

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06030

研究課題名(和文)セイヨウナシの周縁キメラ分離カルスを利用した果皮の全面赤着色メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the red coloration mechanism of periclinal chimera of pear with red pericarp using callus isolated from solid type red skin pears

研究代表者

池田 和生 (IKEDA, Kazuo)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：80555269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：セイヨウナシの果皮は一般的に緑色だが、突然変異によって果皮が赤く着色する品種がある。これは果皮を形成する細胞のみが変異したキメラ個体といわれている。組織培養技術を用いて、赤着色果皮と非赤着色果皮それぞれからカルスを作成し、両者間で大きく発現が異なっている遺伝子を網羅的に解析した。その結果、アントシアニンの代謝に関わる遺伝子が非赤着色果皮と比較して赤着色果皮において強く発現していることが明らかとなり、着色変異にその遺伝子が関与している可能性が高いことが示唆された。また、カルスから植物体を再生させる培養条件を検討し、根を発生させる培養条件を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然変異によってもたらされたセイヨウナシの果皮全面が赤く着色する形質は遺伝しない形質のため、その特徴を持つ新しい品種を交配育種では育成できない。本研究の成果では、全面赤着色形質を遺伝する形質として示すセイヨウナシ個体を再生する組織培養条件の一部が明らかとなった。一方で、セイヨウナシの果皮が赤く着色する形質に関与している遺伝子がいくつか明らかとなり、今後はゲノム編集技術による赤着色形質に関する品種改良に利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：European pears generally have green skin, but some cultivars have red skin due to mutation. This is considered to be a chimeric plant in which only the cells forming the pericarp are mutated. Using tissue culture techniques, callus was regenerated from red-colored pericarp and non-red-colored pericarp, respectively, and comprehensively analyzed the genes whose expression was significantly different between the two. As a result, it was revealed that genes involved in anthocyanin metabolism were more strongly expressed in red-colored pericarp than in non-red-colored pericarp, suggesting that these genes are likely to be involved in color variation. In addition, we investigated the culture conditions for regenerating plants from callus, and clarified the culture conditions for the development of roots.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：セイヨウナシ 果皮色 組織培養 アントシアニン 不定根 カルス キメラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セイヨウナシの着色形質は半世紀以上前から遺伝学的見地から研究がおこなわれており、'スタークリムソン'をはじめとした全面着色形質は周縁キメラであることが要因で遺伝しない形質であるとされてきた (Dayton, 1966)。一方で近年、'スタークリムソン'の後代には赤着色を呈する個体が現れることが指摘され (石黒ら、2008)、Dayton の報告と矛盾した情報が得られている。これらの知見を踏まえ、着色に関与するアントシアニン合成メカニズム解明に向けて遺伝学的、分子生物学的視点から研究を進め、陽光面着色形質と全面着色形質は品種固有の特性であることを明らかにした。

一方、周縁キメラとされる全面着色形質は当代限りの形質で後代に遺伝しないため、交配育種の母本としては利用できない。この問題を解決するため申請者は、L-1 層のみの変異とされる全面着色系セイヨウナシ果実の果皮培養により着色形質と非着色形質の分離を試み、赤着色カルスを誘導することに成功した。しかしながら、この赤着色カルスからの再分化個体を得るには至っていない。周縁キメラの L-1 層由来の遺伝的バックグラウンドを持つ個体を得ることができれば、生産者が求めている良食味全面赤着色品種の開発の交配育種母本となり、セイヨウナシ生産者や消費者のニーズに応える成果となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先の研究で得られた赤着色カルスと非着色カルスを用いて次世代シーケンズによるゲノムおよびトランスクリプトーム解析を行い、着色また非着色の原因因子を特定すること、ならびにまだ得られていない L-1 層由来の赤着色カルスからの再分化個体を得ることである。これらの目的を達成することにより、セイヨウナシにおける全面着色形質のメカニズムを解明し、これまで不可能であった交雑育種による全面着色形質セイヨウナシ育種技術を開発することを目指す。

