

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292056

研究課題名(和文) 単一bZIP型転写因子遺伝子のショ糖非感受性型の導入による高糖度果実の作出

研究課題名(英文) Generation of sweeter tomato fruits by engineering a single transcription factor gene

研究代表者

草野 友延 (Kusano, Tomonobu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40186383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、トマトからtbz17の相同遺伝子である2つの遺伝子を単離し、まずこれらの遺伝子がショ糖による翻訳抑制現象(Sucrose-induced Repression of Translation, SIRT)を引き起こすことを確認した。ショ糖濃度を感知する上流ORFを含む領域を削除し、果実特異的プロモーターの下流に置いた組換えプラスミドを構築した。このプラスミドを生食用にも用いられているマナーメーカー品種に形質導入し、トマト果実を得た。これらの果実内のショ糖、グルコースそしてフルクトースの総和は野生株トマトの値の約1.5倍となっており、本申請の当初目的を達成することができた。

研究成果の概要(英文)：Sucrose-induced repression of translation (SIRT), which is mediated by upstream open reading frames (uORFs), was initially reported in AtbZIP11. Here, two AtbZIP11 orthologous genes, SlbZIP1 and SlbZIP2, were identified in tomato. SlbZIP1 and SlbZIP2 contained several uORFs in the cDNA 5'-leader regions. The second uORFs were conserved and involved in SIRT. Tomato plants were transformed with binary vectors in which only the main open reading frames (ORFs) of SlbZIP1 and SlbZIP2 were placed under the control of the fruit-specific promoter. Growth and morphology of the resulting transgenic tomato plants were comparable to those of wild-type plants. Transgenic fruits were approximately 1.5-fold higher in sugar content than nontransgenic tomato fruits. In addition, the levels of several amino acids were higher in transgenic fruits than in wild-type fruits. This 'sweetening' technology is broadly applicable to other plants that utilize sucrose as a major translocation sugar.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：トマト bZIP gene 翻訳抑制 上流ORF ショ糖 転写因子 高糖度化

1. 研究開始当初の背景

申請者がイネの低温誘導性遺伝子の1つとして単離した low temperature-induced protein gene 19 (lip19)の遺伝子産物は、149 アミノ酸からなる bZIP タンパク質をコードしていた(Aguan et al., 1993)。その後、申請者のグループを中心に lip19 の相同遺伝子としてトウモロコシの mlip15 遺伝子(Kusano et al., 1995)、タバコの tbz17 (Kusano et al., 1997)そして二十日ダイコンの rlip (Ito et al., 1999)が単離され、それぞれ特徴づけがなされた。これらはいずれも低温誘導性および老化時に発現が誘導される遺伝子であった。そこで申請者はこれらを lip19 sub-family 遺伝子と呼称した。

シロイヌナズナには75種のbZIP遺伝子が存在しており、これらは現時点で13のクラス(A~LそしてS)に分類されている。前述の lip19 sub-family 遺伝子はシロイヌナズナのクラスS(17遺伝子が含まれる)に分子系統学的に近縁である。オランダの Smeekens のグループは、シロイヌナズナのクラスSに分類される AtbZIP11 遺伝子のプロモーター解析の研究より、AtbZIP11 の主翻訳領域 (main open-reading frame, mORF)の翻訳がショ糖特異的に抑制されることを発見し、この現象をショ糖誘導性翻訳抑制 (Sucrose-Induced Repression of Translation, SIRT)と命名した(Rook et al., 1998)。さらに同研究グループは、AtbZIP11 の SIRT には、AtbZIP11 転写物の 5'-leader 領域に含まれる短い翻訳領域 (upstream open-reading frame, uORF)が必要であることを明らかにした(Wiese et al., 2004)。シロイヌナズナのクラスSのうち他の4つのbZIP遺伝子が同じようにSIRTを示し、それらの5'-leader領域には進化的に保存されてきたと考えられる25~40のポリペプチドをコードするuORFが存在した。そこで、これら5種のbZIP遺伝子(AtbZIP1、AtbZIP2、AtbZIP11、AtbZIP44そしてAtbZIP53)をクラスS1に再分類した。

申請者は、lip19 sub-family のメンバー全てがクラスS1の転写物の5'-leader領域に保存されているuORFを持つことを確認した。そしてタバコのtbz17遺伝子を用いてSIRTがこのuORF依存的に起こることを確認した(Thalor et al., 2012)。さらにSIRTに必要なuORF部分を欠失したtbz17のmORF部分のみを過剰発現する形質転換タバコを作出した。得られた形質転換タバコ植物は、概ね生育が野生株に比べて悪かった。また葉が明らかに野生型に比べて厚かった(Thalor et al., 2012)。興味深いことに、上述の形質転換タバコの葉のショ糖濃度は野生型タバコの同じ葉位の葉のものとは比べて約4倍高くなっていた

(Thalor et al., 2012)。一方、グルコースとフルクトース濃度は野生株よりも低下していた。tbz17 遺伝子の翻訳産物であるTBZ17の標的遺伝子はアスパラギン合成酵素遺伝子およびプロリン脱水素酵素遺伝子であり、TBZ17がショ糖合成に關与するショ糖6リン酸合成酵素遺伝子やショ糖6リン酸脱リン酸化酵素遺伝子の発現を直接促進せず、間接的にショ糖合成系が高まることを明らかにした(Thalor et al., 2012)。こうした研究背景から、トマトのtbz17相同遺伝子を用いてトマト果実の高ショ糖化を検討することを着想した。

2. 研究の目的

トマト植物より、SIRTを示すbZIP遺伝子を探索した。タバコtbz17遺伝子に相同性を示す4つの候補bZIP遺伝子を見つけた。このうち2つの遺伝子SlbZIP1とSlbZIP2が実験的にSIRTを示すことを確認した。この2つの遺伝子のmORF部分を果実特異的なプロモーターの支配下に発現する組換えプラスミドを構築し、アグロバクテリウム細菌を介して生食用のトマト品種であるマニーメーカーに導入し、果実部分のショ糖濃度が高まっているかを検討した。また、SlbZIP1およびSlbZIP2の標的遺伝子がいずれもアスパラギン合成酵素遺伝子およびプロリン脱水素酵素遺伝子であったことからトマト果実のアミノ酸含量の変化についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 植物材料と生育条件

トマト植物は、Moneymaker品種を用いた。必要に応じミニトマト品種Micro-Tom(マイクロトム)も用いた。SIRT確認実験にはシロイヌナズナのロゼット葉を用いた。

3-2. 分子系統解析

アミノ酸配列のアライメントはClustalWプログラムを用いた。分子系統樹はMEGA version6の最尤法アルゴリズムを用いて作成した。

3-3. GFP融合プラスミドの構築と蛍光顕微鏡を用いた観察

SlbZIP1とSlbZIP2のORF部分の断片をPCR法で調製した。得られたDNA断片の塩基配列が正しいことを確認した後、pGFP2ベクター(Yang et al., 2001)に挿入し組換えプラスミドを作成した。これらのプラスミドをパーティクル・ガン法でタマネギに導入した。約24時間後タマネギ表皮細胞内のGFP蛍光の位置を蛍光顕微鏡で観察した。

3-4. SIRT法

SlbZIP1とSlbZIP2の5'-leader領域のDNA断片をCaMV 35Sプロモーター配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子ORFの間に挿入した組換えプラスミドを作成した。これらをシロイヌナズナのロゼ

ット葉にパーティクル・ガン法で導入後、一方を通常のムラシゲ・スクーグ(MS)液体培地で、他方を6%ショ糖含有MS培地で培養した。両者のルシフェラーゼ活性を比較して、SIRTの有無を検討した。

3 - 5 . 転写活性の検定

S1bZIP1 と S1bZIP2 タンパク質の転写活性化の有無については Yang et al., (2001) に述べた方法で検定した。

3 - 6 . アグロバクテリウム細菌を用いたトマトの形質転換法

Khuong et al., (2013) に述べられている方法に準拠してトマト MoneyMaker 子葉切片にアグロバクテリウムを感染させた。詳細は Sagor et al., (2016) に記載してある。

3 - 7 . 糖分析

トマト果実のショ糖、グルコースそしてフルクトース濃度は、Kanayama et al., (2014) に述べた方法にて行った。

3 - 8 . アミノ酸分析

トマト果実のアミノ酸含量は、Grunau and Swiader (1992) の方法により液体クロマトグラフィー法を用いて行った。

3 - 9 . 他の分子生物学的手法

ゲノム PCR、RT-PCR そして定量的 RT-PCR 法については Sagor et al., (2016) に詳しく記した。

4 . 研究成果

トマトより S1bZIP1 そして S1bZIP2 と名付けた2つの bZIP 遺伝子を見出した。両者は、それぞれタバコ tbz17(Kusano et al., 1997) とタバコ tbzF(Yang et al., 2001) に最も近縁の遺伝子であった。S1bZIP1 と S1bZIP2 タンパク質は植物細胞内で核に局在した。また両 bZIP タンパク質は転写活性化能を有していた。そして進化的に保存された uORF 依存的な SIRT 現象を引き起こすことも確認した。

そこでこれら遺伝子の mORF 部分のみを果実特異的なプロモーターである E8 プロモーターの支配下に発現する組換えプラスミドを構築し、生食用トマト品種 MoneyMaker に導入した。得られた独立した形質転換トマト植物体では、全ての生育ステージにおいて野生型トマトの生育(果実をつけた時点での植物の高さ、全体の姿、小葉の茎の長さ、小葉中の葉の数、開花に要した日数、花の数、受粉率、果実の直径、果実中の種子の発芽率等)において野生株と大きな差異を見出すことはできなかった。次に完熟果実中のショ糖、グルコースそしてフルクトース濃度を測定したところ6系統中3系統で野生株の全糖濃度の約1.5倍であった。他の3系統においても全糖濃度は野生株のものよりも高い値であった。これは T3 世代の植物果実の結果であるが、T1 および T2 世代果実の糖濃度(Brix 値)でも同様の傾向を得ていた。従っ

て、本アプローチでの果実の高糖度化法は遺伝的に安定であると考察している。S1bZIP1 と S1bZIP2 タンパク質の下流の標的遺伝子はアスパラギン合成酵素遺伝子そしてプロリン脱水素酵素遺伝子であることを確認した。そこで果実中のアミノ酸組成に変化が予測されたので、アミノ酸含量を比較した。予測通りアスパラギン、グルタミンに加えアラニン、セリン、スレオニンそして GABA の量が形質転換トマトで増えていた。かつ総アミノ酸含量も野生株に比べ約20%程高い値であった。

これまでの申請者の解析では、被子植物ではいずれも1植物当たり複数の SIRT を示す bZIP 遺伝子が存在すると予測される。因みにシロイヌナズナには、前述した5遺伝子が存在した。従って、本高糖度化手法は、主たる転流糖がショ糖である植物に広く応用できるものと考えている。

今後の課題としては、果実特異的なプロモーターの違いが果実の糖濃度にどのような影響を与えるのかを検討すべきと考えている。事実、申請者は 2A11 プロモーターの支配下に S1bZIP1 mORF と S1bZIP2 mORF を発現するトマトを作成していたが、十分解析が行うことができずに研究機関が終了してしまっ

た。本研究の成果は、以下に記載の原著論文に公表した。また東北大学を通してプレスリリースを行ったところ、複数のメディアにも取り上げていただいた。

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) Sagor GHM, Berberich T, Tanaka S, Nishiyama M, Kanayama Y, Kojima S, Muramoto K, Kusano T (2016) A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene. Plant Biotechnology Journal 14: 1116-1126.

[学会発表](計 4 件)

- (1) Kusano T (invited) Generation of sweeter tomato fruits by engineering a single transcription factor gene. Tohoku University-Russian Academy Joint Seminar. November 25, 2015, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University.
- (2) Sagor GHM, Berberich T, Tanaka S, Kojima S, Nishiyama M, Kanayama Y, Muramoto K, Kusano T: 新規な果実高糖度化法の開発~トマトでの試み~ 平成27年10月3日 日本農芸化学会東北支部会 東北大学農学部
- (3) 田中俊、井澤翔、Thomas Berberich、草野友延 ショ糖による翻訳制御を受ける

bZIP型転写因子遺伝子の特徴づけ 日本農芸化学会 2014 年大会 平成 26 年 3 月 27 日～30 日 明治大学 生田キャンパス

- (4) 田中俊、Sunil Kumar Thalor、朱旭君、Thomas Berberich、草野友延 ショ糖による翻訳制御を受ける bZIP 型転写因子遺伝子の改変による高ショ糖植物の分子育種 日本農芸化学会東北支部第 148 回大会 平成 25 年 10 月 26 日 岩手大学農学部

〔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〕

- (1) 新たな果実高糖度化手法の開発-甘いトマト果実の作出に成功-
2015 年 9 月 25 日
東北大学プレスリリース
<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2015/09/press20150925-02.html>
- (2) Growing sweet on tomatoes
2015 年 11 月 19 日
EurekAlert Science News
http://www.eurekalert.org/pub_releases_ml/2015-11/aaft-111915.php
- (3) Growing sweet on tomatoes
2015 年 11 月 25 日
Science Daily
<https://www.sciencedaily.com/releases/2015/11/151119112429.htm>
- (4) Growing sweet on tomatoes
2016 年
Asia Research News 2016 page 45
http://www.researchsea.com/asia_research_news_2016.php

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草野 友延 (Tomonobu Kusano)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：40186383

- (2) 研究分担者
児島 征司 (Seiji Kojima)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教
研究者番号：20745111

(3) 連携研究者
()

研究者番号：