

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780260

研究課題名(和文)メドウフェスク由来候補遺伝子移入によるペレニアルライグラスの越冬性向上効果の検証

 研究課題名(英文)Candidate gene approach to identify the meadow fescue (*Festuca pratensis* L.)-derived alleles to improve winter-hardiness of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)

研究代表者

田村 健一 (TAMURA, Ken-ichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター酪農研究領域・主任研究員

研究者番号：10414749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年越冬性の改良が強く求められているペレニアルライグラスと交雑可能なメドウフェスクについて、その越冬性関連ゲノム領域を同定する目的で、ペレニアルライグラスにメドウフェスクの一部のゲノム領域が移入したイントログレッション集団を材料に用い、候補遺伝子のアプローチおよび戻し交雑後代のQTL解析により遺伝解析を行った。5つの候補遺伝子を対象にその周辺領域の遺伝子型と耐凍性の関係を解析した結果、VRN1遺伝子周辺領域に耐凍性向上効果が示唆された。一方、圃場越冬性のQTL解析の結果第7連鎖群にメドウフェスク由来アリルが正の効果を示す領域を同定した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the genomic regions in meadow fescue (MF, *Festuca pratensis* L.) associated with QTL to improve winter hardiness in perennial ryegrass (PR, *Lolium perenne* L.). Perennial ryegrass plants with some introgressions from MF were genetically analyzed using two approach; a candidate gene approach and QTL analysis of back crossed population. Comparison of genotypes (MF homo, PR homo or hetero) of MF-PR introgression plants for five candidate genes revealed that MF-derived allele of Vernalization 1 (VRN1) showed positive effect on the freezing tolerance in the PR background. QTL analysis of winter hardiness in the snow-covered region identified a QTL in the linkage group 7, where the MF allele has positive effect. These results could be applied to the molecular breeding to improve winter hardiness of perennial ryegrass.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：イネ科牧草 越冬性 遺伝子 QTL ペレニアルライグラス メドウフェスク イントログレッション

1. 研究開始当初の背景

寒地・寒冷地における草地農業は、しばしば穀実作物などの栽培が困難な厳しい環境条件において営まれるため、寒地型イネ科牧草にとって、冬期間中の致死要因に耐える能力、すなわち越冬性は、翌年の収量や永続性を決定する極めて重要な形質であり、なかでも「耐凍性」と「雪腐病抵抗性」の改良は、重要な育種目標である。寒地型イネ科牧草の越冬性は種間で大きく異なる。ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) は放牧適性や飼料品質に優れた草種であるが越冬性に劣るため、厳寒地では利用できない。そういった地域では越冬性に優れたメドウフェスク (*Festuca pratensis* Huds.) が利用されるが、多くの農業形質はペレニアルライグラスより劣る。この二種は種(属)間交雑が可能であり、その雑種であるフェストロリウムはペレニアルライグラスより高い越冬性を示すが、ペレニアルライグラスの優れた農業形質を維持したまま越冬性を遺伝的に改良するためには、メドウフェスクの越冬性形質のみをペレニアルライグラスへ導入する、イントログレッション(移入)育種の有用性が提唱されている。イントログレッション育種を効率的に進めるためには、両種の越冬性の種間差に関わる遺伝子領域の同定が必要であるが、他殖性であり、また二倍体雑種は不稔であることなどから、連鎖解析など一般的な方法での遺伝解析は制限される。また、一部メドウフェスク由来染色体の導入によりペレニアルライグラスの越冬性が向上することが報告されているが、越冬性向上に関わる遺伝子は明らかになっていない。これまでモデル植物や越冬性作物の分子遺伝学・機能ゲノム研究から越冬性に関与する遺伝子の情報が蓄積されている。ゲノムリソースが少なく、また一般的な遺伝解析が困難なライグラス-フェスク間の越冬性の遺伝解析においては、これらの遺伝子を候補としたアプローチ(candidate gene approach)による逆遺伝学的な手法が有効であると考えられる。

これまでの研究において、越冬性向上のための種間イントログレッション育種に有用な遺伝子を明らかにするために様々な知見の蓄積および研究基盤の構築を行ってきた。越冬性は秋季の低温馴化により向上するが、低温馴化の程度には多くの関連遺伝子の発現量が関与している。そこで低温馴化条件下におけるペレニアルライグラスとメドウフェスク間の網羅的遺伝子発現比較を行い、種間で発現量が明瞭に異なる遺伝子を同定するとともに、メドウフェスク高発現遺伝子の多くは低温誘導性遺伝子であり、越冬性に関連する機能を有する可能性があることや、種間の発現量の差には *cis* 因子、すなわち、プロモータ配列などその遺伝子自体の種間変異が関与していることを明らかにした。また、コムギなどにおいて越冬性 QTL の原因候補遺伝子とされる低温誘導転写因子 *CBF* や春化制

御遺伝子 *VRN1* についても遺伝子単離や連鎖地図へのマッピングを行った。一方、種間の遺伝解析を行うための材料として、上記遺伝子を含むメドウフェスクの様々な一部染色体領域がペレニアルライグラスへ移入された個体集団(イントログレッションライブラリー)を作出するとともに、移入領域の同定のために、比較ゲノムを利用しイントロン多型マーカーを開発した。

以上より、これらの研究材料を用いることで、従来の量的形質座(QTL)解析のアプローチに加え、メドウフェスクに由来する低温馴化時メドウフェスク高発現遺伝子や既知の越冬性関連候補遺伝子周辺領域などの移入によるペレニアルライグラスの越冬性向上効果を検証することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

(1) 候補遺伝子のアプローチによる手法でペレニアルライグラスの越冬性形質の向上に関わるメドウフェスク由来遺伝子を明らかにする。越冬性の候補遺伝子として、低温馴化時メドウフェスク高発現遺伝子である γ -thionin (*THI*)、ice recrystallization inhibition protein 1 (*IRI1*)、metallothionein 2 (*MT2*) 遺伝子、および、コムギなどにおいて越冬性の原因遺伝子と考えられている低温誘導性転写因子をコードする *CBF* および春化制御遺伝子 *VRN1* を対象とする。これらのメドウフェスク由来遺伝子周辺領域がペレニアルライグラスへ移入した系統を作成し、移入が生じていないペレニアルライグラスとの耐凍性や雪腐病抵抗性の比較解析により、当該遺伝子がペレニアルライグラスの越冬性の向上に関与するかどうかを明らかにする。また上記事実を補足する知見を得ることを目的に、低温馴化時メドウフェスク高発現遺伝子については、遺伝子組換え植物体を用いた機能解析により、これらの遺伝子の耐凍性などへの関与を明らかにする。

(2) さまざまなメドウフェスク由来ゲノム領域がペレニアルライグラスに移入したイントログレッション集団(イントログレッションライブラリー)の圃場越冬性の評価により、圃場越冬性に関与する QTL を同定する。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子アプローチによるメドウフェスク由来アレルの越冬性向上効果の検証
①ペレニアルライグラス-メドウフェスクイントログレッション集団を用いた解析

二倍体イントログレッションライブラリーから、メドウフェスク由来の各遺伝子およびその周辺領域が二倍体ペレニアルライグラスへ移入(その他染色体領域が移入している場合を含む)した個体を DNA マーカーにより選抜し、ヘテロ個体間で単交配もしくは複数個体間での交配を行い、各候補遺伝子の分

離集団を作出した。さらにメドウフェスク型ホモ、ペレニアルライグラス型ホモの複数個体間でそれぞれ交配し後代を得た。メドウフェスク由来一部染色体領域の移入を Genomic *in situ* hybridization (GISH) により確認した。得られた集団について、ポット、セルトレイ等で育成した植物体を 2011 年～2014 年の 10 月上旬から 12 月上旬にかけ自然条件下（札幌）で低温馴化させたのち、電解質溶出法（葉身）もしくは冠部凍結法により耐凍性を評価した。メドウフェスク高発現遺伝子については qPCR による遺伝子発現定量を行った。

②メドウフェスク高発現遺伝子のシロイヌナズナを用いた解析

THI、*IRI1* および *MT2* のメドウフェスク由来遺伝子について 35S プロモータに連結したバイナリーベクターを作成し、flower dip 法により形質転換体系統を作出した。T3 形質転換体について、寒天培地上の幼苗を用いて耐凍性を評価した。

(2) イントログレッション集団を用いた圃場越冬性の QTL 解析

3 つの交配組合せの後代からなるイントログレッションライブラリー (A12 (n = 47)、A12-24 (n = 79) および A18-2 (n = 77)) を、2010 年 7 月に札幌・羊ヶ丘の圃場に個体植えし、多回刈条件で管理した。2012 年春まで、越冬性、1 番草乾物重および秋の草勢の調査を 2 あるいは 3 反復で行った。耐凍性は 2010 年秋季に屋外で低温馴化させた冠部組織を -12.5°C および -14.0°C で処理し、3 週間後に再生程度を評価した。メドウフェスク由来ゲノムの検出は 91 DNA マーカーによるジェノタイピングおよび GISH 法により行った。各集団においてメドウフェスクアリの頻度が 5% 以上のマーカー座を対象に、メドウフェスクアリの有無による各形質の平均値の比較を t 検定により行った。

次に圃場越冬性への関与が示唆された第 7 連鎖群の分離集団を作出するために、メドウフェスク由来第 7 連鎖群の一部が移入した二倍体個体 A12-103 と二倍体ペレニアルライグラス「八ヶ岳 D-12 号」由来の 1 個体の交雑により得られた 189 個体について、第 7 連鎖群に座乗する 12 の DNA マーカーによりジェノタイピングを行った。各マーカー座についてヘテロ（ペレニアルライグラス/メドウフェスク）、もしくはペレニアルライグラスホモを判定し、BC1 として連鎖地図を作成した。189 個体中 98 個体について 3 反復で 2012 年 9 月に札幌の圃場に定植し、2013 年春に越冬性（生存程度の 0-9 による評点評価）、画像解析による株中の緑部割合、出穂始め日および一番草乾物重の調査を行い、MapQTL を用いインターバルマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 候補遺伝子アプローチによるメドウフェスク由来アリの越冬性向上効果の検証

①ペレニアルライグラス-メドウフェスクイントログレッション集団を用いた解析

5 つの候補遺伝子について、メドウフェスク由来周辺領域が部分的にペレニアルライグラスへ移入した個体および集団を作出した（図 1）。*MT2* 周辺領域についてはヘテロ、*VRN1* 周辺領域についてはメドウフェスク型ホモ（以降ホモを省略）の個体は雄性不稔を示したため、材料の作出は一部までしかできなかった。メドウフェスク高発現遺伝子について低温馴化後（12 月）の冠部の遺伝子発現量を定量した結果、*IRI1* と *THI* はメドウフェスク型母系においてペレニアルライグラス型のそれぞれ 2.3 および 2.6 倍の有意に高い発現量を示した。*MT2* のヘテロ個体の発現量は葉部においてペレニアルライグラス型より高い傾向を示したが有意差はなかった。5 つの候補遺伝子移入集団を用いて、5～10 数個体のバルクで葉身の耐凍性を評価した結果、*VRN1* は 2 カ年の試験においてメドウフェスク型 > ヘテロ > ペレニアルライグラス型となる傾向が認められた（図 2）。一方、*MT2* はペレニアルライグラス型 > ヘテロであり、また、他の 3 遺伝子は明瞭な差異は認められなかった（試験は 1 カ年のみ）。*IRI1*、*THI* および *CBF* について冠部の耐凍性を母系もしくはその種子等量混合集団を用いて評価した結果、*THI* の種子等量混合集団の耐凍性はメドウフェスク型 > ペレニアルライグラス型であったが、翌年次に母系単位で評価した耐凍性には遺伝子型間に有意な差異は認められなかった。*IRI1* および *CBF* に遺伝子型の違いによる有意な差異は認められなかった（試験は 1 カ年のみ）。以上より 5 つの候補遺伝子のうち、複数年次においてメドウフェスク由来周辺領域の移入が耐凍性に正の効果を示したのは *VRN1* 周辺領域のみであった。

VRN1 の移入個体については *VRN1* の座乗しない 2 番染色体の一部が移入していたため、2 番染色体の移入を除いたヘテロ個体間単交配により分離集団を作出した。この集団はメドウフェスク由来アリの頻度が極端に低い分離の歪みを示し、その -17°C での電解質溶出率はメドウフェスク型で低い傾向を示したものの、ヘテロとペレニアルライグラス型では同程度であった。いずれの集団においても、12 月上旬の葉身におけるメドウフェスク型の *VRN1* 発現量はペレニアルライグラス型の 1/3 から 1/5 程度であった。また *VRN1* 遺伝子周辺領域がメドウフェスク型になると雄性不稔になる傾向を示した。

以上より *VRN1* についてメドウフェスク由来アリのペレニアルライグラスへの移入は耐凍性に正の効果を示す可能性があるが、稔性などの問題から育種への利用は限定される可能性があることが示唆された。

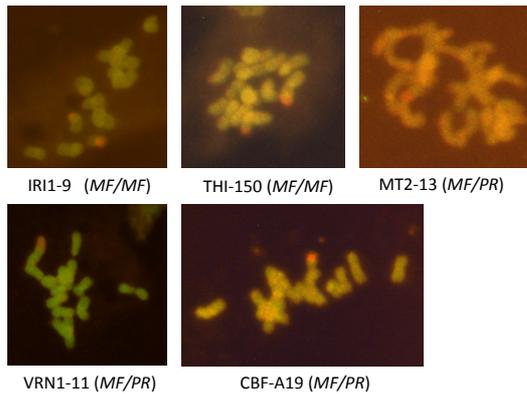


図1 候補遺伝子領域移入個体のGISH画像
赤がメドウフェスク (MF) 由来染色体、緑がペレニアルライグラス (PR) 由来染色体を示す。

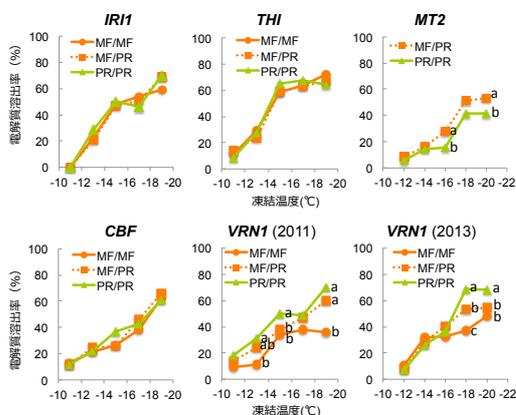


図2 ペレニアルライグラス (PR) -メドウフェスク (MF) -イントログレッション個体集団の候補遺伝子周辺領域の遺伝子型と葉身の凍結処理後電解質溶出率 異なる小文字アルファベットは有意差があることを示す。(P < 0.05, Tukey's HSD test)

②メドウフェスク高発現遺伝子のシロイヌナズナを用いた解析

3つのメドウフェスク高発現遺伝子について、メドウフェスク由来アレルの過剰発現シロイヌナズナについて、幼苗の耐凍性を評価したが、野性型との有意差は認められなかった。以上より、3候補遺伝子の耐凍性への関与は本研究においては認められなかった。

(2) イントログレッション集団を用いた圃場越冬性の QTL 解析

イントログレッションライブラリーの圃場越冬性を調査した2010年~2012年の越冬状況としては、多くの個体で雪腐病の罹病が認められ、1年目の越冬後に4個体(2%)、2年目の越冬後に53個体(26%)の枯死が認められた。形質間の相関を評価した結果、同一年次の越冬性と1番草乾物重は強い相関を示した($r = 0.66 \sim 0.82$)。一方、耐凍性と越冬性および1番草乾物重については、一部の年次・集団で有意な弱い相関が認められた($r = 0.31 \sim 0.39$)。越冬性、耐凍性ともに集団内に変異があり、親の三倍体雑種と同程度の越冬性あるいは耐凍性を示す個体が認められたものの、メドウフェスク並みに優れる個体は認められなかった。DNA

マーカー解析の結果、63%の個体において、少なくとも1マーカー座においてメドウフェスク由来アレルが検出された。また一部の個体についてはGISH法によりメドウフェスク由来染色体の移入・添加を確認した。メドウフェスクアレル頻度が5%以上のマーカー座はA12、A12-24、A18-2それぞれ35(39%)、36(40%)および51(56%)であった。関連解析の結果、3集団共通に越冬性あるいは1番草乾物重にメドウフェスクアレルが正の効果を示す領域が第7連鎖群に認められた。また第2および第5連鎖群にも一部の集団でこれらの形質に正の効果を示すマーカー座が認められた。耐凍性にメドウフェスクアレルが正の効果を示すマーカー座は認められなかった。一方、第4連鎖群など、メドウフェスクアレルが越冬性関連形質に負の効果を示す領域が複数認められた。これらの結果はメドウフェスクゲノムを用いたペレニアルライグラスの越冬性の改良には最適なゲノム領域を導入する必要性を示唆している。

次に、越冬性への関与が示唆されたメドウフェスク由来第7連鎖群について、その分離集団を作成し圃場越冬性を評価した。連鎖解析の結果、A12-103はメドウフェスク由来第7連鎖群の少なくとも31.4cMの領域が移入していた。2012年-2013年の冬期は根雪期間が例年より長く、融雪後には著しい雪腐黒色小粒菌核病の罹病が認められた。融雪1週間後に調査した目視による越冬性評価値と画像解析による緑部割合の角変換値は $r = 0.90$ の高い相関を示した。両形質のQTL解析の結果、イネ0s08g33630オーソログス遺伝子座の近辺に有意なQTLが認められ(図3)、そのピークの説明率はそれぞれ7.6%および8.2%であった。0s08g33630オーソログス遺伝子座がヘテロおよびペレニアルライグラス型の越冬後緑部割合の平均値は、それぞれ2.8%および0.8%であり、5%水準で有意差が認められた。一方、一番草乾物重および出穂始め日については有意なQTLが認められず、検出されたQTLが、生殖生長への移行の早さなど、春の生育速度に関わる形質ではなく、真に越冬性に関係するものであると推察された。土壌凍結の生じない札幌における越冬性には雪腐病の罹病の影響が大きいことから、検出されたQTLは主に雪腐病への抵抗性に関連すると推察された。本研究により、ペレニアルライグラスとメドウフェスクの種間雑種においても、一部染色体の移入個体の戻し交雑後代を解析することで、連鎖解析によるQTLの同定が可能であることが示された。

候補遺伝子のアプローチで耐凍性への関与が示唆されたVRN1は第4連鎖群に座乗するが、圃場越冬性については第4連鎖群にメドウフェスク由来アレルが正の効果を示す領域は認められなかった。これは圃場

越冬性の評価を耐凍性が関与しない積雪地帯においておこなったためと考えられる。今後は、実際の普及目標地域である土壤凍結地帯における圃場越冬性を解析し、本研究で得られた耐凍性関連領域との関係性を評価する必要がある。

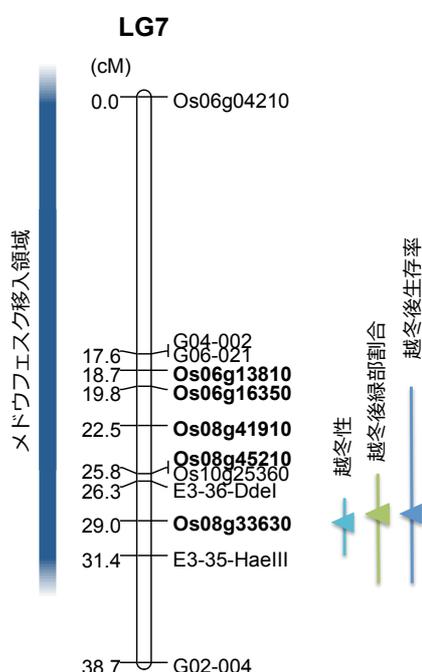


図3 イントログレーション個体の戻し交雑後代集団に認められた第7連鎖群の圃場越冬性QTL (2012-2013) 太字はイントログレーション集団の解析において越冬性 (2011-2012) に有意に関連したマーカー座を示す。

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6件)

①田村健一、田瀬和浩、眞田康治、久保田明人、秋山征夫、フェスク・ロリウム間におけるムギ類耐凍性 QTL *FR-1*, *FR-2* 同祖領域の移入の効果、日本草地学会、2015年3月25-27日、信州大学南箕輪キャンパス (長野県南箕輪村)

②田村健一、田瀬和浩、眞田康治、久保田明人、秋山征夫、メドウフェスク由来候補遺伝子領域のペレニアルライグラスへの移入による耐凍性への影響、日本育種学会、2015年3月21-22日、玉川大学町田キャンパス (東京都町田市)

③田村健一、田瀬和浩、眞田康治、メドウフェスク・ペレニアルライグラス第7連鎖群の越冬性 QTL の同定、日本育種学会、2013年10月12, 13日、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

④田村健一、田瀬和浩、眞田康治、小松敏

憲、久保田明人、ペレニアルライグラスの越冬性向上に有用なメドウフェスク由来ゲノム領域の探索、日本草地学会、2013年3月24-26日、山形大学 (山形県山形市)

⑤田村健一、田瀬和浩、眞田康治、米丸淳一、Comparative transcriptomics between meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) during cold acclimation、Plant and Microbe Adaptations to Cold、2012年6月24-28日、北海道大学 (北海道札幌市)

⑥田村健一、田瀬和浩、眞田康治、小松敏憲、久保田明人、米丸淳一、Molecular breeding for the improvement of winter hardiness in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) by introgression of genes from meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.)、7th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf、2012年6月4-7日、ソルトレイクシティ市 (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 健一 (TAMURA Ken-ichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター酪農研究領域・主任研究員

研究者番号：10414749