

植物のゲノム研究の発展と将来

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	原田, 久也
巻/号	13巻8号
掲載ページ	p. 7-13
発行年月	1990年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



植物のゲノム研究の発展と将来

原田 久也

植物の個々の遺伝子の構造と機能、発現制御にとどまらず、ゲノム全体の構造、オーガニゼーションを解明することは、生命現象をより深く理解するために必要であり、同時に植物育種等の分野に画期的な手法をもたらす可能性がある。ゲノムの構造を表現するのに連鎖地図、細胞学的地図、物理地図があるが、その中でも DNA マーカーの連鎖地図が重要である。DNA マーカーの連鎖地図がゲノム解析に有効に利用されるためには、塩基配列の多型を高感度、簡便に検出する手法、計量形質を含む形質遺伝子と DNA マーカーとの連鎖を解析する理論とソフトウェア、単一コピーの DNA プローブによる染色体の *in situ* ハイブリダイゼーション法、反復配列を含む巨大 DNA の整列クローンの作成が必要である。

1 はじめに

ゲノムの定義を「その生物の完全な生活機能をつかさどるのに欠くことの出来ない最少限の遺伝子群」とすると、植物の場合は核の外にミトコンドリアと葉緑体の DNA の 1 組を加えた全体がゲノムになるが、ここでは便宜上、核（核ゲノム）を中心に考えることにする。核ゲノムに対してミトコンドリア（葉緑体）ゲノムと表現することがある。

近年、植物の遺伝子も相次いで単離されているが、それらは全遺伝子のほんのわずかの部分であり、染色体上には遺伝子産物が未知の多くの遺伝子が存在している。更に染色体上にはタンパク質をコードしていない多くの DNA 領域（種々の反復配列、制御領域、イントロン、スペーサー等）がある。ゲノム DNA は部分的なメチル化・脱メチル化、可動遺伝子の挿入・

転移、組換え、高次構造の変化等を起している動的なものである。更にオルガネラ由来と思われる配列も見い出されている。植物のゲノム研究の目的は、このようなゲノムの構築、動態を解析して、植物の生命現象を理解することであるが、同時にその結果が植物育種等の分野に利用できる新しい技術—DNA マーカーによる識別・選抜、農業形質遺伝子の単離、特定部位導入法の開発、複数の遺伝子の導入、染色体再構成による新しい変異の作出等—に結びつく可能性がある。

2 DNA 塩基配列の多型

単離された遺伝子や DNA 断片の連鎖地図上の座を知るためには、それらと相補的な配列を含むゲノム DNA の領域の塩基配列の多型を検出できれば、通常は遺伝解析が適用できるはずである。制限酵素でゲノム DNA を消化し、単離した遺伝子や DNA 断片をプローブとして Southern 法で解析すると、反応する制限酵素

断片の長さが個体間で異なることがある。これを制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism RFLP) と呼び、これを利用して、DNA 断片の連鎖地図作成が可能なのが Botstein ら¹⁾ により示された。RFLP は制限酵素の認識部位の塩基対置換や認識部位を含む領域での転移、認識部位内部の欠失、挿入などを反映している。遺伝解析を容易にするためには単一コピーかコピー数の少ないプローブが必要である。もうひとつの多型は反復配列の繰り返し数の差異で、反復のコアをプローブにして、そのプローブを切断しない制限酵素でゲノム DNA を消化すると RFLP を示す。Jeffreys ら²⁾ はヒトのミオグロビン遺伝子のイントロンのミニサテライト DNA の反復配列、またはそれをプローブにして得られたクローンをを用いた Southern 分析で、個人に特異的な RFLP パターン (遺伝子指紋、DNA フィンガープリント) を見出した。Dallas³⁾ は Jeffreys のプローブのひとつでイネ (*Oryza sativa*) の供試品種すべてを識別することができた。Epplen ら⁴⁾ は (GATA)₄ をプローブにしてヒヨコマメ (*Cicer arietinum*) の供試品種すべてを識別することができたと報告している。

他に M13 ファージの反復配列が RFLP マーカーとして利用できるという報告もある。植物から中頻度の反復配列で、多型性の高いプローブの探索もおこなわれているので、登録品種の同定や育種家の権利保護に有効な RFLP マーカーが次々に見い出されるだろう。

