

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850015

研究課題名(和文) 内在性プロモーターの機能改変による良着色赤果肉リンゴ品種作出に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Identification of the MdMYB110a binding motif and the endogenous factors in the coloration of type 2 red-fleshed apples

研究代表者

太田垣 駿吾 (OTAGAKI, Shungo)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：50597789

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)：本研究では、MdMYB110a遺伝子のDNA結合モチーフ配列を同定することと植物ホルモンが果実成熟後期でのMdMYB110a遺伝子の果肉特異的発現を誘導する因子であるか否かを検証することを目的とした。前者については組換えウイルスベクターを用いたクロマチン免疫法とアグロバクテリウムを介した一過的発現系を利用したレポーターアッセイを試みたが、残念ながらモチーフ配列の同定には至らなかった。一方、後者については、型赤果肉リンゴにおける果肉着色がリンゴ果実成熟に關与する主要な植物ホルモンであるエチレンではなく、アブシシン酸を介して制御されている可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to identify the MdMYB110a binding motif and to clarify the contribution of plant hormones in the coloration of type 2 red-fleshed apples. For the first research topic, I performed the ectopic expression of MdMYB110a protein for chromatin immunoprecipitation analysis and the reporter assay using the agroinfiltration system but failed to identify the binding motif. For the second research topic, I revealed that the coloration of type 2 red-fleshed apples is not induced by ethylene, which is known as a major plant hormone accumulating during the apple fruit maturation, but by ABA.

研究分野：園芸科学

キーワード：赤果肉リンゴ MYB転写因子 植物ホルモン エチレン アブシシン酸

1. 研究開始当初の背景

赤果肉リンゴとはその名の通り果肉がアントシアニンの蓄積により赤く着色したリンゴ品種・系統を指し、着色制御機構の違いから I 型と II 型に大別される。即ち、I 型赤果肉リンゴでは果実成熟期間を通して果肉が着色するほか、葉や果皮も赤く着色するのに対し、II 型赤果肉リンゴは緑葉の形質を示し、果実も成熟後期の果肉特異的に着色する。また用途としても、I 型赤果肉リンゴは交配育種を経ても渋みを取り除くことが困難なため、主に加工用として用いられるのに対し、II 型赤果肉リンゴでは良食味の生食用品種の育成が進められている。日本では生食用リンゴの需要が加工用リンゴの需要を大きく上回っており、かつ果皮と果肉の着色が独立しているために緑果皮・赤果肉のような新奇品種も育成可能な II 型赤果肉リンゴは高い市場価値を持つと考えられていた。

II 型赤果肉リンゴ生産上の課題の一つは、成熟期が高温であった場合などに着色不良果が見られることであり、この原因を究明するためには II 型赤果肉形質の着色制御機構を解明する必要があった。本研究課題の開始前に、研究代表者らは白果肉品種'Jonathan'と II 型赤果肉リンゴ'Pink Pearl'の交雑に由来する II 型赤果肉リンゴ'JPP35'、および'JPP35'と'Pink Pearl'、もしくは'JPP35'と白果肉品種'シナノスイート'の交雑に由来する F₁ 集団を用い、II 型赤果肉形質の原因遺伝子が *MdMYB110a* 遺伝子であること、II 型赤果肉リンゴの果肉において *MdMYB110a* 遺伝子の発現量とアントシアニン生合成経路の下流に位置する *MdLDOX* 遺伝子の発現量との間に正の相関が見られること、*MdMYB110a* 遺伝子を恒常的に過剰発現させた白果肉リンゴ系統では葉がアントシアニンの蓄積により赤色を呈すること、を明らかにしていた。これらの結果から、成熟後期の *MdMYB110a* 遺伝子の発現量が低い場合に着色不良の II 型赤果肉リンゴが生じており、収穫期まで持続的に *MdMYB110a* 遺伝子を高発現させることで着色不良果の形成を抑制できると予想された。

2. 研究の目的

本研究では、まず内在性 *MdMYB110a* プロモーターを自己活性化型に機能置換するため、*MdMYB110a* 遺伝子の DNA 結合モチーフ配列を同定することを目的とした。また、リンゴの果実成熟に伴って産生量の増大するエチレンおよびアブシシン酸という 2 つの植物ホルモンに着目し、これらの植物ホルモンが果実成熟後期の *MdMYB110a* 遺伝子の果肉特異的発現を誘導する因子であるか否かを検証することをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

MdMYB110a および *MdLDOX* プロモーター領域の単離

GENOME DATABASE FOR ROSACEAE (GDR) に登録されているリンゴゲノム情報を参考に *MdMYB110a* および *MdLDOX* 遺伝子の翻訳開始点上流約 1.5 kb を増幅するプライマーを作成し、II 型赤果肉リンゴ品種'JPP35'より抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。増幅断片を TOPO XL PCR Cloning Kit にてクローニングし、ABI 3130xl を用いて配列決定を行った。

Myc タグ付き *MdMYB110a* 発現用 ALSV ベクターの作成と白果肉品種'王林'への接種試験

リンゴ小球型潜在ウイルス (Apple latent spherical virus: ALSV) の RNA2 に由来する感染性 cDNA クローンである pEALSR2L5R5 に Myc タグを付与した *MdMYB110a* 全長をクローニングし、pEALSR1 と共に *Chenopodium quinoa* に接種することで *MdMYB110a* 発現組換え ALSV を得た。続いて *C. quinoa* の感染葉から RNA を抽出し、パーティクルボンバードメント法により組換え ALSV を白果肉品種'王林'の実生に接種した。

アグロインフィルトレーション法による *MdMYB110a* の転写活性の測定

LDOX 遺伝子の翻訳開始点上流 1.5 kb の制御下でイントロンを含む *GUS* 遺伝子を発現するレポータープラスミド、および植物で恒常的に発現するカリフラワーモザイクウイルス

ルス 35S プロモーターの制御下で *MdMYB110a* 遺伝子を発現するエフェクタープラスミドを作成した。この2種のプラスミドを形質転換したアグロバクテリウム、および35S プロモーター制御下でイントロンを含むルシフェラーゼを発現する内部標準用プラスミドを形質転換したアグロバクテリウムの培養懸濁液を *Nicotiana benthamiana* の葉に注入するアグロインフィルトレーションを行い、インフィルトレーション後48時間目でのGUSおよびルシフェラーゼ活性を計測することで、*MdMYB110a* の転写活性を測定した。

型赤果肉品種'JPP35'、'なかの真紅'および'なかののきらめき'果実への植物ホルモンおよび阻害剤処理

満開後90日目、105日目、130日目の'なかの真紅'および'なかののきらめき'果実に対し、エチレンを発生させる化合物であるエテフォンを1000 ppmの濃度で、エチレン阻害剤であるスマートフレッシュを1 ppmの濃度でそれぞれ処理した。また、満開後90日目の'JPP35'および'なかののきらめき'果実を縦に2等分し、切断面を2.5 mMのABA溶液に浸漬した。処理した果実サンプルより果肉をサンプリングし、アントシアニン蓄積量の測定、および *MdMYB110a*・エチレン・アブシシン酸生成遺伝子群の発現量をリアルタイムPCRにより定量した。

'JPP35'同一果実内における着色部位・非着色部位間での発現変動遺伝子群の同定

同一果実内で着色部位と非着色部位が存在していた満開後130日目の'なかの真紅'果実を用い、それぞれの部位からCTAB法にてTotal RNAを抽出した。GeneFishing DEG Premix Kitを用いて得られた、着色部位と非着色部位の間で増幅量の異なるバンドをクローニングし、配列解析とNCBIのデータベースに対するBLAST検索を行うことで着色部位と非着色部位との間で異なる発現を示す遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

MdMYB110a 結合モチーフの同定

型赤果肉リンゴ'JPP35'より *MdMYB110a* 遺伝子の翻訳開始点上流約1.5 kbをクローニングし、当該領域中に含まれるシスエレメントをPLACEにて検索した結果、植物ホルモン応答性モチーフとしてアブシシン酸応答に関わるものが1つ、ジベレリン応答に関わるものが1つ、オーキシン応答に関わるものが1つ、およびメチルジャスモン酸応答に関わるものが2つ同定された。

続いて、クロマチン免疫沈降法によって *MdMYB110a* の結合するDNAモチーフ配列を同定するため、Mycをタグとして付加した *MdMYB110a* を発現する組換えALS_Vを作成し、白果肉リンゴ品種'王林'の実生に接種した。その結果、感染上位葉において *MdMYB110a* の異所発現による赤色化およびアントシアニンの蓄積が見られた。しかしながら、着色部位からタンパク質画分を精製し、抗Myc抗体を用いたウエスタンブロット解析により *MdMYB110a* の検出を試みたが、予想される分子サイズに明瞭なシグナルを得ることは出来なかった。このことは、ALS_V感染葉にてクロマチン免疫沈降法を行った場合、非特異的な結合に由来するバックグラウンドが非常に高くなることを意味しており、実験の継続を断念せざるを得なかった。そこで、代替案としてGUSレポーター遺伝子を用いた *N. benthamiana* における一過的発現系にて *MdMYB110a* の結合モチーフの同定を試みた。しかしながら、ポジティブコントロールとして用いたWRKY転写因子とその標的遺伝子プロモーターの組み合わせと比較して *MdMYB110a* と *MdLDOX* 翻訳開始点上流1.5 kbの組み合わせでは実験のバックグラウンドが高く、結合モチーフを明確に絞り込むことは出来なかった。この問題点を解決すべく、*MdMYB110a* の転写活性を高めることが報告されているbHLH2をシロイヌナズナより単離し、*MdMYB110a* と共発現させたが、問題の解決には至らなかった。以上の結果より、残念ながら *MdMYB110a* の結合モチーフ配列の決定には至らなかったため、型赤果肉リンゴの着色を安定化させる新たな方策とし

て果実への植物ホルモン処理を考え、種々の植物ホルモンおよびその阻害剤処理が型赤果肉リンゴの果肉着色程度に与える影響を解析することとした。

植物ホルモン処理が型赤果肉リンゴの果肉着色に及ぼす影響の解析

リンゴの果実成熟期にはエチレンの生合成量が爆発的に増加することが知られている。エチレン生合成を司る遺伝子の1つである *MdACO1* の発現誘導時期と型赤果肉リンゴにおける果肉の着色開始時期がほぼ一致していたことから、まず着色開始期前の型赤果肉リンゴに対してエチレンもしくはエチレン阻害剤を処理した場合、果肉着色および *MdMYB110a* 遺伝子の発現量にどのような影響を与えるかを解析した。その結果、エチレン処理を行った果肉ではアントシアニンの蓄積による赤色化および *MdMYB110a* 遺伝子の発現誘導は見られず、また、エチレン阻害剤を処理した際には *MdACO1* の発現誘導が見られないのにも関わらず、*MdMYB110a* 遺伝子の発現は誘導されていた。以上の結果より、型赤果肉リンゴの果肉着色はエチレンを介さない経路で制御されていることが明らかとなった。

そこで、型赤果肉形質を制御する新たな内生因子を探索すべく、同一果実内で着色程度が大きく異なる 'JPP35' 果実を利用し、Differential Display 法にて着色部位と非着色部位の間で大きく発現量の異なる遺伝子群を探索した。その結果、4つの発現変動遺伝子が単離され、そのうちの1つはABAを介して発現が誘導されることが知られているMYB1R1と高い相同性を示していた。そこで、

型赤果肉リンゴ'なかの真紅'および'なかののきらめき'において果実成熟ステージ別にABA生合成遺伝子である *MdNCED1* の発現量を定量した結果、アントシアニンの生合成量と *MdNCED1* の発現様式の間には正の相関があることが示された。さらに、未着色の型赤果肉リンゴをABA溶液に浸漬した場合、非ABA処理区と比較して *MdMYB110a* の発現およびアントシアニンの生合成が顕著に増大していることが明らかとなった(図1)。

以上の結果より、型赤果肉リンゴの着色はABAによって誘導されていることが示唆された。本課題の成果により、今後は樹上でのABA処理試験などを行うことで、型赤果肉リンゴの着色を促進するような新たな栽培技術の確立も期待される。

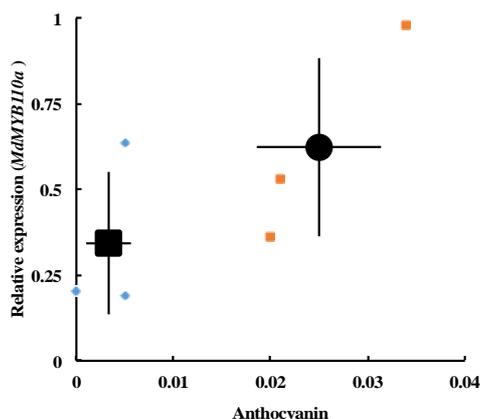


図1 型赤果肉リンゴ'なかの真紅'の未熟果切断面に対してABAを処理した際のアントシアニン蓄積量と *MdMYB110a* 遺伝子発現量の変化。黒丸はABA処理区の平均値を、黒四角は無処理区の平均値をそれぞれ表す。

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 2件)

H. Sato*, S. Otagaki*, P. Saelai, S. Kondo, K. Shiratake, S. Matsumoto(*equally contributed). Varietal differences in phenolic compounds metabolism of type 2 red-fleshed apples. *Scientia Horticulturae*, 査読有、2017、219:1-9
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.041>

Y. Hamada, H. Sato, S. Otagaki, K. Okada, K. Abe, S. Matsumoto. Breeding depression of red flesh apple progenies containing both functional *MdMYB10* and *MYB110a_JP* genes. *Plant Breeding*, 査読有、2015、134:239-246
DOI: 10.1111/pbr.12255

[学会発表](計 3件)

太田垣駿吾、佐藤秀人、サエライ パリチャット、近藤悟、白武勝裕、松本省吾、II型

赤果肉リンゴにおける着色程度と二次代謝産物蓄積様式の関係、平成29年度園芸学会春季大会

小野裕馬、佐藤秀人、前島勤、太田垣駿吾、白武勝裕、松本省吾、リンゴ果皮・果肉着色に関わる MBW 転写因子群の特性とマーカー育種、平成27年度園芸学会秋季大会

佐藤秀人、太田垣駿吾、岡田和馬、阿部和幸、前島勤、小松宏光、白武勝裕、松本省吾、タイプ2赤果肉リンゴ品種・系統ごとの着色関連遺伝子群の発現パターン、平成26年度園芸学会秋季大会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田垣駿吾 (OTAGAKI, Shungo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：50597789

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし