

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380009

研究課題名（和文） 遺伝子探索を効率化するデジタル遺伝子発現 QTL 解析法の確立

研究課題名（英文） Digital gene expression QTL analysis as an efficient gene mapping tool

研究代表者

松村 英生（MATSUMURA HIDEO）

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・准教授

研究者番号：40390885

研究成果の概要（和文）：イネを材料として網羅的な遺伝子発現解析データを基にして量的な形質を支配する遺伝子（QTL 遺伝子）の同定を目指す技術開発の研究を行った。本研究では、品種間の交雑後代のような多数の試料について数千以上の遺伝子発現を定量的なデジタルデータとして解析する方法と、同じく多数の品種や個体間のゲノム DNA 配列の違い（多型）を多数（数百～千箇所）検出できる方法を確立した。これらの結果、遺伝子発現の変化を支配する遺伝子座（遺伝子を含む領域）の位置を見出すための技術基盤を整備することができた。

研究成果の概要（英文）：We aimed at developing a novel QTL (quantitative trait locus) mapping procedure based on genome-wide gene expression analysis data in rice. In the present study, quantitative digital gene expression analysis method was developed, allowed to analyzing expression of thousands of gene in multiple samples, like segregated individuals. Additionally, a novel tool for exploring DNA polymorphisms was also established and it enabled to genotyping many loci at a time. These techniques were basis of digital expression QTL analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・遺伝育種科学

キーワード：ゲノム育種、遺伝子発現解析、DNA マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

従来から農作物の重要形質を支配する遺伝子を同定する方法として連鎖解析によるマッピングという方法が用いられて来た。特にイネでは各種ゲノム情報の充実、品種「日本晴」の全ゲノム配列解読によりマッピングに用いる DNA マーカーの充実、マッピング情報からの遺伝子同定などが効率化され、量的形質遺伝子座（QTL）を含む多くの重要形質遺伝子がマップベースドクローニングされている。さらに、次世代シーケンサーと呼

ばれる高速かつ大量に短い DNA 断片の配列を解析できるシーケンサーの出現により、イネなどの生物ではリシーケンサーと言われる品種や系統の全ゲノム配列解析が可能になり、それ以外の非モデル生物でも新規な全ゲノム配列の解析が促進されている。このシーケンシング技術の進歩およびそれによって得られる情報は、イネを始めとした農作物の遺伝解析、育種に非常に大きな貢献をもたらすことが期待できる。将来的には多くの農作物、品種で全ゲノム配列が明らかになり、

重要形質の原因遺伝子およびその変異との関係が容易に明らかになるであろう。世界的には次世代シーケンサーを用いたゲノム配列解析が農作物の遺伝学、育種に利用されることを目指した研究が進められているが、残念ながら日本国内ではまだそのような研究の推進は遅れている。また、次世代シーケンサーを利用した解析はゲノム配列のみならず、転写産物解析にも有効である。特に申請者は以前よりシーケンス解析を基にした遺伝子発現（転写産物）解析法の確立と利用に関する研究を進めて来ている。申請者は cDNA の特定部位から抽出した 26 塩基の断片（タグ）を多数シーケンス解析して網羅的にデジタルデータとして遺伝子発現を定量解析する SuperSAGE 法を開発した（Matsumura et al., PNAS 2003）。今まではこのようなゲノム解析技術や網羅的遺伝子発現解析は、基礎的な生物学（特に生理学的応答等）の研究の道具としての利用が中心であった。しかし上述のシーケンス技術の進歩および申請者による発現解析技術の改良により、これらの技術が遺伝学においては作物育種へ応用できる可能性が十分にあり、それを実践する道筋をつける必要があると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、次世代シーケンサーを用いた解析で得られるデジタルな遺伝子発現データ（量的変化）の情報を形質としてマッピングする“デジタル遺伝子発現 QTL 解析法”の確立を目的とする。この方法では直接には特定の遺伝子（群）の調節を担う領域や遺伝子をマッピングで同定することが第一義的な目的である。しかし実用的には、定量的な評価が難しい形質や表現型のみでのマッピングに限界がある時に、遺伝子発現量という指標で定量化することで形質を支配する遺伝子の同定をより効率化することが目的である。植物でも既に表現型のマッピングと eQTL 解析を組み合わせて遺伝子同定を進めた報告例もある。本研究では、改良された遺伝子発現解析法を用いることで解析の精度、汎用性、労力、コストを改善できる方法を目指す。

