

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00429

研究課題名(和文)ハプロイド・ハイブリッド個体を用いた高精度ゲノム地図の作製と遺伝解析への応用

研究課題名(英文) Generation of a high-resolution genome map using haploid and hybrid organisms and its application to genetic analysis

研究代表者

浅川 修一 (Asakawa, Shuichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30231872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハプロイド法、ハイブリッド法の実験材料を作出し、それらのDNAタイピング、SELDRAをもちいた連鎖地図作成とコンティグ・スキヤホールドの整列化、ゲノムドラフトシーケンス、ゲノム完成シーケンスの構築を行った。ニホンウナギ×マアナゴ等の雑種形成を行い、ナマズ、各種チョウザメにおいて半数体及び雌性発生2倍体、アユにおいて半数体を誘導した。ニシキゴイにおいて雄性発生を誘導した。マツタケのT2T解読を行った。スマ・クロマグロの連鎖地図をハイブリッド法で作成した。精子を用いたハプロイドタイピングへ展開を試み、トゲ魚で実施した。他にもハイブリッドやハプロイド個体についてタイピングに向けたシーケンスを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム情報は生物学にとって最も重要な基盤の一つである。2005年に出現した次世代シーケンサは、あらゆる生物のゲノム解析を容易にしたが、ゲノムシーケンスを染色体レベルにまで構築するのは未だ容易ではない。我々は染色体レベルにゲノムシーケンスを整列化させる効率的な2つの方法を確認し、その有用性を実証した。これらの手法はHi-C法等とともに、あらゆる真核生物のゲノム解析にとって有用な手法であり、高品質のゲノム配列の構築に貢献できる。得られる高品質ゲノム配列の有用性は基礎的な生物学の諸分野だけでなく、農林水産学などの応用分野においても極めて高く、今後、基礎的な学術分野や諸応用分野への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We generated haploid and hybrid experimental materials, and performed their DNA typing, linkage mapping and contig/scaffold alignment with SELDRA, then generated genome draft sequences, and genome completion sequencing. Generations of hybrid of Japanese eel and common Japanese conger eel, etc., were conducted, and haploid and double haploid individuals of catfish and various sturgeon were generated, and haploid individuals of Ayu were generated. Androgensis of the Japanese two color carp was also performed. Complete genome sequence, T2T of matsutake mushroom was conducted. Linkage maps of Kawakawa (*Euthynnus affinis*) and Pacific bluefin tuna were generated by hybrid method. We attempted to expand to haploid typing using sperm and conducted it in stickleback. Sequences for typing were obtained for other hybrid and haploid individuals.

研究分野：Genomics

キーワード：ハプロイド連鎖解析法 ハイブリッド連鎖解析法 アユ ニホンウナギ トゲウオ クロマグロ チョウザメ マツタケ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーが開発されて以来各種生物のゲノム解析はとて容易になった。それでも完全に染色体をカバーするような整列化されたシーケンスアセンブルの構築は依然容易ではない。現在、染色体レベルの整列化に用いられる主な方法としては、Hi-C法が使われている。同法は有用性が高い方法であるがフレッシュな生体サンプルが必要など難しい点も多い。もう一つの有力な方法としては昔から使われてきている連鎖地図の活用である。我々は非モデル生物においても迅速かつ高分解能に連鎖地図を作成するための手法を開発してきた。本研究はそれらの実践改良発展を目指すものである。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでにトラフグなどを用いて雑種個体やダブルハプロイド/ハプロイド(DH/H)個体等を利用して、低コストで超高分解能の連鎖地図を作製しゲノム配列の完成度を格段に高める手法を確立した。特に雑種を用いた解析について専用のソフト SELDLA を開発した。本研究では魚介類に加え、樹木、菌類、哺乳類など多くの生物種でその手法を応用する。解析検体の準備のため、雑種生物の作製に加え、自然界の雑種のサンプリング、花粉由来カルスや一核菌糸の作製、哺乳類雑種胚盤胞の作製などの試みを行う。雑種作製のマスター種を定める。長鎖 DNA シーケンシングに関しても BAC ライブラリー作製の基礎となる高分子 DNA 抽出技術を活用したアプローチを試みる。これらを起点に各生物の高精度解析を行い、魚類、樹木、菌類の有用遺伝子の探索とゲノム育種、ゲノミックセレクションなどに役立てる。具体的には商業的な価値が高い、魚介類(クロマグロ、スマ、ニホンウナギ、マアナゴ、オオウナギ、ナマズ、カラドジョウ、ギギ、ブリ、ヒラマサ)の雑種形成を行い、ナマズ、コチョウザメ、ベステル(コチョウザメ×オオウナギ)、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメ、アユ、ニシキゴイ、食用菌(マツタケ、シイタケ)について、その高精度ゲノム地図を作成し、有用遺伝子同定、育種、品種改良、種苗生産、人工栽培への活用を試みる。

3. 研究の方法

魚類：養殖対象魚種を用いて雑種形成及び配偶子の染色体操作による半数体並びに雌性発生2倍体を誘導し、受精卵の胚体形成期に採材し、遺伝子解析用サンプルとした。ニホンウナギ×マアナゴ、ニホンウナギ×オオウナギ、ナマズ×カラドジョウ、ナマズ×ギギ、ブリ×ヒラマサの雑種形成を行い、ナマズ、コチョウザメ、ベステル(オオウナギ×コチョウザメ)、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメにおいて半数体及び雌性発生2倍体、アユにおいて半数体を誘導した。ニシキゴイにおいて雄性発生を誘導した。

【交雑種】ニホンウナギ×マアナゴ：サケ脳下垂体抽出物(SPE) 20 mg/kg BW を毎週1回、雌ニホンウナギの腹腔内に注射投与し、体重が120%に増加した時点で排卵誘発のための SPE 及び 17a, 20b dihydroxy 4 pregnen one (DHP) を投与し、採卵した。ニホンウナギから採卵する前に雄マアナゴから精液を搾出し、授精まで氷冷保存した。

ニホンウナギ×オオウナギ：前述同様に雌ニホンウナギから採卵した。雄オオウナギに rLH 1mg/kg BW を毎週1回、腹腔内に注射投与し、5回目投与翌日に採精し、人工精漿により5倍希釈して授精まで冷蔵保存した。

ナマズ×カラドジョウ：ハクレン脳下垂体(SCP) 4 mg/kg BW を乳鉢・乳棒で磨砕し生理食塩水に懸濁し、雌ナマズ及び雄カラドジョウに投与した。その後20時間後にカラドジョウから精巢を摘出し、淡水魚用生理食塩水を加えて乳鉢・乳棒で磨砕し、精液として授精まで冷蔵保存した。SCP投与24時間後にナマズから成熟卵を搾出し、カラドジョウ精液で授精した。

ナマズ×ギギ：前述同様に採精したギギの精子をナマズ卵に授精した。

ブリ×ヒラマサ：ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン(hCG)を注射投与した雄ヒラマサから採精後、hCG注射投与した雌ブリから卵を搾出し、授精した。

【半数体・雌性発生2倍体】ナマズ：雄ナマズに SCP 2 mg/kg BW を磨砕し生理食塩水に懸濁させ、腹腔内に注射投与した。24時間後に搾出により採精し、淡水魚用生理食塩水により5~10倍に希釈し、ガラスシャーレに3mlずつ分注し紫外線殺菌灯の下で4050 erg/mm²の紫外線を照射し、精子を遺伝的に不活化し授精まで冷蔵保存した。雌ナマズに SCP 4 mg/kg BW を雄ナマズ同様に腹腔内注射投与し、24時間後に卵を搾出した。卵に不活化精子を授精し半数体を作成するとともに、一部の不活化精子受精卵を授精後5分に4・60分の低温処理を加えて第二極体放出阻止による雌性発生2倍体を誘導した。

コチョウザメ：雄コチョウザメにコイ脳下垂体(CCP) 3 mg/kg BW を磨砕し生理食塩水に懸濁させ、腹腔内に注射投与した。48時間後に1mlスポイトを泌尿排泄孔に挿入し採精し、予め LH-Rha 1μg/kg BW を腹腔内注射投与し24時間後に採精したベステル又はシベリアチョウザメの精液を4000rpmで遠心分離した精漿により5倍に希釈し、ガラスシャーレに3mlずつ分注し紫外線殺菌灯の下で4050 erg/mm²の紫外線を照射し、精子を遺伝的に不活化し授精まで氷冷保存した。雌コチョウザメに CCP 4 mg/kg BW を雄コチョウザメ同様に腹腔内注射投与し、35時間後に卵を搾出した。卵に不活化精子を授精し半数体を作成するとともに、一部の不活化精子受精卵を授精後18分に34・2分の高温処理を加えて第二極体放出阻止による雌性発生2倍体を誘導した。

ベステル(オオウナギ×コチョウザメ)：雄ベステルに LH-Rha 1μg/kg BW を腹腔内に注射投与した。24時間後にシリコンチューブを泌尿排泄孔に挿入しシリレンジにより吸引採精し、ベステルの分離精漿により希釈した精液をコチョウザメ同様に不活化した。雌コチョウザメ同様に採卵したベステル卵に不活化精子を授精し、

コチョウザメ同様に半数体と雌性発生 2 倍体を誘導した。

ロシアチョウザメ・シベリアチョウザメ：ベステル同様に採精、採卵し、同様に半数体と雌性発生 2 倍体を誘導した。

【雄性発生】ニシキゴイ：ニシキゴイ養殖場において一般的に行われている方法により精液および未受精卵を得た。授精後直ちに 2 の低温処理を 60 分に行い、卵の遺伝的不活化及び第一卵割阻止による雄性発生を誘導した。

菌類: マツタケおよびシイタケの孢子や子実体といった核相が異なるサンプルから DNA や RNA を抽出し、PacBio 社や Illumina 社の次世代シーケンサーを適宜用いた解析を実施することにより、これらの種の高精度ゲノム地図を作成する。その際、孢子由来のシングルセルシーケンシング、孢子由来の単核菌系の全ゲノム解析などによるより細かな解析の可能性についても検討を進める。

4. 研究成果

ニホンウナギ×マアナゴは、殆どの受精卵が囊胚期に発生が停止し、数個体が胚体を形成し、1 個体が孵化した。ニホンウナギ×オオウナギは、多数の正常孵化仔魚を得た。ナマズ×カラドジョウ及びナマズ×ギギは、受精卵が僅かに得られたが囊胚に至る卵は殆どなかった。ブリ×ヒラマサは、既に産業規模で生産しており、多数の胚体形成卵を得られた。

ナマズは、半数体及び雌性発生 2 倍体を得ることができなかった。コチョウザメ、ベステル(オオチョウザメ×コチョウザメ)、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメにおいて半数体胚を得ることができ、雌性発生 2 倍体の孵化仔魚が得られ、ベステル以外の雌性発生 2 倍体を継続して飼育している。アユにおいて半数体の特徴を示す胚が多数得られたが、2 倍体と考えられる正常胚も同数程度存在していた。

ニシキゴイにおいて僅かに雄性発生孵化仔魚が得られ 100g 程度に成長した時点で血液や生殖腺等を採取して遺伝子解析を行っている。

PacBio 社の HiFi リードを用いた解析により、世界で初めてマツタケゲノムを染色体レベルで塩基配列決定することに成功した。人工栽培が出来ないマツタケは菌系の成長も遅く、一次菌系に関しては現時点で次世代シーケンサーに供するのに十分な DNA 量を得ることはほとんど不可能に近かった。そのため、他の生物種で成功しているようなハプロタイプ個体からの染色体地図の作成は非常に困難であった。既存の報告でもほぼゲノムを網羅したドラフト状態のものしかない状況であったが、本研究では既存研究の限界を超え、さらに、子実体という二次菌系から得られたサンプルから、培養困難な真菌の高精度ゲノム地図を作成ができるという新しい可能性を示した。他方、シイタケに関しても HiFi リードによる長鎖 DNA の塩基配列決定による従来にはない高精度のゲノム地図の作成には成功したが、マツタケのような染色体レベルでかつちりとすべてのゲノムを整理することができなかった。シイタケはマツタケとは異なり人工栽培が可能で、一次菌系の成長もマツタケほどは遅くないといった特徴があるため、ハプロイド解析も併用したが染色体レベルでの塩基配列の整理はできなかった。全ての真菌類で普遍的に高精度ゲノム地図を作成するためには、さらなる探求が必要である。

マツタケの染色体レベルのゲノム解読の成功により、ゲノムの 71.6%は転移因子などのリピート配列が占めることが明らかになった。この情報をもとに、野外におけるマツタケの簡易検出技術が可能になるなど、高精度ゲノム地図が完成することで今までにないアプローチが可能になった。

質量分析計を用いて DNA のタイピングを行う手法の可能性を検討した。

本研究開始前に作出したスマとクロマグロのハイブリッドを用いて、スマの連鎖地図を作成した。その結果は愛媛大学が主導して行ったスマのゲノムアセンブルにおいて活用された。またクロマグロの連鎖地図も作成し、本報告書を作成時点で論文の執筆を進めている。

ハンガリーの共同研究者から提供されたチョウザメおよびヘラチョウザメのハイブリッド 144 個体から DNA を抽出し、123 個体からのべ 248Gb のシーケンスデータを得た。

稲野によって作出、提供されたアユ半数体魚 192 個体からのべ 195Gb を得た。

これらのデータから SNP タイピングを行う予定である。

トゲウオについては、所属研究室助教で連鎖地図作成ソフト SELDRA を開発した吉武博士がハプロタイプ法を発展させて精子細胞のシングルセルシーケンシングを行い、トゲウオの連鎖地図作成を成功させた。

その他、オキゴンドウイルカやヒラムシのゲノムシーケンシングを行うのと同時に、本研究の後継研究であるデジタルマッピング法の手法開発の題材として用いて、研究を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 19件）

1. 著者名 Kurokochi Hiroyuki, Tajima Naoyuki, Sato Mitsuhiro P., Yoshitake Kazutoshi, Asakawa Shuichi, Isobe Sachiko, Shirasawa Kenta	4. 巻 2022.07.25
2. 論文標題 Telomere-to-telomere genome assembly of matsutake (<i>Tricholoma matsutake</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.07.25.501483	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Senevirathna Jayan D.M., Yonezawa Ryo, Saka Taiki, Hiramatsu Yuka, Smith Ashley Rinka, Igarashi Yoji, Yoshitake Kazutoshi, Kinoshita Shigeharu, Funasaka Noriko, Asakawa Shuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft genome sequencing and assembly of Risso's dolphin, <i>Grampus griseus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 9~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jgen.78761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshitake Kazutoshi, Ishikawa Asano, Yonezawa Ryo, Kinoshita Shigeharu, Kitano Jun, Asakawa Shuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Construction of a chromosome-level Japanese stickleback species genome using ultra-dense linkage analysis with single-cell sperm sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 lqac026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nargab/lqac026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Havelka Milo, Sawayama Eitaro, Saito Taiju, Yoshitake Kazutoshi, Saka Daiki, Ineno Toshinao, Asakawa Shuichi, Takagi Motohiro, Goto Rie, Matsubara Takahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Chromosome-Scale Genome Assembly and Transcriptome Assembly of Kawakawa Euthynnus affinis; A Tuna-Like Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 739781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.739781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurokochi Hiroyuki、Yoshitake Kazutoshi、Yonezawa Ryo、Asakawa Shuichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Simultaneous amplicon analysis of multiple soil samples using MinION sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 101576 ~ 101576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2021.101576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizobata Hideaki、Hayashi Kentaro、Yonezawa Ryo、Lanza Andre、Kinoshita Shigeharu、Yoshitake Kazutoshi、Asakawa Shuichi	4. 巻 8
2. 論文標題 The complete mitochondrial genome of <i>Spurilla braziliiana</i> MacFarland 1909 (Nudibranchia, Aeolidiidae)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 862 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2023.2241693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lanza Andre、Mizobata Hideaki、Yonezawa Ryo、Yoshitake Kazutoshi、Shigeharu Kinoshita、Asakawa Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Edwardsiella</i> sp. NBRC12716 isolated in 1962 from the liver of diseased eel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00737-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Afsana Bhuiyan・Shuichi Asakawa・Nahoko Bailey Kobayashi・Tetsuhiko Yoshida
2. 発表標題 Localization of KK13 peptide and their potential against ALS
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

マツタケのゲノムを完全解読 ～ 希少化するマツタケの保全に向けて ～
https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230508-1.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒河内 寛之 (Kurokochi Hiroyuki) (00609000)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	
研究分担者	稲野 俊直 (Ineno Toshinao) (50604609)	近畿大学・水産研究所・准教授 (34419)	
研究分担者	川村 猛 (Kawamura Takeshi) (70306835)	東京大学・アイソトープ総合センター・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ハンガリー	NARIC-Research Institute		