

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02947

研究課題名(和文)アブラナ科野菜の雑種強勢発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of hybrid vigor in Brassica vegetables

研究代表者

藤本 龍 (FUJIMOTO, RYO)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60620375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサイの雑種強勢の分子機構の解明を目指して、遺伝学的解析、ゲノムワイド関連解析、全ゲノムDNAメチル化解析を行った。遺伝学的な解析では、QTL解析により、播種後14、21日の葉面積の大きさや収量に関わるQTLを同定した。全ゲノムDNAメチル化解析では、両親系統とF1の3系統間でDNAメチル化レベルが異なる領域を特定した。ゲノムワイド関連解析のために、73品種についてRNA-seq解析を行い、多型情報を得た。ゲノム編集によりDNAメチル化に関わる遺伝子の変異体を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点では雑種強勢を示す親系統の組合せを分子マーカーで推定する方法がないため、最適な親系統の組合せは実際にF1を作成し、そのF1の形質を評価するまで判断できず、この作業には多大な労力と時間を要する。本研究では、雑種強勢が見られる形質に関わるQTLを同定した。また、現在解析中のゲノムワイド関連解析などの結果が得られ、雑種強勢に重要な領域や遺伝子の同定へと繋がれば、DNAマーカー等の分子マーカーの開発へと発展できる可能性がある。これにより、両親系統の選抜や両親系統の組合せ能力検定にかかるコストと労力の軽減が期待され、その社会的な意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of hybrid vigor in Chinese cabbage, we performed genetic, genome-wide association, and whole genome DNA methylation analyses. In the genetic analysis, we identified QTLs that are related leaf area at 14 days after sowing or yield. Whole genome DNA methylation analysis identified regions where DNA methylation levels differed between the parental lines and their F1 progenies. For genome-wide association analysis, RNA-seq was performed on 73 F1 hybrid cultivars to obtain polymorphic information. In addition, mutants of genes involved in DNA methylation were generated by genome editing.

研究分野：園芸学

キーワード：雑種強勢 ヘテロシス エピジェネティクス QTL ゲノムワイド関連解析 DNAメチル化 ゲノム編集
ハクサイ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動植物では、同一種内のある組合せの両親系統間の交雑によって得られた雑種第一代 (F_1) 個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢 (ヘテロシス) という現象が知られている。雑種強勢は、農作物の育種改良 (高収量性等) において重要な遺伝現象であり、現在、数多くの農作物において、雑種強勢の特性を利用できる一代雑種品種 (F_1 品種) が育成されている。農学的に重要な形質である雑種強勢については、イネ、トウモロコシあるいはモデル植物であるシロイヌナズナにおいて精力的に研究が進められているが、未だどの植物種でも雑種強勢の分子機構の完全な理解には至っていない。そのため、 F_1 品種の両親系統の組合せの選抜は、育種家の経験に頼ることが大きく、 F_1 を作出して評価するまでは、最適な両親系統の組合せを判断することができない。これにより、 F_1 品種の育成には多大な労力とコストがかかり、改善策が求められている。

2. 研究の目的

ハクサイの F_1 では、最終的な収量に加えて、播種後数日の初期生育時から雑種強勢が発現して植物サイズが大きいこと、さらに、その後収穫期に至るまで継続的に雑種強勢が発現されることを明らかにしている。露地野菜においては、環境変動の影響を受けやすい初期生育時に、雑種強勢が発現することは、栽培上優れた特性である。さらに、この特徴はハクサイのみならず、近縁のシロイヌナズナ、キャベツ、ナタネ、さらには多くの作物種において共通に見られる現象であり、いずれの作物においても栽培上重要な要素として位置づけられている。そこで、本研究課題では、『ハクサイの初期生育時に見られる雑種強勢発現機構を明らかにする』ことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の4項目について研究を実施した。

課題 (1): 初期生育時の植物サイズと収量に関わるゲノム領域を特定する。

市販ハクサイ F_1 品種 ‘W77’ の F_2 集団を用いて播種後6日の子葉サイズ、播種後14日と21日の本葉のサイズ、収量や収穫期の植物サイズについて計測した。また、 F_2 集団の遺伝子型判定を行い、QTL解析を実施した。

課題 (2): 雑種強勢と関連性を示すゲノム領域を同定する。

SNPs を元にしたゲノムワイド関連解析により、雑種強勢との関連領域を同定するために、市販 F_1 品種 (雑種強勢強) と固定種 (雑種強勢なし、ホモ接合性が高い) について RNA-seq を行い、リファレンスゲノムにマップし、SNPs を同定した。

課題 (3): F_1 で DNA メチル化レベルが変化するゲノム領域を同定する。

両親系統と F_1 品種 ‘W77’ について、全ゲノム DNA メチル化解析を実施し、両親系統と F_1 で DNA メチル化レベルが異なる領域を同定した。

課題 (4): DNA メチル化関連遺伝子の突然変異体の作出と形質への影響を調査する。

シロイヌナズナでは、DNA の維持メチル化に関わる DDM1 の機能が雑種強勢に重要であることが示されている。そこでハクサイについて、DDM1 遺伝子をゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9) を利用して機能喪失させた変異体を作成した。

4. 研究成果

課題 (1): 初期生育時の植物サイズと収量に関わるゲノム領域を特定する。

ハクサイ市販 F_1 品種 (‘W77’) 由来の F_2 分離集団 100~150 個体を用いて、初期生育の形質として子葉の面積 (播種後6日) や本葉の面積 (播種後14日、播種後21日)、生育後期の形質として収量や収穫期の植物サイズを調べた。 F_2 分離集団について、本研究室で開発した 116 個の CAPS マーカーや GRAS-Di 法を用いて遺伝子型の判定を行った。得られた遺伝子型情報と植物の形質データを元に QTL 解析を行った。初期生育では、子葉サイズに関わる QTL を見出したが、複数回の実験で再現性の高い QTL は見出されなかった。播種後14日と播種後21日の本葉の面積については、二つの生育ステージで共通の QTL が2箇所、複数回の解析で同じ領域に検出された。現在、この2領域に注目して、QTL 領域の絞り込みを進めている。また、今回の QTL 解析に、GRAS-Di による遺伝子型判定を導入し、連鎖地図の高密度化に成功した (図 1)。

生育後期については、圃場試験を実施し、収量や収穫期の植物サイズを計測し、CAPS マーカーを用いて遺伝子型判定を行い、QTL 解析を実施した。QTL 解析は複数年実施し、それぞれの年で QTL が見出されたが、単一 QTL の寄与率は大きくなかった。得られた QTL はどれも顕性/優性を示した。収量形質に関わる5つの QTL について、幼植物の段階で DNA マーカーを用いて顕性遺伝子座をホモ接合型あるいはヘテロ接合型で有する個体を選抜して圃場に移植し、選

抜集団 (図 2、F₂-5R)と F₁ で収量を比較したところ、94%の収量を示した (F₁ との間有意差なし)(図 2)。さらに、5 つの領域で顕性の遺伝子型をホモ接合型に固定した系統 (図 3、F₃-5R)と、潜性の遺伝子型をホモ接合型で固定した系統 (図 3、F₄-0R)の収量を調べた結果、前者は F₁ と同等の収量が得られ、後者の収量は低かった (図 3)。よって、本研究結果から得られた QTL は収量のマーカー選抜に利用できる可能性が示唆された。

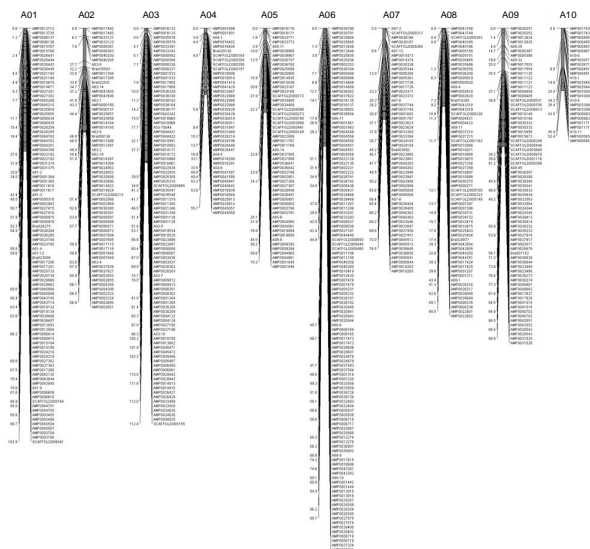


図 1. GRAS-Di を用いて作製した連鎖地図

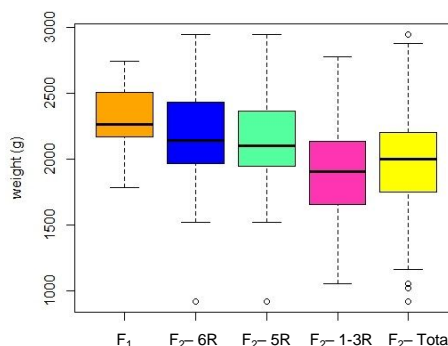


図 2. ハクサイ F₁ 品種と F₂ の収量

F₂-6R は顕性 6 領域を集積

F₂-5R は顕性 5 領域を集積

F₂-1-3R は顕性 1-3 領域を集積

F₂-Total は全 F₂ 個体

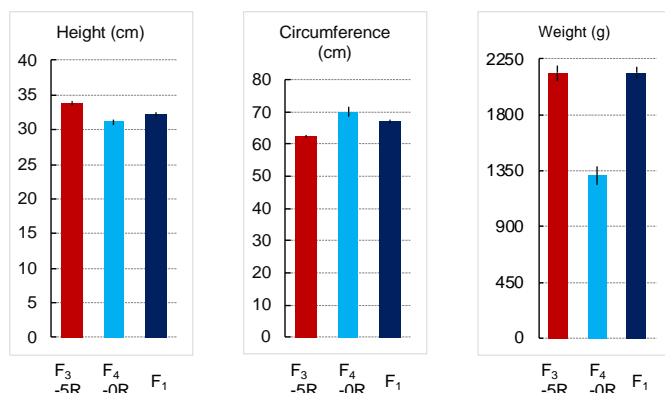


図 3. ハクサイ F₁ 品種と F₃、F₄ 集団の植物

体の高さ、胸回り、収量

F₃-5R は顕性 5 領域を集積

F₄-0R は潜性 5 領域を集積

課題 (2): 雑種強勢と関連性を示すゲノム領域を同定する。

F₁ 品種を用いたゲノムワイド関連解析を行うために、ハクサイの市販品種 140 品種について、播種後 14 日の本葉のサイズを計測した。その中から、合計 73 品種について RNA-seq を実施し、得られたリードをリファレンスゲノムにマップし、SNPs 情報を得た。また、同時に、遺伝子の発現量も算出した。現在、ヘテロ接合性を示す割合が高い領域を同定するための解析条件を検討している。

課題 (3): F₁ で DNA メチル化レベルが変化するゲノム領域を同定する。

ハクサイ市販 F₁ 品種(‘W77’)とその両親系統の播種後 14 日の本葉を用いて、全ゲノム DNA メチル化解析を実施した。両親系統と F₁ で DNA メチル化レベルが異なる領域を同定した。F₁ では多くの領域が、両親系統の中間値と同レベルの DNA メチル化レベルを示したが (相加的)、非相加的な DNA メチル化レベルを示す領域も見出された。また、同じステージで行った RNA-seq の結果と比較し、DNA メチル化の違いが遺伝子発現に及ぼす影響についても調べた。

課題 (4): DNA メチル化関連遺伝子の突然変異体の作出と形質への影響を調査する。

DNA の維持メチル化に関わる DDM1 遺伝子 [2 コピー(A07 と A09)に存在] を標的としてゲノム編集 (CRISPR-Cas9)を利用して、遺伝子機能喪失変異体の作出を行った。22 系統の形質転換体 (T₀ 世代)を作出し、標的配列をダイレクトシーケンスしたところ、4 系統において変異が検出された。T₁ 世代を作出し、DDM1-A07 と DDM1-A09 それぞれについて機能喪失アレルがホモ接合型となっている個体を得た。また、DDM1-A07 と DDM1-A09 のどちらも機能喪失アレルをヘテロ接合型で有する個体を得た。現在、この個体を自殖し、DDM1-A07 と DDM1-A09 の両方が機能喪失した変異体の獲得を進めている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mehraj Hasan, Kawanabe Takahiro, Shimizu Motoki, Miyaji Naomi, Akter Ayasha, Dennis Elizabeth S., Fujimoto Ryo	4. 巻 9
2. 論文標題 In Arabidopsis thaliana Heterosis Level Varies among Individuals in an F1 Hybrid Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 414 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9040414	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 該当する

1. 著者名 Hasan Mehraj, Satoshi Takahashi, Naomi Miyaji, Ayasha Akter, Yutaka Suzuki, Motoaki Seki, Elizabeth S Dennis, Ryo Fujimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of Histone H3 Lysine 4 and 36 Tri-methylation in Brassica rapa L	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 659634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.659634	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 該当する

1. 著者名 藤原一将、白木沙彩、神矢良樹、藤本龍	4. 巻 96
2. 論文標題 植物の雑種強勢研究の現状と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 1075-1085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山下萌, 安田(高崎)剛志, 藤本龍
2. 発表標題 DNAメチル化転移酵素によるシロイヌナズナの雑種強勢制御機構
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上昭実, 安田 (高崎) 剛志, 藤本龍
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるヒストン脱アセチル化酵素HDA6が雑種強勢に及ぼす影響
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 メエラジ ハサン, 松尾康大, 安田剛志, 藤本龍
2. 発表標題 Comparison of the Transcriptome profile between F1 hybrid cultivar and its parental lines at two early developmental stages in Chinese cabbage
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hasan Mehraj, Kodai Matsuo, Motoki Shimizu, Takeshi Yasuda, Ryo Fujimoto
2. 発表標題 Identification of non-additively expressed genes at early developmental stages in an F1 hybrid cultivar of Chinese cabbage
3. 学会等名 2019 KSBB & SABRAO International Conference on Plant Breeding for Sustainable Development (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥崎文子, 肥塚信也
2. 発表標題 アブラナ科作物へのゲノム編集技術の利用
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hasan Mehraj, Satoshi Takahashi, Yutaka Suzuki, Motoaki Seki, Elizabeth S. Dennis, Ryo Fujimoto
2. 発表標題 Characterization of histone H3 lysine 4 and 36 tri-methylation in Brassica rapa L.
3. 学会等名 2021 Australian Brassica Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hasan Mehraj, Satoshi Takahashi, Naomi Miyaji, Motoaki Seki, Elizabeth S. Dennis, Ryo Fujimoto
2. 発表標題 Comparative paralog histone modification states following whole genome triplication in Brassica rapa L.
3. 学会等名 2021 Cold Spring Harbor meeting: Plant Genomes, Systems Biology and Engineering (Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hasan Mehraj, 安田剛志、藤本龍
2. 発表標題 Prospects for increasing the density of genetic markers in Chinese cabbage linkage map using GRAS- Di technique
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Lv H, Miyaji N, Osabe K, Akter A, Mehraj H, Shea DJ, Fujimoto R	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 383
3. 書名 Genomic Designing of Climate-Smart Vegetable Crops	

1. 著者名 Takumi Okamoto, Xiaochun Wei, Hasan Mehraj, Mohammad Rashed Hossain, Ayasha Akter, Naomi Miyaji, Yoshinobu Takada, Jong-In Park, Ryo Fujimoto, III-Sup Nou, Masao Watanabe	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Nature	5. 総ページ数 XVII, 540
3. 書名 Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable crops	

〔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
研究分担者	宅野 将平 (Takuno Shohei) (20547294)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教 (12702)	
研究分担者	奥崎 文子 (Okuzaki Ayako) (40759750)	玉川大学・農学部・准教授 (32639)	
研究分担者	藤井 壮太 (Fujii Sota) (90716713)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	CSIRO		