

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660028

研究課題名(和文) エチレン-ジャスモン酸クロストークを利用した果実成熟・老化調節技術の開発

研究課題名(英文) Attempt for development of the novel method using JAZ, a hub factor for ethylene and JA signal crosstalk, to regulate fruit ripening and senescence

研究代表者

牛島 幸一郎 (Ushijima, Koichiro)

岡山大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：20379720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クライマクテリック型果実の成熟制御は、エチレン合成や信号伝達に着目した形質転換体や薬剤に因るものであったが、非常に高い効果のため果実が十分に可食なレベルにならないなどの問題があった。そこで、この研究ではホルモンのクロストークに着目して、新しい制御技術の開発を試みた。JAZはエチレンとJAのクロストークのhub因子であり、候補として最適と考えられた。そこで、果実作物であるメロンとトマトJAZ遺伝子をデータベースから抽出し、系統樹解析で分類した。JAZ1は果実成熟により急激に発現が低下し、また変異体・形質転換体の発現パターンからもJAZ1が果実成熟に関連している可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Ripening in the climacteric fruits is regulated by ethylene. Many strategies have been proposed to modulate the ripening to elongate storage term and keep it moderate. Transgenic approaches and dose treatment can inhibit ethylene synthesis or perception completely, but the treated fruit is not suitable for food because they cannot ripe to be edible. We attempt to regulate ethylene signaling cascade by using hormone cross talking pathway to regulate fruit ripening moderately. From recent report, JAZ gene was expected to be a good candidate for the signaling hub between ethylene and JA. We isolate all JAZ genes from tomato and melon database and classify them. RNA-seq analysis demonstrated that the expression level of JAZ1 is drastically reduced at the ripening stage and affected by ethylene related mutant/transgenic plant. This fact suggested a possibility that JAZ1 is related to the ethylene signaling and fruit ripening.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：果実成熟 エチレン ジャスモン酸 JAZ クロストーク

1. 研究開始当初の背景

トマトやメロン等に代表される多くの果実はエチレンに因ってその成熟が促進されるクライマクテリック型果実に分類される。クライマクテリック型果実においてエチレンの信号伝達は非常に重要で、その刺激がないと糖度の上昇、香気成分の合成、果肉軟化など、果実に求められる品質を得られない。しかし、エチレンは成熟促進と共に老化も促進してしまうため、一般的にクライマクテリック型果実の可食期間は非常に短い。

エチレンによって影響を受ける農作物は果実だけではなく、花卉類においては花卉老化にエチレンが関与する。花は雌しべが花粉を授粉し受精をすると、エチレンを大量に発生し花卉の老化を一気に加速するため、授粉により急速な花卉の萎れが引き起こされる。

このようにエチレンは果実や花卉類の品質維持・貯蔵に大きな影響をもたらすホルモンであり、様々な制御方法が考案されてきた。1-MCPなどの作用阻害剤の処理やACOなどのエチレン合成遺伝子の抑制などがその代表例である。これらの技術では確かにエチレンの作用を抑制できるが一旦抑制するとその解除が困難であったり、植物種によっては効果が薄い等の問題があり、新たな制御方法の作出が望まれる。

2. 研究の目的

植物ホルモン間のさまざまなクロストークが明らかとなってきているが、具体的にクロストークの要となるハブ因子が分かっているケースは少ない。近年、エチレンとジャスモン酸(JA)のクロストークに関わる因子としてJAZ(jasmonate ZIM-domain)タンパク質が同定された。次ページの図1の様にJAZはJAとエチレン信号系の一員で、それらホルモンによって制御される転写制御因子(MYBとEIN3)の働きを阻害し、ホルモン刺激が無い時は信号伝達を抑制する。本研究ではJAZを改変し、JAを介したエチレン信号の制御技術の開発を試みる。制御技術の基礎的知見の取得には形質転換が容易なアラビドプシスを用いるが、最終的には果実と花卉作物が多く属するナス科植物、とくにトマトやペチュニアを中心に、実際に実用的な技術に繋がるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) データベースからのJAZ遺伝子の抽出
果実作物のメロンとトマトに関しては、ゲノムデータベース(DB)が公開されている。そこで、アラビドプシスのJAZ遺伝子をqueryとしてDBをblastサーチして、ホモログを単離した。

