

委託プロジェクト研究
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」
平成29年度 最終年度報告書

14526622

実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発(DHR)

研究実施期間	平成26年度～平成29年度（4年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門
研究開発責任者	八木 雅史
共同研究機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（果樹茶業研究部門、西日本農業研究センター）
	公益財団法人かずさDNA研究所
	栃木県農業試験場
	千葉県農林総合研究センター
	福岡県農林業総合試験場
	地方独立行政法人青森県産業技術センター
	公立大学法人横浜市立大学
	鹿児島県農業開発総合センター
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-6814 FAX : 029-838-6841 E-mail : myagi@affrc.go.jp

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	26	27	28	29	30	機関	研究室
1. イチゴ果実表面の着色に関する選抜DNAマーカーの開発							
(1) 発現遺伝子解析とアントシアニン含有量の測定	←			→		かずさ DNA 研究所	植物ゲノム・遺伝学研究室・ゲノム情報解析グループ
(2) 栃木県の母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価	←			→		栃木県農業試験場	生物工学研究室 イチゴ研究所
(3) 千葉県の母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価	←			→		千葉県農林総合研究センター	生物工学研究室 野菜研究室
(4) 福岡県の母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価	←			→		福岡県農林業総合試験場	バイテクノロジーチーム イチゴチーム
(5) 選抜マーカーの絞り込みと改良				←	→	かずさ DNA 研究所	植物ゲノム・遺伝学研究室
2. リンゴの果肉褐変性に関する選抜DNAマーカーの開発							
(1) 「あおり27(千雪)」F ₁ 集団における連鎖地図の作成とQTL解析	←			→		青森県産業技術センター	りんご研究所、弘前地域研究所
						農研機構果樹茶業研究部門	品種育成研究領域・ゲノムユニット
(2) PPO遺伝子の解析	←			→		青森県産業技術センター	りんご研究所、弘前地域研究所
						農研機構果樹茶業研究部門	品種育成研究領域・ゲノムユニット
(3) ゲノムワイド関連解析(GWAS)のための褐変性評価			←	→		青森県産業技術センター	品種育成研究領域・ゲノムユニット りんご研究所、弘前地域研究所

<p>(4) 果肉褐変性に関する選抜DNAマーカーの検証</p>					<p>農研機構果樹茶業研究部門</p>	<p>品種育成研究領域 ・ゲノムユニット</p>
<p>3. モモの硬さ（日持ち性）に関する選抜DNAマーカーの開発</p>					<p>青森県産業技術センター</p>	<p>りんご研究所、弘前地域研究所</p>
<p>(1) モモの硬さに関わる原因遺伝子の単離と発現制御因子の同定</p>	←→				<p>農研機構果樹研 農研機構近中四センター</p>	<p>栽培・流通利用研究領域 傾斜地園芸研究領域</p>
<p>(2) 原因遺伝子の機能解明</p>					<p>横浜市立大学</p>	<p>木原生物学研究所</p>
<p>1) ウイルスベクター実験手法の確立</p>	←→				<p>農研機構果樹研 農研機構近中四センター</p>	<p>栽培・流通利用研究領域 傾斜地園芸研究領域</p>
<p>2) YUCCA遺伝子の機能解明とDNAマーカー化</p>		←→			<p>横浜市立大学</p>	<p>木原生物学研究所</p>
<p>(3) 交雑実生によるDNAマーカーの有効性の検証</p>					<p>農研機構果樹研</p>	<p>品種育成・病虫害研究領域</p>
<p>1) 交配および実生の育成</p>	←→					
<p>2) DNAマーカーの有効性の確認</p>						
<p>4. カーネーションの日持ち性に関する選抜DNAマーカーの開発</p>					<p>農研機構野菜花き研究部門</p>	<p>花き遺伝育種研究領域・ゲノム遺伝育種ユニット</p>
<p>(1) 日持ち性関連遺伝子の抽出</p>	←→					
<p>(2) 機能解析およびDNAマーカー化</p>			←→			
<p>5. キクの開花早生性に関するDNAマーカーの開発</p>					<p>農研機構野菜花き研究部門</p>	<p>花き生産流通研究領域栽培生理ユニット、花き遺伝育種研究領域・ゲノム遺伝育種ユニット</p>
<p>(1) キクの開花早生性に関するDNAマーカーの開発</p>	←→					
<p>(2) DNAマーカー開発のためのゲノム解析</p>	←→				<p>かずさDNA研究所</p>	<p>技術開発研究部ゲノム情報解析グループ</p>

<p>(3) 栽培ギクの開花形質の遺伝様式解明</p> <p>6. カフェインレスヘテロ個体を選抜するためのマーカー開発</p> <p>(1) カフェイン合成酵素遺伝子とその相同遺伝子を検出できるマーカーを作成</p> <p>(2) 原因遺伝子の特定</p> <p>(3) マーカーの有用性の確認</p> <p>(4) 遺伝資源のスクリーニング</p>	←	→	→	→		<p>鹿児島県農業開発総合センター</p> <p>農研機構野茶研</p>	<p>花き部</p> <p>茶業研究領域</p>
--	---	---	---	---	--	--------------------------------------	--------------------------

I-2. 実施体制

課題 番号	研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	
		機関	研究室		
DHR1	研究開発責任者	農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	◎ 八木 雅史
	イチゴ果実表面の着色に関する選抜DNAマーカーの開発	(公財) かずさDNA研究所	先端研究部	植物ゲノム・遺伝学研究室	○ 磯部 祥子 (H26~H29)
		(公財) かずさDNA研究所	機器分析グループ		鈴木 秀幸 (H26~H29)
		(公財) かずさDNA研究所	技術開発研究部	ゲノム情報解析グループ	平川 英樹 (H26~H29)
		(公財) かずさDNA研究所	先端研究部	植物ゲノム・遺伝学研究室	永野 聡一郎 (H26~H29)
		(公財) かずさDNA研究所	先端研究部	植物ゲノム・遺伝学研究室	白澤 健太 (H26)
		千葉県農林総合研究センター	生物工学研究室		渡邊 学 (H26~H28)
		千葉県農林総合研究センター	生物工学研究室		津金 胤昭 (H29)
		千葉県農林総合研究センター	生物工学研究室		深見 正信 (H26~H29)
		千葉県農林総合研究センター	野菜研究室		深尾 聡 (H26~H29)
		千葉県農林総合研究センター	野菜研究室		前田 ふみ (H26~H29)
		栃木県農業試験場	研究開発部	生物工学研究室	生井 潔 (H26~H29)
栃木県農業試験場	研究開発部	生物工学研究室	岡田 香織 (H26~H29)		

DHR2	リンゴの果肉褐変性に関する選抜DNAマーカーの開発	栃木県農業試験場	研究開発部	生物工学研究室	田崎 公久 (H26～H29)
		栃木県農業試験場	研究開発部	生物工学研究室	若槻 睦子 (H26～H28)
		栃木県農業試験場	いちご研究所		飯村 一成 (H26～H29)
		栃木県農業試験場	いちご研究所	開発研究室	鶴見 理沙 (H27～H29)
		栃木県農業試験場	いちご研究所	開発研究室	大橋 隆 (H26～H29)
		栃木県農業試験場	いちご研究所	開発研究室	小島 夏実 (H29)
		栃木県農業試験場	いちご研究所	開発研究室	畠山 昭嗣 (H26)
		栃木県農業試験場	いちご研究所	開発研究室	中西 達郎 (H26)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	和田 卓也 (H26～H29)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	平田 千春 (H26～H29)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	高田 衣子 (H26～H28)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	下村 克己 (H26～H29)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	森 美幸 (H26～H29)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	坪根 正雄 (H26～H29)
		福岡県農林業総合試験場	生産環境部	バイオテクノロジーチーム	永松 志朗 (H29)
		福岡県農林業総合試験場	野菜部		奥 幸一郎 (H26～H27)
		福岡県農林業総合試験場	野菜部		末吉 孝行 (H27)
	(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		○ (H28～H29) 田沢 純子 (H26～H29)	

		(地独) 青森県産業技術センター弘前地域研究所	プロテオグリカン室		○ (H26~H27) 赤田 朝子 (H26~H29)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		後藤 聡 (H26~H28)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		初山 慶道 (H27~H29)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		工藤 悠 (H27~H29)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		工藤 剛 (H26~H29)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		坂本 康純 (H29)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		葛西 智 (H26)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		久保 隆 (H26)
		(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所	品種開発部		川口 佳則 (H26)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	山本 俊哉 (H26~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	國久 美由紀 (H26~H29)
DHR3	モモの硬さ(日持ち性)に関する選抜DNAマーカーの開発	農研機構 果樹研究所	栽培・流通利用研究領域		○ 立木 美保 (H26~H27)

		農研機構 果樹研究所	栽培・流通利用研究領域		森口 卓哉 (H26～H27)
		農研機構 果樹研究所	栽培・流通利用研究領域		八重垣 英明 (H26～H27)
		農研機構 果樹研究所	栽培・流通利用研究領域		澤村 豊 (H26～H27)
		農研機構 果樹研究所	栽培・流通利用研究領域		末貞 佑子 (H26～H27)
		農研機構 近畿中国四国農業研究センター	傾斜地園芸研究領域		添野 和雄 (H26～H27)
		横浜市立大学	木原生物学研究所		嶋田 幸久 (H26～H27)
DHR4	カーネーションの日持ち性に関する選抜DNAマーカーの開発	農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	○ 八木 雅史 (H26～H29)
DHR5	キクの開花早生性に関する選抜DNAマーカーの開発	農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	棚瀬 幸司 (H26～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	山口 博康 (H26～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	○ 住友 克彦 (H26～H29)
		(公財) かずさDNA研究所	技術開発研究部	ゲノム情報解析グループ	平川 英樹 (H26～H29)
		鹿児島県農業開発総合センター	花き部		白山 竜次 (H26～H29)
		鹿児島県農業開発総合センター	花き部		渡辺 剛史 (H26～H28)
鹿児島県農業開発総合センター	花き部		木戸 君枝 (H26～H29)		
鹿児島県農業開発総合センター	花き部		南 公宗 (H29)		

DHR6	カフェインレス茶に関する選抜DNAマーカーの開発	農研機構 野菜花き研究部門	花き遺伝育種研究領域	ゲノム遺伝育種ユニット	八木 雅史 (H26~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	花き生産流通研究領域	栽培生理ユニット	久松 完 (H26~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	花き生産流通研究領域	栽培生理ユニット	中野 善公 (H26~H29)
		農研機構 花き研究所	花き研究領域		小田 篤 (H26~H27)
		農研機構 野菜茶業研究所	茶業研究領域		○ 荻野 暁子 (H26)
		農研機構 野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域		福岡 浩之 (H26)
		農研機構 野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域		松元 哲 (H26)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	14526622	研究期間	平成26～29年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名	実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門 八木雅史		

I-1. 研究目的

わが国の農業において、果樹、野菜、花き、茶は農家経営の安定と向上および消費者の生活向上に欠かせない基幹作物である。農業所得の増大や農地の有効利用等を図る観点からも育成・強化を図る必要がある。いずれの園芸作物においても、輸入産物の急増と価格の低迷、燃油価格や肥料等の資材価格の高騰による生産コストの増大、経営体数の減少と高齢化による不安定な経営状況が続いている。そこで、これら諸問題解決に貢献する画期的な形質をもつ先導的な新品種の開発が強く求められている。さらに近年では、生活スタイルの変化を反映した実需者ニーズの変化に対応できる形質の付与が求められている。

このため、本研究では

- DHR1 イチゴ果実表面の着色に関する選抜DNAマーカーの開発
- DHR2 リンゴの果肉褐変性に関する選抜DNAマーカーの開発
- DHR3 モモの硬さ（日持ち性）に関する選抜DNAマーカーの開発
- DHR4 カーネーションの日持ち性に関する選抜DNAマーカーの開発
- DHR5 キクの開花早生性に関する選抜DNAマーカーの開発
- DHR6 カフェインレス茶に関する選抜DNAマーカーの開発

により、各品目において対象とする有用形質の原因遺伝子もしくは遺伝子領域を同定し、研究終了時には育種関係者が育種現場で活用できるDNAマーカーを開発することを目標とする。

その結果、実需者ニーズの高い新たな特徴をもった品種のバラエティの拡大が進み、消費の多様化に応じた国内生産・流通の増加、海外輸出の増加、輸入品からの国内シェア奪還に貢献が期待される。

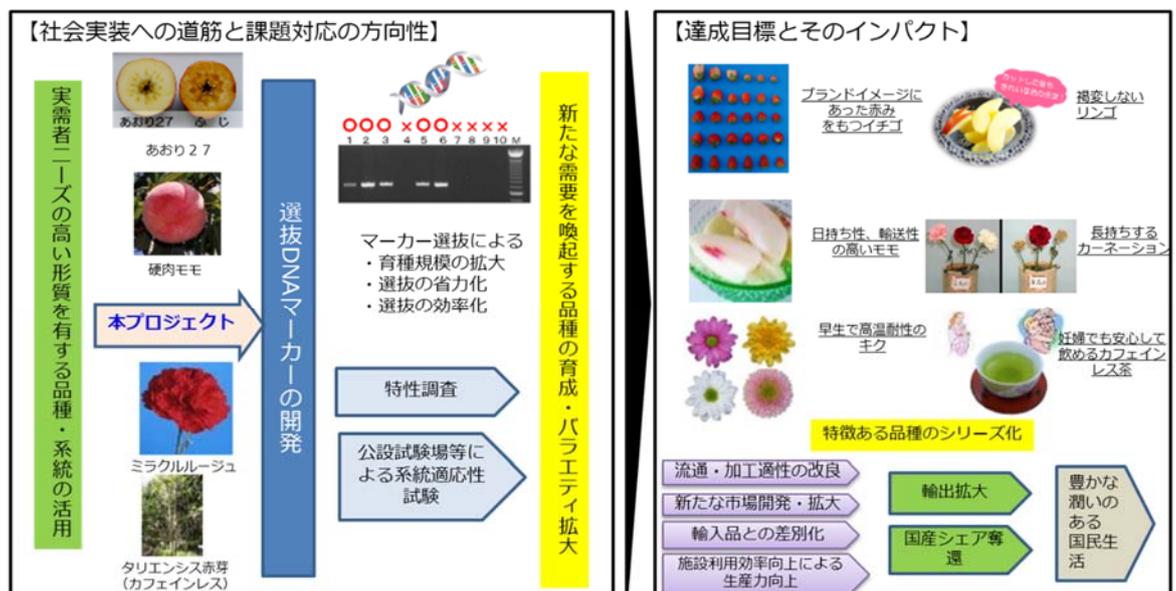
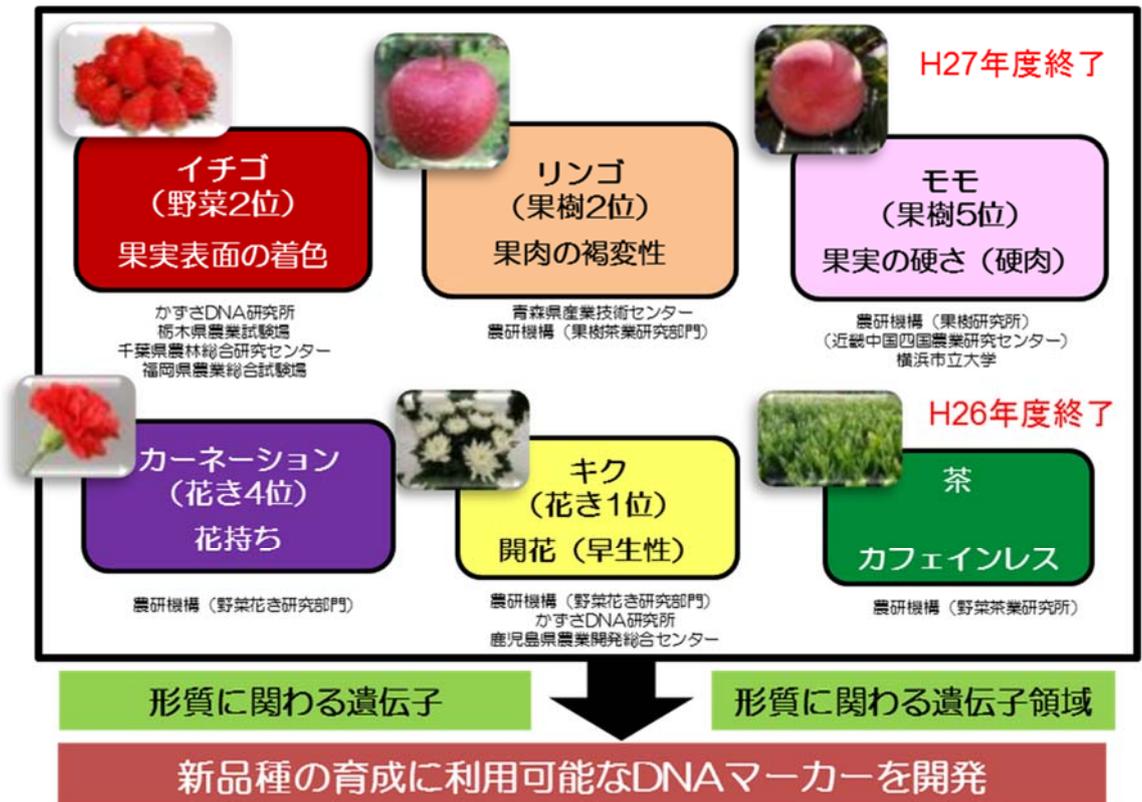
I-2. 研究結果

イチゴ、リンゴ、モモ、カーネーション、キク、チャを材料に、果実表面の着色、果肉褐変性、果肉の硬さ、花の日持ち性、開花早生性、カフェインレスの各形質のDNAマーカーを開発するために、集団の形質評価を進めると同時に、ゲノムワイドアソシエーション (GWAS) 解析、RNA-seq、遺伝子発現解析、遺伝子変異解析、連鎖地図作成およびQTL解析などの各種ゲノム解析手法を用いて解析を進めた結果、各形質に関係する候補遺伝子領域の絞りこみを行い、ゲノム配列の多型に基づいてDNAマーカーを作成した。また、DNAマーカーの実際の育種での有効性を検証するための解析集団の作成ならびに形質の評価を実施した。

本プロジェクトの実施により、これまでゲノム情報に乏しかった園芸作物においてもゲノム配列情報の収集ならびにそれらを活用した効率的なDNAマーカー開発を実施することが可能になった。また、これまで解析が難しいとされてきた倍数性を有する品目であるイチゴやキクにおいても、ゲノム情報を活用した効率的なDNAマーカー作成手法を構築することができた意義は大きい。

当初の予定より1年前倒しで終了となったが、園芸作物において、加工業務特性や機能性成分等、実需者のニーズに即したDNAマーカーの開発という最終目標は概ね達成できたと考えており、イチゴでは、栃木県、千葉県、福岡県が有する各分離集団を用いて、多型を有するSSRマーカーを600個以上選抜し、GWAS解析から果実表面の着色程度と有意な相関を示すSSRマーカーを明らかにした。リンゴでは、果肉褐変性のQTL解析から候補遺伝子を挟み込む位置にSSRマーカーを設計するとともに、GWAS解析からポリフェノール酸化酵素 (PPO) 遺伝子との関連が示唆される領域を見出した。モモでは、硬肉性を支配するオーキシン生合成経路上のYUCCA遺伝子を明らかにした。カーネーションでは、マイクロアレイ解析ならびに日持ち性のQTL解析から遺伝子の絞り込みを進めた結果、日持ち性と高い相関を示すAP2/ERF型の転写因子を見出した。キクでは二倍体のキクタニギクのゲノム情報を整備するとともに、キクタニギクのF₂集団を用いたQTL解析ならびに栽培ギク集団を用いたGWAS解析から開花早生性および高温開花性に関連したSNPマーカーを見出した。チャではカフェイン合成酵素遺伝子の変異のDNAマーカー化が完了し、実際の育種での利用を開始している。

いずれの課題にも実際に育種を行っている機関が参画しており、ここで開発されたマーカーおよび派生する研究成果は、実需者である育種家へスムーズに受け渡しが行われ、新品種育成に利用される。開発されたDNAマーカーに係る知的財産権については適切に許諾し、知見については適切に公知化することで幅広い普及を図っていく。



I-3. 今後の課題

これまでに、対象形質に関わる遺伝子あるいは遺伝子領域をもとにしたDNAマーカーを開発したが、早期終了のため、実際の育種における有効性の検証は残された課題である。検証用の集団作成ならびに形質の評価を実施中であることから、検証と並行して実際育種での利用を早急に開始する。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 14526622

研究期間: 平成 26～29 年度

中課題名: 実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発 (DHR)

小課題番号: DHR1

研究期間: 平成 26～29 年度

小課題名: イチゴ果実表面の着色に関する選抜 DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: (公財)かずさ DNA 研究所・先端研究部・植物ゲノム・遺伝学研究室・磯部祥子

1) 研究目的

我が国のイチゴ生産は、生産量が年間 14 万 9 千 t、産出額が年間 1533 億円 (2012 年) と主要果菜類の一つである。近年、多くのイチゴ産地で開発品種によるブランド戦略を推進し、品種開発競争が激化している。イチゴ品種開発においては収穫量、収穫時期といった特性、甘さや酸味といった食味とともに色、形といった外観形質も重要な選抜基準となっている。特に果実表面の色についてはイチゴ=赤と象徴されるように消費者の目をひく最重要形質のひとつである。

イチゴ果実表面色は主にアントシアニン (ペラルゴニジン、ルテオリニジン) に由来することが知られ、白から濃赤色まで連続的に変異する。果実表面色は主にアントシアニン合成に関与する複数の遺伝子によって支配されていると考えられているが、八倍体であるイチゴは遺伝様式が複雑であることから、複数の遺伝子で支配されている形質を表現型のみで選抜することは困難である。そこで本研究ではイチゴの果実表面の色を選抜する、信頼性と応用性の高い DNA マーカーの開発を実施する。本研究の成果により鮮赤色などブランドイメージに適した色の品種育成が進むことが期待できる。

2) 研究成果

(1) ゲノム・発現遺伝子解析とアントシアニン含有量の測定 (かずさ DNA 研)

2014 年冬～2017 春にかけての 3 年間に栃木・千葉・福岡県で取得した果皮および果肉の組織サンプルからアントシアニン成分 (Cyanidin 3-glucoside、Pelargonidin 3-glucoside、Cyanidin 3-malonylglucoside、Pelargonidin 3-malonylglucoside) の定量を行った。また、同時期にサンプリングした果実表面より抽出された RNA を用いて RNA-Seq を実施した。本報告書作成時点 (2018 年 1 月現在) において全ての配列データ取得が完了し、データを解析中である。一方、データ解析が終了した 2 期分のデータを用いてトランスクリプト配列の類似性を比較したところ、年次間および集団間での差異があった (図 1)。

さらに総アントシアニン量で各年・各集団内のサンプルをそれぞれ 3 グループに分割し、発現変動を比較したところ、アントシアニン合成に関わる上流から下流までのほぼ全ての遺伝子で、グループ間で発現変動があり (図 2) アントシアニン合成系の遺伝子発現量はアントシアニン合成量と相関があった (図 3)。これらの遺伝子に対して eQTL 解析を実施し、アントシアニン合成系遺伝子発現量に関与するゲノム領域を検出した (図 4)。

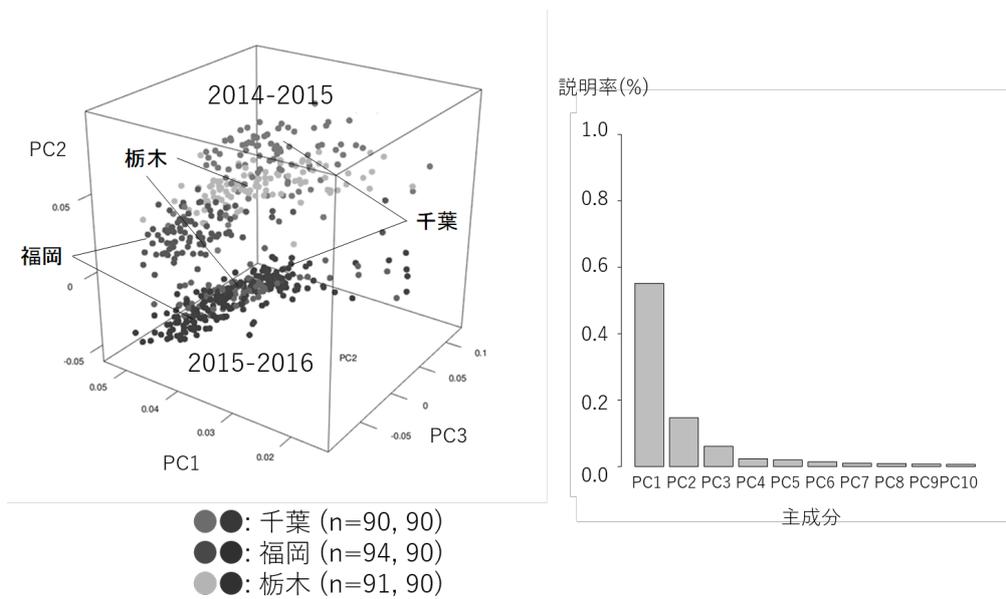


図1 RNA-Seq解析により得られたトランスクリプト配列の類似性
 A: 第3主成分までの主成分分析の結果 B: 各主成分の説明率

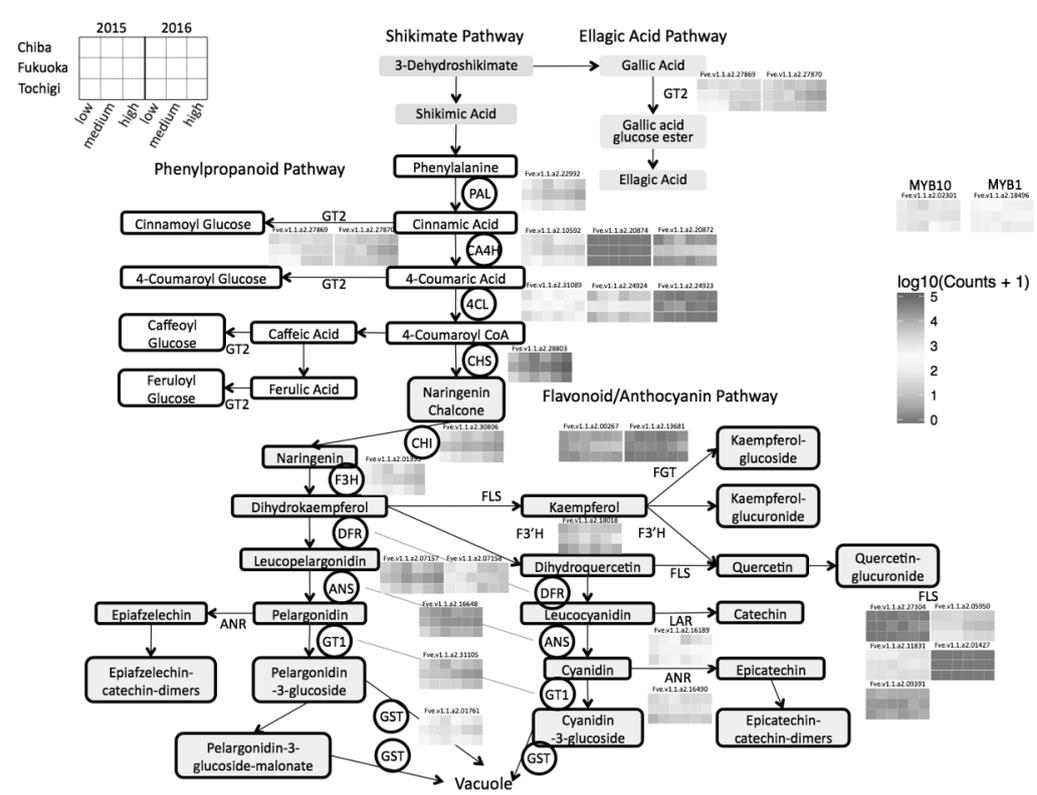


図2 アントシアニン合成パスウェイ。アントシアニン量で分割されたグループ間で遺伝子発現量に差のあった遺伝子を丸印で囲んでいる。

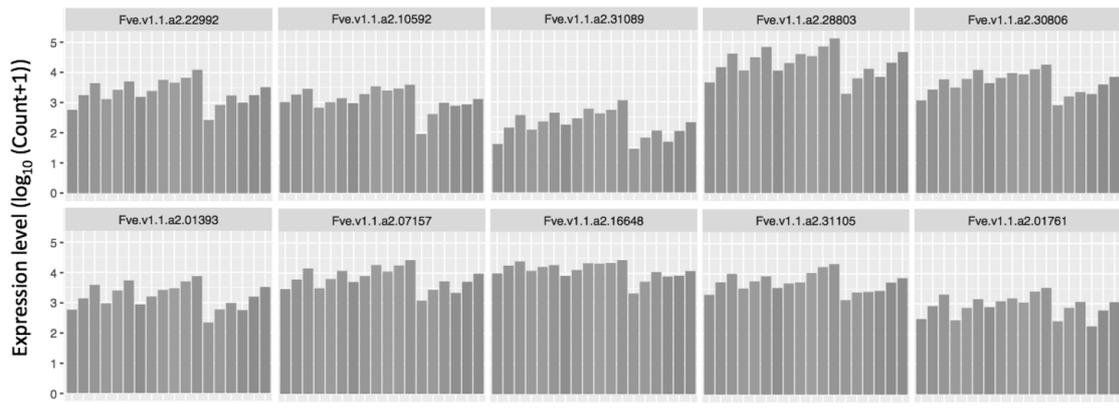


図3. アントシアニン合成系の遺伝子発現量。
各遺伝子発現量の棒グラフについて、左からアントシアニン濃度がlow, medium, highの順に3グループずつ、千葉県1年目（2014-2015年）、千葉県2年目（2015-2016年）、福岡県1年目、福岡県2年目、栃木県1年目、栃木県2年目の順に並んでいる。
各年・各集団内でアントシアニン濃度によるグループ分けに応じた発現量を示した。

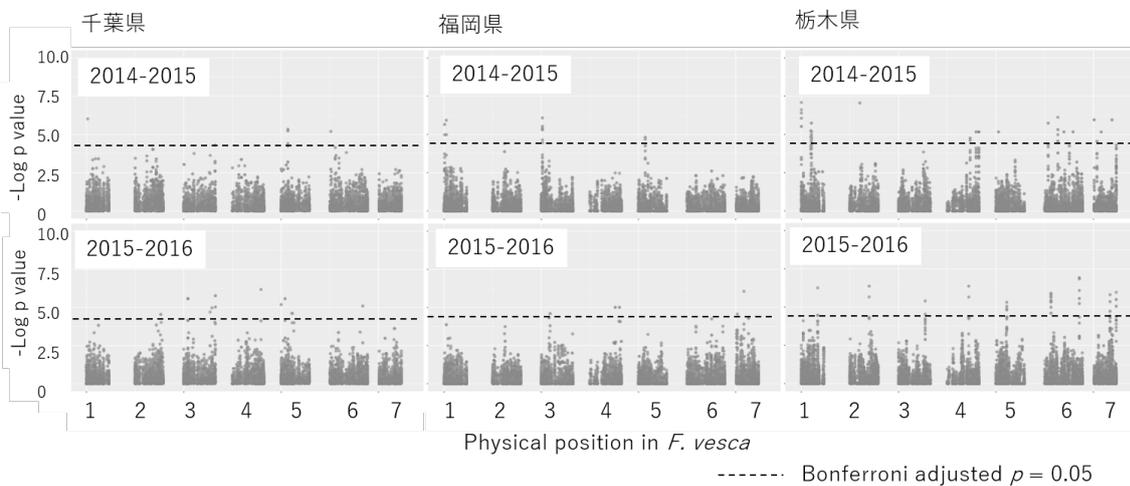


図4 アントシアニン合成系の遺伝子発現量と相関のあるQTL領域 (eQTL)

(2) 栃木県の母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価

3カ年の $L^* \times b^*/a^*$ 値および2カ年の果皮アントシアニン分析値（ペラルゴニジングルコシド濃度）を用いて GWAS 解析を行い、マッハットプロット図にて比較検討した。その結果、 $L^* \times b^*/a^*$ 値およびペラルゴニジングルコシド濃度ともに年次間差が認められたが、第2、第4、第6染色体において $-\log(P)$ 値が高いアリルが検出される傾向にあった（図5）。また、各項目において $-\log(P)$ 値が2カ年で2以上を示すアリルを検索した結果、23アリルが選抜され（表1）、第2染色体で6アリル、第6染色体で4アリルと多い傾向にあった（表1）。

アリルの信頼性を確かめるため、3ヶ年調査を行った集団（IC₂ 集団）よりさらに世代を進めた IC₃ 集団における $L^* \times b^*/a^*$ 値を用いて GWAS 解析を行った結果、IC₂ 集団および IC₃ 集団ともに $-\log(P)$ 値が2以上を示す FVES3528 202（第2染色体）および FVES0447 246（第6染色体）を選抜した（図6および図7）。なお、FVES3528 202については福岡県で選抜したアリルであった。

交配集団における実用性評価は、3集団（12-9-3 × 14-13-1、11-82-4 × 12-9-3、12-4-7 × 12-9-3、

各約 100 個体) を供試し 8 月末に圃場に定植した。12 月中旬から果皮色の色差値の測定を開始し、2018 年 1 月現在で 3 割程度の調査が終了している。達観ではあるが、果皮色には分離が認められる。今後、各個体の遺伝子型を調査し、マーカーの有効性を検証する。

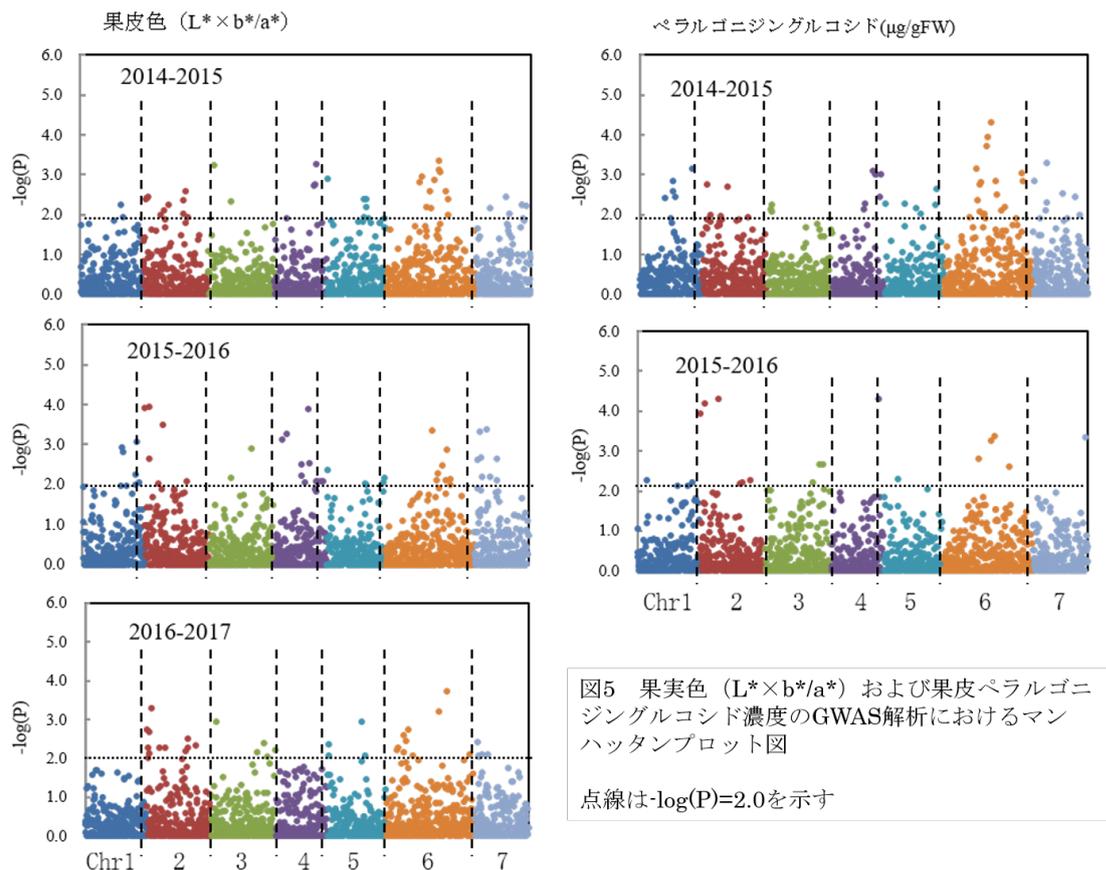


表 1 GWAS解析により選抜された果実表面色に関与するアレル候補

アレル	chr	Mb	$L^* \times b^*/a^*$ ¹⁾			ペラルゴニジングルコシド濃度 ¹⁾			IC_3 ($L^* \times b^*/a^*$)
			2014	2015	2016	2014	2015	2015	
FVES1231_328	1	11.75	2.25	2.80	0.22	0.51	0.70	0.22	
FVES3528_202	2	0.04	0.78	3.92	2.75	1.50	3.94	4.67	
FVES1613_141	2	1.10	2.44	2.66	0.29	1.87	1.49	0.25	
FVES1613_160	2	1.10	0.91	3.96	3.30	1.64	4.20	1.04	
FVES0168b_162	2	12.19	0.65	3.48	2.28	1.25	4.31	0.26	
FVES1079_225	2	23.27	2.37	1.80	2.18	1.37	2.18	0.53	
FVES1631_230	2	23.89	2.57	2.08	2.51	1.50	2.21	0.48	
FVES0540_195	4	31.77	1.80	2.09	1.72	2.43	4.30	0.51	
FAES0114_141	5	0.38	0.63	2.37	2.07	0.93	1.63	0.12	
FVES3693_139	5	12.36	2.38	2.00	1.46	1.01	1.41	0.07	
FVES0658_176	6	23.21	2.86	3.36	1.26	4.33	3.26	0.75	
FVES1242_176	6	25.12	3.35	2.12	1.31	2.83	1.53	1.12	
FVES2533_297	6	25.34	3.08	2.28	1.24	2.50	1.52	1.09	
FVES0447_246	6	31.15	1.17	2.86	3.74	1.15	1.56	2.00	
FVES0128_195	7	3.75	0.48	2.61	2.41	0.31	1.16	0.43	
FVES0030_120	-	-	2.69	2.51	0.88	3.91	2.50	0.28	
FVES0097_263	-	-	2.69	2.51	0.83	3.58	2.31	0.53	
FAES0340_205	-	-	2.55	1.49	2.41	1.05	1.66	0.16	
FVES0045_262	-	-	2.32	2.85	0.88	0.85	0.51	1.37	
FVES2375_404	-	-	2.09	2.95	0.30	1.69	1.71	0.06	
FAES0164_177	-	-	2.07	2.30	2.31	0.89	1.20	1.28	
FAES0462_265	-	-	0.95	2.91	1.26	2.20	3.87	0.65	
FVES0819_191	-	-	0.84	2.05	0.24	3.49	2.06	0.74	

1) 数値は $-\log(P)$ を示す。

2) 網掛けは $-\log(P)$ 値が 2 以上を示す。

3) 太枠は IC_3 集団における $L^* \times b^*/a^*$ 値 GWAS 解析で $-\log(P)$ 値が 2 以上であったアレルを示す。

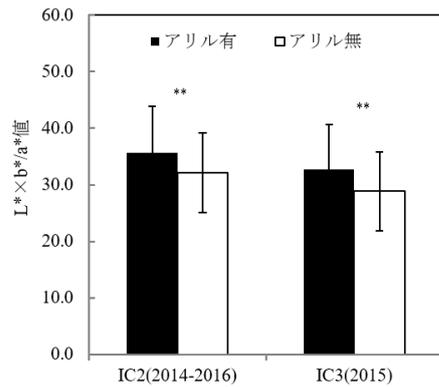


図6 FVES3528_202におけるアリル効果 (L* × b*/a*値)

平均値±標準偏差。
星印は有意差を示す (t-test, **: p<0.01)。

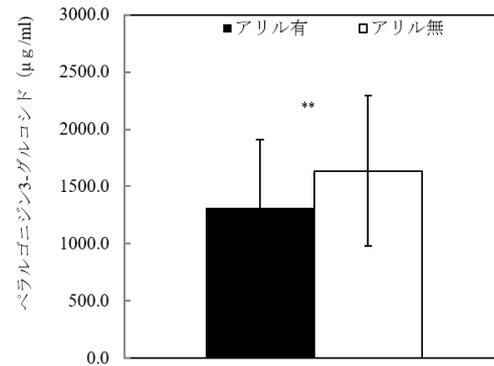


図7 FVES3528_202におけるアリル効果 (Pelargonidin 3-glucoside)

平均値±標準偏差。
星印は有意差を示す (t-test, **: p<0.01)。

(3) 千葉県之母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価

果実表面の $L^* \times b^*/a^*$ 値及び果皮に含まれるペラルゴニジングルコシド濃度を対象に GWAS 解析を行った。3年間の試験の結果、複数年で5%有意水準を超えたマーカーは確認されなかった(図8)。しかし、単独のマーカーではなく数 Mb の大きな領域としてとらえた場合、比較的高い $-\log(p)$ 値を複数年示した領域が存在することから、これらの領域に有望な遺伝子が含まれる可能性が考えられる (*F. vesca* の染色体上にあてはめた場合、Chr2,19.8Mb .Chr4,15.4 ~ 22.1Mb. Chr5,4.0 ~ 7.1Mb. Chr6,37.2Mb. Chr7,17.5 ~ 23.0Mb)。

GWAS 解析の結果、果実表面の $L^* \times b^*/a^*$ 値または果皮に含まれるペラルゴニジングルコシド濃度に関する $-\log(p)$ 値が3.0を超えたマーカーは合計42個存在した(表2)。この中には、昨年度栃木県が選抜したマーカーと同位置にある FVES2229、福岡県が選抜したマーカーと同位置にある FVES2244 が含まれていた。

複数年で $-\log(p)$ の値が3を超えた4マーカーに着目して果実表面の $L^* \times b^*/a^*$ 値を比較してみると、年次間差があるもののアリルの効果が確認できた(図9)。

実用性の評価では千葉県が育成した果実形質が良好で、かつ後代で果実色の分離が期待できる系統を交配し、その実生集団 (F_1) を実証集団とした。2組合せの交配を行い、集団A (120 個体) と集団B (215 個体) を作成した。2018 年1月現在、各個体について果皮の色彩測定を進めている。各集団の果皮色には分離が認められている。今後、各株の遺伝子型を調査し、マーカーの有効性を検証する。

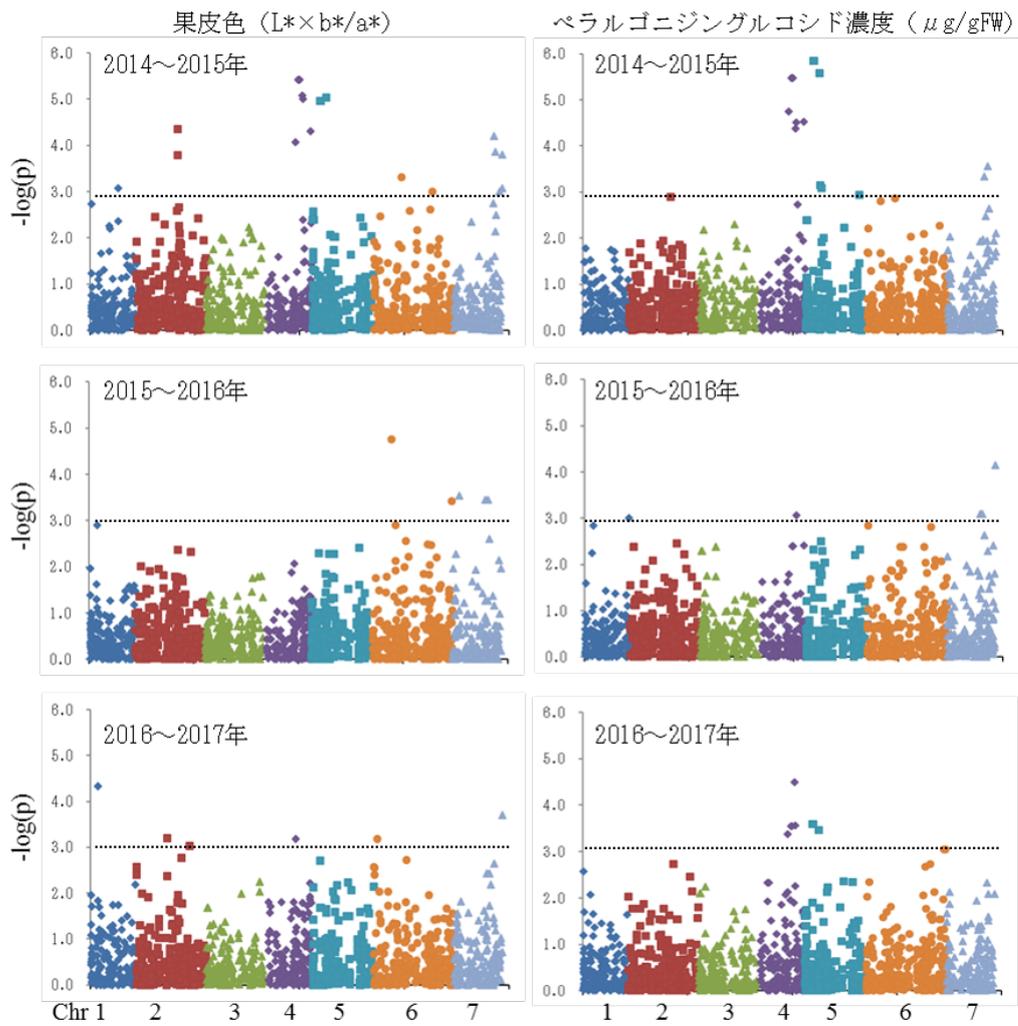


図8 果皮色及び果皮に含まれるペラルゴニジングルコシド濃度のマンハッタンプロット図
 1) 横軸は、各マーカーが位置づけられる*Fragaria vesca*の染色体番号を示す
 2) 縦軸は、 $-\log(p)$ 値、横線は、 $-\log(p)=3$ を示す

