

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871105

研究課題名(和文)ゲノムワイドアソシエーション解析によるキャベツの相転換機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of juvenile-adult phase change in cabbage by genome wide association study

研究代表者

柿崎 智博(Kakizaki, Tomohiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所野菜育種・ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：30547229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生活環における幼若相から成熟相への転換は、生活環を完遂する上で必要不可欠なイベントである。キャベツ(*Brassica oleracea*)における幼若相から成熟相への転換タイミングは個体の発育ステージで説明される。これまでの知見により、転換タイミングには明確な品種間差異が知られていたが、その決定機構は明らかになっていない。本研究ではキャベツにおける生長相の転換メカニズムを明らかにするため、圃場環境下におけるキャベツ固定系統の転換タイミングを決定した。さらにゲノムワイド関連解析により、本形質を司る染色体領域の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：The transition from the juvenile to adult phase is essential for completion of the life cycle. The timing of transition is determined by developmental status in cabbage (*Brassica oleracea*). From the previous study, it is known that the timing of transition shows variation among the cultivar. However, underlying mechanism remains unknown. In this study, to understand the mechanism of juvenile-adult phase change, we evaluated the timing of transition of 80 open pollinated variety under field environment. Furthermore, we attempted to identify the chromosomal region responsible for this trait by genome-wide association study

研究分野：植物育種学

キーワード：相転換 花成 キャベツ

### 1. 研究開始当初の背景

植物は内的要因と外的刺激を受容することで生長相を転換させ、その生活環を完遂している。とりわけ、葉を分化し続ける栄養生長から花芽が分化する生殖生長への相転換は花成と呼ばれ、植物の繁殖戦略上極めて重要なイベントである。アブラナ科植物の生長相は3つの段階に分けて理解されている。すなわち、外部環境に影響されずに栄養生長を行う基本栄養生長相、長期の低温に感応して花芽分化が開始される低温感応相、さらに長日・高温に感応し抽だいと開花が促進される高温長日感応相である(図1)。アブラナ科植物には、我が国の主要な露地野菜であるキャベツ (*Brassica oleracea*) やハクサイ (*B. rapa*) に加え、モデル植物として利用されているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 等が含まれており、生長相の構成から2種類に大別することができる。ハクサイやシロイヌナズナ等の一年生の植物種は、基本栄養生長相を持たず吸水種子の時点から低温感応性を示すため、シードバーナリゼーション型植物に分類される。これに対し、キャベツやブロッコリーなどの多年生植物種は低温に感応しない明確な基本栄養生長相を有しており、グリーンバーナリゼーション型植物に分類されている。各生長相の長短には明確な品種間差異が存在しており、その組み合わせと栽培時期の環境との相互作用により、各品種が持つ抽だい性の早晚が決定される。

### 2. 研究の目的

キャベツの生長相転換に関わる遺伝領域を同定するため、圃場栽培環境下における各系統・品種のグリーンバーナリゼーションの形質評価、すなわち基本栄養生長相から低温感応相への相転換時期を詳細に決定する。定植日における植物体のサイズ(本葉数)を変えた試験区を設定し、翌春における各試験区の花芽分化程度を評価することで相転換時期の早晚性を数値化する。また形質評価に用いた集団の多型データを取得し、ゲノムワイドアソシエーション解析を行うことで、本形質に関与する領域を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 圃場条件下における生長相転換タイミングの決定

生物研ジーンバンクに登録されているキャベツ遺伝資源80点および市販F<sub>1</sub>品種4点を用いた。育苗はエブ&フロー方式で行い、栽植密度と施肥量は慣行に従った。  
育苗方法 : エブ&フロー方式 液肥 (大塚1号150mg/l、大塚2号100mg/l、大塚6号3mg/l)  
栽植密度 : 畝間60cm、株間40cm、1条植え  
施肥量 : N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=26:25:18kg/10a

#### (2) Rad-seq 方によるゲノムワイド多型の取得

制限酵素EcoRI/BglIIを用いたRad-Seq法により、遺伝資源系統内のSNP情報を取得す

る。EcoRIを使用した場合、キャベツの推定ゲノムサイズから予測される取得リード数は6,000カ所である(冗長度10以上)。取得されたSNP情報を元に集団構造解析、連鎖不平衡距離を算出する。

#### (3) 相転換時期に発現が変動する遺伝子の配列取得

これまでの研究により本葉数が11から12枚で低温感応相へと移行することが明らかとなっている。'松波DH系統(以下MP-22)'を材料に、次世代シーケンサー(Illumina・HiSeq2000)による発現遺伝子のリード取得ならびに発現解析を行った(図1)。供試組織には本葉数が9、11、13および14枚の植物体の展開葉を用い、解析条件はリード長100bp・ペアエンド法とした。得られた全てのリードをアセンブルプログラム・velvetを用いてde novoアセンブルした後、シロイヌナズナTAIR10データベースへBlastX検索する事でアノテーションを付与した。

