

ヒメツルアズキにおける耐塩性の種内分化に関する遺伝解析

先端生命科学専攻 応用生物資源学分野 2018年3月修了

学籍番号 47-166311 大橋ほなみ

指導教員 内藤健 准教授

【キーワード】

QTL解析、耐塩性、遺伝資源

【はじめに】

世界の人口は2017年現在、76億人に達し、2050年には98億人、2100年には112億人に達すると予測されている(1)。今後も増加を続ける人口を養うには、食糧の増産が不可欠である。

現在、灌漑農地約3.1億haのうち約9000万haは塩害のため作物栽培が困難である(2)。塩害は毎年1000万haの農地を破壊しており(3)、食糧の増産が求められる現在の状況において、その対策は喫緊の課題である。

そこで本研究では、耐塩性作物の開発につながるため野生種が持つ耐塩性遺伝子を同定することを目指した。

本研究で扱うヒメツルアズキ (*Vigna nakashimae*) は長崎県五島列島の集団(‘G4-2’)のみが耐塩性を持つという特異な種である。すなわち、同種内で耐塩性に変異が生じていることから、五島列島の系統群の耐塩性は、長期間に蓄積した多数の遺伝変異によって生じたのではなく、短期間に起きた少数の遺伝変異によって生じたと考えられる。少数の遺伝子によって耐塩性が制御されているのであれば、QTL解析(quantitative trait locas analysis; 量的形質遺伝子座解析)によって容易に遺伝子を同定可能であり、かつ他の作物へ応用する際にも導入する遺伝子が少なく済むと考えられる。したがって、本研究では、五島列島のヒメツルアズキが獲得した耐塩性遺伝子を同定することを目的とした。

【材料および方法】

ヒメツルアズキの耐塩性系統‘G4-2’と感受性系統‘4076’、交配した自殖後代のF2及びF3を用いて実験を行った。

‘G4-2’と‘4076’を使用して²²Naを用いたNa⁺の局在解析を行った。播種12日後、²²Naを含む100mM NaCl(²³NaCl)の水耕液で3日間培養した後、²²Naから放出された放射線をBASイメージングで可視化した。また、γカウンターで器官ごとの放射線量を定量した。

F2の耐塩性評価にはF2 198系統、および親系統の‘G4-2’、‘4076’を用いた。系統ごとに挿し木クローンを3クローンずつ作成、100 mMのNaCl水溶液に10日間浸漬したのち葉の萎凋程度を外見で評価することにより実施した。

F3の耐塩性評価には、198系統のF2からそれぞれ6個体ずつ、および親系統の‘G4-2’、‘4076’を用いた。塩順化処理開始から3日後、200 mMでの塩処理を行った。塩処理から3、5、7、10、12、14、17日後に外見の萎凋度に基づき評価を行った。

‘G4-2’、‘4076’、197系統のF2からDNAを抽出し、アズキ Simple Sequence Repeat (SSR) プライマーセット(4)を用いたフラグメント解析及びRAD-seqのデータ解析によりジェノタイピングを行った。これらの遺伝子型データから、Antmap (Version 1.2)(5)で連鎖地図を作成した。

連鎖地図に従って並び変えた遺伝子型データと萎凋度の評価結果を合わせてR/qtl (Version 1.41-6)(6)を用いてQTL解析を行った。

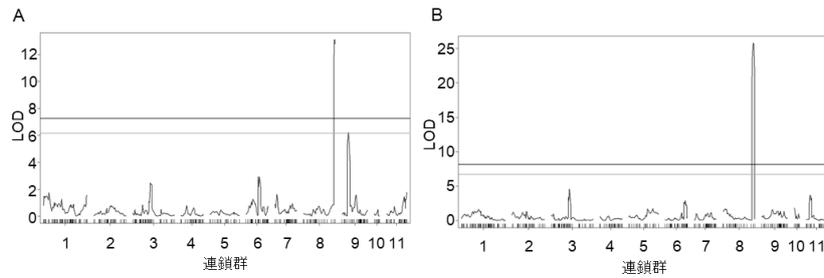


図 1. A. F3 1 回目の塩処理 10 日後、B. F3 2 回目の塩処理 10 日後の評価結果を用いて QTL 解析を行った結果
横断線は 1%有意水準 (上)および 5%有意水準 (下)を示す。

12716 (117.07 cM) の間に強い QTL が繰り返し検出された (図 1)。したがって、'G4-2' の耐塩性は主に単一の QTL によって支配されていることが明らかになった。

また、放射性同位体を用いた実験より 'G4-2' の葉は '4076' の葉より検出された放射線量は少なく、単位乾物重あたりの放射線量も 'G4-2' の葉は '4076' の葉より少なかった (図 2)。この結果より、'G4-2' の耐塩性機構は葉への Na^+ の移行を抑制するものであることが示唆された。

さらに、QTL に座乗する遺伝子から Na^+ 輸送に関与する遺伝子を探索した。その結果、本研究で検出された QTL 領域はアズキゲノムの第 8 染色体上の 45.1 Mbp から 46.3 Mbp の領域に相当し、そこには 113 遺伝子が座乗していた。その中に、シロイヌナズナの CBL-interacting protein kinase 7 (CIPK7) の同祖遺伝子であると考えられるものが存在した。CIPK7 は Na^+ トランスポーターの salt overly sensitive 1 (SOS1) を制御する salt overly sensitive 2 (SOS2) (7) と類似している遺伝子で (8)、多くの植物において塩ストレスにより発現が誘導されることが知られている。SOS1 の Na^+ を排出する機能 (9) は 'G4-2' の Na^+ の葉への移行を抑制する表現型とも関連しており、CIPK7 は耐塩性に関する有力な候補遺伝子だと考えられる。しかし、現時点で原因遺伝子を確定することはできないため、今後はトランスクリプトーム解析や、戻し交雑集団を用いたファインマッピングを行うことで、原因遺伝子を同定することを目指す。

- (1). United Nations, *et al.* (2017). Working Paper No. ESA/P/WP/248.
- (2). FAO. (2011). SOLAW
- (3). 内藤健ら. (2016). 国際林業協力 Vol. 39 (1) 12-19
- (4). Han OK, *et al.* (2005). Theor Appl Genet 111: 1278–1287
- (5). Iwata H, *et al.* (2006). Breeding Science 56: 371-377
- (6). Broman KW, *et al.* (2003). Bioinformatics 19:889-890
- (7). Qiu QS, *et al.* (2002). PNAS vol. 99 (12) 8436–8441
- (8). Kolukisaoglu Ü, *et al.* (2004). Plant Physiology Vol. 134: 43-58
- (9). Ismail AM *et al.* (2017). Plant Biol 68:405-434

【結果および考察】

F2 の遺伝子型解析によって連鎖地図は作成できたが、耐塩性評価の際に病気を発生させてしまい、F2 での QTL 解析は失敗に終わった。

そこで、F3 を用いて耐塩性評価と QTL 解析をやり直したところ、第 8 連鎖群のマーカー 12732 (111.62 cM) と

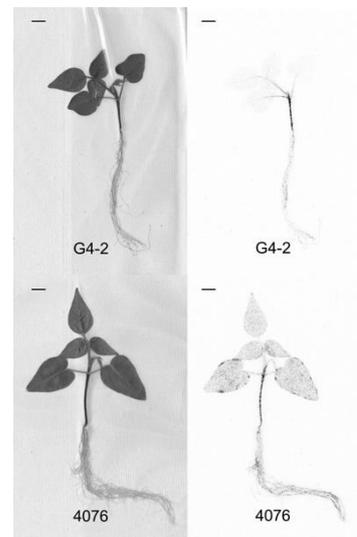


図 2. 明視野 (左) および BAS イメージ (右)。スケールバーは 1cm を示す。