

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892006

研究課題名(和文) トマト日持ち性関連遺伝子の転写制御機構の解明

研究課題名(英文) regulation of ripening related gene in tomato

研究代表者

王 寧 (WANG, Ning)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：90730193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： トマト果実の日持ち性は品質向上に寄与する重要な特性である。生産地域によって人口分布は偏るため、貿易による食料の地域間移動が不可欠である。日持ちが良い農産物の作出は、収穫後の流通・消費の各段階において損失を著しく減少させる。トマト果実の成熟にはエチレン生合成遺伝子群が深く関わることが知られているが、本研究では、トマト果実の日持ち性向上に關与することが示唆された遺伝子であるNOR 機能解析を通じてエチレン生合成の転写制御機構の解明に貢献でき、トマトの重要農業形質の一つである日持ち性を向上させることで、将来的に食糧の安定的かつ持続的な確保につながると確信している。

研究成果の概要(英文)： The long-term selection, domestication, modified wild ancestor plants development to modern crops. As the results, artificial selection reduced such as seed dispersal, life cycle, time to maturation, but also increased in seed or fruit size and number and so on. The burden of population growth and additional farming for use in biofuels require increase in food production. Moreover, better shelf-life ensure less losses during processes of food producing, transporting, retailing, and serving. The role of ethylene in fruit ripening has been reviewed as fleshy fruits of climacteric (tomato, apples, and banana) show a burst of respiration at the one set of ripening along with a large rise in ethylene production. Tomato fruit has been used as a model to study ripening. My research was focusing on one of the most important transcription factor, which regulate ethylene biosynthesis through control expression of ACS and ACO genes at the transcriptional level.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：日持ち性 トマト エチレン 転写因子

1. 研究開始当初の背景

ナス科植物トマト (*Solanum lycopersicum*) は商業的に重要な園芸作物の一つであり、果実の発達・成熟機構と物質代謝の研究を行うためのモデル植物として利用されている。日持ちが良い農産物の作出は、収穫後の流通・消費の各段階において損失を著しく減少させることを可能とする。現在、世界全体における一人当たりの食料生産量は、計算上十分な量は確保されている。しかし、生産地域によって人口分布は偏るため、貿易による食料の地域間移動が不可欠である。特に園芸作物において、ポストハーベスト管理に適した品種の開発は安定した食料供給に有効であり、重要な研究課題の一つである。

トマトは果実の成熟に伴う呼吸量とエチレン生合成量が著しく上昇するクライマクテリック型果実である。このようなタイプの果実は一定の発育段階に達した後に収穫することにより、貯蔵中に自己生成したエチレンによって成熟できる。このような収穫後の成熟現象は、樹上での成熟 (maturation) と区別して追熟 (ripening) と呼ばれている。トマト果実の成熟に関わる分子機構、特にエチレン生成制御・応答性機構の解明は、高日持ち性トマト作出のために重要である。植物ホルモンの一種であるエチレンは植物の器官形成や組織老化など様々な過程において主要な役割を果たしていることが知られている。実際に、トマトでは高日持ち性変異体が複数報告されており、いずれも果実成熟にはエチレンの作用が必須であることが確認された。追熟しない変異体 *Gr* (*Green-ripe*) はエチレン非感受性変異、*Nr* (*Never-ripe*) はエチレンレセプター (*SlETR3*) の変異が原因であった。近年では、筑波大学の岡部ら (*Okabe et*

al., 2011) によるエチレンレセプター *SlETR1* の突然変異体を解析結果から、*SlETR1* が果実日持ち性を負に制御する重要因子であることが明らかになった。この他にも、トマト果実の成熟過程におけるエチレン生合成遺伝子の働きについて様々な研究の進展があった。エチレン生合成の第一段階はアミノ酸メチオニンから合成された S-アデノシルメチオニンと 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸合成酵素 (ACS) によるエチレン中間体 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を合成する。次に、ACC が ACC 酸化酵素 (ACO) に触媒されることによってエチレンが合成されることが知られている。トマト果実 ACS は登熟過程において特異的に発現し、追熟期に活性化する ACS の転写制御を抑えることで日持ち性が向上できると期待できるため、追熟期の ACS を制御する転写因子に焦点を当てた研究が肝要となる。

2. 研究の目的

果実の日持ち性制御にはエチレン生成量を低下させるアプローチと、エチレンに対する感受性を低下させるアプローチが考えられる。エチレン生合成を制御する転写因子としては、*NOR* (*NON-RIPENING*) が古くから知られている。成熟不全を示す *NOR* 遺伝子座は第 10 番染色体にマッピングされ、NAC ドメインを有する転写因子であると報告されているが、その変異箇所及び遺伝子機能については明確な報告はない。一方、自然変異体 *nor* は *rin* と同様にエチレンは基底レベルしか蓄積しない。故に、これらの転写因子はエチレン生合成制御に大きく関わっていると予測できる。トマトでは NAC ドメインを持つ転写因子群は 101 個あり、その大部分は機能未知の遺伝子である。本研究は、*NOR* 機能解析を通じてエチレン生合成の

転写制御機構の解明に貢献できる。

一方 *NOR* 遺伝子配列を解析したところ、乾燥ストレス条件下に誘導される新たな miRNA 配列と相補するドメインを発見した。近年の研究により、タンパク質をコードしない 19-24 塩基の miRNA は相補的な配列を持つ mRNA と結合し、mRNA の分解或いは翻訳抑制を行うことが知られており、植物にも広く保存されて遺伝子の発現制御を調節する。果実が収穫後に植物母体からの水分供給が切断され、まさしく「乾燥ストレス」下に置かれた状態で果実内に保たれた水分で生理反応を持続するためである。*NOR* が属する NAC 転写因子ファミリーは、乾燥応答性の遺伝子としてストレスシグナル伝達経路において重要な役割を果たしており、今回注目している新たな miRNA の発現も乾燥ストレス条件下に特異的に誘導される可能性が高い。本研究では、*NOR* の機能解析を行った上で特異的に発現する miRNA による転写制御の可能性を追求した。

3. 研究の方法

(1) 今回注目している新たな miRNA の発現も乾燥ストレス条件下に特異的に誘導される可能性を検討する研究では、*NOR* の機能解析を行った上で特異的に発現する miRNA による転写制御の可能性を追求した。初に *In silico* で *NOR* 転写領域における標的部位に対する miRNA 候補のスクリーニングを行った。公共データベースの siRNA ショートリード約 20 億リードが対象に BLAST 及びレフレンスゲノムマッピングを行った。更に、*in vitro* での実験系を用いて (Modified 5' RACE 法) *NOR* mRNA の切断が見られるかを検証した。予測された miRNA のターゲット・ドメインの 3' 側に複数の *NOR* 特異的なプライマーを設計し、該当領域内に mRNA 切断され

た後の末端位置をマッピングして miRNA による *NOR* mRNA 切断の有無を検討した。

(2) トマトの各組織における詳細な転写物発現プロファイリングの解析による、*NOR* の器官・組織・時期特異的発現パターンを解析した。35S プロモーターを含む *NOR* 過剰発現システムを作成及び、35S プロモーター含む *NOR RNAi* システムの作成し、*NOR* 遺伝子発現抑制形質転換体を用いる機能解析を行う。特に果実の追熟時期における *NOR* の時期特異的な機能を検討する。トマトに含まれる NAC ドメインをコードする 101 個の遺伝子群に *NOR* と機能重複する遺伝子は存在する可能性が十分にある。よって、発現抑制された *NOR RNAi* 変異システムにおいて *NOR* の機能に対して補償的に働き、表現型に影響が表れないこと予測される。CRES-T 法は転写因子にリプレッションドメインを付加したことで機能重複する転写因子優先して標的遺伝子の発現を抑制することができるため、本法を導入することで明確な表現型が期待される。

4. 研究成果

(1) 本研究では、*NOR* の機能解析を行った上で特異的に発現する miRNA による転写制御の可能性を追求した。*In silico* で *NOR* 転写領域における標的部位に対する miRNA 候補のスクリーニングを行った。約 20 億 siRNA リードが対象に BLAST 及びレフレンスゲノムマッピングを行った。解析した結果、想定した *NOR* 遺伝子の第三エクソンにあるターゲットサイトに相補的な配列を持つ siRNA リード数は少なく、*NOR* が siRNA にターゲットされると言えない結果となった。更に、*in vitro* での実験系を用いて (Modified 5' RACE 法) *NOR* mRNA の切断が見られるかを検証した。*NOR* 遺伝子発現が盛んになる Breaker ステージと赤熟期のサンプルを用いて mRNA の切断された部位の特定を行い、予測された miRNA のター

ゲット・ドメイン NOR mRNA が切断されていないことが明らかにした。一方、NOR 遺伝子周辺領域において siRNA ショートリードのレフレンスゲノムマッピングを行った結果、NOR 遺伝子のプロモーター領域に siRNA リードが特異的マッピングされる 4 ヲ所が発見した。そのうち、プロモーターメチル化に関わる CpG island 領域と重なる領域も存在しており、small RNA ヒストン修飾 DNA メチル化という経路が示唆され、今後の研究課題において更に解明していきたい。

(2) トマトの各組織における詳細な転写物発現プロファイリングの解析による、NOR の器官・組織・時期特異的発現パターンを解析した。野生型マイクロトムを用いて、各組織及び果実の異なる生育段階における NOR 遺伝子の発現解析を行い、NOR 遺伝子が受粉後から緑熟期において遺伝子発現レベルが低く、Breaker ステージが強く発現したことが分かった。続いて先行研究で見つかった EMS 変異体を用いて果実の各生育期におけるエチレン生合成遺伝子 ACS, ACO の発現解析を行い、野生型と比較解析を行った。果実の登熟過程における NOR 遺伝子の機能を明らかにし、特にエチレン生合成遺伝子への影響を評価し、追熟に関わる遺伝子群との相互作用についても解析した。

(3) NOR 遺伝子の過剰発現系統 RNAi 系統及び、機能抑制系統の作成と表現型解析を行い、特に果実の追熟時期における NOR の時期特異的な機能を検討した。35S プロモーター含む NOR RNAi 系統の作成し、NOR 遺伝子発現抑制形質転換体を用いる機能解析を行い、T₀ 世代において果実が Breaker ステージから赤熟までの期間が著しく伸びた。今現在 T₂ 世代までに進め、ホモ個体選抜・発現量解析および表現型している。また、35S プロモーターを含む NOR 過剰発現系統を作成し、NOR RNAi 系統同様に今現在 7 系統が T₂ 世代までに進めてきた。更に、CRES-T

法を用い、機能重複が予測される NOR の機能解析を確実に行った。本実験は CRES-T 法開発者である産業技術総合研究所及び筑波大学野菜花卉グループの協力で行ったところ、トマトへの感染効率が低かった。試行錯誤を重ねて、再分化した T₀ 世代の数系統が得られた。今後世代促進を進め、変異系統の解析を進めていきたい。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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：
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

王寧 (Ning WANG)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：90730193

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：