

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15832

研究課題名（和文）カキ小果変異体に着目した果実サイズ制御機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of fruit size control with a focus on a persimmon small fruit mutant

研究代表者

西山 総一郎（Nishiyama, Soichiro）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50827566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、果実の商品価値を決定する重要な要素の一つである果実サイズについて、カキの主要栽培品種である九倍体「平核無」から生じた小果変異を対象に、ゲノミクスと果実生理の側面から解析した。今回対象とした小果変異体は、細胞サイズに違いはないが、細胞数が極めて少ない。開花期前後の子房組織の発達特性やトランスクリプトームを詳細に調査した結果、器官発達の速度が果実サイズと関連している可能性が示された。ゲノムデータも合わせ、「平核無」のゲノム特性や、小果変異の果実成熟に対する多面発現のメカニズムと起源を推定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果樹における果実サイズは主要な育種対象の一つであり、これを自在に操ることは育種・栽培に関わる者の悲願である。本研究では、園芸学上重要な果実サイズ多様性の基盤となる分子メカニズムの一端を明らかにした。果樹作物において果実サイズの制御メカニズムが明らかにされた例は極めて限られており、本研究の成果は重要である。また、本研究では、小果変異を制御する有力な候補遺伝子や、エピジェネティック制御と思われる新たな果実サイズ変異体を見出しており、今後この解析を通して果実サイズの人為改変に向けた新たな知見が得られると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed fruit size, an important factor that determines the commercial value of fruits, from the aspects of genomics and fruit physiology of a small fruit mutant that arise from a nonaploid persimmon 'Hiratanenashi'. The small fruit mutant has no difference in cell size from the original, but have very fewer cells in fruit. Detailed examination of the transcriptome and developmental characteristics of ovary tissues before and after flowering indicated that the organ development speed may be related to fruit size. Combined with genomic data, we were able to infer the genomic characteristics of the main cultivar 'Hiratanenashi' and the mechanism and origin of the pleiotropic effect of small fruit mutations on fruit maturation.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 ゲノム 倍数体 トランスクリプトーム 果実発達

1. 研究開始当初の背景

果樹作物は、植物にとっての生殖器官である果実を食用とし、そのサイズに多様性を示す。果実サイズの多様性は、種子散布における役割に加え、人間の活動に有益であったと考えられており、消費とともに進化してきた産業上重要な性質であると言える。その機構と進化を研究するには作物種を扱う必要があるが、遺伝的に異なる果実サイズの制御が果樹作物で解明された例は非常に限られている状況にある。研究代表者らは、カキの九倍体品種‘平核無’から、極めて小さな果実を着果する変異体‘突核無’と、変異体から生じる複数の自然復帰変異体を見出している。変異体‘突核無’の果実自体にも、その希少性と果実品質から商業価値があり、変異の生じたメカニズムは基礎研究と育種応用の両面で高いインパクトがある。本研究ではこれを材料に、果実サイズの制御機構解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究ではカキの九倍体品種‘平核無’から生じた小果変異を対象に果実サイズの制御メカニズムについて研究した。器官サイズの主要な決定要因は、細胞数と細胞サイズである。変異体‘突核無’は細胞サイズにほとんど変化がないが、細胞数が少なく (Yamane ら, 2008)、またサイトカイニン処理により元品種と同程度のサイズに回復することが明らかになっている (Habu ら, 2016)。一方で、カキは高次倍数性であり、対象品種は九倍体で後代も作出できないことから、遺伝解析には困難がある。本研究では、果実サイズの制御についての知見を得るために、ゲノミクスとトランスクリプトミクスの観点から、小果変異を解析した。

3. 研究の方法

(1) ‘突核無’および復帰変異体の生長解析

これまでに研究代表者らは、‘突核無’の栽培中に複数の復帰変異体 (枝変わり) を見出している (第1図)。またこの復帰変異は、枝変わりごとに果実サイズの復帰程度にばらつきが認められている。そこで、本研究ではまず‘突核無’および復帰変異体の栄養生長および生殖生長を調査した。特に顕著な差が表れる果実サイズについては、複数年にわたって調査した。また、特に開花期付近のステージについて、‘突核無’および復帰変異体の子房の発達を調査した。