本法の確立のために以下の項目の研究を計画する。

(1) イネ 2 品種由来の RILs (Recombinant Imbred Lines) を材料として各系統の網羅的遺伝子発現情報を収集し、系統間の発現量の違い（変化）をマッピングする方法を確立する。

(2) 同法を活用して複数の異なるイネ RILs を用いて低温発芽時あるいは病原菌感染時における発現遺伝子解析と eQTL 解析を行

う。この情報と別途表現型でマッピングした QTL とを比較して低温発芽および耐病性に関わる QTL の候補遺伝子を同定する。これによってデジタル eQTL 解析によって重要形質遺伝子の同定が効率化できることを示す。

(3) イネ外国産品種を含む多数の品種、系統を材料として低温発芽時のデジタル遺伝子発現解析情報を基にして連関解析による eQTL マッピング法の確立も試みる。この方法の確立により、交雑後代の系統を育成することなく高等植物でもデジタル eQTL 解析が可能であることを示す。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

ハイスループット SuperSAGE 法確立のため、イネ品種「ひとめぼれ」、「かけはし」の播種後 7 日目の幼植物体、「かけはし」と「Dunghan shali」における低温（15℃）条件下での播種後 7 日目の幼植物体、シロイヌナズナ

(Col-0) 播種後 30 日の葉および茎から RNeasy Plant mini kit (キアゲン) を用いてトータル RNA を抽出して供試した。

多試料の遺伝子発現解析条件の確立および低温発芽性等の連鎖解析を目的とした材料として、イネ品種「蒙古稲」と「C8005」およびそれらの交雑後代から作出した RILs (Recombinant Imbred Lines) 96 系統、ならびに「いわてっこ」と「Arroz da Terra」それらの交雑後代から作出した RILs 96 系統を供試した。各イネ品種および RILs 系統は、滅菌した後にろ紙上に播種し、播種後 7 日目の幼植物体を DNA および RNA 抽出に供試した。DNA 抽出には DNeasy Plant Mini kit (キアゲン) を使用した。トータル RNA は各植物体のシュート組織をから RNeasy Plant mini kit (キアゲン) を用いて抽出を行った。

連関解析を目的とした材料として、国内品種のコアコレクション (50 品種) を (独) 農業生物資源研究所より分譲を受けた。各品種について滅菌した後にろ紙上に播種し、播種後 7 日目の幼植物体から DNA を抽出した。

### (2) ハイスループット SuperSAGE 法

各品種および系統からのトータル RNA 10 $\mu$ g を用いてビオチン化アダプターオリゴ dT プライマー (EcoPdT; 5'-biotin-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCCAGCAGTTT TTTTTTTTTTTTT) をアニールし、SuperScript III 逆転写酵素 (インビトロジェン) を用いて逆転写を行った。続いて E. coli DNA polymerase, E. coli DNAligase, RNaseH を用いて二本鎖 cDNA の合成を行った。二本鎖 cDNA は精製後、制限酵素 NlaIII で切断し、ストレプトアビジン磁気ビーズ (Dynabeads) と結合を行った。ビオチンラベルされていない DNA 断片を洗浄後、ビーズ上の DNA 末端に

アダプター2 DNA (5' -  
CAAGCAGAAGACGGCATACGATCTAACGATGTACGCAGC  
AGCATG、amino-3'  
-GTTCTGCTTCTGCGGTATGCTAGATTGCTACATGCGTC  
GTC をアニールして作成) をライゲーション  
した。非結合アダプターを洗浄後、ビーズ上  
の DNA を制限酵素 EcoP15I で切断して、ビー  
ズからアダプター結合した 26 塩基断片を回  
収した。回収した DNA についてフェノールク  
ロロホルム処理、エタノール沈殿を行った後、  
アダプター1 DNA とライゲーションを行っ  
た。アダプター1 DNA (5'  
'-ACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCXXXX、  
amino-3'  
-TGTCGAAGTCTCAAGATGTCAGGCTGCTAGXXXXNN ;  
XXXX は index 配列) は試料毎に異なる Index  
配列を持つアダプターを用いた。アダプター  
1 とライゲーションした DNA 断片は精製後、  
以下の PCR 増幅の鋳型として用いた。PCR 増  
幅には、Phusion-High Fidelity DNA  
polymerase (Finnzymes 社) を用い、プライマ  
ーとして Adapter-1 primer (5'  
-AATGATACGGCGACCACCGACAGGTTTCAGAGTTCTACA  
GTCCGA) および Adapter-2 primer (5'  
-CAAGCAGAAGACGGCATACGA) を用いて 98°C 2  
分、98°C 35 秒と 60°C 30 秒のサイクルを  
10-15 サイクルで反応を行った。PCR 産物は  
TAE バッファーによる 8%ポリアクリルアミド  
ゲル電気泳動 (PAGE) と SYBR グリーン染色  
により 125bp のバンドの増幅を確認した。目  
的断片の増幅確認後、同一の PCR 反応を 8-15  
チューブ分実施し、PCR 反応後の溶液を混合  
して精製、濃縮した後に 8%PAGE ゲルによる  
泳動、染色を行って 125bp のバンドを切り出  
した。切り出したゲルを TE バッファーに浸  
漬して DNA を溶出し、エタノール沈殿により  
DNA を回収した後に定量を行ってシーケン  
ス解析に供試した。

### (3) RAD-seq 解析法

各品種及び系統からの 300ng のゲノム DNA  
を用いて以下の解析に供試した。各ゲノム  
DNA は常法に従って制限酵素 (NotI、PacI も  
しくは AseI) により切断し、切断後の DNA 断  
片は AMPureXP (ベックマンコールター社) 磁  
気ビーズにより精製を行った。精製後の DNA  
に対して RAD 解析用ビオチン化アダプター1  
DNA (5' -biotin-  
GTACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCXXXXXXA  
T、5'  
-XXXXXXGATCGTCCGACTGTAGAAGTCTGAACCTGT を  
アニールして作成。XXXXXX は Index 配列) の  
ライゲーションを行った。アダプター1 は試  
料毎に異なる Index 配列を持つアダプターを  
供試した。アダプターライゲーション後の  
DNA は精製した後、制限酵素 NlaIII で切断し、  
ストレプトアビジン磁気ビーズに結合を行

った。ビーズに結合しなかった DNA (ビオチン  
ラベルされていない DNA) を洗浄し、ビーズ上  
の DNA に対してアダプター2 DNA

(5' -amino-CAAGCAGAAGACGGCATACGACATG、5'  
-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG をアニールして作  
成) のライゲーションを行った。ライゲーシ  
ョンされなかったアダプター2 を洗浄して、  
除去した後にビーズ上の DNA を鋳型として以  
下の PCR 反応を行った。PCR 増幅には、  
Phusion-High Fidelity DNA polymerase  
(Finnzymes 社) を用い、上述のハイスルー  
ット SuperSAGE 解析に使用した Adapter-1  
primer および Adapter-2 primer を用いて  
98°C 2 分の後、98°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C  
30 秒のサイクルを 18 サイクルで反応を行っ  
た。PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動で  
増幅を確認した後、AMPureXP による精製を行  
い、シーケンズ解析に供試した。

### (4) シーケンズ解析

ハイスルーット SuperSAGE および  
RAD-seq 解析において調製した DNA 断片は受  
託により次世代 DNA シーケンサー (イルミ  
ナ社シーケンサー) による解析を行った。  
シーケンズ解析により得られた DNA 配列デー  
タ (fastq 書式) は CLC Genomics Workbench  
ソフトウェア (CLC bio) を用いてタグ配列  
の抽出およびタグ数のカウントを行った。

