

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292014

研究課題名(和文)ダイズ窒素固定関連遺伝子SEN1の多様性と収量性に与える影響

研究課題名(英文)Effect of Polymorphism of Nitrogen Fixation Related Gene SEN1 on Soybean Production

研究代表者

鈴木 章弘 (Suzuki, Akihiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50305108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズにおいて共生窒素固定に必須の遺伝子SEN1には多型が存在する。本研究では、その多型が窒素固定活性や収量性に与える影響を調査した。はじめにミヤコグサのsen1変異体へダイズのPeking型またはエンレイ型SEN1を導入し窒素固定活性を調査した。その結果エンレイ型を導入した場合の方が高い傾向を示した。また、バッククロスを繰り返すことによってPeking型のフクユタカへエンレイ型SEN1を導入し、収量性に関する調査を行った。その結果、100粒重に関しては、エンレイ型で高い傾向にあった。以上の結果は、エンレイ型SEN1が高い窒素固定活性を示すことによって収量性に好影響を与えていると考察された。

研究成果の概要(英文)：We found polymorphism in amino acid sequence of soybean SEN1 genes. Nitrogen fixation activity of *Lotus japonicus* sen1 mutant transformed by Enrei SEN1 gene was slightly higher than that of Peking type SEN1 gene. Effect of polymorphism of soybean SEN1 gene on the soybean yield was analyzed using BC5F2 soybean plants prepared from crossing with Fukuyutaka (Peking type) and Enrei. As a result, 100-seed weight of Enrei type BC5F2 plants slightly higher than that of Peking type. These results show the possibility that Enrei type SEN1 gene have positive effect for soybean 100-seed weight due to higher nitrogen fixation in the nodules.

研究分野：作物生理学

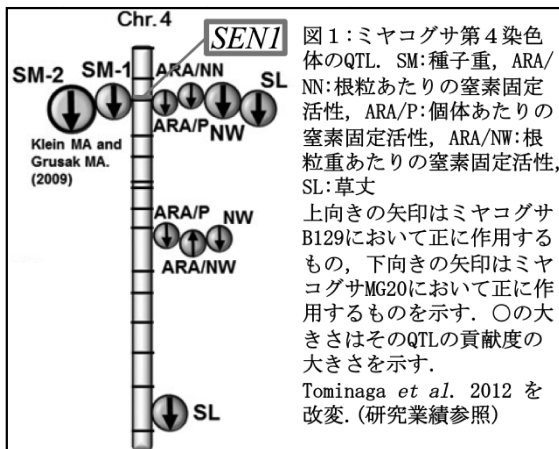
キーワード：根粒菌 窒素固定 共生 ダイズ ミヤコグサ 遺伝子 多型

1. 研究開始当初の背景

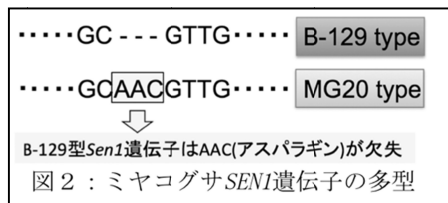
ダイズの子実生産において窒素を多く施肥することは根粒形成の障害に繋がり、必ずしも好結果をもたらさないことが知られている。そして子実中に含まれる窒素の約6割(種類や条件によって値は異なる)が根粒菌による固定窒素であることを考えると、根粒における窒素固定活性の高低がダイズの収量性に大きな影響を与えることは容易に想像がつく。

【窒素固定活性に関する QTL】

申請者は継続してマメ科植物の根粒における窒素固定活性を増強させるための研究をおこなっており (Tominaga et al. *Plant Physiol.* 2009; Suzuki et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; Shigeyama et al. *Plant Signal. Behav.* 2012), マメ科のモデル植物ミヤコグサを用いて窒素固定活性に影響を与える QTL について世界で初めて報告した (Tominaga et al. *J. Plant Res.* 2012). そして複数見出された QTL のうち第4染色体上の1つは、根粒重や草丈の QTL のみならず、ミヤコグサにおいて唯一報告されている種子重の QTL, さらには窒素固定活性に必須な遺伝子 *SEN1* と同じ領域に存在していることが明らかになった (図1参照; Hakoyama et al. *Plant Cell Physiol.* 2012).



QTL が検出されるということは、解析に用いた植物系統間でその領域に DNA の塩基配列の違いがあることを意味するが、驚いたことに、用いたミヤコグサの B129 と MG20 間では、*SEN1* 遺伝子の塩基配列が異



なっていた (図2参照). 以上の事実はこの領域に集中している QTL の原因遺伝子が *SEN1* である可能性を示唆している. そこで窒素固定活性を失った *sen1* 変異体へ「正常な B129 の *SEN1* 遺伝子」または「正常な MG20 の *SEN1* 遺伝子」を導入して窒素固定活性を比較してみたところ (相補実験), 「正常な MG20 の *SEN1* 遺伝子」を導入した場合の方が高い傾向にあった. この結果は、当該領域の QTL が MG20 において正に作用する (下向きの矢印) というデータと合致した.

【ダイズ *SEN1* 遺伝子と種子重の QTL】

以上の結果はミヤコグサを用いたものであるが、仮にマメ科作物の品種間で *SEN1* 遺伝子の塩基配列に多様性が見出されれば、収量性などに影響を与えている可能性が考えられる. そこで45品種のダイズの *SEN1* 遺伝子について塩基配列を比較した. その結果興味深いことにエンレイとシロメユタカ (エンレイの片親) では他の43品種と塩基配列が異なっており、その変異によってアミノ酸の極性も変化していた (未発表データ). エンレイは大粒で収量性が高く日本の代表的な栽培品種として知られているが、エンレイ型の *SEN1* 遺伝子がそれに貢献しているのだろうか? そこでエンレイと Peking (*SEN1* 遺伝子の塩基配列はエンレイとは異なる) を用いて検出された農業形質の QTL と *SEN1* 遺伝子の位置を比較してみたところ、驚いたことに、第8染色体上種子重の QTL と *SEN1* 遺伝子は同じ領域に座していることが判明した. しかもこの QTL はエンレイにおいて正に作用する (種子重を重くする) ものであった. この結果はエンレイ型の *SEN1* 遺伝子が種子重の増加に寄与している可能性を示唆している.

日本で栽培されているエンレイ以外の有力品種は、調べた限りすべてが Peking 型 *SEN1* 遺伝子を有している. 従ってさまざまな有力品種へエンレイ型 *SEN1* 遺伝子を交配によって導入すれば、有力品種の特徴を残しつつ種子重が増加した新規ダイズの創成に繋がると期待できるため、本研究課題を提案することとした.

2. 研究の目的

本研究では下記の小課題を遂行することで、ダイズ *SEN1* が QTL の原因遺伝子であることを示す. さらに優位性を示すダイズ品種「エンレイ」の *SEN1* 遺伝子を交配によって有力品種へ導入して農業形質を調査することで、収量性が向上した新規ダイズの創成を目指す.

- ・ダイズ *SEN1* 遺伝子の多型が共生窒素固定能に及ぼす影響の解明
- ・エンレイ型 *SEN1* 遺伝子の交配による有力品種への導入と収量性調査

3. 研究の方法

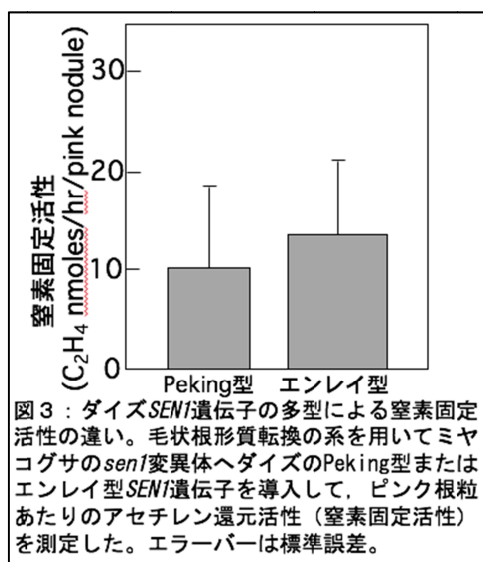
ダイズのエンレイ型 *SEN1* 遺伝子と Peking 型 *SEN1* 遺伝子をミヤコグサの *sen1* 変異体へ導入し根粒菌を接種することで、窒素固定活性に差があることを確認する. また、エンレイと Peking 型 *SEN1*

遺伝子を持つダイズ有力品種(フクユタカ)を交配し、その F2 世代の中からエンレイ型 *SEN1* 遺伝子をホモに持つ系統を選抜する。次にその系統とフクユタカを交配し F2 の中からエンレイ型 *SEN1* 遺伝子をホモに持つ系統を選抜する。この戻し交配を繰り返すことで *SEN1* 遺伝子はエンレイ型で、染色体のそれ以外の部分はほとんどがフクユタカ型という系統を創成することが可能となる。そしてそれらを圃場に展開して農業形質の評価をおこなう。

4. 研究成果

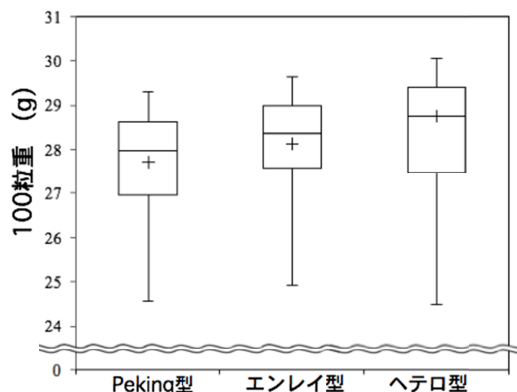
ミヤコグサで見られたように、ダイズにおいても *SEN1* 遺伝子において多型が存在するか過去に調査したところ、ダイズ *SEN1* 遺伝子である *Glyma08g08120* ではダイズ品種 Enrei と Peking 間で一塩基置換によるアミノの置換が生じておりさらにその極性も変化していた。また、Enrei と Peking を用いた QTL 解析では、第 8 染色体上の種子重の QTL の近傍にダイズ *SEN1* 遺伝子が存在し、Enrei において正に作用していることが示されていた。以上の結果から、ダイズ *SEN1* 遺伝子 (*Glyma08g08120*) が Enrei 型である場合に Peking 型よりも高い窒素固定能および種子重を示すという仮説を立てた。

毛状根形質転換の系を用いてミヤコグサの *sen1* 変異体へダイズの Peking 型またはエンレイ型 *SEN1* 遺伝子を導入して、ピンク根粒あたりのアセチレン還元活性(窒素固定活性)を測定した。ミヤコグサ *SEN1* の場合と同様にダイズ *SEN1* 遺伝子が導入された毛状根系形質転換植物体を使用した根粒着生試験で、Enrei 型 *SEN1* が導入された植物体の方が、Peking 型 *SEN1* が導入された植物体と比較してアセチレン還元活性が高い傾向を示した(図 3)。



以上の結果をさらに検証するために、生育培地中のモリブデン量を 10 分の 1 にしてダイズ *SEN1* 遺伝子が導入された毛状根系形質転換植物体を使用した根粒着生試験を行った。しかしながら、Enrei 型 *SEN1* 遺伝子を持つ場合に窒素固定能が高いという仮説および先行研究の結果に反して、ピンク根粒数あるいはピンク根粒重あたりのアセチレン還元活性は Peking 型 *SEN1* 導入形質転換植物体で高い傾向を示した。前述のミヤコグサ *SEN1* を導入した毛状根系形質転換実験もダイズ *SEN1* の場合も方法は同一であることから、両実験の結果を比較したところ、1 粒あたりのピンク根粒重はミヤコグサ *SEN1* が導入された場合よりもダイズ *SEN1* が導入された場合の方が低く、アセチレン還元活性測定の誤差が生じやすいと考えられた。そこで、1 粒あたりのピンク根粒重が 0.5 mg を超えるようなデータ(試験管あたり)でまとめると、ピンク根粒重あたりのアセチレン還元活性は Peking 型 *SEN1* と Enrei 型 *SEN1* を導入した場合でほとんど違いは見られなかったが、植物体あるいはピンク根粒あたりのアセチレン還元活性は Enrei 型 *SEN1* を導入した場合の方がやや高い傾向を示した。以上の結果から、今後は再度新たなアグロバクテリウムにプラスミドを導入するなどして形質転換効率を上げ、生育調査時には根粒の大きさを測定することで、誤差を極力排除した上で実験を継続して行う必要がある。

2 つ目の小課題について、平成 28 年には EFBC5F2(バッククロスを 5 回おこない、エンレイ型 *SEN1* 遺伝子を持ちバックグラウンドが、ほぼフクユタカに置き換わったと考えられる世代)の圃場試験を行ったところ、100 粒重は Fukuyutaka 型よりも Enrei 型 *SEN1* を持つ場合で高い傾向を示した(図 4)。



また、グローブチャンバー内での EFBC3F2 の根粒着生試験では Peking 型(フクユタカ型)よりも Enrei 型 *SEN1* を持つ場

合でアセチレン還元活性が高い傾向を示した。以上の EFBC 植物を利用した実験結果は本仮説を肯定しており、先行研究の結果とも同様の傾向を示した。これらの結果は、エンレイ型 *SENI* が高い窒素固定活性を示すことによって収量性に好影響を与えていると考察された。今後は、毛状根系形質転換実験およびさらに世代を重ねた EFBC 植物を利用した実験を継続して行うことで、新品種の創生へつなげる予定である。

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 2 件)

Aya Shimomura, Susumu Arima, Makoto Hayashi, Maskit Maymon, Ann M. Hirsch, Akihiro Suzuki. Blue light does not inhibit nodulation in *Sesbania rostrata*.

Plant Signaling and Behavior, 12, 1-4 (2017)

Aya Shimomura, Ayumi Naka, Nobuyuki Miyazaki, Sayaka Moriuchi, Susumu Arima, Shusei Sato, Hideki Hirakawa, Makoto Hayashi, Maskit Maymon, Ann M. Hirsch, Akihiro Suzuki. Blue light perception by both roots and rhizobia inhibits nodule formation in *Lotus japonicus*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 29, 786-796 (2016)

〔学会発表〕(計 件)

〔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

鈴木 章弘 (SUZUKI, AKIHIRO)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：50305108

(2) 研究分担者

有馬 進 (ARIMA, SUSUMU)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：90140954
穴井 豊昭 (ANAI, TOYOAKI)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：70261774

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()