

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04433

研究課題名(和文) プラシカ作物の種子春化・緑体春化機構の解明と緑体春化型ハクサイの育成

研究課題名(英文) Study on the mechanism of seed- and green plant-vernalization and development of green plant-vernalization type Chinese cabbage

研究代表者

岡崎 桂一(Keiichi, Okazaki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20270936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：セイヨウナタネの49系統の春化特性を調査し、イスズナタネ(春化要求性、低い)×合成ナプス(春化要求性、強)のF2集団育成した。また、ハクサイの第2染色体の上端にキャベツ由来の開花抑制遺伝子BoFLC2領域を導入した系統(以降、育成ハクサイ系統という)を育成したほか、キャベツ、ハクサイにおける、BrFLC1/2/3の発現量の多様性が春化要求量の多様性と関連性がある可能性を示した。また、RNA-seq解析では、BoFLC2座において低温処理によってlncRNAの発現が誘導されることを示した。育成ハクサイ系統は元品種のハクサイ品種比べ高い晩抽性を示し、育種母本として利用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We characterized vernalization requirement of 49 strains of oilseed rape, and developed the F2 population of Isuzu-natane (low vernalization requirement) × synthetic B. napus (strong vernalization requirement). In addition, we developed a line that was introduced the region containing BoFLC 2 region derived from cabbage into the top of chromosome 2 of Chinese cabbage. We showed that the differences of expression level of BrFLC 1/2/3 in cabbage and Chinese cabbage may be related to the diversity of vernalization requirement in cabbage and Chinese cabbage cultivars. The RNA-seq analysis revealed that long non coding RNA was expressed on BoFLC2 locus by low temperature treatment. Our developed Chinese cabbage line showed delay of flowering in the winter cropping pattern, compared with ordinary Chinese cabbage cultivars, indicating that it can be used as a breeding material.

研究分野：植物育種学

キーワード：春化 キャベツ ハクサイ 遺伝子発現 エピゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの花成形成では、春化に関わる開花抑制遺伝子 *FLC* の発現レベルは一定期間の低温を経たのちほぼゼロで維持され、その後、*FT* 遺伝子の発現が上昇し開花に至る。生殖細胞系を経ると *FLC* の発現抑制はリセットされ次世代で再び発現する。この制御は、*FLC* 座のクロマチンがエピジェネティックに化学修飾されることによると考えられているが、ブラシカ属作物の春化機構が、同様な機構で行われているのかどうか不明である。また、ブラシカ属作物で知られる緑体春化と種子春化がどのように制御されているかまったく分かっていない。

そこで、本研究グループでは申請時の段階までにブラシカ作物の種子春化・緑体春化機構を解明すべく研究材料を整備した。まず、低温遭遇時期の植物体サイズを5段階設け、翌春の開花率を調査する実験を、キャベツ90系統(遺伝資源系統とF1品種)で実施し、低温感応性に移行する生育ステージの品種間差を明らかにした。また、Aゲノム種のハクサイ(種子春化)とCゲノム種のキャベツ(緑体春化)との人為交雑から合成ナプスを育成した。この合成ナプスは緑体春化型であったが、Aゲノム種とCゲノム種の自然交雑種であるセイヨウナタネは種子春化型であることが知られている。さらに、Cゲノムが持つ緑体春化型をAゲノム種のハクサイに導入するためハクサイ(AA)×キャベツ(CC)の交雑により育成した合成ナプスのF1にハクサイを戻し交雑し、その後、BC3を育成した(図1)。BC3ではハクサイのAゲノムバックグラウンドをもち、Cゲノム染色体が添加された個体が育成された。この後代植物への予備な低温処理試験の結果、春化要求性が高まったハクサイが選抜できた。

2. 研究の目的

前述した材料を用いて、ブラシカ作物の種子春化・緑体春化機構の解明と緑体春化型ハクサイの育成を行うため、以下の実験を行う。(1)研究当初の予定にはなかったが、セイヨウナタネ品種の春化特性を明らかにするため、春播き、秋播きなどの播性を調査する。

(2)種子春化型ハクサイ×緑体春化型ハクサイおよび栽培ナタネ(種子春化)×合成ナプス(緑体春化)後代を用い、当該形質を決定するQTLを同定する。

(3)緑体春化型ハクサイ(AA)の全ゲノムを次世代シーケンサーで解析し、どのCゲノムの染色体断片が緑体春化に関与するか明らかにする。

(4)ハクサイおよびキャベツが持つ*FLC* オルソログ(*BrFLC1/2/3*, *BoFLC1/2/3*)や調節因子(*FLC* 座の sRNA, non-coding RNA)の発現解析や染色体

クロマチンのエピゲノム解析を行い、種子春化・緑体春化機構との関連を考察する。

(5)これらの実験と平行してCゲノム染色体が導入されたハクサイの現地圃場栽培試験を行う。

3. 研究の方法

(1)セイヨウナタネ品種の春化特性を明らかにするため、春播き、秋播きなどの播性が異なるセイヨウナタネ品種を49品種収集し、各品種の子葉ステージの植物体3個体を4週および8週間、4℃で低温処理し、春化特性を調査した。また、葉齢(子葉、2-3葉、7-8葉、10葉以上)別に植物体を8週間低温処理し、その後、20℃/日長16時間条件下で栽培して、開花習性を調査した。(2)栽培ナタネ(種子春化)と合成ナプス(緑体春化)を交雑したF2世代を用いて、種子および緑体春化型を決定するため、連鎖地図作成を試みた。(3)ゲノムに異種染色体断片が導入されているか検討するための次世代シーケンサーデータ解析ツールを開発した。これを用いて、BC3個体にCゲノム領域が移入されているか分析した。(4)①育成されたハクサイとその両親種の*FLC* ブラシカホモログの発現解析を行った。(4)②春化感応が可能になる前後のキャベツ系統(13葉齢で8週間の低温処理により開花)における低温応答の違いを明らかにするため、4-6葉齢、13-14葉齢個体を材料に、リアルタイムRT-PCRおよびRNA-seqによる遺伝子発現解析を行った。また、*BoFLC* 座由来の non-coding RNA の発現解析を行った。(4)③ハクサイでは、*FLC* の機能解析やRNA-seqにより低温処理により発現が変動する遺伝子及び non-coding RNA の網羅的な解析を行った。また、低温処理前後の植物体のヒストントリメチル化(H3K27me3, H3K4me3, H3K36me3)を分析するためChIP-seqを行った。(5)Cゲノム染色体が導入されたBC3S2の種子を冬期間に播種して春期に開花させ、特性を調査した。

4. 研究成果

(1)セイヨウナタネ品種の春化特性:セイヨウナタネのSpring type, Semi-winter type(アジア原産系統), Winter typeを含む49系統の春化特性を調査した。各系統とも低温処理がない場合には開花せず、春化要求性であることがわかった。子葉ステージの植物を4℃で低温処理するとSpring type系統は4週間の処理で開花した。Semi-winter typeは4週間処理では12系統中11系統が開花せず、8週間処理では1系統を除き全て開花した(図2)。Winter typeの多くの系統は8週間処理でも開花が見られなかった。これらの結果から、Spring type < Semi-winter type < Winter typeの順で長期間の春化要求性を持っていることがわかった。葉齢(子葉、2-3葉、7-8葉、10葉以上)別に植物体を8週間低温処理しところ、Semi-winter typeのイスズナタネは、全てのステージで開花し種子春化型と判定された。また、Winter typeのキザキノナタネ、きりりぼし、東北18号は、子葉ステージの低温処理では開花しないが、2-3葉ステージで8週間低温すると開花し*B. rapa*と*B. oleracea*の中間型と考えられた。ルタバガのWilhelmsburgerは*B.*

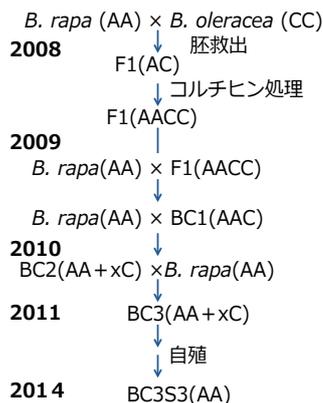


図1. キャベツ染色体添加型ハクサイ系統の育成及び緑体春化型ハクサイの育成

*oleracea*に近い緑植物春化型であった。これまで、*B. napus*は種子春化型であるとされていたが、今回の試験で、その春化の程度に種子春化から緑体春化型まで変異があることがわかった。

(2) セイヨウナタネ品種の春化特性の遺伝解析：セイヨウナタネの春化要求性の遺伝機構を解析するため、春化要求性が低いイスズナタネ×合成ナプス(春化要求性、強)のF2集団育成した。そのF2集団(134 個体)を低温処理し、各個体の開花の有無を調査したところ、開花個体が40 個体、不開花個体が92 個体となった。現在、この集団を使い、開花/不開花のグループに特異的な連鎖DNAマーカーをRAD-seqにより検索中であり、当初予定していたQTL解析を今後実施する予定である。DNAマーカーのうち、セイヨウナタネのCゲノムに含まれる

春化関連遺伝子 *BoFLC2* について、イスズナタネと合成ナプスの *BoFLC2* を識別するマーカーを作成したが、本マーカーのジェノタイピングとF2 集団における春化要求性に関するグルーピングには関連性はなかった。

(3) 育成ハクサイ系統におけるイントログレーション領域の同定：種間交雑後代の異種ゲノム置換領域を同定するため、ゲノム *de novo* シークセンスデータから置換領域を明らかにできるコンピューターソフト“Intromap”を開発した。これを用いてハクサイのAゲノムバックグラウンドへ導入されたキャベツ由来Cゲノム染色体部分を同定できた。この系統は、第2染色体(A02)の上端にキャベツ由来の開花抑制遺伝子 *BoFLC2* 領域を含むC2領域約6.5Mbpが置換されていた(以降、**育成ハクサイ系統**という)。従来法によって異種置換ゲノム領域を同定するには、受容親と供与親より得たゲノムNGSデータ間のアライメント解析に基づきvariant callを行い、リファレンスに対して相同性の低い領域を置換ゲノムとして決定する手間と時間がかかる方法が必要であったが、我々が開発した新規アルゴリズムを用いた“Intromap”ではコンピューターで自動計算ができる極めて有用なゲノム解析ツールである。

