

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780036

研究課題名(和文) ナシ果実の極劣悪果肉障害「みつ症」多発系統・気候条件に特徴的な遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of whole gene expression characteristic of watercore in Japanese pear

## 研究代表者

西谷 千佳子 (NISHITANI, Chikako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門品種育成研究領域・主任研究員

研究者番号：10370553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンナシのみつ症は、果実成熟の進行に伴い果肉の褐変などの症状を呈する生理障害である。みつ症の発症を遺伝子レベルで理解するためには、みつ症を起こす再現性の良い実験材料を作り、収穫時に確実にみつ症を発症する果実とみつ症を確実に発症しない果実を比較することで、発症前から収穫時までの経時的な遺伝子発現解析を網羅的に行うことが必要である。

本課題では、ニホンナシ品種「豊水」x「豊月」のF1系統群から見出した、みつ症発症系統と非発症系統についてマイクロアレイ解析を行い、インベルターゼ、メタロチオネインなどの遺伝子群がみつ症関連遺伝子の候補と同定された。

研究成果の概要(英文)：Watercore is a physiological disorder develops in the pear fruit showing a watery translucent area in the flesh while on the tree and lead to the loss of commercial value. In order to search the genes related to watercore, we used the susceptible and non-susceptible F1 sib strains originated from 'Hosui' x 'Hogetsu'. The susceptible strain developed watercore in all of the fruit every year while no watercore was found in the non-sustainable one even when they were overmatured. By the comparison of gene expression patterns between both lines using immature fruits before showing the disorder, several genes such as invertase are identified as candidates of watercore-related genes.

研究分野：トランスクリプトーム

キーワード：ニホンナシ マイクロアレイ みつ症

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシ、リンゴなどのバラ科果樹の果肉は、しばしば「みつ症」と呼ばれる生理障害を発症する。これらは同じ「みつ症」という名称であるが、症状は異なる。リンゴでは果肉が透明化して見た目が綺麗で食味も良好であるため、生理障害であるにも拘わらず「みつりんご」として称され、市場でもてはやされている。一方、ナシでは果肉が水浸状になり褐変して食味が低下し、出荷不能となるため一般市民が目にすることはまれであるが、農業災害として補助金が付く自治体もあるほどのポピュラーな生理障害である。現在のところ「みつ症」が特に深刻なのは西南日本で、温暖化による気温上昇でその被害が北上することが懸念されている。このため、ナシでは「みつ症」を発生しない品種の育成や、「みつ症」軽減策の開発が急務となっている。

ナシの「みつ症」は、生理学的解析からは過熟現象とされ、これまでにエチレン合成阻害剤処理による軽減策が検討されてきた。しかし、エチレンは果実成熟にも必須であるため、果実成熟を損なうことなく「みつ症」のみを抑えることはできていない。また、「みつ症」発生後の果肉と健全果肉との2群の遺伝子発現比較(サブトラクション法)により、「みつ症」の果肉に特異的に発現している遺伝子が単離されているが、「みつ症」発生の全容は明らかになっていない(井上ら、特願2008-74813)。「みつ症」発生を引き起こす再現性の良い実験系を確立し、収穫時に「みつ症」を発生しないであろう果実対「みつ症」を発生しないであろう果実で、発症前から収穫時までの経時的な遺伝子発現比較を網羅的に行うことが必要である。

2. 研究の目的

「みつ症」は、多数の遺伝子が関与する難関形質とされるが、その遺伝子数も遺伝子の実体も明らかとはなっていない。本研究は、申請者が作成した世界初のナシマイクロアレイを用いて、遺伝子発現解析を行い、「みつ症」に関連する遺伝子群を網羅的に抽出することを目的とする。この成果により「みつ症」を発生しない品種育成のためのDNAマーカーの開発、「みつ症」軽減策の開発に寄与する。

3. 研究の方法

ニホンナシ品種「豊水」x「豊月」のF1系統群から見いだした、「みつ症」の「感受性系統17-26」と「非感受性系統17-3」は、毎年全ての果実でみつ症を発症、またはみつ症を全く発症しない、再現性の良い兄弟系統である(金、井上ら、2006)(図1)。

感受性系統17-26,非感受性系統17-3について、2012年、2013年の2か年にわたり、未成熟時(成熟9週前)から成熟時(9月中旬)までの発達段階の果実の果肉を約3週間ごとにサンプリングし、みつ症の有無、果肉重、果肉硬度、糖含量、酸度などを測定した。

マイクロアレイ解析サンプルとして、これらの果肉部位を切り分けてただちに液体窒素で凍結し、RNAを抽出した。みつ症を発症したサンプルは、みつ症部位と健全部位に分けてサンプリングした。マイクロアレイ解析には、ニホンナシ「豊水」などから収集した発現遺伝子の配列情報、チュウゴクナシゲノムからの予測遺伝子の公開配列情報を元に設計したカスタムマイクロアレイ(Agilent, 25,172遺伝子の解析が可能、図2)を用い、2012,2013両年にわたり発現様式に差のある遺伝子をsubio(Subio)により検索した。

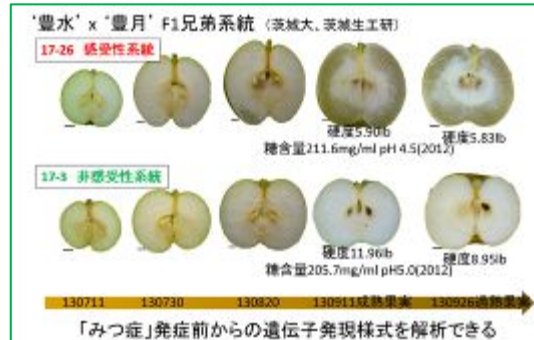


図1 みつ症の「感受性系統17-26」と「非感受性系統17-3」



図2 マイクロアレイ概要

4. 研究成果

感受性系統17-26,非感受性系統17-3について、みつ症の発症を観察した結果、感受性系統では成熟3週間前から果肉の一部にみつ症を発症する果実が見られ、成熟時には全ての果肉の大部分にみつ症が観察された。一方、非感受性系統は過熟果実となった9月下旬でもみつ症の発症はみられなかった。

果実の糖組成を経時的に解析した結果、感受性系統では非感受性系統と比較して健全部位、みつ症部位ともにソルビトールとフルクトースが多い一方でスクロースは少なく、その差異は8月下旬以降に出始めることが明らかとなった(図3)。

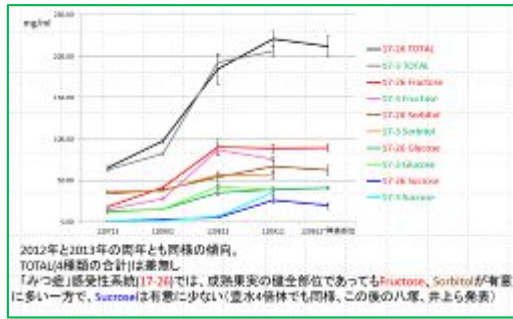


図3 糖含量

マイクロアレイ解析により、両系統での遺伝子発現様式を比較した。感受性系統で高発現する遺伝子として、beta-fructofuranosidase (invertase) の2遺伝子(図4)などがみられた。この結果は感受性系統のみつ症部位ではスクロース量が低下することと一致するものである。そのほか、アブシジン酸関連の遺伝子も感受性系統での高発現が見られた(図5)。その他、感受性系統で高発現する遺伝子として、metallothionein 様タンパク質、chitinase などがみられた。また、感受性系統で低発現の遺伝子として、輸送関連の遺伝子が多数みられた(図6)。metallothionein は、他のみつ症感受性系統でもみつ症発症直前に高発現することが知られており(櫻井・井上ら, 2011), これらの遺伝子群がみつ症発症に関連する可能性が高い。今後はこれらの結果をリアルタイム PCR により検証するとともに、より多様な品種・系統を用いてみつ症に関連する遺伝子群の絞り込みを行う予定である。

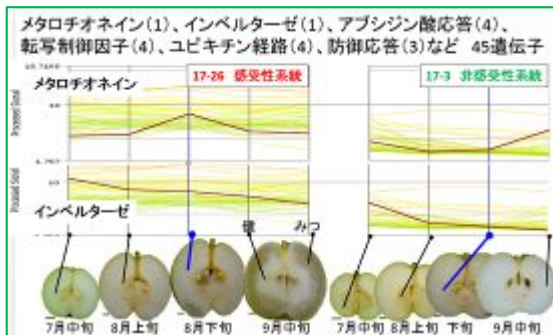


図4 メタロチオネイン、インベルターゼなどの発現様式

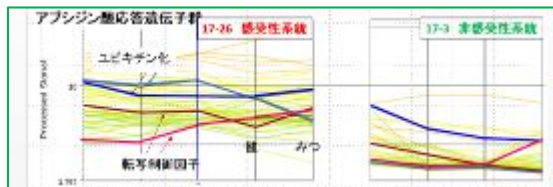


図5 アブシジン酸関連遺伝子群の発現様式 サンプルの順番は図4と同じである。

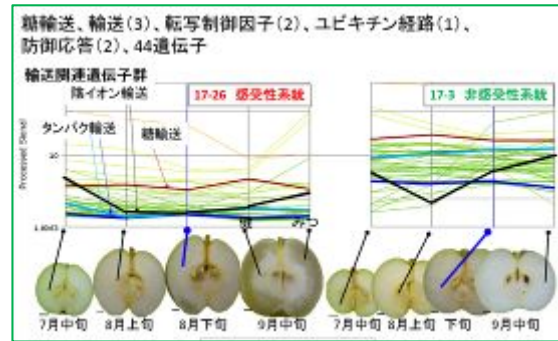


図6 輸送関連遺伝子群の発現様式

以上、本研究では、毎年、すべての果実に「みつ症」を発症する感受性系統と非感受性系統について、遺伝子発現様式をマイクロアレイで解析した。

その結果、メタロチオネイン、インベルターゼが関与する可能性が高いことが改めて示された。その他、アブシジン酸のシグナル伝達系、輸送系、転写制御系、分解系の遺伝子など、「みつ症」関連遺伝子群の候補がとれつつある。

#### <引用文献>

金 鐘潤、郷内武、館野智昭、野村修子、霞正一、原弘道、井上栄一、ニホンナシ果実の「みつ症」発生機構に関する研究(第1報)「豊水」を交配親とする兄弟系統間におけるみつ症感受性の変異、園芸学会雑誌 75・別1、2006、54

櫻井洋平、江幡麻衣、郷内武、高津康正、霞正一、本間貴司、東尾久雄、井上栄一、ニホンナシ果実の「みつ症」発生機構に関する研究(第5報)ニホンナシ「豊水」みつ症組織に特異的なメタロチオネイン様タンパク質遺伝子の解析、園芸学研究 10・別1、2011、72

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

西谷千佳子、井上栄一、奈島賢児、尾形夏海、喜多晃一、郷内武、石井亮二、中村幸乃、小林正明、矢野健太郎、山本俊哉

ニホンナシの果肉障害「みつ症」感受性系統に特徴的な遺伝子のマイクロアレイ解析  
園芸学会 平成28年3月27日 東京農業大学(神奈川県・厚木市)

井上栄一、八塚拓、野口尚美、尾形夏海、西谷千佳子、喜多晃一、郷内武、石井亮二、山本俊哉、東尾久雄

ニホンナシ果実の「みつ症」発生機構に関する研究(第6報)「豊水」染色体倍加個の果実における高いみつ症感受性  
園芸学会 平成28年3月27日 東京農業大学(神奈川県・厚木市)

八塚拓、野口尚美、尾形夏海、喜多晃一、

郷内武、石井亮二、西谷千佳子、山本俊哉、東尾久雄、井上栄一

ニホンナシ果実の「みつ症」発生機構に関する研究(第7報)倍数性の異なるニホンナシ「豊水」の果実におけるみつ症の発症と成熟・糖代謝に関わる遺伝子の関係

園芸学会 平成28年3月27日東京農業大学(神奈川県・厚木市)

西谷千佳子、井上栄一、高津康正、吉田稔之、喜多晃一、尾形夏海、郷内武、寺上伸吾、國久美由紀、山本俊哉

ナシ果実の果肉障害「みつ症」激発系統に特徴的な遺伝子の網羅的解析

果樹バイテク研究会 平成25年10月24日 福山労働会館みやび(広島県・福山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西谷 千佳子(NISHITANI, Chikako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門品種育成研究領域・主任研究員

研究者番号：10370553