

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05525

研究課題名(和文) ホウレンソウゲノム情報を活用した生殖関連形質制御遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for agronomic traits under reproductive stage in spinach, by using a high quality genome sequence.

研究代表者

小野寺 康之 (Onodera, Yasuyuki)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80374619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホウレンソウの生殖形質関連遺伝子を効率的に同定するための研究基盤として、染色体スケールのリファレンスゲノム配列を構築した。雌株および高雄性間性株の交雑後代集団を用いて、リファレンスゲノム上に、雌花率(間性発現)制御に関わる3つのQTL(qFem2.1, qFem3.1, qFem6.1)をマップした。さらに、qFem2.1とqFem6.1は主働遺伝子(qFem3.1)に対する変更遺伝子として機能していることが示唆された。抽苔性制御に関わる二つのQTL領域から見出されたFTホモログは、いずれも花成促進の作用を備えていることが強制発現株の解析から示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウレンソウは雌雄異株として知られるが、実際には雌花および雄花を様々な比率(雌性率)で着生する間性株(雌雄異花同株)が存在する。特に、間性株の雌性率はF1採種の受粉制御に関わる重要形質であり、雌性率の制御機構の解明が重要課題になっている。ホウレンソウの花成・抽苔は長日によって促進され、抽苔性は栽培地域および作型の適性を支配する重要形質の一つである。本研究では、これらの形質の発現に関わる遺伝的機構を明らかにし、当該形質を支配する遺伝子の有力な候補を同定した。本研究成果は、ホウレンソウ育種の効率化への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a chromosome-scale reference genome to identify genes related to reproductive traits in spinach efficiently. By using cross progeny populations of female and highly male monoecious plants, we mapped three QTLs associated with the control of femaleness (monoecious expression) on the reference genome. Additionally, it was suggested that qFem2.1 and qFem6.1 function as modifying genes for the major monoecious gene (qFem3.1). Furthermore, we found that FT homologs located in the two QTLs for bolting promote flowering, based on the analysis of transgenic Arabidopsis with over-expression of the FT homologs.

研究分野：植物育種

キーワード：ホウレンソウ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ホウレンソウは雌雄異株として知られるが、実際には雌花および雄花を様々な比率(雌性率)で着生する間性株(雌雄異花同株)が存在する。特に、間性株の雌性率はF1採種の受粉制御に関わる重要形質であり、雌性率の制御機構の解明が重要課題になっている。

(2) ホウレンソウの花成・抽苔は長日によって促進され、抽苔性は栽培地域および作型の適性を支配する重要形質の一つである。

2. 研究の目的

(1) これまでに申請者は、間性決定に関わる主働遺伝子(M)を同定しており、Mの雄性化作用に関する変更遺伝子(M-modifier)の存在を示唆するデータを得た。本研究では、M-modifierを同定し、その機能解析を通じて、間性株の雌性率決定機構の解明を試みる。

(2) 申請者はホウレンソウの抽苔性制御に関わる3つのQTLを同定しており、責任候補遺伝子の探索および機能解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) ホウレンソウの生殖形質関連遺伝子を効率的に同定するための研究基盤として、染色体スケールのリファレンスゲノム配列(pseudomolecules)の構築を試みた。

(2) ホウレンソウ pseudomolecules を活用して、雌花率(間性発現)に関するQTL解析を行い、M-modifierに相当するQTLの同定および候補責任遺伝子の探索を行った。

(3) 申請者による先行研究によって同定した抽苔性制御に関わるQTL領域から見出されたFTホモログについて、RNAseqおよびRT-qPCR解析に基づいて発現パターンを明らかにし、シロイヌナズナの形質転換系を用いて機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) 高品質ホウレンソウ pseudomolecules の構築：申請者の先行研究において構築したホウレンソウ 03-009 系統ゲノムのロングリードに由来するゲノムアセンブリに同系統由来のHi-Cリードを用いてスキャフォールドリングを行い6本のpseudomoleculesを暫定版として構築した。次いで、暫定版pseudomoleculesにHi-Cリードをマップしてコンタクトマップを構築した。ここで検出されたスキャフォールドリングを修正し、最終版のpseudomolecules(SOL_r2.0_pseudomolecule; 全長 879.2 Mb, ゲノム被覆率 94.0%, BUSCO completeness 97.0%)を構築した。さらに、SOL_r2.0_pseudomolecule に対して、36,976 個のタンパク質コード遺伝子を注釈づけた。

(2) ホウレンソウ間性株の雌花率制御に関わるQTLの同定：雌株(系統 03-009, 雌花率 100%)および高雄性間性株(系統 03-336, 雌花率 10%)の交雑後代(F2世代)の遺伝子型をRAD-seqリードおよびSOL_r2.0_pseudomoleculeを用いて決定した。さらに、当該F2集団の表現型(雌花率)データを用いてSOL_r2.0_pseudomoleculeにおける3本の染色体上(Chr2, Chr3, Chr6)に、雌花率制御に関わるQTL($qFem2.1$, $qFem3.1$, $qFem6.1$)をマップした(図1)。これらのQTLのうち、最もLODおよび寄与率(PVE)が高かった $qFem3.1$ (LOD = 21.8, PVE = 56.1%)は、申請者がすでに同定していた間性決定に関わる主働遺伝子(M)と一致していた。

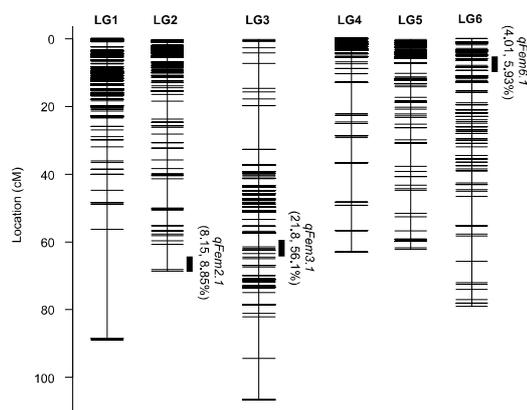


図1 ホウレンソウ間性株の雌花率制御に関わるQTLのマップング

(3) ホウレンソウ間性株における雌花率制御に関わるQTLの交互作用の同定：03-009 x 03-336 F2およびF3世代の遺伝子型および雌花率データに基づいて、間性主働遺伝子(M/ $qFem3.1$)と $qFem2.1$ および $qFem6.1$ の間で交互作用が見出された。すなわち、系統03-336に由来するMアレル(不完全優性アレル)の存在下において、 $qFem2.1$ および $qFem6.1$ が雌花率を制御しており、両QTL領域にM-modifierが座乗していることが示唆された(図2)。

(4) ホウレンソウ間性株における雌花率制御に関わる候補遺伝子の探索: まず, 系統03-009 (雌株) の遺伝的背景に系統03-336 に由来する間性主動遺伝子 (*M/qFem3.1*) を連続戻し交配によって導入した高雌性系統 NIL-M を育成した。

次いで, 系統 03-009, 03-336 および NIL-M の RNAseq 解析を行い, 3 系統のトランスクリプトームを総当たりで比較した(図3)。その結果, 雌花率の低い系統(雄性的の高い系統)で共通して発現量が上昇している 20 遺伝子が見出され,

その中には B クラス遺伝子 *PISTILLATA* の 2 つのホモログが含まれていた。先行研究において, ホウレンソウ雄株で B クラス遺伝子ホモログが雄性器官の促進と雌性器官の抑制を介して, 花の性決定および雄性化に関与している可能性が報告されていたが, 間性株においても同遺伝子が雄性化/雌性抑制に関与している可能性が本研究結果によって示唆された。

雌株(03-009)および高雌性間性株(NIL-M)と比較して, 高雄性間性(03-336)において上方制御されていた遺伝子群において, オーキシンに関連する GO が付与された遺伝子が有意に濃縮されていた。ホウレンソウにおいてもオーキシンが間性の発現に関与している可能性が考えられた。これまで, 雄株における性発現(雄性化/雌性抑制)において, ジベレリンが関与することが報告されているが, 本トランスクリプトーム解析からはジベレリン関連遺伝子の有意な発現変動は見出されず, 間性株における性決定にジベレリンが関与するデータは得られなかった。一つの可能性として, 雄株と間性株における雄性化(および雌性抑制)機構が異なっていると考えられる。

次に, 系統間の DNA 多型およびトランスクリプトームデータに基づいて, *qFem2.1* および *qFem6.1* の責任候補遺伝子の探索を試みた。*qFem2.1* の責任候補遺伝子としてオーキシン関連遺伝子を見出すことができた。これらのいずれの

遺伝子においても機能ドメイン上に系統間変異が存在していた。一方, *qFem6.1* の責任候補遺伝子として茎頂分裂組織の制御に関わるシロイヌナズナ *CLV1* および *RPK2* のホモログであるが見出された。いずれの遺伝子においてもアミノ酸変異を伴う系統間変異が存在したが, 機能ドメイン上に存在する変異ではなかった。しかし, *CLV1* および *RPK2* は幹細胞活性を負に制御する小さな分泌ペプチド *CLV3* の受容体タンパク質である。近年シロイヌナズナにおいて *CLV3* が *AGAMOUS* および *SUPERMAN* と協力して花の分裂組織のサイズを調節する役割に関与していることが示唆されていることに加え, 花の分裂組織のサイズが花の器官数の決定に関与する可能性を考慮して, 両遺伝子のホモログを *qFem6.1* の責任候補遺伝子とした。

(5) ホウレンソウ抽苔性 QTL: 抽苔性制御に関わる二つの QTL 領域から見出されたシロイヌナズナ FT ホモログ (合計 3 コピー) に関する強制発現シロイヌナズナを作成した結果, いずれの FT ホモログも花成促進の作用を備えていることが示唆された。しかし, 当該 FT ホモログの 1 コピーはホウレンソウにおいてほとんど発現していないことから, QTL の責任遺伝子である可能性は低いことが示唆された。一方, 残りの 2 コピーに関しては, 長日条件下における発現パターンが日周変動しており, QTL の責任遺伝子である可能性が示された。

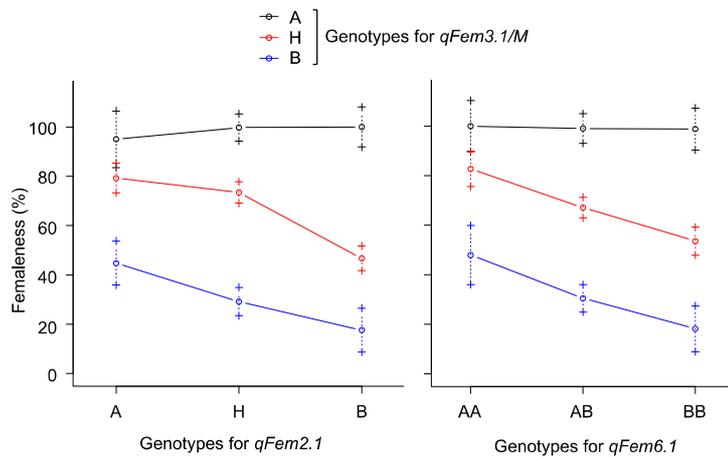


図2 03-009 x 03-336 F₂ 集団を用いた *qFem3.1/M* と *qFem2.1* および *qFem6.1* 間の交互作用の同定

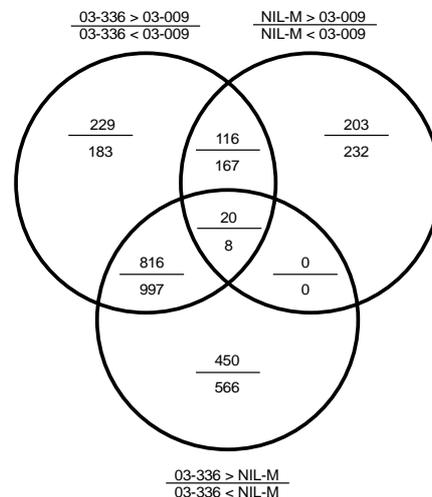


図3. 系統03-336, NIL-Mおよび03-009の花序に関するトランスクリプトーム比較解析によって見出された発現変動遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamano Kaoru, Haseda Akane, Iwabuchi Keisuke, Osabe Takayuki, Sudo Yuki, Pachakkil Babil, Tanaka Keisuke, Suzuki Yutaka, Toyoda Atsushi, Hirakawa Hideki, Onodera Yasuyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 QTL analysis of femaleness in monoecious spinach and fine mapping of a major QTL using an updated version of chromosome-scale pseudomolecules	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0296675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0296675	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山野 薫, 豊田 敦, 平川 英樹, 小野寺 康之
2. 発表標題 ハウレンソウ間性株における雌花着生率に関するQTL解析
3. 学会等名 日本育種学会 第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 梨紗, 濱田 寛也, 山野 薫, 小野寺 康之
2. 発表標題 早抽性および晩抽性ハウレンソウ系統におけるFTホモログの構造および発現比較
3. 学会等名 日本育種学会 第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 梨紗, 濱田 寛也, 山野 薫, 小野寺 康之
2. 発表標題 異なる抽苔性を示すハウレンソウ系統間におけるFTおよびCOホモログの構造および発現解析
3. 学会等名 北海道談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山野 薫, 豊田 敦, 平川 英樹, 小野寺 康之
2. 発表標題 性染色体スケールのハウレンソウゲノム配列を活用した間性株の雌花率に関するQTL解析
3. 学会等名 北海道談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺 康之, 藤田 拓希, 杉山 優, 豊田 敦, 平川 英樹
2. 発表標題 Spinacia属植物の性染色体の構造比較
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山野薫、パチャキル バビル、田中啓介、平川英樹、小野寺康之
2. 発表標題 雌花着生率が異なるハウレンソウ間性株のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本育種学会第144回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野寺 康之、平川 英樹、豊田 敦、田中 啓介、パチャキル バビル
2. 発表標題 ハウレンソウから見出される多様な性表現型
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------