

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450016

研究課題名(和文) 高ヘテロ植物集団を活用した高速育種の実証研究

研究課題名(英文) Research on high efficient breeding using widely diversified outbred family lines population

研究代表者

田口 和憲 (Taguchi, Kazunori)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター畑作物開発利用研究領域・グループ長

研究者番号：80414754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：幅広い祖先品種に由来する自家不和合性系統をランダム交配した合成集団(WOLF: Widely-diversified Outbred Line Family)を複数回無作為交配と循環選抜することで得た「高ヘテロ植物集団」を用いて、重要遺伝子近傍に着眼し、どの程度連鎖不平衡が打破され、新規の組換え遺伝子型が小断片化されているかを明らかにした。また、これらの無選抜集団と糖分循環選抜集団を比較して、選抜に伴ってアリル頻度に偏りが生じているマーカーを明らかにした。さらに、ゲノミックセレクションのシミュレーションにより、高糖分遺伝子型選抜における高速育種のポテンシャルを示した。

研究成果の概要(英文)：Using the synthetic population that were derived from successive random mating of the WOLF(Widely-diversified Outbred Line Family) populations, we obtained several kinds of WOLF population by randomly crossed with recurrent selection or not. Comparing these populations revealed the breeding potential of improvement how linkage disequilibrium was broken and revealed novel recombinant genotypes were small fragmented. In addition, by comparing these non-selected population and sugar circulation selected population, it revealed a marker that has occurred distortion of allele frequency in accordance with the selection. Moreover, on the basis of the genome diversity data, the simulation research conducted for genomic selection for these WOLF synthetic populations. It was suggested that high efficient breeding for the highly sugar content genotype selection has been shown potentially.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：他殖性 連鎖不平衡 ゲノミックセレクション 循環選抜 合成品種

### 1. 研究開始当初の背景

テンサイは、サトウキビと並び、世界のショ糖生産の4分の1を供給する糖質原料作物である (Draycott 2006)。その起源は、飼料用ビートの中から選抜されたショ糖高蓄積型の品種「ホワイトシレジア」に由来し、品種改良の歴史はわずか 200 年と浅い (Fischer 1989)。テンサイの糖原料作物化への過程では、塩水選や偏光糖度計、後代検定法などの適用により、わずか 20~30 年という短期間の選抜で、今日の品種にも匹敵する高糖品種群が派生してきた (Knapp 1958)。現在でも注目に値するこの改良速度を達成できた要因には、以下のような仮説が考えられる。すなわち、元来 *Beta vulgaris* は強い自家不和合性を示し、テンサイの共通祖先「ホワイトシレジア」の集団内にも多くの複対立遺伝子が保持されていた。このような集団ではヘテロ性が高く、かつ、有効な集団サイズが大きいため、遺伝子間の独立性が高かった (連鎖不平衡が低かった)。このような集団に対し、人為的に高糖方向への選抜を加えたことが、根中糖分の蓄積に有効な多数の遺伝子を急速に集積する結果につながった。その後、初期集団である「ホワイトシレジア」から派生した高糖型品種群は、欧州をはじめ世界各地に適応分化し、日本にも多数導入された。日本のテンサイ育種では、このうち約 10 品種をもとに交雑育種が進められてきた (田口ら 2006)。今日、テンサイの育種は、一代雑種育種法が基幹的方法であり、F1 の親としての性能が重要視されているが、親として利用されている自家不和合性エリート育種系統においても、根重、根中糖分、耐病性、抽苔耐性など様々な育種形質について多様な変異が確認されている (図 1)。しかし、その遺伝変異の大半は、限られた祖先品種間の交配後代の中から派生したものにすぎない。また、近年の育種によって遺伝変異の縮小が進んでおり、さらなる糖収量の選抜を繰り返しても、大きな改良効果は期待できない。このような“品種改良の袋小路”を打開する方法として、高レベルでシャッフリングの進んだ高ヘテロな多系統合成集団を使った循環選抜による高速育種の可能性について実証研究を計画した。

### 2. 研究の目的

(1) 高ヘテロ集団を複数回無作為交配することで、育種目標に関わる重要遺伝子近傍での程度連鎖不平衡が打破され、新規の組換え遺伝子型がどの程度生じているかを明らかにする。

(2) 無選抜集団と糖収量選抜集団でアレル頻度に偏りが生じている領域、または、初期世代と後期世代でアレル頻度に偏りが生じている領域を明らかにする。これらの領域には高糖性や地域適応性の遺伝子が座乗している可能性がある。偏りの大きかった領域について、高糖性や地域適応性について遺伝学

的考察を進める。

(3) ゲノム多様性データをもとに、多系統合成集団を基礎集団とするゲノミックセレクションについてシミュレーション研究を行い、高速育種のポテンシャルについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試材料

実験材料は、2006 年に 30 種類の自家不和合性系統各 3 個体計 90 個体をランダムクロスしたテンサイの高ヘテロ植物集団 (Widely-diversified Outbred Line Family (WOLF)) の後代である。WOLF の初期集団 (合成第 1 代) のうち、根中糖分の高い母系系統だけを合成した集団 (WOLF1) と家系図情報から血縁関係を考慮して祖先品種の寄与率に偏りがないように合成した集団 (WOLF2) を作成した。その後、これら 2 集団は、合成第 3 代までは無選抜増殖し、合成第 4 代~第 7 代まで、ラスプ個体選抜法による循環選抜した集団と対照として両集団を無選抜のまま増殖した派生集団を作出した。

なお、ラスプ個体選抜法とは、収穫期に掘り取ったテンサイ菜根を洗浄した後に根の一部を削り取り、その搾汁液の Brix 値を測定して、菜根重と Brix 値に基づいて増殖個体を決定する個体選抜方法である。

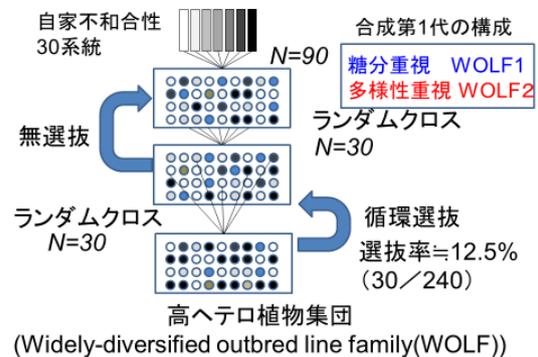


図 1 高ヘテロ植物集団の育成方法

#### (2) 表現型調査

実験は、農研機構北海道農業研究センター (芽室研究拠点) の精密育種試験圃場において、ペーパーポット移植栽培法により実施した。調査形質は、根重、根中糖分、糖量および品質成分 (Na、K、アミノ窒素含量) とし、Sachs-Le Docte の変法 (テンサイの糖分分析の公定法) に従った。根中糖分は旋光計を用いたショ糖分検量線に基づいた推定値を、 $\alpha$ -アミノ態窒素は、比色計を使用して化学発色させた溶液の吸光度を測定することにより、ナトリウムおよびカリウムは炎光度計を使用する方法である。2013 年に、合成 7 代目の WOLF1 および WOLF2 の両循

環選抜集団各 104 個体を芽室研究拠点のテンサイ育種圃場に植付け、個体識別して緑葉から DNA を抽出し、収穫期に根周 (cm)、根長 (cm)、茎葉重 (g) を計測し、その一部からラスプ法に準じてブライ (菜根の一部を削り取ったダイコンおろし状のサンプル) を採取し、根中糖分 (%) 並びに有害性非糖分 (Na、K、 $\alpha$ -N (meq/100g)) を分析した。

### (3) DNA 多型分析

DNA 多型は、日本のテンサイ自殖系統群で明確なアレル変異として確認できた STS 配列上の SNP から作成した 59 種類の Taqman\_SNP マーカーを用いた。また、海外系統も含めたテンサイの遺伝変異を比較検討できるように Schneider ら (1999, 2001) による機能遺伝子ホモログから作成した PCR ベースの ESTs、Mohring (2004) の STS 配列を利用し、日本のテンサイ自殖系統でも明確な制限酵素切断により、視認性および識別性に優れた DNA 多型へ分類ができる 32 種類の CAPS マーカーを用いた。

これら合計 91 種類の DNA マーカーを用いて、WOLF1 (103 個体)、WOLF2 (104 個体)、およびそれぞれの対照となる無選抜集団 WOLF1\_NS (46 個体)、WOLF2\_NS (46 個体) の合計 299 個体を用いた。

### (4) 集団遺伝分析

集団間の遺伝子型変異は、GenAlEx6.5 を用いて AMOVA、F 統計量および HWE テストの計算を行い、個体間遺伝距離に基づいて PCo 分析を行い派生集団間の遺伝構造を推定した。

### (5) ゲノミックセレクションモデルの検討

Brix 値によるラスプ循環選抜後代の形質値と DNA 多型情報を利用して、ゲノミックセレクションモデルの構築について gsWizaRd を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 重要遺伝子近傍における連鎖不平衡

連鎖不平衡の解析には、稔性回復遺伝子 *Rf1* および *Rf2* 近傍の塩基配列を参考にして設計した DNA マーカーを用いた。*Rf1* 近傍については、MPL-L60 (Refbeet 1.2 Bvchr3. sca001) 内にあるマーカー多型を 2 個、*Rf2* 近傍領域 (Refbeet 1.2 Bvchr4. sca004) は、遺伝子座近傍の BAC 配列から設計した 7 個のマーカー多型を利用して連鎖不平衡を調査した。これらは、通常分離集団では密接に連鎖している。*Rf1* 近傍については 299 個体中 1 個体のみ連鎖不平衡が打破された個体が発見されたが、*Rf2* 近傍については表 2 に示すように、rf2\_M1 と rf2\_M2 および Rf2BAC3 と rf2\_310vs184 には組換え型個体は認められなかったが、その他のマーカーペアにおいては、いずれの集団も高度に連鎖不平衡が打破されていることが確認された (表 1)。

表 1 *Rf2* 近傍領域マーカー間における組換え個体の率

	rf2-M1	rf2-M2	mei0147	Rf2BAC3	rf2-310vs184	Rf2BAC6	Rf2BAC5
rf2-M1	-						
rf2-M2	0.00	-					
mei0147	0.15	0.15	-				
Rf2BAC3	0.40	0.40	0.39	-			
rf2-310vs184	0.40	0.40	0.39	0.00	-		
Rf2BAC6	0.56	0.56	0.44	0.74	0.74	-	
Rf2BAC5	0.54	0.54	0.72	0.64	0.64	0.84	-

### (2) 無選抜集団と循環選抜集団のマーカー多型に基づいたアレル頻度に関する集団遺伝学的解析

ラスプ循環選抜を行った集団と無選抜の集団について、集団間で対立遺伝子頻度に偏りが無いかを明らかにするため、4 集団 299 個体の DNA マーカー多型情報に基づいて AMOVA を行ったところ、全体変異のうち 10% が集団間、90% が個体変異に起因するものであった (表 2)。F 統計量を見ても、Fst=0.1、Fis=0、Fit=0.097 であり、集団分化はあまり進んでおらず、WOLF の集団内多様性は高度に保持されていた。WOLF 選抜集団は、毎世代高糖分方向へ選抜率 12.5% の強選抜を 4 回連続循環選抜したにもかかわらず、多様性は長期間にわたり維持されていた。

次に個々のマーカー座における遺伝子型の分離パターンを詳細に見ると、6 マーカーについては 4 集団とも多型が認められず (Monomorphic)、WOLF 集団ではこれらのマーカー多型は保持されていないか、ごく低頻度保持されているためと考えられた。集団ごとに見ると、WOLF1 では 3 個、WOLF1\_NS では 4 個、WOLF2 では 12 個、WOLF2\_NS では 4 個のマーカー座が Monomorphic であり、このうち 1 マーカーは WOLF1 だけに共通し、3 マーカーは WOLF2 だけに共通していた。これらは初期集団の遺伝子構成に起因したものと推察された。なお、これら Monomorphic なマーカーを除いた、残りの 8~9 割のマーカー多型ではアレル頻度は HWE に適合した。したがって、多系統を合成した WOLF 集団では、世代間や選抜有無にかかわらず、集団内の遺伝子型多様性は高度に保持されていた。

表 2 WOLF 4 集団の AMOVA と F 統計量

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	3	705.36	235.12	1.56	10%
Among Indiv	295	4109.32	13.93	0.00	0%
Within Indiv	299	4196.00	14.03	14.03	90%
Total	597	9010.68		15.59	100%

F-Statistics	Value	P(rand >= data)
Fst	0.100	0.00
Fis	-0.004	0.59
Fit	0.097	0.00

### (2) ラสป循環選抜の選抜効果とアレル頻度の偏り

WOLF1 および WOLF2 の合成第 1 代から合成第 7 代までの選抜集団と無選抜増殖集団を

芽室研究拠点のテンサイ育種圃場に植付け、一区2畦4反復の乱塊法で生産力を評価した。その結果、WOLF2 ラスプ循環選抜集団の根中糖分に顕著な選抜効果が確認された。WOLF2 では、ラスプ循環選抜した集団の根中糖分における選抜反応が予想以上に高く、基礎集団の糖分変異ベースを著しく超越した(図2)。一方、根重については、合成4代目以降は4集団とも低下傾向を示した。

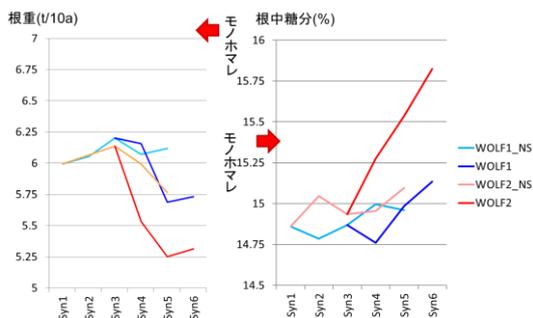


図2 無選抜およびラスプ循環選抜したWOLF 集団の合成世代ごとの根重ならびに根中糖分にみられた選抜効果

次に、各集団の合成7代目の遺伝子型を標本調査し、各マーカーのアリル分離パターンを調べた。分離パターンはマーカーによりさまざまであったが、一部のマーカーではアリル頻度に偏りが認められた。集団毎にアリル頻度の偏りを調査するため、初期集団の遺伝組成の違いについて(WOLF1 群および WOLF2 群)ならびにラスプ循環選抜の有無について(無選抜群と選抜群)に分けて、各群間のアリル頻度を比較した。WOLF1 群と WOLF2 群の違いについては、WOLF1 群(WOLF1 および WOLF1\_NS)と WOLF2 群(WOLF2 および WOLF2\_NS)を比較し、群間で平均 10%以上アリル頻度が異なったマーカー数は 40 個あった。一方、選抜の有無による分離パターンの違いについては、無選抜群(WOLF1\_NS および WOLF2\_NS)と選抜群(WOLF1 および WOLF2)を比較すると、群間で平均 10%以上アリル頻度が異なったマーカー数は 22 個あった。このうち、選抜群と無選抜群の間で、WOLF1 と WOLF2 に共通したアリル頻度の偏りは、主にラスプ循環選抜によって生じたと考えられるが、このようなアリル頻度の偏りは7個のマーカーで生じた。これらは高糖性に関連する遺伝子座の周辺にあることが期待される。また、1 集団だけに生じたアリル頻度の偏りは、全部で 20 マーカーにおいて認められていたが、これらは世代間の増殖過程において、主に意図しない選抜によって生じた遺伝的浮動に起因するものと考えられた。

さらに、個体間の遺伝距離に基づいて PCo 分析(図3)を行うと、PCo1 は、正方向に WOLF1 群、負方向に WOLF2 群に帰属される個体が多く、初期集団の遺伝組成に基づく変異を反映したと推察される。一方、PCo2 につい

ては、原点付近には、無選抜群に帰属される個体が多く認められたが、正負両方向に選抜群に帰属される個体が多く認められた。興味深いことに、無選抜群よりも選抜群に帰属される個体間のダイバーシティが全体的に大きくなっており、集団内の遺伝子型のバリエーションが幅広いことを示唆する。これは高レベルのシャッフリングによって個々の祖先品種が保持していた連鎖不平衡が打破され、組換えの小断片化が進んでいるため、循環選抜伴った新しい適応遺伝子型の頻度が増加したためではないかと推察される。

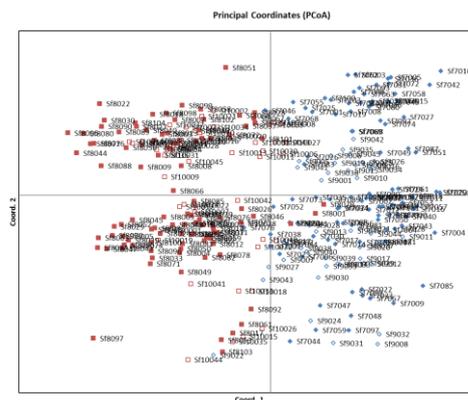


図3 個体間遺伝距離に基づいた PCo 分析

### (3) 多系統合成集団における根中糖分のゲノミックセレクションモデルの検討

WOLF1 および WOLF2 のうち 2013 年に個体別に測定した表現型データ(合計 207 個体)と 82 個の遺伝子型データが完全にそろったデータセットを用いて、ゲノミックセレクションの有効性について検討した。ここでは、同集団が保持している多様性をどの程度高速かつ高効率に集積できるかを明らかにするため、gsWizard を用いて、実測値と予測値の比較を実証的にシミュレーションした。

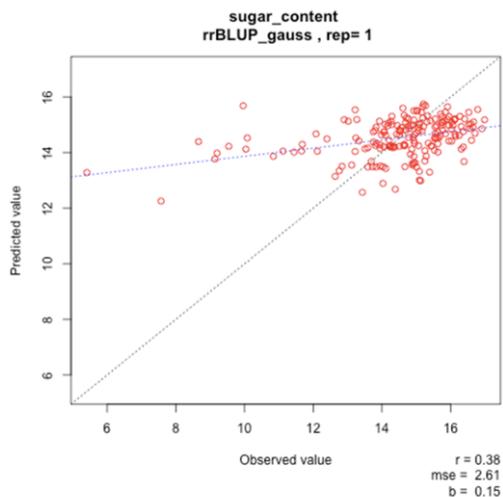


図4 gsWizard による WOLF 選抜集団における根中糖分に対するゲノミックセレクションモデルのシミュレーション

作出した WOLF 集団の特性上、個々の遺伝子座の連鎖不平衡のレベルは低く、小さくフラグメント化していると推察され、それに比較してマーカー数は不十分であったが、図4に示すように rrBLUP\_gauss 法で予測した線形モデルでは、根中糖分については、 $r=0.38$ 前後であるが有意な回帰直線が得られた。しかし、根中糖分以外の形質では、有望なゲノミックセレクションのモデルは見いだせなかった。現状では、実用的な選抜育種技術として応用するには、まだ不十分であるが、今後マーカー数を増やすとともに、異なる年次間で追試を行うことにより、推定精度は向上することが期待される。将来的にゲノミックセレクションの予測精度が向上できれば、テンサイ品種改良の中心命題ともいえる高糖分遺伝子型選抜の高速育種への応用が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① K. Taguchi, H. Hiyama, R. Yui-Kurino, A. Muramatsu, T. Mikami, T. Kubo, 'Hybrid Breeding Skewed the Allelic Frequencies of Molecular Variants Derived from the Restorer of fertility 1 Locus for Cytoplasmic Male Sterility in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)', *Crop Science*, 査読有り, 54, 1407-1421, (2014).

② 田口和憲, 遺伝資源の発見から品種育成までを網羅したテンサイ黒根病抵抗性の遺伝・育種学的研究, *育種学研究*, 16(4), 186-191, (2014)

〔学会発表〕(計6件)

① 田口和憲, 黒田洋輔, 岩田洋佳, テンサイの高ヘテロ植物集団を用いた循環選抜の効果, *育種学研究*, 18(1), 77, 2016年3月21日

② K. Taguchi, K. Okazaki, Y. Kuroda, H. Takahashi, Molecular Dissection and Marker Assisted Selection to Cercospora Leaf Spot in Sugar Beet, *Plant and Animal Genome XXIII*, 2015年1月10日, (招待有り)

③ 田口和憲, 岡崎和之, 黒田洋輔, 高橋宙之, 1960年代から2010年代の標準品種の生産力からみたテンサイ単収向上へ向けた日本の品種改良の貢献, *てん菜研究会報* 55, 17-18, 2014年7月18日

④ 田口和憲, 遺伝資源の発見から品種育成までを網羅したテンサイ黒根病抵抗性の遺伝・育種学的研究, 日本育種学会125回講演会, 2014年3月21日, (招待有り)

④ K. Taguchi, Y. Honma, H. Hiyama, T. Mikami, T. Kubo, QTLs Conferring to Fertility Restoration against Owen Cytoplasmic Male Sterility in Sugar Beet, *Plant and Animal Genome XXII*, 2014年1月

11日, (招待有り)

⑤ 田口和憲, 黒田洋輔, 岡崎和之, 高橋宙之, テンサイの高ヘテロ集団に対する循環選抜, 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 54, 75-76, 2013年12月7日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田口 和憲 (TAGUCHI KAZUNORI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・畑作物開発利用研究領域・テンサイ育種グループ長

研究者番号：80414754

### (2) 研究分担者

岩田 洋佳 (IWATA HIROYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00355489