

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04441

研究課題名(和文) LD係数を利用した連鎖地図作成法の開発と高次倍数性種への応用

研究課題名(英文) Linkage map construction based on LD and its application to polyploid species

研究代表者

磯部 祥子 (Sachiko, Isobe)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究部・室長

研究者番号：20343973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：連鎖解析はイチゴ品種「麗紅」の自殖第1世代(S1)とサツマイモ「徐薯18号」のS1集団および「徐薯18号」と「K123-11」の交雑によるF1集団などを用いて行った。従来法による連鎖地図作成ではイチゴ、サツマイモのS1集団では連鎖地図が作成できたが、サツマイモのF1集団では連鎖群の生成が困難だった。一方、解析法の開発ではマーカー間の連鎖不平衡の程度に基づいた連鎖地図作成用のソフトウェアの開発を進め、カイ二乗値に基づく全マーカー間の連鎖不平衡を評価する指標を算出し、その結果に基づいてマーカー間の遺伝学的な位置関係の階層構造を再構築するプログラムを作成した。

研究成果の概要(英文)：Linkage analysis was performed with a S1 population of strawberry derived from a Japanese variety, 'Reiko', a S1 population of sweetpotato derived from a Chinese variety, 'Xushu 18', and a F1 population cross between 'Xushu 18' and an Ipomoea trifida accession, 'K123-11'.

Although linkage maps were successfully constructed in the S1 populations of strawberry and sweetpotato, it was difficult to generate linkage groups in the sweetpotato F1 population with typical approach in linkage map construction. A software was developed for generation on linkage groups based on linkage disequilibrium (LD) between the two loci. The software calculates indexes representing LDs between the all combinations of two loci and constructing hierarchic structure based on the LD indexes.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：連鎖地図 高次倍数性 連鎖不平衡

### 1. 研究開始当初の背景

従来の連鎖地図は分離集団の各個体の遺伝子型からマーカー間の交叉の数を推定し、Kosambi 関数 (Kosambi, 1944) に代入するなどして算出された連鎖距離を用いて作出される。連鎖距離の推定はマーカー間で生じる交叉の数が基本となるため、連鎖地図作成において各マーカーの対立遺伝子座 (アレル) がどのハプロタイプに由来するか推定できることが前提となる。一方、同質高次倍数性種では核ゲノム内に相同染色体が2本以上存在するため、アレル分離比が複雑になりハプロタイプの相の特定が非常に困難である。そこで、アレルの相の特定が困難な集団においては連鎖不平衡係数 (Linkage disequilibrium, LD) を用いることで染色体の基本数に収束した連鎖群上に DNA マーカーを位置づけることが可能なのではと考えた。

### 2. 研究の目的

連鎖地図は植物の遺伝解析において重要な基盤情報であるが、同質高次倍数性種など対立遺伝子座 (アレル) の由来するハプロタイプの相の特定が困難な種や集団では、共優性マーカーを利用して連鎖群が染色体数の基本数に収束した精度の高い連鎖地図を作成することが難しい。そこで、本研究では LD 係数を用いた連鎖地図作成法を開発することで、アレル間のハプロタイプの相が不明でも共優性マーカーを連鎖群上に位置づける手法の開発を目指す。本研究の成果により、同質高次倍数性種でも染色体数の基本数と同数の連鎖群からなる地図の作成が可能となる。また解析集団の多様性を広げることで全ての種で遺伝学の可能性が広がるとともに、物理地図上位置情報を反映した多次元的かつ統合的な連鎖地図リソースの整備を可能にする

### 3. 研究の方法

本研究では、倍数性、用いる集団の種類、マーカーの規模などが異なるデータセットを用いて LD 係数を利用した連鎖地図作成法を開発する。研究項目は 集団の育成と DNA 抽出、 遺伝子型解析と従来法による連鎖地図作成、 解析法の開発からなる。集団の育成では、同質高次倍数性であるサツマイモの S1、F1 集団を作成する。遺伝子型解析ではサツマイモに加え、トマト F2 集団の大規模データとイチゴ S1 集団のデータを取得する。解析法の開発では、マーカー間の LD 係数の算出のためのプログラムを作成し、そこで得られた LD 係数によって遺伝的に近隣するマーカー群の階層的なクラスター化による連鎖地図の作成手法を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 集団の育成と DNA 抽出

解析に用いたのは二倍体種としてトマト

の F2 集団、高次倍数性種では異質八倍体であるイチゴと同質 (もしくは一部異質) 六倍体であるサツマイモである。トマトの F2 集団は Microtom と品種「Regina」の交配に由来し、本研究実施以前よりかずさ DNA 研究所で保有している 94 個体を用いた。イチゴは品種「麗紅」の自殖第一世代 (S1) の集団を研究開始前に千葉県農林総合研究センターによりすでに作出済みであった (188 個体)。そこで本課題ではサツマイモについて異なるタイプの 2 集団を作成した。

作成したのは中国のサツマイモ品種「徐薯 18 号」の S1 集団および「徐薯 18 号」とサツマイモの近縁野生種である *Ipomoea trifida* の 6 倍体系統「K123-11」との交雑による F1 集団である。「徐薯 18 号」の S1 集団は 2015 年度に 234 個体を作成して DNA を抽出した。一方、F1 集団は 2016 年度に「徐薯 18 号」を花粉親、「K123-11」を種子親とした交雑実生 101 個体を、2017 年度に「徐薯 18 号」を柱頭親、「K123-11」を花粉親とした実生 108 個体を作成し、それぞれ DNA を抽出した。

#### (2) 遺伝子型解析と従来法による連鎖地図作成

トマトの F2 集団の遺伝子型解析では RAD-seq 解析により両親間で得られた 155,952 候補遺伝子から 1,257SNPs による連鎖地図を作成した。イチゴでは AxiomSNP アレイと SSR マーカーを用いて 31 連鎖群による連鎖地図を作成した。連鎖群上に位置付けられた座の数は 11,574 で全長は 2816.5cM だった。

また、RAD-seq によるサツマイモ「徐薯 18 号」自殖集団を用いて 28,087 座による連鎖地図を作成した。連鎖群の数は 96 で全長は 3,3020cM だった。一方、「K123-11」と「徐薯 18 号」の F1 集団について、RAD-Seq 解析を実施し二倍体野生種 (*I. trifida*) のゲノム配列を参照配列として合計 156,991 の SNPs を得た。従来法で連鎖地図作成を試みたが連鎖群の生成が困難であった。フィルタリングを実施し、全検体合計で Reference:Alternative リード比が 1:5 もしくは 5:1 に分離する SNPs のみを用いて従来法で連鎖地図作成を試みたが連鎖群の生成が困難であった。二倍体野生種ゲノム配列上で SNPs 位置を特定したところ 15 染色体上に合計 21,108 の SNPs を座上することができた。

#### (3) 解析法の開発

マーカー間の連鎖不平衡の程度に基づいた連鎖地図 (連鎖不平衡ブロックの階層構造) 作成用のソフトウェアの開発を進めた。カイ二乗値に基づく全マーカー間の連鎖不平衡を評価する指標を算出し、その結果に基づいてマーカー間の遺伝学的な位置関係 (LD ブロック) の階層構

造を再構築するプログラムを作成した。作成したプログラムにより、複数のクラスタリング手法でイチゴの SSR マーカー遺伝子型を用いて連鎖群の同定を試みた。マーカーが座上するサブゲノムの区別には Ward 法によるクラスタリングが最も適していると考えられたが、Minor allele frequency の処理にさらなる検討が必要だと考えられた。

#### 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 2 件)

Shirasawa K, Tanaka M, Takahata Y, Ma D, Cao Q, Liu Q, Zhai H, Kwak SS, Jeong JC, Yoon UH, Lee HU, Hirakawa H, Isobe S, A high-density SNP genetic map consisting of a complete set of homologous groups in autohexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). Sci Rep. (2017), 7:44207. doi: 10.1038/srep44207  
Nagano S, Shirasawa K, Hirakawa H, Maeda F, Ishikawa M, Isobe S, Discrimination of candidate subgenome-specific loci by linkage map construction with an S1 population of octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*). BMC Genomics, 2017, 18:374. doi: 10.1186/s12864-017-3762-y

[学会発表](計 14 件)

白澤健太、平川英樹、磯部祥子、トマトにおける RAD-Seq 法の効率的な利用法の検討と高密度連鎖地図の作成、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015。

Isobe S, Genome sequencing challenge to polyploidy crops, Big data and climate smart agriculture's triple challenges, 2015.

永野聡一郎、白澤健太、平川英樹、前田ふみ、石川正美、磯部祥子、Axiom ジェノタイピングアレイを用いた栽培イチゴの超高密度 SNP 連鎖地図の作成、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015。

Nagano S, Shirasawa K, Hirakawa H, Maeda F, Ishikawa M, Isobe S, Identification of chromosome specific regions in 8X cultivated strawberry by construction of a SNP map. Plant and Animal Genome XXIV, 2016.

Hirakawa H, Shirasawa K, Nagano S, Nagasaki H, Isobe S, Genome sequencing and SNP discovery in the octoploid strawberry, VIII International Strawberry Symposium, 2016.

Shirasawa K, Tanaka M, Takahata Y, Ma D, Cao Q, Liu Q, Zhai H, Kwak SS, Jeong JC, Yoon UH, Hirakawa H, Isobe

S, Genetic map with SNPs from ddRAD-Seq analysis in sweetpotato, 7<sup>th</sup> International Sweetpotato Workshop, 2016.

白澤健太、田中勝、高畑康浩、Ma D, Cao Q, Liu Q, Zhai H, Kwak SS, Jeong JC, Yoon UH, 平川英樹、磯部祥子、日本育種学会第 130 回講演会、2016

Shirasawa K, Nagano S, Hirakawa H, Nagasaki H, Isobe S, De novo whole genome assembly in alloctoploid strawberry. Plant and Animal Genome XXV, 2017

白澤健太、平川英樹、寺地真由子、永野聡一郎、長崎英樹、前田ふみ、柳 智博、磯部祥子、異質八倍体栽培稚児ゲノムのフェージング配列の染色体への位置付けと祖先ゲノムの推定、日本育種学会第 131 回講演会、2017。

Shirasawa K, Tanaka M, Takahata Y, Ma D, Cao Q, Liu Q, Zhai H, Kwak S, Jeong J, Yoon U, Lee H, Hirakawa H, Isobe S, A high-density SNP linkage map toward whole genome sequencing in autohexaploid sweetpotato, PAG Asia, 2017.

Shirasawa K, Nagano S, Hirakawa H, Nagasaki H, Maeda F, Isobe S, De novo whole genome assembly in allo-octoploid strawberry, XIX international botanical congress, 2017

TRAS Sweetpotato genome sequencing consortium (Presenter: Isobe S), Sweetpotato genome sequencing under TRAS collaboration, XIX international botanical congress, 2017.

白澤健太、長崎英樹、田中勝、岡田吉弘、高畑康浩、平川英樹、磯部祥子、同質六倍体サツマイモ栽培種のゲノム解読に向けた取り組み、日本植物学会第 81 回大会シンポジウム、2017。

木村拓海、田中勝、白澤健太、磯部祥子、田原誠、門田有希、サツマイモ塊根における GWAS を用いた着色ゲノム領域の探索、日本育種学会第 133 回講演会、2017。

[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: 該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

磯部 祥子 (Sachiko Isobe)  
(公財)かずさ DNA 研究所・先端研究開発  
部・植物ゲノム・遺伝学研究室長  
研究者番号：20343973

### (2)研究分担者

中谷 明弘 (Akihiro Nakaya )  
大阪大学  
大学院医学系研究科  
特任教授（常勤）  
研究者番号： 60301149

### (3)研究分担者

田中 勝 (Masaru Tanaka )  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構九州沖縄農業研究センター  
畑作研究領域 畑作物生理・遺伝グループ  
長  
研究者番号： 60391455