

# 高次倍数性作物種における遺伝育種学的解析と品種識別技術の開発

門田 有希 (岡山大学農学部)

[y\\_monden@okayama-u.ac.jp](mailto:y_monden@okayama-u.ac.jp)

## はじめに

現在我々が口にする作物品種は人類が長年にわたって生み出してきた産物であり、祖先種から栽培品種を改良、選抜する過程である育種 (品種改良) には途方もない時間と労力がかかる。DNA マーカーは育種にかかる時間を大幅に短縮し、より効率的に品種を選抜可能な技術として長年利用されてきた。現在、様々な作物種において DNA マーカー技術を用いた遺伝育種学的解析やマーカー支援選抜、多様性解析などが行われている。一方、10 年ほど前から高速に DNA 配列を読み取る高速シーケンサー (Next Generation Sequencer : 以下 NGS とする) が普及し、ゲノム情報を活かした新しい育種技術の開発やゲノムワイドな遺伝・連鎖解析、大規模な DNA マーカー開発が実施されている。私はこれまでの研究において、NGS を活用し、多様な作物種を対象とした遺伝育種学的解析ならびに品種の保護に向けた品種識別技術の開発に取り組んできた。本講演ではそれら研究概要を紹介する。

## 高次倍数性作物種を対象とした遺伝育種学的解析

従来、作物の遺伝育種学的な解析はイネ等の二倍体自殖性作物種を中心に行われてきた。NGS についてもイネなどのモデル作物種中心に普及が進み、大規模多型解析やゲノム育種、選抜育種等に利用された。一方で、栽培作物には高次倍数性を示す種が非常に多く、例えば、ラッカセイ ( $2n=4x=40$ )、アルファルファ ( $2n=4x=32$ )、パンコムギ ( $2n=6x=48$ )、サツマイモ ( $2n=6x=96$ )、イチゴ ( $2n=8x=48$ ) などが知られている<sup>1)</sup>。このような高次倍数性種はゲノムサイズが大きい傾向にあり、同祖領域の存在や複雑な遺伝様式を示すことから、ゲノム解析や遺伝解析が極めて困難となる<sup>1)</sup>。よって、二倍体種を対象とした解析法では通用しない場合が多く、独自のアプローチ法が必要となる。

著者らは、代表的な高次倍数性作物種であるサツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) を対象に、遺伝育種学的な研究を進めてきた。サツマイモは世界年間生産量が 1 億トンを超え、アジアやアフリカ、中南米で盛んに栽培されている作物である。栽培が容易で栄養価も高いことから、発展途上国では重要な栄養供給源となっている。しかしながら、六倍体で染色体数も 90 と非常に多く、自家不和合性や巨大なゲノムサイズを示すなどの特徴から、そのゲノム解析や遺伝・連鎖解析は非常に難しい。事実、著者らが 2014 年にサツマイモの遺伝解析を始めた当初、サツマイモの連鎖地図作製についての報告はわずか 6 報であった。このような状況において、著者らは NGS を活用し、新たな解析法を開発するなどの工夫を凝らし、様々な農業形質に関わる遺伝・連鎖解析を実施した (図 1)。まず注目したのはレトロトランスポゾンという複製 DNA 配列である。レトロトランスポゾン配列はゲノム全体に散在しており、一旦挿入された配列は安定して遺伝するため、品種間で異なる挿入部位は

DNA マーカーとして利用可能である<sup>2)</sup>。著者らは NGS を活用し、レトロトランスポゾン の挿入部位を品種横断的かつゲノム網羅的に同定する新しい解析法を開発した<sup>3)</sup>。交雑集団を 対象にレトロトランスポゾン挿入部位を解析し、その分離比を調査したところ、大部分の挿 入部位は単一の染色体に存在する **simplex** の状態で存在することが明らかとなった<sup>4)</sup>。

**Simplex** マーカーは、高次倍数体においても単純な遺伝分離比を示すため、比較的容易に遺 伝解析を行うことができる。著者らの解析結果では、約 90%の挿入部位が **simplex** の状態で 存在することが示され、レトロトランスポゾン挿入部位は高次倍数体の連鎖解析に有用であ ることが示された<sup>4)5)</sup>。さらに **SSR** や **SNP** などのマーカーについても交雑集団を用いた分 離比解析を行い、これら複数種類のマーカーを統合することで高密度な連鎖地図を構築した<sup>6)</sup>。また、ゲノムワイドな **SNP** 情報を用いた **GWAS** (**Genome-wide association study**) も行

い、農業形質を制御する遺伝領域を特定した。特に線虫抵抗性については、複数のレースに 有効な **QTL** 領域を同定することに成功し、検出された **QTL** 領域の **SNP** 情報を参考に実際の 育種現場で利用可能な選抜 **DNA** マーカーを開発した<sup>6)</sup>。最近の研究成果では、ゾウムシ抵

抗性や収量性、 $\beta$ カロテン含量など、様々 な農業形質に関する遺伝領域を同定する ことにも成功した<sup>7)8)</sup>。また質的形質だけ でなく、量的形質のような複雑な農業形質 にも利用可能な解析手法の開発が必要である

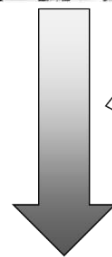
が、著者らは遺伝子座の量的効果 (**Allele dosage**) を考慮した新しい解析手法を適用 し、塊根の色や節間長などを対象とした解 析により、本手法の有効性を実証した<sup>9)</sup>。

この結果はサツマイモのような高次倍数性 作物種においても、量的形質など複雑な農 業形質に関する遺伝領域の特定が可能であ ることを示唆している。



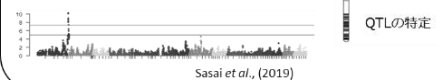
**サツマイモ ( $2n = 6x = 90$ )**

- ・ 代表的な倍数性作物種
- ・ 遺伝様式が複雑
- ・ 巨大なゲノムサイズ
- ・ 自家不和合性 (ゲノムヘテロ性高い)



**NGSを利用した遺伝・連鎖解析**

- ・ 高密度連鎖地図の構築
- ・ ゲノムワイド関連解析



Sasai et al., (2019)

**様々な農業形質に関する遺伝領域の同定!**

- ・ 育種に有用な選抜 **DNA** マーカーの開発
- ・ 高次倍数性作物種でもマーカー選抜育種が可能に

図 1. サツマイモの遺伝解析に関する概要図

### 品種の保護に向けた品種識別技術の開発

近年、国内で育成された優良品種の権利侵害や海外への不法流出、無断栽培などが相次い て報告されており、品種保護に対する重要性が高まっている<sup>10)</sup>。このような育成者権侵害を 防止するためには、品種を適正に識別可能な技術の開発が必要である。特に、税関等で海外 からの輸入農作物を検査し、品種の逆輸入を防ぐためには、迅速かつ簡便に利用可能な技術 の開発が望ましい。しかし、既存の **DNA** 検査法ではジャムや小麦粉など複数品種がブレ ンドされた加工品における原料品種を特定できない、また専用の実験機器や設備を用いた高度 な分析が必要で現場検査には導入できない、などの問題点が指摘されていた<sup>10)</sup>。

そこで著者らは、これらの課題を克服した新たな品種識別技術を開発するべく、技術開発 に取り組んだ。レトロトランスポゾン配列が複製される際、複製されたコピー配列はゲノム 内の 1 箇所にランダムに挿入される。よって、数百 Mb あるいは数 Gb という膨大な長さの

ゲノム全体のうち、異なる品種間で全く同じ領域に挿入が起こることは確率的にまずあり得ない。よって、対象品種にしか存在しない品種特異的な挿入部位は品種を特定する上で非常に優れた DNA マーカーとなる (図 2)。著者らはこの特徴に注目し、品種特異的なレトロトランスポゾン挿入部位を利用した品種識別技術を開発した。

平成 24 年からの 3 年間には、農林水産業・食品産業科学技術推進事業においてイチゴ、リンゴ、カンキツ、サツマイモなどの作物種を対象に品種識別技術に関する研究プロジェクトを実施した。本プロジェクトには、岡山大学他、農研機構 (果樹研究所、九州沖縄農業研究センター)、栃木県農業試験場、福岡県農業総合試験場、(株) ファスマック、(株) ニッポンジーンなど複数の研究機関が参画した。著者らは NGS を活用

し、ゲノム内に存在する膨大なレトロトランスポゾンファミリーの中から品種間で挿入多型を示すファミリーを特定する新たな手法を開発し<sup>11)</sup>、有用なファミリーが見つければその挿入部位を品種間で比較することで、品種特異的な挿入部位を探索した<sup>3)</sup>。品種識別に有用な挿入部位を同定した後は、挿入部位近傍に PCR プライマーを設計し、品種識別性を確認した<sup>3)</sup>。その結果、イチゴでは 8 品種、リンゴでは 5 品種、カンキツでは 8 品種において品種特異的なマーカーを開発した<sup>12),13)</sup>。サツマイモについても、代表的な色素原料用 3 品種において混合サンプルでも品種を特定可能なマーカーセットを開発した<sup>14)</sup>。さらに、現行法では困難であった、ジャムなどの加工品からの品種特定も本マーカーを用いれば可能となることを示した<sup>13)</sup>。その他、シイタケやコムギ等でもレトロトランスポゾン挿入部位を利用したマーカー開発を実施し、その有効性を示した<sup>15)-17)</sup>。

また、簡便かつ迅速な検査を実現するため、C-PAS 法や LAMP 法と言った新しい DNA 検査法や増幅法を取り入れた技術開発にも取り組んだ。C-PAS 法は小型のメンブレンスティックを使った新しい DNA シグナル検出法であり、高額な実験機器も不要で迅速かつ簡便にシグナルを検出することができる。また LAMP 法は、温度サイクル反応不要で、一定温度で高速に DNA を増幅可能な方法である。このような方法を取り入れることで、簡便かつ迅速にイチゴやアズキ品種を特定可能なことを示した<sup>18),19)</sup>。さらにレトロトランスポゾンの品種特異性を活かすことで、複数品種の混合サンプルにおいても品種を特定可能なことも示すことができた<sup>20)</sup>。以上のことから、著者らの開発した手法は現場での利用が期待される画期的な技術であると考えられた。

## 謝辞

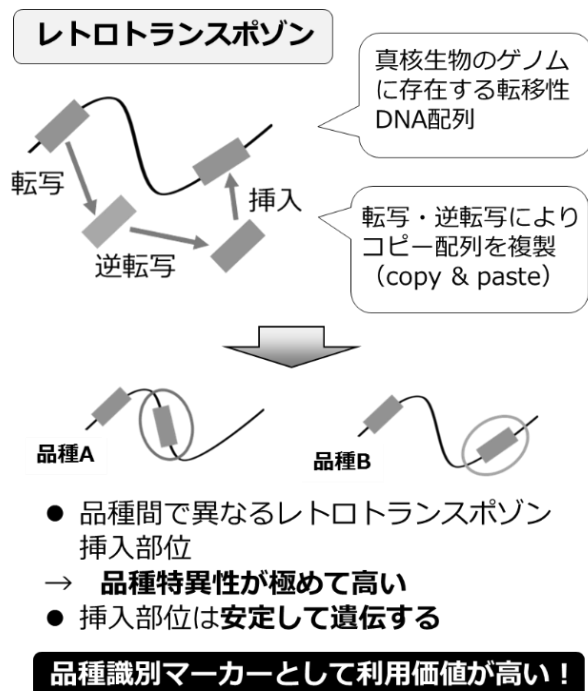


図 2. レトロトランスポゾン配列の特徴

日本農学進歩賞の受賞にあたり、国立大学法人岡山大学農学部および一般社団法人日本育種学会よりご推薦を賜りました。木村吉伸農学部長、大澤良会長ならびに関係者の皆様にご心より御礼申し上げます。また、本講演で紹介した研究は、岡山大学ゲノム遺伝解析学研究室にて行われました。本研究を行うにあたり、多大なるご指導・ご支援を賜りました岡山大学田原誠教授をはじめ、共同研究者の皆様には心より感謝申し上げます。また、共に研究に取り組んでくれた研究室の学生さん達にもこの場をお借りし、厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献 (\*Corresponding author)

- 1) 田中 剛, 磯部 祥子, 門田 有希, 石川 吾郎, 瀬々潤 : 育種学研究 21, 55-60 (2019).
- 2) Monden, Y. and Tahara, M. Hort. J. 84, 283-294 (2015).
- 3) Monden, Y., Yamamoto, A., Shindo, A. and Tahara, M. DNA Res., 21: 491-498 (2014).
- 4) Monden, Y., Hara, T., Okada, Y., Jahana, O., Kobayashi, A., Tabuchi, H., Onaga, S. and Tahara, M. Breed. Sci., 65, 145-153 (2015).
- 5) Monden, Y.\* and Tahara, M. Breed. Sci. 67, 41-51 (2017).
- 6) Sasai, R., Tabuchi, H., Shirasawa, K., Kishimoto, K., Sato, S., Okada, Y., Kuramoto, A., Isobe, A., Tahara, M. and Monden, Y.\*. DNA Res., 26, 399-409 (2019).
- 7) Okada, Y., Monden, Y., Nokihara, K., Shirasawa, K., Isobe, S. and Tahara, M. Plant Cell Rep., 38, 1383-1392 (2019).
- 8) Haque, E., Tabuchi, H., Monden, Y., Suematsu, K., Shirasawa, K., Isobe, S. and Tanaka, M. Breed. Sci., 70, 293-291 (2020).
- 9) Yamamoto, E., Shirasawa, K., Kimura, T., Monden, Y., Tanaka, M. and Isobe, S. G3, 10, 2661-2670 (2020).
- 10) 門田有希 : 化学と生物 55, 817-824 (2017).
- 11) Monden, Y., Fujii, N., Yamaguchi, K., Ikeo, K., Nakazawa, Y., Waki, T., Hirashima, K., Uchimura, Y. and Tahara, M. Genome 57(5): 245-252 (2014).
- 12) 西谷千佳子・山本俊哉・藤井浩・岡田和馬・門田有希・田原誠 : DNA 多型 24, 101-107 (2016).
- 13) Hirata, C., Waki, T., Shimomura, K., Wada, T., Tanaka, S., Ikegami, H., Uchimura, Y., Hirashima, K., Nakazawa, Y., Okada, K., Namai, K., Tahara, M. and Monden, Y.\*. Breed. Sci., 70, 231-240 (2020).
- 14) 田中勝・岡田吉弘・高畑康浩・門田有希・田原誠 : DNA 多型 24, 115-118 (2016).
- 15) 門田有希・高井健・田原誠・梅野佑太・中村遼太 : DNA 多型 22, 60-65 (2014).
- 16) 湯浅まり恵・門田有希・田原誠 : DNA 多型 23, 34-38 (2015).
- 17) 門田有希・民本麻梨・田原誠・梅野佑太・野口晃司 : DNA 多型 25, 68-71 (2017).
- 18) Monden, Y., Takasaki, K., Futo, S., Niwa, K., Kawase, M., Akitake, H. and Tahara, M. J. Biotechnol., 185: 57-62 (2014).
- 19) 高崎一人・リズティアン・門田有希・田原誠・布藤聡 : DNA 多型 24, 134-137 (2016).
- 20) 笹井瑠美・門田有希・田原誠・高崎一人 : DNA 多型 25, 88-91 (2017).