

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21313

研究課題名（和文）アブラナ科葉根菜における春化要求性改変への挑戦

研究課題名（英文）A challenge to modify the vernalization requirement of root and leaf vegetables of 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アブラナ科野菜の低温要求性を人為的に制御することを目的とした。4種類の極晩抽性系統を見出し、そのうち1つの極晩抽性系統では、BrFLC2とBrFLC3遺伝子の第一イントロンに挿入配列が見られ、この領域が高度にDNAメチル化されていることを明らかにした。さらに、挿入配列のDNAメチル化がこれらの遺伝子が低温応答できない要因である可能性を示した。また、シロイヌナズナを用いて、FLC遺伝子座のヒストン修飾を改変するエピゲノム編集用のベクターを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科野菜において、低温要求性は品種開発において重要な形質である。栽培中には、低温により、とう立ちが起こると商品価値が損なわれるため、高い低温要求性を示す品種開発が求められている。しかし一方で、低温要求性を大きくすれば、花を咲かせるのに時間がかかり、品種開発の効率が悪くなる。本研究成果は低温要求性を人為的に改変することで、品種開発を効率的に行う技術開発へと発展する可能性が期待されることから、社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to artificially control the low-temperature requirement of Brassica vegetables. In this study, we found four extremely late-bolting lines, one of which had an insertion in the first intron of the BrFLC2 or BrFLC3 gene. These inserted regions were highly DNA methylated. We suggest that DNA methylation in the inserted regions of these two genes are the possible cause of the decreased cold response. We also constructed a vector for epigenome editing using Arabidopsis thaliana to modify histone modifications at the FLC locus.

研究分野：園芸学

キーワード：アブラナ科 春化 晩抽性 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アブラナ科葉根菜 (*Brassica rapa* 種, ハクサイ、コマツナ、カブ; *Brassica oleracea* 種, キャベツ) の花成誘導は、一定期間の低温を必要とする。アブラナ科葉根菜では、栽培中に低温に遭遇し、花芽が形成されると、薑立ちによって商品価値が損なわれる。そのため、花成誘導に長期間の低温を必要とする (=>低温要求性が大きい) 品種 (=>晩抽性品種) が育成されている。しかし、低温要求性を大きくすれば、その分、花成誘導に長期間の低温処理が必要となり、交配や世代促進に時間がかかってしまうといったジレンマがある。特に、キャベツは、緑植物体春化型であることから、一定期間の栄養生長を必要とするため、花成誘導により長い時間が必要となり、これにより育種スピードが制限されている。このため、品種としては、晩抽性を維持しつつ、育種の際には、早期に花成誘導できれば、画期的な技術となる。

2. 研究の目的

アブラナ科葉根菜の晩抽性は開花抑制遺伝子である *FLOWERING LOCUS C (FLC)* によってもたらされる。そして、低温要求性は、*FLC* の低温遭遇前の発現量と低温遭遇時の発現量の低下速度に大きく依存する。低温遭遇前は、*FLC* 遺伝子座には転写活性型のヒストン化学修飾 (H3K36me3) が蓄積し、*FLC* は発現し、花成誘導が抑制されている。低温に遭遇すると、転写活性型の修飾から、転写抑制型の修飾 (H3K27me3) への変換が起こり、*FLC* 遺伝子の発現が抑制され、低温遭遇期間に応じて *FLC* 遺伝子の発現量が低下していく。この H3K27me3 は、PRC2 複合体が *FLC* 遺伝子座にリクルートされることによって起こる。さらに、低温遭遇後に温度が戻ると、H3K27me3 の蓄積が *FLC* 遺伝子全体に広がることで発現抑制状態が維持され、これにより花成が誘導される。人為的に *FLC* 遺伝子の発現を抑制できれば、低温処理を行わずに、短期間で開花を促進できる可能性がある。そこで、本研究では、エピジェネティックな修飾を人為的に制御することで高い低温要求性を有していても花成誘導を引き起こす技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. rapa* 極晩抽性系統の高い低温要求性の原因解明

B. rapa 種から、低温要求性が極めて大きい晩抽性系統 (極晩抽性系統) を選抜し、*FLC* の低温応答性について調べた。さらに、エピジェネティックな修飾の阻害剤を用いることで、極晩抽性系統の *FLC* の低温要求性に及ぼす影響を調べた。

(2) エピゲノム編集

シロイヌナズナを用いて、エピゲノム編集によりヒストン化学修飾の改変を目指した。エピゲノム編集は、ゲノム編集の CRISPR-Cas9 システムを応用することで行った。通常のゲノム編集に用いられる CRISPR-Cas9 は、ガイド RNA により標的配列に DNA 切断酵素 Cas9 を誘導することで標的配列の塩基配列を変換させるが、エピゲノム編集では、標的配列に結合しても DNA を切断できない Cas9 変異体である dCAS9 (Dead CAS9) を用いた。この dCAS9 に H3K27me3 のヒストンメチル化酵素を結合し、標的配列の塩基配列を変換することなく H3K27me3 の蓄積させることを目指した。

4. 研究成果

(1) *B. rapa* 極晩抽性系統の高い低温要求性の原因解明

事前に低温要求性が高いと推定される 20 系統 (品種) について、4、6、8 週間の低温処理を行った後の開花に要する日数を調べた。ハクサイ品種の中で低温要求性が高いとされる春播き品種で花成誘導が見られる期間の低温処理を行なっても花成誘導が見られない、極めて高い低温要求性を示す 4 つの系統 (品種) (極晩抽性系統/品種) を見出した (図 1)。

この中から、一つの極晩抽性系統について着目して研究を進めた。この系統は、低温処理を行っても、*BrFLC2* では発現抑制が見られず、*BrFLC3* については、発現抑制は見られるがその低下率が小さいことを明らかにした (図 2)。*BrFLC1* と *BrFLC5* は低温処理期間に応じて、発現量の低下が見られた (図 2)。*BrFLC2* と *BrFLC3* には第一イントロンにトランスポゾン様配列の挿入あり、全ゲノム DNA メチル化解析により、この挿入領域にのみ、高度な DNA メチル化が見られることを明らかにした (図 3)。さらに、低温処理前と 4、6、12 週間の低温処理後において、H3K27me3 抗体を用いた ChIP-qPCR を行ったところ、*BrFLC1* では低温

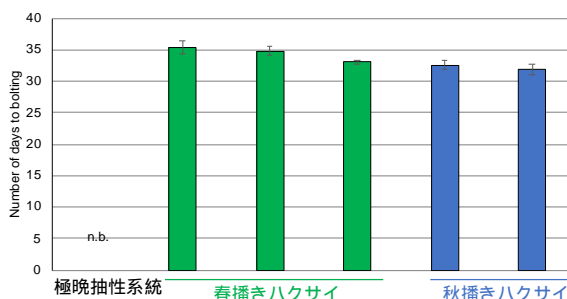


図 1. 6 週間の低温処理後に開花に要する日数
n.b. は開花しなかったことを示す。

処理により、H3K27me3 の蓄積が見られたが、*BrFLC2* と *BrFLC3* では H3K27me3 の蓄積が見られなかった。

以上の結果から、この極晩抽性系統では、挿入配列の DNA メチル化が H3K27me3 の修飾を行う PRC2 複合体のリクルートを阻害している可能性が示唆された。そこで、DNA 脱メチル化阻害剤であるアザシチジンやゼブラリン処理を行った。まず、これらの薬剤を MS 培地に添加し、植物の生育に悪影響を及ぼさない濃度を決定した。決定した濃度を用いて、これらの薬剤が添加された MS 培地で極晩抽性系統を生育させ、挿入配列の DNA メチル化レベルを Bisulfite sequencing 法で調べた。その結果、DNA メチル化レベルの顕著な低下が確認されなかった。今後、更なる条件設定が必要となる。

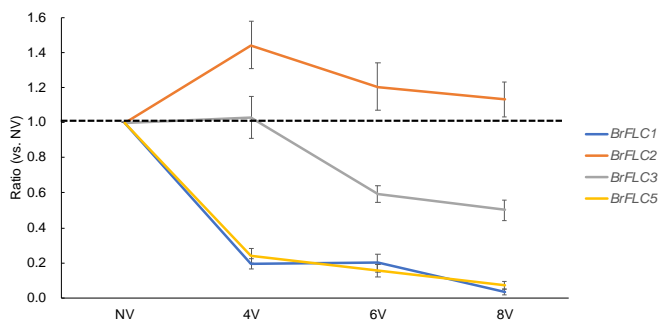


図 2. 極晩抽性系統における、低温処理による *BrFLC* の発現低下率。NV (低温処理なし)、4, 6, 8V (4, 6, 8 週間の低温処理後)。縦軸は、NV の発現量に対する割合を示す。

