

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660027

研究課題名(和文) 葉と果実のクロストーク：Tree Factorが支配する果実追熟性の機構解明

研究課題名(英文) The crosstalk between leaves and fruit: Effect of tree factor on fruit ripening.

研究代表者

板井 章浩 (ITAI, Akihiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10252876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セイヨウナシは樹に着生した状態では成熟が進行せず、収穫後の追熟により完熟する。この樹上完熟の阻害には、果実の成熟を阻害する物質が樹体に存在し、果実に供給されるtreeファクターが関与することが示唆されている。本研究では、このtreeファクターを遺伝子的、物質的に解明することを目的に、収穫前のセイヨウナシ果梗の環状剥皮により、ソースからの物質輸送を阻害し、1週間後の果実のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析を行った。無処理の果実と比較した結果、43遺伝子と24の一次代謝物の発現に有意な差が認められ、これらの遺伝子、一次代謝物がセイヨウナシの樹上完熟の阻害に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：European pear fruit can't ripen on the tree. They are harvested at the mature green stage and ripened off the tree. A tree factor that inhibits ripening has been postulated to explain this effect. However, until now, nobody has elucidated its identity. Here, we have investigated the profiles of metabolic substances induced by girdling the fruit peduncle to inhibit phloem transport of the tree factor. And we have searched genes related to tree factor's effect in European pear by RNA-seq analysis. Total 24 substances showed differences between fruit without girdling and with girdling by metabolome analysis. Also, up-regulated 9 genes and down-regulated 34 genes by girdling treatment were identified by RNA-seq analysis.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果実成熟抑制 メタボローム解析 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

ナシ属栽培植物は、セイヨウナシグループ、アジアナシグループの2つに大きく分類される。この両グループ間には、果実形質(肉質・形態・味・香り)、耐寒性、耐病性など形態・生理・機能など様々な遺伝的形質の違いが見られる。中でも、特に樹上では可食できず、収穫後の追熟期間を必要とするセイヨウナシと樹上から収穫してすぐに食べるニホンナシなどとは大きく果実形質が異なっている。このセイヨウナシが有する樹上で成熟しない、軟化しない追熟性は、キウイフルーツやアボカドなどでも見られ、その要因として葉から果実に移動し、樹上においては果実の成熟および細胞壁の軟化を抑制する Tree factor の存在が明らかとなっている。これまでの研究において、摘葉処理および環状剥皮処理により、果実成熟・軟化が著しく促進されることおよび樹上から切り離して2日程度で細胞壁軟化酵素の β -xylosidase や polygalacturonase などの遺伝子の発現が上昇することを明らかにしてきた (Itai et al. J. Exp. Bot. 50: 877-879, 1999; J. Exp. Bot. 51: 1163-1166, 2000; J. Exp. Bot. 54: 2615-2622, 2003)。この結果は、Tree factor は師管を通る物質であり、その供給が絶たれると比較的早くに阻害効果が見らなくなることを示している。しかし、Tree factor はこのように葉と果実の軟化・成熟とのクロストークに関与する物質であるが、未だその本体の物質および遺伝子本体の同定には世界の誰も至っていない。

2. 研究の目的

ナシにおいては、Tree factor が存在するセイヨウナシと存在しないニホンナシという、近縁の種にも関わらず、果実の成熟・軟化に要求性が大きく異なる。さらにこれまでにニホンナシ×セイヨウナシ集団の解析か

ら1対の主動要因の遺伝子支配を受けていることを示唆されている。そこで未だその正体が明らかでない Tree factor について、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析などのオーム解析および次世代シーケンスによるゲノム情報を用いて、その正体に迫ろうとすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と果梗への環状剥皮

鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンター大塚農場植栽のセイヨウナシ‘ラ・フランス’(*P. communis* L.) を実験に供試した。収穫前の‘ラ・フランス’の果梗上部に環状剥皮を行い、処理から1週間後、2週間後の果実と無処理の果実を収穫し、果実重、果実形、果皮色および果肉硬度を測定した。

(2) 果肉のメタボローム解析

環状剥皮処理から1週間後の処理区・無処理区果実の果肉約2gを液体窒素中で凍結粉碎した後、メタノール抽出を行い、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS法)によりメタボローム解析を行った。

(3) RNA-seq 解析(トランスクリプトーム解析)

1 RNA 抽出

供試材料各20gを液体窒素中で粉碎し、50ml ファルコンチューブを使用して抽出に用いた。80℃に加熱したXT-Buffer(0.2M 四ホウ酸ナトリウム十水和物、30mM EDTA、1%デオキシコール酸ナトリウム、1%SDS)、NP40 500 μ L、ポリビニルピロリドン(PVP) 1g、10mM ジチオトレイトール(DTT) 0.156g、20mg/ml Proteinase K 130 μ L 加え、42℃で90分振とう後、2M KCl を4ml 加え水中、60分静置した。その後、9,000rpm、20分、4℃で遠心分離し上澄みを回収し、8M LiCl 15ml 加えて水中で一夜静置後、9,000rpm、30分、

4 で遠心分離し上澄み除去後、2M LiCl 15ml を加え懸濁し、9,000rpm、20分、4 で遠心分離し上澄みを除去した。さらに 10mM Tris-HCl (pH 7.5) を 400 μ L 加え懸濁後、2ml-エッペンチューブに回収した後、2M 酢酸カリウム (pH 5.5) を 50 μ L 加え氷中、15分静置後 15,000rpm、10分、4 で遠心分離し上澄みを回収した。その後冷 100%Et-OH 1ml を加え、-80、30分静置後 15,000rpm、30分、4 で遠心分離し上澄みを除去した後、冷 70%Et-OH を 400 μ L 加え 15,000rpm、10分、4 で遠心分離し上澄みを除去して、微量用遠心濃縮機 MV-100 (TOMY) を用いて沈殿を 3 分間風乾し、Ultra PURE Distilled Water (Invitrogen) 31 μ L に溶かして Total RNA の濃度を NanoDrop[®] Spectrophotometer により測定した。

Total RNA から高純度で全長を有する polyA⁺ mRNA を回収するため、*Oligotex[™]-dT30 <Super>* mRNA Purification kit (Takara) を用いて、mRNA を溶出した。

2 RNA-seq ライブラリーの作成

精製した mRNA を鋳型として、Ion Total RNA-seq kit v2 (Life Technologies) を用いて、ライブラリーを作成した。まず、RNase を用いて、RNA の断片化を行った。RNA 断片を精製するため、Magnetic Beads Cleanup Module (Life Technologies) を用い、断片 RNA の濃度を Qubit[®] RNA Assay Kit with the Qubit[®] Fluorometer、Agilent[®] RNA 6000 Pico Kit および the Agilent[®] 2100 Bioanalyzer[®] を用いて測定し、2100 expert software を用いて RNA 断片の収量およびサイズ分布を測定した。

つづいて断片 RNA ののはハイブリダーゼーション、SuperScript[®] Enzyme Mix をサンプルに加え、Thermal cycler を用いて 42、30分インキュベートし、cDNA を合成した。合成した cDNA 再度 Magnetic Beads Cleanup Module (Life Technologies) を用い精製

した。精製した cDNA は、Non-Barcoded ライブラリー作成し、ライブラリーの cDNA の濃度を dsDNA HS Assay Kit with the Qubit[®] Fluorometer、Agilent[®] High sensitivity DNA Kit および the Agilent[®] 2100 Bioanalyzer[®] を用いて測定し、2100 expert software を用いて DNA の収量およびサイズ分布を測定した。

続いて Ion PGM[™] Template OT2 400 kit (Life Technologies) を用い、エマルジョン PCR を行った。エマルジョン PCR 終了後 Ion One Touch[™] 2 System (Ion Torrent) を用いてサンプルのエンリッチを行った。

3 シーケンシング

Ion 318[™] Chip v2 に調整したエンリッチ済みサンプルに、Sequencing Primer を加え、Thermal cycler を用いて 95、2分、37、2分のアニーリング反応をした。反応後、polymerase を加え、サンプルのローディングを行った。850 flow、215 サイクル、1ラン、7.3hr でシーケンスのランを行った。

4 相同性検索

トランスクリプトーム解析で得られた配列は NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の nucleotide blast を用いて相同性の高い配列を検索した。

(4) トランスクリプトーム解析に基づいた候補遺伝子の発現解析

cDNA 合成

精製した Total RNA から cDNA を合成するため、ReverTra Ace- (TOYOBO) を用いて反応液 { DNase 処理済全 RNA 1 μ g、Oligo (dT) 20 1 μ L、RNase Free H₂O Scale up to 12 μ L } を調整し、70、10分、氷中で 5分静置した後、反応液 (5 \times RT buffer 4 μ L、dNTP 2 μ L、RNase inhibitor 1 μ L、ReverTra Ase 1 μ L) を加え、42、45分、99、5分、4、5分を 1 サイクル行い反応させた。

リアルタイム RT-PCR

反応液 8 倍希釈 cDNA 1 μ 、Primer 各 0.2 μ L、Fast Start SYBR Green Master 7.5 μ L、滅菌水 5.9 μ L) を調整し、全量 15 μ L とした。反応条件は 94 $^{\circ}$ C、3分、94 $^{\circ}$ C、40秒、60 $^{\circ}$ C、40秒、72 $^{\circ}$ C、40秒、72 $^{\circ}$ C、5分、メルティングカーブで Mini Opticom Real Time PCR System (BIO RAD) または Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad) にて 40 サイクルで PCR を行った。さらに発現量を定量するため、ナシの全組織で恒常的に発現しているナシ由来の *EF-1* 遺伝子を、同様の温度およびサイクル条件でリアルタイム RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 環状剥皮による果実形質への影響

環状剥皮処理から 1 週間後および 2 週間後の果実の果実重、果形および果肉硬度を処理区、無処理区において各 6 果ずつ調査した。1 週間後の果実において処理区果実と無処理区果実の果実重と果形に有意差は認められなかった。果肉硬度にも有意差は認められなかったものの、無処理区果実の 718.58 ~ 27.40N (平均 23.696 \pm 0.961N) に対して、処理区果実は 15.1 ~ 25.09N (平均 21.103 \pm 1.267N) だった。2 週間後の果実でも果実重、果形および果肉硬度に有意差は認められなかった。果肉硬度は無処理区果実で 20.03 ~ 24.11N (平均 21.97 \pm 0.65N) で、処理区果実では 10.31 ~ 21.37 (平均 18.53 \pm 1.69N) だった。また環状剥皮処理から 1 週間後と 2 週間後の果実の果実重、果形、果肉硬度の間にも、処理、無処理ともに有意差は認められなかった。

(2) メタボローム解析

環状剥皮した果実と無処理区果実の果肉のメタボローム解析の結果、全 204 種の一次代謝産物のメタボロームデータを取得した。それらの代謝産物うち 5-Amino-4-oxovalerate、2-MethylSer、

Betaine、など 13 種の代謝産物が環状剥皮した果実の果肉中に無処理に比べて 1.1 ~ 3.0 倍有意に高く含有していた。一方で、Putrescine、Ala、Citrate などの 11 種の代謝産物が無処理区果実の果肉中に処理区果肉に比べて 1.1 ~ 3.4 倍多く含有していた。

(3) トランスクリプトーム解析

環状剥皮した果実と無処理の果実の果肉において、約 0.9G、1.3G ベースのシーケンズデータをそれぞれ取得した。データはアライメントし、セイヨウナシゲノムデータベースにアッセンブルした結果、環状剥皮した果実の果肉で発現の高い 9 遺伝子と、無処理の果肉で高い 34 遺伝子の存在が明らかになった。環状剥皮区の果肉では、エチレン生成やユビキチンリガーゼ等の遺伝子の発現が高かった。一方で無処理の果肉では、ABA 代謝や JAZ 等のホルモン関連遺伝子、LRR 型キナーゼや各種伝達経路に関わるキナーゼ等の遺伝子の高い発現が見られた。

(4) 候補遺伝子の発現解析

トランスクリプトーム解析の結果、環状剥皮区で増大した 9 遺伝子と抑制された 34 遺伝子について、処理 1、2 週間後の処理区、無処理区果実の果肉でリアルタイム RT-PCR による発現解析を行った。処理区で発現が増大した 9 遺伝子のうち、3 遺伝子は、1 週目でそれぞれ 53.6、3.94、17.06 倍、2 週目で 2.40、7.98、3.00 倍、処理区において発現が増大した。また 2 遺伝子は、1 週目は処理区果肉でそれぞれ 17.6 倍、1.5 倍発現が増大したが 2 週目は無処理区果肉に対してそれぞれ 0.32 倍、0.87 倍に減少した。

以上の結果より、果梗の環状剥皮 1 週間後には、果肉の遺伝子発現、代謝産物に変化が認められ、樹上完熟を阻害する tree ファクターに関与している可能性が示唆された。今

後は変化の見られた遺伝子の発現解析や、果梗でのトランスクリプトーム解析およびメタボローム解析を行い、tree ファクターの正体を明らかにする必要がある。

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 1 件)

1 Murayama, H., M. Sai, A. Oikawa and A. Itai (2015): Inhibitory factors that affect the ripening of pear fruit on the tree. The Horticulture Journal, 査読有 **84**:14-20

〔学会発表〕(計 2 件)

1 村山秀樹、板井章浩他 果皮全面がサビで覆われるセイヨウナシ果実の果皮色の变化について、園芸学会、徳島大学(徳島県徳島市) 2015.9.26

2 友松康一、及川彰、板井章浩他 セイヨウナシ果実の樹上完熟を阻害する tree ファクターの解析、園芸学会、徳島大学(徳島県徳島市) 2015.9.27

〔図書〕(計 1 件)

板井章浩 (2015): 果実の発育、果樹園芸学 米森敬三編、朝倉書店、東京、224 ISBN978-4-254-41037-2

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板井 章浩 (ITAI Akihiro)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10252876

(2) 研究分担者

及川 彰 (OIKAWA, Akira)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：50442934

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()