

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04439

研究課題名(和文)コムギ倍数化：2n配偶子の合体によるF1雑種ゲノム倍加の遺伝機構の解明

研究課題名(英文)Wheat polyploidization: the genetic basis of F1 hybrid genome doubling through union of 2n gametes

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の倍数種形成を導く「F1雑種ゲノム倍加」の遺伝機構を明らかとするため、パンコムギ(*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*)の祖先種を人工的に交配して作出した3倍体F1雑種を材料として量的形質遺伝子座(QTL)解析を行い、11個のQTLを見出した。また、花粉母細胞の比較観察結果から、これらのQTLは、F1雑種の2n配偶子形成に関係するものを含むと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To better understand the genetic basis of “F1 hybrid genome doubling through union of 2n gametes”, an important early step in the process of plant allopolyploid speciation, a quantitative trait locus (QTL) analysis was done using triploid F1 hybrids that were produced by artificial cross between the diploid and tetraploid progenitors of bread wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*). As the result, 11 QTLs were found. Comparative observations of the pollen mother cells suggested that at least some of those QTLs might be involved in the process of 2n gamete formation in the triploid F1 hybrids.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：倍数化 2n配偶子

1. 研究開始当初の背景

(1) 倍数化は、植物の進化で大きな役割を果たした生命現象であるとともに、品種育成への応用等、作物育種においても有用な手段として利活用されている。しかし、倍数化がどのようなメカニズムで起きるかについては、未だ不明な点が多い。

(2) 「F₁ 雑種ゲノム倍加」は、種間交雑によって形成された F₁ 雑種のゲノムが自然倍加し、遺伝的に安定な F₂ 個体が生じる現象である。F₁ 雑種ゲノム倍加は、多くの場合、F₁ 雑種が作る雌雄の 2n 配偶子 (あるいは、非還元配偶子) が合体することで起きる。

(3) 興味深いことに、被子植物の倍数種の多くは、2n 配偶子の合体による F₁ 雑種ゲノム倍加を通じて進化したと考えられている。このため、植物の倍数化メカニズムの研究において、F₁ 雑種ゲノム倍加の遺伝機構 (すなわち、どのような遺伝子が F₁ 雑種ゲノム倍加に関わっているか) が 1 つの焦点となっている。

(4) F₁ 雑種ゲノム倍加の遺伝機構を研究するためには、種間交雑が容易で雑種を作出しやすく、かつ、F₁ 雑種でゲノム倍加が生じる性質をもつ植物が材料として望ましい。コムギ・エギロプス属植物は、F₁ 雑種ゲノム倍加を通じて新しい種を形成し多様化してきたことが知られており、この問題を研究する上で、優れた材料である。

(5) 研究代表者らは、これまでに、パンコムギ (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*, 6 倍体) の祖先種、二粒系コムギ (*Triticum turgidum* L., 4 倍体) とタルホコムギ (*Aegilops tauschii* Coss., 2 倍体) を材料として研究を行い、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種 (3 倍体) のゲノム倍加には、タルホコムギ・ゲノム上の 6 つの量的形質遺伝子座 (QTL) が関与していることを明らかにした [Matsuoka Y, et al. (2013) PLoS ONE 8: e68310. doi: 10.1371/journal.pone.0068310.]。

(6) 一方、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種のゲノム倍加には、タルホコムギ由来の遺伝子のみならず、二粒系コムギに由来する遺伝子も関係する可能性がある。実際、これまでの研究により、F₁ 雑種ゲノム倍加に関係する二粒系コムギ遺伝子の存在が示唆され、部分的に確認されてきた。しかし、いくつの二粒系コムギ遺伝子があるのか、それらはどのような遺伝子であるのかは不明であった。

2. 研究の目的

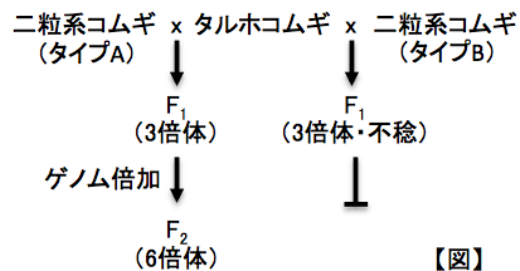
このような状況を踏まえ、本研究は、倍数種形成を導く「F₁ 雑種ゲノム倍加」の遺伝機構の全体像を明らかにすることを目的として実施する。具体的には、コムギをモデルとし

て、研究代表者が開発した「進化を再現する」交配実験系を用いて、F₁ 雑種の減数分裂の比較観察とゲノム倍加の QTL 解析を行い、F₁ 雑種ゲノム倍加を引き起こす二粒系コムギ遺伝子を探索し、同定することを目指す。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究から、二粒系コムギとタルホコムギの交雑では、F₁ 雑種がどの程度種子をつけるか (すなわち、着粒率) がゲノム倍加の発生頻度の良い指標となることが分かっている。着粒率が高い (あるいは低い) F₁ 雑種では、ゲノム倍加が高頻度 (あるいは低頻度) で発生したといえる。

(2) 研究代表者は、本研究の準備として大規模な交配実験を行い、特定のタルホコムギ系統 (♂親) との交配において、正常に成長し、高いゲノム倍加頻度 (着粒率 > 40%) を示す F₁ 雑種を生じる二粒系コムギ系統 (タイプ A) と、正常に成長するが完全に不稔となる F₁ 雑種を生じる系統 (タイプ B) を発見した (図参照)。タイプ A の二粒系コムギ由来の F₁ 雑種 (3 倍体) は、2n 配偶子を高頻度に形成し、遺伝的に安定な F₂ 種子 (6 倍体) を着ける。この交配実験系では、コルヒチン処理などの化学的操作を一切用いることなく F₁ 雑種ゲノム倍加を再現できるため、遺伝解析の材料として有用である。



(3) 研究代表者は、さらに、タイプ A とタイプ B の二粒系コムギを交配して得た F₁ と上記タルホコムギを交配して、分離集団を作出した。3 倍体 F₁ 雑種個体からなるこの集団では、二粒系コムギ由来の遺伝子座が分離し、かつ、着粒率 (ゲノム倍加頻度) が「高い個体」と「低い個体」が連続的に分離するため、各個体を適切な分子マーカーを用いてゲノタイプングして、QTL 解析を実施できる。

(4) 本研究では、この交配実験系を用いて、次の 2 つの実験を行う。

① 減数分裂比較観察

タイプ A とタイプ B のそれぞれの二粒系コムギと上記のタルホコムギの交配に由来する 3 倍体 F₁ 雑種を非加温温室で栽培・育成し、減数分裂期の花粉母細胞を採取する。そして、光学顕微鏡を用いた観察により、減数分裂過程を比較する。これにより、F₁ 雑種ゲノム倍加頻度の違いをもたらす細胞学的要因を調べる。

② QTL 解析

タイプ A とタイプ B を交配して得た F₁ とタルホコムギを交配して得た分離集団を非加温温室で栽培・育成し、各個体のゲノム倍加頻度（着粒率）を調査する。次いで、各個体から DNA を抽出し、DArT-seq マーカーを用いて、各個体をゲノマタイピング（遺伝子型決定）する。そして、着粒率データと遺伝子型データを合わせて QTL 解析を行い、F₁ 雑種ゲノム倍加に関わる二粒系コムギ遺伝子座をゲノム上に位置付ける。さらに、減数分裂比較の結果と合わせて、見出された QTL の機能を推定する。

4. 研究成果

(1) 減数分裂比較観察

① タイプ A 由来の F₁ 雑種 (25 個体) について、各個体 6 穂を開花前に袋掛けして着粒を調査したところ、7,204 小花中 3,213 (44.6%) で着粒した。個体ごとに着粒率をみると、最大 61.7%、最小 28.4% であった。

② タイプ B 由来の F₁ 雑種 (29 個体) についても同様に、各個体 6 穂を開花前に袋掛けして着粒を調査したところ、この雑種は不稔であり、7,070 小花で着粒は無かった。

③ いずれの F₁ 雑種も、発芽後正常に生長し、ネクロシスなどの雑種不全様の表現型は観察されなかった。

④ タイプ A 由来の F₁ 雑種から採取した花粉母細胞を酢酸カーミンで染色し、押しつぶし法で観察したところ、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種でこれまでに報告されてきた標準的な 2n 配偶子形成過程が観察された。すなわち、中期に赤道面に整列した一価染色体が脱凝縮して復旧核を形成した後、再凝集して両極に移動し、1 回の細胞質分裂を経て、花粉二分子が形成される。

⑤ 一般に、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種のゲノムは、相同染色体が無い polyploid 状態であるため、この雑種においても対合は見られない。一方、個々の花粉母細胞を見ると、遅延染色体、異常な細胞質分裂、などが生じているものが一定の割合存在することが確認された。このような異常は、この雑種の稔性に影響し、ゲノム倍加の発生頻度を低下させ得ると推察された。

⑥ タイプ B 由来の F₁ 雑種から採取した花粉母細胞を観察したところ、ほとんど全て細胞で遅延染色体や異常細胞質分裂が生じていた。そして、終期には、サイズが不揃いな複数の分子からなる「花粉多分子」が観察された。タイプ A 由来の F₁ 雑種の終期に観察された花粉二分子は、タイプ B 由来の F₁ 雑種では、皆無であった。

⑦ これらの結果から、タイプ B 由来の F₁ 雑種では、2n 配偶子形成過程で異常（遅延染色体や異常細胞質分裂）が高頻度に発生し、稔性のある花粉二分子の形成が強く妨げられると見られる。このことが原因の 1 つとなっており、この雑種では、ゲノム倍加が起きないと考えられた。

(2) QTL 解析

① タイプ A とタイプ B の二粒系コムギを交配して得た F₁ と上記タルホコムギを交配して得た 3 倍体 F₁ 雑種分離集団の種子 (544 粒) を播種したところ、397 粒が発芽し（発芽率 72.9%）、正常に生長した。

② 分離集団個体は、草丈、穂形、開花期などの形質で分離が見られたが、ネクロシスなどの雑種不全様の表現型は観察されなかった。

③ 分離集団個体について、各個体 6 穂を開花前に袋掛けして着粒を調査した。合計 103,956 小花（個体あたり平均 262 小花）を調べたところ、9,876 小花で着粒した（平均着粒率 9.5%）。個体別にみると、着粒率は、0.0%~73.4% の範囲で分離した。表現型の分布には偏りがあり、約半数の個体の着粒率が 5.0% 以下であった。

④ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて分離集団の各個体から total DNA を抽出し、DArT-seq マーカー (Diversity Arrays Technology 社) によるゲノマタイピング実験に供した。その結果、374 個体について、合計 25,458 マーカー（遺伝子座）での遺伝子型情報を得た。

⑤ 上記の遺伝子型情報には、分離集団個体のゲノムのうち、タルホコムギ由来のものに座乗するマーカーの遺伝子型情報も含まれる。QTL 解析には、二粒系コムギ由来のゲノムに座乗するマーカーのみを用いることから、タルホコムギ由来の情報は取り除いた。

⑥ さらに、欠損値 5% 以下であること、期待される分離比 (1:1) に照らして極端な歪みがないこと、遺伝地図上で互いに最低 0.5cM 離れていること、を基準としてマーカーを選抜し、遺伝子型情報を再整理した。その結果、374 分離集団個体と 997 個の DArT-seq マーカーからなる遺伝子型データを得た。染色体別にみると、これらのマーカーは、少ない染色体で 49 個、多い染色体で 117 個が座乗した。

⑦ 着粒率データと遺伝子型データを用いて、Multiple-QTL マッピング法により解析を行った。その結果、11 個の相加的に作用する QTL と 2 対の QTL 間相互作用からなるモデルが選択された。このモデルによって説明さ

れる表現型分散の割合は 53.2%であった。

⑧ これら 11 個の QTL の LOD スコアは、高いものは 20.4、低いものは 3.3 であった。また、それぞれの QTL によって説明される表現型分散の割合は、2.0%~13.4%であった。2 対の QTL 間相互作用により説明される表現型分散の割合は、1.2%~1.4%であった。

⑨ これらの QTL のほとんど全て (11 個中 10 個) で、タイプ A の二粒系コムギ由来のアリルが着粒率に正の影響 (そして、タイプ B の二粒系コムギ由来のアリルが負の影響) を及ぼすと推定された。この結果は、タイプ A 二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種でゲノム倍加が高頻度に起きることと合致する。

⑩ 一方、1 つの QTL では、タイプ A の二粒系コムギ由来のアリルが着粒率に負の影響 (そして、タイプ B の二粒系コムギ由来のアリルが正の影響) を及ぼすと推定された。この結果は、タイプ A 二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種から採取した花粉母細胞で、遅延染色体や異常細胞質分裂が、一定の割合観察されたことと合致し、タイプ A 二粒系コムギ・ゲノム上に、比較的少数ながら表現型に負に影響する QTL アリルが存在することを示すと解釈される。

⑪ 今回の QTL 解析の結果から、二粒系コムギ・ゲノム上に F₁ 雑種ゲノム倍加に関する遺伝子が存在することが明らかとなった。以前の研究により、タルホコムギ・ゲノム上には、6 個の QTL が存在することが示されている [Matsuoka Y, et al. (2013) PLoS ONE 8: e68310. doi: 10.1371/journal.pone.0068310.]. 従って、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種のゲノム倍加には、合計 17 個の QTL が関係するとみられる。この 2 種類の F₁ 雑種のゲノム倍加は、複雑な遺伝機構をもつと考えられる。

⑫ 減数分裂比較観察の結果を勘案すると、本研究で見出された QTL は、二粒系コムギとタルホコムギの F₁ 雑種の 2n 配偶子形成で機能するものを含むと考えられる。そして、これらの QTL のアリルの違いが、遅延染色体や異常細胞質分裂の発生頻度に影響する可能性がある。

⑬ 本研究で見出された QTL とこれまでに知られているコムギ遺伝子の遺伝地図上の位置関係を調べたところ、1 つの QTL が、既知の減数分裂関連遺伝子の近傍に位置することが分かった。このことから、F₁ 雑種ゲノム倍加に関連する遺伝子の少なくとも一部は、通常の減数分裂で機能する遺伝子である可能性が示唆された。

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 3 件)

① Matsuoka Y, Takumi S (2017) The role of reproductive isolation in allopolyploid speciation patterns: empirical insights from the progenitors of common wheat. *Sci Reports* 7: 16004. doi:10.1038/s41598-017-15919-z. 査読有り

② Saisho D, Takumi S, Matsuoka Y (2016) Salt tolerance during germination and seedling growth of wild wheat *Aegilops tauschii* and its impact on the species range expansion. *Sci Reports* 6: 38554. doi:10.1038/srep38554. 査読有り

③ Matsuoka Y, Takumi S, Kawahara T (2015) Intraspecific lineage divergence and its association with reproductive trait change during species range expansion in central Eurasian wild wheat *Aegilops tauschii* Coss. (Poaceae). *BMC Evol Biol* 15: 213. doi: 10.1186/s12862-015-0496-9. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

① 松岡由浩・宅見薫雄 (2017) 「パンコムギ D ゲノムに遺伝的に近いタルホコムギは二粒系コムギと交雑しやすいか」第 12 回ムギ類研究会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

① 松岡由浩 (2016) 「「パンコムギの起原」を縦横に掘り下げる」木原生物学研究所セミナー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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