

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580014

研究課題名（和文） トウジンビエにおける雑草型超遺伝子の進化・多様化および維持機構

研究課題名（英文） Evolution, diversification and maintenance mechanism of the weediness supergene in pearl millet

研究代表者

三浦 励一（MIURA REIICHI）

京都大学・農学研究科・講師

研究者番号：60229648

研究成果の概要：

西アフリカの半乾燥地で重要な穀類であるトウジンビエの集団中には雑草型遺伝子が保持されており、播種した作物種子のある割合が雑草型個体に変化してしまう。この雑草型遺伝子は多面的に発現することから、実際には複数の遺伝子が強く連鎖した超遺伝子であることが推定されていた。遺伝マーカーを用いた解析の結果、当該遺伝子は動原体近傍にあり、このために遺伝子間の組み換えが抑制されて超遺伝子として振る舞っていることが推定された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学（作物学・雑草学）

キーワード：雑草，雑穀，遺伝学，ゲノム，進化，超遺伝子，アフリカ

1. 研究開始当初の背景

トウジンビエ (*Pennisetum glaucum*) は熱帯半乾燥地で広く栽培されている重要な穀類である。その起源地である西アフリカのトウジンビエ栽培においては特異な作物-雑草複合がみられ、播種した作物型種子の一部が脱粒性をもつ雑草型個体に変化してしまう。筆者らによる以前の研究によって、この雑草型形質を支配する遺伝子はみかけ上1遺伝子座として遺伝し、雑草型個体はそのヘテロ接合体であって、前年の雑草型

個体の花粉（親はヘテロ接合体であるから、正確には花粉の半分）によって汚染された作物種子から生じることがわかっていた (Miura & Terauchi 2005)。作物型と雑草型の対立遺伝子をそれぞれ C、W で表すと、作物型個体は CC、雑草型個体は CW であり、雑草型遺伝子のホモ接合体 WW は不稔となる。雑草型遺伝子が脱粒性・草型・剛毛長・稔性といった発現ステージや発現機構に共通性のない複数形質に同時に影響を与えることなどから、その本体は個々の形質を支

配する複数の遺伝子が強く連鎖したものであることが予想されていた。

2. 研究の目的

トウジンビエの作物—雑草複合は、作物—雑草の遺伝的平衡多型という遺伝学・進化学的にきわめて興味深い系である。また、問題となる雑草型遺伝子は脱粒性・草型・剛毛長・劣性不稔という重要なドメスティケーション関連遺伝子が連鎖したものである可能性が高い。したがって、この遺伝子(群)の構造・機能や維持機構が明らかになれば、トウジンビエのみならず栽培植物と耕地雑草の進化に関して、貴重な示唆が与えられると考えられた。そこで本研究ではまず雑草型遺伝子を単離し、さらにその地域間変異を調べることを目標とした。

3. 研究の方法

筆者らは従来、雑草型遺伝子に関するヘテロ接合体(雑草型個体)の自殖後代である作物型・雑草型分離集団を用い、AFLP分析により雑草型形質連鎖バンド12個を特定しゲルからの回収を行っていた。本研究ではまずこれらの配列をSTS化し、雑草型遺伝子近傍の高密度連鎖地図を作製し、既に作成してある雑草型トウジンビエゲノムDNAのBACライブラリーを用いて、マップベースで標的遺伝子を単離することを試みた。また、これが何らかの理由で成功しない場合には、幼穂におけるRNAの発現プロファイルから候補遺伝子を探索することも検討した。

4. 研究成果

(1) AFLP由来の12個の雑草型形質連鎖バンド(PgMA1~PgMA12とする)を回収したものはいずれも目的外の夾雑フラグメントを多く含んでいることがクローニングの過程で判明し、直接シーケンスすることはできなかった。このため、AFLPセレクトティブプライマーへの塩基付加、サザン分析、クローン選抜などの方法を組み合わせ、最終的に10個の連鎖マーカーをシーケンスすることができた。これらのマーカー座と標的遺伝子(雑草型遺伝子)との組み替え価は0.9~6.2%と推定された。

BLAST検索の結果では、10個のマーカー配列のいずれも機能的な遺伝子に対する相対性は認められなかった。PgMA12はレトロウイルス様エレメントの配列の一部と相対性があり、PgMA17はトウジンビエの既知の動原体関連サテライト配列と高い相対性を示した。PgMA18とPgMA21は、イネ

の未同定配列と部分的に相対性を示した。他の6個のマーカーについては、相対性の高い配列が検出されなかった。

これら10個の連鎖マーカーのそれぞれからニックトランスレーションにより蛍光プローブを作成し、笑気ガス空気乾燥法(Kato, 1999)により作成したトウジンビエ染色体プレパラートに対してfluorescent in-situ hybridization (FISH)を行った。PgMA14とPgMA17についてはすべての染色体の動原体に明瞭なシグナルが検出された(図1)。PgMA17は先述のとおり配列の上からも動原体に関連していることが示唆されている。他の8個のマーカーについてはシグナルが検出できなかった。

以上の結果から、雑草型遺伝子(群)は動原体近傍にあり、このために遺伝子間の組み換えが抑制されて超遺伝子として振舞っていることが示唆された。標的遺伝子が動原体近傍にあるとすると、マーカーから標的遺伝子までの物理距離は組み替え価から考えられるよりもはるかに大きく、またその間は高度反復配列に占められていることが予想され、マップベースでのクローニングは困難と推測される。このため研究期間の後半ではRNA発現ベースでの遺伝子探索に方針を転換したが、残念ながら現時点では、有力な候補遺伝子を見出すに至っていない。

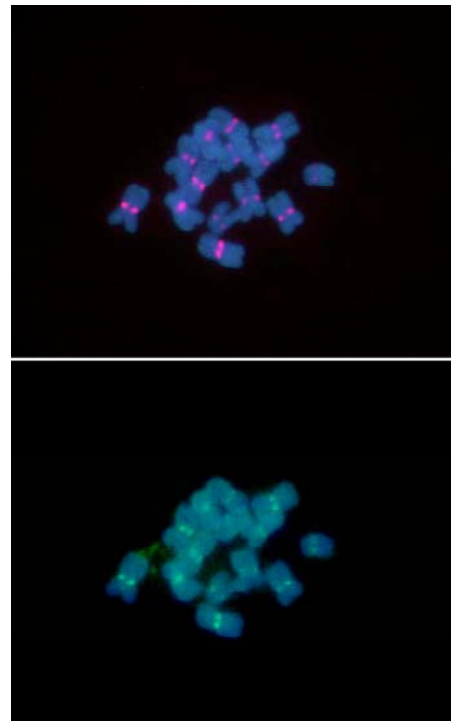


図1 トウジンビエ染色体に対するマーカー配列のFISH像。染色体全体のDAPI染色像にPgMA14の赤色シグナル(上)およびPgMA17の緑色シグナル(下)を重ね合わせたもの。

(2) 標的遺伝子近傍の高密度連鎖地図を作成するためには当該領域付近における組み換え個体をなるべく多数得て形質を分析する必要があるが、熱帯作物であるトウジンビエは植物体が大きい上に戸外での安定した栽培は困難で、作業効率が悪いことが難点であった。本研究においては、分離集団の種子を播種し、発芽直後の実生の微小な葉片から得られた未精製の DNA をテンプレートとしてマーカー領域を PCR 増幅し、cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) により遺伝子型を判定したうえで、必要なもののみを移植栽培する実験系を確立した。このためには、PCR 阻害物質抑制作用のある PCR buffer である Ampdirect® Plus (SIMADSU) を用いた。

現時点ではまだ 5 個体の組み換え個体しか栽培が完了していないが、それらの形態形質の分析結果の一部を第 2 図に示す。ここでは組み換え個体の判定に、RAPD 由来で得られ標的遺伝子の両側に位置すると推定されているマーカー 2 個 (PgMR1 および PgMR2) を用いた。マーカーで判定した組み換え個体は雑草型 (CW) と作物型 (CC) または雑草型と不稔型 (WW) の中間的な形態を示した。この結果は、雑草型遺伝子が複数の遺伝子が連鎖したものであるという仮説を支持している。

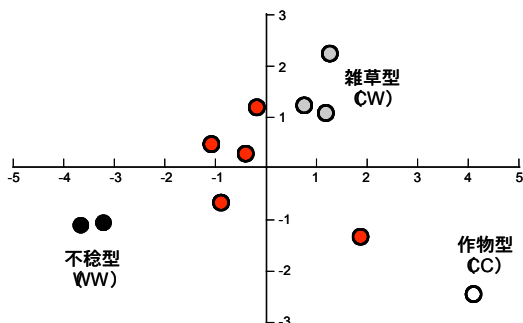


図 2 雑草型遺伝子に関するヘテロ個体の自殖後代に現れた組み換え型と対照としての非組み換え型の形態形質の主成分分析。組み換えマーカー型個体を赤丸で示す。

(3) 西アフリカ・マリ共和国の緯度・気候帯の異なる各地から収集された作物型および雑草型個体の種子を播種し、出現した作物型および雑草型個体の表現型を調べた。より乾燥したサヘル帯の集団では脱粒性だけでなく草型全般において作物型と雑草型との差異がみられたのに対し、比較的雨の多いスーダンサバナ帯の集団では雑草型個体では作物型との差異はほとんど脱粒性の有無のみであることがわかった。野生型トウ

ジンビエの分布域がサヘル帯にあること、野生型トウジンビエが雑草型遺伝子と類似した遺伝子連鎖群を持っていることを考慮すると、雑草型超遺伝子はまず野生型ハプロタイプをもとにサヘル帯で進化し、スーダンサバナ帯へと拡散する過程でその構成遺伝子の一部が脱落した可能性が示唆された。

(4) これまでに明らかになってきたトウジンビエの雑草型形質の遺伝様式と西アフリカにおける栽培サイクルにもとづいて雑草型遺伝子の頻度変化を表すシミュレーションモデルを作成した。現地では、雑草型個体由来の脱粒種子から芽生えた実生は徹底的な除草作業によって排除されるので、雑草型対立遺伝子は主として花粉によって後代に伝わると考えられるが、作物型対立遺伝子は雌雄両経路で伝わる。これを相殺して雑草型対立遺伝子が遺伝子プール中に存続するためには、成長や競争などの局面で雑草型対立遺伝子が 2 倍近い適応度をもたねばならないが、これは現地での観察結果に照らして考えにくい。しかし、干魃などによる不作の状況下では作物型個体の適応度が低下するため、次世代において雑草型遺伝子の頻度が急増する。数年に 1 回といった頻度で不作があれば、雑草型対立遺伝子は増減を繰り返しながら、平均的には現地で観察される程度の頻度で遺伝子プール中に保持されることが示された。

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 1 件)

三浦 励一, 雑草とは何か—特にドメスティケーションとの関係において—, 国立民族学博物館調査報告 No. 84, 35-50, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

下村晃一郎, 三浦 励一, 寺内良平, 富永 達, 雑穀トウジンビエの作物—雑草多型現象に関わる雑草型遺伝子の探索, 日本雑草学会第 47 回講演会, 2008 年 4 月 20 日, 宇都宮大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 励一 (MIURA REIICHI)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号: 60229648

(2)研究分担者

(なし)

(3)連携研究者

寺内 良平 (TERAUCHI RYOHEI)

(財)岩手生物工学研究センター・遺伝子
工学第一研究部・主席研究員

研究者番号：50236981

(4)研究協力者

下村晃一郎 (SHIMOMURA KOUICHIROU)

京都大学・大学院農学研究科・博士後期課程