

「祖先野生種プレブリーディングによるパンコムギ品種改良システムの構築」

神戸大学 農学研究科 植物遺伝学 松岡 由浩

1 研究の背景と目的

小麦の安定供給は、世界の政治・経済の安定に直結します。現在、政情の不安定な中近東・北アフリカでは、パンコムギへの依存度が特に高い状況です。パンコムギでは、これまで、比較的少数の祖先に由来する優良な系統を繰り返し交配して品種改良がなされてきました。その結果、現在各地で栽培されるエリート品種は、育種の出発点となる遺伝的多様性を失い、更なる改良を担保できない状態になっています。本研究は、祖先野生種タルホコムギがもつ、栽培化・近代育種の過程で取り込まれなかった多様な遺伝子アレルをエリート品種に準備的に取り込んだ「プレブリーディング系統群」を作出してこの問題を克服し、新規に取得するゲノム情報と組み合わせてこれに最適な育種方法論を作ることで、コムギ生産・育種の飛躍的進歩に繋げ、この分野での世界的主導権を確立することを目的とします。

パンコムギ (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*、ゲノム構成 AABBDD) は、栽培型の二粒系コムギ (*T. turgidum* L.、ゲノム構成 AABB) と野生種であるタルホコムギ (*Aegilops tauschii* Coss.、ゲノム構成 DD) が自然界で交雑して誕生したと考えられています。タルホコムギは、ユーラシア大陸中央部(シリアから中国中部)に広く分布する、いわゆる「雑草」です(図1)。その「誕生」の過程で、パンコムギは、タルホコムギがもつアレルのごく一部のみを受け継ぎました(図2)。ところが、Dゲノムには、製パン性、病虫害抵抗性、環境ストレス耐性などの重要な農業形質に関係する有用遺伝子が多く存在します。タルホコムギは、それ自身は作物ではありませんが、生態的に幅広い環境に適応して自生しており、耐塩性などの農業的に重要な形質で大きな変異をみせます。このため、タルホコムギは、進化の過程でパンコムギに受け継がれなかった、農業的に利用価値が高い遺伝子の「未利用アレル」の巨大なプールとなっています。本研究は、新規に取得するゲノム情報と「プレブリーディング系統群」を活用して、タルホコムギの有用アレルを包括的に利用することを目標とします。



図1 タルホコムギの穂。縮尺バーは1cm。

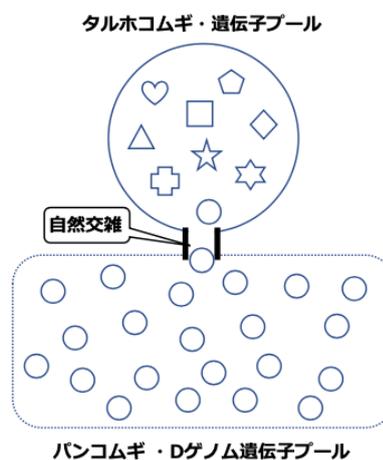


図2 タルホコムギ・遺伝子プールの概念図。タルホコムギの多様なアレルを異なる記号で示した。

2 研究方法・研究内容

本研究では、次の4つの計画を実施し、得られた知見を統合して目的を達成します：

①タルホコムギの分子マーカー・ゲノタイプピング、②プレブリーディング系統群の作出、③プレブリーディング系統群を用いたコムギ品種改良システムの構築、④プレブリーディング品種改良プロセスにおけるDゲノムの遺伝様式の解明。これらのうち、本報告では、「①タルホコムギの分子マーカー・ゲノタイプピング」について述べます。

分子マーカーによるゲノタイプピング（遺伝子型決定）は、タルホコムギの集団構造解析や遺伝子マッピングにおいて

において重要な役割を果たします。例えば、これまでの研究により、タルホコムギには、分子マーカーのゲノタイプで区別できる3つの種内系統群（TauL1、TauL2、TauL3）が存在することが明らかとされました（図3）。図3から、TauL2とTauL3は、TauL1と比べて、パンコムギDゲノムに遺伝的に近いことがわかります。このように、分子マーカーによるゲノタイプピングは、タルホコムギの集団構造の解析に利用されてきました。しかし、図3の結果が得られた研究では、タルホコムギ系統の遺伝子型を調査するために使用された分子マーカーは、タルホコムギの染色体を全体的にカバーするものの、遺伝子マッピングなど、より詳細な解析を行うためには数（169マーカー）が十分でない、という問題がありました。そこで、本研究では、より詳細な遺伝解析をタルホコムギで行うことを可能とするプラットフォームを構築するため、より多くの分子マーカーを取得し、その精度を確認するため、次のような実験を行いました。

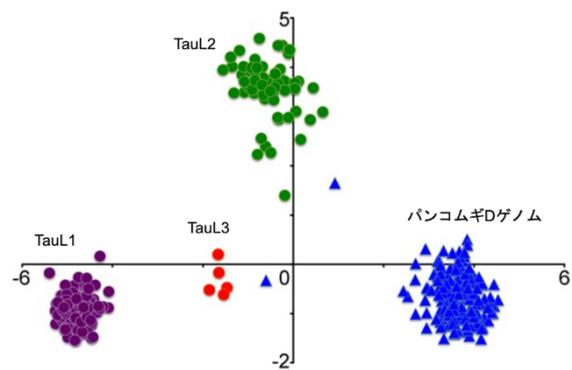


図3 タルホコムギとパンコムギDゲノムの遺伝子型主成分分析。x軸、y軸はそれぞれ、第1、第2主成分。(Matsuoka et al. PLoS ONE 8: e68310, 2013)

【材料・栽培】

タルホコムギの自然分布域を広くカバーする210系統（図3の研究で用いた系統とほぼ同じ）を国内外のジーンバンク等からの分譲により入手し使用しました（図

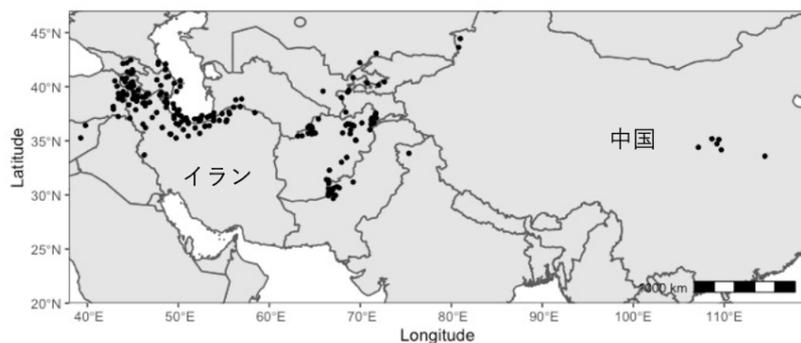


図4 タルホコムギ210系統の地理的分布

4)。栽培については、1系統につき育苗培養土を満

たした鉢を1鉢（スリット鉢、CSM-150L）使用し、1粒の種子を播種しました。全体的に発芽は良好ですが、2週間を経過しても出芽が見られなかった系統については、追加の播種を行いました。最初の播種後3週間程度、発芽を促進するために、必要に応じて温室内の温度が4℃以上になるように加温し、それ以降は、非加温にて栽培しました。

【分子マーカー・ゲノタイピング】

栽培開始後約4ヶ月の時期に、健康な植物体から採取した葉を用いて、cTAB法 (Saghai-Marroof et al., Proceedings of National Academy of Science USA 81:8014, 1984) により、各系統からDNAを抽出しました。精製したDNAを材料として、GRAS-Di® Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct) (Hosoya et al., Molecular Ecology Resources 19:1153, 2019) を行い、各系統のリシークエンス配列を取得しました。また、リシークエンス配列をタルホコムギの参照ゲノム配列 Aet v5.0 (Wang et al., G3 Genes|Genomes|Genetics 11:jkab325, 2021) にマッピングして一塩基多型 (SNPs) を取得し、各系統をゲノタイピングしました。このようにして得られたゲノタイプを用いて集団構造解析を行い、これまでの研究と同様の結果が得られるかと確認しました。

3 研究成果

Gras-Diの結果、各系統あたり平均6,264,909リードのリシークエンス配列が得られました(最小5,237,894リード、最大7,729,794リード)。また、リード数は、種内系統群間で大きな違いはみられませんでした(図5)。このことから、今回実施したGras-Diにより、特定の系統や種内系統群に偏ることのないリシークエンス配列が得られたといえます。

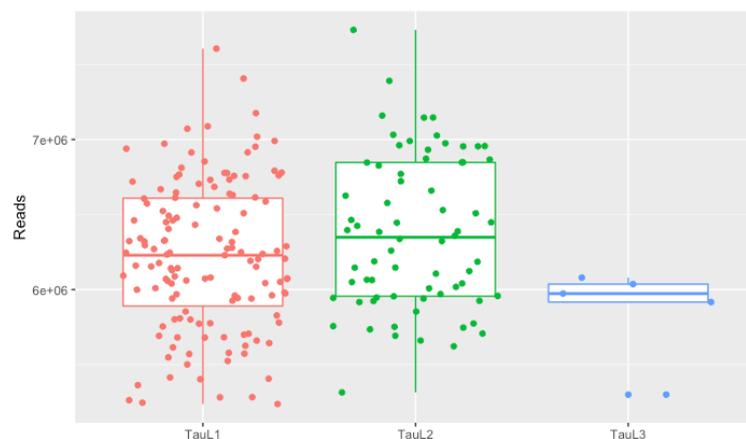


図5 Gras-Di解析により得られたリシークエンス配列のリード数の種内系統群間での比較

リードのクオリティチェックを行なったのち、BWA (commit hash: 139f68f) (Li et al. Bioinformatics 25:1754, 2013) を用いてリシークエンス配列をタルホコムギ参照ゲノム配列 Aet v5.0 にマッピングし、bcftools (Danecek et al. Gigascience 10:giab008, 2021) を用いてSNPsをコールしました。そして、vcftools (Danecek et al. Bioinformatics 27:2156, 2011) を用いて、マイナーアレル頻度が5%以上かつ欠損割合が20%以下のSNPsを選抜しました。その結果、54,095のSNPsを得ました。

Gras-Di解析によるリシークエンス配列から得られたSNPsデータを用いて、主成分分析により集団構造解析を行いました。その結果、図3の結果と同様の3つの種内系統群 (TauL1、TauL2、TauL3) が再構成されました。また、TauL1とTauL2のそれぞれについて、内部に遺伝的組成と地理的分布のパターンが異なるサブグループがあることが分かりました。これらのサブグループは、同様のものが他の研究グループから報告されており、それらを再構成できている結果であると考えられました。

【考察】

タルホコムギでは、Gras-Diにより、5万4千を超える分子マーカーが得られることがわかりました。これは、図3の研究で使用した分子マーカー数(169マーカー)よりも大幅な増加であり、新規分子マーカーを取得する上でのGras-Diの有用性を示すものです。さ

らに、主成分分析により種内系統群が正しく再構成されたことにより、Gras-Di は、タルホコムギ系統を精度良くゲノタイピングする点で有用であることが示されました。

【残された問題】

今回の実験に使用したタルホコムギ 210 系統については、これまでの研究により、生殖形質などのフェノタイプ（表現型）が取得されていきました。そこで、これらのフェノタイプデータと Gras-Di によるゲノタイプデータを用いて GWAS（ゲノムワイド連関解析）による遺伝子マッピングを行なったところ、関連する遺伝子の存在を示す有意なシグナルが得られました。しかし、精度の観点から、マーカー数を 10 倍程度以上に増やす必要があることが示唆されました。

【今後の課題】

上述の研究成果から、タルホコムギ系統のゲノタイピングにおける Gras-Di マーカーの有用性が示されました。一方、GWAS による遺伝子マッピングに Gras-Di マーカーを利用するためには、さらに多くのリシーケンス配列を取得するなどの改善が必要なることが明らかとなりました。また、タルホコムギの集団構造（種内に遺伝的に大きく異なる系統群があること）が、GWAS の精度と関係している可能性があることから、TauL1 系統と TauL2 系統に分けて、それぞれで GWAS できるように、参照ゲノム配列を新規に整備する必要があると思われまます（TauL3 は系統数が少ないため、現時点では GWAS できない）。

4 生活や産業への貢献および波及効果

タルホコムギのゲノムサイズは非常に大きく（4.2GB）、イネ・ゲノム（390Mb）の約 11 倍におよびます。このため、タルホコムギをゲノタイピングする分子マーカーを多数取得することは、技術的にも費用的にも、これまで難しい状況でした。このため、Gras-Di を用いることで、タルホコムギ系統を効率良く、かつ高精度にゲノタイピングすることが可能であることが示されことは、ゲノム配列情報を活用して系統を効率的に選抜して交配に使用することを可能にする点で、祖先野生種タルホコムギのプレブリーディングによるパンコムギ品種改良システムの構築に役立つ知見です。

主要穀物であるパンコムギを食糧生産の危機に即応して改良する技術を人類がもつことは、未来社会での深刻な食糧危機を回避する実効性のある方策となります。また、プレブリーディング法は、原理的に、イネやトウモロコシ、その他の主要作物に適用できます。そのため、本研究の成果は、コムギ以外の重要作物の新しい品種改良法の開発につながり得るものであり、21 世紀の食糧安全保障に貢献するものです。

以上