

窒素固定関連遺伝子の多型とダイズの収量性の関係

鈴木章弘*

佐賀大学農学部生物環境科学科資源循環生産学講座

Effect of Polymorphism of Nitrogen Fixation Related Gene on Soybean Yield

Akihiro SUZUKI*

Agrobiology & Agro-production Systems, Department of Environmental Sciences,
Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502

ABSTRACT

Many leguminous plants establish symbiotic relationship with nitrogen-fixing soil bacteria, called rhizobia. Symbiotic nitrogen fixation is regulated by many QTLs. Therefore identification of localization of such QTLs is important for increase of legume grain yield. We carried out QTL analysis by use of Recombinant Inbred Lines (RILs) derived from the second generation prepared by cross of Gifu B129 and Miyakojima MG20 of model legume *Lotus japonicus*. As a result, we found that there is a loci which works positively on activity of nitrogen fixation on chromosome 4 of MG20. Interestingly, it is known that *SEN1* gene also localizes near this position and *sen1* mutant do not show nitrogen fixation activity. This shows that *SEN1* gene is involving in nitrogen fixation. Moreover, *SEN1* protein of B129 has one amino acid deletion compared with that of MG20. Based on these facts, there is a possibility that *SEN1* gene is the cause of the QTL. Actually, nitrogen fixation activity of *sen1* mutant transformed by intact MG20 *SEN1* gene was higher than that of B129 *SEN1*. Then we found polymorphism in amino acid sequence of soybean *SEN1* genes. Nitrogen fixation activity of *L. japonicus sen1* mutant transformed by Enrei *SEN1* gene was slightly higher than that of Peking type *SEN1* gene. Effect of polymorphism of soybean *SEN1* gene on the soybean yield was analyzed using 18 F2 soybean plants prepared from crossing with Bay (Peking type) and Enrei. Unfortunately, due to the difference of flowering time between Enrei and Bay, significant difference was not observed. For the test of soybean production, soybean plant which have Enrei type *SEN1* gene in the Fukuyutaka background should be used. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 35-40, 2015.

Key words : soybean, nitrogen fixation, symbiosis, rhizobia, SEN1

*〒840-8502 佐賀市本庄町1番地

ダイズの子実生産において窒素を多く施肥することは根粒形成の阻害に繋がり、必ずしも好結果をもたらさない¹⁾。そして子実中に含まれる窒素の約6割(条件によって異なる)が根粒菌による固定窒素であることを考えると、根粒における窒素固定活性の高低がダイズの収量性に影響を与えることは想像がつく。筆者等はマメ科植物の根粒における窒素固定活性を増強させるための研究をおこなっており²⁾、マメ科のモデル植物ミヤコグサを用いて窒素固定活性に影響を与えるQTLについて報告した³⁾。そして複数見出されたQTLのうち第4染色体上の1つは、根粒重や草丈のQTLのみならず、ミヤコグサにおいて唯一報告されている種子重のQTL、更には窒素固定活性に必須な遺伝子*SEN1*と同じ領域に存在していることが明らかになった⁴⁾。QTLが検出されるということは、解析に用いた植物系統間でその領域にDNAの塩基配列の違いがあることを意味するが、驚いたことに、用いたミヤコグサのB129とMG20間では、*SEN1*遺伝子の塩基配列が異なっていた。以上の事実はこの領域に集中しているQTLの原因遺伝子が*SEN1*である可能性を示している。そこで窒素固定活性を失った*sen1*変異体へB129*SEN1*遺伝子またはMG20*SEN1*遺伝子を導入して窒素固定活性を比較したところ、MG20の*SEN1*遺伝子を導入した場合の方が高い傾向にあった。この結果は、当該領域のQTLがMG20において正に作用するというデータと合致した。以上の結果はミヤコグサを用いたものであるが、仮にマメ科作物の品種間で*SEN1*遺伝子の塩基配列に多様性が見出されれば、収量性などに影響を与えている可能性が考えられる。そこで約45品種のダイズの*SEN1*遺伝子について塩基配列を比較した。その結果興味深いことにエンレイとシロメユタカ(エンレイの片親)では他の43品種と塩基配列が異なっており、その変異によってアミノ酸の極性も変化していた。エンレイは大粒で収量性が高く日本の代表的な栽培品種として知られているが、エンレイ型の*SEN1*遺伝子がそれに貢献しているのだろうか?そこでエンレイとPeking(*SEN1*遺伝子の塩基配列はエンレイとは異なる)を用いて検出された農業形質のQTLと*SEN1*遺伝子の位置を比較してみたところ、第8染色体上の種子重のQTLと*SEN1*遺伝子は同じ領域に座上していることが判明した。しかもこのQTLはエンレイにおいて正に作用するものであった。この結果はエンレイ型の*SEN1*遺伝子が種子重の増加に寄与している可能性を示している。そこで本研究では、ダイズ*SEN1*遺伝子の多型が共生窒素固定能に及ぼす影響の解明、ダイズ*SEN1*遺伝子の多型が農業形質へ及ぼす影響の調査の2

つの小課題を遂行し、ダイズ*SEN1*が種子重のQTLの原因遺伝子である可能性を検討した。

方 法

*sen1-1*変異体へのダイズ*SEN1*遺伝子の導入および共生能の評価

窒素固定活性を全く示さないミヤコグサの*sen1-1*変異体へユビキチンプロモーターの制御下で、エンレイ型*SEN1*遺伝子またはPeking型*SEN1*遺伝子を*Agrobacterium rhizogenes* LBA1334株を介して導入した。その後ミヤコグサ根粒菌*Mesorhizobium loti* MAFF303099を接種して28日後に植物体の表現型を調査した。

ダイズ*SEN1*遺伝子の多型が農業形質へ及ぼす影響の調査

Peking型の*SEN1*遺伝子を持つBayとエンレイを交配したF2世代の種子(佐賀大学農学部植物育種学教室提供)を用いて圃場試験をおこなった。F2個体の遺伝子型の判別はターゲット部分をPCR法で増幅して塩基配列を決定することでおこなった。

結果と考察

窒素固定活性を全く示さないミヤコグサの*sen1-1*変異体へユビキチンプロモーターの制御下で、エンレイ型*sen1*遺伝子またはPeking型*sen1*遺伝子を導入した。その後ミヤコグサ根粒菌を接種して28日後に植物体の表現型を調査した。まず始めにqPCRによって導入したダイズ*SEN1*遺伝子の発現を調べたところ、エンレイ型とPeking型で差が見られなかったことから、導入した遺伝子はどちらも同じ程度発現しているものと判断された(Fig. 1A)。またその時の植物体の成長を比較したところ、対照区と比較してエンレイ型とPeking型ではシュートの成長が良くなっていたが、エンレイ型とPeking型間では有意な差が見られなかった(Fig. 1B)。根の成長に関してもエンレイ型とPeking型間で有意差は見られなかった(Fig. 1C)。次にこれらの植物体についての共生能を調査した。Fig. 2Dは形質転換毛状根に形成されたピンク根粒の数(窒素固定をしている根粒はレグヘモグロビンの影響でピンク色を呈する)を示しているが、エンブティーベクターを導入した対照区では形成されず、エンレイ型とPeking型ではほぼ同数の根粒が形成された。このことから導入した*SEN1*遺伝子の塩基配列の違いは根粒数

に大きな影響を及ぼさないことが確認できた。窒素固定活性については、予想通り対照区では全く検出されなかった。しかしながらエンレイ型とPeking型*SENI*遺伝子を導入した場合は窒素固定活性が見られ、個体当たり、根粒数当たり、根粒重当たりのいずれもがPeking型と比較してエンレイ型の方が高い傾向を示した (Fig. 2A, 2B, 2C)。残念ながら1年間では十分な個体数を調査することができなかったため、今後もこの実験を継続しておこないエンレイ型*SENI*遺伝子が高い窒素固定活性を示すか否かを見極める必要がある。

次にダイズ*SENI*遺伝子の多型が農業形質へ及ぼす影響を調査した。すなわちPeking型の*SENI*遺伝子を持つBayとエンレイを交配したF2世代の種子を用いて圃場試験をおこなった。まず始めに播種した18個体のF2植物の葉を一部切り取り、ゲノムDNAを抽出して*SENI*遺伝子の遺伝子型を調査した。その結果Peking型が6個体、ヘテロ型が7個体、エンレイ型が5個体であり、収穫後にそれぞれのグループの草丈、種子数、

種子重を調査した。草丈ではPeking型、エンレイ型とヘテロ型では有意な差は見られなかった (Fig. 3A)。また種子数において有意差は検出できなかったがエンレイ型で少なくなる傾向が見られた (Fig. 3B)。100粒重については有意な差が検出できなかった (Fig. 3C)。親品種のBayとエンレイ間ではいずれの項目でも有意な差が見られたが、これはエンレイが十分成長する前に開花期を迎えてしまったことによるものと考えられた。今年度の調査では、用いたF2世代の個体数が18と少なかったために、*SENI*遺伝子の遺伝子型の影響を反映した結果というよりは、開花期の影響が強く出てしまったものと考えられる。今後の方針として取りうる選択肢は、F2の個体を増やすことと、エンレイ型の*SENI*遺伝子を佐賀県における栽培に適した品種（フクユタカ）へ交配によって導入し、背景がフクユタカで*SENI*遺伝子部分がエンレイ型をもつような系統を作出し同様の調査をおこなうことが考えられる。

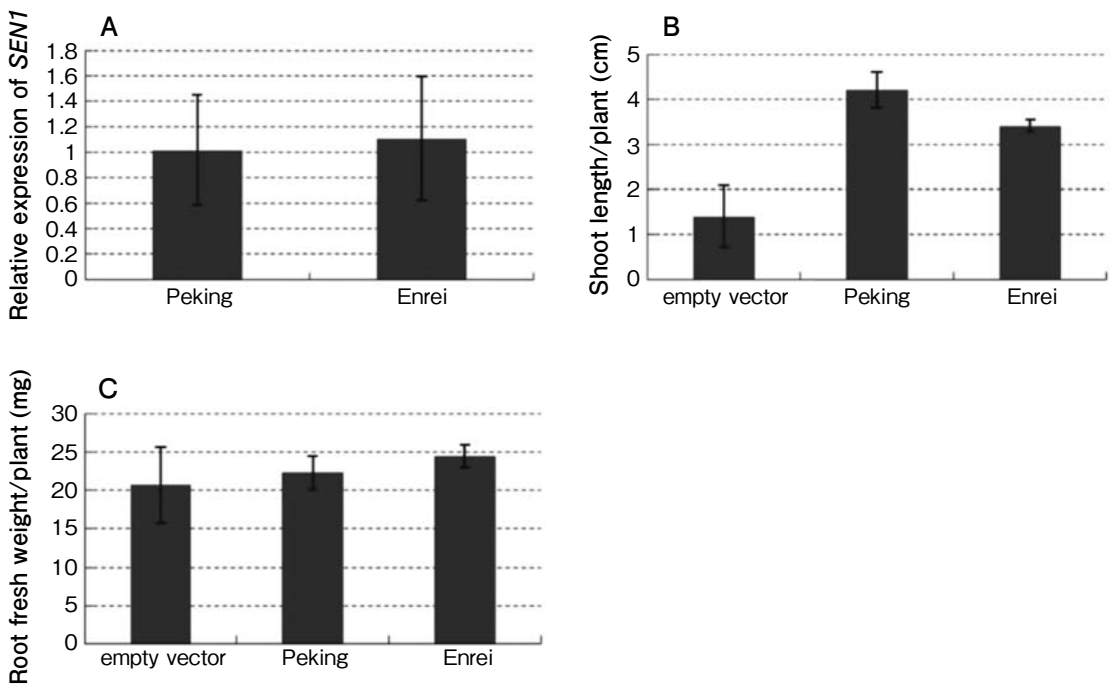


Fig. 1. Effect of polymorphism of soybean *SENI* gene on the growth of *Lotus japonicus sen1* mutant. *L. japonicus sen1-1* mutant was transformed using Peking type or Enrei type *SENI* gene driven by ubiquitin promoter via *Agrobacterium rhizogenes*. Plant possessing transformed hairy roots were inoculated with *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and 28 days later, symbiotic phenotype were analyzed. (A) Relative expression of soybean *SENI* gene (trans gene) in the transformed hairy root. Transcript amounts of soybean *SENI* gene was normalized against *ATP synthase* (internal control) transcripts. The data represent average $\pm$ SE, (n=3) (B) Shoot length, (C) Root fresh weight per plant. (B, C) The data represent average $\pm$ SE, empty vector (n=2), Peking (n=10), Enrei (n=7)

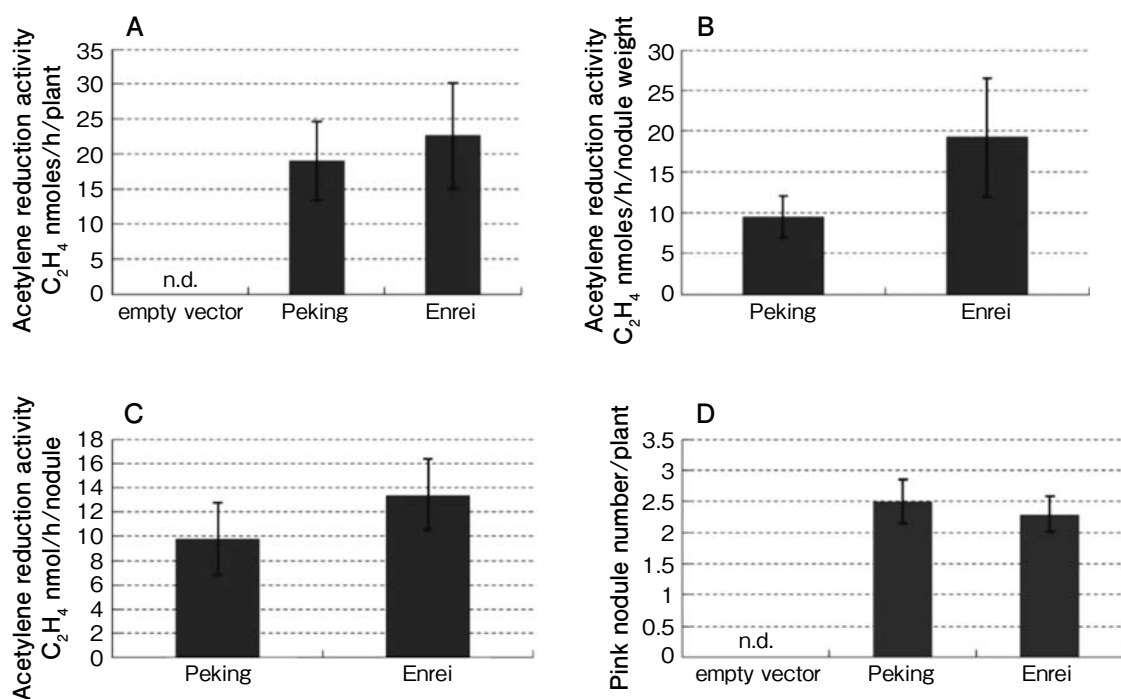


Fig. 2. Effect of polymorphism of soybean *SEN1* gene on the nodulation and nitrogen fixation in *Lotus japonicus sen1* mutant. *L. japonicus sen1-1* mutant was transformed using Peking type or Enrei type *SEN1* gene driven by ubiquitin promoter via *Agrobacterium rhizogenes*. Plant possessing transformed hairy roots were inoculated with *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and 28 days later, symbiotic phenotype were analyzed. (A) Nitrogen fixation activity per plant (B) Nitrogen fixation activity per unit nodule weight (C) Nitrogen fixation activity per nodule (A, B, C) The data represent average $\pm$ SE, empty vector (n=2), Peking (n=10), Enrei (n=7)

