

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712002

研究課題名(和文)Nested Association Mappingによるイネ多収遺伝子の単離

研究課題名(英文)Genome-wide association study of agronomic traits in the rice nested association mapping population

研究代表者

阿部 陽 (Akira, Abe)

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・主任研究員

研究者番号：80503606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：東北地域の主要品種「ひとめぼれ」を共通親とし、世界の多様な遺伝資源を交配し、20組合せ計3,021 RILs (F7-F9世代)を育成した。これらは遺伝的に固定しており、全ゲノムシーケンスから得た高密度のSNPsでgenotypingされたイネNested Association Mapping集団として確立している。このイネNAM集団は、農業形質に関する重要遺伝子領域の高精度同定を可能とする遺伝資源として有用性が高いと考える。イネ多収性に関連する形質として止葉葉身のサイズ及びSPAD値のQTLを複数同定した。

研究成果の概要(英文)：We have developed the rice nested association mapping (NAM) population, composed of 3,000 RILs derived from the crosses of a common parent 'Hitomebore' with each of 20 diverse varieties. These RILs of F7-F9 generations were genotyped using high density SNPs that were detected by whole genome re-sequencing. Through a genome-wide association study (GWAS) of the rice NAM population, we determined the genetic basis of important agronomic traits and identified some of the QTLs. These results demonstrate that the use of GWAS with NAM populations is effective in uncovering the basis of important agronomic traits.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ GWAS NAM 多収性 葉身形態

1. 研究開始当初の背景

地球規模の気候変動による乾燥化や塩類集積による耕作可能地の減少、作物の栽培適地の移動などが懸念される中、世界人口は40年以内に90億人に達すると予想されており、食糧生産を現在の約2倍に増加させる必要が指摘されている (Godfray *et al.* 2010 Science)。これに対応する手段の一つが、作物の育種である。不良環境への適応や生産量の増大を迅速に達成するため、関連する形質の遺伝子及びその機能を明らかにし、その情報を活用したゲノム育種が重要である。

農業上重要な形質の多くは、複数の遺伝子で制御される量的形質であり、関与する遺伝子座を同定するため QTL 解析が行われてきた。QTL 解析は、QTL のおおまかな位置を決定する手法であり、遺伝子単離のためにはさらなる材料育成と Mapping が必要となる。また、異なる形質を示す 2 系統間の交雑後代を用いるため、2 つのアリルのみに着目した解析となってしまう。一方、シーケンス技術の著しい進歩によって、イネでは興味ある系統の全ゲノム配列を容易に得ることが可能となり、多数の品種系統を用いた Genome Wide Association Study (以下 GWAS とする) が行われ始めた (Zhao *et al.* 2011 Nat. Commu., Huang *et al.* 2012 Nat. Genet., Xu *et al.* 2012 Nat. Biotechnol.)。GWAS は、極多数の SNP による高解像度の解析ができること、既存の品種系統を用いるため材料育成の時間が必要ないこと、多数のアリルを解析できることなどメリットが高いとされる。しかし、特にイネでは、長い年月の交配過程で生じた集団構造 (連鎖不平衡) によって統計的パワーは大きく減少すること (偽陽性・偽陰性) 加えて、GWAS はレアアリルを見出す統計的パワーも小さいことが指摘されている (Han and Huang, 2013 Curr.Opin.Plant Biology)。

2. 研究の目的

Yu *et al.* (2008, Genetics) がトウモロコシを材料に提唱した Nested Association Mapping (以下 NAM とする) は、複数の Founder 系統 (既存品種) と一つの共通親との交雑から得られた複数組合せの数千系統の RILs を用いて、GWAS を行う手法である (図 1)。NAM は、Founder のゲノムをシャッフルすることで集団構造がキャンセルされ統計的パワーが高いこと、GWAS と同様に多数のアリルを解析できること、数

千系統が持つリコンビネーションと多数の SNPs による高解像度の Mapping ができることなど、従来の QTL 解析及び GWAS に比べてメリットが大きいとされる (Yu *et al.* 2008 Genetics, Tian *et al.* 2011 Nat. Genet.)。

本研究課題では、1) 20 組合せ 3,000 系統のイネ NAM 集団を確立し、2) 収量性に関連する形質の遺伝子を単離することを目的として、多収性イネのゲノム育種へ寄与することを目指す。

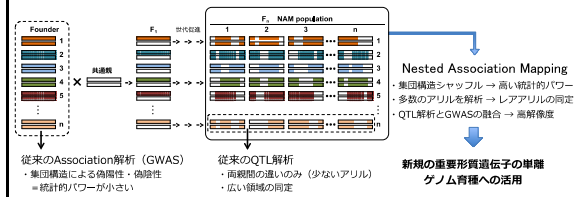


図 1 Nested Association Mapping と従来法の実験材料の違い及び NAM のメリット。

3. 研究の方法

(1) イネ NAM 集団の確立

共通親として東北地方の主要品種「ひとめぼれ」、Founder として NIAS イネコアコレクション (Kojima *et al.* 2005 Breed. Sci.) を中心とした 20 系統を交配し、計 3,021 RILs (F7~F9) を育成している (表 1)。この全 3,021 RILs について Illumina iScan 用いた Golden gate assay により SNP genotyping を行い、3,021 RILs の genotype データを構築する。以上によって、genotype 情報が付与されたイネ NAM 集団を確立する。

表 1 イネ NAM 集団の概要。

	Common parent	Founders	Country	Type	Acc.No.	Generation	No. of Lines
N01	Hitomebore	KASALATH	India	aus	WRC 02	F9	170
N04	Hitomebore	SHONI	Bangladesh	aus	WRC 31	F9	123
N05	Hitomebore	TUPA 121-3	Bangladesh	aus	WRC 32	F9	204
N06	Hitomebore	SURJAMUKHI	India	aus	WRC 33	F9	74
N07	Hitomebore	RATUL	India	aus	WRC 36	F9	64
N08	Hitomebore	BADARI DHAN	Nepal	aus	WRC 39	F9	80
N09	Hitomebore	KALUHEENATI	Sri Lanka	aus	WRC 41	F9	237
N18	Hitomebore	C8005	India	aus		F7	248
N03	Hitomebore	KEIBOBA	China	indica	WRC 17	F9	79
N14	Hitomebore	DEEJIAOHUALUO	China	indica	WRC 98	F9	27
N17	Hitomebore	TAKANARI	Japan	indica		F9	139
N16	Hitomebore	NERICA1	West Africa	O.ativa/O.gabberima		F9	36
N10	Hitomebore	JAGUARY	Brazil	tropical-japonica	WRC 47	F9	140
N11	Hitomebore	REXMONT	U.S.A.	tropical-japonica	WRC 50	F9	187
N12	Hitomebore	URASAN 1	Japan	tropical-japonica	WRC 51	F9	143
N13	Hitomebore	TUPA 729	Bangladesh	tropical-japonica	WRC 55	F9	87
N21	Hitomebore	SESIA	Italia	tropical-japonica		F7	250
N19	Hitomebore	MOUKOTO	China	temperate-japonica		F7	250
N20	Hitomebore	NORTAI	U.S.A.	temperate-japonica		F7	249
N22	Hitomebore	HAYAYUKI	Japan	temperate-japonica		F7	244
Total							3,021

(2) 圃場栽培および形質調査

全 3,021 RILs を 12 個体ずつ水田圃場に移植し、栽培する。基本的形質値として出穂期、収量関連形質としてソース能と関連がある止葉葉身のサイズ、SPAD 値を調査する。系統の管理や形質の調査は、バーコードや無線通信システムによって効率的に行う。

(3) GWAS モデルの検証および有用遺伝子領域の同定

数多くの遺伝子が単離されている出穂期を検証データとして、線形モデル(Buckler *et al.* 2009)、混合線形モデル(Zhang *et al.* 2010)等を検証する。止葉葉身サイズ、SPAD 値における GWAS を行い、形質と関連のある遺伝子領域を同定する。

4. 研究成果

全 3,021 RILs について Low depth の全ゲノムシーケンスを行い、genotyping を行った。「ひとめぼれ」と各 Founder 系統のゲノムシーケンスを比較し、*aus* 及び *indica* ではおよそ 130 万~100 万 SNPs、*tropical-japonica* では 70~30 万 SNPs、*temperate-japonica* では 10 万 SNPs を抽出した(図 2)。これら、親系統間で抽出した SNPs を対象に 3,021 RILs の genotype を決定した。つまり、制限酵素サイトの制限を受ける GBS や RAD-seq と異なり、全 SNP を対象とした極めて高精度な GWAS を可能とする SNP genotype データを構築した。

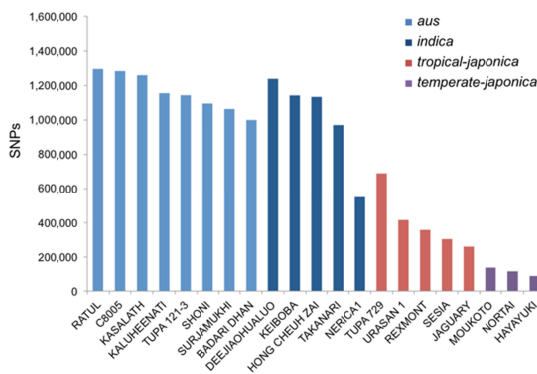


図 2 品種「ひとめぼれ」と Founder 系統間の SNP 数

これら 3,021 系統を圃場で栽培して得た出穂期、葉身形態、SPAD 値における GWAS を行った。まず単回帰による線形モデルと集団構造を考慮した混合線形モデルを出穂期のデータを用いて比較検討した。両者に大きな違

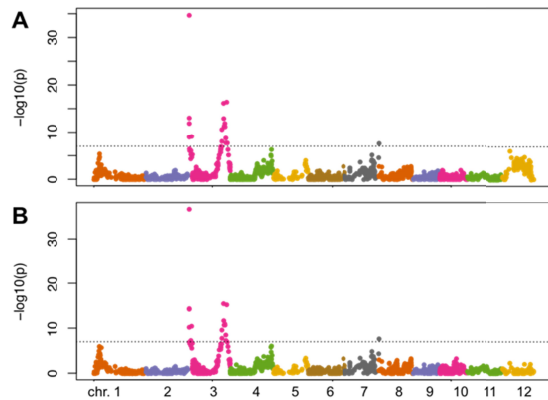


図 3 単回帰線形モデル(A)と集団構造を考慮した混合線形モデル(B)の比較 .形質値は出穂期 .

いは認められなかった(図 3)。

多収性に関係する形質として止葉葉身のサイズ、SPAD 値の単回帰線形モデルによる GWAS を行った。葉身幅の GWAS では、Chr.4 の既知遺伝子 *NAL1* をピンポイントに検出するとともに、その他の 4 箇所にも明瞭なピークを得た(図 4-A)。また、葉身幅と SPAD 値の両者で検出した QTL を *qLWS1*, *qLWS7* (QTL for leaf width SPAD value) と仮称を付した。さらに、「ひとめぼれ/タカナリ」RILs から葉身幅で検出した Chr.1、3、4、6 及び 7 の 5 箇所の QTL における遺伝子型で選抜した RIL の葉身幅は、概ね遺伝子型に対応していた(図 5)。すなわち、葉身幅は複数の遺伝子が関与して決定されており、本研究により構築した 3,021 系統の NAM 集団と全ゲノムシーケンスによる SNP genotype データを用いることで、これまで単離されてきたメジャー遺伝子の他に、これまで見出されていない遺伝子を狭い領域に同定できることを示唆している。

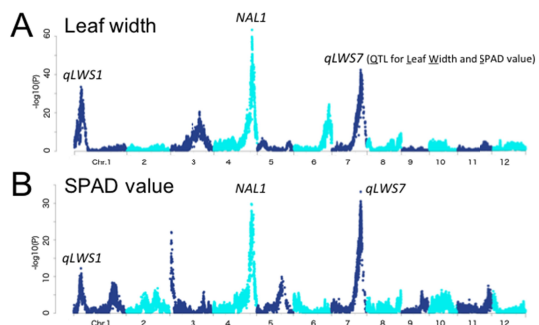


図 4 葉身幅(A)と SPAD 値(B)の GWAS .

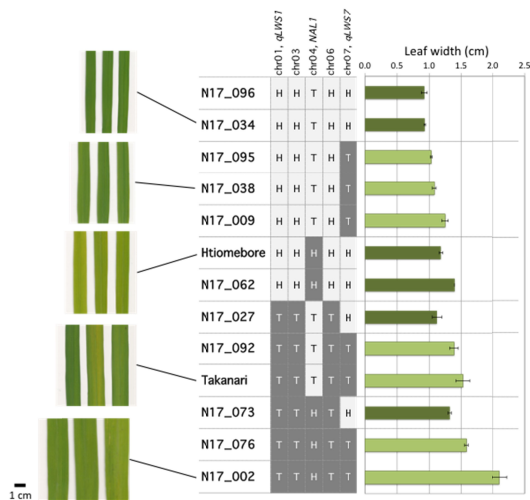


図5 「ひとめぼれ/タカナリ」RILs における葉身幅 QTL の遺伝子型と葉身幅の関係。

以上、遺伝的に固定し、全ゲノムシーケンスから得た高密度の SNP genotype データがある 20 組合せ計 3,021 RILs のイネ Nested Association Mapping 集団を確立した。これらは、農業形質に關与する重要遺伝子領域の高精度同定を可能とする遺伝資源として有用性が高いと考える。イネ多収性に關連する形質として止葉葉身のサイズ及び SPAD 値の QTL を複数同定した。今後、これら遺伝子の単離、機能解析を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

阿部 陽, 高木 宏樹, 夏目 俊, 八重樫 弘樹, 菊池 秀子, 吉田 健太郎, 小杉 俊一, 齋藤 宏昌, 浦崎 直也, 松村 英生, 神崎 洋之, 寺内 良平, 次世代シーケンサーを活用した全ゲノム解析によるイネ育種、生化学、2016、88: 44-53

Utsushi, H.*, Abe, A.*, Tamiru, M., Ogasawara, Y., Obara, T., Sato, E., Ochiai, Y., Terauchi, R., Takagi, H. WIPPER: an accurate and efficient field phenotyping platform for large-scale applications. Breeding Science、2015、65: 285-289 *These authors contributed equally.

〔学会発表〕(計 2 件)

阿部 陽, 高木 宏樹, 八重樫 弘樹, 植村 亜衣子, 及川 香梨, 宇津志 博恵, 菊

池 秀子, 小笠原 由美子, 清水 元樹, 寺内 良平、イネ Nested Association Mapping 集団による農業形質の遺伝解析、日本育種学会第 130 回講演会、2016、鳥取大学

阿部 陽、岩手県における水稲ゲノム育種の取り組み、第 9 回東北育種研究集会、2014、岩手大学

〔図書〕(計 1 件)

Terauchi, R., Abe, A., Takagi, H., Tamiru, M., Fekih, R., Natsume, S., Yaegashi, H., Kosugi, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Yoshida, S., Cano, L., Kamoun, S., Whole Genome Sequencing to Identify Genes and QTL in Rice, Sablok, G., Kumar, S., Ueno, S., Kuo, J., Varotto, G. (eds): Advances in the Understanding of Biological Sciences Using Next Generation Sequencing (NGS) Approaches, Springer、2016、Chapter3: 33-42 ISBN: 978-3-319-17157-9

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 陽 (ABE, Akira)
(公財)岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・主任研究員
研究者番号: 80503606

(2)研究協力者

高木 宏樹 (TAKAGI, Hiroki)
宇津志 博恵 (UTSUSHI, Hiroe)
八重樫 弘樹 (YAEGASHI, Hiroki)