

C₄ モデル植物 *Setaria viridis* の研究ツールの整備

榎原 均, 木羽 隆敏

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Research tools of *Setaria viridis*, a model C₄ plant

Keywords: C₄ plant, genome, *Setaria viridis*, transcriptome, transformation

Hitoshi Sakakibara & Takatoshi Kiba

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1-7-22, Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

1. はじめに

C₄ 光合成の研究はこれまで生化学的・細胞生物学的な手法を中心に行なわれ、CO₂ 濃縮回路の特徴付けや、窒素同化、硫黄同化における維管束鞘細胞と葉肉細胞間での機能分化のしくみなどが研究されてきた。また、C₄ 光合成成立に必要な遺伝子の探索については、近年、フラベリア属植物やエレオカリス属植物をもちいた比較ゲノミクスや、比較トランスクリプトミクスが盛んに行なわれ、鍵遺伝子のマイニングが試みられている。ただし、これらはいずれも逆遺伝学的なアプローチであるため、異なる側面からのアプローチが必要であることも指摘されていた。また、順遺伝学的な変異体のスクリーニングには CO₂ 濃度制御下で生育させるなどの必要もあり、トウモロコシのような大型の C₄ 植物を利用するることは困難であった。本稿では、近年、特に C₄ 植物研究のモデルとして注目されているエノコログサ (*Setaria viridis*) について、その研究ツール整備の現状と可能性について概説する。

2. エノコログサの特徴

エノコログサ (*Setaria viridis*, 慣用英語名 green foxtail) はイネ科エノコログサ属の 1 年生草本で、春から秋にかけて身近に見かける我々になじみの深い植物である（図 1）。いわゆる雑草であるが、穀物のアワ (*Setaria italica*, 慣用名 foxtail millet) の原種とされており、両者間では交雑も起こる。図 2 に主な作物との比較系統樹を示すが、スイッチグラス、ギニアグラスなどのエネルギー作物と近縁である (Li and Brutnell, 2011)。C₄ 光合成のサブタイプはトウモロコシ、ソルガム、サトウキビなどと同じ NADP マリックエンザイム (NADP-ME) 型である。

図1 エノコログサ (*Setaria viridis*)

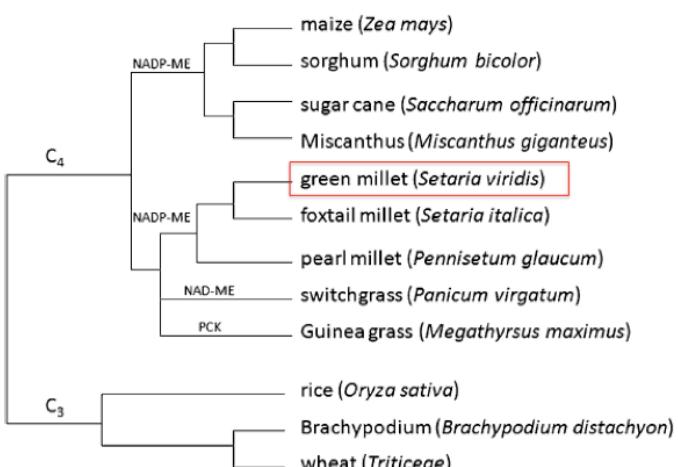
図3にゲノム解析がされている主なイネ科植物の特徴を比較した。エノコログサはゲノムサイズが約510 Mbp、世代時間が約6~8週間である。花成の日長感受性が高く、短日条件で出穂が誘導される。そのため、生育環境をコントロールすれば4週間ほどで種子の収穫も可能である。ただし栄養成長期が短いほど一穂あたりの穎花数も少なくなるため、目的によって生育条件を選択することが賢明である。気温25°C程度の自然光温室または人工気象器があれば栽培可能で、草丈も30cm以下であることから、実験材料として扱いやすい植物である。

米国USDAのNational Plant Germplasm Systemには77アクセッションが登録されているが (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?430573>)、研究用の標準アクセッションとしてA10.1が広く使用されている。このアクセッションは元株のA10から8世代自殖を繰り返したものであり、ゲノム解読にも用いられている。

3. ゲノム情報の整備

S. viridis のゲノム配列は米国のThomas Brutnellらを中心としたコンソーシアムにより解析が進められている。理研ではPacBio RS IIによる*de novo*ゲノムシークエンスや、遺伝子予測のためにRoche GS FLX+による完全長cDNAシークエンスを行い、コンソーシアムのゲノム解読に貢献している。PacBio RS IIによる解析では、平均長6.6 kb、ゲノムサイズの約23倍のデータを取得している。米国でも複数の次世代シークエンシングプラットフォームによる解読が完了している。現在それらのデータのアッセンブリーの最終段階であり、ゲノム配列情報は近いうちに公開される予定である。

栽培種のアワ (*S. italica*) のゲノム配列はすでに公開されている (<http://www.phytozome.net/foxtailmillet.php>) (Bennetzen *et al.*, 2012)。

図2 主なイネ科植物の系統発生関係
Li & Brutnell (2011)を改変

	C ₄ エノコログサ <i>S. viridis</i> (A10.1)	C ₄ トウモロコシ <i>Z. mays</i>	C ₄ ソルガム <i>S. bicolor</i>	C ₃ ミナトカモジグサ <i>B. distachyon</i>	C ₃ イネ <i>O. sativa</i>
ゲノムサイズ (Mbp)	510	2400	700	270	430
染色体数 (2n)	18	20	20	10	24
自殖	○	×	○	○	○
形質転換技術	○	○	○	○	○
掛け合わせ	可	易	易	難	易
ゲノムシークエンス	進行中	利用可	利用可	利用可	利用可
世代時間(週)	6	< 12	< 12	6	< 12
植物サイズ (cm)	10-30	~250	~500	10-20	120-200

図3. ゲノム解析がされている代表的な単子葉研究植物の特徴

完全長 cDNA 配列データについては、器官別と、温度、塩、乾燥および窒素欠乏などのストレス処理をした実生の地上部と地下部から、CAP-trapper 法を用いて均一化完全長 cDNA ライブライリーを作製し、5'および3'末端からの配列を Roche GS FLX+ で解析した。総計 5.6 million reads のデータを取得し、その約半分が完全長であると予測されている。このデータの活用により、より正確な遺伝子予想が可能になることが期待される。

4. 形質転換

エノコログサの形質転換方法は、イネと同様に成熟種子から誘導したカルスにアグロバクテリウム感染を介して外来遺伝子を導入する方法が用いられている。種子からのカルス誘導に 8 週間、感染とシュート再分化に 5 週間、根の誘導に 3 週間、鉢上げから種子収穫に約 4 週間の計約 5 ヶ月で T1 世代の種子が得られる。ただし、その効率については、イネなどに比べまだ低いといわざるを得ない。はじめに報告された方法(Brutnell *et al.*, 2010)では形質転換効率が極めて低く、実際の使用に耐えないというのが大きな問題であった。そこで私たちの研究グループでは、カルス培養培地などの条件を改変した結果、5-10% (感染したカルスあたり) の効率で形質転換体を得ており、遺伝子導入実験が現実的に可能なレベルに達している。この方法については近く公表する予定である。また、他の研究グループによる改良版も報告されている (Van Eck and Swartwood, 2015)。

5. 掛け合わせ

順遺伝学的な解析を進める上で、掛け合わせによる交雑は欠くことのできない技術で

ある。エノコログサの穎花は非常に小さいものの、掛け合わせは可能である。方法は48 °C の温浴で数分処理することで、花粉を不活性化（除雄）させ種子親とし、花粉親と交雑させる。これにより一穂当たり数個の掛け合わせ種子が得られる。詳細についてはビデオジャーナルに報告されている(Jiang *et al.*, 2013)。

6. 種子休眠

エノコログサは雑草であることから、種子休眠が深く、採取した直後の種子を播種しても発芽率は5%に満たず、数ヶ月保存しないと発芽率は上昇しない。それでは実験には向きであるので、休眠を打破するための工夫が試みられている。最も効果的と思われるのがリキッドスモーク処理である (Sebastian *et al.*, 2014)。リキッドスモークは燻製風味をつけるために使う調味料であり、燻煙の濃縮液である。有効成分は未同定ではあるが、この濃縮液中におそらく発芽誘導物質として知られる Karrikin に似た物質が含まれており、これが休眠打破に働くのではないかと考えられる。5%濃度のリキッドスモーク処理により、採取後一週間程度の種子でも発芽率を90%程度にまで上昇させることができる。また、休眠打破に働く植物ホルモンとして知られるジベレリン処理によっても発芽率が上昇することも報告されている (Sebastian *et al.*, 2014)。

7. 変異体リソース

順遺伝学的なアプローチをするためには、変異体のリソースの整備は欠かせない。米国では化学変異源である NMU (N-nitroso-N-methylurea)を用いた変異体ライブラリーを作製している (Brutnell *et al.*, 2015)。理研では、仁科加速器センターの阿部知子博士の協力を得て、重イオンビーム照射変異体ライブラリーの作出に取り組んでいる。すでに照射条件を検討し、大量の種子に炭素イオンを照射しており、名古屋大学の谷口教授らと共同で、3年以内に約10,000 ラインを整備することを目標に、変異率の評価と増殖を行っている。

8. おわりに

エノコログサの研究ツール整備はまだ十分とはいえないが、従来の生化学的な解析を中心であった C₄植物研究に、分子遺伝学を導入するためには、エノコログサの一連の研究基盤を確立する意義は大きい。また、エノコログサは単に C₄光合成回路を持つ植物というだけでなく、乾燥耐性や窒素利用効率など、植物の生産性向上を考える上で様々な特徴のある形質を備えている。シロイスナズナなどのモデル植物研究者が研究材料として手軽に扱えるような基盤環境が整備でき、多くの研究者が利用することを期待している。

9. 引用文献

- Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, Percifield R, Hawkins J, Pontaroli AC, Estep M, Feng L, Vaughn JN, Grimwood J, Jenkins J, Barry K, Lindquist E, Hellsten U, Deshpande S, Wang X, Wu X, Mitros T, Triplett J, Yang X, Ye CY, Mauro-Herrera M, Wang L, Li P, Sharma M, Sharma R, Ronald PC, Panaud O, Kellogg EA, Brutnell TP, Doust AN, Tuskan GA, Rokhsar D, Devos KM. 2012. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnology* 30:555-561.
- Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP. 2015. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. *Annual Review of Plant Biology* 66:465-485.
- Brutnell TP, Wang L, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu XG, Kellogg E, Van Eck J. 2010. *Setaria viridis*: a model for C₄ photosynthesis. *Plant Cell* 22: 2537-2544.
- Jiang H, Barbier H, Brutnell T. 2013. Methods for performing crosses in *Setaria viridis*, a new model system for the grasses. *Journal of Visual Experiments* 80: e50527.
- Li P, Brutnell TP. 2011. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoideae grasses. *Journal of Experimental Botany* 62: 3031-3037.
- Sebastian J, Wong MK, Tang E, Dinneny JR. 2014. Methods to promote germination of dormant *Setaria viridis* seeds. *PLoS One* 9: e95109.
- Van Eck J, Swartwood K. 2015. *Setaria viridis*. *Methods in Molecular Biology* 1223: 57-67.