

連載ミニレビュー

作物研究におけるマップベースクローニング法—イネを例として—

高井俊之

(農研機構作物研究所)

作物学とは安定的かつ持続的に高い作物生産を達成するための理論と技術を構築する応用科学であり、品種のもつ生産・利用上の特性を解明し、さらなる改良に向けて目標となる形質を同定し育種に提示することが1つの役割である。しかしながら、昨今のゲノム研究の進展により、農業上重要である量的形質遺伝子座 (QTL) のマッピングが可能となり、形質を支配する要因を QTLs として分解し、個々の QTLs の機能を作物生理レベルで解明できるようになってきた。このことは作物学の役割が、改良すべき形質の提示に留まらず、改良点をゲノム情報として育種に提示する時代を迎えつつあることを意味している。QTLs の機能を解明するには、その原因遺伝子を単離・同定することが重要であるが、そのための一般的な手法であるマップベースクローニングについて、作物学分野の研究者の視点に立った解説書は少ない。本稿では、マップベースクローニング法について著者のイネでの経験をもとに、最短でのクローニングに向けて各ステップでの留意点等を含めながらできる限りユーザー側の視点で述べる。なお、解析の端緒として、作物研究を担う研究者にとって利用しやすい染色体断片置換系統群 (CSSLs) を用いた、一般的な遺伝解析材料 (F₂ 集団や組換え自殖系統群 (RILs)) を用いた QTL 解析の原理については、鶴飼 (1999) 等を参照されたい。また、イネの DNA マーカーについては、ゲノムワイドにマーカー情報が公開済み (McCouch ら 2002, IRGSP 2005) であるのでマーカーは十分に利用可能であり、冬季期間も温室でイネが栽培可能という前提で話を進める。

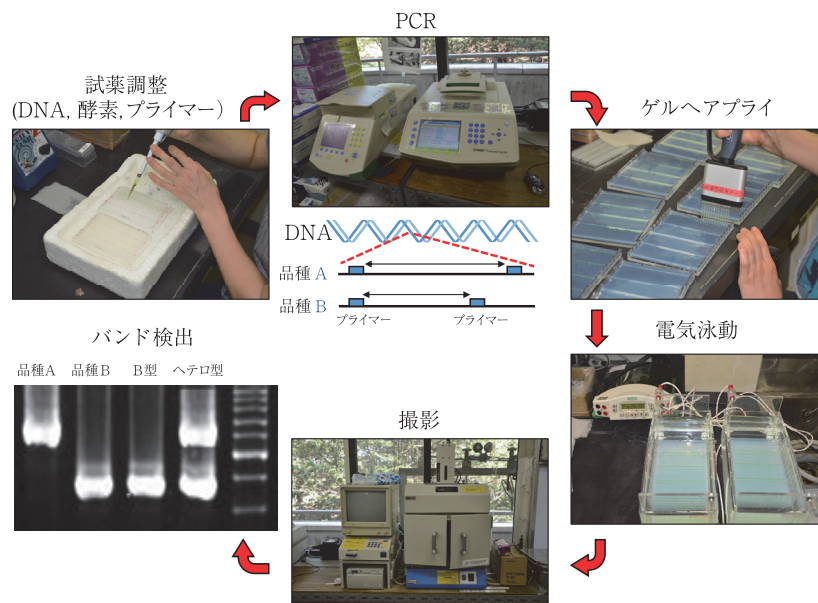
1. 解析を始める前に

遺伝解析およびマップベースクローニングは、一言で言えば解析材料の作出と材料の表現型評価の繰返しである。CSSLs を解析の端緒として用いる場合も、その後の解析には CSSLs から材料を作出する必要がある。材料を作出するためには、その材料が両親からゲノムをどのように受継いでいるか (つまり遺伝子型を)、DNA マーカーを用いて調査しなければならない。この遺伝子型調査について、第1図に概要を示した。まず遺伝子型を調査するための DNA を調査個体から抽出する。ここで紹介する遺伝子型調査は DNA を PCR で増幅して可視化する方法であるため、必要な DNA 量もイネの幼苗 2~3 cm から抽出したもので十分である。DNA は NaCl などの塩溶液に溶けるが、イソプロパノールやエタノールなどの有機溶媒には溶けないため、塩溶液中で葉身を磨り潰して溶解させた後、上澄みをイソプロパノールやエタノールを用いて DNA を沈殿させ、有機溶媒除去後に水などに溶解させれば容易に DNA 溶液が得られる。得られた DNA、ターゲットのゲノム領域を増幅させるためのプライマー、DNA を増幅させるのに必要な酵素を調整して PCR 装置で DNA を増幅させる。ここでは品種 A が品種 B よりもターゲット領域の DNA 配列が長く、この違いを DNA マーカーとして用いるとした。PCR 装置は多くの種類が販売されており、最近では価格が 30 万円の装置もあり、作物学研究者にとっても決して敷居

が高い実験ではない。DNA は負に帯電しているため、電気泳動によりゲルの中を移動させることができる。このとき、増幅配列が長い DNA は配列が短い DNA よりもゆっくり流れる。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドなどの核酸染色剤で染色後、紫外線照射器で撮影すると DNA をバンドとして可視化することができる。ここでは品種 A の増幅配列が品種 B よりも長かったため、品種 A のバンドは品種 B よりも上に位置した。この違いはメンデルの法則に沿って交雑後代に遺伝するため、両親と一緒に調査することで、交雑後代の個体がこの領域について両親 A, B のどちら側のゲノムを受継いでいるのか判別できるわけである。第1図のバンドの写真では、左から3番目は B 型、4番目はヘテロ型 (両方を受継いでいる) となる。同様に別の領域について PCR、電気泳動、写真撮影を繰り返し、望みのゲノム領域全体について遺伝子型を決定していく。このように実験自体はルーチンワークであるため、初心者でも容易にシステムを構築できるものである。著者は 100 個体、10 マーカーくらいの遺伝子型調査であれば、DNA 抽出から PCR、写真撮影までの一連の実験を 2 日で行っている。

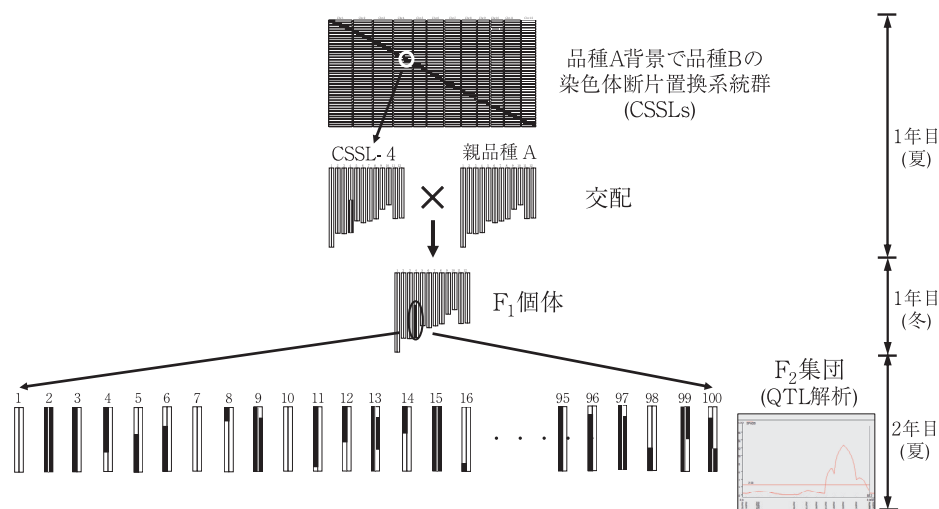
2. CSSLs を用いた遺伝解析

CSSLs はある品種 (ここでは品種 A) の遺伝背景で染色体の一部のみが供与親品種 (ここでは品種 B) 由来の染色体に置き換わった系統の集団であり、染色体の置換領域が重複するように系統を作出することで1つの集団で供与親



第1図 PCR を利用した遺伝子型調査実験.

品種 A と品種 B の DNA 配列が異なる箇所を PCR 装置を用いて増幅させ、電気泳動・紫外線照射器による撮影を通して DNA を可視化し、A 型、B 型、ヘテロ型を識別する。



第2図 マップベースクローニング手順 1.

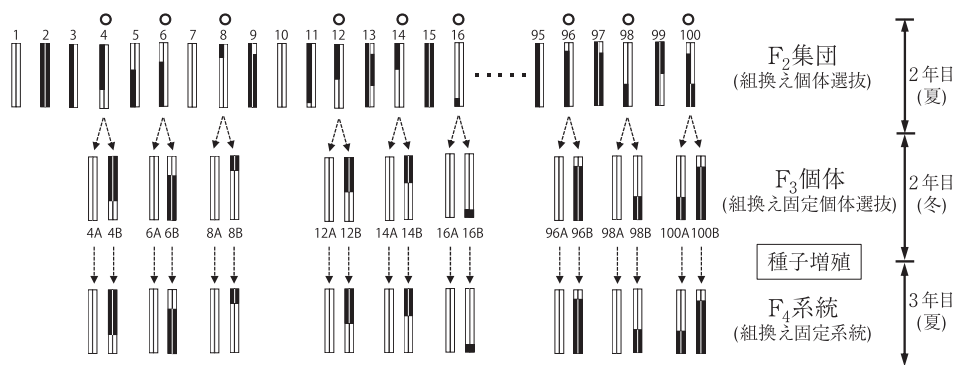
染色体断片置換系統群 (CSSLs) を用いた遺伝解析から注目すべき領域での F_2 集団による QTL 解析までを示している。CSSLs は品種 A 背景に品種 B の染色体断片が置換したもので白抜きが A 型、黒塗りが B 型のゲノム領域である。ここでは、第 4 染色体長腕が置換された CSSL-4 に注目し、品種 A と交配し F_1 個体、 F_2 集団を作成し、QTL 解析を行っている。

(品種 B) の全ゲノム領域をカバーしている (第 1 図)。CSSLs は農業生物資源研究所のイネゲノムリソースセンター (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/>) より複数集団が一般公開されており分譲が可能である。著者自身もイネ品種コシヒカリとタカナリの交雑に由来する正逆 CSSLs を作成しており (Takai ら 2014)、近々一般公開予定である。CSSLs を用いた遺伝解析は平易である。遺伝背景となっている親品種 (品種 A) と CSSLs を栽培後、形質調査を行い、

Dunnnett test による多重検定で品種 A に対してある CSSL が形質値において有意であれば、その CSSL の置換領域に形質に関与する QTL が存在すると宣言できる (1 年目夏)。

3. CSSL 由来 F_2 集団による QTL 解析

注目する形質が出穂前もしくは出穂期に評価可能な場合、その後のマップベースクローニングに必要な実験材料作成のための交配を並行して行くと時間の大きな短縮にな



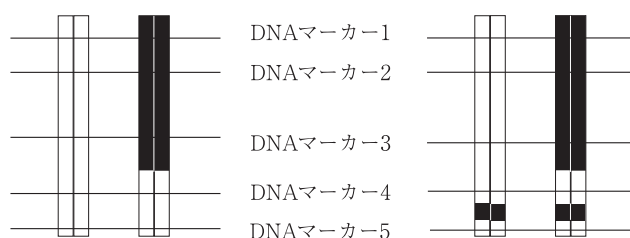
第3図 マップベースクローニング手順2.

F_2 集団の中で組換えを起こした個体 (○で記したもの) を選抜し、その後代の F_3 集団の中でヘテロ領域が A ホモ型と B ホモ型になった個体を選抜する。選抜した F_3 個体の種子を獲得し、 F_4 系統とする。

る。注目形質が成熟期まで調査できない場合は、以下のステップが1年もしくは半年遅れることになる。第2図では、出穂前に形質調査が行え、遺伝解析の結果 CSSL-4 という第4染色体長腕が置換した CSSL が QTL を有しているとして、CSSL-4 と親品種 A との間で交配を行っている。得られた F_1 種子はその冬に播種・栽培し、 F_2 自殖種子を得る。種子数としては、 F_2 集団による QTL 解析およびその後の組換え個体選抜のために最低 100 粒は確保したい。2年目はこの F_2 種子を播種・栽培し、各個体の遺伝子型調査と個体評価可能な形質であれば形質調査を行い、 F_2 集団として QTL 解析を試みる (第2図)。QTL 解析は CSSLs を用いた遺伝解析で検出した QTL の候補領域の絞込みというよりは、QTL の存在の確認作業である。よって、個体評価が困難な形質の場合は QTL 解析を行わずに後述する F_3 、 F_4 系統の育成に進んでも良い。しかし、この QTL 解析により QTL の位置・効果・寄与率等の情報を得られ、それによりこの時点で注目する QTL が絞込み可能なものかどうかの判断を行えるため、できる限り QTL 解析を試みることを勧めたい。

4. マップベースクローニング

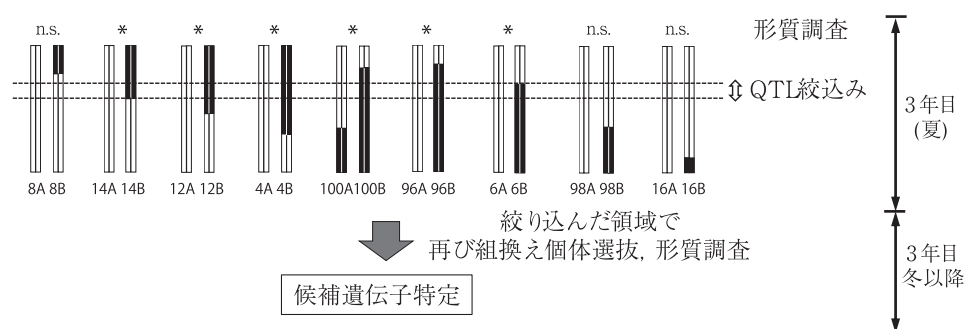
F_2 集団を育成し、各 F_2 個体由来の F_3 種子を得ることができれば、いよいよここからマップベースクローニングの作業となる。第3図に調査した F_2 集団の遺伝子型を示したが、CSSL-4 が有していた置換領域内で組換えが起こっていない場合は個体番号 1, 2, 3 の遺伝子型 (それぞれ A 型, B 型, ヘテロ型) のいずれかになる (例えば個体番号 7, 10, 15, 95) が、組換えを起こしている個体も複数存在する。第3図では、個体番号 4, 6, 8, 12, 14, 16, 96, 98, 100 などが組換えを起こしており、これらは CSSL-4 の置換領域よりも短いヘテロ領域を有している。これら組換え個体を選抜し、2年目の冬に各選抜個体由来の F_3 種子を 20-40 粒播種・育苗する。育苗段階で各個体の DNA を抽出し遺伝子型調査を行い、ヘテロ領域が品種 A 型および品種 B



第4図 マップベースクローニング注意事項.

2つの DNA マーカーが同じ遺伝子型 (A 型, B 型, ヘテロ型) を示した場合、その間のゲノム領域は2つの DNA マーカーと同じ遺伝子型と基本的に見なす。しかしながら、2つのマーカー間に距離がある場合、マーカー間で組換えが生じたことで、マーカーでは確認できない置換されたゲノム断片が存在する可能性がある。左図ではマーカー4と5は A ホモ型のため、その間は白抜きの A ホモ型と見なすが、右図では黒抜きの B ホモ型断片が隠れている。

型にホモ化 (固定) した組換え固定 F_3 個体をそれぞれ選抜する (第3図の2年目冬)。A ホモ型個体および B ホモ型個体はメンデル遺伝の分離の法則によりそれぞれ4分の1の確率で生じるはずなので、20-40 粒調査すればおそらく選抜できるはずであるが、出現しなかった場合は再度数十粒播種して選抜を行う。ここで各 F_3 集団から A ホモ型および B ホモ型を選抜したのは、後述するようにこの両者の間で形質比較をすることで QTL の領域を絞り込んでいくからである。しかし、CSSL-4 は置換領域以外の遺伝背景は A ホモ型であり、かつ第3図の 4A, 6A, 8A 個体などは置換領域も A ホモ型になっている。つまり 4A, 6A, 8A 個体などは品種 A そのものであり、品種 A を用いても良いのではないと思われるかもしれない。ここで留意すべきは、CSSL-4 (CSSLs) は DNA マーカーによって調査した遺伝子型においては遺伝背景が A ホモ型であるが、A ホモ型を示した DNA マーカー間にそのマーカーでは確認できない B ホモ型断片が残っている可能性である (第4図)。この場合、マーカー間にさらにマーカーを作成することで



第5図 マップベースクローニング手順3.

F_4 系統を栽培・形質調査し、A ホモ型と B ホモ型の間で形質値の有意差を統計解析する。

有意差の有無を下に QTL 領域を絞込む。ここでは⇔で記した領域内に QTL を絞込んでいる。その後は絞り込んだ領域で手順 1-3 を繰返し、原因遺伝子を特定する。

断片の有無を確認するのが望ましいが、うまくマーカーを作成できないこともある。加えて、こういった遺伝背景が形質に影響を与えている可能性を否定できないため、同じ遺伝背景由来の後代を用いて形質値を比較することが望ましい。100A, 100B 個体のような場合はこのペアを用いることは言うまでもない。選抜した組換え固定 F_3 個体から F_4 種子を得ることで組換え固定 F_4 系統とする (第3図)。

組換え固定系統が作成できれば、いよいよ QTL の絞込みとなる。第5図では第3図で選抜した組換え固定系統を、便宜上組換えが生じた領域順に並べている。各系統を栽培・形質調査し、系統ごとに A ホモ型と B ホモ型間で形質値に有意差があるか t 検定する。形質値に有意差があれば両者の遺伝子型の違いとなっている領域に QTL が存在するとみなせる。有意差がなければ、QTL は両者の間で共通する A ホモ型もしくは B ホモ型領域に QTL が存在すると考える。第4図では、系統番号 8, 98, 99 は A ホモ型と B ホモ型の間に形質値に有意差は無いが、それ以外の系統では形質値に有意差が存在する。この結果を矛盾なく説明する領域が⇔で示した領域であり、この領域に QTL を絞込んだことになる (第5図)。

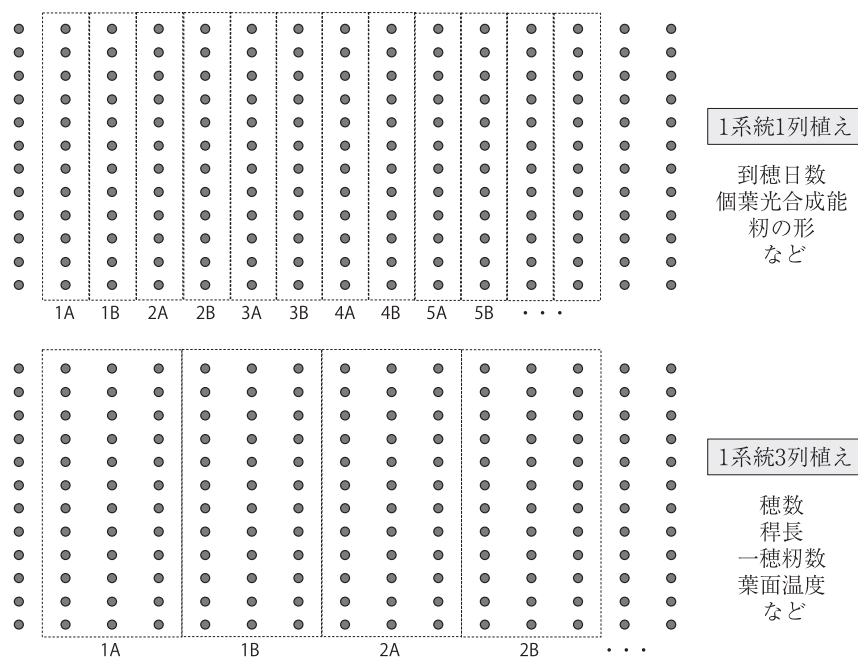
以上が QTL 絞込みの 1 サイクルである。もちろん 1 回の絞込みで原因遺伝子まで辿り着けるわけではなく、絞り込んだ領域内で再度組換え個体を選抜、A ホモ型と B ホモ型系統を作成、形質評価、絞込み、を繰返して原因遺伝子に近づいていく。一方で、絞り込んだ領域が狭まるにつれ、その領域内で組換え個体を得るためにより多くの F_2 個体を調査する必要がある。著者は、最終の絞込みのために数千個体の中から組換え個体を選抜している。この作業は大規模選抜と呼ばれている。これにより、うまく行けば数 kb まで候補領域を絞り込み、候補遺伝子を 1 個まで絞り込むことができる。そこまで絞り込めなくてもこれまでの経験や報告から判断して、数十 kb (候補遺伝子 5 個以下) までは絞込みは可能と考える。数千個体というとその数に辟易するかもしれないが、決して数千個体の形質調査ではなく、数千個体の遺伝子型調査である。上述したように、

幼苗の時期であれば DNA 抽出用の葉のサンプリングは容易であり、384 プレート用の PCR 装置があれば遺伝子型調査も一度に 384 個体調査できるため、形質調査ほど労力はいかからない。以上のステップで QTL の原因遺伝子を同定することをマップベースクローニングという。今回紹介した流れで進めると、CSSLs の評価から QTL の絞込み 1 サイクルまで 3 年である。著者はその後 1 年を費やして大規模選抜から 2 回目の QTL の絞込みを行い、4 年間で光合成 QTL の原因遺伝子を同定した (Takai ら 2013)。QTL 解析は時間のかかる研究であることは否めないが、昨今のプロジェクトベースの受託研究や科研費獲得による研究が 3~5 年間で取組む形になっていることを考えると、その時間軸に納まる研究であるとも言える。

5. 形質調査の工夫

最後に、マップベースクローニングを含む遺伝解析の進捗を最も左右する形質調査について若干述べたい。圃場で形質調査を行う場合、植物体をいかに生育ムラなく均一に栽培できるかが成功のカギである。そうは言っても、広い圃場の中で土壌の均一性にムラが生じるのは完全には避けられない。著者は、その土壌ムラによる誤差を避けるための方法の 1 つとして、比較する系統をできる限り近接して栽培している。例えば系統番号 1 の A ホモ型と B ホモ型を隣接させて 1 列植えすれば両者の間での土壌ムラによる影響をかなり避けられると考えられる (第6図)。ただし、1 列植えの場合、隣接する系統の影響を受けやすい形質の評価は難しくなる。1 列植えでは、到穂日数、個葉レベルでの光合成能、粉の形などの評価は可能であろう。1 列植えで評価できない場合は、3 列植えを提唱したい (第6図)。3 列植えの中央列について形質調査を行うことで隣接系統の影響を最小限にし、加えて比較する系統との距離も近いこと土壌ムラの影響を極力抑えることができる。3 列植えで評価するのに適した形質としては、穂数、稈長、一穂初数、葉面温度などが考えられる。

以上のようにマップベースクローニング法について実践



第6図 効率的な形質調査のための栽培方法.

到穂日数、個葉光合成、籾の形など隣接する系統の影響を受けにくい形質を対象とする場合、1系統1列植えてAホモ型とBホモ型を隣接して栽培する。穂数、稈長、一穂粒数、葉面温度など隣接する系統の影響を受けやすい形質の場合、1系統3列植えてAホモ型とBホモ型を隣接して栽培し、中央の列について形質調査を行う。

に即した形で留意点を含めて述べてきたが、もちろんまだまだ工夫すべき点は多々存在すると考えられる。本稿を読後、それでもマップベースクローニングは作物学には敷居が高いと思われた方もいるかもしれないが、Aホモ型とBホモ型系統を隣接して栽培し、たった1つのQTL（遺伝子）がAホモ型とBホモ型の形質値を制御していることを観察できた時、品種間差を観察したとき以上に作物の本質に触れたという感覚を肌で感じられるはずである。この感覚を経験することで、作物の更なる改良へ向けて視野が広がり、作物研究のアイデアが生まれてくると思われる。また、イネ以外の作物についてはCSSLsなどの解析材料の基盤が整っておらず、マップベースクローニングにはほど遠いと考えられる研究者もいるかもしれないが、次世代シーケンサーの登場以来のゲノム研究の進捗は非常に目覚しく、おそらく全ての作物においてゲノムが解読される日はそう遠くないと思われる。それに伴ってDNAマーカーも整備され、遺伝解析材料も当然整備されるだろう。注意すべきは、CSSLsが無いとマップベースクローニングができないわけではなく、本稿ではマップベースクローニングの理解を深めるために遺伝背景が揃ったCSSLsを用いたわけで、RILsからでも当然可能である。今後、多くの作物研究者がマッ

プベースクローニングに挑戦することを期待したい。

引用文献

- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.
- McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9: 199-207.
- Takai, T., Ikka, T., Kondo, K., Nonoue, Y., Ono, N., Arai-Sanoh, Y., Yoshinaga, S., Nakano, H., Yano, M., Kondo, M. and Yamamoto, T. 2014. Genetic mechanisms underlying yield potential in the rice high-yielding cultivar Takanari, based on reciprocal chromosome segment substitution lines. *BMC Plant Biol.* 14: 295.
- Takai, T., Adachi, S., Taguchi-Shiobara, F., Sanoh-Arai, Y., Iwasawa, N., Yoshinaga, S., Hirose, S., Taniguchi, Y., Yamanouchi, U., Wu, J., Matsumoto, T., Sugimoto, K., Kondo, K., Ikka, T., Ando, T., Kono, I., Ito, S., Shomura, A., Ookawa, T., Hirasawa, T., Yano, M., Kondo, M. and Yamamoto, T. 2013. A natural variant of NAL1, selected in high-yield rice breeding programs, pleiotropically increases photosynthesis rate. *Sci. Rep.* 3: 2149.
- 鶴飼保雄 1999. 量の形質とQTL解析. *日作紀* 68: 179-186.