

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780008

研究課題名(和文) 野生コムギ由来の未同定赤さび病抵抗性遺伝子のゲノム領域の解明

研究課題名(英文) Identification of genomic region of leaf rust resistance gene derived from wild wheat

研究代表者

小林 史典 (Kobayashi, Fuminori)

独立行政法人農業生物資源研究所・作物ゲノム研究ユニット・研究員

研究者番号：80584086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：コムギ系統「RW-12」は国内の赤さび病菌レースに対して明瞭な抵抗性を示すことから、品種育成に幅広く用いられてきた。その抵抗性遺伝子(以下LrRW12)は、野生二粒系コムギに由来し、6B染色体に座乗することが知られるが、LrRW12の詳細は未解明である。本研究では、次世代シーケンス技術やゲノム情報を利用してLrRW12の解析を行った。その結果、LrRW12が6B染色体長腕の末端部に座乗することを明らかにし、近傍領域のゲノム配列を特定した。そのゲノム配列の調査から、ABCトランスポーター遺伝子等の病害抵抗性に関わる遺伝子が複数存在することを明らかにし、赤さび病抵抗性との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A bread wheat accession “RW-12” had been used for improvement of the resistance to wheat leaf rust in Japanese breeding program. Previous studies revealed that a single resistance gene in “RW-12”, designated as LrRW12, was derived from wild emmer wheat and located on long arm of chromosome 6B. However, molecular approach for the LrRW12 gene has not been carried out so far. The objective of current study was to analyze the LrRW12 using next-generation sequencing technology and wheat genome sequences. The result showed that the LrRW12 gene was physically mapped on distal region of long arm of chromosome 6B, and genomic sequences closely linked to the LrRW12 locus were obtained. At least 39 putative gene sequences were found in these genomic sequences, among which several disease-related genes were included such as an ABC transporter gene. This result suggested a relationship between these disease-related genes and the resistance to wheat leaf rust.

研究分野：作物ゲノム科学

キーワード：コムギ 赤さび病 6B染色体 ゲノム GBS RW-12 LrRW12 さび系14号

1. 研究開始当初の背景

(1)コムギ赤さび病は、世界的に最も重大な病害の一つであり、コムギ赤さび病菌によって引き起こされる糸状菌病である。赤さび病は、世界の広範にわたって発生し、小麦生産に多大な影響を与えている。本病により、最大で65%の減収を引き起こすといわれる(米国USDA調査による)。赤さび病は、国内でも幅広く発生し(毎年作付け面積の10~25%がさび病に感染、農林水産省調査による)、特に東北や北海道ではしばしば被害が報告される。

(2)赤さび病抵抗性遺伝子は、これまでに60個以上同定されているが、そのうち約半数が種属間交雑によりコムギ近縁野生種などから導入されている(McIntosh et al. 2010)。1962年に米国より導入された抵抗性コムギ系統「RW-12」は、国内全ての既知レースに対して高度な抵抗性を示す。その抵抗性は、「RW-12」の育成過程で使用された野生二粒系コムギに由来する。「RW-12」は、数多くの抵抗性中間母本の育成に役立てられてきたにもかかわらず、その抵抗性遺伝子が6B染色体の長腕に座乗し、優性の単因子であること以外は未解明である(山口 1997)。

(3)コムギのゲノム解読プロジェクトが、国際コムギゲノム解読コンソーシアム(IWGSC)のもと、2005年より進められている。研究代表者が参加する国内研究チームは、6B染色体のゲノム解読を担当し、ショットガン配列解読、BAC物理地図の構築、参照配列解読を行っている。そこで、6B染色体のゲノム解読によって得られた情報を利用し、「RW-12」が保有する赤さび病抵抗性遺伝子の解析を始めた。

<引用文献>

- McIntosh et al., Catalogue of gene symbols for wheat, 2010
- 山口勲夫、東北農業試験場研究資料 20:1-23、1997

2. 研究の目的

本研究では、「RW-12」が保有する抵抗性遺伝子(以下 *LrRW12* とする)の座乗位置を特定する。また、*LrRW12* を含む領域について、ゲノム情報を利用して、ゲノム構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)材料の準備と抵抗性試験

表1に示した赤さび病菌株とコムギ系統(小麦農林61号以外)の分譲を、農業生物資源研究所の農業生物資源ジーンバンクより受けた。

「さび系14号」、「さび系13号」、「さび保7号」は、「RW-12」と「ミヤギノコムギ」より育成された抵抗性系統で、両者の交配の後

代に「ミヤギノコムギ」による戻し交雑がそれぞれ2回、7回、6回行われている。また「さび系20号」は、「RW-12」と「小麦農林61号」より育成された抵抗性系統で、「小麦農林61号」を遺伝的背景に持つ。「Thatcher」、「Webster」は、過去の報告からそれぞれ「Race 1B」、「Race 6A」に対して抵抗性を示すことから、レース判別品種として用いた。「Race 21B」は、国内で最も感染力が強い赤さび病菌として知られる。

以上の材料を用いて、幼苗期の抵抗性試験を行い、以降の解析に使う材料を選定した。

表1 本研究で用いた赤さび病菌およびコムギ系統

| 赤さび病菌 | MAFF 番号 |
|----------|----------|
| Race 1B | 102012 |
| Race 6A | 102015 |
| Race 21B | 102017 |
| コムギ系統 | GB_JP 番号 |
| RW-12 | 20522 |
| ミヤギノコムギ | 184878 |
| さび系14号 | 20552 |
| さび系13号 | 20412 |
| さび保7号 | 71668 |
| 小麦農林61号 | |
| さび系20号 | 20515 |
| Thatcher | 23818 |
| Webster | 24089 |

(2)F2集団の育成と抵抗性試験

「さび系14号」と「ミヤギノコムギ」(S14/MY)、「小麦農林61号」と「RW-12」(N61/RW12)の2種類の交配からF2集団を育成した。得られたF2集団の抵抗性試験を「Race 21B」を使って行い、抵抗性と罹病性の分離比を調査した。

(3)*LrRW12*のマッピング

S14/MYのF2集団を用いて、SSRマーカーによる多型解析、次世代シーケンス技術を利用したGenotyping-by-Sequencing(GBS)法によるジェノタイピングを行った。この結果と抵抗性試験の結果を合わせて、*LrRW12*をマップした。

(4)*LrRW12*領域のゲノム構造の調査

マッピングの結果から、6B染色体の物理地図上の*LrRW12*のゲノム領域を特定した。物理地図は、ゲノム解読プロジェクトにて構築された実験標準品種「Chinese Spring」(CS)に由来するBACクローンから構成される。また、BACクローンのゲノム配列情報を使って、当該領域のゲノム構造を調査した。

4. 研究成果

(1)抵抗性試験

「RW-12」、「さび系13号」、「さび系14号」は、3つの赤さび病菌レースに対して明瞭な抵抗性を示した(表2)。「ミヤギノコムギ」

は、「Race 6A」および「Race 21B」に対して罹病性を示したが、「Race 1B」に対して抵抗性を示した。また「さび保7号」は、「ミヤギノコムギ」と同様の抵抗性反応を示し、「RW-12」由来の抵抗性遺伝子が脱落していると考えられた。一方、「さび系20号」は「小麦農林61号」と同様に3つのレースに対する抵抗性が見られず、抵抗性遺伝子が脱落していると推察された。「Thatcher」は「Race 1B」に対する抵抗性を持つと過去に報告されたが、今回の試験では抵抗性が確認できず、3つのレースに対して罹病性を示した。「Webster」は過去の報告と同様に、「Race 6A」に対する抵抗性を示した。

表2 抵抗性試験の結果

| コムギ系統 | 1B | 6A | 21B |
|----------|----|----|-----|
| RW-12 | R | R | R |
| ミヤギノコムギ | R | S | S |
| さび系14号 | R | R | R |
| さび系13号 | R | R | R |
| さび保7号 | R | S | S |
| 小麦農林61号 | S | S | S |
| さび系20号 | S | S | S |
| Thatcher | S | S | S |
| Webster | S | R | S |

R：抵抗性；S：罹病性

(2) F2 集団の育成と抵抗性試験

抵抗性試験の結果から、本研究では赤さび病菌「Race 21B」に対して、明瞭な抵抗性あるいは罹病性を示した、「RW-12」、「さび系14号」、「さび系13号」、「ミヤギノコムギ」、「小麦農林61号」を材料とすることとした。これらを用いた交配組み合わせにより得られたF1種子のうち、「さび系14号/ミヤギノコムギ」(S14/MY)、「RW-12/小麦農林61号」(RW12/N61)について、F2集団を育成した。

それぞれのF2集団(S14/MY：111個体、RW12/N61：117個体)に対して「Race 21B」による抵抗性試験を行った。その結果、抵抗性と罹病性が、S14/MYでは82：29、RW12/N61では、89：28に分離し、2検定により統計的に有意に3：1に分離したことが証明された(表3)。このことから、抵抗性が優性の単因子支配であることが確認され、過去の報告と一致した。

表3 F2 集団の抵抗性試験の結果

| 集団 | 抵抗性：罹病性 | P値(3:1) |
|----------|---------|---------|
| S14/MY | 82：29 | 0.7841 |
| RW12/N61 | 89：28 | 0.7896 |

(3) LrRW12 のマッピング

LrRW12の染色体上の座乗位置を特定するために、まず6B染色体のゲノム解読プロジェクトで使用した190個のSSRマーカーを用いて、多型調査を行った。調査では、集団の親系統の「さび系14号」、「ミヤギノコムギ」、「RW-12」、「小麦農林61号」に加えて、「さ

び系13号」、「さび保7号」を用いた。その結果、6B染色体長腕の末端部に位置するSSRマーカーのwmc388が、「ミヤギノコムギ」とそれ以外の系統との間で多型を示した。次に、S14/MY集団を用いてwmc388マーカーの多型の分離を調査したところ、一つのF2個体を除く110個体において、抵抗性/罹病性と多型が一致した。この結果から、LrRW12はwmc388の近傍に座乗することが示され、6B染色体長腕に座乗するという過去の報告と一致した。

LrRW12の詳細な連鎖地図を作製するために、Genotyping-by-Sequencing (GBS)法を用いて、S14/MY集団のジェノタイピングを行った。GBS法は、次世代型シーケンサーを利用したハイスループットでゲノムワイドなジェノタイピング手法として、近年様々な生物種で活用されている。GBS法では、シーケンス解析によって得られるGBSタグ配列に、一塩基多型(SNP)情報が含まれ、この結果に基づいてジェノタイピングを行う。

S14/MY集団のGBS解析の結果、625ヶ所でSNPが検出された。この結果とwmc388の多型調査の結果、および(2)で得られた抵抗性試験の結果とを合わせて連鎖解析を行ったところ、22個の連鎖群からなる連鎖地図が構築され、その内の一つの連鎖群にwmc388とLrRW12がマップされた。これらの連鎖群を構成するGBSタグ配列について、IWGSCが発表したコムギの概要ゲノム配列を使って各GBSタグ配列が帰属する染色体を特定し、連鎖群と染色体との対応付けを行った。その結果、LrRW12を含む連鎖群は6B染色体長腕に相当した(図1)。

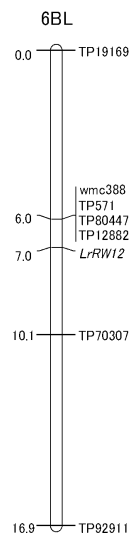


図1 6B染色体長腕の連鎖地図

地図の左側の数字は遺伝距離(cM)、右側にマーカーおよびLrRW12の位置を示す。

(4) LrRW12領域のゲノム構造の調査

連鎖解析により特定されたLrRW12の領域に位置するマーカーの配列情報と、6B染色体

のゲノム解読プロジェクトで構築された物理地図情報から、*LrRW12* が 6B 染色体長腕の末端部に座乗することが明らかとなった。また、これらのマーカーを含み、*LrRW12* 近傍に位置すると考えられる 3 つの BAC コンティグを特定した。約 4Mb に相当するこれらの BAC コンティグのゲノム配列について、植物ゲノムアノテーションプログラムの MEGANTE (Numa and Itoh 2014) を使って、遺伝子予測を行った。その結果、この領域に少なくとも 39 個の遺伝子配列があることが明らかとなった(図 2)。予測された遺伝子配列には、ABC トランスポーター、膜貫通型タンパク質、細胞壁関連タンパク質、リン酸化酵素など、病害抵抗性に関連すると考えられるタンパク質をコードしているものが見つかり、これらと赤さび病抵抗性との関連が示唆された。

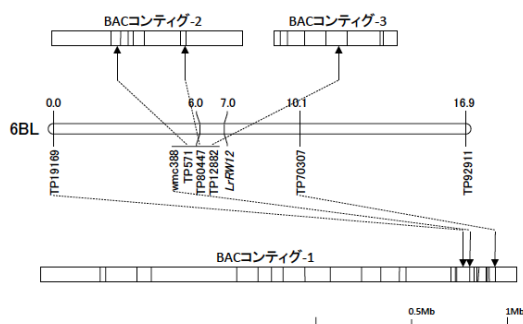


図 2 *LrRW12* 近傍に位置する BAC コンティグ 中央部の 6BL の連鎖地図(図 1 より)を挟んで、BAC コンティグ(1~3)を模式的に示す。BAC コンティグ内のマーカーの位置を矢印、推定された遺伝子配列の位置を縦線で示す。

< 引用文献 >

Numa and Itoh, MEGANTE: A web-based system for integrated plant genome annotation. *Plant and cell physiology* 55: e2, 2014

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 史典 (KOBAYASHI, Fuminori)

独立行政法人農業生物資源研究所・作物ゲノム研究ユニット・研究員

研究者番号：80584086