

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02182

研究課題名（和文）Vigna属耐塩性野生種のNa吸収に関するイメージングおよび全遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Sodium dynamics and transcriptome of salt tolerant species in the genus Vigna

研究代表者

内藤 健（Naito, Ken）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・上級研究員

研究者番号：20581705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では放射性同位体を使ったリアルタイムの元素局在解析と時系列の全遺伝子発現解析を実施することで、海岸に育つ野生植物*V. marina*の耐塩性機構について調査を行った。その結果、根からNa⁺を排出することにより、植物体にNa⁺が蓄積するのを防ぐ能力をもつこと、その排出には日周性があり、夜間に停止することでエネルギー消費を抑えること、そしてその日周性は2遺伝子の発現様式の組合せで説明できること、の3点が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類は「耐塩性遺伝子の使い方」を知らない。塩害の深刻さは早くから認知されており、シロイヌナズナからは586もの耐塩性関連遺伝子が同定されている。しかし、これらの遺伝子は何れも単独では実用に足る効果は得られない。では586遺伝子のうち、どれをどう組み合わせればよいのか。モデル植物を使った実験によって、その問いに答えることは難しい。

この問題の最も有効な解決策は、耐塩性野生種における遺伝子の使われ方を解明することである。野生種における耐塩性遺伝子の使われ方が、人類にとっての模範解答となるのである。したがって本研究の成果は、今後の耐塩性作物開発において一つの模範解答になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The real-time imaging analysis of Na⁺ revealed that the beach species *V. marina* is able to excrete Na⁺ out of the roots, so that it suppresses salt accumulation in the plant body. The study also revealed that the Na⁺ excretion occurred only in daytime, and stopped at night. We then performed transcriptome analysis to compare *V. marina* and two other species that are susceptible or relatively tolerant to salt stress. As a result, we found geneA, one of the cation transporters, is gene is constitutively transcribed only in *V. marina*. We also found geneB, a positive regulator of geneA, is up-regulated at daytime and down-regulated at night. Thus, these results indicate that the expression patterns of only 2 genes could explain the diurnal rhythm of Na⁺ excretion from the root of *V. marina*.

研究分野：育種学

キーワード：遺伝資源 野生植物 耐塩性 Vigna アズキ

1. 研究開始当初の背景

人類は「耐塩性遺伝子の使い方」を知らない。塩害の深刻さは早くから認知されており、シロイヌナズナからは 586 もの耐塩性関連遺伝子が同定されている (Araport11: www.araport.org)。しかし、これらの遺伝子は何れも単独では実用に足る効果は得られないため、複数の耐塩性遺伝子を組み合わせる必要がある。では 586 遺伝子のうち、どれをどう組み合わせればよいのか。モデル植物を使った実験によって、その問いに答えることは難しい。

この問題の最も有効な解決策は、耐塩性野生種における耐塩性遺伝子の使われ方を解明することである。我々はアズキの仲間が多様性の宝庫ともいえる *Vigna* 属に注目し、全ゲノム解読や耐塩性スクリーニングを行ってきた。*Vigna* 属では複数の野生種が独立に耐塩性を獲得しており、これらは何れもダイズが全滅する塩害圃場でも良好に生育する。したがって、これら野生種の耐塩性機構およびその責任遺伝子の解明が、耐塩性作物開発の鍵となる。すなわち、野生種における耐塩性遺伝子の使われ方が、人類にとっての模範解答となるのである。

そこで本研究では、*Vigna* 属の中でも最も耐塩性に優れる *V. marina* に注目することとした。*V. marina* は塩ストレス下において植物体内における Na^+ の蓄積を抑制する。一方、近縁種の *V. luteola* には耐塩性の海岸型と感受性の河岸型の 2 種類があり、海岸型が根に Na^+ を蓄積して地上部への Na^+ 輸送を抑制するのに対し、河岸型は根から吸収した Na^+ のほとんどを葉に以降させて枯死してしまう。したがって、これら 3 系統の比較解析によって、*V. marina* の耐塩性において特異な役割を担う遺伝子が明らかになると期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は

- (1) *V. marina* の耐塩性において重要な役割を担う部位および時間帯の同定
- (2) それに関わる遺伝子の同定

である。(1) においては、ナトリウムの放射性同位体 (Na-22) を用いたリアルタイムイメージング解析により、*V. marina* における Na^+ の吸収・輸送が *V. luteola* (海岸型) および *V. luteola* (河岸型) とどう異なるのかを明らかにする。特に、 Na^+ の吸収・輸送が起きる部位および時間帯を特定することが、(2) に繋がる。(2) においては系統間の部位別・時系列トランスクリプトーム解析を行い、(1) で明らかになった部位・時間帯において *V. marina* で特異的に発現が上昇する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) *V. marina* の耐塩性において重要な役割を担う部位および時間帯の同定

Na の放射性同位体 (Na-22) および Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) 法を用いて、植物体内における Na^+ の吸収・輸送の様子を観察した。

材料は農研機構・遺伝資源センターから入手可能な以下の 3 系統である。

V. marina (JP251971)、*V. luteola* (海岸型) (JP233389)、および *V. luteola* (河岸型) (JP235855)

Na 動態のリアルタイムイメージングについては以下に記す通りである。

- ① NaCl を含まない水耕培地で発芽から 2 週間栽培
- ② Na-22 を含む 100 mM NaCl の水耕液で 24 時間処理
- ③ 洗浄して根の表面から Na-22 を除去
- ④ Na-22 を含まない 100 mM NaCl の水耕液に以降
- ⑤ PETIS 法による放射線量のリアルタイムマッピング (48 時間)

(2) *V. marina* の耐塩性機構に関わる遺伝子の同定

部位別・時系列トランスクリプトーム解析により、*V. marina* で特異な発現様式を示す遺伝子を探索した。

- (1) と同じ 3 系統を使用。栽培条件・サンプリング・シーケンシングは以下の通り。

- ① NaCl を含まない水耕培地で発芽から 2 週間栽培
- ② 午前 11 時に 100 mM NaCl の水耕液で 24 時間処理 (対照区は 0 mM NaCl)
- ③ 翌日の午前 11 時から 12 時間おきに 4 回、根をサンプリング (3 反復)
- ④ RNA を抽出し、3'mRNA-seq のライブラリを調整
- ⑤ Illumina HiSeq4000 によるシーケンス
- ⑥ Kallisto によって遺伝子ごとのリードカウントを取得
- ⑦ edgeR によって系統間・処理区間で発現に有意差のない遺伝子を除去
- ⑧ superTOM によるクラスタリングおよび WGCNA によるネットワーク解析を実施

4. 研究成果

(1) *V. marina* の耐塩性において重要な役割を担う部位および時間帯の同定

$^{22}\text{Na}^+$ を取り込ませた *V. marina*、*V. luteola* (海岸型)、*V. luteola* (河岸型) の PETIS 解析の結果、*V. marina* および *V. luteola* (海岸) 系統は時間とともに根における放射線量が低下する一方、水耕液中の放射線量は増加した。これは、一旦根に取り込まれた $^{22}\text{Na}^+$ が水耕液中に排出されたことによると考えられる。一方、*V. luteola* (河岸型) においては、根からの放射線量は減少しつつも、水耕液中の放射線量の増加は極めて低い水準に留まっていた。したがって、耐塩性をもたない河岸型系統では、根に取り込まれた Na^+ は急速に地上部へと輸送されてしまうことが示唆された。

さらに、PETIS による撮像開始から 72 時間後までの水耕液中の放射線量を推定したところ、*V. marina* では明期に著しく増加する一方、暗期にはほとんど増加しなかった (Figure 1)。したがって、*V. marina* は明期にのみ根から Na^+ 排出し、暗期にはそれを停止する、という日周性が示唆された。

一方、*V. luteola* (海岸型) の水耕液においても明期の放射線増加が暗期よりも高い傾向は見られたが、*V. marina* に比べると明らかにその差は小さかった (Figure 1)。したがって、*V. luteola* (海岸型) は明期・暗期ともに根から Na^+ を排出するが、明期にやや多い傾向があることが示唆された。

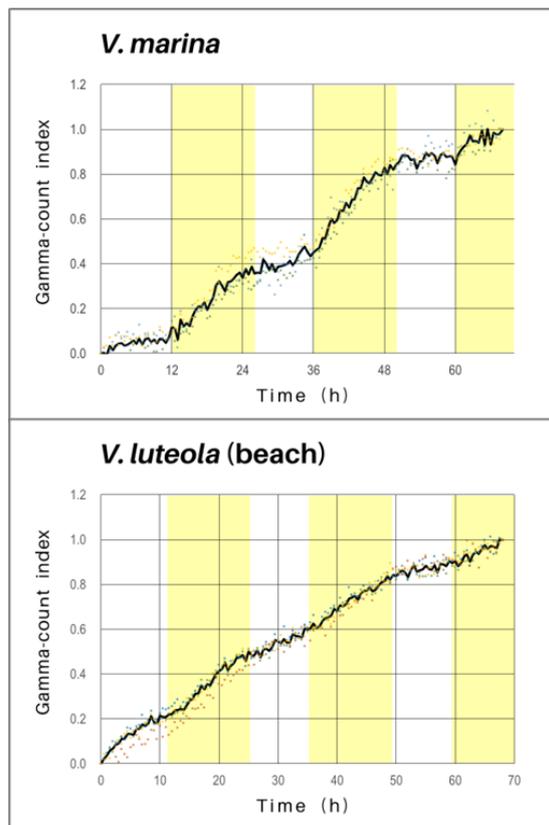


Figure 1. ^{22}Na in hydroponic culture during PETIS. Yellow mesh indicates daytime.

(2) *V. marina* の耐塩性機構に関わる遺伝子の同定

根からの Na^+ 排出がない *V. luteola* (河岸型)、排出はあるが日周性が弱い *V. luteola* (海岸型)、および排出があり日周性も強い *V. marina* の 3 系統について、トランスクリプトーム解析を行った。上述の通り、サンプリングは塩ストレス区および対照区で栽培した植物体の根を、12 時間おきに 4 回実施した。

始めは *V. marina* において、特に塩ストレス区の明期に発現が上昇する遺伝子群を探索したが、注目に値する遺伝子は見いだせなかった。

そこで、*V. marina* や *V. luteola* (海岸型) で発現が高く、*V. luteola* (河岸型) で低い遺伝子群に探索範囲を広げてみると、そこに *geneA* が含まれていた。*geneA* は細胞内に流入した Na^+ を細胞外に排出する輸送体をコードし、植物の耐塩性において特に重要な機能を果たす遺伝子である。その発現様式を比較してみると、*V. luteola* (河岸型) では塩ストレスによって誘導されるものの低い水準に留まるのに対して、*V. luteola* (海岸型) では塩ストレスによる誘導がより大きく、*V. marina* では塩ストレスの有無に関わらず高い発現量を示した (Figure 2)。

しかし、*geneA* 単独では日周性を説明できない。そこで、*geneA* の活性を正に制御する *geneB* の発現量に注目したところ、*geneB* は 3 系統全てにおいて、明期に上昇して暗期に低下するという顕著な日周性を示すことが明らかとなった (Figure 2)。また、*V. marina* では塩ストレスによって夜間の発現量がむしろ低下する傾向にあることも示唆された。これは、A タンパク質の活性が明期に上昇して暗期に低下すること示唆する。

したがって、*V. marina* の根における Na^+ 排出の日周性は、*geneA* および *geneB* の 2 遺伝子の発現様式によって説明できると考えられた。すなわち、*V. marina* においては Na^+ 排出の直接的なプレーヤーである *geneA* が作り置きされており、塩ストレスに晒された際には *geneB* の発現が上昇する明期において速やかに Na^+ 排出が起きるのに対して、*geneB* の発現が低下する暗期には Na^+ 排出が停止する。一方、*V. luteola* (河岸型) においては、*geneA* の発現が一貫して低いために *geneB* の発現量に関わりなく Na^+ 排出が起きない。また、*V. luteola* (海岸型) においては、塩ストレスの開始から *geneA* の発現量が少なくとも 48 時間は増加し続けること、そして *geneB* の発現量も夜間には低下するものの *V. marina* よりは高く保たれること、などの理由から Na^+ 排出の日周性がやや不明瞭になると考えられる。

Transformed CPM

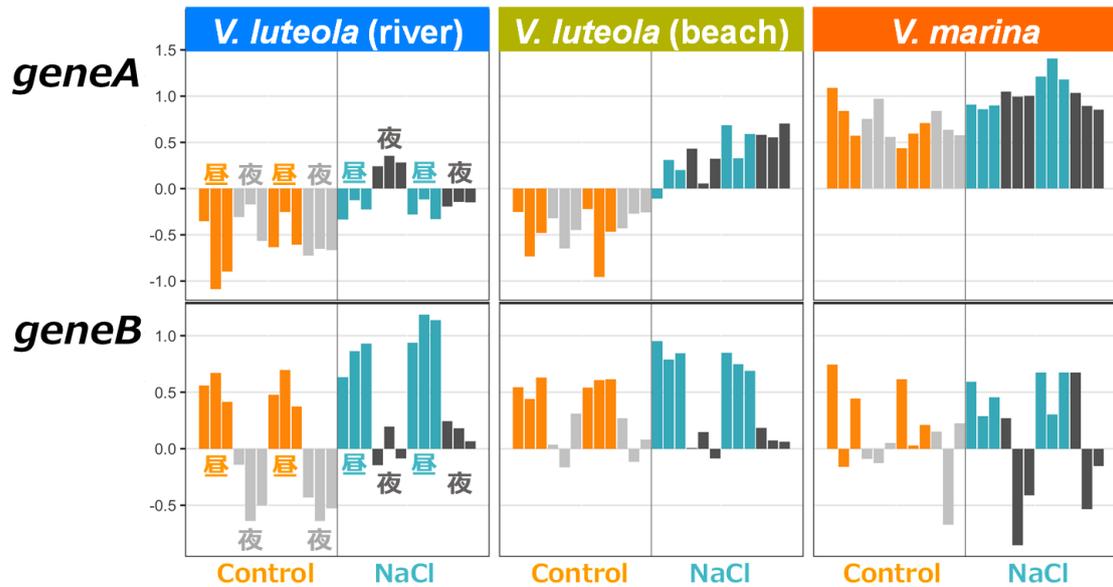


Figure 2. Scaled counts per million of *geneA* and *geneB*. Read counts of RNA-seq data were normalized, log2-transformed and centered (subtracted by mean values). All the three replicates are plotted.

以上により、本研究では耐塩性に優れる *V. marina* は根から Na^+ を排出する能力をもつこと、またその排出には日周性があること、そしてその日周性は *geneA* および *geneB* の 2 遺伝子の発現様式の組合せで説明できること、を明らかにした。

今後形質転換体を用いた検証試験は必要となるが、本研究は野生植物における耐塩性遺伝子の使われ方を示す一例として、今後の耐塩性作物開発において重要な知見になると考えられる。また、本研究で得られたトランスクリプトームのデータからはさらに興味深い遺伝子群が見いだされつつあり、今後あらためて検証と論文化を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 野田祐作、古川純、友岡憲彦、内藤健 |
| 2. 発表標題 植物体内で異なる制御を受けるアルカリ金属：Na、K、およびCs |
| 3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会 |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 内藤健 |
| 2. 発表標題 ゲノムとトランスクリプトームでこじ開けたる。Vigna属野生種の耐塩性進化 |
| 3. 学会等名 種生物学シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 内藤健 |
| 2. 発表標題 ワイルドはセクシーであるー夢のない研究なんてNGだぜー |
| 3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野田祐作、古川純、鈴木伸郎、内藤健 |
| 2. 発表標題 放射性ナトリウムを用いたリアルタイムイメージングが暴くハマササゲのナトリウム排出とその周期性 |
| 3. 学会等名 日本育種学会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ken Naito |
| 2. 発表標題 Genomics of salt tolerance in wild species of genus Vigna |
| 3. 学会等名 The 7th International Legume Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 内藤健 |
| 2. 発表標題 Vigna属の耐塩性進化に関するゲノミクス |
| 3. 学会等名 日本生態学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 内藤健 |
| 2. 発表標題 Vigna属耐塩性野生種群のトランスクリプトーム解析 |
| 3. 学会等名 日本進化学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 鈴井 伸郎 (Suzui Nobuo) (20391287) | 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用 研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員 (定常) (82502) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|---------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 古川 純 (Furukawa Jun) (40451687) | 筑波大学・生命環境系・准教授 (12102) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |