

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：87110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850025

研究課題名(和文) イチジクにおけるゲノム研究基盤の構築とフィトクロムB遺伝子変異の解析

研究課題名(英文) Construction of the information infrastructure for genomic research and phytochrome gene mutation analysis in fig (*Ficus carica* L.)

研究代表者

池上 秀利 (Ikegami, Hidetoshi)

福岡県農林業総合試験場・豊前分場・研究員

研究者番号：40502414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： イチジクのゲノム情報基盤を整備するとともに、イチジクに特徴的な花芽分化様式に関わるFcFT1遺伝子の発現制御の背景を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

最初に、イチジクで初となる全ゲノム概要配列および高密度連鎖地図を構築した。次いで大規模遺伝子発現プロファイルに基づき、FcFT1制御の候補遺伝子を複数特定した。そして、特定の候補遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、機能評価を行った。

以上から、FcFT1発現制御の一端が明らかとなり、同時にゲノム情報基盤が整ったことで、花成等の諸形質に関わるゲノム領域や遺伝子を効率的に解析・評価することが可能となった。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study is to construct a genome information base and uncover the background of the expression control of the *FcFT1* gene related to flower bud differentiation characteristic to fig (*Ficus carica* L.).

The first draft genome assembly was established and high density linkage map were constructed with NGS technologies. Next, based on the large-scale transcriptome profile, plural candidate genes for *FcFT1* regulation were identified. Simultaneously, *A. thaliana* transformants with a candidate gene were created and those transformants were evaluated.

From the above, a part of *FcFT1* expression control was revealed. At the same time, the genome information infrastructure has been prepared, making it possible to efficiently analyze and evaluate genomic regions and genes involved in various traits such as flowering.

研究分野：園芸科学、果樹育種

キーワード：ドラフトゲノム解読 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

イチジクの花芽(花序=果実)は他の多くの果樹と異なり、結果の当年に分化が誘導され、かつその分化時期が長期的に継続する。また同じ結果枝において、花芽分化は下位から上位の節に向かって順に連続して進行する。過去の研究課題(研究課題:23780037)において、上記の時間的、空間的な花芽分化様式に *FcFT1* の発現が強く関連することが明らかとなっているが、*FcFT1* 上位の発現制御の詳細は明らかでなかった。

2. 研究の目的

本課題では *FcFT1* の発現制御にフィトクロム遺伝子が関与しているとの仮説のもと、フィトクロム遺伝子の解析を中心に当初の研究計画を設計した。しかし、ゲノム支援制度の活用により、*FcFT1* の制御に関わる遺伝子を大規模・高精度に予測することが新たに可能となった。そこで本課題では、計画を一部変更()し、イチジクのゲノム情報基盤の整備、*FcFT1* 制御因子の新規探索、*FcFT1* 制御候補遺伝子の機能評価の3つを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) イチジクゲノム研究基盤の構築

次世代シーケンサーHiSeq2000により新規ゲノム配列情報を獲得し、過去に取得したゲノム配列情報と合わせて新規のアセンブル作業を行った。また本アセンブリデータを参照してイチジクの遺伝連鎖地図を構築し、配列情報から予測される花成関連遺伝子群についてマッピングを行った。

(2) *FcFT1* 制御因子の新規探索

FcFT1 発現量の変動する時系列および空間系列の計15サンプルについてHiSeq2500ペアエンド解析によるRNA-seqを実施した。得られたリードのアセンブルと遺伝子予測を行い、予測された遺伝子について発現量の定量と発現量に基づいた遺伝子相互間の相関解析及びネットワーク解析を実施した。

(3) *FcFT1* 制御候補遺伝子の機能評価

目的遺伝子の導入用ベクターを構築して、シロイヌナズナの形質転換を行った。作出した形質転換株(T1)および野生型株を培地上で養成し、花成への影響を調査するとともにT2種子の獲得を行った。

4. 研究成果

(1) 新規アセンブルの結果、27,995個のスキファールド(イチジクドラフトゲノム配列)が得られた。その情報量は約248Mb(N50=166kb)であり、推定ゲノムサイズ約350Mbの約70%に相当した。AUGUSTUSによる遺伝子予測では、計36,138個の遺伝子が予測された(表1)。ゲノム構造の比較ではナツメと最も類似しており、またアミノ酸レベルでは

クワ遺伝子と最も類似(74.0%)していた。また、イチジクゲノムには反復配列が多く含まれていた。

表1 イチジクドラフトゲノムの概要

Estimate of genome size	350Mb
Number of scaffolds (100bp)	27,995
Total size of assembled scaffolds	247Mb
N50 (scaddolds)	166kb
Longest scaffold	1.7Mb
Number of contigs	2,807,457
Total size of assembled contigs	466Mb
N50 (contigs)	241b
Longest contig	10,794b
GC content	33.38%
Number of gene models	36,138
Number of annotated gene models	25,011
Rate of annotated gene models	69.2%
Interspersed or simple repeats masked	49.5Mb
Repeat masking rate	20.0%
Total size of transposable elements	3,061,239
Transposable elements share in genome	1.24%

次に交配実生52個体のRAD-Seq情報に基づき連鎖地図の構築を行った。その結果、マーカー数7,498、総地図長1024.2cMからなる高密度遺伝連鎖地図の構築に成功した(図1)。本地図に花成関連遺伝子ホモログ群をマッピングしたところ、例えば *FcFT1* はFc02連鎖群(20cM付近)、*FcTFL1-2* はFc03連鎖群(45cM付近)、*FcDOF3* はFc05連鎖群(32cM付近)に座乗することを確認できた。一部の遺伝子(*FcFT2*、*FcTFL1-1*他)については座乗位置が不明であった(データ略)。

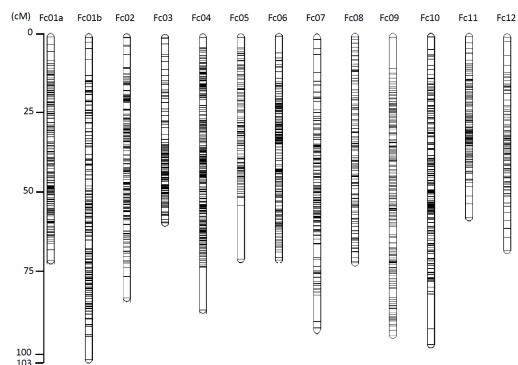


図1 イチジクの高密度連鎖地図

(2) *FcFT1* 制御因子の新規探索

葉由来のサンプルから総計約8億リードのRNA-seq情報を取得した。空間系列の解析においては対象サンプル数が少なく、解析結果の信頼性が十分でなかったため、以下時系列のデータに基づく解析結果を示す。

時系列解析系においては *FcFT1* と極めて強い相関(>0.9)のある遺伝子として502個(正501個、負1個)の遺伝子が(表1)、強い相関(0.8~0.9)のある遺伝子として2,330個の遺伝子が見出された。これらの遺伝子群には *Squamosa promoter-binding (SPL)* や *CONSTANS-like (CO)* 等の既報の花成関連遺伝子が多く含まれており、特に光周期経路上のものも多く存在していたことから、*FcFT1*

が主に光周期経路と齡経路により制御されていることが推察された。またプロファイルの結果から自律的経路の関与も示唆された。光周期経路においては、明期開始後早期に *FcFT1* に先行して *GI* および *CO* ホモログの発現上昇が認められ、*GI-CO-FT* の制御関係の保存が示唆された。

さらに *FcFT1* と極めて強い相関が認められる機能未知な遺伝子が 38 種類検出された。これら機能未知な遺伝子群は *FT* を介した花成制御に関わる新規の遺伝子候補として貴重な情報になると考えられる。

既知花成関連遺伝子の中では、*FcDOF3* の発現が光反応性（暗期に発現量増加、明期に発現量減少）を有し、かつ *FcFT1* 発現（明期に発現量増加、暗期に発現量減少）と相反する特徴を示した(図 2)。このことから、そこで(3)では *FcDOF3* を対象に解析を行った。

表 2 *FcFT1* と発現相関する遺伝子リスト(上位 20)

相関係数	アノテーション
0.977	DNA repair protein rhp54 [Morus notabilis]
0.977	PREDICTED: galactokinase-like [Vigna radiata var. radiata]
0.973	### Not characterized ###hypothetical protein L484.007652 [Morus notabilis]
0.973	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase [Morus notabilis]
0.972	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g18750, chloroplastic [Prunus mume]
0.972	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g25360 [Malus domestica]
0.972	glycine-rich RNA-binding protein 6, mitochondrial [Prunus mume]
0.971	extensin-2-like [Solanum tuberosum]
0.969	phosphoethanolamine N-methyltransferase-like [Glycine max]
0.967	Fanconi anemia group 1 protein [Prunus mume]
0.966	squamosa promoter-binding protein 1 [Nelumbo nucifera]
0.965	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g32630 [Prunus mume]
0.964	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g38150-like [Pyrus x bretschneideri]
0.961	TT12-2 MATE transporter [Theobroma cacao]
0.96	Protein GRIP [Morus notabilis]
0.96	Ribosomal L18p/L5e family protein, putative [Theobroma cacao]
0.96	### Not characterized ###hypothetical protein L484.015186 [Morus notabilis]
0.96	DNA-damage-repair/tolerance protein [Morus notabilis]
0.959	5'-adenylylsulfate reductase 1 [Morus notabilis]
0.958	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g33350 [Prunus mume]

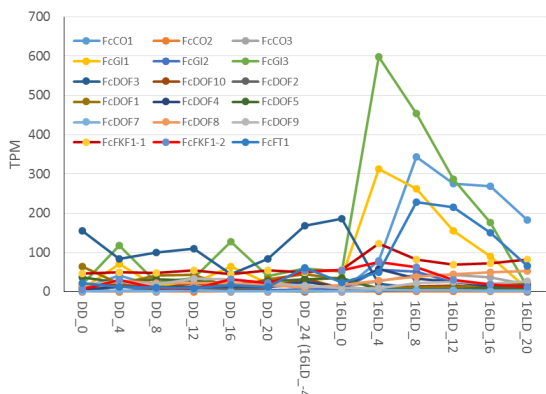


図 2 光周期時系列における花成関連遺伝子の発現変動(一部)

(3) *FcFT1* 制御候補遺伝子の機能評価

(2)において *FcFT1* 制御に関わる因子として有力であった *FcDOF3* のシロイヌナズナ形質転換体(T1世代)の種子を獲得した。さらに抗生物質耐性を有する T1 個体をスクリーニングし、該当個体を養成した。選抜 T1 個体では野生型と比較して、ロゼット葉数が多いことが認められた。今後 T2 世代での検証が必要であるが、*FcDOF3* の花成への影響が示唆された。

以上の結果から、*FcFT1* の制御には齡経路、

光周期経路、自律的経路の関与が推定され、光周期経路においては *FcDOF3* と *FcFT1* 発現抑制との関係が示唆された。さらに、イチジクのゲノム情報基盤が整ったことで、花成等の諸形質に関わるゲノム領域や遺伝子を効率的に解析・評価することが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mori K., Shirasawa K., Nogata H., Chiharu Hirata, Kosuke Tashiro, Tsuyoshi Habu, Sangwan Kim, Shuichi Himeno, Satoru Kuhara and Ikegami H. Identification of RAN1 orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). Scientific Reports. 41124 (2017) 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

IKEGAMI H., Mori K., Hirata C., Tashiro K. and Kuhara S. Draft Genome Sequence of the Fig Tree (*Ficus carica* L.). V International Symposium on Fig, 2015.8.31

池上秀利、白澤健太、森一樹、田代康介、久原哲、羽生剛、平田千春、姫野修一、RAD-seqによるイチジク連鎖地図の作成 園芸学会平成27年度秋季大会 2015.9.27 徳島市

〔その他〕(計3件)

世界で初めてイチジクのゲノム配列の解読に成功 - 福岡県ホームページ

<http://www.pref.fukuoka.lg.jp/press-release/itizikugenomu.html>

文部科学省科学研究費 新学術研究領域「ゲノム支援」拡大班会議 プログラム&要旨集 (2014) pp.23

平成22年度~27年度科学研究費助成事業(科学研究費補助金)(新学術領域研究(研究領域提案型)「生命科学系3分野支援活動」)研究成果報告書, ゲノム科学の総合的推進に向けた大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援(ゲノム支援)(2016) pp.238

6. 研究組織

(1)研究代表者

池上 秀利 (HIDETOSHI, Ikegami)

福岡県農林業総合試験場・豊前分場・研究員
研究者番号: 40502414

(2)連携研究者

久原 哲 (KUHARA, Satoru)

九州大学農学研究院・教授
研究者番号: 00153320

田代 康介 (TASHIRO, Kosuke)

九州大学農学研究院・准教授

研究者番号：00192170

白澤 健太 (SHIRASAWA, Kenta)
公益財団法人かずさ DNA 研究所・先端研究
部・主任研究員
研究者番号：60527026