

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871107

研究課題名(和文)アズキ近縁野生種を利用した超耐塩性アズキの作出と耐塩性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of salty tolerance genes and development of super tolerance azuki bean using Azuki closely related wild species

研究代表者

小木 曾 映里(Ogiso-Tanaka, Eri)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター 畑作物研究領域・研究員

研究者番号：00646929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アズキの耐塩性を持つ近縁野生種は、Na<sup>+</sup>を排除するタイプと、蓄積するタイプの2種類ある。この2つの機構を交配によってアズキに導入することで、超耐塩性アズキを作出できると考えた。まず、遺伝的な耐塩性の要因を調べるためにアズキと耐塩性近縁野生種の交雑後代F<sub>2</sub>を利用したQTL解析を実施したところ、排除タイプと、蓄積タイプでは異なるQTLが検出され、これらのQTLをもつ系統は非常に強い耐塩性を示した。実際に戻し交雑により、耐塩性QTLを蓄積することで非常に強い耐塩性をアズキに付与できることが示された。

研究成果の概要(英文)：There are two types of closely related wild species with a salt tolerance of Azuki, a type that exclude salt and a type that accumulates. We thought that by introducing these two mechanisms into Azuki by mating, super salt-tolerant azuki can be created. First, in order to investigate the factors of genetic salt tolerance, QTL analysis using crossbred progeny F<sub>2</sub> of azuki and salt-tolerance-related wild type was carried out. As a result, different QTL was detected in excluded type and accumulated type, The line with salt tolerance QTL showed very strong salt tolerance.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：耐塩性 野生種 アズキ RADseq QTL Whole genome sequencing

1. 研究開始当初の背景

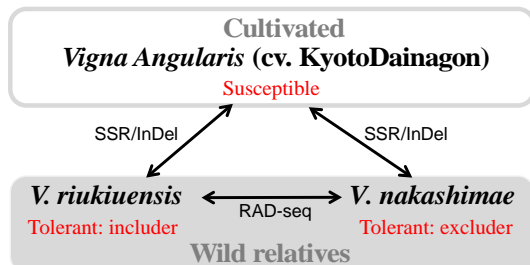
アズキの近縁野生種の耐塩性を水耕栽培でスクリーニングすることで、2種の近縁野生種 *Vigna nakashimae* と *V. riukuensis* から耐塩性を持つ系統が見つかった。さらに *Vigna nakashimae* と *V. riukuensis* では植物体内のNa<sup>+</sup>分布に違いがあることが示唆されたことから、それぞれ違うメカニズムで耐塩性を獲得していると考えられた。近縁野生種は栽培アズキと交配が可能であるため、交配によって両系統の耐塩性のメカニズムをアズキに導入することで、超耐塩性アズキを作出できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

- (1) *V. nakashimae* 及び *V. riukuensis* の耐塩性の遺伝的要因を明らかにすることで、両近縁野生種が持つ耐塩性の共通・特異的QTL・遺伝子を明らかにする。
- (2) 栽培アズキと両近縁野生種を交配し、それぞれの耐塩性遺伝子を導入することで超耐塩性アズキを作出するための材料を育成する。
- (3) *V. nakashimae* が分布する地域から新たに野生集団を採取し、耐塩性のスクリーニングをすることで、より強い耐塩性系統を見つけ出す。多型解析及び(1)のQTL解析から得られた情報を元に耐塩性遺伝子を同定する。
- (4) ゲノム情報が不十分な状態で多型を大量に取得するために ddRAD-seq 法を試行し、正確に連鎖地図を作成し遺伝解析を実施できるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 栽培アズキ(京都大納言)と *V. nakashimae* ver. Ukushima の F2、京都大納言と *V. riukuensis* ver. Tojinbaka の F2、*V. nakashimae* と *V. riukuensis* の F2 集団を育成して耐塩性の QTL 解析を行った。水耕栽培をすることで、塩の濃度を一定に保地、環境要因による変動を最小限に留めることができた。DNA を各個体から抽出し、SSR 及び ddRAD-seq 法による多型検出を行った。親品種間で多型が得られた SNP のみを F2 集団から抽出し、連鎖解析後 QTL 解析に使用した。



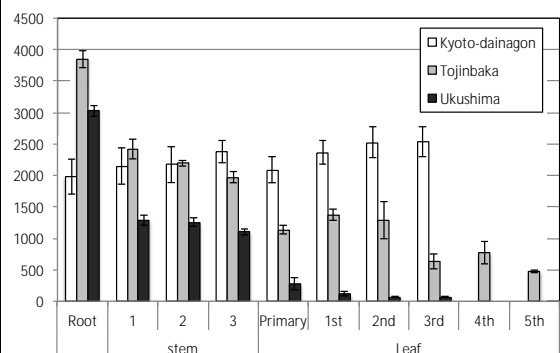
(図1) 交配組み合わせと多型検出手法

(2) 京都大納言と *V. nakashimae* の F2 集団、栽培京都大納言と *V. riukuensis* の F2 集団から耐塩性を持つ系統を選び、交配する。

