

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14655

研究課題名(和文)カンキツ果実の裂果における果皮表面の気孔数の影響

研究課題名(英文) The effect of the number of the peel surface stomata on fruit splitting in citrus

研究代表者

羽生 剛 (HABU, Tsuyoshi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60335304

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)：本研究ではカンキツの裂果発生要因について調査するため、裂果感受性品種と非感受性品種の形態的、生理的特性や遺伝子発現を比較した。気孔数にはやや違いが見られたが、果皮表面からの吸水に関しては裂果発生時期において違いが見られず、裂果が果皮から多くの水を吸水することによって起こるのではないことが示唆された。一方で、裂果感受性品種では裂果の多い秋の雨の時期に砂じょうが急速に肥大しており、このことと果皮が薄いことが裂果発生と関係していると考えられた。RNA-seq解析の結果、細胞肥大に関係している遺伝子の発現パターンが品種間で異なっており、このことが裂果の発生の品種間差異に関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the mechanism of fruit splitting, we compared morphological and physiological characteristics and gene expressions between fruit splitting sensitive and insensitive citrus cultivars. Numbers of stomata were slight different, but fruit weight increase by water absorption from the peel surface were not different between cultivars, suggesting that fruit splitting in citrus is not likely due to water absorption from the peel surface. On the other hand, juice sac weight rapidly increased during the autumn rainy season, in which fruit splitting occurred the most. We supposed that a combination of a thin peel and this rapid enlargement of juice sacs is probably related to fruit splitting. RNA-seq analyses showed that genes related to cell enlargement differently expressed between cultivars. These different expression patterns may be related to differences of the juice sac enlargement, which could lead fruit splitting.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：カンキツ 裂果 RNA-seq

### 1. 研究開始当初の背景

カンキツ生産は愛媛県の重要な産業の一つであり、その生産量は日本一である。愛媛県ではウンシュウミカンの価格低下に伴い中晩柑の生産に力を入れており、新品種の育成も盛んに行われている。現在、県で育成された愛媛果試第28号(紅まどんな)や‘甘平’といった良食味新品種が高値で取引されており、栽培面積が増加傾向にある。しかし、これらの品種は裂果しやすいという欠点があり、それを避けるために雨よけ栽培が推奨されているが、初期投資費用の問題もあり、十分には対策が行われていない。今後も愛媛県がカンキツ生産を維持していくためには、これら品種の問題を解決していくことに加え、さらなる優良品種の作出が必要不可欠である。新品種に一番求められる形質は良食味であることから、‘甘平’などのような良食味品種が今後育種親として新品種の育成に利用されると考えられるが、その後代に裂果感受性の形質が遺伝することは十分に考えられる。しかし、裂果の発生は環境条件や栽培条件によって変化するため、現状の選抜過程でこの形質をもつ個体を除くことは難しく、現在のように現場に普及し始めて問題化する可能性がある。

### 2. 研究の目的

裂果は雨などによる急激な水分状態の変化による果肉の肥大に果皮が耐えられなくなり、果皮に亀裂が生じるあるいは果実が割れる現象である。この果肉の肥大は果肉への水の吸収により起こるが、オウトウなどの研究では雨による裂果が主に果皮表面からの水(雨水)の吸収によるものであることが示唆されている。そこで、雨後に裂果を生じやすい品種‘愛媛果試第28号’と生じにくい‘せとか’を供試して予備試験を行った結果、‘愛媛果試第28号’は果皮表面からの吸水量が有意に多く、また果皮表面の気孔数も有意に多いことが明らかとなり、‘愛媛果試第28号’の裂果感受性は果皮表面の気孔数が多いためであることが示唆された。

近年、気孔数の調節機能をもつペプチド性因子「ストマジエン」が新たに同定された。シロイヌナズナにおけるストマジエン過剰発現株では気孔数が増加し、逆に抑制株では気孔数が減少することが明らかにされており、カンキツ類の果皮表面の気孔数の品種間差異にストマジエンの遺伝子発現量(遺伝子型)の違いが関係している可能性が十分に考えられる。もし果皮表面からの吸水に関して気孔が重要な役割を果たしており、その気孔数がストマジエン遺伝子により制御されているのであれば、ストマジエン遺伝子をマーカーとして裂果耐性個体を選抜できる可能性がある。そこで本研究では、気孔数と吸水との関係についてさらに調査を行うとともにストマジエン遺伝子の単離および発現解

