

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252001

研究課題名(和文) イネQTL遺伝子単離の新手法の確立

研究課題名(英文) Identification of genes involved in agronomical QTLs by novel methods

研究代表者

松岡 信 (MATSUOKA, Makoto)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：00270992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イネの穂構造QTLに関係する遺伝子単離の新手法確立と遺伝子間ネットワーク構築を目的とした。穂構造は収量に直接関係する重要形質であり、近年本形質に関連するQTL(遺伝子)も単離・解析され始めたが、現状、QTL遺伝子解析は多大な労力を要し穂構造構築の包括的理解は困難である。本研究においては、従来の形質ベースによる解析に加えて、穂形成時全遺伝子の発現QTL情報を加え、穂形成の遺伝子ネットワークを構築するとともに、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の有効性についても検討した。その結果、GWA解析は短期間に非常に大きい成果を生むことが確認され、これまで見出されなかった新規QTLが複数発見された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was establishment of a novel tool(s) to easily identify genes involved in formation of the rice panicle, which is one of the most important traits determining the crop yield. For this purpose, we used the information of conventional panicle structural data, such as panicle length, primary rachis blanch number/length, and secondary rachis blanch number/length, and also new information about the expression level of all rice genes in the panicle meristems, to perform the QTL analysis based on panicle structural and expression traits. By combining these two QTL data, we could easily identify some good candidates for genes involved in panicle formation. We also performed a genome wide association study (GWAS) for such purpose and also succeeded to identify a few novel genes for panicle development. Based on these observations, we discussed the feasibility of new tools to easily identify novel genes involved in rice panicle formation.

研究分野：農学

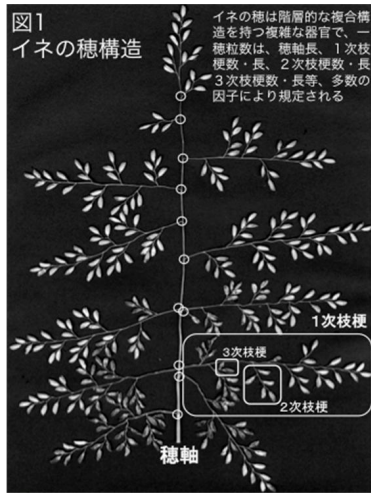
キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 植物

1. 研究開始当初の背景

イネの収量性向上を考えると、穂は最も重要な器官である。

穂の構造を図1を例に説明する。イネの穂

は、穂軸から十数本の枝(一次枝梗)を発生させ、この一次枝梗に更に小枝(二次枝梗)を作り、そこに花(タネ)を着けるといふ複雑な構造を持つため、タネの数(着粒数)は多数の遺伝子群により規定されることになる。実際、一穂当たりの着粒数を制御するQTLとして600以上の領域が報告されているが(GRAMENE、QTLデータベース)これらの穂構造関連QTLで遺伝子の単離・解析に至った例は非常に限られている。その中でも、申請者のグループは世界に先駆けてイネの穂構造を制御する遺伝子単離に挑戦し、サイトカイニンの分解を触媒する酵素をコードするGN1A遺伝子が二次枝梗数を増減し結果として一穂粒数を制御する、転写制御因子WFPや形態形成因子APO1の発現の多寡により一穂粒数を制御する、等の成果を発表してきた。これらの先行研究は、QTL解析及びその遺伝子機能解析が穂形成機構の理解に有効であることを示したが、その一方で、従来型のQTL解析では遺伝子単離に多大な時間と労力が必要であり(上記のGN1A、WFP、APO1の遺伝子単離には各々に数年を要した)ましてや、一つ一つについてQTL研究を積み上げていくのでは穂形成の全体像を包括的に把握するのは困難であることも明らかにした。すなわち、穂形成の全体像を包括的に理解するためには、従来のQTL遺伝子の単離・解析とそれらの積み上げではなく、穂構造関連遺伝子群を包括的に探し出し、それらのネットワーク構築に向けた新しい手法が必要である。



上述のような状況認識に基づき、研究代表者はこれら3遺伝子の共通性(両親間の遺伝子機能の相違は、産生されるタンパク質自体の機能ではなく発現量の違いに依存する)に着目し、「穂構造関連QTLの多くは、発現量の違いが機能相違を引き起こす」と仮定することで、(1)穂構造を規定する39項目についての形質に関するQTL解析(形質QTL解析)と(2)穂メリステムからRNAを単離しイネ全遺伝子の発現量に関するQTL解析(発現QTL解析、expression-QTL解析、以下eQTLと省略)を融合することにより、「(3)形質QTL

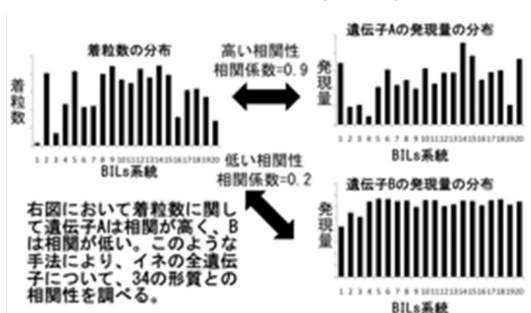
と発現QTL解析より形質値と発現量の相関検定」を行うことで、穂構造関連遺伝子簡便に予測する新手法の確立を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、上述した「現在のQTL解析ではその原因となる遺伝子の単離に多大な時間と労力が必要であり、さらに一つ一つの遺伝子研究を積み上げていく解析方法では複雑形質の全体像を包括的に把握するのが困難」とい認識に基づき、複雑形質の網羅的遺伝解析の新手法を確立するべく、様々な新手法についてその蓋然性を検討することを目的とした。研究当初は、eQTL解析の適用を目指したが、研究遂行中にDNA解析技術の進展により従来よりも大幅に安価で多数のイネ系統の全ゲノム解析が安価で行える事態が出現し、汎用性や有効性の点から考えて上述の目的により合致すると考えられた全ゲノム情報を用いたゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study; GWAS)も試行した。

3. 研究の方法

eQTLについては、コシヒカリと多収インド型品種八咫キとのBILs82系統を用い、穂構造34項目についての形質調査及びQTL解析、BILs集団の枝梗分化期の穂メリステムからRNA単離、RNAを用いたマイクロアレイ及び発現QTL解析を行った(図2)。BILs系



統間における、穂構造34項目データ値の大小と相関する発現パターンを示す遺伝子群を相関解析により抽出し、相関性の高いいくつかを穂構造制御に関わる遺伝子候補とした。候補遺伝子について、発現の詳細な解析および、遺伝子機能を喪失または向上させた転換体を作成し、候補遺伝子が穂構造決定に関与することを分子生物学的に証明することを試みた。

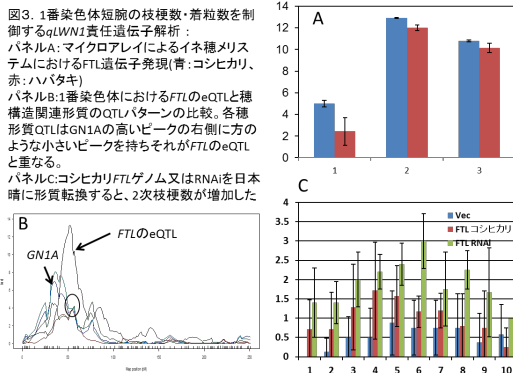
GWASについては、DNA多型マーカーを検出するため、日本の198品種についてIllumina HiSeq 2000を用いて全ゲノム配列解析を行い、1,095,863個の多型をDNA多型マーカーとしてGWA解析を行った。さらにGWA解析から得られたピーク周辺のLDヒートマップを作成するため、Rパッケージの“LD heatmap”を使用した。変異ブラウザの作成については、遺伝子の位置やCDSの情報等が記載されているgeneric feature format file version 3(gff3)をMSU rice genome annotation

project から取得し、すべての DNA 多型をリファレンスゲノム上の分布をもとにグループ分けをした。また、各遺伝子の翻訳開始地点から上流 2kb をプロモーター部位とした。

#### 4. 研究成果

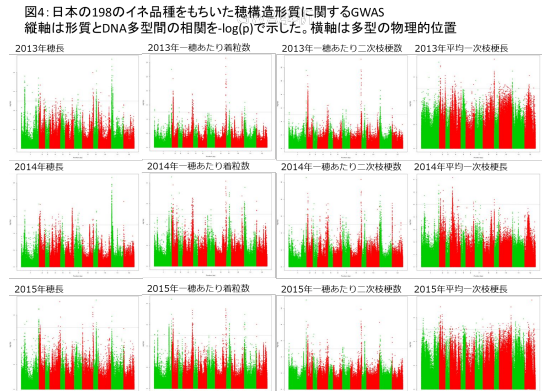
本研究の申請時に、eQTL により既知 1 番染色体短腕の 2 次枝梗数増加に関わる GN1A 遺伝子を容易に見出せること、さらには 7 番染色体長腕に座乗する 1 次枝梗長伸長に関わる QTL・qPBL7 の原因遺伝子が、新規遺伝子 MADS18 の可能性が高いことを述べた。そこで本研究は、まず qPBL7 について再現性確認を行い、申請時の観察が正しく MADS18 が本 QTL の責任遺伝子であることを確認した。

次に、「QTL 遺伝子単離の簡便化に穂形質 QTL と発現 QTL 情報の融合が有効」であることのケーススタディーとして、これ以外の QTL 領域についても解析を行った。その結果、1 番染色体短腕に座乗し枝梗数や着粒数に関与する qLWN1 の責任遺伝子が FTL1 であることをほぼ特定した(図 3)。すなわち、(1)コ

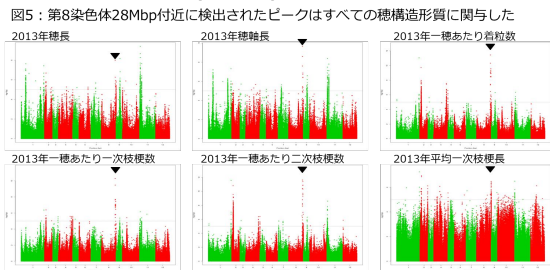


シヒカリの穂メリステムにおける FTL 発現はハバタキより高い(図 3A)、(2)コシヒカリ遺伝背景の BIL 系統において qLWN1 領域がハバタキ型になると FTL 発現量は低下(ハバタキアリルと比較してコシヒカリアリルが機能獲得型と推定)(図 3B)、(3)コシヒカリ FTL ゲノムを日本晴に導入した形質転換体は 1 次枝梗数が増加する傾向がある一方、FTL 発現を RNAi で抑制するとこの傾向が非常に顕著(図 3BC)。さらに、同様の解析を 1 番染色体長腕に座乗し枝梗長に関与する qUPL1 についても行った結果、本 QTL の責任遺伝子が DVL family に属するタンパク質をコードする遺伝子の可能性が高いことが判明した。これらの結果から、eQTL が QTL の責任遺伝子の探索に効果的であることが示唆された。一方で、本研究申請時点で最もゴールに近いと予想された 2 次枝梗数を増やす qUPB8 は、発現 QTL の結果から候補を 2 遺伝子までに絞り込んだが、過剰発現やノックダウン形質転換体の結果は、いずれの候補についても責任遺伝子と特定することができなかった。これらの結果から、eQTL 解析が有効に機能し責任遺伝子の特定が効率的に達成できる場合もあるが、失敗するケースも想定する必要があることが明らかとなった。

eQTL 解析の限界が明らかとなったので、穂構造を規定する QTL 解析を新しい手法である GWAS を用いて行った。まず、2013-15 年の 3 年に亘って上述の穂構造を規定するいくつかの形質値を用いて GWAS を行い、マンハッタンプロットを作製した。図 4 はその内の、



穂長、一穂着粒数、一穂あたり 2 次枝梗数、平均一次枝梗長に関する結果を示した。次に、この GWAS 解析の有効性について、一穂あたり着粒数に着目して検討した。その結果 3 年連続で第 8 染色体長腕 28Mbp 付近に強いピークが観察されたので、このピークに着目した。このピークは「一穂あたり着粒数」以外にも、稈長、穂長、穂軸長、一穂あたり一次枝梗数、一穂あたり二次枝梗数、平均一次枝梗長、等の形質でも検出され、穂構造を多面的に制御する遺伝子がこの領域に座上していると予測し、このピークの原因遺伝子の単離を試みた(図 5)。まずこの候補領域内



ピークが検出された 6 つの形質を多面的に制御する遺伝子が座上していると予測について変異ブラウザを作成し、アミノ酸置換を引き起こす多型を有する遺伝子に直目して調べたところ、この領域にはジベレリンシグナル伝達に関わることが報告されている SPINLY (SPY) が座乗することが確認された(図 6)。ここで、SPY の多型により、今回



使用した日本イネ 198 品種は二つのハプロタ



タイプに分けることが可能であり、ハプロタイプ B は、リファレンス品種である日本晴の持つハプロタイプ A に対して、翻訳開始地点から 2498bp の位置に、各植物に保存される SPY の機能発現に重要な役割を持つと予想されるアルギニンをロイシンに置換する変異が存在した。この 2 つのハプロタイプを用いて、先の 7 つの形質に対してハプロタイプ間の比較を行った結果、7 つの形質全てで有意な差が見られた (図 7)。

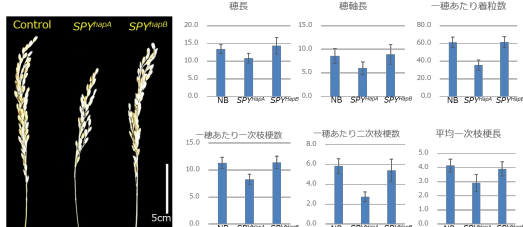
図7: 日本イネ198品種をSPYの構造によりハプロタイプA、Bに分け7つの形質に関してボックスプロットによりSPYの効果を検討



次に、日本晴の SPY の発現を抑制した形質転換個体 (SPY-RNAi) を作成した結果、SPY の発現が抑制されることで草丈、稈長、節間長の伸長が確認された。次に、機能獲得型と考えられたハプロタイプ A と部分機能欠失型ハプロタイプ B の SPY ゲノムを日本晴 (Hap\_A を所有) に導入した形質転換体を作成し穂構造を調査した。その結果、コントロール植物と比較して、Hap\_B 導入個体は、穂長、穂軸長、一穂あたり着粒数、一穂あたり一次枝梗数、一穂あたり二次枝梗数、平均一次枝梗長のいずれの形質においてもその長さが短く数も少ない一方、植物 B はコントロールと変わらなかった (図 8)。これらの結果から、

SPY形質転換体を用いた機能評価

図8: Hap\_BのSPYゲノムは日本晴(Hap\_A型)の収量を増加させる



SPY 遺伝子が穂構造さらには稈長についても負に制御することが明らかになった。さらに、今回記載した穂構造以外の重要農業形質についても同様の GWAS が極めて簡便且つ有効に QTL の責任遺伝子の候補を特定できることが示され、本方法の有効性が確認された。

## 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 5 件)

Yano, K., Ookawa, T., Aya, K., Ochiai, Y., Hirasawa, T., Ebitani, T., Takarada, T., Yano, M., Yamamoto, T., Fukuoka, S., Wu, J., Ando, T., Ordonio, RL., Hirano, K., Matsuoka, M. (2014) Isolation of a novel lodging resistance QTL gene involved in strigolactone signaling and its pyramiding with a QTL gene involved in another mechanism. *Mol Plant*. 査読有 8(2):303-314. doi: 10.1016/j.molp.

Yano, K., Aya, K., Hirano, K., Ordonio, RL., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2015) Comprehensive Gene Expression Analysis of Rice Aleurone Cells: Probing the Existence of an Alternative Gibberellin Receptor(s). *Plant Physiol*. 査読有 2015 Feb;167(2):531-544. doi: 10.1104/pp.114.247940. Epub 2014 Dec 15.

Ordonio, RL., Matsuoka, M. (2016) Increasing resistant starch content in rice for better consumer health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1616053113.

Hirano, K., Yoshida, H., Aya, K., Kawamura, M., Hayashi, M., Hobo, T., Sato-Izawa, K., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2017) Small Organ Size 1 and Small Organ Size 2/Dwarf and Low Tillering form a Complex to Integrate Auxin and Brassinosteroid Signaling in Rice. *Mol Plant*. 査読有 doi: 10.1016/j.molp.2016.12.013.

Yano, K., Yamamoto, E., Aya, K., Takeuchi, H., Lo, PC., Hu, L., Yamasaki, M., Yoshida, S., Kitano, H., Hirano, K., Matsuoka, M. (2016) Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes influencing agronomic traits in rice. *Nat Genet*. 査読有 2016 Aug;48(8):927-34. doi: 10.1038/ng.3596.

## 〔学会発表〕(計 8 件)

矢野憲司、安益公一郎、竹内秀征、池田真由子、山崎将紀、吉田晋弥、北野英己、平野恒、松岡信: 日本のイネ品種を用いた GWAS 解析. 日本育種学会第 127 回講演会. 2015.3 (東京) (口頭発表)

竹内秀征、矢野憲司、安益公一郎、胡麗、山崎将紀、吉田晋弥、平野恒、北野英己、松岡信：GWA 解析を用いたイネ農業関連遺伝子の単離．日本育種学会第 129 回講演会．2016.3（横浜）（口頭発表）

矢野憲司、竹内秀征、山本英司、平野恒、北野英己、松岡信：複雑なゲノム構造がもたらす GWA 解析の偽陽性．日本育種学会第 129 回講演会．2016.3（横浜）（口頭発表）

Yoshida, H., Hirano, K., Matsuoka, M., Ueguchi-Tanaka, M. : DELLA, IDD and SCL3 cooperate in the gibberellin feedback system . 22nd IPGSA, 2016.6 (Tronto. Canada)

Yano, K., Matsuoka, M.:Genome-wide association studies of agronomic traits in Japanese japonica rice. Workshop of Genetic Basis and Breeding Application on High-yield Superior Quality Rice. 2016.10 ( Hangzhou, China)

矢野憲司、西村明日香、瀨瀬永里子、平野恒、北野英己、松岡信:GWAS 解析を用いたイネカサの再分化率に関する候補遺伝子の同定．日本育種学会第 131 回講演会 .2017.3、(名古屋)(口頭発表)

小竹久仁彦、矢野憲司、平野恒、北野英己、松岡信:イネの穂形質に関する GWAS 解析．日本育種学会第 131 回講演会．2017.3、(名古屋)(口頭発表)

西村明日香、高師知紀、林少揚、山本敏央、芦苅基行、瀨瀬永里子、矢野憲司、堤伸浩、松岡信:イネカサの再分化能関連遺伝子の解析．日本育種学会第 131 回講演会 .2017.3、(名古屋)(口頭発表)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：  
  
〔その他〕  
ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

松岡 信 (MATSUOKA, Makoto)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号：00270992

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

なし