

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660006

研究課題名(和文)ゲノムワイド突然変異遺伝子スクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Development of genome-wide screening method for induced mutations

研究代表者

安井 康夫 (Yasui, Yasuo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70293917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンシングを利用したゲノムワイドでの突然変異検出法の開発を目指した。変異誘導処理を施した960個体のM2個体からDNAを抽出し、96プレートに配置した。これらを3次元プールにハルクし、30プールのPCRテンプレートを作成した。6箇所の領域(全長12Kb)をそれぞれPCRで増幅し、変異をスクリーニングした結果、4領域でSNPsと考えられるシグナルの検出に成功した。また、今後、さらに多くの領域を扱える可能性が高いこともわかった。本研究成果は今後の突然変異育種に有効利用できる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the genome-wide-mutation-detection method using a next generation sequencer. Total DNAs were extracted from 960 of M2 plants which were treated by mutation-induced processing. All total DNAs were arranged in 96 well plates, and bulked in 30 PCR template pools (3D pools). Using these 30 pools, six genomic regions (the total length = 12Kb) were amplified by PCR and mutations on the PCR products were screened. We succeeded in the signal detection regarded as SNPs in four PCR regions. Furthermore, it turned out that much more genomic regions will be handled in this method. The method developed in this study will be great help for mutation breedings.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：突然変異育種 変異検出 次世代シーケンシング

### 1. 研究開始当初の背景

今後数十年内に生じると危惧される深刻な食糧不足を未然に防ぐため、植物育種のスピードを高度に加速化するための技術的革新が早急に求められている。ゲノム情報の利用と NGS によるリシーケンスの併用が可能となった現在、イネの野生型と突然変異個体のゲノム配列比較を利用した有用遺伝子の同定法が開発され、イネ育種の高効率化が実現している。しかし自家受粉を行えないソバ等の他殖性作物を材料とし、変異体の表現型をスクリーニングするためには、手作業による近親交配の実施と、これに引き続く大量の M4 世代の表現型調査が必要となり、その実施はほぼ不可能な状況である。事実、我々も他殖性であるソバを材料として、突然変異集団の作成と変異体のスクリーニングを行ってきたが、これまでに有用な突然変異体を 1 個体得たのみである (yasui et al; journal.pone.0031264)。そこで、現在までに TILLING (targeting induced local lesions in genomes) 法や HRM (high resolution melting) アッセイ等の逆遺伝学的手法が考案され、突然変異が生じた遺伝子のスクリーニングが試みられるようになった。しかしながらこれらの既存のスクリーニング法の効率性は非常に低く、また特殊な機器類を必要とするため、普遍的に利用可能な高効率突然変異遺伝子スクリーニング法の開発が待望されていた。

### 2. 研究の目的

数千個体からなる突然変異集団中に極低頻度に存在する変異遺伝子をゲノムワイドかつ迅速にスクリーニングする新規手法の開発を目的とした。本手法により表現型スクリーニングの適用がほぼ不可能であったソバをはじめとする他殖性作物、およびコムギ等の倍數性作物の突然変異育種も可能となる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物育成と 3 次元テンプレートプールの作成

重イオンビーム照射もしくは EMS 処理をほどこしたソバの種子を播種・育成し、採種した (M1 育成)。次に採取した種子を育成 (M2 育成) し、重イオンビーム照射 M2 集団および EMS 処理 M2 集団からそれぞれ 960 個体を選んで total DNA を抽出し、96 穴プレートに配置した。さらに図 1 左側に示したように、等量ずつの total DNA を分注し、3 次元テンプレートプールを作成した。最終的に各処理集団から 30 本ずつの 3 次元テンプレートプールが作成された (合計 2 セット)。

#### (2) 多次元 PCR プールの作成

図 1 右側に示したように 3 次元テンプレートプールを用いた PCR を行った。PCR 増幅領域は自家不和合性関連遺伝子である S-locus

early flowering 3 (S-ELF3) の 5' 側領域および 3' 側領域、S-ELF3 と連鎖関係にあるソバの短柱花特異的発現遺伝子 short style specific gene 2 (SSG2)、デンブンのモチ性に関与する可能性が高いと考えられる 3 つの顆粒結合型デンブン合成酵素遺伝子 (GBSS1, GBSS2, GBSS3) が座乗する領域 (合計 6 領域) である。またそれぞれの領域での増幅塩基長は約 2Kbp とした。PCR 酵素には正確性の高いと考えられるタカラバイオ社製の Prime Star HS を用いた。また PCR のサイクル数は 30 回とした。

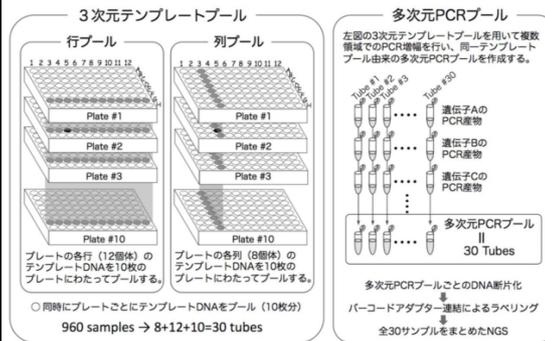


図1 本研究に用いる3次元テンプレートプールと多次元PCRプール

#### (3) NGS 解析

まず、各多次元プールを用いて得られた PCR 産物を電気泳動で確認し、プロメガ社製の Qubit2.0 を用いて DNA 量を測定した。その後 HiSeq2000 での塩基配列決定に必要な PCR 産物の断片化とアダプター配列の付加を、Illumina 社製の Nextera XT DNA Library Preparation Kit を用いて実施し、ライブラリーとした。ライブラリーの塩基配列の読み取りには HiSeq2000 の両エンド解析を利用した。各集団から得られた 2 つのライブラリーを個別にランした。両プールの読み取り量はそれぞれ 20Gbp 程度であった。

#### (4) データ処理

得られた配列データを Trimmomatic を用いてトリミングした。この際、エラーをできる限り低くするためにできるだけクオリティの高い塩基を残すようにした。トリミング後のデータを BWA を用いてリファレンス配列 (PCR 増幅を行った領域の DNA 配列) にマッピングし、プールごとに変異の検出を行った。プールには 80 個体~120 個体の DNA がバルクされているため、変異がヘテロで保持されている場合には 1/160~1/240 の割合で変異がコールされることになる。このためサイトごとに各塩基への置換の割合を算出した場合、いずれかの置換塩基の割合が 1/240 以上であればプールに変異遺伝子が存在する可能性が高くなる。そこで閾値を 1/240 0.004 として、プールごとサイトごとに変異の有無を調査した。さらにランダムに生じると考えられる PCR エラーによるフォルスポジティブを防ぐため、3 種 (プレート、行および列) の

プールで同一箇所かつ同一方向に置換が検出された場合のみを真の置換とみなした。この際には図1に示したように、塩基置換が生じた個体(DNA)の位置(すなわち個体)が3次元プレートプール上で確定することとなる。

#### 4. 研究成果

EMS処理M2集団(960個体)より作成した多次元プールを解析した結果、8箇所の置換が3種(プレート、行および列)のプールで同一箇所かつ同一方向に検出された。変異の内訳は自家不和合性関連遺伝子(S-ELF3およびSSG2遺伝子)に6箇所、デンプン合成酵素である3つのGBSS遺伝子に2箇所であった。S-ELF3およびSSG2遺伝子は短柱花個体のS対立遺伝子にのみ存在することがわかっており(yasui et al; journal.pone.0031264)、サンガー法によるダイレクトシーケンスによる変異箇所の確認が容易である。このためスクリーニングによって得られたS-ELF3およびSSG2遺伝子上の6箇所の置換をサンガー法で確認した。その結果、これら6箇所の置換が3次元プールにより特定された個体に生じていることがわかった。GBSS上に検出された置換に関しては現在、後代の分離集団での遺伝子型と表現型を確認中である。

