

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07630

研究課題名(和文) トウモロコシの耐湿性に寄与するテオシント染色体逆位領域の耐湿性関連遺伝子群の同定

研究課題名(英文) Identification of waterlogging tolerance genes of a teosinte genome region introgressed into a maize genome

研究代表者

アキリ 亘 (ACKLEY, Wataru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：70455319

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)：本研究では、還元ストレス耐性に効果の大きいテオシントのゲノム領域を有するトウモロコシ自殖系統において、還元ストレス応答遺伝子をde novo RNA-seq解析により特定するとともに、同自殖系統ゲノム中のテオシントゲノム領域の物理的位置を推定した。特定した還元ストレス応答遺伝子は、推定されたテオシントゲノム領域内に存在することから、還元ストレス耐性を付与する原因遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国には約30万haの不作付けの水田があり、トウモロコシ等の飼料作物生産の場としての活用が望まれている。しかし、トウモロコシは湿害に弱く、排水不良の水田転換畑で安定的生産するのは困難である。一方、トウモロコシには耐湿性を有するテオシントという近縁種があり、我々はテオシントの耐湿性の一部を従来の交配により取り入れた耐湿性トウモロコシ系統を保有している。この系統は通常のトウモロコシより高い耐湿性を示す。そこで本研究では、この耐湿性系統の遺伝子群を解析し、本系統に耐湿性をもたらす候補遺伝子を同定した。本成果は水田転換畑で安定生産できる耐湿性トウモロコシ品種の開発に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I have identified water-stress responsive genes under reduced soil conditions in a maize inbred line - derived from crossing between maize and teosinte - by de novo RNA-seq. Also, I have presumed a location of the introgressed teosinte genome region in a genome of the maize inbred line by mapping genome sequence data obtained with HiSeq system. Public maize database showed that the most responsive and least responsive genes locate a genome region corresponding to the above mentioned putative teosinte genome region, suggesting that these genes might be related to water logging tolerance.

研究分野：農学

キーワード：トウモロコシ テオシント 耐湿性 還元ストレス 遺伝子発現 染色体逆位 ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

我が国のカロリーベースの食料自給率は39%であり、アメリカ(127%)、カナダ(258%)、ドイツ(92%)、フランス(129%)等の他の先進国に比べて非常に低く、人口増、異常気象、地域情勢の不安定化等による食糧需給の逼迫が懸念される中、国内の食料供給能力の低下が大きな問題となっている。戦後の食文化の多様化による畜産物(肉、乳製品、卵等)の消費量増加に加え、これらの生産に不可欠な栄養価の高い濃厚飼料の低自給率がカロリーベースの食料自給率低下に拍車をかけていることから、濃厚飼料の原料である飼料穀物の増産は我が国の食料安全保障上の大きな課題となっている。

それ故、我が国では全国に約30万haある不作付けの状態の水田を自給濃厚飼料生産の場として活用することが望まれている。しかし、その一方で一般に水田は排水不良のため、水稻以外の作物を栽培すると生育不良を生じることが多く、このことが水田転換畑での飼料安定生産の妨げとなっていることから、耐湿性の飼料作物品種、特に濃厚飼料の基幹作物であるトウモロコシの耐湿性品種が強く求められてきた。

トウモロコシはもともと湿害に弱い作物で、実用に耐える耐湿性を持つ遺伝資源に乏しいことから、種内交配による耐湿性品種育成は困難を極める。しかし、近縁野生種であるテオシントの中には湛水条件下でも高い耐湿性を示すものが存在し、トウモロコシ栽培品種と交雑して後代種子を得ることができることから、テオシントは耐湿性トウモロコシの育種をする上で非常に貴重な遺伝資源と考えられている。これまでにテオシントの耐湿性は、地表不定根形成、根の通気組織、根の表面に存在する酸素漏出バリア、還元ストレス耐性といった組織・生理学的観点から説明されており、それぞれの形質に関連した遺伝学的解析がなされ、遺伝子座が同定されてきた(Mano et al. 2016)。

これら耐湿性に関与する遺伝子座のうち、還元ストレス耐性に効果の大きい領域はテオシントの第4染色体長腕に存在し、当該領域を交雑によりトウモロコシに導入することで耐湿性の向上が期待される。しかし、興味深いことに、交配により導入された当該領域周辺は、トウモロコシのゲノム背景において遺伝的組換えが抑制される。この現象は、当該領域がトウモロコシに相当する領域と染色体逆位の状態であることに起因することが明らかとなっており(Mano et al. 2012)、DNAマーカーで観察する限り、当該領域は後代で遺伝的組換えが生じない。すなわち、遺伝学的に隔離された領域となっている。

これまでに申請者が当該領域を含むトウモロコシ自殖系統に対して行った予備的なゲノム解析によると、約7千万塩基対に相当するトウモロコシゲノムの領域が逆位の状態となってテオシントの染色体と入れ替わっていると推測されている。このことから、テオシントゲノムの染色体逆位領域の物理長も相当長いと考えられ、その中には耐湿性関連遺伝子が複数存在する可能性があるが、未だ同定されていない。それ故、それら耐湿性関連遺伝子を同定し、各々の機能を明らかにすることができれば、テオシントゲノムに由来する染色体逆位領域がトウモロコシに耐湿性を付与するメカニズムを明らかにできる。

## 2. 研究の目的

本研究では、近年著しい発展が認められている次世代シーケンス技術(de novo RNA-seq解析)を活用することで、トウモロコシ内で発現するテオシントの耐湿性に関与する遺伝子群の発現動態を解析し、そこから見出される耐湿性関連遺伝子群と第4染色体長腕に染色体逆位領域として存在するテオシントゲノムとの遺伝学的関係を明らかにする。さらに、トウモロコシ組換え体を用いて耐湿性関連遺伝子の機能解析を実施することで、当該領域がトウモロコシにもたらず耐湿性のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) de novo RNA-seq解析と遺伝子オントロジー(GO: Gene ontology)解析

還元ストレス処理を施した植物体と無処理の植物体から単離したRNAを鋳型として合成した二本鎖cDNAをもとにシーケンスライブラリーを作製し、HiSeq(イノレミナ社)にて塩基配列データを取得した。取得した塩基配列データを使用してTrinityソフトウェアによるアセンブルを行った後、得られたコンティグ配列をリファレンスにして、サンプルごとにRSEMソフトウェアを用いて遺伝子発現量を求めた。また、コンティグ配列のアノテーションとして、NCBIのblastn検索や、ORFの予測、アミノ酸配列のUniPortKBデータベースによるblasp検索、およびGeneOntologyのアサインを行った。GeneOntologyデータを解析ツールAgriGO(Du et al. 2010)に入力し、グラフを出力した。

### (2) 第4染色体内のテオシントゲノム領域の推定

植物体より単離したDNAからシーケンスライブラリーを作製し、HiSeqにて塩基配列データを取得した。取得した配列を解析ソフトウェアGenetyx-Genome(ゼネティクス社)にてマッピングした。マッピングされたデータからトウモロコシのリファレンスゲノム配列と異なる塩基配列を有する断片情報を得た。

#### 4. 研究成果

##### (1) de novo RNA-seq 解析と遺伝子オントロジー (GO : Gene ontology) 解析

自殖系統 Mi29、および自殖系統 IL#18 (テオシントのゲノム領域により高い耐湿性が付与されている) から抽出した RNA の次世代シーケンスによる de novo RNA-seq 解析により構築された転写産物の塩基配列データ (表 1) をもとに、遺伝子オントロジーを整理した (図 1)。また、発現量データを用いて系統間および処理区間で発現量に差があると思われる遺伝子を確認した (表 2、遺伝子名未掲載)。

表 1 シーケンスの概要

	Mi29未処理	Mi29処理	IL#18未処理	IL#18処理
リード数	60,101,196	66,551,724	54,421,606	53,067,05
転写産物数	189,358			
ORF数	68,190			

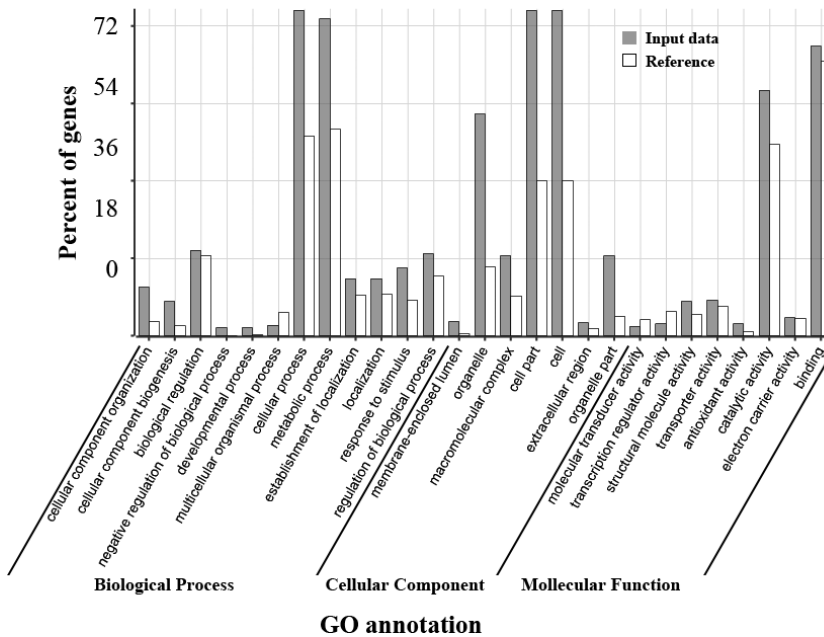


図 1 de novo RNA-seq 解析により構築された転写産物の GO 解析

(白抜き : トウモロコシの全遺伝子に対する各カテゴリーに属する遺伝子数の割合 [比較データ])

表 2 発現量に差のある遺伝子の数

還元ストレスにより発現量に差が認められた遺伝子数		
	Mi29	IL#18
還元ストレス処理-未処理		
高発現 >10000	0	1
1000~10000倍	471	486
100~1000倍	7365	6650
10~100倍	8650	8117
合計	16486	15254
低発現 <1/10000	0	0
1/1000~1/10000以下	379	488
1/100~1/1000以下	5600	5140
1/10~1/100以下	6255	6435
合計	12234	12063

系統間で発現量に差が認められた遺伝子数		
	未処理区	処理区
IL#18-Mi29		
高発現 >10000	3	3
1000~10000倍	511	405
100~1000倍	5144	5755
10~100倍	6113	5879
合計	11771	12042
低発現 <1/10000	1	1
1/1000~1/10000以下	507	459
1/100~1/1000以下	6649	7219
1/10~1/100以下	7821	8895
合計	14978	16574

発現量の差 : log10 ratio

発現量がゼロのデータについては、発現量最小値0.01を代入してlog変換した。

(2) 第4染色体内のテオシントゲノム領域の推定

テオシントゲノムとトウモロコシゲノムの境界を特定するため、イルミナ HiSeq システムにて取得した自殖系統 IL#18b のゲノムのショートリード配列をリファレンスゲノムにマッピングした。当初、遺伝子配列のマッピング深度は、テオシントゲノムに相当する領域で低くなることが予想されたが、解析の結果、そのような傾向は認められなかった（データ未掲載）。そこでさらに、リファレンスゲノムに対して5塩基以上の変異（挿入、欠失、置換）を持つ断片の頻度を1メガ塩基毎にまとめてヒストグラムを作成したところ、変異が多く認められる領域が長腕内で検出された（図2）。当該領域は当初予想された bin4.07 付近を起点としていることから、テオシントゲノムに相当する領域であることが示唆された。

さらに、自殖系統 IL#18b において特に高発現する遺伝子（表2）のゲノム上の位置を公開データベース MaizeDB (Portwood et al. 2018) で確認したところ、テオシントゲノムと推定される領域に存在することが確認され（データ未掲載）、それらが自殖系統 IL#18b に還元ストレス耐性を付与する原因遺伝子である可能性が示唆された。

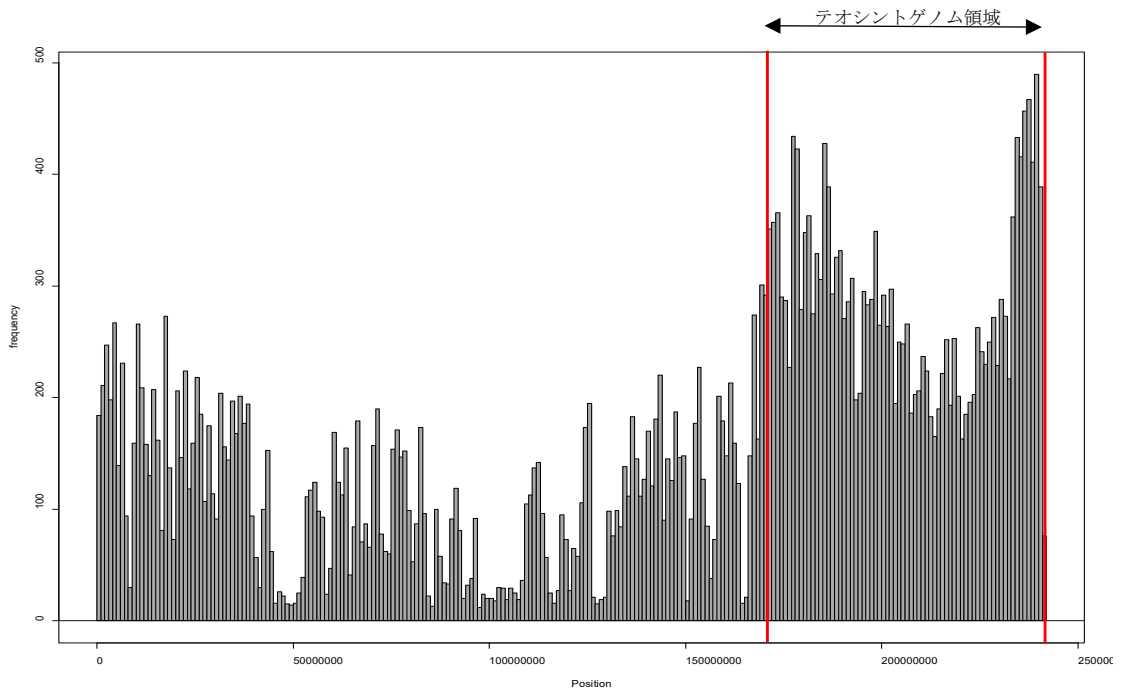


図2 トウモロコシ第4染色体上にマッピングされた変異を含むショートリードのヒストグラム

<引用文献>

- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* 38:W64-W70. doi:10.1093/nar/gkq310
- Mano Y, Omori F, Takeda K (2012) Construction of intraspecific linkage maps, detection of a chromosome inversion, and mapping of QTL for constitutive root aerenchyma formation in the teosinte *Zea nicaraguensis*. *Mol Breed* 29 (1):137-146. doi:DOI 10.1007/s11032-010-9532-z
- Mano Y, Omori F, Tamaki H, Mitsuhashi S, Takahashi W (2016) DNA marker-assisted selection approach for developing flooding-tolerant maize. *JARQ-Jap Agr Res Quart* 50 (3):175-182. doi:org/10.6090/jarq.50.175
- Portwood JL, II, Woodhouse MR, Cannon EK, Gardiner JM, Harper LC, Schaeffer ML, Walsh JR, Sen TZ, Cho KT, Schott DA, Braun BL, Dietze M, Dunfee B, Elsiek CG, Manchanda N, Coe E, Sachs M, Stinard P, Tolbert J, Zimmerman S, Andorf CM (2018) MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res* 47 (D1):D1146-D1154. doi:10.1093/nar/gky1046

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------