

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02199

研究課題名(和文)カキの果実形状多様性を制御する全ゲノムワイドモデルの構築

研究課題名(英文) Genome-wide model to regulate the wide diversity of fruit shape in persimmon

研究代表者

赤木 剛士 (Akagi, Takashi)

岡山大学・環境生命科学学域・研究教授

研究者番号：50611919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では果実形状に幅広い多様性を持つカキ品種群を対象として、ゲノムワイドな観点からの決定分子機作や進化メカニズムの解明を目指した研究を行った。カキ属における栽培カキ近縁野生種の参照全ゲノム配列を新規に構築し、楕円フーリエ記述子を用いた主成分解析によって数値化したカキ品種群における果実形状多様性とリンクする共発現ネットワークを同定した。カキ品種群に共通するものとして、サイトカイニンシグナルに関連するKNAT1などの転写因子群の動態に特異性が見られ、他科植物種では果実における発現が著しく低いこれらの遺伝子群の発現変化がカキの広い形状多様性に関与する可能性も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「形」は作物の価値を決定する大きな要因であるとともに、その植物独自の進化過程を強く反映するものである。これまで葉や花といった器官における形の多様性研究はモデル植物を中心に活発に進められてきた。しかし「果実」器官の形状多様性については種間を横断する機構において遺伝子レベルでの共通性が無いことも多い。本研究におけるカキ果実の発現特異性の獲得機構は、この種特異的な形状多様性が生まれる根本的な要因に迫るものであり、将来的には、進化学的観点から見た際の系統特異的な果実進化の本質に至るものであると思われる。

研究成果の概要(英文)：We here attempted to identify genetic factors and evolutionary mechanisms to drive fruit shape diversity, which is specific to persimmon cultivars, from a genome-wide viewpoint. The draft whole-genome in a wild relative close to cultivated persimmon (*Diospyros lotus*) was assembled. With this reference genome, we identified gene co-expression networks associated with the fruit shape diversity, quantified with principal components of elliptic Fourier descriptors. Some cytokinin-related transcription factors, including KNAT1, exhibited persimmon-specific expression fluctuation in fruit, which was not observed in other fruit crops. This persimmon specific expression behaviors may be a key to express dynamic fruit shape diversities amongst the cultivars.

研究分野：園芸学

キーワード：果実 バイオインフォマティクス ゲノム進化 形状多様性 カキ 選択圧 共発現ネットワーク

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物の形の研究は古くは「花」、また進化学的側面から「葉」において主に行われているものの、果実の形状についての研究は未だ少ない。果実のモデル研究材料として使用されるトマトでは形状多様性を制御する因子の同定がなされているが、明確な形状変異を及ぼす遺伝因子が定義されているに過ぎない。さらに、トマトなどで明らかにされた果実形質に関する分子機構において、遺伝制御レベルでの一般性が無い場合が多い。この原因として、近年の多種に渡る全ゲノム解読から、系統特異的なゲノム進化がその種の特徴たる形質を駆動している事が挙げられる。

カキの果実形状多様性に目を向けると、その形質幅が非常に多角的であることに加えて、高次倍数性であり栄養繁殖性の木本作物という特徴から、高度なヘテロゲノムが維持され、形状に寄与する雑多な遺伝的因子が潜在しているようである。この潜在性は、国内機関における古来より在来栽培されてきた多様な果形・サイズなどを示す 500 以上の保存品種において十分に網羅されており、ここから得られる結果は、進化学的観点からも「カキに特異なゲノム進化」の上に成り立つ機構が多いと推察され、トマトなどモデル研究の結果との比較において、その作用や成立機構の一般性と特殊性を検証していくことで、果実形状というものの進化様式の前が見えてくると考えられた。

2. 研究の目的

「果実」における形質は一見すると同じものであっても、その形質要因は系統特異的なゲノム進化にリンクしたものが多く、これには植物に特異的な多くの独立したゲノム倍化イベントが関与していると考えられている。本研究は、この概念の上で、品種・系統間において近縁野生種では見られない多様な果実形状を有する倍数体栽培ガキに着目し、歴史的に起こった古ゲノム倍化・近年に起こった倍数化の両者を捉えながら、全ゲノムワイド解析データを基礎とした果実形状多様性獲得に至る進化・遺伝学的要因を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

基本情報としてカキ属全ゲノム配列情報が欠落していたため、本研究ではまず二倍体野生種であるマメガキの全ゲノム解読とその情報整備を行った。PacBio RSII を基本としたリード情報をアセンブルし、各器官トランスクリプトーム情報を事前学習させた AUGUSTUS などによる遺伝子情報のアノテーションを行った。ゲノム内全遺伝子ペア間の中立進化率や 4DTv などの累積情報から古ゲノム倍化時期を推定し、これに起因する遺伝子群の進化学的選択圧を指標とした機能推定を行った。具体的には、遺伝子重複後に特異的に表れる episodic positive selection と呼ばれる一過的な正の選択圧を検出することで、適応進化によって積極的に新機能を得たと考えられる遺伝子群のスクリーニングを行った。

構築したマメガキ全ゲノム情報を基礎として、カキ品種群およそ 50 品種の果実形状多様性決定時期(細胞分裂後期)におけるトランスクリプトーム情報を収集し、楕円フリー記述子主成分解析による果実形状指標 (Maeda et al. 2018 Sci Hort) との相関・共発現ネットワーク解析を行った。さらに、共発現ネットワーク解析において、有意な相関が見られた遺伝子群に関しては、他科植物群の果実トランスクリプトーム情報を参照し、遺伝子重複分化情報と発現変動に関する同調進化解析を行った。

カキ 183 品種について、ddRAD-seq 解析を行い、リードデータをマメガキ参照ゲノム情報へマップすることでゲノムワイドな SNPs 情報を抽出した。Updog など倍数体特異的なアレルバランスをコールするツール郡によって品種ごとの詳細な量的遺伝子型を決定した。この情報と楕円フリー記述子主成分解析による果実形状指標 (Maeda et al. 2018 Sci Hort) 間のゲノムワイド連関解析 (GWAS 解析) を rrBLUP 法および GWASpoly によって行い、果実形状と関連のある遺伝子座の特定を目指した。

4. 研究成果

マメガキ全ゲノム解読の結果、染色体数基本数 15 本からなるゲノム量のおよそ 85-90% をカバーするドラフトゲノム情報の構築に至った。ゲノムアノテーションから全遺伝子情報を抽出し、相同遺伝子ペア間の中立変異率の推移から、カキ属ではおよそ 6000-7000 万年前に古ゲノム重複 *Dd-alpha* を経験しており、この倍化現象は同じツツジ目に属するマタタビ属(キウイフルーツ)におけるものと独立した特異的な古ゲノム倍化であることが明らかになった。この古ゲノム倍化に起因するパラログペア間において、ゲノム倍化後に特異的な正の選抜圧 ($dN/dS \gg 1$) を経験した遺伝子セットを抽出した(図 1)。その結果、性決定遺伝子である *MeGI* (Akagi et al. 2014 Science) を含む 10 遺伝子が非常に強い正の適応選抜を受けて新機能を獲得したものである可能性が考えられた (Akagi et al. 2020 PLOS Genetics)。このうち、正確な新機能の実証に至ったものは *MeGI* だけであるが、今後の機能検証によって、これらの遺伝子群におけるカキ属に特異的な形質獲得への関与も示唆されるであろう。

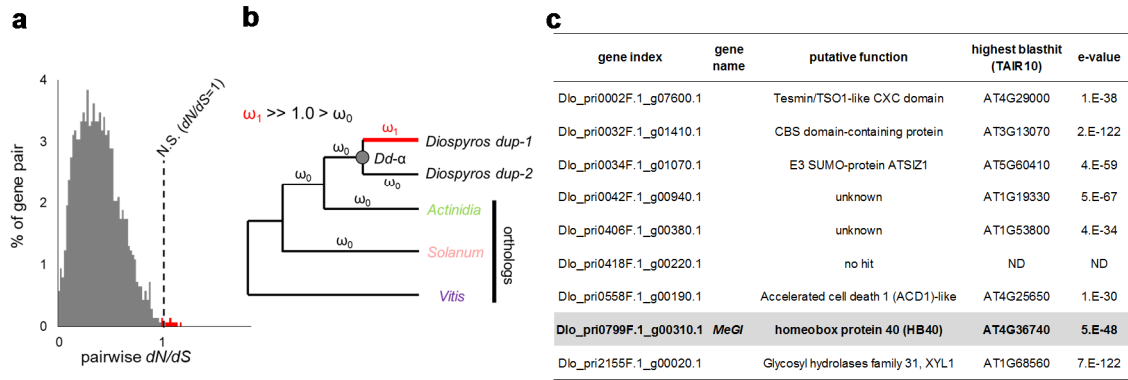


図1: カキ属特異的な古ゲノム重複 *Dd-alpha* によって成立したパラログ間における episodic positive selection の検出

- (a) 遺伝子領域全体での dN/dS 平均値。有意な正の選択圧はマスクされて見えない。
 (b) PAML を用いた枝・サイト特異性を考慮した正の選択圧の検出モデル。
 (c) *Dd-alpha* 直後に episodic positive selection を経験した適応進化因子候補。性決定遺伝子である *MeGI* を含む

カキの全遺伝子情報に基づくトランスクリプトーム-共発現ネットワーク解析から、カキ品種の果実形状多様性に関わる遺伝子群の候補として、サイトカインニ酸化酵素 (*CKX*) や MADS-box 様転写因子である *SEEDSTICK* (*STK*)、KNOX family に属する転写因子である *KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1* (*KNAT1*) などが検出された。

特に class I KNOX Family に属する転写因子群を中心として、この共発現ネットワークの関連遺伝子群は総じてサイトカインシグナルとその後の細胞分裂過程に関与するものが多く(図2) この結果はカキ品種間における果実形状多様性が主に細胞分裂期後期の細胞数に依存して決定していること(Maeda et al. 2018 Sci Hort) と一致していた。さらに、この中で、特に果実形状多様性に相関のある遺伝子ネットワークの中心性を担う遺伝子の一つである *KNAT1* は、他科植物における果実生育期(細胞分裂期)での有意な発現が見られない一方で、栽培ガキでは発現量に大きな変動が見られ、発現量が極めて高いものも散見された(図3)。この *KNAT1* のみでカキ品種群の形状多様性を説明することはできないが、このようなカキ属に特異的な発現パターンの獲得がその特異的な形質多様性に関与している可能性の一つを示唆しているものであると考えられた(Maeda et al. 2019 Plant Cell Physiol)。

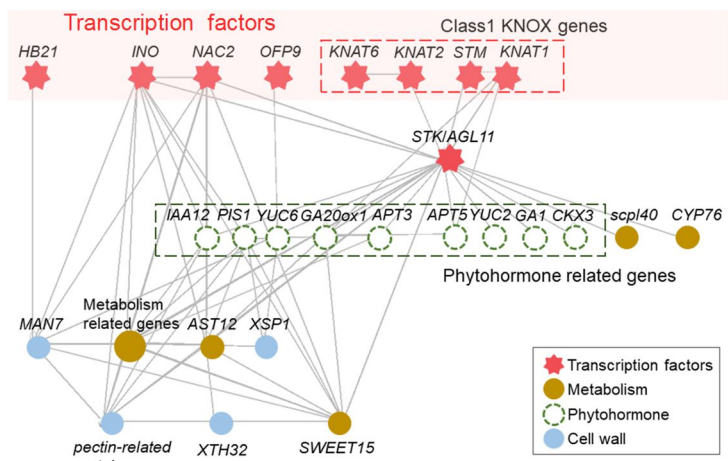


図2: カキ品種群における果実形状多様性の主成分値と相関性の高い共発現ネットワーク

上流制御を担うと考えられる転写因子群には class 1 KNOX family 遺伝子群が多い



図3: class 1 KNOX family に属する *KNAT1* オートログの進化系統樹(左)と果実細胞分裂期における発現量の比較(右)

カキ品種群特異的に *KNAT1* の果実における発現量が高くなっている

カキ品種群における量的遺伝子型を用いた GWAS 解析から、幾つかの遺伝領域がカキ果実の縦横比を中心とする連続的性状値 (PC1, Maeda et al. 2018 Sci Hort) や、果頂部における突出性 (PC4, Maeda et al. 2018 Sci Hort) さらに果実における側溝の有無に関与している可能性が示された (図 4, Horiuchi et al. in prep)。量的遺伝子型を考慮するアレル量の連続的な変化と相関性のある遺伝子座として、特に第二番染色体端部において、果実の縦横比と連関する強いピークを検出しており、本領域にはサイトカイニンシグナルと拮抗作用を為すオーキシニンシグナル応答遺伝子群や、細胞分裂に直接的に関与する AUGMIN 様遺伝子が存在しており、果実細胞において有意な発現を示していた。今後は、品種間においてこれらの詳細な遺伝子型差異、特に重篤なミスセンス変異や発現量の違いを潜在的に生み出すプロモーター領域の変化を検出することによって、果実形状多様性を生み出す遺伝的要因の同定を目指していきたい。

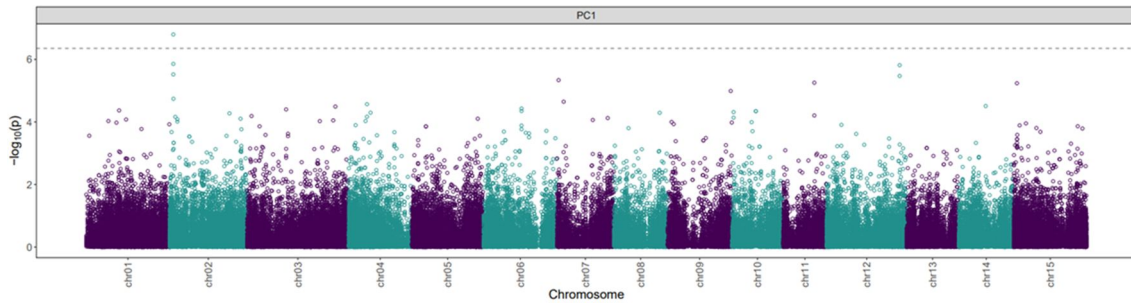


図 4: カキ品種群における果実多様性の PC1 (Maeda et al. 2018 Sci Hort) に関する GWAS 解析
第二染色体の末端領域に有意なピークが見られる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Haruka Maeda, Takashi Akagi, Noriyuki Onoue, Atsushi Kono, Ryutaro Tao | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Evolution of Lineage-Specific Gene Networks Underlying the Considerable Fruit Shape Diversity in Persimmon | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 2464-2477 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz139 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Akagi Takashi, Shirasawa Kenta, Nagasaki Hideki, Hirakawa Hideki, Tao Ryutaro, Comai Luca, Henry Isabelle M. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 The persimmon genome reveals clues to the evolution of a lineage-specific sex determination system in plants | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 e1008566 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008566 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 赤木剛士・増田佳苗・牛島幸一郎・久保康隆 |
| 2. 発表標題 カキ品種の果実生育・成熟に関する倍数体用ゲノムワイドアソシエーション解析 |
| 3. 学会等名 園芸学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 前田春香・赤木剛士・尾上典之・河野淳・田尾龍太郎 |
| 2. 発表標題 カキ果実の形状多様性を制御する遺伝子ネットワーク |
| 3. 学会等名 園芸学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堀内綾乃・増田佳苗・松崎隆介・尾上典之・久保康隆・牛島幸一郎・赤木剛士 |
| 2. 発表標題 カキ「平核無」と枝変わり系統「孝子丸」の比較解析による果実形状決定機構の解明 |
| 3. 学会等名 園芸学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |