

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658008

研究課題名(和文) 倍数性植物における同祖遺伝子計数機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of homoeolog-number counting in polyploid plant species

研究代表者

村井 耕二 (MURAI, Koji)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：70261097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：異質倍数体進化は、種子生産性の拡大などの点で、被子植物における重要な進化過程である。パンコムギは祖先2倍体種に由来するA B Dの3つのゲノムを持つ異質6倍体種である。パンコムギを含む6倍体コムギの花器官形成のクラスBCD MADSボックス遺伝子の同祖遺伝子の発現パターンを調べたところ、3つの同祖遺伝子は同じように発現しているのではなく、それぞれの遺伝子によってどのゲノムの同祖遺伝子がサイレンシングされるか、発現パターンが異なることが明らかとなった。また、このパターンは全ての6倍体コムギで共通であった。本研究の結果から、「ゲノム優先順位付き同祖遺伝子計数機構」が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Allopolyploidization, the doubling of chromosome number in species hybrids, generates polyploids with genome sets derived from related species. Allopolyploidization is an important process both for angiosperm evolution and for functional innovations, such as the development of inflorescence structure. Bread wheat (*Triticum aestivum*) is an allohexaploid species with a genome constitution AABBDD which derived from ancestral diploid species. In this study, I examined the expression patterns of homoeologs of class B, C and D MADS-box genes for floral formation. The homoeolog-specific expression pattern was different in every MADS-box gene, and the differential patterns of homoeologs were consistently observed among different hexaploid wheat varieties and synthetic hexaploid wheat lines developed by the artificial crosses between tetraploid wheat and *Ae. tauschii*. These results suggest that homoeolog-specific regulation of the floral MADS-box occurs in allopolyploid wheat.

研究分野：植物遺伝・育種学

キーワード：倍数性 同祖遺伝子 MADSボックス遺伝子 花器官形成 パンコムギ 合成6倍体

1. 研究開始当初の背景

被子植物の7割以上の種は倍数体種であると推定されており (Masterson 1994)、倍数性進化は植物ゲノムの重要な特徴の一つである (Wood et al. 2009)。倍数体のゲノムに存在する重複した遺伝子 (同祖遺伝子) は基本的に同じであるが、互いに分化し、異なる発現調節を受けていると考えられる。これまで、パンコムギをはじめ、シロイヌナズナ、ワタ、ブラシカを用いた研究により、同祖遺伝子が倍数体化の過程で、ジェネティックあるいはエピジェネティックに変化することが次第に明らかとなってきた (総説 Chen et al. 2007)。

パンコムギ (*Triticum aestivum*) はゲノム構成 AABBDD の異質 6 倍体 (2n=42=6x) で、異なる 3 種類のゲノムを合わせ持っている。A ゲノムはヒトツブコムギ (*T. urartu*, 2n=14=2x)、B ゲノムはクサビコムギ (*Ae. speltoides*, 2n=14=2x)、D ゲノムはタルホコムギ (*Ae. tauschii*, 2n=14=2x) に由来する (図 1)。パンコムギの起源には 2 回の倍数体化が関与しているが、1 回目の倍数体化では、ヒトツブコムギとクサビコムギの交雑から野生のフタツブコムギ (*T. dicoccoides*, AABB, 2n=28=4x) が起源した。その後、栽培化によって栽培型フタツブコムギ (*T. dicoccum*, AABB, 2n=28=4x) が成立した。マカロニコムギ (*T. durum*, AABB, 2n=28=4x) は栽培型フタツブコムギの一種である。そして、栽培型フタツブコムギとその畑に雑草として進入してきたタルホコムギとの交雑による 2 回目の倍数体化が起こり、パンコムギを含む普通系コムギ (AABBDD, 2n=42=6x) が起源した。

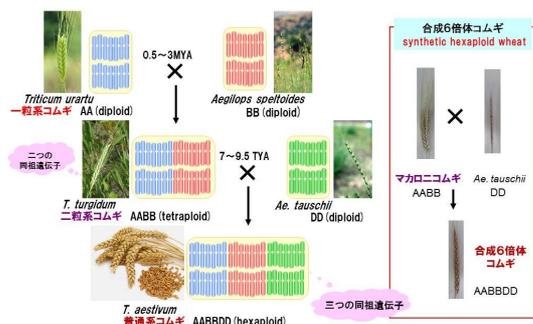


図 1 コムギの倍数性進化と合成パンコムギ

高等植物の花はがく片 (イネ科植物では内穎) 花弁 (イネ科植物ではりん被) 雄ずい、雌ずい (心皮) の 4 つの器官から構成される。さらに、雌ずいの内部には、胚珠が形成される。これらの器官の identity が A、B、C、D、E の 5 つのクラス遺伝子群の働きによって決定される。つまり、花原基の同心円状の領域の最外部 Whorl 1 では、クラス AE 遺伝子が働きあいがく片が、その内側の Whorl 2 では、クラス ABE 遺伝子が働きあいがく片が、その内側の Whorl 3 では、クラス BCE 遺伝子が働き

あい雄ずいが、最内部の Whorl 4 では、クラス CE 遺伝子が働きあい雌ずいが形成される。さらに雌ずい内部ではクラス D 遺伝子が働いて胚珠が形成される (図 2)。私たちは、パンコムギ品種「Chinese Spring (CS)」における花器官の外穎・内穎の形成に関与するクラス E MADS ボックス遺伝子 *WHEAT LEAFY HULL STERILE1 (WLHS1)* の、A、B、D ゲノムに座乗する 3 つの同祖遺伝子の解析を行った (Shitsukawa et al. 2007, Plant Cell)。

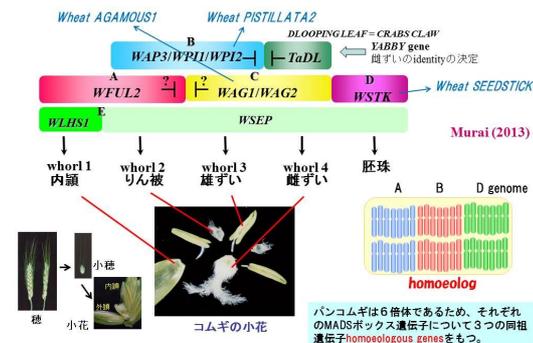


図 2 コムギの花器官とABCDEモデル

その結果、A ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-A*) では遺伝子構造に変化が生じ、機能タンパク質をコードしていないことを、また、B ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-B*) では DNA メチル化によりサイレンシングが起こっていることを見出した。つまり、CS では、D ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-D*) のみが機能的であった。さらに、機能的な D ゲノム同祖遺伝子の座乗する 4D 染色体を 4B 染色体に置換したナリ 4D テトラ 4B 系統では、B ゲノムの同祖遺伝子のサイレンシングが解除され、遺伝子発現の上昇がみられた。また、A ゲノム同祖遺伝子の構造異常をもたないパンコムギ品種「ナンブコムギ (NB)」では、B ゲノム同祖遺伝子に加えて、A ゲノム同祖遺伝子もサイレンシングされていた。これらの結果は、*WLHS1* 遺伝子に関して、同祖遺伝子を 1 つだけ機能させる「同祖遺伝子計数機構」が存在することを示唆すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、花器官形成に関与するクラス ABCDE MADS ボックス遺伝子をモデルに、倍数性コムギにおいて、各遺伝子における発現する同祖遺伝子の数と優先ゲノム順位を決定する「ゲノム優先順位付き同祖遺伝子計数機構」の存在を証明することである。(当初、クラス E 遺伝子 *WLHS1* をモデルとし、詳細な検討を行う計画であったが、後述するように、染色体欠失系統における発現パターン解析が予想通りの結果とならなかったため、クラス E 遺伝子に加え、クラス BCD 遺伝子の解析も行った。)

本研究では、倍数性コムギにおける花器官形成という一連の発生過程における同祖遺伝子の特異的発現について明らかにする。さらに、同祖遺伝子の機能分化の解明とその発

現機構へ研究を導く先導的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) クラス E 遺伝子の発現解析

機能的な *WLHS1-D* 同祖遺伝子が座乗する CS の 4D 染色体長腕に関する欠失系統を用い、*WLHS1* 各同祖遺伝子の発現レベルを、同祖遺伝子特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により解析する。

(2) クラス B, C, D 遺伝子の発現解析

私たちはこれまで、コムギにおけるクラス B 遺伝子 *Wheat PISTILLATA2* (*WPI2*)、クラス C 遺伝子 *Wheat AGAMOUS1* (*WAG1*)、クラス D 遺伝子 *Wheat SEED STICK* (*WSTK*) を同定している。本研究では、まず、これら 3 遺伝子の同祖遺伝子を同定する。それらの塩基配列から、同祖遺伝子特異的プライマーを設計し、リアルタイム PCR 法により、同祖遺伝子の発現パターンを解析する。材料には、6 倍体コムギとして、アジアとヨーロッパのパンコムギ品種をそれぞれ 2 系統ずつ、パンコムギ以外の 6 倍体コムギを 4 系統用いた。また、フタツブコムギとタルホコムギから人為的に作出した合成 6 倍体コムギを 4 系統用いる。

D ゲノム提供親のタルホコムギが現存しているので、マカロニコムギや栽培型フタツブコムギと交雑することにより容易に合成 6 倍体コムギを作出することができる。本研究では、現存のパンコムギ品種に加え、合成 6 倍体コムギを比較対象とすることにより、過去の倍数体化で起こった事象をそのまま実験的に再現できる。

(3) クラス B 遺伝子 *WPI2* 同祖遺伝子のエピジェネティック制御の解析

6 倍体における *WPI2-B* のサイレンシングがエピジェネティック制御によるかどうかを明らかにするため、まず、CS およびそれに由来するナリテトラ系統の 3A ナリ 3B テトラ (NT3A3B)、3D ナリ 3B テトラ (NT3D3B) の各同祖遺伝子発現パターンを解析する。また、CS を用いて *WPI2-B* のプロモーター配列を決定し、CS およびナリテトラ系統を用いてバイサルファイトシーケンシング解析を行い、*WPI2-B* プロモーター配列のメチル化パターンを比較する。さらに、クロマチンのエピジェネティック状態を検討するため、H3 ヒストンの K4 および K9 のメチル化 (H3K4me2 および H3K27me2) 特異的抗体を用いた ChIP 解析により、ヒストン修飾を調査する。

4. 研究成果

(1) クラス E 遺伝子の発現解析

WLHS1-D は 4D 染色体に座乗する。*WLHS1-D* 遺伝子を含むあるいは含まない欠失領域をもつ 4D 染色体長腕部分欠失系統 (ダイテロ 4DL およびダイテロ 4DS) の幼穂における *WLHS1-B* 遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法により調査した。その結果、*WLHS1-D*

の欠失に伴う *WLHS1-B* の明確な発現変動は観察されなかった。

(2) クラス B, C, D 遺伝子の発現解析

コムギ cDNA データベースを用いて、クラス B 遺伝子 *WPI2*、クラス C 遺伝子 *WAG1*、クラス D 遺伝子 *WSTK* それぞれの 3 つの同祖遺伝子を同定した。これらの塩基配列をアラインメントし、特異的 PCR プライマーを設計した (図 3)。同祖性の確認は、ナリテトラ系統を用いて行った。その結果、*WPI2* は第 2 同祖群に、*WAG1* は第 1 同祖群に、*WSTK* は第 5 同祖群にそれぞれ座乗することが判明した。

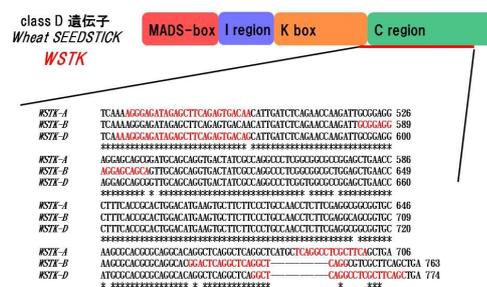


図 3 *WSTK* 遺伝子における同祖遺伝子特異的プライマー

同祖遺伝子特異的プライマーを用い、リアルタイム PCR 法により、同祖遺伝子ごとの発現レベルを、アジアとヨーロッパのパンコムギ品種をそれぞれ 2 系統ずつ、パンコムギ以外の 6 倍体コムギを 4 系統、合成 6 倍体コムギを 4 系統で調査した。その結果、それぞれの MADS ボックス遺伝子で特有の同祖遺伝子特異的発現パターンが存在した。例えば、クラス B 遺伝子 *WPI2* では、A ゲノムと D ゲノムの同祖遺伝子 (*WPI2-A*, *WPI2-B*) は発現しているが、B ゲノムの同祖遺伝子 (*WPI2-B*) の発現は有意に減少し、ほぼサイレンシングされていた。しかも、この同祖遺伝子発現パターンは供試したすべての 6 倍体系統で共通していた。数十年前に作成された合成パンコムギでも数年前に作成された合成パンコムギでも同様の発現パターンを示すということは、*WPI2-B* 遺伝子では 2 つの同祖遺伝子の発現を必然的に残すという「同祖遺伝子計数機構」が存在することを示唆している (図 4)。

(3) クラス B 遺伝子 *WPI2* 同祖遺伝子のエピジェネティック制御の解析

6 倍体コムギにおいて、正常系統とナリテトラソミック系統における同祖遺伝子の発現パターンを比較した。正常系統では前述したとおり、A ゲノム由来の *WPI2-A* と D ゲノム由来の *WPI2-D* が発現し、B ゲノム由来の *WPI2-B* はその発現が抑制されていた。しかし、*WPI2-A* あるいは *WPI2-D* が欠失したナリテトラソミック系統では、*WPI2-B* の発現抑制が解除され、発現上昇がみられた。この結果は、6 倍体コムギにおいて、*WPI2* では 2 つの同祖遺伝子が発現する「ゲノム優先順位付き同

祖遺伝子計数機構」が存在することを強く支持する。そしてこの機構はエピジェネティック制御により調節されていると考えられ。

そこで、B ゲノム同祖遺伝子 (*WPI2-B*) が発現抑制されるCS と、*WPI2-B* の発現抑制が解除されるナリテトラ系統 (NT3A3B および NT3D3B) の *WPI2-B* プロモーター配列の一部 (-434 ~ -612bp) のメチル化パターンを比較した。その結果、CS とナリテトラ系統の *WPI2-B* の DNA メチル化レベルには大きな差異は見られなかった。しかしナリテトラ系統において、特異的な CpHpH 配列のシトシンのメチル化が生じていた。このナリテトラ系統における特異的な CpHpH 配列のシトシンメチル化が *WPI2-B* 発現抑制の解除に関係するのかもしれない。

WPI2-B のサイレンシングとその解除がエピジェネティック制御によるかどうかを明らかにするため、*WPI2-B* のプロモーター領域の H3K4me3 および H3K27me3 抗体を用いた ChIP 解析を行った。その結果、プロモーター領域で解析した2か所両方で、CS に比べてナリテトラ系統におけるヒストンのエピジェネティック抑制指標となる、K9/K4 メチル化レベルが減少していた。この結果は、*WPI2-B* のサイレンシングとその解除がエピジェネティック制御であることを示唆する (図4)。

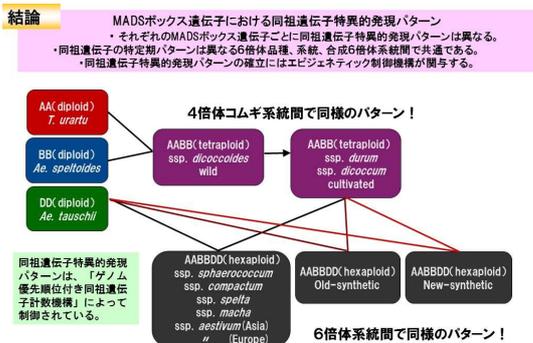


図4 結果のまとめ

倍数体種における遺伝子量効果の補性のための「同祖遺伝子計数機構」の存在は、予想はされるがこれまでその実体は何もわからなかった。本研究は、花器官形成の MADS ボックス遺伝子をモデルに「ゲノム優先順位付き同祖遺伝子計数機構」の存在を検証した。「ゲノム優先順位付き同祖遺伝子計数機構」の解明は倍数体種における同祖遺伝子のエピジェネティック制御の本質を明らかにすることになるだろう。コムギをはじめアブラナ科野菜など、重要な農作物には倍数体種が多い。本研究によって明らかになる同祖遺伝子の制御機構は、同祖遺伝子の発現パターンを変更することにより農業形質を改変するという、これまで全く手付かずであった新たな育種技術の開発へとつながると考えられる。

<引用文献>

Shitsukawa, N. and K. Murai et al.

(2007) Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. Plant Cell 19: 1723-1737.

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 1 件)

Murai, K. (2013) Homeotic genes and the ABCDE model for floral organ formation in wheat. Plants 2: 379-395. 査読有 DOI:10.3390/plants2030379

[学会発表](計 6 件)

村井耕二, 田中美久, 宅見薫雄. 倍数性コムギの花器官形成 ABCDE モデルにおける同祖遺伝子使い分けパターン. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

田中美久, 北川哲, 村井耕二. 倍数性コムギにおける *Wheat PISTILLATA-2* (*WPI-2*) の同祖遺伝子特異的発現レベル変動と DNA メチル化パターン解析. 日本育種学会第 126 回講演会, 2014 年 9 月 27 日, 南九州大学 (宮崎県・都城市)

田中美久, 北川哲, 村井耕二. 倍数性コムギにおける *Wheat PISTILLATA-2* (*WPI2*) の同祖遺伝子発現パターンの変異とプロモーター解析. 日本育種学会第 125 回講演会, 2014 年 3 月 22 日, 東北大学 (宮城県・仙台市)

田中美久, 田中紘子, 北川哲, 村井耕二. 倍数性コムギにおけるクラス B およびクラス C MADS ボックス遺伝子の同祖遺伝子発現パターンの変異. 日本育種学会第 124 回講演会, 2013 年 10 月 13 日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

Tanaka, M., H. Tanaka, S. Takumi and K. Murai. The B genome homoeolog of class D MADS-box gene is preferentially expressed in natural and synthetic polyploid wheats. The 12th International Wheat Genetic Symposium, 2013 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

倍数性コムギにおけるクラス D MADS ボックス遺伝子の同祖遺伝子発現パターンの変異. 田中美久, 田中紘子, 加藤啓介, 北川哲, 村井耕二. 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・世田谷区)

6. 研究組織

(1)研究代表者 村井 耕二 (MURAI, Koji)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号: 7 0 2 6 1 0 9 7