

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292020

研究課題名(和文)ネギ属バイオリソースを用いたオミクス統合解析のタマネギ育種への応用

研究課題名(英文) Application of integrated omics analyses by using Allium bio-resources to onion breeding

研究代表者

執行 正義 (Masayoshi, Shigyo)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：40314827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームやフェノームを統合解析して代謝産物の量的変化や表現形質の発現に直接関与する遺伝子を明らかにすることをオミクス統合解析という。ネギ類において成分育種や耐病性育種を精密に行う場合には、この解析手法から得られる情報をバイオインフォマテックス手法により加工・標準化した統合データベースが必要となる。そこで本研究では、植物材料として、これまでにゲノムやフェノームの観点から変異の理解が進んでいる異種染色体添加系統や倍加半数体系統由来分離集団を用いてオミクス統合解析を行い、得られたメタデータから生物学的な意味を抽出してタマネギ育種ツールの開発に繋げることを試みた。

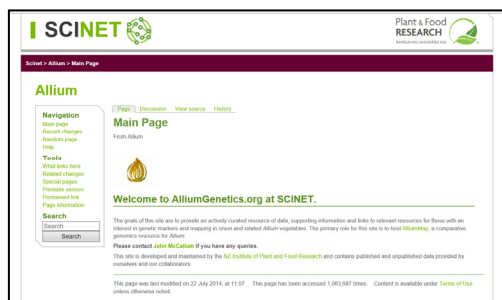
研究成果の概要(英文)：Our research via the use of unique genetic resources was carried out enable a holistic approach to profile the phytochemical composition as well as its related gene expression of alliums for plant breeding studies, through collaborative development of resources for metabolomics-high throughput chemical profiling by mass spectrometry, together with transcriptomics assay metadata by RNA-Seq. The metabolomics analysis of eight monosomic addition lines proved to be effective in revealing the effects of single alien chromosomes from shallot on the production of several functional chemical compounds in the different organs of *A. fistulosum*. Our main focus was to map the resistance gene of shallot with SNP markers together with mQTLs by using the mapping population derived from F1 between shallot and onion DHs. An omics approach could be utilized to characterize variation in these genetic stocks, developing capability and plant materials to support metabolomics-informed plant breeding studies.

研究分野：園芸化学

キーワード：染色体マーカー 連鎖地図 植物病害抵抗性 単一異種染色体添加系統シリーズ 倍加半数体 ネギ類  
トランスクリプトーム解析 メタボローム解析

## 1. 研究開始当初の背景

8種類の染色体より構成されるタマネギ (*Allium cepa* L. Common group) ゲノムはシロイヌナズナの約107倍にあたる約152億塩基対 (17.9pg/1C) を包含している (Havey 2002)。この巨大ゲノムは研究者の解析意欲を減退させ、連鎖地図作成からなるゲノム解析も限定的に行われていた。20世紀末にウィスコンシン大学マディソン校 (King ら 1998) やオランダ国際植物研究所 (van Heusden ら 2000a) のグループがタマネギ連鎖地図の構築に着手した。しかし、従来の解析手法では各連鎖地図が対応する染色体を明らかにすることさえできず、染色体レベルのゲノム解析を困難なものにしていた。一方で、他の主要野菜にないユニークな植物材料として、我々は異種間交雑と染色体倍加を組み合わせて「シャロット (*A. cepa* Aggregatum group) 由来単一異種染色体を添加したネギ (*Allium fistulosum* L.) 系統シリーズ (添加系統シリーズ)」を完成し (Shigyo ら 1996)、膨大な遺伝情報を8本の染色体毎に整理することを開始した。まず、添加系統シリーズを用いてウィスコンシン大と国際植物研究所がそれぞれ構築した多数のDNAマーカーからなる連鎖地図が対応するタマネギ染色体を決定しつつ、両地図の統合を後押しすることで染色体地図の基本骨格を整備した (van Heusden ら 2000; Martin ら 2006)。次に、タマネギの球皮に含まれるフラボノイド類の生合成に関与する全ての調節遺伝子や構造遺伝子の染色体上での所在を突き止めた (Masuzaki ら 2006, 2007)。また、新たにゲノム研究に参画したNZ植物・食品研究所と連携してタマネギの機能性多糖類 (フルクタン) の蓄積に関与する原因遺伝子の座乗部位を第8染色体上に特定する (McCallum ら 2006; Yaguchi ら 2008) とともに、イグノーベル賞受賞者であるハウス食品の今井ら (2002) が発見したタマネギ催涙因子合成酵素遺伝子の高精度染色体マッピングに関する共同研究をロシア国立農業大学と行い、同遺伝子が第5染色体に座乗することを突き止めた (Masamura ら 2011)。この様に、研究代表者が中心となり進めている取り組みより得られたゲノム情報の一部は Web 上のデータベース (SCINET Allium, <http://alliumgenetics.org/>) において公開されている (下図にトップページを示す。)



