

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18639

研究課題名(和文)コムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子のゲノム領域に見られる構造変異の解明

研究課題名(英文) Genomic structure of the QTL region for wheat yellow mosaic virus resistance

研究代表者

小林 史典 (Kobayashi, Fuminori)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・主任研究員

研究者番号：80584086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コムギ縞萎縮病は、コムギ縞萎縮ウイルスを病原とする土壌伝染性の病害である。北海道の超強力コムギ品種「ゆめちから」が保有する抵抗性遺伝子Q.Ymymは2D染色体に座乗し、本病に対して高度な抵抗性を示す。先行研究から、Q.Ymym領域は遺伝的組換えが起きにくく、何らかの構造変異があると推察された。本研究では、Q.Ymym領域に由来するゲノム断片の取得に成功し、配列の特殊性を明らかにした。このことが組換えを起きにくくしている原因の一つであると考えられた。また得られた知見をもとに共優性マーカーを開発し、Q.Ymym遺伝子の選抜・導入の効率化を図ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、「ゆめちから」以外の抵抗性品種でもQ.Ymymと同じ領域に抵抗性遺伝子が検出されてきた。2D染色体上の当該領域は何らかの構造的な特徴があると示唆されてきたが、本研究によってその一端を明らかにすることができた。当該領域の配列は、コムギの参照ゲノム配列と大きく異なり、コムギの進化を考える上でも極めて興味深い。

これまでQ.Ymym遺伝子の選抜・導入には、強連鎖する複数の優性マーカーを使ってきたが、本研究では共優性マーカーの開発に成功した。これにより抵抗性育種の効率化が図れるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Yellow mosaic disease, caused by wheat yellow mosaic virus (WYMV), is one of the most serious diseases of winter wheat in Japan and China. A single major QTL for WYMV resistance in Japanese wheat variety 'Yumechikara', designated Q.Ymym, has been mapped on chromosome 2D. Mapping analysis of Q.Ymym previously indicated that 31 markers tightly linked to the QTL, suggesting that strong linkage block surrounded the Q.Ymym region. In this study, the sequencing of partial or full length genes within the Q.Ymym region was performed. The sequence features of the Q.Ymym region were unique in comparison to reference sequences, which may have led to the low recombination rate within the block. The unique sequence structure of the Q.Ymym region allowed the development of co-dominant markers for use in marker-assisted selection.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：コムギ コムギ縞萎縮病 抵抗性遺伝子 2D染色体 ゲノム配列

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コムギ縞萎縮病は、コムギ縞萎縮ウイルス (Wheat yellow mosaic virus ; WYMV) を病原とする土壌伝染性の病害である。本病は、九州から本州で古くからの発生報告があったが、北海道では平成3年に初めて発生が確認され、抵抗性を持たない優良コムギ品種「ホクシン」の普及に伴い被害が拡大した。コムギの主要産地である北海道では、本病により毎年約36%減収しており(被害額約25億円)近年では全国各地でも被害が報告されている。縞萎縮病に対する実用的な防除薬剤はないため、各地に適応した抵抗性品種の早急な育成が求められている。国内の小麦生産に深刻な被害をもたらす縞萎縮病の研究は、食糧安全保障の観点からもその重要性は極めて高く、現在様々な研究プロジェクトにおいて喫緊の課題として位置付けられている。縞萎縮病の研究は、被害が出ている日本と中国で行われている。これまでにコムギの2D、3B、4D、5A、7B染色体上に抵抗性遺伝子が検出されたが(Liu et al. 2005; Nishio et al. 2010; Zhu et al. 2012; Suzuki et al. 2015; Kojima et al. 2015)、実体解明には至っていない。

国内のコムギ縞萎縮病は、I型(岩手県南部~福岡県)、II型(岩手県以北)、III型(福岡県)に分類される。オランダ由来のコムギ品種「Ibis」はII型とIII型に対して、北海道の超強力品種「ゆめちから」はI型とII型に対して、それぞれ高度な抵抗性を示す。「Ibis」と「ゆめちから」は、2D染色体長腕の末端部に極めて効果の大きい抵抗性遺伝子(*Ym1b*, *Q.Ymym*)をそれぞれ保有する(Nisshio et al. 2010; Kojima et al. 2015)。*Ym1b*と*Q.Ymym*は、その座乗位置から、対立遺伝子あるいは近接した異なる遺伝子であると予想されるが、不明である。

*Ym1b*および*Q.Ymym*領域の調査から、1)当該領域には31個のDNAマーカーが同座にマップされ、遺伝的な組換えが起きにくい、2)抵抗性品種で欠失している遺伝子配列(TNAC3152)がある、3)TNAC3152はRNA合成酵素のメディエーター(ウイルスの増殖にも関与?)をコードする、という知見が得られた。このことから、「Ibis」と「ゆめちから」の両品種において、*Ym1b/Q.Ymym*領域のTNAC3152に欠失があり、それとウイルス抵抗性との関係が推察された。しかし、この領域の構造変異の全容解明には至っておらず、TNAC3152が*Ym1b*あるいは*Q.Ymym*の実体であるかどうか明らかになっていない。このゲノム領域の構造変異を解明することで、抵抗性遺伝子の実体に迫る大きな足掛かりを得ることができる。

2. 研究の目的

(1)「ゆめちから」におけるTNAC3152の構造変異を明らかにする。また、他の遺伝子配列由来のマーカーについても欠失の有無等を調査し、抵抗性品種と罹病性品種でのゲノム構造の変異を明らかにする。

(2)欠失遺伝子について、当該遺伝子のコムギ欠失突然変異体を選抜して形質調査を行い、欠失遺伝子と抵抗性/罹病性との関連を調査する。

(3)ゲノムの変異を利用して、抵抗性遺伝子を効率的に導入するためのDNAマーカーを開発する。また、育成系譜上の品種や近縁野生種を使って、構造変異の由来を探索する。

3. 研究の方法

(1)コムギゲノム配列情報を使って、*Q.Ymym*領域の物理地図および2D特異的なDNAマーカーを作製した。また「ゆめちから」の*Q.Ymym*領域に由来するDNA配列断片を取得し、罹病性品種との比較から、当該領域の特徴を調査した。

(2)TNAC3152が欠失した突然変異体を取得し、I型汚染圃場にて抵抗性試験を行った。

(3)「ゆめちから」で見られた配列の特異性を利用してDNAマーカーを開発した。これを使って、Dゲノムの祖先野生種であるタルホコムギ(219系統)の多型調査を行った。

4. 研究成果

(1)コムギ標準品種「Chinese Spring(CS)」のゲノム情報(IWGSC RefSeq v1.0; IWGSC 2018)を利用して、まず「ゆめちから」の*Q.Ymym*座と同座にマップされている31個の連鎖マーカーの位置関係を明らかにした。その結果から*Q.Ymym*領域のゲノムサイズを推定したところ、およそ43Mbに渡る領域であることがわかった。次に、これらのマーカーの座乗領域についてゲノム配列情報を取得し、43Mb領域内の25カ所を特異的に増幅するPCRプライマーを設計した。抵抗性品種群(ゆめちから、Ibis、Jaggerなど)、罹病性品種群(きたほなみ、Munstertaler、タマイズミなど)、CSを用いたPCR解析の結果、18個のマーカーについて罹病性品種群においてはPCR断片の増幅が確認されたが、抵抗性品種群では増幅は確認されなかった。その他のマーカーにおいては、抵抗性品種群と罹病性の「Munstertaler」で増幅が見られなかったもの(3マーカー)、抵抗性品種群と罹病性の「タマイズミ」で増幅がみられないもの(2マーカー)、「ゆめちから」と*Q.Ymym*の由来元と考えられる「KS831957」で増幅が見られないもの(1マーカー)、全ての品種で増幅が見られたもの(1マーカー)であった。全品種で増幅が確認されたマーカー(*WYMV2D-1*)について、PCR産物の配列調査を行った。その結果、罹病性品種群の配列はCSと

完全一致したが、抵抗性品種群では欠失・挿入、塩基置換などの多型が散在していた。この多型を利用して、「ゆめちから」を材料にして *WYMV2D-1* から下流約 3kb の DNA 断片を単離し、その配列情報を取得した。その結果、得られた断片には TNAC3152 が含まれ、「ゆめちから」の TNAC3152 は欠失していないことがわかった。CS のゲノム情報と比較したところ、「ゆめちから」由来の当該遺伝子は、第 1 エクソンまでは CS の 2D 遺伝子と 94% の相同性を示し、第 2 エクソン以降終始コドンまでは 2B 染色体上の同祖遺伝子と 99% 以上の類似性を示すキメラ状態であることが判明した。また第 4 イントロン内には、コムギゲノム中に多数散在する約 400bp の配列の挿入が見つかった。このことから、「ゆめちから」の同遺伝子は特殊な構造を持つことが明らかとなった。さらに、2D 特異的 PCR マーカーのプライマー配列上にも多型があり、このことが PCR 産物の増幅が見られなかった理由と考えられた。*Q. Ymym* 領域のゲノム構造のさらなる調査のために、シーケンスキャプチャー法によって取得された「ゆめちから」の NGS リード (Ishikawa et al. 2018) を用いて、*Q. Ymym* 領域に由来するゲノム配列を構築した。その結果、「ゆめちから」の 2D 染色体上の 5 箇所について、ゲノム配列断片 (それぞれ約 1.1~4.8kb) の構築に成功した。これらを、CS の 2D 染色体の参照ゲノム配列 (RefSeq v1.0) と比較したところ、それぞれ 85~97% の相同性を示した。また TNAC3152 同様に、2D 特異的 PCR マーカーのプライマー配列上にも多型が見られた。以上の解析から、「ゆめちから」の *Q. Ymym* 領域は CS や罹病性品種と比べて特殊なゲノム配列を持つことが示された。このことが、抵抗性品種で 2D 特異的 PCR マーカーが増幅しなかった原因であり、さらには遺伝的組換えを起きにくくしている要因の一つであるとも考えられた。

(2) 罹病性の「きたほなみ」より作出された突然変異体集団より、TNAC3152 が欠失した系統を選抜した。縞萎縮病 I 型ウイルス汚染圃場での栽培試験を行った結果、TNAC3152 欠失変異体は抵抗性を示さなかった。ゲノム配列の調査から「ゆめちから」にも TNAC3152 は存在しており、TNAC3152 の欠失による抵抗性の発揮という当初の予想は否定された。

(3) 得られたゲノム配列と CS との比較から「ゆめちから」型と CS 型を識別できる DNA マーカーを開発し、他の抵抗性品種や罹病性品種で多型調査を行った。その結果、抵抗性品種は「ゆめちから」型、罹病性品種は CS 型を示し、抵抗性品種は「ゆめちから」と同様のゲノム配列を持つことが示唆された。また、開発した DNA マーカーのうち、TNAC1216CD と TNAC3149CD は共優性マーカーであり、*Q. Ymym* 遺伝子の導入・選抜における有用性が確認できた。*Q. Ymym* 領域の特殊性の由来を調査するために、以上の DNA マーカーを用いて D ゲノムの祖先種であるタルホコムギについて多型調査を行った。その結果、調査に供試した 219 系統の中に「ゆめちから」と同じ多型パターンを示す系統はなかった。今回供試できなかった系統、あるいは他のエギロプス属種に由来している可能性もあり、*Q. Ymym* 領域の由来の解明にはさらなる調査が必要である。

< 引用文献 >

- Ishikawa et al. (2018) DNA Research 25:317-326
IWGSC (2018) Science 361:eaar7191
Kojima et al. (2015) Plant Breed 134:373-378
Liu et al. (2005) Theor Appl Genet 111:651-657
Nishio et al. (2010) Euphytica 176:223-229
Suzuki et al. (2015) Theor Appl Genet 128:1569-1578
Zhu et al. (2012) Theor Appl Genet 124:177-188

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kobayashi F et al., Characterization of the *Q. Ymym* region on wheat chromosome 2D associated with *wheat yellow mosaic virus* resistance, Plant Breeding (submitted)

[学会発表] (計 4 件)

小島久代、小林史典、石川吾郎、藤田雅也、乙部千雅子、藤郷誠、高山敏之、松中仁、中村俊樹、コムギ 2D 染色体上で強連鎖するコムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子と高活性型 PPO の組換え系統の選抜と評価、日本育種学会第 135 回講演会、2019

小林史典、小島久代、石川吾郎、齋藤美香、高山敏之、藤郷誠、乙部千雅子、松中仁、藤田雅也、中村俊樹、コムギ 2D 染色体上の縞萎縮病抵抗性遺伝子 *Ymym* のゲノム構造の解析、日本育種学会第 134 回講演会、2018

小林史典、コムギ突然変異体集団の使い方、第 12 回ムギ類研究会、2017

小林史典、小島久代、中村俊樹、コムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子単離に向けた研究、平成 28 年度作物試験研究推進会議冬作物技術研究会、2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。