

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657171

研究課題名(和文)キノコ類のゲノム多様性からヒト進化の新知見を得るための試行的研究

研究課題名(英文)A study on mushroom genome information for understanding the human genome evolution

研究代表者

中山 一大(Nakayama, Kazuhiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90433581

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)：ヒトと密接な関係にあった生物種のゲノム情報は、ヒトゲノム解析のみでは伺いしることの出来なかった、人類進化に関する貴重な情報を与えてくれる。本課題では、ヒトが古くから食料や医薬品などとして利用してきたキノコ類のゲノム情報からヒトの進化に関する知見を引き出す基盤を整備するべく、菌根菌の一種である *Lactarius volucae* を対象に、全ゲノム塩基配列解析への利用を目標としたDNA抽出法の検討、およびその全ゲノムレベルで多様性の解析を行った。その結果、*L. volucae* のゲノムは非常に多型的であり、進化集団遺伝学的解析の対象として好適であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Analyses of genome information of organisms that coexist with humans would provide valuable clues to understanding the human evolution. Mushrooms have been utilized as foods and medicines for a long time and thus are considered to be good candidates for this purpose. In the present study, to clarify whether genome information of mushrooms can be used to draw insights into the evolution of humans, the whole genome sequence of a mycorrhizal fungi species, *Lactarius volucae*, was determined by using massively parallel sequencing methods and the whole genome polymorphism pattern was evaluated. Additionally, optimization of the DNA extraction method for wild-captured fruit bodies was attempted. The present study showed that *L. volucae* has a highly polymorphic genome and was suitable for subjects of evolutionary population genetics.

研究分野：人類学

キーワード：ゲノム キノコ類 次世代シーケンサー 多型

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の解析は、ヒトの適応放散の過程を明らかにするための一つの方法である。アタマシラミ・コロモジラミのゲノム情報から服飾の開始時期についての知見が得られたように、ヒトと関わりの深い他の生物種のゲノム情報にも、ヒトゲノムそのものの解析からは伺い知ることの出来ない、ヒトの移動や行動・文化進化に関する秘密が隠されているのかもしれない。

キノコ類は生活環の一部で大型の子実体(いわゆる“きのこ”)をつくる菌類の総称で、世界中に分布している。人類は食料や医薬品、あるいは儀式の道具としてキノコを利用してきており、その付き合いは存外に長い。キノコ類の孢子の拡散距離は通常 100m を超えることは稀である上、基質(主に植物とその遺骸)の分布に制限されるため、動物種が分散のベクターとなっている可能性があるキノコ類の地理的分布には、ヒトの活動との密接な関わりが疑われる事例が幾つか認められるも、キノコ類の多様性から人類進化に関する知見を得ようとする試みは未だかつてなされていない。それ以前の問題として、キノコ類のゲノム多様性に関する研究は、植物・動物を対象とした研究より大きく遅れており、キノコ類の生物地理学をヒトの適応放散というコンテキストで捉えるには、多くの多型部位の同定が必要であった。

2. 研究の目的

本課題では、第2世代シーケンシング技術を活用し、幾つかのキノコ類のゲノムが内包する多様性を明らかにし、キノコ類のゲノム情報がヒトの移動・行動・文化などの進化に

関する知見を引き出すための研究材料として利用可能であるかどうかを見定めることを目的とした。

3. 研究の方法

栃木県および福島県産の *Lactarius volumes* を研究対象とした。*Lactarius volumes* は北半球一帯の広葉樹林に自生する菌根菌のキノコであり、一部の地域では食用に利用されている。採集した子実体(2核相)は、常温、冷蔵、冷凍、常温乾燥、および99%アルコール固定の各種条件下で保存した。各子実体から100mgの断片(色素を多く含む表面部分の除く)を切り出し、液体窒素中で凍結後、SKミル(トッケン)を用いて粉碎した。粉碎した子実体から、NucleoSpin Plant II(マッハライ・ナーゲル)、DNeasy Plant(キアゲン)、を用いてゲノムDNAを抽出した。DNA抽出量と品質は分光光度計およびアガロースゲル電気泳動で評価した。

採取した子実体が *Lactarius volumes* であることを確認するため、16SrRNA 遺伝子のスーパー領域(約400塩基対)をPCR法で増幅し、サンガー法で塩基配列を決定した。取得した塩基配列は National Center for Biotechnology Information が提供する BLAST 解析ツールを用いてデータベースとの照会を行った。

全ゲノム塩全ゲノム配列の決定には、GS Junior(ロシュ)によるシングルリード・ショットガンシーケンシング、HiSeq2000(イルミナ)によるペアエンドシーケンシング(インサートサイズ150bp)およびメイトペアシーケンシング(インサートサイズ8kb)を利用した。塩基配列データの解析には、CLC

Genomics WorkBench (CLC Bio) を用いた。

4. 研究成果

各種条件下で保存した子実体より DNA 抽出を行い、抽出量および品質の比較を行った。DNeasy Plant kit よりも、NucleoSpin Plant kit のほうが DNA 抽出量・品質ともに優れていた。2 つのキットはいずれもシリカメンブレンを用いているが、NucleoSpin Plant では、臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) 含有の緩衝液が使用されていることが優位性の原因であると思われる。

また、常温保存および冷蔵保存の子実体が、DNA の抽出量および品質が最も優れており、湿重量 100mg の子実体より 5 μ g (A260/280>1.8) の DNA が抽出できた。アガロースゲル電気泳動の結果でも、2 万塩基対を超える高分子 DNA が維持されていることが確認できた。さらに、冷蔵保存で、子実体の乾燥を防ぐ処置がなされてあれば、採取後から 2 週間程度までなら高品質の DNA を抽出できることが明らかになった。

冷凍・乾燥の子実体は DNA の低分子化が著しかった。エタノール固定のものは、液体窒素凍結によってエタノール成分が凝固して粉碎効率が著しく低下した。以上より、野生キノコの子実体より DNA 抽出を行うには、子実体を常温ないしは冷蔵で保存し、凍結粉碎・CTAB を利用した手法で DNA を抽出することが至適であることが明らかになった。

上記の手法で一子実体から抽出した DNA (LV01) を用いて、GS Junior によるシングルリードショットガンシーケンシングでおよそ 700 メガベース分の塩基配列情報を取得した。また、他の子実体より抽出した DNA

(LV02) を用いて、HiSeq2000 によるペアエンドシーケンシング (インサートサイズ 150bp)・メイトペアシーケンシング (インサートサイズ 8kb) を実施し、12.5 ギガベース分の塩基配列を取得した。

LV01 のリードデータは GS Junior に付属している GS De Novo Assembler でアセンブル作業を行い、コンティグを得た。このコンティグをガイド配列として、LV02 のリード配列を CLC Genomics WorkBench 上でアセンブルした。その結果、およそ 4500 個のコンティグ配列 (平均読み深度 \times 200) が得られた。その最大長は 97 万塩基対で N50 塩基対長は 3 万塩基対であった。推定されるゲノムサイズはおおよそ 5 千万塩基対で、既に報告のある他の菌根菌キノコのゲノムサイズと似通った大きさであった。

LV02 のリード情報からヘテロ接合状態となっている多型部位の検索を行った。その結果、約 18 万部位の一塩基多型 (SNP)、1 万 4 千部位の短い挿入欠失多型、約 3 千のその他の多型部位からなる約 20 万の多型部位が同定された。SNP を例にとると、ヒトではゲノム全体の 0.058% がヘテロ接合状態となっているのに対して、LV02 は 0.36% がヘテロ接合状態であり、*Lactarius volumes* のゲノムが非常に多型的であることが明らかになった。以上より、野生の菌根菌子実体を材料とした全ゲノム解析および全ゲノム多型解析が可能であること、非常に多型的な *Lactarius volumes* は生物地理学的・人類進化的研究へ利用が可能であることが支持された。

キノコ類のゲノムサイズは動物と比較すると概して小さく、全ゲノムレベルで多様性

情報を解析することが容易であるか。今後は解析個体数・解析種を増やして集団遺伝学的解析を行い予定である。しかしながら、多型的であるがゆえに次世代シーケンサーの配列データをアセンブルする際の各種パラメータをより詳細に調節する必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Nakayama K Understanding the Human Genetics and Evolution: High School Biology. Anthropological Science (J-Series). 2015 in press

中山一大 ゲノム多様性情報から集団を科学する 日本生理人類学誌 2014, 19:263-267

〔学会発表〕(計2件)

中山一大 「生物基礎」と「生物」で理解するヒトの遺伝と進化 第68回日本人類学会大会 2014年11月3日 静岡県浜松市

中山一大 ゲノム多様性情報からヒト集団を科学する。日本生理人類学会第70回大会 2014年6月21日 福岡県福岡市

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 一大 (NAKAYAMA, Kazuhiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90433581