

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：若手B

研究期間：2011～2012

課題番号：23780011

研究課題名（和文）植物の遠縁交雑後の世代で進むエピジェネティックな遺伝子発現変化

研究課題名（英文）Epigenetic changes in gene expression profiles induced by species crosses.

研究代表者

深井 英吾 (Fukai Eigo)

独立行政法人農業生物資源研究所植物科学研究領域植物共生機構研究ユニット

研究者番号：00570657

研究成果の概要（和文）：遺伝的に遠い両親間の交雑後代では、通常のメンデル遺伝では説明できないような、エピジェネティックな遺伝子発現変動が生じると考えられている。本研究ではミヤコグサの遠縁交雑集団において、両親と比較して発現変動した転写産物を複数同定した。またその一つであるレトロトランスポゾンについて、エピジェネティックマークの一つであるDNAメチル化の変動を解析した。

研究成果の概要（英文）：Hybridization between distantly related species has been regarded as a stimulus inducing epigenetic changes in gene expression profiles in the progeny. This study identified gene expression changes in the progeny of crosses between different *Lotus* species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：遠縁交雑、エピジェネティクス、トランスポゾン、次世代シーケンサー、トランスクリプトーム、ゲノム、ミヤコグサ

## 1. 研究開始当初の背景

遠縁交雑は、例えば耐病性など、栽培種の集団中に見いだせない質的形質を野生種から導入する際などに、植物育種の手法として利用されている。遠縁交雑には、野生種由来の栽培に適さない性質を除く必要や、栽培種と野生種間の生殖的隔離の問題があるため、多くの場合、交雑 F1 に栽培種を戻し交配する戦略がとられる。しかし今後は、DNA マーカーの高度化が進むにつれ、野生種由来の量的形質利用の試みが増えると考えられ、ここでは、野生種由来のゲノムと栽培種由来のゲノムが共存する期間がこれまでよりも長期化すると考えられる。

以前から、遠縁交雑の後代では通常のメンデル遺伝では説明できないような表現型が

出現する事があると言われてきた。遠縁交雑後代について遺伝子発現プロファイルの変動を解析した研究は複数行われているが、多くは F1、あるいは F1 の染色体が倍数化した個体と、交雑両親との遺伝子発現プロファイルの比較解析であった。それらの解析では、ヘテロシスとの関連が考えられる遺伝子群の発現の変化や、トランスポゾンのサイレンシングの解除が報告されている。トランスポゾンは通常、エピジェネティックなサイレンシングを受けている事が知られており、遠縁交雑後代で生じる遺伝子発現プロファイルの変動には、エピゲノムの変動が関与している可能性が考えられている。

遠縁交雑は、互いに多型を蓄積したゲノム・エピゲノムが接合する現象であり、その

子孫ではゲノム・エピゲノムの新しい平衡状態が形成されるまでの間、不安定な状態が続くと考えられる。この不一致により、遠縁交雑育種では、本来抑制されていた遺伝子が活性化されたり、逆に活性状態の遺伝子が抑制される現象が生じる。前述のように、野生種の量的形質を利用しようとする際など、速やかに戻し交雑を行わない場合は、ゲノム・エピゲノムの不一致が長期化すると考えられるが、遠縁交雑の F2 以降に生じる遺伝子発現の変化に関しては、解析例が少なかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物の遠縁交雑により誘導されるエピジェネティックな遺伝子発現変化に規則性を見だし、変化が生じる原因を明らかにする事を最終的な目的とし、その第一段階として、遠縁交雑により構築された組み換え近交系（以降 RIL）集団において、親と比較して発現変動している転写配列を同定することを試みた。また、解析材料とした RIL 集団において、エピジェネティックな活性化が生じていたレトロトランスポゾンについて、その活性化の様式を解析した。

## 3. 研究の方法

材料として、マメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の 2 つの遠縁交雑 RIL 集団を用いた。2 つの RIL 集団において共通に利用された交配親は、ミヤコグサのアクセッション B-129(岐阜県由来)であった。B-129 に対する交配相手には、ミヤコグサ近縁種 *L. burttii* (パキスタン由来)、近縁種 *L. filicaulis* (アルジェリア由来) のそれぞれが用いられていた。また、ミヤコグサの B-129 アクセッションと MG20 アクセッションの間で構築された、種内交雑 RIL 集団も必要に応じて解析に用いた。これら RIL 集団の他に、RIL 集団の親系統や、F1 等を解析に用いた。

本研究でミヤコグサ遠縁交雑 RIL 集団を用いた理由の 1 つとして、それらにおいて B-129 内在のレトロトランスポゾン *LORE1a* (*Lotus Retrotransposon 1a*) の転移が生じていた事が挙げられる。我々の過去の研究から、*LORE1a* は通常エピジェネティックなサイレンシングを受けており転移しないが、培養細胞からの再分化個体において確率論的に活性化されることが分かっている。ミヤコグサの遠縁交雑集団においても *LORE1a* のエピジェネティックな活性化が生じたと考えられたため、*LORE1a* と同様にエピジェネティックな転写変動を起こしている遺伝子が他にも存在するのではないかと考えたのが、本研究の動機の 1 つであった。そこで、*LORE1a* の配列における DNA メチル化の変動についても解析を行い、遠縁交雑集団で起こりうるエピジェネティック変動

の様式を知るためのモデルとした。

## 4. 研究成果

### (1) 遠縁交雑集団における *LORE1a* の活性化について

B-129 と *L. filicaulis* の間の RIL 集団（以降 *L. filicaulis* 集団）、B-129 と *L. burttii* の間の RIL 集団（以降 *L. burttii* 集団）のそれぞれから、*LORE1a* が活性化状態にあり、新しい転移を起こしている F6 または F7 世代の個体を 2 個体ずつ、計 4 個体同定していた。これら 4 個体においては、*LORE1a* の転写量が上昇していた。これらの個体について、*LORE1a* のプロモーターを含む 5' LTR (Long Terminal Repeat) 配列の DNA メチル化を解析したところ、4 個体全てで DNA メチル化レベルが大幅に低下していた。次に、遠縁交雑集団内の系統のうち、*LORE1a* の転移を起こしていない系統について同様に解析したところ、これらの個体においても *LORE1a* 5' LTR の DNA メチル化レベル低下が生じていた。以上から、*LORE1a* の 5' LTR における DNA メチル化低下は、遠縁交雑集団内で広く誘導されたが、そのうち転移に至る個体と至らない個体が生じた可能性が示唆された。トランスポゾンの DNA メチル化には、RdDM (RNA dependent DNA methylation) の機構が関与している事が知られている。遠縁交雑集団の両親系統や F1、遠縁交雑集団内の *LORE1a* 転移個体と非転移個体などを解析対象に、*LORE1a* の LTR 配列 (*LORE1* ファミリーに共通の配列であり、*LORE1a* に特異的ではない) をプローブとして small RNA ノーザンを行ったところ、解析した全てのサンプルにおいてシグナルが検出された。以上から、*LORE1a* を含む *LORE1* ファミリーを標的とした siRNA の供給は、遠縁交雑集団内において安定していると考えられたので、現時点では、*LORE1a* の DNA メチル化低下が、siRNA の供給不足による RdDM の不全による可能性は低いと考えている。

### (2) *LORE1a* 転移個体のトランスクリプトーム解析について

前述した 4 個体の *LORE1a* 転移個体と、B-129, *L. filicaulis*, *L. burttii* の計 7 系統を解析対象として、RNAseq によるトランスクリプトーム解析を行った。解析には花と葉の 2 組織を用いた。それぞれの組織から抽出したポリ A RNA を鋳型とし、dUTP 法による directional RNAseq ライブラリーを作製し、Illumina HiSeq 1500 により片側 50bp ずつのペアエンドリードを得た。こうして、各植物系統について約 2 億リードペアずつの配列情報を得た。

ミヤコグサのゲノム情報は MG20 アクセ

ッションを基に整備されている。今回 RNAseq 解析を行った植物材料はいずれも MG20 ではないので、それぞれの塩基配列は、MG20 に対して多型を持つ。この事は、以降の発現変動転写産物同定解析の結果に影響を与える可能性が考えられたので、データ解析の方法として次の2つを試みた。1つは、前述の多型の問題を無視して、ミヤコグサゲノム情報から推定された cDNA 配列をリファレンス配列として、リードをそのままマッピングし、各 cDNA 配列あたりの発現量情報に変換する方法である。もう1つは、7系統の各々において、リードの *de novo* アセンブルを行い、得た *de novo* アセンブル配列（以降 *de novo* 配列）に対しリードをマッピングさせ、発現量情報を得る方法である。前者に関しては、例えば葉のリードについて、B-129 では全リードの約 70%、*L. filicaulis* では約 65%が cDNA 配列にマップされた。両者の5%のマップ効率の違いは、MG20 との塩基配列多型レベルを反映していると考えられた。一方後者の解析として、転写の方向性を考慮した Trinity の解析により、各系統から約 20 万ずつの *de novo* 配列を得た。この *de novo* 配列をリファレンスとしてリードをマップしたところ、全リードの約 90%がマップされた。cDNA 配列を用いた場合に比べ 20%程度のリードマッピングの効率向上が見られた事から、*de novo* 配列には、推定 cDNA 配列ではカバーされていない転写産物が含まれる事が示唆された。しかし、*de novo* 配列は系統間の配列多型レベルが大きく、系統間でアレルと考えられる配列を対応づけることが困難であったため、発現変動遺伝子の予測精度が著しく低下する問題が生じた。これらの検討をふまえ、次に説明する発現変動転写産物の同定は、前者の解析方法で得た結果をもとに行った。

リファレンスとして用いた 9 万 8 千の cDNA 配列のうち、*LORE1a* 転移が生じていた 4 個体において、RIL 集団の両親と比べて転写変動した配列を、DESeq を用いて選抜した。その結果、4 個体 2 組織の計 8 データ集団のうちいずれかで転写変動が見られた cDNA 配列は、計約 300 個あった。そのうち 6 割は転写上昇、4 割は転写減少、若干数が転写上昇と減少の両方が RIL 集団ごとに異なって見られた。転写変動した cDNA 配列の 1 割程度はトランスポゾンまたはトランスポゾン関連配列であり、その中に *LORE1* 配列も含まれていた。8 データ集団の全てで転写変動していたのは、*LORE1* 配列ともう1つの cDNA 配列の 2 つのみであった。転写変動 cDNA 配列の約半数はシロイヌナズナの機能遺伝子と相同性があった。それらの cDNA 配列の機能分類を、シロイヌナズナのホモログの遺伝子オントロジーに従って示すと、図 1

