

令和元年6月13日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14834

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたオオムギ耐塩性遺伝子の短期間の同定と作用機構の解明

研究課題名(英文)Rapid exploration of a gene inducing salt-tolerance in barley by using a next-generation sequencer and analysis of its functions

研究代表者

平沢 正(Hirasawa, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：30015119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オオムギ耐塩性品種OUE812は塩感受性品種OUC613に比べて塩ストレス下での稔実歩合の低下程度が小さい。両品種に由来する組換え自殖系統群を用いたエクソーム QTL-seq解析から、塩ストレス下で稔実歩合を低下させる候補遺伝子MLOC_12120を見出した。本遺伝子はJAZ遺伝子で、開花直前のOUC613の葯と雌蕊に高く発現した。稔実歩合低下の品種間差は主として柱頭上の花粉数の減少と花粉発芽率の低下の相違による花粉稔性の低下程度の違いによっておこっていた。以上の結果から、MLOC_12120遺伝子が塩ストレス下によるオオムギの稔実歩合低下の品種間差を引き起こしていることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌の塩類集積は、世界の作物生産を制限する重要な問題となっている。塩ストレス耐性の機構についてこれまで多くの研究があるが、塩ストレス下での子実収量の低下機構と収量低下の鍵となる形質を解析した研究は少なく、したがって、収量差を引き起こす遺伝子とその作用機能を解明した研究もほとんどなかった。本研究によって耐塩性の最も高い作物の一つであるオオムギについて、塩ストレス下での子実重低下の品種間差を引き起こす候補遺伝子と子実重低下機構の一部を明らかにできた。研究成果は耐塩性作物の育成に向けた新たな知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Long-term salinity stress significantly reduces grain fertility in a barley cultivar, OUC613, but not in a cultivar OUE812, resulting in large differences in grain yield. Here, a gene affecting grain fertility under salt stress was explored by QTL-seq combined with exome-capture sequencing and the underlying causes of the difference in grain fertility between the cultivars was investigated.

A QTL for grain fertility was identified on chromosome 2H and the QTL region included a gene, MLOC_12120. MLOC_12120 was a gene encoding JAZ (jasmonate ZIM-domain) protein and expressed significantly at anther and pistil a few days before flowering in OUC613 compared with OUE812. Pollen fertility decreased significantly in OUC613 under salt stress, but not in OUE812. Salt stress decreased the number of pollen grains on stigma as well as pollen germination rate in OUC613 significantly compared with OUE812. MLOC_12120 might be a gene inducing the reduction in grain fertility under salt stress.

研究分野：作物学

キーワード：エクソームQTL-seq 塩ストレス オオムギ 花粉 組換え自殖系統 JAZ遺伝子 不稔 量的形質遺伝子座

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オオムギは耐塩性の最も強い作物の一つとして知られ、塩ストレスに対する反応や耐塩性の品種間差などに関して多くの研究があり、ゲノム解読も進んでいるが、耐塩性の鍵となる形質とその遺伝子の同定はまだである。これまでに、岡山大学資源植物科学研究所大麦・野生植物資源研究センターの保存する 6000 以上のオオムギ系統の中から選抜された耐塩性の強い品種と弱い品種(Mano, 2007) からそれぞれ 1 品種を選んで耐塩性の品種間差に関わる形質を検討し、光合成や葉面積などよりも稔実歩合の違いが塩ストレス下の子実収量の品種間差の鍵となることを明らかにした(Hirasawa et al., 2017)。そして、組換え自殖系統群(RILs) 遺伝解析集団を作成して、塩ストレス下でも稔実歩合を高く維持する作用力が強く、年次、NaCl 処理濃度を変えても同じ位置に安定して現れる量的形質遺伝子座(QTL)を第 2 染色体に 1 ヶ所見出した。

2. 研究の目的

本研究はこれまで育成してきた QTL 解析集団を用いて、最近開発された次世代シーケンサーを用いた QTL マッピング(QTL-seq)法(Takagi et al., 2013)をオオムギ用に改良したエクソーム QTL-seq 法(Hisano et al., 2017)を使って、塩ストレス下で起こるオオムギの稔実歩合低下の品種間差に関わる遺伝子を短期間に同定し、併せてその遺伝子の作用機構を解析することを目的に行う。

3. 研究の方法

(1) 供試材料と栽培方法

オオムギ品種 OUC613 と OUE812 を用い、栽培は東京農工大学農学部構内の網室で行った。2 月上旬にパーミキュライトを充填した育苗用セルトレイに播種し、出芽後に 1/2000 a ワグネルポット(約 14 L)に 1 ポット当たり 12 個体となるように移植した。播種後約 70 日までは Hoagland 水耕液 1/10 倍の濃度、それ以降は 1/2 倍の濃度で栽培した。NaCl 処理は播種後 30 日より開始し、週 2 回、150 mM あるいは 200 mM の NaCl を加えた水耕液(150 mM NaCl、200 mM NaCl 処理)あるいは NaCl を加えない水耕液(0 mM NaCl 処理)を灌水した。水耕液灌水時は、ワグネルポット下部の排水孔に栓をし、所定の濃度の NaCl を加えた水耕液をパーミキュライト表面が浸るまで灌水した後、排水孔の栓を抜いて十分に排水した。パーミキュライトの NaCl 濃度が所定の濃度になるようにこの操作を 2 回繰り返した。

(2) エクソーム QTL-seq 解析

エクソームキャプチャー(EC)ライブラリ作製

RILs 96 系統(F₆)のうち塩ストレス下において高い稔実歩合を示した 20 系統(High fertility グループ、HF)と低い稔実歩合を示した 20 系統(Low fertility グループ、LF)を選抜した。RILs (F₆)のゲノム DNA は、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)を用いて抽出し、DNA 濃度は Qubit R 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて測定した。各 RIL から抽出した DNA の濃度を 20 ng/μL に調整し、HF と LF の各グループにおいて 20 系統の DNA を等量混合してバルク DNA を作製した(HF バルク、LF バルク)。EC ライブラリは Hisano ら(2017)の方法にしたがって作製した。

OUC613 の RNA のシーケンシング

地上部長が 5 cm となった OUC613 の幼植物体から地上部と根を採取し、全 RNA を TRIzol Reagent (Life Technologies Japan, Japan)を用いて抽出し、DNA は RNase-Free DNase Set (Qiagen)を用いて取り除いた。RNA-Seq 解析用のライブラリは TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)を用いて作製した。この RNA-Seq ライブラリを MiSeq シーケンサー用の MiSeq Reagent Kit v3 (2 × 300 bp cycles)を用いてシーケンシングした。

シーケンシングデータ解析

EC ライブラリのショートリードデータは国立遺伝学研究所スーパーコンピューターシステムにアップロードし、QTL-seq パイプライン(Takagi et al. 2013)を用いて解析した。リファレンス配列には Hisano ら(2017)が作製した Morex の provisional exome sequences (PESs) を用いた。OUC613 の RNA-seq から得たショートリードを Morex の PES にマッピングし、検出された SNP を OUC613 型に置換してリファレンス配列を再構築した。この OUC613 のリファレンス配列に各バルクのショートリードをアライメントし、SNP-index と SNP-index を各 SNP の位置で計算した。

(3) 遺伝子の配列決定

プライマー設計

遺伝子の配列は、Ensemble Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>)から得た。シーケンシングのためのプライマーは PCR 産物長を ~750 塩基とし、各プライマーの増幅領域を 100 ~200 bp 程度重複するようにして、遺伝子全体を増幅できるように設計した。プライマーは PCR プライマー設計ツール Primer 3 plus (<https://primer3plus.com/>)を用いて作製した。

DNA の抽出

OUE812、OUC613 の幼植物体の葉を液体窒素で凍結後粉碎し、1.5 × CTAB Buffer を加えて 55

で30分インキュベートした。これにCIAA(クロロホルム・イソアミルアルコール(24:1))を加えて振とう後、15,000 rpmで5分間遠心した。遠心後上層のDNA-CTAB層を採取しCIAAを加えて振とう後、15,000 rpmで5分間遠心した。上層のDNA-CTAB層を採取しCTAB沈殿Bufferを加えて攪拌後、15,000 rpmで5分間遠心した。RNA分解処理後、99.5%エタノール、ついで70%エタノール液中で15,000 rpmで5分間遠心して、DNAを沈殿させた後、1×Tris EDTA溶液でDNAを溶解させ、4℃で保存した。

遺伝子領域の増幅

PCRによる遺伝子領域の増幅にはTks Gflrx™ DNA Polymerase (Takara, Japan)を用い、PCR産物はExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Science, USA)で処理して、精製した。

シーケンス及び配列解析

精製したPCR産物を最終濃度が10~40 ng/μLとなるように希釈した後にフォワードあるいはリバースプライマーを加え、塩基配列のシーケンス解析をDNAシーケンス解析サービス(Premix2)(株式会社ファスマック、<http://fasmac.co.jp/>)に依頼した。解析によって得られた塩基配列データはGENETYX ver.12 (GENETYX, Japan)のアプリケーションATGCを用いてアセンブリし、遺伝子全体の配列を得た。

(4) 遺伝子発現解析

解析用サンプルの採取とトータルRNAの抽出、cDNAへの逆転写

穎花分化期後期(期)と減数分裂期の幼穂、および開花約2日前の葯、雌蕊、内外穎を、採取後アルミホイルに包み、直ちに液体窒素に浸けて凍結させた。採取は9時から15時の間に行った。サンプルはRNA抽出まで80℃で保存した。

トータルRNAの抽出に際しては、サンプルを粉砕機(TissueLyzer, QIAGEN, Germany)で粉砕し、核酸精製システムMaxwell® 16 Instrument用のMaxwell® 16LEV plant RNA Kit (Promega, USA)を用いてRNAを抽出した。トータルRNAからcDNAへの逆転写はPrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara, Japan)を用いて行った。

リアルタイムPCRによる発現解析

リアルタイムPCRは、SYBR Premix EX Taq (Takara, Japan)を用いて、Applied Biosystems® Step One Plus (Thermo Fisher, USA)によって行った。発現解析に用いるプライマーはPrimer 3 plusを用いて作製した。

(5) 人工交配と稔実歩合の測定

0mM NaCl処理、150mM NaCl処理した植物について、開花約3日前に除雄し、開花日に0mM NaCl処理、150mM NaCl処理した植物の花粉を0mM NaCl処理あるいは150mM NaCl処理した植物の小穂に授粉した。収穫期に子実が入っていることを確認できる小穂を稔実子実とし、稔実子実数を総小穂数で除して稔実歩合を求めた。稔実子実数は、2.2mmのふるいで選別した整粒数とほぼ一致した。

(6) 生存花粉率、葯内花粉数、柱頭上の花粉数、花粉発芽率の測定

生存花粉率の測定には、FDA(Fluorescein diacetate)による蛍光染色法を用いた。開花した小穂から採取した花粉に0.001% FDA溶液を滴下し、暗所に約1分間静置後、蛍光顕微鏡BX53, OLYMPUS, Japan)で観察した。明緑色に蛍光を発している花粉を活性のある生存花粉とみなし、生存花粉率を観察した総花粉数に対する割合で求めた。

開花24時間後の小穂をサンプリングし、葯の裂開程度を実体顕微鏡(BX53, OLYMPUS, Japan)で観察した。柱頭上の花粉と発芽花粉の観察は、アニリンブルーによる蛍光染色法で行った。開花後24時間の小穂を採取して10%酢酸エタノールで固定し、12時間後に超純水とリン酸カリウムバッファーで洗浄し0.05%アニリンブルー溶液に浸けて4℃で保存した。花粉は蛍光顕微鏡(BX53, OLYMPUS, Japan)で観察した。

葯内花粉数の測定に際しては、開花1、2日前の葯を採取し、これをエタノール・グリセリン・水混合液(5:1:4)(0.9 mL)とヨードヨードカリウム溶液(0.1 mL)の混合液に浸漬し、超音波洗浄機(VS-100, ASONE, Japan)を用いて20分間破砕して、葯内から花粉を取り出した。花粉数は、フックスローゼンタル計算盤を用いて推定した。

4. 研究成果

(1) エクソームQTL-seq解析

200 mM NaCl 処理条件で栽培した植物から作成したHFとLFライブラリのシーケンスから、それぞれ約3千万(4.5 Gbp)、3.7千万(5.6 Gbp)のリードを得た。QTL-seqパイプラインを用いた解析によってアライメントされたリード数はHFでは4,384,475、LFでは4,660,760、検出されたSNPの総数はHFでは60,331、LFでは56,414であった。そして、5%有意水準を超えたSNP-index値が第2染色体に1ヶ所見出された(図1)。本QTL-seq解析によって見出されたQTLは、これまで連鎖解析によって推定されていたQTLの領域内にあった。

本QTL-seq解析で見出された有意な領域150-kbに含まれる遺伝子をIPK Barley BLAST Server analysis (http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley_ibsc/)で検索したところ、90個の遺

伝子が含まれていた。これらの遺伝子の中には、雄性不稔に関わる二つの遺伝子、F-box タンパク質をコードする遺伝子 *AK357304* と TIFY タンパク質をコードする遺伝子 *MLOC_12120* が含まれていた。

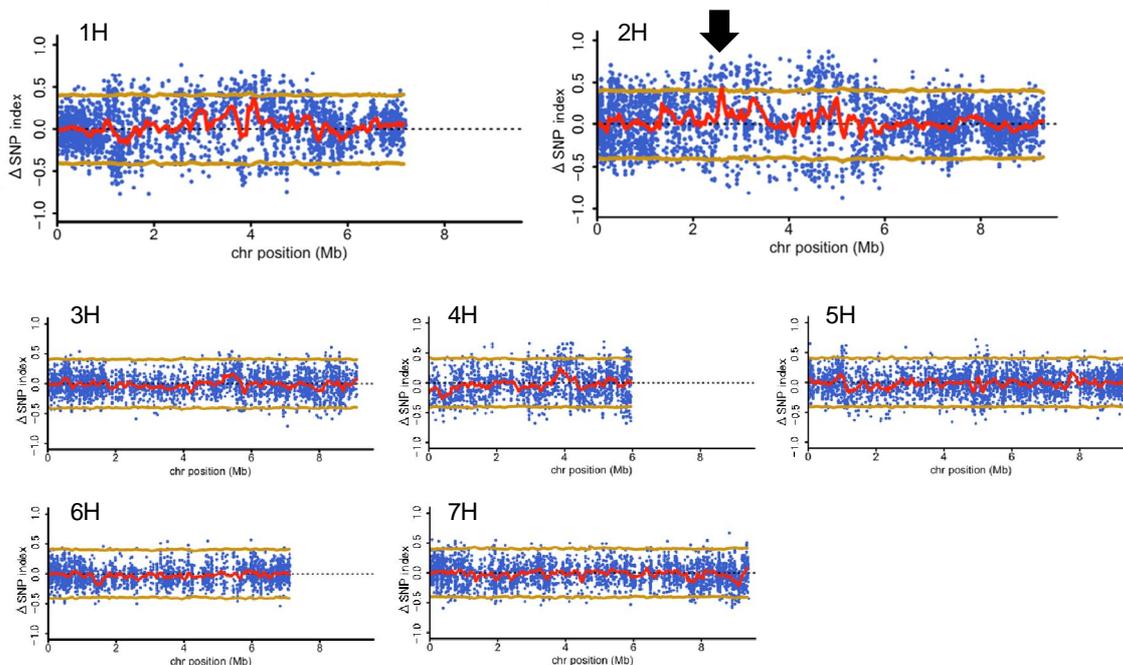


図1 エクソーム QTL-seq で算出された各染色体の SNP index . 赤線、黄色線はそれぞれ SNP index の移動平均、95%信頼区間を示す . 矢印は 95%信頼区間を越えたピークを示す .

(2) 候補遺伝子の配列と発現

*AK357304*にはコード領域にSNP が4ヶ所検出された。そのうちアミノ酸置換が起きていたのは502番目の塩基で、OUC613ではアルギニン(R)、OUE812はセリン(S)であった。*MLOC_12120*のコード領域にはSNPは検出されなかったが、非翻訳領域とイントロンにSNPが計3ヶ所検出された。OUE812、OUC613には、ともにコード領域のアミノ酸配列に変異がなく、TIFYモチーフとともにJasモチーフを有していたことから、*MLOC_12120*がJAZ(jasmonate ZIM-domain)タンパク質をコードする遺伝子であることが分かった。

F-boxタンパク質をコードしている*AK357301*の穎花分化期と減数分裂期の幼穂、開花約2日前の葯、雌蕊、内外穎における遺伝子発現量を比較すると、発現量は穎花分化期以後、幼穂の発育に伴って低下し、特に開花約2日前では発現量が著しく低かった。そして内・外穎を除くいずれの時期、部位においても、0 mM NaCl処理、200 mM NaCl処理のいずれにおいても品種間に差がなかった。TIFYタンパク質をコードする*MLOC_12120*の発現量は、いずれの品種、処理においても、穎花分化期と減数分裂期の幼穂に比べて、開花約2日前には葯、雌蕊、内外穎のいずれも著しく高くなった。そして開花約2日前の発現量は内外穎には品種間差はなかったが、葯、雌蕊では0 mM NaCl処理、200 mM NaCl処理のいずれにおいてもOUC613はOUE812に比較して有意に高くなった。

(3) 人工交配実験

OUC613では、150 mM NaCl処理した植物からの花粉を授粉した0 mM NaCl処理、200 mM NaCl処理した植物では、0 mM NaCl処理した植物からの花粉を授粉した植物に比較して、稔実歩合が大きく低下したが、OUE812では、150 mM NaCl処理した植物からの花粉を授粉しても稔実歩合の低下は有意でなかったことから、OUC613で塩ストレスによる稔実歩合が大きく低下する主たる要因は、花粉稔性の低下にあることが分かった。

(4) 生存花粉率、柱頭上の花粉数と花粉発芽率

花粉の活性(生存花粉率)には塩ストレスの有無、品種の間に大きな相違は認められなかった。一方、柱頭上に付着する花粉数と柱頭上の花粉の発芽率は塩ストレスによって低下したが、OUC613の低下がOUE812に比較して著しく大きく、これらが塩ストレス下での花粉稔性の低下の原因であることが分かった。さらに、OUC613では葯内花粉数、葯の裂開率もOUE812に比較して塩ストレス下で大きく低下していたことから、OUC613の柱頭上の花粉数の減少は葯内花粉数の減少と葯の裂開不良が関係していることが分かった。

(5)まとめと考察

ジャスモン酸は雄蕊の発達に必須で、とくに葯の裂開、花粉の発芽など開花期前後のプロセスに深く関与し、JAZ タンパク質は、ジャスモン酸のシグナル伝達を負に制御する役割をもつことが知られている (Ahmad et al., 2016)。本研究では、エクソーム QTL-seq 解析から候補遺伝子として推定された *MLOC_12120* は JAZ タンパク質をコードする遺伝子であること、そして OUC613 では本遺伝子の発現量が OUE812 よりも開花期直前に大きく増加することが明らかとなった。併せて、塩ストレスによっておこる OUC613 の子実稔性の著しい低下は、葯内花粉数の減少と葯の裂開不良による柱頭に付着する花粉数の減少、および花粉発芽率の低下によっておこることが明らかとなった。以上のことから、*MLOC_12120* は塩ストレス下でオオムギの花粉稔性の低下を引き起こし、塩ストレス下で認められる OUC613 と OUE812 の子実稔性の著しい違いに関わっている遺伝子であることが強く示唆された。

<引用文献>

- Ahmad, P., S. Rasool, A. Gul, S.A. Sheikh, N.A. Akram, M. Ashraf, A.M. Kazi and S. Guzel (2016) Jasmonates: Multifunctional roles in stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 7: 813.
- Hirasawa, T., K. Sato, M. Yamaguchi, R. Narita, A. Kodama, S. Adachi, T. Ookawa and K. Sato (2017) Differences in dry matter production, grain production, and photosynthetic rate in barley cultivars under long-term salinity. *Plant Prod. Sci.* 20: 288-299.
- Hisano H., K. Sakamoto, H. Takagi, R. Terauchi and K. Sato (2017) Exome QTL-seq maps monogenic locus and QTLs in barley. *BMC Genomics* 18: 125.
- Mano, Y. (2007) Studies on the breeding and evaluation of germplasm for salt tolerance in barley: Special Report of the Barley Germplasm Center. Research Institute for Bioresources, Okayama University.
- Takagi, H., A. Abe, K. Yoshida, S. Kosugi, S. Natsume, C. Mitsuoka, A. Uemura, H. Utsushi, M. Tamiru, S. Takuno, H. Innan, L.M. Cano, S. Kamoun and K. Terauchi (2013) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.* 74: 174-183.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Asuka Kodama, Ryouhei Narita, Makoto Yamaguchi, Hiroshi Hisano, Shunsuke Adachi, Hiroki Takagi, Taiichiro Ookawa, Kazuhiro Sato, Tadashi Hirasawa, QTLs maintaining grain fertility under salt stress detected by exome QTL-seq and interval mapping in barley, *Breeding Science* 68, 査読有, 2018, 561-570

DOI: 10.1270/jsbbs.18082

Tadashi Hirasawa, Kosuke Sato, Makoto Yamaguchi, Ryohei Narita, Asuka Kodama, Shunsuke Adachi, Taiichiro Ookawa, Kazuhiro Sato, Differences in dry matter production, grain production, and photosynthetic rate in barley cultivars under long-term salinity, *Plant Production Science*, 査読有, 2017, 20: 288-299

DOI: org/10.1080/1343943X.2017.1343647

[学会発表](計4件)

児玉明日香・成田亮平・山口真功・久野裕・安達俊輔・高木宏樹・平沢正・佐藤和広・大川泰一郎、塩ストレス下でのオオムギの花粉稔性低下に関わる遺伝子の探索、日本育種学会、2019年3月16日、千葉大学

Asuka Kodama, Ryouhei Narita, Makoto Yamaguchi, Hiroshi Hisano, Shunsuke Adachi, Hiroki Takagi, Taiichiro Ookawa, Kazuhiro Sato, Tadashi Hirasawa, QTLs maintaining pollen fertility under salt stress detected by exome QTL-seq and interval mapping in barley, *American Society of Plant Biologists*, Jul. 17, 2018, Montreal, Canada

児玉明日香・成田亮平・山口真功・久野裕・安達俊輔・高木宏樹・大川泰一郎・佐藤和広・平沢正、塩ストレス条件下で稔実歩合を高く維持するオオムギの量的形質遺伝子座(QTL)の同定、日本作物学会第245回講演会、2018年3月29-30日、宇都宮大学

Asuka Kodama, Ryohei Narita, Tammy L. Sage, Shaheen Bagha, Shunsuke Adachi, Taiichiro Ookawa, Kazuhiro Sato, Tadashi Hirasawa, Causes of varietal differences in grain fertility of barley under long-term salt stress, 第58回植物生理学会年会、2017年3月16~3月18日、鹿児島大学

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：児玉 明日香

ローマ字氏名：(KODAMA, asuka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。