

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20780019

研究課題名 (和文) ジベレリン処理によるブドウの単為結果誘起の機構解明

研究課題名 (英文) Study of mechanism of gibberellic acid induced parthenocarpy

研究代表者

羽生 剛 (HABU TSUYOSHI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60335304

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、植物ホルモンであるジベレリンによってブドウの果実が種なしになるメカニズムの解明をのため、種なし化 (単為結果) に関係している遺伝子の解析を行った。その結果、ジベレリン処理による反応に関係していると考えられるジベレリンを植物体内で代謝する遺伝子、種が無くても果実が肥大するために必要であると考えられる細胞分裂関連遺伝子、果実に糖を蓄積するのに必要な遺伝子を同定することができた。

研究成果の概要 (英文) : In this study, to elucidate the mechanism of gibberellic acid induced parthenocarpy, I analyzed about possible parthenocarpy-related genes. I identified the genes including the metabolism of gibberellic acid, which may relate to the response of gibberellic acid treatment, and cell division and sugar accumulation, which may relate to the fruit enlargement without seeds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：果樹・造園学

キーワード：果樹園芸・ブドウ・単為結果・ジベレリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、若年層を中心とした果物離れが問題となっている。その対策として、果物に関する知識の普及啓蒙を目的として、平成 13 年度から「毎日くだもの 200 グラム運動」が全国的に展開されている。しかし、減少傾向にある果物の消費を今後拡大していくには、消費者の意識を変えるだけではなく、生産者側

も消費者のニーズに沿った果物作りをしていく必要がある。若年層の果物離れの大きな原因の一つは、ファーストフードやコンビニエンスストアに代表されるような食生活の簡便化により、若者にとって果物が「食べにくい」、「食べるのが面倒」な食べ物になってしまったことにある。したがって、この問題を解消し、消費を拡大していくには、できる

だけ「食べやすい」果実を生産、供給していかなければならない。この「食べやすい」果物の特徴の一つに「種がない」ことがあり、現在市場での需要も高い。果実の種なしには、カキの‘平核無’のような受精が必要な偽単為結果や温州ミカンのように自然に種なし果実が発育する自動的単為結果、理化学的刺激を受けて果実が発育する他動的単為結果があるが、栽培的にはジベレリンやオーキシンのような植物生長調節剤を処理することにより人為的に他動的単為結果を誘起する方法で種なし果実が生産されている。果樹類においては、ジベレリン処理が単為結果の誘起によく用いられており、特にブドウ栽培では重要な栽培技術の一つとなっている。しかし、このジベレリン処理によるブドウの単為結果誘起の作用機構の詳細に関しては未だ十分に解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

植物の単為結果に関しては、シロイヌナズナおよびトマトで分子レベルでの研究が進められており、変異体や形質転換体を使った解析から、オーキシンのシグナル伝達系、その中でも特に **AUXIN RESPONSE FACTOR8(ARF8)**と **Aux/IAA** タンパク質である **IAA9** が単為結果を誘起する遺伝子の発現を抑制している可能性が高いことが示されている。現在、オーキシンのシグナル伝達にはこの **ARF8** を含む **ARF** タンパク質ファミリーがホモ二量体を形成し、転写因子として機能することが重要であり、この **ARF** タンパク質の機能を **Aux/IAA** タンパク質が **ARF** タンパク質とヘテロ二量体を形成することで阻害する、という仮説が提唱されている。トマトは開花時オーキシン処理により単為結果が誘起されるが、それは本来受精するまでの間 **ARF8** や **IAA9** によって発現が抑制されている遺伝子が、オーキシン処理により発現が誘導されるためであると考えられている。その一方で、トマトにおける単為結果は、オーキシンだけではなく、ジベレリンも重要であると考えられおり、トマトの単為結果果実では内生ジベレリンが増加すること、ジベレリンの生合成阻害剤であるユニコナゾールを処理することにより果実発育が停止することが報告されている。シロイヌナズナでも同様にジベレリンが単為結果に重要であることが示されている。最近、シロイヌナズナにおいて、オーキシンが直接ジベレリン生合成遺伝子の発現を誘導することが明らかにされた。このことから、オーキシン処理による単為結果誘起の過程では、ジベレリンの生合成が誘導され、オーキシンとジベレリン両方の作用によって単為結果の誘起およびその後の果実肥大の促進が起こるのではないかと考えられる。

ブドウの無核化栽培には、満開時～満開 3 日後（品種によっては満開 2 週間前）および満開 10～15 日後に行う花（果）房へのジベレリン処理が効果的であり、現在無核化処理として一般的に行われている。その一方で、ブドウの着果および果実生長の開始と内生オーキシンの上昇が関係していること、ジベレリン処理にオーキシンを混用すると子房の生長が著しく促されるが、逆にアンチオーキシンを混用すると子房の生長が抑制されることが報告されている。シロイヌナズナはブドウと同様ジベレリン処理によっても単為結果するが、シロイヌナズナとトマトは上述した同じ単為結果メカニズムをもつと考えられており、ブドウもこれらと同じ単為結果メカニズムをもつ可能性は高いと考えられる。

そこで本研究では、この仮説を検証するため、ジベレリンとオーキシンを処理した果実における単為結果性発現の調査、ホルモン処理による単為結果性誘起機構に関係していると考えられるオーキシンシグナル伝達系遺伝子、ジベレリン代謝系遺伝子、子房肥大の引き金と考えられるシンク力の増加、それに伴う細胞分裂と細胞肥大に関する遺伝子の同定およびその発現の変化を調査した。

## 3. 研究の方法

(1) 植物生長調節剤による単為結果の誘導  
京都大学大学院農学研究科附属農場植栽の‘巨峰’を供試した。2008 年には満開時に 25ppm ジベレリン溶液（慣行栽培）またはオーキシンである 4-CPU の 15ppm 溶液を浸漬しよりした。2009 年にはジベレリンの濃度による影響を調査するため、12.5ppm、25ppm（慣行栽培）、50ppm のジベレリン溶液を果房に浸漬処理した。両年とも収穫期に各処理 10 果房ずつ採取し、完全種子数、不完全種子数、不受精胚珠数、無核果率を調査した。

(2) 分子生物学的手法およびバイオインフォマティクス的手法を用いた単為結果関連遺伝子の同定

GA 処理果実および無処理の果実から全 RNA を抽出した。GA 生合成に関係している遺伝子である GA20 酸化酵素（以後 GA20ox）および GA3 酸化酵素（以後 GA3ox）、GA の不活性化に関係している遺伝子である GA2 酸化酵素（以後 GA2ox）、オーキシンシグナル伝達系に関係している遺伝子である IAA9 に関して公開データベースから配列を収集し、それらの配列から CODEHOP

(<http://blocks.fhcr.org/codehop.html>) を用いて degenerate プライマーをプライマーを設計した。抽出した全 RNA から cDNA を合成し、設計したプライマーを用いた RT-PCR を行った。得られた PCR 産物を TA クローニングし、

各クローンについてシークエンスを行った。一方で、公開されているブドウの全ゲノム配列からデータベース上の既知の配列をクエリーとして Blast によるホモロジー検索を行い、上記 GA 代謝に関係している遺伝子、細胞分裂に関係している Cyclin の A1, B1, D1, D3, および糖代謝に関係しているスクロース合成酵素、中性インペルターゼ、細胞壁結合型酸性インペルターゼ、液胞型酸性インペルターゼのホモログを検索した。

### (3) 単為結果関連遺伝子の発現解析

(1) の実験で GA またはオーキシン処理した果実と無処理の果実を処理後 0, 6, 24 時間後および 2, 4, 7 日後にサンプリングした。採取した果実を液体窒素で凍結後、全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。(2) で同定した単為結果関連遺伝子からプライマーを設計し、RT-PCR によって発現を調査した。なお、対照として 18S rDNA および Actin 遺伝子を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 植物生長調節剤による単為結果の誘導

収穫果実の植物生長調節剤に種類が無核果率に及ぼす影響について調査した結果、GA 処理では 96% の果実が無核となったが、オーキシン処理では 53% と対照区の 38% よりもやや高い程度であった。しかし、オーキシン処理では不完全種子および不受精胚珠の数が有意に増加した。これらの結果から、GA は種子形成を阻害すると同時に果肉の肥大を促進することによって単為結果するが、オーキシンは不受精胚珠のような擬似的な種子様組織を形成することによりシンク力を高めて単為結果するのではないかと考えられた。また、ジベレリンによる単為結果果実とオーキシンによる単為結果果実に違いが見られたことから、両者の単為結果メカニズムが異なっている可能性が示唆された。

次に、GA の処理濃度が無核化率に及ぼす影響について調査した結果、慣行の GA25ppm 処理では 85% であったのに対し、50ppm 処理区では 84% と慣行との差は見られなかったが、12.5ppm 処理区では 58% であり、無処理の 32% と慣行処理の中間を示した。このことから、GA の処理濃度によってブドウ果実内の単為結果性発現の程度が異なることが示唆された。

### (2) 分子生物学的手法およびバイオインフォマティクス的手法を用いた単為結果関連遺伝子の同定

ホルモン関係遺伝子の発現を調査するため、GA 処理と無処理果実から RT-PCR により遺伝子を単離した。その結果、GA 生合成のキー酵素である GA20ox を 2 種類、GA3ox

を 1 種類単離できた。さらに、GA の不活性化を行う GA2ox を 3 種類単離できた。また、オーキシンシグナル伝達系の IAA9 も単離したが、これは既知の配列と同じであった。これらに加え、データベース検索から GA2ox をさらに 2 種類、GA20ox を 3 種類、GA3ox を 1 種類同定した。

GA 処理による各種遺伝子発現の変化を調査するため、単為結果に関係していると考えられる細胞分裂および糖代謝に関係している遺伝子をバイオインフォマティクスの手法によりブドウの全ゲノム配列およびそこから推定される転写産物の配列から探索した。その結果、細胞分裂に関係している Cyclin の A1 を 1 種類、B1 を 2 種類、D1 を 1 種類、D3 を 1 種類、および糖代謝に関係しているスクロース合成酵素を 5 種類、中性インペルターゼを 7 種類、細胞壁結合型酸性インペルターゼを 2 種類、液胞型酸性インペルターゼを 3 種類同定できた。これらの多くはデータベース上で機能未知とされている遺伝子であったが、全て各遺伝子特有のモチーフを有しており、他植物の同種の遺伝子と非常に高い相同性が見られたことから、それぞれの機能を有する遺伝子である可能性が高いと考えられた。

### (3) 単為結果関連遺伝子の発現解析

2008 年および 2009 年に GA またはオーキシン処理した果実を経時的にサンプリングし、遺伝子発現について調査した結果、サンプル間の発現の再現性が乏しく、遺伝子発現についての差を見出すことはできなかった。

この原因として、ジベレリン処理を行ったタイミングでの花の発育ステージが異なっていたためか、無核化率を果房ごとにみるとかなりばらついており、単為結果性の発現が房ごと、さらには房内の果粒間に異なっていた可能性が考えられ、このため遺伝子発現にも結果にばらつきが見られたのではないかと考えられた。

遺伝子発現については、今後 GA の処理時期およびサンプリング方法、RNA の抽出方法を再検討し、発現についても発現を定量化するためのリアルタイム PCR や次世代シーケンサーを用いた EST 解析を用いて再度調査を行う予定である。

### (4) まとめ

ジベレリンによる単為結果誘起機構解明のため、植物ホルモン処理による単為結果性の調査および単為結果に関係していると考えられる遺伝子の解析を行った。

その結果、ジベレリンとオーキシンでは単為結果程度や不完全種子数に違いが見られ、これらの単為結果誘起機構が異なっている可能性が示唆された。また、単為結果関連遺

伝子については、ジベレリン代謝系遺伝子，細胞分裂関連遺伝子，糖代謝関連遺伝子を分子生物学的手法およびバイオインフォマティクス的手法により新たに単離することができた．これらの遺伝子発現については明らかにすることはできなかったが，今後引き続き解析を進めていく予定である．

#### 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)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60335304