

遠縁交雑を介した雑種化のメカニズム解明と次世代果樹品種の作出

京都府立大学 生命環境科学研究科
森本 拓也

1. 研究の目的と背景

遺伝的多様性の増加は作物育種の最重要課題である。この点において遠縁交雑は、種や属の壁を越えた交雑を可能にすることで多様性を飛躍的に増加させる技術である。進化の過程で独自に獲得された形質を種間の壁を越えて導入することで、温暖化対策・食糧危機の回避などSDGsに関わる農業上の課題を解決したり、異種由来の有用形質を融合させた全く新しい作物を創出できる (Broz & Bedinger 2021)。一方で、これまでの雑種研究は、交雑障壁の機構やその打破を中心として、どのように新規雑種を獲得するかに焦点が当てられてきており、雑種個体の農学的利用を見据えた場合には、雑種形成後に生じうるゲノムや遺伝子発現の変化と表現型との関連性を十分に理解する必要があるものの、雑種個体を対象にした研究例は限られている。

筆者は、バラ科果樹を研究材料として異種ゲノム導入による品種改良に取り組んできた (Morimoto *et al.* 2019; Morimoto *et al.* 2023)。バラ科果樹には、リンゴ (*Malus × domestica*) やナシ (*Pyrus spp.*) など経済的に重要な果樹が多く含まれており、今後の育種利用に有用な遺伝的多様性がみられる。例えば、同じバラ科ナシ属に含まれる果樹でも、セイヨウナシ (*P. communis*) はエステル香に伴う芳醇な香りを持ち濃厚な甘さを感じるのに対して、ニホンナシ (*P. pyrifolia*) は香りが乏しくさっぱりとした食味を感じる。本研究では、雑種形成後に生じる遺伝子発現や表現型の多様性に関する知見を得るために、ニホンナシとセイヨウナシの種間雑種を用いた解析を実施した。

2. 研究材料

2-1. 植物材料

セイヨウナシとニホンナシの種間雑種品種・系統を供試した。親子関係は以下に示す通りである。‘太平洋’ (タイヘイヨウ): セイヨウナシ ‘ラ・フランス’ × ニホンナシ ‘晩三吉’ (オクサンキチ)、育種系統 1: セイヨウナシ ‘マックス・レッド・バートレット’ × ‘おさ二十世紀’、育種系統 2: セイヨウナシ ‘マックス・レッド・バートレット’ × ‘おさ二十世紀’。種間雑種および親品種は京都府立大学生命環境学部附属精華農場にて慣行条件にて管理した。

2-2. 果実の収穫と形質調査

2022年の収穫期において、過去の収穫日や地色、果梗部の離層形成を指標として適熟期に収穫した。収穫後に実験室に搬入して、果実重、縦横径、硬度 (N)、糖度 (Brix)、滴定酸含量 (mg/ml) を測定した。滴定酸含量は 0.1 M の水酸化ナトリウム溶液で中和滴定を行って、クエン酸当量として算出した。また、香気の測定および発現遺伝子の解析のために、5 mm 角の果肉ブロックを作成して液体窒素下で凍結したのちに測定まで -80°C で保存した。セイヨウナシ品種や種間雑種は追熟性を有するため、一部の果実を収穫後に室温 (20°C) で数日間置くことで追熟させた果実についても上記の形質調査とサンプリングを実施した。

2-3. 香気成分の分析

香気分析は果肉ブロック 1.0 g を 20 ml バイアル瓶にとり、内部標準物質として 0.2% シクロヘキサノール 50 μl を加えて分析試料とした。バイアル瓶中のヘッドスペース香気の捕集は固相マイクロ抽出 (Solid-Phase Micro-Extraction: SPME) を用い、ファイバーは SPME Fiber Assembly 65 μm PDMS/DVB, Stableflex 24Ga, Autosampler, 3pk (Supelco, 57327-U) を用いた。質量分析後の香気成分の推定には NIST14s ライブラリを用いた。分析には京都市バイオ計測センターの GCMS-QP2010 Ultra (島津製作所) を用いた。分析条件は以下の通りとした; カラム: DB-WAX (0.25 mm ϕ × 30 m、膜厚 0.25 μm)、昇温条件: 40°C (2 分) → $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ → 240°C (8 分)、ファイバー加熱条件: 250°C (10 分)、サンプル保持条件: 40°C (250 rpm で 30 分間インキュベート)、捕集条件: 40°C (250 rpm で 10 分間)、注入方法: 加熱脱着、スプリット比 (15:1)、注入口温度: 250°C 、サンプル脱着: 2 分、キャリアガス: He (1.78 ml/min)、イオン源温度: 230°C 、インターフェイス温度: 220°C 。

2-4. RNA-seq 解析

果肉からの total RNA 抽出には Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) を使用した。抽出した全 RNA から KAPA mRNA Capture Kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて mRNA を単離して、ライブラリ作成を行った。ライブラリ作成には KAPA Stranded RNA-Seq Kit

(KAPA BIOSYSTEMS) を用いた。作成した mRNA ライブラリを PCR (14-18 サイクル) によって増幅した後、シーケンス解析を委託した。シーケンスには HiSeq X (Illumina) を用いてペアエンド 150 bp のリードデータを取得した。1 品種につき 1 反復のデータを取得した。得られた生リード配列から、fastp (Chen *et al.* 2018) を用いてアダプター配列および低品質のリードを除去した。リードデータは Hisat2 (Kim *et al.* 2015) を用いてニホンナシゲノム (*Pyrus pyrifolia* v1.0 (Shirasawa *et al.* 2021)) のリファレンス遺伝子へアラインメントし、マップされたリード数と遺伝子長から発現量 (Transcripts per million reads) を算出した。その後、種間雑種と親品種との間で TPM を比較して、5 倍以上の発現上昇あるいは発現低下がみられる遺伝子を検出した。

3. 研究結果

3-1. 果実形質の調査

種間雑種と親品種との間での比較を行ったところ、セイヨウナシ ‘マックス・レッド・バートレット’ × ‘おさ二十世紀’ の後代では、育種系統 1 は両親よりも果実重が有意に小さく、育種系統 1 および 2 は両親よりも酸含量が高く、追熟後も同様の結果がみられた。果実硬度および糖度には有意差はみられなかった。セイヨウナシ ‘ラ・フランス’ × ニホンナシ ‘晩三吉’ と後代の ‘太平洋’ の比較では、‘晩三吉’、‘太平洋’ は ‘ラ・フランス’ よりも果実重が有意に大きく、果実硬度、糖度、酸含量には有意差はみられなかった (データ略)。

3-2. 香気成分の分析

セイヨウナシ ‘ラ・フランス’ × ニホンナシ ‘晩三吉’ と後代の ‘太平洋’ の比較を行ったところ、種間雑種の ‘太平洋’ で特異的あるいは成分量の多い物質が確認された (Table 1)。これらには、Ethyl Acetate (パイナップル様)、2-Methylbutyl acetate (スイート、バナナ、トロピカル様)、2-Hexen-1-ol, acetate (青リンゴ様)、alpha farnesene (グリーン様) が含まれており、ナシの種間雑種で生合成が増加する、あるいは新規に合成される候補成分として有力であると考えられる。

3-3. 雑種個体における発現変動遺伝子の解析

果実の発現遺伝子に基づいて供試した品種・系統の類似性を解析するために主成分分析を行った。mRNA-seq 解析によって得た発現遺伝子のうち、平均発現量が TPM>2、サンプル間の変動係数 >0.5 の計 12,031 遺伝子を用いてプロットしたところ、大きく 4 つのグループに分類され、遺伝背景および成熟特性によってグループ化される傾向が確認された (データ略)。ニホンナシ品種、セイヨウナシ品種および種間雑種の追熟前果実はそれぞれでグループを形成したが、種間雑種はニホンナシとセイヨウナシの中間付近に分布していることから、発現遺伝子からも雑種性が示唆された。一方で、追熟させた場合にはセイヨウナシと種間雑種が同じグループに分類されたことから、追熟前後で果実の発現遺伝子が大きく変化することが示唆された。

次に、雑種個体と両親との比較によって遺伝子発現パターンによる遺伝子群の分類を行った (Fig. 1)。全体的

Table 1 Volatile compounds detected in fruit sample

Volatiles	hybrid	<i>P. pyrifolia</i>	<i>P. communis</i>
	Taiheiyo	Okusankichi	La France
Ethyl Acetate	0.2981	0	0.0082
n-Propyl acetate	0.0106	0	0.0093
Acetic acid, butyl ester	0.0668	0	0.0862
Hexanal	0.5377	0.2989	0.4005
D-Limonene	0.008	0.0052	0.007
Acetic acid, hexyl ester	0.1116	0.0059	0.1001
Furfural	0.0237	0.0243	0.0249
2-Hexen-1-ol, acetate	0.0029	0	0
.alpha.-Farnesene	0.0271	0	0
1-Butanol, 2-methyl-, acetate	0.0064	0	0

* values are expressed as relative amounts to the internal standard (Cyclohexanol).

