

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18636

研究課題名(和文) アブラナ科野菜における遺伝子重複とゲノムインプリント遺伝子の出現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of generation mechanism of genomic imprinting genes in Brassica

研究代表者

川邊 隆大 (KAWANABE, Takahiro)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：40544507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムインプリンティングとは、ある対立遺伝子が父親から由来したか母親から由来したかに応じて遺伝子発現の有無が決定される現象のことであり、おもに哺乳動物と被子植物において見つかっている。本研究では、*Brassica rapa*を用いて、網羅的なインプリント遺伝子の同定と胚乳におけるゲノム全体のDNAメチル化状態を明らかとすることを目的として研究を行った。*B. rapa*におけるインプリント遺伝子の数は、これまで報告されている近縁種よりも多いことが明らかとなった。

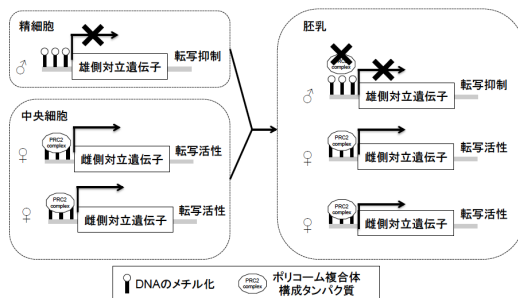
研究成果の概要(英文)：Uniparental gene expression, observed in both animals and plants, is referred to as genomic imprinting. The aim of this research is to elucidate the generation mechanism of genomic imprinting in *Brassica rapa*, a species related to *Arabidopsis thaliana*. We examined the gene expression and DNA methylation status at the whole genome level. We found that the number of imprinting genes in *B. rapa* is larger than the numbers of those reported in previous studies in related species.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：エピゲノム 遺伝子発現制御 ゲノムインプリンティング アブラナ科

1. 研究開始当初の背景

ゲノムインプリンティングとは、ある対立遺伝子が父親から由来したか母親から由来したかに応じて遺伝子発現の有無が決定される現象のことであり、おもに哺乳動物と被子植物において見つかっている。その機構は、主に DNA のメチル化とヒストンタンパク質の修飾が協調的に働くことによりエピジェネティックな制御を受けていると考えられている(参考図)。これまでにシロイヌナズナ、イネ、トウモロコシで同定されたインプリント遺伝子はオーソログなどの関係が見られるものが少なく、高い多様性が存在していた。これら種間で見られたインプリント遺伝子の多様性は種子の多様な表現型に寄与している可能性も考えられている(Bai and Settles, 2015, *frontiers in Plant Science*)。しかし、いくつかのインプリント遺伝子は種子発達に影響を及ぼさない事も示されており、植物において、インプリンティングがどのような生物学的意義があるかは議論が分かれている。本研究で用いる *Brassica rapa* は、日本で主要な野菜であるコマツナ、ハクサイ、カブなどが含まれており、同一種内で形態的に多様な植物が存在し、魅力的な材料である。また、モデル植物のシロイヌナズナと近縁の種であることから、シロイヌナズナの研究例(Gehring M. *et al.* 2011, *PLoS One*; Hsieh TF. *et al.* 2011, *PNAS*)と比較するのに適した材料である。



参考図. 植物におけるゲノムインプリンティング
DNAのメチル化とヒストンの修飾状態(ポリコム複合体構成タンパク質 PRC2 が関与)が胚乳の基となる精細胞、中央細胞で異なるため、胚乳での対立遺伝子の発現様式が違いが生じる。

2. 研究の目的

本研究は、アブラナ科野菜の *B. rapa* を用いて、網羅的なインプリント遺伝子の同定と胚乳におけるゲノム全体の DNA メチル化状態を明らかとすることを目的とする。本研究で用いる *B. rapa* はゲノム内で3倍体化が起きており、その近縁種であるシロイヌナズナに比べて遺伝子重複が多く見られる。このことから、*B. rapa* はインプリンティングと遺伝子重複の関連性を調べるのに適しており、重複したオーソログ間の遺伝子発現状態とそのエピジェネティックな修飾状態との関連性も調べることが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1)インプリント遺伝子の同定

異なる系統間で相互交配を行い、未成熟な

種子から胚乳を摘出し、胚乳におけるゲノム全体の転写情報を、RNA-sequencing(RNA-seq)法を用いて調べる。RNA-seq 法とは、転写産物の塩基配列を次世代シーケンサーで直接決定し、その配列をリファレンス配列にマッピングし、そのリード数を元に転写量を換算する方法である。この方法は、塩基配列を直接決定するため、転写産物に存在する両親間の SNP により、両親の対立遺伝子の発現量を検出することが出来る。RNA-seq により二方向の交雑胚乳から得られた転写情報を比較解析することによりインプリント遺伝子の同定を行う。

(2)RT-PCR による確認作業

胚乳において、それぞれの候補遺伝子について RT-PCR を行い、その RT-PCR 産物の塩基配列を決定する。系統間に存在する SNP を指標に、雄側雌側のどの対立遺伝子が発現しているかを決定し、候補遺伝子がインプリンティングな制御を受けているか確認する。

(3)アブラナ科植物のインプリント遺伝子との比較

これまでに報告されているアブラナ科植物のインプリント遺伝子と、*B. rapa* の結果を比較解析する。

(4)組織・時期特異的なインプリント遺伝子

見いだしたインプリント遺伝子について、胚、胚乳、幼植物体、葉、花序などの様々な組織において、遺伝子発現やエピジェネティックな修飾状態を調べる。

(5)胚乳におけるエピジェネティックな修飾状態の解析

全ゲノムバイサルファイトシーケンス(WGBS)解析による DNA メチル化状態の比較解析を行う。

4. 研究成果

(1)インプリント遺伝子の同定

B. rapa の異なる系統を用いて相互交配し、インプリント遺伝子の同定を行った。その結果、母親特異的発現をする遺伝子(MEG)が200個以上、父親特異的発現をする遺伝子(PEG)が80個以上同定された。この数は、これまで報告されているインプリント遺伝子の数よりも多かった。この同定数の結果が系統特異的な可能性を排除するため、さらに2系統を加え、全4系統を用いて全ての交配組み合わせでのインプリント遺伝子の同定を現在試みている。これらの解析により、*B. rapa* 種内におけるインプリント遺伝子の多様性、保存性が明らかになると考えられる。

(2)RT-PCR による確認

インプリント遺伝子として同定された遺伝子について SNPs を挟むようにプライマー

を作成し、RT-PCR 産物をシーケンスし、雄側雌側のどの対立遺伝子が発現しているかを確認した。その結果、調べた 8 遺伝子の全てがインプリント遺伝子であることが確認できた(図 1)。

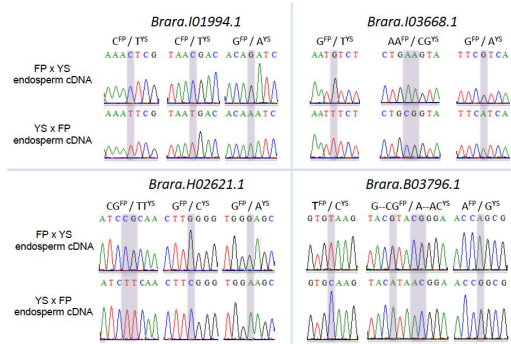


図1. シークエンスによるインプリント遺伝子の確認

(3) アブラナ科植物のインプリント遺伝子との比較

これまでアブラナ科植物では、MEG はシロイヌナズナ 39~285 個、*A. lyrata* 35 個、*C. rubella* 77 個、PEG ではシロイヌナズナ 10~103 個、*A. lyrata* 49 個、*C. rubella* 52 個が報告されている。これらのオーソログのうち、今回同定したインプリント遺伝子は保存されているものが少ないことが明らかとなった。

(4) 組織・時期特異的なインプリント遺伝子

B. rapa の 1 系統を自家交配し、交配後 10 日、13 日、17 日の種子、葉、茎、花序において RNA-seq 法による全ゲノム転写解析を行った。シロイヌナズナなどで報告されているインプリント遺伝子は、胚乳特異的に発現していることが知られているが、本研究で同定されたインプリント遺伝子は胚乳特異的に発現しているものもあったが、他の組織で発現している遺伝子も存在していた。WGBS の解析を進めていくことにより、DNA のメチル化状態と遺伝子発現状態との関連性について調べていく予定である。

(5) 胚乳におけるエピジェネティックな修飾状態の解析

B. rapa の 2 系統(交配親として使用)とその相互交配から得られた胚乳組織を用いて、WGBS を行い、シーケンスを決定した(表 1)。得られたシーケンスを *B. rapa* のリファレンスゲノムにマッピングし、定量化することで DNA のメチル化状態が明らかになる。現在得られたシーケンスを解析中である。

表1 WGBSのシーケンスリード数と配列長

	Yields Mbases	# Reads	% of >=Q25 Bases (PF)
FP-1	9,264	61,354,871	96.1
FP-2	10,699	70,859,078	95.9
FPxYS-1	10,449	69,203,159	94.2
FPxYS-2	10,756	71,236,622	94.3
YS-1	13,068	86,548,106	96.2
YS-2	10,437	69,122,319	95.6
YSxFP-1	9,561	63,318,063	96.1
YSxFP-2	12,393	82,077,472	95.7

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 6 件)

Kawamura K, Shimizu M, Kawanabe T, Pu Z, Kodama T, Kaji M, Osabe K, Fujimoto R, Okazaki K. Assessment of DNA markers for seed contamination testing and selection of disease resistance in cabbage. *Euphytica*. 213: 28. (2017) 査読有り

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. Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(43):E6704-E6711. (2016) 査読有り <https://doi.org/10.1073/pnas.1613372113>

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. Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. *BMC Plant Biol*. 16:45. (2016) 査読有り

Kawanabe T, Osabe K, Itabashi E, Okazaki K, Dennis ES, Fujimoto R. 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):1-10. (2016) 査読有り

Tonosaki K, Osabe K, Kawanabe T, Fujimoto R. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed Sci*. 66(3):333-349. (2016) 査読有り

Furihata HY, Suenaga K, Kawanabe T, Yoshida T, Kawabe A. Gene duplication, silencing and expression alteration govern the molecular evolution of PRC2 genes in plants. *Genes Genet Syst*. 91(2):85-95. (2016) 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

川邊隆大 他、*Brassica rapa* におけるゲノムインプリント候補遺伝子の探索、日本育種学会第131回講演会、名古屋大学(愛知県名古屋市)(2017)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川邊 隆大 (KAWANABE, Takahiro)
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教
研究者番号：40544507