

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06246

研究課題名(和文)長鎖長次世代シーケンサによるイネ育種におけるゲノム動態と進化基本過程の理解

研究課題名(英文)Elucidation of plant genome evolution in rice breeding by long-read next genome sequencing data

研究代表者

井澤 毅 (Izawa, Takeshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：10263443

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文):長鎖型次世代ゲノムシーケンサーの一種であるMinIONを用いて、安価で、ゲノム情報を入手して、来歴のはっきりしたイネの育種におけるゲノムの変化を解析すること、植物の進化における基本過程を明らかにしようと考え、研究を進めたが、x10を超える程度のMinIONデータでは、正確にゲノム配列を決めることが不可能であることが、いろいろな既報ソフトウェアを使った解析から明らかとなった。一方で、イルミナの短鎖readと合わせることで、SV等の新規情報を抽出できることが分かったので、コシヒカリのゲノム解析をして、SVの存在する候補を調べ、一部、PCRによるSVが実際に存在することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MinIONデータが内包する技術的な問題で、MiIONのデータで、安価にイネゲノムの変遷を明らかにすることはできなかったので、当初の目的に到達することができなかったが、MinIONデータとイルミナデータを組み合わせることで、イネ品種コシヒカリのゲノム情報において、日本晴とのSV(Structural Variants)のゲノム上の位置を数十か所見つけることができた。ただし、コシヒカリに存在し、日本晴にない配列情報に関しては、精度に問題が残る状態である。それでも、現在は、コシヒカリをベースにした育種が主流であるので、これからの育種に役立つ情報を提供できた。

研究成果の概要(英文):Using more than ten times depth data obtained by MinION sequencer, we have tried to determine rice genome, but we realized that it may be difficult due to low accuracy of each read. Thus, we were not able to understand the basic principle of plant genome evolution during rice breeding using low-cost MinION data.

Instead, we have found dozen of SV in an elite rice cultivar, "Koshihikari" in Japan compared with the reference rice genome of Nipponbare. This information may be very useful for future breeding process of rice in Japan.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ ゲノム MinION

1. 研究開始当初の背景

当時は、高性能の大型 PC の USB に接続するだけで、安価に長鎖型の DNA 配列情報が大量に入手できるという MinION 技術への期待が大きくなっており、その技術を積極的に取り入れて、この百年間の来歴がしっかり記録されているイネの育種過程におけるゲノムの変遷を明らかにすることが可能になったと考え、本研究を提案した。シーケンサーが消耗品となるという発想の大転換であり、期待度も大きかったが、read の精度が低く、MinION データ単独で信頼できるデータを入手することは非常に難しいということを実感した。今後の改善を否定するつもりはなく、現時点では技術的な限界があるということであり、その点をフォローするために、イルミナデータを利用すると、コスト的な有利さがなくなってしまい、SV の特定等の特殊な用途に限られた使用がしばらくのではと考えられる。

2. 研究の目的

MinION の flow cell は、一サンプルで最大 30Gb の情報が得られ、5 万円強であるので、イネ一品種のゲノムがこのコストで完全解読できる可能性がある。そこで、このシステムを使い、イネゲノムを数多く解析することで、この百年間の記録が残っているイネの来歴とイネの育種におけるゲノムの変遷を解析することで、植物の進化をゲノムの変遷というデータで理解することを目指す。新規変異の集団内の固定や、交配による遺伝子移入(イントログレッション)の詳細等を育種の地図にマッピングすることで理解することを目的とする。

3. 研究の方法

コシヒカリとその兄弟品種の最初のターゲットとして、MinION のデータを入手しようとした。

1) ゲノム DNA の調整の条件検討

一般的に用いられる CTAB 法でのゲノム調整を行い、その DNA で、MinION 用のライブラリ調整を試みたが、マグネチックビーズで、AMPure による調整時に、コンタミした多糖類のため、十分な数の read を得ることができなかった。そこで、いくつかのゲノム調整法を検討した結果、(株)リーゾの DNA すいすいが、AMPure による DNA 精製でも多糖類のコンタミが問題にならないことが明らかとなった。

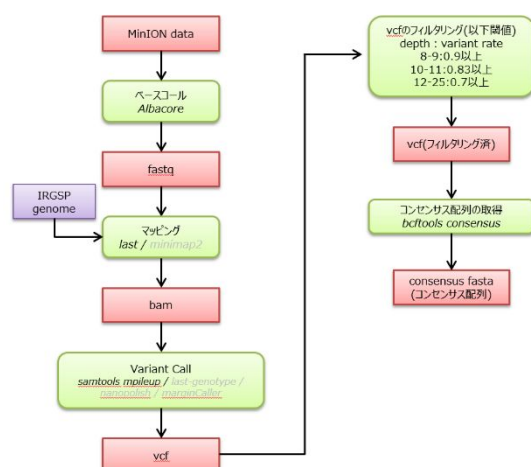
2) MinION が稼働する機器の準備

Dell の Precision Tower を購入し、MinION の稼働に必要なソフトをインストールして、使用した。

3) MinION データの解析、リファレンスゲノムとの比較

得られたデータは、以下のソフトウェアを利用して、得られた read の解析を進めた。

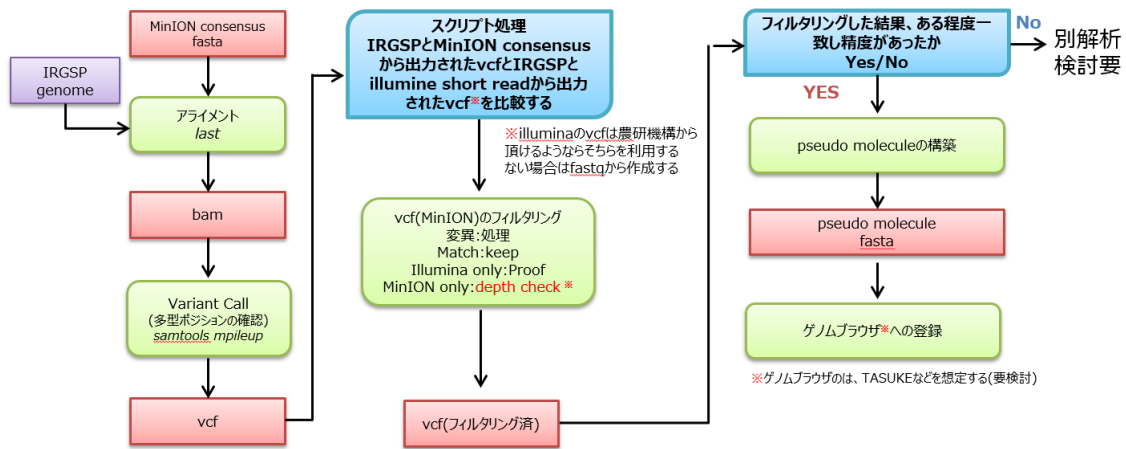
品質に問題があった DNA を用いた MinION データを使って、リファレンスゲノムへのマップ率等を検討した。いろいろと調査した結果、当時、日本で、MinION データをリファレンスにマッピングするために使うソフトウェアは試行錯誤中で、我々は、blastn による長鎖データのゲノムへのマッピングと、last ソフトウェアを利用してのマッピングの条件検討を行った。



その結果、last を中心にした read をリファレンスにマッピングするパイプラインを作成し、以後、このアルゴリズムで read のマッピングを行った。

その Illumina データでの補正を試みた。

その結果、MinION が支持するが、Illumina で支持されない多型が想定外に多く、MinION でのコンセンサスづくりと、Illumina データでの補正という形での MinION データの利用は断念した。



4) SV 情報の取得

MinION データを last でマップした時の read が split する情報を利用して、日本晴とコシヒカリの SV 情報を取り出し、Illumina データで確認し、SV 情報を取りまとめた。

4 . 研究成果

上記のように、MinION の長鎖リードを利用するのに、last によるリファレンスゲノムへのマッピングを行い、コンセンサス配列を獲得したが、Illumina read を Bam-mem と GATK と解析した結果と比較しても、一致しない多型が多く、MinION からのコンセンサス配列を信頼することが難しくなったので、長い INS/DELL、つまり、SV の同定に切り替えて解析を行った。

この解析には、Last split の結果で、read が二か所に分かれてマッピングされるケースを解析し、その結果を minimap 2 や、Illumina data の GATK の結果と比較した。一部の結果を、IGV で調べた結果をここに示す。この結果、コシヒカリの日本晴で、SV の情報を抽出することに成功した。

特定したDELETION

詳細は「Koshihikari_MinION_DEL_Datas_0904.xlsx」を参照ください。

ALL Pos	Split Pos	Same Chr & 1base Pos	2 or more Supported Pos	DELETION
912080	560412	12301	2709	870

特定したINSERTIONS

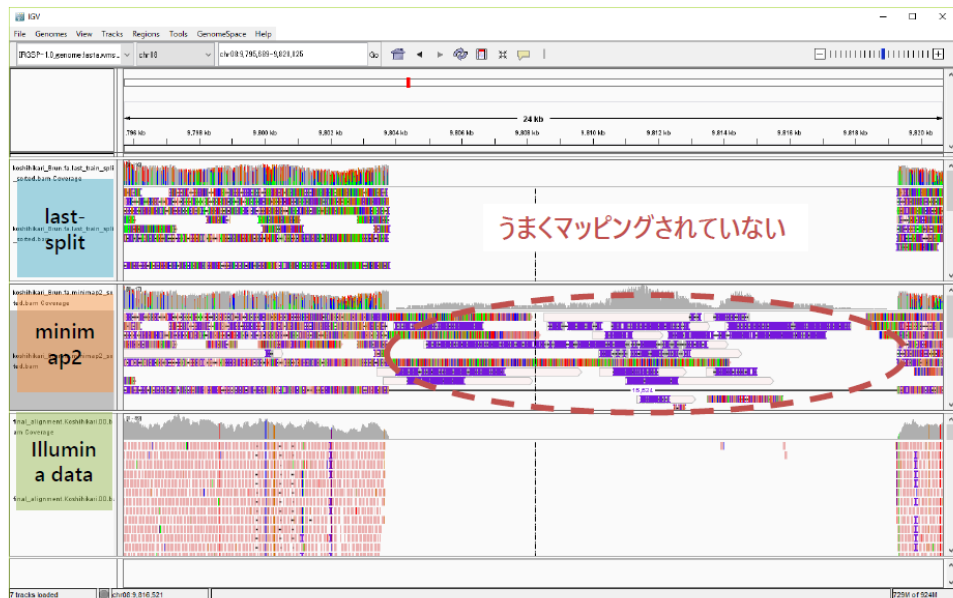
詳細は「Koshihikari_MinION_INS_Datas_0904.xlsx」を参照ください。

ALL Pos	Split Pos	Same Chr & ±10base Pos	2 or more, and INS ≧100base Pos	Same INS Start ±10base range Pos
912080	560412	6028	2022	1522

INSERTIONS	Pilon ×10, and INS ≧ Cover Rate 80%
336	280

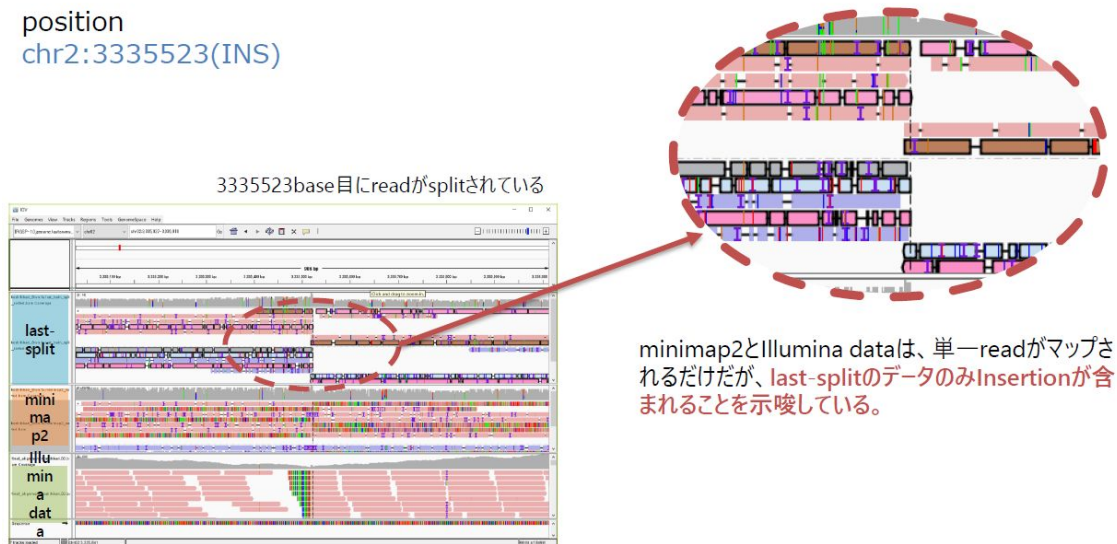
以下に、IGVでの具体例を示す。この例では、last splitで、MinIONデータは、正確にDELを予測できているが、minimap2では、できていない。

position
chr08:9803773(DEL)



INSのケースを以下に示すが、SVの検出には、MinIONデータ利用は有効であることが分かった。

position
chr2:3335523(INS)



minimap2とIllumina dataは、単一readがマップされるだけだが、last-splitのデータのみInsertionが含まれることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh Hironori, Wada Kaede C., Sakai Hiroaki, Shibasaki Kyohei, Fukuoka Shuichi, Wu Jianzhong, Yonemaru Jun-ichi, Yano Masahiro, Izawa Takeshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Genomic adaptation of flowering-time genes during the expansion of rice cultivation area	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 895 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/tpj.13906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Hironori, Tanaka Yuri, Izawa Takeshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Genetic Relationship Between Phytochromes and OsELF3?1 Reveals the Mode of Regulation for the Suppression of Phytochrome Signaling in Rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 549 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/pcp/pcy225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Ryo, Nemoto Yasue, Endo-Higashi Naokuni, Izawa Takeshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Synthetic control of flowering in rice independent of the cultivation environment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Plants	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) doi: 10.1038/nplants.2017.39	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----