

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650146

研究課題名(和文) シダ植物におけるミトコンドリアゲノム全長解読と計算機科学的な「細胞分画法」の開発

研究課題名(英文) Mitochondrial genome complete sequencing and technological development of computer scientific "cell fractionation method" in fern

研究代表者

大槻 涼 (Ootsuki, Ryo)

日本女子大学・理学部・研究員

研究者番号：10646962

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)：本研究により、次世代シーケンスデータを使って、ヤブソテツの葉緑体全長配列を決定することに成功した。また、ヤブソテツのミトコンドリアゲノムのうち、主要な遺伝子の全長配列を決定することができた。しかし、ミトコンドリアゲノムに構造的な複数の構造(マルチパート構造)が存在する可能性が強く示され、当初の計画通りの遺伝子間領域を全て含む完全なミトコンドリアゲノム配列は決定に至らなかった。今後、より長いDNA断片からのシーケンスデータを利用することにより、完全な配列が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in determining the full length sequence of chloroplast of *Cyrtomium fortunei* by Next Generation Sequencing data (NGS). In mitochondrial genomes, we were able to determine the full length sequence of the major genes. But, the complete mitochondrial genome sequence which containing all the intergenic regions as originally planned could not be determined. Because, there may be multiple structural polymorphism (multipartite structure) in the mitochondrial genome.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：次世代シーケンス シダ植物 ミトコンドリアゲノム 無配生殖

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーから得られる大量の配列データをもとにした、遺伝マーカーの開発や活用が盛んになった。特に津村 & 陶山編 (2012) 「森の分子生態学 2」をはじめとした邦文の解説書が続々と刊行され、今後とも研究が促進されていくとおもわれる。対象生物種のゲノム配列を次世代シーケンサーで解読し、そこからマイクロサテライト(SSR)や塩基多型(SNP)を探し出す方法は、従来のマーカー開発に比べても簡便であり、かつ時間的・費用的なコストからも優れている。しかし、例えば集団内のクローン多型の把握や連鎖解析を考えた場合、開発した遺伝マーカーの中にオルガネラ(葉緑体やミトコンドリア)の領域から作られたマーカーが混ざってしまった場合、結果を正しく評価することは難しくなると考えられる。

申請者はこれまでに、ヤブソテツ(オシダ科)を材料に、無性生殖の一種である無配生殖系統で遺伝的分離による新たなクローン多型の創出の可能性を研究してきた。申請者は核 *pgiC* 遺伝子の塩基配列を指標に親-次世代個体間で遺伝型を比較し、2~4%で同祖性染色体の対合による遺伝的分離により新たなクローンが生じたと考えられる結果を得た。(Ootsuki et al. 2012)

さらに、Ootsuki et al. (2012) では *pgiC* の一つの領域でしか遺伝的分離を検証していなかったことから、より多くの核にコードされている遺伝マーカーを開発し、比較することを試みた。次世代シーケンサーのロッシユ社 454 システムを活用し、無調整(核、オルガネラどちらも含む)の DNA から配列を得て、そこからマーカーを開発した(マーカー開発法については、大概ら 2012 日本植物分類学会第 11 回大会にて発表)。次世代胞子体個体を 96 個体用意し、親個体との間で新たに開発した 9 個の遺伝マーカーで比較を行った。その結果、約 7%の次世代胞子体個体はそれぞれ一箇所の領域に親個体とは異なる遺伝型を示し、遺伝的分離がゲノム中の様々な領域において起こっている可能性が示唆された。ところが、このとき用いた遺伝マーカーがどのような領域の配列だったのかを推定することは難しく、また、ミトコンドリア領域ではないことを示すことは現状ではできなかった。なぜならば、近縁種でミトコンドリアゲノムの全長を解読した種がなく、比較しようにもできなかったことが原因であった。そこで、シダ植物において、遺伝子間領域を含むミトコンドリア全長配列を、次世代シーケンサーデータから決定することを考えた。

「一つの組織から、全く調整しないまま、DNA の塩基配列を解読したら、どのような割合で、どの領域の情報が得られるか？」これが本研究の最初の発想であった。ひとつの細胞であれば、核、葉緑体、ミトコンドリア

それぞれのゲノムが、細胞内に存在する比率のまま得られることが期待できる。通常光合成をしている細胞であれば、同じ体積の中でも沢山の葉緑体が含まれている。また、活発に代謝をしていればそれだけミトコンドリアも増えているはずである。一方で、核の配列のコピー数は相対的に低いはずである。特に三倍体で多くの遺伝子座でヘテロ接合になっている個体においては核ゲノムを解析する確率が低くなることもありうる。実際にこれまでの申請者らの、次世代シーケンサーを使った解析では、オルガネラゲノムは核ゲノムと比べると、類似の配列が複数存在することによるスマッチが低くコンティグ配列が長い傾向にあった。模式図に示すと図 1 と表のようになった。

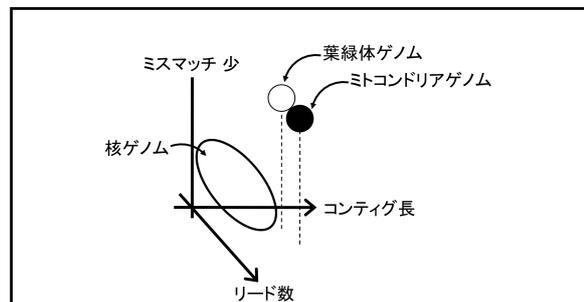


図 1 全ゲノムを次世代シーケンサーで解析した場合の核とオルガネラの情報の模式図。オルガネラゲノムの配列は 1 細胞あたり一種類しかないので、ミスマッチ率は低く、質の高い配列となる。

表 次世代シーケンサーデータに見られた核とオルガネラゲノムの傾向

	核ゲノム	オルガネラゲノム
コンティグ中のミスマッチ	多い	少ない
得られる配列長	短い	長い
リード数	多い	少ない

当初は核にコードされている領域を対象に遺伝マーカーを開発することを目的として次世代シーケンサーを使った解析を進めていたものの、発想を逆転させて、次世代シーケンサーから得られた配列のミスマッチ率、配列長(コンティグ長)、リード数の 3 つの指標からオルガネラゲノムを探し出すことを考案した。もし実現できれば超遠心機を利用した細胞分画法なしに効率よくオルガネラゲノムを探し出すことが可能になる

のではない。この方法は迅速にオルガネラゲノムを探し出すだけでなく、細胞分画法では失われやすい、ミトコンドリアのサブサークル（メインサークルに対し、部分的にちぎれたより小さい環状 DNA）や分子内組み換えの構造など、新しい知見を得ることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーの普及によって従来では考えられなかったほどのゲノム情報を扱えるようになった。しかし、大量のデータに埋もれ、開発した遺伝マーカーの中に意図せずオルガネラ由来の配列が含まれていないか？本研究は、迅速かつ効率の良いオルガネラ（特にミトコンドリア）ゲノムを決定し、さらに大量のデータから探し出す手法をあわせて開発することを目的とした。

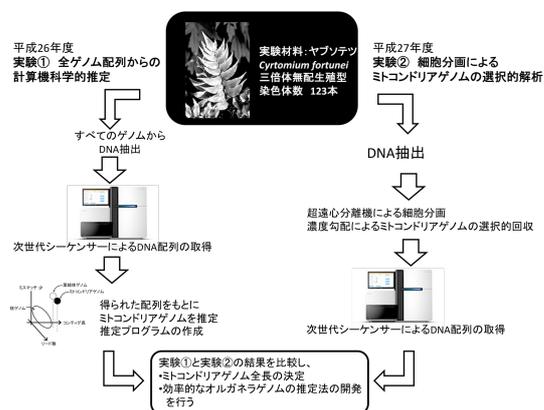
3. 研究の方法

本研究は、ヤブソテツ (*Cyrtomium fortunei* 三倍体無配生殖型シダ植物) を対象として、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列決定を行うことを目的としている。その手順は、2通りあり、

(1) 全ゲノム（核、ミトコンドリア、葉緑体を全て含む）をそのまま次世代シーケンサーにより解析し、得られた配列から計算機科学的にミトコンドリアゲノムを抽出する。

(2) 細胞分画（濃度勾配を作った溶液の中で破碎した組織を超遠心分離にかけ、核やオルガネラをそれぞれ分ける方法）により、ミトコンドリアを選択的に回収し、次世代シーケンサーを用い解析する。

(3) 両者を比較することで正確な配列と、オルガネラ推定プログラムを得ることが期待できると考えた。



4. 研究成果

本研究により、2種類の形式の異なる次世代シーケンサー（PacBio と Illumina）を用い、ヤブソテツから大量のゲノム情報を得る

ことに成功した。これらを元にゲノムを再構成したところ、当初の計画通り、真っ先にヤブソテツの葉緑体全長配列を決定することに成功した。また、ヤブソテツのミトコンドリアゲノムのうち、主要な遺伝子の全長配列を決定することにも成功した。このことから研究計画当初考えていた、「一つの組織から、全く調整しないまま、DNA の塩基配列を解読したら、どのような割合で、どの領域の情報が得られるか？」に対しては、葉緑体、ミトコンドリアの情報が優先して得られることはほぼ確かめられた。しかし、当初の計画にあった、遺伝子間領域を全て含む完全なミトコンドリアゲノム配列は決定に至らなかった。これは、主に2つ理由が考えられる。まず、ゲノム配列の構築の段階で、反復配列（ATATAT...のような単純な配列から、繰り返し単位が数十塩基対におよぶものまで）が散在し、解析の障害となったためである。もう一点として、コムギでも指摘のあるように、ヤブソテツにおいてもミトコンドリアゲノム自身が複数の長さの異なる環状構造を持つ『マルチパート構造』をもつ可能性が考えられる。

今後、より長い DNA 断片からのシーケンスデータを利用することにより、完全な配列が得られることが期待できる。

さらに、本研究によって得られた核、葉緑体、ミトコンドリアのそれぞれのゲノムの特徴は、今後、機械学習と組み合わせることで、より多くの生物に対して応用することも可能であると考えられる。

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)

Misawa, Kazuharu, and Ryo Ootsuki. PAFFT: A new homology search algorithm for third-generation sequencers. *Genomics* (2015) 106 (5): 265-267. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

(1) 大槻涼、関本弘之 イチヨウ (*Ginkgo biloba*)に見られる2種類の葉緑体ゲノム 日本植物分類学会 第16回大会 2017年3月9日~12日 京都大学 (京都府 左京区)

(2) 大槻涼、関本弘之 ヤブソテツ (*Cyrtomium fortunei*) オルガネラゲノムにおけるマルチパート構造の解析 日本植物学会 第80回大会 2016年9月16日~19日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県 宜野湾市)

(3) 大槻涼、関本弘之 4^201兆通りの中の“使われていない”配列 日本進化学会 第18回大会 2016年8月25日~28日 東京工業大学 (東京 目黒区)

(4)大槻涼、関本弘之 オシダ科シダ植物ヤブソテツからの endophyte の単離と同定 日本植物学会 第79回大会 2015年9月6日～8日 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県 新潟市)

(5)大槻涼、関本弘之、三澤計治 ヤブソテツにおける葉緑体全長配列の解読 日本植物分類学会 第14回大会 2015年3月5日～8日 福島大学 (福島県福島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 涼 (Ootsuki, Ryo)
日本女子大学・理学部・研究員
研究者番号: 10646962