

遺伝子の発現の変化と関連付けて

高温ストレス耐性をもつチンゲンサイの品種を創出する

広島県立西条農業高等学校 自然科学部

村上和弥 加藤大芯 井上友貴 上垣内豪太 佐々木親之 西原彩

研究背景

チンゲンサイやキャベツなどの葉茎菜類を中心とした野菜の品種の多くは、今後の地球温暖化による猛暑や乾燥に耐えることが難しいと予想される。申請者のある生徒の家は、農業を営む専業農家だが、昨年の夏、猛暑によって父が栽培していた野菜が高温障害を引き起こし、その時期の収量が45%程度減少してしまった。気候変動に関する政府間パネル(IPCC)報告書によると、今後の日本は21世紀中に1.5~2度上昇すると考えられている。そのため、高温ストレス耐性の高い品種の開発・普及は、今後の日本の農業を救う一助になるはずである。地道な播種や栽培の努力によって、高温ストレス耐性の高い品種をつくることも可能ではあるが、遺伝子発現との関連性を把握することで、成長率などに現れる見た目だけでなく、遺伝的に耐性を獲得した個体を確実に発見することができる。また、ゲノム編集技術を活用するなどにより、より確実かつスピーディーに高温ストレス耐性品種の創出・普及につなげることもできると考え、本活動の計画に至った。

研究目的

チンゲンサイの高温栽培時における遺伝子の発現量の変化を調べ、より高い耐暑性をもつ個体を発見し、新品種構築の新たな手法を開発する。

実験方法

〔Ⅰ〕高温栽培時におけるチンゲンサイの播種のしかたの最適な条件を見つける

材料 チンゲンサイの種（原種）、JAの土、育苗トレイ、ビニールハウス

時期 2024年8月

手順

1. チンゲンサイの種（原種）を育苗トレイ（72穴）の各セルに、1~3粒蒔き（それぞれ24穴ずつ）と条件を変えて播種した。



図 1 育苗トレイへの播種の様子

2. 日中 35°C以上の高温環境に近づけるため、ビニールハウス内に育苗トレイを入れた。
3. 播種 5 日間、育苗トレイ内の各セルの発芽率を調べた。

〔Ⅱ〕 高温ストレス環境でのチンゲンサイの種の発芽率と苗の成長率を明らかにする。

材料 チンゲンサイの種（原種）、JA の土、育苗トレイ、人工気象器、恒温室

時期 2024 年 9 月～12 月

手順

1. チンゲンサイの種を育苗トレイの 30 穴に 3 粒蒔きの条件で播種した。実験Ⅰの結果より、3 粒蒔きの条件で実験することを決定した。この育苗トレイを 2 つ作成した。
2. 片方のトレイは、人工気象器内に入れ、37°Cの条件で種を発芽させた。もう一方のトレイは、25°Cの恒温室の日当たりの良い場所に入れ、種を発芽させた。
3. 播種 2 週間、各栽培条件の種の発芽率と成長の様子を調べた。

〔Ⅲ〕 高温条件で発芽・成長したチンゲンサイ個体の RNA-seq とその解析

材料 〔Ⅱ〕で発芽成長した個体、RNA 抽出キット、RNase クワイエット、逆転写酵素、次世代シーケンサー、ホモジナイザー、マイクロピペット、マイクロチップなど

時期 2024 年 12 月～現在

手順 広島大学ゲノム編集イノベーションセンターで実施

1. 〔Ⅱ〕で発芽成長した個体を育苗トレイから 37°Cで発芽成長した個体と 25°Cで発芽成長した個体をそれぞれ採取した。採取した個体の大きさは、同程度のものを選んだ（図 2）。



図 2 広島大学施設内にて RNA 抽出法の説明を受ける様子

2. それらの個体を刻み、ホモジナイザーで破碎して、RNA 抽出をそれぞれ行った（図 3）。
3. RNA 抽出後は、次世代シーケンサーによって RNA-seq を行い、各個体が持つ全 RNA の塩基配列情報とそれらをコードする遺伝子を同定した情報入手した。
4. 入手した配列情報を解析し、高温条件下で発現量に変化する RNA 配列とその配列をコードする遺伝子を調べた。

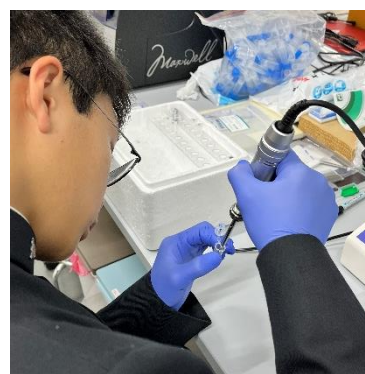


図 3 ホモジナイズの様子

実験結果

〔Ⅰ〕 高温栽培時におけるチンゲンサイの播種のしかたの最適な条件を見つける

実験の結果、24 穴ずつある 1～3 粒蒔きのそれぞれの播種条件におけるチンゲンサイの種の発芽率を表にまとめた（表 1）。

表 1 育苗トレイにおけるチンゲンサイの種の発芽率



表 1 より、高温条件のビニールハウス内で 3 粒蒔きの条件下において、チンゲンサイの種の発芽率が最も高かった（75%、18 穴/24 穴中）。一方、他の条件では 2 粒蒔きの条件が最も発芽率が悪く（33.3%、8 穴/24 穴中）、1 粒蒔きの条件が 2 番目に発芽率が高かった（54.2%、13 穴/24 穴中）。

以上の結果より、今後の実験では 3 粒蒔きの条件でチンゲンサイの種を播種することとした。

〔Ⅱ〕 高温ストレス環境でのチンゲンサイの種の発芽率と苗の成長率を明らかにする。

37℃および 25℃の条件下で発芽・成長した個体の記録と、育苗トレイのようすは以下の図のようになった。37℃の高温条件下でも 30 穴に 3 粒蒔きの条件で播種すれば、5 穴（16.7%）において発芽・成長する個体がみられることがわかった。一方、25℃の適温条件下では、28 穴（93.3%）において発芽・成長する個体がみられた。最大伸長個体

は、25℃の適温条件下で 76mm だった。発芽成長した個体のうち、2つの条件で同程度に成長した個体(40mm 程度)のものを1個体ずつ採取し、RNA-seq のサンプルとした。

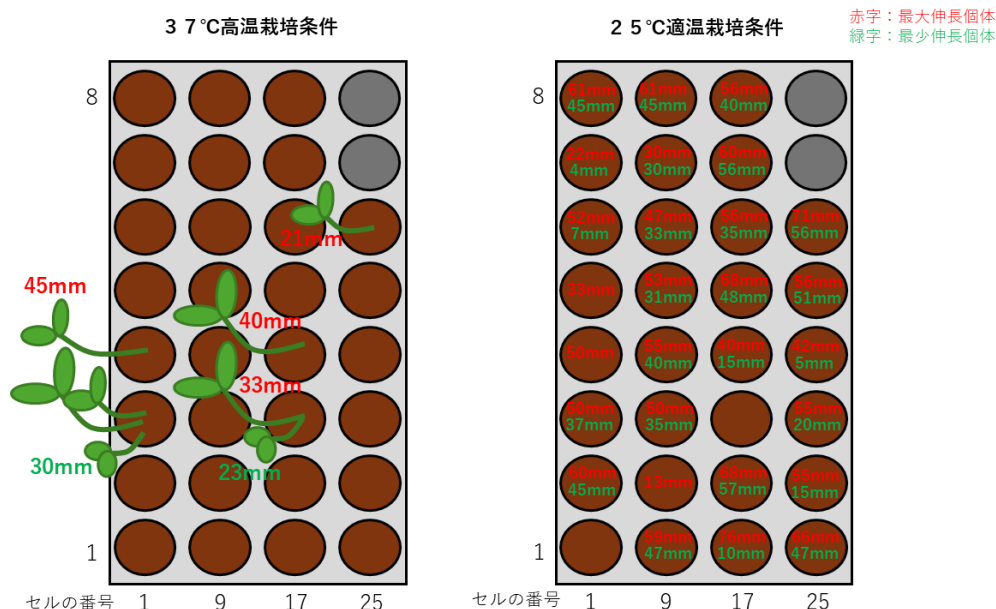


図 4 各条件下におけるチンゲンサイの種の発芽と成長のようす

〔Ⅲ〕 高温条件で発芽・成長したチンゲンサイ個体の RNA-seq とその解析

RNA-seq に使用した個体のようすを図 5 に示した。これらの個体から RNA 抽出を行い、RNA-seq を行った結果、25℃条件の個体において、全部で 6,220,092,887bp と 6,286,544,351bp、37℃条件の個体において全部で 5,731,841,000bp と 5,856,938,757bp の塩基配列を解読し、合計で 139,410 個の RNA 配列情報を入手した。

それらの配列の発現量を TPM 値で表し、25℃と 37℃の条件での各配列の TPM 値の差をもとに、ヒストグラムを作製した(図 6)。その結果、TPM 値が特に大きく変動した配列のうち、100

以上値が大きくなった配列数が 690 個(全体の 0.495%)、小さくなった配列数が 596 個(全体の 0.426%)あった。一方、全体の 99.08%にあたる 138,123 個の配列は、TPM 値が±100 以内の変化であった(図 6 の縦軸は 1,000 までで表示)。



図 5 RNA-seq に使用した個体

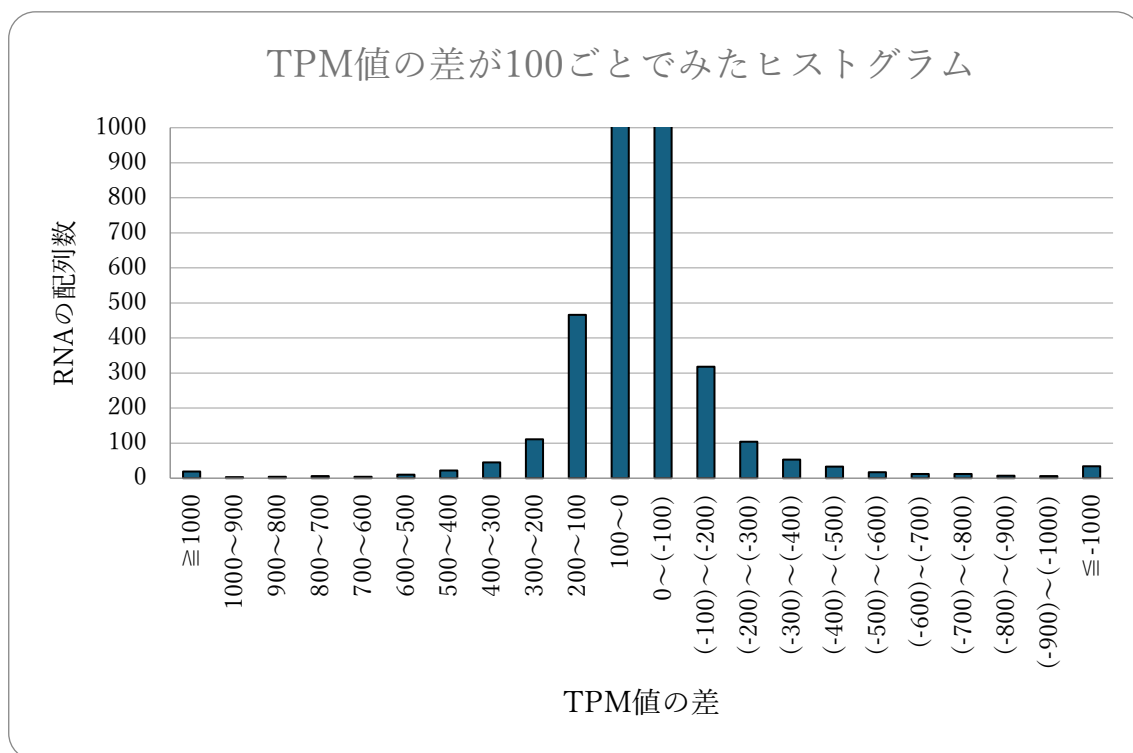


図 6 解説した RNA 配列の TPM 値の変化

TPM 値に大きく変化のあった配列のうち、特に値が上昇した 690 個の配列について、同定作業を行い、機能別に大まかに分類した (図 7)。同定と分類の結果、最も多かったのは機能未決定の配列 (31%) で、その後にタンパク質合成 (転写・翻訳など) に関わる配列 (20%) や光合成や呼吸など代謝に関わる酵素などの配列 (それぞれ 12%、5%、12%) が多くを占めていた。その一方、熱ショックタンパク質やシャペロンタンパク質など熱ストレスに関するタンパク質の配列が 7% あった。

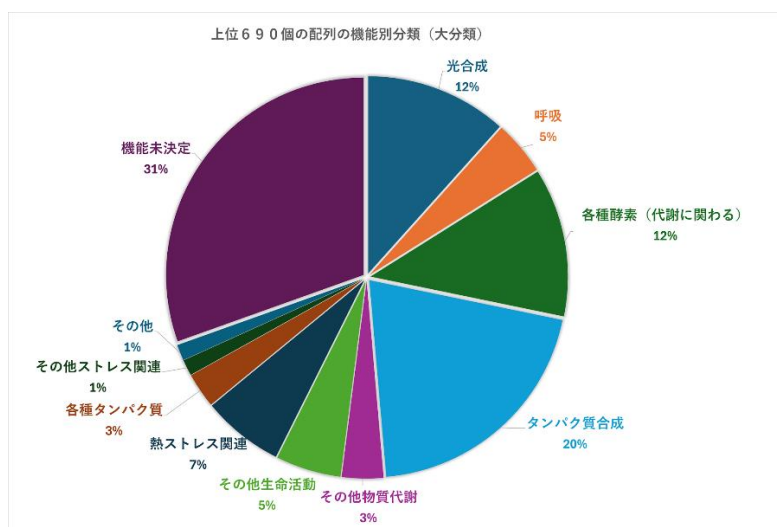


図 7 TPM 値が大きく増加した上位 690 個の配列の機能別分類

また、TPM 値の変化率において変化率の高かった上位 300 配列の同定と機能別の大まかな分類を行った（図 7）。その結果、図 6 の結果と同様に最も多かったのは機能未決定の配列であったが、熱ストレス関連のタンパク質の配列も 4 %程度発見できた。

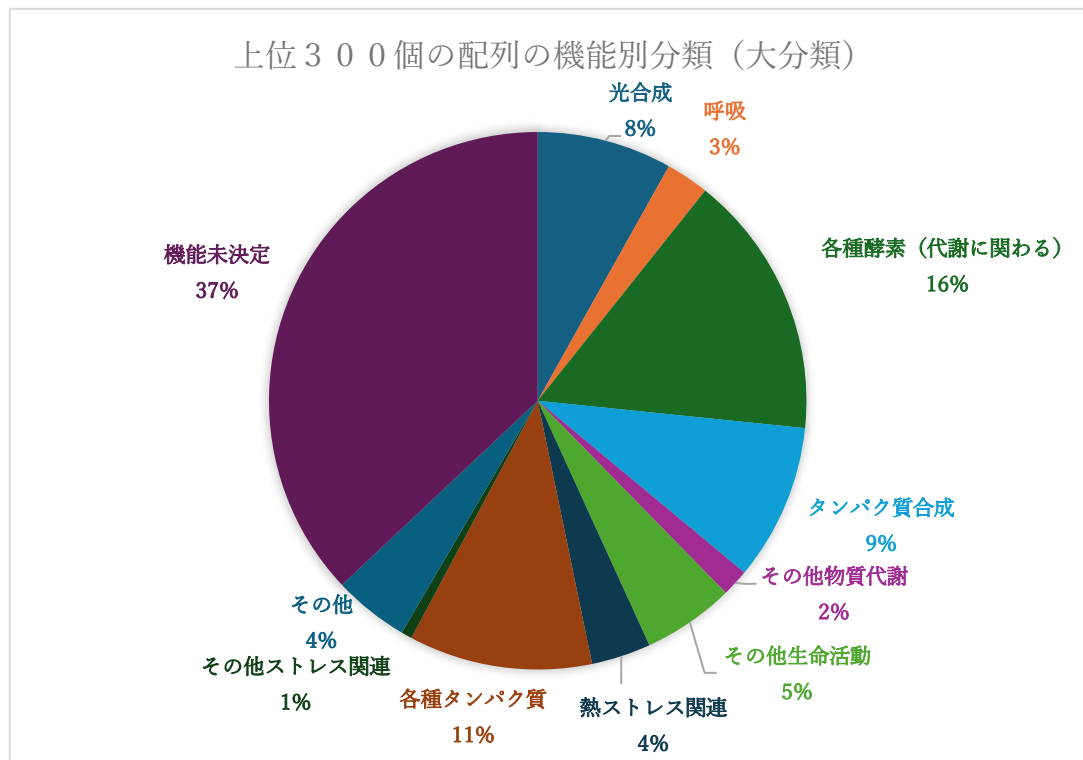


図 8 TPM 値の変動率が高かった上位 300 個の配列の機能別分類

考察と今後の方向性

今回の実験において、高温条件下では、①3 粒蒔きの条件が発芽には向いていること、②割合でみると少ないものの、高温条件で栽培することによって 1,286 個の配列の発現量が大きく変化することがわかった。今後は、約 14 万種の RNA 配列のさらなる解析を進め、数十個の配列を抽出し、それらをターゲットとした定量 PCR を実施する予定である。今回の実験よりもさらに細かい生育段階に分けて遺伝子の発現量解析を行うとともに、栽培実験を継続することで、高い耐暑性をもつ個体の識別につながるターゲット遺伝子を推定したいと考えている。

外部発表

令和7年（2025年）3月16日（日）に安田女子大学で開催された第109回日本生物教育学会広島大会中高生ポスター発表に参加した。全国から参加した様々な研究活動を行っている中学生や高校生、大学教授や教員と研究内容について議論し、様々な知見を得ることができた。



図9 学会での発表のようす

謝辞

本研究の発展に向け、様々なご指導及びご助言をいただいた、（株）プラチナバイオ社の研究員の方々や広島大学教授坊農秀雅先生に、この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- ① 環境省 HP より令和4年11月28日発表「日本の気候の現状について」
- ② 農林水産省 HP より令和6年1月発表「農業分野における気候変動・地球温暖化対策について」
- ③ 北条浩彦編集（2022年）「リアルタイム・デジタルPCR実験スタンダード 実験の原理から検出・定量・診断まで、現場で生きる完全マニュアル」（株式会社羊土社）
- ④ Thermo Fisher 「リアルタイムPCRハンドブック」
- ⑤ 坊農秀雅編集（2023年）「改訂版 RNA-seq データ解析 WET ラボのための超鉄板レシピ ヒトから非モデル生物まで 公共データの活用も充実」（株式会社羊土社）
- ⑥ 坊農秀雅著（2024年）「Dr.Bono のゲノム解説 NGS によるシーケンシングとデータ解析の今」（株式会社 メディカル・サイエンス・インターナショナル）