

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04434

研究課題名(和文) トウモロコシの耐湿性強化に寄与する酸素漏出バリアの形成機構の解明

研究課題名(英文) Understanding mechanism of formation of radial oxygen loss barrier in maize and teosinte

研究代表者

中園 幹生 (Nakazono, Mikio)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70282697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：トウモロコシの近縁種であるニカラグアテオシントは、根表層に根からの酸素漏出を防ぎ、根端への酸素供給を効率化する酸素漏出(ROL)バリアを形成するために、耐湿性が高い。一方で、耐湿性の低いトウモロコシはROLバリアを形成しない。本研究課題により、トウモロコシとニカラグアテオシントの交雑集団を用いて、ROLバリア形成能に関連する染色体領域をマッピングした結果、第3染色体上の約232 kbの領域にマッピングできた。この領域には5つの遺伝子が座乗している。詳細な発現解析を行ったところ、1つの遺伝子にまで候補遺伝子を絞り込むことに成功した。しかし、ROLバリアの構成成分については明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：Zea nicaraguensis, which is a wild relative of maize (*Z. mays* ssp. *mays*), has higher tolerance of soil waterlogging than maize. We found that *Z. nicaraguensis* (but not maize) can form a barrier to radial oxygen loss (ROL). To identify a locus controlling ROL barrier formation in *Z. nicaraguensis*, we used a library of introgression lines (ILs), each containing a chromosome segment from *Z. nicaraguensis* in the maize inbred line Mi29. By fine-mapping and phenotyping, we discovered that the gene controlling ROL barrier formation was located on about 232 kb region of chromosome 3. We conducted gene expression analyses and then finally found one candidate gene. We also carried out suberin staining of root cross sections. However, we were not able to find any relationship between suberin staining pattern and root ROL barrier formation.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：トウモロコシ テオシント 耐湿性遺伝子 酸素漏出バリア マッピング

1. 研究開始当初の背景

イネやヨシなどの耐湿性の高いイネ科植物を過湿条件下で生育させると、根に酸素の輸送経路となる通気組織が形成されるのに加えて、通気組織から根外への酸素漏出を抑制する酸素漏出バリア [Radial Oxygen Loss (ROL) バリア] が形成されることが知られている。ROL バリアは、根の基部における酸素漏出を抑制することにより根端までの酸素輸送を効率化する。それに対して、トウモロコシやコムギなどの耐湿性が低いイネ科植物の根では、通気組織は形成されるものの、ROL バリアは形成されない。その結果、過湿条件下では根の基部から酸素の大部分が漏出するため、根端部が酸素欠乏になりやすくなる。したがって、トウモロコシなどの畑作物に ROL バリア形成能を付与することで、根への酸素供給能力の向上による大幅な耐湿性の強化が期待できる。

ニカラグアに自生するテオシント (トウモロコシの近縁種) の *Zea nicaraguensis* (以下、ニカラグアテオシントと呼ぶ) は、トウモロコシと比べて非常に高い耐湿性を示す。研究開始当初に、ニカラグアテオシントが ROL バリア形成能を持つことを明らかにしていた。ニカラグアテオシントはトウモロコシと交雑可能であるため、トウモロコシの耐湿性育種において有望な遺伝資源となる。したがって、ニカラグアテオシントの耐湿性形質を交雑によってトウモロコシに導入することで、耐湿性の向上したトウモロコシ系統を作出できると考えられた。

2. 研究の目的

ニカラグアテオシントの ROL バリア形成を制御する染色体領域を特定するために、トウモロコシを遺伝的背景にニカラグアテオシントの染色体断片を置換した染色体断片置換系統 (introgression line, IL) シリーズ (42 系統) の ROL バリア形成能を評価した。その結果、1 系統 (系統名 IL#11) のみが ROL バリア形成を示し、他の系統との比較解析から、ニカラグアテオシント由来の 3 番染色体短腕上の領域に ROL バリア形成の制御に関わる遺伝子座が座乗していることが明らかになった。

本研究課題では、ROL バリア形成制御遺伝子を含む IL#11 の兄弟系統で第 3 染色体の短腕の領域が分離している IL シリーズを多数選抜し、DNA マーカーを用いた遺伝子マッピングを実施することにより、ニカラグアテオシント由来の ROL バリア形成制御遺伝子を同定することを目的とした。また、ROL バリアの構成成分を明らかにするために、選抜した IL シリーズを用いて、構成成分の候補と考えられているスベリンの染色を行うことで、ROL バリアの構成成分に関する理解を深めることも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ROL バリア形成制御遺伝子の座乗位置を特定するために、IL#11 の兄弟系統の IL シリーズ (約 30 系統) を用いて、すでに得られている第 3 染色体短腕の 17 個の DNA マーカーの遺伝子型と ROL バリア形成能の形質評価を行って候補領域を決定した。さらに、トウモロコシのデータベース MaizeGDB より候補領域に座乗する DNA マーカーを 20 個程度選んで多型解析・マッピングを行い、候補領域のマーカーを充実させた。これらの系統の中から、候補領域で組換えが起こっている個体をマーカー選抜によって詳細なマッピングを行った。

候補遺伝子の発現解析を行うために、好気条件および嫌気還元条件下で生育させた個体の不定根を用いて、根端部から基部まで 1 cm ごとに 9 か所に切り分けた。また、組織特異的な遺伝子発現を調査するために、レーザーマイクロダイセクションを行い、根の外層、皮層、中心柱に切り分けた。それらの組織から RNA を抽出し、候補遺伝子に特異的なプライマーを用いて、定量 RT-PCR を行った。

根の ROL バリア形成能を評価するために、円筒型酸素電極による ROL 測定法とメチレンブルー染色法を用いた。円筒型酸素電極は内径 2.25 mm、高さ 5.0 mm の筒状であり、根を電極に通すことで電極を設置した部位 (5.0 mm の領域) から漏出する酸素を定量できる。また、メチレンブルーは酸素存在下で酸化されると青色を呈するが、無酸素条件下では無色透明となることから、根から酸素が漏出した部位だけが青色に染色されるので、ROL バリア形成の有無を評価できる。

ニカラグアテオシント、トウモロコシ、ROL バリア形成制御遺伝子を持つ IL (IL#468) の根を用いて、Fluorol Yellow 088 染色法により、ROL バリアの構成成分として考えられているスベリンの染色を行った。

ROL バリアは酸素分子 (O_2) の透過を抑制することから、酸素分子よりも分子量の大きい溶質の透過も抑制することが予想された。そこで、溶質透過性試験でよく使用される過ヨウ素酸 (Periodic acid) を用いて、根の外層における透過性試験を行い、ROL バリアが溶質の透過性を低下させるかどうかを調査した。

4. 研究成果

ROL バリア形成制御遺伝子の座乗している候補領域を絞り込むために、IL#11 の兄弟系統を用いて、DNA マーカー bnlgl325 と bnlgl113 の間の領域で組換えを起こしている系統の探索を行ったところ、23 系統が候補領域内で組換えを起こしていることが分かった (図 1)。そこで、bnlgl325 と bnlgl113 の間の領域でトウモロコシ (Mi29) とニカラグアテオシントの間で多型のある 5 つの DNA

マーカーを用いてジェノタイピングを行った。その結果、23 系統の組換え位置には頻度に差は見られたが、様々な部位で組換えが起こっていることが分かった (図 1)。そこで、これらの系統の ROL バリア形成能についてメチレンブルーまたは円筒型酸素電極により評価を行ったところ、#415、#465、#420、#459 の 4 系統で ROL バリア形成が観察されたことから、ROL バリア形成を制御する領域は TIDP5384 と umc1742 の間の領域 (約 4 Mb) であることが示唆された (図 1)。

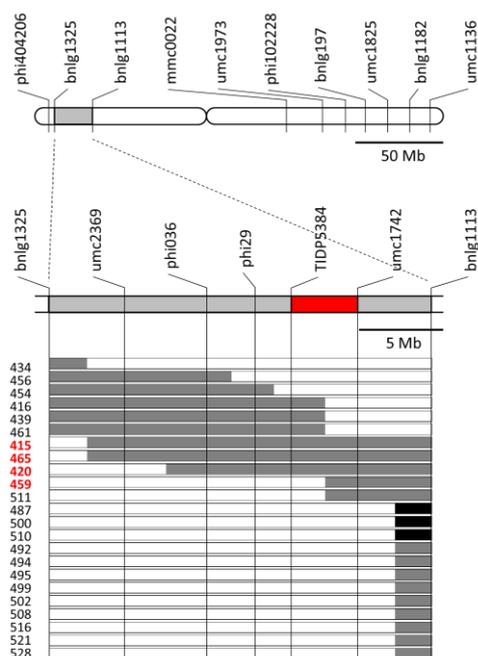


図 1. ROL バリア形成制御遺伝子領域のマッピング 1

bnlg1325 と bnlg1113 の染色体上の位置とこの間の領域で組換えが起きた系統の染色体構造を示した。これらの系統に対し、7 個の DNA マーカーによる遺伝子型決定を行った。ニカラグアテオシントタイプホモ接合型の領域を黒色に、トウモロコシタイプホモ接合型の領域を白色に、ヘテロ接合型の領域を灰色で示した。ROL バリア形成能を示した系統名を赤色で示した。推定される ROL バリア形成制御領域 (TIDP5384 と umc1742 の間の領域) を赤で示した。

TIDP5384 と umc1742 の間の領域をさらに狭めるために、これらのマーカー間で組換えを起こしている系統・個体の探索を行ったところ、11 系統が候補領域内で組換えを起こしていることが分かった (図 2)。MaizeGDB を用いて新たな DNA マーカーの探索を行ったが、データベースに登録されている DNA マーカーにはこの領域内でトウモロコシ (Mi29) とニカラグアテオシントの間で多型のあるものが見つからなかったため、Hi-seq によってニカラグアテオシントのゲノムを断片的に解読した塩基配列データをもとに、10 個の INDEL マーカーと 2 個のシーケンスマーカーを作出し、ジェノタイピングを行った結果、11 系統がどの DNA マーカー間で組換えをし

ていることを明らかにできた (図 2)。そこで、これらの系統の ROL バリア形成能についてメチレンブルー染色または円筒型酸素電極により評価を行ったところ、6 系統において ROL バリアが形成された。この結果から、ROL バリア形成を制御する領域は w-056 と w-066 の間の領域 (約 232 kb) であることが示唆された。

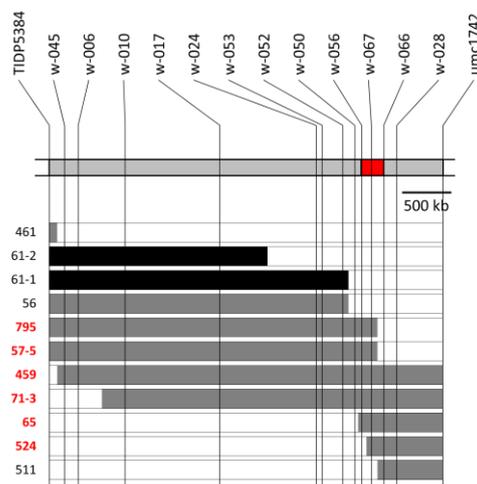


図 2. ROL バリア形成制御遺伝子領域のマッピング 2

TIDP5384 と umc1742 の間の領域で組換えが起きた系統の染色体構造を示した。これらの系統に対し、作出した新規の 12 個の DNA マーカーによる遺伝子型決定を行った。図中ではニカラグアテオシント型ホモ接合体領域を黒色に、トウモロコシ型ホモ接合体領域を白色に、ヘテロ接合体領域を灰色で示した。DNA マーカーの位置は物理的な位置で示した。また、組換え部位は便宜的に隣接するマーカーの midpoint に示した。ROL バリア形成能を示した系統名を赤色で示した。推定される ROL バリア形成制御領域 (w-056 と w-066 の間の領域) を赤で示した。

ROL バリア形成を制御する遺伝子が座乗すると考えられる 232 kb の候補領域内 (w-056 と w-066 の間の領域) には、トウモロコシのリファレンスゲノムにおいて 5 つの遺伝子の存在が推定された (図 3)。

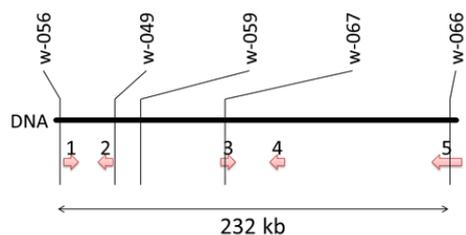


図 3. 候補領域内に含まれる遺伝子情報

トウモロコシのリファレンスゲノムにおける各 DNA マーカーの位置を物理地図で示し、また推定されている 5 つの遺伝子を矢印で示した。矢印の上の番号は候補領域の上流側から順に便宜的に付けた。

5つの候補遺伝子について、遺伝子が根のどの部位で発現をしているのかを調査するために、根を根端からの距離別に切り分け、それぞれの断片からRNAを抽出して定量RT-PCRによる発現解析を行った。その結果、5つの遺伝子のうち、1遺伝子がトウモロコシでは根端から5-50 mmの領域で嫌気誘導性が観察されたのに対し、ニカラグアテオシントではいずれの部位でも嫌気誘導性が観察された(図4)。さらに、根端から30 mmの部位に対して、レーザーマイクロダイセクションを用いて中心柱、皮層、外層の3つの組織に切り分け、それぞれからRNAを抽出して、この遺伝子の組織別発現解析を行ったところ、トウモロコシではいずれの部位においても嫌気誘導性が観察されたが、ニカラグアテオシントは外層で特異的に嫌気誘導していることが分かった(図4)。これらの結果よりこの遺伝子がROLバリア形成制御遺伝子であることが示唆された。

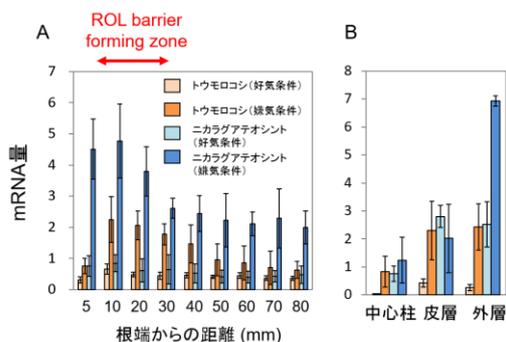


図4. 候補遺伝子の定量RT-PCRによる発現解析

コントロール条件(好気条件)および嫌気条件で2週間生育させたトウモロコシとニカラグアテオシントの不定根を材料に用いた。(A)根端からの距離別にサンプリングを行い、各領域における遺伝子発現を定量RT-PCRにより解析した。(B)根端から30 mmの部位の根の組織に対して、レーザーマイクロダイセクションを用いて中心柱、皮層、外層の3つの組織に切り分け、各組織における遺伝子発現を定量RT-PCRにより解析した。

ROLバリア形成能に関与するニカラグアテオシント由来の第3染色体断片が根表層のスベリンの蓄積を変化させるかどうかを調査するために、ニカラグアテオシント、トウモロコシとともに、第3染色体断片をニカラグアテオシントタイプホモ接合型で有する#468とトウモロコシタイプホモ接合型で有するIL#42を用いて根の横断切片の染色を行うことにより評価した。その結果、スベリンはトウモロコシ、#468、IL#42では根端から40-80 mmの部位で外皮が染色されたのに対し、ニカラグアテオシントでは根端から20-80 mmの部位で染色が観察された(図5)。この結果から、ROLバリア形成能を制御するニカラグアテオシント由来の染色体断片は、

組織化学的な染色方法で検出されるスベリンの蓄積の違いには関与しないことが示唆された。

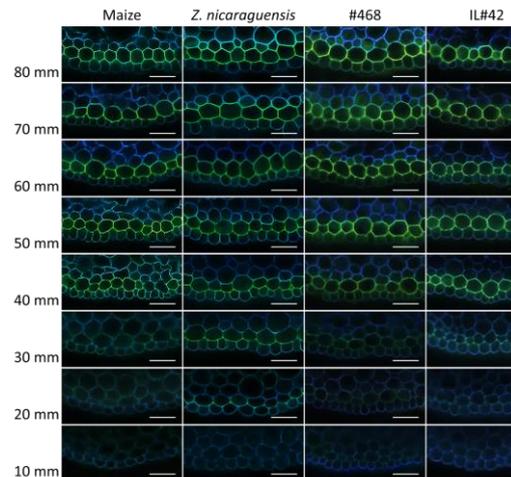


図5. 不定根におけるスベリン染色パターンの比較

嫌気還元処理を2週間行ったトウモロコシ(maize)、ニカラグアテオシント(*Z. nicaraguensis*)、#468、IL#42の不定根に対し、表層におけるスベリン染色を行った。スベリン染色はFluorol Yellow 088を用いて行った。本法ではUVランプを用いて蛍光顕微鏡で観察を行い、スベリンは黄緑色に染色される。Bar = 50 μm。

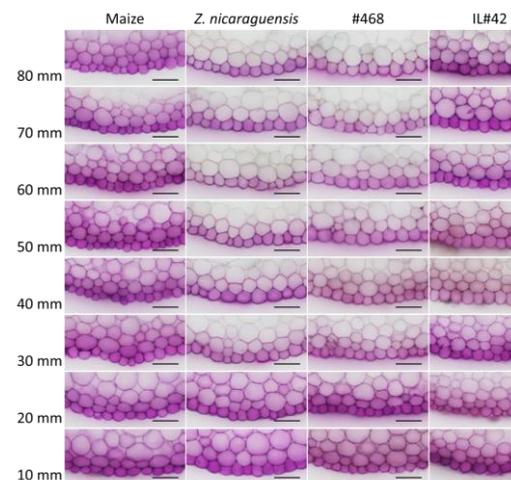


図6. 不定根の根表層における溶質透過性の比較

嫌気還元処理を2週間行った25日齢のトウモロコシ(maize)、ニカラグアテオシント(*Z. nicaraguensis*)、#468、IL#42の不定根に対し、表層における溶質透過性の評価を行った。評価にはアポプラストティックレーザーである過ヨウ素酸を用い、シッフ試薬によって可視化した。本法では、過ヨウ素酸の浸透部位は赤紫色で染色される。Bar = 50 μm

ROLバリア形成能に関与するニカラグアテオシント由来の第3染色体断片が根表層の

溶質透過性を変化させるかどうかを調査するために、ニカラグアテオシント、トウモロコシとともに、第3染色体断片をニカラグアテオシントタイプホモ接合型で有する#468とトウモロコシタイプホモ接合型で有するIL#42を用いて、過ヨウ素酸(Periodic acid)の根組織への透過の程度を観察することで評価した。その結果、トウモロコシとIL#42では、全ての部位で過ヨウ素酸が根内部組織にまで浸透していた(図6)。一方、ニカラグアテオシントと#468においては、根端から30-80mの部位では過ヨウ素酸の浸透が外皮細胞層でブロックされていた(図6)。これらの結果から、ROLバリア形成能を制御するニカラグアテオシント由来の第3染色体断片は、根表層に溶質の浸透を防ぐアポプラスティックバリアの形成にも寄与することが示唆された。

以上、本研究課題により、ニカラグアテオシントのROLバリア形成制御遺伝子の探索を行った結果、1つの候補遺伝子として同定することができた。しかし、ROLバリアの構成成分の同定には至らなかった。今後、本研究を継続することによって、これまで長く未解明であったROLバリア形成の分子機構が明らかになると期待された。

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4件)

- (1) Yamauchi, T., Colmer, T.D., Pedersen, O. and Nakazono, M.: Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant Physiology*, 査読有, 176: 1118-1130 (2018)
- (2) Watanabe, K., Takahashi, H., Sato, S., Nishiuchi, S., Omori, F., Malik, A.I., Colmer, T.D., Mano, Y. and Nakazono, M.: A major locus involved in the formation of the radial oxygen loss barrier in adventitious roots of teosinte *Zea nicaraguensis* is located on the short-arm of chromosome 3. *Plant, Cell & Environment*, 査読有, 40: 304-316 (2017)
- (3) Mano, Y. and Omori, F., Tamaki, H., Mitsuhashi, S. and Takahashi, W.: DNA marker-assisted selection approach for developing flooding-tolerant maize. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 査読有, 50: 175-182 (2016)
- (4) Yamauchi, T., Tanaka, A., Mori, H., Takamura, I., Kato, K. and Nakazono, M.: Ethylene-dependent aerenchyma formation in adventitious roots is regulated differently in rice and maize. *Plant, Cell & Environment*, 査読有, 39: 2145-2157 (2016)

[学会発表] (計5件)

- (1) 井出健斗、渡邊宏太郎、高橋宏和、高橋秀和、大森史恵、間野吉郎、中園幹生: *Zea nicaraguensis* の酸素漏出バリア形成に関わる遺伝子座の同定. 日本育種学会第132回講演会. 2017年10月. 盛岡, 岩手
- (2) 安江広樹、渡邊宏太郎、高橋宏和、Timothy D. Colmer、Ole Pedersen、Anja Fløytrup、大森史恵、間野吉郎、中園幹生: *Zea nicaraguensis* を用いた側根の酸素漏出バリア形成能の評価. 日本育種学会第132回講演会. 2017年10月. 盛岡, 岩手
- (3) Watanabe, K., Takahashi, H., Sato, S., Nishiuchi, S., Omori, F., Malik, A.I., Colmer, T.D., Mano, Y. and Nakazono, M.: A locus controlling formation of a barrier to radial oxygen loss is located on chromosome 3 in *Zea nicaraguensis*. The 12th International Society for Plant Anaerobiosis Conference. 2016年9月. Helsingor, Denmark
- (4) 渡邊宏太郎、西内俊策、佐藤彩織、大森史恵、高橋秀和、間野吉郎、中園幹生: ニカラグアテオシントのもつ酸素漏出バリアとスベリン、リグニンの関係. 日本育種学会第129回講演会. 2016年3月. 横浜, 神奈川
- (5) 渡邊宏太郎、西内俊策、佐藤彩織、大森史恵、高橋秀和、間野吉郎、中園幹生: ニカラグアテオシントの酸素漏出バリア形成に関与する染色体領域の特定. 第23回育種学会中部地区談話会. 2015年11月. 長久手, 愛知

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他] なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
中園 幹生 (NAKAZONO MIKIO)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 70282697
- (2)研究分担者
間野 吉郎 (MANO YOSHIRO)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門・ユニット長
研究者番号: 20355126
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし