

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640099

研究課題名(和文)ハプロイドゲノムの解読・多型解析による高精度ゲノムシーケンス・連鎖地図の作製

研究課題名(英文)High quality genome assembly and construction of high-resolution linkage map by sequencing and SNPs typing of haploid genome individuals

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・教授

研究者番号：30231872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では魚類における雌性発生の技術を用いてダブルハプロイド/ハプロイドの個体を作製し、それをゲノムシーケンシング、およびSNPタイピングによる連鎖地図作製への活用を検討した。ゲノムシーケンシングの結果、ダブルハプロイドの個体では通常のヘテロ2倍体個体よりコンティグやスキャホールドのN50において、はるかに長いシーケンスデータを得ることができ、二倍体生物の新規シーケンシングに関してダブルハプロイド/ハプロイド個体を用いることの有効性を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we planned to prepare individuals of double haploid / haploid using the techniques of gynogenesis in fish, and then we examined the usability of it for the genome sequencing, and construction of the linkage map produced by the SNP typing. Genome sequencing results show that the N50 contig and scaffold from the double haploid individuals are much longer than those from normal hetero diploid individuals. These results indicate the effectiveness of the use of double-haploid/haploid individuals for de novo sequencing of diploid organisms.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノムシーケンシング トラフグ ニジマス ブリ 雌性発生 ダブルハプロイド ハプロイド ホモ接合

1. 研究開始当初の背景

高精度ゲノムシーケンスの存在がその生物学研究の発展において資する所は極めて大きい。しかし、リピートを多く含む2倍体の高等生物のゲノムを高精度で解読することは未だに難しい。現に最も解読が進んでいるヒトですら、真正クロマチン領域にまだ百数十カ所のギャップが残っている。その多くは低頻度反復配列が存在し、さらにコピー数多型があるため、全ゲノムショットガン法で解読できないのはもちろんのこと、BACの整列化でさえ容易ではない。報告者はヒトゲノム解析のメンバーの一人であったが、22番、21番、8番染色体解読でそのような困難さに直面してきた。

魚介類ではトラフグ、メダカを初めとして数種類でドラフトゲノム解読のレポートが報告されているが、その完成度は高くない。他の高等生物でもヒトと同等程度にゲノムが解読されているのは脊椎動物以上ではマウスなど一部である。

申請者は魚介類で連鎖解析、関連解析、各種オーム解析、比較ゲノム解析を推進する観点から高精度のゲノムシーケンスを希求していたが、次世代シーケンサーの特性を活用しながら、魚類で作製が容易なダブルハプロイド個体、あるいはハプロイド胎仔を材料に用いれば、高精度のゲノムシーケンスができること、超高分解能の連鎖地図を作製できることを思いつき、そのための準備を進めてきた。その結果、現在トラフグで多数のダブルハプロイド個体の作出に成功した。またトラフグ、ブリ、ニジマスで数千匹の連鎖解析を目的としたタイピングの検体とすると胎仔を収集していた。

2. 研究の目的

ダブルハプロイド（ハプロイドゲノムがホモ接合している）個体、あるいはハプロイド胎仔を作製し、それらと次世代シーケンサーを用いてゲノムシーケンシング、連鎖解析を行なうことには多大なメリットが有る。すなわち高精度のゲノムシーケンスと超高分解能の連鎖地図が得られることが期待される。本研究では

1 ハプロイド/ダブルハプロイドの個体をゲノムシーケンシングの出発材料として用いることの有用性を検証すること。

2 1匹の母体から生み出される多数のハプロイド/ダブルハプロイド個体を連鎖地図作製の材料として用いて SNP タイピングを行うことによる連鎖地図作製の有用性と実証すること。

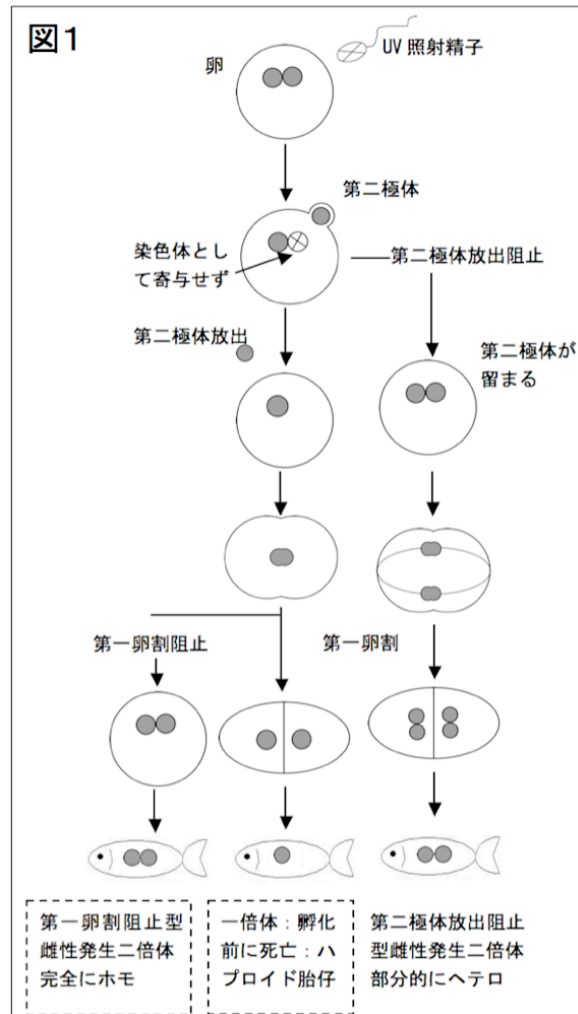
3 それらの手法を組み合わせることにより、高精度のゲノムシーケンスデータを構築すること。

を実践して、本ゲノム解析ストラテジの有用性を検証することを目指した。そして今後、魚類や多卵な生物種における有効なゲノム

解析手段として確立することを目的とした。

3. 研究の方法

雌性発生による第一卵割阻止型雌性発生二倍体（ダブルハプロイド個体）、およびハプロイド胎仔の作出法は図1の通りである。



(1): 2011年に我々は1個体のメス親から数千匹のダブルハプロイド個体の稚魚を得ることができたが、その後は胎仔までは得られるものの、稚魚の作出に成功していない。そのため、第一卵割阻止型のダブルハプロイド個体を再現性良く作出するため、第一卵割阻止のための条件の検討を行う。

(2): 2011年に作出したトラフグダブルハプロイド個体を材料にゲノムシーケンシング、アセンブルを行う。さらに通常の2倍体個体も同様の条件でゲノムシーケンシング、アセンブルを行い、両者のシーケンスデータを確認する。

(3): 2012年に4個体のトラフグメスから作出した雌性発生卵（胎仔）3000個についてゲノムを抽出し、シーケンシング、多型タイピングを行う。

(4): ゲノムサイズがトラフグの約8倍のニジマスにおいて、すでに作出したダブルハプロイド胎仔のタイピングを効率的に行うた

め、シーケンスキャプチャー法の導入を試みる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 第一卵割阻止型のダブルハプロイド個体作出条件の検討

トラフグについて、受精後、第一卵割阻止を行うために冷水暴露を行うが、その受精後のタイミングを検討した。2011年に成功した時はUV照射精子を受精後18℃で3時間保温し、その後、約4℃で45分間保温して第一卵割阻止を実行した。そこで冷水の温度を1～6℃、冷水に暴露するまでの時間を2.5～3.5時間の範囲で複数の条件をテストしたが、ハッチアウトに至る個体を得られたのは1回だけであった。しかしこの1回の成功サンプルの多型タイピングを行った結果、いずれの個体も父親由来の多型は存在しなかったが、母親由来の多型がヘテロで見出された。このことから、これらの個体は第一卵割阻止ではなく第二極体放出阻止による姿勢発生個体であると判断された。文献によると第二極体放出と第一卵割の間には約2時間程度のタイムラグがあり、今回のサンプルは2011年に成功した場合とほぼ同一の条件で卵の処理をおこなったが、第一卵割阻止の雌性発生個体は得られなかった。

(2) 申請前にも予備的な実験により、トラフグダブルハプロイド個体を材料にゲノムシーケンシングをおこなった場合、形成されるコンティグ長が数倍になることが示唆されていたが、それらのデータは完全に同一の条件ではなかったため、本研究において2個体のダブルハプロイドと2個体の通常2倍体を同一条件でシーケンシングおよびアセンブルを行い、得られた結果を比較した。

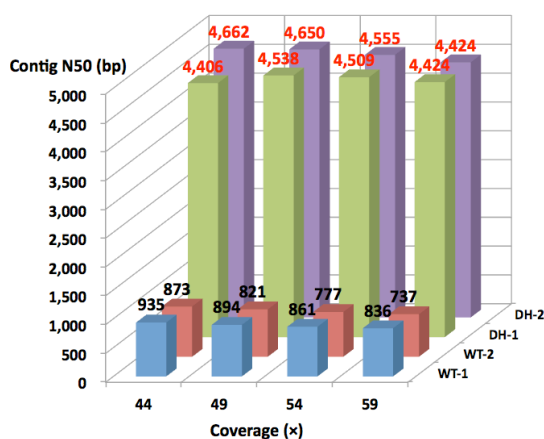


図2 ダブルハプロイド個体(DH-1, DH-2)と通常二倍体個体(WT-1, WT-2)のコンティグN50長の比較

その結果、図2に示したように、コンティグのN50長はダブルハプロイドが5～6倍長くなるなどの著しい改善が見られた。

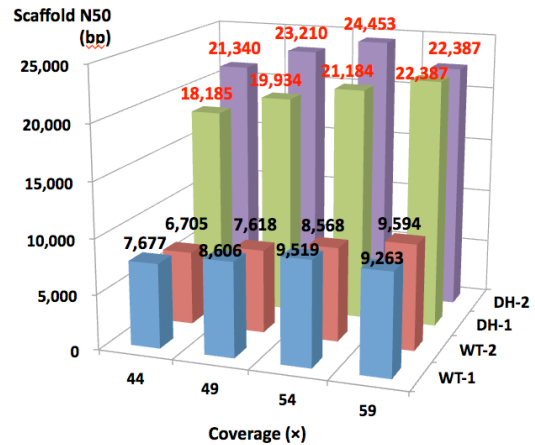


図3 ダブルハプロイド個体と通常二倍体個体のスキャホールドN50長の比較

同じくスキャホールドのN50長においても2～3倍の改善が見られた。

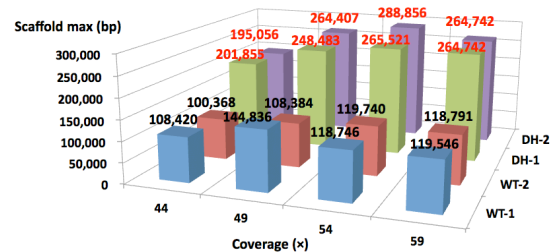
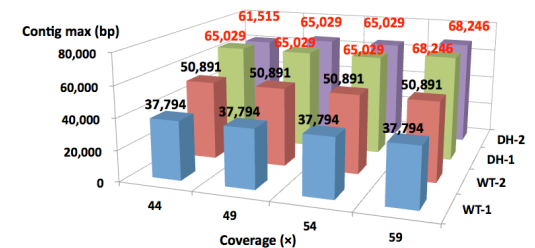


図4 ダブルハプロイド個体と通常二倍体個体のコンティグ、およびスキャホールドの最大長長の比較

さらに、コンティグ、スキャホールドの最大長においてもダブルハプロイドは通常2倍体よりも長いことが示された。

以上の結果によって示されたように、ダブルハプロイド個体をゲノムシーケンシングの出発材料として用いた場合に構築されるゲノムシーケンスデータは著しく優れたものになることが示された。

次にこれらによって構築されたコンティグを図2～4で用いたDH-1個体の0.3-kb, 0.5-kb, 2-kb, 5-kb塩基長の両末端から解読したペアの末端シーケンスデータ、およびそれらとは独立したWT-3個体の0.4-kb, 2-kb, 5-kb塩基長ペアシーケンスデータを用いたペアの末端シーケンスデータを用いてスキ

ャホールドの形成を行った。その結果、スキャホールドの長さにおいて、DH-1 を含めたどの組み合わせにおいても DH-1 のペアの末端を用いた場合と WT-3 のペアの末端を用いた場合では大きな差がなかったが、DH-1, DH-2 のコンティグを用いた方が、WT-1, WT-2 を用いたデータより N50, 最長のどちらでも優れた値を示した (2~3 倍)。このことから一度長いコンティグが形成されれば、他の 2 倍体のペアの末端データを用いてスキャホールドを形成した場合でも、長いコンティグの優越性が維持されることが分かった。このことはシーケンシングのストラテジを構築する上で重要な知見である。

一方、スキャホールドの合計値は WT-1, WT-2 の方が、DH-1, DH-2 より長かった。このことは WT の方が優れていたということではなく、WT の方は多型などにより相同染色体の双方のスキャホールドが形成されたためと考察した。

(3) : 2012 年に作製した 4 個体由来ののべ 3000 個の胎仔のうち 1 個体由来の 400 個から DNA を抽出し、一部についてマイクロサテライトマーカーによる多型タイピングを行った。その結果、それらは第一卵割阻止型の姿勢発生個体であることが示唆された。そのうち 192 個体のシーケンスを行った。データ解析は本報告時までには終わらなかったため、今後行う予定である。

(4) :  
ニジマスはトラフグの約 6 倍のゲノムサイズがあるため、ダイレクトシーケンシングには 6 倍のコストが必要となる。そのため SNP サイトを選抜し、シーケンスキャプチャー法によって濃縮してからゲノムシーケンシングでタイピングすることを試みた。  
ニジマスの雌性発生卵 48 個体から抽出した DNA について、個体毎にバーコード配列を付与しライブラリーを作成し混合した。この混合ライブラリーに対して、我々が配列を設計した作製したロシュ社のカスタムビーズを用いてシーケンスキャプチャー法によりターゲットとした SNP サイトを含む領域のみを濃縮した。それらを Ion Proton シーケンサーを用いてマルチプレックスシーケンスを行った。その結果、ターゲットとした SNP サイトについて 30~50 倍程度の濃縮率が示され、その有効性が確認できた。

## 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)

① Fu X, Zhang H, Tan E, Watabe S, Asakawa S. Characterization of the torafugu (*Takifugu rubripes*) immunoglobulin heavy chain gene

locus. *Immunogenetics*. **67**:179-193 (2015). doi: 10.1007/s00251-014-0824-z. 査読有

② Zhang H, Tan E, Suzuki Y, Hirose Y, Kinoshita S, Okano H, Kudoh J, Shimizu A, Saito K, Watabe S, Asakawa S. Dramatic improvement in genome assembly achieved using doubled-haploid genomes. *Sci. Rep.* **4**:6780 (2014). doi: 10.1038/srep06780. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Hong Zhang, Shigeharu Kinoshita, Engkong Tan, Yutaka Suzuki, Atsushi Shimizu, Hideyuki Okano, Jun Kudoh, Kazuyoshi Saito, Shugo Watabe, Shuichi Asakawa, Utilization of a doubled-haploid individual in construction of a high-quality torafugu (*Takifugu rubripes*) genome assembly, 第 36 回日本分子生物学会、「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

② 張虹・陳盈光・木下滋晴・浅川修一・鈴木穰・清水厚志・岡野栄之・工藤純・斎藤和敬・渡部終五、ダブルハプロイド個体を活用したトラフグゲノムアセンブリ高精度化の検討、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、2013 年 9 月 20 日、「三重大学 (三重県・津市)」

③ S. Asakawa, Genome and transcript analysis of aquatic organisms by next generation sequencing, FABA2013, 2013 年 5 月 30 日~6 月 1 日「エルズルム (トルコ)」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

無し

## 6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号 : 30231872

