

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580027

研究課題名(和文) イタリアンライグラスにおけるセルロース合成変異の分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Molecular genetic study of cellulose biosynthesis mutant in Italian ryegrass

研究代表者

高橋 亘 (TAKAHASHI, Wataru)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所飼料作物研究領域・主任研究員

研究者番号：70455319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースは反芻家畜において重要な栄養源であり、近年ではエタノールの原料としての利用にも注目が集まっている。本研究では、植物のセルロース合成機構解明のため、茎葉が非常にもろい「カマイラス」と呼ばれる形質を示すイタリアンライグラス系統の飼料成分分析を実施し、同系統のセルロース含量が極端に低く、それを相補するようにヘミセルロース含量が高いことや、正常系統と変異系統をもとに養成した戻し交配集団の表現型の調査により、カマイラスが劣性の1遺伝子支配形質であることを明らかにした。さらに、戻し交配集団を用いたバルクDNA解析により、カマイラス形質関連遺伝子座のライグラス第4連鎖群上の座乗位置を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellulose is one of the most important nutrients for domestic ruminants and is recently recognized as a material for bio-ethanol production. To reveal a mechanism of the cellulose biosynthesis, we analyzed feed composition of a brittle column mutant line of Italian ryegrass and found its lower content of cellulose and higher content of hemicellulose when compared to those of normal lines and cultivars. The brittleness phenotype was not observed in an F1 population derived from a single cross between the mutant and a normal individual, but was segregated in a 1:1 ratio in a BC1F1 population derived from backcrossing the F1 progeny to the mutant parent, indicating that the brittleness phenotype is controlled by one recessive genetic locus. Bulk segregant analysis with the BC1F1 population selected two SSR markers that have been shown to tightly link together in ryegrass linkage group 4, suggesting that the genetic locus for the brittleness locates around the two SSR markers.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：遺伝子 カマイラス ゲノム 細胞壁 セルロース DNAマーカー 牧草 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁を構成するセルロースは反芻家畜において重要な栄養源であり、また、近年ではエタノールの原料として、その利用に注目が集まっている。一方、リグニンは植物体を強固にし、環境変化や病害虫に対する防御に重要な役割を果たしている。しかし、細胞壁中のリグニンの存在が、セルロースの家畜消化率低下や工業的利用の非効率化を招く主要因となっていることから、リグニンやセルロースの含量を自在に制御するための技術開発は植物分子育種上の重要な課題の一つとなっている。

このような背景の中、近年、双子葉植物では2次細胞壁合成系のマスター遺伝子 SND1 や NST1 が発見され、さらに SND1 が発現制御する MYB58 と MYB63 がリグニン合成系に属する酵素遺伝子群の直接的な転写因子であることが示される等、2次細胞壁合成、特にリグニン合成に関する知見が急速に蓄積されつつある。リグニン合成同様、セルロース合成に関しても上流の転写因子の存在が考えられるが、今のところ、セルロース合成遺伝子 CesA を筆頭にいくつかの合成関連遺伝子の単離が報告されているのみである。

一方、単子葉植物における2次細胞壁合成機構に関する研究は遅れているのが現状で、リグニン合成系の各段階で働く酵素遺伝子の単離・機能解析は進みつつあるものの、アラビドプシスのように2次細胞壁合成系のマスター遺伝子の発見にはいってならず、セルロース合成関連にいたっては非常に報告が少ない。しかし、単子葉植物にはセルロース合成系の異常により茎葉が非常にもろくなる個体が存在し、日本では「カマイラス」と呼ばれている。近年、カマイラス系統の分子遺伝学的解析が進められ、イネやトウモロコシにおいて原因遺伝子が単離された。これらの報告は、単子葉植物におけるセルロース合成機構解明の足がかりとなると思われるが、セルロース合成系には複数の遺伝子が複雑に関与していると考えられていることから、全容解明のためには更なる研究資源の投入が不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、リグニンおよびセルロースの含量を自在に制御できるような植物分子育種技術開発のため、我が国で最も重要な寒地型イネ科牧草の一つであるイタリアンライグラスのカマイラス系統を用いて、カマイラス性質に関与する遺伝子座を特定するとともに、候補遺伝子の機能を明らかにすることで、イネ科植物の2次細胞壁形成時におけるセルロースとリグニンの同調的合成機構解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 植物体の育成および採種

イタリアンライグラスのカマイラス系統

および正常系統を 1/10000a ポットに播種し、温室(24℃)で育成した後、低温・短日条件(4℃; 8h/16h: 明/暗)により春化处理を行った。処理後、13時間以上の日長条件になるように設定した温室(24℃)に移して出穂を促した。交配は袋掛けにより外部から花粉が侵入しないよう、隔離して行った。

(2) 出穂茎の物理的強度測定

開花期に達した出穂茎を個体ごとにサンプリングし、5本束にした際の物理的強度をフォースゲージにより測定した。

(3) 飼料成分分析

約半分の小花が開花した穂の出穂茎を順次サンプリングした。サンプリング後、葉および穂を取り除いた茎を70℃で2日間乾燥処理し、各品種・系統につき5個体の茎を分析に供した。

(4) DNA マーカー解析用集団の養成

カマイラス系統(山育170号)および正常系統(山系32号)を単交配して得たF1集団から個体を選び、カマイラス系統親個体への戻し交配によりさらに世代を進め、BC1F1集団を養成した。

(5) バルク DNA による近傍マーカーの探索

BC1F1集団から任意に選んだ正常5個体およびカマイラス5個体のDNAを等量混合してバルクを調整し、既存のイタリアンライグラス SSR マーカーのプライマーによりゲノムDNAを増幅した。増幅産物をシーケンサーにより電気泳動し、多型の有無を確認した。多型の認められた一部のマーカーについて、バルク調整に用いた個体の多型を個別に解析した。

4. 研究成果

(1) カマイラス系統の特性

カマイラス系統は自重を支えきれず、直立出来ない。また、柔軟性に欠け、折り曲げると亀裂が入り、乖離する(図1)。開花期に達した出穂茎の物理的強度をフォースゲージにより測定した結果、カマイラス系統の出穂茎は既存の8品種・系統の出穂茎が折損する負荷の55%程度で折損し、折損部が乖離するという特徴を示した(図2)。

飼料成分分析の結果、カマイラス系統の総繊維含量は他の品種・系統よりも低く、セルロース含量においては他の品種系統の半分程度の値であった。一方、ヘミセルロース含量は他の品種・系統より顕著に高く、特徴的な細胞壁組成であった(図3)。



図1 正常系統とカマイラズ系統の草姿

A: 正常系統

B: カマイラズ系統

C: 正常系統の折損の様子

D: カマイラズ系統の折損の様子

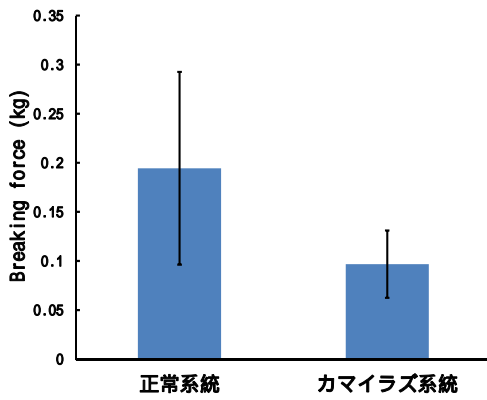


図2 出穂茎の物理的強度

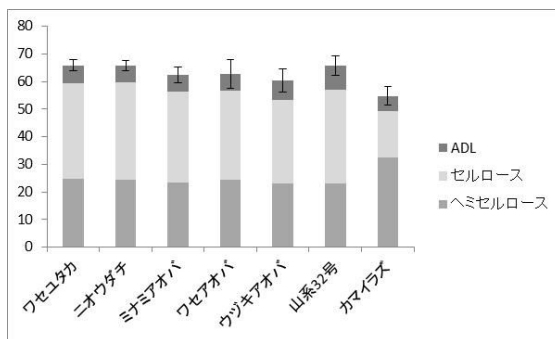


図3 飼料成分の品種間比較
ADL: 酸性デタージェントリグニン

(2) DNA マーカー解析用集団の養成

カマイラズ系統および正常系統の F1 集団において、出穂茎の強度調査および飼料成分分析を行ったが表現型分離が認められなかった。そこで、F1 集団から個体を選び、カマイラズ系統親個体への戻し交配によりさらに世代を進め、BC1F1 集団を養成した。この集団の表現型を調査した結果、表現型が 1:1 に分離することを確認できたことから、カマイラズ形質が劣性の 1 遺伝子により支配されていることを確認した (図 4)。

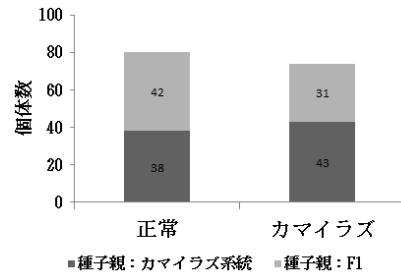


図4 BC1F1 集団における表現型分離

(3) バルク DNA による近傍マーカーの探索

既存のイタリアンライグラス SSR マーカー全 218 個のうち 126 個を用いて正常個体とカマイラズ個体のバルク DNA 解析を行った結果、6 個のマーカーについてバルク間での多型が認められ、そのうち 5 個は第 4 連鎖群に座乗するマーカーであった。多型を確認した 6 個のマーカーについてバルク構成個体を個別に解析した結果、2 個のマーカーにおいて多型と表現型の分離が良く符合することを確認した(データ未掲載)。既存のライグラス連鎖地図 (TAG 113: 270-279) における第 4 連鎖群の情報から、これら 2 個のマーカーは互いに遺伝的に近傍であると推定されることから、カマイラズ形質関連遺伝子座もそれらマーカーの近傍に座乗するものと推定された (図 5)。

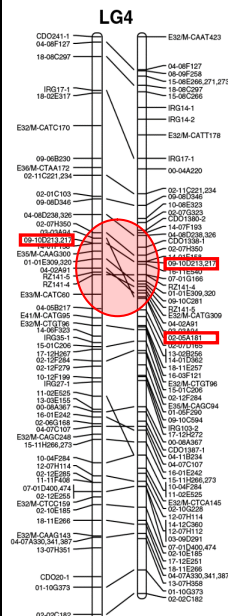


図5 バルク解析で選抜した SSR マーカーの既存ライグラス第 4 連鎖群 (TAG 113: 270-279) 上の位置 (赤) およびそこから推定されるカマイラズ形質関連遺伝子座領域 (赤)

左: 種子親の連鎖地図
右: 花粉親の連鎖地図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計3件)

高橋 亘、小橋 健、藤原 健、水野 和彦、高原 学、高溝 正、イタリアンライグラスにおけるカマイラズ形質遺伝子座乗染色体の同定、日本作物学会、2014年3月29日～2014年3月30日、千葉大学

高橋 亘、小橋 健、高溝 正、イタリアンライグラスにおけるカマイラズ形質遺伝子座解析用集団の養成、日本作物学会、2013年9月10日～2013年9月11日、鹿児島大学

高橋 亘、小橋 健、高溝 正、イタリアンライグラスにおけるカマイラズ系統の飼料成分、日本作物学会、2012年9月10日～2012年9月11日、東北大学

〔図書〕(計2件)

高橋 亘、高溝 正、東京化学同人、形質転換プロトコール【植物編】、2012、88-96

Wataru TAKAHASHI, Tadashi TAKAMIZO, InTech - Open Access Company, Transgenic Plants - Advances and Limitations, 2012, pp 91-116

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 亘 (TAKAHASHI, Wataru)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所飼料作物研究領域・主任研究員

研究者番号：70455319