

学位論文題名

牧草における越冬性向上のための種間比較アプローチを用いた分子育種学的研究

(Studies on molecular breeding using comparative approaches among species for the purpose of an improvement of winter hardiness in forage grasses)

学位論文内容の要旨

北海道のような寒地の草地では寒地型イネ科牧草が栽培されているが、その栽培適応の第一の制限要因は越冬性であり、この遺伝改良は主要な育種目標である。本研究では、寒地型イネ科牧草の越冬性に関する基礎的知見を蓄積するために、越冬性に関わる遺伝子としてCBF (C-repeat binding factor) とフルクタン代謝酵素遺伝子に着目して分子遺伝学・分子生物学的解析を行った。また越冬性改良のための種(属)間雑種を利用した分子育種研究と、その解析ツールとしてDNAマーカーの開発や種間比較トランスク립トーム解析を行った。本研究の遂行にあたり、研究資源の乏しい寒地型イネ科牧草の研究を効率的に進めるため、研究蓄積の豊富なイネやコムギなど近縁作物におけるゲノム情報を有効活用し、また寒地型イネ科牧草間を含めた種間比較を主な研究手法として用いた。

低温に応答し低温馴化に関与する様々な遺伝子発現を誘導する転写因子をコードし、ムギ類などで越冬性QTL (Quantitative trait loci) の候補遺伝子と考えられているCBFのホモログ ($LpCBF$) をペレニアルライグラスから10個単離した。 $LpCBF$ は低温により急激に転写誘導されたが、その後の低温下での発現様式は、遺伝子により異なった。 $LpCBFIb$ の過剰発現シロイヌナズナ形質転換体は著しい矮化を示した一方、 $LpCBFIVa$ 形質転換体は生殖生長への移行に遅延が認められたが、耐凍性は向上した。マッピングできた5つの遺伝子のうち $LpCBFIb$ 、 $LpCBFII$ 、 $LpCBFIIIb$ および $LpCBFIIIc$ の4つは5番連鎖群に2.2cMの範囲にクラスターを形成して座乗していた。ペレニアルライグラスのCBFと他種の越冬性QTLとの関係についてシンテニーに基づき考察した。

フルクタンは寒地型イネ科牧草が蓄積する主要な貯蔵炭水化物であり、耐凍性などの環境ストレス耐性との関連が示唆されている。本研究では特異的に高重合度のフルクタンを蓄積するチモシーからフルクタン代謝酵素遺伝子を単離し、その機能・発現解析を行った。 $PpFT1$ はコムギ由来酵素遺伝子 $wft1$ との比較等により、直鎖 $\beta(2,6)$ 結合型フルクタンを合成する新規酵素遺伝子であることを明らかにした。 $PpFT2$ も直鎖 $\beta(2,6)$ 結合型6-SFTを生成する酵素をコードするが、 $PpFT1$ とは異なる活性構成を示した。また $Pp6-FEH1$ は高重合度の $\beta(2,6)$ 結合型フルクタンに対し高い基質特異性を示すフルクタン分解酵素(6-FEH)をコードすることを明らかにした。 $PpFT1$ と $PpFT2$ はスクロースにより発現誘導されたのに対し、 $Pp6-FEH1$ は刈取り処理後の基部組織において発現誘導が認められた。これらの発現変動には酵素活性の変化も同調したことから、フルクタン代謝酵素の活性がシンク/ソースバランスにより転写レベル

で制御されることが示唆された。低温に対しては *PpFT1* と *PpFT2* がスクロース濃度の上昇とともに徐々に発現誘導されたのに対し、*Pp6-FEHL* は一過的に発現量が増加し、その後急激に減少した。また、越冬前後の自然条件下においてもフルクタン含量や糖組成の変動に、代謝酵素遺伝子の転写レベルの制御が大きく関与することを明らかにした。*PpFT1* 過剰発現 *Brachypodium distachyon* 形質転換体は生育抑制を示したが、低温馴化条件下において単少糖の増加および高重合度のフルクタンの蓄積が認められ、野生型や *wft1* 形質転換体と比較して細胞レベルでの耐凍性向上が認められた。

越冬性に優れるメドウフェスクと放牧適性や飼料品質に優れるペレニアルライグラスの種（属）間雑種を利用した分子育種研究を行った。まずライグラス類とフェスク類の雑種であるフェストロリウムやイントログレーション個体の遺伝解析のために、イネゲノム情報を利用し多型頻度の高いイントロン領域をターゲットとしたDNAマーカーを開発した。イントロン多型の種特異性は高く、フェストロリウムの解析に有用であることを明らかにした。またイネとライグラス・フェスクのシンテニーを利用することでゲノム中の任意の染色体・遺伝子座にDNAマーカーの設計が可能であることを明らかにした。さらにプライマーの3' 側配列の種間保存性を利用することで、近縁種の豊富な配列情報を利用した、寒地型イネ科牧草に広く利用可能なプライマー設計法を開発した。次にペレニアルライグラスにメドウフェスクの優れた越冬性を導入するために、両種の三倍体雑種の戻し交雑により、メドウフェスクの一部染色体がペレニアルライグラスへ移入されたイントログレーション集団の作出を行った。3つの戻し交雑後代二倍体集団について、各染色体に座乗する74のDNAマーカーによるジェノタイプングを行った結果、51~77%の個体でメドウフェスク由来染色体のイントログレーションが確認された。二倍体戻し交雑後代個体の耐凍性は、幅広い変異を示し、戻し交雑親であるペレニアルライグラスより高い耐凍性を示す個体が認められたが、メドウフェスクより優れる耐凍性を示す個体はみられなかった。優れた耐凍性を示したいくつかの個体ではメドウフェスク由来のイントログレーションが認められた。さらに、メドウフェスクとペレニアルライグラスの越冬性の差異に寄与している遺伝子を同定するために、次世代シーケンサーを用いて低温馴化条件下における両種間のトランスクリプトーム比較を行った。低温馴化させた冠部組織由来ESTについて、配列の類似性に基づくクラスタリングを行い、対応する両種由来のクラスターの構成リード数を比較することで、両種間で発現量の異なる遺伝子を同定した。また同条件のcDNAについて種間サブトラクションを行い種間差次的遺伝子の同定を試みた。候補遺伝子について両種に由来する各20個体の発現解析を行った結果、低温馴化時に種間の発現量に2倍以上の差がある遺伝子として、メドウフェスク高発現遺伝子7種およびペレニアルライグラス高発現遺伝子2種を同定した。メドウフェスク高発現遺伝子はペレニアルライグラスとの比較でメドウフェスクにおいて低温馴化時に著しく発現量が増加する傾向が認められた。また低温馴化時のF₂雑種における種間差次的発現遺伝子は両種の間中間的な発現量を示す傾向がみられた。さらにイントログレーション集団におけるメドウフェスク高発現遺伝子の発現量を評価した結果、一部の遺伝子については*cis*因子が、両種間の発現量差に関与することが示された。

以上の研究の結果、ゲノム情報の豊富なモデル植物や近縁種との比較アプローチの手法により、これまで研究蓄積が少なかった寒地型イネ科牧草における越冬性や低温馴化に関わる遺伝子レベルでのメカニズムを明らかにすることができた。今後、本研究で機能を明らかにした遺伝子や有用なDNAマーカーを用いた分子育種の手法により、寒地型イネ科牧草における越冬性の飛躍的な遺伝改良が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山田敏彦
副査	教授	荒木肇
	准教授	山崎健一
	助教	星野洋一郎
	准教授	荒川圭太 (大学院農学研究院)
	准教授	金澤章 (大学院農学研究院)

学位論文題名

牧草における越冬性向上のための種間比較アプローチを用いた分子育種学的研究

(Studies on molecular breeding using comparative approaches among species for the purpose of an improvement of winter hardiness in forage grasses)

北海道のような寒地の草地では寒地型イネ科牧草が栽培されているが、その栽培適応の第一の制限要因は越冬性であり、この遺伝改良は主要な育種目標である。本研究では、寒地型イネ科牧草における越冬性の基礎的知見を蓄積するために、*CBF* (C-repeat binding factor) とフルクタン代謝酵素遺伝子に関する分子遺伝学・分子生物学的研究を行った。また、越冬性改良のための種(属)間雑種を利用した分子育種研究と、その解析ツールとしてDNAマーカーの開発や比較トランスクリプトーム解析を行った。本研究の遂行にあたり、研究資源の乏しい寒地型イネ科牧草の研究を効率的に進めるため、研究蓄積が豊富なイネやコムギなど近縁作物の情報を有効活用し、また、寒地型イネ科牧草間を含めた種間比較を主な手法として用いた。

低温に応答し下流の低温馴化に関与する様々な遺伝子発現を誘導する転写因子をコードし、ムギ類などで越冬性QTL(Quantitative trait loci)の候補遺伝子と考えられている*CBF*のホモログ(*LpCBF*)をペレニアルライグラスから10種単離した。*LpCBF*は低温により急激に転写誘導されたが、その後の低温下での発現様式は、遺伝子により異なった。*LpCBFIb*の過剰発現シロイヌナズナ形質転換体は著しい矮化を示した一方、*LpCBFIVa*形質転換体は生殖生長移行が遅延したが、耐凍性の向上が認められた。5つの遺伝子のうちマッピングできた4つは5番連鎖群に2.2cMの範囲にクラスターを形成して座乗し、近縁種との間にシntenニー関係が認められた。

フルクタンは寒地型イネ科牧草が蓄積する主要な貯蔵炭水化物で、耐凍性などの環境ストレス耐性との関連が示唆されている。本研究では特異的に高重合度(100以上)フルクタンを蓄積するチモシーからフルクタン代謝酵素遺伝子を単離し、その機能・発現解析を行った。*PpFT1*および*PpFT2*は直鎖 $\beta(2,6)$ 結合型フルクタンを合成する新規酵素遺伝子であることを明らかにした。また、*Pp6-FEHI*は高重合度の $\beta(2,6)$ 結合

型フルクタンに対し高い基質特異性を示すフルクタン分解酵素 (6-FEH) をコードすることを明らかにした。これらの遺伝子の発現解析により、チモシーにおけるフルクタン代謝酵素の活性がシンク/ソースバランスの変化や低温により転写レベルで制御されることを明らかにした。また、越冬前後の自然条件下においてもフルクタン含量や糖組成の変動に代謝酵素遺伝子の転写レベルの制御が大きく関与していることを明らかにした。*PpFT1* 過剰発現 *Brachypodium distachyon* 形質転換体は生育抑制を示したが、低温馴化条件下において単少糖の増加と高重合度フルクタンの蓄積が認められ、野生株や *wft1* 形質転換体と比較して細胞レベルでの耐凍性向上が認められた。

越冬性に優れるメドウフェスクと放牧適性や飼料品質に優れるペレニアルライグラスの種 (属) 間雑種を利用した分子育種研究を行った。まずライグラスとフェスクの雑種であるフェストロリウムやイントログレッション個体の遺伝解析に有用な種 (属) 間識別 DNA マーカーを、イネゲノム情報を利用して作出した。これを利用し、両種の三倍体雑種の戻し交雑後代の解析を行い、メドウフェスク由来ゲノムのイントログレッションを確認した。イントログレッション集団の耐凍性は、幅広い変異を示し、戻し交雑親であるペレニアルライグラスより高い耐凍性を示す個体が見出された。また、メドウフェスクとペレニアルライグラスの越冬性の差異に寄与する遺伝子を同定するために、次世代シーケンシングを利用し低温馴化条件下における両種間のトランスクリプトーム比較を行った。網羅的 EST 解析およびサブトラクション法により、低温馴化時に種間の発現量に 2 倍以上の差がある遺伝子として、メドウフェスク高発現遺伝子 7 種およびペレニアルライグラス高発現遺伝子 2 種を同定した。メドウフェスク高発現遺伝子はメドウフェスクにおいてペレニアルライグラスと比較して低温馴化時に著しく発現量が増加する傾向が認められた。また F₁ 雑種における種間差時的発現遺伝子は両種の間間的な発現量を示す傾向を示した。さらにイントログレッション集団におけるメドウフェスク高発現遺伝子の発現量を評価した結果、一部の遺伝子については *cis* 因子が、両種間の発現量差に関与することが示された。

以上の研究の結果、ゲノム情報の豊富なモデル植物や近縁種との比較アプローチの手法により、これまで研究蓄積が少なかった寒地型イネ科牧草における越冬性や低温馴化に関わる遺伝子レベルでのメカニズムに関して数多くの研究知見を明らかにすることができた。今後、本研究で機能を明らかにした遺伝子および開発した有用な DNA マーカーを用いた分子育種の手法により、寒地型イネ科牧草における越冬性の飛躍的な遺伝改良が期待される。

よって、申請者は博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。