

氏 名 (本 国 籍)	杉 山 愛 子 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 547 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 9 月 10 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	カンキツカロテノイド代謝酵素遺伝子のゲノム構造 解析に関する遺伝育種学的研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 高 木 敏 彦 副査 静岡大学 教授 大 村 三 男 副査 岐阜大学 教授 福 井 博 一 副査 静岡大学 准教授 本 橋 令 子 副査 信州大学 教授 南 峰 夫

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

カンキツのカロテノイドは、果実色に関与し、また機能性成分としての期待されることからその高含有化は重要な育種目標の一つとなっている。ウンシュウミカンでは $\beta$ -クリプトキサンチン(B-Cry)に富み、‘トロビタ’オレンジではゼアキサンチンが主成分であるなど多様であり、育種によって含有量および組成を改変する可能性を伺わせる。しかしながら、カンキツ類の多くの育種形質同様、カロテノイドにおいてもその遺伝様式など育種における適切な情報が得られていない。この研究では B-Cry を主とするカロテノイド高含有品種育成のための DNA マーカーによる選抜情報を得るため、一連の研究を行った。本研究では、カロテノイド高含有化のための育種情報を得るため、QTL 解析によるカロテノイド含有量に係わる座位の検出およびカロテノイド代謝酵素遺伝子の発現に関与する要因の解析からのアプローチを採用した。論文は、3 部によって構成される。第 1 に、カンキツ品種におけるカロテノイド組成の品種間差異の解析、第 2 にカンキツにおけるカロテノイド含有量に関する遺伝子座の QTL による解析とカロテノイド代謝酵素遺伝子の発現の eQTL 解析、第 3 にカロテノイド組成や含有量に対して主な制御遺伝子と推察されたゼアキサンチンエポキシダーゼ遺伝子(ZEP)およびフィトエン合成酵素遺伝子(PSY)遺伝子について、そのアリル構造と発現との関連を解析した。

### 1. カンキツ品種におけるカロテノイド組成の品種間差異

カロテノイド高含有品種育成の可能性を探るため、カロテノイド組成の異なることが知られる‘宮川早生’（ウンシュウミカン）と‘トロビタ’オレンジの雑種品種‘清見’とその後代品種について、カロテノイド含量および組成を解析した。その結果、生食用育成品種では両親のカロテノイド含量を超えるものも出現するなど、カロテノイド含有量および組成について、現在の主要品種を用いた交雑育種による改変が期待できる。また、カロテノイド各成分含量間に一定の相関はないため、カロテノイド代謝の各段階での制御関係の総和が品種の組成、含量に関わるものとして推察された。

### 2. QTL 解析および eQTL 解析によるカンキツカロテノイドの含量制御領域の解析

(1) カンキツのカロテノイド含量の増加には多数の遺伝子が関与する可能性が推察されたため、1つの交雑集団を対象に各カロテノイドの含量および総含量について QTL 解析を行った。その結果、総カロテノイド含量に対する QTL の多くで LOD 値は低く、2箇所だけで LOD>2.0 を示した。一方、各カロテノイド含量には有意な値を示す QTL が検出された。これら個別成分の QTL として検出される領域の多くは総含量における弱い QTL と一致した。カロテノイド高含有品種の選抜に関しては、各カロテノイド QTL 領域のマーカーを組み合わせることで、より有効な選抜マーカーの作成できる可能性が示唆された。

(2) 次に、カロテノイド代謝制御によるカロテノイド含有量および組成への関連を遺伝子の発現から解析するため、QTL 解析と同一集団を用いて代謝酵素各遺伝子について発現レベルを量的形質として eQTL 解析を行った。解析した 8 遺伝子中、フィトエン合成酵素遺伝子(*PSY*)、フィトエン不飽和化酵素遺伝子(*PDS*)、 $\zeta$ -カロテン不飽和化酵素遺伝子(*ZDS*)、 $\beta$ -カロテン水酸化酵素遺伝子(*HYb*)、ゼアキササンチンエポキシダーゼ遺伝子(*ZEP*)の発現に有意な QTL が検出された。このうち *PSY*、*HYb* および *ZEP* の eQTL 領域には、それぞれの代謝酵素遺伝子が座乗したため、これらの遺伝子発現の差異には *cis* 因子が関与する可能性が示唆された。また、*PDS* と *ZDS* に共通した eQTL 部位には、転写因子様遺伝子が検出された。

### 3. カロテノイド代謝酵素遺伝子のアリル構造と発現レベルの解析

(1) QTL 解析から B-Cry の蓄積に関わりが推察された *ZEP* について、ゲノム構造を解析し、特に 5'UTR 構造のアリル間差異と発現との関連を解析した。BAC クローンを単離して配列解析した結果、カンキツゲノムには少なくとも 2 コピーが存在するが、そのうち *ZEP-1/-2* 座のアリルが主に果実成熟時期の代謝に関与することが明らかとなった。この *ZEP-1/-2* 座に関してヘテロ接合型品種では、果実での *ZEP* 遺伝子の発現にアリル間差が検出された。このアリルの配列は、カンキツ品種により多様に分化していたが、強い発現を示す *ZEP-1* 型アリルは *ZEP-2* 型アリルにはない MYB 結合サイトに関連モチーフを共通して持っていた。交雑集団において *ZEP-1* 型アリルをもつ個体ではデオキササンチン含量が高い相関があるため、*ZEP-1/2* のアリル型の判定がカロテノイド組成の選抜に利用できる可能性が期待された。

(2) *PSY*はカロテノイド代謝に重要な遺伝子であり、その制御に *cis* 因子が推察されたため、そのゲノム構造を解析した結果、*PSY*はカンキツゲノムでは1コピーであった。*PSY*のアリルにおける塩基配列多様性と発現との関連について、‘興津46号’と‘農5号’を両親とする交雑集団で解析した結果、‘農5号’に由来するアリル *PSY-g2*をもつ個体で *PSY*の発現が低いことが明らかになった。*PSY* 遺伝子 5'UTR 配列を比較すると、*PSY-g2*の5'UTR配列にはMYB結合サイト関連モチーフが欠落していた。これらの結果から、*PSY* 遺伝子の発現レベルには *cis* 要因が関わり、アリル間の発現差を通じて果実のカロテノイド含量および組成に影響を与えると考えられた。

以上の研究を通じて、カンキツ類ではカロテノイドの高含有化品種育成のための選抜マーカー作成には、この代謝の制御に関与する遺伝子のアレル分化を解明しつつ、その機能に関連する配列をマーカー化し、それらを積み上げることが適切であることを示した。

## 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、教員や学生の出席者のもと、平成22年8月23日（月）午後2時より静岡大学農学部A棟110号室（SINET使用）において実施された。

本論文の研究内容は、カンキツの重要な育種目標の一つであるカロテノイド含有量について、高含有品種育成のためのDNAマーカー選抜情報を得ることを最終的な目的とし、一連の基礎的な研究を行ったものである。そのために、カンキツ品種におけるカロテノイド組成の品種間差異を把握するとともに、カロテノイド含有量に関する要因について、QTL解析およびカロテノイド代謝酵素遺伝子の発現の多様性解析からの解明を行い、それらを通じてカロテノイド高含有育種における選抜マーカーの作成のための考察を試みたものである。

本研究は、3部により構成される。まず、カロテノイド高含有品種育成の可能性を探るため、カロテノイド組成の異なることが知られる‘宮川早生’（ウンシュウミカン）と‘トロビタ’ オレンジの雑種品種‘清見’およびその後代品種について、カロテノイド含量および組成を解析した。その結果、両親のカロテノイド含量を超える品種が存在し、品種間の各カロテノイド成分含量比間に一定の相関がなかったことから、カロテノイド代謝の各段階での制御関係の総体が品種の組成、含量に関わるものと推察した。

次に、カロテノイド蓄積に係わる要因について、QTL解析を用いて明らかにしようとした。各カロテノイド成分の含量および総含量について1つの交雑集団を対象に行ったQTL解析では、総カロテノイド含量に対するQTLの多くは弱いものであったが、ほとんどの座位で各カロテノイド成分含量における明瞭なQTLと一致した。

最後に、カロテノイド代謝酵素の発現制御に関わる要因を解析する研究では、代謝酵素各遺伝子のqRT-PCRによる発現レベルを量的形質としてeQTL解析を適用した。解析した8遺伝子中、フィトエン合成酵素遺伝子(*PSY*)、フィトエン不飽和化酵素遺

伝子(*PDS*),  $\zeta$ -カロテン不飽和化酵素遺伝子(*ZDS*),  $\beta$ -カロテン水酸化酵素遺伝子(*HYb*), ゼアキサンチンエポキシダーゼ遺伝子(*ZEP*)の発現に有意な QTL が検出された。このうち *ZEP*, *PSY* および *HYb* の eQTL 領域には, 各遺伝子が座乗したため, これらの遺伝子発現の差異には *cis* 因子が関与する可能性が示唆された。そこで, これらの遺伝子について, 5'UTR 構造のアリル間差異と果実における発現との関連を解析した。*ZEP* 遺伝子では, 果実成熟時期の代謝に関与が認められた *ZEP-1/-2* 座でヘテロ接合型を示す品種では, アリル間に発現差が検出された。強い発現を示す *ZEP-1* 型アリルは *ZEP-2* 型アリルにはない MYB 結合サイトに関連モチーフを品種間で共通して持っていた。また, *ZEP-1* 型アリルをもつ品種ではデオラキサンチン含量が高いことから, *ZEP-1/2* のアリル型の判定がカロテノイド組成の選抜に利用できる可能性が期待された。*PSY* についても, '農 5 号' に由来するアリル *PSY-g2* をもつ個体で発現が低いことが明らかした。*PSY* 遺伝子のアリル間で 5'UTR 配列を比較すると, *PSY-g2* には MYB 結合サイト関連モチーフが欠落していた。これらの結果から, *PSY* 遺伝子の発現レベルには *cis* 要因が関わり, アリル間の発現差を通じて果実のカロテノイド含量および組成に影響を与えたと考えられた。

以上の研究を通じて, カンキツではカロテノイドの高含有化品種育成のための選抜マーカー作成には多数の要因の組み合わせを考慮する必要があるが, 代謝に関与する遺伝子の機能差に基づいたマーカーがその積み上げに有効なことを例示した。

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. Sugiyama, A., Y. Ikoma, H. Fujii, T. Shimada, T. Endo, T. Shimizu and M. Omura. 2010. Structure and expression levels of alleles of *Citrus zeaxanthin epoxidase* genes. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 263-274.
2. Sugiyama, A., M. Omura, H. Matsumoto, T. Shimada, H. Fujii, T. Endo, T. Shimizu, H. Nesumi and Y. IKoma. (2010). Quantitative trait loci (QTL) analysis of carotenoid content in *Citrus* fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. (in press)