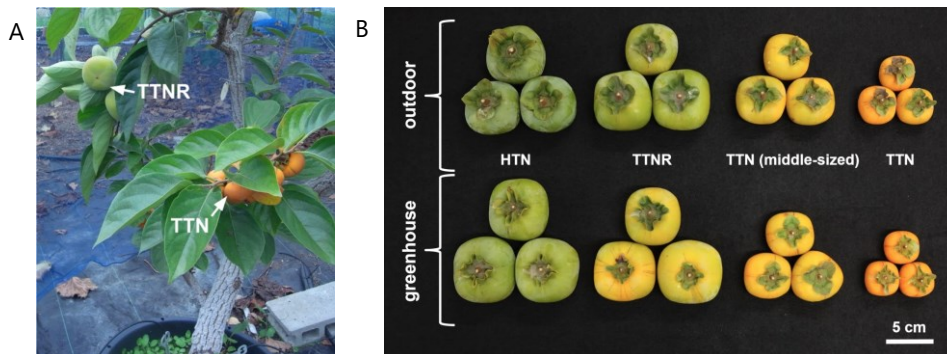
(2) ‘平核無’由来小果変異に関する子房組織の経時的なトランスクリプトーム解析

ここでは、‘平核無’、‘突核無’、復帰変異体の開花期の子房組織 (ステージ s1-s5) を採取し、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq データを Hiseq4000 SE50 により取得し、カキの二倍体近縁種である *Diospyros lotus* の reference CDS (Akagi et al, 2020) にマップした。全体の発現傾向を探るために R の prcomp を用いて主成分分析 (PCA) を行うとともに、DESeq2 を用いて FDR<0.01 の条件で発現変動解析を行った。得られた発現変動遺伝子は、そのアノテーション情報を用いて GO enrichment 解析を行った。3つの遺伝子型のうち、それぞれの比較で共通して得られる enriched GO term に着目し、その機能と、果実サイズの差異をもたらすメカニズムについて考察した。

(3) ‘平核無’変異体群の全ゲノムシーケンス解析

カキの主要品種である九倍体‘平核無’は、その枝変わりも含めて、日本のカキ生産の約4割を占める重要な品種である。長期にわたる栽培の結果、‘平核無’から早生品種の‘刀根早生’や、大果品種の‘大核無’など、複数の枝変わり品種が生じており、これらも重要な経済品種として

栽培されている。ここでは、京都大学附属京都農場植栽の‘平核無’ 2 樹、‘刀根早生’ 2 樹、‘大核無’ 1 樹から葉を採取した。加えて、京都農場で独立に観察された 2 つの‘突核無’ 復帰変異個体を用い、復帰変異が見られた箇所隣の隣り合う枝から‘突核無’ と復帰変異体の葉を採取した。合計 9 個体の葉より DNA を抽出し、NovaSeq6000 で 150bp x 2 のシーケンスを行い、九倍体ゲノムの 20 倍以上のデータを得た。kmc3 (Kokot et al 2017) を用い、k = 31 または k = 45 でライブラリごとの kmer をカウントした。kmersGWAS (Voichkek and Weigel 2019) を用い、個体同士の近縁性を算出した。minimum kmer count は 5 とし、すべての多型を考慮するため minor allele frequency の閾値は設定しなかった。

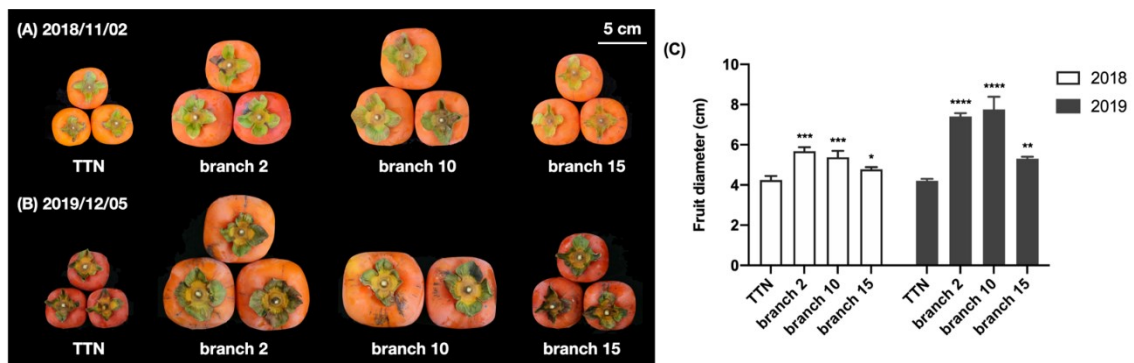


第 1 図 小果変異体‘突核無’の果実形態とそれに生じた復帰変異体 (A) 同一樹に着生する‘突核無’ と復帰変異体 (B) ‘突核無’ 成熟期の果実外観の比較。HTN: ‘平核無’、TTN: ‘突核無’、TTNR: 復帰変異体

4. 研究成果

(1) ‘突核無’ および復帰変異体の生長解析

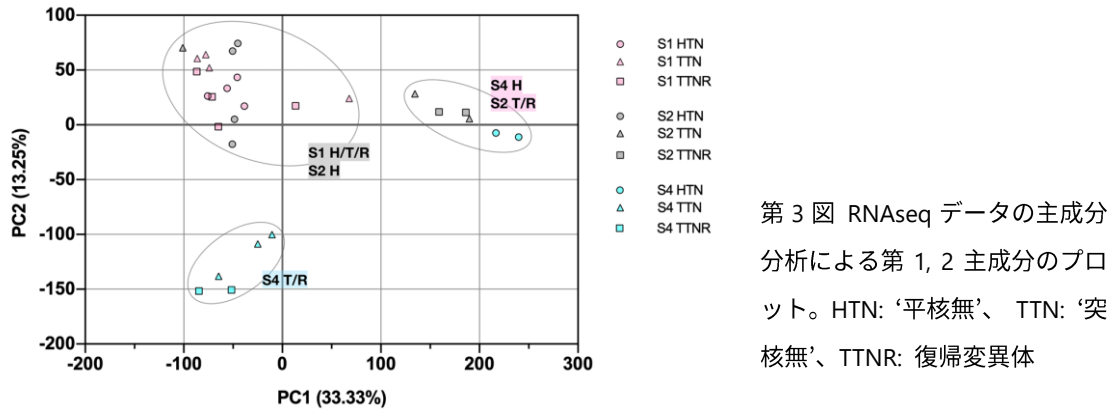
復帰変異体には果実サイズの復帰程度にばらつきがみられ、元品種‘平核無’と同程度の大きさを示すものから、‘突核無’と‘平核無’の中間程度のサイズを示すものまで見られた。復帰の程度に関わらず、果実サイズは複数年の調査で安定していた (第 2 図)。すなわち、中程度の復帰変異体は複数年にわたって‘突核無’と‘平核無’の中間程度のサイズを示した。したがって、今回着目している復帰変異の果実サイズは遺伝要因によって制御されていることが示された。また、‘突核無’は、小果形質に加えて、‘平核無’よりも葉面積が小さく、新梢の節間長が短い性質を示すが、これらについても復帰変異体は‘平核無’と同程度の値を示した。



第 2 図 小果変異体 ‘突核無’ と復帰変異体の果実サイズの年次変動 (A) 2018 年成熟期の果実 (B) 2019 年成熟期の果実 (C) 成熟期の果実直径

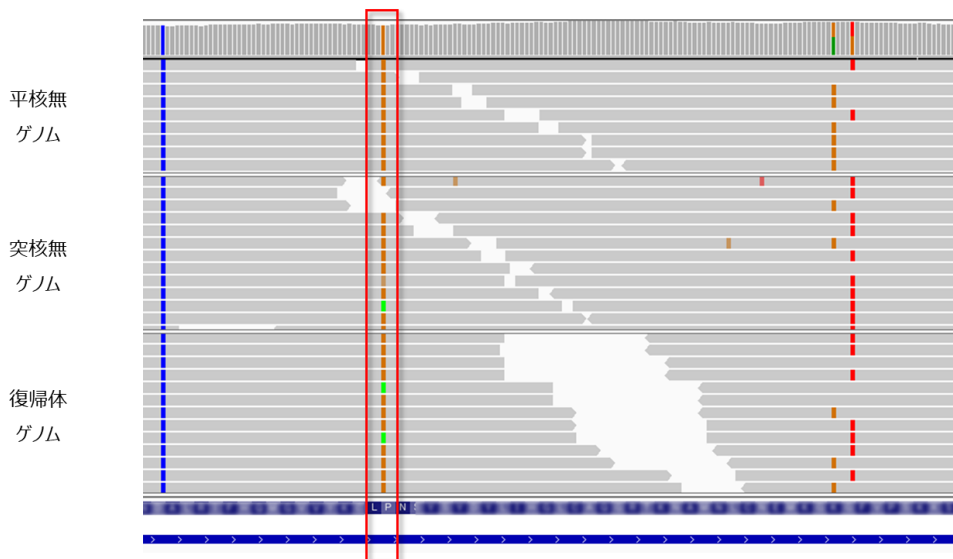
(2) ‘平核無’由来小果変異に関する子房組織の経時的なトランスクリプトーム解析

主成分分析の結果、各サンプルは採取時期・遺伝子型によりクラスターを形成し、発達ステージによるグループ分けが可能であった（第3図）。復帰体は予想と反し‘突核無’とクラスターを形成した。系統間の発現変動解析では、“mitotic spindle assembly checkpoint”を含む、細胞分裂関係のGO termのエンリッチメントがみられた。これは、‘突核無’は細胞数が少ないという既報（Yamaneら, 2008）と一致していた。以上の結果をまとめると、‘突核無’は開花前の段階から‘平核無’よりも速くステージが進行しており、発達スピードまたは期間の差異が小果変異をもたらすという可能性が示唆された。これは、組織観察結果や、観察された開花・成熟期の差異からも支持された。



(3) ‘平核無’変異体群の全ゲノムシーケンス解析

ゲノムデータを用いた枝変わり群のクラスタリングの結果、‘突核無’は他の枝変わり群と異なるグループを形成した。‘突核無’は‘刀根早生’や‘大核無’よりも新しい枝変わり群であることから、‘突核無’に生じた変異は変異速度に影響を与える可能性が考えられた。すべてのkmerのうち、‘突核無’と‘平核無’のみが有しているものは3,450であったが、‘突核無’と‘刀根早生’のみが有しているものは18のみであった。‘平核無’に特異なkmerは検出されなかったことから、枝変わり群の起源が‘平核無’であることが確認できた。



第4図 小果変異候補多型の同定

赤枠で示した変異は非同義置換をもたらす。リファレンスは *D. lotus* genome.

‘突核無’は‘平核無’から枝変わりにより生じたと報告されているが、熟期の早生化もみられることから、‘刀根早生’由来である可能性も示唆されていた。本研究をまとめると、‘突核無’は‘刀根早生’とは独立に生じた変異体であり、‘突核無’の変異は果実発達に影響することで果実サイズと早生性に多面発現することが示唆された。このことは、トランスクリプトーム解析よりもたらされた果実サイズ制御メカニズムに関する仮説とも矛盾しない。

ショートリードデータを基に、kmer 比較により品種特異的多型を検出した（第4図）。枝変わり品種特異的多型はゲノムワイドに分布していた。‘突核無’と復帰体に特異的な kmer を有するゲノムリードをアセンブルし、反復配列を取り除いたのち、‘突核無’ RNAseq データがマップされるコンテイングを5つ同定した。この中には、ホモロジー検索に基づくと、果実サイズを制御できるとされる有力な候補が含まれていた。現在これらの遺伝子の機能解析の準備を行っており、今後の解析によって詳細な機構を明らかにできるものと思われる。

<引用文献>

Yamane, H., Ichiki, M., Tao, R., Esumi, T., Yonemori, K., Niikawa, T., & Motosugi, H. (2008). Growth characteristics of a small-fruit dwarf mutant arising from bud sport mutation in Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *HortScience*, 43: 1726-1730

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 0件）

1. 著者名 Sheng Wang, ChunLai Tam, Ippei Naito, Soichiro Nishiyama, and Ryutaro Tao	4. 巻 -
2. 論文標題 Frequent reversion and continuous size variation of a small fruit mutant 'Totsutanenashi' persimmon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sheng Wang・ChunLai Tam・Soichiro Nishiyama・Ryutaro Tao
2. 発表標題 Transcriptome Analysis on Fruit Size Control in 'Totsutanenashi' Persimmon
3. 学会等名 3rd Asian Horticulture Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山総一郎・王盛・田尾龍太郎
2. 発表標題 九倍体カキ'平核無'とその枝変わり群の系統分化
3. 学会等名 育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山総一郎・Sheng Wang・ChunLai Tam・田尾龍太郎
2. 発表標題 カキ'平核無'に生じた小果変異の起源と多面発現
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山総一郎・尾上典之・河野淳・佐藤明彦・米森敬三・田尾龍太郎
2. 発表標題 カキの果実発達を制御する遺伝子発現ネットワーク
3. 学会等名 園芸学会
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
研究協力者	内藤 一平 (Naito Ippei)		
研究協力者	王 盛 (Wang Sheng)		
研究協力者	譚 俊禮 (Tam ChunLai)		

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