

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380023

研究課題名(和文)アレイ技術と形質転換、TILLING法による果実成熟制御転写因子の機能解析と応用

研究課題名(英文)Functional analysis and its application of transcription factors responsible for fruit ripening using array technique, transgenic and TILLING technologies

研究代表者

久保 康隆(KUBO, Yasutaka)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：80167387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：果実の成熟制御機構解明は、園芸生理研究の焦点の一つであるとともに、貯蔵・流通技術の開発・改善の鍵である。トマトDNAアレイを用いて11,520個の遺伝子の発現を網羅的に解析し、418個の成熟関連因子(224個：成熟に伴い増加, 195個：成熟に伴い減少)を抽出し、それらの制御の鍵となる8個の転写因子を特定した。GRAS転写因子のRNAi形質転換体を作成し、機能解析を行ったところ、果実軟化に重要なPG, PL遺伝子の抑制が確認され、同因子が成熟制御、特に果実軟化過程に重要な役割を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Understanding of regulatory mechanism in fruit ripening is central hot point in horticultural physiology and critical point for technology development of storage and transportation. Using a tomato DNA macroarray consisting of 11,520 genes, we identified 419 ripening-associated genes (224 upregulated, 195 downregulated) and isolated 8 key transcription factors. GRAS-suppressed RNAi transgenic tomato exhibited down-regulation of PG and PL genes, suggesting that GRAS plays a key role for regulation of fruit ripening, in particular for softening process.

研究分野：園芸利用学

キーワード：果実発育・成熟 エチレン アレイ解析 形質転換体

1. 研究開始当初の背景

トマト、メロン、リンゴ、バナナなどの多数の果実は、エチレンを生成し、その信号によって成熟する。エチレン信号はETR1 CTR1 EIN2 EIN3/EIL系を経た後、分岐し、多数の成熟関連遺伝子へと伝達される。筆者らは、以前にEIL遺伝子が完全に抑制された形質転換体を作成したところ、エチレン処理を行っても果実は全く成熟しなかった。また、メロン果実の成熟開始後エチレン作用阻害剤(1-MCP)を処理すると、老化・腐敗が顕著に抑制され可食期間は顕著に延長された。成熟不全を示すトマト突然変異体rinおよびnorが知られており、rinの成熟不全の原因は、MADS-RINの変異に起因することが示された。一方、norはNAC遺伝子に欠陥があり、信号伝達系としてはRINの上流で作用していることが示唆されている。このように、エチレンとRINは果実成熟の主要支配因子であり、その信号伝達経路の主要部分の解析は進んできた。エチレン阻害剤やRIN変異遺伝子を利用した成熟抑制技術も開発・実用化されたが、これらの因子の支配・影響範囲は広範なため、日持ち期間の延長と引き換えに成熟現象全体が抑制され食味や風味が損なわれる。

したがって、食味と風味品質を損なわずに日持ち・貯蔵期間を延長する技術開発には成熟制御信号伝達系の特に下流部分を理解し、過熟による品質劣化の主要な要因である細胞壁分解に関わる遺伝子の特異的に制御する技術が必要である。その候補として Polygalacturonase や Cellulase、Expansin などの細胞壁分解に直接関わる遺伝子の抑制組換え体が試されたが、いずれも果実軟化に顕著な抑制は見られなかった。すなわち、果実の細胞壁分解には、多数の細胞壁遺伝子が関与しており、それらを一度に制御できる転写因子などの制御が必要なることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

果実の成熟制御機構解明は、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。果実の成熟は、糖や有機酸、アミノ酸などの食味関連成分の増減、細胞壁の分解によるテクスチャーの変化、各種色素の分解と合成による着色の進行、芳香成分の合成など多様な要素から構成されている。これらの多様な変化は、遺伝的な生長・発育プログラムによって多数の遺伝子が巧妙に制御され、統一的な調和に基づいて進行する精緻な現象である。トマトは果実研究のモデル作物として位置づけられ、国際ナス科ゲノム計画(SOL)により、全ゲノム配列読み取りが終

了し、公開された。国内では、ブラシノステロイド合成の変異により矮化したマイクロトマトを用いて EMS およびガンマ線照射変異体集団を作成されている。このコレクションは、文部科学省ナショナルバイオリソース事業に選択され、筑波大学を中心として変異体集団の系統保存とその種子の供給体制が整った。

3. 研究の方法

トマトにおけるマクロアレイ解析

MG, Turning 段階, Pink 段階の 'Ailsa Craig' トマト果実から全 RNA を抽出し、マクロアレイを用いて約 12000 遺伝子の発現量を比較した。また、Turning 段階の果実に 5ppm 1-MCP を一夜処理し、2日間常温下で保持した。MG 段階の発現量に対し Turning 段階または Pink 段階での発現量が 3 倍以上に増加または 1/3 以下に減少した因子を成熟関連遺伝子とした。1-MCP 処理に対する反応によって、各遺伝子のエチレン依存性を評価した。

SI-GRAS-RNAi, PG, PL-RNAi 形質転換体の育成と発現解析

SI-GRAS-RNAi 形質転換体を 20 系統作成し、選抜した系統の T1 世代を解析した。PG, PL-RNAi 形質転換体も 16 系統作成し、T0 世代を解析対象とし、現在 T1 世代を育成中。各果実ごとに開花から着色開始までの日数を記録し、着色開始から 2~3 日経過した果実をサンプリングした。SI-GRAS-RNAi 形質転換体については SI-GRAS と多数の成熟関連遺伝子を PG, PL-RNAi 形質転換体については PG, PL 遺伝子の発現レベルを Real-TimePCR 法を用いて解析した。

各組織(根・茎・成葉・幼葉)における成熟関連遺伝子の発現解析

成熟ステージ別の果実において成熟関連遺伝子の発現解析は行っていたが、果実以外の組織については発現解析を行っていなかったため、果実以外の各組織を解析対象とした。そして成熟関連遺伝子の発現レベルを Real-TimePCR 法を用いて解析している。

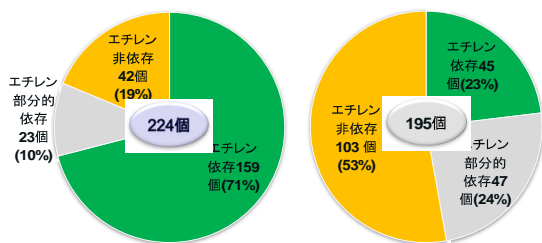
成熟関連遺伝子のプロモーター解析

明治大学に依頼し、成熟関連遺伝子のプロモーター配列について、cis-element の配列を解析し、予測された cis-element 配列から GCC-box や CAAT-box の有無を解析した。

4. 研究成果

マクロアレイ解析によって成熟に伴い発現が 3 倍以上に増加した 224 遺伝子、3 分

の1以下に減少した195遺伝子を成熟関連遺伝子とした。成熟に伴って発現が増加する遺伝子内の、71%にあたる159個、成熟に伴って減少する遺伝子内の、23%にあたる25個が1-MCP処理に強く反応し、顕著なエチレン依存性を示した。

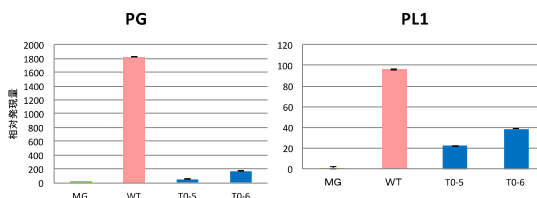


第1図 成熟関連遺伝子のエチレン依存率による分類

・エチレン依存: エチレン依存率>70%
 ・エチレン部分的依存: 70%>エチレン依存率>30%
 ・エチレン非依存: エチレン依存率<30% あるいは成熟期間で遺伝子発現変化異常

成熟に伴って発現が変化する遺伝子の中で炭水化物、脂質およびエネルギー代謝に関連する遺伝子では、その多くが成熟に伴って発現が増加し、エチレンによる直接的な制御を受けていた。一方、光合成関連遺伝子ではほとんどが成熟に伴って発現レベルが低下するものの、エチレンの直接的な支配を受けるものと受けないものに分類された。細胞壁関連遺伝子では、成熟に伴って顕著に増加する因子としてPG, PLおよびmannan endo-1,4-beta-mannosidaseが、逆に低下する因子としてはExpansin18, endo-1,4-beta-glucanaseがスクリーニングされた。転写因子としてはMADS遺伝子群に属するTDR4およびMADS-RINが成熟に伴って顕著に増加し、BTB, bZipが成熟に伴って顕著に低下した。また、信号伝達関連因子としてBNK1, SAHHが成熟に伴って増加した。また、GA合成の鍵因子であるGA20 oxidaseおよびG信号伝達系の転写因子であるGRASが成熟に伴って増加することが観察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。成熟関連遺伝子の機能別の分類を行い、果実の成熟現象に特徴的な呼吸および志望代謝の増大、エチレンとABAの蓄積、細胞壁分解、光合成機能の喪失などに関与する遺伝子群を特定した。さらに、それらの制御の鍵となる8個の転写因子を抽出し、GRAS転写因子についてはRNAiコンストラクトを構築し、20系統以上の形質転換体の作成に成功した。また、細胞壁分解遺伝子としてPG (Polygalacturonase)およびPL (Pectate-lyase)遺伝子に注目し、両遺伝子を同時に抑制する形質転換体作成にも成功した。さらに、トマト果実との比較においてキウイフルーツ果実の成熟解析にも着手し、エチレン非依存性低温誘導成熟現象を見いだした。

開花から着色までの日数については、遺伝子導入による大きな変化は見られなかつ



第2図 GRAS RNAi形質転換体におけるPG, PL1遺伝子の発現解析 (WT: 野生型(ピンク段階), T0-5,T0-6:形質転換体(ピンク段階))

た。しかし開花する時期による差は大きかった。T0世代のPG, PL-RNAi個体では、着果しにくい果実や種子が出来にくい果実が観察された。原因としては、不稔系統には葉が厚くなり色が濃くなるなどの特徴が見られることから培養中の倍数化などが考えられる。現在育成中のT1世代についてもWTと比較して成長が著しく遅延している系統が観察された。SL-GRAS-RNAi個体についてはSL-GRASの発現量を大きく抑制する事が出来なかった。原因としては、SL-GRASは成熟において重要な遺伝子である為SL-GRASの発現を大きく抑制できた個体は生き残れないのではないかと考えられる。また、SL-GRAS-RNAi個体については成熟関連遺伝子の発現量についても調査した。

結果としては、PG, PL, ACS2, Cyanoalaにおいて発現の抑制が見られた。これらの遺伝子については、SL-GRASが転写因子として働くターゲットの遺伝子である可能性が考えられる。各組織における成熟関連遺伝子の発現解析では、成熟に伴って発現量が上がる遺伝子においては果実以外の組織の発現量は低い傾向にあったが、E4遺伝子でのみ比較的高い値を示した。一方、成熟に伴って発現量が減少するChloro-binding遺伝子は、果実以外の組織において顕著な発現量を示した。成熟関連遺伝子のプロモーター解析についてはACC, CER1, PGの上流3kb遺伝子においてCArGモチーフを特定した。

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 4件)

- (1) Asiche, W., Mworira, E. G., Oda, C., Mitalo, O. W., Owino, W. O., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y. 2015. Extension of shelf-life by limited duration of propylene and 1-MCP treatments in three kiwifruit cultivars. *Hort. J.* doi: 10.2503/hortj.MI-066.
- (2) Ohyanagi, H. Kubo Y., Yano K. et. al., 2014. Plant Omics Data Center: An Integrated Web Repository for Interspecies Gene Expression Networks with NLP-based Curation. *Plant Cell Physiol.* 56:e9.
- (3) Yan, R., Yokotani, N., Yamaoka, T., Ushijima K., Nakano, R. Yano, K. Aoki, K.

Kubo, Y. 2013. Characterization of ripening-associated genes using a tomato DNA macroarray, 1-methylcyclopropene, and ripening-impaired mutants. *Postharvest Biol. Technol.* 86: 159-170.

- (4) Mworira, E. G., Yoshikawa, T., Salikon, N., Oda, C., Asiche, W. O., Yokotani, N., Abe, D., Ushijima, K., Nakano R., Kubo, Y. 2012. Low-temperature-modulated fruit ripening is independent of ethylene in 'Sanuki Gold' kiwifruit. *J. Exp. Bot.* 63:963-971.

〔学会発表〕(計 8件)

- (1) Kubo, Y., Yan, R., Yokotani, N., Yamoka, T., Ushijima K., Nakano, R. Yano, K. Aoki, K. Characterization of ripenin g-associated genes using a tomato DNA macroarray, 1-methylcyclopropene in wild type, *rin* and *nor* tomato fruit. The 10th International Conference on the Plant Hormone ethylene. November 14-18, 2015. Chongqing, China.
- (2) Kubo, Y. Regulation of fruit ripening, 1-MCP, Real time PCR, NGS. October 19, 2015. JKUAT seminar, Kenya.
- (3) Kubo Y. Innovation in agricultural sector –past, present and future. The ninth JKUAT scientific, technological and industrialization conference. 2014年11月13日. Jomokenyatta Univ. in Kenya.
- (4) 久保康隆・閻 瑞・村田綾香・牛島幸一郎・中野龍平. DNAアレイによるトマト果実成熟機構の網羅的解析. 平成26年度園芸学会中四国支部会. 2014年7月21日. 徳島県農林水産総合技術支援センター.
- (5) Asiche A.O., Kasahara Y. Kusakabe Y. Ushijima K. Nakano R. and Kubo Y. Distinction between ethylene-dependent and low temperature modulated ripening in 'Sanuki Gold' kiwifruit. 2014年10月25, 26日. 2014年10月25, 26日.
- (6) Kubo Y. E. G. Mworira, W. O. Asiche, K. Ushijima, R. Nakano. Postharvest control of stress-induced fruit ripening in horticultural crops. November 16, 2013. JKUAT Academic Conference, Kenya.
- (7) Asiche O.W., C. Oda, M. Tanigawa, K. Ushijima, R. Nakano, and Y. Kubo. Propylene and 1-MCP treatments in determining optimum ripening of three kiwifruit cultivars. 園芸学会春季大会. 平成25年3月23日. 東京農工大学.
- (8) Asiche O.W., C. Oda, M. Tanigawa, K. Ushijima, R. Nakano and Y. Kubo. Low temperature modulated fruit ripening regulated by ethylene independent system in three kiwifruit cultivars. 園芸学会秋季大会. 平成24年9月22日. 福井県立大学

〔図書〕(計 1件)

Kubo, Y. Ethylene, oxygen, carbon dioxide, and temperature in postharvest physiology. (2015). p. 17-33. In: Kanayama, Y. Kochetov, A. (eds.) Abiotic stress biology in horticultural crops. Springer, Tokyo, Heidelberg, New York, Dordrecht, London.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
久保 康隆 (KUBO Yasutaka)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・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
中野 龍平 (NAKANO Ryohei)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授
研究者番号: 70294444
- (4) 研究協力者
閻瑞 (Yan, Rui)
Eric G. Mworira
William O. Asiche