

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 6 月 4 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580004

 研究課題名（和文）チガヤ法を用いた半数体育種における染色体消失誘発のゲノム同定と
 遺伝的機構の解明

 研究課題名（英文）Identification of genome and chromosomes triggering chromosome
 elimination in haploid breeding using *Imperata cylindrica* system

研究代表者

向井 康比己（MUKAI YASUHIKO）

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：30110795

研究成果の概要（和文）：遠縁交雑において片方の染色体が消失することがあり、コムギでは半数体育種に利用されている。チガヤ花粉をかけた場合ムギ類における半数体制御機構に関わっているゲノムの探索と遺伝子群の座乗染色体を調べ、その染色体消失の原因について分子細胞遺伝学的に解明した。タルホコムギの 2D および 7D 染色体が染色体脱落およびその後の胚の成長に深く関与していることが明らかになった。本研究成果はダブルハプロイド法による品種改良に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：Haploid induction through chromosome elimination by remote hybridization has been a practical technique in wheat breeding using double haploid. Tagging of the specific genome and chromosome(s) of wheat and its relatives triggering chromosome elimination was carried out in wheat x *Imperata cylindrica* system. The mechanism of haploid induction was investigated at molecular-cytogenetic level. The 2D and 7D chromosomes of *Aegilops tauschii* are deeply involved in chromosome elimination and the subsequent growth of a haploid embryo. The results of research contribute to wheat improvement by the double haploid breeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：遺伝育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学、染色体消失、半数体、遺伝子、ゲノム、タルホコムギ、チガヤ

1. 研究開始当初の背景

(1) コムギ半数体育種法の現状

①地球温暖化に伴い、環境ストレス耐性をもつコムギの短期育成が求められている。育種年限を短縮するためには半数体育種法が有効であり、半数体作出では現在トウモロコシ法がもっとも多く用いられている。

②交雑時期がずれることから、温室等の設備が困難である発展途上国ではトウモロコシ法ほとんど普及していない。

(2) チガヤ法の開発

①インドの Chaudhary ら(2005)によって、チガヤ花粉を用いてのコムギの半数体育種法が開発された。

②さらに、我々との日印共同研究により、チガヤ法を用いてライムギの有用クロマチンをパンコムギに導入する方法が確立した。

③従来のトウモロコシ法では、ライムギのクロマチンが多く入ると半数体誘発が強く抑制されるが、チガヤ法ではそれほど抑制されることなく、ライムギ染色体の色々な組み合わせをもつダブルハプロイドを育成することに成功した。

(3) 種間交雑による染色体消失機構

①種間または属間交雑では、正常な受精が起こるにもかかわらず、しばしば両親のゲノム不適合によりどちらか一方の染色体が消失することがある。

②野生のオオムギであるバルボーサム (Barclay 1975) やトウモロコシ (Laurie & Bennett 1989)、パールミレット (Laurie 1989) などの花粉をかけることで半数体を得ることができ、ダブルハプロイド法として育種に利用されてきた。

③染色体消失がセントロメアの不活性化とそれに伴う動原体微小管の結合の不備 (Jin et al. 2004, Mochida et al. 2004) や染色体のヘテロクロマチン化や断片化 (Gernand et al. 2005) によって起こると言われているが、その詳細な遺伝的機構や分子的な機構についてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) チガヤ花粉をかけた場合、ムギ類における半数体を作成させるゲノムを探索する。

(2) 半数体制御機構に関わっている遺伝子群の座乗染色体を明らかにする。

(3) 染色体消失の原因について分子細胞遺伝学的に解明する。

(4) チガヤ法によるダブルハプロイド作製簡便化の手法を開発する。

(5) ライコムギ×コムギ後代から得られたダブルハプロイドにおけるライ由来およびDゲノム染色体を同定する。

3. 研究の方法

(1) ムギ類における半数体形成に関与するゲノムの調査

①半数体を得られることがわかっている6倍性コムギ (AABBDD)、ライコムギ (AABRRR) に加えて、*Triticum boeoticum*、*T. urartu*、*T. monococcum* の2倍性コムギ (ゲノム構成=AA) 3種、*T. dicoccoides*、*T. dicoccum*、*T. durum* の4倍性コムギ (AABB) 3種、タルホコムギ (= *Aegilops tauschii*) (DD) およびBゲノム提供種に最も近い *Ae. speltoides* (SS) のそれぞれにチガヤの花粉をかけ、授粉4日後の胚形成率、授粉2週間後の胚形成率、胚救助後の植物生存率を調べた。

②同様の実験を、ライムギ、オオムギ、カラスムギ、イネに対しても行った。

③受粉後一定時間ごとに子房を固定し、初期胚のチガヤ染色体の脱落を経時的に細胞組織学的に調べた。

(2) 半数体形成に関与するDゲノム染色体の同定

①Dゲノム染色体にはチガヤゲノムを速やかに排除する遺伝子と共に半数性胚を成長させる遺伝子が存在していると予測されたので、これら遺伝子がDゲノムのどの染色体に存在するかを、マカロニコムギのAまたはBゲノム染色体をタルホコムギのDゲノム染色体と置換した系統 (染色体置換系統) にチガヤを交雑し、半数体を得られるかどうか調査した。

(3) 染色体消失の分子細胞学的解析

①コムギのCENH3の抗体を作製し、受精後の初期胚に対してセントロメアの活性を免疫蛍光抗体法で調べた。

②ヒストン修飾抗体を用いた免疫染色法や、抗メチル化シトシン抗体を使ったFISHにより、チガヤ染色体と他ゲノムとの混在にともなうエピジェネティックな変化を調べた。

(4) コルヒチン直接処理による半数性胚の染色体倍加

直接穂軸にコルヒチン溶液を注入して (*in planta*) 半数性未熟胚で倍加させるための、コルヒチンの濃度や処理時期を検討した。

(5) ダブルハプロイドにおけるライ由来およびDゲノム染色体の同定

チガヤ法によりライコムギとパンコムギの雑種 (AABBDR) から得られたダブルハプロイドの中で、病虫害抵抗性や乾燥耐性をもつ優良個体を選び、RおよびDゲノム染色体をFISH法で同定した。

4. 研究成果

(1) ムギ類における半数体出現機構を制御するゲノムの探索

チガヤの花粉によるムギ類の半数体出現機構を制御するゲノムを探索した。2倍性コムギ3種 (ゲノム構成=AA: *Triticum boeoticum*、*T. urartu*、*T. monococcum*)、4倍性コムギ2種 (AABB: *T. dicoccoides*、*T. durum*)、タルホコムギ (DD: *Aegilops tauschii*)、*Ae. speltoides* (SS)、ライムギ (RR)、オオムギ (HH)、カラスムギ、イネに対してチガヤの花粉をかけ、受粉後の半数性胚形成過程を観察すると共に、約2週間後の半数性胚の形成率を調べたところ、タルホコムギでは半数性胚が成長しており (図1)、胚救助により半数体植物が得られた。*T. durum* では胚が形成されていたが、途中で成長が止まっていた。

一方、*T. dicoccoides* では胚は全く見られなかった。それ以外の種では全く胚は形成されなかったことから、ムギ類ではチガヤとの

交雑において、D ゲノム染色体が半数性胚形成およびその胚の成長に深く関与していることが明らかになった。したがって、D ゲノム染色体にはチガヤゲノムを速やかに排除する遺伝子と共に半数性胚を成長させる遺伝子が存在すると予測した。

タルホコムギの半数体植物は世界で初めての報告である (図 2)。半数体であることはセントロメアプローブ等を用いた FISH 法で証明した (図 3)。

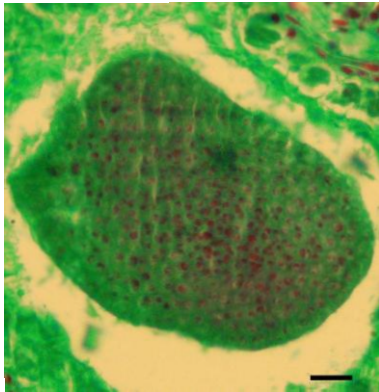


図 1. タルホコムギ x チガヤ (受粉 10 日後の胚)



図 2. タルホコムギ半数体の穂 (左) 右側の穂は正常の 2 倍体

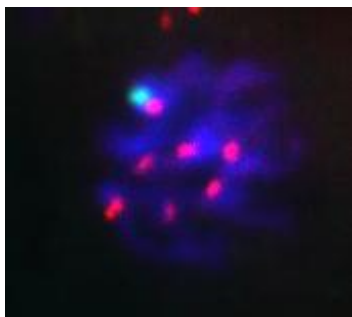


図 3. タルホコムギ半数体の FISH 解析
赤のシグナルはセントロメア DNA 配列 (染色体数が 7 本であることを証明)、緑のシグナルは rDNA 配列 (5D 染色体を示す)

(2) 半数体出現機構を制御する遺伝子は D ゲノムのどの染色体に存在するか

マカロニコムギ (Ldn) の A または B ゲノム染色体をタルホコムギの D ゲノムの同祖染色体と置換した 11 系統 (染色体置換系統) にチガヤを交雑し、受粉後一定時間ごとに子房を固定し、初期発生から 2 週間後までの半数性胚の形成率を解剖学的あるいは細胞組織学的に調べた。その結果、2 週間後の種子において胚解剖により胚の有無を確認したところ、Ldn7D(7A)、Ldn1D(1B)、Ldn7D(7B) で胚が形成されていた (図 4)。また、パラフィン切片による種子での胚形成は Ldn2D(2A)、Ldn7D(7A)、Ldn1D(1B)、Ldn5D(5B)、Ldn7D(7B) で見られた (図 5)。したがって、7D 染色体にはチガヤゲノムを速やかに排除する遺伝子と半数性胚を成長させる遺伝子の両方が座乗していることがわかった。また 1D、2D、5D 染色体も半数体形成に関与していることが明らかになった。



図 4. Ldn7D(7B) x チガヤ (13 日後) の胚

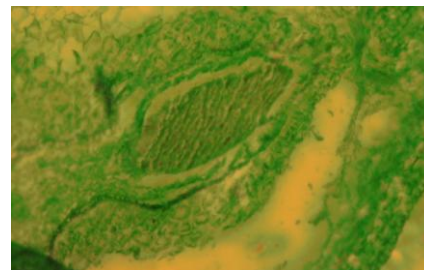


図 5. Ldn7D(7A) x チガヤ (14 日後) の胚

7D 染色体の半数体誘発遺伝子をマカロニコムギに導入することで、4 倍性コムギや 6 倍性ライコムギにおいてもチガヤ法で半数体育種が可能となり、本研究成果はダブルハプロイド法による品種改良に大きく貢献すると思われる。

(3) 染色体消失の分子細胞学的解析

染色体の消失は、受精後の第 1 分裂以降で起こっており、染色体消失とセントロメア不活性化との関連を調べたが、チガヤ CENH3 の十分な抗体を作製することができなかつたので、明瞭な結果を得ることができなかつた。

これまでの研究から、コムギとの雑種胚に

おけるチガヤ染色体の消失は、ヘテロクロマチン化が原因ではないかと考えられるので、受精後の初期胚に対して既知のヒストン修飾（メチル化およびアセチル化）の抗体を用いて、免疫染色法により調べ、さらに、DNAのメチル化についても抗メチル化シトシン抗体を使った FISH 法で染色体上に可視化した。その結果、初期胚の細胞分裂においてチガヤ染色体は、ヘテロクロマチン化して凝縮するなど、エピジェネティックな変化がみられた。

(4) コルヒチン直接処理による半数性胚の染色体倍加

半数性胚に対してコルヒチン直接処理による染色体倍加の実験では、ほとんどの場合、コルヒチンを処理することで、胚が致死となった。交雑後4日目の穂に500 ppmのコルヒチンを処理することにより染色体の倍加が一例(1/728)だけ見られたが、再現性を確認することができなかった。

(5) ダブルハプロイドにおけるライ由来およびDゲノム染色体の同定

ライコムギとパンコムギの雑種(AABBDR)後代から得られたダブルハプロイド系統はDゲノム染色体の一部がライムギ染色体と置換しており、しかもホモに固定されていたので、チガヤ染色体脱落に関与するDゲノム染色体を推定することができた。

いずれの系統も2Dおよび7D染色体をもっていたが、他のDゲノム染色体はライムギ染色体と置換することが可能であった。マカロニコムギのDゲノム染色体置換系統の解剖学的あるいは細胞組織学的研究からも支持されたように、2Dと7D染色体が染色体脱落およびその後の胚の成長に深く関与していることが明らかになった。

本研究は、コムギ育種の省力化のために役立つと共に、チガヤという雑草の利用による環境に優しい、新規の育種技術の発展につながった。その成果は、食糧問題の解決に向けて遺伝子組み換えによらない持続型農業に貢献する。

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0件)

[学会発表] (計3件)

- ① 向井 康比己、Recent advance in *Aegilops tauschii* chromosome research、第4回アジア染色体コロキウム(招待講演)、2010年10月12日、Fragrant Hill Empark Hotel (北京、中国)

- ② 向井 康比己、Recent trends in *Aegilops tauschii* chromosome research、Archana Sharma Memorial Lecture 2011(招待講演)、2011年12月27日、コルカタ大学(インド)

- ③ 向井 康比己、Recent trends in chromosome botany from microscope to molecule、第100回インド科学者会議(招待講演)、2013年1月5日、コルカタ大学(インド)

[図書] (計1件)

- ① 福井 希一、向井 康比己、佐藤 和広、朝倉書店、植物の遺伝と育種第2版、2013、238

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 康比己 (MUKAI YASUHIKO)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号：30110795

(2) 研究分担者

鈴木 剛 (SUZUKI GO)
大阪教育大学・教育学部・准教授
研究者番号：10314444

(3) 連携研究者

()

研究者番号：