

次世代シーケンサーを用いた効率的遺伝解析技術の開発と実用展開

高木 宏樹 (石川県立大学 生物資源環境学部)

h-takagi@ishikawa-pu.ac.jp

はじめに

植物の育種現場では、消費者、生産者および流通業者などの様々な需要に対し、迅速な品種改良が求められる。現在、最も効率的な交配育種方法の一つとして、DNA マーカー利用選抜 (MAS; Marker accessed selection) 挙げられる。MAS では、育種における選抜過程において、有用な形質の有無を DNA マーカーにより迅速に判断することで、育種の効率化が達成される。ただし、MAS を用いた育種を展開する前提として、対象とする植物種における育種上有用な形質に関する遺伝子の同定が必須である。本講演では、これまでに開発に携わった次世代シーケンサーを用いた効率的な遺伝子同定法について概説する^{1),2),3),4)}。また、それらの手法を用いて同定された遺伝子を利用した育種例についても紹介する。

QTL-seq 法：品種の形質の差異を決定する原因遺伝子領域の同定

従来の遺伝子同定は、多数の DNA マーカーを用いた連鎖解析などに依存してきたため、DNA 多型の多い遠縁の品種間交雑後代を遺伝解析に用いることが一般的であった。しかし、草丈や収量などの農業上重要な量的形質を対象とした場合、遠縁の品種間交雑後代を用いた遺伝解析は、影響をおよぼす遺伝子数が多くなり複雑化するため、困難であった。一方、近縁の品種間交雑後代を用いる場合、ゲノム中の DNA 多型数が少なく DNA マーカーの設計自体が困難であった。それ故、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム中の一塩基多型 (SNP) 箇所を解析することで、従来の遺伝解析におけるジレンマを解消し、かつ、効率的に遺伝子を同定する‘QTL-seq’法が開発された⁴⁾。QTL-seq 法は、任意の品種間交雑後代における特定の表現型を有する個体間で共通する遺伝子領域を全ゲノム中に散在する SNP 箇所におけるアリル頻度を指標に同定する手法である。図 1 は、カブにおける根茎肥大部の長さの差異を決定する遺伝子領域を同定する場合を例として、QTL-seq 法の流れを示す。

QTL-seq 法は、イネを研究材料として確立された技術である。しかし、被子植物の約 40%は、自家不和合性メカニズムを有する他殖性植物であり、ヘテロ接合性の高いゲノムを有することが多い。このようなヘテロ接合性の高い品種・系統を親系統として育成した交雑後代にイネで開発した QTL-seq を直接適用した場合、親系統のヘテロ SNP 箇

所において正確なアリル頻度の計算ができず、遺伝子領域の同定に至らないことが多い。それ故、ヘテロ接合性の高い他殖性植物においても精度の高い QTL-seq 解析を実施するため、新たにフィルター処理が追加された‘改良型 QTL-seq 法’が開発された。改良型 QTL-seq 法によって、高いヘテロ接合性ゲノムを有するカブやハクサイなどのアブラナ科植物や雌雄異株植物であるシロギニアヤムなどにおいて迅速な遺伝解析が成功している^{5),6)}。さらに、QTL-seq 法における選抜集団で推定されるアリル頻度に適合する SNP 箇所数をゲノム領域ごとに算出する‘polyploid QTL-seq 法’が、山川らによって開発され、遺伝解析が非常に難しかったジャガイモ、サツマイモなどの高次倍数性植物でも迅速な遺伝解析が可能になっている⁷⁾。

以上より、QTL-seq 法およびその派生技術の開発が進んだことにより、主要な作物やモデル植物種以外では困難だった遺伝解析が様々な有用植物種において加速すると期待される。

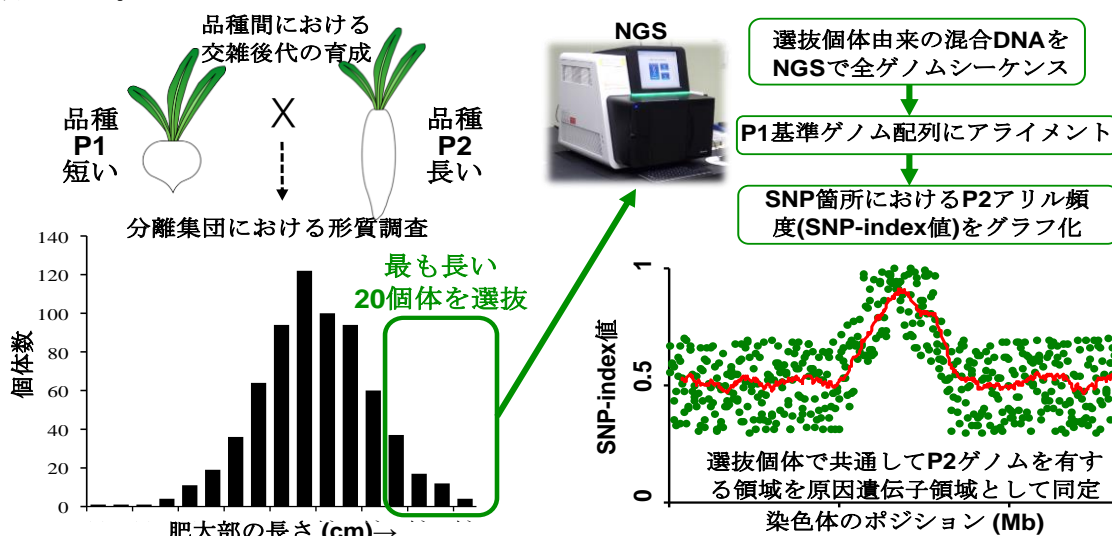


図1. QTL-seq 法の流れ。カブの根茎肥大部の長さを決定する遺伝子領域を同定する場合の適用例。

Sat-BSA 法：QTL-seq 法で同定された遺伝子領域における原因遺伝子本体の同定

QTL-seq 法は、上述の通り、品種間の差異を決定する大まかな遺伝子領域を迅速に同定できる。しかし、数百 bp 程度のショートリードを用いたリシーケンス解析を基礎としているため、基準ゲノム配列に対する SNP や数 bp の挿入・欠失以外の変異の解析が難しい。品種間の差異を決定する遺伝子は、1 世代で人為的に誘発される突然変異と比較して、時間をかけて自然および人為選択を受けて選抜されるため、大きな欠失やトランスポゾンの挿入などの構造変異を伴うことが多い。それ故、QTL-seq 法のみでは、公開されている基準配列と交配に使用した品種間における大きな構造変異を有するゲノム領域に座乗する原因遺伝子本体を同定することが難しかった。

そこで、QTL-seq 法で同定された遺伝子領域における品種間差異を決定する原因遺伝子を効率的に同定する‘Sat-BSA 法’を開発した(図2)⁸⁾。Sat-BSA では、まず、Oxford NanoPore 社シーケンサー由来のロングリードを用いた Local *de novo* assembly 技術によって、QTL-seq 法で同定された遺伝子領域における使用品種のゲノム配列を再構築する。次に、複数品種由来のロングリードを再構築されたゲノム配列に対して、アライメントして、リードの末端部位のアライメント状況を比較することで、再構築ゲノム配列上の品種間の構造変異を同定する。最後に、再構築ゲノム配列上の予測遺伝子における発現パターンと形質の連関を調査し、原因遺伝子を絞り込む。Sat-BSA を適用して、カブの根茎肥大部における着色形質に関与する遺伝子本体が同定されている。Sat-BSA

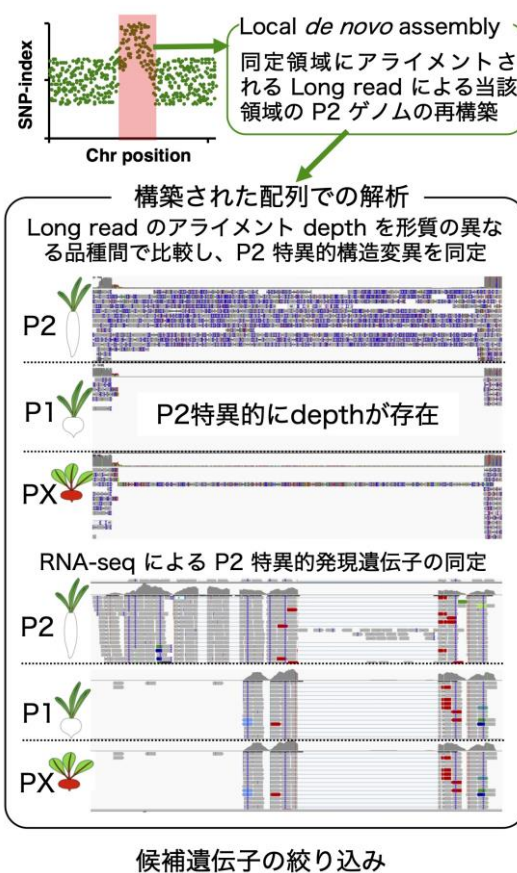


図2. Sat-BSA 法の流れ. 図1で同定された遺伝子領域における遺伝子本体を同定する場合の適用例.

は、ゲノムサイズの大きい植物種やヘテロ接合性ゲノムを有する植物種に対しても適用可能であるため、QTL-seq 同様に、様々な植物種における遺伝子同定への貢献が期待される。

開発した手法で単離された遺伝子の育種への利用

上述の次世代シーケンサーを用いた遺伝解析技術で同定された遺伝子の情報は、MAS による育種に活用されている。これまでに、発表者らが同定した遺伝子のうち、イネの重要病害であるイネいもち病に対する抵抗性遺伝子 *Pii* および *PiNor1* の遺伝子情報は、病害抵抗性品種の育種に利用されている。また、イネにおいて耐塩性に関する遺伝子についても同定しており、耐塩性品種「Kaijin (品種登録番号：29996)」の育成にも成功している⁹⁾。さらに、最近では、カブの根茎肥大部における着色に関する遺伝子単離に成功しており、石川県の伝統野菜「金沢青カブ」の着色形質の改良を進めている。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたり、石川県公立大学法人石川県立大学の生物資源工学研究所より推薦を賜りました。河井重幸所長には深く感謝申し上げます。また、本研究の

遂行にあたり、多大なるご指導を頂きました、京都大学大学院農学研究科教授の寺内良平博士、岩手生物工学研究センター主任研究員の阿部陽博士、La Trobe 大学の Tamiru Mulu 博士、そして、多々協力頂いた岩手生物工学研究センターの職員および石川県立大学の学生皆様に、心よりお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, **Takagi H**, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S and Terauchi R. *Nat. Biotechnol.* 30: 174-178 (2012).
- 2) **Takagi H**, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano LM, Kamoun S and Terauchi R. *New Phytol.* 200: 276–283 (2013).
- 3) Fekih R*, **Takagi H***, Tamiru M*, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kamoun S and Terauchi R. *Equally contributed author. *PLoS One* 8: e68529 (2013).
- 4) **Takagi H**, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano LM, Kamoun S and Terauchi R. *Plant J.* 74: 174–183 (2013).
- 5) Itoh N, Segawa T, Tamiru M, Abe A, Sakamoto S, Uemura A, Oikawa K, Kutsuzawa H, Koga K, Imamura T, Terauchi R and **Takagi H**. *Theor. Appl. Genet.* 132: 2913-2925 (2019).
- 6) Tamiru M*, Natsume S*, **Takagi H***, White B*, Yaegashi H*, Shimizu M*, Yoshida K, Uemura A, Oikawa K, Abe A, Urasaki N, Matsumura H, Babil P, Yamanaka A, Matsumoto R, Muranaka S, Girma G, Lopez-Montes A, Gedil M, Bhattacharjee R, Abberton M, Lava P, Rabbi I, Tsujimura M, Terachi T, Haerty W, Corpas M, Kamoun S, Kahl G, Takagi H, Asiedu R and Terauchi R. *Equally contributed author. *BMC Biol.* 15: 1-20 (2017).
- 7) Yamakawa H, Haque E, Tanaka M, **Takagi H**, Asano K, Shimosaka E, Akai K, Okamoto S, Katayama K and Tamiya S. (2021) *Plant Biotechnol. J.* 19: 2040-2051 (2021).
- 8) Segawa T, Nishiyama C, Tamiru M, Sugihara Y, Abe A, Sone H, Itoh N, Asukai M, Uemura A, Oikawa K, Utsushi H, Ikegami-Katayama A, Imamura T, Mori M, Terauchi R and **Takagi H**. *Breed. Sci.* doi: 10.1270/jsbbs.20148 (2021).
- 9) **Takagi H**, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsuchi H, Kanzaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S and Terauchi R. *Nat. Biotechnol.* 33: 445-449 (2015).