

次世代シーケンサーを用いた遺伝子組換えカーネーション（品種ムーンダストベルベットブルー）の T-DNA 挿入様式の解析

中村典子¹、鈴木孝征^{2,3}、新保由紀子¹、田中良和¹

サントリー¹、名大・院・理²、JST・ERATO³

カーネーションは、紫から青の発色を担うデルフィニジンの合成に必要なフラボノイド 3', 5' - 水酸化酵素遺伝子 (*F3'5'H*) を持たないため、花色が限定されていた。サントリーとフロリジン社は、異種の *F3'5'H* 遺伝子を発現させることによりデルフィニジンを蓄積する青紫色カーネーション『ムーンダスト』を開発し、世界各国で販売している。国内では現在 6 品種（スタンダード品種：4 系統、スプレー品種：2 系統）、欧州ではスタンダード 2 系統が販売されている。

遺伝子組換え植物の利用には当該国での法令に沿った認可を取得する必要がある。欧州ではゲノムに挿入された T-DNA の詳細な解析が求められ、すべての T-DNA 挿入領域周辺の配列を明らかにすることが、新たなアレルゲンや毒性タンパクの出現の有無の判断に必要である。周辺配列は日本でも遺伝子組換え系統の識別法の開発のために必要である。しかし、T-DNA が複数個所に複雑に挿入されているムーンダストベルベットブルーの場合には、従来の Inverse PCR 法や Genome Walking 法などでは全周辺配列を得ることはできなかった。本研究では、次世代シーケンサーにて得た大量のゲノム配列データを解析することにより、全周辺配列の取得を試みた。

まず、本系統のゲノム DNA からメイトペアライブラリーを調整後、HiSeq2000（イルミナ社）を用いて高速シーケンシングを実施し、約 40 億リードを収集した（タカラバイオに委託）。このうち 14 億リードを用いて ALLPATHS-LG(ver.42069)により *de novo* アセンブルを行った後、挿入配列にアライメントされたリードの情報をもとにして、T-DNA 挿入領域周辺の配列を決定した。その結果、ゲノム中の 5 箇所（Locus1-5 とする）に T-DNA が挿入されていることがわかり、これらの挿入配列および周辺配列を取得した。しかし、Locus 3 と 4 については片側の配列しか解読できなかった。Locus3 と 4 は同じ Scaffold に由来したことから、両者は同じ Locus である可能性が示唆された。これらの挿入様式を明らかにするために、Locus3 の未同定の端から順次リードを並べて末端の配列を伸ばしていったところ、Locus4 と一致した。本解析の結果、Locus3 および Locus4 はほぼ同じ領域が逆向きに向かい合わせとなった、Inverted Repeat 構造をとっていることが明らかとなった。また、Locus1 は完全な T-DNA 配列に加え T-DNA の一部の配列を含み、Locus2, 5 は T-DNA の一部だけを含んでいた。

少なくともムーンダストベルベットブルーにおいては、T-DNA が複雑な形でゲノム中に挿入されていること、T-DNA が複数個所に複雑に挿入されている場合でも、次世代シーケンサーで得られた大量の配列データを活用することにより、全 T-DNA の挿入様式が解明できることを示すことができた。