

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：87110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05639

研究課題名（和文）栽培イチゴの多元交雑集団を用いた果実着色遺伝的制御機構の網羅的解明

研究課題名（英文）Study on uncovering genetic control system for fruit pericarp pigmentation of cultivated strawberry using multi-parent generation advanced cross population

研究代表者

和田 卓也（WADA, TAKUYA）

福岡県農林業総合試験場・生産環境部・チーム長

研究者番号：90502435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：栽培イチゴの果実の着色に関する遺伝的制御機構に関する研究を行った。これまでに検出した果実色関連QTLのイチゴ染色体上の座乗位置を明らかにした。またRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析により、アントシアニン合成系の遺伝子のうち、果実着色に関連する遺伝子を探索し、さらにRNAiによる発現抑制試験により、Flavanone 3-hydroxylase (F3H) が果実色の品種間差を決める主要遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栽培イチゴの果実色は消費者の目を引く重要な育種対象形質である。福岡県で育成した「福岡S6号（商標名：あまおう）」は鮮やかな濃赤色の果実色が特徴の品種であり、市場の評価も高く他品種よりも高価格で取引されている。しかしながら、イチゴの果実色に関する染色体領域を明らかにした知見は少なく、その遺伝的制御の仕組みに関しては明らかになっていない。「一般消費者の購買意欲に影響する果実色を決めるのはどのような遺伝子なのか？」という問いは、学術的意義とともに、極めて社会的意義の大きな課題である。

研究成果の概要（英文）：We uncovered genetic regulation system for controlling fruit color pigmentation of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Firstly, we identified chromosome locations on which previously detected QTLs for fruit color pigmentation were located. Secondly, we performed RNA-seq analysis and revealed that one of the anthocyanin synthesis genes, Flavanone 3-hydroxylase (F3H) is a most major factor to control fruit color pigmentation of cultivated strawberry.

研究分野：園芸科学

キーワード：イチゴ QTL 遺伝子発現 トランジェントアッセイ RNAi

1. 研究開始当初の背景

(1) 栽培イチゴ (*Fragaria × ananassa* Duch.) は異質八倍体の複雑なゲノム構造を有する作物であるが、遺伝子解析技術の進歩により、ゲノムワイドマーカーの開発 (Kunihisa et al. 2009、Shulaev et al. 2011)、ゲノム塩基配列の解読 (Hirakawa et al. 2014)、連鎖地図の開発 (Sargent et al. 2012、Isobe et al. 2013) が報告されている。

(2) 一方、ゲノム・マーカー情報を利用したイチゴの重要形質に関する QTL 解析も行われているが、耐病性、四季成り性などの主働遺伝子支配の形質に関するものが多く、消費者にとってより重要な果実形質に関する報告は極めて少ない。

(3) 上記の状況に対し、我々は果実形質の中で特に消費者にインパクトのある果実色に着目して研究を進め、栽培イチゴの多元交雑集団 (Wada et al. 2017b) を用いて果実色に関する QTL を野生イチゴ *Fragaria vesca* の第 1, 2, 7 染色体に相当する領域上に同定した (Wada et al. 2020)。

2. 研究の目的

上記の申請者らの過去の研究を受け、本研究では
果実色 QTL の栽培イチゴ連鎖地図へのマッピング
果実成熟時の果皮色関連遺伝子の発現解析
RNAi を用いた遺伝子ノックダウンによる機能解析
により、最終的に栽培イチゴの果実色の原因遺伝子とそのゲノム上の位置および機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

果実色 QTL の栽培イチゴ連鎖地図へのマッピング
栽培イチゴ多元交雑集団のタイピングで用いられた SSR マーカーの周辺配列約 400bp について、次世代シーケンサー MiSeq を用いたアンプリコンシーケンスで福岡 S6 号 (あまおう) の配列を解析した。得られたシーケンスについて、栽培イチゴの参照配列 (Camarosa v1.0a1、麗紅 FAN_r2.3) へ BLAST を行い、座乗染色体を決定した。

果実成熟時の果皮色関連遺伝子の発現解析

材料は濃赤色の果実色を示す「あまおう」および淡赤色の果実色を示す「かおり野」「おおきみ」に加え果実色に差のある多元交雑集団を選抜して供試した。

栽培イチゴの成熟ステージのうち、アントシアニン合成に関与する遺伝子群は緑熟期から成熟期にかけて発現が認められている (Zhou et al. 2012、Pillet et al. 2015)。成熟期の果実を採取し、そう果を除去、果皮と果肉を分離して凍結後に RNA を抽出した。抽出後の RNA を用いて illumina 製キットを用いてライブラリ作成、その後 RNA-seq (HiSeq4000) による遺伝子発現量の同定を行った。また、親品種系統 (あまおう、かおり野、おおきみ) の RNA を混合して、PacBio Sequel を用いた Iso-seq 解析を行い、得られた配列を参照配列として用いた。

リード後の fastq ファイルを BWA により参照配列にマッピング、その後 samtools により発現量を定量、edgeR により発現変動遺伝子を抽出した。また、アントシアニン合成関連遺伝子について、リアルタイム PCR (ABI 7500) による遺伝子発現解析も行った。

RNAi を用いた遺伝子ノックダウンによる機能解析

で発現量に差の認められた *F3H* (*Flavanone 3-hydroxylase*) の isoform 31 種のうち、濃色品種「あまおう」と淡色品種「かおり野」「おおきみ」間にて有意差が認められた isoform HQ_8407_1193 について、栽培イチゴの参照配列を用いた座乗染色体位置を検索するとともに、親系統、多元交雑集団をにおいて果皮色の濃淡と発現量の関連を調査した。さらに、当該 isoform が着色に及ぼす機能解明を目的として、アグロバクテリウム GV2260 系統 (筑波大学江面浩教授より分譲) を用いたアグロフィルトレーションによる RNAi で着色機能抑制試験を行った。

試験には濃色品種「あまおう」を用いた。F3H-RNAi バイナリーベクター構築は、*F3H* の isoform No.HQ_sample8407_1193 を特異的にノックダウンするヘアピンループコンストラクトを作製し、バイナリーベクター-pRI-201AN に導入した。ネガコンには、ヘアピンのループ部分に使用した quinone oxidoreductase のイントロン配列のみをベクターに導入したものを用いた。果実へのインフィルトレーションは、形質転換したアグロバクテリウムを 28 で培養、注射器を用いて花托部分へ注入 (濃度=OD2.4、1 回につき 0.5ml/個、計 3 回注入) して行った。その後、果実をプラントボックスに入れ、人工気象庫 (22、16h 日長) で 7~10 日間静置後に、果実表面、内部の着色を調査した。

4. 研究成果

果実色 QTL の栽培イチゴ連鎖地図へのマッピング

多元交雑集団を用いたゲノムワイド関連解析において、果皮色に関する QTL は *Fragaria vesca* の第 1, 2, 7 染色体に相当する領域上に検出されたが、最も効果が高いと考えられたのは、第 2 染色体上の領域であった。

そこで第 2 染色体上の QTL 近傍 SSR マーカー、「FVES0380_305」, 「FVES1678_184」, 「FVES3528_202」(アンダーバー以降の 3 桁数値は、当該マーカーによる増幅産物サイズを示す) について、栽培イチゴの参照ゲノム配列における座乗位置を決定した。

参照ゲノム配列に「Camarosa」を用いた場合、FVES0380_305 は *F. viridis* に由来するサブゲノム Fvb2-3 に座乗することが判明した。また、FVES1678_184 および FVES3528_202 は *F. nipponica* に由来するサブゲノム Fvb2-1 に座乗することが判明した(表 1)。一方、参照ゲノム配列に「麗紅」を用いた場合は、FVES0380_305 の座乗領域は特定に至らなかったものの、FVES1678_184 および FVES3528_202 は ch2X1 に座乗することが判明した(表 1)。このことから、第 2 染色体の果皮色関連領域は少なくとも 2 領域あることが明らかとなった。

表 1 多元交雑集団で検出された QTL 近傍マーカーの座乗染色体

Significant SSR marker on GWAS	Camarosa genome v1.0		Reikou_r2.3		Predicted ancestral wild species
	Predicted sub-genome	Position (Mb)	Predicted sub-genome	Position (Mb)	
FVES0380_305	Fvb2-3	16.22	ch0	140.93	<i>F. viridis</i>
			ch0	373.39	
FVES1687_184	Fvb2-1	10.64	ch2X1b	4.57	<i>F. nipponica</i>
	Fvb2-1	11.24			
FVES3528_202	Fvb2-1	2.55	ch2X1b	13.03	<i>F. nipponica</i>

注1) 1QTLに2領域があることは予測座乗領域が複数あることを示す。

果実成熟時の果皮色関連遺伝子の発現解析

2 年間の RNA-seq 解析の結果、親系統(あまおう、かおり野、おおきみ)間の発現量を比較すると、アントシアニン合成系において最も発現量差が安定していた遺伝子は、ナリングニンからジヒドロケンペロールへの変換を触媒する *F3H* 関連の遺伝子であった(表 2)。さらに親 6 品種・系統でみたところ、他の酵素に比較して、*F3H* は果皮色の濃淡に対応した発現量の違いを示しており(図 1)、イチゴ果実の着色に大きく寄与する遺伝子であることが示された。

一方、*F3H* 遺伝子の 31 種のアイソフォームのうち、発現量が多くかつ親系統(あまおう、かおり野、おおきみ)間の発現量差が顕著であった isoform HQ_8407_1193 についてみたところ、多元交雑集団の親系統(あまおう、さちのか、06A-184、紅ほっぺ、かおり野、おおきみ)では同様に果皮色の濃淡に対応した発現量の差が認められた(図 2 A)。一方、多元交雑集団の果皮色に差のある個体群で比較すると、isoform HQ_8407_1193 は淡色個体群に比較して濃色個体群の発現量が多く、親系統と同様の傾向が認められたものの、各個体群内のばらつきが大きく、その差は有意ではなかった($P=0.072$ 、図 2 B)。

表2 イチゴ果皮における着色関連遺伝子発現

遺伝子名	年度 着色方向	2018		2019	
		品種(福岡S6号vs)		品種(福岡S6号vs)	
		かおり野	おおきみ	かおり野	おおきみ
<i>PAL</i>	+				
<i>C4H</i>	+				
<i>4CL</i>	+		*	**	
<i>4CL-1</i>	+		*	-	-
ア ン ト シ ア ン ン 合 成 酵 素	+	**			
<i>4CL-2</i>	+		*	**	*
<i>4CL-3</i>	+			**	**
<i>CHS</i>	+			**	
<i>CHI</i>	+	†			
シ ア ン ン 合 成 酵 素	+		**	**	†
<i>CHI-1</i>	+		**	**	
<i>CHI-2</i>	+		**	**	
<i>F3H</i>	+	**	**	**	**
<i>F3H-1</i>	+	**	**	**	**
<i>F3H</i>	+				*
合 成 酵 素	+			**	**
<i>DFR</i>	+				
<i>ANS</i>	+	*		*	*
<i>FGT-3</i>	+	-	-	**	**
<i>FGT-6</i>	+	**	**	-	-
<i>PUGT</i>	+		**		**
<i>UGT</i>	+	*		**	
<i>GT1/GT5</i>	+			**	
<i>AGT-1</i>	+			**	
<i>AGT-2</i>	+			**	
A B A シ ン グ ル 伝	-				
<i>ABI1</i>	-				
<i>ABI3</i>	-			-	-
<i>CHLH</i>	+			-	-
<i>NCED</i>	+				
<i>NCED1</i>	+	†		**	
<i>NCED2</i>	+			-	-
<i>CYP707A</i>	-	†		†	
<i>SnRK2.6</i>	+		*	-	-

** FDR<0.01, * FDR<0.05, † FDR<0.1, 空欄 FDR>0.1(有意差無), - データ無
着色: 「+」促進、「-」抑制、「†」橙色促進

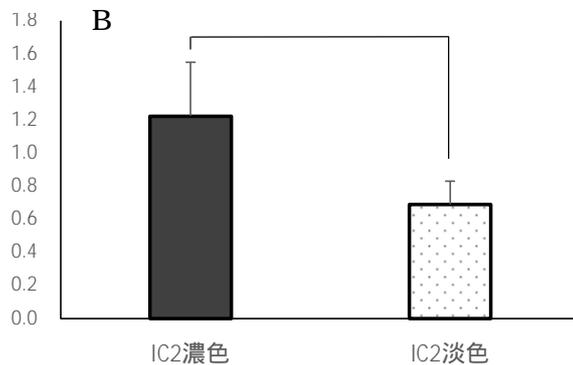
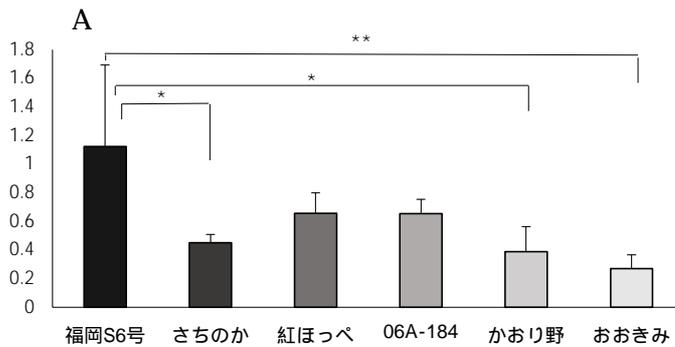


図2 F3H 遺伝子 isoform HQ_8407_1193 の発現量差 (A:親系統、B:IC2 個体群)

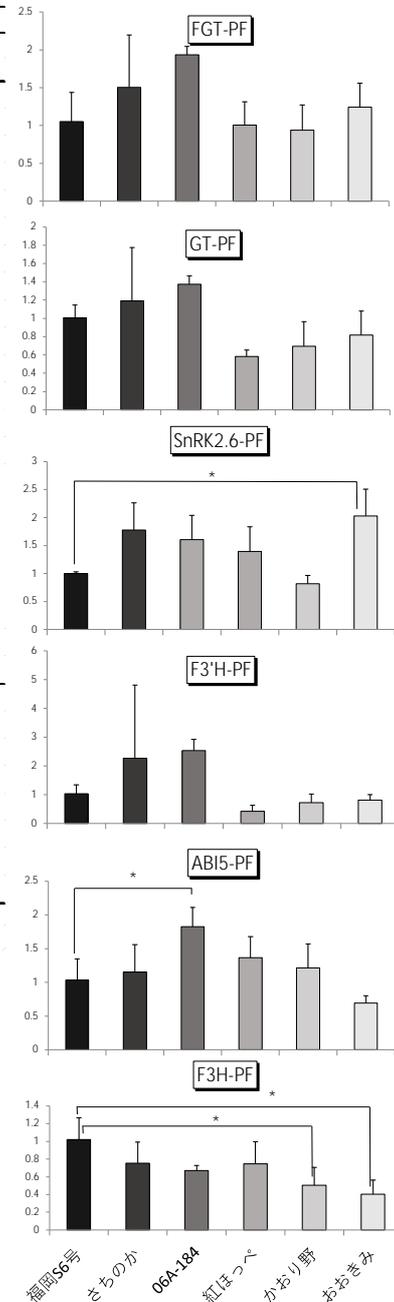


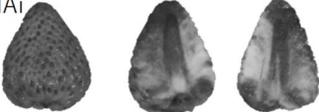
図1 多元交雑集団の親品種・系統におけるアントシアニン合成関連遺伝子発現量の品種間差

RNAi を用いた遺伝子ノックダウンによる機能解析

RNAi によるアグロインフィルトレーションを実施した対照区の果実は、培養 7 ~ 8 日目には果実表皮、内部ともに完全に赤く着色する個体が多かったが、F3H-RNAi 区では、果実表面や果肉部分が淡色あるいは白色化する割合が対照区と比べて有意に ($p < 0.01$) 高かった (表 3)。以上のことから、F3H 遺伝子はイチゴの果実色の品種間差を決める重要な遺伝子であることが示唆された。

F3H 遺伝子 isoform について、参照ゲノム配列に対する BLAST 解析で座乗染色体を調べたところ、第 1、6 染色体に座乗することが判明した (表 4)。

表 3 F3H-RNAi が果実の着色に及ぼす効果

試験区分 / 果実表面断面	供試 数	果実着色への影響 (%)		
		○	△	×
F3H-RNAi 	25	16	4	5
		64.0%	16.0%	20.0%
対照区 	21	3	4	14
		14.3%	19.0%	66.7%

着色変化 ○ 果皮果肉共に淡色もしくは白色化、果肉の1/3以上
△ 局所的に淡色もしくは白色化部分あり
× なし

F3H-RNAi区、対照区の○、×間に有意差有り ($p < 0.01, \chi^2$)

表 4 F3H遺伝子isoformのRNA-seqにおける発現量と座乗染色体

F3H-Isoform ID	リード数平均			blast 解析結果			
	福岡S6号	かおり野	おおきみ	麗紅FAN_r2.3		Camarosa v1.0	
HQ_sample8407_1193	6894	1795	2137	ch1X2	5.99	Fvb1-3	6.42
HQ_sample8407_683	1550	485	562	ch1X2	5.99	Fvb1-3	6.42
HQ_sample7906_1701	1224	355	66	ch6X1b	16.11	Fvb6-2	2.13

**：blast解析結果は、最も高いヒット率を示したサブゲノム名と物理位置(Mb)を示す。

以上から、本研究において栽培イチゴのアントシアニン合成系遺伝子のうち、F3H (*Flavanone 3-hydroxylase*) が品種間差に最も寄与する領域であることを明らかにできた。また F3H 遺伝子のアイソフォームのうち、栽培イチゴの果皮色の品種間差に最も寄与する isoform No.HQ_sample8407_1193 の座乗染色体が第 1 染色体であることを明らかにした。

しかし、GWAS で最も効果が高い FVES0380_305 などの SSR マーカーアンプリコンの座乗染色体は第 2 染色体であり、F3H isoform の座乗位置とは異なる結果となった。この理由としては、F3H の調節因子が第 2 染色体に座乗する可能性、果皮色に関する QTL は第 1 染色体 (FVES0795 など) にも検出されており、F3H はこのマーカーの近傍にある可能性、以上が考えられることから、今後さらに検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takuya Wada, Masao Tsubone, Miyuki Mori, Chiharu Hirata, Shiro Nagamatsu, Koichiro Oku, Soichiro Nagano, Sachiko Isobe, Hideyuki Suzuki, Katsumi Shimomura, Noriko Baba, Keita Hirashima, Takayuki Sueyoshi, Ko-ichi Obu, Hidetoshi Ikegami, Yosuke Uchimura, Tatsuya Hayashida	4. 巻 89
2. 論文標題 Genome-wide Association Study of Strawberry Fruit Quality-related Traits Using a MAGIC Population Derived from Crosses Involving Six Strawberry Cultivars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 553-566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuya Wada, Masao Tsubone, Miyuki Mori, Chiharu Hirata, Shiro Nagamatsu, Koichiro Oku, Soichiro Nagano, Sachiko Isobe, Hideyuki Suzuki, Katsumi Shimomura, Keita Hirashima, Hidetoshi Ikegami
2. 発表標題 Uncovering Genetic Regions Controlling Strawberry Fruit Color by Genome-Wide Association Study
3. 学会等名 Plant and Animal ASIA 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究分担者	磯部 祥子 (Isobe Sachiko) (20343973)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長 (82508)	

	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
連携研究者	森 美幸 (Mori Miyuki) (20502503)	福岡県農林業総合試験場・生産環境部・研究員 (87110)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	平田 千春 (Hirata Chiharu) (50514634)	福岡県農林業総合試験場・生産環境部・研究員 (87110)	
連携研究者	永松 志朗 (Nagamatsu Shiro) (50806883)	福岡県農林業総合試験場・生産環境部・主任技師 (87110)	

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