

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650141

研究課題名(和文)多様性創出新機構の探索：同一個体内ゲノムの体細胞間変異の定量化

研究課題名(英文) Exploring the mosaic genome composition within an individual

研究代表者

佐竹 暁子 (Satake, Akiko)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70506237

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)：北海道大学苫小牧研究林の林冠観測用クレーンシステムを利用して樹高約20m、樹齢150年以上のミズナラとカエデを対象に、異なる枝位置から各3反復ずつ葉と花組織の採取を行った。得られたサンプルから全DNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて大規模塩基配列を取得した結果、約1500遺伝子座において総数100,000塩基の配列情報を取得した。塩基置換が生じた配列を探索した結果、同一個体あたり最大2個の突然変異が検出された。突然変異が観察された位置を分析した結果、一度突然変異が生じるとそれは後に形成された枝に引き継がれていることが確認されたため、同一個体内におけるモザイク状ゲノム構成の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Leaf and flower tissues were collected from the different branches of Japanese oak and maple of more than 100 years old using the Tomakomai Experimental Forest canopy observation crane system at Hokkaido University. The age of each branch was estimated by tree ring observation using fallen trees in Uryu Experimental Forest of Hokkaido University. Total DNA was extracted from each sample and genome sequence data of more than 100,000 bases at 1500 locus was obtained using the next generation sequencers installed in Tohoku University. Based on these sequence data, we found at least two mutations per the same individual. These mutations were carried over to new branches, implying the coexistence of cells with different genetic composition within an individual.

研究分野：数理生物学

キーワード：植物 モデル化 生理学 遺伝子 環境

1. 研究開始当初の背景

通常、多細胞生物の個体を形作る細胞の核内には、同一のゲノム情報が格納されていると考えられている。しかし、DNA複製時においては複製エラーが発生し、ごく低確率で体細胞突然変異が生じる。ゲノムの体細胞間変異の存在は、近年の次世代シーケンサーの出現によってようやく実証可能になってきた。例えば、無限回の分裂が可能な動物ガン細胞においては、同一個体由来の細胞においても塩基配列の変異が認められ、大きく3つの集団に分類可能であると報告されている。このことは、これまで考えられてきた以上に、個体を形作る細胞の遺伝情報は多様であり、その多様性が細胞の形態や機能の発現に影響を与える可能性を示唆している。申請者らは、世代時間が長く細胞あたりほぼ無限に分裂可能な樹木において、ゲノムの体細胞間変異は無視できないほど蓄積されていると考えた。また、動物と異なり生殖細胞が隔離されない植物では、体細胞で蓄積された変異は次世代に受け継がれることが可能である。このことは、ゲノムに蓄積された体細胞変異が、より多様な次世代を創出する機構となり得ることを意味している。樹木におけるゲノムの体細胞間変異の存在は、ブナとサクラの葉を用いた分析によって近年検証されつつあるが (Deepti et al. 2013)、このゲノムの体細胞間変異自体を、動けない植物が多様性を創出する戦略としてとらえ、それを実証しようと試みる研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究では、複数の植物種において樹齢100年以上の巨木を対象に、樹形構造の分析、同一個体内の葉と花組織をもとにした次世代シーケンサーを用いた大規模塩基配列情報の取得、遺伝的距離と物理的距離の相関分析を進めることによって、同一個体内に存在するゲノムの体細胞間変異を定量化し、

異なる体細胞分裂毎に蓄積された変異が次世代に伝わるかどうかを実証し、体細胞変異に由来する多様性創出機構仮説を検証する。ゲノムの体細胞間変異は、世代時間の短いモデル生物では検出することが難しく見過ごされてきた現象である。本研究で対象とする、世代時間が長くかつ無限に分裂可能な細胞からなる樹木において、その存在を実証できれば、植物に特徴的な多様性創出機構の発見や、進化や種概念の一般化に繋がる。

3. 研究の方法

北海道大学苫小牧研究林の林冠観測用クレーンシステムを利用して、樹高約20m、樹齢100年以上の対象木の異なる枝位置から各3反復ずつ葉と花組織の採取を行う。森林の3次元スキャンデータを活用し、サンプル採取位置間の物理的距離を算出する。また、伐倒木を利用して年輪から各枝の分岐年代を推定することで、サンプル間の年代差も算出する。得られたサンプルから全DNAを抽出し、東北大学に設置された次世代シーケンサーを用いて大規模塩基配列を取得する。この際、ゲノム内の多数の領域の塩基配列を並列的に解析可能なRAD-seq法を基にした、コスト削減を目的に独自に改良した分析方法を用いる。サンプル間の物理的距離および年代差と遺伝的距離の関係を分析し、突然変異頻度を種毎に算出する。葉サンプルの解析で十分な細胞間変異が検出された組み合わせの枝の花組織を対象として花粉を分離し、体細胞と生殖細胞の配列を比較することで生殖細胞への変異の伝達を実証する。

4. 研究成果

北海道大学苫小牧研究林と雨竜研究林の2調査地において、樹齢150~220年以上のイタヤカエデ3個体、ミズナラ5個体の異なる枝先8~11箇所からDNA分析用の葉サンプルを

採取した。採取した葉から DNA を抽出し、ゲノム中の複数の単純反復配列に挟まれた数千の領域を PCR 増幅した。次世代シーケンサーを用いて、増幅領域の両端 80 塩基の配列を決定し、塩基置換による突然変異の検出を行った。各個体から得られた座数は 921 ~ 1606 座で、それぞれ 10 万塩基程度を解析した。

その結果、イタヤカエデ 1 個体、ミズナラ 2 個体で 1~2 個の変異がそれぞれ検出された (図 1)。苫小牧研究林では 3D スキャニングデータを用いて、3 次元座標プロットを表示することで、個体内において突然変異の見られた枝先を視覚化した。雨竜研究林では伐倒木内の枝の分岐後年数の計測から、年あたりの塩基置換突然変異率は年あたりおよそ $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-8}$ であると算出された。

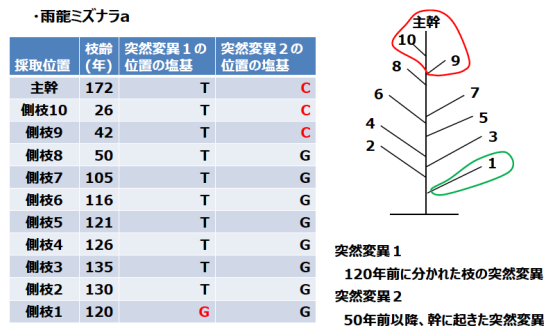


図 1: 雨竜研究林の伐倒木ミズナラを用いた分析結果。2 タイプの突然変異が観測された。

以上の結果から、次世代シーケンサーを用いた本研究において、樹木個体内の体細胞ゲノム変異の検出が可能なが確かめられた。今後も本研究を推進して対象座数を増やし、より多くの突然変異を検出し、分岐後年数や組織間距離と突然変異の関係を明らかにすることで、個体内の体細胞間ゲノム変異の全体像に迫る。

< 引用文献 >

Diwan D, Komazaki S, Suzuki M, Nemoto N, Aita T, Satake A, Nishigaki K (2014) Systematic genome sequence differences among leaf cells within individual trees. BMC Genomics 15,142-153.

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)
伊豆 敏・佐竹 暁子・日浦 勉・陶山 佳久
「同一樹木個体内における体細胞間ゲノム変異の検出」
平成 26 年度東北森林生態研究会 東北大学 (仙台)
2015 年 3 月 11 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
佐竹 暁子 (SATAKE, Akiko)
北海道大学・地球環境科学研究所・准教授
研究者番号: 70506237

(2)研究分担者
陶山 佳久 (SUYAMA, Yoshihisa)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 60282315

(3)研究分担者

日浦 勉 (HIURA, Tsutomu)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号： 70250496