

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658031

研究課題名(和文) ナシにおけるメタキセニア現象の分子機構解明と栽培技術への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of metaxenia and its application in pear fruit growing.

研究代表者

板井 章浩 (ITAI, Akihiro)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：10252876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：果肉や果皮に花粉親の影響が出ることをメタキセニア現象と呼び、ナツメヤシなどで現象が確認されているが、その分子機構はまったく解明されていない。そこで、ニホンナシにおいて花粉親をかえ、メタキセニアの存在を明らかにすると同時に、その分子機構解明のためマイクロアレイおよびRNA-seq解析を用いて花粉親の違いにより変動する遺伝子の探索を試みた。収穫果実において、花粉親の違いによって種子数に差はないにも関わらず、果実重に差が認められたことから、メタキセニアが確認された。メタボローム解析ではアミノ酸、有機酸などで差がみられた。網羅的遺伝子発現解析により、各花粉親間で数百遺伝子の発現に差が認められた。

研究成果の概要(英文)：The effect of different pollen cultivars on the maternal tissues of fruits in several cultivars were evaluated in pear. Significant changes in fruit diameter, length, weight and firmness were observed within pollen and maternal combinations. There are significant differences in metabolites among different combinations by metabolomics. Microarray and RNA-seq analysis also reveals changes in the expression of many genes during fruit growth among different combinations. These results show the evidence of metaxenia: effect of pollen sources on the maternal tissues in pear fruit. The metaxenia may be used for new cultivation techniques in pear fruit growing.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ナシ 花粉親 果実形質 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

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。この現象はキセニアと呼ばれ、キセニアによるクリの渋皮剥離性の向上や、トウコモロコシの黄色粒率の差が確認されている。

このように、種子は花粉親の影響が確認されているが、子房は種子親の一部として構成されているため、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、メタキセニア現象という精核が果肉や果皮に影響をおよぼす現象が確認されているが、原因は明らかにされていない。メタキセニア現象はナツメヤシで初めて確認され、メタキセニア現象によるナツメヤシの果実サイズの異なり、成熟期間の早遅、異常果実の発生率の増減など、ドラゴンフルーツで成熟期間の遅延や、糖度の増減においても確認されている。その他にも、ブルーベリーの成熟早遅、キイチゴや、チェリモヤなどの植物で花粉が果実に及ぼす影響が報告されている。

しかしながら、その分子機構はまったく解明されていない。

2. 研究の目的

上述の通りメタキセニアは、影響が見られないと考えられる果肉組織に見られる果樹独特の現象であるが、その機構は全くもって不明である。本研究では、トランスクリプトームやメタボローム解析を行い、その原因究明を行うことを目的とする。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メタキセニアの影響を受けるのか受けないのかを明らかにする。2.マイクロアレイ分析を行い、花粉親の違いが遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか網羅的解析を行うこれら解析を通じてその原因にせまると同時に目的とする形質(たとえば果実サイズ)に応じた花粉親の選抜をはかり栽培現場への情報として提供する。

そこで本研究では、異なる花粉親を受粉

したニホンナシ3品種を用いて、経時的な果径調査を行い花粉親の違いにおける形態的な差異および、糖度、硬度などの測定による果実の品質差異、メタボローム解析を用いた1次代謝産物含量の物質的な差異、マイクロアレイおよびRNA-seq解析を用いた遺伝的差の調査を行い、ニホンナシにおける、メタキセニア現象の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 花粉親の違いが果実形質に及ぼす影響

1) 植物材料

植物材料は、鳥取大学農学部大塚農場に植栽されているニホンナシ‘豊水’、‘幸水’を供試した。

2) 実験方法

異なる花粉親による‘豊水’‘幸水’の果径調査、品質調査

2012年および2013年4月に、5品種の開花直前の花を収集後、葯を取り、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ファルコンに入れ4℃で保存した。

開花直前の‘豊水’‘幸水’に5品種の花粉をそれぞれ140果そうずつ以上人工授粉させ、多品種の花粉を避けるために、袋をかぶせた。

その後経時的にサンプリングを行い、各品種を受粉させた‘豊水’の果実重、縦径、横径の調査を行い、L/D比を求めた。また、7月に中間調査を行い、樹上の全サンプルの縦径、横径を測定し、L/D比を求めた。

各品種を受粉させた‘豊水’を収穫し、果実重、縦径、横径、L/D比、Lab表色、糖度、pH、硬度、種子数、の調査を行った。

花粉発芽率の調査

花粉親に使用した5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、実態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。

発芽率 = (発芽花粉数 / 100) × 100 とした。

収穫期果実細胞面積の測定

各品種を受粉させた収穫期果実の断面を 0.1% トルイジブルーにより染色し、マイクログラフ (× 200) 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、これを 1 処理区 5 切片行った。

メタボローム解析を用いた 1 次代謝産物含量の測定

1 処理区につき 5 反復、1 反復 5 果とし、10 g の粉碎した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。

(2) 花粉親の違いが果肉の遺伝子発現に及ぼす影響

1) 植物材料

各品種の花粉を人工受粉させた‘豊水’、‘幸水’の受粉後、1、2 週目の果肉および種子の RNA を供試した。

2) 実験方法

RNA 抽出

Hot Borate 法により果肉から全 RNA を抽出した。 - 80 で保存していた各果肉サンプル 5.0g を液体窒素で粉碎し、50ml 遠沈管に入れ、25ml XT Buffer(0.2M 四ホウ酸ナトリウム + 水和物、30mM EGTA、1%デオキシリコール酸ナトリウム、1%SDS、1%NP40、2% ポリビニルピロリドン (PVP) 10mM ジチオトレイトール (DTT) を加え、混合した。Proteinase K 20mg/ml を 130μl 加え、42 、 90 分振とう後、2M KCl 4ml を加え、氷中で 60 分間静置した。その後、4 、 9,000rpm、30 分遠心し、上澄みを回収し、8M LiCl を上澄みの 1/3 量加え、氷中で一晩静置した。一晩静置した後、4 、 9,000rpm、20 分間遠心し、上澄みを取り除いた。10mM Tris-HCl(pH7.5)400μl を加え、沈殿を懸濁後 2.0ml チューブに回収し、2M KAc

(pH5.5) 50μl 、 100%エタノール 1ml を加え - 80 で 1 時間静置後、4 、 15,000rpm、10 分遠心し、上澄みを取り除いた。室温で乾燥した後、ultra PURE Distilled Water (Invitrogen) 40μl に溶かして全 RNA の濃度を測定した。

RNA Cleanup

RNeasy® Mini kit を用いて RNase-free water で 100μl にサンプルを調節し、350μl の RLT バッファーを加え、混合した。希釈した RNA に 250μl 100%エタノールを加え、ピペティングを行った。2ml コレクションチューブにセットした RNeasy スピンカラムにサンプルを入れ、15 秒、15,000rpm 遠心し、ろ液を捨てる。RNeasy スピンカラムを 2ml コレクションチューブに移し、500μl RPEBuffer を加え、15 秒、15,000rpm 遠心を行った。RNeasy スピンカラムにさらに 500μl の RPE Buffer を加え、2 分、15,000rpm で遠心を行った。RNeasy スピンカラムを 2ml コレクションチューブに移し、1 分、15,000rpm、遠心した。RNeasy カラムを 1.5ml チューブに移し、30μl の RNase-free water をスピンカラムに加え、1 分、15,000rpm で遠心し RNA を溶出した。

cDNA 合成

抽出した全 RNA から ReverTra Ace- を用いて、1 本鎖 cDNA を合成した。全 RNA 1 μg を ultra PURE Distilled Water で 11μl に調節し、Oligo(dT)20、1μl を加え、70 で 10 分間インキュベートし、氷中で 5 分間急冷した。その後、5 × Rt buffer 4μl、dNTP 2μl、RNase inhibitor 1μl、ReverTra Ace 1μl を加え、42 /20 分、99 /5 分、4 /5 分で反応させた。

これらの RNA サンプルをもちいて、マイクロアレイおよび RNA - s e q さらには q R T - P C R 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 花粉親の違いが果実形質に及ぼす影響

異なる花粉親による果径調査、品質調査
1年目の収穫果実における品質調査の結果、
‘豊水’において花粉親の違いにより約 50g
と大きな差がみられた。また、L/D 比でも若
干の変異がみられ、扁円型な傾向が見られる
もの、果実が縦長の傾向が見られるものが存
在した。また、硬度も品種間差異がみとめら
れ、熟期に影響を及ぼすものと思われた。糖
度、酸度では花粉親の影響による差は、ほと
んど見られなかった。

経時的にサンプリングを行った結果、受
粉後 13 週目から 16 週目、16 週目から 19
週目にかけて果実重に大きな差がみられた。

以上より、異なる花粉親品種を人工受粉
させることにより、果実重、硬度、形質な
どに差がみられ、花粉親品種の違いによる
形態的、品質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により果実
サイズが小さくなったと考えられた。

メタボローム解析を用いた 1 次代謝産物
含量の測定

1 次代謝産物含量の測定の結果、アミノ
酸および有機酸において、約 40 個以上の
一次代謝産物で花粉親の違いにより、含量
に差がみられた。なかでも、アスパラギン
酸や、リンゴ酸など差が認められた。

異なる花粉親による果径調査、品質調査 (2 年目)

2 年目 ‘豊水’ 収穫果実において、花粉親の
違いによって種子数に差はないにも関わら
ず、果実重に差が認められたことから、メタ
キセニアが 2 年にわたり確認された。‘豊水’
において果実重が最大であった品種と最小

であった品種で約 40g 差がみられた。また、
昨年と同様に硬度で品種間差異が認められ
た。糖度、酸度では差がみられなかった。‘幸
水’においても花粉親の違いにより果実重に
差が認められた。

(2) 花粉親の違いが果肉の遺伝子発現に及 ぼす影響

ナシマイクロアレイの解析の結果、果実
重が大きくなった品種群を花粉親としたも
のと、果実重が小さくなる品種群を花粉親
としたものを比較したとき、1 週目果肉に
おいて果実重が大きくなる組み合わせで、
共通して発現量が 2 倍以上に増加した遺伝
子は、18 個存在し、共通して発現量が 1/2
以下に減少した遺伝子は 33 個存在した。
ほとんどの遺伝子の機能が不明なものが多
かった。また、花粉親 5 品種をそれぞれ比
較したときに、それぞれで 5 倍以上発現量
が増加する遺伝子数および減少する遺伝子
は 100-200 個存在した。

以上より、花粉親の違いにより多くの遺
伝子で差がみられた。そして、機能は不明
ではあった。

また種子の mRNA の次世代シーケシング解
析の結果、800Mb 以上のデータ量が得られ
た。データをアセンブルした結果、花粉親
の違いにより発現が上昇または減少する遺
伝子は 200 種類程度確認された。

これらの遺伝子を GO 解析によってシロイ
ヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において
相同性の認められた遺伝子の Annotation グ
ループを作成し、花粉親の違いによって果実
サイズに変化が表れる要因として、植物ホル
モン、転写因子に関わる遺伝子が関係してい
るのではないかと考え、得られたデータの中
からそれぞれ遺伝子を選抜することに成功
した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1 板井章浩 ナシにおけるメタキセニア現象の分子機構の解析 園芸学会、岩手大学
2013.9.20

2 森下恭行 ナシ果実の着果および成長に伴う植物ホルモン関連遺伝子の発現解析
園芸学会、東京農工大学 2013.3.23

3 及川 彰 園芸研究へのオミクス解析の応用 園芸学会、東京農工大学 2013.3.22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

板井 章浩 (ITAI, Akihiro)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：10252876

(2)研究分担者

及川 彰 (OIKAWA, Akira)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：50442934