

研究成果報告書

【申請者氏名】

佐藤 昌直

【所属機関】

北海道大学大学院農学研究院応用分子昆虫学研究室

【研究題目】

カイコの雑種強勢研究に用いるゲノム配列情報整備

【研究目的】

蚕実用品種開発において系統間の交配による雑種強勢が中心的な役割を果たしてきた一方、蚕における雑種強勢に関する分子生物学的知見は得られていない。申請者は、北海道大学において現在も利用されており、昭和に高い普及率を誇った日 124 号×支 124 号を材料に蚕における雑種強勢機構の解明に着手したい。そこで本申請研究では、日 124 号、支 124 号のゲノム DNA 配列情報を収集し、交配後代の遺伝学的解析を可能とする情報を整備する。

【研究内容及び成果】

以下の方法で研究を進めた：

1. 北海道大学で維持している日 124 号および支 124 号を北海道大学北方生物圏フィールド科学センター養蚕室で飼育し、5 齢幼虫の絹糸腺を摘出した。
2. 摘出した絹糸腺から Qiagen 社 Genome-tip を用いてゲノム DNA を抽出、精製した。エタノールで沈殿させた DNA はローテーターを用いて室温で 10mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁した。
3. 精製した DNA を材料にイルミナ社シーケンサーで配列解読するためのライブラリー調製を行った。
4. ライブラリークオリティを小規模のシーケンスで評価した(イルミナ社シーケンサーでの配列取得はマクロジェン・ジェノミクス社に外注した)。
5. 初回のシーケンスデータから、ライブラリーの品質が高くないことが判明したので、再度、DNA 抽出・ライブラリー調製を行なった。
6. 大規模にシーケンスを行うためにマクロジェン・ジェノミクス社に HiSeqX でのシーケンスを外注した。
7. 得られた塩基配列情報は
(ア) カイコゲノム配列の標準系統である p50 (大造) のゲノム配列 (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/download.cgi>) を参照し、bwa を

用いて p50 染色体配列へのマッピングを行い、bam フォーマットファイルとしてマッピング情報を取得した。

- (イ) 取得した bam ファイルから samtools、bcftools を用いて p50 と日 124 号、p50 と支 124 号の間で異なる塩基を持つ染色体上の塩基情報を得た。多型塩基を特定する際には、カバレッジ（該当塩基が何回シーケンスされたか）が 30 以上の塩基を対象とした。

8. 日 124 号および支 124 号から採卵し、維持を行った。

以上の実験・解析から以下の成果を得た：

p50 に対する日 124 号、p50 に対する支 124 号、日 124 号に対する支 124 号が持つ塩基多型の数を図 1 にまとめた。本研究で供試した両系統は p50 に対して平均約 125 塩基に 1 塩基の多型を持つことが明らかになった。日 124 号と支 124 号の比較では、約 227 塩基に 1 塩基の違いが見つかった。つまり、中国在来種である大造と中国改良酒である支 124 号の間よりも、日本改良種である日 124 号と中国改良種である支 124 号の間の方が多型が少なかった。この結果から、p50 は本研究で供試した系統間よりも遠縁の系統であることが推定される。

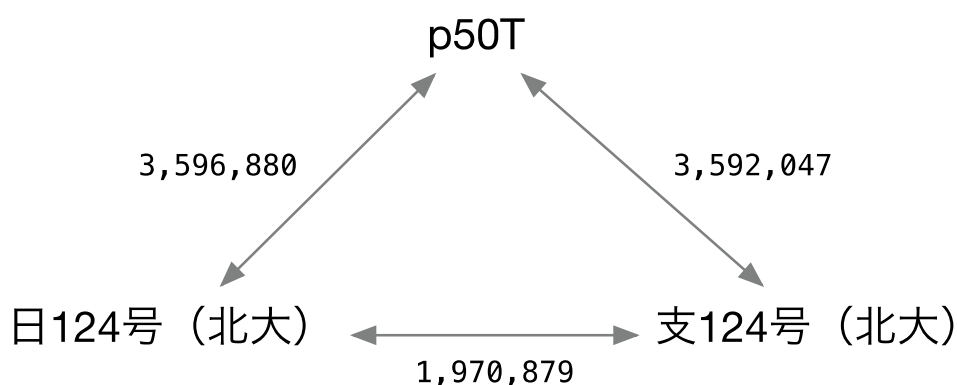


図 1. 日 124 号、支 124 号、p50 間で見つかった塩基多型の総数

次に、これら塩基多型が染色体上にどのように分布しているかを調べた（図 2-4）。p50-日 124 号間の塩基多型、p50-支 124 号間の塩基多型は両者とも、一部の多型がない領域（図 2、3 の白く抜けている領域）が見つかるものの、染色体全体に渡って塩基多型が存在することがわかった。一方で、p50 との比較よりも塩基多型数が少なかった日 124 号-支 124 号間での塩基多型は、染色体の特定の箇所で密集する傾向が見られ、染色体 5 番、9 番、10 番、14 番、16 番、18 番、22 番、26 番に顕著な塩基多型の密集領域があった。

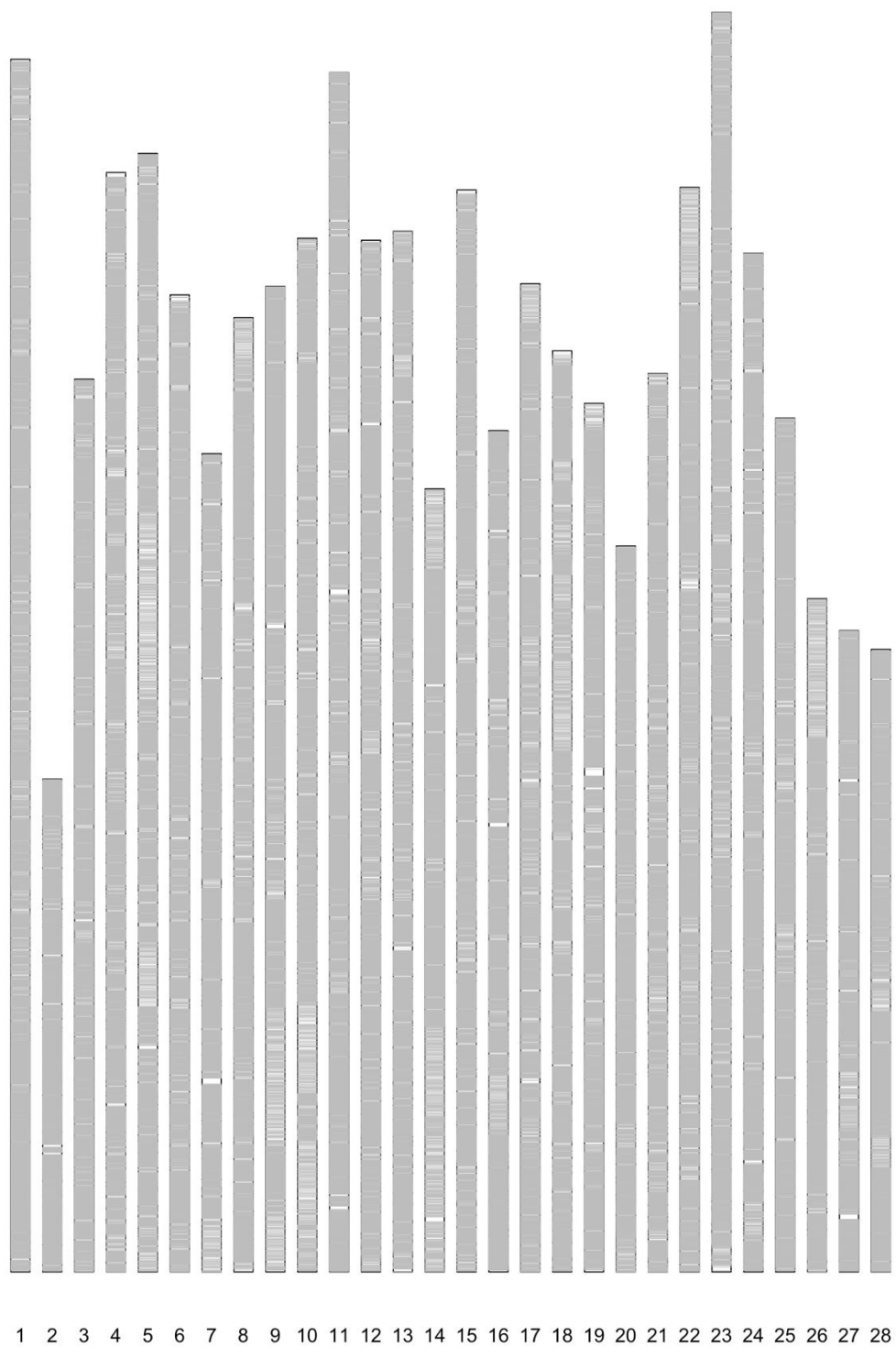


図 2. 日 124 号と p50 間の塩基多型の染色体上の分布。グレーで示されている領域が塩基多型が見つかった染色体領域である。

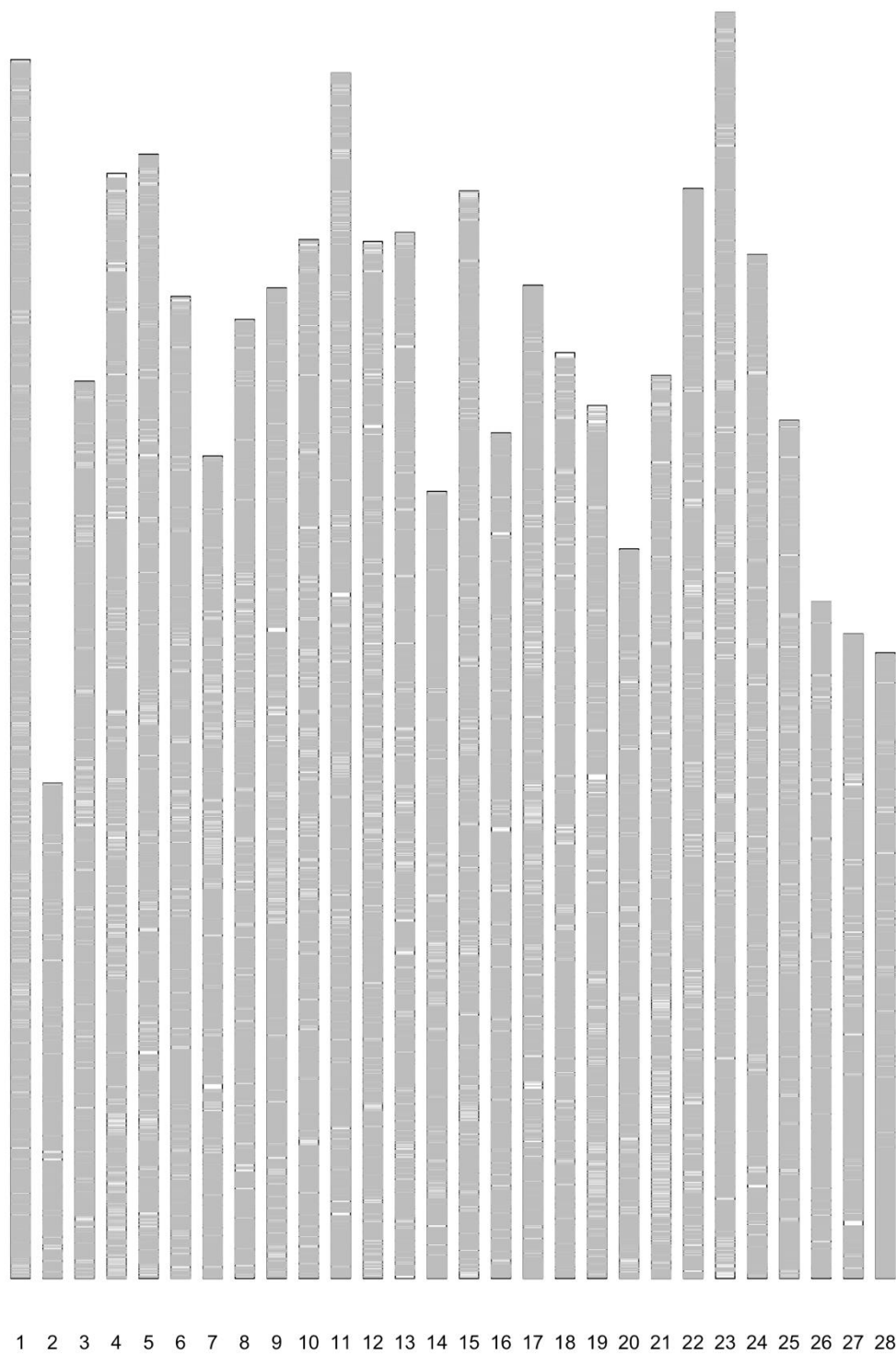


図 3. 支 124 号と p50 間の塩基多型の染色体上の分布。グレーで示されている領域が塩基多型が見つかった染色体領域である。



図 4. 日 124 号と支 124 号間の塩基多型の染色体上の分布。グレーで示されている領域が塩基多型が見つかった染色体領域である。

【今後の課題】

本研究はこれまでの系統育成で優良品種として利用され、顕著な雑種強勢を起こす 2 系統についてゲノム配列情報、塩基多型情報の収集を行なった。今後は、p50 だけではなく他の系統にも比較解析を広げ、今回見つけた塩基多型の頻度、染色体上での分布に有意な特徴があるかを探索する必要がある。そして、その解析で見つけた情報をもとに交配する系統を選定し、雑種強勢ならびに F1 系統の表現型を解析してゲノム多型情報と雑種強勢の関係を明らかにする。今後の蚕系統のゲノム配列解析の難易度は下がっていくと想定される。そのようなゲノム情報時代には、本研究および発展研究で得るゲノムおよび塩基多型情報が蚕糸業に有用な系統の選抜に有用な情報として利用できることが期待される。

【発表論文等】

なし