

# 熱帯作物分子育種基盤構築による食糧保障

実施予定期間：平成 21 年度～平成 23 年度

代表機関：(独) 理化学研究所

代表者：関 原明

国外参画機関：タイ王国 マヒドール大学理学部

代表者：Jarunya Narangajavana

国外参画機関：コロンビア共和国 国際熱帯農業センター (CIAT)

代表者：石谷 学

## I. 概要

我々がこれまで獲得してきた植物分子育種にとって不可欠な最先端ゲノム科学技術をアジア、アフリカの食糧安全保障上・貧困削減上重要な作物であるキャッサバに応用し、野生種等の有用遺伝資源を活用した分子育種の効率化と迅速化を図るための世界標準のゲノム解析基盤を構築する。この基盤を用いてタイにおける高収量、高付加価値キャッサバのマーカー育種を確立すると共に、キャッサバ分子育種分野で国際的な貢献を目指す。

### 1. 研究の目的

提案課題は、アジア、アフリカの多くの諸国で食糧安全保障上そして貧農の生活改善上重要な役割を果たしている熱帯作物キャッサバに注目し、通常品種より優れた有用形質（遺伝子）を持つ野生種などの遺伝資源を積極的に活用し、我々の植物分子育種に関わる最先端ゲノム科学技術と人材を結集し、分子育種を飛躍的に効率化、迅速化する上で不可欠な世界標準のゲノム解析基盤の構築を目指す。その改良、利用を通じて、キャッサバを国の戦略的作物に位置づけているタイにおいて高収量、高付加価値キャッサバのマーカー育種の確立を目指す。又、この基盤を利用することで、世界のキャッサバ研究グループとの国際的なネットワークの強化を図り、我が国を中心とした世界のキャッサバ分子育種改良に貢献できる研究拠点作りを目指す。

### 2. ネットワーク構築の実現可能性

理研植物科学研究センターと CIAT は過去 5 年間に渡り研究者の訪問及び共同研究を行っており、緊密な共同研究体制を構築している。2005 年にはタイの研究代表者が理研植物科学研究センターを訪問し、ゲノム解析の先端技術について意見を交わした。この 3 者は 2006 年以降、キャッサバの分子育種に関わる情報交換を活発に行い、本研究課題で用いる育種材料の選定を進めるなど、共同研究を実施する準備が整っていた。このような状況の下、2009 年以降本研究課題を開始した。3 者は 2010 年 2 月にタイのマヒドール大学にて本共同研究に関する打ち合わせを行った。

### 3. 本制度により取組を支援する必要性

民間ベース或いは ODA による技術供与支援によるキャッサバ事業は農民参加型の栽培技術或いは普及支援が中心である。又国内の植物の分子育種開発事業にキャッサバは含まれていない。従って、本研究課題は本制度の趣旨に沿うのみならず、日本の民間・政府が支援しているキャッサバプログラムと相補できる研究課題である。本提案課題或いは類似の課題は現在までに選択・実施されていない。

### 4. 継続性の担保（特に課題期間終了後の取組）

本提案課題の成果である世界標準のキャッサバゲノム解析基盤は国外参加機関はもとより、世界のキャッサバ研究者の現在のニーズに応えるものである。このようなキャッサバ研究者の要望に鑑み、基盤整備後の共同研究（例：アレイ技術を用い共同研究）を通してネットワークの強化を更にはかると共にこの基盤整備をさらに進め、キャッサバ育種への世界的な貢献を目指す。我々は最先端ゲノム科学研究による成果を社会に還元するという理化学研究所植物科学研究センターの基本方針にのっとり、日本で始めてキャッサバのゲノム解析研究を重要な研究テーマの一つに位置づけ、2006 年以降キャッサバ研究に着手した経緯がある。本課題期間終了後も、1) キャッサバ cDNA リソースを保持提供、2) キャッサバデータベースの維持管理、3) アレイ技術による各国との共同研究を実施する。このために内部資金或いは外部資金を確保することに努める。

### 5. 我が国を中心としたアジア・アフリカ諸国等との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

2008 年の第四回アフリカ開発会議においては、食糧価格高騰問題等の優先分野で活発な議論が展開され、日本政府は農業分野への強いリーダーシップを示した。キャッサバは多くのアジア、アフリカ諸国の食糧安全保障上や貧困削減上重要な作物であることから、我々の提案事業は“国連ミレニアム宣言の趣旨に基づく貧困削減”の観点から現在の或いは今後の日本政府を中心とした政府間協力の強化・構築に資する事業である。

タイでは既にタイ国内又、ベトナム、ラオス等へのタイ品種の導入と言ったキャッサバ事業が、各国政府・国際研究機関レベル或いは民間レベルの資金協力で進んでいる。これらの既存の協力枠組みを利用、発展させ、東南アジアにおける二カ国間・多国間の協力を展開できると確信している。現在人材育成とインフラ整備が遅れているアフリカへの展開は、アフリカでのキャッサバ事業を担っている国際熱帯研究所 (IITA) と共同して取り組む。

### 6. 生命倫理・安全面への配慮について

本研究課題は野外（隔離圃場）での組み換え植物を用いる事業は計画されていない。キャッサバの形質転換方法の確立は全て実験室内で行われる。組み換え大腸菌作業が計画されているが、P1 レベルでの実験であり安全面の処置が通常からなされている。国外研究機関との実験材料の輸入、特に CIAT や IITA からの遺伝資源の提供は遺伝資源に関する国際協定に従う。

### 7. 研究実施体制

#### a. 国外参画機関の役割分担

CIAT はゲノム基盤構築と遺伝子導入技術に必要な遺伝資源を提供する。上述の野生種等を圃場・温室で生育させ、必要な処理後、RNA を単離する。キャッサバデータベースをユーザー側からの視点で検証し、遺伝子多型を検出するなどのマーカー構築の役割分担を担う。マヒドール大学研究グループはゲノム解析基盤を用いて、高収量、高付加価値キャッサバ育種に重要なデンプン糖代謝系の新規候補遺伝子を単離し、遺伝子マーカーを開発し、その実用化を目指す。

#### b. 国内参画機関

CIAT から提供された RNA を用いてキャッサバ完全長

cDNA リソースの整備を行う。又、CIAT から得た野生種試料を次世代シーケンサーに供し、有用遺伝子のリソース化を図り大規模 EST を整備する。これらの cDNA の配列情報を用いて、アジレントカスタムマイクロアレイを構築し、国外機関から提供された野生種或いは高収量キャッサバ品種の発現プロファイル解析を行い、病虫害耐性、高収量、高澱粉含量に関与する有用遺伝子を探索し、遺伝子マーカー

の構築を国外機関と共同で行う。世界のキャッサバ EST 情報を一元化すると共に、遺伝子の機能分類、遺伝子のゲノム上の位置、遺伝子多型情報、遺伝子の発現プロファイル等の本研究成果を網羅した世界標準のキャッサバデータベースを構築する。又、アジア・アフリカにおける実用品種の効率的な形質転換系の開発を試みる。

## 「熱帯作物分子育種基盤構築による食糧保障」

代表機関名：(独)理化学研究所

研究代表者名：関 原明

(実施期間：平成21年度～平成23年度)

### 1. キャッサバのゲノム解析基盤の構築(代表機関および国内参画機関)

理研植物科学研究センター・チームリーダー・関 原明(研究活動全体の統括)

a) 完全長cDNAリソースの整備 分担者：関 原明、櫻井哲也

b) 次世代シーケンサーを用いた高情報化大規模ESTの開発

分担者：関 原明、櫻井哲也、真鍋理一郎(理研オミックス基盤研究領域)

c) アジレントオリゴアレイ解析基盤の構築と重要形質候補遺伝子マーカーの探索  
分担者：関 原明、櫻井哲也

d) 国際標準のキャッサバデータベースの構築 分担者：櫻井哲也

e) キャッサバ実用品種の再分化系および形質転換系の開発 分担者：松井 南

世界規模でのキャッサバ分子育種の効率化と迅速化

アジア・アフリカの食糧安全保障・貧困削減に貢献

2. キャッサバ有用遺伝資源選抜と  
遺伝子マーカー構築  
コロンビア共和国・CIAT・  
上席研究員・石谷 学

a) 有用遺伝資源の選抜とその提供  
b) 重要形質候補マーカーの構築

3. 高収量・高付加価値キャッサバ  
のマーカー育種  
タイ王国・マヒドール大学・助教授  
Jarunya Narangajavana

a) 育種材料の選抜  
b) 重要形質候補マーカーの構築  
c) 遺伝子マーカー育種の構築

氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎関 原明	(独)理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、チームリーダー	研究代表者
内海 好規	(独)理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、特別研究員	代表機関研究参加者
松井 章浩	(独)理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、特別研究員	代表機関研究参加者
石田 順子	(独)理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、テクニカルスタッフ	代表機関研究参加者

田中 真帆	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、テクニカルスタッフ	代表機関研究参加者
諸澤 妙子	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、テクニカルスタッフ	代表機関研究参加者
内海稚佳子	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム、パートタイマー	代表機関研究参加者
櫻井 哲也	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、ゲノム情報統合化ユニット、ユニットリーダー	代表機関研究分担者
秋山 顕治	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、ゲノム情報統合化ユニット、技師	代表機関研究参加者
吉田拓広	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、ゲノム情報統合化ユニット、テクニカルスタッフ	代表機関研究参加者
松井 南	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム機能研究グループ、グループディレクター	代表機関研究分担者
近藤 (栗山) 朋子	(独) 理化学研究所、植物科学研究センター、植物ゲノム機能研究グループ、テクニカルスタッフ	代表機関研究参加者
真鍋 理一郎	(独) 理化学研究所、オミックス基盤研究領域、LSAシステム構築ユニット、上級研究員	代表機関研究分担者
石谷 学	国際熱帯農業センター (CIAT) Agrobiodiversity project、上席研究員	国外参画機関代表者
梅村 佳美	国際熱帯農業センター (CIAT) Agrobiodiversity project、ポストドク	国外参画機関研究協力者
Sarah Ayling	国際熱帯農業センター (CIAT) Agrobiodiversity project、ポストドク	国外参画機関研究協力者
Beata Dedicova	国際熱帯農業センター (CIAT) Agrobiodiversity project、上席研究員	国外参画機関研究協力者
Jarunya Narangajavana	マヒドール大学理学部、助教授	国外参画機関代表者
Kanokporn Triwitayakorn	マヒドール大学理学部、助手	国外参画機関研究協力者
Punchapat Sojikul	マヒドール大学理学部、講師	国外参画機関研究協力者
Supajit Sraphet	マヒドール大学理学部、ポストドク	国外参画機関研究協力者
Le Huy Ham	農業遺伝学研究所 (AGI)、所長	国外協力機関代表者

## 8. 各年度の計画と実績

### a. 平成 21 年度

#### ・計画

キャッサバ有用遺伝資源を出発材料にしてキャッサバ完全長 cDNA ライブラリーを作製する。キャッサバ完全長 cDNA クローンの端読み配列決定に着手する。キャッサバデータベースの開発準備および既存情報による試作を行う。キャッサバ実用品種の再分化条件を検討する。キャッサバ育種材料の選定に着手する。

#### ・実績

ウィルス病を媒介する whitefly(コナジラミ) 耐性品種である ECU72 由来の約 3 万個の完全長 cDNA クローンの端読み塩基配列決定を行った。Mealybug(コナカイガラムシ) 耐性野生種である MPER417-003 を用いて均一化完全長 cDNA ライブラリーを作製し、約 2 万個の完全長 cDNA クローンを単離した。454 シーケンサーを用いて、Poly(A)<sup>+</sup>-RNA の 5' 末端側からの端読み配列決定の条件検討を行いプロトコルを確立した。確立したプロトコルを用いて、ECU72 由来の大量端読み塩基配列決定(約 100 万リード)を行った。これまでに作成済みのキャッサバカスタムオリゴマイクロアレイ(Ver. 1)を用いて、高収量キャッサバなどの品種の RNA サンプルを用いて発現プロファイル解析を行い、キャッサバにおけるマイクロアレイ解析システムを確立した。公共データベースより獲得した核酸配列データの不要配列の検出、除外を行い、有効な核酸配列データを選抜、配列冗長性を排除した。生産した情報をふまえ、データベースの構造を検討、試作した。キャッサバアジア株 KU50、アフリカ株 TMS60444 を入手し、組織培養を開始した。カルス誘導条件を検討し、カルスから個体への再生を行った。2 月にマヒドール大学を訪問し、タイ国内のキャッサバ栽培とキャッサバ育種研究の現状把握を行った。

### b. 平成 22 年度

#### ・計画

キャッサバ完全長 cDNA クローンの端読み配列決定を引き続き行う。キャッサバ有用品種の RNA サンプルを用いて発現プロファイル解析を行い、キャッサバにおけるマイクロアレイ解析システムを確立する。30,000 以上のキャッサバ遺伝子を網羅したオリゴアレイ基盤の構築を図る。次世代シーケンサーを用いた高情報化大規模 EST の同定に着手する。完全長 cDNA クローンおよび次世代シーケンサーを用いた解析により得られた発現遺伝子の配列解析およびアレイデータとの関連付けを行う。キャッサバ実用品種の形質転換条件を検討する。キャッサバ育種材料の選定を引き続き行う。有用遺伝子マーカーの単離に着手する。有用遺伝子マーカーのタイにおけるキャッサバ分子育種の現場への応用に着手する。

#### ・実績

前年度単離した MPER417-003 由来の約 2 万個の完全長

cDNA クローンの 5' 末端からの端読み配列決定を行った。決定済みのクローンと合わせて合計約 7 万個のキャッサバ完全長 cDNA の端読み配列を決定した事になる。配列データをクラスタリングすると約 2 万個の遺伝子グループに分類された。次世代シーケンサーを用いて、MPER417-003 由来の poly(A)<sup>+</sup>-RNA の 5' 末端からの大量端読み配列決定(約 100 万リード以上)を行った。作成済みの Ver. 1 アレイを用いて以下の 2 つの実験を行った。1) キャッサバ塊根由来の RNA を用いた解析から塊根成長期間中に発現する遺伝子を同定した。2) 乾燥ストレス処理したキャッサバ茎葉由来の RNA を用いた解析により、乾燥ストレス誘導性遺伝子を同定するとともに、アジレントアレイを用いて異なるキャッサバ品種間での遺伝子発現解析が可能であることがわかった。3 万個以上のキャッサバ遺伝子を網羅した Ver. 2 アレイのデザインを行った。完全長 cDNA や EST の情報をもとに高収量、高付加価値な塊根をもつキャッサバ品種を作製するための基本情報である糖およびデンプン代謝に関わる遺伝子配列を同定し、これら遺伝子群をリストアップした。これら遺伝子配列の品種間比較を進めた。公共データベース NCBI より、約 8 万個のキャッサバ mRNA 配列を獲得し、品種毎に配列データを分類、シーケンスアセンブラ CAP3 で処理し、共通配列部で整列させることで SNP を探索したところ約 2,000 箇所の SNP が検出できた。上記の基礎的なデータベースを構築し、分子マーカーとして活用するためのプライマー対の設計、データベース化のためのレコード構造の検討を進めた。アジアとアフリカの実用品種である KU50 と TMS60444 に関して、キャッサバ脇芽からの増殖の良いカルス誘導、誘導されたカルスにおける薬剤耐性、カルスからの植物体への再分化、に関して条件検討を行った。アグロ株を用いて遺伝子をキャッサバカルスへ導入し、形質転換体の選抜を進めた。9 月にマヒドール大学とベトナムの農業遺伝学研究所(AGI)を訪問し、キャッサバ分子育種の推進に向けた打ち合わせを行った。高収量・高デンプン含量品種(Huay Bong 60)と低収量・低デンプン含量品種(Hanatee)の F1 植物を用いて、QTL 解析と理研の情報基盤技術により、高収量キャッサバに関わる遺伝子が存在するゲノム DNA 領域を一つ特定し、その中に 35 個の候補遺伝子が存在する事を見出した。マヒドール大学の研究者 2 名を 5 月に理研へ招へいし、アレイ解析の技術指導を行った。

### c. 平成 23 年度

#### ・計画

30,000 以上のキャッサバ遺伝子を網羅したオリゴアレイ基盤を構築し、アレイ解析から有用遺伝子の同定を行う。次世代シーケンサーなどを用いた解析から遺伝子多型を同定する。解析結果のレコード化を行う。アジア・アフリカの実用品種の形質転換系の確立を試みる。有用遺伝子マーカーを単離する。有用遺伝子マーカーを用いてタイにおけるキャッサバマーカー育種の確立を図る。

## 9. 年次計画

研 究 項 目	1 年 度 目	2 年 度 目	3 年 度 目
(1) キャッサバ有用遺伝資源の選抜と試料提供 (CIAT)	ライブラリー ← 試料準備 →	アレイ試料準備 ← →	
(2) 完全長 cDNA リソースの整備 (代表機関)	ライブラリー作成 ← →	cDNA の配列決定 ← →	
(3) オリゴアレイの構築と有用遺伝子の探索 (代表機関)		アレイ構築、発現プロファイリング ← →	有用遺伝子の探索 ← →
(4) 次世代シーケンサーを用いた高情報化大規模 EST の構築 (代表機関)		発現遺伝子の大量同定 ← →	遺伝子多型の同定 ← →
(5) データベースの構築 (代表機関)	開発準備、既存情報による試作 ← →	配列解析、アレイデータ関連付け ← →	解析結果のレコード化 ← →
(6) キャッサバ実用品種の形質転換系の開発 (代表機関)	再分化条件の検討 ← →	形質転換条件の検討 ← →	形質転換系の確立 ← →
(7) キャッサバ育種材料の選抜 (マヒドール大学)	育種材料の選定 ← →		
(8) 重要形質候補遺伝子マーカーの構築 (代表機関、マヒドール大学と CIAT)		候補遺伝子マーカーの単離 ← →	
(9) 遺伝子マーカー育種の構築 (マヒドール大学と CIAT)			候補遺伝子マーカーの利用 ← →