

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450039

研究課題名(和文)次世代DNAシーケンサーによるカンキツおよびその近縁植物の遺伝的分化過程の解析

研究課題名(英文)Analysis of genetic relationships of citrus and its relatives by next generation sequencer

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：最先端分析機器「次世代シーケンサー」を用いてDNAを分析することで、様々なカンキツの類縁関係を調べた。その結果、既知の知見をより厳密に再確認し、さらに、新規な発見をした。中でも特筆すべき発見は、新たに命名したヒマラヤンライムの発見である。ブータンで見つけたヒマラヤンライムは、世界中で知られているメキシカンライムと形態的に似ているが、DNAを調べるとメキシカンライムとは異なるものであった。

研究成果の概要(英文)：We examined the genetic relationship between various citrus fruits, by analyzing DNA using cutting-edge analytical instrument "Next Generation Sequencer." As a result, we reconfirmed the known findings more strictly, and described new findings. Particular finding is the discovery of the new citrus fruit, which was designated as "Himalayan lime." Himalayan lime found in Bhutan is morphologically similar to Mexican lime, which is known all over the world. However, it was different from Mexican Lime when we examined its DNA.

研究分野：ゲノミクス、果樹園芸学

キーワード：カンキツ ヒマラヤンライム ゲノム 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

佐賀大学が世界に誇る研究活動として、「カンキツおよびその近縁植物の遺伝資源コレクション」がある。野生種と栽培種を含め、1科・2亜科・22属・339種・約700個体を保存しており、これは世界有数の規模である。研究代表者らは、葉緑体遺伝子のDNA配列に基づいて、カンキツおよびその近縁植物を徹底的に系統分類してきた (Tree Genetics and Genome (2010)、PLoS ONE (2013))。遺伝的近縁関係の解明はカンキツの育種を展開していく上で重要であり、これら論文の学術的価値は極めて高い。特に、後者の論文では22属、135個体を分析しており、今までにない規模のカンキツおよびその近縁植物の分子系統分類の論文である。実際、後者の論文は頻りに引用されており (Google Scholar によると、2017年5月25日の時点で42件)、このことから、カンキツおよびその近縁植物の系統分類において、「世界基準」となる論文になっていると考えている。

しかし、この研究はあくまで葉緑体遺伝子を調べたもの、すなわち母性遺伝・細胞質遺伝を調べたものである。したがって、系統分類としては不完全な面があり、核ゲノムのデータを用いて系統分類を実施する必要がある。また、葉緑体遺伝子の解析結果では、種間交雑による遺伝的分化の過程、あるいは種内の遺伝的分化の過程を研究するのは難しい。核ゲノムのデータを用いる研究方法としては、特定領域のDNA配列を調べるものや、PCR等を活用して何らかのマーカーを調べるものなどがある。また、急激に台頭中の方法としては、次世代DNAシーケンサーから得られたビッグデータを活用するものがある。しかし、研究開始当初、この最先端の研究手法は、カンキツおよびその近縁植物の系統分類に用いられていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、いち早く次世代DNAシーケンサー活用の重要性を認識し、この方法の活用方法を検討し始めていた。中でも、RAD-seqという方法に注目していた。RAD-SeqはRestriction Site Associated DNA Sequencingの略であり、次世代DNAシーケンサーを活用して制限酵素認識サイト近隣領域のDNA配列を全ゲノムに渡って繰り返し解読する。RAD-Seqは次世代DNAシーケンサーを活用する研究手法の中では比較的安価であるのも特長である。

そこで、このRAD-seq法を用いて、佐賀大学が保有するカンキツおよびその近縁植物の類縁関係を調べることにした。研究の主な目的は、次の通りである。

(1) 科研費に採択される前から開始していた、無性生殖するライムの種内分化に関する研究を完成させる。

(2) 得られたデータを活用し、カンキツおよびその近縁植物の種間、種内の分子系統関

係を明らかにする。上述のように、葉緑体ゲノムレベルでの「世界基準」となる系統分類の論文を発表することができたので、核ゲノムのレベルでもこれまでにない精度の「世界基準」となる系統分類の論文を発表する。