3. 研究の方法

(1) カルスからの再分化系の確立 セイヨウナシ 'リーガル・レッド・コムス' (以下 RRC) および 'ロージー・レッド・パートレット' (以下 RB) の幼果の外果皮を約 5 mm 角に調製し外植片とした。カルスの誘導については、TDZ $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ショ糖 3%、ゲランガム 0.4% を添加した改変 NN 培地に RRC の外植片を置床して誘導を行った。培養条件は 25 暗黒下で 1 カ月間、その後は 16 時間日長下とした。また、カルスを約 30 日毎に新しい培地へ継代した。得られたカルスを MS または 1/2MS 培地を基本培地とし、ショ糖 3%、ゲランガム 0.2%、NAA 1, 3 または $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ を添加した不定根誘導培地に置床した。培養条件は 22 暗黒下とし、約 30 日毎にカルスを同組成の培地へ継代した。培養開始後約 90 日にカルスの形態を観察し、目視で根の形成が確認できた個体を発根カルスとしてカルス発根率を算出した。また、生存したカルス数をもとにカルス生存率を調査した。果皮からの EC 誘導については、MS または NN 培地にショ糖 3%、ゲランガム 0.2% を添加した基本培地に、2,4-D 1, 3 または $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ を添加した EC 誘導培地を用いて行った。両品種の外植片をこの培地に置床し、23 日、16h 日長または暗黒下で培養を行った。培養開始後約 30 日に形成されたカルスの形態を調査し、粒状で白色または黄白色をしたカルスを EC 様カルスと定義して、EC 様カルス形成率を算出した。その後、カルスを基本培地に移植し 23 暗黒下で培養を行い、約 40 日毎にカルスを新しい培地に継代した。基本培地での培養開始後約 160 日に生存したカルス数および不定胚を形成したカルス数を調査し、カルス生存率および不定胚形成率を算出した。

(2) 果皮培養由来カルスおよび幼果皮のトランスクリプトーム解析 セイヨウナシ 'リーガル・レッド・コムス' の果皮培養由来カルスの着色カルス (RCR) および非着色カルス (RCG)、山形県園芸農業研究所植栽の 'リーガル・レッド・コムス' の果皮 (RC) および枝変わりの元品種である 'ドゥワイエネ・デュ・コムス' の幼果の果皮 (C) からそれぞれ total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq を行った。発現変動遺伝子 (DEG) の検出は、DESeq2 パッケージ (version 1.20.0) を用いた。Fold Change (マッピングされた 100 万フラグメントあたりのエクソン 1 キロベースあたりのフラグメントの割合) で、サンプル間の相対発現量比を示した。発現量比は、赤着色カルスおよび 'リーガル・レッド・コムス' の赤の表現型を示す 2 つのサンプルを Red、非着色カルスおよび 'ドゥワイエネ・デュ・コムス' の緑の表現型を示す 2 つのサンプルを Green と定義し、Red/Green で示した。Pyrus communis Bartlett DH Genome v2.0 を参照ゲノムとした GO 解析によりアノテーションを付与し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを参照してアントシアニン生合成に関わる遺伝子群を抽出してトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) カルスからの再分化系の確立 不定根誘導培養では培養開始後約90日の調査において、MS培地と比較して1/2MS培地を基本培地として用いた試験区の方が、全てのNAA濃度においてカルス生存率が優れていた。よって不定根誘導培用のカルスの生存には、培地の窒素濃度は低いほうが適していると考えられる。一方、NAA濃度がカルス生存率に及ぼす影響はほとんど見られなかった。EC誘導について、EC誘導培地での培養後に一部の外植片からはEC様カルスが形成された。EC様カルス形成率は、RRCではMS+3 mg・L⁻¹ 2,4-D, 暗黒下でカルスを誘導した試験区で最も高かった(第1表)。RBではNN+1 mg・L⁻¹ 2,4-D, 暗黒下またはMS+1および5 mg・L⁻¹ 2,4-D, 16h日長下で最も高い値を示した。また、基本培地での培養後に不定胚誘導は観察されなかったものの、一部のカルスからは発根が見られた。RRCではNN+1 mg・L⁻¹ 2,4-D, 暗黒下で誘導したカルスの発根率が最も高い値を示した(第2表)。RBでは発根率が1%とかなり低いものの、MS+1 mg・L⁻¹ 2,4-D, 暗黒下または、NN+3 mg・L⁻¹ 2,4-D, 16h日長下で誘導したカルスから発根が見られた。以上の結果より赤着色果皮からのEC様カルスの誘導および、カルスからの発根が可能な条件が明らかになった。

