



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of genetic management methods for rice varieties and prediction of spontaneous mutation frequencies using next-generation sequencing technology [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Balimponya, Elias George
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15604号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90826">https://hdl.handle.net/2115/90826</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Balimponya_Elias_George_review.pdf, 審査の要旨



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏名 Balimponya Elias George

審査担当者 主査 教授 貴島 祐治  
副査 教授 藤野 介延  
副査 准教授 小出 陽平

### 学位論文題名

**Development of genetic management methods for rice varieties and prediction of spontaneous mutation frequencies using next-generation sequencing technology.**

（次世代シーケンシング技術を用いたイネ品種の遺伝的管理法の開発と自然突然変異の発生頻度の予測）

農業の進歩において重要な取り組みの一つである植物の育種は、既存の作物品種の改良のみならず育成された品種の遺伝的管理を含む包括的な事業である。すなわち育種は新たな品種を育成するだけでなく、品種の遺伝的特性を維持することも、忘れべからざる役割と言える。また、品種の劣化の原因となる自然突然変異がいかに発生するのか、そのメカニズムを理解することも重要な育種学的課題である。しかしながら、殆どの育種学的研究は品種育成を目的とした遺伝的な研究に偏ってきた。品種の遺伝的管理という側面から育種学研究のアプローチはほとんどなされていない。近年のゲノム解析技術の発展により、同一品種あるいは親子、兄妹の関係でも遺伝的多型を検出することが可能になった。Balimponya氏はイネ品種の育種家種子に起こった有害突然変異を短期間で集団から除去する方法を開発した。次いでイネの1個体当たり発生する突然変異を検出し、突然変異発生率を正確に算出することに成功した。

本論文第2章において、Balimponya氏は次世代シーケンサー（NGS）と全ゲノム解析（WGS）を組み合わせた高度なゲノム解析手法を用いて、育種家種子を有害な変異から保護する方法について詳しく研究した。変異株と正常株とのゲノム上の差異を調べることで、観察された異常の原因となる変異を、ゲノムの配列比較から特定するという手法を開発して、ブレークスルーを達成した。また、変異の同定、除去方法の開発、純粋な品種を得る純化までの全プロセスを、1つの栽培シーズン中に完了させることを可能にした点も特筆すべきである。従来の方法では、育種家種子の集団から有害な遺伝変異を排除するのに4~8年が必要であったのに対し、1年以内で取り除くことのできる本方法は時間、コスト、労力の面で大きなメリットがある。

第3章では、イネの1個体当たり発生する突然変異を検出する手法を確立した。Balimponya氏が提案した手法の重要な点は、シーケンス、マッピング、バリエーションコールから生じる誤差を正

確に検出してそれらを適宜配列情報から取り除くことにある。まず、同じゲノム DNA (gDNA) サンプルを独立に配列決定し、エラーを摘出の後コンセンサス参照ゲノムを構築した。この間に反復マッピングとバリエーションコールのアライメントによるエラーの最も少ないアプリケーションの組み合わせを選んだ。さらに CLC genomic workbench を用いてバリエーションコールを行った情報を重ね合わせることで、偽陽性の変異を除き、真の変異型の塩基配列を高い精度で検出した。次に、これらの変異配列が実際に存在するか否かを個体ごとに PCR で増幅した配列をサンガー法によって解読し確認した。以上のプロセスを経て個体ごとに保持するヘテロ接合体の状態にある変異をヘテロ接合体突然変異 (Heterozygous State of Mutation: HSM) とした。その後、de novo な HSM を検出するために親子の gDNA の配列情報を比較することで、その個体に生じたユニークな HSM の発生率の算出を行った。その結果、イネの HSM の発生率は、1 個体のゲノムの 1 塩基あたり約  $10^{-8}$  であることが推定された。この数値は、動植物を含む他の生物で観察された変異率と非常によく一致していた。

第 4 章の総合論議では、日本晴のリファレンスから得られるゲノム情報を利用して、遺伝子領域と非遺伝子領域内に存在する HSM の割合を算出した。遺伝子領域には全体の 45.79% の変異が分布し、非遺伝子領域内には 44.4% が分布した。この割合は遺伝子領域と非遺伝子領域のゲノム領域長に匹敵する。このことから HSM はイネゲノムにランダムに起こると推定した。同定された HSM のうち、非同義置換はイネ 1 個体につき平均 1 箇所存在すると算出された。この発見は、どの個体でも HSM が 1 つは存在する可能性があることを示した。

以上の結果は、作物品種の健全な種子を生産者に配布する上で、育種家種子を採取し配布する方法に有用な示唆を与える研究成果と言える。よって、審査員一同は、Balimponya 氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。