## 2. 研究の目的

タマネギの年間生産量は世界第15位 (2011年・約8千6百万トン) となり、野菜の中ではトマト、スイカに次いで生産量が多い (FAOSTAT 2011)。タマネギを人類が栽培した歴史は古く、紀元前23世紀のエジプトまで遡ることができ、ピラミッド建設に従事した労働者の食生活改善に貢献した。この様にタマネギは、‘先住民の伝統的な知恵’ から健康食材と信じられており、このことは今日の医科学分野での基礎研究や広範な臨床研究においても立証されている。本研究では、機能性代謝物の宝庫‘タマネギ’の化学成分群 (含硫化合物、フラボノイド類、サポニン類等) に着目し、染色体変異系統や交雑集団からなるネギ属バイオリソースのオミクス統合解析により複雑な代謝系やその遺伝系を紐解きながら、持続可能な農業生産に寄与する健康機能性と植物病害抵抗性を併せもつタマネギ育種素材の獲得を目指す。

## 3. 研究の方法

遺伝子 (ゲノム)、転写産物 (トランスクリプトーム)、代謝産物 (メタボローム) や表現形質 (フェノーム) を網羅的に解析する研究手法を‘オミクス’と称し、それらを統合解析して代謝産物の量的変化や表現形質の発現に直接関与する遺伝子を明らかにすることをオミクス統合解析という。ネギ類において成分育種や耐病性育種を精密に行う場合には、この解析手法から得られる情報をバイオインフォマテックス手法により加工・標準化したオミクス統合データベースが必要となる。本研究では、植物材料として、これまでにゲノムやフェノームの観点から変異の理解が進んでいる異種染色体添加系統や倍加半数体系統由来分離集団を用いてオミクス統合解析を行い、得られたメタデータから生物学的な意味を抽出してタマネギ育種ツールの開発に繋げる。具体的には、以下の項目に示すように添加系統シリーズとDH系統間交雑由来F<sub>2</sub>集団の各器官から得られるオミクスデータに関する統合解析を行って代謝系を解明しつつ、その遺伝的制御技術の開発を試みた。

(1) 染色体マーカーの開発, (2) F<sub>2</sub>集団を用いた飽和連鎖地図の構築, (3) 添加系統シリーズのトランスクリプトーム・メタボローム解析, (4) F<sub>2</sub>集団を用いたメタボローム QTL 解析, (5) オミクス統合データベースの構築, (6) 新規選抜指標による優良個体選抜

## 4. 研究成果

本科学研究費補助金による研究成果を項目毎にまとめると以下ようになる。

### (1) 染色体マーカーの開発

植物材料として、山口大で系統維持している添加系統シリーズ (8種類) とその両親種 (ネギとシャロット) からなる10系統について、各3個体からそれぞれ採取した葉身部、

葉鞘部（鱗莖部）および根部を用いた。これらのサンプルから RNA を抽出し、Illumina シーケンサーを用いて RNA-Sequencing データを収集した。得られた添加系統シリーズ由来の RNA-Sequencing データについて、シャロット鱗莖部の unigene セットをリファレンスとしてマッピングを行なうことにより、RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) 値を集計し、比較解析用データを整備した。加えて、RNA-Sequencing で得られたシャロットとネギの間の配列多型の影響で、シャロット由来の遺伝子のみがマップされる（ネギ親株の RPKM 値が 0 となる）unigene を検索したところ、葉身部で 12,346、葉鞘部で 8,620 および根部で 10,197 の対象配列がそれぞれ得られた。さらに、特定の染色体系統のみでシャロットに近い RPKM 値が得られた unigene の数を器官別に整理すると第 1 表のようになる。また、三器官の解析でいずれも検出されている共通 unigene も多数得られており、それらが最も確度の高い染色体特異的 unigene であり、マーカーとして優先的に活用できることが示唆された。

第 1 表 添加系統シリーズの RNA-Sequencing により得られた染色体特異的 unigene の数

| 供試した器官 | 染色体添加系統シリーズ |       |       |       |       |       |       |       | 合計   |
|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|        | FF+1A       | FF+2A | FF+3A | FF+4A | FF+5A | FF+6A | FF+7A | FF+8A |      |
| 葉鞘部    | 592         | 598   | 571   | 425   | 400   | 427   | 397   | 374   | 3784 |
| 根部     | 803         | 830   | 799   | 594   | 603   | 622   | 588   | 489   | 5308 |
| 葉身部    | 749         | 673   | 778   | 596   | 497   | 662   | 503   | 396   | 4854 |

## (2) F<sub>2</sub> 集団を用いた飽和連鎖地図の構築

シャロット倍加半数体 ‘DHA’ とタマネギ倍加半数体 ‘DHC’ のトランスクリプトーム配列の比較により、155 個の InDel (>8bp) が検出された。その領域を増幅するプライマーを設計して ‘DHA’, ‘DHC’ およびそれらの F<sub>1</sub> を用いて PCR を行った結果、93 個で増幅がみられ、そのうち 18 個において両親間の多型が検出された。これらに加え、ネギとタマネギのゲノムおよび EST 由来の SSR や InDel マーカーを用いて F<sub>2</sub> 集団による連鎖解析を行った。その結果、54 マーカーを含む 10 連鎖群からなる連鎖地図が構築された (図 1)。さらに、シャロット単一異種染色体添加ネギ系統を用いて連鎖群中のマーカーの遺伝子型を調査して座乗染色体を決定したところ、18 個のマーカーがシャロットの単一染色体にそれぞれ振り分けられ、9 つの連鎖群 (Group1~9) と物理染色体を対応付けることができた。一方で、DH 間 F<sub>1</sub> 由来雌性発生個体群を分離集団として用い、先に構築された連鎖地図と比較した結果、Group10 は 5 番

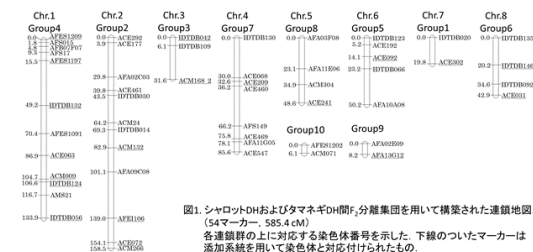


図 1. シャロットDHおよびタマネギDH間F<sub>2</sub>分離集団を用いて構築された連鎖地図。(54マーカー・585.4cM) 各連鎖群の上に対応する染色体番号を示した。下線のついたマーカーは添加系統を用いて染色体と対応付けられたもの。

染色体に振り分けられた (岩田ら, 園学研 12 別 1, '13)。

一方で、F<sub>2</sub> 集団 30 個体において、平成 26 年度の東京農大ゲノム支援によりとり行った RNA-seq のデータから SNP 情報を整理することにより、約 5000 の unigene について遺伝子型情報を得ることができ、この情報を基に、染色体数に収束した遺伝子地図を構築することができた (図 2)。

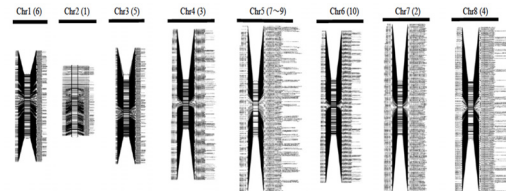


図 2. シャロット・タマネギDH間の F<sub>2</sub> 分離集団を用いて構築された Allium cepa の超高密度染色体地図 (マーカー数: 4,342 個, 11,916cM) : 括弧内の数字は構築した連鎖群番号を示す。

F<sub>2</sub> 集団 68 系統分の解析を追加し、計 98 系統について RNA-seq データを収集した。この情報を基にシャロットとタマネギ間の SNP が検出された約 4,400 の unigene から得られた遺伝子型情報を用い、昨年度構築した連鎖地図の再確認を行って 610 の genotype block からなる高解像度・高精度の遺伝子地図情報を整備することができた。さらに、平成 28 年度先進ゲノム支援のサポートを受け、黄色化処理したシャロットの倍加半数体の葉身部より核から単離して得られた DNA サンプルを用い、イルミナ HiSeq2500 システムにより 250 bp PE で 60 億リードペアの配列を収集した。これらの配列を SOAPdenovo2 によりアセンブルした結果、200 万のコンティグが得られ、総延長がゲノムサイズの約 9 割に相当する 13.5 Gbp となった。現在、これらのコンティグについてシャロットの鱗莖の unigene と対応させる作業を実施し、座乗染色体の同定を進めている。また、SSR や In/Del マーカーを 60 種類まで拡充し、前述の連鎖地図情報と統合して民間種苗会社の小規模研究室でも利用できる染色体情報解析用育種ツールの開発も行っている。

## (3) 添加系統シリーズのトランスクリプトーム・メタボローム解析

添加系統シリーズを圃場で栽培し、葉身部、根部および葉鞘部（鱗莖部）の器官別にサンプリングした。これらのサンプルを用いてメタボローム解析を行なうとともに、同じサンプルから RNA を抽出し、Illumina シーケンサーを用いて配列情報を収集した。

各系統につき 3 サンプルを用い、各サンプル 10M reads 以上の配列情報を収集した。得られた配列情報は、シャロット鱗莖部の unigene セットをリファレンスとしてマップした後に、RPKM 値を算出することにより集計し、整備を進めているネギ属トランスクリプトームデータベース (AlliumTDB) に情報を加えることで比較解析、統合オミクス解析に応用するための基盤情報を整備した (図 3)。RPKM データ整理の結果、添加したシャロット染色体に由来すると考えられるシャロット



トの発現遺伝子の情報やシャロット染色体の添加により発現誘導されたと考えられるネギ遺伝子の情報を得ることができた。

文部科学省ゲノム支援事業と東京農業大学ゲノム解析拠点事業による助成を受け、それぞれ解析を行なった 10 系統の根と葉鞘の RNA-seq データについて、シャロット葉鞘の unigene セットおよびネギ葉鞘の unigene セットをリファレンスとしてマッピングを行なう事により、RPKM 値を集計し、比較解析用データを整備した。データ整理の結果、添加したシャロット染色体に由来すると考えられるシャロットの発現遺伝子の情報やシャロット染色体の添加により発現誘導されたと考えられるネギ遺伝子の情報を得る事ができた。

メタボローム解析に関しては、20 種類 [添加系統+両親 (8+2) × 2 組織] のサンプルを独立個体由来で 3 反復において 499 種の代謝産物の高感度検出条件を検討した。その結果、123 種の代謝産物が高精度 (S/N 比 > 5, RSD 値 < 0.3) に検出でき、ネギ類に特徴的な 2 次代謝産物 (フラボノイド, 含硫黄化合物) の生合成に関連する染色体を推定できた。

#### (4) F<sub>2</sub> 集団を用いたメタボローム QTL 解析

生育中の F<sub>2</sub> 集団の葉身部を収集し、メタボローム QTL 解析を行ったところ、数種類の S 化合物について、特定の染色体上に QTL が検出され、現在、各染色体上の QTL 周辺の遺伝子について関連性の有無を調査している。この様に、ネギ属植物において、初めてメタボローム QTL の解析系を構築した訳であるが、大量の化合物データを用いた解析には時間を要するため、現在も継続して検討中である。

