

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06729

研究課題名(和文) 種子発芽のフェノロジーを決める温度反応制御遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes which control seed germination response to temperature and phenology

研究代表者

川上 直人 (Kawakami, Naoto)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：10211179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：種子発芽の季節を決める仕組みを分子レベルで解明するため、世界中に分布するシロイヌナズナ種内の自然変異を利用し、夏型と冬型系統に対照的な発芽の温度反応性をもたらす量的遺伝子座を解析した。夏型と冬型系統の交配で得た分離集団の解析から、高温と低温の発芽はそれぞれ異なる遺伝子に制御され、高温発芽性は少なくとも7つ、低温発芽性は主に3つの遺伝子に支配されることを見出した。高温発芽性を支配するHTG1は5番染色体下腕に座乗し、その候補として81の遺伝子が抽出された。さらに、このうちの1遺伝子が発芽の高温反応性に関わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種子が発芽する季節は、個体の生存そして次世代の種子生産を左右する。本研究では、発芽時季決定の鍵を握る高温と低温条件での発芽反応が、それぞれ少数の主要遺伝子に支配されることを見出しており、その分子機構解明に大きな進展をもたらすと期待される。温暖化の影響が顕在化しつつある現在、発芽の温度反応性や季節決定に関わる遺伝子の同定としくみの解明に手がかりを与えた意義は大きい。また、作物種子の発芽も温度の影響を強く受け、生産量と品質を大きく左右する。このため、本研究の成果は温暖化に対応した発芽制御技術の開発に繋がるなど、社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Summer and winter annual Arabidopsis wild accessions were crossed and analyzed quantitative trait loci (QTLs) which determine seed germination phenotypes at high and low temperature conditions. Our genetic analysis indicated that germination phenotypes at low and high temperature conditions are determined by different QTLs. HTG1 and HTG2 were found as major QTLs for germination at high temperature conditions, and mapped on the bottom arms of chromosomes 5 and 2. We identified 81 candidate genes for HTG1, and we have obtained preliminary data that indicates one of the 81 genes is responsible for germination at high temperature condition.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：種子 発芽 フェノロジー 自然変異 温度 量的遺伝子座 ゲノム配列解析

## 1. 研究開始当初の背景

春と秋は温度や光などの環境が類似しているにもかかわらず、種や系統により種子が発芽する季節は異なる。暑さに弱い植物の種子が春に、寒さに弱い植物の種子が秋に発芽してしまうと、栄養成長の途上で枯死したり、花芽形成に十分な日長や温度が与えられず、子孫を残せなくなってしまうたりするであろう。このため、種子が何らかの方法で季節を感知し、発芽の季節を決める仕組みは、植物にとって大変重要な役割を持つ。植物が生育する季節(フェノロジー)は、種子発芽と花芽形成の時期に依存している。花芽形成の分子メカニズムについては、バーナリゼーションや日長反応などの解析から多くの知見が蓄積している。一方、種子発芽の季節は、環境の温度と、休眠性とともに変化する種子の温度反応性で決まることが示されているが、その分子メカニズムは未だ不明である。

秋に散布される夏型一年生草本の種子は高温で発芽しやすい性質を持ち、休眠性の低下に連れて発芽可能な温度の下限が低下し、環境の温度が上昇する春に発芽する。一方、春に散布される冬型一年生草本の種子は低温で発芽しやすく、休眠性の低下に連れて発芽可能な温度の上限が上昇し、環境の温度が低下する秋に発芽する。つまり、夏型と冬型の種子は対照的な温度反応性を持つことにより、春と秋に発芽できるようになっている。温度に対応した種子発芽の制御には、温度センサー、温度の情報伝達因子、アブシシン酸(ABA)やジベレリン(GA)などの発芽制御に関わる植物ホルモンの作用制御因子が働くと考えられるが、その分子基盤はほとんど知られていない。

シロイヌナズナはヨーロッパを起源とする一年生草本であり、現在では北半球を中心に低緯度から高緯度、低地から高山に至る様々な環境で生育している(Krämer 2015)。シロイヌナズナの多くの野生株は冬型のフェノロジーを持つが、夏が冷涼で冬が極寒となるヨーロッパ中央部には夏型のフェノロジーを持つ野生株の存在が示されていた(Cetl and Effmertova 1967など)。シロイヌナズナ野生株のフェノロジーは播種から花芽形成までの日数やバーナリゼーション要求性から判断されているが、発芽の季節と温度反応性からも夏型であることが明示されているのは、アイルランドで採種された1系統(Bur-0)のみである(Evans & Ratcliffe 1972, Footitt et al. 2013)。野外の土壌に埋めた冬型のシロイヌナズナ系統の種子(埋土種子)における遺伝子発現の変動解析から、休眠期には休眠の主要遺伝子が発現し、発芽の季節にはホルモン制御遺伝子等、環境を感知して発芽を制御する遺伝子の発現が高まることが示された(Footitt et al. 2011)。近年、夏型の自然変異系統、Bur-0で同様の解析が行われ、埋土種子における休眠性と休眠の主要遺伝子の季節や休眠性の変化に伴う発現変化が冬型と一部異なることが報告された(Footitt et al. 2013)。これらの遺伝子は休眠の季節変化を司るメカニズムを説明するものとして大変興味深い。ただし、種子が環境の温度を感知して最終的に発芽の可否を決定する制御因子については報告がなく、本研究はこの未知のメカニズムにメスを入れるものと期待される。

近年の温暖化を伴う気候変動はすでに樹木の芽の休眠や種子の発芽に影響を及ぼしつつある。今後の温暖化の進行に伴う植生の変化を予測し、作物生産の適応策を考える上で、発芽の温度反応メカニズムの解明は重要な貢献をもたらすであろう。

## 2. 研究の目的

一年生草本が生育する季節(フェノロジー)は種子発芽と花芽形成の時期に依存するが、種子発芽の季節を決める分子機構は明らかにされていない。本研究ではシロイヌナズナ種内の自然変異に着目し、夏型と冬型で対照的な種子発芽の温度反応性をもたらす分子機構を解明することを目的とした。私達はシロイヌナズナの野生株400系統から、夏型の温度反応性を示す10系統を独自に見出している。同一種内の自然変異を分子遺伝学的手法で比較解析し、夏型と冬型の発芽制御の特異性と共通性を浮き彫りにする。自然変異の解析は適応や生態に関わる新たな因子の発見につながると期待される。このため、低温と高温における発芽を指標にQTL解析を行い、各温度、あるいは両温度の発芽を司る遺伝子領域を、一塩基置換(SNP)等の多型を利用して特定する。

## 3. 研究の方法

### 1) F<sub>2</sub>世代におけるQTL解析

冬型および夏型の発芽形質を持つ野生株系統を交配し、F<sub>2</sub>世代の約100系統を用い、低温と高温における発芽形質の分離を調べた。次に、高温および低温条件で高発芽率、あるいは低発芽率を示すF<sub>2</sub>、約20系統ずつからDNAを調製し、RAD-seqにより各F<sub>2</sub>の遺伝型をゲノムワイドに調べ、発芽形質を支配するQTLを検出した。さらに、必要に応じてBIL(Backcross inbred lines)を作成し、マッピング集団を作成した。

### 2) 次世代シーケンサーを用いたゲノム配列の決定と候補遺伝子の絞り込み

F<sub>2</sub>あるいはBIL系統の後代でマッピング集団を作成し、高発芽率および低発芽率を示した約20系統ずつを選び、両親と共に次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を決定した。Col-0系統のゲノムをレファレンスとしてゲノム配列を構築し、発芽の表現型と両親間の配列の多型から、QTLの候補となる遺伝子を抽出した。

### 3) 組換え自殖系統(RIL)の作出

F<sub>2</sub>世代の発芽解析では、QTLの検出感度が低い可能性が考えられた。このため、各交配とも100個体のF<sub>2</sub>を自家受粉させ、単粒系統(single seed descent; SSD)法でF<sub>8</sub>世代を目標にRILを

作成する。これをマッピング集団とし、 $F_2$ と同様に発芽形質と遺伝型を調べ、各温度における発芽の QTL を検出する。

#### 4) *Ler/Cvi-1* 準同質遺伝子系統 (NIL) を用いた高温発芽の QTL 解析

*Ler* をバックグラウンドとして *Cvi-1* を交配して作成された *Ler/Cvi-1* 準同質遺伝子系統集団は 92 の NIL のセットで構成され、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から入手した。解析ソフト R/qtl2 (Broman et al. 2018, <https://kbroman.org/qtl2/index.html>) を用い、高温条件の発芽率と染色体情報を元に QTL 解析を行った。本研究では、5%および 20%水準で閾値を超える LOD スコアを持つ染色体領域に注目し、さらにこの領域の遺伝型と表現型(高温条件の発芽率)の関係を確認した。

### 4. 研究成果

#### 1) $F_2$ 世代を用いた、発芽のフェノロジーを支配する量的遺伝子座の解析

夏型のフェノロジーを示す系統の種子は低温で発芽が抑制され、高温で発芽するが、冬型の種子は低温で発芽しやすく、高温で発芽が抑制される。そこで、夏型と冬型の温度反応性を示す系統の交配(組合せ A)で得られた  $F_2$  世代の分離を調べた。まず、低温と高温の発芽、それぞれの遺伝的分離を調べたところ、いずれも複数の遺伝子が関与する量的遺伝子座に支配されることが示された。次に、低温と高温の発芽形質の関連を調べたところ、両者は独立に遺伝し、それぞれ別の遺伝子に支配されることが示唆された。さらに、高温で発芽する 10 個体の  $F_2$  と発芽しない 15 個体の  $F_2$  を選び、それぞれの混合 DNA を鋳型とし、SSR マーカーを用いて遺伝型を調べた。その結果、高温発芽を支配する主要な遺伝子座が 5 番染色体下腕 (*HTG1*) と 2 番染色体下腕 (*HTG2*) に検出された。次に、QTL をより高精度に検出し、また座乗する染色体領域をより絞り込むため、RADseq 法を用いた個体毎の遺伝型分析を行い、それぞれの座乗位置を確認した。

これら主要遺伝子座のマッピングベースクローニングを目的に、高温発芽を示す  $F_2$  個体に冬型系統を戻し交雑し、いずれかの染色体のみが夏型系統由来の染色体領域を持つ BIL (Backcross inbred lines) を作成した。組合せ A の  $F_2$  系統と BIL (Backcross inbred lines) のジェノタイプピングと発芽試験から、安定した高温発芽性は *HTG1* と *HTG2* の両者が夏型のホモあるいは一方が夏型のホモで他方がヘテロの個体にのみ現れることを明らかにした。この情報を元に、高温発芽性を示した BIL 系統および  $F_2$  系統を選び、それぞれ *HTG1* と *HTG2* の単離同定に向けたマッピング集団を作成した。*HTG1*、*HTG2* のいずれも、後代の高温発芽性が 1 因子のメンデル遺伝に適合する遺伝的分離を示し、遺伝子の単離同定が可能であることが示された。

#### 2) 高温発芽性を支配する HTG 領域の絞り込みと遺伝子の同定

*HTG1* のマッピング集団から、高温で高いあるいは低い発芽率を示す 20 個体ずつを選び、次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を決定した。高温高発芽個体に共通して存在する夏型系統由来の配列と高温低発芽個体に共通して存在する冬型系統由来の配列の解析から、*HTG1* は 5 番染色体下腕の約 600kbp の領域に座乗し、その候補として 81 遺伝子が抽出された。このうち、最も有力な 1 遺伝子については、発芽の高温反応性に関わることを示すデータを得ており、*HTG1* である可能性が高いと判断している。*HTG2* についても、現在ゲノム配列の解析を行っている。

#### 3) 低温発芽性を支配する QTL の解析

組合せ A において、低温条件の発芽は両親間の差がやや小さく、 $F_2$  世代の発芽解析では低温条件での発芽形質について信頼性の高い判断をすることが出来ず、低温発芽の QTL 解析が困難と判断した。そこで、特に低温条件での発芽形質が顕著に異なる別の組合せ B を用い、 $F_2$  集団を作成して発芽形質を解析した。組合せ A と同様、低温条件の発芽は複数の量的遺伝子座に支配され、高温条件の発芽を支配する遺伝子座とは異なることを示す結果を得た。また、発芽形質の分離が明瞭に認められたため、 $F_2$  世代を用いた遺伝子座の検出が十分に可能と判断した。

組合せ B に用いた夏型タイプの発芽を示す系統はゲノム配列情報がデータベースに登録されていなかったため、次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を決定した。得られた配列を元に SSR マーカーを設計し、ラフマッピングを行ったところ、1 番染色体上腕、3 番染色体上腕、4 番染色体下腕に低温発芽を支配する QTL が検出された。さらに、RADseq 法を用いて個体毎の遺伝型分析を行ったところ、1 番染色体上腕および 3 番染色体上腕の QTL の存在が明確に検出された。

#### 4) 組換え自殖系統の作成

夏型および冬型の発芽をもたらす主要 QTL 以外の量的遺伝子座をさらに高感度に検出し、遺伝子の単離同定を容易にするため、単粒系統法による組換え自殖系統 (RIL) の作成を行った。組合せ A では  $F_8$  世代、98 系統の確立を完了し、組合せ B では  $F_6$  世代の 178 系統を得た。これらの系統の発芽形質と遺伝型を調べることで、発芽の温度反応性を制御する QTL がより高感度に検出され、遺伝子間相互作用についても解析することが出来ると考えている。また、 $F_2$  および BIL 由来のマッピング集団の情報と合わせることで、*HTG1*、*HTG2* を初めとした、遺伝子の単離同定がより容易に行われると期待される。

#### 5) *Ler x Cvi* 準同質遺伝子系統 (NIL) を用いた高温発芽性の QTL 解析

シロイヌナズナの分子遺伝学的研究で世界的によく利用されている *Ler* 系統は、これまで解析した 400 系統の中で最も高温で発芽する系統である。そこで、全染色体に渡り、*Ler* をバックグラウンドとして *Cvi* 由来の染色体の一部を持つ準同質遺伝子系統を用いることにより、高温発芽の異なる自然変異を効率的に見出すことにした。

*Ler* と冬型の *Cvi* の交配から作成された 92 の準同質遺伝子系統 (NIL) をストックセンターから入手し、人工気象室で 3 反復、野外の網室で 1 反復の生育を行い、高温発芽遺伝子座の同定に向けた QTL 解析を行った。その結果、各染色体に 1 つ以上、合計 7 つの高温発芽性 QTL を見出した。このうちの 2 つは、組合せ A から見出した *HTG1* と *HTG2* 領域と重複しており、高温発芽を支配する主要な遺伝子は系統間で共通である可能性が示された。また、3 つは休眠を支配する QTL と重複した領域から検出され、休眠性との関連が示唆された。

既知の QTL とは異なる 3 番染色体上腕の QTL、*HTG7* についてマッピング系統を作出し、高温発芽性の遺伝解析を行ったところ、1 遺伝子のメンデル遺伝を示すことが明らかとなった。このため、高温高発芽率および低発芽率を示す系統から DNA を調製し、ゲノム配列の解析から *HTG7* 遺伝子の同定を行う予定である。

*HTG1* と *HTG2* 領域に重複して検出された QTL は、組合せ A の系統と同一の遺伝子である可能性と異なる可能性がある。もし、同一の遺伝子座であれば、*HTG1* と *HTG2* 領域を絞り込み、遺伝子の単離同定を促進することが出来る。また、異なる遺伝子座であれば、新たな遺伝子の発見に繋がるため、*HTG7* と同様にマッピング系統を作出した。

## まとめ

夏型と冬型のフェノロジーを可能とする発芽の季節決定には、高温と低温、両方の反応性が必要であり、いずれも複数の遺伝子座に制御される量的形質であることが明らかとなった。交配組合せ A では、高温反応、B では主に低温反応に関わる遺伝子を単離できる準備が整うと共に、高温発芽を支配する QTL の一つ、*HTG1* については候補遺伝子の一つを同定した。また、夏型系統由来の高温発芽遺伝子を持つと期待される *Ler* をバックグラウンドとして *Cvi* 由来の染色体の一部を持つ準同質遺伝子系統を用いることにより、系統作成にかかる年月を省き、短期間で 7 つの高温発芽性 QTL を見出した。このうちの 2 つの QTL は、組合せ A で見出された *HTG1*、*HTG2* と同じ領域であり、夏型系統の遺伝的な分化に関与する可能性が考えられた。一方、*Ler/Cvi* で独自に見出された QTL を含む 3 遺伝子座について、マッピング集団を作成することができた。このため、分子マーカーを用いたマッピングと次世代シーケンサーを用いた手法を組み合わせることで、早期の遺伝子同定が期待される。

## < 引用文献 >

- Broman KW, Gatti DM, Simecek P, Furlotte NA, Prins P, Sen S, Yandell BS, Churchill GA. (2018) R/qtl2: software for mapping quantitative trait loci with high-dimensional data and multi-parent populations. *Genetics* 211:495-502
- Cetl and Effmertova (1967) The role of the temperature factor in the geographical distribution of "summer annual" and "winter annual" natural populations of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 4
- Evans & Ratcliffe (1972) Variation in 'after-ripening' of seeds of *Arabidopsis thaliana* and its ecological significance. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 9
- Footitt et al. (2011) Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *PNAS USA*, 108(50), 20236-20241.
- Footitt et al. (2013) Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes., *Plant J.*, 74(6), 1003-1015.
- Krämer, U. (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4, 303.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 新津 嵩大、渡辺 暢斗、高木 健太郎、永田 果穂、井内 敦子、井内 聖、小林 正智、川上 直人
2. 発表標題 シロイヌナズナ種子発芽の高温反応性を制御する自然変異遺伝子座のマッピング
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺暢斗、清水諒、井内敦子、永田果穂、高木健太郎、井内聖、小林正智、川上直人
2. 発表標題 シロイヌナズナ種子発芽の温度反応性を支配する自然変異遺伝子座の解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田果穂、川上直人
2. 発表標題 シロイヌナズナ種子の高温発芽能を左右する自然変異遺伝子座の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上直人、丸山紘輝、重枝 絢、長竹 望、清水 諒、棚内美咲、井内 聖、小林正智
2. 発表標題 シロイヌナズナ野生株における種子発芽の温度反応性の自然変異
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
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	井内 聖  (Iuchi Satoshi)  (90312256)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員   (82401)	

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