(4) ①育成ハクサイ系統および両親種における *FLC2* の発現解析：市販ハクサイ品種の子葉展開

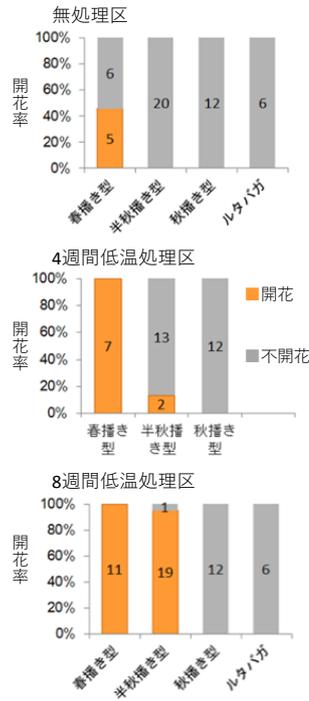


図2 セイヨウナタネ 49 品種の子葉ステージでの春化処理効果。図中の数字は個体数を示す。

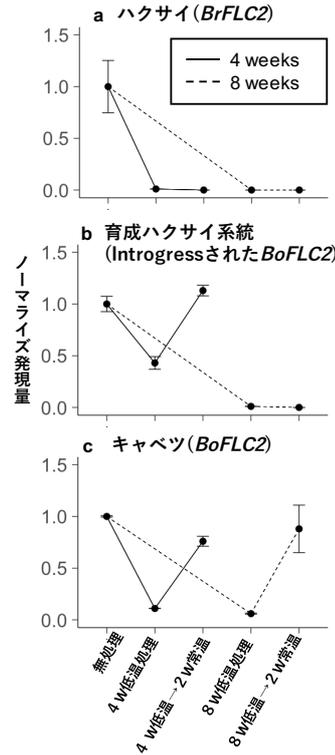


図3 *FLC2* 遺伝子の RT-qPCR 実験。4 週、8 週間低温処理(4w, 8w)およびその後 2 週間常温で栽培 (→2W)。

8 週間の低温処理では下方制御され、常温生育に戻した後も発現は上昇しなかった。この結果は、育成ハクサイ系統が4 週間の低温処理で開花に至らず、開花には8 週間の低温処理が必要であったことと符合した。4-8 週間の低温処理で開花しないキャベツの *BoFLC2* は、両方で再び発現が上昇した。一方、育成ハクサイ系統の生育ステージと低温処理の関係を調査するため、播種後2~12 週齢へ生育ステージが進んだ植物を4 週間定温処理すると(この処理ではハクサイは開花、キャベツは不開花)、週齢毎の試験区で16.7~50.0%の個体が開花した。したがって、育成ハクサイ系統の春化特性はハクサイとキャベツの中間型であることが示唆された。これらの結果から、ハクサイへキャベツの緑体春化機構を付与するには、*BoFLC2* に加え、協働して作用する他の分子メカニズムが必要であることが示唆された。

(4) ②キャベツ系統の低温感応試験における遺伝子発現解析：8 週間の低温処理前、処理期間中、処理後の葉における遺伝子発現を比較した結果、*BoFLC1/2/3* は各々異なる低温応答を示した。特に、*BoFLC2* の低温処理による安定した下方制御は生育ステージ依存的であることが示唆された。また、*BoFLC2* 座において、低温処理による lncRNA の発現誘導が確認されたが、生育ステージ依存性は見られなかった。RNA-seq 解析の結果、低温処理による発現変動遺伝子の中で、主にストレス応答、植物ホルモン応答、遺伝子発現制御、花成に関与するものの変動が生育ステージ依存的であることが示唆された。

実生は4 週および8 週間の低温処理で開花に至るが、育成ハクサイ系統の実生は、4 週間の処理では開花せず8 週間の処理で開花した。RT-qPCRの結果、ハクサイの *BrFLC2* は4-8 週間の低温処理で下方制御されたが、育成ハクサイ系統の *BoFLC2*

(introgressionで置換されたものは、4 週間では下方制御されたものの低温処理後の常温生育条件で、再び発現が上昇した(図3)。

一方、8 週間の低温処理では下方制御され、常温生育に戻した後も発現は上昇しなかった。この結果は、育成ハクサイ系統が4 週間の低温処理で開花に至らず、開花には8 週間の低温処理が必要であったことと符合した。4-8 週間の低温処理で開花しないキャベツの *BoFLC2* は、両方で再び発現が上昇した。一方、育成ハクサイ系統の生育ステージと低温処理の関係を調査するため、播種後2~12 週齢へ生育ステージが進んだ植物を4 週間定温処理すると(この処理ではハクサイは開花、キャベツは不開花)、週齢毎の試験区で16.7~50.0%の個体が開花した。したがって、育成ハクサイ系統の春化特性はハクサイとキャベツの中間型であることが示唆された。これらの結果から、ハクサイへキャベツの緑体春化機構を付与するには、*BoFLC2* に加え、協働して作用する他の分子メカニズムが必要であることが示唆された。

(4) ③ハクサイの低温感応試験における遺伝子発現解析およびエピゲノム解析：ハクサイでは、*BrFLC1*, *BrFLC2*, *BrFLC3*が開花抑制因子として働き、低温処理によりどれも同程度に発現が抑制されることを明らかにした。また、春化处理前の*BrFLC1/2/3*の発現量や、春化处理による*BrFLC1/2/3*の発現量の低下率には系統間差があることを明らかにし、この多様性が春化要求量の多様性と関連性がある可能性を示唆された。さら

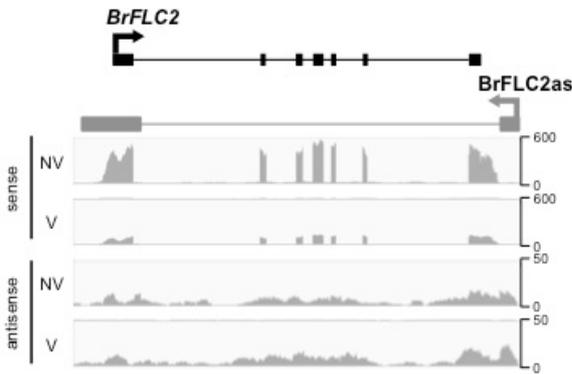


図4 *BrFLC2*で転写されるセンス *BrFLC2*とアンチセンス non-coding RNA, *BrFLC2as*のRNA-seq解析。NV(低温処理前), V(低温処理後)。

に、RNA-seqにより春化处理によって発現が変動する mRNA や Non-coding RNA を網羅的に解析し、*BrFLC2*や*MAF1*では、低温によって誘導される NATs が存在していた(図4)。

また、春化处理前後での H3K27me3 を網羅的に解析し、低温によって H3K27me3 蓄積量に変化する遺伝子を明らかにした。そして、*BrFLC*パラログや*BrMAF*パラログでは低温により第一エクソン近傍に H3K27me3 が蓄積し、低温から通常状態に戻すと H3K27me3 が遺伝子全体に広がることを明らかにした(図5)。

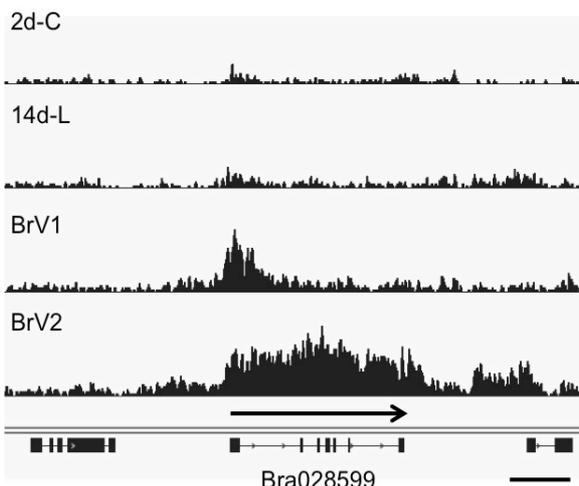


図5 *BrFLC2* (Bra028599)の春化处理前後の H3K27me3 の蓄積の様子。2d-C, 春化处理前の播種後2日の子葉；14d-L, 春化处理前の播種後14日の本葉；BrV1, 4週間の春化直後；BrV2, 4週間の春化处理の後、7日間通常条件で生育。

(5) 育成ハクサイ系統の現地栽培試験：冬期植え

付けハクサイトンネル栽培では、不時抽台しない晩抽性品種の開発が強く求められているため、育成ハクサイ系統の実証試験栽培を行った。茨城県のハクサイ産地での試験栽培では、育成ハクサイ系統は元品種のハクサイ品種比べ高い晩抽性を示し、育種母本として利用できることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

① Shea D.J., Y. Tomaru Y., E. Itabashi, Y. Nakamura, T. Miyazaki, T. Kakizaki, T. Nazmoon Naher, M. Shimizu, R. Fujimoto, E. Fukai, K. Okazaki (2018) The production and characterization of a *BoFLC2* introgressed *Brassica rapa* by repeated backcrossing to an F1. *Breed. Sci.*, In press, 査読あり。

② Itabashi E., K. Osabe, R. Fujimoto, T. Kakizaki (2017) Epigenetic regulation of agronomical traits in Brassicaceae. *Plant Cell Rep.* 37: 87-101, doi: 10.1007/s00299-017-2223-z, 査読あり。

③ Shea D.J., M. Shimizu, N. Nishida E. Fukai, T. Abe, R. Fujimoto, K. Okazaki (2017) IntroMap: a signal analysis based method for the detection of genomic introgressions. *BMC Genetics* 18 101, DOI 10.1186/s12863-017-0568-5 査読あり。

④ Shea D.J., E. Itabashi, S. Takada, E. Fukai, T. Kakizaki, R. Fujimoto, K. Okazaki (2017) The role of FLOWERING LOCUS C in vernalization of *Brassica*: the importance of vernalization research in the face of climate change. *Crop Pasture Sci.* 69: 30-39, doi.org/10.1071/CP16468, 査読あり。

⑤ Kawanabe T., Osabe K., Itabashi E., Okazaki K., Dennis E.S., Fujimoto R. (2017) Development of primer sets that can verify the enrichment of histone modifications and their application to examining the vernalization mediated chromatin changes in *Brassica rapa* L. *Genes Genet. Syst.* 191: 1-10, https://doi.org/10.1266/ggs.15-00058, 査読あり。

[学会発表] (計13件)

① 藤本 龍, 高田 紗都子, 西田 菜美子, 板橋 悦子, 安田 剛志, 柿崎 智博, 宇野 雄一(2018) 結球野菜の開花調節機構に関する研究の現状と今後の展望について。園芸学会平成30年度春季大会, 近畿大学

② 板橋 悦子, 柿崎 智博, 吹野 伸子, 岡崎 桂二, 藤本 龍, 小原 隆由(2018) キャベツの緑体春化における FLOWERING LOCUS C の役割。園芸学会平成30年度春季大会, 近畿大学

③ シェイ ダニエル, 高田 紗都子, 西田 菜美子, 板橋 悦子, 清水 元樹, 岡崎 桂二, 藤本 龍 (2018) LncRNA *BrFLC2as* in *Brassica rapa* differs from *Arabidopsis thaliana* *COOLAIR*, 日本育種学会第133回講演会, 九州大学

④ 西田 菜美子, 高田 紗都子, 板橋 悦子, 宮路 直実, 安田 剛志, 藤本 龍(2018) *Brassica rapa* にお

ける春化経路関連遺伝子の機能解析. 園芸学会平成 30 年度春季大会, 近畿大学

⑤ シェイ ダニエル, 戸丸 祐貴, 板橋 悦子, 宮崎俊夫, 柿崎 智博, 清水 元樹, 藤本 龍, 深井 英吾, 岡崎 桂一 (2017) *Brassica oleracea FLC2* 領域を移入交雑で導入した *Brassica rapa* の特性解析, 日本育種学会第 132 回講演会

⑥ Shea, D.J (2017) Phenotyping and analysis of *FLC2* expression in a hybrid introgressed *Brassica rapa* and its parental cultivar. KAAB International Symposium 2017, Niigata, Japan.

⑦ 高田 紗都子, 板橋 悦子, 宮路 直実, 安田剛志, 藤本 龍 (2017) *Brassica rapa L.* における春化による *FLC* のエピジェネティックな修飾変化の系統間比較. 園芸学会平成 29 年度秋季大会, 酪農学園大学

⑧ Shea DJ, Fukai E, Okazaki K (2016) IntroMap - A bioinformatics-based method for the detection of genomic regions of introgressive hybridization. Brassica 2016, which combines the 20th Crucifer Genetics Conference, and the 19th Australian Research Assembly on Brassicas, Melbourne Australia, Poster presentation.

⑨ Takada S., E. Itabashi, N. Miyaji, T. Takasaki-Yasuda, K. Osabe, E. S. Dennis, R. Fujimoto (2016) The epigenetic regulation of *FLC* expression by vernalization in *Brassica rapa L.* Brassica 2016, which combines the 20th Crucifer Genetics Conference, and the 19th Australian Research Assembly on Brassicas, Melbourne Australia, Poster presentation.

⑩ 高田 紗都子, 板橋 悦子, 宮路 直実, 安田剛志, 藤本 龍 (2016) *Brassica rapa L.* の開花期の決定における *FRIGIDA* と *FLOWERING LOCUS C* の役割. 日本育種学会第 130 回講演会, 鳥取大学

⑪ 藤本 龍, 高橋 聡史, 板橋 悦子, 鈴木 稜, 関 原明 (2016) ハクサイにおけるエピゲノム解析, 日本育種学会第 130 回講演会, 鳥取大学

⑫ 高田 紗都子, 板橋 悦子, 宮路 直実, 安田剛志, 藤本 龍 (2016) *Brassica rapa L.* における開花関連遺伝子 *FRIGIDA* の発現解析および全長配列の決定園芸学会平成 28 年度秋季大会, 名城大学

⑬ 高田 紗都子, 板橋 悦子, 宮路 直美, 安田剛志, 藤本 龍 (2016) *Brassica rapa L.* における春化経路関連遺伝子 *FLOWERING LOCUS C* の発現解析およびエピジェネティックな転写制御について. 園芸学会平成 28 年度秋季大会, 名城大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 桂一 (Keiichi Okazaki)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号 : 20270936

(2) 研究分担者

深井 英吾 (Eigo Fukai)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号 : 00570657

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

柿崎 智博 (Tomohiro Kakizaki)
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・主任研究員
研究者番号 : 30547229

板橋 悦子 (Etsuko Itabashi)
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・研究員
研究者番号 : 70783273