

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650140

研究課題名(和文)非モデル植物におけるゲノムスキャン解析のための基盤塩基配列データ迅速構築法の開発

研究課題名(英文)Development of a quick method to construct linkage maps for genome-scan analysis in non-model plant species

研究代表者

陶山 佳久(Suyama, Yoshihisa)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60282315

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):単一の植物個体から得られた花粉一粒ずつのDNAを材料として、迅速に高密度連鎖地図を構築する方法の技術開発を行った。まずその基礎となる手法として、次世代シーケンサーによって通常のゲノムDNA試料からゲノム網羅的に一塩基多型(SNP)マーカーを得る新手法を開発した。この手法を花粉DNAの解析に応用し、1個体のユリ科植物から得られた花粉を材料としてSNPの検出を行った。その遺伝分離を解析した結果、期待分離比どおりに検出された226座のSNPマーカーが得られ、新手法による連鎖地図の構築が可能であることが確かめられた。

研究成果の概要(英文):We developed a quick method to construct linkage maps with pollen DNA using next-generation sequencer (NGS). As one of the applicable techniques in this study, we developed a PCR-based procedure to construct reduced representation libraries, representing de novo single nucleotide polymorphism (SNP) discovery, and its genotyping using NGS. We then demonstrated the applicability of the method in pollen DNA analysis. Mendelian 1:1 segregation in haploid pollen grains from one individual plant was demonstrated for 226 SNP markers discovered by the method. We concluded that this approach is applicable to construct linkage maps in non-model plant species.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：連鎖解析 次世代シーケンサー 花粉DNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 特定の適応的な形質に関連する遺伝子が、ゲノム中のどこにあり、その領域が集団間・種間等の異なるグループ間でどのように違うのかを調べるためには、ゲノムワイドな関連マッピングおよび集団遺伝学的解析が必要になる。このような解析は、近年発達の著しい次世代シーケンサーの利用により、飛躍的に実現可能性が高まったと言える。例えばゲノム中の制限酵素サイト近辺の塩基配列を網羅的に読み取る RADseq (restriction site associated DNA sequence) と呼ばれる方法では、数万遺伝子座に基づく集団遺伝学的解析も可能である。その結果、分断化および平衡化選択に関わるゲノム内の領域を発見する等、「ゲノムワイド集団遺伝学」として、この分野の新しい方向性が示されている。しかし、全ゲノム塩基配列が明らかにされていない非モデル生物では、基盤としてのリファレンス塩基配列データがないことが大きな障壁となっており、このような解析の実現を阻んでいる。

(2) しかし、実は上記のような解析には必ずしも全ゲノムの基盤塩基配列データが必要なのではなく、RADseq の高密度連鎖地図によっても代用できると考えられる。つまり、RADseq によってゲノムスキャンするのであれば、RADseq のゲノム内での位置さえわかれば、RADseq のゲノム内での位置さえわかれば用が足り、すなわちそれらの連鎖地図で代用できると考えられる。しかしながら、連鎖地図を構築するためには、一般に交配家系を材料とした連鎖解析が必要で、非モデル生物を対象とする場合には、このことが再び大きな障壁となる。

(3) 交配家系がないという前提でこの問題を解決するために、本研究で発案した方法は、花粉一粒 DNA 分析による連鎖地図構築である。つまり、ある個体から得られた花粉一粒ずつの DNA を材料として多数の分子マーカー変異の 1 対 1 の分離比を解析 (連鎖解析) すれば、シンプルに高密度連鎖地図を構築することができるはずである。しかし、次世代シーケンサーによる分析対象としての花粉一粒 DNA の応用はこれまで前例がなく、いくつかの困難が予想される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、実質的にゲノムスキャンのドラフトリファレンスとして利用できる基盤塩基配列データを、次世代シーケンサーを利用した花粉一粒 DNA 分析による高密度連鎖地図として、迅速に構築する方法の開発を目的とした。

(2) そのための第一番目の技術開発として、すでに開発済みの花粉一粒 DNA 分析法 (Suyama 2011) をベースとし、市販の 1 細胞全ゲノム増幅キット等を用いて花粉一粒

ずつの全ゲノム増幅を行う。まずこの全ゲノム増幅法について、花粉を対象として安定かつ再現性高く成功できるよう、細かな技術開発を行う。

(3) 二番目の技術として、次世代シーケンサーによって通常のゲノム DNA 試料からゲノム網羅的に一塩基多型 (SNP) マーカーを得る新たな手法を開発する。

(4) これらの技術を用い、1 個体の植物から得られた花粉 DNA を材料として SNP の検出を行う。さらに、それら SNP の遺伝分離を解析し、連鎖地図の構築が可能であることを確かめる。

3. 研究の方法

(1) 花粉一粒 DNA を対象とした全ゲノム増幅法の基礎技術開発用の材料として、当初予定していたシロイヌナズナではなく、既に研究室に保存してあったマツ属花粉を用いた。具体的には、花粉に含まれるゲノム DNA を全ゲノム増幅法によって増幅し、葉緑体 DNA の塩基配列を読み取り、マツ属の配列が得られるかどうかを確かめた。

(2) パーソナル次世代シーケンサーによる花粉 DNA の網羅的解読手法の基礎技術開発として、当初は RADseq 法を改変することを計画していたが、技術的な問題点が明らかになったため、別途新たに手法を考案し、PCR によってライブラリーを構築する手法を開発することとした。

(3) ゲノムサイズが最も大きい仲間の一つと考えられている非モデル植物であるユリ科植物を対象として、その連鎖解析の基盤となる、F1 個体の花粉を用いたゲノム情報の取得を行った。なおこの解析では、花粉一粒 DNA の全ゲノム増幅法は用いず、本研究で開発した新手法を適用し、花粉一粒から直接 PCR によって複数領域を増幅する方法を用いた。具体的には、ハマカンゾウとキスゲを交雑させた F1 個体の葯から花粉 58 粒を単離して、特殊なマルチプレックス PCR によってゲノム内の多数の領域を同時増幅し、パーソナル次世代シーケンサーによる網羅的塩基配列分析を行った。

4. 研究成果

(1) マツ属花粉に含まれるゲノム DNA を全ゲノム増幅法によって増幅し、葉緑体 DNA の塩基配列解析を行うことに成功した。得られた塩基配列は確かにマツ属由来であることを確認し、この手法が有効であることを確かめた。なおこの手法では、材料 (DNA) が微量であることから、試料とは別に周辺環境等から混在 (コンタミネーション) する可能性のある DNA を除去するために、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼを用いて花

粉表面に付着している可能性のある DNA を除去し、さらに PCR キャリーオーバー防止試薬を使用して、キャリーオーバーによる偽陽性を防止する工夫を行った。これらの工夫により、ネガティブコントロールには DNA 増幅が見られない状態で、花粉粒の中のみから DNA を抽出して増幅する技術を確認した。

(2) 通常のゲノム DNA 試料として、次世代シーケンサーによってゲノム網羅的に一塩基多型 (SNP) マーカーを得る新手法を開発した。この方法では、ライブラリー構築のために制限酵素を用いず、特殊なマルチプレックス PCR によってゲノム内の数千以上の領域を同時に増幅することができた。さらに、このライブラリーを次世代シーケンサーによって分析し、SNP の検出と遺伝子型の特定が可能な手法の開発に成功した。

(3) この技術の再現性や信頼性を確かめるために、以下の分析を行った。すなわち、1) 裸子植物であるドイツトウヒの 1 母樹から複数の雌性配偶体 (胚乳) 組織を採取し、それら一つずつ材料としてライブラリーを構築した。母樹の遺伝子型がヘテロであった場合にそれら半数体組織で期待される 1:1 の SNP の遺伝分離を、16 個の胚乳組織を用いて確かめた。2) クローナル植物であるチマキザサ個体群を対象として、それらのクローン識別を行い、同一クローンでは同じ遺伝子型が、異なるクローンでは明瞭に異なる遺伝子型が得られることを確認した。3) 広い範囲の分類群から選んだ 6 種の生物を対象として、標準的な集団遺伝学的な解析を行い、期待される集団間の遺伝的な違いが検出されることを確かめた。

以上の結果、多くの種で平均的には数千のゲノム領域を効率的に増幅してライブラリーを構築でき、最終的に 100~数百以上の SNP が検出可能であることを確かめた。なお、本研究課題の期間終了後に、この手法開発について論文としてとりまとめ、学術雑誌に投稿した。

(4) 最後に、本研究で開発した新手法を、花粉 DNA の解析に応用する予備的実験を行った。まず、ハマカンゾウとキスゲを交雑させた F1 個体の葯から花粉 58 粒を一粒ずつ単離して (図 1) 特殊なマルチプレックス PCR によってゲノム内の多数の領域を同時に増幅した (図 2)。花粉 58 粒についてそれぞれ構築したライブラリーを次世代シーケンサーで分析した結果、全体で 1,938 万リードを得た。そのうち、15 粒 (25%) 以上で共通して得られた 248 SNP 座を対象として、アリル分離比をカイ 2 乗検定したところ、226 座 (91%) でメンデル遺伝として期待される 1:1 に分離した。

(5) 以上の予備的試験により、非モデル植

物の基盤塩基配列データ迅速構築法として、新手法による連鎖地図の構築が可能であることが確かめられ、これらの基礎技術が利用可能であることを示した。

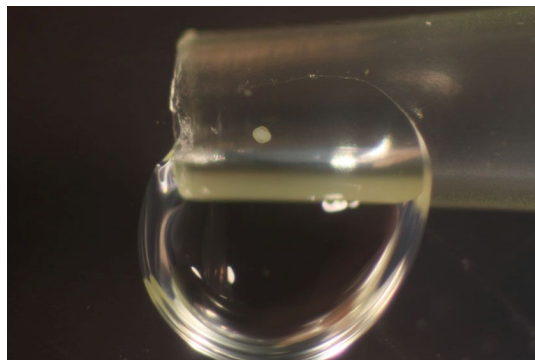


図 1 PCR 増幅のために単離した花粉一粒を PCR チューブの中に移動させ、チューブの壁面を通して水滴中の花粉粒を撮影した。上部に見えるのはピペットチップ (イエローチップ) の先端。この一粒から PCR によって多数の領域を同時増幅する。

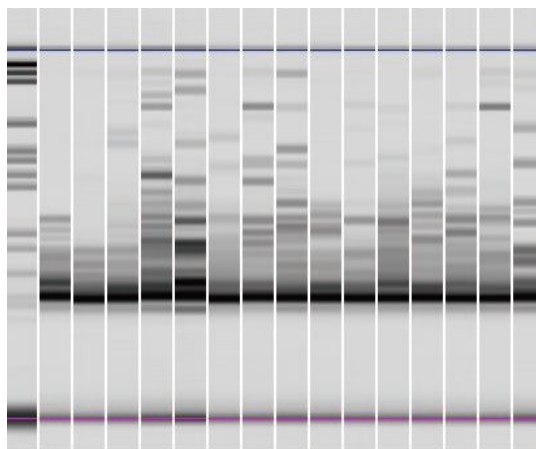


図 2 ハマカンゾウとキスゲを交雑させた F1 個体の葯から単離した花粉一粒ずつを材料として、特殊なマルチプレックス PCR によってゲノム内の多数の領域を同時に増幅し、それらを電気泳動して得られたさまざまな長さの増幅断片の泳動像。

< 引用文献 >

Yoshihisa Suyama, Procedure for single-pollen genotyping. In: Single-pollen genotyping. Isagi Y & Suyama Y (Eds.) 127pp. Springer, 2011 pp. 7-15

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)

[学会発表] (計 3 件)

陶山佳久: 次世代 DNA シーケンシングに

よる森林分子生態学的研究 . 第 125 回日本森林学会大会 2014 年 3 月 14~18 日 , 大宮ソニックシティー (大宮)

Yoshihisa Suyama and Yu Matsuki: Development of a novel method for conservation genetics with next-generation sequencing: Multiplexed ISSR (inter-simple sequence repeat) Genotyping by sequencing (MIG-seq). Contribution of Genetics to Plant Conservation: Brazil-Japan International Workshop 2015, 2015 年 2 月 2~4 日、サンパウロ大学 (サンパウロ、ブラジル)

Yoshihisa Suyama and Yu Matsuki: Development of a novel method for conservation genetics with next-generation sequencing: Multiplexed ISSR (inter-simple sequence repeat) Genotyping by sequencing (MIG-seq). Contribution of Genetics to Plant Conservation: International Seminar in Rio de Janeiro Botanical Garden, 2015 年 2 月 6 日、リオデジャネイロ植物園 (リオデジャネイロ、ブラジル)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 佳久 (SUYAMA, Yoshihisa)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号 : 60282315

(2) 研究協力者

松木 悠 (MATSUKI, Yu)
中澤 文男 (NAKAZAWA, Fumio)