## 4. 研究成果

### (1) ハイスルーット SuperSAGE 法の確立

従来の SuperSAGE 法による遺伝子発現解析  
法を基盤として次世代 DNA シーケンサーに  
より大規模に解析可能な技術を確認するた  
め、イネ幼植物体およびシロイヌナズナ組織  
試料等の RNA を用いた解析を試みた。解析の  
流れは図 1 に示した。各組織からの RNA につ  
いてビオチン化アダプターオリゴ dT を用い  
て二本鎖 cDNA を合成し、cDNA は精製後に制  
限酵素 NlaIII で切断し、シロイヌナズナ試  
料については cDNA を DpnII、または BfaI で切  
断した。切断した DNA はストレプトアビジン  
磁気ビーズと混合して、ビオチンラベル断片  
(dT 配列を含む断片) をビーズに結合させた。  
ビーズ上の cDNA 断片に対して NlaIII、DpnII、  
BfaI 各々に相補的な末端配列を持つアダ  
プター2 を結合させた。このアダプター2 は  
EcoP15I 認識配列 (5' -CAGCAG) が含まれて  
いる。磁気ビーズを洗浄後、ビーズ上の DNA  
を制限酵素 EcoP15I で切断した。同酵素は認  
識配列 (5' -CAGCAG) から 26 塩基下流を切  
断する特性を持つことから、本酵素処理によ  
りビーズ上からアダプター2 に結合した 26bp の  
cDNA 断片 (タグ) を切り出す事ができる。こ  
れら遊離断片を回収した後にアダプター1  
を結合させた。EcoP15I 切断箇所は 2 塩基の  
突出末端を形成し、その 2 塩基は任意である

ことから、アダプター1の末端も任意の2塩基配列の5'突出構造を持たせた。またアダプター1の末端(突出末端の直前)4塩基にIndexと呼ぶ試料識別配列を組み込んだ。本解析では合計27種類の異なるIndex(4塩基配列)を持つアダプター1を準備して各試料各々に異なるアダプター1を割り当てて結合させた(Matsumura et al., 2010を参照)。アダプター1を結合させたDNA断片を鋳型にし、両アダプターの末端配列と相同な配列を持つプライマーにより10サイクルのPCRを行った。目的の26bpタグを両アダプターで挟んだDNAの増幅サイズは125bpとなると推定されたが、PCR産物はPAGEで泳動により目的サイズであることを確認することができた。DNA試料はイルミナ社のシークエンサーによる解析を行った。その結果、合計16,057,777断片(35塩基長)のシークエンスデータを取得した。得られたDNA断片の配列構造は4塩基のIndex配列が位置し5塩基目からNlaIIIもしくはDpnII、BfaIサイトの配列までがタグとなる。シークエンスデータをIndex配列による試料毎の配列の仕分け、制限酵素サイトから上流の26塩基をタグ配列として抽出した後、タグ数のカウントの解析を行った。その結果、全試料の合計タグ数は13,115,603タグであった。各試料のタグ配列はIndex配列によって全ての供試料のデータを仕分けすることができ、各試料当たり9-70万個のタグ(平均423,084タグ/試料)を解析する事ができた。

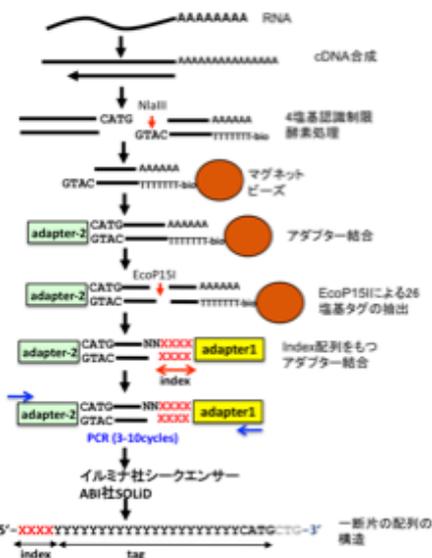


図1 ハイスループットSuperSAGE法の流れ

以上の結果から、多数の遺伝子発現をタグによるデジタルデータとして定量的に解析できる方法が確立できた。この方法を利用すれば、植物(イネ)の環境応答に関わる多数の遺伝子の発現を定量的に解析可能である。

(2) RILs および低温発芽性に関連した品種

のハイスループット SuperSAGE 解析

多試料のハイスループット SuperSAGE 解析における試料調製を迅速化する目的で、イネ品種「蒙古稲」(日本型)と「C8005」(インド型)を両親としたRILs(Recombinant Inbred Lines)の96系統の幼植物体からRNAを抽出し、96ウェルプレートでタグの調製を行った。(1)における方法では、DNAを精製はカラムを用いていたが、磁気ビーズを用いたDNA精製法を採用することで多検体処理を可能にした。これに合わせて96種類の6塩基Index配列を設計してアダプター1を作製して本解析に用いた。その結果96系統中90系統から平均30万タグ以上のSuperSAGE解析データを得ることができた。

次に、低温発芽性と関連した遺伝子発現解析を目的として、低温発芽性に優れる品種「Arroz da Terra」と低温発芽性の劣る品種「いわてっこ」をいくつかの条件で播種した。28℃、15℃、13℃の各条件で、好気条件、冠水条件で播種して、3-14日の生長を比較し、品種間で生長の差が明瞭な条件を検討した。その結果、15℃、好気条件で播種後7日目は比較に最適な条件と決定できた。この条件と28℃、好気条件、7日目の各品種の発芽種子(幼植物体)からRNAを抽出してハイスループット SuperSAGE 解析を行った。現在はシークエンス解析のデータを待機中である。

現時点ではまだ本来の研究目標であった低温発芽性に関わるRILs各系統の遺伝子発現情報を収集するに至っていないが、同解析を実施するための技術(プロトコル)は確立したので、いわてっことArroz da TerraのRILs各系統の低温発芽種子サンプルについてハイスループット SuperSAGE を実施可能である。またその親品種において低温発芽に関連する発現遺伝子も得られることが期待できるため、後述のRAD-seq解析データと低温発芽データから絞り込まれるQTL領域候補にあるディファレンシャルに発現する遺伝子を見出すことでQTLの候補遺伝子を見出すことも期待できる。

(3) イネ Recombinant Inbred Lines の大規模 DNA 多型解析

大規模 DNA 多型解析法である RAD-seq 解析法を利用して、「いわてっこ」と「Arroz da Terra」の品種間多型およびそれらのRILsにおける遺伝子型タイピングを試みた。各品種およびRILsのうち96系統の各個体のDNAを制限酵素PacIで切断し、Index(試料識別配列)を持つアダプターを結合して調整したDNA断片の末端配列を次世代シークエンサーで大規模解析した。得られたシークエンスデータより、Index配列による試料識別を行った後、ゲノムDNA由来のタグ配列(95bp)を得た。各試料におけるこれらのタグ配列の出

現頻度 (タグ数) をカウントし、「いわてっこ」と「Arroz da Terra」間で比較してどちらかの品種にのみ出現するタグを見出した。RAD-seq 解析の結果、いわてっこで 8,462,936 (タグ)、Arroz da Terra で 7,309,743 (タグ) を得た。両品種間のデータ比較から品種特異的なタグ (どちらか品種で 20 以上読まれ、他方で全く出現しないタグ) は、いわてっこ特異的タグとして 5,114 種類、Arroz da Terra 特異的タグとして 5,147 種類が見出された。さらに、いわてっこ特異的タグと Arroz da Terra 特異的タグ間で、1塩基もしくは2塩基多型を示すタグを BLAST プログラムを用いて選出した。このようなタグ配列は同一遺伝子座の対立遺伝子由来であると推定されるため、共優性マーカーとしての利用を試みた。このような共優性マーカーは 673 種類得られた。RILs96 系統について同様な RAD-seq 解析を行った結果、合計 252,026,341 のタグを得た (平均 2,625,274 タグ/系統)。これら RILs 各系統の RAD-seq 解析データにおいて上記の共優性マーカーの遺伝子型を判別することで、96 系統のゲノム全体を網羅する遺伝子型 (いわてっこ型、Arroz da Terra 型) のタイピングを行った。その結果、各 RILs 系統の各マーカー (多型) について、いわてっこ型、Arroz 型、ヘテロ型を判別することができ、表 1 に示すようなグラフィカルジェノタイピングが得られた。

表1「いわてっこ」と「Arroz da Terra」間で見られたDNA多型のRILs各系統における遺伝子型判別結果の例

Seabuck Tag ID	Arroz Tag ID	chromosome	position	Genotype**						
				RIL.1	RIL.2	RIL.3	RIL.4	RIL.5	RIL.6	RIL.7
>B2037	>A2672	chromosome01	9923267	*	*	*	*	*	*	*
>B1126	>A1117	chromosome01	9982400	*	*	*	*	*	*	*
>B2054	>A2591	chromosome01	10476448	*	*	*	*	*	*	*
>B945	>A907	chromosome01	10697105	*	*	*	*	*	*	*
>B4190	>A1589	chromosome01	12319127	*	*	*	*	*	*	*

これらに供試した RILs について 15°C、好気条件で発芽を行い、シュート長、根長を測定した。各 RILs 系統間でこれらの形質には分離が見られ、測定値は現在 3 反復目の測定を実施中である。

ここで得られた RILs の大規模なジェノタイピングデータと低温発芽時の生長測定データを組み合わせることで低温発芽性に関わる QTL 領域を絞り込むことが期待できる。

(4) 連関解析を目指したイネ品種間の大規模 DNA 多型解析

イネにおける多品種間の DNA 多型と表現型から各形質を支配する遺伝子座を見出す連関解析を行うための基盤として、イネコアコレクションの RAD-seq 解析による多型探索を行った。日本品種のコアコレクション 50 品種について DNA 抽出を行って(2)で述べた方法と同様に制限酵素 PacI を用いた RAD-seq 解析を行った。まず 50 品種のうち 29 品種の

タグをシーケンス解析した結果、合計で 172,407,180 個、1 品種平均では 5,387,724 個のタグを得た。ここで得られている全品種のタグとタグ数を比較して、1 品種以上で出現が見られず、他品種では 20 以上のカウントを示したタグを品種特異的タグ (多型) と定義した。その結果、43,279 種類のタグが品種特異的タグとして見出された。これらの品種特異的タグについてイネゲノム配列 (build5.0) に BLAST を用いてマップした結果、13,258 種類のタグがイネ (品種「日本晴」) の 12 本の染色体全てにマップされ、各染色体とも 25-35kb に 1 カ所程度の頻度でタグは分布していた。連関解析において供試する品種間の多様性が重要なファクターであることから、供試品種間の近縁関係を評価した。コアコレクション品種と共にイネ育成品種である、ひとめぼれ、いわてっこ、かけはし、Arroz da Terra (インド型) についても上記と同様に RAD-seq 解析データを加えて、これらも含めた品種特異的タグの有無を遺伝子型として、CLUSTER プログラムを用いて UPGMA 法による解析を行った。続いてそのデータを Tree View プログラムで系統樹として可視化を行うことで、供試品種の近縁関係の評価を行った (図 2)。

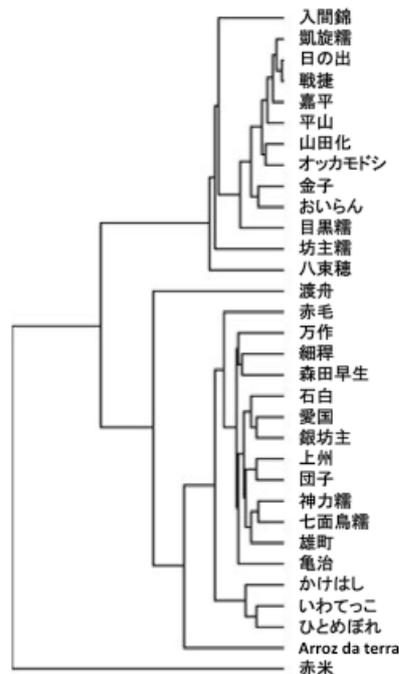


図2 RAD-seqマーカーにより作成した日本型コアコレクション品種間の系統樹

一般に現代の育成品種の多くはコシヒカリ由来であるため、遺伝的多様性が低いと推測されているが、実際にひとめぼれ、いわてっこ、かけはしは系統樹において非常に近縁なクラスターを形成していた。これと比較するとコアコレクション品種は多様性が高く、インド型品種 (Arroz da Terra) と育成品種間

よりも遠縁の品種も見られた。供試品種内では、赤米が他品種と類似性が低い結果となったが、これは恐らくこの品種（赤米）が非常に古い時期に国内に入り、以後の在来品種にその遺伝子が入って来ていないことを示唆すると思われた。

以上の結果から、コアコレクション品種およびそれらのRAD-seq解析データは、今後各品種の形質データと組み合わせて連関解析を実施可能であることが示された。また、前述のハイスループットSuperSAGEによる各品種の遺伝子発現データを活用することで連関解析による遺伝子発現QTL解析という新しい手法の展開へも活用可能である。

#### 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7件）

- ① 松村英生, 寺内良平, 次世代シーケンサーを利用したタグによる遺伝子発現解析, 生物科学, 64 巻, 151-158, 2013, 査読無
- ② Matsumura Hideo, (他5名), SuperSAGE: Powerful Serial Analysis of Gene Expression, Methods in Molecular Biology 883, 1-17, 2013, 査読有  
DOI: 10.1007/978-1-61779-839-9\_1
- ③ Abe Akira, Kosugi Shunichi, Yoshida Kentaro, Natsume Satoshi, Takagi Hiroki, Kanzaki Hiroyuki, Matsumura Hideo, (他7名, 7番目), Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap, Nature Biotechnology, 30, 174-178, 2013, 査読有  
DOI: 10.1038/nbt.2095
- ④ Takahashi Hirokazu, Saika Yoshiaki, Matsumura Hideo, (他4名, 3番目), Cell division and cell elongation in the coleoptile of rice alcohol dehydrogenase 1-deficient mutant are reduced under complete submergence., Annals of Botany, 108, 253-261, 2011, 査読有  
DOI: 10.1093/aob/mcr137
- ⑤ Okuyama Yudai, Kanzaki Hiroyuki, Abe Akira, Yoshida Kentaro, Tamiru Mlumei, Saitoh Hiromasa, Fujibe Takahiro, Matsumura Hideo, (他6名, 8番目), A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes., Plant Journal, 66, 467-479, 2011, 査

読有

DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04502.x

- ⑥ Matsumura Hideo, (他6名), High-Throughput SuperSAGE, Method in Molecular Biology 687, 135-146, 2011, 査読有  
DOI: 10.1007/978-1-60761-944-4\_9
- ⑦ Matsumura Hideo, (他10名), High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing, PLoS ONE 5, e12010, 2010, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0012010

〔学会発表〕（計2件）

- ① 音川俊太郎, 阿部陽, 寺内良平, 松村英生, RAD-tag 解析法によるイネ Recombinant Inbred Lines (RILs) のゲノムワイドな多型解析, 第122回日本育種学会, 2012.9.14, 京都
- ② 松村英生, 阿部陽, 浦崎直也, 宮城徳道, 安藤裕教, 寺内良平, タグ配列による網羅的なゲノム多型の解析, 第119回日本育種学会, 2011, 3.29, 横浜

〔図書〕（計1件）

- ① Matsumura Hideo, Carlos Monina, Detlev H. Krüger, Ryohei Terauchi, Günter Kahl, Wiley-Blackwell, Tag-based Next Generation Sequencing, 2012, pp3-21

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
松村 英生 (MATSUMURA HIDEO)  
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター  
准教授  
研究者番号: 40390885
- (2) 研究分担者  
無し
- (3) 連携研究者  
無し
- (4) 研究協力者  
無し