

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 高松 壮  
 学位 博士 (農学)  
 学位記番号 新大院博 (農) 第 185 号  
 学位授与の日付 平成 30 年 9 月 20 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 博士論文名 Optimized method of extracting rice chloroplast DNA for high-quality plastome resequencing and *de novo* assembly  
 (イネ葉緑体リシーケンスならびに *de novo* シーケンス解析に向けた高純度葉緑体 DNA 精製法に関する研究)

論文審査委員 主査 教授・三ツ井 敏明  
 副査 教授・伊藤 紀美子  
 副査 教授・末吉 邦  
 副査 教授・鈴木 一史  
 副査 教授・原田 直樹

博士論文の要旨

植物細胞の葉緑体には 110-200kb の小型ゲノムが存在し、母性遺伝によって遺伝する。この葉緑体ゲノムは細胞あたり数十から数千コピー存在し、核ゲノムの複製・修復機構とは異なる独自のゲノム恒常性維持機構が備わっている。これまでオルガネラゲノムはコードする遺伝子数がわずかに 100 前後であることや多様性の乏しさから、表現型に与える影響は小さいと考えられてきた。しかし近年、オルガネラゲノムの潜在価値について再評価する研究が行われはじめている。現在、葉緑体ゲノムの次世代シーケンス解析は全ゲノム DNA を用いて行われることが一般的である。しかし、高等植物において、葉緑体ゲノムは核やミトコンドリアゲノムに移行し、核やミトコンドリアゲノムには数から数十コピーの葉緑体ゲノム類似配列が存在する。これらの配列は、相同性の高さ時には数万塩基に及ぶ配列の長さから一般的なショートリードシーケンシングで区別することは極めて困難である。イネは特にそうした配列に富んでおり、全ゲノム DNA を使用すると類似配列に由来するノイズが大きく、解析精度に悪影響が出る恐れがある。そこで本学位論文では、精度の高いイネ葉緑体ゲノムの次世代シーケンス解析に向けて高純度な葉緑体 DNA 単離精製法を確立することを目的とし、単離精製法を検討するとともに、精製した葉緑体 DNA を次世代シーケンス解析して有効性が評価された。

様々な葉緑体 DNA 単離手法を検討・評価し、改良液体窒素ショ糖密度勾配遠心法が最も優れていることを見いだした。この精製により、幼苗組織では核ゲノムとミトコンドリアゲノムに対してそれぞれ 192 倍と 17 倍のコピー比で存在する葉緑体ゲノムを、33,895 倍と 177 倍に濃縮することに成功した。DNA 含有率をコピー比とゲノムサイズをもとに換算すると、幼苗組織で全 DNA の 6.4% を占めた葉緑体 DNA が 90.7% に精製されたことになる。このように純度と品質に優れた精製葉緑体 DNA は、イルミナ Miseq などの低出力シーケンサーでサンプルマルチプレックスやディープシーケンスを可能とするとともに、DNA 品質の要求基準が厳しい PacBio RS II などの低出力なロングリードシーケンサーとも相性が良いことから、幅広い次世代シーケンサーのプラットフォームに使用可能である

と考えられる。さらに、温帯ジャポニカ、熱帯ジャポニカ、インディカ、AUS など 4 グループ合計 10 品種から同様に高純度の葉緑体 DNA が得られることを確認し、本手法が幅広いイネ系統に適用可能であることが示された。

続いて、液体窒素ショ糖密度勾配遠心法で精製した日本晴の葉緑体 DNA をイルミナ Miseq でシーケンスし、リシーケンス解析と de novo シーケンス解析で解析精度を評価し、全ゲノム DNA ではミトコンドリアゲノムに由来する多くのリードが葉緑体ゲノムに誤ってアライメントされているのに対し、精製葉緑体 DNA では精度が高いマッピングが行われていることを示した。また、日本晴の葉緑体ゲノムリファレンス配列は X15901.1 と AY522330 が存在し、X15901.1 にはシーケンスエラーとみられる 189 の SNPs/InDels が存在することが指摘されている。そこで、AY522330 を正解データとして使用し、リードを X15901.1 にマッピングして得られた BAM ファイルから変異検出することで、葉緑体 DNA 純度がバリエーションコールに与える影響が評価された。得られた結果から、アルゴリズムによってはマッピング精度が悪いと擬陽性変異が検出される可能性があることを示唆するとともに、逆位反復配列内の変異検出法開発の必要性を浮き彫りにされた。加えて、葉緑体 DNA 純度が de novo シーケンス解析に与える影響が評価され、変異検出法として精製葉緑体 DNA を用いた de novo シーケンスの有効性が示唆された。

#### 審査結果の要旨

本学位論文では、次世代シーケンサーを用いた高精度なイネ葉緑体ゲノム解析のために、葉緑体 DNA の単離精製法を最適化して確立するとともに、現在主流である全ゲノム DNA を用いた葉緑体ゲノムの次世代シーケンス解析と比較して、精製葉緑体 DNA には解析精度に大きな優位性が存在する事を実証した。本手法により得られた葉緑体 DNA の純度・品質の結果から、その用途はここで示したイルミナ Miseq などのショートリードシーケンサーに限定されず、ロングリードシーケンサーを含めた様々なシーケンスプラットフォームで葉緑体ゲノム解析を可能にすることに疑いの余地はない。将来的には、新規配列の同定、ヘテロプラスミーやレア変異など高解像度が要求される変異解析、極めて遅い進化速度の原因であるゲノム恒常性維持の仕組みなど、これまで知見が限定されてきたトピックについても新たな切り口から事象を捉え、葉緑体ゲノミクスの発展に貢献できるものと期待できる。

本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として以下の論文に掲載済みである。

高松 壮, マロワン バスラム, 猪俣 拓也, 及川 和聡, 伊藤 紀美子, 大西 孝之, 木下 哲, 三ツ井 敏明

Optimized method of extracting rice chloroplast DNA for high-quality plastome resequencing and de novo assembly

*Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: Article 266 (13 pages)

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。