科研費

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号: 14301

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2015~2017

課題番号: 15K07255

研究課題名(和文)コムギのPpd1座不感光アレルの早生化作用を凌駕する出穂開花遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes that surpass the earliness effect of the photoperiod-insensitive early-flowering allele Ppd-A1a in wheat

研究代表者

中崎 鉄也 (Nakazaki, Tetsuya)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号:60217693

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文):四倍体コムギに着目して新規の早生遺伝子の探索を行った。 エンマーコムギ系統TN26を片親とするRILsを供試した解析からFTのオルソログであるVrn-A3と共分離するQTLを 検出し、のプロモーター領域にGATAbox様配列の挿入をもつVrn-A3座のTN26型アレルが四倍体コムギ品種の早生 化に有用な新規遺伝子であることを見出した。純粋早晩性に関するQTL解析からは、同定できた5A染色体上のQTL について作用特性の解析を進め、このQTLが止葉展開から出穂までの期間に作用することや穂の形態への効果を 併せ持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文): I tried to identify novel flowering genes in tetraploid wheat accessions. I identified an early flowering allele of Vrn-A3 that TN26 (Triticum turgidum L. ssp. dicoccum) harbors by QTL analysis and sequence analysis. From the results of expression analysis it was also suggested that the early flowering trait of TN26 was caused by the cis-element GATAbox at a promoter region of the novel Vrn-A3 allele in TN26. From the results of this study it was suggested that the novel Vrn-A3 insertion allele is useful for breeding of early-flowering durum wheat cultivar. From the investigation for an earliness per se QTL in TN26 I could find unique trait of the QTL, which shortens the duration from flag-leaf expansion to flowering and affects ear shape.

研究分野: 育種学

キーワード: 四倍体コムギ 早生遺伝子 開花経路 Vrn-A3 GATAbox 純粋早晩性QTL

1.研究開始当初の背景

- (1) 三大穀類の一つのコムギにおいて、出 穂開花特性は他の作物と同様に地域適応性 を決定する重要形質である。特に日本におけ る秋播栽培においては登熟期が梅雨と重な り、穂発芽や赤カビ病などの湿害による収量 および品質の低下が問題となっているため、 早生化が重要な育種目標である。この観点か ら、コムギの開花特性を構成する低温要求性、 日長反応性および純粋早晩性の 3 形質 (Yasuda and Yamashita 1965) について多 くの研究がなされており、日長反応性遺伝子 Ppd1 や低温要求性遺伝子 Vrn1、Vrn3 などの 遺伝子座に作用力の大きなアレルが見出さ れている(Whilhelm et al. 2009, Yan et al. 2003, Yan et al. 2006)。 さらに、日本の早 生品種の多くは Pod1 の不感光性アレルによ り早生化されていることが明らかにされて いる (Seki et al. 2011)。
- (2) 研究代表者は、研究開始前に、四倍体 コムギ系統群を用いた解析から、Ppd-A1座に 早生アレルを保有しないにもかかわらず Ppd-A1 早生アレルを保有する系統よりも早 生である多数の系統の存在を確認し、これら の系統の開花特性を解析することによって、 Ppd-A1 早生アレルの早生効果を上回る作用 を有する新規遺伝子が同定・単離できる可能 性を見出した。四倍体コムギは複数の亜種を 含む遺伝的に多様な種であるが、解析が比較 的容易な二倍体コムギや世界的に広く栽培 されている六倍体コムギに比べ解析が進ん でいない。したがって、四倍体コムギ系統群 に未知の有用遺伝子を求める研究は、きわめ て合理的かつ重要であると考えられる。これ らのことから、研究代表者は、四倍体コムギ を材料として育種上重要な新規の早生遺伝 子の同定に関する研究を実施することを構 想した。

2. 研究の目的

- (1) コムギ育種においては、早生化は重要な育種目標であるが、早生化は栄養成長量の減少に連動する傾向があり、収量の低下が懸念される。したがって、コムギの早生化育種を進めるにあたっては、収量低下を伴うことなく早生化を実現しうる遺伝子素材が求められ、多様な開花関連遺伝子を同定・単離してその作用機構を解明し、適切な遺伝子の組み合わせを提示するための研究が重要である。
- (2) 四倍体コムギ Triticum turgidum L. subsp. dicoccum 品種エンマー(TN26)は、Ppd-A1 が感光性晩生アレルであるにもかかわらず、同座に不感光性早生アレルを有する T. turgidum L. subsp. turgidum conv. pyramidale 品種ピラミダーレ(TN28)より早く出穂することから、TN26 は自然日長下で

Ppd-A1 の効果を凌駕する早生遺伝子を保有すること推察される。そこで、本研究では、TN26 が保有する'Ppd-A1 早生アレルの早生効果を上回る作用を有する新規遺伝子'の同定・単離を目指した。TN26 \times TN28 交雑集団(以下、TNRILs)を用いてQTL解析を行い、TN26の早生遺伝子を同定すると共に、同定された遺伝子の発現経路上における作用機構に関する解析、および多様なコムギ品種群における分布に関する解析を行った。また、以前に行われた F_5 世代のTNRILs(以下、TNRILs- F_5)を用いた解析において検出された'TN26型アレルが早生である純粋早晩性QTL'qEpse3に関しても後代検定および機能解析を行った。

3.研究の方法

- (1) TNRILs- F_5 、180 系統および両親系統である TN26 と TN28 を供試した。2013 年の秋に TNRILs- F_5 系統各 1 個体を催芽後、京都大学大学院農学研究科附属農場高槻農場(以下、高槻農場)で栽培し(以下、この作期を 2013A とする)、到穂日数を記録した。。これらの TNRILs- F_5 個体から得られた系統(TNRILs- F_6) 各 5 個体を供試し、2014 年の秋に早播区、標準区および遅播区の 3 作期を設けて高槻農場で栽培し(以下、これら作期をそれぞれ 2014A-1、2014A-2 および 2014A-3 とする)、到穂日数を記録した。また、SSR マーカーを用いて TNRILs- F_5 個体集団のジェノタイピングを行った後、連鎖地図を作成し、CIM 法を適用して到穂日数に関する QTL 解析を行った。
- (2) 圃場条件下における到穂日数に関する QTL 解析の結果、7A 染色体の Vrn-A3 座近傍 領域に TN26 型アレルが早生となる比較的作 用力の大きな QTL が同定された。TN26 および TN28 に関して Vrn-A3 座のシーケンスを行っ たところ、2系統間で Vrn-A3のプロモーター 領域に挿入欠失多型が認められたので、 Vrn-A3 に関する姉妹系統を供試して Vrn-A3 に関する発現解析を行った。すなわち、 TNRILs-F₆集団内の 'Ppd-A1 が感光性アレル で Vrn-A3 座がヘテロである個体 'の次代 F₇ 系統から'Vrn-A3座が挿入型ホモの個体'お よび、欠失型ホモの個体、を選抜し、それぞ れから F。系統を得た(以下、これら系統を SL-in および SL-del とする)。SL-in および SL-del を短日(12時間日長)および長日(16時 間日長)条件下で栽培して日周変化に関する 発現解析を行った。これら個体の第4葉を4 時間おきに6回採取して葉身から全RNAを抽 出し、リアルタイム RT-PCR によって、Ppd1、 WCO1、Tahd1、Vrn1、Vrn-A3および Vrn-B3の 発現量を調査した。
- (3) Vrn-A3 上流域の挿入欠失多型を識別する PCR マーカーを作成し、各倍数性の多様なコムギ系統 268 系統を供試して、挿入型 Vrn-A3 アレルの国内、国外コムギ品種における分布を調査した。

- (4) 六倍体コムギにおける挿入型 Vrn-A3 アレルの早生化効果を調査するため、挿入型 Vrn-A3 アレルを保有する KT19-1 と欠失型 Vrn-A3 アレルを保有する KT19-1 と欠失型 Vrn-A3 アレルを保有する Vrn-A3 アレルを保有する Vrn-A3 アレルを保有する Vrn-A3 アレルを保有する Vrn-A3 アレルを保有する Vrn-A3 アレルの遺伝子型を判別した。また、Vrn-A3 アレルの遺伝子型を判別した。また、Vrn-A3 アレルの遺伝子型を判別した。また、Vrn-B1 をは、Vrn-B1 かよび Vrn-D1 座の遺伝子も分離すると想定されることから Vrn-B1 は伝子型調査を行った。遺伝子座についても遺伝子型調査を行った。
- (5) 以前の研究代表者らの TNRILs-F。系統 を用いた 24 時間日長条件下における QTL 解 析の結果から、2A 染色体、5A 染色体に TN26 が保有する早生の純粋早晩性 QTL が検出され ている(西村ら 2014)。本研究では、これら の QTL のうち比較的作用力の大きい QTL、 qEpse3について、後代検定および機能解析を 行った。*qEpse3* の最近傍マーカーがヘテロで ある TNR ILs-F。個体の後代 F₇を 93 個体供試し た。これらの個体を20 、24 時間日長条件 下で生育させ、第1葉止葉展開日、止葉展開 日、および出穂日を調査し、出穂に至るまで の各期間について、qEpse3のアレル間の差の 有無を検証した。また、この集団においては 穂形態に関して分離が見られたので穂長の 計測を行った。 また、 供試した Fァ個体の中か ら gEpse3 の最近傍マーカーが TN26 型ホモお よびTN28型ホモに固定した系統をそれぞれ3 個体ずつ選抜し、その後代 F。を供試して、 20 、24 時間日長条件下で生育させ、第1葉 展開日および開花日を調査し、開花までの各 期間についての解析を行った。さらに、 RADseg 解析を適用して、新たな SNP マーカー を開発し、qEpse3ファインマッピングの準備 を行った。
- (6) 本研究の調査結果から、qEpse3 が生殖生長期を短縮する効果を有することが示唆されたため、各成育ステージの幼穂長を測定するとともにおよび稲村ら(1955)の評価基準に基づく幼穂発達程度を調査した。

4. 研究成果

(1) TNRILs を供試して行った圃場における到穂日数に関するQTL解析の結果、2A、3B、4A、5A および 7A 染色体にLOD スコアの閾値を超えるピークを示す染色体領域が検出された。いずれの作期においても検出された2A 染色体上のピークは *Ppd-A1* 座の位置に検出され、この QTL は *Ppd-A1* であると考えられた。一方、7A 染色体において検出されたQTLは、2A 染色体上のQTLに次いでLOD値が高く、TN26 型アレルが早生であった。この QTL は2014A-3 以外のすべての作期で検出された。

4A、3B および 5A 染色体上の QTL は、7A 染色体の QTL と比べて LOD 値が低く、作用力も小さかった。本解析の結果、圃場条件下で TN26 を早生化する遺伝要因として 7A 染色体に比較的作用力の大きい QTL が検出されたが、この座の早生効果は Ppd-A1 よりもが小さかったことから、TN26 はこの QTL 以外にも早生遺伝子を保有することが示唆された。

(2) 7A 染色体上には開花制御遺伝子座の一 つである Vrn-A3 座が座乗していることから (Yan et al. 2006)、TN26 および TN28 の Vrn-A3 座のシーケンス解析を行ったところ、 両品種間に多型が検出された。すなわち、 TN26 と TN28 の Vrn-A3 座配列を比較すると、 TATA ボックスと開始コドンに挟まれた領域 に 2 か所の挿入欠失多型 (7 bp および 25 bp) と 1 か所の SNP がみとめられた。また、第 3 エキソンにアミノ酸置換を生じる SNP が存在 することが判明したが、FT タンパクが属する PEBP ファミリーに共通して存在する重要な ドメインにはアミノ酸置換を生じる変異は なかった。転写配列の上流領域についてシス 配列の検索を行ったところ、TN26型アレルが 有する 7 bp の挿入配列は、シロイヌナズナ の開花関連遺伝子 CONSTANS が認識するシス 因子である GATA box を含むものであること が明らかとなった(図1)。

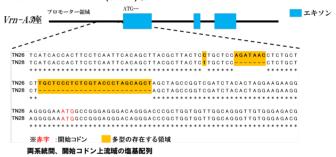


図 1. *Vrn-A3* プロモーター領域におけるにおける 挿入欠失多型 .

一方、SL-in および SL-del 系統を供試して 行った日周期変化に関する発現解析から、 SL-inの Vrn-A3の発現量は短日条件下の明期 開始1時間後に明瞭なピークを示し、その発 現量は SL-del より有意に高かった。これに 対して、Vrn-B3 の発現量は、SL-in、SL-del ともに明期開始1時間後のピークは見られた が、いずれのサンプリング時間においても SL-in、SL-del の発現量に有意差はなかった。 Ppd1、Vrn1 および Tahd1 の発現量は、短日お よび長日のいずれの条件下においても SL-in、 SL-del 間で有意差はなかった。一方、WCO1 の発現量は、短日条件下における明期開始 3 時間前の SL-in で有意に高かった。これらの 開花経路上の遺伝子座に関する日周期変化 の発現解析の結果から、Vrn-A3の上流域に存 在する GATAbox の有無によって短日条件下に おける Vrn-A3 の日周期発現が変化する可能 性が示唆された。また、この挿入型 Vrn-A3

アレルの早生化効果は、短日条件下での成育期間が2014A-1 および2014A-2 の作期より短い2014A-3 の作期においては検出されなかった。これらの結果から、TN26 が持つ Vrn-A3 上流域の GATAbox が短日条件下に置ける Vrn-A3 の発現増加に作用し TN26 の早生化に関与することが示唆され、コムギの開花関連遺伝子の発現経路内における、Vrn-A3 挿入型早生アレルの作用に関するモデルが構築できた。

(3) 挿入型 Vrn-A3 アレルの四倍体コムギ における分布を解析した結果、調査した四倍 体コムギ 100 系統のうち挿入型 Vrn-A3 アレ ルを保有する系統はエンマーコムギ群では 13 系統見られたのに対して、マカロニコムギ 群では、調査した 59 系統すべてが欠失型 Vrn-A3アレルを保有していた。また、採取地 情報を入手できたエンマーコムギ 12 系統の うち、挿入型 Vrn-A3 アレルをもつ 4 系統は インド南部に、欠失型 Vrn-A3 アレルをもつ 5 系統はスペイン北部に由来であった。イラン などカスピ海周辺地域においては両アレル が共に分布していた。TN26 はエチオピアで収 集された系統であり、Vrn-A3座における挿入 型 Vrn-A3 アレルをもつ系統は低緯度地域を 中心に分布していることが示唆された。次に、 挿入型 Vrn-A3 アレルの六倍体コムギにおけ る分布を解析した。日本品種のミニコアコレ クション(Kobayashi et al. 2016)であるJWC、 96 系統を用いた解析の結果、挿入型 *Vrn-A3* アレルを保有する系統は北海道や東北にお ける 15 品種に見られた。次に、Hirosawa et al. (2004)の供試材料 85 系統を用いた解析 の結果、ドイツ原産のスペルトコムギ系統が 挿入型 Vrn-A3 アレルを保有することが明ら かとなった。これらの結果から、このアレル の活用が六倍体パンコムギ品種の早生化育 種に有効である可能性を見出した。また、ス ペルトコムギ系統が保有する挿入型 Vrn-A3 アレルは TN26 が保有する挿入型 Vrn-A3 アレ ルと異なっており(この多型を "SP 型挿入"、 TN26 の挿入型 Vrn-A3 アレルのものを "TN26 型挿入 "とする)、これらの情報から、Vrn-A3 の挿入型アレルの系譜に関するモデルを作 成した(図2)。

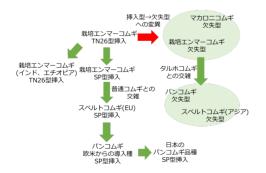


図 2 *Vrn-A3* の各アレルの系譜に関するモデル図 . TN26 型挿入、SP 型挿入および欠失型は *Vrn-A3* のアレルの型を示す

- 挿入型 Vrn-A3 アレルの六倍体品種に おける作用を解析のために、KTRILs を Vrn-A3 の遺伝子型によって分類し、各アレルを保有 する系統間の平均到穂日数を比較したとこ ろ、挿入型 Vrn-A3 アレルを保有する系統群 がCSの欠失型 Vrn-A3アレルを保有する系統 群よりも1日程度早生となったが、その差は 有意ではなかった。次に、KTRILs を Ppd-B1、 Vrn-B1 および Vrn-D1 の遺伝子型によって 8 集団に分類し、集団毎に Vrn-A3 の遺伝子型 によって分類して平均到穂日数を解析した ところ、Vrn-B1 と Vrn-D1 がともに春播型ア レルの系統群および両遺伝子座がともに秋 播型アレルの系統群においては、挿入型 Vrn-A3 アレルを保有する系統群が早生とな る傾向がみられたが、8 集団のいずれにおい ても Vrn-A3 の各アレルを保有する系統間の 平均到穂日数に有意差は認められなかった。 四倍体を用いた解析においては挿入型 Vrn-A3アレルが4日程度の早生効果を示した にもかかわらず、六倍体の KTRILs において は顕著な早生効果が認められなかった。この 原因を明らかにすることが、挿入型 Vrn-A3 アレルの育種上の有用性について検討する 上で重要であると考えられた。
- TNRILs-F。の中で qEpse3 の最近傍マー カーがヘテロである個体の後代 93 個体につ いて最近傍マーカーの遺伝子型を調査した 結果、qEpse3 領域が TN26 型ホモおよび TN28 型ホモと考えられるものがそれぞれ 18 個体、 30個体得られた。これらについて調査したと ころ、第1葉展開日から止葉展開日までの日 数 (DPF) には aEpse3 領域による差はみられ なかったが、第1葉展開日から出穂日までの 日数 (DPH) は TN26 型ホモ個体群の方が有意 に少なくなった。また、この DPH の差は、止 葉展開日から出穂日までの日数(DFH)の差 に起因することが示唆された。また、穂長は TN26 型ホモ個体群の方が有意に長かった。止 葉展開から出穂までの日数と第1葉展開から 開花までの日数は TN26 型ホモ個体群の方が 有意に少なくなったが、第1葉展開から止葉 展開までの日数と出穂から開花までの日数 の qEpse3 領域による差はみられなかった。 以上より、*qEpse3* の TN26 型アレルは 24 時間 日長条件下において、主に止葉展開から出穂 までの間に作用して早生化することが示唆 された。本解析によって、qEpse3の存在が確 認されるとともに、この QTL の TN26 型アレ ルは DFH を短縮し、穂長を長くする作用を持 つことが明らかになった(図3)。また、3葉 期~5 葉期における幼穂長にはアレル間で有 意な差はなかったが、6葉期においてはTN26 型アレルホモ個体群の方が有意に長くなっ た。一方、分化程度には顕著な差は確認でき なかった。

RAD-seq 法を用いた解析により、*qEpse3* が 座乗すると推定される SSR マーカー*barc186*、 *barc40* 間の領域に親系統間で多型のある SNP を 16 個得ることができた。

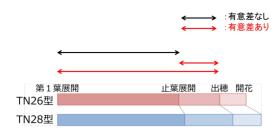


図3 qEpse3が短縮する期間に関する模式図.

< 引用文献 >

Hirosawa, S., S. Takumi, T. Ishii, T. Kawahara, C. Nakamura and N. Mori (2004) Chloroplast and nuclear DNA variation in common wheat: insight into the origin and evolution of common wheat. Genes Genet. Syst. 79: 271–282.

稲村宏・鈴木幸三郎・野中舜二 (1955) 大麦およびコム ギの幼穂分化程度基準について. 関東東山農試研報. 8:75-91

Kobayashi, F., T. Tanaka, H. Kanamori, J. Wu, Y. Katayose and H. Handa (2016) Characterization of a mini core collection of Japanese wheat varieties using single-nucleotide polymorphisms generated by genotyping-by-sequencing. Breed. Sci. 66: 213–225.

西村和紗・桂圭佑・齊藤大樹・北島宣・中崎鉄也 (2014) 不感光性 *Ppd-A1* アレルの早生化作用を超える四倍 体コムギの早生遺伝子. 育種学研究 16(別 2): 217.

Seki, M., M. Chono, H. Matsunaka, M. Fujita, S. Oda, K. Kubo, C. Otobe, H. Kojima, H. Nishida and K. Kato (2011) Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. Breed. Sci. 61: 405-412.

Shindo, C., H. Tsujimoto and T. Sasakuma (2003)
Segregation analysis of heading traits in hexaploid wheat utilizing recombinant inbred lines. Heredity 90: 56–63.

Wilhelm, E. P., A. S. Turner and D. A, Laurie (2009) Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) Theor. Appl. Genet. 118: 285-294.

Yasuda, S. and H. Yamashita (1965) Analysis of internal factors influencing the heading time of wheat varieties. Ber Ohara Inst Landw Biol Okayama Univ 13: 23-38.

Yan, L., A. Loukoianov, G. Tranquilli, T. Fahima and J. Dubcovsky (2003) Positional cloning of wheat vernalization gene VRNI. Proc. Natl, Sci, USA 100: 6263-6268.

Yan, L., D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli, M. Bonafede, A. Sanchez, M. Valarik, S. Yasuda and J. Dubcovsky (2006) The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 19581-19586.

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計1件)

Nishimura, K., R. Moriyama, K. Katsura,

H.Saito, R. Takisawa, A. Kitajima and T. Nakazaki (2018) The early flowering trait of an emmer wheat accession (*Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccum*) is associated with the *cis*-element of the *Vrn-A3* locus. (Accepted) 査読有

https://doi.org/10.1007/s00122-018-3131 -5

[学会発表](計8件)

西村和紗・桂圭佑・齊藤大樹・北島宣・中崎鉄也 (2015) 四倍体コムギ 7A 染色体に座乗する感光性 QTL は Ppd-A1 と相互作用を示す.日本育種学会第 128 回講演会,2015年9月,新潟大学.

西村和紗・桂圭佑・齊藤大樹・北島宣・河原太八・中崎鉄也 (2016) Vrn-A3座上流域に存在する挿入配列の四倍体コムギにおける分布.日本育種学会第129回講演会,2016年3月,横浜市立大学.

齊藤隆成・西村和紗・齊藤大樹・北島宣・中崎鉄也 (2016) 四倍体コムギにおける 止葉展開から出穂までの期間を短縮する 純粋早晩性遺伝子.日本育種学会第130 回講演会,2016年9月,鳥取大学.

西村和紗・齊藤隆成・齊藤大樹・北島宣・中崎鉄也 (2017) 四倍体コムギにおける Vrn-A3 上流域の欠失が Vrn3 の発現に与える影響 .日本育種学会第 131 回講演会,2017 年 4 月,名古屋大学.

齊藤隆成・西村和紗・齊藤大樹・北島宣・中崎鉄也 (2017) 四倍体コムギの純粋早晩性 QTL *qEpse3* が開花まで日数におよぼす効果.日本育種学会第131回講演会2017年4月,名古屋大学.

Nishimura, K., K. Katsura, H. Saito, A. Kitajima and T. Nakazaki (2017) Identification of novel QTL for early flowering in a variety of "Emmer" wheat. 13th International Wheat Genetics Symposium, April 23-28, 2017, Tulln - Austria.

西村和紗・齊藤隆成・森直樹・半田裕一・ 北島宣・中崎鉄也 (2017) 六倍体コムギ 系統 (*Triticum aestivum* L.) における TN26 型 Vrn-A3 早生アレルの分布 .第 12 回ムギ類研究会,2017年 12月,京都大 学.

西村和紗・斎藤隆成・半田裕一・森直樹・川浦香奈子・北島宣・中崎鉄也 (2018) スペルトコムギ(*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta*) 系統 KT19-1 が保有する新規 *Vrn-A3* 座アレルの早生化効果.日本育種学会第133回講演会,2018年3月,九州大学.

6.研究組織

(1)研究代表者

中崎 鉄也(NAKAZAKI, Tetsuya)

京都大学大学院・農学研究科・准教授

研究者番号:60217693

(2)研究協力者

西村 和紗 (NISHIMURA, Kazusa) 齊藤 隆成 (SAITO, Takaaki) 半田 裕一 (HANDA Hirokazu) 森 直樹 (MORI Naoki) 川浦 香奈子 (KAWAURA Kanako)