

令和元年5月21日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K14853
 研究課題名(和文) 下流制御因子の同定によるノンクライマクテリック型果実の成熟・老化制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on ripening and senescence inducing-mechanism(s) controlled by factors at downstream of signaling pathway in non-climacteric fruit

研究代表者
 中野 龍平 (Nakano, Ryohei)
 京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70294444
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ノンクライマクテリック型果実の成熟老化機構の解明を目指し、成熟シグナル下流領域の候補制御因子について、イチゴ2倍体野生種 *F. vesca* を用いて研究した。EIN3/EIL転写因子では保存領域RNAiによりFv-EIL1,2の発現抑制個体を得たが成熟・老化には影響がなく、Fv-EIL3の成熟への関与が示唆された。NAC転写因子ではmiRNA164のターゲット配列を持つアイソジンの内、NAC-SFが成熟時に100倍以上に発現増大した。VIGSコンストラクトを導入したアグロバクテリウムの種子感染により、高頻度にVIGSが誘導され、Fv-EIL3やNAC-SFなど候補因子の機能解析の可能性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実は成熟と老化にエチレンが関与するクライマクテリック型と関与しないノンクライマクテリック型に分類されるが、後者における成熟・老化機構に関しては不明なことが多く、このことがノンクライマクテリック型果実においては有効な貯蔵や流通技術が発展していない一因となっている。本研究では、NAC転写因子の一つNAC-SFの関与を示すなど、その成果はノンクライマクテリック型果実の貯蔵性の向上、流通技術の開発など、育種および技術開発に活用される社会的意義がある。成熟制御機構の下流因子に注目した研究は少なく、また、イチゴ2倍体野生種における有効なVIGS処理方法の開発に至っており、その結果には学術的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Candidate factors that could work at down-streams on ripening related signaling pathways were studied using strawberry wild species *F. vesca* in an attempt to reveal the mechanism(s) that regulate fruit ripening and senescence in non-climacteric type of fruits. For EIN3/EILs transcription factors, RNAi transformant were generated using conserved region and strains with suppressed expression of Fv-EIL1 and 2 were obtained, though they ripened and senesced normally, suggesting the possible involvement of other isogenes such as Fv-EIL3. For NAC transcription factors, within isogene with target sequence of miRNA164, expression level of NAC-SF was dramatically increased during ripening suggesting its involvement. In virus induced gene silencing (vigs), infecting agrobacterium with trv-originated vigs constructs to seeds of *F. vesca* effectively induced gene silencing, showing increased possibility to perform functional analysis of target genes in strawberry.

研究分野：園芸利用学

キーワード：NAC転写因子 EIL転写因子 ノンクライマクテリック型 成熟 老化 miRNA vigs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果実は成熟や老化にエチレンが関与するクライマクテリック型果実と関与しないノンクライマクテリック型果実に分類される。トマトを中心にクライマクテリック型果実の成熟・老化機構の解明は進んでおり、その知見は育種や流通技術の開発へと応用されている。一方で、ノンクライマクテリック型果実の成熟・老化機構は全く分かっておらず、その解明が求められている。2002年にトマトにおいてエチレンとは別に成熟を制御する因子として MADS-BOX 様の転写因子の関与が報告された。MADS-BOX 様転写因子は制御機構の「上流」に位置する因子であり、ノンクライマクテリック型果実においてもその関与が研究されてきたが、明確な機構解明には繋がっていない。

一方で、成熟や老化に伴って進行する軟化、着色、芳香発生などの生理的变化という観点からみると、(エチレン生成と呼吸変化以外は)クライマクテリック型とノンクライマクテリック型という成熟型の区別において明確な違いはなく、それぞれの型に属する果実間でも同様の遺伝子が働いていることが多い。このことから、成熟・老化を制御するシグナル伝達機構において、むしろ「下流」の因子は、ノンクライマクテリック型果実においてもクライマクテリック型果実と同様の因子が関与していると期待される。つまり、エチレン自体はノンクライマクテリック型果実の成熟・老化には関与しないが、ノンクライマクテリック型果実の成熟・老化シグナルがクロストークにより、エチレンシグナル伝達系の「下流因子」を一部分利用している可能性がある。

2. 研究の目的

果実は成熟にエチレンが関与するクライマクテリック型と関与しないノンクライマクテリック型に分類されるが、後者の成熟・老化機構は全く分かっていない。本研究では、成熟・老化時に機能する遺伝子群の構成は成熟型に関わらず共通点が多いことから、ノンクライマクテリック型果実の成熟・老化シグナルがクロストークにより、エチレンシグナル伝達系の「下流因子」を利用しているというアイデアを基とし、特に、エチレンシグナルだけでなく、様々なシグナルのハブとしての役割を持つ EIN3/EILs 転写因子およびアラビドプシスにおいてその下流にて働くことが報告されている miRNA164 と NAC 様転写因子に注目し、イチゴ2倍体野生種 *Fragaria vesca* をモデル材料とした分子生物学的解析により、ノンクライマクテリック型果実の成熟・老化制御機構の「下流因子」を起点とした解明を目的としている。ノンクライマクテリック型果実の成熟・老化機構の解明は、園芸作物の収穫後生理分野における長年のテーマであり、これまでも多くの研究がなされてきたが、未だに、全く解明に至っていない。そのことは、クライマクテリック型果実と比べ、ノンクライマクテリック型果実においては有効な成熟調整・貯蔵・流通などの技術が発展していない要因の一つである。本研究における *F. vesca* を利用した研究において成熟・老化機構の一端が明らかになれば、ノンクライマクテリック型果実全体の機構解明に繋がり、イチゴ、ブドウ、サクランボなど様々な有用作物における熟期調整・貯蔵・流通技術の発展に寄与するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) EIN3/EILs 抑制 RNAi 個体の育成と解析

F. vesca の成熟・老化に伴う、EIN3/EILs 遺伝子群の発現変化を qRT-PCR により把握した。さらに、EIN3/EILs 遺伝子群の保存領域(トマトにおいて4つの EIN3/EILs 遺伝子群のサイレンシングに成功した領域)を Fv-EIL1 配列より単離し、この断片を用いて Hair-pin RNAi コンストラクトを作成し、アグロバクテリウム法により、RNAi 個体を作成した。この RNAi 個体およびその自殖後代に関して、葉の老化などのエチレン応答性および果実成熟・老化への影響を調査するとともに、qRT-PCR により EIN3/EILs 遺伝子群の各アイソジンのサイレンシング状況を調査した。さらに、EIN3/EILs 遺伝子群の一つ、Fv-EIL3 に関しては、Fv-EIL3 由来の配列を利用して、Hair-pin RNAi 個体の作成を試みた。さらに、TRV ウィルス系を利用した VIGS コンストラクトを作成し、(4)の手法により VIGS 個体の獲得を試みた。

(2) NAC 転写因子の成熟制御への関与の解析

F. vesca の miRNA164 のターゲット配列を持つ NAC 遺伝子として、NAC38、NAC87、NAC-SF に着目し、その果実成熟および老化時の発現量変化を qRT-PCR により調査した。さらに、Fv-NAC-SF に関しては、Hair-pin RNAi 個体の作成を試みた。また、TRV ウィルス系を利用した VIGS コンストラクトを作成し、(4)の手法により VIGS 個体の獲得を試みた。

(3) *F. vesca* 成熟時の遺伝子発現の網羅的解析

F. vesca の Small Green、Large Green、White、Half、Pink、Red の各発育段階の果実より、RNA を抽出し、RNA-seq 解析により EIN3/EILs 遺伝子群や NAC38、NAC87、NAC-SF の発現量の比較および、発現量変化を確認するとともに、NAC 遺伝子群に属する遺伝子を中心に、成熟・老化に伴って発現量に変化する他の遺伝子の探索を試みた。

(4) *F. vesca* における VIGS 手法の開発

TRV ウィルス系を利用した VIGS において、コンストラクトの作成時に GFP 断片と標的配列 (Fv-CHS (Control)、Fv-EIL3、Fv-NAC-SF) をタンデムに挿入したコンストラクトを作成し、アグロバクテリウム EHA105、GV3010、LBA4404 などに導入した。このアグロバクテリウムを培養し、感染用の溶液を調整した。以前に作成した GFP を過剰発現させた *F. vesca* 系統の種子(発芽処理なしおよび発芽処理2日目)を感染調整液に浸し、数分減圧処理したのち、一晚放置した。感染調

整液を除き数回洗浄した後、培土に播種した。播種 1~数ヶ月後の幼苗について、蛍光顕微鏡により GFP 蛍光を観察し、サイレンシングの誘導の有無を調査した。

4. 研究成果

本研究では、成熟や老化にエチレンが関与せず、その制御機構が不明なノンクライマクテリック型果実に関して、イチゴ 2 倍体野生種 *F. vesca* を材料として、制御機構の下流では、エチレンシグナル伝達系と同様の因子が関与していると仮定し、エチレンシグナルを含む様々なシグナルのハブとしての役割を持つ EIN3/EILs およびその下流において働く miRNA164 と NAC 転写因子に注目し、以下の結果が得られている。

(1) EIN3/EILs 抑制 RNAi 個体の育成と解析

果実での遺伝子発現を qRT-PCR にて測定したところ、*F. vesca* のゲノム内に存在する 5 つの *EIN3/EILs* 遺伝子の内 4 つ (*Fv-EIL1*, 2a, 3, 5) のアイソジンにおいて、果実での発現が検出され、特に、*Fv-EIL1* の発現量が葉と果実において高かった。*EIN3/EILs* の保存領域を hair-pin 構造に利用した RNAi 個体を作成したところ、T1 世代では、*Fv-EIL1* のみが抑制されており、他のホモログは抑制されていなかった (図 1)。この RNAi 個体では、エチレンによる葉の黄化が抑えられ (図 2) 一方では、果実成熟や老化には影響がなかった。さらに、後代を育成したところサイレンシングが広範となり、*Fv-EIL1* に加えて *Fv-EIL2a* が抑制される個体を得られたが、果実成熟や老化へのサイレンシングの影響はなかった。*Fv-EIL1* はエチレン応答や葉の黄化へ関与し、一方、*Fv-EIL3* など他のホモログの果実成熟を含む別のシグナル伝達への関与が示唆された。後述する RNA-seq 解析により、*Fv-EIL1*、*Fv-EIL2a* に加えて *Fv-EIL3* の発現量が多いことが確認された。*Fv-EIL3* は系統樹解析においても、他の植物も含め、エチレン応答への関与が報告されている *EIN3/EILs* とは異なったクラスターに分類され、その機能に関しては興味もたれる。まだ、着果はみられていないが、*Fv-EIL3* の Hair-pin RNAi コンストラクトを導入した RNAi 個体のカルスや VIGS コンストラクトを後述する種子感染により処理した個体を得られている。

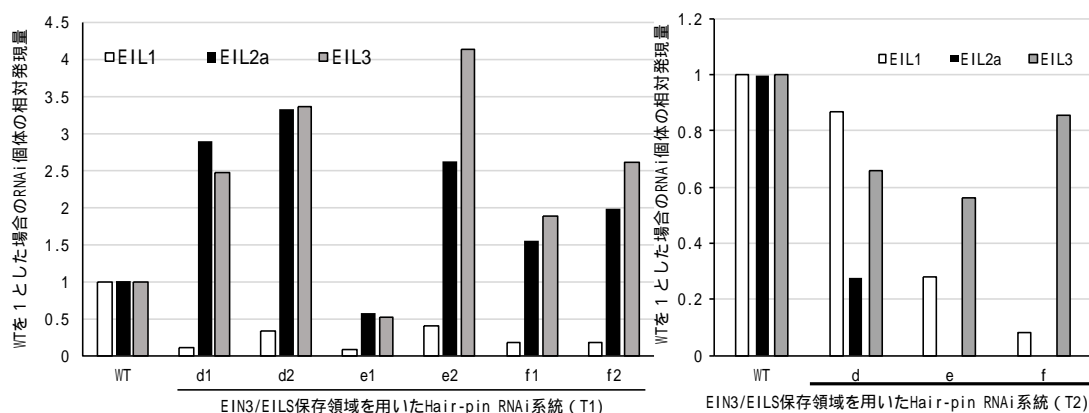


図 1 *Fv-EIL1* より単離した *EIN3/EILs* 遺伝子群の保存領域を用いて作成した Hair-pin RNAi コンストラクトを導入した *F. vesca* RNAi 系統の T1 (左) および T2 (右) 各系統における WT と比べた *Fv-EIL1*, -2a, -3 の発現量。T1 世代では *Fv-EIL1* のみ抑制されており、T2 世代では *Fv-EIL1* と -2 の抑制系統が得られた

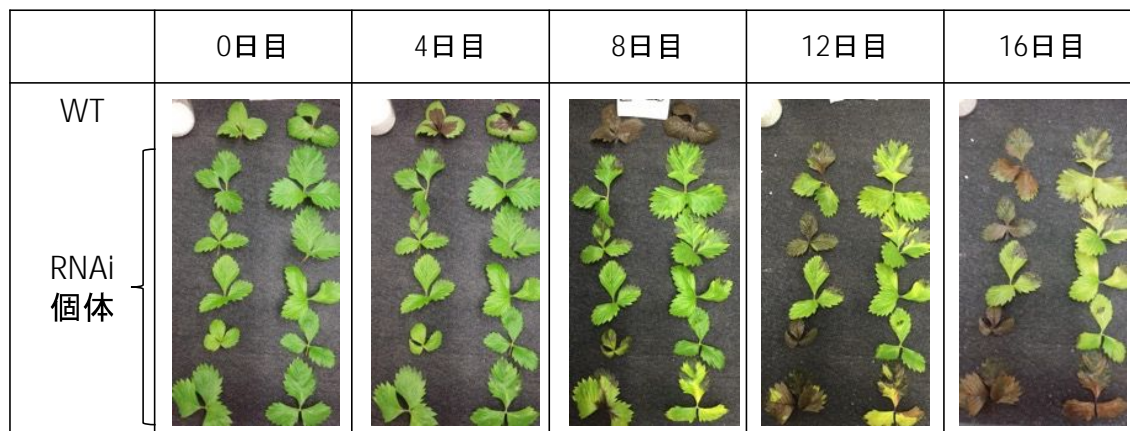


図 2 *EIN3/EILs* 遺伝子群の保存領域を用いて作成した *F. vesca* Hair-pin RNAi 系統の T1 世代における葉の老化の抑制

(2) NAC 転写因子の成熟制御への関与の解析

F. vesca の miRNA164 のターゲット配列を持つ NAC 転写因子として、NAC38、NAC87、NAC-SF に着目し、その果実成熟および老化時の発現量変化を qRT-PCR により調査した。その結果、果実成熟に伴い NAC-SF の発現量が 100 倍以上に増加していた (図 3)。NAC38 と NAC87 は成熟に伴い減少していた (図 3)。これより、NAC-SF は正の制御因子として、NAC38 と NAC87 は負の制御因子としてそれぞれ成熟への関与の可能性が示された。特に、NAC-SF に関して、Hair-pin RNAi コンストラクトを作成して、*F. vesca* の RNAi 個体の作成を進めたところ、数十系統のカルス形成が得られた。その後、数系統においてシュートらしき組織が形成されたが、いずれも生長点がなく、シュート誘導には至らなかった。NAC-SF が果実成熟だけでなくシュート形成にも関連している可能性が示唆された。シュート誘導を必要としない VIGS による NAC-SF のサイレンシングを目指し、NAC-SF の VIGS コンストラクトを作成し、導入したアグロバクテリウムを後述する種子感染法より感染させ、まだ、着果はみられていないが、VIGS 処理した個体を得られている。

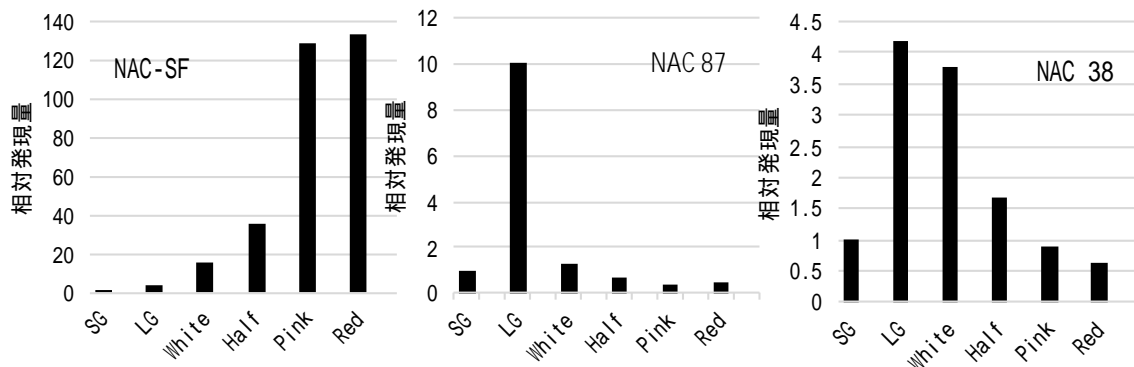


図 3 イチゴ 2 倍体野生種 *F. vesca* における、miRNA164 のターゲット配列を持つ NAC 遺伝子 (NAC-SF, NAC87, NAC38) の発育および成熟・老化にともなう発現量の変化
SG: small green, LG: large green, White-Red: 着色度による成熟-老化段階

(3) *F. vesca* 成熟時の遺伝子発現の網羅的解析

RNA-seq により、*F. vesca* の果実成熟に伴う、遺伝子発現量変化の網羅的解析を進め、成熟に伴って増大する遺伝子群を把握した。*EIN3/EILs* 遺伝子では、いずれのアイソジーンも成熟に伴った発現量の変化は示さないが、*Fv-EIL1*、*-2a* に加えて *Fv-EIL3* の発現量が比較的多いことが明らかとなった。NAC 遺伝子では NAC-SF に加えて、トマトの成熟に関与する *Sl-NAC1* および *Sl-NAC4* の *F. vesca* のホモログが老化時に発現が増加することが明らかとなり、新たな成熟・老化制御に関わる候補 NAC 遺伝子を発見した。

(4) *F. vesca* における VIGS 手法の開発

これまでもイチゴにおける VIGS 手法の報告があるが、VIGS 自体ではなく調整液の注入による影響ではないかと思われる報告、同じ手法を利用しても再現しない報告がほとんどあった。TRV ウィルス系を利用した VIGS において、コンストラクトの作成時に GFP 断片と標的配列 (*Fv-CHS* (Control), *Fv-EIL3*, *Fv-NAC-SF*) をタンデムに挿入したコンストラクト作成し、このコンストラクトを導入したアグロバクテリウムを *F. vesca* の GFP 発現個体の種子に感染する手法により、安定した VIGS 法の確立を試みた結果、発芽処理していない種子への感染により、幼苗段階において葉の一部の GFP 蛍光が消失しており、サイレンシングが誘導されている個体が高頻度で得られた (図 4)。このサイレンシング状態が果実まで維持され、GFP と一緒に標的配列のサイレンシングも誘導することにより、標的配列の機能解析が可能となると考えられる。本手法の導入により、今回の標的遺伝子に限らず、*F. vesca* における様々な遺伝子の機能解析が進むと考えられる。



図 4 TRV 系 VIGS コンストラクトを導入したアグロバクテリウムの種子への感染により、高頻度で誘導されたサイレンシング個体における、GFP 蛍光の消失の様子
左 : 新葉において GFP 蛍光の消失が観察
中央 : 新葉において斑状に GFP 蛍光の消失が観察 (VIGS の特徴)
右 : サイレncing が起こっていない対照の葉

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕

特になし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：牛島 幸一郎

ローマ字氏名：Ushijima Koichiro

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20379720

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久保 康隆

ローマ字氏名：Kubo Yasutaka