

令和元年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07557

研究課題名(和文) 非モデル作物種の完全長cDNA配列の決定とストレス応答性遺伝子の網羅的な発現解析

研究課題名(英文) Iso-Seq and RNA-seq based transcriptome analyses associated with root-knot nematode resistance in sweetpotato

研究代表者

門田 有希 (Monden, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：30646089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモは高次倍数性(2n=6x=90)や自家不和合成等の特徴をもつため遺伝様式が複雑であり、全ゲノム配列情報や遺伝子アノテーション情報は未だに整備されていない。そこで本研究では、Iso-seqやRNA-seq等のNGS解析を行い、サツマイモの転写産物に関する参照配列を構築するとともに線虫抵抗性に関わる遺伝子の同定を試みた。Iso-seqで得られた54000個のアイソフォーム配列と近年公開されたサツマイモ転写産物データを統合することで100,419配列から成る参照配列を構築した。また、線虫抵抗性・感受性品種を対象にRNA-seqを行い、線虫抵抗性に関わる候補遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では他の作物種と比較し遺伝解析の進んでいないサツマイモを対象に、NGSを利用することで転写産物に関する参照配列を構築するとともに重要な農業形質である線虫抵抗性を制御する候補遺伝子を同定することができた。サツマイモのような非モデル作物種において高精度な参照配列を構築し、構築された配列を用いることで重要な農業形質に関わる遺伝子まで同定するに至る一連の研究モデルを示せたことは学術的・社会的に意義が高いと言える。

研究成果の概要(英文)：Sweetpotato is one of the most important crop species in the world, and it has been required to breed superior cultivars with disease resistance, high yield, and nutrient richness etc. However, as a result of the crop's complex genomic architecture, which results from its hexaploidy (2n = 6x = 90), high heterozygosity, huge genome (2-3Gb), and outcrossing nature, its genetic analysis and marker-assisted breeding has been challenging. In addition, the lack of whole genome sequence or gene annotations has hindered the isolation of agronomically important genes or validation of QTL regions. In this study, we performed an Iso-Seq to obtain full length transcripts without the assembly, and also conducted an RNA-seq analysis to understand the mechanism for nematode resistance in sweetpotato. As a result, more than 54,000 isoforms were produced by the Iso-seq, and we could identify candidate gene(s) for controlling nematode resistance.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：サツマイモ トランスクリプトーム RNA-seq Iso-seq 線虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サツマイモは世界的に重要な農作物種の一つであり、病害抵抗性、高収量性などさまざまな優良形質をもつ品種・系統の育成が求められている。しかし、サツマイモは遺伝的に非常に複雑で(他殖性、同質六倍体等の特徴を示す)利用可能なゲノム配列・遺伝子情報も不十分なため、遺伝解析が極めて困難である。最近二倍体野生種のゲノム配列は公開されたが(Hirakawa *et al.*, 2015)、六倍体栽培種については参照ゲノム配列や遺伝子情報の整備はなされていない。近年、ヒト等動物を対象に PacBio 高速ロングリードシーケンサーを利用し、アイソフォームを決定する Iso-Seq (Isoform sequencing) が盛んに行われている。Iso-Seq とは Alternative splicing 等により生じた複数の転写産物(アイソフォーム)をすべてシーケンスし、その配列を決定する手法である。転写産物は 1.5 ~ 5kb であり 100 ~ 150bp の Illumina ショートリードだけではその全体をカバーできない。一方、PacBio ロングリードは平均 10kb であり転写産物全体をカバーでき、高精度に配列を決定できる。

2. 研究の目的

そこで本研究では農作物の収量・外観品質に甚大な被害をもたらすサツマイモネコブセンチュウに注目し、その抵抗性・感受性品種を対象に Iso-Seq や RNA-seq 等を行う。これにより非モデル作物種の参照 cDNA 配列を一から構築・整備し、さらにはストレス抵抗性関連遺伝子の発現情報や配列多型情報も獲得する、という一連の解析モデルを示す。

3. 研究の方法

Iso-seq の解析では、サツマイモ栽培品種「ジェイレッド」の各組織(葉、葉柄、茎、塊根、細根)より Total RNA を抽出し、SMARTer PCR cDNA synthesis kit を用いた逆転写により全長 cDNA を作製した。その後 PCR や 2 段階のサイズセレクション(<2kb、>2kb)、アダプター付加反応等を行い、Iso-Seq 用ライブラリを作製した。2 種類のライブラリについては 6smrt cells ずつ合計 12smrt cells を使用し、PacBio RSII システムを用いたシーケンスによりロングリードを得た。得られたロングリードは SMRT Link 4.0 を用いて解析し、高精度なアイソフォーム配列を決定した。加えて、近年公開された Yang *et al.*, (2017) のサツマイモ転写産物データ (IpoBat4) を統合し、転写産物に関する参照配列 m10 を構築した。またイルミナ社の RNA-Seq リードを用いた配列補正や Blast2GO を用いた機能アノテーション等の解析も行った。さらに、いくつかの遺伝子配列を対象に RT-PCR を行い、構築データの有効性を検証した。

RNA-seq の解析では、抵抗性品種「ジェイレッド」と感受性品種「潮州」を対象に線虫接種・非接種の条件で経時的にサンプリングを行った。Total RNA を抽出した後、KAPA mRNA HyperPrep kit を用い、シーケンス用ライブラリを作製した。HiSeq4000(イルミナ社)によるシーケンスを行い、100bp のペアエンドリードを得た。得られたリードについては前処理やマッピング解析、発現変動遺伝子解析等を行った。

4. 研究成果

PacBio RSII システムの 12smrt cells を用いたシーケンスの結果、合計 1,296,320 のコンセンサス配列(平均長;2,791bp)を得た。さらにクラスタリング及びクオリティフィルタリング等を行い、54,492 個の高精度なアイソフォーム配列を得た。BUSCO ソフトウェアを用い、アイソフォーム配列の網羅性を調べた結果、BUSCO 値は 50.4% と低い値となった。この結果から今回のシーケンスデータだけでは十分な coverage が得られていないことが考えられた。そこで近年公

開された Yang et al., Nature plants (2017)のサツマイモ転写産物データ (IpoBat4) との統合解析を試みた。様々な解析ツール(gffcompare や coresct 等)を用い、かつ重複配列を除去した結果、100,419 配列からなる転写産物に関する参照配列 (m10) を構築することができた。構築された m10 配列の BUSCO 値は 91% となり、網羅性を格段に向上させることができた。さらに pilon ソフトウェアを用い、イルミナショートリードによる塩基補正等も行った。また Blast2GO による機能アノテーション解析の結果、100,419 の転写産物のうち、72,599 の転写産物(79.3%) が GO-Slim でアノテーションされ、8,147 の転写産物(8.1%) が 144 の KEGG pathway でアノテーションされた。さらに、ランダムに選ばれた 5 つの遺伝子配列を対象に RT-PCR を行い、構築データの有効性を検証した。その結果、目的サイズのバンドを検出することができ、今回構築したデータの信頼性を確認した。

サツマイモネコブセンチュウ抵抗性に関する RNA-seq 解析では、HiSeq4000 によるシーケンスの結果、555,137,894 リードが得られた。Cutadapt を用いた前処理によりアダプター配列や低クオリティ配列を除去した結果、545,875,492 (98.3%) のリードが残った。Iso-seq および Yang et al., (2017) の公開データとの統合解析によって構築した参照配列を対象に Bowtie2 を用いリードをマッピングした結果、平均マッピング率は 88.2% であった。マッピング結果を用い、eXpress ソフトウェア (v1.5.1) や edgeR により発現変動遺伝子を解析した。品種間で比較すると線虫接種・非接種条件下いずれにおいても ~8000 個の発現変動遺伝子が検出された。また両品種において線虫接種 1 日後から 6 日後では発現変動遺伝子の数は少なかった。一方、非接種区と接種区を比較すると発現変動遺伝子が多数確認され、線虫接種に伴い多くの遺伝子の発現量が変動することが示唆された。また、先行研究においてネコブセンチュウ抵抗性に関する QTL 解析ならびに GWAS を行い、抵抗性に関する候補遺伝領域を同定している。そこで、候補領域に存在し、かつ抵抗性品種であるジェイレッドで発現が上昇している遺伝子の中から候補遺伝子を探索した。その際、トマトで報告されている線虫抵抗性遺伝子 Mi-1 (Vos et al., 1998) と相同性をもつ遺伝子に絞った。その結果、有力な候補遺伝子の一つを同定することができた。今後は RT-PCR やリアルタイム PCR 等行い、今回見つかった遺伝子の発現量等詳細を調査する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1 . 大畑慎一郎・牛島幸一郎・田淵宏朗・田原誠・門田有希、RNA-seq を利用したサツマイモネコブセンチュウ感染時における大規模トランスクリプトーム解析、第 10 回中国地域育種談話会、2018
- 2 . 小野菜奈・牛島幸一郎・田淵宏朗・大畑慎一郎・田原誠・門田有希、Iso-Seq を利用したサツマイモの高精度な完全長 cDNA 配列の構築、第 10 回中国地域育種談話会、2018
- 3 . Shinichiro Ohata, Koichiro Ushijima, Hiroaki Tabuchi, Makoto Tahara, Yuki Monden, RNA-seq based transcriptome analysis associated with root-knot nematode resistance in sweetpotato, 8th International Sweetpotato Symposium, 2018
- 4 . Nana Ono, Koichiro Ushijima, Hiroaki Tabuchi, Shinichiro Ohata, Makoto Tahara, Yuki Monden,

Iso-Seq analysis for constructing full length cDNAs in sweetpotato, 8th International Sweetpotato Symposium, 2018

5. 門田有希、NGS で 6 倍体サツマイモの形質関連領域を同定する、日本育種学会第 134 回講演会、2018

6. 小野菜奈、牛島幸一郎、田淵宏朗、田原誠、門田有希、Iso-Seq を用いたサツマイモの完全長 cDNA 配列の構築および新規遺伝子の探索、日本育種学会第 133 回講演会、2018

7. 小野菜奈・牛島幸一郎・田淵宏朗・田原誠・門田有希、Iso-Seq を利用したサツマイモの高精度な完全長 cDNA 配列の構築、第 9 回中国地域育種談話会、2017

8. 門田有希、非モデル作物における遺伝解析とロングリードシーケンスを利用した Iso-seq 解析、Annotathon2017, 2017

9. 小野菜奈・牛島幸一郎・田淵宏朗・田原誠・門田有希、Iso-Seq を利用したサツマイモにおける高精度な完全長 cDNA 配列の構築、日本育種学会第 132 回講演会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：牛島幸一郎

ローマ字氏名：Ushijima Koichiro

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20379720

研究分担者氏名：田淵宏朗

ローマ字氏名：Tabuchi Hiroaki

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・

部局名：九州沖縄農業研究センター

職名：上級研究員

研究者番号(8桁): 10355571

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。