

水平伝播遺伝子から探る絶対寄生植物の宿主転換の歴史

History of host shift in a holoparasitic plant revealed by horizontal gene transfer

(日本植物学会推薦)

代表研究者 京都大学

高山 浩司

Kyoto University

Koji TAKAYAMA

Oceanic islands are suitable for examining the evolutionary process of organisms because insular ecosystems tend to be simpler and less harmonic than the mainland ones, and novel interactions between organisms have frequently evolved. *Orobanche boninsimae* is an holoparasitic plant endemic to the Ogasawara (Bonin) Islands. Our previous study showed that individuals of *O. boninsimae* in the Chichijima Island were mainly parasitic to *Ochrosia nakaiana* (Apocynaceae) but those in the Hahajima Islands to *Melicope grisea* (Rutaceae). In addition, its most closely related species, *O. coerulescens*, in continental regions parasites to *Artemisia capillaris* (Asteraceae). These results indicated that *O. boninsimae* had experienced drastic host shifts on the oceanic islands. In this study, we identified current-host species in newly found populations and investigated horizontally transferred genes (HGT genes) from past-host species to reveal the history of host shifts in *O. boninsimae*. By using DNA barcoding, I confirmed the difference of host species between the Chichijima and Hahajima Islands. I obtained RNA-seq reads from three different tissues, bract, stem, and flower of *O. boninsimae* in the two different islands. About 70,000 contigs for amino acid sequences of *O. boninsimae* were screened by using reference transcriptomes/proteins from divergent angiosperm lineages, and finally, five genes were identified as candidates for HGT genes.

研究目的

海洋島では、大陸における共存種が欠如していることが多いため、海洋島に進出した生物同士の新たな種間関係が結ばれることがある。海洋島に新たに進出した生物間の関係性を紐解くことは、海洋島における多様性の創出機構を理解する上で重要である。

他の植物に全ての栄養を依存する植物を絶対寄生植物と呼ぶ。絶対寄生植物が海洋島へ定着するためには、宿主となりえる植物が存在しなければならない。従って、海洋島への定着のためには、絶対寄生植物は様々な宿主から栄養を摂取することがメリットとなる。一方、進化的時間スケールの中で、宿主の防御をかいくぐり、効率的に栄養摂取を摂取するためには、特定の宿主への特異性を進化させた方が生存に有利となるだろう。このような進化的背景のもと、絶対寄生植物は宿主特異性を変化させてきたと考えられるが、実際に寄生植物の宿主特異性の変遷過程を調べた研究はほとんどなく、種内での変遷過程に着目した研究は皆無である。

本研究では、小笠原諸島に固有な寄生植物シマウツボ (*Orobanche boninsimae*) に着目した。シマウツボはハマウツボ科の絶対寄生植物で、最近縁種はハマウツボ (*Orobanche coerulescens*) であることが確かめられている (Li et al. 2017)。ハマウツボが大陸の砂浜海岸でキク科のヨモギ属植物に寄生しているのに対して、シマウツボは主にキョウチクトウ科のヤロード (*Ochrosia nakaiana*) とミカン科のオオバシロテツ (*Melicope grisea*) に寄生している。すなわち、小笠原諸島への定着過程で、シマウツボは宿主植物を変化させた可能性が高いと考えている (Nishimura et al. 2020)。また、これまでの研究でシマウツボは小笠原諸島内の父島と母島では宿主植物が異なっており、父島ではヤロード、母島ではオオバシロテツに寄生していることが知られている。従って、シマウツボは海洋島への進出時のみならず、島間でも宿主植物が変化しており、種内での寄生植物の宿主特異性の変遷過程を調べる上で、優れた研究対象であると考えられる。

本研究では、シマウツボにおける宿主転換の歴史の全貌解明に向けて、現在の宿主植物ならびに宿主植物から寄生植物への遺伝子の水平伝播の実態を網羅的に探索することを計画した。宿主植物の核内にある遺伝子が、寄生植物に水平伝播していることは、ハマウツボ科のストライガで初めて明らかとなり (Yoshida et al. 2010)、それ以来、他のハマウツボ科の植物でも発見が相次いでいる (Sun et al. 2016; Kado & Innan 2018)。本研究では、現在の宿主植物の同定に加えて、過去の宿主植物の痕跡として水平伝播遺伝子を捉えることを目的とする。

研究経過

シマウツボの宿主植物の変遷過程を明らかにするために、1. 小笠原諸島での野外調査、2. 現在の宿主植物の同定、3. RNA-seq による水平伝播遺伝子の網羅的探索を計画した。各項目の研究経過は以下の通りである。

1. 小笠原諸島での野外調査

2019 年までの調査で、父島 8 箇所、母島 3 箇所ですべての個体群を確認していた。2020~2021 年の調査で、新たに父島で 3 か所、母島で 1 箇所の個体群を発見することができた。新たに発見した個体群から、シマウツボならびにその宿主植物の根の一部を採集し、宿主植物の同定に用いた (Fig. 1)。

RNA 解析用に父島および母島でシマウツボの茎、苞、花の各器官と現在の宿主植物であるヤロードとオオバシロテツの葉を採集し、RNA 保存液に浸漬後、実験室に持ち帰った。加えて、京都府京丹後市から近縁種のハマウツボの茎、苞、花の各器官を採集し、同様の方法で保存した。



Fig. 1 *Orobanche boninsimae* in the Chichijima Island.

2. 現在の宿主植物の同定

シマウツボは十数メートル離れた場所に生育する宿主植物の根に寄生していることもあり、根を全て掘り起こし宿主植物にたどり着くことや、根の形態のみで宿主を同定することは極めて困難である。そこで、新たに採集した宿主植物の根について、DNA バーコーディングによる宿主植物の同定を行った。先行研究 (Nishimura et al. 2019) で有効性が確かめられている葉緑体 DNA の *trnH-psbA* 領域の約 500 塩基対を PCR-ダイレクトシーケンス法により決定し、DNA データバンクに登録されている塩基配列と相同性検索を行うことで、宿主植物を決定した。

塩基配列比較の結果、父島で採集した個体はキョウチクトウ科のヤロードに、母島で採集した個体はミカン科のオオバシロテツに寄生していることが明らかとなった。新たに発見した個体群の周囲には、父島ではオオバシロテツを含む他の種が、母島ではヤロードを含む他の種が生育していたにも関わらず、島ごとに宿主が違うことが確認できた。

3. RNA-seq による水平伝播遺伝子の網羅的探索

宿主植物とシマウツボの間での水平伝播遺伝子の存在を調べるために、RNA-seq による発現遺伝子の網羅的配列比較を計画した。野外で採集した試料から、ISOSPIN Plant RNA with Assist Buffer (ニッポン・ジーン) を用いて RNA を抽出し、日本ジーンウィズとマクロジェンで RNA-seq を実施した。

Trinity を用いて、RNA-seq の塩基配列データから転写産物の新規アセンブルを実施した。今回の対象種は同属内近縁種のリファレンスデータが存在しないため、リファレンスは用いずに新規にコンティグを作成した。得られたコンティグのうち、300 塩基対以上からなる約 9 万のコンティグを以降の解析に使用した。

得られた転写産物データの網羅性を確かめるために、BUSCO による遺伝子数のカウントを行った。真正双子葉植物のコア遺伝子 2326 個の中で、シマウツボとハマウツボの各組織では約 70~79%のコア遺伝子が検出された (Fig. 2)。苞、茎、花から得られたデータを結合した場合でも、コア遺伝子数の割合に大きな変化はなかった。一方、ヤロードとオオバシロテツの葉から抽出した RNA のみを解析に用いたが、真正双子葉植物の約 90%のコア遺伝子を検出することができた。

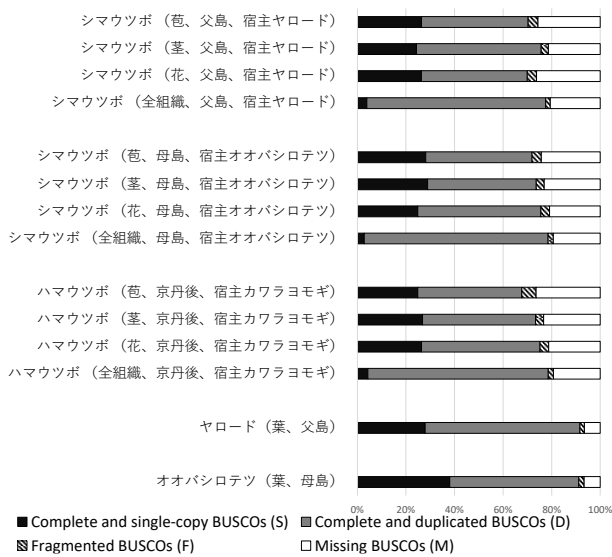


Fig. 2 BUSCOs scores in the transcriptome assembles.

次に、水平伝播遺伝子候補の絞り込みのための相同性検索を実施した。今回は検索対象の分類群をできるだけ広くするために、アミノ酸配列を用いることにした。Trinotate および TransDecoder を用いて、転写産物のデータをアミノ酸配列に変換した。シマウツボから得たアミノ酸配列データが多種のアミノ酸配列データとどの程度類似しているのかを調べるために、blastp を用いた相同性検索を行った。相同性検索の対象として、シマウツボに最も近縁な種であるハマウツボと現在の宿主であるヤロードとオオバシロテツの3種の他、被子植物の系統を広く網羅するように他9種（クスノキ科の1種 *Cinnamomum micranthum*、ナツメヤシ *Phoenix dactylifera*、ササゲ *Vigna unguiculata*、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*、オレンジ *Citrus sinensis*、ツバキ *Camellia sinensis*、レタス *Lactuca sativa*、コーヒー *Coffea arabica*、ストライガ *Striga asiatica*）を選んだ。

相同性検索の結果、シマウツボで得られたアミノ酸配列のうち約10%が、ハマウツボ以外の種と最も類似性が高いという結果を得た。これら10%のアミノ酸配列の中には、ハマウツボでアミノ酸配列が得られなかったものや、部分配列の一致度の高さでハマウツボ以外の種との高い類似性が検出されたものも含まれていると想定される。そこで、ハマウツボ以外の種と高い類似性を示すアミノ酸配列の中から、100個以上のアミノ酸からなり、かつ90%以上の類似性を示すアミノ酸配列約200~250個を水平伝播遺伝子候補として扱うことにした。

blastp 検索と平行して、Orthofinder による相同性

子群の検出を行った。これにより得られたアミノ酸配列を相同性子群にまとめ、各遺伝子系統樹を作成することができる。解析には blastp 検索に用いた全ての種の全てのアミノ酸配列データを含めた。その結果、68,821個の相同性子群が検出され、各遺伝子群の遺伝子系統樹を取得することができた。

Orthofinder で作成した遺伝子系統樹の中で、blastp 検索の結果、水平伝播遺伝子の候補となったアミノ酸配列を含む系統樹74個について、その樹形の確認を行った。樹形をA~Cの3通りに大別し (Fig. 3)、水平伝播遺伝子とは判断できないものが4個 (A)、水平伝播遺伝子の可能性があるものが12個 (B)、どちらも判断できないものが58個 (C) となった。

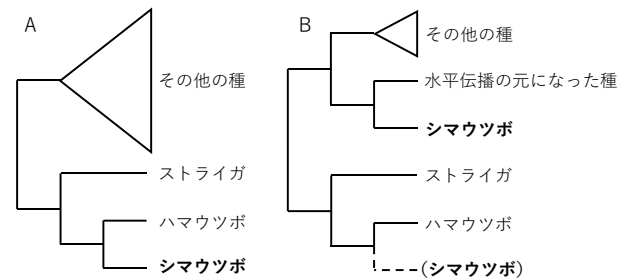


Fig. 3 Expected gene tree. A, species tree; B, typical gene trees expected for horizontal gene transfer genes.

Orthofinder の相同性子群のうち、水平伝播遺伝子の可能性がある12個の遺伝子について、DNAデータベースに登録されている全情報との相同性検索を行った。相同性検索にはアミノ酸配列とそのもととなった塩基配列を使用した。その結果、7個の遺伝子はハマウツボ科の植物と少なからぬ類似性を示したため、水平伝播遺伝子の候補からは除外した。残りの5個の遺伝子のうち3個は既存データベースでは高い類似性を示す配列が見つからず、2個は60~70%にあたる部分配列がハマウツボ科以外の複数の種と高い類似性を示すことが明らかとなった。

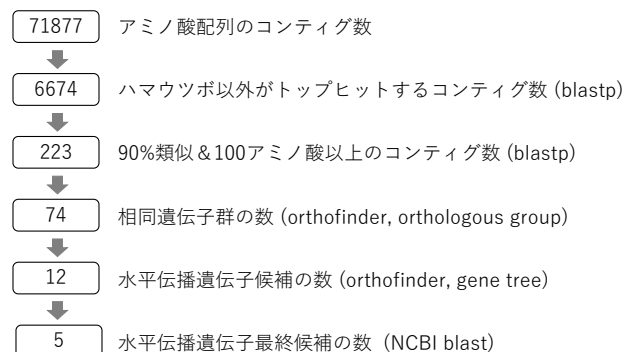


Fig. 4 Screening scheme for horizontal gene transfer genes.

考察

今回の調査で、新たに父島と母島にて新規に4個体群を発見することができた。シマウツボは小笠原諸島にのみ生育する固有種で、環境省レッドリストでも絶滅危惧 IA 類に指定されている絶滅危惧植物であるため、本情報は保全上重要なデータとなる。

RNA-seq の結果、全寄生植物であるシマウツボやハマウツボの地上部の組織（茎、苞、花）では、真正双子葉植物のコア遺伝子の7割程度しか検出できなかった。ヤロードやオオバシロテツの解析では、葉組織のみを使ったにも関わらず、90%以上のコア遺伝子が検出できている。シマウツボやハマウツボで7割程度しか検出できなかった要因として、地下部組織（根や吸器、種子）において特異的に発現している遺伝子が多い可能性が考えられる。また、シマウツボはゲノムサイズが大きい（6.7 Gb, Li et al. 2019）、一部の遺伝子では計算上コンティグが形成できなかったのかもしれない。さらに、シマウツボやハマウツボでは、寄生生活を送るために光合成や代謝に関連した遺伝子が大きく変化したり、欠如したりして、他の真正双子葉植物で見られるようなコア遺伝子を持っていないという可能性も考えられる。今後は、地下部の組織から作出した RNA-seq データを解析に加えるとともに、各遺伝子の機能に着目してコア遺伝子の在不在を確認することが必要である。

水平伝播遺伝子の探索の結果、約 90,000 遺伝子座（アミノ酸のコンティグで約 70,000 個）の中から5個の遺伝子が最終候補として残った。同じハマウツボ科のヤセウツボ（*Orobanche minor*）の先行研究（Kado & Innan 2018）では、28,254 遺伝子座のうち22 遺伝子座が水平伝播遺伝子の候補として挙げられている。ヤセウツボの研究では、水平伝播遺伝子のソース候補をマメ科植物に限定することで、塩基配列を用いた水平伝播遺伝子の絞り込みを行っている。一方、本研究では、シマウツボの最近縁種の宿主植物がキク科の植物であることや、現在の宿主もキョウチクトウ科やミカン科の植物と系統的に多様であるため、できるだけ広範な相同性の検出ができるように、アミノ酸配列を用いて解析を進めていった。今回の研究で水平伝播遺伝子の可能性がある5個の遺伝子を見出したが、そのうち3個は既存データベースでは類似性を示す配列が見つからず、2個も全長配列ではなく60~70%にあたる部分配列がハマウツボ科以外の植物と高い類似性を示すということま

での検証に現在は留まっている。確実に水平伝播遺伝子であると断言するためには、データ取得後の解析手法の改善と深化が必要であると考えている。さらに、今後は小笠原諸島の森林を形成する主要樹種に関して、網羅的に RNA-seq のデータを取得し解析に含めることで、解析の精度だけでなく具体的な過去の宿主植物の洗い出しができることを期待している。

寄生植物から宿主植物へ水平伝播している可能性がある遺伝子もいくつか見つかった。最終候補の74個の遺伝子系統樹のうち、13個の遺伝子系統樹はシマウツボから現在の宿主に遺伝子が水平伝播していると解釈しても矛盾がない樹形を示している。今後は、双方向の水平伝播の可能性を考慮した上で、水平伝播遺伝子の探索を行っていきたい。

参考文献

1. Kado and Innan, Horizontal gene transfer in five parasite plant species in Orobanchaceae, *Genome Biology and Evolution*, 10, 2018.
2. Li et al., Molecular and karyological data confirm that the enigmatic genus *Platypholis* from Bonin-Islands (SE Japan) is phylogenetically nested within *Orobanche* (Orobanchaceae). *Journal of Plant Research*, 130, 273-280, 2017.
3. Nishimura et al., DNA Barcoding reveals evolutionary changes in host specificity of a parasitic plant, *Orobanche boninsimae* (Orobanchaceae), endemic to the Bonin (Ogasawara) Islands, *Pacific Science*, 74, 87-97, 2020.
4. Yoshida et al., Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science*, 328, 1128, 2010.
5. Sun et al., Two hAT transposon genes were transferred from Brassicaceae to broomrapes and are actively expressed in some recipients. *Scientific Reports*, 6, 30192, 2016.

研究の発表

口頭発表

1. 高山浩司:小笠原諸島の自然環境と固有植物、日本植物学会第85回大会、2021年9月
2. 西村明洋、高山浩司:海洋島におけるハマウツボ属寄生植物の送粉者シフト、日本植物分類学会第21回大会、2021年3月