

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07221

研究課題名(和文) 琵琶湖産自然雑種オオササエビモにおける母系効果の分子基盤と個体群特性の解析

研究課題名(英文) Genetic background of maternal effect and population structure of natural hybrid *Potamogeton anguillanus* in Lake Biwa, Japan.

研究代表者

飯田 聡子 (Iida, Satoko)

神戸大学・理学研究科・理学研究科研究員

研究者番号：60397817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水生植物ヒルムシロ科の自然雑種オオササエビモにおいて、生態的特性において母系効果を生じる分子基盤として、光合成遺伝子について着目し、その塩基配列や遺伝子発現の解析を行い、本雑種に特有の遺伝子発現パターンを明らかにした。また琵琶湖の異なる個体群に生育しているオオササエビモの解析から、この特有の遺伝子発現パターンには変異が認められないことを明らかにした。これらの結果から、オオササエビモは葉緑体と核の相互作用が確立する以前の起源が比較的新しい雑種であること、さらに母系が異なる雑種では、葉緑体と核間の適合性の程度が異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Potamogeton anguillanus is a natural hybrid in Potamogeton, the largest aquatic genus. The two parents exhibit contrasting responses to such drought stress: *P. wrightii* is able to survive on land by producing terrestrial shoots, whereas *P. perfoliatus* is unable to express such phenotypic plasticity and thus cannot survive on land. Ecological performance of *P. anguillanus* is dependent upon maternal effects on drought tolerance and local environmental conditions. To examine genetic background of the maternal effect, DNA sequence and gene expression analyses of some photosynthetic genes were performed. Gene expression patterns of *P. anguillanus* were distinct but difference between two maternal types were not apparent. The results suggested *P. anguillanus* is a natural hybrid of relatively recent origin. Novel combination between plastid and nuclear genome may influence hybrid incompatibilities and maternal effect in this hybrid.

研究分野：植物生態学

キーワード：自然雑種 水生植物 母系効果 遺伝子発現 琵琶湖 オオササエビモ

1. 研究開始当初の背景

雑種形成は新たな環境適応能をもつ種の分化に重要である。しかし、雑種形成によるゲノム組成の変化は、新生個体に致死のあるいは不稔といった影響を及ぼす。栄養繁殖が卓越している水生植物の自然雑種では、このような進化的に孤立した不稔の個体が雑種強勢により維持されている。

その一雑種、オオササエビモ(ヒルムシロ科)は、ササバモとヒロハノエビモを両親種とし琵琶湖に多産する。これら両親種は近縁であるが生態的特性は対照的であり、ササバモは比較的浅い水域に分布し、渇水時には気孔が分化した陸生葉をつけて陸上でも生育でき、水陸移行帯に適応している。一方、ヒロハノエビモは比較的深い水域に分布し、渇水時には枯死し、生育は水中に限定される。雑種、オオササエビモ(ヒルムシロ科)は琵琶湖に多産し、渇水時の陸上での生存能や深度分布が母親となった種の特徴を示す、すなわち母系効果の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、自然雑種オオササエビモおよび両親種ササバモ、ヒロハノエビモにおいて、遺伝子の構造や発現解析を行うとともに、母系が異なる雑種個体群の琵琶湖での群落構造を調査し、自然雑種における母系効果の分子的基盤と個体群特性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

母系効果の分子的基盤として、葉緑体と相互作用する核遺伝子のうち光合成に関わるものに着目し、遺伝子の塩基配列と、その発現パターンを解析した。研究材料には先行研究で解析を行い、大学圃場にて系統維持を行っている両親種およびオオササエビモについては、本研究で新たに琵琶湖各地で調査を行い、大学圃場にて栽培した植物体を用いた。

4. 研究成果

(1) オオササエビモの両親種における核遺伝子 *rbcS* の解析

ゲノムの塩基配列解析

光合成の炭酸固定に重要な酵素ルビスコは葉緑体コードの触媒サブユニットと核コードの小サブユニットから構成されるが、最近ワタ属を始めとする異質四倍体において、母系の影響を受けて小サブユニットをコードしている核遺伝子 *rbcS* が、ゲノムでは協調進化をし、遺伝子発現では発現パターンが母系に偏ることが報告された(文献)。このような葉緑体と核との相互作用は、ヒルムシロ科でも雑種における母系効果に影響を与える可能性があることから、はじめに *rbcS* 遺伝子に着目した解析を行った。

