

ミヤコグサ国内野生系統が示す開花時期の違いとその遺伝基盤の解明

～全ゲノム関連解析による責任遺伝子の検出～

若林智美^{1,2}, 瀬戸口浩彰^{1,3}

¹ 京都大学大学院人間・環境学研究科

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田二本松町

² 奈良女子大学理系女性教育開発共同機構

〒630-8506 奈良県奈良市北魚屋東町

³ 京都大学大学院地球環境学堂

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田二本松町

Tomomi WAKABAYASHI^{1,2}, Hiroaki SETOGUCHI^{1,3}

Detecting loci contributing to flowering time variation in *Lotus japonicus* by genome-wide association study

Keywords: flowering time, genome-wide association study, *Lotus japonicus*, wild accession

¹ Graduate school of Human and Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida Nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto city, Kyoto 606-8501, Japan

² CORE of STEM, Nara Women's University

Kitauoya Higashi-machi, Nara city, Nara 630-8506, Japan

³ Graduate school of Global Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto city, Kyoto 606-8501, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c10.00170

1. 開花時期の種内多型

身の回りの植物に目を向けると、美しい花によって季節を感じることができる。適切な時期に花を咲かせ実を結ぶことは、次の世代の質や量、つまり繁殖成功に関わる重要な要素の1つである (Schemske et al. 1986)。植物の生活環は4つの段階に分けることができるが、特に発芽と開花のタイミングは日長や温度などの外的なシグナルを感じ取って決められている。一度根ざした場所から動くことのできない植物にとって、生育する環境に適した開花時期を測ることは種子生産を左右する大切な鍵となる。開花時期を決める経路のうち、日長や温度に関わる経路は植物が野外環境で開花時期を測る上で特に重要である (Henderson and Dean 2004)。

適切な開花時期は植物種によって異なるが、同種内であってもそれぞれの個体が生育する環境によって異なることが知られている。例えば、同じ種であっても異なる環境に分布するエコタイプ間では、それぞれの環境に適応した結果、開花時期を測る機構に違いが生じている場合がある。このようなエコタイプは、同一条件下で栽培した場合であっても開花時期の違いを観察することができる。

2. ミヤコグサが示す開花時期多型

筆者らが研究対象としているミヤコグサはマメ科の多年草草本で、道端や海岸などの低い草原によく見られ、匍匐性の茎を有し黄色い花をつける。日本国内では沖縄県宮古島から北海道利尻島まで広く分布している。分布の緯度差は20度以上にもなり、様々な日長や温度の環境に自生している。本種は様々な形質の種内多型を有し、開花時期に関してもその広い分布域に伴ってエコタイプ間で違いが見られる。長日植物である本種は自生地での様子を観察すると、沖縄などの南の地域では1月末ごろに咲き始めるのに対し、北海道や東北などの北の地域では7月ごろに開花が始まる。さらに、国内各地から採取された多数の系統を同一条件下で栽培した場合でも、採取地の緯度に沿った開花時期の顕著な違いが見られる(Shah et al. 2018, Wakabayashi et al. unpublished)。図1に示す2個体は、温室内の25℃一定/自然光の同一条件下において発芽から1ヶ月半ほど栽培されたものである。北海道由来の系統では栄養成長を続けているのに対し、宮古島由来の系統は多くの花をつけている様子が観察された。



北海道由来の系統



宮古島由来の系統

図1. 温室内の同一条件下で栽培された2系統のミヤコグサを示す。それぞれ北海道由来の系統と宮古島由来の系統で、播種から1ヶ月半の様子を示す。

上記の条件下において筆者らが計測した127系統の開花時期データと、由来地の緯度との相関係数は約0.67となり、開花時期と由来地の緯度に正の相関関係があることが示された(Wakabayashi et al. unpublished)。分散分析による遺伝率は0.96となり、本種に見られる開花時期多型は遺伝的要因によるものということが示された。これらの結果から、ミヤコグサの種内に維持される開花時期は日長や温度などの緯度に沿った環境要素に関連しており、本種が開花時期を通して各自生地の環境に適応している可能性が考えられる。

3. モデル植物としてのミヤコグサ

塩基配列解読技術の発展により、近年では様々な生物種のゲノム配列が解読されている。また、品種やエコタイプの全ゲノム配列を決定することで、種内に保存されている塩基多型を利用した解析が可能となっている。全ゲノム関連解析では、種内の品種やエコタイプ間で見つかったゲノム網羅的な塩基多型情報を用いて、注目した形質の多型に関わるゲノム領域をゲノム網羅的に探索することができる。この解析では、形質との相関関係から形質に関連の高い遺伝マーカー(一塩基多型など)を検出する(図2)。検出された遺伝マーカーの近傍には、注目している形質に関わる責任遺伝子が存在すると考えられる。近年、植物ではシロイヌナズナやイネ、ダイズなどのモデル植物を用いて、開花時期を含む様々な形質の責任遺伝子の検出がなされている(シロイヌナズナ, Atwell et al. 2010; イネ, Zhao et al. 2011; ダイズ, Zhang et al. 2015

など)。

早咲き	1	A	G	C	T	G	T
	2	T	G	C	T	G	T
	3	T	C	C	C	A	G
	4	A	G	C	T	A	T
	5	T	G	C	T	A	G
遅咲き	6	T	G	A	T	A	G
	7	A	C	A	T	G	G
	8	T	C	A	T	A	T
	9	T	G	A	T	G	T
	10	T	G	A	T	G	G
SNPマーカー	1	2	3	4	5	6	

↑
早咲き・遅咲きで分離している。
(形質に関連している。)

図2. 全ゲノム関連解析の概念を示す。例として10系統(早咲き・遅咲き各5系統)における6つの遺伝マーカーと遺伝子型を示す。赤枠で囲われている遺伝マーカーが形質に関連していることを示す。

ミヤコグサはマメ科のモデル植物として、これまで共生研究などの材料とされてきた。ゲノムサイズは0.47 Gbpと小さく、またライフサイクルの短さなどの利点を持ち、マメ科のモデルとして有用な植物である。ゲノム配列の全長が解読されゲノムリファレンスが公開されている(Sato et al. 2008)。National BioResource Project ミヤコグサ・ダイズ中核機関である宮崎大学により実験系統や日本国内で採取された国内野生系統が保存されており、研究に利用することが可能である。さらに136系統の国内野生系統について、全ゲノム配列のリシーケンスが行われており、種内に保存されている一塩基多型(SNP)情報を用いて、全ゲノム関連解析を含めたいくつかの解析が行われている(Shah et al. 2018)。筆者らは温室で得られたミヤコグサの開花時期多型に対して、このSNP情報を用いた全ゲノム関連解析を行うことで、ミヤコグサの開花時期多型に関わる責任遺伝子の候補を検出することを試みた。全ゲノム関連解析では、上述のように注目する形質に関連の高いゲノム領域を、ゲノム網羅的に探索することが可能であり、また筆者らは野生集団に保存される塩基多型を用いることで、将来的にはミヤコグサの環境適応に関わる遺伝的要因の解明を目的としている。

4. 全ゲノム関連解析による開花関連遺伝子の検出

筆者らは116系統の国内野生系統を用いて全ゲノム関連解析を行い、開花時期との関連の高いゲノム領域の検出を行なった。解析モデルにはAMM(Kang et al., 2008, Seren et al., 2012)とLFMM(Frichot et al., 2013)の2つを用いて解析の信頼性を高めた。まずそれぞれのモデルによる解析を行い、その結果をもとに2つのモデル間で共通して開花時期に高い関連を示した遺伝マーカーを抽出して候補遺伝子を絞り込んだ。43 SNPsが2つのモデル間で共通して高い関連を示した遺伝マーカーとして検出され、これらの近傍に存在した81遺伝子を候補遺伝子として挙げた(図3)。これらの遺伝子のアミノ酸配列を基に相同性検索を行い機能推定を行ったところ、候補遺伝子には4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子が含まれており、Enrichment解析の結果、有意に開花時期関連遺伝子の相同遺伝子を検出したことが示された(Fisher's exact test, $p < 0.05$)。4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子はそれぞれ *PLD alpha1-like*, *SUMO1-2*, *SUVR2*, *AKT2-3*に相同な遺伝子であった(図3にゲノム上の位置を示す)。これらの遺伝子はいずれも変

異体の開花時期が野生株に比べて異なっていることが、シロイヌナズナなどの他種を用いた先行研究で実験的に示されている (Lu *et al.*, 2013, Murtas *et al.*, 2003, Stroud *et al.*, 2013, Held *et al.*, 2011)。また、遺伝子の変異と開花時期との直接的な関連は明らかになっていないが、推定された機能を考慮すると開花時期制御に関連する可能性のある遺伝子が3つ含まれていた。それぞれ *CAX4*, *ADF7-like*, *Importin-4* 遺伝子の相同遺伝子で、*CAX1* と *ADF7-like* はパラログが開花時期制御に関わっていることが知られている (Cheng *et al.*, 2003, Dong *et al.*, 2001)。また、*Importin-4* については光受容体であるフィトクロムの核輸送に関わることが明らかになっており (Kevei *et al.*, 2007), 日長経路において開花時期決定に関連している可能性も考えられる。

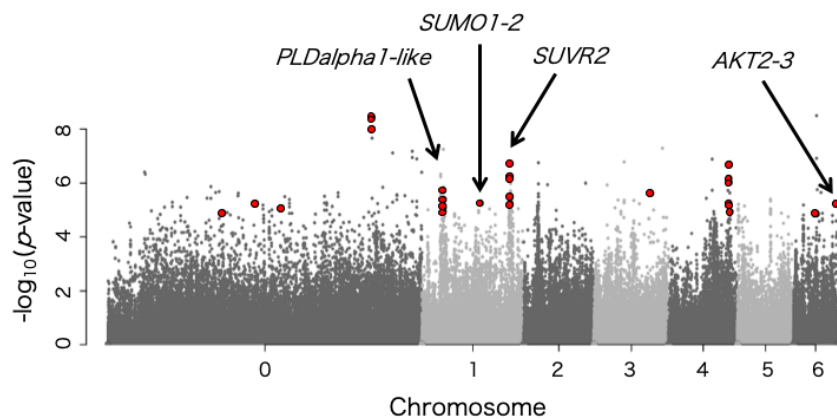


図 3. プロットは各 SNPs の染色体上の位置と開花時期との関連の高さを示す。横軸・縦軸はそれぞれゲノム上の位置と開花時期との関連の高さを示す。赤で示したプロットは2つのモデルで共通して上位に含まれた SNPs を示す。遺伝子名は、検出された SNPs の近傍に位置する遺伝子と相関性が高かった遺伝子を示す。

5. 今後の展望

ミヤコグサはこれまでもモデル植物として利用されてきているため、形質転換やゲノム編集などの実験技術の実績が蓄積されている。上記の解析で得られた候補遺伝子は、あくまでも開花時期と相関関係にある遺伝子である。現在、開花時期決定に関与しているかどうかを形質転換技術やゲノム編集技術を用いて実験的に明らかにすることを計画している。

また、本稿でも紹介したように、本種に見られる開花時期多型は由来地の緯度に沿った連続的な値を示す。このことから複数の要因が開花時期の違いに関わっていることが考えられる。そこで、筆者らは本稿で紹介した以外の条件下においても開花時期データの収集を行っており、これまでに得られている開花時期データと合わせて、複数の形質データを考慮した全ゲノム関連解析を進めている。複数の形質データを考慮することにより、より解析力の高い解析を行うことが可能になる。これにより新たな候補遺伝子を検出することを目指している。

国内野生系統を用いることで、野生集団に維持される遺伝的変異をゲノム網羅的に利用することができるため、本種の開花時期多型を制御する遺伝的要因だけでなく、さらに将来的には開花時期を通じた環境適応機構の解明も可能であると考えられる。こうしたリソースの利用により遺伝学や生理学だけでなく、進化生物学や多様性生物学の研究がさらに発展することを期待する。

6. 謝辞

本稿で紹介した研究内容については、基礎生物学研究所の川口正代司教授、東北大の佐藤修正准教授、Aarhus 大学の Stig U. Andersen 准教授によるご支援に心より感謝いたします。

National BioResource Project ミヤコグサ・ダイズ中核機関におかれましては、多数の国内野生系統のリソースの提供にてご協力いただき御礼申し上げます。また、本稿の執筆の機会を与えてくださったオーガナイザーの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, et al. 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465:627–631.
- Cheng N, Pittman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD. 2003. The *Arabidopsis cax1* Mutant Exhibits Impaired Ion Homeostasis, Development, and Hormonal Responses and Reveals Interplay among Vacuolar Transporters. *The Plant cell* 15: 347–364.
- Dong C-H, Xia G-X, Hong Y, Ramachandran S, Kost B, Chua N-H. 2001. ADF Proteins Are Involved in the Control of Flowering and Regulate F-Actin Organization, Cell Expansion, and Organ Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1333–1346.
- Held K, Pascaud F, Eckert C, Gajdanowicz P, Hashimoto K, Corratgé-Faillie C, Offenborn JN, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud JB, et al. 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Research* 21: 1116–1130.
- Henderson IR, Dean C. 2004. Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131:3829–3838.
- Kang, H.M.H., Sul, J.H.J., Zaitlen, N.N. a, et al. 2010. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42: 348–354.
- Kevei E, Schafer E, Nagy F. 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 58: 3113–3124.
- Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X. 2013. Increased expression of phospholipase Dα1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* 11: 380–389.
- Murtas G, Reeves PH, Fu Y-F, Bancroft I, Dean C, Couplan G. 2003. A Nuclear Protease Required for Flowering-Time Regulation in *Arabidopsis* Reduces the Abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER Conjugates. *the Plant Cell Online* 15: 2308–2319.
- Schemske DW, Willson MF, Melampy MN, et al. 1978. Flowering Ecology of Some Spring Woodland Herbs. *Ecology* 59: 351–366.
- Seren, U., Vilhjálmsson, B.J., Horton, M.W., Meng, D., Forai, P., Huang, Y.S., Long, Q., Segura, V. and Nordborg, M. 2012. GWAPP: A Web Application for Genome-Wide Association Mapping in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4793–4805.
- Shah N, Wakabayashi T, Kawamura Y, et al. 2018. Extreme genetic signatures of local adaptation during plant colonization. *bioRxiv* 485789.

- Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute Y V., Jacobsen SE. 2013. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* 152: 352–364.
- Zhang J, Song Q, Cregan PB, et al. 2015. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. *BMC Genomics* 16:1–11.
- Zhao K, Tung C-W, Eizenga GC, et al. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat Commun* 2:467.