

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02977

研究課題名（和文）果実ポストハーベスト研究のニューフロンティア-低温誘導成熟機構解明とその利用

研究課題名（英文）New Frontier of Fruit Postharvest Physiology-Low Temperature modulated Ripening and its application

研究代表者

久保 康隆（KUBO, Yasutaka）

岡山大学・環境生命自然科学研究科・特命教授

研究者番号：80167387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：園芸作物の成熟・老化制御機構解明は、貯蔵・流通技術の開発・改善の鍵であるとともに、園芸生理研究の焦点の一つである。植物の生理代謝は酵素活性に支配され、明確な温度依存性がある。今回の研究によって、これまでにはほとんど未解明であった低温誘導性成熟・老化機構の明確な存在証拠が示され、果実生理学研究におけるニューフロンティアの基盤構築ができたと考えている。さらに、これらを低温誘導性成熟・老化現象を前提とした実用的な品質保持技術のいくつかが開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって、これまでにはほとんど未解明であった低温誘導性成熟・老化機構の明確な存在証拠が示され、果実生理学研究におけるニューフロンティアの基盤構築ができたと考えている。さらに、これらを低温誘導性成熟・老化現象を前提とした実用的な品質保持技術のいくつかが開発できた。今後これらの手法がさらに研究、改善されSDGsに貢献すると期待している。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the mechanisms controlling fruit ripening and senescence of horticultural crops is a key to developing and improving storage and distribution technologies, and is one of the focal points of horticultural physiological research. Plant physiological metabolism is conducted by enzyme activity and has a clear temperature dependence. The present study provides clear evidence for the existence of low-temperature-induced ripening and senescence mechanisms, which have been largely unexplored to date, and we believe that we have established the foundation for a new frontier in fruit physiology research. Furthermore, we were able to develop several practical quality preservation techniques based on these low-temperature-induced ripening and senescence phenomena.

研究分野：園芸利用学

キーワード：低温応答 低温障害 エチレン エディブルコーティング 遺伝子発現解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

園芸作物の成熟・老化制御機構解明は、貯蔵・流通技術の開発・改善の鍵であるとともに、園芸生理研究の焦点の一つである。植物の生理代謝は酵素活性に支配され、明確な温度依存性がある。果実の品質保持技術の基本は低温環境であり、**低温はすべての代謝を抑制する**と考えられてきた。果実生理研究では低温による成熟・老化抑制は当然のこととされ、低温障害現象以外は、その遺伝子レベルの機構解析はほとんどなされてこなかった。一方、果実成熟・老化の重要な促進要因であるエチレンについては、変異体解析などから受容体から転写因子ETR1から転写因子EIN3/EIL ERFの経路、それにリンクするNOR RIN系およびそれらのプロモーター解析なども精力的に進められている。ただし、**成熟エチレン生成の最初の引きがね因子**や成熟にエチレンを必要としないカンキツやブドウなどの**ノンクライマクテリック型果実の成熟制御因子についてはほとんど解明されていない**。近年の次世代シーケンサーの汎用化により、非モデル植物の園芸作物でもゲノム解析が進み、網羅的遺伝子解析、特定品種の全ゲノム解析なども可能となってきた。さらに、メタボローム解析と併せたオミックス解析によって総合的な信号伝達経路の解析も可能となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**「低温誘導型成熟・老化誘導現象の温帯性木本植物における普遍性を解析し、共通する分子制御機構を解明し、その園芸的実用利用に結びつける」**ことである。

筆者らが提唱している低温誘導成熟機構については、セイヨウナシで現象が経験的に知られているだけで、遺伝子レベルでの研究はほとんどなされていなかった。すなわち、エチレン誘導の初発機構やエチレン系を介さない成熟・老化の最初の引き金となる因子についてはほとんど解明されていなかった。

そこで、筆者らは、低温誘導性成熟・老化はキウイフルーツ果実の特異的なものにとどまらず、温帯性木本植物に共通する現象として広がりを持ち、**「共通する制御機構が存在する」**と考えるに至った。低温遭遇は、種子や芽の自発休眠打破や花芽分化誘導、春化に必要なことがよく知られ、その機構解析も進んでいる。しかし、**低温誘導性成熟・老化は**、これまでにはほとんど意識されず、研究もされていない、果実生理学研究における**ニューフロンティア**と位置付けられる。

ミカンやカキ、キウイフルーツ、セイヨウナシ、モモの栽培では収穫期が異なる多数の早生、晩生品種が育成されている。その早晩性の違いは、葉の老化様相とも相関が強く低温感受性と密接に関連する。そこで、本研究では温帯性果樹を中心に、**多数の品目、品種を活用する園芸学的アプローチ**と次世代シーケンサーやGC/MS, LC/MSによる**分子生物学的・生化学的アプローチ**を活用し、未解明の種横断的低温誘導性成熟・老化・低温障害発生機構を解析した。さらに、品目ごとの実用的な**追熟・貯蔵・流通技術の開発**を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種果実の低温、エチレン応答の解析

各種果実のエチレン処理および温度処理に対する応答性を解析する。温帯性果樹として温州ミカン、レモン、ウメ、セイヨウナシ、カキ、比較対照として年中成熟するトマトを用いた。温度処理は 25 °C - 0 °C とした。また、いくつかの品目では樹上での成熟進行についても未熟期から過熟期までを解析した。収穫後の追熟と樹上成熟を対応させながら、各果実種の低温応答機構の共通性と相違点および低温誘導成熟とエチレン誘導成熟機構の相違点と共通性を検討した。

(2) 低温およびエチレン信号応答に関する遺伝子発現解析

温州ミカン、レモン、ウメ、セイヨウナシ、カキ、トマトでの成熟制御システムの全体像を把握するためにエチレン処理および低温処理を行なった果実について RNAseq 解析による網羅的遺伝子発現解析、GC, LC 解析によるエチレンおよび代謝物解析を行った。

(3) 低温成熟活用型品質保持技術の確立

これまでの果実の貯蔵・流通技術には低温誘導性成熟が意識されていないので、不必要なエチレン吸収阻害剤の使用など、不合理な管理が含まれている。そこで、低温誘導性成熟を前提とした長期貯蔵、品質保持技術開発を進めた。各品目の温度応答性に基づいた低温成熟特性を活用した追熟・貯蔵・流通技術を開発し、温度変動が極めて少ない壁面冷却型冷蔵庫と 1-MCP 処理、限定的なエチレン処理、糖エステルを用いたエディブルコーティングを組み合わせ、国内高需要期出荷や輸出を想定

した実用的な果実の品質保持、貯蔵技術を検討した。

4. 研究成果

(1) 各種果実の低温、エチレン応答の解析

温州ミカン、レモン、ウメ、セイヨウナシ、カキおよびトマトについて貯蔵温度、外生エチレンおよび 1-MCP 処理に対する応答を解析した。いずれの果実でも外生エチレンまたはプロピレン処理により果実軟化や着色が進行し、カンキツ以外では内生エチレン生成も誘導された。セイヨウナシ‘パス・クラサン’果実は 20℃ では8週間後でも全く成熟・軟化しなかった。一方、5℃ では2週間後にはエチレン生成が誘導され、その後に室温に移すと速やかに成熟した。ウメ、カキおよびトマト果実では 5℃ 程度の低温環境に保持するとピッキングや異常軟化を症状とする低温障害が発生し、エチレン生成も誘導された。低温障害でも結果的にストレスエチレンが生成され、成熟のスイッチが入ることになり、室温に移すと成熟が促進された。温州ミカンとレモンは5℃ や20℃ では着色の進行が抑制されていたが、10–15℃ の温度域では着色の進行がむしろ早まった。すなわちいずれの果実でも適当な温度域の低温遭遇によって生物学的な「成熟」が促進されると解釈することができる。温州ミカンやレモンの低温遭遇による着色進行は 1-MCP 処理でも抑制することはできず、エチレン系による制御とは独立であることが示された。

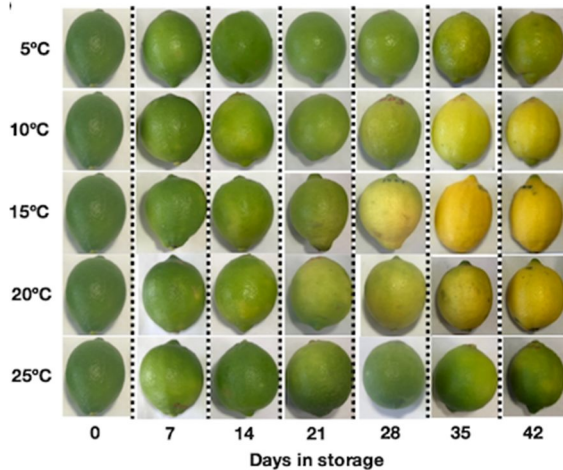


図1. 貯蔵温度がレモンの着色に及ぼす影響

(2) 低温およびエチレン信号応答に関する遺伝子発現解析

いずれの果実でも低温およびエチレン処理などによって成熟が促進されたので、その制御機構を明らかにするために RNAseq 解析による網羅的遺伝子解析を行なった。レモンでは約 600 個の遺伝子が外生エチレンに、約 350 個の遺伝子が 5℃ に、約 100 個の遺伝子が 15℃ に、約 250 個の遺伝子が 25℃ の温度域に特異的に応答していることが明らかになった。この内、25℃ (室温) に応答する遺伝子は果実老化制御、5–15℃ に応答する遺伝子は低温環境順応制御に関する遺伝子と考えられる。温州ミカン、ウメ、セイヨウナシ、カキおよびトマトにおいても RNAseq 解析によってエチレン特異的に応答する遺伝子群と低温応答遺伝子群が存在することが明らかになった。セイヨウナシでは、低温遭遇前(収穫直後)でもエチレンにより果実が軟化し、細胞壁分解に関与する PG 遺伝子が活性化されるものの、低温遭遇によって数百個の遺伝子をはじめエチレン応答性を獲得することが示された。この中にはエチレン生成の鍵となる ACC 合成酵素遺伝子が含まれていた。すなわち、低温遭遇により遺伝子レベルでの大きな相転換が起こっていることが示された。

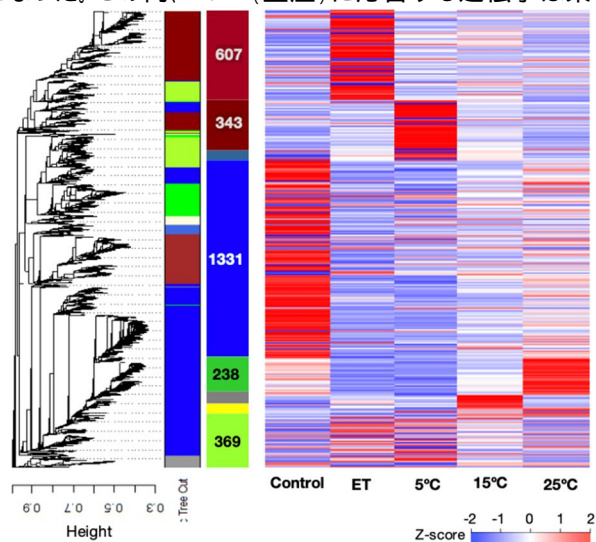


図2 貯蔵温度とエチレン処理がレモンの遺伝子発現に及ぼす影響

(3) 低温誘導成熟、低温障害適応型品質保持技術の確立

温州ミカンやレモンでは収穫後の着色促進にエチレン処理が使われてきたが、同時に老化が促進され病原菌への抵抗力が弱まることから品質保持期間が短くなる傾向にある。そこで、果実を収穫後 10–15℃ に1–2週間保持することによって品質を保持しつつ着色促進を図ることが示された。この方法は、夏期の高温期に収穫されるため食味品質は良好であるが着色が不十分なハウスミカンに商品性改善に有効である。

ウメやトマトでは5℃ では低温障害が発生することから長期貯蔵に低温環境の利用が難しかった。そこで食品添加剤に用いられている糖エステルによるエディブルコーティングを試したところ、両果実ともに

低温障害症状が顕著に抑制できることが明らかになった。カキでは5 前後の低温によって果実軟化が促進されるので、甘柿‘富有’では 20 前後での貯蔵とエディブルコーティングや 1-MCP 処理を組み合わせることによって2ヶ月程度は熟柿化を抑制し、外観と品質を保持することができた。この方法は、同果実の年末出荷に利用することができる。また、‘富有’では0 で3ヶ月以上の長期に軟化が抑制できるが、室温に移すと急速に軟化する。但し、貯蔵前後の1-MCP 処理によって軟化を遅延でき、2月以降の出荷や北米地域への輸出にも活用できることを示した。セイヨウナシでは低温貯蔵によって成熟のスイッチが入るものの成熟進行は抑制でき、果実の均質的な成熟誘導を行うことができる。1-MCP によってエチレン反応性を長期間に渡って抑制できるものの3ヶ月以上の低温貯蔵によって徐々に成熟能を回復位できることが明らかになった。この方法はセイヨウナシ果実の長期貯蔵に活用できる。

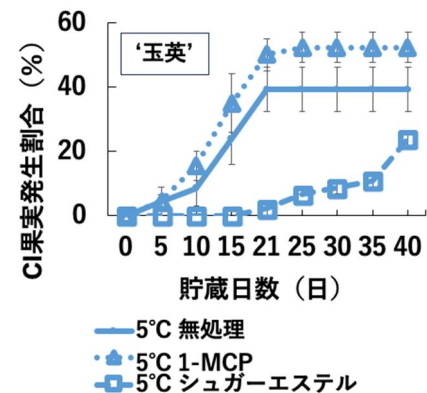


図3. 糖エステルエディブルコーティングと1-MCP 処理がウメの低温障害(CI)発生に及ぼす影響

今回の研究によって、これまでにはほとんど未解明であった低温誘導性成熟・老化機構の明確な存在証拠が示され、果実生理学研究におけるニューフロンティアの基盤構築ができたと考えている。さらに、これらを低温誘導性成熟・老化現象を前提とした実用的な品質保持技術のいくつかが開発できた。今後これらの手法がさらに研究、改善され SDGs に貢献すると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H. Kazimi Abdul, W. Mitalo Oscar, Azimi Azimullah, Masuda Kanae, Yano Chikara, Akagi Takashi, Ushijima Koichiro, Kubo Yasutaka	4. 巻 92
2. 論文標題 1-Methylcyclopropene Pretreatment in 'La France' Pears to Extend Postharvest Life and Maximize Fruit Quality	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.QH-012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Furuta T., Mitalo O.W., Otsuki T., Okada R., Ohashi K., Masuda K., Akagi T., Ushijima K., Nakano R., Kubo Y.	4. 巻 1338
2. 論文標題 Effect of storage temperature on development of chilling injury and its transcriptome analysis in 'Fuyu' persimmon fruit with or without 1-MCP treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 343 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/ActaHortic.2022.1338.49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mitalo Oscar W., Asiche William O., Kang Seung W., Ezura Hiroshi, Akagi Takashi, Kubo Yasutaka, Ushijima Koichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Examining the Role of Low Temperature in Satsuma Mandarin Fruit Peel Degreening via Comparative Physiological and Transcriptomic Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.918226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hira N., Mitalo OW, Otsuki T., R. Okada, Y. Kubo et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 The effect of layer-by-layer edible coating on the shelf life and transcriptome of 'Kosui' Japanese pear fruit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Postharvest Biology and Technology	6. 最初と最後の頁 111787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.postharvbio.2021.111787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mitalo OW, Otsuki T., Okada, R., Kubo Y. et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Low temperature modulates natural peel degreening in lemon fruit independently of endogenous ethylene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 4778-4796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mwaniki, M. Mitalo, O., Mworia, E., Ushijima, K., Y. Kubo et al.	4. 巻 174
2. 論文標題 Combined signal sequence trap and macroarray analysis identifies genes associated with differential fruit softening characteristics during ripening in European and Chinese pears	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Postharvest Biology and technology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.postharvbio.2020.111436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大橋京平・久保康隆・牛島幸一郎・赤木剛士・大槻巧・矢野親良・Muqadas Maqsood・Oscar W. Mitalo
2. 発表標題 カキ果実の成熟軟化機構の解明と長期貯蔵法の模索
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野親良・久保康隆・牛島幸一郎・赤木剛士・大橋京平・Muqadas, Maqsood・岡田留伊・Oscar, Mitalo・Hakim, Kazimi
2. 発表標題 貯蔵温度と1-MCP, エディブルコーティング処理がリンゴ果実の生理と品質に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasutaka Kubo, Oscar MITALO, William ASICHE, Eric MWORIA, Rui OKADA, Willis OWINO, Koichiro USHIJIMA
2. 発表標題 Characterization of Ripening Related Genes Involved in Ethylene Independent Low Temperature Modulated Ripening in Kiwifruit During Storage and On Vine
3. 学会等名 X.international symposium of kiwifruit 3093 27-30 September 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Furuta ¹ , O. W. Mitalo, T. Otsuki, R. Okada, K. Ohashi, K. Masuda, T.Akagi, K. Ushijima, R. Nakano, Y. Kubo
2. 発表標題 Effect of storage temperature on development of chilling injury and its transcriptome analysis in Fuyu persimmon fruit with or without 1-MCP treatment
3. 学会等名 International Symposium on Persimmon S7-P-2 September 20-26, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田真穂、大槻巧、岡田留伊、寒川萌香、阿部大吾、赤木剛士、牛島幸一郎、久保康隆
2. 発表標題 エチレン処理と貯蔵温度が小原紅早生ウンシュウミカン果実の着色に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazimi, AH., 大槻巧、岡田留伊、寒川萌香、牛島幸一郎、飯田真穂、Mitalo, O., Azimi, A.,久保康隆
2. 発表標題 Effects of 1-MCP on ethylene production and quality attributes of pear and apple fruit during long term storage
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保康隆
2. 発表標題 果実の成熟・軟化機構に関する研究-エチレン誘導性成熟と低温誘導性成熟の分子機構の解析とその利用
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牛島 幸一郎 (USHIJIMA kohichiro) (20379720)	岡山大学・環境生命自然科学学域・教授 (15301)	
研究分担者	矢野 健太郎 (YANO Kentaro) (00446543)	明治大学・農学部・専任教授 (32682)	
研究分担者	阿部 大吾 (ABE Daigo) (10414773)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター・主任研究員 (82111)	
研究分担者	加藤 雅也 (KATO Masaya) (10432197)	静岡大学・農学部・教授 (13801)	
研究分担者	赤木 剛士 (AKAGI Takashi) (50611919)	岡山大学・環境生命科学学域・研究教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河井 崇 (KAWAI Takashi) (90721134)	岡山大学・環境生命科学学域・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関