

総説 (招待)

穀物の標的ゲノム改変

久野 裕¹⁾・安倍史高²⁾・Robert E. Hoffie³⁾・Jochen Kumlehn³⁾

(¹⁾岡山大学・資源植物科学研究所, ²⁾農研機構・作物研究部門, ³⁾Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany)

カスタマイズ可能なエンドヌクレアーゼの登場により, 近年, 遺伝子工学は飛躍的に進歩した. この分子のハサミを使えば, 事実上ほぼ全てのゲノム上の標的部位において, 変異の導入や正確な遺伝子改変が可能となる. ゲノム編集と呼ばれるこの技術は, その精度, 効率, 機能汎用性の高さから, 遺伝子機能を解明するための基礎研究だけでなく, 知識に基づいて作物の形質を改良する際にも有効な手段となっている. 標的ゲノム改

変に利用可能なプラットフォームのなかでも, RNA 誘導型 CRISPR (clustered regular interspaced short palindromic repeats)-associated (Cas) エンドヌクレアーゼが最も強力なツールである. この総説では, カスタマイズ可能なエンドヌクレアーゼの開発, 穀物育種における最近の取り組み, そしてこの分野における将来の可能性について, 応用を重視して概説する.

Breeding Science 71: 405–416 (2021)

原著論文

CsKDO はキュウリの種子発芽致死を制御する候補遺伝子である

Chen Wang^{1,2,3,4)}・Ning Hao²⁾・Yutong Xia^{1,3,4)}・Yalin Du^{1,3,4)}・Ke Huang^{1,3,4)}・Tao Wu^{1,2,3,4)}

(¹⁾College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, China, ²⁾College of Horticulture and Landscape, Northeast Agricultural University, China, ³⁾Engineering Research Center for Horticultural Crop Germplasm Creation and New Variety Breeding, Ministry of Education, China, ⁴⁾Key Laboratory for Vegetable Biology of Hunan Province, China)

種子発芽は植物成長の初期段階において重要な役割を果たす. しかしながら, 植物の種子発芽後の致死性に焦点をあてた研究は数少ない. 本研究では, キュウリ (*Cucumis sativus* L.) において異常な種子発芽をするメタンスルホン酸エチル (EMS) 突然変異体 *Csleth* を同定した. *Csleth* 変異体の幼根はゆっくり伸長し, 播種後 14 日以内に子葉から離脱した. 遺伝解析の結果, *Csleth* の突然変異型の表現型は 1 つの劣性遺伝子によって支配されていた. MutMap⁺ および Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) ジェノタイプングの結果から *Csa3G104930* が *Csleth* 変

異の候補遺伝子であることが明らかとなった. 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase をコードする *Csa3G104930* は長さ 4238 bp であり, *CsKDO* と名付けられた. *CsKDO* は野生型キュウリの雄花で高く発現していた. 細胞内局在の結果から, *CsKDO* は核に存在することが示された. 全体として, 以上の結果は, *CsKDO* がキュウリの種子発芽期の致死的な突然変異を制御することが示唆された.

Breeding Science 71: 417–425 (2021)

RAD-R スクリプト : R コンソールにスクリプトをコピー & ペーストするだけで FASTQ ファイルから連鎖地図の構築や R/QTL の実行ができる RAD-seq 解析のための R パイプライン

関 功介

(長野県野菜花き試験場)

シーケンスコストの低下に伴い, RAD-seq 解析の数は急増しており, 多くの作物に関する膨大な遺伝学的知見が生み出されている. ハイスループット塩基配列解読によって得られたデー

タセットの利用に対する関心は高まっているにもかかわらず, 専門的な解析プラットフォームは専門家でないユーザーにとって敷居が高く, また, 各々のコンピュータに導入するのは難し

い。そこで、RAD-seq 解析用の RAD-R スクリプトを Windows10 上で開発し、バイオインフォマティクスに精通していないユーザーでも簡単に膨大な塩基配列データを解析できるようにした。これらの RAD-R スクリプトは、Excel のセルを R コンソールにコピーするだけの簡単な操作で、自殖性植物の F₂ 集団の生のシーケンズリードから、連鎖地図の構築や QTL 解析までの流れを実行できるため、経験の少ない多くのユーザーにとっても有用である。RAD-R スクリプトと Stacks で作成した

連鎖地図を比較したところ、RAD-R スクリプトのほうが遺伝子型データの欠損が少なく、総遺伝的距離が短い連鎖地図を作成できることが示された。RAD-R スクリプトで作成した遺伝子型データファイルのなかから、視覚的にエラーの訂正が適切だと思われる信頼性の高い遺伝子型データを選択することで、QTL 解析結果を容易に得ることができる。

Breeding Science 71: 426–434 (2021)

合成コムギ派生系統における乾燥耐性関連形質の遺伝的変異：気候変動にレジリエントな育種への洞察

Michael O. Itam¹⁾・Yasir S. A. Gorafi^{2,3)}・Izzat S. A. Tahir³⁾・辻本 壽²⁾

(¹⁾鳥取大学大学院・連合農学研究科, ²⁾鳥取大学・乾燥地研究センター, ³⁾スーダン農業研究機構)

これまでの研究により高温または塩害耐性として選抜されていた、タルホコムギ (*Aegilops tauschii*) 染色体断片導入パンコムギ 24 系統を、乾燥・灌漑・乾燥を繰り返す条件下で 2 年間栽培し評価した。この研究の目的は、1 つ以上の非生物ストレスに耐性を持つ育種系統を選抜することである。実験は、3 反復のアルファ格子デザインで行い、干ばつ区は開花期に灌漑を止めることにより設定した。その結果、導入された異種染色体断片の違いを反映して、生理および農業形質に大きな遺伝的変異がみられた。半数出穂日、草丈、千粒重など、多くの形質において高い遺伝率 (47% 以上) が記録され、育種に有用なこれらの形質が遺伝的に制御されていることを示している。また、

異なる灌漑の環境間および環境内の形質間相関からは、これらの形質を制御する遺伝因子間に強い関連性があることが明らかになった。さらに、戻し交配親や高温乾燥地域で一般的に栽培されているエリート品種よりも優れたストレス耐性指数や平均生産性を示す系統も存在した。グラフィカルジェノタイプリングによって、いくつかの乾燥耐性系統には、4B、6B、2D および 3D 染色体に独自の導入断片がみられ、これらは乾燥耐性に関連している可能性がある。さらなる育種によって、これらの系統が気候変動にレジリエントなコムギ品種の開発に利用されることを推奨する。

Breeding Science 71: 435–443 (2021)

遺伝的潜在能力の正確な推定のための圃場異質性を考慮した空間カーネルモデル

石森元幸¹⁾・高梨秀樹¹⁾・藤本 優¹⁾・鐘ヶ江弘美¹⁾・米田淳一²⁾・徳永 毅²⁾・堤 伸浩¹⁾・岩田洋佳¹⁾

(¹⁾東京大学大学院・農学生命科学研究科, ²⁾(株)アースノート)

フィッシャーの原理に従い、試験圃場は局所的な管理のために複数のブロックに分割されるのが一般的である。ブロック内では均質性が仮定されているが、数百のプロットを含むような大きなブロックでは、この仮定が現実的でない場合がある。植物育種に不可欠である系統評価試験では、圃場異質性が遺伝的潜在能力の推定に偏りを生じさせる可能性があるため、注意深く取り扱う必要がある。大規模圃場試験においてより正確に遺伝子型値を推定するために、我々はブロック内および圃場全体の連続的な異質性を考慮した、ゲノムワイドマーカーを組み込んだ空間カーネルモデルを開発した。シミュレーション研究で

は、空間カーネルモデルは様々な条件下で頑健であった。遺伝率、空間的自己相関範囲、反復数、欠測値が遺伝子型値の推定精度に直接影響したが、空間カーネルモデルは常に古典的なブロックモデルよりも優れた性能を示した。また、我々はこれらの空間カーネルモデルを量的形質遺伝子座のマッピングにも応用した。最終的に、バイオエネルギー用ソルガム系統の圃場試験データを用いて、空間カーネルモデルの性能を検証した。その結果、空間カーネルモデルは、不均質な圃場における系統の遺伝的潜在能力の評価に有効であることが示唆された。

Breeding Science 71: 444–455 (2021)

異なる参照ゲノム配列を用いた栽培イチゴの雄性不稔 QTL の比較マッピング

和田卓也¹⁾・門田日陽里¹⁾・磯部祥子²⁾・白澤健太²⁾・末吉孝行¹⁾・平田千春¹⁾・森 美幸¹⁾・永松志朗¹⁾・田中幹大¹⁾

(¹⁾福岡県農林業総合試験場, (²⁾かずさ DNA 研究所)

雄性不稔性は作物の F₁ 種子生産に有用な生殖的隔離現象である。本研究では、QTL-seq 法を用いて、これまでに同定された栽培イチゴの雄性不稔に関する 3 種類の QTL (*qMS4.1*, *qMS4.2*, *qMS4.3*) が座乗するサブゲノムの同定を行った。*qMS4.1*, *qMS4.2*, *qMS4.3* は、‘Camarosa’ の参照ゲノム配列 (v1.0.ai) を用いて、各々 Fvb4-4, Fvb4-3, Fvb4-1 という別々のサブゲノムにマッピングされた。3 つのうち、*qMS4.1* と *qMS4.3* の候補領域はそれぞれ Fvb4-4 の 12–26 Mb および Fvb4-1 の 12–14 Mb であったのに対し、*qMS4.2* の候補領域は Fvb4-3 のなかで細分化されて判然としなかったことから、Fvb4-3 では参照ゲノム配列の構築時にスキップされたアセンブルが正確に行われていない可能性が考えられた。一方、‘麗紅’ の参照ゲノム配列 (r.2.3.) を用いたところ、*qMS4.3* は

ch4X1 にマッピングされたものの、*qMS4.1* と *qMS4.2* はどちらも chr4Av にマッピングされたことから、‘麗紅’ の参照ゲノム配列ではサブゲノムの配列の区別が不十分な可能性が考えられた。‘Camarosa’ の参照ゲノム配列は相を区別しない地図のため相同染色体の配列を 1 つにまとめているのに対し、‘麗紅’ の参照ゲノム配列は相を区別する地図なので相同染色体の配列を区分した配列情報である。異なる参照ゲノム配列を用いた QTL マッピングは、各々の参照ゲノム配列が有する特徴を明らかにしたとともに、栽培イチゴの特定の遺伝子のファインマッピングおよびマップベースクローニングを加速させられると期待できる。

Breeding Science 71: 456–466 (2021)

黄ダイズにおいて毛茸色遺伝子は低温裂開抵抗性を向上させる

山口直矢¹⁾・鈴木千賀¹⁾・山下陽子²⁾・千田峰生³⁾

(¹⁾北海道立総合研究機構・十勝農業試験場, (²⁾北海道立総合研究機構・中央農業試験場, (³⁾弘前大学・農学生命科学部)

著しい低温は黄ダイズの種子背側に裂開を引き起こす。黄ダイズは *I* 遺伝子座について対立遺伝子 *I* もしくは *i* を持ち、それぞれ黄色 (*I*) もしくは着色した臍 (*i*) を有する。我々は以前に *I* 遺伝子座の新規対立遺伝子 *Ic* を単離し、*IcIc* 遺伝子型を有する黄ダイズが低温裂開抵抗性になる可能性を報告した。しかしながら、*Ic* 対立遺伝子だけでは高度の抵抗性を実現できなかった。毛茸色遺伝子 *T* が低温による種皮劣化を抑制することが報告されていた。本研究では、*T* が低温裂開抑制に効果があるかどうかについて、*T* 遺伝子座に関する 2 種類の準同質遺伝

子系統 (*iI* 背景もしくは *IcIc* 背景) を用いて検証を行った。いずれの背景においても *TT* 遺伝子型のほうが *ii* 遺伝子型よりも有意に裂開率が低く、*T* が低温裂開に対して抑制効果を有することが示された。さらに *Ic* と *T* の遺伝子集積により低温裂開抵抗性が向上することが明らかになった。我々の研究結果はダイズ育種プログラムにおける高度の低温裂開抵抗性品種開発の一助になるであろう。

Breeding Science 71: 467–473 (2021)

DNA マーカー選抜を利用したイネごま葉枯病 (*Bipolaris oryzae*) に抵抗性を有する世界初の実用イネ品種の育成と特性解析

松本憲悟¹⁾・太田雄也¹⁾・山川智大¹⁾・大野鉄平^{1,2)}・瀬田聡美¹⁾・本多雄登¹⁾・溝淵律子³⁾・佐藤宏之^{3,4)}

(¹⁾三重県農業研究所, (²⁾桑名地域農業改良普及センター, (³⁾農研機構・作物研究部門, (⁴⁾農林水産省)

Bipolaris oryzae によって引き起こされるイネごま葉枯病 (以下、ごま葉枯病) は、イネの収量を低下させる重大な病害である。ごま葉枯病抵抗性品種の育成は、経営上有用な解決策であるが、抵抗性品種はこれまで育成されていない。ごま葉枯病抵抗性を備えた実用的な品種育成を目標に、筆者らは、収量性は

優れるが、ごま葉枯病に罹病性の品種「みえのゆめ」の遺伝的背景に、ごま葉枯病抵抗性由来遺伝資源「Tadukan」由来の抵抗性量の形質遺伝子座 (QTL) *qBSR11* を導入した。抵抗性は 1.3 Mbp の領域にある単一の劣性遺伝子により支配されることが示され、本遺伝子を *bsr1* (*brown spot resistance 1*) と命名した。

準同質遺伝子系統 *bsr1-NIL* は、原品種の「みえのゆめ」と比較して、ごま葉枯病の発病が軽微な圃場において玄米粒幅が大きく多収、発病が甚大な圃場においてごま葉枯病発病程度が低く 28.8% 多収であった。また、複数のごま葉枯病菌株に対して抵抗性を示した。 *bsr1-NIL* は、安定したごま葉枯病抵抗性を示

し、優れた農業形質を持つことから、我々は *bsr1-NIL* を「みえのゆめ BSL」として農林水産省へ品種登録出願した。本報は、DNA マーカー選抜を用いて育成したごま葉枯病抵抗性イネ品種に関する最初の報告である。

Breeding Science 71: 474–483 (2021)

オオムギ縞萎縮ウイルスに対する抵抗性遺伝子解析のための GFP 発現ウイルスベクターの利用

田上 舞¹⁾・王 蔚芹²⁾・山本芽依美²⁾・萩原智美²⁾・湯本真理²⁾・富山愛佳²⁾・三根 悟²⁾・田村有紀子¹⁾・小林俊一¹⁾・中澤佳子¹⁾・加藤常夫¹⁾・夏秋知英²⁾・西川尚志²⁾

(¹⁾ 栃木県農業試験場, (²⁾ 宇都宮大学・農学部)

土壌伝染性のネコブカビ類である *Polymyxa graminis* はオオムギ縞萎縮ウイルス (BaYMV) の媒介者であり、オオムギに大きな被害を与える。これまで 22 個の抵抗性遺伝子が同定されているが、ごく一部しかウイルス抵抗性品種の育種に利用されていない。近年、これらの抵抗性遺伝子の効果を打破する BaYMV 系統が確認されている。本研究では緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する BaYMV を構築し、接種したオオムギ植

物体におけるウイルスの動態解析に用いた。葉への接種では根やクラウンへの接種よりも感染率が高かった。さらに、いくつかの抵抗性品種への接種においては圃場試験で観察される場合と同様の感染性を示した。本研究の結果により、GFP 発現ウイルスはウイルスの複製や動態の可視化、抵抗性メカニズムの解析において有用なツールであることが示唆された。

Breeding Science 71: 484–490 (2021)

ノート

アメリカのイネ品種「Dawn」のごま葉枯病抵抗性に関する QTL 解析

太田雄也¹⁾・松本憲悟¹⁾・中山幸則¹⁾・山川智大¹⁾・大野鉄平²⁾・溝淵律子³⁾・佐藤宏之⁴⁾

(¹⁾ 三重県農業研究所, (²⁾ 三重県桑名農政事務所, (³⁾ 農研機構・作物研究部門, (⁴⁾ 農林水産省)

糸状菌 *Bipolaris oryzae* によって引き起こされるイネごま葉枯病 (BS) は、収量の低下および玄米品質の悪化の原因となる。一塩基多型 (SNP) マーカーを用いて、我々はアメリカのイネ品種「Dawn (抵抗性)」と「コシヒカリ (罹病性)」との交配に由来する戻し交雑自殖系統群 (BILs) において、BS 抵抗性の量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行った。3 年間の圃場での評価で 4 つの BS 抵抗性 QTL を検出し、それら全ての QTL において「Dawn」が抵抗性アレルを付与していた。最も効果の大きい QTL の *qBSR6-kd* は、全表現型分散の 15.1 ~ 20.3% を説明した。発病程度と到穂日数 (DTH) は 3 年とも負の相関関

係にあったが、*qBSR6-kd* は「Dawn」型アレルが出穂を促進する DTH の QTL の近傍に座乗していた。もう 1 つの BS 抵抗性 QTL (*qBSR3.1-kd*) は DTH の QTL と連鎖していなかった。従って、これら 2 つの QTL は出穂を遅延させることなく BS 抵抗性品種を育種するために役立つと思われる。それら以外の 2 つの QTL (*qBSR3.2-kd* と *qBSR7-kd*) は「Dawn」型アレルが出穂を遅くさせる DTH の QTL の近傍に座乗していた。本研究で報告した QTL は BS 抵抗性品種を育成するための有力な候補になるだろう。

Breeding Science 71: 491–495 (2021)