

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660007

研究課題名(和文) 高次倍数性作物種の遺伝解析に有用な、新規活性型レトロトランスポゾンの探索

研究課題名(英文) Screening of novel active retrotransposon families with a potential for accelerating the genetic analysis in polyploid species

研究代表者

門田 有希 (Monden, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：30646089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、高次倍数性作物種の遺伝解析に有用な新規レトロトランスポゾンファミリーを同定することであった。以前開発した手法をアレンジすることで、サツマイモのような非モデル作物種にも適用可能な新たな手法を開発した。本手法を用いた解析の結果、14種類の品種間挿入多型を示す候補レトロトランスポゾンファミリーを同定した。またそれらの品種間挿入多型を実験的にも証明した。あるファミリーについては全長配列の決定、あるいは挿入部位の詳細なシーケンス解析まで達成しており、当初の目的以上の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to screen the retrotransposon families that showed high insertion polymorphisms among crop cultivars. It was shown that the insertion polymorphisms of those families were quite useful for the genetic analysis in polyploidy species. A novel method was developed by modifying a previous method, which could be applied to non-model crop species including sweetpotato. As a result, 14 new retrotransposon families were identified in sweetpotato, and we experimentally verified their insertion polymorphisms. In addition, one retrotransposon family was cloned and its entire sequence could be determined. Moreover, comprehensive analyses of the insertion sites for several families were conducted. Thus, we achieved our initial goal.

研究分野：農学

キーワード：倍数性 遺伝解析 高速シーケンサー 転移因子

1. 研究開始当初の背景

従来、植物の遺伝解析は自殖性二倍体種（イネやシロイヌナズナ）を中心に行われてきた。しかしながら農作物種の大半は他殖性・高次倍数性等の特徴を示す。必然的に遺伝解析が困難となり、これら作物種における有用遺伝子の同定や遺伝情報を利用した有用品種の育成は大きく遅延している。そのため今後はこれら農作物種の遺伝・連鎖解析の進展が重要とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高次倍数性作物種の遺伝解析に有用な新規レトロトランスポゾンファミリーを同定することである。最近申請者らはレトロトランスポゾンの挿入多型が高次倍数性作物種の遺伝・連鎖解析に極めて有用であることを見出した（Monden et al., 2015）。通常、高次倍数体の連鎖解析では、複数の遺伝分離のパターンを考慮しなければならない（SSR, AFLP 等）。一方、レトロトランスポゾンの挿入部位マーカーは、後代系統において最も単純な分離比（優性：劣性 = 1 : 1）を示す。よって、これら挿入部位多型を利用すれば、高次倍数性作物種の連鎖解析が容易になる可能性が高い。しかし、ゲノム中に存在するファミリーの大部分は不活化しており、遺伝解析への適用は現実的ではない。そこで本研究では品種間挿入多型を示すレトロトランスポゾンファミリーを効率的に同定する手法を確立し、遺伝解析に有用なファミリーを同定することとした。

3. 研究の方法

本研究では他殖性・同質六倍体の特徴を示すサツマイモを例に、高速シーケンサー（以下 NGS とする）を用いた大規模解析により、品種間挿入多型を示すレトロトランスポゾンファミリーを効率的に同定する手法を確立する。具体的な方法を以下に示す。

(1) まずはサツマイモゲノム中の LTR 型レトロトランスポゾンファミリーを網羅的に同定する。LTR 型レトロトランスポゾンの 5' LTR に隣接する PBS (Primer binding site) は、異なるファミリー間でも配列の保存性が極めて高い。そこで、PBS 配列からの PCR 産物を利用した NGS 解析により、多種類の LTR 配列およびそれら挿入部位配列を同定する。サツマイモは、全ゲノム配列情報が利用できない（2015 年に野生種は公開された）ため、シーケンスリードを全ゲノム配列にアライメントし、挿入部位を決定することはできない。そこで本研究ではランダムに切断したゲノム DNA ではなく、制限酵素処理により断片化したゲノム DNA をシーケンスすることで、リードの共通性によりクラスタリングを行い、挿入部位を決定した。

(2) 同定された挿入部位を品種間で比較し、

品種特異的な挿入部位を含む LTR ファミリーを抽出した。これら候補 LTR ファミリーについて S-SAP (Sequence specific amplification polymorphisms) を行い、品種間挿入多型を調査した。

4. 研究成果

(1) まずは NGS 解析に供する MiSeq シーケンス用ライブラリーを作成した。実験材料として、サツマイモ品種「901DN-47」₁、「パープルスイートロード（以下 PSL とする）」₂、「ジェイレッド」および「潮州」を用いた。これらのゲノム DNA を 6 種類の 6 塩基認識制限酵素（*KasI*、*AseI*、*NcoI*、*SpeI*、*SacI*、*Scal*）でそれぞれ処理後、アダプターを付加した。これら産物に関して、PBS 配列で最も使用頻度の高い iMet PBS 配列を片側入れ子プライマーとする PCR を行い、PBS、LTR 配列、さらにその上流の挿入部位を含むシーケンス用ライブラリーを作成した。イルミナ社の MiSeq によるシーケンスを行い、150bp のペアリード配列を得た。MiSeq によるシーケンスの結果、6,498,082 のペアリードが出力された。

(2) (1) で得られたリードを以下の流れで解析し、挿入部位を決定した。出力されたペアリードのうち挿入部位に該当するアダプター側リードを抽出し、制限酵素の種類ごとに分類しクラスタリングを行った。クラスタリングとは相同性の高いリードをまとめ、クラスターを形成する作業であり、形成された各クラスターは独立した挿入部位に該当する。このクラスタリング解析の結果、合計 8,462 の挿入部位を同定した（表 1）。

表1. 各制限酵素における同定された挿入部位情報

制限酵素	挿入部位種類数	リード数
<i>KasI</i>	118	23,397
<i>AseI</i>	3,539	713,740
<i>NcoI</i>	1,021	317,681
<i>SpeI</i>	1,648	385,720
<i>SacI</i>	797	306,242
<i>Scal</i>	1,339	420,783
合計	8,462	2,167,563

得られた挿入部位を品種間で比較し、品種特異的な挿入部位を抽出した。4 品種中 1 品種にのみ検出された部位は、計 2,624 (*KasI* : 21, *AseI* : 1031, *NcoI* : 350, *SpeI* : 493, *SacI* : 266, *Scal* : 463) であった。これら特異的な挿入部位のうち、2 種類以上の類似配列をもつ部位に含まれる断片の PBS 側リードを抽出しクラスタリングを行った。PBS 側リードは LTR 配列に該当するため、得られた各クラスターは独立した LTR ファミリーとなる。解析の結果、14 種類のクラスターが挿入多型を示す候補 LTR ファミリーとして選定された。

(3)得られた14種類の候補レトロトランスポゾンファミリー（CI8, CI10, CI16, CI17, CI18, CI28, CI42, CI43, CI64, CI65, CI66, CI62, CI67, CI113とする）についてS-SAP法により挿入部位数及び多型率の調査を行った。S-SAP法とは、レトロトランスポゾンの挿入多型を検出するために用いられる手法である。ゲノムDNAを制限酵素で消化した後、制限酵素の粘着末端あるいは平滑末端に相補的なアダプターを結合させた。この断片をアダプター相補的なプライマーとレトロトランスポゾン相補的なプライマーで増幅した。増幅されたPCR産物について3500 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）によるフラグメント解析を行い、挿入部位のピークを検出した。使用した品種は立枯病およびサツマイモネコブセンチュウの抵抗性検定に使用される交配集団の親である、「90IDN-47」、「PSL」、「ジェイレッド」及び「潮州」である。S-SAPの結果、多くのレトロトランスポゾンファミリーについて品種間挿入多型が確認された（図1、表2）。またレトロトランスポゾンファミリーによってピーク数、つまり挿入部位数には大きな差があり、また交配親品種間で挿入多型を示すピーク数にも差がみられることが示唆された。多型率の平均は90IDN-47 PSL間で63.9%、ジェイレッド潮州間で62.2%であった（表2）。以上のことから、これらファミリーの挿入多型は遺伝・連鎖解析に有用で

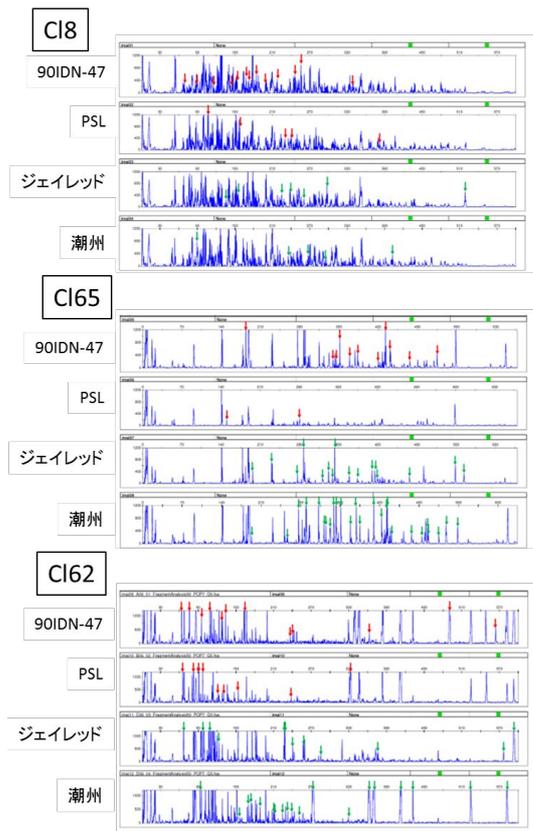


図1. 候補LTRファミリーのS-SAP結果の一部。赤色の矢印はPSLと90IDN-47間の多型を示し、緑色の矢印はジェイレッドと潮州間の多型ピークを示す。

表2. S-SAPの結果まとめ

候補LTRファミリー	90IDN-47×PSL			ジェイレッド×潮州		
	共通のピーク数	多型を示すピーク数	多型率(%)	共通のピーク数	多型を示すピーク数	多型率(%)
CI8	100	73	73	140	102	72.9
CI10	32	23	71.9	40	24	60
CI65	57	50	87.7	73	54	74
CI18	23	17	73.9	28	22	78.6
CI16	65	51	78.5	49	29	59.2
CI17	20	11	55	38	24	63.2
CI28	19	11	57.9	19	11	57.9
CI42	27	14	51.9	34	16	47.1
CI64	67	48	71.6	67	51	76.1
CI66	208	104	50	233	136	58.4
CI43	133	68	51.1	180	103	57.2
CI62	88	62	70.5	102	73	71.6
CI67	227	123	54.2	227	104	45.8
CI113	160	76	47.5	151	74	49
平均	88	52	63.9	99	59	62.2

あることが示唆された。

(3)各候補レトロトランスポゾンファミリーの内部配列の増幅を行ったところ、CI62において明確なバンドが確認されたためこの全長配列の決定を試みた。内部配列のショットガンシーケンス及びLTR配列のシーケンスの結果、CI62は全長4,969bp、5'側LTRが354bp、3'側LTRが369bpであることが示された（図2）。内部配列の相同性検索により、内部の遺伝子コード領域は5'側からCP、PR、IN、RT、RHの順に存在していることが確認され、CI62はTy1-copia型LTRレトロトランスポゾンに属することが示唆された（図2）。コード領域のモチーフについては同じTy1-copia型レトロトランスポゾンであるRtsp-1（サツマイモ）、FaRE1（イチゴ）、Tto1（タバコ）、Tnt1（タバコ）とアミノ酸配列を比較したところ、相同性が確認された。



図2. CI62レトロトランスポゾンファミリーの構造

本研究の結果、PBS配列を利用したNGS解析により、品種間挿入多型を示すLTR型レトロトランスポゾンファミリーを同定できることが示された。今回確立した手法は全ゲノム配列情報の無い生物種にも適用可能であるため、広範囲な種に利用可能である。今後はこれらレトロトランスポゾンファミリーの挿入多型を利用し、さまざまな遺伝・連鎖解析に取り組む予定である。

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 3 件)

今井 佑美、門田 有希、岡田 吉弘、謝花 治、小林 晃、田淵 宏朗、田原 誠、次世代シーケンスを利用したサツマイモにおける品種間挿入多型を示す新規レトロトランスポゾンのスクリーニング、日本育種学会第 126 講演会、2014 年 9 月 26-27 日、南九州大学(宮崎県都城市)

今井 佑美、門田 有希、岡田 吉弘、謝花 治、小林 晃、田淵 宏朗、田原 誠、次世代シーケンスを利用したサツマイモにおける品種間挿入多型を示す新規レトロトランスポゾンのスクリーニング、中国育種談話会、2014 年 12 月 20-21 日、鳥取大学乾燥地研究センター(鳥取県鳥取市)

Yumi IMAI, Yuki MONDEN, Yoshihiro OKADA, Osamu JAHANA, Akira KOBAYASHI, Hiroaki TABUCHI, Makoto TAHARA, A novel method for screening retrotransposons that show high insertion polymorphism among sweet potato cultivars via high-throughput sequencing platform, 6th Japan -China- Korea Sweetpotato Workshop, 2014/11/28-30, Kagoshima Prefectural Citizens Exchange Center, Kagoshima, JAPAN.

〔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

門田 有希 (MONDEN, Yuki)

研究者番号：30646089

岡山大学・大学院環境生命科学研究所・助教

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：