第1表 RRC 幼果の果皮培養におけるカルス誘導時の条件がEC様カルス形成率におよぼす影響

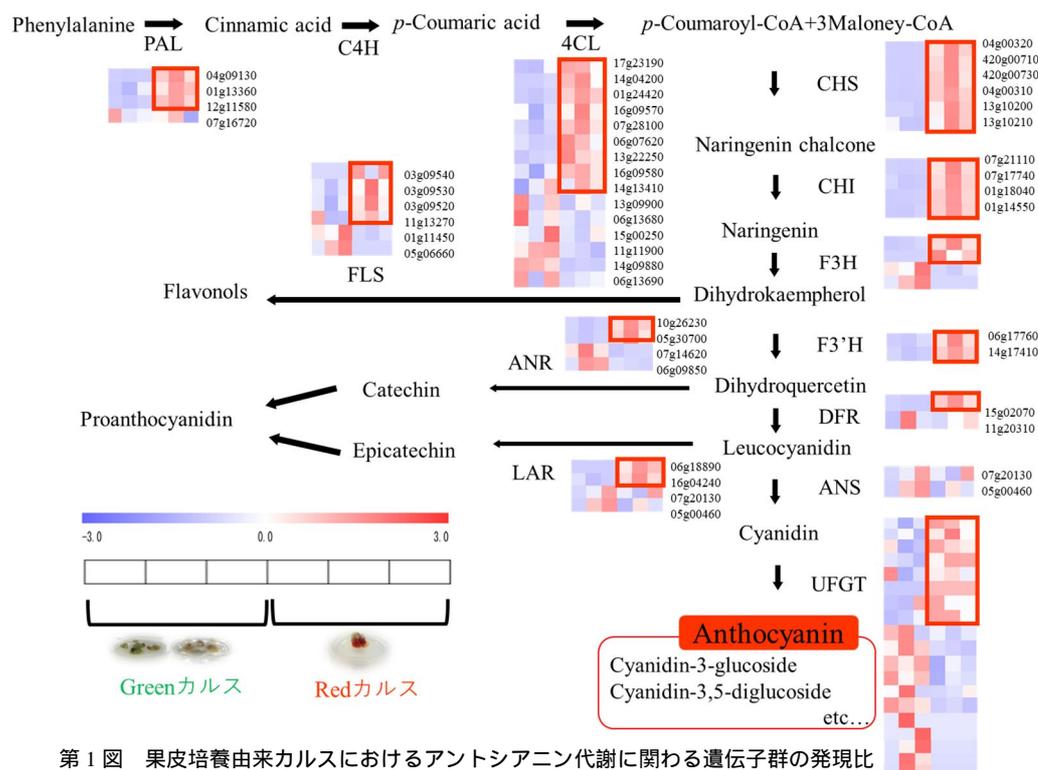
2,4-D濃度 (mg・L ⁻¹)	基本培地	日長	総カルス形成率(%)	EC様カルス形成率(%)
1	MS	16h	8	3
		暗黒下	3	0
	NN	16h	14	6
		暗黒下	30	0
3	MS	16h	10	1
		暗黒下	31	12
	NN	16h	7	0
		暗黒下	27	0
5	MS	16h	19	1
		暗黒下	18	1
	NN	16h	9	3
		暗黒下	17	2

第2表 RRC 幼果の果皮培養におけるカルス誘導時の条件がカルスの生存率と発根率におよぼす影響

2,4-D濃度 (mg・L ⁻¹)	基本培地	日長	生存率(%)	発根率(%)
1	MS	16h	6	0
		暗黒下	2	2
	NN	16h	11	6
		暗黒下	24	12
3	MS	16h	7	0
		暗黒下	24	0
	NN	16h	7	3
		暗黒下	23	1
5	MS	16h	15	0
		暗黒下	11	0
	NN	16h	2	0
		暗黒下	17	4

(2) 果皮培養由来カルスおよび幼果皮のトランスクリプトーム解析 全DEGから、

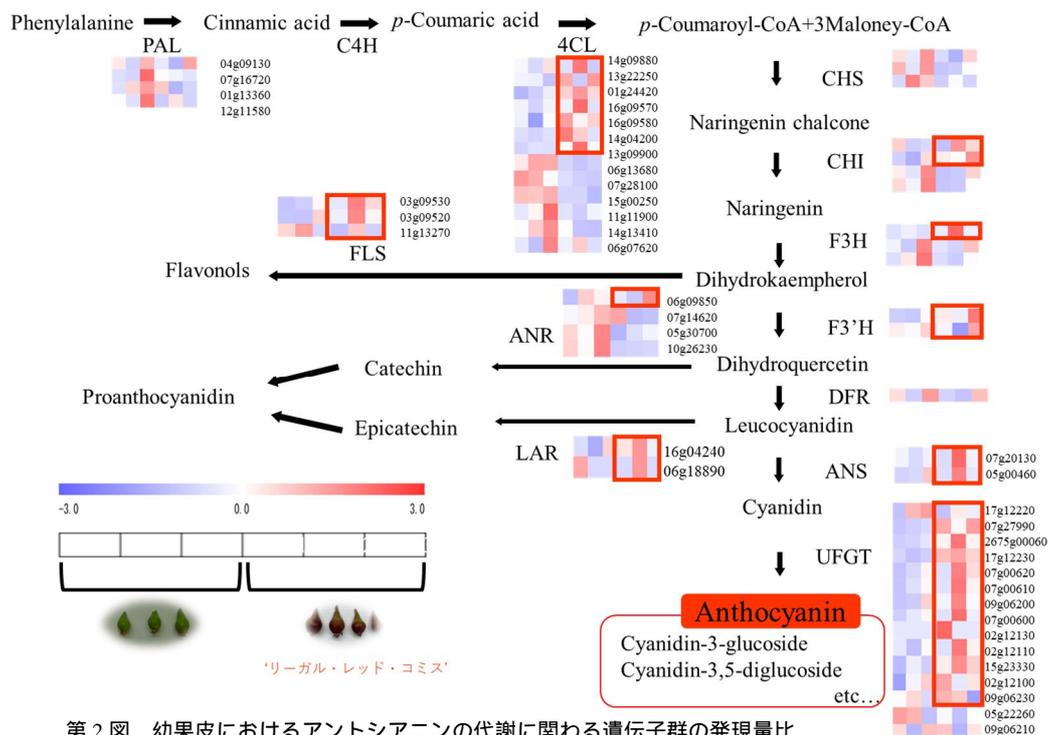
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) のデータベースのフェニルプロパノイド合成経路、フラボノイド合成経路、アントシアニン合成経路の3つの代謝マップを参照して、フェニルアラニンからアントシアニンまでのアントシアニン合成経路に関わる遺伝子を検索した結果、果皮培養由来カルスをサンプルに用いた、赤着色カルスおよび非着色カルス間のアントシアニン合成に関わるDEGを、72遺伝子同定した。その中で赤着色カルスにおいて発



第1図 果皮培養由来カルスにおけるアントシアニン代謝に関わる遺伝子群の発現比

現量が高かった遺伝子は43遺伝子あり、2倍以上の差があった遺伝子は29遺伝子であった。ま

た、赤着色カルスでアントシアニン生合成経路に関わる遺伝子の発現が全体的に高くなっており、特に CHS や CHI, F3'H で明らかに発現が高くなっていった (第 1 図)。次にセイヨウナシの幼果の果皮をサンプルに用いた、赤着色果皮および非着色果皮間でのアントシアニン生合成経路に関わる DEG は、全部で 61 遺伝子同定した。赤着色カルスの方で発現量が高かった遺伝子は 32 遺伝子であり、2 倍以上の差があった遺伝子は 29 遺伝子であった。果皮培養由来カルスに比べると発現量比に大きな差が見られなかったが、比較的赤着色果皮の方でアントシアニン生合成経路に関わる遺伝子の発現が高かった (第 2 図)。最も発現に差があった遺伝子として UFGT が絞り込まれ、赤着色果皮の方で 8.4 倍発現が高かった。さらに、RCR および RC で共通して発現が高くなっていった遺伝子の中に UFGT (07g27990, 09g06230) を同定した。糖転移酵素である UFGT は、アントシアニンの生合成の最後の過程に関与しており、赤い果皮の表現型においてこれらが重要な役割を果たしている可能性が示された。また、それ以外のアントシアニン代謝に関わる遺伝子の発現も全体的に高まっていることから、一連の遺伝子が赤着色形質に関与していると示唆された。



第 2 図 幼果皮におけるアントシアニンの代謝に関わる遺伝子群の発現量比

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 大橋知征, 三瀬範夏, 池田和生
2. 発表標題 赤着色系セイヨウナシの果皮培養における不定根再生および Embryogenic Callus の誘導
3. 学会等名 園芸学会令和5年度春季大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	牛島 幸一郎 (Ushijima Koichiro) (20379720)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	

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