

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310144
 研究課題名（和文）ユーラシア広域分布種のコアコレクションを使った適応遺伝子の解析と保全への応用
 研究課題名（英文）Studies on adaptive genes in annual grasses with wide distribution area in Eurasia
 研究代表者
 河原 太八（KAWAHARA TAIHACHI）
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：20115827

研究成果の概要（和文）：タルホコムギの分布全域についてその遺伝的変異を研究したところ、葉緑体ゲノムでは1つのクラスターであったが、核ゲノムでは互いに離れた2つのリネージの存在が見いだされ、この2つは数百万年にわたる隔離で成立したと推定された。なお、現在では2つが同所的に生育している場合もあり、それぞれの分集団が成立した後、分布を広げたと考えられる。近縁の野生オオムギでも同様な分集団構造が見られたので、こうした広域分布種では、種の進化過程で生じる分集団構造が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Genetic variation was studied in *Aegilops tauschii* covering its whole distribution area. Although only one cluster was recognized in chloroplast DNA variation, two distantly related lineages were found in nuclear DNA. The two lineages were supposed to establish through several million years separation. Similar genetic structure was also detected in wild barley, *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. It was shown that population division through evolutionary time is important to clarify genetic variation at present.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：資源保全学

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：遺伝子資源保全，在来種保全

1. 研究開始当初の背景

遺伝的変異の保全にあたって種全体の遺伝的変異量を把握することが重要であるが、広範囲に分布する種ではサンプリングの問題があり、手つかずと言ってもよい。しかし植物では、栽培植物の近縁野生種を利用すれば、蓄積された研究手法・研究材料が利用でき、この

問いに答えることが可能である。本研究は前プロジェクトに引き続き、ユーラシアに広域分布するコムギ近縁野生種のタルホコムギ (*Aegilops tauschii*) を中心に近縁の数種も含めて、各種で全変異量の推定を行う。さらに本研究では作成したコアコレクションを利用し、実際の適応に個々の適応関連遺

伝子が果たす役割についても、解析を試みる。

広域分布する植物種についての分子レベルでの多様性解析は、日本列島の種（スギ・ブナなど）や東南アジアに分布するフタバガキ (*Shorea*) 属など、いくつかについては行われているが、ユーラシア大陸に広く分布するものについてはほとんど研究がない。タルホコムギは、西アジアのトルコから中央アジアを経て中国西北部まで広く分布するイネ科の一年生草本で、広域分布種の一つのモデルとして扱うことが可能である。なお、世界的にもこのような視点からの研究は見当たらず、日本からの情報発信が期待される。幸い前プロジェクトで、葉緑体を対象とした塩基変異についての調査が全系統について終了し、系統関係の推定に有効であることが確認できた (Matsuoka et al. 2005, Yamane and Kawahara 2005)。また形態や生理・生態的調査の結果と、葉緑体塩基変異から、この種はイラン周辺が分布の中心でそこから東方に分布を広げたが、その過程では秋播から春播への変化が重要な役割を果たしたことが明らかになった (Matsuoka et al. 2008)。ただし播性には複数遺伝子の関与が知られているが、この種で個々の遺伝子がどのように変化したかは未解決である。また遺伝的変異についても、核遺伝子の変異は扱っていない。さらに当然のことであるが、単一種での結果をイネ科一年生草本に拡大できるかも疑問である。そこで、あらたに複数の近縁種についても、同様の解析を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究では前プロジェクトである、「コムギ近縁野生種を用いたユーラシア広域分布種の遺伝的多様性解析」を引き継ぎ、とくに出穂反応にかかわる適応関連遺伝子群に重点を置く。またタルホコムギ以外のコムギ近縁野生二倍性種、近縁属 (*Hordeum*) の野生オオムギについても同様な変異解析を行い、種・属レベルでの比較をする。とくに野生オオムギは、全体の分布域はタルホコムギとほぼ同等であるが、わずかに高温・乾燥の地域に偏っている。このように生理的に微妙な違いがあることが予想されるので、その適応関連遺伝子群をタルホコムギのそれと比較す