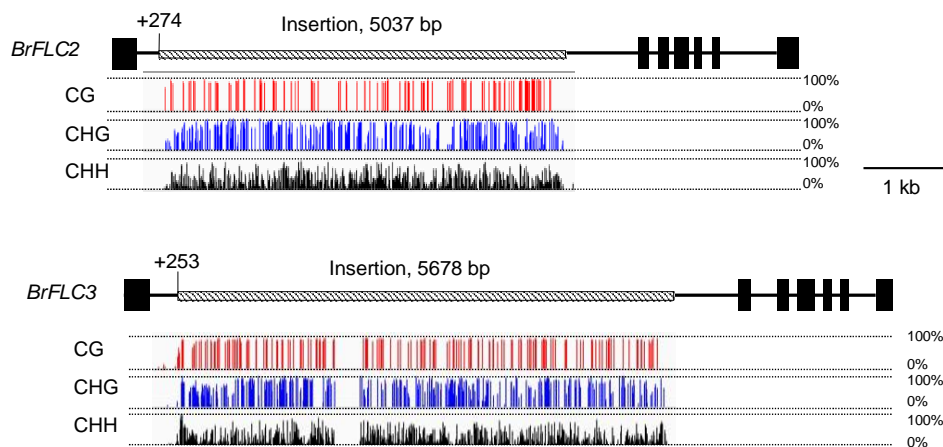


図 3. 極晩抽性系統における、*BrFLC2* と *BrFLC3* 遺伝子座の DNA メチル化レベル

(2) エピゲノム編集

シロイヌナズナを用いて、エピゲノム編集を *FLC* 遺伝子座に誘発するために、コンストラクトの作製を進めた。植物のエピゲノム編集用ベクターを Addgene から購入し、Gateway システムを用いて目的遺伝子を挿入するため、シロイヌナズナの H3K27me3 の修飾に関わる遺伝子 (PRC2 複合体の構成遺伝子; *SWN*, *CLF*, *MEA*) を pENTER ベクターにクローニングした。そして、植物のエピゲノム編集用ベクターにクローニングし、ベクターにマルチ sgRNA の導入を進めた (図 4)。現在、これらのコンストラクトをシロイヌナズナの葉で一過的発現させ、qRT-PCR による発現の確認と ChIP-qPCR による標的 DNA 領域の H3K27me3 の蓄積の変化について調べている。

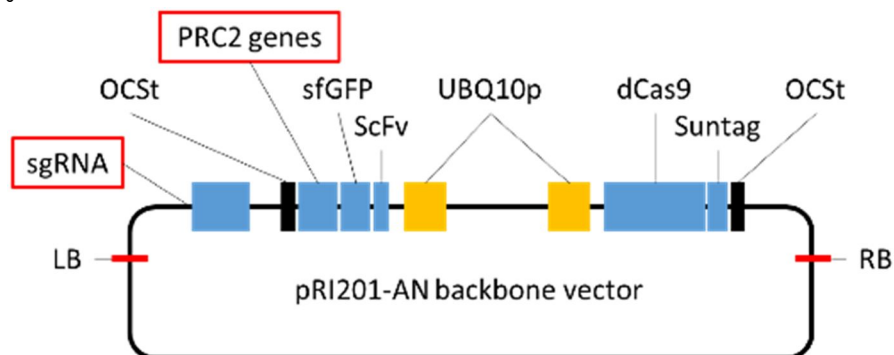


図 4. sgRNA:U6 promoter に融合した複数の sgRNA. PRC2 genes: *SWN*, *CLF* or *MEA* 遺伝子をそれぞれ導入。OCSt: OCS terminator. sfGFP: super-folder GFP. ScFv: single-chain variable fragment. UBQ10p: Ubiquitin 10 promoter. dCas9: dead Cas9. Suntag: Suntag containing tandem repeats of GCN4. LB/RB: バイナリーベクターの left and right border.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mehraj H, Shea DJ, Takahashi S, Miyaji N, Akter A, Seki M, Dennis ES, Fujimoto R, Osabe K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Genome-wide analysis of long noncoding RNAs, 24-nt siRNAs, DNA methylation and H3K27me3 marks in Brassica rapa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0242530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242530.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akter A, Itabashi E, Kakizaki T, Okazaki K, Dennis ES, Fujimoto R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome Triplication Leads to Transcriptional Divergence of FLOWERING LOCUS C Genes During Vernalization in the Genus Brassica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Plant Sci	6. 最初と最後の頁 619417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.619417.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akter Mst. Arjina, Mehraj Hasan, Miyaji Naomi, Takahashi Satoshi, Takasaki-Yasuda Takeshi, Seki Motoaki, Dennis Elizabeth S., Fujimoto Ryo, Osabe Kenji	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcriptional Association between mRNAs and Their Paired Natural Antisense Transcripts Following Fusarium oxysporum Inoculation in Brassica rapa L.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 17~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae8010017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akter Ayasha, 藤本龍
2. 発表標題 Brassica rapaにおける極晩抽性系統の春化特性評価
3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	長部 謙二 (Osabe Kenji) (60751352)	大阪大学・産業科学研究所・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	CSIRO			