

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15502

研究課題名（和文）異質倍数性を逆手に取る：コムギNAM集団の効率的作出による有用遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文）Utilizing Nature of Allopolyploid in wheat: Comprehensive Identification for Useful Genes through Efficient Construction of Wheat NAM Population

研究代表者

西村 和紗（Nishimura, Kazusa）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60835453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：四倍体コムギのF1とタルホコムギとの交雑によって生じた三倍体コムギが、自殖するだけで合成六倍体コムギになることを活用して、迅速にNested association mapping集団を構築する手法の開発を行なった。合計20686小花を除雄したタルホコムギの花粉を受粉した結果、3375粒の三倍体種子を得ることができた。これらの三倍体の一部には雑種生育不全が見られたものの、三倍体個体の多くから後代の種子を得ることができ、迅速にNAM集団を構築できることが示唆された。また生態学の研究に利用の限られていたMIG-seqがコムギの遺伝子型決定に有効であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって作出した合成六倍体コムギNAM集団は四倍体コムギにしか分布しない遺伝子を保有する六倍体コムギの遺伝素材としてパンコムギの育種に直接利用することができる。また、MIG-seqがコムギを含むゲノムサイズの大きな作物種において有効に適用できることを明らかにしたことは、本来は遺伝解析に多大なコストのかかるゲノムサイズが大きい作物種の遺伝解析の効率化に資するため、学術的、社会的意義が大きいものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, I developed a method to rapidly construct a nested association mapping population by taking advantage of the fact that triploid wheat produced by crossing tetraploid wheat with *Aegilops tauschii* becomes synthetic hexaploid wheat simply by self-pollination. A total of 20,686 florets were emasculated and pollinated with pollen from *Aegilops tauschii*. As a result, 3,375 triploid seeds could be obtained. Although some of these triploids showed hybrid incompatibility, it was possible to obtain seed of later hexaploid generations from many of the triploid individuals, suggesting that a NAM population could be established quickly by this method. This study also revealed that MIG-seq, which has had limited use in ecological research, is useful for wheat genotyping.

研究分野：植物育種学

キーワード：コムギ 合成コムギ NAM集団 QTL NGS MIG-seq

1. 研究開始当初の背景

世界の三大穀物であるパンコムギ(*Triticum aestivum* L.)は四倍体コムギ(*Triticum turgidum* L.)と二倍体のタルホコムギ(*Aegilops tauschii* L.)との属間交雑により成立した異質六倍体である(Kihara and Kilienfeld, 1949)。Aegilops属を含む二倍体コムギは解析が容易なため、多くの研究が行われている。また、六倍体コムギは異質倍数体であるので二倍体よりも解析が困難ではあるが、広く栽培されており多くの研究者が注目しているため、研究が進んでいる。一方で、四倍体コムギは野生種、栽培種を含み遺伝的に多様であるにもかかわらず、比較的解析が進んでいない。そこで、この四倍体コムギ系統群を解析すれば、より効率良く新規遺伝子を同定できると考え、出穂開花関連遺伝子の探索・同定、およびその作用の解析を進めてきた。その中で、シロイヌナズナの開花遺伝子 *Flowering locus T* のオルソログである *VRN-A3* 座の新規の早生アレルを同定した(Nishimura et al. 2018, Theor. Appl. Genet.)。また、未知の早生遺伝子を保有するマカロニコムギ系統を見出し、その新規早生遺伝子が 6A 染色体に座乗することを明らかにした(平尾、西村ら 2019、育種学会)。このように、四倍体コムギ系統群を詳細に解析することで、このグループに潜在している新規有用遺伝子を同定できることを実証した。

一方で、*VRN-A3* 座が分離する六倍体コムギの RILs を用いた解析から、*VRN-A3* 早生アレルは四倍体コムギの集団では明瞭な早生効果を示したにもかかわらず、六倍体コムギの RILs では早生効果が認められないことを明らかにした。また、加藤ら(2018)は六倍体コムギの赤カビ病抵抗性 QTL を四倍体コムギへ導入した際、その作用が小さくなったことを報告している。このように倍数性の違いが遺伝子の作用を変化させるため、四倍体コムギを用いた解析から見出された遺伝子を六倍体のパンコムギ育種に活用するには、同定した遺伝子が六倍体コムギの背景で機能するかどうかを逐一明らかにする必要がある。しかし、同定した遺伝子を一つずつ六倍体に導入して解析するのは非常に効率が悪く、四倍体コムギに潜在する遺伝子を六倍体のパンコムギ育種に効率よく活用するための手法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

コムギでは、四倍体コムギを種子親、タルホコムギを花粉親として属間交雑をすると、比較的高い頻度で発芽力のある交雑種子を得ることができ、この三倍体から非還元配偶子が生産され、自殖を行うだけで自然倍加し、合成六倍体コムギを得ることができる(Kihara and Kilienfeld, 1949)。この現象を活用し多様な四倍体コムギ由来の合成六倍体を作り出し、解析することで、六倍体の背景で機能する四倍体コムギの遺伝子が同定できると考えられる。

また、近年、QTL 解析と Genome Wide Association Study (GWAS) を融合させたより効率の良い解析手法として、複数の Founder 系統(多様な系統)と共通親の交雑から得られた多数の RILs を用いて GWAS を行う手法である Nested Association Mapping (NAM) が開発された(Yu et al. 2008)。しかし、NAM 集団の作出には遺伝的固定が必須であり、集団の作出に時間がかかるという問題点がある。しかし、合成六倍体コムギを作出する際に起こる染色体倍加を活用すれば、NAM 集団の速やかな遺伝的固定が行える。すなわち、

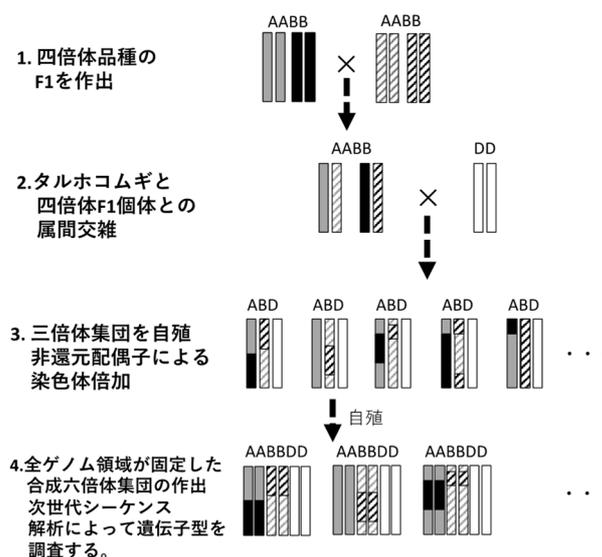
1: 四倍体コムギ F₁ の作成

2: 属間交雑による三倍体の作成

3: 合成六倍体への倍加

の三代目で遺伝的に固定した合成六倍体 RILs を作出することができ、NAM 集団作出の期間を大幅に短縮できる(第1図)。つまり、これらのことを踏まえると、上記の手法で合成六倍体 NAM 集団を作出し、その遺伝解析を行うことで、六倍体コムギの背景で機能する四倍体コムギに潜在する遺伝子を従来の解析方法よりもはるかに効率よく同定できるのではないかと仮説を立てた。

本研究では、この手法で、合成六倍体 NAM 集団を効率良く作出できることの実証を目的とした。また、NAM 集団のような大規模な分離集団を効率よく遺伝子型決定するための手法の検討も行った。



第1図 本研究で提案する合成六倍体 NAM 集団作出法

3. 研究の方法

a) 合成六倍体 NAM 集団構築法の開発

本研究では、複数の亜種を含む多様な四倍体コムギ系統を 24 系統選び、合成六倍体コムギになりやすい四倍体コムギ系統 Langdon との交配を行った。2021 年および 2022 年の春に、多様な四倍体コムギ系統と Langdon との F_1 に対して、タルホコムギ系統 KU-2098 の花粉を受粉し、その交配効率を記録した。また、2021 年度に交配した三倍体種子を催芽し、京都大学大学院農学研究科附属農場内のハウスで栽培を行った。2022 年の春に各三倍体個体を収穫し、種子の有無を調査した。

b) コムギにおける効率の良いジェノタイピング手法の検討

コムギにおいて、効率の良いジェノタイピング手法として RNA-seq、ddRAD-seq および GRAS-di といった手法が広く用いられている。本研究においては、NAM 集団のような大規模集団のジェノタイピングをより効率良く行うために、低品質な DNA からでも NGS ライブラリー構築が可能であるが、生態学の研究に利用の限られていた MIG-seq (Suyama and Matsuki 2015) のコムギの遺伝子型決定に関する適用可能性について検討した。

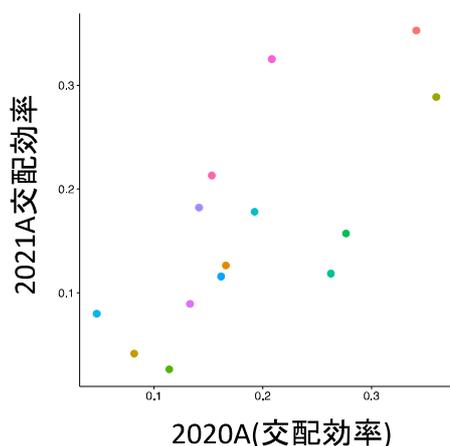
初めに、ゲノムサイズが多様な作物 12 種 (フツウコムギ、フタツブコムギ、タルホコムギ、トウガラシ、キヌア、イチゴ、メロン、ダイコン、キャベツ、バラ、トマトおよびモモ) を供試して MIG-seq によるライブラリー作成を行ない、HiSeqX あるいは NovaSeq 6000 によって 150 bp Paired-End のシーケンスを行なった。各作物種の参照配列にリードをマッピングした後、Samtools によりゲノム全体のカバレッジを取得し、シーケンスデータ量 0.3Gb あたりのカバレッジが 10 以上の塩基数を算出した。連鎖地図作成および QTL 解析には、四倍体コムギ系統 TN26/TN28 間の交雑 $F_{6,7}$ RILs 176 系統、四倍体コムギ系統 TTW139/TTW41 間の交雑 F_2 127 個体を供試した。分離集団に関しては、DNA の濃度を揃えずに MIG-seq ライブラリーを作成し、OneMap によって連鎖地図を作成し、R/qtl により出穂日に関する QTL 解析を行なった。集団構造解析には多様な四倍体コムギ 195 系統 (TWC) を供試し MIG-seq によって得られた SNP/indel を用いて Admixture 解析、系統樹作成および主成分分析を行なった。

4. 研究成果

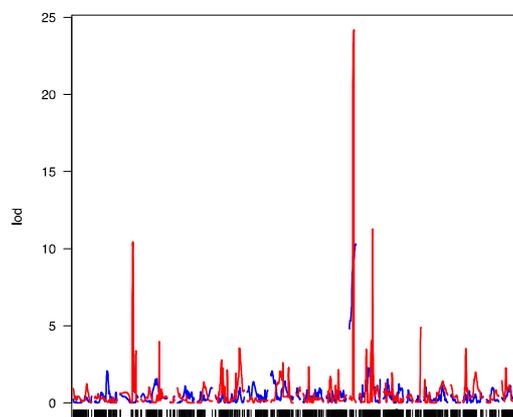
a) 合成六倍体 NAM 集団構築法の開発

2021 年および 2022 年の春にそれぞれ 8680 および 12006 小花を除雄し、タルホコムギの花粉を受粉した結果、1594 粒および 1781 粒の三倍体種子を得た。交配の結果、全ての四倍体 F_1 とタルホコムギ系統の組み合わせにおいて、三倍体種子を得ることができた。一方で、交配の成功率には変異が認められた。2021 年および 2022 年の春の両方において交配した系統の交配効率に関して広義の遺伝率を求めたところ、 $H^2=0.83$ となり、四倍体コムギとタルホコムギの交配効率は遺伝的に強く制御されていることが示唆された (第 2 図)。2021 年の秋から、合計 503 個体を栽培したが、一部の三倍体において雑種生育不全の表現型を示す個体が観察され、その多くは開花へ至らなかった。

これらの交配組み合わせのうち、雑種生育不全を起こすと考えられる四倍体コムギ系統 KU-4238A および Langdon の F_1 に KU-2098 を交配した三倍体コムギの分離集団を用いて、雑種生育不全に関わる遺伝子座のマッピングを行った。三倍体コムギのジェノタイピングには、MIG-seq の改良法 dpMIG-seq (Nishimura et al. 2022, bioRxiv) を適用した。マッピングの結果、2B 染色体長腕末端に雑種生育不全に関する QTL が検出された (第 3 図)。



第 2 図 四倍体コムギ F_1 とタルホコムギ系統 KU-2098 系統との交配効率
各プロットは遺伝子型の違いを示す。



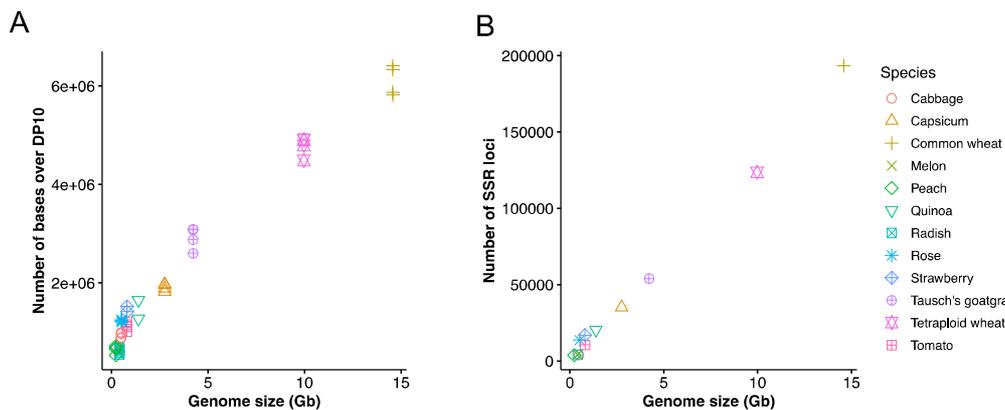
第 3 図 三倍体コムギの雑種生育不全に関わる QTL 解析の結果

2021年の秋から栽培していた三倍体コムギ 503 個体中 433 個体から合成六倍体と考えられる種子が得られた。2022 年の秋にこれらの種子を催芽したところ、健全に生育することが確認された。また 2022 年の夏にファイトトロンにおいて栽培していた三倍体コムギからも合成六倍体と考えられる種子を得ることができた。

これらの結果から、一部の交配組み合わせにおいては雑種生育不全を示す個体が見られるものの、Langdon を片親とした四倍体コムギ F1 個体にタルホコムギの花粉を受粉することによって、迅速に遺伝的に固定した分離集団を構築できることが示唆された。

b) コムギにおける効率の良いジェノタイプング手法の検討

供試した作物種のゲノムサイズと MIG-seq によって安定してシーケンスできる塩基数には有意な正の相関が認められ、Krait (Zhang et al. 2018) による解析からこの結果は、ゲノムサイズと SSR 座数間の強い相関に起因することが示唆された (第 4 図)。

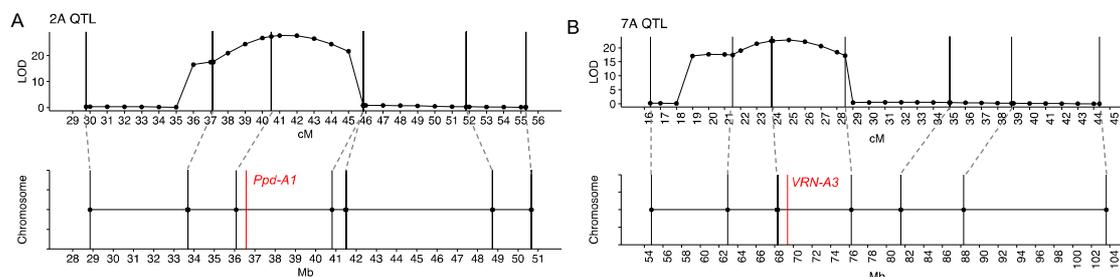


第 4 図 ゲノムサイズと MIG-seq によって安定できる領域の塩基数および SSR の数との関係

A) ゲノムサイズとカバレッジが 10 以上の塩基数の関係

B) ゲノムサイズと MIG-seq が対象とする SSR の数との関係

分離集団のシーケンス結果においては、供試 DNA の濃度を揃えてないにも関わらず、サンプルの取得リード数の最小値は最大値の 4 分の 1 以上であった。このことは、MIG-seq の適用により、各サンプルで安定した配列データ取得が可能であることを示す。得られた配列解析結果の精度を検証するために、分離集団のデータを用いて、連鎖地図作成および出穂日に関する QTL 解析を行なった。2つの分離集団において、それぞれ 1 サンプルずつ遺伝子型の欠損率が高い個体が認められたため、その個体を以後の解析から除外した。F_{6.7}RILs および F₂ 集団の多型データから、それぞれ 95% 以上および 97% 以上の個体がジェノタイプできているという条件で SNP/indel をフィルタリングし連鎖地図を作成したところ、3148 マーカーおよび 3257 マーカーからなる連鎖地図が作成できた。QTL 解析では期待通り、開花関連遺伝子である *VRN-A3* および *Ppd-A1* の座乗位置近傍に明瞭な LOD スコアのピークが見られた (第 5 図)。

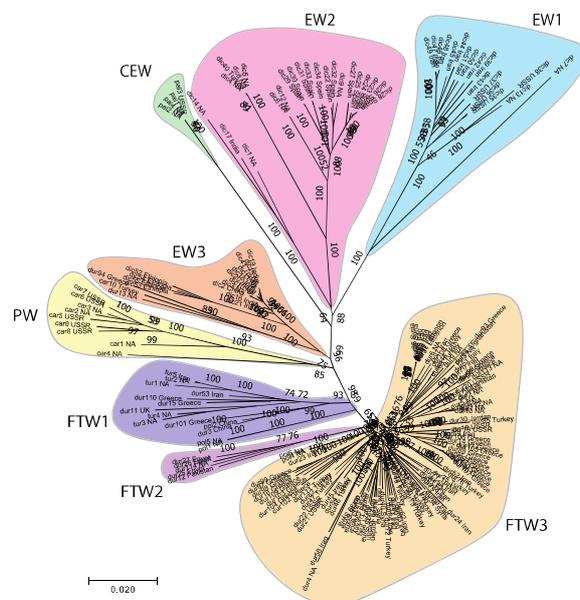


第 5 図 F_{6.7} 集団において検出された QTL の連鎖地図および物理地図との対応関係

A) 2A 染色体の QTL の連鎖地図上の LOD スコアのピークと物理地図上の候補遺伝子 *Ppd-A1* の座乗位置

B) 7A 染色体の QTL の連鎖地図上の LOD スコアのピークと物理地図上の候補遺伝子 *VRN-A3* の座乗位置

また、多様な四倍体コムギに MIG-seq を適用して得た多型データを用いて Admixture 解析、系統樹作成および主成分分析を行なった結果、いずれの分析においても、従来の知見と齟齬のない、亜種および採取地の違いを反映した結果が得られた(第 6 図)。



第 6 図 多様な四倍体コムギ系統群における系統樹

EW1、EW2 および EW3 はそれぞれ、旧ソ連・イラン、スペインおよびエチオピア・インドのエンマーコムギを主に含むグループである。CEW は *Triticum turgidum* L. ssp. *paleocolchicum* からなるグループである。PW はペルシャコムギ。FTW1 は主にリベットコムギ、デュラムコムギおよびポーランドコムギからなる。FTW2 はエジプト由来のデュラムコムギを含む。FTW3 は様々な地域由来のデュラムコムギを含む。

これらの結果から MIG-seq はゲノムサイズが小さな作物種においては有効性が低いと考えられた一方で、ゲノムサイズが比較的大きいコムギにおいては、欠損データが少ない遺伝子型情報の取得が可能であることが明らかとなった。以上のように、MIG-seq によってコムギのハイスループットジェノタイピングが実現できることが示された。

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 Nishimura Kazusa, Motoki Ko, Yamazaki Akira, Takisawa Rihito, Yasui Yasuo, Kawai Takashi, Ushijima Koichiro, Nakano Ryohei, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 29
2. 論文標題 MIG-seq is an effective method for high-throughput genotyping in wheat (<i>Triticum</i> spp.)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsac011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsac011	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村和紗、元木航、山崎彬、安井康夫、滝澤理仁、河井崇、牛島幸一郎、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 MIG-seqの作物ゲノムへの応用 - コムギのハイスループトジェノタイピングはMIG-seqによって実現する -
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村和紗、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 三倍体コムギを活用して三度の採種によってNAM集団を構築する手法の開発
3. 学会等名 第16回コムギ類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村和紗、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 コムギの異質倍数性を活用した効率的遺伝解析手法の開発
3. 学会等名 高次倍数体をどうにかする会2022夏
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和紗
2. 発表標題 迅速、簡単なNGSライブラリー構築 作物学研究におけるMIG-seqの可能性
3. 学会等名 日本作物学会第254回講演会 若手の会企画による小集会(31) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和紗、小梶裕之、元木航、山崎彬、長坂京香、滝澤理仁、安井康夫、河井崇、牛島耕一郎、山崎将紀、齊藤大樹、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 MIG-seqの改良法 “degenerate oligonucleotide primer MIG-seq” の開発と作物の遺伝解析に対する応用
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和紗、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 四倍体コムギが保有する種間雑種生育不全に関する遺伝子の解析
3. 学会等名 第17回ムギ類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和紗、中野龍平、中崎鉄也
2. 発表標題 三倍体コムギのゲノム倍加能を活用したNAM集団構築法の開発
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishimura K., Motoki K., Yamazaki A., Takisawa R., Yasui Y., Kawai T., Ushijima K., Nakano R., Nakazaki T.
2. 発表標題 Application of MIG-seq for genetic analysis and selection of NILs in wheat
3. 学会等名 2nd international wheat congress (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	中崎 鉄也 (Nakazaki Tetsuya)		

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
---------	---------