

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450005

研究課題名(和文) コムギ春播性遺伝子Vrn-D4のマップベースクローニングと機能解析

研究課題名(英文) Map-based cloning and function analysis of a wheat vernalization gene Vrn-D4

研究代表者

西田 英隆 (Nishida, Hidetaka)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：30379820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究でコムギ春播性遺伝子Vrn-D4の座乗領域は5D染色体動原体近傍の0.09cM領域と特定されていたが、本研究ではVrn-D4が短腕に座乗することを明らかにして座乗領域をさらに絞り込んだ。これとは別に実施した実験で、春播性Vrn-D4保有系統がVrn-A1を2コピーもつこと、しかもそのうち1コピーは5D短腕に座乗し、固有の配列変異を有することを明らかになった。他の春播性Vrn-D4保有系統でも5D短腕のVrn-A1コピー配列が確認され、Vrn-D4の原因遺伝子であることが確認できた。さらに、Vrn-D4の起源についても検討した。

研究成果の概要(英文)：In the previous study, a wheat vernalization gene Vrn-D4 was mapped in a centromeric region, 0.09cM interval, of chromosome 5D. In this study, Vrn-D4 was found to be located on the short arm. This new information narrowed further down the Vrn-D4 region. In another analysis, the line with a spring allele Vrn-D4 was found to carry two copies of Vrn-A1, one of which was located on the short arm of chromosome 5D and had specific polymorphisms. Other lines with a spring allele Vrn-D4 also had this Vrn-A1 copy, which confirmed that the causal gene of Vrn-D4 is the Vrn-A1 copy on the short arm of chromosome 5D. Moreover, origin of Vrn-D4 was analyzed.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：コムギ 春播性遺伝子 Vrn-D4 クローニング Vrn-A1 起源

1. 研究開始当初の背景

(1) コムギの春化要求性を支配する春播性遺伝子

コムギの春化要求性は4個の春播性遺伝子 *Vrn-1* ~ 4 により支配されており、この中でも特に *Vrn-1* 同祖遺伝子 (*Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1*) が異なる気候への適応や安定生産に貢献している。*Vrn-1* ~ 3 は既にクローニングされ、*Vrn-1* が花芽・花器官形成に関わる遺伝子 *API/FUL* のオーソログ、*Vrn-3* がフロリゲン遺伝子 *FT* のオーソログ、また *Vrn-2* はイネやシロイヌナズナには見られない *ZCCT* 遺伝子であることが明らかになっている。

(2) コムギ春化要求性の遺伝学的メカニズムの独自進化

上記の通り、コムギは日長反応性や花芽・花器官形成に関わる遺伝子に春化要求性の機能を付与して、春化要求性のメカニズムを独自進化させたと考えられる。春化反応では冬季の低温を主要な環境シグナルとして用いているが、日長の関与(短日春化)も知られており、春化要求性の遺伝学的メカニズムの詳細な解析は、このように複雑な春化反応の解明につながると期待される。

(3) *Vrn-D4* の遺伝学的解析

Vrn-4 は春播性遺伝子の中で唯一クローニングされていない。*Vrn-4* は D ゲノムの同祖遺伝子 *Vrn-D4* においてのみ自然変異が知られている。課題担当者らの研究グループは、*Vrn-D4* の座乗染色体の特定や、詳細マッピングを進め、*Vrn-D4* が 5D 染色体の動原体近傍にある 0.09cM の領域に座乗することを明らかにした。*Vrn-D4* をクローニングし、その遺伝子機能や、他の春播性遺伝子との相互作用を解析すれば、春化要求性の遺伝学的メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

(1) *Vrn-D4* が座乗する染色体腕の特定

Vrn-D4 の座乗領域は 5D 染色体動原体近傍の 0.09cM にまで絞り込まれたが、短腕と長腕にまたがっている。原因遺伝子の特定に至るためのひとつ方法として、大規模分離集団を用いた座乗領域の絞り込みが考えられるが、動原体近傍では組換え型個体の獲得が容易でなく、多大な労力と時間を要する。一方、*Vrn-D4* が座乗する染色体腕を特定すれば、座乗領域の絞り込みが短期間のうちに大きく進展すると期待される。そこでまず、この解析を優先して実施し、続いて組換え個体を解析して座乗領域の絞り込みを進める必要があると考えた。

(2) *Brachypodium* のゲノム配列情報を利用した *Vrn-D4* 候補遺伝子の解析

Brachypodium はコムギと比較的近縁であり、そのゲノム配列情報とシンテニーを利用してコムギの *Vrn-D4* 座乗領域に存在する遺伝子を推定することができる。この遺伝子の中から *Vrn-D4* 遺伝子型と完全に対応する配列変異を見出せば、原因遺伝子を特定できると考えた。

(3) *Vrn-D4* と他の春播性遺伝子の相互作用

春化要求性の遺伝学的メカニズムにおいて *Vrn-D4* が果たす役割を明らかにするためには、*Vrn-D4* と他の春播性遺伝子の相互作用を表現型と遺伝子発現の両面から解析することが有効であると考えた。

3. 研究の方法

(1) *Vrn-D4* が座乗する染色体腕の特定

Chinese Spring のナリテトラソミック系統 N5DT5B (5D 染色体非保有) と Triple Dirk の準同質遺伝子系統 (NIL) である TD(F) (春播性 *Vrn-D4* 保有) を交雑して得られた F2 集団 192 個体の中から、5D テロセントリック染色体をもつ個体を選抜し、無春化・長日 (16 時間日長) 条件における出穂期を調査した。

(2) *Brachypodium* のゲノム配列情報を利用

した *Vrn-D4* 候補遺伝子の解析

先行研究において明らかになった *Vrn-D4* 座乗領域の DNA マーカー配列情報を用いて、*Brachypodium* における該当領域と座乗遺伝子を特定した。そのコムギ同祖遺伝子について座乗領域や配列を解析し、*Vrn-D4* の原因遺伝子の特定を試みた。

(3) *Vrn-D4* と他の春播性遺伝子の相互作用 表現型

Triple Dirk の NILs (*Vrn-D4* や *Vrn-1* 同祖遺伝子の遺伝子型が異なる) 同士を交雑して得られた F₂ 集団を無春化・長日 (16 時間日長) 条件で栽培し、遺伝子型による到穂日数の違いを基に相互作用を解析した。

遺伝子発現

Triple Dirk の NILs 及び Bobwhite (BW) の播種 1、3、5 週間後における *Vrn-1* 同祖遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

(1) ~ (3) の実験結果や当時の研究環境の変化に基づき、研究の進展には (4) と (5) の解析が必要であったため、下記の通り実施した。

(4) *Vrn-D4* 原因遺伝子の特定

Vrn-A1 コピー数変異の解析

Vrn-D4 に関する準同質遺伝子系統である TD(F) (春播性 *Vrn-D4* 保有) と TD(C) (秋播性 *vrn-D4* 保有) 及び対照系統を供試し、リアルタイム PCR 法により *Vrn-A1* のコピー数を推定した。

Vrn-A1 コピー配列の解析

国際コムギゲノム配列コンソーシアムが解読した 5D 短腕の配列情報を解析した。5A 長腕に由来する重複挿入配列が見出され、その中に存在する *Vrn-A1* を解析した。この *Vrn-A1* コピー配列に特異的な変異 (RIP-3 配列及びエキソン 4 における SNPs) を利用し、*Vrn-D4* 遺伝子型との関係を解析した。

(5) *Vrn-D4* の起源

春播性 *Vrn-D4* はインド周辺地域の在来品種が保有することが知られている。春播性 *Vrn-D4* の起源を明らかにすべく、起源地 (イラン) からインド周辺地域に至る地域 (6 ヶ国) の在来品種 194 系統を供試し、5DS 染色体における 5A 長腕由来重複挿入配列の有無、RIP-3 配列及びエキソン 4 における SNPs を解析した。

4. 研究成果

(1) *Vrn-D4* が座乗する染色体腕の特定

5D 短腕もしくは長腕のテロセントリック染色体を 1 個もつ F₂ 個体が得られたので、それぞれ自殖させてテロセントリック染色体を 0 ~ 2 本もつ個体を育成し、出穂期を調査した。

その結果、5D 短腕が 1 本の個体 (76.3 日、6 個体) は、0 本の個体 (97.1 日、12 個体) よりも出穂が 20.8 日早かった。また、5D 短腕が 2 本の個体 (63.6 日、8 個体 (TD(F) を含む)) は 1 本の個体よりも 12.7 日早かった。

春播性 *Vrn-D4* (早生) は秋播性 *vrn-D4* (晩生) に対して不完全優性であり、*Vrn-D4* が 5D 短腕に座乗することを仮定すれば上記の現象を矛盾なく説明できる。したがって、*Vrn-D4* は 5D 短腕に座乗することが明らかになった。

(2) *Brachypodium* のゲノム配列情報を利用した *Vrn-D4* 候補遺伝子の解析

コムギ DNA マーカー情報を利用し、*Vrn-D4* 座乗領域 (0.09cM、DNA マーカー BE404490 ~ BJ315664 に挟まれた領域) に相当する *Brachypodium* のゲノム領域を探索した。その結果、約 1Mb の領域 (第 4 染色体の遺伝子 *Bradi4g39550* ~ *Bradi4g40870* に挟まれた領域) が *Vrn-D4* 領域に相当し (図 1)、この中に 127 個の遺伝子が存在することが明らかになった。

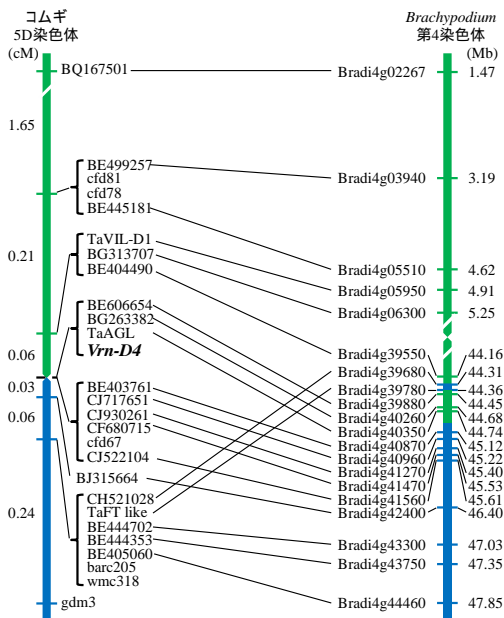


図1 コムギ5D染色体 *Vrn-D4* 座乗領域と、これに対応する *Brachypodium* 第4染色体領域の比較

このうち *Vrn-D4* の候補となり得る転写調節因子や発生関連の遺伝子が10個あったが、9個はコムギにおける座乗領域や配列の情報を基に解析から除外した(3個:5D長腕に座乗、2個:他の染色体に座乗、3個:オーソログなし、1個:偽遺伝子)。残る1個である *TaAGL31* が最有力候補と考えられたため TD(F) (春播性 *Vrn-D4* 保有) と TD(C) (秋播性 *vrn-D4* 保有) の間で配列比較を行ったが、プロモーターから3'UTRまでの領域において配列変異は見られなかった。

(3) *Vrn-D4* と他の春播性遺伝子の相互作用表現型

春播性 *Vrn-D4* と春播性 *Vrn-1* (*Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1*) は相加的な効果を示さなかったことから、*Vrn-D4* は全ての *Vrn-1* 同祖遺伝子と相互作用することが明らかになった。

遺伝子発現

春播性 *Vrn-A1* (TD(D)、BW) は、秋播性 *vrn-A1* (TD(C)) と異なり、生育の早い段階から高発現するが、TD(F)では秋播性 *vrn-A1* であるにもかかわらず、高発現を示した(図2)。この結果から、1) *Vrn-D4* が *Vrn-A1* を発現誘導する、2) TD(F)が複数の *Vrn-A1* を保有す

る、という仮説が立てられ、後者について検討を行った。

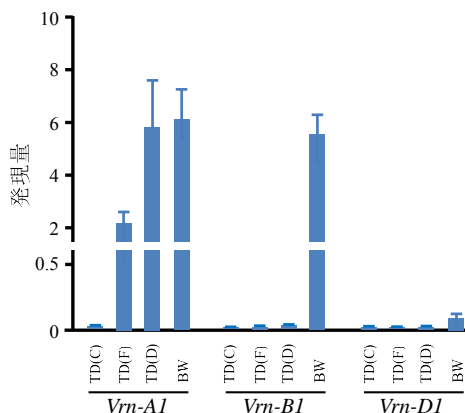


図2 春播性遺伝子型が異なる準同質遺伝子系統(播種3週間後)における *Vrn-1* 同祖遺伝子の発現量。保有する春播性対立遺伝子は次の通りである。TD(C):保有せず、TD(F): *Vrn-D4*、TD(D): *Vrn-A1*、BW: *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1*。

(4) *Vrn-D4* 原因遺伝子の特定

Vrn-A1 コピー数変異の解析

春播性 *Vrn-D4* をもつ系統 TD(F)は *Vrn-A1* を2コピー、秋播性 *vrn-D4* をもつ系統 TD(C)は1コピーを有していた。TD(F)と TD(C)は準同質遺伝子系統であることから、TD(F)が保有する *Vrn-A1* の重複コピーが *Vrn-D4* の原因遺伝子であると推察された。

Vrn-A1 コピー配列の解析

国際コムギゲノム配列コンソーシアムが解読した5D短腕のゲノム配列を解析したところ、5A長腕に由来する約290kbの重複・挿入配列が存在し、この配列中に *Vrn-A1* が存在することが明らかになった(図3A)。しかも、この *Vrn-A1* コピー配列は第1イントロン中の転写抑制因子結合配列(RIP-3)に3個のSNPs、第4エクソンに1個のSNP(アミノ酸置換を伴う)が存在し(図3B)。これらの配列変異により *Vrn-A1* コピー配列が春播性対立遺伝子としての作用を獲得したと考えられた。

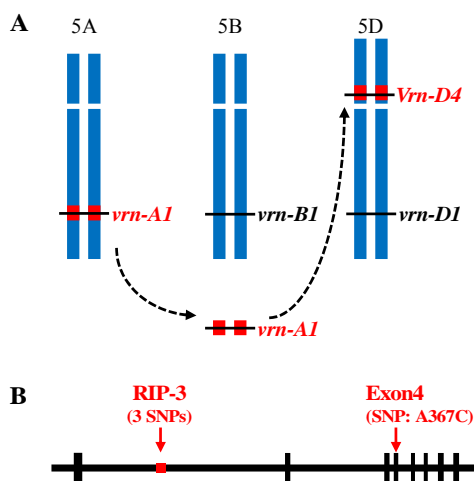


図3 春播性 *Vrn-D4* の成立 . A) 5A 長腕の秋播性 *vrn-A1* を含む領域が重複して 5D 短腕に挿入された後、配列変異によって春播性 *Vrn-D4* が生じた . B) 春播性 *Vrn-D4* がもつ配列変異 .

(5) *Vrn-D4* の起源

春播性 *Vrn-D4* の RIP-3 配列 (転写抑制に関わる cis 配列) は SNP 型が Chinese Spring の秋播性 *vrn-A1* と同じ GCT 型であり、これがコピー元になったと考えられた。

在来品種を解析した結果、GCT 型 RIP-3 配列をもつ系統は起源地 (イランのカスピ海西南地域) 以東に存在し、GCT 型の秋播性 *vrn-A1* の重複によって春播性 *Vrn-D4* が生じたとする先の研究結果と矛盾しなかった。また、5DS 染色体における挿入はイランで起こり、アフガニスタン周辺で挿入配列の変異とエキソン 4 の SNP が生じたことが明らかになった。また本実験により *Vrn-D4* 保有系統が挿入配列とエキソン 4 の SNP をもつことが確かめられた。以上のことから、起源地から東に伝播する過程での変異の蓄積により *Vrn-D4* が成立し、インド周辺に伝播したと考えられた。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

Vrn-D4 の原因遺伝子特定は国内外で注目されており、コムギにおける春化要求性の遺伝学的メカニズムの解明に向けた研究が加速していくことが期待される。また従来品種改

良では主に *Vrn-1* 同祖遺伝子が春播性の付与に利用されてきたが、将来の育種計画におけるマーカー選抜による *Vrn-D4* の利用という新たな可能性が開けたといえる。*Vrn-D4* の起源に関する研究は着手したところであり、今後さらに詳細な解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kippes N, Zhu J, Chen A, Vanzetti L, Lukaszewski A, Nishida H, Kato K, Dvorak J, Dubcovsky J., Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat, *Molecular Genetics and Genomics*, 査読有, 289 巻, 2014, 47-62, DOI10.1007/s00438-013-0788-y

[学会発表] (計 4 件)

原田英樹・西田英隆・加藤鎌司、コムギにおける春播性遺伝子 *Vrn-A1* コピーの多様性と *Vrn-D4* の起源、第 8 回中国地域育種談話会・第 11 回ムギ類研究会、2016 年 12 月 10 日・11 日、岡山大学資源植物科学研究所 (倉敷市)

原田英樹・西田英隆・加藤鎌司、コムギにおける春播性遺伝子 *Vrn-D4* の起源の解明を目指して、第 7 回中国地域育種談話会、2015 年 12 月 19 日・20 日、岡山大学 (岡山市)

加藤鎌司・N. Kippes・原田英樹・西田英隆・J. Dubcovsky、コムギにおける春播性遺伝子 *Vrn-D4* のクローニング及びその起源に関する考察、日本育種学会第 128 回講演会、2015 年 9 月 11 日・12 日、新潟大学 (新潟市)

加藤鎌司・原田英樹・西田英隆、中国のコムギ在来品種における *Vrn-D4* 遺伝子型の再検討、日本育種学会第 127 回講演会、2015 年 3 月 21 日・22 日、玉川大学 (町田市)

[図書] (計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

記者発表ホームページ

http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id344.html

6．研究組織

(1)研究代表者

西田 英隆 (NISHIDA, Hidetaka)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・
准教授

研究者番号：30379820

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

加藤 謙司 (KATO, Kenji)

Jorge Dubcovsky (DUBCOVSKY, Jorge)

Nestor Kippes (KIPPES, Nestor)