

植物の病害抵抗性遺伝子群のmyBaits®を用いたターゲットシーケンス

抵抗性遺伝子濃縮シーケンス（Resistance gene **Enrichment Sequencing**, RenSeq）ワークフローにより、植物ゲノム内の非常に複雑な病害抵抗性遺伝子（R遺伝子）ファミリーの包括的研究が可能になります（Jupe et al. 2013）。R遺伝子は通常、ヌクレオチド結合（"NB"）とロイシンリッチリピート（"LRR"）の2種類のドメインを持つことから、「NB-LRR」または「NLR」タンパク質として知られています（Jupe et al. 2013）。これらの遺伝子は、真菌、卵菌、細菌、昆虫、ウイルスなど、多種多様な病原体から身を守る働きをするため重要です（Schulze-Lefert & Panstruga, 2011）。病害抵抗性遺伝子は農業の観点から理解することが重要であり、育種プログラムや関連研究において最大限に活用することができます。



ハイブリダイゼーションキャプチャの利点

植物ゲノムには通常、数百以上の異なるNLR領域があり、それぞれの領域の長さは数kbです。これらの領域は独立していることもあれば、他のNLR領域の近くにクラスターとして存在することもあります（Jupe et al. 2013）。メンバー間の配列類似性が比較的高く、大規模で複雑な遺伝子ファミリーであるため、low passな全ゲノムシーケンスやアンプリコンシーケンスなど、特定の次世代シーケンシング法でこれらの領域を解明するには困難が伴います。一方、ハイブリダイゼーションキャプチャ技術では、NLR領域全長を十分な深度でシーケンシングすることができます。

ハイブリダイゼーションキャプチャでは、NGSライブラリーを変性させ、図1に示すように、ターゲット領域に相補的なカスタマイズされたビオチン化プローブ（バイト）とハイブリダイズさせます。Daicel Arbor Biosciences社が提供するオリゴ合成技術では、数万個のユニークなプローブを含むmyBaitsカスタムプローブセットを作成することができ、1回のRenSeq実験で特定のゲノム内の既知のR遺伝子の全配列の多様性を網羅することができます。また、プローブ配列と最大20%程度の変異を許容してDNAをキャプチャすることができるため、既知のNLR領域だけでなく、新規の、あるいはリファレンスゲノムから欠落したNLR領域も回収することができます。したがって、ハイブリダイゼーションキャプチャは、新規のR遺伝子を発見するツールとしても、ゲノム中のNLR領域のアノテーションを改善するツールとしても機能します（Jupe et al. 2013）。

myBaitsは、PacBio®やOxford Nanopore®のようなロングリードシーケンシングプラットフォーム用に調整したDNAサンプルも濃縮できるため、数kbの長さのNLR領域を完全に配列決定し、R遺伝子研究に関連するゲノム領域の分解能を向上させることができます。



図1. myBaitsを用いたハイブリダイゼーションキャプチャの概要

RenSeqの概要

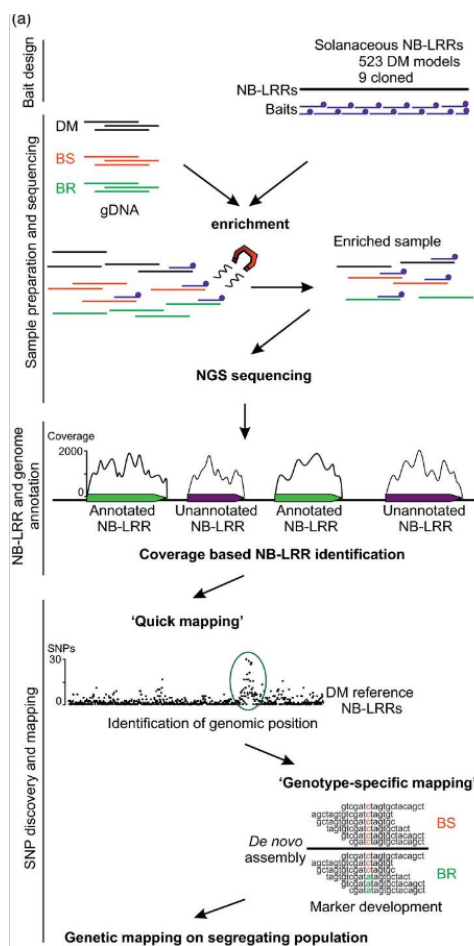


図2. RenSeqの概要 (Jupe et al. (2013) より)

mNB-LRR配列をターゲットとするプローブ（ベイト）を設計

分離集団の最も抵抗性の強い個体群(BR)、および最も罹病性の個体群(BS)のDNAをバルクにする

ベイトを用いた濃縮

次世代シーケンシング

NB-LRR配列とゲノムへのアノテーション

リファレンスへの「クイックマッピング」により、リファレンスでの候補遺伝子および遺伝子座が同定される

BSのリードを用いて、「遺伝子型特異的マッピング」を行いBRとBSのバリエーションをコールする

DNAマーカー化する

分離集団での遺伝マッピングに使用する

RNA-Seqへの応用はこちら：アプリケーションノート
「cDNA RenSeqを使用したNLR遺伝子リサーチエンシングと発現測定」

論文例

Witek et al. (2016) Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. Nat Biotechnol 34: 656-660

Arora et al. (2019) Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. Nat Biotechnol 37: 139-143

Narang et al. (2020) Discovery and characterisation of a new leaf rust resistance gene introgressed in wheat from wild wheat *Aegilops peregrina*. Sci Rep 10: 7573

参考文献

Jupe et al. (2013) Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. Plant J 76(3): 357-544

Schulze-Lefert & Panstruga (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. Trends Plant Sci 16(3): 117-125



web www.arborbiosci.com
email info@arborbiosci.com
phone 1-734-998-0751
X(twitter) @ArborBio

Targeted NGS
arborbiosci.com/products/targeted-ngs/



お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

ライフサイエンス事業部 バイオ試薬ソリューション部
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル 2F
Phone : 03-3816-0851(代表) Fax : 03-3814-5080
E-mail : reagents@primetech.co.jp



primetech.co.jp/mybaits