

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580058

研究課題名(和文)植物ホルモン動態解明に基づくカンキツ単為結果性発現の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of citrus parthenocarpy based on the elucidation of phytohormone dynamics

研究代表者

古藤田 信博(Kotoda, Nobuhiro)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：50355426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウンシュウミカン、清見、ヒュウガナツ、クレメンチンのカンキツ類4品種について調査を行い、各4品種の単為結果性の程度を確認した。特にウンシュウミカンにおいては、高い単為結果性(種なし性)を有するのみならず、子房の初期成長速度が他の品種よりも著しく大きかった。子房のRNAを抽出し、マイクロアレイにより品種間の発現差異を調査したところ、ジベレリン(GA)生合成遺伝子について発現差異のあることが認められた。そこで、ウンシュウミカンのGA生合成遺伝子(GA20酸化酵素遺伝子、GA2酸化酵素遺伝子、GA3酸化酵素遺伝子)の単離と機能解析を行い、成長促進あるいは抑制活性のある酵素遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the degree of parthenocarpy of four citrus cultivars, Satsuma mandarin, Kiyomi, Hyuganatsu, and clementine. Especially, Satsuma mandarin had higher rate of development of ovaries at the early stage besides strong parthenocarpy. Microarray analysis suggested that there was difference in gene expression of gibberellin (GA)-biosynthetic pathway genes between parthenocarpy and non-parthenocarpy cultivars. Therefore, GA 20-, GA 2-, and GA 3-oxidase genes of Satsuma mandarin were isolated and subjected to functional analysis, resulting in the identification of enzymatic genes that have an activity of growth promotion or retardation.

研究分野：園芸科学

キーワード：カンキツ ウンシュウミカン 単為結果性 ジベレリン

1. 研究開始当初の背景

一般に単為結果は、受精を伴わずに種なし果実を形成する結実様式であるが、外部刺激がなくても果実が形成される自動的単為結果と受粉等の外部刺激によって果実が形成される他動的単為結果とに分けられる。これに対して、受精を必要とするがその後の種子形成異常により種なしになるタイプを偽単為結果と呼んで区別している(田尾, 2007)。カンキツ類では比較的多くの品種が単為結果性を有すると考えられているが、無条件に種なし果を結実する絶対的単為結果性をもつ品種は限られている。これは、たとえ単為結果性をもっている、正常な受粉・受精能力があれば種子が形成されてしまうからである。特に、カンキツ類は自家和合性を有する品種も多く、種なし果実の生産には単為結果性と雄性/雌性不稔性との組み合わせが必要となる(Vardi et al., 2008)。日本原産のウンシュウミカン、高い単為結果性と雄性/雌性不稔性によって絶対的単為結果性を発現している希な品種である(Iwamasa, 1966)。その後代である果樹研究所育成の「清見」(「宮川早生」x「トビ」x「タカツ」)や「不知火」(清見 x 中野3号ポンカン)も高い単為結果性を維持している。

カンキツ類の単為結果・果実肥大性については比較的早くから研究がなされており、Monselise ら (1986)は開花後10日にオーキシシン(AUX)濃度がピークになり、外生ジベレリン(GA)は果実肥大や落果防止に効果があることを報告している。高単為結果性のウンシュウミカンと低単為結果性のクレメンティンとの子房におけるGA含量の比較から、ウンシュウミカンの開花期子房は活性型であるGA₁の濃度が高いことが示された(Talon et al., 1990, 1992)。一方、外生AUXの添加はいずれの品種の結実性も高めなかった。さらに高単為結果性のフィノクシムティンにおいても内生GA濃度が高かったことから(Garcia-Papi et al., 1984)、カンキツではAUXよりむしろGAが果実肥大に必須であると考えられている。単為結果性の遺伝様式はあまりよく分かっていないが、ウンシュウミカンの場合、2つの優性な補足遺伝子があることが仮定されている(Vardi et al., 2008)。近年、単為結果性の発現に関わっていると考えられているジベレリン合成の鍵遺伝子であるGA20酸化酵素遺伝子(GA20ox)の単離および機能解析が開始されたが(Fagoaga et al., 2007, Huerta et al., 2009)、その分子機構に関してはほとんど情報がない。最近、Distefano et al. (2011)は、単為結果性カンキツ(クレメンティン)では、受精の有無と果実肥大の開始とはリンクしていないことを報告しており興味深い。

2. 研究の目的

現在、果樹作物において国内外で最も多く経済栽培されているカンキツ類では、商品価

値の高い単為結果性(種なし性)の付与が重要形質の1つとして注目されている。単為結果性の長所は、食べやすさのみならず、受粉樹が不要であること、異常気象による受粉環境悪化時でも安定的な果実生産が可能であることなどが挙げられる。カンキツ類の中ではウンシュウミカンが高い単為結果性を有しているが、その基礎となる単為結果性・果実肥大性の分子機構の詳細は不明である。本実施課題では、マイクロアレイによる俯瞰的な解析手法、*in silico*解析による候補遺伝子アプローチ、候補遺伝子の時空間的発現解析、植物ホルモン分析、遺伝子機能解析、による結果を統合することにより、カンキツ類の単為結果性メカニズムの解明に迫る。

3. 研究の方法

本研究課題では、高い単為結果性(種なし性)を有する「ウンシュウミカン」および「清見」に着目し、果実中の植物ホルモン動態やそれと関連する遺伝子の網羅的発現解析から、単為結果性と強く関連する遺伝子を推定する。また、「ウンシュウミカン」および「清見」と低単為結果性の「ヒュウガナツ」および「クレメンティン」の果実(子房)および胚の発達を組織形態学的に観察し、単為結果性の発現および植物ホルモン濃度・遺伝子発現との関連を明らかにする。研究の柱を組織形態学的解析、植物ホルモン定量に基づく品種比較、遺伝子発現解析に基づく品種比較の3つに絞り、とについては研究代表者が責任をもって遂行し、については2人の研究分担者と協力しつつ研究を進める。

4. 研究成果

(1) カンキツ4品種の子房発達の比較

はじめに、カンキツ4品種の花蕾の大きさ(長さ)と子房発達(重さ)との関係について調査を行った。その結果、つぼみの大きさと子房の重さは、子房発達初期段階ではほぼ直線的な正の相関があり、特にウンシュウミカンではその傾きが大きかった(図1)。

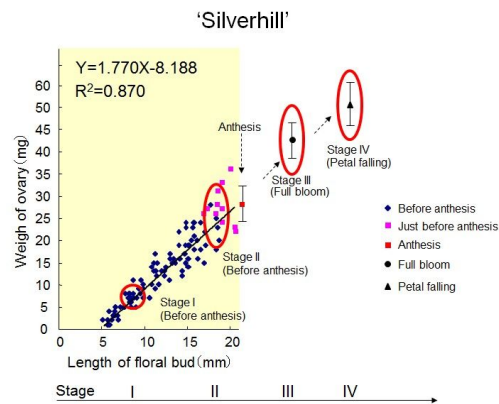


図1. ウンシュウミカンの子房発達(2012年)

また各品種の発達段階を補正して子房重の比較をした場合でも、ウンシュウミカンの子房重増加率が最も大きかった。

(2) マイクロアレイによる解析

単為結果性品種(ウンシュウミカン、清見)と非単為結果性品種(ヒュウガナツ、クレメンチン)から開花前、開花期、開花後の子房を採取し、カンキツ44K マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。その結果、GA2酸化酵素遺伝子等のジベレリン生合成関連遺伝子に発現差異が認められた。

(3) ウンシュウミカン GA20 酸化酵素遺伝子の機能解析

シロイヌナズナのジベレリン代謝関連遺伝子情報をもとにカンキツの EST, cDNA およびゲノム配列から, *GA20-oxidase* 遺伝子と相同な配列を持つオースログを推定した。その結果をもとにウンシュウミカン‘宮川早生’の BAC ライブラリからクローンをスクリーニングし, 該当配列を明らかにした。得られた配列中の目的遺伝子を含む領域を推定してウンシュウミカン‘シルバーヒル’から cDNA を単離し, その構造および発現を解析した。サザンブロット解析には, ウンシュウミカンの他, カンキツ類 11 品種を供試した。さらに, 単離・構造解析した 2 種類の *GA20ox* 様遺伝子 *CuGA20ox1* および *CuGA20ox2* に対して植物形質転換用発現ベクターを構築し, シロイヌナズナに導入するとともに, その形質転換体の表現型を解析した。