ることにより、遺伝子レベルの変異と実際の適応との関連が明らかになることが期待できる。

タルホコムギ：パンコムギで報告されている核マーカーを利用し、種全体での変異を解析する。また、約90系統のコアコレクションを対象に、出穂性にかかわる遺伝子群のうち主動遺伝子であることがわかっている低温要求性・日長反応性遺伝子を塩基レベルで変異解析し、種レベルでの変異幅を明らかにする。それらの対立遺伝子の地理的分布から、個々の遺伝子の適応的な意義について明らかにする。

タルホコムギ近縁種：Cゲノムを持つ *Ae. caudata*, およびUゲノムを持つ *Ae. umbellulata* で、1) 全域での核・葉緑体の塩基多様性を把握し、2) そのうちいくつかの系統について、低温要求性遺伝子 (*Vrn*) の塩基配列を読む。これによって、同じ属内で種間にどのような違いがあるのか、あるいはまったく並行的に分化が進んだのかが明らかになるはずである。たとえば、A種とB種に見られる春播性は同じ低温要求性遺伝子の変異なのか、あるいは違うメカニズムによるものかが解明できるだろう。同様に、日長反応性遺伝子 (*Ppd*) の解析も試みる。

野生オオムギ：野生オオムギ (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) は、タルホコムギ同様ユーラシア広域分布種であるが、中国や中央アジアには見られずトルコ・シリア・ヨルダン・イスラエルに広く分布し、小数であるが北アフリカでも見られるなど、分布域がやや高温・乾燥の地域を中心としている。野生オオムギでは、まず多くの系統を対象として核遺伝子の塩基配列に基づく多型解析を行い、出穂反応に関わる低温要求性や日長反応性のスクリーニングを行う。多型解析のデータは、野生オオムギの系統地理学的解析に利用する。またタルホコムギと同様に、比較的小数 (約20) の系統を選んで低温要求性遺伝子 *Vrn* と日長反応性遺伝子 *Ppd* について塩基配列レベルでの詳細な多型解析を行う。

3. 研究の方法

基本的には前プロジェクトと同様で、植物体からDNAを抽出し、核や葉緑体の特定部位の塩基配列をPCR法で増幅し、その配列情報を読むことで変異を検出するという研究方法である。なお、

研究分担者の異動に伴う、実験室や圃場の新規立ち上げ、また分担者自体の交代などやむを得ない理由で、材料や手法については変更した部分もあるので、当初予定していた方法について、概要を記しておきたい。

1) 研究材料の入手：タルホコムギとその近縁種については、代表者の所属する京都大学農学研究科栽培植物起源学研究室で系統保存されているものを主体に、必要に応じて海外のジーンバンクより分譲を受け、すでに栽培するなど準備済みである。野生オオムギは岡山大学生物資源研究所の保存系統（一部は導入のもの）を利用する。

2) タルホコムギ出穂関連遺伝子の変異解析：神戸と福井の圃場での出穂特性についてはすでに論文にまとめてあり、1次コアコレクションの低温要求性も予備実験が終了している。既にパンコムギで、低温要求性・日長反応性・純粋早晩生の3つの要因が出穂に関与していることがわかっており、それぞれの遺伝的変異についても研究が進んでいるので、その手法を利用する。いくつかの系統を選び、それらのうち低温要求性遺伝子(Vrn)のクローニングを行い、塩基配列を読んで詳しい変異の解析を行う。なお塩基レベルの変異が、実際の早晩性にどのように影響するかは、遺伝子の発現量・RNAスプライシングの状況など数多くの要素が関連するため、その解明にはかなりの時間がかかることが予想される。

3) タルホコムギ核DNAの変異解析：葉緑体の変異解析は終了しており、核のDNA変異を解析する手法の検討を行う。出穂関連遺伝子と同様、パンコムギで開発された様々なマーカーが利用できるが、研究者によりそれぞれ実験条件が異なるため、まず追試を行い実際にタルホコムギの系で効率の良い実験が可能かどうかを検証する。その後、選んだ手法で核の遺伝的多様性情報を集める。

4) 近縁種での変異解析：手法はすでに、Yamane and Kawahara (2005), Kadosumi et al (2005)などで確立されている。ただしこれ以外の実験系も含めて検討を行い、最適と思われる手法で遺伝的多様性情報を収集する。

5) 野生オオムギの変異解析：山根が担当し、核の変異解析を行う予定であったが、本人の異動に伴い実験室および圃場の再整備を余儀なくされたの

で、新たに岡山大学生物資源研究所・最相に分担を依頼し、山根はタルホコムギ近縁種が多様性解析に専念することとした。最相は従来より、栽培および野生オオムギの核遺伝子を研究しているので、引き続きDNAレベルでの研究を継続するよう依頼した。

4. 研究成果

2010年度

分布域を網羅するタルホコムギ122系統について、核遺伝子の塩基多型による集団構造と各種形態形質の関係を調べた。いくつかの形質で、分布域の東西に地理的クラインが認められるが、そのクラインは氷河期の終了にともなう分布域拡大が始まる前に、すでに存在した集団の分化に起因することが示された。またこれまで、多様性が高いとされる西部（トランスコーカサス地方・イラン）の集団を中心に、各種調査がされデータが蓄積されてきたが、本年度は調査が手薄な東部（中央アジア、中国西部）の集団に光を当て、この地域由来の系統間で開花期変異を調査した。具体的には、イラン・トルクメニスタン・ウズベキスタン・キルギスタン・タジキスタン・カザフスタン・中国西部で収集された50系統を、非加温温室で栽培し、開花日数を調査した。その平均は157.4日（標準偏差6.9）であり、最も早生の系統（144日）と最晩生の系統（187日）の開花日数の差は、43日であった。これらのことから、タルホコムギは分布域の東部においても、相当規模の開花期変異を持つことが示された。

2011年度

タルホコムギで、分布域を広くカバーする187系統についてDART (Diversity Array Technology) マーカーによるジェノタイピングを行い、種内の遺伝的分化パターンを解析した。今回使用した7000のマーカーのうち、約4000で多型が見られた。このうち遺伝子地図情報のある253マーカーをつかって解析したところ、この種内には遺伝的に分化した3つのグループがあることが明らかとなった。この結果は、AFLPマーカーによる解析結果 (Mizuno et al. 2010 Mol Ecol 19:999-1013) と一致する。

野生オオムギは、タルホコムギ同様

ユーラシア広域分布種であるが、タルホコムギと比較して分布域がやや高温・乾燥の地域を中心としている。2011年度は、ICARDAから分譲された野生オオムギ150系統および、岡山大学資源植物科学研究所で保有する野生オオムギ250系統について、5つの核遺伝子の多型解析を行った。現在、得られた多型を元に詳細な集団構造解析を進めている。出穂反応に関わる形質については、岡山大学保有の野生オオムギのうち161系統について春化要求性程度について調査した。その結果、約7割の系統は播性程度IIIに分類されること、7系統については春播性（非低温要求性）に分類される事が明らかとなった(Sai sho et al. 2011)。

また近縁野生種の適応形質の遺伝様式の基盤解明のため、エマルジナータ亜節の二種間でF2の遺伝解析を行った。その結果、穂の形態を形成する遺伝子座が、1つの連鎖群に集中して存在することがわかった。また六倍性種 *Aegilops juvenalis* についても、遺伝的多様性の解析を行った。

2012年度

引き続き、昨年度取得したタルホコムギ187系統のDArTマーカーによるジェノタイピング・データを詳細に解析した。コアレッセント・シュミレーション法を用いて解析したところ、タルホコムギ種内に存在する2つの大きなlineage (TauL1とTauL2) の分岐は数百万年前と推定された。このことは、これら2つのlineageの起源が、タルホコムギが種として誕生した当初まで遡りうることを示唆する。タルホコムギの進化について、これまでに類似の研究は無く、この結果は注目される。

また、2010年に北コーカサス地方で新たに採集したタルホコムギ16系統について、形態調査及びDNAマーカーを使用したジェノタイピングを行った。その結果、16系統は全て形態的には *tauschii* 亜種であることがわかった。葉緑体のハプロタイプは、16系統全てがタルホコムギの種内でもっともメジャーなハプロタイプ7に分類され、AFLP分析ではそれらが、南部のデルベント市近郊で採集された11系統と、主に北部で採集された5系統の2つのクラスターに分かれ、全体の多様性で見ると、前者は *strangulata* 亜種を含むコーカサス・カスピ海沿岸の系統のみからなるジ-

ンプルに属し、後者はユーラシア全域のタルホコムギからなる系列に属することが明らかになった。

コムギ、エギロプス属における穂の形態は環境適応に大きく関わる形質であることが示唆されているが、遺伝子は未だ単離されていない。今回エギロプスエマルジナータ亜節に属する *Ae. longissima* (LON) × *Ae. sharonensis* (SHA) のF2集団を用いて遺伝子マッピングを行った。穂の形態、10形質を調査した。側芒は、なしとありが3:1の分離比に適合した ($P=0.075$)。連鎖解析で、側芒の有無はLONマーカー連鎖地図のL1連鎖群に位置していた。QTL解析では、LONマーカー連鎖地図に1つのQTL、SHAマーカー連鎖地図に2つのQTL (1つは寄与率が非常に小さい) が検出された。これらのことから側芒の伸長は主要な1QTLと効果の小さい1QTLにより支配されていることが示された。LONやSHAのSゲノムはコムギBゲノムと相同性がある。コムギにおいて6B染色体長腕に穂中部の芒の伸長を抑制する遺伝子 (*B2*) が知られており、本研究で検出された側芒の伸長を支配する主要QTLは *B2* とホモログである可能性が考えられた。

野生オオムギでは、ICARDAから提供されている野生オオムギのコアコレクション ($n=150$; Liu et al. *Hereditas* 2002) を材料に、オオムギESTマーカーから開発した95 SNP loci のジェノタイピングを実施し、集団構造解析を試みた。さらに、既に集団全体の構造が明らかになっているタルホコムギを材料に進めている発芽時の耐塩性 (最相・松岡ら 未発表) について、分布域の大部分が重複する2種の比較解析を実施することを目的に、形質評価に取り組んだ。95 SNP loci に基づく集団構造解析の結果は、これまでに実施した5 STS loci (169 SNPs) に基づく集団構造解析の結果を踏襲すると共に、より詳細な種内の分集団構造が明らかになった。今後、詳細な集団構造と発芽時耐塩性の自然変異を統合的に解析することにより、野生オオムギの持つ変異の全容解明や栽培化に伴うオオムギ種内変異の変遷について、より詳細な知見が得られると期待される。

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2件)

① Mizuno, N., M. Yamasaki, Y. Matuoka, T. Kawahara and S. Takumi, Population structure of wild wheat D-genome progenitor *Aegilops tauschii* Coss.: implications for intraspecific lineage diversification and evolution of common wheat. *Molecular Ecology*, 査読有, 19, 2010, 999-1013.

② D. Saisho, M. Ishii, K. Hori and K. Sato, Natural variation of barley vernalization requirements: Implication of quantitative variation of winter growth habit as an adaptive trait in East Asia., *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 52, 2011, 775-784, doi:10.1093/pcp/pcr046

[学会発表] (計4件)

① 宅見薫雄・水野信之・松岡由浩, パンコムギ祖先2倍種タルホコムギの集団構造と種内分化, 日本遺伝学会第82回大会, 2010年9月20日, 北海道大学(北海道)

② 太田敦士・河原太八・山根京子, コムギ近縁野生種の種間雑種における穂の形態形質に関する遺伝子座の推定, 2011年9月24日, 福井県立大学(福井県)

③ 柿崎彩佳・阿部利徳・河原太八・Smekalova Tamara N.・佐藤和広・笹沼恒男, 北コーカサスで採集されたタルホコムギの遺伝的特徴の解明, 第7回東北育種研究集会, 2012年8月20日, 秋田県立大学(秋田県)

④ 北コーカサスで採集されたタルホコムギのジェノタイプング, 笹沼恒男・柿崎彩佳・阿部利徳・河原太八・Smekalova Tamara N.・佐藤和広, 日本育種学会第123回講演会, 2013年3月28日, 東京農業大学(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 太八 (KAWAHARA TAIHACHI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 20115827

(2) 研究分担者

松岡 由浩 (MATSUOKA YOSHIHIRO)
福井県立大学・生物資源学部・准教授
研究者番号: 80264688

最相 大輔 (SAISHO DAISUKE)
岡山大学・資源植物科学研究所・助教
研究者番号: 90325126

笹沼 恒男 (SASANUMA TSUNEO)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号: 70347350

宅見 薫雄 (TAKUMI SHIGEO)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 50249166

山根 京子 (YAMANE KYOUKO)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号: 00405359