

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450501

研究課題名(和文) 新規キビ亜科モデル植物アワにおけるSSRマーカー開発・マッピング・野生集団解析

研究課題名(英文) Development and mapping of SSR markers in foxtail millet, a new model plant in panicoid grass and genetic analysis of wild population

研究代表者

福永 健二 (Fukunaga, Kenji)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：50435533

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)：アワは、近年、野生種のエノコログサとともにキビ亜科のモデル植物として注目され、ゲノム配列が決定された。今後のさらなる研究のためにDNAマーカーの作出は不可欠である。本研究では、アワゲノム配列を用いて、アワゲノムからSSRマーカーを作出し、われわれの展開している日本品種×台湾品種間の連鎖地図上にマッピングするとともに、代表的な品種間の多型性を調査した。さらに、日本に広く分布する、エノコログサの変種であるハマエノコロについて集団遺伝学的な解析を試みた。また、次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドなマーカーも作出した。

研究成果の概要(英文)：Recently foxtail millet became a model plant of panicoid grass species and its genome sequence has been determined. For further studies, development of DNA markers is essential. In this study, we developed genome-wide SSR markers and constructed a genetic linkage map between a Japanese landrace and a Taiwanese landrace and we also investigated degree of polymorphism of SSR markers between world-wide landraces. We also carried out a population genetic analysis of coastal ecotypes of green foxtail (wild ancestor of foxtail millet). We also developed genome-wide indel markers based on genome sequences.

研究分野：育種学、環境農学

キーワード：アワ SSRマーカー 多型 連鎖地図 組換え近交系 遺伝資源 ゲノムワイドインデルマーカー ハマエノコロ

1. 研究開始当初の背景

アワ(*Setaria italica* (L.)P.Beauv.)は、雑穀としても重要であるが、ゲノムサイズが小さい、栽培がしやすい、自殖性であるなどの利点があり、2012年にゲノムシーケンズが解読され、キビ亜科のモデル植物として注目されている。今後、さまざまな形質の解析を行うにあたってDNAマーカーの作出とマッピング集団の展開は必要である。

また、祖先野生種エノコログサの海岸に自生する亜種ハマエノコロに関しては、遺伝資源として貴重であるが未解析な状況である。

2. 研究の目的

2012年にアワゲノム配列が決定されたが、マーカー作出、マッピング集団の展開、マーカーの品種間での多型性の調査が必要とされる。本研究では、以上のような目的のために、SSRマーカーの作出と連鎖解析への応用を行った。SSRに加え、ゲノムワイドインデルマーカーも作出した。さらに、日本に自生する野生種ハマエノコロについても遺伝資源として収集を行い、形質の比較を行うとともに、SSRマーカーを用いて系統解析を行った。

3. 研究の方法

(1)ゲノム情報を用いて、ゲノムワイドなSSRマーカーを作出し、日本品種(JP71640)と台湾品種(JP73913)の交雑に由来する組換え近交系(RILs)を展開しQTL解析用の集団用に連鎖地図作成を行う。SSRについてはF2集団でマッピングを行った。

(2) (1)で開発したマーカーの中から40のマーカーについて17サンプルのアワ及びエノコログサでの多型程度の解析を行った。

(3) 次世代シーケンサーを用いて、マッピング集団の片親の台湾品種(JP73913)について、リシーケンシングを行った。これと、基準となる中国品種Yugu1と岩手生物工学研究センターでリシーケンシング済みの日本品種、大槌10との間の挿入欠失(indel=インデル)を検索し、マーカー化し、RILsを用いて連鎖地図作成を行った。

(4) (3)で作成したゲノムワイドindelマーカーのうち、16マーカーについてユーラシア全域の代表99品種で多型解析を行った。

(5) 台湾品種間の組み合わせに基づくF2集団で穂の形(ネコデ)についてQTL-seqを行ったところ、この形質は第9染色体に座乗することが示唆されている。このことをSSRマーカーを用いて確認するとともに、さらに領域の絞り込みを行った。

(6)日本全国の海岸に自生する野生種遺伝資源ハマエノコロの19集団について収集を

行い、栽培実験によって基本的な形質の調査を行った。また、SSRマーカー9遺伝子座について調査を行い、系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) 合計300個以上のSSRマーカーを作出した。このうち両親品種間で多型があり、アガロースゲルもしくは16cm x 16cmのポリアクリルアミドゲルで多型検出可能なものを用いて、142個体からなるF2集団で連鎖地図を作成した。85個のSSRマーカーと6つの遺伝子からなる1279.1cMの連鎖地図を作成することができた(図1)。

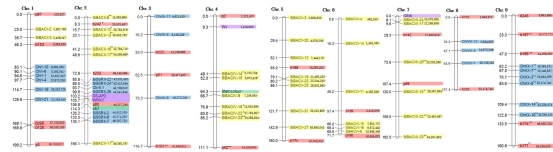


図1. 日本品種と台湾品種のF2集団142個体における連鎖地図(瀧野ら 2016)。

(2) 40個のマーカーについて、多型の調査をおこなったところ、多型指数は0.000~0.855となり、マッピングに用いた両親品種以外でも多型が検出しうることが明らかとなった。

(3) 次世代シーケンサーのデータをもとにゲノム全体で164のゲノムワイドインデルマーカーを作出した。F6世代において、現在までに、95のマーカーをマッピング済である(図2)。

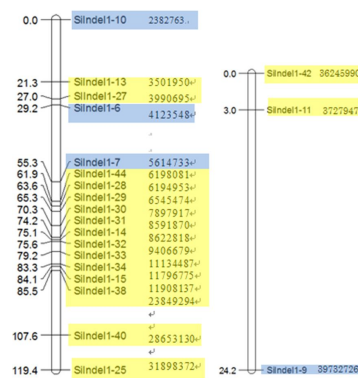


図2. ゲノムワイドインデルマーカーを用いてF6集団で作出した第1染色体の連鎖地図(阿部ら 2016 学会発表)

(4) 16インデルマーカーで世界中の99品種の多様度を調べたところ、多型指数は0.13~0.66であった。品種間でもかなりの多様度があることがわかった。また、マーカーの対立遺伝子の地理的分布を見たところ、東アジア

アに頻度が高い対立遺伝子や、台湾とその周辺で頻度が高い対立遺伝子があることが明らかとなり、アワの伝播を探るマーカーになりうることも明らかとなった(図3)。

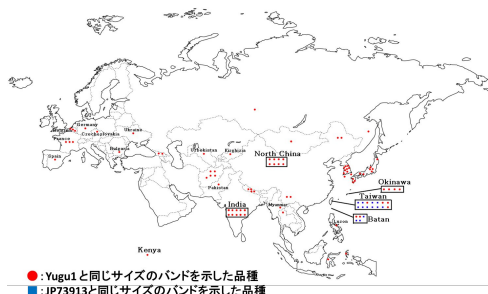


図3.ゲノムインデルマーカー、SiIndel6-7の対立遺伝子の地理的分布(阿部ら2016学会発表)

(5) 台湾品種どうして、穂の形質ネコデについてQTL-seq法を用いてマッピングを行ったところ、第9染色体にマッピングされた。このことをSSRマーカーで確認したところ、同じ結果が得られ、さらに詳細なマッピングを行うことができた(図4)。実際の形質のマッピングに有効であることが明らかとなった。

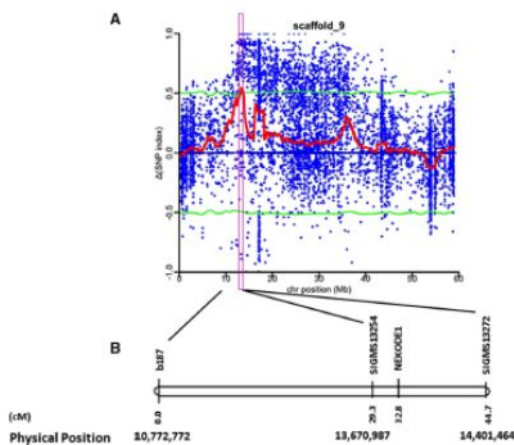


図4.アワのネコデのQTL-seqとSSR連鎖地図. QTL-seqの結果を上連鎖地図を下に示す。同じ位置に遺伝子がマッピングされ、SSRマーカーでさらに絞り込むことができた(Masumoto et al.2016)。

(6) 日本全国のうち19のハマエノコロ集団のサンプリングを行った。京都府立大学農場において、エノコログサ13集団とともに、比較栽培実験を行ったところ、出穂日や草丈、刺毛長などに変異が見られた。9個のSSRマーカーについて多型解析を行い、系統解析を行ったところ、ハマエノコロはエノコログサから多能的に分化した可能性が示唆された。

以上のことにより、アワの連鎖解析に有効なSSRマーカー、ゲノムワイドインデルマーカーを作ることができたことが結論づけられた。連鎖地図作成、形質のマッピングに実際に使用することができた。また、これらマーカーはアワの系統解析、野生集団の集団解析にも有効であることが明らかとなった。また、台湾品種・日本品種の交雑組み合わせからF7世代まで展開することにより、組換え近交系(RILs)を作ることができた。今回の研究で収集したハマエノコロも今後、遺伝資源としてさらに評価していきたい。

## 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3件)

向成洋平、鈴木優紀、福永健二

アワ[*Setaria italica*(L.)P.Beauv.]におけるrDNAのマッピング 生命環境学術誌 6, 2014年, 9-15 査読有

瀧野佑希・石田ゆき・向成洋平・福永健二 アワゲノムシーケンス情報に基づくSSRマーカーの開発と、台湾品種・日本品種の間のF2集団における連鎖地図作成 生命環境学雑誌 8, 2016年 13-27 Masumoto H, Takagi H, Mukainari Y, Terauchi R, Fukunaga K

Genetic analysis of *NEKODE1* gene involved in panicle branching of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv., and mapping by using QTL-seq Molecular Breeding 36(5), 2016年 1-8 DOI 10.1007/s11032-016-0481-z

[学会発表](計5件)

向成洋平、福永健二、アワにおける *spikelet-tipped bristles 1 (stb1)* 遺伝子のポジショナルクローニングに向けて 第6回中国地域育種談話会、2014年、榎本尚人・高木宏樹・向成洋平・寺内良平・福永健二

瀧野佑希、石田ゆき、向成洋平、福永健二、アワにおけるゲノムシーケンス情報に基づいたSSRマーカーの開発とマッピング、2015年、日本育種学会第127回講演会

榎本尚人、高木宏樹、向成洋平、寺内良平、福永健二、次世代シーケンサーを用いたアワのネコデの遺伝子解析 日本育種学会第128回講演会、2015年

阿部 友里香、新川 雄基、田中 伸幸、中山 雄介、向成 洋平、菅 裕、高木 宏樹、寺内 良平、福永 健二、アワにおけるゲノムワイドインデルマーカーの作出 分布、マッピング、多様性

日本育種学会第129回講演会、2016年 山本秋生、福永健二、大迫敬義

ハマエノコロ遺伝資源の収集ならびに遺伝的変異の評価 日本育種学会 第 129 回講演会、2016 年

〔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

福永 健二 (FUKUNAGA, Kenji)  
県立広島大学・生命環境学部・教授  
研究者番号：50435533

### (2) 研究分担者

大迫 敬義 (OHSAKO, Takanori)  
京都府立大学・生命環境科学研究科・講師  
研究者番号：80363969

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：