

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0016

研究課題名（和文）Neo-domesticationによるマメ科ストレス耐性作物の開発

研究課題名（英文）Development of stress tolerant legume crops by Neo-domestication

研究代表者

高橋 有（Takahashi, Yu）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・主任研究員

研究者番号：70726273

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）：本研究の目的は、作物にストレス耐性を付与するという従来の発想を逆転し、野生種に栽培化形質を付与することで、新たなストレス耐性作物を開発することにある。この育種戦略「Neo-domestication」を加速するために、本研究ではマメ科植物において重要な栽培化形質である非休眠性、非裂莢性、器官巨大化の責任遺伝子の候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が試みる育種戦略「Neo-domestication」の成功例を示すことで、発展途上国の人々が自らの手でストレス耐性作物を開発する道を切り拓き、多様な農資源の作出によって食料問題の改善に貢献することを目指す。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reverse the conventional idea of conferring stress tolerance to crops and develop new stress tolerant crops by conferring domestication traits to wild species. To speed up the process, this study identified three candidate genes responsible for three domestication traits in legume: loss of seed dormancy, loss of pod shattering, and organ gigantism.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：マメ科 野生種 栽培化 非休眠性 非裂莢性 器官大型化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は新たなストレス耐性作物の開発に挑戦している。現在、国際社会は飢餓人口約 8 億人を抱えており、食糧増産は急務である。しかし、地球上の陸地の約 9 割は砂漠、塩性土壌、酸性土壌などに覆われており、新たに開拓できる耕作適地はほとんど残っていない。このような耕作不適地で育つストレス耐性作物を開発すれば、食糧問題は大きく改善できるだろう。

そこで注目すべきは約 100 種を含むマメ科 *Vigna* 属植物である。同属はササゲやリョクトウなど計 10 種の食用作物を含むが、その最大の特徴は、乾燥、冠水、塩害、酸性、アルカリ性、病虫害など過酷な環境に適応したストレス耐性野生種が存在することにある(図 1)(Takahashi and Tomooka 2020)。



図1. 過酷な環境に適応した *Vigna* 属野生種

また、各野生種は自生地環境に適応したストレス耐性根粒菌と共生関係を成立させているため貧栄養土壌でも生育できる。このような野生種がもつストレス耐性は、百万年単位の時間を掛けて獲得された多因子性の適応形質であり、その全ての因子を作物に導入することは現在の科学技術でも不可能に近い。

このため我々は「ストレス耐性野生種を作物化する」という逆転の戦略 Neo-domestication を提案している(図 2)。マメ科植物の栽培化で重要な役割を果たした形質変化は、種子休眠性の消失、裂莢性の消失、器官大型化の 3 つであり、これらは少数遺伝子の機能欠損により生じた形質である。つまり本戦略に必要な操作は、突然変異処理によってストレス耐性野生種の遺伝子を数個破壊することのみである。この戦略ならば、社会に受容されていない遺伝子組換え技術を利用せず、野生種が進化の過程で獲得した環境への適応機構を余すことなく使い切ることができる。

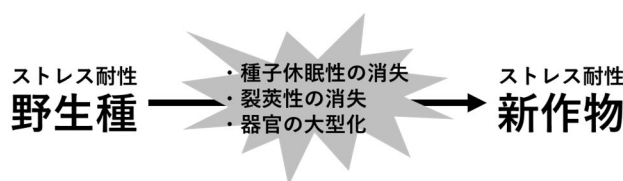


図2. Neo-domestication の概念図

2. 研究の目的

本研究の目的は、栽培化関連遺伝子を同定することである。Neo-domestication を実施する際、栽培化関連遺伝子が既知ならば、ゲノム編集や逆遺伝学的選抜が利用可能となるからだ。我々は病虫害抵抗性と高温耐性に優れるハネアズキを対象に変異原処理集団からの変異体選抜に取り組んだ。その結果、非種子休眠性、難裂莢性、器官大型化を獲得した変異体を獲得することができた(図 3)。しかし、突然変異集団からの表現型選抜は、栽培期間が約 2 か月と短いハネアズキですら莫大な労力が必要であった。それは今後、多数の野生種に Neo-domestication を適用する大きな障壁になると考えられた。マメ科植物にはライフサイクルが長い野生種も存在するためである。それならば、あらかじめ栽培化関連遺伝子を同定してゲノム編集や逆遺伝学的選抜を用いればよい。このやり方ならば、分離世代を大規模に栽培する必要はない。このため本研究では、ハネアズキの 3 つの栽培化変異体から責任遺伝子の同定を試みた。



図3. 栽培化形質を獲得したハネアズキ突然変異体

3. 研究の方法

本研究は 4 名の研究者が協力して実施した。まず、ハネアズキを対象に、ロングリードシーケンスと高密度連鎖地図を用いて、染色体スケールの参照ゲノム配列を構築し、タンパク質をコードする遺伝子を予測した。続いて、野生型を雌親とした 3 つの変異体の各 F2 世代において、変異型を示す個体群の混合 DNA からショートリードシーケンスを取得し、参照ゲノム配列にマッピングした (MutMap 解析)。その中で、変異型アリルのみ検出された遺伝子群からタンパク質配列に与える影響を予測することで、責任遺伝子の候補を選出し、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子機能の検証を試みた。また、Neo-domestication に利用できるジーンバンクアクセスionsを拡充するためマメ科野生種を収集した (Takahashi et al. 2020ab)。

4. 研究成果

まず、ハネアズキの参照ゲノム配列を構築するために、PacBio Sequel II プラットフォームを用いて、農研機構ジーンバンクアクセスions JP252948 のゲノムをシーケンスし、21Gbp の

HiFi リードを取得した。HiFi リードのデノボアセンブリにより、総長 413Mbp、N50 長 12Mbp の 823 本のコンティグを得た。続いて、RAD-seq 解析から得られた 1,163 個の SNP マーカーをもとに 11 本の染色体の遺伝地図を作成し、44 本のコンティグを地図上に固定した。固定配列は 388Mbp におよび、推定ゲノムサイズ 442Mbp の 88% をカバーした。この参照ゲノム配列上

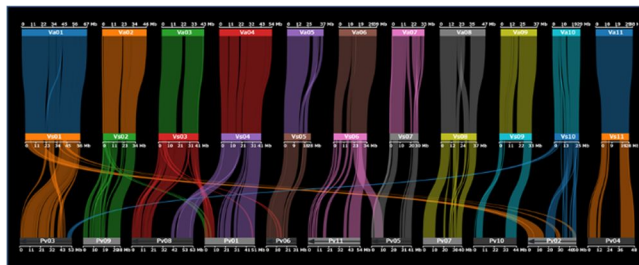


図4. ハネアズキに対するアズキとインゲンマメのシンテニー

に、*ab initio*、トランスクリプトーム、タンパク質による遺伝子予測を組み合わせ、30,963 個のタンパク質をコードする遺伝子を予測した。BUSCO 解析では、予測されたタンパク質の完全性が 99% となった。ハネアズキに対するアズキとインゲンマメのシンテニーを保存遺伝子に基づき MCScanX を用いて評価した結果、ハネアズキとアズキのゲノムは 11 本の染色体の全てにおいて互いに高いシンテニーを有していた一方、ハネアズキとインゲンマメのゲノムには転座や逆位を含む多くの構造的変異が見られた (図 4)。ここで構築した参照ゲノム配列を用いた MutMap 解析により、3 つの栽培化変異体の責任遺伝子の候補の同定を試みた。

非休眠変異体 *isi1* は、種子臍の裂開を外観特徴とし、浸水後約 3 時間で完全な吸水に至るが、野生型は 4 週間後でさえ吸水率 20% に満たない (図 5)。野生型と *isi1* 変異体の F2 世代 280 個体は、野生型と変異型が約 3 対 1 に分離した。なお、種皮は親組織由来であるため、形質評価は F3 種子で実施した。これらのうち変異型を示す 59 個体の混合 DNA のショートリードシーケンスを取得し、参照ゲノム配列にマッピングしたところ、変異型アリルのみ検出される領域が存在した。さらに同じ F2 世代について個別に遺伝子型を決定したところ、シロイヌナズナのセルロース合成に参与する *CesA7* に相同な遺伝子に存在する一塩基多型のみが *isi1* 表現型と完全に一致した (Takahashi et al. 2019)。続いて、ハネアズキの *CesA7* (Vigan.02G191500.01) に最も相同性の高いアズキの *CesA7* (Vigan.02G277200.01) の機能欠損を目的として、CRISPR-P v2.0 プログラムを用い当該遺伝子に標的領域を 4 カ所設計し、これらの標的領域に応じた gRNA を発現させるゲノム編集ベクターを 4 種類構築した (図 6)。アズキ品種「ベニダイナゴン」の完熟種子を滅菌し、MS 培地上に無菌播種した後、約 2 週間の実生の胚軸を 5~10mm に切断し、形質転換実験の外植片とした。事前に構築したバイナリーベクターをアグロバクテリウム EHA105 株に形質転換し、それらの菌体を予め準備した外植片に感染させた。構築したゲノム編集ベクターが機能していることを確認するため、Cas9 タンパク質が切断する領域においてカレスを対象に CAPS 解析を行った結果、2 つの標的領域においてカレスレベルにおいて標的領域に変異誘発が起こっていることを確認できた。今後、再生個体の表現型を確認することで、*isi1* 表現型に対する *CesA7* の機能証明を試みる。

