

機関番号：82508

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2010

課題番号：20380008

研究課題名（和文）落花生のQTL解析によるオレイン酸含有量の遺伝様式の解明とDNAマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of DNA markers and QTL mapping relating to oleic acid contents in peanut.

研究代表者 田畑 哲之（TABATA SATOSHI）

財団法人かずさDNA研究所・副所長

研究者番号：70197549

研究成果の概要（和文）：高オレイン酸含有量の落花生育種を促進するため、オレイン酸含有量を制御する候補遺伝子情報を用いて選抜マーカーを開発し、マーカー選抜育種を開始した。同時に落花生のゲノムワイドな多型DNAマーカー（マイクロサテライトおよびトランスポゾン挿入マーカー）を開発し、連鎖地図の作成を行った。ゲノムワイドなDNAマーカーも選抜マーカーとして利用したところ、5年の選抜工程を3年に短縮することができた。

研究成果の概要（英文）：In order to accelerate breeding for high oleic acid contents in peanut, two selection markers were developed from candidate gene sequences controlling oleic acid contents. In addition, genome wide polymorphic DNA markers (microsatellite and transposon element markers) were developed and mapped on genetic linkage maps of peanut. Those genome wide DNA markers as well as the two candidate gene markers were used for marker assisted selection of the high-oleic peanut breeding program. As a result, we succeed to reduce breeding periods from five to three years.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：植物、育種、ゲノム、遺伝学、脂質

1. 研究開始当初の背景

オレイン酸は落花生油をはじめダイズ油、オリーブ油、ナタネ油など主要な植物油脂に含まれる不飽和脂肪酸である。植物油脂に含まれる主な不飽和脂肪酸は他にオレイン酸を脱水素して生成されるリノール酸がある。オレイン酸は炭素鎖に二重結合を1つ、リノール酸は2つ持つことから、オレイン酸はリノール酸に比べて酸化されにく

く、植物油脂が劣化しにくいという利点がある。またオレイン酸はリノール酸に比べて悪玉コレステロールといわれているLDL-Cを低下させる働きがあるため、動脈硬化等の予防に役立つと考えられていることから、油脂作物においてはオレイン酸含有量の高い品種の育成が望まれていた。

落花生は子実中の約45%が脂肪酸で構成される油脂作物である。アジア、アフリ

カを中心に栽培され穀物豆類の中で第3位の生産量があり、国内においては千葉県を中心に約1万ha作付けされている。子実中の脂肪酸に対するオレイン酸の割合は通常50%程度だが、遺伝資源内で変異があり80%程度の含有率を示す系統が存在する。しかしこれらの系統は小粒で収量性が低いなど農業形質に劣るため、これまで育種母材としては用いられなかった。一方、オレイン酸含有量は温度や湿度など生育・登熟期の環境により変動しやすく、また分析に時間と労力を要するため、表現型による個体の選抜は困難であった。そのため、DNAマーカーを用いた分子育種法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では千葉農林総合研究所の有する遺伝資源コレクションの中で最もオレイン酸含有量が高い系統と収量性等の農業形質に優れるエリートラインを用いてF₂解析集団を作製しマイクロサテライトマーカーおよび脂肪酸生合成を中心としたCandidate gene由来のDNAマーカーを開発して、落花生の連鎖地図を作製する。さらに上記の解析集団を用いてQTLの検出を行い、落花生のオレイン酸含有量の遺伝様式の解明と選抜DNAマーカーの開発を試みる。また、F₂解析集団にエリートラインを戻し交雑し、検出した候補QTLの発現の安定性を検証する。

本申請研究では落花生では最も詳細な連鎖地図を作製することを目標としている。この連鎖地図とCandidate gene approachおよびGMM法を適用してQTLの検出を行い、オレイン酸含有量の遺伝様式の解明と選抜DNAマーカーの開発を図る。本申請研究により明らかにされるオレイン酸含有量の遺伝様式は他の油脂作物の育種において有用な情報になると考えられる。また、本申請研究では、連鎖地図の作製・QTLの検出と戻し交雑による材料の育成を並行して行うことにより、短期間に選抜マーカーを開発し、研究成果を育種現場に還元することが可能になることから、作物の成分育種におけるDNAマーカー育種のモデルケースとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 材料

解析集団の両親にはオレイン酸高含有系統に「YI-0311」(オレイン酸含有量約80%、昨年度まで8I-0311と表記したが本年度より改名)、エリート系統に「ナカテユタカ」(オレイン酸含有量約50%)を用いる。

「YI-0311」は千葉農林総合研究所の有する遺伝資源の中で最もオレイン酸含有量の高い系統

である。「ナカテユタカ」は収量性・食味に優れ、日本における作付面積は第2位である。「YI-0311」を母親、「ナカテユタカ」父親とした交配を平成19年度に行い、平成20年度にF₂分離集団を得た。平成21年度は成分測定およびマーカー選抜で選ばれた高オレイン酸F₂個体に「ナカテユタカ」を戻し交配し、さらに自殖を重ねることで高オレイン酸個体の育種母材化をはかる。一方、「YI-0311」と「ナカテユタカ」間の遺伝距離が極めて近いこと、より遠縁間の組み合わせである「郷の香」(千葉農林総研の育成品種)および「金時」(種皮が赤色で小粒品種)のF₂集団も併用して落花生のDNAマーカーの開発と連鎖地図の作成の充実に試みる。

(2) DNAマーカーの開発および連鎖地図の作製

①Candidate geneによるSNPマーカーの開発

オレイン酸からリノール酸への変換時に働く不飽和酵素を制御する遺伝子として*fad2*および*fad6*が同定されていることから、これらの遺伝子を中心に脂肪酸の合成経路に関わる遺伝子ファミリーをリストアップし、イントロンを挟むエクソン領域にプライマーを設計して「8I-0311」と「ナカテユタカ」間のSNPsを探索する。また、開発したSNPsを地図上に位置づける。

②ゲノムワイドDNAマーカーの開発と連鎖地図作成

研究開始当初は落花生EST-SSR(EST:由来のマイクロサテライトマーカー候補増幅用3000プライマーペアと落花生ゲノムSSR由来のマイクロサテライトマーカー(以下EST-SSRおよびゲノムSSRマーカー)候補増幅用5000プライマーペアを用いて両親間で多型を示すプライマーペアの多型解析を計画していた。しかし、落花生は予想以上に系統間の多型が低かったため、さらにゲノムSSRマーカーの開発とトランスポゾン挿入多型によるマーカー(以下TEマーカー)の開発を*in silico*による事前の多型検出を組み入れて行った。両親で多型を検出したマーカーについて、マッピング後代での遺伝子型解析を行い、JoinMap 4.0を用いて連鎖地図を作成した。また、EST-SSRマーカーについては解析集団親および2倍体の落花生野生種を含む16系統に対する多型解析も行い、開発したマーカーの遺伝資源に対する多型検出能力を評価した。

③落花生種子中の脂肪酸および過酸化脂肪酸の分析

高オレイン酸系統を育種するために、選抜対象となる系統の種子中での脂肪酸含

有量を分析する。こ種子サンプルメタノール抽出物から液相-液相分配法により Lipid 相を得る。この画分に対し質量分析実施のための化学修飾を施した後に、GC-TOF-MS を用いて分析を実施し、脂肪酸分子種ごとに定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) Candidate gene による SNP マーカーの開発

落花生種子中においてオレイン酸からリノール酸へ変換する酵素の活性化に関わる遺伝子の変異については Jung et al (2000), Lopez et al (2000) および Patel et al (2004) が報告している。そこで既報の変異部分を増幅するプライマーペアを設計し、「ナカテユタカ」と「YI-0311」の DNA を用いて増幅した DNA 断片の配列を解読してターゲット遺伝子中における変異の有無を解析した (図 1)。

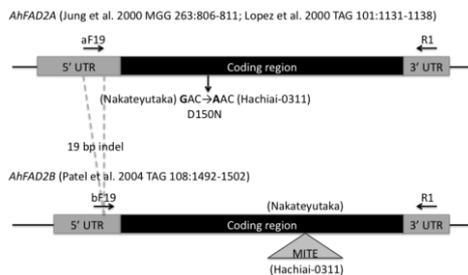


図1. オレイン酸からリノール酸への変換をコードする遺伝子の機能を阻害する変異部分

その結果、リノール酸をほとんど生成しない「YI-0311」の FAD2A は SNP によるアミノ酸置換、FAD2B はトランスポゾンの挿入による終止コドンの出現が原因で機能を失っていると考えられた。これらの変異配列をもとに「ナカテユタカ」と「YI-0311」の FAD2A および FAD2B 遺伝子の多型を検出する DNA マーカーを開発した (図 2、図 3)。

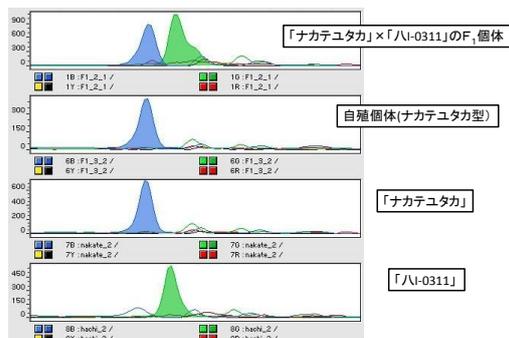


図2. FAD2A遺伝子の変異を検出するDNAマーカー。

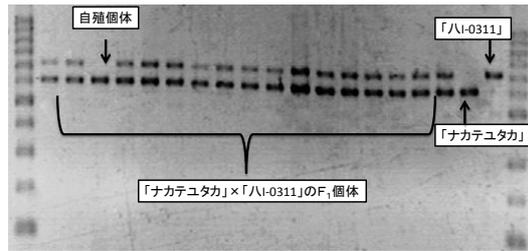


図3. FAD2B遺伝子の変異を検出するDNAマーカー。「ナカテユタカ」のDNA断片は約1200bp、「YI-0311」のDNA断片は約1400bp

「ナカテユタカ」×「YI-0311」の F2 集団のオレイン酸/リノール酸含有量の比と開発した 2 つの候補遺伝子由来マーカーの遺伝子型を比較したところ、2 つの候補遺伝子マーカーが変異型 (YI-0311 型) だった場合、オレイン酸/リノール酸含有量は著しく高くなることが明らかとなった (図 4)。

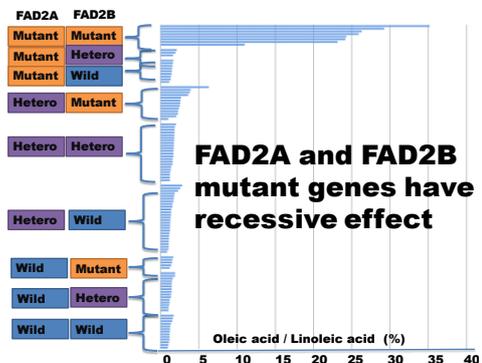


図4. 候補遺伝子マーカーの遺伝子型とオレイン酸含有量の関係

(2) ゲノムワイド DNA マーカーの開発 と連鎖地図作成

① SSR マーカーの開発

落花生品種「千葉半立」の実生に由来する 10,102 の EST 配列から合計で 3187 の EST-SSR マーカーを設計した。これらのマーカーについて、解析集団親および 2 倍体野生種を含む 16 系統を用いて多型解析を行ったところ、1281 マーカーが野生種を含む系統間で多型を示し、366 マーカーが栽培品種間で多型を示した。16 系統間で検出された 1 マーカーあたりのアレルの数は 1~6 で平均 2.1 であり、野生種を除いた 12 系統間では 1~5 で平均 1.4 だった。PIC は 16 系統間で平均で 0.19 であり、野生種を除いた 12 系統間では 0.05 と極めて低かった。

一方、本研究の開始前において、落花生のゲノム濃縮ライブラリから得られた配列をもとに、6818SSR マーカーのプライマーペアを設計した。そのうち 1020 プライマーペアを合成してマッピング集団間で多型解析

を行った。その結果、「ナカテユタカ」×「YI-0311」間では105, 「郷の香」×「金時」間では274の多型マーカーを得られた。

②TEマーカーの開発

上記SSRに加え、ゲノムワイドDNAマーカーの充実をはかるために落花生ゲノム中に挿入されたトランスポゾンの配列を用いて、新たにTEマーカーの開発に着手した。用いるトランスポゾンの種類はFAD2B遺伝子に挿入されていたものと同様のMITEである。「YI-0311」のゲノムを制限酵素により切断し、TEをプローブとしたハイブリダイゼーションまたはゲノム断片のセルフゲージョンを行ってTEを含むゲノム断片を収集し、プライマーを設計してマーカー化した。その結果、714のTEマーカーから「ナカテユタカ」×「YI-0311」間では49, 「郷の香」×「金時」間では388の多型マーカーを得られた。

(3)連鎖地図の作成

得られた多型マーカーを用いて、2つのマッピング集団に対する多型解析を行い連鎖地図を作成したところ、「郷の香」×「金時」集団で比較的信頼性の高い地図を作成することができた。(図6および図7)。

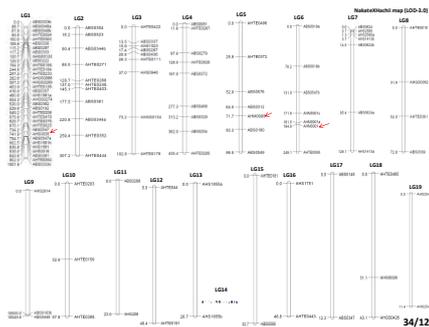


図6. 「ナカテユタカ」×「YI-0311」集団の連鎖地図

「郷の香」×「金時」間の連鎖地図は214座が座乗した23連鎖群で構成されており、地図の全長は1852cMだった。落花生の染色体数は $2n=4X=40$ であることから、最終的には20連鎖群による連鎖地図が作成されなければならない。従って、これらの結果は落花生の系統間で多型を検出するDNAマーカーの更なる開発が必要であることを示唆した。

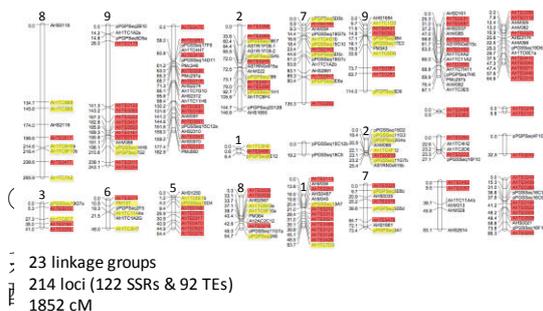


図7. 「郷の香」×「金時」間の連鎖地図の作成

多型を検出しやすい領域を検出してその両端にプライマーを設計、c)設計したプライマーを用いてPCRを複数系統に対して行い多型マーカーをスクリーニングというのが常法であった。しかし、この結果から、落花生は他の植物種に比べて極めて系統間のDNA配列多型が少なく、常法を用いて十分数の多型マーカーを取得するには膨大な費用が必要であることが明らかとなった。一方、連鎖地図作成の結果から、マーカーの多型更なる開発が必要であることが示唆された。そこで、*in silico*による多型解析を組み込むことで、低コストな多型DNAマーカーの開発を試みた。

ターゲットとするマーカーはゲノムSSRおよびTEマーカーとし、SSRおよびTEが挿入しているゲノム領域を濃縮させたライブラリを「郷の香」「金時」のDNAを用いてハイブリダイゼーション法を利用して作成した。これらのライブラリから16080(ゲノムSSR)および25599(TE)の配列を取得した。その結果、SSRモチーフを含んだ配列を4048, TEモチーフを含む配列を1198得た。これらの配列のうち「郷の香」「金時」に共通する領域を相同性解析により検出し、2品種間の配列多型を調査した。その結果、ゲノムSSRでは1446, TEでは511の多型配列が得られた。これらの配列上にプライマーを設計して、実際に「郷の香」「金時」間の多型解析を行ったところ、ゲノムSSRマーカーで793, TEマーカーで310の多型マーカーが得られた。合成したプライマーあたりで得られた多型マーカーの率は従来法の13%に比べて47%と大幅に上昇したことが明らかとなった(図8)。また、開発したマーカーについて「ナカテユタカ」「YI-0311」間で多型を検出するマーカーを解析したところ、436の多型マーカーを得ることができた。

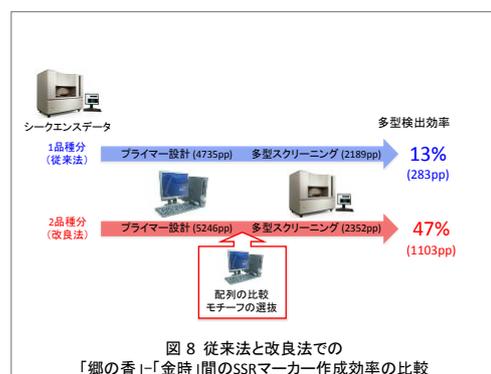


図8 従来法と改良法での「郷の香」×「金時」間のSSRマーカー作成効率の比較

(3) 開発したDNAマーカーによるマーカー選抜育種の開始

オレイン酸含有量に関する2つの選抜マーカー (FAD2A と FAD2B) および「ナカテユタカ」「YI03-11」間で多型を検出するゲノムワイドな DNA マーカーのうちこの中から両親間で多型が安定して検出される34のDNAマーカーおよび選抜マーカーを利用して、オレイン酸含有量に関する領域は「YI03-11」型でそれ以外の領域が「ナカテユタカ」型となるように選抜を行った。

現在「ナカテユタカ」による戻し交雑を2回、自殖を5回行ったBC₂F₅世代の種子を採種中である。ゲノムワイドなDNAマーカーによる遺伝子型解析の結果、BC₁F₃世代(108個体)においてはオレイン酸含有量に関わる領域以外のナカテユタカ型のゲノムの割合は33.3%~75.0%であり、平均で64.8%であった。一方、BC₂F₄世代においては、オレイン酸含有量に関わる領域以外のナカテユタカ型のゲノムの割合は85.3%~95.6%であり、平均で91.7%であることが明らかになった。ゲノムワイドな選抜マーカーを用いなかった場合、供試BC₁F₃世代に2回戻し交雑することで、ナカテユタカ型のゲノムの割合期待値は91.2%に、3回戻し交雑することで95.6%となる。一方、本事業においては1回の戻し交雑でナカテ型のゲノム割合を平均91.7%、最高95.6%まで高めることができたことから、通常の育種に比べて1~2年の期間短縮を図れたことが明らかとなった。

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1件)

Koilkonda P, Sato S, Satoshi Tabata, Shirasawa K, Hirakawa H, Sakai H, Sasamoto S, Watanabe A, Wada T, Kishida Y, Tsuruoka H, Fujishiro T, Yamada M, Kohara M, Suzuki S, Hasegawa M, Kiyoshima H and Isobe S. **Large-scale development of EST-derived SSR markers and diversity analysis in *Arachis* spp.** 査読有 Molecular Breeding (2011) DOI: 10.1007/s11032-011-9604-8.

[学会発表] (計4件)

① Isobe S, Sato S, Shirasawa K, Suzuki S, Watanabe M and Tabata S. **Development of microsatellite, SNP and AFLP markers in cultivated peanut.** Third international conference of the Peanut Research Community on Advances in Arachis through Genomics and Biotechnology (AAGB-2008), ICRISAT, Hderabad India, 4-8 November 2008.

② Shirasawa K, Koilkonda P, Naito Y, Watanabe M, Suzuki S, Hasegawa H, Kiyoshima H, Kuwata C, Tabata S, Isobe S (2009) **Development of microsatellite, single nucleotide polymorphism, and transposon markers for peanut breeding.** Advances in Arachis through Genomics & Biotechnology-2009, 19-22 Oct, Bamako, Mali

③ Shirasawa K, Koilkonda P, Naito Y, Watanabe M, Suzuki S, Hasegawa H, Kiyoshima H, Kuwata C, Tabata S, Isobe S (2009) **Marker assisted backcrossing selection (MABS) for oleic acid content in peanut.** International Plant Molecular Breeding Congress. 25Oct-1 Nov, USA

④ 白澤健太, Koilkonda P, 田畑哲之, 磯部祥子 (2010) **ラッカセイに見出した MITE 型トランスポゾンの特徴** 育種学研究 12(別2):282

[その他]

ホームページ等

<http://marker.kazusa.or.jp/peanut>

落花生のDNAマーカーに関するデータベース

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 哲之 (TABATA SATOSHI)

(財)かずさDNA研究所・副所長

研究者番号: 20380008

(2) 研究分担者

磯部 祥子 (ISOBE SACHIKO)

(財)かずさDNA研究所・植物ゲノム研究部・主任研究員

研究者番号: 20343973

青木 考 (AOKI KOH)

(財)かずさDNA研究所・生体機能応用研究室・室長

研究者番号: 30344021

(3) 連携研究者

なし