

令和 3 年 8 月 18 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：17K07605

研究課題名(和文) シンクロトロン光と次世代シーケンサーを用いた効率的な欠失突然変異体単離系の開発

研究課題名(英文) Development of an efficient short truncated mutant screening system using synchrotron-light irradiation and next-generation sequencing

研究代表者

穴井 豊昭 (Anai, Toyoaki)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：70261774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シンクロトロン光照射により変異集団を作製することで、標的となる遺伝子内に小規模な欠失を生じる頻度を高めることが可能であることを検証するとともに、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子機能がノックアウトされた変異体のみを迅速にスクリーニングする方法を確立することを目的とした。

しかしながら、我々が今回設定した条件では、異なる波長特性のX-線処理を比較したところ、変異の出現頻度に明確な差は観察されず、変異率も通常のX-線処理と同等程度であった。また、次世代シーケンサーを用いた変異の検出にも問題が多く、迅速な欠失変異スクリーニング系を実現するためには、更なる研究が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、さまざまな作物を改良する際に、遺伝子組換え技術に頼らず新たな性質を持った突然変異体を効率よく作成するための技術開発を目指した研究であり、さまざまな作物の品種改良に以前より用いられてきたX-線照射処理をさらに最適化するため、波長領域の異なるX-線を取り出すことができるシンクロトロン装置を使って、「どのような波長のX-線を用いれば作物へのダメージが少なく、より効率よく突然変異を発生させることができるのか？」また「その際に生じた突然変異をより簡単に素早く検出することはできないのか？」ということについて調査したものであり、成功すれば、画期的な品種改良技術が開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we verified the frequency of short deletions in the target gene which was detected by a next-generation sequencer using a mutant population created by the synchrotron radiation. The purpose of this study was to develop a simple and rapid method for screening the functionally knockout mutant.

Unfortunately, in our experimental conditions, the frequency of mutation in the different X-ray wavelength treatments could not observe a significant difference, and the mutation rate was about the same as normal X-ray treatment.

In addition, it needs further improvements in detecting In-Del mutations from next-generation sequencing data, and further research is needed to realize a rapid deletion mutation screening system.

研究分野：植物育種学

キーワード：シンクロトロン光 次世代シーケンス InDel サイズ 突然変異

1. 研究開始当初の背景

突然変異誘発の育種的な利用の歴史は古く、これまでも様々な作物種において有用品種の開発に利用されてきた実績がある。一方で、これまでの突然変異育種では主に表現型に着目して変異体のスクリーニングが進められてきたが、近年では、改良したい形質の原因となる遺伝子の塩基配列を直接の標的として、変異体の探索を行う逆遺伝学的なスクリーニング法が開発され大きな進歩を遂げている。

この逆遺伝学的な変異体のスクリーニングは、遺伝子組換え技術を用いることなく、特定の塩基配列に変異を持つ個体を素早く得ることが可能であり、標的遺伝子の機能を特異的に改変した新たな遺伝資源の作出を通して、遺伝資源の変異を劇的に拡大する手段として有効であると考えられる。これらの手法を用いて得られた突然変異変異体は、個々の機能が明らかにされていない遺伝子の機能解析に利用できるほか、一般的な交雑育種の際の新たな素材としても有用である。以前より、我々の研究グループではダイズを材料とした突然変異育種の研究を続けており、TILLING 法や HRM 法を用いた逆遺伝学的な変異体スクリーニングシステムの構築に取り組んできた。しかしながら、世界的に主流となっている変異体集団の作成法は、変異誘発効率が高いが、主に一塩基置換型の変異を誘発する EMS を変異原として使用した方法であり、欠失型の突然変異はほとんど得られないことも明らかになっている。我々は以前の研究で、ダイズに 200Gy の X-線照射を行った際に、1 から 100 塩基程度の比較的小規模な欠失と数百 Kb~数 Mbp 程度の大規模な欠失が半々程度の頻度で出現することを見出しており、このうち ORF 中に生じる小規模な欠失は高頻度でフレームシフトを引き起こし、当該遺伝子の機能をノックアウトすることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究では、シンクロトロンを用いて異なる波長特性を持つ X-線を照射した変異集団を作製することにより、標的となる遺伝子内に小規模な欠失を生じる頻度を高めることが可能であるかを検証するとともに、次世代シーケンサーを用いて、作製した変異集団中から遺伝子機能がノックアウトされた変異体のみを迅速にスクリーニングする方法を確立することを目的として研究を行なった。

具体的には、変異集団中の欠失変異の導入効率を高め、変異集団のコンパクト化をはかるため、以前に我々が利用していた X-線発生管を用いた照射装置に替えて、佐賀県立九州シンクロトロン光研究センターに設置されているビームラインを利用し、フィルターを用いて X-線のうちでも特定の波長のみを効果的に照射することにより、従来法と比較して植物体へのダメージを低減しつつ変異効率を向上させることが可能であるかの検証に取り組んだ。さらに、効率的な欠失型変異の検出系を開発するため、初年度は既に我々の研究室で作成している X-線照射ダイズ変異体集団の DNA プールを用いて、幾つかの標的遺伝子を対象に次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスを行い、SAM-Tools 等既存の解析ソフトを駆使して欠失型変異の検出系を開発を進めるとともに、集団中で検出された欠失型変異を保持する個体を特定するため、欠失部位を検出するための特異的プライマーを設計し、個体別の DNA 集団の中から目的とする変異体を迅速に単離するための実験系の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では効率的な欠失変異体スクリーニングシステムの構築を目指して、次世代

シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによる変異集団中の欠失変異配列の検出法の確立、 変異体集団中からの目的とする欠失変異個体の迅速検索法の確立、 小規模な欠失変異の導入効率を高めた X-線照射条件の最適化の 3 つのステップについて個別に検討を進め、標的遺伝子上に欠失を生じた突然変異体を迅速かつ確実に得られる技術の開発を試みた。 アンプリコンシーケンスおよび 欠失変異体の迅速検索法についての検討を行う際の材料としては、我々が以前に作成し保存しているダイズの X-線照射集団(約 2 万系統)の DNA を用いた。また、これと並行して、ダイズ種子に対して、シンクロトロン光施設を利用して X-線の線質や照射エネルギー量等を変化させた変異誘発処理を行い、得られた幾つかの変異集団を圃場で栽培して M2 種子を得た。その後、得られた M2 種子の一部について、アンプリコンシーケンスを行い目的とする小規模な欠失突然変異の導入効率を算出することで、X-線照射の最適条件を検索した。

次に、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによる変異集団中の欠失変異配列の検出法の確立を進めるために、以前作成したダイズ X-線照射集団の約 2 万系統から得た DNA を 384 個体分ずつプールし、それぞれのプールを鋳型として標的遺伝子の全長を含む 3~10Kbp 程度の領域を PCR によって増幅する。続いて、それぞれの PCR 産物について、断片化、平滑化、dA tail の付加等の処理を行い、由来するプールを識別するための DNA バーコード配列を含むアダプターを結合することにより、ライブラリーを作成した。このライブラリーについて、次世代シーケンサーを用いて解析し、変異体集団中からの目的とする InDel 変異配列を検索し、これらの InDel 配列を個別に PCR を行うことで個々の変異が検出できるかを評価した。

4 . 研究成果

今回の研究で検出された InDel の多くは、異なる処理区で重複して検出されており、真の変異配列ではなく、何らかの影響で誤って検出されたものであると考えられた。そこで、それぞれの処理区(100Gy : フィルターなし、200Gy : フィルターなし、100Gy : アルミニウムフィルター、100Gy : 銅フィルター)で特異的に観察された変異の一部に対して、多型を検出するためのプライマーセットを設計し、InDel の識別を試みた。前述の 4 種類の処理区について、変異した配列の長さが 100bp 程度の InDel をランダムに 30 個選び、5 個体分のゲノミック DNA をプールしたものを鋳型として PCR を試みたが、期待される大きさの PCR 産物が検出されたのは、僅かに 3 個のみであり、InDel の検出率は 2.5%であった。このため、次世代シーケンスによる InDel 変異の検出の精度に問題があり、このステップを改善する必要があると考えられた。また、実際にシンクロトロン光処理で誘発された InDel 変異の頻度は次世代シーケンスの結果から推定されていたものよりさらに低く、以前我々が作成した EMS 処理変異集団に生じた一塩基置換変異の 1%程度であることが明らかになったため、この手法で目的とする変異体を得るために必要な集団のサイズは EMS 処理を行なった変異集団と比較すると極めて多数の個体が必要となり、現実的には取り扱いが困難であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hirata Kaori, Takagi Kyoko, Yamada Tetsuya, Sayama Takashi, Anai Toyoaki, Kikuchi Akio, Ishimoto Masao	4. 巻 69
2. 論文標題 Isolation and characterization of induced mutants in the gene associated with seed cadmium accumulation in soybean	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 345 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.18091	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 -
1. 著者名 Sarkar Md. Abdur Rauf, Watanabe Satoshi, Suzuki Akihiro, Hashimoto Fumio, Anai Toyoaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of novel MYB transcription factors involved in the isoflavone biosynthetic pathway by using the combination screening system with agroinfiltration and hairy root transformation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.1025a	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 Krishnamurthy Panneerselvam, Fujisawa Yukiko, Takahashi Yuya, Abe Hanako, Yamane Kentaro, Mukaiyama Kyosuke, Son Hae-Reon, Hiraga Susumu, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Ishimoto Masao	4. 巻 60
2. 論文標題 High-Throughput Screening and Characterization of a High-Density Soybean Mutant Library Elucidate the Biosynthesis Pathway of Triterpenoid Saponins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1082 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Kazuhiro, Saruta Masayasu, Shimizu Takehiko, Shu Miao, Anai Toyoaki, Komatsu Kunihiko, Yamada Naohiro, Katayose Yuichi, Ishikawa Masayuki, Ishimoto Masao, Kaga Akito	4. 巻 10
2. 論文標題 Soybean antiviral immunity conferred by dsRNase targets the viral replication complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12052-5	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 Takagi Kyoko, Yano Ryoichi, Tochigi Saeko, Fujisawa Yukiko, Tsuchinaga Hiroki, Takahashi Yuya, Takada Yoshitake, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya, Ishimoto Masao	4. 巻 156
2. 論文標題 Genetic and functional characterization of Sg-4 glycosyltransferase involved in the formation of sugar chain structure at the C-3 position of soybean saponins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 96 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2018.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yano Ryoichi, Takagi Kyoko, Tochigi Saeko, Fujisawa Yukiko, Nomura Yuhta, Tsuchinaga Hiroki, Takahashi Yuya, Takada Yoshitake, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya, Ishimoto Masao	4. 巻 59
2. 論文標題 Isolation and Characterization of the Soybean Sg-3 Gene that is Involved in Genetic Variation in Sugar Chain Composition at the C-3 Position in Soyasaponins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 797 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy019	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 Yamagata Yoshiyuki, Yoshimura Atsushi, Anai Toyoaki, Watanabe Satoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Selection criteria for SNP loci to maximize robustness of high-resolution melting analysis for plant breeding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 488 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.18048	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 Krishnamurthy Panneerselvam, Fujisawa Yukiko, Takahashi Yuya, Abe Hanako, Yamane Kentaro, Mukaiyama Kyosuke, Son Hae-Reon, Hiraga Susumu, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Ishimoto Masao	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 High-Throughput Screening and Characterization of a High-Density Soybean Mutant Library Elucidate the Biosynthesis Pathway of Triterpenoid Saponins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Ryoji, Yan Fan, Di Shaokang, Murai Yoshinori, Iwashina Tsukasa, Anai Toyoaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Genetic and Chemical Analysis of Deep Purple Flower in Soybean	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Crop Science	6. 最初と最後の頁 1893 ~ 1893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2135/cropsci2016.08.0673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Shin, Yokota Yuko, Suzuki Rintaro, Fujisawa Yukiko, Sayama Takashi, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Komatsu Kunihiro, Oki Nobuhiko, Kikuchi Akio, Ishimoto Masao	4. 巻 133
2. 論文標題 Identification of a cytochrome P450 hydroxylase, CYP81E22, as a causative gene for the high sensitivity of soybean to herbicide bentazon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 2105 ~ 2115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-020-03580-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	渡邊 啓史 (Watanabe Satoshi) (40425541)	佐賀大学・農学部・講師 (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
---------	---------