



栽培環境におけるイチゴメジャーアレルゲンFra a 1 の生理的応答

石橋, 美咲

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7526号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007526>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 _____ 石橋 美咲 _____

専攻・講座 _____ 資源生命科学専攻 応用植物学講座 _____

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

栽培環境におけるイチゴメジャーアレルゲン Fra a 1 の生理的応答

指導教員 _____ 宇野 雄一 _____

イチゴ (*Fragaria × ananassa*) は、口腔アレルギー症状 (Oral Allergy Syndrome: OAS) を引き起こすアレルゲンを含んでいる。メジャーアレルゲンは Fra a 1 タンパク質であり、シラカバ花粉のアレルゲン Bet v 1 のオルソログである。これらは、生物/非生物ストレスや植物ホルモンに応答して発現が変化する病害応答性タンパク質の PR-10 ファミリーに属する。そのため、イチゴアレルゲンの低減化にあたっては、Fra a 1 の生理的機能を理解した上で果実における発現を適切に制御する必要がある。*F. × ananassa* には複数の Fra a 1 アイソフォームが存在しているが、生理的な応答性が解明されていないため、植物体において重要となるターゲットの取捨選択ができない。本研究では Fra a 1 の特性を把握するために、特に果実の成熟過程におけるオーキシンと、栽培時期によって変動する環境条件の応答性を調査した。

はじめに *Fra a 1* パラログの情報を整理し、植物体におけるメジャーパラログの推定を行った。*F. × ananassa* のゲノムデータベースから新たに 15 種類の推定アミノ酸配列が見つかり、合計 39 種類の遺伝子によってコードされる 30 種類の Fra a 1 タンパク質が存在すると推定された。その情報をもとに、イチゴ器官における遺伝子およびタンパク質の発現解析を行った。RNA シーケンスに適応する Total RNA の抽出条件を検討し、器官別に方法を最適化した。それらを用いて転写量を比較したところ、*Fra a 1.01* および *Fra a 1.02* が果実で主に発現しているパラログであることが明らかになった。一方イムノブロットで検出されたタンパク質は、栄養器官・花・果実にわたる広範囲にかけて、*Fra a 1.01* が他のアイソフォームより顕著に蓄積しており、特に果托で多く蓄積していた。*Fra a 1.02* は葉・根・果托特異的に蓄積していた。各器官における mRNA の発現量とタンパク質の蓄積量は相関せず、*Fra a 1* の用量反応に基づくアレルゲン性は、タンパク質の蓄積量で評価する必要があることが示唆された。さらに、組換え *Fra a 1* タンパク質とヒト IgE の反応性においては、*Fra a 1.01* がシラカバ陽性ヒト IgE に対して最も強く反応した。植物体におけるタンパク質の局在性と蓄積量から、最も主要なパラログがコードするタンパク質は *Fra a 1.01* であり、次いで *Fra a 1.02*、その他の *Fra a 1* であることが示唆された。

(氏名: 石橋美咲 NO. 2)

次に、収穫前後のイチゴ果実に外生オーキシンおよびオーキシン阻害剤を投与し、果実が成熟する期間の *Fra a 1* 遺伝子およびタンパク質の発現量を比較した。収穫前の緑色果実から、あらかじめ瘦果を除去して合成オーキシン 1-naphthaleneacetic acid (NAA) を投与した場合、果実の着色と *Fra a 1* タンパク質の蓄積が誘導された。一方、収穫前後の果実にそのままオーキシンを投与しても、*Fra a 1* の発現は転写・翻訳ともに変化しなかった。また、オーキシン阻害剤は果実の成熟を遅延させ、それによって *Fra a 1* 遺伝子の発現が制御された。これらのことから、*Fra a 1* 遺伝子の発現や *Fra a 1* タンパク質の蓄積に対しては、オーキシンが直接的に制御するのではなく、果実の成熟過程が間接的に影響を及ぼしていることが示唆された。特に、*Fra a 1.01* の転写発現は果実の成熟とともに減少し、*Fra a 1.02* は増加したことから、パラログごとに異なる制御を受けていることが明らかになった。

さらに、いくつかの白色系統を含む品種を用いて、*Fra a 1* 遺伝子や *Fra a 1* タンパク質の発現における品種間差と季節変動性を調査した。同一環境で栽培した果実において、冬季から春季を通して *Fra a 1* の品種間差は確認されなかった。果実色は *Fra a 1* に基づくアレルギー性の指標とはならず、品種間差を調査する際は同一環境の果実を用いるべきであることが示された。*Fra a 1.01* タンパク質の蓄積量は春季に比べて冬季で高かったため、冬季に *Fra a 1* の発現を制御している環境要因を知るために、太陽光と気温に着目した。遮光処理は *Fra a 1.01* タンパク質の蓄積量に影響しなかった。日内変動性については、1 月に限り、低温状態にある夜間から早朝にかけて収穫したときに、昼間に収穫した果実と比べて *Fra a 1.01* タンパク質の蓄積量が増加した。このため、*Fra a 1.01* は低温等の環境条件によって制御されることが示唆された。

以上の結果から、イチゴの低アレルギー化に向けた総合考察を行い、果実内の *Fra a 1* の発現を適切に制御するための提案を次のように行った。*Fra a 1* によるイチゴのアレルギー性を評価するためには、遺伝子の発現量や果実色を指標とせず、タンパク質の蓄積量を用いるべきである。低アレルギー性のイチゴの育種については、形質転換体の作出が有効であり、

(氏名: 石橋美咲 NO. 3)

可能な限り全てのパラログを欠損させ、厳格な環境制御による栽培管理を行う必要がある。また *Fra a 1* 抑制発現体の設計にあたっては、*Fra a 1* の生理的機能を維持させるために果実特異的、もしくは果実の発達段階を限定できるプロモーターが効果的に利用できる。栽培条件によって *Fra a 1* タンパク質の蓄積を制御する場合、PR-10 の機能を保持するために、各パラログに対応した適切な発達段階や器官で *Fra a 1* 遺伝子の発現を制御することが重要である。特に、*Fra a 1.01* タンパク質の低温による誘導を避けるには、積算温度等を指標にして作型を改変することで、果実品質の維持と *Fra a 1* タンパク質の蓄積抑制を両立できる可能性がある。

氏名	石橋 美咲		
論文 題目	栽培環境におけるイチゴメジャーアレルゲン <i>Fra a 1</i> の生理的応答		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	准教授	宇野 雄一
	副査	教授	大澤 朗
	副査	教授	土佐 幸雄
	副査	准教授	金地 通生
	副査		

印

要 旨

イチゴ果実は、口内に痒み・腫れをもたらす口腔アレルギー症状 (Oral Allergy Syndrome: OAS) を引き起こすことがある。有症者は基本的に摂食回避によって対応しているが、この行動は食生活における質の低下を招くと同時に農産物の消費低迷につながる。関東圏における臨床像の知見によると、食物 OAS 有症者のうち、約 13-17% がイチゴ OAS を発症すると推定されている。よって、アレルゲンを低減化したイチゴの生産が期待されるが、そのためにはアレルゲンとなるタンパク質およびそれをコードする遺伝子の生理的応答を理解した上で、果実における発現を適切に制御する必要がある。イチゴ OAS のメジャーアレルゲンである *Fra a 1* は、生物・非生物ストレスや植物ホルモンにより発現が誘導される病害応答性タンパク質の PR-10 ファミリーに属している。したがって植物にとっては必要な形質を支配すると予想されるが、パラログの全体像や生理的応答の詳細は未だ把握されていない。*Fra a 1* 遺伝子群を個別に特徴づけることにより、育種のターゲットとするパラログを絞ることができる。また、栽培方法により生育時期や器官を限定して制御することで、有用農業形質を維持したまま低アレルゲン性イチゴを生産できる可能性がある。そこで本研究では、*Fra a 1* のパラログを整理し、転写・翻訳レベルの器官特異性、果実成熟に関わるオーキシシンに対する応答性、ならびに栽培期間における季節変動性を解析している。

本論文は5章から構成されており、まず第1章では、この研究の着想に至った背景ならびに研究の目的を記述している。

第2章では、*Fra a 1* パラログの情報を整理し、イチゴ器官における転写および翻訳産物の発現解析を行っている。まずイチゴゲノムデータベースから新たに15種類の推定アミノ酸配列を特定し、合計39種類の遺伝子によってコードされる30種類のタンパク質が存在することを確認している。また作成した系統樹に基づき、*Fra a 1* が4種類のクラスターに分かれることを示している。次に遺伝子の発現解析にあたり、多糖類やポリフェノールなどの阻害物質が豊富なイチゴの各器官を対象としたRNA抽出法を改良し、収率と純度を向上させる方法を確立している。発現解析ではRNA-sequencingを行い、果実で主に発現しているパラログは *Fra a 1.01* および *Fra a 1.02* であることを見出している。一方、タンパク質の解析では、*Fra a 1.01* が栄養器官、花、果実など広範囲に分布すること、*Fra a 1.02* は葉、根、果托特異的に蓄積することを明らかにしている。さらに、シラカバ陽性ヒトIgE抗体を使用した場合は、*Fra a 1.01* が最も強く反応することを確認している。以上の植物体における局在性、タンパク質の蓄積量、ヒトIgEの反応性から、最も主要なパラログがコードするタンパク質は *Fra a 1.01* であり、次いで *Fra a 1.02* であると結論づけている。

氏名	石橋 美咲
<p>第3章では、果実が成熟する期間の <i>Fra a 1</i> の発現量を調査している。<i>Fra a 1.01</i> の発現は果実の成熟とともに減少し、<i>Fra a 1.02</i> は増加したことから、パラログごとに発現の制御機構は異なるかと考察している。次に果実成熟に関与するオーキシシンの影響を調べている。収穫前のイチゴ果実から瘦果を除いてオーキシシンを処理すると、<i>Fra a 1</i> タンパク質の蓄積が誘導されることを見出している。また、オーキシシン阻害剤の処理により <i>Fra a 1</i> の発現時期が遅滞することを示している。その一方で、瘦果を残した収穫前および収穫後の果実にオーキシシンを処理しても <i>Fra a 1</i> が誘導されないことを確認し、オーキシシンによる直接的な転写制御を否定している。また、<i>Fra a 1</i> の誘導が瘦果を除く際の傷ストレスに因らないことも実験的に証明している。以上の結果から、オーキシシンはイチゴの果実成熟を促すことで、間接的に <i>Fra a 1</i> の遺伝子発現やタンパク質に影響すると結論づけている。</p> <p>第4章では、まず果実色と <i>Fra a 1</i> の関わりを調べている。赤色果実の系統よりも白色果実を持つ系統のアレルゲン性が低いという欧州の品種の仮説をふまえて、日本の品種を調査している。5種類の白色果を持つ品種と赤色果を持つ品種の比較により選択した候補を同一環境で栽培し、季節を通じて <i>Fra a 1</i> の発現に品種間差がないことを明らかにしている。またこの結果から、果実色は <i>Fra a 1</i> に由来するアレルゲン性の指標にはならないと結論している。次に、<i>Fra a 1</i> の発現の季節変動性を調査している。<i>Fra a 1.01</i> タンパク質の蓄積量が春季に比べて冬季で高いことを明らかにし、その要因として日照時間と気温に着目している。そこで果実を被覆する遮光処理を行い、<i>Fra a 1.01</i> の蓄積量が増加しないことをふまえて、日照時間の影響を否定している。次に気温の影響をみるために季節ごとの日内変動性を調査し、温度が最も低い1月の夜間に収穫した場合、昼間や春季の収穫時期と比べて果実内の <i>Fra a 1.01</i> の蓄積量が多いことを見出している。以上により、<i>Fra a 1.01</i> が冬季の低温条件によって誘導される可能性を示唆している。また、<i>Fra a 1</i> の低温誘導を支持するデータとして、野生種のイチゴの EST データベースには低温で発現する多数の <i>Fra a 1.01</i> オルソログが含まれていること、<i>Fra a 1.01</i> のプロモーター内に低温応答性シスエレメントが存在することなどを挙げている。</p> <p>第5章では、第2-4章から得られた結果を通して総合考察を行い、<i>Fra a 1</i> の調節によるイチゴの低アレルゲン化に向けた以下の提案を行っている。<i>Fra a 1</i> を介するイチゴのアレルゲン性を評価するためには、果実色や遺伝子の発現量ではなく、タンパク質の蓄積量を指標に用いるべきである。<i>Fra a 1</i> の生理的機能を保持した低アレルゲン性イチゴの品種育成においては、エピトープ配列に特異的な置換変異の導入、果実特異的なプロモーターによる抑制発現などが利用できる。<i>Fra a 1</i> の蓄積を低下させる場合、各パラログの発現時期に対応した成熟段階で制御することが望ましい。果実品質を維持しながら <i>Fra a 1.01</i> の蓄積を抑えるためには、最低温度を指標にして作型を改変する必要がある。</p> <p>本研究はイチゴメジャーアレルゲン <i>Fra a 1</i> について、そのパラログの情報や栽培環境における生理的応答性を研究したものであり、低アレルゲン性イチゴの育種におけるターゲット遺伝子の選定や、低アレルゲン化と有用農業形質を両立させたイチゴの栽培方法の改良について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の石橋美咲は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。</p>	