析を行い、気孔数と遺伝子発現との関係について調査を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 果実の形態的、生理的特性調査

愛媛大学農学部実験圃場栽植の裂果感受性品種‘愛媛果試第28号’と裂果非感受性品種の‘せとか’、‘南柑20号’、‘カラ’、‘清見’の計5品種を供試した。実験は2015年7月22日~12月2日に行った。裂果数の調査として、各品種50果実を樹上で無作為に選抜し、約7日間隔で裂果数を調査した。また、各品種3果実を毎週採集し、果皮表面の単位面積当たりの気孔数、果実重、果皮の厚さ、砂じょう百粒当たりの重量(百粒重)、砂じょう長を調査した。さらに、果皮の一部を切り出し、FAAで固定した。固定した果皮のサンプルから切片を作製し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡で観察した。果皮表面からの吸水特性については約14日おきに各品種5果実を採取し、縦径と横径、果実重を測定した後、果梗切断面を塞いで水の出入りを制限した果実を48時間蒸留水に浸漬し、同項目を測定することで増加率を調査した。

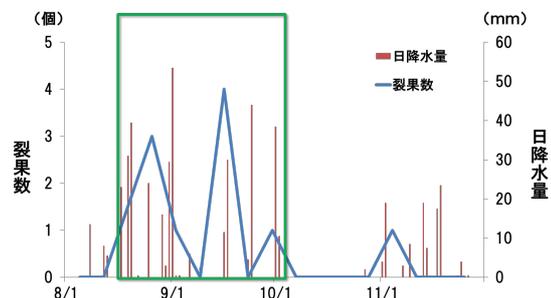
#### (2) RNA-seq 解析

2016年7月20日と9月6日、10月27日に‘愛媛果試第28号’と‘せとか’、‘清見’の果皮と果肉を0.5gずつ採取し、液体窒素で凍結後冷凍保存した。冷凍保存したサンプルからRNAを抽出し、RNA-Seqを行った。得られた配列をオレンジのゲノム配列にマッピングし、時期別あるいは品種別の遺伝子発現の違いを調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) 裂果発生

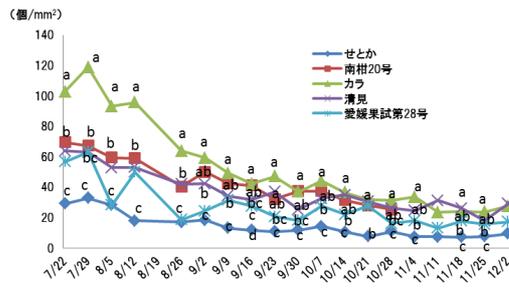
‘愛媛果試第28号’以外の4品種については裂果が観察されなかったが、‘愛媛果試第28号’は8月下旬から10月上旬の間に50果中8果実の裂果が観察された(第1図)。この時期に多量の降雨があったことから、裂果発生と降雨に関係があると思われる。2016年にも調査を行ったが、同様の傾向を示した。



第1図 裂果数と降雨量

## (2) 果皮の気孔数と吸水

果皮表面の気孔数は裂果時期である8月～9月において‘カラ’が多いものの、その他の品種に有意な差はなく；愛媛果試第28号’が特に多くはなかった(第2図)。果皮表面からの吸水について調査したが、裂果発生時期において有意差は認められなかった(データ略)。

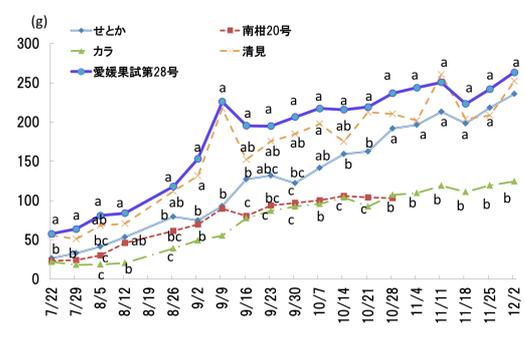


第2図 各品種の気孔数の推移

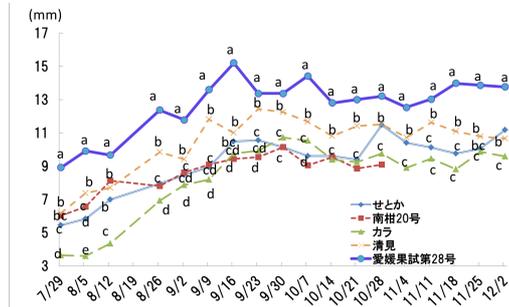
これらのことから、‘愛媛果試第28号’の裂果感受性は果皮表面の気孔数の違いによる吸水量ではないと考えられた。そこで、気孔数以外の形態的特性、果実肥大(砂じょう肥大)や果皮の厚さについての品種間差異について調査を行った。

## (3) 果実肥大

果実重の推移を調査した結果、裂果発生時期において‘愛媛果試第28号’の果実重が最も大きく、急激に増加していた(第3図)。「清見」は‘愛媛果試第28号’と同様の傾向を示し、有意差は見られなかったが、「せとか」は裂果発生時期では有意に低く、その後徐々に差が縮まり、12月では有意差はなかった。これらの違いについてさらに調査するため、砂じょうの成長について調査した。その結果、砂じょうの縦の長さ(砂じょう長)が裂果発生時期に急速に大きくなり、その後あまり変化しないことが明らかとなった(第4図)。砂じょうも果実重と同様、「愛媛果試第28号」が最も大きく、他4品種よりも有意に大きかった。



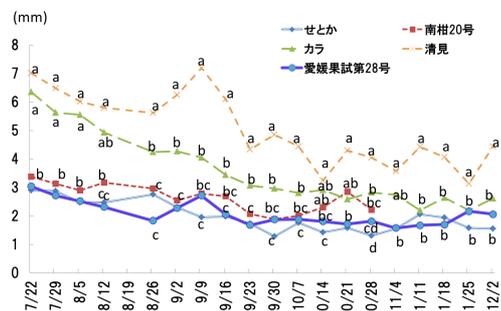
第3図 果実重の推移



第4図 砂じょう長の推移

## (4) 果皮の観察

果皮は‘清見’が最も厚く、「愛媛果試第28号」と‘せとか’が最も薄かった(第5図)。果皮の厚さは9月下旬まで減少し、10月以降はほぼ変化しなかった。また、全品種において調査期間を通してフラベド部分の厚みはほとんど変化が無かった。このことから、果皮の厚さの変化はアルベド部分が薄くなることによるものであることが示唆された。



第5図 果皮の厚さの推移

以上の結果から、「愛媛果試第28号」の裂果は果皮表面の気孔からの吸水ではなく、薄い果皮と雨の多い時期の急速な砂じょうの成長によるものであると考えられた。「清見」は砂じょうの成長は‘愛媛果試第28号’に似ているが果皮が厚いため、「せとか」は果皮の厚さは‘愛媛果試第28号’と同程度であるが、砂じょうの成長が緩やかなため裂果しにくくと考えられた。

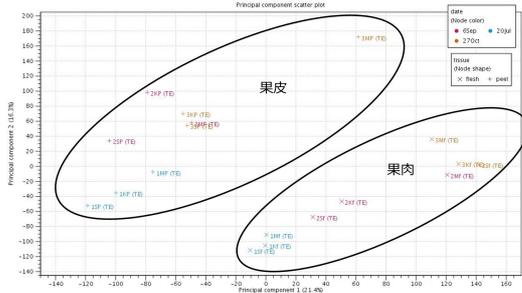
そこで、次年度はこれらの品種間差異をもたす遺伝的要因を明らかにするため、「愛媛果試第28号」と‘せとか’、清見’の果皮と果肉のRNA-seq解析を行った。

## (6) RNA-seq 解析

RNA-seqの結果、60,910,198～110,354,246のリードが得られ、低クオリティのリードを取り除いた後、59,518,394～107,515,218個のリードが得られた。これらをオレンジのゲノムにマッピングした結果、約80%のリードがマップされた。

<主成分分析>

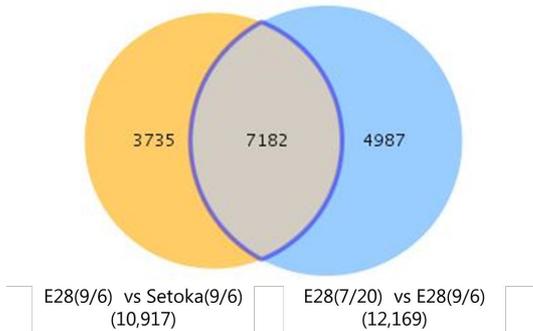
これらの発現をもとに主成分分析を行った結果、大きく果皮と果肉のグループに分かれ、第一主成分、第二主成分ともにステージの進行と正の相関が見られた(第6図)。さらに、9月6日の‘愛媛果試第28号’の果肉と10月26日の‘せとか’や‘清見’の果肉のサンプルがほぼ同じ位置にあり、9月6日の‘せとか’や‘清見’がこれらの中に位置していたことから、‘愛媛果試第28号’の果肉の発達が他の2品種よりも早まっていると考えられた。



第6図 主成分分析の結果

<発現変動遺伝子の抽出>

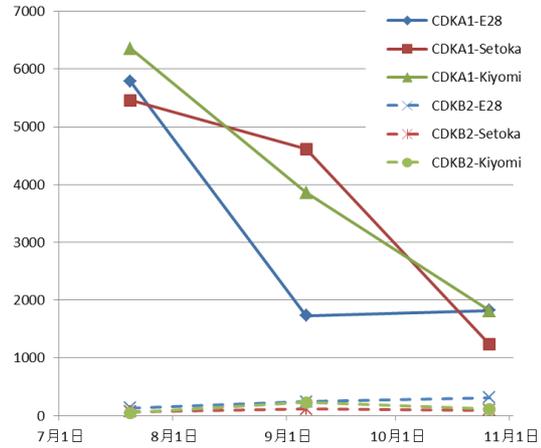
砂じょうの成長パターンと主成分分析の結果をふまえ、‘愛媛果試第28号’における他急速な砂じょう肥大に関係している遺伝子を同定する、7月20日と9月6日の‘愛媛果試第28号’の果肉間で発現が有意に異なり、9月6日の‘愛媛果試第28号’と‘せとか’の果肉間で発現が有意に異なる遺伝子を抽出した結果、7,182個の遺伝子が得られた(第7図)。



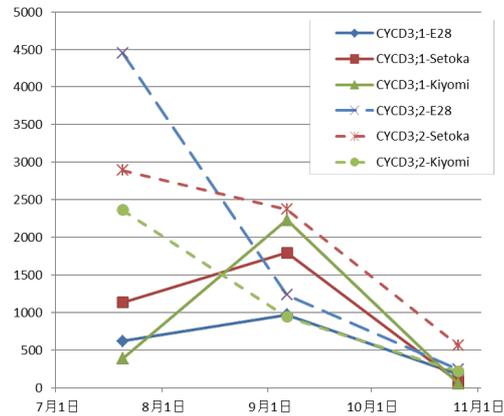
第7図 発現変動遺伝子のベン図

<細胞分裂・細胞肥大関連遺伝子>

発現変動遺伝子の中には細胞分裂に関係しているサイクリン依存キナーゼ(CDKA, CDKB)やサイクリンD3(CycD3;1, CyCD3;2)が含まれており、これらの発現は‘せとか’と‘清見’に対し‘愛媛果試第28号’では9月6日の段階でかなり低下しており、細胞分裂期の終了時期にずれがある可能性が示唆された(第8,9図)。

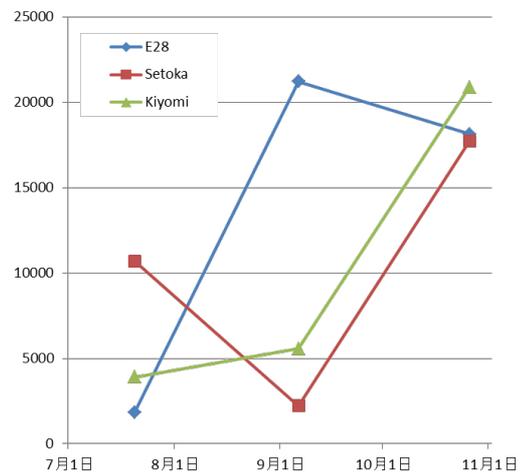


第8図 CDKの発現変動

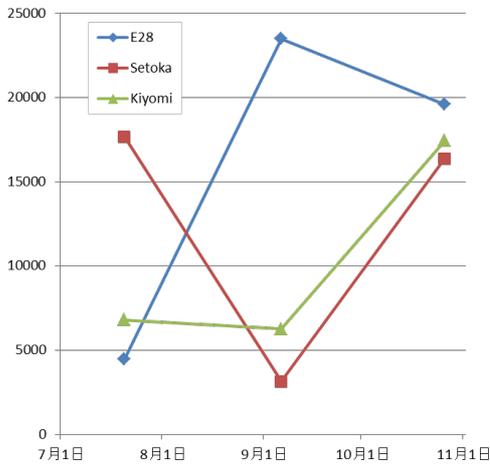


第9図 CycD3の発現変動

さらに、細胞肥大に関係しているエクспанシン(EXLA1)やキシログルカンエンドトランスグリコシラーゼ(XTH16)では‘愛媛果試第28号’において9月6日にピークとなる発現パターンを示した(第10,11図)。



第10図 EXLA1 (expasin-like A1) (LOC102629326)の発現変動

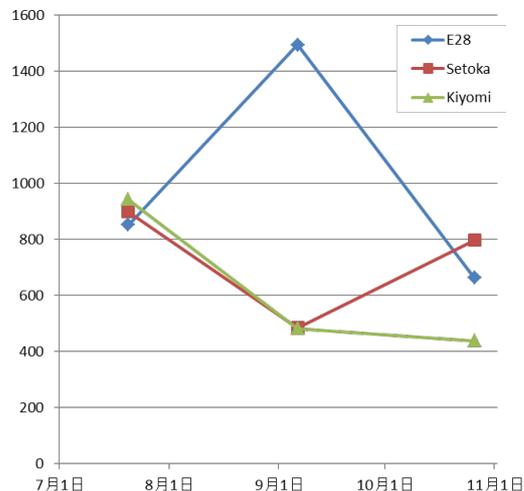


第 11 図 XTH16 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 16) (LOC102621846) の発現変動

これらの結果から、細胞分裂から細胞肥大への移行時期のずれによる肥大時期の違い、特に‘愛媛果試第 28 号’において雨の多い 9 月ごろに細胞肥大関連遺伝子が活発化し、果肉（砂じょう）の肥大成長が旺盛になることが裂果しやすいと関係しているのではないかと思われた。一方で、これらの遺伝子とは別の発現パターンとなるものもあり、これらの遺伝子発現と細胞肥大についてはさらに調査が必要であると思われた。

< 転写因子 >

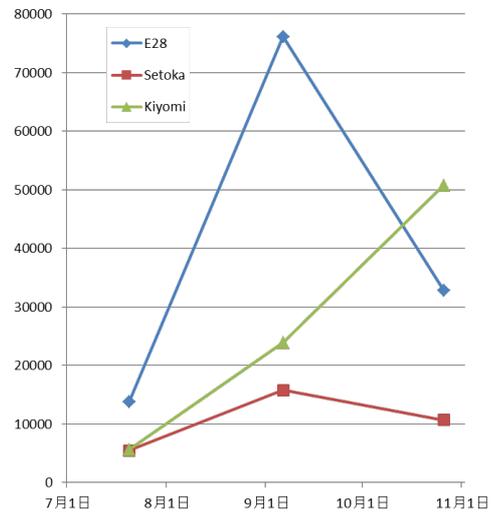
上述の細胞分裂・細胞肥大の上流で発現を制御している遺伝子を同定するため、発現変動遺伝子の中から転写因子に着目し、その発現を比較した。その結果、bZIP や bHLH など多くの遺伝子が品種間で発現が異なっており、中でも C3H タイプの転写因子が上記の細胞肥大関連遺伝子と似た傾向を示し、これらが遺伝子発現の制御に関係している可能性が示唆された（第 12 図）。



第 12 図 Zinc-finger CCCH domain-containing protein (C3H) の発現変動

< 植物ホルモン関連遺伝子 >

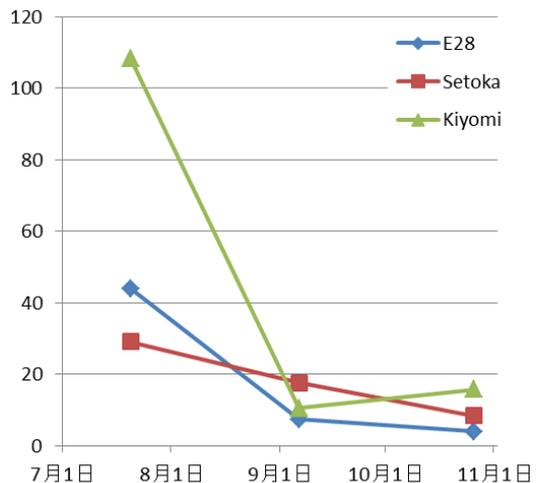
発現変動遺伝子の転写因子の中で最も多かったものは ERF (ethylene response factor) であった。カンキツ類は非クライマクテリック型果実であり、成熟にエチレンが関与していないとされているが、ERF の発現が増加していることから成熟前の果実成長期にエチレンが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。また、 brassinosteroid 生合成系の DWF1 やジベレリンシグナル伝達系の GASA1 も品種間で発現が異なっており（第 13 図）、これらの植物ホルモンも砂じょうの肥大の違いに関係している可能性が示唆された。



第 13 図 GASA1 (GAST1 protein homolog 1) (LOC102628717) の発現変動

< 果皮の RNA-seq 解析 >

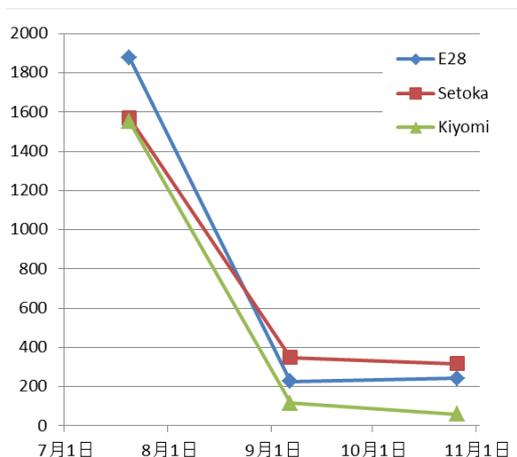
細胞分裂に関係している CDC6 (cell division control 6) や CycD6 (CyclinD6) において果皮の厚い‘清見’で発現が高く（第 14 図）、‘清見’の果皮の細胞分裂活



第 14 図 CDC6 (cell division control 6) (LOC102615076) の発現変動

性が高い可能性が示唆されたが、発現量が低く、これらが果皮の厚さと関係しているかどうかはさらに調査が必要であると思われる。

また、気孔数と関係していると考えられるストマジエンについては9月6日以降最も少ない‘せとか’で高くなり、実際の気孔数とは異なる傾向を示した(第15図)。



第15図 STOMAGEN (LOC102620288) の発現変動

#### <まとめ>

カンキツ、特に愛媛県特産で裂果が発生しやすい‘愛媛果試第28号’の裂果発生要因について、裂果しにくい品種との形態的、遺伝的特性の比較により調査した。当初の仮説である気孔を通した表面からの吸水については品種間に差が見られず、裂果の発生要因ではないと考えられた。

一方で、裂果発生時期に‘愛媛果試第28号’は急速に砂じょうが成長しており、このことと果皮が薄いことが裂果発生と関係しているのではないかと考えられた。砂じょうの成長の違いについてさらにRNA-seqを用いて調査した結果、細胞分裂や細胞肥大に関与している遺伝子において品種間で発現に違いが見られ、このことが砂じょうの成長の違いと関係している可能性が示唆された。また、転写因子や植物ホルモン関係の遺伝子でも砂じょうの成長と対応が見られるものがあり、これらが上述の下流遺伝子を制御しているのではないかと考えられた。また、果皮については、細胞分裂に関与している遺伝子で違いが見られ、これらが果皮の厚さと関係している可能性が示唆された。

裂果しにくい新品種育成のための基礎的知見を得るため、今後これらの遺伝子についてさらに詳細に調査をする必要があるだろう。

#### 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 0 件)

〔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：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

羽生 剛 (HABU, Tsuyoshi)  
愛媛大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：60335304