RFLP マーカーを用いて、品種や種の比較をおこない、類縁関係をデンドログラムとして表示することにより、品種分類や系統分化の解析に利用することができる。既にアブラナ属やイネ (*Oryza sativa*) などで報告例がある。

3 RFLP 連鎖地図

多くの RFLP プローブを用いて、同時に遺伝解析をおこなうと、RFLP マーカーの連鎖地

図をつくることのできる。従来の遺伝解析に比較して非常に多くのマーカーについての同時的な解析が必要なので、そのためのプログラムが開発されている。MAPMAKER⁵⁾、MAPL⁶⁾ がその例である。

RFLP マーカーの特徴、連鎖地図作成の手順については本誌 Vol.11 を参照していただきたい。

植物ではトウモロコシ (Helentjaris 1987, Weber and Helentjaris 1989⁷⁾, Murray *et al.* 1988⁸⁾, Burr *et al.* 1988⁹⁾), トマト (Bernatzky and Tanksley 1986, Zamir and Tanksley 1988, Tanksley *et al.* 1988¹⁰⁾), レタス (Landry *et al.* 1987, Michelmores *et al.* 1989), イネ (McCouch *et al.* 1988¹¹⁾, 矢野ら 1989, Kishimoto *et al.* 1989, 矢野ら 1990¹²⁾), シロイヌナズナ (Chang *et al.* 1988, Nam *et al.* 1989), ジャガイモ (Bonierbale *et al.* 1988, Gebhardt *et al.* 1989), トウガラシ (Tanksley *et al.* 1988) の連鎖地図が報告されている。その他ダイズ (Apuya *et al.* 1988, Keim *et al.* 1989), コムギ (Chao *et al.* 1989, 劉ら 1990), オオムギ (Blake *et al.* 1989), アブラナ (Figdore *et al.* 1988, Slocum 1989), タマネギ等の RFLP 連鎖群が作られつつある。平均 1 ~ 2 cM 間隔の地図をめざして努力が続けられるであろう。

4 DNA マーカーと形質を支配する遺伝子の連鎖

形質を支配する遺伝子はその産物が未知のものが大部分である。RFLP マーカーと形質 (特に農業形質) を支配する遺伝子との連鎖がわかれば、RFLP マーカーを利用して形質遺伝子を分子レベルで解明する糸口をつかむことが出来るだけでなく、その形質を選抜するための安定したマーカーを得ることにもなる。従って、RFLP マーカーだけの連鎖地図でなく、古典的な標識遺伝子や計量形質を含む農業形質の遺伝子の座位を同じ連鎖地図上にマップすることが極めて

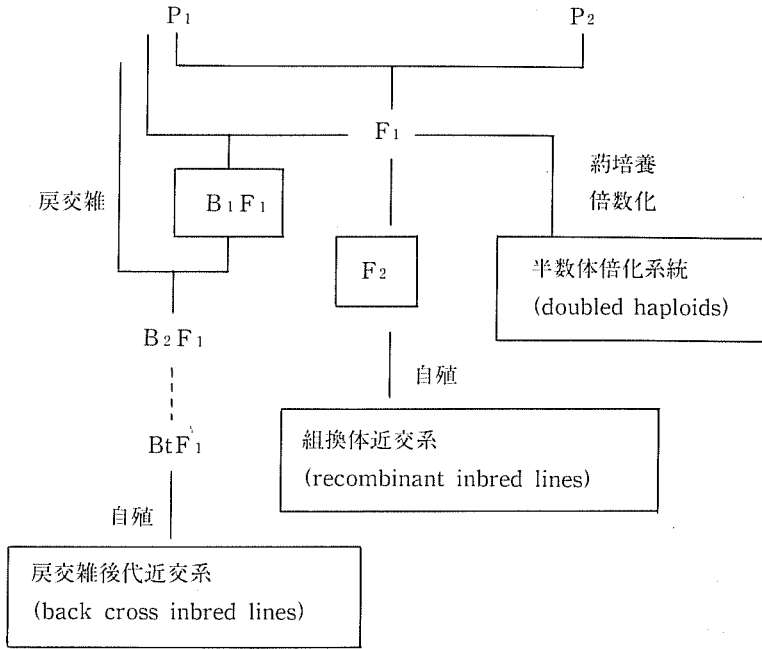


図1 形質を支配する遺伝子とRFLPマーカーの連鎖を解析するための
個体集団または系統群

重要である。

農業形質を支配する遺伝子とRFLPマーカーの連鎖を解析するための分離集団や系統群を図1に示した。inbred lineは異なる研究グループが共通の材料として用いることが出来れば、データを総合化することが可能である。また特に計量形質遺伝子座のマッピングに際しては、F₂や戻し交雑第1代に比較して少ない系統数で多くの座の解析が可能になることや同じ系統内の複数の個体の計量形質を測定することにより、環境による変動を評価できることなどの利点が認められている。

Youngら¹³⁾(1988)は目的の遺伝子に強く連鎖したRFLPマーカーを見い出すために、その遺伝子についての準同質遺伝子系統をSouthern法で比較する方法を報告した。多くのプローブについて迅速な解析をするために、一度に数個のプローブをハイブリダイズさせる方法をとっている。この方法で目的の遺伝子に強く連鎖したRFLPマーカーの候補が選び出され、遺伝解

析等から実際に強く連鎖しているマーカーを同定することができる。多くの有用形質について準同質遺伝子系統が存在するので、この方法は広く適用可能である。最終的に単離されたDNA断片に目的の遺伝子が存在するかどうかは形質転換により確かめなければならない。同様にγ線などによる突然変異体を用いれば関与する遺伝子座がRFLPマーカーにより直接見い出される可能性がある。

計量形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) とRFLPマーカーの連鎖を解析するための統計的手法としてRFLPマーカーのタイプを要因とした分散分析、連鎖を見い出すための尤度比検定 (χ²検定)、RFLPマーカーを説明変数とした重回帰分析が使われている。

主働遺伝子で強く連鎖したRFLPマーカーが見い出されたものには、トウモロコシ萎縮病モザイクウイルス病抵抗性遺伝子 (Genetic Technology News 1988)、トマトのタバコモザイクウイルス病抵抗性遺伝子 *Tm-2a* (Young et

al. 1988¹³⁾), トマト植物体の伸育性を支配する遺伝子 (*sp*) や果実の成熟に関する遺伝子 (*u*) (Paterson *et al.* 1988¹⁴⁾) 及び細菌性小斑病耐性, 根こぶ線虫耐性などの遺伝子 (Tanksley *et al.* 1989¹⁵⁾), レタスのべと病抵抗性遺伝子 (Landry *et al.* 1987¹⁶⁾, Michelmores 1989¹⁷⁾), イネの白葉枯病抵抗性遺伝子 (吉村ら1989¹⁸⁾), イモチ病抵抗性遺伝子 (Yu *et al.* 1990¹⁹⁾) 等がある。

計量形質遺伝子座と連鎖しているマーカーが見い出された形質には, トウモロコシの稈長 (Helentjaris 1987²⁰⁾), トマトの可溶性固形分含量 (Osborn *et al.* 1987²¹⁾, Tanksley and Hewitt 1988²²⁾), 果実のpH (Tanksley and Hewitt 1988²²⁾), 耐虫性に関与する2-tridecane の量 (Nienhuis *et al.* 1987²³⁾), 水分利用効率に相関のある $\delta^{13}\text{C}$ (Martin *et al.* 1989²⁴⁾), ダイズの成熟期や葉の形態 (Keim *et al.* 1989²⁵⁾) 等がある。

Patersonら¹⁴⁾(1988) はトマト果実の重量, 可溶性固形分含量, pH の計量形質遺伝子座のマッピングをゲノム全域にわたっておこなった。RFLP連鎖地図の各点で集団全体の計量形質の値の最大尤度(正規分布を前提)をその点で計量形質遺伝子座が連鎖していないという条件下での最大尤度で割ったものの対数を検定基準にしている。これをLODスコア(Lander and Botstein 1989²⁶⁾)と呼び, 計量形質遺伝子座が存在することの確からしさ(尤度比検定に相当する)を表わしている。これがある限界値以上の値をとるとそこで計量形質遺伝子座が存在すると判断する。この方法はマーカーとマーカーの間の点でも検定が可能である(interval mapping, Lander and Botstein 1986²⁷⁾, 1989²⁶⁾)。計量形質遺伝子座をRFLP連鎖地図上にマップするために必要な理論, プログラム等は更に検討する必要があるであろう。

5 DNA マーカー連鎖地図の利用

RFLP マーカー連鎖地図により, 染色体の構造を従来よりも詳細に比較することが可能になった。トウモロコシでは第2染色体の長腕と第7染色体の長腕の間の重複等からゲノムの由来が推論されている (Helentjaris 1987²⁰⁾, Helentjarisら1988²⁸⁾)。最近トマトの単一コピーのプロープを用いて, ジャガイモ (Bonierbale *et al.* 1988²⁹⁾), トウガラシ (Tanksley *et al.* 1988³⁰⁾) の染色体構成が分析された。ジャガイモの9本の染色体ではトマトと同じマーカー配列を示し, 他の3本では動原体付近での1回の切断を含む, 動原体をはさまない逆位がおこっていた。一方トウガラシではかなりのマーカー配列が変わっていた。Slocum³¹⁾(1989) は共通のプロープを用いて, *Brassica oleracea* ($n=9$) と *Brassica campestris* ($n=10$) のマーカー配列を比較して, 種による染色体数の差異に対応すると思われる再配列を見出した。Chaoら³²⁾(1989) はコムギの第7同祖群の染色体7A, 7B, 7DのRFLPマッピングをおこない, マーカーの配列順序が保存されていることを確認した。Sharpら³³⁾(1989) はまたオオムギの相同染色体でもコムギの第7同祖群とマーカーの配列順序が同じであることを報告している。RFLP マーカー連鎖地図は交雑が不能な種間のゲノムの相同性の解析に極めて有効な手段となる。今後は形質転換植物における外来遺伝子の導入部位の解析から, 染色体への挿入の機構やいわゆる位置効果の実体などに迫れるかも知れない。

農業形質を支配する遺伝子と強く連鎖したRFLPマーカーがあれば, それにより環境の影響を受けない確かな選抜が可能になる。またRFLPは幼植物でも検出できるので選抜の効率化が期待される。いくつかの形質に強く連鎖した各々のRFLPマーカーがあれば, それらを同時にプロープに使うことにより, 複数の形質について効率のよい選抜が可能となるであろう。YoungとTanksley³⁴⁾(1989) はRFLPパターンから推定した染色体構成を図示したものを

graphical genotypeと呼び、選抜の際に非常に有効であることを示した。コンピューターシミュレーションによる例では、戻し交雑で目的の遺伝子を導入するのに必要な世代数が古典的な手法に比較して少いことや、目的の遺伝子に連鎖した DNA 断片を少なくするのに必要な世代数が従来の方法に比較してはるかに少いことが示されている。彼等は RFLPパターンから graphical genotypeに変換しそれを分析したり、選抜するプログラムを開発した (Young and Tanksley 1989³⁵⁾)。

しかし RFLPの解析手法が現在のままであると従来の選抜法に置き換えるのは困難であろう。DNAの抽出やSouthern法の手順の簡便化・自動化、非放射性標識法が必要である。もうひとつ重要なことは連鎖している RFLPマーカーについて、対象となる品種・系統の間で多型が見い出せないとそのマーカーは実際に選抜に使えないことである。連鎖地図の充実のためにも、塩基配列の多型を見い出す感度の高い方法の確立が非常に重要である。

Kreitmanと Aquadé³⁶⁾ (1986)は4塩基対認識酵素を用い、変性ポリアクリルアミドゲルで分析することにより感度を向上させている。ゲノムDNAを部分的に切断する方法やdenaturing gradient gel electrophoresisの簡便法が使えるのではないだろうか。

Nakamuraら³⁷⁾ (1987)はDNAフィンガープリントで使われるプローブからヒントを得て、特定の領域の反復配列の繰り返し数の差を検出する多型性の高いVNTR(variable number of tandem repeat)マーカーを単離している。Weberら³⁸⁾ (1988)はCAの反復配列を含むDNA領域を増幅することにより、高頻度に多型を見い出した。

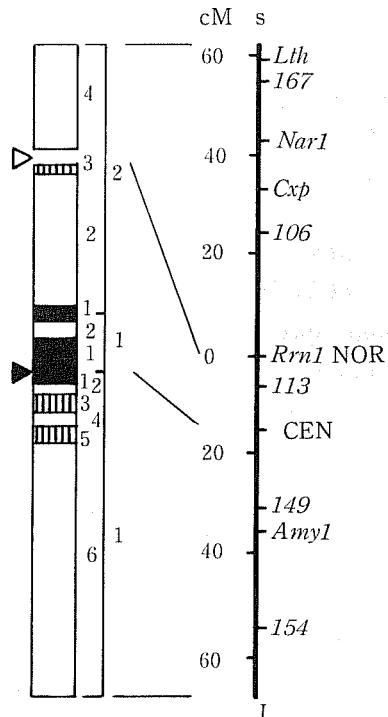
6 遺伝子の単離と物理地図

DNAマーカー連鎖地図の利用として最も重要と思われるのは、連鎖を利用した農業形質遺

伝子等の単離である。この方法を適用するときには注意しなければならない点は、一般にDNAマーカーと目的の遺伝子の間の距離は通常のDNAライブラリーで扱えるインサートの長さと比較してはるかに大きい(表1)こと及び組み換え率から求めた地図距離が物理的な距離と大きく異なる(染色体の部分により組み換え頻度が異

表1 種々の生物のゲノムサイズと図距離当りの塩基対数

生物種	ゲノムサイズ (bp)	図距離当りの塩基対数 (bp/cM)
ヒト	3.3×10^9	1×10^6
トウモロコシ	5.0×10^9	1.5×10^6
トマト	7.1×10^8	5×10^5
シロイヌナズナ	7.0×10^7	1.5×10^5
酵母	1.5×10^7	3×10^3



注) ▷: 仁形成部位 ▶: セントロメア
S: 短腕 L: 長腕 NOR: 仁形成部位
CEN: セントロメア

図2 オオムギの第6染色体の細胞学的地図(左側)と連鎖地図(右側) (Fukui and Kakeda³⁹⁾)

なるため) ことがあることである (図 2)。連鎖地図は細胞学的地図によって補正される。両方の地図を正確に比較するためには RFLP プローブを蛍光色素等で標識して *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなわなければならない。ヒトでは単一コピーの DNA プローブで分解能の高い像が得られているが、植物で同様の像が得られたという報告はない。Fukui ら (1990)^{39, 40)} は画像解析により、オオムギとイネの正確なイデオグラムを完成している。細胞学的地図の完成には植物の高分解能 *in situ* ハイブリダイゼーションの手法開発が必要である。一方相互転座や染色体添加系統等の作出も細胞学的地図作成の助けになる。

染色体の特定領域のマイクロ切断と PCR の組み合わせにより、細胞学的地図と物理地図の対応づけが可能であろう。

実際に目的の遺伝子を単離するためには RFLP マーカーと目的の遺伝子を含む巨大な DNA 領域の物理地図が必要である。高等植物には反復配列が多い (表 2) ので、巨大な領域をクローン化した DNA 断片でオーバーラップさせるのにハイブリッド形成法は使えない。末端ラベル法や制限酵素地図法が使われることが多い。ヒトの場合、連鎖を利用して X-linked granulomatous disease⁴¹⁾ や嚢胞性繊維症⁴²⁾ の遺伝子が単離されているが、植物ではシロイ

ヌナズナのエチレンのリセプター遺伝子や花の形態を支配する遺伝子の単離に近いようである。

ゲノム全体の物理地図も RFLP マーカーが基準になる。Olson ら⁴³⁾ (1989) は物理地図をその構成要素 (RFLP マーカー, contig, 塩基配列の決定された領域等) のユニークな短かい塩基配列 (sequence-tagged sites STS) の順番と各々の間の距離で表現することを提案している。大腸菌 (4.6×10^8 bp) で全ゲノムをカバーする整列クローンが作成され、全塩基配列の解析に着手しようとしているが、植物ではシロイヌナズナで 18,000 のコスミドクローンが 800 の contig にまとめられ、ゲノムの 95% をカバーするところまで到達している。残りのギャップを YAC クローンで結びつけようとしている。他の植物はゲノムサイズがより大きく、反復配列も多いので整列クローンでカバーするだけでも時間がかかるであろう。YAC クローンを使ったトップダウン方式が中心になるようである。

(農業生物資源研究所 適応性遺伝子研究室長)

引用文献

- 1) Botstein, D. *et al.* (1980) *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- 2) Jeffreys, A. J. *et al.* (1985) *Nature* 316, 76-79.
- 3) Dallas, J. F. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6831-6835
- 4) Epplen, T. *et al.* (1989) *Electrophoresis Forum*

表 2 植物の核ゲノム中の反復配列の割合

植 物	染色体数 (2n)	ゲノムサイズ (bp)	反復配列の割合 (%)
コ ム ギ	42	5.9×10^9	74
オ オ ム ギ	14	5.3×10^9	70
イ ネ	12	$(0.58 \sim 1.0) \times 10^9$	58~66
ト ウ モ ロ コ シ	20	5.0×10^9	60
ト マ ト	24	7.1×10^8	10~15
ダ イ ズ	40	1.8×10^9	61
エ ン ド ウ	14	4.5×10^9	84
ワ タ	52	7.8×10^8	40
タ バ コ	48	1.6×10^9	75
シロイヌナズナ	10	7×10^7	26

- ' 89pp175-186
- 5) Lander E. S. *et al.* (1987) *Genomics* 1, 174-181
 - 6) 鶴飼保雄(1989)育雑39 (別冊 2), 240-241
 - 7) Weber, D. and T. Helentjaris (1989) *Genetics* 121, 583-590
 - 8) Murray, M. *et al.* (1988) *Maize Genet. Coop. Newsl.* 62, 89
 - 9) Burr, B. *et al.* (1988) *Genetics* 118, 519-526
 - 10) Tanksley, S. D. *et al.* (1988) *Chromosome structure and function* pp.157-173
 - 11) McCouch, S. R. *et al.* (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76, 815-829
 - 12) 矢野昌裕ら(1990)育雑40 (別冊 1), 468-469
 - 13) Young, N. D. *et al.* (1988) *Genetics* 120, 579-585
 - 14) Paterson, A. H. *et al.* (1988) *Nature* 335, 721-726
 - 15) Tanksley, S. D. *et al.* (1989) *Bio/Technology* 7, 257-264
 - 16) Landry, B. S. *et al.* (1987) *Genetics* 116, 331-337
 - 17) Michelmore, R. W. *et al.* (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics* pp. 45-50
 - 18) 吉村智美ら(1989)育雑39 (別冊 2), 300-301
 - 19) Yu, Z. *et al.* (1990) *Second International Rice Genetic Symposium*, 60
 - 20) Helentjaris, T.(1987)*Trends Genet.* 3, 6035-6039
 - 21) Osborn, T. C. (1987) *Theor. Appl. Genet.* 73, 350-356
 - 22) Tanksley, S. D. and J. Hewitt (1988) *Theor. Appl. Genet.* 75, 811-823
 - 23) Nienhuis, J. *et al.* (1987) *Crop Sci.* 27, 797-803
 - 24) Martin, B. J. *et al.* (1989) *Science* 243, 1725-1728
 - 25) Keim, P. *et al.* (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics* pp. 73-80
 - 26) Lander, E. S. and D. Botstein (1989) *Genetics* 121, 185-199
 - 27) Lander, E. S. and D. Botstein (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7353-7357
 - 28) Helentjaris, T. *et al.* (1988) *Genetics* 118, 353-363
 - 29) Bonierbale, M. W. *et al.* (1988) *Genetics* 120, 1095-1103
 - 30) Tanksley, S. D. *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6419-6423
 - 31) Slocum, J. K. (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics* pp.73-80
 - 32) Chao, S. *et al.* (1989) *Theor. Appl. Genet.* 78, 495-504
 - 33) Sharp, P. J. *et al.* (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics* pp. 29-39
 - 34) Young, N. D. and S. D. Tanksley (1989) *Theor. Appl. Genet.* 77, 95-101
 - 35) Young, N. D. and S. D. Tanksley (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics* pp.123-129
 - 36) Kreitman, M. and M. Aquadé(1986)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3562-3566
 - 37) Nakamura, Y. *et al.* (1987) *Science* 235, 1616-1622
 - 38) Weber, J. *et al.* (1989) *Genome Mapping and Sequencing* pp. 70
 - 39) Fukui, K. and K. Kakeda(1990)*Genome* 33印刷中
 - 40) Fukui, K. and K. Iijima (1990) *Theor. Appl. Genet.* 投稿中
 - 41) Royer-Pokora, B. *et al.* (1986) *Nature* 322, 32-38
 - 42) Rommens, J. M. *et al.* (1989) *Science* 245, 1059-1065
 - 43) Olson. M. *et al.* (1989) *Science* 245, 1434-1435