

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780002

研究課題名(和文)ブラシカのエピゲノム解析及び、植物形質に関わる後天的な転写制御の解明に向けて

研究課題名(英文)Elucidation of post-transcriptional regulation involved in plant traits and epigenome analysis in Brassica

研究代表者

藤本 龍 (Fujimoto, Ryo)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60620375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本及びアジア地域で主要な野菜であるハクサイ (*Brassica rapa*)を用いて、ゲノム全体のエピジェネティックな修飾状態を明らかにすることを目的として研究を行った。ゲノム全体のDNAのメチル化状態とヒストンの化学修飾状態について調べた。また、春化处理後や、病原菌感染時にみられるゲノムワイドなエピジェネティックな修飾状態を明らかにすることを目的に研究を行った。春化处理後には、鍵遺伝子であるFLCにH3K27me3の修飾が蓄積し、FLCの転写レベルが下がることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate of the epigenetic status of *Brassica rapa* at the whole genome level. We examined the DNA methylation and histone modification status at the whole genome level. Next, we assessed the change of epigenetic modification after vernalization or infection by pathogens. We found accumulation of H3K27me3 level at the FLC locus and repression of its expression after vernalization.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：エピゲノム アブラナ科

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は、塩基配列に依存するジェネティックな制御に加え、塩基配列によらず、遺伝子の修飾状態 (DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾) の変化に依存するエピジェネティックな制御が存在する。シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ等では、エピジェネティックな修飾に関わる遺伝子の変異体で、植物の発達異常が見られることから、エピジェネティックな遺伝子発現制御が植物の形質を制御していることが示された。さらに、自然界に存在する植物の形質の変異の中には、エピジェネティックな変異によってもたらされているものがあることが分かってきた。よって、ジェネティックな変異と同様、エピジェネティックな変異も、植物の形質変化に寄与すると考えられる。

エピジェネティックな修飾状態については、DNA のメチル化や特定のヒストン修飾への抗体を用いた免疫沈降により抽出した DNA の配列を直接決定することで、エピジェネティックな修飾状態をゲノム全体で調べることができるエピゲノム解析が開発された。現在、シロイヌナズナを筆頭にエピジェネティックな修飾状態が明らかにされている。

2. 研究の目的

ハクサイ等、日本及び、アジアで主要な野菜を含む *Brassica rapa* L. においても、他の植物同様、エピジェネティックな転写制御が、植物の形質制御において重要であると考えられる。*B. rapa* において、エピジェネティクス研究を進展させるためには、ジェネティックな解析においてリファレンスゲノムに相当する、『ゲノム全体のエピジェネティックな修飾状態』を明らかにすることは重要である。そこで、本研究では、*B. rapa* のエピジェネティックな遺伝現象を明らかにするため、ゲノム全体でのエピジェネティクス情報を調べるエピゲノム解析を行い、*B. rapa* のエピゲノム情報を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

エピジェネティックな修飾状態を認識する抗体を用いた免疫沈降法により回収した DNA 断片の塩基配列を次世代シーケンサーで決定し、リファレンスゲノムにマッピングし、リード数を元に、定量化することで個々のエピジェネティックな修飾状態をゲノム全体で明らかにす。具体的には、Chromatin Immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) 法と Methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq) 法によるエピゲノム解析を行った。エピゲノム解析を行うエピジェネティクスの修飾状態は、一般的に遺伝子の転写の

抑制のマークとして知られている、DNA のメチル化、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のジメチル化 (H3K9me2) と H3K27me3 及び、遺伝子の転写活性型のマークとして知られている H3K4me3 と H3K36me2 について行った。

4. 研究成果

(1) クロマチン免疫沈降法の濃縮確認プライマーセットの作成。

まず、ChIP-seq を行う際にはそれぞれの修飾を有する DNA 断片の濃縮を確認する必要があるが、*B. rapa* では ChIP-seq はほとんど行われておらず、濃縮を確認できる領域の報告がない。そこで、本研究では、H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me3 の修飾を有する領域のスクリーニングを行った。H3K4me3 と H3K36me3 については、これらの修飾が転写活性型のマークとして知られていることから、RNA-sequencing (RNA-seq) を行い、転写レベルが高い遺伝子に着目し、コード領域にプライマーを作成し、ChIP-PCR を行った。その結果、H3K4me3 と H3K36me3 の修飾が確認され、一方で転写抑制のマークである H3K9me2 を抗体に用いた ChIP-PCR では増幅が確認できなかったことから、これらの領域においては H3K4me3 と H3K36me3 の修飾のみが蓄積していることが分かった。H3K27me3 については、シロイヌナズナで H3K27me3 の修飾を持つ遺伝子のオーソログ遺伝子にプライマーを設計して、ChIP-PCR を行ったところ、調べた 6 つの遺伝子全てにおいて、H3K27me3 の修飾が確認できた。よって、H3K27me3 は種が異なっても修飾されている領域は保存されている可能性が示唆された。H3K9me2 については、RNA-seq から転写していない遺伝子やトランスポゾン領域にプライマーを作成して ChIP-PCR を行ったところ、特にトランスポゾンの領域に H3K9me2 の修飾が確認できた。

DNA のメチル化について、トランスポゾン領域にプライマーを作成して、MeDIP-PCR を行ったところ、トランスポゾンでは DNA のメチル化を有することが分かった。

以上より、本研究で見出したプライマーセットを組合せて使用することで、ChIP 及び MeDIP の濃縮を確認することができると考えられる。

(2) エピゲノム解析

播種後 14 日の本葉を用いて、H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me3 の修飾に対する ChIP-seq を行い、それぞれ 2500 万から 4400 万リード、900Mbp から 3000Mbp のシーケンスを決定した (表 1)。得られたシーケンスをリファレンスゲノムにマッピングし、定量化することで、エピジェネティックな修飾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。

DNA のメチル化については、播種後 14 日の

本葉を用いて MeDIP-seq を行い、2700 万リード、900Mbp のシークエンスを決定した。また、small RNA-sequencing を行い、2200 万リード、1000Mbp の配列を決定した。現在、得られたシークエンスデータを解析中である。

それぞれの修飾を持つことが分かった領域については、シークエンス解析とは別のサンプルを用いて ChIP-PCR や ChIP-qPCR を行い、ChIP-seq の再現性を確認した。

表1 ChIP-seqのシークエンスリード数と配列長

	Yield (Mbases)	% PF	# Reads	% of raw clusters per lane	% of >= Q30 Bases (PF)
Input	1,308	92.44	39,298,517	16.23	96.69
H3K4me3	2,993	94.44	41,702,378	20.02	95.19
H3K9me2	1,401	96.42	40,348,450	21.26	98.24
H3K27me3	877	94.96	25,647,645	13.56	97.77
H3K36me3	1,333	94.25	39,281,647	20.69	97.79
H3	1,526	95.61	44,322,307	19.15	97.74
H3K27me3 V	1,220	94.96	35,675,924	18.87	97.70

(3) 春化処理に見られるエピジェネティックな修飾変化

モデル植物であるシロイヌナズナでは、春化処理時に転写抑制遺伝子である *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*)において、エピジェネティックな転写制御が行われていることが明らかになっている。そこで、同じアブラナ科植物である *B. rapa* においても同様にエピジェネティックな修飾の変化が見られるか調べた。シロイヌナズナでは、*FLC* 遺伝子は1つであるのに対して、*B. rapa* では4つ存在する。上述の RNA-seq の結果から、4つの *FLC* 全てが春化処理前には一定のレベルで発現していることが分かった。そして、*FLC* 遺伝子の発現について春化処理後 (4、1ヶ月) に調べたところ、その発現レベルは抑制されることが分かった。次に、4つの *FLC* を区別できるプライマーを用いて、ChIP-PCR を行ったところ、全ての *FLC* は春化前には、H3K4me3 の修飾を持ち、H3K27me3 の修飾を持っていないことが分かった。次に春化処理後の H3K27me3 について調べたところ、全ての *FLC* について H3K27me3 の修飾が増加することが明らかになった。以上より、*B. rapa* においても、*FLC* は春化処理により転写抑制のマークである H3K27me3 の修飾が蓄積し、*FLC* の転写が抑制されることが明らかとなった (図1)。

FLC 以外にも春化処理によって H3K27me3 の修飾が変化する領域を探索する為に、春化処理後のサンプルを用いて、ChIP-seq を行った。3500 万リード、1200Mbp の塩基配列が決定され (表1)、現在解析を進めている。

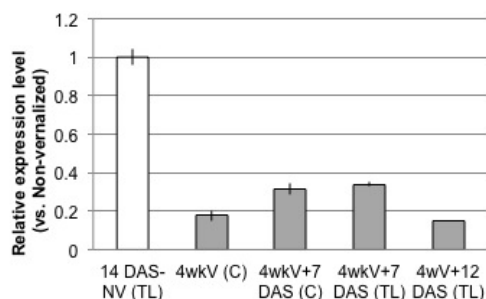


図1 春化処理 (4wkV)による*FLC*の発現抑制

(4) 萎黄病抵抗性遺伝子の同定及び、萎黄病感染時に見られる転写の変化について

現在までに、(株)渡辺採種場との共同研究で育成してきたハクサイの近交系から、土壌伝染性病害である萎黄病菌に対して、抵抗性を示す系統と罹病性を示す系統を選抜した。そして、抵抗性系統と罹病性系統をそれぞれ1系統ずつ用いて、RNA-seq による転写比較解析を行った。特に、今まで抵抗性遺伝子との関わりが強い NBS-LRR 遺伝子に着目して行った。両系統で発現レベルが異なる遺伝子のリストから、抵抗性系統では発現しており、罹病性系統では、遺伝子の欠失により発現が見られない遺伝子を見出した。その遺伝子の有無を判別できる優性 DNA マーカーを作成し、抵抗性系統と罹病性系統から作成した F₂ 分離集団を用いて、接種試験と DNA マーカーによる遺伝子型を照らし合わせた結果、完全な相関が見られたことから、得られた遺伝子が萎黄病抵抗性遺伝子である可能性が強く示唆された (図2)。

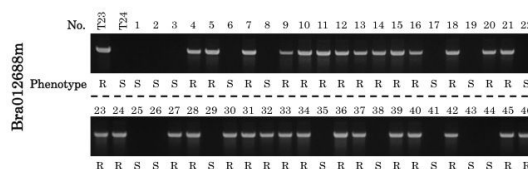


図2 F₂集団を用いた連鎖解析。PCRの増幅と接種試験による抵抗性が一致。

この萎黄病に感染した際の転写の変化やエピジェネティックな修飾状態の変化を網羅的に調べる為に、萎黄病に感染させた後に経時的に防御遺伝子である *PR* 遺伝子を指標として防御反応が見られるステージの特定を行った。今後、決定したステージを中心に RNA-seq やエピゲノム解析を進めていくことで、病原菌感染時の発現の変化とエピジェネティックな修飾の変化との関連性を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Shimizu M, Fujimoto R, Ying H, Pu ZJ, Ebe Y, Kawanabe T, Saeki N, Taylor JM, Kaji M, Dennis ES, Okazaki K. Identification

of candidate genes for fusarium yellows resistance in Chinese cabbage by differential expression analysis. *Plant Mol Biol* (2014) 85: 247-257. 査読有
doi: 10.1007/s11103-014-0182-0

Tomaru Y, Osabe K, Okazaki K, Fujimoto R. Transcriptional regulation of key gene of vernalization, *FLOWERING LOCUS C*. *Bull Facul Agric Niigata Univ.* (2014) 66: 105-110. 査読無

Tomita H, Shimizu M, Doullah MDA, Fujimoto R, Okazaki K. Accumulation of quantitative trait loci conferring broad-spectrum clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Mol Breed* (2013) 32: 889-900. 査読有
doi:10.1007/s11032-013-9918-9

Fujimoto R, Sasaki T, Ishikawa R, Osabe K, Kawanabe T, Dennis ES. Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. *Int J Mol Sci* (2012) 13: 9900-9922. 査読有
doi: 10.3390/ijms13089900

〔学会発表〕(計7件)

清水元樹、江部裕介、川辺隆大、佐伯なつみ、加治誠、岡崎桂一、藤本龍、Differential expression 解析を用いたハクサイ萎黄病抵抗性候補遺伝子の同定、園芸学会平成26年度春季大会、2014年3月29日、30日、筑波大学

清水元樹、川辺隆大、Pu Zi-jing、藤本龍、岡崎桂一、*Brassica oleracea* 品種における萎黄病抵抗性遺伝子 *FocBo1* 連鎖 DNA マーカーと抵抗性との関連性、日本育種学会第125回講演会、2013年10月13日、鹿児島大学

戸丸祐貴、中村友理、清水元樹、藤本龍、岡崎桂一、*Brassica oleracea* 染色体添加型 *B. rapa* を用いた緑植物体春化の遺伝解析、日本育種学会第124回講演会、2013年10月13日、鹿児島大学

藤本龍、アブラナ科植物の種内、種間雑種に見られる非相加的遺伝子発現、日本育種学会第123回講演会グループ研究集会、東京農業大学、2013年3月28日

Tomita H, Shimizu M, Ebe Y, Ying H, Kawanabe T, Kaji M, Fujimoto R, Dennis ES, Okazaki K. Towards identifying a fusarium wilt resistance gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). 10th International Congress on Plant Molecular

Biology. Jeju, Korea. 21st-26th October, 2012.

Shimizu M, Ying H, Fujimoto R, Ebe Y, Tomita H, Kawanabe T, Kaji M, Dennis ES, Okazaki K. Characterization of NBS-LRR motif genes between S11 and R09 by RNA sequencing in *Brassica rapa*. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. Jeju, Korea. 21st-26th October, 2012.

清水元樹、江部裕介、藤本龍、川邊隆大、Hua Ying、加治誠、Elizabeth Dennis、岡崎桂一、RNA-sequence 法を用いたハクサイ品種間 (S11 × R09) 特異的な NBS-LRR モチーフ遺伝子の探索、日本育種学会第122回講演会 京都産業大学、2012年9月15日

〔図書〕(計1件)

Osabe K, Sasaki T, Ishikawa R, Fujimoto R. The role of DNA methylation in plants. pp. 35-66 (2013) *DNA methylation: Principles, Mechanisms and Challenges*. pp. 191, Editor Tatarinova and Gaurav Sablok, Nova Science Publisher.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 龍 (FUJIMOTO Ryo)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：60620375

(2) 研究協力者

川辺 隆大 (KAWANABE Takahiro)
(株) 渡辺採種場・研究員

加治 誠 (KAJI Makoto)
(株) 渡辺採種場・研究部・部長
研究者番号：60545010

岡崎 桂一 (OKAZAKI Keiichi)
新潟大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：20270936