

I. イネゲノム全塩基配列完全解読の歩み

ゲノムとは、細胞内に対になって存在する染色体の1組で、その生物の特徴を保持して生命を維持するために必要な遺伝子及びその他の DNA 配列の総体のことをいう。ゲノム研究は、遺伝子の染色体上での位置付け、塩基配列の決定、有用遺伝子の単離とその機能の解明等によりゲノムの全体像を明らかにするものである。

ゲノム研究を進展させることによって、従来の育種技術では達成できないような優れた特性を持つ品種の開発を可能にし、さらにゲノム全塩基配列を解読することにより、ゲノム研究の飛躍的発展が期待され、農林水産省農林水産技術会議事務局の指導のもとに研究が開始された。

1. イネゲノム解析研究の開始

イネゲノム解析研究を開始するに当たっては、まず農林水産技術会議事務局で、研究組織と研究資金をいかに調達するかを検討し、研究組織は農業生物資源研究所を中心として、新たに農林水産先端技術研究所を創設し、民間、都道府県の研究機関の研究者が結集し、協力して研究できるイネゲノム研究プログラム（RGP）を創設した。さらに、法律改正により、日本中央競馬会の特別研究資金が受けられるようになり、当初は主にこの資金を使って研究を進めることとなった。

イネゲノム解析研究は、1991年度から1997年度までを第1期とし、ゲノム解析研究の基盤的な研究を進め、1998年度からを第2期とし、発展的にゲノムの塩基配列解読を進め、関連して応用研究も進めてきた。

2. 第1期イネゲノム解析研究

プロジェクトの第1期では、ゲノム研究の基盤で塩基配列完全解読には必須である、遺伝地図、物理地図、cDNA ライブラリーの作製を主に進めた。遺伝地図は、各染色体上に DNA マーカーの相対的な位置を示した地図であり、物理地図、発現遺伝子地図などの作製に使われ塩基配列の解読には不可欠のものであるばかりでなく、DNA マーカー育種、遺伝子の単離等を行う際にも極めて重要な基本情報である。1998年の第1期の終了時には2,275個の DNA マーカーの座する植物では最も詳細な遺伝地図を完成した。

物理地図は、YAC と呼ばれる平均 350kb のやや長い DNA 断片を組み込んだ酵母の人工染色体により、ゲノムの 70% をカバーする配列地図を作製した。この YAC 物理地図は、直接塩基配列を解析する材料とはしなかったが、発現遺伝子地図の作製や塩基配列解析の直接の材料とする PAC/BAC などの人工染色体物理地図作製の指標とした。

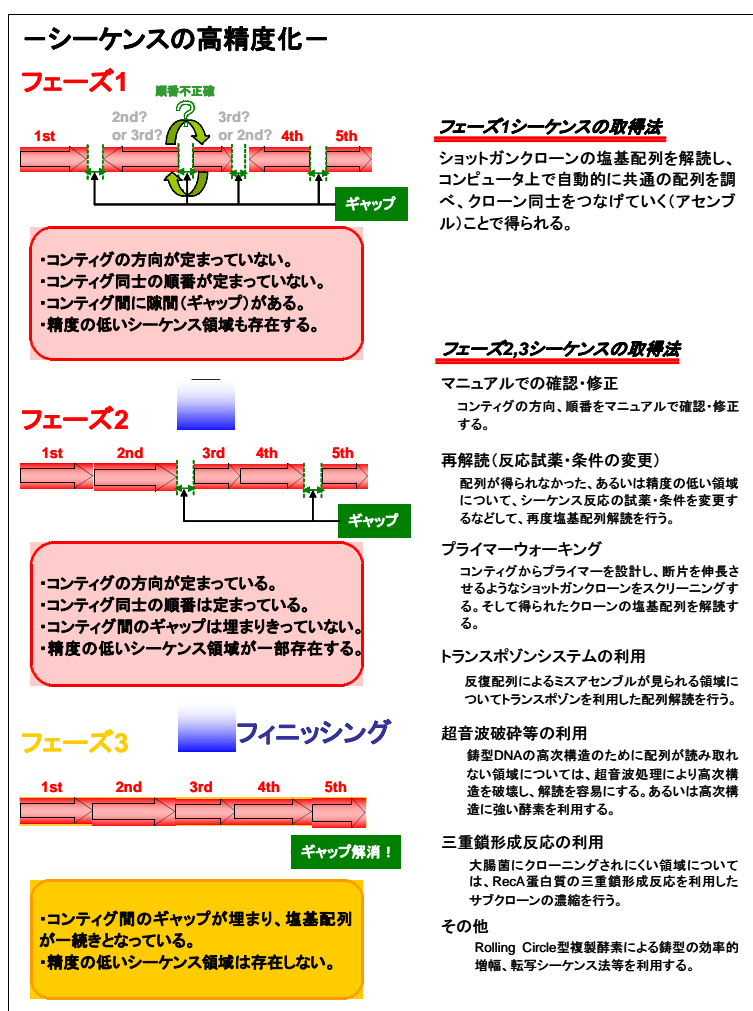
cDNA ライブラリーは、カルス、根、幼苗等各種生育ステージで発現している遺伝子を合計 4 万個の cDNA クローンとして捕捉した。これらの cDNA から両端の約 500 塩基を解読し、ゲノム中の遺伝子に迅速に到達するための標識として使用される発現配列タグ（EST）を作製し、発現遺伝子地図作製の準備を整えた。

3. 第2期イネゲノム解析研究

1) 概要解読まで

ゲノム DNA を短い断片にし、各断片の位置を示す地図を作製した後、塩基配列を解読する階層化ショットガン法では、解読に用いる P1 ファージ由来人工染色体 (PAC) / バクテリア人工染色体 (BAC) のそれぞれについて、サブクローンの両端の塩基配列を解読し、この解読結果から連続するクローンを順次つないでいく。このような作業を編集と呼んでいるが、編集の結果いくつかの配列のつながりとなる。このつながりのことをコンティグと呼んでいる。

この編集結果の進展度合いによって、図1に示すように各 PAC/BAC はフェーズ1からフェーズ3の3段階に区分される。すなわち、フェーズ1はコンティグとコンティグとが



完全につながっておらず、ギャップがあり、コンティグによっては方向が未決定のものもあるという段階、フェーズ2はコンティグの方向はすべて定まったが、ギャップは残っているという段階、フェーズ3はコンティグの方向もすべて定まり、ギャップもすべて埋まったという段階である。

図2は PAC/BAC のシーケンスが約 50%に進行した 2001 年 12 月から完全解読が終了した 2004 年 12 月までの塩基数についてフェーズごとに色分けし、4 ヶ月ごとに表示したものである。2002 年 12 月の概要解読終了時までは、全体の約 6~8 割がフェーズ1かフェーズ2であったが、その後フェーズ3が順増し、2004 年 12 月にはすべての PAC/BAC がフェーズ3になったことがわかる。

図1. PAC/BACシーケンスの高精度化

PAC/BAC のシーケンスは、その進展度合いによってフェーズ1~3の3段階に区分される。フェーズ1はギャップも多く、解読精度の悪い部分やコンティグの方向が定まっていないものを含んでいる。フェーズ2はギャップ、解読精度の悪い部分は少なく、コンティグの方向は定まっている。フェーズ3はギャップがすべて埋まり、解読精度の悪い部分はなく、コンティグの方向は定まっている。

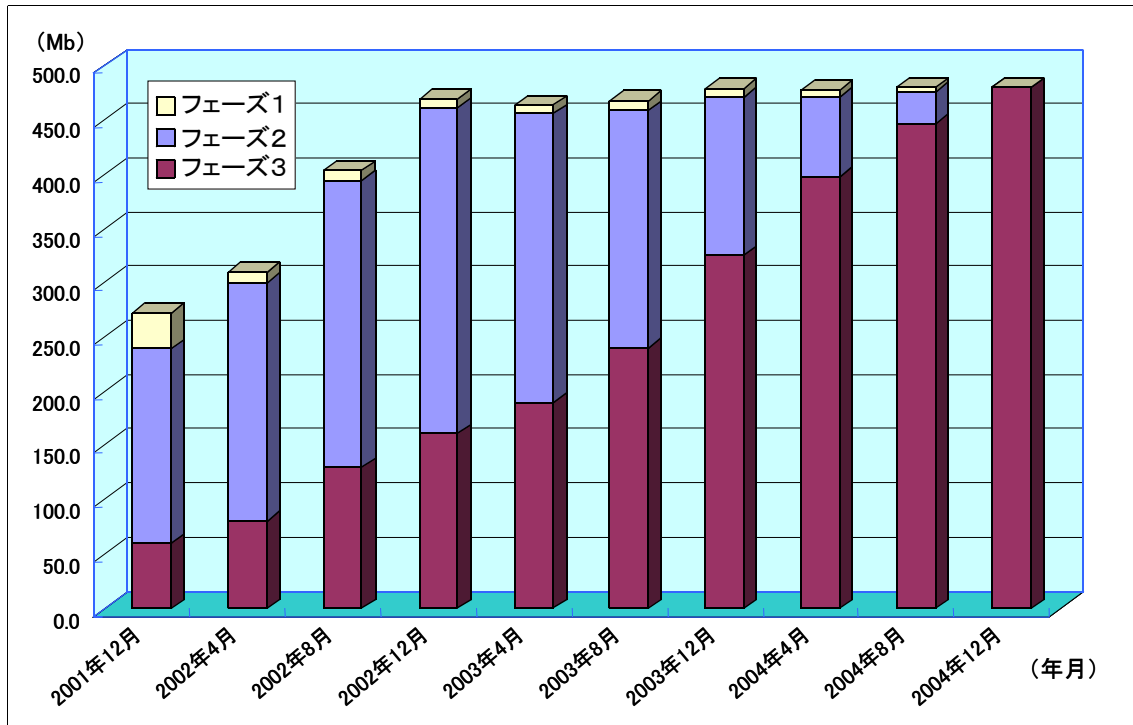


図2. イネゲノム塩基配列解読の推移

2002年12月の概要解読終了時までは約65%がフェーズ1かフェーズ2であったが、その後はフェーズ3が順増し、2004年12月にはすべてのPAC/BACがフェーズ3になっている。

概要解読はPAC/BACすべてがフェーズ2の段階になった時を終了とする。このためにはフェーズ1のPAC/BACについて塩基配列ギャップを埋めるサブクローンを見つけ出し、その塩基配列を解読し、ギャップを埋めるとともに、方向の未定であったコンティグの方向を決定する。さらに、図1に示したプライマーウォーキング、トランスポゾンシステムなどの分析技術を駆使し、ギャップを埋めるとともに解読精度の低い領域の精度向上を図る必要がある。

概要解読終了時点における具体的な精度は、解読の対象としていた3,200個のPAC/BACのうち1%がフェーズ1、64%がフェーズ2、35%がフェーズ3であった。

2) 概要解読から完全解読まで

完全解読とは、すべてのPAC/BACを完全につながった1本の配列とするフェーズ3の段階に精度を上げ、さらにPAC/BACのコンティグ間のギャップを埋めることである。これにはPAC/BACについてギャップを埋める新たなサブクローンを見つけ出し、その塩基配列を解読し、ギャップを埋める。また図1に示したプライマーウォーキング、トランスポゾンシステムなどの分析技術を駆使し、ギャップを埋めるとともに解読精度の低い領域の精度向上を図った。

この期間では、単にコンティグ間のギャップを埋めるだけでなく、同時に一般的には解読困難とされているセントロメアやテロメアの解読を進めた。この結果、2004年末には、

解読対象の PAC/BAC は約 3,500 個に増えていたが、全てをフェーズ 3 段階に格上げすることができた。さらに、当初解読困難と考えられたセントロメアの塩基配列でも日本が第 8 染色体、中国が第 4 染色体について解読を達成し、また第 8 染色体については米国のチームが独自の BAC クローンによる解読を行った。これらのセントロメア解読は、高等植物最初の成果となった。

4. 塩基配列解読の国際協力

イネゲノム全塩基配列の解読作業は日本が最初に企画した。1998 年に日本の主導のもとに国際イネゲノム塩基配列解析プロジェクト (IRGSP) が結成され、いくつかの国・地域の出入りがあったが、最終的に米国、中国、台湾、フランス、インド、韓国、ブラジル、タイ、イギリスが参加してイネ 12 本の染色体を分担し、協力して解読する結果となった。

概要解読から完全解読に到る研究の協力関係も概要解読に到る協力関係と基本的には同じであった。すなわち、フェーズ 2 において担当した各国・地域が、同じ染色体あるいは染色体部分を受け持った。

フェーズ 2 からフェーズ 3 に至るまでの作業には、ギャップを埋めるための高度な編集技術や新たなライブラリーが必要であり、フェーズ 1 からフェーズ 2 に至る作業よりは若干技術的な困難さがあった。そこで、編集作業に慣れた研究機関は、慣れていない研究機関から研究者を受け入れ、技術協力を行った。RGP も中国、台湾、インド、ブラジルから研究員を受け入れ、解読の指導や支援を行った。

IRGSP の設立から完全解読完了に至るまでの各国・地域の役割分担は図 3 に示す通りである。日本は概要解読時の分担と同様に、完全解読においても全塩基配列情報の半分強を解読し、残りをその他の国・地域が解読した。

5. 研究予算の概要

イネゲノム解読を行うための資金は、大きくは日本中央競馬会からの特別振興資金と農林水産省の委託研究費である。研究資金をイネゲノム第1期、第2期（開始～概要解読終了まで）、第2期（概要解読終了～完全解読完了まで）の3期に分けて示すと図4のようである。

第1期の7年間には日本中央競馬会から助成を受けた約54億円と国からの資金約18億円の合計約72億円が投入された。

第2期前期は、解読開始から概要解読の終了した2002年12月までの5年間に国から約100億円の委託研究費を受けた。また、日本中央競馬会からも引き続き支援を受け、コンピュータ整備費7億6千万円や国際研究促進事業費として5年間で1億円強の助成を受けた。

つぎに、第2期後期（概要解読終了～完全解読完了まで）の2年間では、国からの委託研究費が約14億円と日本中央競馬会からの助成金約2千万円であった。

以上のように14年の長期にわたる研究期間中、農林水産省からの研究段階に応じた委託資金が投入されたことがこの完全解読を達成し得た大きな原動力であったことは異論を待たないところであるが、それにも増して、開始時点では達成困難とも思える事業に対し法律改正を受けて、多額の資金を助成して頂いた日本中央競馬会の支援は特筆すべきであった。

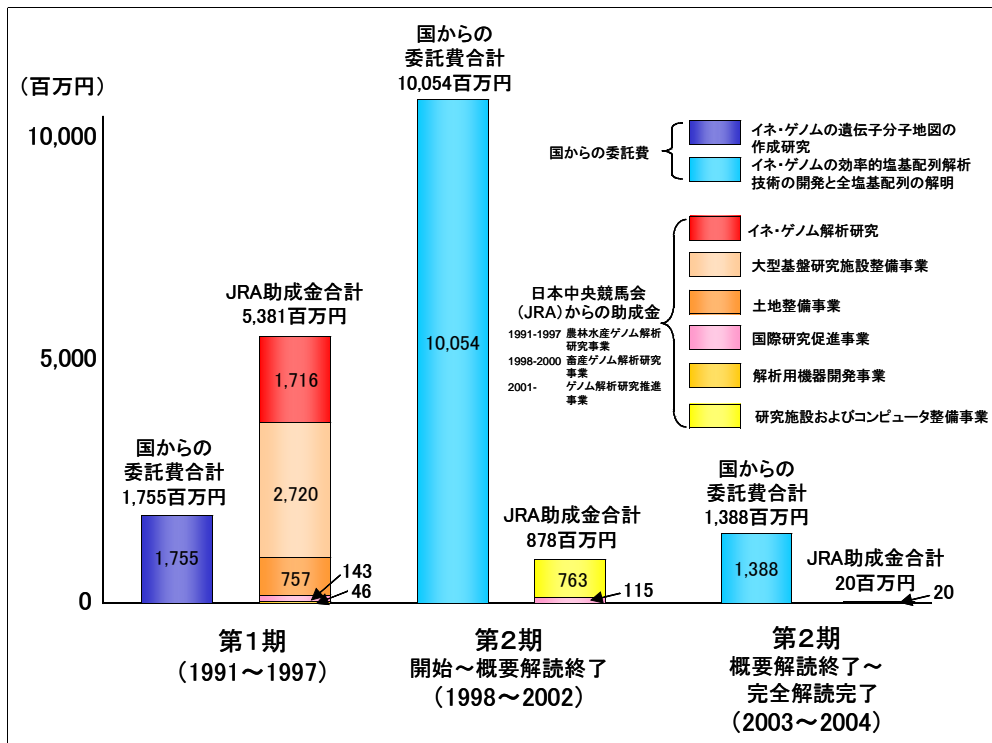


図4. 研究予算の概要

塩基配列完全解読に使った研究費は、概要解読終了までは主に国からの委託研究費と日本中央競馬会からの助成金であり、完全解読完了までの2年間は国からの委託研究費が主体であった。