

研究終了報告書

「ハウス栽培環境におけるウリ科果実の糖度変動に関連するシンク・ソース分子ネットワークの解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：矢野 亮一

1. 研究のねらい

気候変動と少子高齢化時代の農業において、高品質を安定して実現する優良品種の育成ならびに生産技術の確立は最重要課題の一つである。果実を食用として生産する作物では糖度がマーケティング上の重要なターゲットとなる場合が多く、実際に、高糖度果実生産の取り組みは他国産との差別化や高付加価値化に役立っている。ウリ科に属するメロンは、世界的にはビタミンやミネラルの供給源として日常的に食される果菜類であるが、我が国の高級マスクメロンでは高糖度や良食味の追求によるブランド化も進展している。一方、絶えず日照や気温が変動するハウス等の栽培環境(実際の生産現場)においては、高品質なメロンを安定生産することは容易ではない。ゲノムや遺伝子のレベルで、環境によらず安定して高品質を実現するための基礎的知見が得られれば、将来の品種育成や生産技術構築に役立つと期待される。本研究では、日本産高級マスクメロンの標準系統であり育種にも活用される「アールスフェボリット春系3号」を主な対象として、季節など栽培環境の違いによる果実糖度の変動と、環境に応答して変化する遺伝子・代謝物の関連性をバイオインフォマティクスの手法で明らかにすることを目的とする。春系3号は明治時代に英国から渡った系統に由来するとされているが、現代では我が国独自の遺伝資源と言うことができ、数あるメロンの中でも特に高い糖度と良食味を誇る。研究では、遺伝子レベルの解析において最も基礎的な知見となる全ゲノム情報を春系3号メロンにおいて解読し、これを活用することで、果実糖度の増減に連動して変化する因子情報の解明を試みる。さらに、春系3号以外の遺伝資源や誘発変異体ライブラリーを用いた調査研究を実施し、より広いレベルでの研究成果の活用を目指す。さらに研究プロジェクトでは、独自のwebデータベース「Melonet-DB(<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/>)」を開発する。必要に応じてアクセス制限を設定しながら情報公開することで、国内外の研究コミュニティにおける中核データベースとしてプレゼンス向上を図ると共に、ゲノムや遺伝子機能に基づく育種と研究に貢献する狙いである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、①精密トランスクリプトーム解析の前提となる春系3号メロンの高精度全ゲノム解読、②Melonet-DB データベースとwebアプリケーション・ツールの開発、③ハウス栽培メロンにおけるトランスクリプトーム情報収集と果実糖度の変動に相関するマーカー遺伝子の同定、④遺伝資源やメロン変異体ライブラリーを利用した調査とDNA変異解析、を実施した。①のゲノム情報については準備段階にてある程度構築していたが、配列アセンブリや遺伝子予測の精度が不十分であったため、本研究において高精度化を図った。DNA分子のロングリード・シーケンシングを可能にするOxford Nanopore Technology (ONT)とそれをサ

ポートするゲノム構造データ(BioNano 等)を組み合わせることで、春系 3 号メロンの 12 本の染色体ゲノム配列をギャップ数 94 個の高精度で解読した。さらに、ONT RNA-seq に基づく遺伝子予測法と計算機による予測法(*ab initio* 法)を統合し、春系 3 号ゲノムに存在する 33,829 個の遺伝子セットを特定した。これらの研究成果は英科学誌「*Communications Biology*」にて論文発表し、日本産高級マスクメロンの全ゲノム解読ということもあり、国内外の新聞社・ニュースサイトにおいて注目を集めた。②については、①のゲノム情報を基準に Melonet-DB の web アプリケーションを全面的に更新または新規開発し、遺伝子発現アトラスや共発現解析ツール、GO エンリッチメント解析ツールなど、視覚的に遺伝子機能を解釈可能なツールを提供した。③では研究期間を通じて継続的にメロンのハウス栽培に取り組み、果実糖度の非破壊計測情報と合わせてトランスクリプトーム情報を収集した。それらの解析から果実糖度の変化に連動するマーカー遺伝子を探索し、特に、葉の遺伝子発現情報から果実糖度を推定するための遺伝子候補を同定した。④については、春系 3 号以外のメロン遺伝資源と春系 3 号に由来する誘変変異体ライブラリーを用いた調査をそれぞれ行った。アールスフェボリット系メロンとそれ以外のメロン品種・野生系統における違いをトランスクリプトーム情報から解析し、果実糖度の違いや変動に関係する遺伝子候補を同定した。変異体については、高速シーケンサーによるゲノムワイドな変異解析を実施し、化学変異誘発処理によって実際にゲノム配列に変異が生じていることを確認した。

(2) 詳細

研究テーマ A「春系 3 号メロンの全ゲノム解読ならびに果実糖度に係るフィールドオミックス研究」

A-1) 上述のように、研究開始当初は高精度トランスクリプトーム解析の前提となる春系 3 号の全ゲノム情報が不十分な状況であった。このため、ONT によるゲノムシーケンスを新たに実施し、それまでに取得していた他のサポート情報と統合して高精度ゲノム情報を構築した。同時に、アセンブルした DNA 配列上に座乗する遺伝子についても、メロンの 45 組織を網羅する ONT RNA-seq データを用いて予測を行った。その結果、12 本の染色体ゲノム配列をギャップ数 94 でアセンブルすることができ、さらに、これまでに発表されたウリ科ゲノムと比較して最高レベルの網羅性を有する遺伝子情報セットを取得した(33,829 遺伝子、complete BUSCO ベンチマーク値 = 95.3 %)。イルミナ RNA-seq にて mRNA 発現を検出可能な遺伝子数は、それまでに利用可能であった DHL92 ゲノムリファレンスの 16,013 遺伝子から大きく増え、春系 3 号リファレンスでは 27,687 遺伝子となった(45 組織の RNA-seq データに基づく結果)。このように、春系 3 号ゲノムリファレンスを基準とすることにより、より詳細なトランスクリプトーム情報解析が可能になり、共発現ネットワークなどの二次解析でも精度の高い結果を得ることが可能になった(Yano et al. 2020, *Communications Biology*)。研究では、複数の遺伝資源系統によるリシーケンス解析の検証も行った。特にアールスフェボリット系メロンの解析では、リードアライメントや DNA 多型情報の正確さにおいて、春系 3 号ゲノムリファレンスの優位性が証明された。

A-2) 新たに独自の春系 3 号ゲノムリファレンスを構築したため、これに合わせて web デ

データベース「Melonet-DB (<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/>)」の各種アプリケーション・ツールを更新または新規開発した。Melonet-DB では視覚的に遺伝子機能を解析可能な「遺伝子発現アトラス」や「共発現解析ツール」を用意しており、過去に論文発表されたデータについては、世界中の研究者が web ブラウザでアクセスできるようにした(図 2)。共発現解析ツールでは、遺伝子間の共発現の度合いについて閾値をリアルタイムに変更できる仕組みを取り入れ、フレキシブルなネットワーク解析を可能にした。この他にも、ゲノムブラウザや GO エンリッチメント解析ツール、e-TILLING ツール(集団レベルの DNA 多型情報をデータベース化し、遺伝子 ID から当該遺伝子に変異を持つ個体を web ブラウザで特定できるようにしたもの)などを新たに実装し、より包括的な遺伝子情報解析を可能とした。2020 年 1-12 月の間で、Melonet-DB には世界各国より 14,130 回のページビューと 1,103 ユーザーの利用があった(Google analytics 調査)。2018 年の最初の論文発表時(Yano et al. 2018)に比べるとアクセス数が伸びており、世界のウリ科研究者に認知されつつあると考えている。

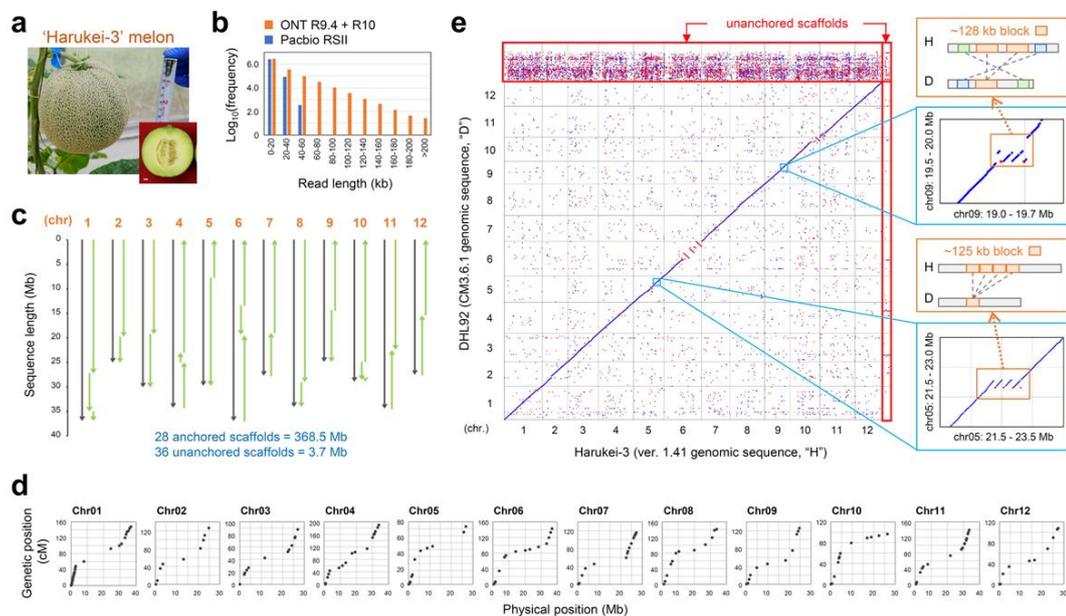


図 1. アールスフェボリット春系 3 号全ゲノム情報の解読 (Yano et al. 2020 より抜粋)
 a) 春系 3 号メロン果実 b) ロングリードシーケンサーのリード長ヒストグラム c) 染色体スケールのゲノムアセンブリの構築 d) 連鎖地図情報によるゲノムアセンブリの検証
 e) 既存のメロンゲノムリファレンス「DHL92」との DNA 配列比較解析

A-3) テーマ A の主題であるハウス環境でのメロン栽培調査とオミックス情報収集については、補助員 2 名のサポートを得て 2018 年から継続して取り組んだ。メロンは生長すると高さ 2m を超え、長さ 20cm ほどのソース葉が 20 枚ほど展開する。1 つの個体に 1 果実を着果させる場合、収穫時果実の重量は 1kg ほどになる。各シーズンともに春から秋にかけてメロン栽培を実施し、非破壊糖度分析計(近赤外分光計)を用いて果実糖度情報を経時的に収集するとともに、これと紐づける形でソース葉の組織サンプリングを実施した(0.5-1cm のり

一パンチ)。研究では1個体につき1つの果実を着果させ、シンク(果実)・ソース(葉)の器官間において非破壊糖度情報とオミックス情報を関連付けて情報分析できるようにした。非破壊糖度分析計を用いた調査によると、春系3号メロンの果実糖度は5-6月に果実成熟した個体で最高値となった(max BRIX=18.4)。他方で、特に夏季に生育した個体ではBRIX値が13程度に留まっており、栽培環境が異なると糖度が大きく変化すると考えられた(supplementary data, Yano et al. 2020)。その他のメロン遺伝資源(しろうり、黄金9号[まくわ]、ハネデュー、スパイシー、雑草メロン)はいずれの栽培時期でもBRIX値15を超えることがなく、春系3号などアールスメポリット系メロンの高糖度が目立つ結果となった。収集した果実糖度情報や組織サンプルは、テーマBにおける情報解析に利用した。

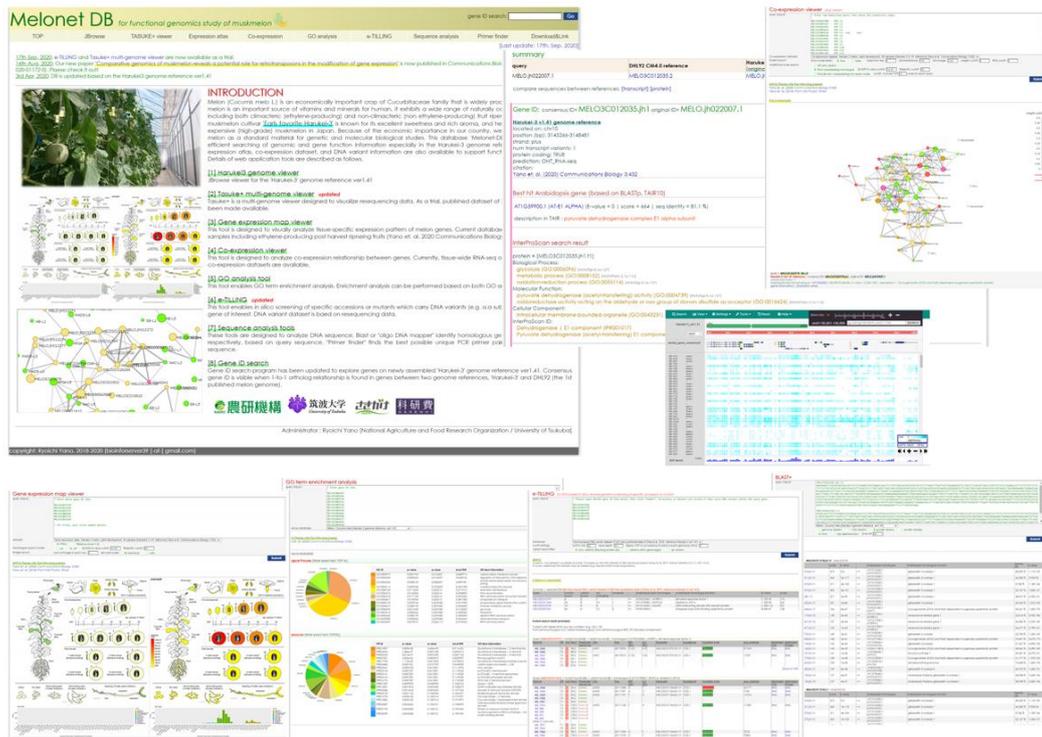


図 2. メロンのゲノム・トランスクリプトーム情報解析を円滑に進めるための Melobet-DB ツール群 (<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/>)。各ツールとも春系3号ゲノムリファレンス基準で設計されているが、既存の DHL92 ゲノムリファレンスをベースとした解析も可能である。

研究テーマ B 「果実糖度に連動するバイオマーカーの探索ならびに因子間ネットワーク解析」

葉は光合成器官としての役割を担っており、そのソース能は果実などシンクの質に少なからず影響すると考えられる。本研究では、ハウス環境における果実糖度関連因子の探索にあたり、特にソース器官側因子の同定に注力した。すなわち、ソース器官側の遺伝子発現情報から、シンク(果実)の糖度を予測することを目的とした。メロンは果実に近い葉ほど、果

実成熟に伴って老化が早く進行するため、シンクの影響を受けやすいのは果実直近の葉であると予想される。このため本研究では、①果実から離れた部位の葉と②果実にもっとも近い部位の葉に分けてサンプル収集した。それぞれにおいて、イルミナによる RNA-seq 解析 (トランスクリプトーム) を実施したところ、①については果実糖度の変化に強く相関する遺伝子は認められなかった。一方で、②については、決定係数 0.8 程度で果実糖度の変化と遺伝子発現レベルで相関する遺伝子群が見つかった。それらには植物ホルモン関連遺伝子や糖代謝遺伝子が含まれており、共発現解析を行うとネットワークを形成する傾向にあった。このため、果実に近い葉は遠い葉と異なって、シンク(果実)からの影響を受けやすく果実糖度の増大に伴って植物ホルモン・バランス(もしくはシグナル伝達)が変化し、物質転流が促されている可能性が考えられた。これらの遺伝子群のいくつかは LASSO 回帰においても説明因子として選抜されており、ハウス環境において果実糖度を予測するためのマーカー遺伝子として有力視された。

研究では、果実側のトランスクリプトーム情報から果実糖度を説明するための試みも実施した。果実から RNA を単離するには破壊的サンプリングが避けられないため、果実サンプルの収集は収穫時のみとした。比較のため、調査系統には春系 3 号と遺伝資源 6 系統(アールスフェボリット系 1 系統、しろうり、黄金 9 号[まくわ]、ハネデュー、スパイシー、雑草メロン)を用いた。上述のように、これらのうち果実糖度が高いのはアールスフェボリット系メロンである。遺伝子発現レベルと収穫時果実糖度の相関性を解析した結果、果実では葉の場合とは異なる遺伝子群が、果実糖度の変化あるいは品種間差と関連する傾向が認められた。果実の肥大化や成熟に関わると予想される特定の植物ホルモン関連遺伝子の関与も示唆された。果実糖度が高いアールスフェボリット系メロンでのみ発現し、さらに、果実糖度の環境変動とも相関性を示す遺伝子が見つかり、当該系統のメロンが他と異なって甘味化したこととの関連について注目している。

研究テーマ C 「春系 3 号以外の遺伝資源ならびに春系 3 号に由来する誘発変異体ライブラリーを用いた調査と検証」

テーマ C では、遺伝資源系統と誘発変異体ライブラリーを用いた研究を計画した。遺伝資源系統を用いた調査研究については、既に上述したので割愛する。誘発変異体ライブラリーは、春系 3 号を親株として Ethyl methanesulfonate(EMS) 処理により変異誘発された系統であり、2292 系統が筑波大学にて保管されている。本研究では、テーマ B 等で同定された候補遺伝子の機能検証のために変異体の活用を計画しており、補助員 2 名のサポートを得て、ゲノム DNA 濃度調整とライブラリー化を完了した。うち 177 系統については予備的な栽培調査を実施し、果実形状が変化した系統や低糖度系統の存在を確認した。さらに、5 系統については全ゲノム・リシークエンス解析を実施すると共に、別の 96 系統は JST opera プロジェクト(代表:筑波大 江面浩 教授、有泉亨 准教授)と協同してエクソームシークエンスを行った。合計 101 系統の変異体系統について、春系 3 号ゲノムリファレンスを基準とした変異情報解析を実施したところ、低閾値条件では約 62 万の DNA 変異を同定した。これらの変異情報は試験的に Melonet-DB にてデータベース化し、web ブラウザを用いて遺伝子 ID から変異体を検索できるようにした(e-TILLING ツール:アクセス制限を設定しており、一般に

は非公開)。当該ツールにより、テーマ B で候補とされたマーカー遺伝子について、複数の変異体候補(アミノ酸置換系統、ストップコドン変異系統など)を得た。将来的に変異体系統数を拡充することにより、より包括的な逆遺伝学研究が可能になると考えられる。

3. 今後の展開

自身にとって大きな研究成果の一つは、データベースサイト「Melonet-DB」の開発だと考えている。データベースは解析ツールがユニークであり、かつユーザーフレンドリーであれば、注目を集め利用価値も上昇すると考えられる。さきがけ研究では、栽培から分子生物学実験、インフォマティクス解析、データベース開発までを単独で行ったことで、改めて実験者の立場(ウェット研究の立場)からデータベースに必要な要素を考えるきっかけとなった。特に、解析結果を無機質なテキストリストでなくビジュアルで理解することは、新たなアイデアを獲得するのに重要であると考えている。Melonet-DB のアプリケーション・ツールも改良を重ねており、その結果、世界的にもアクセス数が増えてきている。今後も、メロンについてはデータベース開発を中核としてバイオインフォマティクス研究に注力したいと考えている。特に、多品種・系統のゲノム情報整備に取り組み、より育種に役立つ情報の提供に焦点を当てる予定である。また、これらのノウハウは、ダイズやイネなど他の作物の研究にも応用して活用することができる。生物種に拘らず可能性を追求したいと考えている。

4. 自己評価

研究の達成状況に関しては、春系 3 号メロンの全ゲノム解読や Melonet-DB データベース開発について論文発表を行ったため、一定の成果を収めたと考えている。Melonet-DB では遺伝子発現アトラスや共発現解析ツールに新しい機能を追加した他、変異体系統等の *in silico* スクリーニング・ツールである e-TILLING を新たに開発した。DB アクセス数も世界的に増えており、論文発表と海外シンポジウム口頭発表の努力によって、認知度が上昇したと考えている。また、本研究の主題ともいえる果実糖度関連因子の研究については、変異体を用いた遺伝学的な検証は未達であるものの、ハウス環境での果実糖度変化に相関する遺伝子マーカー候補を葉・果実の双方で見出すことができた。バイオインフォマティクス研究にのみ注力するのではなく、植物の栽培にも日頃から取り組むことで、果実に近い葉と遠い葉の生理学的な違いに着目し研究成果につなげた。また、Oxford Nanopore など最新のシークエンス・プラットフォームをいち早く試行し、データ解析と合わせて解析手法を確立した。

研究体制については、2018 年から農研機構が本務機関となり筑波大学が併任となったことで、大学で栽培と実験を行い、研究所で情報解析を実施してきた。栽培に関しては補助員 2 名のサポートを得て進めたが、その他の分子生物学実験、バイオインフォマティクス解析、データベース開発(アプリケーションのプログラミング含め)はすべて単独で行ってきた。特に、情報処理のためのプログラミングには高いレベルの集中力を要したが、他の業務もある中でドライ・ウェット双方の研究を進展させ、一定の成果を出せたことには自己を評価している。

研究成果の波及効果については、前述のように Melonet-DB データベースを介して広く宣伝と普及を図ってきた。Melonet-DB は世界的にもアクセス数が増えてきており、今後、トランスクリプトームに加えて品種や遺伝資源、変異体ライブラリー等の塩基配列情報をデータベース化することにより、遺伝子研究者のみならず民間企業や地方団体の育種家の要望にも応えたい

と考えている。また、同様のデータベースはメロン以外でも構築することも計画しており、さきがけ研究で得たノウハウを活用したいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Ryoichi Yano, Tohru Ariizumi, Satoko Nonaka, Yoichi Kawazu, Silin Zhong, Lukas Mueller, James J. Giovannoni, Jocelyn K. C. Rose, Hiroshi Ezura “Comparative genomics of muskmelon reveals a potential role for retrotransposons in the modification of gene expression” *Communications Biology*, 2020, 3, Article number: 432, 1–13

国産高級マスクメロンの標準系統である「アールスメロリット春系 3 号」について、全ゲノム情報を解読して塩基配列情報と遺伝子情報を「Melonet-DB」にてデータベース化した。春系 3 号以外にも遺伝資源 7 系統についてゲノム解読を行い、公開済情報と合わせて計 10 系統の比較ゲノム解析を行った。トランスクリプトームとの統合解析を行うことで、メロン品種が多様化した背景にレトロトランスポゾンが関連した可能性を提唱した。論文は、筑波大学・江面浩教授との共同責任著者(兼 筆頭著者)として発表した。2020 年 8 月 19 日の発表後 30 日間で論文アクセス数 1294 回、Altmetric 指数 63。

2. Ryoichi Yano, Satoko Nonaka, Hiroshi Ezura “Melonet-DB, A Grand RNA-seq Gene Expression Atlas in Melon (*Cucumis melo* L.)” *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(1) Article number: e4, 1–15

遺伝子機能解析を行う上で基本となるトランスクリプトーム情報をメロンにおいてデータベース化した。データベースサイト「Melonet-DB」の 1 本目の論文である。筆頭著者として発表。発表以降の被引用数 18 回(Google analytics)、アクセス数 2,944 回、Altmetric 指数 1。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 筑波大学・農研機構 共同プレスリリース「日本産高級マスクメロンの全ゲノム情報を解読」(2020 年 8 月 19 日)
2. 日本植物細胞分子生物学会 奨励賞受賞(現: 日本植物バイオテクノロジー学会, 2018 年 8 月)
3. メロンのゲノム・遺伝子情報データベース「Melonet-DB」の開発
<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/ap/top>
4. Ryoichi Yano, Tohru Ariizumi, Satoko Nonaka, Hiroshi Ezura. Developing Genome and Transcriptome Information Database for Functional Genomics Research of Japanese Muskmelon. 国際ウリ科シンポジウム「Cucurbitaceae2018, UC-Davis, USA」, selected speaker (2018 年 11 月)
5. 矢野亮一. 「アールスメロリット・マスクメロンの全ゲノム解読」 農林水産技術会議ワ

ークショップ 招待講演 (2019 年 9 月)

