

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660027

研究課題名(和文)低温によって誘導される果実と葉の新規成熟・老化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel mechanism in fruit ripening and leaf senescence induced by low-temperature exposure

研究代表者

久保 康隆 (KUBO, Yasutaka)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：80167387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：キウイフルーツとポプラ，ミカンを材料にエチレンによる成熟・老化誘導と低温遭遇による成熟・老化現象について次世代シーケンサーとReal-Time PCR法を用いて比較・解析した。エチレン誘導と低温誘導の成熟・老化には、末端で共通する関連遺伝子が働く一方で、異なる転写因子によって制御される独立な現象であることが明確になった。低温誘導機構における新規転写因子，NACおよびERFの特定は，今後の成熟・老化機構研究で大きな新展開の契機になる。

研究成果の概要(英文)：Fruit ripening and senescence induced by ethylene and low-temperature exposure were investigated using next generation sequencer and Real-Time PCR in kiwifruit, poplar and Satsuma mandarin. The low-temperature induced fruit ripening shared gene and their regulatory mechanism with ethylene induced ripening in part, however, there are several distinct differences between the two ripening regulation. Identification of transcription factors, NACs and FRFs, responsible for ripening and senescence by low-temperature and ethylene will play important role for new global understanding of physiology in fruit ripening and senescence.

研究分野：園芸利用学

キーワード：果実成熟 低温誘導 エチレン 転写因子

## 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。果実は成熟にエチレンを必須とするトマトやリンゴ、キウイフルーツなどのクライマクテリック型果実と自らはエチレンを生成せずに成熟するカンキツやブドウ、イチゴなどのノン・クライマクテリック型果実に大別される。また、葉や花の老化にもエチレンが深く関与する場合と関与しない場合がある。いずれの成熟や老化現象でも、最終段階に細胞壁の分解とクロロフィルやフラボノイド色素の劇的な変動を伴うので、類似の遺伝子群の活性化が推定される。高等植物ではエチレン合成はACC合成酵素とACC酸化酵素によって律速され、その信号はETR1を受容体としCTR1/EIN2/EIN3/EILへと伝達され、その下流で分岐し、多数の成熟・老化関連遺伝子制御していると推測されている。さらに、果実成熟にはエチレン信号伝達系とは別経路のNOR/NAC/MADS-RIN成熟関連遺伝子の信号伝達が必須であり、最近、RINは複合体を形成し各種の成熟・老化関連遺伝子のプロモーター部に結合することも示された。このように成熟・老化機構に関するエチレン系とRIN系および最下流部の理解は分子レベルで急速に進展している。しかし、成熟・老化の最初の引き金となる因子やその制御には、生理学的プログラムが推定され、環境要因の関与も明らかではあるが、その実態はほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は低温誘導を焦点として果実の成熟・落果と葉の紅葉、落葉を老化現象として一体的に捉え、共通する新規制御機構を解明しようとする先駆的取り組みである。多くの果実の成熟や葉の老化はエチレン誘導型制御系によって制御されていると考えられており、エチレンとは独立した制御系やエチレンの上位の制御系についてはRIN制御系を除いてほとんど解析されていない。その理由は研究の糸口となる現象や材料が乏しいことにある。筆者らはエチレンによって成熟するとされているキウイフルーツ果実の貯蔵技術研究の中で、「低温遭遇によってエチレンの作用なしに成熟する」という全く予想外の現象を発見した(Mworio, E. G., and Y. Kubo et al. 2011, 2012)。一方、ミカンやカキの着色やカエデやイチョウ、ポプラなどの紅葉は秋の訪れによる低温遭遇によって誘導・促進される。すなわち、温帯原産の多年生植物では、「秋に果実成熟と落葉を完了させ冬に備える」必要から果実や葉の成熟・老化の最初の誘導要因として低温遭遇が想定できる。近年、種々の植物種において大規模EST情報が公開され、アレイ技術による網羅的遺伝子解析可能になってきた。またLC-MASS/GC-MASSを利用したメタボロー

ム解析も普及段階を迎えた。本研究は、アレイ技術とメタボローム解析を活用して、低温遭遇したキウイフルーツ果実とポプラ葉を材料に新規の成熟・老化制御系の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 貯蔵中の配置法、温度および殺菌剤処理がキウイフルーツ果実のエチレン生成開始時期に及ぼす影響

キウイフルーツ果実には貯蔵病害として「軟腐病」があり、発病率は70%を超える場合もある。軟腐病を発病すると、果実は多量のエチレンを生成し、この病害誘導エチレンが周囲の果実に影響を与える可能性がある。したがって、果実の成熟生理を正しく理解するためには、病害誘導エチレンの影響が無い条件で解析する必要がある。そこで、「ヘイワード」、「レインボーレッド<sup>®</sup>」、「さぬきゴールド」果実を貯蔵温度22℃および5℃で貯蔵し、果実の配置法、殺菌剤処理、貯蔵温度および1-MCP処理がキウイフルーツ果実のエチレン生成および果実軟化に及ぼす影響について調査した。

(2) キウイフルーツにおけるエチレン成熟と低温誘導成熟の遺伝子発現比較

「さぬきゴールド」果実を商業的収穫熟度で収穫した。低温貯蔵区(5℃)と室温貯蔵区(22℃)を設定し、それぞれに無処理区と1-MCP処理区(2 $\mu$ LL<sup>-1</sup>; 12 h, 2回/週)を設定した。なお、室温貯蔵区では軟腐病の影響を避けるために、果実を5cm程度離して配置し、エチレン生成は即座に取り除いた。また、室温で5000ppmプロピレン(50ppmエチレン相当)処理区も設けた。経時的に果肉硬度、可溶性固形物含量および滴定酸含量を測定した。無処理果実、プロピレン処理果実、20および5℃貯蔵果実(無処理区/1-MCP処理区)の果肉からRNAを抽出してcDNAを合成した後、RNAシーケンズ解析による網羅的遺伝子発現解析を行った。また、リアルタイムPCR法を用いて成熟関連遺伝子の発現量解析を行った。

(3) ポプラ葉およびミカン果皮における色変化の解析

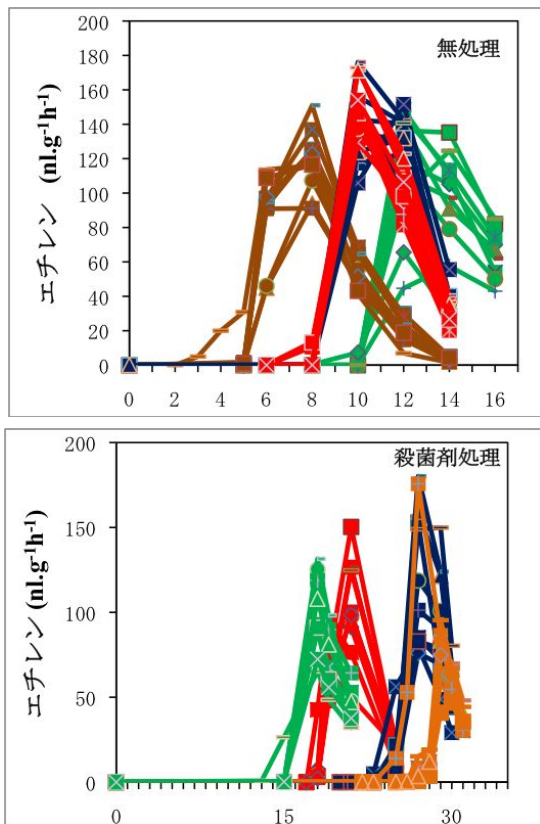
ポプラ葉を8月下旬から11月下旬にかけて経時的にサンプリングし、色調変化を調べるとともにRNA抽出を行った。温州ミカン未熟段階の9月上旬に収穫し、5-25℃の温度下で貯蔵した。また、室温下でのプロピレン処理も行った。これらのサンプルについて、経時的に色調を測定するとともに、RNAを抽出し、Real Time PCR法を用いて遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 軟腐病がキウイフルーツのエチレン生成と果実成熟に及ぼす影響

いずれの品種においても、密集区の同一容器内の個々の果実は、ほぼ同調してエチレン

生成を開始し、典型的なクライマクテリックライズパターンを示した(第1図参照)。これに伴って、果実の成熟・軟化が急速に進行した。ただし、各容器間ではエチレン生成の開始時期は大きく異なっており、同一処理区であっても1週間以上のずれが見られる場合もあった。また、容器によっては10個の果実の中の1個のエチレン生成が他に先だって誘導される様相が見られた。殺菌剤処理は、いずれの品種でも、エチレン生成の開始時期を遅らせる効果があった。エチレン生成が誘導されない果実では、果実成熟・軟化の進行は緩慢であった。したがって、常温貯蔵した場合の急速なエチレン生成開始と果実成熟の進行は軟腐病に起因することが示され、正確な果実成熟機構の理解には軟腐病の影響を除去した果実で行う必要があることが明らかになった。ただし、殺菌剤の多数回投与でも常温下での軟腐病発生を完全に抑止することは難しく、常温貯蔵は技術的に困難であると思われる。また、キウイフルーツはエチレンによって成熟するものの、低温に反応してエチレン信号なしに成熟する機構があることが確認された。



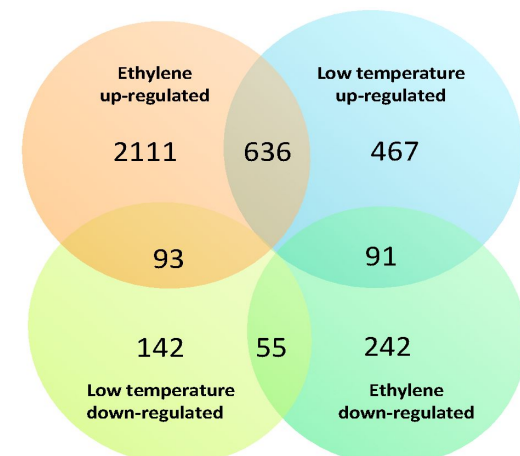
第1図 殺菌剤処理と配置法がキウイフルーツのエチレン生成に及ぼす影響  
同じ色の線は同じ容器の果実のエチレン生成量を示す

(2)エチレン成熟と低温誘導成熟の遺伝子発現比較

【低温による成熟誘導】軟腐病罹病果が生成するエチレンの影響を除いて'さぬきゴール

ド'果実を5で貯蔵すると、貯蔵4週目で果肉部硬度が22貯蔵果実と比較して顕著に低下した。また22貯蔵1-MCP処理果実は貯蔵8週目でも高い酸度を維持していたのに対し、5貯蔵果実は貯蔵4週目で急激に酸度が低下し、10、15貯蔵果実は貯蔵8週目にかけて酸度が低下した。またいずれの温度区でも糖度の上昇が見られた。このような低温による成熟の進行は1-MCP処理でも抑制できなかったことから、低温誘導型成熟現象が確認された。

【成熟関連遺伝子の解析】RNAシーケンス解析において、プロピレン処理によって発現が3倍以上に増加した遺伝子が2840個、1/3以下に減少した遺伝子が388個、5貯蔵で発現が3倍以上に増加した遺伝子が1194個、1/3以下に減少した遺伝子が290個、同定された(第2図参照)。これらの結果とそのアノテーションを基に成熟関連遺伝子の制御メカニズムを考察した。さらに、Real Time PCRによる遺伝子の発現解析で、細胞壁関連酵素である Pectate Lyase1(PL1)や Xyloglucan endotrans glycosylase (XET)では、プロピレン処理果実でのみ発現量が増加していた(第3図参照)。また Pectate Lyase2(PL2)や Expansin6(EXP6)、Pectin methylesterase inhibitor (PMEi)は5貯蔵果実でのみ発現が増加しており、Polygalacturonase (PG)や Expansin1(EXP1)はプロピレン処理果実と5貯蔵果実の両方で発現量が増加していた。また、転写因子である ERF4と ERF6はプロピレン処理にのみ、NAC4は低温にのみ、NAC8はエチレンと低温の両方に反応して発現が増加していた。以上のことから、遺伝子発現レベルでもエチレン成熟と低温誘導型成熟の存在が示され、さらにエチレン成熟と低温誘導型成熟はそれぞれ独立したメカニズムを有しており、一部を共有していることが示された。

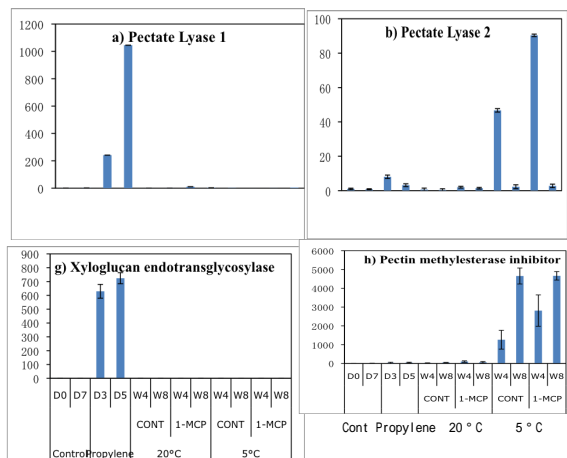


第2図 RNAシーケンス解析によるキウイフルーツの成熟関連遺伝子の網羅的解析(数字は遺伝子数)

Ethylene up-regulated:エチレン処理により発現レベルが3倍以上に増加

Low temperature up-regulated:低温処理に

より発現レベルが3倍以上に増加



第3図 キウイフルーツ果実における成熟関連遺伝子発現に及ぼすプロピレン処理および低温処理の影響

D0, 3, 7: 収穫後日数, W4, 8: 貯蔵週数

### (3) ポプラ葉およびミカン果皮における色変化の解析

ポプラ葉では10月から11月にかけて急速なクロロフィル含量の減少と黄化が見られた。ミカンでは、10°Cでの貯蔵果実で最も急速に黄化が進行し、25°Cおよび5°C下では1月後も収穫時とほぼ同様の緑色を呈していた。室温下でのプロピレン処理は、急速な黄化を誘導した。Real-Time PCR法で遺伝子発現を調査したところ、クロロフィル分解に關与するクロロフィラーゼ遺伝子発現が、プロピレン処理によって顕著に誘導されたが、低温では増加しなかった。したがって、エチレンによるクロロフィルの分解と低温応答の黄化には異なる制御機構が働いていることが明らかになった。

### 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) Asiche, W.O., E.G. Mworira, C. Oda, O. W. Mitalo, W.O. Owino, K. Ushijima, R. Nakano and Y. Kubo. 2015. Extension of Shelf-life by Limited Duration of Propylene and 1-MCP Treatments in Three Kiwifruit Cultivars. Hort. J. (In press). 査読あり

〔学会発表〕(計 6件)

(1) 久保康隆・W.O Asiche・谷川満里奈・日下部裕貴・山岡達也・牛島幸一郎・中野龍平. キウイフルーツにおける果実成熟機構の解析-エチレンと低温の役割. 平成25年度園芸学会中四国支部会. 香川大学農学部. 2013年7月20日

(2) Asiche O.W., Y. Kusakabe, Y. Kasahara, K. Ushijima, R. Nakano, and Y. Kubo. Evaluation of ripeness by a non-destructive method in kiwifruit ripened with postharvest propylene treatment or

on-vine. 10<sup>th</sup> JSOL International Symposium on Solanaceae Genomics. 2013年11月29, 30日. 大阪府立大学.

(3) Asiche A.O., Kasahara Y. Kusakabe Y. Ushijima K. Nakano R. and Kubo Y. Distinction between ethylene-dependent and low temperature modulated ripening in 'Sanuki Gold' Kiwifruit. 11<sup>th</sup> JSOL International Symposium on Solanaceae Genomics. 2014年10月25, 26日. 名古屋大学.

(4) Asiche O.W., Y. Kasahara, Y. Kusakabe, K. Ushijima, R. Nakano, and Y. Kubo. Comparative analysis of gene expression in 'Sanuki Gold' kiwifruit during ethylene dependent and low temperature induced fruit ripening. 平成26年度園芸学会秋季大会. 2014年9月27, 28日. 佐賀大学本庄キャンパス.

(5) 久保康隆・William O. Asiche・笠原有加・日下部裕貴・牛島幸一郎・中野龍平. 貯蔵中の配置法, 温度および殺菌剤処理がキウイフルーツ果実のエチレン生成開始時期に及ぼす影響. 平成26年度園芸学会秋季大会. 2014年9月27, 28日. 佐賀大学本庄キャンパス.

(6) 笠原有加・William O. Asiche・日下部裕貴・中村智哉・牛島幸一郎・中野龍平・久保康隆. 高品質新品種キウイフルーツにおける低温長期貯蔵の試み. 平成26年度園芸学会中四国支部会. 徳島県農林水産総合技術支援センター. 2014年6月21日

〔図書〕(計 1件)

(1) Kubo Y. Ethylene, oxygen, carbon dioxide, and temperature in postharvest physiology. In Kanayama Y. and Kochetov A. eds. Abiotic stress biology in horticultural plants. 2015. 17-33. Springer, Tokyo.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保康隆 (KUBO Yasutaka)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号: 80167387

(2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号: