

クローニングのための遺伝学 (中編)

Akifumi Shimizu

5. マーカー利用選抜

或る病原菌の株 A に対する植物の抵抗性遺伝子 R を考えてみます。真性抵抗性とよばれる植物の防御機構において、抵抗性遺伝子 R を持つ宿主植物は侵入してきた病原菌 A を直ぐに感知し増殖を防ぎます(侵入された細胞が過敏に反応して細胞死し、更なる侵入を防ぐ)。抵抗性品種と感受性品種(対立遺伝子 r を持つ)を交配した F_2 集団 300 系統は病原菌 A に対して以下のような抵抗性・感受性の分離を示す、とします。

表 抵抗性遺伝子の分離例

遺伝子型	期待頻度	観察値
RR or Rr	3/4	218
rr	1/4	82
		300

このように表現型から遺伝子型を推測できる形質を質的形質といいます。質的形質の例としては、エンドウ豆の形(丸またはシワ)や豆の色(黄と緑)があります。質的形質の遺伝子座はマーカーの遺伝子型との連鎖を調べることで、連鎖地図上に位置付けられます。

連鎖地図は遺伝子座の順番を(種別に)集約したもので、抵抗性遺伝子をマッピングした情報(上図の地図 A)をもとに、共通のマーカーをもつ別の地図情報(上図の地図 B)を利用することが可能になります。上図の例なら、 $m3 \sim m5$ マーカーはより密接に抵抗性遺伝子座 R と連鎖すると予測できます。

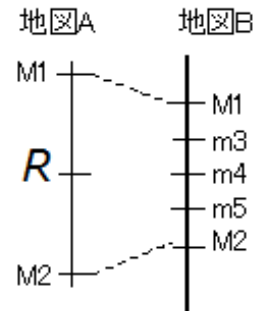


図 形質のマッピング

マーカー情報を利用すると抵抗性遺伝子を持った子孫の選抜が大変楽になります。病原菌の抵抗性は植物がある程度大きくなってからしか判別できないことが多いですが、連鎖するマーカーの遺伝子型は幼苗でも判定可能です。良質だが病気に弱いエリート品種に野生種から抵抗性遺伝子を導入する場合、抵抗性遺伝子以外の形質はできるだけ導入しないようにしたいことが多いので、抵抗性遺伝子を挟み込む連鎖マーカーの遺伝子型で選抜すると効率よい育種ができます。

例として、隣接マーカー座 A と B で挟み込んだ抵抗性遺伝子 R を考えます(右図のように連鎖マーカーの間に R が位置するとき、 R は隣接マーカー A と B で挟み込まれるといいます)。A と B との組換え価が 10% であったとき、抵抗性と感受性の純系品種を交配して得られる F_2 個体のうち、約 2 割は抵抗性親と同じ対立遺伝子構成 AB/AB になります。隣接マーカー遺伝子型の期待頻度は、次の表のようになります。

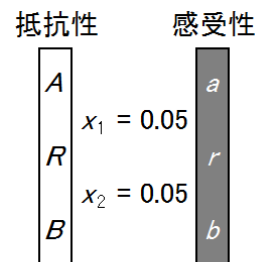


図 マーカー選抜

遺伝子型	期待頻度	$x = 0.1$
<i>AABB</i>	$(1-x)^2/4$	0.2025
<i>AABb</i>	$2x(1-x)/4$	0.045
<i>AAbb</i>	$x^2/4$	0.0025
<i>AaBB</i>	$2x(1-x)/4$	0.045
<i>AaBb</i>	$2(1-2x+2x^2)/4$	0.41
<i>Aabb</i>	$2x(1-x)/4$	0.045
<i>aaBB</i>	$x^2/4$	0.0025
<i>aaBb</i>	$2x(1-x)/4$	0.045
<i>aabb</i>	$(1-x)^2/4$	0.2025

このとき F_2 種子を 1000 粒撒いた場合でも、幼植物の段階で 200 個体ぐらいに調査個体を減らせるので経済的です。つまり、A 座と R 座との組換え価は 5%, R 座と B 座との組換え価は 5%なので、遺伝子型が *AABB* である個体のうち、*r* を持つ個体(*AArrBB* または *AARrBB*)の割合は、0.5%程度です。つまり組換え価が 10%程度の隣接マーカーでも形質を挟み込んでいれば、マーカー遺伝子型だけで形質の遺伝子型を選抜できます(下表)。

表 マーカーAとBで挟み込んだRの選抜確率

$A-R-B$ $A-R-B$	$(1-d_{12})^2$	0.995006
$A-R-B$ $A \times r \times B$	$2d_{12}(1-d_{12})$	0.004988
$A \times r \times B$ $A \times r \times B$	$(d_{12})^2$	0.000006

AとRおよびRとBで二重組換えが起こる確率

$$d_{12} = 0.05 \times 0.05 = 0.0025$$

マーカーによる選抜は、複数の遺伝子座の同時選抜を可能にします。真性抵抗性は、病原菌のレース(系統)に特異的な抵抗性しか示さないため、病菌 A に対する抵抗性遺伝子を持っていても病菌 B に対する抵抗性遺伝子を持たなければ病菌 B には罹病します。それぞれの病原菌に対する抵抗性遺伝子は別々の遺伝子座にあることが多く、抵抗性を複数持つ系統の選抜は非常に困難です。複数の病原菌に感染させて抵抗性を評価することは現実的には困難です。しかし、マーカーによる選抜は、複数遺伝子座も同時に行えます。有用遺伝子のある品種に集積することを **pyramiding** といいます。マーカー選抜はジーン・ピラミディングには欠かせない技術です。ピラミディングにより、例えば良食味品種に、品種 A の多収性形質と、品種 B のストレス耐性形質と、品種 C の病害抵抗性形質を集積した、スーパー良食味品種が育成できます。

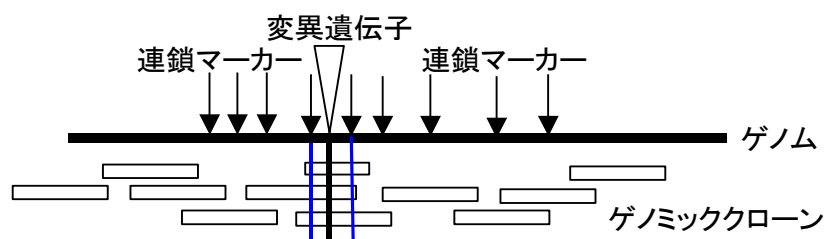
6. Map based cloning

マーカーの連鎖情報を使った遺伝子単離法を Map based cloning (positional cloning) といいます。作物の中で最もゲノムサイズの小さい (400×10^6 塩基) イネの場合を考えてみます。品種 A に人為的な突然変異処理を施した突然変異品種 A' は、品種 A よりも背丈が低い (矮性) とします。変異配列を PCR マーカーで探索することを考えると、安定して増幅できる塩基の数はせいぜい 5~600bp です。600bp の PCR 産物を増幅しその中に偶然に変異配列が含まれる確率は 100 万分の 1 で、ジャンボ宝くじを 10 枚買ってその中に 1 等 3 億円が含まれる確率と同じくらい低いです。つまり、塩基配列をしらみつぶしに探す方法には限界があります¹。この状況は、マーカーと形質の連鎖を使うことで大幅に改善されます。

突然変異品種 A' と品種 B を交配し、F₂ 集団を作成したとします。突然変異形質はそのほとんどが劣性形質で、F₂ 集団中で変異個体は理論比 1/4 で分離します。変異遺伝形質と連鎖マーカーを探して形質に関与する遺伝子座を絞りこむことで、変異遺伝子の探索範囲は 1 千分の 1~1 万分の 1 以下に減少できます。近傍の連鎖マーカーが見つければ、ゲノム情報を利用して変異した塩基にたどり着けます。この連鎖の情報と塩基配列情報とを結びつける作業が、マップベースクローニングを成功させる重要ポイントです。

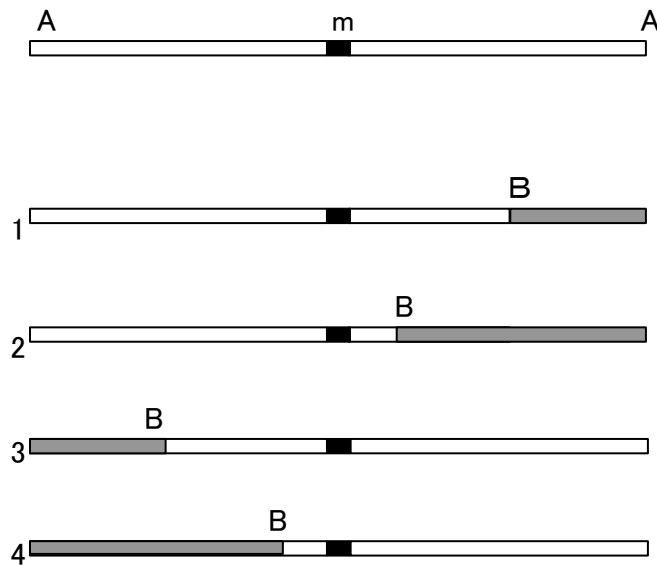


図 連鎖による変異遺伝子解析



ある程度の領域まで目的遺伝子を絞り込んでいけば(例えば 1~5cM 程度の隣接マーカーで挟み込む)、その間に存在するより密接なマーカーを探していくことができます。イネのような塩基配列の研究が進んでいる生物材料の場合、ゲノム情報をもとに密接マーカーの情報を入手できるでしょう。密接マーカーの探し方はおおまかに 2 通りあります。一つは、目的形質を持つ個体を表現型で選抜し、選抜個体の中で近傍マーカー組換え個体を探す方法です。変異形質の原因遺伝子 m と近傍マーカーの組換え状況を、配偶体単位で表すと次図のようになるでしょう。

¹ 高速シーケンサーの登場により状況が一変しました (高速シーケンサーを利用した変異遺伝子単離法は植物遺伝資源学で解説します)。



突然変異形質mが劣性のとき、F₂集団の約 1/4 が選抜され、そのうち組換え個体を選抜しより密接なマーカーについて調査することになります。このとき、二重組換えはあまり考慮にいません。というのも隣接マーカー間が 5cM というあまり密接ではなくちょうど真ん中に目的形質がある場合でも左マーカーと形質との間、形質と右マーカーとの間に同時に組換えが起こる二重組換えの確率は、 0.025×0.025 であり、1600 の配偶体中に一個の割合だからです。

もう一つの選抜方法は、密接な隣接マーカーの遺伝子型を調べてマーカー間の組換え個体についてのみ表現型を調査する方法です。



マーカー間が例えば 5cM と離れている場合でも、上述のように二重組換え個体は殆ど出てこないで、隣接マーカーの遺伝子型が両方ホモか両方ヘテロにならないものだけを選抜し(5cM 間隔なら 10%、1cM 間隔なら 2%)、マーカー選抜個体についてのみ表現型を調査して更に密接なマーカー組換え個体を調査します。表現型の選抜に手間がかかる形質の場合に便利な調査方法です。

いずれの場合にしても、千~数千個体以上の F₂ 分離集団を用いて、形質と密接連鎖するマーカーを見つける必要があります。