

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05614

研究課題名(和文)アブラナ科植物の雑種強勢関連領域の同定

研究課題名(英文)Identification of hybrid vigor related loci in Brassica

研究代表者

藤本 龍 (FUJIMOTO, RYO)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60620375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサイの雑種強勢の分子機構の解明を目指して、遺伝学的解析、エピゲノム解析、及びトランスクリプトーム解析を行った。遺伝学的な解析では、両親系統間の遺伝距離と雑種強勢には相関が見られないことを明らかにした。そして、QTL解析により、播種後14日の葉面積の大きさや収量に関わるQTLを同定した。エピゲノム解析では、両親系統とF1について、DNAメチル化及びヒストンの化学修飾状態を比較した。トランスクリプトーム解析では、RNA-sequencingにより、両親系統とF1で発現レベルが異なる遺伝子を同定し、播種後2日では、葉緑体ターゲット遺伝子の発現がF1で高くなることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両親系統間の遺伝距離と雑種強勢の関連性については様々な植物種で議論されているが、少なくとも本研究によりハクサイでは、両親系統間の遺伝距離を指標に雑種強勢の発現を予測できないことを示した。これにより、雑種強勢は、ある特定領域のヘテロ接合性が重要であると予想される。本研究により、雑種強勢が見られる形質について複数のQTLを同定した。今後、これらの領域について更なる解析を進めることで、雑種強勢に重要な遺伝子領域の同定へと繋がれば、DNAマーカー等により両親系統の選抜や両親系統の組合せ能力検定にかかるコストと労力の軽減が期待され、その社会的な意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of hybrid vigor in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*), we performed genetic, epigenome, and transcriptome analyses. We showed that genetic distance of parental lines was not associated with the level of hybrid vigor. QTLs of leaf area at 14 days after sowing or yield were identified. We characterized the epigenetic states such as DNA methylation or histone modification at the whole genome level in the F1 hybrid and its parental lines. We identified differentially expressed genes between parents and their F1 hybrid by RNA sequencing, and chloroplast-targeted genes tended to be upregulated in F1 hybrid compared to the parental lines at 2 days after sowing.

研究分野：園芸学

キーワード：雑種強勢 ヘテロシス エピジェネティクス エピゲノム トランスクリプトーム アブラナ科 QTL DNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動植物では、同一種内のある組合せの両親系統間の交雑によって得られた一代雑種 (F_1) 個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢 (ヘテローシス) という現象が知られている。雑種強勢は、農作物の育種改良 (高収量性等) において重要な遺伝現象であり、現在、数多くの農作物において、一代雑種品種が育成されている。植物の雑種強勢研究は、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、トマト等で、QTL 解析、転写解析、エピゲノム解析、メタボローム解析等が行われている。しかし、どの植物種においても、完全に雑種強勢の分子機構を説明するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科野菜であるハクサイ (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*) を用いて、遺伝学的解析、エピゲノム解析、及び、トランスクリプトーム解析の結果を統合し、雑種強勢の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的な解析

- 両親系統の遺伝距離を SSR マーカー、CAPS マーカー、RAD-seq による多型解析で調べた。32 組合せの F_1 とそれらの両親系統について、播種後 6 日の子葉サイズと播種後 21 日の本葉のサイズ及び、収量について調査し、雑種強勢の程度を調べ、遺伝距離と雑種強勢の関連性について調べた。
- 市販 F_1 品種の両親系統について、全ゲノムリシーケンスを行った。
- 市販 F_1 品種由来の F_2 集団を用いて、播種後 6 日の子葉サイズ、播種後 14 日の本葉サイズ、収量に関わる QTL 解析を行った。

(2) トランスクリプトーム解析

- 市販 F_1 品種とその両親系統について、RNA-sequencing (RNA-seq) を行った。また、RNA-seq と同一組織を用いてホルモノーム解析を行った。

(3) エピゲノム解析

- 市販 F_1 品種とその両親系統について、播種後 14 日の本葉を用いて、4 種類のヒストンの修飾状態の抗体 (H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me3) を用いて、ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) を行った。
- 市販 F_1 品種とその両親系統について、MeDIP-seq (Methylated DNA immunoprecipitation sequencing) と WGBS (Whole genome bisulfite sequencing) による全ゲノム DNA メチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝距離と雑種強勢

ハクサイ近交系 24 系統と優良親系統 6 系統を交配して得られた 32 組合せの F_1 について、播種後 6 日の子葉と播種後 21 日の本葉の面積、及び収量について調べた。両親系統については、SSR マーカーや CAPS マーカーを用いた遺伝子型判定や、RAD-seq により、

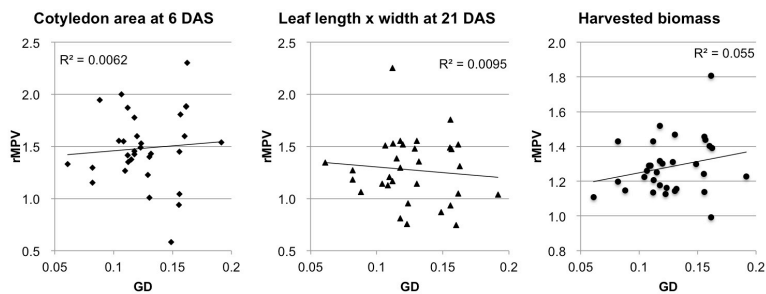


図1. 遺伝距離 (GD) と雑種強勢の程度 (rMPV) との関連性

系統間の遺伝距離を算出した。そして、形質調査を元に算出した雑種強勢の程度と遺伝距離との関係を調べたところ、どの形質においても相関が見られなかった (図 1)。よって本研究より、ハクサイでは、両親系統間の遺伝距離を指標に雑種強勢が現れる親系統を選抜することは難しいことが明らかとなった (Kawamura *et al.* 2016)。

(2) ハクサイ市販品種の両親系統の全ゲノムリシーケンス

ハクサイ市販品種の両親系統について全ゲノムリシーケンスを行い、両親系統間で 98 万ヶ所の SNPs を同定した。SNPs のうち、種子親に少なくとも 1 ヶ所以上の非同義置換を持つ遺伝子の数は 8,558 / 41,020 であり、花粉親に少なくとも 1 ヶ所以上の非同義置換を持つ遺伝子の数は 8,473 であった。さらに、アミノ酸組成に大きな影響を及ぼす可能性が高い SNPs 或は indels (ミスセンス変異、ナンセンス変異等) を同定した結果、種子親では 1,492 遺伝子が、花粉親では 1,561 遺伝子が見出された。さらに、両親系統間の多型が、制限酵素 *Eco* RI サイトに存

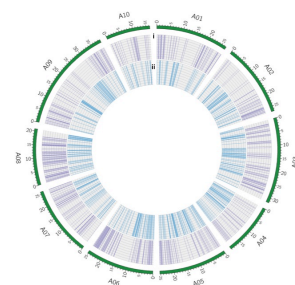


図2. 制限酵素 *Eco* RI サイトに存在する SNPs の染色体上の位置。(i) 種子親 (ii) 花粉親

在するものをおよそ 1,500 ヶ所同定し (図 2)、簡便に遺伝子型判定ができる CAPS マーカーセットを 67 個作製した。作製した DNA マーカーと 96 個体の F₂ 分離集団を用いて連鎖地図を作製した結果、連鎖地図上の DNA マーカーの配置とリファレンスゲノム上での DNA マーカーの配置が一致したことから、作製した DNA マーカーは今後の連鎖解析に利用できることが明らかとなった (Shea *et al.* 2018)。

(3) QTL 解析

ハクサイ市販 F₁ 品種由来の F₂ 分離集団 140 個体を用いて、初期生育の形質として子葉の面積 (播種後 6 日) や本葉の面積 (播種後 14 日)、生育後期の形質として収量を調べた。そのうち、96 個体の F₂ について、SSR マーカーと CAPS マーカーを用いて遺伝子型の判定を行い、さらに、RAD-seq 法による遺伝子型の判定を行った。得られた遺伝子型情報を元に、276 個の DNA マーカーが座乗した、合計 1269cM の連鎖地図を作製した。さらに遺伝子型の情報と表現型の情報から QTL 解析を行った。初期生育については 合計 3 回の独立な QTL 解析を行い、2 回で共通してみられた QTL を 1 つ見出した。収量においては、2016 年度の解析において合計 10 箇所の QTL を検出した。2017 年度と 2018 年度においても F₂ 分離集団 140 個体の圃場試験による収量調査を行っており、QTL 解析を進めている。

(4) 転写解析

ハクサイ市販 F₁ 品種‘W39’とその両親系統 (種子親 S27, 花粉親 R29) について、植物の初期生育の形質について調べた。F₁ では播種後数日の子葉面積が両親系統に比べて大きく、本葉についても面積が大きいことが明らかになった。また、40 種類以上の植物ホルモンの内生含量を両親系統と F₁ で比較した結果、多くの植物ホルモン含量は、F₁ では両親の中間型を示すことが分かった。初期生育に着目して、植物サイズに関わる遺伝子や葉緑体で働く遺伝子 (12 遺伝子) を選抜して qPCR により両親と F₁ で発現量を調べた結果、F₁

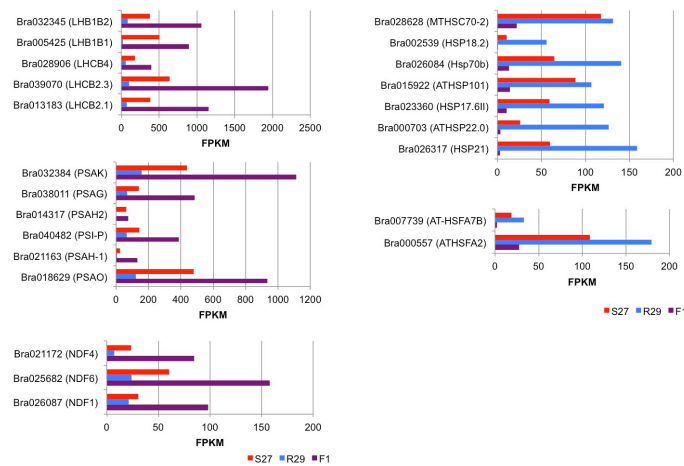


図3. F₁で発現が増加した遺伝子 (左側)と減少した遺伝子 (右側)

では、播種後 2 日において、葉緑体ターゲット遺伝子の発現レベルが両親系統よりも高かった。そこで RNA-seq により、ゲノムワイドに両親系統と F₁ で遺伝子の発現レベルを比較した結果、光合成や葉緑体局在の遺伝子が有意に F₁ で発現レベルが高くなる傾向が見られた (図 3 左)。また、ストレス応答関連遺伝子の発現が F₁ では両親系統に比べて低くなる傾向にあることが明らかとなった (図 3 右) (Saeki *et al.* 2016)。

(5) エピゲノム解析

ハクサイ市販 F₁ 品種と両親系統について、ヒストンの修飾状態や DNA メチル化レベルをゲノムワイドに比較した。

ハクサイで ChIP を行う為に必要な実験条件を確立し、論文として発表した (Kawanabe *et al.* 2016)。そして 4 つのヒストン修飾状態についての ChIP-seq を行い、両親系統と F₁ で比較した結果、ヒストンの修飾状態は系統間差が小さく、また、F₁ は両親系統の中間型を示す傾向にあることが明らかとなった。

両親系統と F₁ についてゲノムワイドに DNA のメチル化レベルを比較する為に、MeDIP-seq を行った。両親系統間で DNA メチル化レベルが異なる領域を明らかにした。また、同一組織の RNA-seq の結果と比較し、DNA のメチル化と遺伝子発現の関連性を調べたところ、遺伝子領域の DNA のメチル化は遺伝子の発現抑制と関連性が見られた。両親系統で遺伝子の発現レベルが異なる遺伝子では、両親系統の DNA のメチル化レベルが異なる傾向にはないことから、遺伝子の発現レベルの系統間差異は、DNA のメチル化とは独立で制御されている可能性が示唆された (Takahashi *et al.* 2018a)。

DNA のメチル化レベルの定量性を向上させる為に WGBS を両親系統と F₁ で実施した。まず、片親系統について解析し、DNA のメチル化レベルと遺伝子の発現レベルには負の相関が見られ、特に遺伝子領域の CHG や CHH サイトのメチル化レベルと遺伝子の発現レベルには負の相関傾向があることが明らかとなった (Takahashi *et al.* 2018b)。さらに、両親系統と F₁ の DNA メチル化レベルを比較し、F₁ で非相加的な DNA メチル化レベルを示す遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- ① Miyaji N, Fujimoto R. (2018) Hybrid Vigor: Importance of epigenetic processes and consequences for breeding. *Adv Bot Res* 88: 247-275. doi: 10.1016/bs.abr.2018.10.001
- ② Shea DJ, Shimizu M, Itabashi E, Miyaji N, Miyazaki J, Osabe K, Kaji M, Okazaki K, Fujimoto R. (2018) Genome re-sequencing, SNP analysis, and genetic mapping of the parental lines of a commercial F₁ hybrid cultivar of Chinese cabbage. *Breed Sci* 2018 68: 375-380. doi: 10.1270/jsbbs.17124
- ③ Takahashi S, Fukushima N, Osabe K, Itabashi E, Shimizu M, Miyaji N, Takasaki-Yasuda T, Suzuki Y, Seki M, Fujimoto R. (2018a) Identification of DNA methylated regions by using methylated DNA immunoprecipitation sequencing in *Brassica rapa*. *Crop & Pasture Sci* 69: 107-120. doi: 10.1071/CP17394
- ④ Takahashi S, Osabe K, Fukushima N, Takuno S, Miyaji N, Shimizu M, Takasaki-Yasuda T, Suzuki Y, Dennis ES, Seki M, Fujimoto R. (2018b) Genome-wide characterization of DNA methylation, small RNA expression, and histone H3 lysine nine di-methylation in *Brassica rapa* L. *DNA Res* 25: 511-520. doi: 10.1093/dnares/dsy021
- ⑤ Fujimoto R., Uezono K, Ishikura S, Osabe K, Peacock WJ, Dennis ES. (2018) Recent research on the mechanism of heterosis is important for crop and vegetable breeding systems. *Breed Sci* 68: 145-158. doi: 10.1016/bs.abr.2018.10.001
- ⑥ 藤本 龍 (2017) アブラナ科植物におけるゲノム多様性および雑種強勢に関する研究、育種学研究 19: 116-123. doi: 10.1270/jsbbr.19.116
- ⑦ Itabashi E, Osabe K, Fujimoto R., Kakizaki T. (2017) Epigenetic regulation of agronomical traits in Brassicaceae. *Plant Cell Rep* 37: 87-101. doi: 10.1007/s00299-017-2223-z
- ⑧ Tonosaki K, Osabe K, Kawanabe T, Fujimoto R. (2016) The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed Sci* 66: 333-349. doi: 10.1270/jsbbs.15114
- ⑨ Kawanabe T, Osabe K, Itabashi E, Okazaki K, Dennis ES, Fujimoto R. (2016a) Development of primer sets that can verify the enrichment of histone modifications, and their application to examining vernalization-mediated chromatin changes in *Brassica rapa* L. *Genes Genet Syst* 91: 1-10. doi: 10.1266/ggs.15-00058.
- ⑩ Kawanabe T, Ishikura S, Miyaji N, Sasaki T, Wu LM, Itabashi E, Takada S, Shimizu M, Takasaki-Yasuda T, Osabe K, Peacock WJ, Dennis ES, Fujimoto R. (2016b) Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E6704-E6711. doi: 10.1073/pnas.1613372113
- ⑪ Saeki N, Kawanabe T, Ying H, Shimizu M, Kojima M, Abe H, Okazaki K, Kaji M, Taylor JM, Sakakibara H, Peacock WJ, Dennis ES, Fujimoto R. (2016) Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. *BMC Plant Biol* 16: 45. doi: 10.1186/s12870-016-0734-3
- ⑫ Kawamura K, Kawanabe T, Shimizu M, Nagano AJ, Saeki N, Okazaki K, Kaji M, Dennis ES, Osabe K, Fujimoto R. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis (2016) *Plant Gene* 5: 1-7. doi: 10.1016/j.plgene.2015.10.003

〔学会発表〕 (計 25 件)

- ① Fujimoto R., Akter A, Takahashi S, Takasaki-Yasuda T, Suzuki Y, Dennis ES, Seki M, Characterization of epigenetic states in *Brassica rapa* L., *Brassica* 2018, 2018
- ② 上園 倅輔、シェア ダニエル、清水 元樹、板橋 悦子、ハサン メエラジ、岡崎 桂一、安田 (高崎) 剛志、藤本 龍、ハクサイ初期生育期における子葉および本葉サイズ関連遺伝子の探索、日本育種学会第 134 回講演会 2018
- ③ 上園 倅輔、Shea Daniel、清水 元樹、板橋 悦子、宮路 直美、岡崎 桂一、安田 (高崎) 剛志、藤本 龍、ハクサイ市販品種'W77'の両親系統間リシークエンスによる片親特異的遺伝子変異の同定、園芸学会平成 30 年度春季大会 2018
- ④ 藤本 龍、アブラナ科植物におけるゲノム多様性および雑種強勢に関する研究、日本育種学会第 131 回講演会、2016
- ⑤ Fujimoto R., Shimizu M, Miyaji N, Takada S, Fukushima N, Kaji M, Peacock WJ, Dennis ES, Characterization of early developmental and yield heterosis in Chinese cabbage. *Brassica* 2016, 2016
- ⑥ 藤本 龍、川辺 隆大、アブラナ科の雑種強勢の分子機構の解明を目指した後成遺伝学的なアプローチ、日本遺伝学会第 87 大会、2015

〔その他〕

http://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2017_04_07_03.html

http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_10_11_02.html

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：加治 誠

ローマ字氏名：(KAJI, makoto)

研究協力者氏名：川辺 隆大

ローマ字氏名：(KAWANABE, takahiro)

研究協力者氏名：板橋 悦子

ローマ字氏名：(ITABASHI, etsuko)

研究協力者氏名：宅野 将平

ローマ字氏名：(TAKUNO, shohei)

研究協力者氏名：清水 元樹

ローマ字氏名：(SHIMIZU, motoki)

研究協力者氏名：関 原明

ローマ字氏名：(SEKI, motoaki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。