

平成30年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07257

研究課題名(和文) 形質選抜はゲノムをどのように変えるのか

研究課題名(英文) Effects of phenotypic selection on the genomic structure

研究代表者

佐藤 和広 (Sato, Kazuhiro)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：60215770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我が国のオオムギ育種の系譜に含まれる109系統についてRNA配列解析および9千あるいは5万の塩基多型アレイ解析によって得られたデータを、系統ごとにオオムギの完全長cDNA配列およびゲノム配列に位置づけた。さらに実際の育種事業の集団で選抜された系統と選抜されなかった系統も同様に解析した。これらのデータから、育種の選抜の中で保守的に残されている領域と改良されているゲノム領域を推定する技術とデータベースを開発した。

研究成果の概要(英文)：Barley strains in the pedigrees of Japanese breeding programs were analyzed by RNA sequence analysis and SNP array analyses of 9 or 50 thousands platforms. The data for each strain were mapped to the full length cDNA and genome sequences of barley. The lines selected or not selected in the population of practical breeding program were also analyzed in the same platforms. From these data, we developed techniques and database to estimate conservatively remaining regions and improved genomic regions during selections in breeding programs.

研究分野：植物育種学

キーワード：育種 オオムギ ゲノム解析 遺伝子型 RNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

これまで作物の品種は目的とする形質の選抜によって育成されてきた。すなわち、開花時期や病害抵抗性など個体判定が可能で少数の遺伝子座に支配されている形質は雑種集団の初期世代から選抜され、品質や収量など多数の個体が必要で環境変動の大きな形質は固定の進んだ中後期の世代で選抜されてきた。現在、重要形質はゲノム情報の充実とともに、関与する遺伝子の単離と機能解析が進行している。また、形質を支配する塩基多型に基づく DNA マーカーによる選抜はゲノム育種法の中心技術となりつつある。

多数の DNA マーカーが利用できるようになると、個々の DNA マーカーを電気泳動で検出するよりはマイクロアレイなどを用いた並列検出が用いられるようになり、検出数は百万単位で可能となった。ただし、少数の親品種に由来する雑種集団の場合、このような多数のマーカーを用いた選抜技術はあまり意味がない。たとえば、オオムギの遺伝地図の全長は 1200 から 1500cM 程度である。これは染色分体あたりの乗換え回数が 12-15 回しか起こらないことを意味しており、7 対の染色体数を有するオオムギでは染色体あたりの乗換えは平均 2 回しか起きていない。DNA マーカーの作業はこの乗換え部位を同定することで、次の乗換え部位までの染色体領域は親の遺伝子型がそのまま保持されて連鎖ブロックとして存在している。

オオムギのゲノム解析が進んで、全ゲノムショットガン解析が可能になると、複数の品種の比較によって大量の DNA マーカー候補（主に一塩基多型:SNP）が得られるようになった。その数は 1500 万（国際オオムギシーケンシングコンソシアム 2012）にもなり、DNA マーカーは自在に活用できるように見える。ところが、実際の育種で用いられる材料で多型解析をすることはなかなか難しい。Close et al. (2009) が開発した cDNA データに基づく 1536SNP の検出が可能システムでは、平均の多型率は 40%（約 600SNP）程度である。しかし、Sato et al. (2011) が解析した日本の醸造用オオムギの品種間（はるな二条とミカモゴールデン）ではわずか 37 個の SNP しか分離していなかった。これは一見品種間にそもそも多型がないためのように見られる。しかし各々の品種について新規に cDNA ライブラリーを作成して品種多型を検出すると、容易にゲノム全体に 1000 以上の SNP が同定可能であった。これは、目的とする品種間で配列解析をしなければ、必要な量の DNA マーカーが得られないことを意味している。

このような知見に基づいて、我々はそれぞれの育種事業で用いられている品種の cDNA 解析を進めてきた。その結果中間母本など選抜の進んだ品種間の交雑に由来する両親間においても、十分な量の多型が得られることがわかった。

さらに、配列解析のための品種を選抜するうちに、育成品種の系譜には同じ交雑親が含まれており、それらが反復して用いられていることが理解できた。試みに、わが国の醸造用オオムギの系譜から重複品種を除いて整理してみると、100 年の育種の歴史が見て取れる。従って、一見複雑に見える育成系譜を構成するゲノムの遺伝子型（ハプロタイプ）は、限定的であることが示唆された。ハプロタイプ間に十分な多型が得られればそれぞれの中間親がどのように選抜されて成立したのかが推定でき、さらに最終の品種が成立するためにはゲノムのどの領域が選抜されてきたのかを推定することも可能であるとみられた。また、系譜に存在する品種のハプロタイプを識別できるマーカーシステムがあれば、この領域は連鎖ブロックを形成しているのか、あるいは十分な乗換えがあるのかどうかも調べることが可能となる。

## 2. 研究の目的

交雑による育種は既存の品種に目的とする形質を持つ品種を交雑し、形質を選抜することで行われてきた。品種の系譜をみると交雑の歴史は明快であるが、どのように選抜が行われて品種が育成されたかを知ることはできない。本研究では、遺伝的に近縁な品種のゲノム領域を識別可能な DNA マーカーを新たに開発し、これらによって系譜上の品種の選抜されたゲノム領域を知ること、さらに、実際の育成系統のうち、育種家が形質で選抜した系統が持つゲノム領域を知ること、「形質選抜はゲノムをどのように変えるのか」をモデル化することである。

乗り換えの起きていない連鎖ブロックにどのような遺伝子が座上しているかをくまなく知ることは、育種にとって極めて重要である。すなわち、これらの遺伝子のそれぞれを詳細に解析することではなく、これまでの品種育成の過程でこれらの連鎖ブロックがどのように選抜されてきたか、そして実際の選抜に際して連鎖ブロックがどのように選抜されるかを推定し、形質選抜がゲノムに対してどのように作用するかを確認し、選抜行為の限界も含めて考察することは重要である。

このような育種学的興味に基づいて、本研究では、代表的な品種の系譜に基づく品種の cDNA 解析を実施して、その選抜ゲノム領域から、品種の成立にかかわる重要領域を推定すること、さらに実際の育成事業と協力して、そのような選抜が集団の選抜においてどの程度行われているかを確認する。本研究では特に遺伝的改良が進み、多様性程度が低いとされている醸造用オオムギの系譜と醸造用の選抜を行わない非醸造用オオムギの系譜を比較して解析する。日本の醸造用オオムギにおいて、完全長解読を実施した高品質の「はるな二条」に収斂する系譜は明快であり、高い醸造品質を維持するためにゲノム領域

がどのように選抜されてきたかを知ることには興味深い。一方で、同じような材料を用いながらも農業形質を重点的に選抜対象としている非醸造用オオムギは、どのようなゲノム領域が選抜されているかを比較するのに格好の研究対照と考えられる。

ゲノム解析は単一品種での精密な配列解析から、遺伝資源の多様性解析へと移行しており、最後には品種育成に活用するための実用技術へと対象を変えつつある。一方で、育種という行為がゲノムにどのような選抜をもたらしているのかを解析した事例は少ない。このような解析は個別の事例によらねばならないが、日本の醸造用オオムギのように選抜が強度で、系譜の明確な対象は格好の研究例であると考えられる。また、育成事業における選抜系統を用いた検証実験はそれを補償するうえで重要である。本研究は交雑育種におけるゲノム選抜を考える上で欠くべからざる作業であり、今後のゲノム育種を行ううえで重要な情報を提供する。その意味では本研究は予備解析であり、将来的にはゲノム育種法の立案に発展する。

### 3. 研究の方法

研究方法は 品種・系統の RNA-seq 解析、品種・系統の遺伝子配列の完全長配列へのマッピングと遺伝子配列の取得、品種間多型の検出、目的品種のハプロタイピングに要約される。

#### (1) 供試材料

醸造用および非醸造用の国産オオムギにおける系譜に含まれる品種・系統のうち、岡山大学で保存している 36 品種を岡山大学の温室および圃場で栽培した。さらに、岡山大学で保存していない 73 品種・系統を育成地から入手して同様に栽培した。

#### (2) 系譜品種の配列解析

オオムギ品種の根、芽および穂の部分から RNA を抽出して、それぞれ RNA シーケンス用ライブラリー (Illumina 社 Truseq キット使用) を作成し、同社 Miseq シーケンサーを用い、同社 v3 シーケンスキットで、約 550 塩基のゲノム断片の両端から 300 塩基ずつ必要量 (約 3~8Gb) の配列解析を実施した。解析した配列はオオムギの遺伝子配列 (醸造用オオムギ品種「はるな二条」に由来する完全長 cDNA 配列約 3 万) にマッピングしてそれぞれの遺伝子に対応する解析品種の配列を取得するとともに、遺伝子のゲノム上の位置情報を決定した。

#### (3) 解析品種および系統のハプロタイプ解析

岡山大学で保存しているオオムギ品種ならびに新規に導入したオオムギ計 109 品種・系統について岡山大学で新規に開発した 9 千マーカーの座標する SNP マイクロアレイ、および英国で開発した 5 万マーカーの座標する SNP マイクロアレイでジェノタイピングを実施した。これらの SNP については、最新のオ

オムギゲノム情報を用いて座標位置を決定した。

#### (4) 育成地における材料および情報の入手

九州・沖縄農業研究センター小麦・大麦育種グループ (筑後市) の育成材料のうち、集団法で個体選抜が終了し系統選抜を実施している系統育成の 2 集団について、現地において系統および交雑親の種子を入手し、核酸分離用のサンプルを採取した。さらに系統についての最終的な育成者の評価および選抜した系統についての情報提供を受けた。

#### (5) 育成地由来の材料の多型解析

入手した核酸および種子サンプルによって RNA-seq ライブラリーを作成し、配列解析した。これらの配列を遺伝子配列にマッピングして系統・品種単位の遺伝子領域の配列を取得し、ゲノム上の位置情報を決定した。さらに、それぞれの集団で選抜した各 40 系統および選抜されなかった各 40 系統ならびに集団の両親について全ゲノム SNP タイピングによって、遺伝子型を判定した。

## 4. 研究成果

### (1) RNA-seq 解析と SNP データのマッピング

岡山大学が保存する 36 品種については計 36 品種のライブラリーを発芽時の根および芽、出穂前の穂のそれぞれで作成し、300 bp のペアードエンドで各品種 5-8 Gb の解読を実施した。さらに、岡山大学で保存していない 73 品種・系統については発芽時の根および芽の混合サンプルでライブラリーを作成し、300 bp のペアードエンドで各品種約 3 Gb の解読を実施した。取得配列は商用ソフトウェア (CLC Genomics Workbench) によって品質調整の後「はるな二条」の完全長配列約 3 万にマッピングした。

この中から SNP 領域を推定し、各用途で複数品種の SNP を取得できる配列を同定した。岡山大学のオオムギゲノムデータベース用サーバー上に「はるな二条」の完全長配列のゲノム上の位置情報を確認し、ブラウザで確認できるシステムを設置した。特に European Bioinformatics Institute (EBI) のオオムギゲノムブラウザを参考として必要な情報を盛り込んだ。さらに、完全長配列上に RNA-seq 解析由来の配列をアラインメントして岡山大学が保存する 36 品種で閲覧可能とした。解析した 36 品種の配列を育成用途別の品種群で多型を確認し、任意の品種のみの表示も可能とする機能、プライマー配列、作成位置の表示、Tm 値を「はるな二条」の完全長配列の塩基位置を指定して表示する機能などを盛り込んだ。

さらに、九州・沖縄農業研究センター小麦・大麦育種グループ (筑後市) の育成材料で、2 つの交配組合せの集団から選抜した各 40 系統のプールおよび選抜されなかった各 40 系統のプールならびに集団の両親の RNA-seq ライブラリーを作成し、配列解析した。

(2) マイクロアレイによるジェノタイピング  
岡山大学が独自に開発した9千マーカーおよび英国で開発された5万マーカーの座する SNP マイクロアレイで計 109 品種・系統ジェノタイピングを実施した結果について、マーカーのゲノム上の位置を同定し、ハプロタイプを確認した。

(3) 公開オオムギゲノム配列のアノテーション情報の改良

オオムギゲノムおよびそのアノテーションは 2017 年に公開された米国品種「Morex」のゲノム配列と高精度 (HC) 遺伝子情報を用いた。このゲノム情報と「はるな二条」の完全長 cDNA 配列およびゲノム配列との比較の結果、「Morex」のゲノム配列には存在しない配列が「はるな二条」のゲノム情報に含まれる場合があった。また、0Hゲノムという7つの染色体に位置づけられない配列が相当量存在した。さらにゲノム情報にはミトコンドリアのゲノム配列が混入していることが知られており、これらを整理して効率的なアノテーションをするために、ミトコンドリアゲノムの配列をオオムギで初めて同定した。BLASTN 解析で E-value = 0 で 400 塩基以上の配列を検索した結果、621 の配列がミトコンドリアゲノムと類似であり、最長で 23,224 塩基のコンティグ配列が含まれることが示された(Hisano et al. 2017)。

(4) RNA-seq データ法の改良

オオムギ品種・系統の RNA-seq データについて、改良されたアノテーション情報を参考に、ゲノム全体に RNA-seq データのマッピングを行った。その後、遺伝子発現領域を決定し、イントロン及び前後 3Kbp を含むゲノム領域を切り出し、RNA-seq 用参考ゲノム情報を作成した。品種ごとに RNA-seq データのマッピングを行い、多型検出を行った。

参照ゲノムへの RNA-seq リードのマッピングと高精度遺伝子から 45,978 か所の発現領域、計 590Mb を決定し、RNA-seq 解析に用いる参考ゲノム配列は 1/8 に縮小した。以上をまとめて、新たな解析パイプラインを構築しオオムギ 109 品種・系統から合計 223 万の多型を取得した。

(5) 選抜ゲノム領域の推定

全ゲノム SNP タイピングした結果から、先に実施した品種の育成系譜で選抜された領域を比較した。その結果、最近の育成品種において、保守的に残されている領域と改良されている領域が明快に示された。一例をあげると、皮ムギ品種の「カシマゴール」は「さやかぜ」×「関東裸 77 号」の交配組合せから育成されたが、染色体 1H は皮ムギ由来、2H および 7H は「さやかぜ」由来、3H は短腕中部が裸ムギでそれ以外皮麦、4H は長腕末部が裸ムギ以外皮麦、5H は長腕中部裸ムギ以外「さやかぜ」、6H は短腕から裸ムギ 関取裸ムギ さやかぜのように染色体およびその部位によって皮ムギの品種グループに保守的 (非選抜) な領域と、裸ムギ等に置換さ

れた領域が明確に示された。

さらに、系譜の中で保存されているゲノム領域を抽出し、それらの領域に含まれる遺伝子群についてのゲノム科学的なアノテーション情報を整理した。申請者が岡山大学から公開中のオオムギゲノムデータベースに本申請の解析内容を追加して、パスワードつきで多型情報を入手可能とした。成果に関する論文は現在準備中で、出版の後にデータベースを公開する予定である。

一方、2 つの交配組合せの集団から選抜した各 40 系統のプールおよび選抜されなかった各 40 系統のプールならびに集団の両親の解析については、これらの集団において選抜されたゲノム領域を推定したが、判然とした結果は得られなかった。このため、選抜系統と非選抜系統の差を示すゲノム領域を効率的に同定するために、DNA プールを解析してシーケンスする Exome QTL-seq 法を開発して、論文成果として公開した(Hisano et al. 2017)。集団における選抜ゲノム領域の推定には更なる手法の改良が必要と考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hisano, H., Sakamoto, K., Takagi, H., Terauchi, R. and Sato, K. 2017. Exome QTL-seq maps monogenic locus and QTLs in barley. BMC Genomics, 査読有, 18:125. DOI: 10.1186/s12864-017-3511-2

Hisano, H., Tsujimura, M., Yoshida, H., Terachi, T. and Sato, K. 2016. Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). BMC Genomics, 査読有, 17:824. DOI: 10.1186/s12864-016-3159-3

〔学会発表〕(計 2 件)

田中剛, 石川吾郎, 小木曾映里, 柳澤貴司, 佐藤和広, RNA-seq に基づく国内オオムギ品種多型解析と育種利用、日本育種学会講演会、福岡県・福岡市、2018 年 3 月 25 日

佐藤和広、オオムギ育種用 SNP タイピングシステムの開発、日本育種学会講演会、神奈川県・横浜市、2016 年 3 月 21 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和広 (SATO, Kazuhiro)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：60215770

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし