

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06905

研究課題名(和文) 高速配列決定技術を用いたコケ植物の金属元素耐性等有用形質に関するオミクス解析

研究課題名(英文) Study for heavy metal tolerance in bryophytes based on high-throughput sequencing and multi-omics approaches

研究代表者

櫻井 哲也 (Sakurai, Tetsuya)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授

研究者番号：90415167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホンモンジゴケのゲノム塩基配列解読に先立ち、培養原系体を用い、核DNAのPI染色によるフローサイトメトリー法によるゲノムサイズの見積もりを行った結果、1億1千万から1億3千万塩基と推定された。長鎖読み取り型シーケンサPacBio RSIIを使用して、ゲノム塩基配列データを獲得し、およそ1億4千万塩基のドラフトゲノム塩基配列データを作成した。

得られたドラフトゲノム塩基配列データおよび各種生育条件下のコケ植物体から得たRNAサンプルによるRNA-seqデータを使用して、遺伝子領域予測を行った結果、およそ1万9千個の遺伝子領域が同定され、予測された転写産物数は、およそ2万5千であった。

研究成果の概要(英文)：We estimated the genome size of *Scopelophila cataractae* by flow cytometry with propidium iodide staining of nuclear DNA using the cultured protonema. As a result, the genome size was calculated to be 110 to 130 million bp. The genomic DNA sequences were generated by using PacBio RSII sequencer and we constructed the draft genome sequence set of *S. cataractae*. The assembly size was approximately 140 million bp. Subsequently, we performed gene region prediction using the constructed draft genome sequence set and the RNA-seq data from RNA samples obtained from *S. cataractae* under various growth conditions, and predicted approximately 25,000 transcripts in approximately 19,000 gene regions.

研究分野：ゲノム情報科学

キーワード：ゲノム塩基配列決定 遺伝子発現プロファイル 植物

1. 研究開始当初の背景

近年、重金属類等の有害物質による環境汚染が増加しており、土壌、水汚染による健康被害拡大の懸念や汚染防止、浄化対策の確立への社会的要請が強まっている。わが国では平成15年2月に、土壌汚染対策法を施行され、有害物質による汚染が疑われる工場跡地等に対する土壌調査や汚染対策の実施が義務付けられるなど規制が強化されており、有害金属の分析調査の必要性の高まりとともに重金属汚染浄化技術の開発が急がれている。

このように、重金属汚染の低減、浄化技術の開発が急がれる中、低コストと低環境負荷を満たす浄化技術の実現が期待できる対象の1つとして植物の活用がある。植物は様々な無機物を吸収し、それらを栄養分として自身の生育に利用する。その過程で重金属などの汚染物質も一緒に吸収してしまうため、一般的に植物は高汚染物質濃度の環境下では生育できない。しかし、植物の中には汚染物質、特に金属類が多く含まれる場所に好んで生育し、さらに汚染物質を高いレベルで吸収・蓄積できる種(金属高集積植物)が存在する。例えば、シダ植物のヘビノネコザは、カドミウム、亜鉛、鉛、銅、銀を蓄積し、コケ植物では、ホンモンジゴケが銅に耐性を示し、高蓄積することが知られている。高等植物では、モデル植物シロイヌナズナと同属のハクサンハタザオは、カドミウム、亜鉛を高蓄積することが報告されている^{1,2,3}。

今日では、真核藻類、陸上植物種のゲノム塩基配列が決定(概要ゲノム塩基配列の決定を含む)され、インターネット上に公開されている。これらの成果は、各植物種の遺伝子機能概観の把握、比較解析、有用形質の理解等のための研究資源として活用され、生物機能研究の重要な情報基盤となっている。

<引用文献>

1. Van et al. 2006, Soil Science & Plant Nutrition
2. Hanikenne et al. 2008, Nature
3. Nomura et al. 2011, J Plant Res.

2. 研究の目的

本研究は、有用な特性が認められているにもかかわらず研究基盤の整備がされていない金属元素耐性コケ植物(主にホンモンジゴケ)について、包括的研究基盤の整備および非金属元素耐性植物との比較解析による有用形質に関わる遺伝子の同定を目指すものである。上述のように、モデル植物、樹木、作物等の様々な植物において、ゲノム塩基配列決定が報告されているが、金属高集積コケ植物のゲノム塩基配列決定は本研究が初めてである。具体的には、対象コケ植物のゲノムサイズ見積もりをはじめ、高速DNAシー

クエンサを使用し、対象コケ植物のゲノム塩基配列決定を行い、高品質なドラフトゲノム塩基配列データを作成する。ドラフトゲノム塩基配列データを精査することで、対象コケ植物の遺伝子機能概観を獲得する。ゲノム解析に加え、通常および高金属濃度環境下等の各種生育条件下における転写産物の発現解析(RNA-Seq)により、コケ植物が持つ金属耐性、蓄積に関与する遺伝子を抽出する。これらの網羅的解析に加え、ヒメツリガネゴケをはじめとする利用可能な様々な植物のゲノム情報と比較することで、種特異的遺伝子群についての機能解析を行い、より詳細な生物機能を把握する。

3. 研究の方法

(1)ゲノムサイズの見積もり

上述のように、金属元素耐性コケ植物のゲノム配列解読は初めてであることから、対象コケ植物のゲノムサイズの見積もりを行う。生物学上の知見という意味だけでなく、ゲノムドラフト塩基配列の作成時の品質向上にも関係する。ゲノムサイズの見積もり手法については、核DNAのヨウ化プロピジウム染色によるフローサイトメトリー法と短鎖型読み取り型高速DNAシークエンサ由来の配列データを用いたk-mer頻度解析の2通りの方法を実施する。

(2)ドラフトゲノム塩基配列データの作成

課題実施者らは、既に長鎖読み取り型シークエンサPacBio RSII由来のゲノムDNA配列データを有していたが、高品質なドラフトゲノム塩基配列の作成にはデータ量が不足している。したがって、ゲノムDNA配列決定を追加して行い、既存の配列データと併せて配列のアセンブル工程を行う。

(3)ドラフトゲノム塩基配列データのアノテーション

作成したドラフトゲノム塩基配列データを用い、遺伝子領域の同定、他生物種の既存データとの比較解析を行うことで、対象のコケ植物の遺伝子概観を獲得する。

4. 研究成果

(1)ゲノムサイズの見積もり

ホンモンジゴケの培養原系体を用い、核DNAのヨウ化プロピジウム染色によるフローサイトメトリー法によるゲノムサイズの見積もりを行った。対照として、シロイヌナズナ(エコタイプ Col-0)を使用し、そのゲノムサイズを1億3千万塩基として、ホンモンジゴケのゲノムサイズを算出したところ、1億1千万から1億3千万塩基と推定された。これは、これまでに研究コミュニティで考えられていた2億塩基よりもだいぶ小さい値といえる。

短鎖型読み取り型高速 DNA シークエンサ illumina 社 HiSeq を使用し、ホンモンジゴケのゲノム DNA 配列データを得た。k-mer 頻度解析ツール jellyfish2、kmergenie、GenomeScope を使用し、上述の短鎖配列データを用いた k-mer 頻度解析によるゲノムサイズ見積もりを実施したところ、最適 k-mer=61 のとき、およそ 1 億 3 千万塩基と算出された (図 1)。先のフローサイトメトリー法による結果と k-mer 頻度解析の結果が近いことから、本研究では、ホンモンジゴケのゲノムサイズを 1 億 3 千万塩基とした。

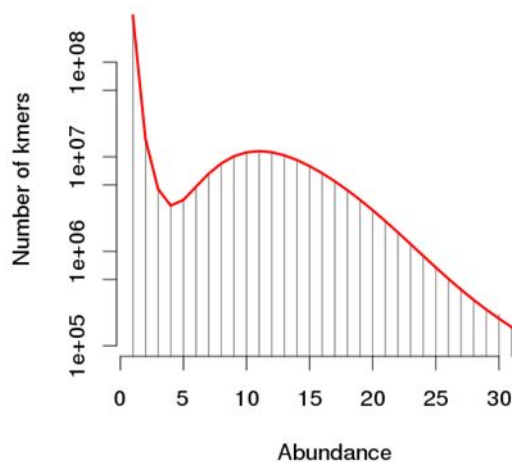


図 1 k-mer 頻度解析

(2) ドラフトゲノム塩基配列データの作成

配列アセンブルソフトウェア canu を使用して初期ゲノムアセンブリを作成後、Quiver、finisherSC を使用して、アセンブリの品質改善を行ったところ、約 1 億 4 千万塩基のドラフトゲノム塩基配列データを得ることができた。この結果は、先の推定ゲノムサイズを上回ることから、ゲノム塩基配列データとしての冗長性が残っている可能性が示唆された。アセンブル工程での実行パラメータの変更、アセンブリ改善工程の改善により、品質向上を図る必要があると考える。

(3) ドラフトゲノム塩基配列データのアンノテーション

得られたドラフトゲノム塩基配列データおよび各種生育条件下のコケ植物体から得た RNA サンプルによる RNA-seq データと遺伝子領域予測パイプライン Maker-P を使用して、遺伝子領域予測を行った。RNA-seq データの 90%以上が得られたゲノム塩基配列データにアラインし、その結果からおよそ 1 万 9 千個の遺伝子領域が同定され、予測された転写産物数は、およそ 2 万 5 千であった。

同定した遺伝子領域の遺伝子機能アンノテーションを進めるとともに、RNA サンプルの各実験区の間において、RNA の転写レベルが顕著に異なる遺伝子群をフィルターした。現在、生育環境の相違と遺伝子発現レベルとの関係性を精査している。

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 1 件)

1. Nomura, T., Sakurai, T., Osakabe, Y., Osakabe, K., Sakakibara, H. (2016) Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Mosses Using the CRISPR/Cas9 System, Plant and Cell Physiology, 57, 2600-2610, 10.1093/pcp/pcw173, 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. ホンモンジゴケにおける銅輸送体を介した銅耐性機構, 野村俊尚, 井藤賀操, 檜垣匠, 櫻井哲也, 馳澤盛一郎, 榊原均, 日本植物生理学会, 札幌, 2018 年 03 月 28 日 ~ 30 日
2. ゲノム編集技術で紐解くホンモンジゴケの銅耐性機構, 野村俊尚, 櫻井哲也, 刑部祐里子, 刑部敬史, 馳澤盛一郎, 榊原均, 日本植物生理学会, 鹿児島大学, 2017 年 03 月 16 日 ~ 18 日
3. ホンモンジゴケにおける Copper-transporting P-type ATPase の銅耐性能への貢献, 野村俊尚, 井藤賀操, 櫻井哲也, 馳澤盛一郎, 榊原均, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス, 2016 年 03 月 18 日 ~ 20 日

〔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

櫻井 哲也 (SAKURAI, Tetsuya)
高知大学・教育研究部総合科学系複合領域
科学部門・准教授
研究者番号：90415167

(2) 研究分担者

野村 俊尚 (NOMURA, Toshihisa)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・特別研究員
研究者番号：20722771

(3) 連携研究者

持田 恵一 (MOCHIDA, Keiichi)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号：90387960

(4) 研究協力者

吉田 拓広 (YOSHIDA, Takuhiro)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・テクニカルスタッフ