

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660025

研究課題名(和文)次世代シーケンシング技術を利用したマメガキおよびカキの雌雄性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis of sex determination in Diospyros species by means of NGS technologies

研究代表者

田尾 龍太郎(Tao, Ryutaro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10211997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：古くより、高次倍数性のカキ(*Diospyros kaki*)の雌雄混株性に関する研究が行われてきたが、その雌雄の制御機構に関してはほとんど知見が得られていなかった。本研究では次世代シーケンシング解析を活用することにより、雌雄異株性の二倍体種マメガキ(*D. lotus*)の雌雄異株性は、小分子RNA遺伝子(OGI)による転写因子MeGIの発現抑制を通じて行われていることを明らかにした。引き続き栽培ガキのゲノムと発現解析を行い、栽培ガキではOGI上流への転移因子の挿入によるOGI発現の不安定化とMeGIのエピジェネティックな制御による可塑性のある性制御へと進化していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A combination of NGS technologies and evolutionary approaches detected a Y-specific sex-determinant candidate small RNA gene, OGI targeting the autosomal MeGI gene in *Diospyros lotus*. Then, the molecular basis underlying sex determination in polyploid *D. kaki* was investigated. OGI appeared to be indispensable for the monoecious phenotype producing male flowers in *D. kaki*, as in dioecious diploid *D. lotus*. However, the existence of OGI alleles did not always lead to production of male flowers. A series of NGS analyses indicated that there is an additional layer of regulation in the form of DNA methylation of the MeGI promoter, which seemed to be associated with the production of both male and female flowers in genetically male trees in *D. kaki*. Concurrently, in Y-chromosome-carrying trees, the expression of OGI is silenced by the presence of a SINE-like insertion in the OGI promoter.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 果樹ゲノム 雌雄異株性

1. 研究開始当初の背景

果実生産に大きく関わる栽培ガキ (*Diospyros kaki*; 以下カキとする) の雌雄性に関する研究は古くより行われてきた。その中で、カキの雌花と雄花の分化期や分化様相が明らかにされてきた。しかしながら、本研究でカキのモデルとして用いる雌雄異株性のマメガキ (*D. lotus*) の花成については、本研究の研究代表者らの予備的な研究結果の報告を除いて、皆無であった。

植物ホルモン処理による、カキの雌雄性制御の試みも多数行われて来ており、エスレルやサイトカイニン処理による雄花の雌性化が認められていたが、実用的なレベルでの人為的な性転換に関しては全く報告がなかった。

雌雄性の遺伝制御についてみると、本研究の研究代表者らが、AFLP 分析による Bulked Segregant Analysis を利用した雄性的 DNA マーカーを開発していたのみであり、分子機作などについては未解明であった。植物全体で見ても雌雄異株性の遺伝制御機構は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

六倍体あるいは九倍体であるカキには、雌花と雄花を着生する品種、雌花と雄花に加え完全花を着生する品種、そして雌花のみを着生する品種が存在するが、雄花のみを着生する品種・系統に関する報告はほとんどない。我が国に半野生状態で自生するカキやカキの原産地である中国でも雄花のみを着生する系統の報告がほとんどないことから、人為選抜により雄花のみを着生する系統が淘汰されたのではなく、雄花のみの分化を促す遺伝的・生理学的制御が生じにくいと考えられる。さらにカキの雌雄性は可塑性に富んでおり、雌花のみを長年にわたって着生していた個体が突然雄花を着生したり、樹勢や樹齢により雌雄の性比が変化したりすることも観察されている。このように複雑でありかつ可塑性に富んだカキの雌雄性は、雌雄混株と表現されている。

カキの雌雄性に関連し、育種や栽培現場で問題が生じている。すなわち、'富有'をはじめ多くの優良栽培品種は雌花のみしか着生しないため、育種現場では交雑の組み合わせに制限が生じ、また栽培現場では、'太秋'など雄花着生品種で雄花の着生過多による生産性の低下が大きな問題となっている。

このようなことから、カキの雌雄分化を制御する手法の開発が以前より望まれ、これまでもカキの雌雄性に関する研究が行われてきた。しかしながら、従来の研究は主として雌花と雄花の分化様相の形態的調査に終始しており、その遺伝的、生理的制御機構の解明に迫る研究は皆無であった。カキの雌雄性の人為制御法の開発には、雌雄性の遺伝的・生理的制御機構の解明が不可欠である。

このような状況のもと我々は、雌株と雄株

が明確に分離して存在し、二倍体であるため遺伝解析が容易な、カキの近縁野生種のマメガキを材料に、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 分析による Bulked Segregant Analysis (BSA) 法を活用して、雌雄の制御機構の解明を試みた。その結果、マメガキの雌雄の制御は XY 型であり、雄性がヘテロ型、雌性がホモ型であることが判明した。

しかしながら、これまで数多くの AFLP ブライマーセットと制限酵素の組み合わせを検討したにも関わらず、性決定遺伝子座に連鎖した信頼できるマーカーは、雌雄性決定遺伝子座から遺伝距離が遠いものを含めても数種類しか作出できておらず、研究の進展は阻まれていた。そこで本研究では、近年急速な発展を遂げた次世代シーケンシング技術に基づいた Genotyping by Sequencing (GBS) および RNAseq の手法を、マメガキの雌雄性研究に導入することでブレイクスルーをはかり、研究期間の終わりまでにマメガキの雌雄性決定因子を同定し、その知見を利用した比較ゲノム解析により栽培ガキの雌雄性制御機構を明らかにすることを試みた。栽培ガキは高次倍数性であるため雌雄性の表現が複雑化していると考えられるが、本研究により植物の倍数化による性表現の変化に関する新たな知見が得られることも期待できる。

3. 研究の方法

マメガキの F1 分離集団 (KK 集団; 君遷柿雌 × 君遷柿雄) 63 個体を実験材料とし、ゲノム DNA を Illumina HiSeq による大量シーケンス解析に供した。得られたリードから、サブシーケンスのカタログ化を行った。雄個体に特異的なサブシーケンスを含むリードから、カキにおいて雄性を制御する Y 染色体の雄特異的領域をカバーするコンティグ群を構築し、その後組み換えをおこなった個体とコンティグを特定した。加えてマメガキの花芽由来の mRNAseq を行い、同様の解析を行った。これらのシーケンス解析から得られたデータを統合することにより、マメガキの交雑分離集団において Y 染色体上の雄特異的領域に存在し、花芽において発現する性決定候補遺伝子を網羅的に探索した。同時に、mRNAseq データを用いた DESeq 解析も行い、雄特異的領域で発現し、雌雄で発現量に差異のある遺伝子を同定した。上記 2 種類の実験で候補となった遺伝子に進化遺伝学的観点からの解析を加え、さらにシロイヌナズナとタバコの形質転換実験により、マメガキにおける雌雄性制御因子の同定を試みた。

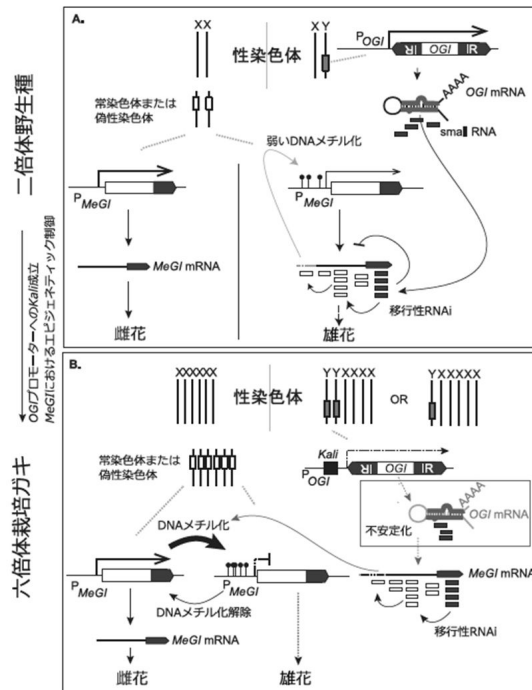
引き続き、京都大学農学研究科附属京都農場植栽のカキ 172 品種を供試し、マメガキにおける雄性決定因子である *OG1* がカキゲノムに存在するのか確認し、またカキの *OG1* 相同配列と雌雄性との関連性を確認した。さらにマメガキでは、*OG1* の制御下にあり雄性抑

制因子あるいは雌性化因子である *MeGI* と *OGI* の発現，さらに *OGI* および *MeGI* 由来の small-RNA の動態もあわせて調査した．引き続き，*OGI* および *MeGI* のメチル化をバイサルファイトシーケンシング解析により調査した．加えて，圃場条件下で脱メチル化剤であるゼブラリンを開花前の花に処理して花性の変化を調査した．

4. 研究成果

マメガキの F1 分離集団を材料にして行った Illumina HiSeq による大量シーケンス解析とそれに続くサブシーケンス解析の結果，全長で約 1 MB 程度と考えられる雄特異的なゲノム領域をカバーするコンティグ群を特定することができた．このコンティグ配列から雄株の花芽特異的に発現する遺伝子領域を特定し，トランスポゾンなどを除いた 22 の性決定遺伝子を特定することに成功した．一方で，mRNAseq による発現解析からも 34 の遺伝子が雌雄間で発現変動する遺伝子として同定された．この中には，雌個体において高発現し，常染色体（あるいは偽常染色体）上に存在するホメオドメイン型転写因子と，それと非常に相同性の高い塩基配列を持つが，雄特異的な発現を示す Y 染色体上の雄特異的領域に存在する性決定遺伝子候補の一つが見られた．のちの遺伝子機能解析の結果も考慮して，これらをそれぞれ *MeGI* (雌木) と *OGI* (雄木) と名付けた．*OGI* は *MeGI* と相同配列を有するが，配列内部に複数の欠損を含み，正常なホメオドメイン型タンパクをコードするものではないと考えられた．また *OGI* はその内部に逆位配列を含んでいるため，ヘアピン構造を形成して，small-RNA を産出する可能性が示された．多様なカキ属種において，*OGI* 配列は雄系統でのみ検出され，その共分離性の起源はカキ属の分化初期以前にまで遡ることが示唆された．一方，*OGI* 以外の 21 の性決定候補遺伝子群に関しては，多くのものが X-Y 染色体アレルを有しており，カキ属種における多様性解析と系統進化的解析から，いずれの Y 染色体アレルも種間で共通した多型を有さず，X-Y 間の多型はカキ属分化以降のごく近年に種特異的に誕生したものである事が示唆された．引き続き，*MeGI* の機能解析をシロイヌナズナとタバコを用いた形質転換実験により試みた．*MeGI* の異所的過剰発現により，シロイヌナズナの植物体全体が矮化し，雄ずいの発達が抑制された．花粉様粒は発芽能を失っていたが，雌ずいや子房・胚珠といった雌器官は正常に発達した．タバコにネイティブプロモーター制御の *MeGI* を導入した場合も同様な表現型が見られた．さらに，ベンサムアナタバコにおける一過的共発現実験により，*OGI* の発現によって *MeGI* の発現量が著しく減少することが示された．引き続き行ったマメガキの混合芽における small-RNAseq 解析により，*OGI* は *MeGI* に対して trans-acting siRNA として機

能し，移行性 RNA 干渉が発動することが示唆され，この移行性 RNAi によって，*OGI* は雌雄原基形成初期における発現ピーク以後も，雌雄器発達ステージ全体を通して *MeGI* の発現抑制を続けていることが明らかになった．以上の結果から，図 1 に示すようなカキ属の性決定モデルを構築した．



第 1 図 二倍体野生種 (A) から六倍体栽培ガキ (B) の進化過程における「揺らぎのある性決定」の成立．

引き続き，カキの雌雄混株性に関して，*OGI* が関与しているか，京都大学附属京都農場に保存されている多様な性表現を示す 172 品種について調査したところ，*OGI* の存在が雄花形成の必要条件となることが明らかになった．すなわち，雌花のみを着生する品種は *OGI* 配列がゲノム中に存在しないが，*OGI* 配列がゲノム中に存在するからと言って必ずしも雄花形成を行うとは限らないことが明らかになった．続いて *OGI* の発現解析を行ったところ，*OGI* はカキではほとんど転写されておらず，*MeGI* の発現抑制を行う *OGI* 由来の small-RNA も検出されなかった．*OGI* の存在するゲノム領域をシーケンスした結果，*OGI* のプロモータ領域に，我々が「Kali」と名付けた SINE 様配列が挿入されており，これが原因で *OGI* がエピジェネティックに転写抑制されていることが明らかになった．この「Kali」の挿入は多様な栽培ガキ品種で保存されており，この挿入による *OGI* の転写抑制は栽培ガキの種成立段階におけるボトルネック，あるいは種の成立時の選抜要因となっていることが示唆された．一方，本来は *OGI* の遺伝的制御の下で恒常的な small-RNA 蓄積

が起こり発現抑制される *MeGI* については、栽培ガキでは *OGL* の発現が見られないにも関わらず、雄花特異的に *MeGI* の発現抑制が生じていた。雄花では *MeGI* の small-RNA が蓄積しており、これに伴って *MeGI* の遺伝子ならびにプロモータ領域では強い DNA メチル化が生じていた。この雄花特異的な *MeGI* の DNA メチル化は栽培ガキのみに顕著で、野生二倍体近縁種では雌雄間の DNA メチル化の程度は相対的に低く保たれていた。DNA メチル化阻害剤であるゼブラリンを雄花・雌花の発生初期に処理したところ、雄花では柱頭の伸長や胚様体の形成、そして花粉稔性の低下といった明らかな雌化の影響がみられた。さらに、雌花化が見られた雄花では *MeGI* の small-RNA 蓄積量が有意に低下しており、*MeGI* における small-RNA の発生と蓄積は同領域の DNA メチル化が起点となって維持されている可能性が示された。すなわち、雄花への運命を決定づける *MeGI* の発現抑制は、small-RNA と DNA メチル化のポジティブフィードバックに起因しており、DNA メチル化の維持・解除により、次年度の花性が決定されるというモデルが考えられた（第 1 図）。

以上より、二倍体野生種における安定な *OGL* による遺伝的で画一的な性制御が、六倍体の栽培ガキでは *OGL* の不安定化と *MeGI* におけるエピジェネティックスイッチによって可塑的な「揺らぎのある性制御」へと進化していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Akagi, T. K. Kajita, T. Kibe, H. Morimura, T. Tsujimoto, S. Nishiyama, T. Kawai, H. Yamane, and R. Tao. 2014. Development of molecular markers associated with sexuality in *Diospyros lotus* L. and their application in *D. kaki*. *Thunb. J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83: 203-212. 査読有り

Akagi, T., Isabelle, M. Henry, R. Tao, and L. Comai. 2014. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346: 646-650. 査読有り

梶田啓・赤木剛士・山根久代・田尾龍太郎・米森敬三. 2015. マメガキ (*Diospyros lotus* L.) で同定された雄性決定因子連鎖領域とカキ (*D. kaki* Thunb.) 品種の雄花着生特性との関連性. *園学研*. 14: 103-113. 査読有り.

Akagi, T., T. Kawai, and R. Tao. 2016. A male determinant gene in diploid dioecious *Diospyros*, *OGL*, is required for male flower production in

monoecious individuals of Oriental persimmon. *Sci. Hort.* 213:243-251. 査読有り.

Akagi, T., I. M. Henry, T. Kawai, L. Comai, and R. Tao. 2016. Epigenetic regulation of the sex determination gene *MeGI* in polyploid persimmon. *The Plant Cell* 28: 2905-2915. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

Tao, R. Sexuality in *Diospyros* species. International Symposium of correlative gene system; Establishing next-generation genetics. (2015.5.29-5.30, Nara, Japan)

Akagi, T. and R. Tao. Successful utilization of the next generation sequencing technologies to identify sex determinant in persimmons: A possible application for kiwifruit study. International Symposium on Genetic Basis for Kiwifruit Breeding. (2015.12.09, Takamatsu, Japan)

Akagi, T., I.M. Henry, R. Tao, and L. Comai. Evolution of a flexible sex determination system in polyploid persimmon. Plant and Animal Genome Conference XXIII (2016.1.9-1.13, San Diego, California)

Henry, I. M., T. Akagi, R. Tao, and L. Comai. Variation on a theme: diploid and hexaploid persimmon regulate sex in slightly different ways. Plant and Animal Genome Conference XXIII (2016.1.9-1.13, San Diego, California)

Tao, R. A review of the current progress in our studies on sex determination in *Diospyros*. ISHS International Workshop on Floral Biology and S-incompatibility in Fruit Species (2016.5.23-5.26, Murcia, Spain)

Tao R. Current progress in the studies on sex determination in *Diospyros*. The Second Asian Horticultural Congress (2016.9.26-9.28, Chengdu, China)

Tao, R. Sex determination in *Diospyros*. ISHS VI International Symposium on persimmon (2016.10.16-10.20, Valencia, Spain)

Tao, R. and T. Akagi. Possible applications of the current knowledge

of sex determination in Diospyros to persimmon breeding and culture. ISHS VI International Symposium on persimmon (2016.10.16-10.20, Valencia, Spain)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

京都大学農学研究科果樹園芸学研究室 WEB ページ(日本語ページと英語ページ)

<http://www.pomology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

京都大学研究成果の WEB ページでの紹介

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/141031_1.html

京都大学研究成果の WEB ページでの紹介

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/161212_2.html

平成 26 年園芸学会年間優秀論文賞受賞

<http://www.jshs.jp/uploads/uploads/files/about/ronbunyou%202016.7.1%20revise.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田尾龍太郎 (TAO, Ryutaro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号： 1 0 2 1 1 9 9 7

(2)研究分担者

河井 崇 (KAWAI, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号： 9 0 7 2 1 1 3 4

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし