

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19259

研究課題名(和文) アブラナ科植物におけるゲノムの自己/非自己認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the self and non self recognition mechanism of genome in Brassicaceae

研究代表者

房 相佑 (Bang, Sang Woo)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：50302443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサイ・キャベツ・ダイコン・カブ・ブロッコリー・セイヨウナタネなど食用に用いるアブラナ科作物においては、未だに簡便にDH系統を育成する方法が確立されず、アブラナ科植物の育種や遺伝学研究における重要課題となっている。本課題によって、組織培養技術や遺伝子組み換え技術に依存しないアブラナ科作物における新しいDH系統の作出法を確立できる「香味菜法」が組織学的、細胞遺伝学および分子遺伝学的方法で検討された。その結果、「香味菜法」は今後アブラナ科野菜の品種改良や遺伝学的研究の飛躍的な進歩に大いに寄与できるものと期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Brassica栽培種×「香味菜」のハイブリッド胚の発生中に花粉親である「香味菜」ゲノムの染色体が選択的に排除されるメカニズムを研究した。「香味菜」ゲノムの染色体は、胚発生後心臓型胚では確認できたが、その後除去されDH系統が得られた。本研究の「香味菜法」は、Brassica栽培種の品種改良に用いられるDH系統を簡便かつ迅速に育成可能となる。今後、親ゲノムはどのようにハイブリッド核内で空間的に分離・排除されるのか、また種子親ゲノムは何時倍加されるのかなどについての分子メカニズムを明らかにすることで、「種の壁」のゲノムレベルでのメカニズムの解明に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：With regard to Brassica crops used for vegetable food, such as Chinese cabbage, cabbage, radish, turnip and broccoli, the smart method for breeding of their DH (Double Haploid) lines has not been established yet, which has become an important issue in breeding and genetic research of Brassica crops. In this study, we have been investigating histological, cytogenetical, and molecular genetic methods for the "Koumina method" that can establish the novel method for producing the novel DH line in Brassica crops without using tissue culture technology or gene recombination technology. As a result, it is expected that the "Koumina method" will contribute to the dramatic progress in the breeding and genetic research of Brassica crops in the near future.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：アブラナ科種属間交雑 DH系統 ゲノムの自己/非自己認識 ゲノム喪失

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

全遺伝子がホモ接合である純系は、育種や研究において重要である。理想的な純系である Double Haploid (DH) 系統は、高い重要性を有するにもかかわらず、DH 系統の育成法にさまざまな問題点があり利用機会が限定的である。申請者はこれまでの研究成果から、アブラナ科機能性新型野菜『香味菜』を用いた交配によって、従来よりも極めて簡便に任意のアブラナ科品種の DH 系統を育成できる手法(香味菜法)を開発しつつある。本研究課題では、これまで近交系や純系の育成が困難であったアブラナ科作物を対象に、DH 系統を簡便に育成する新手法(香味菜法)を実用化に向けて開発・整備するとともに、生殖時に異種ゲノムを受容し雑種が成立する場合と、異種ゲノムを感知し排除する場合とを比較することで、植物生殖におけるゲノムの自己/非自己を認識する機構に迫る。

社会的インパクトの点からも育種や農業生産において純系を整備することは重要な役割をもつ。従来の組織培養に依存した DH 系統作出法には問題点(培養技術が難しい、培養可能な品種が限定される、培養変異が入る)があり、また近年報告されたセントロメア特異的なヒストン cenH3 を改変した形質転換植物を用いた交配による DH 系統育成法(Maruthachalam et al., (2010))には、作出した DH 系統が遺伝子組換え体として扱うべき個体になるという欠点があった。従って、ハクサイ・キャベツ・ダイコン・カブ・ブロッコリー・セイヨウナタネなど食用に用いるアブラナ科作物においては、未だに簡便に DH 系統を育成する方法論が確立されず、アブラナ科植物の育種や遺伝学研究における重要課題となっている。本課題によって、組織培養技術や遺伝子組み換え技術に依存しないアブラナ科作物における新しい DH 系統の作出法を確立できれば、常用野菜の育種や研究の飛躍的な進歩に寄与できる。

## 2. 研究の目的

育種や遺伝学研究において純系を整備することは重要な役割をもつ。アブラナ科植物ではこれまでに葯や花粉を組織培養する半数体育種が行われ、いくつかの DH 系統が作出されている。しかしながら、このような組織培養に依存した手法には次のような問題点(培養技術が難しい、培養可能な品種が限定される、培養変異が入る)があった。

本研究では、新たな DH 系統の育成法と考えられる香味菜法について【課題 1. 香味菜法の分子機構の解明】・【課題 2. 香味菜法の汎用性調査】という視点から研究を実施することで、アブラナ科植物におけるゲノムの自己/非自己認識の分子メカニズムを解明すること、香味菜法を含む遠縁交雑によるゲノム脱落現象を利用した半数体植物(もしくは DH 系統)の作出法を実用化すること、の2つを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【課題 1. 香味菜法の分子機構の解明】

実験 A. どのタイミングで非自己ゲノムが脱落するのか？

受精後からタイムコースを取りながら胚をサンプリングし、脱落する非自己ゲノム特異的な primer セットを用いた PCR によって、非自己ゲノムが脱落する大体のタイミングを調査する。

実験 B. いつ、どのように非自己ゲノムが脱落し、自己ゲノムが倍加するのか？

実験 A. によっておおまかなゲノム脱落のタイミングが特定出来た後、特定したステージの胚サンプルに対して WISH (whole mount in situ hybridization) と呼ばれる、組織や個体全体に対する in situ hybridization 解析を行う。この方法では、切片ではなく組織丸ごとを用いて in situ hybridization 解析を行うため、観察対象の空間的な情報が得られ、さらに組織内の限られた細胞で起こっている現象を見逃すことなく補足できるというメリットがある。

実験 C. 非自己認識（ゲノム脱落）に必要な遺伝情報は何か？

ゲノム脱落現象を引き起こすセンサーは、非自己ゲノムの何を認識しているのか？、という疑問について2つの仮説を立ててアプローチする。1つ目の仮説は、センサーが非自己ゲノムのゲノムサイズを認識しているというもので、2つ目の仮説は非自己ゲノム内の特異的な遺伝子座に由来する情報によって認識しているというものである。これらのどちら仮説が支持されるかを遺伝学的な実験で検証する。

#### 【課題2．香味菜法の汎用性調査】

実験 D. 香味菜法による DH 系統の作出は正逆交雑の両方向において有効なのか？また、どのような作物まで適応できる技術なのか？

これまでに香味菜法による DH 系統の作出（およびゲノム脱落）が試みられたのは、複2倍体である香味菜（AADD or CCDD）を花粉親に用いた場合のみである。この交雑とは逆方向の交雑（すなわち香味菜を母本とした場合）にも DH 系統の作出（ゲノム脱落）が可能であるのかを検証する。また、これまで試した A ゲノム（チンゲン菜）や C ゲノム（ケール）以外のアブラナ科植物、B ゲノム（クロカラシ）や R ゲノム（ダイコン）などでも香味菜法が利用できるかを確認する。

実験 E. ゲノム脱落によって本当に全遺伝情報が消去されるのか？

香味菜法によって得られた DH 系統に、除去された非自己ゲノムの断片が含まれていないのかを illumina Miseq による DNA-seq 解析で検出可能なレベルまで検証する。

### 4. 研究成果

#### 【課題1．香味菜法の分子機構の解明】

実験 A. どのタイミングで非自己ゲノムが脱落するのか？

交配後 20, 30 日後の胚珠と胚を用いてゲノムを抽出し、種子親ゲノムを特異的に増幅するプライマーセットで増幅するプライマーセットと花粉親ゲノムを特異的に増幅するプライマーセットを同時に使用して PCR 解析を行い、種子親ゲノムに由来するバンド（A）と花粉親ゲノムに由来するバンド（D<sup>t</sup>）の有無によって、それぞれのゲノムの有無を判定した（図1）。その結果、胚・胚乳・母親組織で構成される胚珠を用いたレーン（4-13）では、2種類のバンドが確認され、胚珠内のいずれかの組織に両親のゲノムが含まれていることが確認され、交配後 20, 30 日目の胚を用いたレーン（14-19）では、種子親ゲノムに由来するバンドのみが検出され、花粉親ゲノムに由来するバンドが検出されなかった。このことから、交配後 20 日以内に花粉親ゲノムが胚において喪失していることが示唆された。また、交配後 20 日目以前においては胚組織が小さく PCR に必要なゲノム量を抽出することができなかった。

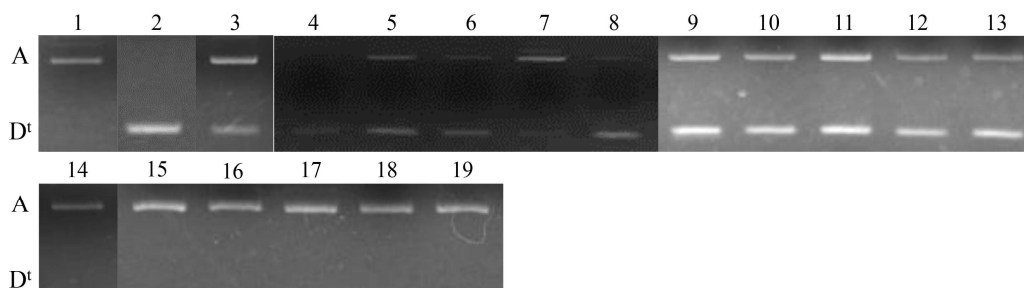


図1 PCR を用いた両親ゲノムの存在確認

1-3 レーンはコントロール，それぞれ種子親ゲノム，花粉親ゲノム，種子親ゲノム+花粉親ゲノムを PCR で増幅させた．4-8 レーンは，交配後 20 日目の胚珠を用いた．9-13 レーンは交配後 30 日目の胚珠を用いた．14 レーンは，交配後 20 日目の胚を用いた．15-19 レーンは，交配後 30 日目の胚を用いた．

実験 B. いつ，どのように非自己ゲノムが脱落し，自己ゲノムが倍加するのか？

実験 A. によっておおまかなゲノム脱落のタイミングが特定出来たため，特定したステージの胚サンプルに対して WISH (whole mount in situ hybridization) と呼ばれる，組織や個体全体に対する in situ hybridization 解析に挑戦したが，植物研究において以前から常用されていた透明化液に加えて，近年開発された ClearSee(Kurihara et al., 2015), TOMEI(Hasegawa et al., 2016)といった試薬も取り入れて挑戦したが，胚組織内に茶褐色が残り，十分な透明化には至らなかった．そのため，残念ながら，ゲノム脱落に関する詳細は未解明である．

しかしながら，後代植物の根端細胞を用いた染色体観察の結果(図 2) やフローサイトメーターを用いたゲノム量の測定から，後代植物においては Double Haploid と同数の染色体数が確認され，ゲノム量の増加も認められないことから，花粉親ゲノムのほとんどすべてが初期に喪失していることが示唆された．

また，後代植物の DNA を使用した RAD-seq 法による種子親ゲノムにおいてヘテロ型であった遺伝子座についての遺伝子型判定の結果から，次の 2 つのことが明らかになった．1 つは，得られた後代の 1 部は，自殖もしくは他殖によって生じた False Positive であること，もう 1 つは得られて後代の中に，ほとんどすべての調査対象遺伝子座ホモになっている個体が含まれていることがわかった．ほとんどすべての遺伝子座がホモとなっている個体については，ヘテロ型と判定された遺伝子座も解析上のエラーである可能性が高く，Double Haploid である可能性が極めて高いと考えている．また RAD-seq 解析の結果から，親個体からのクローン個体が生じているわけではなく，自己ゲノムの倍加による順系の作出が示唆された．

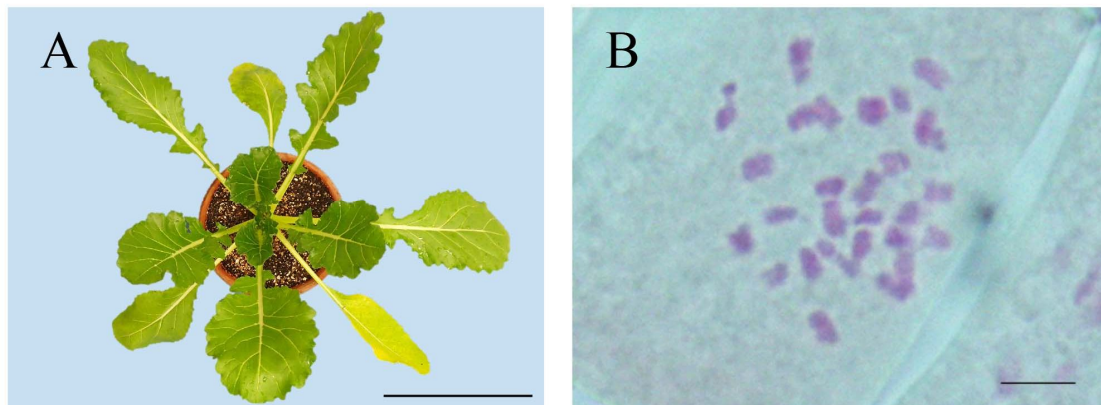


図 2 後代植物とその染色体．

B. *rapa* と香味菜の交配によって得られた後代とその根端細胞における染色体像．

実験 C. 非自己認識 (ゲノム脱落) に必要な遺伝情報は何か？

9 種類の交配組み合わせにおいて，後代種子の取得率を調査したところ，そのうち 4 種類では後代種子が得られず，後代種子が得られた 5 種類の組み合わせにおいても，取得率に差が認められた．これらの結果からよく似た種においても DH 個体の取得効率に差があることが明らかとなった．このことから，ゲノムサイズというよりも，ゲノム内の特定の遺伝情報が成否を決定していると考えられた．今後の予定として，遺伝学を用いた後代種子の取得効率を支配している遺伝子座の同定を計画している．

【課題2．香味菜法の汎用性調査】

実験 D. 香味菜法による DH 系統の作出は正逆交雑の両方向において有効なのか？また、どのような作物まで適応できる技術なのか？

正逆交雑による結果後代種子の取得効率の比較から、交配の方向性によって差が生じていることが示唆された。

また、実験 C の結果でも言及したが、似た種においても後代種子の取得効率に差があるため、適用範囲については、さらなる調査を行う必要がある。RAD-seq 解析によって、False Positive の植物体の存在も確認されたため、より慎重に調査を進めていく必要があると考えている。

実験 E. ゲノム脱落によって本当に全遺伝情報が消去されるのか？

フローサイトメーターによるゲノム量の測定においてゲノム量の増加が認められないこと、また、RAD-seq 解析から花粉親ゲノムに由来していると考えられるリードが含まれていないことがわかった。これらのことからほとんどすべての花粉親に由来する遺伝情報は喪失していると考えられた。また、後代種子の発生過程を調査したところ、その発生が通常と比べて、わずかに遅延していることが明らかになった(図3, 4)。このことは、ゲノムの脱落や倍加に伴う何らかの弊害に起因していると考えられた。

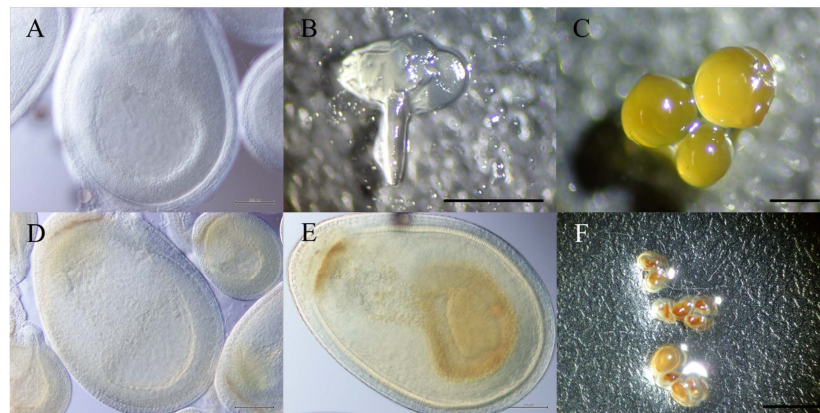


図3 後代植物の胚発生の顕微鏡観察

*B. rapa* と香味菜の交配によって得られた後代の胚 (A,D:交配後 10 日目, B,E : 20 日目, C,F : 30 日目)

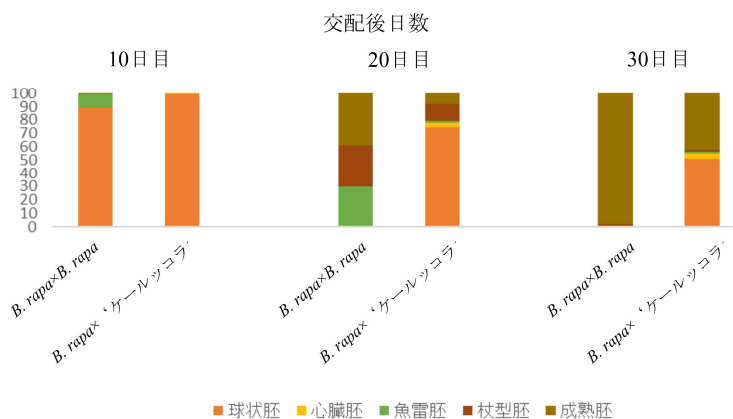


図4 後代植物の胚の発生段階の調査

*B. rapa* と香味菜の交配によって得られた後代の胚の発生ステージを球状胚(橙), 心臓胚(黄), 魚雷胚(緑), 杖型胚(臘脂), 成熟型(茶)に分類した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Fujita, Yuriko Nagashima, Mei Yamaguchi, Su-Hyeun Shim, Takayuki Ohnishi and Sang Woo Bang	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of cytoplasmic female sterility in an alloplasmic and monosomic addition line of <i>Brassica rapa</i> carrying the cytoplasm and one chromosome of <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19147	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiaki Fujita, Atsushi Yagi, Su-Hyeun Shim, Takayuki Ohnishi, Sang-Woo Bang
2. 発表標題 1. Allopolyploidization induces partial remission of cytoplasmic male sterility within <i>Brassica napus</i> carrying <i>Diplotaxis erucoides</i> cytoplasm
3. 学会等名 International Association of Sexual Plant Reproduction Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Fujita, A. Yagi, S.H. Shim, T. Ohnishi, S.W. Bang
2. 発表標題 2. Utilization of useful traits by the interactions between nuclear genome and organelle genome in Brassicaceae
3. 学会等名 The 11th Japan-China-Korea Graduate Student Forum
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山大輝・赤石和也・沈 受玄・大西孝幸 / 房相佑
2. 発表標題 ダイコンのNEBオルガネラゲノムとBrassica rapa核ゲノム間の軌跡
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----