

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05538

研究課題名(和文)アズキの機械化適性に関わる草型形質の遺伝機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the genetic mechanism of plant architecture for mechanization suitability in azuki bean.

研究代表者

森 正彦 (Mori, Masahiko)

帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・准教授

研究者番号：60645711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アズキの胚軸長を制御する2つの遺伝子座のうち、第7染色体に座乗するqECL7を417 kbp領域内に、第10染色体に座乗するqECL10を205 kbp領域内に絞り込んだ。遺伝子発現解析の結果から、qECL7の候補遺伝子として1遺伝子を、qECL10の候補遺伝子として3遺伝子をそれぞれ選定した。ファインマッピング結果、節間長QTLのqSTL7とqECL7は同一の遺伝子で制御されることが示唆された。圃場環境下で安定して発現する葉柄開度QTLを第4染色体上に特定した。本研究により、アズキの機械化適性の向上に重要となる草型関連形質の遺伝情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上胚軸長や低節位節間長の伸長制御や葉柄開度など、アズキの機械化適性に関連する遺伝領域を明らかにした。この結果は、数cmレベルでのアズキ草型の改良だけでなく、総合的な草型改良を可能とする。これらの情報は、栽培品種に内在する遺伝変異から得られた結果であるため、即座に育種利用が可能でありDNAマーカーを利用した実用育種への波及効果が大きい。加えて、アズキの栽培現場において開発が強く求められている大型汎用機器を使用した省力機械化栽培技術の確立に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among the two loci controlling epicotyl length in adzuki bean, we narrowed down qECL7 located on chromosome 7 to a 417 kbp region and qECL10 located on chromosome 10 to a 205 kbp region. Gene expression analysis identified one candidate gene for qECL7 and three candidate genes for qECL10. Fine mapping results suggested that the internode length QTL qSTL7 and qECL7 are controlled by the same gene. We also identified a petiole angle QTL that stably expresses under field conditions on chromosome 4. This study provided genetic information on plant architecture traits for mechanization suitability in azuki bean.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：アズキ 機械化適性 胚軸長 節間長 葉柄開度 QTL 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

アズキは国内のマメ類ではサイズに次ぐ生産量となっており、その9割以上が北海道で生産されている。農家戸数の減少による1戸あたりの農地面積が拡大する中、北海道のアズキの栽培現場では大型汎用機器を使用した中耕・除草作業や一斉収穫を可能とする省力機械化栽培技術の開発が強く求められている。アズキの機械化適性は、胚軸長(地表面から初生葉節までの長さ)と低節位の節間長および葉柄の開度と強く関連する。例えば、出芽後の除草のためのカルチベーターによる中耕時には、耕した土で幼植物体が埋没しないような長い胚軸(6 cm以上)を必要とする。開花前の中耕時には、作業機による植物体への損傷を軽減するために、垂直方向に立った葉柄(小さい開度)をもつことが望ましい。また、コンバインによる収穫時には、地表面から最下位着莢位置までの高さが地際の莢を刈り取り刃で切断することで生じる収穫ロスに影響するため、10 cm以上を確保する必要がある。この最下位着莢位置までの高さは、胚軸長および節間長と関連する。効率的に機械化適性をもつ実用品種を開発するためには、各形質に関連する原因遺伝子を特定することでマーカー利用選抜(MAS)を実施できる基盤を整える必要がある。

申請者は、アズキの機械化適性に関わる胚軸長および節間長の遺伝変異の機構を解明するために、「十育161号」(長胚軸, 長節間)と「ちはやひめ」(短胚軸, 短節間)との交配後代( $F_2$ 世代)を用いて解析に取り組んできた。QTLs解析を行ったところ、第7染色体と第10染色体に「十育161号」の対立遺伝子をもつことで胚軸を長くする胚軸長QTLs( $qECL7$ と $qECL10$ )を検出した。QTLを検出した染色体領域には既報のQTLsが存在しなかったため、これらは新規QTLsであると考えられた。次に、 $qECL7$ と $qECL10$ の各領域の詳細化を進めた結果、両座ともに潜性ホモ接合型で長胚軸となることが示され、長胚軸性個体の作出には $qECL7$ と $qECL10$ の両QTLsを「十育161号」型にもつ必要があることが明らかとなった。しかし、 $qECL7$ と $qECL10$ の座乗領域には多数の推定遺伝子が存在するため、候補遺伝子の特定には至っていない。第1節間および第2節間長に関連するQTL( $qSTL7$ :「十育161号」型が節間長を長くする効果)を $qECL7$ と同一の領域に特定した。これまでに得られた長胚軸個体は、全ての個体で低節位の節間が長かった。この結果から、 $qECL7$ と $qSTL7$ は強連鎖の関係あるいは同一遺伝子が胚軸および節間伸長を制御していることが推察されたが詳細は不明なままである。一方、葉柄開度については「十育161号」が「ちはやひめ」よりも小さいことがわかっているが分離集団を用いて解析を行っていないためQTLsは特定されておらず、胚軸長QTLsの $qECL7$ や $qECL10$ との関係性についても明らかになっていない。

