

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05979

研究課題名(和文) Brassica属作物におけるUの三角形の現代的再構築

研究課題名(英文) Modernized reconstruction of U's triangle of Brassica crops

研究代表者

山岸 博 (Yamagishi, Hiroshi)

京都産業大学・総合学術研究所・科研費研究員

研究者番号：10210345

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)：本研究では世界的に重要なBrassica属の6種作物におけるミトコンドリアゲノムの塩基配列を解析して、種内変異を見出した。その結果に基づき、3種の2倍体作物の栽培化と、3種の複2倍体作物の成立過程を明らかにした。いずれの2倍体種においても2タイプ以上のミトコンドリアゲノムが存在し、栽培化が2回以上起こったことが示された。3種の複2倍体種のうち2種では、2倍体と同一のミトコンドリアゲノムが種内に存在し、複数回の交雑によってこれら2種が成立したことが見出された。これらの結果、6種作物間の関係を示すUの三角形が、詳細な構造で再構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栽培植物の起源と進化を示す代表的な例であるBrassica属作物の種間関係が、種内変異にまで踏み込んで詳しく明らかにされた。この成果は他の多くの植物種に応用され、今後の植物遺伝学、育種学の新しい発展に貢献する。また、本研究で見出されたミトコンドリアゲノムの種内変異は、将来の植物育種において、オルガネラゲノム内の未利用遺伝子を持つ植物を育種素材として活用する可能性を拓く。

研究成果の概要(英文)：Six crop species belonging to genus Brassica contribute as important food crops worldwide. In this project, we analyzed the mitochondrial genome of the 6 crop species and found the intraspecific variations. Based on the results, the process of domestication of the three diploid species and establishment of the three amphidiploid species were clarified. All the three diploids contained two or more mitotypes, the facts indicating that they were domesticated twice or more. Whereas, two of the three amphidiploid species possessed the two mitotypes identical to those of diploid mother species. Thus, the two species were estimated to be established at least twice. These findings enabled us to reconstruct the U's triangle of Brassica crops with detailed structure.

研究分野：育種学

キーワード：作物進化 Uの三角形 Brassica属作物 ミトコンドリアゲノム 種内変異 複2倍体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科の作物、とりわけ Brassica 属の作物は古くから世界的に広く栽培されて、人類の食生活を支えてきた。Brassica 属には6種の栽培植物が存在するが、それらの相互関係は「Uの三角形」として定式化されている (U 1935)。すなわち、Brassica 属作物は *B. rapa* (AA ゲノム)、*B. nigra* (BB ゲノム)、*B. oleracea* (CC ゲノム)の3種の2倍体種と、それらの間の種間交雑によって生じた3種の複2倍体種 (*B. juncea*: AABB ゲノム、*B. napus*: AACC ゲノムおよび *B. carinata*: BBCC ゲノム)で構成されている。この関係は栽培植物の起源と進化の特徴を表す代表的な例である。しかし、この「Uの三角形」では、2倍体種のうちのどちらを母親として複2倍体種が生まれたかは明らかでなかった。

雑種の母親を明らかにするには、葉緑体およびミトコンドリアのオルガネラゲノムの比較が有効である。このうち葉緑体ゲノムによってコードされる RuBisCo の大サブユニットの比較によって、*B. juncea* は *B. rapa* を、また *B. carinata* は *B. nigra* を、それぞれ細胞質親として成立したことが示された (Uchimiya and Wildman 1978)。一方、*B. napus* については、RuBisCo の解析によっても、またミトコンドリアゲノムの比較によっても、*B. rapa* または *B. oleracea* のどのような植物が細胞質親であったかは明らかにされてこなかった。また、3種の2倍体種におけるオルガネラゲノムの種内変異に踏み込んで、複2倍体種の母親を解明しようとする研究は皆無であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Brassica 属作物6種の種間関係(Uの三角形)を、現代的かつ詳細な「現代版 U の三角形」に再構築することである。そのために、ミトコンドリアゲノムの種内および種間変異を明らかにして、それに基づき6種の関係を解明しようとした。近年、技術的発展が著しい次世代シーケンサーを用いたゲノム解析によって、多くの植物で核およびオルガネラゲノムの全塩基配列が決定されてきているが、その成果とりわけ種内変異に着目して、Brassica 属の3種の2倍体作物および3種の複2倍体作物の起源と進化の全体像を明らかにしようとする試みは、現在まで極めて乏しい。本研究は、Brassica 属6種作物のそれぞれについて、種内の変種レベルまで踏み込んでミトコンドリアゲノムの全塩基配列と変種間の変異を明らかにし、それをもとに U の三角形の詳細な全体像を明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

Brassica 属の2倍体作物のうち、*B. rapa* と *B. oleracea* においては、種内に豊富な形態的変異が存在する。また、3種のすべてにおいて、それらと同種の野生植物が存在する。そこでこれら2倍体の栽培植物と野生植物を用いて、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、品種ないしは変種のレベルで、塩基配列変異を解析した。その結果に基づき、2倍体栽培植物の起源を推定しようとした。

同様に複2倍体種のうち、*B. juncea* と *B. napus* においても多様な形態的変異が観察されている。このため、複2倍体3種についても同様にミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定することにより、配列の種内変異を解析した。その上で、2倍体種の配列と比較することによって、複2倍体作物の成立に関わった2倍体種のうち、どちらの種のどの変種が母親となったかを明らかにするとともに、複2倍体種の成立が何回の交雑によって起こったかを知らうとした。

さらに、これらのミトコンドリアゲノムの解析結果を踏まえて、より簡便に細胞質の種内および種間変異を解析するための DNA マーカーを作成した。これによって、世界各地で栽培されている多様な Brassica 属作物の品種・系統について、ミトコンドリアゲノムの分化を大規模に調査する基盤を作ろうとした。

### 4. 研究成果

(1) 2倍体作物における種内変異 本研究開始時点で、我々は *B. rapa* と *B. nigra* のそれぞれに2タイプのミトコンドリアゲノムが存在することを見出していた (Yamagishi et al. 2014; Hatono et al. 2017)。そこでこの2種について調査系統を増やして種内変異を解析した。その結果、*B. rapa* においては2タイプのうちの一方 (A-1 とする) が多くの系統に観察され、もう一方 (A-2) は、ミズナと呼ばれる品種群に特異的に分布することが明らかになった。また、調査系統を広げた結果、南アジアで油料作物として利用されている変種の 'sarson' が、特有のミトコンドリアゲノム (A-3 とする) を持つことが分かった。その一方で、*B. nigra* においては、既知の2タイプ (B-1、B-2 とする) 以外の新しいミトコンドリアのタイプは存在しなかった。

これら2種に対して、*B. oleracea* の種内変異についての解析は未着手であった。そこで、我々が以前に決定したキャベツのミトコンドリア全塩基配列 (Tanaka et al. 2014) をリファレンスとして、*B. oleracea* の他の変種についてミトコンドリアゲノムを解析して比較した。その結果、ケールと東南アジアの栽培品種のカイランで特有の塩基配列が見出された。このことから、同種には3タイプ以上のミトコンドリアゲノムが存在すると考えられた。

以上の2倍体種の解析から、3種の栽培種はいずれも2回以上の栽培化によって成立したと考えられた。とりわけ、*B. rapa* と *B. oleracea* においては、独立して起こった複数回の栽培化の結果として、異なる変種が発達したものと推定された。

(2) 複2倍体種における種内変異 2倍体種における結果を踏まえて、複2倍体種のミトコンドリアゲノムを解析した。まず、*B. juncea* においては、*B. rapa* で認められた3タイプのうち、A-1、A-2の2つのタイプが観察されて、同種が*B. rapa*の異なる系統を母親とする複数回の交雑によって成立した一方で、A-3のタイプは*B. juncea*の成立に関与していないことが明らかになった。これに対して、*B. carinata* においては*B. nigra*の1タイプ(B-1)だけが認められ、同種の成立は、B-1を持つ2倍体植物を母親として1回だけ起こったと推測された。

次に*B. napus*では、*B. rapa*のA-1、A-2と同一の2タイプが観察されるとともに、*B. rapa*、*B. oleracea*のどちらにもない特有のミトコンドリアを持つものが見出された。このことから、*B. napus*の成立も、*B. juncea*と同様に複数回起きているが、本研究の調査の範囲では、*B. oleracea*は母親としては関与していないものと推定された。2倍体種に見出されなかった*B. napus*に特有のタイプの起源については、今後さらに調査の範囲を広げて明らかにする必要がある。

(3) ミトコンドリアゲノムの種内変異とその原因 以上の2倍体種、複2倍体種のミトコンドリアゲノムの解析から、*B. carinata*を除いて全ての種で種内変異が観察された。そのため、まず2倍体種においては、3種とも2回以上の栽培化が起こり、その後の進化によってそれぞれ異なる変種へと発達した可能性が、特に*B. rapa*および*B. oleracea*で示された。また、複2倍体種の成立も複数回起きていることが示された。これらの結果から、「Uの三角形」の形成は、1つの2倍体植物を母親とした1回だけの交雑による「単線」的なものではなく、2つ以上の組み合わせでの交雑に基づく、「複線」的な過程であったと考えることができる。ただし、このように複数回起こった種間交雑において、*B. oleracea*が母親として関与している組み合わせが存在していない点は注目に値する。*Brassica*属植物の種間交雑において、*B. oleracea*がもっぱら花粉親として機能する何らかの生理学的原因があると考えられ、今後の究明が必要である。

なお今回認められた塩基配列の種内変異の源としては、ミトコンドリアゲノムにおけるheteroplasmyな状態の存在が考えられる。多くの場合、ミトコンドリアゲノムの塩基配列決定にあたっては、ゲノム中のメジャーなタイプがその系統の塩基配列として認識されるが、多数の植物で、それ以外のマイナーなタイプが共存することが知られている。このマイナータイプが、おそらく核ゲノム中の遺伝子の影響によってコピー数を増やし、メジャーなタイプに変わる可能性がある。このことが、種内の変種や品種によってミトコンドリアゲノムの塩基配列が異なることの原因であると推測され、今後ミトコンドリアゲノムのコピー数の増減に関与する、核内の遺伝子の解析が必要になると考えられる。

#### < 引用文献 >

- Hatono, S., K. Nishimura, Y. Murakami, M. Tsujimura and H. Yamagishi (2017) Complete mitochondrial genome sequences of *Brassica rapa* (Chinese cabbage and mizuna), and intraspecific differentiation of cytoplasm in *B. rapa* and *Brassica juncea*. *Breed. Sci.* 67:357-362.
- Tanaka, Y., M. Tsuda, K. Yasumoto, T. Terachi and H. Yamagishi (2014) The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. *Curr. Genet.* 60: 277-284.
- U, N. (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* 7: 389-452.
- Uchimiya, H. and S. G. Wildman (1978) Evolution of fraction I protein in relation to origin of amphidiploid *Brassica* species and other members of the Cruciferae. *J. Hered.* 69: 299-303.
- Yamagishi, H., Y. Tanaka and T. Terachi (2014) Complete mitochondrial genome sequence of black mustard (*Brassica nigra*; BB) and *Brassica carinata* (BBCC). *Genome* 57: 577-582.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hiroshi Yamagishi, Ayako Hashimoto, Asumi Fukunaga, Toru Terachi	4. 巻 70
2. 論文標題 Appearance of male sterile and black radishes in the progeny of cross between <i>Raphanus raphanistrum</i> and <i>Raphanus sativus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breed. Sci.	6. 最初と最後の頁 637-641
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 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 Hiroshi Yamagishi, Ayako Hashimoto, Asumi Fukunaga, Sang Woo Bang, Toru Terachi	4. 巻 64
2. 論文標題 Intraspecific variations of the cytoplasmic male sterility genes orf108 and orf117 in <i>Brassica maurorum</i> and <i>Moricandia arvensis</i> , and the specificity of the mRNA processing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome	6. 最初と最後の頁 1081-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1139/gen-2021-0011.	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 Hiroshi Yamagishi, Megumi Jikuya, Kanako Okushiro, Ayako Hashimoto, Asumi Fukunaga, Mizuki Takenaka and Toru Terachi	4. 巻 296
2. 論文標題 A single nucleotide substitution in the coding region of <i>Ogura</i> male sterile gene, orf138, determines effectiveness of a fertility restorer gene, <i>Rfo</i> , in radish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Genet. Genomics	6. 最初と最後の頁 705-717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00438-021-01777-y	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 山岸 博	4. 巻 19
2. 論文標題 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種とその後代の特性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 京都産業大学先端科学技術研究所所報	6. 最初と最後の頁 1-10
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mukai A, Jikuya M, Tsujimura M, Terachi T, Yamagishi H.	4. 巻 138
2. 論文標題 Complete mitochondrial genome sequence of Brassica oxyrrhina and comparative analysis of the region containing orf108, a male sterility gene for mustard (Brassica juncea), among B. oxyrrhina, Diplotaxis erucoides and Sinapis species.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Breeding	6. 最初と最後の頁 614-623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbr.12710	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 Yamagishi, H., Tanaka, Y., Shiiba, S., Hashimoto, A., Fukunaga, A., Terachi, T.	4. 巻 215
2. 論文標題 Mitochondrial orf463 causing male sterility in radish is possessed by cultivars belonging to the 'Niger' group.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-019-2437-y	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 山岸 博	4. 巻 18
