

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07601

研究課題名(和文)ニガウリにおける雌雄比率決定に関わる遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of genes for sex ratio in bitter melon

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・准教授

研究者番号：40390885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ニガウリの生産、育種において重要な形質である雌性花率(雌雄比率)を制御するQTLの同定およびその解明を行うための染色体レベルでの全ゲノム配列解析を行なった。雌性型系統を母親としたF2集団のQTLマッピングの結果、3箇所の雌性花率QTLが見出され、そのうち一箇所は雌性型遺伝子座であると推定され、次にLOD値の高いQTLについては近傍マーカーで挟まれるゲノム配列およびその内部にある候補遺伝子を複数絞り込んだ。またニガウリゲノム配列を充実させるためPacBioシーケンシングによる全ゲノム配列解析により11本の染色体レベルのゲノム配列を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果はニガウリの果実生産性に直接影響する雌性花率のQTLおよびそのマーカーを見出すことができたため、今後のニガウリ育種の効率化に大きく貢献が期待できる。またニガウリにおいて染色体レベルの全ゲノム配列を構築できたことから、他の形質に関する遺伝子、マーカーの同定にも寄与する。さらにニガウリ野生系統と栽培品種群における雌性花率QTL領域の解析から、さらにその栽培化や進化における意義の一部を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：For identifying genes and gene networks for sex determination in bitter melon (*Momordica charantia*), QTL mapping of F2 population was carried out using genome-wide RAD-seq markers. Three loci were detected as QTLs for female flower frequency and the most effective locus was presumed to be a gynoecious locus. Another QTL in LG5 was focused and several candidate genes in this region, showing non-synonymous change in their sequences between parents, were found. Additionally, bitter melon reference genome sequence was re-constructed by de novo assembling of PacBio long reads. Consequently, pseudomolecule, comprising 11 chromosomes, could be developed. Resequencing analysis of 60 varieties and read mapping against this pseudomolecule demonstrated unique region with low *Fst* between wild and cultivar groups, which corresponds to female flower frequency QTL.

研究分野：育種学

キーワード：ニガウリ 性決定 雌雄比率 ゲノム QTL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高等植物における雌雄(性)の様式は高等動物と比較すると多様である。被子植物の90%は両性花のみを咲かせる種であり、残りの約10%の植物種ではそれ以外の様々な性様式を示す。両性花における器官レベルでの雌雄決定(雌蕊、雄蕊)はABCモデルに代表されるように以前より明らかとなっており、高等植物内で保存された機構と推定される。一方で個体レベルや個々の花のレベルでの雌雄決定の機構については未解明の領域が多い。その中で雌雄同株異花であるウリ科作物では雌花/雄花の決定が果実収量やF<sub>1</sub>品種の育成に大きな影響を与える重要な農業形質でもあるため、その遺伝的機構の解明が進められている。特にキュウリ、メロンでは雌花/雄花の決定に関与する遺伝子(*CmACS11*, *CmlWip1*)が既に同定されており、両遺伝子のalleleの組み合わせにより雌雄同株異花のメロンから雌雄異株の系統を作出する事にも成功している(Boualem et al., 2015)。これらの研究でメロンやキュウリの雌雄決定においては花芽における局所的なエチレン合成が重要とされている。しかし、具体的な性決定機構の全体像は不明である。

申請者は雌雄同株異花のウリ科作物の一つであるニガウリ(*Momordica charantia*, ゲノムサイズ:推定 390Mb)についてその雌雄決定機構を解明すべく研究を行ってきた。ニガウリはメロンやキュウリと異なり同属(*Momordica* 属)内に雌雄同株異花と雌雄異株の種が見られるため、高等植物における性決定様式の進化の解明に大きく貢献できる研究材料である。またニガウリは国内では沖縄を中心として各地で生産され、東南アジア、南アジアでも重要な作物として位置づけられるため、その生産性の改良に寄与する雌雄決定の形質は重要な育種目標である。申請者は今までに雌花のみを持つニガウリ雌性型系統を対象とし、混性型(雌雄異花)系統との交雑後代を用いてRAD-seq法を活用した雌性型遺伝子座のマッピングを行った。雌性型は劣性単一遺伝子に支配される事が明らかとなり、当該遺伝子座について連鎖地図上の位置ならびに連鎖マーカーの特定を行った(Matsumura et al., 2014)。さらにニガウリの全ゲノム配列の解析を独自に行うと共に、より詳細な連鎖地図の作成を行って遺伝子同定のための基盤を整備した(Urasaki et al., 2016)。この雌性型遺伝子の同定へ向けた研究を行う過程で、沖縄県保有のニガウリ系統(近交系)を比較すると多様な雌雄比率がみられ(図1)、また雌性型系統×混性型系統のF<sub>1</sub>個体ではほぼ一定の雌雄比率であったが、F<sub>2</sub>集団の混性型を示す個体には様々な雌花と雄花の比率の分離が見られた(図2)。加えて雌性型系統と上記とは異なる花粉親(混性型)のF<sub>1</sub>では前述の交配組み合わせのF<sub>1</sub>とは異なる雌雄比率を示し、かつF<sub>2</sub>の混性型個体における雌雄比率の分布にも変化が見られた。これらから雌雄比率は遺伝的な要因により決定され、複数の量的形質遺伝子座(quantitative trait loci; QTL)に支配されている可能性を推定した。

### 2. 研究の目的

本研究ではニガウリの雌雄比率決定に関わる遺伝子は高等植物の性決定機構解明の一翼を担う遺伝子であると考え、それらの同定および雌雄比率決定に関わる遺伝的機構の解明を目的とした。加えてそれらの解明を実施するためのニガウリゲノム情報の整備を行うことも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 雌性花率のQTLマッピング

沖縄県で育成したニガウリ系統 OHB61-5(雌性花率 100%; 雌性型系統)と OHB95-1A(雌性花率 <3%)とのF<sub>2</sub>個体を材料とし、97個体のゲノムDNAについてRAD-seq解析を行った。RAD-seqライブラリはゲノムDNAを制限酵素AseI(5'-ATTAAT-3')で切断し、切断末端にピオチンラベルしたアダプターを結合した断片をさらに制限酵素NlaIII(5'-CATG-3')で切断してアダプターを結合した後にストレプトアビジンビーズによって回収したDNA断片を鋳型にしてPCR増幅を行って作成した。各F<sub>2</sub>個体のライブラリをイルミナHiSeq2000によりsingle readシーケンスを行い、得られたリードの末端から95bpをタグ配列として、ニガウリリファレンスゲノム(Urasaki et al., 2017)へのマッピングによる多型検出および各タグ配列の有無に基づく遺伝子型判別を行い、JoinMap4.2による連鎖地図作成に供試した。

上記のF<sub>2</sub>個体を沖縄県で育成し、着花した30個の花を調査して雌性花率を算出した。F<sub>2</sub>個体RAD-seqマーカーの遺伝子型、連鎖地図および雌性花率をもとにMapQTL6を用いてQTL領域を見出した。

#### (2) 雌性花率QTL候補遺伝子の絞り込み

上記(1)で検出したQTLのうち、雌性型遺伝子座とは異なるQTL(第4連鎖群)について、近隣の6箇所のRAD-seqマーカー(SNPs)の遺伝子型を(1)のマッピングに用いていないF<sub>2</sub>個体に対して判別を行った。SNPの判別は当該領域をPCR増幅し、シーケンス解析により行った。

またリファレンスゲノム配列から雌性花率QTL領域のDNA配列を抽出した。OHB61-5とOHB95-1AについてイルミナHiSeq2000による全ゲノム配列を行い、リファレンスゲノムへのマッピング結果から、雌性花率QTL領域における両親系統間の予測遺伝子領域の多型を見出した。さらに同領域における発現遺伝子を見出すため、OHB3-1の蕾期の雌花と雄花よりRNAを抽出し、RNA-seq解析を行った。

#### (3) 長鎖リードシーケンスによる全ゲノム配列解析

以前にリファレンスゲノムを作成したニガウリ系統 OHB3-1 の葉より CTAB 法および genomic-tip100(キアゲン)により高分子ゲノム DNA (>30kbp) を抽出し、先進ゲノム支援のサポートにより国立遺伝学研究所において PacBio シークエンスのライブラリ作成、PacBio Sequel によるシークエンスを行った。

得られたシークエンスリードのデータはCanu1.7により *de novo* アセンブルを行って contig を作成し、RAD-seq マーカーに基づいて作成した 11 連鎖群 (染色体) の連鎖地図への各 contig の配置を行うことで Pseudomolecule 配列を作成した。

#### 4. 研究成果

##### (1) OHB61-5 x OHB95-1A の交雑後代における雌性花率 QTL のマッピング

ニガウリ系統 OHB61-5 (雌性花率 100%; 雌性型系統) と OHB95-1A (雌性花率 < 3%) およびこれらの F<sub>2</sub> 個体 (97 個体) について RAD-seq 解析と得られたリードのリファレンスゲノムへのマッピングから 1507 遺伝子座の DNA マーカー (多型) を見出し、また各マーカーの遺伝子型タイピングも行った。これら F<sub>2</sub> 個体の雌性花率は 100% から 0% まで広範囲に分布し、この値を形質値として 1507 マーカーによる QTL マッピングを行った。その結果、LOD 値が有意な QTL は少なくとも 3 箇所 (3 連鎖群) に見出された (図 1)。第 8 連鎖群の末端に位置する QTL が最も LOD 値が高く、その位置は以前に解析した雌性型遺伝子座とほぼ一致した。一方で第 11 連鎖群の QTL は有意ではあるものの LOD 値が低いことから、雌性型遺伝子座とは異なる雌性花率 QTL として第 4 連鎖群の QTL に着目した。

この第 4 連鎖群の QTL の雌性花率への効果について検証するため、LOD 値のピークを挟む 6 箇所 (SNPs) の遺伝子型を上記マッピングに供試していない 24 個体の F<sub>2</sub> 個体について調査し、各個体の雌性花率と比較した。その結果、各マーカーが OHB61-5 (母親) 型ホモの個体は雌性花率が高く、ヘテロ型あるいは OHB95-1A (父親) 型ホモ型では低くなる傾向が見られた。しかしこれらのマーカーおよび雌性型遺伝子座領域のマーカーもヘテロ型を示す個体でも高い雌性花率を示したことから、独立な雌性花率に影響を与える遺伝子座の可能性が考えられた。

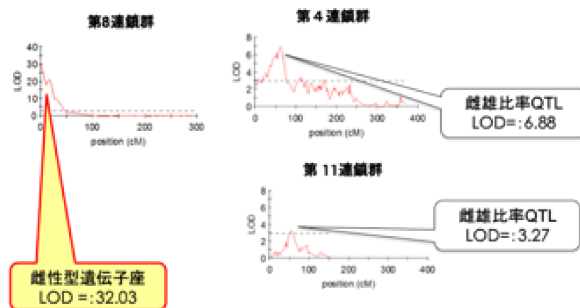


図1 雌性花率QTLマッピングの結果

##### (2) 第 4 連鎖群の雌性花率 QTL 領域の遺伝子解析

第 4 連鎖群において高い LOD スコアを示した雌性花率 QTL の領域に対応したニガウリリファレンスゲノム配列にある予測遺伝子を探したところ、272 個の遺伝子が見出された。これら遺伝子のいずれかが雌性花率に影響を与える遺伝子であるが、その絞り込みを行うため、雌雄花芽の RNA-seq から花芽で発現する遺伝子、両親間 (OHB61-5 と OHB95-1A) の全ゲノムリシークエンス解析から両親系統間でアミノ酸置換を伴う配列多型を示す遺伝子を絞り込んだ。その結果、花芽で発現し両親間で非同義置換を示す 7 遺伝子を選出された。実際にこれら 7 遺伝子について PCR とその配列解析で多型の確認を行った。

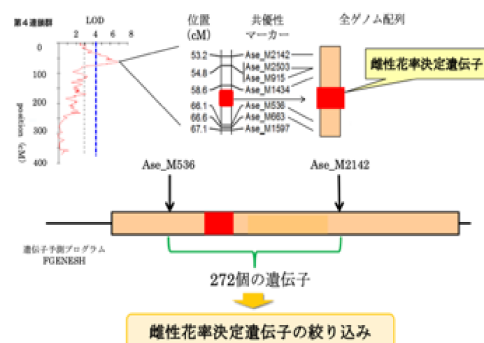


図2 雌性花率QTL領域の遺伝子の絞り込み

絞り込みを行った 7 遺伝子について現時点では詳細を公表できないが、両親間のアミノ酸置換が遺伝子産物の機能に影響を与えるかを明らかにするため *in vitro* でのタンパク質生産を進めている。

##### (3) ニガウリ Pseudomolecule (染色体配列) の構築

雌性花率に関する QTL から原因遺伝子を見出し、さらに QTL 間の相互作用などを解明する上で全ゲノム配列情報の充実が重要である。今までにイルミナシーケンサーによるショートリードシーケンスに基づいてアセンブルを行った全ゲノム配列情報を構築しているが (Urasaki et al., 2017) ゲノム全体のカバー率、連鎖地図との対応などは不完全であった。そこで科研費先進ゲノム支援のサポートを受けて長鎖リードシーケンスによるニガウリゲノムの再解析を行い、より充実した全ゲノム配列構築を行った。前出のリファレンスゲノム構築に使用したニガウリ系統 OHB3-1 の個体より高分子ゲノム DNA を抽出し、国立遺伝学研究所にて PacBio Sequel によるシーケンスを行った。その結果、平均 10,725bp のリードが 2,366,274 断片得られ、総データ量は約 25Gbp であった。これらのシーケンスリードについて Canu1.7 を用いて read correction ならびに *de novo* assemble を行った結果、221contig から構成される 302.99Mbp のゲノム配列が得られた。N50 は 9.89Nbp を示し、BUSCO スコアも 93.4% を示したことからほぼ全ゲノムをカバーした良好なアセンブル配列が得られたと判断した (表 1)。

表1 PacBio SequelによるOHB3-1のゲノムシーケンスとアセンブルの結果

|                        |                      |
|------------------------|----------------------|
| Reads (average length) | 2,366,274 (10,725bp) |
| Assembler              | Canu1.7              |
| Contigs                | 203                  |
| Total length (Mb)      | 302.29               |
| N50                    | 9,898,491            |
| Complete BUSCO (%)     | 93.4                 |

前出の OHB61-5 と OHB95-1A 間の F<sub>2</sub> 個体の RAD-seq 解析データで作出した連鎖地図について 1507 箇所のマーカーのうち 100kbp ウィンドウサイズで同一の遺伝子型分布を示すマーカーを整理した 1036 箇所の遺伝子座をマーカーとして改めて連鎖地図を作成し、上述の各コンティグ配列をマップした。また Cui ら (2017) が中国におけるニガウリ系統を用いて作成した連鎖地図に対しても同様にコンティグのマップを行なった。その結果、各 43 コンティグと 44 コンティグがマップされ、その長さはほぼ 293Mbp となり、アセンブルで得られた総コンティグ長の 97% となった。これら連鎖地図 (11 連鎖群) に配置されたコンティグ配列を各染色体のゲノム配列 (Pseudomolecule) とした (図 3、DDBJ 配列登録番号 BLBB01000001-BLBB01000193)。

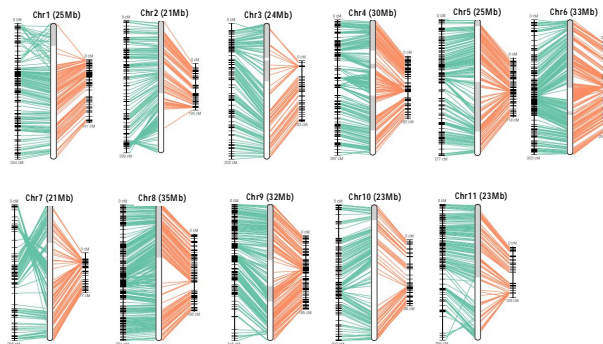


図3 ニガウリ染色体配列と連鎖地図上のマーカーの位置関係 (緑色:Cuiらの連鎖地図、橙色:Urasakiらの連鎖地図)

#### (4) ニガウリ染色体配列上の雌性花率 QTL

新たに構築した Pseudomolecule 並びにその元としたマーカー遺伝子座のデータから、前出の雌性花率の QTL 領域の算出を再度行なったところ、雌性型遺伝子座と推定される領域は第 1 染色体末端、(2) で解析した QTL は第 5 染色体に位置していた。さらに第 1 染色体末端には 2 つの高い LOD 値のピークが検出された (図 4)。これまで QTL 解析の結果 (図 1) において同領域は裾野の広い高い QTL が検出されていたため、雌性型遺伝子座に引っ張られて高い LOD を示していると推測していたが、本結果から近い距離に 2 つの QTL が存在する可能性が示された。どちらが雌性型遺伝子であるかは不明であるが、おそらく染色体末端側の遺伝子座が該当すると予想している。Cui ら (2018) は本研究で用いた系統と異なるニガウリ雌性型系統を利用してその形質を支配する QTL をマップしたが、本結果と類似の連鎖群の末端に 2 つのピークを検出している。

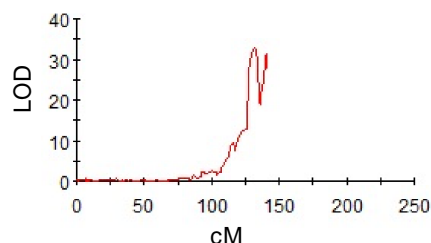


図4 第 1 染色体上の雌性花率 QTL

共同研究を行っている台湾大学において 60 系統のニガウリ栽培品種と野生系統の全ゲノムリシーケンス解析を行なって上記の Pseudomolecule にマップして SNPs を検出し、比較解析を行なった。これらの多型データから栽培品種群と野生系統群の Fst (遺伝的分化程度) を算出し

たところゲノム全体では高い値(分化程度が高い)を示したが、第1染色体の末端に近い領域すなわち上記の雌性花率 QTL 領域は有意に低い値を示した。この領域の遺伝子の遺伝子型が生殖特に雌性花と雄性花の比率という次世代の生産力に影響を与えるためこのような結果が見られている可能性が推測された。

これらの結果の詳細は Matsumura et al., 2020 PNAS に掲載している。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumura Hideo, Hsiao Min-Chien, Lin Ya-Ping, Toyoda Atsushi, Tani ai Naoki, Tarora Kazuhiko, Urasaki Naoya, Anand Shashi S., Dhillon Narinder P. S., Schafleitner Roland, Lee Cheng-Ruei | 4. 巻<br>117            |
| 2. 論文標題<br>Long-read bitter melon ( <i>Momordica charantia</i> ) genome and the genomic architecture of nonclassic domestication   | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.1921016117  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |

〔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<br>Hideo Matsumura  |
| 2. 発表標題<br>Draft Genome Sequence of Bitter Melon ( <i>Momordica charantia</i> ) as Vegetable Crop and Medicinal Plant |
| 3. 学会等名<br>Plant&Animal Genome XXVII (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松村英生、太郎良和彦、谷合直樹、宮城徳道、高木宏樹、浦崎直也 |
| 2. 発表標題<br>ニガウリにおける染色体レベルの全ゲノム配列情報整備へ向けて  |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会第135回講演会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三宅真佑子、鈴木翔太、福島舞、谷合直樹、宮城徳道、太郎良和彦、浦崎直也、松村英生 |
| 2. 発表標題<br>ニガウリ雌性花着花率に関するQTL解析の試み                   |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会第132回講演会                           |
| 4. 発表年<br>2017年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松村 英生, Min-Chien Hsiao, 豊田 敦, 太郎良 和彦, 谷合 直樹, 宮城 徳道, 浦崎 直也, Shashi Anand, Narinder Dhillon, Roland Schafleitner, Cheng-Ruei Lee |
| 2. 発表標題<br>ニガウリにおける Long Readデータによるゲノム配列の構築と系統間の多型解析  |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会第137回講演会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Chittaranjan Kole, Hideo Matsumura, Tusar Kanti Behera | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>Springer   | 5. 総ページ数<br>135 |
| 3. 書名<br>The Bitter Gourd Genome                                 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|---------------------------------|--|----|
| 研究協力者 | 浦崎 直也<br><br>(Urasaki Naoya)    | 沖縄県農業研究センター・研究企画班・上席主任研究員<br><br>(88002) |    |
| 研究協力者 | 太郎良 和彦<br><br>(Tarora Kazuhiko) | 沖縄県農業研究センター・研究企画班・主任研究員<br><br>(88002)   |    |