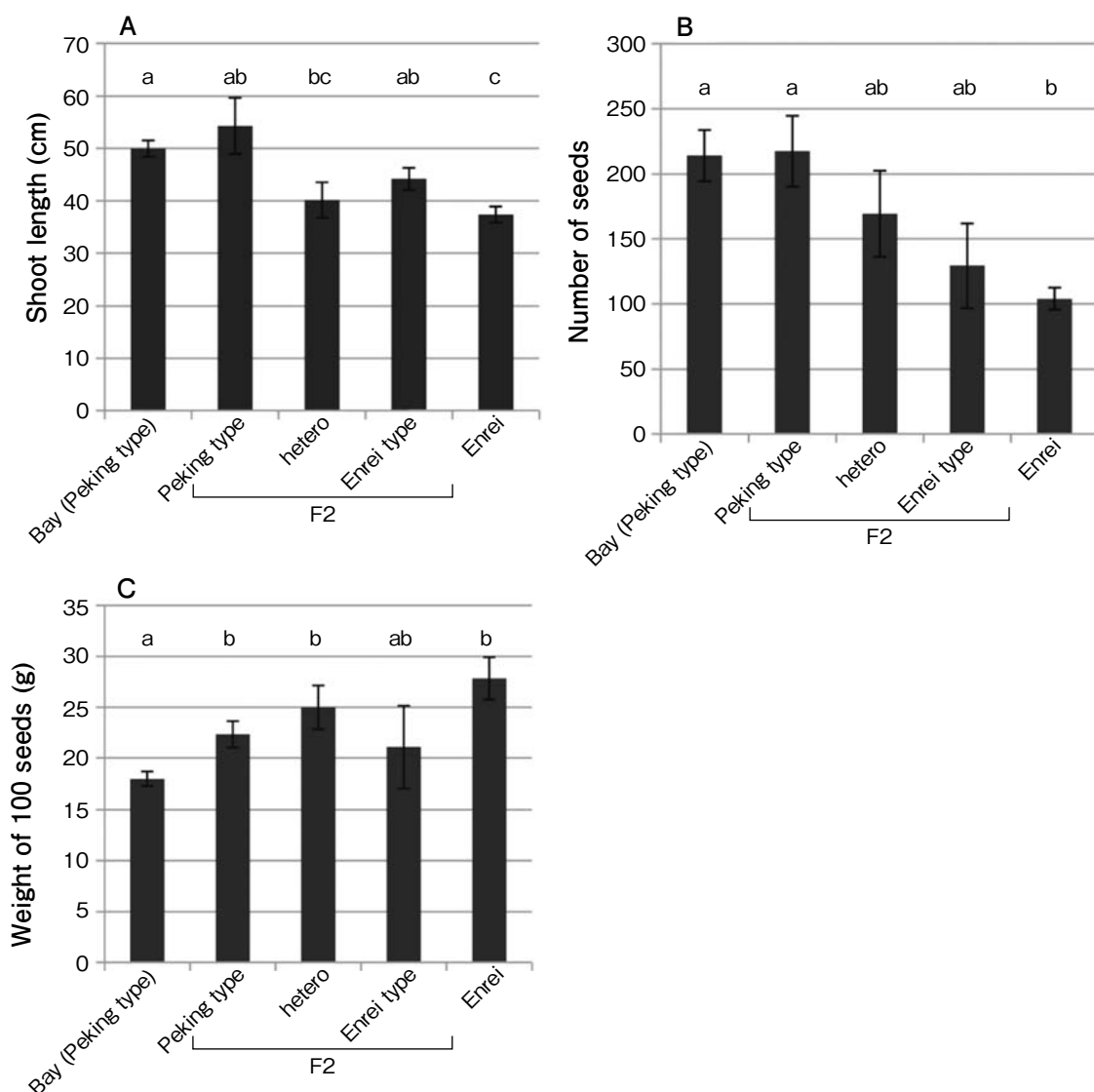


Fig. 3. Effect of polymorphism of soybean *SEN1* gene on the soybean yield. Eighteen F2 soybean plants prepared from crossing with Bay (Peking type) and Enrei were analyzed. Genotypes of individual F2 plant were determined by the nucleotide sequencing. (A) Shoot length. (B) Number of seeds harvested. (C) Weight of 100 seeds. (A, B, C) The data represent average $\pm$ SE, Bay (n=9), Peking type F2 (n=6), hetero F2 (n=7), Enrei type F2 (n=5), Enrei (n=9). Means denoted by the same letter did not differ significantly at $P < 0.05$.

要 約

ミヤコグサの*sen1*変異体へユビキチンプロモーターの制御下でダイズ*SEN1*遺伝子を導入し根粒菌接種28日後にアセチレン還元法によって窒素固定活性を測定した。その結果、エンレイ型*SEN1*遺伝子を導入した場合に、それ以外（Peking型*SEN1*遺伝子）と比較して窒素固定活性が高い傾向にあった。この結果は、エンレイ型*SEN1*が高い窒素固定活性によって種子生産に正の影響を与え得る可能性を示している。次に、エンレイとBay（Peking型*SEN1*遺伝子を持つ）を交配して得られたF2集団を圃場へ展開して各個体の農業形質と*SEN1*の遺伝子型を調査した。その結果、ダイズの成長や収量と遺伝子型の間に有意差は見出せず、開花期の違いを大きく反映した結果となった。今後は、九州の主力品種であるフクユタカ（Peking型）へ交配によってエンレイ型*SEN1*遺伝子を導入した系統を作出して、同様の調査をおこなう必要がある。

文 献

- 1) Harper JE (1974): Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. *Crop Sci*, **14**, 255-260.
- 2) Tominaga A, Nagata M and Futsuki K Abe H, Uchiumi T, Abe M, Kucho K, Hashiguchi M, Akashi R, Hirsch AM, Arima S and Suzuki A (2009): Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant enhanced nitrogen fixation1 of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, **151**, 1965-1976.
- 3) Tominaga A, Gondo T and R, Zheng S Arima S and Suzuki A (2012): Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *J Plant Res*, **125**, 395-406.
- 4) Hakoyama T, Niimi K and Yamamoto T Isobe S, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Kumagai H, Umehara Y, Brossuleit K, Petersen TR, Sandal N, Stougaard J, Udvardi MK, Tamaoki M, Kawaguchi M, Kouchi H and Suganuma N (2012): The integral membrane protein *SEN1* is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol*, **53**, 225-236.