

<p>研究代表者</p>	<p>所属学系・職名 生命・環境学系 准教授 氏 名 兼 子 伸 吾</p>
<p>研究課題</p>	<p>次世代シーケンサーを用いた野生生物における DNA 解析手法の開発 The development of the population genetic analysis methods for the non-model plants using next generation sequencer.</p>
<p>成果の概要</p>	<p>本年度は、異なる 2 種類の次世代シーケンサーを用いた解析を行い、モウソウチクにおける体細胞突然変異の検出による低線量放射線が塩基配列に与える影響評価および次世代シーケンサーのショットガンシーケンスを利用したマクロサテライトマーカーの開発を行った。</p> <p>1. モウソウチクにおける体細胞突然変異の検出</p> <p>研究対象とするモウソウチクは、中国が原産のタケであり、日本国内では鹿児島から函館にまで分布する。日本各地に生育する個体と種子から生育した個体を対象としたマイクロサテライト解析の結果から、日本各地に生育するモウソウチクは、そのほとんど全てが無性生殖によって増殖した同一クローンであることが、確かめられている (Isagi et al. 2016)。本申請研究では、日本各地に遺伝的に同一な個体が生育するモウソウチクを対象として、様々な放射線量の地域からサンプルを収集し、次世代シーケンサーから得られる大量の塩基配列データによって、被ばく線量と塩基配列の突然変異との関係の解析を試みた。</p> <p>解析は、福島県内 9 カ所、福島県外 5 カ所から採取したモウソウチク計 94 サンプルを対象として行った。次世代シーケンサーによる解析は、現在、東北大学農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターの陶山佳明准教授が開発中のイルミナ MiSeq を用いる手法で行った。本手法は、ゲノム中の複数の単純反復配列に挟まれた数千領域以上を同時に PCR 増幅し、その PCR 産物の塩基配列の両端から 80 塩基を次世代シーケンサーによって決定する手法である。</p> <p>解析の結果、上記の 94 サンプルについて 1930~2527 遺伝子座について塩基配列データを得ることができた。得られた塩基配列データは、約 30 万~40 万 bp にのぼる。モウソウチクのゲノムサイズは、約 20 億 bp であるので、全ゲノムの 0.015~0.020% の塩基配列情報を得たことになる。これまで同様のテーマにおける解析は、多くても 300 遺伝子座程度の PCR 産物の長さのみを対象とした解析である。本研究のように 94 サンプルという多数のサンプルを対象とし、約 2000 遺伝子座について塩基配列情報を得た研究はこれまでになく、格段に信頼性の高い結果が得られたと言える。今後は、得られたデータについての、データ解析および追加の解析を行っていく予定である。</p>

成果の概要

2. 次世代シーケンサーを用いたマイクロサテライトマーカーの開発

本年度は、これまで東北大学や京都大学に依頼していたマイクロサテライトマーカーを使用した解析を福島大学において行うための設備整備を行い、福島大学においてもマイクロサテライトマーカーの解析が可能となった。そこで、次世代シーケンサーを用いたマイクロサテライトマーカーの開発を行った。ヒトツバイチヤクソウは、本州ではそれぞれが著しく隔離したごく限られた産地からしか確認されていない不思議な分布をする植物であるとともに、その生態、特に繁殖の状態についてはほとんど明らかになっていない。そこで、ヒトツバイチヤクソウ集団間の遺伝的な関係やヒトツバイチヤクソウの種子繁殖の現状、根茎等で無性的に増殖しているクローンの広がり等を明らかにできるマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

これまでの葉緑体の塩基配列を用いた研究により、ヒトツバイチヤクソウとその近縁分類群であるイチヤクソウの間には、多くの遺伝的変異が蓄積されていることが明らかになり、現在この成果の発表に向けて論文を執筆中である。葉緑体の塩基配列の結果を踏まえて、ヒトツバイチヤクソウとその近縁分類群であるイチヤクソウの主要な3タイプについて、京都大学農学研究科の森林生物学研究室（井鷲裕司教授、ライフテクノロジー Ion PGM）において次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンスを行い、平均で240bp、合計で約75万リードの塩基配列を得た。現在、この配列に基づき、マイクロサテライトマーカーを設計し、有効性の確認を行っている。

これまで207遺伝子座についてプライマーの設計を行い、その有効性を検証した。28遺伝子座について、マイクロサテライトマーカーとして使用できる目途が立った。今後、使用可能なマイクロサテライトマーカーの遺伝子座を増やすとともに、開発したマイクロサテライトマーカーを使用した研究を展開する予定である。

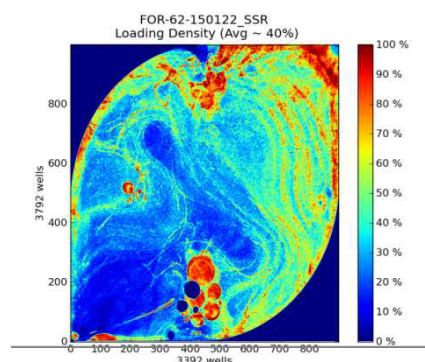


図1. 次世代シーケンサーによるショットガンシーケンスの結果イメージ。マイクロサテライトマーカー開発に十分な数の塩基配列を得ることができた。

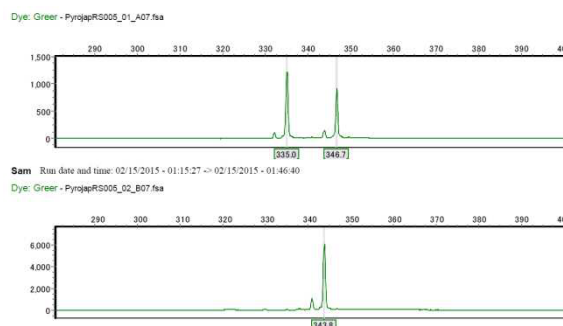


図2. 本研究で開発したマイクロサテライトマーカー(PyjapRS05)のピークパターン。明瞭なピークであり、個体間で異なる長さであることがわかる。