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３月３１日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究（Ｂ）
研究期間：2009～2012
課題番号：２１３８０００５
研究課題名（和文）　二粒系コムギとタルホコムギの雑種で発現する生殖隔離遺伝子の高密度マッピング
研究課題名（英文）　Fine mapping of reproductive isolation genes expressing in hybrids between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*
研究代表者
宅見　薫雄（TAKUMI SHIGEO）
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：５０２４９１６６

研究成果の概要（和文）：パンコムギの直接の祖先野生種で豊富な自然変異を集団中に有するタルホコムギのもつ遺伝子をパンコムギ育種に導入する際に、雑種致死や雑種弱勢が二粒系コムギ（AABB ゲノム）とタルホコムギ（DD ゲノム）の特定の交配組み合わせで起こる。このような二粒系コムギとタルホコムギの種間雑種で見られる生育異常のうち、ネクローシスやクロロシス、生長の停止という４つのタイプについては発生の分子機構をマイクロアレイ解析や電子顕微鏡による細胞の微細観察等によって明らかにした。さらに、これらの生育異常に関与するタルホコムギ側の原因遺伝子について、連鎖地図上に位置づけた。２系統のタルホコムギの葉の RNA-seq 解析から大量の D ゲノムの SNP マーカーを見出し、これを利用して生育不良の D ゲノム側の原因遺伝子に密に連鎖したマーカーを開発した。

研究成果の概要（英文）：Hybrid necrosis and hybrid chlorosis occur in some interspecific hybrids between tetraploid wheat (AABB genome) and *Aegilops tauschii* (DD genome), which inhibits efficient introgression of useful genes found abundantly in natural populations of the wheat progenitors. In the present study, four types of abnormal growth phenotypes observed in the interspecific hybrids, hybrid necrosis, hybrid chlorosis and severe growth abortion, were analyzed by microarray analysis, transmission electron scope observation and other techniques. In addition, causal genes on the D genome for the abnormal growth were mapped in the linkage maps. For development of the linked markers to the causal genes, RNA-seq analysis of seedling leaves from two distinct *Ae. tauschii* accessions was conducted, and a number of SNPs were found. The discovered SNPs were useful to develop linked markers to the causal genes for abnormal growth in the hybrids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
２０１０年度	2,200,000	660,000	2,860,000
２０１１年度	2,200,000	660,000	2,860,000
２０１２年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総　計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学
科研費の分科・細目：農学・育種学
キーワード：変異創成・解析

１．研究開始当初の背景

申請者はこれまでパンコムギとその近縁種

を材料に遺伝育種学的研究を行ってきた。その結果から、栽培コムギで用いられている重要な対立遺伝子は祖先野生種であるタルホコムギ集団中にも保持されており、このことから現在パンコムギのいくつかの困難な育種目標を解決できる遺伝子も集団中に見いだせると考えられた。タルホコムギの有用遺伝子は、４倍性コムギとの交雑 F_1 雑種の自然倍加により作出した合成パンコムギを介してパンコムギに導入可能である。

この合成パンコムギの育成過程で、４倍性コムギとタルホコムギとの F_1 個体で雑種致死や雑種弱勢を示す交配組み合わせが一部で認められた。これらの雑種致死や雑種弱勢はおそらく Dobzhansky-Muller モデルに従い、両親それぞれが持つ遺伝子間の相互作用に起因する。雑種致死を起こすタルホコムギ系統には地理的な偏りがみられ、例えば type2 ネクローシスを示すタルホコムギ系統は日長感応性が低い早生の系統や春化要求性を失った系統などパンコムギの早生化に寄与できる系統が多く、このような場合 type2 ネクローシスによって育種素材として使えない。すなわち二粒系コムギとタルホコムギの間に存在する生殖隔離はかつてパンコムギの成立を阻害した因子であると考えられる。

２．研究の目的

本研究では、この二粒系コムギとタルホコムギの雑種第一代でしばしば認められる雑種致死と雑種弱勢を引き起こす遺伝因子を遺伝学アプローチにより同定し、緊密に連鎖する分子マーカーを単離して、近縁種との交雑による効率的な有用遺伝子の導入法の確立に寄与することを目的とした。

３．研究の方法

(1) タルホコムギ 122 系統の DNA について AFLP 分析を行い、その多型データに基づいて、集団構造解析（STRUCTURE 解析）を行った。このデータと各系統の二粒系コムギとの雑種の表現型を照らし合わせて、タルホコムギ集団中での雑種の成立を阻害する遺伝因子の分布を調べた。

(2) type2 及び type3 ハイブリッドネクローシス個体は、育て方によっては自殖種子をとることが可能である。ネクローシスを示す合成パンコムギ系統と正常系統との間の F_2 集団を利用して、コムギの SSR マーカーによる連鎖地図を作製し、type2, type3 ハイブリッドネクローシスの D ゲノム側の原因遺伝子の染色体中での位置を決定した。ハイブリッドクロロシスについても、同様に、正常系統との間の F_2 集団を利用して D ゲノム側の原因遺伝子の染色体中での位置を決定した。

(3) さらに D ゲノム上に分子マーカーを配置するために、遺伝的に離れた系統関係にある２系統のタルホコムギを用いて、次世代シークエンサーを用いて葉の RNA-seq 解析を行い、得られた塩基配列データを比較して、大量の一塩基多型(SNP)情報を取得した。

(4) 二粒系コムギとタルホコムギの雑種第一代で認められる type2 及び type3 ハイブリッドネクローシス、ハイブリッドクロロシス、幼苗期の生長停止の４つの表現型について、コムギ 38K オリゴアレイを用いて、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子の発現プロファイルを野生型の雑種と比較した。その結果をもとにさらなる発現解析を加えて、これら４つの表現型の発現の分子機構について考察を行った。

４．研究成果

(1) 核ゲノムの AFLP 多型データに基づくタルホコムギの集団構造解析により、タルホコムギ系統は種内で大きく２つの lineage に分岐しており、二粒系コムギとの雑種で異常を引き起こす系統はどちらかの lineage に偏って存在することが明らかとなった。

(2) タルホコムギと二粒系コムギの雑種でみられる２タイプのハイブリッドネクローシスと幼苗期での生長停止という３つの遺伝的異常について、葉やクラウン組織の RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。加えてネクローシス症状を起こしている葉の葉肉細胞について微細構造の解析を透過型電子顕微鏡観察により行った。その結果、ハイブリッドネクローシスを示す葉では病害抵抗性遺伝子の発現が顕著に増加していることが明らかとなった。特に、type 3 ネクローシスでは病害抵抗性反応の HR 細胞死がみられ Autoimmune response と呼ばれる反応がネクローシスの原因となっていた。すなわち、ハイブリッドネクローシスは互いのゲノムがお互いを病原菌だとご認識してしまうことによって引き起こされる現象であると考えられた。

(3) さらに低温下でハイブリッドネクローシスを示す雑種や幼苗期で生長が停止する雑種について、茎頂分裂組織での細胞分裂関連遺伝子の詳細な発現解析を行った。低温下でハイブリッドネクローシスを示す雑種や幼苗期で生長が停止する雑種の茎頂分裂組織では細胞分裂のマーカー遺伝子ヒストン H4 の転写産物が認められず、細胞分裂の異常がそれぞれの雑種の成長抑制と深く関連していることが示唆された。この観察は type3 のようなこれまでに言われているようなハイブリッドネクローシスとは異なる反応がきっかけで type2 ネクローシスや生長の停止が起こることを意味している。

(4) 一方、ハイブリッドクロロシスを示す葉でもマイクロアレイ解析を行った。その結果、ハイブリッドネクローシスと同様にハイブ

リッドクロロシスを示す系統の葉でも病害抵抗性遺伝子の発現が顕著に増加しているが、遺伝子発現プロファイル全体としては、老化に関与する遺伝子群の発現上昇が顕著であった。すなわち、ハイブリッドクロロシスは老化に伴う反応が促進された結果起きる現象であると考えられた。

(5) type 2 ネクローシスを示す個体は常温条件下で育て続けるとネクローシスの症状は起こらず矮化と分げつ数の極端な増加を伴うが、この常温と低温下での表現型の著しい違いが、常温条件下のクラウン組織においてマイクロ RNA の１つである miR156 の蓄積量が増し、そのために分げつ抑制に関与する SPL 転写因子の発現量が低下することによることが示唆された。

(6) ２タイプのハイブリッドネクローシスとハイブリッドクロロシスのタルホコムギ由来の原因遺伝子について、分子マーカーによる連鎖地図上に位置づけることができた。Type3 ネクローシスは *Nec1* と名付けた原因遺伝子が 7D 染色体短腕上に座乗しており、type2 ネクローシスの原因遺伝子 *Net2* は 2D 染色体短腕上に座乗していた。ハイブリッドクロロシスの D ゲノム側の遺伝子 *Hch1* については 7D 染色体短腕上の *Nec1* と似たような領域に位置づけられた。

(7) *Net2* や *Hch1* 周辺の分子マーカーとさらに充実させるために、タルホコムギ２系統の幼苗葉を用いて次世代シークエンサー（Roche 454）により RNA-seq 解析を行い、２つの系統間での SNP を大量に検出した。リアルタイム PCR を用いて、この SNP を HRM 法により効率的に検出できる系を確立し、実際に *Net2* の高密度化に応用したところ、密接連鎖した SNP マーカーを開発することができた。集団の個体数を増やして *Net2* のマッピングを進めた結果、*Net2* については緊密に連鎖する SNP マーカーによって 2.4cM と 3.7cM の距離で挟み込めた。*Hch1* についても２つの SSR マーカーによって 2.9cM と 1.5cM の距離で挟み込めた。

以上の結果から、二粒系コムギとタルホコムギの雑種で見られる４つのタイプの生育異常についてその発生の分子メカニズムを推定することができた。さらに特に *Net2* と *Hch1* の２つのタルホコムギ由来の原因遺伝子について、ゲノム情報を使いながらマップベースドクローニングに向けて、染色体上の位置を絞り込んでいくシステムを確立することができた。

これらの成果は、パンコムギの育種にタルホコムギの豊富な自然変異を有効活用するために有益な情報を提供するとともに、パンコムギの倍数性進化にとって重要なゲノム間相互作用に関与する遺伝子を特定する道筋を付けたものである。

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１１件）

①Nguyen TA, Iehisa JCM, Kajimura T, Murai K, Takumi S. Identification of quantitative trait loci for flowering-related traits in the D genome of synthetic hexaploid wheat lines. Euphytica (in press, 2013) (doi:10.1007/s10681-013-0873-7)（査読有）

②Iehisa JCM, Shimizu A, Sato K, Nasuda S, Takumi S. Discovery of high-confidence single nucleotide polymorphisms from large-scale *de novo* analysis of leaf transcripts of *Aegilops tauschii*, a wild wheat progenitor. DNA Research 19: 478-497, 2012（査読有）

③ Matsuda R, Iehisa JCM, Takumi S. Application of real-time PCR-based SNP detection for mapping of *Net2*, a causal D-genome gene for hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. Genes and Genetic Systems 87: 137-143, 2012（査読有）

④ Hatano H, Mizuno N, Matsuda R, Shitsulawa N, Park P, Takumi S. Dysfunction of mitotic cell division at shoot apices triggered severe growth abortion in interspecific hybrids between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. New Phytologist 194: 1143-1154, 2012（査読有）

⑤Koyama K, Hatano H, Nakamura J, Takumi S. Characterization of three *VERNALIZATION INSENSITIVE3-like* (*VIL*) homologs in wild wheat, *Aegilops tauschii* Coss. Hereditas 149: 62-71, 2012（査読有）

⑥ Takumi S, Koyama K, Fujiwara K, Kobayashi F. Identification of a large deletion in the first intron of a *Vrn-D1* locus associated with loss of vernalization requirement in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. Genes and Genetic Systems 86: 183-195, 2011（査読有）

⑦ Takumi S, Mizuno N. Low temperature-induced necrosis shows phenotypic plasticity in wheat triploid hybrids. Plant Signaling and Behavior 6: 1431-1433, 2011（査読有）

⑧Mizuno N, Shitsukawa N, Hosogi N, Park P, Takumi S. Autoimmune response and repression of mitotic cell division occur

in inter-specific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. that show low temperature-induced hybrid necrosis. The Plant Journal 68: 114-128, 2011（査読有）
⑨Mizumoto K, Hatano H, Hirabayashi C, Murai K, Takumi S. Characterization of wheat *Bell1*-type homeobox genes in floral organs of alloplasmic lines with *Aegilops crassa* cytoplasm. BMC Plant Biology 11: 2, 2010（doi:10.1186/1471-2229-11-2）（査読有）
⑩Mizuno N, Hosogi N, Park P, Takumi S. Hypersensitive response-like reaction is associated with hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. PLoS ONE 5:e11326,2010
（doi:10.1371/journal.pone.0011326）（査読有）
⑪ Mizuno N, Yamasaki M, Matsuoka Y, Kawahara T, Takumi S. Population structure of wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss.: implication for intraspecific lineage diversification and evolution of common wheat. Molecular Ecology 19: 999-1013, 2010（査読有）

〔学会発表〕（計２４件）
①宅見薫雄．コムギ・エギロプス属の Dobzhansky-Müller 遺伝子．第７回ムギ類研究会，2012 年 11 月 29 日（農林水産技術会議事務局筑波事務所）
②宅見薫雄．パンコムギ Chinese Spring のハイブリッドネクローシス座 *Ne1* の遺伝解析．日本育種学会第 122 回講演会，2012 年 9 月 15 日（京都産業大学）
③松田龍典、Iehisa Masaru、宅見薫雄．Type 2 ネクローシス遺伝子を持つ合成パンコムギの生育温度による表現型の劇的な変化と遺伝子発現の解析．日本育種学会第 122 回講演会，2012 年 9 月 14 日（京都産業大学）
④Iehisa Masaru、松田龍典、西嶋遼、宅見薫雄．タルホコムギ SNP マーカーの６倍体コムギゲノム解析への利用．日本育種学会第 122 回講演会，2012 年 9 月 15 日（京都産業大学）
⑤松田龍典、Iehisa Masaru、中野裕樹、宅見薫雄．異常分けつを示す３倍体雑種コムギにおけるクラウン組織のマイクロアレイ解析．日本育種学会第 121 回講演会，2012 年 3 月 30 日（宇都宮大学）
⑥Iehisa Masaru、清水顕史、佐藤和広、那須田周平、宅見薫雄．タルホコムギ幼苗 RNA の大規模解析と SNP の同定．日本育種学会第 121 回講演会，2012 年 3 月 30 日（宇都宮大学）
⑦宅見薫雄．倍数性進化の再現系を利用したコムギ祖先野生種の多様性評価．ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)公開成果報告会，2012 年 1 月 20 日（東京コンファレンスセンター品川）
⑧松田龍典、Iehisa Masaru、宅見薫雄．real-time PCR を用いた合成パンコムギにおける SNP の検出と連鎖地図の作成．日本育種学会第 120 回講演会，2011 年 9 月 23 日（福井県立大学）
⑨水野信之、漆川直希、宅見薫雄．細胞分裂関連遺伝子を発現抑制させた形質転換シロイヌナズナはネクロティックに枯死する．日本育種学会第 120 回講演会，2011 年 9 月 23 日（福井県立大学）
⑩中野裕樹、土佐幸雄、宅見薫雄．クロロシスを示す合成パンコムギのコムギいもち病菌に対する高い病害抵抗性．日本育種学会第 120 回講演会，2011 年 9 月 23 日（福井県立大学）
⑪宅見薫雄、松岡由浩、那須田周平．倍数性進化の再現系を利用したコムギ多様性解析：リソースに保全された変異の顕在化．日本遺伝学会第 83 回大会，2011 年 9 月 22 日(京都大学)
⑫水野信之、松田龍典、秦野仁志、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種における２タイプの雑種致死の類似性．日本育種学会第 119 回講演会，2011 年 3 月 30 日（横浜市立大学）
⑬水野信之、宅見薫雄．３倍体雑種コムギにみられるネクローシス個体における過敏感細胞死様の反応．第 33 回日本分子生物学会年会，2010 年 12 月 8 日（神戸国際会議場）
⑭中野裕樹、水野信之、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種にみられるハイブリッドクロロシスの解析．日本育種学会第 118 回講演会，2010 年 9 月 25 日（秋田県立大学）
⑮水野信之、漆川直希、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種にみられる低温応答性ネクローシスの解析．日本育種学会第 118 回講演会，2010 年 9 月 25 日（秋田県立大学）
⑯宅見薫雄、水野信之、Iehisa Masaru、本村洋一、小林史典．パンコムギ組換え近交集団におけるタイプ１ネクローシスによる分離のゆがみ．日本育種学会第 118 回講演会，2010 年 9 月 25 日（秋田県立大学）
⑰宅見薫雄、水野信之、松岡由浩．パンコムギ祖先２倍種タルホコムギの集団構造と種内分化．日本遺伝学会第 82 回大会，2010 年 9 月 20 日（北海道大学）
⑱水野信之、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種にみられるハイブリッドネクローシスの解析．日本育種学会第 117 回講演会，2010 年 3 月 27 日（京都大学）

⑲秦野仁志、水野信之、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種で幼苗期に生長が停止する個体の解析．日本育種学会第 116 回講演会，2009 年 9 月 26 日（北海道大学）
⑳水野信之、山崎将紀、松岡由浩、河原太八、宅見薫雄．二粒系コムギとタルホコムギの雑種で幼苗期に生長が停止する個体の解析．日本育種学会第 116 回講演会，2009 年 9 月 25 日（北海道大学）
㉑Nakano H, Mizuno N, Park P, Takumi S. Abnormal chloroplasts observed in synthetic hexaploid wheat lines showing hybrid chlorosis. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009 年 9 月 16 日（神戸大学）
㉒Mizuno N, Hosogi N, Park P, Takumi S. Generation of reactive oxygen species in necrotic leaves of crossed progeny between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009 年 9 月 16 日（神戸大学）
㉓宅見薫雄、秦野仁志、中野裕樹、水野信之．二粒系コムギとタルホコムギの雑種で発現する生育不良の解析．日本遺伝学会第 81 回大会，2009 年 9 月 17 日（信州大学）
㉔ Mizuno N, Yamasaki M, Matsuoka Y, Kawahara T, Takumi S. Population structure of central Eurasian wild wheat progenitor *Aegilops tauschii*. 6th International Triticeae Symposium, 2009 年 6 月 1 日（京都大学）

〔その他〕
ホームページ等
神戸大学農学部インターゲノミクス研究会
(http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/index.html)

６．研究組織
(1)研究代表者
宅見　薫雄（TAKUMI SHIGEO）
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：５０２４９１６６