

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780007

研究課題名(和文) アブラナ科野菜高純度 F1 採種技術開発に向けた安定自家不和合性の分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis for the high level of self-incompatibility in *Brassica* vegetables.

研究代表者

畠山 勝徳 (HATAKEYAMA KATSUNORI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所・野菜ゲノム研究チーム・主任研究員

研究者番号：60355625

研究成果の概要：自家不和合性を利用して種子生産されるアブラナ科野菜の親系統は、自殖種子を結実しない高レベルの自家不和合性を有する必要がある。本研究では、ハクサイ類とキャベツを材料に用いて、虫媒受粉法によって自家不和合性程度を評価するとともに、SSR を主とする連鎖地図を構築し、ハクサイ類において5つ、キャベツにおいて1つの QTL が本形質に関与することを明らかにした。また、ハクサイ類における主要な2つの QTL は、自家不和合性の自他認識機構に関与する遺伝子の近傍に位置することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性とは、雌しべと花粉間で自己・非自己の花粉を認識して、自己花粉の発芽を拒絶して近親交配を抑制する機構である。アブラナ科植物では、この認識が1遺伝子座のS複対立遺伝子により説明され(S_1 , S_2 , S_3 , ..., S_n)、雌雄でS遺伝子の表現型が一致すると受精に至らない。アブラナ科野菜の市販品種の多くはF₁品種であり、この性質を利用して種子生産されている。

雌しべと花粉間の認識因子は長い間未解明であったが、国内外の活発な研究から共に

S遺伝子座上に存在するSRKとSP11がそれぞれ雌しべ側と花粉側の認識因子であることが明らかにされた。近年はSRKが受容したシグナルがどのように下流に伝わり、その結果どのように花粉管伸長抑制が起こるのという受粉反応全体を解明する方向に研究が展開しており、Two-hybrid法や自家和合性突然変異体を用いた解析からARCIやMLPKなどの遺伝子が同定されている。近年、自家不和合性である*Arabidopsis lyrata*のSRKとSP11を形質転換した自家不和合性*A. thaliana*を用いた解析によって、発達後期の花における

自家不和合性打破に關与する *PUB8* が同定されている。しかし、これまでの自家不和合性研究のほとんどは自他認識機構の解明に關するものである。

近年の作業体系の機械化や労働の集約化にともない、アブラナ科野菜の F_1 品種においては 100%に近い高い純度の種子が求められているが、自家不和合性反応は内的や外的要因により不安定になるため、自殖種子混入による純度低下が問題となっている。自家不和合性の安定性は自家不和合性程度と呼ばれ、 F_1 品種の親系統には高レベルの自家不和合性が求められるが、本形質に關する研究は皆無である。

2. 研究の目的

高レベル自家不和合性を支配する遺伝子を特定することができれば、種子純度を著しく向上しうる F_1 種子生産技術の開発につながる。自家不和合性程度には複数の内外要因が影響することから、量的形質 (QTL) であると考えられる。本研究では、高レベル自家不和合性を制御する遺伝子の同定に向けた第一歩として、ハクサイ類とキャベツについて、虫媒受粉法により解析集団の自家不和合性程度を評価し、本形質に關する QTL 遺伝子座の同定と連鎖マーカーの開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料

① ハクサイ類 (以下、*Brassica rapa*) では、高レベル自家不和合性親 Ka1-22 (S 遺伝子型: $S_{53}S_{53}$)、低レベル親 Ha1-400 ($S_A S_A$) を両親に用い、 F_1 および F_2 を養成した。

② キャベツ (以下、*B. oleracea*) では、高レベル親 Ca1-1406 ($S_{15}S_{15}$) と低レベル親 Ca1-1408 ($S_{15}S_{15}$) を両親に用い、 F_1 および F_2 を養成した。

(2) Horisaki et al. (2003) により報告されている虫媒受粉法により、 F_2 の自家不和合性程度を評価した。両親、 F_1 、 F_2 を 5°C で春化处理し、網室内に定植した。ハクサイ類については、 F_2 集団をあらかじめ *SLG* の CAPS マーカーによって $S_{53}S_{53}$ 、 $S_A S_A$ 、 $S_{53}S_A$ に分類し、 S 遺伝子型ごとに異なる網室内に定植し栽培した。キャベツでは、同一の S 遺伝子型のもを両親として用いたので、 S 遺伝子型による分類は行わなかった。開花開始後に網室内にミツバチの巣箱を設置し、放任受粉を行った。開花終了後に各個体の一次分枝、二次分枝、三次分枝をサンプリングし、開花数および種子の結実した莢数を調査した。結実率 (莢数/全開花数 $\times 100$) の平均値を不和合性程度の指標とした。なお、結実率値の低い個体は高レベル自家不和合性を示すこととした。

(3) Suwabe et al. (2002, 2004, 2006) により報告されている *B. rapa* に由来する SSR マーカー 290 個 (接頭辞 BRMS)、Lowe et al. (2004) により報告されている SSR マーカー 314 個 (接頭辞 Na, Ni, Ol, Ra)、韓国において作成された *B. rapa* 由来の BAC クローンの末端配列から read2Marker プログラム (Fukuoka et al. 2005) より抽出した SSR マーカー 280 個 (接頭辞 KBr) を供試し、両親系統で多型を示すマーカーのスクリーニングした。

(4) 自家不和合性の認識機構に關与する *SLG* (S 遺伝子座)、*MLPK*、*ARCI*、*PUB8*、および TAIR データベース上のシロイヌナズナの推定遺伝子領域について、両親系統間での多型を調査し、SNP あるいは InDel マーカーを作出した。

(5) 自家不和合性程度の検定を行った F_2 よりゲノム DNA を抽出し、両親系統間で多型の認められたマーカーの遺伝子型を解析し、MAPMAKER/EXP を用いて連鎖地図を構築した。結実率値を用いて、Windows QTL Cartographer v2.5 によって複合区間マッピング法により QTL 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 表現型の変動

① *B. rapa* については、2006 年と 2007 年に虫媒受粉により F_2 の自家不和合性程度の評価を行った。2006 年の検定における高レベル自家不和合性親 Ka1-22 の結実率値は $1.9 \pm 0.6\%$ (S. D.)、低レベル親 Ha1-400 の結実率値は $63.3 \pm 15.0\%$ であった。 F_1 は $30.4 \pm 3.9\%$ と両親のほぼ中間値を示した (図 1)。 F_2 は $9.7 \sim 67.6\%$ の範囲に正規分布に近い連続分布を示した。2007 年の検定においても、2006 年と同様の結果が得られた。 F_2 の分布から、自家不和合性レベルには複数の遺伝子の關与が示唆された。また、 F_2 の S 遺伝子型と平均結実率値を比較した結果、 $S_{53}S_{53}$ を有する個体は $S_A S_A$ を有する個体に比べて結実率値が有意に低かった。このことから、Ka1-22 の

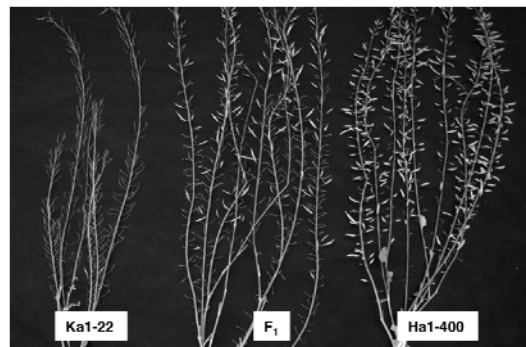


図 1. 2006 年の虫媒受粉検定における Ka1-22、Ha1-400 および F_1 の結実状況。Ha1-400 では多数の莢が形成されるが、Ka1-22 ではほとんど形成されない。

