

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05611

研究課題名(和文) iQTL-seq; 品種間交雑後代における新規遺伝子単離技術の開発

研究課題名(英文) iQTL-seq: Rapid identification of the gene controlling QTL by next generation sequencer

研究代表者

高木 宏樹 (Takagi, Hiroki)

石川県立大学・生物資源環境学部・助教

研究者番号：80616467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：農業上有用な遺伝子の単離は、農作物における育種を加速するうえで、重要な課題である。本研究は、次世代シーケンサーを用いて品種間の表現型の差異を決定する原因遺伝子を単離する技術「iQTL-seq; identification of the gene in QTL」の開発を試みた。iQTL-seqは、シーケンスdepthを比較し、品種間の差異を決定する遺伝子を同定する手法である。本研究では、実際に構築された iQTL-seq法のpipelineを適用して、イネ品種間交雑後代におけるイネいもち病に対する耐病性レベルの品種間差異を決定する遺伝子の同定を試みた。パイプラインは、現在公開準備中である。

研究成果の概要(英文)：The identification of the gene controlling agronomically important trait is an important task for accelerating breeding speed. In this study, we tried to develop the next generation sequencer (NGS) based methods “iQTL-seq; identification of the gene in QTL controlling the phenotypic difference between cultivars/landraces”. iQTL-seq pipeline comprises three steps; 1) identification of the candidate genomic regions controlling the phenotypic difference by QTL-seq. 2) local de novo assembly for the identified region by using aligned sequences plus as well as short reads that were unmapped to the reference. 3) identification of the candidate gene located in the assembled contigs by comparing sequence depth between the bulked samples used for QTL-seq analysis in step 1. The developed pipeline was applied for identifying the resistance gene to rice blast disease. The pipeline is in preparation for opening to publicly available web site.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：植物育種 バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界の人口は、70 億人を突破しており、今後 40 年以内に 90 億人に増加するとされている。一方、過剰な灌漑農業などによる塩類集積や地球温暖化等による気候変動が原因で、耕地面積は減少していくことが懸念されている。それ故、今後、世界的に食料需給の逼迫が予想される (Godfray et al. *science*, 2010)。増え続ける食料需要に対する生産量をあげるために、今まで以上のスピードで作物の育種を進めることが必須である。

現在、最も効率的な植物の育種方法の一つは、DNA マーカー選抜を利用した育種法である。しかし、DNA マーカー選抜を利用した育種を行う前提としては、農業上有用な形質に關与する遺伝子が既に同定されている必要がある。

これまで遺伝子同定は、任意の表現型に差異が見られる品種間において、ゲノム全体に渡って多数の DNA マーカーを設計し、その品種間の交雑後代において大規模な連鎖解析をすることによって行われてきた。このような従来方法は、多大な時間、労力および費用を必要とした。これに対し、近年では、従来の遺伝子同定法と比較して時間、労力および費用を大幅に削減できる手法として、次世代シーケンサーを用いた人為的な突然変異体における遺伝子単離法「MutMap シリーズ (Abe et al. *Nature biotechnol*, 2012; Takagi et al. *New Phytol*, 2013; Fekih et al. *PLoS One*, 2013)」が開発されている。MutMap シリーズは、人為的に誘導した突然変異を同定する技術としては、非常に強力な方法であるが、複雑な自然変異に適用しても、原因遺伝子を同定することができない。自然変異を次世代シーケンサーによって迅速に同定する手法としては、これまでに QTL-seq (Takagi et al. *Plant J*, 2013) 法が開発されている。しかし、QTL-seq 法は、品種間の表現型の差異を決定している大まかなゲノム領域 (数 Mb 間) の特定は可能であるが、最終的にそのゲノム領域において重要な機能をもつ遺伝子本体を同定するまでには至らない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いて効率的に品種間の差異を決定する遺伝子を同定する技術「iQTL-seq」を開発することである。

iQTL-seq の技術的特徴としては、次世代シーケンサーから算出されるショートリードを基準配列にアライメントした際のシーケンス depth を解析に利用する点にある。MutMap や QTL-seq を含む従来の Re-sequencing をベースにした全ゲノム解析手法は、基準配列に対してショートリードがアライメントされた領域において検出される一塩基多型 (SNP) や数 bp の挿入/欠失を解析することが中心であった。それ故、そもそも、アライメントが正確にできないような

品種特異的なゲノム領域では、SNP などを正確に検出できず、品種間の多型を解析することは難しかった。一方、iQTL-seq は、特定のシーケンスサンプル間で品種間特異的なゲノム領域においてアライメントされるシーケンスリードの割合、すなわちシーケンス depth を比較して原因遺伝子同定を行う点が従来の解析手法と大きく異なる。iQTL-seq は、品種間交雑後代において自然変異を同定する技術であるため、人為的に変異体を育成することが困難な生物種における遺伝子単離においても適用できる点で汎用性が高い。

また、本研究では、iQTL-seq 法を実際にイネ品種間交雑後代へ適用して、水稻栽培上重要な遺伝子を同定することも試みた。具体的には、イネ品種間交雑後代において、イネいもち病に対する圃場抵抗性遺伝子および穂ばらみ期耐冷性遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

### iQTL-seq の原理

iQTL-seq のパイプラインを下記の手順で構築した。

- ・ QTL-seq 法による候補遺伝子領域の同定
 

QTL-seq 法による任意の形質に關与す原因 QTL の同定を行う。QTL-seq 法は、まず、任意の形質に差異が見られる品種間において、交雑後代を育成する。次に、交雑後代において両極の表現型を示す個体をそれぞれ約 20 個体以上選抜し、各個体から抽出した DNA を等量ずつ混合したバルク DNA を準備し、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスに供試する。次世代シーケンサーを用いた解析では、Re-sequencing によって検出される全ゲノム中の SNP 箇所において SNP-index 値を計算する。SNP-index は、あるゲノムポジションにおいてアライメントされたショートリードのうち、基準配列と異なる塩基をもつショートリードの割合である (Abe et al. *Nature biotechnol*, 2012)。最後に両バルクサンプルの SNP-index を比較する目的でバルクサンプル間の SNP-index 値の差分である  $\Delta$ SNP-index 値を計算し、品種間の表現型の差異に寄与する遺伝子領域を大まかに同定する。本プロジェクトでは、新たに QTL-seq pipeline version 2 を構築し、解析の精度の向上を行なった (現在公開準備中)。

- ・ Local *de novo* assembly による品種特異的ゲノム領域の再構築

上記の QTL-seq 法は、Re-sequencing を用いた解析手法であるため SNP や数 bp の挿入/欠失のみしか解析できない。すなわち、公開されている基準配列と解析対象とした品種の間で大きくゲノム配列が異なる領域では、アライメントが正確にできないため、変異の検出が難しかった。この問題を解決するために、候補遺伝子領域における Local *de novo* assembly により、解析に用いた品種特異的な

ゲノム領域を再構築する必要がある。具体的な *Local de novo assembly* の手法は、まず、QTL-seq において同定された遺伝子領域にアライメントしたショートリードおよびそのショートリードのペアになるショートリードを選抜し、次に、どのゲノム領域にもアライメントしなかったリードと一緒に *de novo assembly* を行う方法である。リードの選抜は、自作した perl プログラムを用いて行い (パイプライン現在公開準備中)、*de novo assembly* は、公開されているフリーソフトである DISCOVAR *de novo* (<https://software.broadinstitute.org/software/discovar/>) によって実施した。

#### ・ QTL-seq の再解析

コンティグ配列上の品種間多型を解析するために、再度 QTL-seq 解析を実施する。まず、上記 QTL-seq 解析で用いた基準配列のうち *Local de novo assembly* に供試した領域の塩基配列をすべて N に置換する。次に置換された基準配列と *Local de novo assembly* 構築されたコンティグ配列を用いて QTL-seq パイプラインによる解析を行う。

#### ・ コンティグ配列内の遺伝子予想

*Local de novo assembly* によって構築されたコンティグ配列内において遺伝子予測を行う。遺伝子予測は、HISAT2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) を用いて RNA-seq によって得られるショートリードをアライメントしたデータ (BAM ファイル) を準備し、Stringtie (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>) を用いて行う。

#### ・ 遺伝子予測された領域におけるサンプル間のシーケンス depth の比較

QTL-seq の再解析から、コンティグ配列における遺伝子が予測された領域において両バルクサンプルのシーケンス depth を算出する。実際の解析では、エキソン領域ごとに平均シーケンス depth を算出する。最終的に、バルクサンプル間で大きく depth の差が見られ、かつ、遺伝子発現が確認された遺伝子について候補遺伝子としてリストアップする。

#### イネいもち病に対する圃場抵抗性遺伝子の同定にむけた iQTL-seq の適用

イネいもち病に対する圃場抵抗性が強いイネ品種「Nortai」および弱いイネ品種「ひとめぼれ」間で育成された組換え近交系 (RILs) 241 系統において圃場抵抗性が強い 20 個体と弱い 20 個体を選抜し、各表現型の DNA をバルク化した Resistant bulk (R-bulk) および Susceptible bulk (S-bulk) をそれぞれ調整した。全ゲノムシーケンスには、Nortai、ひとめぼれ、R-bulk および S-bulk の genomic DNA を供し、RNA-seq には、Nortai およびひとめぼれに罹病性のイネいもち病菌を接種

して 48 時間後の RNA サンプルを用いた。最終的に、上述で構築した iQTL-seq のパイプラインにより遺伝子同定を試みた。

#### 穂ばらみ期耐冷性遺伝子の同定にむけた iQTL-seq の適用

穂ばらみ期耐冷性が強いイネ品種「ひとめぼれ」および弱いイネ品種「ササニシキ」間で育成された F3 世代 190 系統において最も耐冷性が強い 20 個体と弱い 20 個体を選抜し、それぞれ DNA をバルク化した High-bulk (H-bulk) および Low-bulk (L-bulk) を調整した。全ゲノムシーケンスには、ひとめぼれ、ササニシキ、H-bulk および L-bulk の genomic DNA を供し、RNA-seq には、ひとめぼれおよびササニシキの穂ばらみ期における穂由来 RNA サンプルを用いた。

#### 4. 研究成果

##### iQTL-seq 法を用いたイネいもち病に対する圃場抵抗性遺伝子の同定

iQTL-seq のパイプラインを用いて、候補遺伝子領域である第 6 番染色体の 2.4Mb-6.9Mb において *Local de novo assembly* を行なった結果、2,069 本のコンティグ配列 (N50=5,953bp) を得た (図 1)。構築されたコンティグ配列上で RNA-seq のシーケンスリードを用いて Stringtie による遺伝子予測を行なったところ 1,279 個の遺伝子が予測された。次に予測遺伝子領域において、R-bulk と S-bulk のシーケンス depth を比較したところ、図 2 で示したように、R-bulk において十分なシーケンス depth を有し、かつ、S-bulk でシーケンス depth が少ない遺伝子 (比が 5 倍以上) が、候補遺伝子同定として 4 つ選抜された。4 つの候補遺伝子を blast 検索したところ、それぞれ、Wall associated kinase (WAK) domain, AUGMIN subunit 3, zinc finger domain, ABC transporter をコードする遺伝子と相同性が高い遺伝子であった。本研究では、近年、他の植物種において圃場抵抗性に関与することが知られている WAK をコードする遺伝子を最有力候補遺伝子として考えて以降の実験を行った (Brutus et al. *PNAS*, 2010; Zuo et al. *Nature genetics*, 2015)。まず、RT-PCR および RNA-seq による発現解析から本候補遺伝子が Nortai 特異的に発現している遺伝子であることを確認した。次に、形質転換体による証明を試みた。形質転換は、Nortai 由来の候補遺伝子を Nortai のネイティブプロモーター制御下で発現させた「ひとめぼれ」形質転換体および RNAi 法によって候補遺伝子の発現抑制をおこなった「Nortai」形質転換体を育成した。形質転換体は、選抜後、2 回自殖して、ホモ接合性が高いと考えられる個体を PCR 法により選抜し、各系統 10 個体ずつイネいもち病菌の接種試験に供試した。その結果、いずれの形質転換体もコントロール非形質転換体とイネいもち病菌に対する耐病性レベルに差は見られなかった (図 3)。それ故、

本研究で候補遺伝子で選抜された WAK をコードする遺伝子は、Nortai の圃場抵抗性に寄与しないことが強く推察された。

候補遺伝子の絞り込みに向けて、Nortai を一回親、ひとめぼれを反復親として DNA マーカー利用選抜を用いて連続戻し交配を行い、準同質遺伝子系統 (NIL) を育成した。NIL は、全ゲノムシーケンスにより、97.7% 以上が反復親であるひとめぼれのゲノムを有することが確認されている (図 4)。また、NIL をイネいもち病菌による幼苗期スプレー接種試験に供試したところ、Nortai と同レベルの抵抗性を示したことから、NIL に導入された Nortai 由来の遺伝子領域に圃場抵抗性遺伝子が座上していることが確認された。圃場抵抗性の確認は、畑晩播試験によっても確認されている。また、NIL は、圃場抵抗性以外の主要形質において反復親であるひとめぼれと有意な差は見られなかった。それ故、北東北地域においてひとめぼれに圃場抵抗性を付与した系統として品種育成に利用されることが期待される。今後、NIL を用いて、従来の DNA マーカーを用いたマッピングを進め、残りの候補の 3 遺伝子に関する絞り込みを再度実施し、Norai 由来圃場抵抗性遺伝子の単離を試みる。

### iQTL-seq 法を用いた穂ばらみ期耐冷性遺伝子の同定

まず、QTL-seq に供試するバルクサンプルを選抜するために「ひとめぼれ」x「ササニシキ」間の F3 世代 190 個体を耐冷性圃場で栽培し、稔実率の調査を行なった (図 5)。その F3 分離集団の中から、稔実率が最も高い 20 個体および稔実率が最も低い 20 個体を選抜し、それぞれ、H-bulk および L-bulk として QTL-seq 解析に供試した。QTL-seq により、ひとめぼれ由来の耐冷性遺伝子が座上する候補遺伝子領域は、7 番染色体の 23-26.1Mb の領域に同定された (図 6)。この領域においてひとめぼれ由来のゲノム配列を再構築するために Local *de novo* assembly を実施し、1,985 本 (N50=3,323bp) のコンティグ配列を取得した。また、穂ばらみ期由来の転写産物を用いて RNA-seq 解析を実施してコンティグ配列における遺伝子予測を行なった。その後、iQTL-seq のパイプラインを用いて構築されたコンティグ配列内でサンプル間のシーケンス depth を比較して候補遺伝子の探索を行なった。現在、得られた候補遺伝子について、ひとめぼれ EMS 突然変異体における TILLING 解析により、機能欠損型変異体のスクリーニングを実施している。今後、候補遺伝子において機能欠損型変異を有する EMS 突然変異体を耐冷性圃場で栽培し、形質の確認を行う予定である。

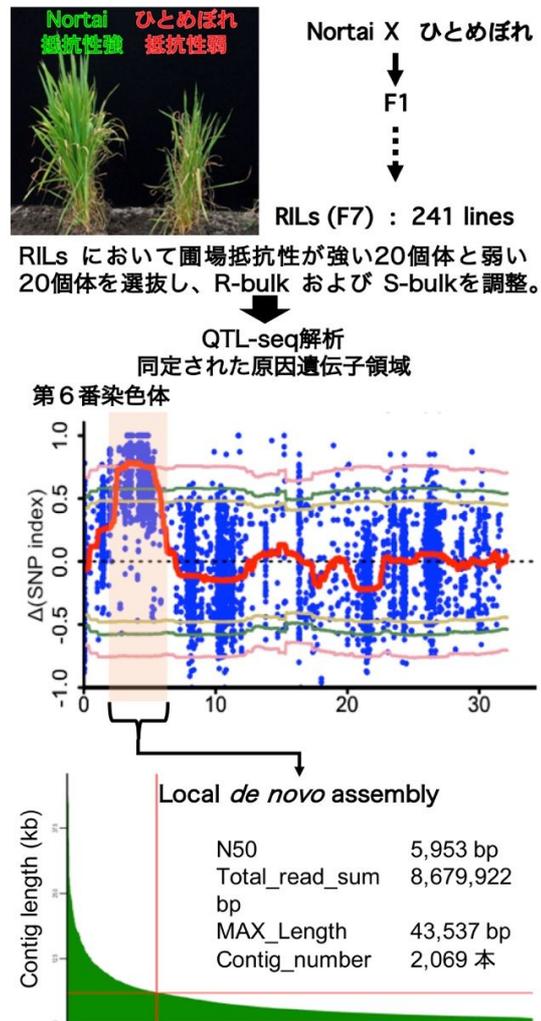


図 1. QTL-seq 解析および Local *de novo* assembly の結果。

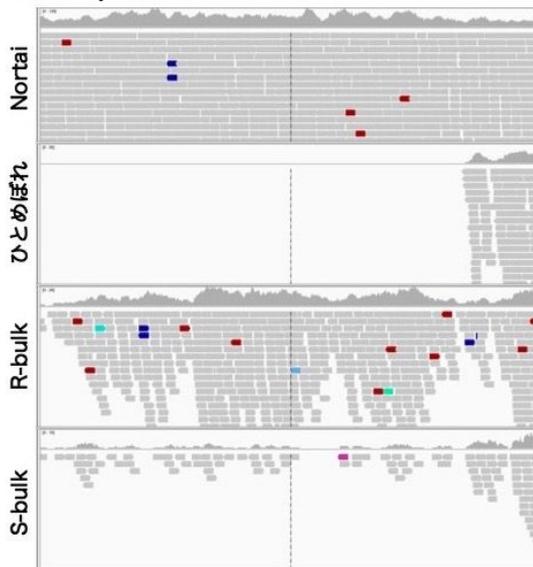


図 2. Contig 176 の WAK 遺伝子がコードされた領域におけるアライメントの様子。上部は、RNA-seq のショートリードを HISAT2 によってアライメントした様子。下部は、gDNA 由来のショートリードを BWA によってアライメントした様子。

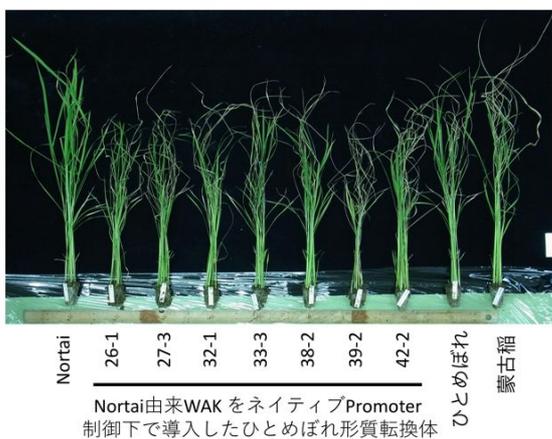


図 3. iQTL-seq で同定された Nortai 由来の WAK 遺伝子をネイティブプロモーター制御下で発現させた「ひとめぼれ」形質転換体。罹病性もち病菌を接種後 2 週間目の様子。

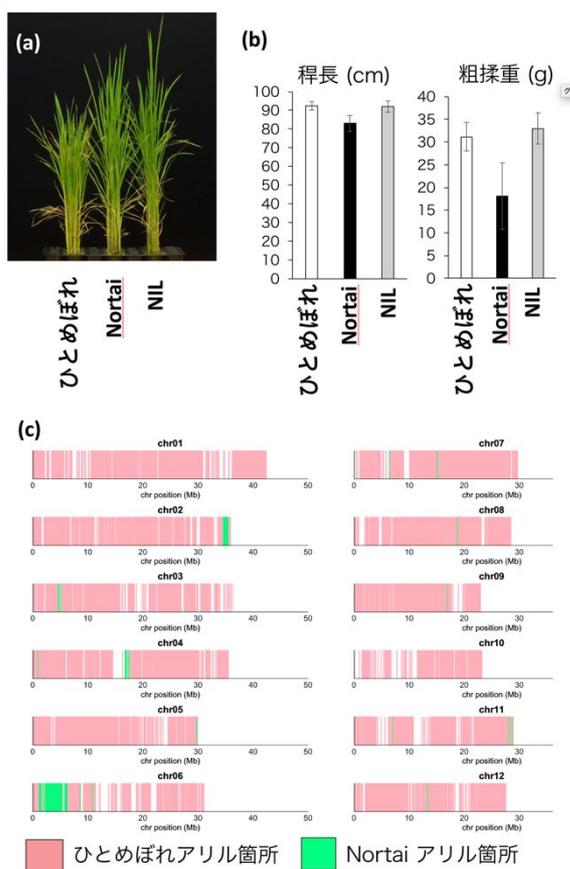


図 4. 育成された NIL の特性評価。(a) ひとめぼれ, Nortai および NIL に罹病性イネもち病菌を接種して 2 週間後の様子。(b) 圃場において育成されたひとめぼれ, Nortai および NIL の稈長および粗粒重。グラフの値は, 10 個体の平均値±標準偏差を示す。(c) 全ゲノムシーケンスによって決定された NIL の全ゲノム中の SNP 箇所におけるジェノタイピングデータ。NIL は, 検出された SNP 箇所のうち, 97%以上がひとめぼれアレルであった。

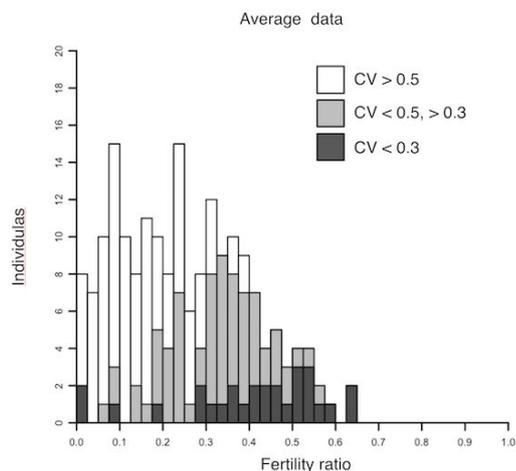


図 5. ササニシキおよびひとめぼれの交雑 F3 世代における稔実率の調査。各系統を 3 個体ずつ栽培し, 各個体から上位 3 穂を採取してその平均値を各系統の稔実率とした。CV は, 変動係数を示す。

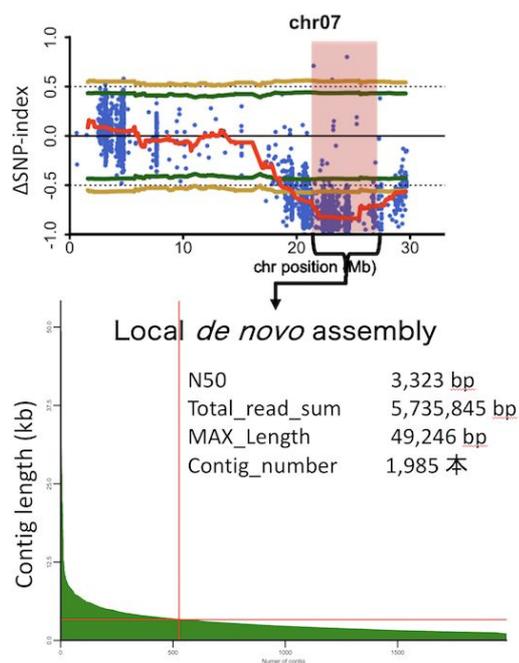


図 6. QTL-seq 解析および候補領域における Local de novo assembly の結果。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

なし。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 宏樹 (TAKAGI, Hiroki)

石川県立大学

生物資源環境学部

准教授

研究者番号: 80616467