

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660020

研究課題名(和文) 倍数性の異なるニホンナシ‘豊水’のマイクロアレイ解析によるみつ症原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploring candidate gene related to exhibit water core fruit in Japanese pear 'Housui' using microarray analysis between diploid and tetraploid

研究代表者

井上 栄一 (Inoue, Eiichi)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90292482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンナシのみつ症は果肉が水浸状を呈する深刻な生理障害であり、その原因解明が急務となっている。そこで本研究では、‘みつ症が激しく発症する豊水’の四倍体を用いて、みつ症発症の原因となる遺伝子の探索を行った。マイクロアレイ解析の結果、四倍体では二倍体と比較し、みつ症発症前に細胞壁構成成分の代謝に関わる遺伝子や果実の成熟や老化に関わる遺伝子の強い発現を確認した。さらに詳細な発現解析を行ったところ、糖代謝に関わる2種類の遺伝子の発現量が、みつ症の発症前に四倍体果実において上昇することを確認した。これらの結果より、細胞壁や細胞質に存在する糖代謝に関連する遺伝子がみつ症の発症に強く関連すると考察した。

研究成果の概要(英文)： Water core of fruit is one of physiological disorder in Japanese pear. The disorder is very serious because a Japanese leading variety Housui is susceptible to it. Although the water core is thought a heritable character, their genetic mechanism is unknown. Recently, more sensitivity for water core had identified in Housui tetraploid than their diploid. In this research, we explored the candidate genes related to exhibit water core fruit in Japanese pear 'Housui' using microarray analysis between diploid and tetraploid.

As a result of microarray analysis, some gene involving in fruit ripening, senescence and cell wall metabolism were strongly expressed in tetraploid fruit just before the exhibiting water core symptom. After analyzing more detailed DNA expression, we confirmed that two types of gene were highly expressed in tetraploid fruit before the symptom. We concluded that the candidate gene for sugar metabolism relate to the water core in Japanese pear.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ニホンナシ みつ症 生理障害 豊水 原因遺伝子 四倍体

1. 研究開始当初の背景

- (1) ニホンナシ果実のみつ症は果肉部が成熟にともない水浸状を呈する生理障害であり、発症した果実は果肉の褐変や、日持ち性の低下などにより、商品価値が著しく低下するため問題となっている (Kajiura ら、1976)。ニホンナシ品種‘豊水’は大果で豊産性なうえに、食味も優れる主要品種であるが、適熟期にみつ症が発生しやすいため、生産者の大きな悩みとなっている。みつ症の発生には、年次、樹体の生理状態および栽培法によって差がみられることから、遺伝的要因ばかりではなく栽培環境要因の影響も大きいと考えられており (佐久間、2005)、このことが、みつ症の発生に関わる原因遺伝子の解明を困難にしている。みつ症に関する遺伝学的検討としては、申請者らが、cDNA サブトラクション法を用いて‘豊水’果実のみつ症組織と正常組織で発現量が異なる複数の遺伝子を発見した。さらに、みつ症発生程度の異なる‘豊水’の後代系統を作出し、それを用いてそれらの絞り込みを行い、みつ症発生ステージにおけるメタロチオネイン遺伝子の発現変動の関与を明らかにしている。しかしながら、みつ症の発現の引き金となる原因遺伝子については明らかになっていない。一方、最新の成果として独自に作出した‘豊水’の4倍体において、‘豊水’よりも果実発達の早期にみつ症が激発することを明らかにしている。‘豊水’においては、農研機構果樹研究所において発現遺伝子情報が整備されていることから (Nishitani et al., 2010)、果実で発現する遺伝子の大半を網羅するマイクロアレイを遺伝子発現解析に利用することが可能となっている。したがって、みつ症に関するこれまでの遺伝学的研究成果を基礎とし、準備の整っている‘豊水’4倍体と‘豊水’のマイクロアレイを、みつ症が発生する前後の果実における発現遺伝子の網羅的解析に高度利用することで、みつ症の原因遺伝子を効率的に探索できる。

2. 研究の目的

- (1) ニホンナシ‘豊水’の果実に現れるみつ症は、対策の難しい生理障害として生産者を悩ませている。みつ症への感受性は遺伝的に制御されていると推定されているが、その原因遺伝子はまだ明らか

にされていない。本研究では、‘豊水’の発現遺伝子の大半を搭載したマイクロアレイを用いて、倍数性の異なる‘豊水’の間でみつ症の発症に伴って発現する遺伝子を網羅的に比較し、みつ症の原因遺伝子の候補を発見する。さらに、定量的PCR法を用いて、みつ症が発現する前後の果実における候補遺伝子の発現を詳細に比較検討することで、みつ症の原因遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ‘豊水’および‘豊水’4倍体の果実形質の経時的評価
倍数性の異なる個体間で、各種果実形質を経時的に評価し、果実の生育パターンを明らかにする。
- (2) ‘豊水’および‘豊水’4倍体の果実品質およびみつ症程度の経時的評価
倍数性の異なる個体間で、糖組成の変化など各種果実品質の推移を経時的に評価する。同時に果実におけるみつ症程度を評価し、両者の関連を考察する。
- (3) ‘豊水’および‘豊水’4倍体の果実におけるマイクロアレイ解析とみつ症原因候補遺伝子のスクリーニング
みつ症程度の異なる‘豊水’および‘豊水’4倍体の果実サンプルから抽出した全RNAを用いてcDNAを合成し、‘豊水’のオリゴアレイを用いてマイクロアレイ解析を行う。
- (4) リアルタイムPCRによるみつ症原因候補遺伝子の絞り込み
選抜した候補遺伝子について個々にプライマーを合成し、経時的に採取した果実のRNAサンプルを用いて、リアルタイムPCRによる詳細な発現解析を行う。各遺伝子の詳細な発現情報に基づいて、みつ症発症との関係を再検討し、候補遺伝子を絞り込む。

4. 研究成果

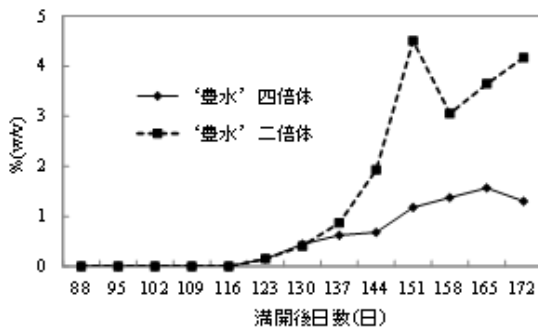
- (1) 倍数性評価の結果、果実、葉の全ての部位で四倍体が二倍体のおよそ2倍のゲノムサイズを有していた。このことから倍加個体にキメラ性はみられず、完全な四倍体であることが確認された(第1表)。さらに四倍体においては、自家不和合性の崩壊および果実の大型化や早熟化が確認された。花器の形態的特徴については、雌蕊、雄蕊の数に差はなかったものの、花卉長、花径といった花冠の大きさに関する形質については四倍体が有意に高い値を示した。果実形質において、

縦横径と果実重については両年とも調査前半に四倍体が有意に高い値を示したが、その後差はみられなくなった。また、果柄の長さや直径については調査期間を通して四倍体が高い値を示した。地色については明白な違いが確認されなかった。

第1表 倍数性の異なる‘豊水’の各部位におけるゲノムサイズ

	四倍体 (Mbp)	二倍体 (Mbp)
果皮	1162.59±17.45	585.84±4.66
果肉	1240.56±33.87	627.6±36.99
果芯	1074.72±39.39	532.89±26.59
葉肉	1214.31±67.05	647.16±8.16
葉脈	1062.13±21.28	527.49±24.40

- (2) 果実品質において、果肉硬度は概して双方とも成熟に伴い低下する傾向にあるが、特に四倍体は調査開始から終了まで常に二倍体より低い値であり、硬度の変化からは、四倍体では果実の成熟が早まることが示唆された。さらに、成熟後期における果汁のスクロース含有量が四倍体において有意に低いことも、みつ症の発症に何らかの関連があると推察された。(第1図)



第1図 ‘豊水’四倍体および二倍体におけるスクロース含有量の推移.

みつ症の発症では、‘豊水’四倍体は満開後116日目に発症が確認され、その後も高いみつ指数を示し、重症化した。一方、二倍体では151日目に遅れて軽微に発症したものの、その後も高い値を示すことはなかった(2013年)。同様に、2014年においても‘豊水’四倍体は満開後100日目にみつ症の発症が確認され、その後も高い値を示した。一方、二倍体では121日目に遅れて発症したものの、その後も高い値を示すことはなかった。以上、複数年の結果より、‘豊水’四倍体は極強度のみつ症感受性であることが明らかとなった(第2図)。このように、‘豊水’四倍体と原品種である‘豊水’二倍体は、基本とするゲノムが同一

であるにもかかわらず、みつ症発症に明白な差が生じたことから、みつ症に関わる遺伝子の解析材料として利用価値が高いことが再確認された。

- (3) みつ症に関わる遺伝子をスクリーニングするためにマイクロアレイ解析を行った。その結果、‘豊水’四倍体では二倍体と比較し、みつ症発症前にガラクトシダーゼのような細胞壁構成成分の代謝に関わる遺伝子やエチレン合成、

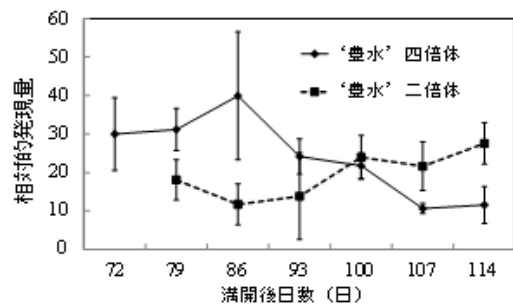


第2図 満開後149日目のニホンナシ‘豊水’四倍体(左図)および二倍体(右図)の果実断面の様子(2014年)

老化に関わる遺伝子が2倍以上強く発現していることが確認された。このことは、これらの遺伝子がみつ症の発症に関連があることを示唆している。

- (4) 果実の成熟、スクロース等の糖代謝に関する遺伝子に着目し、複数年の果実と葉を用いて、リアルタイムPCR法によって詳細な発現解析を行った。その結果、糖代謝に関わる細胞壁局在型酸性インベルターゼとスクロースシンターゼは、複数年において四倍体果実でみつ症の発症前に発現が上昇した(第3図)。

(2)でも詳報したように、みつ症が激



第3図 ‘豊水’四倍体および二倍体における細胞壁局在型酸性インベルターゼの相対的発現量の推移。バーは標準誤差を示す。

しく発症した四倍体果実のスクロース含有量は、発症前から一貫して有意に低かった。これらの結果より、細胞壁や細胞内に存在しスクロース合成等の糖代謝に関連する遺伝子がみつ症の発症に強く関連すると考察した。

さらに、前報において関与が示唆されているメタロチオネイン遺伝子について

ても、今回その発現パターンから、みつ症発症への関与を再確認した。

今後は、原因遺伝子の特定を目指して、みつ症感受性に関する分離集団を用いることで、みつ症感受性を制御する遺伝子を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- ① 井上栄一・八塚拓・野口尚美・尾形夏海・西谷千佳子、他5名、『ニホンナシ果実の‘みつ症’発生機構に関する研究(第6報)‘豊水’四倍体の果実における高いみつ症感受性』、園芸学会平成28年度春季大会、2016年3月26日、東京農業大学
- ② 八塚拓・野口尚美・尾形夏海・西谷千佳子・井上栄一、他5名、『ニホンナシ果実の‘みつ症’発生機構に関する研究(第7報)倍数性の異なるニホンナシ‘豊水’の果実におけるみつ症の発症と成熟および糖代謝に関わる遺伝子の関係』、園芸学会平成28年度春季大会、2016年3月26日、東京農業大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 栄一 (INOUE EIICHI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90292482

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

尾形夏海 (NATSUMI OGATA)

茨城県農業総合センター・生物工学研究所

西谷千佳子 (CHIKAKO NISHITANI)

農研機構・果樹研究所