

委託プロジェクト研究
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」
平成29年度 最終年度報告書

13405175

多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター
研究開発責任者	田中 剛
共同研究機関	国立大学法人 東京大学大学院農学生命科学研究科
	国立大学法人 筑波大学生命環境科学研究科
	国立大学法人 岩手大学
	国立大学法人 大阪大学
	国立大学法人 新潟大学
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（次世代作物開発研究センター、果樹茶業研究部門、九州沖縄農業研究センター、野菜花き研究部門、東北農業研究センター、西日本農業研究センター、中央農業研究センター、作物研究所、近畿中国四国農業研究センター）
	国立研究開発法人理化学研究所
	国立研究開発法人農業生物資源研究所
	長野県農業試験場
	福井県農業試験場
	地方独立行政法人北海道立総合研究機構（中央農業試験場、北見農業試験場）
	公益財団法人かずさDNA研究所
大学共同利用機関法人 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター	
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-7065 FAX : 029-838-7065 E-mail : tstanaka@affrc.go.jp

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. コムギゲノム選抜に資するアンカーマーカーセットの開発 (1) 国内品種を用いた多型検出 (2) 効率的な遺伝子型決定法の開発	多型検出					農研機構 東北農業研究センター	畑作園芸研究領域
	遺伝子型検出法開発						
2. コムギ6B染色体ゲノム配列の高精度化とゲノム情報基盤の整備 (1) BAC物理地図の精密化 ① 遺伝地図およびRH map上へのコンティグの配置 ② 物理地図の修正 (2) 塩基配列情報の高精度化 ① 一次解読結果の検証 ② 再解読の実施 ③ メイトペアライブラリの構築と塩基配列解読 ④ 配列アセンブリとpseudomoleculeの構築 (3) 遺伝子アノテーションと情報基盤構築 ① プロジェクトホームページの作成 ② アノテーションパイプラインの構築 ③ アノテーションの実施 ④ 情報解析支援	コンティグ配置					農研機構 次世代作物開発研究センター	育種法開発ユニット ゲノム育種推進室
	物理地図修正						
① 一次解読結果の検証 ② 再解読の実施 ③ メイトペアライブラリの構築と塩基配列解読 ④ 配列アセンブリとpseudomoleculeの構築	結果検証		再解読			農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室 情報解析ユニット
			配列解読				
① プロジェクトホームページの作成 ② アノテーションパイプラインの構築 ③ アノテーションの実施 ④ 情報解析支援	HP作成		アノテーションパイプライン作成			農研機構 次世代作物開発研究センター	情報解析ユニット
			アノテーション				
3. ゲノムワイドSNPを使用したジェノタイプング解析支援			情報解析支援			農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室
			解析支援				

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
4. イネの収量性向上に向けたゲノミックセレクションの実証							
(1) ゲノミックセレクション手法による予測モデル構築	予測モデル構築 ←—————→					農業生物資源研究所	イネゲノム育種研究ユニット
(2) コシヒカリ／タカナリBILsおよびゲノム断片化集団の養成と温暖地（東日本）における収量性の評価	東日本の形質評価 ←—————→					作物研究所	稲育種研究分野
(3) コシヒカリ／タカナリBILsおよびゲノム断片化集団の世代促進と暖地（西日本）における収量性の評価	西日本の形質評価 ←—————→					九州沖縄農業研究センター	稲育種グループ
(4) 日本晴／コシヒカリBILsおよびゲノム断片化集団の養成と収量性の評価	集団養成と形質評価 ←—————→					農業生物資源研究所	イネゲノム育種研究ユニット
5. 系譜ハプロタイプ情報を利用したイネの食味関連領域の推定と検証							
(1) 新規な食味官能評価値に関する候補ゲノム領域の推定	食味関連領域の推定 ←—————→					農研機構 九州沖縄農業研究センター	稲育種グループ
(2) 検証用集団の育種・評価	検証用集団の育種・評価 ←—————→					農研機構 次世代作物開発研究センター	稲形質評価ユニット 育種法開発ユニット
(3) 良食味に関するデザイン育種の提示と実証	デザイン育種の提示と実証 ←—————→					農研機構 次世代作物開発研究センター	稲育種ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
6. ダイズの難解析形質を対象としたゲノム選抜育種法の開発							
(1) 国産ダイズ品種におけるゲノムワイドSNPマーカーの拡充							
① 高密度 SNP パネルの開発	←→					農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
② ジェノタイピングパネルの開発	←→					農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
(2) ダイズの難解析形質を対象としたゲノム選抜育種法の開発							
① 難解析形質の育種選抜基盤の構築	←→					農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
② タンパク質含量等のゲノミックセレクションの試行と検証						農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
③ 北海道の品種系統を用いた収量のゲノムワイド関連解析	←→					北海道立総合研究機構 中央農業試験場	作物グループ
④ 多収性関与マーカーの検証						北海道立総合研究機構 中央農業試験場	作物グループ
⑤ 育種選抜集団へ適用可能なジェノタイピングパネルの開発						農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
7. 小麦粉の色相に関するゲノム選抜手法の開発と実証							
(1) 育種材料を用いた形質評価	形質評価					農研機構 東北農業研究センター 道総研 北見農業試験場 長野県農業試験場	畑作園芸研究領域 研究部・麦類グループ 育種部
(2) 国内品種の多型調査	多型調査					農研機構 東北農業研究センター	畑作園芸研究領域
(3) 主働遺伝子の解析と形質予測の試行	多型調査					農研機構 東北農業研究センター	畑作園芸研究領域
8. ゲノムワイドマーカー情報に基づく多収・高糖度トマト選抜のための次世代型マーカー育種技術開発とその試行							
(1) トマトの次世代型マーカー育種技術開発のための全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備						農研機構 野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット
①GMRILsを用いたGSモデル高精度化のためのSNPハプロタイプマーカーセットの開発	SNPマーカー開発						
②SL96を用いたWGPモデル構築のためのSNPs情報の取得	SNP情報取得						
③ トマト近代品種群の網羅的多型情報リソースの整備	リソース						

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室			
	25	26	27	28	29	機関	研究室		
(2) 業務用初夏どり寒玉 キャベツ育成のためのGS基 盤の構築と実証 ①4元交雑F2集団の形質デ ータの取得 ②4元交雑F2集団の遺伝子 型データの取得と予測モデ ルの構築	形質評価					農研機構 野菜 花き研究部門	アブラナ科ユ ニット		
	モデル構築							農研機構 野菜 花き研究部門 岩手大学	アブラナ科ユ ニット 植物育種学研 究室
	集団養成と検証								
(3) 予測モデルを用いた 改良集団の養成と選抜効果 の検証									
10. ゲノムワイドなハプロタ イプ定義によるリンゴの選 抜育種法の開発						農研機構 果樹 茶業研究部門	ゲノムユニッ ト		
(1) リンゴにおけるゲノ ムワイドSNPマーカーの 整備 (NGB1005) ①「ふじ」リシーケンス による SNP マーカーの 開発	マーカー開発								
② 20K SNP Infinium Chip の国内品種への利 用検討	ジェノタイピングシステム検討								
(2) 「ふじ」ファミリー 等主要リンゴ品種の遺 伝子型の決定とハプロ タイプ定義								農研機構 果樹 茶業研究部門	リンゴ育種ユ ニット ゲノムユニッ ト
①「ふじ」由来の SNP マ ーカーを用いた「ふじ」 のハプロタイプ定義	ふじのハプロタイプ定義								
②20K SNP Infinium Chipを用いた起源品種 のハプロタイプ定義	期限品種のハプロタイプ定義								

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室			
	25	26	27	28	29	機関	研究室		
(3) ハプロタイプに基づいた 関連解析と各種形質の 支配領域の特定 ① 品種群の形質データの 獲得 ② 形質と「ふじ」ハプロ タイプとの関連解析 ③ 形質と起源品種ハプロ タイプとの関連解析						農研機構 果樹茶 業研究部門	リンゴ育種ユ ニット、ゲノ ムユニット		
	形質評価 ←—————→								
		「ふじ」の関連解析 —————			↔				
		期限品種の関連解析 —————						↔	
(4) 多数の遺伝子領域 に支配される果実形質 の選抜技術の開発 ① 検証用集団のハプロ タイプ定義と形質予 測、および予測精度の 検証 ② 適切な形質予測法の 選定						農研機構 果樹 茶業研究部門	リンゴ育種ユ ニット、ゲノ ムユニット		
	形質予測と検証 ←—————→								
				予測法の選定 —————↔					
								↔	
1 1. ゲノムワイド予測と ゲノミックセレクション によるニホンナシの優良 果実形質の育種技術開発 (1) ニホンナシにおける ゲノムワイドSNPマーカ ーの整備 (2) ニホンナシ育種集団 におけるゲノムワイド予 測の検証 (3) ゲノムワイドSNPの 遺伝子型データ収集とゲ ノミックセレクションのシ ミュレーション構築						農研機構 果樹茶 業研究部門	ゲノムユニッ ト		
	マーカー整備 ←—————→								
		ゲノムワイド予測の検証 ←—————→							
		モデル構築 ←—————→							

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(4) ゲノミックセレクションによる優良果実形質の選抜育種技術の開発			選抜技術開発			農研機構 果樹茶業研究部門	ゲノムユニット ナシ・クリ育種ユニット
12. 早生カンキツ育種効率化のための選抜育種技術の開発とその利用							
(1) 蓄積した形質情報を用いた早生カンキツ選抜技術の開発			集団養成と形質調査			農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ育種ユニット
① 集団の養成と形質評価	← ジェノタイプング →						
② SNPマーカーの拡充と遺伝子型解析	← →					農研機構 果樹茶業研究部門 遺伝研 生命情報研究センター	カンキツ育種ユニット 大量遺伝情報研究室
④ GWAS、GS モデル構築と最適化			モデル構築			農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ育種ユニット
(2) 高精度な形質情報を用いた早生カンキツ選抜技術の開発							
① 高精度形質評価	← 形質評価 →					農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ育種ユニット
② GWAS、GS モデル構築と最適化			モデル構築			農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ育種ユニット
(3) 早期選抜技術の適用と有効性の検証							
① QTL解析等との比較による有効性検証			早期選抜技術の検証			農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ育種ユニット
② 実生集団への適用と選抜			適用と選抜			農研機構 果樹茶業研究部門 遺伝研 生命情報研究センター	カンキツ育種ユニット 大量遺伝情報研究室

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(4) GoldenGate assay に替わる高速遺伝子型解析 手法の検討 13. ゲノム情報利用育種を 支える情報解析技術の開発 とその活用基盤の構築 (1) ゲノムと形質間の関係 を正確にモデル化するた めの情報解析技術の構築 ① 新しい統計モデルの 開発 ②他課題で収集されるデー タの多角的解析、遺伝 子機能データの予測への 活用 (2) ゲノム情報解析および ゲノム育種のためのソフト ウェア開発 (3) 交配・育種シミュレー ションシステムの開発 14. 画像解析による形質 評価のハイスループット 化 (1) 画像解析ソフトウェア の開発のための解析アルゴ リズムの開発とプログラムの 基本設計 (2) 画像解析ソフトウェア の開発のためのプログラミ ングおよび育種データプラ ットホームの整備			手法検討			農研機構 果樹茶 業部門 遺伝研 生命情 報研究センター	カンキツ育種ユ ニット 大量遺伝情報 研究室
			統計モデル開発			農研機構 次世代 作物開発研究セン ター	情報解析ユニッ ト
			データ解析			東京大学	生物測定学研究 室
			ソフトウェア開発			東京大学	生物測定学研究 室
			シミュレーションシステム開発			東京大学	生物測定学研究 室
			ソフトウェア開発			理化学研究所	環境資源科学 研究センター
			プログラミング			かずさDNA研 究所	植物ゲノム応 用研究室

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(3) 最適形質パラメータ群の抽出と組み合わせ合成手法の開発	手法開発					新潟大学	超域学術院
(4) デジタル画像を用いたカンキツ形質評価法の開発	カンキツ形質評価法開発					大阪大学	大学院医学系研究科 カンキツ研究領域
(5) デジタル画像を用いたコムギの形質評価法の開発	コムギ形質評価法開発					農研機構 果樹茶業部門	
(6) デジタル画像を用いたダイズの形質評価法の開発	ダイズ形質評価法開発					農研機構 九州沖縄農業研究センター	水田作・園芸研究領域農業
(7) デジタル画像を用いた炊飯米形質評価法の開発のためのマクロ画像取得	画像取得					農研機構 作物研究所	稲研究領域
(8) デジタル画像を用いた炊飯窯からの炊飯米形質評価法の開発	炊飯米形質評価					福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部 機能開発研究グループ
(9) タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発	果樹用アプリ開発					理化学研究所	環境資源科学研究センター
① 果菜類育種研究における表現型測定用アプリケーションの開発	水田・畑作物用アプリ開発					かずさ DNA 研究所	植物ゲノム応用研究室
② 水田・畑作物育種研究における系統・個体の情報収集・表現型測定用のアプリケーション開発	園芸作物用アプリ開発					筑波大学	生命環境系
③ 園芸作物育種圃場における系統・個体の情報収集・栽培管理用アプリケーション開発							

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
④ 果菜類育種研究における表現型測定用アプリケーションの要素技術の開発 (10) 先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発	手法開発 ←————→					東京大学	農学生命科学研究科
① ユニット型搬送システムの開発	搬送システム開発 ←————→					理化学研究所	環境資源科学研究センター
② ユニット型搬送システムの実証試験	搬送システム試験 ←————→					かずさ DNA 研究所	植物ゲノム応用研究室
③ 自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムの要素技術の開発	要素技術開発 ←————→					筑波大学	生命環境系
④ 自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムにおける画像解析技術の開発	画像解析技術開発 ←————→					東京大学	農学生命科学研究科
⑤ 自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムにおけるカメラアレイと走行技術の開発	カメラアレイ・走行技術開発 ←————→					農研機構 近畿中国四国農業研究センター	傾斜地園芸研究領域
⑥ 自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムにおける環境情報収集およびロボットの制御技術の開発	ロボット制御技術開発 ←————→					農研機構 中央農業研究センター	情報利用研究領域
⑦ 自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムにおける実証試験環境の整備	私見環境整備 ←————→					農研機構 野菜茶業研究所	野菜生産技術研究領域
⑧ クラウドコプター撮影システムの開発	撮影システム開発 ←————→					筑波大学	システム情報系

I-2. 実施体制

課題 番号	研究項目	担当研究機関・研究室			研究担当者
		機関		研究室	
NGB 1001	研究開発責任者	農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	情報解析ユニット	◎ 田中 剛
	国産ダイズ品種におけるゲノムワイドSNPマーカーの拡充	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	○ 石本 政男 (H25～H26)
NGB 1002	コムギゲノム選抜に資するアンカーマーカーセットの開発	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	加賀 秋人 (H25～H26)
		東北農業研究センター	畑作園芸研究領域		○ 齊藤 美香 (H25～H26)
		東北農業研究センター	畑作園芸研究領域		石川 吾郎 (H25～H26)
NGB 1003	コムギ6B染色体ゲノム配列の高精度化とゲノム情報基盤の整備	東北農業研究センター	畑作園芸研究領域	畑作物育種グループ	中村 俊樹 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	作物ゲノム研究ユニット	○ 半田 裕一 (H25～H27)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	育種法開発ユニット	○ 小林 史典 (H28～H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	作物ゲノム研究ユニット	小林 史典 (H25～H27)
NGB 1004	トマトおよびキャベツの次世代型マーカー育種技術開発のための全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備	農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室		呉 健忠 (H25～H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	情報解析ユニット	田中 剛 (H25～H29)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	野菜ゲノム研究グループ	○ 福岡 浩之 (H25～H27)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	野菜ゲノム研究グループ	山本 英司 (H26～H27)

NGB 1005	バラ科果樹の次世代育種技術開発のためのゲノムワイドSNPマーカーの整備	野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	葉根菜育種研究グループ	柿崎 智博 (H27)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	葉根菜育種研究チーム	畠山 勝徳 (H25～H26)
		果樹研究所	品種育成・病虫害研究領域		○ 寺上 伸吾 (H25～H27)
		果樹研究所	品種育成・病虫害研究領域		山本 俊哉 (H25～H27)
NGB 1006	カンキツの育種選抜に利用可能なゲノムワイドSNPの拡充	果樹研究所	カンキツ研究領域	ゲノムユニット	○ 清水 徳朗 (H25～H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	ゲノムユニット	後藤 新悟 (H26～H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	吉岡 照高 (H25～H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	野中 圭介 (H25～H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	今井 篤 (H25～H26)
		国立遺伝学研究所	生命情報研究センター	大量遺伝情報研究室	神沼 英里 (H25～H27)
NGB 1007	ゲノムワイドSNPを使用したジェノタイプング解析支援	農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室		○ 片寄 裕一 (H25～H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムインフォマティクスユニット	川原 善浩 (H25～H27)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムインフォマティクスユニット	沼 寿隆 (H25～H27)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムインフォマティクスユニット	伊藤 剛 (H25～H27)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室		呉 健忠 (H25～H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域		松本 隆 (H27～H28)

NGB 2001	イネの収量性向上に向けたゲノミックセレクションの実証	農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	情報解析ユニット	田中 剛 (H25～H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	イネゲノム育種研究ユニット	○ 堀 清純 (H25～H26)
		九州沖縄農業研究センター	水田作・園芸研究領域	稲育種グループ	佐藤 宏之 (H25～H26)
		九州沖縄農業研究センター	水田作・園芸研究領域	稲育種グループ	片岡 知守 (H25～H26)
		作物研究所	稲研究領域	稲育種研究分野	田中 淳一 (H25～H26)
		作物研究所	稲研究領域	稲育種研究分野	石井 卓朗 (H25～H26)
NGB 2002	系譜ハプロタイプ情報を利用したイネの食味関連領域の推定と検証	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	イネゲノム育種研究ユニット	福田 篤徳 (H25)
		農研機構 九州沖縄農業研究センター	水田作研究領域	稲育種グループ	○ 山本 敏央 (H25～H26)
		作物研究所	稲研究領域		○ 竹内 善信 (H27～H29)
		作物研究所	稲研究領域		竹内 善信 (H25～H26)
NGB 2003	ダイズの難解析形質を対象としたゲノム選抜育種法の開発	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	イネゲノム育種研究ユニット	米丸 淳一 (H25～H26)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	稲研究領域	稲育種ユニット	黒木 慎 (H28～H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	○ 加賀 秋人 (H25～H27)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域		○ 石本 政男 (H28～H29)
		北海道立総合研究機構 中央農業試験場	作物開発部	作物グループ	黒崎 英樹 (H25～H29)

NGB 2004	小麦粉の色相に関するゲノム選抜手法の開発と実証	北海道立総合研究機構 中央農業試験場	作物開発部	作物グループ	鴻坂 扶美子 (H25)
		北海道立総合研究機構 中央農業試験場	作物開発部	作物グループ	藤田 正平 (H25~H27)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	石本 政男 (H25~H27)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物研究領域	畑作物形質評価ユニット	田口 文緒 (H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物研究領域	畑作物形質評価ユニット	佐山 貴司 (H25~H28)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物研究領域	畑作物形質評価ユニット	小木曾 映里 (H27~H29)
		東北農業研究センター	畑作園芸研究領域		○ 石川 吾郎 (H25~H26)
		北海道立総合研究機構北見農業試験場	研究部	麦類グループ	吉村 康弘 (H25~H26)
		北海道立総合研究機構北見農業試験場	研究部	麦類グループ	神野 裕信 (H25~H26)
		北海道立総合研究機構北見農業試験場	研究部	麦類グループ	佐藤 三佳子 (H25)
		北海道立総合研究機構北見農業試験場	研究部	麦類グループ	其田 達也 (H26)
		長野県農業試験場	育種部		前島 秀和 (H25~H26)
		長野県農業試験場	育種部		丸山 (上原) 泰 (H25~H26)
東北農業研究センター	畑作園芸研究領域		伊藤 裕之 (H25~H26)		
東北農業研究センター	畑作園芸研究領域		齊藤 美香 (H25~H26)		

NGB 2005	ゲノムワイドマーカー情報に基づく多収・高糖度トマト選抜のための次世代型マーカー育種技術開発とその試行	東北農業研究センター	畑作園芸研究領域	畑作物育種グループ	中村 俊樹 (H25~H26)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜生産システム研究領域	生産生理ユニット	○ 大山 暁男 (H25~H27、H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	○ 山本 英司 (H28)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	布目 司 (H28~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ナス科ユニット	齊藤 猛雄 (H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ナス科ユニット	松永 啓 (H25~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ナス科ユニット	新村 芳美 (H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜生産システム研究領域	生産生理ユニット	大山 暁男 (H28)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	野菜ゲノム研究グループ	福岡 浩之 (H25~H27)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	野菜ゲノム研究グループ	山本 英司 (H26~H27)
NGB 2006	業務用初夏どり寒玉キャベツ育成のためのGS基盤の構築と実証	野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	葉根菜育種研究チーム	○ 畠山 勝徳 (H25~H26)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	アブラナ科ユニット	○ 柿崎 智博 (H27~H29)
		岩手大学	農学部	植物育種学研究室	畠山 勝徳 (H28~H29)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	葉根菜育種研究グループ	松元 哲 (H25~H26)
		野菜茶業研究所	野菜育種・ゲノム研究領域	葉根菜育種研究グループ	柿崎 智博 (H25~H26)

NGB 2007	ゲノムワイドなハプロタイプ定義によるリンゴの選抜育種法の開発	農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	○ 國久 美由紀 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	リンゴ研究領域	リンゴ育種ユニット	森谷 茂樹 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	リンゴ研究領域	リンゴ育種ユニット	阿部 和幸 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域		西谷 千佳子 (H25~H29)
NGB 2008	ゲノムワイド予測とゲノミックセレクションによるニホンナシの優良果実形質の育種技術開発	農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	○ 山本 俊哉 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	寺上 伸吾 (H28~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	齋藤 寿広 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	高田 教臣 (H25~H29)
NGB 2009	早生カンキツ育種効率化のための選抜育種技術の開発とその利用	農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ育種ユニット	○ 野中 圭介 (H25~H29)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	今井 篤 (H25~H26)
		国立遺伝学研究所	生命情報研究センター	大量遺伝情報研究室	神沼 英里 (H28~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツゲノムユニット	清水 徳朗 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツゲノムユニット	後藤 新悟 (H28~H29)
	農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ育種ユニット	吉岡 照高 (H25~H29)	

NGB 2010	ゲノム情報利用育種を支える情報解析技術の開発とその活用基盤の構築	農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ育種ユニット	浜田 宏子 (H27~H29)
		東京大学	大学院農学生命科学研究科	生物測定学研究室	○ 岩田 洋佳 (H25~H29)
NGB 3001	画像解析による形質評価のハイスループット化	農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	情報解析ユニット	林 武司 (H25~H29)
		(公財) かずさDNA研究所	植物ゲノム研究部	植物ゲノム応用研究室	○ 磯部 祥子 (H25~H27)
		(公財) かずさDNA研究所	技術開発研究部	ゲノム情報解析グループ	平川 英樹 (H25~H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	ゲノムユニット	清水 徳朗 (H25~H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	野中 圭介 (H25~H27)
		果樹研究所	カンキツ研究領域	品種育成ユニット	浜田 宏子 (H26~H27)
		九州沖縄農業研究センター	水田作・園芸研究領域	小麦・大麦育種グループ	中村 和弘 (H25~H26)
		作物研究所	稲研究領域		竹内 善信 (H25~H27)
		大阪大学	大学院医学系研究科	ゲノム情報学共同研究講座	中谷 明弘 (H25~H27)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	石本 政男 (H25~H26)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	佐山 貴司 (H26)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		小林 麻子 (H25~H27)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		富田 桂 (H25~H26)
福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		町田 芳恵 (H27)		

NGB 3002	タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発	理化学研究所	環境資源科学研究センター	機能開発研究グループ	七夕 高也 (H25~H27)
		筑波大学	生命環境科学研究科	生物圏資源科学専攻	○ 吉岡 洋輔 (H25~H26)
		筑波大学	生命環境科学研究科	生物圏資源科学専攻	大澤 良 (H25~H26)
		中央農業総合研究センター	情報利用研究領域		林 武司 (H25~H26)
		中央農業総合研究センター	情報利用研究領域		法隆 大輔 (H25~H26)
		東京大学	農学生命科学研究科	生態調和農学機構	二宮 正士 (H25~H26)
NGB 3003	先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発	理化学研究所	環境資源科学研究センター	機能開発研究グループ	七夕 高也 (H25~H26)
		理化学研究所	環境資源科学研究センター	機能開発研究グループ	○ 七夕 高也 (H25~H26)
		(公財) かずさDNA研究所	植物ゲノム研究部	植物ゲノム応用研究室	磯部 祥子 (H25~H26)
		近畿中国四国農業研究センター	傾斜地園芸研究領域		黒崎 秀仁 (H25~H26)
		筑波大学	システム情報系	計算知能・マルチメディア研究室	延原 肇 (H25~H26)
		筑波大学	生命環境科学研究科	生物圏資源科学専攻	吉岡 洋輔 (H25~H26)
		中央農業総合研究センター	情報利用研究領域		深津 時広 (H25~H26)
		中央農業総合研究センター	情報利用研究領域		菅原 幸治 (H25~H26)
		東京大学	農学生命科学研究科	生態調和農学機構	二宮 正士 (H25~H26)
		野菜茶業研究所	野菜生産技術研究領域		東出 忠桐 (H25~H26)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	13405175	研究期間	平成25～29年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名	多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター・田中 剛		

I-1. 研究目的

作物のゲノム解読が進展し、イネのみならず、ダイズやコムギ、野菜や果樹などの多くの作物においてマーカー選抜育種による品種改良は著しく効率化されてきている。しかしながら、マーカー選抜育種は、その活用範囲を拡大している一方で、収量や品質など効果の小さな遺伝子が多数関与し、環境の影響を大きく受ける形質について、その適用限界も明らかとなってきている。

このため、本研究では、

1. コムギゲノム選抜に資するアンカーマーカーセットの開発
2. コムギ6B染色体ゲノム配列の高精度化とゲノム情報基盤の整備
3. ゲノムワイドSNPを使用したジェノタイプング解析支援
4. イネの収量性向上に向けたゲノミックセレクションの実証
5. 系譜ハプロタイプ情報を利用したイネの食味関連領域の推定と検証
6. ダイズの難解析形質を対象としたゲノム選抜育種法の開発
7. 小麦粉の色相に関するゲノム選抜手法の開発と実証
8. ゲノムワイドマーカー情報に基づく多収・高糖度トマト選抜のための次世代型マーカー育種技術開発とその試行
9. 業務用初夏どり寒玉キャベツ育成のためのGS基盤の構築と実証
10. ゲノムワイドなハプロタイプ定義によるリンゴの選抜育種法の開発
11. ゲノムワイド予測とゲノミックセレクションによるニホンナシの優良果実形質の育種技術開発
12. 早生カンキツ育種効率化のための選抜育種技術の開発とその利用
13. ゲノム情報利用育種を支える情報解析技術の開発とその活用基盤の構築
14. 画像解析による形質評価のハイスループット化

により、作物の収量性や品質など多数の遺伝子が関与し、複雑な遺伝制御を受ける形質の新たな育種選抜技術の開発を目標とする。

その結果、我が国の作物におけるゲノム育種技術の飛躍的な発展が期待される。

I-2. 研究結果

本研究の課題構成と運営方針について図1に示す。まず日本の品種間で利用可能なゲノムワイドに分布するSNPを検出し、その解析基盤を構築するため遺伝情報の整備を行った。ゲノム全体を標的とした品種間多型情報の整備を行った。コムギ、ダイズ、トマト、キャベツ、リンゴ、ニホンナシ、カンキツについて、ゲノムリシーケンシングもしくはSNPアレイを用いて、品種間多型を検出するとともに、ゲノミックセレクション、ハプロタイプ解析、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を行うための、SNPの選抜を行った。また、ジェノタイプングを行うためのプラットフォームについてGolden Gateの他、Infinium、Genotyping-by-Sequencing、Rad-Seq、BioMark、AmpliSeq等の検討を行った。更にコムギについては、参考ゲノムの構築を行う国際コンソーシアムと連携を取り、6B染色体の配列決定を行った。

次に、選抜技術の信頼性や実効性を検証するため、新育種技術の実践を行った。ゲノミックセレクションを中心に、ハプロタイプ解析やGWASを作物種ごとに検討を行った。そのために、検証用集団や実生集団、品種群の育成を行うとともに、収量性や果実品質などの難解形質の評価を行った。更に、ゲノミックセレクション等の統計数理モデル構築には高度な専門性が問われることから、汎用性の高いソフトウェア開発を目指した。

形質評価作業や、データの記録、解析を効率化するための技術開発を行った。画像処理技術を利用した自動計測技術の開発を進め、本研究で扱う作物種を検証対象として評価を行った。

【課題の構成と運営方針】

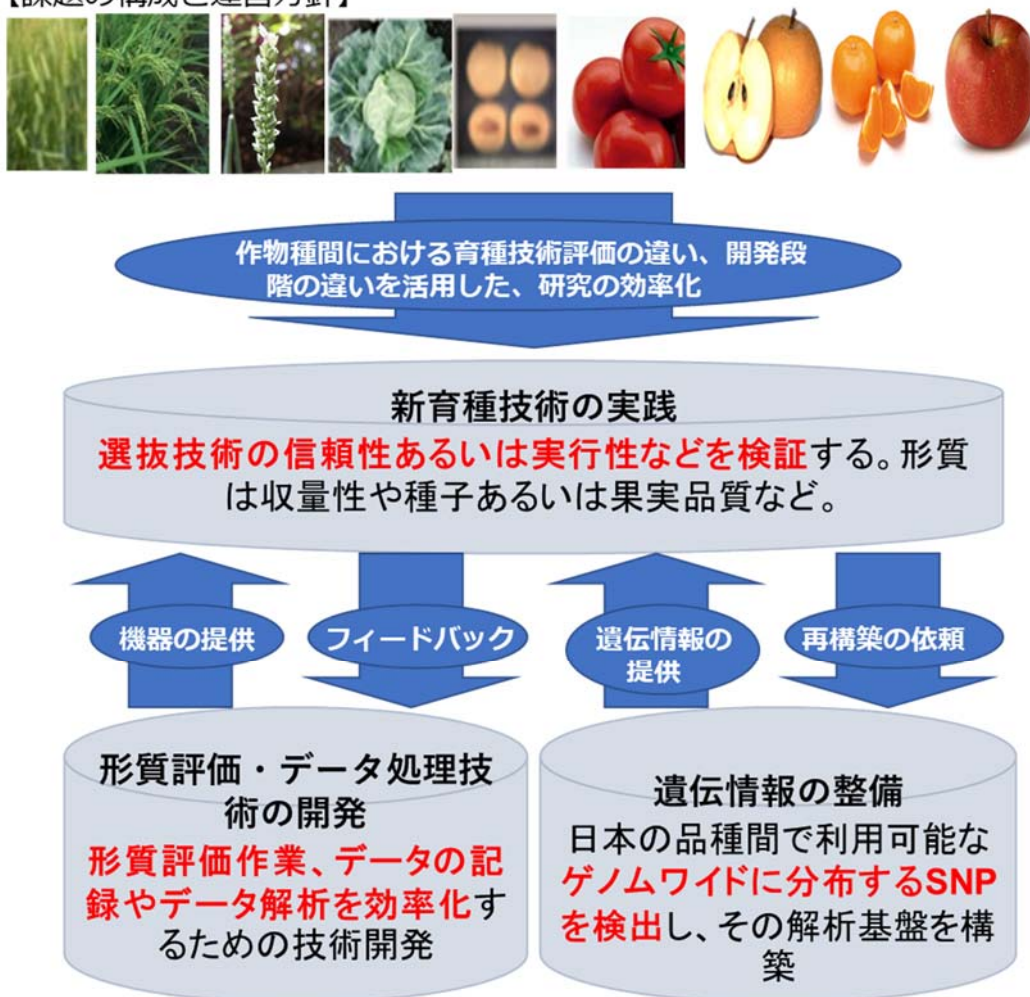


図1 本研究の課題構成と運営方針

本研究の成果として、コムギは、国際コンソーシアムと連携を取り、コムギ品種「Chinese Spring」ゲノム配列決定について、国内では6B染色体を配列決定し、コンソーシアム全体としてはコムギ全ゲノム配列であるRefSeq Ver.1とそのアノテーション情報を完成させた。多型情報については、ムギ、ダイズ、トマト、キャベツ、リンゴ、ニホンナシ、カンキツについて主要品種のゲノムワイドな多型情報を得た。これらの情報とイネを始めとする既存の大規模ゲノム情報を用いて、ゲノミックセレクションを行うための統計数理モデルの構築と試行を行った。モデル構築が成功したダイズ、トマト、キャベツ、リンゴ、ニホンナシ、カンキツでは養成中の集団に適応し、有望品種の選抜を進めることができた。また、イネとリンゴではハプロタイプ解析を、ダイズ、トマト、キャベツ、リンゴ、ニホンナシ、カンキツではGWAS解析を実施し、形質に関連するゲノム領域を同定した。その結果、一部の難解形質については関連するSNP情報を選抜することに成功した。ゲノミックセレクションの解析プラットフォームのプロトタイプを開発した他、イネ、カンキツ、ムギ、ダイズを対象として画像による形質評価技術を開発した。更に、タブレット端末等を用いた、現場での情報収集アプリケーションを試作した他、自動画像計測を可能とするための、自動搬送システムの開発を行った。

I-3. 今後の課題

本研究で得られた各種ゲノム配列情報、多型情報については、既に公開されており利用可能となっているものの、その利用には未だに情報解析の専門知識を必要とする。また、ゲノミックセレクションといった新育種技術やGWASなどの大規模データ解析を育種現場で利用を行うためには、本研究における情報基盤の整備だけでなく、解析基盤を整備していく必要がある。本研究で、新育種技術による形質予測が可能であることが示されたことから、今後は生産現場において必要とされる複雑形質に対してゲノミックセレクションの利用を実践していくことが課題となる。

新育種技術の精度向上には、モデル構築のための精度の高い形質情報と、多型情報が不可欠である。形質情報取得は、本研究で開発された計測技術をそれぞれの形質に最適化していくことで自動的に客観的なデータとして行えるようになると期待される。その一方で、本研究により、形質情報は気候などの環境要因に大きく左右されてしまい、モデル構築に大きな影響を与えることが明らかとなった。形質情報の評価法の確立が今後の課題の一つと考えられる。同時に、多型情報についてもジェノタイピング技術によって異なる結果が出ることが明らかとなった。形質情報同様、遺伝情報の評価法についても計測技術間の違いを正しく補正する必要がある。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB1002

研究期間：平成25～26年度

小課題名：コムギゲノム選抜に資するアンカーマーカーセットの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構東北農業研究センター・畑作園芸研究領域・畑作物育種グループ・斎藤美香

1) 研究目的

品種育成においてゲノムワイドな選抜手法を適用する場合、染色体全体に偏りなくできるだけ均一に分布するマーカーが必要である。そこで本研究には、実施課題NGB2004「小麦粉の色相に関するゲノム選抜手法の開発と実証」で用いるコムギ品種・系統を対象に、染色体全体に均一に分布するアンカーとなるマーカーセットの開発を目的とする。特にプロジェクト開始時点でマーカー数が著しく少ないDゲノム染色体を中心にマーカー開発を行う。具体的には、次世代シーケンサー(NGS)により解読した目的品種・系統の塩基配列からSNP、In/Del等の多型情報を取得し、オオムギなどイネ科植物の染色体物理地図情報やコムギ遺伝子配列を利用することで染色体上に偏りないようにマーカー候補を選出する。また、マーカー候補が埋まらない部分に関しては、その領域を補完するためにSSR等の既存マーカーの利用も検討する。さらに、本研究課題ではSNP、In/Del等の質の異なる多型を同一手法で検出する手法として、NGSを用いたPCR産物の塩基配列解読(アンプリコンシーケンス)によるジェノタイピング法も検討する。最終的には新規マーカーセットと高効率で低コストな多型検出プラットフォームを確立し、上記NGB2004課題の展開に資する。

2) 研究成果

(ア)濃縮ゲノム配列からの多型検出

NGB2004のマップ集団親である「はつもち」および「きたほなみ」を供試した。公開ゲノム情報の17,888遺伝子領域より設計したプローブ(SeqCap EZ Developer Library、Roche)を用いたシーケンスキャプチャでゲノムDNAを濃縮し、GS FLX (Roche)でシーケンスした。品種間多型の検出は、NGB1007「ゲノムワイドSNPを使用したジェノタイピング解析支援」の支援を受け実施した。まず、コムギゲノムのドラフト配列であるIWGSC Survey Sequences¹⁾に対し、GSassembler2.8 (Roche)によりマッピングした。次に、各染色体のリファレンス配列に対しidentityが98%以上のリードをその染色体由来とみなすことにより、他の染色体に座乗する同祖遺伝子との区別を図った。最後に、リファレンスに対しシングルヒットするリード情報のみを用い、各品種・系統のアリルがそれぞれホモであり、かついずれかの品種・系統が異なるアリルを持ち、さらにヒットしたリードが3本以上である箇所のみを多型部位とした。濃縮ゲノムの解読の結果、「はつもち」で1,304,168リード、「きたほなみ」で1,114,866リードが得られた。これらリードのSurvey Sequencesへのマッピングにより、両品種間で12,551箇所の多型を検出した(表1002-1)。多型の種類の内訳はSNPが12,107箇所、In/Delが444箇所であった。また、多型の約96%にあたる12,075箇所が遺伝子およびその上流、下流域に存在していた。

表1002-1 濃縮ゲノム配列より検出された「はつもち」と「きたほなみ」間の多型の染色体分布

ゲノム 腕	染色体群							計
	1	2	3	4	5	6	7	
AS	293	409	137	160	150	287	490	5,293
AL	718	651	529	218	513	292	446	
BS	174	519	1,197	123	241	428	151	6,316
BL	648	929		398	723	512	273	
DS	62	143	23	13	16	63	64	942
DL	56	126	86	17	146	75	52	
計	1,951	2,777	1,972	929	1,789	1,657	1,476	12,551

上記多型箇所のうち、「はつもち/きたほなみRILs」による連鎖地図上の遺伝子由来マーカールと対応付けられたものが2,619箇所あり、うち多型を検出した染色体と同じ染色体にマップされているものは1,807箇所、同祖染色体上にマップされているものが598箇所であった。ビンマップやオオムギ物理地図情報のいずれかと対応付けられた多型は7,543箇所あった。これらについてはコムギ染色体上の位置の推定が可能であることから、マーカール開発候補とした。また、遺伝子もしくは近傍に位置するもののいずれの位置情報とも対応付けられない多型は2,389箇所あった。

(イ) 濃縮ゲノム配列から検出した多型の検証およびマーカール開発

「きたほなみ」および「はつもち」において検出された多型部位についてSurvey Sequencesの遺伝子モデルとの対応付けを行い、遺伝子およびその近傍領域（開始コドン上流および終止コドン下流500bp以内）に存在する多型箇所を抽出した。これら遺伝子および近傍領域の多型部位をオオムギ遺伝子²⁾、PLUGマーカールによるコムギビンマップ³⁾および「はつもち/きたほなみRILs」の連鎖地図上のマーカールに対応付けた。オオムギ遺伝子との対応付けはBLASTPにより、PLUGマーカールおよびRILs地図上のマーカールとの対応付けはBLASTNにより行った。上記連鎖地図上でマーカールが不足している領域に存在すると考えられる多型をマーカール開発の候補箇所とした。

マーカール開発候補の多型箇所について、1,260プライマーセットを設計した（表1002-2）。この際、オオムギの遺伝距離（5~10 cM）およびビンマップ情報をもとに染色体上の位置を推定した。さらに、多型箇所を挟みゲノム特異的な増幅が可能なプライマーを半自動的に設計するためのソフトウェアを開発した。これらプライマーのアンプリコンシーケンスによる検証の結果、83%（1,051箇所）の多型が濃縮ゲノム配列より抽出した結果と一致した。このうち、Dゲノム上のプライマーについて「はつもち/きたほなみRILs」を用いたマッピングを行った（図1002-1）。これにより、Dゲノムの全長は878.4cMから1333.1cMと約1.5倍へ、さらにマーカール間の平均距離は7.1cMから4.1cMと大幅に縮小し、遺伝距離が大きかった箇所にも新たにマーカールを配置できた。

表1002-2 プライマー設計を行った多型箇所の染色体分布

ゲノム	染色体群							計
	1	2	3	4	5	6	7	
A	56	50	47	77	54	53	74	411
B	43	70	65	91	60	65	59	453
D	54	86	58	30	58	44	66	396
計	153	206	170	198	172	162	199	1,260

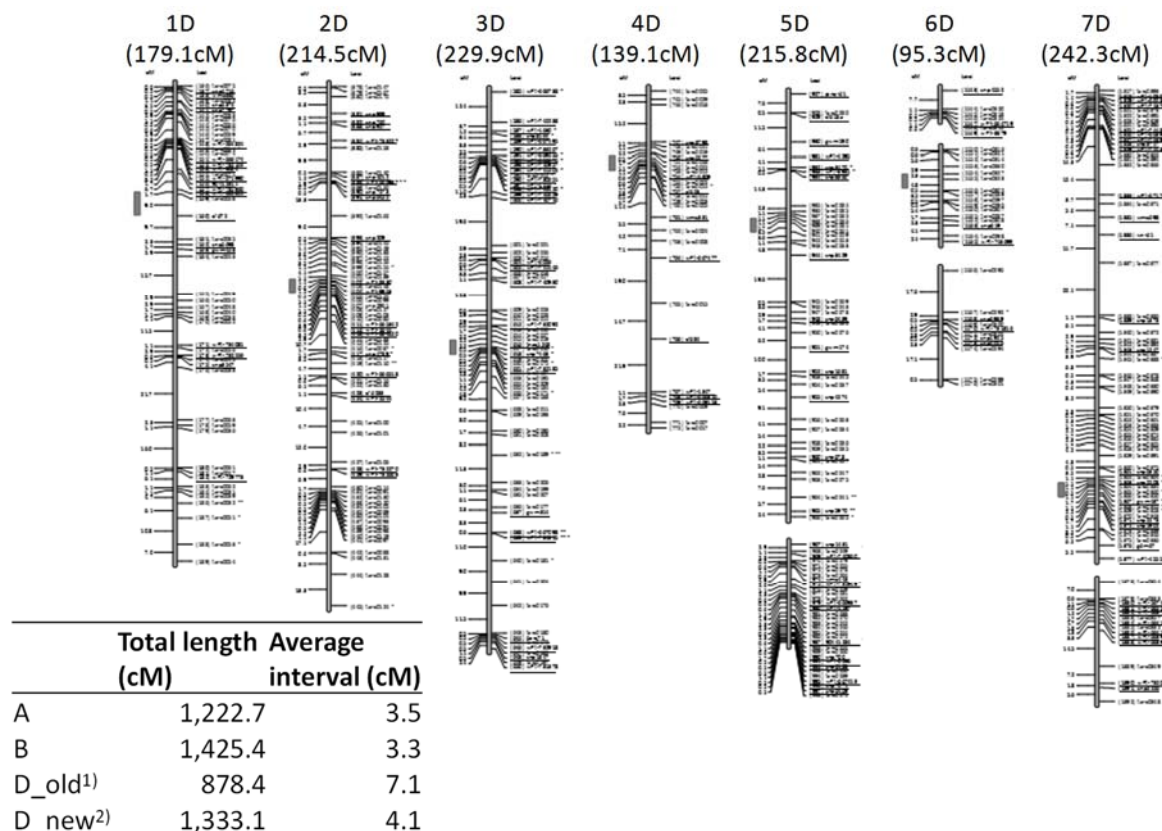


図1002-1 新規開発マーカー（TARC）を追加した「はつもち/きたほなみRILs」の連鎖地図
 既存マーカーには下線を引いた。連鎖地図はMapDisto v1.7.5⁴⁾により作成した。

- 1) 既存マーカーのみを使用した連鎖地図
- 2) 新規開発マーカーを使用した連鎖地図

(ウ) 全ゲノム配列からの多型検出および検証

「きたほなみ」および「はつもち」を用いて、HiSeq2000（イルミナ）による全ゲノムDNAの塩基配列解読を行った。得られたリードはBWA⁵⁾によりSurvey Sequencesにマッピングした。多型検出方法は前述の通りとした。HiSeq2000を用いた全ゲノム配列のシーケンスにより、「きたほなみ」および「はつもち」でそれぞれ約36億リード、約3600億bpの塩基配列が得られた。これら塩基配列のSurvey Sequencesへのマッピングにより、両品種ともに全リードの37%程度がマッピングされた。多型位置間の距離および読みの深度について検討し、多型間距離を200bp以上、深度を10以上とすることで1,089,758箇所の多型が見出された。

全多型箇所中、遺伝子およびその近傍領域には41,628箇所の多型が存在していた（表1002-3）。これら遺伝子領域の多型のうち、3,328箇所については上記濃縮ゲノムから抽出されたもの

と一致していたが、38,300箇所の多型が新規のものと判断された。全多型箇所（イ）において既にプライマーを設計済み、および「はつもち/きたほなみRILs」連鎖地図の位置情報がある多型は9,062箇所であり、全く位置情報のない10,302箇所を除く22,264箇所がオオムギゲノム情報およびコムギビンマップと対応付けられ、これらを新規マーカー開発候補とした。抽出したDゲノム上の多型情報を、「はつもち/きたほなみRILs」連鎖地図と比較し、マーカーの薄い領域を対象に288セットのプライマーを設計した。これらプライマーを用いた増幅産物のアンプリコンシーケンスの結果、266箇所（92%）の多型が全ゲノム配列より抽出した多型と一致した。

表1002-3 全ゲノム配列解読から抽出された遺伝子領域に存在する多型の染色体分布

ゲノム 腕	染色体群							計
	1	2	3	4	5	6	7	
AS	896	1,458	408	455	589	521	1,253	5,580
AL	2,496	1,855	1,468	1,129	1,478	730	1,388	
BS	546	1,828	3,855	642	978	1,197	545	5,736
BL	1,729	2,842		1,096	3,224	1,598	895	
DS	221	393	128	228	152	194	374	1,690
DL	345	371	285	277	741	368	452	
計	6233	8747	6144	3827	7162	4608	4907	41628

(エ) 濃縮ゲノムシーケンスによる国内品種間多型情報の拡充

「しゅんよう」、「東北224号（ゆきはるか）」および「キヌヒメ」を供試して、上述のシーケンスキャプチャによる濃縮ゲノムシーケンスを行ったところ、「しゅんよう」で1,320,554リード（692Mbp）、「東北224号」で1,582,595リード（830Mbp）、「キヌヒメ」で1,383,812リード（899Mbp）が得られた。これらの塩基配列情報より得られた「きたほなみ」に対する上記3品種・系統の多型箇所は、それぞれ13,160箇所、16,284箇所、14,291箇所であった（図1002-2）。これらのうち、これまでに「きたほなみ」「はつもち」間で見出された多型と同位置にあるものは10,697箇所であった。さらに、それらの910箇所については、すでにプライマー設計・検証済みであることから、上記3品種・系統を片親に持つ集団にも利用可能であると判断された。また、今回新規と判断された多型は13,677箇所であった。

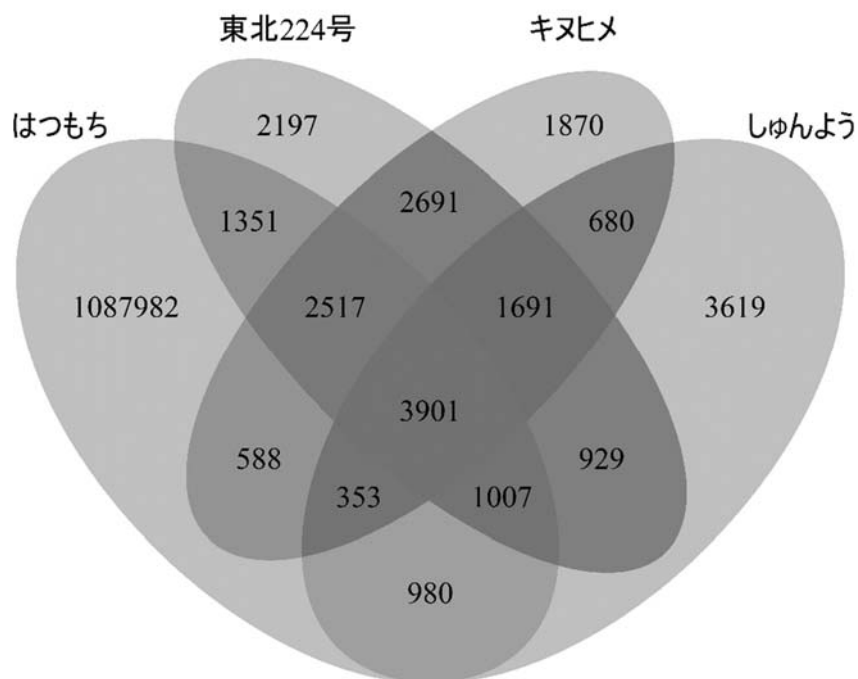


図1002-2 「きたほなみ」に対する品種・系統間多型数

「きたほなみ」「はつもち」間の多型数は濃縮ゲノム配列（12,551箇所）および全ゲノム配列（1,089,758箇所）より抽出された総数を示す。重なっている部分はそれぞれの品種・系統間で共通な位置に見出された多型数を示す。

(エ) マルチプレックスPCRの検討

アンプリコンシーケンスによるジェノタイピングを効率的に行うために、マルチプレックスPCRにおいて1反応で利用できるプライマーの上限数の検討を行った。その結果、48プレックスでも増幅が見られるものがあったが、多くは32プレックスで安定して増幅した（図1002-3）。しかし、組み合わせによっては目的産物がほとんど増えない場合があることが判明した。

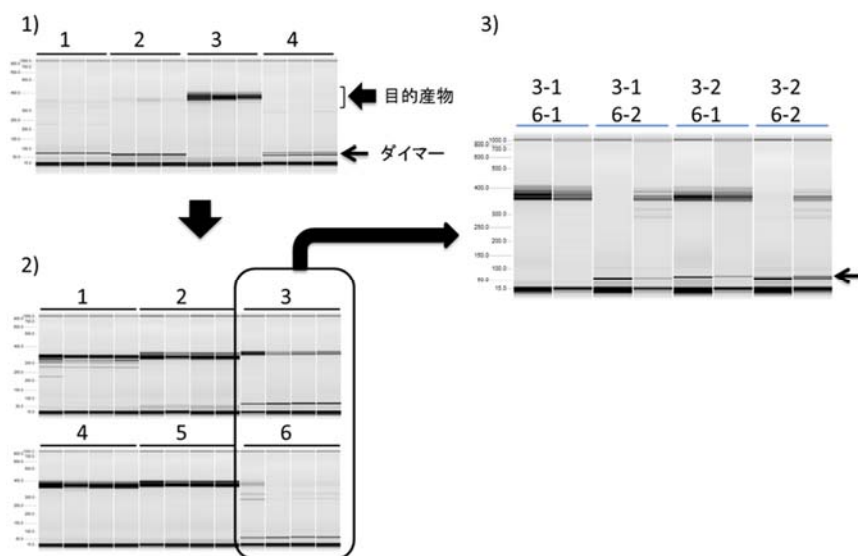


図1002-3 マルチプレックスPCRの検討

- 1) 48プレックス。3以外は目的の産物よりもダイマーが増えている。
- 2) 32プレックス。目的産物が良く増えているもの（1、2、4、5）と、ダイマーが多く増えている組み合わせ（3、6）がある。
- 3) 32プレックス。2) の3、6を半分（16プライマーセット）に分け（3-1、3-2、6-1、6-2）、それぞれを組み合わせでPCRした。6-2を加えたときにダイマーの増幅が優勢となり目的産物の増幅が悪い。

3) 成果活用における留意点

(ア) 濃縮ゲノム配列から検出した品種・系統間多型情報は、96%以上が遺伝子およびその近傍に位置していたことから、シーケンスキャプチャにより効率的に遺伝子領域を濃縮できたと考えられた。本手法を他の品種に対して用いることによって、遺伝子領域の多型情報を効率的に蓄積していくことができる。

(イ) 全ゲノム配列から検出した品種間多型のうち、遺伝子領域に位置する多型は3.8%ほどであった。しかし、この多くはあらかじめプローブ配列を選定する必要がある濃縮ゲノム配列からは得ることのできない領域の多型であることから、これらの情報はマーカーの不足している領域へのマーカー開発に利用できる。

(ウ) 既存のアレイ基盤を用いたジェノタイピング手法では、6倍体のコムギゆえの同祖遺伝子による干渉や、アレイの設計が欧米の品種に由来するため国内品種では多型頻度が低いといった問題がある。本課題で検討を進めたアンプリコンシーケンスによるジェノタイピング手法では、プライマー設計ツールを開発したことによりゲノム特異的な増幅が可能となり同祖遺伝子間の干渉の問題は回避可能と考えられた。また、国内品種由来の多型情報をもとに開発したマーカーということで国内の育種材料への積極的な利用が期待される。

4) 今後の課題

(ア) 本課題ではDゲノムを中心にマーカー開発、連鎖地図作成を行ったが、ゲノム選抜で高い予測精度を得るためには染色体に均一に分布するマーカーセットの存在が必要であると考えられる。今後は、今回開発したマーカーではカバーされていない領域に今回の確立した手法を用いてさらにマーカー開発を進める必要がある。また、本課題で開発したマーカーは国内品種・系統間において高い多型頻度を示した（NGB2004）。本課題では5品種・系統のみを用いて多型検出およ

びマーカー開発を進めたが、引き続き国内品種・系統間で多型頻度の高いマーカーセットの整備が必要であり、そのための研究継続が望まれる。

(イ) アンプリコンシーケンスによるジェノタイピング手法は既存のアレイ基盤に比べて比較的成本が安いというメリットがある。今後、高次マルチプレックスを行う際のプライマーの数や組み合わせなど、よりコストを下げるための最適なPCR条件の検討をさらに進める必要がある。

参考文献

- 1) The International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 345(6194): 1251788.
- 2) The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491(7426), 711-716.
- 3) Ishikawa G., Nakamura T., Ashida T., Saito M., Nasuda S., Endo T., Wu J. and Matsumoto T. (2009) Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers. *Theor. Appl. Genet.* 118(3): 499-514.
- 4) Lorieux M. (2012) MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Mol. Breed.* 30(2): 1231-1235.
- 5) Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25(14): 1754-1760.

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発 (NGB)

小課題番号: NGB1003

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: コムギ 6 B 染色体ゲノム配列の高精度化とゲノム情報基盤の整備

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・育種法開発ユニット・小林史典

1) 研究目的

本研究では、これまでの解析データをさらにブラッシュアップし精密化・高精度化することを目指して、コムギ6B染色体を構成するMTP BACの配列について、アセンブルされたコンティグの位置や方向を決定し、スキヤフォールドの精度を向上させることを目的としている。また、高精度化した配列データを、染色体遺伝地図等にリンク付けし、遺伝子アノテーションや発現情報を付与することにより、育種等のコムギ研究に応用可能なゲノム情報を提供することや、国際コムギゲノム解読コンソーシアム (IWGSC) からの他染色体ゲノム情報を積極的に導入し、6B染色体にとどまらないコムギゲノム情報基盤を確立する。

2) 研究成果

(1) BAC 物理地図の精密化

6B染色体(推定サイズ914 Mb)の91%をカバーする689個のBACコンティグを染色体上に整列させるために、DNAマーカーによるアンカーリングと染色体地図の構築を行った。6B染色体の86%をカバーする454個のBACコンティグに2616個のDNAマーカーをアンカーすることができた。このうち、6B染色体特異的な500マーカーを用いてradiation hybrid (RH) マップを構築し、6B染色体の81%をカバーするBACコンティグ390個の整列に成功した。以上のBAC物理地図の構築の成果を、BMC Genomics 誌に論文発表した(Kobayashi et al. 2015)。構築された物理地図の情報は、フランス国立農学研究所 (INRA) の「Wheat URGI」サイト内の「Wheat physical map viewer」にて、IWGSCで解析されている他の染色体とともに公開された(図1)。

全BACコンティグについて塩基配列情報(下記の一次配列データ)を取得し、塩基配列解読の材料となるminimal tiling path (MTP) クローン間のオーバーラップ部分の配列調査を行った。その結果、全オーバーラップ領域の97.2%で正常なオーバーラップが確認された。異常が見られた2.8%については、ブリッジクロンの探索およびBACコンティグの修正を行い、最終的なBACコンティグは830個となった。

BACコンティグの修正に伴い、RHマップの更新を進めた。未アンカーのBACコンティグについては、コンティグに含まれるMTPクロンの配列情報をもとにユニーク配列を探索し、新規マーカーを開発した。その結果、最終的に958マーカーから構成されるRHマップ(672遺伝子座)を構築した。このRHマップ上に623個のBACコンティグを整列させることができ、pseudomoleculeの基盤構築に成功した。

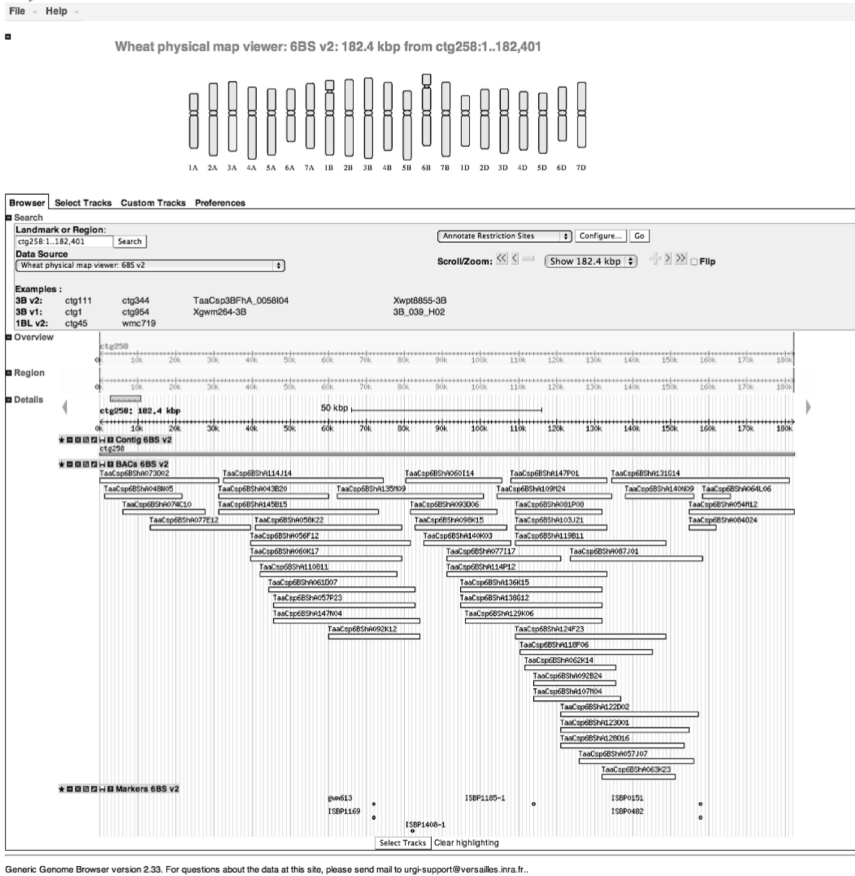


図 1 6B染色体BAC物理地図情報の公開（6BSのBACコンティグCTG258のgenome viewerの例）

（ 2 ） 塩基配列情報の高精度化

物理地図上の 8130 個の MTP クローンについて、個別にタグ付けしたプール化ライブラリを作成し、次世代型シーケンサ (Roche GS FLX) で解読してアセンブリ（一次配列データ）を構築した。また、これらの MTP クローンを対象にしたメイトペアライブラリ（3 kb、8 kb）を作成し、次世代型シーケンサ（イルミナ MiSeq）で解読した。得られた配列情報を用いて、MTP クローン間のオーバーラップ部分の調査（上記物理地図の修正）、アセンブリの整列化（スカフォールドリング）を行った。その結果、7086 クローンより構成される、687 Mb の Pseudomolecule（高精度ゲノム配列アセンブリ）ver.1.0 を構築した。これは、7635 個のスカフォールドより構成され、最大長は約 3.14 Mb、平均長は 94 kb であった。

その後、物理地図および配列情報の修正等を加え、7131 クローンで構成される 679 Mb のゲノム配列アセンブリに更新した。これは、5660 のスカフォールドで構成されており、最大長は約 4.0 Mb、平均長は約 120 kb であった。Pseudomolecule ver.1.0 と比較して、信頼性の低い配列情報の削除によって配列全長は短くなってはいるが、平均長、最大長、N50 のいずれも増加しており、スカフォールドとしては改善されていることが示された（表 1）。

このアセンブリに対して、26 年度に公開した概要ゲノム配列情報（イルミナシーケンサによるショートリードデータ、IWGSC 2014）を使ってギャップ埋めおよびエラー修正を行った。その結果、アセンブリ全長は 680 Mb に更新された。また、メイトペアライブラリの解析結果に基づいて、個々のア

センブリ間のギャップ長を推定し、その数値に相当する「N」を挿入した。最終的に、688 Mbの6B染色体ゲノム配列アセンブリ (Pseudomolecule ver.2.0) を構築した (図2)。RH マップの結果に基づき、位置情報が付加されたゲノム配列アセンブリは648 Mbであり、6B染色体全体のゲノム配列の95%を占めた (図2)。以上の結果から、正確な位置情報を持つ高精度なゲノム配列が構築されたと考えられる。

表1 スキャフォールド結果の比較

	ver.1.0	ver.2.0
BACクローン数	7,086	7,131
スキャフォールド数	7,635	5,660
配列全長 (bp)	687,555,957	678,785,916
平均長 (bp)	90,053	119,927
最大長 (bp)	3,140,367	3,998,456
N50 (bp)	459,245	544,679
スーパースキャフォールド数	871	830
平均長 (bp)	789,353	817,814

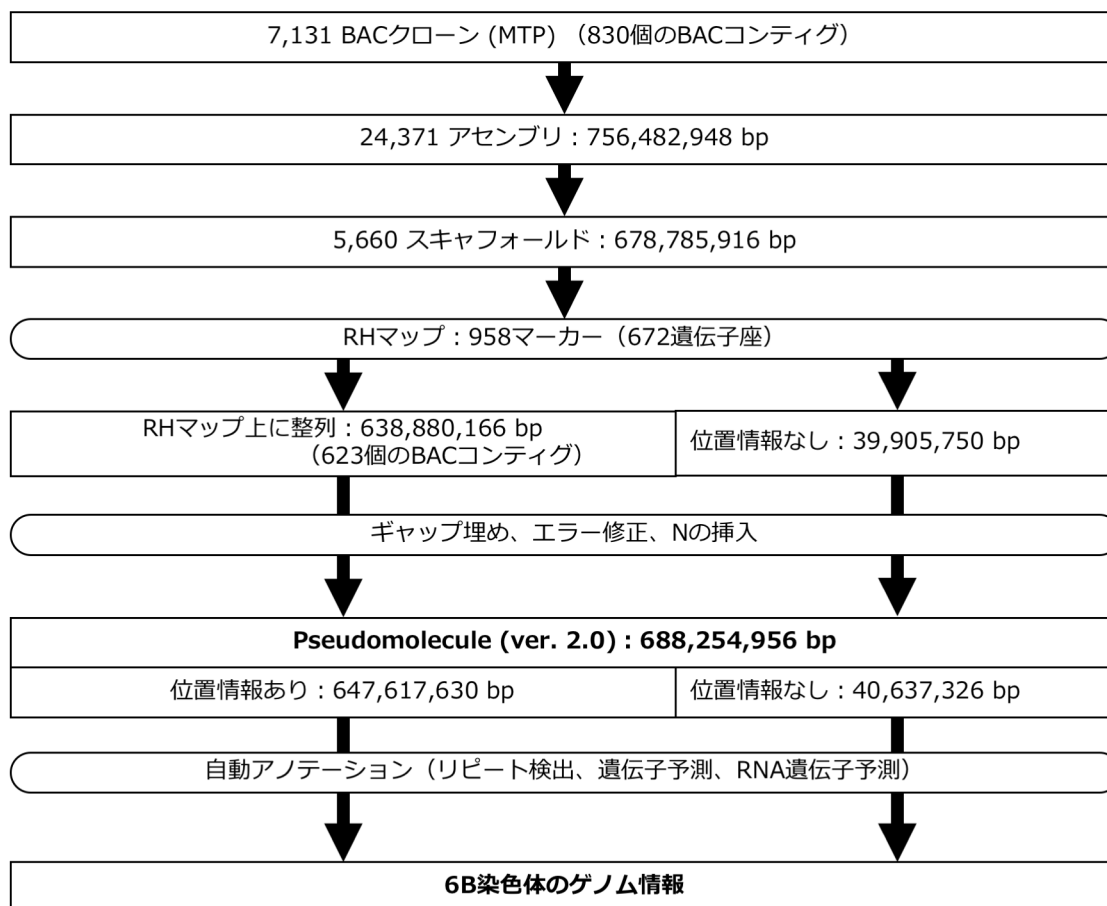


図2 コムギ6B染色体のゲノム情報の構築

7,131クローンから得られたゲノム配列アセンブリ (約756Mb) のscaffoldingにより、約679Mbのゲノム配列が構築された。エラー修正などにより、約688MbのPseudomolecule (ver.2.0)が構築された。RHマップの結果から、その内の95%を占める約648Mbに位置情報が付加された。

(3) ショットガンシーケンス解析による 6B 染色体概要配列の解読

染色体ソーティングで得られた 6B 染色体特異的ゲノム DNA を鋳型として、次世代シーケンサー (Roche GS FLX) を用いて、6B 染色体の概要塩基配列を解読した。6B 染色体短腕 (6BS) と長腕 (6BL) それぞれから 4.94 Gb と 5.51 Gb のショットガン配列データが得られ、アセンブルの結果、それぞれの染色体腕の 55.6% 及び 54.9% をカバーする 235 Mb 及び 273 Mb の塩基配列が得られた。配列の 77% あるいは 86% は反復配列で占められていた。また、コムギのトランスクリプトームデータ等の発現データを基に、4798 の遺伝子座を予測した (表 2)。この成果は DNA Research 誌に論文発表した (Tanaka et al. 2014)。

表 2 コムギ6B染色体の概要配列解読

	6BS (415Mb)	6BL (498Mb)
総リード数	12,873,283	12,082,150
総塩基数 (bp)	4,941,174,940	5,507,636,827
平均リード長 (bp)	383.83	456.00
コンティグ数	262,375	173,655
アセンブル後の総塩基数(bp)	234,772,755	273,193,549
N50 (bp)	1,107	2,675
発現証拠のある遺伝子領域	2,032	2,766
平均深度 (サイトあたりのリード数)	9.05	10.1
リピートマスク率 (%)	76.6	85.5

コムギ転写産物マッピング(84,164 FLcDNAs/mRNAs and 1,286,173 ESTs) と遺伝子予測プログラムを組み合わせた結果。

(4) 全ゲノム参照配列の構築

IWGSC では、国際分担任で行っている染色体ごとの解析を進める一方で、全ゲノムアセンブリ (Whole genome assembly; WGA v0.4) を作成し、両者の解析データを統合して、全ゲノム参照配列を構築することとなった (図 3)。そこで、これまでに蓄積してきた 6B 染色体の解析データのうち、BAC クローンのフィンガープリントデータ (新農業展開ゲノムプロジェクト KGS1003 での解析結果)、MTP クローンの一次配列データ (本プロジェクト解析結果) を IWGSC に提供した。これらのデータを使って、WGA のスカフォールドの位置や向きを修正およびアセンブル間のギャップ埋めが行われ、全ゲノム参照配列 (IWGSC RefSeq v1.0) を構築した (図 4)。

Roadmap to the Wheat Genome Sequence

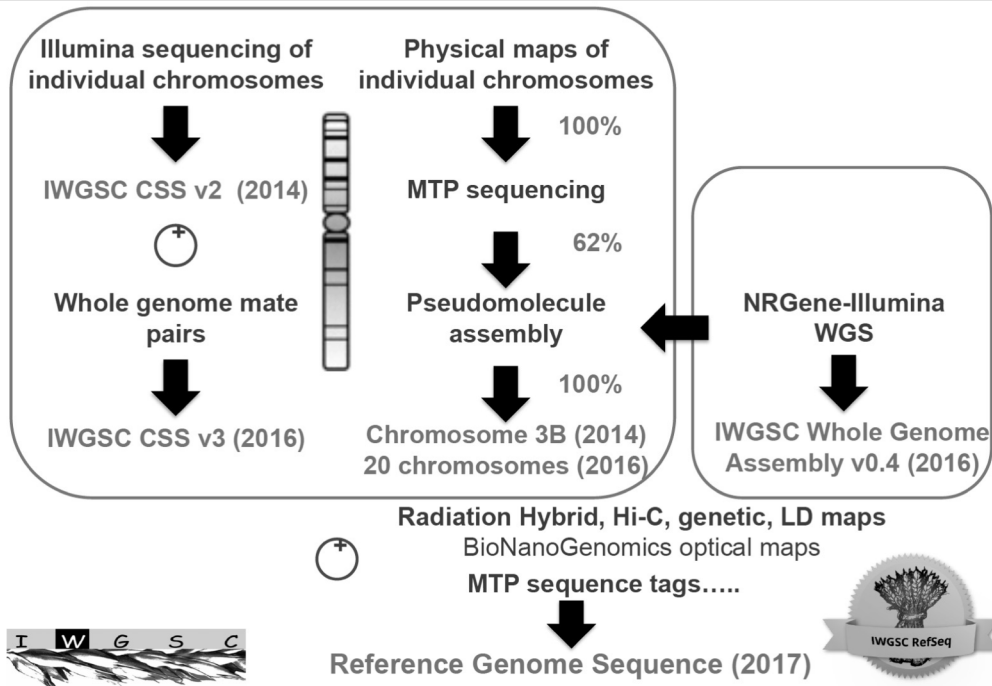


図3 コムギ全ゲノム参照配列の公開までのロードマップ (IWGSC提供資料より転載)
各染色体のBAC-by-BAC解読データ、概要ゲノム配列 (2014年公開)、全ゲノムショットガン配列 (Whole Genome Assembly) など統合して、世界初のコムギ全染色体の参照ゲノム配列を構築し、2017年に公開した。

Comparison of IWGSC Assembly Releases

	IWGSCv0.4	RefSeqv1.0
Number / coverage of scaffolds/contigs	138,607 / 14.5 Gb	138,665 / 14.5 Gb
Number / coverage of scaffolds/contigs >=100kb	4,442 / 14.2 Gb	4,443 / 14.2 Gb
N50 scaffolds / superscaffolds	7.0 Mb	22.8 Mb
L50 (no. sequences → N50)	566	166
N90 scaffolds / superscaffolds	1.3 Mb	4.1 Mb
L90 (no. sequences → N50)	2363	718
Gaps filled with BAC sequences		183 (1.7 Mb)
Average size of inserted BAC sequences		9.5 kb
Sequence assigned to chromosomes	14.1 Gb (96.8%)	14.1 Gb (96.8%)
Sequence assigned to chromosomes (>=100kb)	14.1 Gb (99.1%)	14.1 Gb (99.1%)
No. scaffolds / superscaffolds on chromosomes	3,975	1,601
No. oriented scaffolds / superscaffolds	2,464	1,243
Oriented sequence	13.1 Gb (90.2%)	13.8 Gb (95%)
Oriented sequence >=100kb	13.1 Gb (92.4%)	13.8 Gb (97.3%)



図4 IWGSC RefSeq v1.0の構築結果 (IWGSC提供資料より転載)

28年度に公開されたWGA v0.4に、これまでに世界各国で蓄積された物理地図などの解析結果を統合し、RefSeq v1.0を構築した。

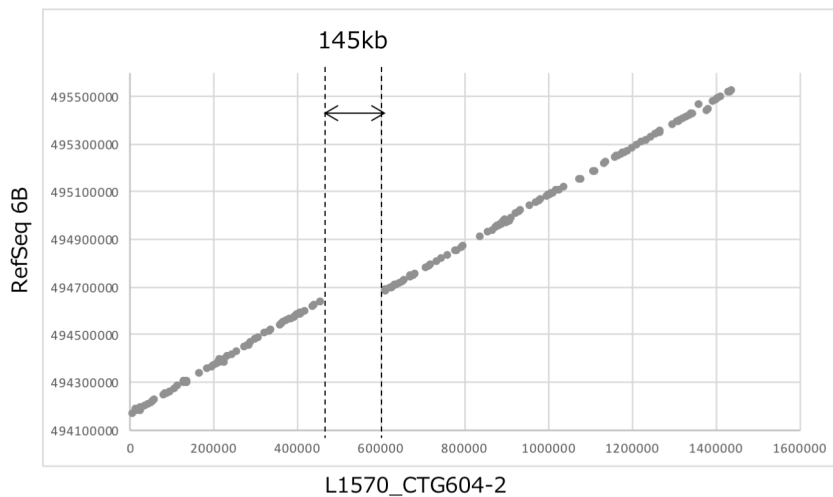


図5 BACコンテグL1570_CTG604-2とRefSeq 6Bゲノム配列との比較
 両者の比較から、L1570_CTG604-2上の約145kbに及ぶ領域が、RefSeq 6B上に存在しなかった。

RefSeq の 6B 染色体ゲノム配列（以降 RefSeq 6B）と Pseudomolecule ver.2.0 との比較・検証を行った。その結果、Pseudomolecule ver.2.0 上の 13 か所が RefSeq 6B 上に存在しなかった。その長さは約 3.8 Mb に及び、13 か所のうち 8 か所には合計 45 個の遺伝子配列が検出された。このうち 7 か所については、6B 染色体の座乗性が確認でき、この領域には 25 個の遺伝子配列が含まれた。この調査から、RefSeq にはこのようなミスアセンブリが他にも存在している可能性を示し、RefSeq だけでなく BAC 配列情報の重要性を強く支持した（図 5）。

（ 5 ） 遺伝子アノテーションと情報基盤構築

6B 染色体の Pseudomolecule ver.2.0 に対して、自動アノテーションパイプラインによるアノテーションを開始した（図 6）。RepeatModeler による新規リピートライブラリ作成後、既知のライブラリである TREP リピートライブラリを加えた 2 種類のリピートライブラリを用いて、censor によるリピートマスキングを実行した。それぞれのライブラリにより、ゲノム配列全体の 83.3%、75.2% の領域がマスクされた。

次に、IWGSC が作成した遺伝子アノテーションデータ（Gene models v2.2; IWGSC 2014）を使って、遺伝子構造予測を行った。その結果、6B 染色体の Pseudomolecule ver.2.0 上に 3482 個の遺伝子配列を検出した。一部を除き、これらのほとんどは RefSeq 6B 上にも存在していた。

ポータルサイト KomugiGSP を構築し、25 年度に一般公開した（図 7）。このサイトでは 6B 染色体の概要配列解析論文（Tanaka et al. 2013）のゲノム配列情報に関して、データダウンロードできるようにした。また 29 年度からは、これまでの解析データの公開のための KomugiGSP サイトの更新作業を行った。ゲノムブラウザ、BLAST 検索システム、BAC 検索システム等を構築した（図 7）。特に BAC クローン情報は、重要なゲノムリソースである。BAC 配列情報及び染色体上の位置情報を充実化させることで、RefSeq 情報との差別化を図る。また RefSeq 6B との比較解析結果を公開することで、RefSeq 6B の補完データとして本データベースの有用性を向上させる。

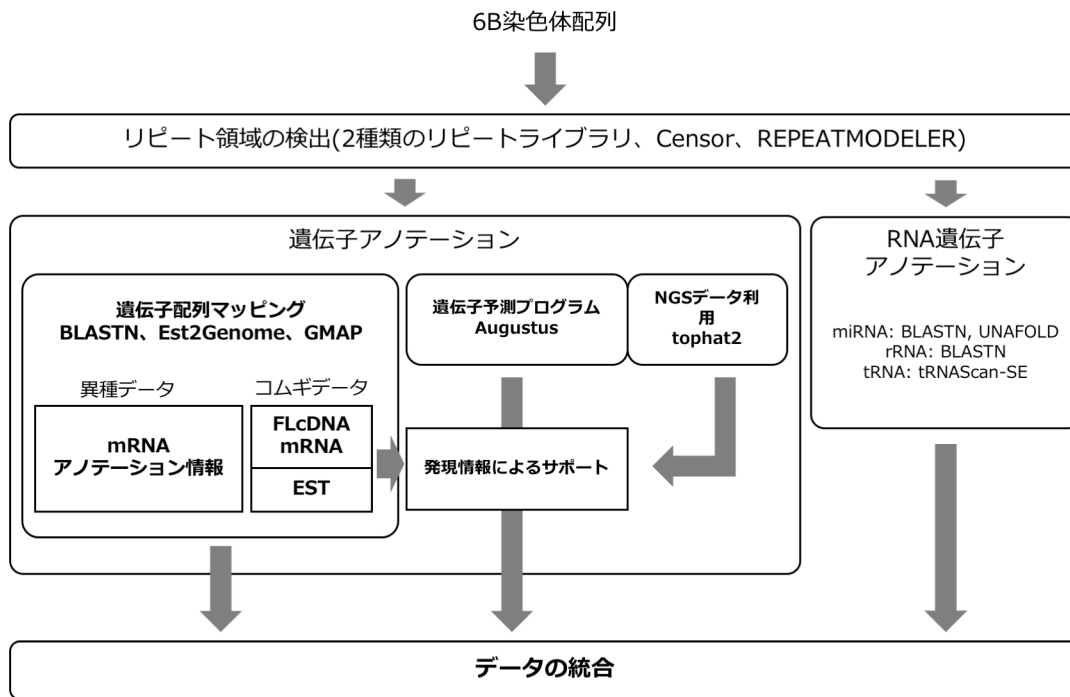


図6 コムギ6B染色体のアノテーションワークフロー
構築されたゲノム配列に対して実行された自動アノテーションパイプラインの概要を示している。

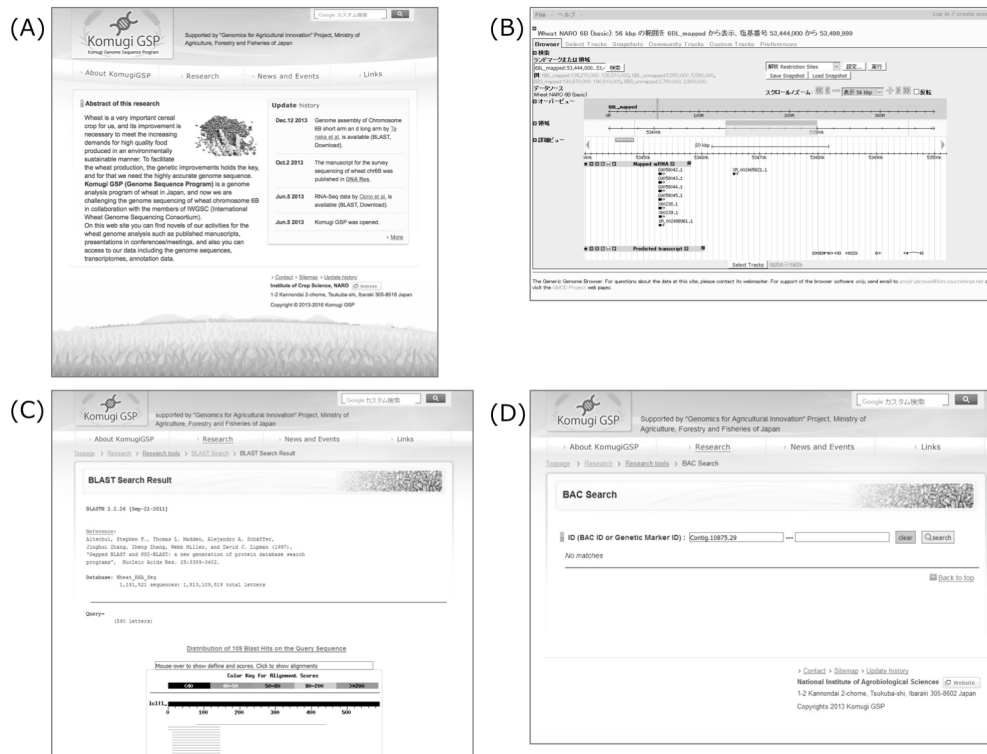


図7 KomugiGSPポータルサイト
6B染色体のゲノム解析データを公開するために、KomugiGSPサイトを作成した。(A) トップページ、(B) ゲノムブラウザ、(C) BLAST検索システム、(D) BAC検索システム。

3) 成果活用における留意点

コムギの全ゲノム情報については、RefSeq の配列情報、遺伝子アノテーション情報などが、フランス INRA の「Wheat URGI」サイトより入手可能となる。また、ゲノムブラウザ、BLAST 検索システムも同サイトからの利用が可能である。一方で、6B 染色体の BAC ベースのゲノム情報については、本研究課題で整備した KomugiGSP サイトから公開する。RefSeq の補完的なデータベースとしての活用を広く呼びかける。

4) 今後の課題

RefSeq を利用した研究が今後増加すると予想される。そこから見えてくるであろう RefSeq の修正すべき点、例えば本研究での RefSeq の検証から見つかった部分的なミスアセンブリの存在など、将来的な RefSeq のアップデートを見越して、コムギ研究コミュニティからの情報収集が必要である。

RefSeq の先行利用から、材料に用いた Chinese Spring だけではコムギのゲノム研究に不十分であることがわかってきた。研究対象となる他の品種・系統のゲノム情報の取得方法について、コムギに適した技術を開発することが強く望まれる。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発 (NGB)

小課題番号: NGB1007

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ゲノムワイド SNP を使用したジェノタイピング解析支援

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 次世代作物開発研究センター・ゲノム育種推進室・片寄裕一

1) 研究目的

作物ごとのゲノムデータを活用し、ジェノタイピング支援を進め、また、次世代シーケンサーなどから算出される大量データを解析し、バイオインフォマティクスの技術によって SNP などのマーカー作成を速やかに行える体制を確立するとともに、支援課題、作物ごとの具体的要請に合わせて実際にデータ解析、データ作成の支援を行う。

2) 研究成果

NGB1001 (および 2003) (ダイズ)、1002 (コムギ)、1003 (コムギ 6 B ゲノム配列決定)、1004 (野菜)、1005 (および 2008) (果樹 (バラ科))、1006 (および 2009) (果樹 (カンキツ))、2002 (イネ) の各課題について、支援解析を進めた (図 1)。ホールゲノムジェノタイピング解析を進めるためには、作物ごとにゲノム塩基配列情報を必要とする。公的データベースからダウンロードした塩基配列情報、以前のプロジェクトで解析した塩基配列情報、外注により取得したゲノム塩基配列データは、相互に比較、既存の配列との比較をすることで必要とする品種間での SNPs の抽出を行ない、それらを元にジェノタイピング解析に用いる Custom Oligo Assay Pool (OPA) のデザインを行ない、開始当初は NGB1001、1005、1006 では GoldenGate Assay 法によるゲノムワイドな SNP を多サンプル、ハイスループットに解析を行った。NGB1001 では国産ダイズ品種の塩基配列解読によってこれまでに集積されている SNPs 情報を活用し、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) やゲノミックセレクション (GS) への運用場面に対応できる SNP マーカーを拡充し、小数の SNPs からなるジェノタイピングパネルを開発するために、Infinium 解析、GoldenGate Assay 用 OPA 作成および GoldenGate Assay 解析支援を行った。NGB1005 ではリンゴ「ふじ」のシーケンス情報から「ゴールデンデリシャス」ゲノム配列間での SNPs を抽出し、ゲノムワイド SNP セットを構築し、GoldenGate Assay などのハイスループットジェノタイピング解析システムに供し、解析支援を行った。ナシについてもゲノムワイド SNP セットを構築し、GoldenGate Assay などのハイスループットジェノタイピング解析システムに供し、解析支援を行った。GoldenGate Assay 法の終了により、ジェノタイピング解析を Fluidigm Assay に移行し、解析を進めた。NGB1006 ではカンキツの全ゲノム情報と SNPs マーカーの解析からカンキツ品種間に適応可能な SNPs マーカーを開発し、GoldenGate Assay などのハイスループットジェノタイピング解析システムに供し、解析支援を行った。さらに、Genotyping by Sequence 法の試行及びデータ解析を進めた。

アンプリコンシーケンスを行なう NGB1002 については、Sequence capture により得られたデータより、遺伝子内の SNP の抽出、プライマー設計を進め、Sequence capture、アンプリコンシーケンスを行ない、得られるデータから情報解析を進めた。NGB1004 ではジェノタイピングが GoldenGate Assay (イルミナ) ではなく Axiom (アフィメトリクス、現サーモフィッシャーサイエンティフィック) を利用するため、キャベツゲノム情報から得られた SNP より、プライマー設計を行ない、ジェノタイピング解析に供した。また、デスクトップ次世代シーケンサー MiSeq をつかって、得られた SNPs 情報の検証を進めた。

NGB1003 ではコムギ 6 B 染色体の塩基配列解読における配列の精度を向上させることを主な目的とし、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解読を進めた。NGB2003 では GoldenGate Assay の支

援を行った。

ジェノタイピング、シーケンスに関する実験は大わし地区で、ゲノム配列からのSNPsの抽出など情報解析は観音台第3事業場で行なわれた。

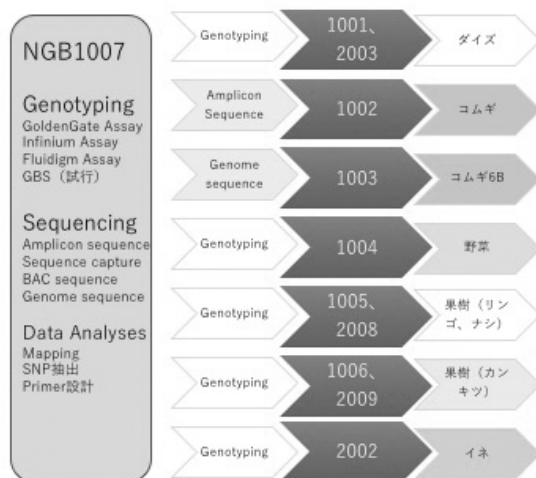


図1 NGB1007と各個別課題との関係

3) 成果活用における留意点

本課題は他の課題の支援であり、ここでの解析データはそれぞれの課題でさらに解析を加え活用していくものである。NGB1007で使用、開発した解析手法については広く他の課題で利活用されるものであり、この課題での留意点はない。

4) 今後の課題

今後もこのような支援システムは円滑に課題を進めるためには重要である。一方、この5年間で起こった問題点として、イルミナ社のGoldenGateAssayシステムの販売終了が挙げられる。Fluidigm Assayやアンプリコンシーケンスなど他の手法も導入したが、解析規模ではGoldenGateAssayシステムに置き換わるものではなかった。このような販売中止は突然のことで想定外であった。次世代シーケンサーなど最新解析機器は過度な世代交代を繰り返しており、補助的な解析手法も含めて進めていく必要がある。また、このプロジェクトでは大幅な予算減が2回あり、課題数の減少にともなう支援課題の変更、組換え、解析手法の選択肢が減るなどと言った弊害があった。結果的にはプロジェクト全体としては目的を達成したが、個別課題については問題が残ったと思われる。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成25～29年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号: NGB2001

研究期間: 平成25～27年度

小課題名: イネの収量性向上に向けたゲノミックセレクションの実証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・イネゲノム育種研究ユニット・堀清純

1) 研究目的

作物の収量性は多数の遺伝要因や環境要因が関係する複雑形質であり、少数遺伝子の導入を対象とした従来のDNAマーカー育種だけでは十分な改良効果を期待することが難しい。ゲノミックセレクション手法は全ゲノムに分布するDNAマーカーを用いて個体や系統の遺伝的能力(遺伝子型値)を予測して選抜を進める手法であり、多数の量的形質遺伝子座(QTL)の効果を同時に考慮できることから育種選抜を大幅に加速させる可能性がある。近年、乳牛などの家畜育種においてゲノミックセレクションの有効性が報告されており、実用化研究が精力的に進められている(Hayes *et al.* 2009)。作物においても、収量性を含む重要形質の多くは効果の小さなQTLが多数関与していることから、ゲノミックセレクションの活用が大きく期待されている(原ら2015)。本研究では、現有の戻し交雑自殖系統BILs(Backcross Inbred Lines, BILs)等の実験系統群から派生した交配後代集団を対象に、イネの育種選抜におけるゲノミックセレクション手法の実証研究を行う。

2) 研究成果

(1)、(2)、(3) コシヒカリ/タカナリのBILsおよびゲノム断片化集団の養成と収量性の評価

コシヒカリとタカナリのBILs(89系統)について、931個のSNPマーカーによる全ゲノム遺伝子型を明らかにした。2年間にわたりBILsの簡易生産力検定試験を行い、出穂期、稈長、粗玄米重および籾重などの収量関連形質を評価した。複数年次の収量試験の結果、単年度ではタカナリより高い粗玄米重を示す系統を見出すことができた(図1)。

一部のBILsをトレーニング集団とした形質予測モデルを構築し、それ以外のBILsの表現型を推定するクロスバリデーション解析を行った。その結果、粗玄米重、粒重などの収量関連形質において、シミュレーションによる予測値と実測値の間で相関係数0.41以上の有意な関係を見出すことができた。この値は遺伝率換算で0.17程度と考えられ、取得した遺伝子型データから各BILの表現型を十分に予測可能であり、ゲノミックセレクション手法による選抜効果が期待できると考えられた。

ゲノミックセレクションを進める選抜集団を作出するために、交配によりゲノム断片が小さくなり高収量を示す系統が後代で出現すると考えられるBILsを4系統選定した。予測解析の結果、その4系統の交配後代においてタカナリよりも多収を示す系統が出現する可能性が示唆された(図2)。そこで4系統のBIL同士を交配し、400個体以上の四元交配のF₁種子を取得した。世代促進を行い、F₄～F₅世代の後代集団を作出した。

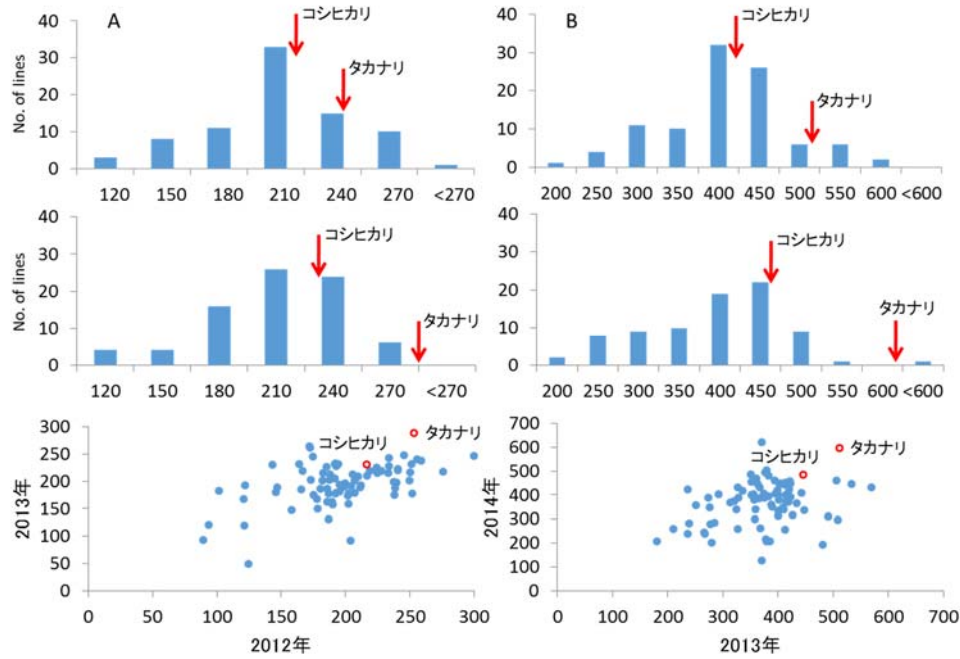


図1 コシヒカリ/タカナリのBILsにおける粗玄米重の2012年と2013年の頻度分布および年次間相関(A: 作物研究所、B: 九州沖縄農業研究センター)。

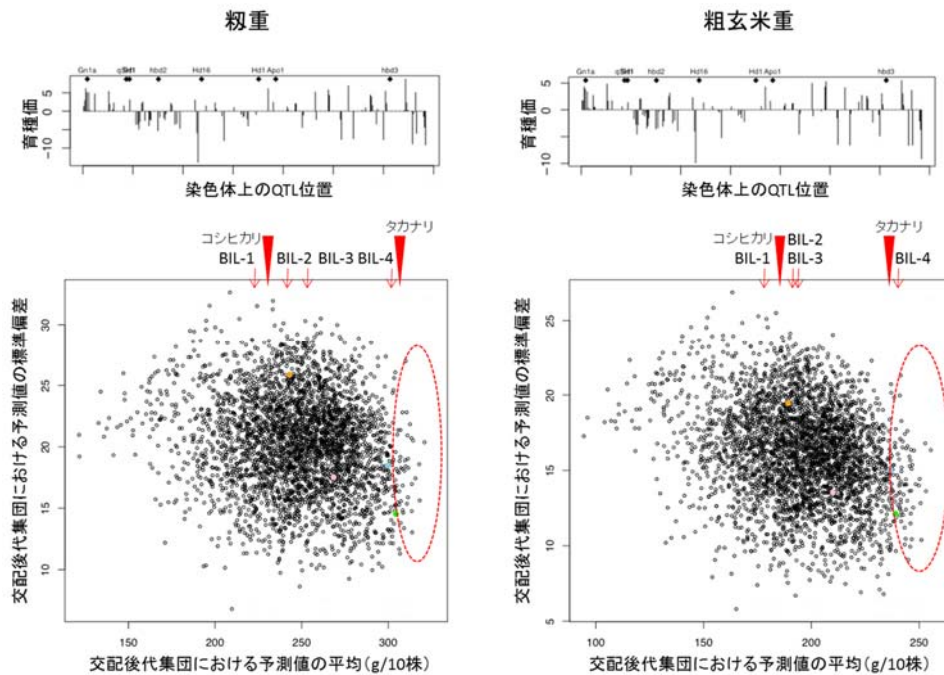


図2 コシヒカリ/タカナリのBILsの四元交配に由来する後代集団における粒重および粗玄米重の予測頻度分布。赤い点線の範囲内に位置する黒点は、後代集団においてタカナリやBILsより多収を示すと予測された個体を示す。

(1)、(4) 日本晴/コシヒカリのBILsおよびゲノム断片化集団の養成と収量性の評価

日本晴とコシヒカリのBILs(100系統)について、647個のSNPマーカーによる全ゲノム遺伝子型を明らかにした。これまでに取得したBILsの簡易生産力検定試験の結果(Hori *et al.*

20123))を用いて、出穂期、稈長、粗玄米重および籾重などの収量関連形質のQTL解析を行った。QTL解析の結果、千粒重などの収量関連形質において出穂期遺伝子と同じ染色体位置にQTLが見出され、この集団では出穂期が収量性に大きく影響することが明らかとなった(図3)。

一部のBILsをトレーニング集団とした形質予測モデルを構築し、それ以外のBILsの表現型を推定するクロスバリデーション解析を行った(図4)。出穂期、千粒重などの農業形質において、シミュレーションによる予測値と実測値の間で相関係数0.61以上の有意な関係を見出すことができた。しかしながら精玄米重などの一部の収量関連形質では、予測精度が0.10以下と低かった。

ゲノミックセレクションを進める選抜集団を作出するために、高収量を示す系統が後代で出現すると考えられるBILsを2系統選び、そのBIL同士を交配して400個体以上の二元交配のF₁種子を取得した。世代促進を行い、F₃世代の後代集団を作出した。後代集団について収量関連形質を調査したところ、後代系統の出穂期はほぼ揃っており、単年度の試験結果ではあるが、交配親品種の日本晴やコシヒカリより高い収量(籾重)を示す後代系統を複数見出した(図5)。

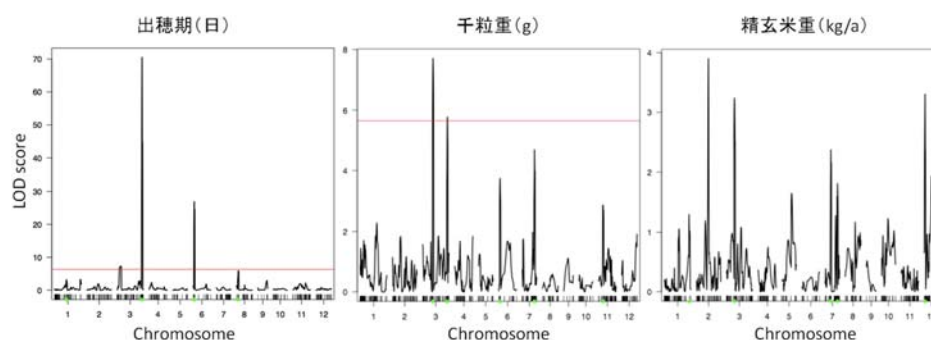


図3 日本晴/コシヒカリのBILsにおける出穂期、千粒重および精玄米重の composite interval mappingによるQTL解析結果(農業生物資源研究所、2012年)。

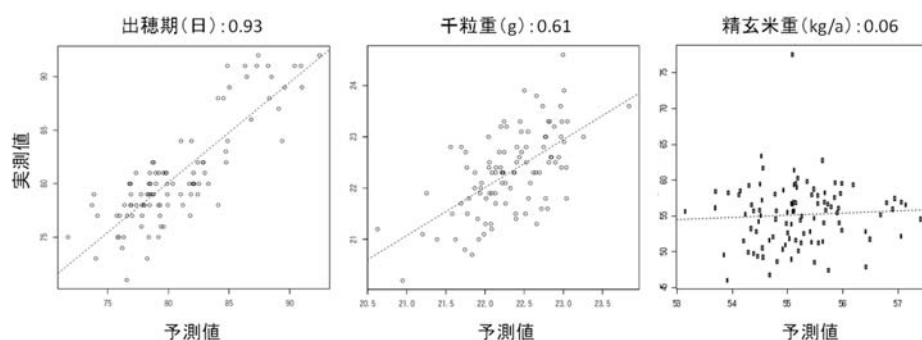


図4 日本晴/コシヒカリのBILsにおける遺伝効果の予測値と実測値の関係を示すクロスバリデーション解析結果(農業生物資源研究所、2012年)。

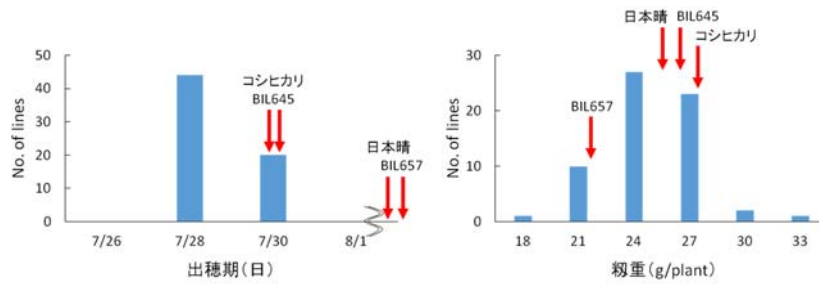


図5 日本晴/コシヒカリのBILsの二元交配に由来するF₃集団における出穂期および籾重の頻度分布(農業生物資源研究所、2014年)。

3) 成果活用における留意点

収量性などの複雑形質を対象としたゲノミックセレクション選抜では、多数個体を対象にした農業形質の評価が必要となることから、今後、タブレット端末などを活用した圃場入力システムなどを導入して形質評価の迅速化や効率化をより一層図る必要がある。

4) 今後の課題

ゲノミックセレクション手法を用いた新規の育種選抜手法が普及するためには、実証実験による選抜結果を公表することが重要である。そのため、本研究課題終了後も引き続き後代集団の養成および表現型評価を進めて、解析結果のとりまとめを進める必要がある。また、実際の育種現場では、労力や圃場スペースや資金的な問題から、ゲノミックセレクション手法による育種選抜に供試する後代集団の個体数やSNPマーカー数に制限が生じる可能性がある。そこで、集団サイズを減少させてシミュレーション解析を行う、必要最小限のSNPマーカー数で予測モデルを構築する、表現型を正確に評価できる形質を選抜指標にするなど、高い予測精度と省労力を両立させた解析手法を開発することが求められている。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発 (NGB)

小課題番号: NGB2002

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: 系譜ハプロタイプ情報を利用したイネの食味関連領域の推定と検証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 九州沖縄農業研究センター・水田作研究領域・稲育種グループ・竹内善信

1) 研究目的

ゲノムワイドな SNP 情報に基づく系譜ハプロタイプ情報を利用し、最新の育種選抜集団の中で残されてきた食味官能評価と連動するゲノム領域を明らかにし、その検証および現在の育種集団における分布を調べ、育種素材としての汎用性を検討する。具体的には、これまでの育種試験において、既報の食味関連遺伝子とは異なる良食味遺伝子の存在が推定される品種群を選び、それらに由来する生産力検定試験材料の系統について、分離ゲノム領域の遺伝子型と食味官能試験の結果を組み合わせた連関解析を実施し、関係する候補ゲノム領域を推定する。

2) 研究成果

(1) 新規な食味官能評価値に関する候補ゲノム領域の推定

平成 24、25、26 と 27 年度の生産力検定試験に供試した系統 (各々 56、64、85 と 53 系統) およびその親品種 (「さとじまん」、「あきだわら」と「イクヒカリ」) について 1297 カ所の SNP 遺伝子型を明らかにし、食味官能試験 (基準炊飯米に対する 5 段階の相対評価) の評価値を用いたゲノムワイドな連関解析を実施した。4 カ年の解析から 40 カ所以上の有意なゲノム領域が検出された。これらの領域のうち「コシヒカリ」とは異なる遺伝子型で食味官能評価値が向上する領域は、10 カ所以上検出された。また、4、3 あるいは 2 カ年で共通に検出されたゲノム領域が見出された。

(2) 検証用集団の育種・評価

複数年で安定して食味官能評価値が向上した候補ゲノム領域を検証するため、「コシヒカリ」と「さとじまん」、「コシヒカリ」と「あきだわら」、「コシヒカリ」と「イクヒカリ」の交雑に由来する各々 F₁ 個体を「コシヒカリ」に 2 回以上戻し交雑した後代から準同質遺伝子系統を作成し、食味官能試験によって連関解析で見出されたゲノム領域のうち、3 箇所について検証できた。

(3) 良食味に関するデザイン育種の提示と実証

実際の育種集団 (「ほしじるし」(「関東 199 号」/「関東 209 号 (後の「さとじまん」)」の交雑後代から育成) / 和 2304 (「中国 193 号」/「関東 222 号 (後の「あきだわら」)」の交雑後代から育成) の交雑後代から、食味官能評価値が向上する 2 箇所のゲノム領域が各々「さとじまん」型と「あきだわら」型に固定した系統を DNA マーカーで選抜した。

3) 成果活用における留意点

ゲノムワイドな SNP 情報に基づく系譜ハプロタイプ情報を利用して新規の選抜育種法の開発を行うことができた。この解析法は、系譜ハプロタイプ情報を利用して食味以外の多収性などの形質についても関連するゲノム領域を検出できると考えている。

また、本解析法で見出された食味関連のゲノム領域の情報は、品種育成の場面で、良食味系統の選抜を効率化するための素材として活用できる。

4) 今後の課題

平成 24、25、26 と 27 年度の生産力検定試験に供試した系統を用いた食味の連関解析から、4、3 あるいは 2 カ年で共通に検出された食味関連のゲノム領域については、「コシヒカリ」の準同質遺伝子

系統を用いて検証できたものの、実際の育種集団を利用した実用性の検証はできていない。今後、実際の育種集団を利用して、これらの候補領域の実用性を検証する必要があると考えている。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB2003(平成27年度にNGB1001(平成25～26年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：ダイズの難解析形質を対象としたゲノム選抜育種法の開発(平成27年度に国産ダイズ品種におけるゲノムワイドSNPマーカーの拡充(平成25～26年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構 次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・石本政男

1) 研究目的

国産ダイズ品種には成熟期、粒大、子実成分、収量など明確な品種間差がありながら、遺伝解析に基づく育種選抜が進んでいない難解析形質が数多く存在する。ゲノム全体にわたって収集された多型情報に基づくゲノムワイド関連解析(GWAS)とゲノミックセレクション(GS)の適用によって、難解析形質に関連する遺伝子座が推定され、理想の遺伝子型に近づける交配組合せの早期予測などが可能になれば、育種効率を大幅に改善できる。近年は米国の多収品種をはじめとする外来遺伝資源を育種母本とした多収品種の育成が各育成地で始められつつあり、今後これらを加速させる上で外来遺伝資源と日本品種との差異を検出できるマーカーの整備も重要になる。

そこでNGB1001では、これまでに解読された国産品種をはじめとする複数のダイズ品種の塩基配列情報を活用して、GWASやGSへの運用場面に対応できる1塩基多型(SNP)マーカーを拡充する。ゲノムワイドな塩基配列比較によって得られる大規模SNPデータから、情報量の多いSNPを選出し、GWAS用の高密度SNPパネルを開発する。さらにそのなかから広範な遺伝資源へ適用可能な汎用性の高いSNPおよび国内の育種選抜集団に適したSNPにそれぞれ集約した少数のSNPからなるジェノタイピングパネルを開発する。

NGB2003では、ダイズミニコアコレクション、組換え自殖系統(RIL)、多収品種を育種素材とした北海道の育成系統群における難解析形質のGWASを行い、多型情報を介した遺伝要因への分解と再構築を可能にする基盤整備を行う。これらの情報に基づいたタンパク質含量の予測モデルの作成と高タンパク質含量へのGSの試行による選抜効果の検証、北海道育成系統群における多収性関与マーカーの検出と後続の多収選抜集団における有効性の検証、ジェノタイピングパネルの開発等により、難解析形質の効率的なゲノム選抜技術の開発をめざす。

2) 研究成果

1- (1) 高密度SNPパネルの開発：国産12品種の塩基配列を相互に比較し、国産品種間の約390万SNPを抽出した。対立遺伝子頻度の高い約19万のSNPについてゲノムワイドな連鎖不均衡を評価し、約4万のTagSNPを選定した。それらのなかから情報量の豊富な約1万1千のSNPを高密度SNPアレイに搭載し(図1)、Infinium法により日本および海外のミニコアコレクション192系統および139農林登録品種など350品種・系統の遺伝子型を取得した。

1- (2) ジェノタイピングパネルの開発：1- (1) で取得した日本および海外のミニコアコレクション、農林登録品種の約1万1千のSNPマーカーの遺伝子型情報を用いてSNPマーカー間の連鎖不均衡を評価し、ジェノタイピングパネル用のマーカーを選定した。動

原体周辺の領域は連鎖不平衡の範囲が広く、このような連鎖不平衡のブロック内にあるSNPマーカーは相互に同じ情報をもっていたため、マーカー密度を低く設定し、周辺の遺伝子型情報を代表でき、かつ多型性の高い768種類のSNPマーカーをジェノタイピングパネルとして選定した。Mass array 法により遺伝的に近縁な日本の品種間の2つのF2雑種集団についてジェノタイピングを行い、連鎖地図を構築したところ、多型率は約50%であったものの、ゲノムの83%~90%の領域を包括することができた。

2-(1) 難解析形質の育種選抜基盤の構築：国内8箇所で評価されたダイズミニコアコレクションの難解析形質に関する特性データについて、1-(1)で取得された約1万1千SNPの遺伝子型データを用いてGWASを行い、開花まで日数については12箇所、成熟まで日数については15箇所、粒大については18箇所、子実タンパク質含量については7箇所のアソシエーションを検出した。複数地域のアソシエーション結果をひとつにまとめたマーカーセットを予測モデルに用いたところ、約7割の精度で形質値の予測が可能なモデルが構築できた。また、多数の遺伝子が関与する粒大に関する予測モデルでは、ゲノム全体の情報を利用することによって、形質値が未知のサンプルも遺伝子型データのみから形質値を高い精度で予測が可能で、難解析形質を選抜できる可能性を示した。

2-(2) タンパク質含量等のゲノミックセレクションの試行と検証：ゲノム情報に基づいて表現型を予測するモデルを構築し、これを用いたシミュレーションによって交配後代の形質値を予測し、形質を大きく改良できる交配組み合わせを選定し、交配とゲノム選抜を行う方法を開発した。タンパク質含量において超越分離が見られるヒュウガ-エンレイ組換え自殖系統をトレーニング集団とし、RIL間の交配とその後代であるF2間の計2回の交配による選抜を実施した。その結果、高タンパク質を目的にゲノム選抜を進めた系統は、交配親や初期集団の最高値を超越する高タンパク質含量を示した(図2)。これらのことから、開発した選抜方法は多数の遺伝子座によって制御されている形質の改良に有効と考えられる。

2-(3) 北海道の品種系統を用いた収量のゲノムワイド関連解析：1-(1)で開発した約1万1千マーカーからなる高密度SNPアレイを用いて北海道立総合研究機構で育成した177品種・系統群を解析し、約1万1千マーカーの遺伝子型情報を取得した。このうち、「フクユタカ」由来の多収選抜系統群では、各系統について得られた遺伝子型データからフクユタカ由来のゲノム領域を推定し、3年間に取得した収量評価データを用いてアソシエーション解析を行った結果、「フクユタカ」に由来する多収関連領域を複数検出した。

2-(4) 多収性関連マーカーの検証：2-(3)に使用したトレーニング集団とは異なる組合せの複数の単交配に由来する多収選抜系統群を検証用集団として、複数年にわたり収量調査およびゲノムワイド関連解析を行い、年次間で安定して収量を向上させる効果を持つ領域や2-(3)で検出した領域と一致する領域を見出した。多収品種の育成の効率化や選抜精度の向上のために、これらの領域を多収選抜マーカーとして利用することが有効であると考えられる。

2-(5) 育種選抜集団へ適用可能なジェノタイピングパネルの開発：1-(2)で開発したジェノタイピングパネルを用いてGoldenGate法により北海道における育種選抜集団への適応性を評価したところ、多型がほとんど得られない染色体の存在などが明らかになり、育成地ごとにSNPセットをカスタマイズする必要があると思われた。

3) 成果活用における留意点

1 - (1)、1 - (2)、2 - (5) で開発したアレイは既に解析のプラットフォームの提供が終了したものがあため、開発したSNPセットを利用するには次世代シーケンサーを利用したジェノタイピングシステムへ移行させる必要がある。

2 - (1) 形質予測モデルは多様性が大きなコアコレクションの形質データに基づいているため、変異幅が限られる精密な育種集団では予測精度が低くなる恐れがある。

2 - (2) で開発したタンパク質含量の予測モデルは畑圃場で作成されており、水田転換畑では作用する遺伝子が異なり同様の結果が得られないため、選抜に利用するには水田でのトレーニング集団の評価などモデルの再構築が必要である。

2 - (3)、2 - (4) で開発した多収性関与マーカーのなかには、年次間で安定して収量増加効果を持つマーカーもあるが、気象条件や遺伝背景の影響を受けて単年度のみ検出されたマーカーや、トレーニング集団のみで検出されたマーカーが多数存在するため、多収選抜マーカーとしての汎用性についてはさらなる検証が必要である。

4) 今後の課題

次世代型シーケンサーによる塩基配列の取得が容易になり、ジェノタイピングも今後はアレイからシーケンスに置き換わっていくと考えられるが、育種用のSNPセットは現場の育成系統や育成地ごとにカスタマイズする必要があり、フレキシブルなジェノタイピング法の開発が望まれる。一方、ゲノミックセレクションについては、選抜期間短縮のために初期集団にRILsを用いたことで集積効果の検証に成功したが、育種集団や収量をはじめとするより複雑な形質で実践するにはまだ改良の余地が残されている。



図1 1万1千SNPのダイズ染色体上の分布

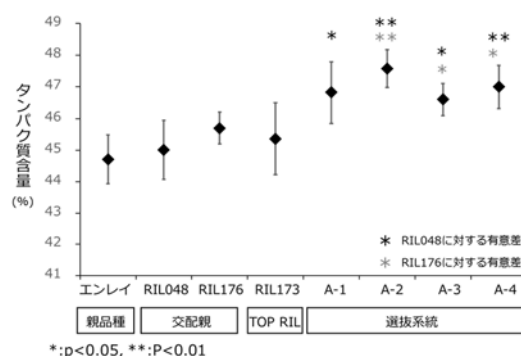


図2 高タンパク質含有率を目的とした選抜系統の検証試験の結果

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB2004

研究期間：平成25～26年度

小課題名：小麦粉の色相に関するゲノム選抜手法の開発と実証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構東北農業研究センター・畑作園芸研究領域・畑作物育種グループ・石川吾郎

1) 研究目的

小麦粉の色相はその加工適性に影響を与える重要な品質項目である。しかし、関東以北のコムギ育種では収穫から次の播種までの期間が短く、この間に十分な品質調査が行えないことが問題となっている。最近、粉色の改良は様々な遺伝資源から効果の小さな多数の遺伝子を組み合わせで行われていることが分かってきた。このような形質は、従来の少数マーカーによる選抜よりもゲノム全体を対象とする選抜法が効果的と考えられる。そこで本研究では、我が国の主要品種および育種母本を用いたアソシエーション解析によって、粉色に関わる遺伝要因を網羅的に探索する。さらに、播種前の粉色選抜を可能にするため、ゲノム遺伝子型から粉色の予測が可能かどうかを検討する。

2) 研究成果

(ア) モデル構築のための育種材料の形質評価

長野県農業試験場（長野）、農研機構東北農業研究センター（東北）および道総研北見農業試験場（北見）の育種材料から、各地域に適応し、製粉による品質選抜を経ていない系統を供試した。つまり、長野は派生系統2年目（播種時F₆）、東北は派生系統1年目（同F₅）、および北見は系統選抜試験材料（同F₃～F₅）の2013年および2014年の収穫物を供試した。供試材料の栽培、製粉および品質調査は各場所で行い、小麦粉ペーストの明るさ（FIL）、赤み（Fla）、黄色み

（Flb）は色差計（ZE6000、日本電色工業）により測定した。小麦粉のタンパク質含量（FPC）は近赤外分光光度計（Infratec 1241、FOSS）、胚乳の明るさ（EnL）はスキャナ式胚乳測色システム（前島ら¹⁾）により調査した。なお、全ての項目で測定は2反復行い、解析には平均値を用いた。その結果、場所および収穫年あたり103～143系統が供試され、2年間で合計729系統のデータが得られた（表2004-1）。全ての調査形質で大きな変異が認められ、北見の材料は、両年とも他の場所に比べてFlaが極めて低く、Flbが高く、FPCが低いという特徴があった。

表2004-1 モデル構築のための育種材料における調査形質の平均値、最小値および最大値

(イ) 新規Dゲノムマーカーおよび既存アレイ基盤における国内品種の多型程度

収穫年	場所	系統数	粉の明るさ (FIL)			粉の赤み (Fla)			粉の黄色み (Flb)			粉タンパク質含量 (FPC)			胚乳の明るさ (EnL)		
			平均	最小	最大	平均	最小	最大	平均	最小	最大	平均	最小	最大	平均	最小	最大
2013	長野	119	85.92	84.38	87.06	0.36	-0.33	1.22	14.44	11.09	18.78	11.3	7.4	15.9	90.5	80.5	96.0
	東北	111	86.68	84.96	87.84	0.31	-0.29	1.13	12.77	10.35	16.19	11.9	9.2	15.7	86.4	79.9	92.3
	北見	137	88.18	86.40	89.00	-0.40	-0.95	0.41	15.02	11.98	18.64	10.0	7.2	14.8	89.9	82.7	95.9
2014	長野	143	88.17	85.37	89.14	0.00	-0.55	0.74	13.99	11.00	16.94	10.4	7.4	14.6	91.4	84.3	99.4
	東北	103	87.60	86.37	88.61	0.24	-0.69	1.04	13.15	10.64	16.89	12.1	8.8	15.0	88.7	82.3	95.0
	北見	116	87.86	86.17	88.73	-0.74	-1.16	0.28	16.25	12.21	20.86	9.4	7.4	14.2	91.0	84.9	95.2

「きたほなみ」および「はつもち」のゲノム解読により検出した多型から、Dゲノム上に新たに開発したマーカー（TARC）396個（課題番号：NGB1002）を用いて、我が国の主要品種および交配母本で構成される「品種パネル」164品種系統の遺伝子型をアンプリコンシーケンス法により調査した。多型程度の指標としてPolymorphism Information Content (PIC) を算出し、他の高密度アレイ基盤のDゲノムのマーカーと比較した。比較に用いるアレイ基盤およびマップ情報は、Infinium 9K²⁾、Infinium 90K³⁾およびDArT[Wheat *PstI*(*TaqI*)v.3]⁴⁾とした。なお、90KはDゲノムの各染色体から5~18個の計96個のマーカーを選び、それらをアンプリコンシーケンス法用に改変して用いた。また、コムギ高密度アレイAxiom 820K (Affymetrix)に国内の主要品種を適用し、我が国材料での多型程度を調査した。その結果、「品種パネル」におけるTARCマーカーのPICは9Kや90Kに比べて全体的に高く、DArTと同程度であった（図2004-1）。PICが0.3以上の割合では、TARCマーカーは9Kの1.5倍、90Kの3倍であった。また、供試材料を「北海道・外国」および「本州以南」由来に分けた場合、「北海道・外国」では9Kと同程度、90Kの2倍であったのに対し、「本州以南」は9Kの2倍、90Kでは3倍以上であった。Axiom 820Kによる解析では、正確な遺伝子型決定ができ、且つ供試材料間で多型を示すマーカーは819,571個のうち25,376個（3.1%）であった。このうち、PICが0.3以上のものは9,351個（1.1%）であった。

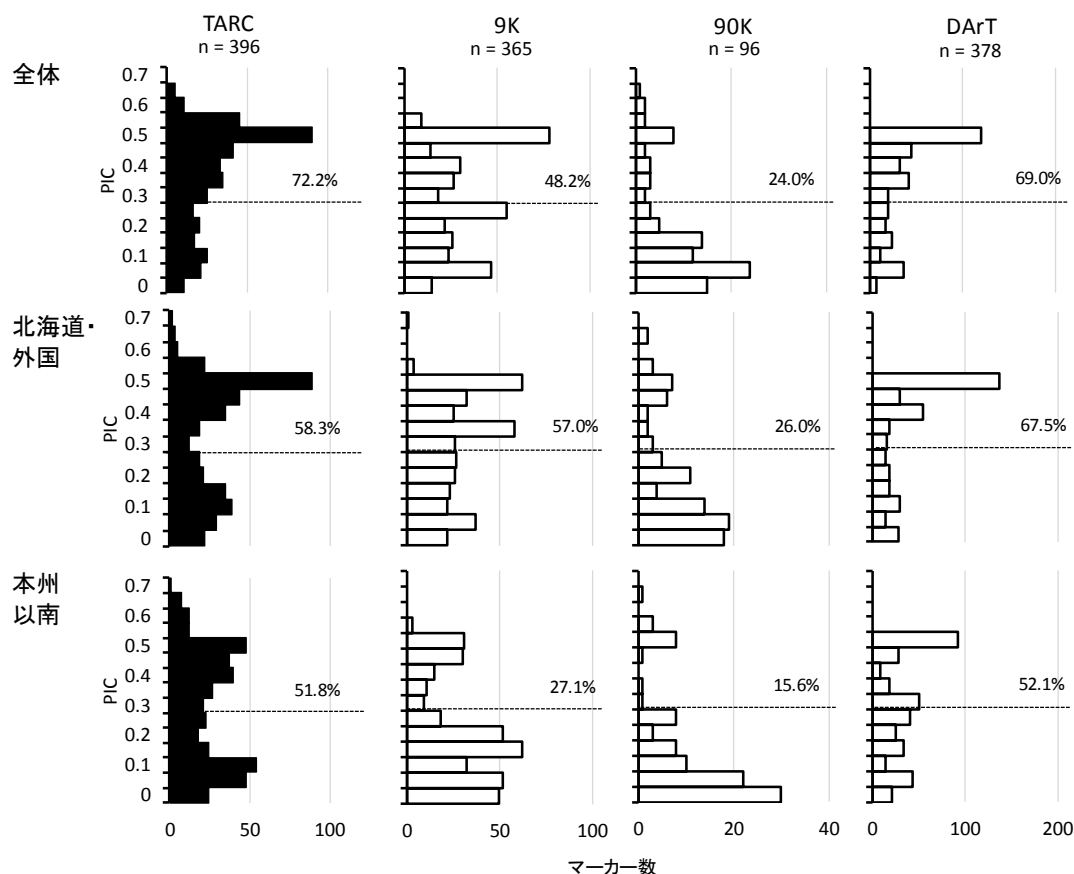


図2004-1 「品種パネル」における多型頻度（PIC）分布およびマーカー基盤間での比較

1) TARC、9Kおよび90Kは164品種系統（北海道・外国78、本州以南86）、DArTは130品種系統（北海道・外国76、本州以南54）による値を示す。

2) 9K、90KおよびDArTはDゲノム上のマーカーのみ抽出して計算した。

(ウ) アソシエーション解析のための形質評価

「品種パネル」のうち、北海道の材料は既に3年間の形質評価値が得られていることから、本課題では本州以南の92品種系統を供試した。なお、「品種パネル」はDArTおよび9Kチップによる遺伝子型データが既に得られている (Ishikawa et al.⁵⁾)。長野は92系統を2反復、東北は64系統 (越冬困難と思われる18系統は除外) を2反復で栽培した。供試材料の収穫物を東北農研で製粉し、F1L、F1a、F1b、FPCおよびEnLを調査した。場所および収穫年で供試材料や形質の平均値が異なるため、各系統の表現型値としてBest linear unbiased estimator (BLUE) を用いた。遺伝子型は、SSR、DArT、9KおよびTARCマーカーのデータを用いた。遺伝子型データのフィルタリング、多様性解析、主成分分析およびアソシエーション解析にはTASSEL 4.0 (Bradbury et al.⁶⁾) を用いた。また、多重比較による偽陽性の増大を補正するため、Rパッケージ「Q-value」 (Storey and Tibshirani⁷⁾) によりFalse Discovery Rate (q値) を算出した。供試した92系統のうち、長野では全てのプロットで収穫物が得られ、プロット毎に製粉した。東北では供試した64系統中14系統が甚大な寒雪害を受けたために収穫物が得られなかった。また、収穫物が得られた50系統のうち10系統は種子量が少なくプロット毎の製粉が困難であったため、2プロット分まとめて製粉した。2009年産の評価値を加えると、最終的に「品種パネル」164系統中154系統について2~7反復で形質評価値が得られた。全ての調査形質でBLUE値は概ね正規分布を示していたが、「はつもち」のF1L、「AS-5」のF1bは外れ値を示していた (図2004-2)。そこで、以後の解析ではこれら2品種系統を除外して行った。F1aとFPC ($r = -0.619$) およびF1aとF1b ($r = -0.680$) の間に高い相関がみられた。

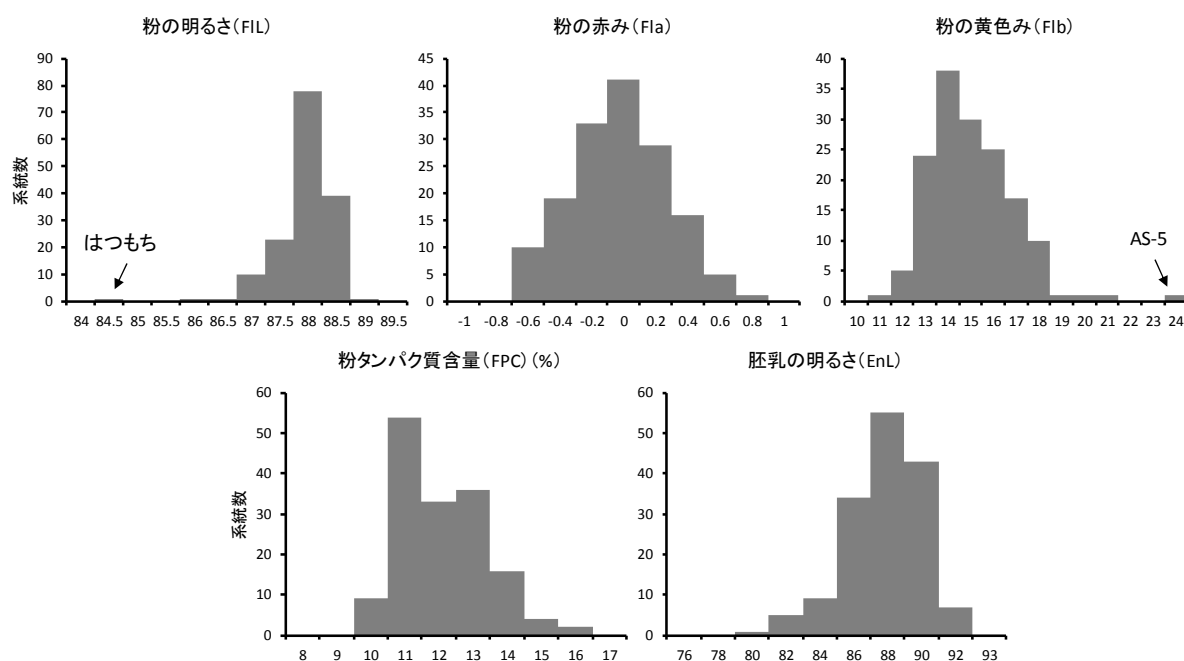


図2004-2 供試材料における粉色および関連形質のBLUE値の分布 (n=154)

TARCマーカーの追加によって「品種パネル」の遺伝子型データは合計10,099マーカーとなった。アソシエーション解析には最少アリル頻度が0.1以上の7,232マーカーを用いた。主成分分析による集団構造 (Q) および類縁関係 (K) を考慮したモデル (QKモデル) を用いて、Flaに関するアソシエーション解析を行ったところ、最も高い有意性を示したマーカーはPinbD1 ($q=0.111$) であった。PinbD1マーカーはピュロインドリン遺伝子のひとつである *Pinb-D1* の変異の有無を判定するマーカーであり、種子の硬軟質に関与している。そこで、硬軟質性を共分散成分として組み込んだモデル (QCKモデル) でも解析を行った。両モデルのどちらかで $q < 0.5$ で有意性を示したマーカーは88個 (F1L) ~ 221個 (EnL) であった (表2004-2)。これらマーカーを「はつもち/きたほなみ」RILによる連鎖地図 (未発表)、9Kコンセンサス地図²⁾あるいはDArTコンセンサス地図⁴⁾で20cM以内に入るものを1つの量的形質遺伝子座 (QTL) としてまとめたところ、最終的に30個 (F1L) ~ 49個 (FPC) のQTLが検出された (表2004-2)。F1bは両モデルで共通のQTLが多いことから、硬軟質性の影響を受けにくい形質だと考えられた。

表2004-2 粉色および関連形質のアソシエーション解析による有意マーカーおよびQTL数

項目	内訳	粉の明るさ (FIL)	粉の赤み (Fla)	粉の黄色み (Flb)	粉タンパク質含量 (FPC)	胚乳の明るさ (EnL)
マーカー	全体	88	154	129	186	221
	マップ情報有	74	140	109	175	204
QTL	全体	30	44	48	49	42
	QKのみ	2	6	4	1	19
	QCKのみ	17	31	3	41	15
	QK、QCK共通	11	7	41	7	8

1) マップ情報のある有意マーカーのうち、同一連鎖地図で20cM以内のものは1つのQTLとみなした。

2) QKは集団構造および類縁関係を考慮したモデル、QCKはQKモデルに硬軟質性を共分散成分として考慮したモデルを表す。

(エ) 粉色に関するゲノム予測の試行

R パッケージ「glmnet」 (Friedman et al.⁷⁾) により、LASSO およびRidge 回帰の2種のモデルで粉色のゲノム予測を試行した。このとき、ゲノム選抜に用いるマーカーの数および分布が予測精度に与える影響を調査するため、位置情報のあるマーカーを均等に間引きした4種 (1856、928、464、232) および意図的に分布を偏らせた3種 (染色体群、腕、ゲノム) の遺伝子型データのサブセットを作成した。なお、計算は5-fold クロスバリデーションを10回繰り返して行った。LASSOおよびRidge 回帰による予測精度 (r値) を比較したところ、F1b と FPC は同程度であったが、他の3形質ではRidge 回帰の方が全体的に優れており、Ridge回帰によるr値は0.418 (F1b) から0.766 (Fla) の範囲であった。予測精度に与えるマーカー数の影響をみた場合、F1L およびEnL では232 マーカーまで減らした場合にも影響はみられなかったのに対し、FlaとFPCでは928 マーカー以下から低下し始め、F1bでは232マーカーで有意に低下した (図2004-3A)。また、マーカーの分布では、F1Lでは偏りの影響は見られなかったが、他の4形質は染色体群を偏らせた場合に有意に予測精度が低下した (図2004-3B)。なお、FPC は染色体腕、Fla はゲノムの偏りでも影響がみられた。

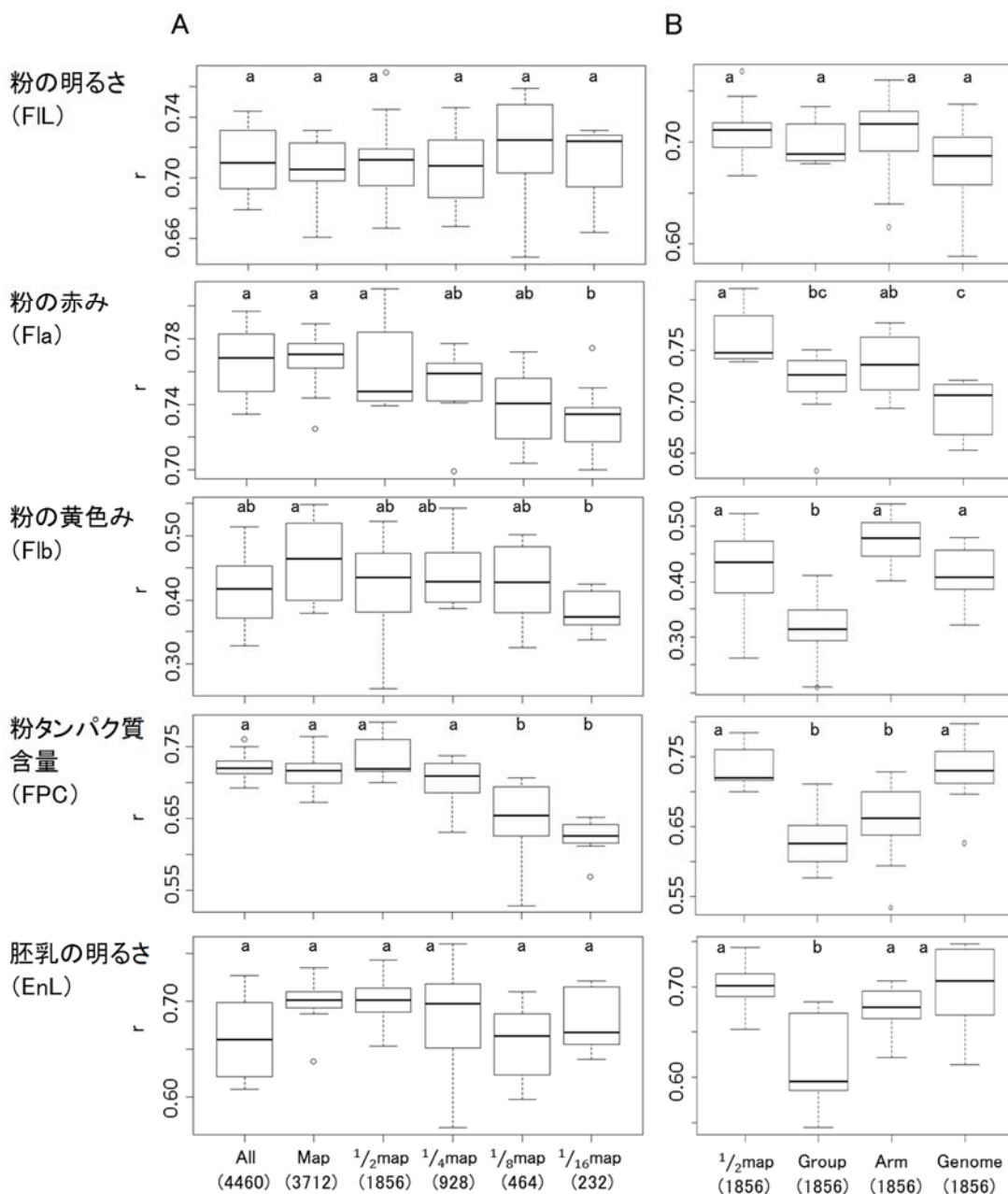


図2004-3 粉色ゲノム予測精度に及ぼすマーカー数 (A) およびマーカーの偏り (B) の影響

- 1) Ridge回帰における交差検定を10回繰り返した場合の予測精度 (r) の分布を示す。
- 2) 各プロットにおいて同じ文字はTukeyHSD検定において有意に異なることを示す。
- 3) カッコ内はマーカー数を示す。

3) 成果活用における留意点

(ア) 小麦粉の品質試験では、各地域に適応した育種材料を用いて、正常な生育・登熟を経た個体に由来する種子を用いることが重要である。このような材料を用いた場合でも、粉色に大きな変異を持つことが示されたことから、予測モデルの構築に有用であると考えられる。

(イ) 国内品種を用いて開発したマーカー (TARC) は、海外で開発された既存のアレイ基盤に比べて国内品種間での多型頻度が高かった。このことは、国内品種向けのマーカー基盤整備の必要性を示している。

(ウ) Dゲノムのマーカーや関東以西の材料の追加によって、新たな遺伝要因が多数見出されたことから、アソシエーション解析の結果は材料およびマーカーに依存することを示されたことから、さらなるマーカーの追加や解析の目的に合った材料の選定が重要であると考えられる。

(エ) ゲノム選抜の試行の結果、粉色はある程度の精度で予測可能であることが分かった。ただ、分布が不均一なマーカーセットでは予測精度が有意に低下し、特に染色体群の偏りによる低下が顕著であった。これらのことから、ゲノム選抜にはゲノム上に均一に分布するマーカー基盤の整備が不可欠である。

4) 今後の課題

本課題で行った粉色ゲノム予測の試行は、遺伝的に固定した品種・系統を用いたものである。実際に用いる育種材料は組合せや固定度、形質評価精度など試行に使ったデータとは異なることから、それらを用いた場合の予測精度は未知である。本課題で得られた育種材料のデータは本手法の実用性を判断する上で有効なリソースとなりうる。また、最近のゲノム研究の進展によりマーカーの「数」は豊富になったが、ゲノム分布や多型頻度という「質」は不十分である。引き続き国内品種間、特に西日本の材料、において多型頻度の高いマーカーの開発および低コスト且つ安定的な遺伝子型決定法の確立が必要である。

参考文献

- 1) 前島ら (2008) 小麦粉色相評価のためのスキヤナ式胚乳測色システム. 平成19年度東北農業主要研究成果情報 (研究・参考) .
- 2) Cavanagh C. R. et al. (2013) Genomewide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 8057-8062.
- 3) Wang S. et al. (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol. J.* 12: 787-796.
- 4) Huang B. E. et al. (2012) A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 10: 826-839.
- 5) Ishikawa G. et al. (2014) Association mapping and validation of QTLs for flour yield in the soft winter wheat variety Kitahonami. *PLoS ONE* 9(10): e111337.
- 6) Bradbury P. J. et al. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- 7) Storey J. D. and Tibshirani R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9440-9445.
- 8) Friedman J. et al. (2008) Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. *J. Statistical Software* 33(1): 1-22.

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB2005(平成28年度にNGB1004(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：ゲノムワイドマーカー情報に基づく多収・高糖度トマト選抜のための次世代型マーカー育種技術開発とその試行(平成28年度に トマトおよびキャベツの次世代型マーカー育種技術開発のための全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構 野菜花き研究部門・野菜生産システム研究領域・生産生理ユニット・大山暁男

1) 研究目的

主働遺伝子や少数の効果の大きいQTLについては、少数のDNAマーカーを用いたマーカー利用育種が有効である。しかしながら、重要な農業形質の多くは、多数のQTLにより支配されていることが多く、これらを積極的に育種に利用する手法は現在のところ皆無である。そこで本課題では、我が国の施設野菜で最も重要なトマトについて、提案者らが既往成果として有する収量性の解析が可能な日蘭主要F₁品種間交雑由来の実験集団(以降、GMRILsと表記)を利用して、循環選抜的な多系統間交雑と、近年注目されているゲノムワイド遺伝子型を用いたQTL集積法であるゲノミックセレクション(GS)を組み合わせ、QTL捕捉が困難で生産上最も重要な収量および糖度の2形質に対するQTL集積の理論構築と試行、検証を行う。この検証に先だって、同じく既往成果として有する日蘭主要F₁品種の数万レベルのSNP情報を利用して、高速遺伝子型タイピングのための高密度タイピングアレイや選抜の為の高速タイピングプラットフォームの整備も行う。さらに、ヘテロ性の高い国内新旧の商用F₁品種群(以降、SL96と表記)を材料として、表現型と遺伝子型情報を元に構築したGSモデルが予測するゲノム育種価および後代シミュレーションに基づく最適交雑親決定と連続交雑による収量性に優れた高糖度系統の選抜試験も併せて行う。SL96やその交雑後代集団に対する高速タイピングプラットフォームは、網羅的かつ高密度な多型情報を次世代型DNAシーケンス技術(NGS)技術を駆使して収集することにより構築する。

2) 研究成果

(1) トマトの次世代型マーカー育種技術開発のための全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備

a) GMRILsを用いたGSモデル高精度化のためのSNPハプロタイプマーカーセットの開発

-1) GMRILs 両親系統のリシーケンスデータを用いた50K SNPタイピングアレイの作成と評価

GMRILsの両親、「Geronimo」および「桃太郎8」について、既往成果のリシーケンスデータから両品種間SNPを抽出した。SAMtoolsによってコールされたリファレンスゲノム(SL2.40ch)に対する1,568,262個のSNPのうち、SNP前後200bpにリピートを含まない288,169個について、変異予測精度(varQ)値が10以上である203,881個を選抜した。これらSNPは3つの多型カテゴリー(Geronimo-桃太郎8について、AB-AA型

(Category1)、AA-AB型 (Cat.2)、AA-BB型 (Cat.4)) に分類したのち、近接した SNP を複数組み合わせることで他の4つのカテゴリー (Cat.3: AB-AC型、Cat.5 AB-CC型、Cat.6: AA-BC型、Cat.7: AB-CD型) を識別するSNPセット (ハプロタイプマーカー) を定義した (図1)。さらにゲノム全体を2cMのブロックに分割し、そのブロックごとになるべく均等に、また、なるべく情報量の大きいハプロタイプマーカーが分布するように考慮してSNPを選択した。その結果、ゲノムのほぼ全域にわたって情報量の大きいハプロタイプマーカーを配置することができた。そこで、アフィメトリクス社の50kSNPスケールのタイピングアレイを想定してマーカー選択を行い、51,214SNPsを選択して、AxiomMyDesign TGタイピングアレイを作成した。

-2) GMRILsを用いたGSモデル構築のための大量SNPデータの取得

トマトGMRILs ($n = 207$ 系統) について、上記で開発した51,214個のSNPを搭載したSNPタイピングチップ (Axiom GM v2013) により、32,473個のSNPの高精度な遺伝子型データが得られた。このうち、1,623個のSNPにより、近接した複数のSNPを組み合わせる最大4つのアリルを判別可能な759のハプロタイプマーカーが定義できた。既に遺伝子型データを取得していた141のSNPマーカーおよび197のSSRマーカーのデータを合わせ、合計で31,947のマーカー遺伝子型データが得られた。

複数のマーカーがゲノム上で近接している場合、GMRILsの207系統すべてにおいて遺伝子型の分離が互いに全く同じである場合がある。このような場合、同じ遺伝子型分離を示す複数のマーカーは単一のマーカーで代表することにより重複を除いた。その結果ユニークな分離パターンを示すマーカーは4,323個 (GMRIL_4K) となった (図1)。

-3) トマトGS 試行実験のための低コストマーカーセットの作成と評価 (NGB2010と連携)

上記GMRIL_4KマーカーとGMRILsの表現型データを用いて糖度と収量のQTL解析を行い、QTLピーク部分のSNPをまず優先的に集め、次いで、ゲノム上の一定間隔 (~10cM) おきに最低1つのSNPが入るように384個のSNPからなるマーカーセット (GMRIL_384) を構築した (上記ハプロタイプマーカーが構成できる領域は該当するSNPセットをなるべく選択するようにした、図1)。

トマトGMRILsに由来するGS試行実験における R_1F_2 世代および R_2F_1 世代についてそれぞれ384個体を供試し、384種の選抜用SNPタイププローブ (BioMark社) のタイピング精度を評価した。その結果、全体の98.7%にあたる379種について、想定通りのSNP遺伝子型のタイピングが可能であることが確認された。なお、タイピング不能であった5マーカーはゲノム上にランダムに分布し近傍に別のマーカーが座乗していること、Axiomタイピングチップによる大量SNPによって構築されたGSモデルと379個のSNPタイプマーカーによるモデルとの間で予測精度に顕著な差が見られなかったことから、ゲノム育種価の推定には大きな問題は生じないものと判断しマーカーセット構築を完了した。

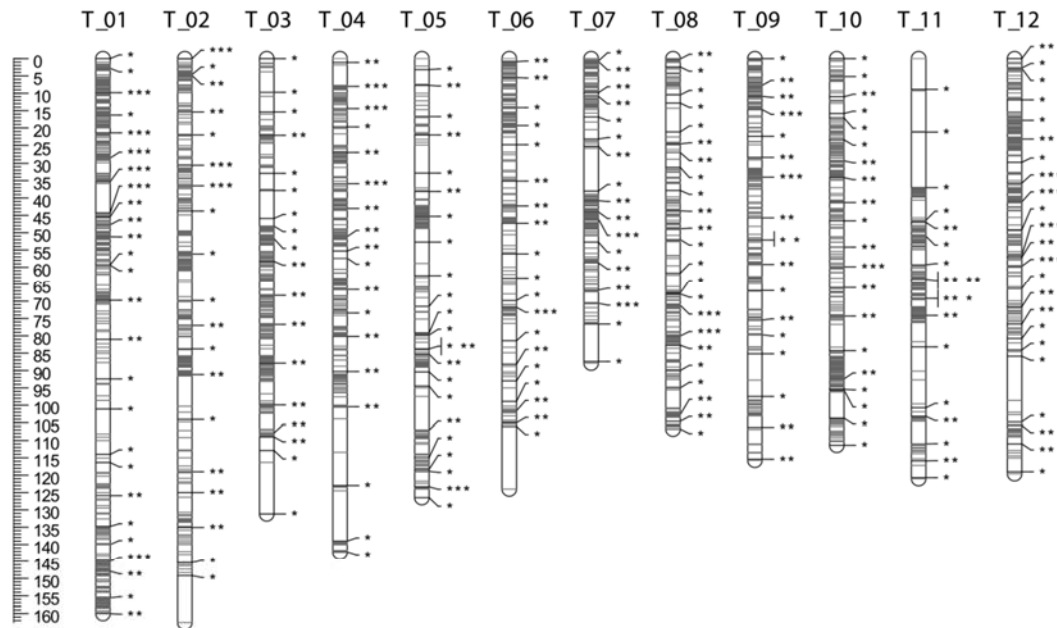


図1 GMRILsを用いたGSに向けて整備したDNAマーカーのトマトゲノム上の分布
 T_01からT_12はトマトの12本の染色体に対応する。灰色の横線はモデル構築のために整備した4,323個のSNPマーカーの位置を示す。★で示したマーカーはGSに用いるために選択した384個のPCRマーカー (SNP型マーカー) を示す。複数のSNPを組み合わせた複合SNPマーカー (ハプロタイプマーカー) は、★★および★★★ (★の数は組み合わせたSNPマーカーの数) で示す。

b) SL96を用いたWGPモデル構築のためのSNPs情報の取得

-1) トマト商用F₁ 品種の低冗長度リシーケンシングによるSNP検出

わが国において1950年代から現在までに育成された96の商用トマトF₁品種を材料として、各品種あたり1x程度のゲノム配列データをHiSeq2000によるペアエンド解析によって取得した。得られたデータ量は合計173Gbであり、一品種あたりの冗長度は1.90、F₁品種であることを考慮したゲノムあたりの冗長度は0.95であった。得られた配列データをCLC Genomic Workbench ver. 6.5を用いてSL2.40chへのマッピングとSNP検出を行った。その結果、ゲノム全体から約1,200万のSNPがコールされた。

-2) トマトSL96を素材としたGSモデル構築のためのSNPデータセットの構築

上記SL96の限定的リシーケンシング (1品種あたり冗長度1.90x) により見いだした約1,200万のSNP候補から、確からしい約280万のSNPを選抜した。トマトの全ゲノムを1cMごとのブロックに分割し、上記の約280万のSNPおよび過去の研究でタイピングされた数千のSNPについて最大50個ずつマーカーを配置し、ゲノム全体に分散した52,425のSNPを選抜した。これを搭載したジェノタイピングアレイ (Axiom SL96 v2014) を作成し、96品種のSNP遺伝子型データを得た。52,425個のSNPのうち、多型が得られたものは全体の68%にあたる35,410個であった。SNPの種別ではAG/CTがそのうちの62%と最も多く、次いでAC/GTの18%、AT/TAの14%、CG/GCの6%の順となった。最少アレル頻度 (MAF) の平均は0.14であり、MAF \geq 0.05のSNPは20,734個 (58.6%)であった。このSNP遺伝子型データについても、上述したGMRILs用のデータセットと同様に重複を除き、14,250個のSNPからなるデータセット (SL96_14k) を構築した。

-3) トマトGS 試行実験のための低コストマーカーセットの作成と評価

上記データセットを基に、SL96を用いた糖度・収量同時選抜モデル（秋作形質データ利用）を作成し、マーカー数および選抜規模と5世代後の予測ゲノム育種価の期待値との間の関係性を調査した。表1に示すとおり、選抜第5世代における予測ゲノム育種価の期待値は、14kマーカー・192個体の育種規模の場合が最も高くなった。しかし、384マーカー・192個体を用いた選抜の場合との期待値の差は糖度・総果収量ともに極めて小さく、マーカーを減らしたことによる期待値の減少幅はわずか-1.7%であった。以上の結果から、1世代あたりの選抜費用や労力を勘案すれば、384マーカー・192個体の育種規模は十分に妥当であると判断した。

上記、SL96に由来するGS試行実験のために設計された384種のSNPタイプマーカー（SL96_384）において、春作および秋作モデルで選択された計8品種間におけるタイピング精度を評価したところ、全体の96.4%にあたる370種において想定通りの結果を得た。タイピング不能であった14マーカーはゲノム上にランダムに分布し近傍に別のマーカーが座乗していること、Axiom タイピングチップによる大量SNPによって構築されたGSモデルと370種のSNPタイプマーカーによるモデルとの間で予測精度に顕著な差が見られなかったことから、ゲノム育種価の推定には大きな問題は生じないものと判断しマーカーセット構築を完了した。

表1 GSにおけるマーカー数および供試個体数が予測ゲノム育種価に及ぼす影響

マーカー数	個体数	ゲノム育種価			
		糖度	Δ%*	総果収量	Δ%
384	192	5.69 ± 0.12	-1.73	3402.5 ± 51.5	-1.74
768	192	5.69 ± 0.12	-1.73	3441.5 ± 48.2	-0.62
384	384	5.71 ± 0.12	-1.38	3414.0 ± 48.6	-1.41
768	384	5.69 ± 0.14	-1.73	3429.3 ± 52.3	-0.97
14,250	192	5.79 ± 0.09	0.00	3462.9 ± 44.6	0.00

* 14,250マーカー、192個体の予測ゲノム育種価に対する百分率から1を引いた値。最も多数のマーカーを用いた場合に比べ、ゲノム育種価の期待値が何%低下するかを示した指標。

c) トマト近代品種群の網羅的多型情報リソースの整備

SL96に含まれていないわが国の大玉トマト品種115品種に加え、ミニ・ミディトマト6品種、海外(オランダ)育成17品種の計138の商用F₁品種を収集し、各1個体からDNAを抽出した。加えて、過去に得ていた1536 SNPsのタイピングデータに基づき、ジーンバンクに保存されている663点のトマト遺伝資源からコアコレクション構築のアルゴリズムを適用して54点を選択して、同様にゲノムDNAを調製した。これら計192品種・系統をAxiom タイピングアレイ (Axiom SL96 v2014) によるSNP タイピングに供試し、データを取りまとめた。

(2) ゲノムワイドマーカー情報に基づく多収・高糖度トマト選抜のための次世代型マーカー育種技術開発とその試行

a) ゲノム育種価算出モデルの構築

-1) GMRILsの秋作養液栽培による形質調査

供試材料として、GMRILs 172系統、対照品種として「Geronimo」、「桃太郎8」、他5品種を用いた。これらは2013年7月31日に播種し、8月19日にロックウールスラブに定植した。培養液は大塚ハウスA処方+大塚ハウス5号混合液を用い、EC値は2.8dS/mとした。植物体は、2条振り分け誘引し、第4花房より上位2枚の葉を残して摘心した。調査は、第4花房までの総収量および良果収量、果実糖度などについて行った。

-2) GMRILsをトレーニング集団とした統計モデルの構築

GMRILsおよびこれらの両親である「Geronimo」と「桃太郎8」間の交雑 F_1 (G_1F_1) 集団に対し得られた4,323個のSNP遺伝子型 (GMRIL_4K) を統計モデルの作成に用いた。GMRIL_4K中には、3つのSNPの組み合わせで4つのハプロタイプを表現しうるマーカー (ハプロタイプマーカー) が含まれている。統計モデルに組み込む形質値は、GMRILsを過去2回の春作養液栽培、過去4回の秋作養液栽培に供した際の糖度、良果収量のデータ (既往成果) を用いた。

ゲノム育種価予測のための統計モデルは、推定された4つのハプロタイプ毎のマーカー効果を返すプログラム (axiomril_3、マーカー効果の推定モデルはBayes D)、あるいは、ハプロタイプを推定せず、2~4アレルのマーカー遺伝子型毎の効果を単純に返すプログラム (snpsselect_3、マーカー効果の推定モデルはBayes D) により作成された (NGB2010との連携)。ゲノム育種価の予測精度は、交差検証法 (一部系統の表現型を除いてゲノム育種価予測モデルを作り、除いた一部系統のゲノム育種価を予測、対応する表現型との相関解析を行う) により評価した。

算出されたゲノム育種価と表現型間の相関は、糖度については、春秋作のいずれも snpsselect_3 が高く、良果収量については、春秋作のいずれも axiomril_3 が高くなった。しかしながら、プログラム間による差は僅かであること、さらに、今後の実験では相互交雑を繰り返すことにより、組換えによるハプロタイプ予測精度の低下が予測されたため、以降の実験では、糖度や良果収量のいずれにおいても snpsselect_3 を採用することとした。一方、GS に使用予定の384種の低コストマーカーセット (GMRIL_384) を用いた場合のゲノム育種価の精度を求めたところ、GMRIL_4K を用いた場合と遜色が無く、今後の選抜において有効であることが示唆された。

-3) SL96の養液栽培による形質調査 (春作および秋作)

春作は、2014年1月31日に播種し、2月20日にロックウールスラブに定植した。1品種当たり1株とし、培養液は大塚ハウスA処方+大塚ハウス5号混合液を用い、そのEC値は、定植時は0.8dS/m とし、段階的に2.4dS/m まで上げた。栽培管理および調査は、-1) と同様とした。秋作は、2014年8月11日に播種し、8月29日にロックウールスラブに定植した。栽培および調査は春作と同様に実施した。

-4) SL96をトレーニング集団とした統計モデルの構築と循環選抜世代での再モデリング

-4-1) 糖度および収量のゲノム育種価算出モデルの構築

14,250のSNP遺伝子型情報とこれまでに得られた5作（春2作、秋3作）の糖度および総果収量の形質値を用いて、SL96に対する予測ゲノム育種価を推定した（NGB2010との連携）。形質値は、各作型間での平均値を算出して解析に用いた。また、ゲノム予測育種価の推定には、代表的な線形回帰手法である、Bayesian Lasso (BL)、Extended Bayesian Lasso (EBL)、Bayes C (BC)、Weighted Bayesian Shrinkage Regression (wBSR)の計4つの統計手法を用いた。さらに、10分割交差検証におけるゲノム予測育種価と形質値との相関係数を調査することにより、手法間での推定精度の比較および評価を行った。

交差検証の結果、BL、EBL、BCおよびwBSRの4つの統計手法間の差はそれほど顕著ではなかった（表2）。しかしながら春および秋の両作期とも、糖度ではBLが、総果収量ではBCが、わずかではあるが高い推定精度を示したため、これら手法をゲノム育種価算出モデルに使用した（表2）。また、全体的に春作よりも秋作の方が高い推定精度を示した（表2）。なお、実際の選抜（秋作）においては、上記（1）b）-3）で作成した384種の低コストマーカーセット（SL96_384）によるSL96のタイピングデータ、SL96の秋3作の糖度および総果収量の形質値および統計手法GBLUPを用いて作成し直した統計モデル（SL96モデル）を使用した。

表2 10分割交差検証による各統計手法の評価

形質	作期	手法			
		BL	EBL	wBSR	BC
糖度	秋作	0.72	0.63	0.71	0.71
	春作	0.52	0.52	0.46	0.5
総果収量	秋作	0.55	0.45	0.54	0.56
	春作	0.28	0.12	0.18	0.29

各手法について、5回の10分割交差検証におけるゲノム予測育種価と形質値との相関を示す。

数値が高い程、その手法が構築するゲノム育種価算出モデルの精度が高いことを示唆する。本研究におけるトマトF1品種群では、春作よりも秋作の方が総じて予測精度が高いこと、また糖度についてはBLが、総果収量についてはBCがモデル構築に優れることが示された。

-4-2) 循環選抜世代でのゲノム育種価算出モデルの再構築

SL96モデルは商用F₁品種96点を持つ遺伝的要素に基づいて予測GSモデルが構築されているが、R₁F₁集団およびR₂F₁集団は親4品種の遺伝的要素からのみ構成されているため、このような遺伝背景の違いが予測精度に影響を及ぼす可能性がある。そのような問題に対しては、選抜後代集団の形質値を用いてGSモデルを再構築（リモデリング）することが有効とされている。そこで、R₁F₁およびR₂F₁集団（秋作）の形質値を用いて、リモデリングの効果を調査した（図2）。マーカーセットはSL96_384、モデル構築のための統計手法はGBLUPを使用した。

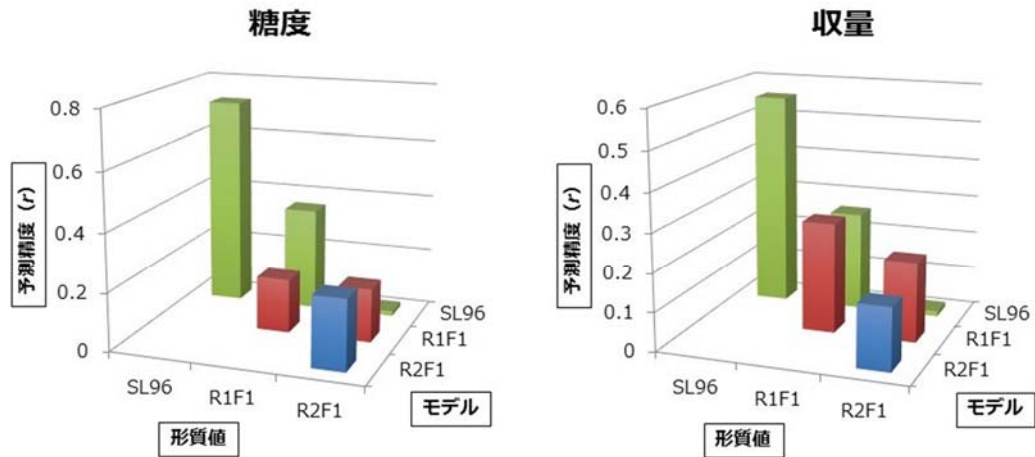


図2 各選抜世代におけるGSモデル予測精度の比較

SL96モデルは R_1F_1 集団に対しては、一定の予測精度を示したものの（図2のうち、集団が R_1F_1 、モデルがSL96モデルでの相関係数）、 R_2F_1 集団に対する予測精度は非常に低いものとなった（図2のうち、集団が R_2F_1 、モデルがSL96モデル）。一方、 R_1F_1 集団のデータを用いて再モデリングを行った場合、 R_1F_1 集団に対する予測精度はSL96 モデルと同等かあるいは下回っていたものの（図2のうち、集団が R_1F_1 、モデルが R_1F_1 モデル）、 R_2F_1 集団に対する予測精度はSL96モデルを上回っていた（図2のうち、集団が R_2F_1 、モデルが R_1F_1 モデル）。なお、 R_2F_1 集団のデータを用いて再モデリングした場合の、 R_2F_1 集団の形質値に対する予測精度は、 R_1F_1 モデルとほぼ同等であった（図2のうち、集団が R_2F_1 、モデルが R_2F_1 モデル）。このように再モデリングは、再モデリングを行った当代での予測精度改善効果は明確ではなかったものの、次の世代に対して顕著な効果を示した。

b) GMRILs間交雑とGSによる糖度に優れた安定多収系統の選抜と検証

-1) SNPタイピングとGSにより選抜された有望系統間の相互交雑と採種

GSによる選抜と相互交雑、さらには検証実験の全体の流れを図3に示す。全てのGMRILsの糖度と良果収量について、GMRIL_4Kを搭載したsnpselect_3により、春作と秋作別にゲノム育種価を算出した。次に、良果収量のゲノム育種価が上位30のGMRILsについて糖度のゲノム育種価でソートし、ゲノム育種価が最上位から7番目までに該当するGMRILsを有望系統とした。この選抜を春秋モデル毎に実施し、各モデルで選抜した7系統に対しラウンドロビン方式による相互交雑を行った。ラウンドロビン交雑は、SNP遺伝子型でクラスタリングした際に、交雑相手間の遺伝距離の合計が最大となるような組み合わせで実施した。後代の R_1F_1 は分離しないため、自殖により世代を進め、遺伝子型のシャッフリングがさらに進む R_1F_2 以降の集団からの有望親の選抜と相互交雑においては、GMRILsに用いた手順と同様に行った。ただし、有望系統を選ぶ際は、供試集団の良果収量のゲノム育種価が上位から約 $n/2$ までのものをまず選び、次いで、選抜した集団から糖度のゲノム育種価が最上位から7番目までに該当する系統を選抜することにより行った。

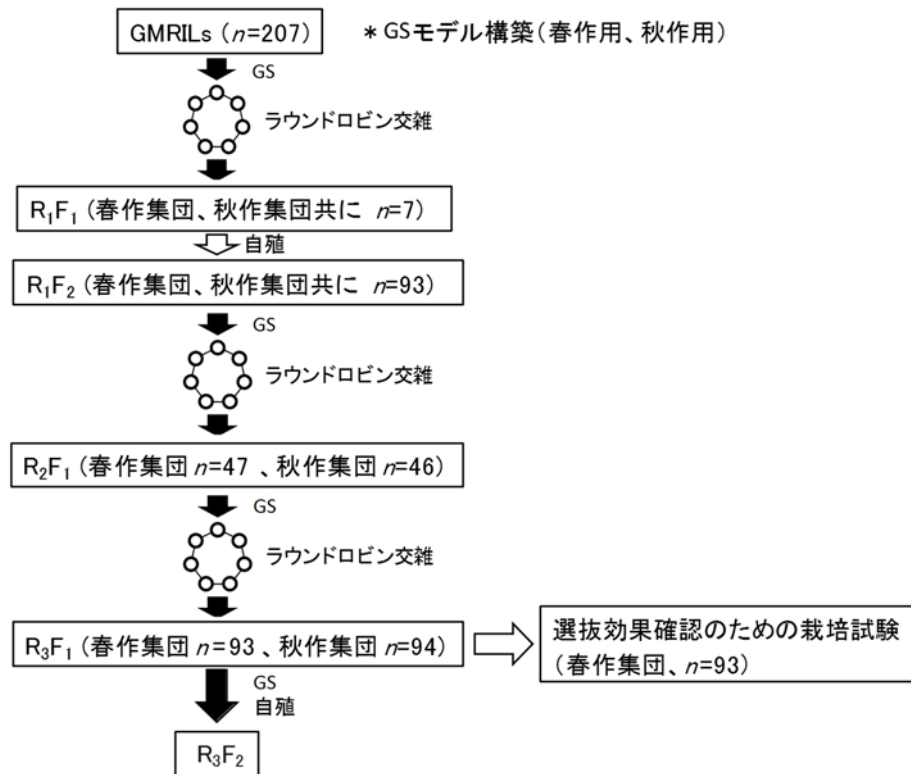


図3 GMRILsを育種母集団とした系統育成の流れ

-2) GSの選抜精度の評価と選抜効果の検証

-2-1) 集団の形質値とゲノム育種価との相関

糖度と良果収量のいずれにおいても、世代が進むにしたがってゲノム育種価と形質値との相関係数が低くなる傾向が見られた。特にR₃F₁集団の良果収量では、ゲノム育種価と形質値との相関は認められなくなった。これはGSの過程で主要なQTLのアリルが集積され、集団内の遺伝的なバリエーションが少なくなったためと考えられる。またこれらの結果は、複数世代にわたって同一のGSモデルを利用すると、世代が進むにしたがって選抜効率が低下することを示唆した。

-2-2) GMRILs とR₁F₂ 集団の形質値の比較

出発集団のGMRILsの春作形質値平均および春モデルで選抜されたR₃F₁集団の春作において得られた形質値平均を比較したところ、R₃F₁ 集団において、糖度および収量性関連形質について改善効果（Geronimoの形質値で補正した値で約数%程度）が認められた。

-2-3) 改良集団の育種素材化に向けた自殖固定系統化

春作集団の糖度についてはQTLの集積が完了したことが示唆され、良果収量についてもゲノム育種価ベースで5～15%の改良効果が予測された。これらの結果からGSによる改良は十分であると判断し、当初の計画通りR₃F₁世代から自殖固定系統化を開始することとした。選抜用集団として準備した春作栽培R₃F₁ 93個体のうち、良果収量ゲノム育種価の高

い48個体をまず選抜し、その中から糖度ゲノム育種価の高い12個体を選抜した。これらの選抜個体を栽培し、 R_3F_2 種子を獲得した。

秋作集団についても、両形質とも改良効果は十分であると判断し、当初の計画通り R_3F_1 世代から自殖固定系統化を開始した。選抜用集団として準備した秋作栽培 R_3F_1 94個体のうち、良果収量ゲノム育種価の高い48個体をまず選抜し、その中から糖度ゲノム育種価の高い12個体を選抜した。これらの選抜個体を栽培し、 R_3F_2 種子を獲得した。

c) SL96間交雑とGS等による収量に優れた高糖度系統の選抜と検証

-1) SNPタイピングとGSにより選抜された有望品種・系統間の相互交雑と採種

まず最初に、品種間交雑後代の分離予測シミュレーションを行い、期待値の高い品種組合せを検索した（以下-1-1）。その後、これら品種間の相互交雑後代について、低コストマーカーセット（SL96_384）によるタイピングとゲノム育種価予測、相互交雑により、GSを用いた循環選抜による実証試験を行った（以下-1-2）。

-1-1) 分離予測シミュレーションに基づく有望品種組合せの選抜

GSにおける交雑組合せは、交雑後代のゲノム育種価を分離予測シミュレーションによって推定し、その結果に基づいて選ぶことが理想的である。しかし、分離予測シミュレーションはその処理に膨大な計算時間を要すること、また本研究のように96品種から4品種を選ぶ場合、その組合せは3,321,960通りもあることから、これらすべてについて分離予測シミュレーションを行うことは現実的ではない。そこで、本研究では有望品種組合せの選抜に、以下の2段階の方法を用いた。

i) ゲノム育種価の最大値に基づく選抜

ゲノム育種価の最大値とは、その4品種に由来する後代で実現できるゲノム育種価の最大値であり、この値が高いほど大きな遺伝的改良効果が期待できる。96品種から4品種を選ぶ全3,321,960の組合せについてゲノム育種価の最大値を算出した結果、糖度のゲノム育種価最大値が高い組合せは、概ね総果収量についてもゲノム育種価の最大値が高い傾向が見られた（図4、5）。これは、既存の品種群のゲノム育種価が示す傾向（糖度と総果収量は逆相関の関係）とは逆であり、今後の糖度と収量の同時改良の実現を期待させる結果となった（図5）。そこで、春作、秋作それぞれについて、糖度・収量の両方でゲノム育種価の最大値が高い24組合せを選び、次の選抜基準であるゲノム育種価分離予測シミュレーションに供試した。

ii) ゲノム育種価分離予測シミュレーションに基づく選抜

ゲノム育種価の最大値が高い組合せでは、より大きな遺伝的改良効果が期待できるが、実際にゲノム育種価が最大値を示す系統を作出することは、時間・労力等の関係により困難である。そこで、上記iで選ばれた春作・秋作それぞれ24組合せについて、トマトの遺伝地図情報を元に構築した交雑後代の分離予測シミュレーションプログラムを用いて、選抜5世代後に実現可能なゲノム育種価の平均値を予測した。その結果、糖度改良においては春・秋の両作期とも選抜5世代後の集団で、既存の品種よりも高い糖度を示すことが予測された（図5-AおよびC）。一方、糖度・収量の同時改良では、糖度・収量の

両形質ともに既存品種を越えるような個体を得ることは難しいことが示された（図5-BおよびD）。しかしながら、既存品種は糖度が高いと収量が低い傾向があるが（図5）、選抜5世代後には、既存品種の糖度を超えながら収量も既存品種の中で上位に入る個体の出現が予測された。

最終的な品種組合せは、この分離予測シミュレーションの結果を元に決定した。

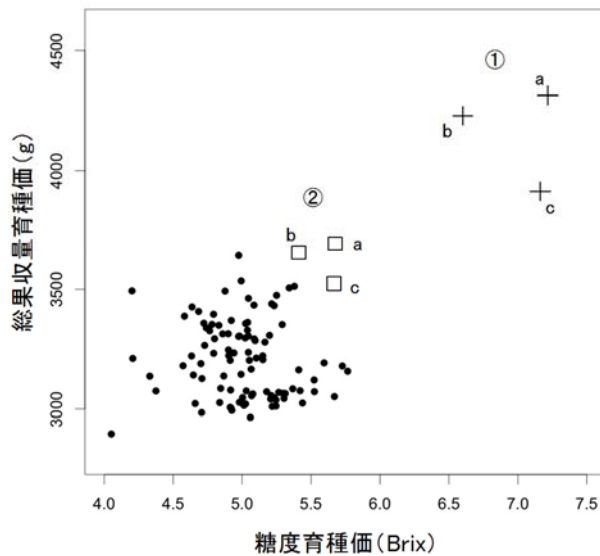


図4 有望品種組合せの選抜方法および図5の見方についての説明

‘●’は現在の品種のゲノム育種価を表す。本研究では、これらの点よりも右（糖度改良）もしくは右上方向（糖度・収量の同時改良）にプロットされる系統の作出を目指す。

① ゲノム育種価の最大値を算出する
選ばれた4品種の後代で実現できるゲノム育種価の最大値が大きいほど、GSの効果が大い期待できる。各品種組合せのゲノム育種価の最大値は、図中では‘+’で示される。図の例では、aの‘+’は、bやcと比べて糖度も収量も高いので、良い組合せであると判断する。

② 選抜5世代後の集団におけるゲノム育種価の予測
ゲノム育種価の最大値を実現することは、現実的には難しい。そこで分離予測シミュレーションを用いて、選抜5世代後に実現可能なゲノム育種価を予測した。図中では、‘□’で示す。
最終的な品種組合せは、この値を元に決定した。

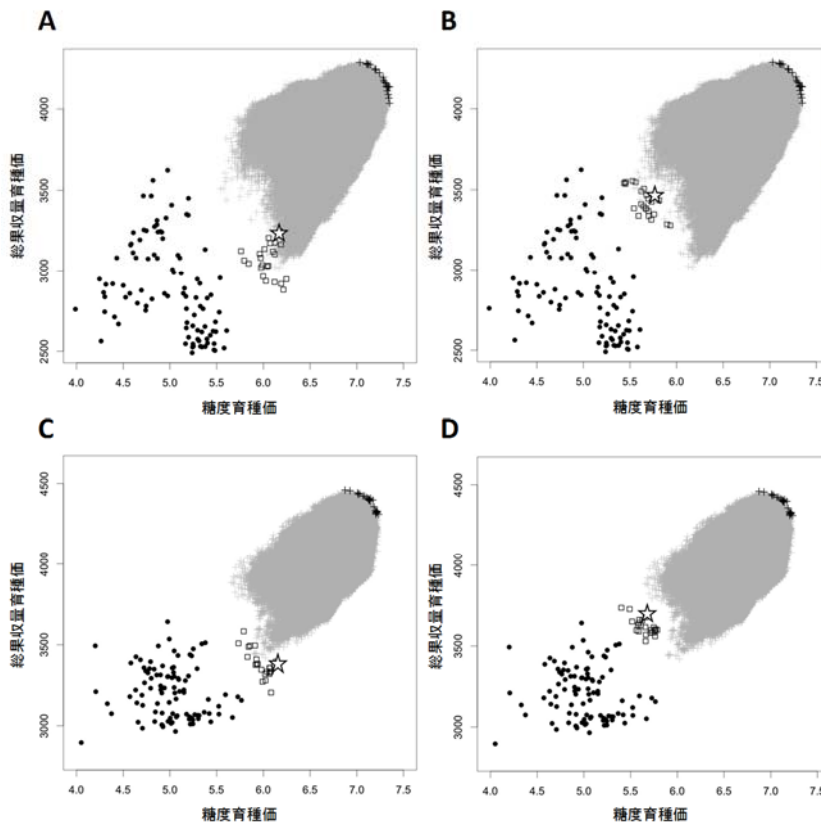


図5 糖度および総果収量のゲノム育種価潜在能力と分離予測シミュレーション

- A 秋作における糖度改良。
- B 秋作における糖度・収量の同時改良。
- C 春作における糖度改良。
- D 春作における糖度・収量の同時改良。

本図の見方については、図4を参照。

‘●’は現在の品種のゲノム育種価。

‘+’は各品種組合せにおけるゲノム育種価の最大値。

各パネル、灰色で塗りつぶされているエリアは、96品種から4品種を選ぶ約300万通りについてプロットされている。

各プロット右上端部の黒色の‘+’は、糖度と総果収量の両方で育種価の最大値が高いため、次の選抜基準である分離予測シミュレーションに供試された品種組合せ。

‘□’は、分離予測シミュレーションにより推定された選抜5世代後のゲノム育種価。

‘☆’は、実際の交雑に採用された品種組合せの選抜5世代後のゲノム育種価。

-1-2) 有望品種・系統間の相互交雑と採種

GSによる選抜と相互交雑、さらには検証実験の全体の流れを図6に示す。

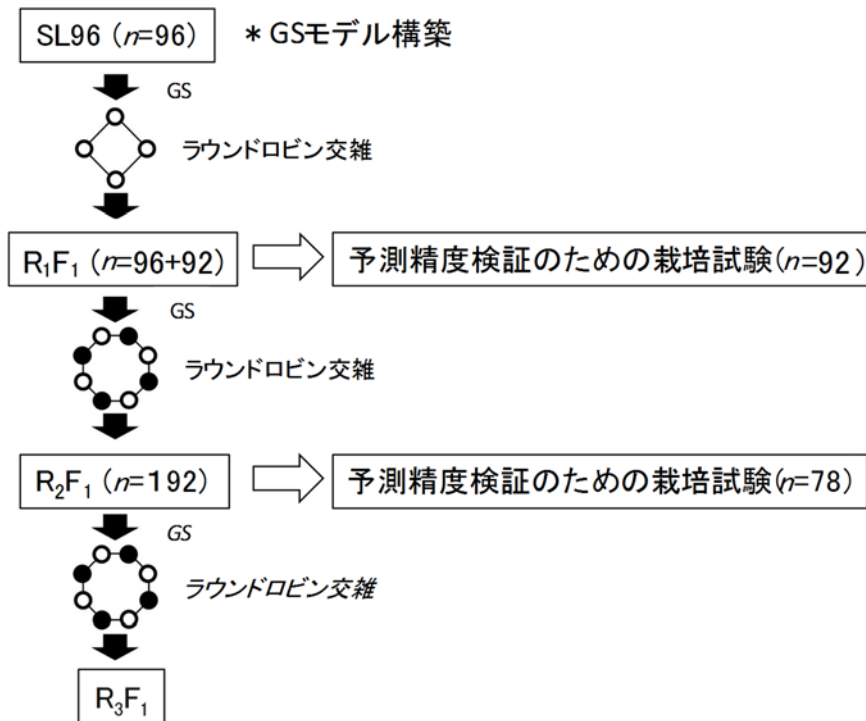


図6 SL96を育種母集団とした系統育成の流れ

有望品種間交雑で得られたR₁F₁集団のうち、収量ゲノム育種価に優れた上位4個体と、糖度ゲノム育種価の上位3個体および上位個体のうち開花時期が他の株と一致した1個体を選抜し、図7のような配置で交雑を行った。

R₂F₁ 集団についても同様にSL96 モデルによる糖度・収量のゲノム育種価を算出し、収量ゲノム育種価に優れた上位4個体と、糖度ゲノム育種価の上位4個体を選抜し、図8のような配置で交雑を行い、R₃F₁種子を採種した。

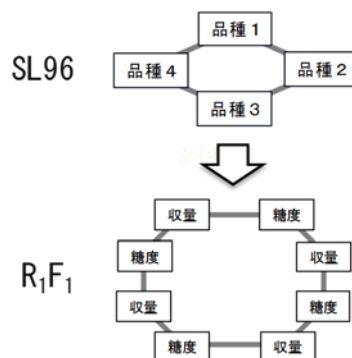


図7 SL96からR₁F₁までのGSの過程

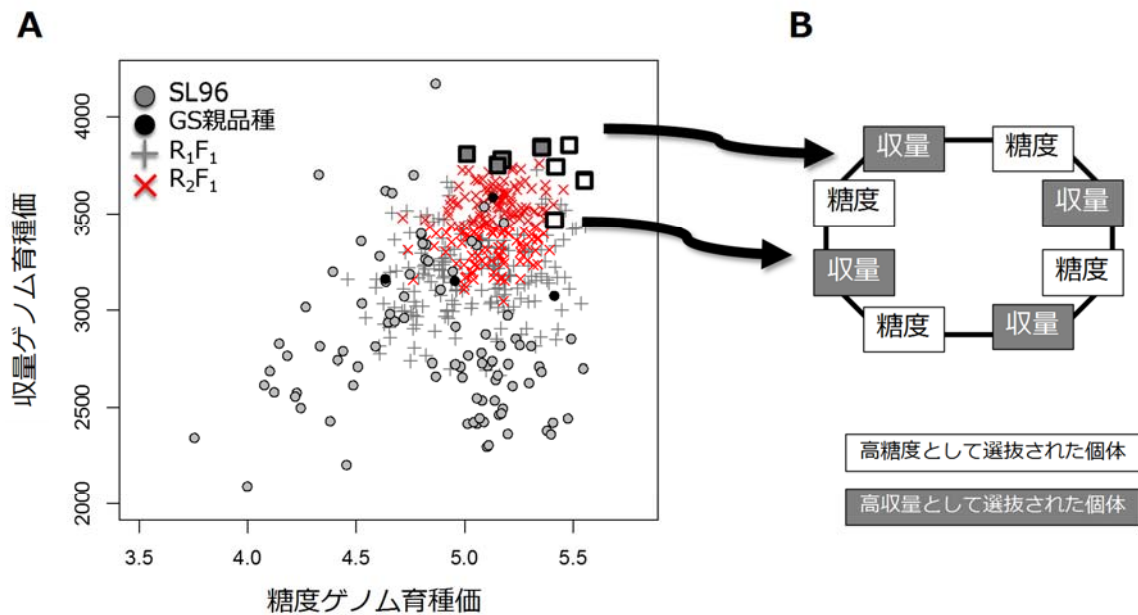


図8 R₂F₁集団の個体選抜と相互交雑
 A SL96モデルに基づくR₂F₁集団のゲノム育種価
 B 相互交雑の模式図

-2) GSによる選抜効果の検証

R₂F₁ 集団の養液栽培における形質評価を行ったが、過去4回にわたって実施したSL96 の形質評価と比べて、H28～H29年度に実施した形質評価は、定植後の9月頃に高温あるいは曇天が続いた影響で着果不良や徒長などが起こり、生育が極めて不安定となった。そのため、R₂F₁を用いたGSによる改良効果の判断は今回保留とした。

3) 成果活用における留意点

- ・ トマトF₁品種群を出発集団としたゲノム育種価算出法はマニュアルとして公開している (2015普及成果情報)。

- ・ GSは、表現型による選抜が難しい少数の形質について、交雑を繰り返すことにより改良する技術であることから、1～2回程度の相互交雑・選抜による育種効果はさほど期待できないと思われる。

4) 今後の課題

再モデル化のための形質評価時に天候不順となると、評価に耐えるモデル再構築が困難となる恐れがある。そのため、別情報を予測モデルに組み込む等の方策により、モデルの精度を改善する工夫も将来的には必要かもしれない。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号:13405175

研究期間:平成25～29年度

中課題名:多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号:NGB2006(平成28年度にNGB1004(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間:平成25～29年度

小課題名:業務用初夏どり寒玉キャベツ育成のためのGS基盤の構築と実証(平成28年度にトマトおよびキャベツの次世代型マーカー育種技術開発のための全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名:農研機構野菜花き研究部門・野菜育種ゲノム研究領域・アブラナ科ユニット・柿崎智博

1) 研究目的

(1)キャベツ全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備

国内の露地野菜生産において特に生産額が大きい重要品目であるキャベツを対象として、多収性や高品質特性をもつ新品種開発の基盤技術となるDNAマーカーリソース、特に高速で省力的なタイピングが可能な一塩基多型(SNP)情報を重点的に整備する。優良品種の交雑後代集団や国内外の多様な商用品種を用いたゲノミックセレクション(GS)育種技術および最適交配親決定のための全ゲノム予測(WGP)技術の開発のために、必要とされる網羅的かつ高密度な多型情報を次世代型DNAシーケンス(NGS)技術を駆使して収集し、得られた多型情報に基づいてジェノタイピングアレイ(Axiom等)やマイクロフルーディクス(BioMark等)などを用いた高速タイピングプラットフォームを構築する。さらに、育成年次の異なる様々な品種・系統のSNP遺伝子型を網羅的に収集し、わが国のキャベツ品種や育種素材に対する汎用性および網羅性の高い多型情報リソース基盤を構築する。

(2)GS基盤の構築と実証

網羅的DNA多型情報をもとに農業有用形質に関与する能力を予測して選抜するGS法は、育種年限の短縮や効果の小さいQTLの効率的な集積が期待される育種法であるが、他殖性露地野菜育種へのポテンシャルは未解明である。他殖性露地野菜の筆頭であるキャベツの生産においては、不結球や抽だいが発生しやすい初夏(4～5月)に安定して収穫できる寒玉系品種が業務加工用に強く望まれている。しかし、結球性や抽だい性は複数の遺伝子が関与する形質であること、キャベツは開花に至るまで長期間を要することなどの理由で、この時期に安定して生産可能な品種の育成は遅れている。そこで、本研究では初夏に収穫可能な寒玉系キャベツ系統群の育成を目的に、結球性と抽だい特性に着目し、解析集団の表現型データおよびゲノムワイドなSNPsマーカーの遺伝子型データに基づいて構築した予測モデルを用いて選抜し、その選抜効果を検証する。

2) 研究成果

初夏に収穫可能な寒玉系キャベツに求められる形質である、早春に素早く結球する性質(結球性)と、低温に遭遇しても花芽分化がおこらず抽だいににくい形質(抽だい性)をターゲットに、両形質についてのGSモデルを構築した((2)GS基盤の構築と実証)。GSモデルの構築に必要な全ゲノム網羅的多型情報の取得は(1)キャベツ全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備において実施した。本課題では、初夏どり寒玉系キャベツ系統群の育成をモデルとしたゲノミ

ックセレクションの基盤構築のため、極晩生寒玉系キャベツF₁品種「T-520」と極早生性の春系キャベツF₁品種「金系201号」を両親とする4元交雑F₂集団を用いた。

(1)キャベツ全ゲノムDNA多型情報の網羅的整備

キャベツ交配親系統間の網羅的SNPデータ取得

「T-520」の両親系統(TK001およびTK002系統)ならびに「金系201号」の全ゲノム解読を行った。HiSeq2000を用いて解析を行った結果を表1に示す。TK001系統からは34.3Gb、TK002系統からは41.4Gb、「金系201号」からは44.9Gbのペアエンドシーケンスを取得できた。これは冗長度9~14倍のデータに相当する。

リファレンスとして使用する倍加半数体系統・「MP22」のメイトペアライブラリーからは、冗長度25倍に相当する配列データが得られた。しかし、「MP22」のペアエンドライブラリーからは期待した量の2割にも満たないデータしか得られなかったため、新たにMiseq用のペアエンドライブラリーを作製し、冗長度37倍に相当する配列データ(リード長300塩基、28.1Gb)を取得した。「MP22」から得られた配列データを利用して、jellyfishを用いてキャベツのゲノムサイズを推定したところ、770Mbであると推定された。また、k-mer=17の出現頻度のピークが一つであったことから、「MP22」は純系であることが確認された。

表1. 供試したキャベツ品種系統のNGSデータ

品種・系統	個体数	ライブラリ	リード数(Fw+Rv)	リード長	データ量(Gb)
TK001 固定系統	8	PE	372,657,010	92塩基	34.3
TK002 固定系統	8	PE	449,534,490	92塩基	41.4
金系201 F1品種	4	PE	487,866,608	92塩基	44.9
		3kb_MP	210,848,154	92塩基	19.4
MP22 DH	1	8kb_MP	214,232,818	92塩基	19.7
		PE	93,600,000	300塩基	28.1

高密度SNPタイピングアレイの構築

次に、支援課題NGB1007と連携し、昨年度3系統のショットガンシーケンス配列を基に抽出した約18万の候補SNPについて、SNP部位の配列リード数と位置情報(遺伝子領域、非遺伝子領域、リピート領域)の違いに基づいて576SNPを抽出した。そのうちの16SNPについて予備的にサンガーシーケンスを行ったところ、8SNPで真性であると判断され、3つは偽陽性であった。また、3系統から増幅した576SNPのアンプリコンのシーケンスデータを取得済みであり、信頼性評価解析を実施中である。抽出したSNPについて元々のシーケンスデータの1個体あたりの厚みを検証したところ、「金系201号」ではリードの厚みが若干薄い方に偏って抽出されていることがわかった。これは、TK001とTK002ではリードの厚みが4x程度に、「金系201号」では12x程度にピークがあったにもかかわらず、一律にリードの厚みが2x~16xのフィルタで抽出したためであると考えられた。そこで、「金系201号」についてはリードの厚みの条件を2x~26xに変更して再度抽出を行い、最終的に約14万SNPを抽出した。隣接するSNPの距離が大きいものを優先に約70,000SNPに絞り込み、AxiomタイピングアレイのSNPデザインのスコアに基づいて約60,000SNPに絞り込んだ。選抜したSNPに染色体情報を付与するために、SNPが検出されたscaffoldおよびSNPデザインのために切り出した周辺配列をクエリとして、今年度公開されたキャベツゲノムに対してblast検索した結果、選抜したSNPはキャベツの9本の染色体(C01~C09)にほぼ均等に分布していると考えられた(表2)。SNPの親品種・系統間の遺伝子型の内訳をみると、「金系201号」

がヘテロ型であるSNPが多く抽出されていた(表3)。

表 2. 候補SNPsのキャベツ染色体(C01~C09)分布

染色体	BLAST検索に用いた配列(クエリ)*			
	Scaffold		SNP周辺配列	
	SNP数	染色体別の割合(%)	SNP数	染色体別の割合(%)
C01	6,741	11.2	4,602	7.7
C02	5,938	9.9	3,590	6
C03	8,182	13.6	6,265	10.4
C04	6,271	10.5	4,506	7.5
C05	5,757	9.6	3,911	6.5
C06	6,031	10.1	4,463	7.4
C07	8,323	13.9	6,130	10.2
C08	6,743	11.2	5,453	9.1
C09	6,008	10.0	4,057	6.8
情報なし**	6	0.0	17,023	28.4

表 3. 候補SNPsの遺伝子型内訳

T-520	金系201号	SNP数
AA	AB	34,835
AB	AA	2,516
AA	BB	17,149
AB	AB	1,050

* SNPの検出されたscaffoldの配列、タイピングアレイ設計のために切り出した配列、をそれぞれクエリとしてBLAST検索を行い、ベストヒットした染色体を抽出した。

** BLAST検索の結果、identity >= 95.0%、coverage=100%の条件でヒットしなかったものは「情報なし」とした。

キャベツのゲノム選抜に供試する384SNPマーカーセットの選抜

抽出した49,795SNPを搭載したAxiomアレイを用いて、解析集団である4元交雑F₁およびF₂から取得した遺伝子型データから、有効なデータが得られているSNPの選定を行った。まず、T-520の両親系統の遺伝子型においてヘテロ型として検出されているSNP(534個)が取り除けていなかったためにこれらを除いた。欠測データが5%以上のSNP(2,261個)、マイナーアレルが5%未満のSNP(2,666個)、F₁およびF₂において分離がゆがんでいる、あるいは同一の遺伝子型のみが検出されているSNP(3,827個)を除いた後、AxiomのSNPolisherTM評価でPolyHighResolutionであったものを選抜し、最終的に79.2%にあたる39,444SNPを有効遺伝子型データが得られたSNPとして抽出した。さらに、T-520x金系201号の遺伝子型の組合せで、AAxABタイプ(クラス1)、ABxBBタイプ(クラス2)、AAxBBタイプ(クラス3)にSNPを分類し、それぞれのクラスごとにSNPの組換え価を計算し、フレームワークとなりうるSNPを抽出し、染色体ごとに位置を決定した。最終的に1,211SNPからなる統合連鎖地図を構築した(表1, 図1)。ここから地図上での位置が均等になるように384SNPを選抜した。選定した384マーカーについて、一塩基伸長法に基づくSNPtypeマーカー384種を設計した。また、トレーニング集団として形質評価したF₂集団の384マーカーの遺伝子型情報を連携課題NGB2006に提供し、GSの予測モデル構築に供試した。

表 4. キャベツ 4 元交雑集団の統合連鎖地図の構築に用いたSNPマーカー

Chromosome	クラス1 AAxAB	クラス2 ABxBB	クラス4 ABxBB	計	平均マーカー間 距離(cM)	最大マーカー間 距離(cM)
C_01	35	21	106	162	0.61	3.30
C_02	42	11	82	135	0.71	8.50
C_03	66	46	109	221	0.63	3.70
C_04	21	11	65	97	1.07	5.10
C_05	22	11	98	131	0.81	11.50
C_06	10	3	86	99	1.06	32.00
C_07	20	15	114	149	0.63	5.30
C_08	34	20	45	99	0.82	4.60
C_09	29	14	75	118	1.07	11.30
計	279	152	780	1211		

クラス1～3：マーカーの情報量に基づく分類。AAxBB：AAはT-520、BBは金系201号の遺伝子型を示す。

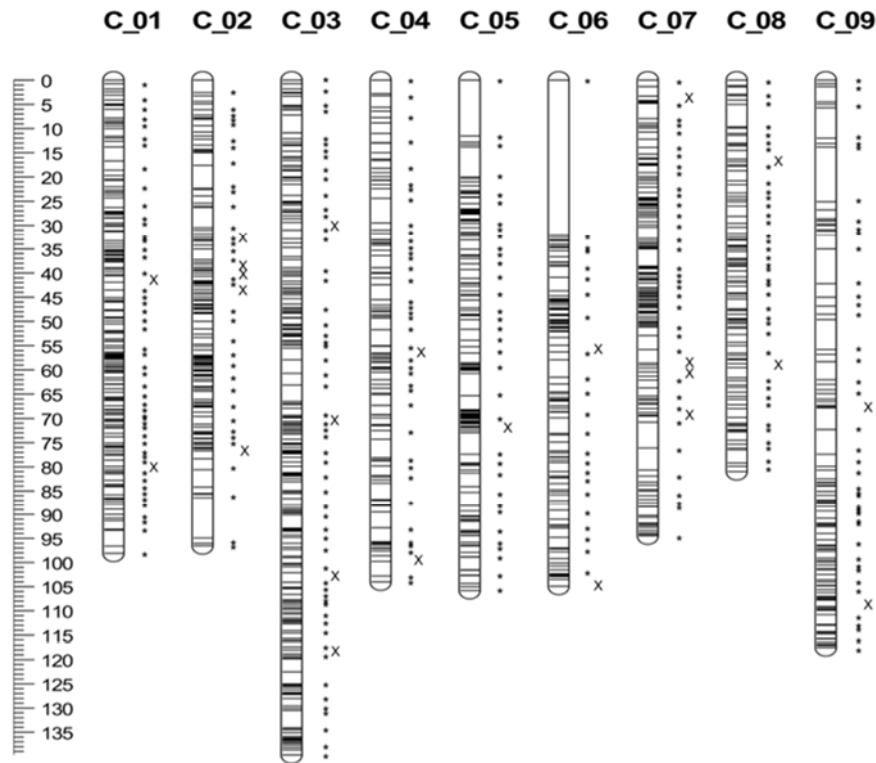


図1. 「T-520」と「金系201号」から開発した1,211SNPsを用いたキャベツ統合連鎖地図
 C_01～C_09はキャベツの染色体番号を示す。灰色の横線は1,211SNPsの位置を、アスタリスクはゲノム選抜に利用するために選抜した384SNPsの位置を示す。
 ×印は、SNPtypeアレイにおいて正しくコールされなかったSNPsを示す。
 目盛りの単位はcM。

キャベツ商用品種・固定種の集団構造解析

開発したSNPtypeマーカーを用いて、キャベツの市販品種と固定種からなる93品種・系統のジェノタイピングを行った。選抜した384SNPsについて、T-520と金系201号のNGSデータとAxiomで得られたF₂の遺伝子型と矛盾がないか確認した後、SNPtypeの遺伝子型データとNGSデータが一致するかどうかを検証した。その結果、24マーカーについては、XX,XY,YYを正しくコールできず、スポットが一カ所に固まっていたり、原点付近にプロットされていたりして親の遺伝子型を誤判定していると考えられた。これらを除く360マーカー(93.7%)は信頼性の高いマーカーであると判断されし、マーカーセット構築を完了した。次いで、キャベツ93品種・系統群から取得した360マーカーの遺伝子型データを用いてクラスタリング解析(Jaccard距離に基づくNJクラスタリングおよびSTRUCTURE解析)を行った(図2)。一般に春系と呼ばれている品種群と寒玉系と呼ばれる品種群に大別される傾向が認められた。寒玉系の中にはボール系と呼ばれるコペンハーゲンマーケット群の品種がまとまったクラスターを形成していた。今回の解析では、農業技術体系のF₁品種の系統関係に記載されているF₁品種やそれらの育種素材となった基本品種群を含めて解析を行ったが、系統関係との類似性は認められなかった。

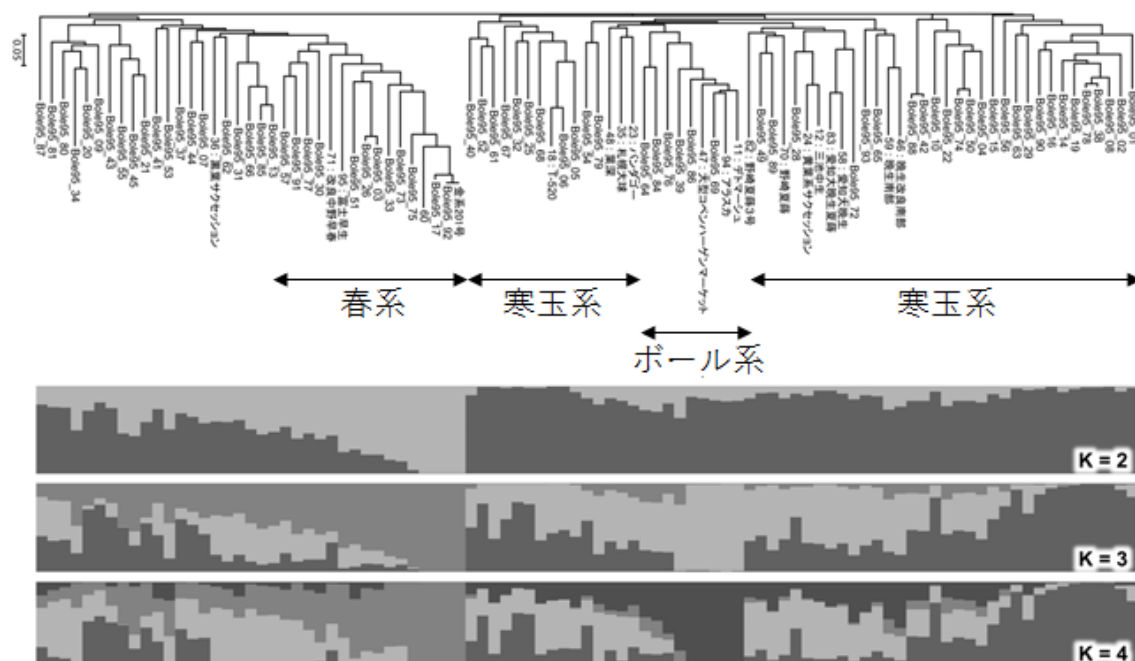


図2. 360SNPsマーカーの遺伝子型に基づくキャベツ品種・系統のクラスター解析
樹形図はJaccard距離に基づく近隣結合法による。STRUCTURE解析のプロット図は、k=2,3,4の結果を併記。計算条件はAdmixture-non Fモデルに従った。大きく春系と寒玉系の2つのクラスターにわけられ、さらにボール系が寒玉系の一部にサブクラスターを形成している。

(2) GS基盤の構築と実証

形質データの取得と予測モデルの構築

極晩生寒玉系キャベツF₁品種「T-520(タキイ種苗)」と極早生性の春系キャベツF₁品種「金系201号(サカタのタネ)」の4元交雑F₂集団を秋まき作型で栽培し、GSモデル構築のためのトレーニング集団とした。トレーニング集団の栽培は、定植日を2回に分けて2013年および2014年の合計4試験区で実施した。2カ年の共に定植日が遅い2区において1区よりも結球個体の割合が多かったため、GSモデルの構築には2カ年分の2区における結球程度(0:非結球、1:内部のみ小さく結球・球幅10cm未満・緩く結球、2:1と3の中間、3:球頭の葉の重なりが不十分、4:完全な結球)と、抽だい性(0:完全なとう立ち開花、1:蕾あり、2:明らかな蕾は確認できないが芯が伸びる、3:蕾確認できない)を形質値として用いた(図3)。GSモデル構築は、NGB1004において構築した1,211SNPsからなる統合連鎖地図から、遺伝距離が均等になるように選抜した384SNPsを使用した。次に構築したGSモデルの予測精度を8分割の交差検証により評価した。その結果、結球性および抽だい性の相関係数がそれぞれ0.400および0.517と比較的高い精度であることがわかった(図4)。

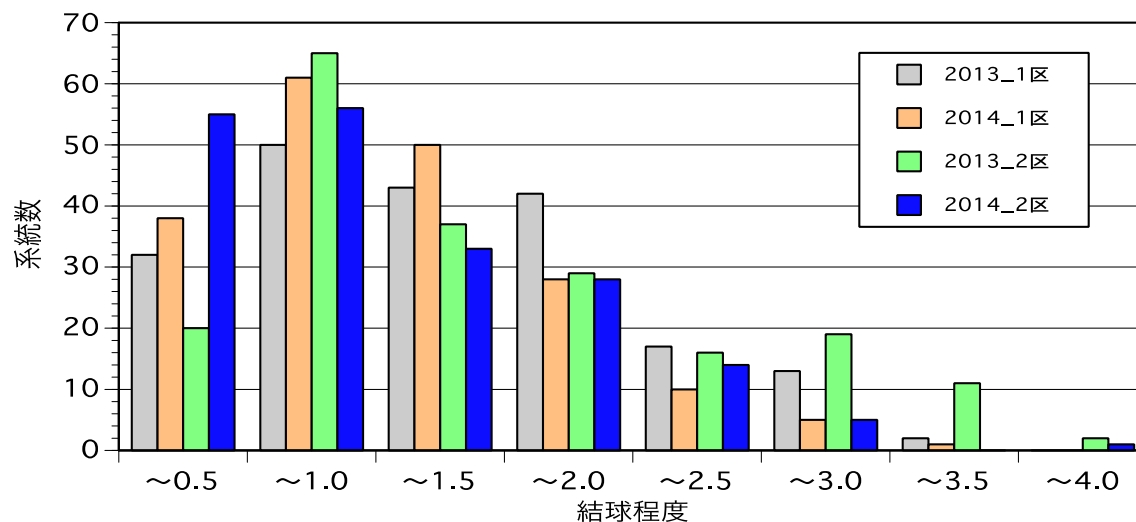


図3. トレーニング集団の結球程度の分布

結球程度は達観による5段階評価(0:非結球、1:内部のみ小さく結球・球幅10cm未満・緩く結球、2:1と3の中間、3:球頭の葉の重なりが不十分、4:完全な結球)。各試験区共に192個体を評価した。

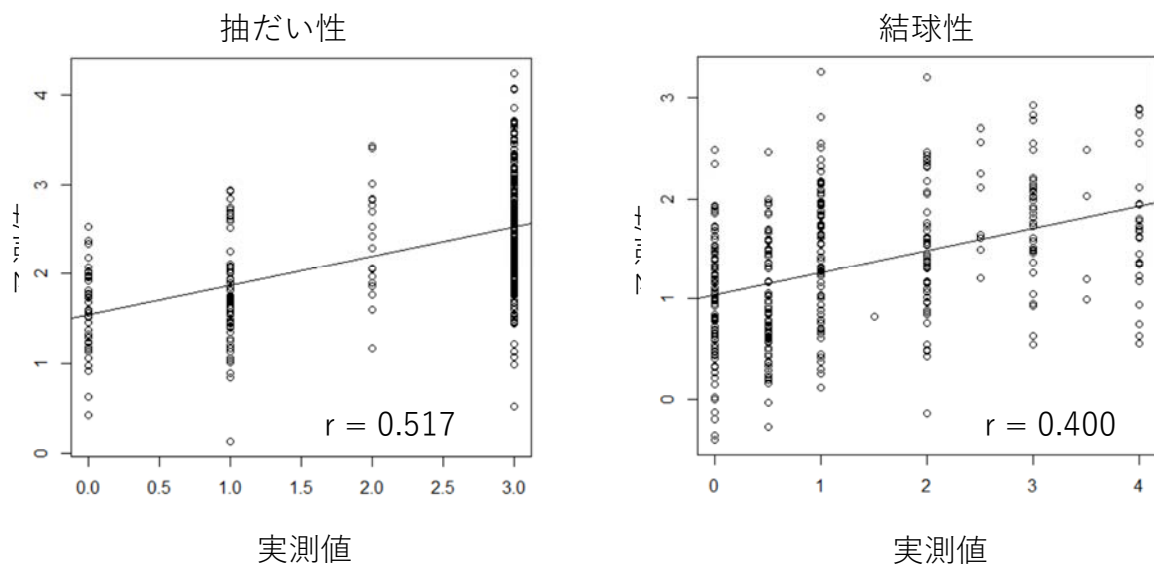


図4. 交差検証による予測モデルの評価

192個体のF₂を8分割し、うち7分割分の形質値でGSモデルを構築した。残り1分割の形質値を予測することで、GSモデルの精度を評価した。

GSモデルによる個体選抜と世代促進

384個体のF₂集団を育成し、全個体についてGSモデル作成に使用した384SNPsによるタイピングを行った。解析プラットフォームはSNPtypeアレイ(BioMark)を用いたが、384マーカーのうち、24マーカーのコールが不正確と考えられたため、GSモデルによる個体選抜には24マーカーを除いた360マーカーを使用した。マーカーの座乗位置は図1に示す。

得られた遺伝子型をGSモデルに代入することにより、結球性と抽だい性に関する高ゲノム育種価個体を選抜した。両形質について5個体ずつを鉢上げ・低温処理することにより、ラウンドロビン交配による改良集団(R₁F₂)の採種を行った。得られた改良集団を速やかに播種し、BioMarkによるタイピング、GS、ラウンドロビン交配することで改良第二世代(R₂F₂)を得た。各世代におけるゲノム育種価の推移を図5に示した。

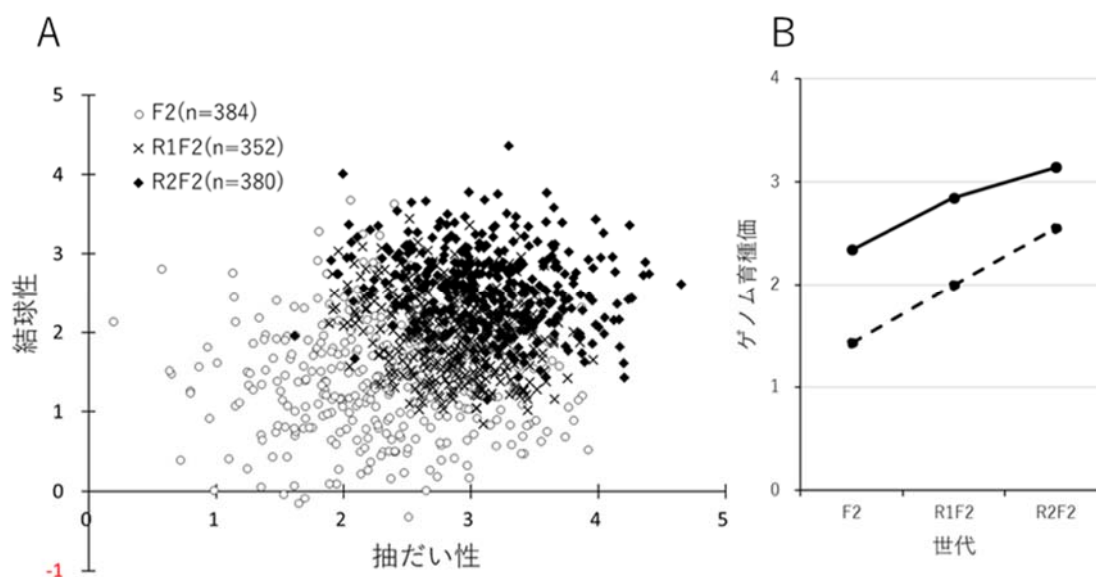


図5. 各世代におけるゲノム育種価の推移

A. 結球性および抽だい性のゲノム育種価の散布図

B. 各世代における平均値の推移

改良集団 (R_1F_2) の形質評価とGSモデルの選抜効果の検証

48個体の R_1F_2 を秋まき作型で栽培した (2016年10月定植)。例年に比べ生育期間の日平均気温が高く定植後の生育が旺盛だったことにより大苗での越冬となった。そのため、現行品種の「さつき女王」においても抽だいが激発した。これに対し、 R_1F_2 集団の抽だい性については、ほとんどの個体で花芽が観察されず晩抽性が付与されていると判断された (表5)。結球性については結球性程度の平均値が3.2とトレーニング集団として用いた F_2 集団 (2013,2014年度栽培: 平均値1.1) よりも向上していた。しかし、片親である「金系201号」が裂球している (過熟) 時期にもかかわらず、球重が軽い、とがり球傾向と言った問題点が多く、さらなる選抜と世代促進が必要と考えられた (表5)。

栽培した R_1F_2 ・48個体について、各個体のゲノム育種価と形質値 (階級値および実測値) の相関を解析することで予測精度 (r) を求めた (表6)。いずれの形質についても階級値に比べ実測値で高い予測精度となったが、結球重および芯長でそれぞれ0.264および0.143となり、GSモデル作成時の交差検証の予測精度 (それぞれ0.400と0.517) よりも大幅に下回った。この原因としては、GSモデル作成時と R_1F_2 栽培時の気温の違いが考えられた。また、ラウンドロビン交配時に採種可能であった交配親の組合せが限られたため、集団の遺伝的多様性が少なくなった事が考えられた。

表5.GSにより選抜されたR₁F₂の収穫期における特性（秋まき作型）

品種・系統	抽だい性 ^a	結球性程度 ^b	結球重(g)	球高(cm)	球径(cm)	芯長(cm)	備考
R ₁ F ₂	2.3	3.2	893.5	14.9	12.1	6.3	
T520 (P1)	1.3	3.1	625.5	13.7	11.9	-	球内抽だい
金系201号 (P2)	3.0	4.0	1770.3	-	-	-	裂球
さつき女王（標準品種）	1.0	4.0	949.9	12.5	15.0	-	球内抽だい
061-3_self (F3系統)	2.4	4.0	1028.9	15.1	15.0	6.2	
176-3_self (F3系統)	0.3	3.3	1113.0	17.0	15.0	15.8	
220-2_self (F3系統)	2.1	1.2	281.1	10.6	12.1	27.3	
009-2_self (F3系統)	0.5	0.3	624.9	13.0	12.0	49.4	
026-3_self (F3系統)	1.4	2.5	527.2	12.3	14.8	14.5	

a, 抽だい性は、0（開花）～3（花芽未分化）の4段階評価の平均値。

b, 結球性は、0（非結球）～4（完全な結球）の5段階評価の平均値。

播種：2016年9月27日、定植：10月21日、形質調査：2017年4月19日

F₃系統は2014年秋まき作型で栽培したF₂から達観により選抜した個体の自殖次代

表6. GSモデルから算出されたゲノム育種価と各形質の相関係数

	結球性		抽だい性	
	階級値	実測値 (結球重)	階級値	実測値 (芯長)
相関係数	-0.123	0.264	-0.261	0.143

3) 成果活用における留意点

本研究に使用した「T-520」および「金系201号」は、国内の種苗メーカーが育成したキャベツ品種であるため、ゲノム情報およびSNPs情報の公開の際は慎重に判断する必要がある。

4) 今後の課題

本研究により、国内のキャベツ品種に適用可能なSNPsマーカーセットが構築された。GSモデルによる選抜効果の検証については、評価年度（2016年）の気象がイレギュラーだったため、世代を進めた集団を用いて再評価する必要がある。寒玉系の親として用いた「T-520」は、球の肥大に時間を要する晩生品種であるため、改良集団の球重の軽さに繋がった。より早生系の寒玉品種を片親とすることで、安定して初夏に収穫可能な系統が作出できる可能性が高まると考えられる。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成25～29年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号: NGB2007(平成28年度にNGB1005(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間: 平成25～29年度

小課題名: ゲノムワイドなハプロタイプ定義によるリンゴの選抜育種法の開発(平成28年度にバラ科果樹の次世代育種技術開発のためのゲノムワイドSNPマーカーの整備(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構・果樹茶業研究部門・ゲノムユニット・國久美由紀

1) 研究目的

果樹研究所で育成されたリンゴ品種「ふじ」は、国内栽培面積の52%、世界総生産量の20%を占め、食味や日持ち性などに極めて優れた品種である。このため、「ふじ」は新品種育成の交配親として多用されており、「シナノゴールド」、「きおう」、「秋映」など多くの血縁関係を持つ新品種が生み出されてきた。一方で、昨今のリンゴ育種においては、日持ち性や着色性の向上など多くの課題が掲げられており、これらを満たす優良品種の育成が急務となっている。このためDNA情報に基づいた効率的な早期選抜システムを開発する必要性が高まっている。

リンゴの多くの果実形質(糖度、酸度、収穫期、日持ち性など)は多数の遺伝子が関与する複雑形質であり、従来のDNAマーカー選抜技術だけでは不十分であり、ゲノム解析によって得られた豊富な遺伝情報と高度な形質評価手法を組み合わせ、新たな育種法を開発する必要がある。そこで本研究では、ゲノムワイドに配置されたDNAマーカーの開発を行い、これを用いて国内の中核品種である「ふじ」を主体に、そのファミリー品種の染色体領域のハプロタイプ決定を行うことで、優良形質を支配する領域をより高精度に特定し、リンゴの新品種育成を理論的・効率的に行うための基盤技術を確立することを目的とする。

具体的には、「ふじ」染色体上に配置されたゲノムワイドなSNPマーカーを指標に、染色体のハプロタイプを決定し、「ふじ」を起源とする「千秋」、「シナノゴールド」、「きおう」など主要リンゴ品種・系統への染色体ブロックの移行を追跡する。さらに、果実形質との関連解析により、酸度、糖度、収穫期、日持ち性などの重要形質を支配する領域を網羅的に抽出する。また、数百個体の育種実生集団について、酸度などの各種形質を支配するブロックの情報を総合的に適用することにより形質を予測し、実測値と比較することで、開発した選抜手法の精度の検証を行う。

2) 研究成果

(1) リンゴにおけるゲノムワイドSNPマーカーの整備

① 「ふじ」リシーケンスによる SNP マーカーの開発

ハプロタイプ解析を行う「ふじ」について、リンゴゲノム(750 Mb)の約60倍相当でゲノムをリシーケンスし、約45 Gbのシーケンスデータを得た。リンゴでゲノム解読の行われた「Golden Delicious」の公開ゲノム配列(v1.0p)と比較し、「ふじ」と「Golden Delicious」の品種間および「ふじ」のアレル間SNP情報を取得した。SNP情報の取得には、アルゴリズムの異なる2種類のSNP検出ソフトウェアを用い、信頼性を高めるために共通して多型があると判定されたSNPのみを選抜した。その結果、約56万種類の品種間SNPおよび、約110万種類の「ふじ」アレル間SNPを見出すことが出来た。推定遺伝子配列のエキソン上に

存在するSNPについて、リードの厚みやSNP間距離、プローブのユニーク性を考慮しつつ、ゲノムワイドにSNPが分布するよう選定を行い、合計1,248種類のSNPマーカーを搭載したGoldenGate Assay用のカスタムBeadChipを開発した。供試した1,248種類のSNPについて、「ふじ」×「Golden Delicious」の実生集団（95個体）を用いて連鎖地図を作成し、それぞれの座乗位置を確認した(図1)。その結果、1,057種類のSNP(85%)についてはリンゴ連鎖地図にマッピングすることが可能であったが、公開配列の推定座乗連鎖群と同じ連鎖群にマッピングされたSNPは、846種類(80%)であった。

② 20K SNP Infinium Chip の国内品種への利用検討

欧米品種を中心とした複数品種由来のリシーケンスにより開発された、20K Fruitbreedomics SNP Infinium Chipを試行し、日本国内のリンゴ栽培品種・系統に適用可能なSNPの選定を行った。搭載されている18,019種類のSNPマーカーのうち、4,284マーカー(26%)はクラスタリングが不明瞭もしくは品種間で多型性を示さなかった。残りのSNPマーカーについては、日本のリンゴ栽培品種・系統間でのタイピングに利用可能と判断し、これらの座乗位置を特定するため、上述の分離集団を用いて連鎖地図の作成を行った。その結果、8,394種類のSNPマーカーについては連鎖地図上にマッピングされ、座乗位置が明らかとなった(図1)。マッピングされなかったSNPマーカーのうち、3,853マーカーについては、公開配列での物理位置情報を参考におおよその座上位置を推定することができたため、合計12,247のSNPマーカーがInfinium Chipから利用可能と判定した。

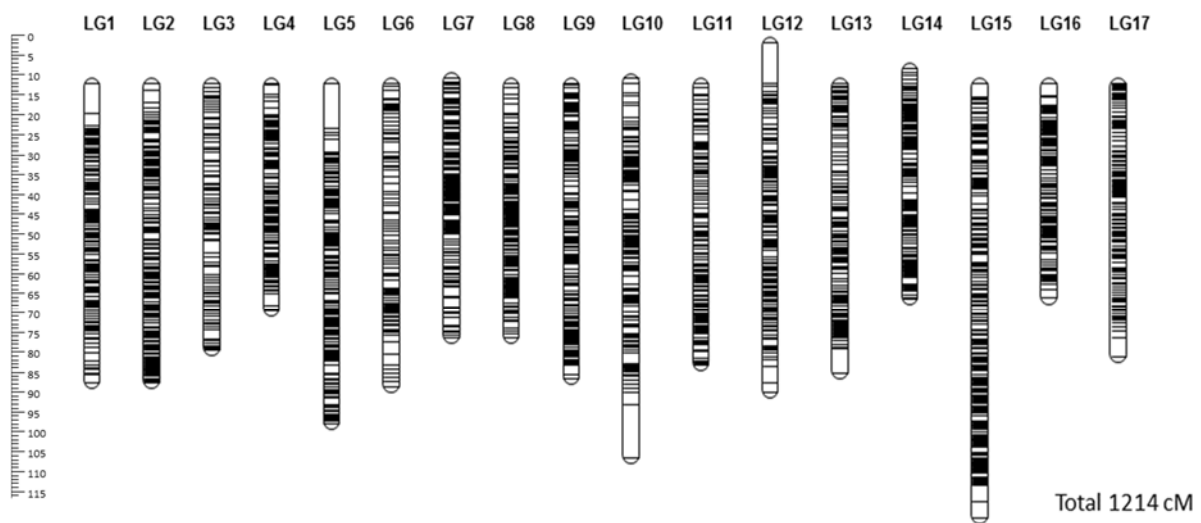


図1 「ふじ」からの開発SNPおよび20K SNP Infinium Chipを併用した高密度連鎖地図

(2) 「ふじ」ファミリー等主要リンゴ品種の遺伝子型の決定とハプロタイプ定義

① 「ふじ」由来の SNP マーカーを用いた「ふじ」のハプロタイプ定義

「ふじ」ゲノム情報から開発した1,057のSNPマーカーを用いて、192品種・系統の遺伝子型を決定し、連鎖地図上の位置情報に基づいて「ふじ」のハプロタイプ定義および「ふじ」ファミリーへのハプロタイプブロックの伝播を追跡した(図2)。ハプロタイプ定義の過程で矛盾するマーカーを除いた結果、最終的に1,014マーカーによる解析となった。これらのマーカーにより、「ふじ」ファミリーにおける「ふじ」に由来する染色体の追跡は十分に可能であったが、一方で、「Golden Delicious」「紅玉」など、「ふじ」以外の起源品種に由来する染色体の追跡は難しく、192品種・系統で由来が定義できた染色体部位は平均で68%(マーカー数換算)にとどまった。

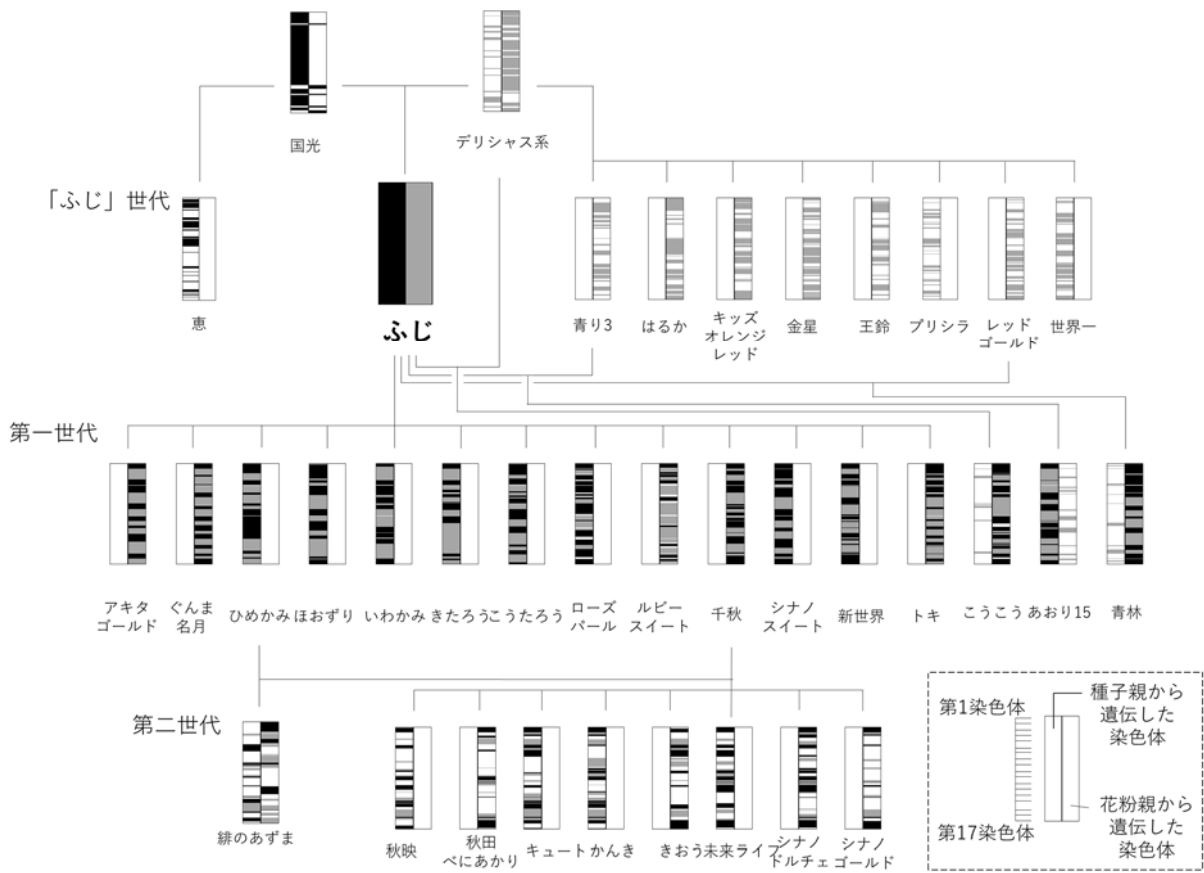


図2 「ふじ」家系品種の系譜とハプロタイプの遺伝

黒および灰色は、「国光」および「デリシャス」から受けついで「ふじ」のハプロタイプを示す。白は「ふじ」以外の品種、又は未定のハプロタイプを示す。

② 20K SNP Infinium Chip を用いた起源品種のハプロタイプ定義

「ふじ」ゲノム情報から開発した SNP、および 20K Infinium Chip より選抜した SNP、合計 13,304 SNP を用いて、192 品種・系統の遺伝子型を決定し、「ふじ」以外の起源品種(「国光」「デリシャス」「Golden Delicious」「紅玉」「McIntosh」「Worcester Pearmain」「印度」「Cox's Orange Pippin」「Stark Earliest」)のハプロタイプ定義、および後代へのハプロタ

イブブロックの伝播を追跡した（図3）。この過程で矛盾するマーカーを除いた結果、最終的に12,787SNPによる解析となった。①の少数SNPでは十分に定義できなかった起源品種由来の染色体の定義が可能となったため、平均で染色体部位の82%（同上）の由来が特定できた（図4）。

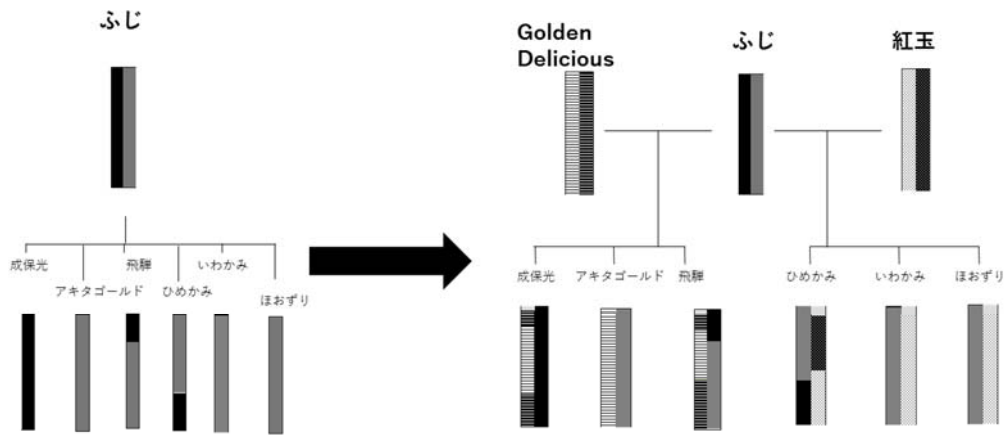


図3 大量SNPの利用により可能となる起源品種のハプロタイプ定義

全17染色体のうち、例として第15番染色体を示す。大量のSNP (>10,000) を利用することで、「ふじ」以外の起源品種に由来する染色体についても後代への追跡が可能になった。

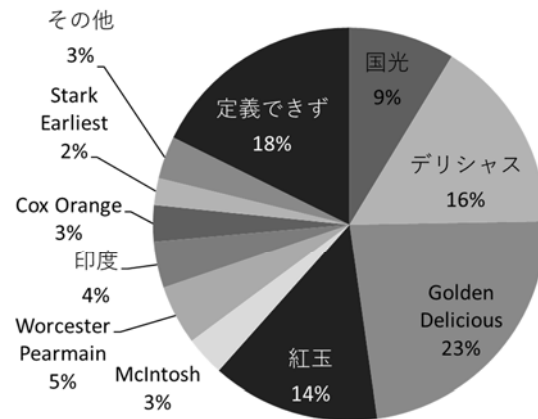


図4 ハプロタイプ定義により判明した192品種における染色体の由来構成

形質	遺伝率	
	94品種 (2013-2014)	181品種 (1990-2014)
収穫日	0.95	0.94
酸度	0.88	0.79
果皮色	0.81	0.76
蜜入り	0.65	0.57
果実重	0.74	0.57
硬度	0.70	0.55
糖度	0.48	0.48
果形（縦横比）	0.64	0.48
さび	0.46-0.57	0.31-0.46
多汁性	0.56	0.35
触感（粗蜜）	0.53	0.14
収穫前落果率	0.78	など30形質
粉質化程度	0.79	
Sucrose	0.50	
果汁褐変	0.54	

など40形質

表1 主要な評価形質と遺伝率

主要15形質の遺伝率（遺伝による変動/全変動）。同一樹について2年間調査したデータと、過去25年間の品種・遺伝資源データ（平均評価年数：6.7年）について各々算出した。

（3）ハプロタイプに基づいた連関解析と各種形質の支配領域の特定

①品種群の形質データの獲得

遺伝子型データの判明している「ふじ」ファミリー等181品種・系統について、過去25年間（1990-2014）に蓄積した育種・遺伝資源データから、収穫日、酸度、果皮色、蜜入り、果実重、硬度、糖度、官能検査等のデータ（計30項目）を抽出・整理し、連関解析に供試可能とした。品種あたりの評価年数は、平均6.7年間であった（表1）。

また、新たな追加評価項目として、日持ち性、褐変性、糖組成（Sucrose、Glucose、Fructose、Sorbitol含量）、収穫前落果性（計10項目）を加え、「ふじ」ファミリー品種を含む94品種について、同年一斉評価を2年間行った（2013-2014）。日持ち性は20℃4週間保存後の果実硬度と粉質化程度の測定により、褐変性は果汁を5時間室温に放置後、目視段階評価により、糖組成はHPLC分析により、また収穫前落果性は収穫時における樹上果数と落果数の計測により行った。

②形質と「ふじ」ハプロタイプとの連関解析

「ふじ」の保有する優良QTLを検出するため、「ふじ」と血縁関係のある115品種・系統（追加項目については63品種・系統）について、各々が保有する「ふじ」の染色体ブロックと形質データの連関解析を行った。形質データについては、育種・遺伝資源データは年次補正後の平均値を、追加項目データは2年間の平均値を、それぞれ解析に用いた。「ふ

じ」が「国光」と「デリシャス」から受け継いだ2種のハプロタイプ間で、1,014SNP座について分散分析を行った結果、収穫日、酸度、蜜入り、粉質化程度に関して有意な座が検出された(図5)。蜜入りおよび粉質化程度のQTLは新規のもので、chr14_32.4cM付近の領域が「デリシャス」型の品種は、この領域が「国光」型またはその他の品種と比較して蜜が入りやすく、chr1_30.4-38.2cMの領域が「デリシャス」型の品種は、「国光」型の品種と比較して、粉質化程度が高かった(図6)。

粉質化程度のQTLは、果実の軟化と関連が示唆されるMd-Exp7遺伝子と重複した。また、品種や品種候補として選抜された42の優良な「ふじ」後代では、9割がこの領域に低粉質化の効果を示す「国光」型のハプロタイプを有しており、「ふじ」後代品種が、日持ち性で選抜を受けた結果、QTLが均一化した可能性が示唆された。

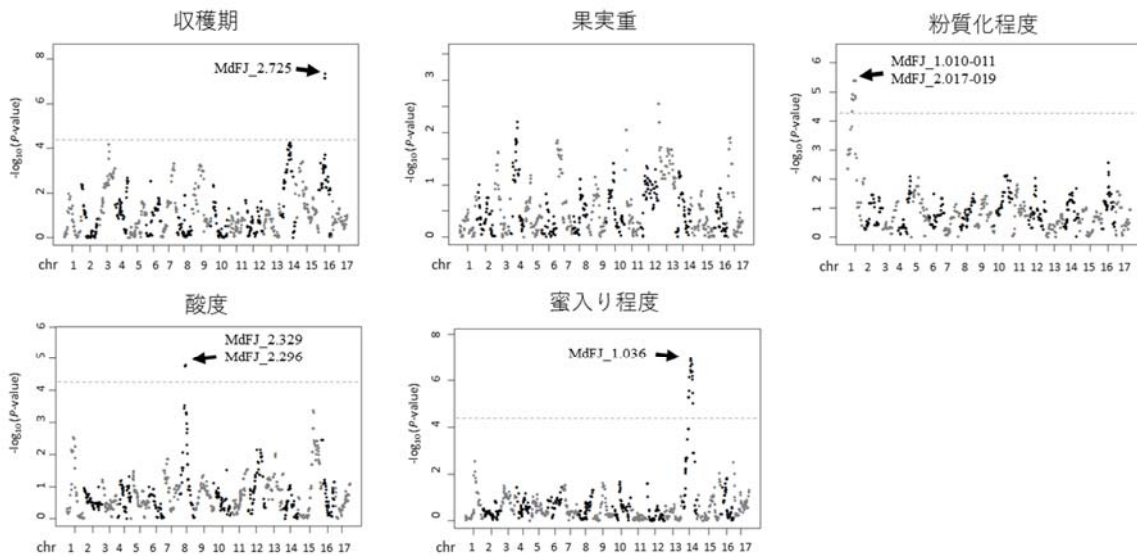


図5 「ふじ」ハプロタイプ間の分散分析により検出されたQTL

各SNPについて、「国光」および「Delicious」由来のアレルを持った品種間で形質比較を行った。黒または灰色の点は、各染色体の個々のSNPに対応しており、QTL検出の閾値は点線 ($P=0.05 \times 10^{-3}$) で示した。

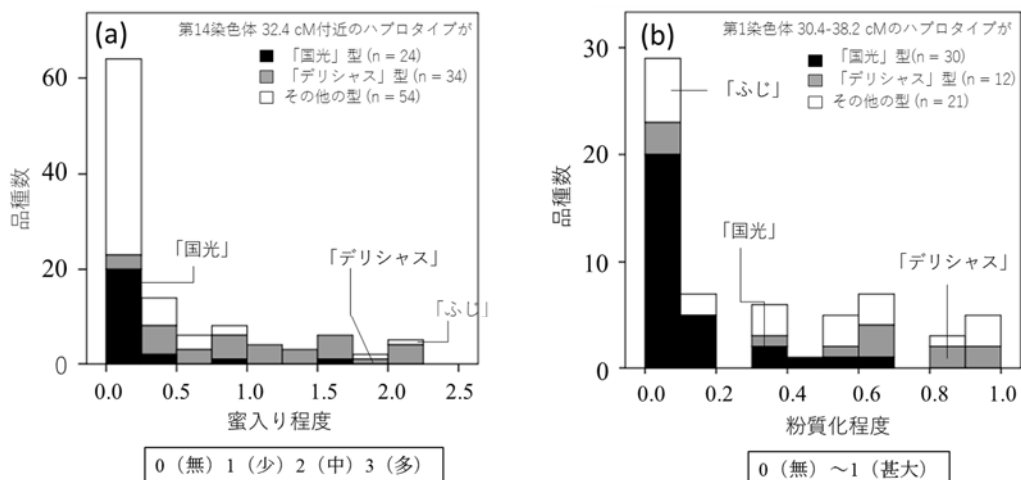


図6 保有するハプロタイプによる品種群の「蜜入り」および「粉質化」程度の差 (a) 蜜入り程度 (b) 粉質化程度。「ふじ」は「国光」「デリシャス」双方のハプロタイプを保有するため、「その他」に分類している。

③ 形質と起源品種ハプロタイプとの連関解析

収穫期、果皮色、着色程度、さび、スカーフスキン、収穫前落果性、粉質化程度、多汁性、蜜入り、甘さ、酸味、果実重、糖度、酸度、硬度に関する合計 22 項目について、過去 25 年間の基本形質データを R プログラム・package “effect”および“lme”にて年次補正し、形質値を獲得した。また、各糖成分含量および果汁褐変性については 2 年間のデータの平均値を形質値とした。

(2) -②で選抜した約 13,000SNP を利用して、主要な起源品種である「国光」「デリシャス」「Golden Delicious」「紅玉」「印度」「Worcester Pearmain」「Cox's Orange Pippin」の 14 のハプロタイプを識別し、Bayes B (EM 法: Hayashi et al. 2010) を用いて各形質の GWAS を行った。また、同条件で SNP 多型による GWAS を併行した。

一方、次の (4) で得られた実生集団の SNP 多型、ハプロタイプおよび形質データを用いた GWAS を併せて行い、品種群を用いた GWAS 結果と照会することで、再現性の高い QTL を抽出した。

起源品種のハプロタイプを用いた GWAS、および SNP 多型を用いた GWAS を比較したところ、QTL の検出力は、形質や解析条件、集団により結果が異なり、優劣に関して一定の傾向は見出せなかった。これらの GWAS において、品種群および実生集団で共通して検出された QTL を抽出した (図 7)。酸度では、ch2、ch3、ch8 および ch16 の QTL が共通に検出され、このうち ch8 および ch16 の QTL は既知の QTL と一致した。収穫期では、ch3、ch5、ch10、ch15 および ch16 の QTL が抽出され、ch5 を除く 4 つは既報と一致した。また、粉質化程度では ch10、蜜入りでは ch14、果汁褐変性では ch10 および ch16、がくあ部さびでは ch2、収穫前落果性では ch15、果皮色では ch9 の QTL が抽出され、いずれも既報と一致した。一方、つる割れは品種群のデータはないが、実生集団で検出された ch12 および ch16 の QTL は、別集団を用いた QTL 解析の結果と一致していた (未公表)。以上から、これらの実生集団を用いた GWAS は安定な QTL を検出できること、また、これらがゲノミックセレクションによる形質予測のモデル作成や検証用としても適当であることが確認できた。

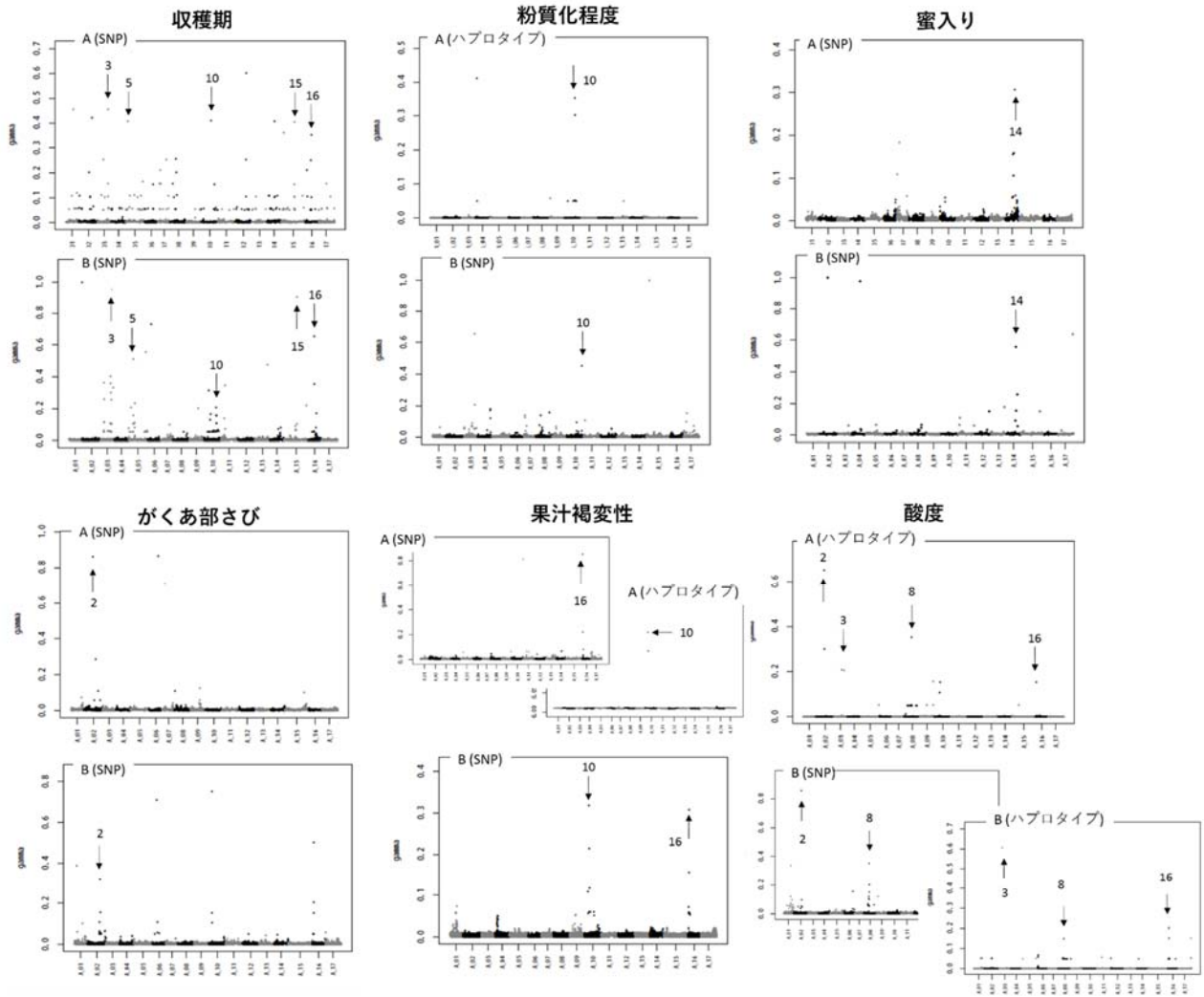


図7. 品種群および実生集団のGWASで共通に検出されるQTL

AおよびBは解析集団（A：品種群、B：実生集団）を示す。主としてSNPの解析結果で比較しているが、一部ハプロタイプの結果を用いた。上記6形質の他、果皮色ではch9、収穫前落果性ではch15（各々MYB1およびACS1に相当する位置）、つる割れではch12およびch16に安定なQTLが検出された。

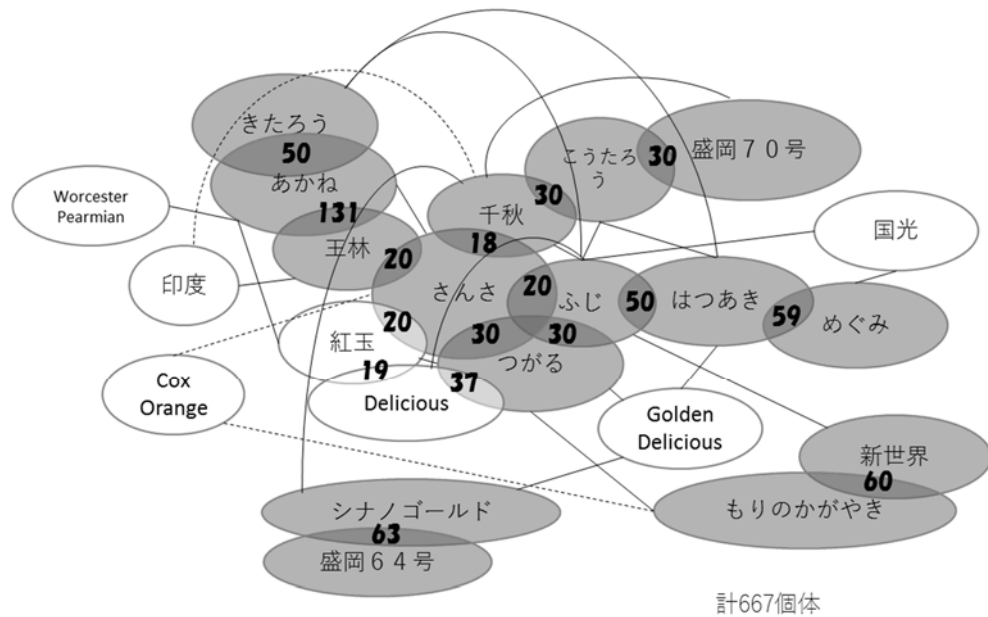


図8 利用した検証用実生集団

実生集団の交配親名を丸で示し、集団の個体数を重複部分に記した。白丸は起源品種を示す。実線は親子関係、点線は2親等の関係を表すが、図の簡略化のため、一部の関係のみ抜粋している。

(4) 多数の遺伝子領域に支配される果実形質の選抜技術の開発

①検証用集団のハプロタイプ定義と形質予測、および予測精度の検証

連関解析による形質予測の検証に用いるため、育種選抜を受けておらず、かつ「ふじ」を含む主な起源品種の血統を概ねカバーするように、合計16集団667個体を選定した(図8)。これらについて、20K Infinium Chipを用いて約12,000SNP (GoldenGate販売中止のため、

(2) -②で利用したSNPのうち、Infinium由来のもののみ)における遺伝子型を決定し、各個体の染色体ハプロタイプを決定した。また、これらの個体について、(3) -①で評価した項目の形質データを獲得した(但し、集団により調査項目は異なり、たとえば糖組成や果汁褐変性は1集団のみの評価である)。これらのデータの大部分は、2000-2014のうち、いずれか1年のみの単年度評価であり、年次補正を加えて、前述のGWASによるQTL検出((3) -③)でも利用した。

表2 ハプロタイプに基づく形質予測モデルの精度

形質	予測値と実測値の相関係数R	
	品種群CV (複数年観測)	実生集団GS (単年観測)
収穫期	0.73	0.62
酸度	0.54	0.56
果皮色	0.63	0.42
蜜入り	0.67	0.11
粉質化程度	0.37	0.39
硬度	0.07	0.26
糖度	0.33	0.14
がくあぶさび	0.32	0.13
果実重	0.24	0.06
収穫前落果性	0.3	0.04
多汁性	0.35	-0.08

CV: 一個体を除き予測モデルを立て、当該個体の形質値を予測

GS: 他集団・品種群で予測モデルを立て、当該集団の形質を個体ごとに予測

これらのハプロタイプおよび形質データを用いて、Bayes Bモデルに基づいたクロスバリデーションにより形質予測法の検証を行った。第一に、(3)で評価した品種群を用いた1個体ごとのクロスバリデーション、第二に、16の検証用集団を用いた集団ごとのクロスバリデーションを行った。後者では、各実生集団の個体ごとに、他の実生集団および品種群をトレーニング集団として予測値を算出し、実測値との相関係数により予測精度を評価した(表2)。品種群では、収穫期、酸度、果皮色、蜜入りでの予測精度が比較的高かったが($R > 0.5$ 以上)、実生集団では精度が低下する傾向があり、特に蜜入りの予測精度の低下が著しかった。これは、品種群では最大25年間の形質評価を行っているのに対し、実生集団は単年度評価であることから、育種価が正確に計測できていないためと考えられる。特に蜜入りや収穫前落果性の発現には環境要因が大きく影響しており、素因を持っている個体であっても形質が発現しない年も多いことから、単年度評価ではかなりの偽陰性を許したことが原因と考えられる。

②適切な形質予測法の選定

a. ハプロタイプおよびSNP多型に基づく形質予測法の比較

ハプロタイプによる形質予測法と比較するため、SNP多型を利用した形質予測を行い、両者の精度を比較した。マーカー数は、約12,000(全SNP)、960(1/12等間隔抽出)、96(1/120等間隔抽出)で比較した。その結果、全12,000座のデータを用いた場合、SNP多型を用いた方がわずかに精度が高くなる一方で、使用する座数の減少に伴って、SNP多型を用いた予測では精度が顕著に低下するのに対し、ハプロタイプを用いた予測では比較的精度が維持される傾向があった。ただし、この傾向は、酸度など予測精度の高い形質には比較的当てはまるが、硬度など、予測精度が低い形質に関しては必ずしも該当しなかつ

た。以上より、ハプロタイプ定義の意義は、大量のDNAマーカーを用いた形質予測精度の向上ではなく、マーカー数を絞り込んだ解析における形質予測精度の維持にあることが明らかとなった。

b. トレーニング集団のハプロタイプ定義の自動化(NGB2010)

少数SNPを用いたゲノムワイドなハプロタイプによる形質予測法の実用化に向けて必須となる、大量SNPによるトレーニング集団のハプロタイプ定義の自動化を行った。遺伝子型の補完および連鎖相の推定のために、4種のプログラムを比較検討し、更に、決定した相の由来(種子親または花粉親)の推定、および起源品種ハプロタイプを用いた集団のハプロタイプ定義のためのプログラムを作成し、併用した。得られたハプロタイプング結果を、マニュアルによるハプロタイプング結果を正答とみなして比較したところ、一致率0.98以上となった。

これらの自動ハプロタイプング結果を用いて、収穫期、酸度、着色程度の3形質について、品種群および実生集団を用いた1集団抜きのクロスバリデーションを行い、各々の実生集団の形質予測精度を算出した。その結果、マニュアルでのハプロタイプング結果を用いた予測精度に匹敵する精度が得られることが判明した。

c. 少数SNPマーカーでの形質予測システムの提示

a. では、ハプロタイプ情報を利用することで、SNP数を減らしたゲノムワイドな形質予測が可能となることを示した。一方で、GWAS解析により検出されたQTLを利用することで、形質予測に用いるSNP数を減らせる可能性がある。そこで、(2) - ③のGWAS解析で安定なQTLを検出した9形質(収穫期、酸度、果皮色、果汁褐変性、蜜入り、粉質化、収穫前落果性、がくあぶさび、裂果性)について、BayesBによる予測精度の低下を最小限に抑えつつ、マーカー数を最小限に絞り込むため、寄与率の高いQTL近傍のSNPの選抜を行った。少数SNP選抜による予測精度への影響を確認するため、品種群のGWAS結果に基づいて選抜したSNPを用いて、品種群をトレーニング集団に16実生集団の予測精度を確認した。またその逆の検証も行った結果、いずれの形質においても、SNP数を5~20まで減らしても、大幅な予測精度の低下は見られないことを確認した(図9)。そこで、これらの品種群と実生集団を併せて再度GWASを行い、その結果を基に、85の最終SNPセットを選抜した(表3)。

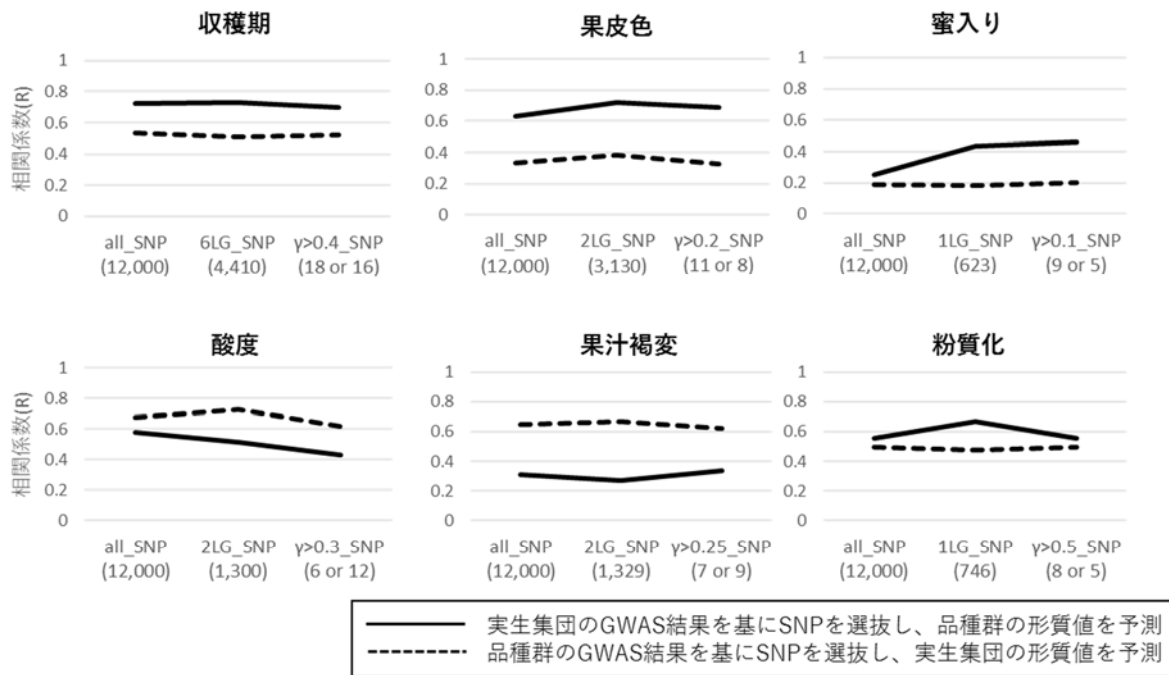


図9 QTL近傍の少数SNP抽出による予測精度

使用したSNP数をカッコ内に示す。全SNP、主要QTLの座する染色体上の全SNP、主要QTL近傍の高関連性の少数SNPを用い、それぞれBayesB (EM法、rep=50) により予測値を算出した。

表3 10形質の育種実生選抜用SNPセット

形質	QTL位置(chr)	SNP数
収穫期	3,5,6,10,15,16	19
酸度	8,16	9
果皮色	2,6,9,15	9
果汁褐変性	10,16	12
蜜入り	14	5
粉質化	10	8
収穫前落果性	1,5,9,15	11
がくあぶさび	2,6	6
裂果性	12,16	5
(斑点落葉病罹病性)	11	1
合計		85

品種群+実生集団のGWAS結果を基に主要SNPを選抜した。

3) 成果活用における留意点

(1) リンゴにおけるゲノムワイドSNPマーカーの整備

GoldenGateカスタムBeadChipを用いてSNPタイピングを行ったが、GoldenGate関連製品は生産および販売が終了している。20K SNP Infinium Chipについても、今後販売が終了する可能性がある。

(2) 多数の遺伝子領域に支配される果実形質の選抜技術の開発

育種選抜への実用化を目的に85のSNPセットを選抜したが、GoldenGateおよび20K SNP Infinium Chip以外での検出手法が未確立である。

4) 今後の課題

選抜した85の最終SNPセットについて、安価で供給の安定したSNP検出システムを構築する必要がある。現在AmpliconSeqを検討しているが、安定性、再現性など解決すべき課題も多く、他の検出システムも検討する必要がある。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB2008(平成28年度にNGB1005(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：ゲノムワイド予測とゲノミックセレクションによるニホンナシの優良果実形質の育種技術開発(平成28年度にバラ科果樹の次世代育種技術開発のためのゲノムワイドSNPマーカーの整備(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構果樹茶業研究部門・品種育成研究領域・ゲノムユニット・山本俊哉

1) 研究目的

農林水産技術会議が策定した「作物育種研究の今後の進め方について」(平成24年5月25日決定)では、優良な果実形質を基本にして、複合病害抵抗性や自家和合性などの様々な特徴を合わせ持つナシ品種の育成が重点課題となっている。ニホンナシの果実形質(収穫期、果実重、果肉硬度、糖度、酸度など)は、多数の遺伝子が関与する複雑形質で、その改良には、これまでのDNAマーカー選抜技術だけでは不十分であり、ゲノム解析によって得られた豊富な遺伝情報と高度な形質評価手法を組合せた、新たな育種法を開発する必要がある。

そこで、本課題では、ニホンナシにおいて、次世代育種技術を開発するための基盤となるゲノムワイドSNPマーカーを開発し、ゲノミックセレクションおよびゲノムワイド予測で利用可能なSNPセットを選定する。ニホンナシのゲノムワイドDNAマーカー遺伝子型と表現形質を基にしたゲノムワイド予測(WGP, whole genome prediction)の手法を用いて、収穫期や果実重を始めとする各種果実形質を対象に、育種デザイン(交配組合せ、集団サイズ、選抜強度など)を最適化する手法を開発するとともに、その有効性を検証する。さらに、ニホンナシ育種実生集団の表現型とDNA多型の関連をモデル化して、ゲノミックセレクション(GS, genomic selection)による予測値に基づく選抜手法を開発することにより、幼植物等の生育初期での選抜を可能とし、選抜に要する時間を大幅に短縮する次世代育種技術を達成する。

2) 研究成果

(1) ニホンナシにおけるゲノムワイドSNPマーカーの整備

ニホンナシ育種の交配親として多用される「豊水」や「あきづき」などの主要栽培品種や、その祖先品種である「二十世紀」、「長十郎」、「新高」、「巾着」などについて、各品種30-40 Gb程度、ニホンナシ推定ゲノムサイズの60倍をカバーするゲノム配列を取得した。ニホンナシではゲノム解読は報告がなされていないが、近縁種であるチュウゴクナシではゲノム解読が報告されている。参照配列であるチュウゴクナシ品種「酥梨」との比較から、約200万種類のニホンナシ品種間SNPおよび、約90-130万種類のアレル間SNPを見出すことが出来た。それらのSNPから、ニホンナシ栽培品種多型を示す、リピート領域に座乗していない、両側80 bpにIn/De1やSSRを含まないなどの条件を満たすSNPを選出した。さらに、AssayDesignTool(ADT) score>0.7となる1536種類のSNPを搭載したGoldenGate Assay用のカスタムBeadChipを合成した。

SNP設計に用いたチュウゴクナシの参照配列は、2,103種類のscaffold情報が公開されているが、対応する染色体(連鎖群)は判明していないことから、今回開発したニホンナシのSNPについても座乗位置は不明である。そこで、上記のSNPマーカーについて、7種類のF1解析集団(合計369個体)を用いて、マッピングを行った。集団毎にマーカーのグルーピングを行った後、共通するマーカーを統合し、統合連鎖地図を構築した結果、連鎖群数はニホンナシの染色体基本数(n=17)に収束し、1087種類のSNPマーカーについてその座乗位置が明らかとなった(図1)。

ニホンナシ87品種・系統でタイピングを行った結果、80種類(5%)のSNPは10品種・系統以上で欠測値を示した。残るSNPのうち、114種類(7%)のSNPは多型性を示さず、30種類(2%)については品種・系統間の親子関係で矛盾が存在していたため除外した。その結果、1,312種類(85%)のSNPマーカーがニホンナシゲノミックセレクションおよびゲノムワイド予測で利用可能と判断した。

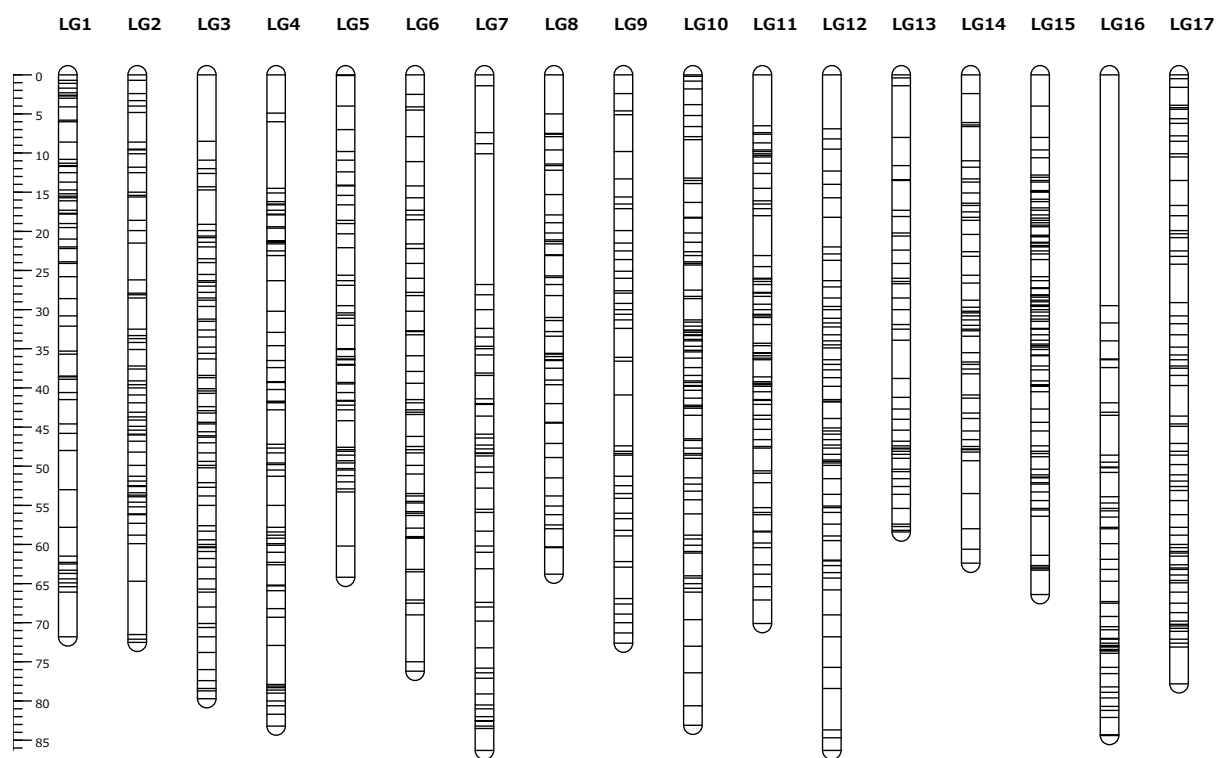


図1 ニホンナシ統合連鎖地図

LGは連鎖群(linkage group)を表し、左の数値は地図距離(cM)を示す。横線は今回開発したSNPマーカーを意味する。

(2) ニホンナシ育種集団におけるゲノムワイド予測の検証

84の主要ニホンナシ品種/333のSSR遺伝子型/12種類の形質データを基に、『ゲノム情

報利用育種を支える情報解析技術の開発とその活用基盤の構築』(NGB2010) 課題と共同して、両親組合せから後代実生集団の形質値の分布を予測する『ゲノムワイド予測 (WGP, whole genome prediction)』の検証を行なった。具体的には、平成25年～26年に開花結実したニホンナシ育種実生7集団*について、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度などの形質について形質値の分布を予測した。なお、「幸水」×筑波58号は早生と晩生の組合せ、「あきづき」×373-55は中生と極早生の組合せ、「秋麗」×筑波56号は黒星病抵抗性+良食味をターゲットとした組合せである。

*7集団の両親組合せ(個体数):筑波52号×「王秋」(30個体)、「あきづき」×「筑水」(29個体)、「秋麗」×筑波56号(90個体)、「八里」×筑波58号(35個体)、「王秋」×「新水」(30個体)、「幸水」×筑波58号(32個体)、「あきづき」×373-55(152個体)。

ニホンナシの育種実生7組合せ約370個体について、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度などの形質について調査した。収穫期は、収穫調査を複数回行った日の平均(月日)を、果実重は、4-29個の健全果実重の平均値(g)、硬度は、健全果実についてマグネステラー硬度計で測定した硬度の平均値(1b)、果汁糖度は、ブリックス計で測定した健全果実のBrix値の平均値(°Bx)、果汁酸度は、pHメーターで測定した健全果実のpH平均値とした。なお、「あきづき」×373-55の実生集団約110個体については、平成25年と26年の2年間に渡って、形質を調査して安定性を評価した。

ゲノムワイド予測により、ニホンナシの育種実生7組合せの5形質(収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度)の分離予測を行い、実際の観察分離と比較した。その結果、収穫期では、7集団とも予測分離と観察分離がよく一致しており、特に「秋麗」×筑波56号で見られる超越分離もうまく予測できた(図2)。果実重では、収穫日ほどではないが、予測分離と観察分離はよく一致し、「秋麗」×筑波56号で見られる超越分離もうまく予測できた。果肉硬度では、おおよそのパターンは対応しているが、十分な精度で予測できておらず、前2形質に比べ、遺伝率が低いことが原因と考えられた。果汁酸度および果汁糖度では、予測分離と観察分離が対応していない部分が多く、予測が最も難しい形質と考えられた。「あきづき」×「筑水」および「あきづき」×373-55では、早生+大果が育種目標であることから、ゲノムワイド予測が有効であると判断された(図3)。以上の結果から、ゲノムワイド予測の精度は、収穫期、果実重>果肉硬度>果汁酸度、果汁糖度であった。果汁酸度および果汁糖度で予測精度が低かった原因として、形質の遺伝率、計測方法(段階評価)、GS予測モデルの構築に用いたデータ数が考えられた。

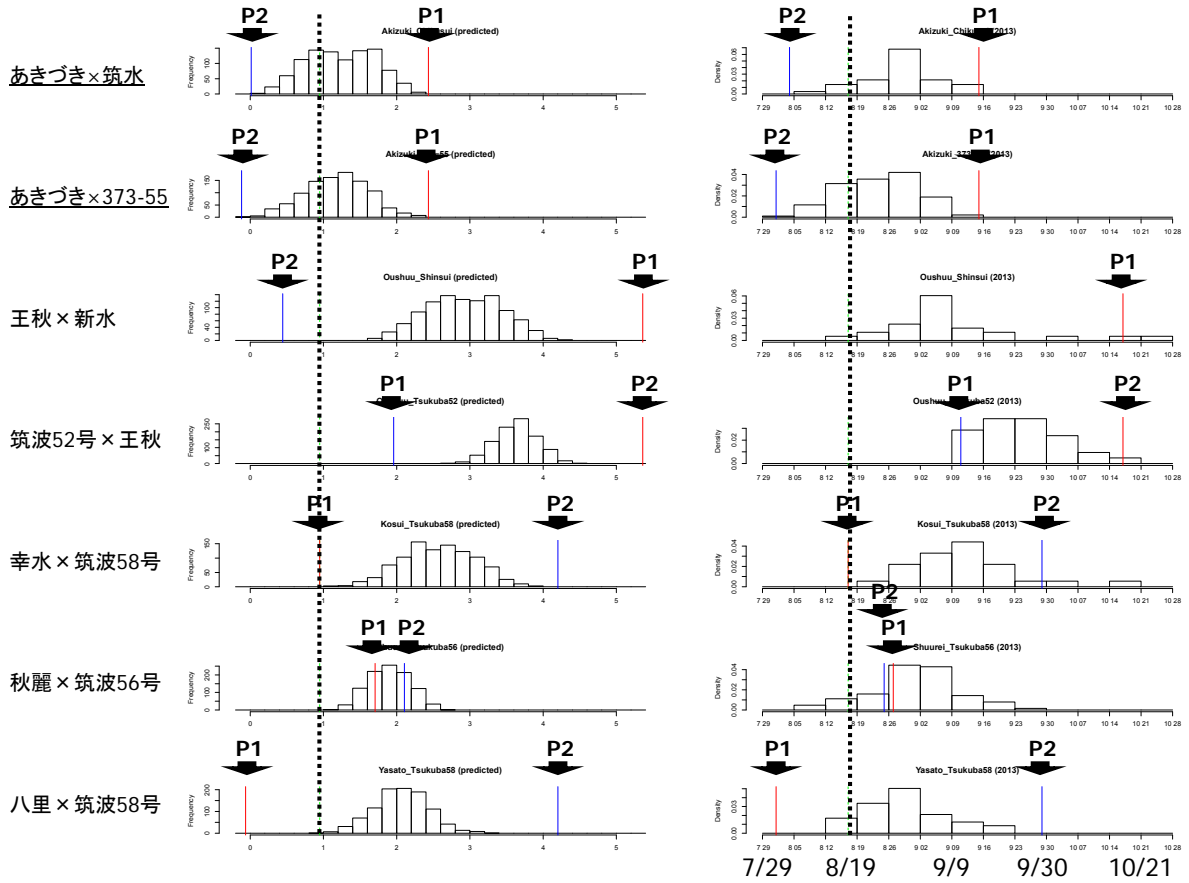


図2. ニホンナシ7組合せの収穫期予測値(左)と実測値(右). P1:種子親、P2:花粉親、点線:幸水の収穫期

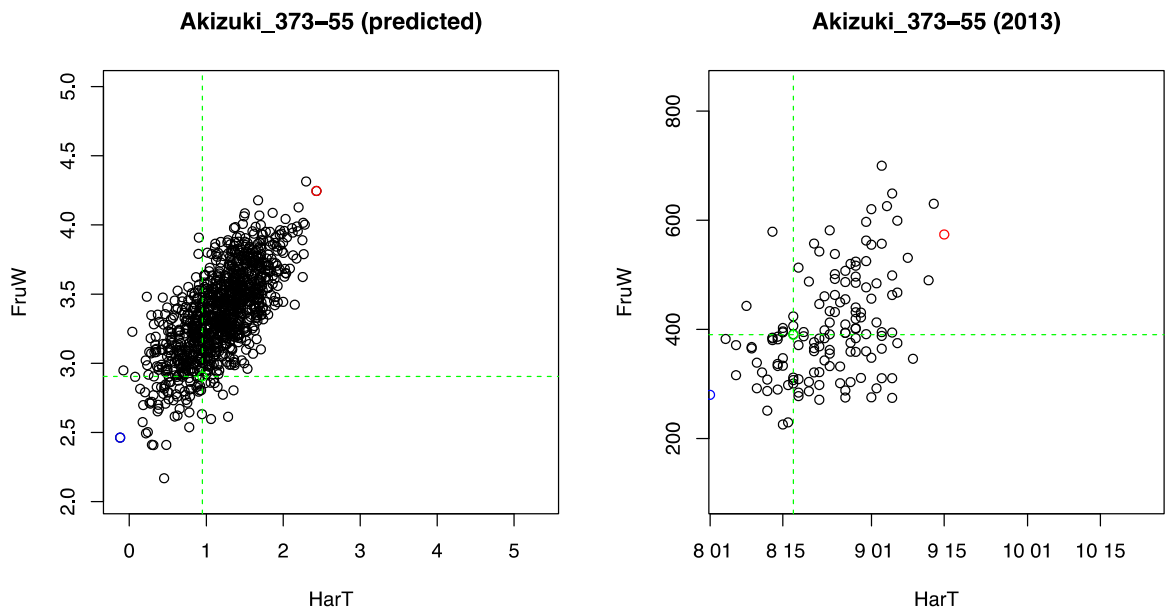


図3. あきづき×373-55組合せの収穫期(横軸)と果実重(縦軸)
左: 予測分離、右: 観察分離、点線: 幸水

(3) ゲノムワイドSNPの遺伝子型データ収集とゲノミックセレクションのシミュレーション構築

主要ニホンナシ84品種、「あきづき」×373-55の交雑組合せを始めとするニホンナシ育種実生7組合せ約370個体、「なつしずく」×「ほしあかり」の交雑組合せを始めとする9組合せ約400個体について、GoldenGateアッセイで1,506のSNP遺伝子型を分析し、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度を始めとする18の形質データを基に、10分割交差検証により予測精度を評価してゲノミックセレクションモデルの有効性の検証を進めた。モデル構築にはリッジ回帰、ガウスカーネル回帰、ランダムフォレストの3つの代表的回帰手法を用いた。具体的には、1) SNP数の違いによる予測精度の比較 (1,506 vs. 749)、2) 計測年を考慮したモデル作り、3) 計測の反復数の違いによる予測精度の比較 (複数年計測 vs. 単年度計測)、4) GS予測モデルの比較、を行った。

1) SNP数の違いによる予測精度の比較 (1,506 vs. 749) では、1,506のSNPと749のSNPとも、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁酸度、果皮色で、高い予測精度 ($r > 0.65$) が得られたが、1,506SNPと749SNPの差は観察されなかった (図4)。また、16家系それぞれで、SNP数の違いによる予測精度を解析したが、1,506SNPと749SNPの差は観察されなかった。2) 計測年を考慮したモデル作りでは、平成27年に形質調査を行った84品種&9家系約400個体のデータで平成26年の7家系約370個体を予測した場合 vs. 平成27年に形質調査を行った84品種のデータで平成26年の7家系約370個体を予測した場合を比較したところ、前者の予測がほぼすべての形質で高かった。品種群データと後代データをともにモデル化に用いることで、構築されるモデルの精度向上が明らかとなった。家系506 (「あきづき」×「筑水」)、家系510 (「秋麗」×「ほしあかり」)、家系523 (「あきづき」×373-55) で予測精度が高く、その理由として平成27年の9家系の親に「あきづき」や「ほしあかり」が多用されていることが挙げられた。3) 計測の反復数の違いによる予測精度の比較 (複数年計測 vs. 単年度計測) では、複数年計測の方が単年度計測よりも、やや予測精度が高かった。4) GS予測モデルの比較では、84品種でモデルを作成した場合、16家系約770個体でモデルを作成した場合、84品種&16家系約770個体でモデルを作成した場合の3者を比較した。84品種&16家系約770個体でモデルを作成した場合が、多くの形質や多くの家系で予測精度が高かった。

GS prediction of progeny, training population: 86 cultivars

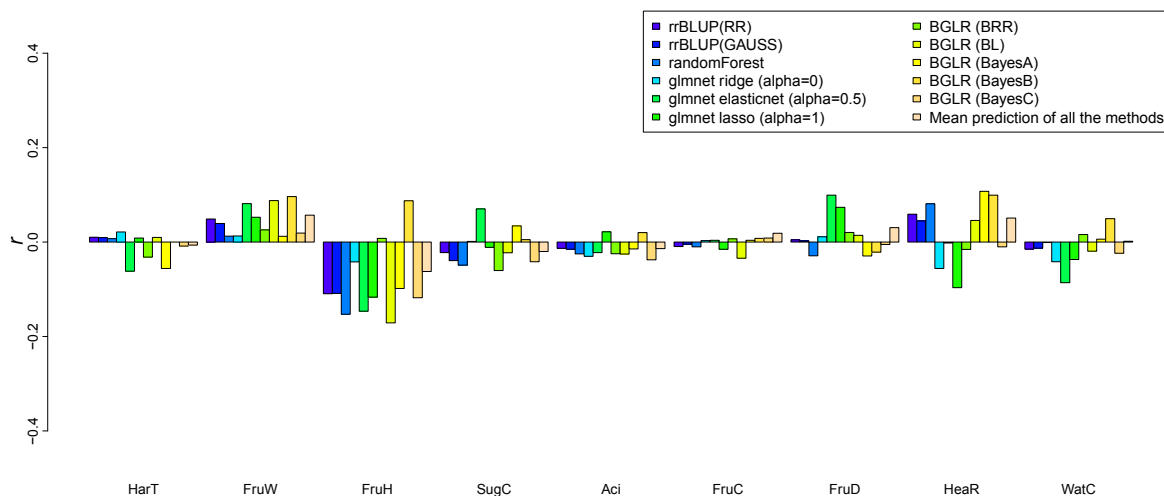


図4. 1,506のSNPと749のSNPによる精度の比較

$r(1,506 \text{ SNPs}) - r(749 \text{ SNPs})$ を示す。

左から収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色、落果率、芯腐れ率、みつ症率を示す。

(4) ゲノミックセレクションによる優良果実形質の選抜育種技術の開発

「あきあかり」×450-7の組合せから1個体（542-027：ナシ筑波63号）、「なつしずく」×「ほしあかり」の組合せで2個体（543-020：筑波60号、543-066：筑波61号）の有望個体が選抜され、ナシ第9回系統適応性検定試験にて全国で評価を開始した。これらニホンナシ品種候補3個体について、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色など形質における予測精度の検証を行った。各形質の予測精度による評価、および「足きりモデル」による評価を行った。なお、「足きりモデル」では、果実重が300g以下、果肉硬度が5ポンド以上、果汁糖度13度以下、果汁酸度4.7以下、心腐れ発生率20%以上、みつ症発生率20%以上を淘汰の対象とした。

家系542＝「あきあかり」×450-7では、中生を目標とした組合せで、ナシ筑波63号（No. 542-027）では、10日ほど早生に予測された。その他の形質では、概ね予測値と実測値が一致していたが、収穫期の予測精度（0.64）、果実重の予測精度（0.62）以外は、それほど高くなかった。家系543＝「なつしずく」×「ほしあかり」では、黒星病抵抗性かつ早生かつ高糖度が育種目標であり、ナシ筑波60号（No. 543-020）とナシ筑波61号（No. 543-066）が、品種候補として選抜されている。収穫期（0.62）および糖度（0.52）とも高精度に予測されていた（図5）。一方、果実重や心腐れ発生率では、ナシ筑波61号が足きりラインに入っていた。以上のことから、ゲノミックセレクションモデルにより、ニホンナシ品種候補3個体の主要な形質について予測可能であり、育種選抜での利用可能性が示された。一方、果実外観の評価など、育種家が達観で評価し数値化できない部分について、今後の課題である。

「なつしずく」×「ほしあかり」のF1集団を供試して、GoldenGateアッセイに代わるSNP

分析手法として、BioMarkシステム (Fluidigm社) を試みた。96種類のSNPsを用いてBioMarkシステムでの系を確立するために、GoldenGateアッセイで評価した1,506のSNPsから、「なつしずく」×「ほしあかり」で分離する205種類のSNPsを選抜した。収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色の6種類の形質について、GWASで効果の大きい96種類のSNPsを選抜した。96種類の内訳は、収穫期に効果の大きい33のSNPs、果実重に効果の大きい29のSNPs、果肉硬度に効果の大きい16のSNPs、果汁糖度に効果の大きい33のSNPs、果汁酸度に効果の大きい8のSNPs、果皮色に効果の大きい16のSNPsである。それぞれの形質に効果のあるSNPsの重複は比較的少なかった。

「なつしずく」×「ほしあかり」のF1個体から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社) により、ゲノムDNAを抽出し、BioMarkシステムにより96種類のSNPsを解析した。BioMarkシステムでスコア不可であった1種類のSNP、「なつしずく」と「ほしあかり」間で多型が検出されなかった5種類のSNPs、その他GoldenGateアッセイとBioMarkシステム間で分離データやクラスタリングにずれがある10種類のSNPsマーカーを除いて、80種類のSNPsが利用可能であった。

BioMarkシステムで利用可能であった80種類のSNPを用いて、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色の形質を予測した。最も効果の大きい予測モデルを再計算したところ、収穫期 ($r=0.65 \rightarrow 0.62$)、果実重 ($r=0.63 \rightarrow 0.63$)、果汁糖度 ($r=0.55 \rightarrow 0.54$)、果汁酸度 ($r=0.77 \rightarrow 0.78$)、果皮色 ($r=0.64 \rightarrow 0.64$) では予測精度は維持されたが、果肉硬度 ($r=0.59 \rightarrow 0.50$) では予測精度が0.1ほど低下した。

GS prediction of family 543

training population: Cultivars and progeny except for family 543

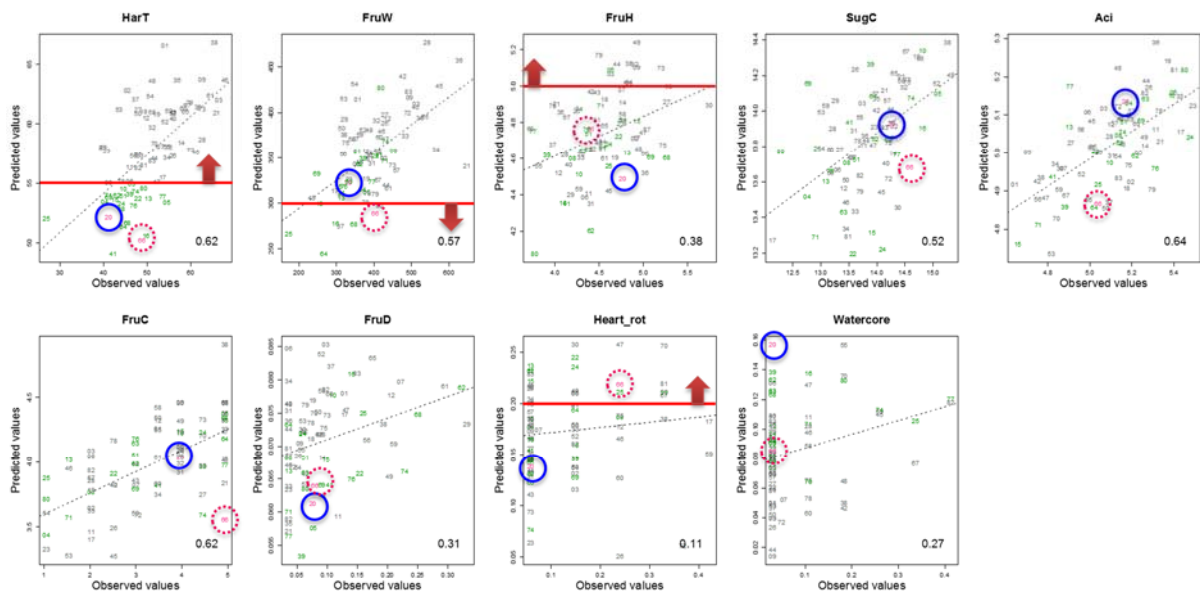


図5. 543家系 (なつしずく×ほしあかり) での各種果実形質の予測精度
 青実線：ナシ筑波60号 (No. 543-020)、赤点線：ナシ筑波61号 (No. 543-066)
 赤線は足きりラインを示す。

3) 成果活用における留意点

(1) ニホンナシにおけるゲノムワイドSNPマーカーの整備

GoldenGateカスタムBeadChipを用いてSNPタイピングを行ったが、GoldenGate関連製品は生産および販売が終了している。BioMarkシステムで、GoldenGateアッセイの代用が可能である。

4) 今後の課題

本課題で評価したニホンナシの主要果実形質（収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色）のうち、収穫期、果実重、果肉硬度、果汁酸度、果皮色では、高い予測精度が得られ、ゲノミックセレクションが可能であると判断された。一方、果汁糖度では、予測精度が低く、現時点でのゲノミックセレクションの利用は限定的である。今後、ブrix計で測定した果汁のBrix値ではなく糖組成により良食味を解析すること、糖の合成・分解・代謝に関わる遺伝子多型との関連を明らかにすることで、高糖度・良食味の選抜技術確立を目指す必要がある。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB2009(平成28年度にNGB1006(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：早生カンキツ育種効率化のための選抜技術の開発とその利用(平成28年度にカンキツの育種選抜に利用可能なゲノムワイドSNPの拡充(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農研機構 果樹茶業研究部門・カンキツ研究領域・カンキツ育種ユニット・野中圭介

1) 研究目的

カンキツの交雑育種には20年前後を要するが、QTL解析では特定の交配組合せに有効な遺伝効果の大きな遺伝子座しか検出することが出来ない。多くの遺伝子座が関わる形質の早期選抜に有効な方法の開発が求められているが、果樹では樹体の大きさや結果習性から形質調査の反復数を大きくすることは困難であり、さらに重要果実形質に対する環境の影響は形質ごとに異なるなどの制限がある。そこで本課題では、早生カンキツ品種候補の効率的育成をモデルとして、酸含量、果実重等の形質をこれまでよりも高精度に評価し、ゲノムワイドアソシエーション解析(GWAS)やゲノミックセレクション(GS)などの新しい手法を活用することでこれらの重要形質を複合選抜するための選抜技術を開発し、その育種上の有効性を検証する。

2) 研究成果

(1) 蓄積した形質情報を用いた早生カンキツ選抜技術の開発

(1) - 1 解析集団の養成と形質評価

育種親として主に利用する品種・系統からなる集団をコア集団として、コア集団を親として育成した育種実生集団を検証用集団として39家系約1000個体を養成し、結実開始した個体から順次果実17形質について評価を行った。形質評価は、毎年12月に果実をサンプリングし、果実重、糖度、酸含量は機械測定による連続データで残りの果皮色や剥皮性などの形質は官能評価による階級データで評価し、階級データは連続値として解析に用いた。なお、形質データの年次の反復測定数は個体によって異なるが、コア集団は6年分、検証用集団は1～5年分のデータを蓄積し、それらをGSおよびGWAS解析に供試した。

(1) - 2 カンキツのゲノムワイドSNPマーカー解析基盤の整備(旧NGB1006で実施)

NGB2009で解析対象とするコア集団のハイスループット遺伝子型解析への利用を目的に、その親品種となる品種・系統13点とその後代品種2点、計15点を選抜し、HiSeq2000のペアエンド解析で得たリードをカンキツクレメンティン半数体参照配列に対してマッピングした。抽出した多型から参照配列に対してヘテロ型またはホモ型の一塩基多型を合計で13,144,408件抽出し、参照配列上になるべく等間隔に配置される、品種識別数が最大になる3つ組SNPを9連鎖群上に1,536選抜した。そこから768SNPを選抜し、Illumina社のGoldenGate Assay SNPアレイをデザインした(表1)。さらに、構築したSNPアレイを利用して840マーカーからなる高密度連鎖地図を構築した(表2)。

(1) - 3 カンキツの全塩基配列を利用したSNPマーカーの拡充(旧NGB1006で実施)

カンキツ15品種の全配列情報から抽出したSNP候補のうち、15品種で多型性が高い167,191件のSNPから、遺伝子候補領域に存在すると推定された115,097SNPを選抜し、そのうち102,386SNPが

マーカー化可能であった。カンキツの主要Scaffold 9本を等間隔に分割し、それぞれに局在するSNPから最も多型性が高く、前後のSNPとの組合せで各ハプロタイプブロックの判別性がもっとも高い1,536 SNPを選抜し、GoldenGate Assay SNPアレイをデザインした(表1)。さらに、構築したSNPアレイを利用して950マーカーからなる高密度連鎖地図を構築した(表2、図1)。

表1. 参照配列のScaffoldあたりの全SNP、遺伝子数と遺伝子内SNP数、および、解析した768 SNPと1,536 SNPの分布

Scaffold	Total SNP#	予測 遺伝子#	遺伝子内 SNP#	設計SNP #		
				768 SNP	1536 SNP	Total
1	14,028	2,467	1876	90	155	245
2	21,118	3,198	2491	93	205	298
3	31,605	4,480	3386	87	272	359
4	18,137	2,495	1995	93	162	255
5	22,886	2,983	2165	87	174	261
6	15,122	2,182	1749	81	143	224
7	14,569	2,147	1617	84	141	225
8	13,918	2,059	1535	87	135	222
9	15,808	2,346	1680	66	149	215
Total	167,191	24,357	18,494	768	1,536	2,304

表2. 設計したSNPマーカーを利用した高密度連鎖地図の構築

Map	交配組合せ	個体数	マーカー数	全長(cM)	供試マーカーの内容
1	興津46号×農6号	69	840	990.4	SSR, SNP(768)
2	興津46号×興津56号	57	950	977.9	SSR, SNP(1,536)

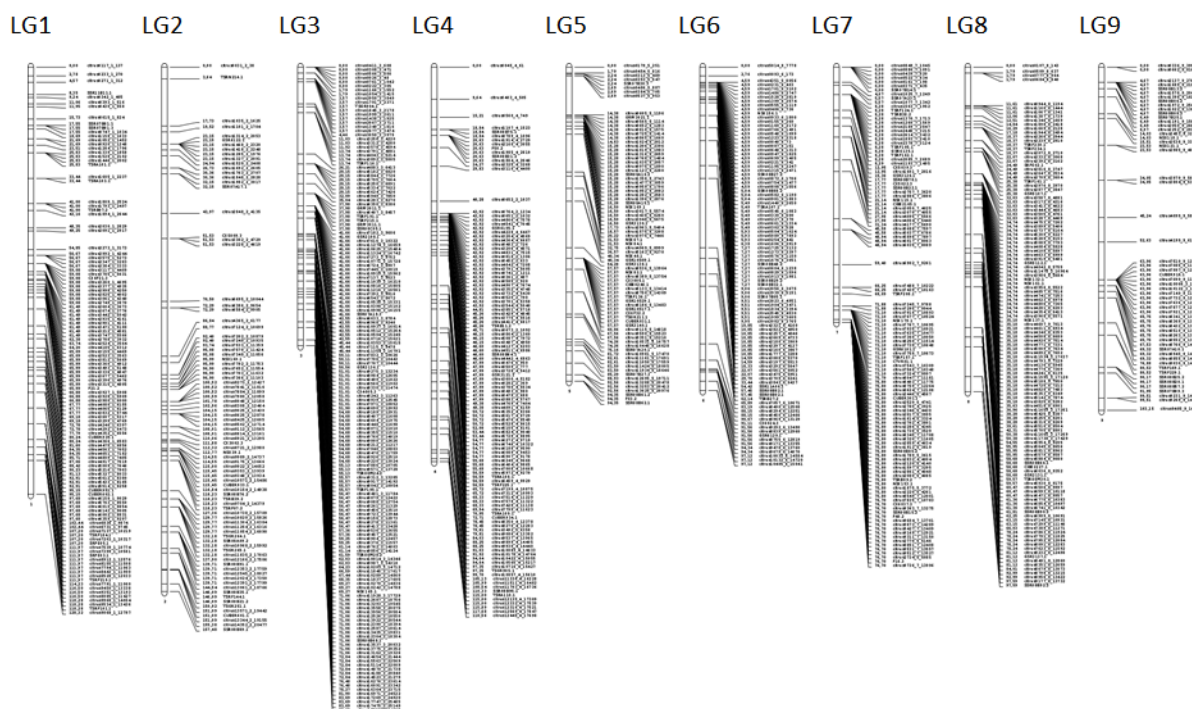


図1 興津46号×興津56号集団で構築した遺伝連鎖地図

参照配列の主要な9 scaffoldsと対応づけられた9連鎖群 (LG1~9) で構成される連鎖地図 (表2のMap2と対応)

(1) - 4 検証用集団におけるカンキツのゲノムワイド遺伝子型の解析 (旧NGB1006で実施)

開発した768および1,536 SNPマーカーを用いて、それぞれ81および84の既知のカンキツ家系を用いて遺伝子型を検証し、すべての親子間で矛盾のない598および1,281、計1,879 SNPマーカーを以後の解析に有効なマーカーとして選抜した (表3)。選抜した有効マーカーを用いて、コア集団 (137品種・系統) および検証用集団 (36家系、823個体) の遺伝子型を評価し、得られた結果をNGB2009およびNGB2010での解析に提供した。

表3. 供試したSNPマーカーと有効マーカー数および遺伝子型が評価された集団と個体数の概要

		SNP set 1	SNP set 2	合計
全SNP数		768	1,536	2,304
有効マーカー数		598	1281	1,879
マーカー確認用親子数		81	84	
コア集団	個体数	132	137	
検証用集団	家系数	13	36	
	個体数	344	823	

(1) - 5 GS、GWAS解析

形質データおよび遺伝子型データが共に得られたコア集団111品種・系統および検証用集団35家系676個体、合計787個体について上述した有効SNPマーカーのうち1,841SNPの遺伝子型データおよび17の果実形質データを用いてGSを実施した。まずは、3つ (a: コア集団、b: 検証用集団、c: コアおよび検証用集団) の異なるトレーニング集団でGSモデルを作成し、予測精度を比較した。予

測精度は予測値と観測値の相関係数で評価した。その結果、cが最も予測精度が高かった(図2)。精度の改善程度は形質によって異なり、形質間相関の高い果皮色(FruC)と果肉色(FleC)はコア集団のみをトレーニング集団としても予測精度は高く、検証用集団をトレーニング集団に入れたb、cとほとんど変わらなかった。一方でモデル形質である果実重(FruW)や酸含量(Aci)は相関係数で0.1程度予測精度が改善した。

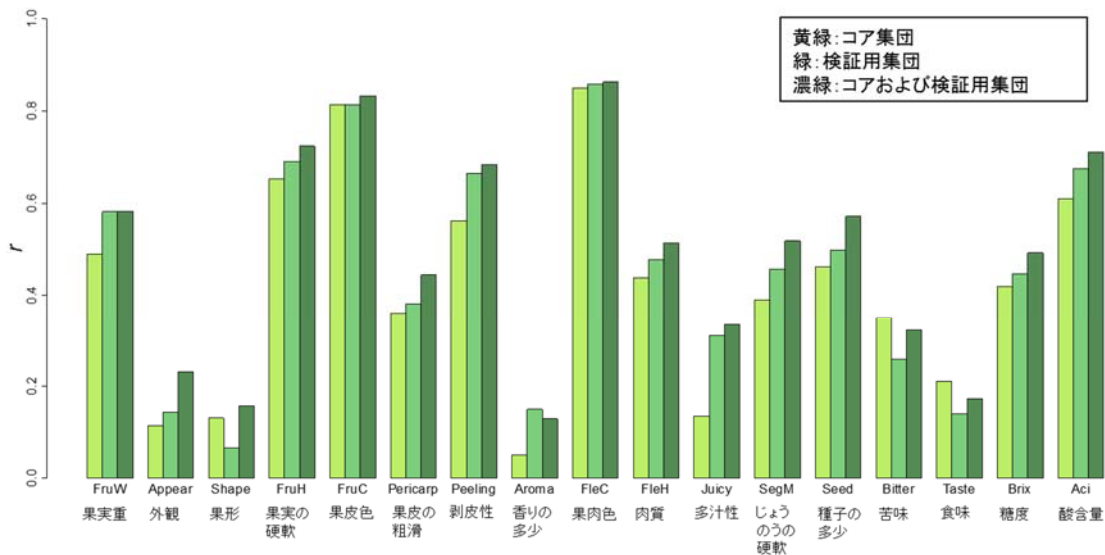


図2. GSによる3種類のトレーニング集団を用いた予測モデルの精度比較
トレーニング集団はコア集団および検証用集団(予測する1家系を除く)を用いた。

また、検証集団の各家系内の予測精度を確認したところ全体の予測精度が高い形質では各家系の予測精度も概ね高かった(図3)。しかし、モデル形質とした果実重および酸含量では家系による予測精度のばらつきが大きかった。その原因として家系内個体数の違いも考えられるが、明らかではない。

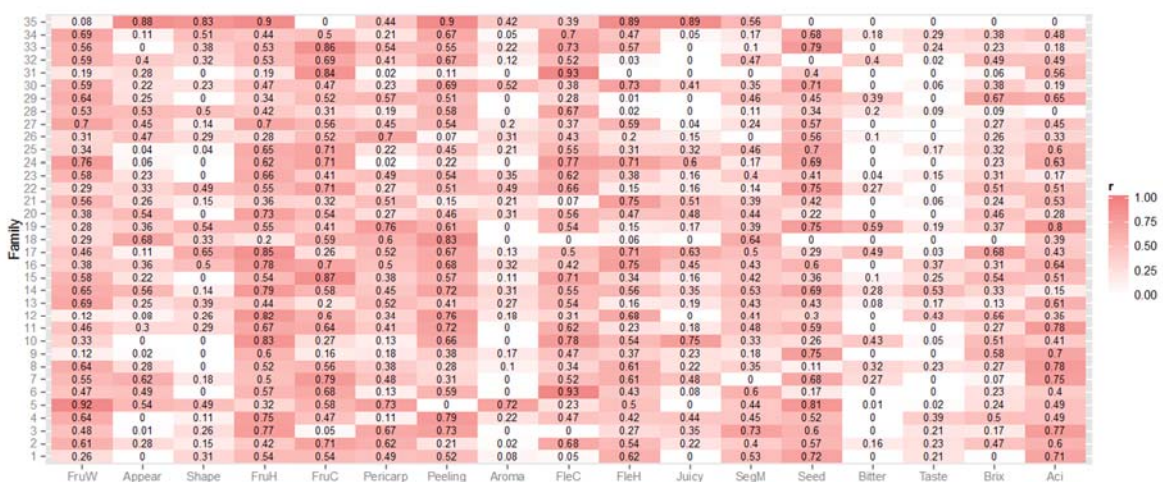


図3. GSによる検証用集団の各家系における予測精度

トレーニング集団はコア集団および検証用集団(予測する1家系を除く)を用いた。

GWASにおいてもGSのモデル構築に用いたのと同様のデータを使用し、統計ソフトRのパッケージ rrBLUPにより解析した。その結果、10形質で有意なSNPが検出された(図4)。また、形質間相関の高い果実の硬軟、肉質および剥皮性ではほぼ同じSNPが検出された。剥皮性の官能評価では果実

への貫入のしやすさが評価軸のひとつになっていることから果実の硬軟と関連したSNPが検出された可能性がある。これらのSNPについては選抜マーカー化を図る予定である。

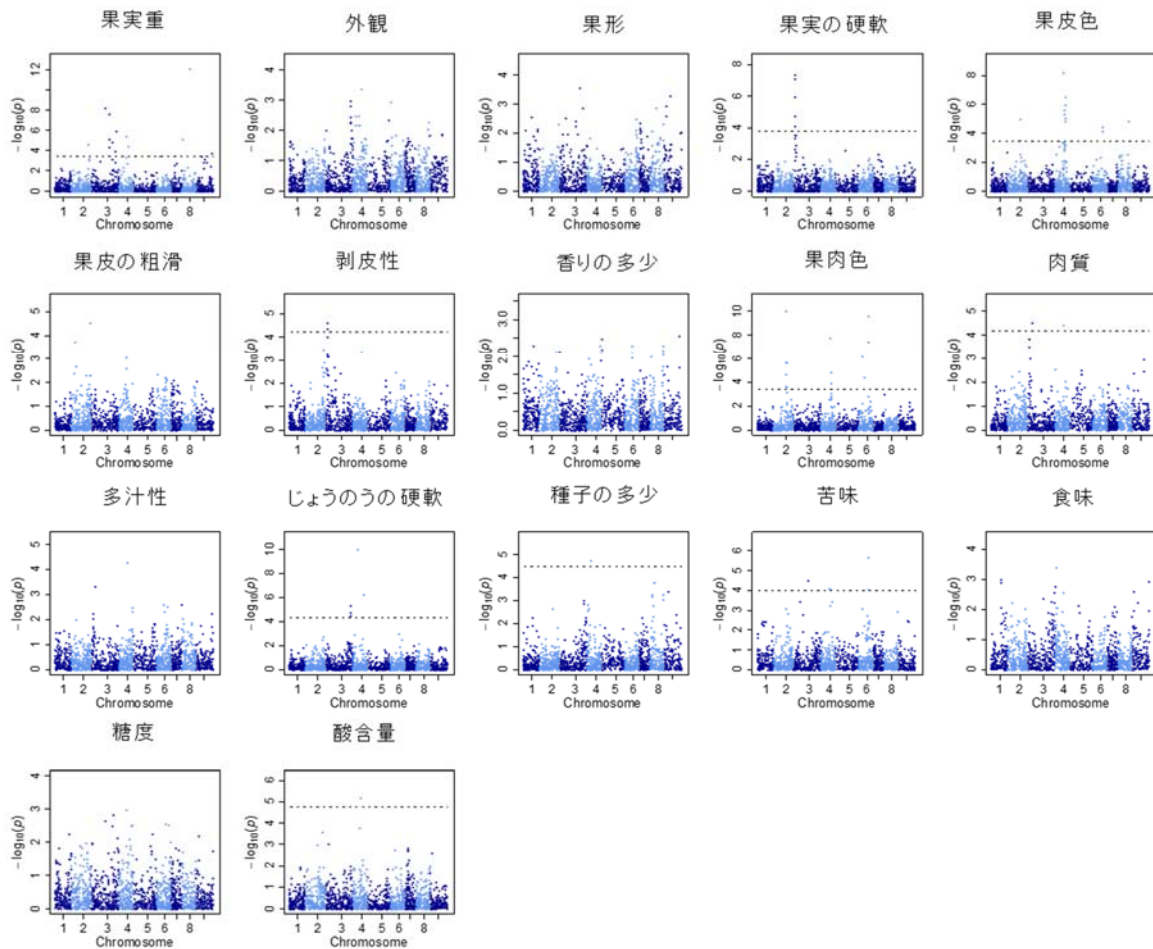


図4. コアおよび検証用集団を用いたカンキツ果実17形質におけるGWAS (rrBLUP, n.PC = 4)
点線はFalse discovery rate (FDR) = 0.05を示す。

次に、従来のDNAマーカー選抜 (MAS) とGSによる形質の選抜の有効性を比較するために a : 数個のマーカーを用いた重回帰モデルによる予測 (従来のMASを想定)、b : aのマーカーを固定効果、残りの全てのマーカーを変数効果とした混合モデルによる予測、c : 全てのマーカーを変数効果とした混合モデルを用いた予測 (GSを想定) の条件で形質値を予測し、その精度を比較した (図5)。果実の硬軟 (FruH)、果肉色 (FleC)、じょうのう膜の硬軟 (SegM)、種子の多少 (Seed) は数個のマーカーによる予測でもその精度は高く、少数の効果の大きい遺伝子により形質がコントロールされていることが示唆された。一方で果実重 (FruW)、果肉の硬軟 (FleH)、多汁性 (Juicy)、糖度 (Brix) は全てのマーカーを利用した予測精度が数個のマーカーによる予測精度よりも大きく改善したことから多数の遺伝子が関与して形質がコントロールされていることが示唆され、これらの形質はGSによる選抜が有効であることが示唆された。

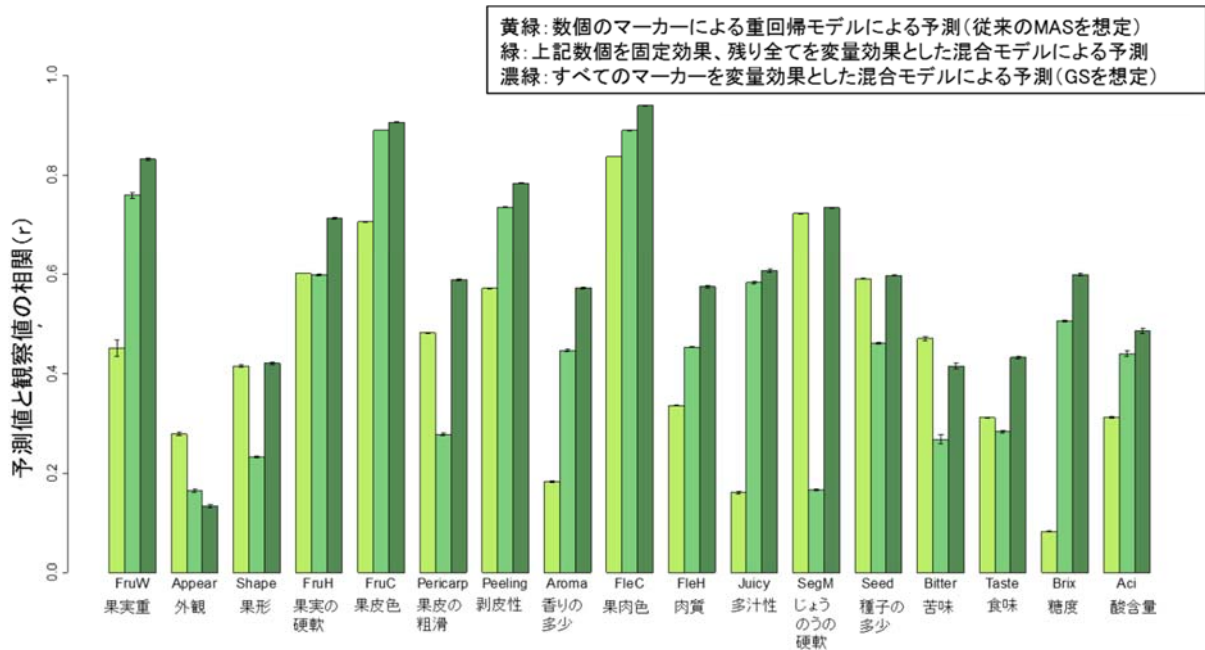


図5. キンキツ果実17形質における各モデル間の予測精度の比較
 トレーニング集団はコア集団を使用し、10分割交差検証法で精度を評価した。

(2) 高精度な形質情報を用いた早生キンキツ選抜技術の開発

高精度な形質評価として有機酸含量について果実生育期間に複数回サンプリングして高速液体クロマトグラフィーにより分析し、減酸に関連する特性を詳細に評価することでGSの予測精度やGWASの新たな関連SNPの検出を試みた。解析に用いた個体数はコア集団111品種・系統、検証用集団35家系501個体であった。しかしながら、GSによる予測精度は(1)で行った既存の形質評価による予測精度よりも低かった。これは供試個体数が高精度解析では2年分計612個体(2年反復測定できていない個体も含む)に対して、簡易測定では6年分計787個体(6年反復測定できていない個体も含む)であり、測定個体数や年次反復数の違いによる形質データの精度に起因している可能性が考えられた。GWASにおいても既存の評価方法と高精度の評価方法による解析結果を比較したところ測定個体数および年次反復数の多い既存法では有意なSNPが検出されたのに対して高精度の評価法では有意なSNPは検出されなかった。これらの結果は、ある程度の精度が確保されている形質データであれば測定点数を増やしたほうがGSによる予測やGWASによる関連SNPの検出には有効であることを示唆している。

(3) 早期選抜技術の適用と有効性の検証

GWASで検出された果実関連形質と連鎖するQTLの早期選抜への利用可能性を検証するために2親交雑の5家系計493個体についてSSRマーカー約130点による骨格連鎖地図を構築するとともにQTL解析を実施し、GWASの結果と比較した。その結果、解析した11形質のうち7形質についてGWASで検出されたSNPの近傍にQTL領域が検出された。これらのQTL領域の多くは複数の家系に共通して検出された領域であった。このことはGWASが有効であることを示している。

GSで予測したゲノム育種価を基に食べやすい早生キンキツを積極的に選抜することを想定し、GSの予測精度が高かった果実重(150g以上)、剥皮性(5段階評価(易~難)のやや易(2.0)以下)で676個体から27個体を選抜し、このうち酸含量が低く、種子の少ない6個体を選抜した。その中から観測値でも果実重が150g以上で酸含量が0.8%以下の種子が少なく、剥きやすかった1個体を早生キンキツ育種素材として選抜した。この個体は高接ぎにより複製をつくり、収量などの栽培性の調査を開始した。

(4) GoldenGate assayに替わる高速遺伝子型解析手法の検討

GoldenGate assay解析に変わる方法としてRAD-Seq解析とGenotype by Sequence (GBS) 解析、Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct (GRAS-Di) 解析などについてコア集団や連鎖解析用実生集団を用いて評価した。RAD-Seq解析は特に遺伝子領域に集中した遺伝子型が得られたが、育種実生集団の評価方法としてはコストが高額であった。一方で、GBS解析は分析コストが比較的安価で得られたSNPデータを段階的に選抜することで従来のSNPマーカーと同等程度の多型情報が得られるものと考えられた。また、GRAS-Di解析では、解析から得られるSNPを用いて連鎖地図を構築するとゲノム全体をよくカバーすることが確認され、推定される連鎖群の総長もSSRマーカーやGoldenGate SNPマーカーを用いて構築したものと同等程度であった。これらのことからGBSとGRAS-Diは検出されるSNPを段階的に選抜して信頼性の高いSNPだけを取り出すことで、連鎖解析にも問題のない精度の多型が得られることが示され、GoldenGate assayの代替手段として有効に機能することが示唆された。

3) 成果活用における留意点

(1) GSのモデル構築に用いた集団は、ウンシュウミカンやスイートオレンジなどを先祖にもつ農研機構におけるカンキツ育種集団をトレーニング集団としていることから、遺伝的背景の大きく異なる集団の選抜に使うには検証が必要である。

(2) GSのモデル構築に用いた形質データは農研機構果樹研究所カンキツ研究口之津拠点（現九州沖縄農業研究センター口之津カンキツ試験地）での評価値であり、大きく異なる栽培環境での選抜に使うには検証が必要である。

(3) 開発したGoldenGate assayシステムは現在利用できないため、注目するSNPを個別にマーカー化するか、もしくはGenotyping-by-sequencing (GBS) などの手法により置き換える必要がある。

4) 今後の課題

(1) 選抜の精度をさらに向上させ、適用可能な特性を拡大するためには、予測モデルの作成に利用するDNAマーカーの数を増やすほか、果実特性の評価方法を官能評価から機械測定に変更して数値化・客観化する、あるいは測定点数を増やすなどして高度化していく必要がある。

(2) 多様なニーズにこたえるために収量などの栽培性や香りといった新規形質について形質評価を行い、GS・GWASを適用していく必要がある。

(3) 特異的な形質について優れた特性を持つ遺伝資源を育種利用し、育種集団の多様性を確保・拡大する手法としてのGS・GWASの有効性を検証する必要がある。

(4) Genotyping-by-sequencing (GBS) などの手法で得られるゲノムワイド遺伝子型を、GS、GWAS解析に利用した場合の予測精度の比較が必要である。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405175

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発 (NGB)

小課題番号: NGB2010

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ゲノム情報利用育種を支える情報解析技術の開発とその活用基盤の構築

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 東京大学・大学院農学生命科学研究科・生物測定学研究室・岩田洋佳

1) 研究目的

ゲノミックセレクションを利用した高速育種を実現するためには、ゲノムと目標形質間の関係を正確にモデル化するための情報解析技術、および、モデルをもとに最適な育種計画を設計するシステムが不可欠となる。本研究課題では、他の研究課題と連携して、ゲノミックセレクションにおける予測選抜のための統計モデリング、および、それに関連した各種遺伝解析のための情報解析技術を開発し、新しいゲノム育種技術の開発に応用する。

2) 研究成果

(a) 4元交配に由来する後代集団における QTL 解析

野菜においては F1 品種が商用品種として普及しており、新品種作出のための材料としても F1 品種は重要である。本プロジェクトの他課題 (NGB2005、NGB2006) においても、F1 品種間交配に由来する後代集団を利用した新規ゲノム育種法の開発がトマト、キャベツについて検討されている。F1 品種間交配に由来する後代集団はゲノムの構成から見ると、2つの F1 品種の交配親である4つの品種を用いた4元交配に由来する後代集団と同等である。そこで、4元交配に由来する後代集団における新たな QTL 解析法の開発を行った。

図 1 に示したような4元交配に由来する後代集団を想定した。ここで、

G0: 交配に用いる4つの品種からなる基礎世代

G1: G0 世代の品種間交配で得られる2つの F1 個体の世代

G1F1: G1 世代の2つの F1 個体間の交配で得られる次世代

であり、それに続く世代を G1F2、G1F3 等で表した。

交配後代集団の各世代の個体については、基礎世代 (G0 世代) の4品種の4種類のゲノムが伝わるが、QTL 座においてこれら4種類のゲノムに対応する4つのアリルを想定して、各世代の個体の QTL 遺伝子型を近傍マーカーの遺伝子型から確率的に推定することができる。複数の QTL における推定された遺伝子型を説明変数として、表現型に対する線形モデルを構築した (図 2)。ここで、一般の G1Ft 世代におけるモデル (1) は、G1F2 については (2)、G1F3 については (3) のように表される (図 2)。さらにこの線形モデルのパラメータの推定のためのベイズ推定のプロセスを考案した。G1F2 世代において QTL の相加効果のみを考慮したモデルについて、ベイズ推定のプロセスを図 3 に示した。他の世代の後代集団についても、同様のプロセスが適用可能である。

開発した手法の有効性を評価するために、シミュレーションを行った。課題 NGB2005 の予備試験で収集されたトマトの2つの F1 品種ジェロニモと桃太郎 8 (G1 世代)、その F1 個体 (G1F1 世代)、および F1 個体の自殖により得られた次世代 (G1F2 世代) の 180 個体における 191 個の SSR マーカーのデータを利用して、3つの SSR マーカー (第1染色体 43.6cM の tbm0013、第2染色体 31.2cM の tbm1050、第9染色体 73.6cM の tbm0495) を3つの QTL とみなし、G1F2 世代の 180 個体の表現型値をシミュレーションにより生成した。ゲノム上に 5cM 間隔で仮想的な QTL 座を設定し、開発した手法を用いて解析した結果、設定した3つの QTL の近傍領域に有意な QTL を検出し、本手法の有効性を確認することができた (図 4)。

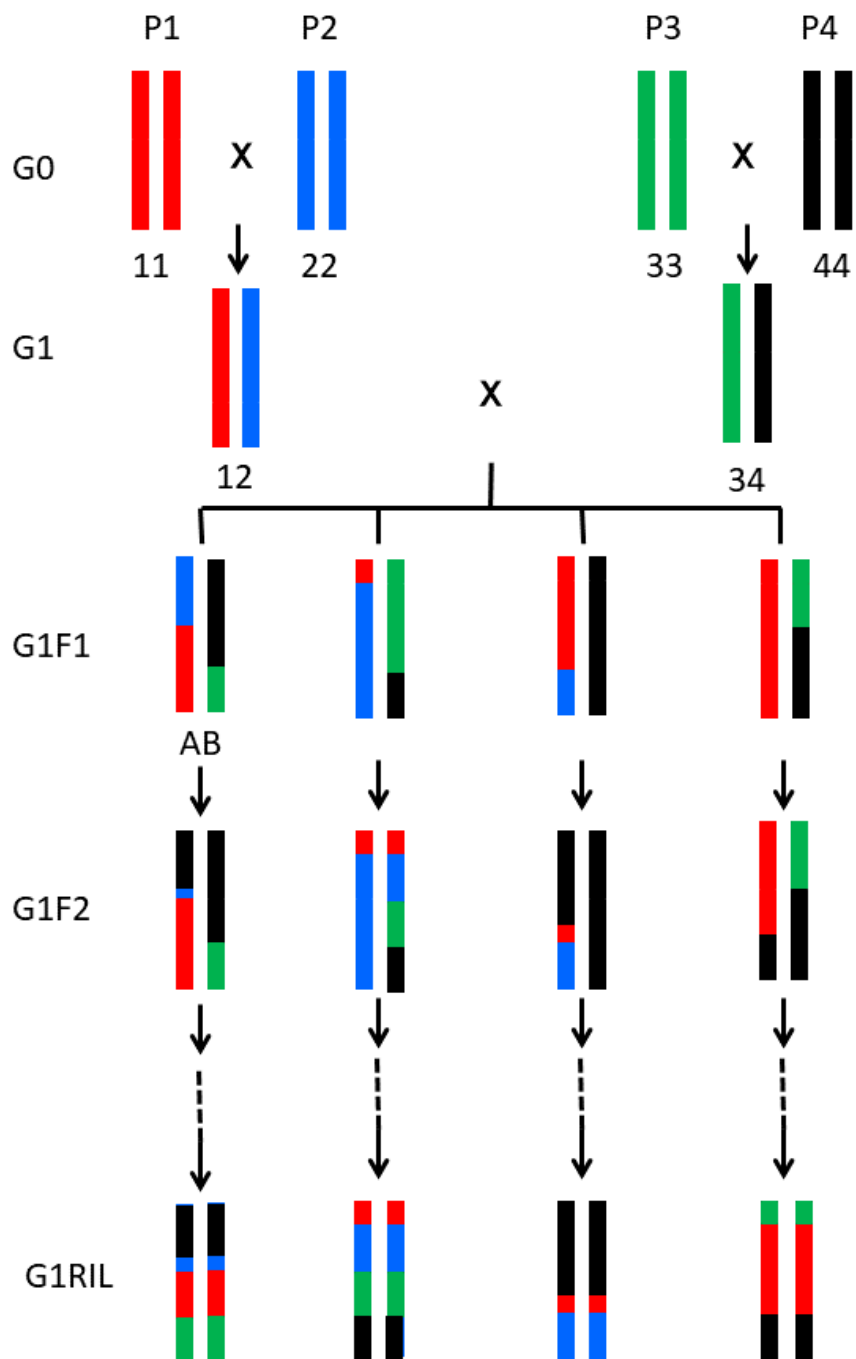


図1. 4元交配に由来する後代集団
 (F1品種間交配に由来する後代集団では、G1世代が初期世代となり、G0世代の4つの親品種は未知として扱う。)

4元交配に由来する後代集団におけるQTL解析のための統計モデル

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^L \{p'_{22i} \times 2a_{2l} + p'_{33i} \times 2a_{3l} + p'_{44i} \times 2a_{4l} + p'_{12i} \times (a_{2l} + d_{12l}) + p'_{13i} \times (a_{3l} + d_{13l}) + p'_{14i} \times (a_{4l} + d_{14l}) + p'_{23i} \times (a_{2l} + a_{3l} + d_{23l}) + p'_{24i} \times (a_{2l} + a_{4l} + d_{24l}) + p'_{34i} \times (a_{3l} + a_{4l} + d_{34l})\} + e_i \quad (1)$$

($i=1, 2, \dots, n$)

y_i : 第 i 番目の個体の表現型値、 μ : モデルの切片、

a_{lk} : 第 l 番目 QTL におけるアリル Q_{lk} の相加効果 ($l=1, 2, \dots, L; k=2, 3, 4$, G0 世代の P1、P2、P3、P4 に由来するアリルを Q_{1l} 、 Q_{2l} 、 Q_{3l} 、 Q_{4l} として、 Q_{1l} の相加効果は 0 とおく。)

d_{jk} : アリル Q_{jl} と Q_{kl} の交互作用の効果 (優性効果) ($j < k$)

p'_{jki} : 第 i 番目の個体の第 l 番目 QTL について、その遺伝子型が $Q_j Q_k$ となる確率

e_i : 残差 $\sim N(0, \sigma_e^2)$

G1F2 世代: ($p'_{12i} = p'_{34i} = 0$ より)

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^L \{(2p'_{22i} + p'_{23i} + p'_{24i}) \times a_{2l} + (2p'_{33i} + p'_{13i} + p'_{23i}) \times a_{3l} + (2p'_{44i} + p'_{14i} + p'_{24i}) \times a_{4l} + p'_{13i} \times d_{13l} + p'_{14i} \times d_{14l} + p'_{23i} \times d_{23l} + p'_{24i} \times d_{24l}\} + e_i \quad (2)$$

G1RIL 集団: (すべての個体がホモ化しており)

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^L (p'_{22i} \times 2a_{2l} + p'_{33i} \times 2a_{3l} + p'_{44i} \times 2a_{4l}) + e_i \quad (3)$$

図2. 4元交配に由来する後代集団におけるQTL解析のための統計モデル

G1F2 のモデル(2)において相加効果のみを考慮すると

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^L (u_{2il} \times a_{2l} + u_{3il} \times a_{3l} + u_{4il} \times a_{4l}) + e_i \quad (4)$$

ただし、 $u_{2il} = 2p'_{22i} + p'_{23i} + p'_{24i}$ 、 $u_{3il} = 2p'_{33i} + p'_{13i} + p'_{23i}$ 、 $u_{4il} = 2p'_{44i} + p'_{14i} + p'_{24i}$ である。

$\mathbf{a}_l = (a_{2l}, a_{3l}, a_{4l})'$ とおき、 \mathbf{a}_l の事前分布を $N(0, \mathbf{I}_3 \sigma_l^2)$ とする。

ここで、 $l=1, 2, \dots, L$ 、また \mathbf{I}_3 は 3 次の単位行列である。

ベイズ推定における \mathbf{a}_l の条件付き事後分布は $N(\boldsymbol{\mu}_l, \boldsymbol{\Sigma}_l)$ となる。ただし、 $\boldsymbol{\mu}_l$ と $\boldsymbol{\Sigma}_l$ は

$$y_i^* = y_i - \mu \quad \sum_{m=1}^L \{(2p'_{22i} + p'_{23i} + p'_{24i}) \times a_{2l} + (2p'_{33i} + p'_{13i} + p'_{23i}) \times a_{3l} + (2p'_{44i} + p'_{14i} + p'_{24i}) \times a_{4l}\}$$

および $\mathbf{u}_{il} = (u_{2il}, u_{3il}, u_{4il})$ とおいて、

$$\boldsymbol{\mu}_l = \frac{1}{\sigma_e^2} \left(\sum_{i=1}^n \mathbf{u}_{il} \mathbf{u}_{il}' / \sigma_e^2 + \mathbf{I}_3 / \sigma_l^2 \right)^{-1} \sum_{i=1}^n y_i^* \mathbf{u}_{il}$$

$$\boldsymbol{\Sigma}_l = \sum_{i=1}^n \mathbf{u}_{il} \mathbf{u}_{il}' / \sigma_e^2 + \mathbf{I}_3 / \sigma_l^2$$

と表される。

$$\text{QTL 検出のための統計量: } z = \boldsymbol{\mu}_l' \boldsymbol{\Sigma}_l^{-1} \boldsymbol{\mu}_l \quad (5)$$

図3. G₁F₂世代におけるベイズ推定を用いたQTL解析法

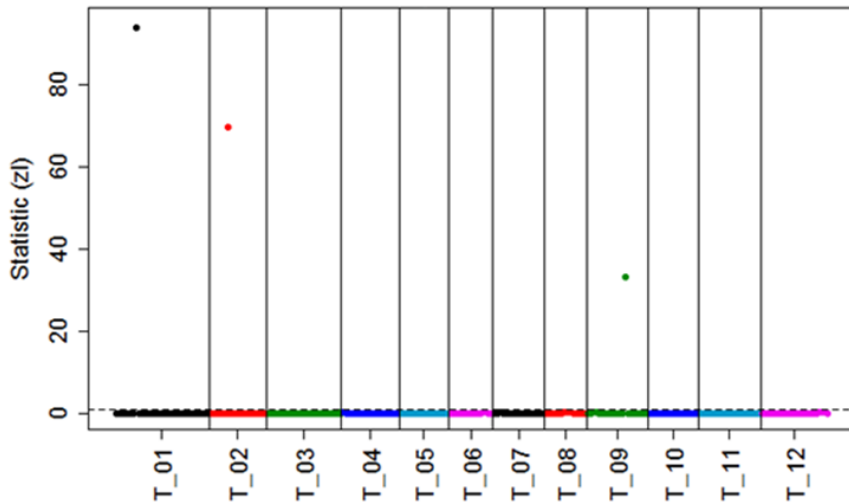


図4. シミュレーションで生成されたG₁F₂世代のデータに対するQTL解析例
第1、第2、第9染色体(T₀₁, T₀₂, T₀₉)のそれぞれ43.6cM, 31.2cM, 73.6cMの位置にQTLを配置して表現型値を生成した。縦軸はQTL検出のための統計量。点線はゲノムワイド1%の閾値。

(b) F1 品種間交配の F1(G1F1) 集団における QTL 解析

トマトやキャベツなどの野菜においては、優良な形質を備えた F1 品種が数多く利用されており、これらの F1 品種の間の交配を利用した育種素材の育成が新品種の作出に有用である。このようなヘテロ性の高い品種間の交配では、次代の F1 世代において形質や遺伝子型が分離してくるため、F1 集団にもとづく連鎖解析・QTL 解析が可能であり、育種集団における選抜対象形質の遺伝的背景を早期に把握することができる。F1 集団の QTL 解析においては、F1 集団を戻し交配集団とみなしたシュードテストクロス法が適用され、2つの交配親それぞれについて、個別に作成された連鎖地図をもとにヘテロで有する QTL を検出することが目的となる。しかしながら、従来のシュードテストクロス法を用いた QTL 解析では、一方の親における QTL を検出するとき、他方の親の QTL 効果は考慮しないため、その効果がノイズとなり検出効率が低下する傾向がある。そこで、F1 品種間交配に由来する F1 集団 (G1F1 集団) におけるシュードテストクロス法にもとづく QTL 解析について、両親のマーカー情報を同時に考慮した統計モデルを構築し、QTL 検出の高精度化を可能とする解析手法を新たに開発した。

ヘテロ性の高い2つの親品種 P1 と P2 の交配により得られる n 個体からなる F1 集団を考える。F1 個体については、マーカーの遺伝子型データと解析対象となる形質のデータが得られているものとし、また、P1 と P2 については、それぞれの連鎖地図が利用できるものとする。P1 と P2 のゲノム上にそれぞれ等間隔で p 個と q 個の仮想的な QTL を配置し、これらの QTL の効果を調べることにより QTL の検出を行う手法として、i 番目の F1 個体の表現型値に対してすべての仮想的な QTL を考慮した線形モデルを考える (図5)。このモデルには、F1 個体が各親品種から受け継いだ QTL のアリルが説明変数として含まれるが、それぞれの仮想的な QTL において F1 個体が受け継いだアリルは、その個体の QTL 近傍のマーカー遺伝子型より類推することができる。この説明変数は、親品

種の QTL の 2 つのアリルのいずれを受け継いだかで、-1 あるいは 1 の値を取るものとする。さらに、 $p+q$ 個のそれぞれの QTL がモデルに含まれるか否かを表すダミー変数をモデルに取り入れた。仮想的な QTL を数 cM の間隔でゲノム全体に配置するとき、 p 、 q の値は数百から数千のオーダーとなり、図 5 のモデルは多数のパラメータを含む高次元の回帰モデルとなる。このような複雑なモデルのパラメータの値を効率的に推定するために変分ベイズ法を適用した。

開発した手法を課題 NGB2006 で得られたデータに適用した。NGB2006 においては、キャベツの 2 つの F1 品種 (T-520、金系 201 号) の間の交配により、193 個体の F1 およびそれらの F1 個体から自殖で得られた F2 系統が作出されており、2 つの親品種と F1 個体については SSR マーカーの遺伝子型データ、F2 個体については形質データが収集されている。ここでは、F2 系統の抽苔性スコアに着目し、F2 の系統平均を F1 の形質値とみなして、開発した手法を用いて QTL 解析を行った。SSR マーカーの遺伝子型データより、2 つの親品種について、それぞれ 110 個、119 個のマーカーから成る連鎖地図が作成されており、それぞれの地図上に 2cM 間隔で仮想的な QTL を配置した。それぞれの地図上の仮想的な QTL の数は $p=483$ 、 $q=467$ であった。また、それぞれの仮想的な QTL がモデルに含まれる事前確率は 0.1 とした。解析結果として、仮想的な QTL のそれぞれがモデルに含まれる事後確率を連鎖地図上にプロットした (図 6)。ゲノム上に配置した仮想的な QTL のうち、高い事後確率を示す QTL が実際に分離している QTL であるとみなされる。図 2 より、抽苔性については、一方の親 (T-520) の第 1 および第 8 染色体に QTL が検出され、他方の親 (金系 201 号) については QTL が検出されなかった。

統計モデル

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^p \gamma_l u_{il} a_l + \sum_{m=1}^q \eta_m v_{im} b_m + e_i$$

y_i : i 番目のF1個体の表現型値($i=1,2,\dots,n$)

u_{il} : i 番目のF1個体がP1から受け継いだ l 番目のQTLのアリルを表す変数($l=1,2,\dots,p$)

v_{im} : i 番目のF1個体がP2から受け継いだ m 番目のQTLのアリルを表す変数($m=1,2,\dots,q$)

a_l : l 番目のQTLのアリル効果 $\sim N(0, \sigma_{a_l}^2)$

b_m : m 番目のQTLのアリル効果 $\sim N(0, \sigma_{b_m}^2)$

γ_l : P1における l 番目のQTLがモデルに含まれるか否かを表すダミー変数
(事前確率 π_1 で1、事前確率 $1 - \pi_1$ で0の値を取るものとする。)

η_m : P2における m 番目のQTLがモデルに含まれるか否かを表すダミー変数
(事前確率 π_2 で1、事前確率 $1 - \pi_2$ で0の値を取るものとする。)

図5. シュードテストクロス法を用いた新規QTL解析法の統計モデル

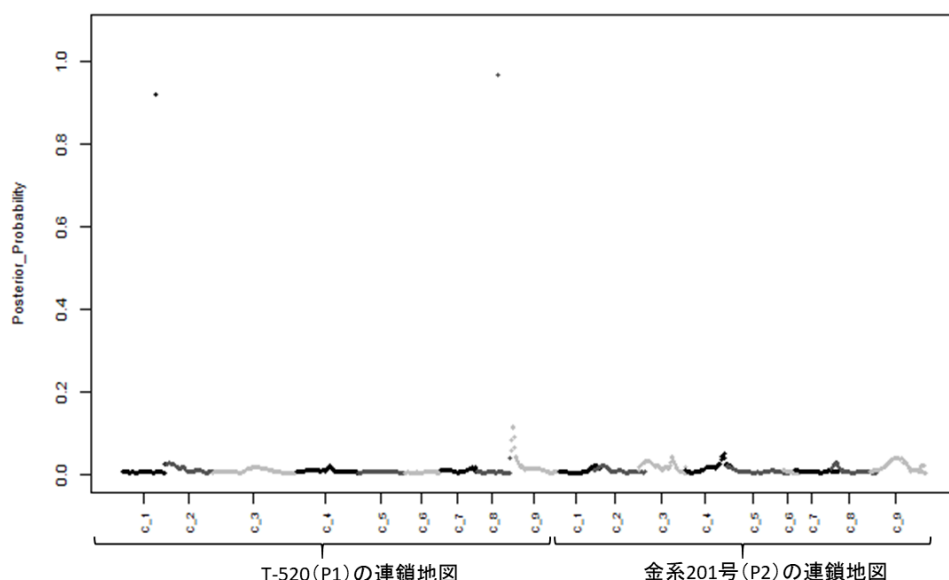


図6. 開発したシュードテストクロス法によるキャベツF1集団の抽苔性スコアのQTL解析

(c) 交配後代集団をトレーニング集団とする予測モデルの構築

課題 2006 で遂行中のキャベツ F1 品種間交配に由来する後代集団における抽苔性と結球性を対象形質としたゲノミックセレクションのために、F2 (G1F2) 集団をトレーニング集団として育種価予測モデルの構築を行った。予測モデルの構築については、複数 QTL の効果を同時に考慮した線形モデルをもとに BayesA 法によるパラメータ推定を行った。

形質に關与する QTL をできるだけ多く、予測モデルの変数として取り込むことにより、予測精度の高いモデルの構築が可能となる。そこで、予測モデル構築の準備として、F2 集団の形質データと SNP 遺伝子型データを用いて、インターバルマッピング法による QTL 解析を行うとともに、BayesA 法による予測モデルを用いた関連解析を行い、検出された QTL の比較を行った。キャベツ F1 品種間交配に由来する G1F2 集団に対するインターバルマッピング法のモデルを図 7 のように構築した。ここでは、検出対象となる QTL について、交配に用いた 2 つの F1 品種のそれぞれの親品種に由来する 4 つのアリルを想定し、各 F2 個体の QTL 遺伝子型を近傍の SNP により推定した。育種価予測に用いる BayesA 法においては、F2 集団の形質データと SNP 遺伝子型データをもとに予測モデルを構築した (図 7)。BayesA 法では、すべての SNP について、その遺伝子型を説明変数として取り込んだ高次元の線形モデルを設定して、縮小推定により各 SNP の回帰係数を推定することによりモデル構築を行った。インターバルマッピング法による QTL 解析の結果は、抽苔性については図 8 のようになり、第 2、5、8、9 染色体に有意な QTL が検出された。BayesA 法による予測モデルを用いた関連解析でも、それらの QTL のシグナルが検出された (図 9)。この結果から、BayesA 法による予測モデルにより、インターバルマッピング法で検出された形質に有意に關与した QTL を予測モデルに取り込むことが可能であることが示された。一つの対象形質である結球性についても、同様の結果が得られたことから、NGB2006 におけるキャベツのゲノミックセレクションにおいて、BayesA 法を用いて F2 以降の世代における実際の個体選抜を行うこととした。

統計モデル

1. インターバルマッピングのモデル

$$y_i = \mu + \mathbf{u}'_i \mathbf{b} + e_i$$

y_i : i 番目のF2個体の表現型値($i=1,2,\dots,n$).

μ : モデルの切片.

$\mathbf{u}_i = (u_{1i}, u_{2i}, u_{3i}, u_{4i})'$: i 番目のF2個体を持つQTLアリルを表す変数.

$u_{1i}, u_{2i}, u_{3i}, u_{4i}$ は、2つのF1品種のそれぞれの親品種から由来する4つのハプロタイプに対応するアリルに対する変数であり、個体を持つアリルに応じて、0、1、2の値を取る.

$\mathbf{b} = (b_1, b_2, b_3, b_4)'$: 2つのF1品種のそれぞれの親品種から由来する4つのQTLアリルの効果(ここでは、 $b_1=0$ とした).

e_i : モデルの残差.

2. BayesA法による予測モデル

$$y_i = \mu + \sum_{l=1}^p u_{il} a_l + e_i$$

y_i : i 番目のF2個体の表現型値($i=1,2,\dots,n$).

μ : モデルの切片.

u_{il} : i 番目のF2個体の l 番目のSNPにおける遺伝子型を表す変数で遺伝子型に応じて、0、1、2の値を取る ($l=1,2,\dots,p$).

a_l : l 番目のSNPの効果で、事前分布として、 $N(0, \sigma_l^2)$ を想定する.
さらに σ_l^2 の事前分布として、 $\chi^2(\nu, S)$ を用いる.

e_i : モデルの残差.

図7. インターバルマッピングのモデルと育種価予測のためモデル

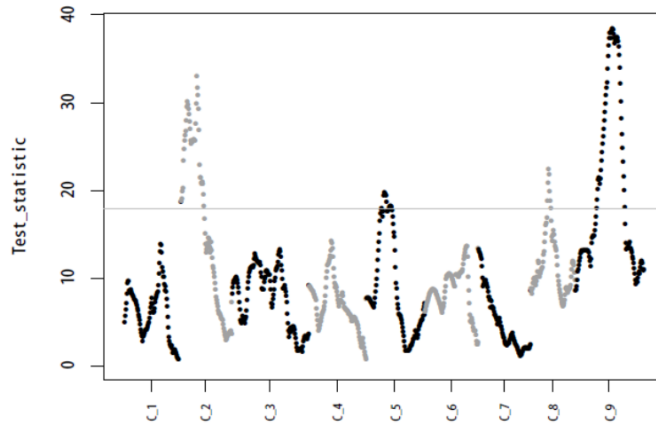


図8. 抽苔性に対するインターバルマッピングによるQTL解析
(縦軸は統計量の値を示し、水平線は5%のゲノムワイドな閾値を表す)

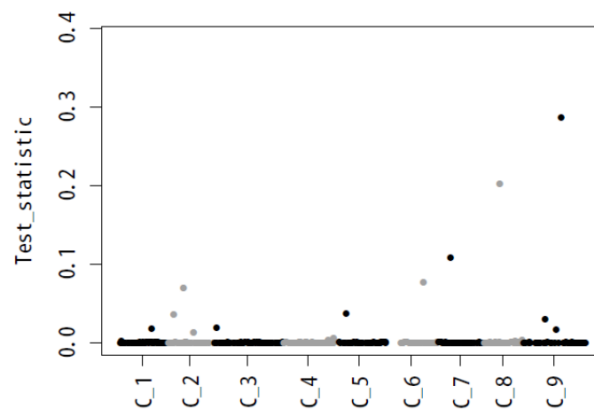


図9. 抽苔性に対するBayesA法によるSNPと形質との関連解析
(縦軸は各SNPの効果の2乗を表す)

(d) 品種群とF1 育種集団情報を利用した、ゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) およびゲノミックセレクション (GS) の予測精度評価：カンキツ

NGB1006、NGB2009 において収集されたカンキツ 111 品種 (親集団) と、35 家系 676 個体の F1 育種集団から得られた 1,841 SNPs の遺伝子型および、17 果実形質 (果実重 Weight、外観 Appear、果形 Shape、果肉硬度 FruH、果皮色 ColorP、果皮の粗滑 SmoothP、剥皮性 Peeling、香気の多少 Aroma、果肉色 ColorF、肉質 FleH、多汁性 Juicy、じょうのうの硬軟 FirmLM、種子の多少 Seed、苦味 Bitter、食味 Taste、糖度 Brix、酸含量 Acid) の表現型を解析に用いた。親集団、育種集団ともに複数年のデータあるため、年次の効果を推定し、補正した遺伝子型値を解析に使用した。

まず、GWAS および GS の成功のための重要な因子である連鎖不平衡と集団構造の強さの程度を調べた。その結果、親集団と育種集団を統合した集団では、親集団のみの集団に比べて、早い段階での連鎖不平衡の減衰が観察されたものの、両集団ともに比較的広い範囲に連鎖不平衡が及んでいることが分かった（図 10）。これは、集団サイズが小さく、かつ、世代時間が長いために減数分裂の頻度が少ないことによると考えられた。集団構造解析では、親集団の一部で果実重に関連した分集団の存在が確認された（図 11）。親集団と育種集団を合わせた集団では、明瞭な分集団の存在は確認されなかった（図 12）。これらの結果は、GWAS および GS を効率的に行える可能性を示した。

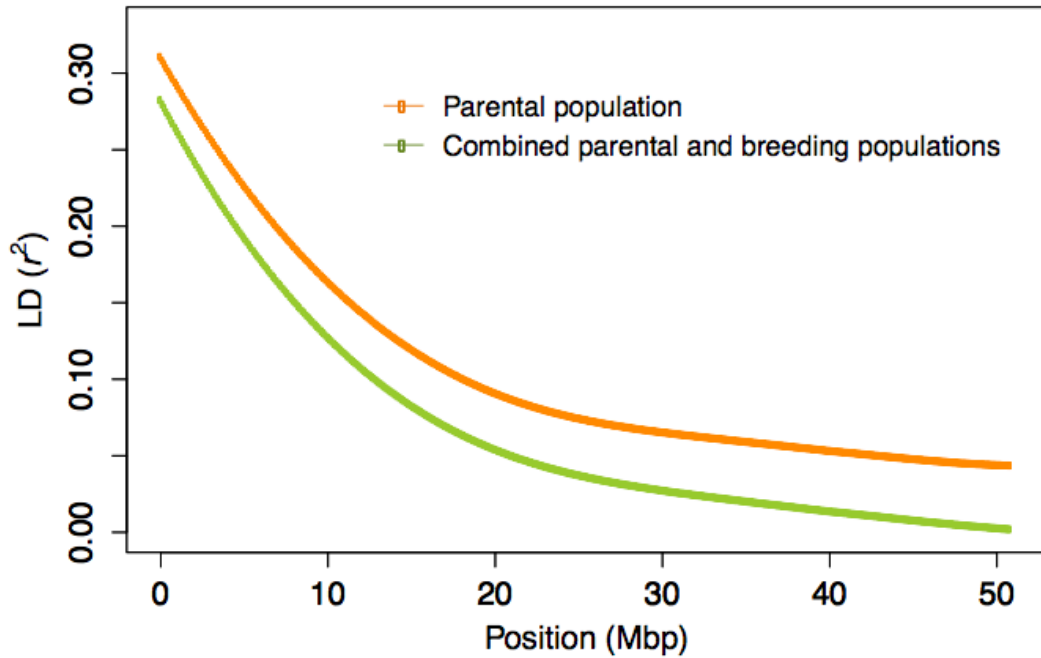


図10. カンキツで観察された連鎖不平衡 (r^2)

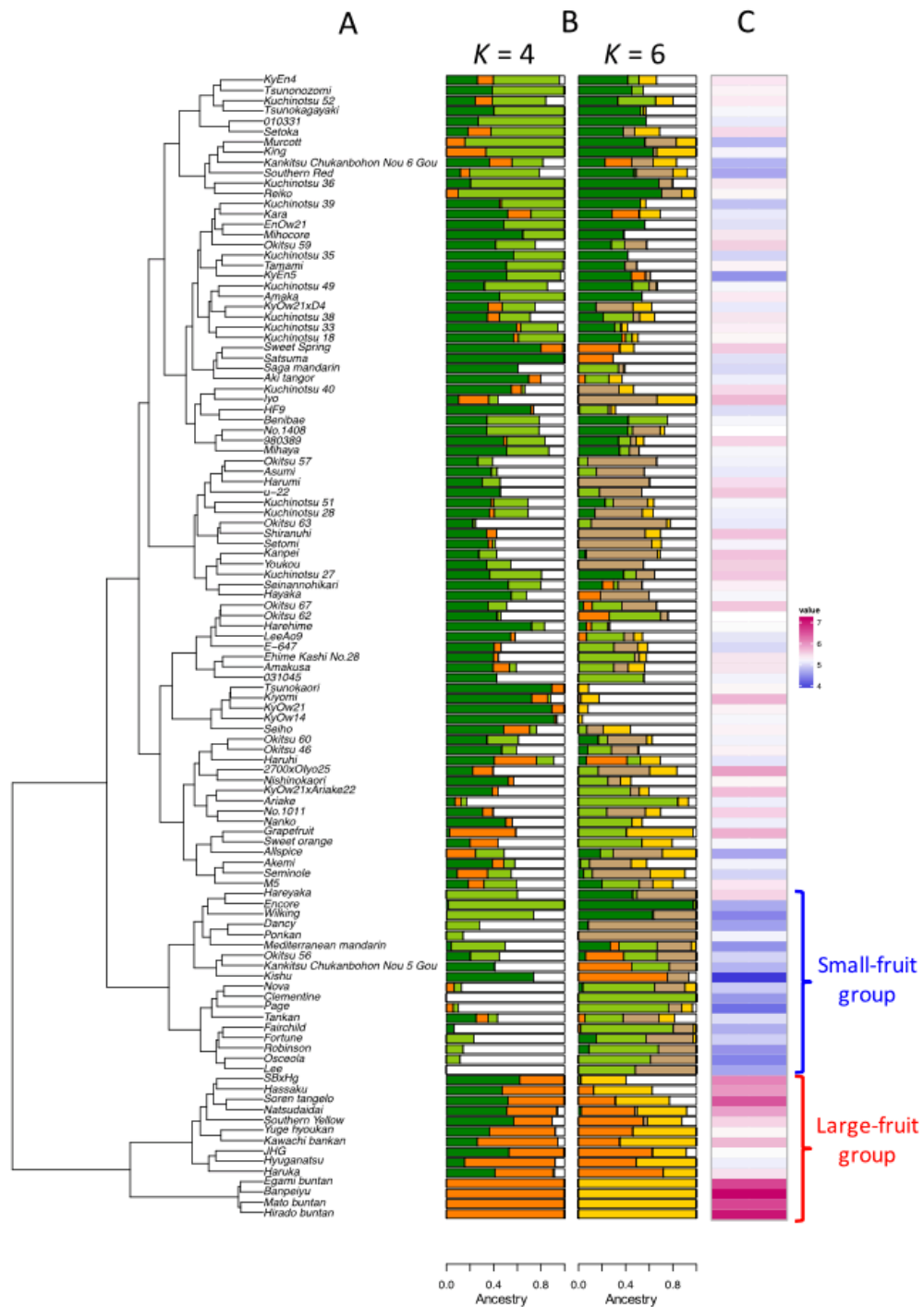


図11. カンキツ親集団の集団構造

A: 階層的クラスタリング、B: ADMIXTURE解析、
C: 対数変換した果実重のヒートマップ

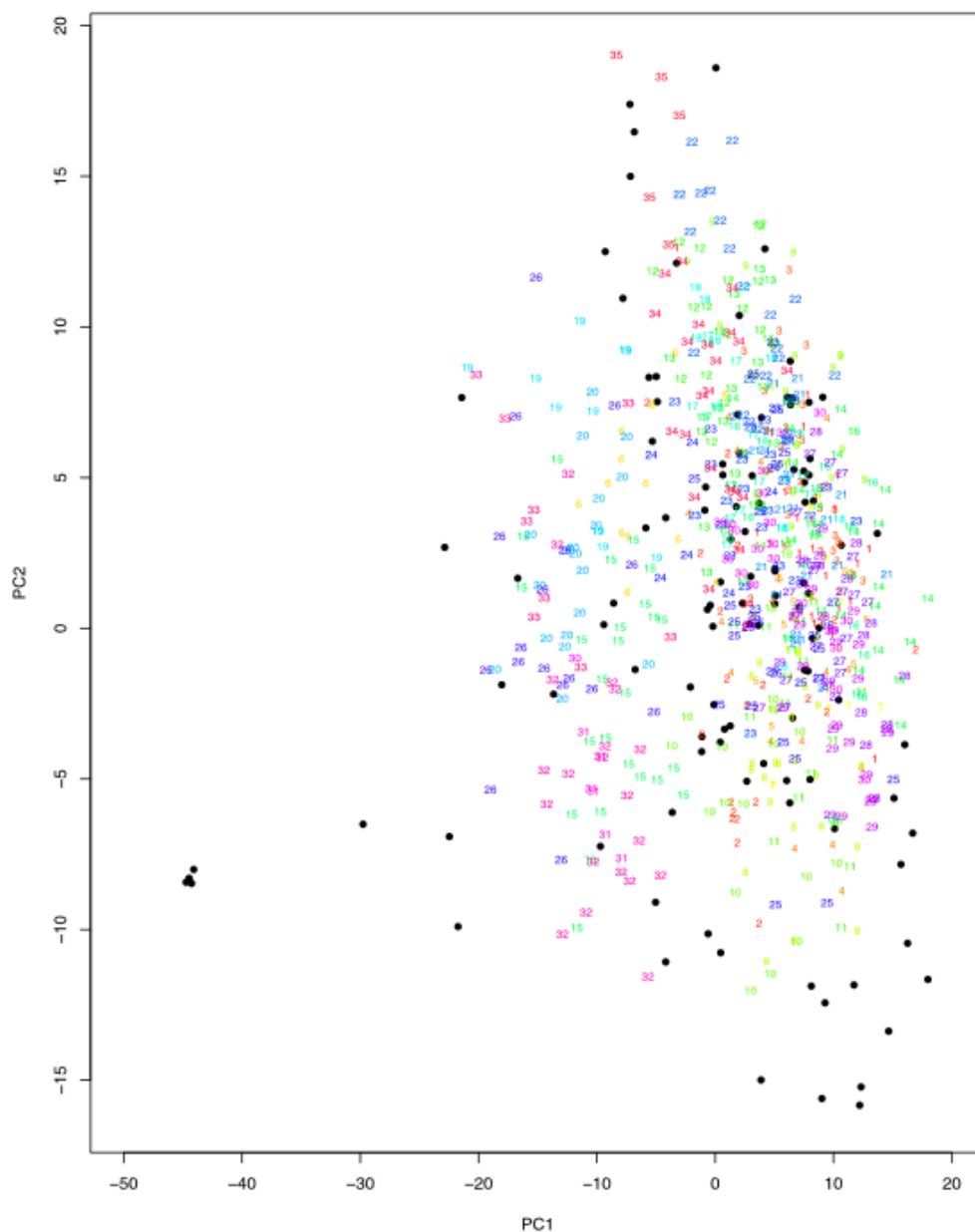


図12. カンキツ親集団と育種集団を統合した集団での主成分分析
 黒は親集団を示し、図中の数字は家系の番号を示す。

親集団と育種集団情報を統合して GWAS を行い、効果の大きな SNP の検出を試みるとともに、親集団のみの情報で GWAS をした場合との結果を比較した (図 13, 14)。混合モデル (GBLUP) を使用し、偽陽性のアソシエーションを防ぐために、血縁と集団構造の情報を母数効果として組み入れた。結果、統合した集団での解析ではアソシエーションが明瞭になり、カンキツの果皮色などにおいて候補遺伝子を推定することができた。

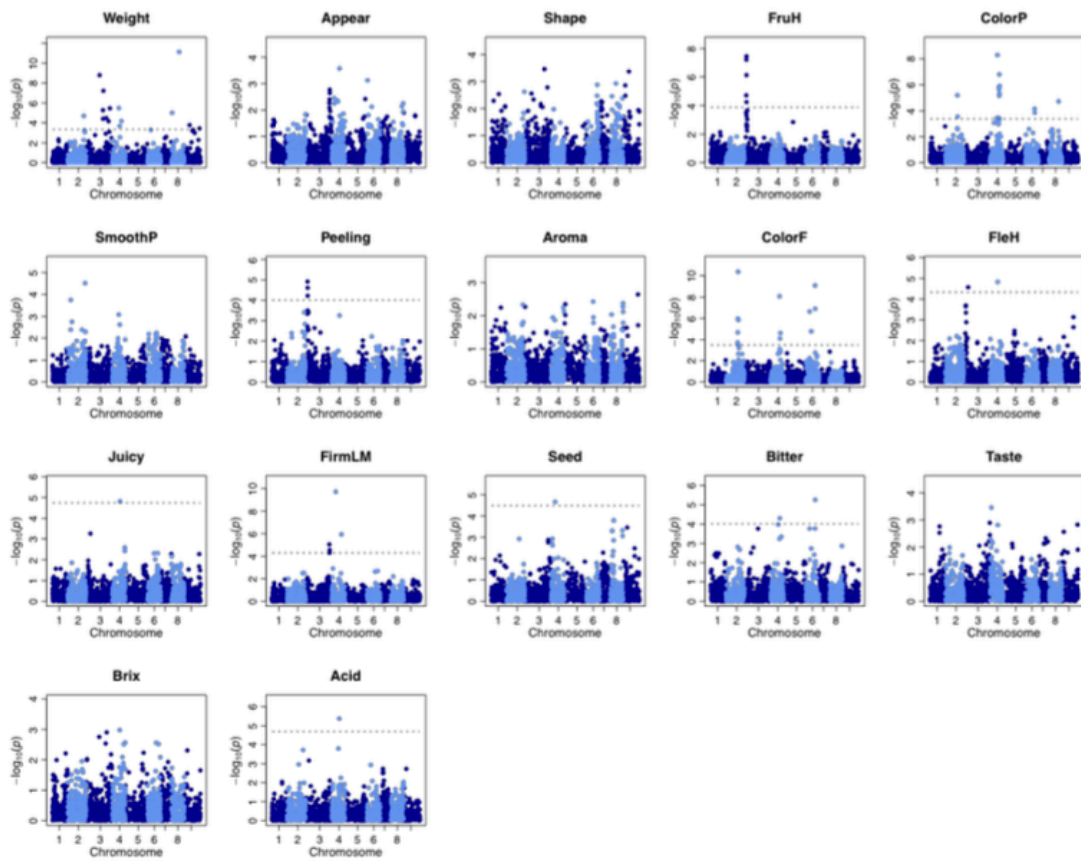


図13. カンキツ親集団と育種集団と統合した集団のGWAS
破線は、FDR 5%を示す。

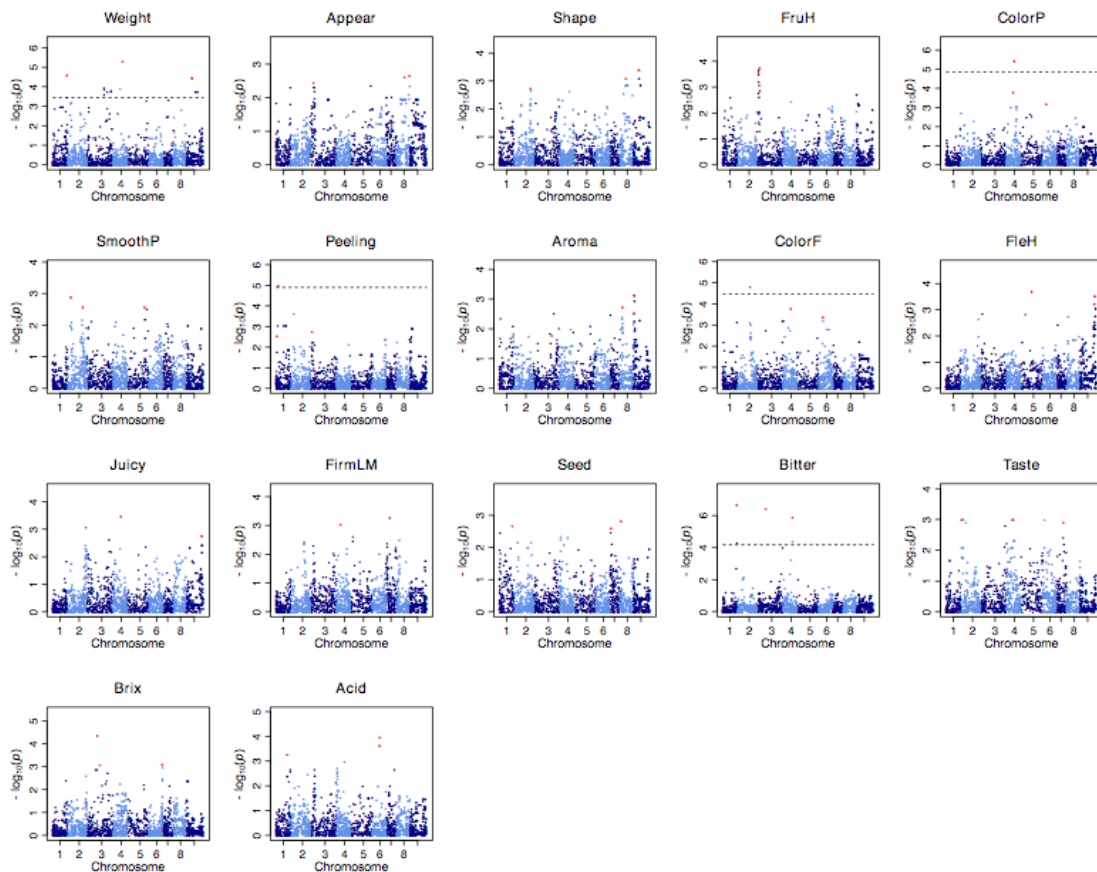


図14. カンキツ親集団のGWAS

破線は、FDR 5%を示す。赤は多変量回帰モデル（MLR）に用いたSNPs（図6B）。

GSモデルの構築には計11の回帰手法（およびその平均）を用いた。形質によって手法の効果は様々であったが、計11の回帰手法の平均では、ほとんどの形質で安定的に中上位の予測精度を示した（図15A）。GWASで検出されるマーカーをモデルに明示的に組み込むことで予測精度が向上する場合がある。そこで、親集団のGWASで効果の大きい3 SNPsに絞った多変量回帰モデル（multiple linear regression: MLR）、それらのSNPsを母数効果、1,841 SNPsからそれらのSNPsを除いた残りのSNPsを変量効果とした混合モデル（GBLUP）と、全1,841 SNPsを全て変量効果とした混合モデルの3種類で予測精度を比較した。果実重（Weight）、香気の多少（Aroma）、多汁性（Juicy）、酸含量（Acid）では、マーカー数を増やすことで、予測精度は大幅に向上した（図15B）。カンキツは、ヘテロ性が高いため、優性効果を考慮した予測モデルを検討する必要があると考えられる。相加効果と優性効果を両方考慮したマルチカーネル回帰と相加効果のみを考慮したシングルカーネル回帰の予測精度を比較したところ、多汁性（Juicy）と酸含量（Acid）では、マルチカーネル回帰の方が高い予測精度を示した（図15C）。予測精度の評価には、親集団における10分割交差検証法を用いた。

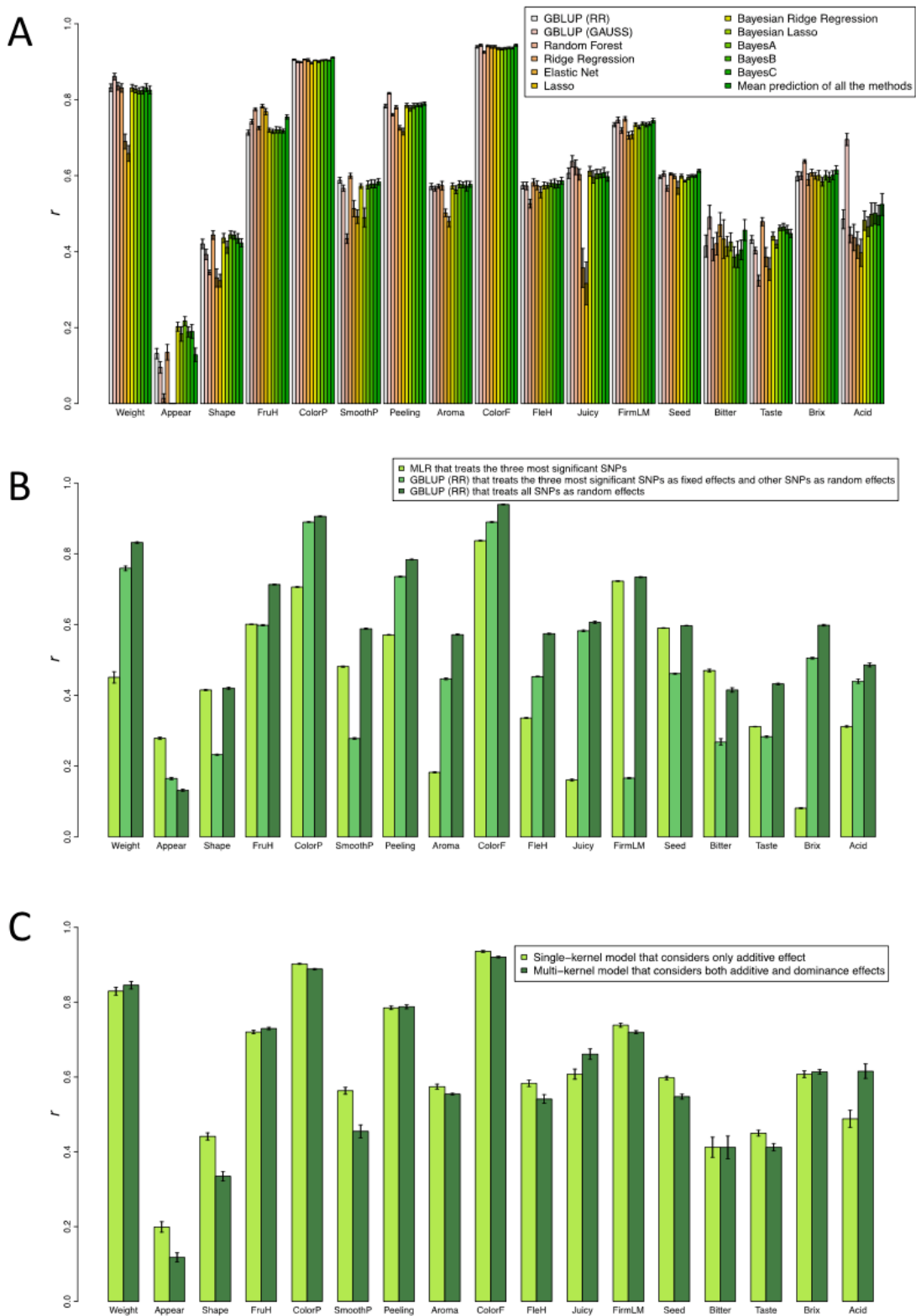


図15. カンキツ親集団を用いた予測モデルの比較

予測値と観察値の相関 (r) を予測精度の指標とした。

A: 11の回帰手法 (およびその平均) の比較、B: GWASの情報を利用した予測、C: 優性効果を含めたモデルと含めないモデルの比較

次に、3種類の異なるトレーニング集団で予測モデルを構築してF1家系の予測精度を評価した。比較した3種類のトレーニング集団とは、[1] 親集団、[2] 育種集団（予測する家系は除く）、[3] 親集団と育種集団（予測する家系は除く）を統合した集団のことを指す。ほとんどの形質において、親集団のみをトレーニングとした場合には予測精度が低かったが、親集団と育種集団を合わせた集団をトレーニングとすることで最も高い予測精度を示した（図16）。果実硬度（FruH）、果実色（ColorP）、果肉色（ColorF）、酸度（Acid）においては、高い予測精度（観察値と予測値の相関が0.7以上）を示した。今後、交配育種を行いながら多数のF1育種集団の情報を蓄積していくことで、GS予測精度をさらに向上できる可能性が示唆された。

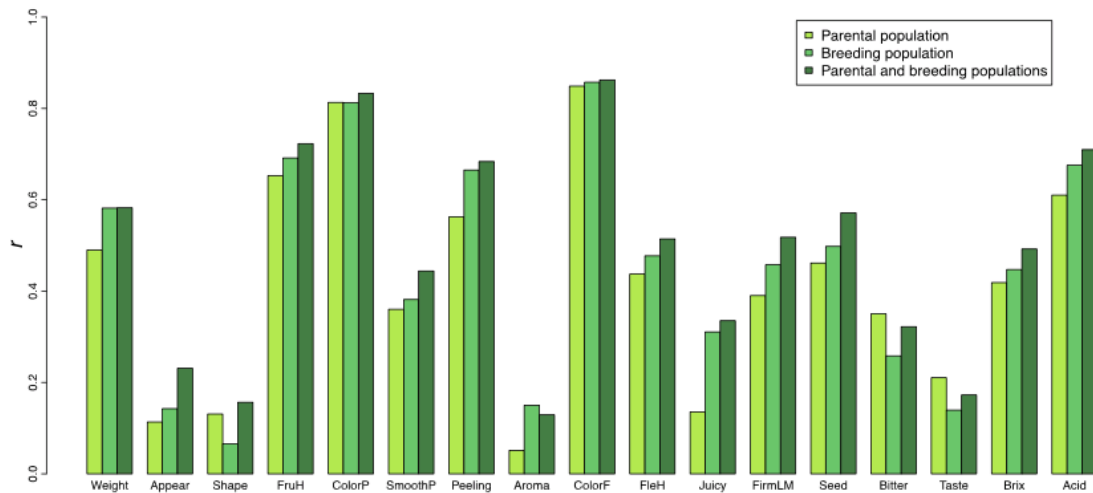


図16. カンキツ育種集団の予測全F₁家系をまとめて評価した。

育種では、これまでになく表現型を得ることが目的の場合（例えば、既存品種よりも高糖度）が少なくないが、統計的アプローチは「外挿」を予測するのが必ずしも得意でない。その外挿の予測の正確性の程度は、手法により依存するところが大きいと予測される。そこで、果実重について、代表的な回帰手法である線形カーネル回帰（GBLUP:RR）と非線形ガウスカーネル回帰（GBLUP:GAUSS）を用いて分布の端にある品種の表現型値の予測を試みた。その結果、線形カーネル回帰（GBLUP:RR）においてより正確に予測できることがわかった（図17）。

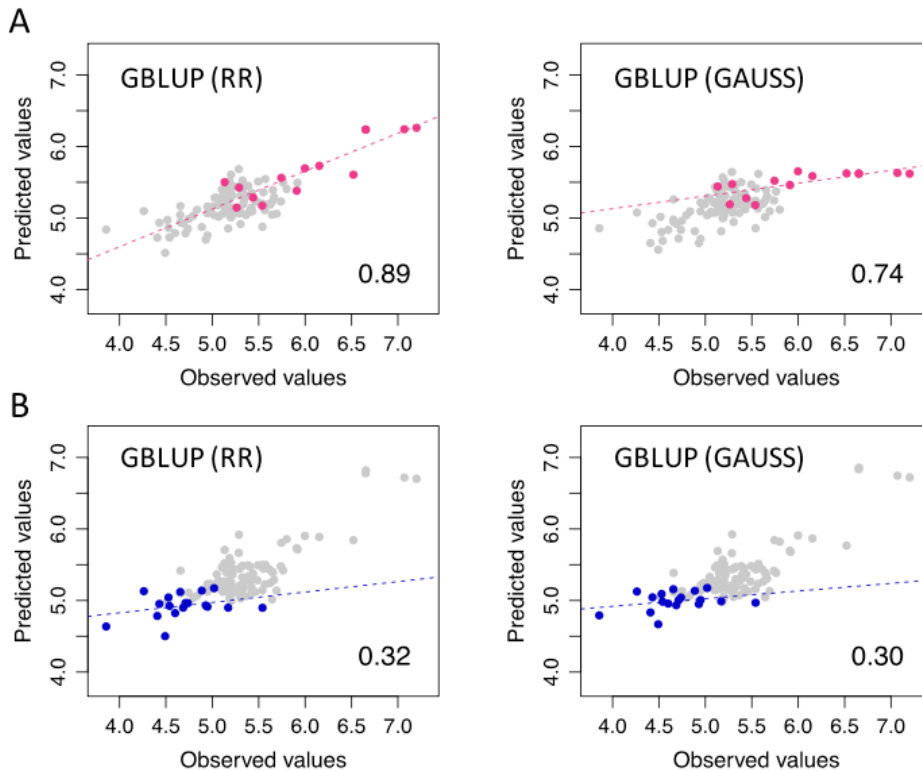


図17. カンキツ親集団を用いた果実重の分布の端にある品種の表現型値の予測

Large-fruit weight group (A) (桃色) と、Small-fruit weight group (B) (青色) (図2) をそれぞれ予測した。灰色はそれぞれを予測するためのトレーニング集団における1個体抜き交差検証 (Leave-one-out cross validation) の結果を示す。

(e) 品種群と F1 育種集団情報を利用した、GWAS および GS の予測精度評価：ニホンナシ

NGB1005、NGB2008 において収集されたニホンナシ 86 品種 (親集団) と、16 家系 765 個体の F1 育種集団から得られた 1,506 SNPs の遺伝子型および、17 形質 (収穫期、果実重、果肉硬度、果汁糖度、果汁酸度、果皮色、落果率、芯腐れ率、みつ症率、重症みつ症率、果形、サビ、外観、条溝、黒斑病抵抗性、樹勢、短果枝の着床) の表現型を解析に用いた。親集団、育種集団ともに複数年のデータあるため、年次の効果を推定し、補正した遺伝子型値を解析に使用した。

親集団と育種集団情報を統合して GWAS を行い、効果の大きな SNP の検出を試みるとともに、親集団のみの情報で GWAS をした場合との結果を比較した。混合モデル (GBLUP) を使用し、偽陽性のアソシエーションを防ぐために、血縁と集団構造の情報を母数効果として組み入れた。結果、統合した集団での解析ではアソシエーションが明瞭になり、収穫期では有意なアソシエーションが検出され、新規の QTL が存在する可能性が示唆された。

次に、5 種類の異なる予測方法で F1 家系の予測精度を評価した。5 種類の方法とは、[1] 親集団をトレーニングとした場合、[2] 育種集団 (予測する家系は除く) をトレーニングとした場合、[3] 親集団と育種集団 (予測する家系は除く) を統合した集団をトレーニングとした場合、[4] 家系内 10 分割交差検証、[5][4] の場合で、トレーニング集団に親集団と育種集団 (予測する家系は除く) を含めた場合、のことを指す。[4]、[5] は予測する家系と同じ家系の情報を GS 予測モデルに利用できる場合を想定している。育種現場では、ある家系で優秀な個体を得られた場合、同じ家系において、新た

な個体の評価と選抜を行うことがある。解析の結果、親集団と F1 育種集団を統合した集団（予測される家系は除く）をトレーニングデータとしてモデルを構築した場合に、F1 育種集団の表現型予測精度が高く、トレーニングデータに予測対象の F1 育種集団と同じ家系の情報も含めることで予測精度はさらに向上した。予測対象の F1 育種集団と同じ家系の情報は予測において非常に有効であることがわかった。カンキツの場合と同様に、今後、交配育種を行いながら多数の F1 育種集団の情報を蓄積していくことで、GS 予測精度をさらに向上できる可能性が示唆された。

(f) 複数のアルゴリズムを用いたリンゴ祖先ハプロタイプの推定

NGB1005、NGB2007 において収集されたリンゴ 185 品種と 16 家系 659 F1 個体について、11,796 SNPs の遺伝子型情報と系譜情報から、7 祖先品種（「Ralls Janet」, 「Delicious」, 「Jonathan」, 「Golden Delicious」, 「Indo」, 「Worcester Pearmain」, 「Cox's Orange Pippin」）由来の 14 祖先ハプロタイプが NGB2007 によってゲノムワイドに定義された。また、このハプロタイプ情報は、マーカー数を絞った GS に有効である可能性が示唆されている（國久ら、日本育種学会第 131 回講演会）。祖先ハプロタイプが定義できれば、GWAS などにより形質と関連のある祖先ハプロタイプを特定できる可能性もある。NGB2007 では、連鎖相推定、ハプロタイピングとともに、親子の関係を見ながら手動で決定されたが、他の果樹への応用も視野に入れ、NGB2010 では、コンピューターアルゴリズムを利用することで簡便かつ自動的に推定する方法を提案する。

まず、4 つのソフト（1. Beagle, 2. findhap.f90, 3. MaCH, 4. fastPHASE）を用いて連鎖相を推定し、手動で推定した場合のデータと比較することで、連鎖相推定精度を評価した。Beagle、findhap、MaCH は家系情報を利用できるが、fastPHASE は利用できないといった違いがある。結果、Beagle は最も高い推定精度を示した。

次に、隠れマルコフに基づくピタビ経路の考えを利用したハプロタイピング用のアルゴリズムを作成し、全品種、F1 個体の祖先ハプロタイプを自動的に推定した。この祖先ハプロタイプ情報と、手動で決定した祖先ハプロタイプ情報を利用した GS の予測精度を比較することで、自動的に推定された祖先ハプロタイピング精度を評価した。予測精度評価のための解析には、リンゴ 185 品種と、16 家系 659 個体の F1 から得られた 11,796 SNPs の遺伝子型と自動的に推定された祖先ハプロタイプ情報、および、収穫期、酸度、果皮着色程度の表現型を解析に用いた。品種群と家系集団（予測する家系は除く）を統合した集団をトレーニングとして予測モデルを構築して F1 を予測した。結果、連鎖相推定精度が最も高かった Beagle は、複数の形質で上位の予測精度を示した。自動的に推定された祖先ハプロタイプの予測精度は、手動で決定した祖先ハプロタイプ情報の予測精度とほぼ同程度であることから、自動推定ハプロタイピング手法に大きな問題はないと考えられた。また、手動で決定した祖先ハプロタイプ情報を利用した場合（國久ら、日本育種学会第 131 回講演会）と同様に、自動的に推定された祖先ハプロタイプ情報はマーカー数を減らしても SNP 情報に比べて予測精度が維持される傾向がみられた。自動的に推定された祖先ハプロタイプ情報も、マーカー数を減らした GS において有効である可能性が示唆された。今回提案した自動推定ハプロタイピング手法は他の果樹への応用も可能であると考えられる。

(g) コシヒカリ×日本晴の BIL100 系統を用いた QTL 解析

NGB2001 において収集されたコシヒカリ×日本晴の戻し交雑自殖系統群 BC1F6 世代 100 系統と 397 個の SNPs マーカーの遺伝子型を解析に用いた。形質調査は 2009 年に九州沖縄農業研究センター、作物研究所（谷和原）、中央農業総合研究センター 北陸研究センター、宮崎県農業試験場、愛知県農業総合試験場山間農業研究所、東北農業研究センター 大仙研究拠点で行い、異なった環境における QTL を比較した。また形質間の相関についても調査したところ、多くの形質において出穂期との相関がみられた。QTL 解析では、出穂関連遺伝子 Hd16 の効果が様々な形質で大きく影響しており、他の QTL を検出することが難しいと考えられた。そこで 12441; 100 系統を Hd16 遺伝子の遺伝子型によって 2 つの集団に分けて QTL 解析を行った。作物研究所における出穂期に関しての

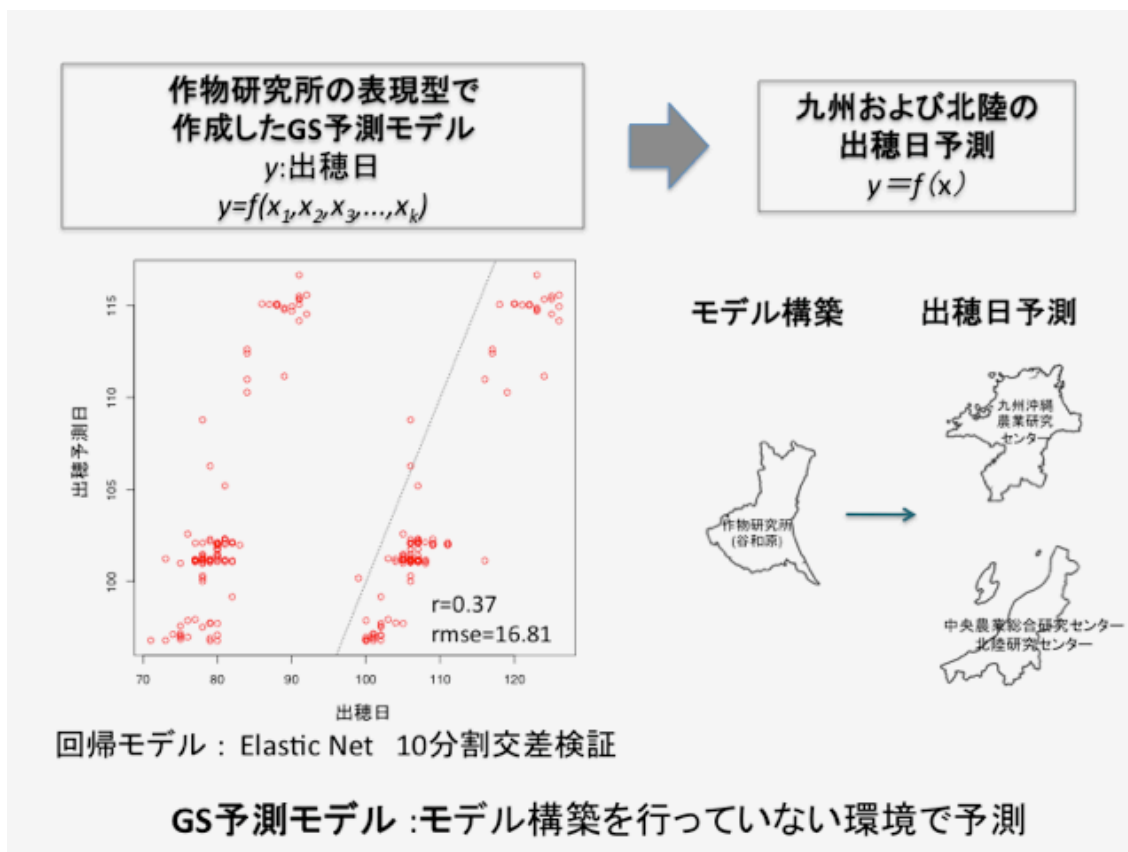
QTL 解析では、Hd16 の遺伝子型がコシヒカリ型の場合、Hd17 遺伝子と第 8 染色体の QTL が大きく影響していた。Hd16 の遺伝子型で集団を分けて QTL 解析を行うことで、Hd16 遺伝子の影響を排除して QTL 解析を行うことが可能となった。

(h) コシヒカリ×日本晴の BIL100 系統を用いた 植物生育の環境応答のモデル化と、出穂日の予測精度評価

ゲノムと表現型の関係を、環境情報を用いて、正確にモデル化する手法を検討するため、GS 予測モデルと遺伝子ベース作物モデルによる出穂日予測を行った。植物生育の環境応答のモデル化と、出穂日の予測精度評価には、コシヒカリ×日本晴の BIL100 系統の九州沖縄農業研究センター・作物研究所・北陸研究センターにおける出穂日を解析に用いた。ゲノミックセレクション予測モデルを構築し、10 分割交差検証を用いて予測精度を評価した。GS モデル構築にはエラスティックネット(線形回帰)を用いた。また、遺伝子ベース作物モデルでは、水稻品種群 112 品種・系統を用いた遺伝子ベース作物モデルから(青池ら、第 127 回講演会)、コシヒカリ・日本晴のパラメータを推定した。

3 環境での出穂日を予測した結果、予測精度 (RMSE) は 2.35 であり、高精度であった。GS 予測モデルではこの集団の出穂日の表現型データを利用し、表現型データをそのままモデリングに用いているため、モデル構築を行った環境においては高精度に予測できると考えられる。しかしながら、作物研究所で栽培した表現型を元に GS 予測モデルを作成し、九州沖縄農業研究センター・北陸研究センターの表現型を予測した場合には予測精度 (RMSE) は 16.81 となり(図 18)、環境が変わると表現型を予測する精度が下がることが明らかとなった。

一方、遺伝子ベース作物モデルを用いて出穂日を予測した結果、予測精度 (RMSE) は 4.67 であり、高精度に出穂日を予測できた。遺伝子ベース作物モデルでは予測する環境における表現型データをモデル構築に必要とせず、モデルの精度の環境依存性が低いと考えられる。未試験の環境にも適用できることから、環境依存性の高い GS の予測モデルに比べて、汎用性が高いことが示された。遺伝子との関連をモデル化してあるため、交配後代について遺伝子の状態を推定して、環境応答パラメータの推定し予測することが可能である。以上の結果から、GS 予測モデルは、遺伝子型×環境交互作用に対応するのが難しいことが明らかになった。遺伝子型×環境交互作用に対応するモデル化には、遺伝子ベース作物モデルを発展させていく必要があると考えられる。



(i) コシヒカリ×タカナリの BIL100 系統を用いたゲノムワイドマーカーおよび関連遺伝子の SNP に基づく予測モデル構築

イネでは農業形質を制御する遺伝子がいくつか単離されており、これらの遺伝子の情報を用いることで、様々な形質を予測できる可能性がある。これらの遺伝子の中から 12 遺伝子を選び、予測モデルを構築することで精度の向上を試みた。

NGB2001 において収集されたコシヒカリ × タカナリ BIL 集団 80 系統の 424 個の SNPs マーカーおよび 12 遺伝子の SNPs を遺伝子型とし、2012-2014 年作物研究所・2013-2014 年九州沖縄農業研究センターにおける栽培試験のデータを解析に用いた。10 分割交差検証法により予測制度を評価し、全ゲノム SNP ベース予測モデルと遺伝子ベース予測モデルの比較を行った結果、全ゲノム SNP ベース予測モデルと遺伝子ベース予測モデルの有効性は形質によって異なることが明らかとなった。また、全ゲノム SNP ベース予測モデルを用いることで、未検出の QTL や遺伝子が関係している形質も予測することが可能であると確認された。

次に予測モデルを構築し、収量関連の 12 遺伝子および各 SNP マーカーの効果を GBLUP の結果から逆計算した。QTL 解析の結果と比較し、これらの結果が育種に利用可能であることが確認された。量的形質に対して、それぞれの SNPs の効果を数値化することで、既知の遺伝子との効果の比較にも利用できる。既知の 12 遺伝子だけでなく、多収になる locus をなるべく多く集積した系統を選抜するために、各 SNP マーカーの効果を利用することが可能となった。

(j) ゲノム情報解析およびゲノム育種のためのソフトウェア開発

ゲノミックセレクションのモデル構築のためのソフトウェア gsWizaRd を開発した。開発された gsWizaRd について説明する。まず、タブ区切りテキストとして保存されたゲノムワイドマーカー遺伝子型データ、表現型データを指定し、出力先を指定する。次に、モデル構築に利用する手法と、各

手法についてオプションの設定を行う。表現型データから、解析対象とする形質を選択する。交差検証の方法を指定し、実行する。解析結果は、PC内のローカルフォルダに保存されるが、webブラウザを用いて確認することができる()。なお、予測結果は、テキストとグラフの両方で確認できる。グラフは、インタラクティブになっており、クリックすると系統番号などを表示することができる。これにより、予測精度が高い系統と低い系統などを確認することができる。作成しておいたモデルは、選抜しようとする個体や系統の遺伝的能力の予測に用いることができる。予測結果は、webブラウザで確認可能なほか、csvファイルとしても得ることができる。

3) 成果活用における留意点

・本研究では、様々な作物に対してゲノミックセレクションを行えるよう、手法・技術の開発を行った。これら手法・技術は、ある特定の作物に限定的に使えるというものではなく、様々な作物に対して(あるいは作物以外の植物に対しても)汎用的に利用できるということが特徴である。開発された手法・技術を、今後、様々な植物に応用することで、その可能性をより一層発展させていくことが重要である。

・開発されたソフトウェアについては、公開可能なものは、プロジェクト終了後も順次公開していく予定である。

・未発表の研究成果についても、順次、論文として公表していく予定である。

4) 今後の課題

今後、ゲノミック予測モデル構築機能を、ソフトウェア間で互いにやり取りが可能な、アプリケーションプログラミングインターフェース(API)として実装することで、様々なシステムへの組み込みを可能にしていく必要がある。また、表現型・ゲノム・環境に関わるデータおよびデータベースの相互運用性の向上、それらのゲノミック予測モデル構築への活用が必要となる。ゲノム育種は、データ駆動型の育種手法であり、データの運用・解析・利用のためのプラットフォームを確立することが極めて重要になる。

「多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405175

研究期間：平成25～29年度

中課題名：多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発(NGB)

小課題番号：NGB3001(平成27年度にNGB3002・3003(平成25～26年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～27年度

小課題名：画像解析による形質評価のハイスループット化(平成27年度にタブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発(平成25～26年度実施課題)及び先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発(平成25～26年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：かずさDNA研究所・植物ゲノム応用研究室・磯部祥子

1) 研究目的

近年、情報端末や測定機器類の飛躍的な進歩と低価格化が相まって、野外の圃場においてもそれらの機器を手軽に用いることが可能になった。系統・個体管理や表現型測定のデジタル化は、多くの植物個体を扱う作物育種研究には特に有効であり、形質の測定作業と測定結果の記録作業の一体化など、最新の情報端末と測定機器類を活用した表現型測定のハイスループット化が強く望まれている。そこで本課題では、デジタルカメラ等の普及によりデジタル画像を評価に用いる需要は高いが、植物の形質評価に適した撮影画像の解析や複数画像の比較に関する手法は確立されておらず、効率的な導入がされていない。そこで本課題では既存の市販機器を用いて撮影した画像を高速に処理するための技術およびソフトウェアを開発する。具体的にはイネ、ムギ、ダイズ、カンキツを対象に2次元デジタル画像を利用した育種のための形質評価法を開発する。対象とする形質を評価するためのデジタル画像取得法を開発するとともに、得られた画像から対象形質を解析する解析プログラムとソフトウェア化を実施する。また、膨大な画像データの中から育種目標に対して真に必要なデータを抽出するための統計アルゴリズムの開発と遺伝子型との比較を行える形に整形する育種データプラットフォームの構築を行う。

また、従来法による形質評価法においてもデータ入力の迅速なデジタル化を図るため、タブレット型情報端末と各種測定機器を組み合わせ、トマトやイネなどの作物試験圃場における系統・個体管理、形態的・生態的特性、収量性、耐病性及び果実品質などに関わる表現型測定の簡易化・高速化を図る。同時により客観的な測定法を構築することにより測定精度の向上を目指す。具体的には、圃場におけるトマトやイネなどの試験圃場における系統・個体管理や形態的・生態的特性に関わる表現型測定の簡易化・高速化に寄与するタブレット型情報端末用のアプリケーションの開発、デジタル秤とタブレット端末を組み合わせた果菜類の収量評価の簡易化・高速化、タブレット型情報端末を用いた耐病性や収穫物の品質評価システムなどの開発を行う。

さらに、ゲノム育種時代にふさわしい形質評価を行うために、対象形質を自動で測定する技術を開発する。先端センシング技術を積極的に導入して測定の自動化を図ることで、得られる形質データの質と量を従来に比べて飛躍的に高めることを目的とする。形質評価の自動測定法は欧米等で既に開発されているが、これらは大規模で高額なシステムであるため育種現場での導入は非現実的である。そこで、本課題では市販品や小型機器を駆使し、育種現場で広く導入することができる手法と技術開発を目指す。また、植物工場などで開発されている新たな栽培技術との連携を進め、農産物の次世代生産基盤技術の確立を行う。

2) 研究成果

(1) 画像解析による形質評価のハイスループット化

デジタル画像を用いたカンキツ形質評価法の開発では、A3サイズのフラットベッド型のスキャナーを用いることで果実の輪切り断面画像を安定的かつ解析に必要な十分な高解像度でとることが可能であることを明らかにした。また、下敷き用フィルム資材はA2サイズのOHPフィルムが光透過性90%以上、厚さ100 μ mと薄く作業性が優れていた。画像解析に必要な画質は、600dpi、TIFF形式とし、カンキツ輪切り画像を取得した。得られた画像を用いて、果実の抽出と各果実の外果皮・アルベド・果肉部を自動検出するプログラムの開発と実証を行った(図1)。開発したプログラムの実証試験として、果肉色、果実横径、外果皮厚(フラベド)についてプログラムにより抽出された値と達観やノギスで実測した値を比較した。果肉色は6段階で達観評価した値と比較したところ L^* 、 a^* 、 b^* いずれも相関係数が0.8以上の有意な相関があり、階級ごとの特徴は評価できた(図2)。なお、画像解析による a^* の外れ値はリコペンを果肉の一部に蓄積し、ピンク色を呈する品種の特徴を抽出したことが原因と考えられた。また、果実横径は画像解析とノギスの評価による結果では決定係数が0.997と高精度で評価できたが、フラベド厚は比例する関係にあるが、果実横径ほどの精度はなかった(図3)。フラベド厚は1mmから3mm程度と薄く、ノギス測定時でも測定値に対する測定誤差の割合が大きいことや画像解析においても一部の果皮色が黄白でアルベド部と似た色を示す場合はフラベド部の抽出精度が落ちたことなどが決定係数の低かった原因と考えられる。以上のことから果肉色や果実横径では十分な測定精度を持ち形質評価の高速化、高精度化が可能となった。

ムギの形質評価法の開発ではムギ種子画像による赤かび病抵抗性評価法の開発を対象とした。赤かび病抵抗性検定圃場にて栽培された小麦品種・系統について、罹病粒率とかび毒(デオキシニバレノール: DON)濃度を測定した。開発したプログラムでは種子ごとに正常部と病斑部の面積比を求めて定量化する(図4)。病斑部、正常部の判定に使う色セットの複数保存の機能など解析作業を効率よく実行するための改良を進めた。開発したプログラムの64bit版対応も含め、ソフトウェアとしての整備を進めた。開発したプログラムの検出精度を確認するため、2009~2012年の計4ヵ年のサンプル画像から罹病粒率の評価を行った。罹病面積60%以上を占める罹病粒の割合を罹病粒率として解析を行ったところ、いずれの年次も目視による罹病粒率より画像解析による罹病粒率のほうが、かび毒(デオキシニバレノール: DON)濃度との相関が高く、4ヵ年のサンプルをあわせた解析でも、DON濃度の目視に対する相関係数は0.68であるのに対し、画像解析による相関係数は0.88であった。以上の結果より、本研究により開発された画像解析プログラムにより年次間にわたり安定的に精度高く罹病粒率の評価(DON濃度の推定)が可能であると考えられた。

ダイズの形質評価法の開発では葉面積、周囲長、長さ、幅、円形度、色(L^* 、 a^* 、 b^*)を出力するプログラム(LeafShape)を開発した(図5)。ダイズの長葉変異遺伝子1nの原因遺伝子と考えられるGlyma20g25000の変異を生じた「エンレイ」の長葉変異体、EnT0541とEnT0685、を「エンレイ」に戻し交配した後代、BC1F2世代の各50、49個体の遺伝子型を調査するとともに、第5本葉中央の葉の画像をスキャナー(EPSON GT-X970, 300dpi)で取得し、LeafShapeにより葉型を計測した。その結果、変異遺伝子のホモ(固定)型において長さ/幅比が大きく、すなわち、長葉になり、周囲長は変化しないものの、葉面積が減少することを確認した。さらに、新規変異アリのヘテロ型個体の葉型

は円葉と長葉の中間を示し、この遺伝変異が不完全劣性であることがわかった。さらにLeafShapeを用いて、種子の形態解析に取り組んだ。種子は厚みがあることからスキャナーで取り込んだ画像では解析精度が低かった。本年度は、臍が上向きの状態と横向きの状態の種子の画像をデジタルカメラ（Canon EOS70DEF40mm F2.8 STM）で取り込んだ。納豆小粒とタチナガハに由来する組換え自殖系統（NsT-RIL-F7）188系統の種子各20粒を撮影し、LeafShapeで「長さ、幅、厚み」などを測定した。そのデータについてQTL解析を行った結果、「幅」と「厚み」に関してQTLは見つからなかった。また、臍が上向きの種子画像から得られた「長さ」と、横向きの種子画像から得られた「長さ」を用いた場合で、解析結果が異なった。以上の結果から、現状のLeafShapeでは種子の形態解析には応用できないことが明かとなり、新たな手法開発の必要性が示唆された。

炊飯米の形質評価法の開発では外観品質を定量的に評価する手法を確立するため、炊飯米表面の画像特徴量を求めるための画像収集と画像処理を実行するプログラム開発を進めた。炊飯後の最適な撮影時間は、「コシヒカリ」と「月の光」の炊飯米の差が画像上でもっとも顕著に観られた30分後に設定した。これ以降は、炊飯米の表面の乾燥が進み両品種間の差が小さくなる傾向が認められた。さらに、これらの項目と食味官能評価値との関係を検証するため、まず全ての食味官能試験に含まれている基準品種「コシヒカリ」と比較品種「月の光」の炊飯米画像からこれらの項目についてパラメータの抽出を試みた。しかし、様々な角度から検証を重ねたところ、スキャナーでの撮影は焦点深度が十分に確保されず、炊飯米の盛り方によってパラメータ値が変動してしまい、食味のような繊細な相違を取られることが困難であった。そこで、画像の撮影方法について再度検討し、ミラーレス一眼レフカメラ（Sony製α6000）によるマクロ撮影で得られた画像であれば焦点深度が十分に確保され食味を評価出来るパラメータ検出が行えると判断した。解析対象となる米粒群は層状になっているため、個々の米粒の位置によって、色（RGB 値）の範囲が必ずしも一致していない。そのため、画像処理による個々の米粒の評価に先立って、米粒の位置に応じた分類や補正が必要になる。そこで、撮像者側を基準として各米粒が概ね何層目に位置しているかを半自動的に認識する手法を開発してGUI 付きのソフトウェアとして実装した（図6）。個々の米粒の表面の特性については、表面の特性を強調する画像フィルターを開発した。米粒表面のペースト状の物質（いわゆる「オネバ」）やクラックを強調して表示することが可能である。原画像（左）の目視では認識が難しい表面の状態を処理後の画像では確認できる。この画像フィルターは上述のGUI 付きのソフトウェアにも組み込んであり、処理前後の画像を確認しながら対話的にパラメータを調整することが可能である。

一方、より簡便に食味に関連する形質を評価するため、炊飯後の釜全体を撮影した画像による解析法も検討した。レンズから炊飯米表面までの距離は37cmとし、露出が異なる3枚の画像を撮影した。コシヒカリ、イクヒカリ、つや姫、あきさかり、さがびより、日本晴、G29、にこまる、ヒノヒカリ、アキヒカリ、森田早生の11品種について、食味官能試験で炊飯米の外観の「つや」を評価するとともに、炊飯米の画像を取得した。「つや」は画像中の特徴点を検出する2種のOpenCV関数と2値化処理で得られる明度の高い箇所面積値で評価する。取得した画像に対してこれらの画像処理を効率良く実行し評価するためのGUIソフトウェアを開発した（図7）。また、「白さ」についてはb*値で選抜できるとし、福井県の育種事業での利用を開始した。また、高温によって多発し玄米外観品質を大きく劣化させる背白について、市販のスキャナーに（EPSON GT-X820）より玄

米の画像（TIFF、解像度600dpi）を取得し、開発したプログラムで解析した。

また、データ共有のための育種プラットフォームの開発ではデータの蓄積と共有のためのウェブサイト（NGB3K）の構築と試験運用を開始し、ドキュメント作成や画像データの管理がウェブブラウザから実行できるようにした。また、reeding Platformの全体構想を作成し、SQLiteによるDB（Breeding Platform）構築について手法を調査し、ひな形の作成を行った。Breeding PlatformはNGB3002およびNGB3003で取得したデータを取り扱うことも予想しているため、NGB3002で開発中の携帯端末を利用した形質評価用のアプリを入手し、DBへのデータ取り込みなどを検討した。

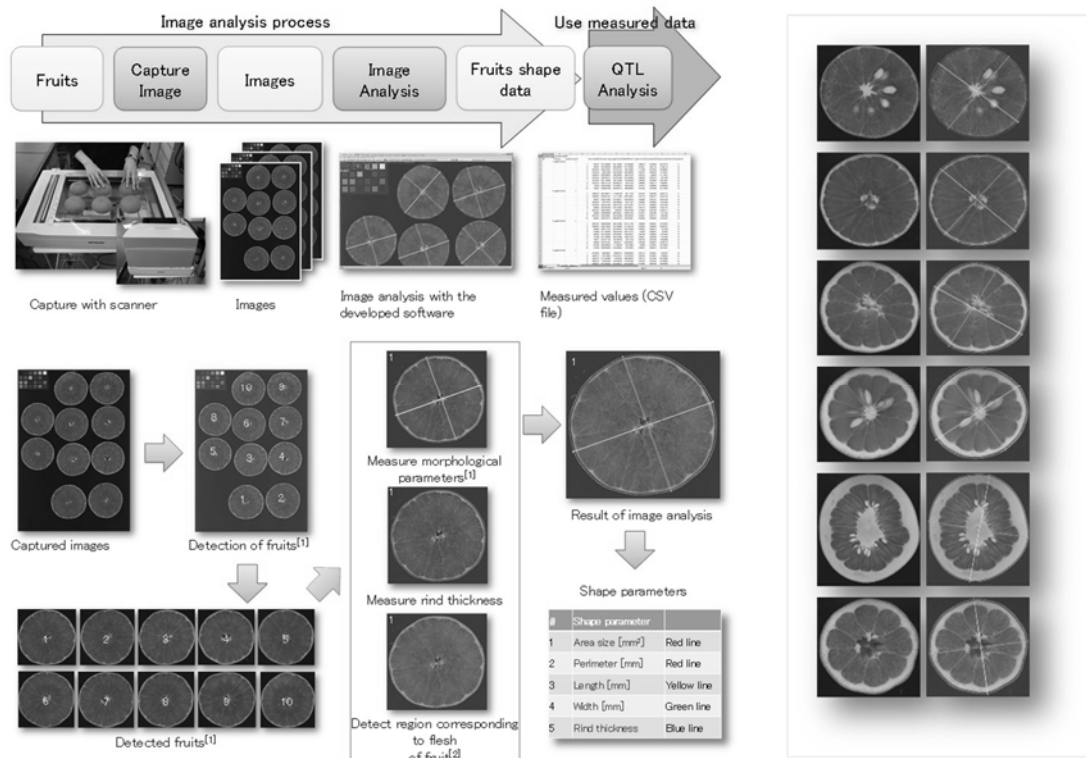


図1. カンキツ解析プログラム流れと解析例

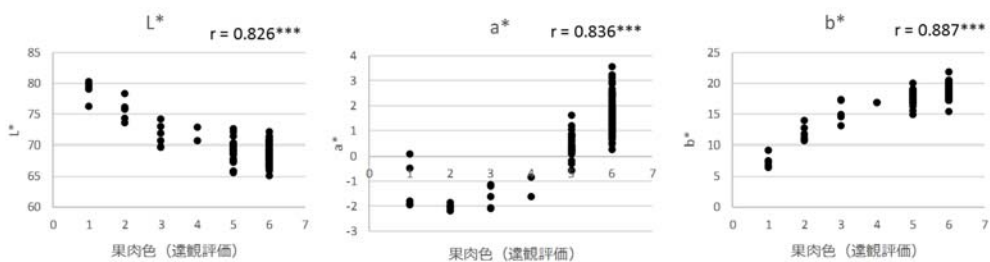


図2. 果肉食色における画像解析による評価と遠観評価の比較. 果肉食色の遠観評価は6段階評価を行い、黄白：1，黄：2，黄橙：3，淡橙：4，橙：5，濃橙：6として示した。

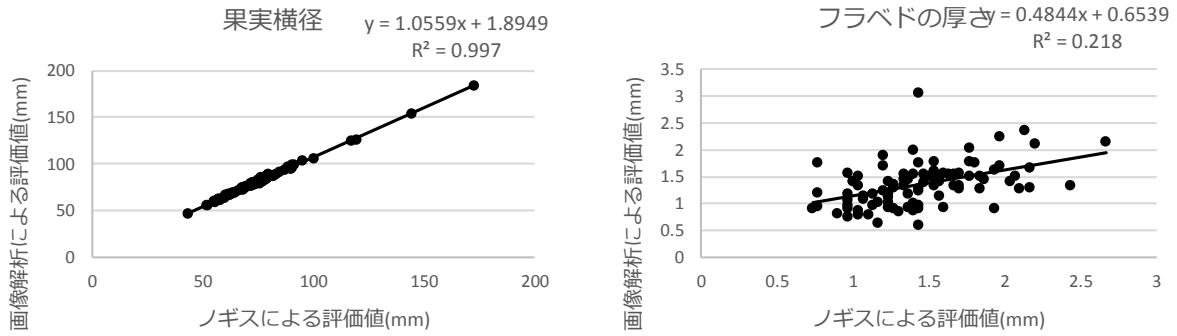


図3. 果実横径および果皮厚（フラベド）における画像解析による評価とノギスによる評価の比較.

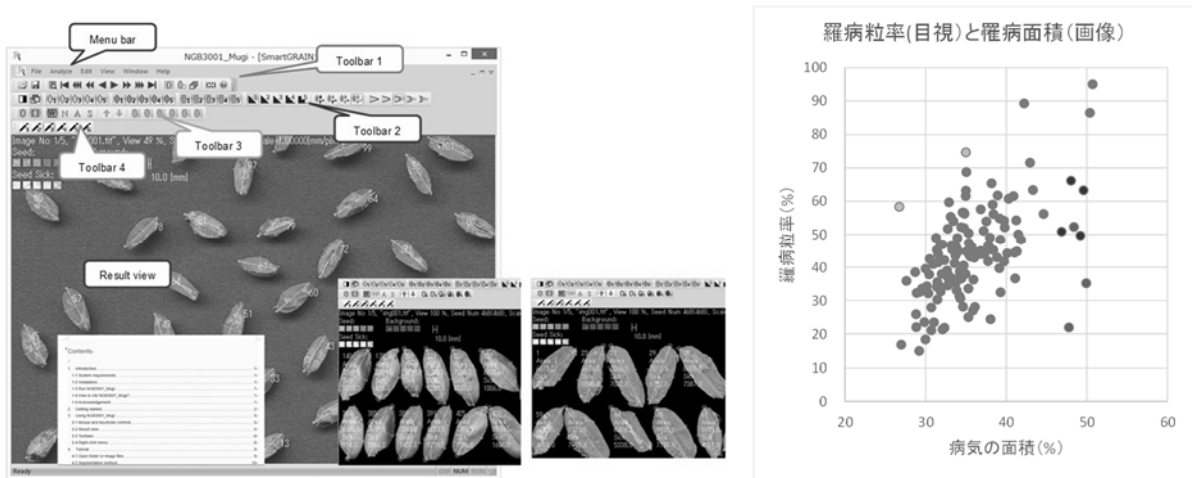


図4. ムギ赤カビ病罹病程度の解析プログラムと解析精度の評価

EasyLeafによる葉形質の測定

測定可能項目

- 縦横の長さ
- 周囲長
- 葉面積
- 円形度
- 端点や重心の座標
- 色彩 (L*a*b*)

エンレイ (Ln/Ln, 円葉)

エンレイ変異体
EnT0685 (ln/ln, 長葉)

完全展開した第5本葉の中央の小葉を採取し、スキャナで画像データ化

EasyLeafを利用した種子の形態解析

○ 測定時間は大幅に短縮

	納豆小粒	タチナガハ
撮影	5分50秒 ± 35秒	4分35秒 ± 24秒
手計測	9分57秒 ± 29秒	9分35秒 ± 17秒

○ 測定誤差は手計測より少し大きい程度

	納豆小粒	タチナガハ	
長さ (mm)	撮影(上向)	6.41 ± 0.03	9.16 ± 0.04
	撮影(横向)	6.43 ± 0.03	9.18 ± 0.03
	手計測	6.38 ± 0.02	9.09 ± 0.03
厚さ (mm)	撮影(上向)	5.11 ± 0.03	7.32 ± 0.05
	手計測	5.06 ± 0.03	7.24 ± 0.05
幅 (mm)	撮影(横向)	6.04 ± 0.07	8.56 ± 0.09
	手計測	5.96 ± 0.04	8.52 ± 0.04

・pixel分の誤差
・手計測では端点を把握できない

○ 二つの「長さ」…臍が上向きと横向き ⇒ 上向きが手計測に近い

	手計測との相関	納豆小粒	タチナガハ
撮影(上向)		0.994	0.989
撮影(横向)		0.989	0.978

1 pixel = 0.0565 mm

図5. EasyLeafによるダイズの葉と種子の画像解析結果

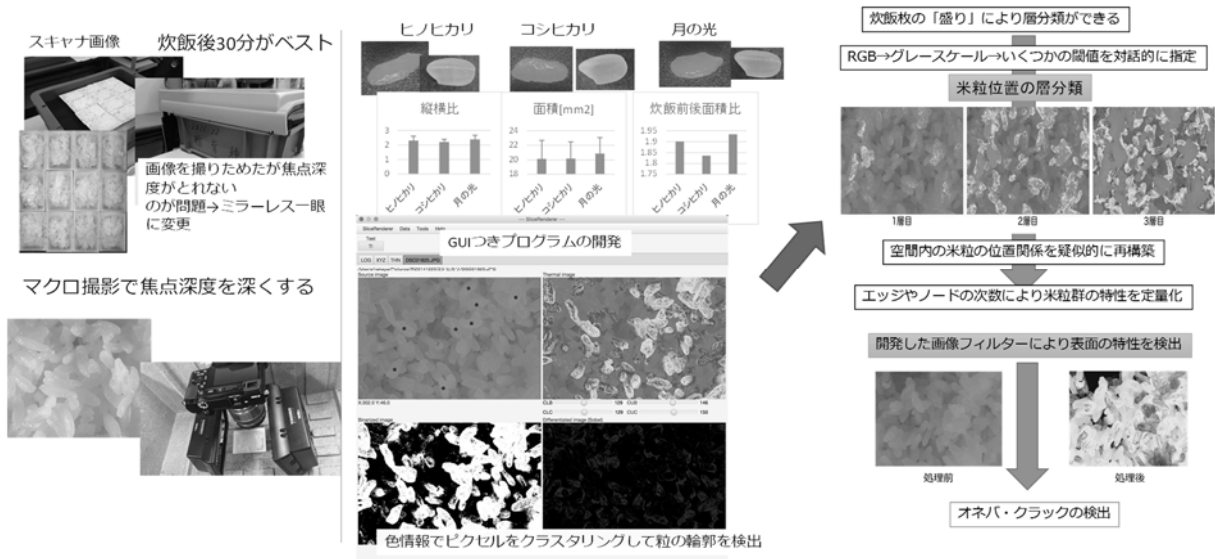
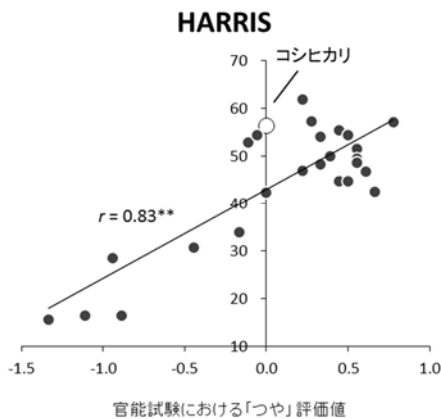
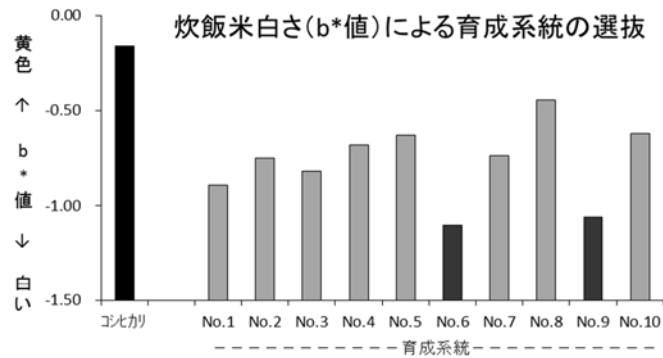
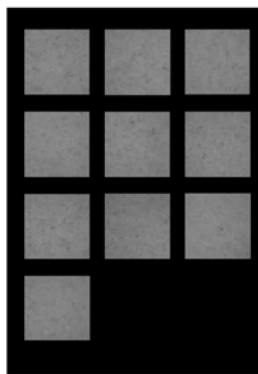


図6. マクロ画像を用いた炊飯米の外観評価

炊飯米の画像を取得 → 画像解析ソフトでb*値を算出 → 選抜に利用



特徴点検出 (HARRIS、最小固有値) 及び二値化処理 (輝度) の値と官能試験における「つや」評価値との間には有意な正の相関が見られた。

白さ (b*値) とつや (HARRIS) のデータにより、炊飯米の外観が良好な系統を評価・選抜することができた。

図7. 釜全体の画像を用いた炊飯米の外観評価

(2) タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発

果菜類の収穫調査用アプリケーションの開発では、初年度にユーザーインターフェースをJavaのSwingを用いて試作し、実際に複数のタブレット端末上で作動させ、視認性や操作性を検証し、改良を進めた。また、圃場の列植図、系統・個体データ、収量調査データ（調査日時、重量、果実数）等のデータの入出力に関わるクラスライブラリの作成を進めるとともに、運搬台車、デジタル秤、タブレット端末を組み合わせた収穫調査用ワゴンを設計した。二年目には使用試験の結果を踏まえ、プロトタイプユーザーインターフェースをJavaFXで実装することにより、視認性や操作性の向上を図った（図8）。また、タブレット端末とデジタル秤のBluetooth接続により収量調査用装置を無線化するとともに、重量データの自動入力機能を付与した。

収量調査用アプリケーションの要素技術として、収量調査と同時に果実の外観品質を同時に評価するための画像解析プログラムの開発を進めた。具体的には、RGBやHSV等の色情報を用いた背景処理、重なった果実を分離するための画像距離変換、変換後の画像における極大値をとる座標検出、検出した座標をマーカーとして用いたWatershedによる領域分割から構成される、タブレット端末で撮影された画像から果実数を自動計測するためのアルゴリズム・プログラムを開発した。また、HSV色空間を用いた色彩評価、極座標系に基づく形状評価、楕円フーリエ法による形状評価、射影面積に基づくサイズ評価等によって得られる果実の外観特徴量の有用性を検証するために、14品種のイチゴと8品種のトマトの果実から外観特徴量を抽出し、それぞれの作物で機械学習手法を用いた品種判別を行った。その結果、品種判別の精度はイチゴで約70%、トマトで約96%であった。さらに、得られた外観特徴量を基に果実間の外観特徴距離を求め、多次元尺度構成法による2次元平面への投影を行った結果では、類似した外観特徴を有する同品種の果実が近い位置にプロットされることが確認された。開発プログラムは一部の処理を除いて画像解析ライブラリのOpenCVを基に実装されているため、Windows, iOS, Androidなど複数のプラットフォームでも動作可能であるという特徴を有している。

果菜類における耐病性評価システムの開発では、キュウリの褐斑病を対象に、罹病程度の異なる固定品種・市販品種の接種試験を実施し、病徴レベルが異なる様々な罹病葉画像を取得した。これらの画像を用い、画像から得られる色情報（RGBやCIE-Lab等）に基づく罹病程度の定量的評価または段階評価法の検討を進めた。また、上記の収量調査用アプリケーションと同様にJavaFXを用いて耐病性評価用アプリケーションのユーザーインターフェースのプロトタイプを開発した（図9）。本ユーザーインターフェースでは、個葉の罹病程度の評価点をボタン操作で記録することが可能であり、ボタンの背景にユーザーが任意に選択した画像を設定することにより、より正確な評価が可能になる。

イネ育種研究を対象とした系統・個体管理や形態的・生態的特性に関わる表現型調査の効率向上・高速化に寄与するタブレット型情報端末のアプリケーションのプロトタイプを開発した（図10）。開発したアプリケーションは、アップル社製の携帯端末 iPod touchで動作するプログラムであり、調査対象の系統・個体リストと調査項目（特性値）は、事前にデータベースシステムSQLiteでデータベース化し、調査結果の入力データとともにデータを一括管理する。開発したアプリケーションを九州沖縄農業研究センター稲育種グループの協力を得て、イネ育種選抜に試験的に活用し、性能評価および今後の開発課題についての検討を実施した結果、従来の紙ベースの野帳で実施する調査作業と比べ、作業効率化に貢献することが確認できた。さらに、開発したプロトタイプについて、試用評価で得

られたユーザーヒアリングの結果をもとに調査作業の効率向上・高速化を目的とした画面表示内容や入力操作方法の改善方法を検討し、プロトタイプの改良と圃場調査での評価試験を実施した。具体的には、ボタンを押して操作する方法に代えてゼスチャーを利用した入力方法の採用、日付データを調査日前後3日の選択方式に加えて任意の日の入力や任意の実数値を入力できる機能の追加、CSVフォーマットファイル出力機能の改良、入力作業時の検索作業を効率化する機能を付与した。さらに、iPot touch で開発したプログラムを活用し、画面と操作方法を改良したイネの稈長・穂長・穂数計測での記録作業を支援するアプリを試作した。

園芸作物育種圃場における系統・個体の情報収集・栽培管理用アプリケーションの開発では、Androidをオペレーティングシステムとするタブレット型携帯端末を対象として、写真撮影などによる試験圃場の情報収集と表現型の測定を行うアプリケーションのプロトタイプの試作を行った(図11)。初期のプロトタイプは、Android端末上での列植図の表示と、簡単な情報入力を行う機能のみであったが、試用試験の結果を踏まえ、記録したメモや写真を簡便に表示する機能等を追加し、完成度を高めた。具体的な機能として、従来から実装している列植図を表示する画面から、系統の部分に触れた際に記録した情報を表示するボタンが追加され、このボタンが選択されると、該当する系統のこれまでの記録のファイルを抽出し別の画面に推移した上で、ファイルに含まれるメモや写真を表示する。このようにメモや写真をファイルの形で保存するシステムとして完結させることで、ネットワーク上のクラウドサービスなどを利用して複数の端末から簡単に情報が共有できるメリットが得られる。Android端末はバージョンやメーカーによる動作の違いが問題になることもあるが、このプロトタイプの動作の検証は複数のAndroid端末を利用して行っており、これらの環境において支障無く動作することを確認した。

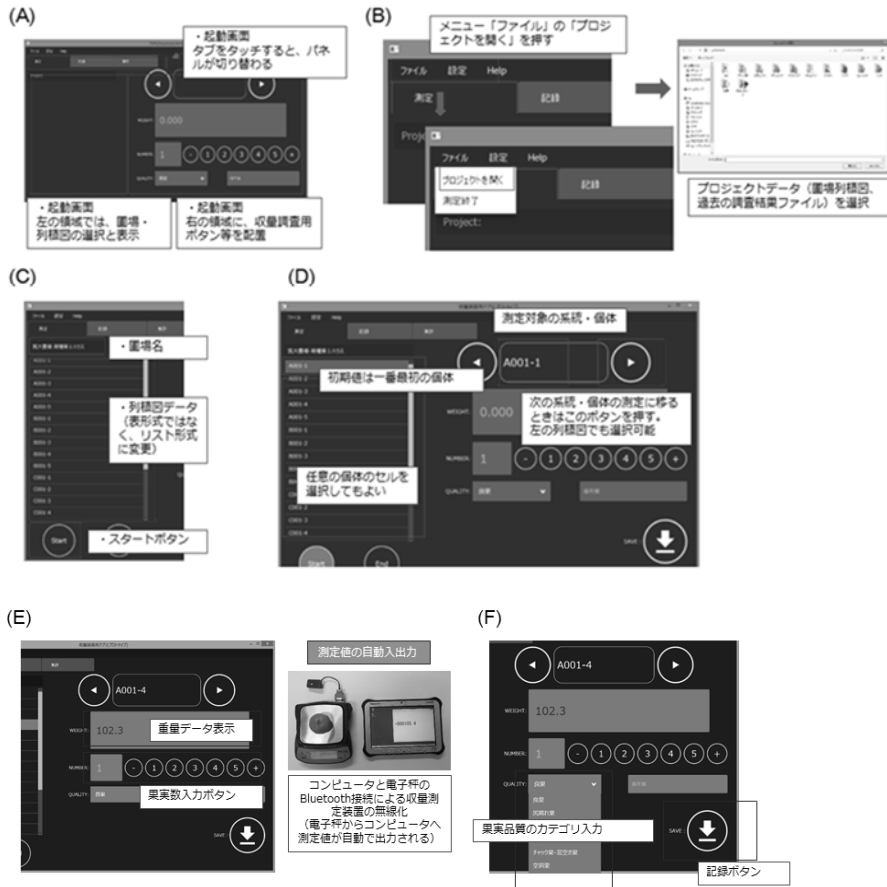


図 8 収量調査用アプリケーションのユーザーインターフェースと操作手順



図 9 耐病性評価用アプリケーションユーザーインターフェースと操作手順

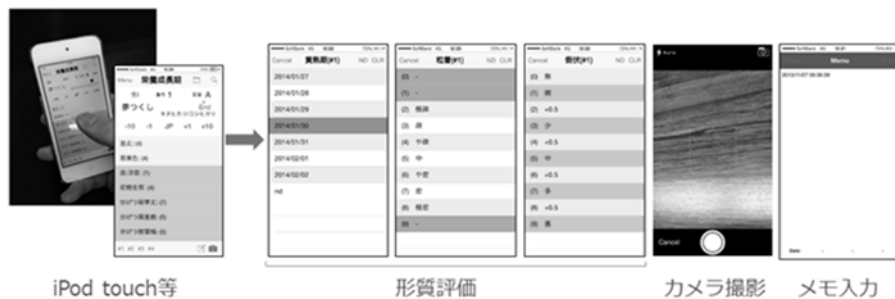


図10 水田・畑作物の系統・個体の情報収集・表現型測定用のアプリケーション

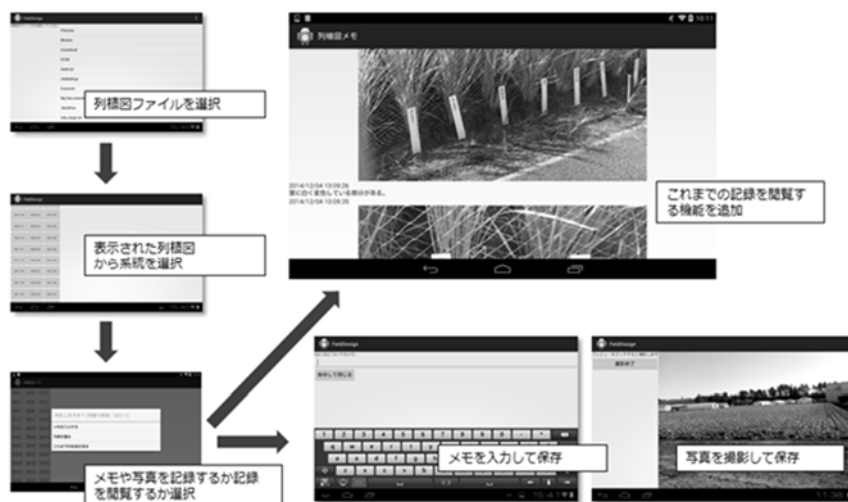


図11 園芸作物育種圃場における作物情報収集・栽培管理のためのAndroid用アプリケーション

(3) 先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発

本課題では小型作物に対応したユニット型搬送システムによる表現型測定システム、自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システム及びクワッドコプター撮影システムの開発を行った。具体的な研究成果は下記の通りである。

小型作物に対応したユニット型搬送システムによる表現型測定システムの開発では、栽培ポットで生育する植物をポットごと搬送し画像記録する装置を試作した(図12)。本装置の特徴として、少ないスペースでできるだけ多くのポット(3号ポットでは16個、4号ポットでは12個、5号ポットでは10個)を搬送しカメラで撮影できること、故障が少なく、将来の低価格化が期待できることなどが挙げられる。本装置を利用する場所は主に温室であることから、本体は簡易の防塵、防水対策がされている。本装置の周囲にはコンピュータからプログラム制御されたカメラ、背景版、白色LEDパネル、夜間撮影を可能にする撮影用補助光源(長波長LED)を設置されており、植物体を撮影し成長画像を記録できる。また、開発した搬送装置、カメラ、LEDを制御し、一定時間ごとに栽培ポットで生育する植物体の成長画像を自動記録するプログラムを開発した。これにより、搬送装置は事前に設定した角度(標準で5度)で回転・停止し、停止時にカメラ撮影が実行され、数日間から数週間、植物体の生長過程を自動で画像記録することができる。

自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムの開発では、磁気テープ追従型自律

走行車両の矢崎化工製フリークル(FH-B32025MJ2D型)に対し、車両制御信号をシリアル通信(USB接続)に変換してPCから制御できるインターフェース回路を開発した(図13)。このインターフェース回路は1.8mmの分解能で走行距離をカウントできるように設計されており、PCとは19200bpsの速度でシリアル通信を行い、PCからの制御信号の中継とロボットの状態を送信できる。また、低コスト環境センシングや自律走行車両・カメラアレイモジュールの制御・計測支援を実現するフィールドサーバシステムの開発を目的として、複数のカメラを同期させて広範囲を近接して精細画像を自動撮影できるカメラアレイモジュールの開発を進めた(図14)。本カメラアレイモジュールには、4台の高解像度1眼レフカメラを利用し、それぞれのカメラに電源やシャッターを制御できる電子回路が取り付けられている。また、これらのカメラを統合して遠隔操作できるコントロールモジュールや、撮影された画像がフィールドサーバのネットワークを通じてアクセスできる機能を付与した。さらに、フィールドサーバシステムでは、温度・湿度・日射量・土壌水分といった温室内の環境センシング機能とともに、自律走行車両やカメラアレイモジュールを支援する機能を追加した。自律走行車両が異常なく動作しているかを確認できるようにフィールドサーバにもカメラモジュールを装備するとともに、カメラアレイモジュールからの画像データを効率的に取得できるようにするためのネットワークおよび管理プログラムを開発した。

さらに、画像を集積するサーバ上で動作する表現型の自動測定アプリケーションの要素となる画像解析アルゴリズム・プログラムを開発では、トマト等の果菜類の画像から生態的・形態的形質に関する情報を抽出するためのアルゴリズムを構築した。まず、トマト果実検出のための画像解析手法を用いて栽培施設のパノラマ画像を解析することで、開発手法の収量マップ生成への適用可能性を検証した結果、栽培施設内における着果数の分布が的確に把握でき、栽培施設全体における総着果数を正確に推定することが可能になった。次に、トマトの生育初期段階における重要な生育指標の1つである本葉の節間距離に着目し、トマト栽培施設内で撮影した生育初期の樹体画像から本葉の節間距離を推定するための画像解析手法を開発した(図15)。本手法は節検出、節位推定、節間距離推定の3段階の処理によって構成される。本手法の核となる節検出処理では、画像特徴量の機械学習によって画像分割条件を決定するため、異なる個体の生育段階が異なる時系列の樹体画像に適用する場合でも閾値の調整が不要であり、Bag of Featuresと呼ばれる一般物体認識手法を適用することで、節検出の精度が大幅に向上している。さらに、検出節の節位推定にはAffinity Propagationと呼ばれる非階層クラスタリング手法を採用するとともに、検出節のクラスタリング結果に対して線形回帰を適用することで、未検出節の補間および誤検出情報による影響の最小化が可能となり、節間距離についても高精度で推定可能である。

クワッドコプター撮影システムの開発では、かずさDNA研究所のアカクローバーの圃場と農研機構果樹研究所(興津)のカンキツ圃場をモデル圃場として撮影実験を実施した。撮影回数については、それぞれ、約1ヶ月ごとに1回、年に3回の撮影を行い、それらの時系列データの取得を行い、検討を行った。本撮影システムでは、小型機としてDJI社製のフライトコントローラNAZAを搭載したクワッドコプター(機体長:45cm、積載重量:0.3-0.5kg)を、大型機としてFreeFly社のCinestar6(機体長:90cm、積載重量:3-5kg)を採用した。搭載カメラは小型機ではGoProを、大型機ではEOS6Dを採用した。小型機に搭載されたGoProを利用する場合、動画として撮影したものからフレームを切り出した静止画像をオルソモザイク化していたが、ローリングシャッター機構による影響のため、予想よりも画質が上がらず、オルソモザイク化がうまくいかない場合が多かった。一方、大型機については、

EOS6Dによるインターバル撮影を行ったため、非常に高精細な画像が獲得でき、良好なオルソモザイク化が実現できた（図16）。図に示すとおり、大型機による撮影では衛星画像および有人航空機による撮影では得られない高精細な画像を取得することができた。これらオルソモザイク画像は、一般的に1枚あたり数百メガ程度の大きなサイズになるため、軽量デバイスで簡単に閲覧することは難しいため、これを育種担当者が屋外環境でタブレットPCやスマートフォン等の軽量デバイスを使って閲覧できるクラウド環境を構築した。さらに、大型機による高精細画像群から3次元モデルを再構成し（図17）、各個体の成長量を推定するフレームワークを構築した。

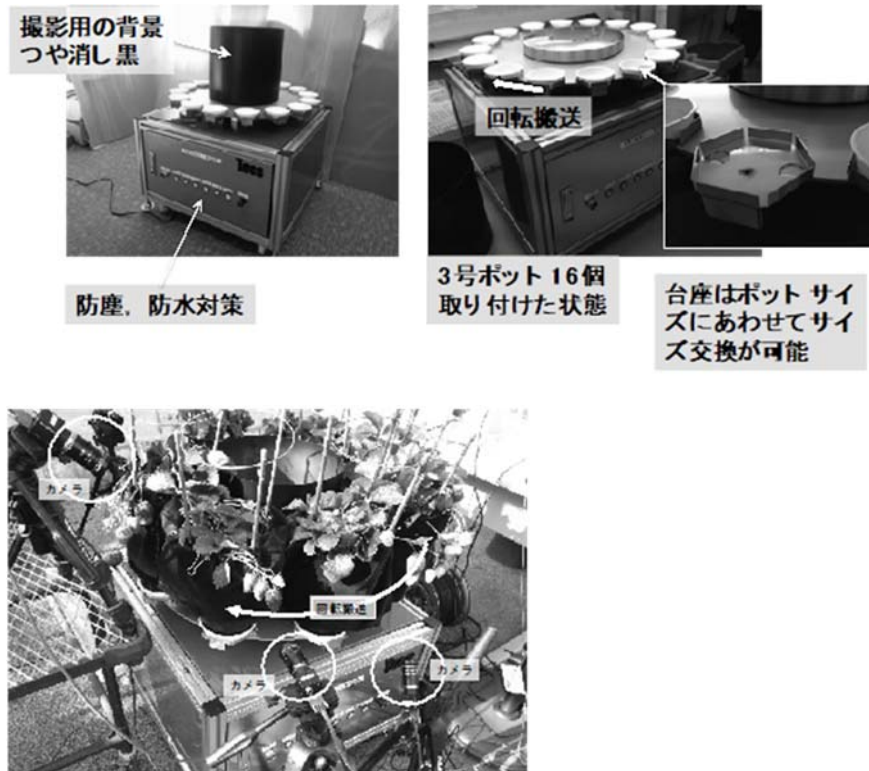


図12 ユニット型搬送システムの試作品（上）と撮影試験の様子

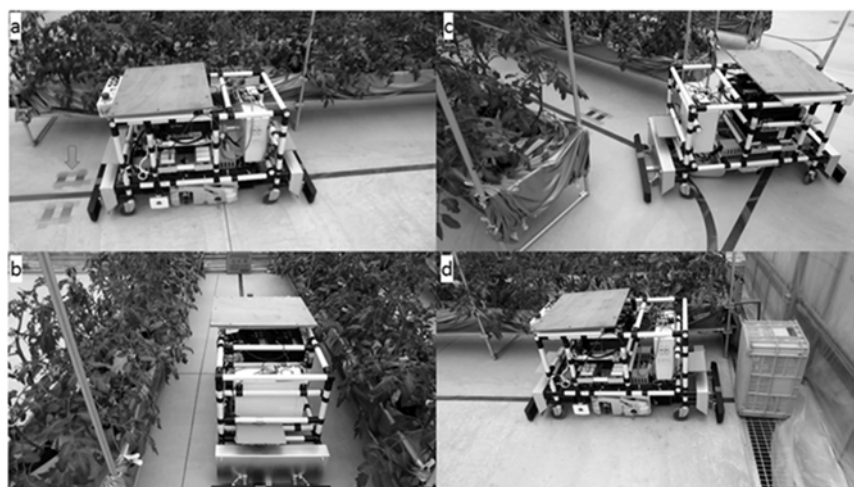


図13 磁気テープ追従型自律走行車両とトマト低段密植栽培圃場における巡回走行試験の様子

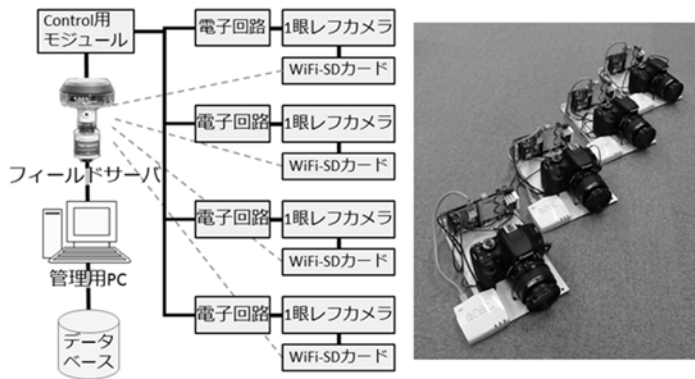


図14 カメラアレイモジュール

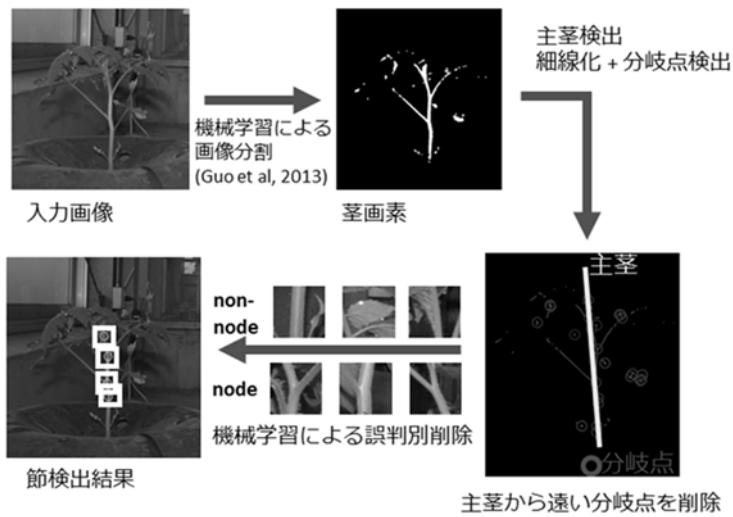


図15 節検出アルゴリズムの概略図

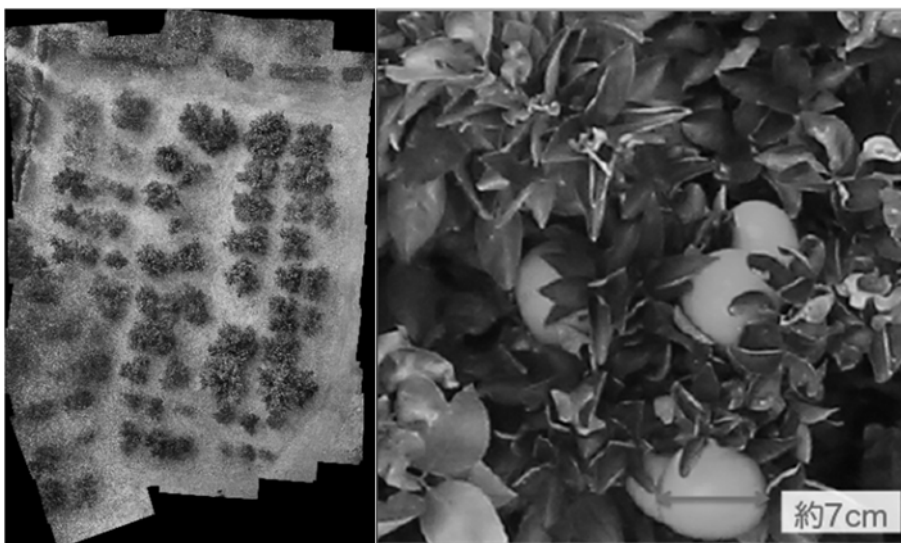


図16 カンキツ圃場の一部の一部のオルソモザイク画像(左)と最大解像度の画像例(右)



図17 カンキツ圃場の一部を3次元再構成

3) 成果活用における留意点

(1) 画像解析による形質評価のハイスループット化

画像解析による形質評価のハイスループット化では3年間にカンキツ、ムギ、ダイズおよび炊飯米の形質評価を行う画像解析プログラムを開発した。カンキツでは輪切り断面画像からの果実の大きさやフラベド、アルベドの厚さの評価、ムギは赤カビ病罹病程度の評価、ダイズは葉の面積と長さ、幅の評価、そして炊飯米では外観品質評価を対象形質としている。作物の形質評価は対象とする植物種ならびに形質により必要とする画像解析処理が異なり、プログラムのチューニングが必要である。そのため、本課題で開発を行ったプログラムを他作物や形質に応用する場合には、かならず精度検証を実施する必要がある。

(2) タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発

タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発では、2年間の研究実施期間中に、①圃場における系統・個体の情報収集・表現型測定用のアプリケーション開発、②果菜類の収量調査用アプリケーションの開発、③果菜類における耐病性評価システムの開発、④果菜類の収穫物の品質評価システムの開発を漸次進めていくことを計画していた。本課題終了時までには①についてはアプリケーションの開発がある程度進み、実際の育種圃場等でユーザーヒアリングや実証試験を実施する段階に入っている。②と③についてはプロトタイプの作成が進み、今後はユーザーインターフェースや自動判別機能の搭載などの課題が残っている。④については未着手である。これらのアプリケーションの開発では、わが国の利用者にとって使いやすいものを開発することを第一の目標にし、ユーザーインターフェースの日本語表記やわが国の育種事情にあった形質評価基準等を取り入れたアプリケーションの開発を進めた。これまでに開発したアプリケーションについて、今後、ユーザーヒアリングや実証試験をできるだけ多くの育種研究圃場や研究者を対象に行うことが望まれる。また、各メーカーが開発・販売するタブレット型情報端末の進化は目覚ましく、OS等の基幹システム等のソフトウェアや、サイズやCPUなどのハードウェアは極めて多様化している。そのため、新旧様々な情報端末上で動作するアプリケーションを開発するためには、様々なタブレット端末についてアプリケーション等の動作確認を行う必要がある。

(3) 先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発

先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発では、2年間の研究実施期

間中に、①小型作物に対応したユニット型搬送システムによる表現型測定システム、②自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システム、③クラウドコプター撮影システムの開発を進めた。いずれのシステムも試用試験により植物体の撮影と撮影画像の転送、保存及び管理については概ね実用的なレベルに達している。また、果実数、節数、生育量などの一部の形質について、得られた画像から自動で評価するための画像解析法を提案できた。今後、試用試験を繰り返し行うことにより撮影システムの高度化や適用作物の拡大を図るとともに、さらに多くの形質を自動測定できるように撮影法及び画像解析法を検討する必要がある。

4) 今後の課題

(1) 画像解析による形質評価のハイスループット化

ムギの開溝程度やダイズ種子の厚みはこれまで開発したプログラムでは評価が困難であった。特にダイズ種子に関しては人間は臍を認識して計測するが、画像解析では臍を認識する手法の開発が難しい。3次元計測も含めてこれらの形質への対応を検討する必要がある。

カンキツではじょうのう膜の識別が想定以上に困難であることが明かとなった。じょうのう膜を正確に識別するにはこれまでとは別の発想のアルゴリズムの開発が必要かもしれない。現状では解決策を見いだせていない。そのため当面はじょうのう膜を識別せずに関肉を評価する手法について取り組む。炊飯米では食味を表現するパラメータについて未検討の部分が残されている。

(2) タブレット型情報端末を利用した表現型測定支援システムの開発

果菜類の収量調査用アプリケーションの開発では、これまでに開発した収量調査用アプリケーションのプロトタイプについて、トマト育種圃場等においてユーザーヒアリングを実施し、その結果に基づいてユーザーインターフェースやデータの記録方法を改良する必要がある。また、果菜類における耐病性評価システムの開発では、JavaFXを用いて段階評価法に基づく抵抗性評価アプリケーションのユーザーインターフェースとデータの入出力に関わるプログラムを開発する必要がある。さらに、タブレット端末で撮影した画像から自動的に評価するためのアルゴリズム、具体的には罹病葉画像の画像間距離計算に基づく抵抗性程度の段階評価法や色情報に基づく定量的評価法などの画像解析アルゴリズム・プログラムを設計・開発することが今後の課題である。また、果菜類・または果樹類の収穫物の品質評価支援アプリケーションについては、2年間の実施期間中は未着手であったが、これらの品質評価は育種研究、育種における選抜、遺伝資源の評価等で広く活用できるため、今後の開発が望まれる。イネ等の水田・畑作物を対象にしたiOS用アプリケーションについては、これまでの試用評価の結果をもとに、表示項目や機能改善、特に国内の様々なイネ研究者やイネ以外の他作物の圃場調査でも活用することを想定し、調査項目や圃場設計をユーザー自身がカスタマイズして利用できる機能の改良を実施する必要がある。園芸作物育種研究を対象にしたAndroid用の情報収集・栽培管理用アプリケーションについては、様々な果菜類圃場において使用試験・ユーザーヒアリングを実施し、その結果に基づいてアプリケーションで用いるアルゴリズム・プログラムを再設計するとともに、ユーザーインターフェースを改良する必要がある。また、タブレット端末で収集した情報を自動的にサーバ等に送信する機能等、ハードウェア及びソフトウェアのさらなる開発を進めることにより、圃場内における情報収集・表現型測定の高度化が望まれる。

(3) 先端センシング技術を活用した表現型自動測定システムの開発

今後の育種では大規模圃場で数多くの系統・個体の表現型を測定する必要があり、本課題ではその自動化に貢献する基盤技術の開発を進めた。今後の課題として、小型作物に対応したユニット型搬送システムによる表現型測定システムでは、大量の系統・個体の表現型計測を実現するためには、開発した装置を複数ユニット使用する必要がある、装置の小型化・低コスト化のための機構の改良が必要である。また、本装置を活用した場合、大量の画像ファイルが蓄積されるため、画像ファイルを効率よく管理し、画像から植物の表現型を自動で評価する画像解析アルゴリズムやソフトウェアの開発が必要となる。

自走式撮影ロボットを利用した表現型測定システムの開発では、引き続き走行試験やテスト撮影を繰り返し実施し、自走式撮影ロボットのハードウェア及びソフトウェアを改良するとともに、フィールドサーバを活用した環境情報収集システムや自走式撮影ロボットの制御システムを高度化する必要がある。具体的には、これまでに開発した自走式撮影ロボットのプロトタイプでの走行試験と撮影実験をトマト圃場で繰り返し実施し、ハードウェアの設計の見直しと改良を進める必要がある。また、撮影実験で得られた画像について、これまでに作成した画像解析ソフトウェアを用い、果実数、果実の大きさ、節間距離等の形態的データの自動解析を行い、その結果に基づいてソフトウェアを改良するとともに、画像解析結果から自動解析に最適な画像の撮影条件等を決定し、撮影システムの改良を行う必要がある。また、フィールドサーバを活用し、自走式ロボットの撮影する画像収集、施設内の環境情報収集、および自走式撮影ロボットの制御支援の技術開発を進め、最終的に上述のハードウェア及びソフトウェアを統合しシステム化する必要がある。

クラウドコプター撮影システムでは、大型機を用いることで高精細な画像群を撮影することが可能であった。しかし、大型のマルチコプターはバッテリーの管理やジンバルの調整など、専門知識を有しないユーザーにとって非常に取り扱いが難しい。今後、マルチコプターの普及とともに、小型機のカメラやバッテリー等の性能向上を期待したい。

V これまでの研究実施期間における研究成果(論文発表、特許他)【一般公表可】

課題番号 13405175

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13405175	1	21	69	33	6	0	0	0	0	14	10	2	0

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	東京大学、中央農業総合研究センター	Genomic prediction of trait segregation in a progeny population: a case study of Japanese pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	H. Iwata, T. Hayashi, S. Terakami, N. Takada, T. Saito, T. Yamamoto	BMC Genet	14	81	2013	9
2	①	農業生物資源研究所	Next-Generation Survey Sequencing and the Molecular Organization of Wheat Chromosome 6B	T. Tanaka, F. Kobayashi, G. P. Joshi, R. Onuki, H. Sakai, H. Kanamori, J. Wu, H. Simkova, S. Nasuda, T. R. Endo, K. Hayakawa, J. Dolezel, Y. Ogihara, T. Itoh, T. Matsumoto, H. Handa	DNA Res	21(2)	103-114	2013	10
3	①	筑波大学	An Efficient Super Resolution Based on Image Dimensionality Reduction Using Accumulative Intensity Gradient	Muhammad Haris, Kazuhito Sawase, Muhammad Rahmat Widyanto, Hajime Nobuhara	JACIII	18(4)	518-528	2014	4
4	①	筑波大学、東京大学	On plant detection of intact tomato fruits using image analysis and machine learning methods	K. Yamamoto, W. Guo, Y. Yoshioka, S. Ninomiya	Sensors (Basel)	14(7)	1219-1220 6	2014	7

5	①	農業生物資源研究所	A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (<i>Triticum aestivum</i>) genome	International Wheat Genome Sequencing Consortium	Science	345(6194)	1251788	2014	7
6	①	果樹研究所、他	Identification of QTLs for fruit quality traits in Japanese apples: QTLs for early ripening are tightly related to preharvest fruit drop	M. Kunihisa, S. Moriya, K. Abe, K. Okada, T. Haji, T. Hayashi, H. Kim, C. Nishitani, S. Terakami, T. Yamamoto	Breed Sci	64(3)	240-251	2014	9
7	①	東北農業研究センター、長野県農業試験場、道総研北見農業試験場	Association mapping and validation of QTLs for flour yield in the soft winter wheat variety Kitahonami	G. Ishikawa, K. Nakamura, H. Ito, M. Saito, M. Sato, H. Jinno, Y. Yoshimura, T. Nishimura, H. Maejima, Y. Uehara, F. Kobayashi, T. Nakamura	PLoS One	9(10)	e111337	2014	10
8	①	福井県農業試験場、理化学研究所	スキャナと画像解析ソフトを用いた炊飯米の白さの測定法	小木芳恵, 七夕高也, 富田桂, 小林麻子	育種学研究	16(3)	115-120	2014	10
9	①	農業生物資源研究所	A high-resolution physical map integrating an anchored chromosome with the BAC physical maps of wheat chromosome 6B	F. Kobayashi, J. Wu, H. Kanamori, T. Tanaka, S. Katagiri, W. Karasawa, S. Kaneko, S. Watanabe, T. Sakaguchi, Y. Hanawa, H. Fujisawa, K. Kurita, C. Abe, J. C. Iehisa, R. Ohno, J. Safar, H. Simkova, Y. Mukai, M. Hamada, M. Saito, G. Ishikawa, Y. Katayose, T	BMC Genomics	16	595	2015	8
10	①	農研機構 野菜花き研究部門	A simulation-based breeding design that uses whole-genome prediction in tomato	Yamamoto E, Matsunaga H, Onogi A, Kajiya-Kanegae H, Minamikawa M, Suzuki A, Shirasawa K, Hirakawa H, Nunome T, Yamaguchi H, Miyatake K, Ohyama A, Iwata H, Fukuoka H.	Sci Rep.	6(19454)	in press	2016	1

11	②	東京大学、農研機構・中央農研	Genomics-assisted breeding in fruit trees	Iwata H, Minamikawa MF, Kajiji-Kanegae H, Ishimori M, Hayashi T	Breed. Sci.	66(1)	100-115	2016	1
12	①	東京大学、神戸大学、農研機構・中央農研	Island-Model Genomic Selection for Long-Term Genetic Improvement of Autogamous Crops	S. Yabe, M. Yamasaki, K. Ebana, T. Hayashi, H. Iwata	PLoS One	11(4)	e0153945	2016	4
13	①	農研機構・果樹茶業研究部門	Identification of QTLs for flesh mealiness as cellular adhesion strength in apple (<i>Malus × domestica</i> Borkh.)	Moriya S., M. Kunihisa, K. Okada, H. Iwanami, H. Iwata, M. Minamikawa, Y. Katayose, T. Matsumoto, S. Mori, H. Sasaki, T. Matsumoto, C. Nishitani, S. Terakami, T. Yamamoto & K. Abe	The Horticulture Journal		in press	2016	7
14	①	農研機構果樹茶業研究部門、国立遺伝学研究所、農研機構次世代作物開発研究	A genomic approach to selecting robust and versatile SNP sets from next-generation sequencing data for genome-wide association study in citrus cultivars	T. Shimizu, E. Kaminuma, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Goto, T. Matsumoto, Y. Katayose, T. Mochizuki, Y. Tanizawa, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Nakamura	Acta Horticulturae	1135	23-32	2016	7
15	①	農研機構・果樹茶業研究部門	Genomic dissection of a 'Fuji' apple cultivar: re-sequencing, SNP marker development, definition of haplotypes, and QTL detection.	Kunihisa M., S. Moriya, K. Abe, K. Okada, T. Haji, T. Hayashi, Y. Kawahara, R. Itoh, T. Itoh, Y. Katayose, H. Kanamori, T. Matsumoto, S. Mori, H. Sasaki, T. Matsumoto, C. Nishitani, S. Terakami & T. Yamamoto	Breed. Sci.	66(4)	499-515	2016	9
16	①	農研機構果樹茶業研究部門、京都大学、国立遺伝学研究所	Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes	T. Shimizu, A. Kitajima, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Ohta, S. Goto, A. Toyoda, A. Fujiyama, T. Mochizuki, H. Nagasaki, E. Kaminuma, Y. Nakamura	PLoS One	11(11)	e0166969	2016	11

17	①	農研機構 野菜花き研究部門、野茶研、東京大学	Efficiency of genomic selection for breeding population design and phenotype prediction in tomato	E. Yamamoto, H. Matsunaga, A. Onogi, A. Ohyama, K. Miyatake, H. Yamaguchi, T. Nunome, H. Iwata, H. Fukuoka	Heredity (Edinb)	118(2)	202-209	2017	2
18	①	農研機構、東京大学、他	Efficiency of genomic selection for breeding population design and phenotype prediction in tomato	Yamamoto E, Matsunaga H, Onogi A, Ohyama A, Miyatake K, Yamaguchi H, Nunome T, Iwata H, Fukuoka H	Heredity	118(2)	202-209	####	2
19	①	果樹茶業研究部門	Allelic composition of MdMYB1 drives red skin color intensity in apple (<i>Malus × domestica</i> Borkh.) and its application to breeding.	Moriya et al.	Euphytica213(4):78	213(4)	78	####	4
20	①	農研機構 野菜花き研究部門	Bayesian QTL mapping using genome-wide SSR markers and segregating population derived from a cross of two commercial F1 hybrids of tomato	Akio Ohyama, Kenta Shirasawa, Hiroshi Matsunaga, Satomi Negoro, Koji Miyatake, Hiroataka Yamaguchi, Tsukasa Nunome, Hiroyoshi Iwata, Hiroyuki Fukuoka and Takeshi Hayashi	Theor Appl Genet	130(8)	1601-1616	####	5
21	①	東京大学、農研機構、国立遺伝学研究所	Genome-wide association study and genomic prediction in citrus: Potential of genomics-assisted breeding for fruit quality traits	Minamikawa MF, Nonaka K, Kaminuma E, Kajiya-Kanegae H, Onogi A, Goto S, Yoshioka T, Imai A, Hamada H, Hayashi T, Matsumoto S, Katayose Y, Toyoda A., Fujiyama A, Nakamura Y, Shimizu T, Iwata H.	Sci Rep	7(1)	####	####	7
22	①	農研機構、国立遺伝学研究所	Draft sequencing of the heterozygous diploid genome of Satsuma (<i>Citrus unshiu</i> Marc.) using a hybrid assembly approach.	T. Shimizu, Y. Tanizawa, T. Mochizuki, H. Nagasaki, T. Yoshioka, A. Toyoda, A. Fujiyama, E. Kaminuma and Y. Nakamura	Frontiers in Genetics	8	180	####	12

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Introduction to NOB Force Project	Hajime Nobuhara, Muhammad Haris, Takumi Sugiura, Liu Ziyang, Kazuhito Sawase, Kento Ishii, Miao Qi	筑波大学	Joint Seminar between Japan and Finland	2013	6
2	A consistent QTL for flour yield on chromosome 3B in the soft winter wheat variety, Kitahonami	Goro Ishikawa, Kazuhiro Nakamura, Hiroyuki Ito, Mika Saito, Mikako Sato, Hironobu Jinno, Yasuhiro Yoshimura, Tsutomu Nishimura, Hidekazu Maejima, Yasushi Uehara, Toshiki Nakamura	東北農業研究センター	The 12th International Wheat Genetics Symposium, Program & Abstract Book	2013	9
3	Development of the BAC physical maps of wheat chromosome 6B for its genomic sequencing	Kobayashi F, Katagiri S, Karasawa W, Hanawa Y, Kanamori H, Ito Y, Fujisawa H, Mukai Y, Tanaka T, Kaneko S, Watanabe S, Sakaguchi T, Nasuda S, Hayakawa K, Abe C, Ohno R, Iehisa J.C.M, Takumi S, Doleel J, Ogihara Y, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	農業生物資源研究所	12th International Wheat Genetics Symposium, Abstract book	2013	9

4	Sequencing of wheat chromosome 6B: Toward functional genomics	Tanaka T, Kobayashi F, Joshi G.P, Onuki R, Sakai H, Kanamori H, Wu J, imkov H, Nasuda S, Endo T.R, Hayakawa K, Doleel J, Ogihara Y, Itoh T, Matsumoto T, Handa H	農業生物資源研究所	12th International Wheat Genetics Symposium, Abstract book	2013	9
5	高度ゲノム多様性とホモ接合化進行問題を対象とするSNPマーカーの設計法	神沼英里, 望月孝子, 谷澤靖洋, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 倉田のり, 清水徳朗, 中村保一	国立遺伝学研究所, 果樹研究所	NGS現場の会第3回研究会	2013	9
6	「ふじ」のゲノム配列に基づいたSNPマーカー開発および「ふじ」ファミリー品種のハプロタイプブロック	國久 美由紀	果樹研究所	平成25年度果樹バイオテク研究会	2013	10
7	Example Based Super-resolution Using Neighbor Edge Similarity on Aerial Images	Muhammad Haris, Kazuhito Sawase, Tokurou Shimizu, Terutaka Yoshioka, Rahmat Widyanto, Hajime Nobuhara	筑波大学	2013 International Workshop on Smart Info-Media Systems in Asia (SISA2013)	2013	10
8	コムギ6B染色体におけるBAC物理地図の整列化	小林史典, 片桐敏, 唐沢渉, 埴優美子, 金森裕之, 藤沢弘子, 田中剛, 渡邊将太, 坂口豊隆, 那須田周平, 大野良子, Iehisa J.C.M, 宅見薫雄, 早川克志, 阿部千香子, Doleel J, 荻原保成, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所, 神戸大学, 他	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10

9	コムギ6B染色体におけるMTP BACクローンの解読終了	金森裕之, 栗田加奈子, 片桐敏, 藤沢弘子, 唐沢涉, 塙優美子, 濱田昌雄, 柴田美知恵, 小林史典, 下村道彦, 並木信和, 伊川浩司, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
10	ダイズの次世代育種にむけた複雑形質解析基盤の構築	加賀秋人	農業生物資源研究所	公開シンポジウム ゲノム情報を駆使した次世代作物育種への展望	2013	10
11	ダイズミニコアコレクションにおける開花期のゲノムワイド関連解析	津田麻衣, 渡辺啓史, 清水武彦, 町田佳代, 石本政男, 加賀秋人	農業生物資源研究所	日本育種学会第124回講演会講演要旨集 育種学研究	2013	10
12	トマトF1 品種間交雑に由来するRILsを用いたQTL解析	大山暁男, 林武司, 松永啓, 岩田洋佳, 根来里美, 宮武宏治, 山口博隆, 布目司, 福岡浩之	野菜茶業研究所	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
13	果樹の次世代育種—良食味・高品質果実へのチャレンジ	山本俊哉	果樹研究所	公開シンポジウム 「ゲノム情報を駆使した次世代作物育種への展望」	2013	10
14	画像解析によるイネの高温耐性評価の試み	小林麻子, 七夕高也, 富田桂	福井県農業試験場, 理化学研究所	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10

15	小麦粉の色相に関するゲノム選抜 -その可能性と今後の課題-	石川吾郎, 佐藤三佳子, 齋藤美香, 伊藤裕之, 神野裕信, 前島秀和, 上原泰, 吉村康弘, 中村俊樹	東北農業研究センター, 道総研 北見農業試験場, 長野県農業試験場	日本育種学会第124回講演会 講演会要旨集 育種学研究	2013	10
16	日欧トマトF1品種の全ゲノム配列比較による網羅的SNP検索	福岡 浩之, 大山 暁男, 熊谷 真彦, 伊藤 龍太郎, 水野 聖士, 根来 里美, 布目 司, 宮武 宏治, 山口 博隆, 小林 裕子, 片寄 裕一, 沼寿隆, 小林 一成, 伊藤 剛	野菜茶業研究所, 農業生物資源研究所	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
17	量的形質変異をゲノム変異に結びつけるための統計解析	岩田洋佳	東京大学	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
18	ゲノミックセレクションの数理:ゲノムと表現型の関係のモデル化とそれに基づく高速育種	岩田洋佳	東京大学	第45回 種生物学シンポジウム プログラム・講演資料集	2013	11
19	NGS由来ゲノムワイド多型マーカ構築とそのRDF注釈情報統合化	神沼英里, 藤澤貴智, 望月孝子, 谷澤靖洋, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 倉田のり, 清水徳朗, 中村 保一	国立遺伝学研究所, 果樹研究所	第36回日本分子生物学会年会	2013	12
20	クアッドコプターによる空撮映像を用いたパノラマ画像の生成および植生観測への応用	苗キ, ムハマドハリス, 杉浦巧美, 劉子揚, 石井健登, 澤勢一史, 延原肇	筑波大学	日本知能情報ファジィ学会 知的システム研究会	2013	12

21	次世代シーケンサを用いたコムギ6B染色体BACライブラリのショットガン解読の終了	金森裕之, 栗田加奈子, 片桐敏, 藤沢弘子, 唐沢渉, 埴優美子, 濱田昌雄, 柴田未知恵, 小林史典, 下村道彦, 並木信和, 伊川浩司, 釜付香, 河合純, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	日本分子生物学会第36回年会	2013	12
22	小麦粉の色相およびその関連形質に関するゲノムワイドアソシエーション解析	石川吾郎	東北農業研究センター	第8回ムギ類研究会 eWIS	2013	12
23	A Bayesian method and its variational approximation for prediction of genomic breeding values in multiple traits	Hayashi T, Ohyama A, Iwata H	東京大学, 中央農業総合研究センター	Plant and Animal Genome XXII	2014	1
24	Evaluation of genetic breeding values (GBVs) for yield-related traits and soluble solid content (SSC) of tomato.	Akio Ohyama, Takeshi Hayashi, Hiroshi Matsunaga, Hiroyoshi Iwata, Satomi Negoro, Koji Miyatake, Hirotaka Yamaguchi, Tsukasa Nunome, Hiroyuki Fukuoka	野菜茶業研究所	Plant and Animal Genome XXII	2014	1

25	Finish of Clone-By-Clone Sequencing of Wheat 6B Chromosome with Next-Generation Sequencer	Kanamori H, Kurita K, Katagiri S, Fujisawa H, Karasawa W, Hamada M, Kobayashi F, Shimomura M, Ikawa H, Namiki N, Kamatsuki K, Kawai J, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome XXII Conference	2014	1
26	Genomic selection of promising parental combinations: a case study in Japanese pear	Iwata H, Hayashi T, Terakami S, Takada N, Saito T, Yamamoto T	東京大学, 中央農業総合研究センター	Plant and Animal Genome XXII	2014	1
27	Toward the reference genome sequence of wheat chromosome 6B; BAC-by-BAC sequencing and assembling	Handa H, Kanamori H, Kobayashi F, Kawai J, Wu J, Nasuda S, Doleel J, Ogihara Y, Matsumoto T	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome XXII Conference	2014	1
28	gsWizaRd: ゲノミックセレクションの予測モデルを構築するための簡便なソフトウェア	岩田洋佳, 高瀬勇悟, 釜付香, 林武司, 大柳一	東京大学, 三菱スペース・ソフトウェア(株), 中央農業総合研究センター	日本育種学会 第125回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	3

29	Sequencing and annotation of wheat chromosome 6B	Tanaka T, Kobayashi F, Joshi G.P, Onuki R, Sakai H, Kanamori H, Wu J, imkov H, Nasuda S, Endo T.R, Hayakawa K, Doleel J, Ogihara Y, Itoh T, Matsumoto T, Handa H	農業生物資源研究所	日本植物生理学会 第55回年会	2014	3
30	ダイズ種子重のQTLは種子や葉の形態に影響を与えるか	佐山貴司, 七夕高 也, 高木恭子, 小菅 一真, 岡野克紀, 笹 間博子, 加賀秋人, 石本政 男	農業生物資源研究所, 理化学研究所	日本育種学会第 125回講演会 講演 要旨集 育種学研究	2014	3
31	パンコムギの新規ゲノム解読	田中剛	農業生物資源研究所	次世代シーケン サー研究推進のため のデータ解析 ワークショップ	2014	3
32	QTL analysis in recombinant inbred lines derived from a cross of two F1 hybrids of tomato	大山暁男, 林武司, 松永啓, 岩田洋佳, 根来里美, 宮武宏 治, 山口博隆, 布目 司, 福岡浩之	野菜茶業研究所	XVIIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Tomato	2014	4
33	クアッドロータにおける可変アームの実現とその安定性解析シミュレーション	杉浦巧美, 劉子揚, ムハマドハリス, 苗 キ, 石井健登, 延原 肇	筑波大学	ロボティクス・メカ トロニクス講演会 2014	2014	5
34	ゲノム育種のための情報解析を支える統計モデリング	岩田洋佳	東京大学	2014年度 日本軽 量生物学会年会 講演要旨集	2014	5

35	マルチコプターを用いたカンキツ樹木のデジタルマップ・アーカイビングとその育種支援への応用	劉子揚, 杉浦巧美, ムハマドハリス, 苗キ, 石井健登, 延原肇, 清水徳朗, 吉岡照高	筑波大学, 他	ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014	2014	5
36	機械学習を用いた画像からのトマト果実検出	山本恭輔, 郭威, 二宮正士	東京大学	農業情報学会2014年度年次大会	2014	5
37	Identification of two QTLs for flesh mealiness of apple (<i>Malus × domestica</i> Borkh.) fruit on linkage group 10.	Shigeki Moriya, Miyuki Kuniyoshi, Kazuma Okada, Toshiya Yamamoto, Kazuyuki Abe	果樹研究所	7th Int. Rosaceae Genomics Conf.	2014	6
38	Tomato Yield Mapping in Green House using Color Image Analysis and Machine Learning Method	K. Yamamoto, W. Guo, S. Ninomiya	東京大学	18th World Congress of CIGR	2014	9
39	ゲノミックセレクションは作物育種を加速できるか	岩田洋佳	東京大学	日本作物学会 第238回講演会要旨集	2014	9
40	コムギ6B染色体におけるMTP BAC クローンの配列情報の精度向上について	金森裕之, 栗田加奈子, 片桐敏, 藤沢弘子, 唐沢渉, 濱田昌雄, 小林史典, 田中剛, 下村道彦, 並木信和, 伊川浩司, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9

41	ニホンナシにおけるゲノムワイド多型検出	小貫 律子, 田中剛, 寺上 伸吾, 浦崎 直也, 太郎良 和彦, 護得久 聡子, 正田 守幸, 山本 俊哉, 伊藤 剛	農業生物資源研究所, 果樹研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
42	ニホンナシ複数F1集団を用いた果実形質のゲノミックセレクションモデルの構築	南川舞, 小野木章雄, 寺上伸吾, 高田教臣, 齋藤寿広, 林武司, 山本俊哉, 岩田洋佳	中央農業総合研究センター, 東京大学, 他	日本育種学第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
43	パンコムギ6B染色体のBAC物理地図の構築とゲノム構造の解析	小林史典, 金森裕之, 田中剛, 片桐敏, 唐沢渉, 渡邊将太, 栗田加奈子, 片寄裕一, 荻原保成, 遠藤隆, Jaroslav Delezal, 早川克志, 那須田周平, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	日本遺伝学会第86回大会プログラム・予稿集	2014	9
44	ヒノヒカリノ／＼こまるのRILを用いた炊飯米の理化学特性に関するQTL解析	小林麻子, 片岡知守, 小木芳恵, 田村克徳, 富田桂	福井県農業試験場, 九州沖縄農業研究センター	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
45	国産ダイズ品種における10KSNPアレイの開発	加賀秋人, 清水武彦, 松本敏美, 大柳一, 渡辺啓史, 金森裕之, 並木信和, 下村道彦, 上西博英, 片寄裕一, 石本政男	農業生物資源研究所, 三菱スペース・ソフトウェア(株)	日本育種学会第127回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9

46	国産ダイズ品種間の組換え自殖系統における難解析形質のゲノム予測モデルの構築と選抜の試行	津田麻衣, 清水武彦, 町田佳代, 猿田正恭, 山田哲也, 石本政男, 加賀秋人	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
47	国内トマトF1品種におけるゲノムワイド連関解析およびゲノミックセレクションの予測精度評価	山本英司, 松永啓, 鈴木晶統, 南川舞, 鐘ヶ江弘美, 布目司, 山口博隆, 宮武宏治, 根来里美, 大山暁男, 岩田洋佳, 福岡浩之	野菜茶業研究所, 東京大学	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
48	日欧トマトF1品種間交雑に由来するRILsを用いたGS試行実験のためのSNP高密度タイピング	福岡 浩之, 大山 暁男, 山本 英司, 林武司, 根来 里美, 宮武 宏治, 山口 博隆, 布目 司	野菜茶業研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
49	圃場での形質評価作業を効率化するための携帯端末アプリの開発	七夕高也, 片岡知守, 小林麻子, 堀清純	理化学研究所, 九州沖縄農業研究センター, 福井県農業試験場, 農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
50	DNA marker development and its application to practical breeding of tomato	大山暁男	野菜茶業研究所	2014 Annual Autumn Conference of the Korean Society for Horticultural Science	2014	10
51	ビッグデータの情報解析が拓く育種の地平線 ―ゲノムと表現型の関連をモデル化し、育種を加速する―	岩田洋佳	東京大学	平成26年度 日本農学会 シンポジウム講演要旨	2014	10

52	A Genomic Approach To Select Robust And Versatile Snp Sets From Ngs Data Towards Gwas Analysis Of Citrus	清水徳朗, 神沼英里, 野中圭介, 吉岡照高, 後藤新悟, 松本敏美, 片寄裕一, 望月孝子, 谷沢靖洋, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 中村保一	果樹研究所, 国立遺伝学研究所, 農業生物資源研究所	The Third International Symposium on Citrus Biotechnology	2014	11
53	Development of Image Analysis Software for Phenotyping of Citrus Fruits	Takanari Tanabata, Naoya Sagara, Sachiko Isobe, Keisuke Nonaka, Tokurou Shimizu	(公財)かずさDNA研究所, 理化学研究所, 果樹研究所	III International Symposium on Citrus Biotechnolog	2014	11
54	High-resolution Digital Map Construction Aims to Support Citrus Breeding Using Autonomous Multicopter	Haris Muhammad, Kento Ishii, Liu Ziyang, Takumi Sugiura, Miao Qi, Takuya Watanabe, Seita Sukisaki, Takanari Tanabata, Sachiko Isobe, Tokurou Shimizu, Terutaka Yoshioka, Hajime Nobuhara	(公財)かずさDNA研究所, 筑波大学, 理化学研究所	The Third International Symposium on Citrus Biotechnology	2014	11
55	コムギ6B染色体におけるMTP BAC クロームの配列情報の検証および解読精度向上について	金森裕之, 栗田加奈子, 片桐敏, 藤沢弘子, 唐沢渉, 濱田昌雄, 小林史典, 田中剛, 下村道彦, 並木信和, 伊川浩司, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	第37回日本分子生物学会年会	2014	11

56	コムギゲノム育種: 複雑な故に利用価値大	石川吾郎	東北農業研究センター	作物ゲノム育種研究センター設立記念シンポジウム	2014	11
57	画像解析等を用いた形質評価開発と農業研究への応用	七夕高也	理化学研究所	計測制御技術の農業研究への積極的活用を検討するための研究交流ワークショップ	2014	11
58	クアッドコプターに対するファジィ制御とPID制御の適用比較	劉子揚, 石井健登, 杉浦巧美, 鋤先星汰, ムハバドハリス, 苗琦, 渡邊拓也, 延原肇	筑波大学	第15回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会	2014	12
59	小型UAV のランダムウォークによる3D 環境モデリング	杉浦巧美, 石井健登, 苗琦, ムハバドハリス, 劉子揚, 渡邊拓也, 鋤先星汰, 延原肇	筑波大学	第15回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会	2014	12
60	振幅変調赤外光による自己位置発信とその3次元位置推定	鋤先星汰, 石井健登, 劉子揚, 杉浦巧美, ムハバドハリス, 苗琦, 渡邊拓也, 延原肇	筑波大学	第15回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会	2014	12
61	トマト商用F1品種群における収量性・品質性関連形質のゲノムワイド関連解析およびゲノミックセレクション予測精度評価	山本英司, 松永啓, 鈴木晶統, 南川舞, 鐘ヶ江弘美, 布目司, 山口博隆, 宮武宏治, 根来里美, 大山暁男, 岩田洋佳, 福岡浩之	野菜茶業研究所, 東京大学	第11回日本ナス科コンソシアム年会	2014	10

62	Development of software for assisting high-throughput phenotyping in citrus breeding	Takanari Tanabata, Naoya Sagara, Sachiko Isobe, Keisuke Nonaka, Tokurou Shimizu	(公財)かずさDNA研究所, 理 化学研究所, 果樹研究所	International Plant & Animal Genome XXIV	2015	1
63	DNA Polymorphism Database from New-Generation Sequence Read Archive and Analytical Workflow	Takako Mochizuki, Yasuhiro Tanizawa, Takatomo Fujisawa, Naruo Nikoh, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Nori Kurata, Hideki Nagasaki, Tokurou Shimizu, Eli Kaminuma, Yasukazu Nakamura	国立遺伝学研究所, 果樹研 究所	Plant and Animal Genome XXIII	2015	1
64	iYacho: Development of digital field note application for rapid and accurate plant phenotyping	Takanari Tanabata, Tomomori Kataoka, Asako Kobayashi, Kiyosumi Hori, Sachiko Isobe	(公財)かずさDNA研究所, 理 化学研究所, 福井県農業試 験場	lant and Animal Genome XXIII Conference	2015	1
65	Verifying the mandarin breeding: lessons from parentage analysis of citrus varieties	清水徳朗, 北島宣, 吉岡照高, 野中圭 介, 後藤新悟, 中村 保一	果樹研究所	Plant and Animal Genome XXIII	2015	1

66	BAC-based sequencing of bread wheat chromosome 6B and its application to the study for the region of agronomic importance	Handa H, Kanamori H, Kobayashi F, Tanaka T, Dolezel J, Matsumoto T, Wu J	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome Asia 2015	2015	7
67	Genome-wide association study and whole-genome prediction in tomato F1 varieties in Japan by using custom 50K SNP genotyping array.	Eiji Yamamoto, Hiroshi Matsunaga, Akinori Suzuki, Mai Minamikawa, Hiromi Kanegae, Akio Onogi, Tsukasa Nunome, Hirotaka Yamaguchi, Koji Miyatake, Satomi Negoro, Akio Ohyama, Hiroyoshi Iwata, Hiroyuki Fukuoka	野菜茶業研究所	Plant & Animal Genome Asia 2015	2015	7
68	BAC物理地図と概要ゲノム配列を使ったコムギ6B染色体のゲノム構造の解析	小林史典, 田中剛, 金森裕之, 向井喜之, 片桐敏, 唐沢渉, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
69	NGSによるパンコムギのゲノム解析の成果と課題:ゲノム塩基配列解読とGBSによるゲノムワイドジェノタイピング	小林史典	農業生物資源研究所	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
70	アレイベースのSNPジェノタイピングの育種利用	加賀秋人	農業生物資源研究所	日本育種学会第128回講演会ワークショップ	2015	9

71	カンキツ育種親集団における果実着色期の品種間差異と環境変異	野中圭介, 浜田宏子, 吉岡照高, 清水徳朗, 山田昌彦	果樹研究所	園芸学会平成27年度秋季大会	2015	9
72	炊飯米の白さに関する遺伝的要因の解析	小林麻子, 町田芳恵, 富田桂他	福井県農業試験場	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
73	国内トマトF1品種群を用いたゲノミックセレクションの有効性評価	山本 英司, 松永啓, 布目 司, 山口博隆, 宮武 宏治, 大山 暁男, 福岡 浩之	野菜茶業研究所	第23回育種学会中部地区談話会	2015	11
74	国内トマト品種群の遺伝解析に向けたAxiomジェノタイピングアレイの開発とゲノム育種への利用	山本 英司	野菜茶業研究所	アフィメトリクス・アグリゲノミクスセミナー	2015	11
75	表計算ソフトウェアを利用した遺伝子型情報評価システム‘GUGS’	清水徳朗, 後藤新悟, 野中圭介	果樹研究所	日本育種学会中部地区談話会	2015	11
76	コムギ6B染色体におけるMTP BAC クローンの配列情報の解読精度向上について	金森裕之, 栗田加奈子, 佐々木晴美, 片桐敏, 藤沢弘子, 唐沢涉, 小林史典, 田中剛, 下村道彦, 並木信和, 伊川浩司, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田裕一	農業生物資源研究所	第38回日本分子生物学会年会会、第88回日本生化学会大会 合同大会	2015	12

77	BAC-based genome assembly and annotation of wheat chromosome 6BL	Tanaka T, Kobayashi F, Kanamori H, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	農業生物資源研究所	9th International Wheat Conference 2015	2015	9
78	Physical mapping of a wild emmer-derived leaf rust resistance gene on wheat chromosome 6B	Kobayashi F, Tanaka T, Kanamori H, Katayose Y, Wu J, Matsumoto T, Handa H	農業生物資源研究所	9th International Wheat Conference 2015	2015	9
79	多環境で評価されたダイズミニコアコレクションの難解析形質に関するゲノムワイド関連解析	津田 麻衣, 渡辺 啓 史, 清水 武彦, 大 木 信彦, 羽鹿 牧 太, 山田 哲也, 菊 池 彰夫, 加藤 信, 杉本 琢真, 山口 直 矢, 猿田 正恭, 岡 野 克紀, 小菅 一 真, 高橋 浩司, 山 田 直弘, 友岡 憲 彦, 堀 智明, 岩田 洋佳, 石本 政男, 加賀 秋人	農業生物資源研究所	日本育種学会第 128回講演会	2015	9

80	DNA Polymorphism Annotation Database (DNApod): Toward an Integration of SRA-Driven Genotypic Data and Public Phenotypic Data	Takako Mochizuki, Yasuhiro Tanizawa, Takatomo Fujisawa, Naruo Nikoh, Tokuro Shimizu, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Nori Kurata, Hideki Nagasaki, Eli Kaminuma, Yasukazu Nakamura	国立遺伝学研究所, 果樹研究所	Plant and Animal Genome XXIV	2016	1
81	Genomic selection in citrus breeding: Accuracy of genomic prediction	Mai Minamikawa, Keisuke Nonaka, Eli Kaminuma, Hiromi KajiyaKanegae, Akio Onogi, Shingo Goto, Terutaka Yoshioka, Takeshi Hayashi, Yasukazu Nakamura, Tokuro Shimizu, Hiroyoshi Iwata	果樹研究所	International Plant and Animal Genome XXIV	2016	1

82	Sequencing and assembling a pseudomolecule for the wheat chromosome 6B	Kanamori H, Kurita K, Sasaki H, Katagiri S, Fujisawa H, Karasawa W, Kobayashi F, Tanaka T, Shimomura M, Namiki N, Ikawa H, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome XXIV	2016	1
83	ダイズにおける子実タンパク質含有率のゲノム予測と選抜の試行	関根大輔, 津田麻衣, 清水武彦, 矢部志央理, 町田佳代, 猿田正恭, 山田哲也, 石本政男, 岩田洋佳, 加賀秋人	農研機構、	日本育種学会第129回講演会 育種学研究	2016	3
84	コムギ6B染色体上の赤さび病抵抗性遺伝子LrRW12領域のゲノム構造解析	小林史典, 水野信之, 田中剛, 金森裕之, 片寄裕一, 呉健忠, 佐藤和広, 那須田周平, 半田裕一	農研機構次世代作物開発研究センター、京都大学、岡山大学	日本育種学会第130回講演会 講演要旨集 育種学研究	2016	9
85	トマトF1品種間交雑に由来するRILsを用いたゲノム育種価予測モデルの構築とRILs間交雑F1を用いた精度評価	大山暁男, 松永啓, 山本英司, 宮武宏治, 山口博隆, 布目司, 福岡浩之, 林武司	農研機構 野菜花き研究部門、農研機構 次世代作物開発研究センター	日本育種学会第130回講演会要旨集 育種学研究	2016	9

86	トマトにおけるコスト効果の高いゲノミックセレクションのための低密度マーカーセットの設計	山本英司, 大山暁男, 松永啓, 宮武宏治, 山口博隆, 布目司	農研機構 野菜花き研究部門	日本育種学会第130回講演会要旨集 育種学研究	2016	9
87	北海道のダイズ育種選抜集団における収量関連形質のゲノムワイドアソシエーション解析	関根 大輔, 藤田 正平, 黒崎 英樹, 鴻坂 扶美子, 山口 直矢, 津田 麻衣, 松本 敏美, 清水 武彦, 片寄 裕一, 石本 政男, 加賀 秋人	農研機構	日本育種学会第130回講演会 育種学研究	2016	9
88	Genetic difference and inheritance of the change of organic acid content in citrus cross-breeding population in Japan	K. Nonaka, H. Hamada, T. Yoshioka, T. Shimizu	農研機構果樹茶業研究部門	International Symposium on Tropical and Temperate Horticulture	2016	11
89	Genomic selection for yield and sugar content in Japanese tomato varieties.	Eiji Yamamoto	農研機構 野菜花き研究部門	The 13th Japan Solanaceae Consortium JSOL2016	2016	11
90	High-density genetic map construction of citrus and structure analysis with reference genome sequence	T. Shimizu, E. Kaminuma, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Goto, T. Matsumoto, Y. Katayose, T. Mochizuki, Y. Tanizawa, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Nakamura	農研機構果樹茶業研究部門、国立遺伝学研究所、農研機構次世代作物開発研究センター	International Symposium on Tropical and Temperate Horticulture	2016	11

91	コムギ6B染色体における配列情報の精度向上について	金森裕之, 片桐敏, 小林史典, 藤沢弘 子 栗田加奈子, 田 中剛, 下村道彦, 並 木信和, 伊川浩司, 松本隆, 片寄裕一, 呉健忠, 半田 裕一	農研機構次世代作物開発研 究センター、三菱スペース・ソ フトウェア(株)	第39回日本分子生 物学会年会	2016	12
92	コムギ6B染色体のゲノム情報の構築とその利用	小林史典, 半田裕 一	農研機構次世代作物開発研 究センター	第11回ムギ類研究 会	2016	12
93	コムギ参照ゲノム配列の現状とポストゲノムの動き	半田裕一	農研機構次世代作物開発研 究センター	第11回ムギ類研究 会	2016	12
94	Improvement of pseudomolecule for wheat chromosome 6B	Kanamori H, Katagiri S, Kurita K, Sasaki H, Fujisawa H, Kobayashi H, Tanaka T, Shimomura M, Namiki N, Ikawa H, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	農研機構次世代作物開発研 究センター、三菱スペース・ソ フトウェア(株)	Plant & Animal Genome XXV	2017	1
95	Structural analysis of a genomic region for the leaf rust resistance gene, LrRW12, on wheat chromosome 6B	Kobayashi F, Mizuno N, Tanaka T, Kanamori H, Katayose Y, Wu J, Sato K, Nasuda S, Handa H	農研機構次世代作物開発研 究センター、京都大学、岡山 大学	Plant & Animal Genome XXV	2017	1

96	A strategy and its application to acquire superior progenies from a soybean bi-parental cross based on prediction by a computer simulation	Daisuke Sekine, Mai Tsuda, Takehiko Shimizu, Shiori Yabe, Masayasu Saruta, Tetsuya Yamada, Masao Ishimoto, Hiroyoshi Iwata, Akito Kaga	Plant &Animal Genome Conference	Plant &Animal Genome Conference (PAG XXV)	2017	1
97	リンゴのゲノミックセレクションにおけるハプロタイプ情報利用の効果	國久ら	果樹茶業研究部門	日本育種学会第131回講演会 講演要旨集 育種学研究	2017	3
98	ゲノムワイドあるいは収量関連 12 遺伝子の SNPs に基づくゲノミック予測モデルの精度比較	鐘ヶ江 弘美, 堀清純, 片岡 知守, 田中 淳一, 岩田洋佳	東京大学、農研機構、他	日本育種学会 第131回講演会	2017	3
99	リンゴ裂果性のQTLと原因ハプロタイプの推定 ~QTL解析とゲノムワイドアソシエーション解析から~	國久ら	果樹茶業研究部門	園芸学会平成29年度秋季大会 講演要旨集 園芸学研究	2017	9
100	ニホンナシの複数育種集団を利用した、ゲノムワイド関連解析とゲノミックセレクションの予測精度評価	南川舞・寺上伸吾・高田教臣・齋藤寿広・小野木章雄・鐘ヶ江弘美・林武司・山本俊哉・岩田洋佳	東京大学、他	日本園芸学会	2017	9
101	シミュレーションによる形質予測に基づいた交配計画の試行	関根 大輔, 加賀 秋人	日本育種学会	第132回日本育種学会講演会 育種学研究	2017	10
102	トマトF1品種間交雑に由来するRILsを育種母集団としたゲノミックセレクションの実践と効果検証	大山暁男、山本英司、松永啓、宮武宏治、山口博隆、布目司、福岡浩之、林武司	農研機構 野菜花き部門	日本育種学会第132回講演会 講演要旨集 育種学研究	2017	10

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	果樹日本(DNA多型をもとに実生苗の将来を予測して選抜する～新しい選抜法「ゲノミックセレクション」)	岩田洋佳	東京大学	日園連	2013	7
2	②	育種学研究(育種のための情報解析ツール使い倒し塾)	神沼英里, 七夕高也, 矢野健太郎, 清水顕史, 岩田洋佳	国立遺伝学研究所, 理化学研究所, 滋賀県立大学, 東京大学	日本育種学会	2013	10
3	①	Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field(Development of the BAC physical maps of wheat chromosome 6B for its genomic sequencing)	Kobayashi F, Katagiri S, Karasawa W, Hanawa Y, Kanamori H, Ito Y, Fujisawa H, Mukai Y, Tanaka T, Kaneko S, Watanabe S, Sakaguchi T, Nasuda S, Hayakawa K, Abe C, Ohno R, Iehisa J.C.M, Takumi S, Dolezel J, Ogihara Y, Matsumoto T, Katayose Y, Wu J, Handa H	Yokohama City University, Kobe University, National Institute of Agrobiological Sciences	Springer	2015	9
4	①	Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field(Sequencing of wheat chromosome 6B: Toward functional genomics)	Tanaka T, Kobayashi F, Joshi G.P, Onuki R, Sakai H, Kanamori H, Wu J, simkova H, Nasuda S, Endo T.R, Hayakawa K, Dolezel J, Ogihara Y, Itoh T, Matsumoto T, Handa H	Yokohama City University, Kobe University, National Institute of Agrobiological Sciences	Springer	2015	9
5	①	Solanum Lycopersicum: Production, Biochemistry and Health Benefits(DNA Markers, Experimental Populations and Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping in Tomatoes.)	Akio Ohyama, Takeshi Hayashi	National Agriculture and Food Research Organization	Nova Science Publishers	2016	11
6	①	Rice Genomics, Genetics and Breeding(Genomic selection in rice breeding)	Jennifer Spindel, Hiroyoshi Iwata	東京大学、他	Springer	2018	4

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月 日
	「該当無し」							

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月 日	出願国
	「該当無し」								

(6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
②	農作物の生育 無人空撮で把握 筑波大、大農場用システム 無線ヘリ活用 葉・枝まで詳細に	日経産業新聞	2013	8	21	筑波大学	
①	コムギのゲノム配列の概要解読に成功-コムギの新品種開発の加速化に期待-		2014	7	18	農業生物資源研究所、京都大学、横浜市立大学、日清製粉株式会社	
②	コムギのゲノム概要解読 遺伝子12万種新品種開発に期待	日本経済新聞	2014	7	19	農業生物資源研究所, 他	
②	コムギの特徴決める遺伝子12万個を発見 生物研・京大など	日刊工業新聞	2014	7	18	農業生物資源研究所, 他	
②	小麦ゲノム概要解読 生物研など	日本農業新聞	2014	7	18	農業生物資源研究所, 他	

②	小麦のゲノム6割解読 国際研究チーム 遺伝子12万個発見	日経産業新聞	2014	7	18	農業生物資源研究所, 他	
④	コムギのゲノム解読 12万個の遺伝子も発見	化学工業日報	2014	7	18	農業生物資源研究所, 他	
②	小麦のゲノム配列概要解読に成功 農業生物資源研究所など研究チームが発表	農業共済新聞	2014	8	1	農業生物資源研究所, 他	
④	コムギのゲノム配列の概要解読に成功 –コムギの新品種開発の加速化に期待–	製パン工業(VOL.43 NO.8)	2014	8	1	農業生物資源研究所, 他	
④	生物研と京都大、横浜市大、日清製粉など国際コンソーシアム、小麦のゲノム配列の概要解読をScience誌で発表	日経バイオテク	2014	8	4	農業生物資源研究所, 他	
②	早熟性などの果実形質を制御するリンゴの染色体領域を特定 –DNAマーカーでリンゴの育種を加速–	読売新聞、化学工業日報、日本農業新聞	2015	4	15	果樹研究所	
②	DNAからトマトの甘さや収量を高精度に予測する手法を開発	日本農業新聞特集記事	2016	6	9	農研機構 野菜花き研究部門	
①	DNAの違いから、芽生え段階でカンキツの様々な果実特性を高精度に予測 –カンキツ品種改良へのゲノミックセレクションの有効性を確認–	筑波研究学園都市記者会、農政クラブ、農林記者会、農業技術クラブ、静岡県社会部記者室、三島記者クラブ、文部科学記者会、科学記者会、東京大学大学記者会	2017	7	5	農研機構、東京大学、国立遺伝学研究所	
②	ゲノム育種 かんきつ類でも 農研機構など実用化めど	日本農業新聞	2017	7	6	農研機構、東京大学、国立遺伝学研究所	

(7) 普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
③	Best Poster Award(A consistent QTL for flour yield on chromosome 3B in the soft winter wheat variety, Kitahonami)	東北農業研究センター, 長野県農業試験場, 地方独立行政法人北海道立総合研究機構北見農業試験場	2013	9		
③	第124回講演会日本育種学会優秀発表賞(ダイズミニコアコレクションにおける開花期のゲノムワイド関連解析)	農業生物資源研究所	2013	11		
③	論文賞(Potential assessment of genome-wide association study and genomic selection in Japanese pear <i>Pyrus pyrifolia</i> . <i>Breeding Science</i> 63(1):125-140.)	東京大学, 中央農業総合研究センター	2014	3		
③	第125回講演会日本育種学会優秀発表賞(ダイズミニコアコレクションにおける難解析形質のゲノムワイド関連解析)	農業生物資源研究所	2014	5		
③	優秀発表賞(ニホンナシ複数F1集団を用いた果実形質のゲノミックセレクションモデルの構築. 日本育種学第 126 回講演会)	中央農業総合研究センター, 東京大学, 他	2014	11		
③	2014年度日本育種学会論文賞 (Identification of QTLs for fruit quality traits in Japanese apples: QTLs for early ripening are tightly related to preharvest fruit drop.)	果樹研究所	2015	3		
③	第129回日本育種学会講演会優秀発表賞(ダイズにおける子実タンパク質含有率のゲノム予測と選抜の試行)	農研機構	2016	6		

③	Recognition Award(Break the Phenotyping Bottleneck in Genomics-Assisted Breeding)	東京大学	2016	8		
③	ベストオーサー賞(【小特集】作物の遺伝的改良を高速化するための機械学習とシミュレーション)(シミュレーション34巻4号)	東京大学	2016	10		
③	2017年度日本育種学会論文賞(Genomic dissection of a 'Fuji' apple cultivar: re-sequencing, SNP marker development, definition of haplotypes, and QTL detection.)	果樹茶業研究部門	2017	3		

(8)発表会の主催の状況
(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
1	「NGSデータの入手からデータベース構築まで」セミナー(NGSデータを用いたコムギゲノム多型解析)	2015	7	27			農業生物資源研究所	
2	平成27年度日本水稲品質・食味研究会第7回講演会 シンポジウム(イネゲノム解析による外觀品質、食味研究の現状と課題)	2015	11	14			福井県農業試験場	

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分：①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1		「該当無し」								