

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05611

研究課題名(和文) 果実がコルクで覆われるリンゴ「ふじ」変異体を用いたサビ形成を制御する遺伝子の解明

研究課題名(英文) Identification of candidate gene controlling cork formation on apple pericarp by using 'Gold farm' as a bud mutation variety of 'Fuji'

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ果実のサビは発生制御が課題となっている劣悪形質だが、その原因遺伝子は不明であった。本研究では、果皮全面がサビに覆われる枝変わり品種「ゴールドファーム」を用いて果皮のトランスクリプトーム解析を実施し、サビ発生の原因候補遺伝子を解明した。

原品種と比較して果皮の微細構造に違いが生じる開花4週後の果皮についてRNA-seq解析を実施し29の原因候補遺伝子を選抜した。次いでリアルタイムPCRにより開花5週目までの遺伝子発現を詳細に比較した結果、「ゴールドファーム」において開花2～3週後にリグニン合成に関わる複数の遺伝子の発現が急上昇し、サビ果の発生に強く関わっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果皮のコルク化(サビ発生)は短期間で分裂細胞が成熟、老化しスベリン化(木化)する過程である。本研究では、コルク化の過程で発現する遺伝子群を世界的に栽培されゲノム情報が豊富なリンゴにおいて明らかにしたことから、多年生木本植物の老化過程を理解するうえで学術的にも極めて意義深い成果であると考えられる。今後はリンゴ果皮の木質化をモデルとして、木本植物の成熟や老化の機構を明らかにしていく研究に発展する可能性がある。さらに、果皮のコルク化を制御する原因候補遺伝子が明らかになったことは果実の品質向上に向けた技術開発に資する成果であり、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Russets on apple fruits is a bad trait which must be prevented by grower, however their genetic basis has never been clarified. In this study, we performed transcriptome analysis of the pericarp using the bud mutation cultivar 'Gold Farm, GF' whose fruits surface is surrounded by russet pericarp, and elucidated the candidate gene controlling russet development. RNA-seq analysis was performed on the pericarp 4 weeks after anthesis, which was a stage where a difference in the ultrastructure of the pericarp of GF was observed compared to those of the wildtype.

In total 29 candidate genes were selected by RNA-seq and their transcriptome analysis. Then their expression profiles were observed by real-time PCR among 2 to 5 weeks after the anthesis. According to the expression profiles, some candidate genes involved in lignin synthesis rapidly increased their expression level between 2 and 3 weeks after the anthesis in GF.

研究分野：園芸科学

キーワード：リンゴ サビ果 枝変わり ゴールドファーム RNA-seq トランスクリプトーム解析 リグニン合成 果樹

1. 研究開始当初の背景

果面全体を覆ったコルクがその特徴であるニホンナシは例外であるが、それ以外の多くの仁果類果樹において、果面のサビ発生は一般的に劣悪形質とされている。代表的な仁果類であるリンゴにおいても、光沢や色彩を有する果面の外観品質を損なうことから劣悪形質とされており、その制御が課題となっている(第1図)。リンゴのサビ形成は果面のクチクラに生ずる微小亀裂が外観上の起因とされ、それが拡大すると周皮層のスベリン化が促進されてサビが発達すると考えられている。その誘因としては、降雨、薬剤、強い日射、ウィロイド感染などが報告されている。リンゴにおいては、果樹の中では比較的充実しているゲノム情報を利用して、これまでにクチクラやサビ形成に関わるいくつかの候補遺伝子が報告されているが、サビ形成の原因遺伝子は特定されていない。



第1図 リンゴにおける果面のサビ形成は果実の品質を損なう劣悪形質

2. 研究の目的

本研究では、この状況を打破する有効な材料としてリンゴ‘ふじ’の枝変わりにより果皮にサビが形成され錆褐色となった‘ゴールドファーム’に着目した(第2図)。この独自の突然変異品種を原品種である‘ふじ’と形態学的手法によって詳細に比較することで、まず果面のサビ形成過程を明らかにする。さらに、サビ形成過程の果皮においてトランスクリプトーム解析を遂行することで、リンゴのサビ形成を制御する原因遺伝子の解明を目的とする。本研究は、仁果類で最もゲノム研究とその公開が進んでいるリンゴを材料としていることから、豊富なゲノム情報を遺伝子解析に活用できることが強みである。



第2図 リンゴ‘ふじ’の枝変わり品種‘ゴールドファーム’

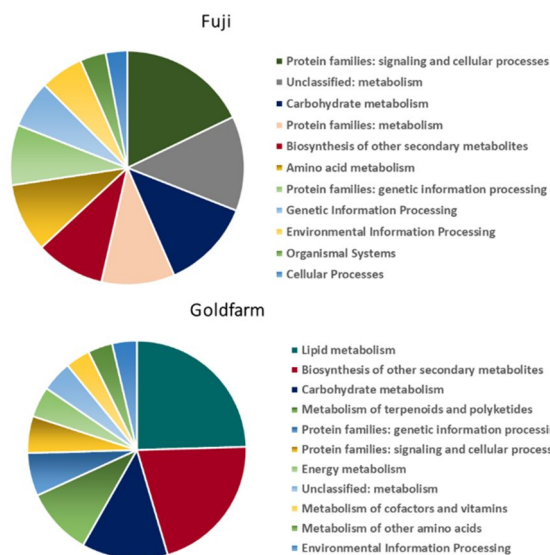
3. 研究の方法

まず‘ゴールドファーム’と‘ふじ’において、開花直後から果実の発達過程を詳細に観察する。特に果面の微細構造の変化を経時的に比較することによって‘ゴールドファーム’にサビが発生する時期を正確に特定する。次いで、サビが形成され始める時期の前後において、RNA-seq法を用いて果皮のトランスクリプトームを両品種間で網羅的に比較解析する。その結果に基づいて、サビ果の発達に関わる候補遺伝子群を特定する。さらにリアルタイム定量PCR法を用いて、特定した遺伝子群の中から、真にサビ果の発生と連動して発現しているものを特定し、果皮形質の発現との関連を裏付ける。

4. 研究成果

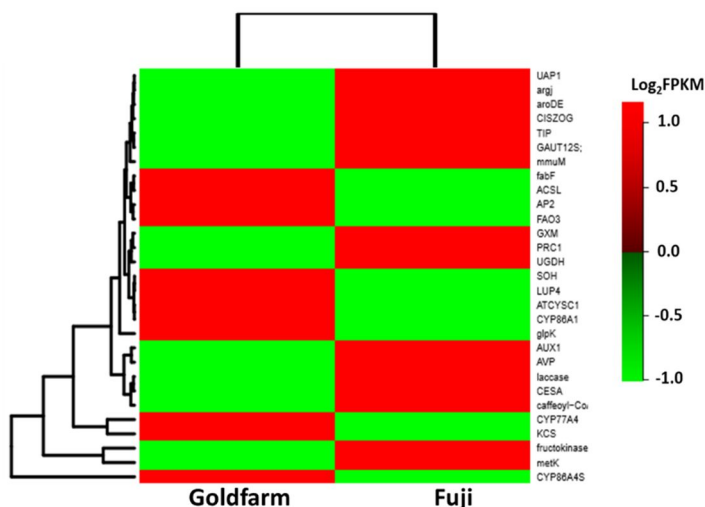
(1) ‘ふじ’果実および‘ゴールドファーム’の葉からゲノムDNAを抽出し、ニホンナシ由来のSSRマーカー13種類を用いて、原品種と枝変わり品種の関係とされている両品種の同一性を確認した。その結果、6遺伝子座で増幅が確認された。これら6遺伝子座について‘ふじ’と‘ゴールドファーム’の遺伝子型を確認したところ両者は完全に一致した。この結果によって、これまでに報告されている両品種の類縁関係が再確認された。

(2) ‘ふじ’および‘ゴールドファーム’の果実を開花後1週目から経時的に採取し、RNA-seqおよびトランスクリプトーム解析に用いるための材料とした。RNA-seq解析に用いる発育ステージとしては、形態学的観察の結果から原品種である‘ふじ’と比較して‘ゴールド



第3図 KOALA(KEGG Orthology And Links Annotation)によるトランスクリプトームの分類

ファーム'の果皮構造に違いが生じる開花40日後とその前後1週間に焦点を当てた。これらの果実試料について、表皮組織から全RNAを抽出しRNA-seqを行った。参照配列としては最新のリンゴゲノム配列(GDDH13 Version 1.1)を用いた。アセンブルされた全塩基配列データを用いて、各品種の各開花後日数における塩基配列データをアラインメントした。次いで、これらの取得した配列データを用いてトランスクリプトーム解析を行った(第3図)。その結果、KEGG pathway解析によるサビ果発生に関わるタンパク質の推定、GO ontology解析による差時的発現遺伝子の分類、Blast解析およびSwiss-Prot解析による機能推定の結果を総合して、29の原因候補遺伝子を選抜した(第4図)。



第4図 サビ果に関わる29遺伝子のヒートマップ: 'ゴールドファーム'と'ふじ'の間で発現量が上昇する遺伝子を赤色、減少する遺伝子を緑色で示す

(3) 'ふじ'および'ゴールドファーム'の果実で開花40日後に差時的発現を示した29遺伝子のうち、サビ果発生との関連が示唆される9遺伝子をさらに絞り込んだ。これらの遺伝子について、両品種間における開花2~5週間までの果実発育過程における遺伝子発現の変動を詳細に比較した(第1表)。その結果、果面にサビが発生する'ゴールドファーム'において、開花2,3週後にリグニン合成に関わる複数の遺伝子が上昇することを明らかにした。これらの遺伝子がサビ果の発生に強く関わっていると示唆された。

第1表 トランスクリプトーム解析の結果に基づく絞り込みによってqRT-PCRに供試した9遺伝子とプライマー配列

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
ACSL	AGGAAGCTGAGGGACTAGGG	GTCCAAGAGAGGTGCTGCTT
CYP86A4S	CTTGGGCTCGGAATGGAAGT	ATGCGACCGATTGCGTAGAT
KCS	CACGCCCTCGATCCATCTAC	TGCGGAAAAAGCAATTCGCA
AP2	AGCACTAACAGGAGCAGCAG	AACGGCATTAAAGTCCACGGT
CESA	GATGAGCTACGGAAGAGGCC	GGAAAGGCGATCGAGGTAGG
UGDH	TACCAAAGAGCCGCTTCGT	ACAGCAGGCATGTCTTGAG
GDSL	TTACCCCGGAGCAATATGCC	GCCGCCGTATATCGATAGGG
CCOAO1	ACCACATCAGCTGACGAAGG	TCACCAACAGGAAGCATGCA
CESA4	TGGTGGCGTAATGAGCAGTT	AGCATGGGGATTCTAGCGTG
MdActin*	ACCATCTGCAACTCATCCGAACCT	ACAATGCTAGGGAACACGGCTCTT

*リファレンス遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------