

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度～2009 年度
 課題番号：19780032
 研究課題名 (和文) 高日持ち性トマトにおける成熟制御の分子機構解明
 研究課題名 (英文) Molecular characterization of the transcription factor regulating ripening of tomato fruit
 研究代表者
 伊藤 康博 (ITO YASUHIRO)
 (独)農研機構食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員
 研究者番号：90353987

研究成果の概要 (和文)：トマト果実の成熟を制御する *RIN* 遺伝子産物とその *rin* 変異の効果について検討した。*RIN* は核局在タンパク質であり、特異的な DNA に対する結合性を示し、転写活性化能を有していた。一方 *rin* 変異により、遺伝子産物は DNA 結合性はあるが転写活性化能を失っていた。この機能の喪失が、*rin* 変異体で成熟が抑制される原因であり、変異タンパク質が正常型タンパク質に対して競合して阻害することがヘテロ型植物が高日持ちを示す原因であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The transcription factor *RIN*, which regulates tomato fruit ripening, was examined for its molecular properties and for the effect of the *rin* mutation. The results revealed that *RIN* is a nuclear localized protein that has a ability to bind specific DNA motif and a transcription-activating function. By the *rin* mutation, the encoding protein lost its transcription-activating function but kept the DNA binding ability. These results suggest that the functional defect of the mutant protein cause the inhibition of the fruit ripening in the mutant and the partial inhibition in the *RIN/rin* hetero plant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,300,000	0	1,300,000
20 年度	900,000	270,000	1,170,000
21 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：野菜、転写因子、成熟制御

1. 研究開始当初の背景

未熟な果実は食味、食感等の点で食用に向かないが、成熟することにより、食用に

適するような味、着色、軟化、あるいは種々の機能性成分の蓄積等の変化が始まる。これらの生理的変化に関わる遺伝子群は、成

熟期に極めて高い同調性を示して発現量が開始・上昇するものが多い。果実の成熟制御機構の研究は、日持ち（棚持ち）性を改善する為の手法の開発、あるいは機能性成分の高蓄積といった実用面での応用が可能であるばかりでなく、植物の遺伝子発現調節機構の研究モデルとしても学術的な重要性が高い。

近年の成熟制御に関する最大の研究トピックは、果実の成熟開始への引き金を引く *RIN* という転写因子遺伝子がトマトにおいて単離された事である (Vrebalov et al. 2002)。この遺伝子座における *ripening inhibitor (rin)* 変異をホモにもつ果実 (*rin/rin*) は成熟が全く進行せず、室温に放置しても数ヶ月以上赤くならず固いまま、その姿を保持する (図 1)。我々と共同研究を行っているカゴメ総合研究所では、*RIN* 遺伝子が不完全優性を示すことに注目し、変異遺伝子をヘテロ (*RIN/rin*) に持つ高日持ち性品種を作出した (図 1)。この系統は食用に適した着色、風味を持ちながら通常品種の 3 倍以上の日持ち性を示す。我々はこの変化は成熟関連遺伝子の発現が部分的に抑制されることが原因でありこれは *RIN/rin* 遺伝子型の効果であることを明らかにした。また、*RIN/rin* 遺伝子型の果実はアレルギー蓄積量が低下することも我々は見出しており、低アレルギー品種の開発への新たな可能性を開いた。*RIN* および変異遺伝子について分子レベルでの知見をさらに蓄積することにより実用レベルでの応用をさらに拡大できると考えられる。

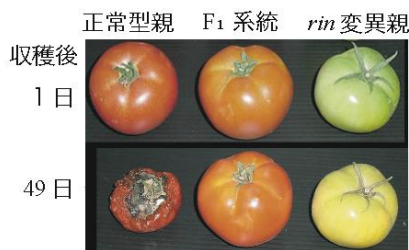


図 1 *rin* ヘテロ型果実の高日持ち性

2. 研究の目的

本課題では、ヘテロ遺伝子型 (*RIN/rin*) 果実が高日持ち性を示す原因を探るため、*RIN* 遺伝子がコードするタンパク質の機能解析、さらに *rin* 変異による遺伝子産物の機能変化を分子レベルで明らかにする事が目的である。そのためまず、正常型 *RIN* の転写因子としての特性を明らかにするために、細胞内局在性、DNA 結合性、転写活性化能等の機能を明らかにし、その後、正常型と変異型の特性を比較した。

3. 研究の方法

(1) *RIN*-GFP 融合タンパク質発現ベクターをタマネギ上皮細胞にパーティクルガンで導入し、一過的に発現させた融合タンパク質が核へ移行・局在するかどうかを蛍光顕微鏡により観察した。

(2) 正常型タンパク質の転写因子機能の検討として以下の実験を行った。

① ランダム配列の二本鎖オリゴ DNA から *in vitro* 反応で *RIN* が結合する DNA 配列を選抜し、その配列を決定した。

② 酵母を用いて、標的タンパク質に転写活性化能があればマーカー遺伝子発現が生じる系を構築し、転写活性の有無を検討した。

(3) *RIN* が直接転写制御している遺伝子を明らかにするために、成熟果実細胞中のクロマチンから *RIN* 特異的抗体を使って免疫沈降し (クロマチン免疫沈降法; ChIP 法)、ChIP-PCR 法により、標的配列に *RIN* が結合しているかどうかを検討した。

(4) 変異型遺伝子がコードするタンパク質について DNA 結合性及び転写活性化能を正常型タンパク質と同様の試験により機能の比較を行った。

4. 研究成果

(1) RIN-GFP 融合タンパク質をタマネギ上皮細胞で一過的に発現させたところ、GFP シグナルが核に局在したので(図 2)、RIN は格で機能するタンパク質といえる。

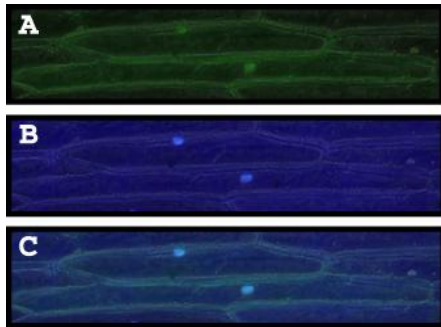


図 2. RIN-GFP 融合タンパク質のタマネギ上皮細胞での一過的発現。(A) GFP シグナルと可視光の合成写真。(B) DAPI 染色シグナルと可視光の合成写真。(C) A, B の合成写真。

(2) 酵母の系を用いて RIN の転写活性を調べたところ、RIN には転写活性を促進する配列があり、その活性には C 末端付近が重要であることが示された(図 3)。

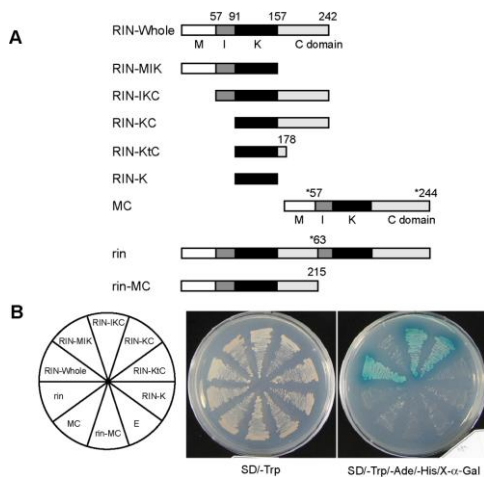


図 3. 酵母におけるタンパク質の転写活性化能評価。(A) 酵母内で発現させた RIN タンパク質の各種構造、及び変異タンパク質と MC タンパク質。(B) 酵母で (A) のタンパク質を発現させた時のマーカー遺伝子発現の有無。転写活性化能があれば酵母は右の選抜培地で生育し、青色色素を生産する。

(3) RIN 結合配列をスクリーニングし、コンセンサスを取ったところ、CCA(A/T)(A/t)(A/T)ATAG (カッコ内は出現頻度が同様に高い場合は大文字、片方が低い場合は小文字で表記) という配列であった。この配列は、シロイヌナズナの SEP1、SEP4 の結合配列に極めて近いことが分かった。

(4) RIN が直接転写制御している遺伝子を明らかにするため、RIN 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降処理を行い、得られた DNA (RIN 結合配列が濃縮されている) を ChIP サンプルとした。成熟中の急激なエチレン生産の増大に強く関わる LeACS2 遺伝子プロモーター部に、明らかに濃縮が見られた(図 4)。LeACS2 は従来 RIN に直接制御されていないといわれていたが、その説を覆す新たな知見となった。

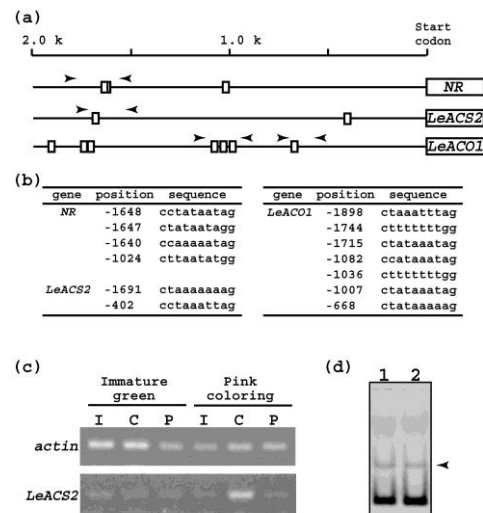


図 4 クロマチン免疫沈降法による *in vivo* での RIN 結合配列の決定。NR、LeACS2、LeACO1 のプロモーター配列上の RIN 結合候補配列 (a および b) においてプライマーを作成し (a 矢印)、未熟または成熟果実の細胞からクロマチンを抗 RIN 抗体により回収し抽出した DNA を PCR 反応に供試したところ、LeACS2 の配列が特異的に増幅した (c)。本配列は *in vitro* 合成した RIN に結合した (d)。以上から、RIN は生体内で LeACS2 のプロモーターに結合していることが明らかになった。

(5) 変異型のタンパク質について DNA 結合性と転写活性化能について検討した。変異型タンパク質は正常型と同様に明確な DNA 結合性を示す一方で、正常型で見られた転写活性が完全に失われていた(図 3)。変異型のタンパク質のうち、MC 遺伝子に由来する部分を取り除いたタンパク質(C ドメインの末端部分を欠失)には転写活性化能がないこと、MC タンパク質にも転写活性化能がなかった。これらの結果をまとめると、正常型のタンパク質の転写活性化能の欠失が *rin* 変異の原因であることが結論付けられる。

(6) 変異型タンパク質が変異体果実細胞中に蓄積していること、正常型タンパク質と相互作用があることも明らかにした。以上から *RIN/rin* 遺伝子型のヘテロ植物体では変異型タンパク質が正常型タンパク質と競合することにより、正常型の遺伝子発現活性化機能に阻害的に働いていることが示唆される。その結果、ヘテロ型果実の成熟の部分的な抑制が見られ、高日持ち性につながっていると考えられた。

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) Y. Ito, M. Kitagawa, その他 8 名: DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN, *The Plant Journal*, 査読有, **55(2)**, 212-223 (2008)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 伊藤康博, 中野年継(その他5名)、トマト花梗部の離層形成に関わる遺伝子発現の網羅的解析、日本農芸化学会大会、2010.3.28、東京大学

(2) 中野年継, 伊藤康博(その他5名)、トマト果梗部の離層形成制御に関わる分子機構解析、日本農芸化学会大会、2010.3.28、東京大学

(3) 中野年継, 伊藤康博(その他5名)、トマト果梗部の離層形成に関わる新規遺伝子の同定、園芸学会度春季大会、2010.3.21、日本大学

(4) Y.Ito(その他9名)、Molecular characterization of the tomato fruit-ripening regulator RIN、International symposium on Solanaceae genome research 2010、2010.3.13、東北大学

(5) 伊藤康博(その他8名)、トマト果実における *rin* 変異の成熟抑制機構の解明、日本農芸化学会大会、2008.3.28

[図書] (計 1 件)

(1) 伊藤康博、北川麻美子、トマトの *rin* 変異体果実はなぜ赤くならないのか?、化学と生物、47(7)、465-472(2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 康博 (ITO YASUHIRO)

農研機構・食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：90353987