

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05515

研究課題名（和文）雌性花率を決める遺伝子からニガウリ属の性決定の多様性を解明する

研究課題名（英文）Elucidation of Momordica sex determination system from genes for sex ratio

研究代表者

松村 英生（Matsumura, Hideo）

信州大学・学術研究院総合人間科学系・教授

研究者番号：40390885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、雌雄同株異花（同一個体に雌性花と雄性花）と雌雄異株（雌雄が別個体）の種を有するニガウリ属における性決定様式に関わる遺伝子同定を目的として、ニガウリの交雑後代のゲノム解析（QTL-seq）により雌性花率、雄性型形質を決める遺伝子座の同定を行った。加えて雌雄異株のナンバンカラスウリ（*M. cochinchinensis*）の全ゲノム配列解析を行い、ニガウリにおける性決定関連遺伝子が位置するゲノム領域とゲノム構造が保存されている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物にとって生殖様式は種の維持および環境への適応において重要であると共に、農作物では果実や種子の生産、交配による品種育成において重要な形質である。ニガウリを含むウリ科作物の多くは雌雄同株異花の種であるが、ニガウリ属には雌雄異株の種があり、進化の過程で雌雄異株から雌雄同株異花へ複数回の転換が生じたと言われている。このようなニガウリ属にユニークな性決定様式転換の機構の解明は性決定の進化の解明に寄与する。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aimed at finding genes for sex determination in *Momordica* species, which include both monoecious and dioecious species. For this purpose, QTLs for sex ratio, including androecy, were identified by using QTL-seq analysis of bitter melon F2 population. Additionally, whole genome sequencing was carried out for *M. cochinchinensis* as the dioecious *Momordica* species, and its synteny with bitter melon genome was found in one of the QTLs for sex determination.

研究分野：育種学

キーワード：性決定 雌雄同株異花 ニガウリ *Momordica* 雌性花率

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物にとって生殖様式は種の維持および環境への適応において重要な形質である。高等植物では自殖により効率的な種子生産が可能な両性花を保有する両全性の種が 90%を占めているが、残りの植物種は雌雄異株、雌雄同株異花など多様な生殖様式を示す。それらは生育環境に適応した結果であると考えられ、性(雌雄)決定の遺伝的機構は高等植物の進化を知る上でも、また農作物における種子や果実の生産量の遺伝的改良においても重要な知見である。

本研究の材料であるニガウリ (*Momordica charantia*) を含むウリ科作物の多くは雌雄同株異花(同一個体に雌性花と雄性花)の表現型を示す。既にメロンやキュウリではエチレン合成関連遺伝子が性決定遺伝子として同定されており、それらはニガウリを含むウリ科作物全般で保存されていると考えられる。一方でニガウリ属 (*Momordica* 属) の植物種には雌雄同株異花とナンバンカラスウリ (*M. cochinchinensis*) などの雌雄異株の種が知られており、Schafer ら (2010) は進化の過程で雌雄異株から雌雄同株異花へ複数回の転換が生じたと推測している。

一般に雌雄同株異花から雌雄異株へという方向への進化は他の植物種でも推測されているが、その逆方向の転換がどのような遺伝的機構で生じるのかは不明である。このような「性決定様式の転換機構」はニガウリ属に限った事象かもしれないが、高等植物における性決定様式と環境への適応を明らかにする上で非常に興味深い学術的な「問い」と考えた。

2. 研究の目的

ニガウリ属における性決定様式の転換機構(関与する遺伝子の同定)の解明が最終的な研究目標であるが、ニガウリ (*M. charantia*) 種内で見られる雌性花率あるいは雄性花率を高める遺伝子が鍵になると想定し、それらの雌雄比率を決める遺伝子座の同定を目的とした。またニガウリ属における雌雄異株種の *M. cochinchinensis* における性決定機構解明へ向けた基盤となる全ゲノム配列の解読とニガウリゲノムと比較した保存領域の探索も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複数の F₂ 集団を用いたニガウリ雌雄比率 QTL の同定

ニガウリ雌性型系統 (OHB61-5) と OHB95-1A、OHB61-2 および OHB1-1 との F₂ 集団を用い、高雌性花率を示す複数個体と低雌性花率を示す複数個体のゲノム DNA をプールしてゲノムシーケンス解析を行う QTL-seq 解析を実施する。この解析により検出した QTL に位置する候補遺伝子を両親間多型のデータおよびニガウリ組織の RNA-seq 解析による遺伝子発現データを用いて絞り込んだ。

(2) 複数の F₂ 集団を用いたニガウリ、雄性型遺伝子座の同定

上記(1)で使用した F₂ 集団から雄性型(雌性花率 <3%)を示す個体を選抜し、それらのゲノム DNA をプールしたゲノムシーケンス解析を行う。そのデータと(1)における各 F₂ のバルクシーケンスデータを用いて QTL-seq 解析を行い、雌性型、雄性型に関わる遺伝子座を同定する。

(3) 雌雄異株の *M. cochinchinensis* の全ゲノム配列解析とニガウリゲノムとの比較解析

ナンバンカラスウリ (*M. cochinchinensis*) は富山大学薬学部薬用植物園より雌株、雄株の各個体の葉を採取した。雌株の葉より NucleoBond HMW(タカラバイオ)を用いて >20kbp の高分子 DNA を抽出し、ナノポアシーケンスにより受託解析を実施した。また雌株、雄株の葉から DNeasy Plant mini (キアゲン)を用いてゲノム DNA を抽出し、KAPA Hyper plus キット(ロシユ)により作成したライブラリを DNBseq G-400 によるショートリードシーケンスを行った。ナノポアシーケンスデータは、Flye および NECAT による *de novo* assemble を行い、contig 作成を行った。また雌雄各個体のショートリードシーケンスデータは jellyfish によるゲノムサイズ推定に供試した。

4. 研究成果

(1) 複数の F₂ 集団を用いたニガウリ雌雄比率 QTL の同定

ニガウリ雌性型系統 OHB61-5 と OHB95-1A、OHB61-2、OHB1-1 との交雑後代である F₂ 集団における各個体の雌性花率から低雌花率、高雌花率の個体を選抜した。まず OHB95-1A との F₂ については 160 個体ずつの集団を 2 年間で形質調査を行っており、そのデータをもとに各集団で独立に低雌花率、高雌花率のバルクを作成して全ゲノムシーケンスに基づく QTL-seq 解析を行なった。その結果、第 2 染色体、第 5 染色体に有意な QTL を検出し、その位置は 2 つの集団でほぼ同一であった。第 5 染色体では >数 Mbp に渡る幅広い領域の SNP-index 値が有意水準を超えていたため、複数のマイナーな QTL が分布している可能性が示唆された。各 QTL 領域の予測遺伝子と多型情報、さらに雌雄両花芽における RNA-seq 解析を実施して発現遺伝子情報も取得し、そ

れらを統合することで QTL 領域で非同義置換を伴う発現 遺伝子を絞り込んだ。さらにそれら遺伝子産物の推定機能を BLAST により検索すると共に非同義置換がモチーフ、ドメイン内にあると推定される 9 個の候補遺伝子を選抜した。その結果、第 5 染色体の QYL 領域において 4 つの L-type Lectin Receptor kinase (L-type LecRK) 遺伝子において両親系統間の複数の非同義置換が見出され、そのうち 2 遺伝子は lection ドメイン内、1 遺伝子は kinase ドメイン内に非同義置換が見られた。L-type LecRK 遺伝子について植物の性決定や生殖器官の形成に直接に関わる機能の報告は無いが、ウリ科植物の性決定の鍵となるエチレンジグナリングに關与する報告がある (He et al., 2004)。これらの詳細な結果およびデータについては、Karube et al., 2023 (<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112330>) に掲載されている。

さらに、OHB61-5x OHB61-2 及び OHB61-5xOHB1-1 の各 F₂ 集団について QTL-seq を利用した雌性花率に関する QTL の同定を行なった。上記と同様に、これらの F₂ 集団では OHB61-5 が有する 劣性の雌性型遺伝子影響が強いため雌性花率が 100%を示す個体と<5%を示す個体を除いた中で高雌性花率を示す個体と低雌性花率を示す個体を 15-20 個体ずつ選抜して DNA をバルク化したサンプルを解析に用いた。各バルクサンプルと両親系統の全ゲノムシーケンス解析を行い、QTL-seq pipeline (Takagi et al., 2013) を用いて解析した結果、OHB61-5xOHB61-2 においては第 1 および第 11 染色体に、OHB61-5x OHB1-1 においては第 6 及び第 9 染色体上に有意な SNP-index を示す箇所が各々 1 箇所ずつ検出された (図 1)。これらは各集団における雌性花率 QTL と推測されるが、以前に OHB61-5x OHB95-1A の F₂ 集団を用いた解析で得られた雌性花率 QTL とは異なる箇所が検出されたことからニガウリについては多様な雌性花率 QTL が存在し、それらはアリル及び遺伝子座間の相対的な組合せで表現型を示す可能性が考えられた。

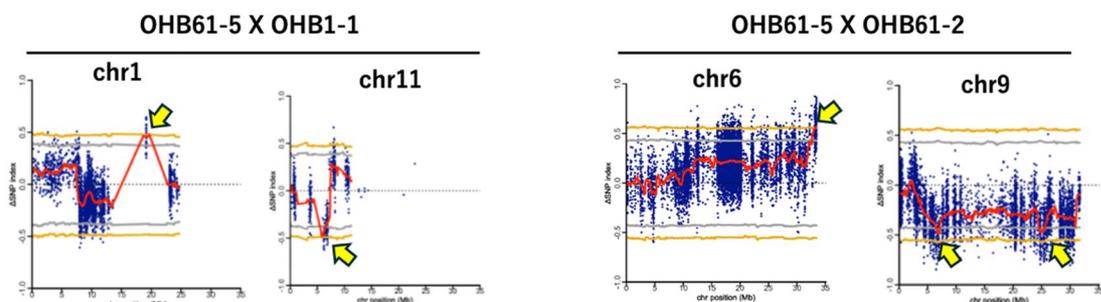


図 1 OHB61-5x OHB1-1(左)及び OHB61-5xOHB61-2 (右) の F₂ 集団を用いた雌性花率の QTL-seq 解析の結果。矢印が有意な SNP-index を示した箇所。

(2) 複数の F₂ 集団を用いたニガウリ雄性型遺伝子座の同定

QTL-seq 解析に供試したニガウリ雌性型系統 OHB61-5 と混性型系統 OHB61-2 および OHB1-1 との交雑後代である 2 つの F₂ 集団における雌性花率データをもとに、0-5%の雌性花率を示す個体を「雄性型」個体として各集団からピックアップした。これら「雄性型」個体のゲノム DNA をプールし、DNBseq による全ゲノムシーケンス解析を行った。このシーケンスデータと前年度に解析したそれ以外の雌性花率のバルクゲノムシーケンスデータを用いた QTL-seq 解析により「雄性型」形質を支配する QTL の同定を試みた。

QTL-seq pipeline (Sugihara et al., 2022) を用いた解析の結果、OHB61-5 x OHB61-2 の F₂ 集団では第 1 と第 4 染色体、OHB61-5 x OHB1-1 の F₂ 集団では第 1 と第 7 染色体に有意とは判定できないものの偏った SNP-index を示す領域が検出された (図 2)。第 1 染色体の検出箇所は両 F₂ 集団ともほぼ同一の箇所であるとともに以前に同定していた雌性型遺伝子座の座乗位置とほぼ一致した (Matsumura et al., 2014, 2020)。従って同一ないしは非常に近傍に雌性型と雄性型に關与する遺伝子の存在が推定される。

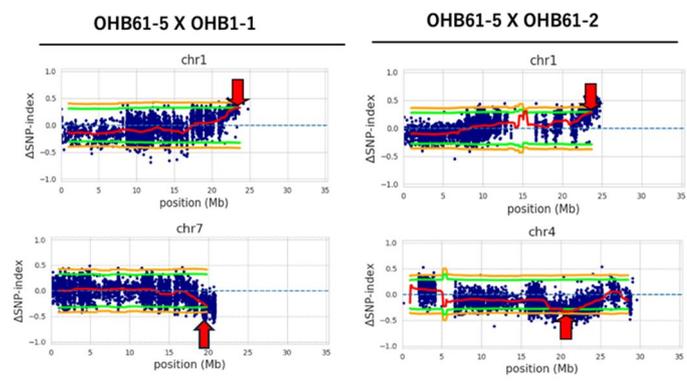


図2 OHB61-5x OHB1-1(左)及びOHB61-5xOHB61-2(右)のF₂集団を用いた雄性型形質の(<3%) QTL-seq解析結果。矢印が有意な SNP-indexを示した箇所。

(3) 雌雄異株の *M. cochinchinensis* の全ゲノム配列解析とニガウリゲノムとの比較解析

ニガウリ属において雌雄異株の表現型を示すナンバンカラスウリについて雌雄の各個体の分譲を受けて雌株についてナノポアシーケンスによる全ゲノムシーケンス解析を実施した。51GbのシーケンスデータからNECATによる *de novo* アッセンブルを行ったところ全長658,8Mb、N50=8.9Mb、最長32.4Mbのコンティグが得られた。得られたコンティグとニガウリゲノムのsynteny解析からニガウリ第1染色体末端領域(上記の雌性型、雄性型遺伝子座領域を含む)とナンバンカラスウリのコンティグ間で13.9Mbの領域がシンテニーを示した

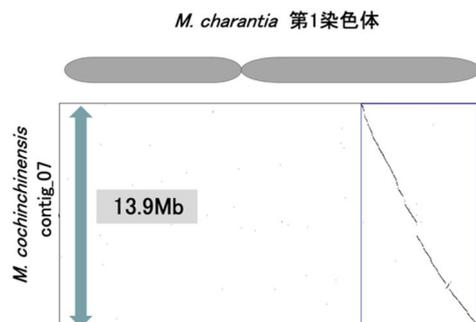


図3 ニガウリ (*M. charantia*) 第1染色体末端と13.9Mbの範囲でシンテニーを示す *M. cochinchinensis* のコンティグ

以上の研究結果から、ニガウリの雌性花率を支配するQTLは多数存在し、おそらく各遺伝子座の効果は他の遺伝子座の影響を受けやすいと考えられる。従って実際の育種においては両親組み合わせによってどのQTLが雌性花率に関与するかが変わってくることから、これを考慮して利用するDNAマーカーの選抜などが必要であろう。一方で、雌性花率が極端に偏る形質の原因遺伝子座は比較的效果が強く、今までの研究から雌性型は単一遺伝子座、本研究から雄性型は2遺伝子座(もしくは2つの効果の高いQTL)支配であると推測される。特に第1染色体末端箇所に雌性型、雄性型の遺伝子座が位置すること、さらに雌雄異株の *M. cochinchinensis* ゲノムにおいても同領域がシンテニーを示すことからニガウリ属の性決定に重要な領域であることを示唆する。今後の研究において同箇所の遺伝子同定および雌雄同株異花性と雌雄異株性の転換への関与を示す科学的証拠の探索を進めたい。

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 2件）

1. 著者名 N. D. Vinay, Matsumura Hideo, Munshi Anilabha Das, Ellur Ranjith Kumar, Chinnusamy Viswanathan, Singh Ankita, Iqubal Mir Asif, Jaiswal Sarika, Jat Gograj Singh, Panigrahi Ipsita, Gaikwad Ambika Baladev, Rao A. R., Dey Shyam Sundar, Behera Tusar Kanti	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular mapping of genomic regions and identification of possible candidate genes associated with gynoeocious sex expression in bitter gourd	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1071648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1071648	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 該当する

1. 著者名 Karube Haru, Suzuki Shota, Miyagi Norimichi, Tani ai Naoki, Miyake Mayuko, Tarora Kazuhiko, Urasaki Naoya, Matsumura Hideo	4. 巻 321
2. 論文標題 Quantitative trait loci for sex ratio in monoecious bitter gourd (<i>Momordica charantia</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 112330 ~ 112330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2023.112330	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 軽部 晴, 三宅 真佑子, 鈴木 翔太, 諸井 清乃, 谷合 直樹, 太郎良 和彦, 浦崎 直也, 松村 英生
2. 発表標題 ニガウリ雌性花率に関するQTL-seq解析
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ismail Siti Norhayati, 軽部 晴, 宮城 徳道, 谷合 直樹, 太郎良 和彦, 浦崎 直也, 松村 英生
2. 発表標題 ニガウリにおける雌雄比率に関わるQTLの探索
3. 学会等名 日本育種学会第144回講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------