

9622 塩ストレスに反応するコムギ遺伝子群の解析

助成研究者：笹隈 哲夫(横浜市立大学 木原生物学研究所)
共同研究者：辻本 壽(横浜市立大学 木原生物学研究所)
根本 泰江(横浜市立大学 木原生物学研究所)
遠藤 隆(京都大学 農学部)

パンコムギ (*Triticum aestivum*) における塩(塩化ナトリウム)反応性の遺伝システムについて研究した。

両研究機関で長年にわたって収集・育成してきたコムギの遺伝資源、遺伝解析システムを用いて、種子発芽、および、分けつ期植物の生育にたいする塩の効果調べた。両者とも系統間で差異を示し、コムギにおいても塩にたいする感受性・耐性の遺伝変異が存在することが判明した。また、種子の塩感受性・耐性と植物体のそれとは相関がなく、別のシステムが働いていることが証明された。

生育に関する塩の影響では、水耕栽培条件下では150mMのNaClが変異を選抜する基準濃度であった。世界各地から集めたコムギ品種の中で、北米と1近代品種と中国・ウイグルの在来品種に塩耐性系統がみつき、極感受性系統とともに、それらを将来の遺伝・育種素材として選抜した。

染色体置換システムを用い、塩溶液かでの生育率を調べ、塩感受性・耐性に関する遺伝子群が座乗する染色体を調べたところ、パンコムギ21本の染色体のうち、3D、4D、5D、6Dが関与していることが判明した。これらは、コムギの進化上野生植物タルホコムギを起源とする染色体であることは興味深い。

ディファレンシャル・ディスプレイ法を改善して、塩処理により発現誘導する遺伝子の単離を行った。32種の特異的反応の遺伝子産物が同定され、その内6種が単離・クローン化された。DNA一次構造の解析の結果、それらは全て塩誘導としては未知の遺伝子であった。今後、単離した塩反応の遺伝子の機能や、耐塩性との関連等を調べていく必要がある。

今回の研究で、コムギの塩反応の遺伝解析の基本系が確立できた。また、それ等を使ってコムギの耐塩性育種へと発展することが期待される。

9622 塩ストレスに反応するコムギ遺伝子群の解析

助成研究者：笹隈 哲夫 (横浜市立大学 木原生物学研究所)
共同研究者：辻本 壽 (横浜市立大学 木原生物学研究所)
根本 泰江 (横浜市立大学 木原生物学研究所)
遠藤 隆 (京都大学 農学部)

1. 研究の目的

近年、コムギ栽培耕地で、灌漑、周辺地の森林伐採、連作、土壌の無機化等による塩の表土集積が報告されており、コムギの減収、耕地の荒廃が深刻な問題となっている。これらの問題を解決するためには、塩蓄積土壌の除去・中和といった対処療法の検討、農業生産形態の改善その他の社会・経済政策の問題があるが、一方では、集積塩の生物的除去や耐塩性植物の育種・育成といった、植物側の技術問題による対策が考えられる。しかし、塩に対する高等植物の反応、それに関与する遺伝子については、まだ十分な科学的理解が進んでいない。

本研究は、世界最大の穀物・コムギの塩反応性の遺伝機構を解明することにある。研究には、横浜市立大学木原生物学研究所および京都大学農学部で長年かけて収集育成してきた豊富な遺伝資源を活用して行った。実験解析では、コムギの持っている塩反応性の遺伝的変異を調べ、塩耐性あるいは感受性の遺伝システムの解明を個体・染色体・分子レベルで行うと共に、その関連遺伝子の単離を行う。この研究は耐塩性コムギの分子育種の基礎をなすものと位置づけられる。

2. 研究の方法

(1) 実験に供した系統

塩反応性、耐塩性の遺伝変異の研究には、横浜市立大学木原生物学研究所および京都大学農学部が収集・保存してきたコムギ類遺伝資源系統を用いた。これらには、パンコムギの祖先野生種、アジアを中心としたパンコムギ在来種、日本の代表

的品種、欧米の近代品種、および遺伝解析標準系統を含む。

遺伝解析には、実験標準系統Chinese Spring (CS) を遺伝的背景として、欧米の品種、Hope (HP) との間で 一対の染色体が置き換わった一染色体置換系統、21系統を用いた。なお後述するように、CSとHPは塩に対する反応性が異なる系統である。また、春播性・秋播性に関係する低温要求性遺伝子(Vrn1, Vrn2, Vrn3, Vrn4) が各々共通の遺伝的背景にある、8種のVrn同質遺伝子系統を解析した。

塩の反応に関する遺伝子発現、遺伝子の単離には、遺伝解析標準系統であるCS系統を用いた。

(2) 方法

形質調査

用いた遺伝資源系統を圃場栽培し、出穂日、植物長、分けつ数、穂長、止め葉長・巾、小穂数、等の特性を調査した。これらの形質と耐塩性との関係を相関分析した。

発芽耐性試験

低温乾燥下で保存されていた完熟種子に、0-1000mM NaCl水溶液を吸水させ、暗黒、20℃下で催芽させた。発芽検定は、処理一週間後の種子胚が、種子表皮を破っているかどうかで判定した。各処理区の発芽%が標準(0mM)のそれに対する割合をもって、その系統の発芽耐性値とした。分散分析により系統間差を検定した。

生育耐性試験

1/5ML S水性培養液で2週間育成した各系統植物(分けつ期)を、同液にNaCl 150mM添加した培養液で水耕した。水耕にあつたては、発泡器で根における酸素の供給を行った。2週間後の生重量および乾燥重量の増加率を測定し、標準(0mM)のそれらとの割合を(生)生育耐性値、(乾)生育耐性値として解析した。解析は分散分析で行った。

ディファレンシャルディスプレイ分析

水耕で育てた分けつ期のCS系統を、150mM NaCl添加区に移し、2時間後の葉および根を回収し、それぞれから全RNAを回収した。オリゴdTカラムによりポリA⁺RNAを分離したmRNAから、逆転写酵素により、cDNAを作成した。得られたcDNAを鋳型にして、カスタムプライマー(12マー;ベックス社)をプライマーとしてPCRでDNAを増幅した。得られた増幅DNAをアクリルアミド電気泳動で分析し、フラグメントパターンを無処理と比較した。また、塩処理特異的DNAフラグメントをゲルより抽出し、再び検出プライマーを用いてPCR増

幅を行い、産物をプローブとしてノーザン解析をおこなった。

NaCl 処理によって発現する遺伝子の単離

塩処理によって発現したフラグメントをプローブにして、cDNAライブラリーから塩によって発現する遺伝子のクローニングを行った。また、クローン化した遺伝子の一次構造解析を行った。

3. 研究結果

(1) 生育塩耐性

用いた水耕条件で、300mMのNaClを添加した培養液の場合では、すべてのコムギ系統は一週間以内に枯死した。種々の濃度の予備実験により、分けつ期のコムギ系統間の塩耐性試験には、1/5LS培地に150mMのNaClを添加する水耕条件で行うことにした。なお、パーミュクライトあるいは礫耕による塩水処理栽培では500mMNaCl灌水でもコムギは生育する場合があることから、植物の塩耐性試験では、どのような条件で行われたか吟味する必要がある。

塩を含む水耕培養で育成したパンコムギの耐塩性指標（塩処理下の重量増加率/無処理下の受領増加率）を検討したところ、全体として、分けつ期のコムギの生育は、150mMNaClにより阻害を受け、全体の半数の系統は全く生長を示さず、マイナスの指標を示した。しかし、一方で、150mMNaCl下でも生長するコムギ系統も存在しており、特に中国の2品種（歴城太白および白小麦）は、調べた系統の中で最高の耐性値（0.44および0.40）を示した。この値は無添加培養液下の生長の約60%阻害を受けながら生育している状態を意味する。また、欧米の近代品種の1系統、中国品種の4系統、朝鮮品種1系統、ウイグル在来品種5系統の計11系統（全体の7.8%）が、相対的に塩耐性の系統であることが評価できた（図1）。

なお、本研究により、発芽と生育両者に耐性の系統として、中国品種「歴城太白」、北米品種「Tam W101」、ウイグル収集の在来品種（H223）が、また感受性系統としてウイグル在来品種H228が選抜された。これらの系統は耐塩性の機構解明の資材として、あるいは、コムギ耐塩性品種育成の母本として用いることが可能である。

(2) 耐塩性と生育形質の関係

耐塩性試験に供試した系統を、圃場での栽培試験に供し、植物生育形質との関係を検討した。15種の生育形質と発芽耐性値、生育耐性値との間には、統計的に有意

の相関がなかった。

しかし、圃場での生育初期の叢性、出穂性に関し、塩耐性とのわずかな相関傾向が観察されたため、播性に関係する遺伝子、V r n同質遺伝子系統を用いて、耐塩性試験をおこなった。その結果、弱い春播性を示す低温要求性の二つの遺伝子V r n 2、3、4を持つ系統が、他の系統に比べて有意に高い耐性値を示すことが判明した(図2)。これらの遺伝子は、コムギ染色体第5同祖群に座乗しており、植物の低温感受性に関係する遺伝子であることから、今後の詳細な研究が期待される。

なお、現在、高耐塩性を示す系統に低耐塩性を示す系統の染色体が置き換わった染色体置換系統を用いた結果、同祖染色体2群および5群が耐塩性に関与していることが示唆された。

(3) 染色体置換系統の塩耐性に関する変異

パンコムギCS系統は塩耐性は中程度を示したが、Hope系統は高い感受性を示す系統であった。そこで、CSの遺伝的背景をもち21本のそれぞれの染色体がHopeと置き換わっている染色体置換系統の塩反応性の検定を行った。これにより、塩に強いあるいは弱い形質の遺伝子がのっている染色体を決定できることになる。150mM NaCl添加水耕栽培下での生育率を無添加でのそれとの割合で塩耐性値としてを求めたところ、3DH、4DH、5DH、6DH系統が塩に弱く、4BH、5BH、7BH、2AH、3AH、4AH、7AH系統が正常CSと同じレベルの耐性値を示した。すなわち、前者4種の染色体にCS系統の塩に対する反応性の遺伝子が座乗している事を示している。

(4) NaCl処理により発現する遺伝子

ディファレンシャルディスプレイ法により、塩ストレスにより誘導される遺伝子の解析を行った。この実験は、従来の方法を改善し、わずかなmRNAの転写も特定出来るよう、高等植物に頻度の高いDNA配列をプライマーに用い、また、PCR解析にはアクリルアミド電気泳動・銀染色でおこなった。従来の解析に比べ、感度の高い結果を得た(図3)。現在までに、75種のプライマーを用いて、32種の塩ストレス誘導cDNAフラグメントが確認できた。その内、8種のcDNAを単離し、クローン化に成功した。それらの内、4種は未報告のもので、2種は既知の遺伝子(オオムギで見つかった転写因子遺伝子、および多くの動植物で報告されている解糖系遺伝子G6PD)であったが、それらは塩誘導性としては初めての知見であった(表1)。

それらを用いてノーザン解析した結果、6種が塩ストレスにより葉における遺伝子発現が1.5-6倍に促進される結果を得た。

4. 考察

本研究によりパンコムギの中に塩感受性に関して大きな遺伝的変異が存在することが示された。従来、コムギはその類縁のオオムギにくらべ、耐塩性が低いとされてきた。しかし、本研究により、6倍性のコムギにおいても塩に感受性を示す物と、耐性を示す物があり、それら遺伝的なものであることが示された。なお、本研究は水耕栽培条件下で行ったが、礫耕、砂耕により感受するNaCl濃度が異なる。本研究では特別の水耕栽培装置を組立てて、再現性があり、遺伝子単離や生理解析にも応用できるシステムを確立した。

調査したパンコムギ遺伝資源の中から、ウイグル地方で収集してきた在来品種の中に塩耐性系統と感受性系統の両者があり、それらを将来のパンコムギ遺伝解析と育種の素材として選抜できた。しかし、塩耐性系統は必ずしも地雷品種群の中にが多数あったわけではなく、むしろ欧米や朝鮮の近代品種の中にも見つけられた。これらは塩耐性系統として選抜されてきたわけではないが、品種育成の過程で乾燥耐性等の選抜指標が塩耐性と関与した結果ではないかと推察できる。

塩に関する染色体解析では、Dゲノム染色体の4種が関与していることが示唆された。パンコムギのDゲノムは、野生種タルホコムギ (*Aegilops squarrosa*) をその起源としている。タルホコムギは、パキスタン、アフガニスタン、イランにわたり分布しており、種内の変異も大きい。コムギがDゲノムを持つことにより、環境適応を高め、寒冷地、乾燥地に広く栽培されるようになった進化過程も含め、Dゲノムの持っている環境適応の遺伝子は重要な遺伝資源といえる。塩反応性の遺伝解析においてDゲノム種の分析は興味ある課題であり、育種についてもDゲノム遺伝子の活用が有効であろう。

コムギの分けつ期における塩感受性・耐性は、発芽のそれとは独立の機構が働いていることが示唆された。また、分けつ期植物の塩感受性・耐性と形態形質との相関は見つからなかった。これらのことは、塩反応性が、植物の成長過程の生理状態によって異なることを意味している。耐塩性の系統が春播き性のものが多いという結果は、生育形質との関連を示唆している(本実験は20度C前後の温室条件下で行っている)。

本研究において、NaCl処理により誘導される遺伝子断片を単離することができた。同定できた全ての遺伝子は塩により誘導される物としては未報告のものであ

った。これは、初期の発現産物であることと、用いた解析系が微量な遺伝子発現を調べられるシステムであったこととに由来しよう。今後、それらの遺伝子の機能と感受性・塩耐性の関係を調べていくことはきょうみある。

5. 結論および今後の研究課題

本研究の本年度の目的は、コムギの塩耐性/感受性の遺伝解析のシステムの基礎開発であったが、以上のように、ほぼ、その目的を達することが出来た。

従来、コムギはその類縁のオオムギにくらべ、耐塩性が低いとされてきた。しかし、進化的にみて、イネ科の近縁関係の両者が独自の進化適応・栽培化の道をたどったとは考えにくい。元来、イネ科植物は乾燥適応型として進化してきたことから、耐乾燥性と密接に関連する耐塩性の遺伝機構をコムギで解明することは有効なものであるといえる。また、コムギは、豊富な遺伝資源(遺伝的変異系統)が収集されており、また、遺伝解析のための突然変異系統、同質遺伝子系統、染色体変異系統、等が備わっており、環境反応性の遺伝解析のモデル植物としても有効である。本研究において、塩耐性/感受性に関しても、コムギ系統に大きな遺伝変異が存在することが示され、染色体解析と分子解析を進めていく上での基礎が確立した。

以上の研究により今後は以下の課題で研究を進めていく展望が出てきた。

(1) 生育に関する遺伝子系統による解析により、塩耐性と植物の生育との関係を明らかにする。

(2) 単離した塩ストレス誘導の遺伝子の機能解析を行うと共に、塩耐性との関連を明らかにしていく。

(3) 組換え純系系統(Recombinant Inbred Lines)による塩耐性/感受性遺伝子群の染色体上の詳細な位置を明らかにする。特に塩反応性のQTL(量的形質遺伝子座位)を明らかにして塩処理誘導遺伝子との関連を検討する。

(4) 解析した塩ストレス誘導遺伝子、生育形質、連鎖するDNAマーカーを標識にして、コムギの耐塩性コムギの育種へと応用する。

6. 研究成果の公表

- (1) 笹隈哲夫・杉谷裕嘉子・上庄あかね 1996. コムギ類の耐塩性の研究 I. 耐塩性と播性の関係。本育種学会第89回講演会。育種学雑誌46(1)

- (2) 笹隈哲夫・杉谷裕嘉子・辻本壽 1996. コムギ類の耐塩性の研究 II. ふたたび耐塩性と播性の関係について。本育種学会第90回講演会。育種学雑誌46(2)
- (3) 根本泰江・川上直人・笹隈哲夫 1996. コムギにおける塩ストレス応答遺伝子の解析。日本育種学会第90回講演会。育種学雑誌46(2)

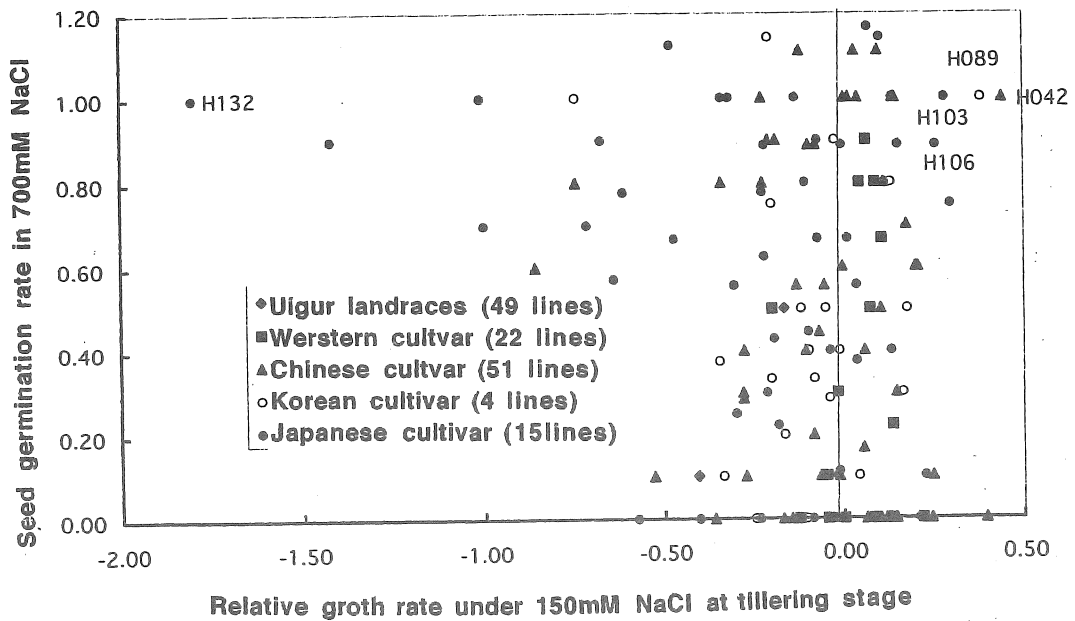


Fig. 1. Distribution of NaCl tolerant lines on plant growth and seed germination

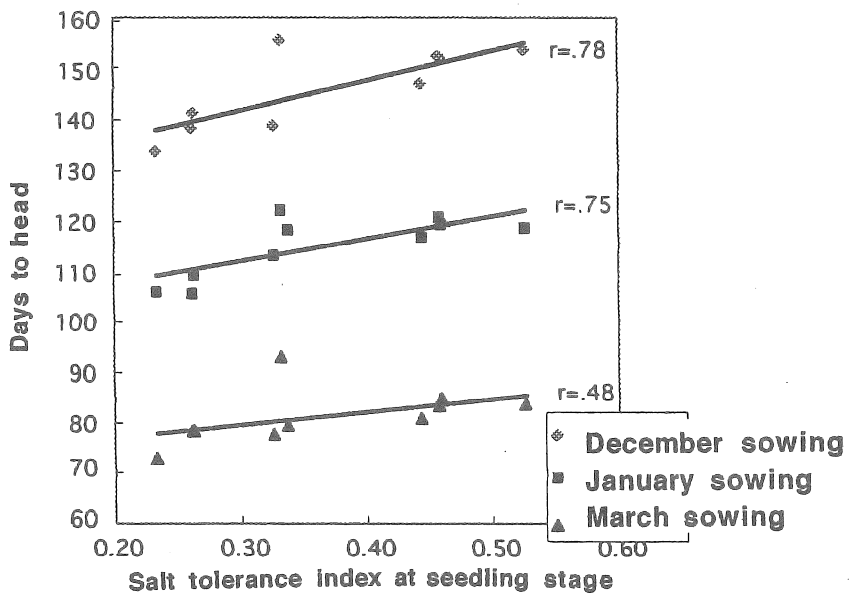


Fig. 2. Correlation between heading date and salt-tolerance in vernalization requirement isogenic lines of wheat

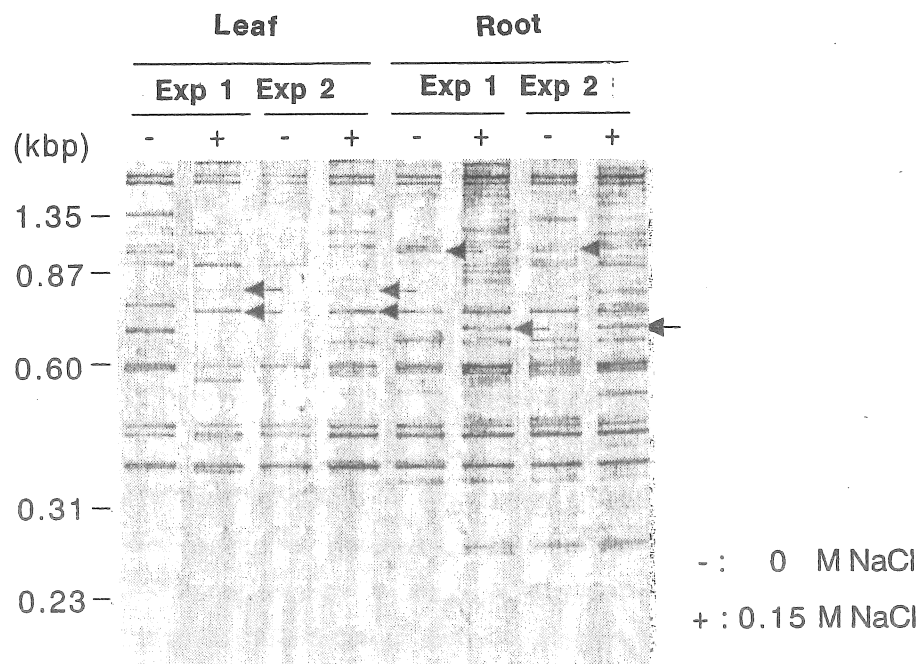


Fig. 3. Detection of NaCl-responding genes by the improved differential display method

Table 1. NaCl responding genes isolated from wheat

Clone name	Tissue	Size (bp) of PCR fragment	Size (kbp) of transcript product	Sequence homology
BL14-1	Leaf	605	1.7	Rice EST clone
BL16	Leaf	301	1.9	Arabidopsis EST clone
Br10-56	Root	366	1.3	Zink-finger motif
BR17-87	Root	719	1.5	Glucose-6-phosphate Dehydrogenase

Salt-responding genes in wheat

Tetsuo SASAKUMA¹⁾, Hisashi TSUJIMOTO¹⁾, Yasue NEMOTO¹⁾,
and Takashi ENDO²⁾

1) Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University

2) Faculty of Agriculture, Kyoto University

Summary

Salt (NaCl) sensitivity-tolerance was examined among genetic resources of common wheat (*Triticum aestivum*) including modern varieties of various countries as well as land-races collected from China. All wheat plants wilted to die when they were treated with more than 300mM NaCl solution. Sensitivity test was conducted with the selection system where wheat plants of various genetic resources at seedling stage were transferred into a hydroponic system containing culture media supplemented with 150mM NaCl. Salt tolerance was evaluated on the bases of growth rate (DW) in comparison with the control condition. Result indicated that there was a large genetic variation of salt sensitivity-tolerance among common wheat lines, and that tolerant lines were not necessary from land-races but from modern varieties. Several tolerant and sensitive lines were selected as the resource materials for genetic analysis and for salt-tolerant breeding.

Chromosome substitution lines were used to identify the responding gene locations to salt. It was proved that chromosome 3D, 4D, 5D and 6D were responsible for NaCl sensitivity among 21 sets of wheat chromosomes.

By an altered differential display method with PCR, specific gene expression were examined in the leaves and roots for responding to salt, where the seedling plants were treated with 150mM NaCl and the mRNA were isolated after 3 hours of the treatment. Among 32 differential products identified in the display, 6 gene were successfully cloned, and their DNA sequences and expression patterns were examined. All the isolated genes were the not-reported ones for the salt response, while two had sequence homology with G6PD gene and a type of transcription factor. These genes should be examined for the relation to the salt-sensitivity/tolerance in wheat.