

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19688003

研究課題名（和文） 果実成熟におけるエチレン合成系遺伝子の転写調節機構の解明

研究課題名（英文） Studies on transcriptional regulation for ethylene biosynthesis genes in fruit ripening

研究代表者

牛島 幸一郎 (USHIJIMA KOICHIRO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：20379720

研究成果の概要（和文）：

トマトやメロンはエチレンによって成熟が制御されるクライマクテリック型果実に分類される。メロンの変異品種‘ハネデユ’ではエチレンが合成されず、長期の貯蔵が可能である。この‘ハネデユ’の解析を足がかりとして、本研究ではエチレン合成酵素遺伝子の転写制御因子の特定とエチレン信号伝達や遺伝子発現制御のメカニズムの解明を試みた。現在のところ2つのタイプの候補遺伝子を単離している。それらは、予備的な段階の実験であるが、遺伝子発現を操作すると果実成熟を抑制する傾向が見られている。

研究成果の概要（英文）：

Tomatoes and melons are classified as climacteric fruits, whose ripening was regulated by ethylene. A mutant melon cultivar ‘Honey dew’ cannot synthesize ethylene at ripening stage and then be stored with a long storage life. Based on characterization of the mutation of ‘Honey dew’, I tried to identify the transcriptional regulator for ethylene synthesis genes and elucidate the mechanism for ethylene signaling and transcription. Then, 2 type genes were cloned as candidate genes. To date, the preliminary experiments, gene silencing and expression manipulation, suggested a possibility that that they and their homologues might repress fruits ripening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：植物生理、園芸利用

科研費の分科・細目：農学 / 園芸学・造園学

キーワード：クライマクテリック型果実、エチレン、転写制御因子、VIGS、貯蔵

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の花器官において受粉・受精が起

きると、子房の肥大が起き最終的には種

子・果実形成に至る。果実は人間の重要な栄養源となる食物の1つであるが、発育初期の（未熟な）段階ではまずく十分な栄養価もない。果実発育の最終段階で「成熟」と呼ばれる段階を踏むことにより、果肉部分の成分が変化し、栄養価が高く美味しい食物へと変貌する。果実は成熟の段階が植物ホルモンの一種であるエチレンの影響を受けるか否かで大別される。エチレンの影響を受けるものはクライマクテリック型果実と呼ばれるが、トマトやメロンなど主要な果実はこちらに分類される。クライマクテリック型果実ではエチレンの茂樹によりエチレン合成系遺伝子（ACS遺伝子、ACO遺伝子）の発現が上昇し、エチレン合成が促進される、自己触媒的なエチレン合成が起きていると考えられている。

エチレンとその信号伝達系は非常に良く研究が成されてきた。とくにエチレン受容体からEIN3までの経路は他の刺激とのクロストークが少ない一本の経路で成り立っており、EIN3より下流で各反応に分岐していると考えられている。EIN3は転写制御因子であるが、ACSやACOといったエチレン合成系遺伝子の発現を直接制御している訳ではない。また、エチレン刺激により様々な形質（色、果肉硬度、糖含量、香气成分など）が変化するが、各々の反応を司る遺伝子の具体的な転写制御は分かっていない。

メロンはトマトと同様に典型的なクライマクテリック型果実である。エチレン合成不全品種‘ハネデュ’ではEIN3より下流の幾つか分岐した経路のうち、エチレン合成に関わるシグナル経路にのみ変異があると推定されている。従って‘ハネデュ’の変異を明らかにすることにより、効率的にEIN3より下流域の解析を行うことが可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究ではメロン変異品種を解析の足がかりとして、EIN3より下流に存在するエチレン合成遺伝子の転写制御を司るシグナル経路の解明と転写制御因子の単離を目的とする。

## 3. 研究の方法

### ①ハネデュ果実の成熟様相の解析

#### (1) 果実成熟の特徴

エチレン合成不全変異体‘ハネデュ’の成熟様相を調べるため、典型的なクライマクテリック型の成熟様相を示す‘シャランテ’との比較を行った。具体的な計測する形質は、エチレン合成量、果肉硬度、香气成分、果肉色の4点である。

#### (2) エチレン合成酵素

とくにエチレン合成に関しては、エチレン合成酵素やその遺伝子について、酵素活性や遺伝子発現について解析を行った。

### ②転写制御因子の探索

#### (1) ‘ハネデュ’に関する解析

エチレン合成遺伝子の遺伝子発現を司る転写制御因子を探索するために、‘ハネデュ’と‘シャランテ’の間で、発現に差異のある転写制御因子の探索を行った。具体的にはメロンのESTデータベースから転写制御因子を抽出し、プライマーを設計、リアルタイムPCRを行い、発現量を調査した。

#### (2) トマトホモログの同定

上記解析で得られたらメロン候補遺伝子と相同性の高いトマト遺伝子を同定した。具体的にはトマトESTから高い相同性を示す遺伝子を抽出し系統樹を作成、近接したグループを形成するホモログを特定した。さらに、遺伝子発現解析を行い絞り込みを行った。

### ③機能解析

#### (1)VIGS

ウィルスを利用した遺伝子発現抑制システム (VIGS) で、②-(2) で得られたトマトホモログの遺伝子発現の一過的な発現抑制を行った。

#### (2)形質転換

上記解析で絞り込んだトマトホモログと、②-(1) で得られたメロンの転写制御因子について、形質転換体を作成し、恒常的な抑制もしくは恒常発現による機能解析を試みた。

## 4. 研究成果

### ① ‘ハネデュ’ の成熟様相の特徴

‘ハネデュ’ は自然条件下では愛知連合性能が低い。そこで、外生エチレンを処理して、強制的にエチレン信号伝達系を与えた。そうしたところ、エチレン合成以外の3つの形質 (果肉軟化、果肉色、香気成分) に大きな変化がみられた。さらに、エチレン合成酵素の活性と遺伝子発現を調査したところ、エチレンを与えても活性・遺伝子発現とも変化がみられなかった。これらのことから、エチレン信号伝達系の多くの部分は正常であるが、エチレン合成に関与する経路に変異が有ることが確認された。クライマクテリック型果実ではエチレン刺激を与えると、自己触媒的にエチレンを増産する。そのため、いったんエチレンを与えると成熟の進行を止めることが出来ない。しかし、‘ハネデュ’ の変異はエチレン合成のみを阻害するので、変異した因子を特定し同様の変異を他の果実に与えることが出来れば、成熟開始・進行のコントロールが容易な品種の作成が可能になると示唆された。

### ②エチレン合成遺伝子の転写制御を司る因子の探索

‘ハネデュ’ の変異の原因を探索するため、典型的なクライマクテリック型果実である ‘シャランテ’ 果実との比較を行うことにした。GeneBankやメロンESTデータベースに登録されている100程の転写制御因子についてプライマーを作成し、リアルタイムPCRに供試した。典型的なクライマクテリック型果実の成熟様相を示す品種とハネデュの間で、発現パターンを比較した。その結果、6つの転写制御因子が大きく異なる発現パターンを示した。

6つの転写制御因子についてトマトのSOLデータベースとアラビドプシスのTAIRデータベースから相同性を示す遺伝子/unigeneを単離した。それらを元に系統樹解析を行い、同じクラスターを形成する遺伝子 (ホモログ) の有無を検証した。その結果、DREB2A転写制御因子をのぞく5つの転写制御因子についてホモログが得られた。それらについて、果実成熟過程における発現パターンを解析したところ、多くの遺伝子がメロン転写制御因子の場合とは異なる発現パターンとなっていた。そのため、今回得られたトマト転写制御因子ホモログはメロン転写制御因子とは単純なオーソログの関係にあるとは思われなかった。しかし、NACとHD-ZIPの2つのトマト転写制御因子ホモログについては、トマト成熟不全変異体で発現が変化しており、成熟に何らかの形で関与しているものと考えられた。

### ③単離した候補遺伝子の機能解析

上記②で行った遺伝子発現の解析によって、4種類のメロン由来の転写制御因子について成熟との関連が示唆されている。NAC、HD-ZIP、HSFに関してはトマトホモログも単離されているので、実際に果実成熟に関与しているかどうかを調べるために、まずウ

イルスベクターを利用した遺伝子サイレンシング技術 (VIGS) を用いて、機能解析を行った。そうしたところ、NACやHD-ZIPに関しては、成熟の遅延が認められた。HSFに関しては、何ら変化は認められず、HSFは果実成熟に対して大きな影響を与えてはいないと考えられた。

VIGSは一過的なサイレンシング技術なので、詳細な解析を行うためには形質転換体の作出が必要であると考えられた。そこで、VIGSに用いたトマトNACやHD-ZIPと、メロンNAC、HD-ZIP、さらにメロンDOF-Znについて形質転換体を作出した。とくに、トマトとメロンNAC、メロンのHD-ZIPに関しては発現パターンから、成熟を促進する可能性があったので、転写活性を抑制するSRDXドメインを結合させたCRES-T法を用いて成熟抑制を試みることにした。その結果、多くの形質転換体で成熟の遅延が認められた。現在はT0世代の観察のみであり、今後はT1、T2での解析が必要であると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① beta-galactosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities and gene expression in European and Chinese pear fruit during ripening. Mwaniki MW, Mathooko FM, Hiwasa K, Tateishi A, Yokotani N, Ushijima K, Nakano R, Inaba A, Kubo Y. JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE 76 巻 : 85-90 ページ (2007) 査読有り
- ② Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. Nishiyama K, Guis M, Rose JKC, Kubo Y, Bennett KA, Lu WJ, Kato K,

Ushijima K, Nakano R, Inaba A, Bouzayen M, Latche A, Pech JC, Bennett AB. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 58 巻: 1281-1290 ページ (2007) 査読有り

- ③ A. Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. Yamane M, Abe D, Yasui S, Yokotani N, Kimata W, Ushijima K, Nakano R, Kubo Y, Inaba A. POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY 44 巻 : 220-227 ページ (2007) 査読有り
- ④ ナシ果実における二次元電気泳動による細胞壁画分タンパク質の解析 坂東麻由・牛島幸一郎・中野龍平・稲葉昭次・久保康隆 日本食品保存科学会誌 34 巻 : 127-132 ページ (2009) 査読有り
- ⑤ Characterization of ethylene biosynthesis and its regulation during fruit ripening in kiwifruit, Actinidia chinensis 'Sanuki Gold'. Mworio EG, Yoshikawa T, Yokotani N, Fukuda T, Suezawa K, Ushijima K, Nakano R, Kubo Y. POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY in press 査読有り

[学会発表] (計10件)

- ① 上田裕太・中野龍平・上高大典・久保康隆・牛島幸一郎 : メロン果実成熟関連転写制御因子のトマトホモログの解析 日本園芸学会平成20年度大会 (2009.3)
- ② 久保拓也・内海芳宣・上高大典・牛島幸一郎・久保康隆・中野龍平 : Virus

Induced Gene Silencing 法による成熟関連 MADS-Box 転写因子の探索 日本園芸学会 平成 20 年度大会 (2008.9)

- ③ 中野龍平・久保拓也・上高大典・吉田香織・世良安絵・大川知子・牛島幸一郎・久保康隆:一過的 RNA サイレncing を用いた果実および花における遺伝子機能の解析 日本園芸学会 平成 20 年度大会 (2008.9)
- ④ 中野龍平・久保拓也・上高大典・吉田香織・世良安絵・大川知子・牛島幸一郎・久保康隆:トマトマクロアレイを用いた果実成熟に関連する転写因子の探索 日本園芸学会 平成 20 年度大会 (2008.9)
- ⑤ Mwaniki, MW・中野龍平・牛島幸一郎・青木 考・Rose, JKC・久保康隆:機能的スクリーニングとマクロアレイ解析によるナシ果実の成熟に関係する細胞外因子の網羅的解析 日本園芸学会 平成 19 年度大会 (2008.3)
- ⑥ 西山精視・中野龍平・加藤鎌司・稲葉昭次・久保康隆・牛島幸一郎: ‘Honey Dew’ 果実におけるエチレン応答遺伝子の発現パターン 日本園芸学会 平成 19 年度大会 (2007.9)
- ⑦ モーリア・エリック・吉川尚志・中野龍平・牛島幸一郎・福田哲生・末澤克彦・久保康隆:キウイフルーツ ‘さぬきゴールド’ の果実成熟におけるエチレン生合成とその制御
- ⑧ 上高大典・原野哲治・横谷尚起・中野龍平・牛島幸一郎・稲葉昭次・久保康隆:トマトマクロアレイを用いた成熟関連遺伝子の発現解析 日本園芸学会 平成 19 年度大会 (2007.9)
- ⑨ 吉川尚志・モーリア・エリック・中野龍平・牛島幸一郎・福田哲生・末澤克彦・久保康隆:キウイフルーツ ‘さぬきゴールド’ の

長期貯蔵の試み 日本園芸学会 平成 19 年度大会 (2007.9)

- ⑩ 原野哲治・上高大典・横谷尚起・中野龍平・牛島幸一郎・稲葉昭次・久保康隆: EIN3/EIL 抑制形質転換トマトの表現型解析 日本園芸学会 平成 19 年度大会 (2007.9)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛島 幸一郎 (USHIJIMA KOUICHIRO)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号: 20379720