#### (5) オミクス統合データベースの構築

標準化合物の高感度検出条件に基づく LC/GC-QqQ-MS 解析を行い、合計 1000 種類以上の代謝産物プロファイルを得た。次に、植物に特徴的な未同定代謝産物に対応可能な LC-QTOF-MS 解析を行い、639 種の化合物候補を検出した。さらに、超分解能な LC-FTICR-MS 解析結果を WEB 上で閲覧、検索、統計解析が可能な RIKEN HIFI (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/hifi/index>) を確立した。一方で、この DB とかずさ DNA 研究所で構築した転写産物データベース (AlliumTDB: <http://alliumtdb.kazusa.or.jp/index.html>) との連携を深め、ネギ属植物専用の統合オミクスデータベースの開発に着手している (下図

The screenshot shows the AlliumTDB website interface. At the top, there are navigation tabs: HOME, BLAST, KEYWORD, and LIST. Below the tabs, it says "List of 12 libraries". A table with 4 columns (No., plant material, organ, data set) lists 12 different samples. The table content is as follows:

| No. | plant material                           | organ | data set      |
|-----|--|-------|---------------|
| 1   | Doubled haploid of Onion (DHC)           | Leaf  | DHC_Leaf      |
| 2   | Doubled haploid of Shallot (DHA)         | Leaf  | DHA_Leaf      |
| 3   | F1 hybrid of DHA x DHC (F1)              | Leaf  | F1_Leaf       |
| 4   | A. roylei                                | Leaf  | A.roylei_Leaf |
| 5   | Doubled haploid of Shallot (DHA)         | Bulb  | DHA_Bulb      |
| 6   | F1 hybrid of DHA x DHC (F1)              | Bulb  | F1_Bulb       |
| 7   | A. roylei                                | Bulb  | A.roylei_Bulb |
| 8   | Doubled haploid of Shallot (DHA)         | Root  | DHA_Root      |
| 9   | F1 hybrid of DHA x DHC (F1)              | Root  | F1_Root       |
| 10  | A. roylei                                | Root  | A.roylei_Root |
| 11  | A. fistulosum                            | Stem  | FFStem        |
| 12  | A. fistulosum with Shallot 5A chromosome | Stem  | FF_SAStem     |

にトップページを示す。)。

#### (6) 新規選抜指標による優良個体選抜

添加系統シリーズと両親種の根部から抽出した粗サポニン抽出物を用い、タマネギ由来フザリウム菌に対する増殖抑制活性試験を実施した。その結果、高い増殖抑制活性を示す添加系統の活性画分を特定しつつあり、物質の特定を進めている。

添加系統シリーズのオミクス統合解析により、タマネギ乾腐病の抵抗性に関与するサポニン化合物 (アリオスピロシドAなど) や生合成遺伝子 (Cytochrome P450, Glycosyltransferase, Beta-glucosidase など) が明らかとなり、耐病性個体の選抜マーカー候補を得ることができた。一方で、タマネギ乾腐病菌を接種したシャロットの根を用いてトランスクリプトーム解析を行い、病原性菌接種区において数種の病害抵抗性関連遺伝子 (Cysteine proteinases, Cytokinin oxidase, Cysteine-rich RLK, Heat shock protein) が得られ、シャロット-乾腐病菌間の相互作用に係る遺伝子の検出が完了した。

#### 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)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 執行正義, ネギ類オミクス研究の意義と今後の展望, 第 20 回ネギ類小集会 (園芸学会平成 29 年度春季大会), 2017 年 3 月 18 日, 日本大学 (神奈川県藤沢市)
- ② 佐藤修正, ネギ類のオミクス解析におけるトランスクリプトームデータの活用, 第 20 回ネギ類小集会 (園芸学会平成 29 年度春季大会), 2017 年 3 月 18 日, 日本大学 (神奈川県藤沢市)
- ③ 藤戸聡志・若生忠幸, ネギ類におけるゲノム研究の進捗について, 第 20 回ネギ類小集会 (園芸学会平成 29 年度春季大会), 2017 年 3 月 18 日, 日本大学 (神奈川県藤沢市)
- ④ 澤田有司, ネギ類におけるメタボロームデータの収集とその育種利用, 第 20 回ネギ類小集会 (園芸学会平成 29 年度春季大会), 2017 年 3 月 18 日, 日本大学 (神奈川県藤沢市)
- ⑤ 佐々木一紀・伊藤真一, タマネギ乾腐病菌の分子生物学的研究とその耐病性育種への応用, 第 20 回ネギ類小集会 (園芸学会平成 29 年度春季大会), 2017 年 3 月 18 日, 日本大学 (神奈川県藤沢市)
- ⑥ M. Shigyo, Clarification of Omics Concepts and Future Challenges for Molecular Breeding in the Pregenomic Era of *Allium*, The Second Asian Horticultural Congress, 2016 年 9 月 26 日, Century City International Convention Center (Chegdu, China)
- ⑦ 藤戸聡史・山下謙一郎・若生忠幸・塚崎光・山北和香・佐藤修正・平川英樹・執

行正義, ネギ属トランスクリプトームデータベース *Allium* TDB を活用した *Allium cepa* 連鎖地図の構築, 園芸学会平成 28 年度秋季大会, 2016 年 9 月 11 日, 名城大学 (愛知県名古屋市)

- ⑧ 山北和香・竹富詩歩・佐藤修正・平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・山内直樹・執行正義, *Allium cepa* における超高密度連鎖地図作成の試み, 園芸学会平成 28 年度春季大会, 2016 年 3 月 27 日, 東京農業大学 (神奈川県厚木市)
- ⑨ 執行正義・佐藤修正・Abdelrahman, Mostafa・平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・杉山信男・山内直樹, ネギ属バイオリーソースを用いたトランスクリプトーム解析データの活用, 園芸学会平成 27 年度秋季大会, 2015 年 9 月 26 日, 徳島大学 (徳島県徳島市)
- ⑩ 山北和香・佐藤修正・Abdelrahman, Mostafa・平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・山内直樹・執行正義, ネギ単一異種染色体添加系統の RNA-Sequencing によるシャロット染色体マーカーの大量取得, 園芸学会平成 27 年度秋季大会, 2015 年 9 月 26 日, 徳島大学 (徳島県徳島市)
- ⑪ M. Shigyo・S. Hirata・M. Abdelrahman・H.Q. Vu・N.A. Ariyanti・N. Yamauchi, A New “OMICS” Platform Technology for Applied Cytogenetics and Implications for Germplasm Enhancement in *Allium*, 7th International Symposium on Edible Alliaceae, 2015 年 5 月 22 日, Nigde University (Nigde, Turkey)
- ⑫ 澤田有司・中林亮・執行正義・佐藤修正・若生忠幸・佐藤心郎・山田豊・森哲哉・坂田あかね・斎藤和季・平井優美, ネギ属の代謝育種を目指した統合メタボローム解析, 園芸学会平成 26 年度秋季大会, 2014 年 9 月 27 日, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市)
- ⑬ 執行正義, ネギ属におけるオミクス研究資源の育種利用の可能性について, 第 17 会ネギ類小集会 (園芸学会平成 26 年度秋季大会), 2014 年 9 月 26 日, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市)

[その他]

特集記事

日経バイオテク 6 月 15 日号「機能性食材研究」(第 18 回), タマネギ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

執行 正義 (SHIGYO, Masayoshi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号: 40314827

### (2) 研究分担者

伊藤 真一 (ITO, Shin-ichi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号: 30243629

若生 忠幸 (WAKO, Tadayuki)

農業・食品産業技術総合研究機構・

野菜花き研究部門・上席研究員

研究者番号: 70414670

佐藤 修正 (SATO, Shusei)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号: 70370921

澤田 有司 (SAWADA, Yuji)

理化学研究所・環境資源科学研究センター

・研究員

研究者番号: 00415176

(3) 連携研究者

平川 英樹 (HIRAKAWA, Hideki)

かずさ DNA 研究所・植物ゲノム研究部・

主任研究員

研究者番号: 80372746

中林 亮 (NAKABAYASHI, Ryo)

理化学研究所・環境資源科学研究センター

・研究員

研究者番号: 30586160