

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 **KITONY Justine Kipruto**

論 文 題 目

**Development and utilization of nested association mapping population in rice**  
(イネ **nested association mapping** 集団の開発と利用)

論文審査担当者

主査 名古屋大学准教授 土井 一行

委員 名古屋大学教授 村瀬 潤

委員 名古屋大学教授 芦苺 基行

委員 名古屋大学教授 犬飼 義明

委員 名古屋大学助教 西内 俊策

## 論文審査の結果の要旨

高スループット DNA シーケンス技術の時代となり、量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) マッピングにおける制限要因は、DNA マーカーではなく、遺伝解析材料となった。農業形質や環境適応などの遺伝的構造を研究するための遺伝資源は、作物の改良に必須である。Nested association mapping (NAM) は、複数の系統を親とする遺伝解析集団を利用する解析法で、従来の連鎖解析とアソシエーション解析の両方の利点を併せ持ち、複雑形質の解析に有用である。NAM 集団は、複数の組換え自殖系統 (recombinant inbred lines, RILs) の集まりであり、各 RIL は共通親と多様性供与親の交雑に由来する。NAM 集団を用いた遺伝解析では、従来型的手法 (single family QTL 解析)、複数集団をまとめて QTL 解析に供する手法 (joint QTL 解析)、および genome-wide association study (GWAS) をベースとする手法を利用することができ、結果を照合してより良い精度を得ることが期待される。また、固定系統であるため、遺伝子型-環境間相互作用の解析にも利用可能である。一方、ゲノミックセレクション (genomic selection, GS) は、次世代の育種技術として注目されている。植物育種における GS の実装では、比較的小規模な集団と、DNA マーカー遺伝子型のみを得るための大規模集団を組合せ、予測モデル作出を小規模集団で行い、大規模集団からの選抜を DNA マーカーの情報のみで行う方法が想定されている。この予測モデルを評価するための集団としても NAM 集団は有用である。申請者は、イネ *aus* 品種を多様性供与親とし、*japonica* 品種である台中 65 号 (T65) を共通親とする NAM 集団 (*aus*-NAM) を作出した。初期の材料として、7 組合せの RILs からなる集団 (*aus*-NAM-I) を用いた解析を行い、遺伝率の高い形質である出穂期により、遺伝子マッピングの精度を確認した。次に、14 組合せからなる集団 (*aus*-NAM-II) に集団を拡大し、GWAS および形質予測モデルの作成と評価を行った。本論文は、これらにより、イネにおける NAM の有用性を示したものである。

まず、*aus*-NAM-I の作出においては、名古屋大学で育成された 5 組合せからなる集団と、九州大学で育成された 2 組合せの計 7 組合せ (供与親は WRC2、WRC29、WRC31、WRC35、WRC39、DV85 および ARC10313)、計 895 系統を得た。これらの系統の遺伝子型決定を *KpnI* と *MspI* の 2 種類の制限酵素を用いた genotyping-by-sequencing (GBS) 法により行った。得られた 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) マーカーの数は交配組合せにより異なり、2868 マーカーから 4285 マーカーが得られた。フィルタリングの条件を満たした 887 系統を解析に使用した。集団構造 (population structure) を確認するために、確率的成分分析を行った結果、WRC29 由来の集団のみ隔離された集団を形成したが、十分に遺伝子マッピングに利用可能と考えられた。形質として、2015 年の東郷フィールドの通常期栽培における出穂期を用い、single family QTL 解析、joint QTL 解析および

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

GWAS 解析を試みた。single family QTL 解析および joint QTL 解析においては 7 組合せのそれぞれの DNA マーカー連鎖地図において共通する SNP マーカーを抽出し、1786 マーカーからなる共通連鎖地図を作成して解析を行った。Single family QTL 解析においては、染色体 5、6、7 および 10 に有意な QTL を検出した。joint QTL 解析においては染色体 6、7 および 10 に single family 解析と同じ QTL が、染色体 1、2 および 3 に新たな QTL が検出され、染色体 5 の QTL は検出されなかった。染色体 6 および 7 の QTL は複数のピークとして検出された。また、GWAS による遺伝子マッピングでは、親系統のリシーケンスデータから 41,561 サイトの SNP を抽出し、これを GBS によるマーカー遺伝子型にプロジェクションすることで遺伝子型データを作成し、これに系譜情報を加えた上で、集団構造と近縁度を考慮した混合線型モデル (MLM (Q+K)) により解析を行った。その結果、染色体 6、7 および 10 に有意な QTL を検出した。検出された QTL のうち、染色体 6、7 および 10 のものは既知の遺伝子座 (*RFT1*、*Hd3a*、*Hd1*、*Ghd7* および *Ehd1*) であると考えられたため、マッピング精度の評価を行った。*Ehd1* とと思われる QTL のピークは約 741kb の範囲に検出され、この範囲に *Ehd1* が含まれていた。*Hd1* 座と思われる QTL に関しても、single family QTL 解析、joint QTL 解析、MLM (Q+K) のいずれにおいても実際の *Hd1* の位置とよく一致した。各親系統の *Hd1* の塩基配列を確認したところ、WRC39 は、解析に用いた親系統 (T65 および 7 系統の *aus*) の中で、唯一 *Hd1* の機能型アレルを持っており、このレアなアレルが NAM により検出できることが確認された。*Ghd7* は、joint QTL 解析における染色体 7 の 2 箇所ピークのうちの 1 つとして正しい位置に検出されたが、GWAS で得られた位置情報は不明確であり、事前の情報および single family 解析と joint QTL 解析の情報が無ければ *Ghd7* と認識することは困難であった。これらのことから、NAM 集団における遺伝子マッピングでは、位置情報の精度に優れる single family 解析および joint QTL 解析と、狭い範囲でピークを検出できる GWAS 解析、および親系統のリシーケンスデータを総合して利用することで、遺伝子マッピングおよび原因遺伝子の絞り込みの迅速化が期待できることが明らかとなった。

次に、*aus*-NAM-I から 2 組合せ (DV85、ARC10313) を除き、新たに 9 組合せを育成して 14 組合せからなる *aus*-NAM-II 集団を確立した。*aus*-NAM-II の遺伝子型決定においては、*aus*-NAM-I で用いた手法に、イルミナの index を加えることで、従来のバーコード方式よりも多くの組合せ・多くの検体をひとまとめにして GBS 解析し、計 1818 系統をその後の解析に使用した。形質評価は 2015 年および 2018 年の東郷フィールド・普通期栽培で行い、到穂日数、稈長、穂長、穂軸長、穂数、穂重、茎葉重、主茎の 1 次枝梗数、主茎の 1 穂粒数、バイオマス (穂重+茎葉重) および種子稔性を調査した。到穂日数に関する GWAS 解析により、既知の QTL

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

(*Ehd1*、*Hd1*、*Hd3a/RFT1*、*Hd9*、*DTH2*、*Hd7*、*Se14* など) が正しく検出された。**GWAS** を行う場合は、**GBS** による遺伝子型データに親系統群のリシーケンスデータをプロジェクションにより挿入して、マーカー数を増やした方が良い結果が得られた。その他の形質に関しても、既知の **QTL** が検出されたほか、新規の **QTL** を検出した。ゲノム予測 (genomic prediction、**GP**) モデルの作成においては、**Bayesian B (BayesB)**、**Baysian least absolute shrinkage regression (BL)**、**reproducing kernel Hilbert space regression (RKHS)**、**ridge regression best linear unbiased prediction (rrBLUP)** の 4 つの統計解析手法を試みた。まず、マーカー数の検討を行った結果、**GBS** による **2006** マーカーにより十分な予測精度が得られ、**GP** においてプロジェクションは不要であることが明らかとなった。次に、**GWAS** 解析により有意なアソシエーションが検出された **63** 個のマーカーのみを用いた場合と、**2006** 個全ての **GBS** マーカーを用いた場合を比較した結果、全ての **GBS** マーカーを用いた場合のほうが高い予測精度が得られ、全ゲノムをカバーするマーカーによる **GP** の有用性が示された。統計解析の手法の比較においては、**RKHS** が最も良い性能を示した。これらの条件検討を行った結果、実測値と予測値の相関係数は **0.88** (**2018** 年の到穂日数) に達した。実際の育種現場において到穂日数は優先順位が高いことから、イネにおける **GS** 育種の実装においては、到穂日数に着目すると選抜を精度良くできること、また、バイオマスのような遺伝率の低い形質でも強い選抜を行わなければ予測が利用可能であることが示された。

以上、申請者は、イネにおける **NAM** 集団の作出および高密度 **DNA** マーカーによる遺伝子型決定を行い、遺伝資源として確立した。また、遺伝子マッピングの精度および形質予測の精度が期待通りであることを示した。今後はさらなる新規遺伝子の探索や **GP** モデルの開発、遺伝子型-環境間相互作用のモデル化など幅広い分野への応用が期待され、イネにおける遺伝子探索および **GS** 育種の基盤として当該分野に関する学術研究に大きく貢献するものである。よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものとして認め、合格と判定した。