先行研究で実施した RNA-seq 解析より得たデータから、部分塩基配列を取得し、発現量が多かった 2 つの *rbcS* 遺伝子 (*rbcS1*,

*rbcS2*) について、プライマーウォーキング法によりイントロン領域を含む全長配列を決定した。またササバモとヒロハノエビモはいずれも異質四倍体であることから、あわせてヒルムシロ属の二倍体種の解析を行った。その結果、過去の倍数体形成に由来する父系(a)と母系のホメオログ(b)が同定された。これらホメオログ間では特徴的な塩基置換が種ごとに共有されており(表1)、ワタ属で報告されているような協調進化がヒルムシロ科でも進行していることが判明した。

② 高速シーケンス解析(RNA-seq)

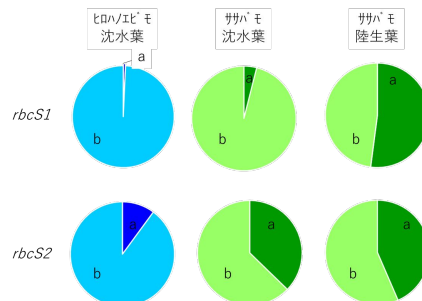
両親種の沈水葉における *rbcS* 遺伝子のホメオログの発現状態を解析するため、栽培系統より RNA を抽出し、高速シーケンス解析をタカラバイオ株式会社に受託し、データを得た(Hiseq2500, 約 6200 と 6300 万リード)。得られたデータは、DDBJ Read Annotation Pipeline 上で、前処理を行い、Bowtie 2 により決定した *rbcS* の塩基配列上にマッピングし、Integrative Genomics Viewer 上で可視化した。その結果、沈水葉では *rbcS1*, *rbcS2* ともに、ササバモとヒロハノエビモでは母系由来のホメオログの発現量が多いことが明らかになった(図1)。一方、陸生葉では父系由来のホメオログが増加し、沈水葉のような発現バイアスは顕著ではない(図1)。

表1. オオササエビモ両親種 *rbcS* における塩基置換数と変異部位(エクソン領域)

SNP/遺伝子	<i>rbcS1</i>	<i>rbcS2</i>
固有派生的	12 (53, 60, 86, 87, 177, 201, 285, 325, 327, 435)	10 (31, 81, 84, 123, 159, 177, 336, 351, 498)
種特異的	1 (232)	3 (292, 319, 322)
ホメオログ特異的	0	5 (35, 97, 198, 201, 522)

下線は非同義置換であることを示す

図1. 両親種における *rbcS* ホメオログの遺伝子発現パターン。



(2) オオササエビモ *rbcS* の遺伝子発現パターン

両親から受け継いだ *rbcS* 遺伝子が、自然雑種オオササエビモにおいてどのように発現しているのかを調べるため、8系統について、両親種と同様の手順で高速シーケンス解析

(RNA-seq)を実施した(表2)。得られたデータ(各々約5500万リード, 5.6-5.9 Gbp)を解析したところ, オオササエビモの rbcS1 遺伝子では, 母系に関わらず主にヒロハノエビモ由来の遺伝子が発現していた。また rbcS2 遺伝子では, 両親種由来のものが発現していたが, ササバモの由来のものの発現量が多い傾向があった(図2)。

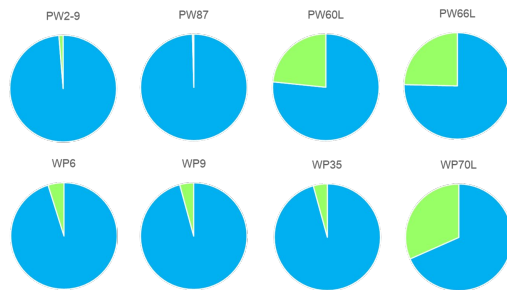
表2. 高速シーケンス解析(RNA-seq)を行った自然雑種オオササエビモ8系統

系統番号	産地	野外採集時の水深	生育形	母系
WP6	真野浜	1m	沈水形	W
WP9	真野浜	1m	沈水形	W
WP35	真野浜	1m	沈水形	W
PW2-9	北小松	2m	沈水形	P
PW87	北小松	5m	沈水形	P
PW60	堅田	- (陸上)	陸生形	P
PW66	堅田	- (陸上)	陸生形	P
WP70	堅田	- (陸上)	陸生形	W

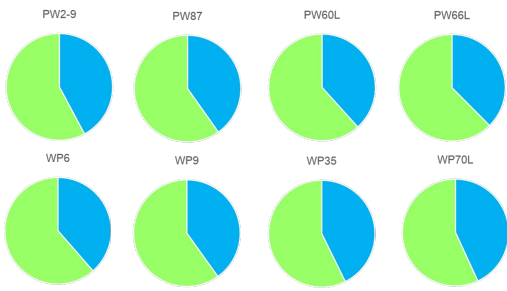
P: ヒロハノエビモ, W: ササバモ

図2. 自然雑種オオササエビモにおける rbcS の遺伝子発現の構成比

a. rbcS1



b. rbcS2



■ ヒロハノエビモ由来のrbcS遺伝子    ■ ササバモ由来のrbcS遺伝子

これらの個体より調整した cDNA の PCR 産物のダイレクトシーケンスを行ったところ, 両親由来の遺伝子の発現量の偏り(発現バイアス)を検出できることが判明した。そこで以後, 琵琶湖各地から採集したオオササエビモの多検体での調査をサンガーシーケンス解析により行った。

(3) 琵琶湖産オオササエビモにおける両親由来 rbcS 遺伝子の雑種化状態と発現バイアス

オオササエビモは琵琶湖内に広範に分布し, 遺伝的多様性が認められていることから, 野外の代表的な集団より採集を行い, rbcS 遺伝子の雑種化状態と発現バイアスについての解析を行った。その結果, 水深 1m までの浅水域(真野浜), 水深 2m-5m の深水域(北小松), 特に高い遺伝的多様性がある個体群(尾上)由来のサンプルについて結果が得られた。これらの集団では母系の出現頻度は集団ごとに偏りがあったが, 大部分の個体が両親由来の rbcS 遺伝子を保持しゲノムが雑種化状態であること, 遺伝子発現パターンは, (2)と同様であり, 発現バイアスが認められるものの母系との関連がないことが明らかになった(表3)。また発現量の低い遺伝子は, 尾上や北小松のごく一部の個体のゲノムからは失われていることも明らかとなった。

表3. 琵琶湖産オオササエビモの両親由来 rbcS 遺伝子の雑種化状態と発現バイアス a. 沈水葉の解析 (N=64)

調査地	母系		rbcS1		rbcS2	
	P	W	雑種化状態	発現バイアス	雑種化状態	発現バイアス
真野浜浅水域	1	16	17	17	17	17
尾上浅水域	17	6	20	23	20	22
北小松深水域1	4	0	4	4	4	4
北小松深水域2	15	5	20	20	19	20
合計	37	27	61	64	60	63
%	58%	42%	95%	100%	92%	98%

b. 陸生葉の解析 (N=11)

調査地	母系		rbcS1		rbcS2	
	P	W	雑種化状態	発現バイアス	雑種化状態	発現バイアス
真野浜浅水域(栽培)	0	3	3	3	3	3
北小松深水域(栽培)	1	0	1	1	1	1
堅田(野外)	5	2	7	6	7	7
合計	6	5	11	10	11	11
%	55%	45%	100%	91%	100%	100%

(5) 他の光合成遺伝子の解析

(2)で RNA-seq 解析を実施した個体について, 他の光合成に関わる核コードの遺伝子について遺伝子発現パターンを調べた。個体変異は認められたものの, 母系が異なる個体間の差異は認められなかった。また遺伝子発現については, RCA 遺伝子ではササバモ由来遺伝子が多く発現する傾向があったが, psb0 遺伝子にはそのような発現バイアスは認められなかった。

(6) 総括

種間雑種のゲノムは, 必ずしも両親種の雑種化状態であるという単純なものではなく, ゲノムの再編成やメンデル遺伝に従わない遺伝子の喪失やエピジェネティックな修飾が起こることが知られている。

琵琶湖産オオササエビモの rbcS 遺伝子は, 大部分の個体において雑種化状態であったが, 遺伝子発現においては偏りがあった。rbcS1 遺伝子ではヒロハノエビモ由来のもの,

rbcS2 遺伝子ではササバモ由来のものの変異量が多い。この傾向は、雑種の母系に関わらず認められた。従って、ヒロハノエビモを母系とする雑種では、ヒロハノエビモ型 rbcL 遺伝子と rbcS1 遺伝子との間に、またササバモを母系にもつ雑種では、ササバモ型 rbcL 遺伝子と rbcS2 遺伝子との間で、協調的な葉緑体-核相互作用が存在していると予想される。一方、葉緑体型と一致しない親種から受け継いだ rbcS 遺伝子については、葉緑体との間に不適合が発生している可能性がある。RNA-seq 解析より見積もられる遺伝子発現量より、沈水葉、陸生葉のいずれでも rbcS2 遺伝子が主要な分子種である。特にヒロハノエビモを母系とするオオササエビモは、ササバモを母系とするものに比べ、より葉緑体と核との間の不適合の影響を受けているのかもしれない。

オオササエビモの両親種は異質四倍体であり、二倍体種より受け継いだ父系と母系のゲノムを保有している。しかし、両親種の rbcS 遺伝子の塩基配列の協調進化や遺伝子発現の偏りから、葉緑体と核の相互作用は確立していると考えられた。一方、オオササエビモではそのような母系との対応は認められなかった。種の起源が新しい雑種では、葉緑体と核の相互作用が確立していない(文献②)。オオササエビモの両親間の交雑は現在の琵琶湖でも生じており、オオササエビモの稔性は低い(文献 )。オオササエビモも葉緑体と核の相互作用が確立する以前の新しい雑種であると考えられる。

本研究では、生態的特性において母系効果が報告されている自然雑種オオササエビモにおいて(文献 )、その分子的基盤として葉緑体と核の相互作用が関与している可能性を検討した。rbcS 遺伝子の解析からは、母系の間での遺伝子発現パターンの差異は認められなかった。しかし、葉緑体と核間の不適合の影響の程度は、母系によって異なるのかもしれない。

#### <引用文献>

- Lei Gong, Mischa Olson, Jonathan Wende, Cytonuclear evolution of Rubisco in four allopolyploid lineage, *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31 巻、2624-2636
- Tina Sehresh, V. Vaughan Symonds, Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis, Jennifer A. Tate, Cytonuclear coordination is not immediate upon allopolyploid formation in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae) Allopolyploids, *Plos one*, 2015, 10 巻、e0144669, 1-17
- Iida Satoko, Kadono Yasuro, Kosuge Keiko, Maternal effects and ecological divergence in aquatic plants: a case study in natural reciprocal hybrids between *Potamogeton perfoliatus* and *P.*

*wrightii*, *Plant Species Biology*, 2013, 28 巻、3-11

#### 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 2 件)

角野 康郎、渡辺 長敬、藤井 良造、飯田 聡子、山梨県忍野村に生育するオオササエビモの変異形。水草研究雑誌、査読無、106 巻、2018、22 - 23

Iida Satoko, Ikeda Miyuki, Amano Momoe, Sakayama Hidetoshi, Kadono Yasuro, Kosuge Keiko, Loss of heterophylly in aquatic plants: not ABA-mediated stress but exogenous ABA treatment induces stomatal leaves in *Potamogeton perfoliatus*, *Journal of Plant Research*, 査読有、129 巻、2016、853 - 862  
DOI: 10.1007/s10265-016-0844-x

[学会発表](計 5 件)

飯田 聡子、角野 康郎、琵琶湖産種間雑種オオササエビモにおける母系効果と遺伝子発現、第 81 回日本植物学会、2017.9.9、東京理科大学(千葉県)

小菅 桂子、飯田 聡子、角野 康郎、坂山 英俊、三村 徹郎、水草ヒルムシロ属の環境応答と種分化、第 5 回 近畿植物学会講演会、2016.11.12、兵庫県民会館(兵庫県)

飯田 聡子、水生植物ヒルムシロ科における生態的多様化 - 沈水植物ヒロハノエビモはなぜ異形葉を形成しないのか? 第 80 回日本植物学会、2016.9.18、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

飯田 聡子、坂山 英俊、角野 康郎、小菅 桂子(神戸大・院・理)、水生植物の気孔形成と塩ストレス応答、第 63 回日本生態学会、2016.3.24、仙台国際センター(宮城県)

飯田 聡子、坂山 英俊、角野 康郎、小菅 桂子、水生植物の異形葉形成と海水適応、第 4 回近畿植物学会講演会、2015.11.7、大阪市立大学理学部附属植物園(大阪府)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 聡子(IIDA, Satoko)  
神戸大学・大学院理学研究科・理学研究科  
研究員  
研究者番号: 60397817