な傾向として、追熟前後において、セイヨウナシ ‘マックス・レッド・バートレット’ × ‘おさ二十世紀’ の後代では、雑種個体で発現低下している遺伝子が多いことが示唆された。一方で、セイヨウナシ ‘ラ・フランス’ ×ニホンナシ ‘晩三吉’ の後代では追熟後において雑種個体で発現上昇する遺伝子が多かった。‘太平洋’、育種系統1および2で共通して発現変動する遺伝子を探索したところ、追熟前では39遺伝子が発現上昇、71遺伝子が発現低下しており、追熟後では58遺伝子が発現上昇、74遺伝子

が発現低下していたことから、セイヨウナシとニホンナシの種間雑種では少数ではあるものの、雑種化に共通して発現変動する遺伝子の存在が示唆された (Fig. 2)。これらの遺伝子群についてGO解析を行ったところ、追熟後の発現上昇遺伝子群でのみ lyase activity に関する GO term が蓄積していた。このうち特に、テルペン合成酵素をコードする遺伝子はすべての雑種品種・系統において両親よりも発現レベルが顕著に高いことが示された (Table 2)。

Expression patterns	Pre-ripening			Post-ripening		
	Ba_Line1_Os	Ba_Line2_Os	LA_THY_Ok	Ba_Line1_Os	Ba_Line2_Os	LA_THY_Ok
No difference	27587(3950)	27520(4170)	27489(5429)	23977(4844)	23384(4677)	26021(5955)
Additive	360	266	197	288	347	203
	268	182	282	645	702	997
Hybrid up	763	510	1564	623	770	1430
	38	31	192	31	45	60
Hybrid down	71	66	67	75	48	47
	1185	1479	1414	1763	1717	749
parental dominance	113	163	147	153	92	33
	202	322	84	473	495	235
parental dominance	1848	1760	1204	1228	1494	1208
	1703	1934	1598	3760	4254	3487
	1325	1137	1934	1678	1381	2217
	2081	2271	1336	1929	1665	659

Fig. 1 Gene expression profile in the fruit. Genes with TPM (0, no expression) is shown in parenthesis.

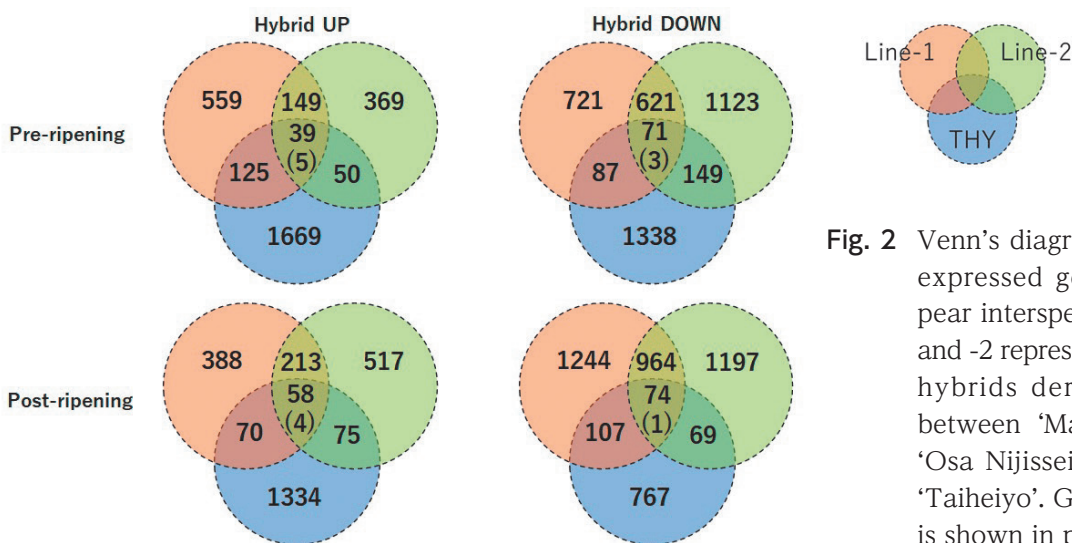


Fig. 2 Venn's diagrams of differentially expressed genes in the fruit of pear interspecific hybrids. Line-1 and -2 represents two interspecific hybrids derived from a cross between ‘Max Red Bartlett’ and ‘Osa Nijisseiki’. THY represents ‘Taiheiyo’. Genes with TPM (>5) is shown in parenthesis.

Table 2 Highly expressed genes in hybrids in the post-ripening fruits

Gene ID	Homolog in Arabidopsis	function
Ppy07g2230.1	AT5G05730.1	anthranilate synthase alpha subunit 1
Ppy10g1858.1	AT4G16740.1	terpene synthase 03
Ppy10g1859.1	AT4G16730.1	terpene synthase 02
Ppy07g2588.1	AT1G12570.1	Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein
Ppy09g0382.1	AT5G15110.1	Pectate lyase family protein
Ppy13g0743.1	AT1G68890.1	2-oxoglutarate decarboxylase/hydrolyase/magnesium ion-binding protein

Gene ID	Max Red Bartlett	Osa Nijisseiki	La France	Okusankichi	Line-1	Line-2	Taiheiyo
Ppy07g2230.1	0	0	0	0	0.03	0.03	0.09
Ppy10g1858.1	19.66	5.37	2.96	0.55	171.67	440.81	124.66
Ppy10g1859.1	16.99	6.98	2.04	0.66	238.85	386.28	174.35
Ppy07g2588.1	0.06	0	0	0	0.39	0.33	0.26
Ppy09g0382.1	0	0	0	0	0.16	0.13	0.21
Ppy13g0743.1	0	0	0	0	0.52	0.11	0.24

4. 結論・考察

近年の農産業を取り巻く課題として、生産面では、気候変動等による新規病虫害の発生や生産物の品質低下、消費面では、オーガニック等の高付加価値生産物に対する消費者ニーズの拡大があげられる。このような課題に対して、育種面からの貢献としては遺伝的多様性の利用による新品種の開発と普及が求められており、種や属の壁を越えた遠縁交雑を利用した品種改良が重要視されている。本研究では、遠縁交雑後に生じる形質や遺伝子発現の変化を捉えるために、バラ科ナシ属の種間雑種を対象として香気成分を中心とした果実形質の評価を行うとともに、網羅的遺伝子発現解析による内的環境の変化を解析した。

その結果、雑種個体ではフルーティな香気との関連が示唆されている成分が検出され、新規香気特性への関与が推察された。一方で、果実のRNA-seq解析では、多くの遺伝子が種間交雑の影響で発現変動する可能性が示唆され、複数の雑種個体の比較によって、共通して発現変動する遺伝子を特定した。以上の結果から、これまでに知見が乏しかった遠縁交雑に伴う内的環境の変化について、果樹を研究モデルとして雑種化による共通発現遺伝子を同定し、雑種化のメカニズム解明とそれを利用した品種改良に繋がる重要な成果を得ることができた。

5. 今後の課題

今後は、匂い嗅ぎ分析等を組み合わせることで、種間交雑によって新規に合成される可能性がある原因物質の絞り込みを行う必要がある。また、雑種個体で共通して発現上昇した遺伝子の中には、果実の香気を構成するテルペンの合成に関与する遺伝子が含まれており、果実香へ及ぼす影響を詳細に解析していく必要がある。

6. Acknowledgments

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係者の皆様に心から感謝申し上げます。

7. 参考文献

- Broz, A. K.; Bedinger, P. A., 2021, Pollen-pistil interactions as reproductive barriers. *Annual Review of Plant Biology*, **72**, p. 615-639. DOI: 10.1146/annurev-arplant-080620-102159.
- Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J., 2018, fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor.

- Bioinformatics*, **34**(17), p. i884-i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- Kim, D.; Langmead, B.; Salzberg, S. L., 2015, HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, **12**(4) p. 357-360. DOI: 10.1038/nmeth.3317.
- Morimoto, T.; Kitamura, Y.; Numaguchi, K.; Akagi, T.; Tao, R., 2019, Characterization of post-mating interspecific cross-compatibility in *Prunus* (Rosaceae). *Scientia Horticulturae*, **246**, p.693-699. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.11.045.
- Morimoto, T.; Matsuda, Y.; Sekiguchi, R.; Itai, A., 2023, Comprehensive assessment of intergeneric cross-compatibility of six fruit tree species in the tribe Maleae (Rosaceae) based on in vivo pollen tube growth and field pollination. *The Horticulture Journal*, **92**(1), p.13-21. DOI: 10.2503/hortj.UTD-383.
- Shirasawa, K.; Itai, A.; Isobe, S., 2021, Chromosome-scale genome assembly of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) variety 'Nijisseiki'. *DNA Research*, **28**(2), dsab001, DOI: 10.1093/dnares/dsab001.