



# アブラナ科植物の基礎研究と応用研究のネットワーク構築を目指して（2016年第58回シンポジウム(シンポジウム・ワークショップ)報告)

山本, 雅也 ; 藤井, 壮太 ; 柿崎, 智博 ; 藤本, 龍 ; 彦坂, 幸毅 ; 畠山, 勝徳 ; 伊藤, 秀臣 ; 岡崎, 桂一

---

## (Citation)

育種学研究, 19(1):21-29

## (Issue Date)

2017-03

## (Resource Type)

journal article

## (Version)

Version of Record

## (URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90005073>



## 特集記事 ワークショップ報告

## アブラナ科植物の基礎研究と応用研究のネットワーク構築を目指して

山本雅也<sup>1)</sup>・藤井壮太<sup>2)</sup>・柿崎智博<sup>3)</sup>・藤本 龍<sup>4)</sup>・彦坂幸毅<sup>5)</sup>・畠山勝徳<sup>6)</sup>・伊藤秀臣<sup>7)</sup>・岡崎桂一<sup>8)</sup><sup>1)</sup> 東北大学大学院農学研究科, 宮城県仙台市, 〒 980-4269<sup>2)</sup> 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科, 奈良県生駒市, 〒 630-0192<sup>3)</sup> 農研機構 野菜花き研究部門, 三重県津市, 〒 514-2392<sup>4)</sup> 神戸大学大学院農学研究科, 兵庫県神戸市, 〒 657-8501<sup>5)</sup> 東北大学大学院生命科学研究科, 宮城県仙台市, 〒 980-8578<sup>6)</sup> 岩手大学農学部, 岩手県盛岡市, 〒 020-8550<sup>7)</sup> 北海道大学大学院理学研究院, 北海道札幌市, 〒 060-0810<sup>8)</sup> 新潟大学農学部, 新潟県新潟市, 〒 950-2181

## Towards network construction between basic and applied researchers in Brassicaceae

Masaya Yamamoto<sup>1)</sup>, Sota Fujii<sup>2)</sup>, Tomohiro Kakizaki<sup>3)</sup>, Ryo Fujimoto<sup>4)</sup>, Kouki Hikosaka<sup>5)</sup>, Katsunori Hatakeyama<sup>6)</sup>, Hidetaka Ito<sup>7)</sup> and Keiichi Okazaki<sup>8)</sup><sup>1)</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-4269<sup>2)</sup> Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara 630-0192<sup>3)</sup> Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO, Tsu, Mie 514-2392<sup>4)</sup> Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe University, Kobe, Hyogo 657-8501<sup>5)</sup> Graduate School of Life Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8578<sup>6)</sup> Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550<sup>7)</sup> Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0810<sup>8)</sup> Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata, Niigata 950-2181

## キーワード

エピジェネティクス, グルコシノレート, 自家不和合性, 種間不和合性, トランスポゾン, 高 CO<sub>2</sub> 適応, 根こぶ病, 萎黄病, アブラナ科

## ワークショップの狙い

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) で得られた知見を農作物に応用する際に、近縁種であるアブラナ科野菜は格好の材料である。近年のハイスループットシーケンサーの発達により、アブラナ科野菜においても分子遺伝学的な研究がより進展し、得られた知見を元に DNA マーカー選抜等の技術が育種現場で今後一層利用されていくと考えられる。しかし、遺伝的に固定され、リソースが充実し、扱いやすいシロイヌナズナに比べて、アブラナ科野菜は、『自家不和合性を有する為に自殖種子を採種するのに手間がかかる』、『多くの系統がバーナリゼーションを必要とする為、採種・ライフサイクルが長い』、『遺伝的にヘテロ性である』、『学術的に使える系統が統一されておらず、一般の種苗会社

から販売されている品種に頼っている』等、研究を開始するのに少なからず障壁があるのも事実である。また、様々な要因により、基礎研究と応用研究の間に大きな隔たりがあるのが現状である。このような隔たりを解消するためには、アブラナ科植物を研究対象とした基礎研究が、実際の育種現場にどのように活用できるか、また、現場ではどのような研究を求めているかを双方向的に議論する機会が必要となる。

そこで、本ワークショップは、主にアブラナ科野菜を材料に研究を進めている演者と、シロイヌナズナで研究を進め、それをアブラナ科野菜で発展させている演者による講演形式で行った。さらに、講演の最後に総合討論の時間を設け、民間種苗メーカーの研究者をファシリテーターとして、応用研究の視点から、アブラナ科野菜の今後の研究展開について、様々な角度からの意見交換を行った。

2016 年 12 月 24 日受領

Correspondence: leo@people.kobe-u.ac.jp; tkaki@affrc.go.jp

## 演題 1 ハクサイにおけるエピゲノム解析

藤本 龍<sup>1</sup>, 高橋聡史<sup>2</sup>, 板橋悦子<sup>1</sup>, 鈴木 穰<sup>3</sup>, 関 原明<sup>2</sup>  
(1. 神戸大, 2. 理研, 3. 東大)

遺伝子の発現は、塩基配列に依存するジェネティックな制御に加え、塩基配列によらず、遺伝子の修飾状態 (DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾) の変化に依存するエピジェネティックな制御が存在する。エピジェネティックな修飾に関わる遺伝子の変異体では、発達異常が見られる場合があることから、エピジェネティックな遺伝子発現制御が植物の形質を制御している可能性が示されている (藤本・石川 2010, Fujimoto *et al.* 2012)。さらに、雑種強勢等、農学的に重要な形質においても、エピジェネティックな制御が関与する可能性が示唆されている (Kawanabe *et al.* 2016a)。

DNA のメチル化や特定のヒストン修飾への抗体を用いた免疫沈降により抽出した DNA の配列を直接決定することで、エピジェネティックな修飾状態をゲノム全体で調べることができるエピゲノム解析が開発されている。そこで我々は、ハクサイ、コマツナ、カブ等が属する *Brassica rapa* L. のエピジェネティックな遺伝現象を明らかにする目的で、ゲノム全体でのエピジェネティックな修飾状態を明らかにするエピゲノム解析 (MeDIP-seq, ChIP-seq, WGBS) を実施している。

エピゲノム解析を実施するに先立ち、*B. rapa* で 4 つのヒストン修飾 (H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3) における ChIP-DNA の濃縮を確認できるプライマーセットを作成した (Kawanabe *et al.* 2016b)。そして、ハイスループットシーケンサーを用いた MeDIP-seq と ChIP-seq により、*B. rapa* の通常生育条件下における DNA メチル化状態とヒストン修飾状態を明らかにした。現在、これらの修飾と遺伝子発現との関わりや、農業形質との関わりについて解析している。

上記のエピゲノム解析においては、科学研究費・新学術領域研究「ゲノム支援」の支援を受けて実施した。

## 演題 2 ダイコンのグルコシノレート合成経路の解明と育種への利用

柿崎智博, 吹野伸子, 板橋悦子, 小原隆由, 石田正彦 (農研機構 野菜花き研究部門)

ダイコンに多く含まれるグルコシノレートの一種・グルコラファサチン (4-メチルチオ-3-ブテニルグルコシノレート) は、ダイコン特有の食味を特徴づける重要な成分である。グルコラファサチンは、植物組織が壊れるとラファサチンと呼ばれる辛み成分 (イソチオシアネート) に分解される。ラファサチンは化学的に不安定なため、保存中に分解が進み、におい成分 (いわゆる“たくあん臭”) や、黄色色素へと変化する (図 1)。業務・加工用途において需要の多い冷凍大根おろしでは、保存期間中にたくあん臭や黄変が発生して品質が低下し、大きな問題となっている。

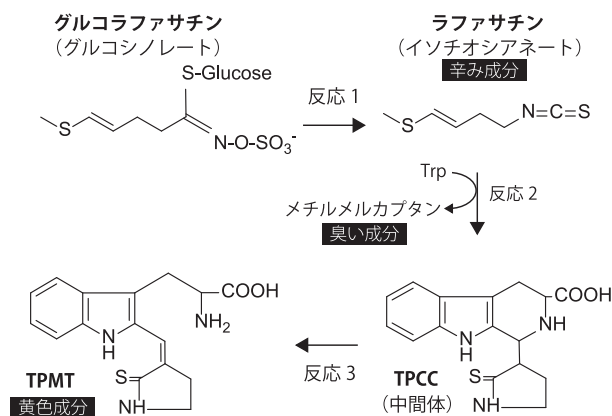


図 1. 加工過程におけるグルコラファサチンの代謝経路。

根に蓄積するグルコラファサチンはミロシナーゼにより辛み成分へと分解される (反応 1。反応 2 および 3 は非酵素的な反応であり、低温・冷凍保存することで臭い成分の発生や黄変を抑制するのは困難である。

こうした背景から、遺伝資源のスクリーニングからグルコラファサチンを含有しない個体を同定し、加工しても臭いや黄変の発生しない品種「だいこん中間母本農 5 号」を育成した (石田ら 品種登録番号 22662)。この品種を用いて製造した、たくあん漬や冷凍大根おろしでは、臭いや黄変の発生がほとんどない。このグルコラファサチンを欠失する性質は単因子劣性に遺伝することがわかってきたが、その原因となる遺伝子は不明であった。

そこで我々は「だいこん中間母本農 5 号」の兄弟系統である *grs1-1* と、グルコラファサチンを含有する野生型「HAGHN」の交雑  $F_2$  および  $F_3$  集団を用いて、ポジショナルクローニング法による原因遺伝子の絞り込みを行い、グルコラファサチン合成酵素遺伝子 *GLUCORAPHASATIN SYNTHASE 1* (*GRS1*) を同定した。相同性検索の結果、*GRS1* は 2-オキシグルタル酸依存型デオキシゲナーゼに属することがわかった。さらに *grs1-1* 型の遺伝子には第 1 エキソンに *Ty1/copia* に相同性を有する配列が挿入されており、in-frame でストップコドンが生じていることを明らかにした。次に *GRS1* 遺伝子をシロイヌナズナへ導入したところ、本葉においてグルコラファサチンの蓄積が観察された。同時にグルコエルシンの減少も観察されたことから、*GRS1* はグルコエルシンを基質としてグルコラファサチンを合成していることが推察された。

現在は、*grs1* 変異を簡便に同定できる DNA マーカーを利用した品種育成を行っており、平成 27 年に品種登録されたグルコラファサチン欠失性品種「悠白」と「サラホワイト」に次ぐ欠失性品種の開発を進めている。

本研究の一部は農林水産省次世代ゲノム基盤プロジェクト (HOR1006) の支援を受けて行った。

## 演題 3 形質転換シロイヌナズナを用いた自家不和合性研究

山本雅也<sup>1</sup>, 西尾 剛<sup>1</sup>, Nasrallah June<sup>2</sup> (1. 東北大院・

## 農学研究科, 2. Cornell Univ. Sec. of Plant Sci.)

約半数の植物は、他家と交配して子孫を残す他殖性である。他殖性を実現するための機構の一つとして自家不和合性機構がある。我々は、アブラナ科植物の自家不和合性機構に注目し、研究を行っている。アブラナ科植物の自家不和合性は *S* 遺伝子座に座乗する *S*-locus receptor kinase (*SRK*) と *S*-locus cysteine-rich protein / *S*-locus protein *II* (*SCR* / *SP11*, 以下 *SCR* と記述) に支配されている。*SRK* と *SCR* は種内に多くの対立遺伝子が存在する (藤本・西尾 2008)。アブラナ科植物の自家不和合性機構は *B. rapa* などのアブラナ属作物を中心に研究が行われてきたが、形質転換が難しいことや世代間の長さから、分子機構の解析は困難を伴うものであった。一方、コーネル大学の Nasrallah らによりモデル植物シロイヌナズナ (*A. thaliana*) に近縁種である *A. lyrata* の *SRK* と *SCR* 遺伝子を導入することでシロイヌナズナは自家不和合性になることが見いだされた (Nasrallah *et al.* 2004)。そこで我々は、形質転換が容易という *SRK*-*SCR* 形質転換シロイヌナズナの利点を生かして、*in planta* で *SRK* の機能解析を行っている。

*SRK* は N 結合型糖鎖修飾配列をもつが、*SRK* への N 結合型糖鎖修飾の重要性や役割については未解明であった。そこで、*SRK* の N 結合型糖鎖付加配列に変異を導入

した変異 *SRK* を発現する形質転換シロイヌナズナを作製して解析した。我々が解析に用いている *A. lyrata* *SRKb* は 6 カ所の N 結合型糖鎖付加配列をもつ。全ての N 結合型糖鎖付加配列に変異を導入した変異 *SRKb* は自家不和合能力を欠損しており、N 結合型糖鎖修飾が *SRKb* の機能に必要なことが明らかとなった。また、各 N 結合型糖鎖付加部位の 1 カ所、2 カ所、3 カ所に変異を導入した変異 *SRKb* を作製し解析を行ったところ、各 N 結合型糖鎖付加部位の重要性は等価ではなく、*SRK* 対立遺伝子間でよく保存されている部位はより *SRKb* の機能に重要であった (図 2)。また、*SRKb* の N 結合型糖鎖修飾は *SRKb* の細胞膜輸送に必要なことも明らかにした (Yamamoto *et al.* 2014)。

*SRK* の機能発現に細胞膜から細胞内オルガネラへの輸送過程であるエンドサイトーシスが必要か検討している。*SRKb* のキナーゼドメイン (細胞質側領域) には 2 つのエンドサイトーシスシグナル配列が存在しており、両方とも *SRK* 対立遺伝子産物間では保存されている。*in vitro* kinase assay の結果、一つ目のエンドサイトーシスシグナルを構成する Tyr600 残基は *SRKb* のキナーゼ活性に必須であった。一方、二つ目のエンドサイトーシスシグナルを構成する Tyr693 残基を Ala に置換した変異 *SRKb* を発現するシロイヌナズナを作製して自家交配を行ったとこ

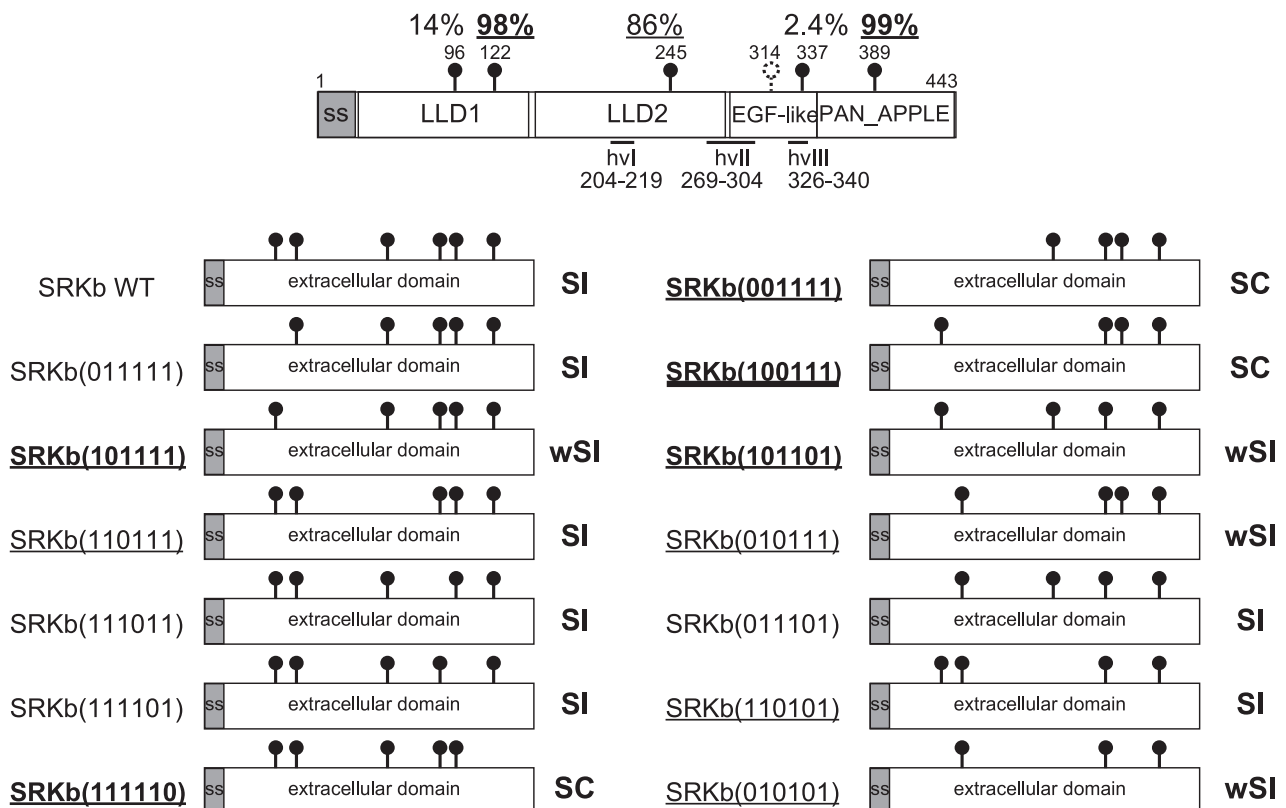


図 2. *SRKb* の N 結合型糖鎖付加部位変異体の結果のまとめ。

自家交配を行い自家不和合性 (SI), 弱い自家不和合性 (wSI), 自家和合性 (SC) を示す *SRKb* 変異体が存在した。S ハプロタイプ間で保存性の高い N 結合型糖鎖付加部位ほど重要であった。



ろ、正常に自家不和合性反応が観察された。これらの結果から、我々は SRK の機能発現にエンドサイトーシスは必要なのではないかと考えている。現在、この仮説をさらに検証するため、エンドサイトーシスに参与する遺伝子を欠損した自家不和合性シロイヌナズナ株を CRISPR/Cas9 法で作製し、解析を行っている。

#### 演題 4 アブラナ科植物の受粉の生理・進化ダイナミクス 藤井壮太、五十嵐元子、Tangpranomkorn Surachat、高山誠司（奈良先端・バイオサイエンス）

生殖は動けない植物が能動的な活動を見せる数少ない生理現象である。中でも花粉と雌蕊の接着の瞬間である受粉は生殖パートナー選択の中心となる過程であり、自他識別、花粉競合など様々な性選択の「場」である。また、育種においては受粉が遺伝資源の利用の律速となるケースも多い。例えば、種間の不和合性によって、利用可能な有用遺伝子のレパートリーが制限される。自家不和合性は多くの植物種に見られるが、一代雑種品種の採種に利用される一方で自殖種子の取得を困難にする。現状、ヘテロ性を保ち自殖劣性を避けるために、あるいは育種家の利権を保つために、多くの作物種において一代雑種品種の作成が望まれる。そのためには受粉を理解し制御することが重要である。

従って我々は、種間不和合性と自家不和合性の分子メカニズムを探索してきた。種間不和合性は 18 世紀から人々の興味を惹いている現象ではあるが、多くは解明されていない。近年、植物の胚珠から放出される花粉管の誘因物質である低分子タンパク質 LURE が同種の花粉管をより強く誘因することから、種間不和合性因子のひとつであると報告された (Takeuchi and Higashiyama 2012)。また、胚発生時に雑種致死性を決定する QTL も見出されており、ポリコム複合体の構成因子が原因であることが推察されている (Tonosaki *et al.* 2013, 2016)。我々は統合的にアブラナ科の種間不和合性を解明するために、ゲノムワイド関連解析を用いた種間不和合性遺伝子座の決定を行った。解析中のため詳細は割愛するが、現在強い効果を示す原因遺伝子座について機能証明を行っている。

一方、自家不和合性に関してもアブラナ科植物をモデルに研究を進めてきた。自家受粉後に、カルシウムイオンの増加を伴う拡散シグナルの存在を見出した (Iwano *et al.* 2015)。最近、我々は雌蕊の先端細胞は自家不和合性反応を引き起こしている状態から、再び初期の状態へと可逆的に遷移できることを示唆する実験結果を得てきた。自家不和合性の研究ではシミュレーションによって現象が持つ生理的意義を探索することが有効である (Tsuchimatsu and Shimizu 2013, Fujii *et al.* 2016)。我々は雌蕊の状態可逆性が、自家不和合性反応後にも非自己の花粉を受け入れられる頑強性をもたらすのではないかとこの仮説を立てた。実際、シミュレーションによって雌蕊の頑強性が集団において自家不和合性がより安定的に維

持される要因となっている可能性を示した。今後も拡散シグナルの動態の更なる解明を目指し、変動環境下における自家不和合性の可塑性の理解へとつなげたい。

#### 演題 5 アブラナ科植物における高温活性型トランスポゾンの解析とその応用

伊藤秀臣（北大・院理学）

内在性の転移因子、トランスポゾン植物のゲノム中に数多く存在している。その多くは、自らの遺伝子内変異の蓄積により転移能力を失ってしまったものや、宿主によるエピジェネティックな制御機構により活性が抑制されている。一方、ストレスにより活性化するトランスポゾンも数多く報告されている (Grandbastien 2004)。我々は、アブラナ科植物に保存されている高温活性型のレトロトランスポゾン *ONSEN* (Ito *et al.* 2011, 2013) に着目し、種苗会社から取り寄せた 20 種のアブラナ科植物における *ONSEN* の保存性について詳しく解析した。コピー数を調べた結果、近縁種では共通性が見られたが、全体的には種により多様であった。次に、*ONSEN* の高温活性について解析した結果、発現量に差はあるものの、多くの種で高温活性がみられた。このことから、アブラナ科における *ONSEN* は配列が保存されているだけではなく、高温活性も保存されていることが明らかとなった。さらに、レトロトランスポゾンが転移する際の間産物である、染色体外 DNA を検出することができたことから、いくつかの種では、*ONSEN* は転移能力を持っていることが推察された。そこで、アブラナ科植物の 1 種であるダイコンについてさらにゲノム解析を進めた。*ONSEN* のゲノム内コピー数を解析した結果、多くの品種で個体ごとに多型を示した。しかし、いくつかの品種では *ONSEN* 配列領域に関して品種内で固定されているものを見つけた。これらの品種を用いて *ONSEN* の転移解析を行った。シロイヌナズナを用いた先行研究で、*ONSEN* はカルスを介した高温処理によって体細胞で転移誘導することが可能であることが明らかとなっている。この技術を応用することで、ダイコンのカルスから *ONSEN* が転移した再分化個体の作出を試みた。その結果、ダイコンの 1 品種で、再分化個体に新たな *ONSEN* の転移が観察された。このことから、育種上重要なアブラナ科作物においても *ONSEN* の転移を誘導することが可能であると考えられた。*ONSEN* は遺伝子内に転移する傾向があることから、将来的には *ONSEN* の転移集団の中から、優良形質を選抜することを考えている (図 3)。

#### 演題 6 自然変異に学ぶ適応のしくみ：アブラナ科植物の種内変異を用いたアプローチ

彦坂幸毅<sup>1,8</sup>、森長真一<sup>2,8</sup>、小口理一<sup>1</sup>、永野聡一郎<sup>3</sup>、見塩昌子<sup>1</sup>、上妻馨梨<sup>1</sup>、藤井伸治<sup>1</sup>、須藤恵美<sup>4</sup>、石塚航<sup>5</sup>、田島直幸<sup>2</sup>、尾崎洋史<sup>6</sup>、Wang Q-W<sup>1</sup>、花田耕介<sup>7,8</sup>  
(1. 東北大・生命科学, 2. 日大・生物資源, 3. かずさ

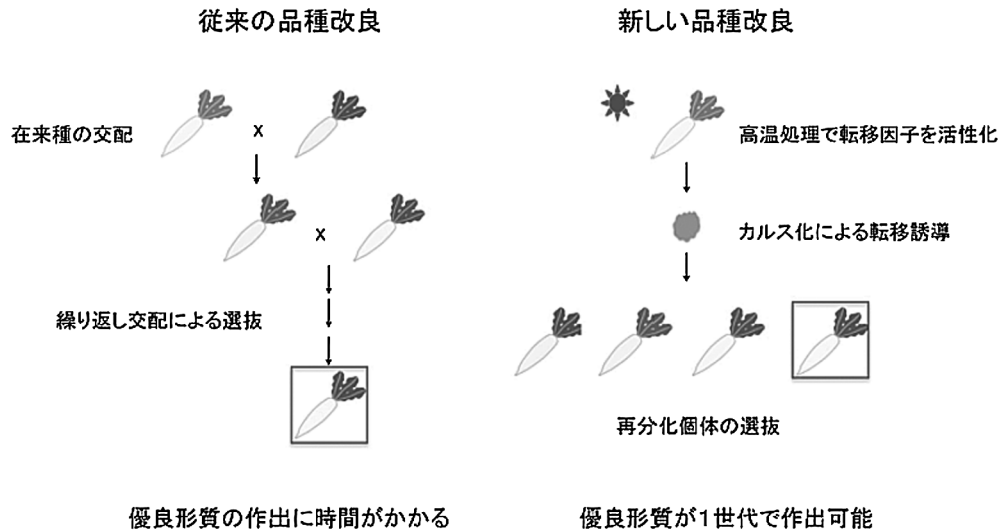


図3. 高温活性型転移因子 ONSEN の転移を利用したゲノム育種。

DNA 研, 4. 東北大・農, 5. 道総研, 6. 東京薬大・生命科学, 7. 九州工大・若手フロンティア, 8. CREST・JST)

同一種であっても、集団や品種によって様々な性質に遺伝的な違いが見られる。これらの一部は中立な変異であるかもしれないが、それぞれの生育環境への適応の結果であったり、人為選抜の結果であったりと、何らかの意味で「有利」な変異である可能性もある。自然界に存在する様々な遺伝的変異を品種改良に利用し、収量増加やストレス耐性の増加に結びつけることができるかもしれない。

我々のプロジェクトでは、アブラナ科の様々な種における自然変異を利用し、成長速度やストレス耐性が高い作物を創出することを試みている。ここではその一部を紹介したい。

#### 1) シロイヌナズナの自然変異からの高 CO<sub>2</sub> 適応遺伝子の探索

産業革命以降大気 CO<sub>2</sub> 濃度は増加しており、今後も続くことは間違いない。我々は天然 CO<sub>2</sub> 噴出地周辺に生育するオオバコが高 CO<sub>2</sub> 環境に適応していることを見出し（Nakamura *et al.* 2011）、高 CO<sub>2</sub> 環境で優れた性質をもつ作物を創ることが可能であることが示唆される。我々は世界各地で採取されたシロイヌナズナ 44 エコタイプの成長解析を行い、成長速度やその CO<sub>2</sub> 応答に大きな差があることを見出した（Oguchi *et al.* 2016）。この違いから、ゲノムワイド関連解析とトランスクリプトーム解析によって成長速度の高 CO<sub>2</sub> 促進にかかわると期待される候補遺伝子を多数特定した。これらの遺伝子について強制発現株と発現抑制株を作製し、成長を解析したところ 11 遺伝子で成長促進が認められ、うち 7 遺伝子については同一遺伝子の複数系統で成長促進が認められた。これらの結果から、高 CO<sub>2</sub> 適応遺伝子を発見できたと考えている。各遺伝子の機能解明が今後の課題である。

さらに、これらの遺伝子変異を有用植物に付与することを試みている。材料としてハツカダイコンを選び、遺伝子組換えは消費者の理解を得がたいことから、TILLING 法（Targeting induced local lesions in genomes; Wang *et al.* 2012）によって当該遺伝子に変異が生じた変異体を単離する方法を採用した。シロイヌナズナの高 CO<sub>2</sub> 適応遺伝子と考えられる 7 遺伝子のうち 4 遺伝子は発現抑制株で有効であるため、遺伝子破壊によって形質が改善される可能性がある。現在はいくつかの遺伝子について変異体を得ることができ、実験に使用するために後代を育成しているところである。

#### 2) ハツカダイコンへハマダイコンの高温耐性を付与する

ハマダイコンは栽培ダイコンと交配可能な同種で、栽培ダイコンが野生化したものと考えられる。我々は秋田から沖縄まで 10 数集団の種子を採集し、共通圃場実験を行った。葉光合成系の高温耐性に集団間変異が見出され、ゲノムワイド関連解析によって高温耐性に関与すると期待される候補遺伝子を多数特定した。高温耐性に違いが見られる 3 集団から得た個体をハツカダイコンと交配させ、F<sub>2</sub> 個体を得た。現在、F<sub>2</sub> 個体に対して高温耐性試験を行い、特定した候補遺伝子の変異から F<sub>2</sub> 個体の高温耐性を予測することが可能かを検証している。

これらの手法は他の作物にも適用可能であると考えられ、新しい品種開発法となる可能性を有すると期待される。

本研究は JST, CREST の支援を受けて行った。

#### 演題 7 ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離と育種への応用

##### 畠山勝徳（岩手大学農学部）

根こぶ病は、絶対寄生性の *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされる土壌病害であり、本病に対する抵抗性はアブラナ科野菜の重要な育種目標の一つである。

表 1. ハクサイ根こぶ病菌の病原型と抵抗性遺伝子の対応関係

判別品種	病原型			
	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4
SCR ひろ黄	S	R	S	R
CR 隆徳	S	S	R	R
抵抗性遺伝子 (座)				
<i>Crr1</i> ( <i>Crr1a</i> , <i>Crr1b</i> )	S	R	S	R
<i>Crr1a</i>	S	R	S	R
<i>Crr1b</i>	S	S	S	S
<i>Crr2</i>	S	S	S	S
<i>Crr1b</i> , <i>Crr2</i>	R	R	S	R
<i>Crr1a</i> , <i>Crr1b</i> , <i>Crr2</i> (PL9, CR 寒次郎)	R	R	S	R
<i>CRb</i> (=CRa)	S	S	R	R
<i>Crr1a</i> , <i>Crr1b</i> , <i>Crr2</i> , <i>CRb</i> (あきめき)	R	R	R	R

S : 罹病性, R : 抵抗性.

ハクサイでは根こぶ病抵抗性 (CR) 品種が多数育成されているが、圃場内には病原型の異なる菌が混在しているために、単一の抵抗性遺伝子をもつ品種は短期間で発病してしまう。我々は、「SCR ひろ黄」と「CR 隆徳」の 2 品種を利用することにより、菌株を 4 つの病原型 (グループ 1~4) に分類している (表 1, Hatakeyama *et al.* 2004)。多様な病原型に対応した強度抵抗性の獲得のためには、複数の抵抗性遺伝子の導入が有効な手段の一つと考えられる。

農研機構野菜茶業研究所において、QTL 解析によって CR 飼料用カブ「Siloga」に由来する遺伝子座 *Crr1*, *Crr2* が同定された (Suwabe *et al.* 2006)。*Crr1* は単独でも抵抗性を付与するが、*Crr2* と共存することでより宿主範囲の広い菌株にも抵抗性を示す。我々は DNA マーカーの利用によって 2 つの遺伝子座を効率的に導入し「はくさい中間母本農 9 号 (PL9)」を育成した。また、同様の手法で既存の一代雑種品種の両親系統に *Crr1* と *Crr2* を導入し、抵抗性レベルを向上した一代雑種品種「あきめき」を実質 4 年間で育成した (松元ら 2012)。「あきめき」は、*Crr1*, *Crr2* および戻し親に由来する *CRb* の 3 つの遺伝子をもつ品種である。この成果は、エリートラインに DNA マーカー選抜で CR 遺伝子を導入することが効果的であることを示しており、同様の手法で「CR 寒次郎」が育成された (松元ら 2017)。

*B. rapa* では 8 つ以上の CR 遺伝子座が同定されているが (Hirai 2006)、CR 遺伝子の異同や病原型特異性が不明瞭であり育種を困難にしていた。近年 CR 遺伝子の単離が進められることで、徐々に病原型との対応関係が明らかになってきている (表 1)。*Crr1* をクローニングする過程で、この座には *Crr1a* と *Crr1b* の 2 つの遺伝子が存在することが示唆された (Suwabe *et al.* 2012)。*Crr1a* は単独で病原型グループ 2, 4 に抵抗性を付与する遺伝子であり (Hatakeyama *et al.* 2013)、*Crr1b* は、単独では抵抗性

を付与しないが、*Crr2* と共存することでグループ 1, 2, 4 に抵抗性を付与することが明らかになった。また、*CRb* をクローニングしたところ、*CRa* (Ueno *et al.* 2012) と同じ遺伝子であることが示された (Hatakeyama *et al.* 2017)。このように CR 遺伝子側からの解析は進められているものの、病原型の分化についての解析は進んでいない。より詳細な病原型-CR 遺伝子間対応関係の解明には病原体側からの解析も必要であると考えられる。

本研究の一部は農林水産省次世代ゲノム基盤プロジェクト (HOR1002) の支援を受けて行った。

## 演題 8 アブラナ科野菜の市販品種およびキャベツ固定系統における萎黄病抵抗性遺伝子の多型解析

岡崎桂一 (新潟大学農学部)

萎黄病菌では、*B. oleracea* と *B. rapa* に感染する *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *B. rapa* に選択的に感染する *F. oxysporum* f. sp. *rapae* など、宿主特異性や病原性を異にする複数の分化型が同定されている。*F. oxysporum* は耐久性のある厚膜胞子を形成するため、土壌中でも長期間の生存が可能で輪作や薬剤による防除が困難な病気である。キャベツ萎黄病の被害報告は、1963 年ごろから全国的に見られるようになり、1967 年に愛知県、東京都の主産地で発生し大きな被害を与えた (飯島 1971)。これを受けて、アメリカで開発された萎黄病抵抗性品種が導入され、日本での萎黄病抵抗性 (YR) 育種が開始され、キャベツ主産地での被害抑制に貢献した。このとき導入された抵抗性素材は、Type A と呼ばれる単因子優性遺伝子による抵抗性遺伝子であった。Type A 抵抗性は高温条件下でも安定的な抵抗性を示し、導入以来半世紀以上にわたり、キャベツの安定生産に寄与している。しかし、Type A 遺伝子の実体が不明であるほか、現在、市販品種の何割がその遺伝子を保有しているかなど、萎黄病抵抗性育種に関連して解明すべき課題となっていた。



そこで、DNA マーカー選抜をアブラナ科野菜の YR 育種へ普及すべく、我々は、萎黄病 Type A 抵抗性遺伝子のクローニングや多型解析を行ってきた。ここでは、その経過を報告する。

我々は、萎黄病抵抗性キャベツ品種「安寿」由来の萎黄病抵抗性が単因子優性遺伝子によって制御されることを遺伝解析によって明らかにし、この遺伝子座を *FocBo1* と名付けた (Pu *et al.* 2012)。さらに *FocBo1* 座のファインマッピングとマップベースクローニングにより *FocBo1* が同定され、*B. rapa* では RNA-sequencing 法を用いた抵抗性と感受性系統間の Differential 転写解析により萎黄病遺伝子 (*FocBr1*) を同定した (Shimizu *et al.* 2014, 2015)。塩基配列解析から、両遺伝子はオルソログな遺伝子であり、TIR-NBS-LRR 型の抵抗性遺伝子であることがわかった。*B. oleracea* の市販品種、および近交系の解析を行ったところ、1つの抵抗性アレルと3つの感受性アレルが明らかになった。感受性アレル *focbol-1* は exon4 に 1 bp の挿入が見られ、かつ exon10 が欠失していた。*focbol-2* は exon5 に 10 bp の欠失があり、*focbol-3* は exon8 の途中からそれ以降の部分が大きく欠失していた。これらの感受性アレルを識別するプライマーセットを作成し、固定系統、134 系統と市販の 78 品種において、*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* の接種試験による表現型解析と DNA マーカー選抜の結果を比較したところ、完全に一致した。134 系統の内訳は、77 系統が抵抗性で、57 系統が感受性であった。市販品種では、41 品種が抵抗性で、57 品種が感受性であった。このように、*FocBo1* DNA マーカーの判定精度が高いことが明らかになった。また、市販キャベツ品種では、抵抗性遺伝子を持つものは4割ほどであり、本研究で開発した抵抗性遺伝子マーカーを用い、YR 育種の拡充を図る必要があると思われる。

*B. rapa* に属するハクサイ (13 品種)、チンゲンサイ (13 品種)、コマツナ (20 品種)、カブ (14 品種) においても、接種試験と *FocBr1* DNA マーカーを用いた遺伝子判定を行った。その結果、遺伝子解析と *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* の接種試験による表現型解析が完全に一致した。また、検定した 60 品種のうち、感受性品種はチンゲンサイの 2 品種とコマツナの 2 品種のみであり、その他の品種はすべて抵抗性遺伝子を持っていた。*B. rapa* については、感受性アレルのマーカーを作成しておらず、現状では、抵抗性ホモとヘテロを区別することができない。育種の過程では、抵抗性ホモとヘテロを区別する必要があり、今後の課題である。

本研究の一部は、平成 24-26 年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、平成 28 年度マッチングプランナープログラム「企業ニーズ解決試験」の支援を受けて実施した。

## おわりに

本ワークショップでは、アブラナ科植物を用いた研究者のネットワーク構築のきっかけと、応用と基礎研究の隔たりを再認識し、お互いがどのように協力できるかを議論する場を作れたのではないかと考える。*B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus* のリファレンスゲノムが公開され、世界的にも研究の進展が著しく、生産現場サイドが最新の研究成果を把握するには、これまで以上に努力が必要となってくると考えられる。同様に、大学の研究者が現場を知る機会も必要である。この意味で、学会でのワークショップが果たす役割が大きいが、依然として両者の隔たりは大きく、効果的な解決方法が見出された訳ではない。このような機会を継続して設けることで、より良い方向性が見出されればと期待する。また、国内での共同研究体制の構築は、国際的な競合に対抗する方法の一つとなると考えられ、本ワークショップをきっかけに少しでも共同研究の輪が広がることを願う。

## 謝 辞

本ワークショップで座長を引き受けていただきました、高田美信氏 (東北大) と板橋悦子氏 (農研機構) に感謝致します。

## 引用文献

- Fujii, S., K. Kubo and S. Takayama (2016) Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nat. Plants* 2: 16130.
- 藤本 龍・西尾 剛 (2008) アブラナ科自家不和合性の分子生物学的研究の現状と展望. *育種学研究* 10: 1-9.
- 藤本 龍・石川 亮 (2010) エピジェネティクスが制御する植物の形質. *育種学研究* 12: 123-131.
- Fujimoto, R., T. Sasaki, R. Ishikawa, K. Osabe, T. Kawanabe and E.S. Dennis (2012) Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 9900-9922.
- Grandbastien, M.A. (2004) Stress activation and genomic impact of plant retrotransposons. *J. Soc. Biol.* 198: 425-432.
- Hatakeyama, K., M. Fujimura, M. Ishida and T. Suzuki (2004) New classification method for *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F<sub>1</sub> cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. *Breed. Sci.* 54: 197-201.
- Hatakeyama, K., K. Suwabe, T. Kato, R.N. Tomita, T. Nunome, H. Fukuoka and S. Matsumoto (2013) Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *PLoS ONE* 8: e54745.
- Hatakeyama, K., T. Niwa, T. Kato, T. Ohara, T. Kakizaki and S. Matsumoto (2017) The tandem repeated organization of NB-LRR genes in the clubroot-resistant *CRb* locus in *Brassica rapa* L. *Mol. Genet. Genomics*. In press.
- Hirai, M. (2006) Genetic analysis of clubroot resistance in *Brassica* crops. *Breed. Sci.* 56: 223-229.



- 飯島 勉 (1971) カイラン萎黄病の防除に関する試験. 東京農試研報 5: 7-36.
- Ito, H., H. Gaubert, E. Bucher, M. Mirouze, I. Vaillant and J. Paszkowski (2011) An siRNA pathway prevents trans-generational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472: 115-119.
- Ito, H., T. Yoshida, S. Tsukahara and A. Kawabe (2013) Evolution of the *ONSEN* retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene* 518: 256-261.
- Iwano, M., K. Ito, S. Fujii, M. Kakita, H. Asano-Shimosato, M. Igarashi, P. Kaothien-Nakayama, T. Entani, A. Kanatani, M. Takehisa *et al.* (2015) Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nat. Plants* 1: 15128.
- Kawanabe, T., S. Ishikura, N. Miyaji, T. Sasaki, L.M. Wu, E. Itabashi, S. Takada, M. Shimizu, T. Takasaki-Yasuda, K. Osabe *et al.* (2016a) Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E6704-E6711.
- Kawanabe, T., K. Osabe, E. Itabashi, K. Okazaki, E.S. Dennis and R. Fujimoto (2016b) Development of primer sets that can verify the enrichment of histone modifications, and their application to examining vernalization-mediated chromatin changes in *Brassica rapa* L. *Genes Genet. Syst.* 91: 1-10.
- 松元 哲・畠山勝徳・高下新二・宮崎俊夫・近藤友宏 (2012) DNA マーカー選抜による根こぶ病と黄化病に抵抗性のハクサイ新品種「あきめき」の育成. 農林水産技術研究ジャーナル 35(5): 61-64.
- 松元 哲・畠山勝徳・高下新二・宮崎俊夫・近藤友宏 (2017) 2つの根こぶ病抵抗性遺伝子 (*Crr1*, *Crr2*) を有するハクサイ中晩生 F<sub>1</sub> 品種「CR 寒次郎」の育成, 農研機構研究報告・野菜花き研究部門 印刷中.
- Nakamura, I., Y. Onoda, N. Matsushima, J. Yokoyama, M. Kawata and K. Hikosaka (2011) Phenotypic and genetic differences in a perennial herb across a natural gradient of CO<sub>2</sub> concentration. *Oecologia* 165: 809-818.
- Nasrallah, M.E., P. Liu, S. Sherman-Broyles, N.A. Boggs and J.B. Nasrallah (2004) Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: Implications for the evolution of selfing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16070-16074.
- Oguchi, R., H. Ozaki, K. Hanada and K. Hikosaka (2016) Which plant trait explains the variations in relative growth rate and its response to elevated carbon dioxide concentration among *Arabidopsis thaliana* ecotypes derived from a variety of habitats? *Oecologia* 180: 865-876.
- Pu, Z.J., M. Shimizu, Y.J. Zhang, T. Nagaoka, T. Hayashi, H. Hori, S. Matsumoto, R. Fujimoto and K. Okazaki (2012) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in *Brassica oleracea*. *Mol. Breed.* 30: 809-818.
- 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) Identification of candidate genes for Fusarium yellows resistance in Chinese cabbage by differential expression analysis. *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) Map-based cloning of a candidate gene conferring Fusarium yellows resistance in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 128: 119-130.
- Suwabe, K., H. Tsukazaki, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Kondo, M. Fujimura, T. Nunome, H. Fukuoka, M. Hirai and S. Matsumoto (2006) Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* 173: 309-319.
- Suwabe, K., G. Suzuki, T. Nunome, K. Hatakeyama, Y. Mukai, H. Fukuoka and S. Matsumoto (2012) Microstructure of a *Brassica rapa* genome segment homoeologous to the resistance gene cluster on *Arabidopsis* chromosome 4. *Breed. Sci.* 62: 170-177.
- Takeuchi, H. and T. Higashiyama (2012) A species-specific cluster of defensin-like genes encodes diffusible pollen tube attractants in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 10: e1001449.
- Tonosaki, K., K. Michiba, S.W. Bang, H. Kitashiba, Y. Kaneko and T. Nishio (2013) Genetic analysis of hybrid seed formation ability of *Brassica rapa* in intergeneric crossings with *Raphanus sativus*. *Theor. Appl. Genet.* 126: 837-846.
- Tonosaki, K., K. Osabe, T. Kawanabe and R. Fujimoto (2016) The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed. Sci.* 66: 333-349.
- Tsuchimatsu, T. and K.K. Shimizu (2013) Effects of pollen availability and the mutation bias on the fixation of mutations disabling the male specificity of self-incompatibility. *J. Evo. Biol.* 26: 2221-2232.
- Ueno, H., E. Matsumoto, D. Aruga, S. Kitagawa, H. Matsumura and N. Hayashida (2012) Molecular characterization of the *CRA* gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Mol. Biol.* 80: 621-629.
- Wang, T.L., C. Uauy, F. Robson and B. Till (2012) TILLING in extremis. *Plant Biotechnol. J.* 10: 761-772.
- Yamamoto, M., T. Tantikanjana, T. Nishio, M.E. Nasrallah and J.B. Nasrallah (2014) Site-specific N-glycosylation of the S-locus receptor kinase and its role in the self-incompatibility response of the Brassicaceae. *Plant Cell* 26: 4749-4762.

## 当日 演題

はじめに 藤本 龍 (神戸大学大学院農学研究科)

### 講演

#### 1. ハクサイにおけるエピゲノム解析

藤本 龍<sup>1</sup>, 高橋聡史<sup>2</sup>, 板橋悦子<sup>1</sup>, 鈴木 稔<sup>3</sup>, 関 原明<sup>2</sup> (<sup>1</sup>神戸大, <sup>2</sup>理研, <sup>3</sup>東大)

#### 2. ダイコンのグルコシノレート合成経路の解明と育種への利用

柿崎智博, 吹野伸子, 板橋悦子, 小原隆由, 石田正彦 (農研機構 野菜花き研究部門)

3. 形質転換シロイヌナズナを用いた自家不和合性研究  
山本雅也<sup>1</sup>, 西尾 剛<sup>1</sup>, Nasrallah June<sup>2</sup> (1. 東北大院・農学研究科, 2. Cornell Univ. Sec. of Plant Sci.)
4. アブラナ科植物の受粉の生理・進化ダイナミクス  
藤井壮太, 五十嵐元子, Tangpranomkorn Surachat, 高山誠司 (奈良先端・バイオサイエンス)
5. アブラナ科植物における高温活性型トランスポゾンの解析とその応用  
伊藤秀臣 (北大・院理学)
6. 自然変異に学ぶ適応のしくみ：アブラナ科植物の種内変異を用いたアプローチ  
彦坂幸毅<sup>1,2</sup> (1. 東北大学大学院生命科学研究科, 2. CREST, JST)
7. ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離と育種への応用  
畠山勝徳 (岩手大学農学部)
8. アブラナ科野菜の市販品種およびキャベツ固定系統における萎黄病抵抗性遺伝子の多型解析  
岡崎桂一 (新潟大学農学部)

総合討論