

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292007

研究課題名(和文)コムギに染色体切断を誘発する配偶子致死遺伝子の単離と機能解析

研究課題名(英文) Identification of the gametocidal gene that induce chromosome breakage in common wheat

研究代表者

那須田 周平 (Nasuda, Shuhei)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10273492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：パンコムギに近縁属の*Aegilops*から導入された配偶子致死染色体は自己を持たない配偶子に染色体切断を誘発し、自己を優先的に後代へ伝達させる利己的遺伝因子である。本研究は、マップベースドクローニングによる配偶子致死遺伝子の単離を目指した。ラフマッピングを終了し、4B染色体長腕末端上の*Ae. sharonensis*由来のクロマチン領域に座乗し、遺伝的に最近傍のマーカーが作る約15 cMのインターバルにマップされることを示した。我々の分離集団のマップ解像度が83 kb/cMと高いので、1 cMのマーカー間に当該遺伝子をマップできれば、100 kb程度の物理的距離に遺伝子を限定することになる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to identify the gametocidal gene that induce chromosome breakage in wheat. We took the approach of map-based cloning to identify the gene. First, we roughly mapped the gene to the tip of the long arm of chromosome T4B-4Ssh. Then, by adopting molecular markers of the syntenic chromosomal region of rice, we could narrow down the chromosomal region harboring the gametocidal gene to a 15 cM interval between two markers. It may give an impression that the gene is still distant from the molecular markers, but eventually the region is physically estimated to be 1.3 Mb because of inflation of apparent recombination near the gene in the population tested here. Our estimation is that if we could identify the markers as close as 1.0 cM, the gene would be within 100 kb from the markers. The results of the present study will promote identification and cloning of the causal gene.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：配偶子致死 マッピング

1. 研究開始当初の背景

パンコムギの近縁種 *Aegilops* 属植物由来の配偶子致死遺伝子 (Gametocidal gene, Gc 遺伝子) は花粉体細胞分裂時に染色体切断を誘発する (Nasuda et al. 1998)。Gc 遺伝子は、パンコムギ染色体だけでなく、パンコムギゲノム中に添加されたライムギ、オオムギなどの異種染色体も切断し、欠失・逆位・転座などの染色体構造異常を生成する。この現象 (Gc システム) を利用し育成された染色体欠失系統はムギ類の遺伝学・ゲノミクスで不可欠な実験材料であり (総説: Endo 1990, 2007)、Gc システムは有用遺伝子を持つ異種クロマチンをコムギゲノムに導入する育種ツールとしても用いられている (総説: Endo 2011)。以上のように Gc 遺伝子による染色体切断現象は広く知られ利用されているが、染色体切断のメカニズムに関する知見は限られていた (表 1)。

表 1. Gc 染色体による染色体切断の機構 (Endo 2007; Nasuda et al. 1998 など)

発現様式	Gc 染色体を 0 本、2 本持つ個体は正常、1 本持つ個体で染色体切断
染色体切断部位	全染色体、ヘテロクロマチンとユークロマチン、好発部位あり
切断の起きる組織	両性の配偶体 (花粉細胞 (小孢子)、胚嚢 (大孢子)) 染色体切断は Gc 染色体をもたない配偶子でのみ起こる
切断の起きる時期	減数分裂後の配偶体の体細胞分裂 (花粉では第一花粉体細胞分裂前期)
切断強度と表現型	Gc 染色体の種類により切断強度が異なる (遺伝的背景の影響あり) 強い切断: 不稔、弱い切断: 可稔 (染色体構造変異)

研究代表者は、1998 年に配偶子致死染色体による染色体切断の発現時期を明らかにし

て以来、Gc システムの解析と利用に従事してきた。1999 年には Gc 遺伝子に密に連鎖しヘテロクロマチン領域を形成する反復配列を単離した (Nasuda 1999)。2003 年には米国カンザス州立大学の Friebe 博士と突然変異体を育成して、Gc システムが 2 因子システム (染色体切断因子と切断保護因子の 2 因子) に支配されていることを実証した (Friebe et al. 2003)。そのほか、分離集団の作製、突然変異体の育成、Gc 染色体単離のための端部動原体染色体育成、機能解析のための易形質転換性コムギ系統への Gc 染色体の導入など、着実に実験材料を集積して、ゲノミクスの進歩に即応して Gc 遺伝子をクローニングし、作用機作を解明する準備を整えていた。コムギのゲノム配列情報の解読の進行と並走して、コムギでしか報告されていないユニークな生命現象である『配偶子致死』の原因遺伝子をクローニングし機能解析する研究を行った。

2. 研究の目的

パンコムギに近縁属の *Aegilops* から導入された特定の染色体 (配偶子致死染色体) は配偶子形成時に自己を持たない配偶子に染色体切断を誘発し、自己を優先的に後代へ伝達させる利己的因子である。本研究は、配偶子致死遺伝子とその抑制因子をクローニングし、同遺伝子による染色体切断の分子機構を解明することを目的とした。具体的には、以下の 3 点を目標とした。

- (1) 配偶子致死遺伝子のクローニングによる原因遺伝子の単離
- (2) 同遺伝子に対する抑制因子のクローニングによる抑制遺伝子の単離
- (3) 単離した遺伝子の機能解析による、配偶子致死作用の分子基盤の解明

以上の目的を達し、配偶子致死遺伝子による遺伝的染色体切断誘発機構を統合的に理解することを全体目標とした。

3. 研究の方法

コムギに染色体切断を誘発する配偶子致死遺伝子の機能解析をするために、マップベースドクローニングの定法に従いつつ、ゲノミクス的手法を駆使して同遺伝子とその抑制遺伝子を単離することとした。

遺伝子の単離は、マップベースドクローニングで行い、候補遺伝子の絞り込みには申請者らの研究で遺伝的地図よりも解像度の高いことが示されたガンマ線照射微小クロマチン欠失系統群による Radiation Hybrid mapping 法を適用した。遺伝子構造予測、発現解析によっても候補遺伝子を絞り込むこととした。

具体的には、以下の2つの小課題を行った。

(1) マップベースドクローニングによる Gc 遺伝子の単離

Ae. sharonensis 由来の Gc 遺伝子について、分離集団を利用してファインマッピングを行った。放射線照射で作成した微小クロマチン欠失 (RH) 系統で候補遺伝子を絞り込んだ。Gc 遺伝子の突然変異体の RNAseq 解析を行い、遺伝子マッピング用のマーカーとなる遺伝子配列をスクリーニングした。

(2) Gc 作用の抑制因子のマップベースドクローニングと分子的基盤の解明

Ae. triuncialis の 3C 染色体の Gc 遺伝子 Gc3-3C に対する抑制遺伝子 *Igc1* (パンコムギ品種農林 26 号の 3B 染色体に座乗) をファインマッピングして、近傍マーカーを特定するために、放射線照射で作成した RH マッピング系統を育成し、PCR マーカー、並びに全ゲノムマーカーによるジェノタイピングを行った。また、3C 染色体のフローソーティングを行い、分取した DNA を増幅し、次世代シーケンス解析することで当該染色体のサーベイシーケンスを得た。

4. 研究成果

(1) マップベースドクローニングによる Gc 遺伝子の単離と形質転換による証明

Ae. sharonensis の異なった系統に由来する 4S^{sh} 染色体置換系統を交配し、*Ae. sharonensis* の 4S^{sh} 染色体の長腕末端部に遺伝的組換えを起こさせた。表現型調査のため、これに正常系統のパンコムギを交配して分離集団を育成した。このほか、EMS 突然変異体の育成、Gc 染色体単離のための端部動原体染色体育成、機能解析のための易形質転換性コムギ系統への Gc 染色体の導入、RH マッピング集団の作成、RNAseq データの取得、*Ae. sharonensis* 系統のリシーケンスの取得など、着実に研究成果を集積した。その結果、配偶子致死遺伝子をパンコムギの第 4 同祖群染色体の推定 1.3 Mb 以内の領域にマップした。Gc2 遺伝子は長腕の末端部の組換え頻度が高い領域に座乗し、実際の物理距離は 1.3 Mb よりも短いと推定されることを明らかにした (吉岡ら、2016 年日本育種学会第 130 回講演会)。さらに、RH マッピング集団も育成し、詳細マッピングへの準備を整えた (酒井ら、2016 年日本育種学会第 130 回講演会)。引き続き発現遺伝子のバイオインフォマティクス解析を行って、遺伝子マッピングに適したマーカー配列を抽出し、遺伝的マッピングを進めた。2017 年 3 月末時点で、当該遺伝子に完全連鎖したマーカーを得ている。しかし、RH マッピングの結果と整合性がまだ取れず、このマーカーが物理的に Gc 遺伝子に近接するかは、今後の解析を待たねばならない。

このほか、染色体切断時の発現遺伝子解析のために、人為的に染色体切断を誘発できる系を模索した。Gc 遺伝子については接合体での染色体切断も報告されており、我々は Gc 遺伝子を持たない卵細胞が Gc 遺伝子を持つ精核と受精すると染色体切断が起きることを確認した。この接合体染色体切断は接合体の初めての体細胞分裂後期以前に起きている。この系を用いれば、人工授粉後の特定の時期の遺伝子発現の調査により、当該遺伝子の同定ができるものと期待している。

(2) Gc作用の抑制因子のマッピングと分子基盤の解明

Ae. triuncialis の 3C 染色体の Gc 遺伝子 *Gc3-3C* に対する抑制遺伝子 *Igc1* のファインマッピングのため、RH 集団を育成した(那須田ら、2014 年日本遺伝学会 第 86 回大会)。この集団を用い、コムギ 3B 染色体に座乗する PCR ベースのマーカーを用いて解析を進めてきたが、*Igc1* 遺伝子を保持するはずの高稔性群で共通して保持されるマーカーを見出せずいた。さらに、全ゲノムをカバーする約二万のマーカーで再調査を行ったところ、3B 染色体の動原体近傍に座乗するマーカーが高稔性群で保持されていることが見えてきた。現在、全ゲノムマーカーを個別の PCR マーカー化してジェノタイプを再確認中である。

Igc1 遺伝子は 3C 染色体の Gc 遺伝子 *Gc3-C1* の抑制遺伝子である。さらに、もともとアクロセントリックな 3C 染色体染色体の長腕の大部分が欠失した del(3CL)染色体が同定されている(Endo 2007)。この染色体も *Gc3-C1* 遺伝子を保持する。同染色体をチェコの連携研究者の協力によりフローソーティングして、次世代シーケンサーによるショートリードを得た。de novo アセンブルとマッピングの結果、del(3CL)染色体が全長にわたりコムギの第 3 同祖群染色体と相同性を持つことが明らかになった。3B 染色体との詳細な比較を行ったところ、3B 染色体の動原体周辺の配列と相同であることが明らかになった(水野ら、2015 年日本育種学会 第 127 回講演会)。異常の結果は、*Gc3-C1* と *Igc1* が同祖遺伝子であるという説と矛盾しない。

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 4 件)

Joshi, G. P., T. R. Endo, S. Nasuda. PCR and sequence analysis of barley chromosome 2H subjected to the

gametocidal action of chromosome 2C. *Theoretical and Applied Genetics*. (2013) 126 (9): 2381-2390. 査読あり DOI: 10.1007/s00122-013-2142-5
Li, J., S. Nasuda, T. R. Endo. Dissection of rye chromosomes by the gametocidal systems. *Genes and Genetic Systems*. (2013) 88: 321-327. 査読あり <http://doi.org/10.1266/ggs.88.321>
Ishihara, A., N. Mizuno, R. A. K. M. Islam, J. Dolezel, S. Nasuda, T. R. Endo. Dissection of barley chromosomes 1H and 6H by the gametocidal system. *Genes and Genetic Systems*. (2014) 89: 203-214. 査読あり DOI: 10.1266/ggs.89.203
Li, J., Y. P. Gyawali, R. Zhou, N. Stein, S. Nasuda, T. R. Endo. Comparative study of the structure of chromosome 1R derived from *Secale montanum* and *Secale cereale*. *Plant Breeding*. (2015) 134: 675-683. 査読あり DOI: 10.1111/pbr.12314

[学会発表](計 8 件)

小林 史典、片桐 敏、唐沢 渉、埜 優美子、金森 裕之、藤沢 弘子、田中 剛、渡邊 将太、坂口 豊隆、那須田 周平、大野 良子、Iehisa, J. C. M.、宅見薫雄、早川 克志、阿部 千香子、Dolezel, J.、荻原 保成、松本 隆、片寄 裕一、呉 健忠、半田 裕一 コムギ 6B 染色体における BAC 物理地図の整列化、日本育種学会 第 124 回講演会、2013/10/13、鹿児島大学(鹿児島市)
水野 信之、坂口 豊隆、遠藤 隆、那須田 周平 パンコムギ芒抑制遺伝子 *B2* の欠失マッピング、日本育種学会 第 124 回講演会、2013/10/13、鹿児島大学(鹿児島市)
那須田 周平、渡邊 将太、五十嵐 太郎、吉岡 資洋、辻本 壽 コムギにおける配偶子致死関連遺伝子の radiation hybrid mapping、日本遺伝学会 第 86 回大会、2014/9/18、長浜バイオ大学(長浜市)
水野 信之、田中 剛、Jan Vrana, Marie Kubalaková, Dolezel Jaroslav、遠藤

隆、那須田 周平 *Aegilops triuncialis* に由来する del(3CL)染色体のサーベイシークエンス、日本育種学会 第 127 回講演会、2015/3/22、玉川大学(町田市)

那須田 周平 配偶子致死因子の解析、2015 年 鳥取大学乾燥地研究センター研究集会、2015/9/1、鳥取大学乾燥地研究センター(鳥取市)

吉岡 資洋、水野 信之、酒井 那乙斗、Bernd Friebe、那須田 周平 パンコムギにおける配偶子致死遺伝子 *Gc2-4Ssh* の遺伝的マッピング、日本育種学会 第 130 回講演会、2016/9/25、鳥取大学(鳥取市)

酒井 那乙斗、吉岡 資洋、水野 信之、那須田 周平 パンコムギの配偶子致死遺伝子 *Gc2-4Ssh* の Radiation Hybrid マッピング集団の育成、日本育種学会 第 130 回講演会、2016/9/25、鳥取大学(鳥取市)

山田 創、那須田 周平 配偶子致死遺伝子による接合体における染色体切断作用の解析、日本育種学会 第 131 回講演会、2017/3/30、名古屋大学(名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.plant-genetics.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須田 周平 (NASUDA, Shuhei)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号： 10273492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

バート・フリーベ (FRIEBE, Bernd)

エデュアルト・D・アクノフ (AKHUNOV, Eduard D.)

ビクラム・S・ギル (GILL, Bikram S.)

アンドレアス・フーベン (HOUBEN, Andreas)

ヤノスラフ・ドレツェル (DOLEZEL, Jaroslav)

吉岡 資洋 (YOSHIOKA, Motohiro)

水野 信之 (MIZUNO, Nobuyuki)

酒井 那乙斗 (SAKAI, Natsuto)

山田 創 (YAMADA, Hajime)

村田 和樹 (MURATA, Kazuki)