

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780031

研究課題名（和文） 硬肉モモ果実におけるエチレン生合成抑制機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of ethylene biosynthesis in stony hard peach fruit

研究代表者

立木 美保（TATSUKI MIHO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・主任研究員

研究者番号：10355381

研究成果の概要（和文）：硬肉モモ果実成熟期におけるエチレン生成抑制は、エチレン生合成の鍵酵素である *PpACS1* の転写制御シス領域ではなく、更に上流にあることが明らかとなった。マイクロアレイ解析により、オーキシン等他の植物ホルモンが、果実成熟期における *PpACS1* の発現制御に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The mutation of stony hard peach is not in the *cis* element of *PpACS1*, which is a key enzyme of ethylene biosynthesis. Microarray analysis reveals that some plant hormones are concerned in the regulation of *PpACS1* expression during fruit ripening.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,600,000	510,000	3,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：果樹

1. 研究開始当初の背景

(1) 硬肉のモモは、成熟に伴い溶質のモモと同様な果皮色の変化や糖度の上昇等が認められるが、エチレン生成の上昇や果肉硬度の急激な低下は見られない。これまでの解析から硬肉のモモでは ACC 合成酵素アイソジーンの一つである *PpACS1* の発現が果実成熟期に抑制されているため、成熟期に達しても

エチレン生成が起こらず軟化しないことが明らかとなっているが、その発現抑制機構については解明されていない。

(2) 硬肉モモの *PpACS1* は葉や果実における傷害、花の老化等では誘導されることから、果実成熟期における発現誘導のみが抑制されていると推測される。

2. 研究の目的

(1) 硬肉モモにおける果実成熟期特異的な *PpACS1* の発現抑制機構を解明することで、成熟期特異的なエチレン生合成調節機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *PpACS1* のゲノミッククローンを単離して塩基配列を決定する。様々な品種から単離した *PpACS1* のプロモーター領域配列を比較し、硬肉モモ特異的な塩基の置換、挿入、欠損等について確認する。硬肉モモ特異的な変異等が確認できた場合、その部位が成熟期の発現を制御するシス領域であることが推測され、一方、配列上の差異が確認できなかった時には、転写調節因子に相違があると推測される。

(2) モモ果実成熟期において発現している転写因子等を解析するために、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析し、成熟期特異的な *PpACS1* の発現様式と強い相関の見られる遺伝子を選抜する。選抜された遺伝子について、ノーザン法又はリアルタイム PCR 法を用いて mRNA 発現様式を溶質モモと硬肉モモ間で比較する。

4. 研究成果

(1) 溶質モモ ‘あかつき’ 幼葉から抽出したゲノム DNA を用いてインバース PCR 法により *PpACS1* の上流域を含む部位を単離し、開始コドンより 3kbp ほど上流の塩基配列を決定した。更に ‘あかつき’ から得られた塩基配列情報を基に溶質モモ ‘川中島白桃’、硬肉モモ ‘おどろき’、‘まなみ’、‘有明’ の幼葉からそれぞれ抽出したゲノム DNA を用いて、*PpACS1* の上流領域を増幅後、各品種 3 クローンずつ塩基配列を決定した。その結果同じ品種内でもクローンによって数カ所異なる塩基配列が認められた。品種による配列の違いを比較すると 2.6kbp 中数 10 箇所ほど違いが見られたが、硬肉モモ、溶質モモ間での特徴的な違いは認められなかった。塩基配列の違いは主に T の連続配列中の数の相違 (2-3 数塩基) や、硬肉、溶質に関係なく 1 塩基の相違などであった。データベース情報から、既に報告されているシス配列と一致する配列も多数見つかったが、果実成熟時期に関するものは認められなかった。以上の結果より成熟時期特異的に *PpACS1* の発現が抑制される原因はプロモーター領域ではなく、転写因子を含めた更に上流域にあることが推測された。

(2) 成熟期特異的に *PpACS1* の発現を制御する因子を探索するため、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。最初に、マイク

ロアレイを作製するために、モモの EST データベース GDR (Genome Database for Rutaceae) を利用してプローブの設計を行った。マイクロアレイ解析で用いるサンプルを選定するために、溶質のモモ ‘あかつき’ 果実の収穫適期前後の果実について、エチレン生成量を調査した (図 1)。エチレン生成量について 7 月 7、10 日に収穫した果実ではガスクロマトグラフィーの検出限界以下であったが、7 月 13 日に収穫した果実において、わずかに検出され、7 月 19 日を期に急激に増加した。そこで、*PpACS1* の発現を制御する因子を探索するために、その発現量が増加する前後として、7 月 7 日、13 日、19 日、22 日の溶質モモ果実から抽出した RNA を用いた。更に、*PpACS1* が発現している溶質品種と比較するために、*PpACS1* の発現が抑制されている硬肉モモ品種 ‘まなみ’、‘おどろき’、‘有明’ の成熟果実から抽出した RNA を用い、マイクロアレイ解析を行った。

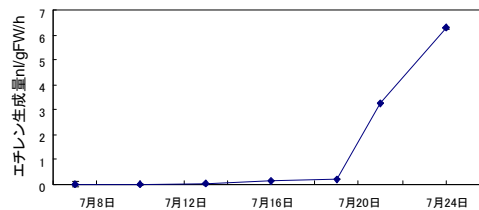


図1 ‘あかつき’ 果実エチレン生成量の変化

(3) マイクロアレイデータの解析から、ペクチンエステラーゼ遺伝子は *PpACS1* と非常に良く似た発現傾向を示すことが明らかとなり、*PpACS1* とペクチンエステラーゼの発現制御機構の一部は共通していることが推測された。

硬肉モモと溶質モモにおいて発現様式が大きく異なる遺伝子として、ABA、ブラシノステロイド、オーキシン、ジャスモン酸等の植物ホルモンの生合成や代謝等に関連するものが多数単離された。従って、*PpACS1* の発現制御の上流には、他の植物ホルモンが関与する可能性が考えられた。

特にその中でも *PpACS1* の発現様式は、オーキシンによって発現が誘導される遺伝子のホモログ (*Aux/IAA*, *ILR*, *SAUR* 等) のものと良く一致し、これら遺伝子の発現は、溶質モモでは成熟期に増加するが、硬肉モモ果実では抑制されていた。このことは硬肉モモにおいて、内生オーキシン (IAA) 含量が減少している可能性を示唆していた。そこで、硬肉モモ果実に合成オーキシン剤である 1-ナフチル酢酸 (NAA) 処理を行ったところ、*PpACS1* が誘導されエチレン生成が起これ、軟化することが明らかになった。以上のことから硬肉モモのオーキシン応答性は正常で

あるが、供給（生合成または輸送）に問題が生じている可能性が考えられた。また、エチレン処理を行って軟化させた硬肉モモではオーキシン誘導性遺伝子の発現量は増加しなかった。

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1件）

- ① Miho Tatsuki, Ethylene biosynthesis and perception in fruit, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有、印刷中

〔学会発表〕（計0件）

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立木 美保 (TATSUKI MIHO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・果樹研究所・主任研究員

研究者番号：10355381

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者