

イネのマップベースクローニング

Rice gene identification by map-based cloning approaches.

岩 佐 裕 章、一 色 正 之

(横浜市立大学木原生物学研究所)

1. マップベースクローニングとは

マップベースクローニング（染色体歩行ともいう）とは既に作成された詳細な遺伝地図をもとに目的遺伝子を単離する手法である。遺伝子の翻訳産物や機能が推定できない場合の遺伝子単離法の一つである。この手法は従来から一部の動植物における遺伝子単離に利用されてきた。植物ではイネやシロイヌナズナの全ゲノム塩基配列情報の公開により、マップベースクローニング法はさらに取り組みやすくなり、最近では遺伝学的な存在すら曖昧であった量的形質（QTL）遺伝子においてもこの手法により単離することが可能となっている。

2. マップベースクローニングの一般的な手法

マップベースクローニングとは遺伝子地図を基にして遺伝子の位置を特定するため、まず遺伝子地図を作ることが必要である。イネにおいても精密な遺伝地図が作成されており（Harushima et al. 1998）、遺伝子単離に利用されてきた。しかし、現在シロイヌナズナやイネといったモデル植物においてはゲノム解読が完了しており、旧来の遺伝子地図を用いなくてもマッピングが可能になっている。また、マップベースクローニングに用いるマーカーもモデル植物では多数作ることができる。マーカーとは染色体上の位置を示すもので、品種間で塩基配列やその長さに差がある領域に作られる。

マップベースクローニングに用いる植物サンプルは交配によって作出する必要がある。目的の表現型をもつ変異体の系統（A系統、イネの場合は日本晴など）とそれとは異なり遺伝子の多型を検出しやすい系統の野生型（B系統、多くがインディカ品種のKasalath）を交配させF₁を得る。このF₁世代はそれぞれの系統の染色体を持っているため全て同じヘテロの遺伝子型を示す。このF₁世代を自家受粉させることにより、減数分裂の際に両染色体の間で組換えが起こり、F₂世代ではそれぞれの染色体が混在した染色体を持つことになる（図1）。その結果遺伝子型も様々なものとなり表現型が分離される。目的の突然変異体の表現形が劣性ホモで発現する場合は理論上F₂世代の1/4に分離して表れる。この時、突然変異

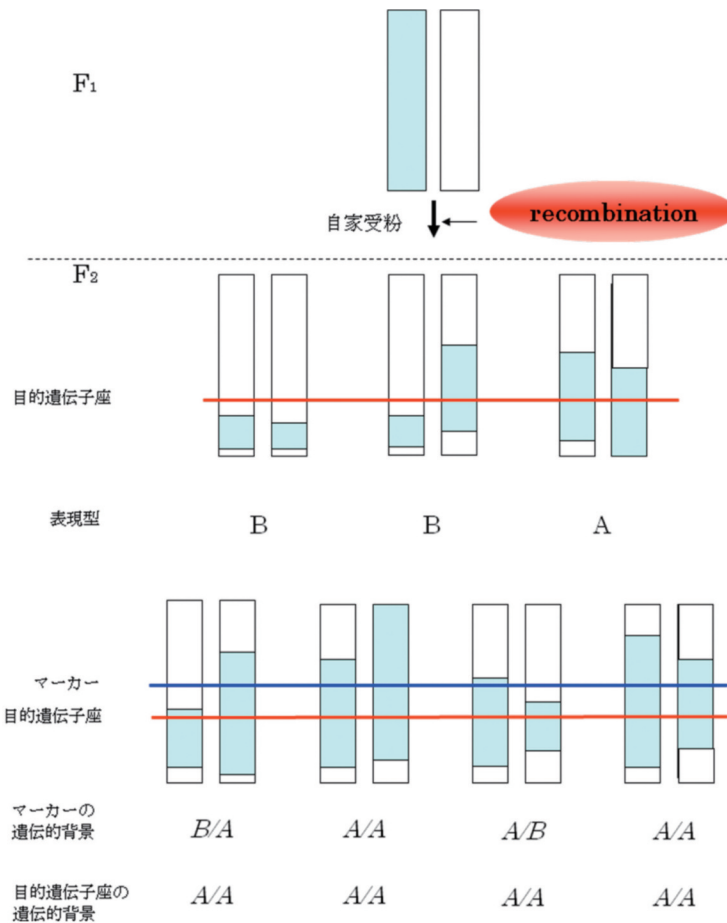


図1 マップベーススクローニングのモデル

の表現型を示すF₂集団は目的の遺伝子座における染色体が2本ともA系統の染色体になっている。マップベーススクローニングに用いるためには一般的にF₂世代の目的遺伝子座における染色体領域が2本とも同一の系統である、つまり目的の遺伝子座の遺伝的背景が同一でなければならない。劣性ホモで目的の表現形を示す遺伝子座の場合は表現型でスクリーニングすることが可能で、サンプルとして用いることができる。野生型の表現形を示す集団は、目的遺伝子座における染色体がB系統のホモあるいはA・B系統のヘテロの2種類があり表現形から判別できないためサンプルとして使用することはできない (F₃世代の表現型を調べれば使用可能である。優性の突然変異も同様)。

このように交配で得られた目的遺伝子座の遺伝的背景が同じサンプルを用いてマップベーススクローニングを行う。まず、全染色体上にマーカーを設計しラフマ

ッピングを行うことで座乗染色体とおおよその位置を決める。その際各マーカーは50cM程度以内の間隔で設計する。マッピングベーススクローニングに用いる遺伝マーカーは交配した両系統の多型を検出することを目的として設計する。RFLP (restriction fragment length polymorphism) マーカーはある領域における多型を制限酵素サイトの差異で検出するものである。一方SSR (simple sequence repeats) マーカーは単純な繰返し配列の回数による多型を検出するものであり、PCRを行い、電気泳動をするだけで増幅断片の長さが異なるという多型を検出することができる。イネでは多くのSSRマーカーについての報告がなされており (Miyao et al. 1996, McCouch et al. 1997, McCouch et al. 2002)、マッピングによる遺伝子単離を容易にしている。

マーカーにおける組換え価 r は以下の式で算出される

$$r = \frac{\text{組換えの検出できた染色体数}}{\text{調べた染色体数}} \times 100 (\%)$$

調べた染色体数であるため、イネならばサンプル数 $\times 2$ となる。ここでの組換えは目的の形質を持つA系統から野生型であるB系統への組換えである。目的遺伝子座から遠いマーカーはその組換え価は50%程度になる。目的遺伝子座に近づくほど組換え価は低くなる。各マーカーの組換え価を算出し、組換え価の低いマーカー付近に目的遺伝子座が存在する。また、組換え価 r からマーカーから目的遺伝子座の遺伝的距離を算出することができる。

$$D = 25 \ln \left(\frac{100 + 2r}{100 - 2r} \right) (cM)$$

ここで得られた遺伝的距離は絶対値であるのでマーカーから上流・下流かは決定されない。また、マーカーを中心としてこの距離の間にあるという値でもなく、マーカーからこの距離の位置付近にあるということである。遺伝的距離は物理的距離ではないため塩基数ではなくモルガン (M) という単位を用いる。モルガンは遺伝学的方法で定められた、染色体の上での遺伝子間の距離を表す単位である。生殖細胞ができる減数分裂1回当たり、相同染色体間に平均1回の交叉が起こる距離を1モルガンとし、その1/100を1センチモルガン(cM)とする。イネにおける遺伝的距離と物理的距離の比較では、100kbが平均約0.4cMであるとの報告がある (Wu et al. 2003)。セントロメア付近では組換えが起こりにくいため、他の

場所と同じ遺伝的距離でも物理的距離は離れている。イネでは、310-620kbの物理的距離の中で全く組換えがないという領域が存在するという結果が報告されている (Wu et al. 2003)。このようにして目的遺伝子座付近と思われるマーカーからの遺伝的距離を算出し新たなマーカーを作ることによって候補領域を狭めていく。

ある程度候補領域を決定することができたら、データベースでその領域の遺伝子情報を確認し候補遺伝子と思われるものをピックアップする。候補遺伝子の配列解析や発現解析を行ない、目的遺伝子であるかどうかを検証した上で候補の中から目的遺伝子を決定し目的遺伝子の単離となる。変位部位などが発見しにくいQTL遺伝子など候補遺伝子をはっきりしない場合は、サンプルの個体数を増やす必要がある。セントロメア付近に座乗する遺伝子であった場合などは、個体数を増やしても領域を狭めることができず、マップベースクローニングでの遺伝子単離をあきらめる場合もある。

3. マップベースクローニングに関する最近のトピックス

ここで、イネにおけるマップベースクローニングで、実際に遺伝子がクローニングされた例をいくつか挙げる。

イネにおける半矮性の表現型は「緑の革命」においてイネの収量増加に寄与したように、育種上非常に重要であることが知られている。Asanoら(2008)は優性の半矮性突然変異体*Slr1-d*を選抜し、マップベースクローニングにより原因遺伝子単離を行った。マッピングにはジャポニカ品種から得られた突然変異体とインディカ品種の*kasalath*を交配させたF₂植物体632個体が用いられた。この植物体の背丈を指標とし、半矮性の植物体について連鎖解析が行われた。その結果、優性矮性遺伝子は3番染色体上の長腕におけるマーカーと強く連鎖していることがわかった。データベース検索によると、この領域には120以上の予想遺伝子が存在した。その中にDELLAタンパク質をコードしている遺伝子*SLR1*が含まれていた。*SLR1*にコードされているDELLAタンパク質について調べると、他の植物における相同遺伝子はジベレリン・シグナルのリプレッサーであることがわかった。*Slr1-d*変異体はアミノ酸置換変異のため、ジベレリン・リプレッサーの分解速度が野生型よりも遅く、その結果として優性で半矮性の表現型を示していた。背丈が低いイネは、背丈が高いイネに比べて倒れにくくなることから、肥料を多量に与えることが可能になる。さらに、茎や葉に対するイネの実の部分の比率が高まり単位面積当りの収量を増加することができる。

また、収量を上げるだけでなく病害に抵抗性をもつ遺伝子もマップベースクローニングで単離されている。いもち病は世界的な主食であるイネにおける壊滅的

な真菌の病害であり、いもち病に対するレース特異的抵抗性は一般的に持続性がない。1014個体のF₂植物を用いて単離された*Pi2l*は重金属結合ドメインとタンパク質-タンパク質相互作用ドメインと推定されるモチーフを持ったプロリンリッチのタンパク質をコードしていた (Fukuoka et al. 2009)。

その他にも農業形質として重要な遺伝子が多く単離されている。米穀粒の大きさや重量に影響するQTLである*GW2*遺伝子は新規なRING-type E3 ubiquitin ligaseをコードしていた (Song et al. 2007)。やはり穀粒の大きさに影響するQTLのひとつ*qSW5*は機能不明な遺伝子であった (Shomura et al. 2008)。多収性に関係する*DEP1* (Huang et al. 2009) や*GIF1* (Wang et al. 2008)、栽培イネと野生イネ*O. rufipogon*の草型の違いを決定する*PROG1* (Tan et al. 2008)、深水イネが水に浸かったときに節間伸長を促進するために機能する*SNORKEL1* (Hattori et al. 2009) などNature関係のジャーナルだけでもかなりの報告例がある。このように、イネにおける重要形質はマップベースクローニングによって、その原因遺伝子が明らかになってきている。

4. 低アミロース突然変異体の原因遺伝子単離

それでは、実際に我々が行っているマップベースクローニングを例にして具体的な実験を紹介する。

ジャポニカイネにおいて低アミロースの特徴である白濁した米穀粒の表現形を示す変異体として*dull(du)*が知られている。*du*変異体はジャポニカ栽培品種の金南風から化学変異源処理により作成された。*du*はアミロース合成酵素をコードしている*Waxy(Wx)*遺伝子とは異なる遺伝子座に座乗し、5つの異なる遺伝子座が知られている (Yano et al. 1988)。異なる*du*遺伝子はアミロース含有量の低下に対して異なる影響を示し、異なる*du*遺伝子の二重変異体を作出するとアミロース含有量の低下に対して相加的な影響を示す。このようなアミロース含有量への影響から*du*変異体は良食味米の作出のための片親として育種に使用されてきた。今回はそのうち*du4*についてのマッピングを行った。*du4*は12番染色体に座乗し、遺伝子量効果があることが示されていた (Yano et al. 1988)。さらに*Wx*の発現を、RNAレベルおよびタンパク質レベルで調べたところ、*du4*変異体では野生型と比べてほとんど変化がなかった (Matsuda未発表データ)。胚乳のアミロース含有量は0%程度まで減少していることから、*du4*は他の植物種でも知られていないアミロース合成酵素の活性に必要な補酵素の変異体であることが示唆された。

まず、12番染色体のみKasalathに置換した部分置換系統のイネと*du4*変異体を交配し、F₂種子にてマッピングを行った。しかし、12番染色体上に座乗領域は発

見できなかった。このため、改めてKasalathと*du4*変異体を交配し、F₂種子を得た。種子における突然変異体の選抜は目視で行い、分離比は2000粒のうち、表現型が変異体と思われる種子が301粒、野生型と思われる種子が1699粒であった。ただし、遺伝子量効果があるため、変異体として完全に白濁した種子のみを選抜した。このうちラフマッピングに用いた18個体についてF₃種子を確認したところ、すべての種子が完全に白濁した変異体であったことから、変異体選抜には成功していた。この選抜した変異体においてラフマッピングを行うため、図2に示したSSRマーカーが使用された。このマーカーはPCRにより長さの違うDNA断片として増幅される。

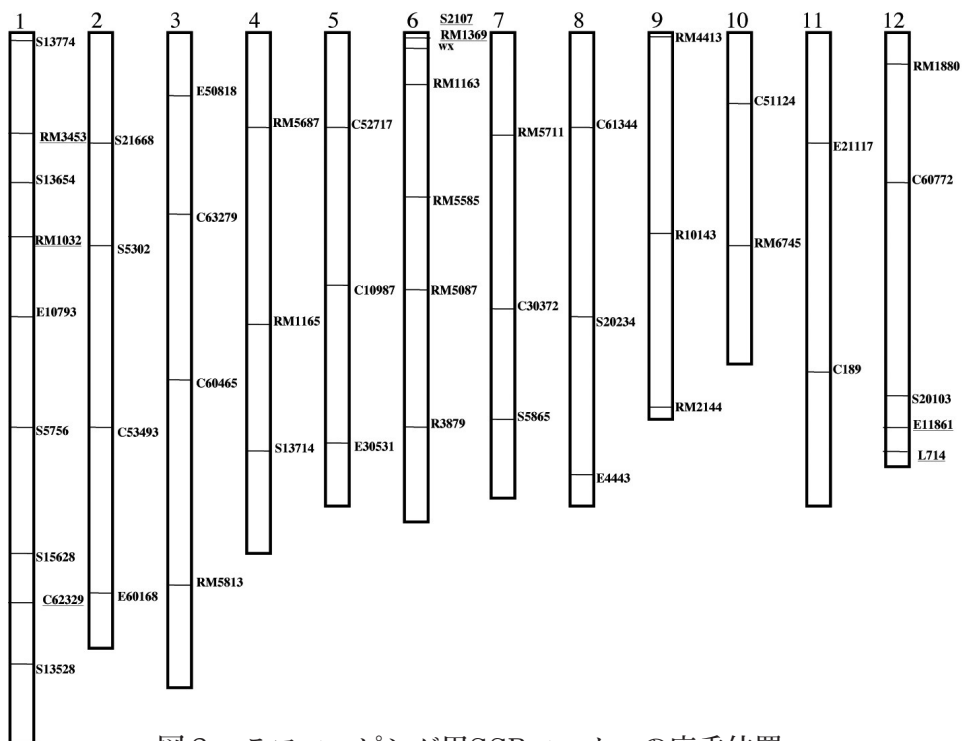


図2 ラフマッピング用SSRマーカーの座乗位置

まず、F₂変異体植物の葉からDNAを粗抽出した。上記のマーカーを使用し、PCRで増幅した後、アガロースゲル電気泳動でバンドサイズの差からそのマーカーの遺伝子型を検出した（図3）。

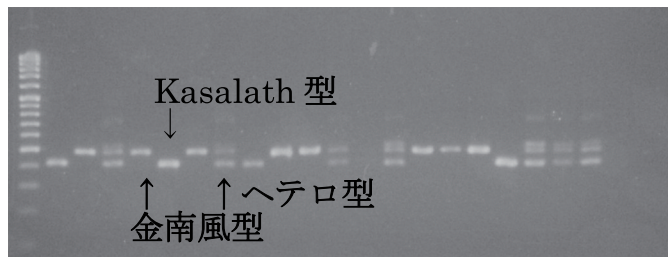


図3 SSRマーカーによる多型分析の例

図3のように分かれるバンドから金南風型、Kasalath型、ヘテロ型を検出し数を数えた。得られた結果から組換え価と遺伝子間距離を算出した。

全マーカーのうち金南風の染色体の割合から算出された組換え価が40%以下であったものは1番染色体のS13654、E10793、S13528、6番染色体上のRM1163、RM5585、9番染色体上のRM4413、12番染色体上のS20103であった。また、その中でも遺伝距離が特に小さく、候補領域となったのは6番染色体の長腕のテロメア側の末端に位置するRM1163 (15.5cM) から13.9cM離れた領域と9番染色体のセントロメア付近に位置するRM4413 (0.65cM) から8.4cM離れた領域であった。この結果を受けてさらに詳細なマッピングを行うために候補領域近傍にマーカーを作成しようと試みた。しかし、9番染色体におけるマーカーは、候補領域がセントロメア近傍であったため、これまでのところ多型を示す新規マーカーを作成することに成功していない。これに対して、6番染色体に作成したS2107 (5.1cM)・RM1369 (6.6cM) どちらのマーカーも金南風型の染色体の割合は100%であった。また、6番染色体の7.9cMに座乗する *Wx* 遺伝子のジャポニカタイプのアレル *Wx^a* とのリンクを調べたところ、全てが金南風型であった。この結果から、*du4* 遺伝子は *Wx* 遺伝子の近傍領域に座乗している可能性が示唆された。今後は詳細なマッピングを行うためにサンプル数を増やすとともに、*Wx* 遺伝子座の近傍領域に候補となりそうな遺伝子がないかをゲノムデータベースで検索し、変異の有無を調べる予定にしている。

5. さいごに

QTLのような量的形質に関するマッピングは、突然変異体ほどには表現型がわかり易くはなく、また候補遺伝子のDNA配列に明確な変異がないことから作業量が非常に多くなる。しかし、近年はそのような困難を克服して素晴らしい研究成果が次々に報告されている。それとは逆に、突然変異体のマップベースクロ

ーニングについては、材料のF₂植物を作成する時間を除けば、イネゲノムの成果もあるが、割合に簡単に原因遺伝子を発見することができるようになっている。今後、地球環境の変動に伴い、乾燥や塩、高温などの不良環境に耐性のあるイネが求められるだろう。イネゲノムの成果からの逆遺伝学的な遺伝子機能解析とともに、従来のような遺伝学的な遺伝子機能解析により重要形質遺伝子が単離され、利用されていくことは間違いないだろう。

引用文献

- Asano K, Hirano K, Ueguchi-Tanaka M, Angeles-Shim RB, Komura T, Satoh H, Kitano H, Matsuoka M, Ashikari M. (2009) Isolation and characterization of dominant dwarf mutants, *Slr1-d*, in rice. *Mol Genet Genomics* **281**:223-231
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M. (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**:998-1001
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, Ashikari M. (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**:1026-1030
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiya H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS, Sasaki T. (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* **148**:479-494
- Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X. (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet.* **41**:494-497
- McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair M. (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol.* **35**:89-99
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, 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, Stein L. (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* **9**:199-207
- Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet.* **40**:1023-1028

- Song XJ, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX.** (2007) A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet.* **39**:623-630
- Tan L, Li X, Liu F, Sun X, Li C, Zhu Z, Fu Y, Cai H, Wang X, Xie D, Sun C.** (2008) Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. *Nat Genet.* **40**:1360-1364
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z.** (2008) Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat Genet.* **40**:1370-1374
- Wu J, Mizuno H, Hayashi-Tsugane M, Ito Y, Chiden Y, Fujisawa M, Katagiri S, Saji S, Yoshiki S, Karasawa W, Yoshihara R, Hayashi A, Kobayashi H, Ito K, Hamada M, Okamoto M, Ikeno M, Ichikawa Y, Katayose Y, Yano M, Matsumoto T, Sasaki T.** (2003) Physical maps and recombination frequency of six rice chromosomes. *Plant J.* **36**:720-730
- Yano M, Okuno K, Satoh H, Omura T.** (1988) Chromosomal location of genes conditioning low amylose content of endosperm starch in rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet.* **76**:183-189