(3) *V. nakashimae* が分布する五島列島で種子を採取し、耐塩性のスクリーニングをすることで、ジーンバンクの系統から見出された既知の耐塩性系統よりも強い耐塩性系統を探索する。採取した野生集団だ ddRAD-seq 法により多型検出をすることで遺伝的な解析を行う。最も耐塩性が強いと評価された系統について全ゲノムシーケンスを実施する。(4) 2種類の制限酵素でゲノムを断片化し、サイズセレクションを行なってシーケンスを実施することで、制限酵素サイト周辺だけのシーケンスを取得する。親品種間で多型が見られるサイトのみを選択して、分離集団の多型を調査し、連鎖解析に使用する。De novo 及び栽培アズキの Scaffold 及び全ゲノムを使用して解析を行う。

4. 研究成果

(1) 栽培アズキ(京都大納言)と *V. nakashimae* の F2、栽培アズキ(京都大納言)と *V. riukuensis* の F2、*V. nakashimae* と *V. riukuensis* の F2 集団を使用した QTL 解析から、*V. nakashimae* と *V. riukuensis* が持つ QTL の共通性と違いが明らかになった。また、全く耐塩性を持たない栽培アズキが耐塩性を強くする QTL があることが明らかになった。栽培アズキ、*V. nakashimae*、*V. riukuensis* に塩処理栽培し、各部位を分けて Na<sup>+</sup>の分布を調査したところ、Na<sup>+</sup>を体内に蓄積していると思われていた *V. riukuensis* の葉の Na<sup>+</sup>濃度は比較的高い値ではあるが、茎よりも低い濃度になっていた(図2)。これは、*V. riukuensis* にも Na<sup>+</sup>を排除する機構があることを示唆している。以上のことから、*V. nakashimae* と *V. riukuensis* に共通して見出された耐塩性 QTL は、Na<sup>+</sup>を排除する機構に関与していると考えられた。*V. riukuensis* で特異的に検出された QTL は、葉に Na<sup>+</sup>を蓄積する機構に関与していると考えられた。



(図2) 栽培アズキ、*V. riukuensis* ver. Tojinbaka および *V. nakashimae* ver. Ukushima の植物体内 Na<sup>+</sup>分布。茎および葉は下位を 1 とした。Na<sup>+</sup>測定時、栽培アズキ及び *V. nakashimae* は第3葉、*V. riukuensis* は第5葉が最上位葉出会った。Y 軸は Na<sup>+</sup>濃度(ppm)を示す。

(2) F2 集団から非常に強い耐塩性系統が出現した(図3)ことから、これらの遺伝的要因を戻し交雑によりアズキに導入することを試みたが、不稔となった。また、別の非常に強い耐塩性を示した系統は、塩処理条件下では開花はしても結実することができなかった。この系統は、塩処理をやめると結実できたことから、塩処理が不稔の原因であると考えられた。以上のことから、作物へ耐塩性を付与するために、耐塩性 QTL を蓄積しても、植物体は枯れないかもしれないが、そもそも収穫ができない状態になるため、Na<sup>+</sup>の移行に関わるような直接的な耐塩性の要因以外にも、収穫が可能な状態を維持できる耐塩性を獲得するには何が必要か調査する必要がある。また、*V. nakashimae* 及び *V. riukiensis* は、栽培アズキに近縁ではあるが、かなり不稔が出るため、引き続き粘り強く材料を育成する必要がある。

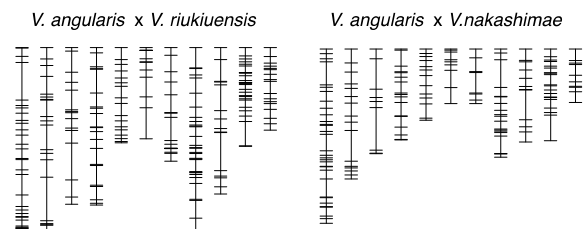


(図3) 塩処理後の植物体。耐塩性野生種よりも強い耐塩性を持つ BC1F2 系統(左)と *V. nakashimae*(右)

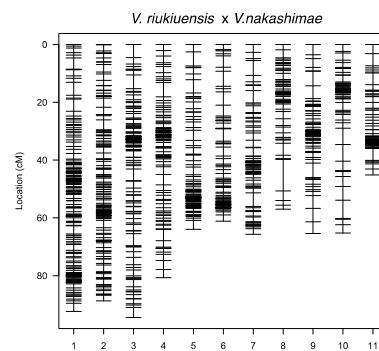
(3) QTL 解析に使用した *V. nakashimae* は、ジーンバンクに保存されている *V. nakashimae* の系統の中で最も耐塩性が強い ver. Ukushima である。五島列島の探索により、Ukushima も含め新規に 50 系統の耐塩性スクリーニングを実施したところ、より耐塩性が強い G412 系統を見出した。50 系統について ddRADseq による多型解析を実施し、GWAS などを試みたが QTL を検出することはできなかった。*V. nakashimae* の耐塩性は Na<sup>+</sup>の排除に関わっていることが示唆されているため、遺伝子の配列ベースからの予測が可能と考え、Ukushima と G412 について、HiSeqX による全ゲノムシーケンスを実施し、解析を行なっているところである。(1)で検出された Na<sup>+</sup>排除に関わる QTL を中心に遺伝子多型の調査を行なっている。

(4) 多型検出は SSR および ddRADseq を実施した。SSR は栽培種 x 野生種の組み合わせでスクリーニングを行い、300 弱のマーカーを得た(図4、5。表1)。野生種間の組み合わせは ddRADseq による多型検出を実施

した(表2)。研究をスタートした当初はアズキの参照ゲノムが Scaffold しかない状態であったため、*De novo*での解析と、Scaffold を使用した解析の両方を試行したところ、Scaffold を使用し他方がより精度の高い多型を検出し、より遺伝距離が小さな連鎖地図を作成することができた。かなり質の悪い状態であっても、*De novo*での解析よりも Scaffold を使用した方が良い結果が得られた。当初は栽培種と野生種の交雑集団のみであったが、野生種同士の集団を育成し、遺伝解析をする頃には、別のプロジェクトで行われていた栽培アズキの全ゲノムシーケンスがかなり整ってきたため、より完成度の高い参照ゲノムを使用して遺伝解析を行なった。しかし、最終的な参照ゲノムが出来るまでに複数の細かい修正が入ったため、結果的に ddRAD-seq を参照ゲノムにマップする作業を 5 回繰り返すことになった。最終的には、完成したアズキの参照ゲノムを利用してマッピング及び多型検出を行い地図を作成した(図5)。さらにアノテーション情報を利用して QTL 領域から候補遺伝子の推定を行い、論文投稿準備中である。



(図4) SSR を使用して作成した栽培種 x 野生種の連鎖地図



(図5) ddRADseq を使用して作成した野生種 x 野生種の連鎖地図

Marker sources	Number of SSR primer pairs			
	No. of screened	No. of amplified (%)	No. of polymorphic (%)	
<i>V. angularis</i>	Azuki bean	330	329 (99.7)	267 (80.9)
x	Common bean	40	40 (100.0)	15 (37.5)
<i>V. nakashimae</i>	Cowpea	7	5 (71.4)	3 (42.9)
	Total	377	374 (99.2)	285 (75.6)
<i>V. angularis</i>	Azuki bean	330	326 (98.8)	218 (66.1)
x	Common bean	40	38 (95.0)	16 (40)
<i>V. riukiensis</i>	Cowpea	7	6 (85.7)	3 (42.9)
	Total	377	370 (98.1)	237 (62.9)

(表1) SSR のスクリーニング結果

	Number of reads	Mapping ratio to custome reference genome (%)	Number of fixed SNPs		
			Total	Chr1-11	Scaffolds
All samples	536,785,685		25,350 <sup>*1</sup>		
<i>V. nakashimae</i> var. Ukushima	13,052,980	74.1%	15,438 <sup>*2</sup>	14,856	582
<i>V. riukiensis</i> var. Tojinba	6,632,164	62.0%	5,469 <sup>*3</sup>	5,348	121
F2 population (310 plants)	515,437,838				
average per plant	1,662,703	55.4%	2,485 <sup>*4</sup>	2,485	19

\*1 Total detected SNPs (filtered by depth and quality)

\*2 SNPs of homozygous A (same to reference) in Ukushima

\*3 SNPs of homozygous B in Tojinbaka

\*4 SNPs of homozygous A and B in Ukushima and Tojinbaka

## (表2) ddRADseq の多型検出数

### 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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 4 件)

小木曾映里、内藤健、坂井寛章、加賀秋人、友岡憲彦 (2015) RADseq を用いたアズキと近縁野生種のゲノム構造比較と耐塩性遺伝子候補の探索 日本育種学会第 128 回講演会 新潟県新潟市西区五十嵐 2-8-50 新潟大学

小木曾映里、Sompong Chankaew, Rusama Marubodee, 坂井寛章、内藤健、馬場晶子、井関洸太郎、高橋優、友岡憲彦 (2015) アズキ近縁野生種 *Vigna nakashimae* における耐塩性系統の特定と RADseq を用いた遺伝的多様性解析 日本育種学会第 127 回講演会 東京都町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学

小木曾映里、Sompong Chankaew, Rusama Marubodee, 内藤健、坂井寛章、友岡憲彦 (2014) 近縁野生種 *Vigna nakashimae* における耐塩性系統の特定と RADseq を用いた遺伝的多様性解析 日本植物生理学会第 56 回年会 東京都世田谷区桜丘 1-1-1 東京農業大学

小木曾映里、吉田裕太郎、伊勢村武久、加賀秋人、内藤健、奥野員敏、友岡憲彦 (2013) 近縁野生種を用いたアズキの耐塩性関連 QTL の解析 第 123 回日本育種学会 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

## 東京農業大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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  
小木曾映里 (OGISO-TANAKA, Eri)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター  
畑作物研究領域・研究員  
研究者番号：00646929

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )