

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580010

研究課題名(和文) マメ科植物における遺伝子機能獲得型変異体を用いた根の特性に関する遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of root traits in Lotus corniculatus produced by gain-of-function strategy

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マメ科植物のセイヨウミヤコグサヘシロイヌナズナ由来の機能遺伝子をランダムに導入し、バイオマスの増加や根の伸長と分化、および根粒形成に影響をもたらす遺伝子の探索を行った。作出された個体について導入された遺伝子の同定と発現解析を行い、地上・地下部諸形質、根粒着生について調査した。その結果、形態的特性において非形質転換体に対して有意な差を有する個体が選抜された。全ての情報は画像を含めてデータベース化し、一般公開する準備を整えた。これらの研究により生育が旺盛でバイオマスを増加させる候補遺伝子が見いだされたことから、今後のダイズにおける生産性を向上させる分子育種に必要な基盤整備ができた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate useful genes that can increase plant biomass, root elongation and differentiation, and increase rhizobium production rates in legumes. Here, Arabidopsis thaliana cDNAs were randomly transformed into Lotus corniculatus. Using FOX system, a molecular tool to rapidly and efficiently dig useful trait, plants that had overexpressed the introduced genes from Arabidopsis were evaluated. We measured the upper parts and lower parts of the plant, and also the production rates of rhizobia in the roots. From this method, we found plant lines that showed significant differentiations based on the morphological characteristics, including rhizobia production. All information gathered from these results was compiled in a working database. Specially, this database will be prepared and opened for research use. Furthermore, this result is useful for the molecular breeding of glycine to improve glycine production.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：FOXハンティングシステム セイヨウミヤコグサ 根の成長と分化 根粒形成

## 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度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。これまで申請者は、*Lotus corniculatus* 由来の根培養系から見いだされたスーパールートに、シロイヌナズナ由来の種々の完全長 cDNA を導入した、130 個体の FOX スーパールート形質転換個体(FOX 個体)が得ることができている(Himuro et. al. 2011)。

## 2. 研究の目的

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 アグロバクテリウム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)へランダムに導入するファンクショナルゲノミックスのため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根粒形成に対して影響をもたらす新規な遺伝子の探索を行うものである。

## 3. 研究の方法

次の 5 つの項目について研究を行った。

### (1) 130 個体の FOX 個体について導入された遺伝子の塩基配列の同定と発現解析

培養試験管内で維持している FOX 個体の葉から DNA を抽出して PCR 法により導入遺伝子を増幅させ、ダイレクトシーケンシングを行う(現有設備)。また、PCR の増幅が不可能、もしくはシーケンシングが確認できなかった系

統については、新たなプライマーを設計するとともに、PCR 条件を再検討する。さらに、サザンブロット解析、およびノーザンブロット解析または qRT-PCR (現有設備) にて導入遺伝子のコピー数と発現量の解析を行う。

### (2) 決定した遺伝子の構造解析やシンテニー解析

塩基配列を決定した遺伝子に関しては、構造解析を行い、新規な遺伝子であれば DDBJ 等に登録する。また、それぞれの遺伝子はシンテニー解析も行う。

### (3) 既知および未知の遺伝子が導入された FOX 個体について地上部と地下部および根粒形成における特性調査

方法としては、人工気象室(現有設備)において各個体を 3 反復とり、FOX 個体のうち 40 系統を選び、3 ヶ月間の栽培を行い、開花期における特性調査を行う。特性調査は、先のミヤコグサ QTL 解析の論文(Gondo et al. 2007) に準じて行う。

### (4) F1 の採種

各系統に対しては、FOX 個体は西洋ミヤコグサであるため 4 倍体の自家不和合成であり、採種は困難である。ところが、近年、申請者らは 4 倍体のミヤコグサを作成したことにより、これを交配することで F1 の採種が可能となった。そこで、この新たに構築した系を用いて FOX 個体における F1 の採種を試みる。

### (5) FOX 個体のデータベースを作成

各 FOX 個体に対する情報を集約し、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)ミヤコグサ・ダイズの情報公開サイト Legume Base(<http://legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp>)に登録する準備を行う。

