

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15207

研究課題名(和文)ヘテロシス発現に寄与する遺伝子の分類基準と育種への応用に関する研究

研究課題名(英文) Study on identification of genes associated with heterosis and application for breeding.

研究代表者

北崎 一義 (Kitazaki, Kazuyoshi)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：60532463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロシス(雑種強勢)は、交雑によって得られた後代が親を上回る現象で、農作物の多収に貢献しているが、その分子機構は不明である。そこで、テンサイの初期生育におけるヘテロシスの発現を調査した。表現型解析の結果、ほぼ全身のバイオマスに関する形質でF1は親よりも大きく、直根の肥大には細胞サイズが寄与していることが示唆された。また、相対成長速度がF1で親よりも高かった。そこで、葉および直根の遺伝子発現解析を行ったところ、F1のバイオマス増加を直接説明できる代謝経路の促進は見られなかった。これらの結果から、テンサイ初期生育におけるヘテロシスの発現には多数の遺伝子が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハイブリッド品種は環境ストレスに強く、安定して収量を得られるため、今後さらにニーズは高まるであろう。一方、品種育成には多大な時間と労力を要し、効率化や省力化技術の開発が期待されている。本研究は、その基礎となるヘテロシスの分子機構や発現様式について詳細に調査し、種々の知見を得ることができた。また、バイオマスを一定環境で経時的に評価できる実験系を構築できたことは、今後の研究と発展にとって重要である。

研究成果の概要(英文)：Heterosis, which is phenomenon that progeny of varieties of species exhibit greater various traits than both parents, contributes to produce crops in high yields. However, mechanisms of heterosis remain unclear. This study analyzed expression of heterosis in sugar beet during early growth. Phenotypic investigation showed that almost all traits related to biomass of F1 were higher than those of both parents and cell size likely contribute to increase biomass in tap roots. Relative growth rate is higher in F1 than in parents. As the results of gene expression analysis by RNA-seq in leaf and tap root, no up-regulation of metabolic pathways explained that biomass of F1 more increased. These results suggested that there are many genes related to heterosis in sugar beet during early growth.

研究分野：植物育種

キーワード：ヘテロシス テンサイ 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘテロシス(雑種強勢)は、種内あるいは種間の交雑によって得られた後代が、バイオマスや繁殖力などにおいて両親を上回る形質で、多くの生物種で確認されている。農作物では、ハイブリッド品種にこの形質が利用され、安定的な多収に貢献されている。ヘテロシスの程度の強弱は両親の組み合わせによって決まるため、ハイブリッド育種では組み合わせを考慮した親系統選抜が重要になる。しかし、ヘテロシスの分子機構の詳細は明らかにされておらず、分子マーカー等を用いた効率的な選抜技術は確立されていない。また、テンサイ(サトウダイコン)において、ヘテロシスに関する研究報告例はほとんどない。そこで本研究では、ハイブリッド育種の効率化に資するため、テンサイ初期生育におけるヘテロシス発現の分子機構の解明に取り組む。

### 2. 研究の目的

テンサイ初期生育におけるヘテロシスの発現機構を明らかにするため、以下を明らかにする。

- (1) 表現型を詳細に調査する。これにより、バイオマス増加に寄与する形態形成等を明らかにする。
- (2) F1 系統のバイオマス増加に寄与する遺伝子群およびその特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試材料

北海道農業研究センター育成の一組の親系統(P1、P2)およびそのF1系統を用いた。これは圃場試験においてF1のバイオマス増加が確認されている。さらに、F1にP2を戻し交雑したBC1F1集団を用いた。

#### (2) 栽培条件と表現型解析

屋内人工光水耕栽培装置を構築し、播種後(DAS)30日までの生育を調査した。各器官について表現型を調査した。また、直根で最も肥大した部分の横断切片を作製し、各組織の細胞数や細胞サイズを顕微鏡撮影画像から計測した。

#### (3) RNA シーケンスと遺伝子発現解析

26 DAS の第3(4)葉と直根からRNAを抽出し、Novaseq6000(Illumina社)にて、シーケンスリードを得た。それらをHISAT2(Kim et al. 2013)を用いてリファレンス配列にマッピングした。発現変動遺伝子群(DEGs)の検出は、Niederhuth et al. (2007)の方法を一部変更して行った。Gene ontology (GO) 解析にはBlast2Go(biobam社)を用いた。

#### (4) DNA シーケンスと塩基多型の検出

両親およびBC1F1集団の各個体について、それぞれDNAを抽出し、DNAシーケンスをした後、GRAS-Di技術(トヨタ自動車社)にてアンプリコン多型を得た。また、シーケンスリードをリファレンス配列にBWA(Li et al. 2009)を用いてマッピングし、GATK(McKenna et al. 2010)にて塩基多型を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオマス増加に関するヘテロシスの表現型解析

表現型を詳細に調査するため、栽培環境の変動が小さい屋内水耕栽培装置を構築した(図1)。まず定植前について、発芽率は三系統間でほとんど違いが見られないものの、播種から初根が1cmに達するまでの日数はF1系統が両親系統よりも一日程度短かった。次に、定植後(14 DAS~)の表現型について、長さや重さなど全身の48形質を4期間で調査した。その結果、ほぼ全て形質でF1系統が両親系統よりも上回っており、栽培期間が長いほどその差は顕著に見られた。一方、発達ステージの指標である葉数や直根内の形成層数に著しい違いは見られなかった。24 DAS以降において、F1系統と両親系統のバイオマスは一日以上の差があり、少なくとも発芽後の生育にもヘテロシスに関する何らかの違いがあることが示された。26 DASの個葉の光合成能力に有意差は見られなかった。一方、草姿について、P1は立性を、P2は伏性を示し、F1はその中間型であった(図2)。先行研究において、F1の両親の中間的な形態形成が栽培環境により適し、バイオマス増加の主因となった事例が報告されている。そこで、BC1F1集団を用いて各個体の草姿とバイオマスの関係を調査したところ、両者に有意な相関は見られなかった。また成長解析では、相対成長速度は全系統で24-27 DASが最大で、F1系統が最も大きかった。次に、直根の横断切片を作製し、内部の組織構成を比較した。その結果、二つの形成層間領域において、細胞数と細胞サイズはF1が大きく、全系統で直根重量とそれぞれ有意な相関がみられた。さらに、BC1F1集団を用いて形質間のクラスター解析を行ったところ、直根重量は細胞数よりも細胞サイズと近いクラスターを形成した。

#### (2) F1 系統のバイオマス増加に寄与する遺伝子群の探索

表現型解析で相対成長速度が最も高かった期間内の26 DASについて、本葉と直根の一部からRNAを抽出し、RNAシーケンスによる遺伝子発現解析を行った。主成分分析の結果、第一主成分と第二主成分の二次元プロットにおいて、いずれの器官においてもF1系統は両親系統の中間に

プロットされた。次に、系統間で発現変動遺伝子(DEG)を検出した。また、テンサイリファレンスゲノムにコードされる遺伝子について、シロイヌナズナのアノテーション情報を参照に GO タームを付与し、選定された遺伝子群について GO エンリッチメント解析をおこなった。その結果、DEG の数は両器官ともに両親間が多く、F1 系統と各親系統間はその約半分であった(図 4)。それぞれ GO エンリッチメント解析を行ったところ、F1 系統と各親系統の間に有意な GO タームは検出されなかった。そこで、各遺伝子を詳細に発現パターンでまとめた。その結果、発現量に差がない遺伝子が最も多く、全体の約 60%であった。さらにこの遺伝子群の約 65%は両器官ともに同じ発現パターンのカテゴリーに属し、GO 解析ではハウスキープな機能を保持するものが多かった。一方、F1 系統が両親系統よりも有意に発現量が多いもしくは少ない遺伝子群はそれぞれ 1%に満たなかった。また両器官で同じカテゴリーに属する遺伝子は十数%で、器官特異的な発現パターンを示す遺伝子が多かった。F1 系統で発現が促進される遺伝子群の中には、他植物種でバイオマス増加に関与することが報告されている転写因子やセルロース合成酵素をコードする遺伝子が見つかり、F1 系統のバイオマス増加に示唆的なデータを得た。一方、発現量が少ない親系統(劣性親)に対し、F1 系統で有意に発現量の多い遺伝子群が約 6%見つかった。先行研究において、このような遺伝子が F1 でヘテロ接合になることで、発現量が少ないという劣性親の弱有害性を補完しているという分子モデルが報告されており、本研究においても同様の機構が寄与している可能性が示された。

BC1F1 集団について、DNA シーケンスデータからゲノム全体の塩基多型を検出し、各個体の DNA マーカーのヘテロ接合度を算出した。この値と各形質の関連を調べたところ、地上部乾物重との間に緩やかだが有意な相関が見られた。しかし、直根の細胞サイズや細胞数との間に相関は見られなかった。また、予備的に行った QTL 解析では、高い LOD 値を示す QTL は検出されなかった。

以上より、テンサイ初期生育のヘテロシス発現に関する様々な基礎的知見を得ることができた。表現型解析では、バイオマス増加に寄与する可能性が高い形質が見つかった。特に、相対成長速度といった時間軸を含む形質は、ヘテロシス発現機構において重要な意味をなす可能性が高く、今後の解析でも注目すべきである。一方、遺伝子発現解析では、F1 系統のバイオマス増加を直接的に説明できる発現変動遺伝子群はみつからなかった。これまでに、複数の植物種において、炭素固定や細胞周期などに関与する遺伝子群のエピジェネティックな発現制御が F1 のバイオマス増加に寄与しているとする報告例がある。この違いが植物種によるものなのか、あるいは栽培環境によるものかなどは今後明らかにする必要がある。一方、後代集団の解析においてヘテロ接合度と地上部乾物重に緩やかながらも有意な相関が見られた。しかし、バイオマス増加に寄与すると考えられた個々の形質(直根の細胞サイズや細胞数など)とは明確な相関が見られなかった。今後は複数系統の組み合わせを用いて、各形質とバイオマス増加の因果関係を明確にし、それに関わる遺伝子群や分子機構を明らかにする。

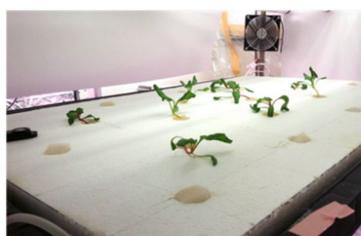


図 1

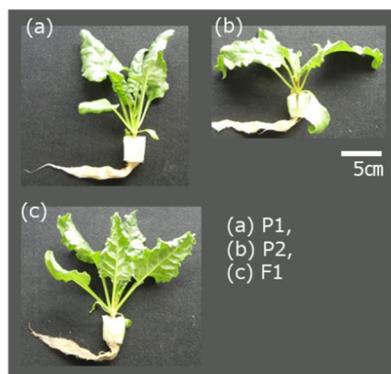


図 2

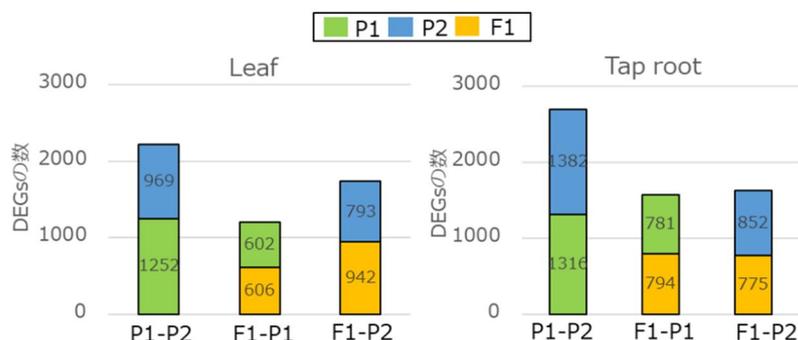


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arakawa T, Ue S, Sano C, Matsunaga M, Kagami H, Yoshida Y, Kuroda Y, Taguchi K, Kitazaki K, Kubo T	4. 巻 132
2. 論文標題 Identification and characterization of a semi-dominant restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> )	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 227-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s00122-018-3211-6">https://doi.org/10.1007/s00122-018-3211-6</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa T, Uchiyama D, Ohgami T, Ohgami R, Murata T, Honma Y, Hamada H, Kuroda Y, Taguchi K, Kitazaki K, Kubo T	4. 巻 13
2. 論文標題 A fertility-restoring genotype of beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.) is composed of a weak restorer-of-fertility gene and a modifier gene tightly linked to the Rf1 locus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0198409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198409">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198409</a>	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 -

1. 著者名 Kitazaki K, Fukushima A, Nakabayashi R, Okazaki Y, Kobayashi M, Mori T, Nishizawa T, Reyes-Chin-Wo S, Michelmore RW, Saito K, Shoji K, Kusano M	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolic Reprogramming in Leaf Lettuce Grown Under Different Light Quality and Intensity Conditions Using Narrow-Band LEDs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-018-25686-0">https://doi.org/10.1038/s41598-018-25686-0</a>	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保めぐみ、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 テンサイの初期生育にみられるヘテロシス (雑種強勢) の網羅的な表現型解析
3. 学会等名 てん菜研究会 (第16回技術研究発表会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保めぐみ、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 網羅的表現型解析によって見出されたテンサイ初期生育のヘテロシス発現に関する形態的特徴
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北崎一義、大久保めぐみ、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ初期生育におけるヘテロシスの分子機構解明に向けたゲノム配列比較解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北崎一義、大久保めぐみ、久保友彦
2. 発表標題 ヘテロシス(雑種強勢)のオミクス解析に向けたテンサイの初期生育における表現型解析とゲノム比較
3. 学会等名 第36回 日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保めぐみ、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 テンサイの生育初期で発現するヘテロシスの表現型解析および親系統間のゲノム配列比較
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保めぐみ、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 テンサイ初期生育において発現するヘテロシス(雑種強勢)の形態的特徴
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 年次講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北崎一義、大久保めぐみ、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ初期生育におけるヘテロシスの表現型と遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保めぐみ、佐藤宏亮、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 テンサイ初期生育の遺伝子発現およびゲノム解析によるヘテロシス分子モデルの検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北崎一義、大久保めぐみ、佐藤宏亮、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ初期生育におけるヘテロシス(雑種強勢)に関する遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保 めぐみ, 佐藤 宏亮, 久保 友彦, 北崎 一義
2. 発表標題 テンサイ初期生育におけるヘテロシス(雑種強勢)の発現に關与する遺伝子群の探索
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019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