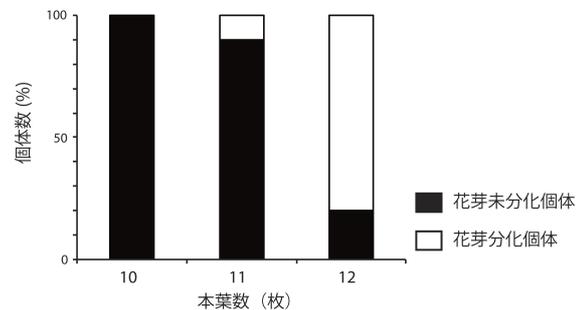


図1. 低温処理開始時の本葉数が低温感応性に及ぼす影響

各葉数の個体を5で56日低温処理した後、2012時間日長の人工気象室で育成し花芽分化個体数を調査した

### 4. 研究成果

#### (1) 圃場条件下における生長相転換タイミングの決定

キャベツ遺伝資源80系統および市販F<sub>1</sub>品種の定植日を約10日ごとに6回に分けて本葉数2~3枚の苗を定植した(6個体×6回定植)。日平均気温が約10となった日の前後における各個体の本葉数を計測し低温遭遇時葉数とした。翌春に各個体の花芽分化状況を目視により調査し、花芽分化率および低温感応に必要な最小本葉数を算出したところ2~18枚と幅広い分布を示した(表1)。第6区は低温期の定植となったため活着率が悪く越冬できた個体数が少なかったことから、花芽分化調査を行わなかった。同一試験区内での花芽形成株率が100%または0%に近い値で揃う品種が存在する一方で、'愛知大晩生' '札幌大球'などに見られた様に全ての試験区で花芽形成が見られるものの、播種期の遅い試験区では花芽形成率が100%を大きく下

回る品種もあった。各品種で花芽分化した個体のうち最も葉数の少ない個体の葉数を相転換タイミングとした場合、これらの品種は相転換タイミングをより早いステージに見積ってしまう恐れがある。今後は、各試験区における花芽形成株率を加味した相転換タイミングの推定方法を用いる必要がある。

長い基本栄養生長相が必要とされる春どりの作型に適する中野早生群（‘早生豊玉’、‘中野極早生丸’、‘富士早生’）に属する品種は、いずれも花芽分化した個体の最小葉数が13枚以上であった。これに対し丸球の早生種である‘大型コペンハーゲンマーケット’や‘アラスカ’では、低温遭遇時に本葉数が2枚であった個体においても花芽形成が確認された。これらの品種は生育期に低温に遭遇しない春まき初夏どりの作型で利用されており、長い基本栄養生長相が必要とされない事が再確認された。

表1. キャベツ遺伝資源の低温遭遇時葉数と低温感応に必要な葉数(抜粋)

系統名	低温遭遇時葉数(枚) <sup>1</sup>					花芽分化率 <sup>2</sup> (%)	花芽分化個体の最小葉数(枚)
	1区 <sup>2</sup>	2区	3区	4区	5区		
愛知大晩生	17.7	10.5	7.7	4.0	2.7	60.0	2
札幌大球	17.0	11.2	6.3	3.7	2.0	53.6	2
大型コペンハーゲンマーケット	17.0	10.7	6.2	3.2	2.0	90.0	2
ヤマトサクセション	15.7	10.4	6.8	3.5	2.2	25.9	2
かんらん中間母本農1号	18.0	11.2	6.8	4.2	3.0	79.3	2
マルシェ	15.8	10.6	6.8	4.2	2.8	96.7	2
愛知大晩生夏蒔	15.0	11.8	7.5	4.2	2.8	59.3	3
かんらん中間母本農2号	19.5	11.4	7.3	5.0	3.0	70.4	3
野崎夏蒔	14.3	11.5	7.3	4.0	3.0	50.0	4
南部	15.3	10.5	6.7	4.0	2.2	20.0	10
三年子サクセション(黄葉系)	18.3	11.0	7.2	4.3	2.5	28.6	10
千葉系富士	15.7	10.2	6.7	3.6	2.0	20.0	10
野崎早生	18.3	11.8	7.3	3.8	2.8	33.3	12
パンダゴ	13.3	9.3	6.0	4.0	2.3	13.3	12
ともえ大丸	14.3	10.3	6.3	3.2	2.3	11.1	12
キング	13.8	10.8	6.0	3.8	2.2	14.8	12
富士早生新1号	13.3	9.4	6.0	3.5	2.2	20.0	12
黄葉系サクセション	16.0	10.8	7.2	4.0	3.2	20.7	12
MP-22	-	11.5	7.0	4.0	2.7	0.0	12
晩生南部	13.5	10.2	5.8	3.0	2.0	20.0	13
改良中野早春	14.4	11.0	7.2	4.2	2.5	16.7	13
富士早生	13.8	8.8	4.8	3.5	2.2	20.0	13
野崎中生	14.3	11.0	6.5	5.0	-	20.0	13
FLOWER OF SPRING	14.2	8.8	6.3	4.0	2.5	20.0	13
三池中生	16.3	11.4	6.7	3.5	2.7	14.3	14
金系201号	16.4	9.4	6.8	3.8	2.3	17.2	15
黒葉サクセション	16.5	10.0	6.5	4.0	2.5	20.7	16
あさしお	16.8	10.8	6.8	4.0	2.8	20.0	16
T520	18.7	11.4	7.3	3.7	2.0	20.0	18

1. 平成24年12月5日における葉数(各区6個体の平均値)  
 2. 定植日 1区:10/9, 2区:10/22, 3区:10/29, 4区:11/9, 5区:11/21  
 3. 平成25年4月28日に花芽形成が認められた個体の割合(花芽形成個体/全個体x100)

表2. 相転換前後で発現が変動する遺伝子(抜粋)

Transcript_Name	9枚				11枚				13枚				14枚				TAIR10 Annotation	
	RPKM <sup>a)</sup>				RPKM <sup>a)</sup>				RPKM <sup>a)</sup>				RPKM <sup>a)</sup>				Top hit	e-value
Up-regulated																		
Locus_27653	0.94	18.21	34.59	354.89	At1g72290.1	3.00E-35	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein											
Locus_27686	0.47	2.7	3.31	56.51	At5g24770.1	5.00E-98	vegetative storage protein 2											
Locus_27711	0.25	0.45	5.97	16.99	At5g59310.1	2.00E-26	lipid transfer protein 4											
Locus_25805	0.6	0.86	2.92	26.11	At1g75280.1	4.00E-135	NmrA-like negative transcriptional regulator											
Locus_27703	0.9	5.7	18.34	39.08	At2g14610.1	2.00E-67	pathogenesis-related gene 1											
Locus_27317	0.33	0.19	1.87	14.39	At1g14520.2	2.00E-101	myo-inositol oxygenase 1											
Locus_27547	0.61	2.41	3.31	19.22	At3g28740.1	3.00E-102	Cytochrome P450 superfamily protein											
Down-regulated																		
Locus_19132	6.08	13.3	1.28	0.43	At5g67420.1	7.00E-18	LOB domain-containing protein 37											
Locus_15768	10.89	8.83	1.25	0.76	At5g64570.1	3.00E-133	beta-D-xylosidase 4											
Locus_22264	6.21	1.34	0.9	0.14	At1g70260.1	5.00E-81	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein											
Locus_14915	10.16	4.57	1.16	0.22	At2g40330.1	2.00E-72	PYR1-like 6											
Locus_20960	4.47	0.37	0.58	0.08	At3g48360.1	5.00E-40	BTB and TAZ domain protein 2											
Locus_20830	14.96	11.06	0.09	0.05	At1g74160.1	6.00E-25	unknown protein											
Locus_19120	2.68	8.2	1.51	0	At1g77990.1	2.00E-12	STAS domain / Sulfate transporter family											

<sup>a)</sup> RPKM=カウント数 x (1,000,000/全カウント数) x (1,000/gene length)

(2) Rad-seq 方によるゲノムワイド多型の取得

GWAS 解析に供する多型データの取得は Rad-seq 方を用いた。次世代シーケンスにより得られたリードをキャベツの公開ゲノム配列へマッピングし、Stacks による SNP のコールを行った。欠測となる遺伝子座が多く、GWAS を行うに十分な多型データを取得することができなかった。今後、制限酵素を変える、SNP アレイ等の他のプラットフォームのデータを蓄積する等の対策を講じる必要がある。

(3) 相転換時期に発現が変動する遺伝子の配列取得

全てのリード(191,260,484 配列)をショートリード用のアセンブルプログラムである velvet を用いて de novo アセンブルすることによりマップ率の向上を図った。その結果、29,473 個、全長 36.3Mb の冗長性の無い遺伝子配列セットが構築され、76.3%のリードをマップする事に成功した。続いて各遺伝子について RPKM 値の算出およびアノテーション付与を行った。相転換の前後で発現が変動する遺伝子を抽出したところ、1,753 遺伝子が相転換後に 2 倍以上発現上昇しており、1/2 以下に発現が減少していた遺伝子は 484 遺伝子であった(表2)。相転換に伴い発現が著しく上昇する遺伝子群にはトリプシンインヒビターをコードする遺伝子等、虫害抵抗性に関する遺伝子が多く見られた。同じく発現が上昇する遺伝子群には、シロイヌナズナにおいて幼若相から成熟相への転換時に発現が上昇する *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE(SPL)* が含まれていた。今後、キャベツの相転換における同遺伝子の関与を詳細に解析する必要がある。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

柿崎智博、小原隆由、吹野伸子、畠山勝徳、松元哲、榛澤英昭、石田正彦 キャベツの抽だい性に関するダイアレル分析 日本育種学会第126回講演会 2014年9月27日、南九州大学(宮崎県都城市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿崎 智博 (KAKIZAKI, Tomohiro)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 野菜育種ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：30547229