

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14654

研究課題名(和文) カキ属のゲノム倍化に伴う重要形質多様化機構の解明

研究課題名(英文) Diversification of agriculturally important traits accelerated by polyploidization in Diospyros

研究代表者

赤木 剛士 (Akagi, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50611919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主に、二倍体カキ属野生種と六倍体の栽培ガキの性表現の変化に着目し研究を行った。二倍体種は基本的に明確な雌雄異株性を示すのに対し、六倍体栽培ガキは雌雄の両者が同一の個体に着花する個体が現れ、より柔軟な性表現を示す。調査の結果、カキ属の性決定遺伝子であるsmall-RNAをコードする「OGI」の発現が、六倍体種ではSINE様配列によって抑制されており、その代わりに、OGIの標的となるMeGIのプロモーター領域におけるDNAメチル化が花単位の性決定の鍵因子であることを明らかにした。さらに栽培ガキの倍数化においてOGIに挿入されたSINE様配列への強い選抜が生じていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In diploid persimmons, we previously elucidated the mechanism of sex determination that a Y-encoded pseudo-gene called OGI, via the production of small-RNAs against the gene encoding the female-determining factor MeGI, derives separate male and female individuals. On the other hand, in hexaploid Diospyros kaki, this regulatory mechanism leads to the formation of both male and female flowers (monoecy), in genetically male individuals. Here we revealed that, in monoecious hexaploid persimmon, the DNA methylation levels on the MeGI is the key factor to determine flower sexuality. Instead, OGI expression is generally undetectable, due to the SINE-like transposon insertion of a transposon in the 5' region of its promoter. This transposon insertion is highly methylated as is reported SINE families in other plant species, and is conserved in all Y-carrying D. kaki cultivars, suggesting either natural selection or a strong bottleneck for the silenced OGI gene during polyploidization.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：性決定 進化 ゲノム 果樹 カキ 倍数化 雌雄異株 雌雄異花同株

1. 研究開始当初の背景

カキ属植物の多くは二倍体であるが、アジアで栽培される栽培ガキは基本的に六倍体である。この六倍体栽培ガキでは、二倍体では見られない多様な農業上重要な形質が表出しており、これは倍数体という特徴と栽培化という人為的な選抜作用の二つが重なって得られた多様性であると考えられる。特に、栽培ガキの果実のサイズ・形状と性表現には二倍体には全く見られない多様化が見られ、育種・栽培上非常に重要な形質であることから、その制御機構の解明が求められていた。一般に倍数化は、個体サイズの大幅な増加や、性決定・性表現の変化に寄与することが古くから示唆されており、基礎生物学的観点からも、このカキ属植物の倍数化による形質変化の作用機作の解明は大きな意味を持つと考えられる。しかし、これまでにカキの歴史的な倍数化が及ぼす形質制御に対して分子メカニズムまで踏み込んだ例は無く、また、二倍体種からの進化という概念でその差異を明らかにした例も報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、二倍体の野生種から六倍体である栽培ガキへの推移において多様化の見られる重要形質のうち、特に性表現の柔軟化についての生理機作・進化機構を明らかにすることを目的とした。二倍体野生種はY染色体上の性決定遺伝子であり small-RNA をコードする *OGI* と、その標的となり雌化制御を統御する *MeGI* 遺伝子の発現量によって性が決まっており、基本的に明確な雌雄異株性を示すのに対して、六倍体栽培ガキでは、より柔軟化した性表現を示し、雌雄花の両者が同一個体に着花する雌雄異花同株個体出現する。また、両性花様の着花も見られている。ここでは、画一的な雌雄株がいかにして雌雄花両者を着花するような分子機構を手に入れたのか、倍数化の概念を含む進化的観点からの解釈を求めた。

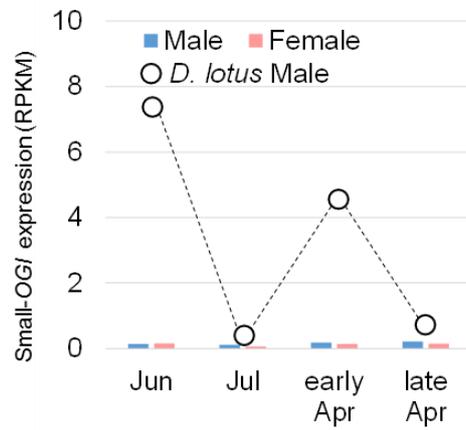
3. 研究の方法

OGI および *MeGI* について、六倍体栽培ガキにおける発現調節機作の保存性・共通性を調査し、周辺ゲノム構造を含む二倍体種との差異を調査した。まず、性決定の最上流因子である *OGI* について、六倍体である栽培カキの雌株及び雌雄両花を着花する個体間においてその配列保存性・アレル量・周辺ゲノム配列を網羅的に決定した。合計 173 品種について調査を行い、*OGI* が検出された品種群については集団遺伝学的観点から *OGI* における自然・人為選抜圧なども検出した。次に、Illumina HiSeq 4000 によって *OGI/MeGI* における small-RNA 解析を行い、二倍体種・六倍体種における small-RNA の発現・蓄積パターンを特性化した。また、small-RNA 蓄積の結果として現れる DNA メチル化を調査するためにバイサルファイトシーケンシングを

OGI/MeGI に対して行い、年単位の周期で特性化して、雌雄花における差異や保存性などを調査した。さらに、花の器官ごとに DNA 抽出を行い、上記同様、バイサルファイトシーケンシングによって器官特異的な DNA メチル化パターンを検出した。雄花特異的に保存される *MeGI* における DNA メチル化の影響を調査するために、DNA 脱メチル化剤である zebularine および 5-AzaC を発達中の雄花に処理し、性表現への影響や small-RNA 蓄積に与える影響などを調査した。性表現への影響が得られた品種・処理区においては、*smMeGI* の蓄積量やプロモーター領域における DNA メチル化程度を確認した。

4. 研究成果

カキ属の性決定遺伝子である small-RNA をコードする *OGI* は、二倍体種では雄個体特異的に安定的に発現するのに対して、六倍体種では雄花・雌花共に *OGI* の発現が年周期を通じて抑制されていた (第 1 図)。

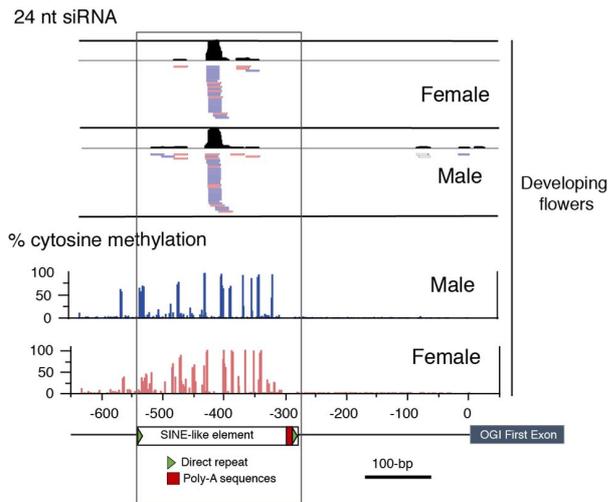


第 1 図: 二倍体マメガキ (*D. lotus*) と六倍体栽培ガキ (*D. kaki*) の雄花・雌花における *OGI* に由来する small-RNA の蓄積。二倍体では安定的な *OGI* の発現が見られるが、六倍体栽培ガキでは年間を通じて雌雄共に *OGI* の発現が見られない

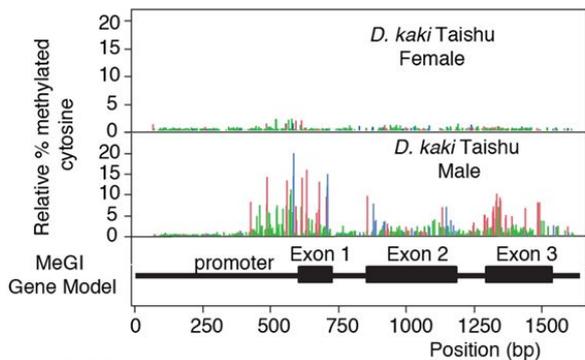
OGI 周辺のゲノム配列解析より、SINE 様配列が *OGI* の 5'プロモーター領域において六倍体種特異的に挿入されており、さらにこの SINE 様配列上には 24-bp の small-RNA の蓄積と高度な DNA メチル化が生じており、これによって二倍体種で見られるような安定的な発現が阻害されている可能性が示唆された (第 2 図)。しかし、一方で、雌雄異花同株品種群と雌株品種群を網羅的ににおいて *OGI/MeGI* の多型探索および量的ジェノタイピングを行った結果より、遺伝子型としての *OGI* は雄花着花の必要条件であり、何らかの機作、あるいは偶発的なシグナルによる *OGI* の発現寄与が *MeGI* の small-RNA 化に必須であることも明らかになった。

Small-RNA によって移行性 RNA 干渉が生じた *MeGI* においては、有意な発現低下が起

このとともに、プロモーター領域まで small-RNA の蓄積が生じ、六倍体種に特徴的な高度 DNA メチル化が生じることが明らかとなった (第 3 図)。



第 2 図：六倍体栽培ガキのプロモーター上流域における SINE 様挿入配列と、その配列上に蓄積した 24-bp small-RNA と高度な DNA メチル化。雌雄いずれにおいてもこの傾向は保存されている。

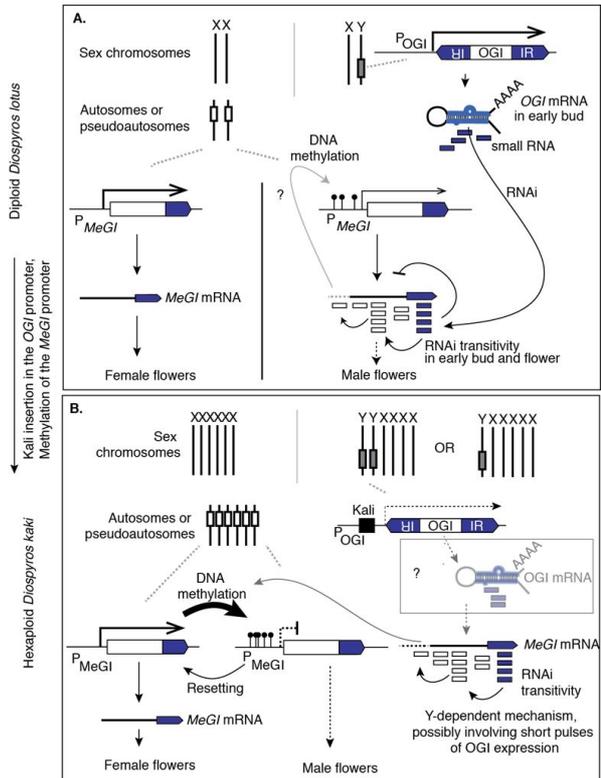


- M-CG
- M-CHG
- M-CHH

第 3 図：六倍体栽培ガキの雌雄同株個体では、雄花特異的に small-MeGI が MeGI のプロモーター領域にまで及び、高度な DNA メチル化が維持される。

この DNA メチル化は年周期を通して雄花特異的に保存されており、small-RNA の蓄積が見られない時期においても有意に保存されていることが明らかになった。また、DNA メチル化は花器官だけに特異的に維持されており、前年の性表現の影響を受けない、de novo メチル化である事が示唆された。この MeGI における DNA メチル化が性表現に及ぼす影響の調査のため、DNA 脱メチル化剤を生育中の雄花に処理したところ、いくつかの品種においては、低確率ながら雄花からの雌花化が観察された。以上より、MeGI 付近のゲノム領域における DNA メチル化状態が、花

単位の性決定の鍵因子である事が明らかになった (第 4 図)。



第 4 図：性決定における二倍体種から六倍体栽培ガキへの進化。六倍体栽培ガキでは本来の性決定最上流因子 OGI が抑制され、その標的である MeGI におけるエピジェネティック制御によって可塑性のある性表現を可能にしている。

DNA 脱メチル化の影響は処理した品種間で異なっていたが、有意にメチル化が解除された個体でのみ、雌化が進んでおり、また、それに伴って、MeGI における small-RNA 蓄積にも減少が見られた。つまり、MeGI 由来の small-RNA は MeGI の DNA メチル化を誘導するだけでは無く、DNA メチル化を起点としてポジティブフィードバックして産出されるものであり、このポジティブループによって六倍体栽培ガキにおいては、雄花が着花した結果母枝では翌年も雄花が着生する機構が生じていることが明らかになった。

この一連の機構は OGI における SINE の挿入による発現抑制に起因するものであると考えられるが、この OGI における SINE 様配列を多様な栽培ガキ品種で調査した結果、栽培ガキ品種全体においてこの SINE 様配列が保存されており、その起源は栽培ガキ特異的な SINE のバーストに依存していることが明らかになった。さらに集団遺伝学的解析によって、六倍体種成立時における倍數化において偶発的に生じた OGI への SINE 様配列とそれによる安定的な OGI の抑制効果に対して、強い自然選抜またはボトルネックが生じて

いることが示唆された。

以上により、倍数化を経験した栽培ガキと二倍体野生種間における性表現の変化および、倍数性種における性表現の柔軟性が単純な DNA 配列では無く、エピジェネティックな状態における可塑性を導入したことで成立したことを明らかにした。

本研究内容は以下に記載の 2 報の科学論文として掲載済みであり、そのうち一報の内容は、掲載された Plant Cell 誌および Nature Plants 誌によってハイライトされている (Lockhart 2016, Plant Cell; Surridge, 2017, Nature Plants)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Takashi Akagi, Takashi Kawai and Ryutaro Tao. A male determinant gene in diploid dioecious *Diospyros*, *OGL*, is required for male flower production in monoecious individuals of oriental persimmon (*D. kaki*). 査読有, Scientia Horticulturae. 213: 2016, 243-251.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.046>
2. Takashi Akagi, Isabelle M. Henry, Takashi Kawai, Luca Comai and Ryutaro Tao. Epigenetic regulation of the sex determination gene *MeGI* in polyploid persimmon. 査読有, Plant Cell 28: 2016, 2905-2915.
Doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.16.00532>

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Akagi, T., I. M. Henry, T. Kawai, L. Comai and R. Tao. Sex determination in oriental persimmon (*Diospyros kaki*). Plant and Animal Genome Conference XXV (Jan. 14-18th, 2017, San Diego, USA)
2. Akagi, T. Evolution of a flexible sex determination system in polyploid persimmon. Kyoto-Swiss Symposium2016 (Oct. 31-Nov. 1, 2016, Kyoto, Japan)
3. 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 (Jan. 9-13th, 2016, San Diego, USA)
4. 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 (Jan. 9-13th, 2016, San Diego, USA)
5. 赤木剛士. 柿における性の成立と揺らぐ

性への進化. 植物科学シンポジウム (2016.12.7, 東京大)

6. 赤木剛士. 木本性植物における性決定機構の多様性と一般性 ~カキとキウイフルーツと... 日本植物学会第 80 回大会 (2016.9.16-19, 沖縄コンベンションセンター)
7. 赤木剛士・Isabelle M. Henry・Luca Comai・田尾龍太郎. エピジェネティックな記憶によるカキの可塑的な性決定 (第 2 報). 園芸学会平成 28 年度秋季大会 (2016.9.10-12, 名城大学)
8. 赤木剛士. カキ属植物における「柔軟な」性決定 ~ 遺伝的制御からエピジェネティック性への進化. 日本遺伝学会第 88 回大会 (2016.9.7-9, 国立遺伝学研究所)
9. 赤木剛士・Isabelle Henry・河井 崇・Luca Comai・田尾龍太郎. エピジェネティックな記憶によるカキの可塑的な性決定 (第 1 報). 園芸学会平成 28 年度春季大会 (2016.3.26-27, 東京農業大)

〔図書〕(計 1 件)

1. 赤木剛士・田尾龍太郎. 2016. カキの性決定. 果実日本 71: 24-26.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木剛士 (AKAGI, Takashi)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 50611919

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()