

令和元年8月30日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04859

研究課題名(和文) ソルガムのバイオリファイナリー最適化育種の基盤となる高糖性と開花期の研究

研究課題名(英文) A study on sweetness and flowering time as a basis for biorefinery optimization breeding of sorghum

研究代表者

佐塚 隆志 (SAUZKA, 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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：スイートソルガムはサトウキビ同様、茎に糖液を蓄積する性質を有するが、殆ど食用に用いられておらず、バイオリファイナリー利用が期待されている。本研究ではその搾汁液の高糖性に注目し、その責任遺伝子座qBRX-6を解析した。その結果、(1) qBRX-6は複数の責任遺伝子が複合して座乗していると考えられ、かつ、環境要因にも影響を受けていること。(2) その内の1つの候補遺伝子領域を狭めた結果、5つの遺伝子に絞り込んだこと。(3) 別の候補遺伝子として、SbPRR37の可能性も検討した結果、スイートソルガムのアレルは部分的機能欠失であり、これが原因で糖の転流に影響を与えている可能性、などが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代・未来社会において、エネルギー創出に貢献するバイオエタノール生産や、バイオプラスチック生産などのバイオリファイナリー産業の基本原料は糖である。しかし、これまでサトウキビなどの糖原料作物において、糖の産生の原因遺伝子は明らかにされていなかった。本研究は、スイートソルガムを糖原料作物のモデル作物と位置付け、遺伝学的及び分子遺伝学的観点から、どのような遺伝子座及び遺伝子が糖の産生に関与しているのかについて解析を進め、学術的理解を深めた。さらに低炭素社会など、持続可能な開発目標(SDGs)の達成に向けた社会の基盤作りへ向けて、農学や育種学の貢献が重要であるという社会的意義を示した。

研究成果の概要(英文)：In the biorefinery industry such as bioethanol and bioplastics production for the "non-petroleum society", the basic raw material is sugar. In this study, we focused on the high sugar content of sweet sorghum juice and analyzed its responsible locus qBRX-6. As a result, (1) qBRX-6 is considered to be a complex locus of multiple responsible genes, and also influenced by environmental factors. (2) As a result of narrowing down one of the responsible genomic regions, five genes were assigned. (3) As a result of examining also the possibility of SbPRR37 as another candidate gene, the sweet sorghum allele is partial loss-of-function, which may have an influence on the translocation of sugar in plant.

研究分野：植物育種学

キーワード：ソルガム バイオリファイナリー PRR37



図1 スイートソルガム (SIL-05)

1. 研究開始当初の背景

石油代替エネルギーや二酸化炭素削減などの国際社会の課題に対する科学技術に基づく研究開発の方向性に、バイオリファイナリー研究がある。バイオリファイナリーとは、バイオエタノールだけでなく、より付加価値の高いバイオプラスチックやバイオ繊維など、植物由来の高機能化学製品を生産することである。その原料には糖が使われており、バイオマス由来のセルロースなどを糖化することによって糖を得る方法が長い間議論されてきた。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。このことを考えれば、植物が産生する糖そのものを原料とする方がはるかに現実的である。しかし、これまでどの主要な糖産生物においても高糖性遺伝子は明らかにされていなかった。

スイートソルガムはサトウキビ同様に稈に多量の糖を蓄積するが(糖度約20%)(図1)その糖液は、煮詰めても結晶糖とならないため、現在では食用糖に全く利用されていない。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)の雑種集団を用いたQTL解析を行い、高糖性遺伝子座 *qBRX-6* を明らかにし、(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、高糖性新品種の育成を行い、糖多収の新F₁品種(品種名:炎龍、品種登録中)を作出した(図2)。これは、育種学研究がバイオリファイナリーに貢献できる可能性を示した世界でも初めての例である。



図2 高バイオマス高糖性品種「炎龍」(品種登録申請中)

2. 研究の目的

本研究では、砂糖原料には用いられないため砂糖価格に影響のないスイートソルガムに注目し、その高糖性遺伝子の同定を目指し、バイオリファイナリーに最適化したソルガムのゲノム育種の基盤を構築することを目的とした。

ここで問題となるのは、*qBRX-6* 遺伝子と開花(出穂)期遺伝子 *Ma1/SbPRR37* が連鎖していることである(図3)。もし、*qBRX-6* 遺伝子が同定されれば、*Ma1* を含まないゲノム断片を作成し *qBRX-6* のみを育種に利用することができる。また、開花期遺伝子が糖度にどれほど影響するかについての研究報告がほとんどなかった。そこで本研究では、(1) *Ma1/SbPRR37* の同定、(2)高糖性とは独立の遺伝子座に座乗する *Ma6/Ghd7* の開花期遺伝子と高糖性の関係解明を目的とした。

3. 研究の方法

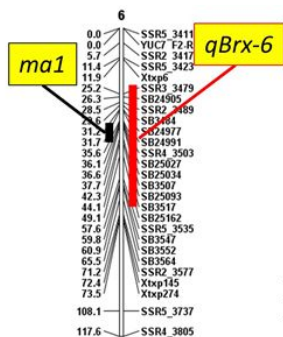


図3 第6染色体における *Ma1/SbPRR37/Hd2* 及び *qBRX-6* の座乗位

試験圃場として、名古屋大学東郷フィールド内の温室に植物育成環境を制御できる精密圃場を設置した。試験材料として、低糖性品種 74LH3213 を背景とし、*qBRX-6* 候補領域をスイートソルガムのゲノムに置換した染色体部分置換系統(SL-6)の置換領域分離集団を用いて、原因遺伝子の候補領域の絞り込みを目指した。また、親品種ゲノムDNAのリシーケンシング解析及びRNA-seq解析を行い、候補遺伝子の同定を行った。また、開花期と糖度との関係を解析するために、新たな染色体部分置換系統(SL-6s)の作出も行った。

4. 研究成果

(1)染色体部分置換系統を用いた *qBRX-6* 遺伝子のクローニング

本研究前の予備試験では、染色体部分置換系統 SL-6 を用いて *qBRX-6* 候補領域の絞り込みを行い、順調な結果が得られた。そこで本研究ではまず、この SL-6 由来のマッピング集団を用いて大規模展開を行った。この染色体部分置換系統 SL-6 は、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 を連続戻し交雑を行い得られた系統である(図4参照)。この過程では高糖性遺伝子座である *qBRX-6* が残存するように(図4赤丸部分)

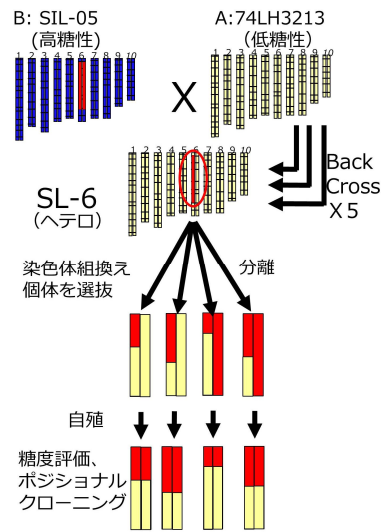


図4 高糖性遺伝子 *qBrx-6* 同定のための染色体部分置換系統を用いたポジショナルクローニング

ノム配列であり、スイートソルガムではこの領域のゲノム DNA 配列が異なるという可能性であった。そこで、この候補領域を含む SIL-05 の BAC ライブラリーのスクリーニングを行い、その BAC DNA の次世代シーケンシングを行った。この結果、この領域に大きな InDel はなかったが、SIL-05 ゲノムでは、新たに 5 つのタンパクコード領域 (ORF) が予測された。この 5 つの ORF はいずれも 100bp 以下の小さい ORF であり、4 つは既知遺伝子との相同性も見つからなかったが、1 つ (図6の ORF(a) 遺伝子) は ATP-dependent protease La と相同性があった。特に重要な点として、ORF(b) と ORF(d) には、それぞれ 346bp、239bp の挿入配列が SIL-05 (スイートソルガム) に見出されたが、子実型ソルガム BTx623 (リファレンスゲノム) には存在しなかった。そこで、我々のグループが有する子実型ソルガム 33 系統とスイートソルガム 96 系統を調査したところ、33 系統の子実型ソルガムは全てこの挿入が存在せず、一方、スイートソルガムは 346bp の挿入は 4 系統に、239bp の挿入は 23 系統に存在していた。特に 346bp の挿入はアフリカ在来種に、239bp の挿入はアフリカ在来種とアジア在来種に存在していた。以上、この挿入配列が高糖性の原因である直

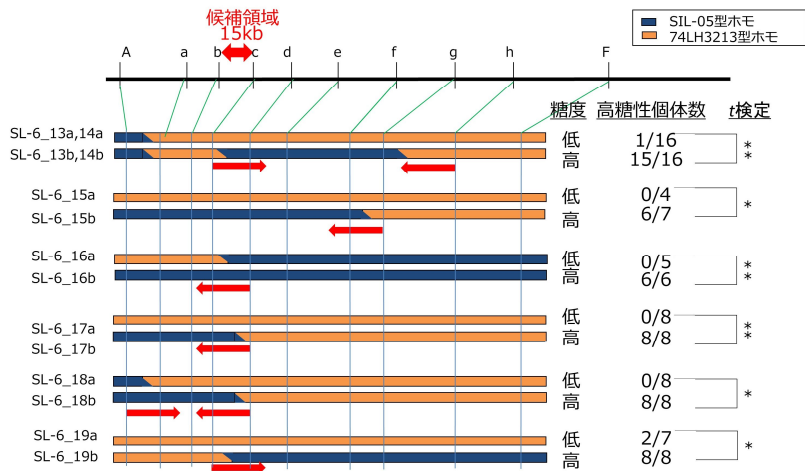
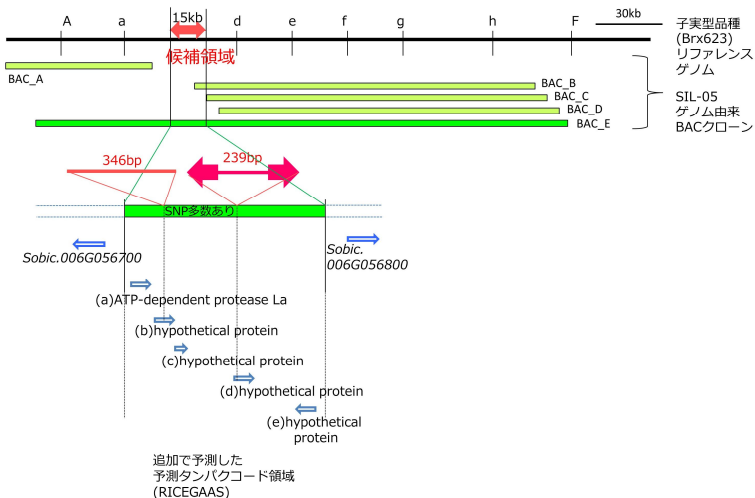


図5 高糖性遺伝子 *qBrx-6* 同定のための染色体部分置換系統を用いたポジショナルクローニング

それぞれ 346bp、239bp の挿入配列が SIL-05 (スイートソルガム) に見出されたが、子実型ソルガム BTx623 (リファレンスゲノム) には存在しなかった。そこで、我々のグループが有する子実型ソルガム 33 系統とスイートソルガム 96 系統を調査したところ、33 系統の子実型ソルガムは全てこの挿入が存在せず、一方、スイートソルガムは 346bp の挿入は 4 系統に、239bp の挿入は 23 系統に存在していた。特に 346bp の挿入はアフリカ在来種に、239bp の挿入はアフリカ在来種とアジア在来種に存在していた。以上、この挿入配列が高糖性の原因である直

図6 スイートソルガム (SIL-05) と子実型ソルガム (BTx623) における *qBRX-6* 候補領域の構造



接的な証拠は得られていないが、少なくともこの挿入配列は高糖性遺伝子座乗するゲノム断片に連鎖し、その由来はアフリカ（もしくはアジア）由来である可能性が示唆された。また、次世代シーケンサーによって SIL-05(スイートソルガム)の RNA-seq を行ったが、残念ながら候補領域の明確な発現は確認できなかった。さらに、次年度にはこの *qBRX-6* 候補領域のさらなる絞り込みを行ったが、前年度とは異なり、糖度と遺伝子型との間には有意な連鎖が見られなかった。このことから、*qBRX-6* は環境要因や複数の遺伝子に影響される典型的な量的形質であることも示唆された。

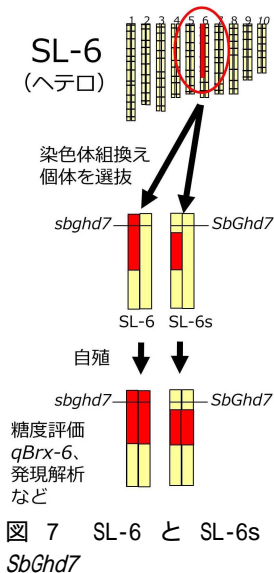


図 7 SL-6 と SL-6s の *SbGhd7*

(2) 搾汁液の糖度と開花期の関係性

糖度と開花期の関係性を明らかにするため、74LH3213 をゲノム背景とし、第 6 染色体の一部をスイートソルガム SIL-05 ゲノム断片（長腕に高糖性 QTL、*qBRX-6* を含む）に置換した 2 つの染色体部分置換系統、SL-6、及び SL-6s を系統化した（図 7）。SL-6 は、第 6 染色体短腕のソルガム開花遺伝子 *Ma6/SbGhd7* が機能欠失型（SIL-05 アレル）であり、SL-6s は、それが機能型（74LH3213 アレル）となるようにデザインした。すなわち、SL-6 と SL-6s は共に高糖性遺伝子を有するが、開花期の異なることが期待される NILs である。この二系統を糖性比較実験に供試した。

この開花調査の結果、予想外なことに SL-6、SL-6s は共に開花期が早生型（74LH3213 の表現型）となった。このことから、74LH3213 では *Ma6/SbGhd7* が機能していない可能性が示唆された。そこで 74LH3213 ゲノムにおける他の開花期遺伝子の配列を調べたところ、第 1 染色体に座乗する *Ma3/PhyB* 遺伝子が機能欠失型であることが明らかとなった。イネでは、出穂期の情報伝達モデルとして、*Ghd7* が *PhyB* の下流に位置することが示唆されている。このことから、ソルガムでも *Ma6* は *Ma3* の下流に位置しており、*Ma3* が機能欠失している 74LH3213 背景では *Ma6* が機能していないことが示唆された。この実験結果は作業仮説どおりではなかったが、予想外に得られた知見として、ソルガムの開花期における *Ma6* と *Ma3* の相互作用を明らかにした点で進捗があった。

(3) *Ma1/SbPRR37* 遺伝子と高糖性との関係性

(1)の結果から、*qBRX-6* 遺伝子座は典型的な量的形質であり、形質値は環境要因に大きく左右され、また原因遺伝子は複数座乗している可能性も想定された。もし、原因遺伝子が複数ある場合は連鎖解析による遺伝子の同定は困難である。そこで今後の研究の方策として、*qBRX-6* 候補領域にタイトに連鎖している *Ma1/SbPRR37* 遺伝子に注目し、この遺伝子そのものが、高糖性の原因遺伝子の 1 つであるかどうかには焦点を絞り、研究を進めることにした。*Ma1/SbPRR37* 遺伝子は、ソルガム育種では登熟期遺伝子 *ma1* として知られる変異があり、現在の品種を含む様々な品種に広く利用されている重要遺伝子である。また、そのイネのオルソログ遺伝子 *PRR37* は、出穂期遺伝子である *Heading date2 (Hd2)* と考えられている。一方、シロイヌナズナのオルソログ遺伝子（*PRR3*, *PRR7*）の研究では、生物時計遺伝子として位置づけられている。出穂期や生物時計に関わるといことは、糖の転流に直接的、或いは間接的に関わっている可能性も考えられた。そこで、まず *qBRX-6* 遺伝子座を有する品種、SIL-05 の *SbPRR37* アレル及び、他品種由来のアレルを決定した。次に、

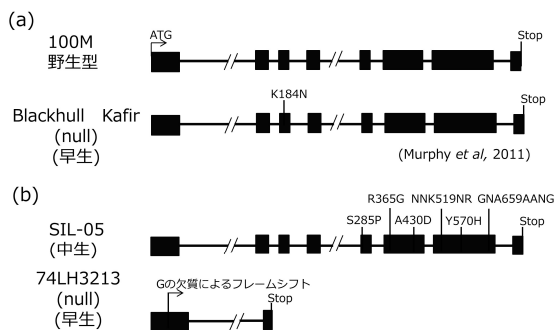


図 8 *SbPRR37* 遺伝子のアレル (a)Murphy らによる報告、(b)本研究による報告

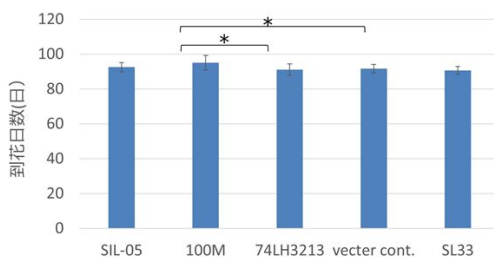


図 9 ソルガムの *SbPRR37* のアレルを形質転換したイネの出穂期（到花日数）
* ; $p < 0.05$

ソルガムの *SbPRR37* 遺伝子について、SIL-05 アレル、機能型アレル、機能欠失アレルの 3 つのアレルを用いたイネへの形質転換実験を行なった。イネでは *PRR37* 遺伝子が機能欠失型の染色体断片置換系統 (SL-33; 農業生物資源ゾーンバンクより分譲して頂いた) が樹立されていたので、これに形質転換することで、野生型なのか、機能欠失型なのか、或いは機能獲得型なのかを明らかにすることにした。

まず、*qBRX-6* を有する品種 SIL-05 (出穂期は中生) をリシーケンシングし、全ゲノム配列を解析した。その結果、この品種は遺伝的固定が完全

ではなくヘテロ領域も見つかったが、*PRR37* 領域については特に目立ったゲノムレベルの変異（重複、転座、逆位など）は見出されなかった。次に、SIL-05 及び他品種の *PRR37* アレルについて検討した。この結果、SIL-05 アレルは以前我々が予備的に指摘したように、野生型アレルと比較し 10 ヲ所のアミノ酸が置換及び欠失していた（図 8）。一方、早生品種 74LH3213 は、第一エキソンにフレームシフトを起こす null 変異が置いていた。以上、SIL-05 のアレルの特殊な配列が再確認されたが、それが、野生型アレル、機能獲得型アレル（neomorph や hypermorph など）、機能欠失アレル、部分的機能欠失アレル、などのいずれかなどの知見は全くなかった。そこで、この SIL-05 アレル、機能獲得型（野生型）アレル（100M）、機能欠失型アレル（74LH3213）の 3 つのアレルを有するゲノム断片を供試し、日本晴背景で *PRR37* 遺伝子座が機能欠失型に置換したイネの染色体断片置換系統 SL-33 に形質転換し、この SIL-05 アレルについて検討した。その結果、出穂期を形質値の指標とした場合、SIL-05 は部分的に機能を欠失したアレルであることが明らかとなった（図 9）。このことから、このアレルの部分的機能欠失性が高糖性への寄与している可能性も考えられた。

以上、これまでの実験結果をまとめて考察すると、次の三点が考えられた。(1) *qBRX-6* は量的遺伝子座であり、複数の遺伝子が原因で、かつ環境要因に影響を受けている可能性が高いこと。(2) 候補遺伝子領域（図 6）の 5 つの遺伝子はその候補の一つであること。(3) 一方、*SbPRR37* の SIL-05 アレルは部分的機能欠失であり、生物時計が微妙に狂うことで糖の転流に異常をきたしている可能性もあり得ること。今後、ソルガムの形質転換が容易に行えるようになれば、これらの可能性についてより正確な情報を得ることができると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hirano K, Kawamura M, Araki-Nakamura S, Fujimoto H, Ohmae-Shinohara K, Yamaguchi M, Fujii A, Sasaki H, Kasuga S, Sazuka T, Sorghum DW1 positively regulates brassinosteroid signaling by inhibiting the nuclear localization of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2. *Sci Rep*. 査読有, Vol.7, No.2, 2017, pp.126, DOI: 10.1038/s41598-017-00096-w.

Kobayashi M, Ohyanagi H, Takanashi H, Asano S, Kudo T, Kajiya-Kanegae H, Nagano AJ, Tainaka H, Tokunaga T, Sazuka T, Iwata H, Tsutsumi N, Yano K. Heap: a highly sensitive and accurate SNP detection tool for low-coverage high-throughput sequencing data. *DNA Res*. 査読有, Vol.24, No. 4, 2017, pp.397-405, DOI: 10.1093/dnares/dsx012.

Sasaki K, Tsuge Y, Kawaguchi H, Yasukawa M, Sasaki D, Sazuka T, Kamio E, Ogino C, Matsuyama H, Kondo A. Sucrose purification and repeated ethanol production from sugars remaining in sweet sorghum juice subjected to a membrane separation process. *App. Micbio Biotech*. 査読有, Vol. 101, No. 15, 2017, pp.6007-6014, DOI: 10.1007/s00253-017-8316-3.

Teramura H, Sasaki K, Kawaguchi H, Matsuda F, Kikuchi J, Shirai T, Sazuka T, Yamasaki M, Takumi S, Ogino C, Kondo A. Differences in glucose yield of residues from among varieties of rice, wheat, and sorghum after dilute acid pretreatment. *Biosci Biotech Biochem*. 査読有, vol. 81, No. 8, 2017, pp.1650-1656. doi: 10.1080/09168451.2017.1336922.

Teramura H, Sasaki K, Oshima T, Kawaguchi H, Ogino C, Sazuka T, Kondo A. Effective usage of sorghum bagasse: optimization of organosolv pretreatment using 25% v/v 1-butanol and subsequent nanofiltration membrane separation. *Bioresour Technol*. 査読有, Vol. 252, 2018, pp.157-164. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.100.

Wijaya H, Sasaki K, Kahar P, Yopi Y, Kawaguchi H, Sazuka T, Ogino C, Prasetya B, Kondo A. *Bioresour Technol*. Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* F118 strain. *Bioresour Technol*. 査読有, Vol. 265, 2018, pp.542-547. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.039.

〔学会発表〕(計 7 件)

Sazuka T, Dw1, an Important Gene for Lodging Resistance and Mechanical Harvesting of Sorghum, Encodes a Novel Protein Involved in Cell Proliferation, Plant and Animal Genome XXV, San Diego, Jan. 15, 2017. (招待講演)

藤井昭裕、和田多門、中村(荒木)聡子、倉見慶二郎、篠原(大前)梢、伊藤祐介、北野英己、松岡信、春日重光、佐塚隆志、ソルガム搾汁液の糖収量に関する育種遺伝学的解析、日本育種学会第131回講演会、名古屋、2017年3月30日

佐塚隆志、藤井昭裕、中村(荒木)聡子、和田多門、山口未来、岡村進之介、篠原(大前)梢、伊藤祐介、松岡信、北野英己、春日重光、高バイオマス・高糖収量性を併せ持つバイオリファイナリーに最適化したソルガム新品種「炎龍」の育成、日本育種学会第131回講演会、名古屋、2017年3月30日

川口秀夫、吉原久美子、佐塚隆志、高谷直樹、蓮沼誠久、寺村浩、荻野千秋、近藤明彦、組換え大腸菌によるフェニル乳酸における多様な草本系バイオマス糖化液の発酵阻害とその成分の比較、日本農芸化学会関西支部第501回講演会、神戸、2017年12月2日

丹羽佑介、岡村進之介、中村(荒木)聡子、河江琴奈、篠原(大前)梢、三浦孝太郎、春日重光、佐塚隆志、スイートソルガムの有する新規高糖性QTLの同定を目指した遺伝学的解析、第25回育種学会中部地区談話会、静岡、2017年12月2日

佐々木碩哲、和田多門、中村聡子、大前梢、岡村進之介、藤井昭裕、春日重光、佐塚隆志、花粉親品種における開花期改良の試み、第8回ソルガムワークショップ、東京、2018年1月23日

Sazuka T, Hirano K, Araki-Nakamura S, Ohmae-Shinohara K, Kawamura M, Fujimoto H, Yamaguchi M, Fujii A, Kasuga S, An agronomically important gene, Dw1, encodes a novel component of brassinosteroid signaling, and controls the cell proliferation in internodes, *Sorghum* in the 21st Century, Cape Town, Apr. 9-10, 2018.

〔図書〕(計 1件)

Ordonio R, Ito Y, Morinaka Y, Sazuka T, Matsuoka M, Molecular breeding of *Sorghum bicolor*: A Novel Energy Crop. *Int Rev Cell Mol Biol.*, Vol 321, 2016, pp. 221-257, Elsevier Inc.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

呉健忠 (Jianzhong WU) (農業・食品産業技術総合研究機構)