

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：新型シーケンサを活用した複数のウルシ品種間に存在するゲノム差異の網羅的解析	
研究代表者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 教授 福永健二	連絡先：fukunaga@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 教授 菅裕	
<p>【研究概要】</p> <p>【背景】 これまでの本学重点研究を中心とした助成により、日本漆の優良標準種、‘丹波一号’のゲノムを解読が終了している。【目的】 オックスフォードナノポア社の MinION を使用し、‘丹波一号’に加え、徳島の優良品種‘阿波’のゲノムを解読することにより、縄文時代以来の我が国の財産であるこの貴重な遺伝資源の保護につなげる。【成果の概要】 ‘丹波一号’と‘阿波’の葉緑体ゲノムの間に3か所の塩基置換を見出した。この塩基置換部位を利用して dCAPs 法で簡便に差異を検出する手法を開発した。</p>	

【研究内容・成果】

2020年4月、三次漆生産組合の武田氏の畑より‘丹波一号’と‘阿波’の若芽をサンプリングし、Nucleobond HMW DNA (タカラ)により高分子量ゲノム DNA を抽出した。DNA は更に Short Read Eliminator Kit (日本ジェネティクス)により処理し、短い DNA を除去した後、オックスフォードナノポア (ONT) 社の MinION (図1)により、計4個のフローセルを使用してそれぞれの品種のゲノムの配列決定を行った。ベースコールはスーパーコンピュータ(日本遺伝学研究所)上で Bonito プログラムを走らせることにより、AI を活用して高精度に行った。作出したデータを Flye アセンブラによりつなぎ合わせ、更に過去のデータも併せて配列のエラーを修正するなどの処理を行った結果、非常に高品質にゲノム配列を決定することができた(表1)。特に配列のつながりの良さを示す指標の一つである N50 が 20 倍近く向上したことにより、ゲノムのトランスポゾン転移や欠失、挿入などの大きな変化を検出しやすくなった。



図1 MinION シーケンサ (オックスフォードナノポア社)

表1 解読したウルシゲノム配列の品質向上

	Scaffold 数	総塩基数	最大 scaffold	N50
丹波一号				
平成 29 年度 (Illumina のみ)	738,339*	612,309,169	2,918,691	213,841
平成 31 年度 (+PacBio+ONT)	970	435,436,747	8,348,585	1,531,482
令和 2 年度 (ONT 追加)	752	461,461,851	11,616,144	29,019,362
阿波				
令和 2 年度 (ONT のみ)	629	463,204,295	12,007,738	29,118,872

*, 100 bp cutoff ;

丹波一号と阿波のゲノムの差異を利用した品種識別マーカーを開発するため、葉緑体ゲノムを全長にわたり詳細に比較したところ、3か所の塩基置換(SNPs1-3)を発見することができた。

【研究区分：先端的研究】

この塩基置換部位を dCAPs 法で簡便に検出できるよう、PCR 用のプライマーを 4 セット開発し、制限酵素で消化した。SNP1 については 2 種類のプライマーと制限酵素の組合せを用いた。実際に‘丹波一号’と‘阿波’から抽出したゲノム DNA にこれを適用したところ、全てのプライマーセットと制限酵素の組合せで差異を明確に検出することができた (図 2)



図 2 ウルシ 2 品種間の dCAPs による識別。3 か所の塩基置換 (SNP1 - SNP3) が、4 種類のプライマーセットと制限酵素との組み合わせにより明確に検出されていることが、PCR で増幅された DNA のバンドの位置が異なっていることからわかる。A は‘阿波’、T は‘丹波一号’の DNA を検出したレーンを示している。

【成果】

招待講演

1) 菅裕；漆を作る遺伝子を探すーウルシのゲノム解析，日本進化学会第 22 回大会シンポジウム「ゲノム概念誕生百周年を記念する」，オンライン，2020 年 9 月 8 日。

重点研究の成果を基にした外部研究費獲得

1) 漆の過去・現在・未来 (新学術領域「ヤポネシアゲノム」公募研究，代表者・菅，2021-2022 年度)

その他

ウルシゲノム関連のホームページを作成し，情報の発信に努めている。

http://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/hsuga/urushi_genome/default.html

現在，Google からウルシゲノムを検索するとまず本学のサイトが現れる。ウルシゲノムと言えば県立広島大学，という認識はほぼ確立したと言ってよい。

【今後の展開】

開発した dCAPS マーカーのプライマーセットは知的財産として登録を検討したい。成果発表などを通じて，広島県総合技術研究所や民間との共同研究が始まっている。ゲノム配列決定の成果を利用し，実際に漆の増産や将来的な品種改良につなげていきたい。そのために，アカデミックな課題による外部資金だけでなく，実用化を見据えた農水省などの大型助成獲得を目指す。

【謝辞】

三次漆生産組合の武田浩嗣氏にサンプリングで多大なご協力をいただいた。菅研究室の日本学術振興会特別研究員 (DC1) 傳保聖太郎と，修士学生の日野礼仁がサンプリング作業に協力した。