

「植物の近交弱勢における遺伝機構の解明」

研究期間：2021 年 12 月～2023 年 3 月

研究者：竹島 亮馬

加速フェーズ期間：2023 年 4 月～ 2024 年 3 月

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。

加速フェーズでは、これまでの研究で確認された「近交弱勢を引き起こした系統(近交系)におけるゲノムの大規模欠失」に着目し、ゲノム欠失の発生機構の解明を目指した。

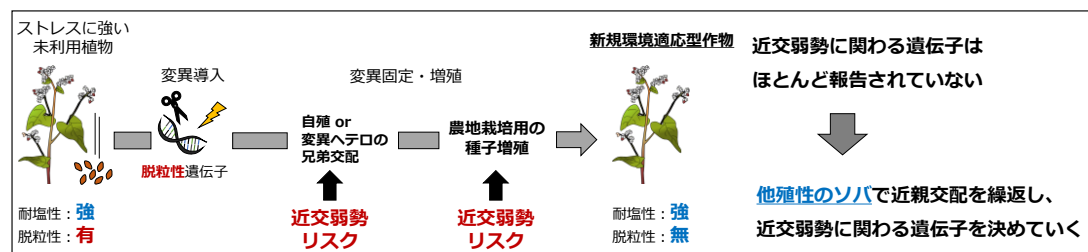


Fig.1. 本研究の概要.

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

加速フェーズでは、ロングリードシーケンスによる近交系のゲノム構造変異の可視化・定量化を実施した。

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、論文投稿した** (Table 1)。

(加速フェーズ) 上記の成果を co-1st author として Nature Plants へ投稿し、掲載された。

Table 1. Summary of reference database			
	Yasui et al., 2016	Penin et al., 2021	Fawcett* and Takeshima* et al. 2023. * 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) 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。

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。

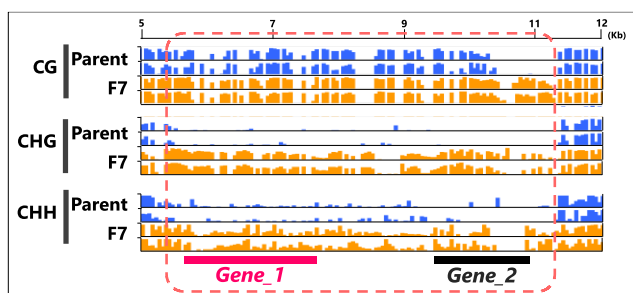


Fig.4. 生殖に関わることが予想される遺伝子領域の DNA メチル化レベルの可視化。近交系 (オレンジ色)では、CG, CHG, CHH 全てでメチル化されている。

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。

(加速フェーズ)

3) 発現変動遺伝子群のゲノム構造の比較

RNA-seq で検出された遺伝子のうち、いくつかの遺伝子は近交系の発現量がゼロになっており、極端に発現が抑制されていた。そこで近交系/親系統で発現抑制が著しい遺伝子群のゲノム構造を比較したところ、近交系では遺伝子領域を含む大規模なゲノムの欠失が確認された (Fig. 5)。またこの欠失はゲノムの複数領域で起きていることも分かった。

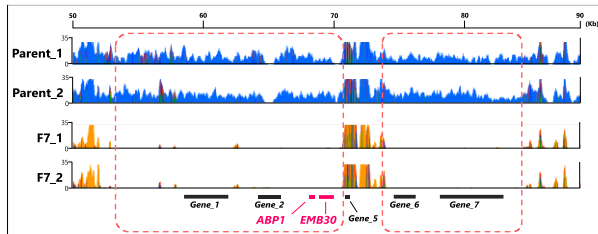


Fig.5. 近交系における重要遺伝子群の欠失の例. 近交系 (オレンジ色)では生殖に関わることが予想される遺伝子領域のゲノムが大規模に欠失している (赤点線枠部分)

さらに、ソバの全遺伝子 (30,608 遺伝子) における欠失サイトの有無を親系統 (非近交系)・F4 系統・F5 系統間で比較し、ゲノム全体における遺伝子領域の欠失頻度を確認した。その結果、近交系である F4 系統・F5 系統は、非近交系に比べゲノム全体の遺伝子の欠失サイト数が 1.28 倍および 1.35 倍多く、特に第1～第5染色体でその傾向が強いことが分かった (Fig. 6)。

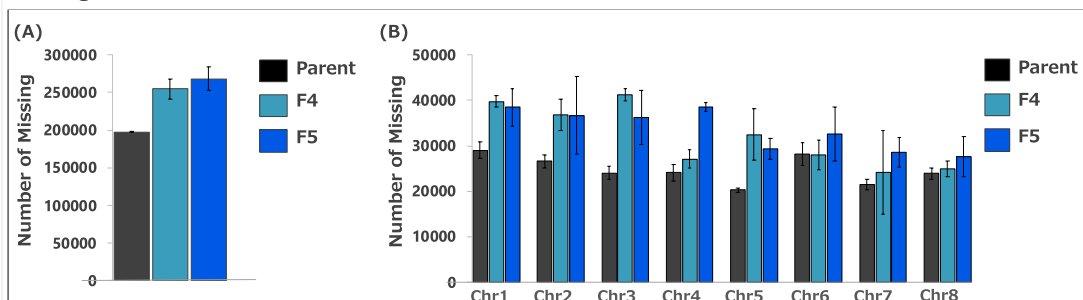


Fig.6. (A) 親系統および近交系のゲノム上の全遺伝子における欠失サイトの総数. (B) 各染色体の欠失サイトの総数.

4) ロングリードシーケンスによるゲノム構造変異の可視化・定量化

これまでの解析はショートリードシーケンスのデータを利用しており、ゲノムの大規模な欠失・挿入・転座などの構造変異を正確に検出できていなかった。そこで、親系統および F7 系統のロングリードシーケンスのデータを取得し、ゲノム構造変異の可視化・定量化を試みた。

まず、これまでに構築したソバの Pseudomolecule レベルのリファレンスゲノム (Fawcett and Takeshima et al., 2023) に親系統および F7 系統のロングリードデータをマッピングした。その結果、これまでのショートリードで確認できたような、生殖に関連することが予想される遺伝子領域を含む数十 kb 以上の大規模な欠失が検出できた。また、ショートリードの解析では検出できなかった大規模な挿入・転座を検出できた。

次に、Sniffles により、リファレンスゲノムに対する全ての構造変異を検出した。その結果、ホモで固定された 1kb 以上の欠失および転座の数は、F7 系統が親系統に対して 1.11 倍および 1.26 倍多いことが分かった。

以上のことから、少なくとも解読した F7 系統の個体に関しては親系統よりも大規模な欠失が増加していることが分かった。また、ショートリードでは検出できなかった転座などの重要な構造変異も F7 系統で増加していることが明らかになった。

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。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズでは、ロングリードの解析から、近交系において親系統が保持していない大規模な欠失や転座などの構造変異が生じている可能性を示すことができた。今後は近親交配の過程で生じ得る構造変異の発生メカニズムを解明するとともに、他の生物種でも同様な現象が起こり得るか、検証したい。

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 co-1st author で論文投稿済みで Acceptable な minor



revision 中である。VIGS の成果で来年論文投稿予定、2)の成果で来年論文投稿予定である。当初の目的は概ね達成でき、想定していなかった次に繋がる興味深い成果も得られたが、期間内に論文掲載に至らなかった点が悔やまれる。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズでは、ソバの Pseudomolecule レベルのリファレンスゲノムの構築、およびソバの自家不和合性を制御するゲノム領域・原因遺伝子の特定などの成果を co-1st author としてまとめ Nature Plants に掲載することができた (Fawcett and Takeshima et al., 2023)。また、加速フェーズでは近交弱勢とゲノムの構造変異との関連解析に注力し、近親交配によるゲノムの大規模な欠失・転座の顕在化という仮説を強める結果を得ることができ、当初の目的は十分達成できたと考えている。ただし、VIGS および葉の形態異常に関する遺伝解析の成果は論文化できなかったため、速やかに成果のとりまとめを進めたい。

■研究の進め方

研究期間中に子供が2人生まれ、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。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズ期間中も引き続き領域会議などで育児・研究の両立についての相談・議論ができ、研究を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。



(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズ期間中はオンサイトでの領域会議やサイトビジットが活発に開催され、領域内の異分野の研究者と多くの議論を進めることができた。また、領域内の研究者と引き続き共同研究を進め、1件の外部資金を獲得することができた。

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: 0件⇒1件(加速フェーズ実施後更新)

Jeffrey A Fawcett*, **Ryoma Takeshima***, Shinji Kikuchi, Euki Yazaki, Tomoyuki Katsube-Tanaka, Yumei Dong, Meifang Li, Harriet V Hunt, Martin K Jones, Diane L Lister, Takanori Ohsako, Eri Ogiso-Tanaka, Kenichiro Fujii, Takashi Hara, Katsuhiro 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. * co-1st author

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

Nature Plants, Aug 10, 2023, 9, pages 1236–1251 (2023).

普通ソバのPseudomoleculeレベルの高精度なリファレンスゲノムの構築、ソバのゲノム重複や進化学的解析、ソバの異形花型自家不和合性の分子機構とゲノム構造の解明およびソバの栽培起源地の特定などに関する内容を報告している。ACT-Xの予算は主にリファレンスゲノムの構築および自家不和合性の分子機構の解明に利用した。

※加速フェーズ実施の成果

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 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)

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。

研究期間累積件数: 5件(加速フェーズ実施後更新)

① プレスリリース: 京都大・理研・農研機構・総研大・かずさDNA研・千葉大・京都府立大・JST “ソバゲノムの解読～高精度ゲノム解読がソバの過去と未来を紡ぐ～”

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20230811/index.html>



② 受賞:日本育種学会第144回講演会優秀発表賞, 竹島 亮馬, Fawcett Jeffrey A, 松井 勝弘, 水野 信之, 松本 大生, 平川 英樹, 大田 竜也, 安井 康夫, 「ソバの異形花型自家不和合性の分子機構とゲノム構造」

③ セミナー:竹島 亮馬, 「ソバの近交弱勢および異形花型自家不和合性に関する分子遺伝学的研究」, 東京大学 第14回 AgTechセミナー

④ シンポジウム:竹島 亮馬, 「ソバゲノムの解読—高精度ゲノム解読がソバの過去と未来を紡ぐ—」, 植物科学シンポジウム2023「植物科学の食料安全保障への貢献」

⑤ メディア掲載:京都新聞(2023年8月11日 22面)、朝日新聞(8月11日 25面)、読売新聞(8月30日夕刊 11面)および日刊工業新聞(9月7日 24面)に掲載

※加速フェーズ実施の成果

