

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02175

研究課題名(和文) 酸素漏出バリア形成機構の解明及びトウモロコシの耐湿性向上への寄与の検証

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of radial oxygen loss barrier formation and verification of its contribution to the improvement of waterlogging tolerance of maize

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：トウモロコシの近縁野生種であるニカラグアテオシントは、根からの酸素漏出を防ぐ酸素漏出(ROL)バリアを表層に形成できることから、トウモロコシと比べて高い耐湿性を示す。本研究では、ファインマッピングによりROLバリア形成制御遺伝子(RBF1と命名)を同定し、トウモロコシにRBF1を形質転換したところROLバリアが形成されることを確認した。また、RBF1遺伝子座を含む準同質遺伝子系統では、過湿条件下において有意な根の伸長が観察された。RNA-Seq解析の結果より、RBF1はリグニンやスベリンの生合成遺伝子の発現を誘導させて、ROLバリアの形成を促すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、世界に先駆けてROLバリア形成制御遺伝子が同定できたことによって、作物の耐湿性付与に重要な形質であるROLバリア形成機構の全貌解明が可能となり、学術的意義は高いと言える。また、交配によってトウモロコシにニカラグアテオシントのROLバリア形成制御遺伝子を導入することで、高耐湿性トウモロコシ系統を作出する道筋を示すことができた。これらの研究結果は、野生遺伝資源由来の有用農業形質遺伝子を育種利用できることを実証するとともに、今後気候変動が深刻化しても安定した作物生産が可能となる方策を提案できる成果となった。

研究成果の概要(英文)：Zea nicaraguensis, a wild relative of maize, exhibits higher waterlogging tolerance than maize, because it can form a radial oxygen loss (ROL) barrier that prevents oxygen leakage from the roots to waterlogged soil. In this study, we identified the regulatory gene for ROL barrier formation (designated as "ROL BARRIER FORMATION-1" (RBF1)) of *Zea nicaraguensis* by fine mapping, and confirmed that an ROL barrier was formed when RBF1 gene was transformed into maize. Root elongation under waterlogged deoxygenated conditions was larger in the near-isogenic line (NIL) containing the RBF1 locus than in maize inbred Mi29. RNA-Seq analysis suggested that RBF1 induces the expression of lignin and suberin biosynthetic genes to promote 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

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の降雨の集中化や降水量の増加に伴い、長期的な土壌の過湿・冠水による畑作物の湿害の問題が深刻化しており、畑作物の耐湿性向上は重要な農業目標になっている。過湿土壌では根圏の酸素濃度が著しく低下するため、根の酸素欠乏が作物の生育への大きな障害となることから、根への酸素供給能力が植物の耐湿性を決定する重要な要素となっている。

イネなどの耐湿性の高いイネ科植物は、土壌が過湿状態になると、根に酸素の輸送経路となる通気組織を形成し、さらに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] を形成する。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。一方で、トウモロコシなどの耐湿性の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、湿害が発生する。

ニカラグアに自生するテオシント (トウモロコシの近縁野生種) の *Zea nicaraguensis* (ニカラグアテオシント) は、トウモロコシと比べて非常に高い耐湿性を示す。ニカラグアテオシントは ROL バリア形成、恒常的通気組織形成、地表根形成、還元耐性などの重要な耐湿性形質を持つことが明らかになっている。これらのニカラグアテオシントの持つ耐湿性形質は、耐湿性の低いトウモロコシにはみられない。さらに、我々の先行研究によって、トウモロコシの自殖系統 Mi29 とニカラグアテオシントの交配により、トウモロコシ Mi29 の染色体の一部がニカラグアテオシントの染色体の一部に置換された染色体部分置換系統が作出されており、これらの材料を用いてニカラグアテオシントの第 3 染色体の短腕領域に ROL バリア形成制御遺伝子が座乗していることを報告している。

2. 研究の目的

先行研究において、ニカラグアテオシントの ROL バリア形成制御遺伝子の座乗領域を約 230 kb の範囲内まで狭めており、トウモロコシゲノム配列を元に推定すると、この領域に 5 つの遺伝子 (そのうち 1 つは転写因子遺伝子) が座乗していることが明らかになっていた。そこで本研究では、以下の 4 課題に焦点を当てた。(1) ファインマッピングを実施し、さらに候補領域を絞り込むことにより、候補遺伝子の特定を目指した。(2) ROL バリア形成制御遺伝子の座乗するゲノム領域が狭まった準同質遺伝子系統 [Near Isogenic Line (NIL)] を作出し、ROL バリア形成に関わる形質が耐湿性向上に寄与するかどうかを調査した。(3) ROL バリア形成制御遺伝子の発現解析をするとともに、RNA-Sequencing (RNA-Seq) 解析による候補遺伝子の制御下にある遺伝子の網羅的解析を行った。(4) 候補遺伝子をトウモロコシに形質転換することで、ROL バリアが形成されるかどうかを調査した。これらの解析を通して、ROL バリア形成制御遺伝子を同定し、長年不明であった ROL バリアの形成制御機構を解明することと、ROL バリア形成制御遺伝子領域を含む純度の高い NIL の作成によって、耐湿性の高いトウモロコシ系統を作出することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファインマッピングによる ROL バリア形成制御候補遺伝子の特定

ROL バリア形成制御遺伝子の極近傍の DNA マーカーを探索し、それらの DNA マーカーを用いて、トウモロコシの自殖系統 Mi29 とニカラグアテオシントを交配した。その後、戻し交配・自殖を行うことで作出した BC₃F₅ とその後代の中から、候補領域で組換えをしている系統を選抜し、候補領域を絞り込んだ。また、ニカラグアテオシントのゲノム断片の BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンライブラリーを用いて、候補領域を含む BAC クローンをスクリーニングした。選抜した BAC クローンの塩基配列を決定して、その配列をもとに候補遺伝子を特定した。さ

らにトウモロコシ Mi29 の同遺伝子の塩基配列も決定して、遺伝子配列の比較解析を行った。

(2) ROL バリア形成制御遺伝子領域を含む準同質遺伝子系統 (NIL) の作出と耐湿性評価

研究方法 (1) で用いた戻し交配系統にトウモロコシ Mi29 を 2 回戻し交配して作出した系統を選抜して、ROL バリア形成制御遺伝子を含む純度の高い NIL を作出した。さらに、作出した NIL とトウモロコシ Mi29 をポット栽培して耐湿性検定を行った。

(3) ROL バリア形成制御候補遺伝子の発現解析および RNA-Seq による網羅的発現解析

候補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。また、遺伝子発現の組織特異性を明らかにするために、レーザーマイクロダイセクション (LM) により根の中心柱、皮層、表層の組織を単離し、定量 RT-PCR にて組織別の発現解析を行った。さらに、NIL (#468-3) とその対照系統 (#468-7) を用いて、ROL バリア形成条件で生育させた植物の根の表層を LM 法によって単離し、RNA を抽出後、RNA-Seq 法による網羅的発現解析を行った。

(4) ニカラグアテオシントの ROL バリア形成制御候補遺伝子を導入した形質転換トウモロコシの作出および ROL バリア形成形質の評価

アグロバクテリウムを用いてトウモロコシ Mi29 へ候補遺伝子を導入し、形質転換体 (T₀ 世代) を作出した。形質転換体 (T₀ 世代) における導入遺伝子を PCR により確認した後、これらの個体をポット栽培にて生育させ採種した。それを 3 回自殖させて導入遺伝子をホモに固定させた系統 (4a-1-18-19-17) を得た。形質転換体をホモに固定させる際に、分離した *RBF1* 遺伝子が抜け落ちた系統 (4a-1-11-8-22) を対照系統とした。形質転換体と対照系統の植物を水耕栽培にて嫌気還元処理を行い、メチレンブルー染色と円筒型酸素電極による ROL 測定によって、ROL バリアが形成されるかどうかを評価した。

4. 研究成果

(1) ファインマッピングによる ROL バリア形成制御候補遺伝子の特定

トウモロコシ Mi29 とニカラグアテオシントを交配後、戻し交配・自殖を行うことで作出した BC₃F₅ とその後代 2, 498 個体の中から、先行研究によって領域を狭めた約 230 kb の ROL バリア形成制御遺伝子の座乗領域の中で組換えを起こしている個体を探したところ、最終的に 22 個体の組換え系統が得られた。嫌気還元条件下で生育させた 22 個体の組換え系統のメチレンブルー染色を行うことで、ROL バリアの形成の有無を評価し、さらに、新たに作出した DNA マーカーを用いたジェノタイピングを行った。その結果、ROL バリア形成制御遺伝子座が DNA マーカー i-080 と w-067 の間の約 90kb の領域にあることが示唆された (図 1)。トウモロコシのリファレンスゲノムを調査したところ (B73 RefGen_V4, <http://www.maizegdb.org/>)、この領域内に 1 つの遺伝子 (図 1 の遺伝子 2) が存在することが明らかになった。遺伝子 2 は転写因子をコードする遺伝子であった。この遺伝子の塩基配列を、ニカラグアテオシントとトウモロコシ Mi29 の間で比較したところ、Mi29 の当該遺伝子の 5' 末端非翻訳領域 (5' UTR) 内にトランスポゾンが挿入していることが明らかになった。この結果より、トウモロコシ Mi29 では、当該遺伝子の 5' UTR にトランスポゾンが挿入したことによって、この遺伝子の機能が低下したこ

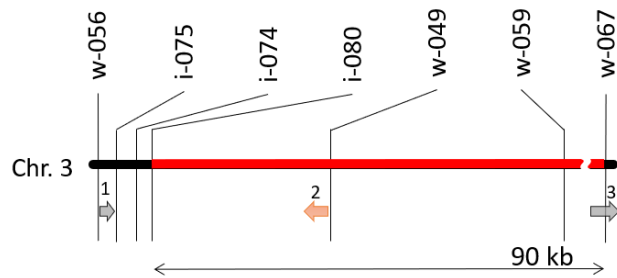


図 1. ファインマッピングによって絞り込まれた ROL バリア形成制御遺伝子座乗領域

遺伝子 2 が候補遺伝子であることが示唆された。

とが示唆された。この遺伝子を *ROL BARRIER FORMATION-1 (RBF1)* と名付けた。

(2) ROL バリア形成制御遺伝子領域を含む準同質遺伝子系統 (NIL) の作出と耐湿性評価

戻し交配と自殖によって得られた ROL バリアを形成する NIL (#468-3) について、ニカラグアテオシントの染色体断片がどの程度残っているかを調べるため、約 8,500 個の超高密度 SNP マーカーを用いて NIL のジェノタイピングを行った。*RBF1* 近傍の 3 つの SNP マーカーはニカラグアテオシントのアレルで、導入されたニカラグアテオシントの染色体断片は約 700 kb であった。それ以外は全てトウモロコシ Mi29 のゲノムであったことから、NIL (#468-3) は高純度な NIL であることが確認できた。

ROL バリアの遺伝子を導入した NIL (#468-3) と対照系統のトウモロコシ Mi29 について、ポット栽培で幼植物における耐湿性を調べたところ、NIL (#468-3) は湛水条件下においてトウモロコシ Mi29 よりも多くの地表根を形成し、節根も長くなる傾向がみられた。なお、地上部の乾物重の対照区比には有意差はみられなかった。今回の比較において、*RBF1* 遺伝子単独でも根の伸長が促進されることが明らかになったが、今後通気組織の遺伝子と組み合わせることで根端への酸素供給能が高まり、さらなる耐湿性の向上が期待できる。

(3) ROL バリア形成制御候補遺伝子の発現解析および RNA-Seq による網羅的発現解析

RBF1 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 (図 2)。その結果、トウモロコシ Mi29 では根端から 5-50 mm の領域で発現の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。また、嫌気還元条件下のニカラグアテオシントの発現量を調べると、根端から 5-20 mm の部位でより高い発現を示した (図 2)。

さらに、LM 法を用いた *RBF1* 遺伝子の組織別発現解析を行ったところ、トウモロコシ Mi29 ではいずれの組織においても嫌気誘導されていたが、ニカラグアテオシントでは根の表層特異的に発現が誘導されることが分かった (図 3)。これらの結果から、ニカラグアテオシントでは、嫌気還元条件下で根の表層特異的に *RBF1* 遺伝子を発現上昇させ、その結果 ROL バリアが形成されていることが示唆された。

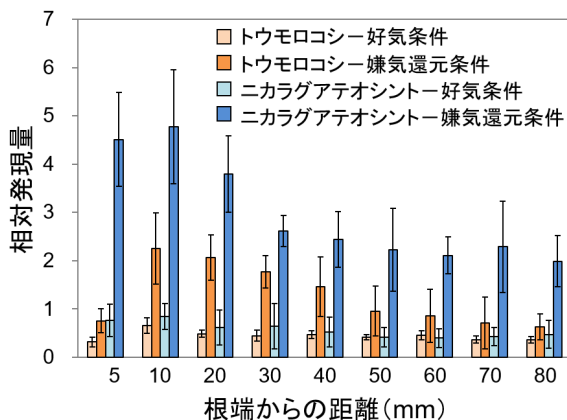


図 2. *RBF1* 遺伝子の定量 RT-PCR による発現解析

好気条件と嫌気還元条件下で 2 週間生育させた 25 日齢のトウモロコシ Mi29 とニカラグアテオシントの 90 mm 以上の長さの不定根に対し、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。

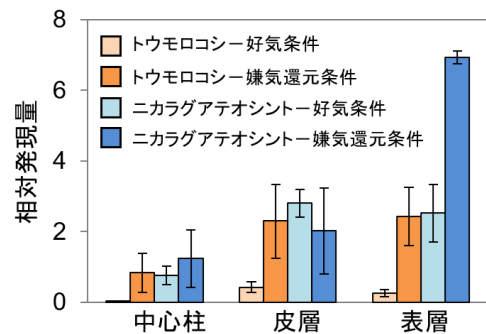


図 3. *RBF1* 遺伝子の組織別発現解析

好気条件と嫌気還元条件下で 2 週間生育させた 25 日齢のトウモロコシ Mi29 とニカラグアテオシントの 90 mm 以上の長さの不定根の根端から 30 mm 付近の根断片がパラフィン包埋切片を作製した。LM 法によって、中心柱、皮層、表層の 3 つの組織に切り分け、各組織における *RBF1* 遺伝子の発現を定量 RT-PCR により解析した。

LM法を用いて、ROLバリアが形成される根の表層組織を単離し、RNA-seqによりNILとその対照系統の遺伝子発現変動を調査した。GO enrichment解析を行い、ROLバリア形成部位で高発現している遺伝子群の機能特性を調査した結果、リグニン生合成遺伝子が高発現していた。また、RNA-seq解析により、リグニン生合成遺伝子以外にもカスパー帯形成遺伝子やスベリンの芳香族成分の生合成に関わる遺伝子の発現量も上昇しており、カスパー帯やスベリンの芳香族成分の増加が強固なROLバリア形成に寄与している可能性も考えられた。

(4) ニカラグアテオシントのROLバリア形成制御候補遺伝子を導入した形質転換トウモロコシの作出およびROLバリア形成形質の評価

ニカラグアテオシント由来の*RBFI*遺伝子がROLバリア形成の制御に関与するかどうかを確認するため、*RBFI*遺伝子のプロモーター領域、コード領域、ターミネーター領域を含むゲノム断片をつないだ形質転換用プラスミドを、アグロバクテリウム法によりトウモロコシMi29に形質転換した。形質転換体を3回自殖させて導入遺伝子をホモに固定させた系統(4a-1-18-19-17)と*RBFI*遺伝子が抜け落ちた対照系統(4a-1-11-8-22)を用いて、ROLバリア形成形質を評価した。

形質転換体の根におけるROLバリア形成を確認するためにメチレンブルー染色を行ったところ、嫌気還元条件下で生育させた*RBFI*遺伝子導入系統(4a-1-18-19-17)の根では根端部周辺のみ染色が観察されたのに対し、対照系統(4a-1-11-8-22)の根では基部から根端部まで根全体で青い染色が観察された(図4A)。さらに、円筒型酸素電極を用いてROL量の測定を行ったところ、*RBFI*遺伝子導入系統(4a-1-18-19-17)は、基部(根端から40-80mmの部位)ではROLが非常に少ない(約20 nmol/m²/s)のに対し、根端部周辺(根端から20-30mmの部位)ではROLが上昇し、根端部では高い値(約190 nmol/m²/s)を示した(図4B)。

一方で、対照系統(4a-1-11-8-22)では、基部から根端まで高い値(約100 nmol/m²/s)を示した(図4B)。これらの結果より、*RBFI*遺伝子導入系統(4a-1-18-19-17)はニカラグアテオシントと同様に嫌気還元条件下において根の基部に強固なROLバリアを形成するのに対し、対照系統(4a-1-11-8-22)は根の基部に強固なROLバリアを形成できないことが確認でき、ニカラグアテオシント由来の*RBFI*遺伝子が嫌気還元条件下におけるトウモロコシのROLバリア形成を制御することが明らかになった。

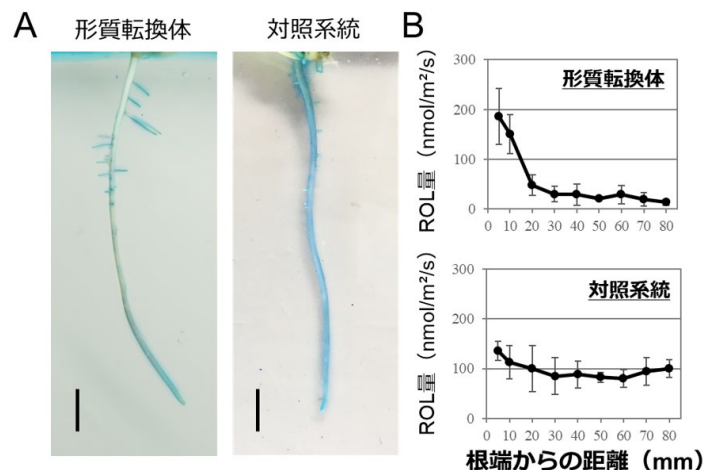


図4. *RBFI*遺伝子導入系統と対照系統を用いたROLバリア形成の評価

嫌気還元条件下で2週間生育させた25-27日齢の*RBFI*遺伝子導入系統(4a-1-18-19-17)と対照系統(4a-1-11-8-22)の不定根に対してメチレンブルー染色(A)と円筒型酸素電極(B)によるROLパターンの評価をした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gong Fangping, Takahashi Hirokazu, Omori Fumie, Wang Wei, Mano Yoshiro, Nakazono Mikio	4. 巻 70
2. 論文標題 QTLs for constitutive aerenchyma from <i>Zea nicaraguensis</i> improve tolerance of maize to root-zone oxygen deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 6475 ~ 6487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erz403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pedersen Ole, Nakayama Yohei, Yasue Hiroki, Kurokawa Yusuke, Takahashi Hirokazu, Heidi Floytrup Anja, Omori Fumie, Mano Yoshiro, David Colmer Timothy, Nakazono Mikio	4. 巻 229
2. 論文標題 Lateral roots, in addition to adventitious roots, form a barrier to radial oxygen loss in <i>Zea nicaraguensis</i> and a chromosome segment introgression line in maize	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 94 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pedersen Ole, Sauter Margret, Colmer Timothy David, Nakazono Mikio	4. 巻 229
2. 論文標題 Regulation of root adaptive anatomical and morphological traits during low soil oxygen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mano Yoshiro, Nakazono Mikio	4. 巻 71
2. 論文標題 Genetic regulation of root traits for soil flooding tolerance in genus <i>Zea</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 30 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.20117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakazono Mikio
2. 発表標題 Root traits that determine waterlogging resilience in rice and maize
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference - Climate Change-Linked Stress Tolerance in Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazono Mikio
2. 発表標題 Roles of plant hormones in anatomical responses of roots to flooding stress
3. 学会等名 23rd International Conference on Plant Growth Substances (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山洋平, 渡邊宏太郎, 井出健斗, 黒川裕介, 高橋宏和, 高橋秀和, Timothy D. Colmer, Ole Pedersen, 大森史恵, 間野吉郎, 中園幹生
2. 発表標題 Zea nicaraguensis における酸素漏出バリア形成能の遺伝学的解析
3. 学会等名 第26回中部地区談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中園幹生, 中山洋平, 安江広樹, 黒川裕介, Ole Pedersen, Anja Heidi Floytrup, Timothy David Colmer, 高橋宏和, 大森史恵, 間野吉郎
2. 発表標題 Zea nicaraguensisの側根に形成される酸素漏出バリアの遺伝・生理学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山洋平、高橋宏和、Maurizio Camagna、佐藤豊、豊田敦、大森史恵、間野吉郎、中園幹生
2. 発表標題 RNA-Seq解析によるZea nicaraguensisの酸素漏出バリア形成に関する重要遺伝子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021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	間野 吉郎 (Mano Yoshiro) (20355126)	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 (82111)	
研究分担者	高溝 正 (Takamizo Tadashi) (00355124)	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・再雇用職員 (82111)	

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			
オーストラリア	西オーストラリア大学			
デンマーク	コペンハーゲン大学			
中国	河南農業大学			