

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580043

研究課題名(和文)カキ果実の軟化およびエチレン生成誘導要因の解明

研究課題名(英文)Studies on fruit softening and factor of ethylene synthesis in persimmon

研究代表者

板村 裕之 (ITAMURA, HIROYUKI)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80109040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脱渋処理したカキ果実では、エチレン生成誘導後、細胞膜の脂質を過酸化するリポキシゲナーゼ遺伝子の発現が増加することで、細胞膜が劣化し、果肉硬度の低下と電解質漏出量の増加、還元型アスコルビン酸含量の減少が認められた。アクアポリン遺伝子発現は樹上軟化と関連が深かった。エチレン生成誘導要因はこれらの因子以外であると思われた。

樹上で軟化した果実からcDNAライブラリーを作成し、EST遺伝子情報を獲得した。15の細胞壁分解酵素遺伝子を発現解析すると、5種のペクチン分解酵素と3種のキシログルカン分解酵素の遺伝子が急速な果実軟化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ethylene synthesis triggered and induced the deterioration of cell membrane via increase of lipoxygenase gene expression, ion leakage, decrease of flesh firmness and ascorbic acid in persimmon fruit treated by removal of astringency. Aquaporin gene expression was related to the on-tree fruit softening. The induction factor of ethylene synthesis is thought to be another one except for above mentioned.

To prolong shelf-life of persimmon, cDNA was constructed from softened pulp of immature fruit and sequenced ESTs. Obtained 4701 EST information contained pectin and xyloglucan degrading enzyme genes. Fifteen isogenes expression were analyzed by real-time PCR. On-tree senescent fruit rapidly softened and produced ethylene, mRNA of five pectin and three xyloglucan degrading enzyme genes increased concomitant with softening degree.

研究分野：園芸利用学・果樹園芸学

 キーワード：カキ エチレン生成誘導 果実軟化 リポキシゲナーゼ アクアポリン ポリガラクトシダーゼ  
 -ガラクトシダーゼ エンド型キシログルカン加水分解・転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

果実軟化機構については多くの研究がなされ、申請者らも、平成 17~19 年度科学研究費基盤研究 B、平成 21~23 年度農水省実用化技術開発事業で知見を積み上げてきた。しかしながら、軟化の主原因であるエチレンについては、その生成系とシグナル伝達が詳細に解明されたものの、エチレン生成系そのものがどのようにして誘導されるのか殆どわかっていなかった。

そこで、本研究においては、果実の中でも特に貯蔵性が低く、国内需要や輸出拡大商材として注目されているカキを対象として、プレ-エチレン-イベントを解明することとし、申請者らが確立したカキの網羅的遺伝子情報：EST (Expressed Sequence Tag) を用いた DNA アレイ解析を駆使して研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

エチレン生成によって誘導されるクライマクテリック型果実の軟化を抑制し、大幅に貯蔵性を高める技術を開発するために、急速に軟化するカキ果実をモデルとして、軟化の引き金となるエチレンがどのように誘導されるのか、いわゆるプレエチレンイベントのメカニズムを解明する。すなわち、果実への水や同化産物の取り込み時の水チャンネル(アクアポリン)の開閉やトランスポーターのシグナル、ならびに、脱澁ストレスなどによって生じた細胞壁の構造変化・断片化シグナル、活性酸素やリポキシゲナーゼによる細胞膜の劣化、改変シグナルと消去系であるアスコルビン酸-グルタチオンサイクルが、エチレン生成のスイッチのオン・オフに関わっているという観点から研究を行った。同時にエチレン生成に誘導される細胞壁分解酵素発現の挙動も解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) プレエチレンイベント

カキ‘西条’果実を用いて、網羅的遺伝子発現解析としての、DNA マイクロアレイ解析結果を参考にして、アクアポリン遺伝子 *DKAQP1* と *DKAQP2* 発現解析を行った。

‘西条’ドライアイス脱澁処理果を用いて、還元型アスコルビン酸の減少および細胞膜の脂質過酸化や電解質の漏出量を指標とした細胞膜の劣化と、カキ果実のエチレン生成誘導との関連を調査した。さらに、リポキシゲナーゼ(*9-LOX*)およびアクアポリン(*PIP1*、*PIP2*)の発現解析を行った。

また、カキ‘守屋’果実を用いて、ESR 解析を行った。

### (2) ポストエチレンイベント

### - 細胞壁分解酵素遺伝子の発現 -

10 月上旬に‘西条’果実を 4 つの異なる軟化度で収穫し、すべての軟化度の果実を用いて cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA ライブラリーの塩基配列決定し、得られた EST 情報を Blast プログラムにより既知の遺伝子情報と比較した。そのうち、細胞壁分解酵素に関連する遺伝子に関して、発現解析を行った。

発現解析の材料は老化により樹上軟化したもしくはエチレン生成を誘導するため樹上で傷害処理した‘平核無’果実を用いた。果実の軟化度およびエチレン生成を測定した後、RNA を抽出し、逆転写を行い、遺伝子特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR による発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) プレエチレンイベント

#### [平成 24 年度]

アクアポリン遺伝子 *DKAQP1* と *DKAQP2* の発現解析の結果、*DKAQP1* が‘西条’の樹上軟化と関連が深いことが明らかとなった。また、マイクロアレイ解析の結果アスコルビン酸の代謝系の最終段階の酵素である L-galactonolactone dehydrogenase の発現量が樹上軟化しやすい系統で低いことより、アスコルビン酸の軟化に關与する可能性が示唆された。さらに、‘守屋’幼果を用いた ESR 測定の結果より、軟化に伴って果肉中に・OH ラジカルの発生が認められた。

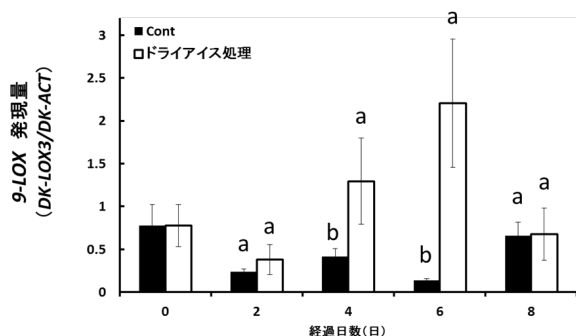
#### [平成 25 年度]

DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により、カキ‘西条’のエチレン生成を誘導しやすい系統では、脂質の過酸化に關与するリポキシゲナーゼの発現量が多いことを見出している。そこで、ドライアイス脱澁処理果を用いて、還元型アスコルビン酸の減少および細胞膜の脂質過酸化や電解質の漏出量を指標とした細胞膜の劣化と、カキ果実のエチレン生成誘導との関連を調査した。その結果、エチレン生成誘導に伴い、還元型アスコルビン酸の急速な減少と、脂質の過酸化、電解質の漏出量の増加が起こった。これらのことから、ドライアイス脱澁処理によるストレスによって、抗酸化物質であるアスコルビン酸含量の減少とともに、細胞膜の酸化が起こり、膜の機能が低下することと、エチレン生成とのあいだに密接な関連があると思われた。

さらに、昨年度解析したカキ‘西条’2 系統を用いてアクアポリン遺伝子を反復解析した結果、*DKAQP1* がエチレン生成誘導量の大きい系統で高く発現していることを再確認した。

#### [平成 26 年度]

細胞膜の劣化がカキ果実のエチレン生成の誘導要因になっているのかを調査した。カキ‘西条’成熟果のドライアイス脱凍を行うと、エチレン生成誘導後、果肉硬度の低下と電解質漏出量の増加、還元型アスコルビン酸含量の減少が認められた。細胞膜の脂質を過酸化するリポキシゲナーゼ (*9-LOX*) はエチレン生成にตอบสนองして増加した (第1図)。アкупオリン (*PIP1*) は処理後発現量が減少し、*PIP2* の発現量に変化はなかった。1-MCP 処理による実験も加味した結果、細胞膜の劣化はエチレン生成後に誘導されることが示唆された。



第1図 ドライアイス処理後のリポキシゲナーゼ (*9-LOX*) の発現量

アルファベット異符号間に有意差あり (  $P > 0.05$  )

## (2) ポストエチレンイベント

### - 細胞壁分解酵素遺伝子の発現 -

細胞壁分解酵素遺伝子の発現樹上軟化した‘西条’カキ果実から cDNA ライブラリーを作成し、4701 の EST 情報を得ることができた。そのうち、ペクチンおよびキシログルカンの分解に関与する酵素遺伝子は主にポリガラクトチュロナーゼ (PG)・ペクチンメチルエステラーゼ (PME)・-D ガラクトシダーゼ (Gal)・-L アラビノフラノシダーゼ (Arf) およびエンド型キシログルカン加水分解・転移酵素 (XTH) であった。樹上軟化した‘平核無’果実においてこれらの遺伝子発現解析したところ、樹上で老化した‘平核無’の果実軟化において、*DkPG1*、*DkPG2*、*DkGal1*、*DkArf1*、*DkXTH1*、*DkXTH2* および *DkXTH5* の発現が関与していると思われた。これらの遺伝子は傷害処理によりエチレン生成を誘導した果実の軟化においても、軟化度の進行と一致する発現パターンを示した。

## (3) まとめ

カキ果実の軟化にはエチレン生成が必須なことはもとより、エチレン生成を誘導する要因として、アкупオリンを介した水ストレスと、アスコルビン酸による還元能の低下、 $\cdot\text{OH}$  ラジカルの発生などが関与すること

が示唆された。

そこで、細胞膜の劣化がエチレン生成誘導のシグナルとなっているのではないかという観点から、調査を行った。エチレン作用阻害剤の 1-MCP を用いた実験により、エチレン生成によって、リポキシゲナーゼ (*9-LOX*) を介した細胞膜の脂質過酸化が起こっていることがわかった。このことより、細胞膜の劣化はエチレン生成誘導後に起こっていることが証明された。さらに、還元型アスコルビン酸の減少もエチレン生成誘導後に起こっていた。

したがって、カキ果実におけるエチレン生成誘導の真のシグナルまたは要因は、MADS-BOX 遺伝子や、申請者らの DNA マイクロアレイによる網羅的解析結果から得られた Vegetative storage protein や Myb-related transcription factor などの遺伝子の解析、次世代シーケンサーを用いた解析などにより、さらに検討していく必要があると考えられる。

ポストエチレンイベントとしての細胞壁分解酵素遺伝子の動きについては、エチレンによって誘導された *DkPG1*、*DkPG2*、*DkGal1*、*DkArf1*、*DkXTH1*、*DkXTH2* および *DkXTH5* が果実軟化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 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5件)

Nakatsuka, A., Nakagawa, T. Yano, K., Sun, N., Sakata, H., Koyama, K. Kobayashi, N. Esumi, T. and Itamura H. Gene expression of pectic polysaccharide degrading enzymes in on-tree softened ‘Hiratanenashi’ persimmon fruit. Food Preservation Science 40:185-193. (Jul. 2014)

Itamura, H., Nakatsuka, A., Sun, N., Esumi, T., Yamada, A., Yano, K. and Nakagawa, T. 2013. Effect of ascorbate on prolonging shelf life of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. Acta Hort. 989:131-138 (May, 2013)

Nakatsuka, A., Itamura, H., Yano, K., Abe, R., Someya, T. and Nakagawa, T. Analysis of expressed sequence tags from rapidly softened pulp of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Acta Hort. 996:111-116 (June, 2013)

Itamura, H., Nakatsuka, A., Adachi, T. and Yoshioka, M. Relationships among ethylene, cell wall degrading enzyme activities and on-tree softening in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit Acta Hort. 996:379-384 (June, 2013)

Sun, N., Tang, Z., Nakatsuka, A. and Itamura, H. Studies on the 'Tree Factor' and Its Role in Regulating Induction of Ethylene in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit. Acta Hort. 996:399-404 (June, 2013)

[学会発表](計 13 件)

川口 浩・中務 明・江角智也・山内直樹・板村裕之. カキ果実における生体膜の劣化・褐変および軟化とエチレン生成の関係. 園芸学会平成 26 年度秋季大会. 2014 年 9 月 27 日 - 28 日. (佐賀大)

Sun, N., Nakatsuka, A. and Itamura, H. Inhibition of ethylene in the presence of leaves in stage II persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit under wounding treatment on a tree. The 29th International Horticultural Congress, Brisbane, Australia, 17-22 Aug. 2014  
Nakatsuka, A., Tsuma, M., Ito, A., Hitomi, M., Mizuta, D. and Kobayashi, N. Effect of multiple factors on flower coloration in evergreen azalea. The 29th International Horticultural Congress, 17-22 Aug. 2014, Brisbane, Australia.

板村裕之・中務 明・矢原郁哉・米永裕二・末廣優加・江角智也・山内直樹. カキ果実におけるポリフェノールオキシダーゼの特性と褐変に及ぼす影響. 第 63 回日本食品保蔵科学学会. 2014 年 6 月 28 日. (JA 長野ビル)

中務 明・孫 寧静・板村裕之. 傷害処理したカキ '平核無' 果実の樹上における軟化と細胞壁分解酵素遺伝子の発現. 第 63 回日本食品保蔵科学学会. 2014 年 6 月 28 日. (JA 長野ビル)

川口 浩・中務 明・江角智也・板村裕之. 細胞膜の劣化がカキ果実のエチレン生成誘導に及ぼす影響. 園芸学会平成 26 年度春季大会. 2014 年 3 月 29 日 - 30 日. (筑波大)

板村裕之・中務 明・米永裕二・末廣優加・江角智也・山内直樹. カキ '守屋' 果実の褐変とポリフェノールオキシダーゼおよびアスコルビン酸との関係. 第 62 回日本食品保蔵科学学会大会. 2013 年 6 月 15 日. (山形大)

中務 明・板村裕之. 樹上におけるカキ果実の軟化と細胞壁分解酵素遺伝子の発現. 第 62 回日本食品保蔵科学学会大会. 2013 年 6 月 15 日. (山形大)

Nakatsuka, A., Itamura, H., Nakagawa, T., Yano, K., Abe, R. and Someya T. Analysis of expressed sequence tags from rapid softened pulp of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). The 5th International Symposium on Persimmon.

20-25 Oct. 2012, Wuhan-Gongcheng, China.

Itamura, H., Nakatsuka, A., Adachi, T. and Yoshioka, M. Relationships among ethylene, cell wall degrading enzyme activities and on-tree softening in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. The 5th International Symposium on Persimmon. 20-25 Oct. 2012, Wuhan-Gongcheng, China.

Sun, N.J., Tang, Z.P., Nakatsuka, A. and Itamura, H. Studies on the 'Tree factor' and its role in regulating induction of ethylene in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. The 5th International Symposium on Persimmon. 20-25 Oct. 2012, Wuhan-Gongcheng, China

板村裕之・中務 明・米永裕二・末廣優加・江角智也・山内直樹. カキ '守屋' 果実の褐変とポリフェノールオキシダーゼの関係. 第 61 回日本食品保蔵科学学会大会. 2012 年 6 月 21 日. (KKR ホテル大阪)  
中務 明・坂田裕明・中川 強・矢野健太郎・小林伸雄・板村裕之. 樹上軟化果実 EST 由来のペクチン分解酵素遺伝子の発現解析. 第 61 回日本食品保蔵科学学会大会. 2012 年 6 月 21 日. (KKR ホテル大阪)

[図書](計 1 件)

板村裕之. 果樹園芸学 第 7 章 カキ, 金浜耕基 編, 文永堂出版, 東京, pp. 185-218, 291-294.  
ISBN: 978-4-8300-4129-7 (2015 年 3 月)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板村 裕之 (ITAMURA, Hiroyuki)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 80109040

### (2) 研究分担者

中務 明 (NAKATSUKA, Akira)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 40304258

### (3) 連携研究者

石川孝博 (ISHIKAWA, Takahiro)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 60285385