

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14624

研究課題名(和文) バイオリファイナリー産業を加速化するソルガム高糖性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of sorghum genes controlling brix to accelerate the biorefinery use

研究代表者

佐塚 隆志 (Sazuka, Takashi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：70362291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：バイオリファイナリーにおいて発酵原料となる糖は重要であり、糖生産作物の高糖性遺伝子はその鍵遺伝子である。我々のこれまでの研究から、スイートソルガムSIL-05は高糖性遺伝子座(qBRX-6)によって、稈に多量の糖を蓄積することが明らかになっている。しかし、その近傍に開花遺伝子Ma1/SbPRR37が座乗するため育種の障害となっていた。そこで、この2つの遺伝子の物理位置関係を明らかにすることを目的に本研究を行った。染色体部分置換系統SL-6を用いた連鎖解析の結果、qBRX-6の座乗領域を190kbに絞り込むことに成功し、これらを切り分けて導入することが可能なDNAマーカーを樹立した。

研究成果の概要(英文)：In biorefinery, sugar is a key molecule, and genes controlling brix is the key genes. In our previous studies, the introgression of a QTL associated brix (qBRX-6) detected in sweet sorghum (SIL-05) increased the brix score in culm. However, Ma1/SbPRR37 disturbed the marker assisted selection in breeding, because it located nearby qBRX-6. In this study, we narrowed down the candidate region of qBRX-6 into about 190kb using a chromosome segment substitution line. Based on this results, we established a DNA marker that can distinguish two loci.

研究分野：植物分子育種

キーワード：ソルガム 高糖性 QTL Ma1 SbPRR37

1. 研究開始当初の背景

近年では石油代替エネルギーや二酸化炭素削減などが国際社会の課題となり、また、資源の乏しい我が国では新規産業シーズが求められ、バイオエタノール生産やバイオプラスチック生産など(ここではバイオリファイナリーと呼ぶ)に対して、バイオマスをどのように利用するのが盛んに議論されてきた。しかし、バイオマスの糖化には多くのエネルギーとコストがかかることから、糖そのものを原料とする方がはるかに現実的であると考えられている。つまり、バイオリファイナリーにおいて糖は鍵分子であり、糖生産作物の高糖性遺伝子は鍵遺伝子である。

ソルガムは、高バイオマス品種(4m以上にもなる)やサトウキビ同様に稈に多量の糖を蓄積するスイートソルガム(糖度約20%) (図1)が知られているが、単糖比率が高く結晶糖とならないため、現在では食用にほとんど利用されていない。我々はこれまで、(1)スイートソルガム(高糖性)とグレイソルガム(低糖性)のQTL解析を行い、高糖性遺伝子座 *qBRX-6* を明らかにし(図2)、(2)連続戻し交雑によって、この遺伝子を高バイオマスソルガムに集積(QTLピラミディング)することで、高糖収量品種の育成を行っている(<http://nc-carp.org/project>)。ソルガムは、サトウキビやテンサイと比べ栽培適地が広く(熱帯~温帯)、また耕作不適地(塩害地、半乾燥地帯など)に強いことから、この新規な高糖収量品種は食料と競合しないバイオリファイナリー作物としての利用が期待されている。実際、我々は神戸大学との共同研究によって、スイートソルガムの搾汁糖液を原料として、バイオエタノール発酵やバイオプラスチックの原料であるフェニル乳酸の発酵に成功している。

しかしこの育種では、次のことが問題となっている。*qBRX-6* の座乗領域は広い領域(約2 Mb)にしか絞り込めていない。その理由は



図1 スイートソルガム(SIL-05)

(1) 候補領域内にソルガムの開花期遺伝子 *Ma/SbPRR37* が座乗し、*qBRX-6* 遺伝子とタイトに連鎖することから、糖度にも影響を与えてしまうこと、また、(2) 糖度は遺伝的要因に比べ環境要因に大きく影響される形質であるためである。この *qBRX-6* 遺伝子座を育種に活用する場合、*Ma/SbPRR37* が必ず連鎖(ヒッチハイク)してしまうため、本来の出穂期と異なってしまい、諸々の悪影響を生じる可能性もある。

2. 研究の目的

qBRX-6 のみを DNA マーカー育種に利用するため、*qBRX-6* 遺伝子の候補領域を絞り込み、*Ma/SbPRR37* との物理地図上の位置関係を明確にする。

3. 研究の方法

(1) 試験圃場

灌水など植物育成環境を制御できる精密圃場を設置し、灌水量を制御できるように計画した。

(2) 試験材料と方法

本申請に向けて3年前から染色体部分置換系統 SL-6 を準備してきた(図2)。この SL-6 系統の作成では、まず低糖性ソルガム品種(74LH3213)とスイートソルガム品種(SIL-05)を交配した F1 個体に 74LH3213 を連続戻し交雑した。その過程で高糖性遺伝子座である *qBRX-6* が残存するように、戻し交雑後の幼苗育成の各段階で、この遺伝子座に

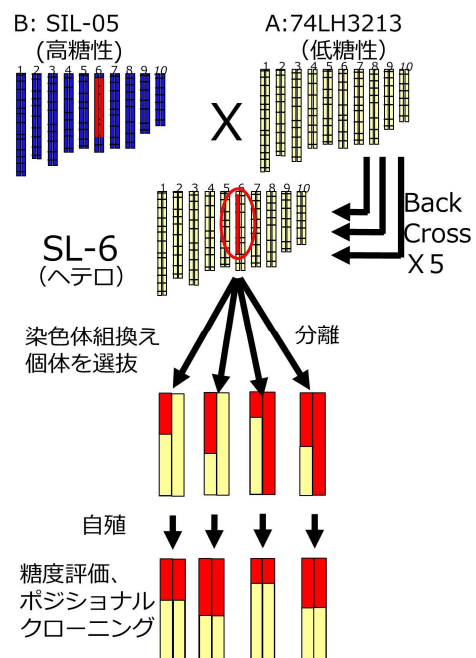


図2 高糖性遺伝子 *qBRX-6* 同定のための染色体部分置換系統を用いた分離系統の育成

設置した DNA マーカーを用いて *qBRX-6* 残存個体を選抜し、これを繰り返した。この結果、SIL-05 由来 *qBRX-6* が残存した 74LH3213 が作出され、これを染色体部分置換系統 SL-6 とし本研究に供試した。

(3) 糖度評価とポジショナルクローニング

これまでの予備試験から、搾汁液の糖度評価は出穂後 30 日以降が適正な時期であることが示唆されていた。そこで、出穂後 30 日に稈の中央節間の中央部を約 1cm 切り取り搾汁し、搾汁液の糖度をブリックス計で測定した。また、小型微分光計測システムを用いた非破壊糖度測定法も試みた。

(4) 次世代シーケンサーを用いたスイートソルガム SIL-05 のリシーケンシングと RNA-seq 解析

スイートソルガム品種 SIL-05 ゲノムのリシーケンシングを試み、そしてこれまで公開されているリファレンスゲノムであるグレイソルガム品種 BTx623 のゲノム配列と比較した。また、SIL-05 の出穂期（稈の糖が蓄積する前）及び登熟期（稈の糖が蓄積している時期）の節間から RNA を抽出し、RNA-seq 法で発現解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 試験圃場として、愛知県愛知郡東郷町にある名古屋大学大学院生命農学研究科附属東郷フィールド科学教育研究センター内の温室に、灌水など植物育成環境を制御できる精密圃場を設置した。精密圃場には各畝に灌水チューブを設置し、灌水量を制御できるようにした。この結果、育成された系統の形質評価において環境要因（病虫害、及び灌水量）の低減が確認された。

(2) 本試験では、SL-6 の派生系統で *qBRX-6* がヘテロの系統を用いた。この後代の苗を育成し、*qBRX-6* 内に設定した複数の DNA マーカーを用いてジェノタイピングを行い、*qBRX-6* 領域内で組換えを起こした 8 系統 (SL-6(1) ~ SL-6(8)) を選抜した。これらの系統は、今回の温室での実験材料の基準となる草丈約 2m を満たしていた（草丈が 3m 程度になると精密圃場の天井に当たるため、不適である）。このことから、温室内での評価が可能となった。この選抜系統の後代を精密圃場へ展開し、ジェノタイピングを行ったのち、候補領域内ヘテロ領域が SIL-05 型ホモ、74LH3213 型ホモとなった系統を選抜した（図 3）。これらは、候補領域内で組換えのある系統と、候補領域内で組換えのない系統、つまり比較対照となるコントロール系統である。これら対となるセット系統（図 3 では SL-6(1)_a、または SL-6(1)_b と表記）をそれぞれ 8 個体の糖度を評価し、連鎖解析による候補領域の絞り込みを行った。

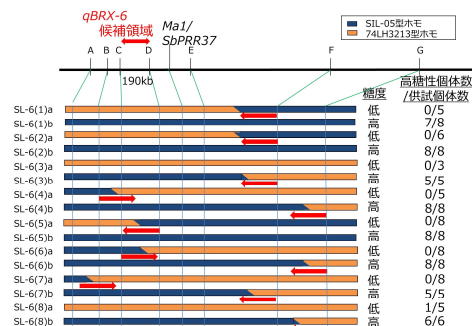


図 3 高糖性遺伝子 *qBRX-6* 候補領域の絞り込み

(3) 評価はまず、節間を破壊して得た搾汁液をブリックス計にて計測した。次に、小型微分光計測システムを用いた非破壊糖度測定法も試みた。この結果、双方の値は概ね一致したが、今回はより信頼性の高い、破壊して測定した実測値を用いて連鎖解析を行った。

以上、(1)-(3)の結果を用いて連鎖解析を行った結果、*qBRX-6* の候補領域を約 190 kb に絞り込むことに成功した（図 3）。また、*qBRX-6* の候補領域から *Ma/SbPRR37* が外れた。このことから、*qBRX-6* と *Ma/SbPRR37* を区別して DNA マーカー育種することが可能となり、本研究の主な目的は達成された。

(4) SIL-05 のゲノムのリシーケンシングを行った結果、*qBRX-6* の候補領域のゲノム配列が明らかとなった。また、SIL-05 の出穂期及び登熟期の節間の RNA-seq 法を行った結果、候補領域内の転写領域、及び節間での発現量が明らかとなった。

そこで、シロイヌナズナやイネで詳しく研究されている糖の合成代謝遺伝子及び糖の輸送体について、候補領域内に座乗遺伝子を選抜し、(3)と(4)のデータと比較した。その結果、既知の遺伝子には有力な候補は見いだされなかった。このことから、*qBRX-6* の原因遺伝子は新規遺伝子であることが予想された。シロイヌナズナはもちろん、イネも節間に高い糖濃度を蓄積する能力を有さない。このことから、*qBRX-6* はイネ科の中でもキビ亜科などで農業有用形質として独自に選抜された遺伝子である可能性も考えられた。今後は、この萌芽研究を基盤とし、*qBRX-6* 遺伝子のクローニング及び機能解析について科研費(B)にて引き続き研究続ける予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawaguchi H, Sasaki K, Uematsu K, Tsuge Y,

Teramura H, Okai N, Nakamura-Tsuruta S, Katsuyama Y, Sugai Y, Ohnishi Y, Hirano K, Sazuka T, Ogino C, Kondo A. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour Technol.* 査読有、198 巻、2015、410-417
doi: 10.1016/j.biortech.2015.09.024.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ソルガム改良植物
発明者：佐塚隆志、春日重光
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2016-008121
出願年月日：平成 28 年 2 月 22 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐塚 隆志 (SAZUKA, Takashi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センタ

ー・准教授

研究者番号：70362291

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし