



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	牧草およびセルロース系バイオマス資源作物の世界におけるゲノム解析の状況ならびに海外との国際共同研究の取組み：植物ゲノム研究の育種への利用最前線 - 世界の最先端と育種への利用状況、その可能性 -
Author(s)	山田, 敏彦
Citation	Techno innovation テクノイノベーション, 21(4), 27-34
Issue Date	2011-11-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53130
Type	journal article
File Information	yamadaTI882012.pdf



牧草およびセルロース系バイオマス資源作物の世界におけるゲノム解析の状況ならびに海外との国際共同研究の取組み

国立大学法人北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

生物資源創成領域 教授 山田 敏彦

牧草は、他殖性でゲノムサイズが大きいこと、ゲノム解析の進展は遅いが、種子の需要量が多いので、DNAマーカー開発による新品種の期待は高い。次世代シーケンサーを用いたゲノム解析やSNPマーカーの開発も実施されている。また、育種現場で利用できるDNAマーカー選抜技術が開発された。一方、これまで家畜飼料として利用させてきた多年生草本植物のスイッチグラスやススキ属植物は、バイオ燃料、特に、バイオエタノールを製造する原料として注目されている。セルロース系バイオマス資源作物の育種が開始され、米国エネルギー省や農務省は巨額な研究資金をスイッチグラスやススキのゲノム解析研究に投資している。ここでは著者たちのススキの研究を紹介するが、わが国でも、エネルギーの海外や原子力依存からの脱却には、高位バイオマス生産が可能で良質な原料となる資源作物の開発は必須で、ゲノム解析プロジェクト研究を立ち上げる必要がある。

1 はじめに

牧草には多くの草種があり、一般にはイネ科牧草、マメ科牧草に大別される。わが国で栽培されているイネ科牧草には、チモシー、イタリアンライグラス、オーチャードグラス、トールフェスク、ギニアグラス、バヒアグラスなど、マメ科牧草にはアカクロバ、シロクロバ、アルファルファなどがあげられる。牧草品種種子は改良草地の新規造成や更新を行うときに、広大な面積に播種されるため需要が大きく、種子ビジネスとしての比重は高い。たとえば、北海道ではチモシーは毎年約700トンの種子が播種されている。また、イネ科牧草のうちでペレニアルライグラス、ケンタッキーブルーグラス、ベントグラスなどは芝草としての需要もかなり多い。そのため、新品種育成への期待が高く、DNAマーカー選抜などの新しい育種技術開発への期待は高い。しかし、牧草は種類が多く、多くの牧草は自家不和合性による他殖性植物で、倍数体の種も多く、ゲノムサイズが大きいことから、ゲノム解析の進展は他の主要な穀類作物などに比較して遅い。著者は「イネ科牧草のゲノム解析研究の

現状と将来方向」と題して、本誌57号⁽¹⁾ですでに紹介しているので、それ以降の研究の進展について、著者が関わる研究を中心に本稿では紹介したい。

一方、最近では、セルロース系バイオマス資源作物の開発は重要な研究テーマである。地球温暖化への対策や化石燃料の枯渇問題などから、持続可能な低炭素社会構築を目指し、持続再生可能なエネルギー生産のシステム開発が各方面で注目されている。植物バイオマス資源からバイオ燃料、特に、バイオエタノールを製造する技術もその一つである。この場合、その製造コストをいかに安くするかが重要な技術開発のポイントとなる。そのためには、「量」の改良としてバイオマス収量を増加させるとともに、「質」の改良として、植物成分の改変、たとえば、セルロース原料からエタノール変換を行う場合には、糖化効率をいかに向上させるかは重要な課題となる。一つの戦略として、細胞壁構成成分のリグニン含量を低減させることがあげられる。このように、原料植物の遺伝改良には多くの期待が寄せられ、最近では、アメリカ合衆国を中心に資源作物の品種改良に多くの研究投資がされ、ゲノム研究についても多くの研究プロジェクトが

立ち上げられている。米国ではこれまで牧草として利用されてきたスイッチグラスがバイオマス資源作物として注目されるようになったことから、これまで牧草を研究していた研究者の多くは資源作物の研究開発にシフトしている。著者も近年、バイオマス資源作物として注目されているススキ (*Miscanthus*) 属植物に関する研究を手がけており、品種改良や遺伝子組換え技術の開発に関する研究を実施している。さらには、米国の大学とゲノム解析に関する国際共同研究も開始したので、本稿では、バイオマス資源作物のゲノム解析の研究開発の最近の状況についても紹介したい。

2 牧草ゲノム解析の最近の現状

最近の牧草におけるゲノム解析の開発状況については、Yamada and Spangenberg (2009)⁽²⁾、Yamada et al. (2010)⁽³⁾ に詳しい。主な牧草ではマイクロサテライト (SSR) マーカーが開発され、これを用いて連鎖地図が作製され、出穂期、耐寒性、飼料品質などの特性に関するQTL解析が行われている。自殖性植物では連鎖地図作成は通常F₂集団を用いて作成するが、自殖できない多くの牧草ではF₁集団を用いて両親ごとの染色体の組換え価をもとにマーカーの位置が決定されるのが一般的である。一つのマッピング集団から両親 (P₁、P₂) に対応する2種類の連鎖群が形成されるが (P₁およびP₂特異的な連鎖群)、マーカーの中にはP₁、P₂のどちらにおいても多型が検出されるマーカー (共通マーカー) が存在するので、この共通マーカーを橋渡しにして各両親の連鎖群を統合し、一つの連鎖地図となる。連鎖地図を構築して、形質評価からQTL解析により、目的形質のQTL領域は特定できる。自殖性植物では目的のQTL領域を検出した後は、目的領域のみを別の遺伝子型に置換した準同質遺伝子系統 (NILs) を作出し、個々のQTLの作用力を評価するのが一般的である。しかしながら、自殖率が低い牧草ではNILsを作成するのは不可能であることから、アソシエーション解析などの、多数の遺伝子型からなる集団とマーカー多型のデータから表現型とDNAマーカーの関係を解析する手法を用いて選抜マーカーの開発を推し進めていく必要がある。

開花に関与する遺伝子や飼料品質に関与する候補遺伝子の解析や連鎖不平衡 (LD) に関する研究がペレニアルライグラスなどで行われている。Isobe et

al. (2009)⁽⁴⁾ はアカクローバの集団内の各個体におけるSSRマーカーの対立遺伝子データから、LDの値が小さいことを明らかにし、ゲノム全体を高密度にカバーするマーカーが必要であることを指摘している。LDやアソシエーション解析に関する詳細はYamada and Skot (2010)⁽⁵⁾ を参考にしていただきたい。

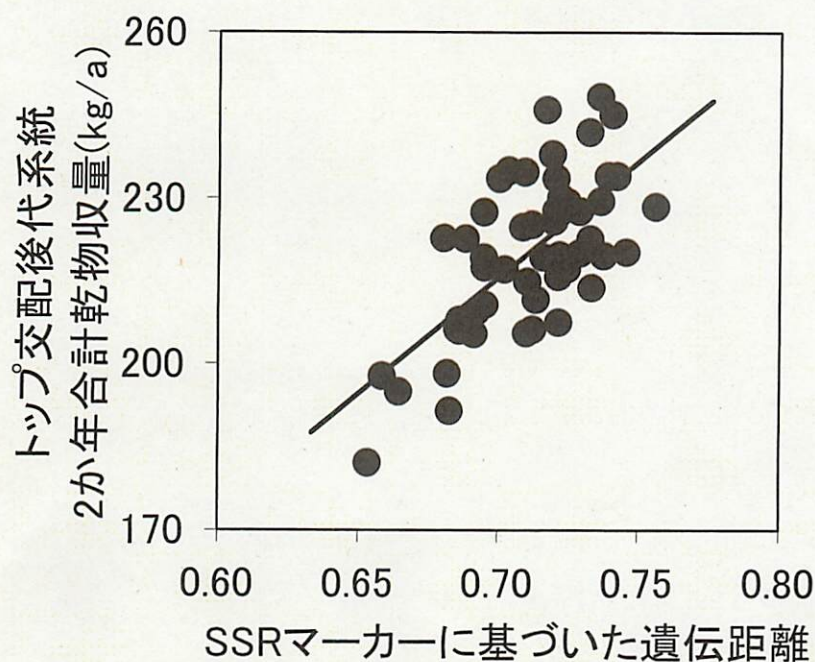
2012年1月に米国で開催されたPlant and Animal Genome XXに参加した。最もホットな研究情報として、アイルランドTeagascのグループはペレニアルライグラスの全ゲノムのショットガンシーケンスと遺伝子領域の特定に関する研究を、デンマークAarhus大学のグループはペレニアルライグラスの*de novo* シーケンス解析の研究をそれぞれ発表していた。また、日本草地畜産種子協会のグループは、ライグラス類の植物について、次世代シーケンサーを用いた大量なSNPマーカーの開発を報告した。今後、次世代シーケンサーによるゲノム解析研究の進展が期待される。

3 牧草育種へ利用できる技術開発

著者が関係している研究で、DNAマーカーを利用して品種開発に利用できる研究情報を、以下に紹介したい。

1) チモシーのSSRマーカーによるプロファイリング

チモシーは、現在、北海道草地面積55.5万haの70%で栽培され、北海道の草地酪農を支える最も重要なイネ科牧草である。北見農業試験場では、昭和39年からチモシーの品種改良が開始され、当初より収量性の向上を目標としてきたが、チモシーの改良速度は約0.3%/年と、トウモロコシ (約2.0%/年) と比較すると明らかに低い。その理由として、トウモロコシでは、集団間において雑種強勢を発揮するグループ (ヘテロティックグループ) を構築し、グループ内の優良遺伝子の集積と雑種強勢の利用を同時に図る「相反循環選抜法」が採用されている。これに対し、チモシーを含む多くの牧草類は、雑種強勢を利用する育種方法が確立されていないため、その品種改良では集団内の優良遺伝子の集積を目的とする集団改良法が採用され、相反循環選抜法は行われていない。雑種強勢利用の基盤情報の一つとして、優良母材間の遺伝的近縁度がある。一般に、ある材料間での交配によって生じる能力は、材料同士が遠縁である程、高い能力を示すことが



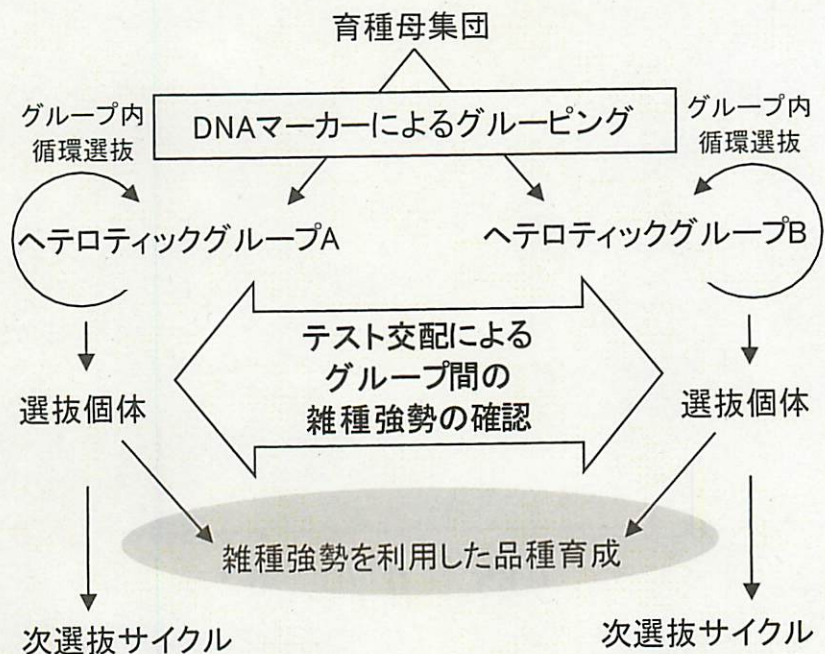
Tanaka et al. (2011a)

図1 種子親－テスター間遺伝距離とトップ交配後代の収量

期待され、チモシーの収量性に関しても同様である。しかしながら、他殖性であるチモシーは、選んだ元の集団もしくは母親しか特定できないため、チモシー母材間の類縁関係を正確に把握することが難しいのが現状である。一方で、DNAマーカーによる解析は、遺伝子型を容易に同定できるために、類縁関係を把握するのに有効な手段である。SSRマーカーを用い、トップ交配（1つの検定品種との交配）後代の収量と母材の多型解析に基づいた遺伝距離との間に有意な正の相関がみられた（Tanaka et al. 2011a）⁽⁶⁾（図1）。このことは、DNA多型により母材間の雑種強勢程度が推定できることを示唆しており、DNAマーカーを利用したヘテロティックグループの作出の可能性が示された。そこで、DNAマーカーを用いて、優良な育種母材についてヘテロティックグループを特定し、グループ内については従来の循環選抜による相加的な優良遺伝子の集積を図り、遺伝距離の離れたグループ間による交雑により雑種強勢を利用した相反循環選抜法について提案した（Tanaka et al. 2011b）⁽⁷⁾（図2）。今後、本育種手法で優良なチモシー品種が開発されることが期待される。

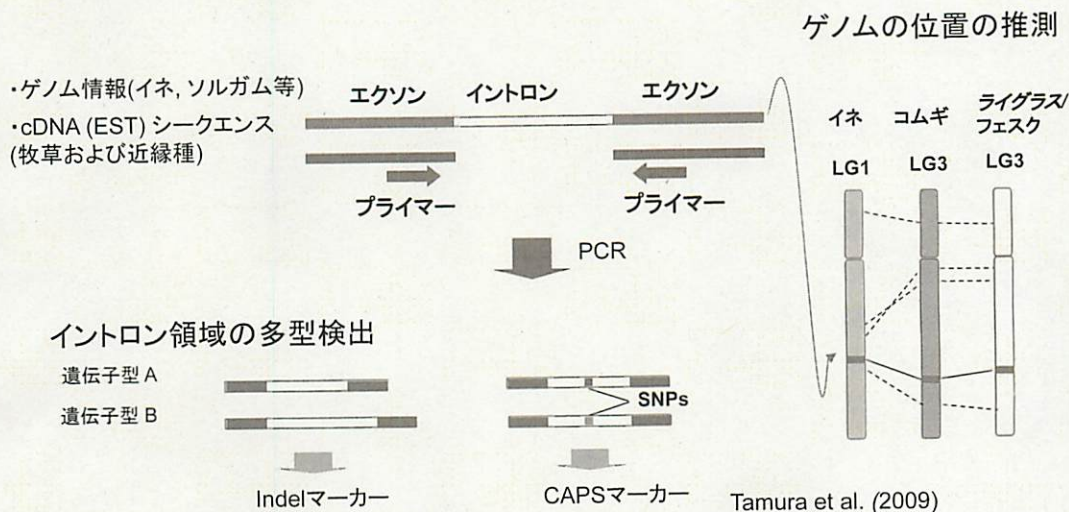
2) ライグラスとフェスクを識別できるイントロン多型DNAマーカー

飼料品質や再生などに優れるイタリアンライグラス、ペレニアルライグラスのライグラス類（*Lolium* 属）と越冬性や耐干性などの環境ストレス耐性に優れるメドウフェスクやトールフェスクのフェスク類（*Festuca* 属）との属間雑種であるフェストロリウムは、北海道向けとしては越冬性に優れる品種、本州以南では越夏性に優れる品種としてそれぞれ期待されている。フェストロリウムの育種を行う上で育種素材のゲノム構成が明らかになれば、表現型からだけではできない、ゲノム構成に着目した材料の選抜が可能となる。また両属に由来する有用形質に連鎖するDNAマーカーが開発できれば選抜の高精度化・効率化が期待できる。そのためにはゲノム全体をカバーする両属の識別DNAマーカーの開発が必要である。イネ科牧草はゲノム配列などの研究資源に乏しいため、効率的なDNAマーカーの開発には、すでにゲノム情報が整備されているイネ、ソルガムの遺伝子情報ならびに牧草およびコムギなどのEST情報は有効である（図3）。これらの情報から、多型頻度の高いイントロン領域からマーカーを作成することで、ペレニアルライグラス



Tanaka et al. (2011b)

図2 相反循環選抜への移行の提案



Tamura et al. (2009)

図3 イネのゲノム情報などを利用したイントロン・フランキングESTマーカーの作成

とメドウフェスクを識別できるDNAマーカーを開発することができた (Tamura et al. 2009)⁽⁸⁾。今後、これらのマーカーを用いて選抜を行うことにより、優良なフェストロリウム品種が育成されることが期待できる。

4 資源作物におけるゲノム解析の現状

これまで家畜飼料として利用されていたスイッチグ

ラスやススキなどの多年生イネ科草本植物は、効率的な栄養養分利用していることから、持続的なバイオマス生産するという観点から注目されている。多年生草本植物は春から夏にかけては地下部の栄養養分を吸収して、光合成によりバイオマス生産を行うが、秋になると地上部の生長が止まり、栄養養分が地下部へ転流する。そのため、冬に刈取りしてバイオマスを系外へ搬出すれば、翌春の再生に必要な栄養養分は地下部に

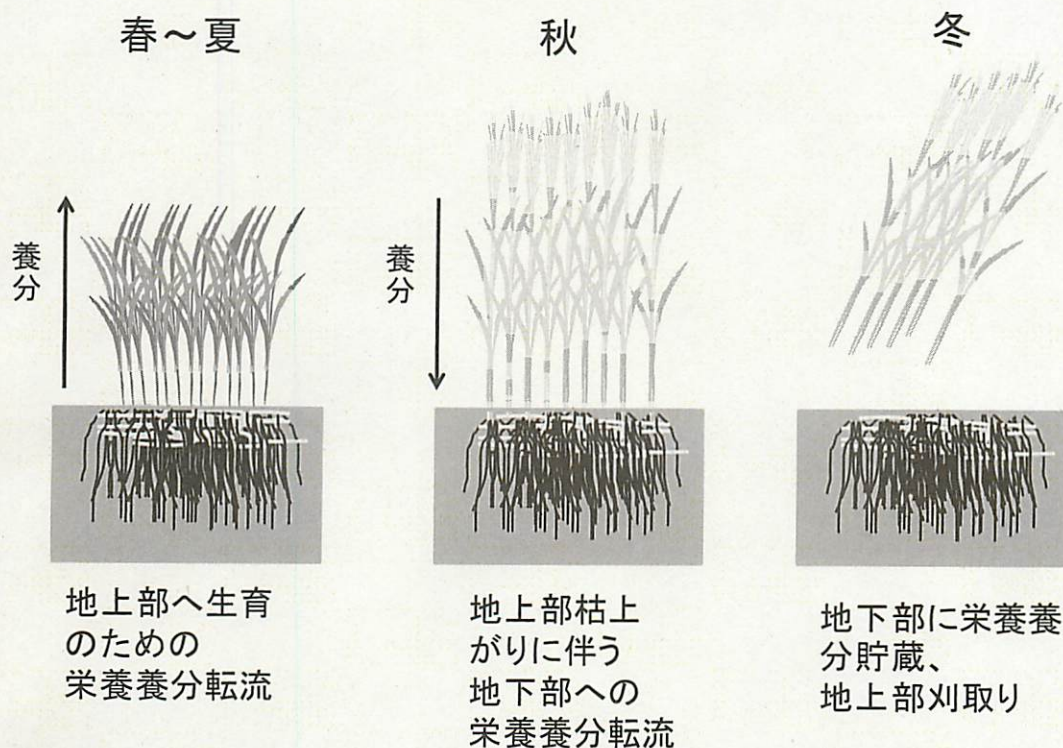


図4 多年生草本植物の効率的な栄養養分使用の概念

蓄積される（図4）。このような栄養養分の循環により、施肥を抑えながら、持続的なバイオマス生産が可能になる。また、多年生草本植物は土壌中に炭素を蓄積する機能があり、ススキ草地では毎年500kg/haの炭素が蓄積される（Toma et al. 印刷中）⁽⁹⁾。このため、バイオマス資源作物として注目されるようになり、近年、育種が本格的に開始された。その研究基盤としてゲノム解析のプロジェクトが米国では多く立ち上げられた。

1) スイッチグラス

北アメリカの草原地帯に広く自生している多年生草本植物のスイッチグラス（*Panicum virgatum*）（写真1）が、バイオマス資源作物として米国では最も有望視されている。これまでの収量調査から、最大30t/ha/年の乾物収量が期待できると報告されている。スイッチグラスは暖地型草種のC₄植物で、牧草として家畜の飼料として利用されているが、家畜の嗜好性はあまり良くない。スイッチグラスには二つのエコタイプ（生態型）、LowlandsとUplandsが存在し、Lowlandsは四倍体（2n=4x=36）で、合衆国南部の湿潤、温暖な冬の地域に分布しており、草丈が高く、バイオマス量が多い。一方、Uplandsは八倍体（2n=4x=72）で、

合衆国北部の乾燥、寒い冬の地域に分布し、草丈は低く、バイオマス量はLowlandsに比べて少ない。

米国エネルギー省、農務省ではスイッチグラスのゲノム解析に巨額な研究資金を投資しており、大量なEST解析、連鎖解析、アソシエーション解析、トランスクリプトーム解析などが行われている（<http://www.switchgrassgenomics.org/index.shtml>）。Plant and Animal Genome XXでは、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析の報告がいくつかあった。最近では、スイッチグラスのリグニン合成酵素遺伝子の発現を抑制する遺伝子操作により、リグニン含量の低減と糖化効率の向上が報告されている（Fu et al. 2011）⁽¹⁰⁾。

2) ススキ（ミスカンサス）

バイオマス資源作物として注目されているススキ（*Miscanthus*）属の中で、ススキ（*M. sinensis*）（二倍体、2n=38）とオギ（*M. sacchariflorus*）（四倍体、2n=76）との自然交雑した三倍体雑種のジャイアントミスカンサス（*M. xgiganteus*）が、特に欧米で関心を集めている。これまでのヨーロッパにおけるバイオマス調査では、ジャイアントミスカンサスは草丈が7mにも達し、最大45t/ha/年の高い乾物量を生産することが可能であると報告されている。そもそもジャ



写真1 スイッチグラス (米国オクラホマ・ノーブル財団研究所、2007年11月撮影)

ジャイアントミスカンサスは1935年にデンマークの植物コレクターが日本の横浜からヨーロッパへ当初観賞用植物として持ち出したものである。1960年代にデンマークでその高いバイオマスが認められた。1970年代のオイルショック以降、その優れたバイオマス生産が欧州各国で高く評価された。ジャイアントミスカンサスは三倍体雑種であるために不稔で種子を生産しない。そのため、増殖には根茎による栄養繁殖が用いられている。ジャイアントミスカンサスは、現在は、ヨーロッパで火力発電用などの燃焼原料に利用されている。最近では、ジャイアントミスカンサスがヨーロッパでもバイオ燃料製造の原料として検討されている。一方、米国では、イリノイ大学が中心になって、石油メジャーBP社が出資した創設されたEnergy Biosciences Institute (EBI)の研究資金でバイオ燃料原料としてのジャイアントミスカンサスの研究が精力的に行われている。ジャイアントミスカンサスは、最大で61t/ha/年のバイオマス、平均で30t/ha/年のバイオマス生産が可能であると報告がある (Heaton et al. 2008)⁽¹¹⁾。札幌でもジャイアントミスカンサスはバイオマス生産性に優れ、40t/ha/年の乾物収量を示す (写真2)。



写真2 ジャイアントミスカンサス (北大農場、2011年10月撮影)

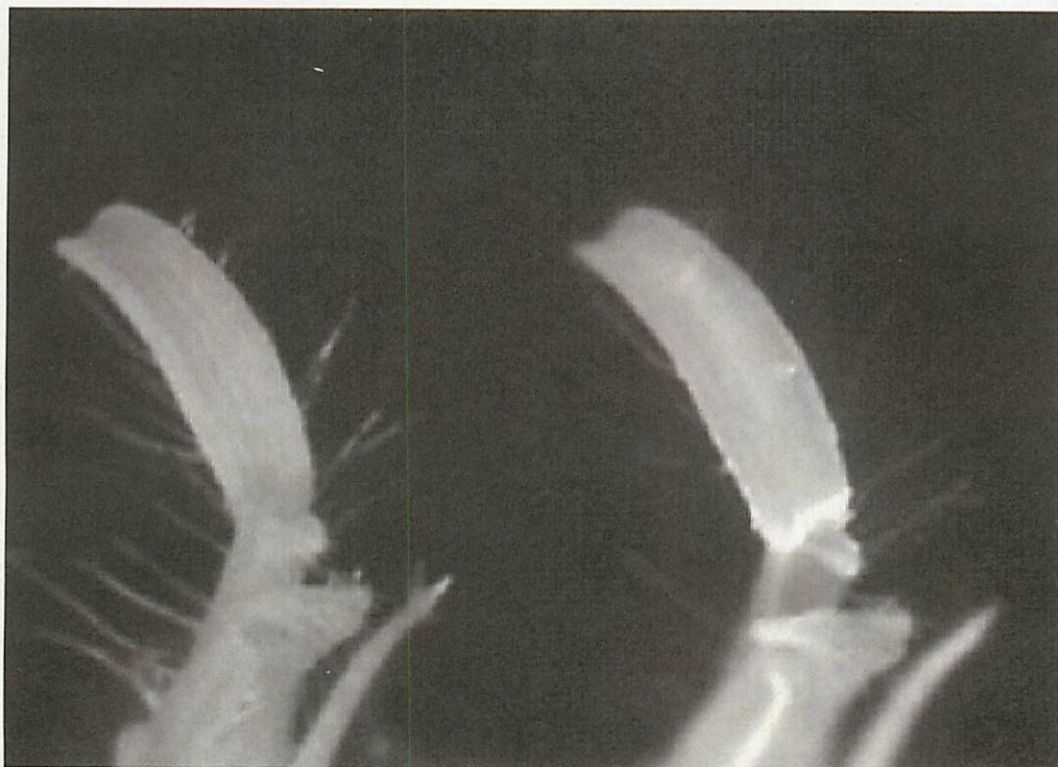


写真3 緑色蛍光発光している遺伝子組換えススキの葉（右）と対照植物の葉（左）

EBIの予算でジャイアントミスカンサスのシーケンスが行われているが、ゲノムサイズが大きいことに加えて、三倍体であることから、まだ十分な研究成果は得られていない。

米国ジョージア大グループは、二倍体のススキとオギとの交雑後代を用いて連鎖地図を構築し、ソルガムとのゲノム比較を行っている（印刷中）。著者のグループではジャイアントミスカンサスの片親で、わが国に広く自生しているススキを用いて遺伝子組換え技術について検討し、世界で最初に遺伝子組換え植物体の作出に成功した（Wang et al. 2011）⁽¹²⁾。レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入技術の最適な実験諸条件を明らかにすることができ、形質転換植物を作出することができた（写真3）。さらに、フルクタン合成酵素遺伝子を導入した形質転換植物の作出に成功するとともにRNAi法によるリグニン含量の低減させる遺伝子操作を現在実施している。

最近、イリノイ大学が代表機関として著者たちが参画して研究コンソシアムを組み、米国エネルギー省のゲノム研究予算を獲得し、国際共同研究を開始した。アジアに自生するススキについて、その遺伝的多様性

や環境に対する適応性を明らかにし、バイオマス資源作物であるジャイアントミスカンサス品種の開発に必要な基礎データを得ることを目的とする研究である。ススキの自生地域である日本、中国、韓国で広範囲な地点から収集されたススキ系統群をまとめて1つのコア集団を作った。このコア集団についてDNAマーカーによる多型解析を行い、遺伝的多様性や進化系統発生の知見などの情報を明らかにする。また、コア集団植物を北米および日本、中国、韓国の圃場で栽培して、収量性や環境適応性を調査して表現型データを取得し、環境と遺伝子型の関係を明らかにすることにより、アメリカでの環境に適応する品種を開発するための基礎的な研究情報を得るというのが研究内容である。著者たちのグループでは、形質評価に加えて、開花遺伝子の遺伝子解析を担当し、HDI遺伝子について、現在各地のススキ系統を供試して、遺伝子多型を調査中である。

5 おわりに

以前から牧草では国際コンソシアムでゲノム解析研究が行われてきているが、ゲノムサイズが大きく複雑であることなどから1か国での研究投資に限界がある

山田 敏彦【やまだ としひこ】

昭和31年生まれ、岐阜県出身、昭和56年4月農林水産省東北試験場草地部草地第一研究室研究員、平成4年4月山梨県酪農試験場牧草育種指定試験地主任、平成11年4月農林水産省北海道農林試験場草地部イネ科牧草育種研究室長、その後、組織再編に伴い、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター作物開発部イネ科牧草育種研究室長として、牧草の育種やゲノム解析の研究に従事した。

平成17年4月より国立大学法人北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物資源創成領域教授として、バイオマス資源作物としてススキ属植物の育種、ゲノム解析および栽培・保管試験、原料の特性評価試験などに従事。生物生産研究農場長を兼務。



ために、今後とも、国際的に共同してゲノム解析研究することが重要であると考えられる。今後は、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析が加速していくものと推測される。

一方、セルロース系バイオマス資源作物については、米国では、研究投資が盛んであるが、わが国ではまだ限られている。わが国でも、エネルギーの海外や原子力依存から脱却しなければいけないが、そのためには、高位バイオマス生産が可能で良質な原料となる「量」と「質」に優れた資源作物の開発は必須で、基盤として、ゲノム解析研究を立ち上げる必要がある。特に、ススキはわが国に各地に自生し、豊富な遺伝資源を有していることから、これを活用して、ゲノム解析をすることは、わが国におけるバイオマス生産向上につながる優良品種開発に役立つとともに、有用なゲノム情報を世界へ発信することにもなり、日本の植物科学の国際社会への貢献にもつながる。そのためには、ススキを始めとして資源作物のゲノム解析に、もう少しわが国の公的資金による研究投資が行われてもよいのではと考える。

【引用文献】

1. 山田敏彦 (2005) イネ科牧草のゲノム解析研究の現状と将来方向、Techno Innovation 15, No.3, 60-65.
2. Yamada T, Spangenberg G (2008) Molecular Breeding of Forage and Turf, Springer, New York, 1-352.
3. Yamada T et al. (2010) Transgenesis and genomics in forage crops, Jain SM, Brar DS (eds.), Molecular Techniques in Crop Improvement, 2nd Edition, Springer, the Netherlands, 719-744.
4. Isobe S et al. (2009) Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.). BMC Plant Biol, 9, 57 3353-3365.
5. Yamada T, Skot L (2010) Allelic diversity for candidate genes and association studies: methods and results., Huyghe C (ed.) Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding. Springer, New York, 391-396.
6. Tanaka T et al. (2011a) DNA profiling of seed parents and top-cross tester and its application for yield improvement in timothy (*Phleum pratense* L.). Crop Science, 51, 612-620.
7. Tanaka T et al. (2011b) Proposal for shift to reciprocal recurrent selections in 'clone and strain synthesis' timothy breeding using molecular marker diversity. Crop Science, 51, 2589-2596
8. Tamura K et al. (2009) Development of intron-flanking EST markers for the *Lolium/Festuca* complex using rice genomic information. Theoretical and Applied Genetics, 118, 1549-1560
9. Toma T et al. (2012) Carbon sequestration in soil in a semi-natural *Miscanthus sinensis* grassland and *Cryptomeria japonica* forest plantation in Aso, Kumamoto, Japan, Global Change Biology Bioenergy, in press
10. Fu C et al. (2011) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. Proc Natl Acad Sci USA, 108, 3803-3808.
11. Heaton EA et al. (2008) Meeting US biofuel goals with less land : the potential of *Miscanthus*. Global Change Biol, 14, 2000 ~ 2014.
12. Wang X et al. (2011) Establishment of an efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anderss., a potential bioenergy crop. Global Change Biology Bioenergy, 3, 322-332.