

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14758

研究課題名(和文) 1塩基マイクロサテライトDNAの高精度分析法による葉緑体ゲノム変異研究の新展開

研究課題名(英文) Development of highly-precise typing of single nucleotide SSR in chloroplast genome study

研究代表者

白石 進 (Shiraishi, Susumu)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70226314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：裸子植物の葉緑体ゲノムは父性遺伝することから、葉緑体DNAマーカーは森林遺伝・育種・生態学的研究において必要不可欠である。しかし、葉緑体ゲノムにおける塩基配列変異のほとんどは、1塩基SSR(ホモポリマー)変異である。このため、1塩基の繰返し数を高精度で検出するための新たな分析系(HoPPE: homopolymer primer extension)の開発を行った。また、HoPPE分析データからDNAタイピングを行う処理システムを構築した。さらに、スギにおいて、葉緑体ゲノムに存在するホモポリマー領域を探索し、その頻度を定量的に評価した。

研究成果の概要(英文)：In forest genetics, breeding and ecology, chloroplast DNA markers are essential as paternal markers, since chloroplast genome is inherited from only its paternal parent. Most of the DNA markers, however, are single nucleotide SSR (homopolymer). Therefore, an analysis method (HoPPE: homopolymer primer extension) was newly developed, that is able to detect precisely the variations of single nucleotide repeats in the homopolymer regions. A computer program for translating the HoPPE data to DNA types was created using programming macros in Excel (Microsoft). In Japanese cedar (Sugi), the frequencies of homopolymer regions in the chloroplast genome were estimated for validating the homopolymer polymorphism.

研究分野：造林学

キーワード：DNA分子マーカー 葉緑体ゲノム 1塩基マイクロサテライト ハプロタイプ 裸子植物

1. 研究開始当初の背景

1986年に、タバコで初めて葉緑体ゲノムの全塩基配列が解読され、現在までに多くの植物種(約250種)で完全解読が行われている。このうち、13属19種が針葉樹である。これらの塩基配列情報を用いて、遺伝、育種、生態研究を効率的に進める上で強力な手段となるDNA分子マーカーの開発が、1995年以降進められてきた。

DNA分子マーカーとして最も利用されているのは1~数塩基の繰返し配列(SSR)である。葉緑体SSRマーカーは、81種の維管束植物(うち針葉樹はわずか6種)で開発されているにすぎない。しかも、葉緑体SSRの大多数はホモポリマー(1種類の塩基の繰返し配列(1塩基SSR))である。1塩基SSRは、変異(対立遺伝子)間の分子量の違いが小さいため、1塩基の分子量の差を高精度で検出することが求められる。このため従来の分析系では正確な塩基繰返し数の測定が難しく、信頼性の高いDNAタイピングが困難であった。

葉緑体ゲノムは、核ゲノムに比べて変異性が小さい。このため、多数の葉緑体マーカーを同時に利用し、情報量を増やすことが必須となる。葉緑体ゲノム中に存在する多数の1塩基SSR変異を活用し、葉緑体ゲノムを包括的にタイピング(global chloroplast genome typing, gCGT)することで、種々の遺伝現象を詳細に解明することができる。このgCGTの活用を進めるためには、ホモポリマーの分子量を正確・迅速に分析できる手法の開発が不可欠となる。そこで、新たに考案・構築するHoPPE(homopolymer primer extension, 以下HoPPE)によりホモポリマー領域のみ(最長で50塩基程度)を分析対象とすることで、高分解能質量分析計等を用いたDNA分子量(/DNA長)測定が可能となり、1塩基SSRの分析精度と効率が飛躍的に向上する。

2. 研究の目的

針葉樹の葉緑体ゲノムは父性(父親のみから)遺伝し、父系解析や父親鑑定のための重要なDNA情報をもつ。このため、森林遺伝育種学や森林分子生態学研究において葉緑体ゲノム変異の活用は必要不可欠である。

そこで本研究では、

- (1) 葉緑体ゲノム変異の大多数を占めるホモポリマー(特定の塩基が連続するマイクロサテライトDNA領域(1塩基SSR(short sequence repeats)))における繰返し数の変異(多型)を簡便、迅速かつ高精度で検出するため、高分解能質量分析計等を用いた新たな分析系(homopolymer primer extension, 以下HoPPE)を開発する。
- (2) 質量分析データ等からDNAタイピングのための処理システム(パイプライン)を構築する。
- (3) スギにおいて葉緑体ゲノム変異を網羅的に調べ、1塩基SSRの有用性を評価する。

3. 研究の方法

- (1) プライマー伸長によるホモポリマー分析系(HoPPE)の開発: ホモポリマー変異を正確に捉えるために、ホモポリマー領域のみのDNA分子(プライマー伸長鎖)をDNAポリメラーゼにより合成する系を確立する。
- (2) 分子量データをgCGTに変換するためのパイプラインの構築: 分析によって得られる膨大な分子量(/DNA長)データを変換し、タイピングするためのデータ処理システムを構築する。
- (3) スギをモデルとした新規法の有用性評価: モデルとしてスギの葉緑体ゲノム情報を用い、ゲノム中に存在するホモポリマー領域を探索し、新規法(HoPPE)により利用可能となるホモポリマーマーカーの有用性を評価する。

4. 研究成果

- (1) プライマー伸長によるホモポリマー分析系(HoPPE)の確立
ホモポリマー分析系を確立するために次の反応条件について検討し、最適化を行った。
HoPPE反応に供試するPCR産物の精製法
ホモポリマー配列の伸長反応に使用するDNAポリメラーゼ
ターミネータ(ddNTP)濃度
ホモポリマー塩基(dNTP)/ターミネータ(ddNTP)比
HoPPE反応条件(温度, 時間, サイクル数)
鋳型DNA(PCR産物)濃度
HoPPEプライマー濃度, など

例として、このHoPPE反応系を用いて、スギの葉緑体ゲノムにあるcpC019ホモポリマー領域のHoPPE分析の結果を、図1、図2に示す。

```
ACATAATCATTTTTTTATGAAAGATTTTCATAGGTT  
CCACGGGTCGATCGGTACCTATCGATTATAatcga  
tatataatcgaactccgttgttttttttttttttt  
ttcGATTTGCTAGAAAGACATAGTATCAATTTGAT  
TTCCCTTGAACATTTTATCCAATATGTGCGCCT  
TGAGGAGGACTCGAACCTCCACACTCAGCAGTAAC  
CGGTGTTAGGTGTTTACCTCGTGCATATCGTATGC
```

図1 ホモポリマー(cpC019)における
HoPPE分析の概要

下線: PCRプライマーのアニーリングサイト
赤字: 標的ホモポリマー領域
青字: HoPPEプライマーのアニーリングサイト
緑字: ターミネーター
小文字: HoPPE反応による生成分子

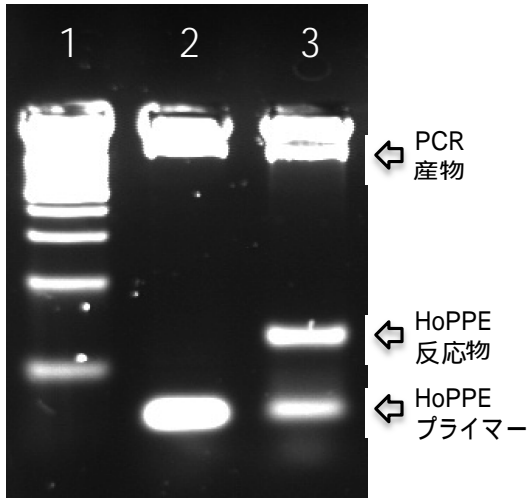


図2 ホモポリマー領域(cpC019)のHoPPE反応
1: サイズマーカー(20b ラダー)
2: HoPPE反応なし
3: HoPPE反応あり

まず、ホモポリマー配列に接する配列に HoPPE プライマー(ATCGATATATAATC-GAACTCCGTTG: 図1の青字配列, 図2のレーン2と3)を設計・合成し,これを鋳型DNA(PCR産物)にアニーリングさせ,DNAポリメラーゼとdNTP+ddNTP混合液を用いて伸長反応を行うことによって,プライマー(25mer)に(T)₁₇とCの18merが付加した一本鎖DNA(43mer: 図1の小文字配列, 図2のレーン3)が生成された。

(2) 分子量データから DNA タイプに変換するためのパイプラインの構築

質量分析で得られる質量データおよびキャピラリー電気泳動で得られる DNA 長さデータから DNA タイピングのための処理システムを, 利用汎用性の高い MS エクセル(Microsoft)のマクロ(VBA)を用いて構築した。

(3) スギをモデルとした新規法の有用性評価

スギでは既に葉緑体ゲノムの全塩基配列(Acc. No.: AP009377 ほか)が報告されている。この配列情報を用いて, DNA 長さ変異である SSR 変異と Indel 変異を, VBA プログラムを用いて網羅的に検出した。その結果を表1に示す。なお, ホモポリマー(1塩基繰返し SSR)は10回以上の繰返し数, 2塩基繰返し SSR は5回以上とした。

スギ葉緑体ゲノム上の変異は, SSR が65個存在し, DNA 長さ変異の大多数を占めた。また, ゲノム研究で最も良く使われている2塩基繰返し SSR はわずかに11個しかなく, 葉緑体 DNA マーカーとしては, 1塩基繰返し SSR(ホモポリマー)マーカーの開発が必要不可欠であることが明らかとなった。また, ホモポリマー領域は, (C/G)_n が1個あった他は, すべて(A/T)_nであった。

表1 スギ葉緑体ゲノムにおけるDNA長さ変異

変異の種類		モチーフ	変異数
SSR	1塩基繰返し	A/T	53
		C/G	1
	2塩基繰返し	AT/TA	11
Indel			4
計			69

また, 本表では1塩基繰返し数を便宜的に10回以上の領域に限定したが, これより短い(繰返し数が9回以下)ホモポリマー領域は非常に多く存在することから, 今後のスギ葉緑体ゲノム研究において, HoPPE 法によるゲノム解析の有用性は大きい。

HoPPE 法では, 分析試料の調製において, 従来法の PCR に加えて, プライマー伸長反応が必要となるが, 次のようなメリットがある。

反応産物(分析する DNA 分子)が最長で50塩基程度と極めて低分子であるため, ホモポリマー領域での1塩基の違いが相対的に大きくなることから, 高精度のタイピングが可能となる。

従来用いられてきた分析機器(DNA シーケンサー(高分解能キャピラリー電気泳動))に加え, 分子量の小さな分子をきわめて高い精度で分析できる高分解能質量分析計(TOF-Mass)が利用できる。

今後, Multiplex 分析へと発展させることにより, より安価な系が期待できる。短時間での分析が可能となり, 分析における迅速性が著しく向上する。

従来の分析法では, PCR 産物がそのまま分析されるため, SSR 領域以外の配列に存在する変異(SNP や Indel)も含めた分子量が測定されていた。このためサイズホモブラシーの危険性があったが, 新規分析法では SSR 領域の繰返し数のみが分析されるので, この問題から解放される。

以上の結果, タイピングの信頼性をきわめて高めることが可能である。

これまで核ゲノムを対象とした DNA 分子マーカーは, 多数開発されているが, 葉緑体ゲノムマーカーはきわめて限定的であった。これは葉緑体ゲノムが核ゲノムに比べゲノムサイズが極端に小さい(針葉樹では10⁻⁵オーダー)こと, SSR のほとんどがホモポリマーであることに起因している。ホモポリマー変異を正確・迅速に分析できれば, 葉緑体ゲノム変異を利用した研究が大きく進展する。

また、被子植物の葉緑体ゲノムは、母性遺伝することから、被子植物においても、母親鑑定や母系遺伝研究等への活用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔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〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 進 (Shiraishi, Susumu)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70226314

(2) 研究分担者

後藤栄治 (Gotoh, Eiji)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90614256