

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450026

研究課題名(和文)ライグラスにおけるセルロース合成変異遺伝子座の同定と関連遺伝子群の動態解析

研究課題名(英文) Identification of a genetic locus and dynamic analysis of genes for cellulose biosynthesis in ryegrasses

研究代表者

高橋 亘 (TAKAHASHI, Wataru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門飼料作物研究領域・上級研究員

研究者番号：70455319

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)：本研究では、我が国で最も重要なイネ科牧草であるイタリアンライグラスにおいて、茎葉が脆い「カマイラス」と呼ばれるセルロース合成変異の原因遺伝子LmBC1がライグラス第4連鎖群に存在することをDNAマーカー解析により明らかにした。また、LmBC1遺伝子座周辺に位置づけられた連鎖地図上のイネ遺伝子由来DNAマーカーの遺伝学的配置が、ライグラス第4連鎖群とシンテニーの関係にあるイネ第3染色体上の物理的配置とよく符号することや、イネの当該ゲノム領域にもカマイラス遺伝子BC1が存在することを明らかにした。これらの結果は、LmBC1がイネBC1のオーソログであることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We have identified a ryegrass brittle culm 1 gene (LmBC1) for cellulose biosynthesis on a genetic map of a linkage group (LG) 4 of Italian ryegrass by conducting DNA marker analysis with a BC1F1 population derived from backcrossing a F1 progeny to a mutant individual that showed qualitative and recessive phenotype of culm brittleness. The F1 progeny was derived from a single cross between a wild-type individual and the mutant individual. The order of the rice gene-derived markers mapped around the LmBC1 on the genetic map was well correlated with the physical order of the corresponding genes in rice chromosome (Chr) 3 that is syntenic to the LG 4. Data analysis with public database of the rice gene expression profile revealed that the rice brittle culm 1 gene (BC1) locates on the rice Chr 3, and both the LmBC1 and BC1 locate between the same markers/genes in the LG 4 and rice Chr 3, respectively. These results strongly indicate that the LmBC1 is an ortholog of the BC1.

研究分野：農学

キーワード：イネ科牧草 カマイラス 消化性 植物二次細胞壁 セルロース合成変異 バイオマス ライグラス

## 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およびリグニンは、地球上に存在する天然高分子化合物の中でそれぞれ1、2番目に多い物質である。植物細胞は分裂直後の若いうちは細胞壁も薄く柔軟性に富むが、セルロースやヘミセルロースが合成され、細胞分化が進むと、リグニンが沈着する2次細胞壁が形成されるようになる。

セルロースは草食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。

近年、双子葉植物において2次細胞壁合成系のマスター遺伝子 *SND1* や *NST1* が発見され、これらの遺伝子により、2次細胞壁を構成するセルロースやリグニンの生合成が同調的に制御されることが明らかとなっており (Zhong et al. 2006; Mitsuda et al. 2007)、単子葉植物においても同様の遺伝子 *SWN1* 等が報告されている (Zhong et al. 2011)。セルロース合成に関しては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もの (Dhugga 2007)、植物全体を見渡してもリグニン合成関連遺伝子に比べ知見は少なく、特に単子葉植物における報告は非常に少ない。

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系統がイネ、トウモロコシ、オオムギにおいて存在し、日本では「カマイラズ」と呼ばれている。近年、カマイラズ系統の分子遺伝学的解析が進められ、イネ、トウモロコシにおいていくつかの原因遺伝子が単離されている (Li et al. 2003; Zhou et al. 2009; Sindhu et al. 2007; Rao et al. 2013)。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、単離された遺伝子の同機構における詳細な役割は未だ不明のままであることや、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。しかしこれまでに前述の作物以外にはカマイラズ系統に関する分子遺伝学的な報告はなかった。

このような背景の中、申請者は我が国でも主要なイネ科牧草イタリアンライグラスのカマイラズ系統の飼料成分分析およびゲノム解析を行ってきた。その結果、本系統は他作物のカマイラズ系統同様、セルロース含量が低く、ヘミセルロース含量が高いことを明らかにした。また、カマイラズ系統と正常

系統を交配して得た  $F_1$  集団は全て正常形質を示したことから、 $F_1$  個体をカマイラズ系統の親個体に戻し交配して得た  $BC_1F_1$  集団においてカマイラズ形質と正常形質が 1:1 に分離することを確認したことから、カマイラズ形質が遺伝的に劣性の1遺伝子により支配されていることを確認した。さらに、 $BC_1F_1$  集団および既存のライグラス SSR マーカーを用いた予備解析により、当該遺伝子が第4連鎖群に座上していることを示唆する結果を得た。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、第4連鎖群に座上すると思われるイタリアンライグラスのカマイラズ形質遺伝子座に対し、比較ゲノムによりその詳細な座上位置を確認する。また、当該遺伝子座に相当するイネ第3染色体のゲノム領域に焦点を当てて、細胞壁合成遺伝子群をデータベース検索し、データベースから抽出された遺伝子のイネゲノム上の物理的位置情報とライグラス第4連鎖群におけるカマイラズ形質遺伝子座の遺伝学的位置情報を比較することで原因遺伝子を特定する。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA マーカー解析用集団

解析用の集団は、カマイラズ系統(山育 170号)および正常系統(山系 32号)を単交配して得た  $F_1$  集団の中から1個体を選び、さらにカマイラズ系統親個体へ戻し交配して得た  $BC_1F_1$  集団を使用した。本集団の DNA を個体別に抽出し、多型解析に供した。

### (2) SSR マーカーによる多型解析

$BC_1F_1$  集団の親間における多型の有無を、ライグラスの第4連鎖群を構成することが報告されている SSR マーカー (Hirata et al. 2006) により確認し、増幅効率の高いマーカーを用いて  $BC_1F_1$  集団の多型を個体別に解析した。

### (3) Intron-scanning primer による多型解析

イネ科植物の遺伝子のエクソン/イントロン構造、およびエクソン領域の塩基配列が植物種間で保存されていることを利用してイネ遺伝子のエクソン領域の塩基配列をもとに設計された PCR プライマー (Tamura et al. 2012; Guan et al. 2014) を用い、多型性の高いイントロン領域を増幅した。 $BC_1F_1$  集団の親間における増幅断片長の違いを多型として検出し、明瞭な多型が認められたプライマーペアを用いて  $BC_1F_1$  集団の多型を個体別に解析した。

### (4) 電気泳動および多型解析

DNA シーケンサー 3130x1 によるキャピラリー電気泳動の後、解析ソフトウェア GeneMarker により画像データを解析して多型情報を整理した。

(5)連鎖地図の構築

連鎖地図は、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>集団の個体別解析により得られた多型データを解析ソフトウェアJoinMap4に入力して構築した。また、カマイラズ形質は完全に質的であることから、表現型の情報もバイナリーデータとして同解析ソフトウェアに入力し、マーカーとの遺伝的連鎖関係を解析した。

(6)イネゲノム領域における細胞壁合成関連遺伝子群の検索

カマイラズ形質遺伝子座の周辺とシンテニーの関係にあるイネゲノム領域上の細胞壁合成関連遺伝子と思われる遺伝子群を公開データベースRiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/index.html>)により検索した。

4. 研究成果

(1)DNA マーカーによる多型解析

ライグラス第4連鎖群を構成する全65個のSSRマーカーを用いて集団親間での多型を調査し、23個(35.4%)のマーカーにおいて多型を認めた。一方、ライグラス第4連鎖群とシンテニーの関係にあるイネ第3染色体に由来するDNAマーカーを用い、集団親間での多型を調査した結果、全136個のうち、97個(71.3%)のマーカーで多型を確認した。

(2)連鎖地図の構築

多型の認められた上記(1)のマーカーについて個体別解析と連鎖解析を実施し、正常系統の優性マーカー41個から成る連鎖地図、変異系統の優性マーカー33個から成る連鎖地図、およびこれら優性マーカーに両親でホモあるいはヘテロの遺伝子型が示されたマーカーを加えて統合した114個のマーカーから成る連鎖地図を構築し、カマイラズ形質遺伝子座を同連鎖地図上に位置づけることに成功した(図1)。この遺伝子を *LmBC1* (*Lolium multiflorum* Brittle Culm 1) と名付けた。

(3)比較ゲノムによる原因遺伝子の推定

*LmBC1* 遺伝子座近傍にはイネゲノム情報をもとに作成されたマーカーが複数存在する(表1)。これらイネ由来DNAマーカーのライグラス第4連鎖群上の遺伝学的配置は、シンテニーの関係にあるイネ第3染色体上の物理的配置と高い相関(Spearman's rank correlation rho = -0.76, P < 0.05)があり、共線性が認められた(図2)。

*LmBC1* 遺伝子座はイネ由来マーカーTNAC1447とCOTER148の間に座乗するので、イネ第3染色体上、特にTNAC1447とCOTER148周辺について、細胞壁合成関連遺伝子を公開データベースにより検索したところ、*LmBC1* 遺伝子座に相当するイネゲノム上にイネカマイラズ遺伝子 *Brittle Culm 1* (*BC1*) が存在することが明らかとなった(表1)。

以上の結果、*LmBC1* が *BC1* のオースログで

あることが強く示唆された。

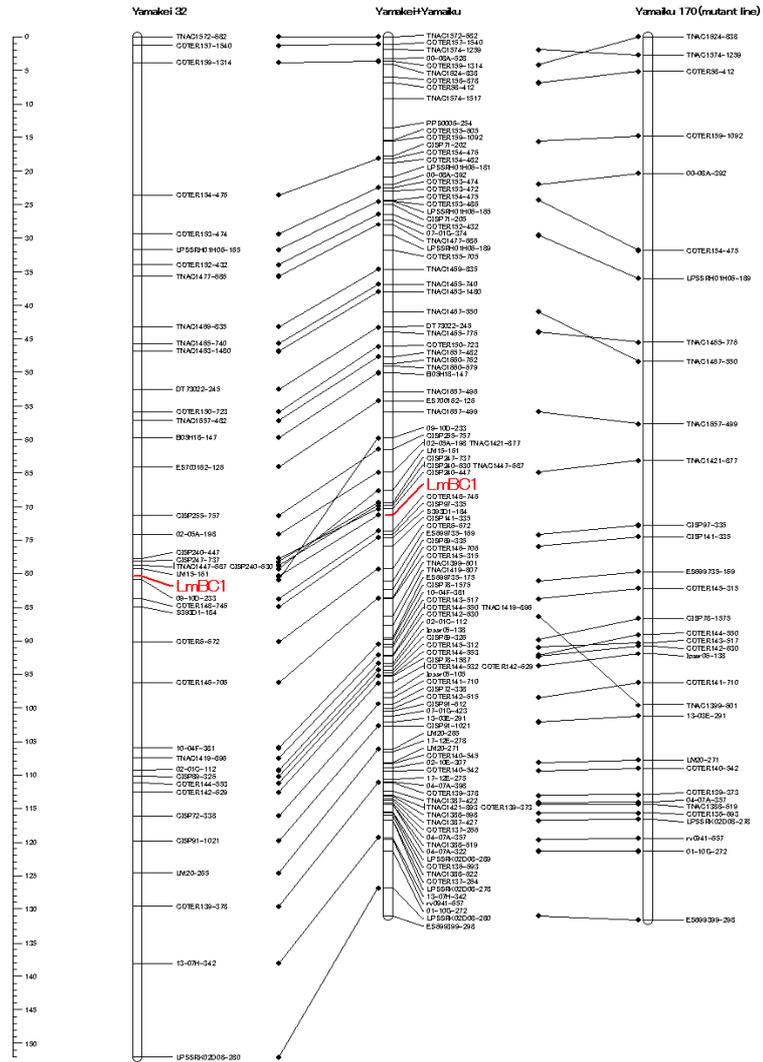


図1.ライグラス第4連鎖群上のカマイラズ形質遺伝子座  
左:正常系統の連鎖地図  
右:変異系統の連鎖地図  
中:上記2つを統合した連鎖地図  
*LmBC1*:カマイラズ形質遺伝子座

表1.カマイラズ形質遺伝子座周辺にマッピングされたイネ由来マーカーの連鎖地図上の配置順とイネ第3染色体上の物理的位置

| 連鎖地図上の配置順 | マーカー名                        | イネ第3染色体上の位置 |
|-----------|------------------------------|-------------|
| 1         | TNAC1657                     | 26396385    |
| 2         | TNAC1421                     | 9436483     |
| 3         | TNAC1447                     | 17983491    |
|           | BRITTLE CULM 1<br>(イネBC1遺伝子) | 17260407    |
| 4         | COTER148                     | 15648919    |
| 5         | COTER6                       | 12008191    |
| 6         | COTER146                     | 10400794    |
| 7         | COTER145                     | 6948035     |
| 8         | TNAC1399                     | 3854304     |

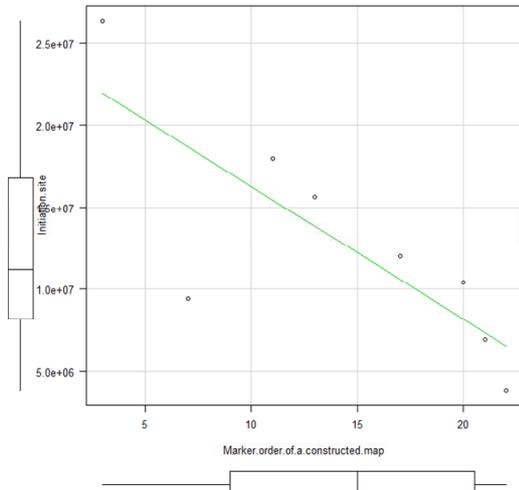


図2 . カマイラス形質遺伝子座周辺にマッピングされたイネ由来マーカーの連鎖地図上の配置順（横軸）とイネ第3染色体上の物理的位置（縦軸）の関係を示した散布図

< 引用文献 >

Dhugga KS (2007) Maize Biomass Yield and Composition for Biofuels Crop Sci 47:2211-2227.

Guan X, Hirata M, Ding C, Xu N, Yuyama N, Tan L, Fu Y, Wang J, Cai H (2014) Genetic linkage map of *Lolium multiflorum* Lam. constructed from a BC<sub>1</sub> population derived from an interspecific hybridization, *L. multiflorum* × *Lolium temulentum* L. × *L. temulentum*. Grassl Sci 60:142-149.

Hirata M, Cai H, Inoue M, Yuyama N, Miura Y, Komatsu T, Takamizo T, Fujimori M (2006) Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Theor Appl Genet 113:270-279.

Li Y, Qian Q, Zhou Y, Yan M, Sun L, Zhang M, Fu Z, Wang Y, Han B, Pang X, Chen M, Li J (2003) *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. Plant Cell 15:2020-2031.

Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. Plant Cell 19:270-280.

Rao Y, Yang Y, Xin D, Li X, Zhai K, Ma B, Pan J, Qian Q, Zeng D (2013) Characterization and cloning of a brittle culm mutant (*bc88*) in rice (*Oryza sativa* L.). Chin Sci Bull 58:3000-3006.

Sindhu A, Langewisch T, Olek A, Multani DS, McCann MC, Vermerris W, Carpita NC, Johal G (2007) Maize *brittle stalk2* encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity. Plant Physiol 145:1444-1459.

Tamura K, Kiyoshi T, Yonemaru J (2012) The development of highly transferable intron-spanning markers for temperate forage grasses. Mol Breed 30:1-8.

Zhong R, Demura T, Ye Z-H (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. Plant Cell 18:3158-3170.

Zhong R, Lee C, McCarthy RL, Reeves CK, Jones EG, Ye Z-H (2011) Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors. Plant Cell Physiol 52:1856-1871.

Zhou Y, Li S, Qian Q, Zeng D, Zhang M, Guo L, Liu X, Zhang B, Deng L, Liu X, Luo G, Wang X, Li J (2009) BC10, a DUF266-containing and Golgi-located type II membrane protein, is required

for cell-wall biosynthesis in rice  
(*Oryza sativa* L.). Plant J 57:446-462.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takahashi W, Miura Y, Sasaki T, Takamizo T (2014) Identification of a novel major locus for gray leaf spot resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). BMC Plant Biol 14:303 (査読有)  
DOI: 10.1186/s12870-014-0303-6

〔学会発表〕(計3件)

Takahashi W, Development of molecular markers linked to gray leaf spot resistance loci for practical breeding of Italian ryegrass. The 6th Korea-China-Japan Grassland Conference, August 17-20, 2016, Jeju (Korea)

高橋 亘、藤原 健、小橋 健、水野 和彦、高原 学、高溝 正、イタリアンライグラスのカマイラス形質遺伝子座周辺に座乗する DNA マーカーの高密度化、日本作物学会、2015年9月5日~9月6日、信州大学(長野県・長野市)

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ス形質遺伝子座のマッピング、日本作物学会、2015年3月27日~3月28日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

〔図書〕(計1件)

Takahashi W, InTech, Genomic approaches to developing molecular markers linked to grey leaf spot resistance loci in ryegrasses. In: Plant Genomics, 2016, pp 145-166

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 亘 (TAKAHASHI, Wataru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門飼料作物研究領域・上級研究員

研究者番号：70455319