

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02171

研究課題名(和文)アズキの栽培北限への適応形質に関する分子機構の解明

研究課題名(英文)Genetic and molecular basis of adaptation in northern limit of adzuki bean cultivation

研究代表者

加藤 清明 (Kato, Kiyooki)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：60271748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：アズキは、短日植物なため国内外の遺伝資源を北海道で栽培すると、ほぼ全てで長日条件に反応して開花が遅れ(感光性)、収穫できない。一方で、北海道の品種は感光性を消失している。本研究では、FD1 遺伝子の機能低下が、北海道の品種の感光性の消失に関わることを解明した。アズキは、花粉の形成される減数分裂期の低温によっておしべ・花粉の発育障害を起こし、受精障害が起こる。本研究では、アズキの遺伝資源のうち、最も耐冷性が強い系統が特異的に持つ3種類の耐冷性遺伝子を特定した。これらの成果は、アズキの栽培北限地の安定生産に関わる開花日の早晚生と耐冷性の強化のための品種改良に活用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アズキの感光性の消失に関わる遺伝子を世界に先駆けて特定した。また、開花期における耐冷性に関する研究も他になく、3遺伝子を世界に先駆けて分子地図上に特定し、遺伝子単離の準備を整えた。将来、アズキの開花制御と低温ストレス下における正常な花粉の発達の分子遺伝学的研究を展開するための基礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：The present study clarified that FD1 is a negative regulator for flowering in response to long day treatment and contributes the gain of photoperiod insensitivity in adzuki bean. Three QTLs controlling chilling tolerance at flowering stage were identified on molecular linkage map.

研究分野：植物育種学

キーワード：アズキ 安定生産 開花日 耐冷性

1. 研究開始当初の背景

アズキは、一般に短日植物で、国内外の遺伝資源を北海道で栽培すると、16時間にもおよぶ長日条件に反応して90%以上の遺伝資源で開花が遅れ、秋の収穫に間に合わない(佐藤 未発表)。一方で、北海道の品種は長日への感受性(感光性)を消失している。しかし、アズキの感光性に関わる分子機構は未解明であった。我々は、北海道の品種「しゅまり」(早生、耐冷性弱)が、長日(16時間日長)への感受性を完全に消失し、北海道の自然日長下では7月下旬に開花すること、Acc2265(極晩生、耐冷性極強)は長日では開花せず、北海道の自然日長下では10月中旬に開花することを確認した(Yamamoto et al. 2016)。そこで、両者間の交雑 $F_{2:3}$ 系統と組換え自殖系統を用いた開花期の遺伝学的解析から、「しゅまり」の感光性の消失には、効果の大きな主働遺伝子 *Flowering Date1 (FD1)* が、単独で関与することを明らかにした(Yamamoto et al. 2016)。しかし、*FD1* の遺伝子産物ならびに感光性の制御における機能が未解明であった。さらに、感温性の遺伝的制御機構も未解明であった。

アズキは、花粉の形成される減数分裂期に低温障害を受けやすく、低温によっておしべ・花粉の発育障害を起こし、受精障害(障害型冷害)が起こる(島田 1997)。開花期の耐冷性について、研究の先行しているイネにおいても *Ctb1* と *CTB4a* が単離されているのみで(Saito et al. 2010; Zhang et al. 2017)、分子機構の多くが未解明である。これまでに、青山と島田(2014)によって、アズキについて3,000点以上の遺伝資源を対象に、従来の評価法より厳しい低温処理を施して、既存の北海道の品種を凌駕する耐冷性極強の遺伝資源 Acc2265 が見出されてきた。しかし、当該遺伝資源のもつ耐冷性極強を司る分子機構は、未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、栽培北限におけるアズキの安定生産に欠かせない開花期の制御と開花期における耐冷性に関わる分子機構の解明を目的とする。そのために、本研究では、*FD1* を単離して、その機能を明らかにする。さらに、*FD1* 以外の開花制御遺伝子座の特定を目指した。

さらに、これまでに、「しゅまり」と Acc2265 の交雑後代では、耐冷性極強の系統の分離を確認したが、感光性の違いによる3ヶ月以上の開花期の差や多様な草姿の分離が、耐冷性の評価を困難とした(堀内 未発表)。そこで、本研究では感光性の消失した *fd1fd1* 型交雑後代に「しゅまり」を戻し交雑した自殖系統を用いて、耐冷性極強に関わる遺伝子の特定を目指した。

3. 研究の方法

実験1 *FD1* の遺伝子単離

[目的] ポジショナルクローニング法で *FD1* を単離する。

[方法] 「しゅまり」と Acc2265 の交雑 F_2 集団 3,799 個体をマッピング集団として供試した。供試材料をについて、長日条件下での開花日を調査した。また、*FD1* 領域に30種のDNAマーカーを作出した。マッピング集団のDNAマーカーの遺伝子型ならびに開花日の表現型を用いて *FD1* をマッピングした。一部のマッピング集団については、 F_3 後代検定により *FD1* の遺伝子型を決定して、地図の詳細化に用いた。また、Acc2265 について、全ゲノムリシーケンス解析を実施し、公開されているリファレンス配列の「しゅまり」との変異解析を行った。

実験2 *FD1* の機能解析

[目的] *FD1* の遺伝子発現における日長反応性をしゅまりと Acc2265 で特徴付ける。

[方法] 「しゅまり」と Acc2265 を長日(16時間日長)と短日(8時間)で1反復あたり3個体を5反復分を栽培し、30日齢の最上位展開葉をサンプリングしてトータルRNAを抽出した。定量RT-PCR法により、ユビキチン遺伝子に対する *FD1* の相対的発現量を解析した。

実験3 新規開花遺伝子の特定

[目的] 新規の開花期制御に関わる遺伝子座を特定する

[方法] マッピング集団として、*fd1fd1* を遺伝的背景にもつ戻し交雑自殖系統(BC1F6, BILs)を供試した。BILs を高温長日(27 16時間日長)、高温短日(27 8時間日長)、低温短日(21 8時間日長)の3条件で栽培し、開花日のQTLs解析を実施した。

実験4 開花期の耐冷性遺伝子の特定

[目的] 耐冷性に関与する遺伝子座を特定する。

[方法] 実験3と同じマッピング集団を供試した。R1年度とR2年度の2カ年、十勝農業試験場人工気象室内で耐冷性を評価した(青山と島田 2014)。

4. 研究成果

FD1の遺伝子単離と機能解明

ポジショナルクローニング法により、FD1領域を17.1kb内にマップした。リファレンス配列データの当該ゲノム領域内には、単一の遺伝子が推定されていた。Acc2265の全ゲノムリシーケンス解析の結果、コード領域内には両親間に塩基配列の変異はなかったが、コード領域の上流配列には、29の挿入欠失と178のSNPsが見出された。この候補遺伝子の遺伝子発現量は、Acc2265では、長日で発現上昇し、短日条件では発現が低くなった。「しゅまり」では日長に関係なく、Acc2265の短日条件下での発現量と同程度まで低く抑えられていた。以上より、FD1が長日条件に反応して発現上昇する開花の抑制因子として作用すること、感光性の消失にはプロモーターの塩基配列の変異に起因する発現の日長反応性の消失が関わるものと考察した。

感光性と感温性の遺伝的制御機構

低温短日区、高温短日区、高温長日区のいずれの環境下においても「しゅまり」が、Acc2265と比較して開花が早かった。開花日に関わる遺伝子座は、低温短日区で1遺伝子、高温短日区で3遺伝子、高温長日区で5遺伝子が検出され、いずれも「しゅまり」型対立遺伝子が開花を早めるものと推定された。これら9遺伝子座は、いずれも重ならなかったことから、異なる遺伝子の制御下にあるものと考察された。以上の結果は、今後のアズキの開花制御の分子機構の解明の基盤となった。

開花期の耐冷性の遺伝的制御機構

2カ年で共通して6遺伝子座が検出され、3遺伝子がAcc2265、残りが「しゅまり」の対立遺伝子が、それぞれ耐冷性を高めた。但し、マッピング集団内には、Acc2265と同程度の耐冷性を示す系統が分離しなかったことが、課題として残された。低温下における正常な花粉の発達に欠かせない遺伝子の特定に向けた基礎となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori Masahiko, Maki Kento, Kawahata Tsubasa, Kawahara Daigo, Kato Yuta, Yoshida Toru, Nagasawa Hidetaka, Sato Hitoshi, Nagano Atsushi J., Bethke Paul C., Kato Kiyooki	4. 巻 71
2. 論文標題 Mapping of QTLs controlling epicotyl length in adzuki bean (<i>Vigna angularis</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 208 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.20093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤清明
2. 発表標題 小豆の農業形質に関する遺伝子マッピング
3. 学会等名 中日小豆学術交流会 第14回十勝小豆研究会 中国にて開催（日本語発表 通訳あり）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井元 佑亮, 堀内 優貴, 松田 修一, 吉川 晶子, 森 正彦, 得字 圭彦, 加藤 清明
2. 発表標題 アズキ品種「しゅまり」の日長不感受性に関与するFD1領域内の推定遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤清明
2. 発表標題 ゲノム情報に基づいたアズキの品種開発の基盤づくり
3. 学会等名 (公社)日本鑄造工学会 平成31年度北海道支部大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊井田拓実、井元佑亮、森正彦、堀内優貴、加藤清明
2. 発表標題 アズキの国内外の遺伝資源の開花始まりの日長反応性とFD1近傍のDNA多型との関連性の検討
3. 学会等名 日本育種学会・作物学会北海道談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井元佑亮、堀内優貴、松田修一、吉川晶子、森正彦、得字圭彦、加藤清明
2. 発表標題 アズキの感光性遺伝子Flowering Date1の候補遺伝子の解析
3. 学会等名 日本育種学会2019年春季大会135回講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀内 優貴 (Horiuchi Yuki) (10502403)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部 十勝農業試験場・研究主任 (80122)	
研究 分担者	森 正彦 (Mori Masahiko) (60645711)	帯広畜産大学・畜産学部・助教 (10105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------