

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26292018

研究課題名(和文)メロン遺伝資源を活用した日持ち性に関する分子生物学的解析

研究課題名(英文)Molecular biological studies on shelf-life in melon using various genetic resources

研究代表者

中野 龍平(Nakano, Ryohei)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70294444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：日持ち性の良いメロン遺伝資源について生理的特徴を把握し、その形質の遺伝様式や関連遺伝子を調査した。1) B2はエチレン生成能を持つがエチレン依存的軟化が緩慢で、Cm-PG1およびCm-EXP5の発現抑制が関連していた。春系3号との交配後代においてこの形質は優性を示した。2) ハニーデューはエチレン生成能が欠損しており、シャランテとの交配後代においてこの形質と連鎖した領域が見出された。3) ハミウリでは、シャランテとの交配後代においてエチレン生成能の欠損系統とエチレン依存的軟化の欠損系統が見つかった。いずれも劣性であり、シャランテへの戻し交配を繰り返しこの形質を持つ系統がBC4F2世代まで選抜された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果において、自己触媒のエチレン生成能とエチレン依存的軟化誘導がそれぞれ別々に欠損されているメロン系統が発見されている。このようなエチレン生成とエチレンによる軟化が別々に制御されている事象は果実生理研究のトマトにおいても報告がない。さらに、B2の持つエチレン依存的軟化誘導の欠損は優性の変異であり、このような変異の発見は新規性が高く学術的な意義は高い。本研究は、実際の流通現場で問題となっているメロンの日持ち性の改善を目的とした研究であり、研究過程で得られた系統や成果は、今後のメロンの日持ち性を改善する育種あるいは流通・技術の開発に繋がるなど社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：In melon genetic resources with long self-life, their physiological characteristics were studied as well as hereditary pattern of their traits and related genes. 1) B2 melon produced ripening ethylene, while lose ability to soften in response to ethylene. That trait was linked to suppressed expression of cell wall degradation related-genes, Cm-PG1 and Cm-EXP5. The trait showed dominant inheritance in cross between B2 and Haru3-melon. 2) Haneydew-melon lose ability to produce ripening ethylene. Linkage analysis in F2 population of corss between haneydew and charentais-melon suggest chromosome regions linked to this trait. 3) In progeny of cross between hami-melon and charentais, two types of strains, one lacking ability to produce ripening ethylene and the other lacking ability to soften in response to ethylene were found. Both traits were recessive and through repeated backcrosses against charentais-melon, strains possessing each trait was identified at BC4F2 generation.

研究分野：園芸利用学

キーワード：メロン 日持ち性 エチレン 軟化 老化 遺伝資源

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メロンは商業的に重要な作物であるが、一般に日持ちが悪く、その改善が強く求められている。メロンは成熟に植物ホルモンエチレンが関与するクワイケリック型の果実に分類される。本研究グループは、成熟の開始のみならず、過度の軟化や老化の進行にもエチレンが関与していること明らかにし、日持ち性には、メロン自身のエチレン生成能とエチレンにより果肉が軟化・崩壊する反応性の二つが大きく影響することを見出している。近年の次世代シーケンサーの発達により、メロンでは 2012 年に全ゲノム配列が公開され、ゲノムワイドな網羅的発現解析や公開された配列をリファレンスとした解析による多型・変異の探索などが実現可能な状況が整えられている。しかしながら、一般的にゲノムサイズが大きく、一世代の期間が長い園芸作物では、モデル植物と同じスピードで変異体コレクションや遺伝子組換え体を作成することは困難であり、モデル植物とは異なった方向性によるゲノム情報を生かしたポストゲノム解析が必要である。その一つとして、園芸作物には、栽培起源以来の長年にわたる園芸活動の結果として、様々な特性を持つ品種や系統の蓄積があり、その遺伝資源の活用が注目されている。実際に、次世代シーケンサーが普及し、誰にでも一気に全ゲノムレベルの解析が導入可能となったこれからは、その解析目標に合致した遺伝資源・遺伝的集団の保有が研究の正否を決定するといっても過言ではない。本研究は、これまでに研究グループの一員を中心に収集された 1500 系統以上におよぶメロン遺伝資源を活用し、特に、日持ち性の良いハミウリ、ハニーデュー、ネット系メロン B2 などに注目して解析を進め、収穫後の日持ち性に関連する遺伝子の探索を試みようとするものである。

2. 研究の目的

本研究では、研究グループが保有するメロン遺伝資源を活用し、2012 年に公開されたメロン全ゲノム配列や急速に進歩した次世代シーケンサーによる解析手法と組み合わせることにより、メロン果実の収穫後の日持ち性に関連する遺伝領域や遺伝子の探索を目的とする。メロンは一般に日持ちが悪く、その改善が強く求められているが、メロン遺伝資源の中には、日持ち性の良い系統が存在する。これらの系統と一般のメロン、あるいは、その交配後代について、次世代シーケンサーを利用した解析を実施し、日持ち性に関連する遺伝領域や遺伝子を探索する。成熟にエチレンが関与するクワイケリック型果実の成熟・老化に関する研究はこれまでトマトを中心に行われてきた。しかし、トマトの知見は必ずしも他の果実に当てはまらず、近年、トマトの情報だけでは不十分であると指摘されている。本研究では、トマトでも報告されていない反応を示す系統が見つかる可能性が高く、エチレン生成や感受性といった既知の経路だけでなく、エチレンと協調的に作用すると予想されている未知の経路の発見に繋がる可能性がある。また、本研究は、日持ち性が悪いというメロンの問題を起点としており、得られた知見や研究過程で育成された系統は、今後、流通技術の開発、新品種育成に活用されると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、日持ち性の良いメロン遺伝資源の内、特に、B2、ハミウリ、ハネデューにおいて日持ち性に関連する遺伝領域や遺伝子の探索を試みた。

(1) B2 メロンが持つ日持ち性の向上に関わる因子の探索：

日持ち性の良いネット系メロンである B2 に対加え、一般的なネット系メロンである春系 3 号を対照として供試した。プレクワイケリック段階で収穫した果実にエチレンアナログのプロピレンを外生処理し、その自己触媒的エチレン生合成や果肉軟化への影響を調査した。B2 x 春系 3 号、春系 3 号 x B2 の F1~F3 世代を育成し、自己触媒的エチレン生合成やエチレン応答性軟化の遺伝様式を調査した。さらに、qRT-PCR や RNA-seq 解析により、軟化関連遺伝子、エチレンシグナル伝達系主因遺伝子などの発現変化や遺伝子配列のプロファイリングおよび比較を行った。

(2) ハニーデューメロンが持つ日持ち性向上因子の分子生物学的解析：

自己触媒的エチレン生成能が欠損しているハニーデューに対して、エチレンを生成し軟化が早く日持ち性の悪いシャランテメロンを対照して供試し、プロピレン処理果実やエチレン作用性阻害剤の 1-MCP を処理した果実などについて RNA-seq 解析を行い、軟化関連遺伝子を含む遺伝子発現の網羅的解析を実施した。さらに、ハニーデュー x シャランテの F2 世代に関して、自己触媒的エチレン生成能を含む多くの形質を調査するとともに、それらの形質の予備的なマッピングを試みた。

(3) 日持ち性およびその要因が異なるメロン系統の統合解析：

B2、ハニーデューとも日持ち性が優れるが、B2 は外生エチレンによる軟化の誘導がなく、自己触媒的エチレン生成を示す。ハニーデューは自己触媒的エチレン生成能が欠損しており、外生エチレンには反応して軟化するというように、エチレンに対する応答性が異なっていた。日持ち性の悪い春系 3 号、シャランテも含めた、シーケンスタデータの統合的解析を行い、それぞれの形質につながるシグナル因子の探索を試みた。

(4) ハミウリが持つ日持ち性向上特性の解析：

ハミウリ x シャランテの F1 および F2 後代を育成し、外生プロピレン処理への反応から、その自己触媒的エチレン生成能およびエチレン依存的軟化特性を調査しつつ、日持ち性の良い系統を選抜した。2 タイプの日持ち性の良い系統が見出され、それぞれについてシャランテへの戻し交雑とその F2 世代における選抜を繰返した。異なった要因による日持ち性の良い系統を BC4F2 世代まで育成し、その自己触媒的エチレン生成能およびエチレン依存軟化特性を調査した。

4. 研究成果

本研究では、研究グループが保有するメロン遺伝資源より日持ち性の良いメロン数種を材料とし、それぞれの遺伝資源の日持ち性に関連する生理学的、遺伝的特徴を把握するとともに、公開されたメロン全ゲノム情報や次世代シーケンサーによる解析手法との組合せにより、日持ち性に関連する遺伝領域や遺伝子の探索を試み、以下の成果が得られた。

(1) B2 メロンが持つ日持ち性の向上に関わる因子の探索：

B2 にエチレンと同じ作用を持つプロピレンを外生的に処理したところ、自己触媒的エチレン合成は誘導されるにも関わらず、軟化は誘導されずプロピレン存在下でも日持ち性が良いことが明らかとなった（図 1）。また、B2 と代表的なネット系メロンである春系 3 号の交配 F1 後代について調査したところ、B2 の持つ軟化に関するエチレン非感受性の形質が優性形質であることが明らかとなった。F2 世代の結果より、複数の遺伝子座に関わる量的な形質であることが示唆されたが、F3 後代のエチレン感受性を調査したところ、寄与率の大きな遺伝領域の存在の可能性が示唆された。B2 と春系 3 号に関して、エチレン伝達系の主因子を網羅的に比較解析したところ、配列、発現ともにエチレン非感受性を説明できる違いは見出されなかった。両者の RNA-seq 解析による比較より、春系 3 号においてエチレンに応答して発現増加する多数の細胞壁分解関連遺伝子の内、B2 では *Cm-PG1* と *Cm-Exp5* の発現が増加しないことが明らかとなり（図 2）、この傾向は交配後代における日持ち性とも関連していた。これまでも、エチレンに非感受性を示す変異体の例はあるが、自己触媒的エチレン生成能を保持しながらも、軟化においてのみエチレン非感受性を示す例はトマトの変異体でも報告がない。また、その性質が優性であることや、Expansin ホモログ（*Cm-Exp5*）の関与を明示した結果も、これまでの果実生理の研究で報告されておらず、新しい知見である。

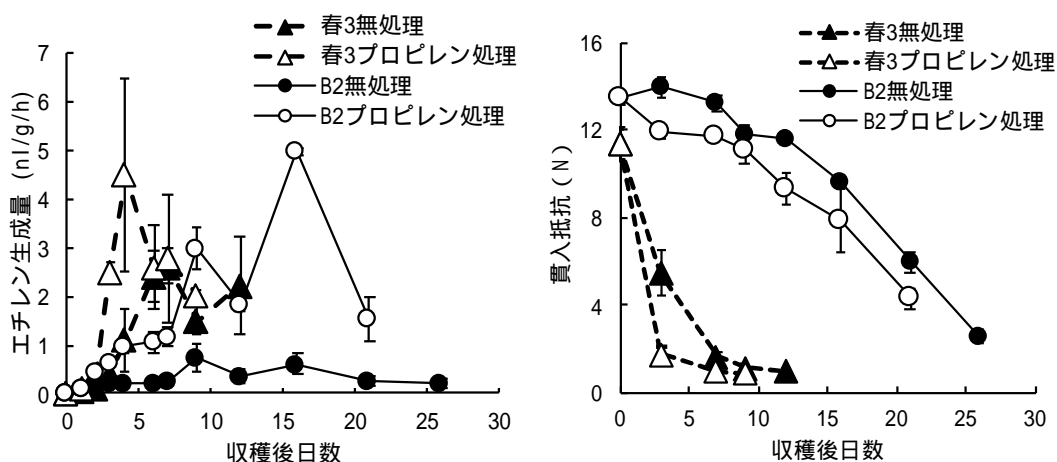


図 1 B2 および春系 3 号メロンにおける、収穫後のエチレン生成と果肉硬度（貫入抵抗）の変化およびプロピレン処理がこれらに及ぼす影響

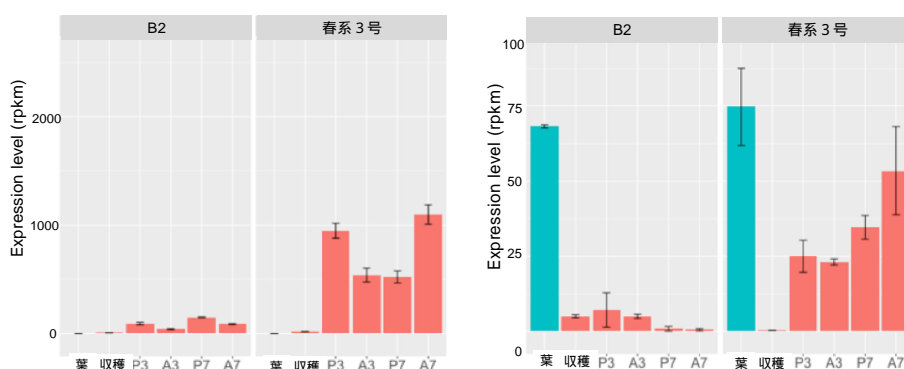


図 2 B2 および春系 3 号メロンにおける *Cm-PG1*(左)および *Cm-Exp5*(右) 遺伝子の発現量 (RNA-seq 解析の rpkm、P3,P7; プロピレン処理 3,7 日目、A3,A7; 無処理 3,7 日目)

(2) ハニーデューが持つ日持ち性向上因子の分子生物学的解析：

ハニーデューメロンは自己触媒的エチレン生成能を欠いているために日持ち性が良いこと、外生エチレン処理に反応して軟化・老化することが確認された。ハニーデューおよび日持ち性の悪いシャランテの RNA-seq による網羅的発現解析を実施した。無処理の果実、エチレン処理した果実、エチレン作用性阻害剤 1-MCP を処理した果実を用いて解析した結果、細胞壁分解関連タンパク質、エチレン情報伝達系転写因子群を含む様々なタンパク質をコードする遺伝子に関して、その発現制御のエチレン依存性ととも、日持ち性に関連した違いを示す候補遺伝子が見出され

た。ハニーデュー x シャランテの F2 後代を 100 系統育成したところ、様々な形質を示す個体が得られ (図 3)、その外生プロピレン処理への反応に関して表現型を調査した。さらに、予備的なマッピングを試みたところ、自己触媒的エチレン生成や果肉色を含むいくつかの形質と連鎖する領域が見つかった (図 4)。

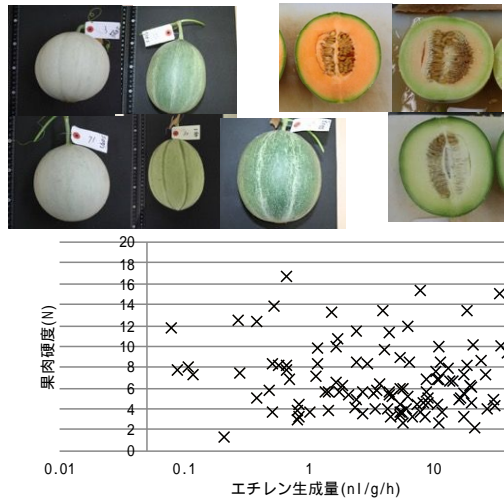


図 3 様々な形質を示すハニーデュー x シャランテの F2 後代

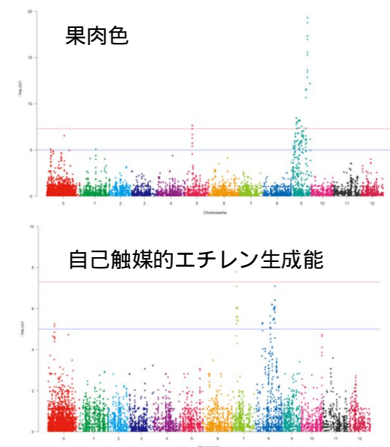


図 4 ハニーデュー x シャランテの F2 後代における果肉色および自己触媒的エチレン生成能に関する予備的連鎖解析

(3) 日持ち性およびその要因が異なるメロン系統の統合解析:

B2、ハニーデューとも棚持ちが良いが、上述のように B2 とハニーデューはエチレンに対する応答性が異なっており、それぞれの形質につながるシグナル因子の解析が期待できる。日持ち性の悪い春系 3 号、シャランテも含めた、シークエンスデータの統合的解析の結果、*Cm-PG1* および *Cm-Exp5* はエチレンによる軟化の挙動と一致した発現を示した。エチレンシグナル因子 *Cm-ETR2*、転写因子 *Cm-NAC87* などがシグナル因子の候補として見つかったが、各メロンのエチレン応答性の違いとの明確な関連性は検出されなかった。

(4) ハミウリが持つ日持ち性向上特性の解析:

ハミウリは自己触媒的エチレン生成能を持たず、果肉軟化が起こらず日持ち性の良い。ハミウリと日持ち性の悪いシャランテの交配による F1 世代では、すべての果実がエチレンを生成し急激な軟化・老化を示し、ハミウリの形質が劣性であることが確認された。F2 後代においては、様々な形質の分離が観察され、プロピレンを外生処理したところ、a) 自己触媒的エチレン生成の誘導および軟化とも抑制されている系統と、b) 自己触媒的エチレン誘導は起こるにも関わらず軟化抑制されている系統の、2 種類の系統が見出された。シャランテへの戻し交雑を繰り返しつつ、日持ち性の良い系統の選抜を継続したところ、タイプ a の後代からもタイプ b の系統が出現することが分かり、タイプ a の形質にタイプ b の形質が隠れていること、各々の形質が異なった遺伝子座に座乗していることが示唆された。戻し交配のさらに後代においても a)、b) 2 種類の日持ち性の良い系統を選抜できており (図 5)、遺伝的バックグラウンドがシャランテに近く、網羅的解析や育種素材として有益な日持ち性の良い系統が獲得できた。

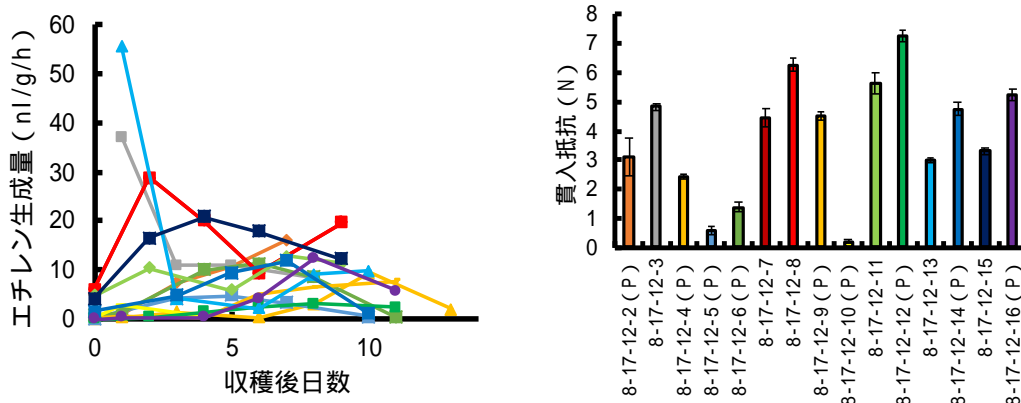


図 5 ハミウリ x シャランテの BC3F2 世代におけるエチレン生成 (左) や処理 10 あるいは 14 日目の果肉硬度 (右) (軟化のみ抑制されるタイプ B の系統が選抜)

以上のように、それぞれ異なった因子に起因した日持ち性の良いメロン系統が見つかっており、日持ち性の悪い系統も含めて、それぞれの網羅的解析が進んでおり、関連する遺伝子の発見に至っている。今後、さらなる交配後代の解析や、統合的な解析を進めることにより、自己触媒的エチレン生成やエチレン依存的軟化に関連する因子の特定が期待できる。これらの成果の中には、トマトでも報告されていない特徴も発見されており、今後、流通技術の開発、新品種育成に活用されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

中野龍平・園芸利用学分野における次世代シークエンサーの活用の可能性・園芸学会平成27年度秋季大会シンポジウム(招待講演)(2015年9月26日-27日、徳島大学)

岡本健、中村智哉、上山美穂、浜田佳代子、山岡達也、牛島幸一郎、村上賢治、加藤謙司、久保康隆、中野龍平・棚持ち性の良いメロン系統のエチレン応答性に関する研究・園芸学会平成27年度秋季大会。(2015年9月26日-27日、徳島大学)

岡本健、中村智哉、上山美穂、山岡達也、牛島幸一郎、村上賢治、加藤謙司、久保康隆、中野龍平・ハミウリおよびその後代の棚持ち性に関する調査・園芸学会中四国支部平成27年度大会。(2015年7月25日、米子市)

岡本健、上山美穂、中西諒祐、牛島幸一郎、村上賢治、加藤謙司、久保康隆、中野龍平・棚持ち性の良いメロン系統の交配後代における表現型の調査・園芸学会平成28年度春季大会(2016年3月26-27日、東京農業大学)

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤謙司

ローマ字氏名：Kato Kenji

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40161096

研究分担者氏名：村上賢治

ローマ字氏名：Murakami Kenji

所属研究機関名：石川県立大学

部局名：生産科学科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40200266

研究分担者氏名：高居恵愛

ローマ字氏名：Takai Mei

所属研究機関名：石川県立大学

部局名：生産科学科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70589770

研究分担者氏名：牛島 幸一郎

ローマ字氏名：Ushijima Koichiro

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20379720

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久保 康隆

ローマ字氏名：Kubo Yasutaka