

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651234

研究課題名(和文)次世代シーケンスによるイチゴ病害罹病性遺伝子単離へのDNAマーカーの取得

研究課題名(英文)Development of Linked DNA Marker to Isolation of Gene Controlling Disease Susceptibility to Black Spot in Strawberry Based on NGS Analysis.

研究代表者

山本 幹博(Yamamoto, Mikihiro)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：60274015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では栽培種イチゴの黒斑病に対する罹病性/抵抗性の決定に関与する遺伝子の単離，に向けて連鎖するDNAマーカーの開発を行った。AFLPバルクタグ法に準じてシーケンスライブラリの調製，塩基配列を取得，CD-HIT-ESTによる配列クラスタリングで罹病性イチゴ集団および抵抗性イチゴ集団それぞれにリード数が著しく偏った配列クラスターのフィルタリングし，偏ったリード数を示す3,679DNA配列をマーカーとした。さらに検証するため，配列クラスターを特異的に増幅可能と思われるPCRプライマーの設計と増幅による検証を行い，マーカー候補231のうち126が増幅多型を示し，DNAマーカーの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：To develop DNA maker for isolation of disease specificity gene, we have combined AFLP (amplified fragment length polymorphism) bulk tagging method, NGS (next generation sequencing) and sequence clustering by CD-HIT-EST. Both bulks of genomic DNA derived from disease susceptible and resistant genotype were prepared according to AFLP method. Determined sequences were clustered into 89,531 by CD-HIT-EST. Total of 3,679 sequence clusters was filtered by read count bias (a ratio of read count derived from susceptible bulk / resistant bulk). To check availability of these sequence clusters as linked makers, PCR primers were designed through mapping of sequences on *Fragaria vesca* genome. Currently, of tested 231 primer combinations, 126 primer sets showed polymorphic amplification. These results reveal that along with our methods was proven to be useful for development of DNA makers; we have succeeded to develop at least 126 linked makers to disease specificity locus (loci).

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・産業植物ゲノム

キーワード：イチゴ 黒斑病 DNAマーカー 次世代シーケンス 病害罹病性 病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

イチゴ黒斑病は自然界ではイチゴ品種盛岡16号および交配後代品種とされるエイチエス-138のみを宿主とする特異性の高い病害である。イチゴ黒斑病菌（糸状菌 *Alternaria alternata* イチゴ病原型）は人工接種によって二十世紀ナシに代表される品種群に対しても病原性を示す。

上記のような高い特異性を示す病原性は病原菌が感染時に分泌する低分子の宿主特異的毒素AF毒素によって発揮される。盛岡16号は毒素感受性であるためにイチゴ植物が本来示すべきAF毒素非産生菌に対する防御応答の発揮が抑制・遅延され、菌の感染を許す。

AF毒素感受性 *S* であるか非感受性 *R* であるか、言い換えればイチゴ黒斑病罹病性であるか抵抗性であるか、は交配検定の結果、毒素感受性が不完全優性であって、*SS* 遺伝子型はAF毒素高度感受性、*SR* 遺伝子型は感受性、*RR* 遺伝子型は感受性が全くない非感受性となる。盛岡16号はヘテロである。一方、植物生理学、組織学的研究からは毒素感受性を示す分子は原形質膜の機能と密接に関連することが示唆されているが、標的分子は明らかではない。本分子の特定は植物の病害罹病性/抵抗性機構の解明という病害防除の基礎知見として、また、実際のイチゴ育種においても盛岡16号を遺伝子源として利用するにあたって重要な知見である。

これまでに *SS* 遺伝子型集団と *RR* 遺伝子型集団を利用し、AFLP バルクタギング法を利用することで *S* あるいは *R* に連鎖すると思われるDNAマーカー作出が可能であることを明らかとしてきたが、8倍体イチゴにおいては2倍体植物に比べ、非常な困難を伴い、少数マーカーの作出にとどまっていた。

2. 本研究の目的

本課題では、次世代シーケンスによる大量データ取得を利用して、現状ゲノム情報に乏しい栽培種イチゴにおける黒斑病に対する罹病性/抵抗性の決定に関与する遺伝子、イチゴ黒斑病罹病性遺伝子 *S* あるいはその対立遺伝子である抵抗性遺伝子 *R* の単離に向けて、連鎖するDNAマーカーの作出とSTS化を次世代シーケンスの利用により同時に行うことを目的とした。

なお、課題達成において、得られた大量のリード中から *S* あるいは *R* いずれかのライブラリに偏った、あるいは、片方のライブラリにのみ存在するリードを簡便に効率よく抽出できることが重要である。しかし、研究開始当初においては課題のようなアプリケーションに適したソフトウェアは見いだせず、ソフトウェアの選定あるいは開発を並行して行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) *S* および *R* それぞれのDNAプールの準備

黒斑病に対する反応を支配する遺伝子をヘテロで有する親植物（盛岡16号）*SR* を自殖させた分離世代（F₂相当）からAF毒素に対する感受性を定量的に検定することで *SS* 個体と *RR* 個体を分離集団から選抜し、それぞれ20個体ずつから別個にゲノムDNAを調製したのち等量ずつ混合して *SS* 集団のバルクDNAと *RR* 集団のバルクDNAを調製した。

(2) シーケンス用ライブラリの調製

既報のAFLPバルクタギング法に準じて、バルク化したDNAを制限酵素 *EcoRI* と *MseI*

で完全消化し，AFLP アダプターをライゲーションした．加えて，後の解析で SS バルクあるいは RR バルクどちらに由来するかを識別するための異なるタグ配列を断片の増幅にあたって 5'末端に付加した．

(3) 次世代シーケンサーによるシーケンス
上記で調製した SS バルクおよび RR バルク DNA を 1 : 1 で混合し，シーケンス用アダプターをライゲーションし，200 bp から 400 bp の断片を精製し，イルミナ HiSeq 2000 を用いて配列決定を行った．

(4) 塩基配列のクラスタリングのためのソフトウェア探索と実行
実施段階において探索の結果，塩基配列のクラスタリングプログラム CD-HIT-EST(W. Li ら，Briefings in Bioinformatics, (2012) 13 (6):656-668) が課題解決に適しているとの結論から試用を経て本解析に至った．

(5) マーカー領域を特異的に増幅する PCR プライマーの設計と増幅確認
クラスタリングによる STS 化したマーカー部分に新たに PCR プライマーを設計しても S あるいは R いずれかのライブラリで増幅断片多型を示せる可能性が低いことを過去に実施した AFLP バルクタグgingにおいて経験した．原因はゲノムの高次倍数性と AFLP アダプターライゲーションのための制限酵素認識部位における塩基変異にあると考えられた．
そこで，2 倍体野生種イチゴ *Fragaria vesca* で明らかにされたゲノムを参照ゲノムとして利用し，今回得られたリードすべてを BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool) でマッピングし，IGV (Integrative Genomics Viewer)

で可視化し，同位置にマッピングされるクラスター配列代表配列との塩基多型から SS あるいは RR 遺伝子型で多型的に増幅可能なプライマーの設計を試みた．また，これらプライマーを用いて SS ライブラリおよび RR ライブラリから多型的な増幅，つまり，片方のライブラリからしか増幅断片が見られないか，増幅断片長などに差異がある増幅が見られるかどうかを検証した．

4 . 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるシーケンスおよび配列のクラスタリング
SS ライブラリおよび RR ライブラリから合計で 56,150,211 リードが以降の解析に供試可能であった．

CD-HIT-EST によって 98% 同一性でクラスタリングを行い，1,125,014 クラスターへと集約し，あわせて代表配列も抽出できた．

なお，本手法の採用は計画段階で予定していた解析の前処理としてのアラインメントを兼ねており，また，予め不要シーケンスの除去も必要なく滞りなく次段階へと進むことができ，研究進捗に大きく寄与した．

(2) SS バルクあるいは RR バルクに偏ったクラスターの検出による DNA マーカーの作出

タグ配列を利用したカウントスクリプトと SQL Express によるフィルタリングによってクラスター内 SS ライブラリ由来リード数および RR ライブラリ由来リード数から両者の比が 10 以上の 440,297 クラスター および，0.1 以下の 445,003 クラスターと，いずれかのライブラリからのリード数に偏ったクラスターを検出した．なお，リード数の差異 10 倍

は 5%水準の危険率を参考にした。

しかし、これらのクラスターの内訳には 1 リードしかないクラスターも多数存在しており、信頼性に欠けると思われた両ライブラリ由来のリード数の合計が 10 に満たないものはフィルタリングによって対象から外した。

その結果、有効クラスター数は 89,531、 SS/RR 10 の SS ライブラリに偏ったクラスターが 702、 SS/RR 0.1 の RR ライブラリに偏ったクラスターが 2,977 を検出した、なお、これらの中にはすべてのリードが SS か RR かどちらかのライブラリだけに由来するものも含まれていた。この結果、配列相同性の上では合計 3,679 配列が課題において期待した STS 化された DNA マーカーであると考えた。

(3) マーカー領域を特異的に増幅する PCR プライマーによる DNA マーカーの検証
遺伝子型によって多型的に増幅するプライマーを設計し、増幅を試みた結果、設計した 231 プライマーのうち 126 が増幅多型を示し、 SS および RR 遺伝子型を識別可能な DNA マーカーであることを実証した。これらは例えば BAC などゲノムライブラリからクローンのスクリーニングに直接利用できると考えた。

(4) マーカーの連鎖状況の確認と簡易連鎖地図の作成

上記において選抜されたマーカーをそれぞれの遺伝子型 20 個体すべてが保存しているかどうかは次世代シーケンスのリード数からは明らかではない。

そのため、バルク DNA 調製に用いた 20 個体のうち、DNA に残量があった 10 個体についてバルク化しないライブラリを調製し、上記

6 において増幅多型を示した 126 プライマーの一部を用いて、連鎖程度を調べた。

ランダムに 12 マーカーを選抜した結果、6 マーカーは 10 個体中 10 個体、2 マーカーが 10 個体中 9 個体、1 マーカーが 10 個体中 8 個体、3 マーカーが 10 個体中 7 個体の割合で保存しており、すべてのマーカーが連鎖強度に違いはあるものの連鎖していることが明らかとなった。

(5) 手法改良の検討

今回の解析においては AFLP バルクタグging を基礎により簡易に連鎖マーカーを開発することを目指したが、上記(4)の結果は手法にさらなる改善の余地があることを示していた。つまり、多数の個体で保存された多型断片、言い換えれば強く連鎖するマーカーをより効率よく選抜できるのではないかの疑問であった。

これまでの過程を見直すと次世代シーケンスにおけるタグ配列を利用し、シーケンス解析ではバルク化したサンプルで配列決定を行うが、シーケンスアダプターのタグ配列を個体ごとに変えることですべての個体が保存している、より強く連鎖すると推測されるクラスターがフィルタリングできるものと考えた。現在、本作業仮説に基づき課題を進展させ、高効率 DNA マーカー取得を目指し、配列解析と PCR による検証を進めている。

(6) 総括

課題において目標としたイチゴ黒斑病罹病性遺伝子 S あるいはその対立遺伝子である抵抗性遺伝子 R の単離に向けて連鎖する DNA マーカーの作出と STS 化を達成した。

課題達成において実施した手法は豊富な制限

酵素認識部位を利用する簡便な実験手順で特定遺伝子に連鎖する DNA マーカー作出に利用できることを実証した。

現在進行中の改善によってさらに高効率で DNA マーカー作出が進められると期待しており、その可能性が高いとの途中経過を得ている。

課題着手前には全く手がかりのなかった標的とした栽培種イチゴにおける黒斑病に対する罹病性 / 抵抗性の決定に関与する遺伝子であるが、課題において作出したマーカーによって実態としての客観的な存在を明らかとすることができた。

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)

山本幹博, 吉良 聡, 牛島幸一郎, イチゴ黒斑病菌の宿主特異的毒素(AF毒素)感受性の遺伝的背景(3)次世代シーケンサーを利用した AFLP 解析, 日本植物病理学会報, 査読有, 79 巻, 2013, 170-171.

牛島幸一郎, 中野龍平, 池田和生, 久保康隆, 山本幹博, アマ科植物の異形花型自家不和合性の解析 V. AFLP 断片解析への次世代シーケンサーの利用, 園芸学研究別冊, 査読無, 12 巻, 444.

[学会発表](計3件)

池本早紀, 牛島幸一郎, 稲垣善茂, 能年義輝, 豊田和弘, 一瀬勇規, 山本 幹博, イチゴ黒斑病菌の宿主特異的毒素(AF毒素)感受性の遺伝的背景(4)NGS 解析に基づいた DNA マーカー作出, 日本植物病理学会平成 26 年度大会, 2014 年 6 月 3 日, 札幌市

牛島幸一郎, 中野龍平, 池田和生, 久保康隆, 山本幹博, アマ科植物の異形花型自家不和合性の解析 V. AFLP 断片解析への次世代シーケンサーの利用, 平成 25 年度日本園芸学会春季大会, 2013 年 3 月 23 日, 小金井市

山本幹博, 吉良 聡, 牛島幸一郎, イチゴ黒斑病菌の宿主特異的毒素(AF毒素)感受性の遺伝的背景(3)次世代シーケンサーを利用した AFLP 解析 山本幹博, 吉良 聡, 牛島幸一郎, 日本植物病理学会平成 25 年度大会, 2013 年 3 月 28 日, 岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 幹博 (YAMAMOTO MIKIHIRO)

岡山大学 大学院環境生命科学研究科 准教授

研究者番号: 60274015