

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780021

研究課題名（和文） 次世代シーケンシングによるブドウの単為結果関連遺伝子の探索

研究課題名（英文） Searching for parthenocarpic-related genes in grape by next-generation sequencing technology

研究代表者

羽生 剛（HABU TSUYOSHI）

京都大学・大学院農学研究科・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のため、新しい技術である次世代シーケンシングを用いて種なし化（単為結果）に関係している遺伝子を探索した。ジベレリン処理前後の果実で発現している遺伝子を網羅的に解析した結果、ジベレリン処理によってヒートショックタンパク質をコードする遺伝子の発現が顕著に減少しており、この遺伝子が種無し化に関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the mechanism of gibberellic acid induced parthenocarpy, I searched for possible parthenocarpy-related genes by next-generation sequencing technology. By large-scale sequencing analyses in non-treated and GA-treated grape fruits, the expression of heat shock protein (HSP) genes was significantly reduced after GA treatment, indicating that the HSPs may be related to the GA-induced parthenocarpy in grape.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：園芸学・造園学

キーワード：果樹園芸・ブドウ・EST 解析・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い。

2. 研究の目的

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(GA)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。また、ブドウはストレプトマイシン (SM) 処理によっても単為結果することが知られている。しかし、これら植物生長調節剤処理による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い。

GA 処理による単為結果の誘起はブドウだけではなくアウトウのような核果類やニホンナシのような仁果類でも報告されており、SM 処理ではブンタンのような柑橘類で無核化が報告されている。植物生長調節剤処理による単為結果誘起の作用機構を明らかにすることが出来ればこれら果樹類の無核化栽培および無核性品種育成に有用な知見が得られるものと考えられる。そこで、本研究では植物生長調節剤処理によるブドウの単為結果誘起のメカニズムに関して分子生物学的アプローチからその解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

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。‘巨峰’の満開日、満開1日後、満開2日後、満開4日後、満開7日後に無処理およびGA25ppm 処理果実を採取し、果実10粒の大きさを測定した。その後、RNA抽出に供するため液体窒素で凍結後-80℃で保存した。また、収穫時に無処理およびGA処理果実の無核果率および種子数を測定した。

(2) シークエンスおよびアセンブル

‘巨峰’の満開日 (0d)、満開1日後 (1d)

および2日後 (2d) の果実から全 RNA を抽出した。mRNA の精製後、cDNA を合成し、GS FLX Titanium によるシーケンシングを行った。得られた Read 配列は、Seqclean を用いて PolyA 配列等を除去した後、RepeatMasker を用いて反復配列をマスクし、自作の Perl スクリプトにより低 QV 領域のマスク等の整形を行った後、Trinity によるアセンブルを行った。

(3) アノテーション

アセンブルにより得られた配列 (contig) を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の非冗長タンパク質データベース (nr) およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のタンパク質データベース (TAIR10) に対して BLASTx 検索した。BLAST 検索において、nr については e-value を $1e^{-3}$ で TAIR10 については $1e^{-5}$ で検索した。nr のアノテーションに基づき Blast2GO を用いて Gene Ontology (GO) Term を各 Contig にアサインした。

(4) 発現変動遺伝子の抽出

Contig に対して EST のマッピングを行い、マッピングされた EST 数によって発現の多少を評価した。マッピングには BWA を用い、得られたカウントデータの統計処理には統計解析ソフト R のパッケージである DESeq を用いた。多重検定の補正をした補正 P 値が 0.05 以下、EST 数が倍以上異なる遺伝子を候補遺伝子として選抜した。その後、全 Contig に対する候補遺伝子の GO Enrichment 解析を行った。また、これらの候補遺伝子配列からプライマーを作成し、一部遺伝子については Real-Time PCR または半定量 RT-PCR により発現を調査した。

(5) ヒートショックプロテインの系統解析

全 Contig の中からヒートショックプロテインと考えられるものを、nr に対するアノテーション結果をもとにして選抜した。選抜した Contig について、シロイヌナズナをモデルとして ESTscan によってアミノ酸配列を推定し、その配列を用いて最尤法により系統樹を作成した。

4. 研究成果

(1) GA 処理後の果実サイズの変化

GA 処理による単為結果誘起に関する遺伝子発現変動時期を調査するため、満開日の GA 処理以降における果実（子房）のサイズを測定した。その結果、GA 処理1日後の段階で無処理との間に有意な差がみられたことから、GA 処理による遺伝子発現の変動が1日後には既に現れていると考えられた。また、無処理と GA 処理果で無核果率および種子数を測定した結果、GA 処理果では無核果実率が

94.8%, 平均種子数が 0.06 個であり, 一方無処理果では 7.7%, 1.34 個であり, 本処理によって慣行通り単為結果を誘起できていた.

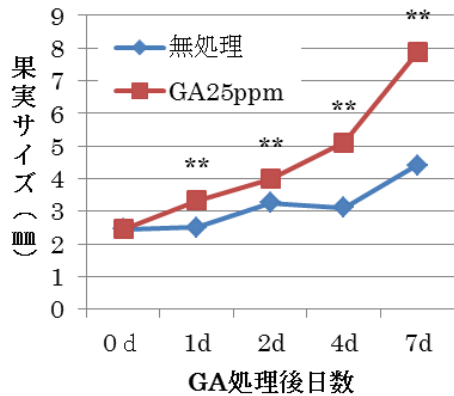


図1 GA 処理による果実サイズの変化

(2) シークエンスおよびアノテーション

果実サイズの調査から処理 1 日後には既に遺伝子発現に変化が見られると考えられたので, 処理前および処理 1 日後, 2 日後のサンプルから RNA を抽出し, GS GLS Titanium によるシークエンスを行った. シークエンスの結果, 0d のサンプルから 223,212 個, 1d から 226,900 個, 2d から 163,278 個の合計 625,001 個のリードが得られた. これらのリードに関して PolyA や低 QV 領域のトリム, short read の削除等の pre-processing を行った後 Trinity によるアセンブルを行った結果, Contig が 19,208 個得られた. これら Contig 配列の長さは 200bp~1282 bases の間で, 平均長は 452 bases であった. nr および TAIR10 に対する Blastx の結果, ヒットする配列が存在した Contig はそれぞれ, 16,432 個 (85.5%), 11,299 個 (58.8%) であり, いずれかの配列にヒットした Contig は 17,968 個 (93.5%) であった. 全 Contig における GO の Biological Process の結果は図 2 の通りであり, metabolism が最も多く, 続いて biosynthesis, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism となっていた. これら以外にも多くのカテゴリーが見られ, GA 処理前後で幅広い機能の遺伝子が発現していることが明らかとなった. しかし, これらの GO 分布から単為結果との関連性を見出すことが困難であったため, 次に GA 処理前後で発現変動している遺伝子の抽出を試みた.

(3) 発現変動遺伝子の抽出

全 Contig 配列を参照とし, Read のマッピングを行った結果, 1 つの contig につき平均 99.1 個のリードがマッピングされた. これら

の中で, 補正 P 値 0.05 以下で, 倍以上の変動をしていた contig は 563 個であり, このうち, 0d から 1d で発現が増加した Contig は 251 個, 減少した contig は 312 個であった. これら発現変動遺伝子群に関して GO Enrichment 解析を行ったものの統計的に有意に増加あるいは減少している GO Term は発現増加・減少ともに見られず, 発現変動遺伝子群に特徴的な機能遺伝子群は見出せなかった.

GO 解析からは特徴的な機能遺伝子群を見出すことはできなかったが, 遺伝子発現の減少程度が顕著な遺伝子の上位には熱ショックタンパク質 (HSP) が多く含まれていた. これらの HSP は GA 処理前には高発現していたが, 処理 1 日後にはほぼ発現が見られなくなっており, この発現変動は Real-Time PCR でも同様の結果が得られた. これらのことから, HSP の発現減少が単為結果の誘起に関与している可能性が示唆された. しかし, 全 Contig には発現変動しない HSP も多く含まれ

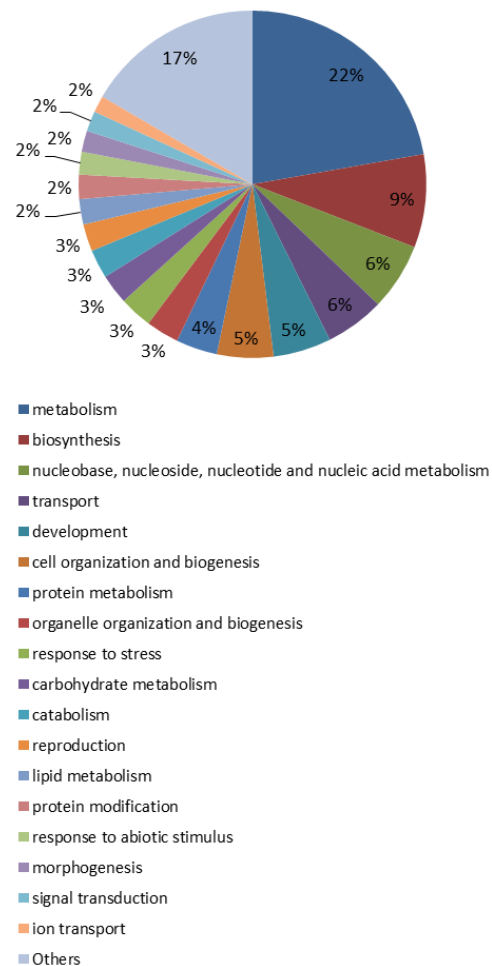


図2 全 Contig における GO 分布 (Biological Process)

ており、今回発現が変動した HSP どのようなものかを調査するため、次に HSP の系統解析を行った。

(4) HSP の系統解析

HSP と考えられるアノテーションをもつ遺伝子を全 Contig から抽出した結果、計 106 個の配列が得られた。これらの中で発現変動遺伝子にカテゴリ化されたものは 20 個であり、残り 86 個では有意な発現変動が見られなかった。これらの配列からアミノ酸配列を推定し、最尤法による系統樹を作成したが、発現変動していた 20 個の配列は別々のクラスターに分かれ、特徴的なクラスターを形成しなかった。したがって、配列の相同性と発現変動との関連を見出すことはできなかった。しかしながら、一部 HSP の発現減少は顕著であり、これらが単為結果に関係している可能性は十分に考えられる。これまで HSP が単為結果に関係しているという報告はなく、単為結果と HSP の関係を明らかにできれば単為結果誘起機構に関する新たな知見が得られるだけでなく、HSP がもつストレス耐性とは別の一面に関しても明らかにできる可能性があると思われる。

(5) その他の発現変動遺伝子

上記 HSP 以外にもいくつか特徴的な発現変動遺伝子が得られている。例えば、発現が増加している遺伝子群には phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS) といったフラボノイド合成系の遺伝子が含まれていた。近年、トマトでは CHS のサイレンシングにより単為結果が誘導されると報告されているが、本研究では CHS などフラボノイド合成系の発現は上昇しており、逆の結果となっている。これらの遺伝子発現上昇が単為結果とどのように関係しているかについては今後のさらなる研究が必要である。これら以外の遺伝子についても単為結果に関係している可能性は十分に考えられるため、今後順次解析を行っていく予定である。

(6) まとめ

ジベレリン処理前後の果実(子房)を用いて、ジベレリンによって誘導される単為結果に関連している可能性のある候補遺伝子を次世代シーケンシングにより網羅的に探索した。

シーケンシングの結果、625,001 個のリードが得られ、それらをアセンブルし、19,208 個の Contig を得た。これらの Contig には幅広い機能の遺伝子が含まれており、その中でも発現の変化が顕著なものにヒートショック

タンパク質(HSP)が多く含まれていた。HSP はジベレリン処理1日後には顕著に減少しており、この遺伝子発現の変化と単為結果との間に何らかの関係がある可能性が示唆された。今後、これら HSP をさらに調査するとともに他の発現変動遺伝子についても順次調査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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽生 剛 (HABU TSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60335304

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし