

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02180

研究課題名(和文) 6倍体コムギの花成遺伝子経路におけるゲノム間クロストーク機構の解明と育種的利用

研究課題名(英文) Elucidation of genome-to-genome cross-talk mechanism in the flowering-time gene pathway of hexaploid wheat and its breeding use

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) 13,080,000円

研究成果の概要(和文)：パンコムギは、マカロニコムギ(ゲノム構成：AABB)とタルホコムギ(DD)との交雑により生じた異質6倍体である。マカロニコムギ品種「Langdon」を共通の親として早生および晩生型のタルホコムギを交雑し、合成6倍体コムギを作出した。早生型タルホコムギ由来の合成コムギでは、早生型DゲノムがA、Bゲノム上のCO-like遺伝子の発現を、ゲノムを超えて活性化し早生となる。この「ゲノム間クロストーク機構」はエピジェネティック発現制御が関与している。さらに、早生型合成パンコムギの育種的利用として、パンコムギ品種「ゆきちから」を北陸地方での栽培に適した早生型へと改良することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、倍数性コムギにおける花成遺伝子群の「ゲノム間クロストーク作用」がエピジェネティック発現制御機構により起こることが示唆された。これまでの育種はジェネティックな遺伝変異にのみ注目してきたが、倍数性作物では、エピゲノムにも注目する育種法が未来型育種法として、可能であることを意味する。エピゲノム育種によって出穂性を微妙にコントロールすることが可能となり、出穂性のファインチューニング育種が実現するだろう。また、本研究により、早生型合成コムギそのものが、コムギ育種に有用であることが実践できた。

研究成果の概要(英文)：Bread wheat (*Triticum aestivum*) is an allohexaploid species with A, B and D genomes. I made two synthetic hexaploid wheat lines (AABBDD) by crossing of *T. turgidum* ssp. *durum* cv. Langdon (AABB) with early-flowering *Aegilops tauschii* accession AT80 (DD) or late-flowering accession PI508262 (DD). In the synthetic hexaploid wheat line Syn6239 derived from AT80, a florigen gene, WFT, and its upstream CO-like genes were up-regulated in A and B genome as well as D genome. These results indicated that the expression of WFT and two CO-like genes located on A and B genome were affected by the effect of D genome; that is, the genome-to-genome crosstalk of flowering-time genes. In this study, I revealed the possibility that genome-to-genome crosstalk is involved in epigenetic regulation. Furthermore, I used the early-flowering synthetic hexaploidy wheat lines to develop early-heading “Yukichikara” lines, which are suitable for Hokuriku region.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：倍数性 花成 ゲノム間クロストーク 日長反応性経路 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

高等植物の約7割の種は、進化の過程で重複したゲノムを持つようになった倍数体種である (Masterson 1994)。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。近年、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明らかとなってきた (総説 Jackson and Chen 2010)。倍数体種は、2倍体種よりも広域適応性、高生産性、高ストレス耐性を示す。これは、倍数体種がもつ特異な遺伝子発現制御機構によるゲノムをまたいで相互作用 (ゲノム間クロストーク) によると考えられるが、その実態はほとんど何もわかっていない。

高等植物の花成 (栄養成長から生殖成長への移行) は、主に春化経路、日長反応性経路、構成的促進経路といった遺伝子ネットワークにより制御される (総説 Andres and Coupland 2012)。コムギの出穂性 (花成) は、これらの経路に対応した低温要求性、日長反応性、純粋早晩性の3つの出穂形質の複合作用により決定される。コムギの日長反応性経路では、*Ppd1* を構成要素とした生物時計からのシグナルが、*GIGANTEA* 遺伝子 (*TaGI*) を経て、2種類の *CONSTANS*-like 遺伝子 (*WCO1*, *TaHd1*) に伝達され、フロリゲン遺伝子 *WFT* (*Wheat FLOWERING LOCUS T*) を制御する。

パンコムギ (*Triticum aestivum*) はゲノム構成 AABBDD の異質6倍体 ($2n=42=6x$) で、マカロニコムギ (*T. durum*, AABB, $2n=28=4x$) とタルホコムギ (*Ae. tauschii*, DD, $2n=14=2x$) との交雑により起源した。合成6倍体コムギは、マカロニコムギ (AABB) にタルホコムギ (DD) を人工交配して得られた6倍体である。マカロニコムギ品種「Langdon」に成熟期の早晩性の異なる2系統のタルホコムギ (早生系統 AT80、晩生系統 PI508262) をそれぞれ交配し、合成6倍体コムギ (Syn6239、Syn6228) を作出した (Fujiwara et al. 2010) (図1)。これまでの解析から、早生型タルホコムギ (AT80) を親系統にもつ合成6倍体コムギ (Syn6239) は早生であり、晩生型タルホコムギ (PI508262) を親系統にもつ合成6倍体コムギ (Syn6228) は晩生であることが明らかとなった。そしてその原因は、早生型合成コムギでは、晩生型合成コムギに比べて、Dゲノムのみならず、AゲノムおよびBゲノムに座乗する *WFT* および *CO*-like 遺伝子の発現レベルの上昇が生育初期から見られ、また、発現レベルが高いためであることが判明した (未発表データ)。早生型合成コムギも晩生型合成コムギも Ldn 由来の同一のAおよびBゲノムの遺伝子をもつにもかかわらず、

発現パターンが異なるということは、異なるDゲノムの花成関連遺伝子の作用により、AおよびBゲノムの *WFT* および *CO*-like 遺伝子発現の制御が変更されていること、つまり「ゲノム間クロストーク」が行われていることを示している (図1)。

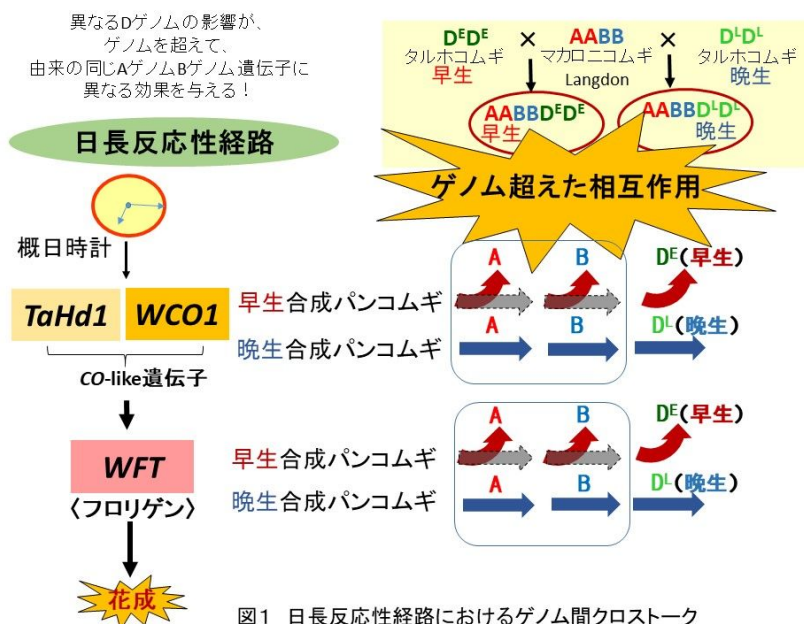


図1 日長反応性経路におけるゲノム間クロストーク

2. 研究の目的

本研究では、マカロニコムギ(4倍体、ゲノム構成 AABB)に、早生あるいは晩生のタルホコムギ(2倍体、ゲノム構成 DD)を交雑して得られた出穂性の異なる2種類の合成6倍体コムギ(ゲノム構成 AABBDD)を材料に用い、Dゲノム上の花成(栄養成長から生殖成長への移行)に関する遺伝子が、どのようにしてAおよびBゲノムの遺伝子を制御し、合成6倍体コムギの花成(出穂性)が決定されるのか、6倍体コムギの花成遺伝子経路における「ゲノム間クロストーク機構」の実態を解明し、育種的利用を図る。

3. 研究の方法

(1) 日長反応性経路遺伝子群の遺伝子構造および塩基配列変異解析

合成6倍体コムギの作出に用いた早生型タルホコムギ AT80 と晩生型タルホコムギ PI508262 を材料とし、*WFT*、*WCO 1*、*TaHd1*のスタートコドンから約2kb上流と遺伝子内部にわたり、遺伝子構造を解析した。ゲノム情報を元に、PCR法により遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。また、早生型タルホコムギ系統を4系統、晩生型タルホコムギ系統を4系統からDNAを単離し、*WFT*、*WCO 1*、*TaHd1*の遺伝子型と早晩性との関係を調査した。また、早生型合成6倍体コムギ系統と晩生型合成6倍体コムギ系統間の組換え近交系(Recombinant Inbred lines: RILs)をもちい、遺伝子型と早晩性を調査した。

(2) バイサルファイト・シーケンス法によるエピジェネティック制御機構の解析

早生型タルホコムギ(AT80)と晩生型タルホコムギ(PI508262)、マカロニコムギ品種 Langdon (Ldn)、AT80 を親系統にもつ早生型合成6倍体コムギ Syn6239 および PI508262 を親系統にもつ晩生型合成6倍体コムギ Syn6228 を実験圃場で栽培し、栄養成長から生殖成長へ移行する直前の植物体からDNAを単離した。遺伝子構造と塩基配列解析から、早生および晩生のタルホコムギ間で、発現がエピジェネティックに制御されると予想された *WCO1* 遺伝子について、プロモーター領域、第1エキソン領域、第1イントロン第2エキソン領域における、DNAメチル化パターンを解析した。

(3) 早生型合成6倍体コムギを1回親にもちいたパン用優良コムギ品種「ゆきちから」の早生型系統の育成

早生型合成6倍体コムギにパン用優良6倍体コムギ品種「ゆきちから」を交雑したF₁に、「ゆきちから」を2回戻し交配し、自殖を6回繰り返した系統を作出した。「ゆきちから」は東北地方向けのパン用コムギ品種であるが、福井県など北陸地方での栽培では、早生化が必要である。育成した系統の農業形質を圃場で調査した。

4. 研究成果

(1) タルホコムギにおける日長反応性経路遺伝子群の遺伝子構造および塩基配列変異解析

花成ホルモン(フロリゲン)遺伝子 *WFT* の遺伝子構造を早生型タルホコムギと晩生型タルホコムギで比較解析した。その結果、両系統間で第1エキソン内に非同義塩基置換が1箇所あり、1アミノ酸の変異が存在ことが判明したが、タルホコムギ系統間の比較解析により、花成には関係しないことが明らかとなった。日長反応性経路で *WFT* の上流に位置する *CO-like* 遺伝子の一つ *WCO1*について、遺伝子構造を調べたところ、早生型と晩生型のタルホコムギでコード領域内では塩基置換はみられなかった。もう一つの *CO-like* 遺伝子である *TaHd1* 遺伝子で

は、早生型タルホコムギと晩生型タルホコムギでアミノ酸配列にフレームシフト変異が存在したが、これもアミノ酸変異と早晩性が関係しないことが示された。早生型タルホコムギおよび晩生型タルホコムギのこれら3遺伝子の遺伝子構造の変異結果を考慮すると、以下のような仮説が導かれる。

< 仮説 >

早生型タルホコムギのDゲノム(D^Eとする)と晩生型タルホコムギのDゲノム(D^Dとする)では、6倍体になった際の組み合わせられたAゲノムとBゲノムのWCO1遺伝子発現に及ぼす効果が異なっており、その効果はエピジェネティック制御の変化である。早生型合成6倍体コムギではD^Eゲノムの何らかの影響により、AゲノムとBゲノムのWCO1のエピジェネティック制御による高発現が誘導され、その結果、その下流のWFTの高発現が誘導され、早生の表現型となる。

(2) WCO1 遺伝子におけるエピジェネティック変異の解析

プロモーター領域

スタートコドンから上流約300bpのプロモーター領域について、早生型タルホコムギ AT80 と晩生型タルホコムギ PI508262 のDNAメチル化の変異を調査した(図2)。メチル化はCG配列、CHH配列、CHG配列の3つのコンテキストについてみた。CG配列のメチル化は、メチル化が起こる場合、40%~90%と高頻度のメチル化であるのに対し、

CHH配列やCHG配列のメチル化は10%以下と低頻度でしか起こらない。プロモーター領域のCG配列のメチル化はこの領域で6か所あり、早生型 AT80 で特異的なメチル化が2か所、晩生型 PI508262 で特異的なメチル化が1か所見いだされた。CHH配列のメチル化は、早生型と晩生型でそれぞれパターンが全く異なった。CHGのメチル化は両系統共に見られなかった。

早生型および晩生型合成6倍体コムギ系統(Syn6239 および Syn6228)におけるプロモーター領域のメチル化パターンを、Aゲノム、Bゲノム、Dゲノム別に調査した(図3)。まず、タルホコムギから由来したDゲノム遺伝子では、早生型タルホコムギ

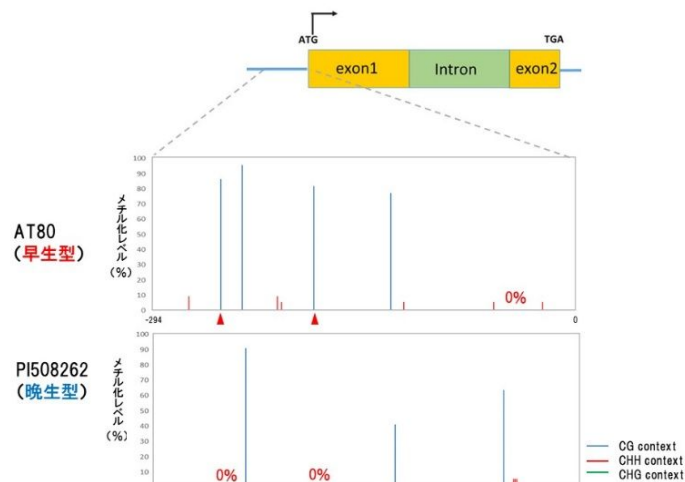


図2 早生型および晩生型タルホコムギ間のメチル化解析結果(プロモーター)

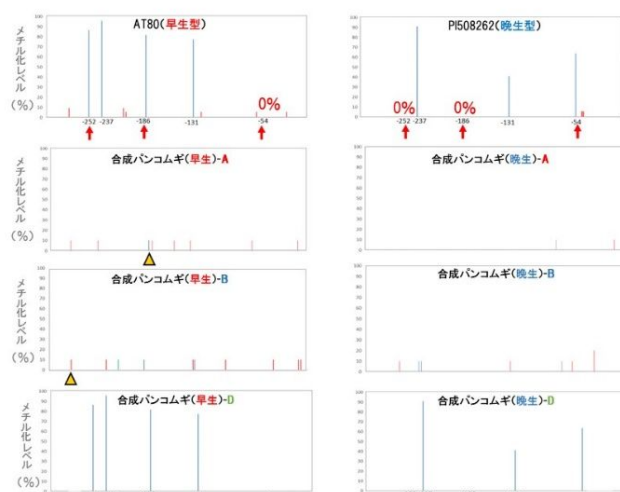


図3 早生型および晩生型合成パンコムギ間のメチル化解析結果(プロモーター)

のCG配列のメチル化パターンはそのまま早生型合成コムギに引き継がれ、晩生型合成コムギでは、晩生型タルホコムギのメチル化パターンが引き継がれた。一方、早生型も晩生型もタルホコムギのCHHのメチル化は合成コムギでは引き継がれなかった。合成コムギのAゲノムとBゲノムでは、CG配列の高レベルのメチル化は全くみられなかった。また、CHH配列のメチル化パターンでは、高発現するAゲノムとBゲノム遺伝子でメチル化さらたか所が多い傾向にあった。

エキソン - イントロン領域

プロモーター領域と同様の解析を、第1エキソンから第1イントロンにかけて行ったが、遺伝子発現と関連するようなメチル化変異は認められなかった。

<ゲノム間クルストーク機構とは?>

D^Eゲノムの効果によるAゲノムとBゲノムの *WC01* 遺伝子のプロモーター領域におけるCHH配列のメチル化の上昇による発現上昇であると結論付けられた。今後、これを証明するために、4倍体親であるマカロニコムギ品種 Langdon のAゲノムとBゲノムの *WC01* 遺伝子のCHH配列のメチル化を調査する必要がある。

(3) 早生型6倍体コムギ系統を用いた「ゆきちから」の早生化

圃場における出穂期を確認した結果、育成早生3系統は原品種「ゆきちから」に比べて、約1週間早生であった。2018-2019年は到穂日数(種を播いてから穂が出るまでの日数)換算で「ゆきちから」が190日、「SB3」が173日、「SB11-1」が161日、そして「SB11-2」は169日と早生系統は約2週間も早生であった。

また、早生型タルホコムギを由来とした早生関連遺伝子による早生化であることを確認するためにグラフィカルジェノタイピングを行った。その結果、早生系統がもつDゲノムの5D染色体に由来する領域が育成系統に持ち込まれていた。第5染色体には *VRN1* に加えて、*AGLG1* や *CYS*、*PHY-C* など花成に関わる遺伝子が多数座しており、今後はグラフィカルジェノタイピング結果をもとに候補領域をしぼり、早生性につながる原因遺伝子を同定することも可能である。

「ゆきちから」を由来としたパン用コムギとしての品質性は、外観的にも遺伝子型的も同じであり、品質は維持されていると考えられた(図4)。今後は生産力検定を行い、新たなパン用コムギ品種として、品種登録が可能かどうかを判断していきたい。

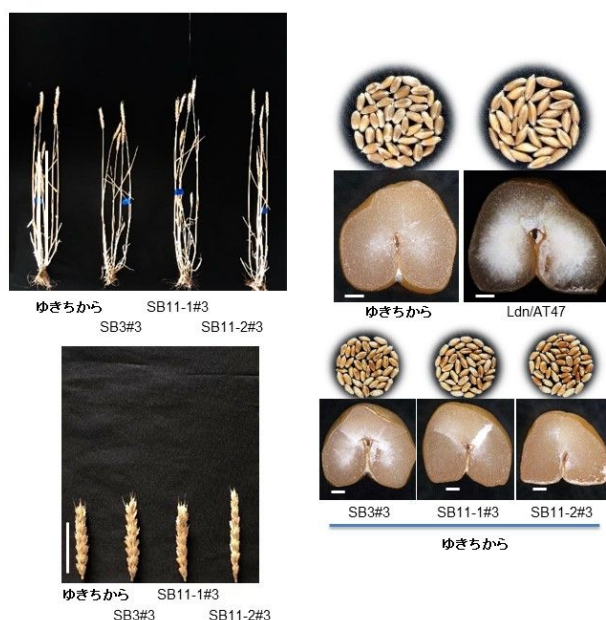


図4 早生型ゆきちからの形質

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi, S., S. Mitta, S. Komura, T. M., Ikeda, H. Matsunaka, K. Sato, K. Yoshida and K. Murai	4. 巻 -
2. 論文標題 Introgression of chromosomal segments conferring early heading date from wheatdiploid progenitor, <i>Aegilops tauschii</i> Coss., into Japanese elite wheat cultivars.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村井耕二, 水内友美子, 大山貴裕, 山影裕也, 藤原佑紀, 宅見薫雄
2. 発表標題 異なるDゲノムを持つ合成パンコムギにおけるAおよびBゲノムの花成関連遺伝子の発現パターン変化
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古村翔也, 吉田健太郎, 三田聖人, 池田達哉, 佐藤和広, 村井耕二, 宅見薫雄
2. 発表標題 早生型合成コムギへのパンコムギ品種戻し交配後選抜系統のグラフィカルジェノタイプング
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水小夜, 大山貴裕, 水野信之, 村井耕二
2. 発表標題 早生型および晩生型タルホコムギにおけるCONCTANS-like花成関連遺伝子の構造変異と発現変異
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水小夜, 大山貴裕, 水野信之, 宅見薫雄, 村井耕二
2. 発表標題 パンコムギの日長反応性遺伝子経路におけるゲノム間相互作用機構の解明
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三田聖人, 宅見薫雄, 村井耕二
2. 発表標題 早生型合成パンコムギを用いて育成したパンコムギ早生系統の特性
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Murai
2. 発表標題 Genome-to-genome crosstalk of flowering-time genes in hexaploid wheat
3. 学会等名 International Conference on Plant Science Research (Plant-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村井耕二, 水内友美子, 大山貴裕, 山影裕也, 藤原佑紀, 宅見薫雄
2. 発表標題 異なるDゲノムを持つ合成パンコムギにおけるAおよびBゲノムの花成関連遺伝子の発現パターン変化
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会 2019年春季千葉大学
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------