

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780005

研究課題名(和文)コムギ春播性遺伝子Vrn-D4の単離と機能の解析

研究課題名(英文)Cloning of wheat vernalization gene Vrn-D4 and its functional analysis

研究代表者

西田 英隆(Nishida, Hidetaka)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：30379820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：コムギの春化要求性メカニズムを解明するためには、全ての春播性遺伝子を単離し、機能を解析する必要がある。本研究では春播性遺伝子Vrn-D4に着目し、同遺伝子が座乗する5D染色体の詳細な遺伝学的地図を構築した。その結果、Vrn-D4が動原体近傍の0.09cM領域に座乗することが明らかになった。次に、モデル植物Brachypodiumの相同領域におけるゲノム情報に基づいて候補遺伝子を選定し、塩基配列を解析したが、重要な配列変異は見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：To dissect the wheat vernalization mechanism, molecular cloning of all vernalization genes and their functional analyses need to be conducted. In this study, we focused on the vernalization gene Vrn-D4. We constructed the high density genetic map around the Vrn-D4 locus, which narrowed down the Vrn-D4 region to the 0.09cM interval. By referring the genomic information on the Brachypodium corresponding region, we selected Vrn-D4 candidate genes. However, no significant variation was found.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：コムギ 春播性遺伝子 Vrn-D4 クローニング VIL-D1

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

コムギの春化要求性(春播性・秋播性)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、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* を含む全ての春播性遺伝子をクローニングして、包括的な解析を進める必要がある。

Vrn-4 は D ゲノムの同祖遺伝子 (*Vrn-D4*) においてのみ自然変異が知られており、課題担当者の研究グループでは品種 Triple Dirk の準同質遺伝子系統で春播性 *Vrn-D4* を保有する TD(F) を用いて座乗染色体・領域の研究を進めてきた。初期段階の研究では、*Vrn-D4* が春化要求性を支配しており、5D 染色体の DNA マーカー *gdm3* と連鎖すること、したがって *Vrn-D1* とは別の遺伝子であることを明らかにした。

しかし、当研究グループと同様に TD(F) を解析材料としているにもかかわらず、*Vrn-D4* の存在を疑問視する研究結果や座乗染色体に関して異なる研究結果が報告されていたことから、当研究グループと他研究機関のそれぞれにおいて維持・保存されている TD(F) を供試し、既知の春播性遺伝子及び 5D 染色体について DNA マーカー解析を行った (Yoshida et al., 2010, Theor. Appl. Genet. 120: 543-552.; 科研費・若手研究(B) 20780002)。その結果、他研究機関の TD(F) は Triple Dirk (秋播性 *vrn-D4* 保有) と同一の DNA マーカー型であったことから、何らか

の原因で誤った系統が維持・保存されてきたと考えられた。これに対し、当研究グループの TD(F) は既知遺伝子が全て秋播性であり、5D 染色体の DNA マーカー型は Triple Dirk とは異なるタイプであったことから、春播性 *Vrn-D4* を保有する正しい系統であることを確認した。また、春化要求性に関する表現型解析により、TD(F) の *Vrn-D4* が春化要求性を支配することを改めて確認した。

そこで次に、*Vrn-D4* の座乗領域を特定するために、TD(F) を片親とする 3 種類の F2 集団を供試し、マッピングを行った (Yoshida et al., 2010, Theor. Appl. Genet. 120: 543-552.; 科研費・若手研究(B) 20780002)。その結果、*Vrn-D4* が 5D 染色体動原体近傍の SSR マーカー *cfD78* (短腕に座乗) と *barc205* (長腕に座乗) に挟まれた 1.8cM の領域に座乗することを明らかにした。しかし、*Vrn-D4* は、この領域内に座乗する *cfD67* (長腕) と EST マーカー *BG313707* (短腕) と共分離し、染色体腕を特定できなかった。また、イネにおける相同領域は巨大であり、ゲノム情報を基に候補遺伝子を絞り込む段階には至らなかった。したがって、*Vrn-D4* のポジショナルクローニングを行うためには、同遺伝子領域の高密度マッピングをさらに進めることが不可欠である。

なお、二倍性コムギである *Triticum monococcum* では、シロイヌナズナの春化要求性メカニズムの初期段階において働く *VIN3-like 1* (*VIL1*) のオースローク (*VIL-A¹*) がクローニングされている。この遺伝子は 5Aⁿ 染色体 (5D の同祖染色体) の動原体近傍に座乗し、春化処理に応答して発現が変化することが明らかになっている。したがって、5D 染色体動原体近傍にも座乗すると考えられる *VIL1* (*VIL-D1*) は *Vrn-D4* の重要な候補遺伝子のひとつであり、春化要求性と対応する塩

基配列変異の有無を解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)ポジショナルクローニングの手法により *Vrn-D4* の原因遺伝子を特定するとともに、(2)シーケンス解析により春化要求性の有無（表現型；秋播性、春播性）の原因となる塩基配列変異を見出し、*Vrn-D4* が春化要求性メカニズムにおいて果たす役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *Vrn-D4* の高密度マッピングとポジショナルクローニング

Vrn-D4 の高密度マッピング

TD(F)（春播性 *Vrn-D4* 保有）× CS(5D₅₄₀₂)（秋播性 *vrn-D4* 保有）の大規模F₂集団（1591個体）を温室（20～25℃）・長日（16時間日長）条件下で栽培して出穂期を調査するとともに、新規・既存のDNAマーカーを用いて *Vrn-D4* 座乗領域の高密度マッピングを行った。新規DNAマーカー（ESTマーカー；20個）は、モデル植物である *Brachypodium* の第4染色体上に存在する *Vrn-D4* 相同領域のゲノム情報（アノテーション）を利用して設計した。

Vrn-D4 が座乗する染色体腕の特定

Chinese Springの遺伝的背景をもつナリテトラソミック系統（N5DT5B）とTD(F)のF₂集団（192個体）の中から、5D染色体の短腕が欠失したテロセントリック染色体を1ないし2本保有する個体（それぞれモノテロソミック及びダイテロソミック）を選抜し、出穂期に及ぼす影響を解析した。

(2) *Vrn-D4* 候補遺伝子のシーケンス解析

VIL-D1 のシーケンス解析

二倍性コムギ（Aゲノム種 *T. urartu*、S(B)ゲノム種 *Aegilops speltoides*、Dゲノム種 *Ae. tauschii*）において *VIL1* の塩基配列（エキソ

ン1～3' UTR）を解析し、Dゲノム特異的な塩基配列変異を利用して *VIL-D1* 特異的プライマーを設計した。これらのプライマーを用いて Chinese SpringのBACライブラリーをスクリーニングし、得られたポジティブクローンを用いて5'上流域の塩基配列を解析し、特異的プライマーを設計した。

以上の *VIL-D1* 特異的プライマーを用いて、春播性 *Vrn-D4* を保有する系統（TD(F)）及び秋播性 *vrn-D4* を保有する系統（CS(5D₅₄₀₂)、他3系統）の *VIL-D1* 配列を解析した。

Vrn-D4 領域における候補遺伝子のシーケンス解析

Brachypodium の *Vrn-D4* 相同領域に存在する遺伝子の中から、*Vrn-D4* の原因遺伝子である可能性が高いと期待される、発生もしくは転写制御に関わる遺伝子を探索した。さらに、コムギ同祖遺伝子の有無や座乗する染色体・領域を考慮しつつ、候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子の塩基配列を決定し、播性（対立遺伝子）の違いに対応する配列変異の有無を解析した。

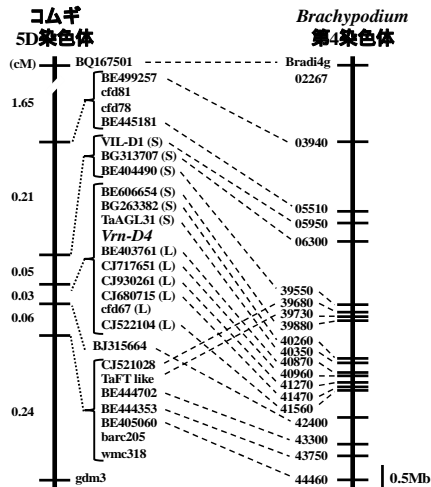
4. 研究成果

(1) *Vrn-D4* の高密度マッピングとポジショナルクローニング

Vrn-D4 の高密度マッピング

高密度マッピングの結果、*Vrn-D4* 領域と *Brachypodium* の相同領域においてマーカーの並び順がほぼ一致し、co-linearityがきわめてよく保存されていることが確認できた（第1図）。また *Vrn-D4* は、短腕に座乗する3個及び長腕に座乗する1個のDNAマーカーに挟まれた0.09cMの領域に座乗することが明らかになり、座乗領域の絞り込みを進めることができた。しかしながら、*Vrn-D4* は、短腕に座乗する3個及び長腕に座乗する6個のDNAマーカーと共分離しており、高密度マッピングを実施して

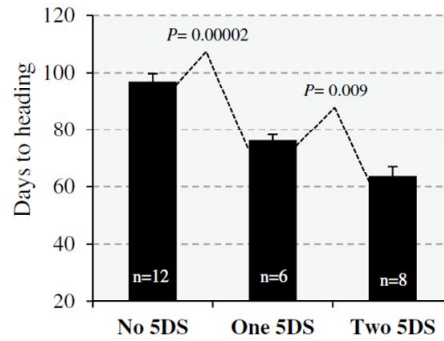
も染色体腕の特定には至らなかった。



第1図 TD(F) × CS(5D₅₄₀₂) 大規模F₂集団を用いて作成した5D染色体の*Vrn-D4*領域における高密度マップ及び*Brachypodium* 第4染色体とのシンテニー。マーカー名の右に付した(S)及び(L)はそれぞれ短腕及び長腕に座乗することを表す。

*Vrn-D4*が座乗する染色体腕の特定

高密度マッピングにおいて*Vrn-D4*が座乗する染色体腕を特定できなかったことから、正常個体、5D染色体短腕に関するモノテロソミック個体及びダイテロソミック個体の出穂期を解析した。その結果、ダイテロソミック個体の出穂期は正常個体と比べて著しく遅く、モノテロソミック個体の出穂期はダイテロソミック個体と正常個体の中間であった(第2図)。この結果は、5D短腕の数が少ないほど出穂が遅くなることを示しており、*Vrn-D4*が出穂を早める効果をもつという過去の結果とも符合した。以上から、*Vrn-D4*は5D染色体の短腕に座乗していると推定した。



第2図 5D短腕のテロセントリック染色体が出穂期に及ぼす効果

(2) *Vrn-D4*候補遺伝子の解析

*VIL-D1*のシーケンス解析

春播性*Vrn-D4*を保有する系統(TD(F))及び秋播性*vrn-D4*を保有する系統(CS(5D₅₄₀₂))、他3系統)において*VIL-D1*配列を比較した結果、5'上流域(1kb)、遺伝子領域(3.2kb)、3'下流域(1.2kb)のいずれにおいても播性(対立遺伝子)の違いに対応する配列変異は見出されなかった。また、高密度マッピングにおいて、*VIL-D1*は*Vrn-D4*との間で組換えが生じ、原因遺伝子ではないことが明らかになった(第1図)。

*Vrn-D4*領域における候補遺伝子のシーケンス解析

*Brachypodium*の第4染色体に存在する、*Vrn-D4*相同領域には127個の遺伝子が座乗すると予測され、発生もしくは転写制御に関わる遺伝子が10個存在した。これらについて、コムギ同祖遺伝子の有無や、座乗する染色体・領域を考慮した結果、*TaAGAMOUS-like 31*(*TaAGL31*)が最も有力な候補であると考えられた。しかし、*TaAGL31*も*VIL-D1*と同様に播性(対立遺伝子)の違いに対応する配列変異は見出されず、原因遺伝子ではない可能性が高いと考えられた。

*Vrn-4*はDゲノムの同祖遺伝子(*Vrn-D4*)にのみ自然変異が存在しており、進化の過程でコムギが分岐した後で変異が生じたことを示

唆している。今後の解析を進める上での戦略のひとつとして、*Brachypodium*に同祖遺伝子が存在しないコムギ遺伝子に着目し、シーケンス解析を行うことが考えられた。

本研究課題の遂行により、*Vrn-D4*座乗領域を0.09cMに絞り込み、5D染色体動原体近傍の短腕側に座乗(*Brachypodium*の相同領域に127個の遺伝子が存在)することを明らかにした。しかしながら、*Vrn-D4*の候補遺伝子には重要な配列変異が見出されず、原因遺伝子の特定には至らなかったことから、*Vrn-D4*のクローニングは今後の課題として残された。

課題担当者の研究グループは、*Vrn-D4*原因遺伝子の特定を目的として、世界に先駆けて研究を進めてきた。このため、*Vrn-D4*の研究においては世界をリードする立場にある。*Vrn-D4*原因遺伝子の特定とその機能解析は、コムギ春化要求性メカニズムとその独自進化の解明につながり、また他の植物種における同種の研究など関連分野への影響も大きい。また基礎研究分野だけでなく、本研究で開発した多数の*Vrn-D4*近傍マーカーはマーカー選抜育種への利用が期待され、これまで*Vrn-1*同祖遺伝子のみ依存してきた春播型コムギ育種において、新たな春播性遺伝子(*Vrn-D4*)の利用に道を開くことになると考えられる。今後、*Vrn-D4*をクローニングできれば、対立遺伝子を直接選抜できるDNAマーカーの開発も可能である。

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)

Kippes N, Zhu J, Chen A, Vanzetti L, Lukaszewski A, Nishida H, Kato K, Dvorak J,

Dubcovsky J (2014) Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics*, 査読有, Vol. 289, 2014, 47-62, DOI: 10.1007/s00438-013-0788-y.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 英隆 (NISHIDA HIDETAKA)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号：30379820

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし