

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06017

研究課題名(和文) イワテヤマナシ遺伝資源を用いた香気関連遺伝子多型と香気成分多型の関連解析

研究課題名(英文) Association analysis between flavor contents and DNA polymorphisms of flavor related genes in Iwateyamanashi (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*)

研究代表者

片山 寛則 (KATAYAMA, HIRONORI)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50294202

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)：イワテヤマナシ果実の香気成分生成の分子メカニズムの解明が目的である。イワテヤマナシの‘ナツナシ’とニホンナシ‘幸水’の交配集団にて‘ナツナシ’の第2連鎖群にエチルエステル類のQTLが検出された。本課題にてQTL領域の構造決定のためにNGSでde novoアセンブリした。LG2にはエステル合成関連AAT遺伝子がタンデムに座乗していた。‘ナツナシ’由来の交配2集団(F1, BC1F1)と遺伝資源にて香気成分量との関連解析を行いPuAAT1、PuAAT2遺伝子を特定した。発現解析で両AAT遺伝子は機能しており、プロモーター活性を比較した。香りナシ選抜用に遺伝子近傍に11種類DNAマーカーを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

香りナシ育成の交配親として豊かな香りを持つイワテヤマナシに注目しており、すでに多様な香りを有する2集団を得ている。しかしナシの香りの分子メカニズムは不明である。本課題ではフルーティーな果実香気を有する‘ナツナシ’の第2連鎖群(LG2)に香気エステル合成の鍵酵素をコードする2個のAAT遺伝子を単離・同定した。発散香気がほとんど無いニホンナシ‘幸水’にもAAT遺伝子が存在しており、香りが弱い原因を解明すべく2個のAAT遺伝子の制御領域の活性を調査したが差異はなかった。現在、AATタンパク質の酵素活性を調査中である。香りナシ育種選抜用としてAAT遺伝子近傍の11種類のDNAマーカーを開発した。

研究成果の概要(英文)：To address the molecular mechanisms underlying fruit flavor synthesis in Iwateyamanashi germplasm, QTL for ethyl esters was mapped on LG2 in Iwateyamanashi using F1 population between Japanese pear 'Kousui' (*Pyrus pyrifolia*) and Iwateyamanashi 'Natsunashi' (*Pyrus ussuriensis*). On the basis of whole genome data for 'Natsunashi' and 'Kousui' by long read NGS, two AAT (alcohol acyltransferase AAT1 and AAT2) genes were located tandemly on LG2 of both. Allelic PuAAT1-2 and PuAAT2-2 genes were truncated and deleted from LG2 in 'Natsunashi'. Though single amino acid substitution and in/del were found in comparison of coding regions of PuAAT2-1 and PaAAT2-1, no mutation was detected between PuAAT1-1 and PaAAT1-1. After Iso seq analysis for 6 alleles, all constructs harbouring promoter regions connected with GUS reporter gene were active transiently in 'Kousui' fruit. Mutation detected by MdAAT1-19 marker in PuAAT2 was significantly associated with ester content in F1 and BC1F1 progenies.

研究分野：園芸科学 遺伝資源学

キーワード：香気関連遺伝子 イワテヤマナシ Alcohol Acyl Transferase QTL 香気成分 DNAマーカー NGS de novo アセンブル

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果物の香りは消費者の購買意欲を刺激する。ナシではセイヨウナシやチュウゴクナシは果実香気を有するものが多いが、ニホンナシ栽培品種では相対的に香りが弱い。研究代表者は香りを有するニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) を育成するための交配親として香り豊かなイワテヤマナシ遺伝資源 (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) を用いてきた。イワテヤマナシの中でも強い発散香気を有する‘ナツナシ’と香りが弱いニホンナシ‘幸水’のF1集団では多様な香りを有する個体が得られており、香り供与体としてのイワテヤマナシが注目されている。ナシ果実の香気合成に関する分子遺伝学的な知見を得るために本研究課題の前段として基盤研究C「香りナシ育種の展開を目指した香気関連遺伝子の同定」により‘ナツナシ’の第2連鎖群に多数のエチルエステルに対して複数年 QTL を見いだした。リンゴの先行研究においてこの領域にはエステル合成関連候補遺伝子 MdAAT1 (*Malus domestica* Alcohol Acyl Transferase 1) が座乗しており、‘ナツナシ’でも AAT1 遺伝子の存在が示唆された。QTL 領域近傍の SSR マーカーと‘幸水’X‘ナツナシ’のF1 個体でのエステル量に強い相関があり、エステル合成関連遺伝子の単離と同定を試みることで、香りナシ育種における DNA 選抜マーカーを開発すべく、本研究課題の遂行に至った。

2. 研究の目的

QTL が得られた‘ナツナシ’の第2連鎖群 (LG2) に座乗する AAT1 遺伝子の配列決定とゲノム構造を解析する。‘ナツナシ’と‘幸水’の AAT1 の配列比較により多型 (変異) を確認する。エステル系香気成分との関連 (アソシエーション) 解析により‘ナツナシ’ AAT1 遺伝子の機能部位を決定する。これまで AAT1 遺伝子多型の探索と香気成分との関連解析はリンゴで行われたが (Dunemann et al. 2012)、ナシ属では研究例が無いことから AAT1 遺伝子多型と香気の高多様性の関係に新たな結果をもたらす可能性が見込まれる。多重遺伝子族である‘ナツナシ’と‘幸水’由来の AAT1 遺伝子の Iso-seq による発現量を推定する。発現量を制御する因子を決定するために LG2 に座乗する AAT 遺伝子の制御領域 (プロモーター配列) および遺伝子の配列を比較して差異が見つかった場合はプロモーター活性や酵素活性を測定する。香りナシ育種で育成年限を短縮するために AAT1 遺伝子多型を指標とした選抜マーカー (MAS) を開発する。

3. 研究の方法

‘ナツナシ’第2連鎖群 (LG2) に座乗する AAT 遺伝子の配列決定とゲノム構造
‘ナツナシ’と‘幸水’の全ゲノム配列情報を得るために PacBio Sequel II ロングリード解析を行い、HGAP4 による de novo アセンブリ、AAT1 遺伝子予測、セイヨウナシゲノムを参照としたアノテーションを行う。

‘ナツナシ’、‘幸水’の LG2 で見つかった PuAAT1, PuAAT2, PpAAT1, PpAAT2 遺伝子とその対立遺伝子の合計 8 個の配列とエステル類の香気成分との関連解析を‘幸水’X‘ナツナシ’のF1 集団の 64 個体で行う。また‘筑水’X F1 選抜個体 (系統番号 K1701-25) の BC1F1 集団 100 個体、イワテヤマナシ遺伝資源でも関連性を確認する。

‘ナツナシ’、‘幸水’の LG2 で見つかった PuAAT1, PuAAT2, PaAAT1, PaAAT2 遺伝子とその対立遺伝子の合計 8 種類について発現量を Iso-seq 解析により推定する。AAT 遺伝子はナシゲノムに多数存在し、配列の相関性が高いことからショートリードによる RNA-seq 解析では各 AAT を区別できない可能性があるため Iso-seq による Nanopore ロングリード解析により、得られたリード数からおおよその発現量を推定する。

LG2 に座乗する AAT 遺伝子の発現量の制御因子を決定するために‘ナツナシ’、‘幸水’由来の 8 個 AAT 遺伝子のプロモーター領域 1kb を GUS のレポーター遺伝子 (pBI101-Hm) を結合したコンストラクトを作成する。‘ナツナシ’、‘幸水’完熟果実にて一過的な発現を起こさせる。またこれらの 8 個の遺伝子を大腸菌での発現ベクター (pGEX 6P-1) に組み込み、タンパク質を大量発現させ酵素活性を測定する。

香りナシ育種にて香りを有する個体の早期選抜のため AAT1 遺伝子多型を指標とした選抜マーカー (MAS) の開発と検証を行う。‘ナツナシ’、‘幸水’の SSR マーカーによる連鎖地図と AAT 遺伝子が座乗するコンティグ配列を参照に、SSR, SNP マーカー等を作成する。またマーカーの有用性を‘幸水’X‘ナツナシ’のF1、‘筑水’X F1 個体の BC1F1 の2 集団とイワテヤマナシ遺伝資源を用いて検証する。

4. 研究成果

‘ナツナシ’第2連鎖群 (LG2) に座乗する AAT1 遺伝子の配列決定とゲノム構造
‘ナツナシ’と‘幸水’の全ゲノム配列を読むために de novo アセンブリしたコンティグに対して予め PCR 法で単離していたゲノミック由来 gAAT 19 配列, cDNA 由来 cAAT 6 配列をクエリー配列としてアノテーションを行った。‘ナツナシ’には 25 個の AAT 遺伝子ファミリーが見つかった。そのうち LG2 には AAT 遺伝子が同一のコンティグ配列中に 47Kb 離れてタンデムに座乗して

おり PuAAT1-1, PuAAT2-1 (*Pyrus ussuriensis* AAT) と名付けた。またそれらの対立遺伝子座の PuAAT2-2 は欠失により偽遺伝子化しており、PuAAT1-2 は欠失していた。‘幸水’の PaAAT1-1, PaAAT2-1 (*Pyrus pyrifolia* AAT) も対立遺伝子座 PaAAT1-2, PaAAT2-2 とあわせて 4 個単離した (図 1) 。‘ナツナシ’、‘幸水’間の相同性は非常に高く PuAAT1-1 と PaAAT1-1 のコード領域の塩基配列は完全一致した。また PuAAT2-1 と PaAAT2-1 とは 1 アミノ酸のみ異なっていた。この 1 アミノ酸変異は AAT タンパク質の機能ドメイン内で生じていた。また AAT1 と AAT2 間では ‘ナツナシ’、‘幸水’ともに AAT1 の C 末端が 20 残基短かった。プロモーター領域でも変異があり PuAAT1-1 と PaAAT1-1 間では 1 塩基置換、PuAAT2-1 と PaAAT2-1 では 105bp の in/del が見つかった。これらの変異が ‘ナツナシ’ と ‘幸水’ での香気発現量の差異に関与している可能性が示唆された。

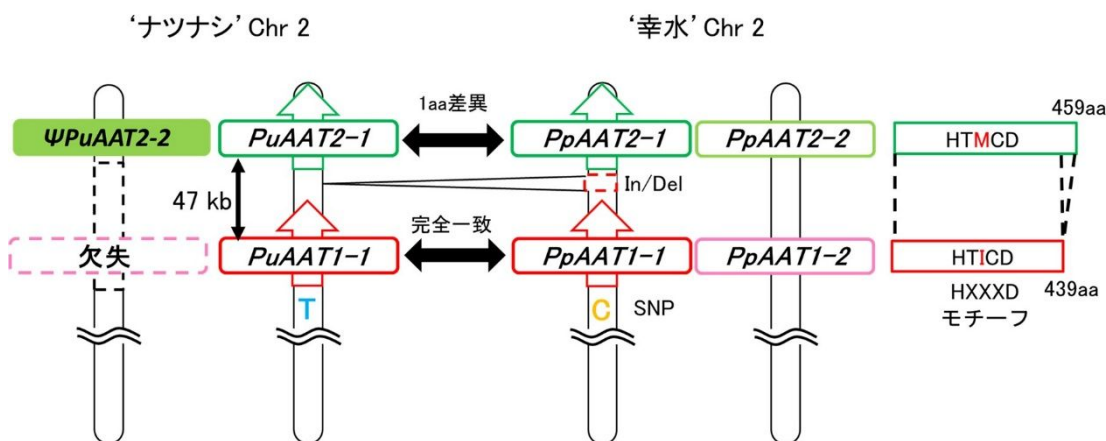


図 1. ‘ナツナシ’、‘幸水’の第 2 連鎖群に座乗する AAT 遺伝子

‘ナツナシ’ PuAAT1-1, PuAAT2-1 と ‘幸水’ 4 遺伝子の合計 6 個を比較して遺伝子型多型を探索した。PuAAT2-1 と PaAAT2-1 では 3 塩基 (1 アミノ酸残基) 異なるだけで、‘ナツナシ’ と ‘幸水’ 間での相同性は非常に高かった。AAT 遺伝子の酵素活性に関わるモチーフ配列中にアミノ酸並列の変異が生じており酵素活性低下の要因かと示唆された。しかし各遺伝子の相同性の高さとコピー数が多いことから 3 塩基の差異を検出する DNA マーカーをエクソン配列中に見いだせなかったため、イントロン領域にある変異を調査し、リンゴの MdAAT1-19 SSR マーカーの増幅部位が利用可能と判明した。このため MdAAT1-19 とエステル系香気成分量との関連解析を ‘ナツナシ’ と ‘幸水’ の F₁, BC₁F₁ の 2 集団にて試みた。F₁ では関連性は非常に高く、BC₁F₁ でも比較的高い差異があった (図 2)。またイワテヤマナシ遺伝資源 20 個体とニホンナシ 16 品種で確認したところ、‘ナツナシ’ と同様の変異 (PuAAT2-1/null) がイワテヤマナシ遺伝資源の 4 個体で見つかり、それらはエステル量が多かった。ニホンナシでは PuAAT2-1 をヘテロで持つ個体が 2 個体見つかったがエステルの産生量は低く PuAAT2-1 遺伝子の酵素活性のみの原因でニホンナシの香りが弱いとは断定できなかった。そこで予定外の プロモーター活性と酵素活性測定を追加した。

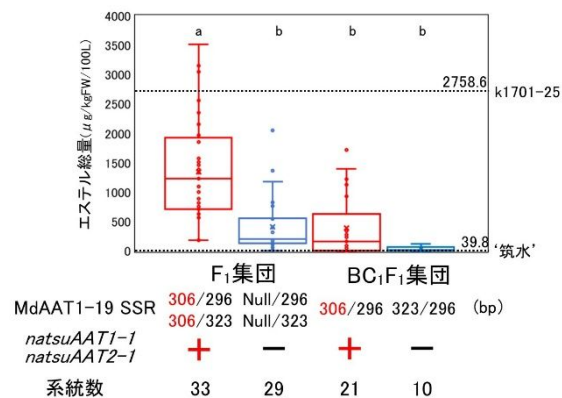


図 2. F₁, BC₁F₁ 集団における PuAAT1-1, 2-1 (306bp) を有する個体の分布図

AAT 遺伝子の Iso-seq による発現量の推定

‘ナツナシ’ と ‘幸水’ の LG2 に座乗する 6 個の AAT 遺伝子についてロングリード Iso-seq 解析を行い発現量を確認した。‘ナツナシ’ と ‘幸水’ 完熟果実由来の total RNA を MinION にてダイレクトシーケンスした。ダイレクトシーケンスデータを ‘ナツナシ’、‘幸水’ ゲノム由来の全コンティグをリファレンスとして Minimap2 (Galaxy) でマッピング、String Tie (Galaxy) によりカウント後 TPM 正規化した。PuAAT1-1, PuAAT2-1, PpAAT1-1, PpAAT1-2, PpAAT2-1 は発現していたが、PpAAT2-2 は発現がほとんど無かった。‘ナツナシ’ の PuAAT1-1, PuAAT2-1 と ‘幸水’ PpAAT1-1, PpAAT2-1 が発現していたことから ‘幸水’ のエステル香気成分量の低発現の主因が PpAAT1, PpAAT2 遺伝子の発現量低下にあるとは考えにくかった。今回はゲノム中に AAT 遺伝子のコピー数が多く、また配列の相同性が高いことからロングリード Iso-seq 解析により発現量を推定したが、ショートリードの RNA-seq の様な発現量を統計処理できるツールが Iso-seq で開発されておらず発現量の正確な統計データが得られなかった。植物の多重遺伝子族を発現解析する上での今後の課題であろう。

AAT 遺伝子発現の制御因子

LG2 に座乗する AAT 遺伝子発現の制御因子を決定するために、‘ナツナシ’、‘幸水’由来の 6 個 AAT 遺伝子のプロモーター領域 1kb と GUS のレポーター遺伝子 (pBI101-Hm) を結合したコンストラクトを作成して、‘ナツナシ’、‘幸水’完熟果実にて一過的な発現を起こさせた。‘幸水’の完熟果実で 6 個のプロモーター配列全て GUS 活性が同程度に得られた (図 3)。PpAAT1-1, PpAAT1-2, PpAAT2-1, PpAAT2-2 遺伝子のプロモーター領域の変異が‘幸水’のエステル香気成分量の低発現の主因では無いと考えられた。次に‘ナツナシ’、‘幸水’由来の 6 個の AAT 遺伝子のタンパク質を大腸菌にて大量発現させた。現在大腸菌からタンパク質を精製中である。簡易法として大腸菌を培養した液体培地にアルコールを投与し、大腸菌内因性アシル CoA により縮合反応を起こさせ、エーテル産生の有無を確認したところ Iso-seq による発現量解析データとほぼ矛盾しない結果が得られている。リンゴでは LG2 の MdAAT1 遺伝子の酵素活性の差異が香気成分量に参与していることが報告されており、今回の結果はリンゴとは異なるメカニズムの存在を示唆している。今後、大腸菌由来の精製タンパク質による酵素活性測定や基質特異性の調査等の更なる解析を行う予定である。

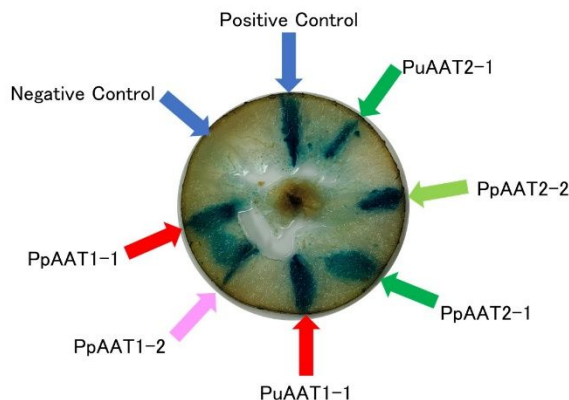


図 3. AAT のプロモーター活性を確認するため‘幸水’果実で一過的に発現した GUS 遺伝子

AAT 遺伝子多型を指標とした選抜マーカー (MAS) の開発

AAT1, AAT2 遺伝子型多型を指標とした選抜マーカー (MAS) の開発と検証を行った。‘ナツナシ’で QTL が得られた 2 種類の SSR マーカー内部の AAT1, AAT2 遺伝子を含む約 153kb 領域に 8 個の SSR マーカー、1 個 SNP マーカー、1 個の in/del マーカー、1 個の T-stretch マーカーを作成した (図 4)。特に AAT2 遺伝子のイントロン領域に座乗する MdAAT1-19 マーカーは PCR 増幅が可能なため有望である。このためマーカーとエステル量の相関を‘幸水’ X ‘ナツナシ’の F1 64 個体、‘筑水’ X F1 個体の BC1F1 31 個体の 2 集団で調査した。その結果、‘ナツナシ’の遺伝子型 (PuAAT1-1, PuAAT2-1) を有する個体はエステル量が多いことが分かり、MAS マーカーとしての利用が期待される。PuAAT1-1, PuAAT2-1 は常に連鎖しておりどちらか一方の効果が分かる分離個体は得られておらず、今後の課題である。さらにイワテヤマナシ遺伝資源では‘ナツナシ’と遺伝子型が一致する個体が数個体見つかり、これらの香気成分量を調査中である。また二ホンナシ 16 品種で遺伝子型が一致した品種は‘八雲’、‘赤穂’のみと少なかった。

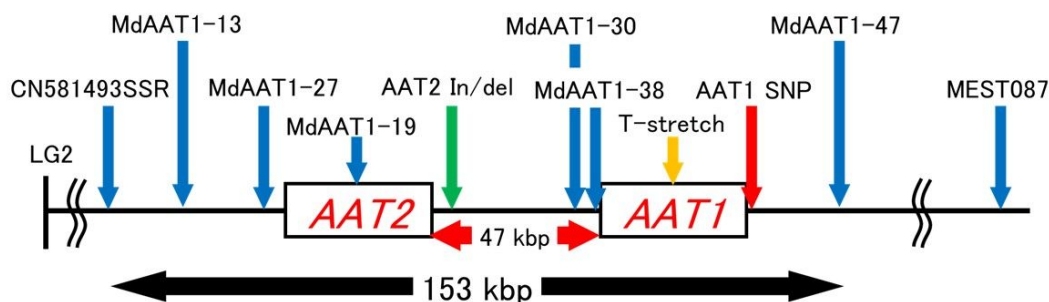


図 4. ナシの AAT1, AAT2 遺伝子近傍における 11 個の DNA マーカー
Md はリンゴ由来の SSR マーカー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 片山寛則	4. 巻 76
2. 論文標題 個性豊かなイワテヤマナシ在来品種（後編）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 果実日本	6. 最初と最後の頁 18-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 片山寛則	4. 巻 76
2. 論文標題 個性豊かなイワテヤマナシ在来品種（前編）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 果実日本	6. 最初と最後の頁 28-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 片山寛則	4. 巻 68
2. 論文標題 暮らしを支えた東北の果実「イワテヤマナシの保全と利用」	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 水の文化	6. 最初と最後の頁 12-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 片山寛則	4. 巻 64
2. 論文標題 総説： 新規ナシ遺伝資源としてのイワテヤマナシ； 保全と利用の両立を目指して	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 作物研究，	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18964/jcr.64.0_1	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片山寛則
2. 発表標題 ナシの官能評価と成分分析による香気プロファイリングとDNAマーカーの開発
3. 学会等名 園芸学研究第20巻別2, p44-45. 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部哲士, 鈴木光宏, 大原朋花, 岸本祐子, 國久美由紀, 保坂ふみ子, 辻野希, 吉田康子, 高田教臣, 齋藤寿広, 山本俊哉, 片山寛則
2. 発表標題 ニホンナシXイワテヤマナシ交雑集団における香り関連遺伝子に連鎖するDNAマーカーの開発
3. 学会等名 園芸学研究第20巻別1
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本祐子, 関本陽介, 保坂ふみ子, 上野真奈, 山本俊哉, 吉田康子, 齋藤寿広, 名田麻希子, 片山寛則
2. 発表標題 ナツナシにおいて香気成分のQTLを示した領域へのAAT (alcohol acyl transferase) 遺伝子のマッピング
3. 学会等名 園芸学研究第18巻別1
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋亮太, 布山郁恵, 齋藤寿広, 金沢功, 藤井美穂, 山本俊哉, 片山寛則
2. 発表標題 官能評価・機器分析によるニホンナシおよびナシ遺伝資源の果実香気特性プロファイリング
3. 学会等名 園芸学研究第18巻別1
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

リサーチマップ https://researchmap.jp/HironoriKatayama 神戸大学農学研究科附属食資源教育研究センターのホームページ http://www.edu.kobe-u.ac.jp/ans-foodres/b_03_edu_03.html 神戸大学研究者紹介システム https://kuid-rm-web.ofc.kobe-u.ac.jp/profile/ja.7c1727994825ce4d520e17560c007669.html
--

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
---------	---------