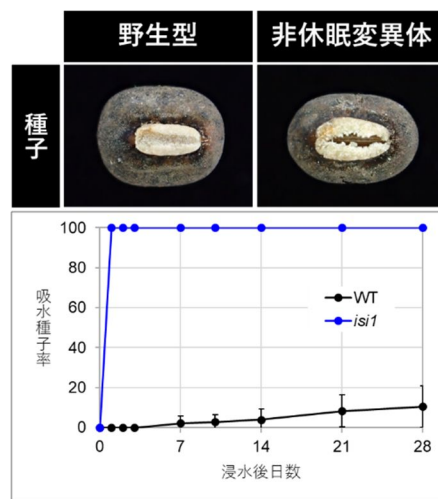


図5. 非休眠変異体 *isi1* の特徴

非裂莢変異体 *rps1* は、莢片縫合部の離層が消失しており、完全に裂莢性を消失している (図 7)。栽培サイズは、栽培化の過程で裂莢性が低減しているものの、国内では登熟してから収穫までの期間が長い場合、海外では早魑のあった年に、裂莢による減収が報告されている。サイズよりも裂莢性が低減しているアズキの難裂莢性に関する責任遺伝子の候補が同定されているものの (Takahashi et al. 2020)、これまでに主要マメ科作物において完全な非裂莢性品種は開発されていない。一方、*rps1* 表現型は、莢片縫合部の離層が消失し、完全な非裂莢性を示すため、Neodomestication に有用と考えられた。野生型と *rps1* 変異体の F2 世代 397 個体は、野生型と変異型が約 3 対 1 に分離した。これらのうち変異型を示す 103 個体の混合 DNA のショートリードシーケンスを取得し、参照ゲノム配列にマッピングしたところ、変異型アリルのみ検出される領域が存在した。その領域にアノテーションされている遺伝子に生じた一塩基変異がアミノ酸配列に与える影響を SNPeff ツールで予測したところ、ジベレリン合成に参与する遺伝子におけるナンセンス変異が抽出された。現在、F2 世代について個別に遺伝子型を決定しているところである。今後、サイズの変異原処理集団から、当該遺伝子オースログのナンセンス変異を逆遺伝学的

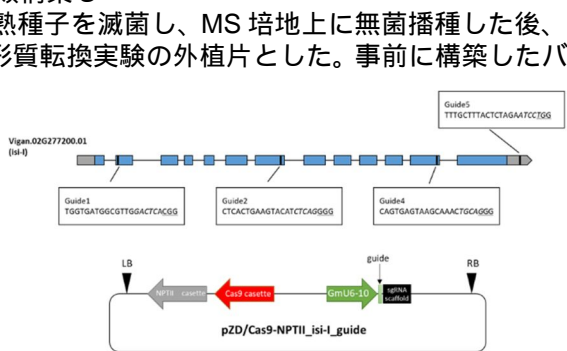


図6. ゲノム編集の標的領域と形質転換用ベクターの構造

に選抜することで、*rps1* 責任遺伝子の機能を証明するとともに、世界最高レベルの非裂莢性をもつダイズを開発する予定である。

大型化変異体 *gra1* は、莢葉や種子などの器官全てが大型化している(図8)。草丈は8割増、葉面積は5割増、種子百粒重は3割増であったが、地上部乾物重、表皮細胞面積、開花まで日数、莢長には有意な差が認められず、莢内粒数は2割減であった。野生型と *gra1* の F2 世代 400 個体は、野生型と変異型が約 3 対 1 に分離した。これらのうち変異型を示す 110 個体の混合 DNA のショートリードシーケンスを取得し、参照ゲノム配列にマッピングしたところ、変異型アリルのみ検出される領域が存在した。その領域にアノテーションされている遺伝子に生じた一塩基変異がアミノ酸配列に与える影響を SNPeff ツールで予測したところ、ミトコンドリア局在型の遺伝子におけるストップコドンの消失によるアミノ酸延長変異が抽出された。

本研究開始時点では、上述の *isi1*、*rps1*、*gra1* の解析のみを解析対象にしていたが、異なる非休眠変異体 *isi2*、非裂莢変異体 *rps2*、大型化変異体 *gra2* も一部解析した際、栽培化関連変異体は、作物として負の影響を与える多面発現形質を付随している場合が多いものの、その有無や程度は同一表現型を示す変異体でも遺伝子座ごとに異なることに着目した。その観察に基づき、マメ科野生種の作物化に最適な遺伝子を特定することの重要性を提案することで、科研費のアドオン課題である国際共同研究強化(A)の採択に繋がった。

5. 引用文献

Takahashi Y, Tomooka N (2020) Taxonomy of Mungbean and Its Relatives. In: Nair RM, Schafleitner R, Lee SH (eds) The Mungbean Genome. Springer, pp27-41.

Takahashi Y, Kongjaimun A, Muto C, Kobayashi Y, Kumagai M, Sakai H, Satou K, Teruya K, Shiroma A, Shimoji M, Hirano T, Isemura T, Saito H, Baba-Kasai A, Kaga A, Somta P, Tomooka N and Naito K (2020) Same Locus for Non-shattering Seed Pod in Two Independently Domesticated Legumes, *Vigna angularis* and *Vigna unguiculata*. Front Genet 11:748.

Takahashi Y, Yoshida S, Ohm Mar Saw, Tomooka N (2020a) The *ex situ* Conservation of Legume Genetic Resources in the Southern Shan State of Myanmar in 2018. AREIPGR 35:185-204.

Takahashi Y, Akiba M, Hirashima S, Tomooka N (2020b) The *ex situ* Conservation of Wild Legume Genetic Resources in Shimane Prefecture in 2018. AREIPGR 35:1-15.

Takahashi Y, Sakai H, Yoshitsu Y, Muto C, Anai T, Pandiyan M, Senthil N, Tomooka N, Naito K (2019) Domesticating *Vigna Stipulacea*: A potential legume crop with broad resistance to biotic stresses. Front Plant Sci 10:1607.

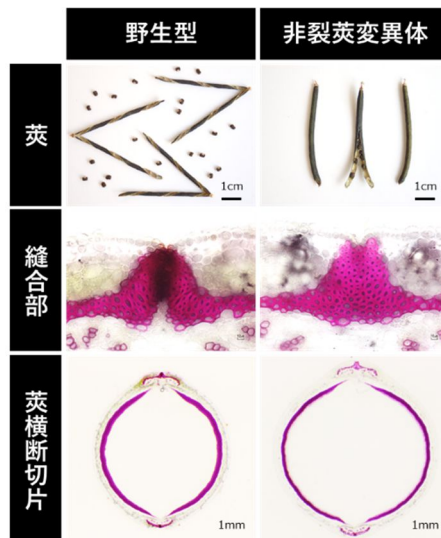


図7. 非裂莢変異体*rps1*の特徴

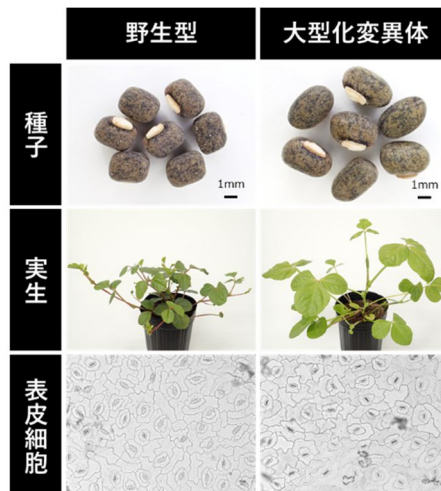


図8. 大型化変異体*gra1*の特徴

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Kongjaimun Alisa, Muto Chiaki, Kobayashi Yuki, Kumagai Masahiko, Sakai Hiroaki, Satou Kazuhito, Teruya Kuniko, Shiroma Akino, Shimoji Makiko, Hirano Takashi, Isemura Takehisa, Saito Hiroki, Baba-Kasai Akiko, Kaga Akito, Somta Prakit, Tomooka Norihiko, Naito Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Same Locus for Non-shattering Seed Pod in Two Independently Domesticated Legumes, <i>Vigna angularis</i> and <i>Vigna unguiculata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2020.00748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Y, Sakai H, Yoshitsu Y, Muto C, Anai T, Pandiyan M, Senthil N, Tomooka N, Naito K	4. 巻 10
2. 論文標題 Domesticating <i>Vigna Stipulacea</i> : A Potential Legume Crop With Broad Resistance to Biotic Stresses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Y, Akiba M, Hirashima S, Tomooka N	4. 巻 35
2. 論文標題 The ex situ Conservation of Wild Legume Genetic Resources in Shimane Prefecture in 2018	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24514/00003218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y, Yoshida S, Ohm Mar Saw, Tomooka N	4. 巻 35
2. 論文標題 The ex situ Conservation of Legume Genetic Resources in the Southern Shan State of Myanmar in 2018	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources	6. 最初と最後の頁 185-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24514/00003229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takahashi Y, Tomooka N	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 Taxonomy of Mungbean and Its Relatives. In: Nair R, Schafleitner R, Lee SH (eds) The Mungbean Genome.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂井 寛章 (Sakai Hiroaki) (20455322)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・ユニット長 (82111)	
研究分担者	友岡 憲彦 (Tomooka Norihiko) (40373253)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・再雇用職員 (82111)	
研究分担者	山田 哲也 (Yamada Tetsuya) (70374618)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------