

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82112

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892031

研究課題名(和文)ダイズの開花期関連遺伝子型構成の改変による収量性の向上

研究課題名(英文) Relationship between yield performance and allele combination of flowering related loci in soybean

研究代表者

佐山 貴司 (Sayama, Takashi)

独立行政法人農業生物資源研究所・ダイズゲノム育種研究ユニット・研究員

研究者番号：00650772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：開花期関連遺伝子座の遺伝子型が大きく異なる品種間の交雑に由来する分離集団を用いて、各開花期関連遺伝子が栽培期間全体に与える効果を明らかにした。その際に、各開花期遺伝子型を簡便かつ正確に判別可能な分子マーカーを設計した。

さらに、同程度の栽培期間を示す開花期関連遺伝子型構成が複数存在することを見出し、開花まで日数が長い遺伝子型構成の方が多収になる傾向を認めた。しかし、この傾向を確かめるためには、さらに詳細な調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：I investigated the effects of flowering-related loci of soybean on the growing period and yield performance with the use of segregated population derived from the cross of two soybean cultivars, which differ in the genotypes at the six loci. I designed PCR-based markers for each flowering-related locus to discriminate the genotypes correctly and quickly.

Among the allele combinations at the six loci, I found that different allele combinations exhibited almost the same growing period. Among these allele combinations, the extension of the pre-flowering period gave high yield performance. This results are useful in the strategy determination for yield improvement in soybean. However, the more detailed study is required to verify this result.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：ダイズ 収量性 開花期関連遺伝子 遺伝子型構成の改変 成熟期

1. 研究開始当初の背景

(1) 全世界のダイズ生産量は過去 15 年で約 2 倍に急増しており、将来の人口増に対応するためにさらなる増産が必要である。一方、日本のダイズの自給率は食用に限定しても 2012 年度で 23 % (全消費量では 8 %) であり、食糧の安定供給の面から国内生産量を倍増させる計画が進行している。増産には栽培面積の拡大はもちろんのこと、生産性の向上が欠かせない。2012 年度の日本のダイズの収量 (単位面積あたりの収量) は 1.6 t/ha であり、世界平均 (2.5 t/ha) に遠く及ばない¹⁾。国内外の収量差は 1990 年以降徐々に拡大してきたが (図 1)、その原因の一つとして、国内の品種育成では高品質化に重点が置かれ、収量性の向上は後まわしにされてきたことが考えられる。言い換えれば、近年の海外品種が保持している多収の遺伝要因を解析、導入することで国内品種に求められる生産性の向上を実現できる可能性がある。

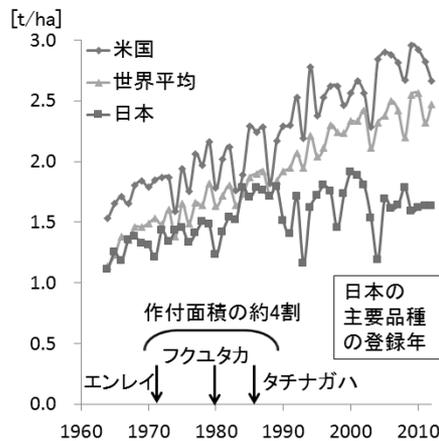


図1. ダイズにおける単位面積当りの収量の推移

1990年以降、日本の主要品種は置き換わっておらず、収量が停滞している。

(2) ダイズの遺伝解析は、米国において「Williams 82」、国内において「エンレイ」のゲノム配列が解読されたことにより飛躍的に進展した。なかでも開花期関連遺伝子の単離が進み、主要な 5 つの遺伝子 (*E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *Dt1*) が国内の研究グループによって同定された。これらの知見から、「Williams 82」と「エンレイ」では、*E1*, *E2*, *E3*, *Dt1* 座の遺伝子型が異なることが明らかになった。また、最近の研究により、さらにいくつかの開花期遺伝子座の遺伝子型が異なっていることがわかっている (未発表)。栽培期間 (作期) による分類 (成熟群) では、ほぼ同じになるにも関わらず、国内外の品種間における開花期関連遺伝子座の対立遺伝子の構成が大きく異なることから、一定の作期を示す遺伝子型構成が複数存在する可能性が大きい。(3) イネでは、出穂期関連遺伝子によって成熟期をほぼ推定できるのに対し、ダイズでは開花後も栄養生長が継続し、開花期関連遺伝

子群と成熟期との関係はよくわかっていない。ダイズの開花期と成熟期とが独立して遺伝的に制御されていることは、福井らが国内品種を開花まで日数 (*I-V*) と開花から成熟まで日数 (*a-c*) の組合せによって生態型として分類したことから推測できる。また、開花まで日数には大きな変化を与えず、開花から成熟まで日数を大きく変化させる遺伝要因が報告されている。今日においては、遺伝子型によって成熟群を説明することがほぼ可能になってきた。一方、国内であまり利用されてこなかった対立遺伝子を利用することにより、作期を大きく変えることなく生育特性および収量性に大きな変化をもたらすことができるかもしれない。そこで、本研究では、現在までに単離されている (未発表含む) 開花期関連遺伝子型が大きく異なる両親間の交雑から作出された集団を用い、開花期関連遺伝子座の対立遺伝子型の構成と作期との関連性を明らかにする。そして、一定の作期となる遺伝子型において生育特性や収量性を比較する。

2. 研究の目的

(1) ダイズは開花後も栄養生長が続くことから、開花期関連遺伝子と作期との関係はよくわかっていない。そこで、本研究ではまず、これらの開花期関連遺伝子座の対立遺伝子型の構成と作期との関連性を明らかにする。(2) これまでに同定された開花期関連遺伝子は多様な塩基配列多型が存在するため、本研究では新たに開花期関連遺伝子型を簡便かつ正確に判別する解析システムを開発する。(3) 開花期関連遺伝子の対立遺伝子型構成の違いから、同じ生育日数でも開花始めや開花期間、着莢期間など各生育ステージに多様性が存在する可能性がある。そこで、一定の作期となる複数の遺伝子型構成について生育特性と収量性を比較する。以上から、開花期関連遺伝子型による成熟期の制御機構を解明し、一定の作期において高い収量性を示す遺伝子型構成を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *E1*, *E2*, *E3*, *Dt1* 座および、第 11 および 12 染色体に座乗する未発表の 2 座 (ここでは *qFT11-1*, *qFT-12-1* と呼称する) を加えた 6 座の遺伝子型が異なる、国産品種「エンレイ」と中国の在来種「Peking」(表 1) の交配に由来する戻し交雑集団 (*E/P//E* BILs) を用いて以下の解析を行った。

表1. 「エンレイ」「Peking」の開花期遺伝子型の構成

品種名	開花期関連遺伝子型の構成*						
エンレイ	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3</i>	<i>E4</i>	<i>qFT11-1</i>	<i>qft12-1</i>	<i>dt1</i>
Peking	<i>e1-p</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>qft11-1</i>	<i>qFT12-1</i>	<i>dt1-t</i>

*影付きの遺伝子型: 優性

(2) BC₁F₃ 世代を 2013 年(播種日 6 月 11 日)に、BC₁F_{3.4} 世代を 2014 年(播種日 6 月 16 日)に作物研圃場(つくば市)で栽培し、開花期と成熟期を調査した。また、収穫物について、主茎長や分枝数、種子数や種子重を調査した。

(3) 開花期関連遺伝子型の判別には、もっぱら近傍の連鎖マーカーが利用されてきた。しかし、多様な遺伝子型を判別するには十分ではない。そこで、DNA シーケンサーのフラグメント解析やリアルタイム PCR 装置の高精度融解曲線(HRM)解析を利用して、単離された遺伝子情報あるいは位置情報に基づいて DNA マーカーを設計し、「エンレイ」「Peking」だけでなく、多くの品種の開花期関連遺伝子型の構成を正確かつ簡便に判別できる解析システムを開発した。

4. 研究成果

(1) E/P/E BILs の BC₁F₃ 集団から DNA マーカーにより開花期関連遺伝子型を判別し、多くの座が固定している個体を選抜した。BC₁F₃ 個体に実った種子について開花期関連遺伝子型を調査し、全ての遺伝子座が固定した個体を選抜した。各個体の開花期および作期を調査し、遺伝子型構成との相関を求めたところ、重相関係数はそれぞれ R=0.914 および 0.923 を示し(表 2a) 既知の開花期関連遺伝子により開花期と作期をほぼ説明できることがわかった。

表2. 重回帰分析による各開花期遺伝子型の効果

a) BC₁F₃ 集団(2013年度)

	開花期遺伝子(晩生)型の効果(日)		
	播種～開花	開花～成熟	作期全体
E1	9.8	5.3	15.5
E2	5.5	3.6	9.5
E3	6.5	ns	7.2
qFT11-1	3.5	8.8	12.7
qFT12-1	4.8	3.3	8.5
dt1-t	ns	ns	ns
重相関係数	0.914	0.745	0.923

ns: 有意差なし

b) BC₁F_{3.4} 集団(2014年度)

	開花期遺伝子(晩生)型の効果(日)		
	播種～開花	開花～成熟	作期全体
E1	9.8	10.9	20.2
E2	6.8	5.1	11.9
E3	4.9	2.9	7.8
qFT11-1	4.8	9.3	14.1
qFT12-1	5.4	4.8	10.2
dt1-t	ns	ns	3.4
重相関係数	0.929	0.885	0.965

ns: 有意差なし

極早生の遺伝子型構成を除いた、つくば地区で栽培が可能な BC₁F₃ 個体を選抜し、次代においてそれらを系統(BC₁F_{3.4} 世代)に展開して圃場で栽培した。開花期遺伝子型構成と作期との重相関係数は R=0.965 となり(表 2b) 各開花期関連遺伝子の作期への効果は年次によらず安定していた。しかし、開花後成熟まで日数の重相関係数は相対的に低い値(R=0.745 もしくは 0.885)を示した。これは、開花まで日数(約 40~60 日)に対して、開花後成熟まで日数(約 60~80 日)は長い、多くの開花期関連遺伝子の効果は逆に小さくなっていることに起因すると考えられた。従って、開花後成熟まで日数を大きく変動させることは基本的に難しく、qFT11-1 はダイズの生育を操作する上で貴重な遺伝要因であることがわかった。

一方、ほぼ同じ作期を示す遺伝子型構成が複数存在したことから、一定の作期において開花期関連遺伝子型構成を改変できることがわかった。

(2) 各開花期関連遺伝子が開花まで日数および開花後成熟まで日数に与える効果を調査したところ、E1、E2、qFT12-1 は両期間に大きく影響することがわかった。また、Dt1 は作期への効果はあまり大きくなく、2013 年は遺伝子型間に有意な差が確認されなかった。一方、E3 は開花まで日数への影響が大きく、qFT11-1 は開花後成熟まで日数への影響が大きかった。このことから、E3 と qFT11-1 における遺伝子型の組合せによって、開花まで日数と開花後成熟まで日数との比率を大きく変化させられることがわかった。

この比率を改変することは、生育に大きな変化をもたらす可能性があるため、ほぼ同じ作期を示した異なる遺伝子型構成の系統間で収量性や草型を比較した。「エンレイ」並みの作期においても(表 3) つくば地区の標準的な作期においても(表 4) 多収になった開花期遺伝子型構成は、開花まで日数が長い遺伝子型構成、すなわち、A2 型、および B2、B3 型であった。また、これらの遺伝子型構成では、主茎節数および、莢数の増加が確認された。以上から、A2 型、および B2、B3 型の開花期関連遺伝子型構成では、播種～開花の期間が長くなることにより、節数を多くし、着莢数を増加させることにより多収化したと考えられた。一方、主茎長は開花まで日数とは無関係であり、qFT11-1 の遺伝子型が劣性すなわち早生型であった A2 型および B2 型において主茎長の伸長が見られた。開花まで日数の比率が大きい遺伝子型構成の創出に有効な qft11-1 遺伝子型は、主茎長が伸長し、倒伏を考慮する必要があることが示唆された。しかし、主茎長の伸長は、qFT11-1 座近傍の別の遺伝子が関与している可能性もあるため、qFT11-1 の原因遺伝子を単離し、その効果を明らかにする必要がある。

表3. エンレイ並みの作期となる開花期関連遺伝子型構成間の収量比較

a) エンレイ並みの作期となる開花期関連遺伝子型の構成

遺伝子型 構成名	開花期関連遺伝子型の構成*					播種~ 開花(日)	作期 全体(日)
A1 (4系統)	E1	e2	e3	qFT11-1	qft12-1	dt1	41.6 108.1
A2 (10系統)	E1	e2	E3	qft11-1	qFT12-1	dt1	46.4 111.9

*影付きの遺伝子型: 優性
A1: エンレイと同じ遺伝子型構成

b) A1型とA2型との草型および収量性の比較

遺伝子型 構成名	主茎長 (cm)	主茎 節数	分枝 数	莢数	種子数	百粒重 (g)	収量 (g)
A1 (n=20)	43.0 ^{a*}	13.0 ^a	6.2	80.9 ^a	137.6 ^a	27.3	34.6 ^a
A2 (n=46)	59.2 ^b	15.5 ^b	6.6	93.2 ^b	158.4 ^b	26.9	39.3 ^b

*a<b (有意水準5%のt検定)
百粒重25~30gの個体を調査

表4. つくば地区の標準的作期となる開花期関連遺伝子型構成間の収量比較

a) つくば地区の標準的作期となる開花期関連遺伝子型の構成

遺伝子型 構成名	開花期関連遺伝子型の構成*					播種~ 開花(日)	作期 全体(日)
B1 (3系統)	E1	E2	e3	qFT11-1	qft12-1	dt1	46.6 124.0
B2 (4系統)	E1	E2	E3	qft11-1	qFT12-1	dt1	52.3 125.6
B3 (5系統)	E1	e2	E3	qFT11-1	qFT12-1	dt1	51.4 127.1

*影付きの遺伝子型: 優性
B1: サチユタカと同じ遺伝子型構成

b) B1型、B2型、B3型間における草型および収量性の比較

遺伝子型 構成名	主茎長 (cm)	主茎 節数	分枝 数	莢数	種子数	百粒重 (g)	収量 (g)
B1 (n=12)	64.7 ^{a*}	16.1 ^a	7.7	86.8 ^a	145.5 ^a	28.4 ^b	38.1 ^a
B2 (n=21)	73.5 ^b	17.6 ^b	7.7	113.0 ^b	194.3 ^b	26.9 ^a	48.3 ^b
B3 (n=21)	65.7 ^a	17.7 ^b	7.2	125.0 ^b	212.0 ^b	26.4 ^a	52.1 ^b

*a<b (有意水準5%のTukey検定)
百粒重25~30gの個体を調査

日本の主要品種は A1 型および B1 型を示す品種が多い。栽培品種には、A2 型、および B2、B3 型を示すものが非常に少ないため、本研究により、日本の主要品種の開花期関連遺伝子型の構成を改変することにより作期を大きく変えずに多収化できることが示唆された。一方、近年の米国品種は、*qft11-1* *qft12-1* 型を示すものが多いため、A2 型、および B2、B3 型との単純な比較はできないが、*qft11-1* 型を利用して、開花まで日数を長くすることにより(表2)、多収化を実現していることが示唆された。以上の結果は、収量性および草型の調査は単年の調査によるものであり、調査した遺伝子型構成数が少なく、また、遺伝背景が限られている。以上の点から、さらに詳細な調査を行うことにより、多収化に寄与する開花期遺伝子型の構成を明確にできると考えられた。

(3) 以上の研究を行うにあたり、既に同定されている5座(*E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *Dt1*)と同定中の2座(*qFT11-1*, *qFT12-1*)の遺伝子型を簡便に判別可能なマーカーを設計した。「エンレイ」「Peking」間において、*E4*を除く6遺伝子座全て、内部に塩基長多型が存在することが報告されている。また、*e4*型を示す多くの品種では、内部に挿入配列が存在することが報告されている。そこで、一回のマルチプレックス PCR と蛍光シーケンサー

のフラグメント解析により、これらの遺伝子型を判別できるマーカーを設計した(表5)。詳細な実験手法は Sayama et al. に従った。多くの品種において、*E1*, *E2*, *Dt1* の遺伝子型を正確に判別するためには、翻訳領域における一塩基多型(SNP)を検出する必要がある。SNP を簡便かつ正確に検出する方法として、リアルタイム PCR 装置の HRM 解析を利用した LunaProbe 法が報告されている。そこで、LunaProbe 法により、これらの遺伝子型を判別できるマーカーを設計した(表6)。また、*E1* については、*E1* 型 *e1-as* 型 *e1-nl* 型を同時に判別できるようにマーカーを設計した。詳細な実験手法は Zhou et al. に従った。

表5. 塩基長多型による開花期関連遺伝子型判別用マーカーの詳細

遺伝子座	プライマー名	配列*	産物長 (bp)	
			エンレイ	Peking
<i>E1</i>	E1-p-indel-F	[NED] CTCAGAGAGTTTCAACACTAATTC	278	277
	E1-p-indel-R	GGCTTAATTTGAGTGTTTTGAGTG		
<i>E2</i>	E2at-F	[PET] GTGCCTTTCTCGCCTTTTCA	303	269
	E2at-R	TCGGCCATTTTTAACTTGTG		
<i>E3</i>	E3indel-F	[6-FAM] GGAGGGATTGGATGATGC	186	151
	E3indel-Rw	CCAATGTGAGAGCCTTATGTTTC		
	E3indel-Rm	GATAAGAAAAGGAAAGAGAGACATG		
<i>E4</i>	E4indel-F	[NED]GGTTTTGCTTCTAACCCCTGTC	314	314
	E4indel-Rw	GGTTAAAAGAGATTTGTTCTAACAAAAAC		
<i>qFT11-1</i>	E4indel-Rm	CCTCTCCATGATCATCCTTG	72	71
	Ft11-1indel-F	[PET] 遺伝子同定中のため非公表		
<i>qFT12-1</i>	Ft11-1indel-R	遺伝子同定中のため非公表	154	168
	Ft12-1indel-F	[PET] 遺伝子同定中のため非公表		
	Ft12-1indel-R	遺伝子同定中のため非公表		
<i>Dt1</i>	Dt1indel-F	[VIC] CTTTATCTCTCTCTCTTATTC	134	139
	Dt1indel-R	CCGTGTGACCATGATTACAG		

*[]: 蛍光プライマー
e4遺伝子型の産物長: 275bp

表6. HRM解析を利用した遺伝子型判別用マーカーの詳細

遺伝子座	プライマー名	配列*	遺伝子型	融解温度(°C)
<i>E1</i>	E1asHRM-F	CCCATCAAAGTTCACGACCCCTA	<i>E1</i>	66
	E1asHRM-R	CTAACTGGGGTCCCTTCTG	/	/
	E1asHRM-probe	CAGTGTCAAAGAGAGGAAATCC- -ACCATATGGCTTC[Amino]	<i>e1-as</i>	62
	E1nlHRM-F	GATCAAATCAAGCATCGTTTTTC	/	/
<i>E2</i>	E1nlHRM-R	CAAGTATTATGTCGCCAC	<i>e1-nl</i>	70
	E2HRM-F	CACTACAGCCTCCCGTG	<i>E2</i>	71
	E2HRM-R	GAGGCAGAGCCAAAGCCTA	/	/
	E2HRM-probe	CAGAGGCATGTCTTATGAAAATAT- -TTGCTGCTACAGTGG[Amino]	<i>e2</i>	68
<i>Dt1</i>	Dt1HRM-F	GCAGCAGAGAACGACCTTTG	<i>Dt1</i>	73
	Dt1HRM-R	GGCAAACAGCAGCTACTTAG	/	/
	Dt1HRM-probe	GCTGTCTACTTCAATGCACAGAGG- -GAAACGGCTGC[Amino]	<i>dt1</i>	70

*[Amino]: 3' 末端にアミノ基を付加 (LunaProbe)
融解温度は3uM SYTO9 (Life Technologies)をGoTaq Hot Start Master Mix (Promega)に添加してPCRを行った場合の値

<引用文献>

- Production, Supply and Distribution Online (United States Department of Agriculture);
<http://www.fas.usda.gov/psdonline/>
 Tsubokura et al, Ann Bot, 113 (2014), 429-441
 福井 他, 育種学雑誌, 1 (1951), 27-39
 Komatsu et al, Breed Sci, 61 (2012), 646-652

Tian et al, PNAS, 19 (2010)、8563-8568
Sayama et al, DNA Res, 18 (2011)、
107-115
Zhou et al., Clin Chem, 50 (2004)、
1328-1335

研究者番号：

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

佐山 貴司 他、ダイズの開花期関連遺
伝子型構成の改変による収量性向上の可
能性、育種学研究、第17巻別冊1号
(2015)、137
優秀発表賞受賞

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐山 貴司 (SAYAMA Takashi)
農業生物資源研究所・ダイズゲノム育種研
究ユニット・研究員
研究者番号：00650772

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()