

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580044

研究課題名（和文）モモ果実成熟初期のエチレン生成に及ぼすオーキシンの分子機構

研究課題名（英文）Effect of Auxin on ethylene biosynthesis of peach fruit ripening

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 栽培・流通利用研究領域・主任研究員

研究者番号：10355381

研究成果の概要(和文):モモ果実には、成熟期にエチレン生成量が増加し軟化する溶質モモと、エチレン生成量が増加せず軟化しない硬肉モモがある。硬肉モモ果実では、成熟後期に IAA 内生量が増加しないため、エチレン生成量が増加せず軟化しないことを明らかにした。また、溶質モモの成熟初期は IAA が関与しない微量なエチレン生成により糖度の上昇等は起こり、成熟後期は IAA が引き金となり多量のエチレンが生成され果実が軟化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): The fruit of stony hard peach cultivars do not soften and produce little ethylene due to low expression of *PpACS1*. The IAA concentration increased suddenly just before harvest time in melting flesh peaches. In contrast, the IAA concentration did not increase in stony hard peaches. These observations indicate that suppression of *PpACS1* expression at the late-ripening stage of stony hard peach may result from a low level of IAA, and a high concentration of IAA is required to generate a large amount of system 2 ethylene in peaches.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

エチレンは様々な生理作用を持つ植物ホルモンであり、リンゴ、モモ等のクライマクテリック型果実の成熟を制御する最も重要な因子の一つである。溶質モモは果実成熟期に達するとエチレン生成量が増加し、それによって果肉軟化等の果実成熟が進行する。一方、硬肉モモにおいて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は認

められるが、エチレン生成の上昇や果肉の軟化は見られない。これまでに我々は、硬肉モモにおいて、エチレン生合成経路の鍵酵素である ACC 合成酵素遺伝子ファミリーの一つ *PpACS1* の発現が果実成熟時期に特異的に抑制されているため、エチレン生成が起こらず、軟化しないことを明らかにした(Tatsukira, 2006, *J. Exp. Bot.*, 57, 1281-1289)。硬肉モモにおける *PpACS1* の発現制御因子

を明らかにするために、溶質モモおよび硬肉モモにおける *PpACS1* の発現様式と似た挙動をする遺伝子群について、DNA マイクロアレイ解析法を用いて明らかにした。その結果、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*, *SAUR* 等) の発現様式は *PpACS1* のものと良く一致していることが明らかとなった。即ち、これら遺伝子の発現量は、成熟期に達すると溶質モモでは増加するが、硬肉モモ果実では増加しなかった。オーキシン誘導性の遺伝子の発現量が硬肉モモ成熟果実において減少していたことから、この組織において内生オーキシン (IAA) 含量が減少している可能性が考えられた。また、溶質モモにおいては、*PpACS1* の発現様式が *Aux/IAA*, *SAUR* のものと類似していたことから、オーキシンは成熟開始のシグナル物質として働き、エチレンはオーキシンのシグナルを受けて生成が誘導され、それによって軟化関連の遺伝子発現が誘導されている可能性が示唆された。

モモの成熟にオーキシンが関与している可能性については、モモ果実成熟期におけるエチレン生成量の増加は内生 IAA の増加と一致すること (Tonutti ら, 1991)、モモ果実に合成オーキシン剤処理をすると、軟化やエチレン生成が促進されること (Agusti ら, 1999)、モモ果肉ディスクにオーキシン処理をするとエチレン生成が起こること (Ohmiya, 2000) 等の報告があった。また、近年、モモ DNA マイクロアレイの解析から、成熟期にオーキシン誘導性遺伝子の発現が増加することも示されていた (Trainotti ら, 2007)。しかし、成熟過程におけるオーキシンとエチレン生成の分子機構については明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

オーキシンがモモ果実の成熟にエチレンを介して重要な影響を及ぼしていると考えられるので、硬肉モモと溶質モモの果実を用い、オーキシンが成熟初期のエチレン生成および成熟進行に及ぼす影響を分子レベルで解明する。

具体的には、硬肉モモ果実成熟期特異的に IAA 含量が低下している可能性について検討するために、溶質モモおよび硬肉モモ果実生育期間における IAA 含量を測定する。更に、硬肉モモ果実にオーキシン処理をすることによって、オーキシンが硬肉モモのエチレン生成や果実軟化に及ぼす影響について明らかにする。更に溶質モモにおいては、オーキシン作用阻害剤等を用いてオーキシンの影響を阻害することによって、エチレン生成および果実軟化に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モモ果実における内生オーキシンの動向
溶質モモ ‘あかつき’ と硬肉モモ ‘まなみ’ の果実について、開花後から約 10 日おきに定期的にサンプリングした。また、硬肉モモ ‘おどろき’ については成熟果実のみをサンプリングした。これらの果実は液体窒素で凍結後、 -80°C フリーザーに保管した。組織から Edlund ら (1995) および Zourelidou ら (2009) らの方法に従って IAA 抽出後、GC-MS を用いて IAA 含量を測定した。

(2) 果実成熟に及ぼすオーキシンの影響について

溶質モモ ‘あかつき’ の未成熟果実 (開花 88 日後の果実)、硬肉モモ ‘まなみ’ および ‘おどろき’ の成熟果実に合成オーキシン剤である 1-ナフチル酸 (NAA) をスプレーで塗布した後に貯蔵した。経時的にサンプリングを行い、エチレン生成量および果肉硬度を測定した後、RNA 抽出用に果肉を凍結保存した。

(3) 硬肉モモ果肉ディスクにおけるオーキシン剤の影響

硬肉モモ ‘まなみ’ 成熟果肉を用いて、ディスクを作成し、IAA, NAA, 2, 4-D 処理をした。その後、エチレン生成量を測定し、果肉は RNA 抽出用に凍結保存した。

(4) アンチオーキシン剤の溶質モモにおけるエチレン生成および果肉硬度に及ぼす影響について

開花 91 日および 102 日後の ‘あかつき’ 果実に、アンチオーキシン剤である 1 mM α -(phenylethyl-2-one)-IAA (PEO-IAA) (Hayashi et al., 2008, 2012) を樹上でスプレー処理した。開花 105 日後 (収穫適期) に収穫し、エチレン生成量および果肉硬度を測定した。果肉は RNA 抽出用に凍結保存した。

(5) 遺伝子発現の解析

凍結した組織から全 RNA 抽出後、DNase 処理をした RNA を鋳型として cDNA を合成した。これらを用いて、リアルタイム PCR 定量法によって遺伝子発現について調べた。

4. 研究成果

(1) モモ果実における内生オーキシンの動向
モモ果実の生育ステージは果実の生長速度等の違いから、3 期に分けることができる。第 1 期は結実後細胞分裂が盛んに起き、細胞肥大が著しい時期である。第 2 期は、核が硬化する硬核期と呼ばれる期間で、果実の生長速度がやや遅くなる。第 3 期は硬核期後、再び細胞肥大が起こる時期であり、その後果実は成熟期となる。溶質・硬肉モモともに、果実重量当たりの IAA 内生量は第 1 期の結実後

に最も高いが、その後果実生育期間を通じて徐々に減少する傾向を示した。過去の報告においては、第2期の硬核期に IAA 含量が最も少ないと考えられていたが、本研究では、硬核期において IAA 量は減少傾向を示すものの、十分検出可能な量であった。第III期に入ると‘あかつき’および‘まなみ’共に更に IAA 量は減少し、収穫適期2週間ほど前から検出限界以下となった。その状態が数日続いた後、‘あかつき’では再び IAA 量が急激に増加し、収穫適期時には 10~15 nL/g 果実重 となった。一方、‘まなみ’では、収穫期に達しても IAA 含量は増加しなかった(図1)。更に別の硬肉品種である‘おどろき’についても、成熟果実における IAA 量は‘まなみ’と同量程度であった。以上の結果より、溶質モモの果実成熟期において IAA 含量が増加することは、モモのエチレン生成および軟化と関連があると考えられた。また、硬肉モモでは IAA 量が低いために軟化抑制が起こると推測された。

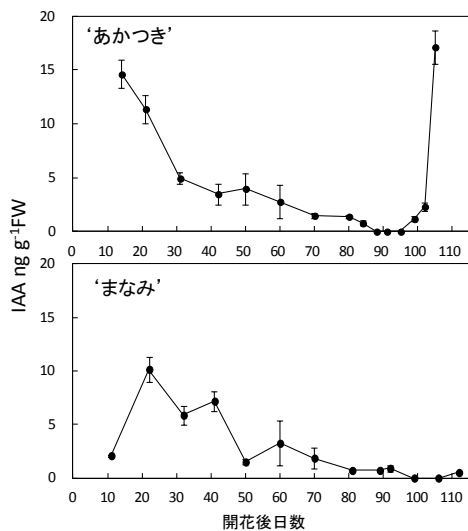


図1 モモ果実生育期間中の IAA 量の変化。上段: 溶質品種‘あかつき’、下段: 硬肉品種‘まなみ’

(2) モモ果実成熟に及ぼすオーキシンの影響について

モモ果実軟化とオーキシンの直接的な関係を明らかにするために、果実におけるオーキシシン剤塗布試験を行った。最初に‘あかつき’の収穫適期10日前の果実(エチレン生成量が上昇する前)を収穫し、0.1 mM NAA または 1 mM NAA をスプレー処理し、4日間貯蔵した。NAA 処理したものについては、濃度依存的にエチレン生成量は増加し、果肉硬度も低下した。エチレン生合成経路の酵素 *PpACS1*, *PpACO1* および軟化関連酵素 *PpPG2* の

発現量についても NAA 濃度依存的に発現量は増加していた。

硬肉モモ‘まなみ’と‘おどろき’の成熟果実について 0.1 mM NAA, 0.5 mM NAA, 1 mM NAA をそれぞれスプレー処理し、4日間貯蔵したところ、NAA の濃度依存的にエチレン生成量は増加し、果肉硬度は低下した。‘まなみ’と‘おどろき’に 20 ppm エチレンを通気処理をすると、エチレン生成量は増加せず、果肉硬度は低下した(図2)。

以上の結果から、オーキシシン処理によって、溶質モモにおいては、未成熟果実の成熟(軟化)は促進され、硬肉モモにおいてはエチレン生成が起こり、果肉硬度が低下することが明らかとなった。

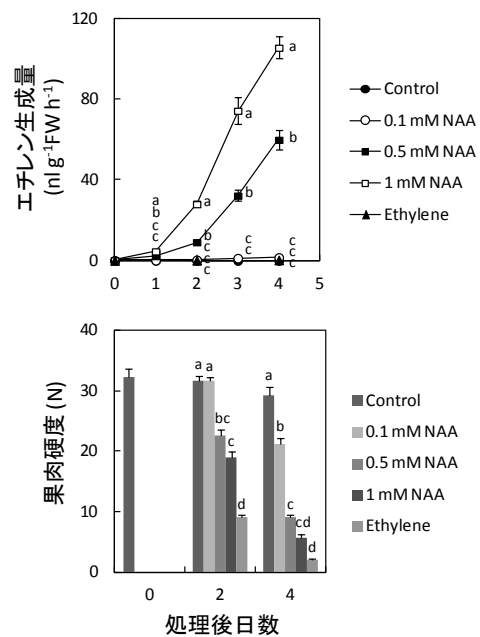


図2 ‘まなみ’に NAA またはエチレン処理した時のエチレン生成量(上段)、果肉硬度の変化(下段)

(3) 硬肉モモ果肉ディスクにおけるオーキシシン剤の影響

硬肉モモ果肉ディスクを作成し、IAA および合成オーキシシン剤である 2,4-D または NAA 処理をしたところ、いずれのオーキシシン剤についてもエチレン生成量は増加し、*PpACS1* および *PpPG2* の遺伝子発現量も増加した(図3)。オーキシシン剤の中では、NAA が最も効果が高かった。

(4) アンチオーキシシン剤の溶質モモにおけるエチレン生成および果肉硬度に及ぼす影響について

アンチオーキシシン剤として知られる PEO-IAA はオーキシシン受容体タンパク質のオーキシシン結合部位に結合することで、オーキシシンによって引き起こされる植物の様々な

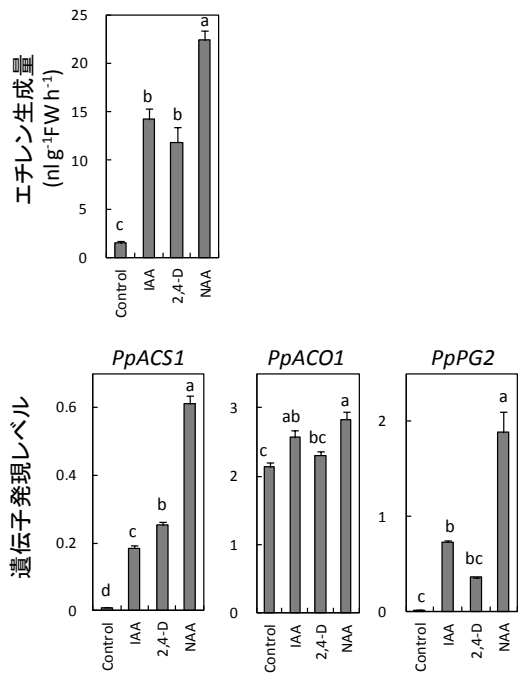


図3 ‘まなみ’ 果肉ディスクにおけるオーキシシン剤処理のエチレン生成（上段）および遺伝子発現（下段）に及ぼす影響。

反応を阻害する作用を持つ。本研究では、溶質モモ成熟期における内生 IAA の影響を調べるために、収穫前の樹上果実にスプレー処理をした。適期に収穫した果実について、エチレン生成量、果肉硬度について調べると、有意差は示さないものの、アンチオーキシシン剤処理をした果実でエチレン生成量は少なく、果肉硬度は高い傾向を示した。これらの果実における遺伝子発現について調べたところ、PpACS1, PpACO1 および PpPG2 はアンチオーキシシン剤処理した果実において発現が抑制されていた。また、あかつき果肉ディスクを作成しアンチオーキシシン剤の影響を調べたところ、PpACS1, PpPG2 の遺伝子発現は抑制されていた（図4）。この結果から、内生 IAA は溶質モモ成熟果実におけるエチレン生成および軟化に関与していることが明らかとなった。

以上の結果を通じて、溶質・硬肉モモとも成熟初期に生成される微量なエチレン生成（システム1のエチレン生成）は正常に起こることから、システム1のエチレン生成には、IAA が関与しないと推測された。また、溶質モモでは成熟後期に起こるエチレン生成量の増大（システム2のエチレン生成）に先行して、IAA 内生量の増加が認められたことから、システム2のエチレン生成には内生 IAA 量の増大が関与していることが明らかとなった。一方、硬肉モモでは、IAA 内生量の増加が起こらないため、システム2のエチレン

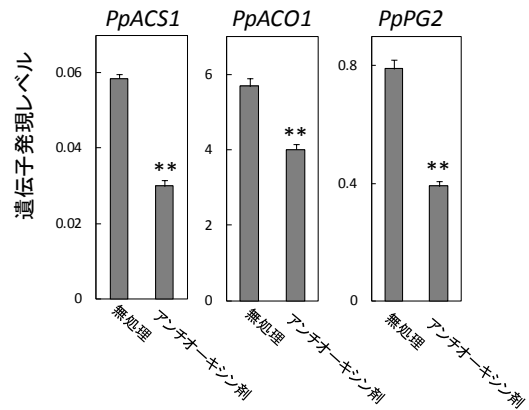


図4 ‘あかつき’ におけるアンチオーキシシン剤の遺伝子発現に及ぼす影響。

生成は起こらないことが明らかとなった。

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, Naoko Nakajima (他7名), Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). J.Exp.Bot. 査読有, 64, 2013, 1049-1059, doi:101093/jxb/ers381

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：果実の鮮度保持剤

発明者：立木 美保

権利者：横浜市立大学、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類：特許

番号：特願 2013-008344

出願年月日：25年1月21日

国内外の別：国内

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・食品産業技術研究機構
果樹研究所 栽培・流通利用研究領域・主任研究員

研究者番号：10355381

(2) 連携研究者

中嶋 直子 (NAKAJIMA NAOKO)
独立行政法人農業・食品産業技術研究機
構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領
域・主任研究員

研究者番号：20332299