

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15224

研究課題名(和文) トウガラシ属の種間雑種植物に認められる受精後交雑障壁の解明

研究課題名(英文) Analysis on postzygotic isolation mechanisms in interspecific crosses of Capsicum

研究代表者

手塚 孝弘 (Tezuka, Takahiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：20508808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トウガラシ属植物の種間雑種に認められる雑種弱勢(受精後交雑障壁)の解析を行った。雑種植物で生じる特徴的な生育異常は、生育途中での新葉の形成停止および草丈増加の停止であり、上位節間長は正常な生育を示す両親よりも短くなっていた。雑種の茎頂分裂組織は発達が遅延し、扁平で表層の細胞層が不明瞭という異常な構造を示していた。雑種弱勢は温度感受性であり、高温で抑制された。また、雑種弱勢には病害抵抗性関連の遺伝子やプログラム細胞死が関与し、雑種植物において糖含量が増加していることも明らかにした。さらに、トウガラシ属植物の分子系統解析や検定交雑の結果、雑種弱勢アレルの分布を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠縁交雑育種は、遺伝子組換えを行わずに、野生種等から栽培種に有用形質を導入できる育種法である。しかし、遠縁の植物種間では、種の独立性を維持するための機構である生殖隔離がしばしば認められ、遠縁交雑によるF1雑種作出やその後代の育成が困難あるいは不可能であることが多い。そのため、生殖隔離を回避・克服する技術が求められている。本研究では、トウガラシの種間交雑で認められる雑種弱勢(生殖隔離)を解析し、どのような表現型の異常が生じているのか、どのような遺伝子が関与しているのか、などを明らかにした。一方で、雑種植物を高温で栽培することで雑種弱勢を抑制することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, hybrid weakness, a type of postzygotic reproductive isolation, in the genus Capsicum was analyzed. The hybrid weakness phenotype was evidenced by almost complete arrest of new leaf formation, delayed increase in plant height, and reduced upper internode length. The shoot apical meristem (SAM) of F1 plants exhibited delayed development and an abnormal structure characterized by a flat shape and the presence of fuzzy cell layers on the surface. Hybrid weakness was temperature sensitive and suppressed at elevated temperatures. It was revealed that disease resistance-related genes and programmed cell death were related to hybrid weakness, and sugars were accumulated in hybrid plants. Furthermore, allelic distribution of hybrid weakness genes was investigated using molecular phylogenetic analyses and test crosses.

研究分野：園芸科学

キーワード：雑種弱勢 温度感受性 細胞死 糖 病害抵抗性 rDNA-ITS配列 SSRマーカー トウガラシ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遠縁交雑育種は、遺伝子組換えを行わずに、野生種等から栽培種に有用形質を導入できる育種法である。この方法を利用することで、同じ種の品種間・系統間交雑のみでは育成することができなかったような新しい品種を育成することが可能となる。しかし、遠縁の植物種間では、種の独立性を維持するための機構である生殖隔離がしばしば認められ、遠縁交雑による F1 雑種作出やその後代の育成が困難あるいは不可能であることが多い。そのため、生殖隔離を回避・克服する技術が求められている。

Capsicum annuum に分類されるトウガラシやピーマン、パプリカ等は、香辛料や野菜、さらには薬用、防虫用、美容用、観賞用として広く利用されている。日本で栽培・利用されている品種数は比較的少ないが、トウガラシとピーマンは世界中で栽培されている重要作物である。したがって、*C. annuum* を育種改良し、辛味や甘味、果実の形・大きさ・色・収量が異なる品種、新規の病害抵抗性を有した品種、新規の機能性を有した品種等、これまでとは異なる全く新しい品種を育成することが求められている。この場合、*C. annuum* の品種・系統のみを遺伝資源として用いた育種には限界があることから、研究代表者はトウガラシ属の他の種を利用することを検討している。しかし、*C. annuum* と他の種との交雑では様々な生殖隔離が認められ、新品種作出の妨げとなっている。

2. 研究の目的

トウガラシ属植物の種間雑種に認められる雑種弱勢は生殖隔離の一種であり、進化の過程で重要な役割を果たしてきた。しかしその一方で遠縁交雑育種を行う際の大きな障害であり、本現象を克服することが求められている。本研究では、雑種弱勢の分子機構を解明することを目的とした。具体的には、雑種弱勢の原因遺伝子を順遺伝学・逆遺伝学的手法により明らかにし、それらの遺伝子や発育不全を引き起こす細胞質が地理的にどのように分布しているか、またそれらがトウガラシ属においてどのように獲得され、進化してきたかを分子系統解析に基づき明らかにする。さらに、雑種弱勢を起こした雑種においてどのような異常が生じているかを、組織学的観察、遺伝子発現解析、細胞死の解析等により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 雑種弱勢の特徴づけ

C. annuum と *C. chinense* の交雑に生じる雑種弱勢を対象とし、表現型、細胞死、遺伝子発現の観点から特徴づけを行った。雑種植物を 25°C で栽培し、表現型の異常を調査した。また、茎頂部分を組織学的に観察した。トリパンブルー染色による細胞死の検出、活性酸素種である過酸化水素の検出、DNA のヌクレオソーム単位での断片化の検出を行った。さらに、RT-PCR により、病害抵抗性関連遺伝子である *CaPR1* および *CaPR2* を調査した。

(2) 雑種弱勢における温度感受性および糖含量等の評価

雑種子が発芽後、植物体を各温度条件 (15, 20, 25, 30, 35°C) に設定した人工気象器で栽培した。7 日毎に草丈および主茎の展開葉数を測定し、発芽後 90 日目に地上部・地下部乾物重を測定した。また、高温からより低い温度に雑種を移すことで弱勢を誘導できるかを調査するために、雑種を 30°C で 21 日間栽培した後、20°C に移した。20°C に移した後、0、1、7、14、42 日目の上位第 3 葉を用いて、トリパンブルー染色による細胞死の検出、RT-PCR による糖トランスポーター遺伝子およびサリチル酸、エチレン、ジャスモン酸関連遺伝子の発現量解析を行った。さらに、0、7、42 日目の上位第 3 葉を用いて、キャピラリー電気泳動により多糖類および遊離アミノ酸の蓄積量を測定した。

(3) 雑種弱勢に関与する遺伝子の網羅的解析

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により、雑種弱勢に関与する遺伝子を網羅的に解析した。

(4) 雑種弱勢の遺伝解析

雑種弱勢の遺伝解析を行うために、分離集団を育成した。分離集団の各個体の遺伝子型の判定を行った。

(5) rDNA の ITS 領域を用いた系統解析

トウガラシ属植物の形態形質の違いを評価するとともに、rDNA の ITS 領域を用いた系統解析を行った。形態形質の調査のために、*C. annuum* 12 系統、*C. baccatum* 2 系統、*C. chinense* 3 系統、*C. frutescens* 4 系統、*C. pubescens* 1 系統を栽培し、種の分類に使用される 6 形質に加え、草型、

萼の裂片の有無、葯の色、果形、果実の辛味の有無を調査した。ITS による分子系統解析には、*C. annuum* 11 系統、*C. chinense* 2 系統、*C. frutescens* 1 系統、*C. pubescens* 3 系統に加え、野生種である *C. chacoense* 1 系統、*C. eximium* 1 系統を用い、ITS 配列をシーケンスし、最尤法により系統樹を作成した。

(6) SSR マーカーを用いた系統解析

C. annuum、*C. chinense*、*C. frutescens* のそれぞれについて数十系統を育成し、SSR マーカーを用いて系統解析を行った。

(7) 雑種弱勢の系統地理学的解析

検定交雑により、*C. annuum*、*C. chinense*、*C. frutescens* における雑種弱勢アレルの保有状況を調査し、雑種弱勢アレルの地理的分布を SSR マーカーによる系統解析の結果と併せて解析した。

4 . 研究成果

(1) 雑種弱勢の特徴づけ

雑種では、発芽後 40 日目以降に両親よりも展開葉数が少なくなり、上位節間長が短くなった。発芽後 60 日目以降では、雑種の草丈が両親よりも低く、下位の葉が硬くなり、発芽後 100 日目までに、全ての葉が硬くなっていた。発芽後 270 日目では、両親は旺盛な生育を示したが、雑種は生育を停止したままであり、側枝を展開しない代わりに異常な葉が腋芽から展開していた。発芽後 20 日目の雑種の茎頂は扁平な形であり両親の茎頂とは異なる形であった。また、発芽後 40 日目では、両親の茎頂部は花芽へと分化しているにも関わらず、雑種は花芽分化していなかった。雑種の葉では、細胞死と過酸化水素が検出された。さらに、DNA 電気泳動を行うと、雑種の硬い葉において、DNA のラダー化が検出され、プログラム細胞死が生じていることが明らかとなった。遺伝子発現解析の結果、雑種でのみ病害抵抗性関連遺伝子 *CaPR1* と *CaPR2* の発現が認められた。以上の結果より、トウガラシ雑種弱勢が生じる雑種では自己免疫応答が生じていることが示唆された。

(2) 雑種弱勢における温度感受性および糖含量等の評価

各温度条件下で栽培すると、雑種植物は 25℃以下で弱勢症状を示したが、30℃および 35℃では弱勢が抑制され、両親に比べて生育が旺盛であった。雑種の地上部乾物重は 30℃および 35℃で、地下部乾物重は 35℃で両親よりも高い値であった。したがって、雑種を 30℃および 35℃で栽培することで、雑種弱勢を回避できることが明らかになった。

雑種を 30℃で 21 日間栽培した後に 20℃に移すと、14 日目頃から雑種の生育が停止した。細胞死は両親では検出されなかったが、20℃に移して 7 日目以降の雑種の葉では検出された。キャピラリー電気泳動による解析の結果、20℃に移して 42 日目の雑種において、スクロース、グルコース、フルクトースの蓄積量が大きく増加していた。また、クエン酸が 42 日目の雑種で蓄積量が有意に増加しており、一方で、アスパラギン酸およびグルタミン酸は蓄積量が低下している傾向にあった。遺伝子発現解析の結果、雑種で糖トランスポーター遺伝子である *CaSTP7* および *CaSTP8-3* が特異的に発現していた。また、サリチル酸関連遺伝子である *CaPAL3* も雑種で発現量が増加する傾向にあった。植物の病害応答において、糖トランスポーターが活性化されて細胞内に糖が蓄積されること、サリチル酸が合成されることが報告されている。トウガラシの雑種弱勢においても、病害応答と類似の反応が生じることにより、サリチル酸関連遺伝子および糖トランスポーター遺伝子の発現量が上昇し、糖が蓄積することが示唆された。

(3) 雑種弱勢に関与する遺伝子の網羅的解析

RNA-seq により、雑種弱勢に関与する多数の遺伝子を同定した。同定した遺伝子には病害抵抗性に関与する遺伝子などが含まれていた。

(4) 雑種弱勢の遺伝解析

遺伝解析の結果、両親のそれぞれがもつ単一の遺伝子が原因であることを明らかにした。

(5) rDNA の ITS 領域を用いた系統解析

形態形質は種によって多様であることが確認された。ITS 領域による系統解析の結果、*C. annuum* クレード、*C. chinense* および *C. frutescens* クレード、*C. baccatum* クレード、*C. pubescens* クレードの 4 つのクレードが形成された。したがって、トウガラシ属の種の分類に ITS 領域を解析することが有効であることが示唆された。

(6) SSR マーカーを用いた系統解析

SSR マーカーによる系統解析では、最初に *C. annuum* を中心とした解析を行った。系統樹において、採取地別の 3 つのクレード (中南米、日本を除くアジア、日本クレード) が形成された。STRUCTURE 解析 (K=2) の結果、いくつかの *C. annuum* 品種・系統が他栽培種に近縁であるこ

とが示唆された。次に、*C. chinense* および、*C. frutescens* の系統数を増やし、これらの種を中心とした系統解析を行った。この系統樹では、*C. annuum* クレード、*C. chinense* クレード、*C. frutescens* クレードが形成され、*C. frutescens* クレードには一部の *C. chinense* 系統が含まれた。STRUCTURE 解析の結果、 ΔK が最大値をとる $K=3$ が最適であると求められた。 $K=3$ のとき、*C. annuum* クレードに属する系統と *C. frutescens* 4 系統が近縁であることが確認された。これらの *C. frutescens* 4 系統は *C. annuum* と遺伝的に近いものであると推測された。

(7) 雑種弱勢の系統地理学的解析

検定交雑の結果、雑種弱勢アレルをもつ *C. annuum* は日本品種・系統の 42%、日本を除くアジア品種・系統の 12%、中南米品種・系統の 6% で見つかった。一方、*C. chinense* では 3 系統で雑種弱勢アレルが見いだされた。SSR マーカーによる系統解析の結果と併せて考察すると、雑種弱勢アレルは *C. annuum* の一部の中南米原産系統で獲得され、大航海時代に雑種弱勢アレルをもつ系統およびもたない系統の両方が世界中に伝来され、世界各地で育種されてきたことが推測された。また、検定交雑において、雑種弱勢の他にも種子が得られない障害、得られた種子が発芽しない障害が認められることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hai He, Takahiro Iizuka, Maho Maekawa, Kumi Sadahisa, Toshinobu Morikawa, Masanori Yanase, Shuji Yokoi, Masayuki Oda, Takahiro Tezuka*	4. 巻 132
2. 論文標題 Nicotiana suaveolens accessions with different ploidy levels exhibit different reproductive isolation mechanisms in interspecific crosses with Nicotiana tabacum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 461-471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-019-01114-w	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 -
1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Takahiro Iizuka, Katsuyuki Ichitani, Tsutomu Kuboyama, Toshinobu Morikawa, Masayuki Oda, Takahiro Tezuka*	4. 巻 8
2. 論文標題 HWA1- and HWA2-mediated hybrid weakness in rice involves cell death, reactive oxygen species accumulation, and disease resistance-related gene upregulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants8110450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka*	4. 巻 70
2. 論文標題 A hypersensitive response-like reaction is involved in hybrid weakness in F1 plants of the cross Capsicum annuum × Capsicum chinense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 430-437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 手塚孝弘*・一谷勝之・松本雄一・何海・木下哲・宅見薫雄・久保山勉	4. 巻 21
2. 論文標題 植物の生殖隔離機構解明に向けて 多様性と統一性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 75-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbr.21.W05	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Rie Nakamura, Shigeki Nomura, Hai He, Tetsuya Yamada, Wataru Marubashi, Masayuki Oda, Takahiro Tezuka*	4. 巻 37
2. 論文標題 Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds are related to hybrid lethality in the cross <i>Nicotiana suaveolens</i> × <i>N. tabacum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 327-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0606a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumpei Shiragaki, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka*	4. 巻 6
2. 論文標題 Phylogenetic analysis and molecular diversity of <i>Capsicum</i> based on rDNA-ITS region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/horticulturae6040087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 何海・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ種間交雑における子房落下現象には母親の過剰な高次倍数性および種子発育不全が関与する
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白柿薫平・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ属種間交雑で生じる雑種弱勢の表現型解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 定久公美・何海・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 葉緑体DNAを用いたNicotiana suaveolens 8系統の系統解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立田智輝・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ栽培種におけるSSRマーカーを用いた系統解析および雑種弱勢原因遺伝子の分布の調査
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白柿薫平・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 形態形質とrDNAのITS領域を用いたトウガラシ属栽培種5種の系統解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 何海・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコの異倍数性種間交雑後の子房落下現象における脱離関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 手塚孝弘・何海
2. 発表標題 タバコの異倍数性種間交雑に認められる子房落下および種子発育不全
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Tezuka, Sae Imagawa, Akira Hasegawa, Hai He, Shuji Yokoi
2. 発表標題 Genetic mapping of the HLA1 locus causing hybrid lethality in tobacco interspecific hybrids
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumpei Shiragaki, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka
2. 発表標題 Hybrid dwarfism observed in the cross between <i>Capsicum annuum</i> and <i>C. chinense</i>
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hai He, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka
2. 発表標題 Comparative analysis of different types of reproductive isolation observed in interspecific-interploidy crosses between two <i>Nicotiana suaveolens</i> accessions and <i>N. tabacum</i>
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hai He, Shuji Yokoi, Takahiro Tezuka
2. 発表標題 Distinct mechanisms are involved in seed abortion and ovary abscission in interploidy-interspecific crosses between <i>Nicotiana suaveolens</i> and <i>N. tabacum</i>
3. 学会等名 6th Plant Dormancy Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 何海・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコの異倍数性種間交雑 (<i>Nicotiana suaveolens</i> PI 555565 × <i>N. tabacum</i>) における子房落下現象の組織学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 何海・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 タバコ野生種 <i>Nicotiana suaveolens</i> 2系統と栽培種 <i>N. tabacum</i> との異倍数性種間交雑に生じる異なる生殖隔離の比較解析
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白柿薫平・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ雑種弱勢における系統地理学的解析
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白柿薫平・古川一・横井修司・手塚孝弘
2. 発表標題 トウガラシ属種間交雑で生じる雑種弱勢における温度感受性および糖蓄積
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪府立大学大学院 植物育種繁殖学研究グループ
<https://shyokoi.wixsite.com/plantbreeding>

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

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