

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05623

研究課題名(和文)全ゲノム解析で明らかにする、日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑過程

研究課題名(英文) Whole genome analysis to investigate the hybridization process between Japanese indigenous citrus and foreign derived citrus

研究代表者

永野 幸生 (NAGANO, Yukio)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：00263038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本固有のカンキツ及び、日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑の結果で生まれた可能性がある栽培種について、全ゲノム配列解析を実施し、日本のカンキツの歴史を調べた。その結果、「海外由来カンキツによる遺伝的に連なるグループ(マンダリンとブンタンの交雑のために形成された多様な栽培種からなるグループ)」と「日本固有カンキツ(タチバナ、シークワサー)による遺伝的に連なるグループ」の間の交雑により、10種類以上の日本在来のカンキツが生まれたことを明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンキツは、特によく利用される果樹である。海外に由来するカンキツの栽培種の他に、我が国に元々自生するカンキツが利用されている。海外由来カンキツと日本固有カンキツに関係を探ったのが本研究であり、その結果、興味深い知見がいくつかわかった。これら知見を活用して、各地の在来カンキツをアピールして、これらカンキツに付加価値をつけることが期待できる。また、本研究の成果は、カンキツの育種にも活用できる。

研究成果の概要(英文)：cultivated species that may have been formed as a result of hybridization between Japanese indigenous citrus and those of foreign origin, and investigated the history of Citrus species in Japan. As a result, we found that more than 10 Japanese indigenous Citrus species were generated by hybridization between "a genetically related group of foreign-derived Citrus species (a group consisting of various cultivated species formed due to hybridization between mandarin and pummelo)" and "a genetically related group of Japanese indigenous Citrus species (tachibana and shikwaasa)".

研究分野：ゲノム科学

キーワード：カンキツ タチバナ シークワサー 日本固有 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

カンキツには基本種と言われるものがある。マンダリン、ブンタン、シトロン、パペダ、イーチャンパペダ、キンカンなどである。これらの基本種間の交雑により、多種多様な系統が生まれた。例えば、シトロンとパペダの交雑がメキシカンライム、イーチャンパペダとマンダリンの交雑がユズ、キンカンとマンダリンの交雑がシキキツ(シキカン)、シトロンとマンダリンの交雑がラフレモン・ラングプールライム・ヒマヤンライム(我々が初めて記載したライム)である。また、マンダリンとブンタンの交雑として、多種多様な栽培系統があり、遺伝的クライン(連続体)を形成している。グレープフルーツ・スイートオレンジ・ウンシュウミカンなどのよく知られているカンキツは、このクラインに位置している。

さて、佐賀大学の代表的研究活動として「カンキツ遺伝資源コレクション」がある。以前に、このコレクションを主な対象として100系統以上を部分ゲノム解読法 RAD-Seq で解析した。その一部の結果については、既に発表済みである¹⁾。この解析の結果、更に詳細に解析すべき、日本国内の系統が見つかった。一つは、日本に自生している「日本固有のカンキツ」、つまりタチバナ、シークワサー(琉球語表記)である。もう一つは、日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑の結果で生まれた栽培種である。これらの植物の遺伝的変化や、交雑の過程を解明することは興味深い問題である。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、これら興味深い日本国内のカンキツ系統の全ゲノム配列を読んで、以下の疑問・課題に答えることである。

(1) 日本に自生している「日本固有のカンキツ」

日本には、タチバナ、シークワサー、コウライタチバナの3種が自生している。これらはどれもマンダリンの仲間とされているが、その歴史について謎が多い。この三者の遺伝的関係はどうか? マンダリンとブンタンの間に形成される遺伝的クラインの延長線上に、これら日本固有のカンキツは位置するのか? 珠心胚で増殖する、つまり、体細胞で次代が生まれる本土のタチバナは、どのようにして個体差が生まれるのか? などが解くべき謎である。

(2) 日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑の結果で生まれた栽培種

海外由来カンキツの多くは、上述の、遺伝的にマンダリンとブンタンの間に形成されるクラインに位置している。以前の RAD-Seq による予備的検討で、日本固有のカンキツ(タチバナ、シークワサー)とこのクラインの間で交雑が起こって、日本のいくつかの栽培種が生じた可能性が示唆された。全ゲノム解析で、この謎に最終決着をつけるべきである。

(3) その他のカンキツ等に関連する問題

(1)と(2)のカンキツの研究と併行して、その他のカンキツ等に関連する問題も研究することにした。RAD-Seq の結果により示唆されていた他の興味深いカンキツの遺伝的背景はどうなっているか? ゲノムの情報を活用して、簡便な交雑の検定ができないか? ミカン亜科の植物の類縁関係をより高精度に調べることができないか? などである。

3. 研究の方法

ゲノム解読に用いる植物は、佐賀大学あるいは鹿児島大学で生育している植物または葉をフリーザーで保管している植物を用いた。ただし、タチバナについては、高知県土佐市甲原松尾山のタチバナ群落から10個体の葉を採取した。これらは、天然記念物であるため、許可を取った上、市役所の担当者の監視の下で、採取を行った。

DNA 抽出については、DNeasy Plant Mini Kit を用いて行った。また、既に DNA を抽出済みの検体があったので、抽出済みの DNA を用いることもあった。蛍光法で DNA の濃度を測定し、アガロースゲル電気泳動で、DNA の品質を確認した。必要に応じて、DNA をエタノール沈殿で濃縮した。DNA 配列は、イルミナ社又は MGI 社の DNA シーケンサーで解読した。

ところで、DNeasy Plant Mini Kit を用いて、これまでカンキツから、ゲノム解析に適した高純度 DNA の精製を日常的に行ってきた。そこで、高知のタチバナからの DNA 精製は容易であろうと推定していた。しかし、真冬に採集した、これら材料については精製が容易ではなく、DNA 精製過程で DNA 分解がおこることが判明した。DNA 分解を防ぐ方法を検討したが、その方法を見いだすことはできなかった。そこで、分解 DNA を除くことで高純度 DNA を精製することができた。

解読した DNA 配列(リード)は、クレメンタイン(*Citrus clementina*)の参照ゲノム配列に対して、マッピングした。DeepVariant を用いて、variants を検出した。この variants データを用いて、様々なアプリケーション(例えば、主成分分析では SNPreLate)を用いて、ダウンストリームの解析を行った。

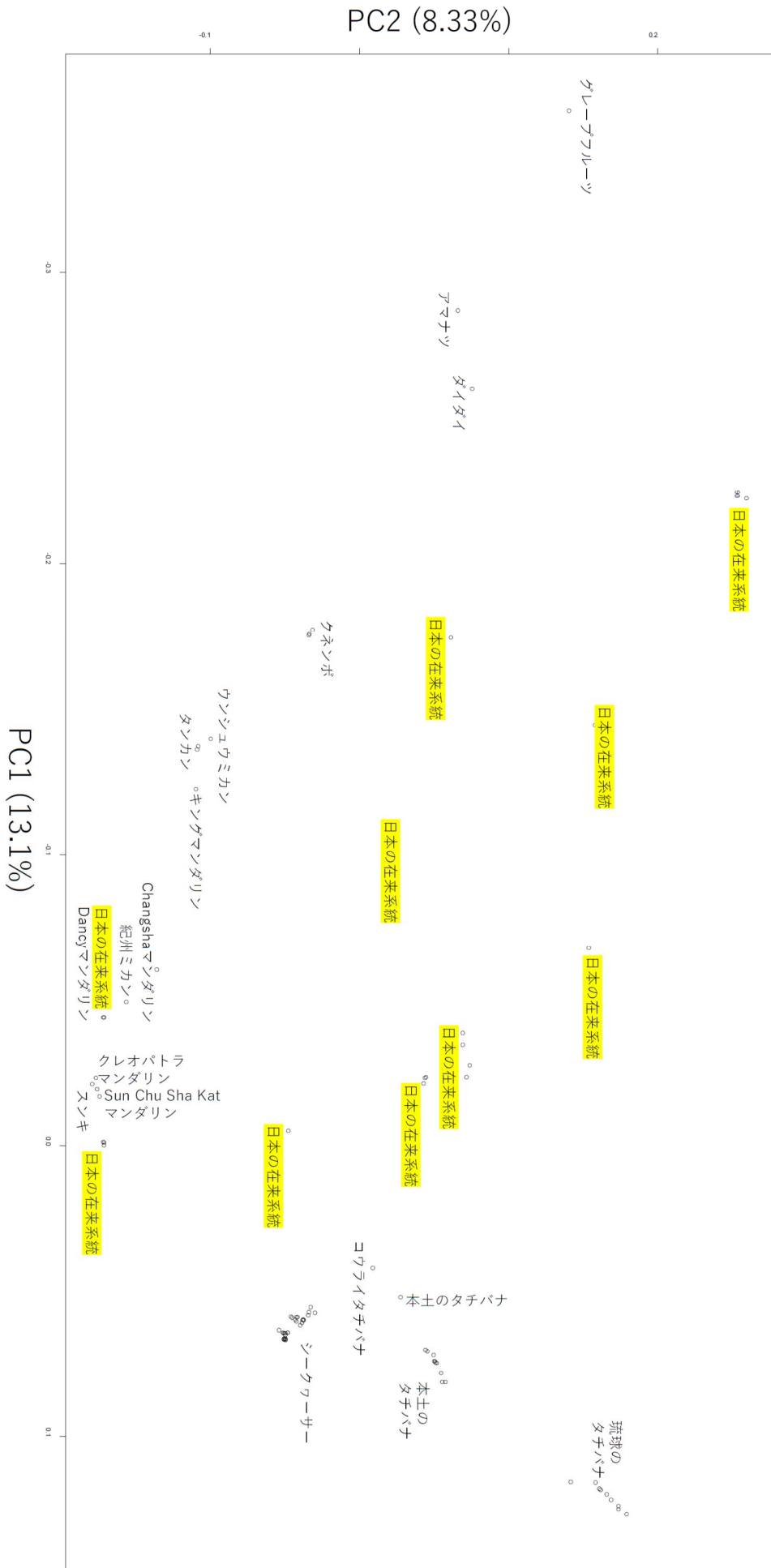


図 1. 主成分分析

4. 研究成果

(1) 日本に自生している「日本固有のカンキツ」

全ゲノム配列データに基づいて、タチバナ、シークワサー、コウライタチバナの3種について分析した。主成分分析の結果(図1)に示すように、これらは、琉球のタチバナ、本土のタチバナ、シークワサー、コウライタチバナの四群に分

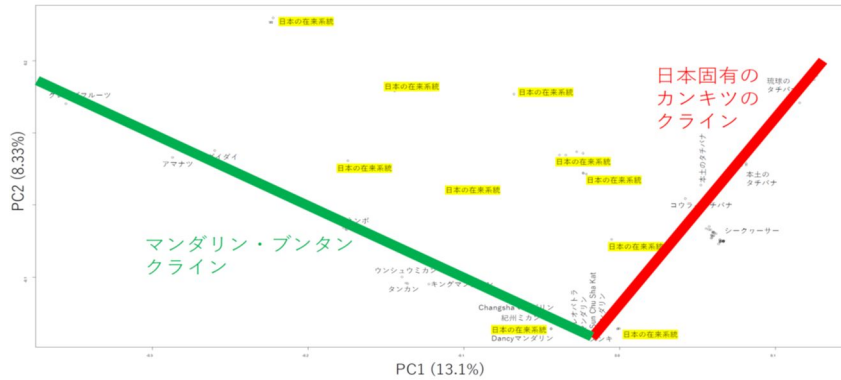


図2. 図1を改変してクラインを示したもの

けられた。なお、コウライタチバナ以外については、他の研究グループも同様の結果を発表している²⁾。クレオパトラマンダリン、Shu Chu Sha Kat マンダリン、スンキ等が基本種に近いマンダリンであることを考慮すると、琉球のタチバナ、本土のタチバナ、コウライタチバナ、シークワサー、マンダリン基本種が一続きとなるクラインが存在することがわかる。これを「日本固有カンキツのクライン」とした。これをわかりやすく示したのが、図2である。今回、解析することができなかつたが、琉球のタチバナの更に外(図の右上)に、台湾のタチバナ³⁾が位置すると考えるのが自然である。おそらく基本種である台湾のタチバナとマンダリン基本種の間、交雑によるクラインが形成され、両者の間に、琉球のタチバナ、本土のタチバナ、コウライタチバナ、シークワサーが位置することになったと考えている。なお、この推定とは異なり、琉球のタチバナを基本種とする主張もある²⁾。

図1には、ブントを入れていないが、ブントとスイートオレンジの交雑であるグレープフルーツを入れている。この図で、マンダリン基本種とグレープフルーツの間に遺伝的なクラインが形成されていることがわかる。このクライン上に多数の有名な栽培種、ウンシュウミカン、ダイダイ、タンカンなどが位置している。これを「マンダリン・ブントクライン」とした(図2)。すなわち、マンダリン・ブントクラインの延長線上に日本固有カンキツのクラインにあるわけではなく、二つのクライン上で起こった多様な種・系統の形成は、独立のイベントであることがわかる。前者の多様な種・系統の形成は、一部日本を含むけれども、中国大陸などの世界の各所で起こったイベントであり、後者の多様な種・系統の形成は、日本から台湾を結ぶ地域で起こったイベントであると考えられる。

なお、図1では、日本の在来系統を単に「日本の在来系統」と表記し、系統名を記さなかつた。論文発表前であるため、詳細の公表を控えたためである。この図からマンダリン基本種に極めて近いところいくつかの日本在来系統が位置している。これらの中には、琉球に自生しているとされていたものが含まれている。つまり、我が国にもマンダリン基本種が存在している可能性を示唆している。

さて、珠心胚で増殖する、つまり、体細胞で次代が生まれる本土のタチバナは、どのようにして個体差が生まれるのかだろうか?そこで、自生地タチバナ10個体の全ゲノム配列データを用いて、この問題にも挑んだ。その結果、DNA複製の際のミスや化学物質・放射線によるDNAの損傷によりおこる「ホモ接合からヘテロ接合への変化」よりも体細胞における組換え等でおこる「ヘテロ接合からホモ接合への変化(ヘテロ接合性喪失)」の頻度が高いことが分かった。同様の結果は、ウンシュウミカンのゲノム配列データの解析やメキシカンライムのゲノム配列データの解析でも得ており、珠心胚で増えるカンキツ一般に成り立つメカニズムであると推定した。カンキツの多く、特に栽培種は、珠心胚で増殖する。また、接ぎ木で繁殖させることも多い。つまり、体細胞クローンとして増殖することが多い。体細胞は遺伝的に均質であると考えられている。そのため、接ぎ木・挿し木・珠心胚実生が農業に活用されてきた。しかし、枝変わりという現象がよく知られており、これは体細胞の遺伝的变化である。この体細胞が遺伝的に変化をするメカニズムを知ることが農業においても科学においても重要である。カンキツの遺伝的分化において、ヘテロ接合性喪失に注目して研究を行っていくことは、今後、重要となると考えられる。

(2) 日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑の結果で生まれた栽培種

日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑の結果で生まれた栽培種についても、全ゲノム配列データを用いて解析した。その結果、10系統以上が、日本固有カンキツのクラインとマンダリン・ブントクラインの間に位置していた。これらは両クライン間で様々な組み合わせで交雑が起こったために、この図のように散らばった形で、各系統が位置することになったと考えら

れる。今回はスペースの関係で記さないが、その他の解析結果 (admixture 解析) 等もこの結果を裏づけている。以上により、本研究の目的であった、日本固有カンキツと海外由来カンキツの交雑が、日本国内の様々なカンキツの形成に寄与している示す事に成功した。なお、上述の様に、図 1 は、日本の在来系統を単に「日本の在来系統」と表記し、系統名を記さなかった。

(3) その他のカンキツ等に関連する問題

(1)と(2)の研究と併行して、その他のカンキツ等に関連する問題も研究した。

RAD-Seq の結果、ラフレモン・ラングプールライム・ヒマラヤンライム以外のシトロンとマンダリンの交雑種が我が国にあることが示唆されていたが、これを全ゲノム配列データにより証明することが出来た。

イーチャンパペダとマンダリンの交雑であり、もともと中国からもたらされた可能性が高いユズと、上述のマンダリン・ブンタンクラインの間で様々な交雑がおこり、5 系統以上の日本の香酸カンキツが生まれたことがわかった。これらの交雑は我が国で起こったイベントであると考えられ、興味深い。

ミカン亜科植物の類縁関係をより高精度に調べることも行った。そのために、佐賀大学に保存されているミカン亜科植物全ての葉緑体全ゲノム配列を決定した。その上で、我々が以前に発表したミカン亜科植物の系統樹^{4,5)}よりも正確な系統樹を作成した。

また、ゲノムの情報を活用して、簡便な交雑の検定方法、および、簡便な栽培品種の鑑定法を開発した^{6,7)}。

< 引用文献 >

- 1) Penjor, T., Mimura, T., Kotoda, N., Matsumoto, R., Nagano, A. J., Honjo, M. N., ... & Nagano, Y. (2016). RAD-Seq analysis of typical and minor Citrus accessions, including Bhutanese varieties. *Breeding science*, 16059.
- 2) Wu, G. A., Sugimoto, C., Kinjo, H., Azama, C., Mitsube, F., Talon, M., ... & Rokhsar, D. S. (2021). Diversification of mandarin citrus by hybrid speciation and
- 3) 田中長三郎 (1931)台湾に於けるタチバナの発見よ其の学術的竝に産業的意義. *柑橘研究*, 5(1) 1-20.
- 4) Penjor, T., Yamamoto, M., Uehara, M., Ide, M., Matsumoto, N., Matsumoto, R., & Nagano, Y. (2013). Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on matK gene sequences. *PLoS one*, 8(4), e62574.
- 5) Nagano, Y., Mimura, T., Kotoda, N., Matsumoto, R., Nagano, A. J., Honjo, M. N., ... & Yamamoto, M. (2018). Phylogenetic relationships of Aurantioideae (Rutaceae) based on RAD-Seq. *Tree genetics & genomes*, 14(1), 1-11.
- 6) Noda, T., Daiou, K., Mihara, T., & Nagano, Y. (2020). Development of Indel markers for the selection of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) hybrids that can be used for low-cost genotyping with agarose gels. *Euphytica*, 216(7), 1-13.
- 7) Noda, T., Daiou, K., Mihara, T., & Nagano, Y. (2021). Potential application of simple easy-to-use insertion-deletion (InDel) markers in citrus cultivar identification. *Breeding Science*, 71(5), 601-608.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Noda Takahiro, Daiou Kaoru, Mihara Takashi, Nagano Yukio	4. 巻 216
2. 論文標題 Development of Indel markers for the selection of Satsuma mandarin (<i>Citrus unshiu</i> Marc.) hybrids that can be used for low-cost genotyping with agarose gels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-020-02654-2	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 -
1. 著者名 Tashiro Hiroaki, Nagano Yukio, Jiromaru Ayaka, Sakaguchi Ryunosuke, Hiehata Naofumi, Fukuda Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Three Strains of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> , a Pathogen Causing Canker Disease in Loquat, Isolated in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01049-20	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 -
1. 著者名 Premarathne Maddumage Dona Ginushika Priyadarsh, Fukutome Nami, Yamasaki Kazuaki, Hayakawa Fumiyo, Nagano Atsushi J., Mizuno Hisataka, Ibaragi Nobuo, Nagano Yukio	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of Japanese pepper (<i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle) domestication using RAD-Seq	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85909-9	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 -
1. 著者名 Toshinori Tanaka, Nobukazu Tanaka, Yukio Nagano, Hiroataka Kanuka, Daisuke S Yamamoto, Natsuko Yamamoto, Eiji Nanba, Takumi Nishiuchi	4. 巻 早期公開
2. 論文標題 Efforts to enhance safety measures for CRISPR/Cas-based gene drive technology in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Environment and Safety	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11162/daikankyo.E19SC0801	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 -

1. 著者名 Kato Dai-ichiro, Suzuki Hirobumi, Tsuruta Atsuhiko, Maeda Juri, Hayashi Yoshinobu, Arima Kazunari, Ito Yuji, Nagano Yukio	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the population structure and phylogeography of the Japanese Genji firefly, <i>Luciola cruciata</i> , at the nuclear DNA level using RAD-Seq analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58324-9	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 -

1. 著者名 LWIN Moe, MON Su Lai Yee, NAGANO Yukio, KAWABE Kotaro, MANNEN Hideyuki, OKAMOTO Shin, SHIMOGIRI Takeshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Genetic diversity of Myanmar cattle breeds using complete mitochondrial D-loop sequence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Animal Genetics	6. 最初と最後の頁 57 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5924/abgri.46.57	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 -

1. 著者名 Lwin Moe, Mon Su Lai Y., Yamanaka Hayate, Nagano Yukio, Mannen Hideyuki, Faruque Mohammad O., Kawabe Kotaro, Okamoto Shin, Shimogiri Takeshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Genetic diversities and population structures of four popular Myanmar local cattle breeds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1648 ~ 1655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13112	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Wee Alison K.S., Mori Gustavo M., Lira Catarina F., Nunez-Farfan Juan, Takayama Koji, Faulks Leanne, Shi Suhua, Tsuda Yoshiaki, Suyama Yoshihisa, Yamamoto Takashi, Iwasaki Takaya, Nagano Yukio, Wang Zhengzhen, Watanabe Shin, Kajita Tadashi	4. 巻 33
2. 論文標題 The integration and application of genomic information in mangrove conservation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Conservation Biology	6. 最初と最後の頁 206 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cobi.13140	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Fukuda Shinji, Nagano Yukio, Matsuguma Kimitaka, Ishimoto Keiichiro, Hiehata Naofumi, Nagano Atsushi J., Tezuka Ayumi, Yamamoto Toshiya	4. 巻 251
2. 論文標題 Construction of a high-density linkage map for bronze loquat using RAD-Seq	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 59 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2019.02.065	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野田 孝博、大王 かおる、三原 崇史、永野 幸生
2. 発表標題 温州ミカン品種交雑判定を可能にするIndelマーカーの開発と応用
3. 学会等名 九州農業研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 at Htoo San, Yoshio Kawamura, Yukio Nagano, Kei Kimura, Genta Kobayashi, San San Aye, Khin Thu Thu Min, Cherry Aung, Moe Moe Khaing
2. 発表標題 Physiological and molecular characterization of heat-tolerant <i>Pyropia</i> species from Myanmar
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野 幸生、木村 圭、小林 元太、川村 嘉応
2. 発表標題 <i>Pyropia</i> 属39個体の全ゲノムレベルの多様性
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷 雪乃、永野 幸生、川村 嘉応、木村 圭
2. 発表標題 メタゲノム解析によるスサビノリ定着細菌の網羅的な検出および代謝系の解明
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ginushika Priyadarshani Premarathne, Nami Fukutome, Kazuaki Yamasaki, Fumiyo Hayakawa, Atsushi J. Nagano, Hisataka Mizuno, Nobuo Ibaragi, Yukio Nagano
2. 発表標題 Diverse genetic resource of <i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle (Japanese pepper) elucidated by RAD-Seq
3. 学会等名 代42回 日本分子生物学会 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野幸生、山本ちひろ
2. 発表標題 無性生殖する植物は遺伝的にどう変化するか？
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本ちひろ、永野幸生
2. 発表標題 早生ウンシュウミカン2品種と極早生ウンシュウミカン6品種のDNA比較
3. 学会等名 第42回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永野幸生、Milton Groppo、Theodor C. H. Cole
2. 発表標題 ミカン科の系統ポスター（日本語版）
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永野幸生
2. 発表標題 ゲノムから見えてきたカンキツの多様な世界
3. 学会等名 くまもと在来種研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>総合分析実験センター 生物資源開発部門（本庄地区） http://www.iac.saga-u.ac.jp/lifescience/Tinyindelmarkersの活用法 https://www.iac.saga-u.ac.jp/lifescience/InDel_markers/index.html</p>
--

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
研究分担者	山本 雅史 (Yamamoto Masashi) (00305161)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	古藤田 信博 (Kotoda Nobuhiro) (50355426)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	

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