstage 2において、スモモウメおよびその両親間における初右舷変動遺伝子を検出するために、DESeq解析を行った結果、合計675遺伝子がスモモウメ特異的な発現変動を示すと考えられた。これらのうち、384遺伝子がスモモウメ特異的な発現上昇を示しており、GO解析の結果、膜構造に関連する遺伝子・オルガネラ（主にミトコンドリア）に関連するものを多く含む傾向にあった（第2図）。他方、291遺伝子はスモモウメ特異的な発現低下を示し、リボソームに関連する因子を多く含む傾向にあった。これらの発現、特にオルガネラゲノム関連の遺伝子発現は、花粉稔性に必須のタペート層崩壊に深くかかわることがこれまでに報告されており、種間交雑において、母方由来のオルガネラゲノムと、両親由来の核ゲノムの間での同調性が維持できなくなることで雄性不稔を生じている可能性が考えられた。

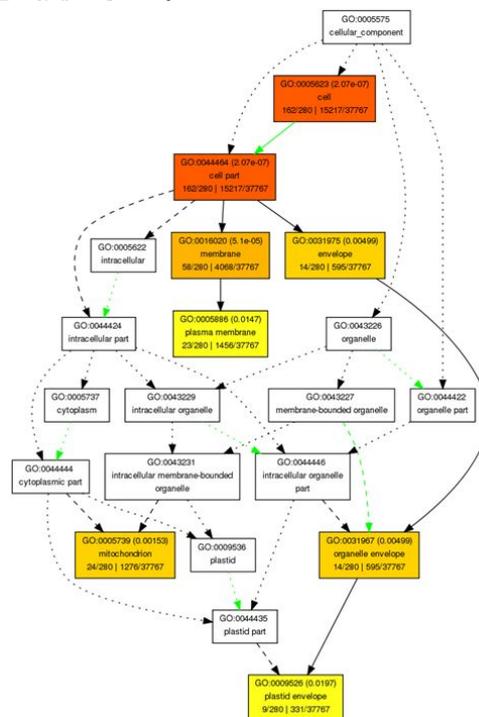
さらに、本研究では、発現リードのSNPs情報を活用し、両親アレルを区別して、両親におけるアレル発現バランスと種間交雑後代におけるアレル発現バランスを比較した。その結果、両親

親における発現バランスから著しく逸脱したアレル間発現バランスをスモモウメにおいて示す



第1図：PCAによるウメ・スモモ間種間交雑のステージ間全発現プロファイル

A. ウメ（四角で表示）[地蔵梅（Jiz）、養青（Yos）]、スモモウメ（丸で表示）[露茜（Tsu）、ユモモウメ一号（SU）]、スモモ（菱形で表示）[ソルダム（Sol）]におけるPC1-PC2プロット。Stage2-3への推移を表した。B. PC1におけるstage2-3の推移率、スモモウメでは有意に推移が小さい。



第2図：スモモウメ特異的DEGsのGO階層構造

370 遺伝子（非相加的調節遺伝子）を同定した（第3図）。このうち、スモモウメにおいて両親のアレルバランスがバイアスのある状態から1:1に近づくものについては、trans因子による制御によって説明が可能である。一方、本来、両親において、1:1の発現を示すものが、スモモウメにおいて大きくバイアスを示すようになる遺伝子については、種間交雑における遺伝子制御に関してのエピジェネティックな再編成が理由の一つとして想定された。これらの遺伝子には、葉緑体関連遺伝子やプログラム細胞死に関する遺伝子が含まれており、タペート層の崩壊との関連を示唆するものであった。

## 2. 種間交雑の薬器官における DNA メチル化制御

メチローム解析の結果、遺伝子領域（gene body）においてスモモウメは両親のウメ・スモモの中間値を取らず、両親よりも有意に低い DNAS メチル化レベルを示すことが明らかになった（第4図）。この傾向は CG, CHG, CHH いずれのメチル化コンテキストでも同様の傾向を示していた。一方、遺伝子領域の上流・下流では、ウメ（花粉親）のみが高い DNA メチル化程度を示し、スモモ（種子親）とスモモウメは同程度の DNA メチル化を示していた。遺伝子領域・その周辺領域ともに、DNA メチル化制御は両親寄与から逸脱しているものであると考えられ、種間交雑においてエピゲノムの再編成が生じている可能性が考えられた。

また、上記のトランスクリプトーム解析で得られた非相加的調節遺伝子について、DNA メチル化レベルを調査した結果、スモモウメにおいて著しく両親寄与から逸脱したものが多く含まれており、エピジェネティック制御の再編成によって非相加的な調節が生じる可能性も示唆された。両親のアレル特異的な DNA メチル化レベルの検出にはいまだ障壁があるため、非相加性の具体的な制御機構は明らかにできなかったが、今後、遺伝子単位に着目した詳細な解析によって、その分子機作が明らかになるとと思われる。

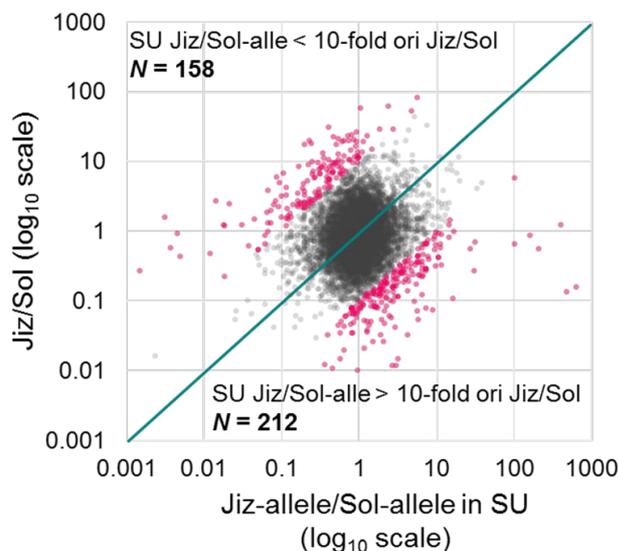
### <引用文献>

Kawakatsu, T., Huang, S. shan C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J. J., Urich, M. A. A., et al. (2016) Epigenomic Diversity in a Global Collection of *Arabidopsis thaliana* Accessions. *Cell*. 166: 492-506.

### 5. 主な発表論文等

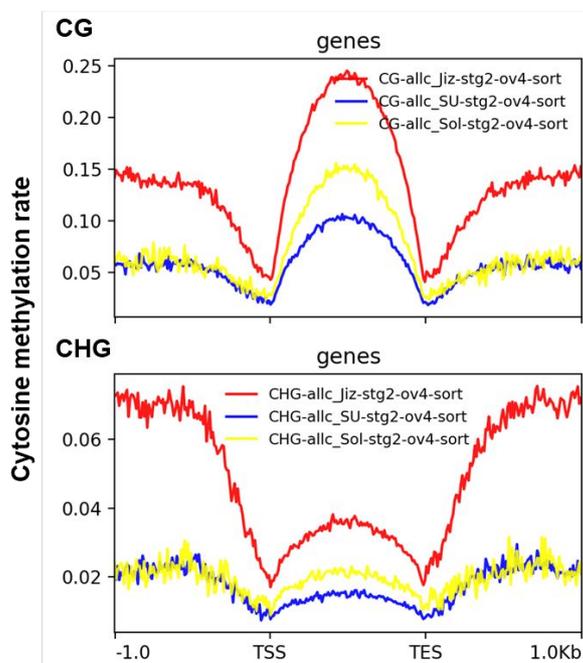
〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takuya Morimoto, Yuto Kitamura, Koji Numaguchi, Takashi Akagi, Ryutaro Tao. Characterization of post-mating interspecific cross-compatibility in *Prunus* (Rosaceae). *Scientia Horticulturae*, vol 246 (27): pp693-699 (2019)  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.045>



第3図：スモモウメにおける非相加的調節遺伝子の探索

X軸にスモモウメにおける両親アレルのバイアス(地蔵梅/ソルダム)を、Y軸に両親における発現バイアスを示した。両者において10倍以上の差異が検出されるものを赤で彩色した。



第4図：サクラ属種間交雑が薬における遺伝子領域付近の DNA メチル化レベルに与える影響

ここではCG/CHGコンテキストのみ抜粋(CHHも同傾向)地蔵梅(赤)ソルダム(黄色)に対して、種間交雑系統であるスモモウメ号(青)は両者アレルを有するにも関わらず、中間値は取らず、両親よりも有意に低いメチル化レベルを示した。この傾向は特に遺伝子領域(gene body)で顕著であった。

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 5 種のバラ科サクラ属果樹における種間交雑和合性, 森本拓也, 北村裕人, 沼口孝司, 赤木剛士, 田尾龍太郎, 園芸学会平成 31 年度春季大会, 2019 年 3 月

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：北村佑人

ローマ字氏名：(KITAMURA, Yuto)

所属研究機関名：和歌山県農林水産部

部局名：果樹試験場うめ研究所

職名：副主査研究員

研究者番号 ( 8 桁 ): 10631640

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：森本拓也

ローマ字氏名：(MORIMOTO, Takuya)

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、研究者個人に帰属されます。