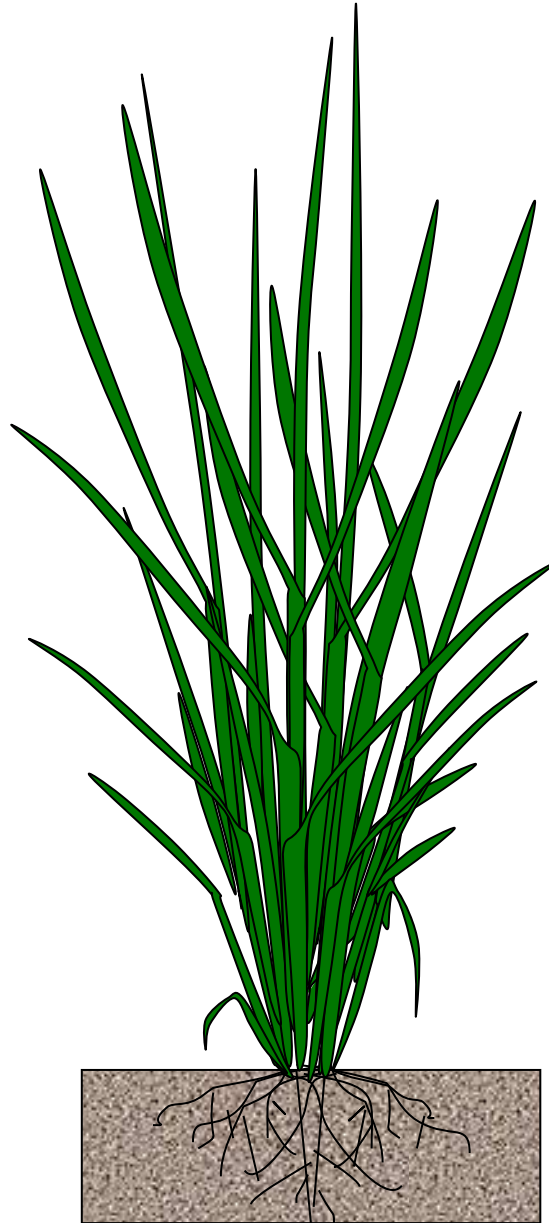


連鎖解析

遺伝学を用いて、生命現象の原因遺伝子を見つける

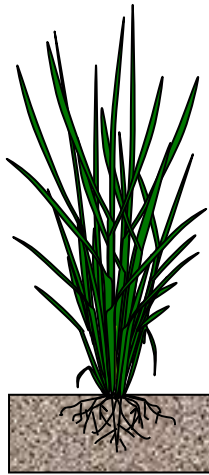
生物の表現型・形質(収量が多い、病気に強い・・・etc)は
環境要因と遺伝要因で決定される



環境要因

よく生長

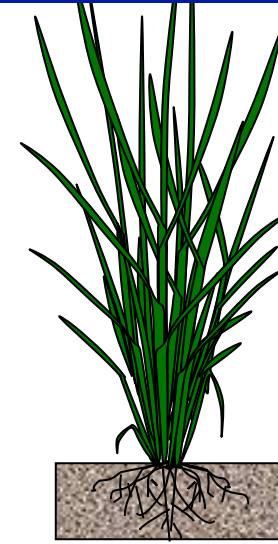
A 品種をX圃場に植える



環境要因によって差がでた

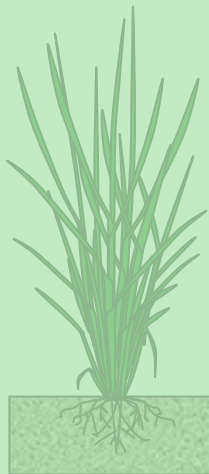
寒い
土地が
やせている
VS
乾燥

A 品種をY圃場に植える



暖かい
土地が
肥えている
水がある

A 品種をX圃場に植える

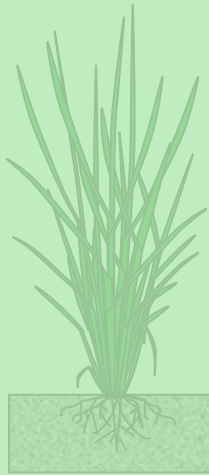


B 品種をY圃場に植える



環境要因

A 品種をX圃場に植える



環境要因によって差がでた

寒い

土地が
やせている

乾燥

VS

暖かい

土地が
肥えている

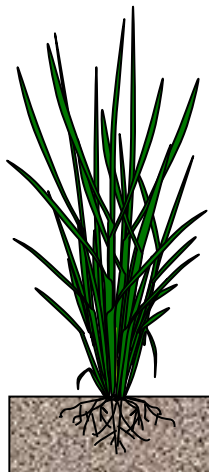
水がある

A 品種をY圃場に植える



よく生長

A 品種をX圃場に植える

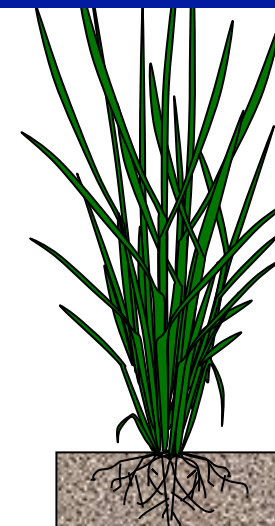


遺伝要因

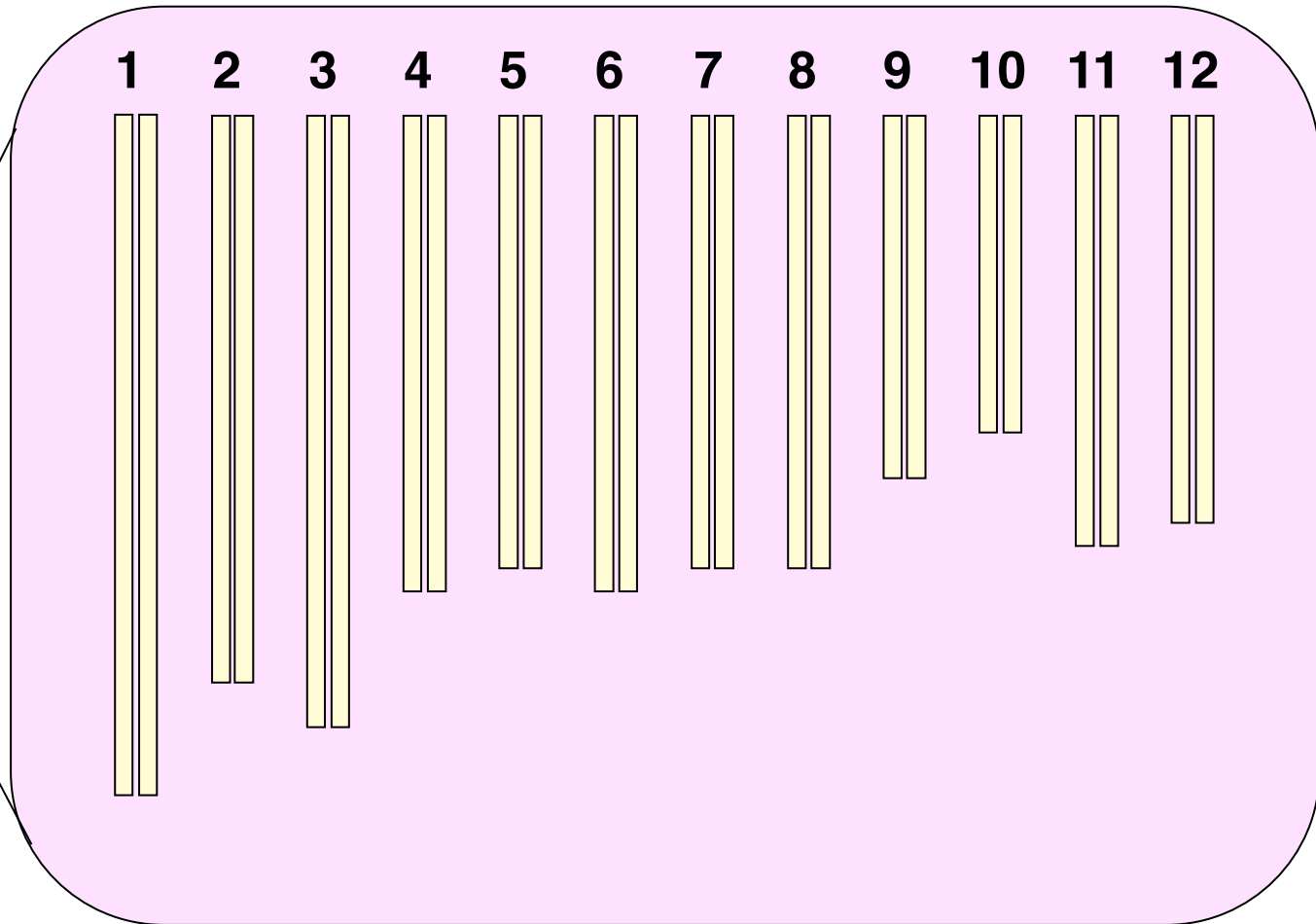
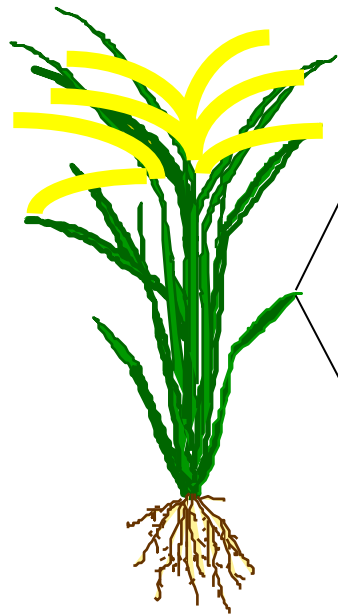
遺伝要因によって差がでた

遺伝子

B 品種をX圃場に植える



イネの細胞の中の染色体とDNA



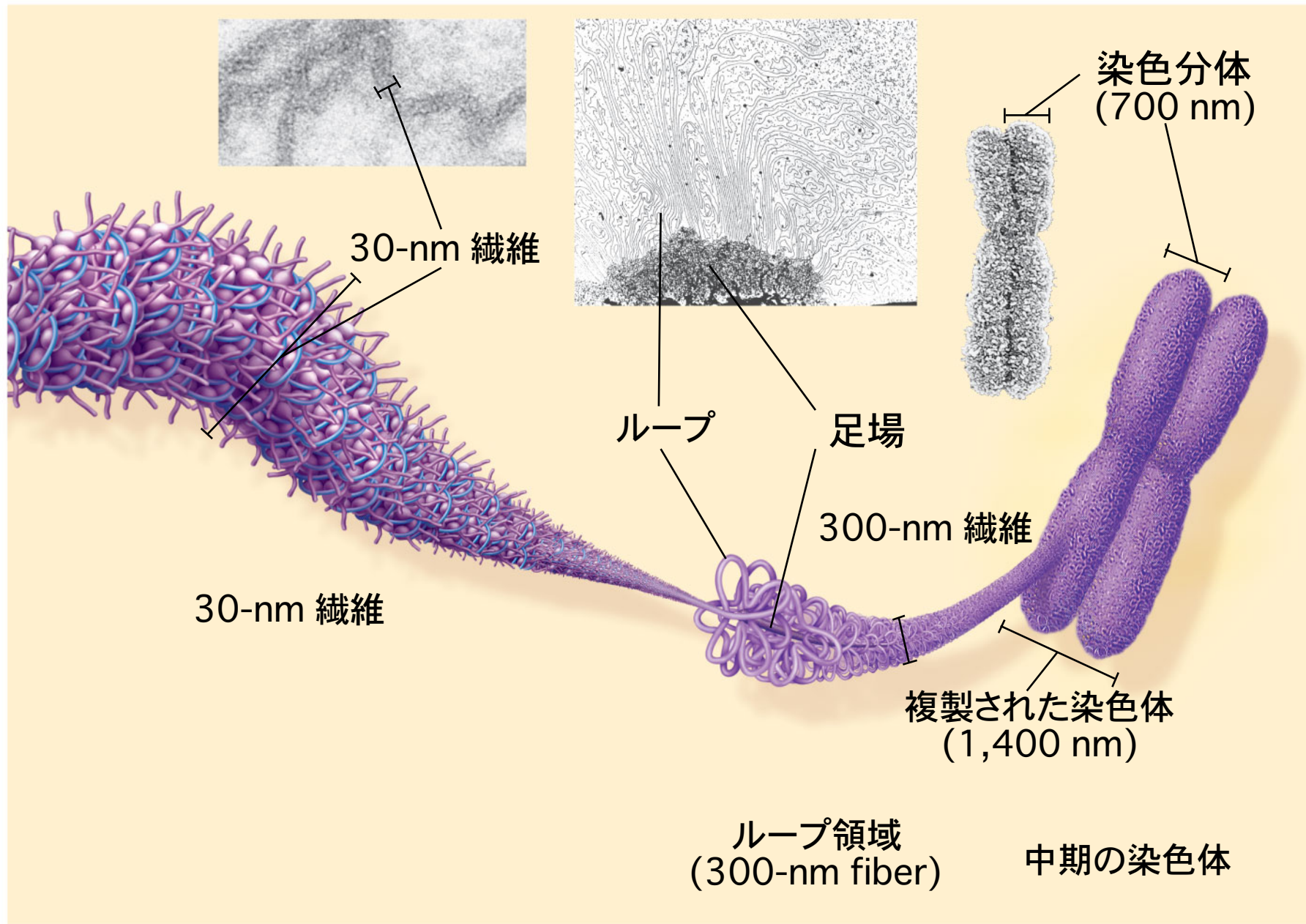
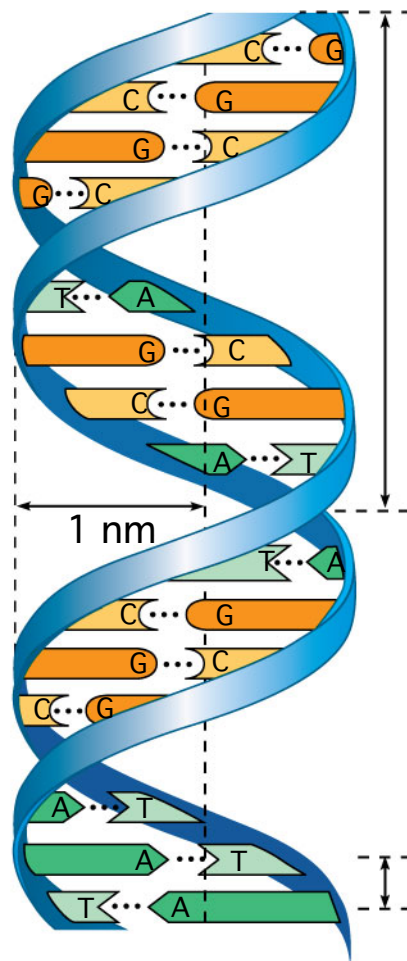
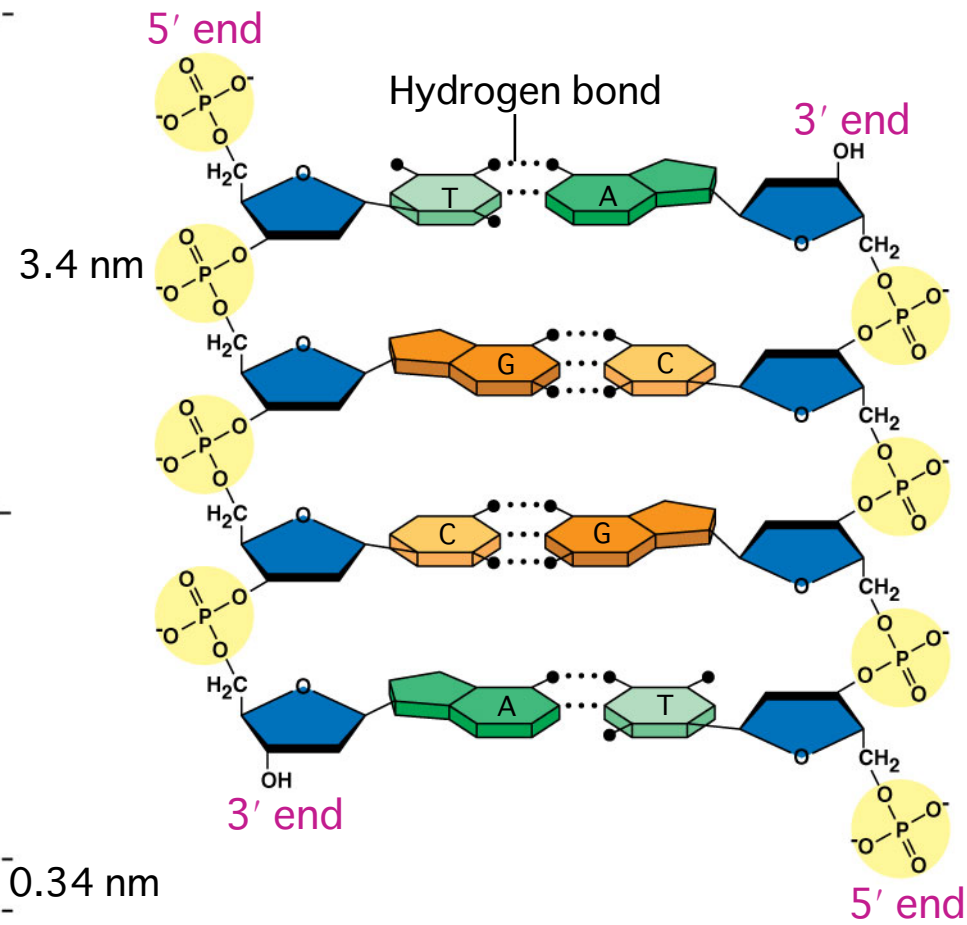


Figure 16.7

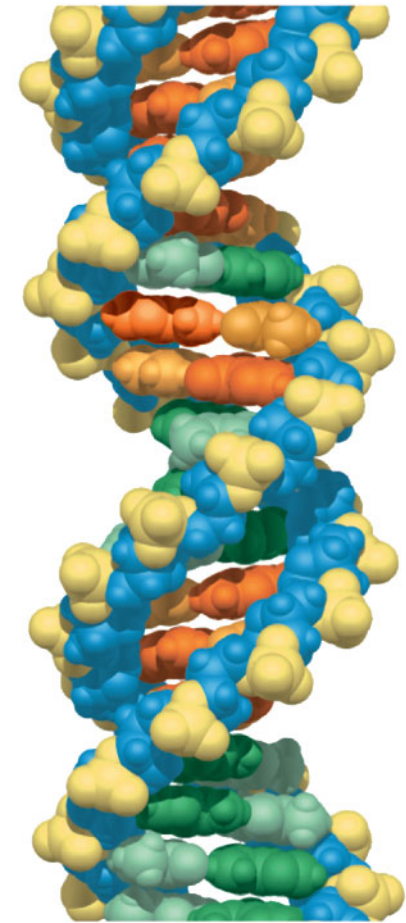


(a) Key features of DNA structure

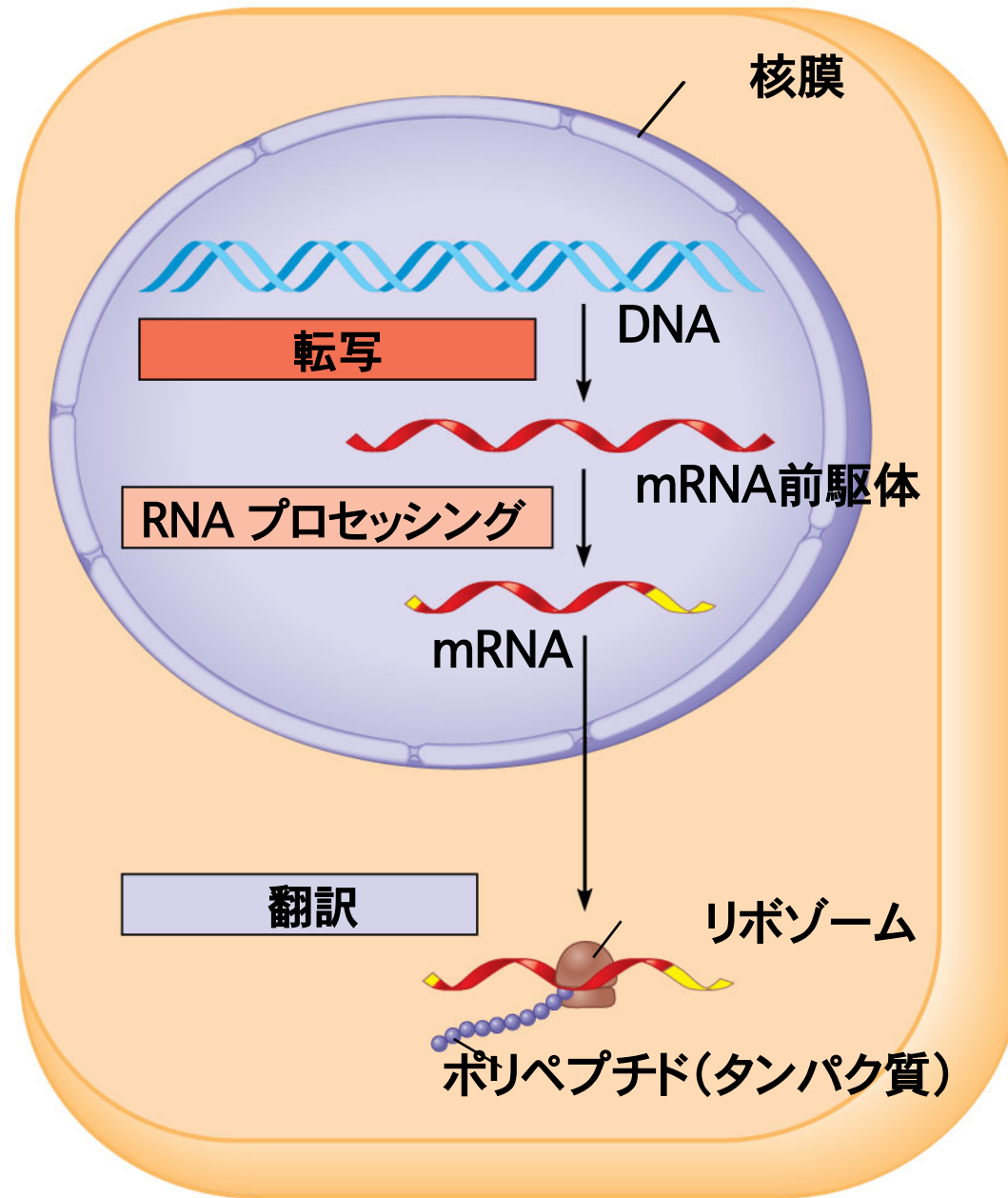
© 2011 Pearson Education, Inc.



(b) Partial chemical structure



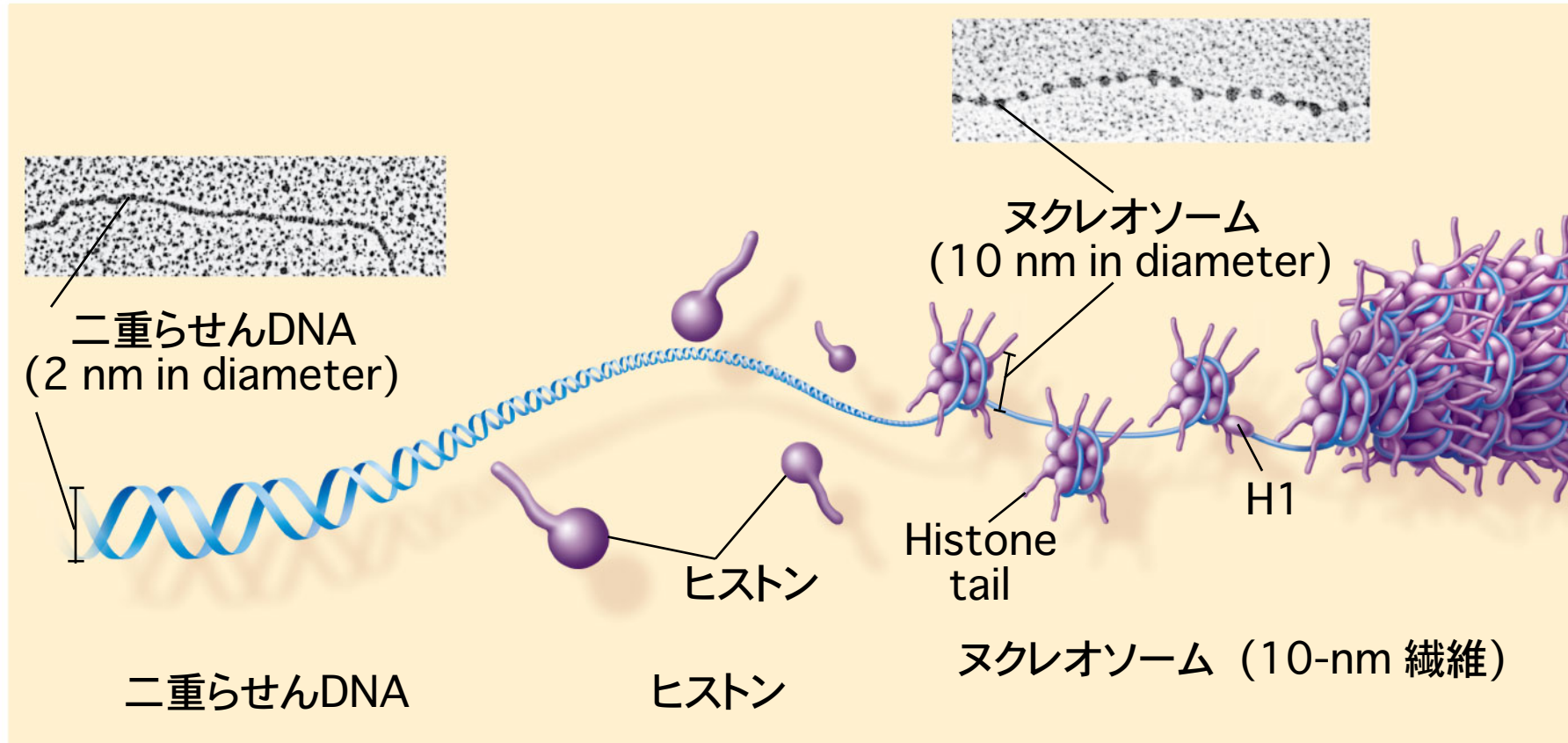
(c) Space-filling model



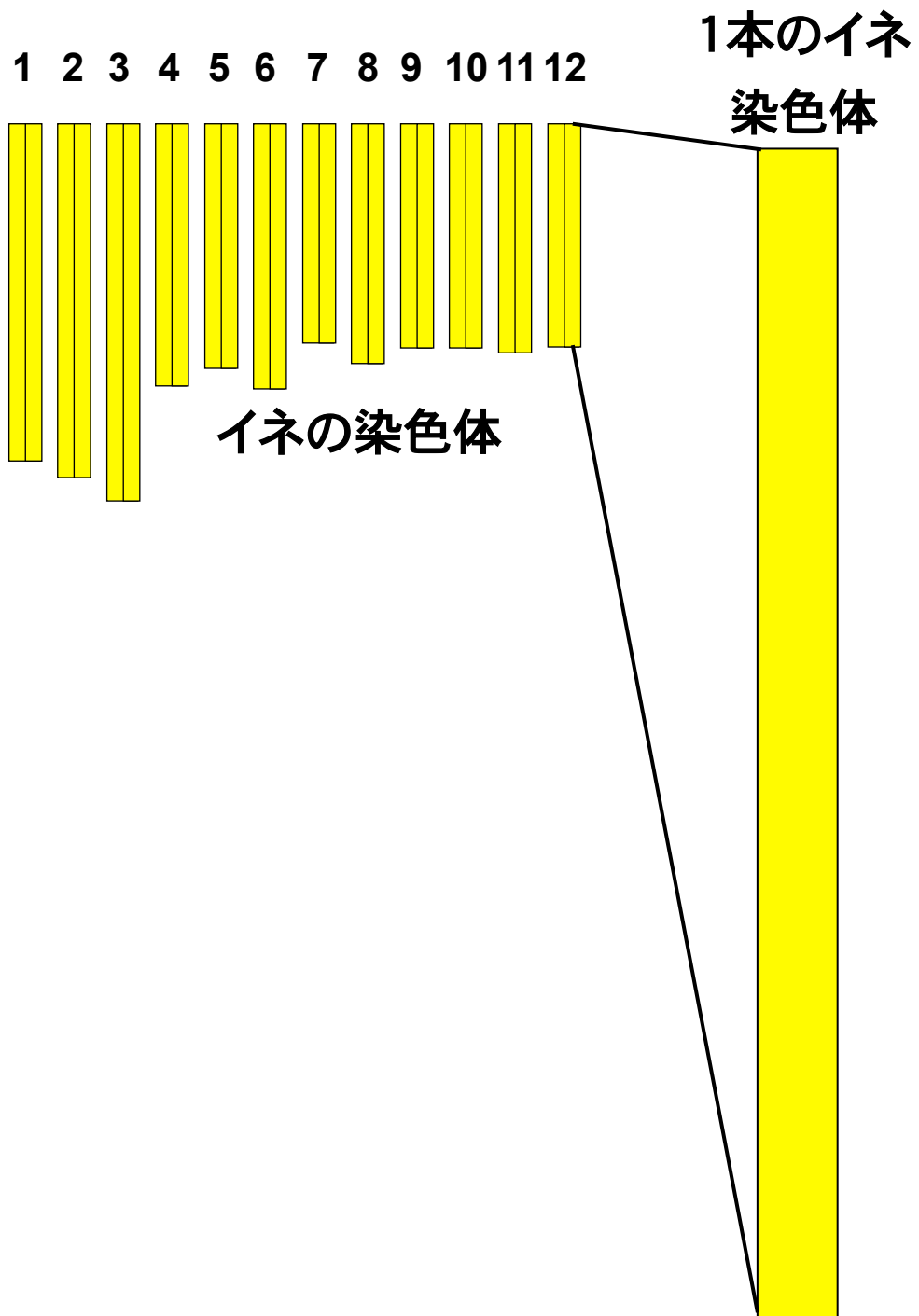
(b) 真核生物の細胞

© 2011 Pearson Education, Inc.

キャンベル参照



© 2011 Pearson Education, Inc.



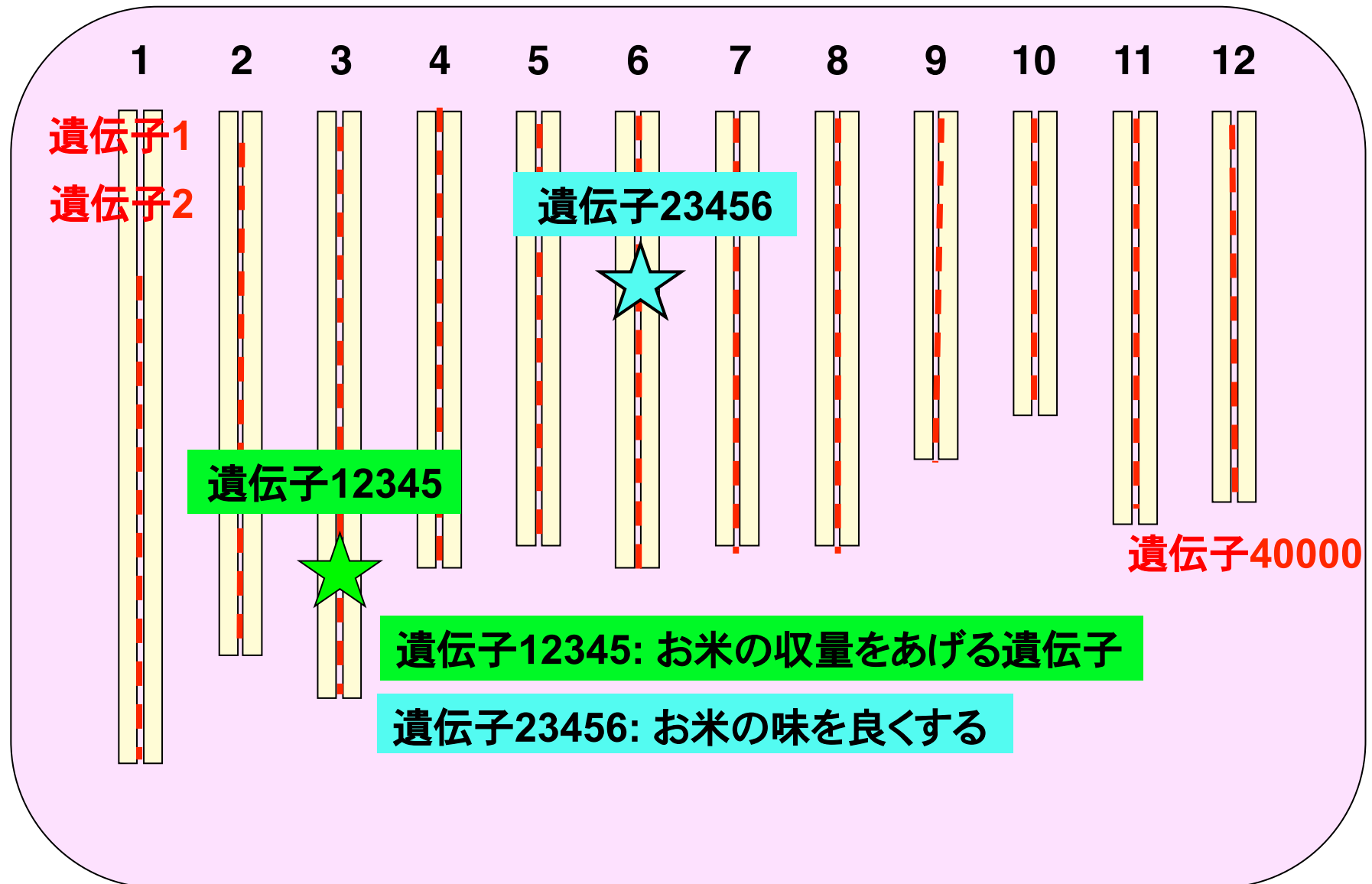
DNA

A
T
A
A
T
G
T
T
T
A
G
G
T
A
A
A
T
G
T
T
A
G
G

遺伝子1

遺伝子2

遺伝子とその機能



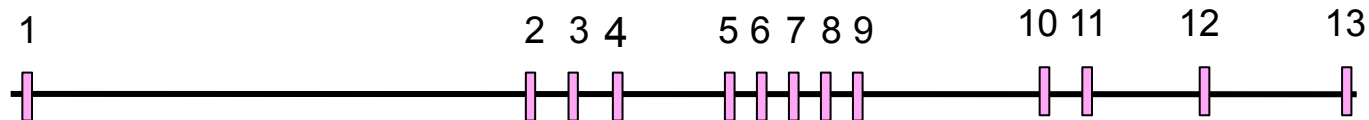
これまでに誰かが解明した現象や遺伝子に頼る

でも、初めての生命現象を明らかにするには？

アルコールの代謝



肝臓で働くアセトアルデヒド脱水素酵素には2種類ある。
ALDH1とALDH2



第12exon

第13exon

Z1CDS GCATACACTGAAGTGAAAACGTGCACAGTCAAAGTGCCTCAGAAGAACTCATAA
Z2CDS GCATACACTAAAGTGAAAACGTGCACAGTCAAAGTGCCTCAGAAGAACTCATAA

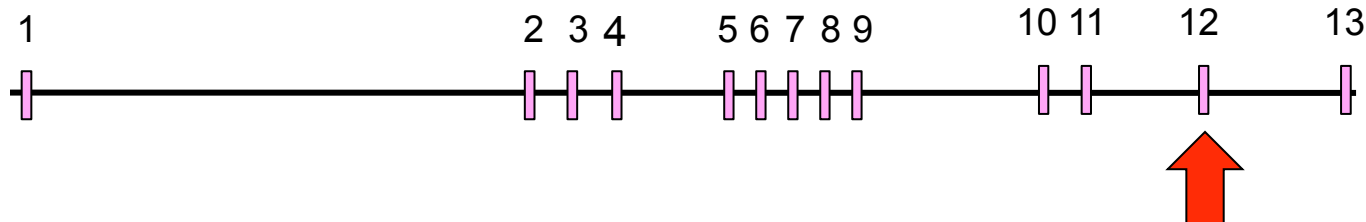
第12exon

グルタミン酸

第13exon

Z1Amionoacid PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS
Z2Amionoacid PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTKVKTVTVKVPQKNS

リジン



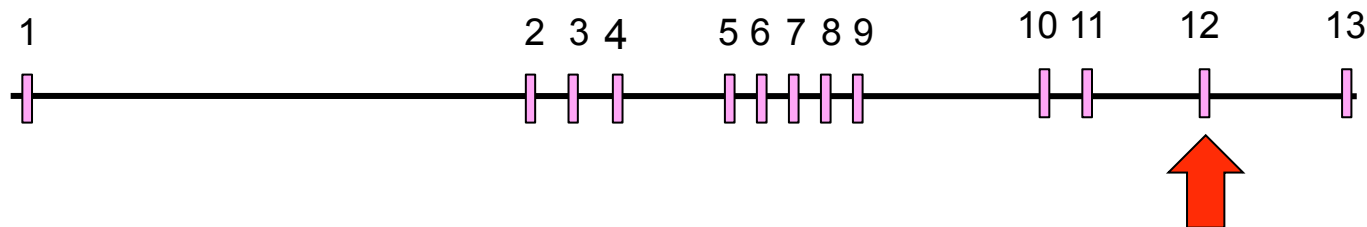
アルコールの代謝



肝臓で働くアセトアルデヒド脱水素酵素には2種類ある。

ALDH1とALDH2

お酒に強い人、弱い人はALDH2遺伝子の1塩基の違いによる。
1塩基多型: SNP (Single Nucleotide Polymorphism) と呼ぶ

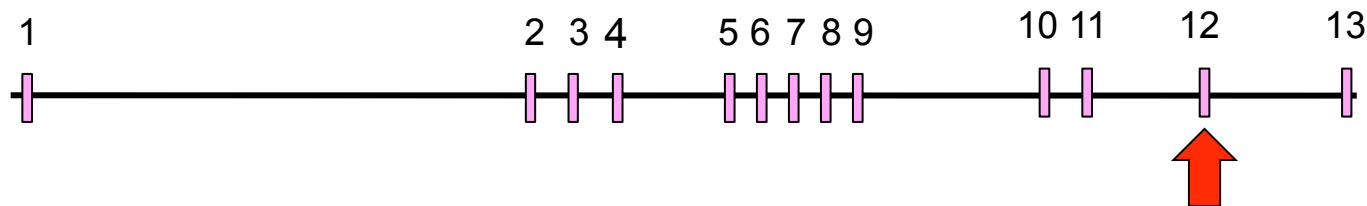


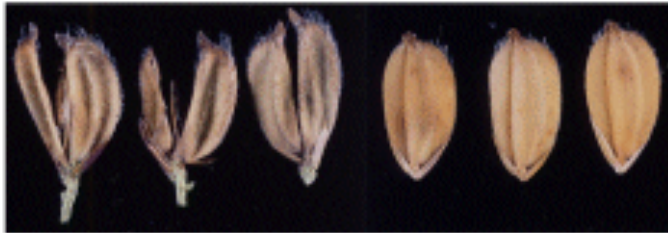
アルコールを飲めない人の原因を明らかにする



例えば: お酒を飲める人と飲めない人の違い

1. アセトアルデヒドの蓄積が原因
2. アセトアルデヒドを分解する酵素を探す
3. アセトアルデヒドを分解する遺伝子を探す
4. お酒を飲める人と飲めない人のアセトアルデヒドを分解する遺伝子を比較
5. 相補性検定 (お酒を飲める人アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子を飲めない人に導入)





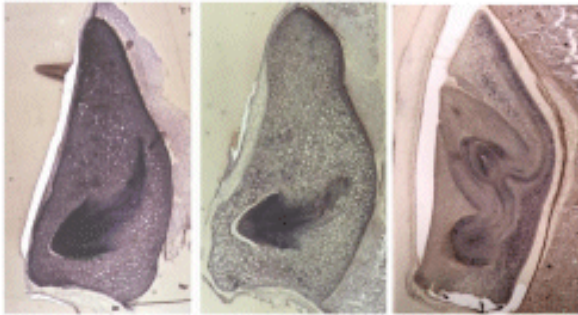
ops

Normal



wx

Normal



sh1-1

sh1-2

wild type



bl-1

Normal



d-11



Normal



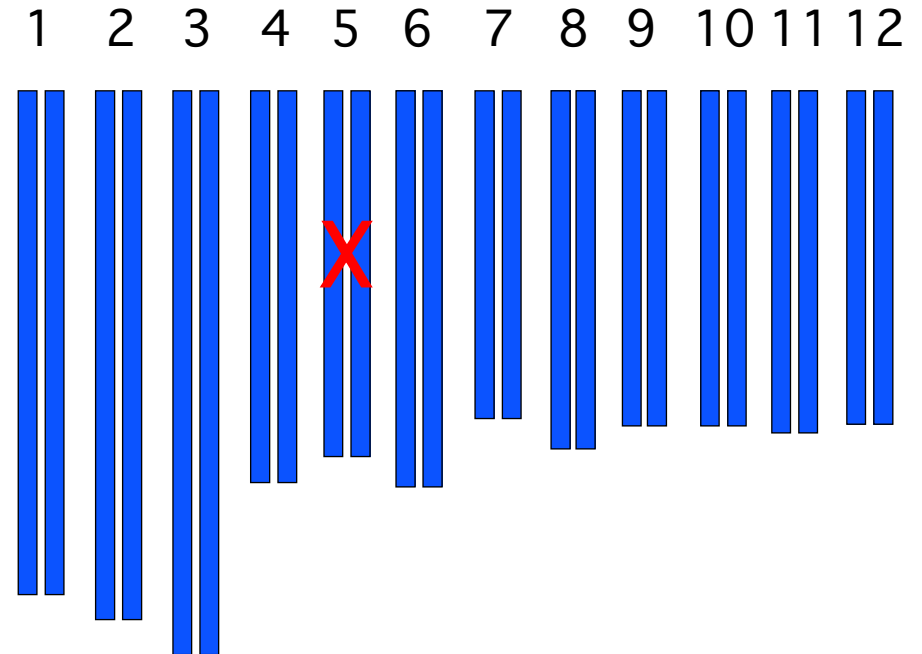
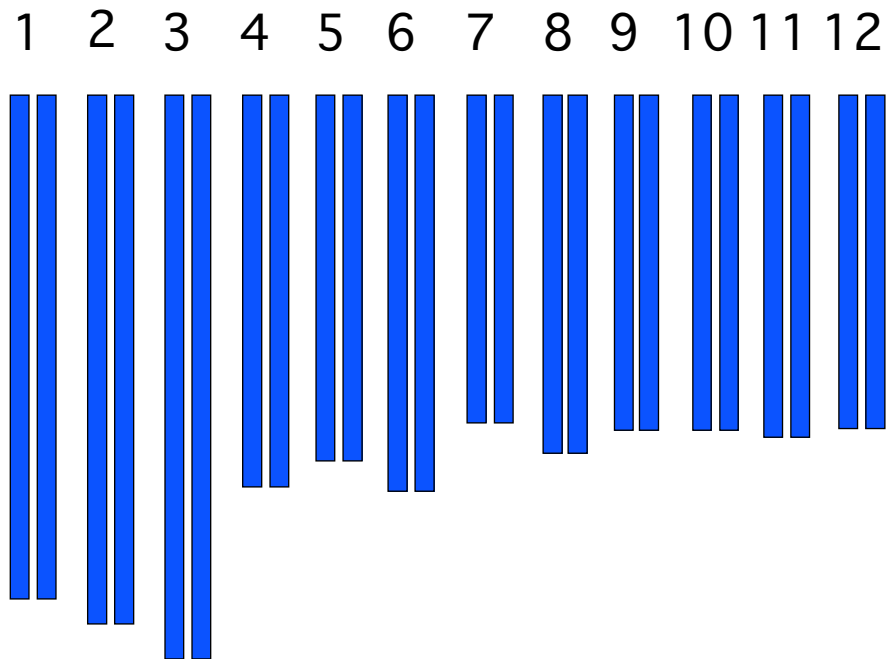
連鎖解析(遺伝学)で遺伝子を見つける

草丈を短くした原因の遺伝子がどこかにある

日本晴



矮性突然変異体

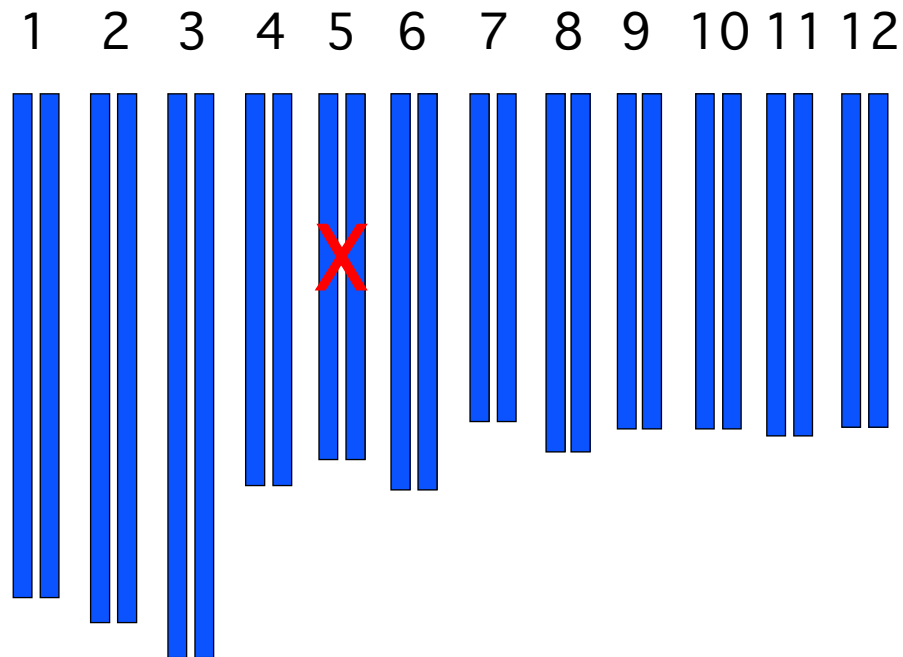
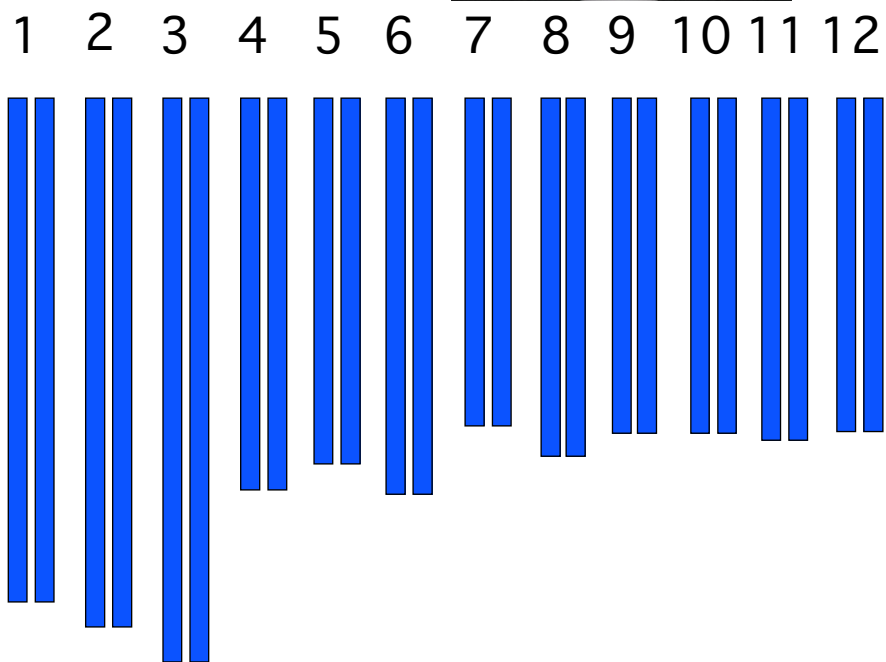
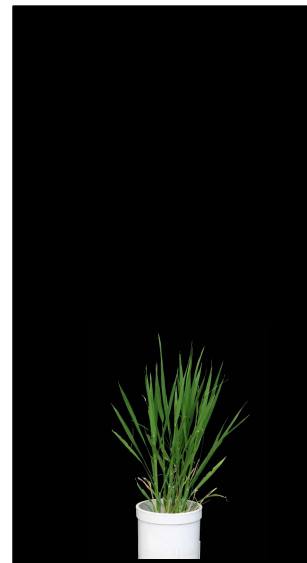


どうやって遺伝子を探すのか？

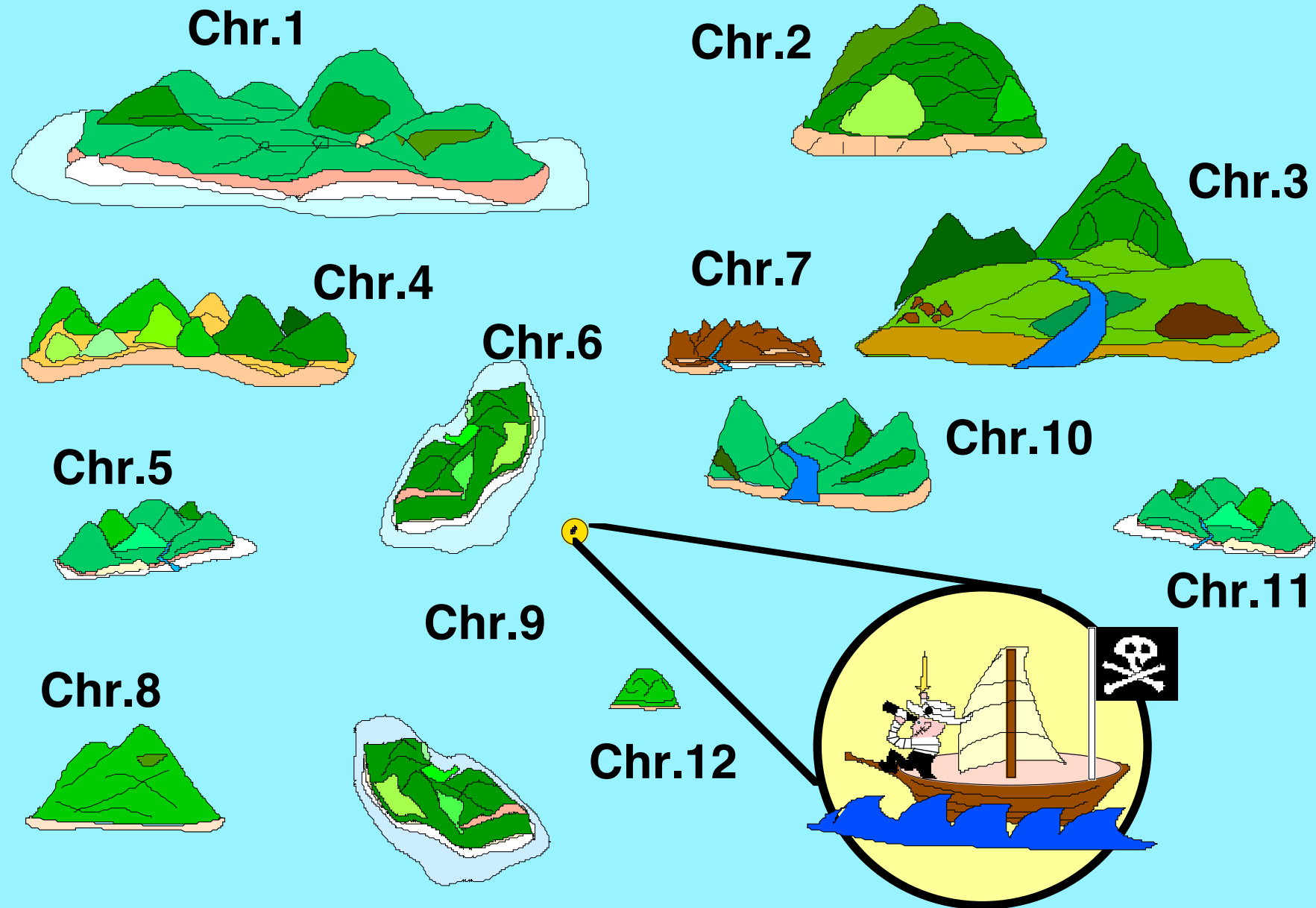
日本晴



矮性突然変異体



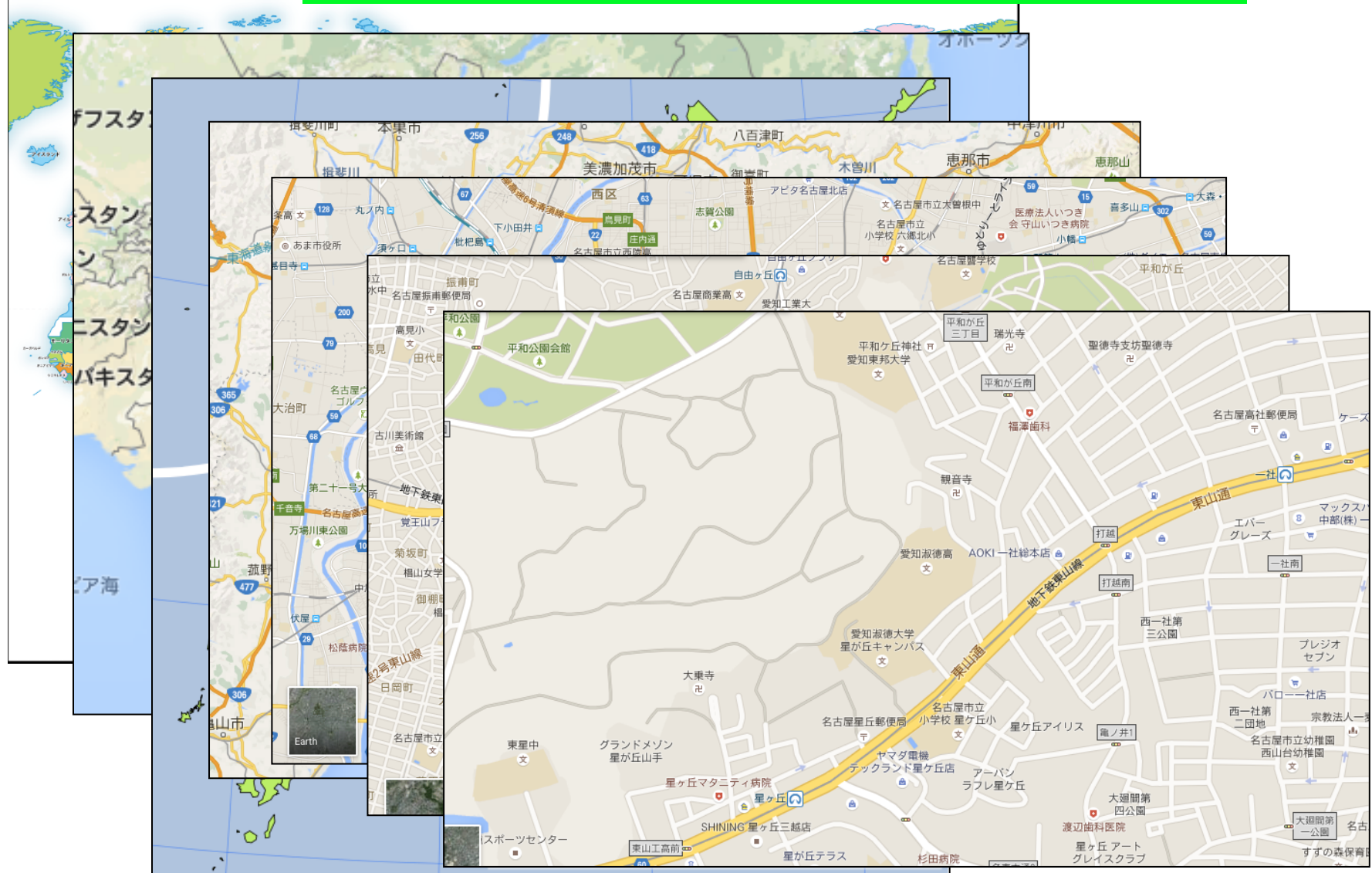
突然変異の原因遺伝子がイネの12本の染色体のどこに存在するかを明らかにする

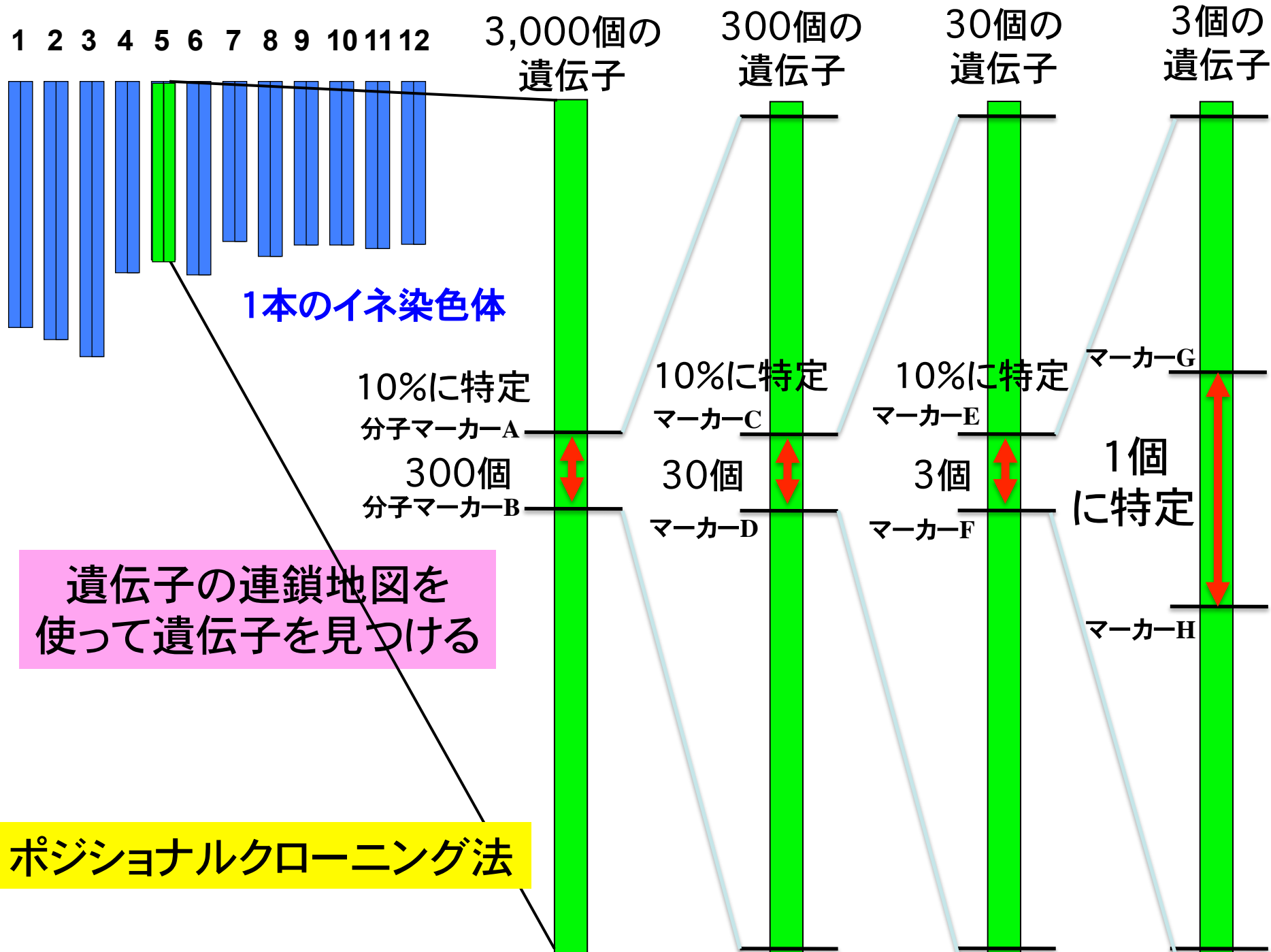


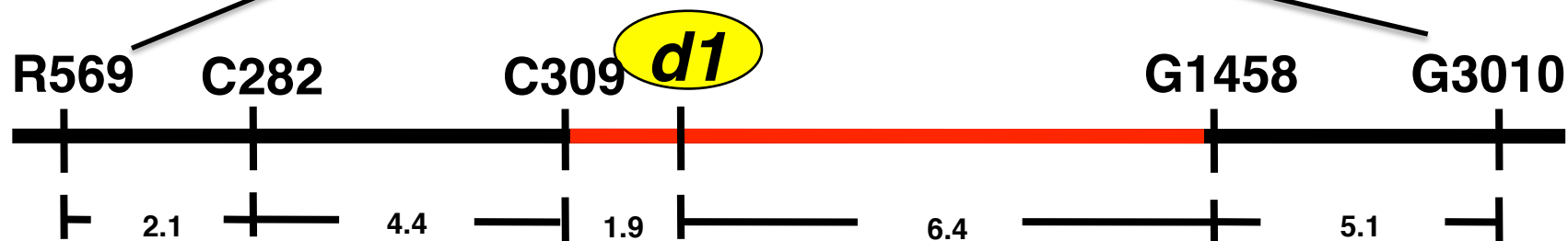
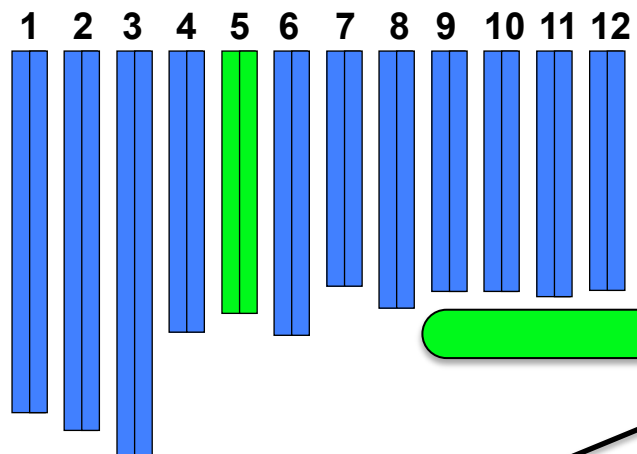
Map-based cloning is like treasure hunting

遺伝子の探し方(例):地図をつかって絞り込んでいくやり方

アジアー日本ー愛知県ー名古屋市ー千種区ー星ヶ丘

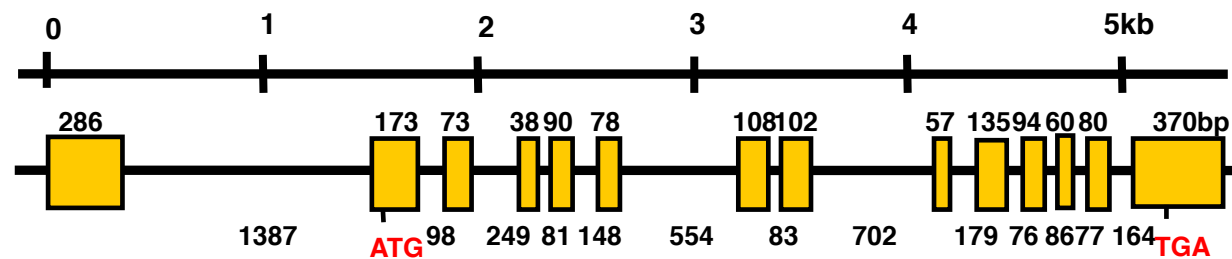




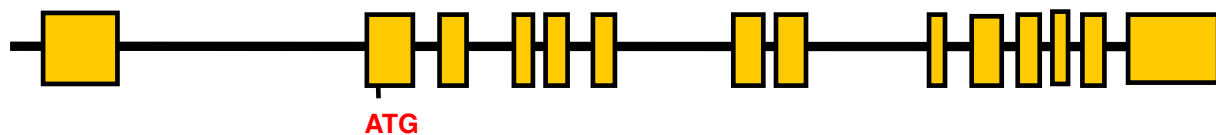


map distance (cM)

正常型



突然変異型

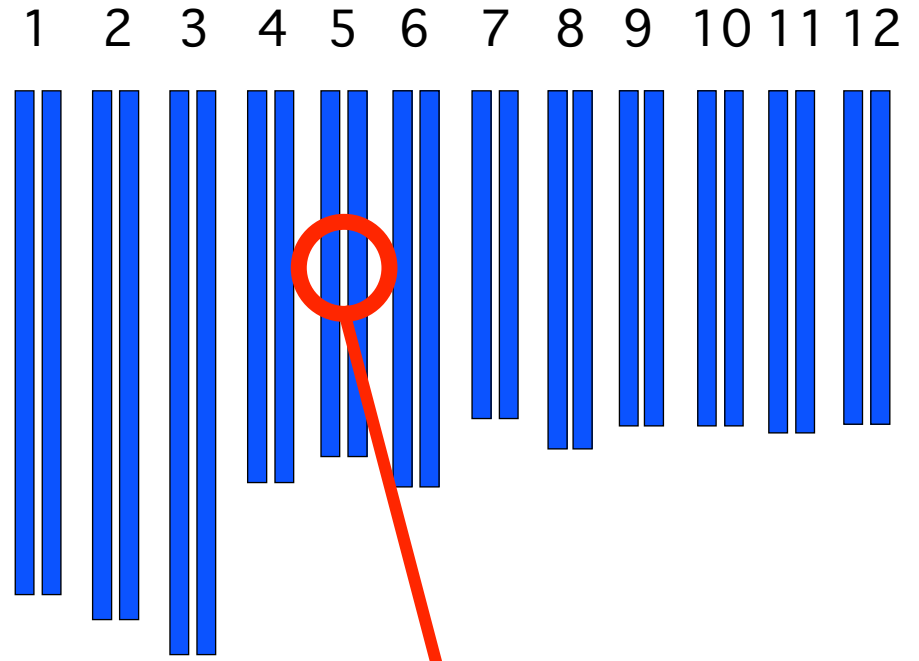
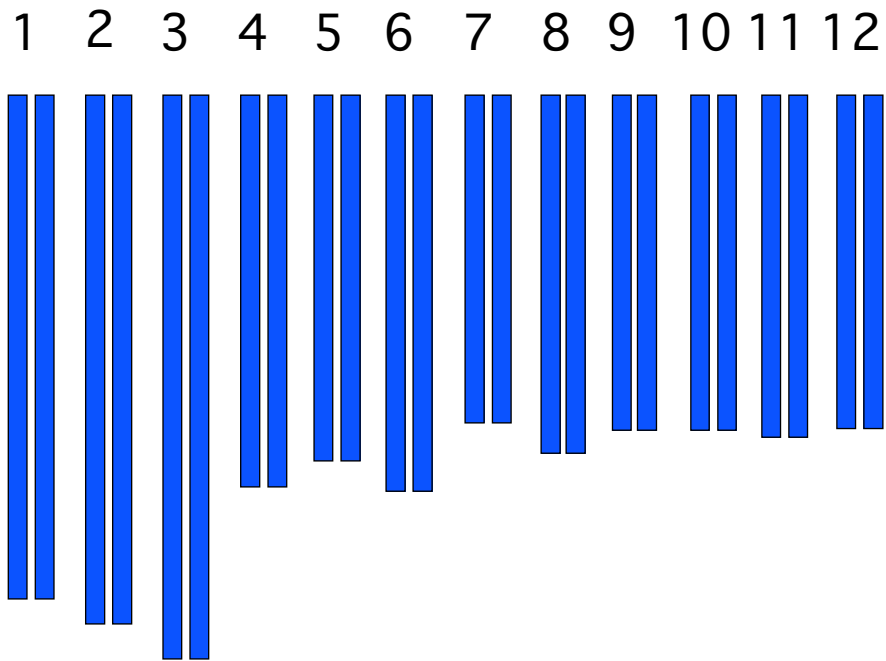


草丈を短くした原因の遺伝子がどこにある

日本晴



矮性突然変異体



d1 : 草丈を制御する遺伝子

連鎖解析で遺伝子を見つける

栽培種



突然変異体

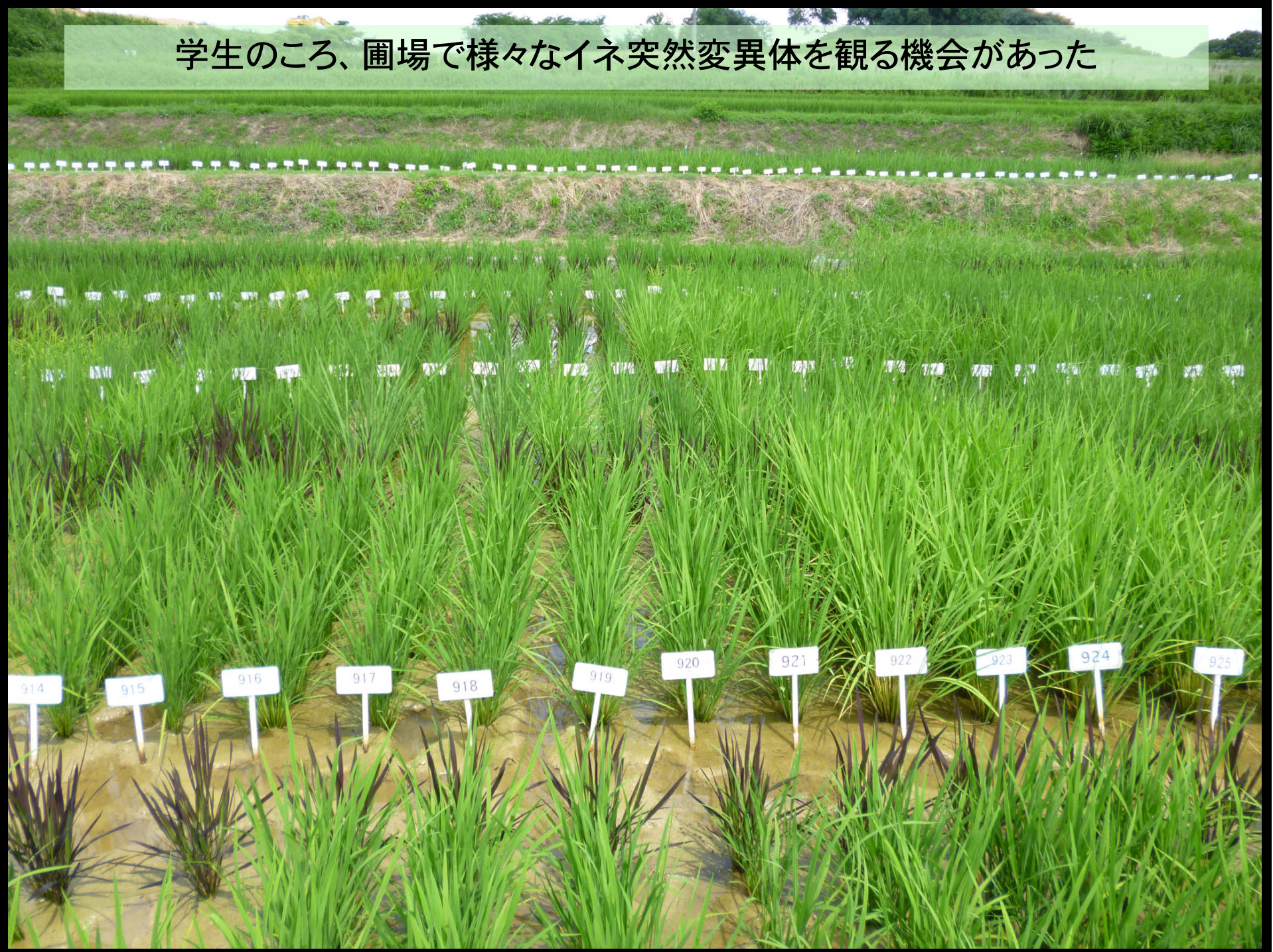


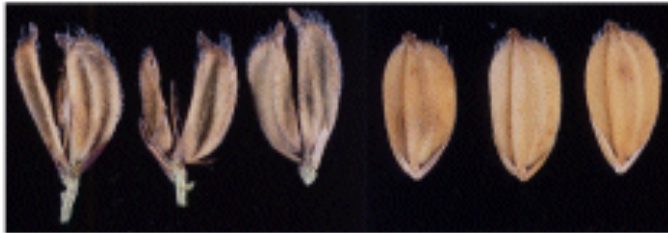
Wild



Mutant

学生のころ、圃場で様々なイネ突然変異体を観る機会があった





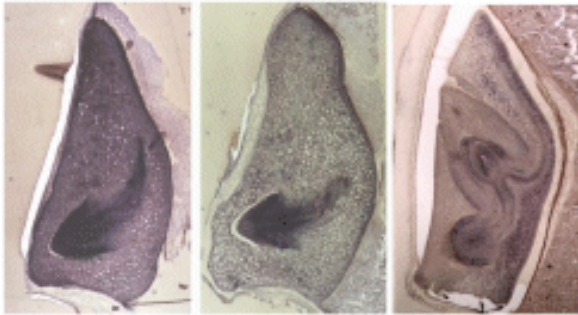
ops

Normal



wx

Normal



sh1-1

sh1-2

wild type



bl-1

Normal



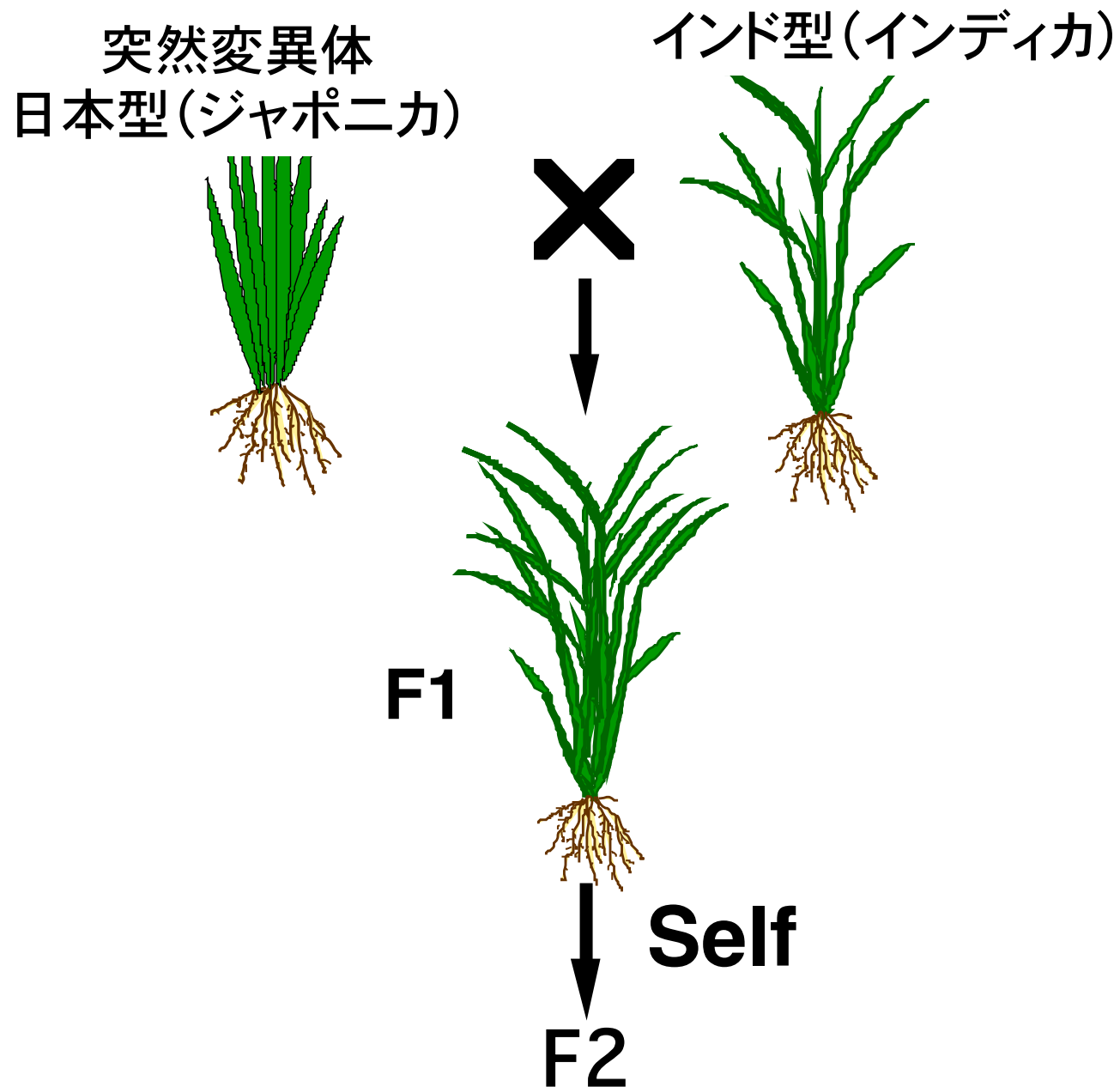
d-11



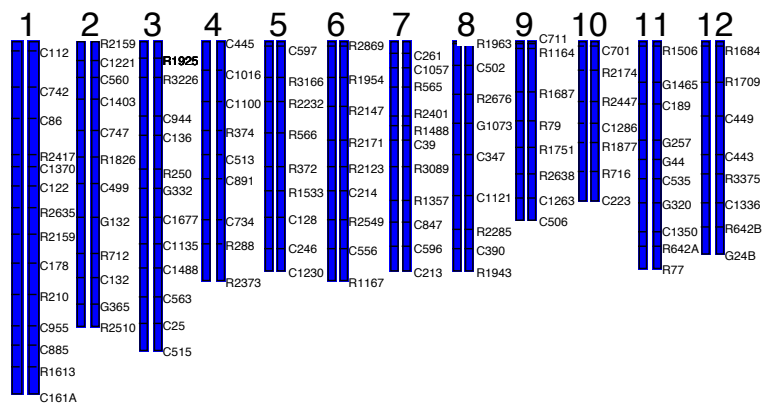
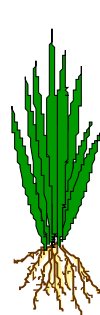
Normal



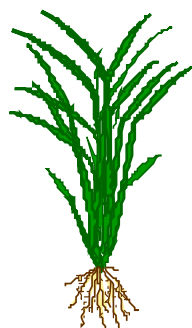
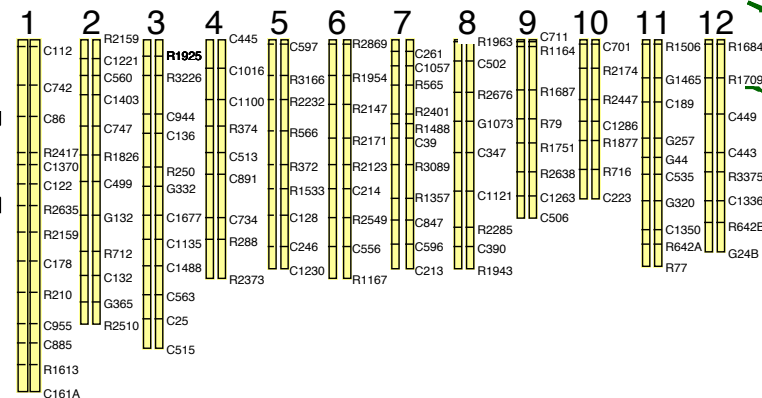
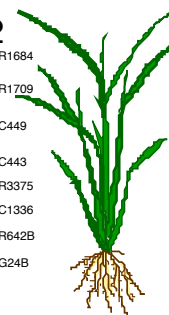
連鎖解析を行う際には 遺伝的に少し異なる系統を交配してF2を準備する



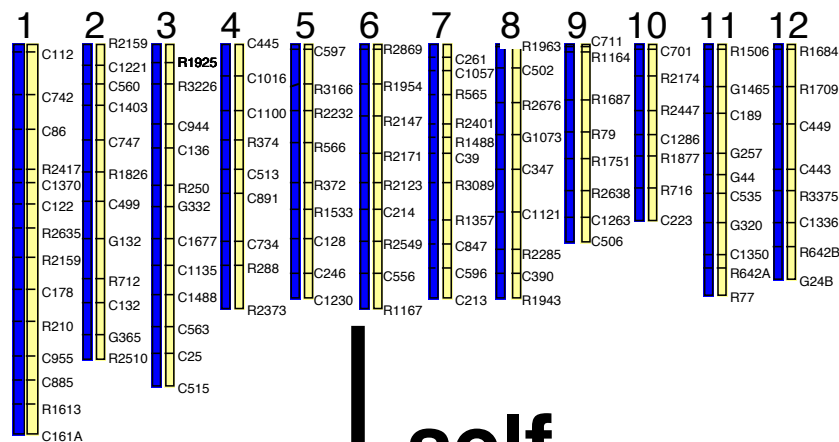
日本型(ジャポニカ)



インド型(インディカ)



F1



self



F2

F2では表現型が1 : 3に分離する

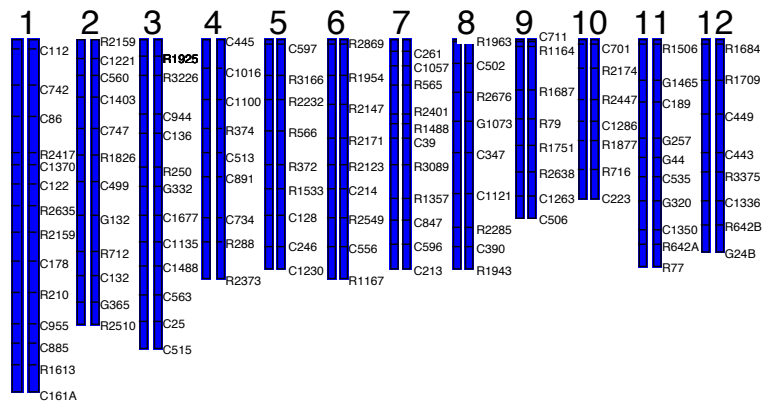
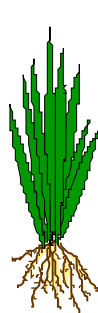


d1/d1 *d1/D1 or D1/D1*

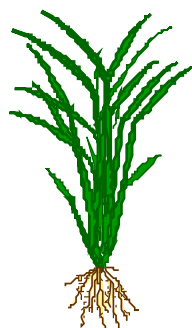
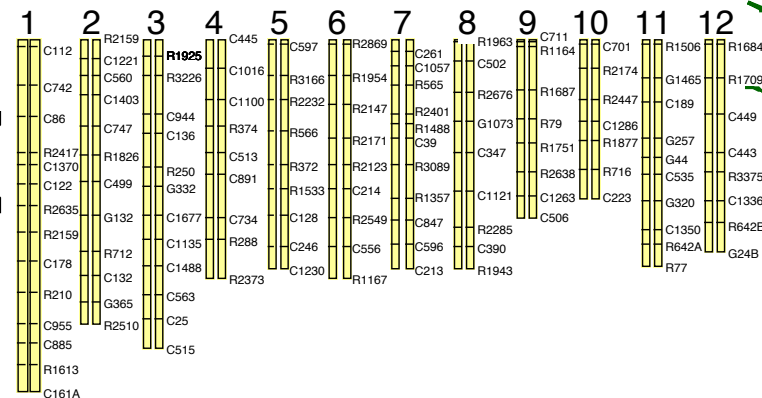
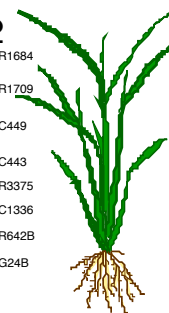
減数分裂の過程では新しいゲノムが生ずる

- ①減数分裂の第一分裂の際、母方と父方の相同染色体が独立に選び取られるために、 n 個の染色体を持つ生物では 2^n 種の一倍体配偶子が生ずる。イネの場合は $2^{12} = 4096$ 通りの一倍体配偶子が生ずる。
- ②減数分裂の第一分裂前期に交差顔こり、相同染色体の一部が交換され、個々の染色体内でゲノムの新しい組み合わせが生ずる。

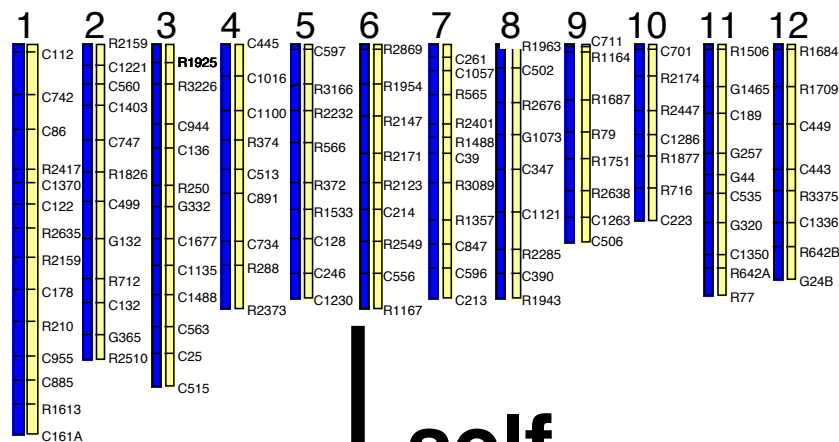
日本型(ジャポニカ)



インド型(インディカ)



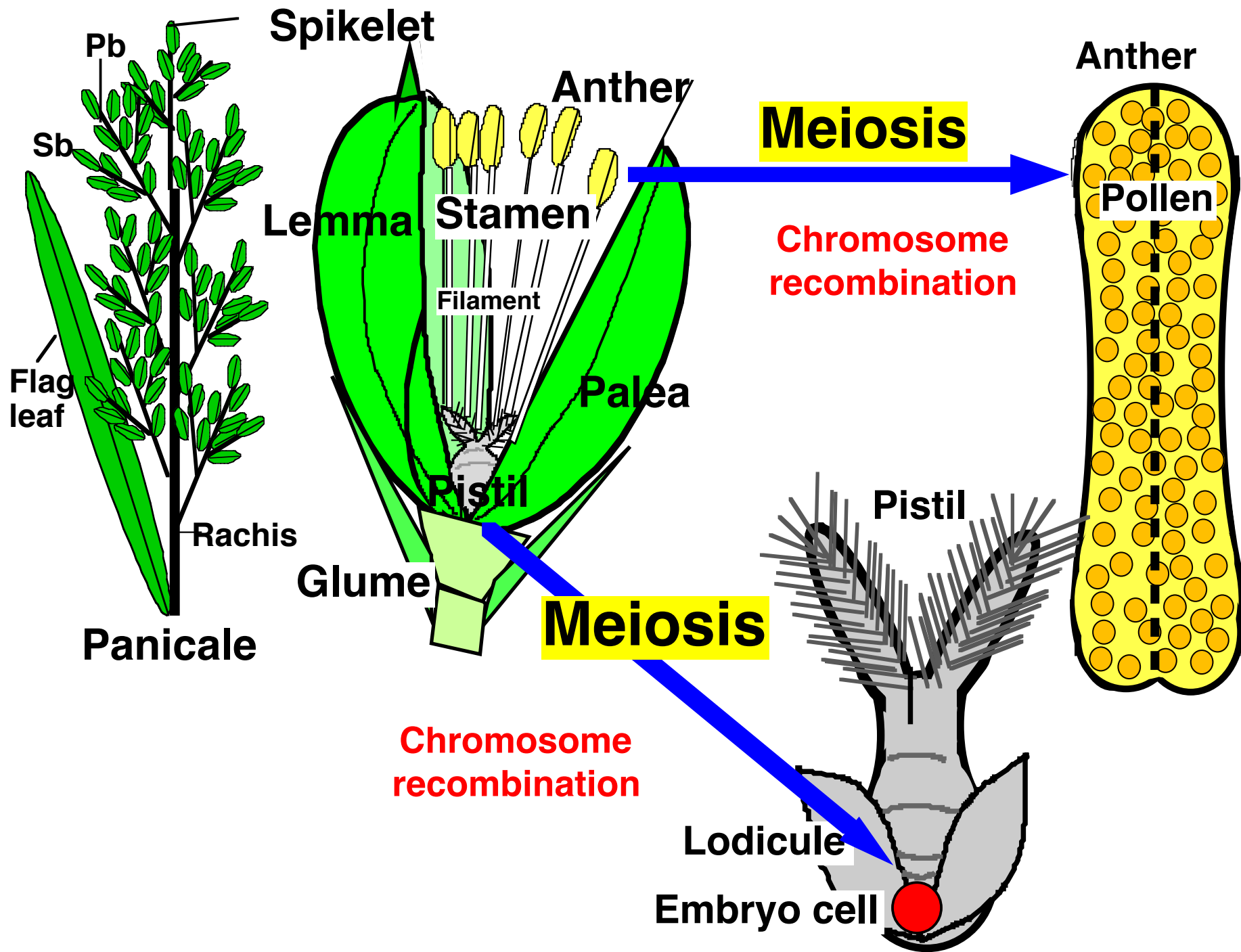
F1



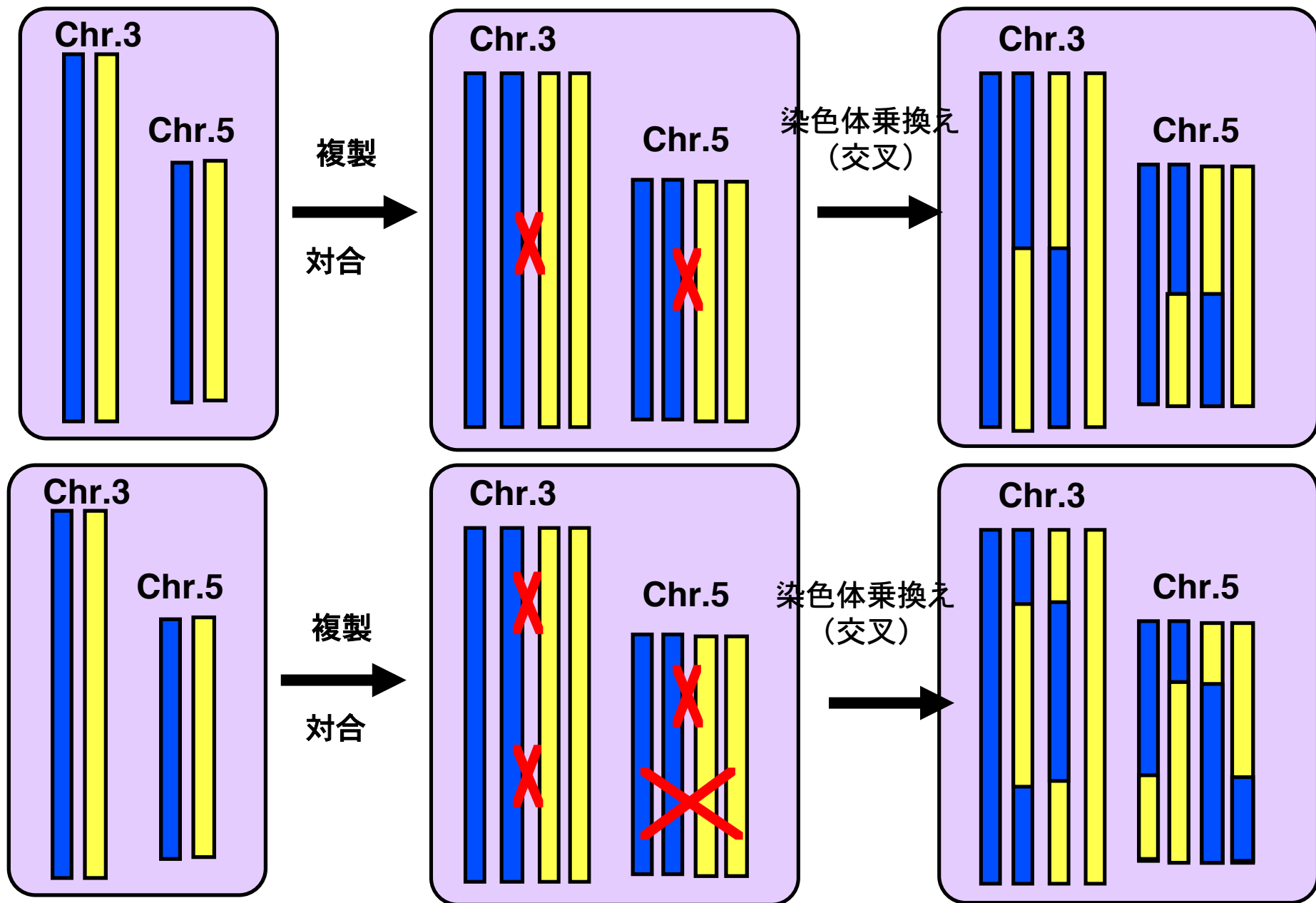
self



F2



Scheme of chromosome recombination in meiosis



Age Group	Number of People
0-14	100
15-24	95
25-34	105
35-44	85
45-54	90
55-64	100
65+	95

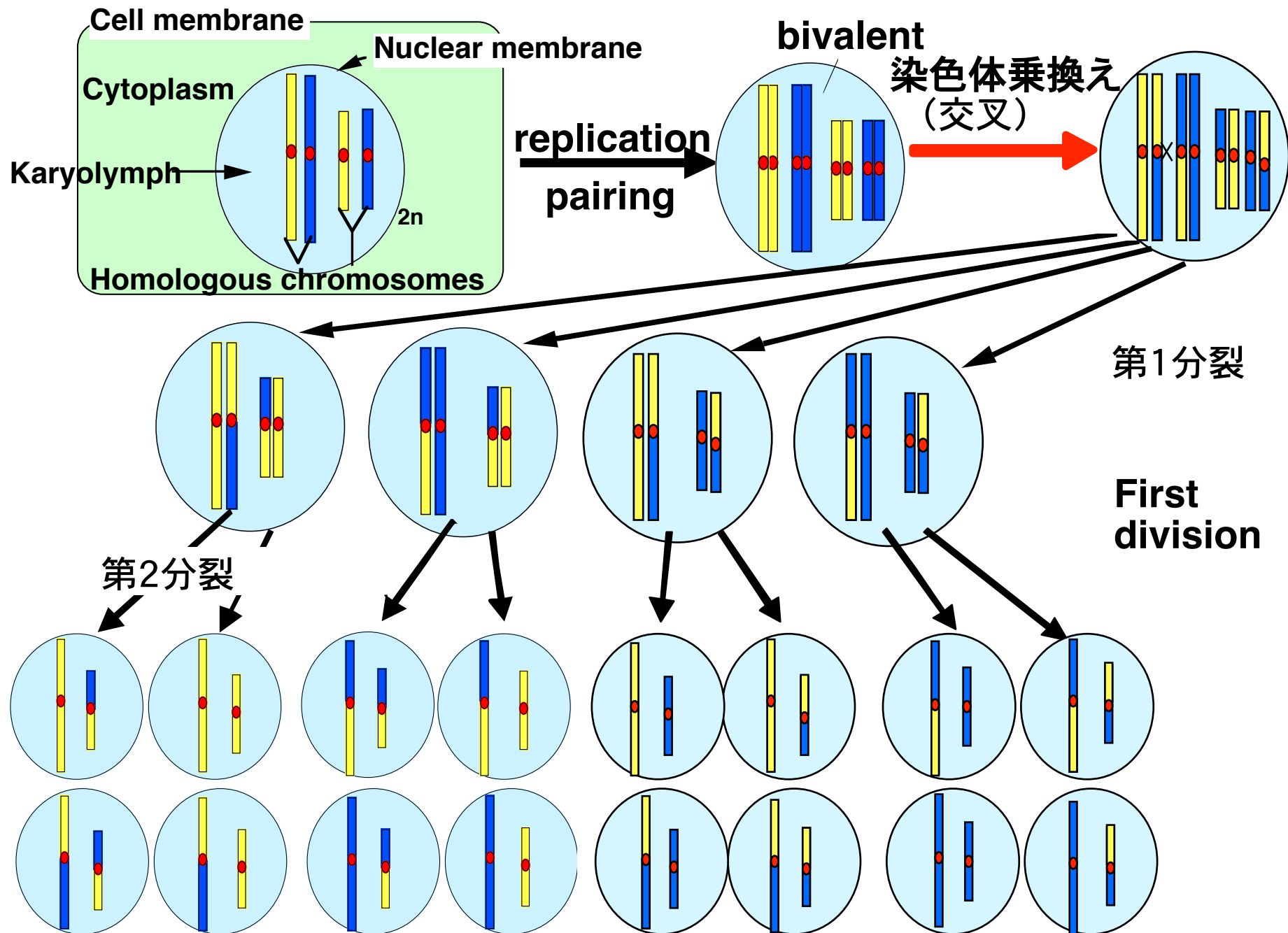
Diagram illustrating a crossover event between two DNA strands. The left strand sequence is A T A A T G T T A G G T A A A T G T A G G T A A. The right strand sequence is A T A T A T T A G G T G T A T G T A G G T A A. A blue 'X' marks the crossover point between the G at position 6 of the left strand and the T at position 6 of the right strand.

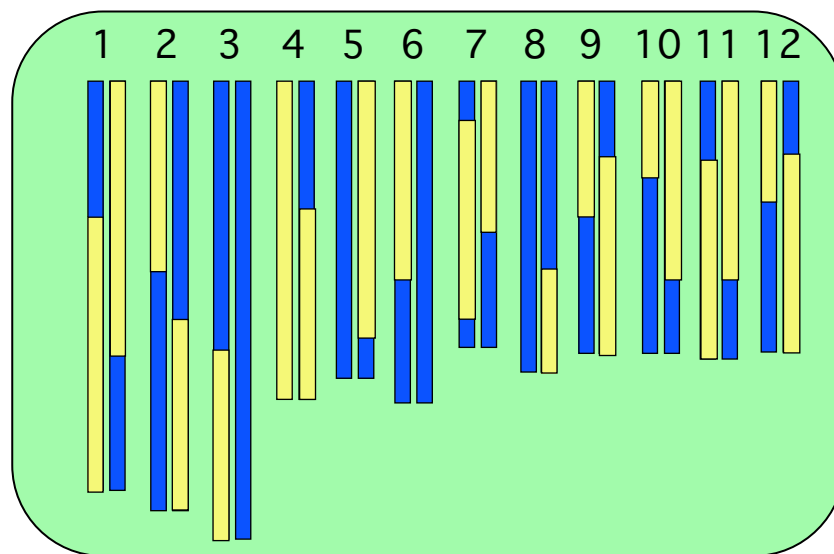
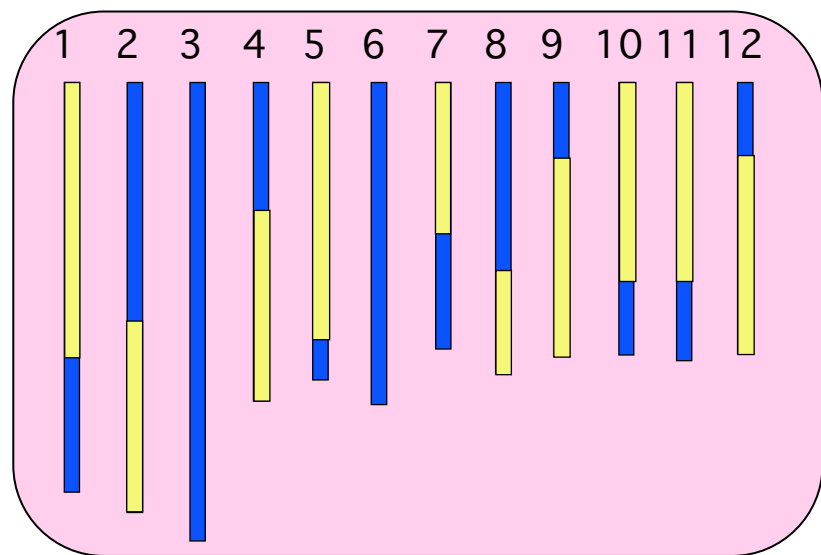
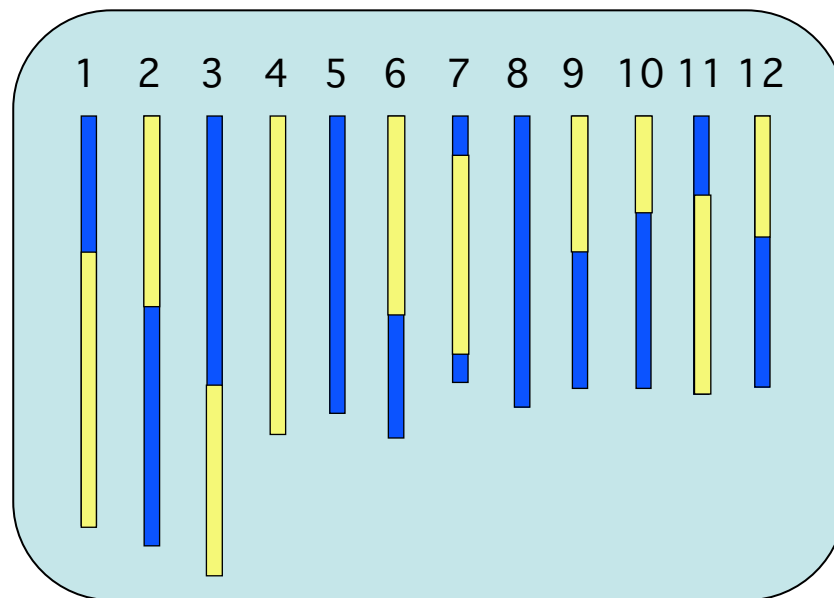
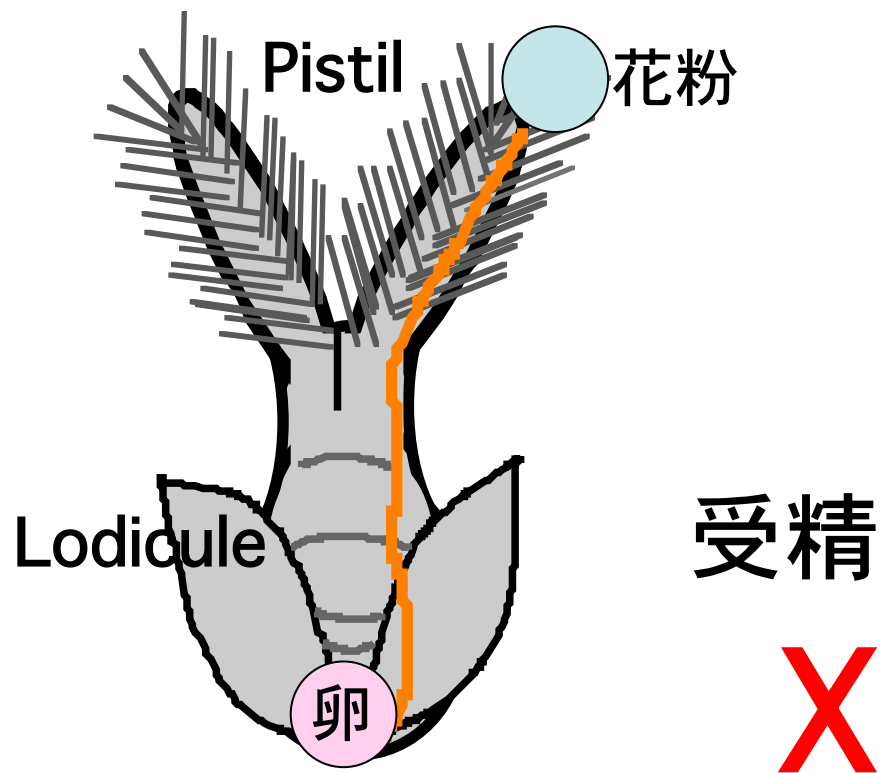
Music Type	Number of People
Rock	8
Pop	9
Jazz	10
Classical	7
Electronic	6

減数分裂の過程では新しいゲノムが生ずる

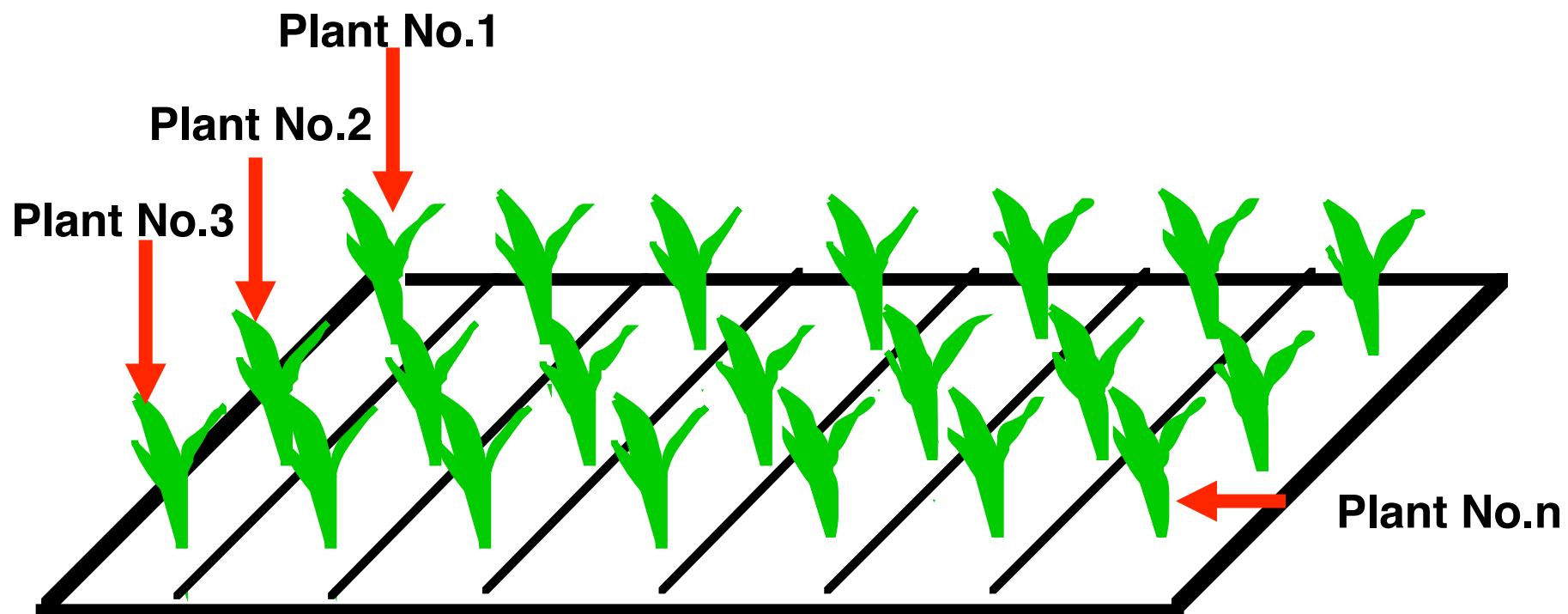
- ①減数分裂の第一分裂の際、母方と父方の相同染色体が独立に選び取られるために、 n 個の染色体を持つ生物では 2^n 種の一倍体配偶子が生ずる。イネの場合は $2^{12} = 4096$ 通りの一倍体配偶子が生ずる。
- ②減数分裂の第一分裂前期に交差顔こり、相同染色体の一部が交換され、個々の染色体内でゲノムの新しい組み合わせが生ずる。

Cell division - **Recombination** in meiosis



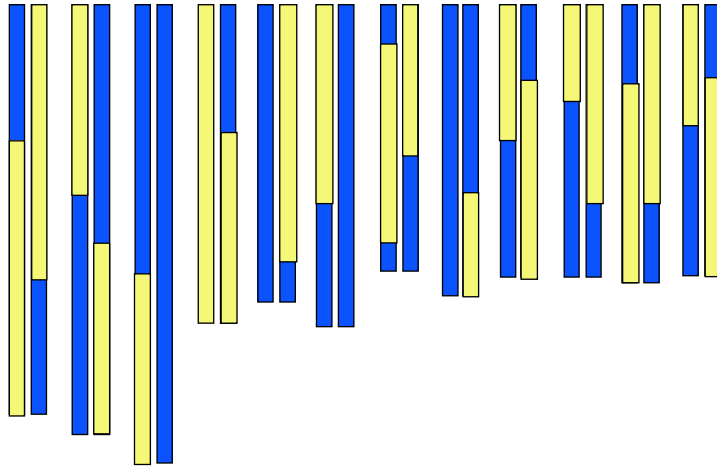


F₂ 集団

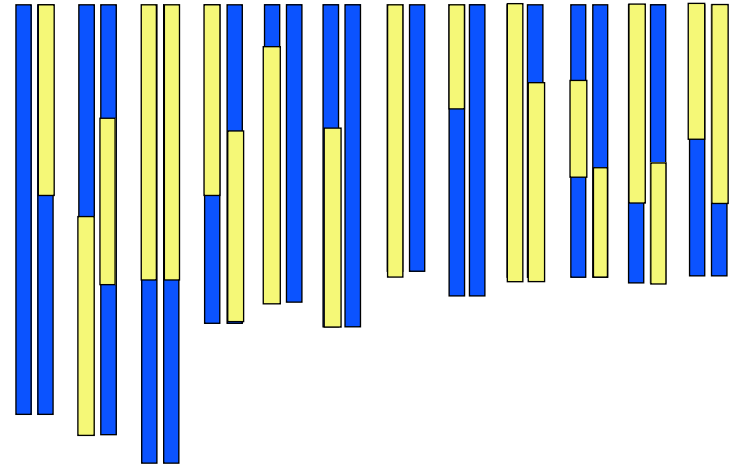


Graphical genotype in F2 plants

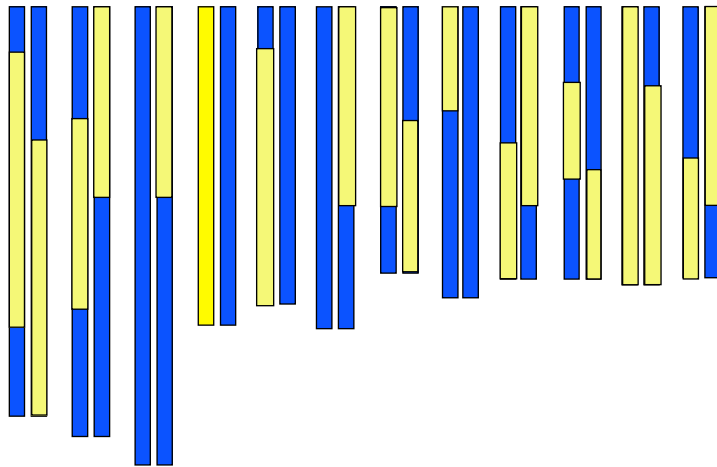
Plant No.1



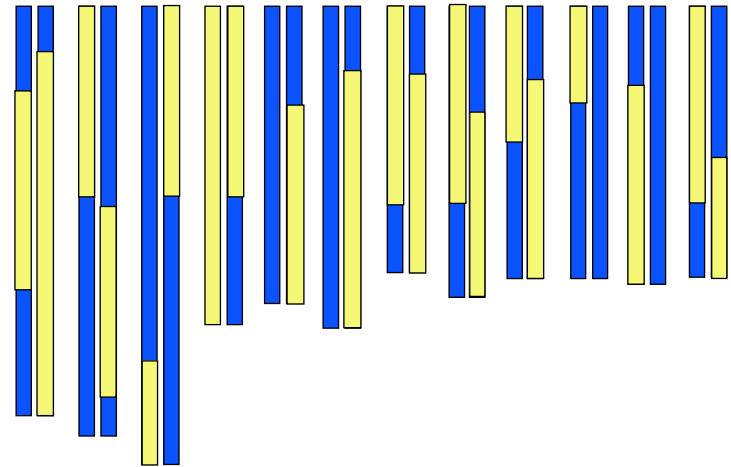
Plant No.3



Plant No.2

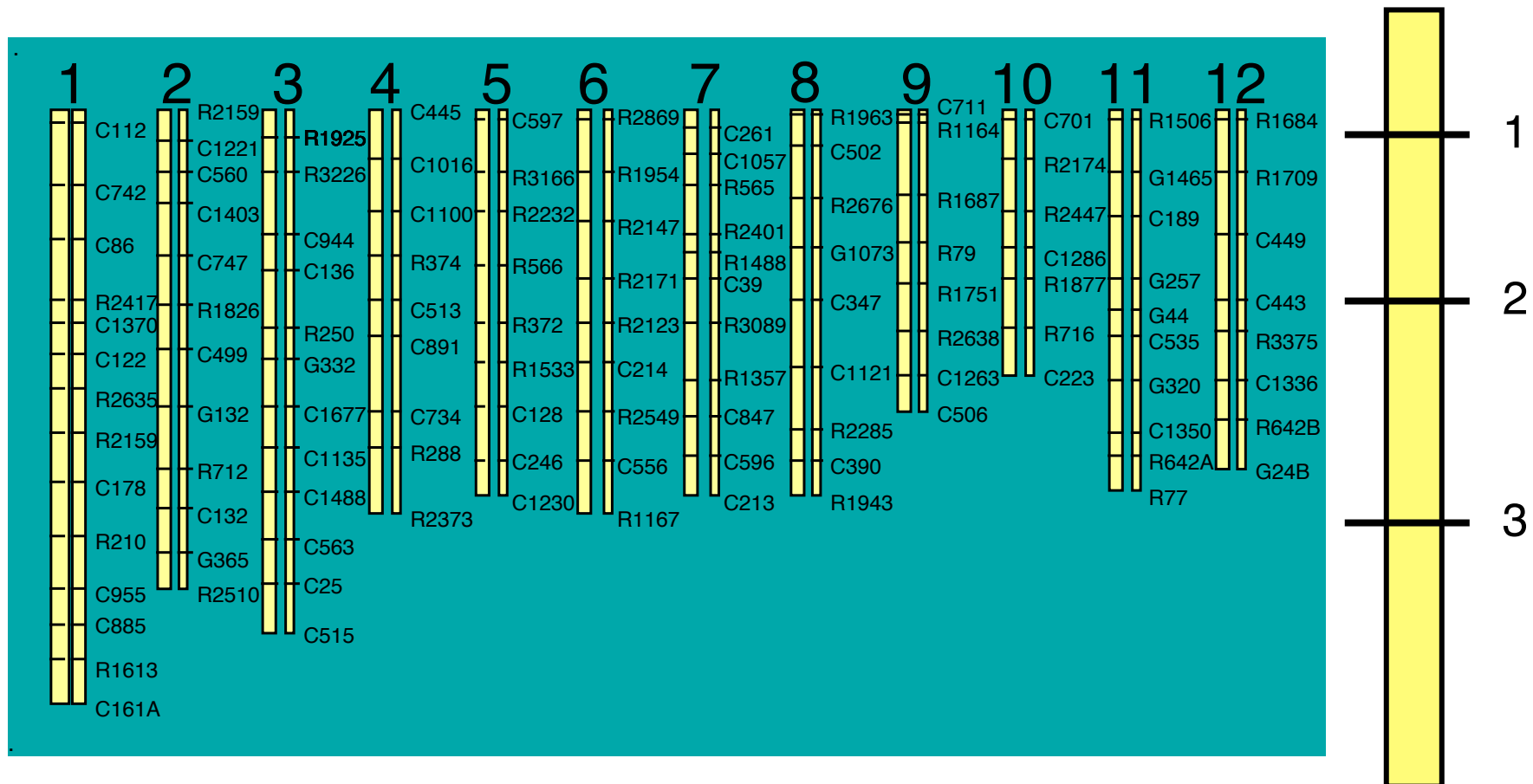


Plant No.n

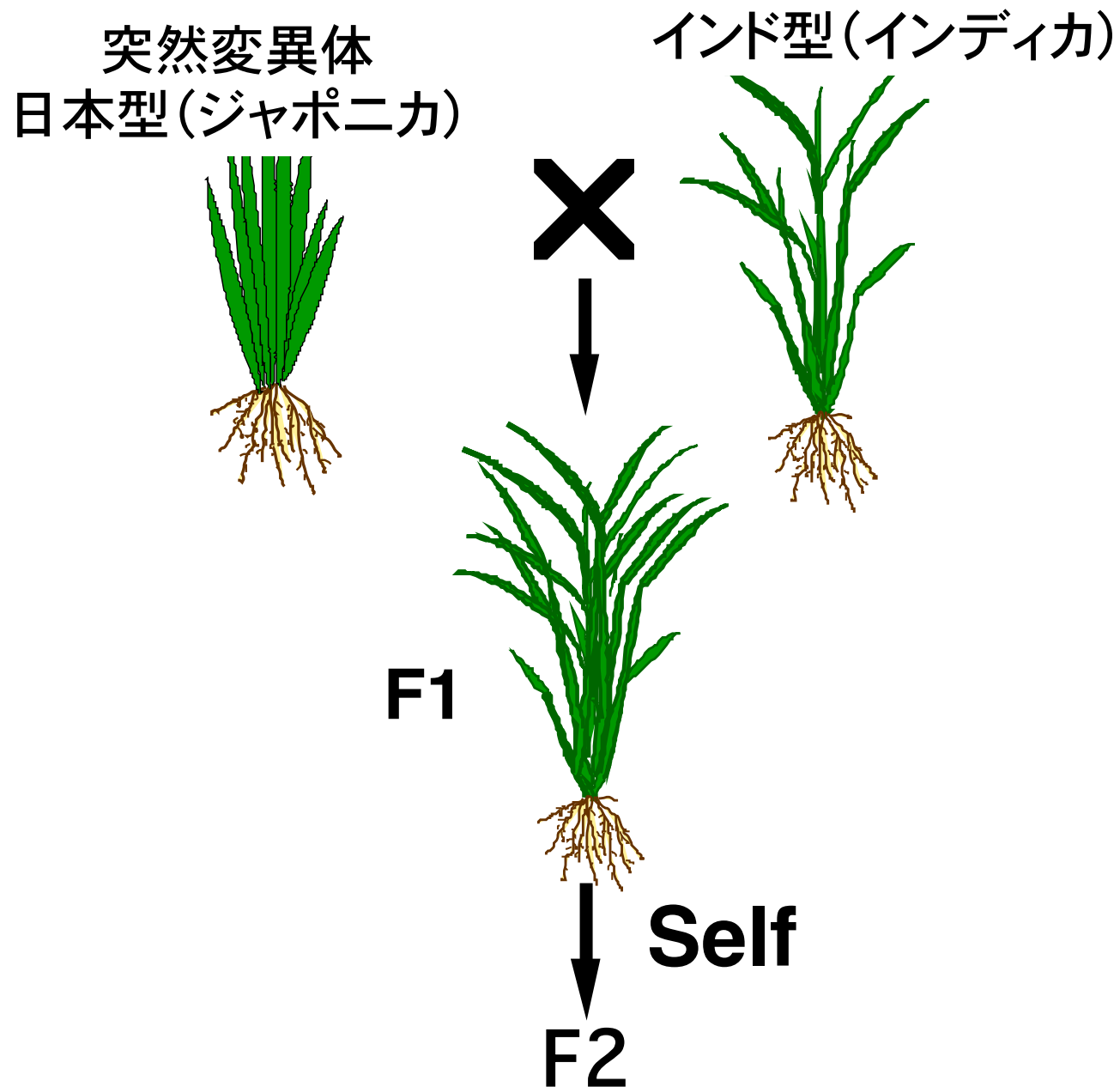


ゲノムの地図作りには分子マーカーが不可欠

分子マーカーとはDNAの塩基配列の違いにより、父方と母方のゲノムに相違が生ずることを利用して、その分子マーカーが存在するゲノム上の位置が父方に由来するか、母方に由来するかを区別する目印である。



連鎖解析を行う際には 遺伝的に少し異なる系統を交配してF2を準備する



分子マーカーの一例

A品種（日本型イネ）のゲノム配列（CAの繰り返しが11回）

ACTGTTTCTGCCTT CACACACACACACACACACACATACGCTATTTATTTGCTTGGT

B品種（インド型イネ）のゲノム配列（CAの繰り返しが18回）

ACTGTTTCTGCCTT CACACACACACACACACACACACACACACACACATACGCTATTTATTTGCTTGT

矢印のプライマーでPCRを行ったら日本晴とカサラスのゲノム間でPCR産物の大きさに差が出る。従って、そのPCR産物を電気泳動にかけ、そのサイズにより分離すれば、今、解析を行っているF2個体のこの配列を持つゲノム位置における遺伝子型（A品種由来か、B品種由来か、両方の親に由来する遺伝子を一つずつもつか）が判定できる。

A品種ホモ



B品種ホモ

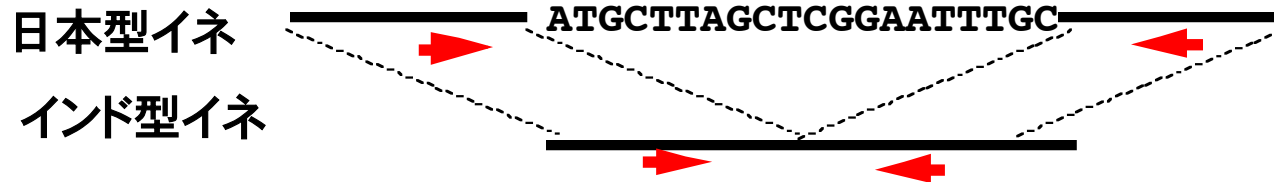


ヘテロ

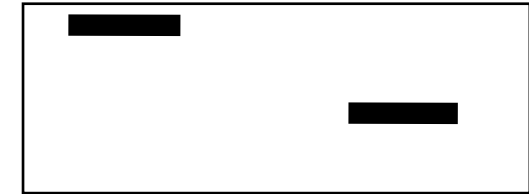


PCRベースマーカーの作出

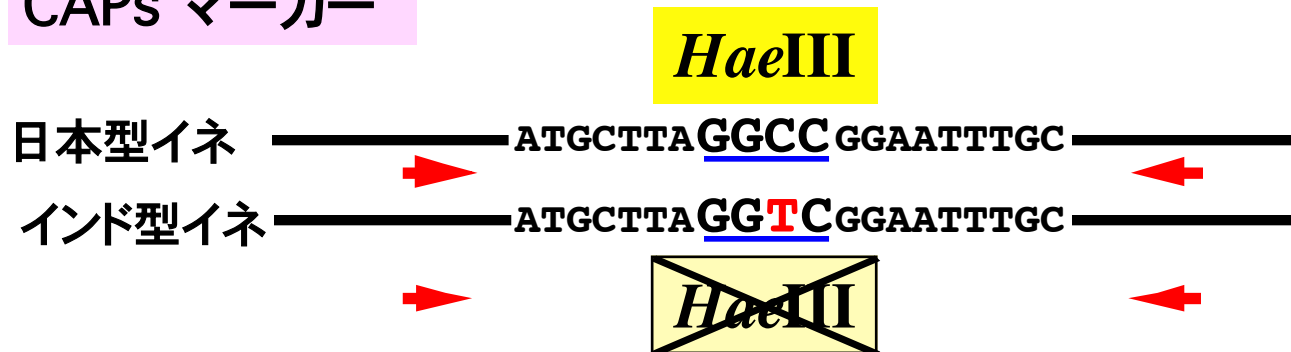
STSマーカー



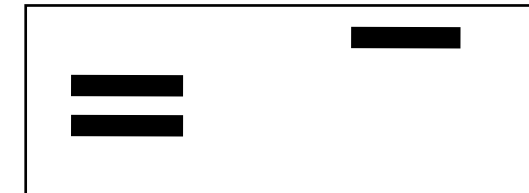
日本型イネ インド型イネ



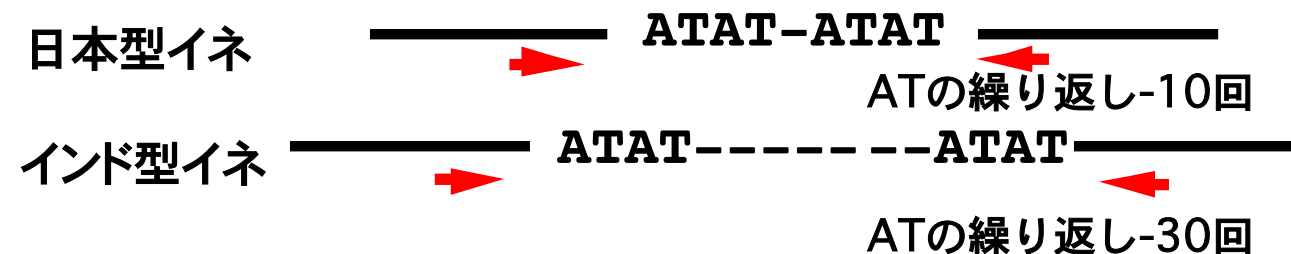
CAPs マーカー



日本型イネ インド型イネ



Microsatellite マーカー



日本型イネ インド型イネ



DNAの変異に基づく様々な分子マーカー

RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism)

SSCP (Simple Strand Conformation polymorphism)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

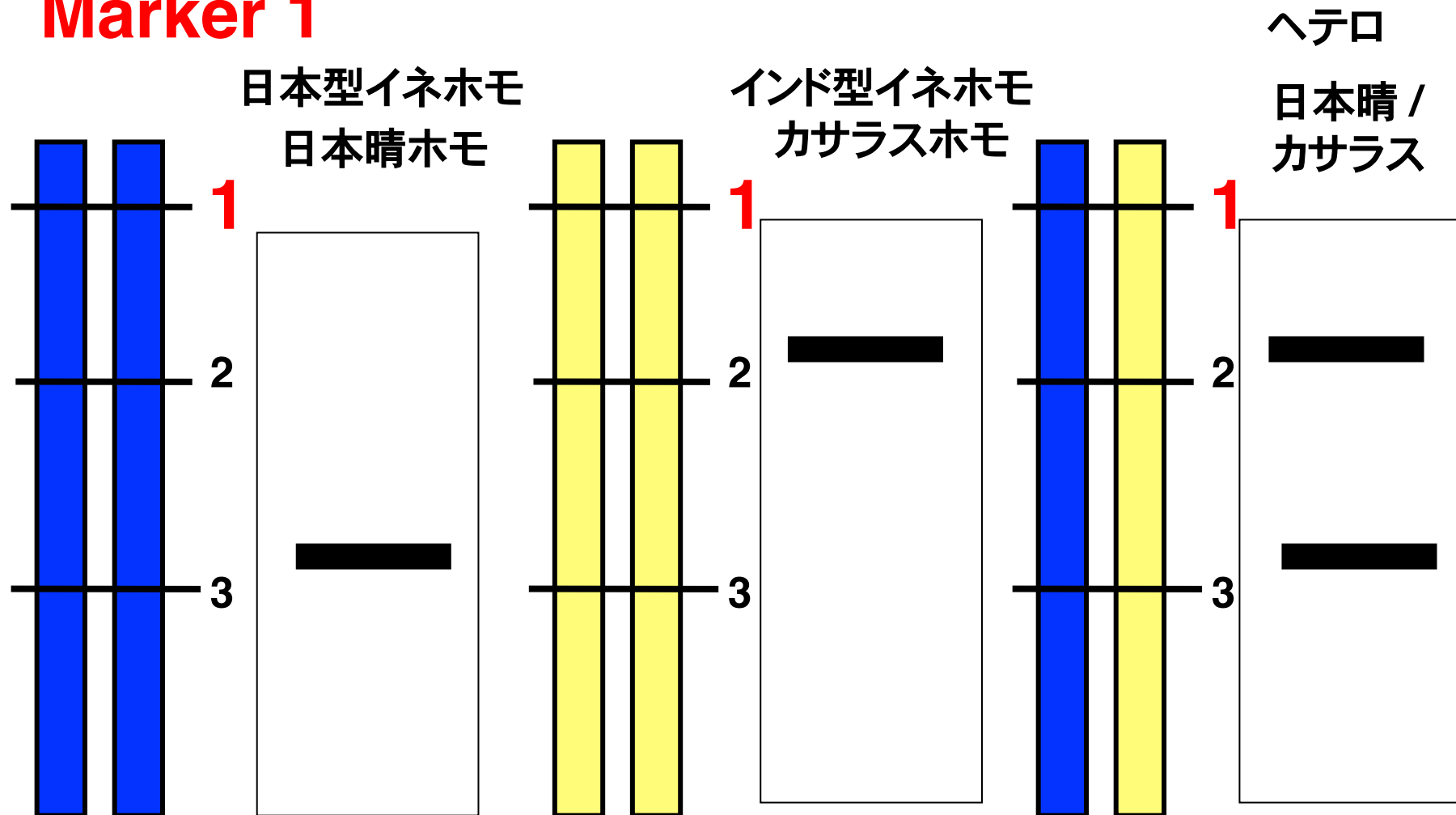
SSR (Simple Sequence Repeat)

STS (Sequences Tag Site)

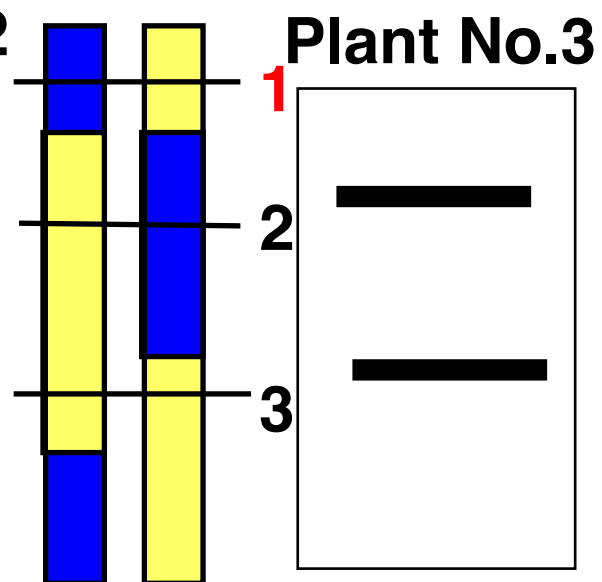
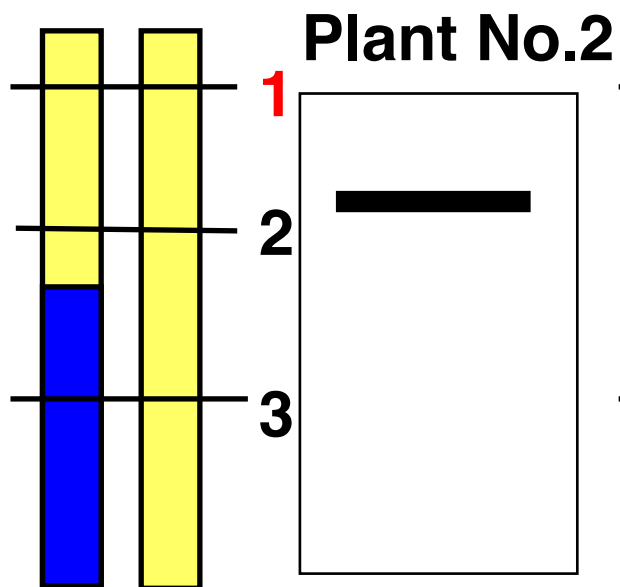
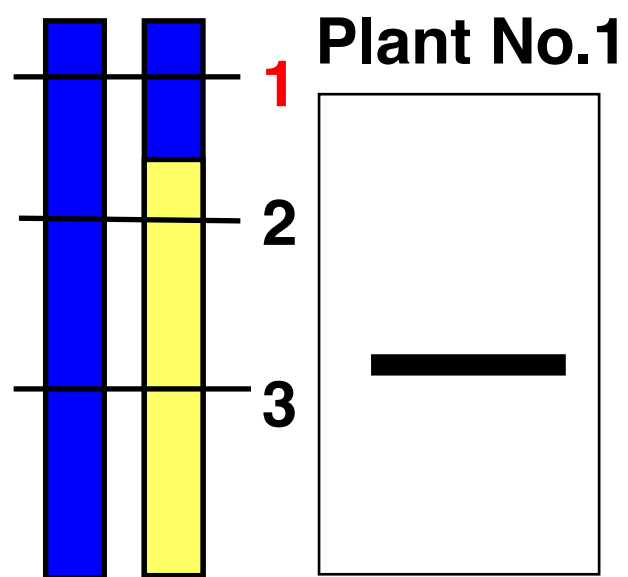
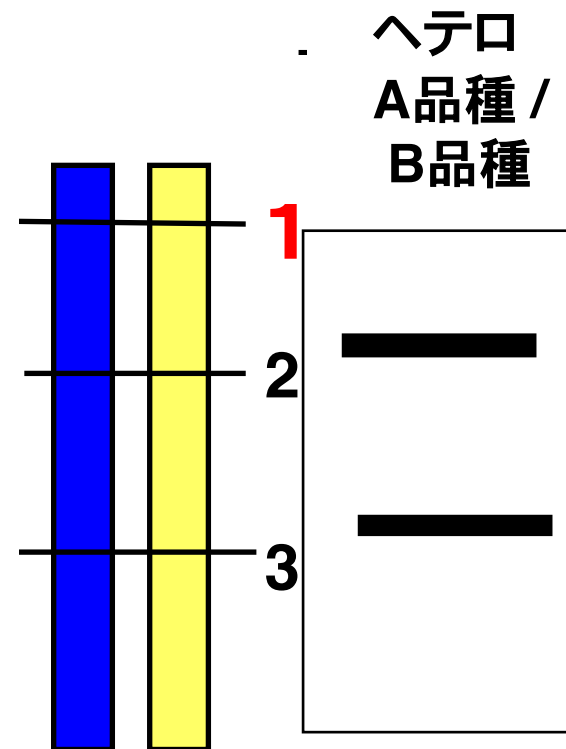
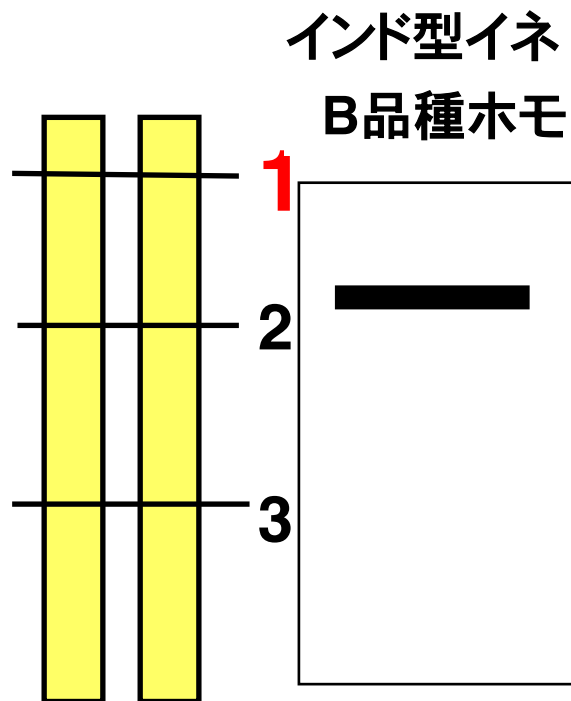
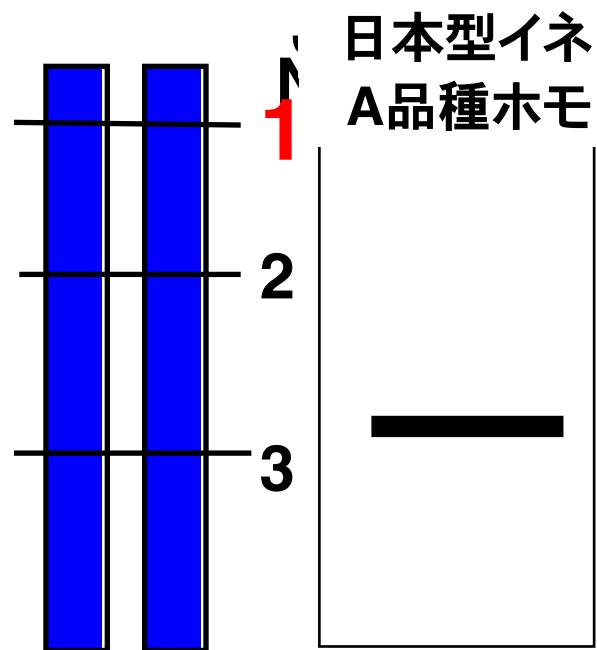
SNPs (Single nucleotide polymorphism)

2つの品種間のDNA多型が分子マーカーになる

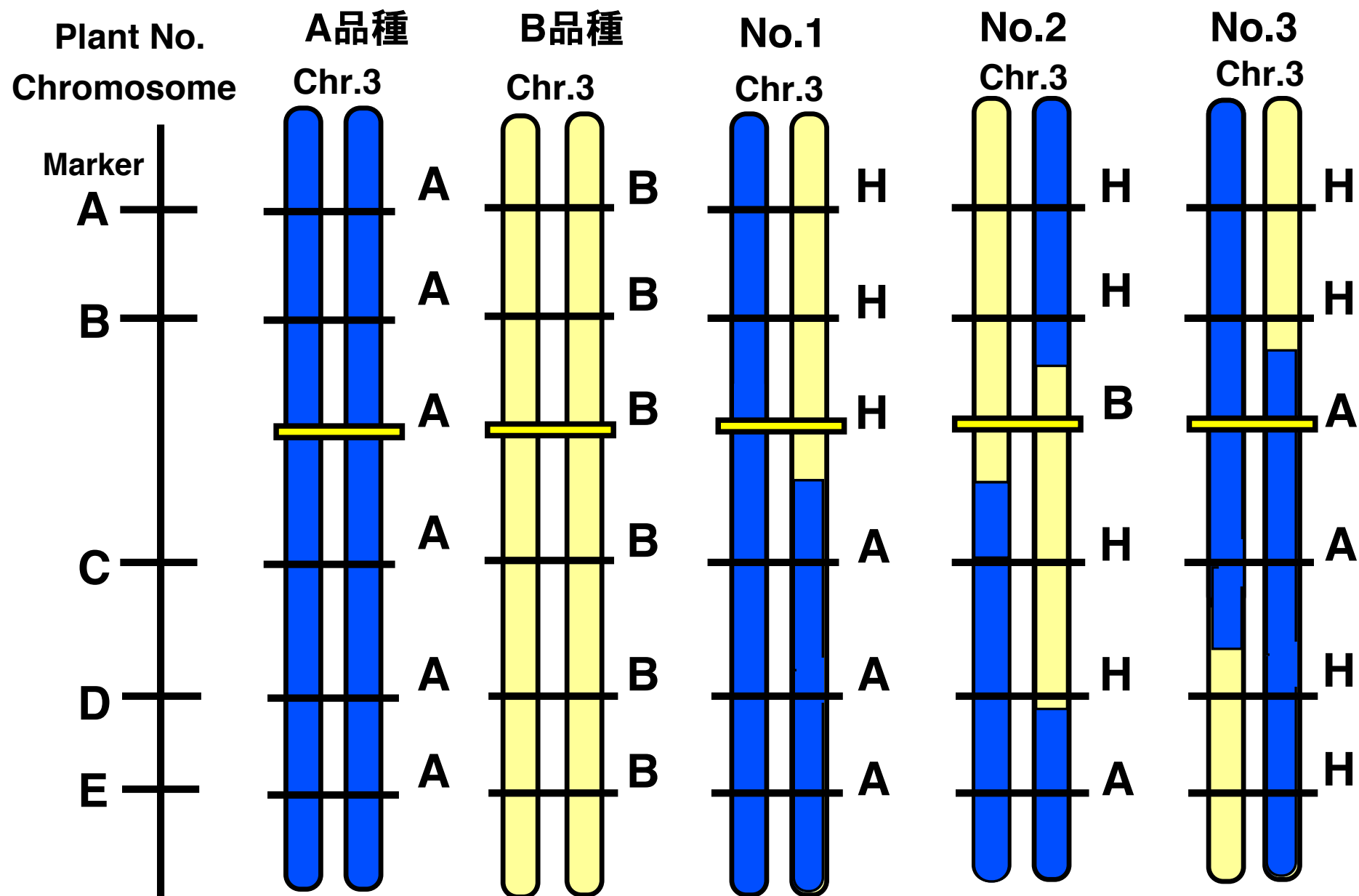
Marker 1



Marker 1

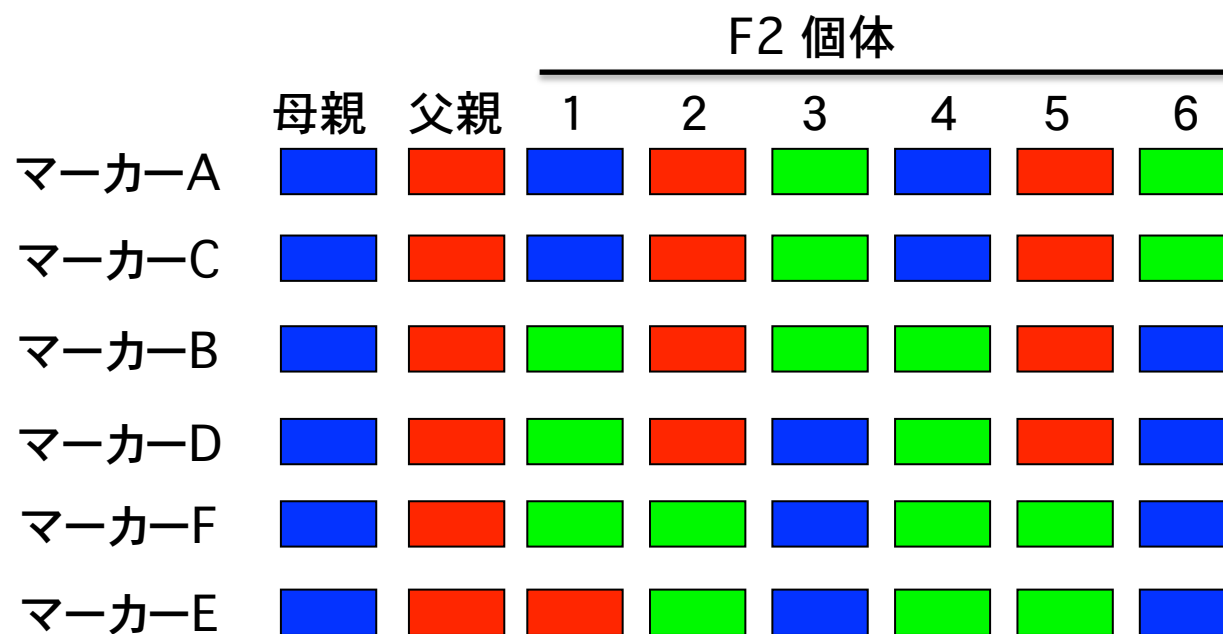
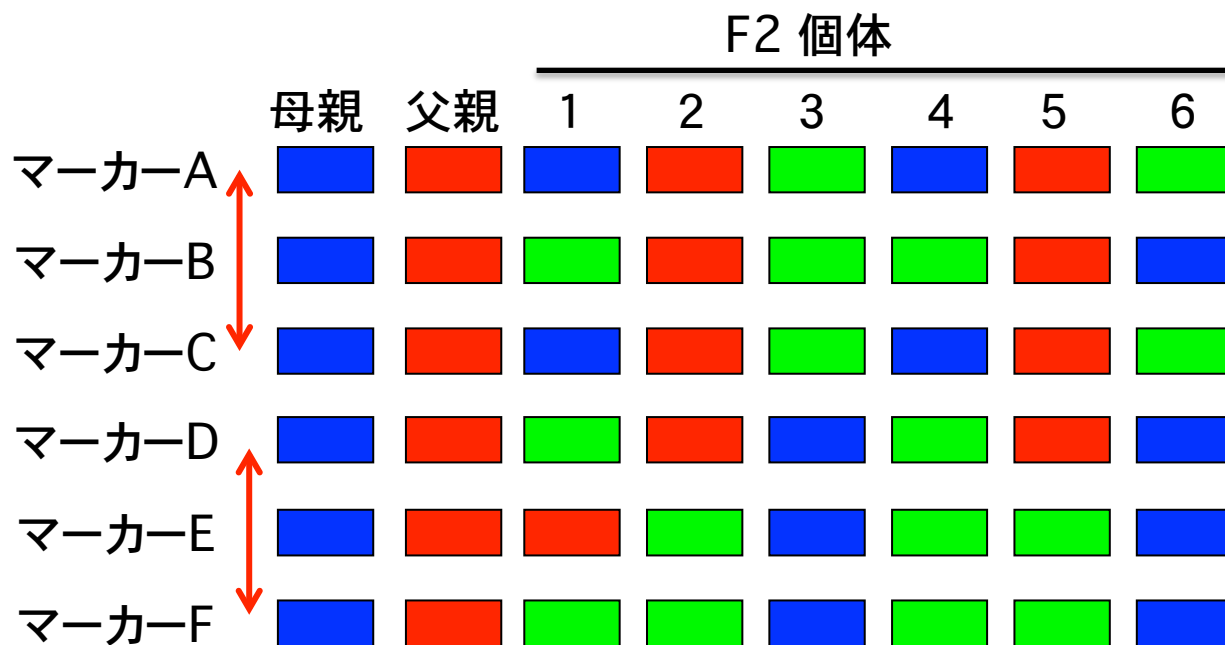
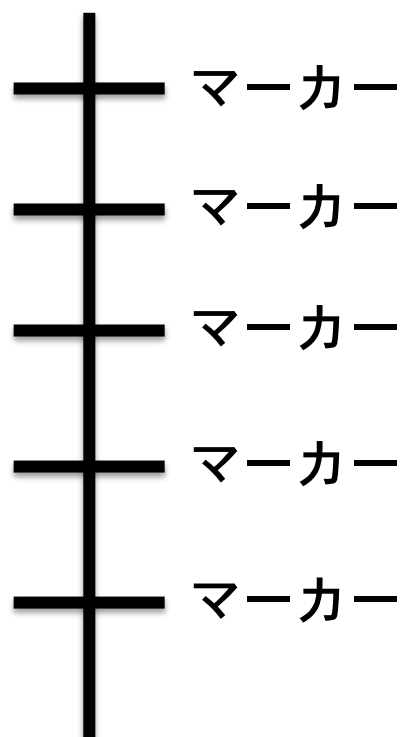


位置関係の分かっているマーカーが複数あれば、それぞれのF2個体がどのようなゲノム構造を持っているかが分かる

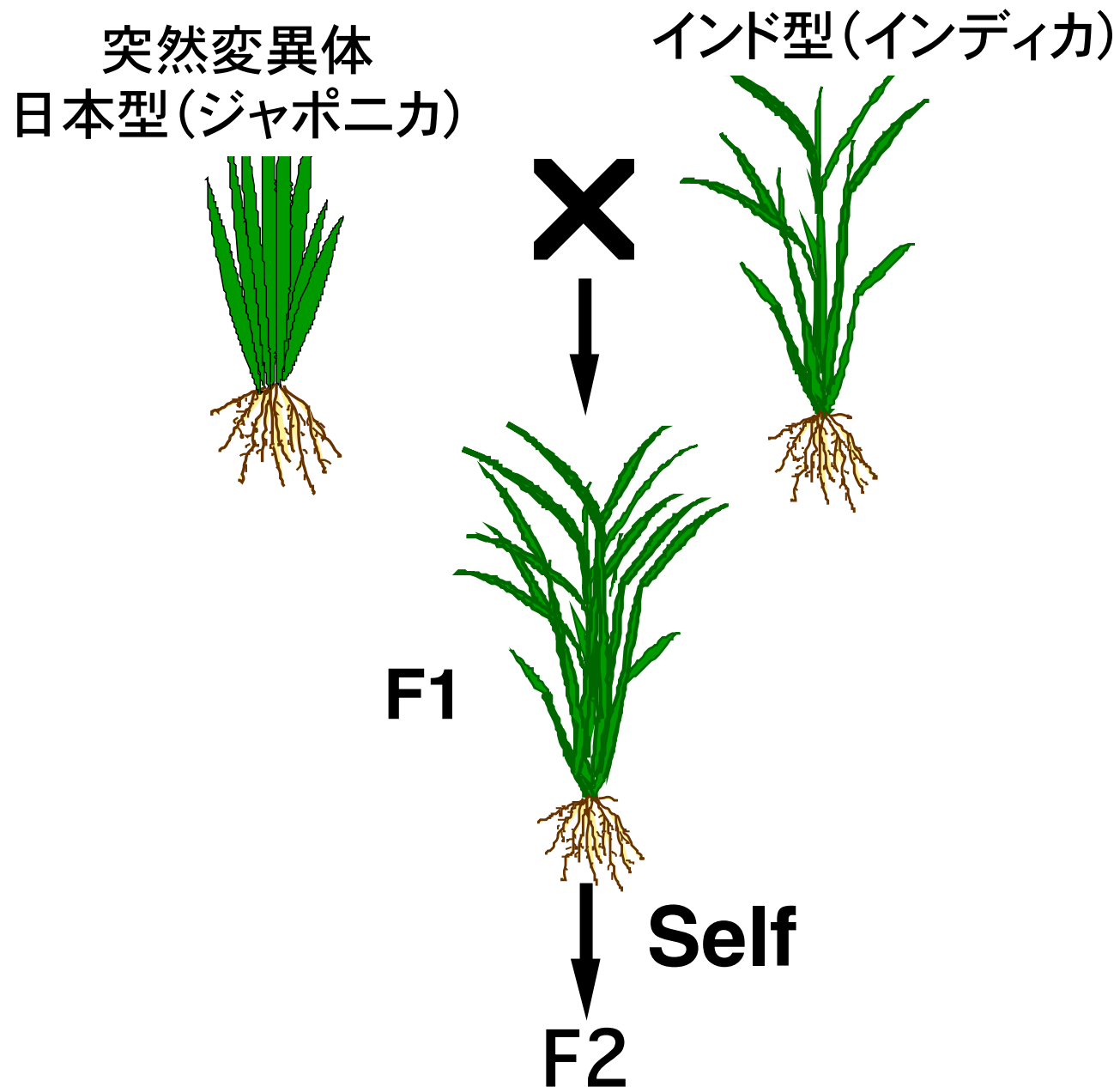




分子マーカー
(A~F)の並びは?



連鎖解析を行う際には 遺伝的に少し異なる系統を交配してF2を準備する



F2では表現型が1 : 3に分離する

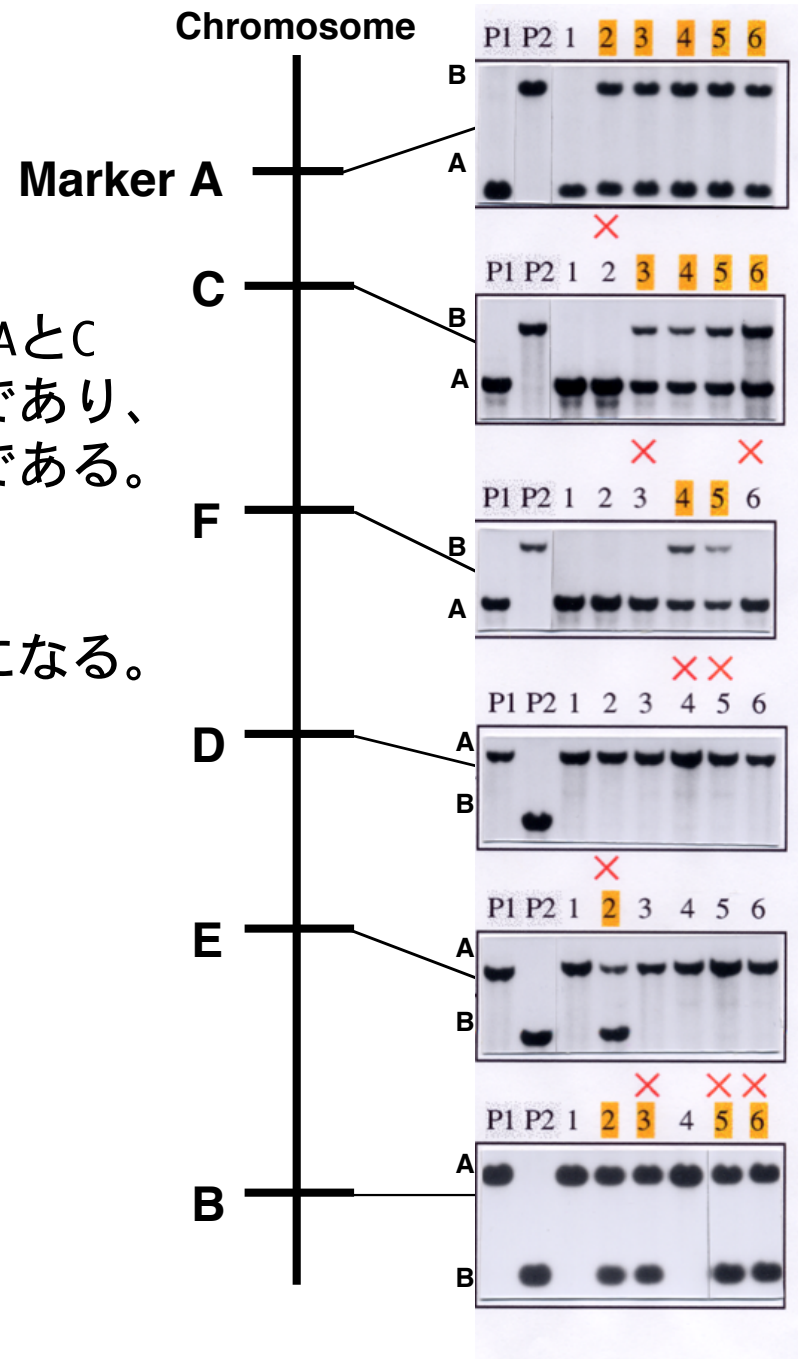


d1/d1

d1/D1 or D1/D1

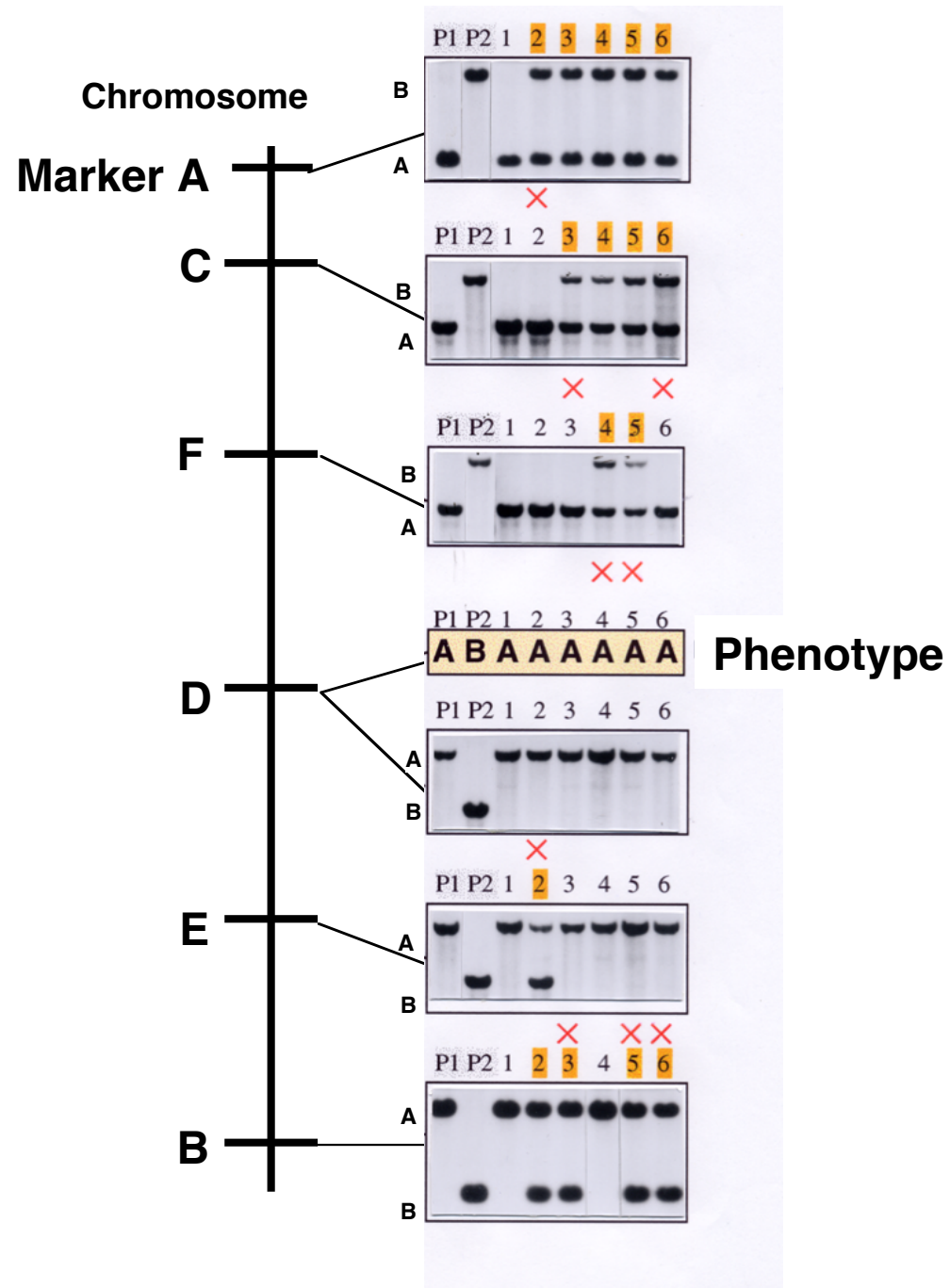
分子マーカーによる 連鎖解析

左のDNA多型解析の結果、マーカーAとC
の間でゲノムが交差した個体は2であり、
CとF間で組み替えた個体は3，6である。
同様に、FとD間では4，5
DとE間では2
EとB間では3，5，6ということになる。

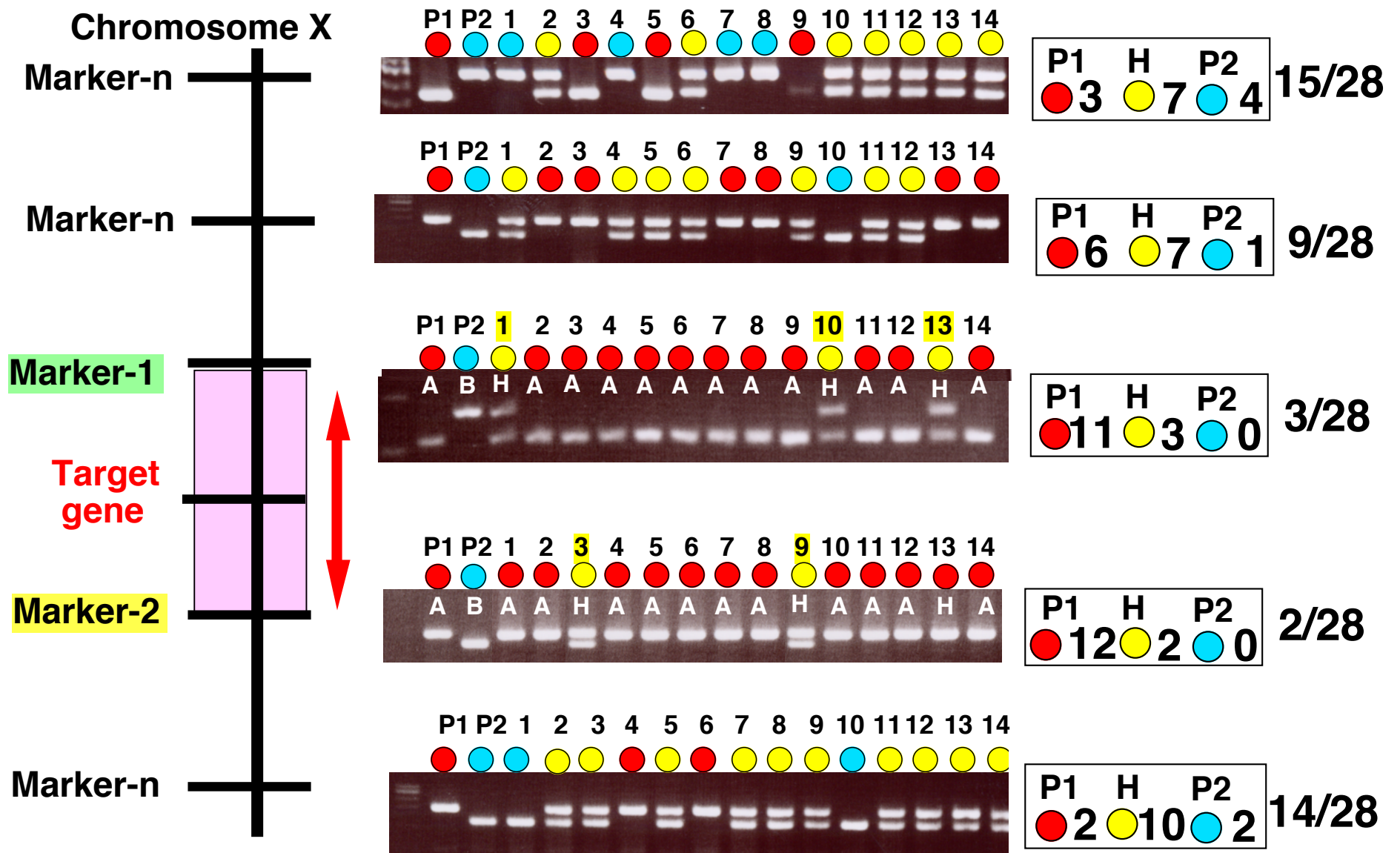


遺伝子のマッピング

通常、我々が変異体を作成し解析する際は日本型イネを用いるのが普通である。従って、そのような変異体を元にインド型イネと交配しF2分離集団を遺伝解析に用いる場合、F2変異型個体は、目的としている遺伝子座について日本型のアリルを持つことになる。これは、目的遺伝子と分子マーカーとの連鎖を考えた場合、F2変異型個体の全てについて分子マーカーが日本型のアリルを示す近傍にその遺伝子が位置することを意味している。



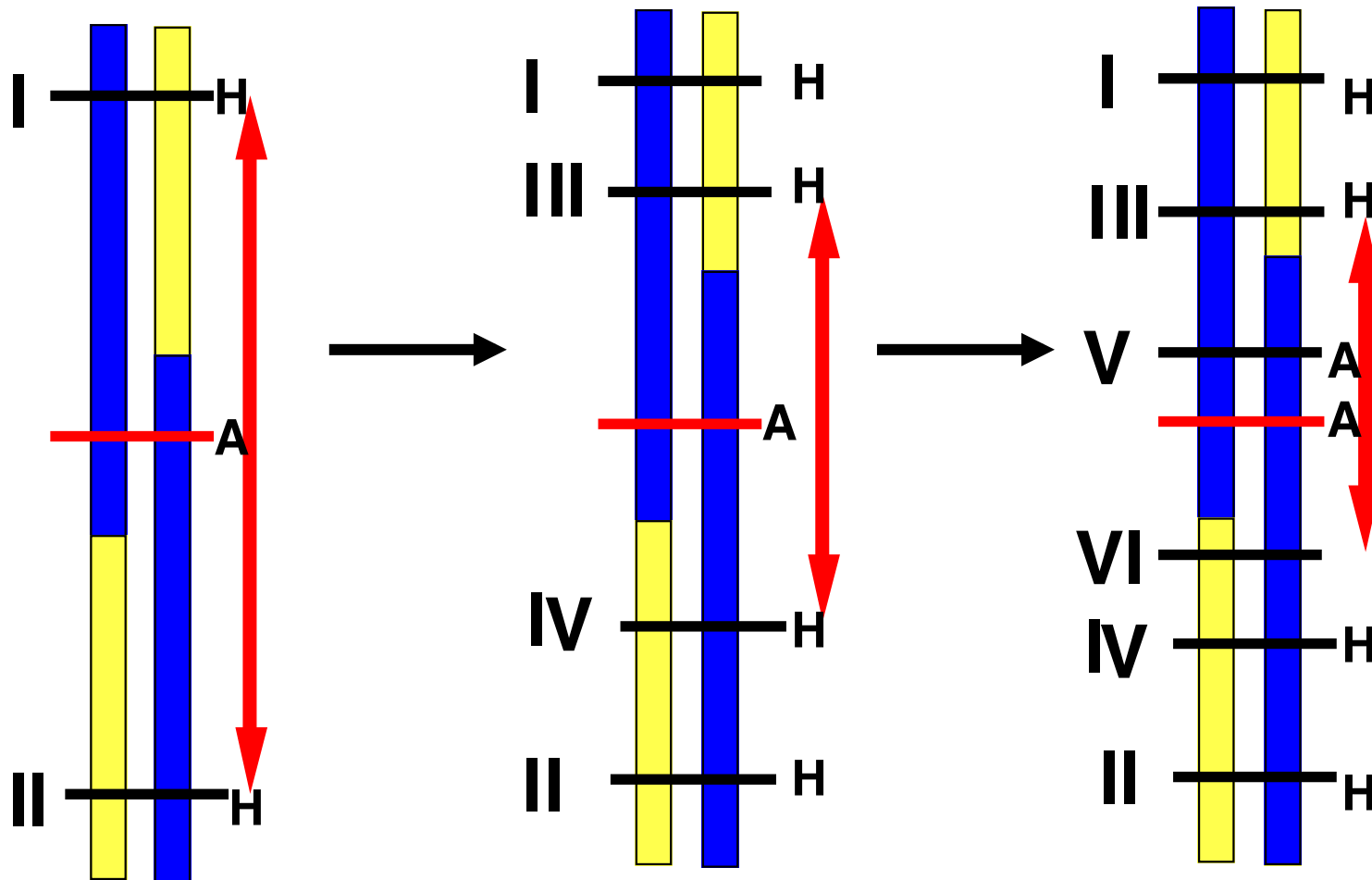
High throughput DNA mapping system



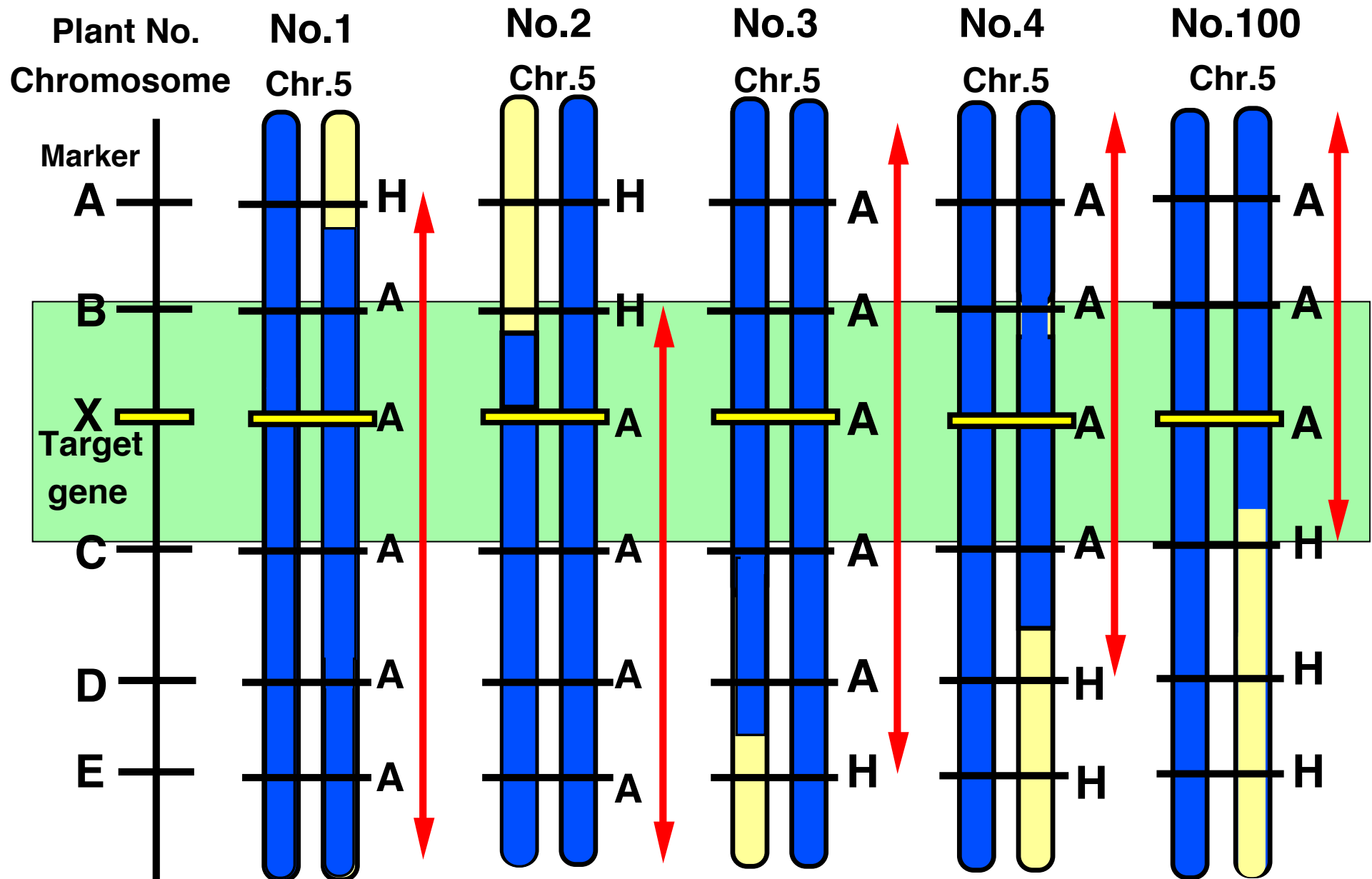
分子マーカーで遺伝子の候補領域を狭めていくことができる

Example: Target locus is japonica homozygote

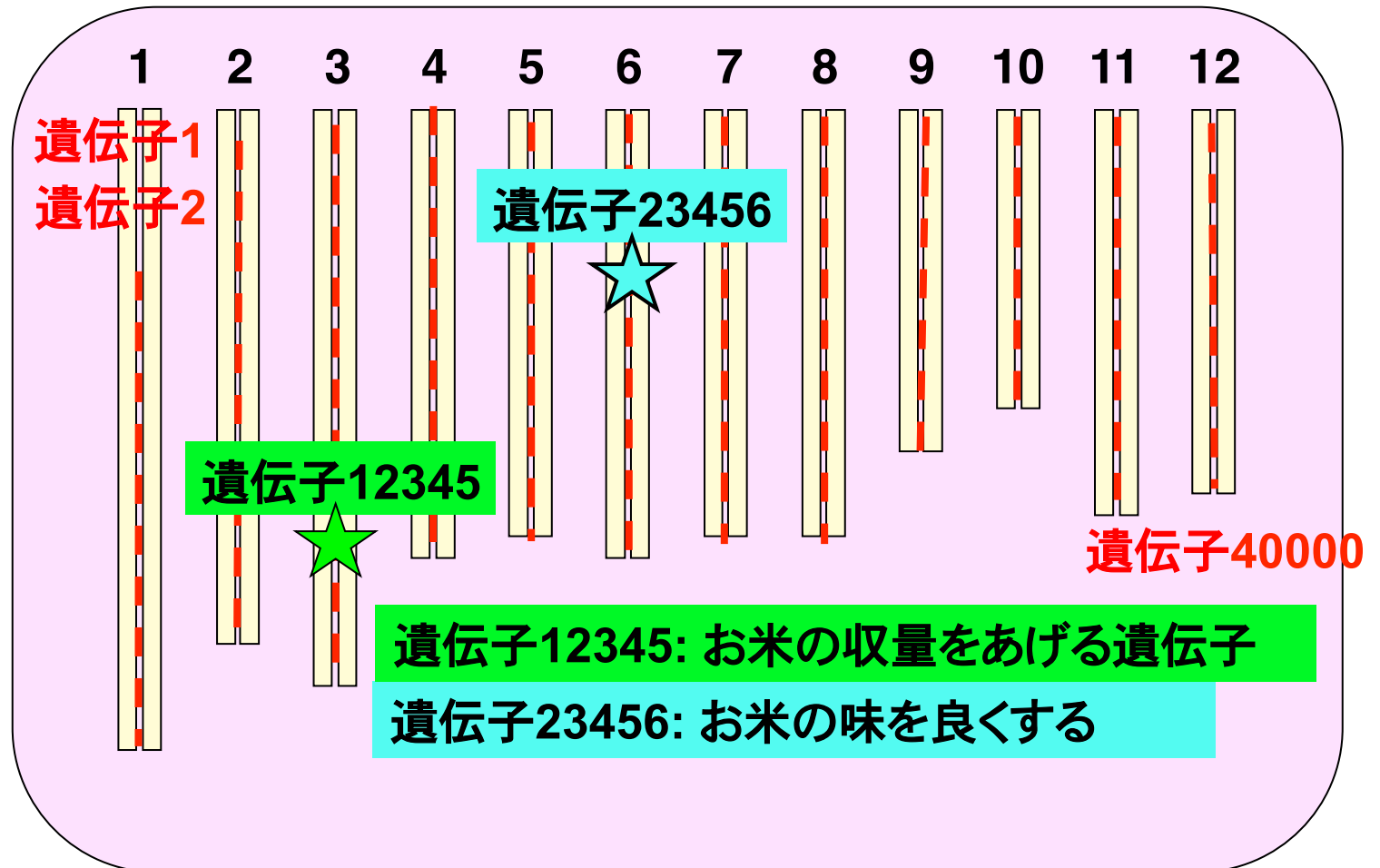
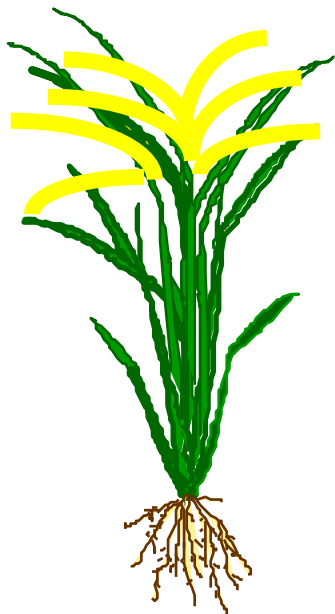
Chr.5 of No.1 Plant



遺伝子マッピング



イネのDNAには約4万個の遺伝子がある



F2では表現型が1 : 3に分離する

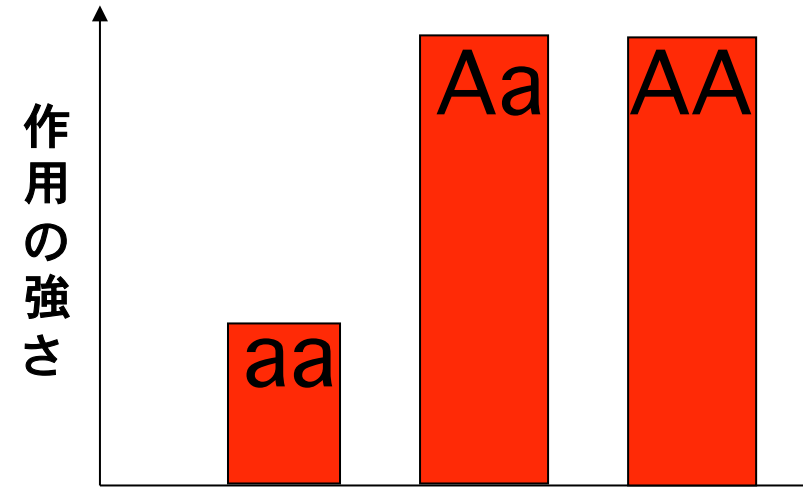


d1/d1 *d1/D1 or D1/D1*

形質には質的形質と量的形質がある

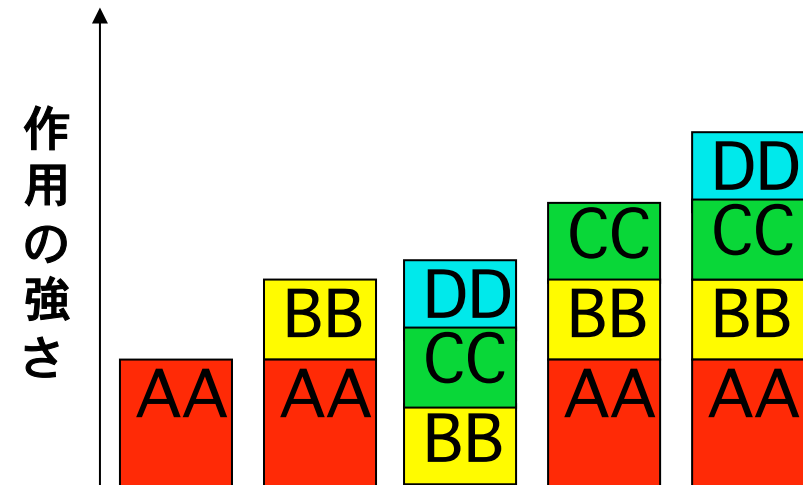
質的形質

一つまたは少数の
遺伝子で決定される
形質



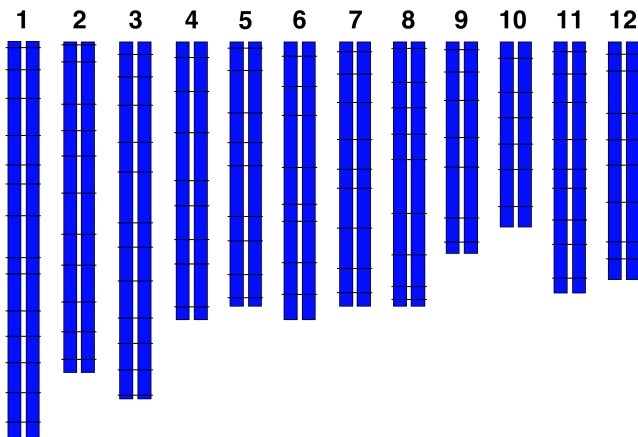
量的形質

似た作用を持つ多くの
遺伝子の相互作用で
決定される形質

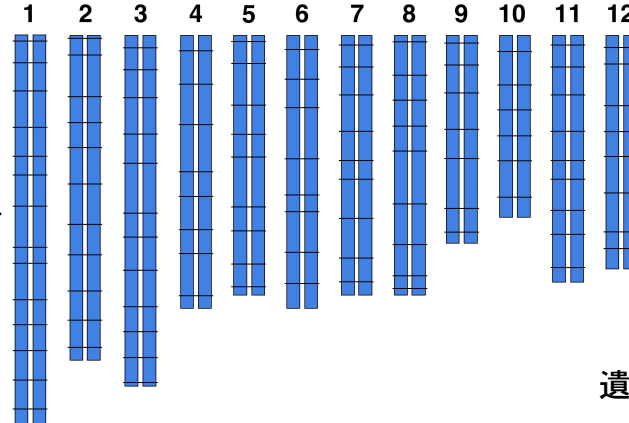


遺伝的多様性

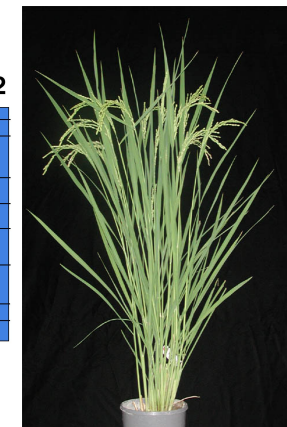
d1変異体(ジャポニカ)



遺伝的に少し遠い品種

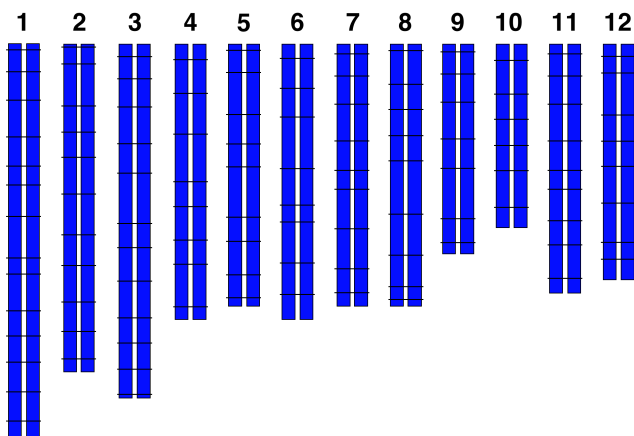


×

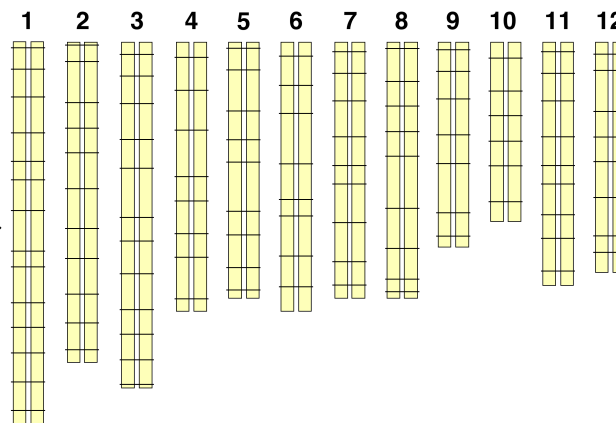


遺伝的に少し遠い品種

d1変異体(ジャポニカ)



遺伝的に遠い品種



×



遺伝的に遠い品種



d1変異体



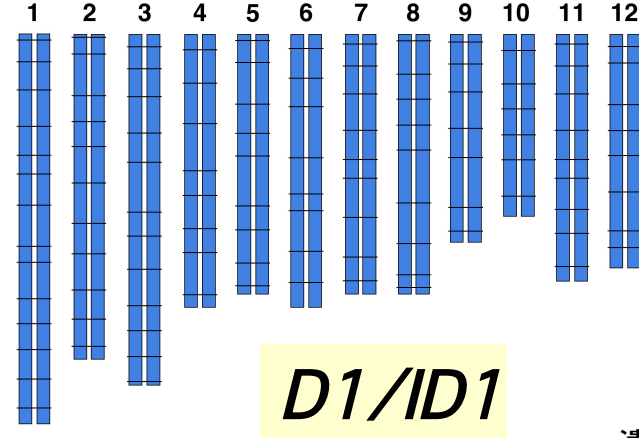
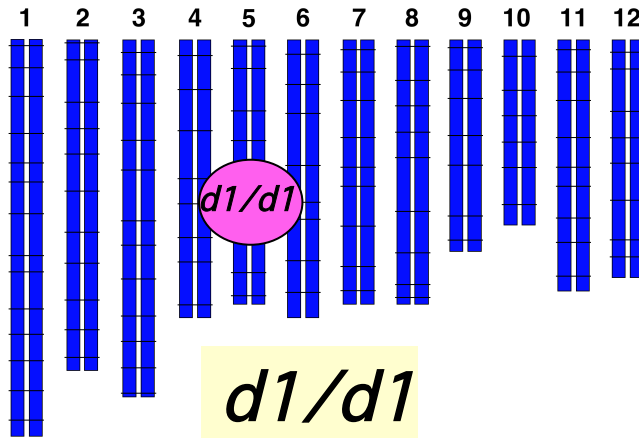
d1変異体

***d1*変異体 (ジャポニカ)**

遺伝的に少し遠い品種



*d1*変異体

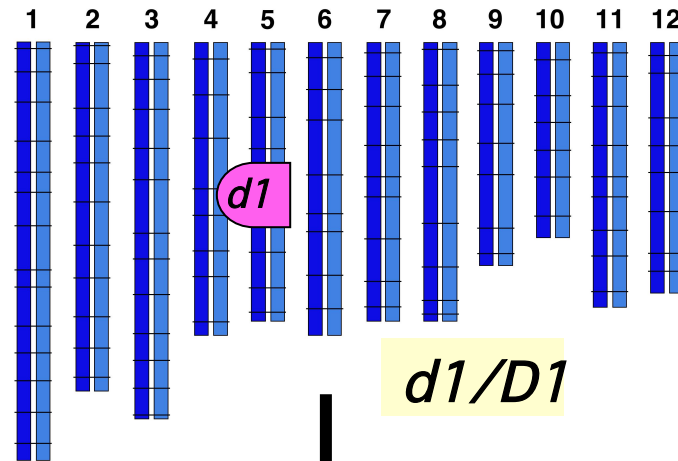


遺伝的に少し遠い品種

×



F1



F2

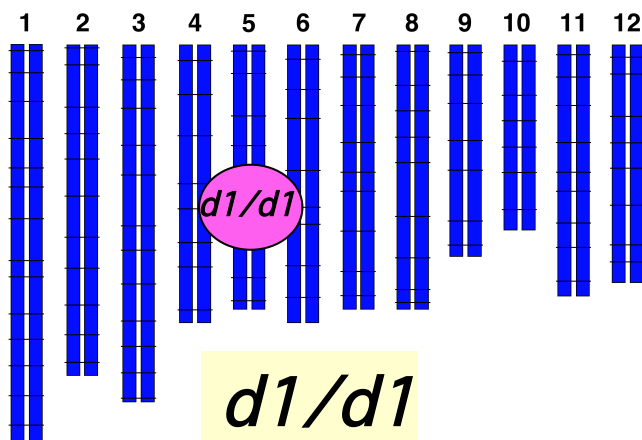


***d1*変異体(ジャポニカ)**

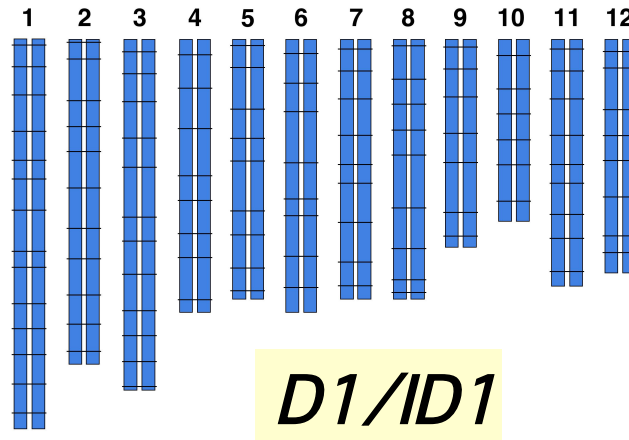
遺伝的に少し遠い品種



*d1*変異体

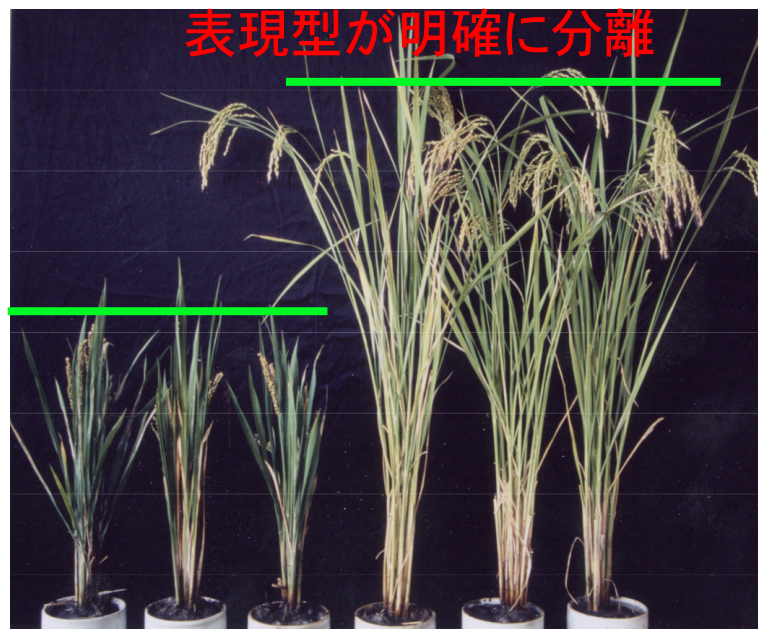


×



遺伝的に少し遠い品種

F₂

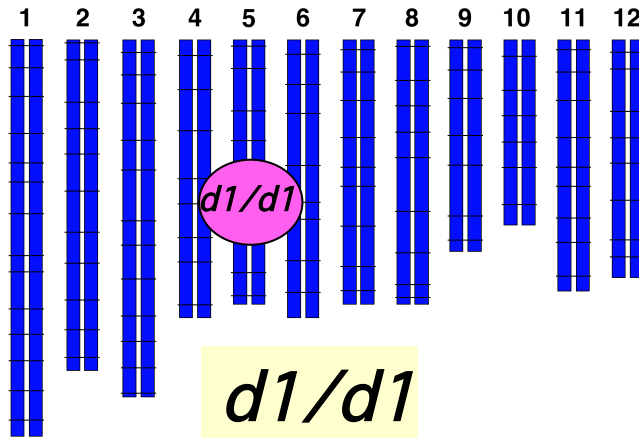


*d1*変異体(ジャポニカ)

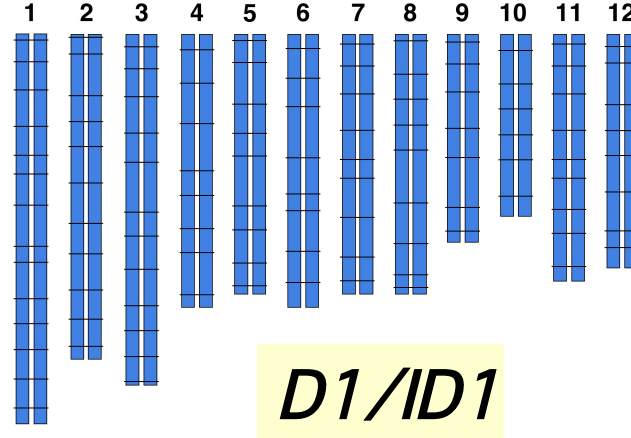
遺伝的に少し遠い品種



*d1*変異体



×



遺伝的に少し遠い品種

F₂

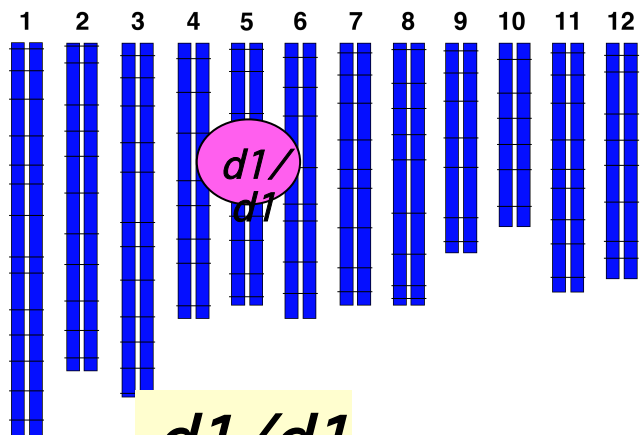


分離比=1:3

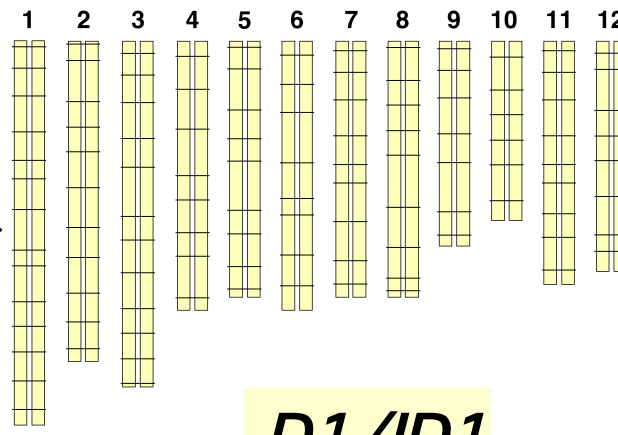


*d1*変異体

*d1*変異体(ジャポニカ)



遺伝的に遠い品種

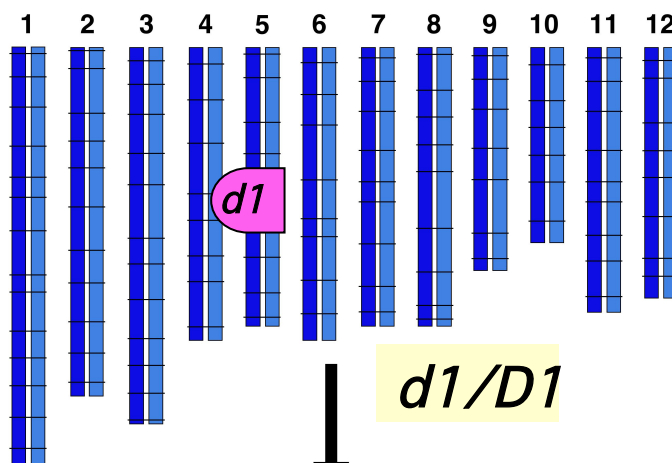


遺伝的に遠い品種

×



F₁



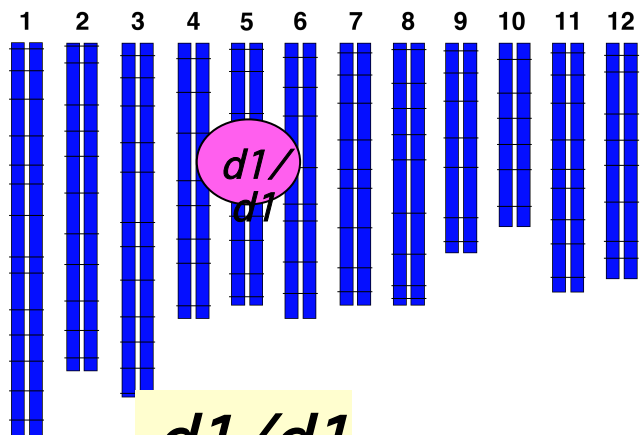
F₂





*d1*変異体

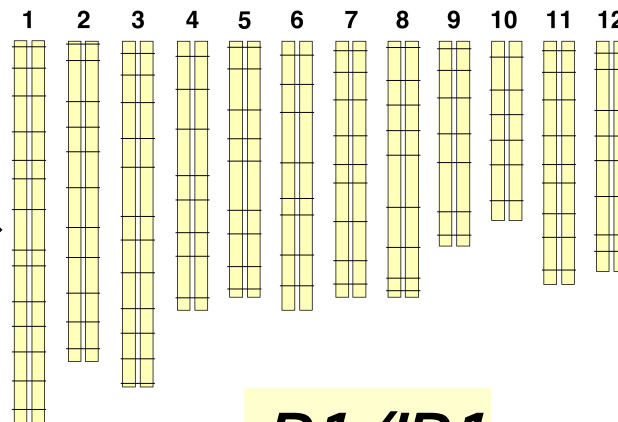
*d1*変異体(ジャポニカ)



d1/d1

×

遺伝的に遠い品種



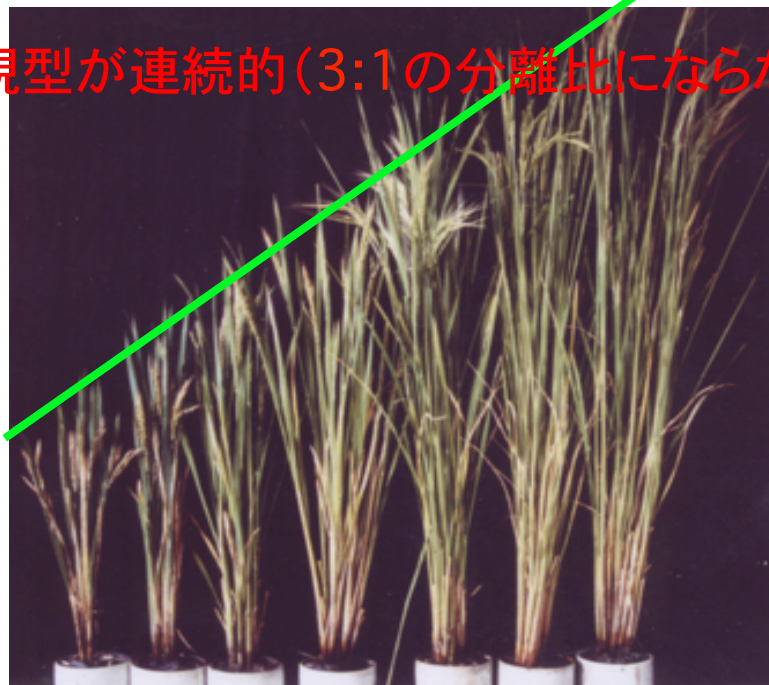
D1/ID1



遺伝的に遠い品種

F₂

表現型が連続的(3:1の分離比にならない)



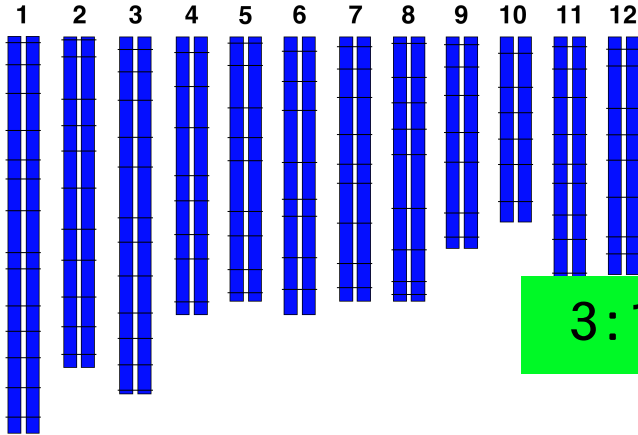
遺伝的多様性

*d1*変異体(ジャポニカ)

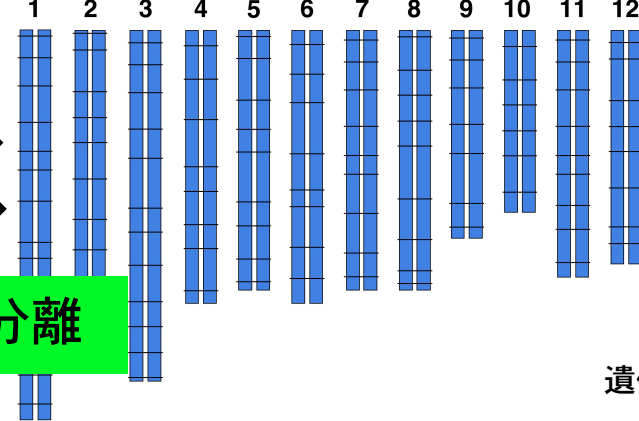
遺伝的に少し遠い品種



*d1*変異体



×



3:1に分離



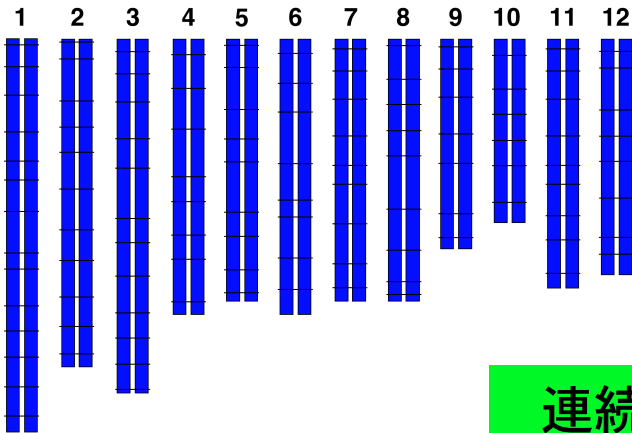
遺伝的に少し遠い品種

*d1*変異体(ジャポニカ)

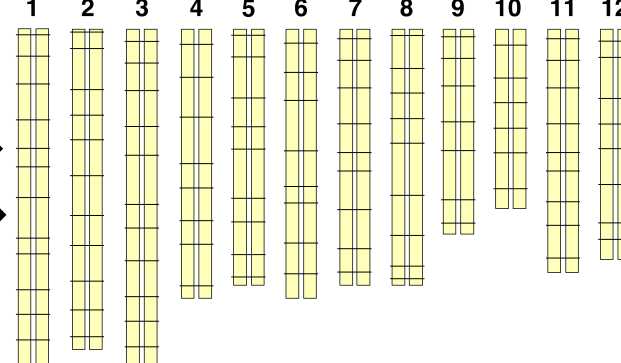
遺伝的に遠い品種



*d1*変異体



×

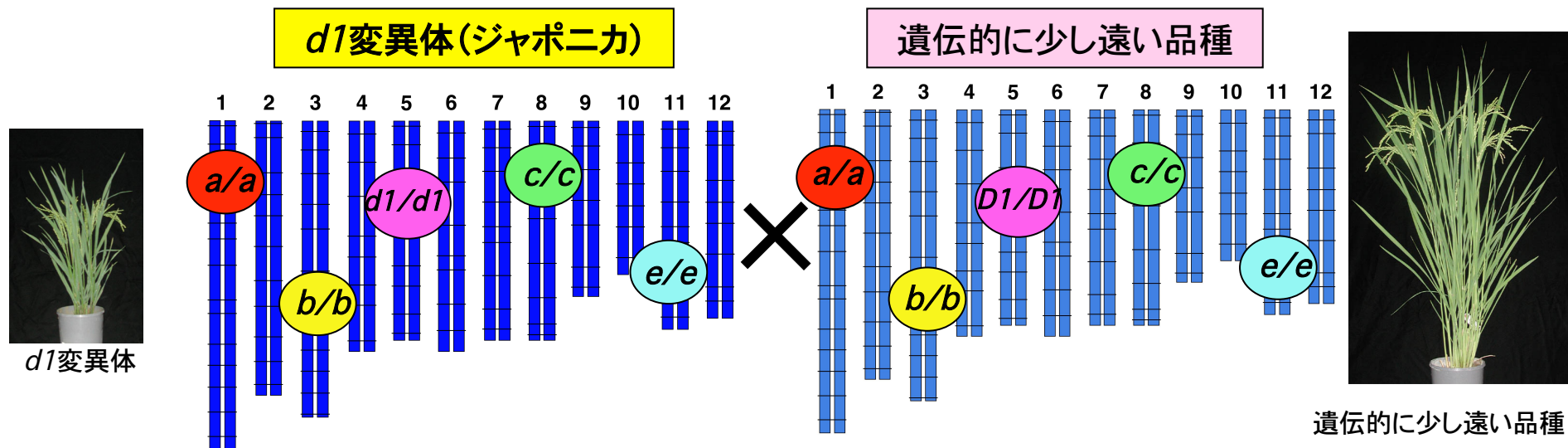


連続的に分離

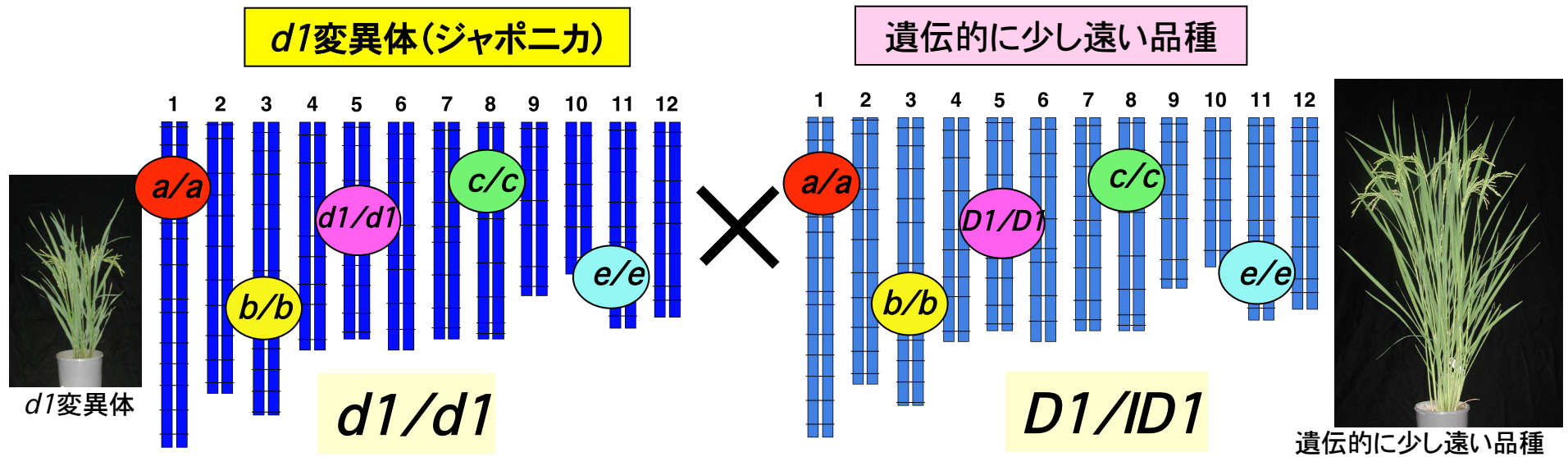


遺伝的に遠い品種

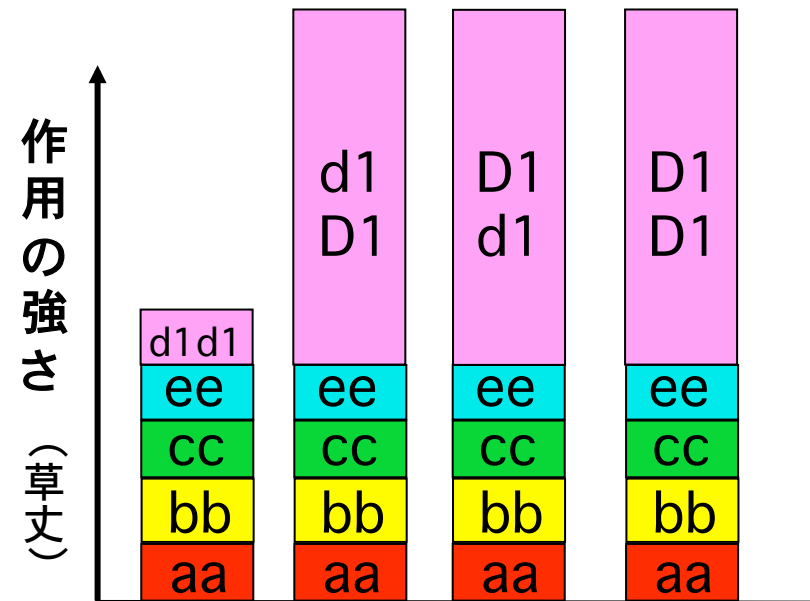
F2で表現型が3:1になる理由



F2で表現型が3:1になる理由



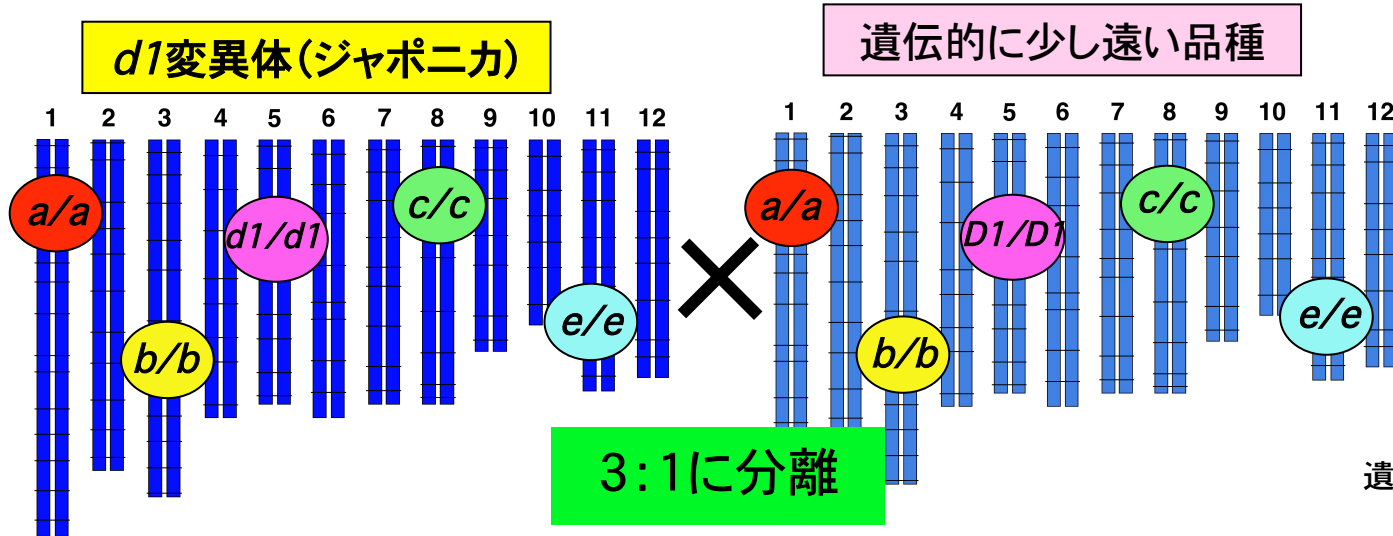
F2



F2で表現型が3:1になるか連続的になるか？



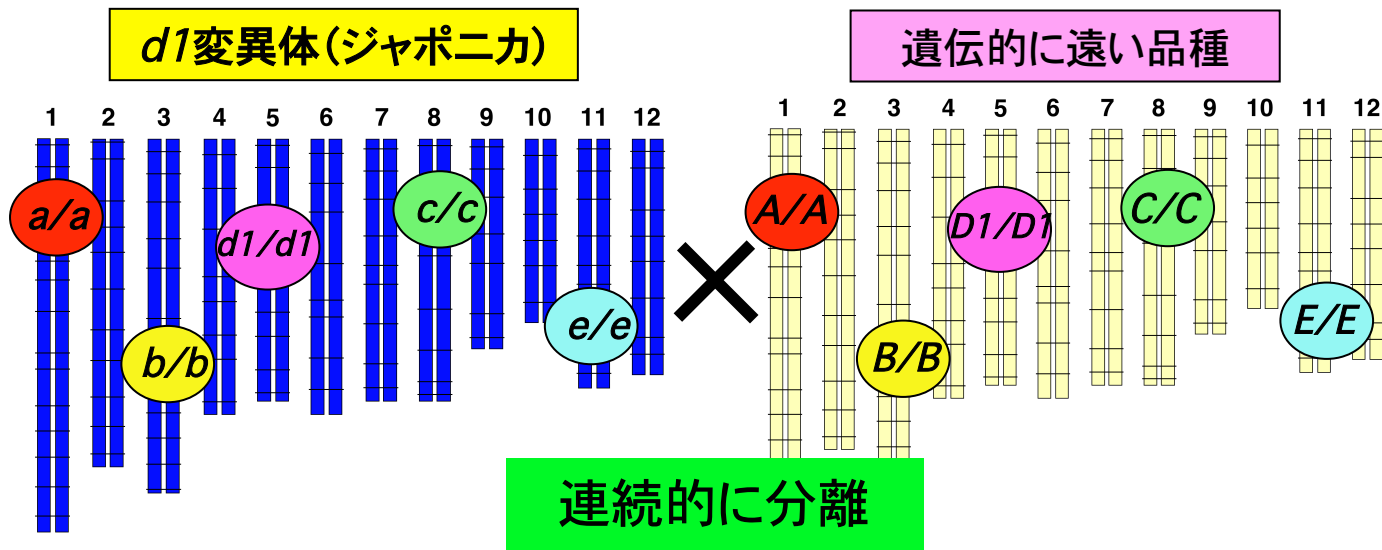
d1変異体



遺伝的に少し遠い品種

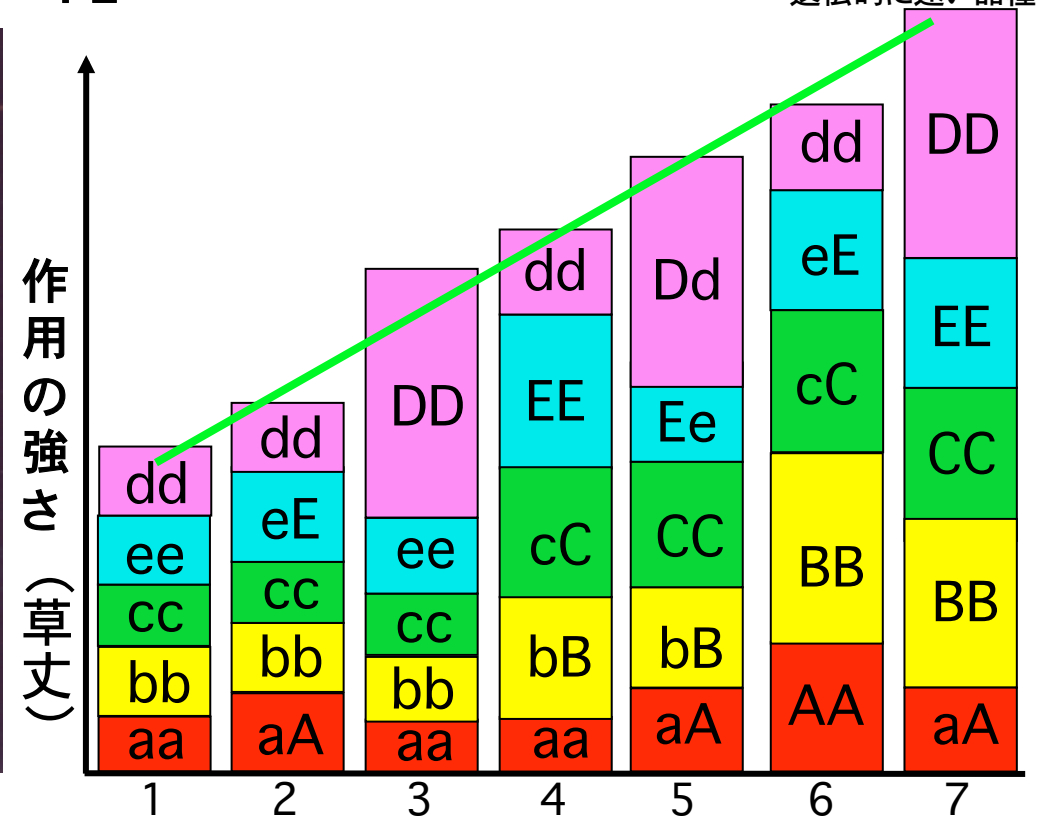
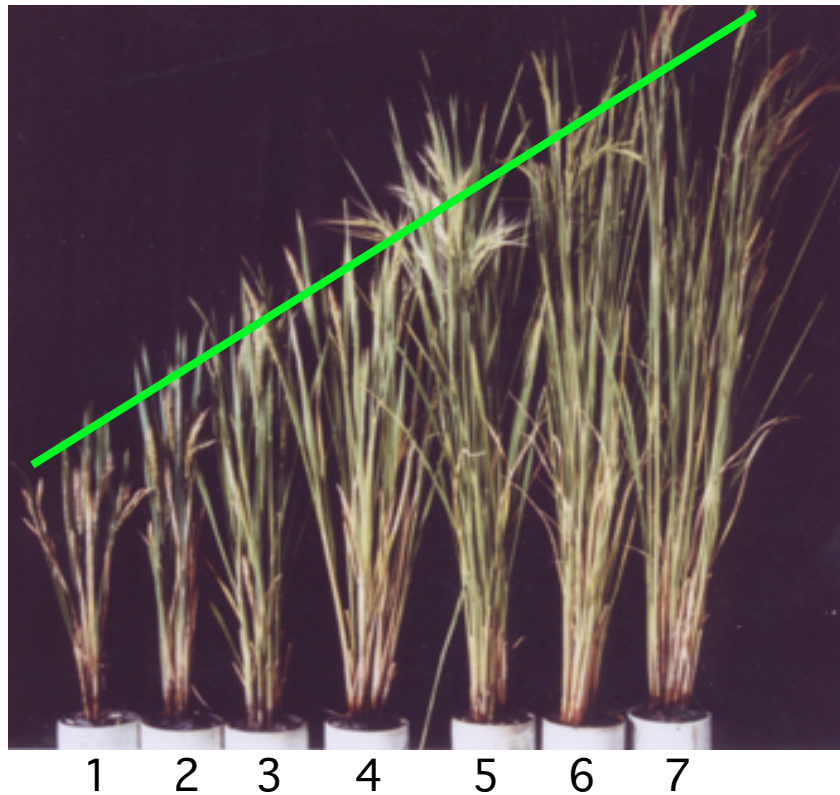
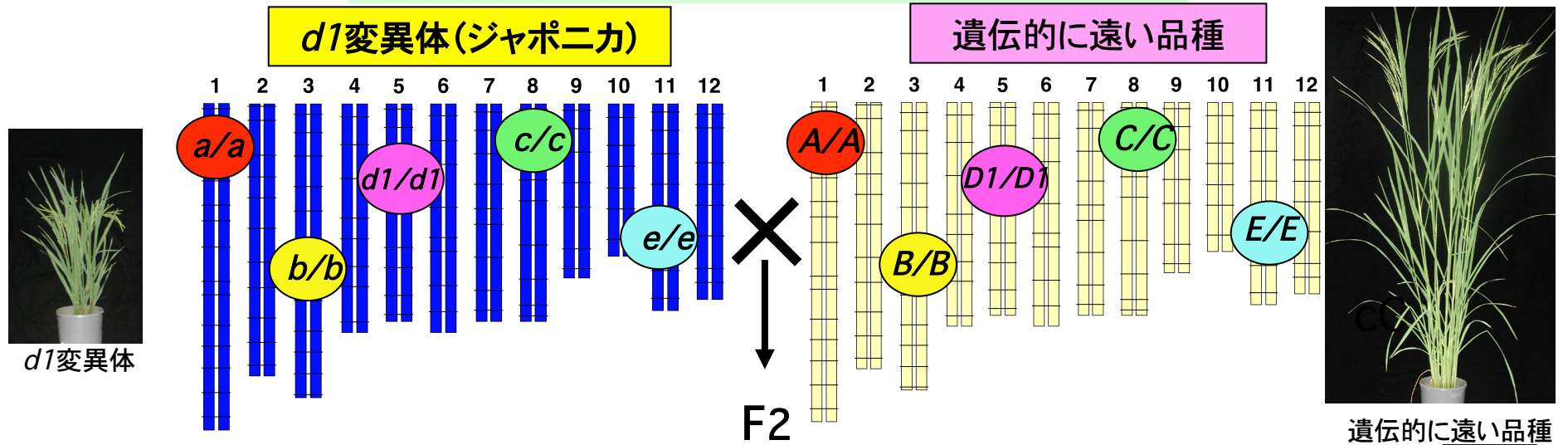


d1変異体



遺伝的に遠い品種

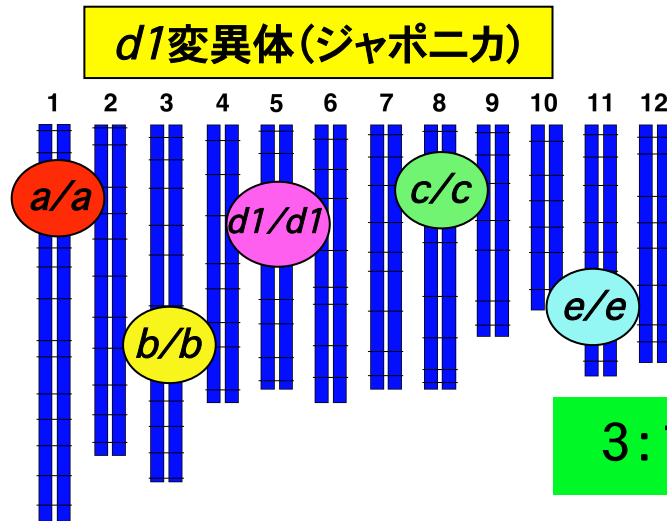
F2で表現型が連続的になる理由



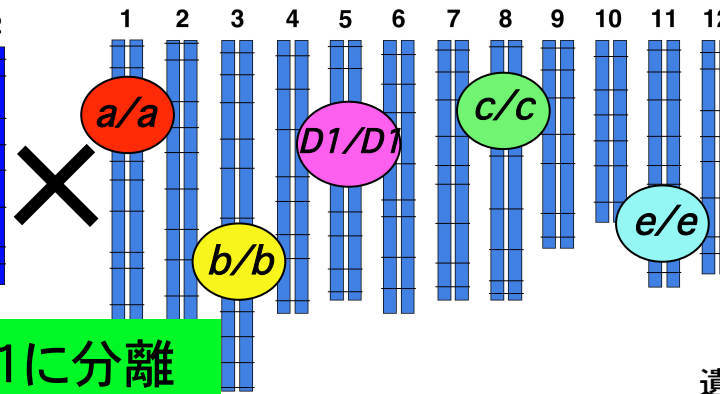
F2で表現型が3:1になるか連続的になるか？



d1変異体



遺伝的に少し遠い品種



3:1に分離

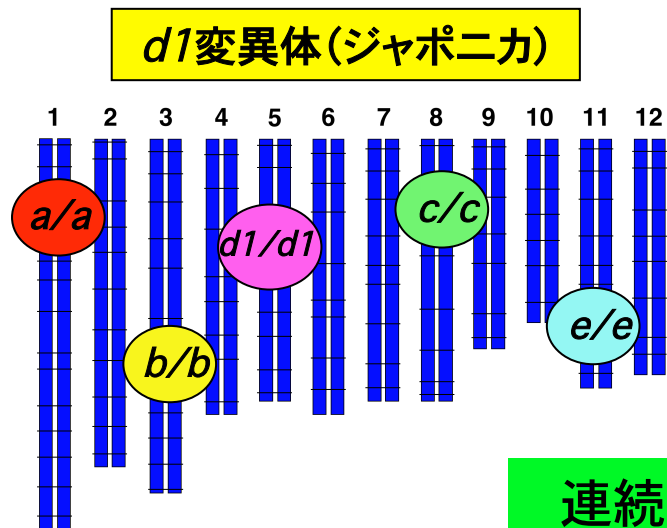


遺伝的に少し遠い品種

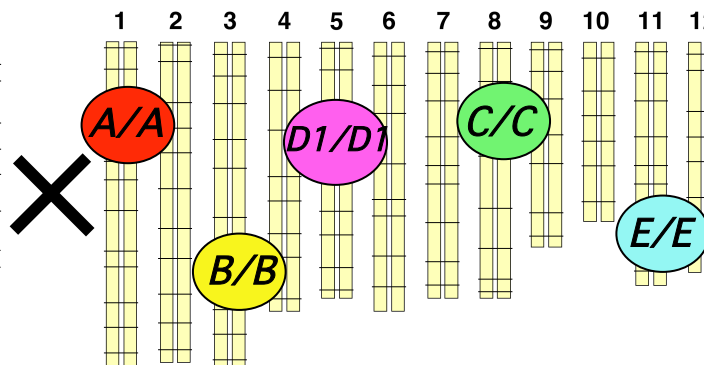
栽培種間の遺伝的多様性が存在



d1変異体



遺伝的に遠い品種



連続的に分離

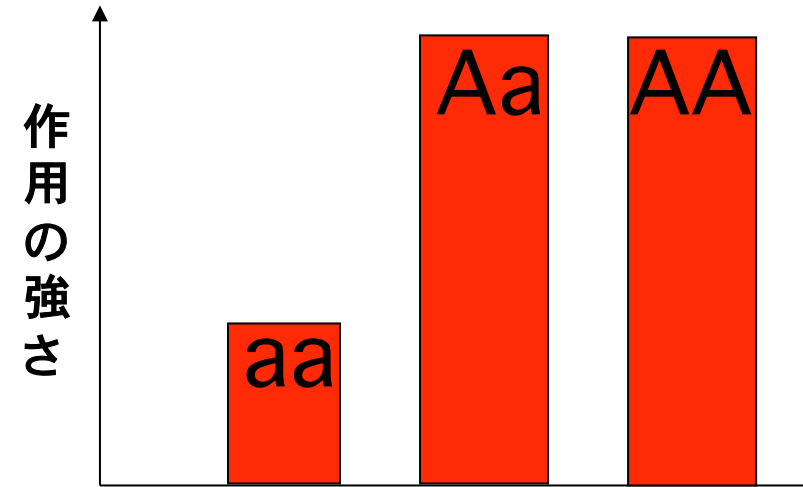


遺伝的に遠い品種

形質には質的形質と量的形質がある

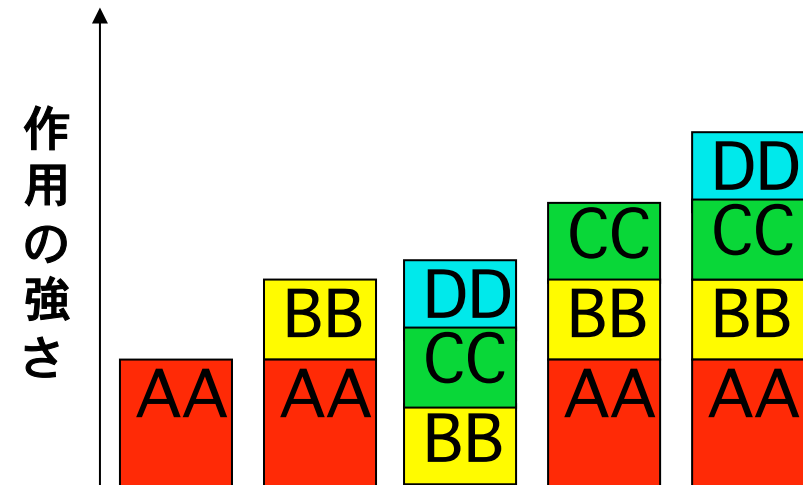
質的形質

一つまたは少数の
遺伝子で決定される
形質



量的形質

似た作用を持つ多くの
遺伝子の相互作用で
決定される形質



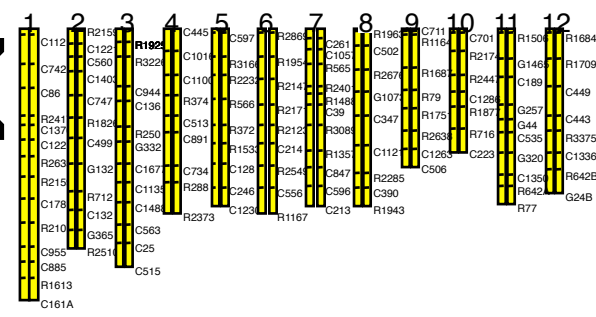
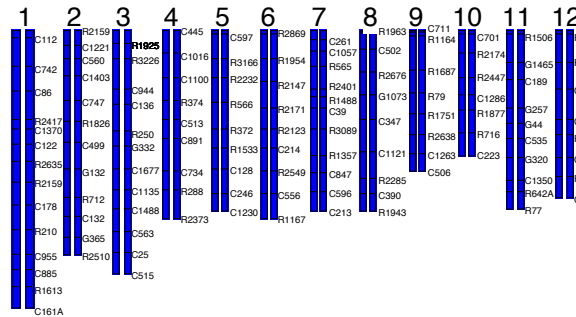
組換え自殖系統を用いた稈長に 関与する量的形質の解析

Asominori

IR24

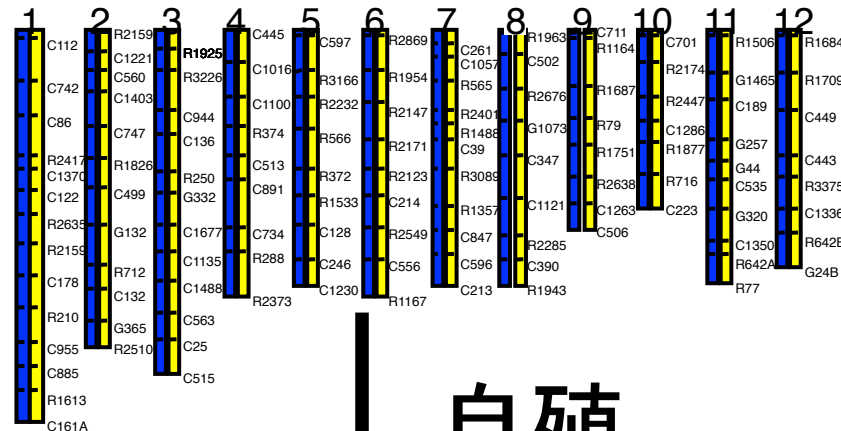


日本型イネ



矮性の
インド型イネ

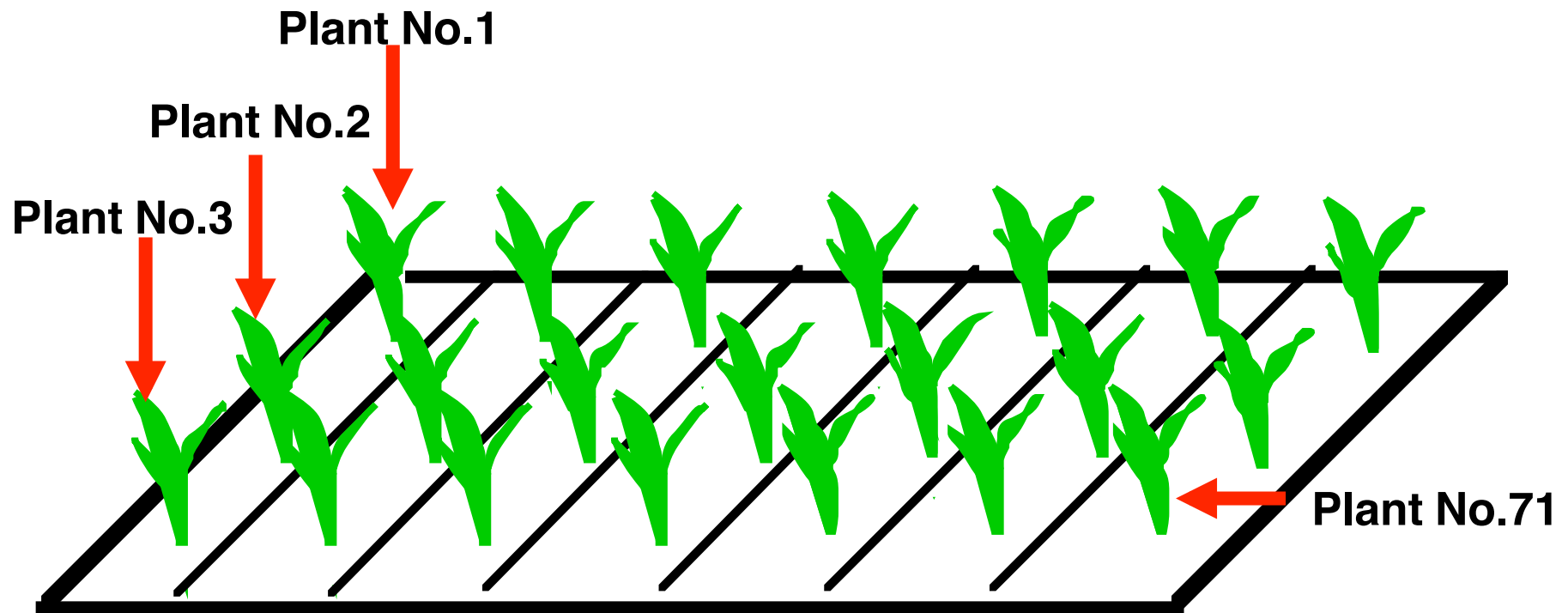
F1



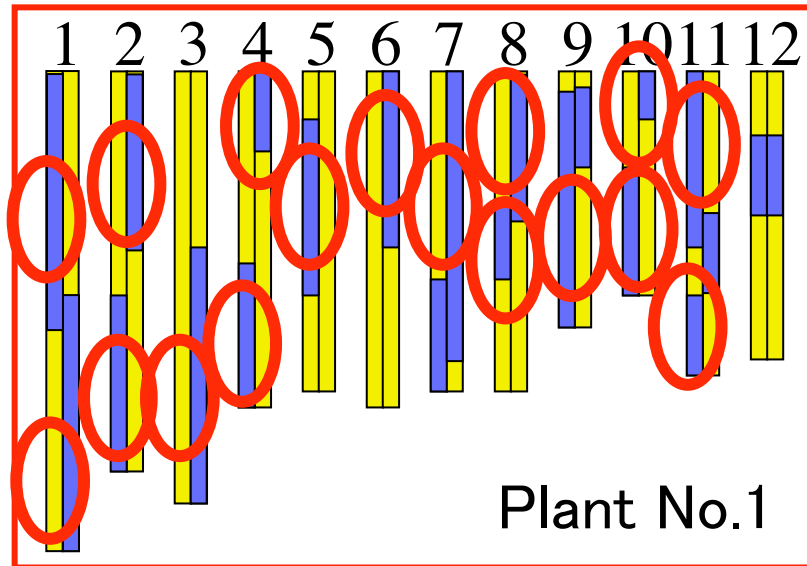
自殖



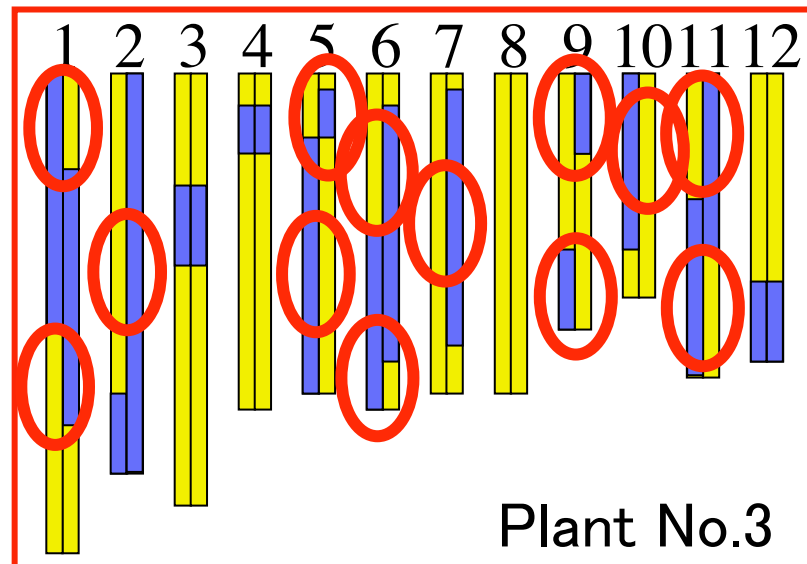
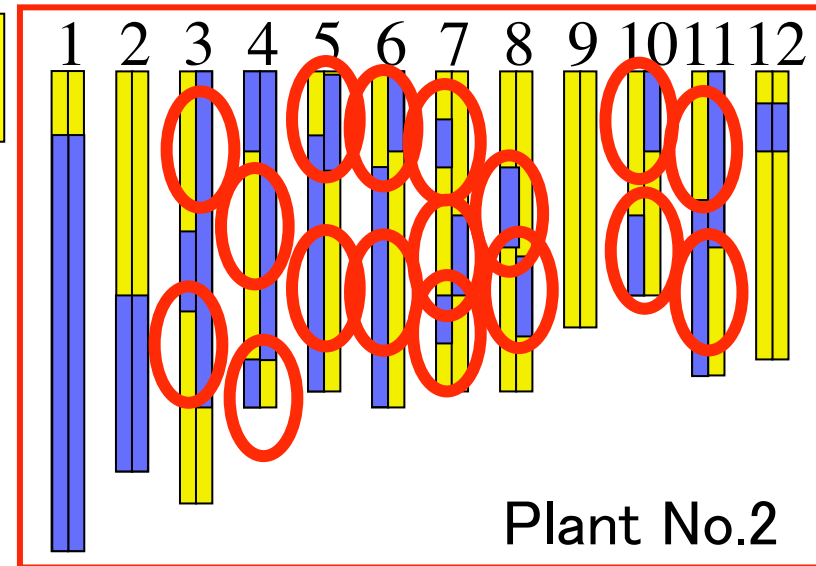
F2個体のそれぞれのgenotypeを見てみると



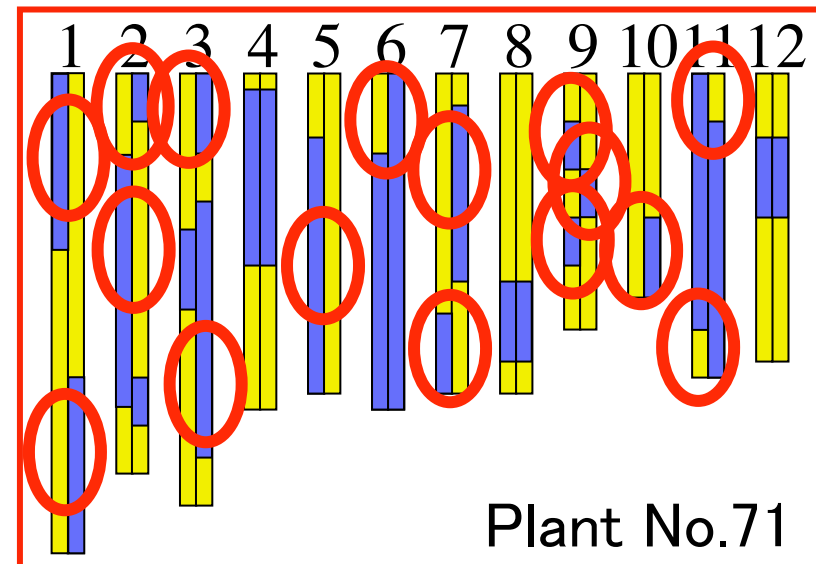
F2世代における各個体の genotype



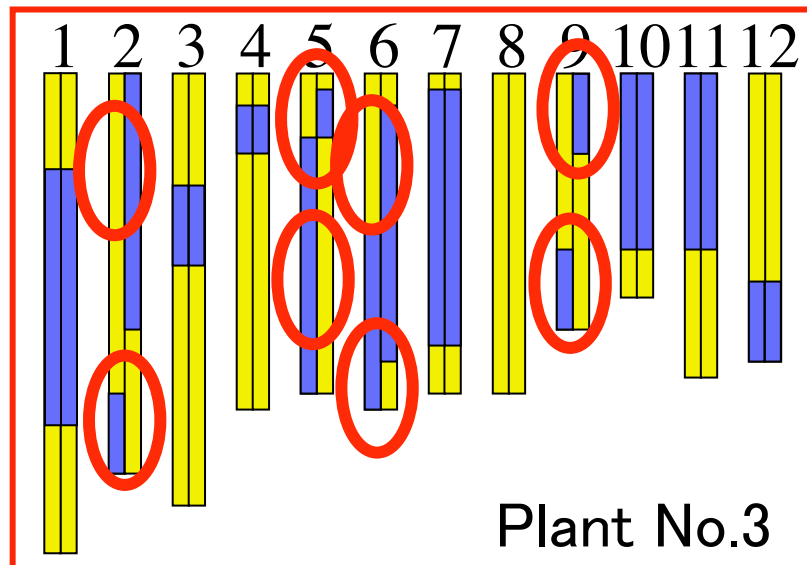
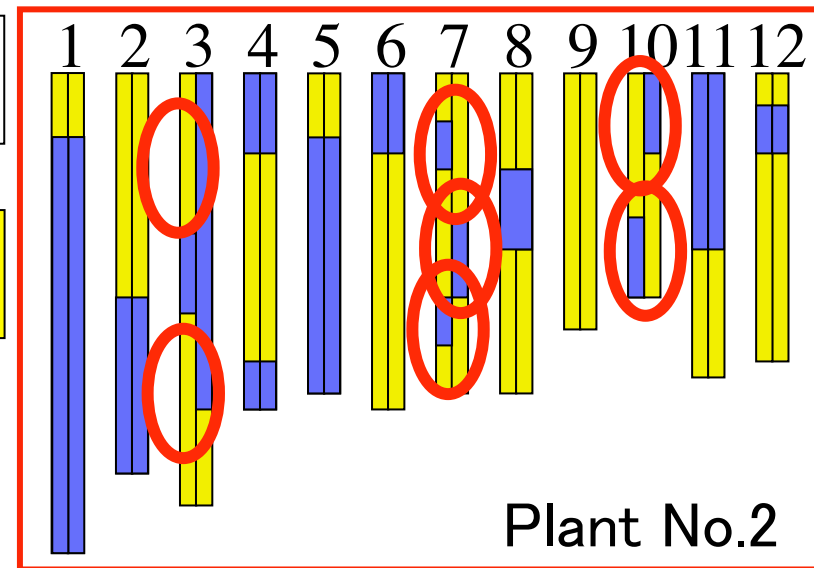
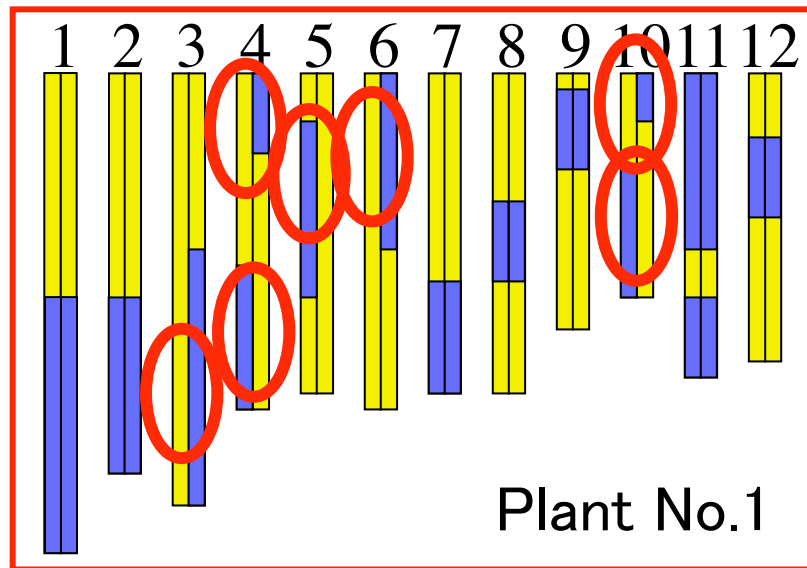
F₂



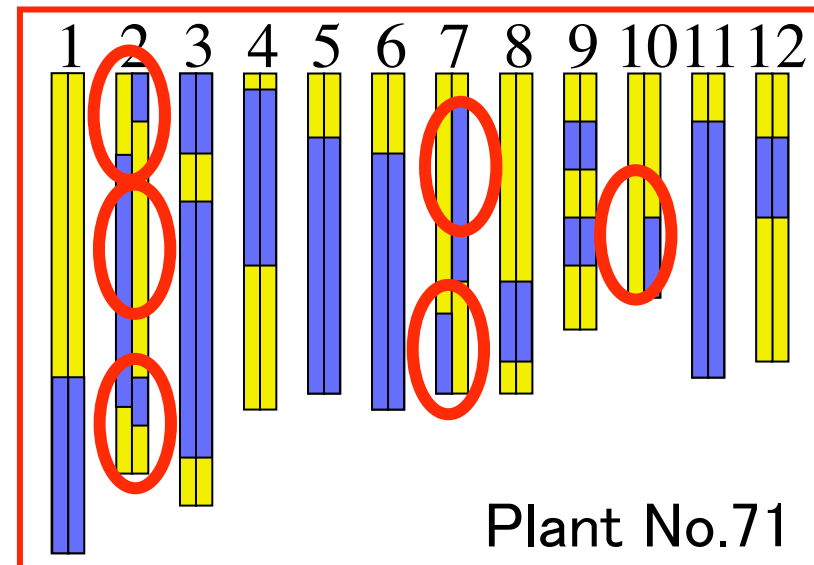
...



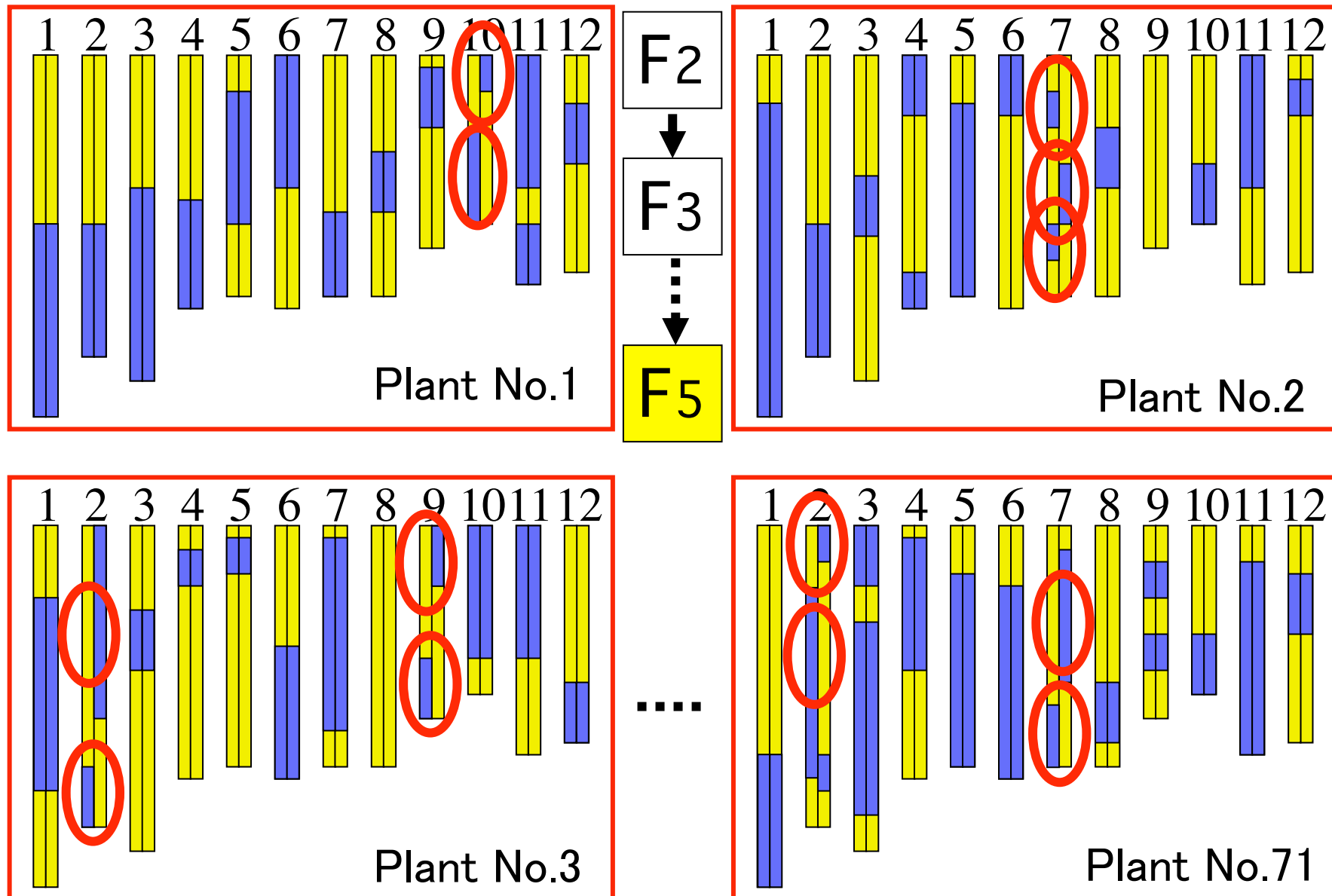
F3世代における各個体の genotype



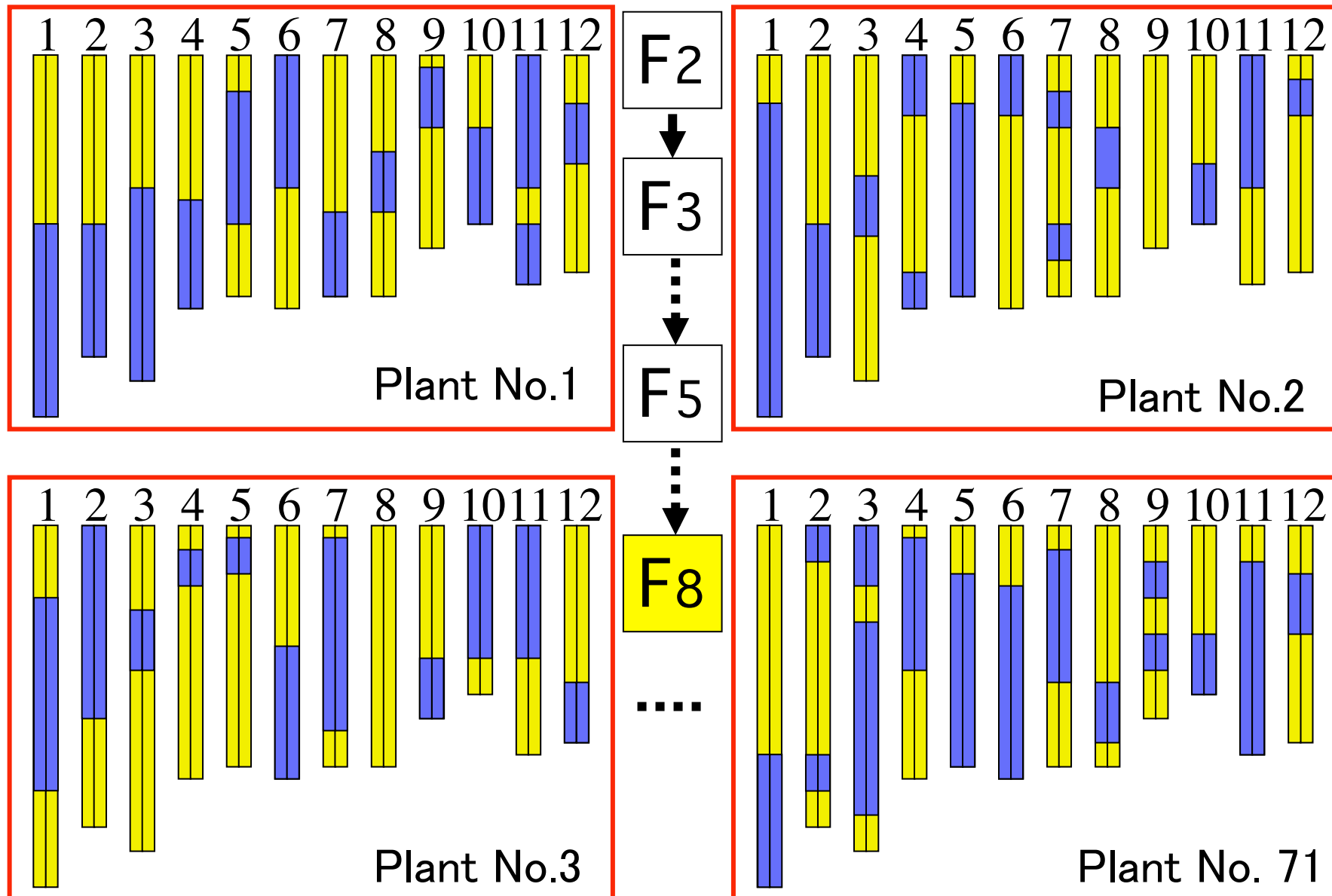
....



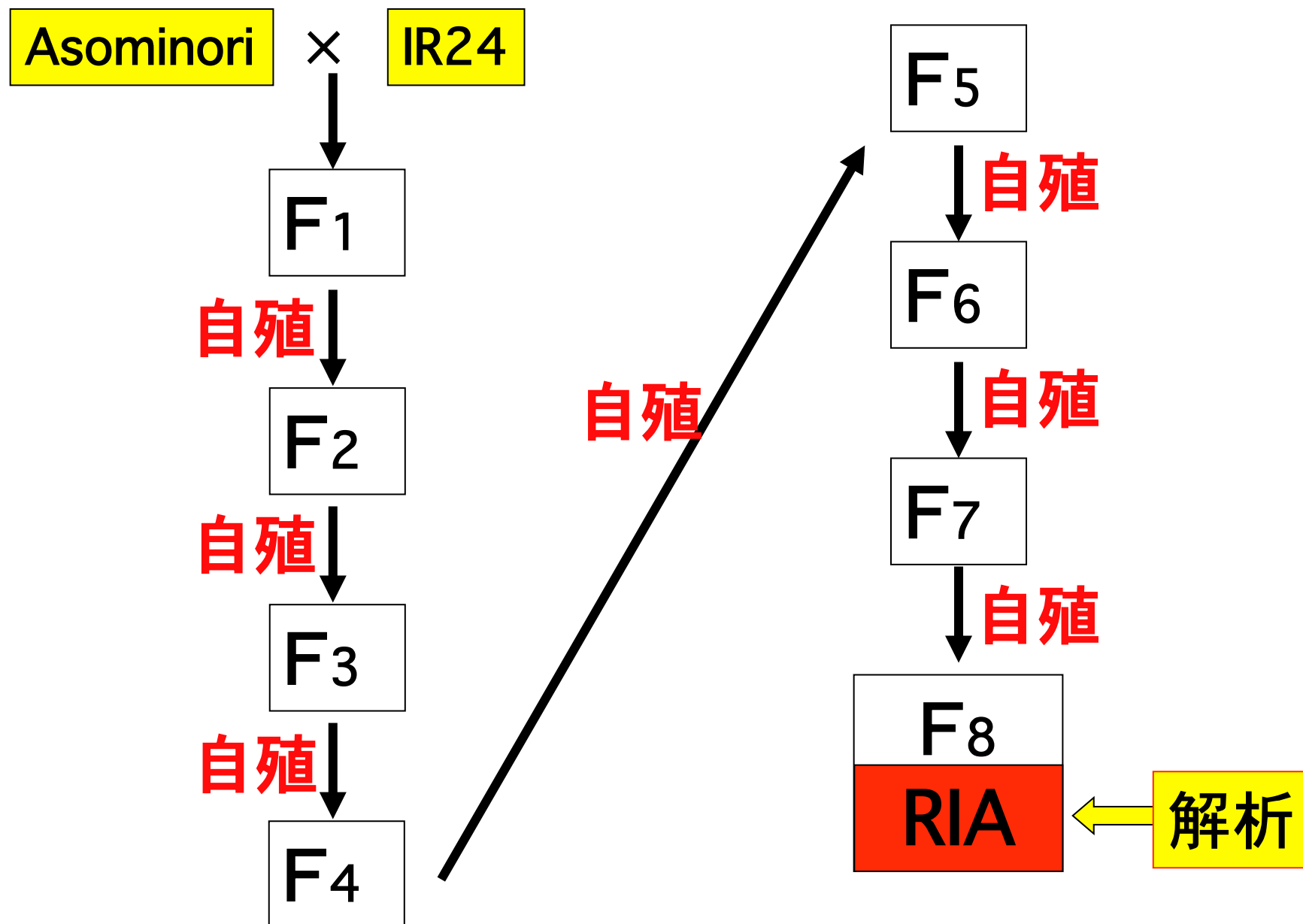
F5世代における各個体の genotype



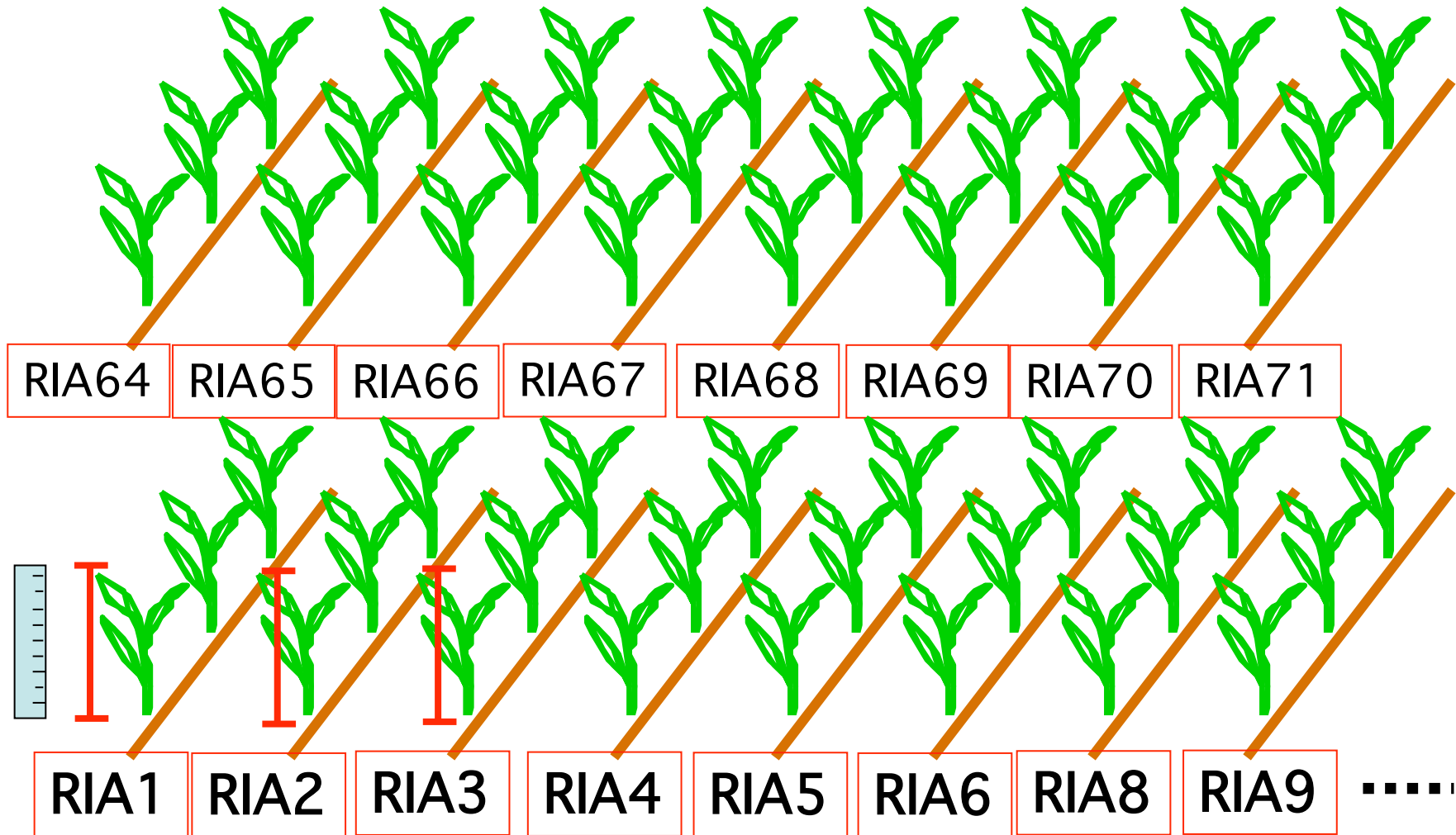
F8世代における各個体の genotype



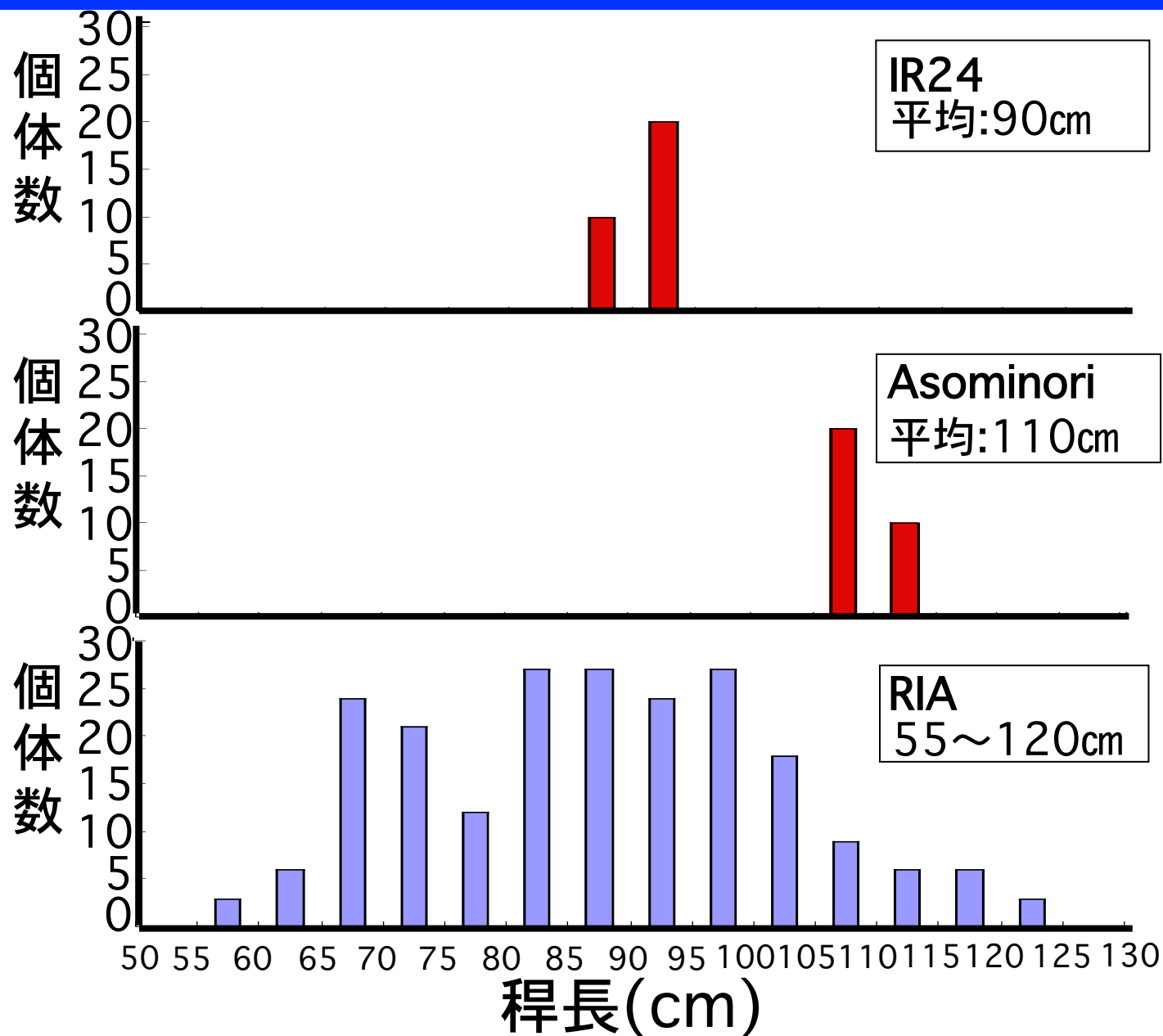
自殖を続け、genotypeを全てhomoに固定する



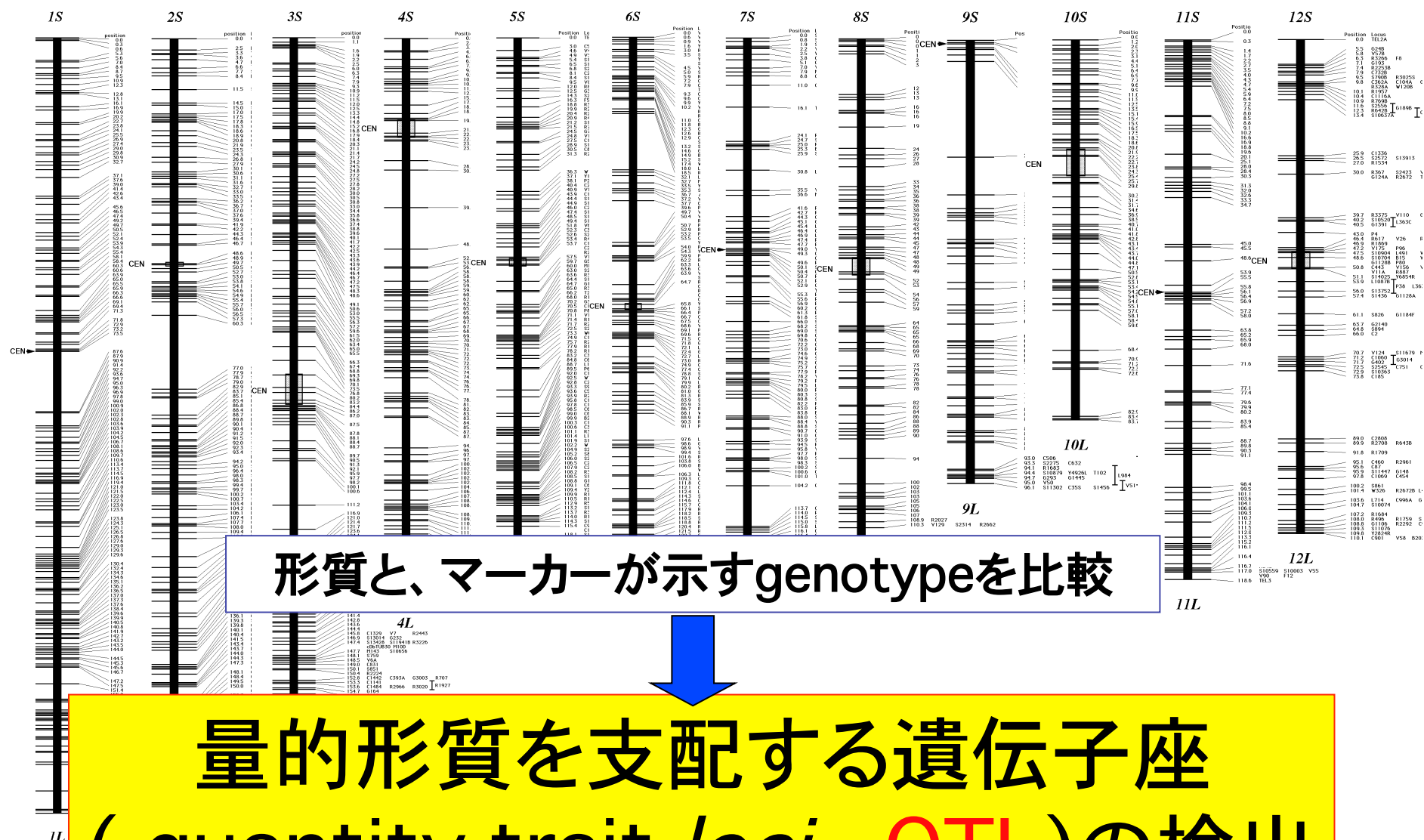
71系統からなるRIA集団



RIA集団では様々な稈長が現れた

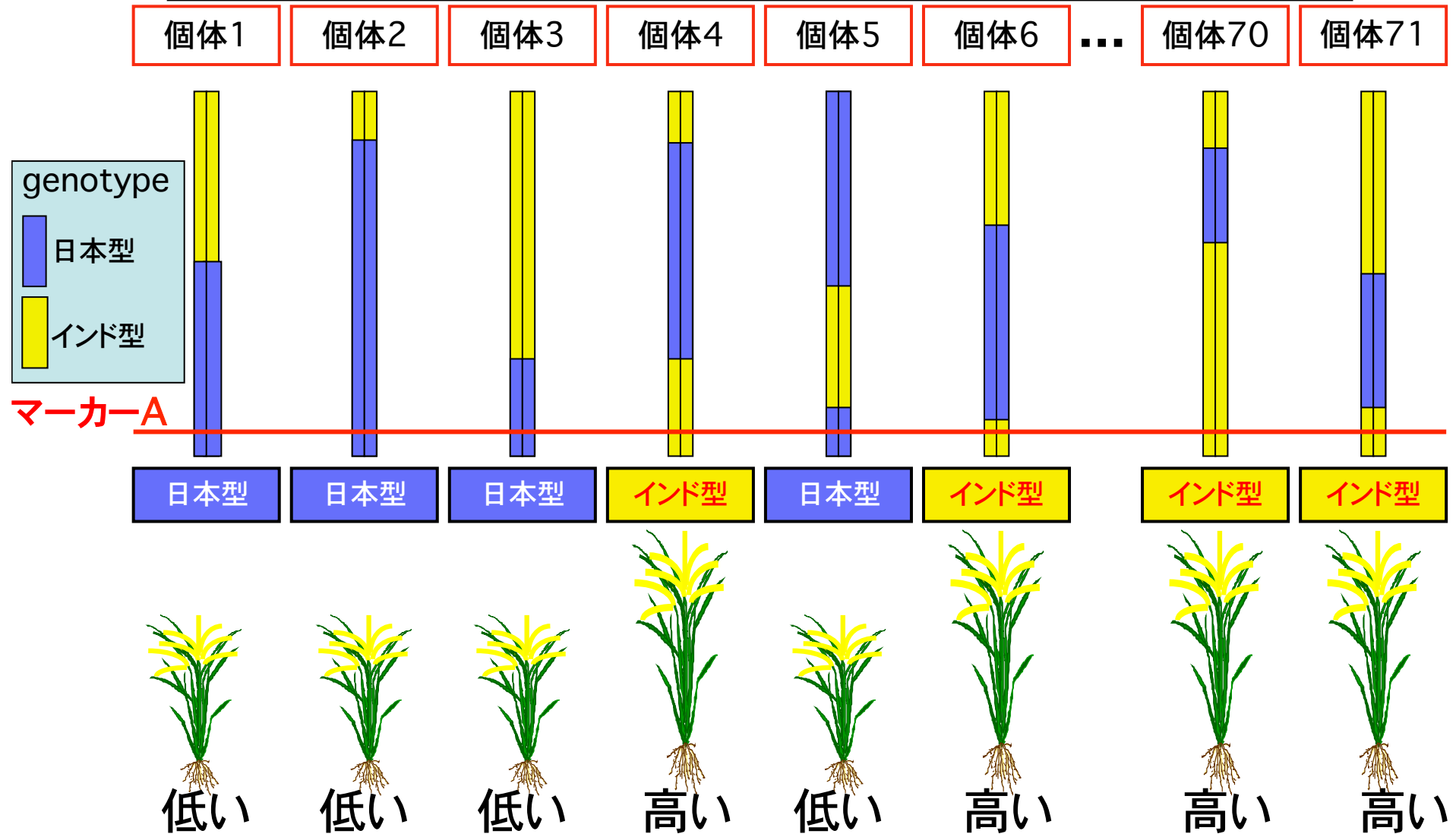


イネの染色体には約3500もの分子マーカーが存在する



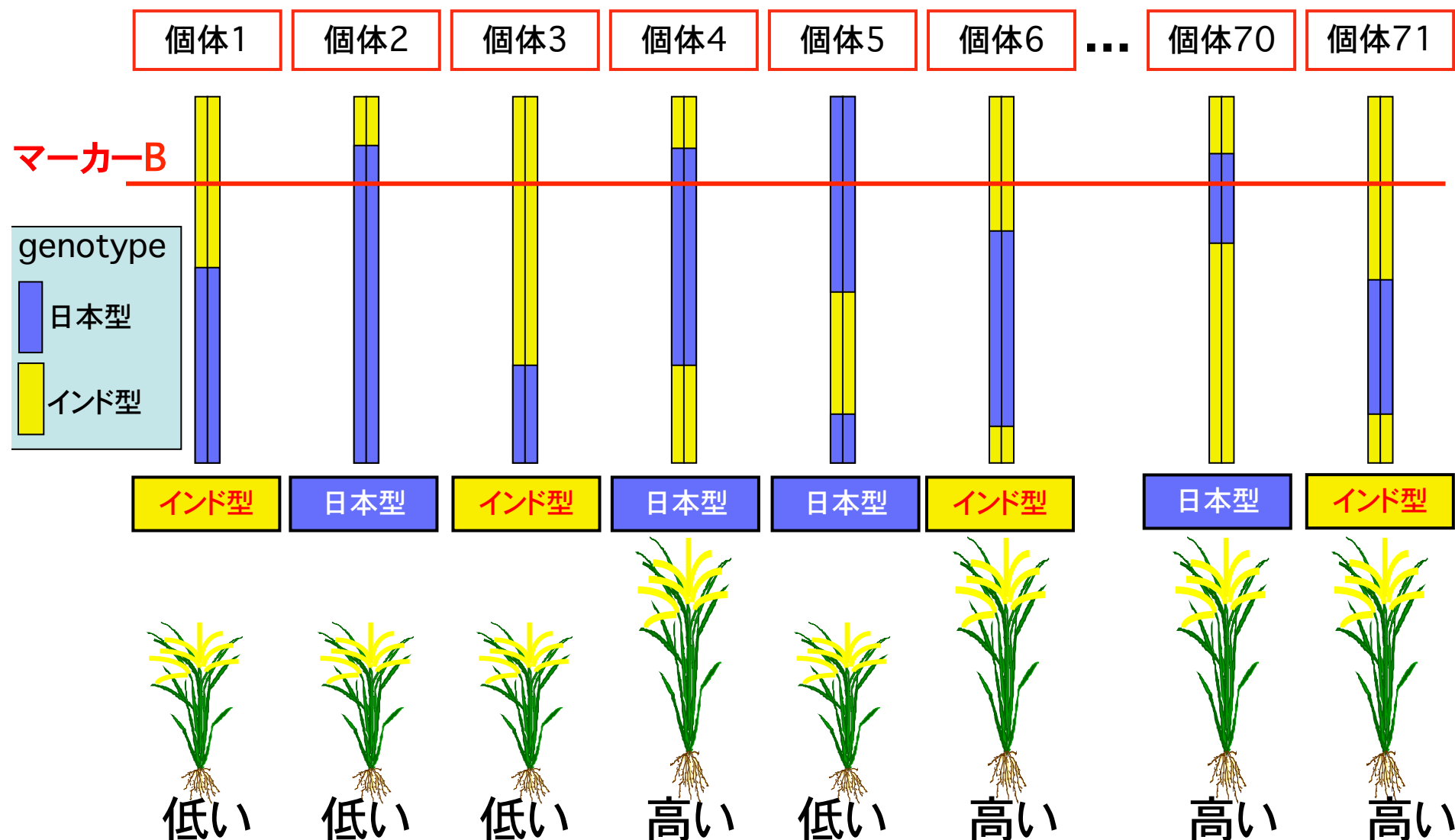
QTL解析とは

例えば、第1染色体上のあるマーカーAを調べると、



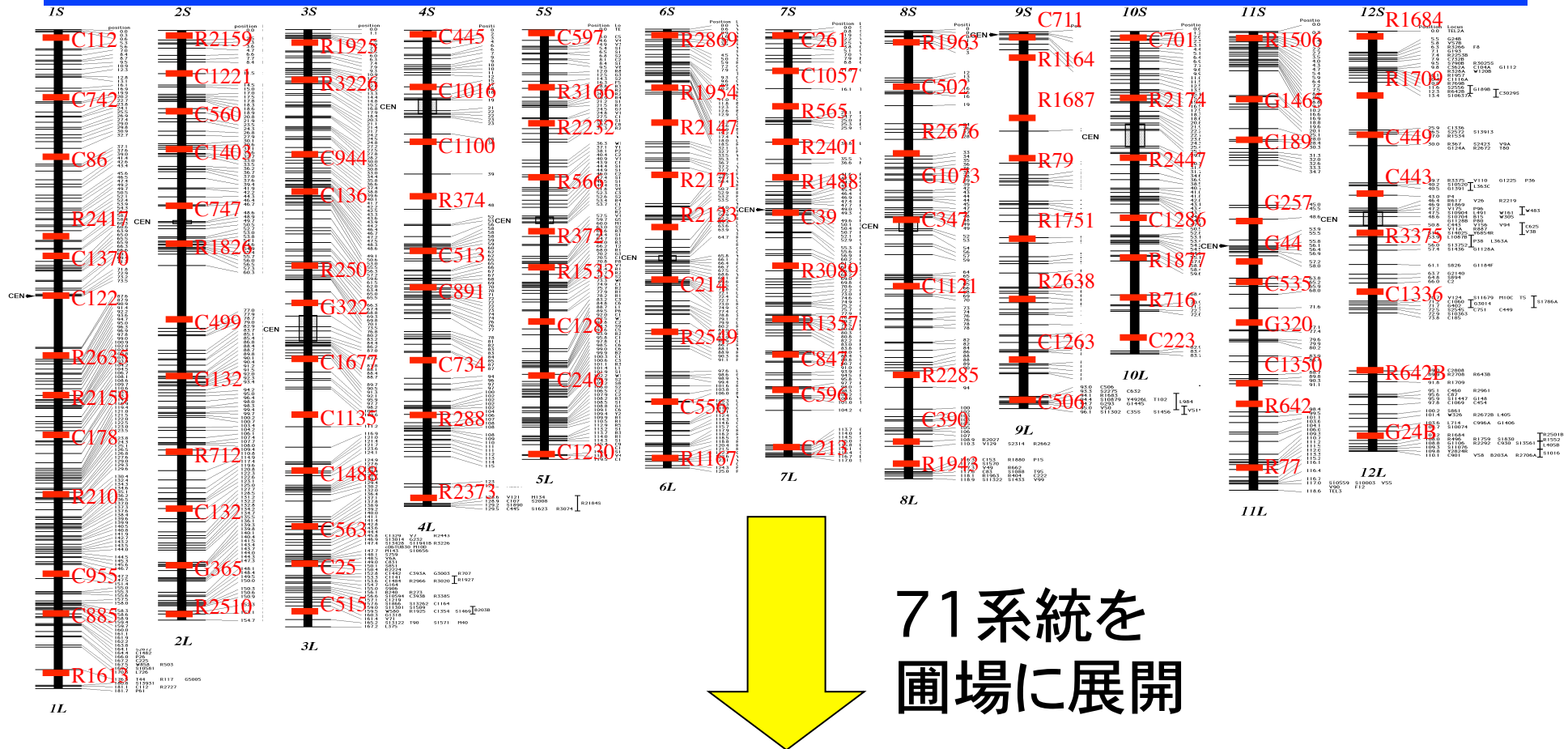
マーカーAの近くに稈長を決定する強いQTLがあると予想できる

次に、第1染色体上のマーカーBを調べる



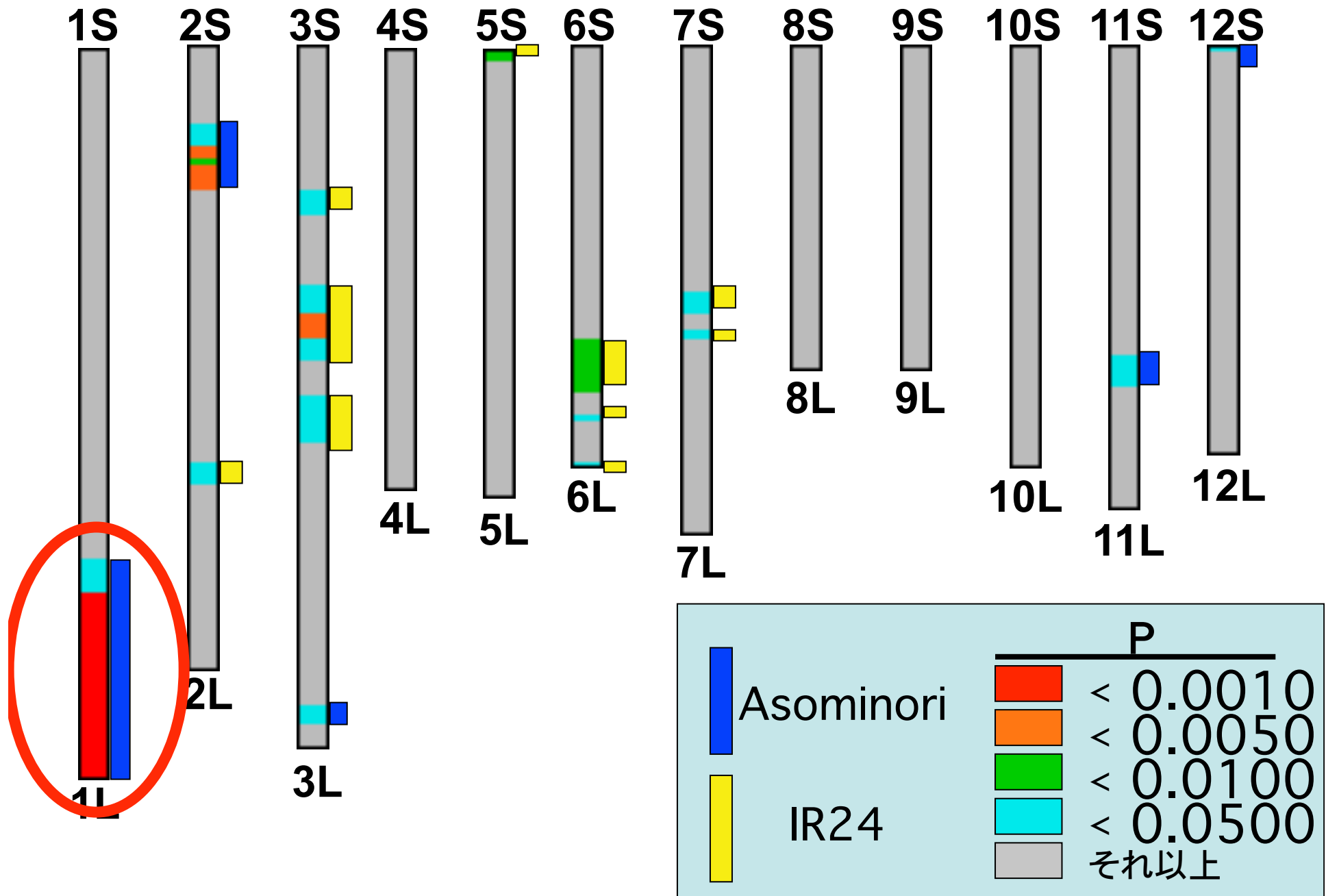
マーカーBの近くには稈長を決定するQTLは存在しないと考えられる

71 系統のRIA集団は246個の分子マーカーで
genotypeが決定されている

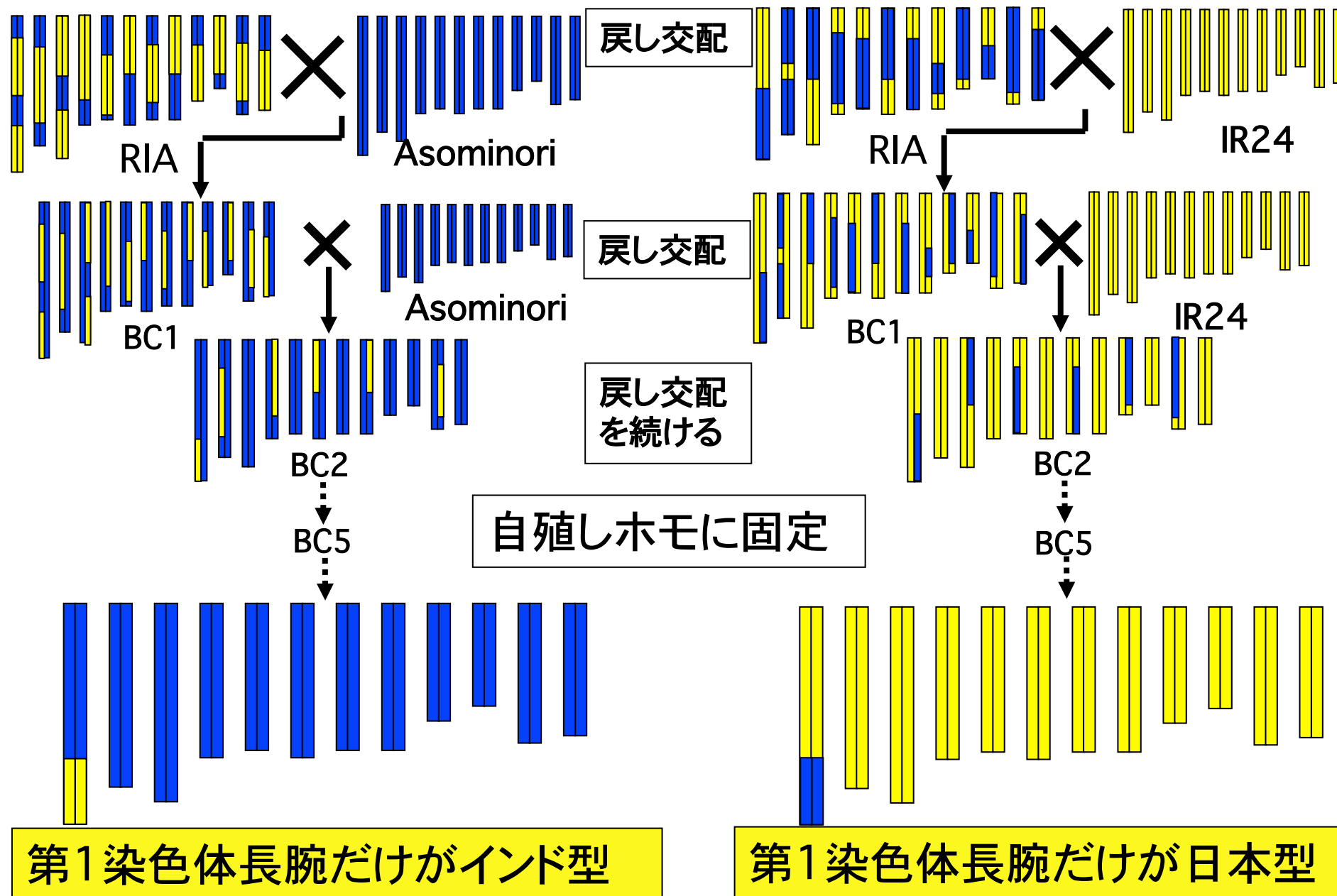


稈長を測定し、稈長の制御に関わるQTLを解析した

第1染色体の長腕に稈長を長くする強いQTLを検出した

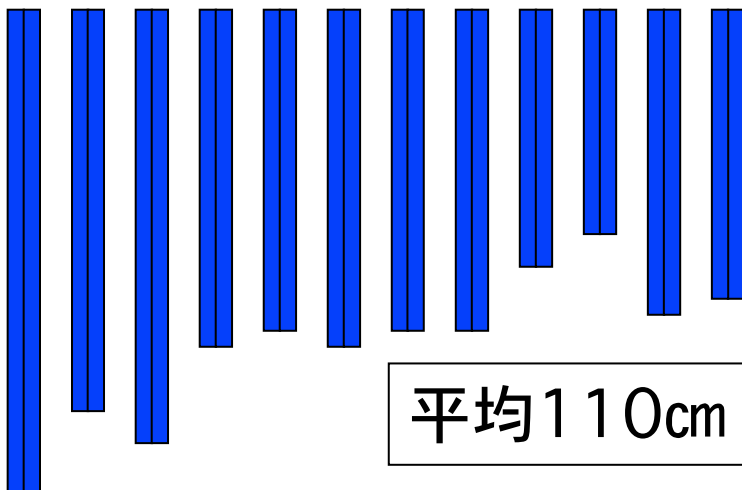


準同質遺伝子系統を用いてさらに解析する

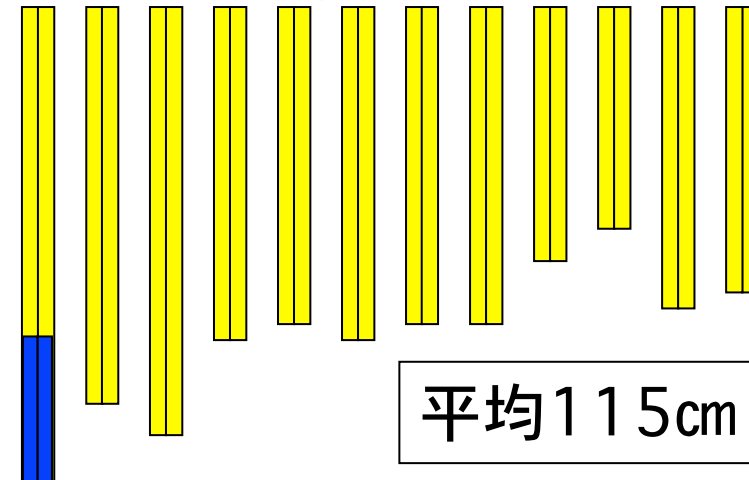


準同質遺伝子系統と親系統の稈長の比較

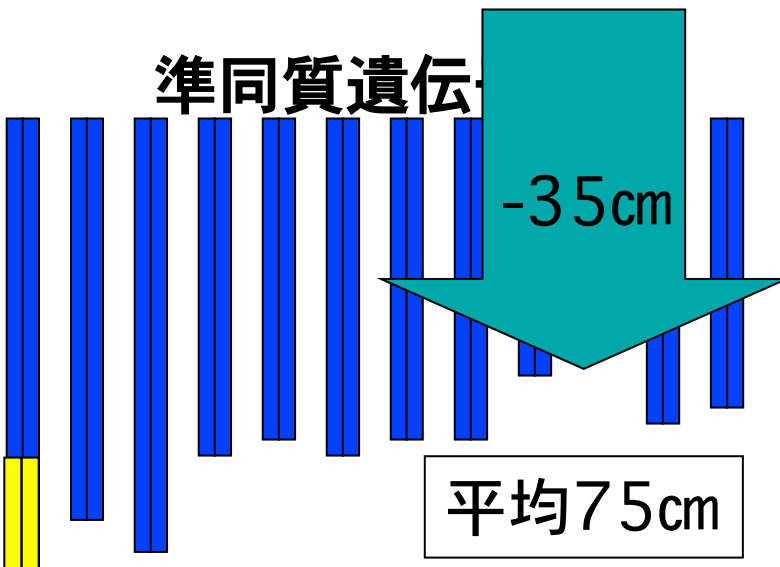
Asominori



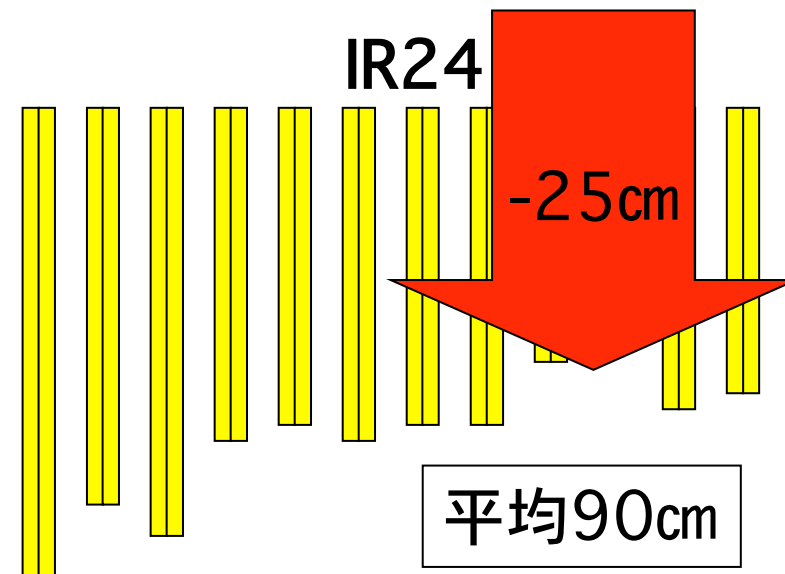
準同質遺伝子系統



準同質遺伝子系統

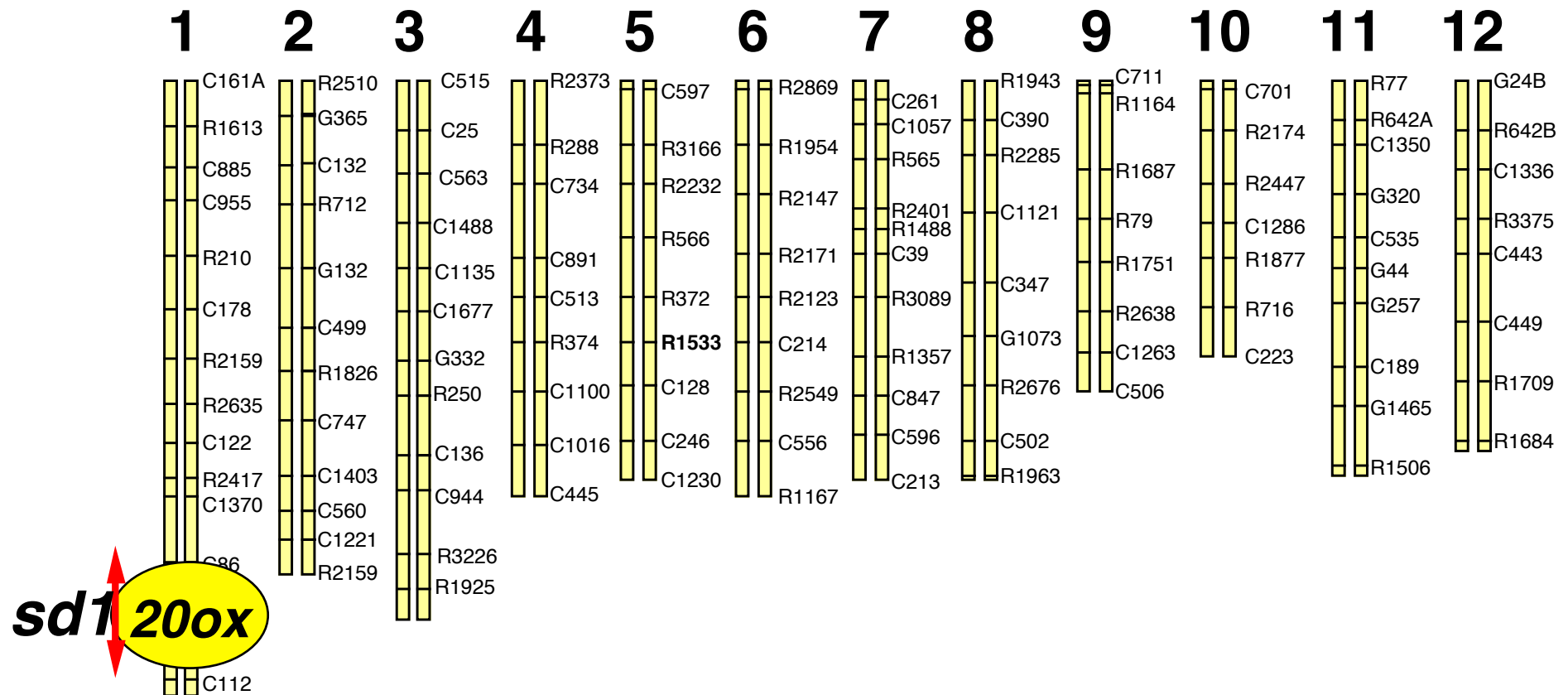


IR24



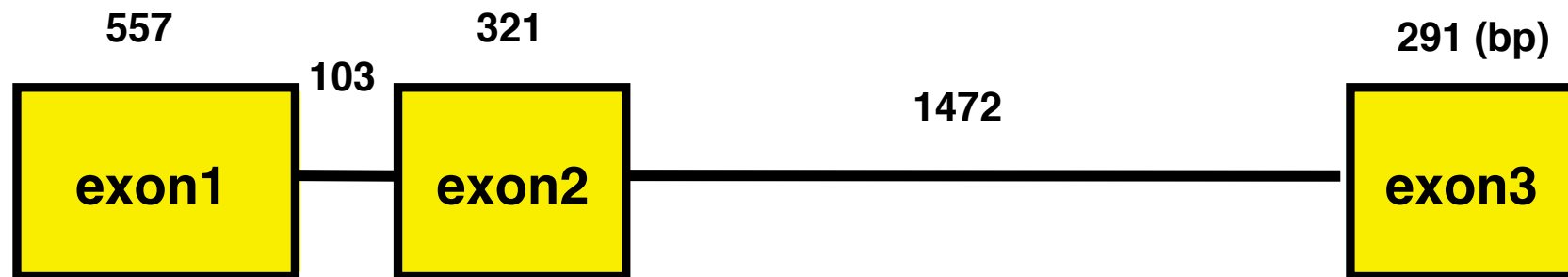
強いQTLを示した領域には稈長を制御する遺伝子の存在が確認できた

第1染色体長腕には半矮性遺伝子 *SD1 (semi dwarf 1)* が座乗する

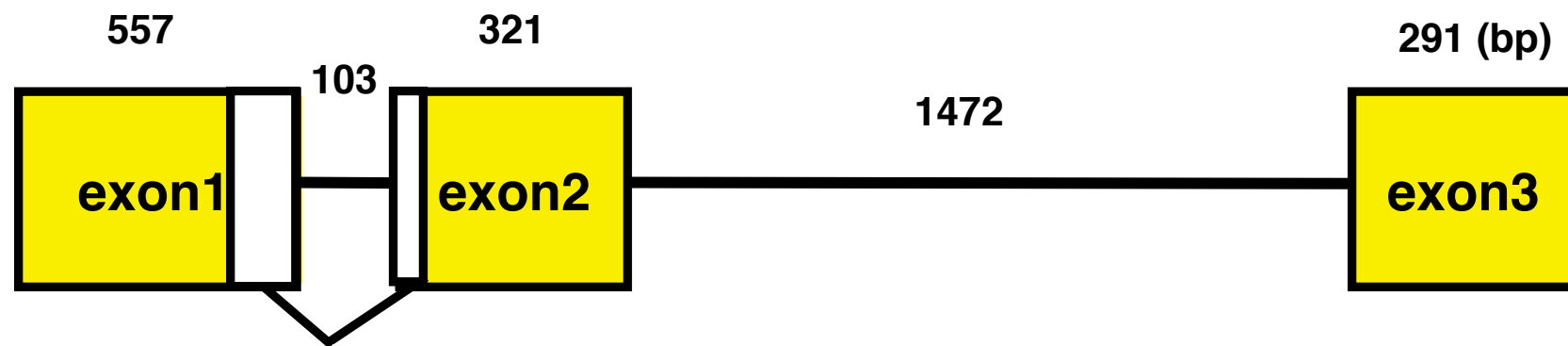


IR24のSD1 (GA20酸化酵素遺伝子) に塩基の欠失が検出された

Asominori



IR24



383塩基対欠失