

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658007

研究課題名（和文）

バイオエタノール及び高品質サイレージ生産に有用なソルガムの種子高糖性遺伝子の解析
研究課題名（英文） Genetic analysis of seeds for high sugar content suitable for
production of bioethanol and high quality silage

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

研究成果の概要（和文）：

種子高糖性のSugary Feteritaと種子低糖性的那系MS-3Bの雑種F₂集団の分離比を調べた結果、種子高糖性は劣性の1遺伝子による支配であると予想された。ラフマッピングの結果、原因遺伝子は第7染色体長腕に座乗していることが示唆された。この候補領域にはスイートコーンの種子高糖性の原因遺伝子であり、デンプン合成系酵素をコードするSUIのオルソログ(*SbSUI*)が確認された。*SbSUI*の塩基配列を両親品種で調べた結果、*SbSUI*では2ヶ所で1アミノ酸置換を引き起こす多型が見出され、他の植物のSUIとの比較からSugary Feteritaのアリルが変異型と考えられた。Sugary Feteritaの原品種Feterita（種子低糖性）では、種子での貯蔵デンプン合成が盛んな開花後11日頃に*SbSUI*の高発現が確認された。これらのことから、Sugary Feteritaではこの変異によって種子でのデンプン合成に障害が生じ、糖が蓄積する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sugary feterita is a cultivar of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, which accumulates sugar in the seeds. Here, we generated an F₂ population by crossing Sugary Feterita with Nakei MS-3B which accumulates sugar in the seeds at low levels. An analysis of the segregation ratio of the F₂ population indicated that the phenotype is determined by a recessive gene. A rough mapping analysis indicated that the corresponding gene is located on chromosome 7. Within the candidate region, a gene that encodes a starch biosynthetic enzyme, *SbSUI*, was located. This gene is an ortholog of maize *SUI*, the mutation of which is responsible for the high sugar content in the seeds of sweet corn. We carried out sequence analysis of the gene from both parental lines and found some SNPs. Two of them result in amino acid substitutions. After comparing *SbSUI* with other orthologous genes from other species, we confirmed that Sugary Feterita possesses a mutant allele. *SbSUI* transcripts increased toward flowering time, during which starch is being accumulated in wild-type (Feterita) seeds. These results suggest that the mutation(s) in *SbSUI* of Sugary Feterita might also cause abnormal starch synthesis, consequently resulting in the accumulation of sugars in the seeds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ソルガム、Sugary feterita、種子高糖性、starch debranching enzyme、SU1

1. 研究開始当初の背景

ソルガムは草丈 4m 以上の品種もある大型のイネ科の C4 作物であり、その茎葉部分のバイオマスや種子収量がイネの 10 倍以上になる品種もある。日本でも室町時代以来、食用として栽培されており、現在は主に家畜飼料用として栽培され、耕作放棄地を活用した機械化収穫体系も確立している。また、サトウキビと同様に茎に糖を蓄積するスイートソルガムは、その糖のバイオエタノールへの利用が注目されている。このことから、ソルガムの糖搾汁液をバイオエタノールの原料に、その残った残渣を家畜飼料に用いる利用法（カスケード利用）が提案されている。

本研究計画では、日本のエネルギー問題、家畜飼料の自給率問題、耕作放棄地問題の解決を目指す研究として、ソルガムの一品種 Sugary Feterita に注目した。ソルガムの普通種は種子にデンプンを蓄積するが、この品種は未知なメカニズムによって種子に大量の糖を蓄積し、甘い種子を結実する。もしこの遺伝子が単離され、種子多収性遺伝子と共にスイートソルガムにピラミディングすれば、上記の緒問題に革新的解決をもたらす可能性がある。つまり、(1) 種子、茎ともに糖を蓄積させることに成功すれば、糖収量がさらに増大した改良型の高糖性品種が誕生し、高いバイオエタノール生産が期待できる。

(2) これまでのホールクロップサイレージでは、種子が硬く家畜が消化できないため、種子のもつ養分が十分に消化されず可消化養分総量 (TDN) が低かったが、Sugary 型の種子を持つ系統では胚乳がもろくやわらかいため、高い TDN をもつ新しいサイレージ用品種として期待される。(3) この新品種は耕作放棄地対策の切り札の可能性もある。

一方で、Sugary Feterita を材料とした研究はこれまで全く行われてこなかった。また、ソルガムの全ゲノム配列が決定され、イネと同様にゲノム育種学的アプローチが現実のものとなった。実際、我々はこれまでに SSR マーカーをベースとしてホールゲノムジェノタイプングを可能にし、ソルガムの茎の高糖性に関する QTL 解析や突然変異体の遺伝子同定に成功した実績がある (未発表データ)。

2. 研究の目的

本研究では高いバイオマスを持つソルガ

ム、特に糖を種子に蓄積する品種 Sugary Feterita に注目し、その種子における糖の蓄積メカニズムを解明し、ゲノム育種学的アプローチを駆使したエネルギー問題、家畜飼料の自給率問題、耕作放棄地問題などの解決を目指した挑戦的、萌芽的なソルガム育種研究を目的とする。この達成のために、(1) Sugary Feterita における種子高糖性遺伝子を単離し、遺伝子の機能および高糖性のメカニズムを解明と、(2) 耕作放棄地問題をふまえ、スイートソルガム (茎高糖性) にこの遺伝子を導入した超高糖性品種によるバイオエタノール生産及び、高可消化養分総量 (TDN) サイレージ用ソルガムの育種素材の育成を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 種子高糖性の遺伝様式を調べるため、種子高糖性ソルガム Sugary Feterita と種子低糖性の那系 MS-3B を交配し、雑種 F₂ 集団における種子高糖性の分離比を調査した。なお種子高糖性の種子はシワ型の表現型を示すことが知られているので、この表現型に注目して分離比を調査した。

(2) 種子高糖性遺伝子単離を目的に雑種 F₂ 集団を用いてマッピングを行うため、約 1,700 の SSR マーカーをスクリーニングし、Sugary Feterita と那系 MS-3B で多型を示すマーカーを選抜した。これら選抜したマーカー及び種子高糖性 (シワ型) を示す F₂ 種子を用いてラフマッピングを行った。

(3) ラフマッピングにより決定された候補領域に存在する候補遺伝子 (*SbSUI*) を選抜し、この塩基配列を両品種で比較した。

(4) 野生型 (Feterita、Sugary Feterita の原品種、種子低糖性) における *SbSUI* の転写産物の蓄積量を調査するため、開花後の穎果または種子を 5 日間隔でサンプリングし、半定量 RT-PCR を行った。

(5) Sugary feterita のサイレージへの適性を調べるため、Sugary feterita、Feterita からサイレージを作製し、その成分を分析した。

(6) 種子高糖性遺伝子をスイートソルガムにピラミディングするため、スイートソルガム SIL-05 と Sugary feterita を交配し、F₂ 世代まで進めた。

4. 研究成果

(1) 種子高糖性ソルガム Sugary Feterita の種子高糖性の原因遺伝子を同定するため、Sugary Feterita と種子低糖性の那系 MS-3B を交配した。雑種 F₂ 集団における種子高糖性の分離比を調査した結果、種子低糖性(シワなし) : 種子高糖性(シワ) はほぼ 3:1 を示した(表1)。この結果、種子高糖性は劣性の1遺伝子支配であることが示された。

低糖性(シワなし) 高糖性(シワ) 総計 帰無仮説 結果
1212 415 1627 3:1 棄却できない

表1 那系 MS-3B x Sugary feterita (F₂) 集団における種子糖性の遺伝様式

(2) 種子高糖性遺伝子単離を目的に、雑種 F₂ 集団を用いたポジショナルクローニングを行うため、約1,700のSSRマーカーをスクリーニングし、Sugary Feterita と那系 MS-3B で多型を示すマーカーを選抜した。その結果、170のマーカーの選抜に成功し、物理地図が作成された(図1)。

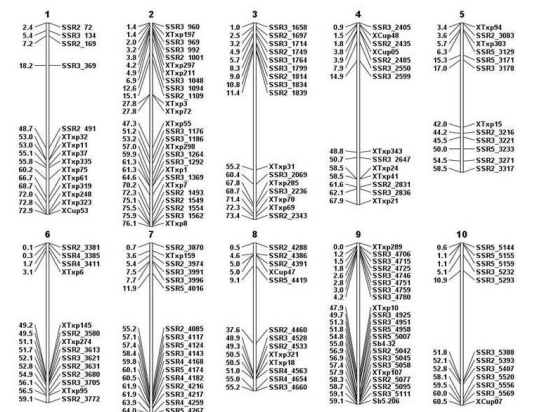


図1 那系 MS-3B と Sugary feterita 間で多型を示す DNA マーカーとその物理地図

次に、F₂ 種子を材料とし、種子高糖性(シワ)の表現型を示す種子を選抜し、図1のマーカーを用いたラフマッピングを行った。その結果、第7染色体に遺伝子型の分離のゆがみが検出され、それは Sugary Feterita 型(シワ型)しかないものであった。表1に示した遺伝学的解析によって、この遺伝は劣性の一遺伝子によって支配されていることが明らかことから、原因遺伝子は第7染色体に座乗していると考えられた。ラフマッピングの結果、原因遺伝子は、60.59-63.95Mb に座乗することが明らかとなった(図2)。

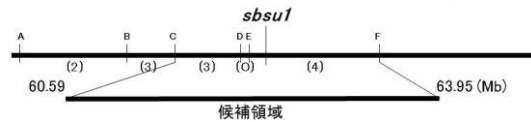


図2 ラフマッピングの結果

(3) トウモロコシではスイートコーンの種子高糖性の原因遺伝子として、ADP グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase) や枝切り酵素 (Starch debranching enzyme, DBE) の *SUI* などのデンプン合成系の遺伝子が知られている。そこでラフマッピングの結果、分離のゆがみが検出された第7染色体の候補領域に座乗する糖及びデンプン代謝関連遺伝子を調べたところ、ソルガムの *SUI* オルソログ、*SbSUI* が座乗していることが明らかとなった(図3)。

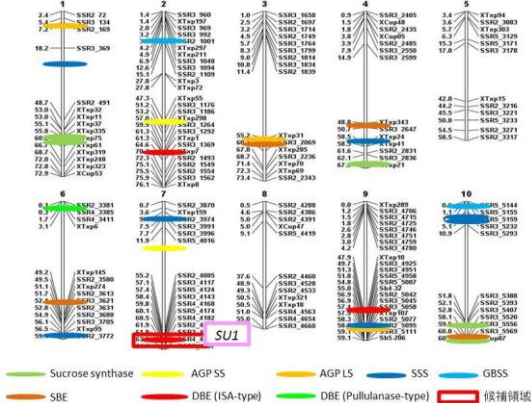


図3 ソルガムのデンプン合成関連遺伝子

この *SbSUI* の塩基配列を Sugary feterita と那系 MS-3B で比較したところ、第1エクソンと第9エクソンにそれぞれ非同義アミノ酸置換を起こす1塩基置換が存在し、また他の植物の *SUI* の比較から Sugary Feterita 型が変異型であることが明らかとなった。(図4, 5)。このことは、Sugary Feterita に生じた突然変異が、この品種の種子高糖性の原因である可能性を示唆した。また、ドメイン構造を考慮すると、特に第9エクソンの置換が種子高糖性において重要な変異である可能性が考えられた(図4, 5)。

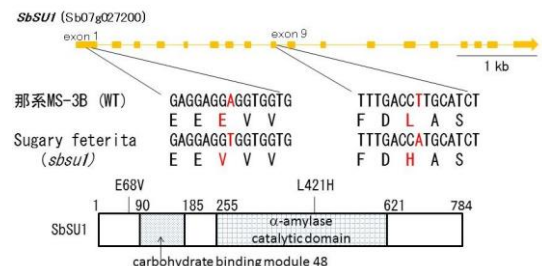


図4 *SbSUI* 遺伝子の変異

```

61                               90
Sugary feterita QEDGEEEEVWVEERYALGGACRVLAGMPAP
那系MS-3B      QEDGEEEEVWVEERYALGGACRVLAGMPAP
maize         EDDDDDEEVA-EERFALGGACRVLAGMPAP
rice         -----VEAVMPERYALGGACRVLAGMPAP
Arabidopsis   DRRSNEAENI AVVEKPLKSDRFFISDGLPSP
                * . * : . . : * : * : *

416                               445
Sugary feterita DGFRFDLHASIMTRGCSLWDPVNVYGSPEMGD
那系MS-3B      DGFRFDLHASIMTRGCSLWDPVNVYGSPEMGD
maize         DGFRFDLHASILTRGCSLWDPVNVYGSPEMGD
rice         DGFRFDLHASIMTRGCSLWDPVNVYGSPEMGD
Arabidopsis   DGFRFDLGSIMSRSSSLWDAANVYGADVEGD
                * * * * * . * * : * . * * * * . * * * * : * * * *

```

図5 *SbSUI* とオルソログの推定アミノ酸配列の比較

(4) 野生型 (Feterita) で開花後の穎果、または種子における *SbSUI* の転写産物の蓄積量を調べたところ、種子での貯蔵デンプン合成が盛んな開花後 11 日頃に高い発現が検出された (図 6)。このことは、種子高糖性の Sugary Feterita ではこの *SbSUI* の変異が種子でのデンプン合成を阻害し、糖が蓄積するという作業仮説と矛盾しなかった。

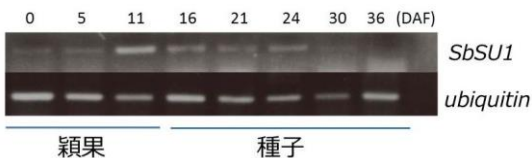


図 6 野生型 (Feterita) の開花期における *SbSUI* の転写産物量
DAF: 開花後日数

(5) Sugary feterita のサイレージへの適性を調べるため、Sugary feterita 及び原品種の Feterita を用いてサイレージを調製し、成分を分析した。その結果、興味深いことにサイレージ中の有機酸比率について差が検出され、Sugary feterita では多くの乳酸を含んでいたことから、サイレージとして重要要素である乳酸発酵が促進されていること

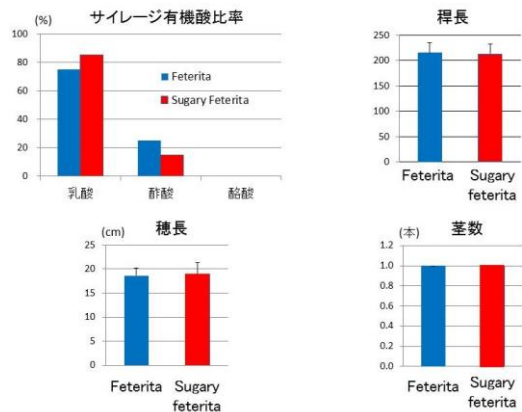


図 7 Sugary feterita 及び Feterita のサイレージ試験結果

が明らかとなった (図 7)。なお、稈長や穂長、茎数などに品種間差は観察されなかった。

(6) 種子高糖性遺伝子をスイートソルガムにピラミディングするため、スイートソルガム *SIL-05* と *Sugary feterita* を交配し、 F_2 世代まで進めたことで、今後、稈高糖性と種子高糖性を併せ持つ新品種に向けた素材を育成した。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

佐塚隆志、高バイオマス高糖性ソルガムの育種開発、第 23 回バイオテクノロジーシンポジウム (招待講演) 2012 年 11 月 30 日 (名古屋)

佐塚隆志、高糖性高バイオマスソルガムの育種開発とその利活用の可能性、2012 年植物科学シンポジウム (招待講演) 2012 年 12 月 3 日 (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
春日 重光 (KASUGA SHIGEMITSU)
信州大学・農学部附属アルプス圏フィールド科学教育研究センター・教授
研究者番号：50345758