

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780021

研究課題名 (和文)

果樹作物における一過的RNAサイレンシング法の確立とその成熟制御因子解析への利用
 研究課題名 (英文) Establishment of transient RNAi methods in tree fruit and its application on evaluation of genes regulating fruit ripening

研究代表者

中野 龍平 (NAKANO RYOUHEI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70294444

研究成果の概要 (和文)：ブドウにおいて一過的 RNA サイレンシング手法が機能する可能性を示した。さらに、トマトを用いて成熟関連遺伝子 (AP3, TM6, AGL1, GRAS) の絞込みに成功した。これらの遺伝子に関して、ブドウにおけるサイレンシングを実施したが、その成熟への関与は明確ではなかった。今後、本研究の手法を用いてブドウの成熟や品質に関わる遺伝子の解析も進展が期待され、トマトにおいて選抜した遺伝子の成熟制御の証明により、大きな成果が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：Transient RNA silencing technique was suggested to be possible in developing grape berry. When tomato is used as model plant for screening of fruit ripening-associated genes, AP3, TM6, AGL1, GRAS were assumed to be involved in ripening. Involvements of these genes in ripening of grape berry were investigated using the transient RNA silencing technique, although their involvements were not clear. It is suggested that the transient RNA silencing technique would be useful for analysis of ripening-associated genes in grape in future and that deeper investigation of function of these genes for fruit ripening will provide new insight into the study for fruit physiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：RNAサイレンシング、果実、成熟

1. 研究開始当初の背景

(1) 果樹作物におけるRNAサイレンシング法の確立

果樹作物の研究に分子生物学的手法が導入されはじめてから、すでに10年以上が経過し、申請者らの報告も含め数多くの遺伝子が単離され、その発現様式が明らかとされてきた。近年では、EST Databaseの構築とマクロアレイ解析の発展により、果樹作物においても遺伝子の単離と発現解析が網羅的に進められている。しかしながら、これらの情報より導かれる各遺伝子の役割についての考察はあくまで推測であり、直接的な証明ではない。

モデル植物やイネの研究では、当該遺伝子のノックアウト個体や遺伝子発現抑制個体の解析により、直接的な解明が当たり前となっている。一方、果樹作物では、遺伝子組換え体の作成が困難であり、また、(特に果実の形質に関わる遺伝子に関しては)長時間を要するために、このような直接的な解明はわずかしか報告されていない。

近年、VIGS (Virus Induced Gene Silencing) やhair-pin RNAiといった強力な遺伝子発現抑制 (RNAサイレンシング) 技術に、アグロバクテリウムを組織に直接注入するAgroinjectionを組み合わせることにより、一過的に目的遺伝子のmRNA量を著しく低下させる (つまりサイレンシングさせる) 方法が開発されている。申請者も、トマトとイチゴにおいて、それぞれVIGSと hair-pin RNAi により、一過的なRNAサイレンシングに成功している。

これら一過的RNAサイレンシング法は、従来の組織培養を経る手法とは異なった簡便な方法であり、特に果樹作物において、遺伝子の役割を直接的に証明するのに有効である。

(2) MADS-Box様転写因子による成熟制御の解明

これまでの果実成熟に関する研究は、植物

ホルモンエチレンの生合成とその作用にばかり焦点が当てられてきた。そのために、エチレンの働きとは別に発育に伴って果実成熟を制御する機構やブドウなどエチレンが成熟に関与しない果実の成熟制御に関してはほとんど分かっていない。近年、成熟不全トマト変異体 (rin) の解析により、MADS-Box様転写因子の発育に伴う成熟制御への関与が報告され、大きな反響を呼んだ。以来、数多くの研究グループがMADS-Box遺伝子の解析を試みているが、未だ、さらなる究明はなされていない。

申請者らは、ナシ、バナナ、ブドウ、カンキツなどから数種のMADS-Box遺伝子を単離している。さらに、ブドウから単離した遺伝子の一つ(VI-MADSRINLike)をrin変異トマトに導入したところ、成熟の回復を観察している。この結果は、成熟にエチレンを必要としないブドウにおいてもトマトと同様にMADS-Box様転写因子が成熟に関与していることを示唆しており、興味深い。

植物内には多数のMADS-Box様転写因子が存在し、各器官の形態形成や発育調節を行っている。さらに、MADS-Box様転写因子は多量体として働き、その多量体の構成により異なった働きを示すことが知られている。このことから、未だ、その働きが分かっていないMADS-Box様転写因子の中に成熟に関連する因子が存在することが予測される。

このように数多くの候補因子の中から成熟に関連する因子を探索する場合には、簡便かつ短時間で解析が可能なRNAサイレンシング法は有効な手段である。

2. 研究の目的

(1) 本申請では、第一に、ブドウ、カンキツ、リンゴ、バナナといった果樹作物において一過的RNAサイレンシング技術を確立する。

①具体的には、Intron 付きGus遺伝子を用い、

アグロバクテリウムを介した一過的遺伝子導入条件を検討、

②すでに関与が報告されている、着色関連遺伝子のサイレンシングによりRNAサイレンシング条件の確定を行う。

(2)第二に、確立されたRNAサイレンシング法を用いて、以下のように果実の成熟および品質に関わる遺伝子の解析を行う。

①すでに、VIGS法による簡易RNAサイレンシングが確立されているトマトを用い、果実の成熟および品質に関わる候補となる遺伝子の絞り込みを行う。

②果樹作物において、MADS-Box遺伝子など①において選抜された果実成熟・品質に関連する遺伝子のサイレンシングを引き起こし、品質および成熟制御に関連する因子を直接的に同定する。

これらより、果樹作物では困難であると考えられてきた遺伝子組換えによる遺伝子機能の直接的な証明を可能とすると共に、成熟制御や貯蔵・流通技術の発展、新品種育成に役立つ基礎的知見を提供することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、以下のように果樹作物において一過的なRNAサイレンシング法を確立し、確立された手法を用いて果実の品質や成熟制御に関わる遺伝子の役割の解明を試みた。

(1)果樹作物における一過的RNAサイレンシング技術の確立

①Gus遺伝子コンストラクトを用いた遺伝子導入方法の確立。

Gus遺伝子 (Intron 付きGus遺伝子) を持つアグロバクテリウムを介した遺伝子組換え用のコンストラクトを作成し、アグロインジェクションにより果実に導入し、Gus遺伝子による青色発現により導入効率を検討した。

②着色関連遺伝子のサイレンシングによるRNAサイレンシング条件の検討

既知の着色関連遺伝子 (ブドウCHS遺伝子、myb遺伝子など) を挿入したRNAiサイレンシング用のコンストラクトを数種果樹作物に関して作成し、アグロバクテリウムを介した一過的RNAサイレンシングを試み。その着色抑制効果を調査しつつ、処理方法、時期などの検討を行った。

また、限られたスペースでの実施を可能とするために、岡山県農業試験場が開発した超密植栽培法を利用しブドウの鉢植個体の作成を行った。

(2)一過的 RNAサイレンシング法を用いた果実成熟・品質関連遺伝子の機能解析

①トマトを用いた果実の成熟および品質に関わる候補となる遺伝子の絞り込み

トマトにおいて獲得しているVIGS法による簡易なRNAサイレンシング手法を用いて、ブドウなど果樹作物において解析すべき因子の絞り込みを行った。

②果樹作物における成熟関連遺伝子の機能解析

(1)において、一過的サイレンシング手法を確立しつつある果樹作物 (ブドウ) において、(2) -①において選抜された果実成熟・品質に関連する遺伝子の内、AP3, TM6, AGおよびAGL1に関して、品質および成熟への関与の調査を試みた。まず、上記4つの成熟制御因子 (MADS-Box転写因子) に関して、ブドウのホモログ遺伝子を単離し、これらを挿入した解析用コンストラクト (hair-pin RNAiコンストラクト) の作成した。アグロインジェクションにより一過的RNAサイレンシングを実施し、そのブドウの成熟への影響を調査した。

4. 研究成果

本研究では、果樹作物において一過的なRNA

サイレンシング法を確立し、確立された手法を用いて果実の品質や成熟制御に関わる遺伝子の役割の解明を試みた。

(1) 果樹作物における一過的RNAサイレンシング技術の確立

①Gus遺伝子コンストラクトを用いた遺伝子導入方法の確立。

Gus遺伝子 (Intron 付きGus遺伝子) を持つアグロバクテリウムを介した遺伝子組換え用のコンストラクトを作成した。アグロインジェクションにより果実に導入し、Gus遺伝子による青色発現により導入効率を検討した結果、80%近くの高い導入効率を得られた。

②着色関連遺伝子のサイレンシングによるRNAサイレンシング条件の検討

従来のRNAサイレンシング用のベクターでは果実への遺伝子導入の効率が低いことが判明した。そこで、CRIS0のpHannvalベクターの一部をアグロインジェクション用ベクターpCambia0380に移替え、一過的RNAi専用のベクター (pCam0380hair-pin) を作成した。このベクターによりイチゴで予備実験をしたところ、遺伝子導入効率が向上した。(2)次に、pCam0380hair-pinへ既知の着色関連遺伝子 (ブドウCHS遺伝子、myb遺伝子など) を挿入したコンストラクトの作成に成功した。

次に、上記のコンストラクトを用い、数種の果樹作物に関して、着色関連遺伝子の一過的RNAサイレンシングを試みたところ、特に、ブドウにおいて、CHS遺伝子およびmyb遺伝子いずれに関しても、着色の抑制が観察され、一過的RNAサイレンシング手法が機能している可能性が示唆された。

ブドウは成熟にエチレンが関与しないノンクライマクテリック型の果実に属し、その園芸的価値が高いにも関わらず、リンゴやバナナと比べ、成熟機構が全く分かっていない。また、遺伝子組換えが難しく多大な時間も要

する。そのために、今回、得られた一過的RNAサイレンシング機構は簡便な方法であり、短期間で結果が得られる。今後、この手法を用いてブドウ果実の成熟機構や品質に関わる遺伝子の機能解析が進むものと期待される。

なお、本研究のRNAサイレンシング手法は隔離温室での実施が必要であり、限られたスペースでしか行えないが、本研究では、岡山県農業試験場が開発した超密植栽培法を利用し準備した鉢植個体により、挿し木2年後の個体を用いて、隔離温室内での果実へのRNAサイレンシング実験に成功しており、スペース的な問題の解決にも成功している。

(2) 一過的 RNAサイレンシング法を用いた果実成熟・品質関連遺伝子の機能解析

①トマトを用いた果実の成熟および品質に関わる候補となる遺伝子の絞り込み

初年度の研究により、解析の候補遺伝子が予想以上に多数存在することが分かった。そこで、トマトにおいて獲得しているVIGS法による簡易なRNAサイレンシング手法を用いて、ブドウなど果樹作物において解析すべき因子の絞り込みを行った。その結果、まず、新たにMADS-Box転写因子に属するAP3, TM6, AGおよびAGLが候補因子として選抜された。さらに、GRASとbZipに属する転写因子が候補として選抜された。

本研究と並行して、他の研究グループにより、AGLのトマト果実への成熟への関与がPlant Cellに報告された。このことは、本研究におけるVIGS法による成熟制御因子の探索方法が正確であることを示すとともに、この手法により新規成熟関連遺伝子を発見することで、高い評価を受けられることを示している。

本研究により選抜されているAP3, TM6, GRASといった遺伝子の成熟への関与は、まだ、全く報告されておらず、今後、これらの因子の

成熟への関与をより確実に証明することで、大きな成果が期待できる。

②果樹作物における成熟関連遺伝子の機能解析

(1)において、一過的サイレンシング手法を確立しつつある果樹作物(ブドウ)において、(2)-①において選抜された果実成熟・品質に関連する遺伝子の内、AP3, TM6, AGおよびAGL1に関して、品質および成熟への関与の調査を試みた。まず、上記4つの成熟制御因子(MADS-Box転写因子)に関して、ブドウのホモログ遺伝子を単離し、これらを挿入した解析用コンストラクト(hair-pin RNAiコンストラクト)の作成に成功した。超密植栽培により育成に成功した果実を付けているブドウ鉢植個体を用い、アグロインジェクションにより一過的RNAサイレンシングを実施した。その結果、いずれの遺伝子に対しても対照区と比べ、有意な成熟の遅延や促進はみられず、これら遺伝子のブドウの成熟への関与は明確ではなかった。

以上より、ブドウにおいて一過的RNAサイレンシング手法が機能する可能性を示した。さらに、トマトを用いて成熟に関連する遺伝子(AP3, TM6, AGL1, GRAS)の絞り込みに成功している。それらの遺伝子に関して、超密植栽培により多数の作成に成功したブドウ鉢植個体を用いて、一過的RNAサイレンシングの実施に成功したが、これらの遺伝子のブドウ成熟への関与は明確ではなかった。今後、本研究の一過的RNAサイレンシング手法を用いてブドウ果実の成熟機構や品質に関わる遺伝子の機能解析が進むものと期待され、トマトにおいて選抜されているAP3, TM6, GRASといった遺伝子の成熟への関与をより確実に証明することで、大きな成果が期待できる。

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0件)

[学会発表] (計3件)

(1) Erin Zui、Screening of ripening related transcription factors using tomato DNA macroarray, 1-MCP and ripening impaired mutants、園芸学会平成20年度秋季大会、2011年3月6日、岡山市。

(2) 中野 龍平、一過的RNAサイレンシングを用いた果実および花における遺伝子機能の解析、園芸学会平成20年度秋季大会、2008年9月27日、津市。

(3) 久保 拓也、Virus induced gene silencing法による成熟関連MADS-Box転写因子の探索、園芸学会平成20年度秋季大会、2008年9月27日、津市。

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 龍平 (NAKANO RYOUHEI)

研究者番号：70294444

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久保 康隆 (KUBO YASUTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80167387

牛島 幸一郎 (USHIJIMA KOICHIRO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20379720