

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840156

研究課題名(和文)自然雑種オオササエビモにおける交配の方向性は生理・生態的特性の違いに相関するか？

研究課題名(英文)Cross direction and ecophysiological traits in natural hybrid *Potamogeton anguillanus*

研究代表者

飯田 聡子 (Iida, Satoko)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：水生植物オオササエビモは、ヒルムシロ属のヒロハノエビモとササバモを両親種とする主にF1から構成される自然雑種で琵琶湖に多産する。本研究では高温耐性が対照的な両親種からF1雑種や自然雑種が、どのように形質を受け継いでいるかを検討した。馴化条件下で、高温耐性をクロロフィル・バイオアッセイ法により測定したところ、自然雑種はF1雑種と同様であり、高温耐性は両親種の中間的か、いずれか一方の親種と同程度だった。この雑種の母系統は、高温耐性と相関しなかったが、高温ストレス時に現れる障害の程度と関連していた。本研究は、琵琶湖に多産する自然雑種オオササエビモの高温耐性とその多様化状態を解明した点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：A natural hybrid, *P. x anguillanus* Koidz. has been originated by multiple bidirectional crosses between *P. perfoliatus* L and *P. wrightii* Morong. Our previous study showed that heat acclimation leads to species-specific changes in heat response in the parental species. In this study, we found their F1s and natural hybrids *P. x anguillanus* had variable extent of thermotolerance. Consistent with the view that *P. x anguillanus* is multiclinal F1-like hybrids, the thermotolerance classes of the natural hybrids resembled to that of F1s although only small number of F1s was examined. In parental species, differential heat induction of HSF2A2 have correlated with species-specific responses to heat, however, the genes were expressed similarly among hybrid strains and did not associated with their thermotolerance. There was no correlation between thermotolerance and cross direction, however specific heat injury phenotype was observed in natural hybrid with *P. perfoliatus* mother.

研究分野：植物生態学

キーワード：生態学 ストレス耐性 雑種 水生植物 母系効果 琵琶湖 クロロフィル 高温障害

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、新生個体に致死あるいは不稔といった影響を及ぼす。水生植物、ヒルムシロ科の自然雑種オオササエビモでは、このような進化的に孤立した不稔の個体が栄養繁殖により維持されている。この雑種では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。一方、両親種では渇水耐性と深度分布が異なるが、これら生態的特性の違いの生理的背景として高温耐性が関わることが近年明らかになっている。従って、雑種において高温耐性を比較すれば、母系効果の存在をより明確にできると考えて本研究の提案をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では、琵琶湖に生育するオオササエビモ個体群の生理的特性を詳細に比較し、母系効果の存在を分子レベルで検証するとともに、母系の異なる個体群間での環境適応性の違いを検証することを目的とする。具体的には、両親種ササバモとヒロハノエビモ間で違いが明確である高温耐性に着目し、F₁雑種と自然雑種オオササエビモについて下記の解析を行った。

- (1) F₁雑種と自然雑種オオササエビモの、遺伝子型解析を通じた雑種状態と母系の解析。
- (2) クロロフィルバイオアッセイ法による F₁雑種と自然雑種オオササエビモの高温耐性度の解析。
- (3) ストレス耐性に重要な遺伝子 HSFA2(熱ショック転写因子)とHSP21 遺伝子(葉緑体局在熱ショックタンパク質)の高温応答の解析。
- (4) F₁雑種と自然雑種オオササエビモの高温障害の解析。

3. 研究の方法

(1) 実験材料の採集・系統維持

琵琶湖にて生育深度毎(水深 0.5m, 1.5m)にベルトトランセクト法により、オオササエビモを採集した。採集は人為的な攪乱が起こり遺伝的多様性が蓄積されていることが予想された琵琶湖の北西部(真野浜)で行った。シュートは神戸大学に持ち帰り、圃場の栽培池にて維持した。個体は圃場より季節ごとに採取、あるいは室内水槽にて培養後、実験に用いた。

(2) 遺伝子型解析

採集した個体の母系解析は、両親種特異的なプライマーを用いた、葉緑体ゲノムの rbcL 遺伝子の PCR 増幅により行った。また、核支配の ADH 遺伝子を PCR 増幅し、両親種それぞれに特異的なイントロンの長さの違いにより雑種化状態を確認した。

(3) クロロフィルバイオアッセイ法による高温耐性度の解析

高温耐性の解析は、Burke(1994)により開発されたクロロフィルバイオアッセイ法により行った。採取した葉を30分間の高温ストレス処理し(処理温度を以下、チャレンジ温度とよぶ)、葉の乾重当たりのクロロフィル量をもとに、未処理の葉との比較により高温耐性度の指標である相対クロロフィル量(%)を算出した。両親種を用いてあらかじめ46 から52 までの"チャレンジ温度"を検討したところ、この温度範囲では種差が一定していた(図1)。このことから、本研究では"チャレンジ温度"を48 とした。未馴化条件は、5-6月の栽培池、あるいは室内水槽(25 一定)の個体を用いた。高温馴化条件は、先行研究に従い、室内水槽(25/30 ,夜/昼)の個体を用いた。各個体の高温耐性度は、分散分析と多重比較により両親種の値と比較し、その結果をもとにクラス分けを行った。

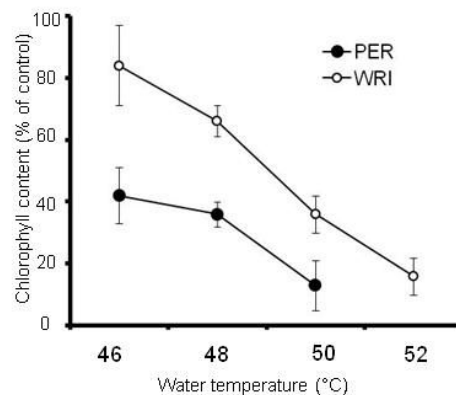


図1. クロロフィルバイオアッセイ法におけるチャレンジ温度の検討。Chlorophyll content (% of control)は高温耐性度の指標であり、この値が高いほど高温耐性が高い。アッセイは未馴化条件のヒロハノエビモ(PER)とササバモ(WRI)を用いて行った。バーは標準偏差 (n=3)

(4) HSFA2とHSP21の高温応答の解析

解析には、未馴化条件と馴化条件の F₁ 個体を用いた。35 1時間の処理を行った個体から葉を採取し液体窒素で凍結した。このサンプルをもとに、両親種の各遺伝子に特異的なプライマーを用いた、RT-PCR 法により発現状態を解析した。

(5) 高温障害の解析

複合的な環境ストレスに晒される野生植物における複数のストレス条件で高温耐性を評価することは重要である。先行研究から、高温耐性が低い親種、ヒロハノエビモでは、致死温度である40 に4時間以上晒されると、植物から抽出される total RNA 量が顕著に低下する。これは長期のストレスによって生じた活性酸素が、生体内の RNA 分子を酸化したためである。Total RNA 量は高温障害の一つの指標として適していることから、F₁雑種と自然雑種オオササエビモにおい

ても、40 に 8 時間の高温ストレスを与えたサンプルより total RNA を抽出し、定量することにより、高温障害と、クロロフィルバイオアッセイで解析された高温耐性度との対応関係を検討した。

4. 研究成果

(1) F₁ と自然雑種の遺伝子型解析

すべての F₁ と自然雑種は、ADH 遺伝子において両親由来のフラグメントを保持しており雑種状態だった。rbcL の解析により F₁ 雑種 4 個体と自然雑種 20 個体のうち、F₁ 2 個体と自然雑種 7 個体はヒロハノエビモを母系とする雑種 (以後 PW-hybrid) で、残りの F₁ 2 個体と自然雑種 13 個体はササバモを母系とする雑種 (以後 WP-hybrid) だった。

(2) F₁ 雑種の高温耐性

F₁ 雑種 4 個体の高温耐性は未馴化条件と馴化条件で調べた。未馴化条件では、両親種に比べ、雑種の高温耐性度は総じて低い傾向があった (図 2a)。高温馴化条件では、2 個体はヒロハノエビモと同程度 (PER-like, ヒロハノエビモを母系とする PW1 とササバモを母系とする WP1)、残りの 2 個体は両親種の間適的な高温耐性を示した (Intermediate, ヒロハノエビモを母系とする PW2 とササバモを母系とする WP2) (図 2b)。

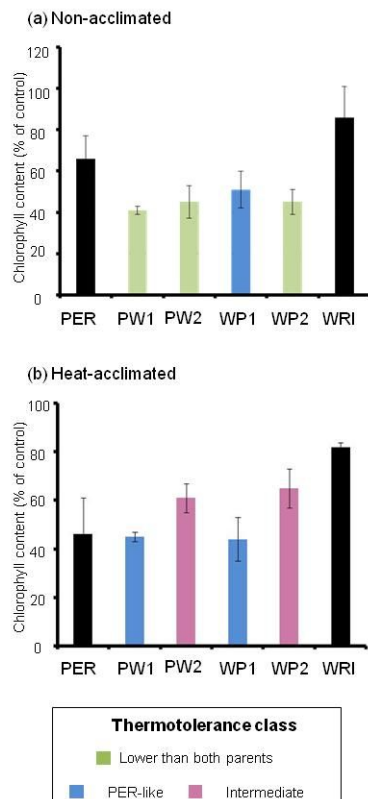


図 2. クロロフィルバイオアッセイ法により解析したヒロハノエビモ (PER) とササバモ (WRI) の F₁ 雑種の高温耐性度。Chlorophyll content (% of control) は高温耐性度の指標であり、この値が高いほど高温耐性が高い。(a) 未馴化条件、(b) 馴化条件。バーは標準偏差 (n=3)

(3) HSFA2 と HSP21 遺伝子の高温応答

F₁ 雑種の遺伝子発現パターンは HSFA2 については、相加的であり、高温で発現が誘導されないヒロハノエビモ由来の HSFA2a2-P 遺伝子を除くと、両方の親の遺伝子を発現させていた (図 3ab)。HSP21 についても、未馴化条件では、HSFA2 と同様の相加的なパターンが観察された (図 2a)。しかし高温馴化条件では、ほとんどの個体でヒロハノエビモから由来した HSP21b 遺伝子の発現が抑制されていた (図 3b)。

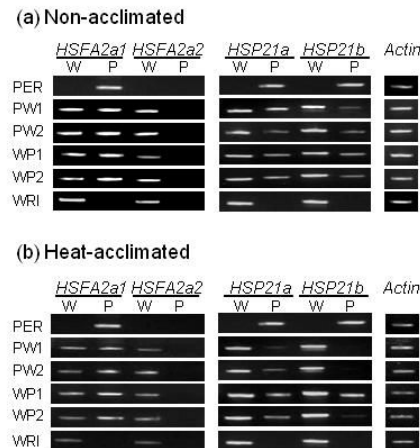


図 3. HSFA2 と HSP21 の遺伝子発現解析 (RT-PCR 法)。ヒロハノエビモ (PER) とササバモ (WRI)、および両種間の F₁ 雑種 (PW, WP)。W, P はそれぞれササバモ、ヒロハノエビモの遺伝子。アクチンは内部標準。(a) 未馴化条件、(b) 馴化条件。

(4) F₁ 雑種の高温障害

高温耐性度が低い F₁ 雑種ではヒロハノエビモで報告されているような高温障害が観察された。すなわち高温耐性度が低い個体 (PW1, WP1) では 40 に 8 時間の高温ストレスにより total RNA 量が顕著に低くなり、RT-PCR 法での遺伝子の増幅ができなかった。また同時に、これらのサンプルでは葉の褐変が観察された (図 4)。

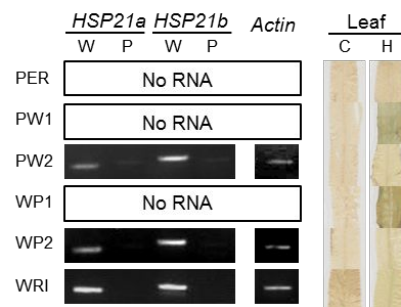


図 4. F₁ 雑種の高温障害。高温障害は 40 8 時間のストレス処理後に RNA 抽出を行いその収量により判定した。収量が高いサンプルについては HSP21 遺伝子の RT-PCR を行い、その電気泳動像を示した。No RNA: total RNA 量が著しく低い、leaf: 褐変を視覚的に示すためにクロロフィルを抽出した後の葉を示した (C: コントロール, H: 高温ストレス)

(5) 自然雑種の高温耐性

自然雑種オオササエビモの高温耐性は馴化条件で調べた。雑種の高温耐性度は、大部分のものはヒロハノエビモと同程度 (PER-like, 70%, n=14), 4 個体 (Intermediate, 20%) は両親の中間的, 残りの 2 個体 (WRI-like, 10%) はササバモと同程度であった (図5)。

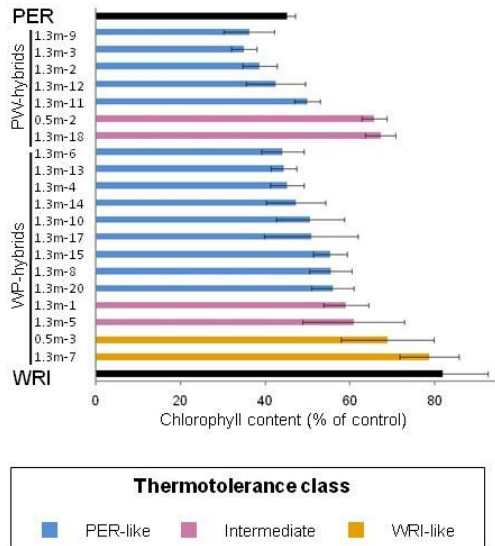


図5. クロロフィルバイオアッセイ法により解析した自然雑種オオササエビモの高温耐性度。バーは標準偏差 (n=5)

(6) 自然雑種の高温障害

自然雑種には F₁ 雑種と同様に, 高温障害を示す個体とそうでない個体が存在した。これら高温障害が認められたサンプルでは F₁ 雑種の時と同様に, 葉の褐変が観察された (図6)。クロロフィルバイオアッセイ法による高温耐性度が比較的高い Intermediate や WRI-like の個体では, 高温障害が認められず, クロロフィルバイオアッセイ法と高温障害の表現型の結果は対応していた。一方, ヒロハノエビモと同様の高温障害は, 一部の PER-like 個体にも認められた。

| PW-hybrids | | | | WP-hybrids | | | |
|------------|-------|-----|----------|------------|-------|-----|----------|
| Strain | Class | RNA | Leaf (H) | Strain | Class | RNA | Leaf (H) |
| 1.3m-9 | P | - | | 1.3m-6 | P | + | |
| 1.3m-3 | P | - | | 1.3m-13 | P | + | |
| 1.3m-2 | P | - | | 1.3m-4 | P | + | |
| 1.3m-12 | P | + | | 1.3m-14 | P | + | |
| 1.3m-11 | P | - | | 0.5m-3 | W | + | |
| 0.5m-2 | I | + | | 1.3m-7 | W | + | |

図6. 自然雑種オオササエビモの高温障害。-: 総 RNA 量著しく低い, +: 総 RNA 量高い, leaf (H): 葉色 (褐変が分かるようにクロロフィルを抽出した後の葉を示した)

(7) 総括

自然雑種オオササエビモの両親種, ササバモと

ヒロハノエビモは高温耐性が対照的であることが最近の研究で明らかになった。本研究では, 2 種の F₁ と自然雑種が多様な高温耐性をもつことを明らかにした。自然雑種オオササエビモの高温耐性度や高温障害は F₁ のものと類似しており, この結果はオオササエビモが遺伝的に多型の F₁ に似た雑種であるというこれまでの見解と一致した。両親種間では, 高温による HSFA2 遺伝子の誘導パターンが異なっていたが, 雑種では高温耐性度が異なっても同様の遺伝子発現パターンを示した。

本研究ではクロロフィルバイオアッセイと高温障害の解析によって高温耐性を検討した。高温障害は高温耐性度が低いごく一部のサンプルに観察された。クロロフィルバイオアッセイでは, 高温障害がみられない個体間で耐性のクラス分けをするのに有効だった。この2つの解析結果をもとに, F₁ 雑種と自然雑種オオササエビモの形質発現を評価すると, いずれかの両親に類似, あるいは中間的である。F₁ はしばしば成長力や代謝が旺盛でストレスへの感受性が低い, すなわち雑種強勢があると考えられている。自然雑種のストレス耐性については, これまで自然交雑を行っている近縁種間で作成された F₁ 雑種についていくつかの研究が行われてきた。これらの研究で検討されたストレス条件下 (温度, 日陰, 乾燥, 冠水) では, 雑種の形質発現は大体において中間的かいずれかの親種に類似しており, 雑種強勢は検出されていない。本研究でも, 雑種強勢は検出されなかった。

オオササエビモの一方の親種ササバモにおいて, 高温ストレスへの高い耐性は, 夏季の水位低下による干出の影響をしばしばうける生育地での生存に適している。自然雑種オオササエビモはササバモのように夏季の水位低下により, 陸生シュートを形成し浅瀬で生育を継続することができるが, その能力は劣る。陸生シュート形成は, 形態形成と複合的な環境ストレス (乾燥, 強光, 高温) への耐性に関わる形質であるが, 本研究はオオササエビモの陸上での低い生存能力は, 本種の高温耐性と関わることを示唆した。

自然雑種オオササエビモの水位低下への応答は, 2つの母系 (PW-hybrid, WP-hybrid) の間で異なり, WP-hybrid はPW-hybridより陸生シュートを多く生産し, 旺盛な栄養成長を示すことが知られている。本研究では, オオササエビモの高温耐性度については, 母系との対応は明確ではない。しかし高温障害については, 同じ P-like クラスの個体について, PW-hybridの方が, 高温障害を示す傾向があった。本研究で検討した高温障害は, 比較的高い高温ストレス存在下で蓄積した活性酸素が関わると思われる。現実の野外条件においては, 高温ストレスは, 強光や乾燥といった他のストレスと複合的に作用し, 活性酸素を蓄積させる。オオササエビモの2つの母系は深度分布においても異なる。母系統の間で分化した高温障害は, 自然雑種オオササエビモの環境適応性と深く関わる可能性がある。

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 0 件)

(学会発表) (計 1 件)

1. 飯田聡子・池田美幸・天野百々江・角野康郎・小菅桂子(神戸大・院・理) . 水生植物ヒルムシロ属における生態的多様化ーストレス耐性と表現型可塑性, いずれをとるか? 第61回日本生態学会, 2014年3月. 広島国際会議場(広島県).

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: