

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450013

研究課題名(和文)ダイズ遺伝資源に認められる耐塩性遺伝子の単離とその機能解析に関する研究

研究課題名(英文) Map-based cloning of salt tolerance gene and its utilization for improvement of salt tolerance in soybean

研究代表者

許 東河 (Xu, Donghe)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：90425546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マップベースクローニング法を用いてダイズ耐塩性遺伝子を第3染色体の16.5 kbの領域に特定した。加えて、この遺伝子(Ncl遺伝子)が根で強く発現すると、地上部のNa⁺、K⁺及びCl⁻の蓄積量が低下し、耐塩性が向上することを明らかにした。戻し交雑とDNAマーカー選抜によりNclを導入した塩感受性品種Jacksonや、遺伝子組換え法によりNclを過剰に発現させた塩感受性品種カリユタカは耐塩性が向上した。今回解明されたNcl遺伝子は、DNAマーカー選抜や遺伝子組換えなど分子育種の手法で既存ダイズ品種に導入することが可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated a salt tolerance gene (Ncl) using map-based cloning strategy. The salt-tolerant soybean lines showed higher expression of the salt tolerance gene Ncl in the root and resulted in lower accumulations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ in the shoot under salt stress. We transformed Ncl into a soybean cultivar Kariyutaka using the Agrobacterium-mediated transformation method, and significantly enhanced its salt tolerance. To determine the usefulness of Ncl in conventional soybean breeding, we conducted introgression of Ncl into a salt-sensitive variety Jackson through continuous backcross, followed by DNA marker-assisted selection (MAS) in each generation, and finally produced an improved salt tolerance line. Our study suggests that using Ncl in soybean breeding through transgenic or MAS would contribute to sustainable soybean production in saline-prone areas.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：ダイズ 耐塩性 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ダイズは世界の重要なマメ科作物の一つであり、主要なタンパク質および油脂原料として、その利用は多岐にわたる。しかし、ダイズの生産性は、イネやトウモロコシなどイネ科作物に比べると低く、また、さまざまな環境ストレスの影響により不安定である。塩害は、世界のダイズ生産地帯、特に、中国、ブラジル等の乾燥・半乾燥地域においてしばしば報告されている。現在、世界の灌漑耕地の約 1/3 の面積が土壌塩性化の影響を受けている。また、地球温暖化に伴う水不足や不良灌漑により塩類集積地が拡大しつつある。わが国においても、津波等による海水の流入に起因する塩害が報告されている。これらの問題への対策として、耐塩性ダイズ品種の育成が有力な手段であり、栽培種内の遺伝的変異を利用したダイズ耐塩性の改良が試みられている。現在、ダイズ耐塩性に関する量的遺伝子座 (QTL) が複数の雑種集団において報告され、ダイズ育種に利用できる DNA マーカーが特定されつつある。しかし、ダイズの耐塩性の原因遺伝子は特定おらず、耐性の機構は未知の部分が多い。一方、イネにおいては耐塩性遺伝子が既に単離され、イネ耐塩性育種に利用されつつある。申請者は、ブラジル由来のダイズ多収品種 FT-Abyara において耐塩性に関する効果の大きい QTL を検出し、ダイズ第 3 染色体の SSR マーカー Sat_091 と Satt255 近傍の領域に座乗していることを明らかにした。加えて、その QTL に関する F7 世代の残余ヘテロ接合系統 (Residual heterozygous line, RHL) の自殖による耐塩性の準同質遺伝子系統 (NILs) を育成した。温室および塩害圃場において耐塩性の準同質遺伝子系統の評価により、感受性系統と耐塩性系統との間には明確な差異が認められ対象とする耐塩性遺伝子の効果が極めて大きいことを確認した。この遺伝的背景が均一で耐塩性遺伝子座およびその周辺領域のみが異なる準同質遺伝子系統 (NILs) を利用して詳細マッピングを行うことで耐塩性遺伝子が座する領域をさらに絞り込むことが可能になる。また、ダイズゲノム塩基配列は米国で公開されており (<http://www.phytozome.net/soybean>)、この塩基配列情報は、耐塩性遺伝子の詳細マッピングのための DNA マーカーを作製することに加え、耐性候補遺伝子の同定に活用することができる。

2. 研究の目的

本研究では、ダイズの耐塩性の原因遺伝子を同定するため、以下の目標を設定する：

(1) 耐塩性の QTL に関する準同質遺伝子系統 (NILs) 間の交配により得られた大規模分離集団を用いた詳細マッピングにより、ダイズの耐塩性遺伝子の候補領域を特定する。

(2) 公開されたダイズ塩基配列情報を活用

し、ダイズゲノム候補領域中に耐塩性候補遺伝子を同定する。

(3) 同定された耐塩性候補遺伝子について、耐塩性系統と感受性系統における遺伝子発現のパターンを比較、解析し、耐塩性遺伝子の機能検証を行う。

(4) 単離した遺伝子を過剰発現させた形質転換ダイズを作成し、遺伝子の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ダイズ耐塩性 QTL の詳細マッピングと候補遺伝子の同定

供試材料は、耐塩性 QTL 準同質遺伝子系統 (NILs) 間の交配に由来する約 6,000 大規模の分離集団であった。この大規模の耐塩性遺伝子分離集団から選抜した耐塩性 QTL 領域の組換え後代系統群を用い、耐塩性 QTL の領域をさらに絞り込み、ダイズゲノム物理候補領域での耐塩性候補遺伝子を同定した。

(2) 耐塩性候補遺伝子の機能解析

推定された耐塩性候補遺伝子について、耐塩性系統と感受性系統における塩処理条件下遺伝子発現パターンの解析を行い、耐塩性遺伝子の効果を検証した。供試材料は、育成した耐塩性準同質遺伝子系統 (NILs) および世界各国に由来するダイズ遺伝資源約 130 系統であった。

(3) 同定した耐塩性遺伝子の形質転換ダイズの作出

同定した耐塩性遺伝子の機能解析を検証するため、同定した耐塩性遺伝子を導入した形質転換ダイズを作成した。方法としては、完熟種子を外植片として用い、アグロバクテリウムを介したダイズの形質転換系を利用した。遺伝子発現ベクターとして耐塩性遺伝子を 35S プロモーターに連結し、さらに選抜マーカー *bar* 遺伝子を含む発現プラスミドベクターを構築した。このベクターをアグロバクテリウム EHA105 株に導入し、ダイズ品種カリユタカに感染させ、形質転換体を作成した。導入遺伝子の固定系統を育成し、耐塩性の機能を解析した。

(4) 戻し交配と DNA マーカー選抜よりダイズ耐塩性の育成

単離した耐塩性遺伝子に対して実際のダイズ耐塩性育種で耐塩性の効果を検証するため、戻し交配と DNA マーカー選抜により、耐塩性遺伝子を感受性ダイズ品種 Jackson へ導入し、BC₄F₃ 世代を獲得し、戻し交配系統の耐塩性を評価した。

4. 研究成果

(1) ダイズ耐塩性 QTL の詳細マッピングと候補遺伝子の同定

QTLの詳細マッピングには、F₉世代の耐塩性QTL領域のResidual heterozygous lines (RHLs)の自殖に由来する5,828個体の分離集団から選抜した固定化した組換え系統27系統を用いて耐塩性遺伝子の高精度マッピングを行った。ダイズのゲノム情報に基づき、QTL領域間に7個のマーカーを開発した。この7個のマーカーを用いて27個の固定化組換え系統のジェノタイピングをし、整列化した。これらの固定化組換え系統に対して耐塩性の評価結果より、ダイズ耐塩性遺伝子(*Ncl*)を第3染色体の16.5 kbの領域に特定した。この領域に一つだけの遺伝子が存在することから、耐塩性の候補遺伝子を確定した(図1)。

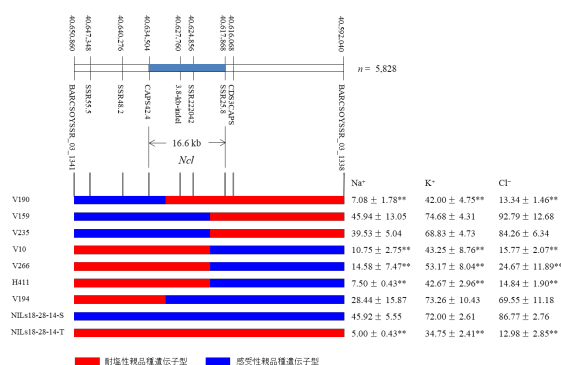


図1 耐塩性遺伝子(*Ncl*)の物理的地図

(2) 耐塩性候補遺伝子の機能解析

高精度マッピングの解析により耐塩性の候補遺伝子*Ncl*を決定した後、耐塩性遺伝子の発現パターン、Na⁺、K⁺およびCl⁻の蓄積の制御などの機能解析を行った。その結果、遺伝子*Ncl*は耐塩性ダイズ系統の根で恒常的に発現していることが分かった。*Ncl*はNa⁺/H⁺アンチポーター遺伝子と高い相同性を示したものの、ダイズ植物体地上部のNa⁺、K⁺、Cl⁻濃度を同時に抑制することを明らかになった。今後の課題としてこの遺伝子がCl⁻濃度を制御する機構を究明する必要がある。また、単離した耐塩性遺伝子*Ncl*における異なる遺伝的背景の中に耐塩性効果を検証するため、世界各国から由来するダイズ遺伝資源123系統を用い、*Ncl*の発現量と耐塩性の関係を調べた結果、両者は高い正相関を示し、即ち、*Ncl*の発現量が高いほどダイズの耐塩性は高いことが明らかとなった。

(3) 同定した耐塩性遺伝子の形質転換ダイズの作出

形質転換体の作出には、遺伝子発現ベクターとして耐塩性遺伝子*Ncl*を35Sプロモーターに連結し、さらに選抜マーカー*bar*遺伝子を含む発現プラスミドベクターを構築した。このベクターをアグロバクテリウムEHA105株に導入し、ダイズ品種カリユタカ(塩感受性)に感染させ、形質転換体を作成した。得

たT₂世代の形質転換体を水耕栽培し、遺伝子の発現と耐塩性を評価した。評価した材料は、形質転換T₂世代系統54-1-1、34-2-7、20-1-4、16-1-8計4系統に加え、野生型品種カリユタカ、カリユタカのGFP遺伝子形質転換系統および耐塩性準同質遺伝子系統NIL18-TとNIL18-Sであった。耐塩性を評価した形質転換T₂世代の4系統のうち、系統54-1-1と系統20-1-4は高い発現量と高い耐塩性を示し、*Ncl*はダイズ耐塩性の原因遺伝子であることが確認された(図2)。今後は遺伝子組換え手法により、既存の耐塩性ダイズ品種よりも高い耐塩性品種の開発が期待できる。



対照(Null) *Ncl*形質転換ダイズ(20-1-4)

図2 塩感受性ダイズ品種カリユタカで*Ncl*を過剰に発現させた系統(右)の塩ストレス下における生育の様子。塩処理は、100 mMのNaClを含む水耕液で約3週間生育させた。

(4) 戻し交配とDNAマーカー選抜より耐塩性ダイズ系統の育成

今回単離した耐塩性遺伝子*Ncl*に対して実際のダイズ耐塩性育種で耐塩性の効果を検証するため、戻し交配とDNAマーカー選抜により、耐塩性遺伝子を受感性ダイズ品種Jacksonへ導入し、BC₄F₃世代を獲得した。水耕条件下耐塩性評価の結果、*Ncl*を導入した系統は、元親品種Jacksonよりも高い耐塩性を示した(図3)。このことより、*Ncl*は、DNAマーカー選抜などの分子育種の手法で既存ダイズ品種への導入は可能であることが実証された。



BC₄F₃-J1T BC₄F₃-J1S
(*Ncl*導入系統) (*Ncl*未導入系統)

図3 DNAマーカー選抜手法で*Ncl*遺伝子を塩感受性ダイズ品種Jacksonに導入した系統(BC₄F₃-J1T、左)と未導入系統(BC₄F₃-J1S、右)の塩ストレス下における生長比較。塩処理は、100 mMのNaClを含む水耕液で約3週間生育させた。

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 1件)

Tuyen Duc Do, Huatao Chen, Hien Thi Thu Vu, Aladdin Hamwiah, Tetsuya Yamada, Tadashi Sato, Yongliang Yan, Hua Cong, Mariko Shono, Kazuhiro Suenaga, Donghe Xu, *NcI* synchronously regulates Na⁺, K⁺, and Cl⁻ in soybean and greatly increases the grain yield in saline field conditions, Scientific Reports, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 19,147
DOI: 10.1038/srep19147

[学会発表](計 7件)

Do Tuyen Duc, Chen Huatao, Vu Hien Thi Thu, Hamwiah Aladdin, 山田哲也, 佐藤雅志, 巖勇亮, 叢花, 庄野真理子, 末永一博, 許東河, *ダイズ耐塩性遺伝子 NcI* の単離とその利用による耐塩性の向上, 日本育種学会第 131 回講演会, 2016 年 9 月, 鳥取

Donghe Xu, Cloning, Characterization, and Utilization of a Salt Tolerance Gene *NcI* in Soybean, 日本作物学会第 243 回講演会, 2017 年 3 月, 東京

Yong Song, Satomi Nakamura, Makie Kokubun, Donghe Xu, Koki Homma, Genotypic variation in salinity tolerance among soybean genotypes and its association with N uptake capacity, 7th International Crop Science Congress (7th ICSC), 2016 年 8 月, Beijing, China

庄野真理子, 山田哲也, 許東河, 耐塩性ダイズからクローニングした Na⁺/H⁺ アンチポーター遺伝子 *qNaCl3* の機能解析, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月, 岩手

Donghe Xu, Do Duc Tuyen, Huatao Chen, Vu Thi Thu Hien, Aladdin Hamwiah, Genetic analysis of salt tolerance in soybean, Plant & Animal Genomes (PAG) XXIV, 2016 年 1 月, San Diego, CA, USA

小野寺真由, 国分牧衛, 許東河, 中嶋孝幸, 本間香貴, *ダイズ品種の耐塩性に関する生理的特性*, 日本作物学会第 242 回講演会, 2016 年 3 月, 茨城

庄野真理子, Hien Vu Thi Thu, 許東河, 耐塩性ダイズからクローニングした

Cation/H⁺アンチポーター遺伝子の機能解析, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月, 東京

[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]

ホームページ等

<https://www.jircas.go.jp/ja/release/2015/press11>

6. 研究組織

(1)研究代表者

許 東河 (XU, Donghe)

国際農林水産業研究センター・生物資源利用領域・主任研究員

研究者番号: 90425546

(2)研究分担者

山田 哲也 (YAMADA Tetsuya)

北海道大学大学院農学研究院・講師

研究者番号: 70374618