



Genome-wide analysis of histone modifications in heterotic hybrid and its parental lines of Chinese cabbage

HASAN MEHRAJ

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Date of Publication)

2023-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8369号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008369>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏名 HASAN MEHRAJ専攻・講座 資源生命科学専攻・応用植物学講座

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Genome-wide analysis of histone modification in heterotic hybrid and its parental lines of Chinese cabbageハクサイのヘテロシスを示す F₁ とその親系統を用いたゲノムワイドなヒストン修飾解析指導教員 藤本 龍

Brassica rapa is a diploid (AA genome) thought to be one of the ancestral species of both *B. juncea* (AABB genome) and *B. napus* (AACC) through genome merging (allotetrapolyploidization). Complex genome restructuring and epigenetic alterations are thought to be involved in these allotetrapolyploidization events. Chinese cabbage (*B. rapa* var. *pekinensis*) is an economically important leafy vegetable. Heterosis is the superiority of the F₁ hybrid compared with its parental lines, which is important for crop breeding. The molecular mechanism of heterosis might regulate by the modifications of chromatin marks. At first, two active histone marks (H3K4me3 and H3K36me3) were characterized in the parental lines (female parent; RJKB-T24, and male parent; RJKB-T23) and were reported the distribution in 14-day leaves in two lines of *Brassica rapa* L. by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq). Both lines were enriched with H3K4me3 and H3K36me3 marks at the transcription start site, and the transcription level of a gene was associated with the level of H3K4me3 and H3K36me3. H3K4me3- and H3K36me3-marked genes showed low tissue-specific gene expression, and genes with both H3K4me3 and H3K36me3 had a high level of expression and were constitutively expressed. Bivalent active and repressive histone modifications such as H3K4me3 and H3K27me3 marks or antagonistic coexistence of H3K36me3 and H3K27me3 marks were observed in some genes. Expression may be susceptible to changes by abiotic (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *Foc*) and biotic (vernalization) stresses in genes having both H3K4me3 and H3K27me3 marks. We showed that the presence of H3K36me3 marks was associated with different gene expression levels or tissue specificity between paralogous paired genes, suggesting that H3K36me3 might be involved in subfunctionalization of the subgenomes. These results suggested that covalent modifications of histone proteins act as epigenetic regulators of gene expression. The F₁ hybrid showed heterosis compared to its parental lines in different phenotypes at early and final yield stages of Chinese cabbage, suggesting the fitness of the current genetic materials for heterosis study. H3K4me3-, H3K9me2-, H3K27me3- and H3K36me3-marks through the genome of F₁ hybrid and its parental lines were then examined by ChIP-seq. Differentially modified histone marked genes (DMGs) were identified for all four histone marks, and parental lines had a difference in genes having DMGs. A small number of genes showed F₁ hybrid-specific histone modification. For all four histone marks, most DMGs of between F₁ hybrid and each of parental line showed high-parent specific pattern while a small subset of DMGs showed intermediate or low parent pattern, suggesting that high parent-specific inheritance of histone marks might be associated with the heterotic growth in Chinese cabbage F₁ hybrid.

(氏名: HASAN MEHRAJ NO. 2)

Long noncoding RNAs (lncRNAs) are RNA fragments that generally do not code for a protein but are involved in epigenetic gene regulation. lncRNAs of *B. rapa* were classified into long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs), natural antisense RNAs (NATs), and intronic noncoding RNAs (incRNAs) and their expression analyzed in relation to H3K27me3 marks. lncRNA did not overlap greatly with H3K27me3 marks, but the expression level of intronic noncoding RNAs that did coincide with H3K27me3 marks was higher than without H3K27me3 marks. Both H3K4me3 and H3K36me3 marks were enriched in chromatin regions encoding lncRNAs, especially around the transcription start site. The transcription level of lincRNAs was positively associated with the level of H3K4me3 and H3K36me3, while this association was not observed in NATs and incRNAs. Using previous datasets of *Foc* inoculation and paired genes overlapping lncRNAs, 12 mRNA and NAT pairs in 14-day leaves in RJKB-T24 were identified and examined the H3K4me3, H3K36me3, and H3K27me3 marks. Three pairs did not have any histone modifications, one pair had only H3K4me3 or H3K27me3 and four pairs had H3K4me3 and H3K36me3. Two pairs (Bra016382/MSTRG.19710 and Bra033549/MSTRG.1355) had bivalent active and repressive histone modifications H3K4me3 and H3K27me3. This result suggests that the bivalent modification might have some role in the transcriptional regulation in biotic stress. The outcomes of my dissertation provide significant insights into the epigenetic mechanisms of heterosis in *B. rapa*.

氏名	HASAN MEHRAJ		
論文 題目	Genome-wide analysis of histone modifications in heterotic hybrid and its parental lines of Chinese cabbage ハクサイのヘテロシスを示す F ₁ とその親系統を用いたゲノムワイドなヒストン修飾解析		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	藤本 龍
	副 査	教授	安田 剛志
	副 査	教授	宇野 雄一
	副 査		
	副 査		
要 旨			
<p><i>Brassica rapa</i> 種に属するハクサイ、コマツナ、カブ等のアブラナ科野菜の育種において、雑種強勢は重要な形質である。雑種強勢とはある特定の両親系統を交雑して得られた雑種第一代 (F₁) が収量等の形質において両親系統よりも優れる現象のことである。多くの農作物で、雑種強勢の特性を利用して収量性を向上させた F₁ 品種が育成されており、アブラナ科野菜の国内品種においては、90%以上が F₁ 品種である。雑種強勢を示す親の組合せは、交雑した F₁ を栽培して評価するまで決定することができないため、多くの組合せ交配が必要となり、多くの時間、労力、コストを要している。雑種強勢を示す親系統を効率的に選抜する方法を開発するためには、雑種強勢の分子機構の理解が必要となる。様々な植物種で雑種強勢の分子機構の解明を目的として遺伝学的解析やオミクス解析が行われており、遺伝子発現制御に重要な役割を担うエピゲノムに着目した研究も行われている。アブラナ科野菜ではエピゲノム研究の報告例が少なく、ヒストン修飾に着目した雑種強勢研究の報告がなかった。本学位論文は、<i>B. rapa</i> においてヒストン修飾に着目してエピゲノム情報、エピゲノムが遺伝子や長鎖非コード RNA の転写に及ぼす影響、さらにヒストン修飾が雑種強勢に及ぼす役割を明らかにすることを目的とし、その成果を取りまとめたものである。</p> <p>第1章では、植物におけるエピジェネティクス研究、非コードRNAに関する研究、雑種強勢研究について、今までの研究知見をまとめている。</p> <p>第2章では、転写活性型の修飾として知られる H3K4me3 と H3K36me3 について、ゲノム全体での修飾状態を明らかにした。ハクサイの近交系2系統の播種後14日の本葉について、H3K4me3 と H3K36me3 の抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。ChIP-seq 解析により、H3K4me3 と H3K36me3 を有する遺伝子を同定した。H3K4me3 と H3K36me3 を有する遺伝子は発現レベルが高くなる傾向が見られたことから、これらの修飾は <i>B. rapa</i> においても転写活性化の役割を担っていると結論づけた。また、遺伝子発現の組織特異性の指標である T-value を用いて、H3K4me3 と H3K36me3 を有する遺伝子の組織特異性を調べた結果、これらの修飾を有する遺伝子は組織特異性が低い、つまり恒常的な発現を示す傾向が見られた。<i>B. rapa</i> 種ではゲノムの3倍体化が生じていることが知られており、3つのパラログを有する遺伝子が多く存在する。パラログ間で H3K4me3 の有無と遺伝子発現レベルに関連性は見られなかったが、H3K36me3 では修飾を有しているパラログの発現レベルが修飾を有していないパラログの発現レベルよりも高くなる傾向が見られた。このことから、パラログ間に見られる遺伝子発現レベルの違いには、H3K36me3 の修飾が関わっており、パラログ間の発現分化に重要な役割を担っている可能性が示された。本研究結果と H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq の結果を比較したところ、転写活性型の H3K4me3 と転写抑制型の H3K27me3 の両方の修飾を有する Bivalent クロマチン構造を構築している遺伝子を同定し、これらの遺伝子は病原菌感染や低温処理によって発現が変動する傾向が見られた。このことから、Bivalent クロマチン構造はストレスにおいて発現が変動しやすい構造である可能性が示唆された。</p>			

氏名	HASAN MEHRAJ
<p>第3章では、ハクサイの市販 F₁ 品種とその両親系統について、生育初期と収穫期の形質について調べ、雑種強勢は播種後数日で現れることや、収量においても雑種強勢が見られることを明らかにした。そして、F₁ 品種の播種後 14 日の本葉を用いて、転写活性型 (H3K4me3 と H3K36me3) と転写抑制型 (H3K9me2 と H3K27me3) の抗体を用いた ChIP-seq 解析を行い、ヒストン修飾状態について F₁ と両親系統で比較した。4 つのヒストン修飾について、3 系統間 (F₁, 父親系統, 母親系統) でヒストン修飾レベルが異なる遺伝子を同定した。3 系統間の比較では、4 種類のヒストン修飾全てにおいて、両親系統間でヒストン修飾レベルが異なる遺伝子の数が最も多かった。また、両親系統と F₁ の比較では、F₁ のヒストン修飾レベルが親系統よりも高くなる傾向が見られた。4 種類のヒストン修飾において、F₁ では相加的なヒストン修飾パターンを示す遺伝子が大半であるが、非相加的なヒストン修飾パターンを示す遺伝子は、F₁ のヒストン修飾レベルが、ヒストン修飾レベルが高い方の親系統と同レベルである High parent dominance を示す傾向が見られた。一方、F₁ 特異的なヒストン修飾を示す遺伝子はほとんど見られなかった。以上より、F₁ では、どちらか一方の親のヒストン修飾状態を示す傾向があり、このようなバランスが雑種強勢の発現に重要な役割を担っている可能性が示唆された。アブラナ科野菜を用いてヒストン修飾と雑種強勢との関連性について調べた報告はないことから、本章は、アブラナ科野菜の雑種強勢研究において重要な知見をもたらしたと考えられる。</p>	
<p>第4章と第5章では、タンパク質に翻訳されない 200 スクレオチド以上の RNA である長鎖非コード RNA をコードするゲノム領域について、DNA メチル化とヒストン修飾状態について調べた。長鎖非コード RNA をコードするゲノム領域の DNA メチル化レベルはゲノム全体の DNA メチル化レベルと同程度であった。トランスポゾン様配列を含む inverted repeat regions (IRRs) 領域と長鎖非コード RNA をコードするゲノム領域が重複する領域は DNA メチル化レベルが高かった。H3K27me3 領域と重複する長鎖非コード RNA をコードする領域の割合は、遺伝子領域と H3K27me3 領域が重複する割合に比べて低かった。また、長鎖非コード RNA をコードする領域に H3K27me3 の修飾が見られても発現レベルが低下する傾向は見られなかった。H3K4me3 および H3K36me3 において、long intergenic noncoding RNAs をコードする領域ではこれらの修飾を有すると転写レベルが高くなる傾向が見られたが、natural antisense RNAs や intronic noncoding RNAs をコードする領域ではこれらの修飾を有していても転写レベルが高くなる傾向は見られなかった。以上の結果から、長鎖非コード RNA の発現におけるエピジェネティックな修飾の役割は遺伝子発現におけるエピジェネティックな修飾の役割とは異なる可能性が示唆された。ゲノム解析では、長鎖非コード RNA はアブラナ科の近縁種間では保存性が低いが、同一種内の系統間では保存性が高いことが明らかとなった。本章では、長鎖非コード RNA のゲノム領域について、<i>B. rapa</i> のエピゲノム構造を包括的に解析し、エピジェネティックな修飾を持つ長鎖非コード RNA 領域を網羅的に同定することに成功した。</p>	
<p>第6章では、第2章から第5章で得られた結果を総合的に考察することで、エピジェネティックな修飾が遺伝子あるいは長鎖非コード RNA の発現に及ぼす影響についてまとめた。</p>	
<p>本研究は、ハクサイのエピジェネティクスや雑種強勢について研究したものであり、エピジェネティクスの遺伝子及び長鎖非コード RNA の発現制御機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の HASAN MEHRAJ は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。</p>	