

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370041

研究課題名(和文)次世代大量ミトゲノム解析による魚類多様性研究の新展開：サンガー法から超並列法へ

研究課題名(英文)Development of fish diversity studies by next-generation mitogenome sequencing: From Sanger method to massively parallel method

研究代表者

西田 睦(Nishida, Mutsumi)

琉球大学・その他部局等・理事

研究者番号：90136896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類の大規模系統研究に有用なミトコンドリア全ゲノム(ミトゲノム)分析を、超並列次世代シーケンス技術を活用して、質の良くないDNA試料も含めた多数の試料で効率的に進める方法の確立を目指した。質の良いDNA試料については、ロングPCR産物にParallel tagged sequencing法によるタグ付加を行い、多数の試料を同時分析できた。質の良くないDNA試料には、Capture-on-beads法で、ミトゲノム全領域を万遍なくキャプチャーすることに成功した。以上により、超並列シーケンシング法による本格的な大量ミトゲノム分析を実施する基盤が完成した。

研究成果の概要(英文)：Whole mitochondrial genome (mitogenome) sequences are extremely useful for resolving phylogenies of animals including fishes. This study aims to establish efficient procedures to obtain mitogenome data from many samples including degraded ones by using "next-generation" massively parallel sequencing technologies. For samples in good condition, long-PCR amplification/purification and parallel tagged sequencing successfully provided mitogenome data from many samples simultaneously, suggesting that this is a rather easier method for such samples. For degraded samples, many segments from mitogenome were successfully captured by using the capture-on-beads method with double indexing. Thus, we conclude that efficient procedures have been established to have large mitogenome data from many samples including degraded ones by using next-generation sequencing technologies.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：進化 集団・種多様性 遺伝的多様性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生物多様性理解の基礎として的高密度系統樹の必要性

地球の生命界を理解する上で基本となる生物多様性は進化的に形成されてきたものなので、その理解のためには系統学的解析が不可欠である。ことに、多様化のパターンを見出すには、多くの種・分類群（できれば全ての現生種）を解析に含めた高密度系統樹が必要である。近年、分子系統解析が活発になり、種々の生物グループの系統関係の解明が進んでいるが、大きな分類群を対象に上述のような高密度系統樹の構築にまで到達した研究はまだない。

### (2) ミトゲノム分析に基づく魚類の大規模系統解析の進展と次なる課題

我々はミトゲノム分析による大規模系統研究を開拓・推進してきた。既に1000以上のミトゲノム決定（世界全体の約9割）を行って魚類の多様性進化の解明に多くの貢献をし、魚類の包括的系統樹の概要を確立することに成功するなど、当該分野で世界をリードする成果をあげてきた。このことは、我々の成果を報じた66編の主要原著論文の被引用件数が2000件を上回っている(2117件：2010年4月22日現在)ことや、いくつもの国際的教科書（例えば、Avise 2004）に取り上げられていることから明らかである。一方、この研究の過程で、多様化の理解を飛躍的に高めるために、分析種数を格段に多くして系統樹の密度を高め、分化パターンを詳細に解析することの必要性が明瞭に認識されるに至った。このためには、魚類には3万種に届かんとする多数の種が存在することに鑑み、シーケンス速度を飛躍的に高めねばならない。

## 2. 研究の目的

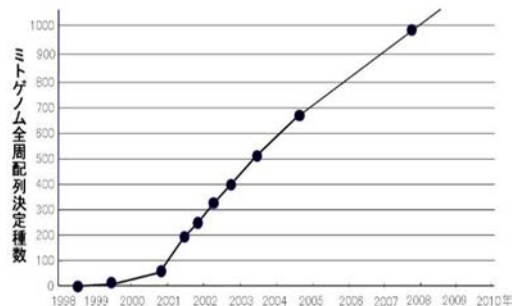
幸い、近年、高速の超並列型次世代シーケンス技術が実用化された。我々はその活用の検討を進めてきたが、とくに質の良くない多数のDNA試料に次世代シーケンサーを効率的に活用するにはまだ大きな困難がある。そこで本研究では、この困難を、主としてサンプルへの適切なタグ付加法を検討することを通じて突破し、超並列次世代シーケンス技術により魚類の大規模系統研究の飛躍的高密度化（第二期）への道を切り拓くことを目指す(図1)。

## 3. 研究の方法

(1) **ロングPCRによるミトゲノムの増幅・濃縮**：質の良いDNA試料については、既存の2~4セットのプライマーを用いたロングPCRにより、ミトゲノムの長い断片を増幅した。

(2) **Parallel tagged sequencing (PTS) 法 (Meyer et al., 2008) によるタグ付加および次世代シーケンサーによる配列決定**：ロング

(a) 申請者らによる過去10年余(第一期)の実績



(b) 本研究による中期展望

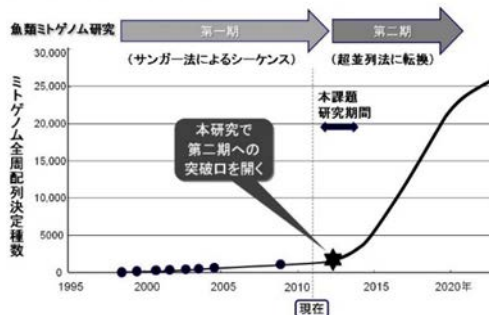


図1. (a) 申請者らによる魚類ミトゲノム全周配列決定の過去10年余(第一期)の実績、および(b) 本研究による魚類ミトゲノム全周配列決定の中期展望(第二期の開拓)。

PCRによってミトゲノムの増幅・濃縮に成功した各サンプルについて、増幅産物を丁寧に等分子ずつ混合し、断片化酵素を用いて約500-1000bpに断片化した。各サンプルの識別のためにPTSタグを付加した後、パーソナル次世代シーケンサー1ランにつき、およそ50-90サンプル程度を混合し、超並列塩基配列解析を行った。解析機器には、ロシュ社のGS Juniorを用いた。

(3) **Double indexing法によるタグ付加およびCapture-on-beads法によるミトゲノム断片の濃縮**：質の良くないDNA試料については、各サンプルのDNAを約500bpに断片化した後、Double indexing法 (Kicher et al., 2011) により各サンプルにタグ付加を行った。ミトゲノムの濃縮には、化石霊長類のDNA試料からミトゲノム濃縮の報告があるCapture-on-beads法 (Maricic et al., 2010) を適用した。タグが付加された各サンプルを混合したライブラリーを、ミトゲノムプロンプとハイブリダイゼーションすることによりミトゲノムを濃縮し、ロシュ社のGS Juniorにより超並列塩基配列解析を行った。

(4) **データ解析のパイプラインの構築**：超並列塩基配列解析により得られた大量データを解析するために、パイプラインを構築した。PTS法ならびにDouble indexing法により付加

したタグを目印に、塩基配列データをサンプル毎に選別するスクリプトを作成した。選別された塩基配列について、サンガー法によるリファレンス配列がある種については、マッピングを行い、リファレンス配列がない種についてはデノボ・アッセンブルを行った。

(5) サンガー法による塩基配列解析と集団・系統解析： 並行してサンガー法による塩基配列解析も進め、申請者らの研究グループで既にデータの蓄積がある魚類グループについて集団・系統解析を進め、その成果を順次公表した。

#### 4. 研究成果

(1) 質の良いDNA試料については、ロングPCRによるミトゲノム濃縮を行い、サンプルのタグ付加にPTS法(Meyer et al., 2008)を適用した。課題とした「アユの高精度集団構造」の解析のために、アユならびに亜種リュウキュウアユの分布域である、日本、奄美大島、朝鮮半島ならびに中国からのサンプル合計90サンプルについて、2分割のロングPCRによりミトゲノムを濃縮した。全個体試料をプールし、パーソナル型次世代シーケンサー(ロシュ社のGS Junior)にて塩基配列決定を行った結果、各サンプルからは約450bpの塩基配列が、約270~2500リード得られた(図2)。各個体について、リファレンス配列へのマッピングを行ったところ、アユのミトゲノム決定に十分なカバレッジを有しており、1ランで90個体のミトゲノムを決定できた(図2)。

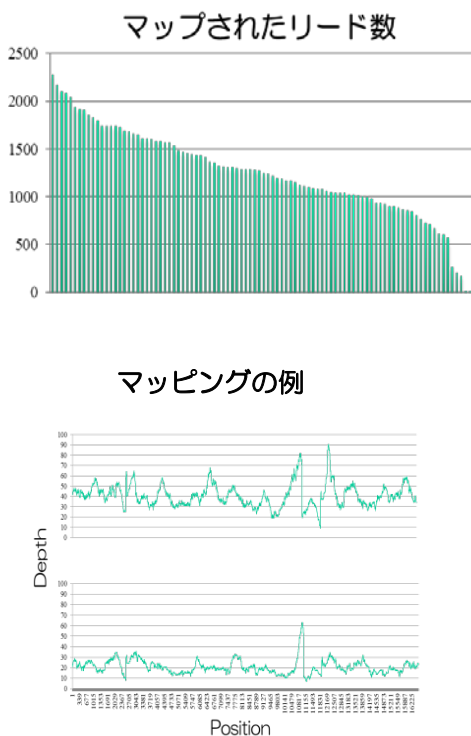


図2. アユの各サンプルから得られたリード数ならびにリファレンス配列へのマッピング

グ結果の例

(2) またこの方法により、他にアゴハゼの82個体、ウキゴリ類の53個体、モロコ類の48個体、スゴモロコ類の48個体など、合計458個体のミトゲノムを決定できた。ウキゴリ類やスゴモロコ類の分析では、同属別種のサンプルを多く含んでおり、「近縁種間の比較分析」にも有効であることが分かった。

(3) 質の良くないDNA試料のミトゲノム断片の濃縮には、Capture-on-beads法(Maricic et al., 2010)を適用し、サンプルのタグ付加には、Double indexing法(Kicher et al., 2011)を導入した。実際に、質の良くないアユのDNA試料8サンプルについて、ミトゲノム濃縮ライブラリーを作成し、次世代シーケンシングを行ったところ、アユのミトゲノム全領域を万遍なくキャプチャーすることに成功した(図3)。

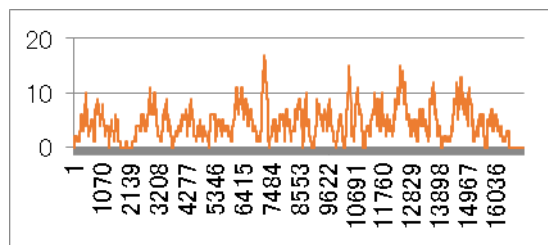


図3. アユ8個体から得られたリードのリファレンス配列へのマッピング結果

(4) 以上のように、2つの実験系の検討から、PTS法とパーソナル型次世代シーケンサーを利用した場合の1ランあたりのサンプル数、Capture-on-beads法を利用した場合のハイブリダイゼーションの最適条件など、主要な実験条件がほぼ明確となり、超並列シーケンシング法によって本格的な大量ミトゲノム分析を実施する基盤が完成した。

#### 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 31 件)

- 2014 Ha Yeun Song, K. Mabuchi, T. P. Satoh, J. A. Moore, Y. Yamanoue, M. Miya, M. Nishida. Mitogenomic circumscription of a novel percomorph fish clade mainly comprising “Syngnathoidei” (Teleostei). *Gene* 542, 146-155. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.040>
- 2013 Lavoue, Sebastien, M. Miya, P Musikasinthorn, WJ Chen, and M.

Nishida. Mitogenomic evidence for an indo-west pacific origin of the clupeoidei (Teleostei: Clupeiformes). PloS one 8 (2), e56485. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0056485

3. 2013 Miya, M., Friedman, M., Satoh, T.P., Takeshima, H., Sado, T., Iwasaki, W., Yamanoue, Y., Nakatani, M., Mabuchi, K., Inoue, J.G., Poulsen, J.Y., Fukunaga, T., Sato, Y. and Nishida, M. Evolutionary origin of the Scombridae (tunas and mackerels): members of a Paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families. PLOS ONE 8:e73535. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0073535
4. 2013 Iwasaki, W., Fukunaga T., Isagozawa R., Yamada K., Maeda Y., Satoh T.P., Sado T., Mabuchi K., Takeshima H., Miya, M. and Nishida M. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. Molecular Biology and Evolution 30:2531-2540. 査読有 doi:10.1093/molbev/mst141
5. 2013 Poulsen, J.Y., Byrkjedal, I., Willassen, E., Rees, D., Takeshima, H., Satoh, T.P., Shinohara, G., Nishida, M. and Miya, M. Mitogenomic sequences and evidence from unique gene rearrangements corroborate evolutionary relationships of myctophiformes (Neoteleostei). BMC Evolutionary Biology 13:111. 査読有 10.1186/1471-2148-13-111

[学会発表] (計 53 件)

1. 武島弘彦ら, 次世代シーケンシングによるアユの集団ミトコンドリアゲノミクスへのアプローチ, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県.
2. 西田睦ら, 高性能自動アノテーションパイプライン MitoAnnotator の実装による魚類ミトコンドリアゲノムデータベース MitoFish の充実. 2013年度日本魚類学会年会, 2013年10月5日, 宮崎観光ホテル, 宮崎県.
3. Nishida, M. Molecular phylogenetic approach to diversity of fishes. Gordon Research Conference “Marine Molecular Ecology”, 2013年8月13日, The HongKong University of Science and Technology, HongKong.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 睦 (NISHIDA, Mutsumi)

琉球大学・理事

研究者番号: 90136896

### (2) 研究分担者

武島 弘彦 (TAKESHIMA, Hirohiko)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 50573086

宮 正樹 (MIYA, Masaki)

千葉県立中央博物館・研究員

研究者番号: 30250137