

平成 2 7 年度種苗産業におけるオープンイノベーションの推進委託事業

報告書

公益財団法人かずさDNA研究所

目次

1. 本事業の目的	2
2. 検討委員会の設置	3
2.1 検討委員会委員	3
1.2 検討委員会の開催	4
3. 国内種苗会社当を対象とするセミナーの開催	5
3.1 第1回セミナー	5
3.2 第2回セミナー	5
3.3 第3回セミナー	10
3. モデル試験の実施	13
3.1 材料および方法	14
3.2 結果	14
4. 種苗産業におけるオープンイノベーションの実現にむけたアクションプラン	17

1. 本事業の目的

近年、育種プロセスの飛躍的な効率化・高度化等を実現するゲノム情報を活用した育種が取組が世界的に強化されており、今後、急速に多様な新品種の開発が進むと考えられる。一方、我が国においては、一部の大手種苗会社を除いては育種におけるゲノム情報の利用が進んでおらず、このことにより我が国の種苗産業が有する育種力の相対的な脆弱化ひいては種苗産業の国際競争力の低下につながることが懸念される。

大手種苗会社のみならず、中小規模の種苗会社から個人育種家までに至る我が国種苗産業界において、育種におけるゲノム情報の活用を促進し、我が国の種苗産業の国際競争力の強化を図るためには、様々な学術論文等で公表され、分散して存在する DNA マーカーの情報を集約して利用しやすくするとともに、単独では遺伝子解析を実施することができない中小規模の種苗会社等も手数料さえ支払えば研究機関等から育種に必要な遺伝子解析サービスを受けることができる環境を整備し、種苗産業におけるオープンイノベーションを図っていく必要がある。

このため、本事業においては、平成 26 年度種苗産業におけるオープンイノベーションの推進委託事業の結果を踏まえ、利用可能な DNA マーカーを用いた育種の試行を実施し、事業目的に沿って結果や課題の整理を行うこととする。事業内容は以下で構成する。

- (1) 検討委員会の設置
- (2) 国内の種苗会社等を対象とするセミナー開催
- (3) DNA マーカーを用いたモデル試験の実施
- (4) 調査報告書の作成

2. 検討委員会の設置

国内の種苗会社等を対象とするセミナー開催および DNA マーカーを用いたモデル試験の実施についての開催、実施方法や取りまとめについて検討するため、専門知識を有する委員 6 名で構成される検討委員会を設置し、事業実施の設計時及び最終報告時の 2 回検討会を開催した。

2.1 検討委員会委員

下記委員で検討委員会を設置した。

- ・矢野 昌裕 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所
- ・福岡 浩之 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所
- ・諏訪部 圭太 国立大学法人 三重大学
- ・油木 大樹 株式会社 武蔵野種苗園
- ・近藤 友宏 株式会社日本農林社
- ・酒井 隆子 みかど協和株式会社

検討委員会その他の出席者

- ・ 長野 暁子 農林水産省 食料産業局 新事業創出課
- ・ 九島 紗衣子 農林水産省 食料産業局 新事業創出課
- ・ 田畑 哲之 公益財団法人 かずさ DNA 研究所
- ・ 磯部 祥子 公益財団法人 かずさ DNA 研究所先端研究部
- ・ 白澤 健太 公益財団法人 かずさ DNA 研究所先端研究部
- ・ 永野聡一郎 公益財団法人 かずさ DNA 研究所先端研究部

1.2 検討委員会の開催

開催した検討委員会は下記のとおりである。

第一回検討委員会

日時：平成 27 年 8 月 5 日（水）13:30～16:00

場所：フクラシア東京ステーション 5 階 I 室

〒100-0004 東京都千代田区大手町 2-6-1 朝日生命大手町ビル

議事

- （１）事業の全体像
- （２）国内種苗会社等を対象とするセミナー開催
- （３）DNA マーカーを用いたモデル試験の実施
- （４）全体討議

第二回検討委員会

日時：平成 28 年 3 月 8 日（火）13:00～15:30

場所：TKP 東京駅前カンファレンスセンター ミーティングルーム 5B

〒103-0028 東京都中央区八重洲 1 丁目 5-20 石塚八重洲ビル

議事

- （１）本年度の事業報告
セミナーの概要/アンケート調査結果
モデル試験の結果
- （２）次年度事業内容に対する提案

3. 国内種苗会社を対象とするセミナーの開催

育種家を対象とし DNA マーカーを活用した育種の概要や利点を紹介するセミナーを開催する。経営者向けのセミナーを 1 回、実務担当者を対象とするセミナーを 2 回開催した

3.1 第 1 回セミナー

セミナータイトル：DNA マーカーの活用による種苗産業のオープンイノベーション

日時 10 月 1 日 場所：上野精養軒 15:30-16:30

日本種苗協会の会議にあわせ、経営者を対象に DNA マーカーの基礎と利用場面について、DNA マーカーに関する知識がない参加者にも理解してもらえよう、基本的な説明を行った。

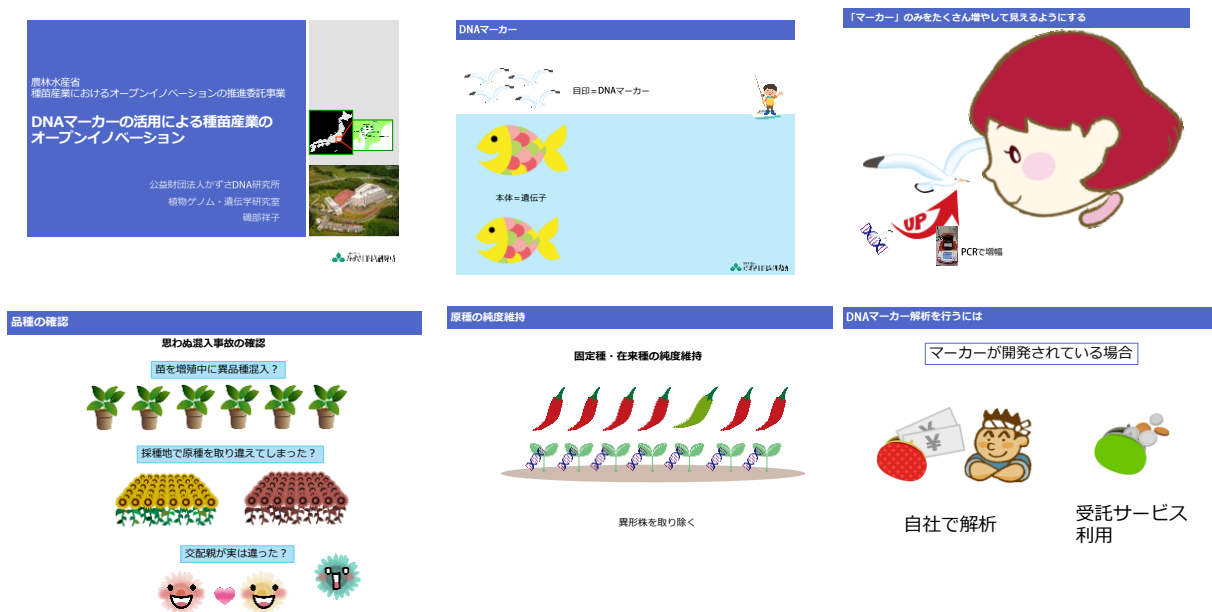


図 セミナーで用いた説明資料の抜粋

3.2 第 2 回セミナー

セミナータイトル：DNA マーカーの活用による種苗産業のオープンイノベーションセミナー

日時： 11 月 26 日 13:00-15:00 場所：東京ステーションコンファレンス

参加人数：受講者 61 名 関係者 12 名

受講者のうち種苗会社は 51 名、他は農業関連企業、食品会社および公的研究機関だった。

プログラム

13:00 開会あいさつ

13:05-13:40 「作物育種における DNA マーカーの利用法」

講演者：かずさ DNA 研究所 磯部祥子

13:40-14:20 「野菜の DNA マーカー利用技術をめぐる諸問題」

講演者：(国) 農業・産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 福岡 浩之 氏

14:20-15:00 「オウトウ育種における DNA マーカー開発と利用」

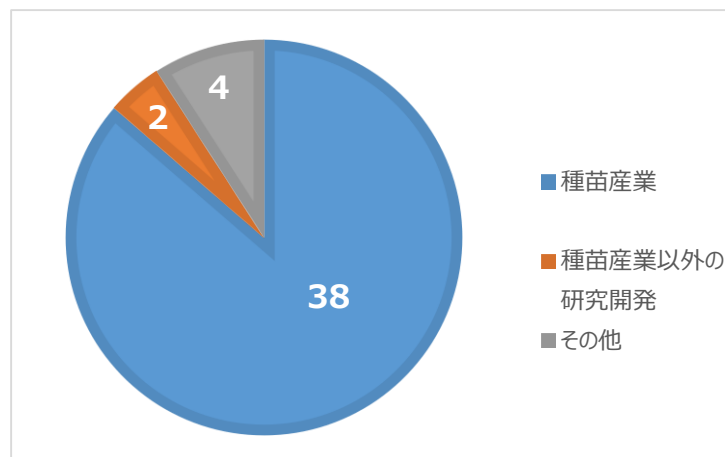
講演者：山形県農業総合研究センター園芸試験場 五十鈴川寛司 氏

15:00 閉会

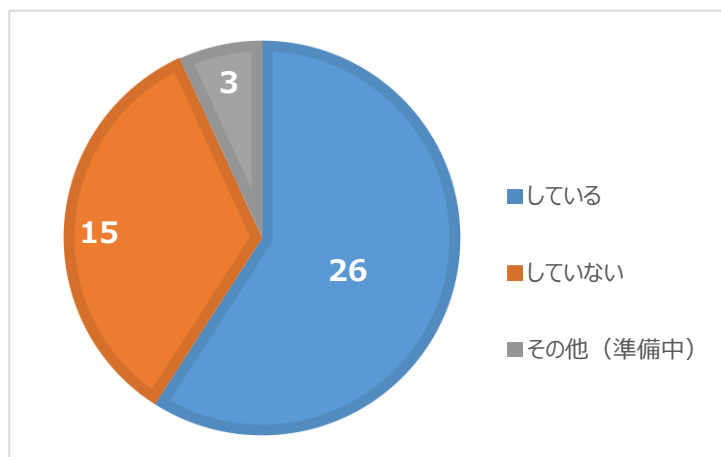
セミナー終了後にミキサーの時間を設け、参加者の間で意見交換を実施した。

また、参加者に対してアンケートを実施し、44 名の回答を得た。アンケートの設問および回答は以下のとおりである。

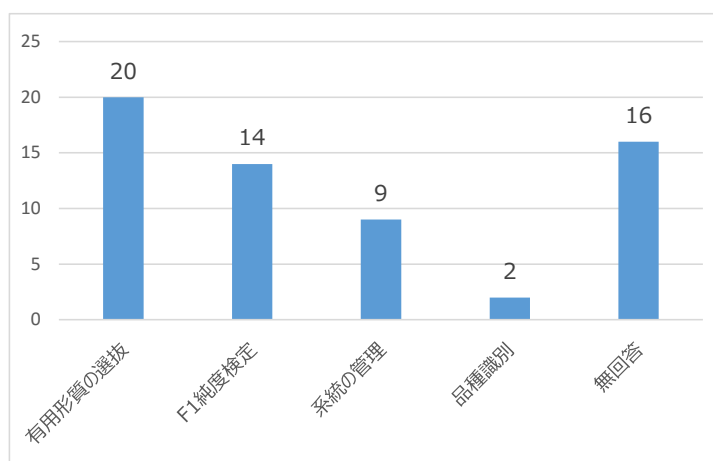
1. ご職業の内容をお選びください。



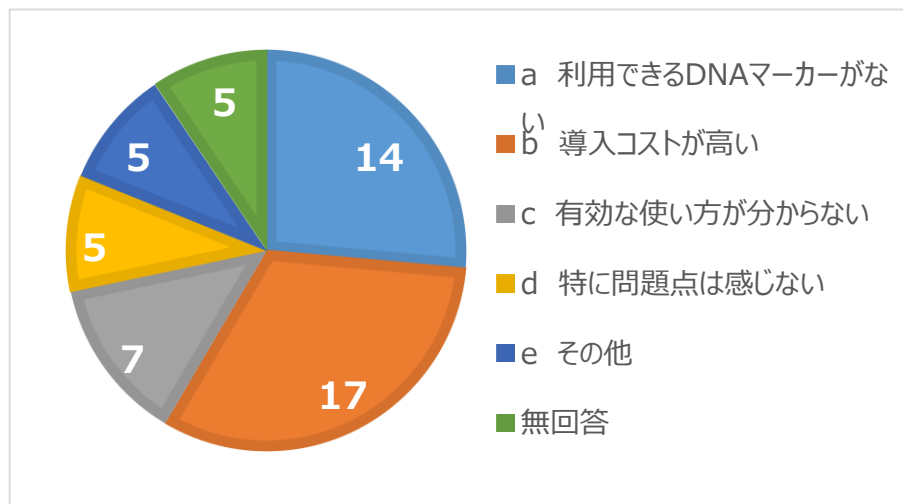
2. 現在のご職業で DNA マーカーを利用していますか。



3. DNA マーカーを利用している方に伺います。マーカー利用の目的は何ですか。（複数回答可）



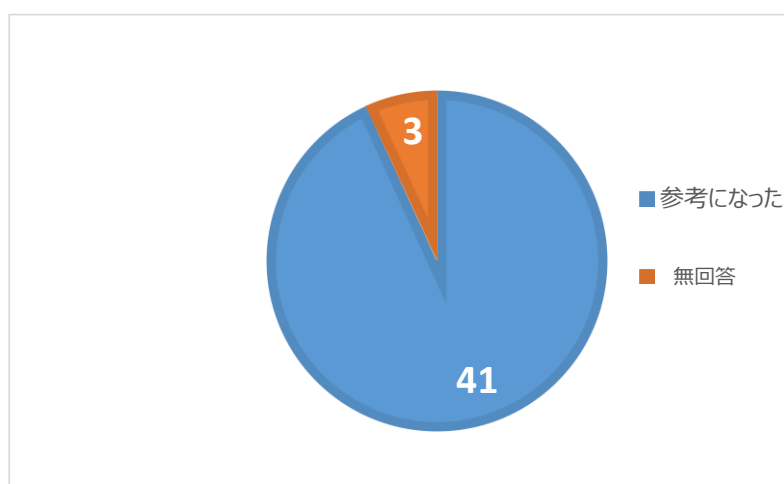
4. DNA マーカーの導入にあたっての問題点があればお答えください。（複数回答可）



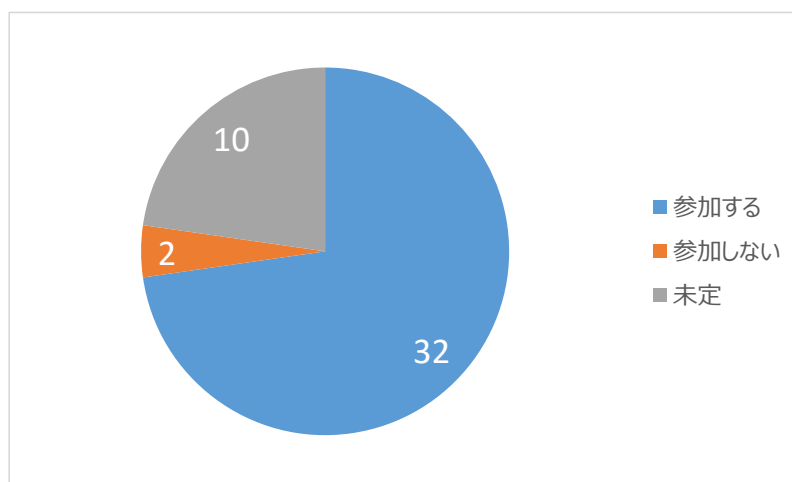
「その他」での自由記載の内容

- ・望む結果に結びつか不明、コスト回収
- ・知識、技術が不足している場合本業に加えて取り組むことが困難
- ・利用できる制度の高い DNA マーカーが少ない
- ・マーカー情報（特に育種選抜用）の文献を集めるのが一般企業では大変である
- ・開発が難しい

5. 本日のセミナー内容はいかがでしたか。



6. 次回セミナー（1/26 日）はご参加されますか。また要望があればご記入ください。



7. DNA マーカーの一層の利用に向けて、必要とする公的支援があればご記入ください。

- ・ 白さび病のマーカーを開発してほしい
- ・ キャベツ黒腐病・晩抽性のマーカーを開発してほしい
- ・ 全体的なコンサルティング・機器類の購入指導
- ・ 花きの研究を進めてほしい
- ・ メロン共台の育種に有用なマーカー開発
- ・ キャベツの単一遺伝子支配の病気抵抗性のマーカーがあれば
- ・ 情報を積極的に公開してほしい
- ・ 実際に DNA マーカーを作成する一連の流れを体験してみたい
- ・ ねりウリ MYSV 抵抗性品種選抜マーカーの開発・MYSV 弱毒株の選抜マーカーの開発
- ・ 参画しやすい共同研究の働きかけがほしい
- ・ 花きの DNA マーカーの開発
- ・ SSR,SNP マーカーを初めて利用するための技術講習会を開いてほしい
- ・ トマト拠点病抵抗性遺伝子マーカー（SCAR）を開発してほしい
- ・ しいたけの発生までの培養期間のマーカー
- ・ 豆類のマーカー開発（ダイズ以外）が可能かお聞きしたい
- ・ 各研究機関が公開しているゲノム DB を国内で全て統一した 1 つの DB に集約してほしい
- ・ 技術講習会があればぜひ参加したい
- ・ ｲﾝｺﾞについて育種に取り組む都道府県は多いがマーカーを自力で開発できる所は限られているため是非マーカー作成をお願いしたい
- ・ マーカー技術について詳しく教えられるような講演（基礎的、技術的）を開いてほしい（QTL 解析等）
- ・ 低コストで DNA マーカー利用を行いたい・技術講習会希望
- ・ ポスターセッションのような時間がほしい
- ・ 各業界でより有益となるような DNA マーカーを開発できた際に国から補助金等補助が出るとよい

- ・ 低コストでできるマーカーの利用法の開発
- ・ マーカー情報・データベースの充実・研究講習会を希望（有効な解析ソフトの紹介）
- ・ DNA マーカー開発に先立ち実施する調査（文献・DB 調査）で有効な調査項目の詳細
- ・ コストに関する話が非常に参考になった

8. その他ご意見がございましたらご記入ください

- ・受託事例の紹介
- ・DNA マーカー（プライマー）の作成方法をもっと知りたい
- ・公開されるゲノム情報を使用してマーカー選抜を行う流れをより詳細に教えていただきたい
- ・途中で休憩がほしい
- ・内容が難解なので整理する時間がほしい

3.3 第3回セミナー

セミナータイトル：DNA マーカーの活用による種苗産業のオープンイノベーションセミナー(2)

日時： 1月26日 13:00-15:45 場所：東京ステーションコンファレンス

参加人数：受講者 59 名 関係者 15 名

受講者のうち種苗会社は 53 名、他は農業関連企業、DNA 解析受託サービス会社および公的研究機関だった。

プログラム

13:00 開会あいさつ

第1部 DNA マーカー開発と利用の実際

13:05-13:40 「作物育種における DNA マーカーの利用法・その2」

講演者：（公財）かずさ DNA 研究所 植物ゲノム・遺伝学研究室 磯部祥子

13:40-14:15 「病害抵抗性選抜のための DNA マーカーの開発と利用」

講演者：岩手大学農学部農学生命課程 准教授 畠山 勝徳 氏

14:15-14:25 休憩

第2部 DNA マーカーの利用にむけて-受託解析の紹介-

14:25-14:45 「リーゾが提供する育種向け DNA 解析受託サービス」

講演者：（株）リーゾ 代表取締役 門奈 理佐 氏

14:45-15:05 「DNA マーカーを利用した検査法法の開発とサービス化について」

講演者（株）ファスマック 遺伝子検査事業部 高橋 一人 氏

15:05-15:25 「DNA マーカーを用いた種子品質検査および育種のサポート」

講演者：（株）インコテックジャパン 宮原 章 氏

15:25-15:45 「最先端技術による DNA マーカー利用のトータルサポート」

講演者：（公財）かずさ DNA 研究所 DNA 解析センター 田畑哲之

15:45 閉会

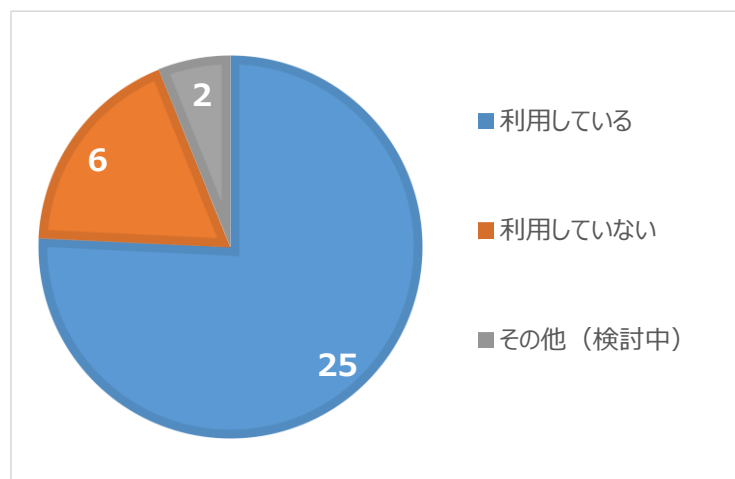
セミナー終了後にミキサーの時間を設け、参加者の間で意見交換を実施した。

また、参加者に対してアンケートを実施し、33名の回答を得た。アンケートの設問および回答は以下のとおりである。

1. ご職業の内容をお選びください。

a. 種苗産業：33名、 b. 種苗産業以外の研究開発：0名、 c. その他：0名

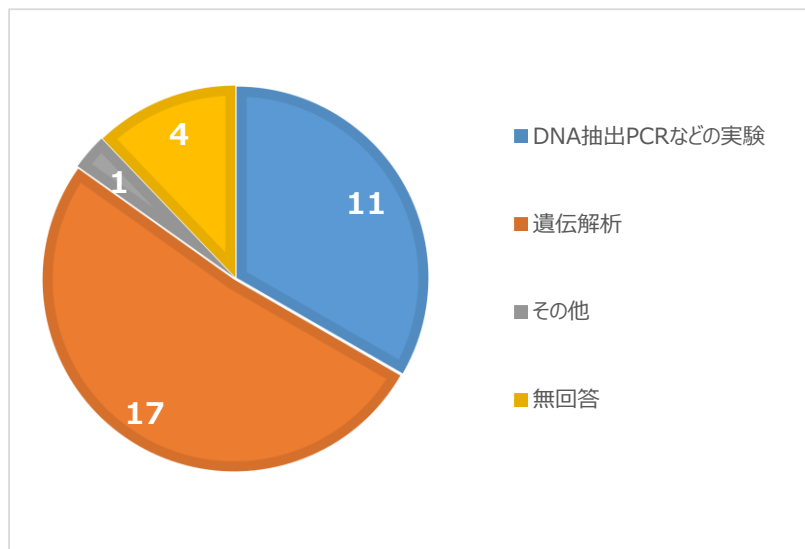
2. 現在のご職業で DNA マーカーを利用していますか。



3. 本日のセミナー内容はいかがでしたか。

a. 参考になった : 33 名、 b. 参考にならなかった : 0 名 、 c. その他 : 0 名

4. 今後技術講習会が開かれた場合、受講したい内容がありますか。



5. 公的サポートによる DNA マーカーの共同開発に興味はありますか。

a. 興味ある : 32 名、 b. 興味ない : 0 名、 c. その他（無回答） : 1 名

6. 5 で a と回答した方のみお答えください。実施にあたってはどのような条件が必要でしょうか（費用負担、系統名を含めた諸情報の公開等）

費用負担 : 12 名、無回答 9 名

その他の回答は下記のとおり。

- ・遺伝資源の公開
- ・耐病性マーカー開発時の接種試験の開発
- ・病気等抵抗性に関する情報がほしい
- ・費用対効果の検証
- ・機器の共有等
- ・こちらでの経費負担内容がわからないと判断できない、最初にわかると話が早い
- ・各会社で開発したマーカーを有償で安価に共同利用したい、特許開発したものを使いやすくしたい
- ・情報公開の制限等

- ・系統、素材は公開しないでほしい、実用品種化した場合の権利等
- ・情報公開は難しい
- ・別の実施者（他文献等）、実施方法（別マーカー）の結果と照合し目的のマーカーの有無が検体別に一致するかどうかの確認。
- ・自社でも反復実験で再現性がとれる
- ・育種に関しての権利
- ・情報公開について
- ・系統名を含めた情報公開はリスクを伴う
- ・不和合性 S 因子の程度（強弱）の選抜できるマーカーが欲しい
- ・開発後の情報公開が必要であるか
- ・非公開、IP や育成者権は系統提供者へ戻す等の協議が必要

7. その他ご意見がございましたらご記入ください

- ・スライド資料があるとわかりやすかった（2 名）
- ・安価な SNP タイピング講習会を希望
- ・詰め込みすぎで内容が浅いのが残念
- ・育種利用にあたり MABC を実施する場合のサポート、リンケージドラッグをいかにして切るか等の助言があるとかずさ及び企業の利用に積極的になれる
- ・花卉関係のゲノム情報の充実、公開
- ・中小企業の種苗メーカーであるがゲノム情報活用方法が見いだせていない

3. モデル試験の実施

平成 26 年度事業で作成された計画案に基づき、検討委員会の議論等に応じて必要な調整を加えて実際の植物体を用いた試験を行った。実施する品目・形質については、おおむね半年以内に判定ができること、かつセミナーで結果を報告することを想定し、種苗業界のニーズが高く、かつ効果が分かりやすい形質として、ハクサイ根こぶ病抵抗性を試験対象とした。また、用いる DNA マーカーについては特許権等、知的財産権の問題が生

じないよう留意した。本モデル試験では論文で公表されている選抜 DNA マーカーについて簡易・低コストで解析できる手法を提示し、DNA マーカーを用いた場合の作業性やコストの参考とした。

ハクサイ根こぶ病について：ハクサイ根こぶ病は *Plasmodiophora brassicae* Woronin によって引き起こされるハクサイの重要病害である。国内の感染菌は抵抗性によって 4 つのグループに分かれており、それぞれ異なる抵抗性遺伝子が関与する。グループ 3 菌に抵抗性を発現する *CRb* 遺伝子は単離はされていないものの、近傍のマーカーが Kato et al. (Breeding Science 63:116-124, 2003)により論文で公表されている。この近傍マーカーは特許申請等がされていないことから、本モデル試験で対象にすることとした。

3.1 材料および方法

対象マーカー：Kato et al. (Breeding Science 63:116-124, 2003)で公開されている *CRb* 抵抗性遺伝子近傍の 11 マーカーとした。

材料：ハクサイ品種「秋理想」（抵抗性）、「無双」（罹病性）および「新黄」F2 集団（分離集団）

接種菌：*Plasmodiophora brassicae* グループ菌

ハクサイ種子および接種菌は（国）農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所より入手した。また、接種検定法は同研究所・野菜育種・ゲノム研究領域・葉根菜育種研究グループで実施している手法により行った。

マーカーによる多型解析を実施する前にハクサイ品種「秋理想」および「無双」の接種試験を実施し、それぞれ抵抗性および罹病性を示すことを確認し、論文に記載の抵抗性/罹病性の遺伝子型と一致することを確認した。また、簡易・低コストに解析を行うため、DNA のサンプリング、抽出法の確立および使用マーカーの選定を実施した。

3.2 結果

1. ハクサイ根こぶ病接種試験

ハクサイ品種「秋理想」および「無双」の種子を直径 9cm のポットに播種し、（国）農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所で実施している手法に従って接種した。

抵抗性品種（「秋理想」）と罹病性品種（「無双」）でそれぞれ抵抗性および罹病性を示すことを確認した（下図）。



図 接種試験の結果。グループ3菌を接種した個体について、罹病性系統「無双」では根こぶが出来ているが、抵抗性系統「秋理想」では根こぶができていないことを確認した。

2. サンプルングおよび DNA 抽出法

サンプルングおよび DNA 抽出法は以下のとおりとした。

- ① 幼葉 2mm x 3mm 位をハサミで切り取り、96well-PCR plate の well に入れる。
- ② well あたり 70ul の bufferA を加え、組織を潰す。
- ③ サーマルサイクラーで 95℃10 分熱処理をする。
- ④ well あたり 70ul の bufferB を加えてよく混ぜる、滅菌蒸留水で 10 倍希釈して、2ul を PCR template に使用する。
- ⑤ 希釈した DNA 抽出液は-20℃に保存する。

BufferA: NaOH 0.1M, 2% Tween 20

Buffer B: 0.1M Tris-Hcl, 2mM EDTA

3. PCR

反応液組成(合計 5 μ l)は以下の通りである：1X Buffer P, 200 μ M each dNTP, 3mM MgCl₂, 0.8 μ M each primer, DNA テンプレート 2 μ l, 滅菌蒸留水 1.624 μ l。PCR はタッチダウン変法で行

い、PCR 後、反応液に 1x BPB sol.を 5ul 加えて、そのうち 8ul を 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した（下図）。

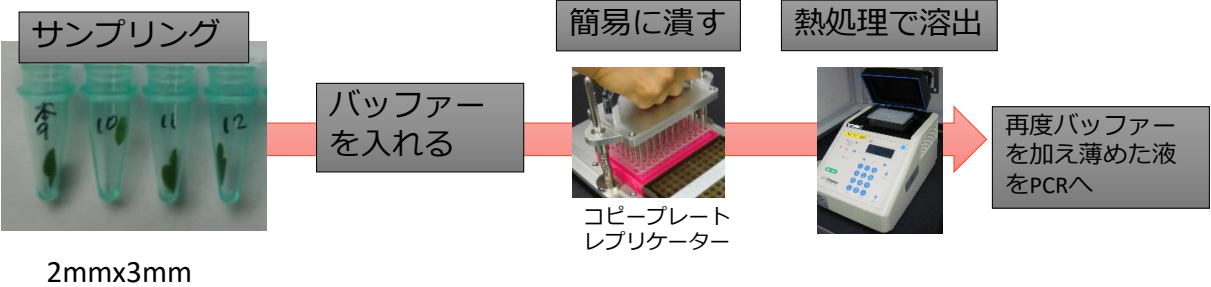


図 サンプリングおよび DNA 抽出法

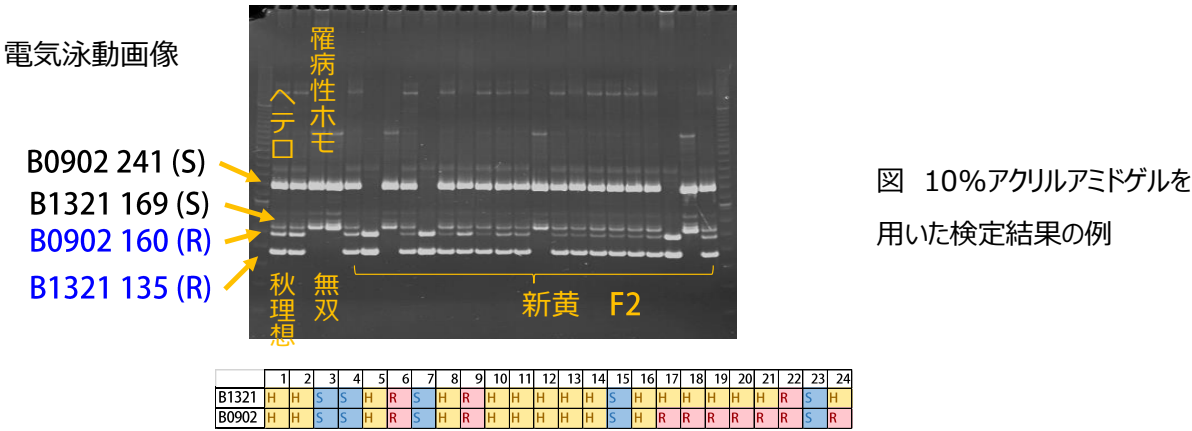
4. マーカーの選定

論文に記載の 11 マーカーに対し、2 マーカーによるマルチプレックス PCR で明確にターゲットバンドが検出できるマーカーとして下記の 2 マーカーを選定した。

マーカー	FW	Rv	アレルサイズ(bp)	
			抵抗性	罹病性
B1321	AGTGAAACAGACTATGATTAATGTTTT	GTTTCAACTTTGGTATAAGCGTTGAGA	135	169
B0902	AGCCTTGCGTAAAGCAACTAC	GTTTGGAATCCGACAAATACATCCAT	160	241

5. 解析結果

確定したプロトコルとマーカーで抵抗性および罹病性の判別を行うことができた。また、分離集団においても明瞭な分離を確認できた。



F₂ 分離集団では多くの個体がヘテロ型を示し、またマーカー間で組み換えも生じていた。マーカーを用いることで該当領域がホモ型である個体を選べることが明らかとなり、根こぶ病抵抗性育種におけるマーカー利用の有効性を示すことができた。

	秋理想	新黄 F2										無双
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	H H	H H	S S	R R	H H	H H	S S	H R	H R	H R	S S	S S
2	H H	R R	H H	H H	H H	H H	H H	R R	R R	R R	R R	S S
3	H H	H H	H H	H H	S S	R R	H H	R R	S S	R R	S S	S S
4	H H	H H	H H	H H	S S	R R	S S	S S	R R	H H	H H	S S
5	H H	R R	H H	H H	H H	H H	H H	S S	R R	R R	H H	S S
6	H H	S S	R R	R R	R R	S S	H H	H R	R R	H H	H H	S S
7	H H	R R	H H	H H	R R	H H	S S	H R	S S	H R	R R	S S
8	H H	H H	H H	R R	H H	H H	H H	H R	R R	H H	H H	S S

図 セルトレイに播種した F₂ 分離集団と各セル個体のマーカー遺伝子型。上段が B1321, 下段が B0902 の遺伝子型を示す。R:抵抗性ホモ、S:罹病性ホモ、H:ヘテロ型

4. 種苗産業におけるオープンイノベーションの実現にむけたアクションプラン

検討委員会での議論およびセミナーでのアンケート等を通じた種苗会社の実態調査から、種苗産業におけるオープンイノベーションに向けた今後のアクションプランを算定した。

前年度および本年度の事業から、種苗会社では DNA マーカーの導入には高い期待があるものの、十分に活用できていないことが明らかとなった。その原因は「マーカーが自分の材料で使えるか分からない」「使えるマーカーがない」「費用対効果」などだった。これを打開するには

1. 分散して存在する DNA マーカーの情報を集約して利用しやすくする
2. 遺伝子型解析サービスを受けることができる環境を整備

が有効であると考えられた。特にマーカー開発について、これまでは公的研究機関や大学等で開発が行われるのを待つのみであったが、種苗会社が自ら参画する「公的サポートによる DNA マーカーの共同開発」にも高い興味を持っていることが明らかとなった。以上の背景を踏まえ、今後のアクションプランとして以下の 2 点を提案する。

1. 「複数の種苗会社が参加した DNA マーカーの共同開発」の事例を作る

DNA マーカーの開発には多大な経費がかかるが、国内ではこれまでは各社が独立で開発を検討していたことから、取り組みが非効率であった。そこで各社の材料の機密性を保証した上で、DNA マーカーの開発に共同で取り組む事例を最初に作ることで、競争を保持しつつ協力して DNA マーカーによる選抜技術を開発する流れを生み出す。最初の事例ではゲノム全体にわたる遺伝子型を検出するための共通のマーカー基盤を確立することとし、特定の種において多型解析のための SSR または SNPs マーカーセットを作成する。これにより、系統維持管理を行うための DNA マーカーが開発されるとともに、選抜マーカー開発を行う際の基盤となる情報が整備される。すなわち「分散して存在する DNA マーカーの情報」のうち、情報量の高いマーカーを集約し、利用しやすくする最初のステップが達成できる。対象とする種については聞き取り等により選定するとともに、将来に備えて開発が必要な選抜マーカーの調査も行う。

2. 「マーカー開発・利用」に関する技術講習会

種苗産業界の DNA マーカー利用に関する技術力向上や受託解析サービスを利用する場合に役立つ基本的な技術の知識習得を図るため、実験、遺伝解析の技術講習会を実施する。将来は有料で各社が必要に応じで受講することを目指すことから、技術講習会を行える事業者を育成することも踏まえ、可能なかぎり民間業者に外注をする。

これら 2 つのアクションを通じ、国内の種苗産業において競争を保持しつつ、協力して選抜技術を開発する流れを生み出し、オープンイノベーションの実現を図る。