

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02189

研究課題名（和文）キクをモデルとした転写制御情報に基づく高次倍数体の高精度遺伝解析手法の開発

研究課題名（英文）Development of genetic analysis methods for hexaploid chrysanthemum

研究代表者

白澤 健太（Shirasawa, Kenta）

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長

研究者番号：60527026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

研究成果の概要（和文）：高次倍数体の表現型の多くは遺伝子型だけではなく、アレル特異的な転写にも制御されている可能性を見出してきた。同質六倍体であるキクをモデルとして、高次倍数体のゲノムにおけるアレル特異的な転写を引き起こす機構を明らかにすることを目的として本研究を実施した。キクの連鎖解析集団を栽培し、表現型の年次反復データを取得するとともにトランスクリプトームとエピゲノムのデータを取得し、キクの二倍体近縁野生種であるキクタニギクのゲノム配列を参照配列としてマッピングし、遺伝子の転写発現量を定量するとともに発現遺伝子のアレル頻度の歪みを明らかにした。同質六倍体であるキクの参照ゲノム配列の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高次倍数体の表現型を高精度に推定するためには、従来の二倍体を対象とした分子遺伝学研究やゲノム研究の手法が適用できない場合が多い。本研究結果により高次倍数体の実用的な遺伝解析研究が大きく進展し、キクに限らずサツマイモやカキ、キウイフルーツ、イチゴなどの遺伝という現象をより深く理解できるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Many of the phenotypes of higher polyploids may be controlled not only by genotype but also by allele-specific transcription. Using chrysanthemum, a hexaploid plant, as a model, this study aimed to elucidate the mechanisms that cause allele-specific transcription in the polyploid genomes. We cultivated a mapping population of chrysanthemum to collect phenotype data. Simultaneously, transcriptome and epigenome data were also obtained. Using the genome sequence of *Chrysanthemum seticospe*, a closely related diploid wild species, as a reference sequence, we mapped the data and quantified the transcription levels of genes while revealing the distortion of allele frequencies in transcripts. Additionally, we constructed the reference genome sequence of hexaploid chrysanthemum.

研究分野：園芸科学関連

キーワード：キク 高次倍数体 遺伝解析 ゲノム トランスクリプトーム エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高次倍数体の表現型は、ゲノムの遺伝子型の情報からだけでは十分に説明することができない。高次倍数体の表現型を高精度に推定するために必要な、ゲノムの遺伝子型情報以外の因子を明らかにし、それに基づく遺伝解析法を開発することを目指す。

キクは、日本の切り花生産量の4割以上を占める重要な花き園芸作物の一つである。キクの品種開発は、優良品種を母本とした交雑育種法や突然変異育種法により行われているが、育種者の経験と勘に頼る部分が大きく、形質の遺伝様式の解明やDNAマーカーの活用といった科学的な知見に基づく効率的な品種の開発が遅れている。キクは同じゲノムを6セット有する同質六倍体であり遺伝様式が複雑であることに加え、ひとつのゲノムのサイズも30億塩基と巨大であり複雑なゲノム構造を持つ。このゲノムの複雑さがキクの効率的な育種技術の開発を阻んでいる最大の理由である。

これまで、キクと同じ同質六倍体であるサツマイモを使用して、高次倍数体に適した遺伝解析手法を開発してきた。一見複雑に見える同質倍数体のSNPであるが、申請者らは同質倍数体におけるsimplex SNPsはメンデルの法則に従って遺伝することを示し、同質倍数体では初めて全ての染色体を高精度に識別した遺伝地図を完成させた。この遺伝地図に基づき、サツマイモの農業形質に関わる遺伝子座のマッピングに成功した。さらにmultiplex遺伝子座を利用した遺伝解析が可能であると発想し、各アレル量の存在確率を遺伝解析に適用する方法を開発し、一部の量的形質遺伝子座の検出に有効であることを明らかにした。

キクのゲノム育種を実現するために、キクの二倍体野生種であるキクタニギクのゲノム解読を基盤として、サツマイモの手法を適用することで、質的形質の花弁色および病害抵抗性に関する遺伝子の正確な座乗位置と遺伝様式を明らかにした。一方で、同質倍数体の量的形質の遺伝解析は未だ困難が多く、形質発現機構の解明とそのための技術開発が望まれる。

2. 研究の目的

二倍体では、二つの対立遺伝子の相加効果と優性効果によって表現型が推定できる。一方で、高次倍数体では3つ以上のゲノムが表現型に関わるため、遺伝子型から表現型を説明するための複数のモデルが提案されている。各表現型がどのモデルに当てはまるのかは、それぞれの形質発現がどのような作用機作によって制御されているのか、に依存する。高次倍数体の表現型の多くは、ゲノムの遺伝子型や遺伝子コピー数などのゲノム情報だけではなく、アレル特異的な転写量でも制御されていることを本研究の仮説とした。二倍体では二つのアレル間の転写量に差が生じるゲノムインプリンティングが知られており、これは高次倍数体の複雑な形質発現を説明するための有力な候補である。

高次倍数体の遺伝効果を精度良く推定しようとする本研究課題は、従来の二倍体を対象とした分子遺伝学研究やゲノム研究の手法が適用できない場合が多いため、新しい発想や手法の開発が必要であり学術的独創性が高い。研究成果は、キクに限らずサツマイモやカキ、キウイフルーツ、イチゴなど多くの高次倍数体が含まれる園芸・育種分野での新しい研究への切り口を与えることができる。

これまでに、キクの草丈や開花期などの量的形質において、各アレル量の存在確率に基づく遺伝解析を行ったが、遺伝子座が検出できなかった。すでにゲノムと転写量との間にアレル頻度に歪みがあることを見出している。高次倍数体でもRNAが相同遺伝子から均一に転写されているとは限らず、インプリンティングにより転写量とゲノム上のコピー数の関連付けが出来ないことを裏付ける証拠である。高次倍数体の表現型の多くは、遺伝子型や遺伝子コピー数などのゲノム情報だけではなく、転写量でも制御されていることが原因であると考えられた。本研究課題では、高次倍数体におけるゲノム情報がアレル特異的な転写を引き起こす機構を明らかにし、表現型値を予測できる遺伝モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

キクの連鎖解析集団を栽培し、花、茎、および葉などの形質の表現型データを取得する。遺伝子型および遺伝子コピー数を利用した遺伝解析を行い、各形質の遺伝効果モデルを推定するとともに、遺伝子型および遺伝子コピー数の情報では遺伝子座が検出できない形質を明らかにする。

解析集団の各個体の花、茎、および葉のサンプルからRNAを抽出し、RNA-Seq分析によりトランスクリプトームデータを得る。RNA-Seqによって得られたリードはキクタニギクのリファレンス配列にマッピングし、配列変異を検出する。相同遺伝子であってもアレルによって転写量が異なる可能性があることから、アレルごとの転写量を定量する。つまり、リードに含まれる配列変異を手がかりとして各相同遺伝子からのアレル特異的な転写産物を定量する。各アレルの発現量で重み付けした配列変異を遺伝子型情報として用いて遺伝解析を行い、表現型の変化に関連するアレル特異的転写産物を同定する。

アレル特異的転写におけるゲノムインプリンティングの影響を明らかにするため、解析集団

のエピゲノム解析を実施する。ゲノム中のメチル化シトシンをバイサルファイト処理によりウラシルに変換したゲノムライブラリを作成し、シークエンス分析によりエピゲノムデータを得る。エピゲノム分析によって得られたリードはキクタニギクとキク栽培種のリファレンス配列にマッピングし、各相同遺伝子におけるゲノム DNA のメチル化修飾状態を定量する。遺伝子の発現量とエピゲノムの状態から、各相同遺伝子のアレル間におけるインプリンティングの状態を明らかにする。以上の解析から、各形質がゲノム遺伝子型、遺伝子コピー数、ゲノム修飾、および転写量の 4 因子のいずれに制御されているのかが明らかになる。

4 . 研究成果

キクの連鎖解析集団を栽培し、花や茎などの形質の表現型の年次反復データを取得した。各個体の花や茎などから RNA を抽出し、その配列分析からトランスクリプトームデータを取得した。リードを、キクの二倍体近縁野生種であるキクタニギクのゲノム配列を参照配列としてマッピングし、遺伝子の転写発現量を定量するとともに相同遺伝子のアレル間の配列変異を明らかにした。さらに RNA とゲノムとの間でのアレル頻度の歪みを明らかにするために、配列変異を見出した遺伝子を含むゲノム領域をターゲットキャプチャー法で濃縮し、配列分析を行った。リードをキクタニギクのゲノム配列を参照配列としてマッピングし、ゲノムにおけるアレル間の配列変異を明らかにした。同時に、発現遺伝子のアレル頻度の歪みの原因を明らかにするために、花や茎などのゲノム修飾の状態を調査するバイサルファイト法による DNA のメチル化解析を実施した。

同質六倍体であることから遺伝解析が困難であったキクの、品種改良を目指した育種研究や遺伝子の効率的な同定などの遺伝解析の高精度化を図るために、キクのゲノム基盤の整備に着手した。先進ゲノム支援の援助を受けてキクのゲノム配列データに加えて、高精度なロングリード配列データを取得し、さらに光学マッピング、遺伝地図、および染色体の立体構造に着目したコンタクト情報を取得し、同質六倍体であるキクの参照ゲノム配列の構築に目処をつけた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	住友 克彦 (Sumitomo Katsuhiko) (70391406)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員 (82111)	

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