

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05965

研究課題名（和文）抗生物質による無核化現象に関わる分子実体の解明

研究課題名（英文）Elucidation of factors involved in antibiotic-induced seedlessness

研究代表者

西村 明日香（Nishimura, Asuka）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：70767342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大粒ブドウ品種の種なし処理には抗生物質ストレプトマイシンが使用されている。しかしながら、その種なし現象が引き起こされるメカニズムについては全く解明されていない。本研究ではストレプトマイシンによる種なし現象の分子機構の解明を目指し、関連する分子の同定を試みた。具体的にはストレプトマイシン処理により存在量変動する分子の探索を行い、種なし現象への関連が示唆される候補分子を複数単離した。また本種なし現象がブドウのみならずシロイヌナズナやイネでも引き起こされることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年人気の大粒ブドウ品種の生産においては抗生物質ストレプトマイシン処理による種なし化が一般的となっている。しかしながら、なぜ種子が形成されなくなるメカニズムに関しては解明されていない。一方で、このような農業現場での抗生物質の利用は、薬剤耐性菌の出現とそれによる感染症の拡大要因の一つとして懸念されていることから、抗生物質に替わる新たな種なし手法の開発が望まれている。本研究はブドウ蕾への抗生物質処理により存在量変動するタンパク質の同定に世界で初めて成功した。今後、同定されたタンパク質の機能解析を糸口として研究を発展させることにより、将来、抗生物質不要の種なし手法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The antibiotic streptomycin has been used for seedless treatment of large grape varieties, but the mechanism by which the seedless phenomenon is caused has not been elucidated at all. In this study, we tried to identify the factors involved in the phenomenon and succeeded in identifying the factors whose abundance fluctuates depending on the treatment. We also found that this seedless phenomenon is caused not only in grapes but also in Arabidopsis and rice.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：抗生物質 無核化 プロテオーム解析 植物 ブドウ 種なし

1. 研究開始当初の背景

近年、消費者の種なし志向の高まりによりブドウの無核化(種なし化)が重要な栽培技術となっている。特に人気品種のシャインマスカットは従来法のジベレリン処理では完全無核化が困難なことから、抗生物質であるストレプトマイシン処理による無核化法が広く利用されている。しかしながら、なぜストレプトマイシン処理により無核化が生じるのか、という分子生理機構については全く解明されていない。一方で、このような無核化処理に伴う農業現場での抗生物質の利用は、薬剤耐性菌の出現とそれによる感染症の拡大要因の一つとして将来的な使用規制が検討され始めている。

2. 研究の目的

本研究は上記のような動向を踏まえ、詳細機構が未解明のままである抗生物質による無核化現象の分子機構解明を通じ、抗生物質を用いない新たな種なしブドウ生産法開発のための糸口探索を目的に研究を行った。具体的には抗生物質の作用点であるタンパク質合成に着目したプロテオーム解析を起点に研究を進め、無核化に関わる分子実体の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 解析材料の作製

東京大学生態調和農学機構(西東京市)に植栽されているシャインマスカット樹2本の開花始め期の花房にアグレプト(Ag、20%ストレプトマイシン含有液剤、Meiji Seika ファルマ)1000倍希釈液を処理し、6、24時間後に処理花房より採取した花蕾を解析材料とした。また未処理および満開時にジベレリン(GA、25 ppm、協和発酵バイオ)を処理した花房の花蕾をコントロールおよび比較材料とした。なお、各処理花房の花蕾の一部は種子が形成される果粒肥大期まで生育させ、処理による無核化の確認を行った。

(2) プロテオーム解析

(1)で得られた各花蕾100mgより全タンパク質を抽出し、プロテオーム解析サンプルとした。

非標識プロテオーム解析

未処理(0時間)及び各処理後6、24時間後の花蕾中のタンパク質をnanoLC-MS/MSを用いて網羅的に解析した。Mascot(Matrix Science, UK)検索によりMSデータから予想されたタンパク質の検出量をサンプル間で比較した。

標識定量プロテオーム解析(iTRAQ)解析

未処理(0時間)及び各処理後6時間のサンプルを用いiTRAQ法による比較定量プロテオーム解析を行った。各サンプル中に含有するペプチドのアミノ酸配列から推定されるタンパク質を同定し、同定タンパク質のペプチド検出量をサンプル間で比較した。

(3) メタボローム解析

(1)で得られた未処理およびアグレプト処理後6時間の花蕾100mg(n=3)に含まれる親水性代謝物をLC-MS分析し、各サンプルに含有する代謝物の変動について解析した。

(4) 他の植物種におけるストレプトマイシン処理による種子形成への影響解析

モデル植物であるシロイヌナズナとイネの開花前の蕾に(1)のブドウへの処理と同様の濃度のストレプトマイシン溶液を処理し種子形成の有無や異常について解析した。

4. 研究成果

(1) 無核化調査(解析材料の無核化の確認)

有核(種あり)粒と無核(種なし)粒が明確になる果粒肥大期(処理から約2ヵ月後)に処理房に残した全果粒について種子の有無を調査した(1mm以上の種子が確認できた果粒を有核とした)。未処理房では全果粒が有核であったのに対し、アグレプト(ストレプトマイシン)処理房のうち最も高いものでは84.8%、ジベレリン処理房では92.3%の果粒が無核粒となっており、各処理により確かに無核化現象が生じることを確認した(図1)。

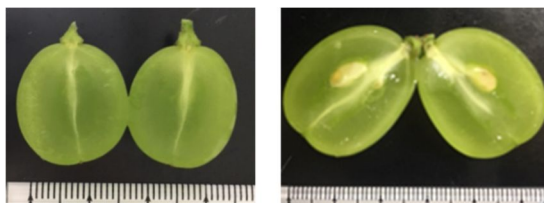


図1. アグレプト処理による無核粒(左)と未処理房の有核粒

(2) プロテオーム解析

非標識プロテオーム解析

未処理 (Cont.) に対してアグレプト (Ag) 処理によりペプチド検出数が 3 倍以上 (UP) または 3 倍以下 (Down) となったタンパク質数は表 1 の通りであった。アグレプトの成分ストレプトマイシンはプラスチドゲノムコードタンパク質の翻訳が有意に阻害されると考えられているが、本解析で変動が確認されたタンパク質はすべて核コードタンパク質であった。特に検出量が低下したタンパク質としてフラボノイド合成に関わるタンパク質が確認された。

表 1. Ag 処理により変動したタンパク質数 (非標識解析)

	Ag-Cont	Ag-6h	Ag-24h
全検出タンパク質数	434	339	307
DOWN	-	32	24
UP	-	8	4

Ag-Cont: アグレプト処理時の未処理サンプル、Ag-6h: アグレプト処理6時間後サンプル、Ag-24h: アグレプト処理24時間後サンプル

標識定量プロテオーム解析 (iTRAQ) 解析

検出された各タンパク質のサンプル間量比 (Ag 処理有 / 無) が 2 以上または 0.5 以下でありかつ、ジベレリン処理による変動がない Ag 処理特異的変動タンパク質を探索した。Ag 処理有 / 無量比が 2 以上は 11 個、0.5 以下では 35 個のタンパク質が同定された。そのうち、プラスチドコードタンパク質は 2 以上、0.5 以下とも各 1 個ずつ確認された。また本解析により変動が確認されたタンパク質には、上記の非標識プロテオーム解析で変動したタンパク質は含まれていなかった。変動タンパク質にはシロイヌナズナで胚珠や花粉の発達に関与するタンパク質や配偶子形成に関与するタンパク質のホモログタンパク質が含まれていた。また Ag 処理によりタンパク質量が低下したプラスチドコードタンパク質は光合成機能に関連するタンパク質であったが機能は未解明であり無核化との関連についても今のところ情報は得られていない。

(3) メタボローム解析

上記(2)-で行った非標識プロテオーム解析によりフラボノイド合成系に関与するタンパク質の変動が確認されたため、Ag 処理による代謝物の変動を確認するためメタボローム解析を行った。解析により 5788 個の有効なイオンピークが検出され、化合物データベース検索によりアノテーション解析を行った結果、100 以上のフラボノイド候補化合物の存在が示唆された。それらのうち差のあるピークについて精査を行ったところ、Ag 処理区で蓄積量が増加しているフラボノイド化合物候補を 1 つ、フェノール性化合物候補 2 つが確認された。処理区で蓄積量が減少したタンパク質は見い出されなかった。Ag 処理によるフラボノイド合成系への影響についてはさらなる検証が必要だと考えている。

(4) 他の植物種におけるストレプトマイシン処理

Ag (Stm) 処理による無核化現象が植物種に限らず引き起こされる現象か否かを調べるため、モデル植物であるシロイヌナズナとイネの開花前の蕾に対し Stm 溶液を処理しその後の経過を観察した。その結果、シロイヌナズナ、イネともに特定の生殖生長段階の花器において種子形成の異常や不稔現象が確認された (図 2)。したがって本現象は、高等植物に共通の種子形成機構への作用により生じる現象であることが示唆された。今後はブドウを用いた解析に加え、これらモデル植物の活用により研究を加速していきたい。



図 2 シロイヌナズナ、イネにおける Stm 処理

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村明日香、本多親子、堤伸浩
2. 発表標題 抗生物質による無核化現象に関わる因子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村明日香、本多親子、堤伸浩
2. 発表標題 抗生物質によるブドウの無核化現象に関わる因子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本多 親子 (Honda Chikako) (40343975)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授 (12601)	
研究分担者	堤 伸浩 (Tsutsumi Nobuhiro) (00202185)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------