

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05582

研究課題名（和文）トランスクリプトーム解析によるパッションフルーツ成熟前落果の発生機構解明

研究課題名（英文）Transcriptome Analysis for the Elucidation of the Mechanism of Premature Fruit Drop in Passion Fruit

研究代表者

篠原 卓（SHINOHARA, TAKASHI）

東京農業大学・国際食料情報学部・教授

研究者番号：90459719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 800,000円

研究成果の概要（和文）：パッションフルーツにおいて未成熟のまま果実が落ちる成熟前落果は生産上の問題である。この成熟前落果が発生するメカニズムを明らかにするために研究を行った。

成熟前落果が発生する時期と発生しない時期の離層部で発現する遺伝子を網羅的に測定・比較するRNA-Seq解析を実施して、成熟前落果に関連する物質の選抜・特定を試みた。その結果、パッションフルーツ成熟期間中のエチレン生成の増加により、細胞壁構成物質の減少や細胞壁構造機能の低下がみられ、離層細胞が崩壊するため落果が生じると考えられた。エチレンに対する感受性は品種間差異があり、ごく微量のエチレン生成で落果する品種は成熟前落果しやすいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の熱帯果樹研究は、地球温暖化に対応するためマンゴー、パッションフルーツ、チェリモヤ、レイシなど熱帯・亜熱帯果樹の栽培普及の必要性から、栽培法の改善についての研究が多くなされてきた。その中で、開花直後の「落花」を抑え着果安定を図るために、施設内温度と花器の発達異常、花粉発芽率、雌しべ受容性など解剖学的、生殖生理学的研究がなされ世界の果樹研究に貢献してきた。

本研究は、分子生物学的手法によって成熟前落果に関わる物質を特定し、それらの物質への感受性の品種間差異を示した点で学術的意義がある。また、これらの知見は低酸度で高品質なパッションフルーツ生産に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Premature fruit drop (PmFD) is a problem in passion fruit production. Research to elucidate the mechanism of PmFD was conducted.

RNA-Seq analysis was employed to comprehensively determine and compare the amount of gene expression in the abscission zone during the periods when PmFD occurred and when PmFD did not occur.

The results suggest that an increase in ethylene production during passion fruit maturation leads to a decrease in cell wall constituents and cell wall structural function, resulting in the disintegration of cells at the abscission zone, which in turn causes FD. Moreover, cultivar difference in the susceptibility to ethylene existed, and the cultivar responding to a very little amount of ethylene is prone to PmFD.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：パッションフルーツ 熱帯果樹 生理的落果 RNA-Seq解析 エチレン オーキシン 細胞壁

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果樹は多年生植物であるため作期や産地移動が困難で、他の作物と比べ気候変動に脆弱である。我が国の果樹生産における地球温暖化適応策の一つとして、熱帯・亜熱帯果樹の導入が挙げられる。国産のパッションフルーツは、高品質な生食用果実の生産を志向し生産量も増加しているが、高酸度のまま落果することが課題となっている。

パッションフルーツの落果について、着果負担などの栽培管理に加え栽培環境など落果に影響を及ぼす要因に関する報告はあるが、落果メカニズムは未だ不明瞭である。他果樹の落果についての先行研究では、生理的落果にはエチレンが影響し、また、離層部における主要な細胞壁分解酵素はセルラーゼであるとされてきた。しかし、リンゴやカキの早期落果に関する研究においては、エチレンが落果の主要因ではないという事例も報告されている。オーキシンについて、脱離部分における濃度勾配の変化がリンゴの落果に影響を及ぼしたとする報告もある。さらに、他の植物ホルモンや、幾つかの細胞壁分解酵素、離層細胞に蓄積する様々な物質が関与しているといわれている。

2. 研究の目的

パッションフルーツにおいて未成熟のまま落果する現象を「成熟前落果」とし、成熟前落果関連物質を特定し発生機構を解明することを研究課題とした。

3. 研究の方法

生物がある特定の状況下で発現している遺伝子 (mRNA) を次世代シーケンサーを用いることで網羅的にトランスクリプトーム解析する手法の一つとして RNA-Seq 解析がある。この RNA-Seq 解析を用いることによって、パッションフルーツの成熟前落果が発生する時期と発生しない時期の離層部の遺伝子発現量を比較し、成熟前落果関連物質を選抜・特定する解析を行った。

また、落果特性の異なる品種を用いた栽培試験を行い、落果や生理的な状態測定の他、RNA-Seq 解析で選抜した成熟前落果関連物質の遺伝子発現量の増減を RT-PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) RNA-Seq 解析による成熟前落果関連遺伝子の選抜

パッションフルーツ「サマークイーン(SQ)」を栽培(東京都世田谷区・温室)し、受粉後日数(DAP)の異なる果実及び離層部を採取した。DAP60 は成熟前落果が開始する時期で、果実は DAP65 で完熟する。DAP50 は、果実は未熟で落果しない時期である。この成熟段階の異なる時期の離層から RNA を抽出し、RNA-Seq 解析に供試した。その結果、約 48,000 遺伝子の配列が、パッションフルーツ離層部 RNA-Seq 解析により検出され、そのうち 1,300 遺伝子が、果実成熟段階が進むにつれて有意に発現量が変動した(図1)。

その 1,300 遺伝子について、GO(Gene Ontology) enrichment 解析を実施した結果、「細胞構造や組織の変化・分解」及び「ストレスや刺激を伝達する植物ホルモン」に関わる遺伝子群が成熟前落果に関連する生理現象であることが示された。そこで、更にこれらの遺伝子群について主にモデル植物であるシロイヌナズナの遺伝情報からアノテーションしたところ、「エチレン」、「オーキシン」、「細胞構造機能関連物質」が落果関連遺伝子として抽出された。

これらの情報をもとに Heat map を作製したところ、エチレン関連遺伝子は DAP50 から 65 にかけて徐々に発現増加する、オーキシン関連遺伝子は主にオーキシン応答タンパク質遺伝子が DAP50 から 65 にかけて発現減少する傾向が示された。更に、細胞構造機能に関わる遺伝子は、細胞壁構成物質の 1 つであるセルロースに加え、主に細胞壁構造に関与する物質であるアラビノガラクトタン関連遺伝子が DAP50 から 65 にかけて発現減少傾向を示した。同じく細胞壁構造に関わる主要な物質であるキシログルカン、これを構成するキシロースの分解機能を持つキシロシダーゼ遺伝子の発現増加がみられた。植物ホルモン関連遺伝子に加え、細胞構造に関わるいくつかの物質が、離層細胞における機能抑制や構造変化、及び脱離に直接的に関与する可能性が示唆された。これらの RNA-Seq 解析で選抜した成熟前落果関連物質の遺伝子のうち、12 個の遺伝子

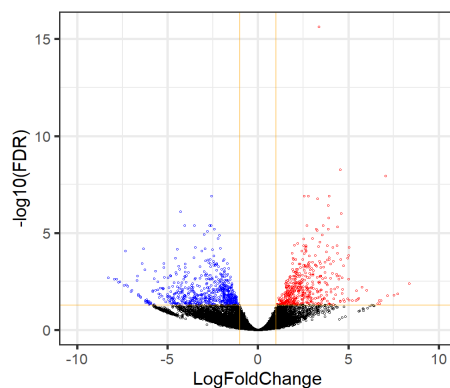


図1(左) PF「SQ」離層部において受粉後(DAP)50から65日間の遺伝子発現量の変動。

FDR: 2(右側赤色部分)は有意な発現増加、
-2(左側青色部分)は発現減少を示す。

PF:パッションフルーツ,SQ:サマークイーン

について発現量の増減を RT-PCR により確認した (図 2)。

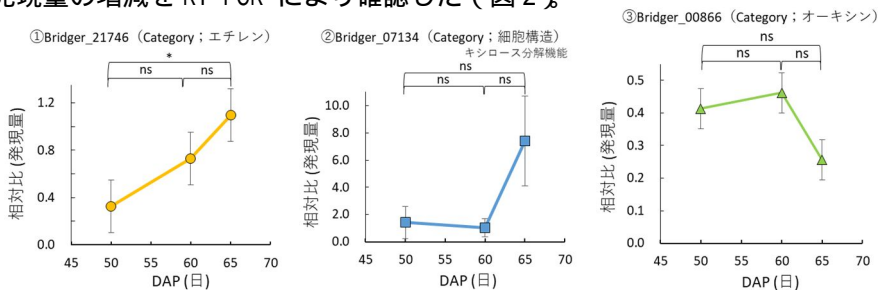


図 2 PF'SQ'における RNA-Seq 解析から選抜した遺伝子のうち 3 遺伝子(エチレン・細胞構造・関連遺伝子)に対するバリデーション実験。

エラーバー=SE. *, ns: 括弧で示した DAP2 間比較の t 検定において、5%水準で有意,有意差なしを示す。

PF:パッションフルーツ,SQ:サマーキーン

(2) 落果特性の品種間差異を利用した成熟前落果関連物質の検証

落果時期のピークが異なる SQ 及び 'ルビースター'(RS)'の 2 品種を栽培し、選抜した 12 個の遺伝子を用いて、RT-PCR により同様の遺伝子発現傾向が確認できるか検証した。加えて、2 品種の果実における果実品質・落果特性の品種間差異を検討した。

その結果、SQ では微量なエチレン生成にもかかわらず DAP60 以降に落果率が急激に増加した一方、RS は落果率が 10%と低かった DAP65 頃にエチレン放出速度が増加し、2 品種の落果特性の違いがみられた (図 3)。エチレン及び細胞構造関連遺伝子は発現増加がみられたが、オーキシン関連遺伝子は SQ 及び RS とともに発現減少傾向を示さない遺伝子がみられた (図 4)。また、12 遺伝子全てにおいて SQ と比較し RS の発現量が 10~100 倍高かった。

以上より、エチレン及び細胞構造関連遺伝子の発現増加傾向は確認できたものの、オーキシン関連遺伝子の発現減少はほとんどみられず、落果に対するオーキシンの機能を明確にすることはできなかった。

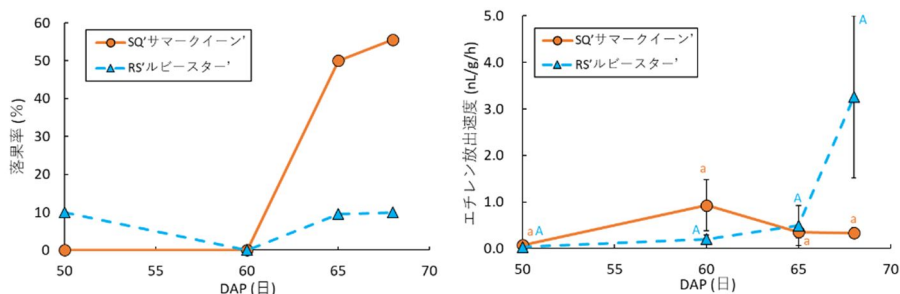


図 3 2 品種の PF 果実における落果率(上)及びエチレン放出速度(下)の経時的变化。

エラーバー=SE. 異なるアルファベットは、SQ ('サマーキーン'):オレンジ(小文字)、RS ('ルビースター'):水色(大文字)について 5%水準で有意差があることを示す。PF:パッションフルーツ。

(3) パッションフルーツ成熟前落果の発生機構についての考察

パッションフルーツ離層部における RNA-Seq 解析から、成熟前落果にはエチレンの増加、オーキシンの減少、及び細胞構造関連遺伝子の増減が関与すると推察された。これらの成熟前落果関連物質における遺伝子発現量と落果特性の品種間比較から、エチレンに対する感受性の違いが成熟前落果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

これらの結果から、パッションフルーツ成熟期間中のエチレン増加により、細胞壁構成物質の減少や細胞壁構造機能の低下がみられ、離層細胞が崩壊することで落果が生じると考えられた。

(4) パッションフルーツにおける減圧貯蔵の可能性

成熟前落果の発生機構を研究する過程で、成熟前落果した果実を追熟することで生食用果実とできないかという課題が生じた。成熟前落果した果実は、果汁酸度が高いので減酸するのに長期間を要するが、この追熟期間中に水分ロスがおきて果実重量の減少と果皮にシワが寄ることで外観品質が著しく損なわれる。

果実からの水分ロスを抑えながら追熟する方法を検討するため、果実を減圧下に置く実験を実施した。つまり、パッションフルーツの果実をチャンパーにいれ、チャンパー内を減圧 (40kPa) すると、果実からの水分ロスが減り果皮にシワが寄らないことがわかった。これに低温 (6) 条件を加えるとエチレン放出速度を有意に低下させることも明らかになった。これらの知見は、

成熟前落果した果実を生食用として利用できる可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 William Viera, Takashi Shinohara, Atsushi Sanada, Naoki Terada, Lenin Ron and Kaihei Koshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Seed Germination and Seedling Growth of Yellow and Purple Passion Fruit Genotypes Cultivated in Ecuador	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae8080754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西澤 南・篠原 卓・田中 啓介・宮浦 理恵
2. 発表標題 パッションフルーツの成熟前落果発生機構に関する研究 果実へのオーキシンおよびエチレン生成阻害剤散布が落果に及ぼす影響
3. 学会等名 日本熱帯農業学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西澤南、篠原卓、宮浦理恵
2. 発表標題 パッションフルーツにの成熟前落果発生機構に関する研究III -果実からのエチレン放出と落果の関係-
3. 学会等名 日本熱帯農業学会
4. 発表年 2021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
---------	---------