

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03752

研究課題名(和文) イネNAM集団を利用した群落ソース能関連遺伝子の解明

研究課題名(英文) GWAS using rice nested association mapping population revealed agronomically important QTLs

研究代表者

阿部 陽 (Abe, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・主任研究員

研究者番号：80503606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：東北地域の主力水稻品種「ひとめぼれ」を共通親とする20組合せ約3,000 RILs (F8～F10) のイネNested Association Mapping 集団を用いて、群落構造に關与する葉身形態や分けつ角度などについてGWASを実施した。全3,000RILsの全ゲノムリシーケンスから、278,947 SNPsから成るGWAS用Genotypeデータセットを構築した。GWASから、葉身幅、SPAD値、分けつ角度において既知遺伝子が原因と推察される主要QTLに加えて、多数のマイナーQTLを検出した。これらQTLの原因遺伝子の同定および機能解明により、イネ多収性ゲノム育種の進展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立されたイネNested Association Mapping 集団とその高密度genotypeデータセットは、今後の基礎研究において有用な遺伝資源である。このNAM集団を用いることによって、多数のQTL遺伝子の同定のみならず、遺伝子間相互作用(エピスタシス)や遺伝子環境間相互作用の解明が達成でき、多収性のような複雑形質の遺伝学的理解が進むことが期待できる。さらには、ゲノム育種による迅速な品種改良によって、グローバルな食糧生産および国内の省力低コスト生産の課題解決に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We generated a NAM population using a Japanese elite cultivar “Hitomebore” as the common parent. Hitomebore was crossed with 20 rice accessions (founders) that represent a wide genetic diversity of *Oryza sativa*, and the resulting F1 progeny have been used to generate recombinant inbred lines (RILs). Finally, we have established a total of 3,021 RILs of F8-F10 generations. The 21 parental accessions were subjected to whole-genome sequencing, resulting in 0.1M-1.3M SNPs detected between “Hitomebore” and each founder. Subsequently, the 3,021 RILs were re-sequenced, and their genotype datasets have been generated based on 278,947 SNPs. GWAS using the rice NAM population successfully detected not only major QTLs but also minor QTLs controlling the various important agronomic traits. In future studies of this NAM population, nonadditive genetic effects like epistatic interaction will be investigated to further explain the genetic basis of complex traits such as high yielding ability.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ NAM GWAS QTL 葉身形態 SPAD

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球規模の気候変動による耕作可能地の減少、作物の栽培適地の移動などが懸念される中、世界人口は 40 年以内に 90 億人に達すると予想され、食糧生産を現在の約 2 倍に増加させる必要が指摘されている (Godfray et al. 2010 Science)。イネは、食糧の 3 分の 1 を供給する重要な作物であり、不良環境への適応や生産量の増大の達成は、食糧問題の解決に大きく貢献することが期待される。この目的のため、イネ系統が進化・栽培化の過程で蓄積してきた多様な自然変異から有用遺伝子・アリル及びその機能を解明し、その情報を活用した分子育種に取り組み必要がある。

(2) これまで、イネ多収性に寄与するとされる QTL/遺伝子の単離研究は多く実施されている。シンクサイズでは、玄米サイズに関与する *qSW5* (Shomura et al. 2008 Nature Genet.) や *GS3* (Mao et al. 2010 PNAS)、籾数を増やす *Gn1a* (Ashikari et al. 2005 Science) や *WFP* (Miura et al. 2010 Nature Genet.) を始めとして多くの遺伝子単離の報告がある。一方、受光態勢や個葉光合成能から成るソース能については、葉身角度に関与する *OsDWARF4* (Sakamoto et al. 2006 Nature Biotechnol.)、個葉光合成能に関与する *GPS/NAL1* (Takai et al. 2013 Sci.Rep.) などの報告があるものの、その数はシンクサイズ関連と比較して少なく、ソース能の向上に寄与する有用遺伝子・アリルの探索が重要である。また、作物の形態・生理生態には多数のマイナー QTL が関わっていることは明らかであり、量的形質の変動の原因となる遺伝子とそれらネットワークを理解することも重要な課題である。

(3) イネで Nested Association Mapping (NAM) 集団を独自に確立した。Yu ら (2008, Genetics) がトウモロコシを材料に提唱した NAM は、複数の Founder 系統 (既存品種) と一つの共通親との交雑から得られた複数組み合わせの数千系統の RILs を用いて、Genome Wide Association Study (GWAS) を行う手法である。NAM は、Founder のゲノムをシャッフルすることで連鎖不平衡がキャンセルされ統計的パワーが高いこと、GWAS と同様に多数のアリルを解析できること、数千系統が持つリコンビネーションと多数の SNPs による高解像度の Mapping ができることなど、従来の QTL 解析及び GWAS に比べてメリットが大きいとされる (Yu et al. 2008 Genetics, Tian et al. 2011 Nature Genet.)。我々は、「ひとめぼれ」を共通親とする 20 組合せ約 3,000 RILs (F8~F10) のイネ NAM 集団を確立し、その全系統について全ゲノムシーケンスによる genotyping を完了した。

2. 研究の目的

単位面積当たりソース能を向上させた多収性イネの育成に寄与することを最終目的として、本研究課題では、独自に確立したイネ NAM 集団を用いて、葉身形態 (葉身長、葉身幅、SPAD 値) に関与する遺伝子の単離とその機能解明、光の利用効率が高いとされる群落構造に関与する V 字葉 (Sasahara et al. 1989 Japan J.Breed.) や葉身角度等の遺伝子の単離とその機能解明を目的とする。

3. 研究の方法

NAM 集団の概要は表 1 のとおりである。共通親として東北地方の主力品種「ひとめぼれ」、Founder 系統として NIAS イネコアコレクション (Kojima et al. 2005) 等 20 系統を交配し、計 3,031 系統の NAM 集団を構築している。この NAM 集団を水田圃場で栽培し、止葉の葉身長・葉身幅、SPAD 値、葉身の形態 (V 字) 分げつ角度を調査する (各系統 5 個体)。

全ゲノムリシーケンスデータから SNP を抽出し、GWAS に用いる SNP データセットを構築する。GWAS は、R パッケージ「rrBLUP」(Endelman 2011) の GWAS ファンクション (Kinship matrix および PC=6 の集団構造を考慮した Mixed Linear Model) にて行う。

GWAS によって候補領域 (QTL) を同定した後は、QTL を保有する NAM 集団の RIL を選び、「ひとめぼれ」を戻し交配することで Fine mapping 集団を作出し、領域の絞り込みを行う。候補遺伝子を同定した後は、QTL ゲノム断片を「ひとめぼれ」 Founder 系統あるいは RIL に導入した形質転換体を作成し、遺伝学的な証明を行う。また、「ひとめぼれ」

表1 NAM集団概要

Common parent	Founders	Country	sub-group	Acc.No.	Generation	No. of Lines
HITOMEBORE (temperate-japonica)	KASALATH	India	aus	WRC 02	F10	170
	SHONI	Bangladesh	aus	WRC 31	F10	123
	TUPA 121-3	Bangladesh	aus	WRC 32	F10	204
	SURJAMUKHI	India	aus	WRC 33	F10	74
	RATUL	India	aus	WRC 36	F10	64
	BADARI DHAN	Nepal	aus	WRC 39	F10	80
	KALUHEENATI	Sri Lanka	aus	WRC 41	F10	237
	C8005	India	aus		F8	248
	KEIBOBA	China	indica	WRC 17	F10	79
	DEEJIAOHUALUO	China	indica	WRC 98	F10	27
	TAKANARI	Japan	indica		F10	139
	JAGUARY	Brazil	tropical-japonica	WRC 47	F10	140
	REXMONT	U.S.A.	tropical-japonica	WRC 50	F10	187
	URASAN 1	Japan	tropical-japonica	WRC 51	F10	143
	TUPA 729	Bangladesh	tropical-japonica	WRC 55	F10	87
	SESIA	Italia	tropical-japonica		F8	250
	NERICA1	West Africa	O.sativa/O.grabberima		F10	36
	MOUKOTO	China	temperate-japonica		F8	250
	NORTAI	U.S.A.	temperate-japonica		F8	249
	HAYAYUKI	Japan	temperate-japonica		F8	244
Total						3,021

を遺伝背景とした準同質遺伝子系統 (NIL) を作出し、QTL の効果を確認する。

4. 研究成果

(1) GWAS genotype データの構築
イネゲノムリファレンス (IRGSP1.0) を用いて、「ひとめぼれ」と各 Founder 系統との間で SNPs を同定した。aus および indica では 100 万~130 万 SNPs、toropical-japonica では 25 万~70 万 SNPs、temperate-japonica では 10 万 SNPs を信頼性の高い SNPs として同定した (図 1)。

上記両親間の SNPs 情報を基に、RILs の genotyping を行った。交配組合せごとに、BCFtools プログラム mpileup コマンドおよび call コマンドにより RILs の genotyping を行い、LB-impute プログラム (Fragoso *et al.* 2016) による imputation で欠失値を補完した後、これらを統合し、3,021 RILs のおよそ 338 万 SNPs による genotype データ (3.38M genotype データ) を構築した。この genotype データから GWAS に用いることができるサブセットを構築するため、SNPs 選抜を行った。SnEff プログラム (Cingolani *et al.* 2012) によるインパクトが高い SNPs の抽出 (HIGH および MODERATE)、任意の window 内においてハプロタイプを生み出す SNPs の抽出などによって、278,947 SNPs の GWAS 用 genotype データを構築した。

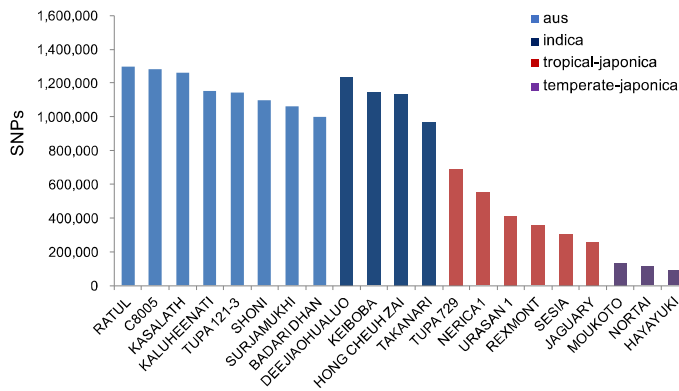


図1 「ひとめぼれ」とFounder系統間のSNP数

(2) GWAS

止葉の葉身幅を形質値とした GWAS から、13 カ所の領域に統計的に有意な SNPs を検出した (図 2A)。 $-\log_{10}(P)$ の値が最も高い SNP ($P = 4.142 \times 10^{-45}$) の位置は、4 番染色体の 31,212,801 bp であり、NAL1 遺伝子のエクソン上に座乗していた。NAL1 遺伝子は、葉身幅および SPAD 値に関与することが既に報告されており (Qi *et al.* 2008, Takai *et al.* 2013)、我々の NAM 集団および genotype データを用いることでピンポイントに形質に関与する遺伝子領域を検出できることが示された。この他、3 番染色体、1 番染色体などに $-\log_{10}(P) > 10$ の SNPs を検出した。

SPAD 値では、3 番染色体に $-\log_{10}(P)$ の値が最も高い SNP ($P = 9.1997 \times 10^{-34}$) を検出した (図 2B)。この SNP を含む 1bp~3Mbp の範囲について、3.38M genotype データを用いて Local GWAS を行ったところ、 $-\log_{10}(P)$ の値が最も高い SNP ($P = 2.0449 \times 10^{-37}$) は、1,270,252 bp に位置していた (図 3A)。

この SNP は、出穂期に関与することが報告されている遺伝子 MADS50 の 3'UTR 下流極近傍に位置していた。また、MADS50 の相補鎖側にコードされている long noncoding RNA (lncRNA) が Early flowering - completely dominant (Ef-cd) として最近報告されたが (Fang *et al.* 2019 PNAS) 当該 SNP はこの Ef-cd のコーディング領域に位置していた (図 3B)。Fang らは、Ef-cd lncRNA の発現量は、MADS50 の遺伝子発現量およびメチル化と正の相関関係にあること、早生型アリルにおいて葉身幅拡大・SPAD 値向上・収量性向上の表現型が観察されることを報告している。当該領域は葉身幅の GWAS においても検出されており (図 2A)、表現

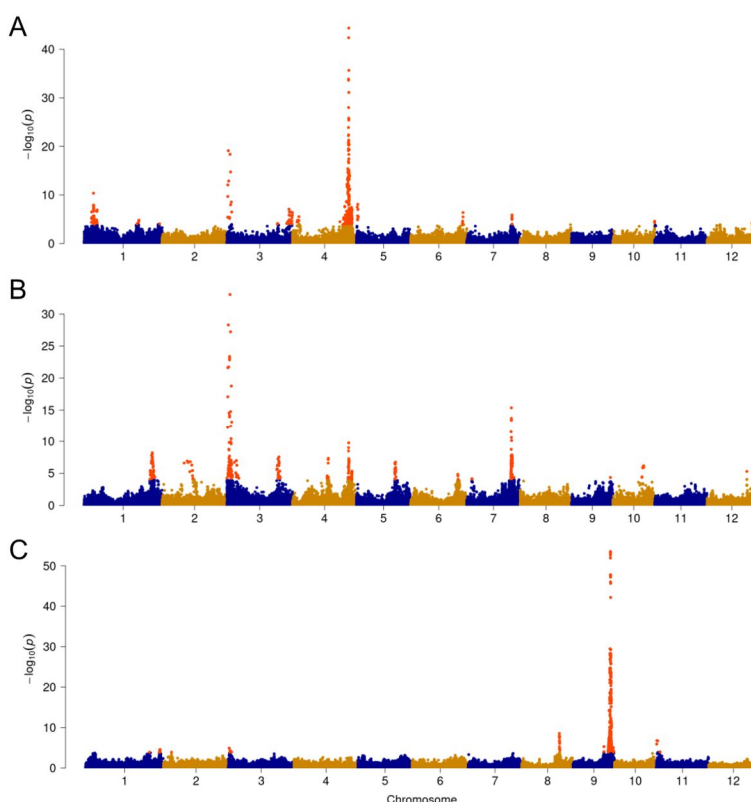


図2 NAM集団を用いたGWAS結果。(A)止葉葉身幅。(B)止葉SPAD値。(C) 分けつ角度。赤点は、FDR adjusted $P < 0.05$ を示す。

型においては Fang らの報告と一致している。本研究の GWAS の結果が、*Ef-cd* によるものかについては検証が必要である。

7 番染色体では、 $-\log_{10}(P)=15.37$ の SNP を検出した。当該領域には窒素吸収に関わる可能性がある遺伝子が座乗しており、候補遺伝子として検証を進めている。この他、1 番染色体、3 番染色体長碗および 4 番染色体に検出した SNPs は、それぞれ *SD1*、*OsTB1*・*SLR1* および *NAL1* を含む領域に座乗していた。

葉身幅と SPAD 値において共通して検出された領域は、3 番染色体、4 番染色体および 7 番染色体であった (図 2A,B)。4 番染色体は Takai ら (2013) の報告にあるとおり *NAL1* が、3 番染色体の原因遺伝子は前述のとおり *Ef-cd* および *MADS50* であると推察された。本研究成果により、主要 QTL においては葉身幅と SPAD 値の両方に影響を与えているが、独立的に形質に関与するマイナー QTL が多くあることが示唆され、これらを集積することによる形質の変化および遺伝子間相互作用解明が今後の課題である。

分けつ角度を形質値とした GWAS では、9 番染色体に $-\log_{10}(P)$ の値が最も高い SNP ($P = 2.9602 \times 10^{-54}$) を検出した。この領域には、分けつ角度に関与することが報告されている *TAC1* 遺伝子 (Yu *et al.* 2009) が座乗していた。また、8 番染色体に検出した領域では、*TIG1* 遺伝子が報告された (Zhang *et al.* 2019)。

(3) V 字葉に関する QTL-seq 解析

NAM 集団の内、明確な V 字型の葉身形態が観察されたのは、*indica* 型の「TAKANARI」および「DEEJIAOHUALUO」由来の RILs においてのみであった。

まず、「TAKANARI」由来 RILs から V 字型の葉身形態を示す系統 N17-002 を選抜し、「ひとめぼれ」と交配した。その自殖後代 F2 集団において、表現型の分離を確認し、V 字型の葉身形態を示す個体を選抜し、「ひとめぼれ」を交配した。これを 2 回繰り返して、「N17-002/ひとめぼれ//ひとめぼれ/3/ひとめぼれ」の F2 集団を作出した。この F2 集団 300 個体を水田圃場へ展開し、V 字葉型の 30 個体 (V 型) および通常葉型 (ひとめぼれ型、H 型) の 30 個体を選抜し、それぞれバルク DNA を調製し、QTL-seq 解析に供試した。

QTL-seq 解析の結果、9 番染色体に 1% 水準で有意な領域、1 番染色体および 3 番染色体に 5% 水準で有意な領域が検出された (図 4)。すなわち、V 字葉形態には複数の遺伝子領域が関与していることが示唆された。

また、「DEEJIAOHUALUO」由来 RILs から V 字型の葉身形態を示す系統 N14-001 を選抜し、「ひとめぼれ」を交配した。この自殖後代 F5 世代 175 系統を圃場に展開し、V 型 30 系統および H 型 30 系統を選抜し、QTL-seq 解析に供試した。その結果、1 番染色体および 9 番染色体の QTL が「タカナリ」の結果と共通して検出された。「DEEJIAOHUALUO」の後代においても、9 番染色体の寄与が高いと考えられたことから、遺伝子同定に向けた解析を進めている。

なお、本課題を進めるにあたり、QTL-seq および MutMap の高速化と使いやすさの改善を達成した新パイプラインを構築し、公開した (Sugihara *et al.* 2020)。

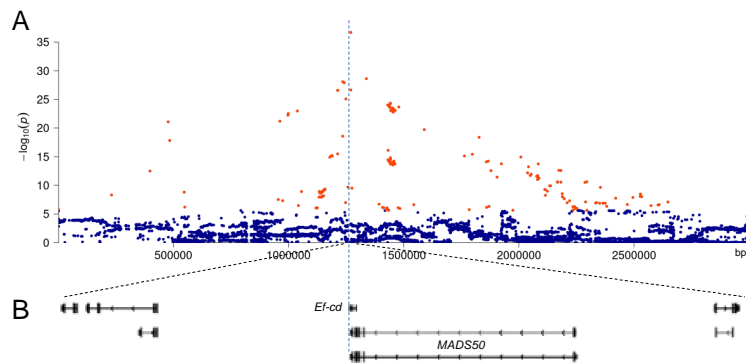


図3 (A) 3番染色体 1-3,000,000 bp 領域における SPAD 値の Local GWAS 結果。
(B) 最も高い $-\log_{10}(P)$ 近傍の遺伝子 (トランスクリプト)。

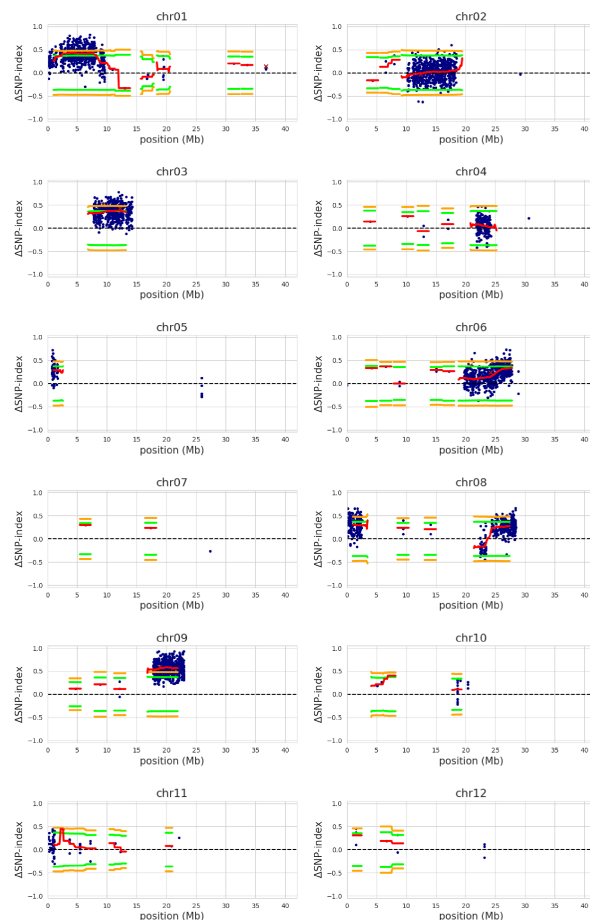


図4 V字葉に関する QTL-seq 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugihara Yu, Young Lester, Yaegashi Hiroki, Natsume Satoshi, Shea Daniel J., Takagi Hiroki, Booker Helen, Innan Hideki, Terauchi Ryohei, Abe Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 High-performance pipeline for MutMap and QTL-seq	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.06.28.176586	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Abe, Hiroki Yaegashi, Shinsuke Nakajo, Tomoaki Fujioka, Yuki Ota, Kaori Oikawa, Hiroe Utsushi, Yumiko Ogasawara, Hideko Kikuchi, Motoki Shimizu, Hiroki Takagi, Ryohei Terauchi
2. 発表標題 GWAS using Rice Nested Association Mapping population revealed agronomically important QTLs
3. 学会等名 Plant and Animal Genome XXVII（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Akira Abe, Hiroki Takagi, Hiroki Yaegashi, Satoshi Natsume, Hiroe Utsushi, Muluneh Tamiru, Ryohei Terauchi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Next-Generation Breeding of Rice by Whole-Genome Approaches. IN: Rice Genomics, Genetics and Breeding. Eds: Takuji Sasaki and Motoyuki Ashikari	

1. 著者名 阿部陽、仲條真介、高木宏樹、清水元樹、太田裕貴、夏目俊、八重樫弘樹、野々上慈徳、植村亜衣子、宇津志博恵、及川香梨、齋藤宏昌、寺内良平	4. 発行年 2017年
2. 出版社 公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会	5. 総ページ数 5
3. 書名 JATAFFジャーナル	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	及川 香梨 (Oikawa Kaori)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究助手 (81202)	
研究協力者	宇津志 博恵 (Utsushi Hiroe)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究助手 (81202)	
研究協力者	八重樫 弘樹 (Yaegashi Hiroki)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究専門員 (81202)	
研究協力者	夏目 俊 (Natsume Satoshi)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究専門員 (81202)	