

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657029

研究課題名(和文)シロイヌナズナ全ゲノム関連解析のハイスループット化のための試験的研究

研究課題名(英文)Pilot studies for high throughput analysis of Arabidopsis GWAS

研究代表者

山本 義治 (YAMAMOTO, Yoshiharu Y.)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50301784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：全ゲノム配列が公開されているシロイヌナズナ 80 系統を用いて植物GWAS解析を試みた。DNA多型情報にはゲノム配列より抽出した150万SNPを用意した。表現型としては光合成活性に影響を与える環境ストレス耐性をタイピングしGWAS解析に供与した。GWAS解析データから、グローバルな状況においては、単一の優良SNPタイプが拡散・展開していく、というよりは単一の遺伝子座における起源の異なる変異が多所的に発生し集積している、という状況が観察され、シグナル検出及びシグナルの有意差検定の方法を新たに開発する必要性が示唆された。擬陽性シグナルが多数観察されたが、用いるSNPを選抜することで除くことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried GWAS mapping using Arabidopsis 80 accessions whose genome sequences have been published (Cao et al, 2011). DNA polymorphism data has been prepared from the genome sequences, and 1.5 M SNPs have been extracted. As for the phenotyping, environmental stress resistance has been measured using photoinhibition as a parameter of resistance. Association mapping was done using TASSEL (Bradbury et al, 2007) and STRUCTURE (Pritchard et al, 2000). Survey of the obtained GWAS signals revealed some differences from human GWAS signals in the peak height and distribution, and the differences are suggested to be due to different population structures between human and Arabidopsis. These differences are to be considered for modification of the human GWAS calculation methods to fit with Arabidopsis studies. As expected, false-positive GWAS signals were observed in our GWAS calculations, and they could be removed by deletion of minority SNP loci from the calculation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：GWAS 環境ストレス 光合成

1. 研究開始当初の背景

表現型に多型を持つ二系統を交配し、分離世代での表現型と DNA のタイピングを行い相関関係を解析するのが QTL マッピングであるが、アソシエーションマッピングにおいては数百の(交配しない)系統を材料に系統間の DNA の多型と表現型の多型データを用いて解析を行う。近年ヒト SNP データの充実を得てアソシエーションマッピングにより多因子性疾患(高血圧等)の原因遺伝子が多数特定されており、解析スキームを整えば極めて強力に表現型~遺伝子の相関を特定出来ることが示されている。シロイヌナズナ研究においては、百程度のアクセシオンを用いたアソシエーション解析でも単一遺伝子まで特定できる場合があるが、擬陽性のシグナルも相当得られてしまうという状況である。

近年 25 万点の SNP 情報(Clark ら(Science 317: 338, 2007) のデータによる)に基づく高密度タイピングの結果が 360 系統について公開されており、このデータを用いれば原理的にはより高精度な Whole Genome Association (WGA) 解析が可能である。さらにコレクションされている 1000 近くのアクセシオンの全ゲノム配列を決定しようというプロジェクトが現在進行中である(Ossowski ら Genome Res 18: 2024, 2009)。この膨大なゲノム配列情報が原因遺伝子の特定にどのような形で利用できるのかは未知数ではあるものの、マッピングの成功率や方法が大きく進展するのは確実であると思われる。

以上まとめると、数百のアクセシオンの表現型タイピングを行うだけで原因遺伝子の同定が行えるようになるということであり、WGA 解析はシンプルかつ非常に強力な遺伝子機能解析方法として期待されている。しかし、克服すべき課題がまだいくつもあり、ストレートに解析が進むような解析環境が整えられている訳ではない。

2. 研究の目的

超高速 DNA シークエンサーの普及により比較ゲノム研究が劇的に進展しつつある。シロイヌナズナ研究においては種内変異系統(アクセシオン)の DNA タイピングデータを参照することで、数百の系統における興味の表現型をタイピングするだけで原因遺伝子座を特定出来るという Whole Genome Association (WGA) 解析の可能性が示唆されている。このアプローチはまだ緒に就いたばかりで解析手段は整備されていない。本申請研究では 360 系統の 250K 公開 SNP データと、光ストレス応答に関わる表現型 (*in vivo* クロロフィル蛍光を用いる)のタイピン

グデータを用意し、シロイヌナズナ WGA 解析に必要な情報環境を整備しつつ原因遺伝子の推定を行う。

3. 研究の方法

in vivo クロロフィル蛍光を指標に光合成活性に影響を与える環境ストレス耐性に関わる表現型をタイピングする。材料には全ゲノム配列決定が行われ、配列データが公開されているシロイヌナズナのエコタイプ 80 系統(ヨーロッパ・北アフリカ・中央アジア原産、Cao et al, Nat. Genet. 43, 956-963, 2011)を用いる。

公開されている配列データから SNP 情報を抽出し、GWAS の計算に用いる。

擬陽性シグナルの出方に注意し、GWAS の計算方法を改良する。

4. 研究成果

(1) テスト解析

光ストレス耐性、低温耐性、そして両者の複合ストレス耐性について全エコタイプの表現型解析を行った。耐性の評価にはクロロフィル蛍光測定による光阻害(Fv/Fmの低下)の程度、そして、ストレス応答のひとつであるアントシアニンの蓄積量を指標として用いた。また、馴化の有無による効果も解析に含めた。

80 系統の公開ゲノム配列より SNP 情報を抽出したところ、約 140 万 SNP を検出することができた。この情報と上記の表現型多型の情報を GWAS 解析ソフト TASSEL (Bradbury et al, Bioinformatics 23, 2633-2636, 2007)を用いて相関解析(遺伝子座のマッピング)を行った。

(2) 解析結果の傾向と解釈

本研究により得られた GWAS 解析データから、グローバルな状況においては、単一の優良 SNP タイプが拡散・展開していく、というよりは単一の遺伝子座における起源の異なる変異が多所的に発生し集積している、という状況が観察された。この状況は凍結耐性の主要決定因子である *CBF2* 遺伝子座のナチュラルバリエーションに関する文献情報とも一致する。観察されたシロイヌナズナの併発・集積を特徴とする GWAS スコアの性質はシロイヌナズナが野外環境において他殖性を失っていることに起因するものと解釈された。

上記のような状況によりシロイヌナズナの集団遺伝学的な特性はヒトの場合とは異なっていることが強く示唆されており、従ってヒト GWAS 研究において確立されている解

析の方針の中にはシロイヌナズナ研究には適合しない部分がある、と考えられた。具体的には以下の2点についてヒト GWAS 解析手法からの修正が必要となるはずである。すなわち、①検出すべき遺伝子座の GWAS シグナルの分布形状（ヒトでは高スコアな単一 SNP を探せばよいが、シロイヌナズナでは中程度のスコアのものクラスター化しているような遺伝子座を検索する）、②検出された遺伝子座の有意性の検定法（シロイヌナズナでのひとつひとつの SNP の GWAS スコアはヒトと比べると低くなるので、単独 SNP ローカスの有意性をヒトの基準で評価するとほぼすべての SNP は有意性なしとして却下されてしまう。シロイヌナズナの場合はクラスター化の確率値を指標に加えた統計診断手法を用いるのがよい）。

研究開始時の課題のひとつに擬陽性の問題があった。解析結果から、マッピングされた SNP ローカスの分布状況から見て明白な擬陽性シグナルが予想どおり多数検出された。解析結果を検討したところ、マイノリティ SNP 型を持つエコタイプが中央値から大きく外れた表現型を持つ場合にこのタイプの擬陽性シグナルが現れることが分かった。そこで、マイノリティ SNP は相関解析から除く、ということでこのタイプの擬陽性シグナルを除くことができた。他のタイプの擬陽性シグナルについては出現理由等検討中である。

(3) 成果

- ① 140 万 SNP 情報を利用した植物 GWAS 解析を行うことができた。
- ② 多量に出現する擬陽性シグナルを除去することができた。

(4) 今後の課題

自殖性生物（シロイヌナズナやバクテリアなど）に適合する GWAS 計算プログラム（シグナル検出及びシグナルの有意性検定）の開発。

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 9 件）

1. Hieno A, Naznin HA, Hyakumachi M, Sakurai T, Tokizawa M, Koyama H, Sato N, Nishiyama T, Hasebe M, Zimmer AD, Lang D, Reski R, Rensing SA, Obokata J, and Yamamoto YY. (2014). ppdb: plant promoter database version 3.0. **Nucleic Acids Res** 42 D1188-1192. doi:10.1093/nar/gkt1027. (査読有)

2. Hieno A, Naznin HA, Sawaki K, Koyama H, Sakai Y, Ishino H, Hyakumachi M, and

Yamamoto YY. (2013). Analysis of environmental stress in plants with the aid of marker genes for H₂O₂ responses. **Methods Enzymol** 527, 221-237. doi:10.1016/B978-0-12-405882-8.00012-X. (査読有)

3. Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshikawa K, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice and soybean. **DNA Res** 19, 37-4, doi: 10.1093/dnares/dsr040. (査読有)

4. Kobayashi Y, Ohshima Y, Kobayashi Y, Ito H, Iuchi S, Fujita M, Zhao CR, Tanveer T, Ganesan M, Kobayashi M, and Koyama H. (2014). *STOP2* activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by *STOP1* in Arabidopsis. **Mol Plant** 7, 311-322. doi:10.1093/mp/sst116. (査読有)

5. Kobayashi Y, Kobayashi Y, Sugimoto M, Lakshmanan V, Iuchi S, Kobayashi M, Bais HP, and Koyama H. (2013). Characterization of the Complex Regulation of *AtALMT1* Expression in Response to Phytohormones and Other Inducers. **Plant Physiol** 162, 732-740. doi:10.1104/pp.113.218065. (査読有)

6. Kobayashi Y, Lakshmanan V, Kobayashi Y, Asai M, Iuchi S, Kobayashi M, Bais HP, and Koyama H. (2013). Overexpression of *AtALMT1* in the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia results in enhanced Al-activated malate excretion and beneficial bacterium recruitment. **Plant Signal Behav** 8, e25565. doi:10.4161/psb.25565. (査読有)

7. Kobayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Shaff JE, Ohta H, Kochian LV, Wagatsuma T, Kinraide TB, and Koyama H. (2013). Molecular and physiological analysis of Al(3)(+) and H(+) rhizotoxicities at moderately acidic conditions. **Plant Physiol** 163, 180-192. doi:10.1104/pp.113.222893. (査読有)

8. Ohshima Y, Ito H, Kobayashi Y, Ikka T, Morita A, Kobayashi M, Imaizumi R, Aoki T, Komatsu K, Sakata Y, Iuchi S, and Koyama H. (2013). Characterization of *AtSTOP1* orthologous genes in tobacco and other plant species. **Plant Physiol** 162, 1937-1946. doi:10.1104/pp.113.218958. (査読有)

9. Sawaki Y, Kihara-Doi T, Kobayashi Y, Nishikubo N, Kawazu T, Kobayashi Y, Koyama H, and Sato S. (2013). Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta** 237, 979-989. doi:10.1007/s00425-012-1810-z. (査読有)

[学会発表] (計 36 件)

1. 中野友貴、大橋聖、山中啓史、井内聖、小林正智、山本義治、小山博之、小林佑理子 「シロイヌナズナにおけるアルミニウム及び低 pH 耐性のゲノムワイド関連解析」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

2. 圓山恭之進、後藤新悟、中島一雄、山本義治、櫻井哲也 「乾燥環境下における単子葉植物 (イネ・トウモロコシ) 特異的シス因子の同定」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

3. 三田村梨帆、野元美佳、森毅、時澤睦朋、山本義治、多田安臣 「JAZ-MYC モジュールを介した NO 初期認識機構の解明」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

4. 野元美佳、森毅、Rajinikanth Mohan、岡和、時澤睦朋、秋光和也、山本義治、Xinnian Dong、多田安臣 「サリチル酸シグナルにおける新奇 NPR1 相互作用因子の機能解析」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

5. 時澤睦朋、小林安文、小林佑理子、井内聖、小林正智、野元美佳、多田安臣、山本義治、小山博之 「シロイヌナズナリンゴ酸トランスポーターALMT1 遺伝子のアルミニウム応答の解析」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

6. 日恵野綾香、Most. Hushna Naznin、百町満朗、澤木克亙、小山博之、樋口美栄子、花田耕介、松井南、時澤睦朋、趙成日、山本義治 「過酸化水素に対する転写応答のマイクロアレイ解析と転写制御配列の in silico 予測」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

7. 速水 菜月、石野はるか、内藤彩乃、日恵野綾香、樋口美栄子、花田耕介、松井 南、山本義治 「シロイヌナズナにおける強光・低温ストレス応答の関連解析」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

8. 内藤彩乃、石野はるか、大橋聖、中野友貴、小林佑理子、小山博之、山本義治 「光合成活性を指標とした強光、低温ストレス耐性のナチュラルバリエーション」日本植物生理学会 (富山) 2014.3.18-20

9. 佐藤壮一郎、松尾充啓、松崎素道、山本義

治、小保方潤一 「ATG 開始コドン欠損型の偽遺伝子化はゲノム上で転写領域の消失を引き起こす」日本分子生物学会 (神戸) 2013.12.3-6

10. Mori T, Nomoto M, Tokizawa M, Akimitsu K, Yamamoto YY, Tada Y. "Prediction of the core cis-regulatory elements responsible for salicylic acid-dependent gene expression. 香川大学農学部主催「ファイトジーンの可能性と未来 VI (国際学会)」(高松) 2013.10.28

11. Mitamura R, Nomoto M, Tokizawa M, Akimitsu K, Yamamoto YY, Tada Y. "Nitric oxide activates JAZ-mediated signaling pathway in Arabidopsis", 香川大学農学部主催「ファイトジーンの可能性と未来 VI (国際学会)」(高松) 2013.10.28

12. 三田村梨帆、野元美佳、森毅、時澤睦朋、秋光和也、山本義治、多田安臣 「一酸化窒素が活性化するジャスモン酸シグナル伝達機構の解明」日本植物病理学会関西支部会 (岡山) 2013.9.26-27

13. 江隈美鈴、小林佑理子、小林安文、山本義治、井内聖、小林正智、小山博之 「シロイヌナズナエコタイプを用いた銅過剰と鉄欠乏クロロシスの関係解析」日本土壌肥料学会 (名古屋) 2013.9.11-13

14. 大橋聖、中野友貴、小林佑理子、山本義治、井内聖、小林正智、小山博之 「シロイヌナズナのアルミ耐性のナチュラルバリエーション」日本土壌肥料学会 (名古屋) 2013.9.11-13

15. 時澤睦朋、小林安文、小林佑理子、山本義治、小山博之 「アルミニウム応答性リンゴ酸トランスポーターALMT1 遺伝子の転写制御機構の解析」日本土壌肥料学会 (名古屋) 2013.9.11-13 **ポスター賞受賞**

16. 時澤睦朋、櫻井哲也、黒谷篤之、篠崎一雄、山中啓史、小山博之、鈴木穰、菅野純夫、小保方潤一、山本義治 「次世代シーケンサーを用いたシロイヌナズナの転写開始点位置の大規模同定」第三回 NGS 現場の会 (神戸) 2013.9.4-5

17. 森毅、野元美佳、時澤睦朋、山本義治、多田安臣 「サリチル酸シグナル伝達における NPR1 応答性シスエレメントの同定」感染生理談話会 (北陸栗津温泉) 2013.8.19-21

18. 三田村梨帆、野元美佳、森毅、時澤睦朋、山本義治、多田安臣 「植物免疫応答における一酸化窒素応答性因子の同定」感染生理談話会 (北陸栗津温泉) 2013.8.19-21 **ポスター賞受賞**

19. 大出奈穂子、遊佐陽一、山本義治、永田典子「囊舌垂目ウミウシの葉緑体取り込みメカニズムに関する超微構造学的解析」日本植物学会（北海道大学）2013.9.13-15
20. 佐藤優太、松山明加、山本義治、早川享志、中川智行「出芽酵母の遺伝子プロモータにおけるアセトアルデヒド特異的応答配列の探索と Met4 依存的硫黄代謝系の機能」日本生物工学会年会（広島）2013.9.18-20
21. 速水菜月、坂井優作、吉岡洋平、百町満朗、時澤睦朋、井内聖、小林正智、齋藤竜典、小林佑理子、小山博之、山本義治「光防御関連遺伝子 ELIP2 プロモーターに含まれる、強光、UV-B、低温ストレス応答を統合する制御配列」日本光合成学会年会（名古屋大学）2013.5.31-6.1 **ポスター賞受賞**
22. 石野はるか、内藤彩乃、大橋聖、小山博之、小林佑理子、山本義治「強光・低温ストレス耐性におけるシロイヌナズナナチュラルバリエーションの解析」日本光合成学会年会（名古屋大学）2013.5.31-6.113.
23. 佐藤壮一郎、松尾充啓、山本義治、小保方潤一「遺伝子重複型偽遺伝子の転写状態の維持における ATG 配列の役割」日本植物生理学会（岡山）2013.3.21
24. 山中啓史, A. Hoekenga Owen, Lipka Alex, Gore Michael, 山本義治, 小山博之, 小林佑理子「シロイヌナズナのアルミニウム耐性のゲノムワイド関連解析」日本植物生理学会（岡山）2013.3.21
25. 日恵野綾香・時澤睦朋・小山博之・小保方潤一・山本義治「植物プロモーターデータベース ppdb ver3.0 の紹介」日本植物生理学会（岡山）2013.3.21
26. 坂井優作、吉岡洋平、百町満朗、時澤睦朋、小林佑理子、小山博之、井内聖、小林正智、速水菜月、齋藤竜典、山本義治「強光・紫外線・低温ストレス及び概日リズムに応答する ELIP2 のプロモーター解析」日本植物生理学会（岡山）2013.3.21
27. 大出奈穂子、遊佐陽一、山本義治、永田典子「囊舌垂目ウミウシの盗葉緑体メカニズムの超微構造学的解析」第37回日本顕微鏡学会関東支部講演会（東京）2013.3.6
28. Yoshiharu Y. Yamamoto, “Arabidopsis Promoter Analysis” Congress of International Plant Biology (ISPMB), Evening Seminar (Jeju, South Korea) 2012.10.23
29. Yoshiharu Y. Yamamoto, “Plant Promoter

Analysis in the Genomic Age” Symposium on Plant Biology and Agrobiotechnology, in honor of Prof. Xing-Wang Den’s 50th Birthday (Beijing) 2012.10.17-18

30. Naznin HA, Yoshioka Y, Hieno A, Yamamoto YY, Hyakumachi M “*In silico* analysis of transcriptional regulatory elements related with disease resistance” 日本植物病理学会関西支部会（鳥取）2012.9.27

31. 山中啓史、Hoekenga Owen, Likpa Alex, Gore Michael, 山本義治、小山博之、小林佑理子「シロイヌナズナにおけるアルミニウム耐性のゲノムワイド関連解析」日本土壌肥料学会（鳥取）2012.9

32. 時澤睦朋、趙成日、澤木宣忠、小林安文、小林佑理子、小山博之、吉岡洋平、百町満朗、山本義治「マイクロアレイデータを用いた金属イオン応答に関わる転写制御配列の解析」日本土壌肥料学会（鳥取）2012.9

33. 吉岡洋平、百町満朗、時澤睦朋、小林佑理子、小山博之、井内聖、小林正智、趙成日、坂井優作、山本義治「合成プロモーターを利用した転写ネットワーク解析の試み」日本土壌肥料学会（鳥取）2012.9

34. Hushna Ara Naznin, Yohei Yoshioka, Ayaka Hieno, Mitsuro Hyakumachi, and Yoshiharu Y. Yamamoto, “*In silico* analysis of transcriptional regulatory elements related with disease resistance”. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, July 29-Aug 2, Kyoto

35. Ayaka Hieno, Naznin Most. Hushna Ara, Yohei Yoshioka, Mitsuro Hyakumachi, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Yoshiharu Y. Yamamoto, “*In silico* prediction of transcriptional regulatory elements for stomatal regulation in disease resistance induced by plant growth promoting fungi”, 77th CSHL Symposium: The Biology of Plants 2012, Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 2012, June

36. Yohei Yoshioka, Mitsuro Hyakumachi, Yuriko Kobayashi, Hiroyuki Koyama, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Tetsuya Sakurai, Kazuo Shinozaki, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Yasuomi Tada, Yoshiharu Y. Yamamoto, “Plant promoter analysis in the genomic age”, 77th CSHL Symposium: The Biology of Plants 2012, Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 2012, June

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 義治 (YAMAMOTO, Yoshiharu)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50301784

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小林 佑理子 (KOBAYASHI, Yuriko)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号：40610952