特集記事

全ゲノム情報を用いた突然変異遺伝子および QTL 同定法の開発とその活用

寺内良平^{1,2)}・阿部 陽¹⁾・高木宏樹^{1,3)}

¹⁾ 岩手生物工学研究センター, 岩手県北上市, 〒024-0003

²⁾ 京都大学農学研究科, 京都府向日市, 〒617-0001

³⁾ 石川県立大学生物資源環境学部, 石川県野々市市, 〒921-8836

Development of whole genome sequencing (WGS)-based methods for identification of mutated genes and QTL and their applications to breeding

Ryohei Terauchi^{1,2)}, Akira Abe¹⁾ and Hiroki Takagi^{1,3)}

¹⁾ Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan

²⁾ Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Muko, Kyoto 617-0003, Japan

³⁾ Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

キーワード

ゲノム解析, 突然変異, QTL, MutMap, QTL-seq

はじめに

作物の表現型のちがいをゲノム上の単一または複数の遺伝子の遺伝子型の差で説明することは、遺伝育種学上の重要課題の一つである。この目的のために、表現型とゲノム上の遺伝的変異を結びつける連鎖解析 (linkage analysis) が用いられる。遺伝子は染色体上に線状に分布している (Morgan 1911, Lobo and Shaw 2008) ため、同染色体上の近接する DNA 領域は、高い確率で共に同じ配偶子に入り子孫に遺伝する。一方、異なる染色体上の 2 領域は、独立に子孫に遺伝する。同一染色体上にあっても、より離れた位置にある 2 領域は、領域間に生じる組換え (recombination) により、共に子孫に伝わる確率が減少する。着目形質を支配する遺伝子と遺伝マーカー間の染色体上距離と、それらの間の組換え頻度には正の相関があるため、形質変異の遺伝と共に挙動する遺伝マーカーを発見すれば、その近傍に形質を支配する遺伝子が座乗することが推定できる。連鎖解析に用いられる交配集団には、F2 や組換え近交系 (recombinant inbred lines: RILs) などがある。イネ科穀類の多くに見られるような自殖可能な生物では、純系を育成し、純系同士を交配して得られた F1 個体を自殖することにより F2 世代を得る。F2 を起点に一種子更新 (single seed descent) 法により自殖を繰り返して RILs を得る。世代が進んだ RILs では、

ゲノムの大部分がホモ接合になり純系に近いため、同一遺伝子型の多数の個体を用いた精度の高い表現型検定が可能となる。

連鎖解析を効率的に実施するためには、ゲノム上の多数の遺伝マーカーが必要である。遺伝解析の歴史は遺伝マーカーの開発の歴史であると言っても過言でない。1970 年代には、制限酵素を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) が利用され始めた。1980 年後半の PCR 法の発明以来、simple sequence repeat (SSR) マーカー、amplified fragment length polymorphism (AFLP) マーカーなどが利用可能となった。ゲノム情報が充実するに従い、ゲノム上に多数の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) が見出され、SNP 情報をもとにした CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーなどが広く利用されるようになった。多数の遺伝マーカーの開発により、連鎖解析および連鎖解析の精度が飛躍的に高まった。しかし、これらの遺伝マーカーはゲノム上のごく一部の DNA 変異をサンプルして利用していたに過ぎない。

2005 年頃から次世代 DNA シーケンサーが普及し始め、生物の全ゲノムシーケンスが容易になり、全ゲノム情報を活用した作物育種の取り組みが開始された。イネでは、品種「日本晴」を材料として、2005 年に精度の高い全ゲノム配列が発表された (International Rice Genome Sequencing Project and Sasaki 2005)。これを契機として、イネのゲノム育種に拍車がかかった。

(公財) 岩手生物工学研究センター・ゲノム育種グループは、岩手県農業研究センターと協力して、岩手県を含

2019 年 10 月 28 日受領 日本育種学会賞受賞 (第 140 号)

2019 年 11 月 14 日 J-STAGE 早期公開

Correspondence: terauchi@ibrc.or.jp

む東北地方に適した水稻を迅速に育種する目的で、2005 年から、水稻品種「ひとめぼれ」突然変異系統群、「ひとめぼれ」と世界各地の水稻品種を交配した大規模交配系統群 (RILs) を育成してきた。水稻品種「ひとめぼれ」突然変異系統群は、ethylmethane sulfonate (EMS) 処理により得られた約 12,000 系統で、各系統あたり平均 1,500 箇所の SNP で親系統「ひとめぼれ」と異なっている。これらの遺伝子資源を活用して、育種上重要な遺伝子および量的遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) を迅速に同定して活用するために、全ゲノム解析による突然変異遺伝子同定技術 MutMap 法、QTL 同定技術 QTL-seq 法の開発に取り組んだ。

1. MutMap 法

MutMap 法は、次世代 DNA シーケンサーを用いた全ゲノム解読により突然変異体の原因遺伝子を迅速に同定する技術である (Abe *et al.* 2012)。本手法では、注目する表現型を示す突然変異体を変異処理前の親系統に交配し、F2 世代において表現型の分離を観察する。突然変異形質を示す子孫を 20–30 個体選別し、それらの DNA を均等に混合した一つのサンプル (バルク DNA) を用意する。バルク DNA の全ゲノムシーケンスを Illumina 社などの次世代 DNA シーケンサーにより解読する。その際、ゲノムを平均 10 回以上カバーすることに相当するシーケンスリード (リード) 量を解読する。得られたリードをイネの基準ゲノム配列にアライメントする。ゲノムの特定箇所にアライメントされた複数のリードの内、基準配列と異なる塩基 (SNP) を保有するリードの割合 (SNP-index) を計算し、SNP のゲノム上の位置と SNP-index の関係をグラフ化する (SNP-index plot)。突然変異体の表現型が劣性変異のホモ接合で生じている場合には、原因の SNP の SNP-index は 1.0 になるのに対し、表現型と関係のない SNP の SNP-index は 0.5 となることが期待される。原因 SNP の近傍の SNP も連鎖により SNP-index が高くなるため、原因 SNP の近くのゲノム領域では SNP-index plot が 0.5 から外れ、山状になる。こうした領域を精査することにより、原因突然変異を見つけることができる。本技術により、一度の全ゲノムシーケンスで、全ての SNP を遺伝マーカーとして利用して突然変異原因遺伝子を同定することが可能となり、迅速安価な遺伝解析が実現した。従来の連鎖解析では、多数の DNA マーカーを利用する目的で、突然変異体を遠縁の系統に交配して子孫分離集団を育成した。遠縁両親間に遺伝的変異が多数ある場合、突然変異形質が両親間の自然形質変異にマスクされ、F2 個体の中から目的の変異体を識別することは容易でなかった。MutMap 法においては、変異系統を親系統に交配するため、わずかな量的変異をもたらし突然変異についても F2 個体で変異体を識別可能であり、その原因遺伝子の同定が可能となった。MutMap 法を活用するこ

とにより、「ひとめぼれ」突然変異体から選抜された耐塩性系統 hst1 の原因遺伝子同定に成功した (Takagi *et al.* 2015)。さらに hst1 を「ひとめぼれ」に戻し交配することにより、耐塩性水稻品種「Kaijin」を育成し、品種登録 (26505 号:平成 30 年 1 月 30 日) に至った。MutMap 法の改良版として、MutMap+法を開発した (Fekih *et al.* 2013)。本手法は、分離集団で得られる変異型表現型の集団と野生型表現型の集団のバルク DNA を別々に全ゲノムシーケンスし、両者の間で SNP-index plot のパターンが異なるゲノム領域を探索する方法であり、突然変異の原因遺伝子同定の確実性が向上した。MutMap+法を利用することにより、ホモ接合になると致死性の突然変異や、不稔になるような突然変異の原因遺伝子を迅速に同定することも可能となった (Fekih *et al.* 2013)。MutMap-Gap 法 (Takagi *et al.* 2013a) は、実験対象としている品種と基準配列として用いる品種の間に、ゲノムの挿入欠失などの変異がある場合に有効である。本技術では、原因遺伝子の大きな領域を従来の MutMap 法で同定後、その領域のゲノム配列を *de novo assembly* によって再構築して欠失領域 (gap) を埋め、gap 内の変異遺伝子を同定する技術である。MutMap-Gap 法は、イネのいもち病抵抗性遺伝子 *Pii* 単離同定に活用され (Takagi *et al.* 2013a)、いもち病菌の非病原力因子 AVR-Pii との分子間相互作用の解析 (Fujisaki *et al.* 2015) にも貢献している。

2. QTL-seq 法

QTL-seq 法 (Takagi *et al.* 2013b) は、次世代 DNA シーケンサーを活用して作物の QTL を迅速に同定する技術である。本手法は、異なる系統間の交配で得られた子孫 (F2 または RILs など) において、注目する量的形質の値が連続的な分離を示す場合、形質値が最大の子孫のグループと最小の子孫のグループそれぞれ 20–30 個体の DNA をバルク化して 2 つの DNA サンプルを作成し、各々全ゲノムシーケンス後、両親間に存在する SNP 全てについて SNP-index を計算して、2 つのバルク DNA 間で SNP-index plot のパターンの異なるゲノム領域を探索して QTL を同定する方法である。本手法は、集団を表現型で分割して 2 集団に分けた時に、2 集団間で遺伝的距離が最も高いゲノム領域を同定する方法である。本技術を用いて、イネいもち病に対する圃場抵抗性 QTL の座標位置を同定した (Takagi *et al.* 2013b)。QTL-seq 法は、アワ (*Setaria italica*) の出穂期を決定する QTL の同定 (Yoshitsu *et al.* 2017)、西アフリカの重要な根菜作物であるギニアヤム (*Dioscorea rotundata*) の性決定領域同定 (Tamiru *et al.* 2017) にも用いられた。最近 Itoh *et al.* (2019) は、ヘテロ接合性の高い両親間の交配集団に QTL-seq を適用する方法を開発し、カブ (*Brassica rapa*) の開花期を支配する QTL および葉のトリコームを支配する遺伝子領域同定に成功した。

3. ゲノムの大きい生物への応用

MutMap 法および QTL-seq 法は、比較的小さなゲノムサイズのイネ (390 Mb) を実験材料として用いて開発された。いずれの方法も全ゲノムシーケンスを必要とするため、ゲノムの大きい生物では依然として費用がかかる。これらの生物では、ゲノム領域の一部をサンプルすることにより、MutMap 法および QTL-seq 法を適用することが可能である。restriction-site assisted DNA (RAD) 法 (Baird *et al.* 2008), genotype-by-sequencing (GBS) 法 (Elshire *et al.* 2011) は、ゲノムを制限酵素で切断後、アダプター断片を連結し、アダプター配列から 100 塩基前後 (RAD-tag) をシーケンスして多型を検出する技術である。MutMap 法および QTL-seq 法と同様に、特定の形質を示す個体のバルク DNA を対象として RAD をおこない、RAD-tag を基準配列にアライメントして位置を特定した上で SNP-index を計算することにより、ゲノム上の位置と SNP-index の関係のプロットを得ることができる。これにより突然変異や QTL の大まかな位置を迅速に知ることが可能である。また、遺伝子のエクソン領域のみを exome-capture 法により回収して、QTL-seq 法を適用する方法 (Exome QTL-seq) が開発され (Hisano *et al.* 2017), オオムギに適用された。分離集団の特定形質を示す個体のプールに対して RNA-seq を実施して SNP-index を調べることで QTL を同定することも可能である。

4. おわりに

DNA シーケンス技術の進歩により、ゲノム解読はますます迅速かつ低廉化しており、作物のゲノム育種が格段に進むことが予想される。現時点では、ゲノムサイズの大きい生物ではゲノムから実験的に部分配列をサンプルして解析することが必要であるが、この作業は煩雑であるため、そのコストを考慮すると将来には全ゲノムシーケンスの方が安価になる可能性がある。様々な作物を対象に MutMap 法および QTL-seq 法を適用することにより、重要形質遺伝子および QTL の同定作業が迅速化され、交配育種が加速化することが期待される。

謝 辞

本研究に共に携わった (公財) 岩手生物工学研究センター、岩手県農業研究センターの皆様には感謝します。特に岩手県農業研究センター前所長木内豊氏の指導に感謝します。本研究は、農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、生研支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業、日本学術振興会科研費の支援を受けて実施しました。ここに謝意を表します。本研究を通じて、終始ご支援と激励をくださった黒田秧博士に

心より感謝申し上げます。

引用文献

- Abe, A., S. Kosugi, K. Yoshida, S. Nasume, H. Takagi, H. Kanzaki, H. Matsumura, K. Yoshida, C. Mitsuoka, M. Tamiru *et al.* (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci using MutMap. *Nat. Biotechnol.* 30: 174–178.
- Baird, N.A., P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresko and E.A. Johnson (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3: e3376.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, U.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler and S.E. Mitchell (2011) A robust, simple genotype-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 5: e19379.
- Fekih, R., H. Takagi, M. Tamiru, A. Abe, S. Natsume, H. Yaegashi, S. Sharma, S. Sharma, H. Kanzaki, H. Matsumura *et al.* (2013) MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One* 8: e68529.
- Fujisaki, K., Y. Abe, A. Ito, H. Saitoh, K. Yoshida, H. Kanzaki, E. Kanzaki, H. Utsushi, T. Yamashita, S. Kamoun *et al.* (2015) Rice *exo70* interacts with a fungal effector, AVR-Pii, and is required for AVR-Pii-triggered immunity. *Plant J.* 83: 875–887.
- Hisano, H., K. Sakamoto, H. Takagi, R. Terauchi and K. Sato (2017) Exome QTL-seq maps monogenic locus and QTLs in barley. *BMC Genomics* 18: 125.
- International Rice Genome Sequencing Project and T. Sasaki (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793–800.
- Itoh, N., T. Segawa, M. Tamiru, A. Abe, S. Sakamoto, A. Uemura, K. Oikawa, H. Kutsuzawa, H. Koga, T. Imamura *et al.* (2019) Next-generation sequencing-based bulked segregant analysis QTL mapping in the heterozygous species *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.* 132: 2913–2925.
- Lobo, I. and K. Shaw (2008) Discovery and types of genetic linkage. *Nat. Education* 1: 139.
- Morgan, T.H. (1911) Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science* 34: 384.
- Takagi, H., A. Uemura, H. Yaegashi, M. Tamiru, A. Abe, C. Mitsuoka, H. Utsushi, S. Natsume, H. Kanzaki, H. Matsumura *et al.* (2013a) MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *New Phytol.* 200: 276–283.
- Takagi, H., A. Abe, K. Yoshida, S. Kosugi, S. Natsume, C. Mitsuoka, A. Uemura, H. Utsushi, M. Tamiru, S. Takuno *et al.* (2013b) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.* 74: 174–183.
- Takagi, H., M. Tamiru, A. Abe, K. Yoshida, A. Uemura, H. Yaegashi, T. Obara, K. Oikawa, H. Utsushi, E. Kanzaki *et al.* (2015) MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nat. Biotechnol.* 33: 445–449.
- Tamiru, M., S. Natsume, H. Takagi, B. White, H. Yaegashi, M. Shimizu, K. Yoshida, A. Uemura, K. Oikawa, A. Abe *et al.* (2017) Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC Biology* 19: 86.
- Yoshitsu, Y., M. Takakusagi, A. Abe, H. Takagi, A. Uemura, H. Yaegashi, R. Terauchi, Y. Takahata, K. Hatakeyama and S. Yokoi (2017) QTL-seq analysis identifies two genomic regions determining the heading date of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Breed. Sci.* 67: 518–527.