

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450006

研究課題名(和文) FOXハンティングシステムを用いたダイズのファンクショナルゲノミクス研究

研究課題名(英文) The study of functional genomics in soybean by FOX hunting system

研究代表者

明石 良 (Akashi, Ryo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20253809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、シロイヌナズナ由来の機能遺伝子をランダムに導入した西洋ミヤコグサ FOXSRシステムを用いて、収量やバイオマスに関連する遺伝子の探索を行い、その機能を明らかにするとともに、作物への応用研究も視野に入れ、ダイズに候補遺伝子を導入し、その作用を検証した。アスパラギンイルtRNAシンターゼ(SYNC1)遺伝子は、上記候補遺伝子の一つであり、本遺伝子が導入されたFOXSR系統では、草丈、分枝節数の増加が認められ、組換えダイズにおいても同様の結果が得られた。また、SYNC1遺伝子の強発現は、ダイズ種子中のアミノ酸代謝にも影響を及ぼし、作物の収量増加やアミノ酸成分の改良に有効であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored plant biomass and seed yield-related genes, and identified the gene functions by using *Lotus corniculatus* FOX-superroot lines (FOXSR lines) randomly transformed with *Arabidopsis thaliana* cDNAs. Further, we transformed the candidate gene, an asparaginyl-tRNA synthetase gene (SYNC1), into soybean and verified its functions in this typical legume crop, soybean. FOXSR lines harboring the SYNC1 gene increased in plant height and branch node number. Similarly, transgenic soybeans which were highly regulated by SYNC1 gene obtained the same results with those of the FOXSR lines. Moreover, high expression of SYNC1 gene affected amino acid synthesis in soybean seeds. Therefore, SYNC1 gene is considered to be effective in increasing plant biomass and seed yield, and improving amino acid contents in legume crops.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：FOXハンティングシステム ファンクショナルゲノミクス 西洋ミヤコグサ SYNC1遺伝子 スーパールート ダイズ

1. 研究開始当初の背景

作物の生産性を向上するには、十分な根圏の成長が必要である。特に、マメ科作物における根は根粒を形成する上で重要な組織である。根に形成される根粒は、発生学的に側根や不定根と同じく内生分枝であり、胚発生以降に環境の変化に応答して形成される後胚発生と同様である (川口ら, 2000)。したがって、マメ科作物における根の成長と分化に関する遺伝子群の解析は、その生産性を向上するための重要な課題である。

植物における遺伝子の探索と機能解析は、植物の多様な性質を遺伝子レベルで理解する上で重要である。従来の機能欠損型 (変異体) の遺伝子機能探索法は、野生型に比べてわずかな発現の違いしか認められず、遺伝子の機能解析が困難である。また、アクチベーションタギング法のような機能獲得型の遺伝子機能探索法は、同時に複数の遺伝子を強発現させることから、変異の原因遺伝子の特定が困難であるなどの欠点を有している。一方、近年開発された FOX ハンティングシステム (Full-length over expressor gene hunting system) は、植物由来の完全長 cDNA をランダムに導入し、強発現させることにより新規な遺伝子の機能を同定し、新規な遺伝子を探索する機能獲得型の高速遺伝子探索技術であることから (Ishikawa et al., 2006)、本法はシロイヌナズナやイネなどの豊富なゲノム情報が蓄積されているモデル植物を中心に展開されている。

2. 研究の目的

スーパールートは、セイヨウミヤコグサ (*Lotus corniculatus*) 由来の根培養系から見出され (Akashi et al., 1998)、その根が植物ホルモン非存在下で無限的に成長し、また、根端からプロトプラストが容易に単離でき、植物体の再分化が可能である等の特徴を有している。これまで、申請者はシロイヌナズナ由来の完全長 cDNA を導入し、FOX ハンティングシステムを確立し、130 個体の FOX スーパールート形質転換個体 (FOX 個体) が得ることができた。これらの FOX 個体は、試験管で各々培養して根の形態を観察したところ、異なる根の成長を示す個体が認められた。現在、130 個体のうち 67 個体において導入遺伝子のパーシャルなシークエンスも終わり、種々の既知遺伝子や未知遺伝子が導入された個体を得られている (Himuro et al., 2011)。

本研究は、遺伝子機能獲得型変異体の一つである FOX ハンティングシステムを用いて、シロイヌナズナ由来完全長 cDNA アグロライブラリーを西洋ミヤコグサ由来のユニークな根培養系 (スーパールート) ヘランダムに導入しするファンクショナルゲノミックスの技術を確立するとともに、シロイヌナズナ由来の遺伝子がマメ科植物における根の成長と分化および植物のバイオマスや収量に対して影響をもたらす新規な遺伝子の探索

と、それを用いて生産性を向上させる分子育種を展開するための基盤整備と、有用遺伝子をダイズへアグロバクテリウム法により再導入し、その機能性を確認するものである。

3. 研究の方法

(1) 西洋ミヤコグサ FOX 系統 (FSL) の初期成長とバイオマス関連遺伝子の探索

FSL130 系統の中から生育旺盛な 9 系統、FSL#32、58、110、115、116、118、121、125、126 を選抜し、初期成長の調査を行った。それぞれの FSL 系統とともにスーパールート (SR) 系統およびベクターのみ導入した形質転換体 (T-SR) 系統をバーミキュライトを含むポットに移植し、27°C16 時間明期条件下のインキュベーター内で 1 ヶ月生育させた。その後、それぞれ系統について、草丈、地上部新鮮重、総根長を測定した。バイオマス関連遺伝子の探索は、選抜した FSL 系統の導入遺伝子の配列を解読し、NCBI より BLAST 検索することで明らかとした。

(2) FSL#83 および FSL#121 における特性調査
ブラシノステロイド関連遺伝子 (*CPD* 遺伝子) が導入された FSL#83 およびアスパラギン tRNA シンテターゼ (*SYN1*) 遺伝子が導入された FSL#121 について、形態調査を行った。それぞれ 2 系統の FSL 系統と SR 系統を特定網室で 4 ヶ月生育させ、草丈、茎数、茎径、分枝数、主茎節数、分枝節数、節間長、葉長、葉幅、地上部乾物重、地下部乾物重、再生性、開花数および粗タンパク質量について調査した。また、FSL#121 については、植物体中のアミノ酸含量についても調査した。

(3) ダイズへの *SYN1* 遺伝子の導入

作物への応用研究を視野に入れ、*SYN1* 遺伝子をダイズに導入した。供試したダイズ品種は、「Williams82」であり、アグロバクテリウムを用い、Half-Seed 法により遺伝子組換えを行った。導入遺伝子は、ダイズ由来の *SYN1* 遺伝子であり、ナショナルバイオリソースプロジェクト ミヤコグサ・ダイズより cDNA クロンの提供を受けた。Gateway システムにより、*SYN1* 遺伝子を植物発現用ベクター pB7WG2D (Plant Systems Biology 社より購入) に導入し、ベクターを構築した。アグロバクテリウムとの共存培養後、胚軸は洗浄され、5 mg/L ビアラホス存在下のシュート誘導培地および伸長培地で培養し、*GFP* 遺伝子の発現が認められるシュートを発根培地に移植して、発根を促した。その後、組換え体は、土に順化され、導入遺伝子の確認を行った後、特定網室で育成された。

(4) *SYN1* 遺伝子が導入された遺伝子組換え体の形態調査およびアミノ酸分析

SYN1 遺伝子が導入された組換え体の解析は、自殖により導入遺伝子をホモ化させたものを用い、コントロールとしてダイズ品種

「Williams82」を用いた。それぞれの種子は、1/5000 アール深型ポットに播種した後、特定網室で栽培し、4ヶ月後の形態特性を評価した。アミノ酸分析は、植物体と種子について行い、植物体は人工気象室で4週間育成した根（地下部全て）、茎（主茎 2~3 節間）、葉（第 1~3 葉）を、種子は特定網室で採種した種子（完熟種子）とその発芽種子を用い、UF-Amino station で分析した。

4. 研究成果

(1) 西洋ミヤコグサ FOX 系統 (FSL) の初期成長とバイオマス関連遺伝子の探索

FSL130 系統の中から生育旺盛な 9 系統、FSL#32、58、110、115、116、118、121、125、126 を選抜し、初期生育を調査したところ、コントロールとして用いた SR および T-SR に比べ、全ての FSL 系統が生育旺盛な傾向を示した (図 1)。地上部新鮮重は、FSL#110 が最も高く、次いで 121、118、125 の順であった。草丈は FSL#110 が最も高く、次いで FSL#125、121 であり、草根長は FSL#125 の次に 126、121 の順であった。なお、これらの FSL 系統は、SR の形質値よりも有意に高いものであり、FSL#121、#125 が全ての形質で SR よりも有意に高い形質値を示した。生育旺盛な FSL 系統 9 系統について、その導入遺伝子の塩基配列より BLAST 検索したところ、表 1 に示した遺伝子と相同性を示し、機能未知のものや光化学反応に関連するもの、デンプン合成、発芽に関与するものなどが含まれた。

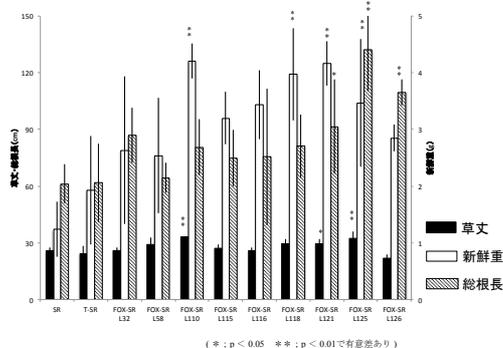


図1. SR、T-SRおよび9系統FOX系統における草丈、新鮮重、総根長

表1. 選抜したFOX系統の導入遺伝子

FOX系統	導入遺伝子
58	Similar to PS II 32 Kda protein,mRNA sequence
110	Selenoprotein,Rdx type mRNA
115	Phosphoglucomutase-like protein
116	Long-chain acyl-CoA synthetase
118	Hypothetical proteinと70タンパク質配列と一致
121	アスパラギンtRNA合成酵素遺伝子(SYNC1遺伝子)
125	Unknown
126	FOX L58と同じ

(2) FSL#83 および FSL#121 における形態調査

FSL#83 および FSL#121 における導入遺伝子の発現を確認したところ、FSL#83 は CPD 遺伝

子の発現が、FSL#121 は SYNC1 遺伝子の発現が共に根、茎、葉の全ての器官で認められた。形態および特性調査において、FSL#121 は、FSL#83 および SR に比べ草丈、茎径、主茎節数、分枝節数について有意に高いものの、茎数は最も低く、地上部乾物重については、SR と同等であった (表 2)。FSL#83 は、他の 2 系統に比べ、節間長、地上部乾物重、花数について有意に高く、茎数、分枝数、分枝節数についても最も高い傾向を示した。粗タンパク質量は、FSL#121 が有意に低く、FSL#83 は SR と同等であった。

表2. 特定網室での栽培4ヶ月目のSR、FSL#83 およびFSL#121の形態



図 2 は、特定網室での栽培 4 ヶ月目の SR 植物体、FOX 系統 FSL#83、FSL#121 である。FSL#121 は、主茎が著しく伸長し、茎数が少ない特徴を有する。FSL#83 は、茎数、分枝数および分枝節数が増加し、旺盛な生長を示した。特に本系統は、開花数の増加が特徴的であり、SR より 1.5 倍増加した。また、SYNC1 遺伝子が導入された FSL#121 と SR について、植物体のアミノ酸含量を調査したところ、FSL#83 の葉と根において、アスパラギン、アスパラギン酸、バリン、リシン、ロイシンが有意に高い値を示した (表 3)。これらのことから、FSL#83 に導入された CPD 遺伝子は、バイオマス生産を増加し、花芽形成も促進することが明らかとなった。一方、FSL#121 に導入された SYNC1 遺伝子は、植物体の形態およびアミノ酸代謝に影響を及ぼし、作物の収量増加やアミノ酸成分の改良に有効であることが考えられた。



図2. 特定網室での栽培4ヶ月目のSR、FSL#83およびFSL#121

表3. SRおよびFSL#121における植物体中でのアミノ酸含量

公表不可

(3) ダイズへの *SYN1* 遺伝子の導入

ダイズへの形質転換は、図3に示したプラスミドベクターを用い、アグロバクテリウム法により行った。アグロバクテリウムへの感染後、共存培養した胚軸は、ビアラホス存在下で選抜培養を行い、*GFP* 遺伝子の発現が認められるシュートを発根させて、形質転換体を獲得した。4系統の形質転換体系統が得られ（系統8、14、17、18）、サザン分析により導入遺伝子の確認を行ったところ、系統8では1コピー、系統14では2コピー、系統17では1コピー、系統18では2コピーの導入遺伝子のゲノムへの挿入が認められた（図4a）。これらの系統について種子を採種したところ、系統8、系統17、系統18の3つの系統で種子が得られ、系統17のみが導入遺伝子の後代への遺伝が認められた（図4b）。そのため、系統17を用いて、自殖を繰り返し、*GFP* 遺伝子の発現を指標に導入遺伝子をホモ化させた。

公表不可

図3. ダイズ形質転換に用いたプラスミドベクター

公表不可

図4. ダイズ遺伝子組換え体の *EGFP* 遺伝子サザン分析

(a) および後代への *SYN1* 遺伝子のPCRによる遺伝の確認 (b) . P: プラスミドDNA, WT: 非組換え体。

(4) *SYN1* 遺伝子が導入された遺伝子組換え体の形態調査およびアミノ酸分析

SYN1 遺伝子が導入されたダイズ組換え体は3世代に渡り自殖を繰り返し、導入遺伝子

をホモ化させた系統を実験に供試した。組換え体と非組換え体は特定網室で生育させ、導入遺伝子の発現、特性評価、および採種した種子のアミノ酸分析を行った。導入遺伝子発現量は、定量PCRにより行われ、組換え体は非組換え体に比べ、*SYN1* 遺伝子の発現量が4.7倍高い値であった。形態調査では、組換え体は、非組換え体に比べ、草丈、分枝数、分枝節数が有意に高く、大型の草姿となり、着莢数、種子数も増加する傾向が認められた（表4、図5）。

表4. ダイズ遺伝子組換え体の特性評価

公表不可

公表不可

図5. 特定網室での栽培4ヶ月目のダイズ植物体

表5. 組換えおよび非組換えダイズ種子中のアミノ酸含量

公表不可

アミノ酸はダイズの植物体および種子について分析し、植物体では、組換え体のアミノ成分が高い傾向を示し、特に、根において、その傾向が顕著に認められた。種子では、発芽種子で両系統間に有意差を示すアミノ酸が多く認められ、導入遺伝子の作用に関連するアスパラギン酸、アスパラギンなどのオキサロ酢酸群やアラニンとロイシン等を含むピルビン酸群の小計が組換え体で有意に高かった(表5)。また、アミノ酸成分の合計も同様の結果を示した。

以上のことから、ダイズにおける *SYN1* 遺伝子の強発現は、植物体の形態およびアミノ酸代謝に影響を及ぼし、作物の収量増加やアミノ酸成分の改良に有効であることが考えられた。これらの一連の研究により、FOXハンティングシステムによる有用遺伝子の探索から代表的なマメ科作物であるダイズにおけるファンクショナルゲノミックスに至る基礎から応用に繋がる研究展開を構築することができた。

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 2 件)

- ① Yano T, Tanaka H, Kurino T, Yamamoto A, Kunitake H, Saeki Y, Akashi R (2015) Functional genetic analysis of *Arabidopsis thaliana SYN1* in *Lotus corniculatus* super-growing roots using the FOX gene-hunting system. *Plant Root* 9: 6-14 (査読有) .
- ② Yano T, Yamamoto A, Kunitake H, Saeki Y, Akashi R (2014) The phenomenon of root elongation and high respiration activity in the *rolB*-gene-enhanced FSL#35 variant of *Lotus corniculatus* FOX-SR line. *Plant Root* 8: 82-91 (査読有) .

[学会発表] (計 5 件)

- ① 権藤崇裕・永野優・末吉佳那子・明石良 ; 西洋ミヤコグサスーパールートを用いた FOXハンティングシステムによるバイオマス関連遺伝子の探索と機能解析, 日本草地学会大会, 2017年3月20日~22日, 弘前大学(青森県弘前市).
- ② 権藤崇裕; 西洋ミヤコグサスーパールート FOXハンティングシステムによる根の生長に関する遺伝子の探索とダイズへの応用, ダイズ研究会大会, 2016年3月10日~11日, 生涯学習プラザ(広島県福山市).
- ③ Yano T, Tanaka H, Kurino T, Yamamoto A, Kunitake H, Saeki Y, Akashi R: Analysis of *Arabidopsis thaliana SYN1* relating biomass production and nodulation associated with change of amino acid

contents in *Lotus corniculatus* super-growing roots. 日本植物生理学会大会, 2015年3月16日~18日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京).

- ④ 矢野翼・後藤舞・山本昭洋・佐伯雄一・明石良 : シロイヌナズナ *γ -glutamyl peptidase 3* が導入されたセイヨウミヤコグサ由来 FOX-SR における形態学および生理学的解析, 日本土壤肥料学会九州支部会大会, 2014年5月8日~9日, 宮崎大学木花キャンパス(宮崎県宮崎市).
- ⑤ 安藤円・矢野翼・中武亜由美・山本昭洋・佐伯雄一・明石良 : シロイヌナズナ硝酸トランスポーターが導入されたセイヨウミヤコグサ由来 FOX-SR における機能解析, 日本土壤肥料学会九州支部会大会, 2014年5月8日~9日, 宮崎大学木花キャンパス(宮崎県宮崎市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 良 (AKASHI, Ryo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 20253809