



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on Development and Application of
High-throughput Genomic and Bioinformatics
Tools for Citrus Fruit Physiology and Breeding

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2014-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49024

氏 名 (本 国 籍)	藤 井 浩 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博乙第 1 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 6 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	Studies on Development and Application of High-throughput Genomic and Bioinformatics Tools for Citrus Fruit Physiology and Breeding (カンキツ果実の生理学と育種学のためのハイス ループットなゲノム及びバイオインフォマティク スツールの開発と応用に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教 授 大 村 三 男 副査 岐阜大学 教 授 鈴 木 徹 副査 静岡大学 教 授 本 橋 令 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、世界的に経済上、最も重要な果樹の 1 つであり、果実の色や香り、味、健康機能性成分高含有などの多様な育種目標をもつカンキツを対象とし、近年急速に発達しているゲノム科学を利用して、果実の生理学的な特性解明や育種に対する基盤的な技術開発とその応用をめざした研究である。カンキツにおける国内外のゲノム解析の進展をうけて、発現遺伝子配列断片 (EST) 解析や DNA マーカー、連鎖地図、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析、そして、2011 年の全塩基配列の公開等が育種の効率化や果実における遺伝子発現の解明に利用されてきている。しかしながら、カンキツの重要形質に関する遺伝子レベルの解明を支える情報として十分に利用可能なものとして提供されているとは言い難い状況にあった。シロイヌナズナやイネなどの先進作物の事例からの情報では解明が困難なカンキツ特性の解析のためには、形質に関わる多数の遺伝子の発現解析や多数の品種についてのゲノムワイドな遺伝子型情報解析及び、それらを組み合わせた解析が不可欠である。

そのため、本研究は結実まで長年月を要するカンキツ育種において、育種素材の遺伝的系譜の解析、DNA マーカー選抜、果実生理現象に関わる遺伝子の抽出など広範な利用を目的に、ゲノム情報の収集、管理、利用にいたる一連の解析技術、特にスループットの改良を重ね、とりまとめたものである。その内容は、以下の 3 つの研究により構成される。

1. オリゴアレイによるカンキツ成熟果実における遺伝子発現解析

ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) の果実における遺伝子の転写制御の解明のために、カンキツの 22K オリゴマイクロアレイ (オリゴアレイ) を作成することで、網羅的な遺伝子発現解析を行った。そして、ウンシュウミカンの成熟果実のエチレン及びジベレリン 3 (GA_3) に対する遺伝子の応答性を解析した。エチレン処理 72 時間後には、1493 個の遺伝子が 3 倍以上の発現変化を示し、エチレン応答遺伝子と推察された。また、エチレン応答遺伝子の半分以上はエチレン処理により発現が抑制されていた。このことは、エチレンが多くの生物学的なプロセスを低下させ、果実の成熟と老化に関して重要な役割を果たしていることを示していた。エチレンは光合成や葉緑体生合成、糖代謝等の遺伝子の転写を抑制した一方、病害抵抗性や防御、ストレス、アミノ酸合成、タンパク質分解、2 次代謝に関連する遺伝子の転写を誘導した。

次に、オリゴアレイを用いて GA_3 応答遺伝子を調査した。 GA_3 処理 72 時間後のウンシュウミカン成熟果実と対照区との遺伝子発現を比較したところ、3 倍以上の発現変化を示す 213 個が GA_3 応答遺伝子として推定された。 GA_3 処理は、生体防御タンパク質や光合成、葉緑体生合成、病害抵抗性、防御、ストレスに関連する遺伝子の発現を誘導した。また、果実の成熟に関連するカロテノイド代謝遺伝子等のエチレンに誘導される遺伝子の転写を低下させた。その効果はエチレンと対照的で、内性の GA_3 のレベルが果実の成熟と老化の制御に重要であると推測された。

2. DNA マーカーによる効率的な品種識別のためのソフトウェアの開発

品種の育成系譜の正確な判定は、その遺伝子型が影響を及ぼす生理学研究や育種に極めて重要である。近年では、その目的のため DNA マーカーが開発されている。DNA マーカーを様々な品種に適用した結果は、DNA マーカー型を記号に置き換えた表に整理され、品種識別に利用される。しかし、膨大な 2 次元表から最も少ない数で全ての品種を識別することができる最少マーカーセットを求めることは簡単ではない。そこで、DNA マーカー型を記号に置き換え整理した表に着目して、最少マーカーセットを求めるための組み合わせ最適化理論に基づくアルゴリズムとその計算を実現するソフトウェア MinimalMarker を開発した。MinimalMarker は共優性マーカーにも優性マーカーにも適用可能であり、アリルの数を問わないこと、また、単純反復配列 (SSR) マーカーのような数値表記のマーカーにも適用できることなど優れた特徴をもつため、広範な作物への適用が期待される。

3. SNP アレイを用いたカンキツ品種のハイスループットなジェノタイピング

カンキツの様々な特性に関与する遺伝子をマッピングしたり、品種の遺伝的類似性の検定を効率よく行うために、多数の品種や複数の交配集団に対するハイスループットなジェノタイピングのシステムが望まれる。そのために、*CitSGA-1* と名付けた 384 個の一塩基多型 (SNP) を搭載する SNP ジェノタイピングアレイ (SNP アレイ) を開発し、その性能と信頼性を評価した。搭載した SNP はわが国のカンキツ育種の遺伝的な多様

性を代表する品種から収集した。 *CitSGA-1* を 88 個体の交雑集団とわが国のカンキツ育種に関連する 103 種類の品種・系統に適用した結果、351 個の SNP で遺伝子型を識別できた。 SNP アレイ解析による遺伝子型の信頼性を確認するために親子分析を行った結果、276 個の SNP が信頼できると判定された。 これらの SNP に MinimalMarker を適用したところ、7 つの SNP を用いることにより、すべての品種・系統を識別できることを明らかにした。 同時に、本システムによる解析からジェノタイピングの信頼度に関わる要素を検討し、今後のハイスループットな解析を実施するための基礎情報を抽出することができた。

これらの一連の研究を通じて開発したオリゴアレイと SNP アレイの 2 つのゲノム解析ツールにより、網羅的かつハイスループットな遺伝子発現解析と品種ジェノタイピングが可能になり、これらの情報を使いこなすバイオインフォマティクスツールの開発とあわせて、果樹の諸形質に関わる形質制御遺伝子の探索、連鎖地図の効率的な作成や、マーカー支援育種など幅広く利用される研究基盤になると期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席者のもと、平成 25 年 12 月 16 日（月）午後 1 時より静岡大学農学部 A 棟 110 号室において実施された。

本論文は、結実まで長年月を要するカンキツ育種において、育種素材の遺伝的系譜の解析、DNA マーカー選抜及び果実生理現象に関わる遺伝子の抽出など広範な利用を目的に、ゲノム情報の収集、管理、利用にいたる一連の解析技術、特にスループットの改良に関わる研究を重ねたものである。その内容は、以下の 3 つの研究より構成される。

1. オリゴアレイによるカンキツ成熟果実における遺伝子発現解析

ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) の成熟果実におけるエチレン及びジベレリン 3 (GA_3) に対する応答遺伝子の特定とその転写制御の解明のために、カンキツの 22K オリゴマイクロアレイ（オリゴアレイ）を設計・作成し、遺伝子発現解析を行った。エチレン及び GA_3 処理 72 時間後に 3 倍以上の発現変化があった 1493 個及びの 213 個遺伝子をエチレンまたは GA_3 応答遺伝子と特定した。エチレン応答遺伝子の半分以上はエチレン処理により発現が抑制されていた。このことは、エチレンが多くの生物学的なプロセスを低下させ、果実の成熟と老化に関して重要な役割を果たしていることを示していた。同時に、エチレンは病害抵抗性や防御、ストレス、アミノ酸合成、タンパク質分解、二次代謝に関連する遺伝子の転写を誘導した。一方、 GA_3 処理は、生体防御タンパク質や光合成、葉緑体生合成、病害抵抗性、防御、ストレスに関連する遺伝子の発現を誘導した。また、果実の成熟に関連するカロテノイド代謝遺伝子等のエチレンに誘導される遺伝子の転写を低下させた。その効果はエチレンと対照的で、内性の GA_3 のレ

ベルが果実の成熟と老化の制御に重要であると推測した。

2. DNA マーカーによる効率的な品種識別のためのソフトウェアの開発

品種の育成系譜の正確な判定は、その遺伝子型が影響を及ぼす生理学研究や育種に極めて重要である。近年では、その目的のため DNA マーカーが開発されている。DNA マーカーを様々な品種に適用した結果は、DNA マーカー型を記号に置き換えた表に整理され、品種識別に利用される。膨大な 2 次元表から最も少ない数で全ての品種を識別することができる最少マーカーセットを求めることは簡単ではない。そこで、最少マーカーセットを求めるための組み合わせ最適化理論に基づくアルゴリズムとその計算を実現するソフトウェア **MinimalMarker** を開発した。**MinimalMarker** は共優性マーカーにも優性マーカーにも適用可能であり、アレルの数を問わない。また、単純反復配列 (SSR) マーカーのような数値表記のマーカーにも適用できる。

3. SNP アレイを用いたカンキツ品種のハイスループットなジェノタイピング

カンキツのハイスループットなジェノタイピングを実現するために、*CitSGA-1* と名付けた 384 個の一塩基多型 (SNP) を搭載する SNP ジェノタイピングアレイ (SNP アレイ) を開発し、その性能と信頼性を評価した。搭載した SNP はわが国のカンキツ育種の遺伝的な多様性を代表する品種から収集した。*CitSGA-1* を 88 個体の交雑集団とわが国のカンキツ育種に関連する 103 種類の品種・系統に適用した結果、351 個の SNP で遺伝子型を識別できた。SNP アレイ解析による遺伝子型の信頼性を確認するために親子分析を行った結果、276 個の SNP が信頼できると判定された。これらの SNP に前項で開発した **MinimalMarker** を適用し、7 つの SNP ですべての品種・系統を識別できるという利用事例を示した。

これらの一連の研究を通じて開発したオリゴアレイと SNP アレイの 2 つのゲノム解析ツールにより、網羅的かつハイスループットな遺伝子発現解析と品種ジェノタイピングが可能になり、これらの情報を使いこなすバイオインフォマティクスツールの開発とあわせて、果樹の諸形質に関わる形質制御遺伝子の探索、連鎖地図の効率的な作成や、マーカー支援育種など幅広く利用される研究基盤になると期待される。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士 (農学) の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. [Fujii, Hiroshi](#), Takehiko Shimada, Aiko Sugiyama, Fumie Nishikawa, Tomoko Endo, Michiharu Nakano, Yoshinori Ikoma, Tokuro Shimizu and Mitsuo Omura. (2007). Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Plant Science*. 173 (3), 340-348.
2. [Fujii, Hiroshi](#), Takehiko Shimada, Aiko Sugiyama, Tomoko Endo, Fumie Nishikawa, Michiharu Nakano, Yoshinori Ikoma, Tokuro Shimizu and Mitsuo Omura. (2008). Profiling gibberellin (GA3)-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Scientia Horticulturae*. 116 (3), 291-298.

3. Fujii, Hiroshi, Takehiko Shimada, Keisuke Nonaka, Masayuki Kita, Takeshi Kuniga, Tomoko Endo, Yoshinori Ikoma and Mitsuo Omura. (2013). High-throughput genotyping in citrus accessions using an SNP genotyping array. *Tree Genetics & Genomes*. 9 (1), 145-153.
4. Fujii, Hiroshi, Tatsushi Ogata, Takehiko Shimada, Tomoko Endo, Hiroyuki Iketani, Tokuro Shimizu, Toshiya Yamamoto and Mitsuo Omura. (2013). Minimal marker: an algorithm and computer program for the identification of minimal sets of discriminating DNA markers for efficient variety identification. *Journal of bioinformatics and computational biology*. 11 (2), 1250022 (17pages).

既発表学術論文

1. Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Kyouji Kobayashi, Takashi Araki, Hiroshi Fujii and Mitsuo Omura. (2005). Ectopic expression of an *FT* homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*. 14, 703-712.
2. Hiroko Hayama, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Akiko Ito and Yoshiki Kashimura. (2006). Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. *Journal of Experimental Botany*. 57 (15), 4071-4077.
3. Fumie Nishikawa, Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tokuro Shimizu, Mitsuo Omura and Yoshinori Ikoma. (2007). Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*. 58 (14), 3915-3927.
4. Feng Li, Yoichi Hasegawa, Masako Saito, Sachiko Shirasawa, Aki Fukushima, Toyoaki Ito, Hiroshi Fujii, Sachie Kishitani, Hiroyasu Kitashiba and Takeshi Nishio. (2011). Extensive chromosome homoeology among Brassicaceae species were revealed by comparative genetic mapping with high-density EST-based SNP markers in radish (*Raphanus sativus* L.). *DNA research*. 18 (5), 401-411.
5. Miho Tatsuki, Naoko Nakajima, Hiroshi Fujii, Takehiko Shimada, Michiharu Nakano, Ken-Ichiro Hayashi, Hiroko Hayama, Hirohito Yoshioka and Yuri Nakamura. (2013). Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Experimental Botany*. 64 (4), 1049-1059.
6. Songling Bai, Takanori Saito, Daisuke Sakamoto, Ito Akiko, Hiroshi Fujii, Takaya Moriguchi. (2013). Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant & Cell Physiology*. 54 (7), 1132-1151.