

## 日本作物学会 第 238 回講演会シンポジウム 1 作物研究におけるゲノム情報利用の現状と展望

(2014 年 9 月 9 日 於愛媛大学)

根本圭介<sup>1)</sup>・岩田洋佳<sup>1)</sup>・花岡秀樹<sup>2)</sup>・岩上哲史<sup>3)</sup>・内野彰<sup>4)</sup>・鶴丸博人<sup>5)</sup>・小柳敦史<sup>6)</sup>・黒田栄喜<sup>7)</sup>

(<sup>1)</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, (<sup>2)</sup> ライフテクノロジーズジャパン, (<sup>3)</sup> Bayer CropScience,

<sup>4)</sup> 農研機構中央農業総合研究センター, <sup>5)</sup> 東北大学大学院生命科学研究科,

<sup>6)</sup> 農研機構九州沖縄農業研究センター, <sup>7)</sup> 岩手大学農学部)

オーガナイザー：根本圭介（東京大学大学院農学生命科学研究科）

コーディネーター：黒田栄喜（岩手大学農学部），小柳敦史（農研機構九州沖縄農業研究センター）

- |                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| 1. ゲノミックセレクションは作物育種を加速できるか        | 岩田洋佳     |
| 2. “道具”の進歩－次世代シーケンサー関連技術の作物研究への活用 | 花岡秀樹     |
| 3. 除草剤抵抗性の分子機構－研究の現状と課題－          | 岩上哲史・内野彰 |
| 4. 共生微生物の情報を利用した作物栽培              | 鶴丸博人     |
| 5. QTL から見えてくるもの                  | 根本圭介     |

### 趣旨と概要

2004 年 12 月に「国際イネゲノム塩基配列解析プロジェクト (IRGSP)」によってイネゲノムの全塩基配列が解読されてから、はや 10 年が経とうとしている。この間、ゲノム情報の利用は作物研究のアプローチに大きな変革をもたらしてきたが、いっぽうコストの面で組織的な研究インフラやリソース作成への依存が不可欠であったことから、研究の自由度を考えた場合、それらは必ずしも万人向けのアプローチとは言えないところがあった。近年、次世代シーケンサーによる塩基配列解読能力の飛躍的向上と低コスト化により、このようなアプローチがようやくラボ単位でも手が伸ばせるようになってきている。本シンポジウムではこうした状況を踏まえ、ソフト・ハード両面から作物研究におけるゲノム利用の将来について考える上で有益な情報を共有することを目指し、5 名の講師の方々に最新の解析技術の現状と具体的な研究の取り組みについて紹介していただいた。

岩田氏は、「ゲノミックセレクションは作物育種を加速できるか」をテーマに、多数個体について収集されたゲノムと表現型に関する情報を作物の遺伝的能力の改良に結びつけるゲノミックセレクション (GS) では、選抜の際に形質評価を行う必要がないため、世代促進技術等と組合せて利用することにより、育種に要する時間を大幅に短縮できることを報告した。また、GS では、個体単位では評価が難しい形質についても個体選抜が可能であり、また、多数の QTL に支配される形質の改良にも適用できる点がマーカー利用選抜とは異なることが紹介された。花岡氏は、「“道具”の進歩－次世代シーケンサー関連技術の作物研究への活用」をテーマに、次世代シーケンサー技術はその急速な発展に伴い、低コスト化・高速化が達成され、各研究室レベルで汎用的に使用される技術となりつつあることを報

告した。また、イネなど農学分野における最新の活用例として、新規マーカーの創出、ジェノタイピングやメタゲノム (菌叢解析) の取り組みについて紹介された。内野氏は、「除草剤抵抗性の分子機構－研究の現状と課題－」をテーマに、除草剤抵抗性の分子機構は作用点抵抗性 (TSR) と非作用点抵抗性 (NTSR) に大別され、ヒエ属水田雑草の ACCase 阻害剤抵抗性は NTSR であると考えられている。NTSR には、数種の雑草で解毒代謝酵素のシトクロム P450 (P450) が関与することが知られているが、多剤抵抗性の米国産タイヌビエにおける CYP81A サブファミリーの P450 は、ALS 阻害剤抵抗性に強く関わっていること、本サブファミリーの P450 はイネ科植物のみで報告されていることから、イネ科植物に効果の低い ALS 阻害剤に対しては、このグループの P450 の存在がその低感受性に関与している可能性があることを紹介した。そして、雑草研究の分野では材料となる植物種のゲノム情報が少なく、遺伝的に多様な集団も扱うことから、遺伝子解析において次世代シーケンシング技術が極めて有用であることを指摘した。鶴丸氏は、「共生微生物の情報を利用した作物栽培」をテーマに、「共生微生物を植物から直接抽出する方法」



によって、非培養法を用いた作物共生微生物の解析が可能であり、圃場レベルでの、作物と微生物の共生機構が徐々に解明されつつあることを報告した。さらに、共生細菌の多様性及び機能的特徴の解析結果は、作物生育促進細菌の分離戦略を立てるのにも役立つことを紹介された。根本氏は、「QTL から見えてくるもの」をテーマに、1980年代後半に登場した QTL 解析が広く普及するようになったのは、分子生物学技術の進歩とコンピューター利用技術の発展により、各種作物のゲノム解読が進展して任意の染色体領域に PCR マーカーが開発され実験者が煩雑なサザン解析から解放された 2000 年代に入ってからであり、それ以降、イネでは収量や耐性に関わる多数の重要な QTL が同定され、それらの一部はすでに原因遺伝子も単離されている。一方で、収量に関する既往の QTL のうち、遺伝子が明らかになったものは大半が花序の形態形成遺伝子であって、より大きな枠組みで収量を規定していると考えられるバイオマス生産能力や再転流能力といった“高次の要因”が収量の QTL として同定されることはほとんどないことが報告された。すなわち、想定されるカスケードの上流に位置する因子が最終産物の QTL に反映される度合いは予想以上に低いことが指摘された。

本シンポジウムには 160 余名の参加者があり、総合討論では、次世代シーケンサーによる分析コストや GS の可能性など多様な視点からの質問が出されるとともに、活発な議論が続いた。最後に、作物学と育種学では、QTL 情報に期待することは必ずしも同一ではないことから、生理生態の本質的な理解に近づくためには、作物研究独自の視点を盛り込むことが不可欠であると締めくくられた(黒田栄喜・小柳敦史)。

## 1. ゲノミックセレクションは作物育種を加速できるか

岩田洋佳

(東京大学大学院農学生命科学研究科, JST・CREST)

次世代シーケンサー (NGS) の登場は、様々な作物のゲノム配列の解読を可能とした。NGS の登場により、少数品種のゲノムや発現遺伝子に関する詳細な解析だけでなく、多数個体の網羅的解析を現実的なコストで行えるようになった。オミックス研究のボトルネックといわれている表現型計測についても、現在、そのハイスループット化に関する研究が熱心に進められており、今後、様々な測定機器を利用して多様な形質データが得られるようになると期待される。こうして得られる大量の情報は、作物育種の高速化に結びつけられることは間違いなく、現在、こうした情報を利用する新しい育種システムの構築に向けて様々な模索が始められている。

多数個体について収集されたゲノムと表現型に関する情報を作物の遺伝的能力の改良に結びつけるための方法として、現在、ゲノミックセレクション (GS) に注目が集まっ

ている。GS とは、ゲノムワイドマーカー多型に基づき目的形質を選抜する方法である。GS では、ゲノムワイドマーカー多型と目的形質の表現型多型を関連づけるモデルを構築し、そのモデルをもとにゲノムワイドマーカー多型から目的形質が優良な個体を“予測して”選抜する。GS では選抜の際に形質評価を行う必要がないため、世代促進技術等と組合せて利用することにより、育種に要する時間を大幅に短縮できる。また、GS を用いれば個体単位では評価が難しい形質についても個体選抜が可能になり、これまでとは異なるスキームに基づく育種も可能となる。マーカーを利用して優良個体を選抜する点は、GS もマーカー利用選抜 (MAS) も同じだが、GS は多数の QTL に支配される形質の改良にも適用できる点が異なる。

次世代シーケンサーの登場により、ゲノムワイドマーカーをタイピングするためのコストは急落しており、GS 実用化へのコストの壁は破られつつある。しかし、GS を実用化し、作物育種を加速するためには、更なる研究開発が必要である。例えば、現在の予測手法では、遺伝子間交互作用や遺伝子型×環境交互作用、形質間相関等の要因が十分に考慮されておらず、まだまだ精度向上の余地がある。また、GS を適切なスキームで育種に利用することも重要であり、そのためには、シミュレーションに基づき GS 利用育種の最適デザインを模索する研究が必要である。また、関連する様々な技術 (表現型計測法、解析ソフトウェア) の開発・改良も不可欠である。日々深刻化する食料問題やエネルギー問題の解決のためにも、こうした研究開発の手を休めてはならない。

## 2. “道具”の進歩—次世代シーケンサー関連技術の作物研究への活用

花岡秀樹 (ライフテクノロジーズジャパン)

次世代シーケンサ技術はその急速な発展に伴い、低コスト化・高速化が達成され、各研究室レベルで汎用的に使用される技術となりつつある。一例としてイオントレントは、DNA 伸長時に放出される水素イオンを検出し塩基を解読するというシンプルな原理で低コスト化 (1 ラン 5 万円~10 万円)・高速化 (200 bp~400 bp で数時間) を実現した。論文も約 700 報となり、イネなど農学分野の報告も急速に増えつつある。本シンポジウムでは以下のような最新の活用事例等から、作物研究への展開について紹介する予定である。

**新規マーカーの創出** 複数の株において制限酵素で切断されたゲノムの共通部位の配列のみを比較することにより、安価にマーカーを定義できるようになった。オオムギ (Mascher et al. 2013) やウナギ (Kai et al. 2014) で報告が出ている。

**ジェノタイピング** ヒトでは 1 チューブ内で 6000 以上の PCR をする技術 (AmpliSeq™) により、「興味ある数十遺伝子のシーケンス」や「全遺伝子エクソンシーケンス」も



簡単に実施できるようになった。本技術を応用して大量の SNP 部位配列を簡単に安価に読むことができる。トマトや イネでの応用例を紹介する予定である。

**メタゲノム (菌叢解析)** サンプル中に存在する 16S rRNA の配列を解読することにより土壌など特定環境に存在する菌叢を明らかにすることができる (Frank-Fahle et al. 2014; Milani et al. 2013)。提供されている専用のデータ解析フローも合わせて紹介したい。

**ゲノム編集後の検証** TALEN/CRISPR といったゲノム配列を任意に編集する技術がイネなどで普及するとともに (Li T et al. 2012), 編集後の配列確認等に NGS 使用例が報告されている (Malina et al. 2013)。

Mascher et al. (2013) Application of Genotyping-by-Sequencing on Semiconductor Sequencing Platforms: A Comparison of Genetic and Reference-Based Marker Ordering in Barley. PLoS ONE.

Kai et al. (2014) A ddRAD-based genetic map and its integration with the genome assembly of Japanese eel (*Anguilla japonica*) provides insights into genome evolution after the teleost-specific genome duplication. BMC Gen.

Frank-Fahle et al. (2014) Microbial Functional Potential and Community Composition in Permafrost-Affected Soils of the NW Canadian Arctic. PLoS ONE.

Milani et al. (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. PLoS ONE.

Li T, et al. (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat. Biotech.

Malina et al., (2013) Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. Gen. Dev.

### 3. 除草剤抵抗性の分子機構—研究の現状と課題—

岩上哲史 (バイエルクロップサイエンス)・  
内野彰 (中央農業総合研究センター)

日本の水稲作では 20 年ほど前から除草剤抵抗性が問題となっており、イヌホタルイやコナギ、オモダカなどの水田雑草において、アセト乳酸合成酵素 (Acetolactate synthase: ALS) を阻害する除草剤 (ALS 阻害剤) に対する抵抗性が研究されてきた (内野・岩上 2014a)。また最近になってアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCCase) 阻害剤抵抗性のヒエ属の水田雑草も報告され (那須・吉永 2011), その分子機構が注目されている。除草剤抵抗性の分子機構は作用点抵抗性 (Target site resistance: TSR) と非作用点抵抗性 (Non-target site resistance: NTSR) の 2 種類に大別され、ALS や ACCCase など除草剤の作用点に変異して除草剤抵抗性となる場合を TSR, 除草剤の解毒代謝機能の向上など作用点以外に変異して除草剤抵抗性となる場合を NTSR としている (Yu and Powles 2014)。日本の水田雑草における ALS 阻害剤抵抗性は、オモダカなど一部の場合を除きほとんど TSR が関与することが分かっているが、ヒエ属水田

雑草の ACCCase 阻害剤抵抗性は NTSR であると考えられている (内野・岩上 2014b)。

抵抗性の分子機構は TSR では多くの知見があるが NTSR では未知の部分が多い。NTSR には、数種の雑草で解毒代謝酵素のシトクロム P450 (P450) が関与することが示されている。P450 は外来異物の解毒代謝反応において中心的な役割を果たしている酵素であるが、植物は数百種類以上の P450 アイソザイムを保有するため、その中から除草剤代謝に関わる P450 を同定するのは容易でない。イネでは CYP81A サブファミリーの P450 が ALS 阻害剤耐性に関わっていることが知られていたが、演者らは多剤抵抗性の米国産タイヌビエにおいて同じサブファミリーの 2 種類の P450 が ALS 阻害剤抵抗性に強く関わっていることを明らかにした (Iwakami ら 2014)。本サブファミリーの P450 はイネ科植物のみで報告されていることから、イネ科植物に効果の低い ALS 阻害剤に対しては、このグループの P450 の存在がその低感受性に関与している可能性がある。

雑草研究分野では材料となる植物種のゲノム情報が少なく、遺伝的に多様な集団も扱うことから、遺伝子解析において次世代シーケンシング技術が極めて有用となる。TSR の広域モニタリングでは次世代シーケンサーを使って多集団の TSR 遺伝子一斉解析が行われており (Délye ら 2014), NTSR 研究ではトランスクリプトーム解析によって抵抗性にリンクして高発現する遺伝子の同定が試みられている (Gaines ら 2014)。植物の P450 は極めて多様であるが、その全体像が解明されれば作物と雑草の除草剤選択性の理解も進むものと考えられ、次世代シーケンシング技術はその中で大きな役割を果たすことが期待される。

Délye, C., Causse, R., Gautier, V., Poncet, C. and Michel, S. 2014. Using next-generation sequencing to detect mutations endowing resistance to pesticides: application to acetolactate-synthase (ALS)-based resistance in barnyard grass, a polyploid grass weed. Pest. Manag. Sci. 2014 Apr 28. doi: 10.1002/ps.3818.

Gaines, T., Lorentz, L., Figge, A., Herrmann, J., Maiwald, F., Ott, M., Han, H., Busi, R., Yu, Q., Powles, S. and Beffa, R. 2014. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. Plant J. 78: 865-76.

Iwakami, S., Endo, M., Saika, H., Okuno, J., Nakamura, J., Yokoyama, M., Watanabe, H., Toki, S., Uchino, A. and Tatsuya, I. 2014. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phylllopogon*. Plant Physiol. 165: 618-629.

那須英夫・吉永京司 2011. 水稲直播水田におけるシハロホップブチル抵抗性ヒメタイヌビエの発生. 雑草研究 56(別): 12.

内野彰・岩上哲史 2014a. 水田雑草におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性の出現とその生態. 日本農薬学会誌 39: 25-62.

内野彰・岩上哲史 2014b. 水田雑草の ALS 阻害剤抵抗性—抵抗性の機構と個体群動態—. 東北の雑草 13: 1-7.

Yu, Q. and Powles, S.B. 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. Pest. Manag. Sci. 70: 1340-1350.

#### 4. 共生微生物の情報を利用した作物栽培

鶴丸博人（東北大学大学院生命科学研究科）

共生微生物は、作物成長に大きな影響を与えることが知られている、しかし、作物ゲノム DNA の混入などが障壁となり、非培養法を用いた作物共生微生物の解析は、これまでほとんど行われてこなかった、近年、池田ら（2009）が開発した「共生微生物を植物から直接抽出する方法」によって、非培養法を用いた作物共生微生物の解析が可能となり、圃場レベルでの、作物と微生物の共生機構が少しずつ明らかとなってきている（Bao et al., 2014）、演者の研究グループの目的は、この手法を用いて、共生微生物に関する情報を網羅的に収集し、作物生産に活用することである、本講演では、演者のグループが中心となり農業に有用な微生物群の利用や制御のための新技術開発を目指した農水省委託プロジェクトの成果、具体的には、テンサイ（*Beta vulgaris*）の共生細菌の多様性解析やメタゲノム解析結果の活用法の一例を紹介する。

テンサイ（リッカまたはアマホマレ品種）栽培は、北海道農業研究センターの圃場で行った、7月に収穫したテンサイから、共生微生物群集を抽出し、共生細菌の多様性解析・メタゲノム解析・分離などを行った、多様性解析には、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた、メタゲノム解析は、次世代シーケンサー（454 GS FLX+）とメタゲノム解析ソフト（MEGAN）を用いて解析した、細菌分離は、岡崎ら（2013）の方法を用いた。

多様性解析結果は、テンサイ主根に *Rhizobiales* 目が優占していることを示した、この結果は、共生細菌の分離結果（Okazaki et al., 2013）やメタゲノム解析結果とも一致した、これらの解析結果を基に、多種多様な分離菌の中から *Rhizobiales* 目細菌を中心に接種菌を選抜し、テンサイ生育促進細菌を獲得した（特許出願番号:2013-146402）、メタゲノム解析結果は、作物生育促進因子の中で、リン酸溶解遺伝子の検出頻度が高いことを示した、テンサイは、リン酸欠乏に強い作物であるが、その機構は不明である、これらのことは、リン酸溶解性細菌との高い共生能が、リン酸欠乏耐性の一因である可能性を示した、一方、窒素固定遺伝子は検出されなかった、このことは、窒素固定のテンサイ生育への貢献度が低いことを示唆している、共生細菌の多様性及び機能的特徴の解析結果を用いる手法は、他の作物生育促進細菌の分離においても有効だと思われる。

Ikeda et al. (2009) Microbial Ecol. 58,703-714.

Bao et al. (2014) Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.00969-14.27.

Okazaki et al. (2013) doi:10.1264/jsme2.ME13182.

#### 5. QTL から見えてくるもの

根本圭介（東京大学大学院農学生命科学研究科）

作物の生産性や環境耐性の探求にとって1980年代後半におけるQTL解析の登場は大きな福音であったが、演者がイネのQTL解析を始めた1990年代の末においても、連鎖地図作成まで自前で行おうとすると、そのハードルは決して低くはなかった。実際、QTL解析が万人の技術となったのは、各種作物のゲノム解読が進展して任意の染色体領域にPCRマーカーが開発され実験者が煩雑なサザン解析から解放された2000年代以降のことであろう。以来、イネでは収量や耐性に関わる多数の重要なQTLが同定され、それらの一部はすでに原因遺伝子も単離されてきた。しかし同時に、収量のような複雑かつ高次の形質—我々がQTL解析に期待を抱いた動機とは、まさに、収量に代表されるような複雑形質の成り立ちをよりよく理解することであった—を相手にしたとき、期待に反して、“想定されるカスケードのごく末端の要因に関わるQTLしか引っかかってこない”というフラストレーションを感じた人も多いのではないか。例えば、収量に関する既往のQTLのうち、遺伝子が明らかになったものは大半が花序の形態形成遺伝子であって、より大きな枠組みで収量を規定していると考えられるバイオマス生産能力や再転流能力といった“高次の要因”がQTLとして同定されることはほとんどない。演者もこの点が気になり、1つの手がかりとして窒素同化の代謝産物のQTLを、代謝経路を追って比較してみた。その結果、予想どおり、カスケードの上流に位置する因子が最終産物のQTLに反映される度合いは予想以上に低いことが分かった。

こうした複合的かつ高次の要因にQTL解析のメスを入れるにはどうしたらよいのだろうか。1つの方法は、生理学的なモデルとQTL解析の融合であろう。作物の早晩性の遺伝解析を行う時には出穂日をそのままQTL解析にかけるのが普通だが、①花成の環境応答を温度感受性、日長感受性および基本栄養生長性に対応する3つのパラメータによって記述する发育モデルを構築し、②マッピング集団を圃場栽培して系統ごとに各パラメータを決定し、③それらのQTLを同定する、という手法を用いることにより、早晩性に関するQTLの検出感度を向上させることができる（Nakagawa, Yamagishi, Miyamoto, Motoyama, Yano and Nemoto, 2005, Theor.Appl.Genet. 110: 778-786）。

また、QTL解析を単に遺伝解析の手法と考えるのではなく、同一のマッピング集団を様々な環境で栽培させた場合の生育や収量のQTLの現れ方を比較することにより、作物に対する環境の働きかけを“生物検定”することも可能だろう。作物学と育種学では、QTL情報に期待することは必ずしも同一ではない。生理生態の本質的な理解に近づくことを目指し、作物学研究者独自の視点を盛り込むことを通じてQTL解析を自家菜園中のものとしていくことが求められているのではなかろうか。