

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660129

研究課題名(和文)チシマザサ集団を用いたミューテーションクロックの開発

研究課題名(英文)Development of mutation clock using *Sasa kurilensis*

研究代表者

井上 みずき (Inoue, Mizuki)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：80432342

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)：齢が概ね明らかなチシマザサ(*Sasa kurilensis*)を用いて、次世代シーケンサーを利用した改良GBS法によって網羅的なSNPs情報を得ることで、高精度な齢の推定方法を確立することを目的とした。十和田湖周辺より採取した齢の異なるチシマザサを用いて、同一個体内の異なるラメットから4～8試料/個体、計24試料を解析した。共通座における個体内のSNPsの検出数には、齢や個体による差が認められなかったがSNPsの多様性は齢が古い個体でわずかに高いことが分かったことから、得られたSNPs情報が齢の推定に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to get genome-wide SNPs using modified GBS and developed new method to estimate the longevity. We used 24 leaves of *Sasa kurilensis* in Towada, whose longevity has already identified by flowering interval (18years old: each 4 ramets of 2 genet and 8 ramets of 1genet, 80years old: 8 ramets of 1genet). We found no difference in numbers of SNPs among new and old individuals. However, we found the diversity of SNPs was higher in old individuals than in younger ones. It suggested that information from SNPs using NGS might be useful to estimate longevity.

研究分野：森林生態学

キーワード：NGS ササ GBS SNPs 齢

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとして、多くの森林生態系で優占するタケ・ササ類の一斉開花・枯死現象の解明は森林の構造変化や他種共存メカニズムを考える上で重要である[1]。

また、絶滅危惧パンダの重要な餌資源として中国ではタケの一斉枯死に関する研究が精力的におこなわれ[2]、タケを重要な経済資源とする東南アジアでは、持続的な資源管理のために開花周期の把握が望まれている。実際に、アマゾンでは衛星画像を利用しタケの広大な一斉開花域の変遷とその周期を明らかにしている[3]。

このようにタケ・ササの一斉開花・枯死現象に関する研究は国内外で盛んである。しかしながら、一斉開花は長周期で非常に希な現象であり、現在のところ、その開花を予測できていない。もし、野外のササ集団の年齢推定を行うことができれば、開花予測が可能となり、タケ・ササ類の生態学的重要性、また持続可能な資源利用の観点からも非常に有益な情報が得られると考えられた[4]。

## 2. 研究の目的

タケ・ササは、地下茎を介してクローン成長を行うクローナル植物の1つである。クローナル植物は、地下茎や匍匐枝を介して新たな娘個体(ラメット)を形成することで、個体(ジェネット)を極めて長期間にわたって維持する。そのため、ジェネット内にゲノム内変異(SNPs)が蓄積されることが報告されている[5]。

報告者らは、ササの一斉開花・枯死・更新に関する研究を複数の地域で継続的に行ってきた。1995年に秋田県十和田湖畔で一斉に開花したチシマザサ個体群では、DNA分析を用いてジェネット識別を行い、長期的なジェネット動態に関する研究を行ってきた。そこで、本研究では年齢が既知のチシマザサの複数のジェネットを対象に、次世代シーケンサーを用いてジェネット内のゲノム変異を網羅的に探索し、年齢の推定方法(Mutation clock)を確立することを目指した。

## 3. 研究の方法

### 3-1.材料

2015年、4つのジェネットを選定した。3つのジェネット(18年生:ジェネットA、B、C)は、1996年に更新した個体群から選定した(写真1)。もう1つは、1995年の一斉開花時に開花しなかった年齢の異なるジェネット(推定年齢が80年生以上:ジェネットD)を選定した(写真2)。選定したジェネットごとに異なる当年稈を4~8本選び、DNA抽出し、ジェネット内のゲノム変異を調べるサンプルとして用いた(合計24サンプル)。

### 3-2.ライブラリーの調整とシーケンス

ゲノム内変異を網羅的に得ることと複数のサンプルで同一の塩基配列(リード)を得ることはトレードオフの関係にある。そのため、従来のライブラリー調製法では、年齢を推定するためのゲノム変異を十分に得ることが難しかった。そこで、報告者らはゲノムワイドかつ同一サンプル間で同じリードが得られるようにGBS法(Genotypin By Sequence)を改変し[6, 7]、カスタムライブラリーを調製した。シーケンスはMiSeq(Illumina)で行った。なお、正確性が高く、かつ長いリード(シーケンス配列)を得るために、MiSeq Reagent Kit Nano v2(500 Cycle)をペアエンドで使用した。

### 3-3.SNPsの検出

次世代シーケンサーの普及とともに、さまざまなSNPsを検出するためのパイプラインが開発されてきた。その中でも、Stacks[8]やTassel[9]は、多くの研究で利用されている。しかしながら、Stacksはデータ量が少ない場合や同じリードが読まれた回数(depth)の少ないデータの解析を行うことができない。また、Tasselは長いリードの解析には対応していない。そこで、報告者らはTassel 3.0 UNEAK pipelineを用いて解析を行うとともに、長いリードの解析を行うことができるGBS-SNP-CROP v.1.1[10]も併用することで、SNPsの検出の高感化を検討した。



写真1. 更新個体群のササ (18年生)



写真2. 非開花個体群のササ (80年生以上)

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 齢と SNPs 数

ライブラリーの調製方法を改変することで MiSeq Reagent Kit Nano でも SNPs 検出に十分なデータ量を得ることが出来た。また、GBS-SNP-CROP を用いることで、SNPs の検出感度が劇的に向上した。表 1 に、各リードの 251 bp までの配列をもとに算出したパイプラインごとの SNPs 数を示した。非モデル生物の SNPs 検出に用いられる Tassel 3.0 UNEAK pipeline を Default のパラメーターで解析した結果、Total で 1061 の SNPs が検出され、ライブラリー調製の改変が良好であると考えられた。また、GBS-SNP-CROP により 251 bp 全長を用いて解析を行った結果、4247 の SNPs が検出され、劇的に高感度化された。ただし、SNPs の検出に必要な共通座のリードを増やす（各共通座のデプスを増やす）と SNPs の検出数は大幅に低下することから、検出された SNPs の精度をより詳細に評価する必要が考えられた。

一方で、SNPs の数は、80 年生以上のジェネット D で最も多くなっていた。つまり、齢とともにジェネット内にゲノム変異が蓄積されていくことが考えられた。

表 1. パイプラインとデプスごとの SNPs 数

Pipeline	Depth	Number of SNPs				
		Total	A (#8)	B (#4)	C (#4)	D (#8)
TASSEL	Default	1051	355	449	449	419
	Total	4247	3873	2998	3050	3738
TASSEL +CROP	1	191	73	64	49	112
	3	21	6	2	3	7
	5	12	0	2	0	4

##### 4-2. 齢と SNPs の多様性

既存研究の多くは、ジェネット内に蓄積されるゲノム変異として“数”だけに注目してきた。そこで報告者らは、数だけではなく、検出された SNPs の多様性について検討した。多様性の指標として、SNPs の情報からサンプル間の遺伝距離を算出した。その結果、SNPs の多様性は齢が古いジェネットでわずかに高いことが分かったこと（図 3）。このことから“数”だけではなく“多様性”も齢を推定する有用な情報であることが分かった。

##### 4-3. Mutation Clock としての SNPs の有用性

ジェネット内のゲノム変異が一定の割合で蓄積されていくことを過程し、サンプル間の遺伝距離から系統樹（UPGMA）を作成した。その結果、18 年生のジェネットと比較して、80 年生以上のジェネット D の枝長が長かった。このことから、齢とともに分子時計が進むことが分かった。

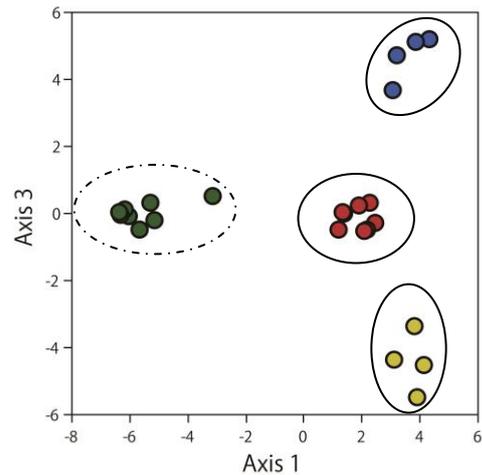


図 3. SNPs の PCA

18 年生のジェネットは実線で、80 年生以上のジェネットは破線で囲った。18 年生と 80 年生以上のジェネットごとの色は、以下の通りである。

赤色：ジェネット A、黄色：ジェネット B、青色：ジェネット C、緑色：ジェネット D  
同じ色の丸は、同じにジェネットに属するサンプルを示す。

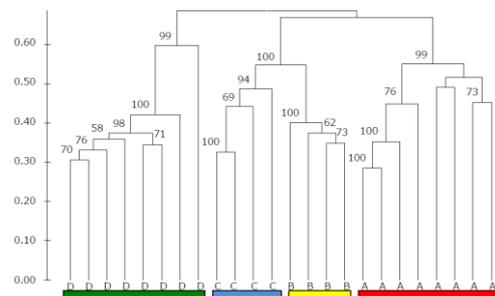


図 4. UPGMA 解析で作成した系統樹

18 年生と 80 年生以上のジェネットごとの色は、以下の通りである。

赤色：ジェネット A、黄色：ジェネット B、青色：ジェネット C、緑色：ジェネット D  
同じ色の丸は、同じにジェネットに属するサンプルを示す。

## 今後の展望

ライブラリーの調整方法を改良し、複数のパイプラインを併用することで、高感度にSNPs情報を得ることが可能になった。その結果、ジェネット内のゲノム変異が齢とともに蓄積されていることが明らかになった。今後は、同一の齢や異なる齢のジェネットを増やすことで、齢の推定方法である Mutation Clock の開発を目指す。

## <引用文献>

[1] Nakashizuka T. (1988) Regeneration of beech (*Fagus crenata*) after simultaneous death of undergrowing dwarf bamboo *Sasa kurilensis*. *Ecological Research* 3: 21-35.

[2] Wang W, Franklin SB & Cirtain MC. (2007) Seed germination and seedling growth in the arrow bamboo *Fargesia qinlingensis*. *Ecological Research*, 22, 467-474.

[3] de Carvalho AL, Nelson BW, Bianchini MC, Plagnol D, Kuplich TM & Daly DC. (2013) Bamboo-Dominated Forests of the Southwest Amazon: Detection, Spatial Extent, Life Cycle Length and Flowering Waves. *Plos One*, 8.

[4] 蒔田明史 (2017) ササの不思議な生活史～開花習性を中心に～. *森林科学*, 69:4-10.

[5] Klekowski EJ. Jr. (1997) Somatic mutation theory of clonality. *The Ecology and Evolution of Clonal Plants* (eds H.de Kroon & J.van Groenendael), pp. 227-241. Backhuys, Leiden, The Netherlands.

[6] Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, et al. (2011) A robust, simple genotyping by sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One* 6.

[7] Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL. (2012) Development of high density genetic maps for barley and wheat using a novel two enzyme genotyping by sequencing approach. *PLoS ONE* 7.

[8] Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EC (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3.

[9] Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y & Buckler ES. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*

23:2633-2635.

[10] Melo ATO, Bartaula R & Hale I (2016). GBS-SNP-CROP: a reference-optional pipeline for SNP discovery and plant germplasm characterization using variable length, paired-end genotyping-by-sequencing data. *Bmc Bioinformatics*, 17.

## 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)

Mizuki I, Sato A, Matsuo A, Suyama Y, Suzuki JI, & Makita A. (2014). Clonal Structure, Seed Set, and Self-Pollination Rate in Mass-Flowering Bamboo Species during Off-Year Flowering Events. *Plos One*, 9:e105051. DOI:10.1371/journal.pone.0105051

Matsuo A, Tomimatsu H, Suzuki JI, Saitoh T, Shibata S, Makita A, & Suyama Y. (2014) Female and male fitness consequence of clonal growth in a dwarf bamboo population with a high degree of clonal intermingling. *Annals of Botany*, 114: 1035-1041. DOI:10.1093/aob/mcu176

[学会発表] (計 1件)

NGS を利用したチシマザサのジェネット内 SNPs 変異  
岡野 邦宏・松尾 歩・蒔田 明史・鈴木 準一郎・陶山 佳久・井上 みずき  
日本生態学会第 63 回 仙台 (2016.3 月)

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

蒔田 明史 (2014)不思議に満ちたササの一生.  
グリーンエージ, 9:36-37,

ホームページ等

#### 7. 研究組織

##### (1)研究代表者

井上 みずき (INOUE, Mizuki)  
秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：80432342

##### (2)研究分担者

蒔田 明史 (MAKITA, Akifumi)  
秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60315596

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

鈴木 準一郎 (Suzuki, Junichiro)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：00291237

##### (3)連携研究者

齋藤 智之 (Saito, Tomoyuki)  
独立行政法人森林総合研究所・森林植生研究  
領域・研究員

研究者番号：00414483