

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05587

研究課題名(和文)モモの硬さを決める制御機構 - 早晩性やDNAメチル化の影響解明

研究課題名(英文)The regulatory mechanism of peach firmness: the effects of maturity and DNA methylation

研究代表者

立木 美保 (Tatsuki, Miho)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員

研究者番号：10355381

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)：硬肉モモは一般的なモモとは異なり果実が成熟期に達しても軟化しない。硬肉モモでは、成熟果実においてオーキシン生合成酵素であるYUCCA (PpYUC11)の発現が上昇せず、その原因はPpYUC11の5'上流域においてトランスポゾンが挿入することであると推測されている。本研究では、硬肉モモPpYUC11の発現抑制とトランスポゾンの関与を明らかにするために、トランスポゾン周辺部のメチル化程度について解析し、トランスポゾン挿入がPpYUC11の転写制御に関わる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的なモモは軟化が早く日持ちしない。一方、硬肉モモは収穫後もほとんど軟化しないため、日持ち性に優れる。しかし、モモの硬さに対する嗜好性は人によって異なり、軟らかめのモモを好む人は硬肉モモを好まない可能性もある。近年報告された軟らかめの硬肉モモは、幅広い層に好まれる可能性があるが、その機構は明らかとなっていない。そこで、本研究では、このようなモモの硬さを制御する機構の解明を目的とした。本研究では、原因となる候補因子を絞り込んだことから、更に研究を進めることで、品種育成につながる知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：Unlike melting flesh peaches (MF), which are common peach in Japan, stony-hard (SH) peaches do not soften even when the fruit reaches maturity. In SH peaches, the expression of the auxin biosynthetic enzyme YUCCA (PpYUC11) does not increase in mature fruit, and it is assumed that this is due to transposon insertion in the 5' upstream region of PpYUC11. In this study, to clarify the suppression of expression of PpYUC11 in SH peaches and the involvement of transposons, we analyzed the degree of methylation around the transposon and suggested that transposon insertion may be involved in the transcriptional regulation of PpYUC11.

研究分野：園芸科学

キーワード：モモ 貯蔵 果肉硬度

### 1. 研究開始当初の背景

我が国で一般に栽培されている「あかつき」などのモモは、収穫後に果肉が急激に軟化する(図1)。一方、硬肉モモは、成熟に伴う果皮色の变化、糖度の上昇、減酸などは一般的なモモと同様に進行するが、果肉は収穫後もほとんど軟化しない(図1)。硬肉モモは成熟期に内生オーキシンである IAA 量が増加しないため、エチレンが誘導されずに軟化しない(Tatsuki et al., 2013)。さらに、硬肉モモでは IAA 生合成経路の酵素である YUCCA のアイソジーン、*PpYUC11* の発現が抑制されているため IAA 量が増加しない。また、硬肉モモの *PpYUC11* の 5' 上流域にはトランスポゾンの挿入が認められており、本挿入の有無を DNA マーカーとすることで、硬肉モモを 100% 見分けることが可能となっている(Tatsuki et al., 2018)。挿入されたトランスポゾンはメチル化されている可能性が高く、それによって下流の遺伝子である *PpYUC11* の発現が抑制されていると考えられるが詳細は明らかにされていない。我が国におけるモモの栽培品種は硬肉アリルをヘテロに持つものが多く、これらの既存品種を用いた交配によって硬肉モモは一定の頻度で出現する。近年、普通の硬肉モモとは異なり、軟らかめの硬肉モモが幾つか発見されており、その中には既に品種登録されたものもある。軟らかめの硬肉モモは、収穫時の硬度がやや低下しており、収穫後にやや軟化が進行するが普通モモほど軟化しない(図1)。このような軟らかめの硬肉モモについてその機構は不明である。

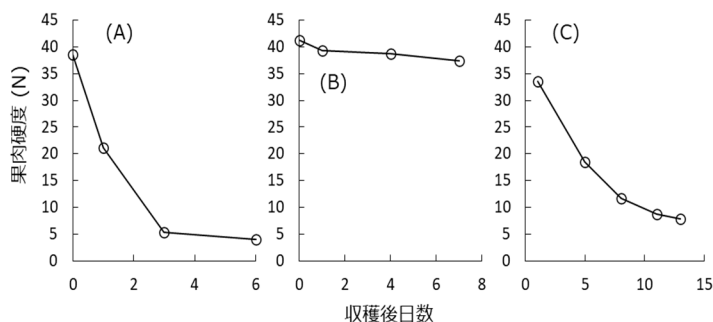


図1 収穫後モモの果肉硬度(N)の変化。(A) 普通モモ(B) 硬肉モモ (C) 軟らかめの硬肉モモ。

### 2. 研究の目的

硬肉モモではトランスポゾンの挿入と遺伝子型が完全に一致することから、トランスポゾンが下流遺伝子 *PpYUC11* の発現を抑制していると考えられる。しかし、トランスポゾンはプロモーター領域と考えられる部位よりやや上流に挿入されていることから、その抑制機構には、DNA のメチル化が関与すると推測される。モモゲノム上には *PpYUC11* の上流域に挿入されているものと同じタイプのトランスポゾンは 10 コピーある。その中には低低温要求性モモの自発休眠に関わると考えられる遺伝子のイントロンに挿入されている(Yamane et al., 2011)。このように、トランスポゾンの挿入は周囲の遺伝子発現に多くの影響を及ぼしていると推測される。トランスポゾンの挿入と遺伝子発現制御の直接的な原因は不明な場合が多い。そこで、本研究では、成熟期特異的に誘導する *PpYUC11* の発現がトランスポゾンによって抑制される原因を明らかにすることを第1の目的とする。

現在見つかっている軟らかめの硬肉モモは全て早生であり、中生以降では普通の硬肉モモしか見つかっていない。このことから、軟らかめの硬肉形質は高温下で起こらないような制御下にある可能性が推測される。後者に関連して、植物において遺伝子発現に影響を及ぼす DNA メチル化が、温度条件により変化することが報告されている(キュウリ花の性決定:Lai et al., 2017、モモ果肉のアントシアニン蓄積:Zhu et al., 2020等)。このように軟らかめの硬肉モモの制御に DNA メチル化が関わる可能性も考慮して、軟らかめの硬肉モモの軟化機構を明らかにすることを第2の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *PpYUC11* のメチル化と発現制御 (McrBC 切断法)

McrBC 切断法による解析

果実から抽出したゲノム DNA を McrBC および HhaI を用いて切断し、PCR によって増幅させた際の増幅程度から切断の有無を確認し、メチル化の有無を推測した。

バイサルファイトシーケンス解析

果実から抽出したゲノム DNA を用いてバイサルファイト処理によって塩基を置換させた。目的箇所のプライマーを用いて増幅させたものについて、数十個ずつ選抜し、それぞれの塩基配列を決定した。塩基配列の置換が起こっている割合から、メチル化程度を推定した。

#### (2) 軟らかめの硬肉モモ特異的な遺伝子発現解析

硬肉モモの中で、果肉硬度が 30N 以上程度の硬度を示す品種や系統と、20N 程度まで低下する比較的軟らかめの品種や系統を用いた。これらの成熟果実について、収穫直後および数日貯蔵し

た果実から抽出した RNA を用いて RNAseq 解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *PpYUC11* のメチル化と発現制御

*PpYUC11* の発現抑制に関わる機構としては、前述のとおりメチル化が関与する可能性が高い。そこで、一般的なモモにおいて *PpYUC11* の発現量が増加する果実成熟期におけるゲノム DNA のメチル化程度について確認した。また、同様に硬肉モモについても調査した。

##### McrBC 切断法による解析

モモ成熟果実は糖やポリフェノールが多く含まれることから、通常の方法でゲノム DNA を行うと、糖などの夾雑物が含まれ、その後の酵素反応等を阻害する。そこで、最初に成熟果実から不純物が含まれない抽出手法について検討した。その結果、Genomic-tip (QIAGEN) によって抽出することで、以降の研究に使用可能なゲノム DNA が単離できることが明らかとなった。

次に、McrBC または HhaI 処理を行った際の切断状態を確認した。図 2 に示すように、ある領域について切断状況を確認すると、McrBC 処理で切断されたが、HhaI サイトを含むにも拘わらず切断されなかった。このようにトランスポゾン周辺やイントロン付近はメチル化されている可能性が示唆された。

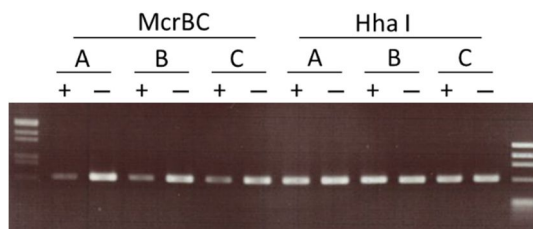


図 2 McrBC または HhaI 反応後のゲノムを鋳型とした PCR 産物の電気泳動写真。A, B, C は硬肉モモ品種または系統を示す。+ は酵素を添加したもの、- は酵素を添加しないもの。この図では、いずれの処理も HhaI 切断サイトを含む同じプライマーセットを用いて増幅させた。

##### バイサルファイトシーケンス解析

の結果に基づき、メチル化されていると推測された領域について、詳細にメチル化程度を解析した。普通モモ、硬肉モモ品種・系統について *PpYUC11* の 5' 上流域のゲノム配列のうち、7 箇所についてバイサルファイトシーケンスを行い、メチル化される可能性があるシトシンについてその割合を確認した(図 3)。その結果、いずれの硬肉モモ品種においても、挿入されているトランスポゾンの一部におけるメチル化割合が高いことが確認された。また、その他の部位については、品種・系統における差が大きい箇所が確認された。一方で、いずれの品種・系統においてもメチル化が起こらない領域が認められた。

以上の結果より、報告されているようにゲノム上に挿入されたトランスポゾンは、メチル化されている割合が高いこと、また、その他領域におけるメチル化の度合いは、品種・系統に応じて異なることが明らかとなり、これらの相違が下流の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

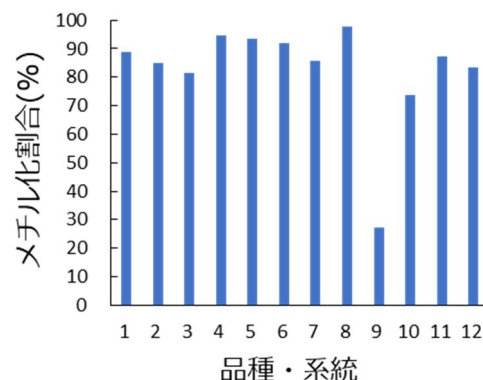


図 3 バィサルファイトシーケンス解析によるゲノム DNA のメチル化割合。普通モモ (*PpYUC11* の 5' 上流域にトランスポゾンを含まないホモ型)、硬さの異なる硬肉モモ品種・系統の果肉から抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理した後、DNA 配列を確認した。図は *PpYUC11* の 5' 上流のある領域に存在するシトシン(CpG)7 箇所がメチル化されていた割合の平均値。1~12 はそれぞれの個体を示す。

##### (2) 軟らかめの硬肉モモ特異的な遺伝子発現解析

硬肉モモの 5 つの品種・系統を使って、収穫直後または貯蔵後のサンプルから RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。硬肉モモの硬さの違いによる発現が異なるグループとして、転写因子、植物ホルモンに関する因子、メチル化に関与する因子などが抽出された。特に発現量に特徴が認められた因子については、qRT-PCR により発現の特徴を明らかにした。

以上の結果より、*PpYUC11* におけるトランスポゾンの挿入による遺伝子発現の抑制にはメチル化が関与する可能性と植物ホルモンの制御が関与する可能性が示唆された。また、温度との関係についても、これらが関わる可能性が示唆された。現在、他の因子との相互作用などについても検討を行っている。

(参考文献) Tatsuki et al. (2013) J. Exp. Bot., 64, 1049-1059. Tatsuki et al. (2018) Plant J, 96, 815-827. Lai et al. (2017) J. Exp. Bot., 68, 2899-2912. Yamane et al. (2011) J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 80, 276-283. Zhu et al. (2020) Plant J, 102, 965-976.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	八重垣 英明  (Yaegaki Hideaki)  (00355372)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主席研究員    (82111)	

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