

令和元年6月14日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18650

研究課題名（和文）カンキツ果実におけるCitCCD4の転写因子の単離および機能解析

研究課題名（英文）Isolation and functional analysis of transcriptional factor of CitCCD4 in citrus fruit

研究代表者

張 嵐翠（Zhang, Lancui）

静岡大学・農学部・特任助教

研究者番号：20767371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： β -シトラウリンはカンキツ果実の果皮に蓄積する赤色のアポカロテノイドであり、CitCCD4は β -シトラウリンの生合成に関わる重要な酵素遺伝子である。本研究では、CitCCD4の発現を制御する転写因子をマイクロアレイ解析およびRNA-seq解析により単離し、アグロインジェクションにより機能解析を行った。その結果、選定した1つの候補遺伝子についてCitCCD4の転写因子として機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カンキツ果実から β -シトラウリン生合成に関わる転写因子を単離し、その機能を明らかにすることにより、 β -シトラウリン生合成の転写調節メカニズムを解明することを目的とした。 β -シトラウリンの転写調節メカニズムを解明することにより、DNAマーカーを利用した β -シトラウリンを集積する鮮やかな濃い橙色の果実の育種技術や、果実に β -シトラウリンを高含有化する栽培技術、収穫後の処理技術の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）： β -Citraurin, a C30 apocarotenoid, is a color-imparting pigment responsible for the reddish color of citrus fruits. CitCCD4 is the key enzyme involved in biosynthesis of β -citraurin. To elucidate the mechanism of β -citraurin accumulation in citrus, transcription factors of CitCCD4 were isolated, and the functions of these transcription factors were analyzed by agroinfiltration method. The results indicate that one of the candidate genes might have the function to regulate the expression of CitCCD4 and the accumulation of β -citraurin in citrus fruits.

研究分野：収穫後生理学

キーワード：カンキツ カロテノイド β -シトラウリン CCD4 転写因子

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

1. 研究開始当初の背景

-シトラウリンはC30のアポカロテノイドであり、カンキツ果実のフラベド(果皮部分)に蓄積する赤色の色素である。この -シトラウリンの集積は、一部の品種(セミノール、クレメンティンなど)において、果実の成熟に伴いフラベド部分に蓄積することが分かっている。 -シトラウリンを高含有する果実は濃い橙色を示すことから、果実の商品価値を高める(より甘くみえる)と期待される。したがって、 -シトラウリン集積についての研究は興味深く、さらにカンキツ果実の品質の向上にも重要である。

これまで私たちのグループは、 -シトラウリンを蓄積するウンシュウミカンの‘山下紅早生’と蓄積しない‘宮川早生’を比較することにより、*CitCCD4*が -シトラウリン生合成に関わる重要な酵素遺伝子であるということを経験的に報告した。 -シトラウリンは、*CitCCD4*により、 -クリプトキサンチンまたはゼアキサンチンを酸化開裂することによって生成される。また、 -シトラウリンを蓄積する‘山下紅早生’と蓄積しない‘宮川早生’の*CitCCD4*の塩基配列に差違は認められなかった。しかし、2品種間の*CitCCD4*の遺伝子発現レベルには、大きな差が認められた。‘山下紅早生’のフラベドでは、9月から急速に*CitCCD4*の発現が増大し、同様に -シトラウリンの蓄積が認められた。一方、‘宮川早生’のフラベドでは成熟過程において*CitCCD4*の発現は非常に低いレベルのままであった。したがって、カンキツ果実の -シトラウリン蓄積は、*CitCCD4*の発現により起きると考えられる。

近年、カロテノイド生合成に関わる遺伝子が転写因子によって調節されているという研究報告が増えており、転写因子による転写制御はカロテノイド集積において非常に重要な役割を担っている。シロイヌナズナでは、Phytohormone-interaction factor (PIFs)とAtRAP2.2転写因子はフィトエンターゼの発現を転写調節することでカロテノイド蓄積を変化させる。また、クロッカスでは、新しいアポカロテノイド生合成調節遺伝子*CsULT1*が単離されており、*CsULT1*を過剰発現することにより、アポカロテノイド生合成に関わる遺伝子群の発現を高め、クロセチン(アポカロテノイドの一種)の生合成を活性化することが明らかとなっている。しかし、これまでカンキツ果実に特異的に蓄積する -シトラウリンの生合成に関わる転写因子は未知であり、 -シトラウリン生合成に関する*CitCCD4*遺伝子の特異的な転写調節メカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、カンキツ果実から -シトラウリンの生合成に関与する転写因子の単離、発現解析および機能解析を行うことにより、カンキツ果実における -シトラウリン生合成の転写調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究では、これまで行ってきたカンキツ果実におけるカロテノイド代謝研究を基盤として、以下の研究を推進した。

① ‘山下紅早生’と‘宮川早生’を比較したトランスクリプトーム解析による

-シトラウリン生合成に関わる重要な転写因子の単離
アグロインジェクションを用いたカンキツ果実の転写因子の機能解析

3. 研究の方法

(1) ‘山下紅早生’と‘宮川早生’を比較したトランスクリプトーム解析による -シトラウリン生合成に関わる重要な転写因子の単離

ウンシュウミカンの‘宮川早生’とその枝変わり品種である‘山下紅早生’の2品種を9月、10月および12月に採取した。これらのサンプルから増幅したcRNAとクレメンティン(*Citrus clementina*)の遺伝子から予測して作成したプローブを用いてマイクロアレイおよびRNA-seqを行ったところ、品種間で発現に差が認められ、‘山下紅早生’において*CitCCD4*と変動が類似している転写因子遺伝子の候補をスクリーニングした。

(2) 2 kb *CitCCD4* プロモーター + GUS リポーター遺伝子を導入した形質転換タバコの作成

本研究で作出したコンストラクトの構造を図1に示した。2 kb *prCCD4*/GUS-pZK3B コンストラクトは次のように作成した。Forwardプライマー(Asc I サイトを含む)およびReverseプライマー(Hind III サイトを含む)を用いたPCRにより、*CitCCD4*の上流プロモーター約2,000 bpの断片を増幅した。次に、PCR産物およびバイナリーベクターGUS-pZK3BをAsc IおよびHind IIIで処理し、精製後ライゲーションした。コンストラクトを大腸菌に導入し、得られたプラスミドをシーケンシングし、塩基配列を確認した。植物の形質導入用のアグロバクテリウムは、三菌系交雑法(triparental mating)で作成した。

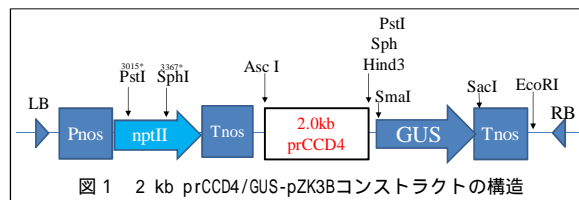


図1 2 kb *prCCD4*/GUS-pZK3Bコンストラクトの構造

形質転換したアグロバクテリウムを培養し、培養した菌液に5 mm角に刻んだ無菌のタバコ(*Nicotiana benthamiana*)葉切片を浸漬することによって接種した。感染させたタバコ葉切片は共存培地で1~2日間培養した後、選抜培地に移し、2週間ごとに培地を交換しながら培養することにより形質転換個体を選抜した。また、Southern blot解析をすることにより、シングルコピーの個体を選抜し、次の転写因子機能解析実験に用いた。

(3)アグロインジェクションを用いたカンキツ果実の転写因子の機能解析

転写因子の機能解析をするため、(2)のコンストラクト作成方法と同様に転写因子コンストラクト 35S -転写因子-GUS-pZK3B を作成した。転写因子遺伝子の機能解析はアグロインフィルトレーション法で行った。形質転換したアグロバクテリウムを LB 培地中 28 °C で振とう培養した。その後、遠心して集菌し、ペレットを MMA 懸濁液に溶かし、OD₆₀₀ を 0.6~0.8 に調整した。その後、室温で MMA 懸濁液に混ぜたアグロバクテリウムを 1~2 時間振とうした。このアグロバクテリウム菌液を 1 mL シリンジでタバコの葉の裏面に注入した。ブドウからの WMYb および 35S -GUS-pZK3B コンストラクトを Control として用いた。注入してから 5 日後に葉の状態を観察し、直径約 0.5 cm の葉を GUS 染色液に入れて、染色した。

4. 研究成果

(1)マイクロアレイおよび RNA-seq 解析とシトラウリン蓄積に関わる転写因子の探索

CitCCD4 は -シトラウリン含量の高い‘山下紅早生’で高い発現を示し、-シトラウリン含量の低い宮川早生では低い発現を示す。本研究では、この差異を生むメカニズムを調査するため、マイクロアレイおよび RNA-seq 解析による網羅的な遺伝子発現解析により、-シトラウリン生成に関わる *CitCCD4* の転写因子を探索した。2016 年 9 月、10 月、12 月に収穫した‘山下紅早生’と‘宮川早生’を使用し、果皮から RNA を抽出した。2 品種の遺伝子発現を RNA-seq とマイクロアレイで解析したところ、30,885 の遺伝子が検出された。また、マイクロアレイの結果より、‘宮川早生’および‘山下紅早生’における転写因子が 1,665 個を確認された。‘山下紅早生’において‘宮川早生’より 2 倍以上発現上昇している転写因子が 9 月には 114 個、10 月には 90 個、12 月には 91 個あった。また、9 月および 10 月いずれも 2 倍以上発現上昇している転写因子が 21 個、10 月および 12 月いずれも 2 倍以上発現上昇している転写因子が 21 個、9 月、10 月および 12 月いずれも 2 倍以上発現上昇している転写因子が 2 個確認された。その中でも、*CitCCD4* の遺伝子発現パターンと類似の転写因子の候補が 12 個確認された。本研究では、転写因子は TF1 - TF12 で表示した。

(2)2 kb *CitCCD4* プロモーター + GUS リポーター遺伝子を導入した形質転換タバコの作成

CitCCD4 の 2 kb のプロモーター領域を導入した形質転換タバコを 5 個体作成した。これらのタバコについて Southern blot 解析を行った結果、3 個体が 1 コピー、1 個体が 2 コピー、1 個体が多コピーであることが分かった。1 コピーの個体について、アグロインフィルトレーション法による転写因子の機能解析に用いた。

(3)アグロインジェクションを用いたカンキツ果実の転写因子の機能解析

アグロインフィルトレーション法では候補とした 12 個の転写因子遺伝子を *CitCCD4* のプロモーター領域を導入したタバコに導入し、転写因子の機能を調査した。その結果、選定した転写因子のうちの 1 つ (TF3) について、わずかだが GUS 染色のスポットが認められた (図 2)。TF3 は WOX (WUSCHEL Related homeobox) 型の転写因子であり、遺伝子の長さは 882 bp、推定アミノ酸配列は 294 残基であった。マイクロアレイの結果により、TF3 は‘山下紅早生’のフラベドの色の变化に伴い発現量が減少する傾向が認められ、‘宮川早生’と比較して顕著に高い傾向を示した。RNA-seq 解析の結果より、12 月の‘山下紅早生’のフラベドにおける TF3 の遺伝子発現レベルは、‘宮川早生’と比較して顕著に高い値を示した (図 3)。

以上のように選定した候補の遺伝子の 1 つ (TF3) について、*CitCCD4* の転写因子として機能する可能性が示唆された。

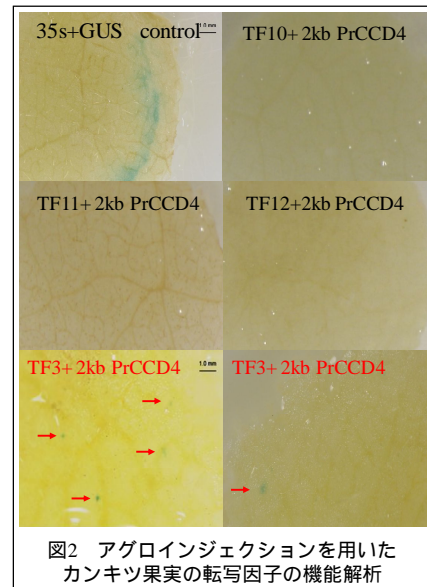


図2 アグロインジェクションを用いたカンキツ果実の転写因子の機能解析

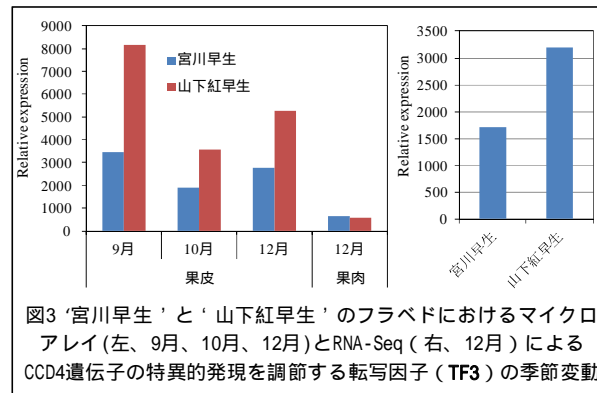


図3 ‘宮川早生’ と ‘山下紅早生’ のフラベドにおけるマイクロアレイ (左、9月、10月、12月) と RNA-Seq (右、12月) による *CCD4* 遺伝子の特異的発現を調節する転写因子 (TF3) の季節変動

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①Gang Ma, Lancui Zhang, Kohei Iida, Yuki Madono, Witchulada Yungyuen, Masaki Yahata, Kazuki Yamawaki, and Masaya Kato. Identification and quantitative analysis of -cryptoxanthin and -citraurin esters in Satsuma mandarin fruit during the ripening

process. Food Chemistry, 2017, 234: 356-364. 査読有.

[学会発表](計1件)

- ①馬 剛、眞殿祐樹、飯田康平、張 嵐翠、八幡昌紀、山脇和樹、加藤雅也
Accumulation of -cryptoxanthin fatty acid ester during maturation in citrus fruit、
園芸学会平成28年度秋季大会、2016年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 雅也

ローマ字氏名：KATO Masaya

研究協力者氏名：馬 剛

ローマ字氏名：MA Gang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。