

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712005

研究課題名(和文) カキ果実の生育・成熟機構に関する全ゲノムワイドモデルの構築

研究課題名(英文) Genome-wide modeling of fruit development and maturation in persimmons

研究代表者

赤木 剛士 (Akagi, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50611919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではカキの果実形状における品種間多様性を量的に評価する手法を確立して果実の形状発達パターンを特性化するとともに、形状決定に寄与する遺伝的要因の同定を目指した。SHAPEソフトウェアにより、カキ品種間における果実の複雑形状を幾つかの主要な成分へと展開し、その変化パターンを数値化した。カキ果実の形状決定時期においてトランスクリプトームデータと果実形状変化パターンの相関解析や共発現ネットワーク解析を行い、カキ品種・分離後代間に共通する果実形状決定遺伝子候補や、その分子経路を特定した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to quantitatively characterize the pattern of fruit shape development and to identify genetic factors contributing to that pattern, in a wide variety of persimmon cultivars. We developed a method to quantify the pattern of fruit development by separating the principal components of complex shape of persimmon fruits, with "SHAPE" software. In the stage of fruit shape development, transcriptomic data in persimmon cultivars/segregated populations were assessed with Pearson correlation or co-expression network analyses, to identify the genetic factors associated with fruit shapes. Lastly, we found some candidate genes and potential molecular pathways which contribute to fruit shape determining in a wide variety of persimmon accessions.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：カキ 果実 形状多様性 進化 全ゲノム解読 倍数性 バイオインフォマティクス 共発現ネットワ
ーク

1. 研究開始当初の背景

果実の成育過程は果樹作物の商業価値を決定する直接的要因である。しかし、モデル植物を用いた果実形質の解析は難しく、トマトなどによる成熟のモデル研究も進められてきたが、遺伝制御レベルでの一般性が無い場合も多い。近年の多種に渡る全ゲノム解読から、果実の成育機構は、種の分化に特異なゲノム進化が大きく関与する事が示唆されている。これに関して、カキ (*Diospyros kaki*) は他の果樹作物と比較して、単一の種内品種間における果実形状の多様性が非常に大きく、その機構の解明によって様々な果実形状の人為的制御に向けた知見を得られる可能性がある。しかし、代表的な数品種の果実サイズを制御する要因についての組織学的手法を用いた研究は行われてきたが、果実形を決める遺伝的・環境的要因は十分には解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、そのゲノム構造が未解明であるカキにおいて、全ゲノムワイドな進化遺伝学的観点から、その果実成育、主にその形状の発達パターンに関する基礎メカニズムと多様な形質を持つ品種分化に応じた決定要因を明らかにすることを目的とする。

具体的には、まず複雑な形状多様性を示すカキ果実において、その変化パターンを数値として特性化する手法を開発し、果実の形状変化に対して大きな影響を持つ遺伝因子・環境因子の同定を目指した。この上で、トランスクリプトーム解析を中心としたゲノムワイド解析が必須であったため、カキ属の全ゲノム配列を決定し、カキ独自の進化パターンを示した遺伝子群を同定することも本研究の目的としている。

3. 研究の方法

マメガキ全ゲノム配列の決定

マメガキ‘君遷柿(雄)’葉緑体フリーサンプルから高分子 DNA を抽出し、PacBio SMRT ライブラリの作製を行った。PacificBio RSII によって 60-SMRT Cell を出力し、Falcon/Quiver によってアセンブル/ポリシングを行い、ドラフト配列 DLO_r1.0 を得た。各生育段階の混合芽・花器官 RNA-Seq リードを DLO_r1.0 に対して BRAKER1 パイプラインを用いてマッピングすることで遺伝子モデルを構築し、これを用いて AUGUSTUS により遺伝子を予測した。Pseudomolecule の構築 マメガキ‘君遷柿(雄)’を父親に持つ KK 集団 (N = 314)・VM 集団 (N = 119) において 2 種類の GBS/ddRAD-Seq 解析を行い、得られた連鎖地図に基づいてゲノムコンティグの遺伝的アンカリングを行った。

シンテニー・古倍数化解析

マメガキ・キウイフルーツ・ブドウ・トマト各ゲノム配列より非反復遺伝子を抽出して相同遺伝子ペア間における in-frame アライ

メントを行い、中立塩基変異率 (dS) および 4-fold degenerative transversion (4DTv) を検出した。dS 分布に見られるカキ属特異的なピークに含まれる遺伝子ペアについてゲノム全体での物理位置情報を CIRCOS によってプロットした。

果実形の評価方法の確

2016-2017 年度に開花期から成熟期まで 2 週間毎に 156 品種 (それぞれ N=3) をサンプリングした。果実横断面および縦断面をそれぞれ画像撮影し、SHAPE パッケージソフト (Iwata と Ukai, 2002) を用いて楕円フーリエ記述子による評価を行った。楕円フーリエ記述子の数を N = 20 とし、計 80 個の記述子で形状を記述した。フーリエ記述子の係数を変量とした主成分分析を行い、各主成分の形状変異に対する意味を視覚化した。

果実におけるトランスクリプトーム解析

代表的な果実形状を網羅するカキ 49 品種および果実形状に分離性を示す交雑分離集団 50 個体の 6 月上旬および 6 月下旬の果実から mRNA を抽出し、Illumina ライブラリーを作製した。マメガキ全ゲノム情報 (赤木ら、投稿中) に対して BWA プログラムを用いたマッピングを行い、平均 RPKM > 2 の遺伝子を抽出した。

相関解析・共発現ネットワーク解析

果実縦断面の 6 月の主成分得点の変化量と発現量を標準化し、ピアソン積率相関解析を行い、相関係数の絶対値が 0.36 以上 (p < 0.01) の遺伝子を果実形と相関のある遺伝子とした。さらに WGCNA プログラムを用いて全遺伝子 (N = ca 40,000) における共発現ネットワークを構築した。形状の変化パターンと相関性が見られたモジュールに着目し、詳細な分子経路を検討した。

GWAS 解析

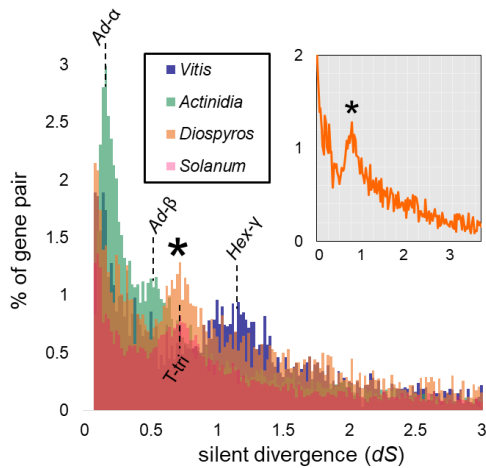
交雑分離後代 50 個体におけるトランスクリプトーム解析 Illumina リードデータから bcftools/vcftools によって SNPs 情報を抽出し、TASSEL プログラムにおける GLM モデルを用いて形状変化パターンとの単相関解析を行った。

4. 研究成果

カキの全ゲノム解読と特異な進化

マメガキ‘君遷柿(雄)’ゲノムより 3,073 コンティグから成る総延長 746.1Mb, N50=1.06Mb の primary ドラフトコンティグ配列を構築した。kmer 分布より、この配列は推定ゲノムサイズの 95.6%程度をカバーしていると考えられた。2 種類の分離後代の GBS/ddRAD-Seq 解析から 5,959 SNPs が座乗した 15 連鎖群から成る全長 1913 cM の統合連鎖地図を構築した。この統合地図のうち、‘君遷柿(雄)’の連鎖地図を用いて遺伝的アンカリングを行った結果、約 411 Mb の primary コンティグ配列がアンカリングされ、pseudomolecule 数は染色体数と一致する 15 に収束した。Primary コンティグにヘテロ領

域のアレルを捉えたと仮定される alternative コンティグセットを加えた配列より 38,634 遺伝子が予測された。このうち primary コンティグ由来の 30,218 遺伝子からゲノム内における重複性の低い (blastp, hit-N<6, e-value < e-20) 12,058 遺伝子を選抜し、相同配列ペア間において網羅的に中立変異率を検出した結果、全ゲノム倍化(古倍数化)に特徴的な有意なピークが検出された(第1図)。

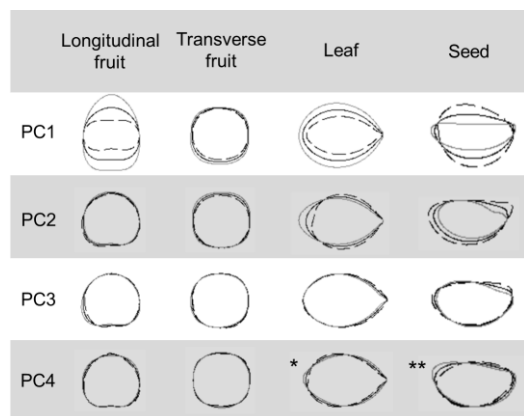


第1図: ゲノム内パラログ間における中立変異率の分布。カキゲノムでは有意なピークがいくつか所検出され、この時期 (dS=0.7, およそ 6,000-7,000 万年前) に全ゲノム倍化が起こったことが示唆された。

キウイフルーツおよびブドウゲノムにおいて同様の解析を行った結果、キウイフルーツに特徴的な二回の古倍数化および双子葉植物に共通の古六倍体化 (Jaillon et al. 2009) が検出されるとともに、カキ属ゲノムにおける古倍数化のピークはカキ属に特有なものであることが示唆された。

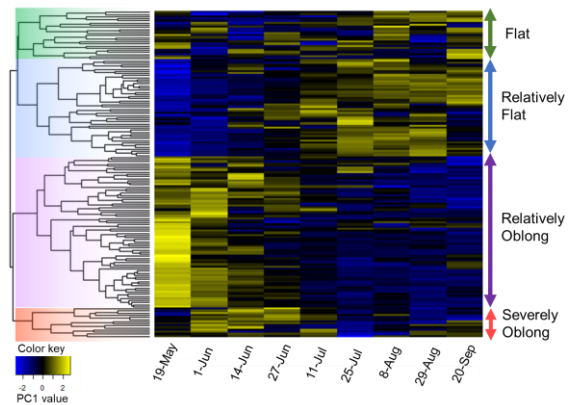
カキ品種間における果実形状多様性

成熟期における果実縦断面および横断面の果実形評価の結果を第2図に示した。第2図より、果実縦断面の品種間形状多様性の主成分は縦横比であること、横断面の形は果実を上から見た場合の扁平さの程度によって決定することが示唆された。



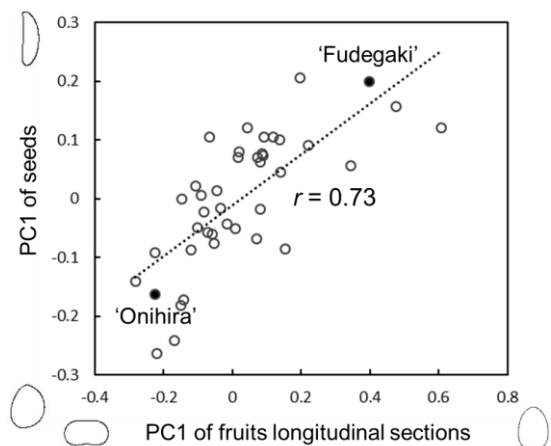
第2図: カキ果実の縦断面・横断面および葉・種子の形状における品種間多様性の主成分分析。

経時的な果実形の観察により、開花 2 週間後においてはほぼすべての品種において果実縦断面の形状は扁平であったが、6 月下旬の時点ではほぼ最終的な果実形を反映していた。また、果実縦断面・横断面それぞれについて第1主成分の経時的な変化のクラスタリングを行ったところ、果実縦断面は品種同調的に形が決定することが示唆された(第3図)。これらの結果により、6月中の縦径方向への成長程度が果実形の主成分を決定することが示唆された。



第3図: 果実発達ステージ間における果実縦断面形状の経時的な変化パターンとクラスタリング。最終的な形状(4種類に分類)に同調的なクラスターが見られることから、果実縦断面形状はカキ品種間において同調的な変化(同時期の形状決定)を示すことが示唆される。

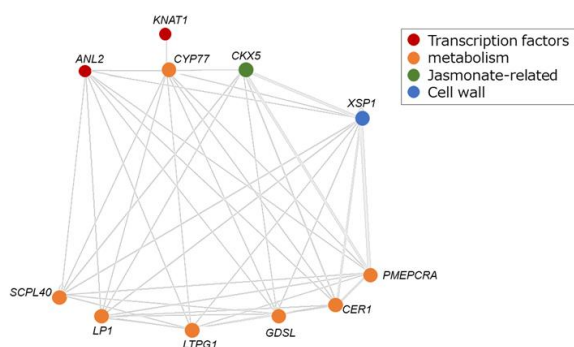
さらに、種子や葉の形状(第2図)と果実形状の相関解析から、種子形と果実形には強い相関がある事が示された(第4図)



第4図: 果実縦断面形状の第一主成分と種子形状第一主成分間の相関解析。品種間において非常に強い相関性が検出される。

果実形状に影響を及ぼす遺伝的因子

分離交雑後代 50 個体において、果実形状指数と発現解析間のピアソン積率相関解析の結果、主に果実縦横比を示す PC1 について 228 遺伝子が有意な相関を示した。転写因子ではシロイヌナズナにおいて葉の形態形成に関与する *KNAT1* および *YABBY5* (*YAB5*) が含まれており、植物ホルモン関係では *CKX5* および *SAUR* が含まれていた。共発現ネットワーク解析において、RPKM 値の平均値が 1 以上である 22,492 遺伝子は 26 のモジュール (soft-thresholding power =7; minimal module size = 30; cutoff for merging = 0.15) に分類された。果実形について、各モジュールとの相関を調査した結果、一つのモジュールと有意な相関を示した。このモジュールには 49 遺伝子が含まれており、果実形が細長いほど発現量が増加する傾向を示した。また、*KNAT1* および *CKX5* が含まれており、ピアソン積率相関解析と結果が一致していた。このネットワークにおける転写因子は class 1 KNOX 遺伝子である *KNAT1* および HD-ZIP IV に属する *ANL2* であり、植物ホルモン関係は *CKX5* であった (第 5 図)。



第 5 図: 分離交雑後代系統の果実形状と相関のあるモジュール内における中心的な遺伝子ネットワーク。Class 1 KNOX 遺伝子である *KNAT1* などが下流の植物ホルモン関係および代謝関係遺伝子を統御している可能性が考えられる。

カキ 49 品種における果実形状指数と発現解析間のピアソン積率相関解析の結果、主に果実縦横比を示す第 1 主成分 (PC1) について 208 遺伝子、果頂部の形を示す第 4 主成分 (PC4) について 255 遺伝子が有意な相関を示した。この中にはシロイヌナズナの葉の形の決定に関わる転写因子であると報告されている *ASYMMETRIC LEAVES 2* (*AS2*)、*HAT14* および *PHAVOLUTA* (*PHV*) が含まれていた。共発現ネットワーク解析の結果、2 つのモジュールが形質との有意な相関を示した。これらには *PHABULOSA* (*PHB*) や class 1 KNOX 遺伝子である *KNAT2* および *KNAT6* が含まれていた。*PHB* および class 1 KNOX 遺伝子は形態形成に関与することが報告されているため、これらのモジュールに含まれる転写因子は果

実形制御において重要な役割を果たしていると考えられた。以上より、カキ品種における多様な果実形状の主成分は Class 1 KNOX 遺伝子を中心とした転写因子群の発現に律速である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Haruka Maeda, Takashi Akagi (Corresponding author), Ryutaroo Tao. 2018. Quantitative characterization of fruit shape and its differentiation pattern in diverse persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars. *Scientia Horticulturae* 228:41-48.

[学会発表] (計 2 件)

1. 前田春香・赤木剛士・田尾 龍太郎. カキにみられる多様な果実形状の数値化, 園芸学会平成 29 年度秋季大会 (2017.9.2-4, 酪農学園大学)

2. 赤木剛士・白澤健太・長崎英樹・平川英樹・Luca Comai・田尾龍太郎・Isabelle M. Henry. カキ属の全ゲノム配列解読 (第 1 報): 系統特異的なゲノム進化, 園芸学会平成 29 年度秋季大会 (2017.9.2-4, 酪農学園大学)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

赤木 剛士 (AKAGI, Takashi)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：50611919