

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248004

研究課題名(和文)全ゲノム解析によるイネ量的遺伝子座の迅速単離

研究課題名(英文)Quick isolation of rice QTL by whole genome sequencing

研究代表者

寺内 良平(Terauchi, Ryohei)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・部長

研究者番号：50236981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：主要作物イネの遺伝的改良を目標として、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析と「QTL-seq法」(Takagi et al. Plant J. 74:174)により、有用形質を支配する量的遺伝子座(QTL)の単離同定を進めた。その結果、高度耐冷性、出穂期、いもち病圃場抵抗性を決定するQTL複数の位置同定に成功した。さらに生物発光リアルタイム計測技術とQTL-seq法を併用することにより、耐病性信号伝達系に關与する遺伝子群を同定単離することを目指し、シロイヌナズナの耐病性遺伝子WRKY29のプロモーターを用いたQTL-seq解析の予備試験に成功した。

研究成果の概要(英文)：Aiming at efficient breeding of rice cultivars, we applied QTL-seq method (Takagi et al. Plant J. 74:174) to rice to identify quantitative trait loci (QTL) controlling important agronomic traits, resulting in successful identification of QTL for cold tolerance, heading date, and partial resistance to blast disease. We further attempted to combine QTL-seq with a high-throughput luciferase bioluminescence measurement system to identify QTL governing WRKY19 gene promoter activity in Arabidopsis, with a promising preliminary result.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：全ゲノム解析 QTL イネ 生物発光リアルタイム測定 シロイヌナズナ

### 1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加に伴い、作物の迅速な育種作業が急務である。近年、次世代シーケンサーの開発により、生物全ゲノム解析が飛躍的に容易になった。これにより、全ゲノム解析を利用した次世代育種が現実化した。報告者らは、これまでに北東北に適した多様な水稻品種を開発する目的で、品種「ひとめぼれ」突然変異系統群多数を作出した。これらの材料を用いて、次世代シーケンサーにより形質に変化をもたらす原因突然変異を迅速に同定する技術「MutMap法」(Abeら2012, Nature Biotechnol.30:174-178)を開発し、活用を開始した。

しかし、突然変異処理で得られる遺伝的変異には限界がある。イネ系統が進化の過程で蓄積してきた多様な自然変異を、育種に有効に活用する必要がある。育種上重要な形質は、稈長、穂数、収量など、その多くが量的形質である。従来、量的形質の改良に寄与する自然変異を活用するためには、Quantitative Trait Locus (QTL)解析が用いられてきた。従来のQTL解析においては、1)異なる形質を示す2系統間の交配、2)F<sub>2</sub>を起点としてRecombinant Inbred Lines (RILs)の作出、3)RILsの表現型検定、4)両親間で多型を示すDNAマーカーによるRILsのgenotyping、5)表現型とDNAマーカーの間の連鎖解析によるQTL同定を、順次実施し、両親間の量的形質変異を支配する遺伝子領域を特定することがおこなわれてきた。しかし、特に上記1)において微妙な表現型を調査する目的で近縁系統間の交配を行った場合、上記4)の作業は、非常に困難であり、時間と労力が必要とされた。そのため、大規模なQTLの単離同定は実施されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、重要な育種形質を支配する自然変異を、次世代シーケンサーの活用により迅速に大量に同定し、DNAマーカー開発および育種の迅速化につなげる事を目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、報告者らが開発した新技術、「QTL-seq法」(Takagi et al. 2013, Plant J. 74:174-183)を活用して、イネの有用遺伝子領域を同定する事を目標とする。QTL-seq法では、従来のQTL解析法(上記1)~3)と同様に、育種上重要な形質において異なる表現型を示す系統間の交配を実施し、RILsないしF<sub>2</sub>系統で形質の分離を調査する。これらの分離集団において、形質の両

極端を示す個体(系統)を複数バルク(プール)して、全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより解析する。得られたシーケンスリードを一方の親個体のゲノム基準配列に対してアライメントし、各バルクにおいてゲノムのどの領域がどちらの親からより多く伝わっているかを迅速に調べる事により、QTLを同定する技術である。本技術は、分離集団と形質データがあれば、一度のシーケンスでQTL同定が可能になる点で、簡便迅速である。本研究では、さらにQTL-seq法と名古屋大学石浦正寛研究室で開発された「大規模生物発光リアルタイム計測装置」による遺伝子プロモータ活性測定法の技術的統合に取り組む。すなわち、耐病性遺伝子プロモータをluciferase遺伝子に連結したDNA断片で形質転換した植物を各種系統と交配して、F<sub>2</sub>において、プロモータの病原菌エリシターに対する反応kineticsを測定し、反応の大きい(または速い)系統群と小さい(または遅い)系統群のDNAをバルクし、上記のQTL-seq解析を実施する。これにより、耐病性信号伝達系に関わる遺伝子の自然変異を大規模に同定することが可能となる。

### 4. 研究成果

(1) 高度耐冷性を支配する遺伝子領域を同定する目的で、品種「ひとめぼれ」と高度耐冷性系統を交配後、F<sub>2</sub>世代において、耐冷性試験を実施した。F<sub>2</sub>系統の耐冷性程度を測定し、高耐冷性系統群と低耐冷性系統群に分割し、各群のDNAをバルク化して全ゲノムシーケンスに適用した。その結果、第10染色体上に、両系統の耐冷性の違いを決定する遺伝子座があることが判明した。(2) 岩手県南で栽培される晩生品種「ひとめぼれ」と県北で栽培される早生品種「いわてっこ」の出穂期を決定する遺伝子領域をQTL-seq法により解析した。その結果、第3染色体上に目的の遺伝子領域を同定する事に成功した。(3) いもち病圃場抵抗性強の系統「Nortai」と弱の「ひとめぼれ」の交配後代のRecombinant Inbred Lines (RILs)を用いて、QTL-seq解析を実施した結果、第6染色体上に「Nortai」の圃場抵抗性遺伝子領域が座座上することを明らかにした。有力な候補遺伝子同定にも成功した。イネ-いもち病菌相互作用の解析にQTL-seq法が有効であることを示した。(4) シロイヌナズナの耐病性遺伝子*WRKY29*プロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子を結合したDNA断片によりシロイヌナズナのCo11系統の形質転換体を作成した。本系統は、ペプチドエリシターf1g22に反応して一過的に発光することを明らかにした。本系統をf1g22受容体遺伝子*FLS2*の欠失した突然変異体*f1s2*株に交配後、F<sub>2</sub>世代で発光測定により、発光誘導

株グループと非誘導株グループに区別し、それぞれの DNA をバルク化して QTL-seq 法を適用したところ、グループの差を決定する遺伝子領域を同定した。本遺伝子領域は、既知の *FLS2* 遺伝子座領域と対応したので、今後 *WRKY29* 遺伝子発現を支配する上流の信号伝達系遺伝子を QTL-seq 法を活用することにより、単離同定する事が可能である事が示された。今後、本実験系を活用して、大規模に植物耐病性信号伝達系遺伝子同定作業を進める。

#### 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 9 件)

Takagi, H., Tamiru, M., Abe, A., Yoshida, K., Uemura, A., Yaegashi, H., Obara, T., Oikawa, K., Utsushi, H., Kanzaki, E., Mitsuoka, C., Natsume, S., Kosugi, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Urasaki, N., Kamoun, S., Terauchi, R. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotechnology* 査読有, 33, 2015, 445-449  
DOI:10.1038/nbt.3088

Tamiru, M., Undan, J.R., Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Undan, J.Q., Natsume, S., Uemura, S., Saitoh, H., Matsumura, H., Urasaki, N., Yokota, T., Terauchi, R. A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 査読有, 88, 2015, 85-99  
DOI:10.1007/s11103-015-0310-5

Fekih, R., Tamiru, M., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Kanzaki, E., Saitoh, H., Takagi, H., Natsume, S., Undan, J.R., Undan, J., Terauchi, R. The rice (*Oryza sativa* L.) LESION MIMIC RESEMBLING, which encodes and AAA-type ATPase, is implicated in defense response. *Molecular Genetics and Genomics* 査読有, 290, 2014, 611-622  
DOI:10.1007/s00438-014-0944-z

Cesari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., Shimamoto, K., Dodds, P., Terauchi, R., Kroj, T. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO Journal* 査読有, 33, 2014, 1941-1959.  
DOI:10.15252/embj.201487923

Varshney, R.K., Terauchi, R., McCouch, S.R. Harvesting the promising fruits

of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. *PLoS Biology* 査読有, 12, 2014, 1-7

DOI:10.1371/journal/pbio.1001883

Tamiru, M., Abe, A., Utsushi, H., Yoshida, K., Takagi, H., Fujisaki, K., Undan, J.R., Rakshit, S., Takeichi, S., Jikumaru, Y., Yokota, T., Terry, M. J., Terauchi, R. The tillering phenotype of the rice plastid terminal oxidase (*PTOX*) loss-of-function mutant is associated with strigolactone deficiency. *New Phytologist* 202, 2014, 116-131

DOI:10.1111/npg.12630

Takagi, H., Uemura, A., Yaegashi, H., Tamiru, M., Abe, A., Mitsuoka, C., Utsushi, H., Natsume, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Yoshida, K., Cano, L.M., Kamoun, S., Terauchi, R. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice resistance gene *Pii*. *New Phytologist*, 査読有, 200, 2013, 276-283

DOI:10.1111/nph.12369

Fekih, R., Takagi, H., Tamiru, M., Abe, A., Natsume, S., Yaegashi, H., Sharma, S., Sharma, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Mitsuoka, C., Utsushi, H., Uemura, A., Kanzaki, E., Kosugi, S., Yoshida, K., Cano, L., Kamoun, S., Terauchi, R. MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One*, 査読有, 8, 2013, e68529

DOI: 10.1371/journal.pone.0068529

Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Utsushi, H., Tamiru, M., Takuno, S., Innan, H., Cano, L.M., Kamoun, S., Terauchi, R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal* 査読有, 74, 2013, 174-183

DOI:10.1111/tpj.12105

##### [学会発表](計 8 件)

高木宏樹, 八重樫弘樹, 植村亜衣子, 宇津志博恵, 夏目俊, 阿部陽, 寺内良平. MutMap, Mutmap+ & MutMap-Gap: 次世代シーケンサーを用いた遺伝子単離技術. 第124回日本育種学会講演会.

2013年10月12日 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)  
寺内良平, 神崎洋之, 齋藤宏昌, 藤崎恒喜, 高木宏樹 分子間相互作用によるイネ-いもち病菌の共進化. 第124回日本育種学会講演会. 2013年10月12日 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)  
寺内良平. 植物-病原菌相互作用の集団ゲノム解析. 日本遺伝学会第85回大会. 2013年9月20日 慶応大学(神奈川県川崎市)  
Terauchi, R. Whole genome analysis of rice-Magnaporthe interactions. 10<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology. 2013年8月26日 BICC (Beijing, China)  
寺内良平 いもち病菌とイネ相互作用の解析. 第54回日本植物生理学会年会. 2013年3月23日 岡山大学(岡山県岡山市)  
Terauchi, R. Toward understanding Magnaporthe-rice interactions. 30<sup>th</sup> New Phytologist Symposium: Immunomodulation by plant-associated organisms. 2012年9月19日 Fallen Leaf Lake(California, USA)  
寺内良平 全ゲノム情報を活用したイネ-いもち病菌相互作用の解析. 平成24年度植物感染生理談話会. 2012年8月31日. 近江八幡国際休暇村(滋賀県近江八幡市)  
Terauchi, R. Toward understanding Magnaporthe-rice interactions. 15<sup>th</sup> International Congress on Molecular Plant-Microbe interactions. 2012年8月1日, 京都国際会議場(京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕なし  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

寺内 良平 (TERAUCHI, Ryohei)  
(公財)岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・部長  
研究者番号: 50236981

##### (2) 研究分担者

石浦 正寛 (ISHIURA, Masahiro)  
名古屋大学・遺伝子実験施設・教授  
研究者番号: 20132730

##### (3) 研究分担者

小内 清 (ONAI, Kiyoshi)  
名古屋大学・遺伝子実験施設・教授  
研究者番号: 00402454  
(平成24年度のみ)