

平成23年 5月13日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780002

研究課題名 (和文) コムギ春播性遺伝子 *Vrn-D5* のクローニング研究課題名 (英文) Cloning of *Vrn-D5* for spring growth habit in wheat

研究代表者

西田 英隆 (NISHIDA HIDETAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：30379820

研究成果の概要 (和文)：

コムギの播性 (春播型・秋播型) を決定する春播性遺伝子のひとつである *Vrn-D5* (現在は *Vrn-D4* に改名) の高密度マッピングを試み、本遺伝子が 5D 染色体動原体近傍の SSR マーカー *Xcfd78* と *Xbarc205* に囲まれた 1.8cM の領域に座乗し、*Xcfd67* および EST マーカー *XBG313707* と共分離することを明らかにした。これらのマーカーは育種現場におけるマーカー選抜に有効であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

High density mapping of *Vrn-D5* (renamed to *Vrn-D4*), one of the vernalization genes that determines the growth habit of wheat, was attempted in this study. As the result, *Vrn-D4* was mapped on the 1.8cM region between the SSR markers *Xcfd78* and *Xbarc205* that were located on the centromeric region of chromosome 5D, and cosegregated with *Xcfd67* and EST marker *XBG313707*. These markers were considered useful for marker assisted selection in the future breeding program.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：コムギ、春播性遺伝子、*Vrn-D5*、*Vrn-D4*

1. 研究開始当初の背景

コムギの春化要求性 (播性) は春播性遺伝

子 *Vrn-1*, *Vrn-2*, *Vrn-3*, *Vrn-4*によって支配されている。このうち、*Vrn-1*, *Vrn-2*, *Vrn-3*は既にクローニングされており、分子遺伝学的研究により、コムギの春化要求性メカニズムが徐々に明らかにされつつある。その結果、コムギ（単子葉植物）の春化要求性メカニズムは、シロイヌナズナ（双子葉植物）と大きく異なっており、それぞれのメカニズムが別々に進化したことが示唆されている。コムギにおいて春化要求性メカニズムの全容を解明するためには、*Vrn-4*を含む既知の春播性遺伝子を全てクローニングして、包括的な解析を進める必要がある。

*Vrn-4*は3Dゲノムの同祖遺伝子（*Vrn-D4*、旧名 *Vrn-D5*）についてのみ自然変異が知られており、当研究グループでは以前よりこの遺伝子の座乗染色体・領域について研究を進めてきた。その結果、*Vrn-D4*が5D染色体に座乗し、同染色体長腕のSSRマーカー *Xgdm3*と連鎖することが明らかになった。しかし、*Vrn-D4*をポジショナルクローニングするためには、同遺伝子領域の高密度マッピングや物理地図の作製が不可欠である。

しかし一方で、他の研究者らによって *Vrn-D4*の存在を疑問視する報告が提出されており、このような矛盾の原因は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) コムギ春化要求性メカニズム研究の前段階として、*Vrn-D4*のポジショナルクローニングを試みる。そのために、以下の実験を行う。

- ① *Vrn-D4*の高密度マッピング
 - ② *Vrn-D4*領域の物理地図作成
 - ③ *Vrn-D4*候補遺伝子のシーケンス解析
- (2) 異なる研究機関で維持・保存されているTD(F) (*Vrn-D4*を保有すると考えられている系統)を解析し、*Vrn-D4*の存在を証明する。

- ① 遺伝子分析
- ② *Vrn-D4*領域のマーカー遺伝子型解析

3. 研究の方法

(1) *Vrn-D4*のポジショナルクローニング

- ① *Vrn-D4*の高密度マッピング

先行研究で用いたF2集団と比べて、多くのDNAマーカーが利用できるTD(F) (*Vrn-D4*保有・春播型) × 早小麦 (*vrn-D4*非保有・秋播型) のF2集団を供試し、*Vrn-D4*の高密度マッピングを行う。

- ② *Vrn-D4*領域の物理地図作成

*Vrn-D4*が座乗する領域のBACクローンを整理化するとともに、大規模な分離集団 (F2集団など) を用いて連鎖解析を行うことにより、*Vrn-D4*が座乗するBACクローンを絞り込む。

- ③ *Vrn-D4*候補遺伝子のシーケンス解析

イネのゲノム情報を援用し、BACクローンに含まれる遺伝子を推定する。その中で、*Vrn-D4*の候補遺伝子と考えられるものについてはシーケンス解析を行い、TD(F) と早小麦の間に遺伝子機能に関わる重要な配列変異が存在するかどうかを確かめる。変異が見出された場合、その遺伝子を *Vrn-D4*と特定する。

(2) *Vrn-D4*の存在の証明

- ① 遺伝子分析

異なる研究機関で維持・保存されているTD(F) と秋播型品種・系統のF2集団について分離解析を行い、分離に関わっている春播性遺伝子が *Vrn-D4*であるかどうかを確かめる。

- ② *Vrn-D4*領域のマーカー遺伝子型解析

異なるTD(F) 系統について、*Vrn-D4*近傍領域のマーカー遺伝子型を解析し、*Vrn-D4*を保有・非保有の可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) *Vrn-D4*のポジショナルクローニング

- ① *Vrn-D4*の高密度マッピング

はじめに、TD(F) (*Vrn-D4*保有・春播型) ×

早小麦 (*vrn-D4*非保有・秋播型) のF2集団258個体ならびにその後代であるF3系統を供試し、多数のSSRマーカーを用いて *Vrn-D4* の高密度マッピングを試みた。この集団は、無春化・自然日長条件において出穂期 (春化要求性) が1遺伝子の期待分離比である早生型 (春播型) : 晩生型 (秋播型) = 3 : 1を示し、*Vrn-D4* のみが分離することが確かめられた。そこで、*Vrn-D4* のマッピングを行った結果、本遺伝子は5D染色体短腕に座乗する *Xcfd78* と同・長腕に座乗する *Xbarc205* に挟まれた約1.8cMの領域、すなわち5D染色体の動原体近傍領域に座乗することが明らかになった。また、*Vrn-D4* は、長腕に座乗する *Xcfd67* ならびに短腕に座乗するESTマーカー *XBG313707* と共分離しており、どちらの染色体腕に座乗しているかを明らかにすることができなかった。

次に、*Vrn-D4* 座乗領域を絞り込むことを目的として、新たにTD(F) × 早小麦のF2集団368個体を解析し、*Vrn-D4*、*Xcfd78*、および *Xbarc205* の間で組み換えが生じた個体48個体を見出した。しかし、この48個体は全て、*Vrn-D4*、*Xcfd67*、および *XBG313707* の間では組み換えが生じていなかった。*Vrn-D4* 座乗領域の絞り込みには、組み換え型個体の獲得が不可欠であることから、さらにF2集団476個体を展開し、解析を進めているところである。

以上の通り、本研究期間内には② *Vrn-D4* 領域の物理地図作成、③ *Vrn-D4* 候補遺伝子のシーケンス解析には着手することができなかった。しかし、ESTマーカーがマッピングできたことにより、今後はESTマーカー地図情報や、イネ・ゲノム情報を援用できるようになり、物理地図作成への足がかりが得られた。

なお、5D染色体のESTマーカー地図情報を基に *Vrn-D4* 座乗領域を解析したところ、この領域には有力な候補遺伝子のひとつが存在することが明らかになった。現在は、この候補遺

伝子のシーケンス解析を行っているところであり、F2の両親間に重要な塩基配列変異が存在するかどうかを明らかにする予定である。

(2) *Vrn-D4* の存在の証明

① 遺伝子分析

ワシントン州立大学で維持・保存されているTD(F) (以下、TD(F)-US) と秋播型系統 (*Vrn-D4*非保有) とのF2集団を供試し、無春化条件における出穂期 (春化要求性) の分離を解析したところ、*Vrn-D4* は分離に関与していなかった。そこで、*Vrn-I* 同祖遺伝子 (*Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1*) の対立遺伝子を識別できるDNAマーカーを用いて解析したところ、この分離が *Vrn-A1* と *Vrn-B1* によるものであることが明らかになり、TD(F)-USが保有する春播性対立遺伝子は *Vrn-D4* ではなく、*Vrn-A1* と *Vrn-B1* であると推察された。このことは、TD(F)-USのマーカー解析によっても確かめられた。一方、当研究室で維持・保存しているTD(F) (以下、TD(F)-J) は *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* のいずれも保有していなかった (全てが秋播性対立遺伝子)。

② *Vrn-D4* 領域のマーカー遺伝子型解析

TD(F)-JおよびTD(F)-USについて、*Vrn-D4* 近傍領域のSSRマーカー遺伝子型を解析した結果、両系統は異なる遺伝子型を示し、TD(F)-Jが *Vrn-D4* を保有するのに対し、TD(F)-USは保有しないことを支持する結果が得られた。

したがって、これまでの *Vrn-D4* 研究において研究者により結果が異なった原因は、TD(F) の中には遺伝子型が異なるストックが存在したことであると考えられた。

本研究の結果、*Vrn-D4* が5D染色体動原体近傍に座乗することが明らかになり、同遺伝子と共分離、また密接連鎖するDNAマーカーが得

られた。これらは今後の物理地図作製や候補遺伝子の解析に有用であり、さらに育種現場におけるマーカー選抜にも有効であると考えられた。

これまでに当研究室では、*Vrn-D4*を有するTD(F) (TD(F)-J) を用いて研究を進めてきたことから、*Vrn-D4*研究では世界をリードする立場にあり、今後も同遺伝子のクローニングを目標に解析を進めていく予定である。

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)

Yoshida T, Nishida H, Zhu J, Nitcher R, Distelfeld A, Akashi Y, Kato K, Dubcovsky J, *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat, Theoretical and Applied Genetics, 査読有, Vol. 120, 2010, 543-552.

[学会発表] (計1件)

Yoshida T, Nishida H, Distelfeld A, Dubcovsky J, Kato K, Genetic Mapping of *Vrn-D4* in Hexaploid Wheat, 11th International Wheat Genetics Symposium, 24-29 August, 2008, Brisbane (Australia)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 英隆 (NISHIDA HIDETAKA)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：30379820

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし