

令和元年6月12日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14855

研究課題名（和文）種子と果肉の情報伝達機構の解明と高品質果実生産技術の開発

研究課題名（英文）The mechanism of cross talk between seed and flesh and its application for high quality fruit production

研究代表者

板井 章浩（ITAI, AKIHIRO）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10252876

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：花粉品種の影響が、種子の形質の影響を及ぼすことはキセニアとして知られているが、メタキセニアは種子以外の果実形質に影響を及ぼすみられる現象である。本研究では、ニホンナシ‘おさゴールド’を材料として、自家受粉および他家受粉シグナルが、どのような影響をもたらすか、その原因究明を分子レベルで行うことを大きな目的とした。自家受粉および他家受粉のシグナルは、遺伝子発現解析および植物ホルモン分析より、多面的な差をもたらすことが明らかとなった。自家受粉および他家受粉のシグナルは種子と果肉という異なる組織間でも、遺伝子発現などで協調性がみられ、種子と果肉の情報伝達機構の存在が示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種子と果肉の情報伝達機構は未解明であった。今回花粉親が果肉に及ぼす影響をトランスクリプトームやメタボロームなどのオーム解析により、網羅的に現象と遺伝子発現機構を明らかにすることができ、学術的な新たな知見を得ることが出来た。またこの機構を元に花粉親を選ぶという単純な方法により、母親品種の果肉形質を最大限発揮できる栽培技術方法の開発が可能になるため、今後の果樹栽培の発展に寄与できるものと思われ、さらなる研究を進めることにより、産業的な発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of cross talk between seed and flesh, the effect of self and cross pollination on fruit characteristics was investigated in Japanese pear ‘Osa Gold’, a self-compatible mutant of ‘Gold Nijisseiki’. We found that there were large differences in fruit diameter, length, weight and seed number between self and cross pollination. We also found that there were differences in 16 out of about 200 primary metabolites between self and cross pollination at harvest. RNA-seq analysis revealed that changes in the expression of many genes associated with plant hormone and transcription regulating factor during fruit growth were observed between two combinations. Similar pattern of gene expression between self and cross pollination in both seed and flesh indicated cross talk between seed and flesh. This cross talk may be used for developing new techniques in pear cultivation.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：花粉親 トランスクリプトーム メタボローム ホルモノーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花粉品種の影響が、種子の形質の影響を及ぼすことはキセニアとして知られているが、メタキセニアは種子以外の果実形質に影響を及ぼすみられる現象である。この現象の存在は、クリ、ナツメヤシ、ブルーベリーで報告がされている。クリにおいては、剥皮性の良いチュウゴクグリにニホングリの花粉を交配した場合に剥皮性が悪くなることや、ナツメヤシでは果実サイズや熟期に影響が認められることが報告がされている。胚珠は精核と卵核により構成されているため、種子には花粉親の影響がでるのは、ある意味予想される現象であると考えられる。しかし、種子親由来組織である果肉や果皮は花粉の影響は受けないとされている。しかしながら、現実にはこのようにメタキセニア現象の存在は、報告がされている。この要因として、種子と果肉の情報伝達機構の存在が考えられるが、その機構は全くもって不明である。

2. 研究の目的

種子と果肉の情報伝達機構は未解明である。これまで花粉親が果実形質に及ぼすメタキセニア現象については、現象論についてのみの言及しかされていない。課題責任者のグループでは、ニホンナシ‘豊水’に様々な品種を花粉親に用いた実験を行い、結果、果実形態およびサイズに差を生じ、ナシにおいてメタキセニアが存在するのを見いだした。これからの結果を元に、種子と果肉の情報伝達機構について、本研究では、ニホンナシ‘おさゴールド’を材料として、を大きな目的とした。まず 1.メタボローム解析を行い、形態のみならずどのような成分が花粉親の影響を受けるのかを明らかにする。2.トランスクリプトーム解析を行い、花粉親の違いが種子および果肉の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを解析する。3. 種子(胚と胚乳)と果肉の情報伝達物質としての可能性のある植物ホルモンの定量分析を行う。以上のことから、種子と果肉の情報伝達の分子機構解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

植物材料は、ニホンナシ‘おさゴールド’を実験に供試した。

(2) 実験方法

1.異なる花粉親が‘おさゴールド’の果実形質に及ぼす影響

異なる花粉親による‘おさゴールド’の果径調査、品質調査

‘おさゴールド’(Self区)と3品種(Cross区)の開花直前の花を採集後、薬を取り、室温で一晩静置し、花粉を摘出、ろ紙に包み、湿気を防ぐためにシリカゲルとともに4で保存した。開花直前の‘おさゴールド’を除雄し、‘おさゴールド’、他3品種の花粉をそれぞれ100果そうずつ人工授粉させ、他品種の受粉を避けるために、袋をかぶせた。

開花後経時的に果実のサンプリングを行い、果実重、縦径、横径の調査を行い、L/D比を求めた。サンプルは実体顕微鏡下で、種子と果肉組織に分けて、それぞれを分析まで-80度に保存した。適熟期に‘おさゴールド’を収穫し、果実重、縦径、横径、L/D比、色度、糖度、pH、硬度、種子数の調査を行った。

花粉発芽率の測定

花粉親に使用した‘おさゴールド’他3品種の花粉を採取し、ショ糖10%濃度、1%寒天培地に花粉を散布し、室温で14時間静置後に、実体顕微鏡で視野内にある100花粉の発芽花粉をカウントし、シャーレ内の場所を変え3回測定を行った。

収穫期‘おさゴールド’果実細胞面積の測定

各品種を受粉させた収穫期‘おさゴールド’果実の断面を0.1%トルイジンブルーにより染色し、マイクロスコープで1切片につき2ヶ所視野内に存在する全ての細胞の面積及び周囲長を測定した。

メタボローム解析を用いた1次代謝産物含量の測定

収穫期果肉を用いて、メタボローム解析を行い、花粉親品種の違いによる1次代謝産物含量の差を調べた。

果実落果率の測定

開花1ヶ月後までに樹上の全サンプルの落果数を調査し、各品種を受粉させた‘おさゴールド’の落果率を求めた。

2.異なる花粉親が‘おさゴールド’の網羅的遺伝子発現および植物ホルモン含量に及ぼす影響

‘おさゴールド’の受粉後1、2週目自家受粉区、他家受粉区の種子および果肉を供試した。各処理区につき3反復ずつ解析した。

RNA-seq解析

サンプルを液体窒素で十分に粉砕した。液体窒素で冷却した15ml遠心チューブに粉砕サンプルをいれ、80℃に加熱したXT Buffer{0.2M 四ホウ酸ナトリウム十水和物、30mM EGTA、1% SDS、1% デオキシリコール酸ナトリウム、10mM DTT、2%ポリビニルピロリドン(PVP)、1% NP-40}を0.7mlいれ、よく攪拌後に21μlのProteinase Kを加えた。42℃、90分振とう後、2M KClを終濃度160mMになるよう加え、軽く攪拌後水中で60分間静置した。

その後、4℃、15,000 rpmで20分間遠心分離し、上澄みをミラクロスで濾過し10 M LiClを1/4量加えて4℃で一晩静置した。一晩静置した後、4℃、15,000 rpmで20分間遠心分離し、上澄みを捨て2 M LiClを1 ml加えた。15,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し、上澄みを捨て2 M LiClを1 ml加えた。この操作を上澄みが着色しなくなるまで行い、200 µlのDEPC処理水を加えた。15,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し上澄みを新しい2 mlのエッペンチューブに移し、1/10量の2 M 酢酸カリウムを加え氷中で15分静置した。15,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し上澄みを新しい2 mlのエッペンチューブに移し、100%エタノールを1 ml加え、-20℃で1晩または-80℃で1.5時間静置した。15,000 rpm、4℃で30分間遠心分離し、上澄みを捨て1 mlの70%エタノールを加え、15000 rpm、4℃で10分間遠心分離した。減圧乾燥させたあと50 µlのUDWに溶解し全RNAの濃度を測定した。抽出したRNAは、polyA⁺mRNAを回収するため、*Oligotex[™]-dT30 <Super>* mRNA Purification kit (Takara) を用いて精製した。精製したRNAはBioanalyzerを用いて、純度を検定した。検定後のサンプルからライブラリを作成し、Ion PGM[™] Sequencer またはイルミナ Mi-seq またはHi-seq シークエンサーによるRNA-seq解析をおこなった。

ホルモノーム解析

受粉後1、2週目自家受粉区、他家受粉区、の種子および果肉を用い、80%メタノール抽出後、カラム精製を行い、LC-ESI-MS/MSによる植物ホルモノン一斉分析を行った。

4. 研究成果

1. 異なる花粉親が‘おさゴールド’の果実形質に及ぼす影響

異なる花粉親による果実調査

収穫期果実の調査の結果、果実重において、‘おさゴールド’に‘おさゴールド’を受粉させた処理(Self)区では、他家受粉させた処理区に比べ約30(g)の果実重の減少効果がみられた。また、‘おさゴールド’Self区において果実サイズが小さくなる傾向は、中間調査の段階で確認された。

種子数もSelf区とCross区で差が見られた。また、L/D比(縦径/横径)にも若干の差がみられた。一方、糖度、pH、硬度、果皮色において差がみられなかった。以上より、異なる花粉親品種を‘おさゴールド’に人工受粉させることにより、果実重、果実形質などに差がみられ、花粉親の違いによる形態的差異が確認された。

花粉発芽率の測定

花粉発芽率は、品種間差異は認められなかった

細胞面積の測定

細胞面積は花粉親の違いにより、差が認められ、果肉細胞面積の大きさの違いにより果実サイズが影響を受けたと考えられた。

メタボローム解析を用いた1次代謝産物含量の測定

1次代謝産物の測定では、花粉親の異なる‘おさゴールド’において解析された189個の物質のうち、花粉親の違いによって16個の1次代謝産物含量に差がみられた。これらの物質の多くはグルタミン、リシン、アルギニンなどアミノ酸であり、以前の‘豊水’における花粉親を変えた実験において、含量に差がみられた物質がほとんどであった。花粉親‘おさゴールド’では他の花粉親に比べ、含量が最も高いものや低いものが多く存在しており、これは異なる受粉シグナルによる影響が物質の含量にも認められた。

果実落果率の測定

果実落果率は、Self区で最も高い値を示し、種子親‘おさゴールド’において自家受粉を行うと果実落果率が高くなることが考えられた。

2. 異なる花粉親が‘おさゴールド’の網羅的遺伝子発現および植物ホルモン含量に及ぼす影響

RNA-seq 解析

受粉後1、2週目の果肉のRNA-seq解析の結果、発現量に差が認められた遺伝子のうち1、2週目で共通して他家受粉(Cross)区で多い発現量を示した遺伝子は644個、自家受粉(Self)区で多い発現量を示した遺伝子は575個存在した。他家受粉区で多い発現量を示した遺伝子にはジベレリン応答や、ジャスモン酸生合成酵素、オーキシン不活性化酵素やcytochrome P450などがみられた。一方、自家受粉区で多い発現量を示した遺伝子にはオーキシンの早期応答因子やカルシウムの結合タンパク質、転写因子のZinc finger(C3HC4-type RING finger) family proteinなどがあつた。種子のRNA-seq解析の結果、自家受粉区で発現量が多いものは1174個、他家受粉区で発現量が多いものは1857個存在した。他家受粉区で発現量が多い遺伝子のジャスモン酸生合成酵素、オーキシン不活性化酵素は果肉の他家受粉区と共通して見られ、自家および他家受粉シグナルとしてオーキシン、ジャスモン酸、ジベレリンなどの植物ホルモンとの関連が示唆された。

ホルモノーム解析

植物ホルモンでは、JA類、ABA、IAA、GAなどの含量が自家受粉シグナルと他家受粉シグナルの差を受けていた。

以上の結果、自家受粉および他家受粉のシグナルは、遺伝子発現解析および植物ホルモン分析より、多面的な差をもたらすことが明らかとなった。自家受粉および他家受粉のシグナルは種子と果肉という異なる組織間でも、遺伝子発現などで協調性がみられ、種子と果肉の情報伝達機構の存在が示唆される結果を得た。今後、異なる花粉親の受粉シグナルを果肉の改変にどのように利用するかさらなる解析が必要となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ito, A., D. Sakamoto, A. Itai, T. Nishijima, N. Oyama-Okubo, Y. Nakamura, T. Moriguchi and I. Nakajima. Effects of GA3+4 and GA4+7 application either alone or combined prohexadione-Ca on fruit development of Japanese pear 'Kosui'. The Horticulture Journal 85 : 201-208, 2016

板井章浩. 果実成長に関わる植物ホルモンの働きと利用 植調 50(11): 334-339, 2017

〔学会発表〕(計 1 件)

中島由葵・山口俊春・金高信吾・虎尾亮・池田隆政・村山秀樹・平山隆志・森 泉・松浦恭和・板井章浩 自家および他家受粉が自家和合性品種「おさゴールド」の果実形質に及ぼす影響 園芸学会 明治大学 2019.3.24

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：及川 彰

ローマ字氏名：Oikawa Akira

所属研究機関名：山形大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50442934

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。