

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02183

研究課題名（和文）オオムギの幅広い種子休眠性自然変異の基となる主要なQTL遺伝子の解析

研究課題名（英文）Analysis of major quantitative trait loci determining the wide range of seed dormancy levels in barley

研究代表者

中村 信吾（Nakamura, Shingo）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・主席研究員

研究者番号：20343965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,390,000円

研究成果の概要（和文）：コムギやオオムギなどの麦類は、日本で栽培すると収穫期が梅雨と重なるため、降雨により収穫前に種子が発芽してしまう穂発芽という現象がしばしば発生することが知られている。穂発芽が起こると種子の品質が著しく低下してしまうため、我が国の麦類の安定生産上の大きな問題となってきた。この課題の克服には、雨にぬれても発芽しない強い種子休眠性を持つ品種の育成が重要となる。これまでに、MKK3遺伝子が強い種子休眠性に必要なことを明らかにしてきたが、本研究では、野生オオムギの非常に強い休眠性にもMKK3遺伝子が役に立っている可能性があることを明らかにした。この結果は、麦類品種の穂発芽耐性の改良に役立てることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、野生オオムギの非常に強い休眠性にもMitogen-activated Protein Kinase Kinase 3 (MKK3) 遺伝子が役に立っている可能性がQTL領域を絞り込むことにより初めて具体的に示されたことは、学術的にも大きな意義がある。今後、さらにこのQTL領域を絞り、原因となる遺伝子多型を同定することができれば、日本と同様、収穫期に降雨の多い気象条件を持つ穂発芽被害で困っている世界中の地域における麦類品種の穂発芽耐性の改良に役立てることができ、本研究成果は、大きな社会的意義を持つ成果であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Wheat and barley are known to often undergo a phenomenon called pre-harvest sprouting (PHS) in which the seeds germinate before harvesting due to rain because the harvest season overlaps with the rainy season when cultivated in Japan. Since the quality of seeds is remarkably deteriorated when PHS occurs, it has become a serious problem for the stable production of wheat and barley in Japan. To overcome this problem, it is important to breed cultivars with strong seed dormancy that do not germinate even when wet in the rain. We have already identified that an allele of MCK3 gene is necessary for strong seed dormancy. This study has revealed possibility that the MCK also plays an important role for the extremely strong dormancy of wild barley. This result contributes to improve PHS tolerance trait of wheat and barley cultivars.

研究分野：分子生物学

キーワード：オオムギ 種子休眠 穂発芽 量的形質遺伝子座 自然変異

1. 研究開始当初の背景

穂発芽を防止するためには、穂上で雨に濡れても発芽しないような休眠性をもった品種を開発する必要があります。麦類の場合、理想的には、収穫期までは発芽せず、収穫後は、急速に休眠が急速に覚め、播種や麦芽生産時には発芽率が 100%となるような休眠性を持たせることが望ましい。こうした理想の休眠性に近づけるためには、単に発芽試験で選抜して穂発芽耐性品種を育成するのでよしとするのではなく、休眠の強さを調節している遺伝機構を理解する必要があります。つまり、どのような遺伝子がどのように休眠の強さに影響を与えているのかを知る必要があります。こうした遺伝制御機構の理解が進めば、どの程度理想に近づけられるのかもわかってくるに違いありません。そのための一つの方法として、休眠の自然変異の原因となる遺伝子を見つけしていく方法があります。本研究課題の対象である、大麦は、非常に幅広い種子休眠の自然変異を持つことが知られている。祖先型の野生大麦(*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*)は、一般に、発芽試験で常に発芽率 0%となるような非常に強い休眠性を持つものに対して、麦芽生産のため斉一な発芽が要求される醸造用オオムギでは、発芽しやすいよう、休眠性を弱める方向に品種改良が行われてきたため、休眠性が弱く、発芽試験では、常に 100 %近い休眠性を示す。オオムギの様々な品種系統は、この非常に強い休眠性から弱い休眠性までの間の連続分布を示す。こうした多様な休眠性の原因となる遺伝子を明らかにしていけば、様々なレベルの休眠性を生み出している仕組みが明らかになり、その知見を取り入れた穂発芽耐性育種が可能になっていくと考えられる。

これまでに申請者は、オオムギの休眠性の強い食用品種「アズマムギ」と休眠性の弱い醸造用オオムギ「関東中生ゴールド」の休眠性の差異が、5H 染色体長腕末端に座乗する SD2 座 (*Qsd2-AK*)によることを QTL 解析であきらかにし、マップベースクローニング法によりその原因遺伝子が *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3* (*MKK3*) 遺伝子であることを明らかにした (Nakamura et al. 2016)。また、その原因が、一塩基の自然変異により *MKK3* のリン酸化ドメイン上の進化上高度に保存された 260 番目のアミノ酸残基アスパラギン(N)がトレオニン(T)に置換する *N260T* の変異によることも明らかにした (Nakamura et al. 2016)。こうした成果は、オオムギの穂発芽耐性遺伝子のマーカーとして対立遺伝子型の判別に利用できるとともに、劣性の対立遺伝子が休眠を強くすることからコムギの休眠性を強くする新たな方法を示す結果ともなった。そこで、申請者は、次に、栽培オオムギと比較してはるかに強い休眠性を持つ祖先型の野生オオムギの休眠性に興味を持ち、野生オオムギ系統「H602」と「関東中生ゴールド」を材料に研究を開始した。

2. 研究の目的

本課題では、我が国でも穂発芽による大きな被害がしばしば発生しその対策が求められている麦類を対象にその休眠性の多様な自然変異がどのような遺伝的機構によって生じているかを、非常に休眠性の強い野生大麦と休眠性をほとんどもない醸造用大麦の間での種子休眠性の量的形質遺伝子座(QTL)の解析を通して解明しようとする課題である。すでに4つのQTLを同定、そのうち、5H染色体上に座乗する主要な2つのQTL *Qsdw-5H*と *Qsd2-OK*の原因遺伝子について単離を目指す。

3. 研究の方法(当初の予定)

主要な2つのQTL *Qsdw-5H*と *Qsd2-OK*に関して、5H染色体が「関東中生ゴールド」型の5H染色体に、大きさの異なる「H602」型染色体断片がQTL領域に挿入されているRILやNILを交配し、得られたF2世代のQTL近傍マーカーの遺伝子型と表現型の分離の相関を調べることで、*Qsdw-5H*と *Qsd2-OK*のQTL領域をそれぞれ約70cMおよび7cMの領域に特定することができてい

る (Nakamura et al. 2017)。Qsdw-5Hは、その 70cM の領域内に組み換えが起きた個体の遺伝子型と表現型の解析から、さらに 20cM の領域に絞り込めることも明らかになっている (未発表データ)。この結果は、この方法で遺伝子領域をさらに絞り込んでいける可能性が高いことを示している。次世代シーケンサーによる、「H602」と「関東中生ゴールド」の完熟種子胚の RNA シーケンスもすでにおこなっており、遺伝子の配列多型や発現情報が得られている。このデータは、QTL 領域のマーカーの作出に利用するとともに、発現量の解析にも使用する予定である。今後、各 QTL 領域の中で組み換えが起きている個体を詳しく解析していくことで、段階的に、領域の絞り込みを進め、最終的には、100 分の数センチモルガン程度まで絞り込みたいと考えている。絞り込みを進めながら、2017 年 4 月に公表された最新のオオムギゲノム情報などを使いながら候補遺伝子を明らかにしたい。候補遺伝子が同定できれば、変異系統や形質転換手法などによる遺伝子機能の確認実験を行い、最終的な証明を行う。

4. 研究成果

5 年間の研究経緯について下記の図 1 にまとめた。5 年間全体の研究成果は、Qsdw-5H に関しては、材料の生育不良等の原因のため、再現性のある後代検定結果が得られず、うまく QTL 領域を絞り込むことができなかった。Qsd2-OK に関しては、順調に絞り込みを進めることができ、「Morex」の参照ゲノム ver.3 配列上で約 400kb の領域に絞り込むことができた。その領域に MKK3 遺伝子が含まれることから、Qsd2-OK の原因遺伝子は、「アズマムギ」で見出した Qsd2-AK の原因遺伝子である MKK3 遺伝子のアリルである可能性が明らかになった。

各年度の研究成果は下記の通り。

1) 2018 年度は、精密マッピングのために必要な組み換え個体の育成を進めた。

Qsdw-5H に関しては、F₄ 世代で遺伝子型を調べ、組み換えが起きた個体を選抜、後代の種子を 2018 年の秋に圃場に植え、育成した F₅ 世代の植物体の QTL 領域の遺伝子型の決定を進めた。

Qsd2-OK に関しては、QTL 領域の遺伝子型の違いにより表現型の差がよりはっきり区別できると予想された系統間で交配を行い、新たに F₂ 集団を作出、2017 年秋から圃場で育成し、2018 年度は、この F₂ 集団 (約 480 個体) から種子を収穫し、遺伝子型と発芽率の相関を調べた。当初の予想通り QTL 領域の遺伝子型と発芽率の間にはっきりとした相関が検出できた。この結果から作出した集団は、Qsd2-OK の精密マッピングにより適した材料であると判断した。さらに、QTL 領域を絞り込むため F₂ 世代の遺伝子型を調べ、QTL 領域内で組み換えが起きた個体を選び、その後代を 2018 年秋に圃場に播種し、マッピング材料の育成を進めた。

2) 2019 年度では、種子休眠 QTL Qsdw-5H 及び Qsd2-OK に関する最初の QTL 領域の遺伝子マーカー型と、発芽率のアソシエーション解析結果が得られた。

Qsdw-5H に関しては、2018 年秋に播種した、F₅ 世代の 15 系統の植物体 100 個体ずつの遺伝子型の決定を前年度に引き続き進め決定した。生理的成熟期に収穫した種子の発芽率を調べて、決定した遺伝子型と発芽率の相関について t-検定したところ、1 系統において相関が検出された。その系統は、QTL のピークを含む領域をヘテロにもつことから、その領域に QTL がやはり座乗していることが示唆された。しかし、同じような領域をヘテロに持つ他の系統では相関が検出されず、再現性が得られなかった。原因の一つとして、環境要因の影響を Qsdw-5H が受けやすいことが考えられた。Qsdw-5H は、3 カ年行った QTL 解析のうち、2 カ年においてしか QTL が検出されていない。また、F₅ 系統間の遺伝的背景の違いが影響している可能性も考えられた。結果の再現性をみるため、F₅ 世代 21 系統について 100 粒ずつを 2019 年秋に新たに圃場に播種し、それら個体の QTL 領域の遺伝子マーカー型の決定を行った。次年度に、アソシエーション解析を本年度と

同様に言う予定とした。

*Qsd2-OK*に関しては、 F_2 世代 12 系統の後代 F_3 世代の種子 100 粒ずつを用いて、アソシエーション解析を行った。QTL 領域の絞り込みを進めた。今後、2019 年度に取得した次世代シーケンサーの配列情報を用いて、絞り込んだ QTL 領域内に新規マーカーを作製し、さらに QTL 領域を絞り込むことができると考えた。2019 年秋に新たに F_2 世代 18 系統由来の F_3 種子を 100 粒ずつ圃場に播種したので、同様に、2 回目のアソシエーション解析による絞り込みを進める予定。

2019 年末頃に次世代シーケンサーによる発現解析も行った。今後、発現差のある遺伝子リストの作成など解析を進め QTL 領域との対応関係についても解析する予定。

3) 2020 年度の研究により、種子休眠 QTL *Qsdw-5H* 及び *Qsd2-OK*に関する 2 回目のアソシエーション解析結果が得られた。

*Qsdw-5H*に関しては、昨年報告の 15 系統に続き、 F_5 世代 21 系統について植物体 100 個体ずつの遺伝子型を調べるとともに、植物体の種子の発芽率を調べてアソシエーションについて t-検定したところ、昨年同様の結果と同じように、1 系統においてしかアソシエーションが検出されなかった。*Qsdw-5H*が環境の影響を受けやすい可能性もあるが、その他の原因の一つとして、昨年も同じような状況がみられたが、 F_5 世代の植物体の圃場での生育が悪く、欠失してしまう植物体が多くあることも、きちっとしたアソシエーション解析の結果が得られない原因として考えられた。解析材料の作り直しを考える必要がでてきたため、もう一度、アソシエーションがきちっと観測された初期世代にもどってみるために、 F_2 系統を昨年秋に播種した。

*Qsd2-OK*に関しては、昨年の F_2 世代の 12 系統後代の F_3 個体の解析に続いて、本年度は、新たに別の F_2 世代 18 系統後代 F_3 個体のアソシエーション解析を行った。次世代シーケンサーの配列情報を用いて新規に作出したマーカーとの対応から、オオムギ品種「Morex」参照ゲノム配列上の約 1Mbp の領域に QTL 領域を絞り込むことができた。今後は、1Mbp の領域のさらなる絞り込みを行うため、2020 年秋に圃場に F_2 世代 3000 個体を播種し、現在、マーカーにより、1Mbp の領域内の組み換え個体を調べている。領域内の組み換え個体が見つければ、秋に後代を播種して来年度さらに絞り込みを進める予定。

昨年末頃に次世代シーケンサーにより得られた発現データの解析は、時間がとれず進められなかった。今後、解析環境を整えて、発現差のある遺伝子リストの作成など解析を進め QTL 領域との対応関係についても解析する予定。

4) 2021 年度では、これまでの結果から、*Qsdw-5H*に関しては、RIL4013 と RIL4058 を交配して作出した材料では、後代の成育不良等のため、後代検定のデータが十分に得られず、これ以上マッピングを進められないことが明らかになったので、*Qsdw-5H*の解析は取りやめ、2021 年度は、*Qsd2-OK*の F_2 世代 3000 個体の解析に集中することとした。

2021 年度は、*Qsd2-OK*領域のさらなる絞り込みのため、 F_2 世代 3000 個体を解析して、絞り込んだ *Qsd2-OK*領域 1Mbp の領域内で組み換えが起きた F_2 世代 36 個体から F_3 種子を得ることができた。*Qsd2-OK*の有力な候補遺伝子 *MKK3* 遺伝子の近傍の組み換え個体を含む、13 個体の組み換え体を選び、後代の種子を 100 粒ずつ 2021 年秋に播種し、2022 年 2 月から QTL 近傍のマーカーで各個体の遺伝子型の調査を行った。今後は、2022 年 6 月に種子を収穫、発芽試験を行いマーカーと発芽率の対応関係をみること、ならびに、最近更新されたオオムギ品種「Morex」の参照ゲノム配列 ver.3 を用いて新規マーカーを作出、得られた組み換え個体の組み換えのポイントを絞り込むことで、*Qsd2-OK*領域をさらに絞り込む予定。

2021 年度も、一昨年末に次世代シーケンサーにより得られた発現データの解析は、時間がとれず進められなかった。今後、先進ゲノム支援に申請するなど解析環境を整えて、発現差のあ

る遺伝子リストの作成など解析を進め QTL 領域との対応関係についても解析する予定。

5) 2022 年度は、引き続き *Qsd2-OK* に的を絞って、種子休眠 QTL 領域の絞り込みを進めた。

2021 年度秋に播種した F_2 世代 13 系統後代の F_3 種子 100 粒ずつから育った個体を用いて、2022 年 6 月に種子を収穫、発芽試験と、各個体の QTL 近傍マーカーを用いたジェノタイプング結果を用いて、ジェノタイプと発芽率のアソシエーション解析を行い、*Qsd2-OK* を約 400kb の領域に絞り込むことができた。この領域には、4 個体の組み換え F_2 個体が存在し、今後さらにこれら個体の QTL 領域内の遺伝子型を詳しく調べることで、*Qsd2-OK* 領域をさらに絞り込むことができる。この 400kb の領域は、申請者が *Qsd2-AK* の原因遺伝子として同定した *MKK3* 遺伝子が含まれているので、野生オオムギの *Qsd2-OK* の原因遺伝子も、*MKK3* 遺伝子であることが示唆される結果となった。「H602」の *MKK3* 遺伝子配列には、「アズマムギ」で申請者が見つけた種子休眠を強める原因となると考えられる N260T のアミノ酸残基の置換を引き起こす一塩基多型はないので、「H602」の *MKK3* 遺伝子は、別の原因配列多型を持つ可能性が示唆された。今後、さらに原因となる配列多型を同定することができれば、新たな *MKK3* 遺伝子の対立遺伝子判別マーカーの作出につなげることができるのではないかと考えている。この絞り込んだ 400kb 領域内の組み換え個体を探索するための材料を準備するために、種子を圃場に 2022 年秋に 200 粒播種した。

また、先進ゲノム支援解析により、RNA-seq のデータ解析を行っていただき、GO 解析で、休眠種子に特徴的にみられる傾向を明らかにすることができた。引き続き解析をお願いして、さらに詳しい解析を行っていきたいと考えている。

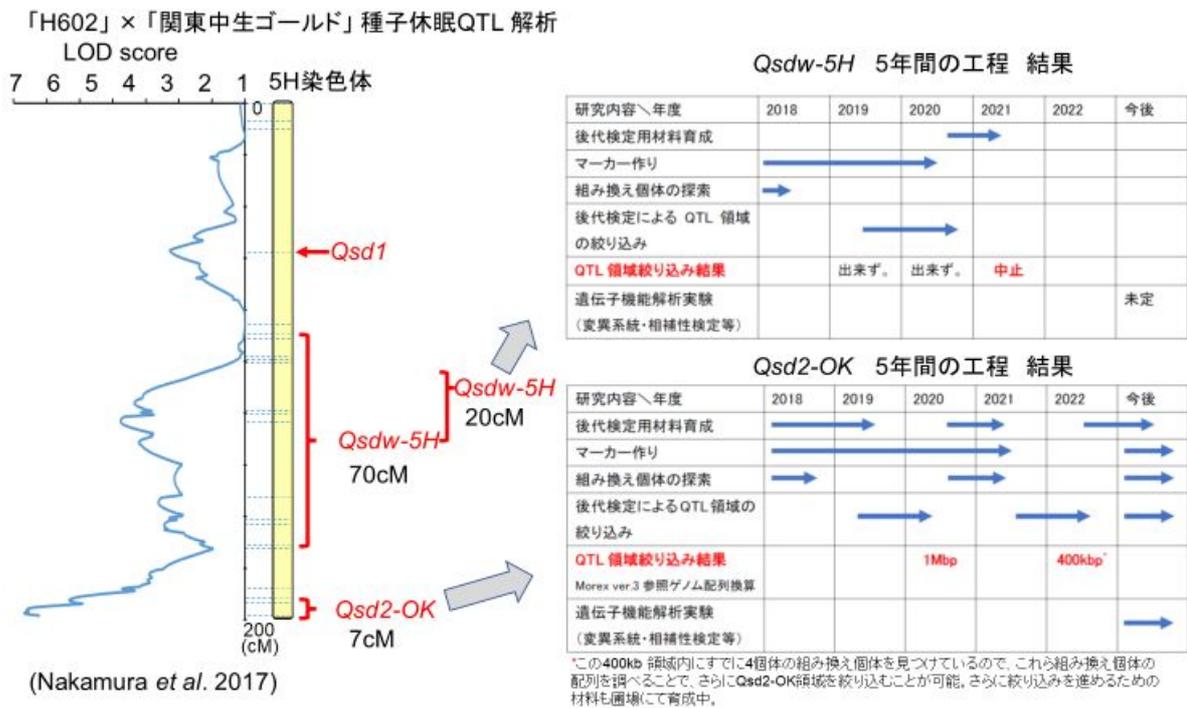


図1 5年間の研究結果まとめ

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Shingo	4. 巻 68
2. 論文標題 Grain dormancy genes responsible for preventing pre-harvest sprouting in barley and wheat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 295 ~ 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.17138	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiromi Morishige, Tsuyoshi Tanaka, Yoko Oono, Kazuhiro Sato, Jianzhong Wu, Takao Komatsuda, Shingo Nakamura
2. 発表標題 Effects of the two major seed dormancy QTL from wild barley 'H602' (<i>Hordeum vulgare spontaneum</i>) in the genetic background of the malting barley cultivar 'Kanto Nakate Gold'
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Nakamura
2. 発表標題 Grain dormancy genes responsible for preventing pre-harvest sprouting in barley and wheat
3. 学会等名 6th Plant dormancy symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shingo Nakamura, Mohammad Pourkheirandish, Hiromi Morishige, Mohammad Sameri, Kazuhiro Sato and Takao Komatsuda	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Frontiers in Plant Science	5. 総ページ数 235
3. 書名 SEED DORMANCY, GERMINATION AND PRE-HARVEST SPROUTING	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------