

研究終了報告書

「植物の近交弱勢における遺伝機構の解明」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：竹島 亮馬

1. 研究のねらい

地球温暖化の加速に伴う気候変動や異常気象の頻発により、主要作物の収量低下や栽培可能農地の減少が懸念されている。この問題の解決にむけ、干ばつ・高温・豪雨などの環境ストレスに対する耐性を既存作物に付与する試みと、**ストレス耐性が優れる未利用・低利用植物を新たに作物化する試み**が進められている。未利用・低利用植物の新規作物化には、脱粒性・休眠性の消失や可食部の増大といった栽培化形質や人類にとって有用な形質の集積・固定が必須となる。しかし、**この過程では近親交配もしくは自家受粉(自殖)による急速な遺伝的多様度の低下が起き、近交弱勢のリスクが高まる (Fig.1)**。近交弱勢が発生すると、その系統は期待される能力を発揮できず、作物育種は固定度の低い選抜初期まで戻ってしまう。このような作物化の過程で生じ得る近交弱勢を回避するためには、近交弱勢の発生機構および関連遺伝子の理解が必須であるが、現在まで植物の近交弱勢に関わる遺伝機構はほとんど解明されていない。

そこで本研究では、近交弱勢に関わる遺伝子領域および遺伝子型の組合わせを把握し、近交弱勢発生リスクを事前に排除できる選抜モデルの構築を最終目標とする。その第一歩として本研究では、他殖性作物であり近交弱勢が発生し易いことが知られている**普通ソバ (*Fagopyrum esculentum*)**をモデルとして、**近交弱勢の遺伝的制御機構の解明を目指す**。具体的には、兄弟交配などにより近交係数を高めたソバ近交系集団を作出し、1) 近交弱勢形質の特徴づけと画像解析などによる定量化手法の開発、2) 弱勢形質関連遺伝子座の特定、3) 近交弱勢系統のメチローム・トランスクリプトーム解析を行う。以上により、近交弱勢の発生機構の理解、関連する遺伝子領域および遺伝子型の組合わせの把握を目指す。

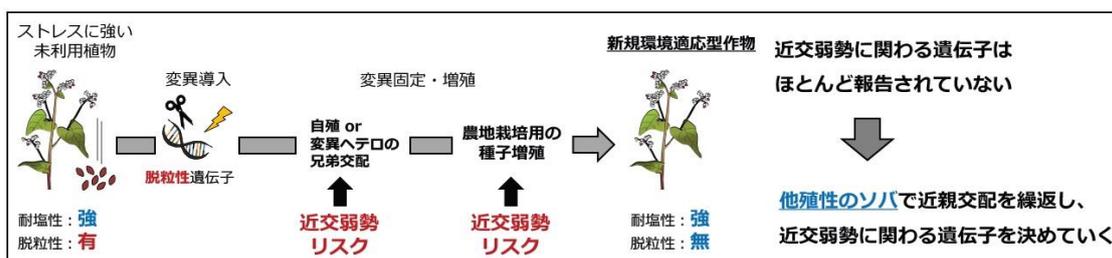


Fig.1. 本研究の概要。

2. 研究成果

(1) 概要

ACT-X 研究期間内では、以下の成果・知見が得られた。

- ① ソバの高精度なリファレンスゲノムの構築および遺伝子機能解析系の開発

- ② 近親交配により出現した葉の奇形に関する原因遺伝子座の特定と候補遺伝子の検出
 - ③ 近親交配により出現した生殖器官の弱勢化に関わる遺伝子群の検出および DNA メチル化レベルの変化の検出
- 次項から、研究成果の詳細を記載する。

(2) 詳細

他殖性作物である普通ソバ (Fig.2)を植物の近交弱勢に関わる遺伝学的研究のモデルとした。本研究では兄弟交配により作出した近交系集団などを用いて以下の項目を実施した。

- ① 効率的な遺伝解析にむけたゲノム情報・遺伝子機能解析系の整備
- ② 弱勢形質(葉の奇形)に関連する原因遺伝子の特定
- ③ 近交弱勢系統のメチローム・トランスクリプトーム解析



普通ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench)

- 他殖性作物 (異形花型自家不和合性)
- 2倍体 (2n=16), ゲノムサイズ 1.2 Gb
- 近交弱勢が発生しやすいことが報告されている (Komaki, 1982)

Fig.2. 普通ソバの特徴

① ソバの効率的な遺伝解析にむけたゲノム情報・遺伝子機能解析系の整備

効率的な遺伝解析には、その生物種の高精度なリファレンスゲノムと、遺伝解析で検出される候補遺伝子の機能解析系が必須である。しかし、ソバではその両方が整備されていなかった。そこで、本項目では近交弱勢の遺伝解析に先立ち、これらの解析基盤を構築した。

1) リファレンスゲノム構築

これまでソバの公開されているリファレンスゲノムは、多数の断片に分断されたドラフトゲノムのみであった。実施者は、他のプロジェクトと連携し、次世代シーケンサを用いたロングリード・ショートリード・連鎖解析によるハイブリッドアセンブリを行い、**ソバの染色体数と同じ8本に集約された高精度なリファレンスゲノムを世界で初めて構築した** (Table 1)。

2) 遺伝子の機能解析の実験系の確立

遺伝子の機能解析では形質転換もしくはウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) がよく用いられる。実施者は他のプロジェクトと連携し、タバコ茎えそウイルス (TRV) というウイルスベクターのソバへの感染手法を確立し、ソバの内在遺伝子の機能を VIGS により証明することに成功した。以上により、ソバでもモデル植物に近い分子遺伝学的解析が可能となった。

Table 1. Summary of reference database

| | Yasui et al., 2016 | Penin et al., 2021 | Jeffrey* and Takeshima* et al. Under review. * co 1 st author |
|--------------------|--------------------|--------------------|---|
| Number of scaffold | 387,594 | 85,180 | 8 (染色体数と同じ) |
| Sum length (kbp) | 1,177,687,305 | 1,211,257,866 | 1,221,107,085 |
| N50 (kbp) | 25,109 | 188,058 | 155,806,887 |

従来のドラフトゲノム ↑ 染色体数と同じ8本に集約された高精度なリファレンスゲノム

② 弱勢形質(葉の奇形)に関連する原因遺伝子の特定

本項目は、葉の奇形を示す近交系 (Fig.3A)について、葉の奇形を引き起こす原因遺伝子を探索した。まず、葉の奇形/正常が分離する集団を作成、その分離比を計測し、葉の奇形形成は潜性2遺伝子座支配であることを明らかにした。次に、①のリファレンスゲノムと上記分離集団を用いて遺伝解析を実施した結果、葉の奇形形成に関する原因候補遺伝子座のひとつを特定した。候補領域内の機能欠損遺伝子を探索し、オーキシン関連遺伝子の *IAA33* のホモログ (*FeIAA33*) を原因候補遺伝子として検出した。奇形個体ではこの *FeIAA33* の stop codon が消失しており、正常な *IAA33* タンパク質が翻訳できない (Fig.3B)。シロイヌナズナの *IAA33* はオーキシンのネガティブレギュレーターとして報告されているため、機能欠損の *feiaa33* では、オーキシンが過剰に蓄積する可能性がある。実際に *feiaa33* 型の奇形個体では、葉でのオーキシン下流遺伝子の発現が上昇していた。以上のように、今回の近親交配で顕在化した葉の奇形には、少なくとも第七染色体の遺伝子座が関与しており、その原因候補遺伝子は、stop codon が消失した変異型 *feiaa33* である可能性を示すことができた。



Fig.3. (A) 葉の奇形を示す近交系. (B) 原因候補遺伝子の *FeIAA33* の奇形個体の遺伝子型 (*feiaa33*) の構造と、AlphaFold2 によるタンパク質の構造予測.

③ 近交弱勢系統のメチローム・トランスクリプトーム解析

本項目では、花の発育不良・稔性低下によって収量が低下する近交系を対象に、その生殖器官の弱勢化に関わる分子機構の解明を目的とした。特に花に着目し、近交系/親系統間のトランスクリプトーム・メチロームの比較から、弱勢化に関わる遺伝子群の検出、およびその遺伝子群の発現変動に関与する DNA メチル化の有無を検証した。

1) トランスクリプトーム解析による発現変動遺伝子群の検出

近交系/親系統の花について、RNA-seq により解析した。その結果、近交系では花粉-柱頭認識と受精に関わる *FLP1* のホモログや、雌蕊の発育・胚発育に関わる *SPL8* のホモログ、胚発生に関わる *EMB30* のホモログなどの遺伝子の発現が有意に低下しており、これら遺伝子の発現変動が、花の発育不良や稔性低下に関わる可能性が示された。

2) メチローム解析による発現変動遺伝子群のメチル化レベルの比較

近年、近交弱勢と DNA メチル化の関連が報告されている。例えばトウモロコシでは、ゲノム全体の CHH メチル化レベルの増加が、近親交配によるバイオマスの低下に関連すると報告されている。一方、キングサーモンでは、ゲノム全体のメチル化レベルは変動しないものの、生殖に関わるいくつかの重要な遺伝子周辺の CG メチル化が、近親交配による生育量の低

下に関連すると報告されている。そこで本項目でも、ゲノム全体もしくは RNA-seq で検出された重要遺伝子群周辺の DNA メチル化レベルの変動を、近交系/親系統間で比較した。メチル化は全ゲノムバイサルファイトシーケンスにより解析した。

その結果、ゲノム全体の CG, CHG, CHH のメチル化レベルは近交系/親系統間で差が認められないものの、RNA-seq で検出されたいくつかの遺伝子領域では、近交系で CG, CHG, CHH 全てのメチル化レベルが有意に増加していた (Fig. 4)。遺伝子領域内の CG, CHG, CHH 全てがメチル化されている場合、その遺伝子はトランスポゾン様メチル化状態にあり、遺伝子発現が抑制される傾向にある。

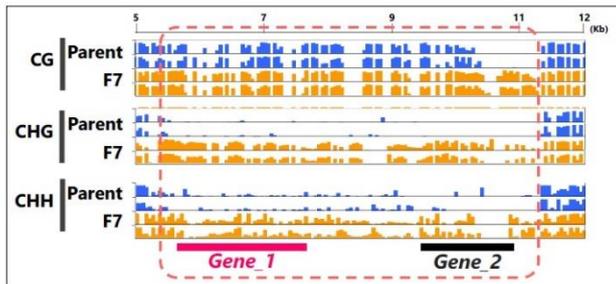


Fig.4. 生殖に関わることが予想される遺伝子領域の DNA メチル化レベルの可視化。近交系 (オレンジ色)では、CG, CHG, CHH 全てでメチル化されている。

以上から、この系統の近親交で顕在化した生殖器官の弱勢化には、FLP1 や SPL8 などの生殖に関わる遺伝子の発現低下が関連し、その発現低下に近交系特異的な遺伝子内メチル化の増加が関与する可能性を示せた。

3. 今後の展開

全体的な今後の展開や将来的な社会実装は以下に記載する。

将来的な社会実装・必要な展開・おおよそのタイムスパン

この研究の最終目標は、植物に共通した近交弱勢を引き起こす遺伝子やそのメカニズムを複数同定し、今後の環境変動に適応した新規の作物を創出する際の壁となる近交弱勢のリスクを事前に取り除く選抜・育種システムの構築である。

本研究では 1st step として普通ソバをモデルに、近交弱勢に関わる遺伝子を探索した。その短期的な社会実装としては、普通ソバの育種の高速化である。普通ソバは固定度が進む選抜後期で近交弱勢が発生し、減収する場合がある。本研究で明らかにした葉の奇形や生殖器官の弱勢に関わる可能性のある遺伝子領域は特定しているため、**その不良遺伝子型をマーカー化し、交配初期に不良遺伝子型を全て排除しておけば、育種過程での近交弱勢の発生を未然に防げる。**

長期的な社会実装は、不適環境に強い野生ソバ属の新規作物化への貢献である。ソバ属野生種には、乾燥や強酸性土壌、貧栄養土壌に強い野生種が存在する。そのような野生ソバ属にも本研究で明らかにした不良遺伝子型が存在していた場合、マーカー選抜で事前に排除すれば、新規作物化過程での近交弱勢のリスクを低下させることができる。

野生ソバ属の新規作物化には、「今回明らかにした不良遺伝子型が野生ソバでも保持されていて近交弱勢に関わるか」という検証、および「野生ソバを作物化させるために必要な栽培化遺伝子の特定とその変異導入」を確立する必要がある、概ね 10 年ほどの時間を要すると予想する。

4. 自己評価

■研究目的の達成状況

ACT-X 研究期間内では、以下の成果・知見が得られた。

- ① ソバの高精度なリファレンスゲノムの構築および遺伝子機能解析系の開発
- ② 近親交配により出現した葉の奇形に関する原因遺伝子座の特定と候補遺伝子の検出
- ③ 近親交配により出現した生殖器官の弱勢化に関わる遺伝子群の検出および DNA メチル化レベルの変化の検出

このうち、1)のゲノム構築の成果は *Nature Plants* へ投稿・掲載された。また、2)の成果で論文投稿予定である。想定していなかった次に繋がる興味深い成果も得られ、当初の目的は概ね達成できたと考えている。

■研究の進め方

研究期間中に子供が 2 人産まれ、育児・家事により研究時間が十分に確保できず苦しい時期があったが、領域内の育児経験のある皆様からの有益なアドバイスに助けられ、研究実施体制及び研究費執行状況は概ね計画通りに進めることができた。

■研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果・領域独自の評価項目

成果の科学技術及び社会・経済への波及効果は、以下の2点であると考えている。

1) ソバの育種への貢献: 近交弱勢に関わる遺伝子領域の特定と選抜マーカー化が完了し、普通ソバの育種に貢献する成果が十分得られたと考えている。環境適応性の高い野生ソバ属の新規作物化で近交弱勢を回避する選抜システム構築についても、足がかりとなる知見が得られたと考えている。

2) 動植物の近交弱勢の遺伝研究分野への貢献: 従来の近交弱勢の原因とは異なる制御機構の可能性を示すことができ、この現象をさらに精査し報告できれば、当該分野のマイルストーンになり得ると考えている。また、動植物においてまだ報告が少ない、近交弱勢とエピジェネティックな制御機構(DNA メチル化)の関連を示すことができ、当該分野に新たな知見を与えられたと考えている。

また、研究総括及び領域アドバイザー先生方のご助言・ご指導のもと、新たなアイデアを考え出すことができ、それを実行することで、原因遺伝子領域の特定まで効率的に進めることができた。さらに、領域会議では積極的にコミュニケーションをとり、2 件の共同研究も開始できた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

Jeffrey Fawcett*, **Ryoma Takeshima***, Shinji Kikuchi, Euki Yazaki, Tomoyuki Katsube-Tanaka, Yumei Dong, Meifang Li, Harriet Hunt, Martin Jones, Diane Lister, Takanori Ohsako, Eri Ogiso-Tanaka, Kenichiro Fujii, Takashi Hara, Katsuhiko Matsui, Nobuyuki Mizuno, Kazusa Nishimura, Tetsuya Nakazaki, Hiroki Saito, Naoko Takeuchi, Mariko Ueno, Daiki Matsumoto, Miyu Norizuki, Kenta Shirasawa, Chengyun Li, Hideki Hirakawa, Tatsuya Ota, Yasuo Yasui.

* These authors contributed equally to this work.

“Genome sequencing reveals the genetic architecture of heterostyly and domestication history of common buckwheat”

Nature Plants, 2023. DOI :10.1038/s41477-023-01474-1.

概要: 普通ソバの擬似染色体レベルのリファレンスゲノム構築を構築した。また、構築したゲノム情報を用いて、ソバの異形花型自家不和合性を支配するS locusのゲノム構造の決定および座乗遺伝子の機能解明、栽培起源地の特定、ならびに育種に有用な変異体の作出を行った。

(2) 特許出願

(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)

研究期間累積件数: 2件

① **学会発表: 竹島亮馬**, 安井康夫, 松井勝弘, 「ソバの近親交配による生殖器官の弱勢化とメチローム・トランスクリプトームの変動について」, 日本育種学会第142回講演会.

② **学会発表: 竹島亮馬**, 安井康夫, 平川英樹, 松井勝弘, 「ソバの近交弱勢の遺伝解析- 茎葉異常型に関する遺伝解析-」, 日本育種学会第140回講演会.