のようになった。

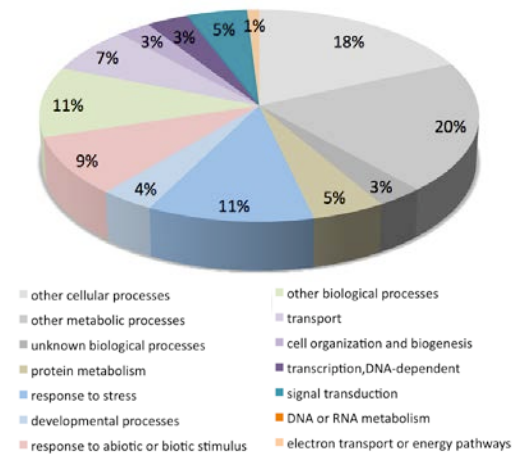


図 1. 発現変動 cDNA 配列の遺伝子オントロジーの分類

各 cDNA 配列に対応するシロイヌナズナのホモログの Biological process のカテゴリのオントロジー情報に基づき分類を行った。

同定した転写変動の中には、エピジェネティックな原因によるものと遺伝的原因によるものの両方が含まれていると考えられる。今後は、転写変動 cDNA をコードしている遺伝子のエピジェネティックマークの変動解析等を通じ、エピジェネティックな要因による現象を同定し、それらの変動が遠縁交雑集団においてどのように生じたのか解析を行う。*LORE1* 配列と同様に 8 データセット全てで転写変動していたもう1つの cDNA 配列については、*LORE1a* の活性化との因果関係を検討する。また、*de novo* 配列にのみ含まれている転写産物から得られる情報を加え、転写変動 cDNA 配列同定の網羅度を向上させる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1)Eigo Fukai, Jens Stougaard, Makoto Hayashi

Activation of an endogenous retrotransposon associated with epigenetic changes in *Lotus japonicus*: A tool for functional genomics in legumes

The Plant Genome, Accepted, (2013)

査読有り

(2)Eigo Fukai, Takashi Soyano, Yosuke Umehara, Shinobu Nakayama, Hideki Hirakawa, Satoshi Tabata, Shusei Sato, Makoto Hayashi

Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the

exon-targeting endogenous  
retrotransposon *LORE1*  
The Plant Journal, 69:720-730 (2012),  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04826.x.  
査読有り

〔学会発表〕(計6件)

(1) 深井英吾, Niels Sandal, 吉川学, 平川英樹, 梅原洋佐, 河内宏, 佐藤修正, Jens Stougaard, 廣近洋彦, 林誠

ミヤコグサの種間交雑 RIL 集団におけるレトロトランスポゾンの活性化

日本育種学会第123回講演会、2013年3月27日、東京農業大学

(2) 深井英吾, Niels Sandal, 吉川学, 平川英樹, 梅原洋佐, 河内宏, 佐藤修正, Jens Stougaard, 廣近洋彦, 林誠

ミヤコグサの種間交雑 RIL 集団におけるレトロトランスポゾンの活性化

日本植物生理学会年会 第54回、2013年3月22日、岡山大学

(3) Eigo Fukai, Takashi Soyano, Yosuke Umehara, Shinobu Nakayama, Satoshi Tabata, Shusei Sato, Makoto Hayashi

Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the endogenous retrotransposon *LORE1*.

VI International conference on Legume Genomics and Genetics, October 10 (2012), Hyderabad, India

(4) 深井英吾, 征矢野敬, 梅原洋佐, 中山しのぶ, 平川英樹, 田畑哲之, 佐藤修正, 林誠

内在性レトロトランスポゾン *LORE1* によるマメ科モデル植物ミヤコグサの大規模遺伝子タギング系の開発

日本育種学会第121回講演会、2012年3月29日、宇都宮大学

(5) 深井英吾, 征矢野敬, 梅原洋佐, 中山しのぶ, 平川英樹, 田畑哲之, 佐藤修正, 林誠

内在のレトロトランスポゾン *LORE1* を用いたミヤコグサの大規模遺伝子タギング系の開発

日本植物生理学会年会 第53回、2012年3月16日、京都産業大学

(6) 深井英吾, 征矢野敬, 梅原洋佐, 中山しのぶ, 岸田佳恵, 平川英樹, 田畑哲之, 佐藤修正, 林誠

内在のレトロトランスポゾン *LORE1* を用いたミヤコグサの大規模遺伝子タギング系

植物微生物研究会第21回研究交流会、2011年9月20日、岡山大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

日本育種学会春季大会(第121回講演会)

日本育種学会優秀発表賞

所属研究室のウェブサイト

<http://www.nias.affrc.go.jp/org/DivPlant/Symbiosis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 英吾 (FUKAI EIGO)

独立行政法人農業生物資源研究所

植物科学研究領域

植物共生機構研究ユニット 特別研究員

研究者番号: 00570657