



アブラナ科植物におけるゲノム多様性および雑種強勢に関する研究

藤本, 龍

(Citation)

育種学研究, 19(3):116-123

(Issue Date)

2017-09

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 日本育種学会

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90004611>

特集記事

アブラナ科植物におけるゲノム多様性および雑種強勢に関する研究

藤本 龍

神戸大学大学院農学研究科, 兵庫県神戸市, 〒657-8501

Research on genome diversity and hybrid vigour in Brassicaceae

Ryo Fujimoto

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

キーワード

エピジェネティクス, 雜種強勢, 自家不和合性, アブラナ科, DNA マーカー選抜

はじめに

アブラナ科植物には、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) や、我が国の主要な野菜であるハクサイ、コマツナ、カブ等の *Brassica rapa* 種、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー等の *Brassica oleracea* 種、さらには、ダイコンなどの *Raphanus sativus* 種、そして、世界的に主要な作物で、植物油の原料となるナタネなどの *Brassica napus* 種が含まれる。そして、‘禹の三角形’で知られるように、2倍体種の *B. rapa* (A ゲノム), *Brassica nigra* (B ゲノム), *B. oleracea* (C ゲノム) と異質倍数体種である *Brassica juncea* (AB ゲノム), *Brassica carinata* (BC ゲノム), *B. napus* (AC ゲノム) のゲノムの関係性が知られている (U 1935)。

アブラナ科野菜の重要な農業形質としては、色・形等の外観形質に加え、耐病性、一代雑種品種の育成に重要な雑種強勢や、一代雑種品種の F_1 種子の採種に利用される自家不和合性や細胞質雄性不稔性等が挙げられ、葉物野菜では、晩抽性が重要な形質となる。これらの形質に関わる遺伝子の幾つかは明らかにされており (Shimizu *et al.* 2014, 2015), DNA マーカー選抜も行えるような状況になっているが (Kawamura *et al.* 2015, 2017), 依然として、DNA マーカー選抜が可能な形質は限られている。

また、植物の形質は、遺伝的な要素に加え、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子の修飾状態 (エピジェネティクス) によっても制御されている (Fujimoto *et al.* 2012a)。現在、ゲノム全体のエピジェネティックな修飾状態 (DNA メチル化やヒストン化学修飾) を調べるエピゲノム解析が様々な植物種で行われている。中でも、34

の多様な被子植物種において、全ゲノムレベルでの DNA メチル化状態を比較した研究では、アブラナ科に属する *Eutrema salsugineum* や *Conringia planisiliqua* において、gene body methylation (gbM) (エキソン領域に CG サイトのメチル化が見られる) を有する遺伝子の数が極端に少ないことが示された (Niederhuth *et al.* 2016)。そして、*B. rapa* や *B. oleracea* も他の種に比べると gbM を有する遺伝子が少ないため (Niederhuth *et al.* 2016), DNA メチル化の研究においてアブラナ科植物は興味深い研究材料である。

本稿では、アブラナ科植物の自家不和合性、エピジェネティクス、雑種強勢の研究について、ゲノムの多様性に着目して紹介する。

1. アブラナ科自家不和合性研究

アブラナ科植物の多くは柱頭に受粉した花粉が遺伝的に同一の個体由来か、遺伝的に異なる個体由来かを識別し、遺伝的に同一な個体との受精を回避する自家不和合性と呼ばれる機構を有している。アブラナ科植物の自家不和合性は 1 つの複合座 (*S* 複合座) によって説明され、花粉と柱頭の *S* 対立遺伝子が一致したときに、花粉の発芽や柱頭内への花粉管の挿入が阻害される。この自他認識反応は、柱頭側の認識決定分子である *SRK* (*S receptor kinase*) と、花粉側の認識決定分子である *SPII/SCR* (*S locus protein II/S locus cysteine rich*) (以下 *SPII* を用いる) 間の *S* 特異的なタンパク質間相互作用により決定されている (Watanabe *et al.* 2003, 藤本・西尾 2008, Kitashiba and Nasrallah 2014)。*SRK* と *SPII* の 2 つの遺伝子は遺伝的に強く連鎖しており、1 つのユニットとして遺伝するため、*S* ハプロタイプと呼ばれる。*S* ハプロタイプは *S* 複合座と連鎖する *SLG* (*S locus glycoprotein*) の相同性に基

づいて 2 つのグループ (class I, class II) に分類されている (藤本・西尾 2008).

1.1 種間における *S* 遺伝子座のゲノム構造比較

B. rapa, *B. oleracea* および *R. sativus* では多くの *S* ハプロタイプの *SRK* と *SPII* の塩基配列が決定されている (Fujimoto and Nishio 2007, 藤本・西尾 2008). それらの配列について種間あるいは属間で比較したところ, *SRK*, *SPII* の相同性が非常に高い組合せ (種間ペア, 属間ペア) が複数見出された (Sato *et al.* 2002, Okamoto *et al.* 2004). さらに, これらの組合せでは, 認識特異性が同じであったことから, 種・属分化前は同一の *S* ハプロタイプであることが示された (Kimura *et al.* 2002, Sato *et al.* 2003, 2004, 2006). このような種間ペアの *S* 複合座のゲノム構造を比較することで, 種分化後にそれぞれの種で生じた *S* 複合座のゲノム構造の変化を調べることができる. 種間ペア 3 組合せについて, *S* 複合座のゲノム構造を比較したところ, 認識決定分子である *SRK* と *SPII* の遺伝子構造は比較的保存されていたが, それらの遺伝子が座乗する *S* 複合座のゲノム構造は大きく異なり, *B. oleracea* の *S* 複合座の方が *B. rapa* の *S* 複合座よりも広範囲に及んでいた (Fujimoto *et al.* 2006a). そして, *B. oleracea* の *S* 複合座にはレトロトランスポゾンが複数挿入されていた (Fujimoto *et al.* 2006a). 2 種間の *S* 複合座の大きさの違いは, *B. oleracea* の *S* 複合座特異的にレトロトランスポゾンが挿入された可能性と, *B. oleracea* では種分化後に, ゲノム全体でレトロトランスポゾンの活性化が生じ, 他の領域同様 *S* 複合座にレトロトランスポゾンが挿入された可能性が考えられた (Fujimoto *et al.* 2006a, Fujimoto and Nishio 2007). 近年の両種のゲノム解析から, *B. rapa* (530 Mb) と *B. oleracea* (630 Mb) ゲノムに占めるトランスポゾンの割合は, それぞれ 21.5% と 38.8% であり, *B. oleracea* の方が染色体全体に渡ってレトロトランスポゾンの占める割合が高いことが示された (Liu *et al.* 2014). さらに, 2 種間のユーフロマチニン領域に存在する 157 のシンテニー領域についてゲノム構造を比較したところ, *B. oleracea* の領域の方がおよそ 1.7 倍長かった (Liu *et al.* 2014). このことから, *B. oleracea* の *S* 複合座に複数のレトロトランスポゾンが挿入されているのは, *S* 複合座に特異的な現象というよりは, 他の領域同様に *B. oleracea* に多数のレトロトランスポゾンが挿入された結果である可能性が高いと考えられる.

1.2 自家不和合性の優劣性の分子機構

アブラナ科植物の自家不和合性は胞子体型であることから, *S* 複合座のヘテロ接合体では, 一般的には, 柱頭側と花粉側の両方で, それぞれ 2 つの異なる対立遺伝子の転写・翻訳産物が発現する (共優性). 一方, *S* ハプロタイプ間には, 柱頭, 花粉の両者において優劣性が存在することが知られており, *S* ハプロタイプ間の優劣関係

は, 柱頭側と花粉側で独立であり, 優劣性の機構も両者で異なる (藤本・西尾 2008). 柱頭側の優劣性は *SRK* 分子そのものが原因である可能性が示されているが (Hatakeyama *et al.* 2001), その分子機構は未だ明らかとなっていない.

花粉側の優劣性では, class II の *S* ハプロタイプは class I の *S* ハプロタイプに対して劣性を示すという特徴があり, class I と class II の *S* ハプロタイプのヘテロ個体では, 劣性の class II *S* ハプロタイプの *SPII* の発現が抑制される (Shiba *et al.* 2002). 自家和合性品種「イエローサルソン」の *S* ハプロタイプは class I に分類され, *SPII* は完全に欠失している (Fujimoto *et al.* 2006b). 「イエローサルソン」と class II *S* ハプロタイプ個体とのヘテロ接合体では, class II *S* ハプロタイプの *SPII* の発現が抑制されることから, 優性側の *SPII* の転写やその近傍領域が必ずしも優劣性に重要ではないことが示された (Fujimoto *et al.* 2006b). その後, 優性側の class I *S* ハプロタイプの *S* 複合座の *SMI* (*SPII*-Methylation Inducing region) 領域から, 劣性側の class II *S* ハプロタイプの *SPII* のプロモーター領域の一部と相同性を示す 24 ヌクレオチド (nt) の small RNA である *Smi* (*SPII* methylation inducer) が生成され, この *Smi* が劣性側の *SPII* のプロモーター領域に時期・組織特異的な *de novo* の DNA メチル化を生じさせることによって, 劣性側の *SPII* の転写抑制が引き起こされる可能性が示された (Tarutani *et al.* 2010). 先述した *SPII* が欠失した自家和合性品種「イエローサルソン」においても *SMI* 領域は存在していたことから, 優劣性は正常に機能したと考えられる. また, 花粉側の優劣性は異なる種の *S* ハプロタイプ間でも見られることから (Okamoto *et al.* 2007), *Smi* は異なる種の劣性 *S* ハプロタイプにおいても作用できると考えられる. さらに, 花粉側の優劣性は, 異なる class II *S* ハプロタイプ間のヘテロ個体でも見られ, この class II *S* ハプロタイプ間の優劣性においても, 24 nt の *Smi2* (*SPII* methylation inducer 2) によって, 劣性側の *SPII* のプロモーター領域に DNA メチル化が生じ, 劣性側の *SPII* の転写抑制が引き起こされる可能性が示された (Yasuda *et al.* 2016). small RNA を網羅的に解析した結果, 劣性側の *SPII* のプロモーター領域と相同性を示す small RNA として検出されたのは, *Smi* あるいは *Smi2* のみであった. これらの small RNA は, プロモーター領域の 18 bp に対応した 1箇所にしか相同領域が見られない. しかし, DNA メチル化は, よよそ 300 bp に渡って見られる. どのような分子機構で DNA メチル化領域が広がるのかは明らかとなっていないが, Finnegan *et al.* (2011) によって仮説が提唱されている. シロイヌナズナで知られているような RdDM (RNA directed DNA methylation) 経路あるいは tasiRNA (*trans*-acting siRNAs) 経路によって, 劣性側の *SPII* のプロモーター領域に *de novo* のメチル化が生じているのかは興味深く, 今後の更なる研究が期待される.

1.3 *S*ハプロタイプ判定の育種への利用

一代雜種品種の F_1 採種に、自家不和合性の特性が利用されている。 F_1 採種では、両親系統間で異なる *S*ハプロタイプを用いる必要があることから、育成系統の *S*ハプロタイプの判定が必要である。交配試験による *S*ハプロタイプの判定は、多大な時間と労力を要するので、簡便な *S*ハプロタイプ判定法が必要となる。*SRK*, *SPII*, *SLG* 遺伝子の塩基配列の多型を利用した DNA レベルでの *S*ハプロタイプ判定法が考案されている。一つは、*SLG* や *SRK* の多型を用いた PCR-RFLP 法による *S*ハプロタイプの判定法である (Nishio *et al.* 1994, 1997)。これは、交配試験による判定に比べ、非常に簡便である。もう一つの方法は、*S*ハプロタイプ間で塩基配列の多様性が大きい *SPII* をプローブに用いた dot-blot 分析による *S*ハプロタイプ判定法である (Fujimoto and Nishio 2003, Oikawa *et al.* 2011)。この方法は、電気泳動を行わずに多検体の解析が可能であるという特徴を有する。しかし、用いる *S*ハプロタイプの *SPII* の塩基配列情報が全て得られていることが前提となる。また、*SPII* では特定の *S*ハプロタイプのみ PCR 産物を增幅させる *S*ハプロタイプ特異的なプライマーを作製できることから、系統間の組合せ次第では、*S*ハプロタイプ特異的なプライマーセットを用意することで簡便に *S*ハプロタイプを判定できる。しかし、*SPII* はその多様性により、新たな *S*ハプロタイプの *SPII* の塩基配列を決定するのは容易ではないという問題点がある。そこで、育種現場では *SLG* を用いた PCR-RFLP 法が広く用いられている。最初に開発された class I *S*ハプロタイプ用の PS5/PS15 や class II *S*ハプロタイプ用の PS3/PS21 のプライマーを用いた PCR-RFLP 法は、ハクサイやコマツナなどの *B. rapa* ではほとんどの *S*ハプロタイプを判定できるが (Kawamura *et al.* 2015, Kawanabe unpublished data), キャベツ等の *B. oleracea* では、PS5/PS15 のプライマーでは PCR 産物の増幅が見られない *S*ハプロタイプが多数存在した (Kawamura *et al.* 2017)。著者は、PS5/PS15 で増幅できない class I *S*ハプロタイプに対して、増幅可能なプライマーを新たに開発し、これにより *B. oleracea* の多く種類の *S*ハプロタイプの判定が可能となった (Fujimoto unpublished data)。

また、*B. rapa* においては、同一種内で異なる *S*ハプロタイプであっても、不和合反応を示す場合がある。この不和合反応は、雌雄を入れ替えた組合せでは、通常の交雑が可能であることから、一側性不和合性と呼ばれる (Takada *et al.* 2005)。最近、この一側性不和合性の雌しべ側と花粉側の制御因子が同定されたことから (Takada *et al.* 2017)，これらの組合せも両親系統を選抜する際には考慮する必要があるだろう。

2. アブラナ科植物を用いたエピジェネティクス研究

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクスな修飾は、DNA 配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構である (藤本・石川 2010)。DNA メチル化はシトシン残基に見られる修飾で、トランスポゾンや反復配列など、ヘテロクロマチン領域に多く見られ、一般的に遺伝子の転写抑制に働いていると考えられている。

2.1 DNA メチル化に関わる遺伝子

シロイヌナズナでは、DNA メチル化酵素として 5 つの遺伝子が同定されており、それらは機能的に「維持型 DNA メチル化酵素」と「*de novo* 型 DNA メチル化酵素」の 2 つに分類される。維持型 DNA メチル化酵素としては、*MET1* (*Methyltransferase 1*) と植物に特異的な *CMT3* (*Chromomethylase 3*), *CMT2* があり、それぞれ CG サイト, CHG サイト, CHH サイト (H は、A, T, G のいずれか) のメチル化の維持に関わっている (Osabe *et al.* 2012, Fujimoto *et al.* 2012a, Zemach *et al.* 2013)。これらの遺伝子は、同じアブラナ科植物の *B. rapa* でもオーソログが同定されている (Fujimoto *et al.* 2006c)。*de novo* 型 DNA メチル化は *DRM2* (*domains rearranged methylase 2*) と *DRM1* により誘導され、全てのシトシンのメチル化に関わる。植物では、この *de novo* 型 DNA メチル化機構に small RNA が関わっていることが示されている。この機構は RNA 依存的 DNA メチル化 (RdDM) と呼ばれ、関連因子がこれまでに数多く同定されている (Matzke and Mosher 2014)。small RNA の生成と標的領域への誘導には、ともに植物に特異的な RNA ポリメラーゼである Pol IV と Pol V が関与している (Matzke and Mosher 2014)。Pol IV の転写産物は、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ, Dicer タンパク質など、真核生物で広く保存された RNAi (RNA interference) 因子によるプロセシングを経て、最終的に 24nt-siRNAs (short-interfering RNAs) となる。そして、24nt-siRNAs は、Argonaute タンパク質に取り込まれたあと、ゲノム領域との相同性により標的領域に誘導される。最終的に *DRM2* が標的領域に誘導され、DNA メチル化反応が起こる (Matzke and Mosher 2014)。上述した DNA メチル化酵素の他にも、DNA メチル化に必要な因子がたくさん明らかとなっており、その中には、クロマチンリモデリング因子である *DDMI* (*Decrease in DNA methylation 1*) が含まれる (Osabe *et al.* 2012)。シロイヌナズナの *ddm1* 変異体ではゲノムワイドな DNA メチル化の低下が観察され、*B. rapa* においても、*DDMI* 遺伝子の発現抑制形質転換体では DNA メチル化レベルが低下することが明らかとなっており、DNA の維持メチル化に関わっていることが示されている (Fujimoto *et al.* 2008a, Sasaki *et al.* 2011)。

2.2 インプリント遺伝子 *FWA* の制御領域

ddm1 変異体の後代では、植物の形質に変化が見られ、そのうちの幾つかの形質は安定的に後代に遺伝し、DDM1 の機能が復帰してもその形質は元に戻らないことから、エピジェネティック変異体（エピミュータント）と呼ばれる。エピジェネティック変異体の原因遺伝子は複数同定されており、その中には、開花遅延の原因遺伝子である *FWA* (FLOWERING WAGENINGEN) も含まれる (Soppe *et al.* 2000)。シロイスナズナの *FWA* 遺伝子は野生型では転写開始点付近の DNA メチル化によって、転写が抑制されている。しかし、*ddm1* 変異体では、*FWA* 遺伝子の転写開始点付近においても DNA の低メチル化が引き起こされ、*FWA* の発現が誘導される。このように、DNA メチル化の低下により *FWA* の異所的な発現が誘導されたエピジェネティック変異体の *fwa* では、*FWA* 遺伝子座の DNA の低メチル化状態が安定的に後代に遺伝し、開花遅延が引き起こされる (Soppe *et al.* 2000)。この *fwa* の開花遅延は、発現が誘導された *FWA* が開花促進因子である FT (FLOWERING LOCUS T) とタンパク質間相互作用することで、FT の機能を阻害することが原因であると考えられている (Ikeda *et al.* 2007)。

野生型を用いた *FWA* の詳細な発現解析から、*FWA* は中央細胞と胚乳で発現しており、かつ受精前の中央細胞において母親の対立遺伝子のみが特異的に発現するインプリント遺伝子であることが示された (Kinoshita *et al.* 2004)。中央細胞では、母親由来の *FWA* は DNA の脱メチル化酵素の *DME* (DEMETER) により脱メチル化されるが、父親由来の *FWA* は *DME* による脱メチル化が生じ

ないことから、受精後の胚乳において母親由来の *FWA* のみが発現している (Kinoshita *et al.* 2004)。

シロイスナズナの *FWA* 遺伝子の転写開始点付近の DNA メチル化領域には 2 つの特徴的な構造が見られ、一つは、SINE (short interspersed nuclear element) 配列が存在すること、もう一つはこの SINE 領域が 2 つの重複構造をとっていることである (図 1)。このどちらか片方、あるいは両方が DNA メチル化の標的となっている可能性が示唆されていた (Lippman *et al.* 2004, Chan *et al.* 2006)。シロイスナズナの Columbia-0 (Col) 系統では、46 bp の重複構造と 172 bp の重複構造が存在する。シロイスナズナの 96 系統について、*FWA* の構造を調べたところ、172 bp の重複構造は 96 系統全てに存在していたが、46 bp の重複構造は 3 系統で見られなかった (図 1)。*FWA* 遺伝子座の DNA メチル化は、96 系統全てで見られた (Fujimoto *et al.* 2008b)。シロイスナズナで見られた重複構造は、シロイスナズナの近縁種間で多様性が見られ、*Arabidopsis lyrata* では、シロイスナズナとは異なる場所に 39 bp のリピートが 3 つあるいは 4 つタンデムに並んでおり、*Arabidopsis halleri* では重複構造が見られなかった (図 1)。SINE 配列はこれらの近縁種で確認されたことから、SINE の挿入は種分化前に起こったと考えられる。一方、重複構造は種間で多様性が見られたことから、種分化後に生じたと考えられる (Fujimoto *et al.* 2008b)。*A. halleri* では栄養組織において SINE 配列に DNA メチル化が見られ、かつインプリントング（母親性発現遺伝子）が確認されたことから、重複構造ではなく SINE 配列が DNA メチル化の標的となっていることが示された

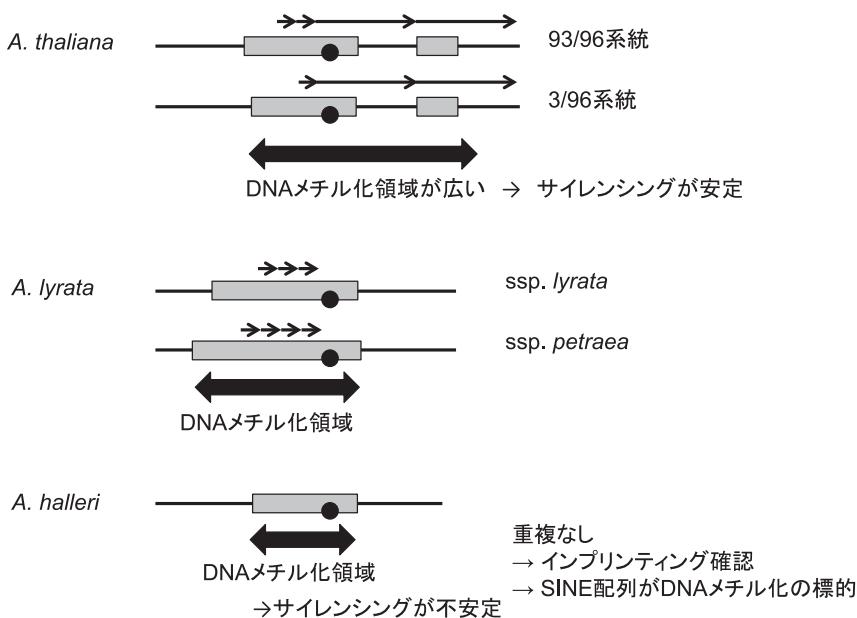


図 1. シロイスナズナとその近縁種における *FWA* の転写開始点付近の構造。SINE 配列を灰色で、重複構造を矢印で示した。SINE 領域内の重複位置を両矢印で示した。黒丸は転写開始点を示した。*A. halleri* には重複構造が見られない。*A. thaliana* (シロイスナズナ) では、2 つの重複構造により、DNA メチル化領域が広がっている。

(Fujimoto *et al.* 2008b). どの植物種においても、トランスポゾンはDNAメチル化の最大の標的であることから、*FWA*のインプリンティングは、トランスポゾン配列のDNAメチル化機構を起源としている可能性が考えられた (Fujimoto *et al.* 2008b). トランスポゾンのDNAメチル化は胚乳組織で脱メチル化され、かつ他のインプリント遺伝子の近傍にはトランスポゾン等の反復配列が存在することから、シロイスナズナでは*FWA*だけでなく他のインプリント遺伝子も*FWA*同様にトランスポゾン配列のDNAメチル化機構を起源としている可能性が示唆された (Gehring *et al.* 2009, Hsieh *et al.* 2009).

シロイスナズナの*FWA*は、ほとんどの系統で栄養組織での発現が見られないのに対して、近縁種では同一種内においても、栄養組織で*FWA*の発現が見られる系統や見られない系統が存在していた。この*FWA*の発現とSINE領域のDNAメチル化レベルには負の相関関係が見られた (Fujimoto *et al.* 2011)。重複構造を持たない*A. halleri*のある系統では、SINE領域の配列は完全に同一であっても、発現が見られる個体や見られない個体が存在した (Fujimoto *et al.* 2011)。このことから、*A. halleri*の*FWA*のサイレンシングはメタステイブルである可能性が考えられた。また、*A. lyrata*とシロイスナズナや*A. halleri*とシロイスナズナの種間雑種を作成したところ、*A. halleri*や*A. lyrata*由来の*FWA*ではDNAメチル化レベルの低下が見られ、発現レベルが増加するのに対して、シロイスナズナ由来の*FWA*の発現は見られなかった (Fujimoto *et al.* 2008b, 2012a)。このことからも、近縁種の*FWA*のサイレンシングはシロイスナズナの*FWA*に比べて不安定であり、サイレンシングの安定性には重複構造が関わる可能性が示された (Fujimoto *et al.* 2012a)。

シロイスナズナは他の近縁種と比べて、2種類の重複構造を有することで栄養組織でのDNAメチル化領域が広範囲におよび、*FWA*のサイレンシングが安定していると考えられる (図1)。また、シロイスナズナでは、*FWA*のDNAメチル化領域のC/Gサイトの突然変異には負の選択が見出されている (Fujimoto *et al.* 2008b)。そして、シロイスナズナの*FWA*の発現誘導は開花遅延を誘導するのに対して、近縁種の*FWA*を過剰発現させても開花遅延が見られない (Fujimoto *et al.* 2011)。以上の結果から、シロイスナズナの*FWA*は、異所的な発現によって開花遅延が誘導されることから、進化の過程でサイレンシングが安定している2つの重複構造を持つ系統が選択されてきた可能性が考えられた (Fujimoto *et al.* 2011, 2012a)。

3. アブラナ科植物の雑種強勢研究

植物では、同一種内のある組合せの両親間の交雑により得られた雑種第一代 (F_1) 個体が両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢 (ヘテロシス) という現象が知られている。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育種がアブラナ科野菜をはじめ、種々の作物や野菜で行われており、日本国内においても、特に野菜において、数多くの優れた一代雑種品種が育成されている。しかし、雑種強勢の分子機構は、未だ明らかになっていない。雑種強勢の分子機構を解明し、制御することは、高収量作物の品種育成において重要である。

3.1 シロイスナズナの雑種強勢研究

シロイスナズナにおいて、63組合せの F_1 を作成して、幾つかの形質に着目して、両親系統と F_1 を比較したところ、特定の組合せにおいて、植物体の大きさ (葉面積、バイオマス) に、雑種強勢が見られることが明らかとなつた (Meyer *et al.* 2004)。

Col 系統と *C24* 系統の組合せでは、生育初期 (播種後4日以降) から植物サイズにおいて雑種強勢が顕著に見られる。一方、生育速度 (葉の展開スピード) や根の生育においては、播種後14日までの間では雑種強勢が見られない (Fujimoto *et al.* 2012b, Meyer *et al.* 2012)。両親系統と F_1 について、トランスクリプトーム解析を行った結果、両親系統の発現量の平均値 (MPV; Mid parent value) と F_1 との間で発現量が異なる遺伝子 (非相加的発現遺伝子) が見出された。非相加的な発現を示す遺伝子は、生育ステージ特異的であった (Fujimoto *et al.* 2012b, Meyer *et al.* 2012)。播種後4日の子葉では、葉緑体に移行するタンパク質をコードする遺伝子 (葉緑体ターゲット遺伝子) が F_1 で特異的に発現レベルが増加していた。同様の結果は *C24* 系統と *Ler* 系統の F_1 においても確認されている (Zhu *et al.* 2016)。しかし、*C24* 系統と *Col* 系統の F_1 では、単位面積あたりの光合成量や単位重量当たりの葉緑素含量は、両親系統と F_1 で差が見られなかったことから、葉緑体ターゲット遺伝子の発現量の増加は光合成の活性化には直接結びついていなかった。生育初期に葉緑素の合成を化学薬剤で阻害した場合、処理後の F_1 では雑種強勢が消失することから、生育後期の顕著な雑種強勢には、生育初期の葉面積の増加に伴った「個体当たりの光合成量の増加」が生育に従い増幅されることが重要である可能性が示された (Fujimoto *et al.* 2012b)。

シロイスナズナでは、 F_1 の雑種強勢の程度と両親系統間の遺伝距離には関連性がないことが示されており (Meyer *et al.* 2004)、両親系統の遺伝的な多様性よりエピジェネティックな修飾状態の多様性が雑種強勢には重要な可能性が議論されている (Greaves *et al.* 2015)。両親系統と F_1 の間で、small RNAの発現量をゲノムワイドに比較したところ、 F_1 では、非相加的な24nt-siRNAの発現が見出されたことから、雑種強勢との関連性が議論された (Groszmann *et al.* 2011, Shen *et al.* 2012, Li *et al.* 2012)。同様にDNAメチル化レベルについても、両親系統と F_1 で比較したところ、片親の対立遺伝子ではDNAメチル化を有していないのに F_1 ではDNAメチル化が見られるTCM (Trans chromosomal methylation) や、親では

DNA メチル化を有しているのに, F_1 ではその親由来の対立遺伝子において DNA メチル化が見られなくなる TCdM (Trans chromosomal demethylation) が見出され, TCM あるいは TCdM を介した DNA メチル化状態の変化が雑種強勢と関連する可能性が議論された (Greaves *et al.* 2012, 2014, Shen *et al.* 2012).

DNA メチル化に関わる遺伝子の機能を喪失した変異体が両親系統で存在すれば, DNA メチル化と雑種強勢の関連性を調べることができる. DNA メチル化に関わる遺伝子の機能喪失変異体を Col 系統と C24 系統で用意し, 掛け合わせた F_1 の雑種強勢の程度を調べたところ, 多くの遺伝子は, 単独で機能喪失しても雑種強勢の程度に影響が見られなかった (Kawanabe *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016). 特に, 24nt-siRNA の生合成に関わる Pol IV の変異体同士の F_1 でも雑種強勢が見られたことから, 24nt-siRNA の発現量の変化と雑種強勢が関連する可能性は低いと考えられる (Kawanabe *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016). 同様の研究は, トウモロコシでも報告されており, 24nt-siRNA の生合成に関わる RNA 依存 RNA ポリメラーゼである *MOP1* (*Modifier of paramutation 1*) が機能喪失した F_1 で雑種強勢が見られたことから, トウモロコシの雑種強勢においても, RdDM との関連性は低いことが示された (Barber *et al.* 2012). 一方, クロマチンリモデリング因子で DNA メチル化の維持に関わる DDM1 の機能が喪失した Col 系統と C24 系統の F_1 では, 雜種強勢の発現レベルが低下することが明らかとなった (Kawanabe *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016). このことから, 雜種強勢を 100 % 発揮させるには DDM1 が必要であることが明らかとなった. 今後は, DDM1 によって制御され, かつ雑種強勢に関わる遺伝子の特定を進めることで, 雜種強勢の分子機構の解明を目指す.

3.2 ハクサイの雑種強勢研究

ハクサイの近交系 18 系統を種子親に, 6 系統を花粉親にして, 合計 32 種類の F_1 を作成し, 播種後 6 日の子葉面積, 播種後 21 日の本葉の大きさ, および収量について調べたところ, いずれのステージにおいても雑種強勢が見られる F_1 が見出された. 両親系統の遺伝距離を RAD-seq (Restriction-site associated DNA sequencing) により算出し, 雜種強勢の程度との相関関係を調べた結果, 全ての形質において, 有意な相関が見られなかった. このことから, ハクサイにおいても遺伝距離と雑種強勢には関連性がないことが明らかとなった (Kawamura *et al.* 2016).

ハクサイ市販品種「W39」(渡辺採種場) とその両親系統を用いて, 雜種強勢の形質について調べたところ, 播種後 4 日から, F_1 の子葉面積が両親系統よりも大きく, 播種後 14 日の本葉も F_1 の方が大きく, 収量においても, 雜種強勢が確認された. 一方, 根の生育においては, F_1 で顕著な雑種強勢は見られなかった. ハクサイの雑種強勢は, 播種後 4 日以降の植物体に顕著に見られ, これは

シロイスナズナの雑種強勢の発現と似ていた (Saeki *et al.* 2016).

F_1 と両親系統について, 播種後 2 日の子葉と播種後 10 日の本葉を用いて, 植物ホルモンを網羅的に調べるホルモン解析を行った結果, F_1 では解析した 43 種類の植物ホルモン含量は, 両親系統のどちらかと同程度, あるいは両親の中間値を示し, F_1 で特異的に増加あるいは減少する植物ホルモンはほとんど見出されなかった. このことから植物ホルモン含量の変化によって雑種強勢が引き起こされる可能性は低いと考えられた (Saeki *et al.* 2016).

シロイスナズナの研究では, 播種後 4 日の子葉では, 葉緑体ターゲット遺伝子の発現レベルが F_1 で高かったことから (Fujimoto *et al.* 2012b), シロイスナズナの F_1 で発現レベルが増加した 8 つのオーソログ遺伝子について, 播種後 2, 3, 4, 5, 6 日のハクサイの F_1 と両親系統を用いて RT-qPCR を行った結果, 播種後 2 日では, 全ての遺伝子において, F_1 の方が両親系統よりも発現レベルが高かった. さらに, 播種後 2 日の子葉を用いて, RNA-sequencing により網羅的に遺伝子の発現レベルを比較した結果, 葉緑体ターゲット遺伝子の発現量が F_1 において両親系統よりも高くなる傾向が見られた (Saeki *et al.* 2016). そこで, シロイスナズナの研究と同様に, 化学薬剤を用いて初期生育時に葉緑素の合成を阻害し, 雜種強勢に及ぼす影響を調べた. 播種後 1 週間通常のムラシゲ・スクーグ培地 (MS 培地) で栽培した後に, 化学薬剤を添加した MS 培地に移して葉緑素の合成を阻害すると, 葉は白くなるものの雑種強勢は発現した. 一方, 播種後すぐに化学薬剤を添加した MS 培地で育てた後, 通常の MS 培地で生育させると, 葉では葉緑素の合成が見られるが, 雜種強勢が現れなかった. 以上の結果から, 播種後数日の子葉における葉緑素の発達がその後の雑種強勢に重要な可能性が示唆され, 葉緑体ターゲット遺伝子の発現上昇との関連性が示唆された (Saeki *et al.* 2016).

おわりに

シロイスナズナ, ハクサイとともに, 雜種強勢は, 播種後数日の子葉から見られ, その後は展開する全ての葉で観察される. さらに, 播種後まもない時期に, 葉緑素の合成を阻害すると, その後通常の栽培条件で育てても雑種強勢が見られなくなることから, 播種後数日間が雑種強勢の分子機構を解明する上で重要な要素と考えられる. この他にも, DDM1 によって制御される DNA メチル化等が雑種強勢に関与する可能性も示唆された. これら二つの現象の関わりは明らかにされていないが, 今後も継続して研究を行い, 雜種強勢の分子機構の解明を目指したい.

謝 辞

本研究成果は、東北大学大学院農学研究科の西尾剛教授、国立遺伝学研究所の角谷徹仁教授、オーストラリアのCSIROのLiz Dennis博士とJim Peacock博士の指導により得られたものであり、感謝の意を表します。さらに、新潟大学大学院自然科学研究科、神戸大学大学院農学研究科で継続して行った研究成果も含まれており、岡崎桂一教授、安田剛志教授を始め、本研究に関わった学生、共同研究者全ての方に心より感謝申し上げます。また、研究材料を提供していただいた（株）渡辺採種場に感謝の意を表します。

本原稿の作成において、貴重な助言を頂きました岡崎桂一教授、板橋悦子博士、岡本俊介博士、柿崎智博博士、川辺隆大博士、佐々木卓博士、高田美信博士に深く感謝致します。

引用文献

- Barber, W.T., W. Zhang, H. Win, K.K. Varala, J.E. Dorweiler, M.E. Hudson and S.P. Moose (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 10444–10449.
- Chan, S.W., X. Zhang, Y.V. Bernatavichute and J.E. Jacobsen (2006) *PLoS Biol.* 4: e363.
- Finnegan, E.J., D. Liang and M.B. Wang (2011) *Trends Plant Sci.* 16: 238–241.
- Fujimoto, R. and T. Nishio (2003) *Theor. Appl. Genet.* 106: 1433–1437.
- Fujimoto, R., K. Okazaki, E. Fukai, M. Kusaba and T. Nishio (2006a) *Genetics* 173: 1157–1167.
- Fujimoto, R., T. Sugimura, E. Fukai and T. Nishio (2006b) *Plant Mol. Biol.* 61: 577–587.
- Fujimoto, R., T. Sasaki and T. Nishio (2006c) *Genes Genet. Syst.* 81: 235–242.
- Fujimoto, R. and T. Nishio (2007) *Adv. Bot. Res.* 45: 139–154.
- Fujimoto, R., T. Sasaki, H. Inoue and T. Nishio (2008a) *Plant Mol. Biol.* 66: 463–473.
- Fujimoto, R., Y. Kinoshita, A. Kawabe, T. Kinoshita, K. Takashima, M. Nordborg, M.E. Nasrallah, K.K. Shimizu, H. Kudoh and T. Kakutani (2008b) *PLoS Genet.* 4: e1000048.
- 藤本 龍・西尾 剛 (2008) *育種学研究* 10: 1–9.
- 藤本 龍・石川 亮 (2010) *育種学研究* 12: 123–131.
- Fujimoto, R., T. Sasaki, H. Kudoh, J.M. Taylor, T. Kakutani and E.S. Dennis (2011) *Plant J.* 66: 831–843.
- Fujimoto, R., T. Sasaki, R. Ishikawa, K. Osabe, T. Kawanabe and E.S. Dennis (2012a) *Int. J. Mol. Sci.* 13: 9900–9922.
- Fujimoto, R., J.M. Taylor, S. Shirasawa, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2012b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 7109–7114.
- Gehring, M., K.L. Bubb and S. Henikoff (2009) *Science* 324: 1447–1451.
- Greaves, I.K., M. Groszmann, H. Ying, J.M. Taylor, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 3570–3575.
- Greaves, I.K., M. Groszmann, A. Wang, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 2017–2022.
- Greaves, I.K., R. Gonzalez-Bayon, L. Wang, A. Zhu, P.C. Liu, M. Groszmann, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2015) *Plant Physiol.* 168: 1197–1205.
- Groszmann, M., I.K. Greaves, Z.I. Albertyn, G.N. Scofield, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 2617–2622.
- Hatakeyama, K., T. Takasaki, G. Suzuki, T. Nishio, M. Watanabe, A. Isogai and K. Hinata (2001) *Plant J.* 26: 69–76.
- Hsieh, T.F., C.A. Ibarra, P. Silva, A. Zemach, L. Eshed-Williams, R.L. Fischer and D. Zilberman (2009) *Science* 324: 1451–1454.
- Ikeda, Y., Y. Kobayashi, A. Yamaguchi, M. Abe and T. Araki (2007) *Plant Cell Physiol.* 48: 205–220.
- Kawamura, K., T. Kawanabe, M. Shimizu, K. Okazaki, M. Kaji, E.S. Dennis, K. Osabe and R. Fujimoto (2015) *Data Brief* 6: 229–237.
- Kawamura, K., T. Kawanabe, M. Shimizu, A.J. Nagano, N. Saeki, K. Okazaki, M. Kaji, E.S. Dennis, K. Osabe and R. Fujimoto (2016) *Plant Gene* 5: 1–7.
- Kawamura, K., M. Shimizu, T. Kawanabe, Z.J. Pu, T. Kodama, M. Kaji, K. Osabe, R. Fujimoto and K. Okazaki (2017) *Euphytica* 213: 28.
- Kawanabe, T., S. Ishikura, N. Miyaji, T. Sasaki, L.M. Wu, E. Itabashi, S. Takada, M. Shimizu, T. Takasaki-Yasuda, K. Osabe et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E6704–E6711.
- Kimura, R., K. Sato, R. Fujimoto and T. Nishio (2002) *Plant J.* 29: 215–223.
- Kinoshita, T., A. Miura, Y. Choi, Y. Kinoshita, X. Cao, S.E. Jacobsen, R.L. Fisher and T. Kakutani (2004) *Science* 303: 521–523.
- Kitashiba, H. and J.B. Nasrallah (2014) *Breed. Sci.* 64: 23–37.
- Li, X., J. Zhu, F. Hu, S. Ge, M. Ye, H. Xiang, G. Zhang, X. Zheng, H. Zhang, S. Zhang et al. (2012) *BMC Genomics* 13: 300.
- Li, Y., K. Varala, S.P. Moose and M.E. Hudson (2012) *PLoS One* 7: e47043.
- Lippman, Z., A.V. Gendrel, M. Black, M.W. Vaughn, N. Dedhia, W.R. McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K.D. Kasschau et al. (2004) *Nature* 430: 471–476.
- Liu, S., Y. Liu, X. Yang, C. Tong, D. Edwards, I.A. Parkin, M. Zhao, J. Ma, J. Yu, S. Huang et al. (2014) *Nat. Commun.* 5: 3930.
- Matzke, M.A. and R.A. Mosher (2014) *Nat. Rev. Genet.* 15: 394–408.
- Meyer, R.C., O. Törjék, M. Becher and T. Altmann (2004) *Plant Physiol.* 134: 1813–1823.
- Meyer, R.C., H. Witucka-Wall, M. Becher, A. Blacha, A. Boudichevskaia, P. Dörmann, O. Fiehn, S. Friedel, M. von Korff, J. Lisec et al. (2012) *Plant J.* 71: 669–683.
- Niederhuth, C.E., A.J. Bewick, L. Ji, M.S. Alabady, K.D. Kim, Q. Li, N.A. Rohr, A. Rambani, J.M. Burke, J.A. Udall et al. (2016) *Genome Biol.* 17: 194.
- Nishio, T., K. Sakamoto and J. Yamaguchi (1994) *Plant Cell Rep.* 13: 546–550.
- Nishio, T., M. Kusaba, K. Sakamoto and D.J. Ockendon (1997) *Theor. Appl. Genet.* 95: 335–342.
- Oikawa, E., S. Takuno, A. Izumita, K. Sakamoto, H. Hanzawa, H. Kitashiba and T. Nishio (2011) *Mol. Breed.* 28: 1–12.
- Okamoto, S., Y. Sato, K. Sakamoto and T. Nishio (2004) *Sex. Plant Reprod.* 17: 33–39.
- Okamoto, S., M. Odashima, R. Fujimoto, Y. Sato, H. Kitashiba and T. Nishio (2007) *Plant J.* 50: 391–400.
- Osabe, K., T. Sasaki, R. Ishikawa and R. Fujimoto (2012) In “DNA Methylation: Principles, Mechanisms and Challenges”. Tatiana,

- T.V. and G. Sablok (eds.), Nova Science Publishers, USA, pp. 35–66.
- Saeki, N., T. Kawanabe, H. Ying, M. Shimizu, M. Kojima, H. Abe, K. Okazaki, M. Kaji, J.M. Taylor, H. Sakakibara *et al.* (2016) BMC Plant Biol. 16: 45.
- Sasaki, T., R. Fujimoto, S. Kishitani and T. Nishio (2011) Plant Cell Rep. 30: 81–88.
- Sato, K., T. Nishio, R. Kimura, M. Kusaba, T. Suzuki, K. Hatakeyama, D.J. Ockendon and Y. Satta (2002) Genetics 162: 931–940.
- Sato, Y., R. Fujimoto, K. Toriyama and T. Nishio (2003) Plant Mol. Biol. 52: 617–626.
- Sato, Y., S. Okamoto and T. Nishio (2004) Plant Cell 16: 3230–3241.
- Sato, Y., K. Sato and T. Nishio (2006) Plant Cell Physiol. 47: 340–345.
- Shen, H., H. He, J. Li, W. Chen, X. Wang, L. Guo, Z. Peng, G. He, S. Zhong, Y. Qi, *et al.* (2012) Plant Cell 24: 875–892.
- Shiba, H., M. Iwano, T. Entani, K. Ishimoto, H. Shimosato, F.S. Che, Y. Satta, A. Ito, Y. Takada, M. Watanabe *et al.* (2002) Plant Cell 14: 491–504.
- Shimizu, M., R. Fujimoto, H. Ying, Z.J. Pu, Y. Ebe, T. Kawanabe, N. Saeki, J.M. Taylor, M. Kaji, E.S. Dennis *et al.* (2014) Plant Mol. Biol. 85: 247–257.
- Shimizu, M., Z.J. Pu, T. Kawanabe, H. Kitashiba, S. Matsumoto, Y. Ebe, M. Sano, T. Funaki, E. Fukai, R. Fujimoto *et al.* (2015) Theor. Appl. Genet. 128: 119–130.
- Soppe, W.J., S.E. Jacobsen, C. Alonso-Blanco, J.P. Jackson, T. Kakutani, M. Koornneef and A.J. Peeters (2000) Mol. Cell 6: 791–802.
- Takada, Y., T. Nakanowatari, J. Sato, K. Hatakeyama, T. Kakizaki, A. Ito, G. Suzuki, H. Shiba, S. Takayama, A. Isogai *et al.* (2005) Sex. Plant Reprod. 17: 211–217.
- Takada, Y., K. Murase, H. Shimosato-Asano, T. Sato, H. Nakanishi, K. Suwabe, K.K. Shimizu, Y.P. Lim, S. Takayama, G. Suzuki *et al.* (2017) Nat. Plants 3: 17096.
- Tarutani, Y., H. Shiba, M. Iwano, T. Kakizaki, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai and S. Takayama (2010) Nature 466: 983–986.
- U, N. (1935) Jpn. J. Bot. 7: 389–452.
- Watanabe, M., S. Takayama, A. Isogai and K. Hinata (2003) Breed. Sci. 53: 199–208.
- Yasuda, S., Y. Wada, T. Kakizaki, Y. Tarutani, E. Miura-Uno, K. Murase, S. Fujii, T. Hioki, T. Shimoda, Y. Takada *et al.* (2016) Nat. Plants 3: 16206.
- Zemach, A., M.Y. Kim, P.H. Hsieh, D. Coleman-Derr, L. Eshed-Williams, K. Thao, S.L. Harmer and D. Zilberman (2013) Cell 153: 193–205.
- Zhang, Q., Y. Li, T. Xu, A.K. Srivastava, D. Wang, L. Zeng, L. Yang, L. He, H. Zhang, Z. Zheng *et al.* (2016) Cell Discov. 2: 16027.
- Zhu, A., I.K. Greaves, P.C. Liu, L. Wu, E.S. Dennis and W.J. Peacock (2016) Plant J. 88: 597–607.