

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380022

研究課題名（和文） DNAアレイと成熟不全変異体、形質転換体トマトを用いた果実成熟制御鍵因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of key factor in fruit ripening using DNA array, ripening-impaired mutant and transgenic tomato

研究代表者

久保 康隆 (KUBO YASUTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80167387

研究成果の概要（和文）：

モデル作物であるトマトにおいて、DNA アレイ、成熟不全変異体および形質転換技術を駆使して成熟制御における鍵因子を解析した。12000 遺伝子の DNA アレイを用いて、成熟前後に顕著に変化する 428 個の成熟関連遺伝子を特定し、内 244 個は完全にエチレンの制御下にあることを示した。新規成熟関連転写・シグナル因子として GRAS, SAHH, b-Zip および BTB 因子を見いだした。また、成熟および花弁離脱を顕著に抑制される EIL 抑制形質転換トマトを作成し、成熟エチレン生成の開始は発育段階的によって決定されていることを示した。これらの知見を基にキウイフルーツ果実の成熟機構を解析し、エチレン信号伝達系とは独立した低温誘導成熟機構があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We screened ripening key genes using tomato DNA macroarray consisted of 12,000 clones, ripening-impaired mutants and transgenic technology. Ripening-regulated 428 genes were isolated and 244 genes were regulated under ethylene signaling. As ripening-regulated novel transcription factor or signaling factor, GRAS, SAHH, b-Zip and BTB genes were identified, suggesting their involvement in regulation of fruit ripening at the downstream of ethylene signaling. Transgenic tomatoes with all known *LeEILs* suppressed, exhibited non-ripening phenotype and indicated that onset of ripening-ethylene is regulated by developmental factors. Based on information in tomato, low-temperature induced ripening in kiwi fruit was analyzed and it was shown to be independent of ethylene signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：園芸利用、エチレン、果実成熟、転写因子、変異体、形質転換技術

1. 研究開始当初の背景

果実の成熟機構解明は、貯蔵・流通技術の開発・改善の鍵であるとともに、園芸生理研究の焦点の一つである。トマトは果実のモデル作物として取り上げられ、国際協力の下にゲノム計画が進展しつつある。国内では筆者らも協力した変異体集団の作成やDNAアレイの整備、完全長cDNA収集、データベースの整備などが行われ、多様な研究基盤が整ってきた。一方、キウイフルーツでは高品質新品種が開発されたが、成熟機構の理解が不十分で長期貯蔵技術開発が模索されていた。

2. 研究の目的

本研究は、(1) トマト果実成熟に関わる遺伝子を網羅的に解析し、その制御機構の全体像を把握すること、(2) 成熟の引き金となる最初のエチレン生成を誘導する鍵因子を決定すること、(3) 成熟進行における信号伝達系の系統整理と主要転写制御因子を決定することを目的とする。本研究の特徴は、筆者らが独自に作出したエチレン不感受性形質転換体（エチレン信号伝達因子EIN3/EIL遺伝子をノックアウト）、変異体集団およびDNAアレイなどの新技术を駆使して、多数の候補の中から成熟の鍵因子を検索し、形質転換技術を用いて決定することにある。本研究ではトマト果実の成熟機構解析で得られた知見を他の園芸作物（キウイフルーツ）に応用し、果実成熟機構における一般性と特殊性の解析を進めるとともに、応用技術に結びつけようとする点にある。本研究の成果は、果実生理研究における新局面を開くとともに、実用面でも果実品質の向上、流通・貯蔵技術の改善、高品質・長寿命品種の育成に繋がる。

3. 研究の方法

(1) 筆者らが作出したエチレン不感受性形質転換体、成熟不全突然変異体（rin, nor）の果実および1-MCP処理した野生型果実について、DNAアレイ技術を用いて1万種以上の遺伝子発現を網羅的に解析し、初期エチレン誘

導因子、成熟制御因子の候補を抽出する。

(2) 抽出された候補因子について、VIGS法および抑制形質転換技術を作成し、その果実の成熟特性（エチレン生成、軟化特性、呼吸活性、着色度）、成熟関連成分（糖、有機酸、色素組成、香り成分）の分析を行う。さらに、DNAアレイ技術を用いて成熟関連遺伝子の発現特性の変化を解析し、各制御候補因子の支配範囲を確定する。

(3) トマト果実の解析で得られた知見を基に、1-MCPおよびMA技術を利用してキウイフルーツ果実の成熟制御機構を解析し、長期貯蔵技術開発の基礎を確立する。

これらを総合して、果実成熟の全体像を把握し、関連信号伝達系の系統整理を行うとともに、最初のエチレン生成を誘導する鍵因子と成熟制御重要転写制御因子を決定する。

(4) トマト果実での知見を基にキウイフルーツ果実の成熟制御機構を解析し、'さぬきゴールド'種の貯蔵期間が短い分子機構を解析する。

4. 研究成果

1-MCP 処理した野生型トマトおよび成熟不全変異体トマトについてマクロアレイを用いて成熟関連遺伝子を網羅的に調査した。その結果、12284 個の遺伝子のうち成熟関連遺伝子として 428 個（全体の約 5%）が同定された。成熟に伴い発現が増加した遺伝子は 240 個、減少した遺伝子は 216 個あった。そのうち Turning 段階の 1-MCP 処理によって、発現レベルが MG 段階のレベルに戻るエチレン依存性遺伝子は、成熟に伴って発現が増加する遺伝子のうち 231 個（96%）、減少した遺伝子のうち 67 個（35%）、合計 298 個であった。

エチレン依存性成熟関連遺伝子のうち RIN 依存性の遺伝子は、213 個存在し 71% の割合を占めた。NOR 依存性の遺伝子は、264 個存在し 89% の割合を占めた。RIN と NOR 両方に非依存性を示した遺伝子は、僅か 16 個でエチレン応答性遺伝子の多くは、RIN, NOR に依

存していた。信号伝達経路においてNORはRINの上流に位置し、より多くの遺伝子を制御していると推測されており、今回の結果はその見解に一致した。また、成熟に伴って増加するエチレン依存性転写因子としてTDR4, TDR6などのMADS因子に加えてGRAS因子が抽出され、エチレン信号伝達系とGA信号伝達系のクロストークが示唆された。また、成熟に伴って減少する転写因子としてはbZip, BTB, TF-other因子などが抽出された。さらに、抽出された転写因子について、VIGS法および形質転換技術を用いて、果実成熟における役割と制御範囲の解析を進めた。GRASについては約20系統の形質転換体を得られ、表現型解析を進めている。エチレン信号伝達系下流に位置するEIL因子については、4つのEIL遺伝子全てが強く抑制された組換え系統が得られ、果実成熟、花弁の離脱、3重反応、不定根形成が強く抑制されていた。ところが、この系統でも開花40日前後にエチレン生成が見られ、成熟開始に関与する成熟のトリガーとなるエチレン生合成は発育段階的に制御されていることが示された。

これらの知見を基に、キウイフルーツ果実の成熟制御機構について解析したところ、エチレンジグナルとは独立した低温による成熟誘導機構が働いていることを明らかにした。

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7件)

- ① Mworia, E. G., T. Yoshikawa, N. Salikon, C. Oda, W. O. Asiche, N. Yokotani, D. Abe, K. Ushijima, R. Nakano and Y. Kubo. Low-temperature-modulated fruit ripening is independent of ethylene in 'Sanuki Gold' kiwifruit. *J. Exp. Bot.* 63:963-971. 2012. 査読あり
- ② Mworia, E. G., T. Yoshikawa, N. Salikon, C. Oda, T. Fukuda, K. Suezawa, W. O. Asiche, K. Ushijima, R. Nakano and Y. Kubo. Effect of MA storage and 1-MCP on storability and quality of 'Sanuki Gold' kiwifruit harvested at two different maturity stages. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 372-377. 2011. 査読あり
- ③ Aoki K., K. Yano* 他 (*These authors contributed equally to this work) (31名中1番目). Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11, 210. 2010. 査読あり
- ④ Ojiewo, C., Y. Kubo, Murakami K., and Masuda M. Comparative analysis of differential gene expression in wild-type and 12C5+ ion beam-induced abnormal flower mutant of *Solanum villosum* by tomato cDNA macroarray. *Int. J. Plant Dev. Biol.*, 4, 1-7 (2010). 査読あり
- ⑤ Yokotani N., R. Nakano, S. Imanishi, M. Nagata, A. Inaba and Y. Kubo. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmental regulated. *J. Exp. Bot.* 60:3422-3433. 2009. 査読あり
- ⑥ Suzuki A., Sawabe K., Yano K. Web databases for Omics data in tomato. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78:23-31. 2009. 査読あり
- ⑦ Mworia E., T. Yoshikawa, N. Yokotani, T. Fukuda, K. Suezawa, K. Ushijima, R. Nakano, Y. Kubo. Characterization of ethylene biosynthesis and its regulation during fruit ripening in kiwifruit, *Actinidia chinensis* 'Sanuki Gold'. *Postharvest Biol. Technol.* 55:108-113. 2009. 査読あり

[学会発表] (計9件)

- ① Yasutaka Kubo, Eric G. Mworia, Chisato Oda, William O. Asiche, Koichiro Ushijima, and Ryohei Nakano. Low-temperature induced fruit ripening is independent of ethylene in 'Sanuki Gold' kiwifruit. The 9th International Conference on the Plant Hormone Ethylene. 2012年3月19日-23日. Rotorua Convention Center, New Zealand.
- ② Enn Zui, N. Yokotani, K. Ushijima, R. Nakano and Y. Kubo. Transcriptome profiling of ripening associated genes

using tomato cDNA macroarray in ethylene and 1-MCP treated fruit. (8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. 2011年11月28日-12月2日.神戸.

- ③ 閻瑞・上高大典・横谷尚起・牛島幸一郎・中野龍平・久保康隆. トマト DNA マクロアレイと VIGS 法を利用した果実成熟制御機構の解析. 園芸学会平成 23 年度秋季大会. 2011 年 9 月 24 日～26 日. 岡山大学.
- ④ 閻瑞・上高大典・横谷尚起・牛島幸一郎・中野龍平・久保康隆. トマト DNA マクロアレイによるエチレン制御下にある果実成熟関連因子のスクリーニング. 園芸学会平成 22 年度秋季大会. 2010 年 9 月 19 日～20 日. 大分大学.
- ⑤ Kubo Y., N. Yokotani, Y. Rui, D. Kamitaka, K. Ushijima and R. Nakano. Screening of ripening related genes using tomato DNA macroarray, 1-MCP and ripening impaired mutants. Gordon Conference for Postharvest Physiology and Technology. 2010 年 6 月 30 日. Tilton School NH USA.
- ⑥ Kubo Y. Regulation of fruit ripening through manipulation of ethylene biosynthesis and signaling. AASPP and JKUAT Joint Conference. 2011 年 11 月 18 日. JKUAT, Kenya.
- ⑦ Kubo Y. Diversity in regulation of fruit ripening. JSOL2010. 2010 年 3 月 13 日, 東北大学
- ⑧ Mwaniki, W. M., R. Nkano, K. Ushijima, K. Aoki, D. Shibata, J.K.C. Rose and Y. Kubo. Functional screening for the secretomes associated with fruit softening in pear. The 8th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene. 2009 年 6 月 21 日-25 日. Cornell University Ithaca, USA.
- ⑨ 久保康隆・上高大典・牛島幸一郎・中野龍平. トマトマクロアレイを用いた果実成熟に関連する転写因子の探索. 園芸学会平成 20 年度秋季大会. 2008 年 9 月 27 日～29 日. 三重大学.

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 康隆 (KUBO YASUTAKA)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：80167387

(2) 研究分担者

矢野 健太郎 (YANO KENTARO)
明治大学・農学部・准教授
研究者番号：00446543

(3) 連携研究者

該当なし