

<平成25年度助成>

ワサビ属植物のジェノタイピングにむけた 次世代シーケンス技術を用いたDNAマーカー開発

山根京子

(岐阜大学応用生物科学部植物遺伝育種学研究室)

背景および目的

ワサビは日本で栽培化された数少ない植物であり、日本が誇る重要な香辛野菜である。近年海外の需要も増え、医学、薬学、生化学などの分野でも注目されている。しかしワサビの自生地や在来種についての包括的な調査が行われたことはなく、遺伝学的な研究も皆無であった。山根は2005年よりワサビ属植物の現地調査と植物収集を開始しこれまでに150地点を越える地点から個体を収集し、世界で唯一のワサビ属植物系統保存施設を運営している(図1)。遺伝資源としてのワサビを持続的に利用し保全することを目的として地域系統間の遺伝的類縁関係等を調査しているが、品種判定や個体識別が可能なDNAマーカーは未だ開発されていなかった。マーカーさえ開発できれば、品種改良や保全のためのジェノタイピングが容易になり、ワサビ育種や保全策の策定など、幅広い分野で応用が可能となる。そこ本研究では、ワサビの遺伝資源としての基盤情報を整備するために、次世代シーケンサーを用いて新規DNAマーカーを構築することを目的とした。DNAマーカーとしては、単一塩基配列の繰り返しを含む領域であるマイクロサテライト(=SSR [Simple Sequence Repeat])マーカー(例:・・・AAAAAAAAAAAAAAAA・・・)を作製する。マイクロサテライトは、その変異性の高さから、品種判別や個体識別に利用されており、ワサビにおいても多方面での応用が期待できる。近年、次世代シーケンス技術の発達により、より安価で簡

便にプライマー設計ができる手法が構築されており、本研究でも本技術を用いることとした。



図1 岐阜大学応用生物科学部植物遺伝育種学研究室において系統維持をしているワサビ属植物(2013年撮影)。

材料および方法

●葉緑体全ゲノム解読と葉緑体SSRマーカー開発
供試植物材料は、静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センターわさび科および岐阜大学応用生物科学部植物遺伝育種学研究室において系統保存されている標準系統「ふじだるま No.3」を用いた。本系統の本葉から改良CTAB法を用い全DNAを抽出した。抽出した全DNAを北海道システムサイエンス社に送付し、イルミナ社 TruSeq Nano DNA LT Sample Prep Kit の標準プロトコル(350bp Insert)に基づきライブラリーが調製され、次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq2500)による塩基配列決定が行われた。

明治大学農学部バイオインフォマティクス研究室准教授矢野健太郎氏および高野知之氏により、RayおよびPlatanusでアセンブルが行われ、得られたコンティグ配列から、葉緑体ゲノムの全長配列を決定した。

得られたワサビの葉緑体全ゲノム配列とダイコ

ンで既に全ゲノムが解読され情報公開されている配列 (Jeong *et al.*, 2014) と比較解析を行った。

全ゲノム情報から、A, T, C, Gそれぞれの繰り返し数ごとの分布を調べ、SSRの繰り返し数とゲノム中の数を明らかにした。最終的に、高い変異性が得られる可能性があるSSRを含む領域でのプライマー設計を行った。

• ジェノタイピングの確認

申請者により全国各地より収集・維持されているワサビおよび近縁野生種であるユリワサビを用いて、得られたSSRマーカーが本当にジェノタイピングできるマーカーであるのかどうかを確認した。

結果および考察

• 標準系統「ふじだるま No.3」の葉緑体全ゲノム解読

次世代シーケンサーを用いた、de novo ゲノムショットガンシーケンスにより、アセンブルの結果、Rayでは、コンティグ数:113,675、総塩基数:190,604,939、平均長:1,677となり、Platanusでは、コンティグ数:2,671,540、総塩基数:716,717,698、平均長:268となった。予測ゲノムサイズは、アブラナ科の中でも大きいことが予想され、Platanusが予測に合致している可能性がある。また、ワサビの辛味成分の生成に関与するミロシナーゼ遺伝子とそのプロモーター配列を含む11752bpのコンティグも同定された。また、葉緑体ゲノムを含む大きなコンティグが得られ、その結果、葉緑体の全ゲノムが一つのコンティグで構成され、ダイコンの配列などを比較し、葉緑体全ゲノム配列が、世界にさきがけて解読できたことがわかった。ダイコンの全ゲノム配列が152860bpであるのに対して、ワサビは153852bpであった。今回は、全DNAを抽出し、次世代シーケンサーで解読したこともあり、結果的に細胞質ゲノムも含まれていたためにコピー数が多い葉緑体の解読につながったと考えられ

る。ダイコンの葉緑体ゲノムと比較解析をした結果、遺伝子の構成、向き、並びは一致していた。

• ワサビ葉緑体ゲノムにおけるSSRの分布

全ゲノム中、モノヌクレオタイド配列の繰り返し数と総数の一覧は次の通りである (表1)。

表1 ワサビ葉緑体ゲノムにおけるモノヌクレオタイドの繰り返し数と総数

繰り返し数*	総数			
	A	T	C	G
4	0	0	252	218
5	0	0	49	49
6	0	0	13	11
7	0	0	8	11
8	40	57	4	2
9	26	38	0	0
10	8	18	2	1
11	4	8	0	0
12	0	5	0	0
13	2	4	0	0
14	2	2	0	0
15	0	2	0	0
16	0	1	0	0
17	0	0	0	0

*ただし、AまたはTは8以上を、CまたはGは4以上をカウントした

表1のとおり、モノヌクレオタイドの繰り返し数は、繰り返し数が少ないほどゲノム中の数が多くなることがわかった。これは、Yamane *et al.* (2006) で得られたイネ科植物における結果と一致する。また、AまたはTとCまたはGとの間では、繰り返し数の分布が異なり、CまたはGの方が、AまたはTに比べ、全体的に繰り返し数が少ないことがわかった。

マイクロサテライトやSSRにおいては、繰り返し数が多いほど変異性が高いことが知られている。そのため、ゲノム中のモノヌクレオタイドの繰り返し数が大きいものから順番に、マーカー候補として検証した。このなかで、葉緑体のInverted Repeat領域に存在するモノヌクレオタイドの繰り返し配列は、マーカーとして除外している。これは、本領域が非常に保存的でマーカーとしては不的確であることが既に知られているためである。さらに、プライマーの設計は、できるだけ繰り返

し数の多い SSR 座を含みながら、プライマー配列は遺伝子のコード領域において設計できるようにした。これは、プライマーサイトでの突然変異の可能性を減らし、あらゆる日本のワサビ属植物において増幅が可能なマーカーとして利用できるようにするためである。以上の結果、表2の新規マーカーの開発に成功した。次に、本マーカーの有用性について検証する。

• 新規開発 SSR マーカーの有用性の検証

上記のうち、5 領域を用いて、山根によって集められた自生ワサビおよびユリワサビ系統と、静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センターわさび科が所有する栽培品種の計40系統の系統関係を明らかにしたのが図2である。

その結果、ごく一部の栽培品種を除き、ほとんどの栽培品種が同一の塩基配列を有していること

表2 ワサビの葉緑体ゲノムにおける SSR を含むマーカー一覧

モチーフ	遺伝子間領域	フォワードプライマー	リバースプライマー	プライマー名略称
A14	<i>rbcL-accD</i>	CGATAAATTAGATGGCCAAGC	AGCTCGCCTCTGTATTCCAA	K
A14	<i>trnV-rps7</i>	GCTCGAACTGATGACTTCCA	ACCGAGAAGAAAGGAGGCTC	I
A13	<i>trnE-trnT</i>	TCCTGAACCACTAGACGATGG	CGGATTTGAACCGATGACTT	L
A11	<i>rps2-rpoC2</i>	ATGACACCGAGCCCTTATTG	GATTGGTTGAAAGGCCTGAA	M
A11	<i>psaJ-rpl33</i>	ATGGTTCGGTTCGTTAGCAG	TAGGGGTGTTATGCCGATTC	N
A11	<i>rps18-rpl20</i>	TCGATTTATTAGTGAACAAGG	TTATTTGCATCAAGCTTTTCG	E
A11	<i>rpl32-trnL</i>	ATCACTTTCTACAGGTAATTC	TCTACCAATTTACCATAGC	H
T16	<i>matK-trnK</i>	CGAGCCCCATCGAACTTTA	CGGTAGAGTACTCGGCTTTT	O
T13	<i>psaA-ycf3</i>	CGGACAACACATACAAAAGAA	CCTGGTAATTATATTGAAGC	A
T13	<i>clpP-clpP</i>	AACGAACTAGCGGGTTGATG	GTCGGAGGAGCAATTACCAA	P
T12	<i>trnH-psbA</i>	GAACGACGGGAATTGAACC	GCTATGCATGGTTCTTGGT	Q
T11	<i>ycf6-psbM</i>	TGGATATAGTAAAGTCTCGCA	TTGCATTTATTGCTACTGCA	C
T11	<i>trnP-psaJ</i>	GATGACAGGATTTGAACCCG	AAGGGAAATGTTAATGCATC	B

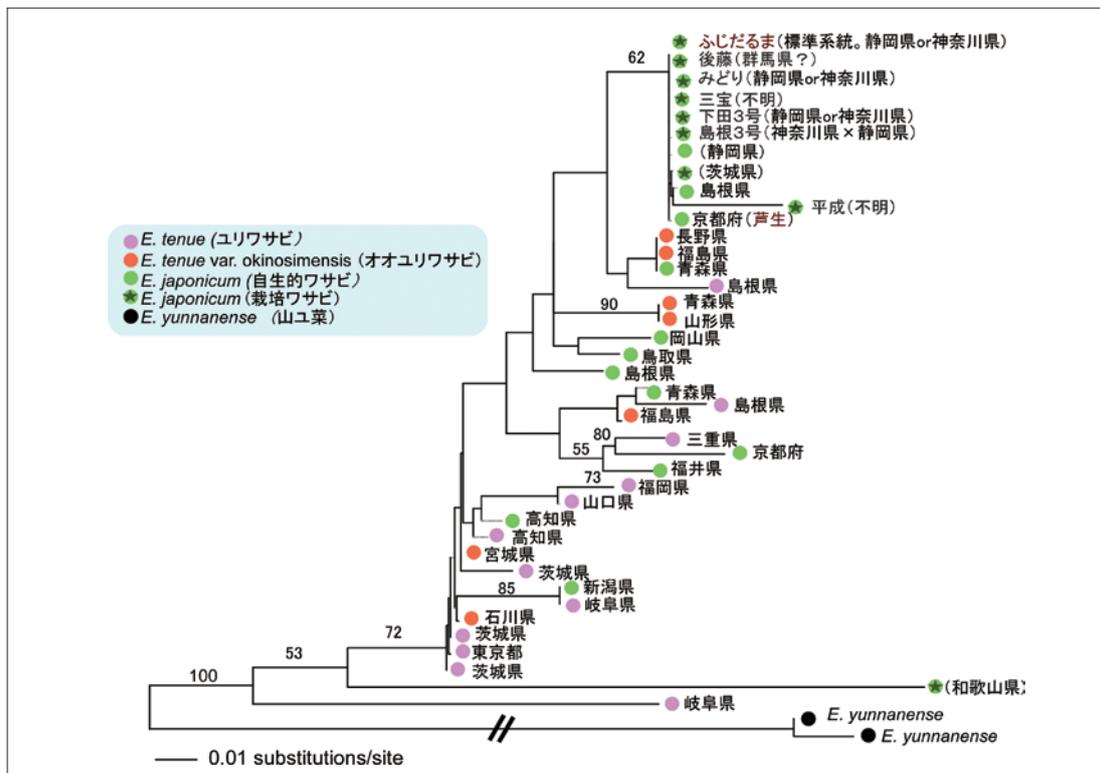


図2 ワサビ属4種における葉緑体DNA5領域の塩基配列多型に基づくNJ系統樹。枝の上部は50%以上のブーストラップ確率。都府県名が同じでも、種が同じ場合は全て集団が異なる。尚、栽培品種は静岡県農業試験場より譲渡されたもの。ふじだるまは標準系統として、静岡県と岐阜大学が共同で系統維持を行っており、現在全ゲノム解読を行っている系統である。

だ、芦生地区においてはシカの食害による被害が深刻であり、山から植物がどんどん消えている。ワサビも例にもれず、絶滅寸前となっていることがわかった。見た目だけではわからないため、本研究で開発したDNAマーカーが有効性を発揮し、自生ワサビの発見につながっている。現在具体的な保全計画が進行中で、今年中にシカよけの柵を設置し、保全活動を開始する予定である。

以上のように、次世代シーケンサーを用いて、世界に先駆けてワサビの葉緑体全ゲノムを解読することができた。さらに本情報を用いて、進化速度の速いSSRマーカーを開発することができた。実際に本マーカーを用いることで自生ワサビのDNA鑑定に成功し、自生ワサビを地域ブランド化し、売り出すための保証データをつくることができた。京都府の芦生地区においては、保全計画を策定し、具体的な保全事業を実行するにま

で至っている。今後は、次世代シーケンサーで解読した膨大なゲノム配列のなかから、さらに有用なマーカーを選抜し、品種改良や保全に役立つマーカーを構築し、順次公開したいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行に際しまして、白山白峰地区の自生ワサビを提供して下さった松風産業 風一様に心より御礼を申し上げます。また、終始サポートして下さい、当研究室の小林恵子様にも心より感謝申し上げます。また、全国各地を調査した折にお世話になりました、京都府南丹市芦生地区の皆様をはじめとしました多くの方々に、この場をお借りして御礼を申し上げます。

本研究は平成25年度公益財団法人浦上食品・食文化振興財団の研究助成により資金提供を受け実施されました。ここに厚く御礼を申し上げます。

Development of DNA markers for genotyping of wasabi using next-generation sequencing technologies

Kyoko Yamane

*Faculty of Applied Biological Sciences, Plant Breeding and Genetics Laboratory
Gifu University*

[Summary]

This report shows the development of new DNA markers for wasabi using next-generation sequencing technologies. Wasabi (Japanese horseradish: *Eutrema japonicum* (Sieb.) Maxim., syn. *Wasabia japonica* (Miq.) Matsum.) is a perennial herb that plays an important role in traditional Japanese cuisine and culture. Although many research articles focused the biochemical and pharmaceutical properties of wasabi, including its pungency, or flavor, and its anti-carcinogenic or anti-inflammatory effects, there has been no genetic study of wasabi. It remains poorly understood for the genetic diversity or the genetic background of wasabi. In this study, using next-generation sequencing technologies, search for DNA markers of wasabi was conducted. Consequently, whole-genome shotgun sequencing successfully provided the whole chloroplast genome sequences of wasabi, “Fujidaruma”. The length of complete chloroplast genome in wasabi was 153852bp, and the structure and order of chloroplast genes completely coincident with those of radish, *Raphanus sativus*. Based on these sequence data, new 13 SSR primer sets were constructed. Phylogenetic analyses of the chloroplast 5 SSR regions of 40 *Eutrema* accessions in Japan plus outgroup species, *E. yunnanense*, were used to generate neighbor joining (NJ) tree, revealing that major cultivar of wasabi, *E. japonicum*, form a single clade clearly separated from other *Eutrema* accessions. Accordingly, using these SSR markers, genotyping of major cultivars and one of the landraces are successfully achieved. These data could help to identify native grown wasabi and to launch the wasabi as a special local products.