

平成21年8月11日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17201045
 研究課題名（和文） コムギ近縁野生種を用いたユーラシア広域分布種の遺伝的多様性解析
 研究課題名（英文） Analysis of genetic diversity in plants with wide distribution in Eurasia by using wild relatives of wheat
 研究代表者
 河原 太八（KAWAHARA TAIHACHI）
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：20115827

研究成果の概要：トルコから中国西部にかけて、ユーラシア大陸内陸部に広域く分布するタルホコムギ (*Aegilops tauschii*) について、種内の葉緑体塩基配列・穂の形態・開花までの日数などについて変異を明らかにした。解析の結果同じような気候条件に対し、分布の東と西で違う遺伝子の変異によって適応していることが分かったので、これらの遺伝子について塩基配列を決定しその変異を明らかにした。また乾燥に応答する遺伝子など、そのほかいくつかの遺伝子の変異を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2006年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：遺伝的多様性，ユーラシア広域分布種，コムギ近縁野生種，葉緑体ゲノム，マイクロサテライト，適応的形質，出穂反応性，タルホコムギ

1. 研究開始当初の背景

ある植物種が全体としてどの程度の遺伝的変異を保有しているかは、資源保存の観点から重要な問題である。しかし種の分布が広範囲にわたる場合、サンプリングに大きな問題があり未解決のままである。スギ・ブナなど日本列島に分布する一部の限られた種については、分子レベルでの多様性解析も始められていたが、ユーラシア大陸に広く分布するような植物については、ほとんど研究がなかった。ところで、栽培植物の近縁野生種を利用すれば、これまでに蓄積された研究手法・研究材料がそのまま利用できるため、ユーラシア広域分布種についても、そのような問いに

答えることが可能である。

タルホコムギ (*Aegilops tauschii*) はユーラシアに広く分布するコムギ近縁野生種で、人類の食糧として重要な穀類であるパンコムギの祖先種の一つである。栽培植物の近縁野生種は、1920年代のロシアのバビロフの研究・収集活動を初めとして、多くの国で研究・収集の対象となり、それらのほとんどは現在もなお生きた系統として保存されており、様々な研究に利用可能である。ところで従来こうした種では、栽培植物を改良する場合の新規遺伝子の供給源と言う観点からの研究が多く、野生種としてそれ自体の変異の大きさが明らかにされることはほとんど無かった。

この種については、これまで種子タンパクのグルテニン遺伝子の変異が多く研究されてきた。このほかドイツのグループが核のマイクロサテライト部位 (SSR 部位) で、また米国では DNA の制限酵素断片長を使って変異を調査しているが、いずれもパンコムギの D ゲノム親の同定という限られた視点からの研究である。またロシアの Dudnikov らは自然集団でのアイソザイム変異を研究しているが、ロシア国内の集団に限られていた。

このように従来の研究は、扱う系統もさまざまに相互の関連性が欠けているので、本研究は最初の多面的な変異解析を目指した。またタルホコムギは栽培のパンコムギの D ゲノム親であり、今回の解析はパンコムギの有用遺伝子の探索という実用面にもすぐに応用可能である。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、タルホコムギを対象とすることにより、① 分布全域での分子レベルでの多様性を明らかにする、② これに基づいて調査系統を絞り込むことにより、形態形質や出穂性・播性などの生理的形質を詳しく解析する、③ これら適応に重要と考えられる形質と地理的分布の関係を明らかにする、という3点を目的とする。また本研究は、従来個別に行われてきた変異の解析を統一的に評価することも視野に入れており、研究成果のデータベース化と研究材料の公開を目指す。

(2) なおタルホコムギは、西アジアのトルコから中央アジアを経て中国西北部まで広く分布するイネ科の一年生植物で、広域分布種の一つのモデルとして扱うことが可能である。そのため、パンコムギで開発された様々な研究手法をこの種に適用し、分類群の異なる他の野生種でも同様に応用できるかという可能性も検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の入手：調査の結果、全世界でタルホコムギ約 1,200 系統が保存されていることを確認し、海外の主要ジーンバンクよりそのなかで研究に必要な約 500 系統の分譲を受けた。また研究代表者が所属する研究室(京都大学農学研究科栽培植物起源学分野)では、約 220 系統を保存しており、合計 720 系統を研究対象とした。

(2) 系統の栽培、DNA 抽出：対象系統はジーンバンクの保存系統であり、採集地点が国レベルでしか分かっていないものや重複系統、場合によって種の同定の誤りなどがあるため、720 系統より重複を避け採集地点がある程度絞り込める、約 450 系統を選んだ。これらを

17年と18年の秋に、宅見・松岡・河原が分担し、神戸・福井・京都で栽培した。幼葉から DNA を抽出すると共に、袋かけを行い自殖種子を得た。また簡単な形質調査を行い、収集データと照らし合わせ、重点的に解析を進める 210 系統を選抜した。これらの系統は分布全域をカバーするもので、全体の変異をほぼ代表するものと考えられる。

(3) 葉緑体塩基配列変異の解析：パンコムギでの研究を参考に、葉緑体ゲノムのマイクロサテライト・SNP 座位にみられる塩基配列の変異を主対象とし、解析した。また、葉緑体 DNA 変異を用いて、タルホコムギの種内系統分化のプロセスを、系統的に解析する手法を開発し、成果を論文として公表した。またタルホコムギ以外のコムギ近縁種を対象として、同じような手法が使えるかどうかの検討を行った。また核ゲノムについては、ゲノム特異的な PCR 増幅断片の探索と、それを利用した変異の解析を試みた。

(4) 形態形質の調査：これまでタルホコムギで、種内分類の基準として取り上げられてきた形質を中心として、穂の形態を詳細に計測した。

(5) 生理・生態的形質の調査：コアとなる 210 系統を対象に、神戸と福井でそれぞれ複数回栽培し、出穂日を記録した。また京都では加温温室内・全日長での出穂日を調査し、春播き性か秋播き性かの判定をした。

(6) 核遺伝子塩基配列の決定：いくつかの主動遺伝子について、種内での変異の大きさを知るために、複数の系統を対象として塩基配列情報を決定した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体塩基配列変異の解析

タルホコムギの種内分化のプロセスを、分子マーカーを用いて解析する方法を開発することを目的に各種実験を行なった。具体的には、葉緑体 DNA のマイクロサテライト・SNP 座位にみられる塩基配列の変異を主な対象とし、栽培種のパンコムギで開発された手法をもとに各種実験条件の最適化を行って、解析した。またこのデータに基づき、葉緑体 DNA 変異を用いて、タルホコムギの種内系統分化のプロセスを、系統的に解析する手法を開発した。

次にコアとなる 210 系統について、マイクロサテライト座を含む葉緑体の 20 領域について塩基配列を読み取り、変異を調査した。その結果、全体が 10 のグループに分かれ、多くの系統がそのうちの 3 つに属した。また 3

つの主要グループに属する系統の分布域には違いがあることが、明らかになった。さらに残りの 240 系統についても変異解析を終了したが、これについては現在取りまとめを進めているところである。

またタルホコムギの近縁種であるコムギ・エギロプス属の他の種でも、同様な解析を行い、この手法がこの属内で広く利用できることを確認した。核ゲノムについては、ゲノム特異的な PCR 増幅断片の探索と、それを利用した変異の解析を試みた。どちらも場合も効率よく変異の解析を行うことが出来たので、それらの結果について学会発表を行った。

(2) 形態形質の調査

タルホコムギの種内多様化のメカニズムを研究するための効率的な手法を開発する目的で、小穂形態変異を例にとり、その地理的及び系譜的構造についての解析を行なった。210 系統を共通圃場実験に供して得た小穂形態データと葉緑体 DNA ハプロタイプデータを用いた数量分類解析を行ない、① タルホコムギの 2 つの亜種 (*tauschii* 亜種と *strangulata* 亜種) は、小穂形態により区別可能であること、② *tauschii* 亜種については、分布域東部の集団で小穂が小型化する傾向があること、を明らかとした。③ また *strangulata* 亜種は、特定の葉緑体ハプログループにおいて成立した亜種であることも明らかとなった。これらの結果から、タルホコムギが起原地であるトランスコーカサスから中国西部に分布域を拡げる過程で、どのように小穂形態を多様化させてきたのかについて、その全体像を考察し、論文を発表した。

さらに、タルホコムギ近縁のいくつかの種について、同じように小穂形態変異の解析を行った。

(3) 生理・生態的形質の調査

タルホコムギにおいて出穂開花時期に幅広い変異が認められたので、210 系統の開花日数変異データと各系統の採集地点の気候データを使い、開花日数変異に影響を及ぼしている環境要因の推定を試みた。重回帰分析を行なったところ、タルホコムギの分布域の東部 (トルクメニスタン以東) では、冬期気温が開花日数変異に大きく影響していることが分かった。これに対し分布域の西部 (トルクメニスタン以西) では、日長が開花日数変異に影響する主要因のひとつと推定された。これらの結果から、タルホコムギの開花日数変異は、分布域の東部と西部で異なる遺伝的メカニズム、つまり東では春化要求性の違い、西では日長感応性を違いによって、成立したと考えられる。

なお、同 210 系統について連続日長下で播種の調査を行なったところ、ほとんどの系統

は秋播であったが、数系統の春播極早生の系統見いだすなど、多様な変異を確認した。

同様に乾燥耐性にも幅広い変異が認められた。この乾燥耐性の変異には ABA への感受性の関与が示唆されるので、乾燥と ABA の両方に応答する転写因子 *WDREB2* と *WDBF1* をコードする 2 つの遺伝子、及びその下流に位置する遺伝子 *Wcor615* についてタルホコムギのゲノム配列を単離し、その構造を決定した。分布域を網羅する 30 系統のタルホコムギについて、これら 3 遺伝子座の塩基配列を決定したところ、下記に述べる *Vrn-1* 座の塩基配列で作成した系統樹とは異なった種内分化パターンを示した。このことから、対象とする遺伝子によってタルホコムギの種内分化は、異なったパターンを示すことが明らかになった。

(4) 核遺伝子塩基配列の決定

タルホコムギの出穂開花時期の幅広い変異について、栽培種であるパンコムギと同様に、春化要求性と日長感応性に多様性があることが期待される。そこでこの二つの形質について約 100 系統に絞り込んで比較した。また、パンコムギやオオムギでそれぞれの形質の主働遺伝子であることがわかっている *Vrn-D1* 座と *Ppd-D1* 座のタルホコムギゲノムでの塩基配列を、複数の系統を用いて決定した。

その結果、タルホコムギでは春播き性パンコムギと同様に *Vrn-D1* 座の第 1 イントロンに大きな欠失を持ち、春化要求性を失っているものが、パキスタン及びアフガニスタンの系統に認められた。しかし、圃場における出穂開花の多様性をこの春化要求性の有無で説明することはできなかった。一方、日長感応性についても約 20 系統のタルホコムギを用いて調べたところ、日長感応性が低下している系統がタジキスタン、アフガニスタン、パキスタンにいくつか認められたが、エキソン及びイントロン領域で日長感応性の差異を説明できる変異は認められなかった。

今後は様々な条件下で、二つの遺伝子の発現量を比較し、開花調節のメカニズムを解明する予定であるが、これらの詳細な解析には別の独立したプロジェクトが必要であろう。

(5) 研究の取りまとめ

平成 20 年度末まで、様々な実験や解析を行ったため、一部生データののままの部分もあり、全体の取りまとめは完了してないが、順次成果を公表してゆく予定である。なお、研究成果のデータベース化と研究材料の公開についても、残念ながら取りまとめの終了後になる。

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10件)

① Matsuoka, Y., E. Nishioka, T. Kawahara and S. Takumi, Genealogical analysis of subspecies divergence and spikelet-shape diversification in central Eurasian wild wheat *Aegilops tauschii* Coss. *Plant Syst. Evol.* 279, 233-244, (2009), 査読有

② Matsuoka, Y., S. Takumi and T. Kawahara, Flowering time diversification and dispersal in Central Eurasian wild wheat *Aegilops tauschii* Coss.: Genealogical and Ecological Framework. *PLoS ONE* 3(9): e3138. doi:10.1371/journal.pone.0003138, (2008), 査読有

③ Matsuoka, Y., S. Takumi and T. Kawahara, Natural variation for fertile triploid F1 hybrid formation in allohexaploid wheat speciation. *Theor. Appl. Genet.* 115. 509-518, (2007), 査読有

④ 宅見 薫雄, 「コムギ倍数化の遺伝機構: 再現系を用いた解析」, *生物の科学 遺伝*, 別冊 No. 21, 153-156, (2007), 査読無

⑤ 松岡 由浩, 「栽培植物進化遺伝学への招待」, *細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 「植物の進化」*, 別冊 23, 136-143, (2007), 査読無

⑥ 宅見 薫雄, コムギの栽培化とパンコムギの成立: 種内分化と異質倍数化による多様性, *蛋白質核酸酵素*, 52, 1947-1952, (2007), 査読無

⑦ Dudnikov, A. J. and T. Kawahara, *Aegilops tauschii*: genetic variation in Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 53, 579-586, (2006), 査読有

⑧ Ishii, T., S. Arimura, N. Ikeda, O. Kamijima, and N. Mori, Mitochondrial microsatellite variability in common wheat and its ancestral species. *Genes and Genetic Systems* 81, 211-214, (2006), 査読有

⑨ Yamane, K., K. Yano, and T. Kawahara, Pattern and rate of indel evolution inferred from whole chloroplast intergenic regions in Sugarcane, Maize and Rice. *DNA Research* 13, 197-204, (2006), 査読有

⑩ Matsuoka, Y., N. Mori and T. Kawahara, Genealogical use of chloroplast DNA variation for intraspecific studies of *Aegilops tauschii* Coss. *Theor. Appl. Genet.* 111, 265-271, (2005), 査読有

[学会発表] (計20件)

① 松岡由浩, 「パンコムギの起源」の再検討 - フィールド調査・多様性解析・QTL, 第3回ムギ類研究会, 岡山大学資源生物科学研究所, 2008年12月6日

② 中村準・宅見薫雄, タルホコムギにおける出穂の低温要求性に関する自然変異, 日本育種学会, 滋賀県立大学, 2008年10月11日

③ 太田敦士・山口裕文・河原太八・山根京子, コムギ・エギロプス属 *Sitopsis* 節 *Emarginata* 亜節にみられる穂の形態的変異と地理的分布, 日本育種学会, 滋賀県立大学, 2008年10月11日

④ 奥村ゆりか・宅見薫雄, タルホコムギの日長反応性変異と関連遺伝子の発現解析, 日本育種学会, 滋賀県立大学, 2008年10月11日

⑤ Kawahara, T., K. Yamane and T. Imai, Phylogenetic relationships among *Aegilops-Triticum* species based on sequence data of chloroplast DNA. *Proceedings of the 11th Int. Wheat Genet. Symp.*, P076, Sydney University Press, August 25, 2008

⑥ Takumi, S., N. Mizuno, Y. Okumura, T. Kawahara and Y. Matsuoka, Two major lineages of *Aegilops tauschii* Coss. revealed by nuclear DNA variation analysis. *Proceedings of the 11th Int. Wheat Genet. Symp.*, P050, Sydney University Press, August 25, 2008

⑦ 松岡由浩・宅見薫雄・河原太八, ユーラシア広域分布種タルホコムギの開花変異と系統地理, 日本進化学会, 東京大学, 2008年8月23日

⑧ 笹沼恒男・廉隅紗代・山際宏昭・河原太八, Uゲノム特異的PCR増幅断片U31の塩基多型に基づく四倍性エギロプスにおけるUゲノムの多起源性, 日本育種学会, 明治大学, 2008年3月28日

⑨ 河原太八, コムギおよびその近縁種の分類と系統進化, 日本育種学会シンポジウム「Triticeae Breeding - ムギ類育種の展望と基礎」, 山形大学, 2007年9月22日

⑩ 宅見薫雄, 祖先野生種タルホコムギの種内多様性とその育種的利用に向けて, 日本育種学会シンポジウム「Triticeae Breeding - ムギ類育種の展望と基礎」, 山形大学, 2007年9月22日

⑪ 笹沼恒男・田村忠彦・河原太八, コムギ近縁野生種 *Aegilops umbellulata* における春化要求性と *Vrn* 遺伝子との関係, 日本育種学会, 山形大学, 2007年9月21日

⑫ 松岡由浩・宅見薫雄・河原太八, タルホコムギの開花変異について, 日本遺伝学会, 岡山大学, 2007年9月20日

⑬ 宅見薫雄・広瀬志津子・松岡由浩, コムギDゲノム特異的CBF低温誘導性転写因子 *WCBF2* の分子集団遺伝学的解析, 日本遺伝学会, 岡山大学, 2007年9月20日

⑭ 奥村ゆりか・松岡由浩・村井耕二・宅見薫雄, タルホコムギ *Ppd-H1* 相同遺伝子の構造及び発現解析, 日本育種学会, 茨城大学, 2007年3月31日

⑮ 笹沼恒男・山際宏昭・河原太八・笹隈哲夫, 核遺伝子の塩基配列に基づくUSゲノムをもつエギロプス属四倍性種の多起源性, 日本育種学会, 茨城大学, 2007年3月31日

⑯ Takumi, S., Y. Okumura, K. Murai and Y. Matsuoka, Natural variation of two major loci controlling wheat heading date in a wild, diploid wheat relative. *Plant & Animal Genome XV*, San Diego, January 15, 2007

⑰ 宅見薫雄・奥村ゆりか・村井耕二・松岡由浩, 2倍体祖先野生種にみられるパンコムギで出穂性を決める2つの主働遺伝子の自然変異, 日本分子生物学会, 名古屋, 2006年12月7日

⑱ 山際宏昭・笹沼恒男・河原太八・笹隈哲夫, USゲノムを持つエギロプス四倍性種のSゲノムの系統解析, 日本育種学会, 愛媛大学, 2006年9月23日

⑲ 宅見薫雄・藤原健祐・小林史典・村井耕二・松岡由浩, *Vrn-1* 遺伝子座の構造多型からみたタルホコムギの種内分化, 日本育種学会, 愛媛大学, 2006年9月23日

⑳ 松岡由浩・宅見薫雄, 栽培植物の遺伝学: 雑種形成・倍数性進化・多様性, 日本遺伝学会ワークショップ「栽培植物の遺伝学: 雑種形成・倍数性進化・多様性」, つくば国際会議場, 2006年9月26日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 太八 (KAWAHARA TAIHACHI)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 20115827

(2) 研究分担者

安井 康夫 (YASUI YASUO)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号: 70293917

宅見 薫雄 (TAKUMI SHIGEO)
神戸大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 50249166

松岡 由浩 (MATSUOKA YOSHIHIRO)
福井県立大学・生物資源学部・講師
研究者番号: 80264688

森 直樹 (MORI NAOKI)
神戸大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 80230075

山根 京子 (YAMANE KYOUKO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 00405359

笹沼 恒男 (SASANUMA TSUNEO)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号: 70347350