

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	コムギの冠水ストレス応答に及ぼす異種細胞質の効果と核細胞質相互作用に関する解析		
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人		
研究組織	中村千春 竹中祥太郎 山本涼平 古本強	農学部・特任教授 農学部・助手 農学部・助手 農学部・教授	研究代表者 共同研究者 共同研究者 共同研究者
研究期間	<input checked="" type="checkbox"/> 1年研究 <input type="checkbox"/> 2年研究		
キーワード	(1) パンコムギ (2) エギロプス属 (3) 核細胞質置換雑種 (4) 冠水ストレス (5) 核細胞質相互作用 (6) 転写産物プロファイル		

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

本研究では、前年度（2016年度-2017年度の2年間）に解析したパンコムギ品種CSを共通の核ゲノム提供親としエギロプス属の近縁野生種を細胞質ゲノム提供親とした核細胞質置換雑種系統群に加えて、これらと対照的な冠水ストレス応答性を示す核親を持つ系統群を選抜して、冠水ストレス応答に働く核ゲノムと細胞質ゲノムの相互作用を明らかにしようとした。特に、当該の選抜系統群を比較対照群として用いて、それらの活性酸素除去酵素の活性変動と転写産物プロファイルを調査し、核細胞質相互作用の要因となる遺伝子群を探索した。

以下の4点に目標を絞った研究を実施した。1)標準品種CSと対照的な冠水ストレス感受性を示すパンコムギ品種を複数選抜し、これらを核親とした核細胞質置換雑種系統群を生物検定に供試することで、冠水ストレス応答に働く核細胞質相互作用の効果を検証した。2)冠水ストレスに応答して発現変動を示す核親CSの転写産物群について、発現の特異性を調査し、さらに上記1)で選抜した対照的な核親ゲノムをもつ雑種系統群の詳細な転写産物プロファイルの比較解析を行った。3)冠水ストレスの主要な要因が活性酸素による酸化ストレスである可能性を検証するために、活性酸素の主要な除去酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の活性を測定した。4)種子の老化が冠水ストレス応答に及ぼす効果を調査する目的で、長期貯蔵した核細胞質置換雑種系統群の種子を生物検定に供試し、収穫直後の種子と比較した(この計画は当初計画に追加した)。

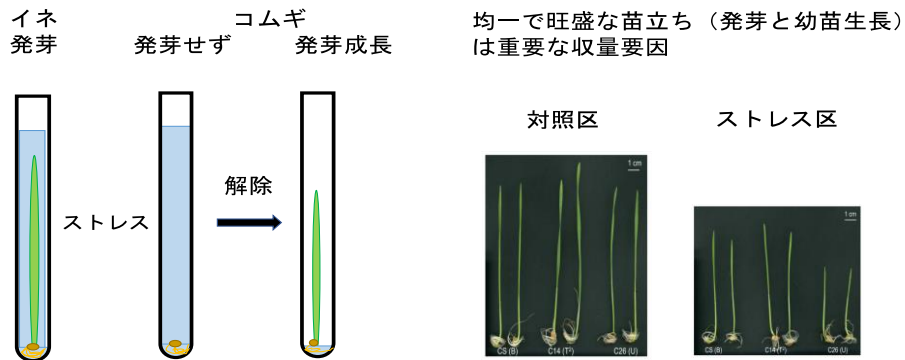
現在解析中であるが、核ゲノムの遺伝子発現制御に関わる細胞質シグナルを探る手立てを得ることができれば、将来的には重要な無生物環境ストレス要因の一つである冠水ストレスに対する有効な耐性を持つコムギ品種の育種に道を開く可能性があるかと期待する。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

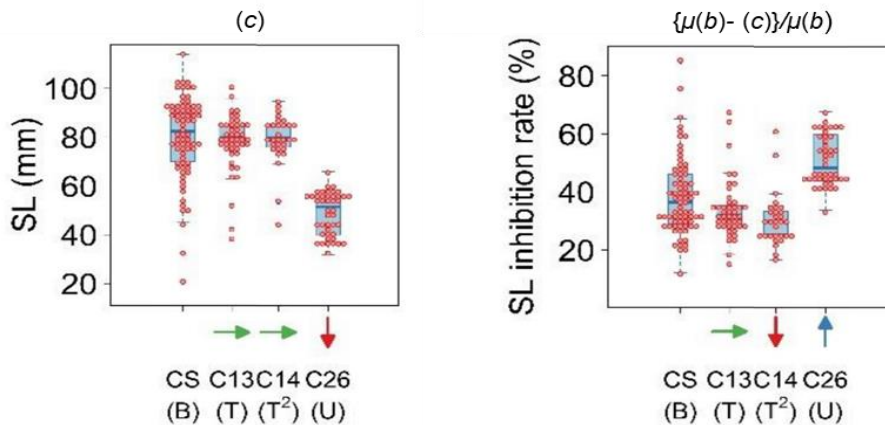
試験管生物検定法による冠水ストレス応答の評価

コムギの近縁野生種エギロプス属の持つ異種細胞質ゲノムを標準パンコムギ品種チャイニーズ・スプリング(CS)の核ゲノムと組み合わせた39系統の核細胞質雑種系統と核親CSを用いて、吸水後の種子発芽と幼苗成長に与える冠水ストレスの効果を、イネで開発した試験管生物検定法を用いて調査した。3日間のストレス処理あるいは無処理の条件下で、吸水・育苗した幼苗の子葉(あるいは第1葉)の長さを3つの変数として測定し、これらをもとに求めた6つの誘導変数を加えた合計9変数で幼苗生育を評価した。同時に、核親を含む12のパンコムギ品種群を用いて、細胞質ゲノムの効果を核ゲノムの効果と比較した。以下に示すこれらの結果は国際誌 Scientific Reports で公表した(発表論文1)。

試験管検定法で吸水時に与えた冠水ストレスの効果を調べる

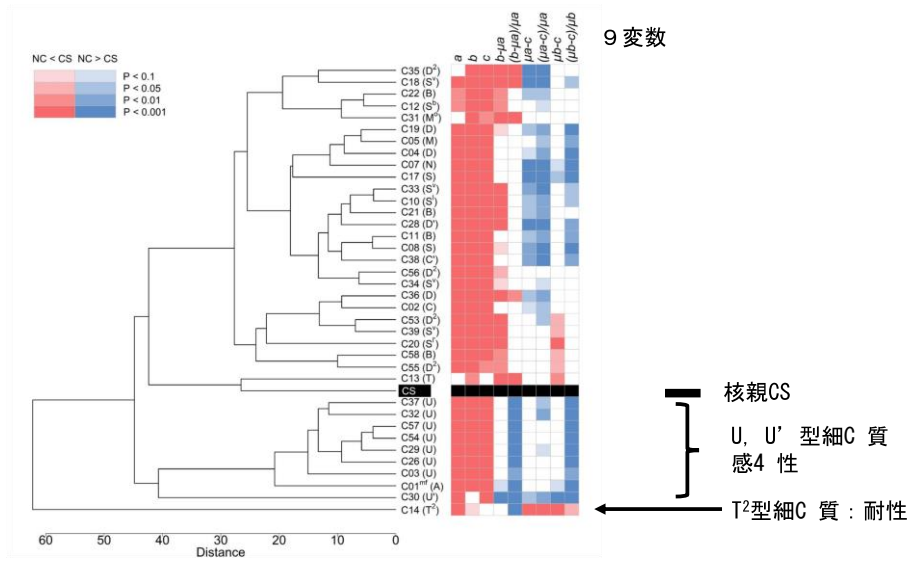


生物検定の結果(ここでは2変数のみについて解析結果の一部を示す)、異種細胞質ゲノムに大きな遺伝的多様性が認められ、さらに、特に *Aegilops mutica* の T² 型細胞質を含む複数の細胞質で置換した核細胞質雑種系統では冠水ストレスによる生育阻害が有意に減少することを明らかにし、これらの異種細胞質がパンコムギの冠水ストレス耐性の向上に寄与する可能性を示唆した。一方、特に U および U' 細胞質をもつ核細胞質雑種系統では冠水ストレスに対する感受性が他細胞質を持つ系統に比べてより高まった。

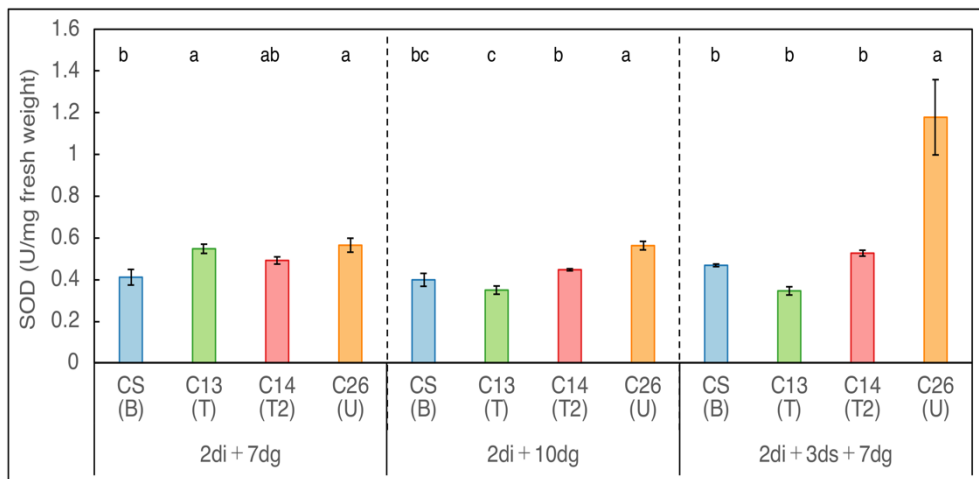


次に、細胞質ゲノムの多様性と類縁関係を冠水ストレス応答に基づき評価した。次ページの図は、9変数で分類した40種類のコムギ・エギロプス属細胞質の類縁関係を示すUPGMA系統樹である。これにより、T²型、U型、U'型細胞質の特異性が明らかになった。

冠水耐性に及ぼす4 細胞質ゲノム, 2 果に基づく系統樹



さらに、冠水ストレス応答で認められた細胞質ゲノムと核ゲノムの多様性をそれぞれの系統の平均形質値から求めた集団の変動係数に基づき比較したところ、細胞質ゲノムの変動係数は核ゲノムの値の60%にも及ぶことが示され、細胞質ゲノムの多様性が核ゲノムのそれと比べて予想以上に大きいことが判明した。続いて、冠水ストレスと活性酸素の関係を調査するために、活性酸素の主要な除去酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の活性を耐性レベルの異なる系統間で比較したところ、感受性系統の C26 (U 型細胞質) で核親 CS (B 型) および耐性系統の C13 (T 型)、C14 (T² 型) と比べて顕著な活性上昇が認められた (下図参照)。この結果から、冠水ストレスによる生育障害は高レベルの活性酸素の蓄積に起因する可能性が示唆された。



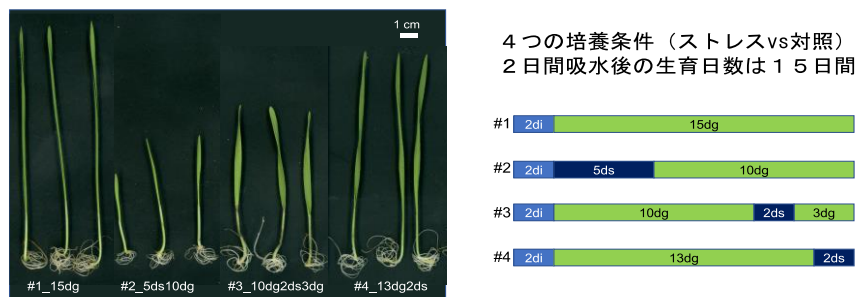
加えて本研究では、CS と対照的な冠水ストレス応答を示したパンコムギ2品種 (Jones Fife と S615) を選抜し、これらと CS を核親とした核細胞質置換雑種の合計30系統を用いて生物検定を行い、特異的な核細胞質相互作用を明らかにした。これらの結果は、現在、論文に取りまとめであり、近く投稿予定である。

RNA-Seq 解析による冠水ストレス下での転写産物プロファイルの解析

試験管生物検定法により、冠水ストレスによる幼苗の成長阻害に及ぼす核ゲノムと細胞質ゲノムの多様な効果を明らかにしたが、ではこうした効果はどのような要因に基づくのだろうか。それを明らかにするためには、冠水ストレスがパンコムギ幼苗の遺伝子発現に与える効果を詳細に調査する必要がある。そこで、はじめに核親のパンコムギ標準品種 CS を用いて転写産物に与える冠水ストレスの効果を解析した。

下図に示すように、対照区 (#1、無ストレス条件) と比べて明瞭な生育阻害が認められた 3 種類の冠水ストレス条件 (#2-#4) を選定した上で、幼苗から全 RNA を抽出し、高速シーケンサーを用いた転写産物の網羅的な解析法である RNA-Seq に供試した。

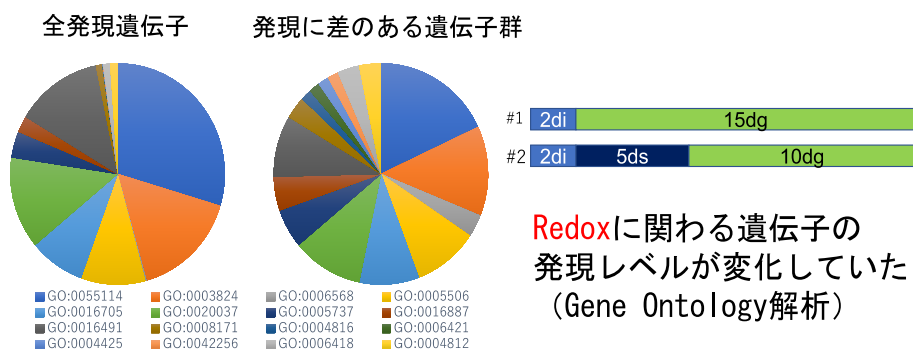
核親CSでの遺伝子発現プロファイル解析 (RNA-Seq)



3つの冠水ストレス条件区と対照区の間で転写産物の比較を行なったが、ここでは、#2 (5日間ストレス条件) と#1(対照区)の比較結果のみを下図に示した。解析の結果、冠水ストレスにより148の遺伝子群の発現が変化(増加あるいは減少)していた。Gene Ontology 解析(遺伝子の機能別類縁解析)の結果、特に酸化還元状態(Redox状態)に関わる遺伝子群の顕著な発現変化が認められた。この結果は、冠水ストレスの主要な要因が酸化ストレスであるという既に示したSOD活性の上昇結果を支持した。

幼苗の冠水ストレス応答: RNA-seqの結果

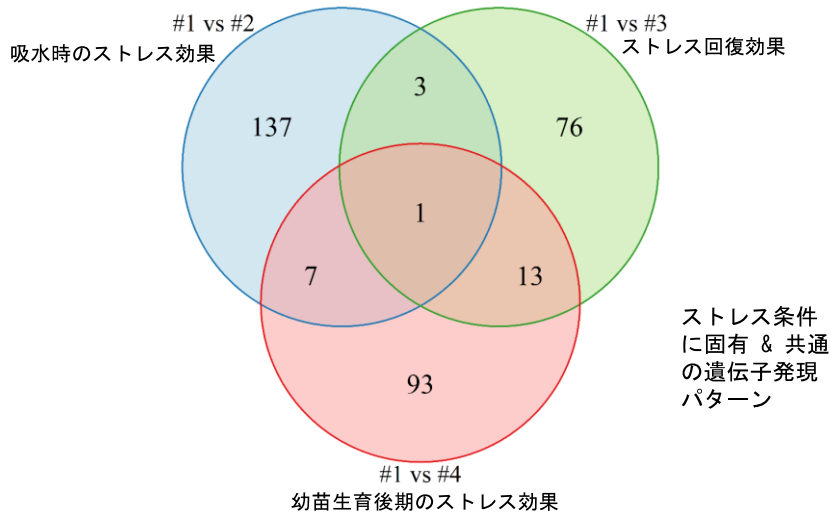
#1 vs #2: 148の遺伝子群の発現が変化していた



さらに、3つの冠水ストレス条件下での遺伝子発現プロファイル間の比較解析を行った。その結果、各ストレス条件に固有な示差的発現遺伝子群 (DEGs、発現量が異なる遺伝子群) と比較対象のストレス条件に共通な DEGs が存在することが明らかになった (次ペー

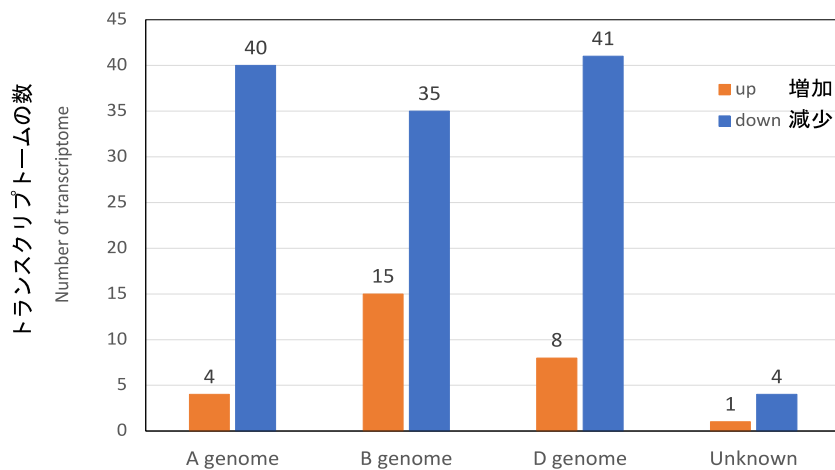
ジの図参照)。この結果は、冠水ストレスを与える時期や期間によって発現調節を受ける遺伝子群に違いが存在すること、およびそれらの条件によらず共通した発現調節を受ける遺伝子群が存在することを示唆している。

差示的に発現する遺伝子群 (DEGs) のベン図



パンコムギは6倍性であるが、A, B, D 3つのゲノムが統合した複2倍体である (ゲノム構成は AABBDD)。そこで、ゲノムごとに DEGs を分類して見たところ、発現量の増加した遺伝子群とともに発現量の減少した遺伝子群が B ゲノムで多いことが判明した。

差示的に発現した148遺伝子のゲノム別分布



以上の結果については、現在、論文を取り纏め中である。さらに、CS と対照的な冠水ストレス応答を示した *Ae. mutica* の T² 型細胞質を持つ系統 C14 (耐性系統) と *Ae. triaristata* の U 型細胞質を持つ系統 C26 (感受性系統) の RNA-Seq によるデータ取得を既に完了し、現在、解析中であり、これについても論文を取り纏めて投稿予定である。

なお、種子の老化と細胞質の冠水ストレスに与える相乗効果および差示的效果についても解析を行なったが本報告では省略した (発表論文 2)。

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

○記載項目例

発表論文：著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）

学外資金獲得状況：獲得年、研究費名、代表 or 分担、研究課題名、獲得金額

<学会発表>

- 1) 竹中祥太郎, 山本涼平, 中村千春、パンコムギの冠水耐性における核と細胞質の多様性、日本遺伝学会 (2018)
- 2) 竹中 祥太郎, 山本 涼平, 中村 千春、パンコムギの冠水応答にみられるコムギ・エギロプス属細胞質の多様性、日本植物学会 (2018)
- 3) 竹中 祥太郎、山本 涼平、中村 千春、パンコムギの冠水耐性：細胞質置換と種子老化の影響、日本育種学会 (2018)
- 4) 竹中祥太郎, 山本涼平, 中村千春、冠水ストレスを指標としたコムギ・エギロプス属細胞質の多様性評価、日本育種学会 (2018)
- 5) C. Nakamura, S. Takenaka, R. Yamamoto and T. Furumoto, Keynote Lecture, Nucleus-Cytoplasm Genome Interaction Affecting Adaptive Traits in Wheat, 2nd Intl. Conference on Biotechnology and Medical Engineering 2019, Bali, Indonesia (2019)

<発表論文(査読有り)>

- 1) S. Takenaka, R. Yamamoto and C. Nakamura, Genetic diversity of submergence stress response in cytoplasm of the *Triticum-Aegilops* complex, Scientific Reports, Online www.nature.com/articles/s41598-018-34682-3 (2018)
- 2) S. Takenaka, R. Yamamoto and C. Nakamura, Differential and interactive effects of cytoplasmic substitution and seed ageing on submergence stress response in wheat (*Triticum aestivum* L.), Biotechnology and Biotechnological Equipment, Online <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1549960> (2018)

*上記に加えて、現在3つの論文を準備中である。

<著書>

- 1) C. Nakamura, S. Takenaka and N. Jahan, Prospects for Utilization of Cytoplasmic Diversity and Nucleus-Cytoplasm Interaction in Agriculture: A Case Study of Submergence Stress Response in Wheat. Research Trends in Crop Plants, (eds, M.R, Javed & C. Nakamura), pp67-81, UTP Press (2018)

<学外資金獲得状況>

該当なし