

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05622

研究課題名(和文) ウンシュウミカンの浮き皮発生程度の品種間差異に関する遺伝的要因の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic factors related to differences between cultivars in the degree of peel puffing occurrence of satsuma mandarin

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウンシュウミカン栽培で大きな問題となっている浮き皮の発生に関する品種間差異の遺伝的要因を明らかにすることを目的として、発生程度の異なる2品種を供試して、発現解析とゲノム解析を行った。品種間や浮き皮軽減効果がある植物成長調節剤処理における遺伝子発現変動を調査した結果、ジャスモン酸シグナル伝達に關与するJAZ遺伝子が浮き皮が発生しやすい品種である「南柑20号」の果皮で高く、その発現がGAやGA+PDJ処理で低下することが明らかとなった。JAZはジャスモン酸シグナルを抑制することで成長を促進する役割があることから、JAZ遺伝子の高発現と浮き皮発生に關係がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウンシュウミカンの浮き皮発生に植物ホルモンであるジャスモン酸のシグナル伝達に關わる遺伝子が關係している可能性があることを明らかにした。この知見はこれまで得られていないものであり、その点で学術的に新規性のあるものであり、また浮き皮発生機構解明に資するものであることから、将来的に浮き皮発生を抑えるための栽培技術や新品種育成につながるミカン栽培にも有用な成果であると思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the genetic factors of the difference between cultivars in the degree of peel puffing occurrence, which is a serious problem in the cultivation of Satsuma mandarin in Japan, two varieties with different degrees of peel puffing occurrence were used for this study, and expression analysis and genome analysis were carried out. As a result of investigating gene expression differences between cultivars and among the treatments of plant growth regulators that have the effective for reducing peel puffing, the expression of JAZ genes, which are involved in jasmonic acid signal transduction, were higher in the peel of 'Nankan No. 20', which is sensitive to peel puffing, and were downregulated by the GA and the GA + PDJ treatments. Since the JAZ has a role of promoting growth by suppressing the jasmonic acid signal transduction, it was suggested that the high expression of JAZ genes may be related to the peel puffing.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ウンシュウミカン 浮き皮

1. 研究開始当初の背景

「浮き皮」とはウンシュウミカンにおいて発生する生理障害の一つであり、果皮（フラベド：外側の着色部分）と果肉の間にあるアルベド（白い海綿状の組織）に空隙ができ、果皮と果肉が分離する現象である。「浮き皮」になった果実の果皮は破れやすいため、選果・貯蔵・流通中に腐敗しやすく、また空隙に存在する空気、特に酸素と果肉が接触するため、糖や酸が減少し、異臭が発生するため、食味も低下する。そのため、「浮き皮」発生はカンキツ栽培において以前から大きな問題となっており、その解決に対する栽培現場からの要望は非常に強い。

現状、「浮き皮」対策として、施肥や摘果、水分管理といった栽培管理、カルシウム資材や植物成長調節剤の施用といった方法が行われており、最近ではプロヒドロジャスモン酸とジベレリンの混合処理が「浮き皮」軽減対策として推奨されているが、この方法でも完全に抑制することは困難である。「浮き皮」は高温多湿で発生しやすいことがわかっており、地球温暖化により今後発生が増加することが懸念されていることから、「浮き皮」が発生しないウンシュウミカンの新品種育成は急務であると言える。しかし、「浮き皮」発生の分子機構や発生程度の品種間差異に関する遺伝子レベルでの要因については未だ不明な点が多い。

「浮き皮」は果肉が成長を停止した後も果皮が成長するため起きるが、その発生機構については未だほとんどわかっていない。Ibáñez ら (2014) は、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析により「浮き皮」果と健全果の比較を行い、一次代謝や糖代謝が上昇し、ジベレリンやサイトカイニンのシグナル伝達系が低下することを明らかにしているが、それらと「浮き皮」の症状との関連性については明らかではない。一方で、Imai ら (2017) は、交雑集団を用いて「浮き皮」の発生程度に関する 3 つの量的形質遺伝子座 (QTL) が同定しており、「浮き皮」の発生程度が遺伝的支配を受けていることが示唆されている。しかし、その遺伝子自体は明らかではない。つまり、「浮き皮」の発生程度は遺伝的支配を受けているが、その遺伝的メカニズムは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、ウンシュウミカン栽培で問題となっている浮き皮発生機構を明らかにし、浮き皮抑制のための栽培技術や浮き皮が発生しない新品種育成のための知見を得ることを目的とし、まず浮き皮発生程度が異なる品種間の遺伝的要因の違いを明らかにすることを試みる。まずは、遺伝子発現や DNA 配列の違いを明らかにし、その違いと浮き皮発生との関係について調査を行う。DNA 配列については、品種間の違いに加え、果皮と果肉の違いについても調査を行う。これは、浮き皮が果肉の成長停止後も果皮が成長を続けることによって起こることから、果皮の成長に関する遺伝子にのみ何らかの変異が起きている周縁キメラである可能性があるためである。本研究では、浮き皮発生程度が異なる 2 品種の果皮と果肉の遺伝子発現と DNA 配列を比較することで浮き皮の発生程度の違いに関する遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

植物材料

本研究では浮き皮が発生しやすいウンシュウミカンの「南柑 20 号」とほぼ発生しない「石地」を供試した。これら 2 品種の果皮と果肉を 9 月～11 月にかけて経時的に採取し、液体窒素で凍結後以下の実験に用いるまで -80℃ で保存した。また、浮き皮軽減処理であるジベレリンとプロヒドロジャスモンの混用処理あるいはジベレリン単独処理した果実からも同様にサンプルを採取した。

実験 遺伝子発現解析

上記のサンプルから RNA を抽出し、RNA-seq を行った。得られたリードを CLC Genomic workbench を用いてクリーニング後、ウンシュウミカンのゲノム配列にマッピングし、各遺伝子の発現量を算出した。Blast によってアノテーションを付与した後、Gene Ontology 解析などを行った。さらに、RNA-seq で発現がサンプル間で有意に異なった遺伝子については Real-time RT-PCR で発現を調査した。

実験 ゲノム解析

「南柑 20 号」と「石地」の果皮と果肉から DNA を採取し、次世代シーケンサーによるリシーケンシングを行った。得られたリードを CLC Genomic workbench を用いてクリーニング後、ウンシュウミカンのゲノム配列にマッピングし、SNP や挿入、欠失を検出し、サンプル間で比較した。

4. 研究成果

実験 遺伝子発現解析

i) 遺伝子発現の品種間差異

浮き皮発生に関する品種間差異を明らかにするために、遺伝子発現の違いを調査した。浮き皮発生に関する遺伝的知見が乏しいため、まず RNA-seq による網羅的解析を行い、候補遺伝子の探索を行った。

RNA-seq 解析

9月における‘石地’と‘南柑 20号’の果皮を用いて RNA-seq を行った結果、‘南柑 20号’から約 4440 万個、‘石地’からは約 4630 万個のリードが得られた。それらをウンシュウミカンのゲノムにマッピングした結果、品種間で発現が異なる発現変動遺伝子 ($\text{adj-p} < 0.05, |\log\text{FC}| > 1$) の数は、2574 個であった。そのうち、‘南柑 20号’の方が‘石地’よりも発現が高い遺伝子の数は 1583 個、‘石地’の方が‘南柑 20号’よりも発現が高い遺伝子の数は 844 個であった。浮き皮が発生しやすい‘南柑 20号’に注目すると、‘石地’よりも‘南柑 20号’で高発現していた遺伝子の中にはエチレンのシグナル伝達系に含まれる遺伝子 (ERF) やジャスモン酸 (JA) のシグナル伝達系に含まれる遺伝子 (JAZ や MYC2) が‘南柑 20号’の果皮で有意に高く発現していた。さらに、11月の果皮サンプルでも同様に RNA-seq を行った結果、‘南柑 20号’から約 4000 万個、‘石地’からは約 3280 万個のリードが得られ、それらをウンシュウミカンのゲノムにマッピングした結果、品種間で発現が異なる発現変動遺伝子は 1176 個であった。そのうち、‘南柑 20号’の方が‘石地’よりも発現が高い遺伝子の数は 603 個、‘石地’の方が‘南柑 20号’よりも発現が高い遺伝子の数は 573 個であった。これらを比較した結果、9月と11月の両方で‘南柑 20号’が有意に発現が高い遺伝子は 127 個、‘石地’で高い遺伝子は 98 個であった。9月で発現が高かった ERF のほとんどは 11月では有意な違いは見られず、MYC2 も 11月では発現に違いは見られなかった。しかし、CUMW_024740 (JAZ10) や CUMW_030520 (JAZ1)、CUMW_036480 (JAZ1) といった JAZ は 9月と 11月で発現が有意に異なり、‘南柑 20号’で有意に高かった。

リアルタイム PCR 解析

RNA-seq 解析の結果、JAZ 遺伝子が‘南柑 20号’の果皮において‘石地’よりも高く発現していることが示された。そこでこれらの遺伝子発現についてさらに調査するため、これら 3つを含む 5つの JAZ 遺伝子についてリアルタイム PCR を行った。その結果、CUMW_024740 (JAZ10) と CUMW_030520 (JAZ1)、CUMW_036480 (JAZ1) は 9月の‘南柑 20号’の果皮において‘石地’よりも有意に発現量が高く、これらは 11月においても高い発現を維持しており、RNA-seq の結果と一致していた。さらに、これらの遺伝子は果肉よりも果皮で有意に発現が高かった。また、CUMW036490 1 (JAZ1) や CUMW0147101 (JAZ8) のように時期によって発現量が大きく異なる遺伝子も見られた。

品種間で JA に違いがある可能性が考えられたため、11月の果皮における JA 生合成遺伝子の発現の違いを調査した。JA はアレンオキシドシンターゼ (AOS) やアレンオキシドシクラーゼ (AOC)、12-オキシフトジエン酸レダクターゼ (OPR) を介するオクタデカノイド経路において、リノレン酸から合成されるが、本研究ではこの中の AOS と OPR をコードする遺伝子の発現を調査した。その結果、JA 生合成遺伝子の発現量は‘石地’の方が‘南柑 20号’よりも有意に高く、さらにこれらの遺伝子は果皮に比べて果肉では発現が非常に低かった。

考察

浮き皮発生について違いがみられる 2 品種の果皮を用いた RNA-seq の結果、発現が異なる遺伝子が数多く検出されたが、その中で浮き皮軽減処理に用いられているジャスモン酸のシグナル伝達に関与する JAZ が 9月と 11月の両方で顕著な違いを示したため、JAZ に着目して発現を詳細に調査すると JAZ が‘南柑 20号’の果皮で得意的に発現が高いことが明らかとなった。JA シグナル伝達の抑制因子である JAZ は通常、MYC2 と結合し、転写活性を抑制することで防御応答を抑制させ、防御に必要なエネルギーを生長に回すことで生長を促進させる。しかしながら、傷害等に対して JA が生成されると、JAZ はユビキチンシステムによって分解され、MYC2 の転写活性によりストレス応答に必要な遺伝子の発現が調節され、防御応答が促進される。その際に、防御に必要なエネルギーを作るための副作用として生長が抑制されることが報告されており (Takaoka ら, 2018)、JAZ の欠損変異体は成長が抑制されることが報告されている (Guo ら, 2018)。JAZ は成長促進に働くと考えられることから、‘南柑 20号’での果皮特異的な JAZ の高発現は果皮の生長を促進させ、その結果浮き皮をもたらしている可能性がある。しかし、ここまでの結果は品種間、組織間の遺伝子発現の差だけであるので、浮き皮と JAZ の関係についてさらに調査するために、‘南柑 20号’に浮き皮軽減処理を施した際の遺伝子発現を調査した。

ii) 植物成長調節剤処理が遺伝子発現に及ぼす影響

浮き皮が発生しやすい南柑 20 号'に処理の推奨時期である 9 月初旬に GA または GA+PDJ 処理を施した。処理により、浮き皮の指標である比重の低下が抑えられていたこと（データ略）から、今回の処理は浮き皮を軽減していたと考えられたため、処理した果皮のサンプルを用いて発現解析を行った。

RNA-seq 解析

GA 処理とその対照区、GA+PDJ 処理とその対照区の果皮サンプルについて RNA-seq を行い、3300 万～4000 万個のリードが得られ、それらをウンシュウミカンのゲノム配列にマッピングした。その結果をもとに発現量を算出し、サンプル間で比較した結果、9 月における南柑 20 号'の果皮において GA 処理によって発現が変動した発現変動遺伝子の数は 536 個であった。そのうち、GA 処理によって発現が上昇した遺伝子は 237 個、低下した遺伝子は 299 個であった。さらに、GA+PDJ 処理によって発現が変動した遺伝子の数は 1929 個であり、そのうち処理によって発現が上昇した遺伝子の数は 729 個、低下した遺伝子の数は 1200 個であった。

これらの結果と上述の 9 月の品種間比較の発現変動遺伝子の結果をあわせると、3 つの RNA-seq 全てで発現が有意に変動した遺伝子は 120 個であり、その中で南柑 20 号'において GA 処理および GA+PDJ 処理の両処理で低下し、且つ石地'よりも南柑 20 号'で高発現している遺伝子の数は 90 個、逆に南柑 20 号'において GA 処理および GA+PDJ 処理の両処理によって発現が上昇し、尚且つ南柑 20 号'よりも石地'で高発現している遺伝子の数は 4 個であった。南柑 20 号'で高発現し、処理によって低下した遺伝子には光合成に関する遺伝子が多く含まれており、JAZ も 1 つ含まれていた。また、南柑 20 号'で発現が低く、GA および GA+PDJ 処理によって発現が上昇した遺伝子には BEL1 と呼ばれる光合成関連の遺伝子を抑制する遺伝子が含まれていた。

リアルタイム PCR 解析

植物成長調節剤処理でも JAZ が発現変動していることが示唆されたため、品種間で違いがみられた JAZ の発現をリアルタイム PCR で調査した。JAZ の中で JAZ8 遺伝子だけ 11 月に GA+PDJ 処理果実の果皮において有意に発現が低下したが、その他の処理時期やその他の遺伝子では処理果実において低下する傾向が見られたものの、果実間のばらつきが非常に大きく、有意な差は見られなかった（データ略）。JA 生合成遺伝子の発現に及ぼす影響についても調査した結果、11 月の南柑 20 号'の果皮において OPR3 および AOS 遺伝子の発現は共に GA 処理では上昇し GA+PDJ 処理で低下した。

同一果実内での遺伝子発現比較

果実ごとの処理で見られた果実間のばらつきをなくすため、果実の片側のみに GA および GA+PDJ を処理し、同一果実の無処理側と処理側を対応させ、これまでの実験で浮き皮への関与が示唆された JAZ 遺伝子や JA 生合成遺伝子の発現を解析した。JA シグナル伝達経路遺伝子である JAZ 遺伝子の発現量は 9 月の石地'および南柑 20 号'の果皮において GA 処理による発現の違いは見られなかった一方、11 月は南柑 20 号'において無処理と比較して GA 処理で有意に発現が低下した。同様の傾向は GA+PDJ 処理でも見られた。OPR3 発現量は処理による違いは見られなかったが、AOS 遺伝子は 11 月の南柑 20 号'において GA 処理で発現が低下し、石地'は 9 月と 11 月の両方で GA+PDJ 処理によって発現が上昇した。

考察

品種間の遺伝子発現の違いと浮き皮発生との関係についてさらに調査するため、南柑 20 号'に浮き皮軽減に効果がある GA 処理や GA+PDJ 処理を行った際の遺伝子発現の変化を調査した。RNA-seq 解析の結果、品種間と処理間で共通にみられた発現変動遺伝子で浮き皮が発生しやすい南柑 20 号'の果皮で発現が高く、GA 処理などでそれが低下する遺伝子や逆に南柑 20 号'で低く、処理によって発現が上昇する遺伝子がみられた。特に前者の数が多く、その中でも光合成関連遺伝子が数多く含まれていた。また、品種間差でも注目した JAZ も含まれていた。JAZ については品種間でも処理間でも有意に発現が変動しており、特に浮き皮が発生している 11 月で顕著な差がみられた。上述のように JAZ には生育促進効果があると考えられていることから、11 月の JAZ の高発現と果皮の成長継続による浮き皮発生に関係がある可能性が示唆された。JAZ に関連した JA 生合成遺伝子については、個々の果実に処理した場合には発現に違いがみられたが、同一果実での比較では異なる傾向を示したため、JA 生合成と浮き皮の関係についてはさらに研究が必要であると思われる。光合成関連遺伝子と浮き皮発生との関係についても未だ明らかではないため、今後さらに研究を行う予定である。

実験 ゲノム解析

遺伝子発現に品種間で違いがみられたことから、これらの違いにゲノムレベルでの違いが影響していると考えられる。そこで、ゲノム配列の違いについて調査を行った。さらに、ゲノム配列の違いについて果肉と果皮のキメラ性が関与している可能性もあるため、浮き皮が発生しやすい‘南柑 20 号’と発生しにくい‘石地’の果皮と果肉の DNA 配列多型について調査を行った。まず、‘南柑 20 号’と‘石地’の果皮と果肉から DNA を抽出して、次世代シーケンサーによるシーケンスを行った。DNA はごく微量であったが抽出でき、‘南柑 20 号’の果皮からは約 2,437 万個、果肉からは約 2,327 万個、‘石地’の果皮からは約 3,872 万個、果肉からは約 3,853 個のリードが得られ、それらをウンシュウミカンのゲノム配列にマッピングした結果、‘南柑 20 号’の果皮からは約 90 万個、果肉からは約 66 万個、‘石地’の果皮からは約 229 万個、果肉からは約 172 万個の配列多型 (SNP, InDel など) が得られた。これらを比較した結果、‘南柑 20 号’の果皮と果肉で異なる多型が 442,499 個、‘石地’では 848,872 個得られ、両品種とも果肉と果皮において DNA の配列に違いが生じていると考えられ、栄養繁殖の過程で異なる変異が生じているキメラである可能性が示唆された。また、‘南柑 20 号’と‘石地’の果皮同士で異なる多型が 915,175 個、果肉では 719,794 個得られ、これらの中で果皮と果肉で異なるものは‘南柑 20 号’の果皮では 90,134 個、果肉では 59,627 個、‘石地’の果皮では 368,280 個、果肉では 215,566 個であった。

考察

本研究では、果皮と果肉から別々に DNA を抽出し、それぞれのリードデータから SNP などの配列多型を同定した結果、果皮と果肉で異なるものが多く検出された。このことから、‘南柑 20 号’や‘石地’が周縁キメラであると考えられた。また、これらの多型は品種間でも違いがみられ、品種間差の原因にも関係していると考えられた。そこで現在、上記の発現変動遺伝子と配列多型の関係について調査を行っている。まだ全てが解析できていないが、遺伝子上流と考えられる位置の配列多型と遺伝子発現の違いについては明確な関係がみられるものはなかった。しかし、コード領域内などの別の場所の配列の違いも見られるため、今後も引き続き解析を進める予定である。

<まとめ>

ウンシュウミカン栽培で問題となっている浮き皮の発生に関する品種間差異の遺伝的要因を明らかにすることを目的として、発生程度の異なる 2 品種を供試して、発現解析とゲノム解析を行った。品種間や浮き皮軽減効果がある植物成長調節剤処理における遺伝子発現変動を調査した結果、ジャスモン酸シグナル伝達に関与する JAZ 遺伝子が浮き皮が発生しやすい品種である‘南柑 20 号’の果皮で高く、その発現が GA や GA+PDJ 処理で低下することが明らかとなった。また、光合成に関連する遺伝子も同様の変動をすることが示唆され、浮き皮発生に関係している可能性が考えられた。これらの遺伝子発現の差異の原因を明らかにするため、果皮と果肉から DNA を抽出し、ゲノム解析を行った。その結果、品種間や組織間で配列多型に違いがみられ、品種間だけでなく果皮と果肉でも配列がことなる周縁キメラである可能性が示唆された。これらの配列の違いと遺伝子発現の違いの関係については未だ明らかではないが、今後さらに研究を進めることで品種間の遺伝的要因の違いが明らかにできるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋田あきは・羽生 剛・山田 寿
2. 発表標題 浮皮発生程度の品種間差に関する遺伝的要因の調査
3. 学会等名 園芸学会中四国支部
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------