重イオンビームM2集団(960個体)より作成した多次元プールを解析した結果、3種(プレート、行および列)のプールで同一箇所かつ同一方向に置換が検出される新規置換は見られなかった。しかしながら、ポジティブコントロールに用いた既知の変異体の変異サイトが検出されたため(図2)、重イオンビームM2集団には調査した領域上には変異が存在しなかったと考えた。一般に重イオンビームによる変異誘導率はEMSよりも低いと考えられており、EMS集団に変異が見つかり、重イオンビーム集団に変異が見つからなかった結果は納得のいくものである。重イオンビームによって変異を誘導し、これを検出するためには、さらに多くの個体を扱うか、もしくは累代照射により変異を蓄積した集団を使うべきであろう。

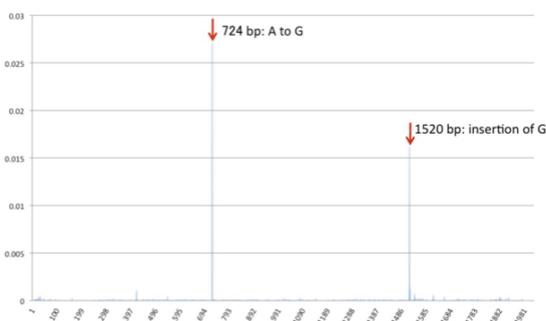


図2 S-ELF3における各サイトでのグアニンへの置換率  
コントロールとして混合した野生種の変異サイト(724番目および1520番目の塩基)が検出されている。  
縦軸: 塩基サイト  
横軸: グアニンへ置換したと考えられる変異を含むショートリードの割合

以上のように本研究により開発されたスクリーニング法により、EMSによって誘導された複数の突然変異の検出に成功した。今後、本手法を他殖性種であるソバや倍数性種であるコムギをはじめとする変異表現型の検出が困難な植物に応用していく。今回は6領域しか用いなかったが、マッピングの際のデプスが数万程度であったため、さらに多くのゲノム領域を扱うことができると考えている。この際、PCRエラーをいかに抑えるかがポイントとなるであろう。さらに、Hiseq2000でのレーン数を増やせば、個体数をより多く扱うことも可能である。このように2年間の研究期間で満足のいく萌芽的な結果が得られた。

#### 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 2 件)

Yabe S, Hara T, Ueno M, Enoki H, Kimura T, Nishimura S, Yasui Y, Ohsawa R, Iwata H “Rapid genotyping with DNA micro-arrays for high-density linkage mapping and QTL mapping in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench).” *Breed Sci.* 64:291-9 (2014).  
doi: 10.1270/jsbbs.64.291. (査読あり)

Sano M, Nakagawa M, Oishi A, Yasui Y, Katsube-Tanaka T “Diversification of 13S globulins, allergenic seed storage proteins, of common buckwheat.” *Food Chem.* 55:192-8 (2014). (査読あり)  
doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.047.

[学会発表](計 2 件)

Yasuo YASUI, Masashi MORI, Jotaro AII, Shingo SATO, Ohmi OHNISHI, Tomoko ABE, Yoriko HAYASHI, Daiki MATSUMOTO, Tatsuya OTA “Intact S-ELF 3 is exclusive to heteromorphic SI species in *Fagopyrum* (基調講演)” 12th International Symposium on Buckwheat Lasko, Slovenia (2013年8月23日)

安井康夫、林 依子、阿部知子 「重イオンビーム照射を利用したソバ S-supergene への突然変異誘導の試み」第9回イオンビーム育種研究会大会 敦賀 (2013年5月28日)

[図書](計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安井康夫（やすいやすお）  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：70293917

##### (2) 研究分担者

相井城太郎（あいじょうたろう）  
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教  
研究者番号：10391591

##### (3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：