表2 GWAS解析で検出された $L^* \times b^*/a^*$ 値及びペラルゴニジングルコシド濃度に連鎖したマーカー

マーカー名	Chr	Mb	$L^* \times b^*/a^*$ ³⁾			ペラルゴニジングルコシド濃度 ³⁾			複数年で -log(p) が3を超えた マーカー
			2014	2015	2016	2014	2015	2016	
FVES2587_124	Chr 1	3.7	0.57	2.90	4.33	0.58	2.25	0.69	
FVES0326_191	Chr 1	13.4	3.07	0.54	1.75	1.75	0.43	1.43	
FVES1644_154	Chr 1	21.3	0.59	1.59	2.18	0.10	3.00	1.63	
FVES2110_232	Chr 2	14.6	0.40	0.49	3.19	0.81	0.32	1.18	
FAES0340_208	Chr 2	19.8	4.35	1.75	1.96	2.90	0.84	0.52	
FAES0340_207	Chr 2	19.8	3.79	1.58	1.43	0.17	0.76	0.81	
FVES1026_279	Chr 2	25.4	1.47	0.03	3.02	1.62	0.19	0.94	
FVES0076_253	Chr 4	15.0	4.07	0.75	1.15	0.31	1.78	3.37	
FVES0076_241	Chr 4	15.0	0.70	2.07	3.18	0.13	0.64	2.13	
FVES0076_259	Chr 4	15.0	0.75	0.54	0.32	4.75	0.42	0.36	
FVES0716_138	Chr 4	16.5	5.42	0.72	1.56	0.38	2.39	3.54	
FVES0373_109	Chr 4	17.0	5.42	0.72	1.56	5.48	2.39	3.54	○
FVES3464_359	Chr 4	18.2	5.07	1.01	1.79	0.18	1.32	4.50	
FVES3464_362	Chr 4	18.2	0.67	0.84	0.52	4.37	0.83	0.15	
FVES0123_307	Chr 4	18.6	5.00	1.28	1.54	0.44	3.07	3.56	○
FVES0123_304	Chr 4	18.6	0.10	0.02	0.06	4.51	1.01	0.64	
FVES2229_211	Chr 4	22.1	4.30	1.37	2.22	0.55	2.41	1.72	
FVES2186_254	Chr 4	22.1	0.64	0.18	0.32	4.52	0.00	0.05	
FVES3102_322	Chr 4	22.7	0.15	0.99	1.79	5.48	0.13	0.51	
FVES0478_305	Chr 5	3.7	4.95	1.02	1.68	0.84	1.98	3.59	
FAES0105_137	Chr 5	4.0	4.95	1.02	1.68	5.84	1.98	3.59	○
FAES0209_151	Chr 5	6.5	5.04	0.96	1.57	0.56	1.82	3.46	
FVES1403_218	Chr 5	7.0	1.08	1.84	0.24	3.08	2.50	0.76	
FVES0441_372	Chr 5	7.1	1.31	0.13	0.23	5.84	0.27	0.62	
FVES0441_371	Chr 5	7.1	0.05	1.10	0.58	5.58	0.32	0.27	
FVES1281_182	Chr 5	7.7	0.33	0.04	0.42	3.15	0.30	0.12	
FVES0301_313	Chr 6	1.5	1.81	1.76	3.18	0.35	1.69	2.35	
FVES2066_246	Chr 6	9.0	0.21	4.76	0.01	0.08	1.70	0.83	
FAES0521_502	Chr 6	13.5	3.31	0.01	0.13	0.09	0.01	0.06	
FVES3450_303	Chr 6	27.9	3.01	2.47	0.74	1.23	2.04	0.59	
FVES1043_245	Chr 6	37.2	0.91	0.80	0.27	0.29	0.90	3.04	
FVES0397_280	Chr 6	37.8	0.58	3.42	1.56	0.15	1.70	0.83	
FVES0397_302	Chr 6	37.8	0.91	0.80	0.27	0.40	0.90	3.04	
FVES0125_285	Chr 7	2.7	0.12	0.02	0.45	3.56	0.70	0.56	
FVES0192_170	Chr 7	3.5	1.16	3.54	1.82	0.41	1.09	0.25	
FAES0255_383	Chr 7	13.4	0.08	0.17	0.24	3.34	0.51	0.08	
FAES0097_284	Chr 7	15.9	1.44	3.45	2.43	1.01	3.10	1.12	
FVES0158_306	Chr 7	17.0	1.35	3.45	2.43	0.52	3.10	1.12	
FVES0088_209	Chr 7	19.5	4.20	0.49	1.33	0.45	0.65	0.95	
FVES1422_202	Chr 7	20.2	3.86	0.48	0.61	0.03	0.98	1.51	
FVES2244_305	Chr 7	23.2	3.80	1.97	3.71	0.17	4.15	6.77	○
FVES2244_302	Chr 7	23.2	3.08	0.18	0.71	1.55	1.05	2.09	

注1) 2014～2016年の調査結果から、-log(p)が3を超えたマーカーを示す。

2) 120系統、1414マーカーのデータを用い、GWAS解析を行った。

3) 単位は、-log(p-value)

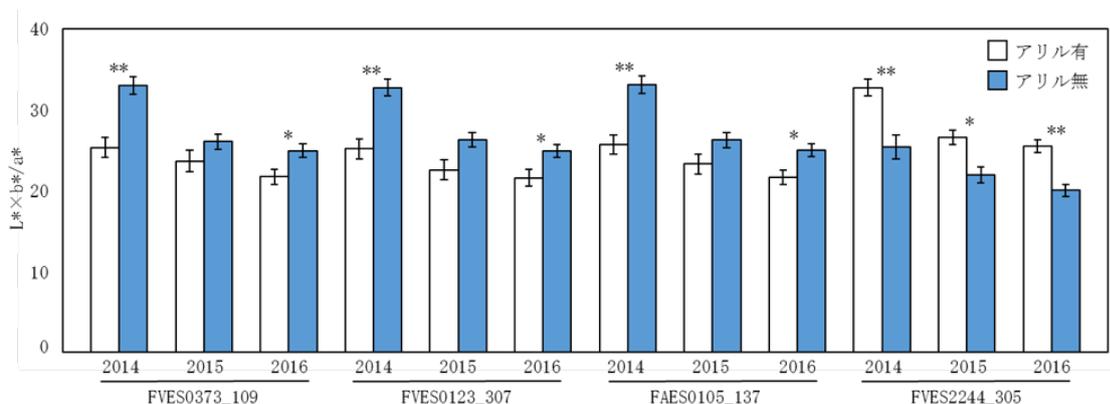


図9 複数年で $-\log(p)$ の値が3を超えたマーカーの $L^* \times b^*/a^*$ 値に対するアリル効果

1) 棒グラフは、平均値±標準誤差を示す

2) t検定の結果を棒グラフ上に示す。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$

(4) 福岡県の母系を用いた選抜マーカーの開発と実用性評価

果皮色 ($L^* \times b^*/a^*$) 及び果皮のアントシアニン含量について、GWAS 解析を行った結果、多数の有意なマーカーが認められたが、複数年で有意なマーカーは、*F. vesca* の物理地図で第1、2、7染色体(果皮色: 第2染色体、アントシアニン含量: 第1、7染色体)に相当する領域に存在した(図10)。特に、第2染色体上のマーカーは、 $-\log P$ 値の4か年平均値も有意に高く、その近傍に果皮色の濃淡に関わる主要なQTLが存在すると推定された。

果皮色QTL近傍マーカーのうちFVES0795について‘おおきみ’の配列をサブクローニングしたところ、‘福岡S6号’と比較して‘おおきみ’にのみ存在する配列が見出され、この配列が果実色を淡くするアリルと推定されたことから、特異配列を鋳型としたプライマー設計で、STSマーカーを作出した(データ略)。この結果、前年度までに作出したSTSマーカー(FVES0380)を含めると、*F. vesca* 上の第1染色体及び第2染色体に相当する領域に存在する2つのQTL近傍の選抜マーカーを作出できた。他の4つのQTL近傍マーカーについては特異配列の特定まで終了し、識別性の高いプライマー配列の選定を進めている段階である。

作出した選抜マーカーによる実用性を評価するため、実育種材料(29年度に定植した実生選抜集団:F₁世代)の交配親を用いて果皮色QTL近傍6マーカーについてフラグメント解析によるタイピングを行い、それらの遺伝子型を踏まえて実証候補集団を選定しており(表3)、今後、果皮色のバラつき程度を考慮した上、実証集団を決定し、マーカーの選抜効果を検証する予定である。

なお、実育種材料の交配親43品種・系統のフラグメント解析結果から、果皮色QTL近傍マーカーの有効性を評価したところ、第2染色体上のFVES3258_202及びFVES0380_305でピークを検出しないグループは、ピークを検出したグループより有意($p < 0.05$)に果皮色が濃かった(表4)。さらに、28年度に定植した実育種材料の実生選抜集団のうち、集団内で果皮色に差異が見られた3組合せ($n=263$)を用いて、フラグメント解析により多型が確認された2マーカー(FVES1687_184とFVES3232_239)について選抜効果を確認したところ、FVES3232_239でピーク未検出のグループは有意($p < 0.1$)に果皮色が濃かった(表5)。なお、第1染色体上のQTL近傍マーカーについては、MAGIC集団以外ではほとんどピーク未検出であり、第1染色体上のQTLは‘おおきみ’が特異的に持つQTLであるものと推察された(表4、一部データ略)。これら及び前年度におけるFVES0380のSTSマーカーの実証結果から、MAGIC集団での解析により選定した果皮色QTL近傍6マーカー

のうち、第2染色体上の FVES3258_202 と FVES0380_305 及び第7染色体上の FVES3232_239 が他集団での果皮色選抜にも有効である可能性が示唆された。

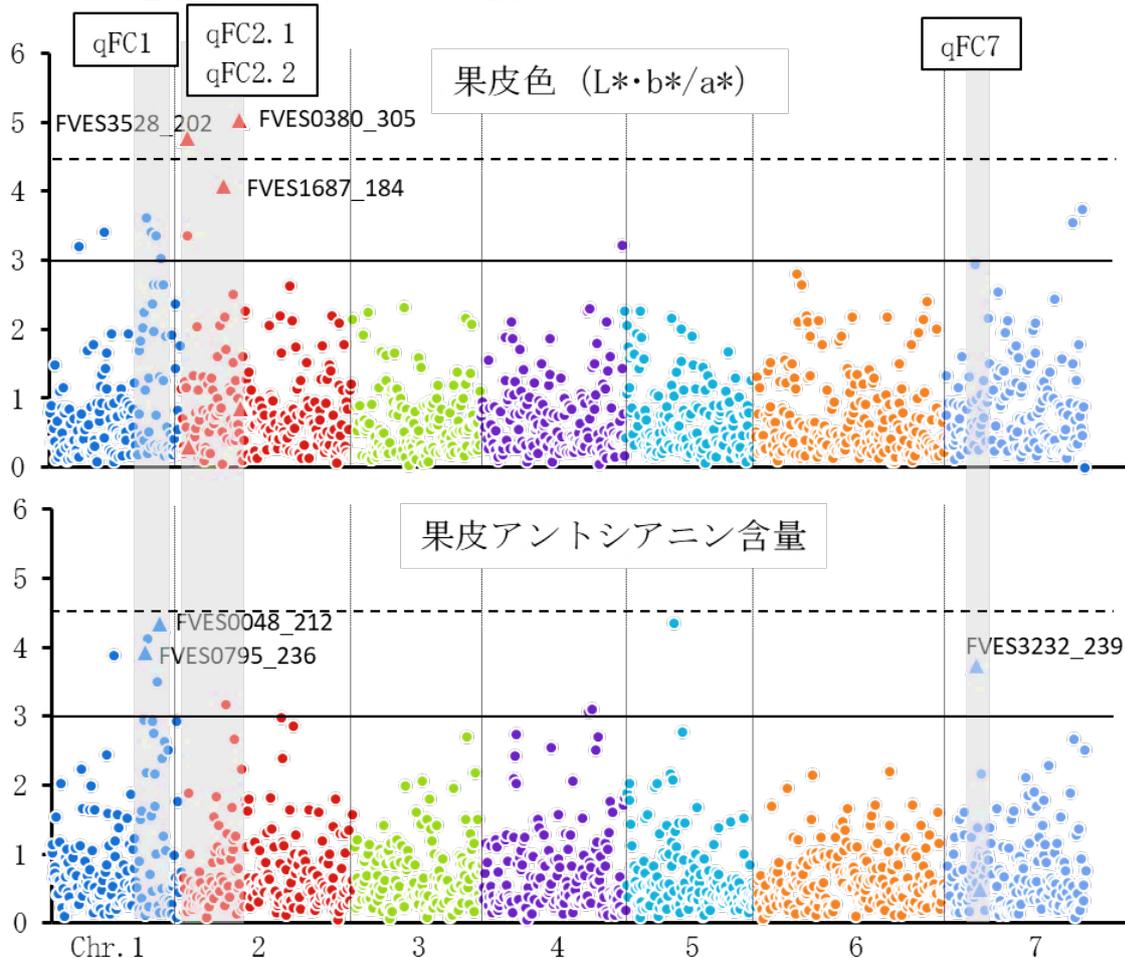


図10 果皮色、果皮アントシアニン含量のマンハッタンプロット図

- 1)横軸は染色体番号で、*Fragaria vesca*における座乗染色体番号を示す。
- 2)縦軸は $-\log P$ 値（2013–2016年の4カ年平均）。
- 3)破線は5%有意水準 ($n=1322$, $-\log P$ 値=4.42)、実線は $-\log P$ 値=3。
- 4)図中の▲印のプロットは、複数年で有意な果皮色QTL近傍マーカーを示す。

表3 実証候補集団（29年度実生選抜集団）における親系統の果皮色関連マーカーの遺伝子型

マーカー名	実証候補集団①		実証候補集団②		実証候補集団③		実証候補集団④		実証候補集団⑤	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
	14C-8-13	× 13種母1	14C-8-7	× 12C-30-7	14種母1	× 14C-8-13	15C-4-5	× 13種母1	15C-4-5	× 14種母1
FVES0048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FVES0795	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FVES3528	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
FVES0380	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
FVES1687	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FVES3232	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

1) 遺伝子型は、「-」がフラグメント解析でピークなし、「+」がピークあり（「-」が果皮色を濃くする）。

2) 各集団の個体数は、100個体。

表4 実証候補集団の親品種・系統における果皮色QTL近傍マーカーの遺伝子型別果皮色値

QTL名	qFC1				qFC2.1				qFC2.2		qFC7	
	FVES0795		FVES0048		FVES3528		FVES0380		FVES1687		FVES3232	
マーカー名	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
遺伝子型	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
品種・系統数	43	0	42	1	15	28	16	27	27	16	22	21
果皮色値	5.98	-	6.00	5.00	6.40	5.75	6.38	5.74	5.93	6.06	5.86	6.10
t-test	検定なし		検定なし		*		*		ns		ns	

- 1) 遺伝子型は、「-」がフラグメント解析でピークなし、「+」がピークあり（「-」が果皮色を濃くする）。
- 2) 果皮色値は、1（黄白）～4（橙）～8（暗赤）での連鎖評価値。
- 3) *は5%水準で有意差あり、nsは有意差なし（Welch's t-test）。

表5 実証集団（28年度実生選抜集団）における果皮色関連マーカーの遺伝子型別果皮色値

QTL名	qFC2.2		qFC7	
	FVES1687		FVES3232	
マーカー名	-	+	-	+
遺伝子型	-	+	-	+
個体数	40	223	153	110
果皮色値	4.88	4.96	5.01	4.85
t-test	ns		†	

- 1) 遺伝子型は、「-」がフラグメント解析でピークなし、「+」がピークあり（「-」が果皮色を濃くする）。
- 2) 果皮色値は、1（黄白）～4（橙）～8（暗赤）での連鎖評価値。
- 3) †は10%水準で有意差あり、nsは有意差なし（Welch's t-test）。

（5）果実表面色を選抜する候補マーカー

eQTL解析を含む全ての結果を比較したところ、染色体2番の上腕と4番の下腕に候補マーカーの座上位置が集中していた。なかでも染色体2番の上腕の端に位置する FVES3528 マーカーは栃木県と福岡県の両県で有望マーカーとして選出され有望であった（図11）。

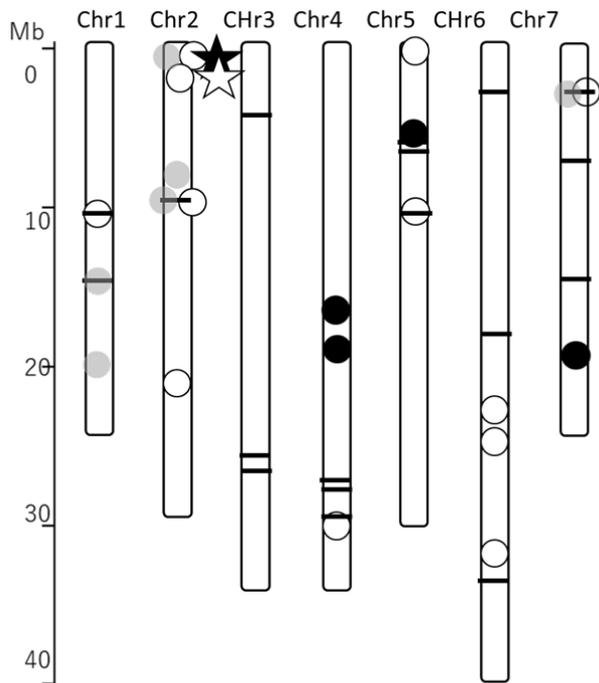


図11 複数環境下で検出されたeQTL(横棒)と各県で果実色/アントシアニン含有量と連関のあった主要なマーカー(○)の*F. vesca*上のマップ位置。★印はFVES3527、☆印はFVS0380

3) 成果活用における留意点

本研究によりイチゴの果皮表面色はアントシアニン合成に関わる遺伝子をはじめ、多数の遺伝子で支配されていることが明らかとなった。また、育種素材により選抜に効果的なマーカーは異なったことから選抜マーカーリストを用意し、交配親系統などで効果をあらかじめ確認して使うことが有効であると考えられた。選抜マーカー候補となるマーカーはゲノム上に散在していたが、なかでも染色体2番上腕は候補領域として最も有望である。

4) 今後の課題

現在実施中の実証集団の形質評価が終了したのちに選抜マーカー候補の遺伝子型を比較して、果実表面色を選抜するためのリストを決定する。得られた結果は論文などで公開する。本課題ではSSRマーカーを遺伝子型解析に用いたが、八倍体ゲノム上の位置が特定できなかったため、遺伝子型はSSRマーカーにより検出されたアレルの有り・無しで記録した。開発したマーカーの一層の汎用性と解析精度を高めるため、候補マーカーのSTS化と染色体特異性など八倍体ゲノム上の位置の確認を今後も進める必要がある。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 14526622

研究期間: 平成 26 ~ 29 年度

中課題名: 実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発 (DHR)

小課題番号: DHR2

研究期間: 平成 26 ~ 29 年度

小課題名: リンゴの果肉褐変性に関する選抜 DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: (地独) 青森県産業技術センターりんご研究所・品種開発部・田沢純子

1) 研究目的

わが国のリンゴ産業は、外国産のリンゴ輸入や生産者の高齢化など問題を抱えている。最近の生活スタイルの変化を反映し、カットフルーツにしても果肉が褐変しにくいリンゴなど実需者ニーズの変化に対応した品種が求められている。難果肉褐変性のリンゴ品種を効率良く育成するために、選抜 DNA マーカーの開発が望まれる。

難果肉褐変性のリンゴは、1) 生果で流通して、サラダやデザートなど料理や製菓用として家庭やレストラン、製菓店での利活用、2) パック入りのカットリンゴにして学校給食やファーストフード、コンビニエンスストアなどの中食・外食産業での利活用、3) すり下ろして、離乳食や、病人、高齢者用としての利活用が大いに期待されており、新たな需要の掘り起こしが可能で、今後、リンゴの消費拡大に貢献できる。凍結・融解後も褐変しないので冷凍での流通も可能(無添加リンゴシャーベット)で、また加工用としては、添加物(酸化防止剤)なしのジュースやジャムなどへの活用が期待される。青森県農林総合研究センターりんご試験場(現・地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所)で育成されたリンゴ品種「あおり 27(千雪)」は、果肉をすり下ろしても褐変しにくい特徴があり、りんご研究所で栽培・保存している 205 品種・系統のいずれよりも、褐変しにくい。その要因は PPO 活性が著しく低く、基質であるポリフェノール量が低いためであると考えられている。



図1. 果肉褐変のメカニズム

難果肉褐変性のリンゴの需要の拡大を制限する要因となっている利用期間の問題をクリアするため、収穫時期の異なる極早生～晩生の難果肉褐変性品種、貯蔵性に優れ長期販売可能な難褐変品種の育成が期待される。そのために、リンゴの果肉褐変性に関する選抜 DNA マーカーの開発が必要不可欠である。そこで、本研究課題では、1) QTL 解析によりリンゴ品種「あおり 27」の持つ難果肉褐変性に関連する遺伝子領域を明らかにし、2) ゲノムワイドアソシエーション解析 (Genome-Wide Association

Study) の手法を用いて、果肉褐変性に関わるゲノム領域及び DNA マーカーを同定し、3) その有効性を検証することにより、効率的な難果肉褐変性新品種の育成技術開発を研究目的とする。

2) 研究成果

1) 「あおり 27 (千雪)」F₁ 集団における連鎖地図の作成と QTL 解析による果肉褐変性に関連する DNA マーカー開発

(a) F₁ 集団の栽培と形質評価

難果肉褐変性のリンゴ品種「あおり 27」と褐変性品種および系統との F₁ 集団 (2 集団合計 105 個体) について、慣行に従って栽培管理を行い、適熟期を判定して収穫した果実各 3 果を形質評価に用いた。評価項目はすり下ろし後の果肉褐変性 (処理 15 分後と 24 時間後の目視による 6 段階指数評価)、果汁褐変性 (A400)、総ポリフェノール含量、PPO 活性とした。総ポリフェノール含量と PPO 活性について F₁ 集団から効率良くサンプルを調製する簡便で信頼性の高い実験系を確立した。改法では、抽出に用いる果肉量と処理時間を大幅に短縮することができ、収穫当日に多検体の処理が可能になったほか、同一果実で複数形質の調査が可能となった。これにより、QTL 解析に十分な形質データが得られた。

F₁ 集団では果肉が褐変し難い個体 ~ 非常に褐変する個体 (指数 0 ~ 5) の分離が認められた。果肉褐変性について調査した 2 か年の評価結果は概ね一致し、年次相関が認められた。また、各形質 (評価項目) 間の関係を検討したところ、両集団ともに果肉褐変 (処理 24 時間後) と総ポリフェノール含量に高い相関を示したが、PPO 活性との相関は集団により異なっていた。



図2.果肉の褐変状況の比較

(b) 連鎖地図の作成

リンゴやナシで開発された約 1,000 種類の SSR マーカーを供試し、「あおり 27」および褐変性親品種・系統でヘテロ型を示すマーカーを選抜した。選抜したマーカーを用いて F₁ 集団全体のジェノタイピングを行い、連鎖地図の作成を行った。褐変性親品種・系統につ

いては全 17 連鎖群を概ねカバーする連鎖地図が得られた。「あおり 27」は、いくつかの染色体領域でホモ化が進んでおり、マーカーが分離しなかったため地図が欠落する領域がみられた。しかし、これらの領域は後代の形質分離の原因領域にはならないことから、QTL 解析上の障害ではないと考えられる。

(c) QTL 解析

連鎖地図と形質データを用いて、果肉褐変性、果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性に関する QTL 解析を実施し、原因遺伝子領域の数・座乗連鎖群の同定を行った。両集団の褐変性親のほぼ同一領域に、複数形質について寄与率の高い QTL が検出された。本 QTL は報告されている PPO 遺伝子とは別の連鎖群上であった。果肉褐変性に関する QTL は複数年検出され、安定性が確認された。

(d) DNA マーカーの作成と原因遺伝子領域のハプロタイプ予測

F₁ 集団を用いた QTL 解析で最も有力であると推定された候補遺伝子について、F₁ 個体および品種群で発現解析を実施した。F₁ 個体の果肉褐変性と候補遺伝子の発現が明確に関連することを明らかにし、候補遺伝子領域を挟み込む 2 つの SSR マーカーを作成した。また、発現解析の結果をもとに祖先品種から「あおり 27」および難褐変 F₁ 個体に遺伝している原因遺伝子領域のハプロタイプを推定した。

難褐変性の「あおり 27」、褐変性の「ふじ」、「ゴールドンデリシャス」、「こうたろう」の 4 品種について、果実生育期間における遺伝子発現の網羅的解析を実施したところ、「あおり 27」では上記候補遺伝子の発現が果実生育期間を通して顕著に低かった。

2) ゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) による果肉褐変性に関連する DNA マーカー開発

(a) 品種・系統の栽培と果肉褐変性評価

2015 年産 (64 品種・系統) の適熟果各 3 果を用い、果肉褐変性 (処理 15 分後と 24 時間後の目視による 6 段階指数評価)、総ポリフェノール含量、PPO 活性を評価した。解析の精度を上げ、年次間差異を検討するために、2016 年産果実については品種数を追加して 94 品種・系統とし、果汁褐変性も形質評価項目に加え、解析に十分な形質データを得た。年次間相関を検討したところ、果肉褐変と PPO 活性は年次間相関がみられたが、総ポリフェノール含量の年次間相関は低かった。

(b) GWAS、DNA マーカーの同定

2 か年の果実の褐変特性評価データおよび約 12,000 SNP マーカー等による品種・系統群のタイピング結果を用いて rrBLUP 法でゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) を行い、各形質の QTL を検出した。果肉褐変性および PPO 活性について検出された QTL の座乗位置は、PPO 遺伝子クラスターの近傍で、この領域の果肉褐変性への関与が示唆された。また、果汁褐変および総ポリフェノール含量の QTL は、1) - (c) の F₁ 集団を用いた解析で検出された果肉褐変性の QTL とほぼ同位置に検出され、作成した選抜マーカーの適用性が確認された。

以上の結果を基に、PPO 遺伝子近傍および 1) - (c) で同定した QTL の 2 か所の領域について選抜 DNA マーカーを同定し、目標を達成した。これらを組み合わせて利用することで難褐変性個体の選抜が期待できる。

(c) PPO 遺伝子の解析

GWAS で検出された PPO 近傍 QTL と褐変の関係性の精緻な解明のため、PPO パラログの分類とマッピングを試みた。データベース (Genbank および GDR) のキーワードお

よび類似配列検索で 26 種の PPO 遺伝子様配列がヒットした。2017 年に公開された高精度のリンゴリファレンスマップにマッピングしたところ、これら 26 種の PPO 遺伝子様配列は、染色体上の 2 か所にクラスターを形成する 8 群 12 種類に分類された。「あおり 27」等 4 品種からグループ (8 群) 別に cDNA 断片をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、グループの多くが複数遺伝子由来であることが推察された。一方、果実生育期間における「あおり 27」、「ふじ」、「ゴールドデリシャス」、「こうたろう」の遺伝子発現の網羅的解析を実施する中で、果実肥大期から収穫期にかけての PPO 群の RNA 蓄積量は、「あおり 27」が同 4 品種の中で最も低いことが明らかとなった。

3) 果肉褐変性に関する選抜 DNA マーカーの検証

検証集団約 300 個体から DNA 抽出用のサンプルを前倒して採取した。

3) 成果活用における留意点

難褐変品種「あおり 27」の F₁ 集団を用いた QTL 解析および GWAS によって、褐変性の判別に実用性の高いマーカーが得られた。2018 年実施予定の検証用集団を用いたマーカー検証のために前倒してサンプルを確保済みであり、今後実用性を検証する。

4) 今後の課題

対象形質に対する各マーカーの寄与率は集団によって異なるため、様々な交配組合せの集団を用いた解析を行い、ハプロタイプの組合せによる形質への影響力を整理する。また、候補遺伝子領域付近には他の重要形質の原因遺伝子も存在する。品種育成に活用するために、難褐変ハプロタイプとこれら重要形質の関係性を明らかにする。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：14526622

研究期間：平成26～29年度

中課題名：実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発(DHR)

小課題番号：DHR3

研究期間：平成26～27年度

小課題名：モモの硬さ(日持ち性)に関する選抜DNAマーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構果樹研究所・栽培・流通利用研究領域・立木美保

1) 研究目的

我が国で一般に栽培されているモモは、収穫後に果肉が急激に軟化しモモ特有のとりりとした軟らかな肉質となる。反面、日持ち性は極めて低く、流通過程で廃棄される果実も多い。一方、モモには硬肉と呼ばれるタイプがあり、我が国では「おどろき」などが生産されているが、ほとんどの生産者や消費者にはなじみのない形質である。硬肉モモは、成熟に伴う果皮色の変化、糖度の上昇、減酸などは一般的な品種と同様に進行するにもかかわらず、果肉は収穫後もほとんど軟化せず、硬いままである。このような硬肉モモの従来とは異なる肉質は、新たな需要を創出し消費拡大へ貢献する可能性がある。また、硬肉モモは押し傷もつきにくいいため、輸出など長距離輸送を必要とする遠隔地での販売、需要に合わせた機動的な販売等を視野に入れた新たな付加価値の高い商材になり得る。

このように高品質なモモを広く流通させるためには、日持ち性の高い品種育成や硬いモモを適宜軟化させる調節技術の開発等が求められる。そのためにはモモの硬さに関わる分子機構を明らかにすることは重要である。

2) 研究成果

①モモの硬さに関わる原因遺伝子の単離

硬肉モモと一般的なモモ果肉のオーキシン生合成系路における中間代謝産物量を測定したところ、成熟期において硬肉モモではIAAが減少しているのに対し、IAA前駆体物質であるIPyAが蓄積していた。この結果から硬肉モモ成熟果実におけるIAA含量の減少はIPyAからIAAを合成する段階を触媒するYUCCA活性であることが明らかとなった。

モモの全ゲノム配列の情報を元に、モモから7つのYUCCA様遺伝子を単離し、それぞれについての遺伝子発現解析を行った。モモ果実生育期間における発現を比較すると、*PpYUC10-3* (仮名) は、一般的なモモにおいて果実成熟初期から発現量が増加していたが、硬肉モモでは成熟期にも発現量の増加は認められなかった。このことから、果実成熟期のIAA生合成には*PpYUC10-3*が関与している可能性が考えられた。

② 原因遺伝子の機能解明 (ウイルスベクター実験手法の確立)

モモにおける遺伝子機能解析を効率化するため、ウイルスベクターを用いた機能解析系を確立した。導入の成否が視覚的に判断できるカロテノイドの分解に関わるcarotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4) 遺伝子を用い、CCD4の2カ所の一部配列 (CCD4-1とCCD4-2) をタバコラットウイルスに導入したベクターを作成した。白肉モモである「あかつき」等にアグロバクテリムを介してウイルスベクターを導入して感染させると、収穫前10日の果実に接種して10日間培養した時に導入部分が黄色になった (図1)。このことは白色肉のモモではカロテノイドを分解するCCD4の活性が高いために、カロテノイドが集積しない

が、ウイルスベクターにより転写後にジーンサイレンシングを引き起こして、CCD4の活性が無くなったため、黄色（カロテノイド集積）になったと考えられた。また、黄色部分のカロテノイド量が増加していることを確認した。

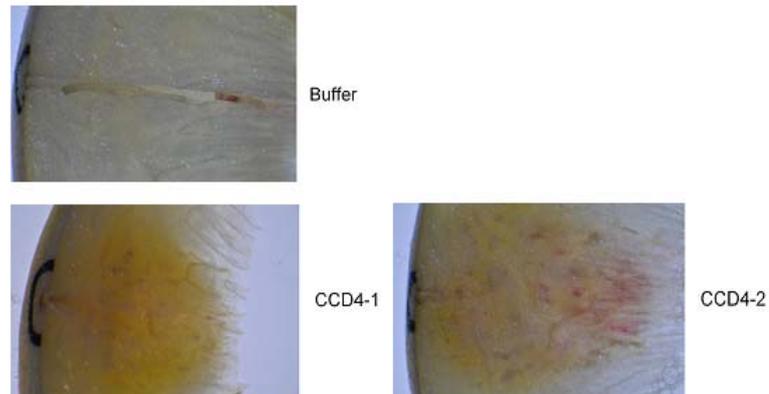


図1. ウイルスベクターの感染による果肉の黄色化。

③ 交雑実生の獲得と育成

硬肉の個体が得られる交雑を合計7組合せ1,557花行った。成熟まで至った果実を収穫し、除核剥皮法および一部はさらに種子培養法を用いて実生を養成した。現在合計122実生を養成した。初結実を迎えた交雑実生83個体を含めた合計240個体について果実調査を行った。硬肉と判定された個体は1個体のみであった。更に翌年度、硬肉の個体が得られる交雑を4組合せ680花行った。成熟まで至った果実を収穫し、除核剥皮法および一部はさらに種子培養法を用いて実生を養成した。前年度獲得した実生と併せて現在合計169実生を養成中した。また、初結実を迎えた交雑実生246個体について果実調査を行い硬肉と判定された個体は18個体であった。

上記の研究を通じて、*PpYUC10-3*が硬肉の原因遺伝子の候補であることが推測された。

3) 成果活用における留意点

特になし

4) 今後の課題

候補遺伝子配列をもとにDNAマーカーを作成し、既存系統や実生集団の遺伝子型と表現型を明らかにする予定である。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 14526622

研究期間: 平成 26～29 年度

中課題名: 実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発 (DHR)

小課題番号: DHR4

研究期間: 平成 26～29 年度

小課題名: カーネーションの日持ち性に関する選抜 DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・花き遺伝育種研究領域・ゲノム遺伝育種ユニット・八木雅史

1) 研究目的

カーネーションは、キク、バラと並んで生産の多い世界三大花きの一つであり、日本における生産本数が第2位(3.1億本:2012年)、産出額が第4位(126億円:2012年)の重要な品目である。花きにおいて、消費者が最も望む形質の一つが日持ち性であり、近年、花の消費拡大を狙って、小売店における日持ち保証販売が広がりを見せている。農研機構野菜花き研究部門ではこれまでに従来品種の3倍長持ちする品種「ミラクルルージュ」や「ミラクルシンフォニー」を育成し、その過程で多数の日持ち性の優れる系統を開発している。日持ち性の評価には多大な時間と労力がかかることから、これらの素材を有効に活用するためのDNAマーカーの開発が強く望まれている。これまでの研究から、農研機構育成品種・系統は老化時のエチレン生成量が極めて低く、エチレンの生合成に関わる遺伝子(ACC合成酵素遺伝子(ACS)、ACC酸化酵素遺伝子(ACO))が低く抑えられていることが明らかになっている。さらに、日持ち性に優れる品種・系統の花に外生的にエチレンを処理すると自己触媒的エチレン生成を起こすこと、ACSとACOのゲノムには大きな変異が見られないことから、これらの発現を調節するシス因子または転写因子に違いがあると考えられる。本課題では、農研機構が育成した日持ち性に優れる品種・系統を利用して、日持ち性に関連するこれらの因子を明らかにし、DNAマーカー化することを目的とする。

2) 研究成果

日持ち性の異なる品種間(良日持ち性品種「ミラクルルージュ」と一般品種「フランススコ」)で花弁の老化時のマイクロアレイ解析を実施した結果、エチレン生合成に関連する転写因子の中から合計6個のエチレン生成に対応する遺伝子を明らかにした。また、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて日持ち性の異なる15品種・系統のリシーケンスを行い、各系統について300万か所以上の遺伝子の変異箇所(1塩基多型、挿入・欠失配列)を同定した。さらに、日持ち性の分離集団(良日持ち系統806-46b×「ミズキ」のF₂集団)を用いて、285個のSSRマーカーおよび2119個のRADマーカーで構成される全長971.5cMの詳細連鎖地図を作成し(図1)、2か年にわたる日持ち性の評価結果を用いてQTL解析を実施した結果、第9連鎖群に有意な日持ち性のQTLを見出した。

QTLが検出された領域ならびに発現解析等から絞り込んだ遺伝子配列に基づいてDNAマーカーを作成し、これまでに良日持ち性で選抜を進めた系統における多型を調査した結果、AP2/ERF型の転写因子625の変異配列に基づいて作成したDNAマーカーの多型が、日持ち性と高い相関を示すことが示唆された。現在、良日持ち性品種「カーネ愛農1号」を用いた品種間交雑による検証用集団を作成しており、今後、この集団を用いてこれまでに作成したDNAマーカーの実際の育種における有効性を検証する。また、候補遺伝子については発現抑制あるいは過剰発現のベクターを作成し、ペチュニアおよびシロイヌナズナに遺伝子導入を行った。

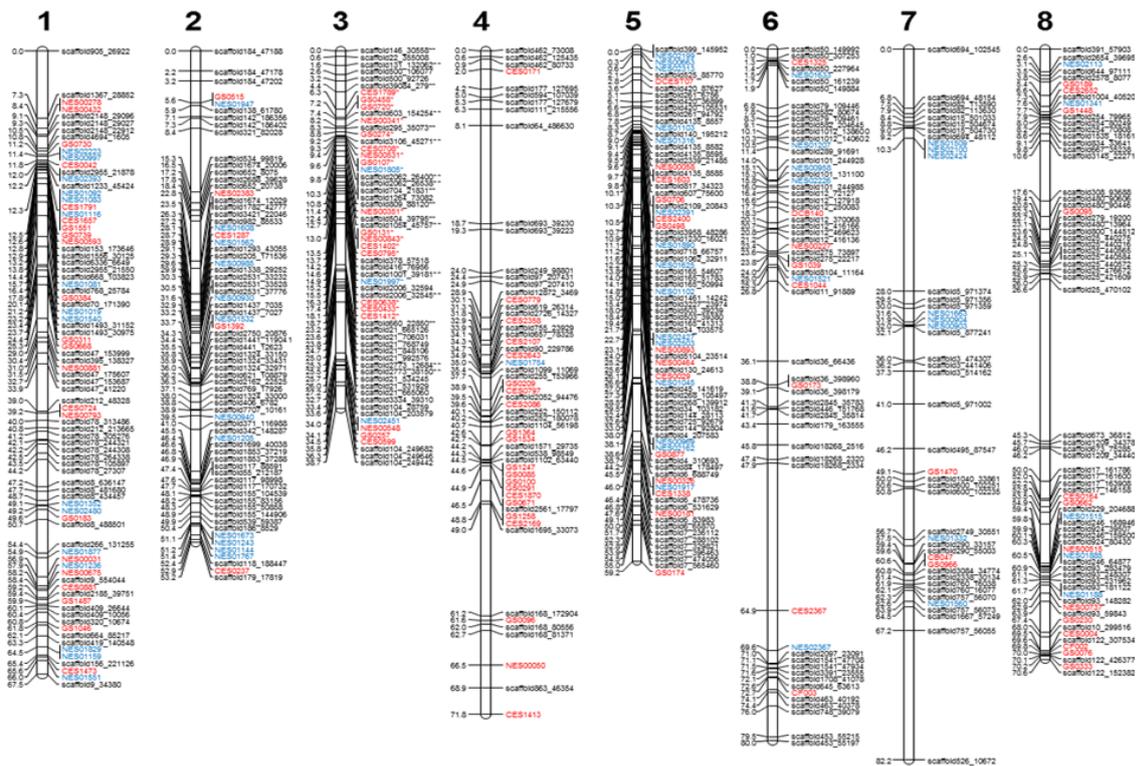


図1 285個のSSRマーカーと2119個のRADマーカーが座乗する全長971.5cMのカーネーションの詳細連鎖地図

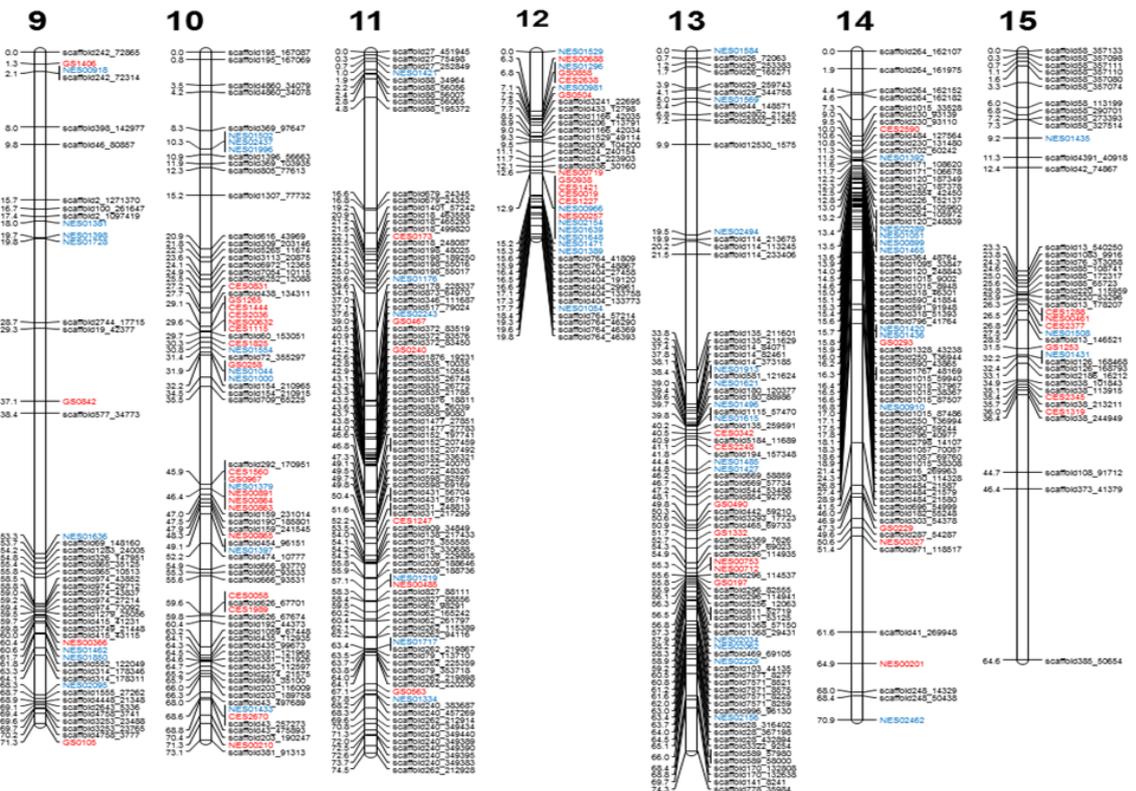


図1 つづき

3) 成果活用における留意点

今回材料に用いた日持ち性品種「ミラクルルージュ」やその派生系統は花卉の老化時のエチレン生成が極めて少ないタイプの日持ち性品種である。

4) 今後の課題

検証用集団を用いて、作成した DNA マーカーの有効性を検証するとともに、転写因子 625 を含む候補遺伝子については、組換えペチュニアおよびシロイヌナズナを作出し、遺伝子の機能解明を進める。

日持ち性には複数の因子が関与していると考えられ、日持ち性の全容の解明に向けてはさらに解析を進める必要がある。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 14526622

研究期間: 平成 26 ~ 29 年度

中課題名: 実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発 (DHR)

小課題番号: DHR5

研究期間: 平成 26 ~ 29 年度

小課題名: キクの開花早生性に関する選抜 DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・花き遺伝育種研究領域・ゲノム遺伝育種ユニット・住友克彦

1) 研究目的

きくは我が国の切り花生産本数の約 3 分の 1 (16 億本) を占め、卸売価額約 640 億となる花き生産の基幹品目であるが、近年、需要期の供給不足を背景に 2013 年は 2.8 億本のきく切り花を輸入し、この 10 年で 3.9 倍と急増している (図 1)。きく切り花の国産シェアの奪還には施設生産効率の向上による国内増産が不可欠である。施設栽培では早生品種を作付けすることで 1 作当たりの栽培期間を短縮し、施設の年間生産回数の上昇による増産が可能である。また、きくは夏期には高温によって開花が遅延するため、施設利用効率が低下する。これらのことから、早生品種および高温下でも開花が遅延しない耐暑性品種の効率的な開発は、我が国のきくの増産ならび国産シェア奪還には不可欠である。

栽培ギクは同質六倍体かつ自家不和合でヘテロ性が高く、遺伝解析が困難であることから、これまで DNA マーカーの開発はおろか、形質の遺伝様式に関する知見もほとんど報告されていない。そこで本課題では、きく属モデル植物である二倍体野生種キクタニギクの解析基盤およびゲノム解析技術を活用し、栽培ギクにおいて早生品種および耐暑性品種の効率的開発を可能とする DNA マーカーを得ることを目的とする。

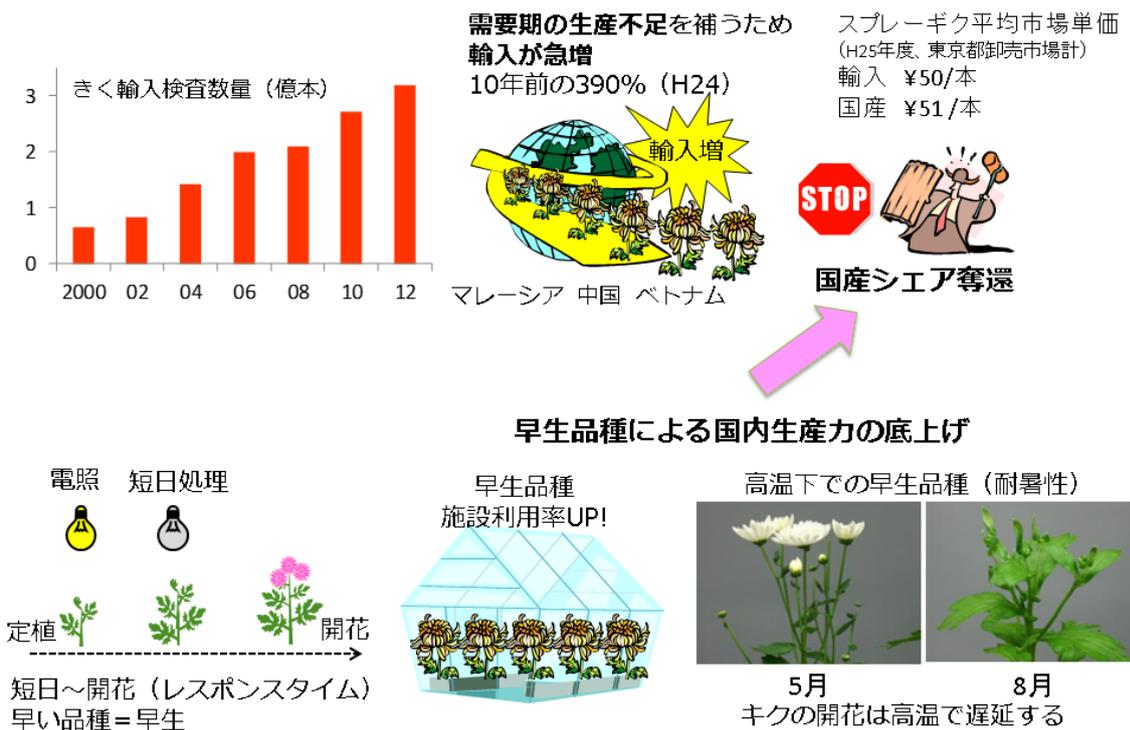


図1 開花早生性DNAマーカーの開発は国産キクの増産につながる

2) 研究成果

本課題では、栽培ギクでの開花早生性 DNA マーカーの開発のため、キク属モデル植物である二倍体キクタニギクにおいて DNA マーカーを開発し、栽培ギクへの適用を検討した。さらに、栽培ギク特有の DNA マーカーの開発も検討した。

[1] 二倍体キクタニギクでの DNA マーカー開発。オーソドックスな遺伝学的手法を用いて DNA マーカーを開発し、栽培ギクへの適用性を検討した。キクタニギクの純系より F₂ 集団を整備し、遺伝子型および表現型データを用いた QTL 解析によって DNA マーカーを開発し、栽培ギクでの有効性を評価した (図 2)。

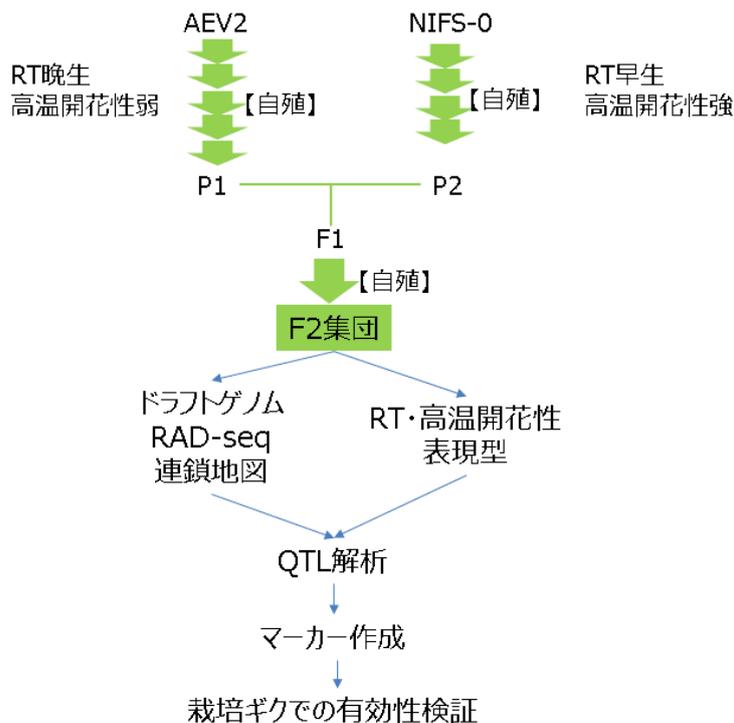


図2 2xキクタニギク解析スキーム

1 ドラフトゲノムの整備。キクタニギク純系を材料とした de novo ゲノムシーケンシングを行った。超並列シーケンサーのリードデータをアセンブルした結果、ゲノム配列は約 35 万本のスキャフォールド配列となり、総延長は 2.72Gbp であった (推定長 3.06Gb)。N50 長は 44.7kbp であった。キクタニギクの RNA-Seq 情報および他種の遺伝子配列情報によって 71,052 遺伝子を予測した。これらの情報をデータベースとして構築し、解析基盤としての活用が可能となった。

2 キクタニギクにおける QTL 解析。本課題で注目する形質は、適温下での短日処理から開花までの日数 (Response Time、以下 RT) および高温下での RT の遅延日数 (Heat Delay、以下 HtDly) である (図 3)。純系の P₁ および P₂ より F₂ 解析集団を育成し、両形質を調査した。RT において、P₁ は早生、一方 P₂ は晩生であった。また HtDly において、P₁ は小、P₂ は大であった。F₂ 集団の RT は両親間に連続的に分離した。HtDly は 3 ~ 21 日の間に連続的に分布したが、HtDly の少ない、すなわち高温開花性の高い系統が多かった。

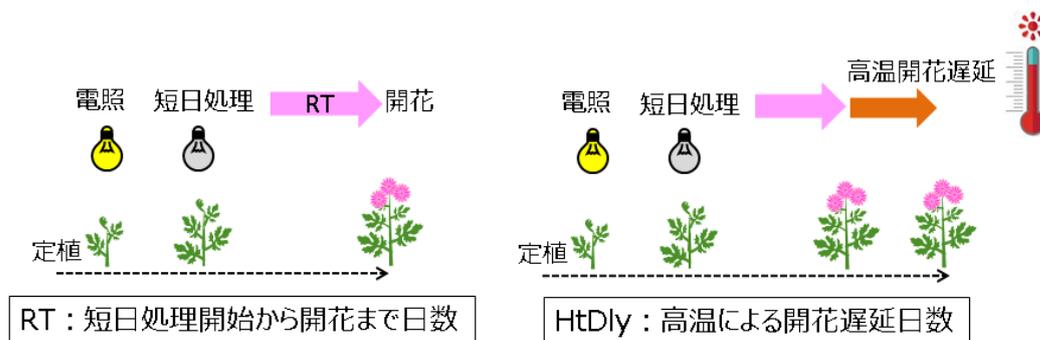


図3 本課題で注目した開花形質RTおよびHtDly

F₂ 集団を用いて RAD-Seq およびゲノム配列情報を利用して SNP 多型情報を収集し、高密度連鎖地図を作成した。連鎖地図では約 6,600 の SNP マーカーが 9 連鎖群で構成され、キクタニギクの基本染色体数に収束した。

F₂ 集団の連鎖地図および表現型データを用いて QTL 解析を行った。RT に関する有意な QTL が 2 カ所に検出された。QTL ピークの近傍に存在する各 SNP マーカーについて、遺伝子型によって RT を分類すると、それぞれ RT 早生親 P₁ タイプをホモあるいはヘテロで持つ個体では、RT 晩生親 P₂ タイプをホモで持つ個体と比較して平均 RT が小さく、RT 早生となった。

HtDly に関する有意な QTL が、1 カ所に検出された。F₂ 集団において、この QTL 近傍 SNP マーカーの遺伝子型ごとに HtDly を分類すると、高温開花性親 P₁ タイプをホモあるいはヘテロで持つ個体では、HtDly が少ないものが多く、一方 P₂ タイプをホモで持つ個体では HtDly が多いものが多く分布した。

3 開花早生性原因遺伝子の探索。ゲノムドラフトデータベースを用いて、QTL 近傍の原因候補遺伝子を探索した。有意な QTL の範囲に座乗するスキファールドを抽出し、スキファールド内に予測された遺伝子に対してキーワード検索し、既知の花成関連遺伝子を見いだした。RT に関して、CRY1、EMF1、RGL3、SPL13、PIF、VIN3、ELF3、ELF4-like 4、GI、GRAS 転写因子、FT/TFLファミリーの合計 5 遺伝子および複数の MYB 様転写因子遺伝子が見いだされた。HtDly に関わる QTL ピーク近傍に、花成抑制因子 DELLA タンパクの一つをコードする RGL3 遺伝子および花成関連遺伝子 SPL13 遺伝子が見いだされた。

[2] 六倍体栽培ギクでの DNA マーカー開発。栽培ギクは自家不和合性の同質高次倍数体であり、DNA マーカーの開発事例はおろか、開花関連形質の遺伝様式に関する知見もほとんどない。栽培ギクの交配実験によって、RT および HtDly に関する遺伝様式を明らかにするとともに解析集団を整備し、キクタニギクのドラフトゲノム配列をリファレンスとしてゲノムワイドな遺伝子型の解析を行い、栽培ギク固有の開花早生性および耐暑性のゲノム領域を推定した(図4)。

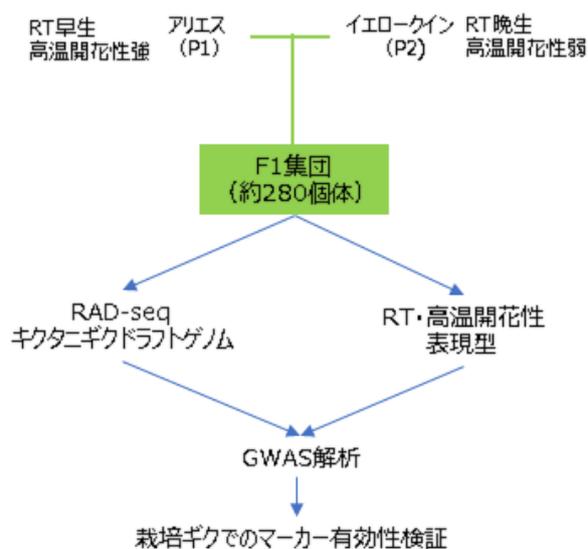


図4 6x栽培ギク解析スキーム

1 栽培ギクにおける GWAS による DNA マーカーの開発手法の確立。Shirasawa ら (Sci. Rep. 7, 44207; doi: 10.1038/srep44207 (2017)) がサツマイモにおいて開発した手法を栽培ギクに適用することを試みた。手法の有効性は、品種アリエスおよび品種イエロークインの F₁ 集団における舌状花のカロテノイド蓄積の分離を対象として検証した。本形質は、評価が容易で原因遺伝子 (カロテノイド酸化開裂酵素遺伝子: CmCCD4a 遺伝子) が明らかにされている。

約 10,000 の SNP マーカーを用いた GWAS 解析によって、カロテノイド分解と有意に関連のあるマーカーが多数得られ、F₁ 個体におけるハプロタイプで分類した結果、大きく 2 つのハプロタイプブロックに分けられた。F₁ 個体においては、2 ブロックのうち少なくともどちらか 1 ブロックの遺伝子型がアリエス型の場合にはカロテノイド分解がみられた。このことより、舌状花でのカロテノイド分解には、2 つのゲノム領域が関与すると判断された。これら 2 ブロックは、別途 PCR で確認したアリエスの持つ 2 個の CmCCD4a 遺伝子それぞれの有無と対応していた。このことより、ここで検討した六倍体栽培ギクの GWAS でのマーカー開発手法は、有効であることが示された。

2 交雑試験による開花関連形質の遺伝様式の解明。栽培ギクにおいて RT および HtDly とともに大きな品種間差が見られ (表 1)、RT に関する親品種の組み合わせと分離集団における個体の出現パターンより、RT の遺伝子様式について以下のとおり推測された。ア. RT に関して、多数の遺伝子が集積して形質に関与している、イ. RT の遅い品種・系統では、開花を遅らせる強い因子が存在する、ウ. RT の早い品種・系統では、開花を遅らせる因子が存在しない、エ. RT の早い品種・系統では、開花を早くする弱い因子の集積効果がみられる。また HtDly に関する親品種の組み合わせと分離集団における個体の出現パターンより、ア. 高温開花性には複数の因子が関与している、イ. 高温開花性の高い品種では、高温下でも開花を遅延させない遺伝子が集積され、多く場合飽和している、と推測された。

表1 マーカーの有効性検証に用いた栽培ギク品種のRTおよびHtDly

品種	RT	HtDly	品種	RT	HtDly
23KS-21	38	5	サザンアブリコット	50	7
サザンシェル	39	8	ユートピア	51	4
サザンピロート	39	6	デッキモナ	52	11
リモナーダ	40	13	アンコール	52	1
サザンチェリー	40	6	ハイクリスタル	53	7
21KS-53	41	1	イリニスプリングタイム	60	
23KS-05	41	6	トウキョウ	62	
AS10-14	42	8	ピンクデージー	63	
オルカ	42	5	寒山陽	63	53
アリエス	43	3	ホリム	64	
23KS-01	43	8	糸車	65	27
ロアール	44	4	イエロークイン	65	29
サザンシャイン	44	6	ぎゅらキッズ	65	10
AS09W-28	46	4	ミスルトー	67	26
イエローシューズ	47	1	希望の光	71	
ジェム	47	13	精興の寿	74	20
ピノキオ	47		轟秀芳	84	35
モゼフラーム	49	11	如月	100	
モゼセレブ	50	12			

3 開花関連形質の GWAS 解析。栽培ギク品種アリエス (RT: 早生・HtDly 小) および品種イエロークイン (RT: 晩生・HtDly 大) の交雑より F₁ 集団を育成し、RT および HtDly を評価した。F₁ 集団の各個体の RT は両親間 (イエロークイン: 69 日、アリエス 47 日) に連続的に分布し、平均 RT は両親のほぼ中間であった。高温期には高温による開花遅延が発生し、RT が増加した。F₁ 集団の各個体の RT は両親間 (イエロークイン: 97 日、アリエス 61 日) に連続的に分布し、平均 RT は両親の中間よりややアリエス側に寄っていた。適温期 RT および高温期 RT の相関を調査したところ、正の相関が見られたことから、適温期に RT 早生の個体は、高温期でも RT が比較的早生となった。また HtDly および RT の間には、中程度の正の相関が見られた。このことは、両形質における原因因子が一部重複する可能性を示唆している。

RT および HtDly に関して、約 10,000 の SNP マーカーを用いた GWAS 解析を行った。HtDly に関して、Bonferroni 補正 (全体の有意水準 5%) で有意な連関があった SNP マーカーが 1 つ得られた。一方、RT に関しては統計的に有意な SNP は得られなかったものの、P 値の小さい SNP マーカー上位 10 個のうち 2 つの SNP マーカーがそれぞれキクタニギクの RT に関する QTL 周辺にマッピング

された。よってこれらの2マーカーは、生物学的に有意にRTに関与している可能性が高いと判断された。

[3] 栽培ギク品種におけるマーカーの有効性の検証。

キクタニギクのQTL解析より得られたマーカーについて、キクタニギク系統間および栽培ギク品種間(表1)でのアリル型の判定および形質との関連性の分別に有効か、の検証作業を行った。得られたSNPマーカーは、アリル特異的プライマーを設計し、ARMSマーカーに変換し、栽培ギクの遺伝子型を調査した。RT早生性に関するマーカーについて、キクタニギク6系統のアリル型は、RT早生である3系統のうち2系統において早生親型のアリルが検出され、RT晩生系統からは検出されなかった。このことより、このSNPマーカーは、キクタニギク系統間におけるRT早生の判別に有効である可能性が考えられる。さらに栽培ギク品種を用いて本マーカーによるアリル型と表現型の判定を試みたが、ほとんどの品種で早生親型および晩生親型のアリルが検出され、表現形との関連を見いだすことはできなかった。HtDlyに関するSNPマーカーについて、HtDlyが大きい(高温開花性が低い)キクタニギク3系統においても、低HtDly型親のアリルが検出され、さらにほとんどの栽培ギク品種で低HtDly型親および高HtDly型親の両方のアリルが検出され、表現形との関連を見いだすことは出来なかった。

次に、栽培ギクのGWAS解析より得られたHtDlyに関する1マーカーおよびRTに関する2マーカーについて、栽培ギク品種間での形質の判定に有効か、の検証を行った。RTについては栽培ギク37品種(表1)を用いて有効性の検定を行った。RTに関する1つ目のSNPマーカーについて、早生親アリエス型のアリルはRT早生~晩生の品種間で幅広く確認され、また晩生親イエロークイン型のアリルは全品種で見られた。アリル型別のRT平均値には差が見られなかった。RTに関する2つ目のSNPマーカーについて、RT晩生型のアリルは全品種で見られた。RT早生型のアリルはRT早生~晩生の品種間で幅広く確認されたが、アリエス以外の夏秋ギク品種では検出されなかった。このことより、RT早生型のアリルは栽培ギクの秋ギク品種特有のゲノム領域であると推測された。本マーカーによるアリル型別のRT平均値を計算したところ、供試37品種全体を対象とした場合には差が見られなかったが、秋ギク品種特有のゲノム領域を検出していることを考慮し、秋ギク21品種を対象を絞りアリル型によって表現型を分類すると、RT早生型アリルを有する12品種の平均RTは、アリルを有さない9品種と比較して、大きく減少した。よってこのマーカーは秋ギク品種のRT早生性の判定に有効である可能性が示された。

HtDlyについて、栽培ギク30品種(表1)を用いて有効性の検定を行った。高温開花性の低い品種イエロークイン型のアリルは、全品種において検出されたが、高温開花性親のアリエス型のアリルは栽培ギクのわずか5品種において検出された。アリル型によって高温開花遅延日数を分類したところ、差は見られなかったが、高温開花性親のアリエス型のアリルを持つが高温開花遅延日数がきわめて大きい1品種を除いた場合には、アリエス型のアリルを持つ品種の平均高温開花遅延日数はアリルを持たない品種と比較して大きく減少し、本マーカーを持つ場合には高温開花性が優れると判定できる可能性が示された。

3) 成果活用における留意点

本課題では、遺伝的な背景の大きく異なる品種間での比較によってマーカー有効性を粗く判定した。育種場面での活用を想定しマーカーの有効性を明確にするためには、マーカーを有する品種を親とした交配集団を用いた適用性の判定が望ましい。

4) 今後の課題

今回キクタニギクで選抜された候補マーカーについて、残念ながら栽培ギク品種間では多型を見いだすことは出来なかった。マーカー配列の特異性が両種間において高くなかったのではないかと推

察された。現状では、巨大かつ同質六倍体の栽培ギクの全ゲノム情報は得られておらず、両種のゲノムの相同性を推定し、マーカー作成に反映させることは困難である。キクタニギクで得られたマーカーを栽培ギクに適用する際には、ORF など相同性が高いことがある程度把握されている領域にマーカーを設計するなど、工夫が必要である。ゲノム情報を活用し、キクタニギクの開花早生性に関する候補遺伝子を抽出できる見通しがついたので、さらなる情報の高精度化および深化とあわせて、遺伝学的な QTL 領域の絞り込みを行い、絞り込まれた候補遺伝子の機能解明によって原因遺伝子を明らかにすることが出来ると考えられる。キクタニギクの原因遺伝子情報を得ることによって、栽培ギクでも同祖の原因遺伝子に着目した開花メカニズムの解明と DNA マーカー開発が可能になると期待される。

本課題の大きな成果として、ヘテロ同質六倍体の栽培ギクにおいて、キクタニギクのゲノム情報を活用した GWAS によるマーカー開発手法の有効性が示されたことが挙げられる。この手法によって栽培ギク集団から開花早生性および高温開花性に関連した SNP マーカーが得られ、栽培ギク品種間での形質判定に有効である可能性が示された。開花関連形質について、栽培ギクの GWAS 解析とキクタニギクの QTL 解析の結果を突き合わせた場合、キクタニギクでは QTL が検出されなかった領域に、栽培ギクでは比較的有意性の高い SNP マーカーがマッピングされる事例があった。このことは栽培ギク特異的な開花関連形質の原因遺伝子があることを示唆している。そのような栽培ギク特有原因遺伝子の特定には、二倍体キクタニギクを用いた解析では困難である可能性が高く、同質六倍体の栽培ギクにおいて 6 本の同祖染色体をそれぞれ個別に識別し、原因遺伝子を探索する手法が必要である。

「実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：14526622

研究期間：平成26~29年度

中課題名：実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発(DHR)

小課題番号：DHR6

研究期間：平成26年度

小課題名：カフェインレス茶に関する選抜DNAマーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構野菜茶業研究所・茶業研究領域・荻野暁子

1) 研究目的

カフェインは茶の重要な成分の一つであるが、その覚醒作用や利尿作用により、必要以上のカフェイン摂取を避けたほうがよい人が常に一定数存在する。そのため、カフェインを含まない茶品種（カフェインレス茶品種）の育成が多くの実需者から期待されている。カフェインレス茶品種の育種は既に始まっているが、現在得られている育種素材は近縁野生種のタリエンシス (*Camellia taliensis*) の1系統であり、カフェインレス形質が劣性形質であることから、迅速な栽培品種の育成には選抜マーカーの作成が欠かせない。これまでの茶のカフェイン合成に関する遺伝子 (*TCSI*) の研究からカフェインレス形質は、タリエンシスの *TCSI* に相当する遺伝子と推定される。そこで、*TCSI* を選抜マーカーにすることを検討してきたが、複数の相同遺伝子が存在することから、遺伝解析が容易ではなく、未だ選抜マーカーの開発には至っていない。本研究では、タリエンシスの *cafless* 遺伝子とその相同遺伝子を解析し、精度の高い選抜DNAマーカーを整備し、カフェインレス茶品種育成の効率化を図ることを目的とする。

2) 研究成果

①カフェインレスヘテロ個体を選抜するためのDNAマーカー開発

公開されているチャの *TCSI* 遺伝子の配列を基に、第2エクソンの大部分と第2イントロンの一部を増幅できるプライマーセットを設計し、チャとタリエンシスにおいてPCRを行った結果、約500bpの増幅断片が得られ、シーケンス解析の結果、チャとタリエンシスの間に3bpのin/de11が見出された (図1)。

その多型について、104個体の分離集団においてPCR産物をダイレクトシーケンスし、遺伝子型の確認を行った結果、図2に示したように、チャ型、タリエンシス型、ヘテロ型と判定できることが示され、PCRと増幅断片のダイレクトシーケンシングによる、遺伝子型の判定技術が確立できた。さらに、表現型（カフェインの有無）との比較でも、遺伝子型と表現型が完全一致していることが示された (表1)。

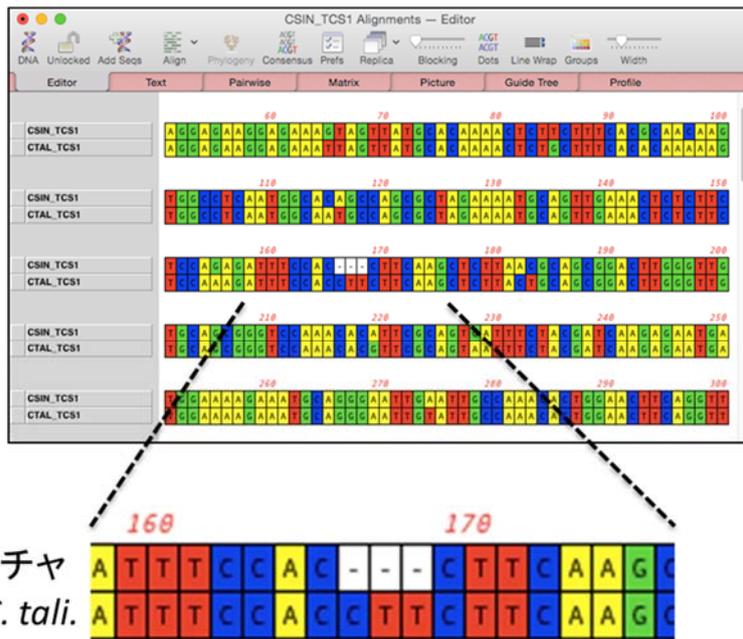


図1. チャとタリエンスのORFに見出されたIn/Dell多型

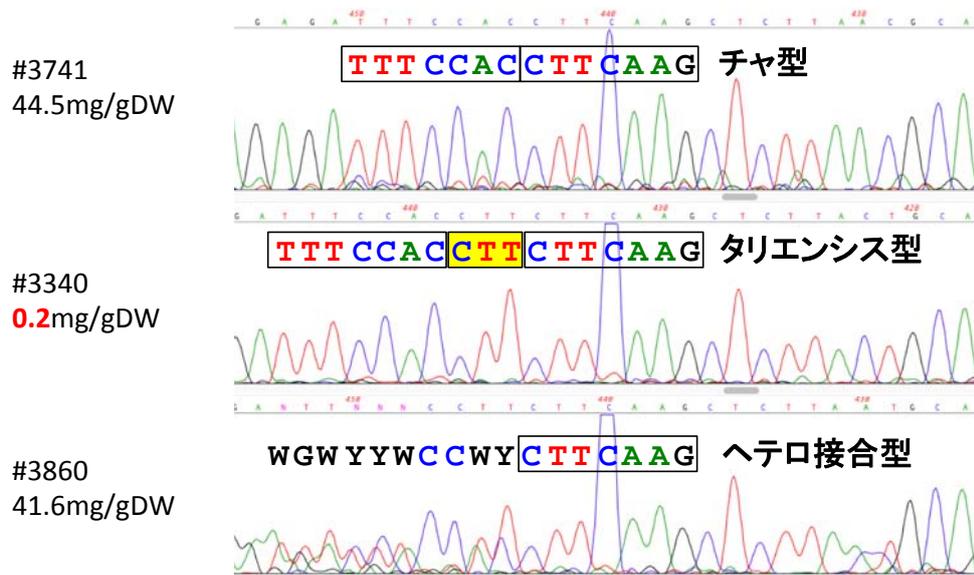


図2. PCR産物のダイレクトシーケンスによるジェノタイピング

表1. ヘテロ個体同士の交雑後代によるマーカーの検証

	チャ型	ヘテロ型	タリエンシス型	合計
カフェイン有り	30	52	0	82
カフェインレス	0	0	22	22
合計	30	52	22	104

②マーカーの有用性の確認

開発したマーカーを用いて、チャ型ホモの品種・系統とヘテロ型の系統のF₁世代1,359個体の遺伝子型を確認し、母本となる3個体を選抜し、745花の相互交配を実施した。交配の結果、交配の結果、カフェインレス個体が含まれると期待できる約160個の種子が得られた。

3) 成果活用における留意点

TCSIの多型を利用したマーカーが活用できるのは、「タリエンシス赤芽」の後代に限られる。「タリエンシス赤芽」は圃場での生育が弱いなど栽培特性に問題があるので、交配を実施する際にはそれらの欠点を考慮した母本の選定をすることが望ましい。

4) 今後の課題

得られた約160個の種子由来の実生個体における、カフェインレス表現型および遺伝子型の確認を進めている。また、カフェインレス形質とDNAマーカーの連鎖を確認し、カフェインレスの原因遺伝子の特定を進める。

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
14526622	0	3	18	2	0	0	0	0	0	2	1	0	3

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	農研機構	Knockdown of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 (CCD4) via Virus-Induced Gene Silencing Confers Yellow Coloration in Peach Fruit: Evaluation of Gene Function Related to Fruit Traits	S. Bai, P.A. Tuan, M. Tatsuki, H. Yaegaki, A. Ohmiya, C. Yamamizo, T. Moriguchi	Plant Mol Biol Rep.	34	257-264	2016	
2	①	農研機構、かずさDNA研究所、栃木県農業試験場、愛知県農業総合試験場	Construction of an SSR and RAD Marker-Based Genetic Linkage Map for Carnation (Dianthus caryophyllus L.)	M. Yagi, K. Shirasawa, T. Waki, T. Kume, S. Isobe, K. Tanase, H. Yamaguchi	Plant Mol Biol Rep		online	2016	9
3	①	福岡県農林業総合試験場、かずさDNA研究所	Development and characterization of a strawberry MAGIC population derived from crosses with six strawberry cultivars	Takuya Wada, Koichiro Oku, Soichiro Nagano, Sachiko Isobe, Hideyuki Suzuki, Miyuki Mori, Kinuko Takata, Chiharu Hirata, Katsumi Shimomura, Masao Tsubone, Takao Katayama, Keita Hirashima, Yosuke Uchimura, Hidetoshi Ikegami, Takayuki Sueyoshi, Ko-ichi Obu,	Breeding Science	67(4)	307-381	####	8

(2) 学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	イチゴ果実のアントシアニン合成に関わる遺伝子発現解析	磯部祥子	かずさDNA研究所	日本育種学会第127回講演会	2015	3
2	イチゴのゲノム情報整備の現状	磯部祥子	かずさDNA研究所	かずさDNA研究所ワークショップ イチゴゲノム育種時代の幕開け	2015	7
3	福岡県におけるイチゴ重要形質に関する遺伝解析とDNAマーカー開発	和田卓也	福岡県農林業総合試験場	かずさDNA研究所ワークショップ イチゴゲノム育種時代の幕開け	2015	7
4	「夏秋ギクと秋ギクの交雑により得た実生個体の開花に及ぼす高温の影響」	渡辺剛史	鹿児島県農業総合センター	平成27年度園芸学会秋季大会	2015	9
5	「キクタニギク系統および交雑集団の開花特性」	住友克彦	農研機構	平成27年度園芸学会秋季大会	2015	9
6	多元交雑集団を用いた栽培イチゴの果実色に関するGWAS解析	和田卓也	福岡県農林業総合試験場	平成27年度園芸学会秋季大会	2015	9
7	リンゴの果肉褐変性に関するDNAマーカーの開発	深澤(赤田)朝子	青森県産業技術センター	平成27年度果樹バイテク研究会	2015	10
8	SSRおよびRADマーカーによるカーネーション連鎖地図の作成	八木雅史, 白澤健太, 和氣貴光, 久米貴志, 磯部祥子, 棚瀬幸司, 山口博康	農研機構、かずさDNA研究所、栃木県農業試験場、愛知県農業総合試験場	平成28年度園芸学会秋季大会	2016	9

9	リンゴ‘あおり27’のF1集団を用いた果肉褐変関連特性に関するQTL解析	田沢純子, 國久美由紀, 押野秀美, 今智之, 葛西智, 工藤剛, 久保隆, 後藤聡, 工藤悠, 初山慶道, 山本俊哉, 深澤(赤田)朝子	青森産技りんご研究所、弘前地域研究所、農研機構果樹茶部門	園芸学会平成28年度秋季大会	2016	9
10	リンゴ‘あおり27’のF1集団を用いた連鎖地図作成—果肉褐変関連特性の解析に向けて—	押野秀美, 田沢純子, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 深澤(赤田)朝子, 山本俊哉	農研機構果樹茶部門、青森産技りんご研究所、弘前地域研究所	園芸学会平成28年度秋季大会	2016	9
11	リンゴの果肉褐変性に関わる選抜DNAマーカーの開発について	深澤(赤田)朝子	青森産技弘前地域研究所	園芸学会平成28年度秋季大会シンポジウム	2016	9
12	カフェインレス茶品種育成のための母本選抜用DNAマーカーの開発	荻野暁子	農研機構	日本育種学会130回講演会	2016	9
13	Transcriptome sequencing to investigate genes involved in fruits color in the three MAGIC populations of cultivated strawberry.	永野聡一郎, 平川英樹, 和田卓也, 田崎公久, 前田ふみ, 森美幸, 鶴見理沙, 飯村一成, 白澤健太, 奥幸一郎, 大橋隆, 渡邊学, 生井潔, 磯部祥子	かずさDNA研究所、福岡県農林業総合試験場、栃木県農業試験場、千葉県農林総合研究センター	Plant and Animal Genome Coference XXV	2017	1
14	キクタンギクのゲノム配列解読	平川英樹, 住友克彦, 久松完, 中野善公, 八木雅史, 中野道治, 白澤健太, 草場信, 磯部祥子	かずさDNA研究所、農研機構、広島大学	園芸学会平成29年度春季大会 園芸学研究	2017	3

15	A genome-wide association study (GWAS) for strawberry fruits color using a multi-parent advanced generation inter-cross population	Wada, T., S. Isobe, M. Mori, K. Oku, M. Tsubone, S. Nagano, C. Hirata, K. Takata, S. Nagamatsu, K. Shimomura, K. Hirashima, H. Ikegami, Y. Uchimura	福岡県農林業総合試験場、かずさDNA研究所	Plant and Animal Genome in ASIA 2017	2017	5
16	栽培イチゴ (Fragaria × ananassa) MAGIC集団を用いた完着期果実の遺伝子発現プロファイリング	永野聡一郎、平川英樹、和田卓也、田崎公久、前田ふみ、Ghelfi Andrea、森美幸、鶴見理沙、津金胤昭、坪根正雄、飯村一成、白澤健太、奥幸一郎、大橋隆、渡邊学、生井潔、磯部祥子	かずさDNA研究所、栃木県農業試験場、千葉県農林総合研究センター、福岡県農林業総合試験場	園芸学会平成29年度秋季大会	2017	9
17	リンゴ「あおり27」の果肉褐変関連特性に関する候補遺伝子LARの発現解析とハプロタイプ分析	押野秀美・田沢純子・國久美由紀・寺上伸吾・西谷千佳子・初山慶道・深澤(赤田)朝子・山本俊哉	農研機構果樹茶研,青森産技セりんご研,青森産技セ弘前地域研	園芸学会平成29年度秋季大会	2017	9
18	カーネーション系統806-46bの日持ち性のQTL解析	八木雅史・白澤健太・磯部祥子・棚瀬幸司・山口博康	農研機構、かずさDNA研	園芸学会平成29年度秋季大会 園芸学研究	2017	9
19	画像解析を用いたイチゴ果実形態の定量解析およびGWAS解析	永松志朗、坪根正雄、和田卓也、林篤司、七夕高也、磯部祥子、森美幸、平田千春、高田衣子、下村克己	福岡県農林業総合試験場、かずさDNA研究所	日本育種学会第132回講演会	2017	10
20	リンゴ「あおり27」のF1集団を用いた褐変特性等果実形質に関するQTL解析	田沢純子・國久美由紀・押野秀美・今智之・葛西智・工藤剛・久保隆・後藤聡・工藤悠・初山慶道・西谷千佳子・深澤(赤田)朝子・山本俊哉	青森産技セりんご研,青森産技セ弘前地域研,農研機構果樹茶部門,筑波大院生命環境科学研究科	平成29年度果樹バイオテック研究会	2017	11

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1		「該当無し」					

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
	「該当無し」							

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	「該当無し」								

(6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
①	カフェインレス茶品種育成のための母本選抜用DNAマーカーの開発	日本育種学会第130回	2016	9	8	農研機構	
②	カフェイン含まぬ茶	日本農業新聞	2016	9	25	農研機構	

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)年月		主な利用場面	普及状況
③	日本農学進歩賞(カーネーションのゲノム研究と育種への利用)	農研機構	2017	11		

(8)発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
1	「該当無し」							

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分：①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	①	花き研究シンポジウム「国産シェア奪還と輸出拡大に向けて」	2016	10	24-25	つくば国際会議場	200	都道府県、市場関係者、種苗会社、小売販売者	農研機構	
2	①	平成28年度果樹バイテク研究会「難褐変性リンゴに関するDNAマーカーの開発に向けて」「多元交雑集団を用いた栽培イチゴの果実色に関するGWAS解析」	2016	10	19,20	栃木県職員会館 ニューみくら	50	都道府県	農研機構、福岡県農林業総合試験場、青森県産業技術センター	
3	②	2016年度青森県保健医療福祉研究発表会「褐変しないリンゴ品種の開発に向けた研究」	2016	12	17	青森県立保健大学	100	大学、医療福祉関係者	青森県産業技術センター	