

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月11日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22380011

研究課題名（和文）

多系交雑集団を用いたゲノミックセレクション法の開発と実証

研究課題名（英文） Development and investigation of genomic selection approach for a poly-crossed population

研究代表者

磯部 祥子（ISOBE SACHIKO）

（公財）かずさDNA研究所・植物ゲノム研究部・室長

研究者番号：20343973

研究成果の概要（和文）：多型交配集団を用いることで、親子関係のない系統間では有意な連鎖不平衡の距離が極めて短いアカクローバにおいても数百程度のマーカーで Genomics Selection を行えることが実証できた。また、育種集団の選抜時において限られたマーカー数で選抜を行うことができる EGGs 法を新たに開発することができた。

研究成果の概要（英文）：By using a poly-crossed population, genomic selection was successfully demonstrated in red clover, which showed linkage disequilibrium decay in short distance among unrelated lines. In addition, we have developed an advanced GS algorithm named EGGs (Ensemble-based Genetic and Genomic Selection) that chooses a set of markers for investigation of Breeding score.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	6,000,000	1,800,000	5,460,000
平成23年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
平成24年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：植物分子育種、他殖性

1. 研究開始当初の背景  
ゲノミックセレクション（GS: Genomic Selection）法は家畜育種の分野を中心に提唱されてきた育種法である。その概略としては、まずトレーニング集団の選定と集団内の各個体の遺伝子型と表現型値の調査を行い、得られたデータをもとに育種値推定式を作成する。次に育種集団の遺伝子型のみを調査し、これを推定式に当てはめることで各個体の推定育種値を求め、この値によって個体の選抜を行う。すなわち、GS法は育種集団の表現型を調査する手間が省けるため、より低コスト・短期間に優良個体の選抜を行えるという利点がある。

GS法で最も重要なポイントは、トレーニ

ング集団から得られる育種値推定式をより正確なものにすることである。この推定式は通常、各マーカーの遺伝子型が形質値におよぼす相加効果の加算を基本として作成されている。各マーカーの相加効果は、マーカーの遺伝子型と形質値を比較することで求められるので、DNAマーカーが対象とする遺伝子と連鎖不平衡（LD: Linkage Disequilibrium）の関係がないと相加効果を検出できない。LDが崩壊する距離は植物種やゲノム上の位置などで異なるが、例えばイネでは75～500kb、トウモロコシでは0.1～1.5kbという報告がある。すなわち、GS法を正確に行うためには、膨大な数のDNAマーカーを解析することが必要である。一部のメ

ジャーン作物種を除く多くの作物種においては、必要とされるマーカー数を解析に用いることは現状では非現実的であり、このことがGS法の実施を困難にしている。

## 2. 研究の目的

本研究では、多系交雑集団をトレーニング集団に用いることで集団内のLDの距離を長くし、数百マーカー程度の解析でGS法を行う手法を開発する。材料には、他殖性でゲノムのランダムなシャプリングが容易であり、2倍体でゲノムサイズが430Mbと比較的小さいアカクロバ (*Trifolium pratense* L.) を用いる。多系交雑集団は親集団のハプロタイプを起点として、その後の世代でLDが崩壊するとみなせるので、親子関係のない集団に比べてLDの距離が長くなる。その結果、少ないマーカー数でも育種値推定式の作成が可能となると考えるものである。また、育種集団における選抜効果を高めるために、最初の解析で検出されたマーカーの近傍にマーカーを再設定して解析し直すことで、最終的にはLDが短い育種集団においても有効な育種値推定式の作成を試みる。並行して全てのゲノムワイドなマーカーから得られた遺伝子型ではなく、一部のマーカーに由来する遺伝子型データから選抜効果を推定する手法を開発する。

## 3. 研究の方法

本研究では6親からなるアカクロバの多系交雑集団 (以下 AIL 集団) をトレーニング集団として、世界4ヶ国で開花始日、種子生産量などの形質特性を評価した (図1)。また、6親のうち2親に由来する transcript 配列を比較することで候補 SNP を検出した。これら候補 SNP について Illumina Golden Gate システムを用いて多型解析を行った。同時にアカクロバの一塩基多型 (SNP) マーカーによる遺伝子型データを取得した。得られた表現型および遺伝子型データを用いて、Adaboost 法による選抜に最適なマーカーセットを選ぶ手法を開発した。

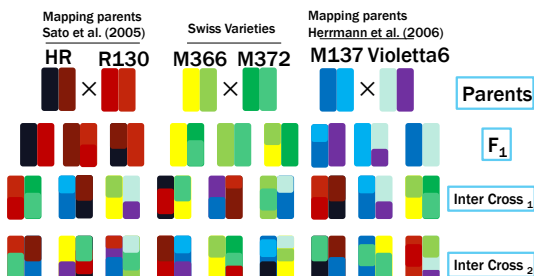


図1. AIL 集団の構造

## 4. 研究成果

H22年度はAIL集団の各200個体を日本、スイス、インドおよびロシアの4カ国で

栽培し、開花特性、収量性および植物性エストロゲン濃度など様々な形質の評価を行った (図2)。一方、ゲノムワイドなSSRマーカーによる多型マーカーによる遺伝子型解析を行った。

これらのマーカーより検出された平均のアレル数は6.5であった。さらにSNPマーカーの開発を進めるため、Roche社454シーケンサーを用いてアカクロバの異なる2系統の配列を収集し、配列のアセンブルおよび候補SNPの検出を行った。アセンブルの結果から得たコンティグ数は41,587であり、全リード長は45,990,294Mbpだった。これらの配列から2,227の候補SNPを設計し、Illumina社GoldenGateのSNPタイピングに適する1536のSNPを選抜した。AIL集団における多型解析の結果、1536SNPのうち784SNPが集団内で分離することが明らかとなった。

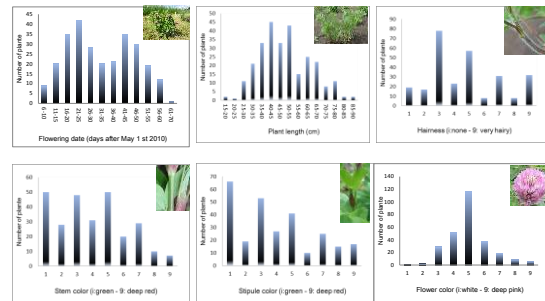


図2. 日本における形質評価値

H23年度はAIL集団の各200個体を日本、スイスおよびインドの4ヶ国で栽培し、形質評価をH22年度に引き続き行った。また、H22年度に開発したSNPのうち、ゲノム全体をカバーし、かつ集団内の分離の程度が良好だった384SNP、および75SSRマーカーを用いて、形質評価を行った全ての個体群に対し、遺伝子型解析を行った。解析を行った384SNPについては、H22年度に解析を実施できなかった約400個体についても遺伝子型解析を行った。得られた遺伝子型と表現型値をもとにGenotype Matrix Mapping (GMM) 法により解析を行ったところ有意なQTLを同定することができた (図3)。

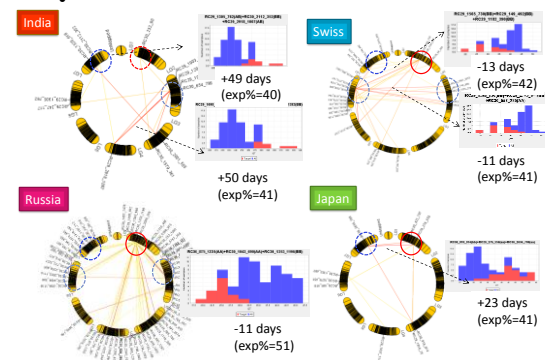


図3. GMM法による開花始め日のQTL検出

一方、ゲノムワイドなマーカーから選抜マーカーを同定する手法として、連続した表現型値を 1/0 データに変換した後に選抜マーカーを同定する Adaboost 法による選抜法を開発した。Adaboost 法による選抜マーカーと GMM 法により検出された QTL 近傍のマーカーを比較したところ、概ね一致することが明らかとなった (図 3)。

H24 年度は H24 年度に開発した Adaboost 法による選抜マーカーの選定法をさらに改良し、Ensemble-based Genetic&Genomic Search (EGGS)法として確立した。EGGS 法を用いて H22 および H23 年度に評価した開花始日に関するデータで選抜マーカーを検出したところ、約 20 のマーカーで個体が選抜できることが明らかとなった。また、異なる環境下 (日本、インド、スイス、ロシア) で得られたデータから選抜されたマーカーを比較したところ、共通して選ばれるマーカーがあることが認められた (図 4)。これらのマーカーの選抜効果を確認するため、新たに展開した 1000 個体の遺伝子型を調査した。遺伝子型を調査した個体は平成 25 年度に評価が終了し、選抜効果が確認できる予定である。

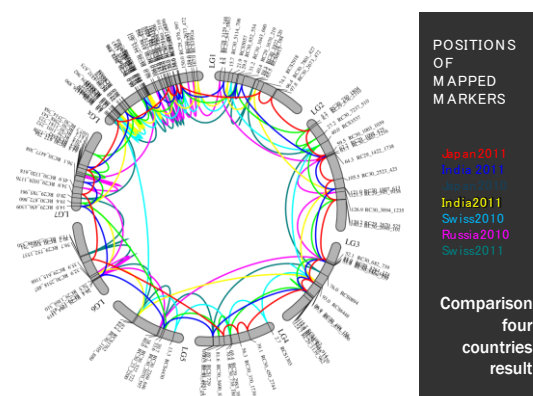


図 4. EGGS 法により選ばれた開花始日の選抜マーカーのゲノム上の位置。異なる年次、国のマーカー位置は異なる色で示している。各マーカーセットは曲線で結ばれている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Nakaya A and Isobe S (2012) Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Annals of Botany* 110:1303-1316

[学会発表] (計 7 件)

1. Isobe S, Shirasawa K, Sato S, Hirakawa H, Koilkonda P and Tabata S. Getting across the Devil river in the Legume land. (2010) Vth International Conference on Legume Genetics and Genomics, Ahilomar, CA, USA
2. Isobe S, Boller B, Klimenko I, Kölliker S, Rana JC, Sharma TR, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S and Tabata S. Genome-wide SNP marker development and QTL identification for genomic selection in red clover. (2011). The 29th EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grass Section meeting. The 29th EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grass Section meeting. Dublin, Ireland
3. Isobe S, Boller B, Klimenko I, Kölliker S, Rana JC, Sharma TR, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S and Tabata S. QTL identification for agronomic traits using an AIL-like population in red clover. (2012) The 4th Japan-China-Korea Glassland Conference. Aichi, Japan.
4. 中谷明弘ら、赤クローバ量の形質のゲノミック選抜に向けた表現型予測のブースト手法、日本育種学会、2012 年 9 月
5. Nakaya A, Sharma TR, Boller B, Klimenko I, Kölliker R, Rana JC, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S, Tabata S, and Isobe S. Identification of optimum DNA markers sets for MAS in red clover with a novel approach based on 'Adaboost' algorithm (2012) VI International Conference on Legume Genetics and Genomics, Hyderabad, India
6. Nakaya A, Sharma TR, Boller B, Klimenko I, Kölliker R, Rana JC, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S, Tabata S, and Isobe S. Genomic selection in red clover: issues and solutions (2013) Plant & Animal Genome XXI, San Diego, USA
7. Nakaya A, Sharma TR, Boller B, Klimenko I, Kölliker R, Rana JC, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S, Tabata S, and Isobe S. EGGS: A novel approach for identification of optimum DNA markers sets for MAS. (2013) GPGR3, Juju, Korea.

[図書] (計 1 件)

Isobe S, Boller B, Klimenko I,

Kölliker S, Rana JC, Sharma TR, Shirasawa K, Hirakawa H, Sato S and Tabata S. Genome-wide SNP marker development and QTL identification for genomic selection in red clover. (2012) In: Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement. Barth S, Milbourne D (ed). Springer, DOI 10.1007/978-94-007-4555-1

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯部 祥子 (ISOBE SACHIKO )  
(公財)かずさ DNA 研究所・植物ゲノム研究  
部・研究室長  
研究者番号：20343973

### (2) 研究分担者

中谷 明弘 (NAKAYA AKIHIRO )  
新潟大学・推進機構超域学術院  
研究者番号：60301149

### (3) 連携研究者

白澤 健太 (SHIRASAWA KENTA)  
(公財)かずさ DNA 研究所・植物ゲノム研究  
部・研究員  
研究者番号：60527026