

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力
強化と生産物活用のための基盤技術の創出」
平成24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

堤 伸浩

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

高速ジェノタイピングを利用したエネルギー作物のテーラーメイド育種技術の開発

§1. 研究実施体制

(1) 堤グループ

- ① 研究代表者: 堤 伸浩 (東京大学大学院農学生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・高純度の DNA を多数の試料から抽出する方法の確立
 - ・シーケンシング用ライブラリの構築

(2) 岩田グループ

- ① 主たる共同研究者: 岩田 洋佳 (東京大学大学院農学生命科学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・バイオマス関連形質の表現型データの解析と 250 系統の選抜
 - ・選抜シミュレーションシステムの開発
 - ・表現型計測の IT 化

(3) 矢野グループ

- ① 主たる共同研究者: 矢野 健太郎 (明治大学農学部、准教授)
- ② 研究項目
 - ・収集される表現型データのデータベースシステムの開発
 - ・次世代シーケンシングデータの効率的解析システムの開発

(4) 佐塚グループ

① 主たる共同研究者: 佐塚 隆志 (名古屋大学生物機能開発利用研究センター、准教授)

② 研究項目

- ・開花およびバイオマス関連形質の作期移動試験
- ・開花およびバイオマス関連遺伝子の形質転換系の検討

(5) 徳永グループ

① 主たる共同研究者: 徳永 毅 (株式会社アースノート、ゼネラルマネージャー)

② 研究項目

- ・遺伝資源の形質評価
- ・モデリング用 F1 系統群の作出

§2. 研究実施内容

堤グループ

次世代シーケンサーを用いて、ゲノム上の特定領域 (2種類の制限酵素で処理し、両制限酵素サイトでは含まれた領域で特定のサイズをもつ領域のみ) について、多数のサンプルを同時にジェノタイピングするシステム (Genotyping by Sequencing; GBS) を開発することを目的として以下の項目を実施した。

(ア) 高純度の DNA を多数の試料から抽出する方法の確立

各個体の遺伝子型から予測モデルに基づいて交配組み合わせを決定していく本育種システムでは、発芽から開花期までの間にすべての個体の遺伝子型を決定しておく必要がある。96穴ディープウェルを用いた破碎と CTAB 法による抽出を組合わせて、複数の制限酵素で完全に消化される程度の純度を持つ DNA を、多数のソルガム系統から効率よく抽出するシステムを確立した。

(イ) シーケンシング用ライブラリの構築

3系統のソルガムから抽出した DNA を用いて、シーケンシング用ライブラリを作製した。各系統から抽出した DNA を 2 種の制限酵素で切断し、2種の制限酵素の認識配列をそれぞれ片側に持つ DNA 断片のみを特異的に増幅するためのシーケンシング用アダプタープライマーを結合させた。これらのプライマーには個体識別用の index 配列を導入してある。これらのライブラリを混合し、ゲルでサイズ分画した後、シーケンシングした。矢野グループによるシーケンスデータの解析から、シーケンス断片のゲノム上での分布、depth と系統間での SNP の頻度を評価した。その結果、得られたシーケンス断片の多くがゲノム上の予測された場所にマップされ、3 系統間でおよそ 6 万の SNPs が検出された。

岩田グループ

(ア) バイオマス関連形質の表現型データの解析と 250 系統の選抜

2012 年に福島での栽培試験で収集されたバイオマス関連形質の表現型データをもとに交配に利用する 250 系統を選出した。まず、全形質に見られる表現型変動を 3 主成分に要約した。次に、主成分得点をもとに 458 系統を K-medoids 法で 250 クラスタに分類し、medoids となった 250 系統を選抜した。

(イ) 選抜シミュレーションシステムの開発

R を用いて選抜シミュレーションシステムを構築した。同システムは、実際に得られたマーカーデータをもとに交配実験や選抜をコンピュータ内で模擬的に行うことができる。これにより、効率的な交配計画や育種計画をデザインできる。

(ウ) 表現型計測の IT 化

IC チップおよび Bluetooth 通信機能を利用した高効率な表現型計測システムの構築に着手し、そのプロトタイプを作成した。このシステムでは IC チップを利用して、圃場における品種・系統を管理する。さらに、デジタルノギスや電子秤などの Bluetooth 機器で計測された表現型データを圃場で収集し、インターネットを介して矢野グループが構築するデータベースに計測データを集積する。

矢野グループ

(ア) 収集される表現型データのデータベースシステムの開発

各系統の形質調査データを容易に検索・閲覧し得るデータベースシステムのプロトタイプを開発した。本研究課題では、遺伝資源および育成系統の形質調査データが重要な情報基盤となる。そこで、各形質(稈長、生重量など)について、所要の表現型を有する系統を簡便に抽出し得る機能をデータベースに実装した。また、各形質の表現型値を系統間で容易に比較可能とするために、表現型値の分布をヒストグラムで表示するなど視覚化を行った。また、圃場調査実施者が計測値(表現型値)を簡便にデータベースに格納するシステムのプロトタイプを開発した。

(イ) 次世代シーケンシングデータの効率的解析システムの開発

高速シーケンサーから得られる大規模な次世代シーケンシングデータから、品種・系統間の SNP を効率的に同定するための解析システムの整備を実施した(継続中)。特に、ショート・リードをリファレンス・ゲノム配列にマッピングするためのパイプラインについて検討した。これらには、マッピングに用いるツールや SNP 探索条件についての検討が含まれる。

佐塚グループ

作期移動試験による開花及びバイオマス関連形質の調査に向けて、作期移動試験に適した品種を選定した。

名古屋大学が系統保存しているソルガムの約 300 系統を育成し、開花及びバイオマス関連形質の調査に適した系統を選抜した。評価項目として、出穂期、バイオマス、耐病性とした。また、品種の普及率(汎用性)や日本での栽培特性も考慮した。評価は達観で行った。この結果、まず、愛知県での栽培では未出穂系統(もしくは極晩生のため種子が不稔実)となる系統が約 215 系統あった。そこで残り85系統について、出穂調査を行った。この85系統については、出穂期が品種間で大きく異なっていた。この結果とともに、次年度に供試するものとして次の系統を選抜した。まず、早生品種として、Bmr-6(短稈、低リグニン)、那系-3(短稈、低リグニン)、Italian(中稈、高糖性)、晩生品種としてSIL-05(長稈、高糖性)、Rio(長稈、高糖性)の5系統を選抜した。次に、新たに導入したバイオマス関連品種として、MS79B(やや早生、中稈)、長品232(やや早生、中稈)、Tall white sooner milo(中生、長稈)、Dwarf milo(中生、中稈)、Tx430(早生、短稈)を選抜した。これらの系統は、系統の普及率やこれまでに記載されている出穂期の表現型から本調査に重要であると判断し追加した。

徳永グループ

(ア) 遺伝資源の形質評価

ソルガム遺伝資源 500 系統のバイオマス関連形質を中心とする各形質の表現型データを取得することを目的とした栽培試験を福島県内の圃場にて行った。バイオマス関連形質を中心とする20形質(出穂期、生重量、草丈、分けつ数、Brix など)について調査した。調査は10月下旬まで継続して行い、最終的に475系統について各形質の表現型データ取得を完了した。収集された475系統の表現型データは岩田グループによって解析が行われ、475系統のもつ表現型変異をもっともよく代表する250系統が選出された。

(イ) モデリング用 F1 系統群の作出

選抜した250系統を花粉親としてCMS2系統との間にF1400系統を作出する事を目的に、沖縄県内の温室にて交配作業を行った。花粉親、CMSともに11月中旬より育成を開始した。花粉親とCMSの出穂期を合わせるために花粉親は時期をずらし2回播種し、CMSについては週に1回の頻度で計14回の播種を行った。同様に花粉親とCMSの出穂期を合わせるために一定期間育成した個体については温室内に設置した短日装置内で育成した。1月下旬より出穂期の合致した花粉親とCMSとの交配を順次進めた。交配作業は3月下旬まで継続して行い、最終的に437組合せのF1系統作出を完了した。