GA20ox 様遺伝子の cDNA を‘シルバーヒル’から 2 種類単離し, *CuGA20ox1* および *CuGA20ox2* とした。これらの配列は既に報告のある *CcGA20ox1* および *CcGA20ox1* (カンキツ台木の Carrizo citrange 由来) とほぼ一致した。サザンブロット解析により, *CuGA20ox1* は 1 コピー, *CuGA20ox2* は 1 もしくは 2 コピーがゲノム上に存在していることが示された。また, ウンシュウミカン以外のカンキツ品種 11 種類においても上記 2 種類の *GA20ox* 様遺伝子の存在が示された。特に *CuGA20ox1* は品種横断的にほぼ同様のバンドパターンを示し, 進化的に強く保存されていることが示唆された。*CuGA20ox1* は栄養組織全般に発現が見られたのに対し, *CuGA20ox2* は花蕾に発現が限定されていた。このことからこの 2 つの遺伝子は機能的に分化したか, あるいは元々異なる機能を有していた可能性もある。次に, これらの 2 種類の遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナを作出したところ, コントロールに対していずれも抽台時期の早期化および花序の徒長が観察された(図 2)。表現型に著しい変化が生じた系統では, 導入遺伝子の発現が高い傾向にあった。これは, *CuGA20ox1* あるいは *CuGA20ox2* の過剰発現がシロイヌナズナのジベレリン生合成に影響を与えた結果であると考えられる。しかしながら, いずれの組換え系統も開花時期については有意な差は見られなかった。

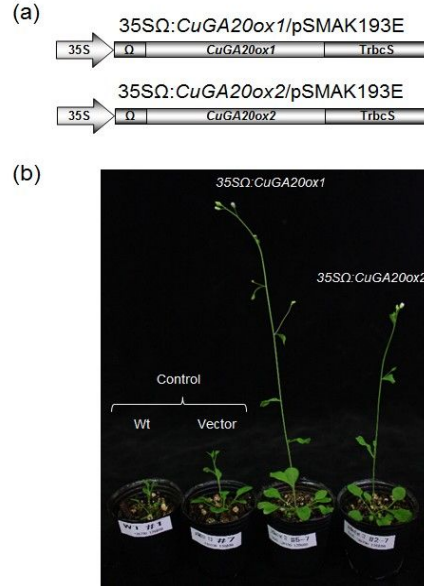


図 2 *CuGA20ox1/2* の形質転換ベクター (a) と形質転換体 (b)。左から右へ: wt, empty vector, 35S:*CuGA20ox1*, 35S:*CuGA20ox1*。

(4) GA20酸化酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナのジベレリン濃度変化

CuGA20ox1 と *CuGA20ox2* の発現は, 早期非水酸化経路上の GA_{24} と GA_{34} の産生に有意に影響を与えた。同様に早期水酸化経路上の GA_{19} 、 GA_{29} 及び GA_8 の産生にも影響を与えた。これらの結果を考慮すると, *CuGA20ox1* 及び/あるいは *CuGA20ox2* は, 早期水酸化経路及び早期非水酸化経路のどちらも活性化して活性型ジベレリンを増加させ, 形質転換シロイヌナズナの花序伸長を引き起こしたと考えられる。

(5) ウンシュウミカン GA2 酸化酵素遺伝子の機能解析

現在, 果樹作物において国内外で最も多く経済栽培されているカンキツ類では, 商品価値の高い単為結果性(種なし性)の付与が重要な育種目標の 1 つとして注目されている。単為結果性の長所は, 食べやすさのみならず, 受粉樹が不要であること, 異常気象による受粉環境悪化時でも安定的な果実生産が可能であることなどが挙げられる。カンキツ類の中では日本原産のウンシュウミカンが高い単為結果性を有しているが, その基礎となる単為結果性・果実肥大性の分子機構は不明である。カンキツ類の結実性については古くから研究がなされており, ウンシュウミカンの後代である果樹研究所育成の‘清見’(‘宮川早生’ x ‘トロピタ’) や ‘不知火’(‘清見’ x 中野 3 号ポンカン) は高い単為結果性を維持していることが知られている。また一部のカンキツでは, ジベレリン散布による果実の無核化が観察されており, 単為結果性とジベレリンとの関連が指摘されている。そこで,

ウンシュウミカンのジベレリン生合成経路上にある種々の遺伝子の機能を明らかにし、単為結果性と内生ジベレリンとの関係を解明するため、本研究では活性型ジベレリンを不活性化する GA2 酸化酵素遺伝子 (GA2ox) に着目して機能解析を行う。

シロイヌナズナのジベレリン代謝関連遺伝子情報をもとにカンキツの EST およびゲノム配列から、GA2ox 遺伝子と相同な配列を持つホモログを推定した。その結果をもとにウンシュウミカン '宮川早生' の BAC ライブラリからクローンをスクリーニングし、該当配列を明らかにした。得られた配列に基づきウンシュウミカン 'シルバーヒル' から cDNA を単離し、その構造および発現を解析した。サザンブロット解析には、カンキツ類 13 品種を供試した。さらに、単離・構造解析した 4 種類の GA2ox 様遺伝子に対して植物形質転換用ベクターを構築し、シロイヌナズナに導入するとともに、その形質転換体の表現型を解析した。

GA2ox 様遺伝子のゲノム領域および cDNA を 'シルバーヒル' から 4 種類単離し、対応するシロイヌナズナ遺伝子の配列に基づき暫定的に *CuGA2ox/GA3ox-like*、*CuGA2ox4-like*、*CuGA2ox2/ox3-like*、および *CuGA2ox8-like* とした。サザンブロット解析により、*CuGA2ox/GA3ox-like* と *CuGA2ox2/ox3-like* は単一コピー、*CuGA2ox4-like* と *CuGA2ox8-like* は 1 もしくは 2 コピーがゲノム上に存在していることが示唆された。*CuGA2ox/GA3ox-like* は種子特異的に、*CuGA2ox4-like* は果実に、*CuGA2ox2/ox3-like* は幼若性組織に、*CuGA2ox8-like* は多様な組織に発現が見られた。これら 4 種類の遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナを作成したところ、コントロールに対していずれも抽台時期の遅延化および植物体の生長抑制が観察された (図 3、右 4 系統)。

CuGA2ox/GA3ox-like は構造上 GA2ox 様機能を有するか GA3ox 様機能を有するか判別がつかなかったが、組換シロイヌナズナの表現型から少なくとも GA2ox 機能を有することが示唆された。4 つの遺伝子のうち *CuGA2ox2/ox3-like* は相対的に発現が低く、ウンシュウミカンにおける GA2ox 機能への寄与は低いものと思われた。*CuGA2ox8-like* は、抽台時期および開花時期を著しく遅延させ、茎の伸長も極端に抑制したことから、強い GA2ox 機能を有していることが示唆された。

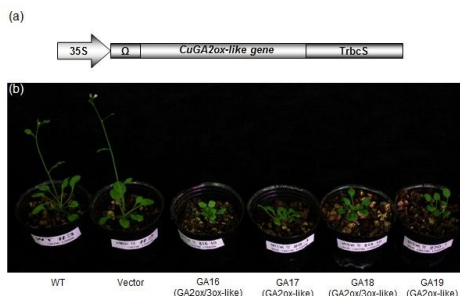


図 3 ウンシュウミカン GA2ox/3ox を導入したシロイヌナズナ (右 4 系統) の表現型。

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 2 件)

古藤田信博、矢野加奈子、松尾哲、本多一郎、藤井浩、島田武彦、遠藤朋子、清水徳朗、ウンシュウミカン由来ジベレリン 20 酸化酵素遺伝子の機能解析、園芸学研究、査読なし、12(別 1)、2013、p86.

古藤田信博、矢野加奈子、松尾哲、本多一郎、藤井浩、島田武彦、遠藤朋子、清水徳朗、ウンシュウミカン由来ジベレリン 2 酸化酵素遺伝子の機能解析、育種学研究、査読なし、15(別 1)、2013、p103.

〔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：
出願年月日：
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

古藤田 信博 (KOTODA, Nobuhiro)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：50355426

(2)研究分担者

松尾 哲 (MATSUO, Satoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・野菜茶業研究所・研究員

研究者番号：20414675

本多 一郎 (HONDA, Ichiro)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：00241852