## 4. 研究成果

人工気象室で生育させた FOX-SR の形態的な特性調査において、地上部および地下部において成長の旺盛な 2 系統が見出された。この系統に導入された遺伝子を確認したところ、SYNC1 (asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic 1) 遺伝子および機能未知遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子は作物収量の増加や植物体の維持に関わることが示唆されたため、再度人工気象室において生育させ、さらに詳細に調査を行った(図 1, 2)。SYNC1 遺伝子が導入された FOX-SR (以下 FOX-SR SYNC1) は、草丈が SR の  $19.7 \pm 1.2$  cm に対して  $23.6 \pm 1.9$  cm、茎径が SR の  $0.68 \pm 0.06$  mm に対して  $0.84 \pm 0.07$  mm、葉幅が SR の  $7.1 \pm 0.6$  mm に対して  $7.7 \pm 0.3$  mm、根径が SR の  $0.45 \pm 0.02$  mm に対して  $0.51 \pm 0.03$  mm と有意に高い値を示した。

一方で、機能未知の遺伝子が導入された FOX-SR (以下 FOX-SR Unknown) では、草丈が  $25.3 \pm 1.9$  cm、根径が  $0.52 \pm 0.04$  mm と SR

に対して有意に高い値を示した。しかしながら、葉幅においては  $6.3 \pm 0.5$  mm と有意に下回った。また、FOX-SR Unknown における根粒着生数はSRにおける根粒着生数の18%程度であった(図3)。

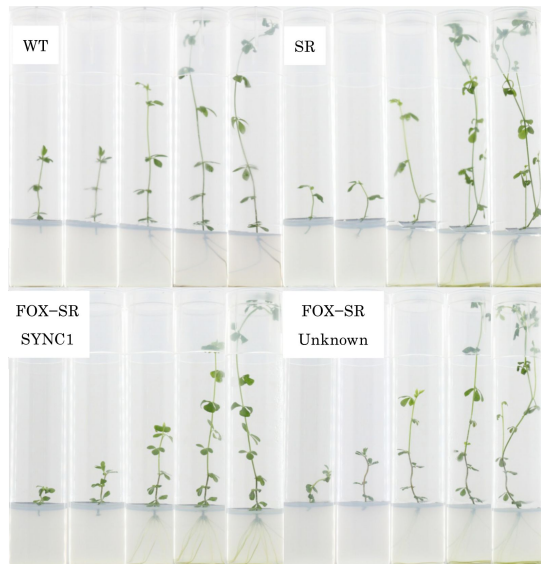


図 1. 特徴的な形質を示した系統における in vitro での成長比較  
各系統において、それぞれ左から 0、1、2、3、4 週目

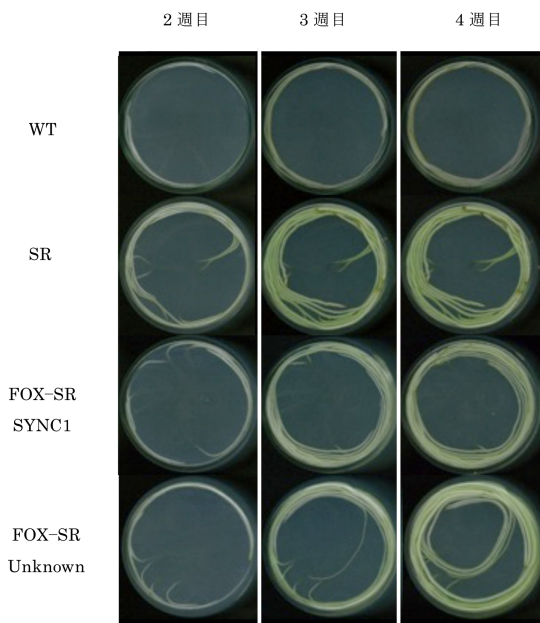


図 2. 特徴的な形質を示した系統における 2 週目、3 週目、4 週目の根の成長

一方で、葉における単位面積当たりの気孔数が、SR における  $14.8 \pm 3.4$  個 / 検鏡範囲に対して、 $24.8 \pm 4.3$  個 / 検鏡範囲と有意に上回った(表 1)。

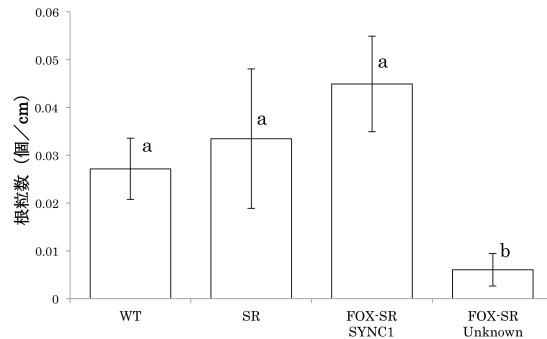


図 3. 特徴的な形質を示した系統における根長あたりの根粒着生数の比較  
異なる文字間には各系統間で 5%水準での有意差があることを示す。

表 1. 特徴的な形質を示した系統における表皮細胞長、孔辺細胞長、気孔数の変化

	表皮細胞長 (μm)	孔辺細胞長 (μm)	気孔数 (個/検鏡範囲)
WT	$80.0 \pm 12.4$ b	$25.6 \pm 2.8$ a	$16.2 \pm 4.8$ b
SR	$90.7 \pm 14.6$ a	$23.7 \pm 2.2$ b	$14.8 \pm 3.4$ b
FOX-SR SYNC1	$84.1 \pm 12.6$ b	$24.0 \pm 2.8$ b	$17.4 \pm 3.0$ b
FOX-SR Unknown	$66.9 \pm 8.2$ c	$22.3 \pm 2.5$ c	$24.8 \pm 4.3$ a

さらに、この機能未知遺伝子をアミノ酸に翻訳し、既存の公的データベースを用い、機能推定を行った。その結果、光合成における光化学系 および の間で電子伝達を仲介することが報告されている、*M. truncatula* 由来の Cytochrome b6 遺伝子と 48% の相同性があった。このことから、FOX-SR Unknown では、光化学系の効率が向上したことによって、気孔数の増加や、旺盛な成長を引き起こしたと推察された。

次に、四倍体ミヤコグサを種子親に、FOX-SR Unknown を花粉親に人工交配を行った結果、17 粒の種子が得られ 1 粒の発芽が認められた。また、得られた幼植物体から DNA を抽出し、PCR 反応を行い増幅産物を得た。増幅産物を電気泳動にかけ導入遺伝子を確認したところ、FOX-SR Unknown で確認されたバンドと同じ位置に、バンドを確認することができた。このことから、後代に遺伝子が伝搬されたことが確認できた。

最後に、これまでの研究について情報をデータベース化し、NBRP ミヤコグサ・ダイズの情報公開サイト LegumeBase にて公開する準備を整えた。

これらの一連の研究により、生育が旺盛でバイオマスを増加させる候補遺伝子が見いだされたことから、今後のダイズにおける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の一部を構築することができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

Ryo Akashi, Yasuyo Himuro, Hidenori Tanaka, Masatsugu Hashiguchi; Development and characteristics of FOX-superroots in *Lotus corniculatus*; Plant and animal genome XX; 16 Jan 2012; San Diego, California USA

矢野翼、山本昭洋、明石良、佐伯雄一；根粒着生数が減少したセイヨウミヤコグサスーパールート系統における表現型解析；土壤肥料学会年次大会；2013年9月11日～13日；名古屋

Tsubasa Yano, Akihiro Yamamoto, Yuichi Saeki, Ryo Akashi; Phenotype analysis of *Lotus corniculatus* FOX-SR line reducing nodule number; 18th International congress on nitrogen fixation; 14-18 Oct, 2013; Miyazaki Japan

Tsubasa Yano, Akihiro Yamamoto, Yuichi Saeki, Ryo Akashi; Phenotype analysis of the mutant in decreased nodulation of *Lotus corniculatus* super growing root; 植物生理学会年会; 18-20 Mar, 2014; 富山

## 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