有する高レベル自家不和合性形質が *S* 遺伝子座と関連する形質であることが示唆された。

② *B. oleracea* 解析集団の自家不和合性程度を 2007 年において虫媒受粉法によって評価したところ、 F_2 の結実率は、 F_1 値 ($38.9 \pm 5.7\%$) を頂点とする連続的な分布を示し、その分離は 3.6%–83.6% の範囲に位置した。両親系統の *S* 遺伝子型が同一であることから、Ca1-1406 のもつ高レベルの自家不和合性形質は *S* 遺伝子座とは独立の複数の遺伝子座が関与することが想定される。*S* 遺伝子座とは異なる受粉・受精・結実に関わる因子を特定できる可能性があり、科学的な意義は極めて大きい。

(2) 連鎖地図の構築

① *B. rapa* 解析集団については、148 の SSR マーカー、10 の SNP/InDel マーカー、および 1 つの CAPS マーカーが座乗し、10 連鎖群からなる全長 771cM の連鎖地図を構築した (図 2)。既報の *B. rapa* 連鎖地図との共通の SSR マーカーを利用して、国際アブラナ科コンソーシアムで認められた連鎖群 R01–R10 に対応付けた。本研究において、新たに 69 の SSR マーカーと 10 の SNP/InDel マーカーがマップされた。それらのプライマー配列は論文において公開予定であり、国内外のアブラナ科研究者との統合遺伝地図の構築に貢献すると考えられる。

これまで、自家不和合性関連遺伝子がマッピングされた遺伝地図の報告はほとんどない。本研究において、*S* 遺伝子座は LG4、*ARCI* は LG10、*MLPK* は LG1、*PUB8* は LG6 にマッピングされた。*PUB8* はシロイヌナズナの *S* 遺伝子座に近接していることから、シロイヌナズナの *S* 遺伝子座は、*B. rapa* の LG6 連鎖群に位置することを明らかにした。

② *B. oleracea* 解析集団については、84 の SSR マーカー、1 つの InDel マーカーが座乗する 9 連鎖群からなる全長 543cM の連鎖地図を構築した (図 3)。座乗するマーカー数が不十分ではあるが、*B. oleracea* において SSR マーカーを基本とする連鎖地図の報告は少なく、さらにマーカー数を増やすことによって、キャベツの有用形質連鎖マーカーの開発などへの応用が期待できる。

(3) QTL 解析

① *B. rapa* では、2006 年の検定結果から LG1、LG4、LG8 の 3 カ所に、2007 年の検定結果から LG1、LG2、LG4、LG9 の 4 カ所に高レベル自家不和合性に関与する QTL が検出された。これらを *BrHLSI*-1–5 とした (図 2、表 1)。これまで、自家不和合性程度

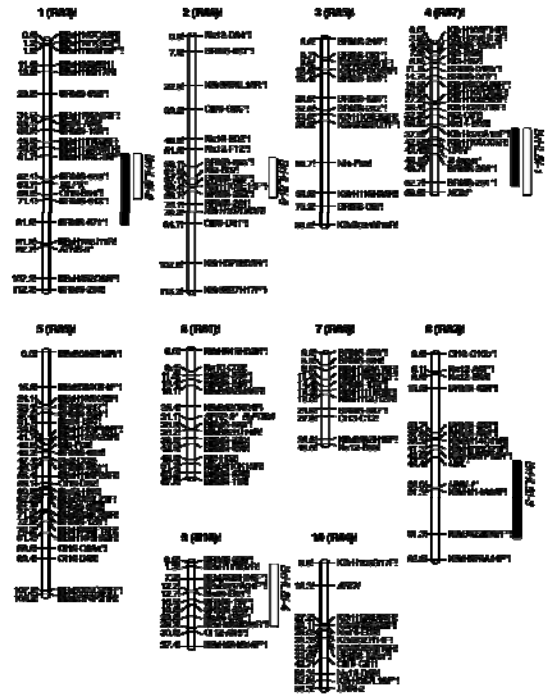


図 2. *B. rapa* 連鎖地図と高レベル自家不和合性関連 QTL。連鎖群の右側に検出された QTL の位置を黒 (2006 年) と白 (2007 年) のバーで示す。

表 1. *B. rapa* の高レベル自家不和合性 QTL の概要

QTL	Linkage group	Marker	2006 experiment			2007 experiment		
			LOD	Additive effect	Variance explained (%)	LOD	Additive effect	Variance explained (%)
<i>BrHLSI</i> -1	LG4	BRMS-298	7.9	-7.7	10.5	6.8	-6.2	20.8
<i>BrHLSI</i> -2	LG1	MLPK	6.6	6.2	14.0	4.8	5.0	11.0
<i>BrHLSI</i> -3	LG8	UEL	7.5	-8.2	10.0	ND		
<i>BrHLSI</i> -4	LG9	BRMS-197	ND			6.2	-7.2	12.0
<i>BrHLSI</i> -5	LG2	BRMS-227	ND			3.5	-4.8	7.2

ND: not detected

は当日開花した花に人為的に自家受粉を行う方法によって評価されていたが、結果が安定しない、実用レベルで評価できない、などの問題があったために、自家不和合性程度に関する研究は皆無であったが、本研究では F_1 採種現場に近い条件の虫媒受粉法を採用することで、高レベル自家不和合性に関与する遺伝子座を世界で初めて明らかにした。

LG4 に検出された *BrHLSI*-1 と LG1 に検出された *BrHLSI*-2 は、2006 年と 2007 年の両年で検出された。*BrHLSI*-1 は最も作用力の大きな QTL で (表 1)、 F_2 個体における近接する SSR マーカー (BRMS-298) の遺伝子型と結実率値の関係をみると、Ka1-22 のアレルをホモ型で有する個体が有意に高レベルの自家不和合性を示した。また、*BrHLSI*-1 は *S* 遺伝子座の近傍に検出されたことから、候補遺伝子は SRK/SLG、あるいはそれらに近接する別の遺伝子座であると考えられた。

本研究で検出された 5 つの QTL のうち一つ (*BrHLSI*-2) は、低レベル自家不和合性親 Ha1-400 に由来するアレルが自家不和合性程度を高める効果を示した。QTL 近傍には *MLPK* がマップされたことから、候補遺伝子として考えられる。

BrHLSI-3、*BrHLSI*-4、*BrHLSI*-5 は、2 カ年の試験のうち、いずれかの年度にのみ検出さ

表2. F₂におけるBrHLS-1とBrHLS-2近傍マーカー遺伝子型と結実率値の関係

Group no.	Marker genotype ^a		2006 experiment		2007 experiment	
	BrHLS-1	BrHLS-2	replicate	Rate of pod set (%) (n)	replicate	Rate of pod set (%) (n)
	CFM05-200	MLPK				
1	AA	AA	3	26.7 ± 3.04 abc ^b	11	33.7 ± 3.16 abc
2	AA	BB	7	20.0 ± 5.14 ab	8	23.0 ± 7.07 a
3	AA	AB	13	22.7 ± 2.09 a	15	23.3 ± 2.72 a
4	BB	AA	5	22.9 ± 4.09 a	9	42.1 ± 3.02 ba
5	BB	BB	10	31.5 ± 3.91 abc	5	35.1 ± 3.27 abc
6	BB	AB	19	41.2 ± 2.78 bc	16	45.7 ± 3.44 c
7	AB	AA	14	26.5 ± 3.72 abc	17	43.7 ± 3.00 c
8	AB	BB	11	22.8 ± 3.03 a	11	26.7 ± 2.98 abc
9	AB	AB	30	31.8 ± 1.98 abc	20	34.9 ± 2.03 abc

^a AA: genotypes of BrHLS-1 (high level of self), BB: genotypes of BrHLS-2 (low level of self)

^b Values followed by the same letter within each trait are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's multiple-comparison test.

れた。自家不和合性程度に影響する外的要因としては、高温、高湿度などが報告されている。開花最盛期における試験圃場の外気温が20℃以上の日数は2006年に比べて2007年の方が7日多く、2007年の方が高温に推移したと考えられる。BrHLS1-3, 4, 5は高温による自家不和合性程度の変化に関与する遺伝子座である可能性が示唆された。

BrHLS1-1とBrHLS1-2の効果を見るために、2つのQTL近傍マーカーの遺伝子型と結実率値を比較した。その結果、両QTLを有する個体は、有意に高レベルの自家不和合性を示した(表2のグループ2, 3, 8, 9)。経験的にF₁採種の親系統の自家不和合性程度は、虫媒受粉試験において20%以下の結実率値が求められる。両遺伝子座を持つ個体の平均結実率値はこれに満たないが、BrHLS1-3も有す

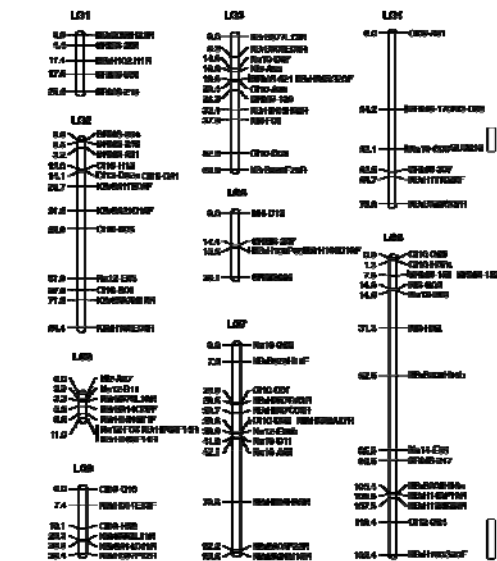


図3. *B. oleracea* 連鎖地図と高レベル自家不和合性関連QTL連鎖群の右側に検出されたQTLの位置を白(2007年)のバーで示す。

る3F₂個体では15%程度を示すことから、QTLのピラミディングによって高レベル自家不和合性形質を有する系統を効率的に育成可能であることが示唆された。

② *B. oleracea* 解析集団の2007年の検定結果を用いてQTL解析を行った結果、LG4 (LOD値3.5、寄与率10.5%)とLG5 (LOD値8.6、寄与率29.7%)のQTLが検出され(図3)、い

ずれも高レベル自家不和合性親 Ca1-1406に由来するQTLであった。2つのQTLについて、Ca1-1406親型をホモ型に持つF₂個体の結実率値は18.0±3.8%と、親系統に実用レベルで求められる20%以下の値を示した。このことから、本研究で同定された2つのQTLを利用することによって実用レベルの親系統をマーカー選抜によって育成できる可能性が示唆された。

連鎖地図上のマーカー密度が希薄なため、今後さらにSSRマーカーを中心に開発を進める必要がある。2009年春に、自家不和合性程度評価の反復試験を実施しており、検出されたQTLの信頼性の確認を行う。

本研究では、アブラナ科野菜である*B. rapa*および*B. oleracea*について、SSRマーカーを主体とする連鎖地図を構築し、高レベル自家不和合性という重要かつユニークな形質に関連する複数のQTLを同定することができた。高レベル自家不和合性系統の効率的育種に向けた高精度マーカーの開発、ならびに原因遺伝子の同定に向けた基盤を構築することができた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ① Hatakeyama K. et al. Identification of QTLs for the high level of self-incompatibility in *Brassica rapa* L. 5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 16th Crucifer Genetics Workshop. 平成20年9月8日. ノルウェー・リレハンメル
- ② 畠山勝徳ら. *Brassica rapa*における自家不和合性程度に関するQTL解析. 日本育種学会、平成20年3月29日、明治大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 勝徳 (HATAKEYAMA KATSUNORI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム・主任研究員

研究者番号：60355625