(3) 得られたデータを活用して、各々の種が互いにどう交雑したかを明らかにし、また、無性生殖と有性生殖による種内分化の様式を明らかにすることで、今後のカンキツ育種の展開・方向性に有用な情報を提供する。

(4) 栽培品種の意図的・非意図的移動・取り違えは、栽培農家、種苗業者、販売業者、あるいは消費者にとって好ましくない問題である。そこで、品種鑑定技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

カンキツ100系統以上から、高品質DNAを抽出し、RAD-seq解析に適したライブラリを作成する。RAD-seq解析では、より多くのデータが得られるけれども、1検体あたりのコストが高価な通常のRAD-Seq法、および、得られるデータは少ないけれども、1検体あたりのコストが安価なdouble digest RAD-seq (ddRAD-Seq)を用いる。

得られた配列データはBio-Linuxを搭載した高性能コンピューターを用いて解析するが、解析方法の詳細を記すことは省略する。

4. 研究成果

主な研究成果は、以下の通りである。

(1) 科研費に採択される前から開始していた研究であるが、無性生殖するライムの種内分化に関する研究を完成させた (Scientific Reports, 2014)。インドネシアから入手したライム3点、および、ブータンから入手した1点は、ヘテロ接合性が保存されていた。つまり、1本の木から無性的に増殖した植物であることを明確に示した。同様に、ブータンから入手した4点もヘテロ接合性が保存されていた。つまり、前者4点とは異なる1本の木から無性的に増殖した植物であることを示した。また、翼葉の有無、果実表面の滑らかさなど、前者4点と後者4点の間に若干の形態的違いがあったので、遺伝的違いが形態的違いに影響を及ぼしたと結論づけた。なお、この発見の時点では、この二種類のライムは、メキシカンライム (*Citrus aurantifolia*) 内の遺伝的多様性であると考えていた。ただし、その後の研究で、前者4点とメキシカンライムの基準種の比較から、前者4点のみがメキシカンライムであることがわかっている (Breeding Science, 2016)。

2014年の論文では、このメキシカンライム (前者4点) は、無性的に増殖するにも関わらず、遺伝的に大きく異なる2系統が存在することを明らかにした。分析の手法の詳細は複雑なので記さないが、体細胞内相同組換えなどのメカニズムで、ヘテロ接合性がホモ接

合性に变化していることを、この 2014 年の論文中で提案した。体細胞における、ヘテロ接合性からホモ接合性への変化という概念は、植物学・園芸学の教科書には出てこないので、論文執筆当時、強くこの概念を提唱することに自信がなかった。そこで、論文中で弱く主張した。しかし、論文発表後に、「ヘテロ接合性喪失」と呼ばれる癌研究で盛んに研究されているメカニズムを考えれば、無性生殖するメキシカンライム内の遺伝的分化を説明できることに気がついた。癌研究を紹介しながら、メキシカンライムにおける発見を記せば、よりインパクトが高い論文を発表できたと思うので、非常に残念である。

(2) 2014 年の論文の論文で、ヘテロ接合性の保存を指標にして、1 本の木から無性的に増殖した植物ものかどうかを判定した。カンキツの栽培種は無性的に増殖する植物が多いので、このことを利用すれば、品種鑑定などに利用できる可能性が高い。そこで、ヘテロ接合性の保存を調べて見た結果、グレープフルーツ、スイートオレンジ、ウンシュウミカン、メキシカンライム、ヒマラヤンライム（ヒマラヤンライムの詳細は後述）でヘテロ接合性の保存が確認できた（Breeding Science, 2016）。つまり、ヘテロ接合性の保存を調べることは、形態的に類似した栽培種と区別するのに、有用な手法となる。2016 年の論文で用いた ddRAD-Seq 法は安価であることから、有用な品種鑑定手法となる。例えば、この手法は、国家間あるいは産地間の意図的・非意図的な品種の移動を知るのに有用である。近年、知的財産や ABS に関わる問題が発生しているので、尚更である。また、苗木業者が穂木を取り違えて、農家に供給することが問題になっているが、この問題の解決に繋がる可能性がある。このように、栽培品種の意図的移動・非意図的移動・取り違えは、栽培農家、種苗業者、販売業者、あるいは消費者にとって好ましくない問題であるので、本品種鑑定技術は有用である。

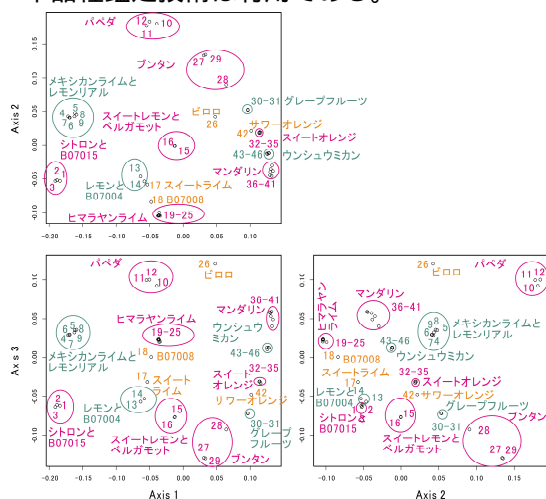


図 1. 各個体間の遺伝的距離を、多次元尺度解析法により、三次元で表した図。二次元の図を 3 個使用して三次元を表した。B で始まるものは、プータンの個体。

(3) カンキツ属に属するものの多くが、シトロン、パペダ、プンタン、マンダリンの基本 4 種の変種又は交雑種であるという説が 10 年くらい前から台頭してきた。以前はシトロン、プンタン、マンダリンの基本 3 種という説が有力であったが、用いるマーカー数が増えたことによると考えられる。2016 年の論文でも、この説を支持する結果が得られた（Breeding Science, 2016）。図 1 に、調べた個体間の遺伝的距離を示した。シトロン、パペダ、プンタン、マンダリンの各々が、角に位置していることから、これらが基本 4 種であるという説が再確認できた。残りの種・個体はこれらの交雑種であると考えられる。例えば、メキシカンライムは、パペダとシトロンの交雑種とされていたが、図 1 で示すように、メキシカンライムは、パペダとシトロンの中間に位置していた。図 1 でグレープフルーツはスイートオレンジとプンタンの中間に位置するが、これもグレープフルーツがスイートオレンジとプンタンの交雑種であるという説と一致した。スイートオレンジはプンタンとマンダリンの交雑種であるという説を図 1 は支持した。サワーオレンジはプンタンとマンダリンの交雑種であるという説も図 1 は指示している。ただし、交雑の組合せがサワーオレンジとスイートオレンジでは異なる。レモンはサワーオレンジとシトロンの交雑種と考えられているが、図 1 はこの考えと矛盾がない。なお、これら結果については、他の解析方法でも確認している。

(4) この研究における最大の発見は、新たに命名したヒマラヤンライムである（Breeding Science, 2016）。2014 年の論文（Scientific Reports, 2014）の時点では、プータンで見つけたライム 4 点はメキシカンライム (*Citrus aurantifolia*) 内の変種であると考えていた。しかし、多数の種・個体を調べ、特に、上述の基本 4 種と比較することで、メキシカンライムはパペダとシトロンとの交雑種であるのに対して、プータンで見つけたライムはマンダリンとシトロンとの交雑種であることがわかった。そこで、新たにヒマラヤンライムと命名した次第である。実際、図 1 ではヒマラヤンライムはマンダリンとシトロンとの中間に位置している。なお、この結果については、他の解析方法でも確認している。また、2014 年の論文に記載した 4 点以外のプータンで見つけたライムも大部分はヒマラヤンライムであった。例外は後述の B07008 と数点のメキシカンライムであった。マンダリンとシトロンとの交雑は、これまで報告されていなかった種間交雑の組合せであった。このように、形態的には似るけれども遺伝的に異なるカンキツを発見した。

(5) 他にも、形態的には似るけれども遺伝的に異なるカンキツ、および、遺伝的には似るけれども形態的に異なるカンキツをいくつか発見した（Breeding Science, 2016）。例えばプータンで見つけた個体 B07004 は形

態にはシトロンに似ていたけれども、遺伝的にはレモンと似ていた(図1)。B07004 とレモンは、ヘテロ接合性の保存から、1本の木から無性的に増殖した植物ではないことがわかった。スイートレモンとベルガモットは、形態的には似るけれども遺伝的に異なる植物である(図1)。さらに両者の間でヘテロ接合性が保存されていたことから、両者は、1本の木から無性的に増殖した植物であることがわかった。

(6)他にも、これまで報告されていなかった種間交雑の組合せをいくつか見つけた(Breeding Science, 2016)。ピロロは、マンダリンとパペダの種間交雑であった(図1)。レモンリアルはパペダとシトロンの交雑種であった。パペダとシトロンの交雑種としては、メキシカンライムが知られている。しかし、レモンリアルとメキシカンライムの両者が一本の木から無性的に増殖したという証拠は、ヘテロ接合性の保存を調べた結果、得られなかった。ブータンで見つけた B07008 は、シトロンとマンダリンの交雑種であった。シトロンとマンダリンの交雑種として、ヒマラヤンライムを発見しているが、B07008 とヒマラヤンライムが一本の木から無性的に増殖したという証拠は、ヘテロ接合性の保存を調べた結果、得られなかった。また、母性遺伝する葉緑体遺伝子は、両者の間で異なっていた。

(7)カンキツ近縁属の類縁関係を調べた。2亜科内に属する種の系統樹としては、最も精度が良いものできており、今後、カンキツ近縁植物の系統分類において、「世界基準」となる論文になることが期待できる。また、カンキツ属、カラタチ属、キンカン属、*Clymenia* 属、*Eremocitrus* 属、*Microcitrus* 属、の6属、つまり多くの場合互いに交雑可能な真正カンキツ内の類縁関係も明らかにしている。これらについては、現在、論文作成を進めているところであり、詳細は、今後、論文として発表していくことになる。

(8)他にも多くの発見をした。日本に自生するカンキツ(タチバナ、シークワサー、コウライタチバナ)は三群以上に別れ、各群は、1本の木から無性的に増殖していた。さらに、シトロン、パペダ、ブンタン、マンダリンの基本4種の変種又は交雑種であるという説では説明できないカンキツ属に属する種を発見している。しかし、これら発見についても、現在、論文作成を進めているところであり、詳細は、今後、論文として発表していくことになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Tshering Penjor, Takashi Mimura, Nobuhiro Kotoda, Ryoji Matsumoto, Atsushi J. Nagano, Mie N. Honjo, Hiroshi Kudoh, Masashi Yamamoto, Yukio

Nagano

RAD-Seq analysis of typical and minor *Citrus* accessions, including Bhutanese varieties. *Breeding Science*, 66: 797-807 (2016) doi:10.1270/jsbbs.16059 (査読有り)

Tshering Penjor, Takashi Mimura, Ryoji Matsumoto, Masashi Yamamoto, Yukio Nagano

Characterization of limes (*Citrus aurantifolia*) grown in Bhutan and Indonesia using high-throughput sequencing. *Scientific Reports*. 4, 4853 (2014) DOI:10.1038/srep04853 (2014).

〔学会発表〕(計16件)

Himalayan lime, a new citrus variety found in Bhutan
Yukio Nagano
Third Myanmar-Japan International Symposium
2016年12月3~5日
Patheingyi (Myanmar)

永野幸生, Tshering Penjor, 三村高史, 古藤田信博, 松本亮司, 永野惇, 本庄三恵, 工藤洋, 山本雅史
ヒマラヤンライム等のブータンで発見した興味深いカンキツ遺伝資源
園芸学会平成28年度秋季大会
2016年9月10~11日
名城大学(名古屋市・愛知県)

永野幸生・Tshering Penjor・三村高史・松本亮司・山本雅史
無性生殖するライムで遺伝的分化がおこる仕組みとしての「ヘテロ接合性喪失」
園芸学会平成26年度秋季大会
2014年9月27日~9月29日
佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

〔その他〕

ホームページ等
・研究代表者のウェブページ
<http://www.iac.saga-u.ac.jp/lifescience>
・ブータン農林省の発表
<http://www.moaf.gov.bt/a-new-indigenous-citrus-variety-identified-from-bhutan/#more-6771>
・ブータンでのTV報道
<https://www.youtube.com/watch?v=eaLesZtFGul>
・佐賀新聞での報道
<http://www.saga-s.co.jp/column/economy/22901/402184>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

山本 雅史 (YAMAMOTO, Masashi)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：00305161

古藤田 信博 (KOTODA, Nobuhiro)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：50355426