

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688002

研究課題名(和文) Vigna属遺伝資源の栽培化による環境適応性作物の開発

研究課題名(英文) Developing stress-adapted crop by domesticating wild Vigna species

研究代表者

内藤 健(Naito, Ken)

独立行政法人農業生物資源研究所・多様性活用研究ユニット・研究員

研究者番号：20581705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円、(間接経費) 6,180,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、まずマーカーを充実するため、次世代シーケンサーによる全ゲノム解読を行い、アズキゲノムの9割以上のアセンブルを得た。

アズキゲノムからマーカーを設計し、Vigna属の遺伝資源の交雑集団のファインマッピングを行い、種子の大きさを2倍にするmog遺伝子および裂莢性を支配するptw遺伝子を同定した。

さらに、病害虫に強く、栽培が用意な野生種V. stipulaceaのEMS処理集団から変異選抜を行い、種子大型化および非裂莢性の変異体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To develop DNA markers, we sequence Azuki bean genome by next generation sequencer. The assembled sequences covered more than 90% of the genome.

With the genome sequence information, we fine-mapped the mapping population derived from Vigna species. We identified two useful genes, mog and ptw. The mog gene makes the seed size doubled, while the ptw gene controls seed pod twisting, which is related to seed pod dehiscence.

We also tried to screen EMS-treated M2 population of V. stipulacea, which is pests and diseases resistant. As a result, we found 5 lines with bigger seed size and one line with non-seed pod dehiscence. With all these results, we considered domestication of wild Vigna species is a quick and practical approach to develop a stress-tolerant crop.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：Vigna属 ゲノム 遺伝学 栽培化 環境ストレス 突然変異 育種

## 1. 研究開始当初の背景

*Vigna* 属にはササゲ、リョクトウアズキなど 9 種の栽培種があり、その年間生産量はインド・ミャンマーではそれぞれ約 300 万トン、アフリカ全土では 500 万トンを超えており、増大する人口を支える重要なタンパク源となっている。

一方、野生種は 98 種あるが、その多くが非常に優れた環境適応性をもつ (友岡ら 1992)。例えば、*V. marina* は海岸の砂浜で生育し、400mM の高塩濃度条件下で生育できるほど耐塩性が高く、食用にもなる。*V. trilobata* は乾燥地帯に適応し、ほとんど側根のない主根を地下深く伸ばすという特徴的な地下部形態をもち、やはり食用になる。*V. vexillata* も適応性に優れ、酸性土壌地帯や標高 2,700m の高地でも生育できる。さらに *V. vexillata* は塊根を形成し、種子だけでなく地下部も食用になる。さらに、塊根も種子同様にタンパク質が豊富(ジャガイモの約 3 倍)で、栄養学的にも利用価値が高い。このように *Vigna* 属野生種は高い農業的価値を秘めた遺伝資源であるが、実際の利用方法に関する研究は皆無に等しかった。

このような野生種を利用して食糧問題の解決を目指す研究はこれまでも多数あった。確かに、野生種から優れた耐性機構を栽培種に導入できれば、旱魃や塩害等による生産の減少を食い止められる。しかしながら、一部の病害虫抵抗性を除けば、その成果はほとんど上がっていない。その背景には、適応のメカニズムが複雑なことがある。例えば、乾燥に適応した植物は C4 光合成回路、クチクラ層の発達、深根性など、多くの形態的・生理的特徴を獲得しているが、このような適応機構は多様かつ複雑な遺伝子制御網によって支配されている。それらを丸ごと単離・導入するのは困難なのだ。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では従来の育種戦略の発想を逆転させ、作物が有する栽培化形質を野生種の側に導入する (Neo-domestication) ことによって新型作物を開発することを目指した。植物栽培化の最初期において最も重要な役割を果たした形質は種子脱粒性の消失、種子休眠性の消失、および可食部大型化の 3 つであり、これらはいずれも単一または少数の遺伝子に機能欠損の突然変異が生じることに起源している。これは、栽培化の遺伝変異が、環境適応のそれよりも遥かに単純で扱いやすいことを意味する。無論、食用に適さない野生種を栽培化することには別の問題があるが、*Vigna* 属野生種には毒性もなく、実際に食用として利用されているものは多い。すなわち、Neo-domestication に必要なのは数個の遺伝子を破壊することのみであることから、突然変異育種の手法で達成でき、遺伝子組換えは必要ないと考えられる。したがって、遺伝子組換えならば必須となる安全

性評価や環境試験等も不要となり、開発から実用化までの所要期間が大幅に短縮される。以上の点から、本計画は環境適応型作物の迅速な開発を可能にし、食料問題の有効な対策になると考えられる。

## 3. 研究の方法

まずアズキゲノムを Roche GSFLX を用いて解読し、Celera Assembler によるデノボアセンブルを実施した。

コンティグから SSR モチーフを検索してプライマーを設計し、交雑集団の両親間で多型の得られるものを選抜した。

多器官大型化遺伝子の同定については、ケツルアズキと近縁野生種との交雑に由来する BC3F2 集団 1, 300 個体を用いて、種子の 100 粒重をもとに連鎖解析を行った。

裂莢性遺伝子の同定については、アズキと近縁野生種との交雑にゆらいする BC3F2 集団 1, 100 個体を用いて、莢の巻き数をもとに連鎖解析を行った。

それをもとに変異原処理を施した野生種集団から栽培化遺伝子を欠損した変異体のスクリーニングを行うこととした。また、マーカー拡充のために次世代シーケンサーを用いたアズキの全ゲノム解読を行った。

## 4. 研究成果

アズキゲノムを次世代シーケンサーで解読し、9 割以上をカバーするアセンブルを得た。これにより DNA マーカーの設計が飛躍的に効率化された。



図 1. *mog* 遺伝子による種子大型化  
左に野生型種子を、右に変異型種子を示す。

新たに設計されたマーカーにより、ケツルアズキと近縁野生種に由来する BC3F2 集団のジェノタイプングを行ったところ、形質と連鎖する遺伝子は第 8 連鎖群の 1 遺伝子に絞られた。この遺伝子の塩基配列を解読し、栽培種と野生種で比較したところ、栽培種にのみ 8 塩基対の欠失が生じていることが明らかとなった。この遺伝子が機能を失うと、種子の大きさが倍加し、植物体も巨大化するおとから、この遺伝子を多器官大型化遺伝子 (MOG) と名づけた (図 1)。MOG 遺伝子はシロイヌナズナ PPD 遺伝子のオルソログであり、この遺伝子の null 変異体はやはり野生型株に比べて巨大化することが報告されている。

さらに、アズキと近縁野生種の交雑集団から、裂莢性を支配する遺伝子の詳細マッピングを行った (図 2)。その結果、第 7 連鎖群にマップされていた QTL は 19kb の領域に狭め

られ、さらに前述のアズキゲノム情報から、この領域に座乗する遺伝子は2個であることが明らかとなった。このうち1遺伝子については栽培種で1塩基が挿入してフレームシフトが生じていることが明らかとなり、裂莢性遺伝子の有力な候補となった。

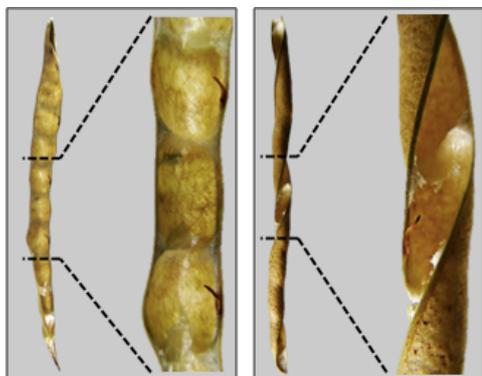


図2. アズキ莢の裂莢性  
左に栽培種型（非裂莢性）を、右に野生型（裂莢性）を示す。

また、野生種 *V. stipulacea* に EMS を処理した M2 集団 1 系統につき 6 個体ずつ、1,600 系統栽培し、表現形による選抜を行った。その結果、種子が大型化したものを 5 系統、裂莢性を失ったものを 1 系統得ることができた。



図3. 野生種 *V. stipulacea* の栽培化  
EMS 処理により、裂莢性を消失した系統を上段に、種子が大型化した系統を下段に示す。

以上により、野生種の栽培化はストレス耐性作物の開発に関して、実現可能性の高い手段であることと結論づけられた。

#### 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 1 件)

Ken Naito, Akito Kaga, Norihiko Tomooka, and Makoto Kawase (2013) “*De novo* assembly of the complete organelle genome

sequences of azuki bean (*Vigna angularis*) using next-generation sequencers.” *Breeding Science* 63: 176-182

Susan McCouch and Ken Naito et al. (2013) “Agriculture: Feeding the future.” *Nature* 499: 23-24

[学会発表] (計 8 件)

① Hiroaki Sakai, Ken Naito, Eri Ogiso, Akito Kaga, Takeshi Itoh and Norihiko Tomooka (2014) “The *Vigna* Genome Project.” *Plant and Animal Genome XXII*

② Hiroaki Sakai, Ken Naito, Eri Ogiso, Akito Kaga, Takeshi Itoh and Norihiko Tomooka (2013) “The *Vigna* Genome Project.” 2013 CSHL Plant Genomes & Biotechnology Meeting

③ 高橋有、内藤健、伊勢村武久、武藤千秋、坂井寛章、加賀秋人、Natesan Senthil、Muthaiyan Pandiyan、友岡憲彦 (2013) *Vigna* 属野生種の Neo-domestication 第 124 回日本育種学会講演会

④ Ken Naito, Hiroaki Sakai, Eri Ogiso, Akito Kaga and Norihiko Tomooka (2013) “The *Vigna* Genome Project” 3<sup>rd</sup> International Symposium of Genomics of Plant Genetic Resources

⑤ 内藤健、武藤千秋、小木曾映理、加賀秋人、友岡憲彦 (2013) アズキ裂莢性遺伝子のファインマッピング 第 123 回日本育種学会講演会

⑥ 内藤健、平野久美、加賀秋人、白澤健太、磯部祥子、友岡憲彦 (2012) 多器官大型化突然変異遺伝子の同定 第 122 回日本育種学会講演会

⑦ 内藤健、加賀秋人、Duncan Vaughan、友岡憲彦 (2012) アズキのオルガネラゲノム 第 121 回日本育種学会講演会

⑧ 内藤健、加賀秋人、磯部祥子、白澤健太、平川英樹、田畑哲之、友岡憲彦 (2011) *Vigna* 属野生種の Neo-domestication を目指した栽培化遺伝子のファインマッピング 第 120 回育種学会講演会

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 健 (Naito, Ken)

研究者番号：20581705

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：