

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07604

研究課題名(和文) ダイズ突然変異集団を利用した変異遺伝子の高速マッピングシステムの構築

研究課題名(英文) Development of rapid mapping system, identifying mutant gene loci with the soybean mutant library.

研究代表者

渡邊 啓史 (Watanabe, Satoshi)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：40425541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンス解析データから取得した、品種間の多型情報を元に、1塩基多型の近接塩基に塩基置換を伴ったプライマーを設計することでPCR断片の融解温度の差分を最適化したDNAマーカー(Nearest neighboring nucleotide substitution HRM marker; NNNs-HRMマーカー)を開発した。このマーカーを用いた選択的遺伝子型決定法により、変異遺伝子座を少数の遺伝子型情報を元に染色体上に位置づけ、次世代シーケンス解析から得られた多型情報と組み合わせることで、変異遺伝子の責任遺伝子を比較的低コストで同定することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発した技術は突然変異集団から表現型選抜によって見出された突然変異系統の変異遺伝子について、表現型の変化の原因となるDNA多型を選択的遺伝子型決定法と次世代シーケンス解析技術を組み合わせることで、比較的容易に同定することを可能にした。またその変異遺伝子を新品種の育成に利用するにあたり、遺伝子型判別の容易なDNAマーカーと併せて育種現場に提供することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：High-resolution melting (HRM) analysis and optimization of the nearest neighboring nucleotide (NNN) of an SNP by nucleotide substitution in the primer can detect a single nucleotide polymorphism (SNP) in two polymerase chain reaction (PCR) fragments as a melting temperature (T_m) difference without additional experimental steps, such as gel electrophoresis. We also identified some of the responsible genes for mutant lines. To identify the gene responsible for the mutant phenotype, we applied NNNs-HRM genotyping analysis to a small number of F2 plants with the mutant phenotype. This analysis was followed by alignment of short reads obtained by NGS analysis to the identified QTL (the locus of the mutated gene) region and identification of functional SNP for the mutant phenotype. This procedure is time and cost effective and DNA marker developed by this procedure is very effective to select a line having favorable allele during the breeding programs using these mutant alleles.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：ダイズ DNAマーカー 突然変異集団 次世代シーケンス解析 マッピング

1. 研究開始当初の背景

植物のゲノム研究は、大量の塩基配列情報が得られるプラットフォームである次世代シーケンズ解析の発達により、どのような生物種であっても短期間に全ゲノムを網羅するだけの塩基配列情報が得られるようになった。ゲノムの塩基配列情報を得るためのコストが減少している中で、それぞれの種において、遺伝資源を対象としたリシーケンズ解析が活発に行われている。これらの塩基配列情報やゲノム全体に散在する一塩基多型 (SNPs) を利用して、遺伝資源の持つゲノム全体の遺伝情報を利用した関連解析によって収量性等に係る遺伝子座の同定なども行われているが、QTL の存在の確認が必要となる等、これらの情報が実際の育種現場で利用可能な状況にあるとは言えない。一方で、人為突然変異集団を用いた遺伝資源の拡大も行われている。特に変異を検出する対象となる遺伝子を予め定めた上で変異体を選抜する逆遺伝学的手法の場合、当該遺伝子に変異を持つ個体の選抜に必要な突然変異集団の育成、アンプリコンシーケンズや TILLING 等を利用した変異検出技術が確立されている。ダイズ突然変異体集団を構成する任意の個体を対象にした変異率はおよそ 100Kbp に 1 塩基と極めて高いことから、ダイズ突然変異体集団は逆遺伝学手法だけでなく、表現型に基づいた変異体のスクリーニングにおいても、多数の変異体を利用できる状況にある。本課題では突然変異系統が変異表現型の原因遺伝子を明らかにするためには、ゲノム全体を網羅する連鎖地図の構築とマッピングが必要となるが、通常の DNA マーカーを利用した場合、多大な労力と時間が求められる。これまでに変異体と原品種との交雑によって得られた分離集団およびシーケンズ解析を利用した変異遺伝子の座上領域の特定、および変異遺伝子を探索する手法がイネで利用されているが、イネの 2 倍以上のゲノムサイズを持ち、ゲノム上の重複が多いダイズにおいて適応された例は未だに無い。また多数の変異体についてその責任遺伝子を、全ゲノムシーケンズで解析するためには、ゲノムの数十倍の塩基配列情報が必要となり、コスト的にも甚大な金額が必要となると考えられる。そこで本課題では変異遺伝子の積極的な育種利用を目指すうえでより安価な変異遺伝子のマッピング手法の開発を目指した。

2. 研究の目的

本課題ではダイズ国産品種「フクユタカ」の突然変異集団から、表現型選抜によって得られた複数の突然変異体を対象に、個々の変異遺伝子について、国産大豆品種との交雑後代と次世代シーケンサーを利用したバルク分析法を組み合わせることで、効率的な変異遺伝子の染色体上の座上領域の特定および、個々の変異遺伝子に連鎖する DNA マーカーの作出法の開発を行うことを目的としている。具体的には簡便な遺伝子型判別技術の開発と次世代シーケンズ解析を組み合わせることにより、安価で高効率な変異遺伝子の単離・同定システムを構築し、変異遺伝子の機能多型のカタログ化を目指す。

3. 研究の方法

本課題では 変異体と近縁国産ダイズとの交雑による分離集団の育成、 分離集団 (F2 世代) の栽培および F3 種子を利用した表現型の調査、 表現型に基づいたバルクの作成および次世代シーケンサー解析用 DNA ライブラリーの作成、 次世代シーケンズ解析および得られたシーケンズの遺伝子型頻度の歪みに基づいた変異遺伝子の座上領域の特定、 変異遺伝子に連鎖する DNA マーカーの作成および簡易遺伝子型判別技術の開発、 DNA マ

ーカーを用いた変異遺伝子の座上領域の確認および変異遺伝子との連鎖分析、F3 集団を利用したマーカー選抜による育種母本の選抜と表現型の再確認により、作成した DNA マーカーの選抜効果を検証した。

4. 研究成果

次世代シーケンス解析データから取得した、品種間の多型情報を元に、1塩基多型の近接塩基に塩基置換を伴ったプライマーを設計することで PCR 断片の融解温度の差分を最適化した DNA マーカー (Nearest neighboring nucleotide substitution HRM marker: NNNS-HRM マーカー) の有用性について検討を行った。次世代シーケンス解析から得られた多型の大部分を、遺伝子型の識別において信頼性の高い DNA マーカーとして変換することが可能になり、ゲノム上の任意の位置に DNA マーカーの設計が容易となった。

この新規 DNA 多型解析技術を用いて、ダイズ種子中に含まれるイソフラボンの組成が異なる青黄豆とフクユタカ、球磨地 1 号とフクユタカの交雑後代を用いたイソフラボン含量の QTL 解析によって、染色体 11 番にマロニルグリシチンの増減に關与する遺伝子座 qMgly-11 と、染色体 15 番にマロニルゲニスチンの増減に關与する遺伝子座 qMGe-15 を同定した。フクユタカ突然変異集団から得られた変異系統と、フクユタカとは遺伝的に由来の異なるトヨシロメとの交雑後代を用いたイソフラボン変異体の変異遺伝子のマッピングについて、マロニル化体が減少した変異体と、ダイゼイン系が減少した変異体、ダイゼイン系が増加した系統を対象に、本課題で構築した高速マッピングシステムの適応が可能かどうか検証した。

それぞれの変異体とトヨシロメを交配した F2 集団を作成し、F3 種子をから抽出したイソフラボン含量を測定した。それぞれの集団から変異体と共通の表現型を示す個体を選抜したところ、どちらの集団においても、変異系統と同様の表現型を示す個体は 1/4 程度であり、変異遺伝子は劣性 1 遺伝子によって支配される形質であった。さらにそれぞれの分離集団から選抜した変異個体の DNA を用いて、上記で開発した NNNS-HRM マーカーを用いたバルク分析 (少数の変異型ホモ接合型個体を用いた選択的遺伝子型決定法) によって、關与する遺伝子座を同定した。バルク分析では限られた個体を用いることから、従来と比較して遺伝子座の同定に必要な遺伝子型数や労力を大幅に減少させることが可能となった。

具体的な 1 例として、ダイゼイン系のイソフラボン含量を変化させる変異遺伝子は染色体 18 番の末端に位置づけられた。この変異遺伝子の直接の原因となる DNA 多型を同定するために、次世代シーケンス解析を行い、当該 QTL 領域を大量に配列データのマッピングと機能多型の特定を行ったところ、変異遺伝子が座乗する染色体領域に存在するカルコンリダクターゼ遺伝子の第 3 エキソンに 1bp の欠損を変異体が有することが明らかとなった。この変異を対象に PCR のみで遺伝子型判別が可能な HRM 法による DNA マーカーを作成したところ、当該変異を正確に判別できるマーカーを作出した。

本課題で構築した HRM 技術を改良した DNA マーカーと選択的遺伝子型決定法による高速マッピングシステムと NGS 解析の組み合わせによって、変異遺伝子のマッピングと機能多型の同定が迅速に実施できるシステムが整った。本課題では当初 10 遺伝子座について、その座乗領域を同定することを目的として挙げていた。4 年間の課題実施期間において、イソフラボン組成関連遺伝子について 5 遺伝子座、脂肪酸組成に關する 4 変異遺伝子座、草型に關与する 1 変異遺伝子について責任遺伝子の同定を行っており、本課題で挙げた目標を十分に達成したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sarkar Md. Abdur Rauf, Otsu Wakana, Suzuki Akihiro, Hashimoto Fumio, Anai Toyoaki, Watanabe Satoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Single-base deletion in <i>GmCHR5</i> increases the genistein-to-daidzein ratio in soybean seed	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 265 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Satoshi, Yamada Risa, Kanetake Hazuki, Kaga Akito, Anai Toyoaki	4. 巻 69
2. 論文標題 Identification and characterization of a major QTL underlying soybean isoflavone malonylglycitin content	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 564 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rauf Sarkar, 橋本文雄, 鈴木章宏, 穴井豊昭, 渡邊啓史
2. 発表標題 GmCHR5に生じた一塩基欠損はダイズ種子におけるダイゼインに対するゲニステイン比を増大させる
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	穴井 豊昭 (Anai Toyoaki) (70261774)	佐賀大学・農学部・教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------