

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：92723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06835

研究課題名(和文) シロイヌナズナ属野生種における自殖の進化プロセスの包括的理解

研究課題名(英文) Genomic analysis into the evolution of selfing in a wild Arabidopsis species

研究代表者

久保田 涉誠 (Kubota, Shosei)

株式会社ファスマック・バイオ研究支援事業部・研究員(移行)

研究者番号：10771701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサンハタザオはシロイヌナズナに近縁な野生種であり、これまで他殖のみ行うと考えられてきた。本研究では日本国内の野生集団を網羅的に探索し、室内での受粉実験から自殖可能な集団が存在することを証明した。さらに、室内で他殖種子と自殖種子の生長を観察したところ、両者の生存力と繁殖力には差はないことが示された。一方で、全ゲノムリシーケンスデータを活用した集団遺伝学的解析からは自殖が集団の繁殖に貢献している傾向は認められず、野外では近交弱勢によって自殖種子が排除されていると考えられる。さらに、上記リシーケンスデータからは、自殖をもたらす遺伝的変異についても解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他殖と自殖の進化を扱う研究は、ダーウィンをはじめとして古くから数多くの研究が実施されてきた。本研究は他殖から自殖への進化という、被子植物において一般的な進化傾向のメカニズムとプロセスの包括的理解を目指す研究である。自殖性は育種や農業にも重要な形質であるため、その包括的理解は進化研究の発展のみならず、食料生産分野における新規有用形質の創出や、生産性向上にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis halleri is a wild perennial herb closely related to A. thaliana. The plant has long been considered as a self-incompatible, fully outcrossing species. Here, self-compatible selfing populations were identified from crossing experiments. However, genome-wide population genomics has pointed out that selfed seeds do not contribute to population reproduction, probably because of strong inbreeding depression. Furthermore, genome-wide resequencing dataset was used to investigate the genetic mutation underlying the breakdown of self-incompatibility.

研究分野：ゲノム生態学

キーワード：次世代シーケンサー 自殖 ハクサンハタザオ 自家不和合性 S遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの被子植物は、ひとつの花の中に雄性(花粉)と雌性(胚珠)の両方が存在する両性花を顕花する。他個体同士の交配、「他殖」に対し、自己の花粉と胚珠で種子生産することを「自殖」と呼ぶ。両性花において自殖を回避する仕組みとしては、「S 遺伝子座」と呼ばれる単一の遺伝子座に座上する多数の対立遺伝子によって自他認識を行う、「自家不和合性」が知られている。他殖から自殖への進化は様々な植物分類群で観察される最も一般的な進化傾向のひとつであり、進化生態学における中心的な課題として古くから取り組まれてきた。シロイヌナズナを中心としたアブラナ科植物では、この10年で飛躍的に研究が進み、花粉側遺伝子と柱頭側遺伝子はもちろん、各種が内包する対立遺伝子の特定も進んだ。さらにシロイヌナズナでは過去に自家不和合性を不活化した突然変異が特定され、植物としては初めて自殖進化の遺伝的基盤が明らかになった。その一方で、シロイヌナズナにおける自家不和合性の崩壊は数十万年前にまで遡り、比較対象となる、他殖を行う集団がすでに存在しないため、自殖が進化した背景や集団への影響を検証することは非常に難しい。自殖進化の包括的理解のためには、シロイヌナズナと同等の分子生物学的知見が蓄積され、かつ、種内に他殖と自殖を内包する植物を対象とする必要がある。

2. 研究の目的

ハクサンハタザオはヨーロッパから東アジアまでの広い範囲に分布する多年生草本である。自殖に特化したシロイヌナズナに最も近縁な種であるにもかかわらず、自家不和合性による他殖を維持していることから、S 遺伝子座の解析が進められ、自他認識機構の鍵となる対立遺伝子も30個以上が同定されている。近年では国内の研究者により、全ゲノムデータ、トランスクリプトーム、DNA メチレーションなどの解析が精力的に進められ、野生植物としては他に類を見ないレベルの分子生物学的知見が蓄積されている。これまで本種は他殖のみを行うとされてきたが、もしも自殖可能な集団を見出すことができれば、この豊富な研究リソースを利用することで、他殖から自殖への進化という、被子植物において一般的な進化傾向のメカニズムとプロセスの包括的理解が可能になると考えられる。本研究は自殖進化の包括的理解を目指し、(1) ハクサンハタザオにおける自殖性の探索、(2) 自殖が個体と集団に与える影響の評価、(3) 自殖の遺伝的基盤の解明の3点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハクサンハタザオにおける自殖性の探索

自殖可能な集団が実際に存在するかを検証するため、北海道から九州に至る9集団を選定、それぞれ10個体以上を採取し、人工気象器内での系統維持と開花条件の検討を実施した。開花させた個体については集団内および集団間での強制他家受粉および強制自家受粉処理などの受粉実験を行い、結果率や結実率を比較した。また、送粉昆虫などの花粉媒介者が存在しない条件で蕾を放置することで自動自家受粉の有無についても検証を行った。

(2) 自殖が個体と集団に与える影響の評価

近交弱勢など、自殖が個体に与える影響を評価するために、上記(1)の受粉実験で得た種子について発芽と生長を記録し、他殖由来の種子と自殖由来の種子の生存力を比較した。とくに、自殖由来の種子が開花まで至り、種子繁殖が可能か検証を行った。自殖由来の種子が野外でも生産され、繁殖活動に参加して次世代の創出に貢献しているのであれば、集団遺伝学的な側面に影響を及ぼすと考えられる。そこで野生集団から全ゲノムリシーケンスデータを取得し、遺伝的多様性やヘテロ接合度などが自殖性と関連しているか解析を行った。全ゲノムリシーケンスデータについては、先行研究で取得済みの80集団分のデータに加え、受粉実験を実施した集団を含めた40集団分を追加した。

(3) 自殖の遺伝的基盤の解明

アブラナ科における自家不和合性の崩壊、すなわち自殖への進化は複数の分類群で独立に生じているが、いずれも花粉側遺伝子の機能喪失に起因することが示唆されている。これは「誰でも受け入れる雌」よりも「見境のない雄」の方が進化しやすいという理論予測とも合致している。ここではハクサンハタザオの全ゲノムリシーケンスデータから自家不和合性を担う花粉側遺伝子と柱頭側遺伝子の配列を取得し、本種において自殖性が進化した遺伝的変異の推定を試みた。また、各集団におけるS 遺伝子座をカウントし、自殖集団において機能を失ったS 遺伝子座の数が減少しているかについても検証を試みた。

4. 研究成果

自然条件下での自家受粉の有無および、野生環境下での近交弱勢は自殖の適応的意義や進化的な背景を推察する上で非常に重要な要素となる。本研究でも自生地での採取や受粉実験など、フィールドワークに重きを置いた計画を立てていた。しかしながら、コロナ禍でフィールドワークの多くを自粛せざるを得ず、人工気象器内での室内実験や、全ゲノムリシーケンスなどの分子生物学的実験とデータ解析に注力した。

図1右のように、今回は地理的に分断された9集団から植物を採取し、人工気象器内で栽培、開花条件を検討した。本種は *reversion* と呼ばれる、開花後に腋芽から葉と根が形成される特徴を持つため、この特徴を用いてクローン増殖と系統維持を行った。北海道を含むほとんどの集団は4の低温処理(春化处理)の後に20に直すことで開花した一方、国内最西端に位置する熊本集団だけは同じ条件で開花させることができなかった。そこで4の低温処理の後に、一定期間15で維持し、その後20に直す処理を試したところ開花が認められた。本種では温度応答の分子メカニズムについて詳細な研究が展開されており、地球温暖化による開花不全という生態的リスクが指摘されている。ここで得られた知見は同じハクサンハタザオであっても、集団によって気温変化への応答が異なることを示唆している。実際、国内において九州地方におけるハクサンハタザオ集団は規模も数も少ないことから、すでに温暖化の影響を強く受けていることが危惧される。

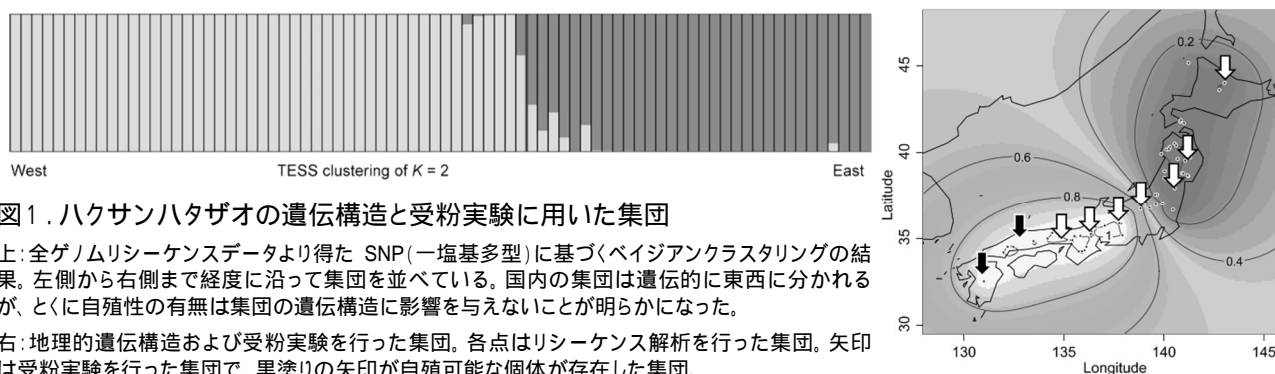


図1. ハクサンハタザオの遺伝構造と受粉実験に用いた集団

上: 全ゲノムリシーケンスデータより得た SNP(一塩基多型)に基づくベジアンクラスタリングの結果。左側から右側まで経度に沿って集団を並べている。国内の集団は遺伝的に東西に分かれるが、とくに自殖性の有無は集団の遺伝構造に影響を与えないことが明らかになった。

右: 地理的遺伝構造および受粉実験を行った集団。各点はリシーケンス解析を行った集団。矢印は受粉実験を行った集団で、黒塗りの矢印が自殖可能な個体が存在した集団。

開花させた個体を用いて受粉実験を実施したところ、図1右の白色の矢印で示した集団ではどの個体も強制自家受粉で種子を作ることとはなく、本種で指摘されてきた自家不和合性を再現することができた。また、集団内の別の個体間で強制他家受粉を行ったところ、問題なく種子が形成された。一方で、黒色の矢印で示した島根と熊本の集団については、ほぼ全ての強制自家受粉処理で種子が形成された。これらの自殖種子を播種したところ、発芽、生長し、開花まで至った。また、これらの自殖第1世代もやはり自殖性を示し、同様に自殖を繰り返して自殖第3世代まで作成したが、とくに他殖由来の個体と比べて生存力の低下などを確認することができなかった。さらに、自殖集団の花を花粉媒介者が存在しない状態で放置しても、自動自家受粉によって4割程度の花が結実した。以上から島根と熊本の集団は自動自家受粉能力を含む自殖性を持つことが明らかになった。野外環境下での近交弱勢については検討が出来なかったものの、人工気象器内ではとくに生存力の低下は認められず、野外でも自殖による繁殖が行われている可能性が示唆された。上記で述べた自殖に関する発見の他、集団間の交配では雄側と雌側を入れ替えた場合で受粉の可否が異なる、一側性不和合性も検出された。同様の例はアブラナ科の様々な分類群で報告されており、自己認識機構解明の一助になることが期待される。

ハクサンハタザオの自家不和合性を支配するS遺伝子型に関しては、すでに30以上の対立遺伝子が同定されている一方、周辺領域に大きな変異が蓄積しているために単一のプライマーペアを使ったPCRで増幅、解析することが難しい。また、自殖が個体や集団に与える影響を評価するためにも、本研究では受粉実験を実施した集団を含む120集団、170個体以上の全ゲノムリシーケンスデータを取得した。このリシーケンスデータは1個体あたりゲノムサイズの20倍量にあたる5Gbpを目安に取得されており、S対立遺伝子のような特定の遺伝子領域の解析から各種ゲノムワイドな解析までが実現可能なため、単一の野生植物としては国内外を見渡しても例のない規模のデータベースとなっている。今回の受粉実験による検証から、ハクサンハタザオの自殖集団は西日本に分布していることが予想されたが、遺伝的集団構造の解析からはとくに自殖集団と他殖集団が分かれるような傾向は認められなかった。また、遺伝的多様性についてもとくに地理的傾向は認められず、実際に自殖性が確認できた集団も他の他殖集団と同レベルの遺伝的多様性が見られた。これは野生環境下では強い近交弱勢がはたらき、自殖性が次世代の創出に貢献していない可能性を示唆している。

本研究では共同研究者の協力のもと、ハクサンハタザオにおける自家不和合性の遺伝的メカニ

ズムにせまる解析も進めた。実際の野生集団においてどのような S 対立遺伝子が分離しているのかを把握するために、自殖可能な個体を含む、計 173 個体について全ゲノムリシーケンスを行った。S 対立遺伝子ごとに BAC ライブラリ由来のリファレンスを用意し、それらすべてについてマッピングを行う方法を用いて解析を進めた。全個体について S 対立遺伝子を同定することには至っていないが、一部については既知の対立遺伝子と一致する配列を検出することができた。さらに、同一の特異性をもつとされる S 対立遺伝子内にもいくつかの非同義置換が見られることが明らかになり、そのうちのいくつかは雄側、雌側因子の推定相互作用部位の中にあつた。これらは自家不和合成崩壊の遺伝的基盤である可能性があり、今後さらに解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	阪口翔太、堀江健二、石川直子、重信秀治、山口勝司、長谷部光泰、三木綾乃、瀬戸口浩彰、永野惇、久保田涉誠、
2. 発表標題	全ゲノム分析によるアキノキリンソウ土壌生態型の隔離遺伝子の特定
3. 学会等名	日本生態学会第68回大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	久保田涉誠
2. 発表標題	植物標本を利用した全ゲノムリシーケンス - 過去100年間における適応遺伝子の探索 -
3. 学会等名	日本生態学会第67回大会（招待講演）
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	佐藤真、久保田涉誠、南雲垂希子、西山依里、渡辺拓実、山崎裕治、松平崇弘
2. 発表標題	アジア大陸一本州産アカギツネの全ゲノムSNP解析
3. 学会等名	日本哺乳類学会2021年度大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	吉田直史、森長真一、若宮健、石井悠、久保田涉誠、彦坂幸毅
2. 発表標題	F2個体の形質値分布から見るハクサンハタザオの標高間変異
3. 学会等名	日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 佐藤真、久保田涉誠、西山依里、臼井敦子、南雲亜希子、村上博昭、松平崇弘
2. 発表標題 浅く広く読んだNGSデータでナメクジの系統関係はヌルリと解決するのか!?
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田直史、森長真一、若宮健、石井悠、久保田涉誠、彦坂幸毅
2. 発表標題 F2 個体の形質値分布から見るハクサンハタザオ <i>Arabidopsis halleri</i> の標高間変異
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

〔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

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