

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K01087

研究課題名（和文）メロン種子遺存体のDNA情報を活用して選抜された果実特性を推定するための基盤研究

研究課題名（英文）Development of ancient DNA analysis in melon seed to discuss which fruit traits were preferred in change of the Japanese society

研究代表者

田中 克典（Tanaka, Katsunori）

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：00450213

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）：食の嗜好性について選抜されたメロンの形質から提示するために、現生メロンのDNAならびに遺跡から出土したメロン種子に残存するDNAを次世代塩基配列解析手法によって解読した。現生メロンの解析では果実の甘さや長さに関わるDNA領域を検出できた。種子遺存体の解析では、DNA遺存量が多いと、メロンのゲノム領域は検出されやすいことがわかった。また、メロンの核ゲノム領域が検出されたことは、果実の甘さや長さが選抜されたことを分子レベルで解析できることを示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種子遺存体においてDNA遺存量が多いとメロンのゲノム領域が検出されやすい結果は新たな知見であった。特に、結果はDNA遺存量を把握することによって多くの遺伝情報が種子遺存体から収集できることを示唆しているため、種子遺存体のDNA情報を活用する研究において重要な知見となる。

また、本研究によって現生メロンから解読されたDNA情報はコアコレクション構築に貢献した。コアコレクションは間もなく配布予定であり、試料数を縮小して短期間のうちに形質を評価することを通じて育種の材料を速やかに提示できるので、農業に貢献する点で意義があった。

研究成果の概要（英文）： To understand food preference inferred by selected-fruit-traits in melon, DNA from modern melon accessions and archaic DNA from melon seed remains were sequenced by next-generation DNA sequencer. Quantitative trait locus of fruit length and soluble solid contents were detected by the analysis of modern melon accessions. An analysis of melon seed remains revealed that archaic-melon-nuclear-genome remained in seeds that large number of archaic DNA regions was found. It indicated that selection for fruit length and sweetness in melon was able to be analyzed by molecular genetic technology.

研究分野：遺伝育種科学、文化財科学、園芸科学

キーワード：考古学 遺跡 育種 形質 NGS 次世代シーケンス 多様性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本において、メロン仲間は、考古学的知見 (藤下 1992 など) また数々の史実 (『古事記』他) から鑑みて、古くから庶民に利用されていたと考えられる。そこで、申請者は科研費「若手研究 B」や「基盤研究 C」(以下、「先の科研費」とする。)において、江戸時代までに様々なメロンが導入され、その後には選抜されたことを示していた (Tanaka et al. 2016)。一方、分析試料に残存する DNA が生物分解や劣化で断片化していたため、技術上、得られる情報量が少なかった。その問題により、人が嗜好などによってメロンを選んで固有の品種を成立させたことなど、選抜の実態を示すことはできなかった。

2. 研究の目的

メロン仲間の種子遺存体に残存しているできるだけ多くのメロン DNA を情報として活用するために、次の 2 点の課題を克服すべく本研究を着想するに至った。

- ・次世代塩基配列解析で現生メロンから種子遺存体分析用のバックデータを構築する。
- ・種子遺存体に残存するメロン DNA を多く解読できる次世代塩基配列解析法を見出す。

3. 研究の方法

申請者は日本のメロンにおける選抜の実態を解明するために、下記 2 つの項目を実施して、次世代塩基配列解析をメロン種子遺存体の分析に適用できるようにした。

次世代塩基配列解析で現生メロンから種子遺存体分析用のバックデータを構築した。

次世代塩基配列解析 (RAD-Seq 法) を利用して 778 系統のメロン遺伝資源において DNA 配列を網羅的に解読した。系統間で DNA 配列に違いがある部分をデータ解析により見だし、種子遺存体分析用のバックデータとした。また、選抜に関わる嗜好性として果実の大きさと甘さに着目しこれらの形質に関わる DNA 領域 (QTL) の検出した。

種子遺存体に残存するメロン DNA を多く解読できる次世代塩基配列解析法を見出す。

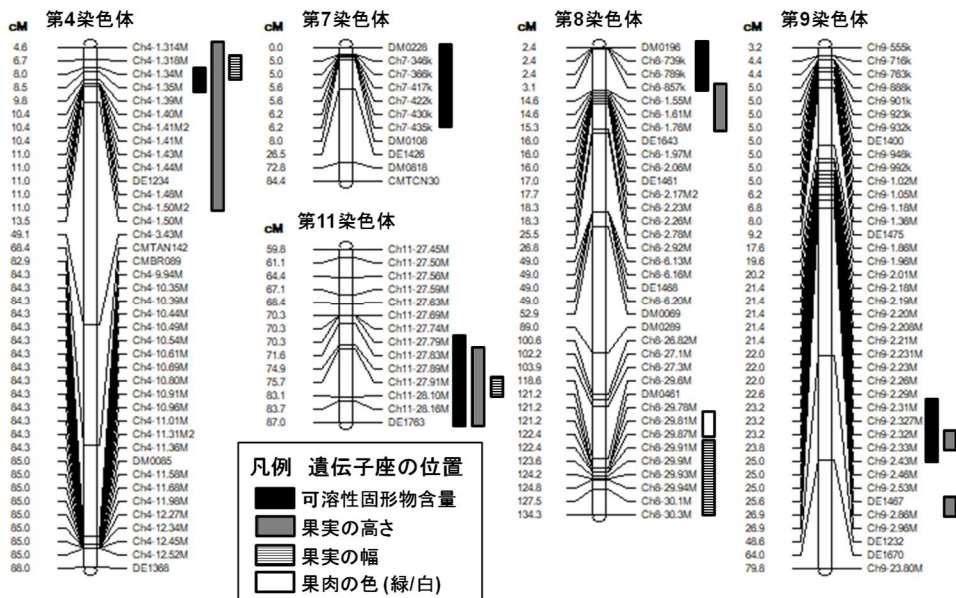
鹿田遺跡の種子遺存体 (弥生中期 - 江戸時代) において残存する DNA について塩基配列を次世代塩基配列解析法で解読した。残存 DNA は PCR 増幅を介しない手法と PCR 増幅により極低頻度に含まれる DNA を解読可能にする方法 (アンプリコンシーケンス法) で調整してから、塩基配列の解読に用いた。解読した塩基配列は米国国立生物工学情報センター (NCBI) のデータベースと照合してメロンゲノムの配列を特定した。

4. 研究成果

研究成果は研究目的に沿って 2 つに分けて以下に記した。

次世代塩基配列解析で現生メロンから種子遺存体分析用のバックデータの構築

RAD-Seq 法によって得られた塩基配列をメロン参照ゲノム配列 (DHL92) に位置づけて、44,645 箇所の一塩基多型 (SNPs) を検出した。これら SNPs によって分類された 5 つのメロングループは、「若手研究 B」で見出した母系と対応していた (嶋田ら 2020)。この結果によって、メロン種子遺存体を大別するうえで比較的試料に遺存している葉緑体ゲノムが活用できることがわかった。



第 1 図 85 系統のネットメロン F6 集団において IM 法により検出された果実形質関連遺伝子座 LOD 閾値は 3.5. CIM 法においても IM と同じ検出結果を得た。可溶性固形物含量や果実の高さの遺伝子座数はそれぞれ 5 箇所検出された。

一方メロンでは、果実の食味が嗜好性を左右するものの、食味に関わる遺伝子は、苦みと酸味について明らかになっているのみである。また、日本を含む東アジアで近世には品種が成立しているマクワやシロウリでは、果実の長さが大きく異なることから、長さを含めた果実サイズも嗜好性に関わる形質と考えられた。そこで、甘さ（「可溶性固形物含量」で代替）と果実サイズに関わる遺伝子座（量的形質遺伝子座: QTLs）を検出するため、雑種後代で連鎖分析とQTL解析を実施した。解析によって、可溶性固形物含量の関連遺伝子座は、メロン染色体の5箇所において検出され、表現型変異の71.1%を表していた（第1図）。果実サイズのうち、果実の高さに関わる遺伝子座もメロン染色体において5箇所検出され、54.6%の表現型変異を説明可能であった。上記の10箇所の遺伝子座から甘さや果実の高さに直接関わる塩基配列変異を特定し、それら塩基配列変異を種子遺存体において分析することによって、食の嗜好性についてメロンを事例にして提示する。

種子遺存体に残存するメロン DNA を多く解読できる次世代塩基配列解析法

次世代塩基配列解析法によって解析前のDNA調整におけるPCR増幅の有無にかかわらず、弥生時代中期後半の種子遺存体では、古墳時代初頭、11世紀ならびに江戸時代の種子遺存体よりも遺存DNAの領域数が多く検出された（第1表）。データベースとの照合によって、弥生時代中期後半の種子遺存体においては6箇所（検出率: 0.2%, 0.6%）のメロンゲノムが遺存していた。検出率は、Nistelberger et al. (2016)によるオオムギ、ブドウ、コムギやイネの結果とは単純に比較できないが、メロン種子遺存体においても極わずかながらDNAが遺存していることが実証された。またDNAの遺存には時代の新旧よりも、試料の埋没状況や発掘後の保存状態などが大きく関わっていることを示していた。なお、検出されたメロンゲノム領域は、メロン第1染色体、第4染色体、第8染色体から第11染色体と、すべて核ゲノム領域であった。

第1表 種子遺存体に遺存するDNA領域数

時代	DNA調整方法	解読 ¹ 領域数	メロンゲノム特異的領域 ¹		
			解読領域数	検出率 (%)	解読塩基数 (bp)
弥生中期後半	PCR無	2,750	6	0.2	26 – 85
弥生中期後半	PCR有	1,066	6	0.6	31 – 79
古墳時代初頭	PCR無	128	0	0	
古墳時代初頭	PCR有	364	0	0	
11世紀	PCR無	316	0	0	
11世紀	PCR有	261	0	0	
江戸時代	PCR無	66	0	0	
江戸時代	PCR有	51	0	0	

¹各時代において上下の領域数は同一試料3粒の平均である。平均はそれぞれの試料において片側解読または両側解読による各配列から重複を除いて、算出した。

本研究ではDNAの遺存状態によって、の研究で収集した甘さや果実の高さに関わる塩基配列変異が種子遺存体で解読できる筋道を示すことができた。既報では、DNA遺存をPCRベースで調査するなどして次世代塩基配列解析に用いる試料を選択することによって核ゲノム領域が解読できる可能性が示されている（熊谷ら 2020）。今後、DNA遺存をPCRベースで確認しながら、種子遺存体からメロンの選抜に関わる塩基配列変異を復元する。

<引用文献>

- 藤下典之、出土種子からみた古代日本のメロンの仲間、考古学ジャーナル、354 巻、1992、7-13
- Tanaka, K., Stevens, C.J, Iwasaki, S., Akashi, Y., Yamamoto, E., Dung, T.P, Nishida, H., Fuller, D.Q, Kato, K., Seed size and chloroplast DNA of modern and ancient seeds explain the establishment of Japanese cultivated melon (*Cucumis melo* L.) by introduction and selection, Genetic Resources and Crop Evolution, 63 巻、2016、1237-1254
- 嶋田玄太郎, Phuong, D.T.・Pervin, M.N., Nnennaya, I.O., 門田有希, 西田英隆, 田中克典, 杉山 充啓, 川頭洋一, 加藤謙司、ゲノムワイドな GBS-SNPs に基づくメロン遺伝資源の多様性解析とコアコレクション候補の選定、育種学研究、22 巻別冊 2 号、2020、82
- Nistelberger, H. M., Smith, O., Wales, N., Star, B., & Boessenkool, S., The efficacy of high-throughput sequencing and target enrichment on charred archaeobotanical remains, Scientific Reports, 6 巻、2016、37347 番
- 熊谷真彦・水野文月・王瀝、次世代シーケンサーを用いた植物遺存体の DNA 分析、河姆渡と良渚 中国稲作文明の起源、2020、

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 1件）

1. 著者名 Tanaka K., Shigita G., Dung T. P., Sophea Y., Thun V., Sophany S., Kato K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Collection of melon and other Cucurbitaceous crops in Cambodia in 2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources	6. 最初と最後の頁 121-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24514/00003226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中克典・明石由香利・小川真輝・加藤謙司
2. 発表標題 温室メロン B2 と パール との交雑後代における可溶性固形分濃度の遺伝
3. 学会等名 第14回東北育種研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 玄太郎・Tran Phuong Dung・Mst. Naznin Pervin・西田 英隆・門田 有希・杉山 充啓・田中 克典・加藤 謙司
2. 発表標題 コアコレクションの作成に向けたメロン遺伝資源の多様性・集団構造の解析
3. 学会等名 第10回中国地域育種談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上遼馬・田中克典・杉山充啓・Anna M. Artemyeva・Zharas Mamypbelov・Tian V. Sergevich・Sergey M. Alexanian・加藤謙司
2. 発表標題 カザフスタンのメロン遺伝資源における遺伝的多様性と類縁関係
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 奈乃佳・小川 真輝・明石 由香利・石川 隆二・田中 克典・加藤 謙司
2. 発表標題 ネットメロンにおける可溶性固形分濃度に関連する遺伝子座の推定
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋田 玄太郎・Phuong Dung Tran・Pervin Mst. Naznin・Nnennaya Imoh Odirichi・門田 有希・西田 英隆・田中 克典・杉山 充啓・川頭 洋一・加藤 謙司
2. 発表標題 ゲノムワイドなGBS-SNPsに基づくメロン遺伝資源の多様性解析とコアコレクション候補の選定
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南雲 美徳・田中 克典・鈴木 真唯・明石 由香利・山本 達也・吉野 照道・石川 隆二・龍 春林・加藤 謙司
2. 発表標題 葉緑体ゲノムならびに核ゲノムのマーカーに基づいた中国雲南省南西部の在来メロンにおける遺伝的構造
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 謙司 (Kato Kenji)		材料の提供と研究手法や結果への助言

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------