2. 論文標題 アブラナ科植物における雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の複雑な対応関係	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 京都産業大学先端科学技術研究所所報	6. 最初と最後の頁 1-12
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山岸 博, 橋本 絢子, 福永 明日美, 竹中 瑞樹, 寺地 徹
2. 発表標題 ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する新規稔性回復遺伝子 (Rfs) の同定 . 1. 背景および Rfs の位置
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺地 徹, 橋本 絢子, 福永 明日美, 竹中 瑞樹, 山岸 博
2. 発表標題 ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する新規稔性回復遺伝子 (Rfs) の同定 . 2. RFS タンパクの 構造と機能
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新原 由依, 山岸 博, 辻村 真衣, 寺地 徹
2. 発表標題 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代のオルガネラゲノム解析
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻村 真衣, 須佐見 朝日, 有村 慎一, 山岸 博, 寺地 徹
2. 発表標題 mitoTALENを用いたナスの細胞質雄性不稔候補遺伝子ノックアウトの試み
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄司 穂弘, 辻村 真衣, 竹中 祥 太郎, 寺地 徹
2. 発表標題 ミトコンドリアのorf181は <i>Aegilops mutica</i> 細胞質を持つパンコムギ系統の雄性不稔原因遺伝子か？
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場 裕士, 見田 知一, 中元 海里, 植村 香織, 寺地 徹
2. 発表標題 葉緑体内で自律複製する形質転換 ベクターの開発
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺地 徹
2. 発表標題 植物生産現場 遺伝子組換え作物とゲノム編集作物に対する取り組み
3. 学会等名 第20回 日本バイオセーフティ学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺地 徹
2. 発表標題 自律複製型の葉緑体形質転換ベクター作製の試み
3. 学会等名 第38回 日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸博, 軸屋 恵, 奥城佳奈子, 橋本絢子, 福永明日美, 竹中瑞樹, 寺地徹
2. 発表標題 オグラ型雄性不稔の回復遺伝子がコードするORF687は, orf138 mRNAのコード領域に結合して翻訳を妨げる
3. 学会等名 日本育種学第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸博, 橋本絢子, 中村天音, 森田佳奈, 寺地徹
2. 発表標題 ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔遺伝子 (orf138) における塩基置換と稔性回復遺伝子の効果
3. 学会等名 日本育種学第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中元海里, 馬場裕士, 植村香織, 寺地徹
2. 発表標題 葉緑体DNA断片を用いた自律複製型の葉緑体形質転換ベクターの構築
3. 学会等名 日本育種学第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新原由依, 辻村真衣, 山岸博, 寺地徹
2. 発表標題 花器形態に異常を示すシロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代のミトコンドリア解析
3. 学会等名 日本育種学第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 健太, 辻村 真衣, 寺地 徹
2. 発表標題 Aegilops mutica細胞質を持つ置換コムギの形態学的観察及び遺伝子発現の調査
3. 学会等名 日本育種学第136回講演会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山岸 博, 橋本 絢子, 福永 明日美, 寺地 徹
2. 発表標題 Brassica maurorumおよびMoricondia arvensisにおける細胞質雄性不稔遺伝子の変異
3. 学会等名 日本育種学第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植村 香織, 寺地 徹
2. 発表標題 自律ベクターによる葉緑体形質転換タバコで観察された白色個体の特徴づけ
3. 学会等名 日本育種学第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 裕士, 中元 海里, 植村 香織, 寺地 徹
2. 発表標題 タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 . 異なる葉緑体DNA断片を持つプラスミドによる形質転換体の作出
3. 学会等名 日本育種学第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中元 海里, 馬場 裕士, 植村 香織, 寺地 徹
2. 発表標題 タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 . 形質転換体内で自律複製しているプラスミドが持つ葉緑体DNA断片の特定
3. 学会等名 日本育種学第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田知希, 太田星史, 牧田真之, 辻村真衣, 寺地徹, 森直樹
2. 発表標題 コムギの細胞質置換系統におけるミトコンドリアDNAの分子内組み換えの定量的解析
3. 学会等名 ムギ類研究会第14回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻村 真衣, 佐藤 南美, 永島 伊都子, 森 直樹, 寺地 徹
2. 発表標題 パンコムギのミトコンドリアゲノム上に散在するショートリピートを介した組換えに関する研究
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸 博, 橋本 絢子, 福永 明日美, 寺地 徹
2. 発表標題 野生種と栽培種の交雑F2における雄性不稔ダイコンとクロダイコンの出現
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 裕士, 中元 海里, 植村 香織, 寺地 徹
2. 発表標題 葉緑体へ導入したプラスミドに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片の特徴づけ
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植村 香織, 中元 海里, 馬場 裕士, 児島 和志, 寺地 徹
2. 発表標題 プラスミドに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片探索の過程で得られた予期せぬ形質転換体の解析
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
研究分担者	寺地 徹  (TERACHI TORU)  (90202192)	京都産業大学・生命科学部・教授    (34304)	

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
---------	---------