

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14831

研究課題名(和文) 制御環境によるダイズ早晩性遺伝子の顕在化

研究課題名(英文) Detection of maturity loci in soybean under controlled environments

研究代表者

石本 政男 (Ishimoto, Masao)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・研究領域長

研究者番号：20355134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズは短日植物であり、日長に対する反応性は、収量性に関わる重要な農業形質の一つである。本研究では、制御環境下で早晩性に関わる候補遺伝子を単離し、変異体を用いて候補遺伝子の機能欠損による開花遅延を確認した。さらに、ダイズミニコアコレクションについてこの遺伝子の多様性を調査するとともに短日条件で開花調査を行った。その結果、日長に対する感受性が低下した遺伝資源を複数見出した。これらの遺伝資源にはこの遺伝子の変異が確認できず、普通品種との後代分離集団の遺伝解析により複数の遺伝要因の関与が示唆されたことから、ダイズ栽培の低緯度地域への拡大にはいくつかの異なる遺伝要因が関わっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Soybean is a short day plant, and its response to day length is one of important agronomic traits related to yield performance. In this study, a candidate gene involved in flowering time was isolated under a controlled environment, and the delay of flowering time due to functional defect of the candidate gene was confirmed using soybean mutants. In addition, we investigated the sequence diversity of this gene and the flowering time under the 12 hours photoperiod condition in the soybean mini-core collection. As a result, we found several genetic resources with decreased susceptibility to short day length. Since mutation of this gene could not be confirmed in these genetic resources, and genetic analysis of the segregating population with ordinary cultivars suggested the involvement of different genetic factors, so that several different genetic factors are thought to be involved in the expansion of soybean cultivation in low latitudes.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：早晩性 開花期関連遺伝子 適応性 ダイズミニコアコレクション

1. 研究開始当初の背景

ダイズは日本を含む東アジアの中緯度地域に分布するツルマメから栽培化され、現在では、赤道から北緯 60 度まで広範な地域で作付けされている。この栽培地の拡大には早晩性に関わる感光性や感温性の遺伝変異が利用されていると推測される。近年、高緯度への適応に貢献した早生遺伝子が相次いで単離された。一方、晩生や感温性に関わる遺伝要因は我が国の圃場環境では解析が困難であり、遺伝解析は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では栽培環境を人工的に制御することで既知の開花期関連遺伝子の機能を無効化し、晩生や感温性の表現型を顕在化させ、原因遺伝子の育種的利用を可能にする。まず、日長や温度などの制御により低緯度地域のダイズの栽培環境を再現する。そして、その環境で多様な遺伝資源を栽培することにより、既知の開花期関連遺伝子では説明できない感光性や感温性を示す遺伝資源を探索する。見出された遺伝資源は代表的なダイズ品種と交配し、後代での開花特性の分離を調査するとともに、ポジショナルクローニング等により原因遺伝子を同定する。感光性や感温性に関わる遺伝子群はダイズの生育相の転換に関わっており、それらの組合せは収量性に大きく影響する。本研究により、新規の開花期関連遺伝子の育種的利用を可能にし、ダイズの生産性向上へ貢献する。

3. 研究の方法

1) 晩生や感温性を顕在化させる制御環境の検討

黒田ら (Kuroda and Ikenaga 2015) が開発した小規模種子生産を目的としたミニチュア水耕栽培法を基本に、制御環境条件、水耕液組成、温度や日長などについて検討した。また光源には、植物育成用蛍光灯と光合成光子束密度 (Photosynthetic photon flux density, PPFD) に優れた LED を比較した。エンレイ、フクユタカ、Williams 82 の 3 品種を栽培して開花まで日数や種子重などを調査することにより条件検討を行った。

2) LJP 品種における候補遺伝子の構造と発現解析

LJP 原因候補遺伝子の絞り込み

低緯度地域での栽培では、短日条件でも開花遅延を示し収量を確保できる形質 long juvenile period (LJP) を導入した品種が利用されている。この遺伝子の同定を目指して、LJP を示すブラジルのダイズ品種 MG BR-22 を用いて遺伝解析を行った。エンレイ×MG BR-22 由来の組換え自殖系統 (EM-RIL、F₆ 世代) 152 系統を屋外の日長処理施設 (12 時間) で栽培して開花日を調査した。そして、SSR ゲノムパネル (Sayama et al. 2011) により分子連鎖地図を作成し、QTL 解析を行った。さらに、LJP に関与する遺伝子が座乗する領域の近傍マーカーについてヘテロ型を示す RIL の後代 (ヘテロ残余系統: RHL) を高精度マッピングに用いた。そして、絞り込んだ領域内に含まれる各候補遺伝子について、遺伝子発現を調査するとともに各遺伝子の塩基配列を決定した。

候補遺伝子の配列比較

MG BR-22 以外に LJP を示す遺伝資源 PI159925 (*j*) と Paranaoiana (*e6*) について、LJP 候補遺伝子上流 2.5 kb、下流 1.5 kb を含む領域を、ダイレクトシーケンスあるいはサブクローニングによりゲノム配列を決定した。また、比較のために Williams 82 とエンレイについてもゲノム配列を解析した。

開花期関連遺伝子の発現比較

Paranaoiana (*e6*) とその原品種である Paraná (*E6*) について、qRT-PCR により LJP 候補遺伝子を含む開花期関連遺伝子 (*E1*, *FT2a*, *FT5a*) の発現量を比較した。なお、発現量は β -tubulin を内部標準として 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法 (Livak and Schmittgen, 2001) により算定した。

3) LJP 候補遺伝子座に変異を持つダイズ変異体とダイズミニコアコレクションの探索と開花調査

ダイズ LJP 変異体の選抜

エンレイとフクユタカの変異体ライブラリーから、LJP 候補遺伝子に変異を持つ系統を選抜した。分離集団を養成して、野生型ホモ、ヘテロ接合型、変異型ホモ個体を短日条件下 (12 時間日長、27 °C 一定) で水耕栽培により開花まで日数を調査した。

ダイズミニコアコレクションの短日条件での開花遅延

遺伝的多様性を少数の系統で幅広くカバー

する NIAS ダイズミニコアコレクション (Kaga et al. 2012) の LJP 候補遺伝子のゲノム配列を決定し、エキソン部分に変異を持つ品種を選抜した。そして、既知の主要な開花期関連遺伝子型が同一の品種と交配した。交配後代 (F_2 世代) の開花まで日数を、1) で開発した制御環境下(12 時間日長、昼 30、夜 23) および圃場(つくば市観音台)で栽培して調査した。

4) ダイズミニコアコレクションの LJP の遺伝解析

ミニコアコレクションを 1) で開発した制御環境下で栽培した。開花遅延を示したミニコアコレクションの品種に、既知の開花期関連遺伝子型が同一の品種を交配した。圃場(つくば市観音台)で交配後代 (F_2 世代) の開花調査をした。そして、SSR ゲノムパネルにより分子連鎖地図を作成し、QTL 解析を行った。

4. 研究成果

1) 晩生や感温性を顕在化させる制御環境の検討

蛍光灯を光源として栽培した場合、エンレイ、フクユタカ、Williams 82 の 3 品種とも節間が著しく徒長して蔓化したが、LED 照明では蔓化することなく、葉色も濃く、開花結実に至った。以降は、LED 照明を光源として 12 時間日長で栽培した。既報の水耕液 (MS: ムラシゲスクーク培地) で栽培した場合、開花期以降に多くの個体が枯死した。一方、ホーグランド溶液では、収穫時に圃場栽培同様に斉一に枯れ上がった。また、ホーグランド溶液で栽培した場合、収穫した種子の 1 粒重は圃場栽培した場合と近似した。以降はホーグランド溶液で栽培した。

3 品種は主要な開花期関連遺伝子の遺伝子型構成が異なっている。そのため、圃場(つくば市観音台)での栽培では、開花まで日数は Williams 82 < エンレイ < フクユタカの順に遅くなり、およそ 2 週間の差を示した。一方、12 時間日長(短日条件)の制御環境下での栽培での開花まで日数の差は 2 日間であり、主要な開花期関連遺伝子の効果のある程度無効化できるものと判断した。

2) LJP 品種における候補遺伝子の構造と発

現解析

候補遺伝子の配列解析

各 RIL の開花まで日数のヒストグラムは大きく 2 つのピークを示し、1 つの遺伝子の関与が示唆された。分子連鎖地図を用いて QTL 解析を行ったところ、LJP に関与する遺伝子 (*LJP*) は第 4 染色体 Sat_337 の近傍に座乗することが分かった。この領域をヘテロ型で有する RIL 系統の後代 1386 個体の組換え型個体の調査から 212 kb、さらにそれらのヘテロ型個体の後代 960 個体の組換え型の調査から 33 kb の領域まで *LJP* の座乗領域を絞り込んだ。この領域内には 3 つの遺伝子が含まれていた。MG BR-22 とエンレイでこれら 3 遺伝子の発現を比較したところ、MG BR-22 で発現量が減少している遺伝子を見いだした。また、この原因候補遺伝子は MG BR-22 では第 2 エキソンに 10 塩基の欠失が確認され、このフレームシフトによって 20 アミノ酸後終止コドンが生じることがわかった。

候補遺伝子の配列解析

今回用いた LJP 形質を示す 3 品種はいずれも LJP 候補遺伝子のエキソン部分に変異が存在した。MG BR-22 と PI159925 の変異は、Lu et al. (2017) が報告した *J* 座の変異と同一であり、Paranagoiana (*e6*) が示す LJP もこの遺伝子 (*J*) 座が原因と考えられた。

開花期関連遺伝子の発現比較

Paranagoiana と Paraná について発現解析を行ったところ、長日条件では 2 品種とも *EI* が発現し、ダイズフロリゲン遺伝子 (*FT: FT2a* と *FT5a*) の発現が抑制されていた。一方、短日条件において、Paraná では *EI* の発現が確認されなかったのに対し、Paranagoiana では *EI* が発現し、*FT* の発現が抑制されていた。すなわち、*J* 座は *EI* の制御因子であり、短日条件下では *EI* の発現を抑制することにより、*FT* の発現量が多くなり、開花を促進する。一方、LJP を示す品種系統では、*J* 座の機能低下あるいは欠損により、短日条件下でも *EI* 遺伝子の発現が抑制されず、開花の時期が遅くなるものと考えられる。

3) *J* 座に変異を持つダイズ変異体とダイズミニコアコレクションの探索と開花調査

ダイズ LJP 変異体の選抜

変異体ライブラリーから *J* 座にナンセンス変異あるいはミスセンス変異を生じた、エンレイ変異体 1 系統、フクユタカ変異体 2 系統

を得た。短日条件において、野生型と比較してエンレイ変異体では約9日、フクユタカ変異体では23~26日開花が遅延した。以上の結果から、J座の塩基変異によりLJP形質を示すことが明らかになった。

ダイズミニコアコレクションの短日条件での開花遅延

コアコレクションから、Jの第2エキソンに1塩基欠失を持つ系統GmWMC170とGmWMC187を見出した。これらの品種は短日条件下で顕著な開花遅延を示さなかった。両品種のEI座の遺伝子型は*el-as*(機能低下型)であった。先述したように、JはEIの発現を制御する。そこで、J座の変異の効果をEIと組み合わせて確認するために、GmWMC170 × GmWMC143 (EI)、GmWMC187 × フクユタカ (EI)の交配を行い、F₂個体の開花調査を行った。2集団とも遺伝子型がEI/jの個体はLJPを示し、jの効果、すなわち短日条件下でEIとjの組合せで開花遅延を示すことを確認した。

4)ダイズミニコアコレクションのLJPの遺伝解析

コアコレクションを1)で開発した制御環境下で栽培したところ、Jの構造遺伝子に変異がないにも関わらず、LJPを示すものが10系統以上存在した。これらの系統のうちGmWMC173とGmWMC186を、既知の開花期関連遺伝子型が同じ品種であるフクユタカと交配して分離集団(F₂世代)を養成し、圃場で栽培した。フクユタカは約49日で開花したのに対し、GmWMC173とGmWMC186は、開花までに約69日を要した。F₂個体の開花まで日数は両親間で分離した。SSRマーカーにより分子連鎖地図を作成し、QTL解析を行ったところ、両集団で第16染色体に効果が大きなQTLが検出され、第4染色体に座乗するJ座以外の遺伝子が短日条件下での開花遅延に関与していることが示唆された。

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)

1. 横田侑子、山田哲也、佐山貴司、加賀秋人、小木曾映里、石本政男 . 短日条件下でダイズの開花を遅延する遺伝要因の解析 . 育種学研究 第20巻別1号:238 日本育種学会第133回講演会 2018年3月15-16日 . 九州大学箱崎キャンパス(福岡県)〔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:
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

石本 政男 (ISHIMOTO, Masao)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・領域長
研究者番号:20355134

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

小木曾 映里 (OGISO, Eri)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・次世代作物開発研究センター・
畑作物研究領域・研究員
研究者番号：00646929

(4)研究協力者

()