

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H02948

研究課題名（和文）メロン交雑集団を用いた棚持ち性関連遺伝子座の特定

研究課題名（英文）Genetic control of long term storage in melons

研究代表者

牛島 幸一郎 (Ushijima, Koichiro)

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：20379720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000 円

研究成果の概要（和文）：メロンはジューシーで人気の高い果実である。その成熟はエチレンによって制御されるクライマクテリック型果実であるため、急激に成熟が進行し棚持ち性がわるい。本研究では棚持ち性が良いメロン品種であるハネデユとB2における変異を特定するために、分離集団を作成し遺伝解析とGWAS解析を行った。B2の果肉軟化不全については複数の遺伝子座の関与が示唆され遺伝子座の特定には至らなかった。ハネデユのエチレン合成不全については1遺伝子座支配と予測され、GWAS解析においても8番染色体に原因遺伝子の存在が示唆された。この領域にはエチレン合成との関与が示唆される遺伝子は存在せず、新規の遺伝子の発見に繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のクライマクテリック型果実の成熟機構に関する研究は成熟期におけるエチレン信号伝達そのものではなく、緑熟期における最初の自己触媒エチレンの合成を行う因子に焦点が移っている。しかし、成熟によって変化する形質は実際にはエチレン信号の下流で働く因子に制御されており、その因子を直接的に操作することが望ましい。本研究では下流で働く未知の因子の存在を示唆するものとなった。

研究成果の概要（英文）：The melon is a juicy and popular fruit. Melons are climacteric fruits and their ripening is controlled by ethylene. This causes rapid ripening and poor shelf-life. This study was conducted to identify mutations in Honeydew and B2, melon varieties with good shelf-life. Segregated populations were created and genetic and GWAS analyses were conducted. Multiple loci were suggested to be involved for the defect in flesh softening trait in B2, but the loci could not be identified. For the defective ethylene synthesis trait in Honeydew, a single locus was predicted to be responsible, and GWAS analysis suggested the presence of the responsible gene on chromosome 8. There are no genes suggested to be involved in ethylene synthesis in this region, which may lead to the discovery of novel genes.

研究分野：園芸学

キーワード：メロン エチレン GWAS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果実として非常に人気の高いメロンであるが、日本人が好むメルティング質でジューシーな果肉の品種の棚持ち性は良いとはいえない。メロンは果実成熟がエチレンによって進行するクライマクテリック型果実である。現在のクライマクテリック型果実の成熟機構に関する研究は成熟期におけるエチレン信号伝達(図1)そのものではなく、緑熟期における最初の自己触媒エチレンの合成を行う因子に焦点が移っている。しかし、実用的な品種改良を考えるとむしろエチレン信号の下流の分岐した信号伝達を個別に制御する方が好ましい。申請者のグループではこの下流因子の特定と制御を行う上で適したメロン品種を特定し、解析のための分離集団を作成している。

2. 研究の目的

報告者のグループでは棚持ち性がよいメロン品種のハネデュと B2 では、エチレン信号伝達系の下流域に属する因子に変異が生じていることを明らかにした。更に遺伝解析から、これらの重要な形質を決定している主要な変異は1遺伝子座である事を見出している。とくに B2 の変異は果実硬度を適度に維持し棚持ち性が単に向上するだけではなく、優性形質であるので育種現場での容易な活用が期待される。そこで申請者らはこれらの F2 分離集団や F4 系統を作成している。本申請では、これらの材料を利用して、GWAS 解析などの遺伝解析を通じて、原因遺伝子座の特定を行う。マーカー作出に加え、最終的には遺伝子組換えなどで原因遺伝子の特定に繋げたい。

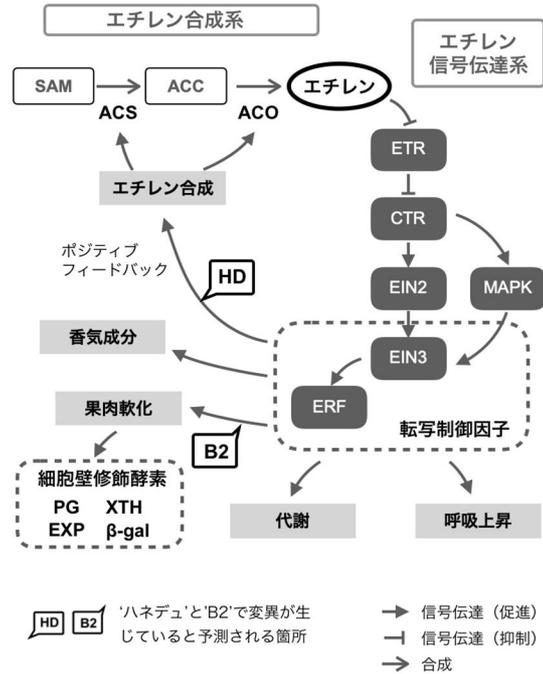


図1 果実成熟におけるエチレン信号伝達系

3. 研究の方法

2つの変異体(図2)について個別に分離集団を作成し、分離比から遺伝的制御について特定を行う。さらに、次世代シーケンサー(NGS)を利用した genotyping を行い、GWAS 解析を行い遺伝子座の特定をおこなう。さらに、遺伝子座が特定できた場合は、トランスクリプトーム解析を行い、原因遺伝子の特定を試みる。

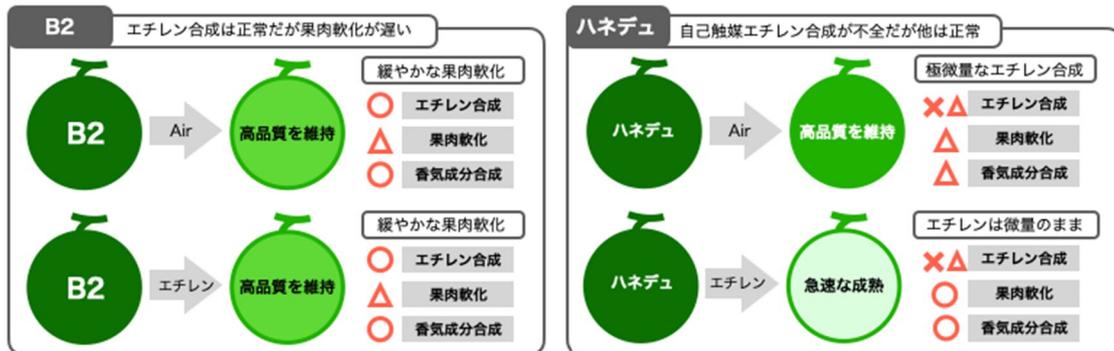


図2 本研究で解析したメロン品種の成熟特性

矢印の「Air」と「エチレン」は、それぞれ緑熟果を空気条件下と外生エチレン処理下で貯蔵したことを示す

4. 研究成果

(1) B2 の果肉軟化遅延形質

i) 遺伝様式

B2 はエチレン合成は正常だが、果肉軟化が遅延する(図2)。通常のクライマクテリック型果実である春3との分離集団の解析から1遺伝子座の劣性形質である可能性が示唆されている。そこで、B2 タイプと春3タイプのF4を交雑しF6における分離を検証した。その結果、果肉軟化遅延形質の遺伝様式を調査するために、F4を交雑しF5世代における分離を観察した(図3,4)。

その結果、果肉軟化が急激な個体と遅延する個体が 27:25 と 1:1 に分離した。このことは親に利用した春 3 タイプの F4 個体はヘテロであると仮定すれば、果肉軟化遅延形質は F2 で観察されたとおり 1 遺伝子座支配の劣性形質であると考えられた。

ii) GWAS 解析

F5 世代において十分な個体数から形成される分離集団が作成されたので GWAS 解析を行った。Gras-di を用いて、SNP と検出し genotyping を行った。リードは minimap2 を使ってメロンの参照配列である DHL92 にマッピングし、varscan で SNP calling を行った。得られた遺伝子型データと果肉軟化遅延形質データを用いて Tassel で解析を行った(図 5)。しかし、形質と高い相関を示す SNP は検出されなかった。参照配列を春系 3 号に変えても同様に、果肉軟化遅延形質と相関の高い SNP は検出されなかった。このことは、果肉軟化遅延形質が実際には 1 遺伝子座支配ではなく、複数の遺伝子座に複雑に制御されている事を示すと考えられた。

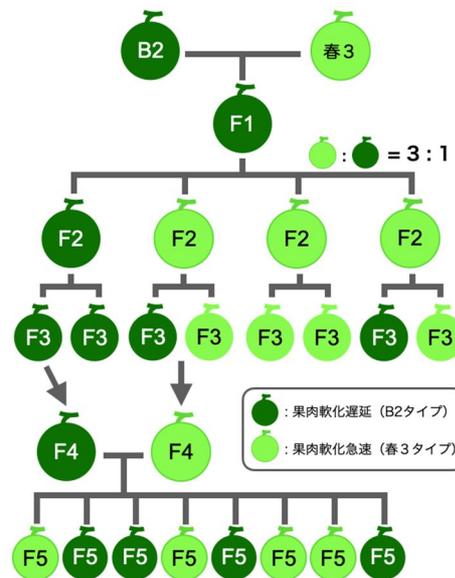


図3 B2交雑集団

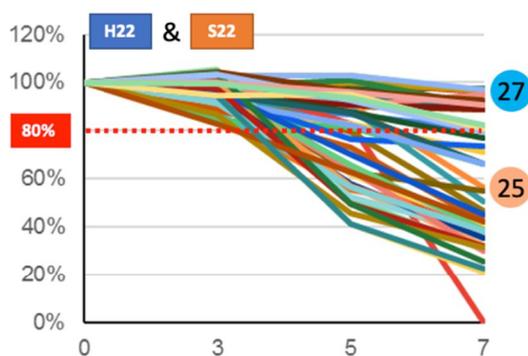


図4 音響振動法による果肉軟化様相の観察

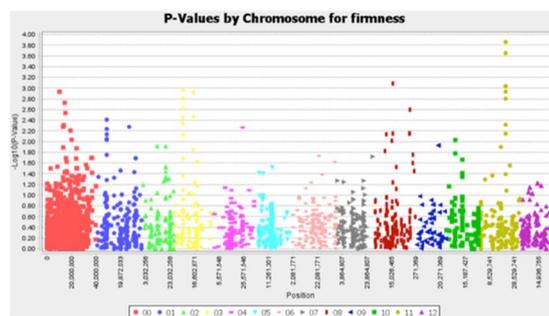


図5 B2の果肉軟化遅延形質に関するGWAS解析

iii) トランスクリプトーム解析

B2 と春 3 についてトランスクリプトーム解析を行い発現変動遺伝子を特定した。Expansin や Pectin Esterase, XTH といった細胞壁修飾酵素が春 3 で多く遺伝子発現していた。さらに、エチレン信号伝達系の因子については、エチレンレセプターやその調整をする RTE に発現変動が観察された。さらに、エチレン信号伝達のキーとなる EIN3 タンパク質の安定性に関わる F-box タンパク質である EBF の遺伝子発現も 2 品種間で異なっていた(図 6)。

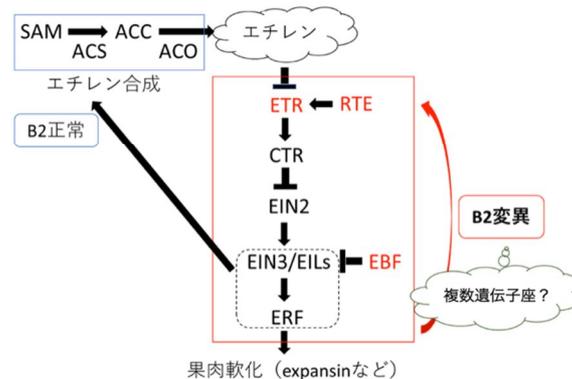


図6 B2で発現変動が観察されたエチレン信号伝達因子

B2 の果肉軟化遅延形質は 1 遺伝子座支配であると想定して解析を進めていたが、実際には複雑な遺伝的制御を受けていることが明らかになった。原因遺伝子の特定に至らなかったが、エチレン信号伝達系の重要な因子の遺伝子発現が関与することが確認出来た。今後は、これらの発現制御に焦点を絞り解析をする必要があると考えられた。

(2) ハネデュのエチレン合成不全形質

i) 遺伝様式

ハネデュは成熟時に自己触媒的エチレン合成が出来ないが、外生エチレンを処理するとエチレ

ン合成は出来ないままだが、果肉軟化や芳香成分の合成は正常に進行する。ハネデュを正常なク
ライマクテリック型メロンのシャランテを交雑して分離集
団を二度にわたって作出し、遺伝解析を行った。2つの集団
(集団Aと集団Bとする)においてF1は全て自己触媒エチ
レン合成能を有していた(図7)。F2においてはエチレン合
成能を有する個体と不全の個体は3:1に分離した。この結
果は、エチレン合成不全形質は1遺伝子座によって支配され
ており、劣性形質である可能性を示唆するものである。そこ
で、各々の集団に関してGWAS解析を行った。

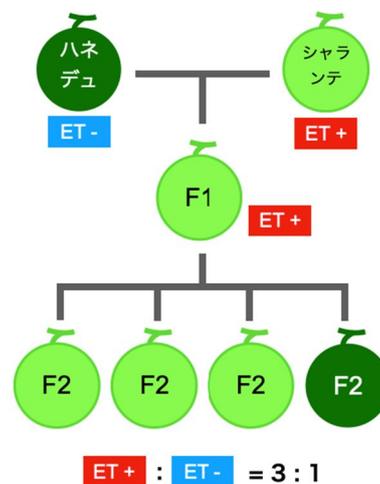


図7 ハネデュ交雑集団

ET+ : 成熟エチレン合成あり
ET- : 成熟エチレン合成無し

ii) Genotyping 方法の検討と GWAS 解析

GWAS 解析のためには genotyping を行う必要がある。B2 の解
析では Gras-di を利用したが、高価であることが解析におい
て問題となる。そこで集団Aについては Gras-di に加えて、
MIG-seq の変法である安価な dpMIG-seq の利用の検討を行
いつつ、エチレン合成不全形質の遺伝子座の特定を試みた。
Gras-di と dpMIG-seq、それぞれの方法でリードを得て、B2
の場合と同様の方法で SNP calling を行い、遺伝子型デー
タを得た。エチレン合成能の表現型データと共に GWAS 解析に
利用した。その結果、2つの手法共に8番染色体の20Mb 付
近にエチレン合成能と高い相関を示す SNP が検出された(図8)。果肉色や果皮模様など他の形
質についても Gras-di と dpMIG-seq の間で同じ遺伝子座領域で形質と高い相関を示す SNP が検
出された。得られる SNP 数の比較を行ったところ、dpMIG-seq は GRAS-Di の6割程度であった
(図9)。SNP 数が減少したとは言え、染色体全域をカバーしており複数の形質で制御遺伝子座の
特定に至っている。したがって、少なくともメロン程度のゲノムサイズの植物においては、dpMIG-
seq は genotyping ツールとして非常に有用である事が示された。

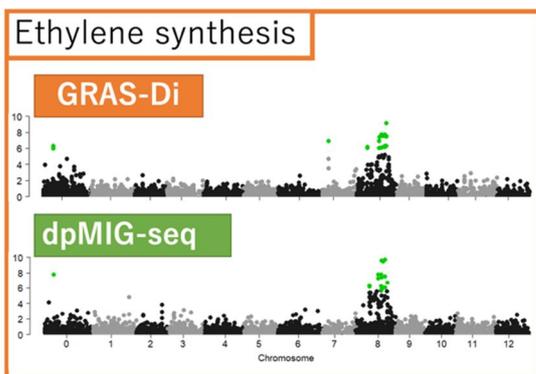


図8 集団AにおけるGWAS解析

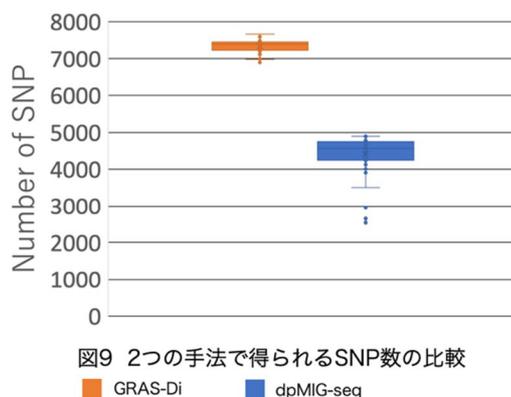


図9 2つの手法で得られるSNP数の比較

iii) 集団BにおけるGWAS解析

集団Aの解析において dpMIG-seq が GRAS-Di の代替になり得ることが示唆された。そこで、集
団Bについては dpMIG-seq で遺伝子型データを得て、GWAS 解析に利用した。その結果、集団A
と同様に20Mb 付近にエチレン合成不全形質と相関を示す SNP が検出された(図10上)。ハネ
デュの2つの集団は共に dpMIG-
seq 解析を行っているので、2集
団をまとめて SNP calling を行
った。得られた遺伝子型デー
タで再度 GWAS 解析を行ったと
ころ、より高い相関が8番染色
体の SNP で観察された。そこで、
この領域を ET8 として候補遺伝
子の探索を試みた。

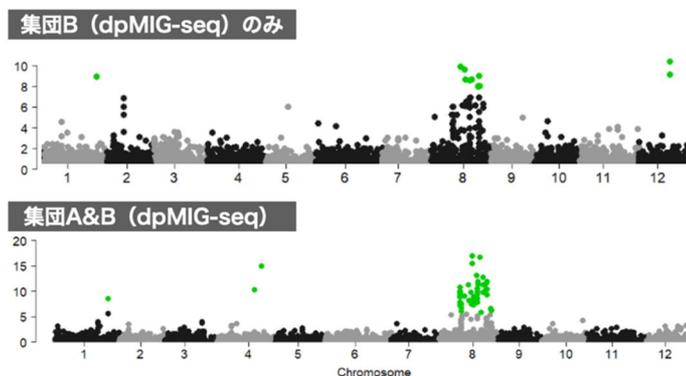


図10 集団Bを加えたGWAS解析

iv) 候補遺伝子の探索

ET8 周辺の遺伝子からエチレン合成に関与する候補遺伝子の探索を行った。遺伝子の変異（非同義置換）と発現量の違いなどから候補遺伝子の絞り込んだ。しかし、アミノ酸の置換や発現量が異なる遺伝子に関して、直ちにエチレンと関連があるとアノテーションされている遺伝子は存在しなかった。

今回、エチレン合成不全形質に関わる候補遺伝子は ET8 周辺では検出されなかった。しかし、ET8 は異なる年に作成し形質調査した集団を解析して、同じ領域に高い相関を示す SNP が得られていることから、ハネデュのエチレン合成不全形質に関与する遺伝子が存在する可能性が高いと考えられた。このことは、機能が明らかとなっていない未知の遺伝子が関与している可能性を示唆するものと考えられる。また、参照配列に遺伝子が該当する遺伝子が存在しない可能性もあり、実際にハネデュのゲノム配列を解読し独自に参照配列を整備する必要があると考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura Kazusa, Kokaji Hiroyuki, Motoki Ko, Yamazaki Akira, Nagasaka Kyoka, Mori Takashi, Takisawa Rihito, Yasui Yasuo, Kawai Takashi, Ushijima Koichiro, Yamasaki Masanori, Saito Hiroki, Nakano Ryohei, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Degenerate oligonucleotide primer MIG seq: an effective PCR based method for high throughput genotyping	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.16708	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 影山竜一, 西村和紗, 中野龍平, 池田和生, 加藤鎌司, 久保康隆, 赤木剛士, 牛島幸一郎
2. 発表標題 メロンにおける改良 MIG-seq 利用の検討とエチレン合成関連遺伝子座の再評価
3. 学会等名 育種学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山 竜一, 西村 和紗, 中野 龍平, 池田 和生, 加藤 鎌司, 久保 康隆, 赤木 剛士, 牛島 幸一郎
2. 発表標題 メロンにおける改良 MIG-seq 利用の検討とエチレン合成関連遺伝子座の再評価
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林和真・合田駿平・池田和生・赤木剛士・久保康隆・中野龍平・牛島幸一郎
2. 発表標題 メロンの成熟エチレン合成に関わる遺伝子座の同定とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田駿平, 池田和生, 小林和真, 赤木剛士, 加藤謙司, 久保康孝, 中野龍平, 牛島幸一郎
2. 発表標題 メロン軟化遅延系統の遺伝的制御とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shumpei Goda, Toshiki Hatanaka, Takashi Akagi, Yasutaka Kubo, Ryohei Nakano and Koichiro Ushijima
2. 発表標題 The Genetic Control of Long Shelf Life in Melon (Cucumis melo L.)
3. 学会等名 Plant and Animal Genome Conference XXVIII (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	中野 龍平 (Nakano Ryohei) (70294444)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	池田 和生 (Ikeda Kazuo) (80555269)	山形大学・農学部・准教授 (11501)	
研究分担者	門田 有希 (Monden Yuki) (30646089)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

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
---------	---------