

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580011
 研究課題名 (和文) 候補遺伝子アプローチによるダイズ耐冷性遺伝子の同定
 研究課題名 (英文) Identification of soybean chilling tolerance genes by candidate gene approach
 研究代表者
 船附 秀行 (FUNATUKI HIDEYUKI)
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター低温耐性研究チーム・主任研究員
 研究者番号：60370590

研究成果の概要：ダイズの耐冷性に関連する遺伝子を同定することを目的として、ダイズの耐冷性に関する量的形質遺伝子座 (QTL) を同定するとともに、モデル植物などで耐冷性に関与することが明らかになっている遺伝子の相同性遺伝子をマッピングし、両者の遺伝地図上での位置関係を比較した。さらに、ダイズのゲノム情報を利用することで、熱ショックタンパク遺伝子などがダイズの耐冷性候補遺伝子として同定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	510,000	4,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダイズ、量的形質遺伝子座 (QTL)、耐冷性、低温、種子形成、候補遺伝子

1. 研究開始当初の背景

北海道やカナダ、北欧、東欧等の寒冷地では、夏季の低温によってダイズの収量が著しく減少することがあり大きな問題とされてきた。これらの国々において、ダイズの耐冷性育種が進められてきたが、その中で、北海道では世界最高水準の耐冷性品種の育成に成功しており、そうした品種のもつ耐冷性遺伝子の特性解明は、耐冷性研究の発展だけではなく、耐冷性育種の効率化にも寄与するものである。

シロイヌナズナやイネでは、ゲノム上のほぼすべての塩基配列が決定され、種々の遺伝子に関して、その機能や形質との関連性が明

らかになりつつある。これらの情報をいかに効率よく利用し応用するかが、今後他の作物の育種を推進していく上での重要な課題となる。その一つの方法として、QTL解析と遺伝子クローニングを組み合わせた候補遺伝子アプローチ法 (candidate gene approach) が提唱されている。これは、微生物やモデル植物で機能の明らかになっている遺伝子と相同性の高い遺伝子を、目的とする作物でクローニング・マッピングし、遺伝解析から明らかになっている QTL の位置と比較することによって、有用遺伝子を推定する、というものである。この方法により、迅速に農業上有用な遺伝子の単離・同定が進められることが

期待されている。

また、研究代表者らは、北海道で育成された耐冷性の強い品種「ハヤヒカリ」と比較的弱い「トヨムスメ」の交雑後代の組み換え型自殖系統 (RIL) を用いて、耐冷性に関する QTL を同定している (Funatsuki et al. 2005)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、候補遺伝子アプローチ法を用いることによってモデル植物で耐冷性との関与が明らかになっている遺伝子のダイズにおける相同性遺伝子や、ダイズにおいて耐冷性との関連が示唆されている遺伝子について、ゲノム上での座乗位置を決定し、北海道の耐冷性品種のもつ耐冷性遺伝子の候補となるものを明らかにすることを目的とした。

具体的には、環境応答に重要な役割を果たすとされるプロテインキナーゼ (e.g. Jonak et al. 1996, Saijo et al. 2000) や転写因子 (e.g. Kim et al. 2001, Shinozaki et al. 2003, Chinnusamy et al. 2003)、ストレス耐性に大きな役割を果たすとされる抗酸化性 (e.g. Sato et al. 2001) やシャペロン機能 (e.g. Karlson et al. 2002) をもつタンパクの遺伝子をターゲットとして、ダイズにおいて充実している EST 情報を利用してクローニングし、品種間で塩基多型を検出することで、耐冷性関連遺伝子のマッピングを行った。この位置と、既に SSR マーカーを用いて同定している QTL の位置と比較することで候補遺伝子を同定することを目的とした。

それに先立ち、近年育成された耐冷性品種「トヨハルカ」の耐冷性に関して遺伝解析を行い、新規の耐冷性 QTL を同定した。当課題の実施中に、ダイズの全ゲノムの塩基配列 (予備版) が発表されたので、この情報を用いて、候補遺伝子の特定を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) トヨハルカの耐冷性 QTL の同定

「トヨムスメ」と「トヨハルカ」の RIL192 系統を用いて、まず、公開されている SSR マーカー (Song et al. 2004) を用いて両親間の多型検索を行った。多型の得られた 104 のマーカーで連鎖地図を構築した。DNA 抽出は自動破砕機を用いて、PCR 反応は 384 ウェルのサーマルサイクラーを用いて、Funatsuki et al. (2005) の方法に準じて行った。PCR 産物は、両親のバンドのサイズの差に応じて、3.5% アガロースゲル、6% 非変性ポリアクリルアミドゲル (ミニゲル)、6% 変性ポリアクリルアミドゲル (シーケンスゲル) によって分離し、エチジウムブロマイド、または SybrGold を用いて、染色し、バンド

を可視化した。連鎖地図の構築には、MAPMAKER と MapManagerQTX を用いた。156 系統については、人工気象室の常温区ならびに低温区で栽培した。常温区は、昼間 24°C 夜間 17°C、低温区は昼夜とも 15°C に設定した。ただし、播種から開花前までは、どちらの区の植物も同様に 22°C/17°C で育成し、開花日に、常温区または低温区に移動した。成熟まで同じ条件で栽培し、種子数や種子重など収量に関する諸形質のほか、熟性に関する形質、草型に関する形質の調査を行った。同実験は F₅、F₆ の 2 世代にわたり、行った。連鎖地図と形質値を用いて、QTLcartographer により複合区間マッピング (CIM) を行った。

(2) トヨハルカの耐冷性 QTL の確認

(1) で、耐冷性 QTL の最も近傍に位置することが同定された SSR マーカー Sat_162 に関して、ヘテロ型を示す系統を選抜し、その自殖後代について Sat_162 のマーカー遺伝子型を調査した。それぞれの系統の後代において、Sat_162 のマーカー遺伝子型がトヨハルカ型の個体とトヨムスメ型の個体を分別し、常温区ならびに低温区で栽培し、成熟期に諸形質の比較を行った。

(3) 日米品種間交雑に由来する F₂ 集団を用いた SSR マーカー による連鎖地図の構築

候補遺伝子を効率的にマッピングするため、塩基多型が高い頻度で得られることが期待される日米の品種間交雑に由来する分離集団を用いて、連鎖地図の構築を行った。96 個体からなる、トヨムスメ × Harosoy F₂ 集団について、多型の得られた 159 の SSR マーカーを用いて、(1) と同様の方法で連鎖地図を構築した。

(4) 低温耐性関連遺伝子近傍のゲノム領域のクローニングと品種間での塩基配列の比較

ダイズにおいて、低温耐性との関連が示唆されている、転写因子様遺伝子 SCOF1、および SCOF1 と相互作用ともつとされる SGBF1 の遺伝子情報からプライマーを設計した。さらに、SCOF1 と非常に相同性の高い EST が存在したので、これからもプライマーを設計した。また、イネやシロイヌナズナで低温耐性との関連が証明されているシグナル伝達系に関わる、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) や MAP キナーゼ (MAPK)、DREB 遺伝子に加え、シャペロン機能を有するコールドショックタンパク遺伝子、ポリアミン合成に関与するスペルミン合成遺伝子 (SPMSY)、スペルミジン合成遺伝子 (SPDSY)、抗酸化性や解毒作用に関与するグルタチオンの代謝に関連する、グルタチオンリダクターゼ遺伝子 (GR)、グル

タチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子、グルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子、ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (GCS) について、EST 情報をもとにダイズにおける相同性遺伝子に対するプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて、ゲノム DNA をテンプレートとして PCR 反応を行った。ダイレクトシーケンシングまたは TA クローニングの後にシーケンシングを行い、各品種 (トヨムスメ、ハヤヒカリ、Harosoy、トヨハルカ) の塩基配列を明らかにした。違いが見られない場合は、さらにハヤヒカリとの交雑後代の F₂ 集団で連鎖地図を作成済みの「サチユタカ」でも塩基配列を調べた。PCR 反応は ABI 社製または Biorad 社製サーマルサイクラーで、シーケンシングは、ABI PRISM3130xl 自動シーケンサーによって行った。

(5) 塩基配列の違いに基づくマーカーの作成と遺伝子のマッピング

品種間で得られた塩基配列の多型に基づいて、CAPS や dCAPS 等のマーカーを設計し、交雑後代集団を用いて、遺伝子のマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 「トヨハルカ」の耐冷性に関連する新規 QTL の同定

① RIL の常温区ならびに低温区での収量構成要素に関する頻度分布

常温区では、いずれの収量構成要素 (個体当たり莢数、莢当たり種子数、一粒重) においても、RIL 集団は正規分布に近い分布を示したが、低温区では、莢当たり種子数と一粒重において、2つのピークがみられ、低温で特異的に大きな効果をもつ少数の遺伝因子の存在が示唆された。

② 連鎖地図の構築

「トヨハルカ」と「トヨムスメ」は、同じとよまさり銘柄に属し、共通の祖先も有することから、SSR マーカーのスクリーニングにより多型の得られる頻度は低く、一部の連鎖群においては、ごく少数のマーカーしか使用できなかった。全体では、104 のマーカーを用いて、24 の連鎖群からなる 1500cM の連鎖地図が構築された。

③ QTL 解析

①および②の結果を利用し、QTL 解析を行った。表 1 に示すように、さまざまな形質において有意な QTL が検出されたが、特に低温区で連鎖群 A2 の Sat_162 の近傍に収量関連形質に大きな効果を及ぼす QTL が同定された。F₅、F₆ ともに、莢当たり種子数、一粒重において、高い LOD 値と寄与率が得られ、それにともない、種子重にも大きな効果がみられた。これらは「トヨハルカ」型で数

表1 常温および低温で検出された各形質に関するQTL

形質 温度	世代	位置		LOD ^a	r ²	相加 効果 ^d
		連鎖群 ^b	マーカー ^c			
個体当たり莢数						
常温	F5	B1	Satt519	6.1	0.20	-3.5
	F6	A2	Sat_162	4.0	0.11	-2.9
		B1	Satt519	3.1	0.08	-2.5
		H	Satt635	2.8	0.06	-2.3
低温	F5	A2	Sat_162	4.2	0.10	-1.6
	F6	A2	Sat_162	4.5	0.12	-2.0
莢あたり種子数						
常温	F6	B1	Satt519	3.6	0.17	-0.09
低温	F5	A2	Sat_162	13.9	0.36	0.27
	F6	A2	Sat_162	17.6	0.38	0.31
一粒重(mg)						
常温	F5	A1	Sat_271	3.2	0.09	-15
	F6	O	Satt653	3.8	0.12	-21
低温	F5	A2	Sat_162	17.7	0.41	74
	F6	A2	Sat_162	19.3	0.42	70
		D1a	Satt184	4.8	0.06	28
個体当たり種子重(g)						
常温	F5	B1	Satt519	4.0	0.10	-2.2
	F6	A2	Sat_162	3.7	0.09	-2.2
		B1	Satt519	4.1	0.12	-2.6
低温	F5	A2	Sat_162	8.0	0.18	1.1
	F6	A1	Sat_271	5.3	0.11	-0.9
		A2	Sat_162	15.5	0.31	1.6
開花まで日数(日)						
-	F5	B1	Satt519	4.2	0.12	-0.44
		O	Sat_321	3.1	0.10	0.39
	F6	B1	Satt519	3.6	0.11	-0.48
		O	Satt576	4.6	0.11	0.49
成熟まで日数(日) ^e						
常温	F5	B1	Satt519	6.2	0.18	-5.2
	F6	B1	Satt519	9.6	0.22	-3.4
低温	F6	A2	Sat_162	6.2	0.15	-3.2
節数 ^e						
常温	F5	B1	Satt519	4.9	0.18	-1.5
	F6	A2	Sat_181	4.3	0.12	-1.4
		H	Satt635	3.8	0.14	-1.6
低温	F6	A2	Sat_162	4.6	0.12	-1.5
主茎長(cm) ^e						
常温	F6	B1	Satt519	3.0	0.09	-2.1
低温	F6	F	Sat_197	4.9	0.16	2.2

^a 1000回の並べ替えテストで有意のもののみ記載

^b 連鎖群名は Cregan et al. (1999)に準拠.

^c QTLに最も近接するマーカー

^d 正の値のものは、「トヨハルカ」型で増加

^e これらの形質は、F5世代の低温区では未調査

値が大きくなることから、「トヨハルカ」の耐冷性に関連する主要な QTL であることが示唆された。一方、同領域には常温区ならびに低温区で莢数に関する QTL も見出され、これらは、「トヨハルカ」型で数値が小さくなった。しかしながら、莢数に関する QTL は効果が小さいことから、「トヨハルカ」型において耐冷性があるのは、莢数が減ったことによる二次的な作用によるものではないことが示唆された。

④QTL の確認

Sat_162 の遺伝子型がヘテロであった 11 系統の後代を、このマーカーの遺伝子型により、「トヨハルカ」型と「トヨムスメ」型に分別し、常温区ならびに低温区で栽培・調査し、QTL の確認を行った。これらは、準同質遺伝子系統とみなされ、基本的には、QTL 周辺のゲノム領域の差異を反映していると解釈される。表 2 に示すとおり、「トヨハルカ」型の系統は、「トヨムスメ」型に比べて、低温で、莢当たり種子数、一粒重ともに約 2 倍になっており、また、莢数は少ない傾向にあった。以上のとおり、RIL での解析結果と一致したことから、連鎖群 A2 の QTL は「トヨハルカ」の耐冷性に関連する主要なものであると結論された。

形質		常温区		低温区	
		TM ^a	TR	TM	TR
個体当たり 莢数	主茎	19.5	17.3	18.5	12.7 **
	全体	23.8	19.2 *	20.8	13.4 ***
莢当たり 種子数	主茎	1.8	1.9	1.1	1.8 ****
	全体	1.8	1.9	1.0	1.8 ****
一粒重 (mg)	主茎	411	418	215	325 ****
	全体	398	410	208	321 ****
個体当たり 種子重(g)	主茎	14.7	14.4	4.0	7.4 ****
	全体	17.1	15.8 *	4.1	7.6 ****

^a TM:トヨムスメ型の平均値、TR:トヨハルカ型の平均値
 *, **, ***, **** はそれぞれ、P=0.05, 0.01, 0.001, 0.0001
 で有意であることを示す

(2)耐冷性候補遺伝子のマッピング

①「トヨムスメ」と「Harosoy」の F₂ 集団における連鎖地図の作成

「トヨムスメ」と「Harosoy」は多型頻度が高く、スクリーニングしたマーカーのうち半数以上で多型が得られた。位置的に適当な間隔をとり、159 のマーカーでジェノタイプングしたところ、26 連鎖群からなる連鎖地図が作成され、全遺伝距離は 2780cM と推定された。ダイズの全ゲノムの遺伝距離は、2500-3000cM と報告されており、ほぼ全域がカバーできたものと考えられた。

②候補遺伝子の多型検索とマッピング

転写因子としては、SCOF1、SCOF2、DREB1、プロテインキナーゼとしては、CDPK1、MAPK3、MAPK4、グルタチオン関連酵素としては、細胞質型 GR1、GCS1、ポリアミン関連では、SPDSY2、SPMSY1 で、塩基多型が見出された (表 3)。しかしながら、それらの連鎖地図上の位置と「ハヤヒカリ」と「トヨムスメ」、「トヨムスメ」と「トヨハルカ」の RIL 集団で検出された QTL の位置を比較すると近接しているものはなく、これらは、現在までに同定されているダイズの耐冷性 QTL の候補遺伝子ではないことが示唆された。

推定機能	遺伝子 ^a	組み合わせ ^b		座乗連鎖群
転写因子	SCOF1	TM	HR	D1b
	SCOF2	TM	HA	B2
	DREB1	TM	HA	F
タンパク質	CDPK1	TM	HA	B2
	キナーゼ	MAPK3	HA	SY
MAPK4		TM	HR	B1
グルタチオン代謝	GR2	TM	HA	J
	GCS1	TM	TR	A1
ポリアミン代謝	SPDSY2	TM	HA	D2
	SPMSY1			

^a 番号および略号は本研究における暫定のもの
^b TM:トヨムスメ、HR:ハロソイ、HA:ハヤヒカリ、TR:トヨハルカ、SY:サチユタカ

③ゲノム配列を用いた候補遺伝子の推定

本研究課題実施中の平成 20 年初頭、アメリカより、予備的なダイズの全ゲノム配列が公表されたので、耐冷性 QTL が位置するゲノム領域近傍に存在する、耐冷性遺伝子の候補となり得る遺伝子の検索を行った。まず、「トヨハルカ」の耐冷性遺伝子についてであるが、QTL は Sat_162 のごく近傍に位置することが RIL での区間マッピングから示唆されたが、隣のマーカーである Sat_181 と Sat_233 といずれもかなり遺伝距離があったため、その間に多型を示すマーカーがないかを調査した。公開されている 14 の SSR マーカーに加え、ゲノム情報を利用し設計した新規の 14 の SSR マーカーも検索したが、Sat_162 を除き、一つとして多型が得られたものはなかった。トヨムスメとトヨハルカが共通の祖先をもつことを考えると、Sat_162 のごく近傍を除く他の領域は、どちらの品種でも全く同じ配列をもつことが推定された。そこで、Sat_162 周辺の遺伝子を検索してみると、SUMO (small ubiquitin-like modifier) 様遺伝子や DEAD-box helicase 様遺伝子など耐冷性との関連が報告されている遺伝子が見出された。これらの ORF の塩基配列は、トヨムスメとトヨハルカで相違なかったが、発現調節領域に変異がある可能性もあり、これらは耐冷性候補遺伝子として、今後発現解析等を行い解析を続ける必要がある。一方、「ハヤヒカリ」の耐冷性遺伝子のうち、最も大きな効果を有する連鎖群 C2 のものについて、近隣領域の検索をおこなったところ、現在まで候補遺伝子とされていたフラボノイド代謝関連遺伝子に加え、熱ショックタンパク質遺伝子も座乗していることが明らかになった。この遺伝子の ORF の塩基配列を「トヨムスメ」と「ハヤヒカリ」で比較したところ、アミノ酸配列での変異を伴う塩基多型がみられたので、本遺伝子も耐冷性候補遺伝子とみなされ、今後さらに検討することが臨まれる。

(3)本研究の意義と今後の展開

イネでは、穂ばらみ期耐冷性に関する QTL がいくつか同定されているが (Saito et al. 2001; Takeuchi et al. 2001; Andaya and Mackill 2003, Kuroki et al. 2007)、いずれも低温での稔実率を制御しており、本研究で同定された QTL には、新しいタイプの耐冷性遺伝子が座乗していることが推定され、科学的に非常に興味深い。さらに、ストレス条件下における莢当たり種子数や一粒重の減少は、マメ科作物で広く問題になっていることから、本研究の成果はそうした研究分野へ波及することも期待される。また、「ハヤヒカリ」の耐冷性に関連する QTL とは、位置が異なっており、これらの QTL の集積により、より耐冷性の強い品種が育成できる可能性も示された。以上から、本研究成果は国際的にも高く評価され、農学分野のトップジャーナルに掲載された。

候補遺伝子からせまるアプローチについては、耐冷性遺伝子の同定には至らなかった。これは、病害に関する真性抵抗性遺伝子などと異なり、多種多様な機能のタンパク質が低温耐性に関与し得ることに起因していると考えられる。当研究課題の開始時点では、ダイズのゲノムリソースは限られており、有用遺伝子をポジショナルクローニングするには、多大な費用と労力を要するとされていた。しかしながら、この3年の間に、ダイズのゲノムリソースはめざましい速度で整備された。高密度連鎖地図が作成され (Hisano et al. 2007, Xia et al. 2007, Hwang et al. 2009)、完全長 cDNA クローンの情報が公開され (Umezawa et al. 2008)、そして、全ゲノムシーケンスが公表されるに至った (DOE 2009)。このことは、確実な形質評価と作用力の大きな QTL があれば、比較的簡単に遺伝子をマップベースでクローニングできる段階に来たことを意味する。「トヨハルカ」の耐冷性は、大きな効果を持つ QTL によることが本研究で明らかにされ、その検定法も確立している。「トヨムスメ」との交雑後代では、QTL 周辺にマーカー多型が得られなかったが、他の交配親を使い、大規模集団を養成することで、「トヨハルカ」のもつ耐冷性遺伝子を単離・同定することは可能であると考えられる。「ハヤヒカリ」の候補遺伝子の解析とあわせ、今後の研究により、ダイズにおける耐冷性のメカニズム解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計3件)

1) Tatsuya Ikeda, Shizen Ohnishi, Mineo Senda, Tomoaki Miyoshi, Masao Ishimoto, Keisuke Kitamura, Hideyuki Funatsuki,

A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1477–1488 (2009) <査読有り>

2) Hideyuki Funatsuki, Shizen Ohnishi Recent advances in physiological and genetic studies on chilling tolerance in soybean. *Japan Agricultural Research Quarterly* 43: 95-101 (2009) <査読有り>

3) 池田達哉、大西志全、三好智明、千田峰生、石本政男、喜多村啓介、船附秀行
ダイズ品種「トヨハルカ」の耐冷性に関連する QTL. *日本育種学会日本作物学会北海道談話会会報* 48:101-102 (2007) <査読なし>

〔学会発表〕 (計2件)

1) 池田達哉、大西志全、三好智明、千田峰生、石本政男、喜多村啓介、船附秀行
ダイズにおける新規耐冷性 QTL の同定. *育種学研究* 10(別2):194. 2008年10月11-13日. 滋賀県立大学.

2) 船附秀行、池田達哉、大西志全、三好智明、千田峰生、石本政男、喜多村啓介
連鎖群 A2 に同定された新規ダイズ耐冷性 QTL の効果. *日本作物学会紀事* 77(別2):196-197. 2008年9月24-25日. 神戸大学農学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船附 秀行 (FUNATUKI HIDEYUKI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター低温耐性研究チーム・主任研究員
研究者番号: 60370590

(2) 研究分担者

石本 政男 (ISIMOTO MASAO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター低温耐性研究チーム・上席研究員
研究者番号: 20355134