

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2021

課題番号：19KK0151

研究課題名（和文）孤児作物在来品種の機能性向上を目指した高効率育種システムの確立

研究課題名（英文）Development of a high efficient breeding system for improving functional ingredient of local varieties in orphan crops

研究代表者

大澤 良（Ohsawa, Ryo）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80211788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では葉菜アマランサス（ヒユナ）の機能性向上に資する高効率育種システムを確立することを目的に、国内3研究機関と世界野菜センターによる国際共同研究を進めた。その結果、新しいフェノーム解析技術や成分分析によるヒユナ遺伝資源の特性評価による有用育種素材の同定、最先端のゲノム解析技術を用いた遺伝資源の多様性評価および系統解析による世界初のコアコレクションの構築、ヒユナの全染色体をカバーする17個の連鎖群からなる世界初のヒユナ高密度遺伝地図の構築、ヒユナの主要な機能性成分であるベタレイン生合成に関与する遺伝子座の同定等、世界に先駆けてヒユナ育種基盤の整備を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

孤児作物において、その在来品種が有する環境ストレス耐性等の有益な特性を維持しつつ、栄養・呈味成分等の特定の形質のみを短時間で改良することができれば、開発途上国における孤児作物の新品種開発およびその普及が大きく前進すると考えられる。本国際共同研究では、新しいフェノーム解析技術を用いた遺伝資源の特性評価、最先端のゲノム解析技術を用いた遺伝資源の多様性評価とコアコレクションの構築等、世界に先駆けてヒユナ育種基盤の整備と育種に有用な知見および技術を獲得した。これらの知見や技術は、莫大な時間と労力を必要とする従来型のヒユナの育種を根本的に変革する端緒となり、様々な研究機関で活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：An international joint research among three domestic research institutes and the World Vegetable Center were performed with the aim of establishing a highly efficient breeding system that contributes to improving the functionality of leafy amaranth (*A. tricolor*). As a result, we have acquired useful knowledge and techniques for *A. tricolor* breeding. In particular, we could identify useful breeding materials by characterization of genetic resources by new phenome analysis and traditional ingredient analysis. We successfully constructed a core collection of this species for the first time in the world based on results of diversity evaluation and phylogenetic analysis of genetic resources using the latest genome analysis. In addition, the world's first high-density *A. tricolor* genetic map consisting of 17 linkage groups covering all chromosomes was constructed, and loci involved in betalain biosynthesis, which is one of main functional ingredients of this species, were identified.

研究分野：植物育種学

キーワード：アマランサス 孤児作物 QTL GWAS ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

世界中で持続可能な社会を構築するためには、人々が常に活動的・健康的な生活を送るために必要となる安全で栄養価に富む食料を確保することが特に重要である。先進国ではイネ、コムギ、トウモロコシ等の穀物のほか、栄養・機能性に優れた野菜や果樹等の主要作物の近代品種が次々に育成され、生産・消費されている。一方、開発途上国では極度の高温や乾燥等により、作物によっては単位面積あたりの収量が著しく低く、収穫物の品質が安定しない等の問題がある。また、開発途上国の栽培体系は先進国とは全く異なり、先進国で広く普及している作物やその近代品種をそのまま導入することは難しい。開発途上国の栽培環境では、植物は種々の生物学的・非生物学的ストレスに常にさらされる。このような栽培環境に適応する品種の育成には長い年月とコストがかかることが大きな問題となっている。

熱帯アジアやアフリカ地域に目を転じると、近代的な育種や生産技術の改善等の対象にされてこなかった孤児作物とよばれる農作物が普及している。その在来品種には、現地の劣悪な栽培環境に高度に適応しているものも多い。これらの“孤児作物在来品種”は開発途上国の、特に貧困層の食料安全保障と農家の現金収入に重要な役割を果たしている。しかし、孤児作物の多くは収量、茎葉の形態、栄養・機能性及び食味・食感に関わる形質等に改良が必要な点が多い。孤児作物在来品種の多くは現地の栽培環境に高度に適応しており、この有益な特性を維持することが特に重要である。その上で、生産性の向上、様々な環境ストレス耐性の集積、栄養価の向上、有害物質の除去等が望まれる。現在広く用いられている戻し交雑育種では一旦遺伝的組成を大きく変えてしまうため、特定の遺伝子を導入した後に遺伝的組成を元に戻すのにかなりの時間を要する。そのため、遺伝的背景を変えずに栄養・呈味成分等の特定の形質のみを短期間で改良するための技術が望まれる。

アマランサスはヒユ科ヒユ属植物の総称であり、多くの種は中南米や熱帯アジア原産の一年草である。種子には豊富な栄養素が含まれており、高栄養・高機能性穀物「スーパー・グレイン」の一つとして世界的に普及している。一方、アジアやアフリカ地域ではアマランサスのいくつかの種が古くから野菜として栽培されている。アマランサスの茎葉にも種子と同様にミネラルやビタミン等の人体に有益な成分が多く含まれており、近年、高栄養・高機能性野菜「スーパー・ベジタブル」として、世界的にも注目されつつある。また、耐暑性等の環境ストレス耐性や病害抵抗性が優れており、アブラナ科植物等の主要な葉菜が栽培し難い不良環境下でも容易に栽培できることが知られている。しかし、現状では葉菜アマランサスを対象にした育種分野の基礎的研究は進んでおらず、積極的な品種改良も十分に行われていない。

2. 研究の目的

本課題では孤児作物の育種行程を抜本的に変革するための技術と知見を獲得することを目指し、熱帯野菜の一つである *Amaranthus tricolor* (ヒユナ) をモデルとして、遺伝資源の大規模フェノミクスデータの収集と有用系統の探索および遺伝解析材料の作出、量的形質遺伝子座解析またはゲノムワイド関連解析による主要栄養・呈味成分の遺伝子領域の特定、およびゲノム編集技術等の逆遺伝学的手法の確立を進める。これにより、開発途上国の局所環境に高度に適応した在来品種の遺伝的背景を変えずに、栄養・呈味成分のみを短期間で改良するための技術と知見を獲得する。

3. 研究の方法

遺伝資源の大規模フェノミクスデータの収集と有用系統の探索および遺伝解析材料の作出

世界野菜センターおよび米国農務省ジーンバンクから入手したヒユナ遺伝資源 456 系統を世界野菜センター内実験圃場(台湾台南市)で栽培し、フィールドフェノミクス装置(LeasyScan, Phenospex 社)を用いて生態的・形態的形質を網羅的に計測した。また、本課題で構築したコアコレクション 95 系統を世界野菜センター内実験圃場で栽培し、播種後 1 ヶ月の個体から葉をサンプリングし、糖度、カルシウム、鉄、亜鉛を測定した。

ヒユナの主要な機能性成分であるベタレイン含有量の量的形質遺伝子座(QTL)解析のために、緑色固定系統と赤色固定系統の交雑後代(F₂世代)を作出し、筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター農場(茨城県つくば市)のビニールハウスにおいて、6月播きと9月播きの2回の栽培で、各個体の茎葉色および穂色を評価した。

量的形質遺伝子座解析またはゲノムワイド関連解析による主要栄養・呈味成分の遺伝子領域の特定

世界野菜センターおよび米国農務省ジーンバンクから入手したヒユナ遺伝資源 494 系統と、QTL解析の材料となるF₂分離集団(384個体)からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを制限酵素で切断し、切断末端にアダプターを付加し、アダプターの配列をもとに設計したオリゴDNAをプライマーとしたPCRを行うことで、DNAを増幅した。DNAの塩基配列を次世代シーケンサーで分析し、取得した配列データを高性能計算機で処理した。具体的には、配列データに含まれる

アダプター配列と低品質な配列データを除いた高品質な配列データを葉菜アマランサスのゲノム配列上に整列化することで配列のアライメントを作製し、試料間の配列データの違いをアライメントから抽出し、品質を精査することで、高品質な SNP データを得た。なお、一部の遺伝資源は種の誤同定が疑われたため、葉緑体 DNA の *matK* 領域の塩基配列情報に基づいて種の再同定を行い、ヒユナとは異なる種と考えられた遺伝資源はその後の解析から除外した。遺伝資源の SNP データについて、系統樹を構築するとともに、集団構造解析と主座標分析を行った。

F2 分離集団から得た SNP データに基づいて連鎖解析を行い、遺伝地図を作製した。葉菜アマランサスのゲノム配列と遺伝地図上での SNP データの並びと対応させることで、葉菜アマランサスの染色体規模の配列を構築した。得られた表現型データを併せて QTL 解析を行った。

ゲノム編集技術等の逆遺伝学的手法の確立

ゲノム編集技術の適用に必須となるヒユナの組織培養系の確立を目指し、ヒユナ品種「パイラム」を用いて、培養部位、植物ホルモンの種類および植物ホルモンの濃度について検討した。

4. 研究成果

遺伝資源の大規模フェノミクスデータの収集と有用系統の探索および遺伝解析材料の作出

遺伝資源の評価では、ヒユナ遺伝資源 456 系統の生態的・形態的形質を、フィールドフェノミクス装置を用いて網羅的に計測し、特徴的な系統を選抜した。また、コアコレクション 95 系統の呈味成分や栄養・機能性成分を網羅的に測定し、糖度、カルシウム、鉄等の高含有系統と、シユウ酸低含有系統を選抜した。

緑色固定系統と赤色固定系統の交雑後代 (F2 世代) では赤色と緑色の個体数が 6 月および 9 月播き栽培のいずれにおいても 3:1 の分離比に適合した。胚軸が緑色の F2 個体はすべて本葉も緑色であった。一方、胚軸が赤色の F2 個体のなかには、本葉に赤色が現れない個体が存在した。また、本葉が赤色の個体の中でも赤色の濃さの程度は個体間で異なっており、連続的な変異が認められた。従って、ベタレインの含有量あるいは着色部位の大きさは複数の遺伝子が関与する量的形質であると考えられた。

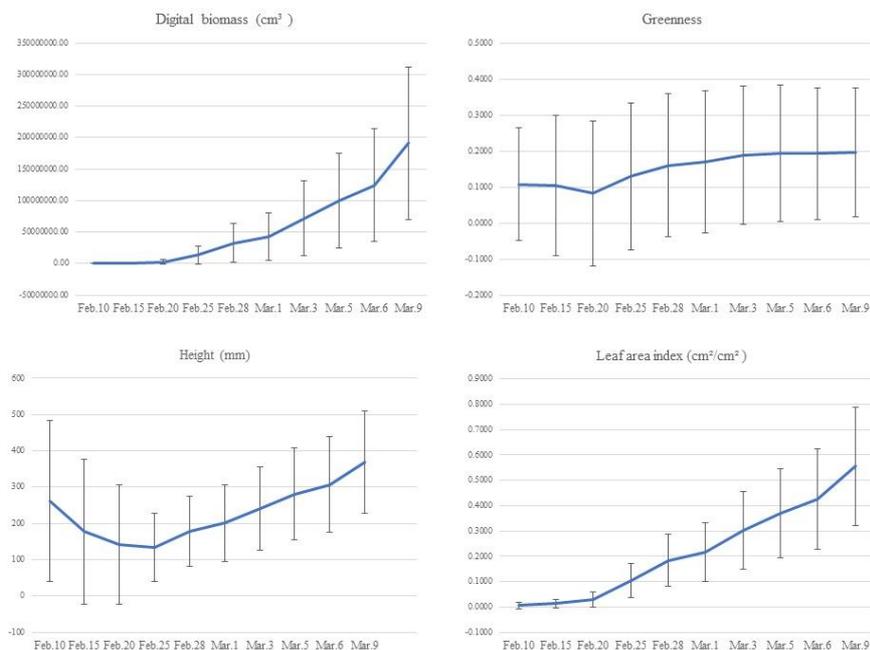


図 1. フィールドフェノミクス装置を用いたヒユナ遺伝資源の特性評価 (全系統の平均値の推移)

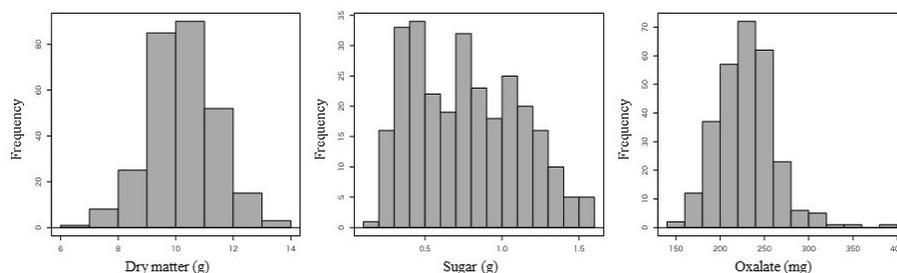


図 2. ヒユナ遺伝資源の乾物重および呈味成分の多様性

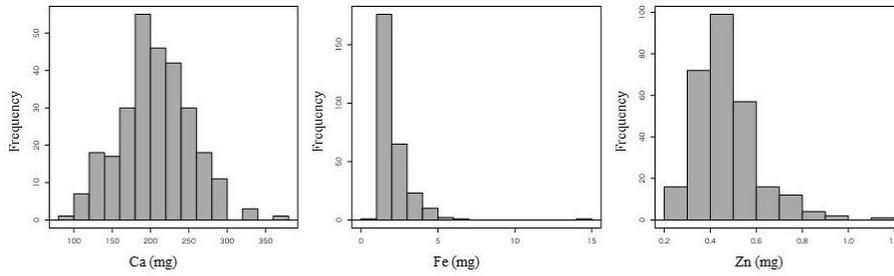


図3．ヒユナ遺伝資源の無機成分の多様性

量的形質遺伝子座解析またはゲノムワイド関連解析による主要栄養・呈味成分の遺伝子領域の特定

ddRAD-Seq解析で得られた5638個のゲノムワイドSNPを使用して、465点のヒユナ系統間の遺伝的多様性と集団構造を明らかにした。また、ヒユナであることが確認できた377系統の遺伝的多様性を表す105系統から構成されるコアコレクションを構築した。

QTL解析の材料となるF2分離集団のddRAD-Seq解析によるジェノタイピングによりSNPデータを取得し、これらのSNPsの連鎖解析を実施することで1126SNPsが座乗するヒユナの全染色体をカバーする17個の連鎖群からなる高密度遺伝地図を構築した。この遺伝地図上にヒユナの全ゲノムデータ(未公開)を整列化し連結することで、ヒユナの染色体規模のゲノム配列を完成させた。また、同属の*A. hypochondriacus*とのゲノム比較により、種間のゲノム構造変異を明らかにした。上述のSNPマーカーのうち、カイ二乗検定で1:2:1の期待分離比に適合した683個のSNPマーカーについて連鎖解析を行い、17の連鎖群からなる全長1,419cM、平均マーカー間距離2.1cMの連鎖地図が構築された。胚軸色のQTL解析では、第17連鎖群に1座のQTLが検出された。胚軸色の表現型の分離比とQTL解析の結果から、胚軸のベタレイン色素の生合成は顕性形質であり、単一因子により支配されると考えられた。次に、胚軸が赤色の個体のみを用いて本葉色のQTL解析を行ったところ、6月および9月播き栽培のどちらにおいても胚軸色のQTLとは異なる1座のQTLが第17連鎖群上に座乗した。また、穂色のQTLも本葉色のQTLと同一の場所に検出された。この結果から、緑色系統由来のアリルをホモ接合型で有することで器官特異的にベタレインの生合成を抑制する因子の存在が示唆された。

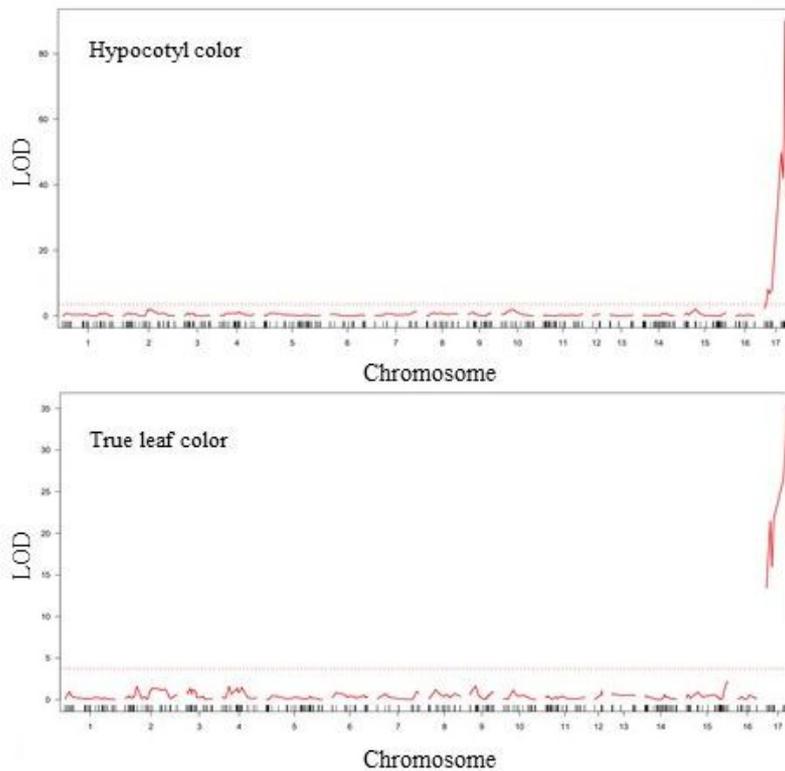


図4．胚軸および本葉におけるベタレイン（赤色色素）の有無に関するQTL解析の結果

ヒユナ品種「バイアム」の3つの部位(子葉、胚軸、外植片) 3種の植物ホルモン(BA、GA3、NAA) および異なるホルモン濃度の組み合わせ(総計162組み合わせ)を用いて組織培養を行い、効率的なカルス誘導法を確立した

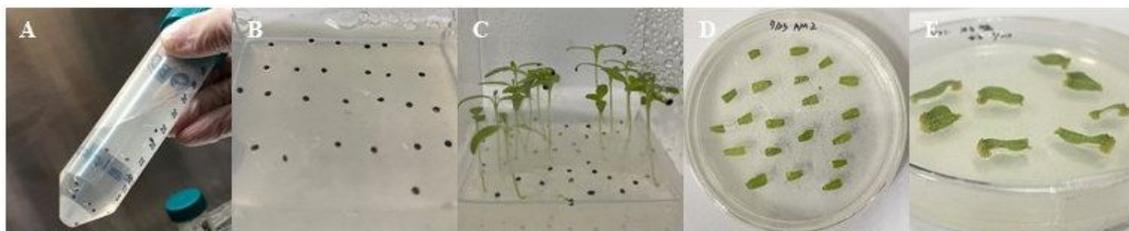


図5. 新たに確立したカルス誘導法の手順。A.種子殺菌、B.播種、C.実生、D.子葉の切断、E.カルス形成

以上、本国際共同研究では、新しいフェノーム解析技術を用いた遺伝資源の特性評価、最先端のゲノム解析技術を用いた遺伝資源の多様性評価とコアコレクションの構築、さらにはヒユナの主要な機能性成分であるベタレイン合成に関与する遺伝子座の同定等、世界に先駆けてヒユナの遺伝育種研究に資する基盤整備と育種に有用な知見および技術を獲得できた。本国際共同研究で生み出される知見や技術は、莫大な時間と労力を必要とする従来型のヒユナの育種工程を根本的に変革する端緒となり、様々な研究機関で活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sarker Umakanta, Lin Ya-Ping, Oba Shinya, Yoshioka Yosuke, Hoshikawa Ken	4. 巻 182
2. 論文標題 Prospects and potentials of underutilized leafy Amaranths as vegetable use for health-promotion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 104 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plaphy.2022.04.011	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保日奈、星川健、吉岡洋輔
2. 発表標題 ヒユナ（ <i>Amaranthus tricolor</i> ）の緑色系および赤色系品種の交雑後代における形態的形質の変異
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯部 祥子 (Isobe Sachiko) (20343973)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長 (82508)	
研究分担者	吉岡 洋輔 (Yoshioka Yosuke) (50462528)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	
研究分担者	白澤 健太 (Shirasawa Kenta) (60527026)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員 (82508)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	星川 健 (Hoshikawa Ken) (70634715)	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・ 利用領域・任期付研究員 (82104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
その他の国・地域（台湾）	World Vegetable Center			