

平成 31 年 4 月 12 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21227

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを利用したメロン生殖隔離緩和遺伝子piaの解析と育種利用

研究課題名（英文）Analysis melon reproductive barrier alleviation gene pia using a next generation sequencer

研究代表者

松本 雄一（Matsumoto, Yuichi）

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：80538265

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）：RAD-seqの結果467,632,885本のリードが得られ、Stacksを用いた解析により173,886個の遺伝子座が検出され、P1320052とP1364475間に23,929個のSNPが検出された。それらのうちF2分離集団99個体中70個体以上で検出できた1,548個のSNPをマーカーとして用い、pia遺伝子型推定の結果と合わせて解析を行ったところ、12連鎖群から成る1,473個のSNPが座乗する全長26,406cMの連鎖地図が構築された。piaは連鎖群Hのマーカー112296とマーカー13073の間にそれぞれ10.9cMと8.5cMの距離に位置した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メロン育種において野生遺伝資源の利用の妨げとなる生殖隔離の克服に向け、生殖隔離緩和遺伝子piaの利用を可能とするための遺伝子座の位置について次世代シーケンサーを用いた調査を行った。その結果遺伝子の位置する染色体の領域について明らかとなり、今後の遺伝子の詳細なメカニズムの解明や実際の品種開発への利用について基礎となる情報が得られた。これらの結果をもとにした、生殖隔離の学術的解明のほかメロンを始めとする様々な品種開発への利用・貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：467,632,885 leads were provided as a result of RAD-seq, and 173,886 locus were detected by analysis with Stacks, and 23,929 SNP was detected.

A linkage map of full length 26,406cM that 1,473 SNP consisting of 12 linkage groups was constructed.

研究分野：園芸学

キーワード：メロン 生殖隔離

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

### 1. 研究開始当初の背景

ウリ科キュウリ属野生種はつる割病レース 1,2y 真性抵抗性など従来の栽培種には見られない有用形質を有しており、有用遺伝資源として注目されている。しかしながら、メロンとこれら野生種間での種間交雑においては受精前の花粉管の伸長停止などの生殖隔離により、雑種の獲得が困難であった。しかしながら、近年メロンと野生種との種間交雑において高温条件下受粉により花粉管伸長の阻害が緩和され、受精が可能となること、さらにこの緩和現象には *C. anguria* の単因子劣性遺伝子 *pia* が関与していることが明らかになるなど、新たな展開を見せている。本遺伝子について座乗位置等を明らかにすることで、生殖隔離緩和現象の解明や種間交雑育種へと応用することが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、生殖隔離緩和遺伝子 *pia* について次世代シーケンサーによる RAD-seq 法を用いた解析を行い、高密度連鎖地図の作成を通じた選抜マーカーの開発を行う。さらに、開発マーカーを利用した他種への *pia* 遺伝子の導入による生殖隔離の回避について検証する。

### 3. 研究の方法

*C. anguria* の 2 系統間の F<sub>2</sub> 分離集団を作成し、花粉管伸長と RAD-seq の結果をもとに連鎖解析を行い *pia* に近傍なマーカーの特定を試みた。*C. anguria* の雌蕊上でのメロンの花粉管伸長を観察するために花粉親にはメロン系統 'MR-1'、雌蕊親には *C. anguria* の 2 系統 'PI 320052'、'PI 364475'、その交雑に由来する F<sub>1</sub> (PI 320052 × PI 364475) 及び F<sub>2</sub> 分離集団 69 個体を用いた。種間交雑を行った雌花については 33 に設定したインキュベータに移し、7 時間後に雌蕊を回収した後、アニリンブルーで染色し花粉管伸長距離を蛍光顕微鏡下で測定した。RAD-seq は、PI 320052、PI 364475 及び F<sub>2</sub> 分離集団 99 個体の DNA を抽出し、EcoRI と Covaris M220 によって断片化させライブラリ調製を行った。調製したライブラリは HiSeq2500 を用いて 50 bp シングルエンドの条件でシーケンスを行った。得られたリードは Stacks を用いて SNP の検出を行った。連鎖解析は花粉管伸長と SNP の遺伝子型の結果をもとに JoinMap 5 を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *C. anguria* とメロンとの種間交雑における生殖隔離緩和の確認

33 のインキュベーター内で受粉後 7 時間における PI 320052、PI 364475 及び F<sub>1</sub> の雌蕊上でのメロンの花粉管伸長距離は 3.49 mm、0.83 mm、0.89 mm であった。PI 320052 においては PI 364475 及び F<sub>1</sub> と比較して、メロン花粉管伸長阻害の緩和が観察された。

#### (2) PI 320052 × PI 364475 の F<sub>2</sub> 分離集団の作出

2016 年に行った F<sub>1</sub> の自殖により合計で約 600 粒の F<sub>2</sub> 分離集団の種子が得られた。

#### (3) PI 320052 × PI 364475 の F<sub>2</sub> 分離集団における *pia* 遺伝子型推定

F<sub>2</sub> 分離集団 69 個体について花粉管伸長の観察を行った。69 個体のうち 1.0 mm 以下の花粉管伸長を示す個体は 53 個体見られ、ほとんどが PI 364475 や F<sub>1</sub> と同様、メロンの花粉管伸長が阻害されるものであった。一方、花粉管伸長が 1.0 mm 以上となり阻害が緩和された個体は 16 個体見られた。1.0 mm 以下を非緩和系統、1.0 mm 以上を緩和系統として期待される分離比 3 : 1 のカイ二乗検定を行ったところ、X<sup>2</sup> 値 0.12、*p* 値 0.73 となり緩和現象が単一遺伝子に支配されていることが示唆された。

#### (4) PI 320052 × PI 364475 の F<sub>2</sub> 分離集団における RAD-seq 及び SNP 検出

ライブラリ調製の結果、2017 年と 2018 年にそれぞれ 16.4 ng/μL、11.4 ng/μL の濃度のライブラリが得られた。これらのサンプルをシーケンスにかけたところ、合計で 467,632,885 本のリードが得られた。このリードを process\_radtags コマンドで各個体のリードに分け、短いリードの除去が行われ最終的に Stacks の解析に用いた。F<sub>2</sub> 分離集団 99 個体の中で最もリード数が少ないのは F2\_28 の 538,534 本、最も多いのは F2\_81 の 5,521,180 本であった。これらのリードを denovo\_map.pl につけて個体ごとに遺伝子座の検出を行った。個体ごとの遺伝子座の平均リード数 (Coverage depth) は、最小の Coverage depth を示したのは F2\_28 の 8.63、最大は F2\_93 の 23.36 であった。PI 320052 及び PI 364475 からは 173,886 個の総遺伝子座と 23,929 個の SNP が検出された。それらの結果をもとに genotypes によって F<sub>2</sub> 分離集団の SNP 検出を行った結果、99 個体中 70 個体以上で検出できた SNP マーカーは 1,548 個であった。

#### (5) 生殖隔離緩和遺伝子 *pia* の連鎖解析

得られた F<sub>2</sub> 分離集団の SNP マーカーの遺伝子型をもとに JoinMap 5 を用いて連鎖解析を行ったところ、12 連鎖群から成る 1,473 個の SNP が座乗する、全長 26,406.4 cM の連鎖地図が構築された。この地図のマーカー間の平均距離は 17.9 cM であった。*pia* 遺伝子は連鎖群 H の 112296 マーカーと 13073 マーカーの間に位置し両マーカーからの距離はそれぞれ 10.9 cM と 8.5 cM であった。

今回の研究では前回報告されていた結果と同様に、PI 364475 および F<sub>1</sub> においては花粉管伸長停止の緩和が見られず、PI 320052 でのみ緩和が見られた。前回の研究における PI 320052 の花粉管伸長は受粉 8 時間後では 1.95 mm であり、今回の実験の条件は受粉 7 時間後の花粉管伸長であるにもかかわらず 3.49 mm であった。PI 364475 及び F<sub>1</sub> についても前回の報告ではそれぞれ 0.60 mm、0.59 mm に対して本研究では 0.83 mm、0.89 mm であった。前回の実験の条件は受粉後、湿ったキムタオルに雌花を挟み、32 に設定したインキュベーターに 8 時間置くというものであり、雌花の萎れが見られていた。今回は受粉後の雌花を水の入ったチューブに立て 33 に設定したインキュベーターに置いたため、雌花が萎れることなく良い状態を保つことができたと考えられる。そのため本研究ではこの方法花粉管の観察を行った。

F<sub>2</sub> 分離集団を用いた表現型観察では非緩和系統と緩和系統が 3 : 1 の分離を示した。前回の報告においても非緩和系統と緩和系統がそれぞれ 60 個体と 24 個体であり 3 : 1 の分離を示した。この結果から *pia* が単一遺伝子であることが強く示された。

2017 年の結果では PI 320052 及び PI 364475 に RAD-seq を適用した際には総遺伝子座数は 164,930、SNP 数は 22,908 であった。2018 年では RAD-seq により 173,886 個の総遺伝子座と 23,929 個の SNP が検出され、これらの数は 2017 年と同程度の結果となった。2018 年ではこの 23,929 個の SNP のうち F<sub>2</sub> 分離集団 70 個体以上において検出できた 1,548 個の SNP をマーカーとして連鎖解析を行い、1,473 個の SNP マーカーが座乗する、12 連鎖群、全長 26,406.4 cM、全体のマーカー間の平均距離 17.9 cM の連鎖地図が得られた。連鎖群数については *C. anguria* の基本染色体数 12 本に収束した。一方で全長とマーカー間の平均距離については、*C. anguria* において以前の研究で作成された 44 個の SSR マーカーが座乗する全長 311.3 cM、マーカー間の平均距離 6.9 cM の連鎖地図と比較し、今回作成された連鎖地図は非常に長く低密度なものとなった。また *C. anguria* と基本染色体数が同じであるメロンにおいて近年報告されている連鎖地図はマーカー数 168 ~ 713 個、全長 877 ~ 1,654 cM であることや、ニガウリ (*Momordica charantia*) に RAD-seq を適用し得られた全長 1,821 cM の連鎖地図、*Vitis* 属種間雑種に RAD-seq を適用し得られた 1,912.3 cM の連鎖地図と比較しても今回作成された連鎖地図の全長が長いことが分かる。本研究で作成された連鎖地図は以前 *C. anguria* において報告された 44 個よりも約 33 倍のマーカー数に増加したにも関わらずこの様に低密度になったのは、全長がマーカー数の増加を上回る約 75 倍の長さになったためであるが、地図の全長が長くなった原因については現在調査中である。また以前の研究で報告された *pia* に隣接したマーカーは 3.7 cM と 4.5 cM であり、今回報告した連鎖群 H のマーカー 112296 とマーカー 13073 の 10.9 cM と 8.5 cM よりも近い位置に座乗しており、より近傍なマーカーの作出には至らなかった。

本研究は *C. anguria* の F<sub>2</sub> 分離集団に対して初めて RAD-seq を適用し、連鎖解析を行った研究である。得られた連鎖地図は全長 26,406.4 cM と非常に長いものとなった。しかしながら、今後その原因が明らかとなることで、本研究により得られた SNP マーカーの情報をもとに高密度連鎖地図を構築することができるであろう。今後、*pia* により近傍なマーカーが得られることで、生殖隔離緩和現象機構の解明や原因遺伝子の特定が進むことを期待したい。

連鎖群 H

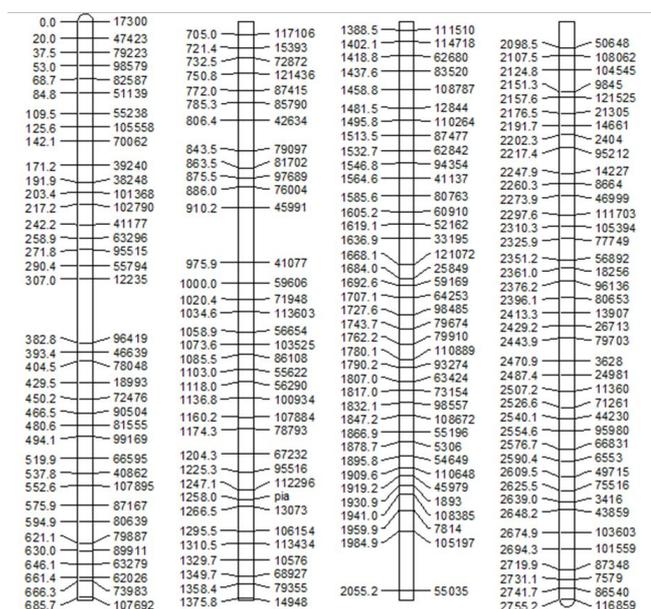


図 : F<sub>2</sub> 分離集団を用いて作成された *C. anguria* の連鎖群 H

連鎖群の右側は SNP マーカー名を表し、左側はマーカー間の距離 (cM) を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

白川篤史、有馬進、永野幸生、松本雄一. *Cucumis* 属種間交雑における高温処理による不親和性緩和の遺伝様式. 日本育種学会第134回講演会. 2018年

松本雄一、久保山勉. 生殖隔離の克服による *Cucumis* 属野生種とメロンとの種間雑種作出の試み. 日本育種学会第134回講演会. 2018年

白川篤史、永野幸生、有馬進、松本雄一. キュウリ属の野生種における RAD-seq を用いた SNP 探索及び解析方法の検討. 日本育種学会第12回九州育種談話会. 2017年

〔図書〕(計0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。