

午後開花アサガオを用いた開花時刻決定遺伝子の探索

前田 菜名 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

[背景・目的]

植物の中には一日のうち特定の時間に開花するものが存在する。このような時刻依存的な開花には植物自身が持つ遺伝的要因や光周期・温度・湿度などの外的要因、また、成長・加齢・概日リズムなどの内的要因が複雑に関与していると考えられている。

本研究の材料であるアサガオ (*Ipomoea nil*) は朝に開花するという特徴を持ち、光周期の影響を大きく受けることから光周性花成研究のモデル生物として研究が進んでいる。さらに、これまでの研究からアサガオは蕾部分で光周期を感知していること、また、約 24 時間周期の概日リズムで開花時刻決定が制御されていることが明らかになっており、日本の標準実験系統である系統 Violet では暗期開始後約 10-12 時間後の早朝に開花することが知られている。しかし、アサガオの中でも開花時刻に関連する自然変異体がこれまでに 1 系統のみ発見されており、早朝ではなく夕方から夜にかけて開花するという特徴から Evening Blue と命名されている。

先行研究では午後開花型の変異系統 Evening Blue と早朝開花型の標準系統 Violet の交配から得られた雑種後代である F2 世代を用いて QTL (Quantitative Trait Loci) 解析を行うことにより、開花時刻の違いをもたらす原因遺伝子の探索が試みられた。ゲノムワイド関連分析 (GWAS) の結果、アサガオが持つ全 15 本の染色体のうち、3 番染色体の約 30 Mb 付近と 4 番染色体の 10 Mb 付近の 2 箇所にて QTL のピークが検出され、開花時刻の決定には複数の遺伝子が関与していることが示唆された。さらに、遺伝子マーカーを用いた F2 集団の遺伝子型解析から、3 番染色体の 34,895,056 - 35,275,674 bp および 4 番染色体の 4,964,498 - 5,930,951 bp が先行研究段階での候補領域として有力であると結論付けられた。

本研究では、まず系統 Evening Blue と系統 Violet の精密全ゲノムシーケンスを行った。この 2 系統は遺伝的に遠いため遺伝子構造の違いが多数存在し、これまでゲノム構造の比較が困難であったが、今回系統 Evening Blue の精密全ゲノムシーケンスを行うことにより、2 系統での遺伝子構造の直接的な比較が可能となることが予想され、詳細な原因遺伝子の解明が期待される。

さらに、より候補領域を絞りこむことを目的として QTL-seq 法を試みた。QTL-seq 法とは、品種間の形質の違いを決定する QTL の同定に特化した技術である。先行研究で行った GWAS 解析では DNA を 2 種の制限酵素で切断し、切断部位のシーケンスにより SNP を検出する ddRAD-seq が用いられたが、この手法では制限酵素サイトの分布に偏りが見られた場合に遺伝子型の欠測率が高くなるのが危惧される。これに対し、今回行う QTL-seq は次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解読するという点において秀でているためさらに正確な候補領域が決定されることが期待される。

また、F2 世代の自殖後代である RILs (Recombinant Inbred Lines) として F3 世代、および F7 世代を作出および育成し、それぞれの表現型と遺伝子型の評価を試みた。

[材料と方法]

1. 全ゲノムシーケンス

雑種後代の作出に用いた親系統である系統 Evening Blue および系統 Violet の葉から抽出した DNA を用いて精密全ゲノムシーケンス (*de novo* シーケンス)を行った。

2. QTL-seq

系統 Evening Blue と系統 Violet の交配で得られた F1 世代の自殖後代である F2 世代 180 系統のうち、開花時刻が最も早い 20 系統および最も遅い 20 系統について、ゲノム DNA を等量ずつプールし、このプール DNA を次世代シーケンスに供した。

3. RILs (Recombinant Inbred Lines) の作出および評価

・F3 世代について

系統 Evening Blue と系統 Violet を交配して得られた F1 世代の自殖後代である F2 世代のうち、F3 世代で分離が見られると期待される 3 系統をそれぞれ 8-9 個体播種し、開花時刻の測定を行うことにより、表現型の評価を行った。

・F7 世代について

先行研究で QTL 解析に用いた F2 世代について各系統別にそれぞれ自殖させて得られた F7 世代では、組換えがほとんど終了し、系統ごとにどちらかの親系統の遺伝子型のホモ接合体として固定されていると考えられるため、各系統のゲノム領域の差異と形質を直接関連付けることが可能となる。遺伝的に遠縁である 2 系統の雑種後代は不稔性が高く、世代を経るごとに複数の系統が脱落したが、最終的に得られた F7 世代計 83 系統をそれぞれ 3 個体ずつ播種し、開花時刻の測定を行うことにより、表現型の評価を行った。

[結果・考察]

詳細は発表会にて報告する。

[展望]

今回行っている QTL-seq の結果明らかになるであろう正確な候補遺伝子領域と全ゲノムシーケンスによって可能になるゲノム構造の比較、また、RILs を用いた解析を組み合わせることにより、最終的に開花時刻を決定する原因遺伝子を同定し、機能解析を行うとともに、アサガオの開花時刻決定機構の解明を試みる。

[謝辞]

本研究に際し、系統 Evening Blue を提供して頂いた米田芳秋先生 (静岡大学名誉教授) と中村信雄先生 (函館白百合学園中学高等学校)、各シーケンス解析を行って頂いた白澤健太先生 (かずさ DNA 研究所)、情報提供を頂いた星野敦先生 (基生研・NBRP) および F3 以降の雑種後代を作出して頂いた仁田坂英二先生 (九州大学・NBRP) に厚く御礼申し上げます。