

## IV. 今後の展開

ここにイネゲノムの全塩基配列が完全解読できたことは、遺伝学ならびに植物の品種開発にとって極めて大きな意義を持つものである。これらの結果はすでに多くの研究者に活用され始めており、利用する研究者は今後ますます増えていくものと考えられ、将来的には配列情報を有効に活用した研究者が大きな成果を上げるであろうことも期待できる。

現在研究者は、遺伝子への正確なアクセス、ゲノム構造や遺伝子機能、発現機能の生物間での比較、DNA マーカーの品種育成への利用などの研究にイネの塩基配列情報を具体的に活用しており、今までは外部に現れた表現型を調べることにより捉えられていた遺伝子の DNA レベルでの解析が急速に進み始めたと言える。

このような画期的な研究の成果を踏まえ、イネゲノム塩基配列解読そのものの充実、発展を今後どのように進めていくべきかという点と、塩基配列情報の生物学、農学への応用、発展をいかに進めていくべきかという点を考えてみる。

### 1. イネゲノム塩基配列解読の充実、発展

完全解読は PAC/BAC ごとに今まで詳述した基準に基づいて解読精度を高め、すべての PAC/BAC がその基準を達成した時をもってその終了時期と定めたものである。しかし、イネ品種「日本晴」本来のゲノム塩基配列を 1 塩基の間違いもなく、また、ギャップもなく解読できたかといえ、必ずしもそうではなく、今後も精度の向上およびギャップを埋める努力は続けねばならない。

また、解読された塩基配列情報から遺伝子を見つけ出し、その作用の推定が可能となる。塩基配列を調べ、その配列から遺伝子を予測し、機能を推定するアノテーションは、PAC/BAC がフェーズ 3 に達したところで PAC/BAC ごとに逐次進めてきた。しかし、完全解読を達成した時点でもアノテーションの完了していない PAC/BAC が少し残っているので、これらについてアノテーションを完了すること、ならびに今までは十分できていない調節遺伝子に関する予測など、より進んだアノテーションを今後目指していく必要がある。

#### 1) ゲノム塩基配列解読情報の充実

今回の完全解読の達成により、イネゲノムの塩基配列は正確な情報がデータベースに入れられ公開され、世界各国の研究者、関係者が利用できるようになっている。解読作業は一応の終了を見たといえるが、今後ある特定の領域を対象に研究者が研究している領域の塩基配列について公開データに対する間違いを指摘したり、疑問を見出す可能性もありうるであろう。このような場合には、当該領域について指摘してきた研究者と協力してより正確な配列解読を進めていかねばならない。

今後はイネのゲノム塩基配列を活用し、遺伝子の機能研究、マーカー育種、さらにはタンパク質の研究に発展することが必須であるが、これらの研究を効率的に進めるにも精度

の高い配列情報がぜひとも必要である。現在完成した塩基配列も徐々に修正補充し、より完成度の高いものにしていかねばならないが、この作業は、恐らく世界各地の、イネに限らず植物あるいは微生物や動物の研究者も含め関係する研究者と、このデータベースを責任持って管理する担当者との連携プレーになると考えられる。

また、今回の解読の結果でも反復配列部分では完全解読には至っていない。特に、セントロメアやテロメア領域は反復回数が多く解読は困難である。セントロメアでは 12 本の染色体のうち第 4、8 染色体を除き解読されていない。テロメアでは、第 2、7 染色体に関してその両端で塩基配列が解読され、第 1、6、8 染色体では一方の端のみ解読されている。これら以外の染色体は両端とも解読されておらず、これからの課題である。

## 2) ゲノム塩基配列から遺伝子を予測

ゲノム塩基配列から遺伝子領域を予測し、類似性検索による遺伝子機能の推定は現時点ではかなり完了しているが、一部残されている部分もあり、早急に終了する必要がある。

また、アノテーションは新しい情報を加えることにより予測精度が高まる。遺伝子や調節機構に関する新たな情報が入ったところで再度やり直すことにより予測精度はさらに高まるので、今後とも精度向上に努めなければならない。実際、最初の予測プログラム作成時には、発現遺伝子の情報がまだ十分ではなく、取り入れることができなかったが、後に完全長 cDNA の情報が充実したので、これを入れて再度アノテーションをやり直すことにより、著しく予測精度が高まった。

さらに、ゲノム塩基配列からは単に遺伝子領域の予測だけでなく、遺伝子の調節機構やその生物の進化の歴史が刻み込まれている。そこで今まではそれほど研究の蓄積が多くない遺伝子の調節に関する情報を取り出すバイオインフォマティクスを開発し、イネゲノム塩基配列情報からも遺伝子の調節に関する研究を発展させていかねばならない。

また、イネゲノムでは、類似遺伝子が染色体上に縦列に重複して存在していることが見つけられており、これがイネの進化、栽培化とどのように関連するのかを明らかにし、祖先種との関連を推定する研究も必要である。

## 2. 塩基配列情報の生物学、農学への応用

解読された塩基配列は、遺伝子の単離、機能解明、DNA マーカーによる効率的な品種開発、シンテニーを利用した植物間のゲノム比較などに極めて大きな役割を果たすものである。また、これらの技術開発は、遺伝現象の解明という生物学的に重要な意味を持つだけでなく、効率的な育種技術の開発にも結びつくと言える。

### 1) 遺伝子の単離、機能解明

塩基配列情報を利用して遺伝子を単離し、機能を解明する方法には、地図情報を利用して遺伝子の位置を確定し、その機能を調べるマップベースクローニング、遺伝子を破壊し、

その位置と機能を調べる遺伝子破壊、多数の cDNA をガラス板上に貼り付け mRNA を反応させることにより遺伝子の特定と機能解明をするマイクロアレイ、塩基配列をコンピュータにより解析し位置と機能を推定するバイオインフォマティクスなどがある。

これらの遺伝子単離や機能解明法はゲノム全塩基配列が解読されたことによって可能となった、あるいは著しく効率が上がった技術分野であり、今後ゲノム全塩基配列の解読結果を活用しながら発展すべきものである。

現在のところ各種の方法により研究されてきている遺伝子と、マイクロアレイに使われている cDNA や塩基配列情報等との間の完全な対応関係ができるまでには至っていないが、将来的には対応関係を付けていくことにより、大きな成果に結びついていくことが期待できる。

## (1) マップベースクローニング

マップベースクローニングは、遺伝地図、物理地図、塩基配列情報などをもとに交雑後代を調べることにより、対象とする遺伝子が染色体のどこにあるのかを明らかにし、単離する方法である。この方法によって、イネの出穂期、矮性、いもち病抵抗性などの遺伝子がすでに単離され、さらにこれらを組み換え、発現を調べることによりその機能が明らかにされてきている。

この方法は技術がほぼ確立されており、単離した遺伝子を組み換えることにより遺伝子を確実に確認することができるため、今後遺伝子の単離、機能解明のために盛んに使われることが期待されるものである。

## (2) 遺伝子破壊

遺伝子を破壊し、塩基配列情報を参照しながら、破壊された遺伝子と表現型との関係を調べ、遺伝子機能を明らかにしようとする方法である。遺伝子を破壊するにはアグロバクテリウムを用いた形質転換で導入された T-DNA を用いる方法、トランスポゾンを利用する方法等がある。トランスポゾンは動く遺伝子とも呼ばれ、ゲノム上を移動し新たな位置に転移し、そこにある遺伝子を破壊し、その機能を失わせる。イネでは多くの種類のトランスポゾンが見つけられているが、*Tos17* と呼ばれる内在性のトランスポゾンが培養によって活性化し、活性程度も高いことから、遺伝子破壊には最も適したトランスポゾンであると考えられている。

農業生物資源研究所では、*Tos17* によりこれまでに約 5 万種類の遺伝子破壊システムを作出している。図 12 に示すように、破壊システムの表現型を解析し、*Tos17* の挿入部位との連鎖解析を行うことにより、原因遺伝子の同定が可能となり、また、*Tos17* に特異的なプライマーと対象遺伝子に特異的なプライマーとを組み合わせた PCR 反応を行い、対象遺伝子の破壊システムを見つけ出すことによりその遺伝子の機能を解明することができる。

このような破壊システムから選抜した変異体のコレクションのことをミュタントパネルと呼んでいる。これを逐次調査することにより、多くの遺伝子の単離や機能解明が可能とな

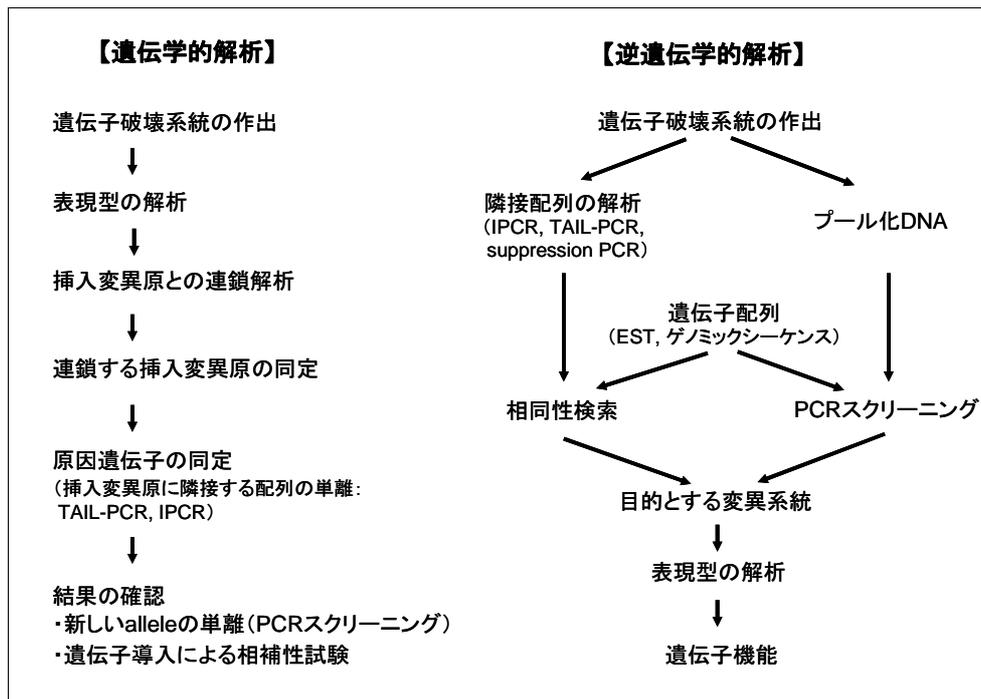


図12. 遺伝子破壊を利用した遺伝子機能解析研究の概略

遺伝子破壊を利用した遺伝子の機能解析とは、遺伝子の配列と遺伝子破壊による形質変化との対応関係を明らかにすることである。破壊系統の表現型を解析し、その原因となる遺伝子を *Tos17* を指標に単離するのが遺伝学的方法であり(左)、まずは遺伝子配列に注目し、その遺伝子に変異を持つ系統を探してきて表現型を解析するのが逆遺伝学的方法である(右)。

。今後はイネ遺伝子のすべてを網羅したミュータントパネルの作出ならびに個々の変異体の調査により遺伝子の全体像を明らかにしていくことが必要である。

RNAi 法 (RNA interference, RNA 干渉法) や相同組換え法なども遺伝子破壊方法として存在するが、植物ではまだ完成されているとは言えないであろう。今後はこれらの方法を植物でも発展させ、遺伝子の単離や機能解明技術を多様化することが重要となる。これらの技術開発に当たっても、全塩基配列や地図情報は欠くべからざるものである。

### (3) マイクロアレイ

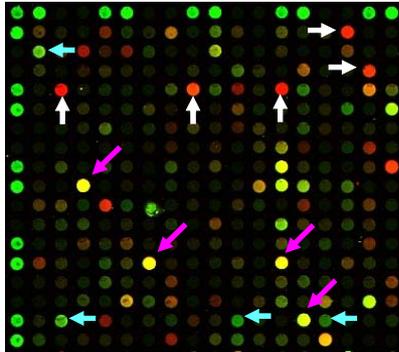
マイクロアレイ法では、できるだけ多くの cDNA ライブラリーを作製すること、また、cDNA も完全長と言われる、発現遺伝子の塩基配列が切れ目なく完全なものが望ましい。

日本では、イネゲノム解析プロジェクトが開始されて以来、発現遺伝子を可能な限り数多く収集する努力を進めてきた。米国、中国でも同じように作製努力がなされ、2003 年 9 月時点で NCBI の発現遺伝子データベース dbEST には約 26 万件が登録されている。

日本ではこれらの発現遺伝子や、農業生物資源研究所等が作製した完全長 cDNA を使用したマイクロアレイが作製されており、外部の研究者が利用可能な体制が取られている。今後この技術を利用した遺伝子の機能解明研究が進むことが期待される。

## 60merオリゴアレイ結果の — Color Swap —

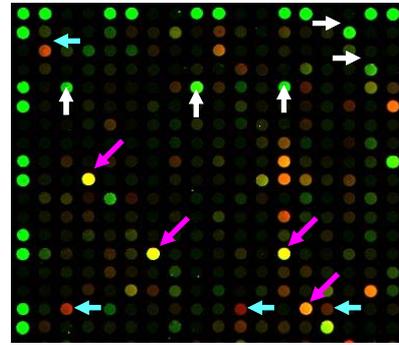
スライド1 : A- Cy3 × B-Cy5



コントロールAを Cy3 ( ● ) でラベルした場合

- が 発現量が増加した遺伝子
- が 発現量が減少した遺伝子
- が 発現量が変わらない遺伝子

スライド2 : A- Cy5 × B-Cy3



コントロールAを Cy5 ( ● ) でラベルした場合

- が 発現量が増加した遺伝子
- が 発現量が減少した遺伝子
- が 発現量が変わらない遺伝子

図13. マイクロアレイサンプルのカラーズワップ結果

マイクロアレイにおいて、異なる蛍光色素間でサンプルの標識に差が出ないかを確認するための分析がカラーズワップである。農業生物資源研究所では、このような分析を通じてマイクロアレイシステムを確立した。

### (4) バイオインフォマティクス

コンピュータによる遺伝子の特定、機能推定も今後ますます重要性を増していくものと考えられる。遺伝子の配列を基に、遺伝子配列のデータベースを検索して類似した配列をピックアップする相同性検索、GC 含量や縮重コドンの使用頻度を用いた遺伝子予測、スプライシング部位の予測などに関するアノテーションはすでにイネゲノム全塩基配列に対して進めているが、さらに技術を高めることにより、プロモーターを初めとする調節領域などの予測が可能になることが期待される。

### 2) DNAマーカー利用による効率的品種開発

つぎに、実際の品種開発の場面でも、塩基配列の解読結果は大いに役立つとしている。従来の育種では表現型を選抜の指標として希望するものを選んできた。しかし、調査に多大な労力と時間を要する形質、発現が不明瞭で希望型を判定するのが困難な形質、収量や品質に関連する量的形質、劣性遺伝子型が希望型であり、後代検定をせねば希望型を確定できない形質などがあり、従来の育種方法では改善や工夫に多くの努力が払われてきた。

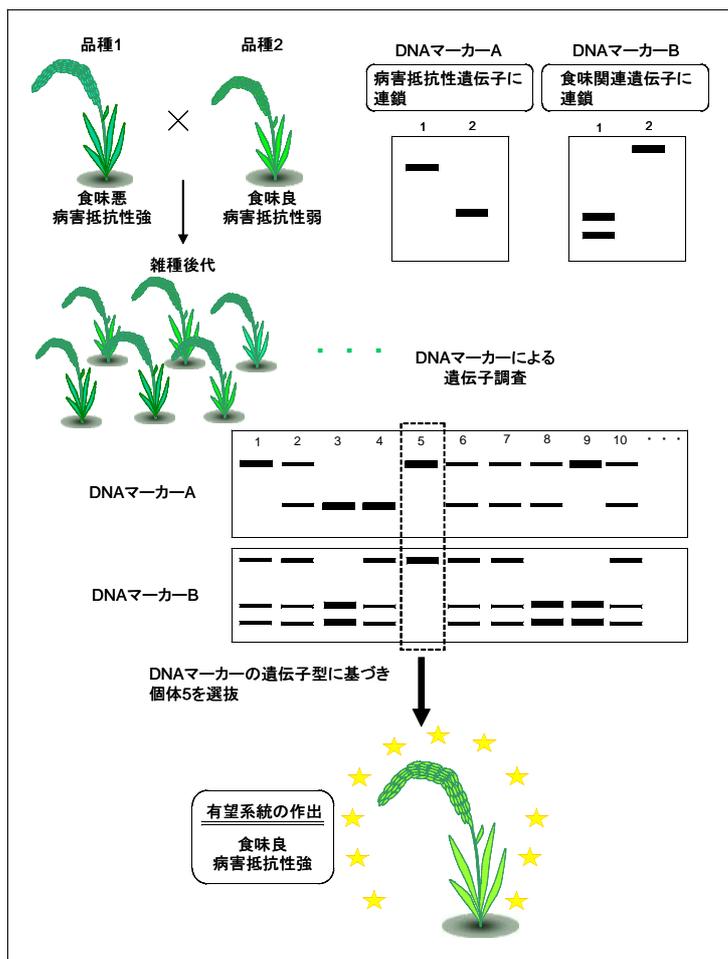


図14. DNAマーカーを利用した有望系統の選抜

実際の育種では、病害抵抗性、収量、品質などが選抜の対象となる。しかしこれらの形質は調査に労力がかかり、環境による影響が大きいため、表現型を調べるだけでは遺伝子の正確な推定が難しい。しかし、DNAマーカーを利用することにより苗の段階で、正確に、大量に判定できるので、利用価値が非常に高い。

を目的とする戻し交雑育種がよく行われる。この育種法は、改良しようとする性質に関して望ましい特性を持っている品種と標準品種とを交雑し、 $F_1$ を作成し、この $F_1$ に標準品種を戻し交雑する。次世代以降、さらにこれに標準品種の戻し交雑を繰り返し、次第に標準品種にほとんどの形質では似ているが、改良したい形質では他の親と同じ性質を備えているものを作り上げていく方法である。この方法を実行するにもDNAマーカーや塩基配列の変動を調べながら戻し交雑を進めていけば極めて短期間に、正確に希望型が得られる。

さらに、収量や品質などの量的形質は表現型で精度の高い選抜が難しい。しかし、このような形質の選抜も関与する遺伝子を調べ、これを指標に育種をすれば精度の高い選抜が可能となる。

既にこれらDNAマーカーを利用した育種は、ゲノム解析研究が開始された10年以上前から同時並行で進められてきたが、今後もイネゲノムの塩基配列結果と地図情報を有効に利用しながら重要な形質を対象とするマーカー作製を進め、DNAマーカー育種をさらに発展させていかねばならないであろう。

イネ全塩基配列の解読結果と解読のために作製された遺伝地図、発現遺伝子地図、物理地図を有効に利用すれば、従来育種を大幅に改善し、効率を高めることができる。

DNAマーカーを利用した育種では、図14に示すように、その形質に関与する遺伝子の近傍のDNA配列を指標として、希望型を間接的に選抜する。この方法だと仮にその形質が生育の後期に発揮される果実の特徴や病害抵抗性などである場合にも、幼苗期など生育の初期での選抜が可能となる。また、従来の育種技術では、品質や病害抵抗性などに関しては、検定法が複雑であったり、設備を整えるのに多くの経費がかかる場合が多かったが、DNAマーカーを有効に使えば、この点も解消することができる。

また、作物育種では現在の標準品種を部分改良すること

### 3) イネの比較ゲノム研究

高精度イネゲノム塩基配列情報は、広く世界中に存在する、12万種とも言われるイネ品種間の遺伝子レベルでの相違を知るために欠かせない。我が国ではジャポニカ種のみが栽培されているが、世界のコメ生産量の90%はインディカ種である。今回ゲノム塩基配列が解読されたのはジャポニカ種「日本晴」であり、この情報を広くインディカ種の遺伝変異の解析とその後の育種への応用に結びつけていくことが要求される。

イネでこのような多数の品種が存在することは、これだけの数の配列上の変異、あるいはアレルが存在することを示唆しており、これらの集積が各々の栽培環境や人々の嗜好に合致するように選択されてきたといえる。この意味で、栽培イネの起源をたどることは重要であり、ゲノム塩基配列情報のみがそれを可能にする。

イネは約1万年前に栽培が始まったと言われているが、現在の栽培種 *Oryza sativa* そのものの野生種は存在しない。この近縁種として *O. rufipogon* や *O. nivara* が知られているが、それらのゲノム構造は *O. sativa* を基準としてのみ解析可能となる。また、これら近縁種には病虫害抵抗性や環境ストレス耐性など、未利用な情報が存在する。収量に関しては、これらを組み合わせて初めて明らかになる部分もある。現在アフリカで進められているネリカ米の開発は、*O. sativa* と *O. glaberrima* の組合せによって収量が増えた好例である。

この他、イネのゲノム中には多くの遺伝子が重複して配列していることが明らかになってきた。また、染色体が2倍体ではなく、4倍体の近縁野生種も存在する。このようなゲノム構造の特徴とイネという植物の存在との関連も、今後研究対象とされるべき課題となる。

### 4) イネゲノム情報の他植物への利用

イネゲノム解析研究が始まってかなり早い時期に、日本の RGP とイギリスの研究者が共同研究する中で、イネの DNA マーカーがコムギにも反応し、さらに一定の範囲内ではマーカーの配列順序が一致していることを見つけた。これは近縁の植物間では、ゲノム間で相同遺伝子の並び方に類似性のあることを意味し、シンテニーと呼ばれた。

イネ科の作物であるトウモロコシ、アワ、サトウキビ、ソルガム等はイネとの間に高いシンテニーが見られる。そして、これらの作物はいずれもイネよりもゲノムサイズが大きく、遺伝子の特定や機能解明などはゲノムサイズの小さいイネよりは難しい。そこで、イネの遺伝子の染色体上の位置がわかれば、他の作物での同種の遺伝子の位置が推定できることなどシンテニーを利用することにより、これら作物のゲノム解析や育種などの研究が効率よく進められることが期待される。このシンテニーを利用したイネ以外の主要作物の研究や、作物間の比較ゲノム研究も今後進めていかねばならない研究分野である。

また、イネで作製した DNA マーカーがすべて近縁作物のマーカーとして使えるというわけではないが、コムギ、イネ科牧草などでは使えるものもかなり見つけられており、その作物で独自に作るより、イネで開発したもので利用できるものはまず利用する道を探るのが効率的な方法といえる。さらに、近縁作物の塩基配列の解読、遺伝子の単離、マーカー

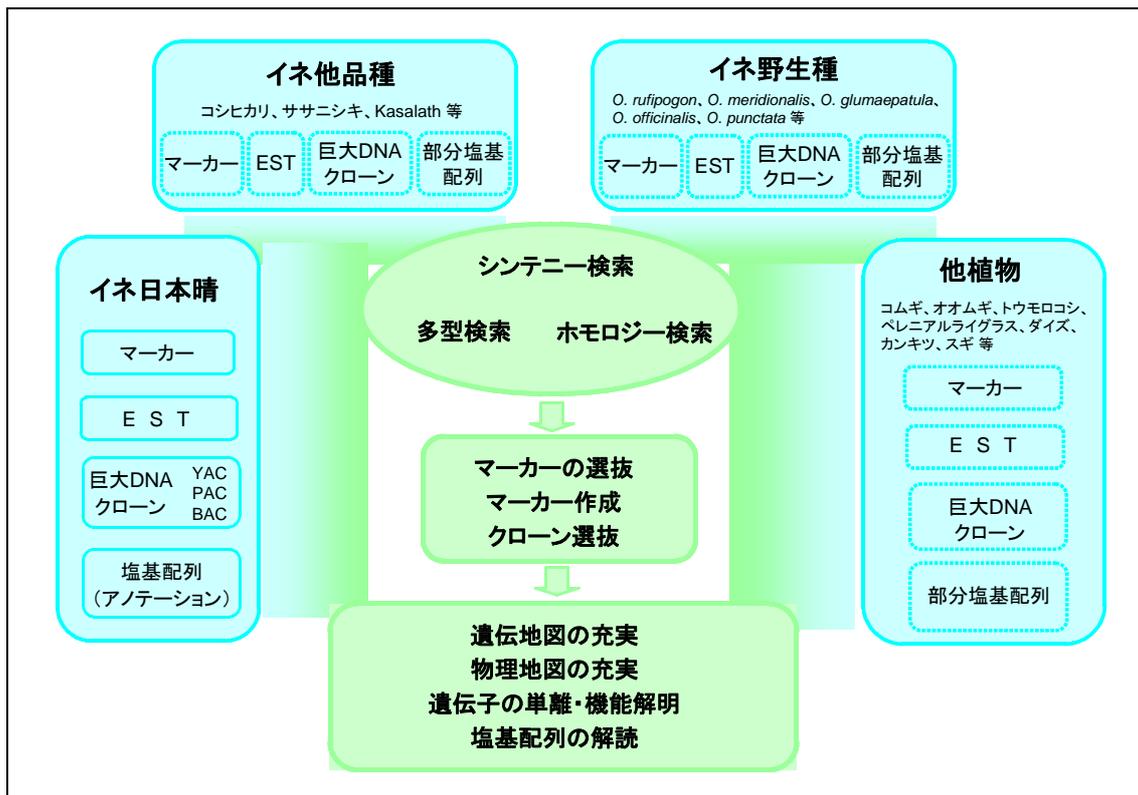


図15. イネゲノム情報の他植物への利用

オルソログと呼ばれる共通の祖先から進化した類似機能を持つ遺伝子と、シンテニーと呼ばれるゲノム上での遺伝子の配置の類似性を有効に利用して、イネのゲノム情報を他の植物に応用する。しかし、オルソログもシンテニーも類縁関係の近縁なもの同士では明確な類似性が見られるが、遠縁になるほど類似性は薄くなる。

一育種などゲノム解析研究のあらゆる場面でイネの塩基配列情報が極めて役に立つことが期待される。

イネゲノム情報には、遺伝地図、物理地図、EST 地図、cDNA カタログ、DNA マーカーなどがあり、その実体は冷凍保存されたクローンであったり、データベース上の情報であったりする。さらに、ゲノム解析研究をイネで進めるに当たって、多くの技術開発が行われてきたが、このような技術そのものもイネゲノム情報の1つと考えることができる。

イネゲノム情報を他の作物に利用する方法としては、多くのものがあると考えられるがその技術については未だ完全に確立されたものではない。現在比較ゲノムと呼ばれている研究分野で、その手法が次第に開発されつつある。その主な原理はオルソログと呼ばれる共通の祖先から進化した類似機能を持つ遺伝子と、シンテニーと呼ばれるゲノム上での遺伝子の配置の類似性に基づくものであり、このオルソログとシンテニーを有効に利用しようとするものである。しかし、オルソログもシンテニーも類縁関係の近縁なもの同士では明確な類似性が見られるが、遠縁になるほど類似性は薄くなる。そこでイネのゲノム情報を利用しようとする場合でもイネと近縁な作物では、効果的な利用が可能であっても、遠縁の作物の場合には、それほど有効なイネゲノム情報の利用はできない場合がある。しかし、いずれの場合にもイネゲノム解析で培った技術に関しては有効利用が可能である。図15はオルソログやシンテニーを利用したイネゲノム塩基配列の利用技術を図示したもの

である。現在多くの生物間でゲノムの比較が進められているが、その手法には定まったものがあるのではなく、個々の研究者の創意工夫により開発中であり、今後さらに新しい有効な技術が開発されることが期待される。今までにゲノムの比較に用いられている方法の中には、イネ品種「日本晴」のように塩基配列がほぼ全て解読された植物のゲノムの配列情報に、他植物の EST の配列情報を当てることにより、その EST の機能を推定するだけでなく、シンテニーから染色体上の位置をも推定する方法やイネの EST の塩基配列から他植物の該当遺伝子の座乗する PAC/BAC クローンを選抜する方法などがある。

このようにイネの情報を介して得られた機能あるいは位置情報は、最終的には遺伝子の単離やマーカーの作製に役立ち、マップベースクローニング、遺伝地図、物理地図の作製、塩基配列解読などの効率化を図ることができる。

### 3. 情報の公開と利用

ゲノム情報はそれ自身が経済的な価値を持ち、実用的な商品の開発につながる可能性がある。一方、ゲノム情報は公開することにより、多くの研究者が利用しその分野の発展につながる。そこで、迅速に公開するか、特許申請するまでは非公開とするかが常に問題となるところである。イネゲノム塩基配列については PAC/BAC ごとに解読後、時を置かず公的データベースに登録、公開することを原則としてきた。この公開データは遺伝地図、物理地図、アノテーション結果とともに複数の研究機関のホームページから工夫されて発信されている。

表2はイネゲノムに関する情報を発信している主なホームページを示したものである。イネに関してはこの他にも世界で多数のゲノム情報・データベースが発信されており、イネ

表2. イネゲノム関連データベース

イネゲノム関連データベースの主なものは日本と米国のそれぞれ2つずつある。INEとThe TIGR RICE DatabaseはIRGSPの塩基配列の解読結果を中心にデータベースが作製されており、ORYZABASEとGrameneとはイネ野生種あるいはイネ科植物を中心としイネの塩基配列も含むデータベースである。

名称	URL	作成国	作成機関	機能
INE	<a href="http://rgp.dna.affrc.go.jp/giot/INE.html">http://rgp.dna.affrc.go.jp/giot/INE.html</a>	日本	イネゲノム研究チーム (RGP)	イネゲノムの遺伝地図、物理地図、塩基配列情報の統合データベース。統合地図は各染色体毎に描かれている。マーカーからDNAクローン上の利用可能な情報へ導かれる。マーカー間の位置関係について容易に把握できる。
ORYZABASE	<a href="http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/rice.html">http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/rice.html</a>	日本	国立遺伝学研究所 九州大学 東京大学	野生型イネ情報、染色体地図、形質関連遺伝子情報、突然変異系統画像、参考文献、基礎知識等を含むイネ遺伝資源データベース。統合地図は、形態的/生化学的形質遺伝子の連鎖地図とRFLP連鎖地図、物理地図を結合して表される。いくつかの遺伝子はその突然変異系統の画像ヘリリンクが張られている。
The TIGR Rice Database	<a href="http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/">http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/</a>	米国	ゲノム研究所 (TIGR)	遺伝地図上に位置づけられたBAC/PACクローンの塩基配列、塩基配列のアノテーション結果、ゲノム内で予測されたタンパク質の領域・モチーフによる分類結果等参照できる。また、反復配列のデータベースも構築されている。
Gramene	<a href="http://www.gramene.org/">http://www.gramene.org/</a>	米国	コールドスプリングハーバー研究所 米国農務省 コーネル大学	イネ科植物の比較マッピングデータベースであり、イネ研究コミュニティの研究資源。イネと他のイネ科植物間の比較遺伝/物理地図の統合的資源を提供し、イネ科植物間において利用可能な遺伝情報、表現型情報が得られる。

に限らず植物を対象とする研究者、品種開発担当者にとっては、これらの情報は大いに参考となるものである。今後はこのようなデータベース、ホームページに関しては、できるだけアクセスしやすいよう、また、研究者のニーズに沿うよう工夫を凝らし開発を進める必要がある。