

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14634

研究課題名(和文) 潜在の変異が生み出す先制適応機構の理解～環境変動耐性の革新的向上に向けて～

研究課題名(英文) Understanding of the pre-adaptation mechanisms generated by cryptic genetic variation

研究代表者

恩田 義彦(Onda, Yoshihiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50547073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： ミナトカモジグサは、コムギやオオムギなどの主要作物が含まれるイネ科イチゴツナギ亜科に属する温帯性モデル草本である。申請者は、標準系統と比較して高温耐性が非常に高いミナトカモジグサ自然系統を複数見出した。そこで、これらの高温耐性が著しく異なる自然系統間のゲノムの潜在の変異に着目した研究を展開した。高温耐性が著しく異なる2系統を交配することで作出したF2集団を展開し、QTL解析を実施した。その結果、第4染色体上に効果の強いQTLを検出することができた。さらに、F3集団を展開して解析を行い、当該QTLを220 kbの領域(40遺伝子)にまで絞り込むことができた。

研究成果の概要(英文)： *Brachypodium distachyon* is an annual grass species that belongs to the Pooideae subfamily and is phylogenetically related to economically important temperate cereals such as wheat and barley. We performed heat stress test with several natural accessions, and found the difference in heat stress tolerance among natural accessions. We found single QTL for heat stress tolerance on chromosome 4 by QTL analysis with F2 mapping population. Moreover, we could narrow the QTL down to 220 kb containing 40 annotated genes by using F3 mapping population.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：ミナトカモジグサ *Brachypodium* 高温耐性 QTL SNP

1. 研究開始当初の背景

これまでの育種では、表現型と遺伝的変異が密接に関連したものを中心に進められてきた。近年、平常時には形質に影響を与えないような潜在的な遺伝的多様性は、環境が激変した際の適応進化に重要な役割があることが、酵素の触媒活性という単純化した *in vitro* の系や (Hayden et al., 2011, Nature)、プランクトンを用いた実験生態系で (Kasada et al., 2014, PNAS) 明らかにされた。申請者は、コムギやオオムギなど主要作物が含まれるイネ科イチゴツナギ亜科の温帯性モデル草本であるミナトカモジグサについて、標準系統と比較して、高温耐性が非常に高い自然系統を複数見出した (図 1)。多くの系統が平均気温 28 で著しい生育阻害を示すのに対して、高温耐性を有する系統は、通常の栽培温度の 22 から 10 も上昇させた 32 の高温環境でも生育できた。本研究では、これらの高温耐性が著しく異なる自然系統間のゲノムの潜在の変異に着目し、内在する高温耐性機構を明らかにすることを試みた。

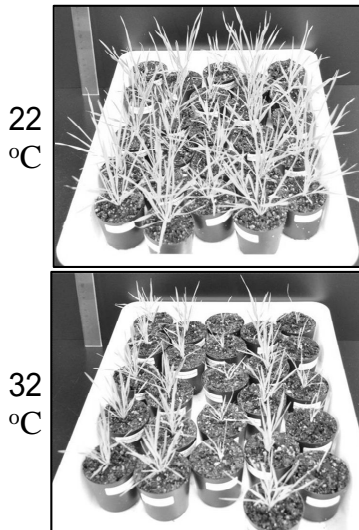


図1 自然系統による高温耐性の差列ごとに系統が異なり、左から1,2,4列目の系統は32 °Cでも生育した。

2. 研究の目的

遺伝的多様性の1つであるゲノムの潜在的変異は、通常の生育環境下では表現型に観察可能な変化をもたらさない。しかし、時として環境が大きく変動した際には有利に働き、適応進化を促進する可能性が長年議論されている。申請者は、温帯性植物ミナトカモジグサから熱帯適応型の自然系統を見出した。この自然系統の高温耐性は、ミナトカモジグサの生存環境では潜在的である。そこで本研究では、この高温耐性に関わる遺伝子とその潜在的変異を同定し、高温環境下における機能を明らかにすることを目的とした。また、このような知見に基づいて、植物の環境変動耐性を向上させる新たな分子育種のための基礎的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

a. 交配によるマッピング集団の作出

既知の交配方法である Garvin Lab method (<https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/1931/BrachypodiumCrossing.pdf>) や Vogel Lab method (<http://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2015/05/Vogel-lab-Crossing-Brachypodium-2-3-2010.pdf>) を参考にしつつ人工交配を行い、複数の組み合わせの F₂ マッピング集団を作出した。

b. 表現型評価と遺伝子型決定

高温耐性の指標となる表現型として、32 の高温環境下で栽培した際の生重量などを用いた。遺伝子多型の解析は、申請者らが開発した multiplex PCR targeted amplicon sequencing (MTA-seq) (論文投稿中) (図 2) により実施した。この方法では、1つの SNP が含まれるような PCR 断片を増幅できるプライマー対により、各個体のゲノム DNA を鋳型として Multiplex PCR を行い、一度に約 400 遺伝子座を増幅した。増幅したアンプリコンについて、Barcoded Adaptors によって個体識別しつつライブラリーを調製し、次世代シーケンサーでアンプリコンの塩基配列を取得した。どの個体由来のサンプルかはバーコード配列で識別でき、どの遺伝子にどのような多型が含まれているかはリファレンスゲノムを参照することで確定した。

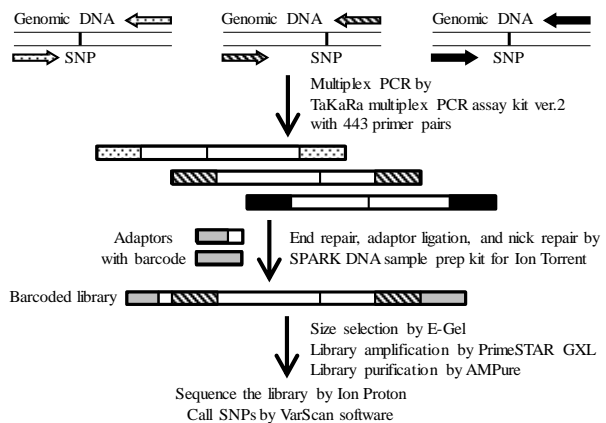


図2 MTA-seq: multiplex PCR targeted amplicon sequencing の概要

c. QTL マッピングと候補遺伝子の探索

取得した F₂ マッピング集団の表現型および遺伝子型のデータを使用して統計解析ソフト R/qtl によるインターバルマッピングを行い、高温耐性 QTL をマッピングした。さらに、当研究室のゲノム情報統合データベース (全長 cDNA 情報、アノテーション情報 (Mochida et al., 2013, PLoS One)) を活用して候補遺伝子を探索した。

d. F₃ 集団の展開と候補遺伝子の絞り込み

F₂ マッピング集団の解析だけでは、候補遺伝子を絞り込むことが困難だと考えられた。そこで、当該 QTL 領域の遺伝子型がヘテロの F₂ 個体を選抜し、自殖により F₃ 集団を展開し

た(図3)。このF₃集団のQTL領域では組換えが観察されると予測でき、高温環境下での表現型を計測することで候補遺伝子のさらなる絞り込みが可能である。

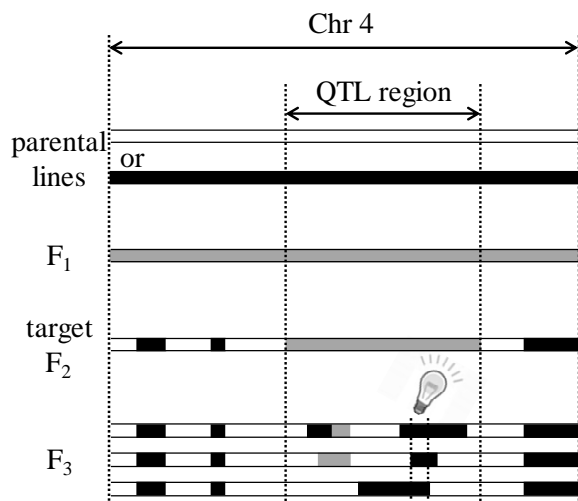


図3 F₃マッピング集団の展開によるQTLの絞り込み

4. 研究成果

ミナトカモジグサは、コムギやオオムギなどの主要作物が含まれるイネ科イチゴツナギ亜科に属する温帯性モデル草本である。これまでの研究で、標準系統と比較して高温耐性が非常に高いミナトカモジグサ自然系統を複数見出した。そこで、これらの高温耐性が著しく異なる自然系統間のゲノムの潜在的変異に着目し、高温耐性機構を明らかにすることを目的に研究を進めた。

まず、高温耐性が著しく異なる親系統を交配して作出したF₂マッピング集団を材料に、高温環境下での表現型の情報と、申請者らが開発した遺伝子型決定方法である multiplex PCR targeted amplicon sequencing (MTA-seq) (論文投稿中) によるゲノムワイドな遺伝子多型情報を得た。合計で760個体のF₂集団を展開し、高温環境下で栽培した時の生重量などを高温耐性の指標としてQTL解析を実施したところ、第4染色体上に非常に効果の強いQTLを見出した。また、上記とは異なる自然系統由来の190個体のF₂集団を展開してQTL解析を実施したところ、第4染色体上の同じ領域にQTLが検出されたため、高温耐性の原因遺伝子は別の系統においても、少なくとも同じ領域に存在することを明らかにした。そこで、これまでにより多くのマッピング集団を展開してきた前述の自然系統に注力して研究を進展させることにした。

次に、当該QTL領域に371 SNPs マーカーを追加・集積させて解析した結果、QTLは642.8 kbの領域の91個の遺伝子に絞り込まれ、これらが高温耐性の原因遺伝子の候補であることが示唆された。当研究室で公開しているゲノム情報統合データベース (<http://brachy.bmep.riken.jp/ver.1/index.pl>) を

利用して、これらの候補遺伝子のアノテーション情報を参照したところ、これまでに高温耐性に効果があると報告されている Heat shock protein や Heat shock factor などは含まれていなかった。

当初の計画では、F₂ 集団での QTL 解析と申請者所属の研究室で整備されたゲノム情報統合データベースを活用して、候補遺伝子を同定する予定であった。しかしながら、データベース情報のみでは候補遺伝子を絞り込めず、また、当該 QTL 領域での組換え頻度が低く F₂ 集団で原因遺伝子をマッピングすることが困難であると考えられた。そこで、原因遺伝子を効率よくマッピングするために F₃ 集団を展開した。F₃ 集団は、当該 QTL 領域の遺伝子型がヘテロ接合型の個体を複数選抜し、それらを自殖させて作出した。この F₃ 集団の高温環境下での栽培試験と遺伝子型情報を、これまでの F₂ 集団の情報とあわせて解析した結果、QTL 領域を 220 kb にまで絞り込み、この領域には 40 個の遺伝子が含まれていた。また、通常環境と高温環境下での親系統のトランスクリプトーム解析を行ったところ、40 遺伝子のうち 23 遺伝子のみがある程度発現している (FPKM が 1 以上) ものであった。この 23 遺伝子を有力な候補と考へて、過剰発現体の作出を進め、高温耐性の原因遺伝子がどれであるかを決定するための実験を進めている。

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 4 件)

Kouzai, Y., Kimura, M., Yamanaka, Y., Watanabe, M., Matsui, H., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Toyoda, K., Onda, Y., Mochida, K. and Noutoshi, Y. (2016) Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. (査読有り) *BMC Plant Biology*, 16 (1): 59.

Onda, Y. and Mochida, K. (2016) Exploring Genetic Diversity in Plants by Using High-Throughput Sequencing Techniques. (査読有り) *Current Genomics*, 17 (3): pp. 356-365.

持田恵一, 恩田義彦, 佐々木忠将, 氷室泰代, 最相大輔, 小林正智, 平山隆志, 篠崎一雄 (2015) 新しいモデル草本植物 ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) (査読無し) *植物の生長調節*, 50 (2): pp. 103-109.

Onda, Y., Hashimoto, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Toyooka, K., Mochida, K. and Shinozaki, K. (2015) Determination of growth stages and metabolic profiles in *Brachypodium distachyon* for comparison of developmental context with Triticeae crops. (査読有り)
Proceedings of the Royal Society B, 282 (1811): 20150964.

【学会発表】(計 3件)

Kouzai, Y., Noutoshi, Y., **Onda, Y.**, Mochida, K. (2017)
Screening and evaluation of sheath blight resistant accessions in *Brachypodium distachyon*. 第58回日本植物生理学会年会. (2017/3/16-18. 鹿児島県鹿児島市)

Onda, Y., Shimizu, M., Takahagi, K., Kato, F., Nakayama, R., Mochida, K. (2016)
Artificial crossing method and development of population genotyping technique based on amplicon sequence in *Brachypodium distachyon*. 第57回日本植物生理学会年会. (2016/3/18-20. 岩手県盛岡市)

Onda, Y., Hashimoto, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Toyooka, K., Mochida, K. and Shinozaki, K. (2015)
Comparison of metabolic profiles across different growth stages and across different stress conditions between *Brachypodium distachyon* and wheat.
2015 International Brachypodium Conference, (2015/6/16-19. Massachusetts, USA)

【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】

ホームページ等
<http://orcid.org/0000-0003-0484-3008>
<http://researchmap.jp/yoshihikoonda>

6. 研究組織

(1)研究代表者

恩田 義彦 (ONDA, Yoshihiko)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員
研究者番号: 50547073

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

持田 恵一 (MOCHIDA, Keiichi)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー
研究者番号: 90387960

清水 みなみ (SHIMIZU, Minami)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

上原 由紀子 (UEHARA, Yukiko)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

加藤 史子 (KATO, Fumiko)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・パートタイマー

中山 梨紗 (NAKAYAMA, Risa)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・パートタイマー