

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05587

研究課題名(和文) 超並列ターゲットSNPタイピング法によるイネ耐塩性遺伝子の単離および機能解析

研究課題名(英文) Development of a massively parallel SNP-typing method for rapid and efficient identification of responsible genes in mutants

研究代表者

市田 裕之 (Ichida, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80513382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究目的に応じて一塩基多型などを含むターゲット領域を任意に選択して回収する、オープンソースのターゲット濃縮技術を開発した。イネ品種間に存在する一塩基多型(SNP)をモデルにターゲット濃縮を行い、得られたDNA配列を解析したところ、遺伝子型を決定するSNP領域の前後各50 bpをターゲットとすることで実用的な感度で遺伝子型が決定できることを示した。また、ミヤコグサの組換え自殖系統を用い、ランダムに抽出した22,327のSNP座位をターゲットにSNP濃縮を行った結果、8サンプルを予め混合してシーケンシングした場合でも大部分のSNP座の遺伝子型を正確に決定可能であり、本法の有用性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では商用プラットフォームに依存しない、オープンソースなターゲット濃縮法を開発し、その有効性を複数の生物種で実証した。本研究で確立したターゲット濃縮法を用いることで、研究目的に応じて解析ターゲットを柔軟に設定し、ゲノム上に散在する2万ヶ所以上の領域における遺伝子型を一斉に解析することができる。これにより、従来のマーカー選抜育種では不可能であった、極めて多数の領域における遺伝子型を指標とした集団規模の系統選抜が可能となり、画期的な新品種などの創出に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：An open-source target enrichment technology was developed and used to capture and sequence target regions with single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other mutations. Six rice cultivars were used as a model for a target capturing. Target enrichment and genotyping were successfully performed with a minimum of 50 bp of the target flanks. In addition, SNP enrichment can be successfully performed by pre-mixing eight samples before the target capturing.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ SNPタイピング 重イオンビーム

1. 研究開始当初の背景

品種や系統間の一塩基多型（SNP）を利用してマッピングを行う場合、近接する SNP 同士は強く連鎖するため、必ずしもゲノム上に存在する全ての SNP の遺伝子型を決定する必要はない。むしろ、一定の距離を保ちながら遺伝子型を決定することで、連鎖解析の精度を維持しながら遺伝子型の決定に必要な配列決定量を削減することができ、配列決定コストを低減することができる。この実装として、ゲノム上に散在する制限酵素サイトを利用した **Restriction site Associated DNA Sequencing (RAD-seq; Baird et al., 2008)** が、シーケンシングによる遺伝子型決定における事実上の標準法として利用されている。しかしながら、制限酵素サイトの出現頻度はゲノム領域の塩基組成や反復配列によって大きく左右されるうえ、任意の物理的／遺伝的距離に位置する SNP のみを対象として遺伝子型を決定することは不可能である。すなわち、RAD-seq の弱点である制限酵素サイトに対する依存性を克服し、遺伝子型決定の対象とする SNP を任意に選択可能な新しい遺伝子型決定法を開発することができれば、高密度の SNP 遺伝子型解析によって形質と原因領域の相関を明らかにするゲノムワイド相関解析や、ゲノム情報情報に基づいて目的形質を有する個体を選抜するゲノミックセレクションといった新しい品種改良技術をはじめ、ゲノムワイドな遺伝子型判定に基づく育種技術全体を革新する基盤技術が確立されると考えられる。

申請者らは、我が国における最重要作物の一つであるイネを対象に、ゲノムに散在するタンパク質をコードするエキソン領域（計 300,746 ヶ所）を選択的に濃縮・回収し、その塩基配列を集中的に解析することで変異体における原因遺伝子を迅速かつ低コストで同定する「エキソーム解析技術」を開発した。また、本法による全遺伝子規模の網羅的解析を未選抜のイネ集団を対象とした重イオンビーム誘発変異の解析に応用することで、変異体選抜に伴うバイアスを含まない重イオンビーム誘発変異の特徴を明らかにした（図 1）。

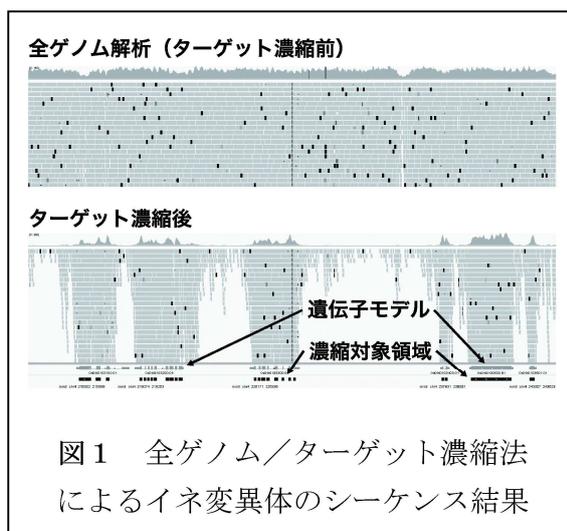


図 1 全ゲノム／ターゲット濃縮法によるイネ変異体のシーケンス結果

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが開発したイネの全エキソンを対象としたターゲット濃縮の原理をゲノム上に散在する SNP 領域における遺伝子型解析に応用し、①アレイ技術を用いて合成した長鎖オリゴ DNA ライブラリを用い、研究目的に応じて任意の SNP を対象として選択的に遺伝子型を決定する「ターゲット SNP 濃縮」に基づく実用的な新手法を開発する。また、本法の実証実験として、イネ耐塩性変異体における変異領域のマッピングを行い、イネの耐塩性に関与するゲノム領域を同定する。

3. 研究の方法

【研究項目 1】長鎖オリゴ DNA ライブラリを用いたターゲット SNP 濃縮法の開発

アレイ技術を用いた商用の大規模遺伝子合成プラットフォームを利用し、SNP 遺伝子型決定の対象とする任意のターゲット領域を選択的に濃縮するプローブ配列を安価に合成する方法を確立する（図 2）。ターゲット濃縮に利用するプローブ配列は目的領域の配列に対する特異性が高いことが重要であり、反復配列や重複が存在する領域に由来する配列を排除する必要がある。このため、既存の *k-mer* 計数ライブラリ (Deorowicz et al., 2015) を用いてプローブ候補配列の反復度を大まかに推定するステップをプログラムに実装し、予め指定した領域の範囲内で最も反復度が低い領域を選択する方法を確立する。また、ターゲット濃縮に最適なプローブ配列長を決定するため、ランダムに選択したターゲット領域に対して異なる配列長を有するプローブを実際に合成し、プローブ長およびプローブ設計領域と濃縮される DNA 配列の広がり、および SNP 塩基におけるタイピング成功率の関係を定量的に評価する。

【研究項目 2】ターゲット SNP 濃縮を応用したイネ耐塩性に関与するゲノム領域のマッピング

重イオンビーム照射によって誘発・単離したイネ耐塩性変異体をモデルに、耐塩性以外の形質が類似のイネ在来品種を交配し、F₂ 集団を作成する。この F₂ 集団を実際に塩害水田で栽培し、各個体の耐塩性の強弱を評価する。開発したターゲット SNP 濃縮法を用いて耐塩性の程度が異なる複数系統の遺伝子型を決定し、耐塩性と連鎖するゲノム領域を絞り込む。

4. 研究成果

ゲノム解析に基づいて検出した一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) および突然変異のリストに基づいて、反復配列や重複領域に座乗するマーカーを可能な限り排除して特異性の高い長鎖オリゴ DNA プローブを設計するプログラムを開発した。本プログラムを用いることで、これら多型領域に特異的に結合するプローブ配列をほぼ全自動で設計することが可能となった。実際に本プログラムを用いてイネ在来品種間の SNP に対応するプローブを設計し、ゲノム配列にみられる特徴から判断して妥当な領域にプローブが設計されていることを確認した。

本プログラムによるプローブ設計の妥当性と、実際に濃縮された DNA 配列の性状を解析するため、DDBJ Sequence Read Archive に登録されたイネ品種「五百万石」「亀治」「コシヒカリ」由来のリードを既報の変異解析パイプラインを用いてイネリファレンス配列にマッピングし、各系統に特異的な SNP を抽出した。これらの中から、各品種でホモ接合の多型を約 100 kb 間隔となるよう無作為に選択し、本プログラムを用いてプローブ配列を設計した。設計したプローブ配列 (計 12,091 種類) を実際に長鎖オリゴヌクレオチドライブラリとして合成し、Biotin-UTP 存在下で試験管内転写反応を行うことでビオチン化 RNA プローブを調製した。このビオチン化 RNA プローブとイネ 6 品種のゲノム DNA から作成したショットガンライブラリを用いて SNP 濃縮を試みたところ、ターゲット領域長を 200 bp 以上とした場合に高精度の SNP タイピングに十分な量のリードが得られた。

また、プローブを設計するターゲット領域長を SNP 座乗部位の前後 50-200 bp に変化させて同様の実験を行ったところ、SNP 前後各 50 bp をターゲットとした場合でも実用的な感度で SNP の遺伝子型を決定可能であることを示した。より大規模な集団を対象とした SNP 濃縮を評価するため、ミヤコグサの組換え自殖系統 (RIL) 120 系統を用い、ランダムに抽出した 22,327 の SNP 座位をターゲットに SNP 濃縮を行った。その結果、8 サンプルを予め混合してシーケンシングした場合でも大部分の SNP 座の遺伝子型を正確に決定可能であり、本法の有用性を実証した。これらのことから、本法によって理論通りに SNP 濃縮が可能であることを実証した。

本法を応用した形質マッピングの実証実験として、イネ品種「日本晴」種子に重イオンビームを照射した後代集団 (M₂) から見いだされた塩害水田において良好な生育を示す耐塩性変異系統の全ゲノム解析を実施した。得られたリードは超並列計算システム上に構築した変異検出パイプラインを用いてリファレンス配列 (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) にマッピングし、異なるアルゴリズムに基づく 4 種類の変異検出プログラムを用いて変異体ゲノムに誘発された変異を網羅的に検出した。その結果、計 509 の変異 (うちホモ接合: 125, ヘテロ接合: 386) を検出した。本研究で開発したターゲット濃縮法を用いてイネ耐塩性変異体の原因領域を同定するため、耐塩性変異体に親品種である日本晴を戻し交雑した自殖後代を塩害水田で栽培した。F₂ 世代で耐塩性が強かった個体の後代を列植えて評価すると、通常の劣性遺伝とは明らかに異なる分離比で非常に強力な耐塩性を有する個体が出現した。穀粒判別機を用いて塩害水田で収穫した 34 系統・171 個体の種子を測定したところ、塩害水田での耐塩性評価が、種子の大きさ (投影断面積) および厚みと高い相関を有することが分かった (p<0.01)。今後、これらの形質を指標に、非メンデル遺伝が原因の可能性も想定しながら遺伝子単離を進める予定である。

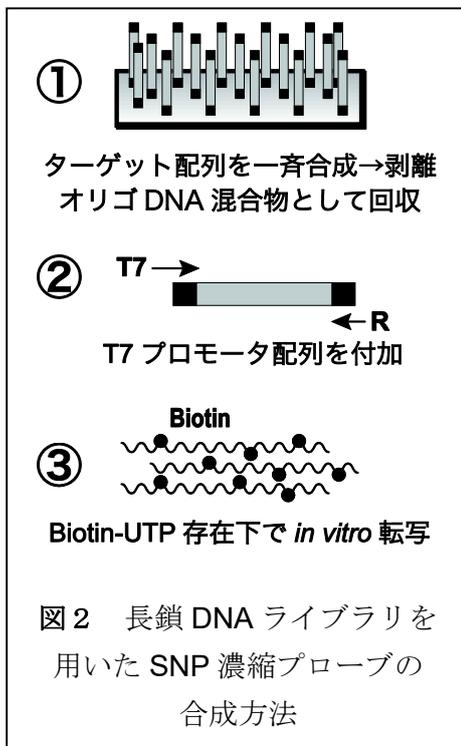


図2 長鎖 DNA ライブラリを用いた SNP 濃縮を試みたところ、ターゲット領域長を 200 bp 以上とした場合に高精度の SNP タイピングに十分な量のリードが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hisashi Udagawa, Hiroyuki Ichida, Takanori Takeuchi, Tomoko Abe and Yoshimitsu Takakura	4. 巻 -
2. 論文標題 Highly efficient and comprehensive identification of ethyl methanesulfonate-induced mutations in <i>Nicotiana tabacum</i> L. by whole-genome and whole-exome sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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） 10.3389/fpls.2021.671598	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ichida Hiroyuki, Morita Ryouhei, Shirakawa Yuki, Hayashi Yoriko, Abe Tomoko	4. 巻 98
2. 論文標題 Targeted exome sequencing of unselected heavy ion beam irradiated populations reveals less biased mutation characteristics in the rice genome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 301 ~ 314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tbj.14213	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市田裕之, 阿部知子
2. 発表標題 オープンソースな変異タイピング手法の開発とイネをモデルとした概念実証
3. 学会等名 日本育種学会 第137回講演会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------