マメ類の胚軸長は、下胚軸が伸長することで子葉を地上に押し上げる下胚軸伸長型と、下胚軸がほとんど伸長しないで子葉を地中に留めて上胚軸を伸長させて出芽後に初生葉を展開する上胚軸伸長型に類別される。研究の先行しているサイズは下胚軸伸長型で、これまでに自然突然変異に起因する4つの遺伝子座が連鎖地図上に同定されている。しかし遺伝子は単離されていないために、その分子的なメカニズムは不明である。また、上胚軸伸長型のアズキについても胚軸長QTLsは同定されているがその単離には至っていない。申請者がこれまでに同定した2つのQTLs( $qECL7$ と $qECL10$ )の原因遺伝子を特定して、その機能を明らかにすることで、胚軸の伸長制御機構が解明できると考えた。また、 $qECL7$ と $qSTL7$ の遺伝機構を解明することにより、連鎖あるいは多面発現による効果が明らかになり、今後、数cmレベルでの草型の改良が可能となると考えた。また、従来着目されてこなかった葉柄開度の遺伝子を特定することで、総合的な草型改良への知見が得られ、実用育種への波及効果が大きいと考えた。以上のような点から本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

これまでの準備研究では、「十育161号」と「ちはやひめ」の交雑 $F_2$ 集団に由来するヘテロ残余系統(RHLs)を用いて、 $qECL7$ を第7染色体に座乗する2つのDNAマーカー間の1.7Mbの領域に絞り込んでいる。一方、第10染色体に特定した $qECL10$ は染色体長腕末端から255kbの領域内にマッピングしている。本研究では、 $qECL7$ と $qECL10$ の原因遺伝子をファインマッピングおよび網羅的な遺伝子発現解析により特定することを目的とした。

最下位着莢位置までの高さは胚軸長だけでなく、特に低節位の節間長が重要となる。そこで、下位節の節間長を制御する $qSTL7$ の原因遺伝子を特定するとともに、当該遺伝子と $qECL7$ 遺伝子との関係性を明らかにすることを目的とした。

葉柄開度は中耕や除草作業の際に植物体の損傷を少なくする上で重要な形質である。しかし、個体毎の葉柄開度は葉位や植え付け場所によって大きく変化すると考えられる。安定的に形質の表現型を取得するために、組換え自殖系統(RILs)は $F_{10}$ 114系統を供試して葉柄開度に関連するQTLsおよび候補遺伝子を特定することを目的とした。

これまでに、上胚軸長の伸長の制御に関する分子的基礎の解明を目指した研究はモデル植物を含めて他に例がなく、本研究課題はアズキの機械化適性と大きく関わる発芽後の植物の形態形成における新たな研究成果が期待できる。また本研究では、栽培品種に内在する機械化適性の

遺伝変異を明らかにするため、即座に育種利用を可能にし、アズキの省力化栽培技術の開発に貢献できる。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 *qECL7*および*qECL10*のファインマッピング

普通胚軸品種の「ちはやひめ」と長胚軸系統の「十育 161 号」の交雑 F<sub>1</sub> 種子の自殖により得られた F<sub>2</sub> 集団から、*qECL7* 領域をヘテロ接合型にもち、*qECL10* 領域を「十育 161 号」ホモ接合型にもつ個体 (#223) および *qECL7* 領域を「十育 161 号」ホモ接合型にもち、*qECL10* 領域を「十育 161 号」ヘテロ接合型にもつ個体 (#286) をそれぞれ選抜した。#223 個体を自殖し、*qECL7* 領域内の 6 種の DNA マーカー間で組み換えをおこした個体を F<sub>3</sub> から F<sub>5</sub> 世代で選抜、ホモ固定した計 7 系統を *qECL7* のファインマッピングに供試した。#286 個体を自殖し、*qECL10* 領域内の 13 種の DNA マーカー間で組み換えをおこした個体を F<sub>4</sub> から F<sub>8</sub> 世代で選抜し、ホモ固定した計 5 系統を *qECL10* のファインマッピングの材料とした。

これらの材料は園芸培土を充填したセルポットに播種し、昼間 22 / 夜間 15、16 時間日長、光量子 360 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の環境下で栽培した。胚軸長の調査は、胚軸の伸長が停止した播種後 23 日目に行った。個体毎に地表面から初生葉節の托葉までの長さを計測した。

#### 3.2 RNA-seq による *qECL7* および *qECL10* の候補遺伝子の選定

普通胚軸品種の「ちはやひめ」と長胚軸系統の「十育 161 号」の胚軸伸長時における発現遺伝子を網羅的に解析し、*qECL7* と *qECL10* の候補遺伝子を選定するために実施した。消毒後の種子を 4 倍希釈した MS 寒天培地に播種し、17.5 °C の恒温条件、16 時間日長で植物体を栽培した。発芽後 3 日目の植物 4 個体を 1 サンプルとして品種毎に RNA を 3 反復抽出した。次世代シーケンス解析 (NovaSeq6000) 後、両親品種間の発現量が異なる遺伝子を選定した。

#### 3.3 *qSTL7* のファインマッピング

3.1 で供試した #223 の後代系統の 7 系統を使用した。これらの材料を 3.1 と同様にセルポットに播種し、人工気象機内 (22 / 15、16 時間日長、光量子 360 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) で栽培した。播種 34 日後に初生葉節から第 1 節間および第 1 節間から第 2 節間までの長さを計測し、それぞれ第 1 節間長および第 2 節間長とした。なお、各データは 1 系統あたり 10 個体の平均値から算出した。

#### 3.4 葉柄開度 QTL の特定と QTL 領域の詳細化

「十育 161 号」/「ちはやひめ」F<sub>10:12</sub> RILs 114 系統を供試した。RILs は 1 系統あたり 11 個体を 1 反復、両親系統は 11 個体を 5 反復栽培した。北海道立総合研究機構十勝農業試験場の試験圃場に畝間 60 cm、株間 20 cm で播種し、播種後は慣行法により栽培を行った。

2021 年は播種後 72 日目の開花盛期に、2022 年と 23 年は播種後 48~58 日目の開花期直前にデジタル傾斜計および分度器を用いて葉柄開度を計測した。地面と垂直方向の主茎と葉柄の間のなす角度を葉柄開度とし、本葉第 4 葉の葉柄開度を 1 系統あたり 6 株計測した。

「十育 161 号」と「ちはやひめ」のシーケンス情報をもとに、計 108 種の DNA マーカーを用いて作製した連鎖地図を用いて MapQTL ver.6 (van Ooijen 2009) で QTL 解析を行った。LOD 値の閾値は 1,000 回の permutation test を行い決定した ( $p < 0.05$ ; Churchill and Doerge 1994)。

4.4 で第 4 染色体の 50 Mbp 領域に検出した開花始期の葉柄開度 QTL の領域を詳細化するために、「ちはやひめ」/「十育 161 号」の交配に由来する F<sub>2</sub> 集団からこの領域をヘテロ接合型にもつ #102 を選抜し、#102 の自殖により得られた F<sub>3</sub> 種子を実験材料として供試した。96 個体を帯広畜産大学圃場に畝間 60 cm、株間 20 cm で播種し栽培した。播種後 62 日目の開花期に本葉第 4 葉の葉柄開度をデジタル傾斜計で測定した。QTL の効果の検証には計 5 種の DNA マーカーを用いた。

### 4. 研究成果

#### 4.1 *qECL7* および *qECL10* のファインマッピング

#223 由来の組み換え 7 系統のうち、3 系統は「十育 161 号」と同程度の長い胚軸をもち (6.6~8.5 cm)、4 系統は「ちはやひめ」と同様に胚軸が短かった (4.4~5.8 cm)。第 7 染色体上の 10.211 Mbp から 10.628 Mbp 領域間で組み換えが起こることで胚軸長に大きな変化があったことから、*qECL7* は 417 kbp 領域間に存在することが明らかとなった。Vigna Genome Server (VIGGS) によると、この領域内には 35 個の遺伝子が推定されていた。

#286 由来の組み換え 5 系統のうち、第 10 染色体上の 28.403 Mbp から 28.608 Mbp 領域の約 205 kbp の領域内に共通して「十育 161 号」の遺伝子型をもっていた 4 系統の胚軸長は「十育 161 号」と同程度となり「ちはやひめ」よりも長かった。この結果より、*qECL10* はこの 205 kbp 領域間 (推定遺伝子数: 31 個) に存在することが示された。

以上のように、各 QTL の原因遺伝子をマッピングにより単離することを試みたが、組み換え頻度が極めて小さくなったため候補遺伝子領域の詳細化が困難となった。このため、4.2 の網羅的な遺伝子発現解析の結果と合わせて候補遺伝子を選定することを試みた。

#### 4.2 RNA-seq による *qECL7* および *qECL10* の候補遺伝子の選定

「ちはやひめ」と比較して「十育 161 号」で発現量が増加した遺伝子数は 486 個、発現量が減少した遺伝子数は 206 個あり、全遺伝子 (27,406 個) のうち約 2.5% が両親間で異なる発現量

となった。

*qECL7*の候補領域(417 kbp)に着目したところ,35個の推定遺伝子の内,*Vigan.07G112500.01*のみで両親間の発現量に差があり,「ちはやひめ」で発現量が多かった。*qECL10*の候補領域(205 kbp)に含まれる31個の推定遺伝子のうち,7個の遺伝子で両親間の発現量に差があり,*Vigan.10G244100.01*,*Vigan.10G244200.01*,*Vigan.10G244300.01*,*Vigan.10G245300.01*の4つは「ちはやひめ」で発現量が多く,*Vigan.10G244700.01*,*Vigan.10G245400.01*,*Vigan.10G246300.01*の3遺伝子は「十育161号」で発現量が増加した。

*Vigan.07G112500.01*はシロイヌナズナにおいてジベレリンの不活性化に関与する酵素をコードする遺伝子と配列が類似していた。「ちはやひめ」では合成されたジベレリンが代謝され細胞伸長が抑制される一方で,「十育161号」では代謝酵素がほとんど合成されないためジベレリンの作用によって個々の細胞が「ちはやひめ」よりも長く伸長し胚軸が長くなったと推察された。今後はジベレリンの定量や阻害剤による表現型への影響等を調べるとともに,ゲノム編集等の技術を用いて相補性検定を進める必要がある。*qECL10*の候補領域内に*Vigan.10G244100.01*,*Vigan.10G244200.01*,*Vigan.10G244300.01*の3コピーがタンデムに配列していた。これらの遺伝子はペクチンメチルエステラーゼをコードする遺伝子と相同性が高かった。ペクチンはペクチンメチルエステラーゼによって脱メチル化され,カルシウム架橋を形成する。これらの遺伝子はペクチンのメチル化度を調整し,細胞壁の硬度に関与すると考えられる。発現量の低かった「十育161号」では脱メチル化されるペクチン量が少ないため細胞壁の硬度が弱く細胞の伸長が起こったと予想された。

#### 4.3 *qSTL7*のファインマッピング

「十育161号」の第1節間長と第2節間長はそれぞれ $2.6 \pm 0.3$  cm, $2.7 \pm 0.4$  cmとなり「ちはやひめ」よりも長くなった。組み換え系統のうち第7染色体上の10.211 Mbpから10.628 Mbp領域内に共通して「十育161号」の遺伝子型をもつ3系統の各節間長は「十育161号」と同程度になった一方で,同一領域内を「ちはやひめ」の遺伝子型をもつ4系統よりも有意に各節間長が長かった。

*qECL7*と*qSTL7*は第7染色体の10.211 Mbpから10.628 Mbpの417 kbpの同一領域内に座乗することが明らかとなった。今後は,節間伸長期における*Vigan.07G112500.01*の遺伝子発現を定量し,同一の遺伝子が胚軸長および低位節の節間長を制御しているかを調査する予定である。

#### 4.4 葉柄開度 QTL の特定と QTL 領域の詳細化

葉柄開度を調査した3年間のいずれの年次においても「ちはやひめ」の葉柄は地表面とほぼ水平方向に伸長していたのに対して「十育161号」の葉柄は水平方向よりも斜め上方向に伸長しており,30°程度の差があった。RILsの葉柄開度は $49.5 \sim 115.0^\circ$ (平均値: $80.3^\circ$ ,2021年), $30.7 \sim 92.5^\circ$ (平均値: $59.2^\circ$ ,2022年), $46.7 \sim 118.3^\circ$ (平均値: $82.7^\circ$ ,2023年)の間で連続的に分布した。RILsの中には両親系統の形質値を超える系統も存在した。

QTL解析の結果,開花盛期(2021年)の葉柄開度QTLが第2染色体の2.5 Mbp領域と第4染色体の35.6 Mbp領域に検出された。これらQTLはいずれも「ちはやひめ」の対立遺伝子をもつことで葉柄開度を10°程度大きくする効果があった。一方,開花始期(2022年と2023年)の葉柄開度QTLを第4染色体の50.7 Mbp領域に検出した。このQTLは2ヵ年で安定して発現し「ちはやひめ」の対立遺伝子をもつことで葉柄開度を10°程度大きくする効果が示された。葉柄開度に影響をおよぼすと考えられた葉柄長および小葉の重さについてQTL解析を行ったが,第4染色体の50.7 Mbp領域にこれらのQTLは検出されなかった。

RILsで検出した第4染色体の50.7 Mbp領域のQTLを詳細化するために,#102集団96個体の遺伝子型を「ちはやひめ」型,ヘテロ接合型,「十育161号」型の3グループに分類して葉柄開度の平均値を比較した。その結果,第4染色体の48.3 MbpのDNAマーカーでは「ちはやひめ」型が $73.8 \pm 16.9^\circ$ ,ヘテロ接合型が $63.4 \pm 14.9^\circ$ ,「十育161号」型が $61.9 \pm 13.9^\circ$ となり「ちはやひめ」型の遺伝子型をもつグループの葉柄開度の平均値が有意に大きくなった。また,ヘテロ接合型と「十育161号」型との間に差がなかったことから,葉柄開度を小さくする「十育161号」の遺伝子型が顕性形質であることが明らかとなった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kachapila Modester, Horiuchi Yuki, Nagasawa Hidetaka, Michihata Noe, Yoshida Toru, Kato Yuta, Bethke Paul C., Kato Kiyooki, Mori Masahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Fine-Mapping of qECL7.1, a Quantitative Trait Locus Contributing to Epicotyl Length in Adzuki Bean ( <i>Vigna angularis</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Agriculture	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agriculture13071305	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Modester Kachapila, Yuki Horiuchi, Hidetaka Nasegawa, Noe Michihata, Toru Yoshida, Yuta Kato, Paul C. Bethke, Kiyooki Kato, Masahiko Mori
2. 発表標題 Two major QTLs for epicotyl length qECL7 and qECL10 identified in adzuki bean ( <i>Vigna angularis</i> ) using QTL-seq analysis.
3. 学会等名 第143回日本育種学会講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Modester Kachapila, 堀内 優貴, 吉田 透, 加藤 清明, 森 正彦
2. 発表標題 アズキ ( <i>Vigna angularis</i> ) の開花期と成熟期を制御するQTLの特定
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 2021年

1. 発表者名 森 正彦, Modester Kachapila, 堀内 優貴, 長澤 秀高, 道畑 乃映, 吉田 透, 加藤 清明
2. 発表標題 アズキ ( <i>Vigna angularis</i> ) の草型関連形質のQTL解析
3. 学会等名 第141回日本育種学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Modester Kachapila, Yuki Horiuchi, Takumi Kodama, Toru Yoshida, Kiyooki Kato, Masahiko Mori
2. 発表標題 Identification of QTLs associated with pod maturity in adzuki bean ( <i>Vigna angularis</i> )
3. 学会等名 第141回日本育種学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥居志帆, カチャピラ モデスター, 春日純, 川畑翼, 得字圭彦, 森正彦
2. 発表標題 アズキ上胚軸の伸長制御に関わる環境応答性の品種間差異
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 2023年

1. 発表者名 坂井瑞基, カチャピラ モデスター, グエン トロン, 堀内優貴, 武岡遼, 田村純里, 加藤清明, 森正彦
2. 発表標題 アズキの草型を制御する主要QTLの特定
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 2023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・主査    (80122)	

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			
米国	アメリカ合衆国、農務省	ウイスコンシン大学マディソン校		