

	タカギ ヒロキ
氏 名	高木 宏樹
本籍（国籍）	富山県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 616 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻
学位論文題目	Next generation sequencing (NGS)-based methods for simultaneous mapping and identification of candidate gene and QTLs in rice（イネにおける次世代シーケンサーを用いた遺伝子および QTL 同定法の確立）
学位審査委員	主査 客員教授 寺内 良平 副査 教授 上村 松生 副査 教授 石川 隆二 副査 教授 加藤 清明

論文の内容の要旨

2012 年に世界の人口は、70 億人を突破し、今後も増え続けることが予想されている。それ故、世界的に食料需要がますます高まると予想され、作物の生産量を上げるために、今まで以上のスピードで作物の育種を進めることが必要である。

現在、作物の育種において最も効率的な方法は、DNA マーカー選抜育種法である。DNA マーカー選抜を利用した育種を行う前提として、農業上有用な形質に関与する遺伝子領域が同定されていることが必須である。そのため、今後、育種スピードを加速する上で、有用な遺伝子を迅速に同定できるかどうかが課題となる。従来の遺伝学的解析手法を用いた遺伝子同定法では、まず、連鎖解析により目的とする有用遺伝子が座上するゲノム領域を決定する。次に、そのゲノム領域内に多数の DNA マーカーを作製して連鎖解析を続け、最終的に連鎖解析で狭められたゲノム領域の DNA 配列を比較することによって行なわれてきた。このような従来方法は、多大な時間、労力および費用を必要とした。

育種上有用な形質の多くは量的であり、これらを支配する遺伝子座は *quantitative trait loci (QTL)* と呼ばれる。育種目的には、系統間に存在する QTL の自然変異が活用されてきた。QTL 同定にも、従来、多数の DNA マーカー作製と連鎖解析が必要であった。本研究では、育種上有用な QTL を迅速に同定して利用する目的で、QTL-seq 法を確立した (Takagi *et al.* 2013)。QTL-seq 法は、系統間の交配後、後代の子孫で形質の分離を観察し、形質値の両極端を示す個体群のゲノム DNA をバルク化して全ゲノムシーケンスし、両親の何れかの基準ゲノム配列にアライメントし、SNP-index と呼ばれる指標とゲノム位置の関係を調べることにより QTL 領域を迅速に同定する技術である。QTL-seq 法を活用してイネ品種 Nortai の保有する圃場抵抗性 QTL 領域同定に成功した。

さらに人工的に誘発した突然変異を迅速に同定する技術 MutMap 法 (Abe *et al.* 2012) を改良し、MutMap-Gap 法 (Takagi *et al.* 2013) と MutMap+法 (Fekih, Takagi, Tamiru *et al.* 2013) を開発した。基準ゲノム配列が報告されている品種 (イネでは「日本晴」) と異なる品種 (例; イネでは「コシヒカリ」や「ひとめぼれ」) の変異体を MutMap 法による遺伝子同定に供試した場合、シーケンス結果は、その品種特異的なゲノム領域において正確にアライメントされない。そのため、従来の MutMap 法は、このような領域に生じた変異の検出ができなかった。MutMap-Gap 法は、MutMap と *de novo* アセンブリを併用することで、そのような品種特異的ゲノム領域に入った原因突然変異を同定できる強力な技術である。また、MutMap 法では、まず、突然変異体とその変異体の原品種を交配して F2 世代を育成する必要があった。幼苗期致死変異体や不稔変異体では交配が困難なため、MutMap 法の適用に限界があった。そこで、変異形質を示す M2 個体の兄弟個体で、原因遺伝子をヘテロ接合で保有する個体を自殖して、分離する M3 世代において変異型と野生型の個体群の DNA をそれぞれバルク化してシーケンスし SNP-index を比較することにより、原因遺伝子を同定する技術の開発に成功し、MutMap+法と名付けた。MutMap+法は、交配を行なう必要がないため、交配が難しい植物種に対しても適用することができる。現在、多くの農業上重要な植物種において全ゲノム解読が進められている。本研究で確立した QTL-seq 法、MutMap-Gap 法、および MutMap+法が、そのような植物種における遺伝解析に利用され、育種が飛躍的に進むことが期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、次世代シーケンサーを利用したイネ全ゲノム解析による量的遺伝子座 (Quantitative Trait Locus: QTL) 同定技術「QTL-seq 法」の開発、およびイネ全ゲノム解析による突然変異原因遺伝子同定技術「MutMap-Gap 法」および「MutMap+法」の開発に関する研究成果についてまとめたものである。

水稻品種の育種において、有用形質を支配する遺伝子座を同定し、その近傍に DNA マーカーを設計し、マーカーを追跡することにより迅速に選抜を実施する手法が頻繁に用いられるようになってきた。この手法は Marker-assisted selection (MAS) と呼ばれる。MAS において、有用形質 QTL 領域を同定する作業が必要となる。従来、QTL 解析には、DNA マーカーの開発など多くの労力と時間が必要とされた。近年の DNA シーケンス技術の進歩により、次世代シーケンサーが開発され、生物全ゲノム解読が飛躍的に容易になった。学位申請者は、本論文において、次世代シーケンサーを活用してイネ全ゲノムを解析することにより、煩雑な連鎖解析を実施することなく QTL のゲノム上位置を迅速に同定する技術「QTL-seq 法」を開発した。形質の異なる 2 系統の交配由来の組換え近交系 (Recombinant Inbred Lines: RILs) もしくは F2 世代の分離集団で、注目した形質について両極端な性質を示す子孫個体をそれぞれ 20-50 個体ずつ集め、各集団のゲノム DNA をバルク化して全ゲノムシーケンスし、基準ゲノム配列にアライメントした後 SNP-index 値を求め、SNP-index をグラフ化することにより、QTL の位置を特定できる事を示した。本技術の適用により、品種「Nortai」の保有するいもち病圃場抵抗性 QTL の同定に成功した。

さらに、学位申請者は、突然変異体の原因遺伝子を同定する技術 MutMap 法 (Abe *et al.*

2011)を改良して、基準配列に存在しないゲノム領域の突然変異を同定する技術 MutMap-Gap法を開発し、品種「ひとめぼれ」のいもち病真性抵抗性遺伝子 *Pii* の単離に成功した。

幼苗期致死性や不稔を示す突然変異体は交配に供することができないため、その原因遺伝子同定は煩雑であった。このような問題を解決するために、学位申請者は MutMap+法を考案し、交配を経ないで遺伝子同定に到る手法の開発に成功した。

申請者の研究成果は、イネ育種および作物遺伝学研究全般において重要な知見であり、審査委員会は、全員一致で、本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. **Takagi H**, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano LM, Kamoun S and Terauchi R. “QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations.” *The Plant Journal* 74:174–83, 2013
2. **Takagi H**, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano LM, Kamoun S and Terauchi R. “MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*.” *New Phytologist* 200:276–83, 2013
3. Fekih R*, **Takagi H***, Tamiru M*, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kamoun S and Terauchi R. “MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice.” *Equally contributed author. *PLoS One*. 8:e68529, 2013

参考論文

1. Undan JR, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, **Takagi H**, Yoshida K, Kanzaki H, Saitoh H, Fekih R, Sharma S, Undan J, Yano M and Terauchi R. “Mutation in OsLMS, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.).” *Genes Genet Syst.* 87:169–79, 2012 “GGS Prize 2013 受賞”
2. Abe A, **Takagi H**, Fujibe T, Aya K, Kojima M, Sakakibara H, Uemura A, Mitsuoka M and Terauchi R. “OsGA20ox1, a candidate gene for a major QTL controlling seedling vigor in rice.” *Theor Appl Genet.* 125:647–57, 2012
3. Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, **Takagi H**, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S and Terauchi R. “Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap.” *Nat Biotechnol.* 30:174–8, 2012
4. Kamiishi Y, Otani M, **Takagi H**, Han DS, Mori S, Tatsuzawa F, Okuhara H, Kobayashi H and Nakano M “Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene” *Mol Breed.* 30:671–680, 2012
5. Terauchi R, Abe A, **Takagi H**, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Yaegashi Y, Kanzaki H,

Matsumura H, Mitsuoka C, Utsushi H and Tamiru M. “Whole genome sequencing and future breeding of rice.” *J Plant Biochem Biotech.* 21:10-14, 2012

6. **Takagi H**, Sugawara S, Saito T, Tasaki H, Yuanxue L, Kaiyun G, Han DS, Godo T and Nakano M “Plant regeneration via direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in *Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Solereder” *Plant Biotechnol Rep* 5:187-195, 2011