

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：2014～2016
課題番号：26850006
研究課題名(和文) 逆遺伝学的手法によるVigna属野生種のNeo-domestication

研究課題名(英文) Neo-domestication of the genus Vigna

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・遺伝資源センター・研究員

研究者番号：70726273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、劣悪環境に生息しているマメ科野生種を栽培化することにより、高いストレス耐性をもつ新作物を開発することにある。この時、栽培化に必要な遺伝子が既知であると、それに必要な時間と労力を縮減することができる。マメ科野生種のハネアズキに変異原を処理することで、難裂莢変異体と非種子休眠変異体を得た。遺伝分析により、両変異は単一遺伝子座に支配されることがわかった。詳細な解析によって、原因遺伝子を数個に絞ることができた。本研究によって、野生種の栽培化は比較的容易に達成できることがわかった。今後、栽培化に必要な遺伝子が同定されることで、様々なストレス耐性をもつ野生種の栽培化が容易になるだろう。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop new crops with high stress tolerances from wild legumes living in harsh environments. When doing this, it is possible to reduce the time and labor required if the domestication genes are already known. By treating a wild legume with mutagen, mutants with non-shattering pods or non-dormancy seeds were obtained. Genetic analysis showed that both mutations were dominated by a single locus. After detailed analysis, it was possible to narrow down the causative gene to several. This study found that domestication of wild legumes could be easily achieved. In future, by identifying causative genes we will be able to develop crops with various stress tolerances from wild plants.

研究分野：植物育種学

キーワード：マメ科 Vigna属 栽培化 突然変異

1. 研究開始当初の背景

現在、国際社会は飢餓人口を約8億人抱えており、食糧増産は急務である。しかし世界の耕作地15億haのうち約9割は粗放農地であり、作物は常に乾燥・洪水・貧栄養・病虫害の危機にさらされている。さらに地球上の陸地130億haのうち約9割は砂漠・塩性土壌・酸性土壌・アルカリ性土壌などに覆われており、新たに耕作を広げる土地はほとんど残っていない。つまり食糧増産するには必然的に、このような耕作不適地を開拓していかなければならないのである。

そこで、注目すべきは約100種を含むマメ科 *Vigna* 属である (図1)。同属はササゲ (*Vigna unguiculata*)、リョクトウ (*Vigna radiata*)、アズキ (*Vigna angularis*) など10種もの作物を含むが、その最大の特徴は、過酷な環境に適応した野生種が乾燥・冠水・塩・酸・アルカリ・病虫害など様々なストレスに耐性を示すことにある。さらに各野生種



図1 *Vigna*属野生種の多様性

は自生地環境に適応した根粒菌と共生窒素固定系を確立しており、貧栄養土壌でも生育できる。このような野生種ほど優れたストレス耐性をもつ作物を開発できれば、耕作不適地における食糧生産が現実的になるだろう。

しかし、これまでにそのような作物は開発されていない。なぜなら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、その全てに関する遺伝子を単離し、作物へ導入することは不可能に近いからである。

2. 研究の目的

そこで、作物にストレス耐性を与えるという従来の発想を逆転させ、野生種に栽培化形質を与えることでストレス耐性作物を開発することが提案された (図2)。この育種戦略を野生種の新規栽培化という意味で Neo-domestication と呼ぶ。



図2 野生種の栽培化によるストレス耐性作物の開発

一般に、植物の栽培化で重要な役割を果たした形質は「休眠性の消失」「脱粒性の消失」「器官の大型化」の3つであり、これらはいずれも少数遺伝子の機能欠損により生じた単純な遺伝形質である。このため本戦略に必

要な操作は、数個の遺伝子を破壊することのみであり、それは突然変異育種法で十分に達成できる。つまり作物と交雑できない野生種であっても適用できるだけでなく、遺伝子組換えを利用しないため栽培に規制がかかることもない。Neo-domestication ならば、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のだ。

ここで、栽培化形質を支配する遺伝子があらかじめ同定されていれば、変異原処理集団からの選抜過程が容易になる。TILLING 法など逆遺伝学的選抜が可能となるからだ。

本研究では、耐虫性および耐病性に優れるマメ科野生種ハネアズキ (*Vigna stipulacea*) を対象として、栽培化に関わる変異体を開発すると共に、その原因遺伝子の単離を試みた。

3. 研究の方法

ハネアズキ 4000 個体に変異原 (EMS) を処理して、各系統 3 世代を栽培した。その間、難裂莢性・非種子休眠性・器官大型化に注目して、表現型選抜を行った。

ハネアズキ変異体の原因遺伝子の候補を絞るために MutMap 法を用いた。変異体と野生型の雑種 2 世代目 160 個体を栽培し、変異型を示す個体の混合 DNA を、次世代シーケンサーで解析した。既得のハネアズキ全ゲノム配列に混合 DNA から得られたリードをアライメントして、変異型が 100% の SNP を探した。

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) のレトロトランスポゾン挿入変異体を用いて、候補遺伝子の機能を検証した。

4. 研究成果

栽培化に関わる変異体を見出した。ハネアズキの *lignification pod (lip)* 変異体は莢全体にリグニンを発現することで難裂莢性になっており (図 3)、*bedding (bed)* 変異体

は種皮臍が裂開することで非休眠性になっていた (図 4)。



図3 ハネアズキ野生型の莢 (左) と *lip* 変異体の莢 (右)



図4 ハネアズキ野生型の種子 (左上) と *bed* 変異体の種子 (右上) および浸水3日後の様子 (各下段)

この両者について、野生型との雑種 2 世代目を栽培したところ、野生型と変異型が約 3 : 1 の割合で得られた。このことから、両変異は単一の遺伝子座に支配されていることが示唆された。

続いて MutMap 解析を行った。野生型と *lip* 変異体の雑種 2 世代目における変異型バルク DNA のゲノム解析を行ったところ、変異型 SNP が 100% を占める座位が 2 つ見出された。そのうち 1 つがセルロース合成関連遺伝子上に、もう 1 つは遺伝子間に存在していた。

そのセルロース合成関連遺伝について、ミヤコグサのトランスポゾン挿入系統を栽培したが、*lip* 変異体と同一の表現型は認められなかった。

残るもう 1 つの SNP は遺伝子間領域に存在するため、この SNP が存在する領域が他の遺伝子の調整に関わる可能性がある。ただし、その解析は今後の課題として残された。

本研究の最大の成果は、作物内在の栽培化遺伝子とは異なる機序の栽培化変異 (*lip* および *bed*) が見出されたことである。通常、作物の突然変異育種では作物内在の栽培化遺伝子に隠れて後天的な栽培化変異はみつけにくい。しかし、野生種の変異原処理では新たな栽培化変異が得られやすい。作物内在の栽培化形質とは機序の異なる新たな栽培化遺伝子の情報を蓄積すれば、Neo-domestication だけでなく、作物における突然変異育種の可能性が拡大するだろう。

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 14 件)

- ① Naito K, Takahashi Y, Chaitieng B, Hirano K, Kaga A, Takagi K, Ogiso-Tanaka E, Thavarasook C, Ishimoto M, Tomooka N (2017) Multiple organ gigantism caused by mutation in VmPPD gene in blackgram (*Vigna mungo*) *Breeding Science* 67:151-158, 査読有
- ② Takahashi Y, Somta P, Muto C, Iseki K, Naito K, Pandiyan M, Natesan S, Tomooka N (2016) Novel Genetic Resources in the Genus *Vigna* Unveiled from Gene Bank Accessions. *PLoS One* 11:e0147568, 査読有
- ③ Iseki K, Takahashi Y, Muto C, Naito K, Tomooka N (2016) Diversity and evolution of salt tolerance in the genus *Vigna*. *PLoS One* 11:e0164711, 査読有
- ④ Sakai H, Naito K, Takahashi Y, Sato T, Yamamoto T, Muto I, Itoh T, Tomooka N (2016) The *Vigna* Genome Server, 'VigGS': A Genomic Knowledge Base of the Genus *Vigna* Based on High-Quality, Annotated Genome Sequence of the Azuki Bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi. *Plant Cell Physiol* 57:e2, 査読有
- ⑤ Suanum W, Somta P, Kongjaimun A, Yimram T, Kaga A, Tomooka N, Takahashi Y, Srinives P (2016) Co-localization of QTLs for pod fiber content and pod shattering in F2 and backcross populations between yardlong bean and wild cowpea. *Molecular Breeding* 36:80, 査読有
- ⑥ Takahashi Y, Iseki K, Kitazawa K, Muto C, Somta P, Irie K, Naito K, Tomooka N (2015) A Homoploid Hybrid Between Wild *Vigna* Species Found in a Limestone Karst. *Front Plant Sci* 6:1050, 査読有
- ⑦ Takahashi Y, Yokoi S, Takahata Y (2015) Genetic divergence of turnip (*Brassica rapa* L. em. Metzg. subsp. *rapa*) inferred from simple sequence repeats in chloroplast and nuclear genomes and morphology. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63:869-879, 査読有
- ⑧ Takahashi Y, Lay-Heng S, Channa T, Makara O, Tomooka N (2015) Exploration of Leguminous Crops and Their Wild Relatives in Western Regions of Cambodia, 2014. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources 31:121-149, 査読有

- ⑨ Sakai H, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Takahashi Y, Iseki K, Muto C, Satou K, Teruya K, Shiroma A, Shimoji M, Hirano T, Itoh T, Kaga A, Tomooka N (2015) The power of single molecule real-time sequencing technology in the de novo assembly of a eukaryotic genome. Sci Rep 5:16780, 査読有
- ⑩ Yoshida Y, Marubodee R, Ogiso-Tanaka E, Iseki K, Isemura T, Takahashi Y, Muto C, Naito K, Kaga A, Okuno K, Ehara H, Tomooka N (2015) Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi. Genetic Resources and Crop Evolution 63:627-637, 査読有
- ⑪ Matsunaga H, Matsushima K, Tanaka K, Theavy S, Lay-Heng S, Channa T, Takahashi Y, Tomooka N (2015) Collaborative Exploration of the Solanaceae and Cucurbitaceae Vegetable Genetic Resources in Cambodia, 2014. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources 31:169-187, 査読有
- ⑫ Takahashi Y, Peou U, Lay-Heng S, Channa T, Makara O, Tomooka N (2014) Collection and conservation of Leguminous crops and their wild relatives in Cambodia, 2013. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources 30:109-143, 査読有
- ⑬ Takahashi Y, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Inoue J, Hirashima S, Tomooka N (2014) Collection and Conservation of Wild Leguminous Crop Relatives on the

Yaeyama archipelago, Okinawa Prefecture, Japan, 2013. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources 30:29-51, 査読有

- ⑭ Takahashi Y, Akiba M, Iizumi T, Tomooka N (2014) Collection and Conservation of Wild Leguminous Crop Relatives on Iki Island and Hirado Island, Nagasaki Prefecture, Japan, 2013. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources 30:1-27, 査読有

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

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・遺伝資源センター・任期付き
研究員

研究者番号：70726273

(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

()