

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20585

研究課題名（和文）トランスクリプトーム関連解析によるコムギ種子関連シス・トランス因子の網羅的単離

研究課題名（英文）Transcriptome-wide association study of synthetic hexaploid wheat accessions

研究代表者

西嶋 遼（Nishijima, Ryo）

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：00841561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：合成パンコムギ82系統ならびにABゲノム提供親Ldnの開花1週間後の胚乳を材料にRNA-seq解析を行った。パンコムギ参照配列由来のABゲノムとタルホコムギ参照配列のDゲノムを統合した擬似合成パンコムギ配列に対しリードをマッピングした。Ldnに対し合成パンコムギで高発現、低発現していた遺伝子数はAゲノムにおいて132、380、Bゲノムでは97、238であった。Dゲノムにマップされたリードからは5890のSNPが抽出された。その内、Dゲノム由来の転写因子に非同義置換を生じ、形質との間に高い相関を示すABゲノム由来の遺伝子の発現量を対象としたGWASで有意な関連を示すSNPが3つ見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に異質倍数体種は祖先二倍体種に比べて高いストレス耐性を示す。これは、環境に応じて同祖遺伝子の発現を調整することで、適応性を向上させてきたためと考えられている。近年、モデル植物の異質倍数体種において、発現バイアスと有用形質との関連性が議論されてきたが、特にコムギではゲノムの大きさと複雑性から理解が進んでこなかった。本研究では、倍数性進化の過程を人為的に再現した合成6倍体コムギ系統群を用いて、コムギにおけるトランスクリプトーム関連解析の適用可能性を検証した。植物の発生段階の任意の一点で働くシス・トランス因子を網羅的に単離できれば、エンハンサーの改変など、新たな育種への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：RNA-seq analysis was performed using endosperms of 82 synthetic hexaploid wheat accessions and their common AB-genome progenitor tetraploid wheat cultivar Langdon (Ldn) at one week after anthesis. The RNA-seq reads were mapped to pseudo-synthetic hexaploid genome sequence, which consists of the AB genomes of the bread wheat reference genome, IWGSC RefSeq v2.1 (Alaux et al. 2018), and the D genome of the Ae. tauschii reference genome, Aet_v5.0 (Wang et al. 2021). Compared to Ldn, 132 and 97 genes were up-regulated and 380 and 238 genes were down-regulated on A and B genomes, respectively. From the reads mapped to the D genome, 5890 SNPs were detected, three out of which were shown to be associated with the expression levels of AB genome-derived genes having strong positive correlation coefficients with seed morphological traits of the synthetic hexaploid wheat accessions.

研究分野：植物遺伝学

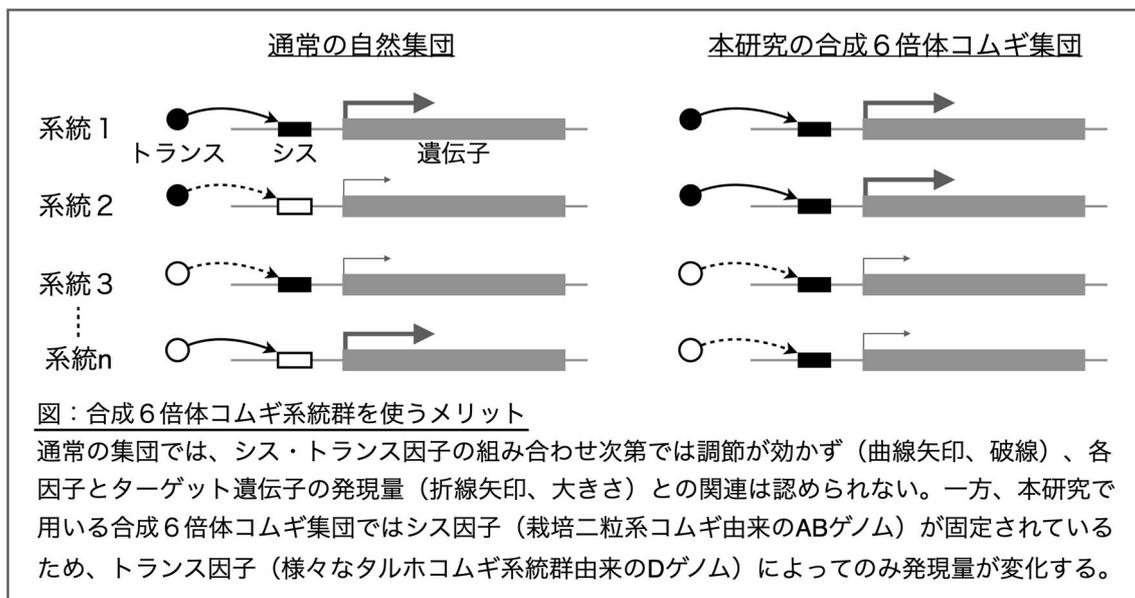
キーワード：合成パンコムギ、タルホコムギ、ゲノム間クロストーク、シス・トランス因子、種子、胚乳、トランスクリプトーム関連解析、異質倍数体

1. 研究開始当初の背景

コムギやワタをはじめとする異質倍数体種では、あるサブゲノム由来のトランス因子(転写因子や **sRNA**)が別のサブゲノムのシス因子(プロモーターやエンハンサー)に結合して発現を制御するゲノム間クロストークの存在が古くから唱えられてきた(Yoo et al. 2013)。これが、多様な遺伝子発現パターンを可能にし、倍数体種が祖先二倍体種よりも高生産性、高ストレス耐性、広域適応性を示す一因であると考えられている。実際に、パンコムギや倍数体ミナトカモジグサにおいて、塩ストレスや高温ストレスに呼応してサブゲノム間の発現様式が変化することが報告されているが(Takahagi et al. 2018)、一連の応答にまつわる分子機構の多くは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、異質倍数体種におけるゲノム間クロストークを制御するシス・トランス因子の網羅的な単離を目的に、合成6倍体コムギを対象とした **TWAS** を行う。**TWAS** は、その名の通り **GWAS (genome-wide association study)** とトランスクリプトーム解析あるいは **eQTL** 解析を組み合わせた手法だが(Gusev et al. 2016)、障壁となるのがシス・トランス因子の組み合わせの問題である(図)。通常の自然集団ではシス因子とトランス因子の双方に多型が存在することから、それらの制御下にある遺伝子の発現量は必ずしも一方の効果を表していない(図、左側)。一方、本研究で用いる合成6倍体コムギ集団(ゲノム構成 **AABBDD**)は、栽培二粒系コムギ品種 **Langdon (Ldn, ゲノム構成 AABB)** と様々なタルホコムギ系統群(ゲノム構成 **DD**)との交配から作出されたものであり、**AB** ゲノムの遺伝子発現変動は、**AB** ゲノム由来のシス因子が固定されているために、**D** ゲノム由来のトランス因子の多型のみで左右される(図、右側)。このことから、通常の自然集団におけるシス・トランス因子の組み合わせの問題を克服し、精度の高い **TWAS** が可能になると考えられる。**TWAS** によって植物の発生段階の任意の一点、あるいはストレス条件下で働くシス・トランス因子をカタログ化できれば、エンハンサーの改変など、新たな育種が発展することも期待される。



3. 研究の方法

具体的には、合成6倍体コムギ **82** 系統について、開花後1週間の胚乳を材料に **RNA-seq** 解析を行った。研究計画時点では種子登熟期に先立って幼苗でもトランスクリプトーム解析を実施する予定であったが、種子の発芽率が低くサンプル数を確保できなかったために実施を見合わせた。また、当初は **BrAD-seq** 法(Townsend et al. 2015)により **3'** 末端 **RNA-seq** ライブラリを作製する予定であったが、シミュレーションの結果、同祖遺伝子を区別できなくなると考え、転写産物全長のライブラリに変更した。パンコムギ参照配列(**IWGSC RefSeq v2.1 from URGI repository**)由来の **AB** ゲノムとタルホコムギ参照配列(**Aet_v5.0**)を統合した擬似合成パンコムギ参照配列に対し、**STAR (Dobin et al. 2013)** を用いてリードをマッピングした。種子の長さ、幅、高さ、千粒重などを対象形質に、**RNA-seq** 解析から得られた **AB** ゲノム由来の各同祖遺伝子の発現量と、**D** ゲノム由来の **SNP** 情報を組み合わせ、**TWAS** を実施した。**TWAS** 内における **GWAS** には **rrBLUP (Endelman et al. 2011)** を、**eQTL** 解析には **Matrix eQTL (Shabalina 2012)** を使用した。

4. 研究成果

(1) 合成6倍体コムギの種子関連形質の調査

合成6倍体コムギ **82** 系統の **3** 穂を収穫し、穂長、小穂数、不稔小穂数、第一・第二小花の種子高、ならびに **SmartGrain (Tanabata et al. 2012)** により第一・第二小花の種子数、種子長、種子幅、周囲長、面積、種子長/幅比、重心のずれの計 **22** 形質を計測した。**KS** 検定の結果、不稔小穂数を除く **11** 形質で正規分布を示した。各形質間の相関を調べると、穂長と種子長が最も高い正の相関を、小穂数と種子長が最も低い負の相関を示した。合成6倍体コムギの **D** ゲノム提供親となったタルホコムギ系統群は遺伝的に大きく **3** つの **lineage** に分かれる (**Matuoka et al. 2013**)。今回使用した **82** 系統のうち、**29** 系統は **TauL1** に、**49** 系統は **TauL2** に、**4** 系統は **TauL3** に由来する。種子高と種子幅、穂長、小穂数については **TauL1** が **TauL2** より有意に低く、不稔小穂数と種子長/幅比については有意に高かった。この傾向はタルホコムギと概ね一致していた。

(2) 合成6倍体コムギ胚乳の RNA-seq 解析

合成6倍体コムギ **82** 系統の RNA-seq 解析の結果、**10.1 M** から **3.6 M** まで、平均で **5.3 M** のリードが得られた。擬似合成パンコムギ参照配列に対するマッピングの結果、**69.0%** から **92.6%** まで、平均で **85.4%** がゲノムの一カ所にマップされた。少なくとも全系統の **9** 割 (**74** 系統以上) で発現が確認された遺伝子は **A, B, D** ゲノムでそれぞれ **9906, 9438, 8530** 遺伝子 (**TPM > 3**)、**3** つの同祖遺伝子全てで発現が確認されたのは **7726** 遺伝子群であった。このうち、**84.1%** はサブゲノム間で発現に差がなく、**15.9%** はいずれか1つのサブゲノムで高発現ないし低発現を示した。**Ldn** と比較したところ、合成パンコムギで高発現、低発現していた遺伝子数は **A** ゲノムにおいて **132, 380**、**B** ゲノムにおいては **97, 238** であった。**GO enrichment** 解析の結果、**AB** ゲノムともに高発現遺伝子にはストレス応答性遺伝子が、低発現には光合成関連遺伝子が多く見つかった。**D** ゲノムあるいは **AB** ゲノムの発現量をもとに主成分分析を行ったが、いずれの場合も **lineage** 間で明確な分離は認められなかった。また、染色体腕末端から数 **Mb** の連続した領域、数にして **200** 前後の遺伝子の発現が全く確認されない系統が **4** つみつかった。これらの系統は合成6倍体作出あるいは継代の過程で染色体断片を失ったものと考えられる。今後、これらの欠失遺伝子によるトランス効果についても評価する必要がある。

(3) 合成6倍体コムギを対象とした TWAS

D ゲノムにマップされたリードからは **5890** の **SNP** が抽出された。また、**AB** ゲノムで発現していた計 **19344** 遺伝子のうち、**2487** 遺伝子が今回調査したいずれかの形質と相関係数 **0.7** 以上の高い相関を示した。この内、種子長または種子高と高い相関を示した **AB** ゲノム由来の **570** 遺伝子の発現量を対象とした **TWAS** で有意な関連を示す **SNP** が **D** ゲノム上に **32** みつかった。転写因子をコードする遺伝子上に存在する **SNP** は **3** つあり、**2** つは **bZIP** 型転写因子、**1** つは **Dof** 転写因子上に存在した。また、**1** つは既知のドメインに非同義置換を生じたが、**2** つはドメイン上には存在しなかった。現在、これら **SNP** の効果を検証するため、アグロバクテリウム法によるパンコムギの形質転換系の研究室内での確立に向けた準備に取り掛かっている。

<参考文献>

- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29:15-21**
- Endelman JB (2011). Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. Plant Genome 4:250-255**
- Gusev A, Ko A, Shi H, Bhatia G, Chung W, Penninx BW, Jansen R, de Geus EJ, Boomsma DI, Wright FA, Sullivan PF, Nikkola E, Alvarez M, Civelek M, Lusi AJ, Lehtimäki T, Raitoharju E, Kähönen M, Seppälä I, Raitakari OT, Kuusisto J, Laakso M, Price AL, Pajukanta P, Pasaniuc B (2016) Integrative approaches for large-scale transcriptome-wide association studies. Nat Genet 48:245-52**
- Matsuoka Y, Nasuda S, Ashida Y, Nitta M, Tsujimoto H, Takumi S, Kawahara T (2013) Genetic basis for spontaneous hybrid genome doubling during allopolyploid speciation of common wheat shown by natural variation analyses of the paternal species. PLoS One 8:e68310**
- Shabalina AA (2012) Matrix eQTL: ultra fast eQTL analysis via large matrix operations. Bioinformatics 28:1353-8**
- Takahagi K, Inoue K, Shimizu M, Uehara-Yamaguchi Y, Onda Y, Mochida K (2018) Homoeolog-specific activation of genes for heat acclimation in the allopolyploid grass Brachypodium hybridum. Gigascience 7:giy020**
- Tanabata T, Shibaya T, Hori K, Ebana K, Yano M (2012) SmartGrain: high-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. Plant Physiol 160:1871-80**
- Townsend BT, Covington MF, Ichihashi Y, Zumstein K, Sinha NR (2015) BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. Front Plant Sci 6:366**
- Yoo MJ, Szadkowski E, Wendel J (2012) Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton. Heredity 110:171-180**

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 2件）

1. 著者名 Nishijima Ryo, Sanjaya Alvin, Shinoyama Harue, Kazama Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Touch-Induced Transcriptional Changes in Flower Buds of a Non-Model Horticultural Plant <i>Dianthus hybrida</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 918 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/horticulturae8100918	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 Numajiri Yuko, Yoshino Kanami, Teramoto Shota, Hayashi Atsushi, Nishijima Ryo, Tanaka Tsuyoshi, Hayashi Takeshi, Kawakatsu Taiji, Tanabata Takanari, Uga Yusaku	4. 巻 107
2. 論文標題 iPOTs: Internet of Things based pot system controlling optional treatment of soil water condition for plant phenotyping under drought stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15400	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 Kobayashi Taiki, Takahashi Masako, Nishijima Ryo, Sugiyama Ryuji, Ishii Kotaro, Kawano Shigeyuki, Kazama Yusuke	4. 巻 86
2. 論文標題 Effective Chromosomal Preparation Protocol for the Dioecious Plant <i>Silene latifolia</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 323 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.86.323	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 久家徳之、西嶋遼、川勝泰二、宇賀優作
2. 発表標題 重力屈性変異体を用いたイネ根端における水分屈 性遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野悠平、西嶋遼
2. 発表標題 Targeted Amplicon Sequencingによる国内コムギ品種の深根性遺伝子DR01の多型解析
3. 学会等名 第17回コムギ類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生駒拓也、サンジャヤ アルピン、池田美穂、西嶋遼、村井耕二、阿部知子、風間裕介
2. 発表標題 シロイヌナズナ染色体における遺伝子量補正の調査
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田和陽、サンジャヤ アルピン、西嶋遼、田中裕之、伊藤武彦、村井耕二、阿部知子、風間裕介
2. 発表標題 シロイヌナズナの新規染色体部分的重複変異体における遺伝子発現変動とクロマチン動態
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西嶋 遼、アルピン サンジャヤ、篠山 治恵、風間 裕介
2. 発表標題 ナデシコ属植物における接触刺激に対する遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺本翔太、高安聡子、丸山奈津子、木富悠花、西嶋遼、川勝泰二、宇賀優作
2. 発表標題 畑作条件で栽培した世界のイネ品種の根系フェノーム解析
3. 学会等名 育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川勝泰二、寺本翔太、西嶋遼、高安聡子、丸山奈津子、木富悠花、宇賀優作
2. 発表標題 畑作条件で栽培した世界のイネ品種のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriyuki Kuya, Yuka Kitomi, Ryo Nishijima, Taiji Kawakatsu, Yusaku Uga
2. 発表標題 Comprehensive search for gravity-responsive genes of rice root tip after simulated microgravity condition generated by a three-dimensional clinostat
3. 学会等名 ISRR11/Rooting21 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井県立大学 生物資源学部 植物遺伝資源学分野
<https://sites.google.com/g.fpu.ac.jp/iden>

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
---------	---------