

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5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380004

研究課題名（和文） パンコムギのもつコムギ連近縁種との交雑バリアーに関する分子細胞遺伝学的解析

研究課題名（英文） Molecular cytogenetic analyses on crossing barrier between common wheat and its alien species of Triticeae

研究代表者

木庭 卓人（KOBATAKATO）

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：40170302

研究成果の概要（和文）：パンコムギの染色体置換系統を元にして開発した組換え近交系統を利用してライムギとの交雑親和性に関する QTL 解析を行ったところ、交雑親和性遺伝子がパンコムギの 5B 染色体短腕に位置することが判明した。共焦点レーザー顕微鏡によるライムギ花粉のパンコムギ雌蕊での花粉管伸長の観察から、パンコムギの交雑親和性と花粉管長との間に有意な相関がみられた。これらのことから、交雑親和性は、5B 染色体短腕に位置する *Skr* 遺伝子が異種花粉の花粉管の伸長を雌蕊内の花柱で阻害していることによることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：QTL analysis on the crossability of common wheat with rye using recombinant inbred lines (RILs) developed from inter-varietal chromosome substitution lines clarified that the gene for crossability was located on the short arm of common wheat. Observation of pollen tube elongation of rye pollen on the common wheat pistils showed high correlation between pollen tube elongation and the degrees of crossability. These facts show that *Skr* gene located on the short arm of chromosome 5B inhibits pollen elongation in the styles of common wheat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：パンコムギ、交雑親和性、QTL 解析、染色体置換系統、組換え近交系統、分子マーカー、花粉管伸長、共焦点レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

高等植物の受粉・受精の過程における交雑不和合現象は、異種植物のもつ有用遺伝子の栽培植物への導入や自殖性種子の生産といった育種学の観点から克服すべき課題である

とともに、栽培植物の成立過程や種の分化過程における性的隔離、不和合性のメカニズムといった興味ある問題を包含している。不和合現象のひとつである自家不和合性については、ブラシカ、ニホンナシ、リンゴといっ

た植物で代表されるように、受粉過程における雌蕊と花粉との間の細胞間認識に関与する分子機構が明らかになっている。しかし、異なる種あるいは属の間の交雑不和合性についての研究は例が少ない。これは、異種あるいは異属といった遠縁の交雑においては雑種形成は不可能であるという一般的な考え方が存在すること、および交雑の成功・不成功が遺伝的要因に基づくものであるのかどうかという表現型を判定することが自家不和合性の場合ほど明確でないことによる。しかし、コムギ連植物の間では互いに人為的な交雑が行われ雑種が得られる場合があることは知られていた (Sakamoto 1973)。中でもパンコムギでは古くからライムギとの交雑がヨーロッパを中心に行われ、その中でパンコムギ品種の中にライムギとの交雑が容易な品種と困難な品種が存在することは知られていた。Lein (1943) は多大な労力をかけてパンコムギとライムギとの間の交雑親和性がパンコムギの側の二つの遺伝的因子によるものであることを発見し、*Kr1* と *Kr2* という遺伝子記号を与えた。さらに、Lange and Riley (1973) はパンコムギの染色体置換系統を用いることによって、ライムギとの間の主要な交雑親和性が 5B 染色体上の遺伝子によるものであることを見出し、5B 染色体上の遺伝子を *Kr1* と特定した。Snape ら (1979) はパンコムギと *H. bulbosum* との間の交雑親和性がライムギとの間の交雑親和性と相関関係にあることを明らかにし、さらに染色体置換系統を用いることによって、それが 5B、5A 染色体上の遺伝子によることを見出した。さらに報告者らはパンコムギと栽培オオムギとの雑種植物を育成する過程で、同様の現象を見出した (Koba et al. 1992)。これらのことから、パンコムギの異種植物との交雑親和性が、第 5 同祖群染色体に座乗する少数の遺伝子に制御されていることが明らかとなった。一方、報告者らはパンコムギの染色体置換系統とパンコムギの D ゲノム祖先種である *Aegilops squarrosa* との交雑実験から、この組合せの場合、交雑の阻害に対して 5D 染色体上の遺伝子が大きく貢献することを見出した (Koba and Shimada 1993)。これらのことから、パンコムギの異種植物との間の交雑親和性には第 5 同祖群染色体上の遺伝子が関与しているが、それらの間では花粉親の違いによって反応が異なることが明らかとなった。雌蕊内における受精阻害機構については、雌蕊内での花粉管の伸長阻害であることは報告者らの研究によって明らかとなった (三科ら 2007) が、阻害物質の同定とその作用機構については未だ不明のままである。報告者らは、パンコムギの 5B 染色体上に座乗する *Kr1* 遺伝子について関連する遺伝子 DNA を特定すべく、5B 染色体に関する組

換え近交系統 (Recombinant Inbred Lines) を用いてディファレンシャル・ディスプレイ法により雌蕊特異的な cDNA を単離し、クローニングを行って塩基配列の決定を試みてきた (平成 14 年度科学研究費補助金報告書)。しかし、実験材料におけるノイズの多さによって *Kr1* 遺伝子に対応する DNA 断片を獲得するには至らなかった。Tixier ら (1998) は、5B 染色体に関する分子マーカーを用いた QTL 解析により、5B 染色体にはライムギとの交雑親和性に関与する 2 つの QTL (量的形質遺伝子座) があり、染色体短腕に位置する QTL を *Skv*、長腕に位置する QTL を *Kr1* とし、*Skv* の方がより大きな受精阻害効果を持つことを明らかにした。申請者らも追試験をおこない、この事実を確認した (Manickavelu et al. 2007)。さらに、雌蕊より mRNA を抽出し、cDNA-AFLP 法により交雑親和性の低いコムギ系統特異的な DNA 断片の単離を試み、候補の一部と考えられる 14 断片を単離した (Manickavelu et al. 2008, 2009)。これらの研究から、パンコムギの持つ交雑親和性遺伝子を解析することは、交雑不和合性のメカニズムを明らかにするのみならず、その遺伝子の成立過程、同祖遺伝子間の分化、コムギ連植物の間における交雑の難易といった育種学及び進化的視点からも新しい知見が得られるものと思われ、研究を進めてゆくこととしたものである。

2. 研究の目的

(1) 交雑親和性遺伝子の 5B 染色体上への詳細な位置付けに関する研究

パンコムギの持つ交雑親和性遺伝子をマッピングする試みはいくつかの研究グループによって行われてきた。初期には、Lange and Riley (1973) 及び Sitch ら (1985) がコムギのダイテロソミック系統を用いて、*Kr1* 遺伝子が、5B 染色体の長腕に位置していることを報告した。しかし、その後、分子マーカーを用いた QTL 解析により、Tixier ら (1998) は 5B 染色体の短腕の末端領域に交雑親和性に関与する遺伝子が存在することを明らかにし、これを *Skv* と命名した。さらに、Tixier ら (1998)、Lamoureux ら (2002)、Alfares ら (2009)、Mishina ら (2009) が 5B 染色体上の交雑親和性に関与する遺伝子のうち、長腕上の遺伝子より短腕上の遺伝子の方がより強い効果をもたらしていることを明らかにした。そこで、本研究では、染色体置換系統をもとに報告者らが育成した組換え近交系統 (RILs) 3 集団を用いて、*Kr1* と *Skv* のどちらの遺伝子がより効果的に交雑親和性に関与しているかを明らかにしようとした。

(2) 交雑親和性遺伝子の機能解明に関する研究

これまで、パンコムギとライムギとの交雑において、交雑親和性どの段階で決定されるのか明らかにするため、花粉管の観察が、押しつぶし法や切片を作成して観察されてきた。しかし、明確な解剖学的な結論は得られていない。そこで、本研究では、交雑親和性の高い品種及び低い品種にライムギ花粉を授粉して共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元的な像を観察することにより、より詳細な花粉管の行動を観察することとした。

3. 研究の方法

(1) 交雑親和性遺伝子の5B染色体上への詳細な位置付けに関する研究: 組換え近交系統3系統を用いた。これらの組換え近交系統は、交雑親和性の高いパンコムギ品種 Chinese Spring (CS と略) に交雑親和性の低い品種 Mara, Hope 及び Cheyenne のそれぞれの5B染色体を置換した系統をCSの正常系統と交雑した。Mara 及び Hope5B の場合は、そのF1をCSのモノソミック5B系統に交雑して得られた個体をさらに自殖し、その後代から2n=42の個体を選抜して得られたものである。Cheyenne5BRILsはF1をF7世代まで自殖して得られた。RIL系統は、5B染色体上の *Kr1* あるいは *Skr* 遺伝子に関して優性あるいは劣性のホモとなり、その発現は安定しているはずであり、表現型の変異は環境変異によるものであると判定することができる。19系統のCS/Mara5BRILs、19系統のCS/Hope5BRILs および 115系統のCS/Cheyenne5BRILs 集団を用いて QTL 解析を行った。表現型は、ライムギ花粉をそれぞれの個体に1穂あたり24小花授粉し、少なくとも3穂について1ヶ月後の種子形成率を観察し、その平均値を系統あるいは個体の表現型値とした。

RIL 集団の遺伝子型は 81 の SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーを用いて判定した。これらのマーカーは Somers ら (2004) によって既に染色体地図上に位置づけられている。マーカーの物理的位置についてはナリ・テトラソミック 5B5A 系統及びダイテロソミック 5BL 系統を用いて確認した。ゲノム DNA は CTAB 法により若い葉 200mg より抽出した。PCR 溶液は定法により 10 μ g とし、94°C の変性、55°C のアニーリング、そして 72°C の伸長を 45 サイクル行った。PCR 産物を 13% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。遺伝子連鎖地図は Mapmaker/QTL (Lander et al. 1987) により作成し、LOD2.0 を域値とした。

(2) 交雑親和性遺伝子の機能解明に関する研究: ライムギとの交雑親和性の高い品種 CS、及び交雑親和性の低い品種 Cheyenne、Hope、Mara を雌親とし、ライムギ品種 Petkus の花粉を受粉した。雌蕊の成熟の 2、3 日前に除

雄し、他の花粉が付かないように紙袋で穂を蔽い、成熟雌蕊にライムギ花粉を授粉した。授粉 1 時間後、3 時間後及び 1 日後に雌蕊を回収し、-80°C で保存した。エタノール酢酸 (3 : 1) で固定した後、乳酸エタノール (2 : 1) で軟化し、アニリンブルー及びよう化プロピジウム (PI) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。得られた画像は画像ソフトウェアを用いて編集した。

4. 研究成果

(1) 交雑親和性遺伝子の5B染色体上への詳細な位置付けに関する研究: 図1に示すように、CS/Mara5BRIL 集団を用いた交雑親和性の分布では、8 系統が高い交雑親和性を、7 系統が低い交雑親和性を、そして、4 系統が中間的な表現型を示した。CS と CS/Mara5B との間の多型は 28 のマーカーで見られた。5B 染色体の動原体の位置は、Xgwm540 と Xgwm213 との間であること (Grain Genes 2.0) から、これらを用いた QTL 解析の結果、交雑親和性に関与する遺伝子がマーカー Xcfb341 の位置にあり、これが 5B 染色体短腕に座乗していることが判明した (図2)。用いたマーカーの多型性の有無に違いはあるが、CS/Hope5BRIL 集団、及び、CS/Cheyenne5BRIL 集団を用いた実験においても、交雑親和性に関する QTL が 5B 染色体短腕上に得られた。これらのことから、本研究では、5B 染色体に座乗する交雑親和性遺伝子は、これまで報告されてきた 5B 染色体長腕に座乗する *Kr1* ではなく、短腕上の *Skr* であると結論づけた。

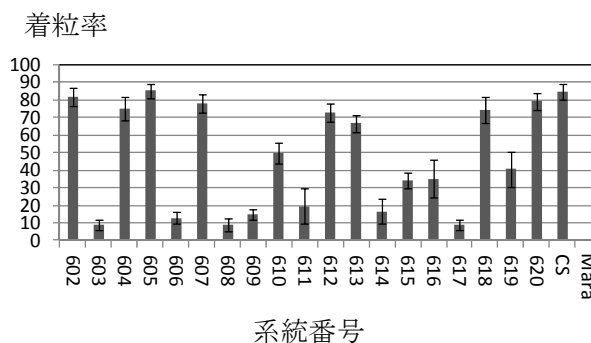


図1. CS/Mara5BRIL 系統のライムギとの交雑親和性の分布

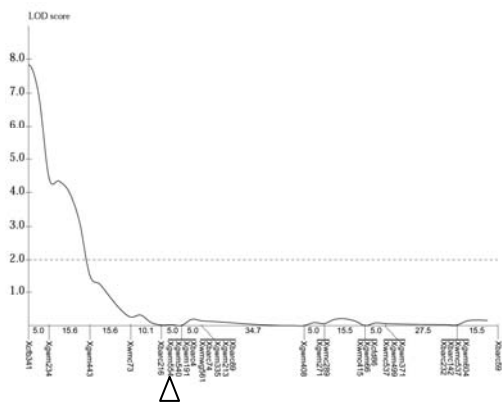


図2. 交雑親和性（着粒率）に関する5B染色体上のQTL解析（横軸は5B染色体上の分子マーカーの位置を示す（△：動原体の位置、左：短腕、右：長腕）。縦軸はLOD値を示す）

(2) 交雑親和性遺伝子の機能解明に関する研究：パンコムギにおける花粉管の観察は多くの研究者が試みてきたが、本研究において乳酸を用いることによって、これまで不明瞭であった花粉管と雌蕊の剛毛の自家蛍光を明瞭に識別することが可能となり、さらにPIにより花粉粒を染色することができた。

4品種のパンコムギにおいて、明瞭に花粉管の伸長を観察することが可能となり、交雑親和性の高低と花粉管伸長との関係を明らかにすることが可能となった。ライムギの花粉は、柱頭上で交雑親和性の高低に係わらず発芽し、花粉管を柱頭内に伸長させていた。コムギの雌蕊は多くの剛毛によっておおわれているが、花粉が柱頭のどの位置に付着しても花粉管を伸長させていた。従って、柱頭の下位で授粉された花粉は上位で受粉された花粉よりも短距離で胚珠に到達することが可能である。しかし、授粉3時間後の花粉管では、交雑親和性の高低により花粉管の行動が異なっていた。交雑親和性の低い品種では、胚珠の上部に至った花粉管はほとんど見られず、その前に花粉管の伸長が停止していた。交雑親和性との相関関係を知るために、授粉1時間後と1日後の花粉管の長さを測定し交雑親和性（着粒率）との間の相関係数を算出した。その結果、ライムギとの交雑親和性の最も低いMaraではライムギ花粉の花粉管が最も短く、着粒率による交雑親和性の程度が花粉管の長さとは有意な相関関係にあることが判明した。しかし、柱頭下部に受粉された花粉粒については花粉管は短くても、受精に至ることが観察されたことから、*Skr*遺伝子は、受精率そのものに関与するのではなく、花粉管の伸長を阻害する役割を担って

いるものと考えられる。従って、本研究は、交雑親和性のより明確な指標として花粉管長が有効であることを明らかにし、その観察手法を確立したものである。

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）

〔学会発表〕（計3件）

- ① Koba, T., K. Nagataki, S. Takumi, S. Kikuchi, K. Mishina and H. Sassa
Chromosomal stability in amphidiploids between tetraploid wheat cv. Langdon and *Aegilops uniaristata* and their progenies. 12th International Wheat Genetics Symposium, Yokohama, Japan, 2013
- ② Mishina, K., H. Sassa and T. Koba
Re-localization of the gene for crossability on chromosome 5B of common wheat. 26th International Triticeae Mapping Initiative Symposium, Mexico City, Mexico, 2011
- ③ Koba, T., T. Kawaguchi, K. Mishina, S. Kikuchi and H. Sassa
Identification of wheat-barley addition lines using EST markers mapped in barley. 26th International Triticeae Mapping Initiative Symposium, Mexico City, Mexico, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木庭 卓人 (Koba Takato)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号：40170302

(2) 研究分担者

佐々 英徳 (Sassa Hidenori)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：50295507

菊池 真司 (Kikuchi Shinji)
千葉大学・大学院園芸学研究科・助教
研究者番号：80457168

(3) 研究協力者

三科 興平 (Mishina Kouhei)
横浜市立大学・木原生物学研究所・研究員
研究者番号：なし