

研究報告書

「雑種強勢の分子機構の解明とその高バイオマス作物への活用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 藤本 龍

1. 研究のねらい

植物は、光合成により、大気中の二酸化炭素から糖類などの有機物を合成し、人にとって重要な炭素源の役割を担っている。人は、作物や野菜の物質生産機能の効率化を図り、その生産量の増大に成功してきた。これは、栽培技術や化学肥料の進歩に加え、育種（品種改良）によるところが大きい。

育種により、動植物の収量増加に貢献した遺伝現象としては、雑種強勢（ヘテローシス）がよく知られている。雑種強勢は、同一種内のある特定の両親間の交雑により得られた F_1 個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す現象である。多くの穀物や野菜では、雑種強勢を示す F_1 種子を大量に採種し、品種とする一代雑種（ F_1 ）育種が世界的に行われている。トウモロコシでは、一般品種から F_1 品種の転換が行われた 1940 年代から、1ha あたりの収量が 3 倍以上にもなり、 F_1 品種による収量改善効果が著しいことが明らかとなっている。日本国内においても、多くの野菜は一代雑種品種である。雑種強勢は品種育成において重要な現象であるが、未だその分子機構の全貌を理解するには至っていない。

本研究課題では、既に雑種強勢が見られる両親系統の選定が終了しているモデル植物のシロイヌナズナを用いて雑種強勢の分子機構の解明を目指す。シロイヌナズナでは、雑種強勢と両親系統間の遺伝距離には相関がないことが示されている。遺伝子の転写は、ジェネティックな制御だけではなく、エピジェネティックな制御も受けることから、遺伝的に近縁な両親系統間でも、エピジェネティックな修飾状態は多様である可能性が考えられる。シロイヌナズナでは、エピジェネティックな修飾に関わる遺伝子が数多く同定され、また解析方法も成熟していることから、エピジェネティクス研究の基盤が整っている。そこで、本研究では、従来のジェネティックなアプローチに加え、エピジェネティクスにも着目して研究を行う。

また、シロイヌナズナと最も近縁な野菜であるハクサイ (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) についても、雑種強勢の分子機構の解明を目指して研究を行う。

本研究課題では、2 種の研究結果を元に、雑種強勢の分子機構の解明を目指し、雑種強勢に関わる領域或は遺伝子の機能を明らかにし、効率的に高収量作物を作出する方法を構築したい。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、モデル植物であるシロイヌナズナと、その近縁種で、国内の主要な野菜の一つであるハクサイを用いて、遺伝学的な側面とエピジェネティックな側面から解析を行い、雑種強勢の分子機構を明らかにすることを目的としている。

シロイヌナズナを用いた課題では、以下の2つの内容について取り組んだ。

1. 戻し交雑集団や、染色体置換系統を片親とする F_1 を用いて、シュートサイズと遺伝子型情報を元に、雑種強勢に関わる領域の推定を行った。その結果、染色体の複数箇所の領域がヘテロ接合性を示すことが、雑種強勢の発現に重要であることを明らかにした。
2. Col と C24 系統の遺伝的背景をもつ機能欠失型の突然変異体同士を掛け合わせ、雑種強勢の発現を調べることで、特定の遺伝子或はその遺伝子が制御する現象が雑種強勢に関与するかを調べた。その結果、siRNA の生合成に重要な Pol4 や概日リズムの鍵因子である TOC1 は、雑種強勢には関与しないことを明らかにした。一方、DNA のメチル化の維持に関わる DDM1 の機能喪失は、雑種強勢の発現の低下を引き起こしたことから、DDM1 は雑種強勢に関与する可能性が示唆された。

ハクサイの研究においては、市販の一代雑種品種 'W77' の F_2 集団を用いた QTL 解析により、収量に関わる領域を同定した。さらに、'W77' と両親系統を用いて、RNA-seq、small RNA-seq、MeDIP-seq、ChIP-seq を行い、両親系統と F_1 で発現量や遺伝子の修飾状態が異なる領域を明らかにした。

(2) 詳細

1. シロイヌナズナの雑種強勢研究

1-1. 分離後代、戻し交雑集団、染色体置換系統を用いた遺伝学的解析

Col 系統と C24 系統の F_1 では、シュートサイズに雑種強勢が見られたが、 F_2 世代あるいは F_3 集団のシュートサイズの平均値は両親系統と同程度の値を示したことから、分離世代において、シュートサイズを遺伝的に固定することは難しいと考えられた。

戻し交雑集団を利用して、 BC_2F_1 集団の中から、植物サイズが大きい個体 (雑種強勢が F_1 と同程度、雑種強勢レベル+++) の遺伝子型を決定すると、植物サイズが小さい個体 (雑種強勢レベル+) に比べて、全体的にヘテロ接合性を示す領域が多く、幾つかの領域がヘテロ型であると植物サイズが大きくなることを見出した (図 1)。

少なくとも染色体 1 本が C24 系統のホモ型である CSL (Chromosome substitution line) 系統を各染色体について作成した。さらに、Single Seed Descent 法により F_6 集団から、独立した ~170 系

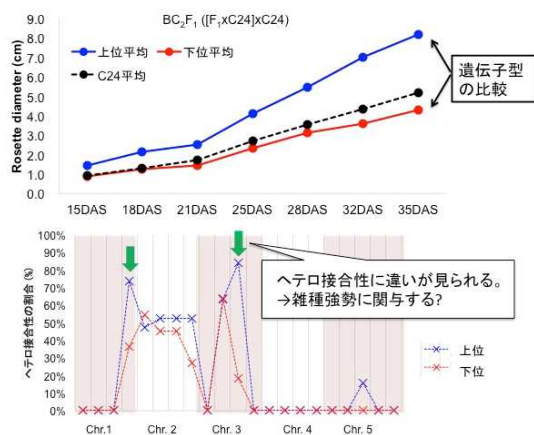


図1. 戻し交雑集団を用いた雑種強勢関連候補領域の特定

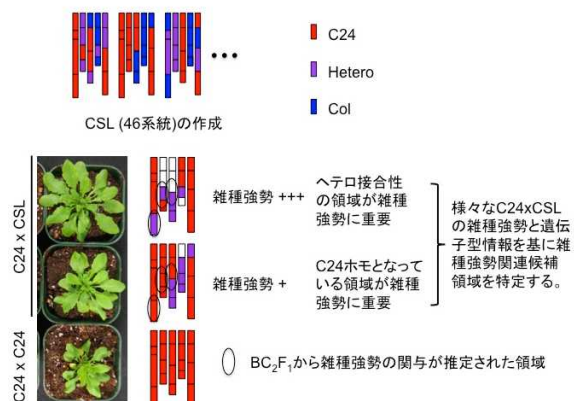


図2. CSLを用いた雑種強勢関連候補領域の特定

統の RIL (Recombinant Inbred line)を作成した。様々な CSL 系統と C24 系統を掛け合わせた F_1 の雑種強勢の発現と遺伝子型との関連性を調べた結果、 BC_2F_1 の結果から得られた候補領域のヘテロ接合性と雑種強勢の発現に関連性が見られた (図 2)。

1-2. 突然変異体を用いたアプローチ

Col 系統と C24 系統の両者で同一遺伝子の突然変異体が存在すれば、その遺伝子やその遺伝子が制御する現象と雑種強勢の関連性を調べることができる。そこで、概日リズムの鍵遺伝子の 1 つである *TOC1*、24nt-siRNA の生成に関わる *Pol4* の構成遺伝子である *NRPD1a*、DNA の維持メチル化に関わる *DDM1* について、突然変異体同士を掛け合わせて F_1 を作成し、雑種強勢の発現を調べた。その結果、*TOC1* と *NRPD1a* については機能を喪失していても雑種強勢が見られたことから、これらの遺伝子が雑種強勢に関わる可能性は低いと考えられた。

一方、*ddm1* (*d/d*) では雑種強勢の程度が低下した (図 3)。さらに、C24 系統 (*ddm1/DDM1*) と Col 系統 (*ddm1/ddm1*) を掛け合わせた F_1 では、雑種強勢の程度に分離が見られ、植物サイズが大きい個体 (雑種強勢レベル+++) の遺伝子型は *ddm1/DDM1* を、植物サイズが小さい個体 (雑種強勢レベル+) は *ddm1/ddm1* の遺伝子型を示す傾向にあった。しかし、*ddm1/DDM1* の遺伝子型でも植物サイズが小さい

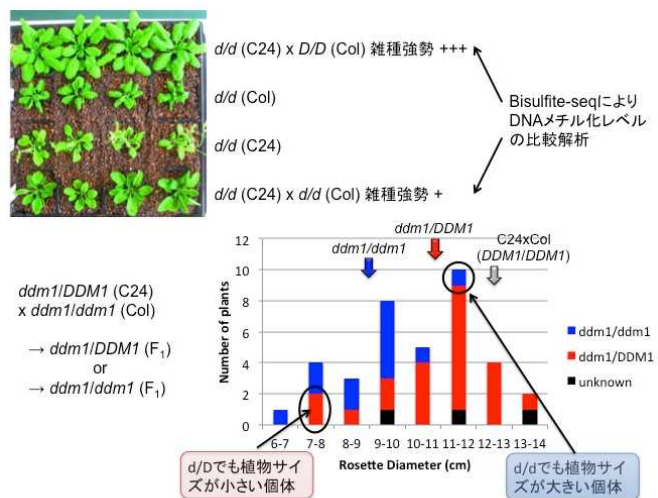


図3. *DDM1* 依存的DNAのメチル化が雑種強勢に関与する?

い個体(雑種強勢レベル+)や、*ddm1/ddm1* の遺伝子型でも植物サイズが大きい個体 (雑種強勢レベル+++) が得られた (図 3)。このことから、雑種強勢の発現と *DDM1* の機能喪失とは完全に連鎖しておらず、*DDM1* によって制御される DNA のメチル化等が、雑種強勢を安定的に発揮するのに重要である可能性が示唆された。

また、*Cvi* 系統の遺伝的背景を持つ *ddm1* 変異体を得られたのでそれを Col あるいは C24 系統の *ddm1* 変異体と交配して F_1 を作成した。その結果、Col 系統と *Cvi* 系統の F_1 や C24 系統と *Cvi* 系統の F_1 においても、*DDM1* の機能喪失により雑種強勢の発現が弱くなることが明らかとなった。そこで、4 つのサンプル (1. *ddm1-9* (C24) x *ddm1-1* (Col)、2. *ddm1-9* (C24) x WT (Col)、3. *ddm1-9* (C24) x *ddm1-1* (*Cvi*)、4. *ddm1-9* (C24) x WT (*Cvi*)) について、Bisulfite sequencing 解析を行った。*ddm1* がホモ型である 1 と 3 では、*ddm1* がヘテロ型である 2 と 4 に比べて、トランスポゾン領域の DNA のメチル化の低下が確認できた。現在、より詳細な解析を進めている。

2. ハクサイの雑種強勢研究

2-1. QTL 解析

市販のハクサイ一代雑種品種 'W77' では、播種後数日から、最終的な収量に至るまで雑種

強勢が現れる。そこで、収量の増加に関わる遺伝子座を明らかにすることを目的に QTL 解析を実施した。まず、QTL 解析の為に DNA マーカーのスクリーニングを行った。既存の SSR マーカーに加え、両親系統の RNA-seq やリシークエンスによって得られた SNP 情報を元に、200 以上の CAPS マーカーを開発した（各染色体 20 マーカー）。これらの DNA マーカーと RAD-seq により、F₂ 集団の遺伝子型判定を実施し、圃場試験による表現型調査の結果を用いて、収量に関わる QTL を検出した。

2-2. ハクサイにおけるオミクス解析

‘W77’ とその両親系統を用いて、播種後 2 日の子葉と播種後 10 日の本葉を用いてホルモーム解析（43 種類）を実施したところ、播種後 2 日では、F₁ は種子親と植物ホルモンの組成が似ており、播種後 10 日では、F₁ は両親系統のどちらか一方あるいは両親系統の中間値を示し、F₁ のみで顕著に蓄積量が異なるような植物ホルモンは検出されなかった。

‘W77’ とその両親系統の播種後 2、4、6 日の子葉、及び播種後 10、14 日の本葉を用いて、RNA-seq を行った。それぞれのステージで F₁ と両親系統で発現が異なる遺伝子が見出されたが、F₁ と両親系統で発現が異なる遺伝子は、ステージ間で重複しておらず、両親系統と F₁ で発現レベルが異なる遺伝子には時期・組織特異性があることが明らかとなった（図 4）。その中でも、Gene ontology 解析の結果、ストレス応答性の遺伝子の発現が F₁ で変化する傾向が見られた。

‘W77’ とその両親系統の播種後 2 日の子葉、及び播種後 14 日の本葉を用いて、small RNA-seq を行った。両ステージとも、miRNA の発現量は、両親系統と F₁ で差が見られなかった。siRNA については、両親系統間で発現量が異なる傾向にあった。F₁ で特異的に変化する siRNA も検出されたが、両親系統間での差に比べるとその数は少なかった。

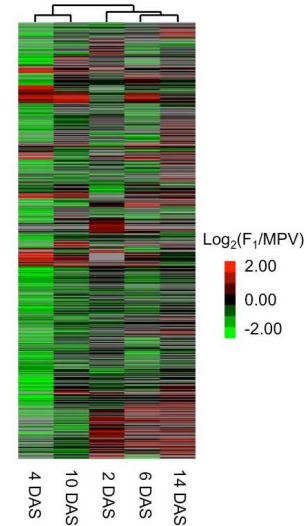


図4. F₁と両親系統の平均値 (MPV) で発現レベルが異なる遺伝子のクラスター解析

2-3. ハクサイにおけるエピゲノム解析

‘W77’ とその両親系統の播種後 14 日の本葉を用いて、MeDIP-seq と 4 種類のヒストンメチル化修飾抗体を用いた ChIP-seq を行った。MeDIP-seq では、両親系統と F₁ で DNA のメチル化レベルが異なる領域が見出されたが、F₁ で見られた遺伝子発現の変化との関連性は見られなかった。ヒストンのメチル化修飾においても、両親系統と F₁ で異なる領域が見出されたが、全体の傾向として、F₁ では、ヒストンのメチル化修飾の変化はドラスティックには起こっていないことが明らかとなった。

3. 今後の展開

シロイヌナズナの研究においては、雑種強勢に重要な候補領域を同定できたことから、今後更に絞り込みを進めることで、雑種強勢に重要な領域や遺伝子、更には領域間の相互作用を明らかにし、雑種強勢の分子機構の解明へと展開させたい。また、DNA のメチル化が雑種強勢を安定的に発揮させるのに必要な可能性が出てきたことから、どの領域あるいは遺伝子の DNA のメ

メチル化が雑種強勢の発現の安定性に関与するかを明らかにすることが今後の課題となる。

ハクサイにおいても、両親系統の遺伝的背景は近かったが、RNA-seq やリシーケンスにより、簡便に判別できる DNA マーカーを工夫して作成し、QTL 解析を実施できる準備を整えることができた。今後、QTL 解析やオミクス解析を通して、雑種強勢に関わる遺伝子座や遺伝子を同定する必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

雑種強勢の現象は昔からよく知られており、多くの研究者が取り組んできた研究課題であるが、未だその分子機構の共通理解には至っていない。シロイヌナズナの研究では、雑種強勢に関わる遺伝子領域が同定できた。また、DNA のメチル化が雑種強勢の安定発揮に関わる可能性を見出した。これらの研究知見は、雑種強勢の分子機構を理解する上で重要な知見となったと考えている。ハクサイにおいては、QTL 解析により、収量に関わる領域を同定できた。この領域は今後の品種育成において重要となる可能性がある。更なる反復実験や検証実験が応用に向けての課題となる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

藤本氏は、アブラナ科植物を用いて、育種学上の大きな課題である雑種強勢の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、シロイヌナズナの雑種強勢において DNA メチル化に係わる遺伝子 DDM1 の関与や、特定領域のヘテロ接合性が雑種強勢に重要であることを明らかにした等の成果は評価できる。しかし、当初の計画のハクサイの QTL 解析に関しては収量に関わる領域の特定にとどまっており、雑種強勢との関係に関しては課題が残った。藤本氏の解析の手法が、従来行われていた研究手法の枠をあまり超えなかったのは、やや残念である。このテーマは、一研究者のライフワークにもなるような研究課題であり、この研究を一つの契機として、継続発展させ、雑種強勢の仕組みの解明に迫ってほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Groszmann M, Greaves IK, Fujimoto R, Peacock WJ, Dennis ES (2013) The role of epigenetics in hybrid vigour. *Trends in Genetics* 29: 684–690.
2. Kawamura K, Kawanabe T, Shimizu M, Nagano AJ, Saeki N, Okazaki K, Kaji M, Dennis ES, Osabe K, Fujimoto R. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis. *Plant Gene* (2016) 5: 1–7
3. Saeki N, Kawanabe T, Ying H, Shimizu M, Kojima M, Abe H, Okazaki K, Kaji M, Taylor JM, Sakakibara H, Peacock WJ, Dennis ES, Fujimoto R. Molecular and cellular characteristics of

hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. BMC Plant Biology (2016) 16:45

4.

5.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 藤本龍 アブラナ科植物の種内、種間雑種に見られる非相加的遺伝子発現。日本育種学会第 123 回講演会 2013 年 3 月
2. Kawanabe T, Saeki N, Fujimoto R. Variation of the level of the heterosis among F_1 hybrid individuals in *Arabidopsis thaliana*. 24th International Conference on Arabidopsis Research. June 2013.
3. 川辺隆大、佐伯なつみ、阿部寛史、今野周平、加治誠、岡崎桂一、藤本龍。アブラナ科植物一代雑種品種における両親系統の対立遺伝子間相互作用。日本育種学会第 124 回講演会 2013 年 10 月
4. 川辺隆大、佐伯なつみ、阿部寛史、藤本龍。シロイヌナズナの雑種強勢に概日リズムは関わるか。日本育種学会第 126 回講演会 2014 年 9 月
5. 藤本龍、川辺隆大。アブラナ科の雑種強勢の分子機構の解明を目指した後成遺伝学的なアプローチ。日本遺伝学会第 87 回講演会 2015 年 9 月