

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 奈 島 賢 児

論 文 題 目

セイヨウナシの成長時期別果実および

枝変わり変異体のトランスクリプトーム解析

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	白 武	勝 裕
委 員	名古屋大学教授	松 本	省 吾
委 員	名古屋大学教授	森	仁 志
委 員	名古屋大学教授	中 園	幹 生
委 員	名古屋大学助教	太 田 垣	駿 吾

マイクロアレイ解析や次世代シーケンス解析といったトランスクリプトーム解析から、重要遺伝子を同定する試みはこれまでに数多く行われて、多くの成果が得られている。セイヨウナシにおいてもトランスクリプトーム解析を行うことで様々な重要遺伝子を同定できると期待されるが、これまでにセイヨウナシでトランスクリプトーム解析が実施された例は少ない。本研究では、セイヨウナシ果肉の成長ステージを追ったトランスクリプトーム解析と、大果形質を示すセイヨウナシ枝変わり変異体とその原品種のトランスクリプトーム解析から、それぞれ果実の重要形質に関与し得る候補遺伝子を探索した。

まず、セイヨウナシ果肉の成長ステージを追ったトランスクリプトーム解析から、果実の重要形質に関与し得る候補遺伝子を探索した。セイヨウナシ‘La France’の開花 30 日後、68 日後、97 日後、132 日後、162 日後（収穫期）および追熟期の果肉および開花 1 週間前と開花日の花蕾より単離した花床について、約 1 万のニホンナシ EST を基に設計されたカスタムオリゴアレイを用いた遺伝子発現プロファイルを作成した。開花 1 週間前および開花当日の花床を、レーザーマイクロダイセクション法を用いて単離し、単離した花床から抽出した RNA を用いた。作成した遺伝子発現プロファイル中から、特徴的な発現パターンを示す遺伝子を抽出するために、K-means 法によるクラスタリングを行い、発現パターン別に 20 個のクラスターに分類した。これらクラスターについて Gene ontology 遺伝子機能分類に従ったエンリッチメント解析を行ったところ、複数のクラスターで、特定機能の遺伝子が高い頻度で存在していた。開花 30 日後に特異的に高い発現を示すクラスターでは、リグニン合成系の遺伝子が顕著に多いことが確認され、これらの遺伝子はナシの石細胞の形成に関与している可能性が考えられた。一方、追熟期に特異的に発現が上昇するクラスターには、エチレン合成に関与する遺伝子や細胞壁分解に関与する遺伝子など、多くの既知の追熟誘導性遺伝子が分類された。収穫期から追熟期にかけて、劇的に誘導される遺伝子に着目したところ、これまでに追熟で誘導されることが報告されていない遺伝子を見出すことができた。成長ステージ別の遺伝子発現プロファイル中より、種々の特徴的な発現パターンを示す遺伝子を見出すことができた。

次に、大果形質を示すセイヨウナシ枝変わり変異体とその原品種のトランスクリプトーム解析から、果実の重要形質に関与し得る候補遺伝子を探索した。本研究では山形県の農家で発見されたセイヨウナシ‘La France’の枝変わり変異体で、通常枝の果実に比べ約 1.6 倍の大きさの果実をつけるにも関わらず、糖度が変わらない枝変わり大果変異セイヨウナシ Giant La France (GLaF)に着目した。GLaF は‘La France’に比べ

て細胞数には違いは見出されないが、果肉の細胞サイズが大きいことが報告されている。GLaF では果肉においてゲノム倍加が観察されることが報告されており、果肉の細胞サイズの増加の原因だと考えられるが、GLaF におけるゲノム倍加のメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、まず、GLaF についてマイクロアレイ解析を実施した。開花 1 週間前の花蕾からレーザーマイクロダイセクション法を用いて単離した花床から採取した RNA について、前述のニホンナシカスタムオリゴアレイを用いて‘La France’と GLaF を比較したところ、‘La France’を基準とした時 GLaF において有意に 1.5 倍以上の発現を示した発現上昇遺伝子が 277 個、有意に 2/3 倍以下の発現を示した発現減少遺伝子が 120 個存在した。有意な発現変動を示した遺伝子についてエンリッチメント解析を行ったところ、発現上昇遺伝子群においては、核局在タンパク質をコードする遺伝子およびサイトスケルトン局在タンパク質をコードする遺伝子が有意に高頻度で存在しているという結果が得られた。ゲノム DNA の複製は核内で起こり、また細胞分裂を起こすにはサイトスケルトンの働きが必須であることから、これらカテゴリに属する遺伝子が、発現変動を示した遺伝子群において高い頻度で存在していることと、GLaF におけるゲノム倍加に関わりがあることが予想された。またこれらカテゴリに分類された遺伝子中には、ホモログ遺伝子がエンドリデュプ리케이션に関与することが報告されている *cyclin-A2-3* (NFR3_21_11), *CDT1-like protein* (NFR2_11_50), *26S proteasome regulatory subunit 4 homolog A* (NFR1_18_90)や、ホモログ遺伝子がエンドミトシスを引き起こす *cyclin-B1-4* (NFR3_07_31)が含まれていた。これらの遺伝子は、GLaF において観察されるゲノム倍加に関与する可能性が考えられた。

以上のように、マイクロアレイ解析によって大果変異セイヨウナシの形質に関与する重要遺伝子候補を見出すことができたが、用いたニホンナシカスタムオリゴアレイはニホンナシの各部位から採取した RNA から得た約 1 万クローンに由来するものであるため、4 万から 5 万個程度存在すると推定されるセイヨウナシの遺伝子の大半について解析できていない。このためさらに網羅性を高めた遺伝子発現解析が必要であるため、新奇なセイヨウナシの遺伝子配列を取得することと GLaF において発現量が増加している遺伝子を選抜することを目的に、前述のマイクロアレイ解析と同じ開花 1 週間前の花蕾から単離した花床から抽出した RNA を用い、pyrosequencing 法による大規模 EST 配列解析を行った。その結果、‘La France’から 636,801 個、GLaF から 529,874 個のリードが得られた。得られたリードについて低品質領域のトリミングを行った後 *de novo* アセンブルを行った結果、49,181 個のコンティグおよび 78,431 個のシングレットが得られた。遺伝子発現を GLaF と‘La France’で比較するため、各コンティグを構成するシークエンスリード数を比較したところ、GLaF において有意に発現が増加しているコンティグが 61 個、減少しているコンティグが 43 個存在した。各

コンティグ配列をシロイヌナズナタンパク質配列に対して **BLAST** を行い、最も高い相同性を示したシロイヌナズナタンパク質に対応付けた。有意かつ顕著な発現変動を示した 26 個のコンティグについてリアルタイム PCR により遺伝子発現量の確認を行ったところ、18 個については **pyrosequencing** によるリード数による比較と同様の発現傾向が見られたが、ゲノム倍加に関与することが報告されている遺伝子に関連付けられるコンティグは存在しなかった。

またエンドリデュプリケーションやエンドマイトーシスといったゲノム倍加は、細胞周期の変化によって発生することが知られていることから、細胞周期調節タンパク質は機能的には **GLaF** におけるゲノム倍加に関与する可能性が考えられる。細胞周期調節タンパク質に対応付けられたコンティグがどの程度 **pyrosequencing** により得られたのかを調べたところ、69 個のコンティグが得られていた。この中にはエンドリデュプリケーションへの移行において中心的な働きをすることが知られている A タイプサイクリン依存性キナーゼ (**CDKA**)、B タイプサイクリン依存性キナーゼ (**CDKB**)、サイクリン依存性キナーゼインヒビターである **Kip-related protein (KRP)** および **SIM Related (SMR)** に対応付けられたコンティグに加え、エンドマイトーシスを発生させるとの報告がある **B1 タイプサイクリン (CYCB1)** および **B2 タイプサイクリン依存性キナーゼ (CDKB2)** に対応付けられたコンティグも含まれていた。これらコンティグに対応するセイヨウナシ遺伝子が **GLaF** におけるゲノム倍加に関与している可能性は十分に考えられる。

以上のように、本研究ではセイヨウナシの果実成長を追ったマイクロアレイ解析と、枝変わり大果変異セイヨウナシのマイクロアレイ解析および次世代シーケンサーを用いた大規模 **EST** 配列解読を実施し、セイヨウナシ果実のトランスクリプトームデータの収集、果実の成長や追熟に関わる重要遺伝子の特定、大果変異に関わる細胞周期関連遺伝子の特定を行った。これらの結果は、セイヨウナシをはじめとするバラ科果樹研究や果実の成長メカニズムの解明に大きく貢献するものであり、審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査に合格と判定した。