

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19262

研究課題名(和文) 超劣性形質である植物栄養器官肥大(シンク化)機構の遺伝解析

研究課題名(英文) Genetic analysis for recessive genes controlled tuberous stem formation

研究代表者

岡崎 桂一 (Okazaki, Keiichi)

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ブロッコリとコールラビの交雑集団を用いて、5つの茎肥大制御に関与するQTLを同定した。このうち、REnBo2-QTLの絞り込みを行い、物理距離で0.73Mbpの範囲に、候補遺伝子領域を絞り込むことができた。この領域に座乗する遺伝子83個の内、ブロッコリとコールラビのRNA-seqでDEGsとして同定できた遺伝子は12個あった。発芽後10-30日のブロッコリとコールラビ実生の植物ホルモン分析から、両種では、オーキシシン、活性型のGA4、サイトカイニン類の含量に差があった。これらのことから、コールラビの茎肥大に内生の植物ホルモン濃度が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な人口増に伴い農作物の生産性向上が望まれる中で、植物の貯蔵器官の肥大性の制御機構を解明することは重要である。アブラナ科植物には、種が異なっても、類似した栄養器官が肥大する生態型が見られ、結球ではハクサイとキャベツ、茎や根の肥大ではカブ、コールラビなどがある。栄養器官が肥大しないコマツナやケールもあり、アブラナ科植物は栄養器官の肥大性機構を研究する上で優れた材料である。コールラビでの肥大制御遺伝子の同定を行うことにより、アブラナ科植物の他種や一般的な果樹、野菜の栄養器官の肥大化機構解明に向けた端緒とすることができ、遺伝学的解析の1つのモデル系として、本研究から得られる知見は有用である。

研究成果の概要(英文)：Using a broccoli and kohlrabi cross population, we identified five QTLs involved in tuberous stem enlargement. Of these, REenBo2-QTL was narrowed down with map-based method and the candidate gene region could be narrowed down to a physical distance of 0.73 Mbps. Of the 83 genes located in this region, 12 were identified as DEGs by RNA-seq of broccoli and kohlrabi. Phytohormonal analysis of broccoli and kohlrabi seedlings 10 to 30 days after germination revealed that the contents of auxin, active GA4 and cytokinins differed between the two species. From these results, it was thought that the endogenous plant hormone levels play an important role in the tuberous stem enlargement of kohlrabi.

研究分野：植物育種学

キーワード：コールラビ 茎肥大 遺伝子発現 QTL解析

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増に伴い農作物の生産性向上が望まれている中で、植物の貯蔵器官の肥大性がどのような遺伝機構で制御されているかを解明することは重要である。アブラナ科植物には、種が異なっても、類似した栄養器官が肥大する生態型が見られ、結球ではハクサイとキャベツ、茎や根の肥大ではカブ、コールラビなどがある。これらの形態的变化は、栽培化の過程において種間で保存されたオルソログスな遺伝子の変異が独立に生じた並行進化の事例と考えられる。アブラナ科の種には栄養器官が肥大しないコマツナやケールもあり、アブラナ科植物は栄養器官の肥大性機構を研究する上で優れた材料である。

我々はそのなかでもコールラビについて興味をもち、コールラビとブロッコリーの戻し交雑集団を用いた遺伝学的解析を通じ、コールラビの肥大組織形成が、少なくとも4遺伝子座で起きた劣性変異の蓄積による超劣性形質である事を予備的に突き止めている。植物では往々にして、少数の遺伝子の機能欠損により大きな形態的特徴の変化が生じうるが、コールラビの茎肥大はそのケースにあたらぬことが分かった。本研究でコールラビでの肥大制御遺伝子の同定を行うことにより、アブラナ科植物の他種や一般的な果樹、野菜の栄養器官の肥大化機構解明に向けた端緒とすることができると考えたほか、栽培植物の有用形質の中にはコールラビの肥大性と同様、超劣性の形質が多く存在すると考えられるので、それらの遺伝学的解析の1つのモデル系としても、本研究から得られる知見は有用だと考えた。



図1 茎肥大性の目視による評価指標

2. 研究の目的

先行研究では、コールラビ(市販品種、セーヌ)×ブロッコリー(倍加半数体系統、GCP04)のF1にコールラビを戻し交雑した集団を用い4つの茎肥大を制御するQTLを同定していたが、本研究では、コールラビの茎肥大性の遺伝機構を知るため、「研究の方法」で述べる5つの実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 新たな遺伝分析集団として、倍加半数体系統(DHライン)のブロッコリーGCP04(以下、GC)×コールラビKr13-511(以下、KDH)のF1にKDHを戻し交雑し、BC1集団を作成した。この集団の各個体のジェノタイプングと表現型調査結果を用いてQTL解析を実施した。表現型では、直径、目視で茎肥大を等級化した指標(図1)を用いて調査した。

(2) 上記の交雑集団の個体(BC2S1)の中から、同定された茎肥大制御QTLの*REnBo2*をヘテロに持ち、他4つのQTL(*REnBo1*, *REnBo3*, *REnBo4*, *REnBo5*)でコールラビ由来のホモ遺伝子型を持つ選抜個体を選抜し、その自殖から多数のBC2S2後代を育成し、その中から*REnBo2*-QTL両端のDNAマーカーを用い、このQTL領域で組換えを持つ個体を選抜した。同時に、この組換え個体の表現型を調査し、組換え型と表現型との関係から候補遺伝子の絞り込みを試みた。

(3) ブロッコリーとコールラビの茎部内部でどの組織が肥大に関与しているか明らかにするため、両種の発芽後10-35日の実生の茎直径、子葉から生長点までの高さを調査し生長曲線を作成した。また、コールラビとブロッコリー実生の上胚軸部分をそれぞれ発芽後10日、15日、20日、25日にサンプリングし、カルノア液で固定後、パラフィンに包埋し、内部形態を観察した。

(4) コールラビ(Kr13-511)ブロッコリー(GCP04)の発芽後10、15、20、25、30日の実生の茎と葉(それぞれ100mg/個体、3個体の反復)を液体窒素を用いて破砕後、常法に従ってオーキシシン、ジベレリン(GA)、サイトカイニン(CK)、アブシジン酸(ABA)、サリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)を抽出し、その含量をHPLCで測定した。

(5) コールラビ(Kr13-511)ブロッコリー(GCP04)それぞれ発芽後10日、20日に成長点を含む茎部をそれぞれ3個体ずつサンプリングし、RNAを抽出後、cDNAを作成後、Illumina HiSeq TM2000を用いてペアエンドRNA-seq解析を行い、発現量が増減した転写物(DEG)の解析を行った。DEGは、 $\log_2\text{Ratio} \geq 1$, $P \text{ value} < 0.05$, $\text{FDR} \leq 0.001$ を用いて同定した。さらに、茎肥大制御QTLの範囲に位置するDEGsを同定し、茎肥大制御に関与する遺伝子の絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) ブロッコリーGCP04(GC)とコールラビKr13-511(KDH)の倍加半数体を用いて新たに育成したBC1集団を用いてQTL解析を実施した。その結果、これまで同定されていた*REnBo1*, *REnBo2*と染色体上の位置が同じであり、同一のQTLと考えられるものが2つ同定された(図2)。また、新しいQTLが1つ同定され*REnBo5*と命名した。DHラインを用いた集団では、コールラビの市販品種(セーヌ)×GCP04のBC1で同定されていた*REnBo3*, *REnBo4*は検出されなかった。

(2) コールラビを戻し交雑して作成したBC2S1の中から、4つの茎肥大制御QTLがコールラビホモ型で、*REnBo2*の遺伝子型のみヘテロの個体を自殖し、BC2S2を作成した。BC2S2の中から*REnBo2*-QTLの両端のDNAマーカーを用いて組換えが見られた158個体を選抜し、QTL内の11個のDNAマーカーを用いて連鎖地図を作成すると同時に、表現型として、茎の高さ、直径、目視で茎肥大を等級化した指標を計測した。QTL解析の結果、Bo1012974, Bo1017480間に、茎肥大形質でLOD値4.8の有意なLODピークを検出した。連鎖地図上では10.7cM、物理距離で0.73Mbpの範囲に、*REnBo2*-QTLに関与する候補遺伝子領域を絞り込むことができた。この領域には83個の遺伝子が含まれていた。

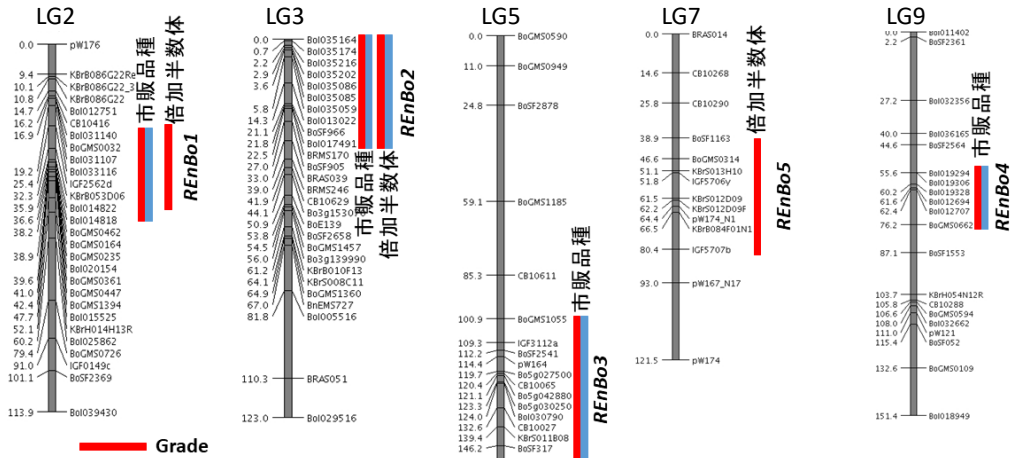


図2 ブロccoli(GCP04)とコールラビの交雑から得た集団を用いた QTL 解析。コールラビの親には市販品種、倍加半数体を用い GCP04 とそれぞれ交雑し 2 集団を育成し、別々に解析した。

(3) ブロccoliでは、発芽後 10~35 日の間に、茎の縦方向への伸長が著しかったが、コールラビでは、縦方向への伸長が抑制され、発芽後 12 日~18 日には、横方向への茎の肥大が始まることわかった (図 3)。

内部形態をパラフィン切片法で観察したところ、細胞数の比較では、皮層、髄、共に broccoli と比べ、コールラビの皮層、髄の細胞数が多くなっていることがわかった (図 4)。1 細胞あたりの平均の大きさでは、髄でコールラビの細胞の大きさの増大が顕著であった。切片を見ると皮層、髄共に形成層の近くに存在する細胞は小さく形成層から離れるにつれて細胞が大きくなっていることが観察された。コールラビの直径の増大は細胞数の増加、細胞の肥大の両方によって引き起こされていることがわかった。

(4) 発芽後 10, 15, 20, 25, 30 日のコールラビ実生の上胚軸で肥大が見られる茎部と本葉およびその部分に対応する broccoli 実生の茎部と本葉を採取し、植物ホルモン濃度を測定したところ、茎部の IAA と IAAsp の両方において、その濃度は、broccoli と比較してコールラビの茎で低かった (図 5)。コールラビの茎では、活性型の GA4 を検出できなかったが、broccoli では、発芽後 10~30 日の実生において GA4 が検出され、測定した期間で大きな変化なかった。

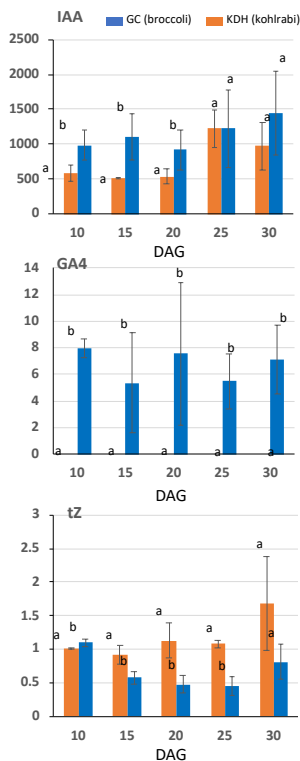


図 5 qPCR による RNA-seq の再現性の確認

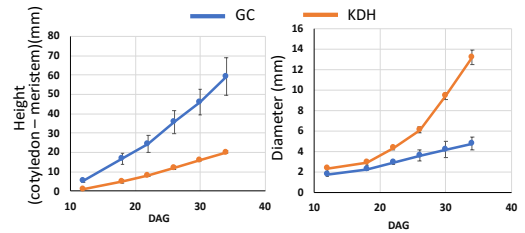


図 3 ブロccoli(GCP04)とコールラビ(KDH)の茎の生長曲線

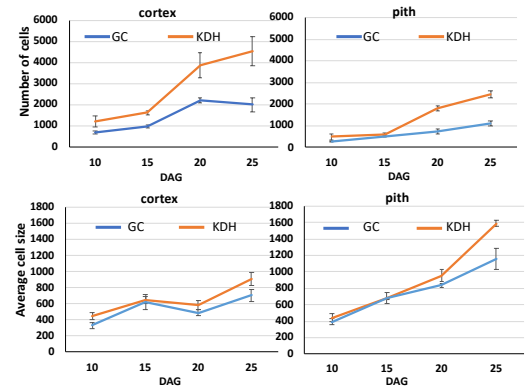


図 4 コールラビと broccoli の皮層と髄における細胞数と細胞サイズ

サイトカイニン類は、コールラビの茎で broccoli に比べ高濃度で含まれていた。これらのことかコールラビの茎肥大に内生の植物ホルモン濃度が重要な役割を果たしていると考えられた。

(5) 生長曲線と切片作成の結果から、発芽後 10 日を肥大開始前、発芽後 20 日を肥大開始後とし、これらの生育ステージのトランスクリプトームの比較を RNA-seq 解析により行った。RNA-seq によって得られたショートリードをレファレンスゲノムにマッピングした後、cufflinks によりコールラビと broccoli 間の Differential Expressed Gene (DEG) を同定した。コールラビ、broccoli それぞれにおける生育ステージ間の比較では、発芽後 20 日で発現が下方制御されている DEGs がコールラビでは 4104 個、broccoli では 1453 個 (図 6a) あった。それらの中で、コールラビ、broccoli 共に下方制御された DEGs 数は 742 個であり、それぞれの生態型にユニークなものは 3155, 670 であった (図 6b)。またコールラビでは broccoli に比べて、生育ステージが 10 日から 20 日に進むにつれて下方制御される DEGs が多いことがわかった (図 6a, b)。生育ステージの進展に従って発現が上方制御されている DEGs に注目すると、コールラビでは 1750 個、broccoli

では 1670 個が見出され、これらのうちコールラビ、ブロッコリー共通に上方制御される DEGs 数は 408 個、それぞれの生態型にユニークなものは 1301 個、1055 個であった (図 6a, b)。

一方、同じ生育ステージにおける生態型間の比較では、発芽後 10 日では、コールラビでブロッコリーよりも発現量が高かった DEGs が 3520 個、ブロッコリーでコールラビよりも発現量が高かった DEGs が 2977 個あったが (図 6c), 発芽後 20 日では、ブロッコリーで発現量が大きかった DEGs 数がコールラビで発現量が大きかった DEGs 数を上回った。これは、前述の通りコールラビでは発芽後 20 日では下方制御される遺伝子が多いことによると思われる。発芽後 10 日、20 日で共通してブロッコリーで発現量の高い DEGs, コールラビで発現量の高い DEGs をそれぞれ 2075 個、1930 個同定できた (図 6d)。また、ブロッコリーで発現の多かったユニークな DEGs は、852 個 (発芽後 10 日)、2447 個 (発芽後 20 日) であった。発芽後 10 日と 20 日のコールラビで発現の多かったユニークな DEGs は、それぞれ 1403 (発芽後 10 日)、1632 (発芽後 20 日) であった。各生態型間で有意に発現量が増減する遺伝子の中に、生態型に特徴的な生理・形態的形質を特徴づける遺伝子があると思われる。

(6) 実生の生育ステージ間の比較で同定された DEGs のエンリッチメント解析では、コールラビの実生において、1372 個の上方制御 (KDH10 < KDH20) および 3438 個の下方制御 (KDH10 > KDH20) された DEGs を用いて GO エンリッチメント解析を行ったところ、biological process ではそれぞれ 274, 361 個、molecular functions では 34, 85 個、cellular components では 47, 98 個のサブカテゴリーがエンリッチされていた (表 1)。ブロッコリーの実生において、1339 個の上方制御 (GC10 < GC20)、1220 個の下方制御された (GC10 > GC20) DEGs について GO エンリッチメント解析を行ったところ、biological process ではそれぞれ 418, 175 個、molecular functions では 81, 48 個、cellular components では 45, 25 個のサブカテゴリーがエンリッチされていた。これらの結果から、発芽後 10 日→20 日への実生の生長に伴って、コールラビは下方制御される DEGs がブロッコリーに比べ多いが (図 6), それに対応して同定される GO サブカテゴリーも多くなった。

表 1 実生の生育ステージ間の比較で同定された DEGs のエンリッチメント解析において有意な集積がみられた GO サブカテゴリーの数

GO categories	KDH10 < KDH20	KDH10 > KDH20	GC10 < GC20	GC10 > GC20
biological process	274	361	418	175
molecular function	34	85	81	48
cellular component	47	98	45	25
Sub total	355	544	544	248
Total	899		792	

発芽後 10 日の発達段階の実生を用いてコールラビとブロッコリーの生態型間で同定された 4354 個の DEG について、(GC10 > KDH10) および (GC10 < KDH10) の 2 つに分けて GO エンリッチメント解析を行ったところ、biological process ではそれぞれ 142, 148 個、molecular functions では 57, 54 個、cellular components では 24, 23 個のサブカテゴリーがエンリッチされていた (表 2)。発芽後 20 日の発達段階の実生を用いてコールラビとブロッコリー間で同定された 6008 個の DEG について、(GC20 > KDH20) および (GC20 < KDH20) について GO エンリッチメント解析を行ったところ、biological process ではそれぞれ 402, 105 個、molecular functions では 95, 38 個、cellular components では 71, 36 個のサブカテゴリーがエンリッチされていた。

実生の生育ステージ間の比較で同定された DEGs およびコールラビとブロッコリーの生態型間での比較で同定された DEGs において、濃縮された有意なサブカテゴリーとしては、biological

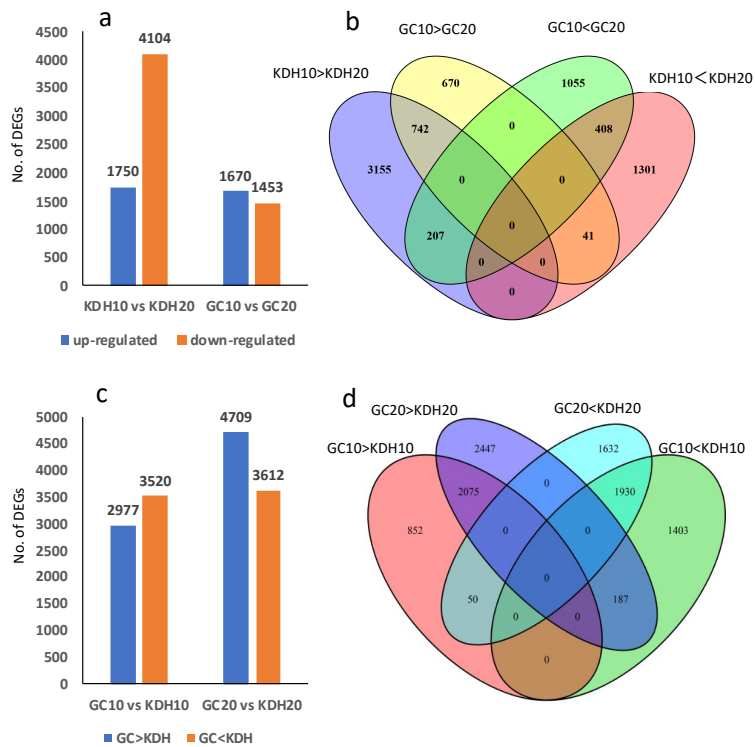


図 6 ブロッコリー (GC) とコールラビ (KDH) の発芽後 10 日と発芽後 20 日の生育ステージ間での比較による DEGs 数 (a) とそのベン図 (b)。発芽後 10 日、20 日のブロッコリー (GC) とコールラビ (KDH) の生態型間の比較による DEG 数 (c) とそのベン図 (d)。

process では hormone biosynthetic process, hormone metabolic process が, molecular functions では, active transmembrane transporter activity が, cellular components では cell-cell junction, external encapsulating structure などであった。

表 2 生態型間の比較で同定された DEGs のエンリッチメント解析において有意な集積がみられた GO サブカテゴリーの数

GO categories	GC10>KDH10	GC10<KDH10	GC20>KDH20	GC20<KDH20
biological process	142	148	402	105
molecular function	57	54	95	38
cellular component	24	23	71	36
Sub total	223	225	568	179
Total	448		747	

(7) 植物ホルモン定量実験や GO 解析から, 植物ホルモンの合成や調節因子, また, 各種のトランスポーターなどの遺伝子がコールラビの茎肥大性に係る因子であることが推察できた。そこで, DEGs の中から 8 個の遺伝子を選抜して qPCR を行い, RNA-seq の再現性を確認するとともに, 生育ステージでの発現変動と生態型間での発現量の違いを確認した (図 7)。コールラビとブロッコリーの発現の違いを発芽後 10 日と 20 日を用いて, q-PCR によってそれぞれで比較したところ, *Bo1022283*, *Bo1042954*, *Bo1017052*, *Bo1042944* では発芽後 10 日, 20 日とそれぞれで q-PCR と RNA-seq データとの間に再現性がみられた。*Bo1014822*, *Bo1019347*, *Bo1013842*, *Bo1009655* では発芽後 20 日でのみ再現性が確認された。ここで取り扱った遺伝子の発現量は, 2 つの生態型間で差が見られた。*Bo1014822* はオーキシンの輸送に関わる *PIN4* 遺伝子 (Blilou et al. 2005; Krecek et al. 2009) であり, コールラビで発現が抑えられていることが確認された。茎のオーキシン含量がコールラビで低いことと矛盾がない結果である。*Bo1042954* は二次細胞壁の形成やインドール(トリプトファン), オーキシン(インドール 3 酢酸) 等) 合成, 輸送の促進の機能を持つ *WAT1* に関与するタンパクをコードしている。*Bo1019347* はジベレリンに制御される *GASA7* (Zhang, Wang 2008) をコードし, コールラビで *Bo1019347* の発現が低いことから, コールラビでジベレリンの量が少なく, 茎の縦方向への伸長が抑えられていることが考えられる。*Bo1009655*, *Bo1042944* はそれぞれ *SWEET1*, *SWEET4* であり, 糖の輸送に関わるタンパク質をコードする (Chen et al. 2010)。コールラビで *SWEET1* は転写レベルで抑制され, *SWEET4* で同じく促進されている可能性が示唆された。他にも植物の発生に関わる転写因子 *Bo1022283* (*MYB86*), *Bo1017052* (*TCP5*), *Bo1013842* (*WOX1*) でも発現の変動が見られ, 様々な転写因子の働きにより, 肥大が制御されることが考えられる。

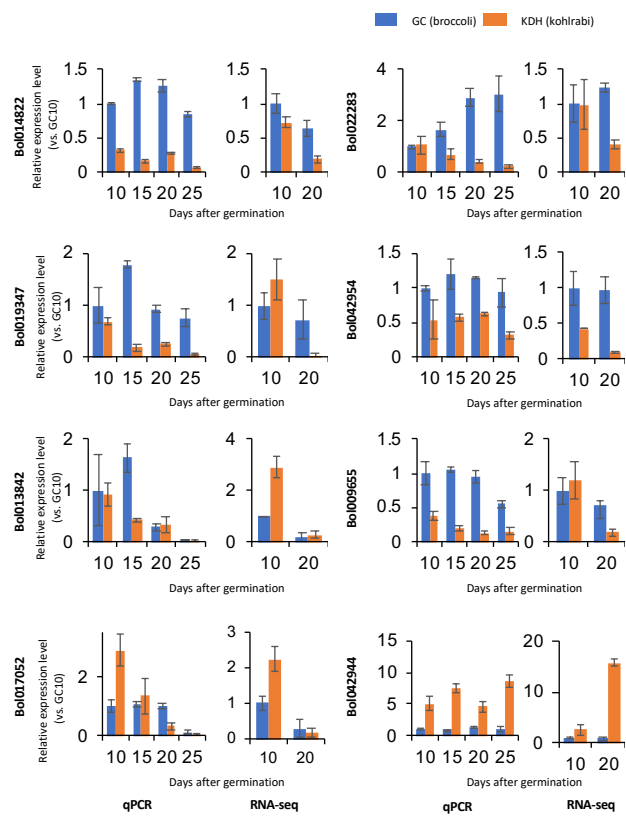


図 7 qPCR および RNA-seq による遺伝子の発現変動分析

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 M. HOQUE, DJ. SHEA, M. ASADA, MD. ASAD-UD-DOULLAH, M. SHIMIZU, R. FUJIMOTO, E. FUKAI and K. OKAZAKI	4. 巻 37
2. 論文標題 QTL mapping for tuberous stem formation of kohlrabi (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L.).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11032-017-0709-6	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 ホック モジャミール、シェイ ダニエル、佐藤庄人、松村涼介、ドウラ モハメド ウド ドウラ、清水元樹、藤本龍、深井英吾、岡崎桂一
2. 発表標題 コールラビ茎肥大性のトランスクリプトーム解析
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 Mozammel Hoque, Daniel J. Shea, Masato Sato, Ryosuke Matsumura, Mohamad Asad- ud-doullah, Motoki Shimizu, Ryo Fujimoto, Eigo Fukai, Keiichi Okazaki
2. 発表標題 QTL mapping combined with transcriptome analysis using broccoli and kohlrabi
3. 学会等名 Brassica 2018, 21st Crucifer Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 庄人 , モジャミール ホック , シェイ ダニエルジョン , 松村 涼介 , 清水 元樹 , 藤本 龍 , 深井 英吾 , 岡崎 桂一
2. 発表標題 コールラビ茎肥大性 QTL のファインマッピング
3. 学会等名 日本育種学会 第137回講演会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----