(2) 系統樹解析に因る分類

得られたメロンとトマトのJAZホモログとアラビドプシスのJAZタンパク質のアミノ酸配列をclustal Wで整列化し、NJ法で系統樹を作成した。

(3) RNA-seq解析

メロンとトマトに関してRNA-seq解析から発現量を推定した。トマトに関してはリファレンスとしてはITAG2.4を、トランスクリプトームのデータはSRAデータベースにあるSRP010775を利用してRNA-seq解析を行い、比較に用いた。

一方、メロンに関しては適当なNGSデータがSRA上に存在していなかったため、植物材料の育成から行った。メロン品種の‘シャランテ’を材料として供試した。緑熟段階(MG)で収穫し、エチレンのアナログであるプロピレンを処理し、成熟を誘導した。MGとプロピレン処理3日後(DAP3)の果肉からRNAを抽出し、RNA-seqのためのライブラリーを作成した。illumina HiSeq2000で解読し、CLC genomic workbenchでde novo assemblyとRNA-seq解析をおこなった。

(4) コンストラクトの作成

アラビドプシス、トマトのJAZ1について全長cDNAを単離し、fusion PCRを用いてJAZドメインを欠失したJAZ1Δコンストラクトを作成した。Thermo Fisher社のgateway systemを用いてエントリベクターを作成し、35Sプロモーターでドライブする植物形質転換用のバイナリーベクターに導入しコンストラクトとした。コンストラクトはアグロバクテリウム系統EHA105に導入し、感染に供試した。

(5) 形質転換

アラビドプシスの形質転換には典型的なfloral dip法を用いた。トマトの形質転換にはリーフディスク法にておこなった。感染させる材料には発芽10日後の胚軸を用いた。形質転換体の選抜は抗生物質(カナマイシンもしくはバスタ)と、トマトに関してはGFP蛍光も利用した。

4. 研究成果

(1) メロンおよびトマトの全JAZ遺伝子の抽出と分類

‘シャランテ’のリードを用いてde novo assemblyを行い、得られたコンティグ配列からblast検索でJAZ遺伝子を抽出した。得られた配列を既存のデータベース(MeloGene)と比較したが、果実で発現しているJAZ遺伝子についてはおおむね同じ配列が得られていた。相同性を元に対立遺伝子やsplicing variantと考えられる配列を整理した上で、系

統樹解析を行ったところ、メロンには 10 の JAZ 遺伝子が存在していた (図 1, 表 1). トマトでは 12 の JAZ 遺伝子が確認された. アラビドプシスには 12 の JAZ 遺伝子が存在しており, 4 つのサブグループ (A~D) に分類される. メロンではサブグループ A と B, トマトではサブグループ C でそれぞれ一つずつ遺伝子が少なかった.

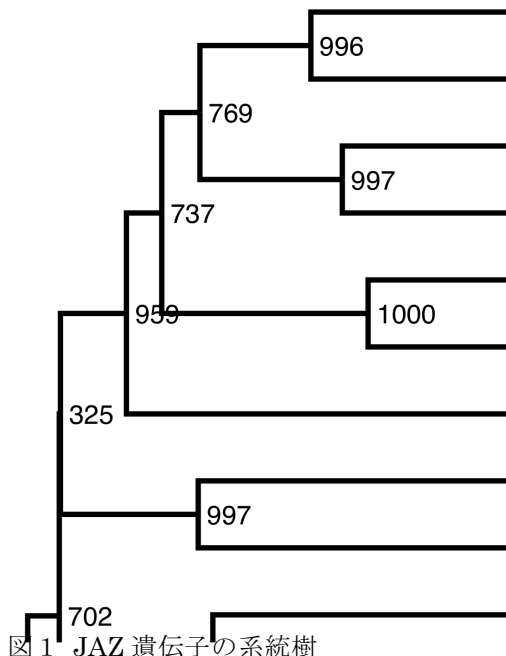


表 1 メロンとトマトにおける JAZ 遺伝子の分類

	メロン	トマト	
subgroup B	JAZ1	METC116424	Solyc07g042170.2
	JAZ2	-	Solyc12g009220.1
	JAZ5	METC114732	Solyc03g122190.2
	JAZ6	METC117916	Solyc12g049400.1
subgroup A	JAZ3	METC113693	Solyc01g005440.2
	JAZ4a	METC097151	Solyc03g118540.2
	JAZ4b	-	Solyc06g068930.1
	JAZ9	-	Solyc11g011030.1
subgroup D	JAZ7a	METC131948	Solyc08g036620.2
	JAZ7b	METC084840	Solyc08g036660.2
	JAZ7c	METC092766	Solyc08g036640.2
	JAZ10	METC102266	Solyc01g009740.1
subgroup C	JAZ11	METC097083	-

(2) JAZ の果実成熟における発現量変化

トマトとメロンの JAZ 遺伝子の発現量を調査するため, 発現量 (rpkm) をマップされたリードのカウントデータから推測した (表 2). メロンとトマト共に果実ではサブグループ A と B の遺伝子が主に発現しており, サブグループ C と D は rpkm が 1 前後, もしくはそれ以下でほとんど発現していないと考えられる. 発現量を MG と DPA3 で比較したところ, メロンではサブグループ A と B のうち JAZ1 と JAZ3 で発現が減少していた. トマトではサブグループ A と B の遺伝子は全体的に成熟に伴って減少傾向を示しており, 幾つかの遺伝子では

発現パターンに違いが見られた. 発現パターンに違いが見られた遺伝子やメロンに存在しなかった JAZ 遺伝子のほとんど (JAZ6, JAZ4a, JAZ4b, JAZ9) は, トマトではその発現のピークは果実以外の器官か未熟果であり, 果実成熟にはほとんど関係しないと考えられる. アラビドプシスの研究では, JAZ1 が EIN3 と結合し EIN3 の機能を抑制することが分かっている. その JAZ1 が 2 つのクライマクテリック型果実において, 共通して発現が減少しているのは興味深い. また, JAZ3 については EIN3 や EIL との結合について, 検証する必要があると考えられる.

表 2 果実における JAZ 遺伝子の発現

	メロン		トマト		器官機関
	rpkm	比	rpkm	比	
JAZ1	6.04	0.36	37.98	0.14	蕾, 果実
JAZ2	-	-	15.95	0.02	蕾, 花, 果実
JAZ5	14.74	1.00	30.29	0.24	蕾, 果実
JAZ6	10.55	1.42	3.86	0.02	蕾, 未熟果
JAZ3	9.80	0.20	84.04	0.39	未熟果
JAZ4a	6.31	2.14	2.27	0.86	根
JAZ4b	-	-	0.00	nd	根
JAZ9	-	-	2.50	0.03	蕾, 未熟果
JAZ7a	0.00	nd	0.36	0.00	蕾
JAZ7b	0.23	0.61	0.53	0.00	蕾
JAZ7c	0.00	nd	1.60	0.00	蕾, 果実
JAZ10	0.38	2.15	0.00	nd	
JAZ11	0.15	5.37	-	-	

比は成熟前後での発現量の比較 (成熟後/成熟前)

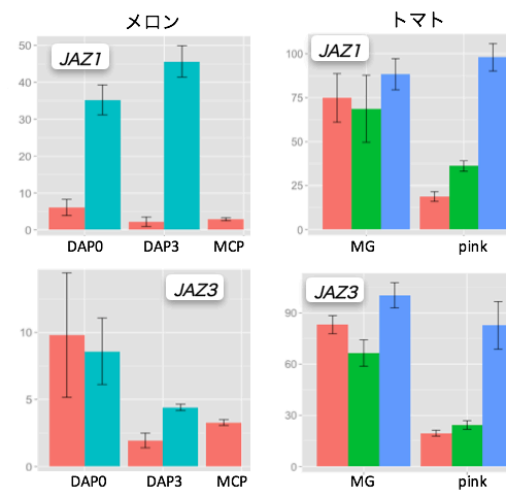


図 2 JAZ1 と JAZ3 の発現

メロン果実
 ■ シャランテ
 ■ ハネデュ

トマト果実
 SRP028278 を利用
 ■ 野生型
 ■ rin 変異体
 ■ TF18
 (成熟不全遺伝子組換え体)

JAZ1 と JAZ3 について, 品種や系統間での発現パターンを比較した (図 2). メロン品種 'ハネデュ' はエチレンを感じし軟化するが, エチレンを合成できない. JAZ1 がは MG 段階で 'ハネデュ' で高発現しており, 成熟開始後も 'ハネデュ' のように減少することはなく高い発現レベルを維持している. 一方, JAZ3 に関しては特に品種間での差は認められな

った。トマトにおいて *rin* 変異体や *FUL* 抑制系統 TF18 (Fujisawa ら 2014) について比較したところ、*JAZ1*、*JAZ3* ともに *rin* 変異体では野生型と比べ変化はなかったが、TF18 では共に成熟が進行しても発現レベルが維持されており、*FUL* によって *JAZ* 遺伝子何らかの発現制御を受けている可能性が示唆される。

‘ハネデュ’と同様に TF18 でもエチレン合成が低下することが報告されている。また、EIN3 との結合を考慮すると、*JAZ1* が何らかの形で、エチレン合成のシグナリングに関与している可能性が示唆される。今後はメロンの *JAZ1* やトマト *JAZ3* の EIN3 への結合などを解析する必要があると考えられる。

(3) ドミナントネガティブコンストラクトを用いた機能解析

2つの科が異なる植物の果実発育と、*JAZ1* の発現パターンに類似が見られた。また、変異体・形質転換体でも発現に変化が見られている。そこで、*JAZ1* 遺伝子の変異コンストラクトを作成し、その機能と果実成熟の関連の調査を試みた。これまでの研究から *JAZ1* の JAS ドメインを取り除くと、ドミナントネガティブの変異になる事が知られている。そこで、アラビドプシスの *JAZ1* の JAS ドメインを除いたコンストラクト (AtJAZ1Δ) を作成し、アラビドプシスに形質転換した。その結果、期待通り、雄ずいの不稔が観察された。この現象は他の科の植物の *JAZ1* でも再現しており、AtJAZ1Δ がトマトやメロンでも機能すると考えられた。



野生型 アラビドプシス JAZ1Δ アマJAZ1Δ

図3 JAZ1Δによる雄ずい器官の発達障害

アグロバクテリウム法を用いて AtJAZ1Δ のトマトへの形質転換を試みた。遺伝子が導入されたカルスは得られているが、カルスからのシュートが得られなかった (図4)。この実験は複数回おこなっても同様にシュートが得られず、また選抜の抗生物質をカナマイシンから basta に変更しても改善されなかった。AtJAZ1Δ コンストラクトは 35S プロモーターでドライブしており、恒常発現した *JAZ1Δ* が再分化に悪影響を及ぼしているものと考えられ、プロモーターの変更が必要であると考えられた。

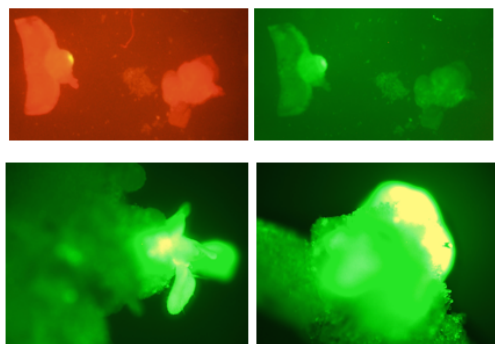


図4 トマトの形質転換カルスにおける GFP 蛍光の観察
一部、シュート用の器官が形成されるものもあったが、最終的に枯死した。

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)

[学会発表] (計1件)

① 牛島幸一郎、浜田佳代子、久保康隆、中野龍平
メロン果実における *JAZ* 遺伝子の分類と発現 日本園芸学会 2014年 9月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛島幸一郎 (USHIJIMA Koichiro)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・
准教授
研究者番号：20379720

(2) 研究分担者

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