

トマト試験研究におけるDNAアレイ利用 — トマト成熟生理研究への利用 —

今西俊介

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所

Large-scale Gene Expression Analyses of Tomato Fruit Ripening Physiology Using DNA-array Technology

Shunsuke IMANISHI

National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

National Institute of Vegetable and Tea Science

キーワード：トマト，DNAアレイ，エチレン，ジャスモン酸，成熟変異系統

1 はじめに

昨今の青果物に対するニーズは、高鮮度・高品質・高機能性へと高度化している。成熟した果実を食するトマトなどの果実の利用に関しては、成熟が進みすぎると商品性を失うため、未熟果収穫・定温輸送貯蔵といった成熟を抑制する流通技術が発達してきたが、高品質を求める現在の食生活ニーズには対応し切れていない。流通のグローバル化により激化した国内外の野菜の産地間競争においては、これらのニーズに応えるための高品質化流通技術を開発することが急務である。そのため、生長の中で強度に制御かつ高度にプログラムされている果実成熟の生理機構を、分子生物学的手法を活用して解明し、果実の成熟メカニズムに則った技術開発を行うことが効率的である。数千個以上の遺伝子発現変動を同時に解析するDNAアレイ技術は、果実成熟のように複雑かつダイナミックな現象の解析において、有用である。本稿では、DNAアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析によるトマト果実の成熟生理機構の解明への取り組みを紹介する。

2 成熟関連因子と成熟変異系統における網羅的遺伝子発現解析

生化学および分子生物学的な解析結果から、成熟を制御している内的因子としてエチレンが大きな役割を果たしていることが知られている¹⁾。エチレン生合成に関わる遺伝子のうち、ACC(1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid)生成酵素4遺伝子(*LeACS4*)が成熟初期に、ACC生成酵素2遺伝子(*LeACS2*)とACC酸化酵素1遺伝子(*LeACO1*)が成熟期を通して、それぞれ発現するこ

とが知られている¹⁾。また、ジャスモン酸等のオクタデカノイド類は、新しい植物ホルモンとして、植物の病害抵抗性や、老化、成熟に深く関わっていると考えられる^{2,3)}。我々はジャスモン酸メチルエステル(MeJA)処理が、成熟のエチレン生合成に関わる*LeACS2*遺伝子発現を誘導するが、*LeACS4*遺伝子の発現には顕著な影響を与えないことを明らかにしてきた⁴⁾。トマトにおいては、*rin* (*ripening inhibitor*)、*nor* (*non-ripening*)等の成熟が抑えられた表現型を示す変異系統がいくつか報告されている。これらの原因遺伝子が転写因子をコードしていることが明らかとなり、エチレンとは独立して果実成熟を制御する機構の存在が明らかとなってきた⁵⁾が、その全容は解明されていない。そこで、野生型系統および成熟変異系統*nor*トマト果実の成熟におけるエチレンおよびオクタデカノイド類の遺伝子発現に対する影響をDNAアレイを用いて網羅的に解析した⁶⁾。

2.1 試験方法

本研究では、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業No.1424「DNAアレイを活用したトマト果実形質の育種選抜技術の開発」の受託により整備されたDNAマクロアレイを使用した。これは、トマト研究のモデルとして利用されている極矮性品種'Micro-Tom'の果実および緑葉由来のEST解析により得られた、重複の無い10,911個のcDNAクローンが搭載されている。

開花後35日目の野生型系統もしくは*nor*系統のトマト果肉組織から、コルクボーラーによって果肉ディスクを作製し、蒸留水、もしくはエテフォン(1 ppm)、MeJA(100 μ M)で処理した後、全RNAを抽出した。5 μ gの全RNAをラベルし、DNAマクロアレイへハイブリダイゼーションを行った。発現強度は、各遺伝子のシグナル強度

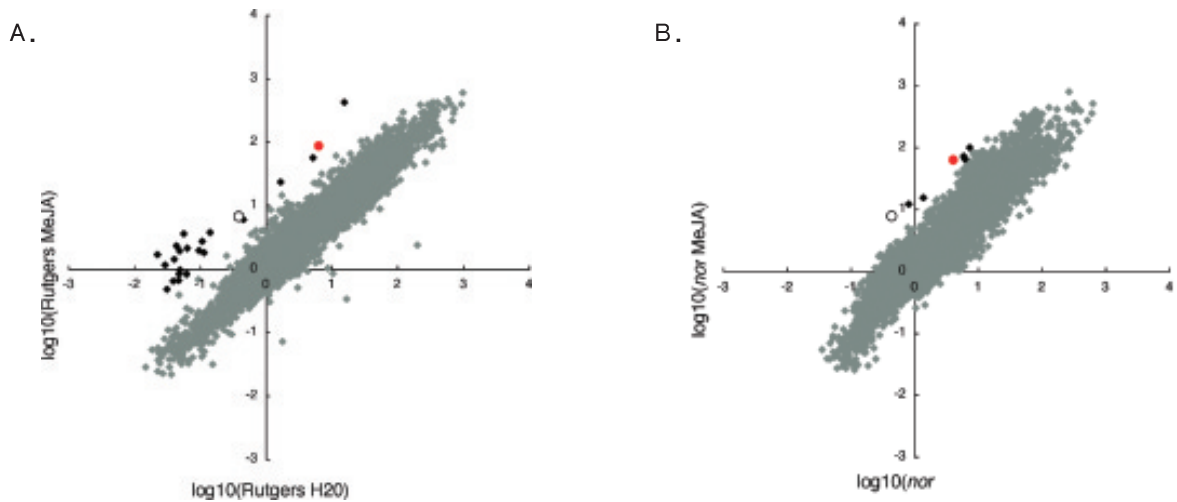


図1 トマト果皮ディスクにおけるジャスモン酸メチルエステル処理 (MeJA) による遺伝子発現の変化

(A) 野生型系統'Rutgers' (B)'Rutgers'をバックグラウンドとする成熟変異系統*nor*

横軸：水処理時，縦軸：MeJA処理時の発現レベルをそれぞれ対数で示す。濃黒，10倍以上MeJA

処理で上昇；丸（白および赤），両系統において10倍以上MeJA処理で上昇；赤丸，*LeACO1*



図2 多変量解析による発現パターンの分類

全遺伝子の発現パターンを類似性によりSelf-Organized Map解析で20x20カテゴリーに分類した。

をアレイ上の全遺伝子のシグナル強度の中央値で除して求めた。

2.2 解析結果

図1に各遺伝子のMeJAに応答した発現変化を示した。DNAアレイに固定されたcDNAクローンのうち，野生型系統ではMeJAによって，4クローンの発現レベルが10分の1以下に下降し，24クローンが10倍以上に上昇した（図1A：濃黒スポット）。これらの野生型系統で10倍

以上に上昇するクローン中，成熟変異系統*nor*においても，MeJA処理によって発現レベルが10倍以上に上昇するのは2クローンのみ（丸スポット）であり，多くのジャスモン酸類誘導性遺伝子が，成熟変異系統*nor*の原因遺伝子である*LeNOR*の支配下にあることが示唆される（図1B）。また，*LeACO1*（赤丸スポット）は重複する2クローンに含まれ，ジャスモン酸類が成熟エチレン生成関連の遺伝子の発現を，*LeNOR*非依存的に調節していると考えられる。野生型系統で見られたMeJAによる発現誘導が

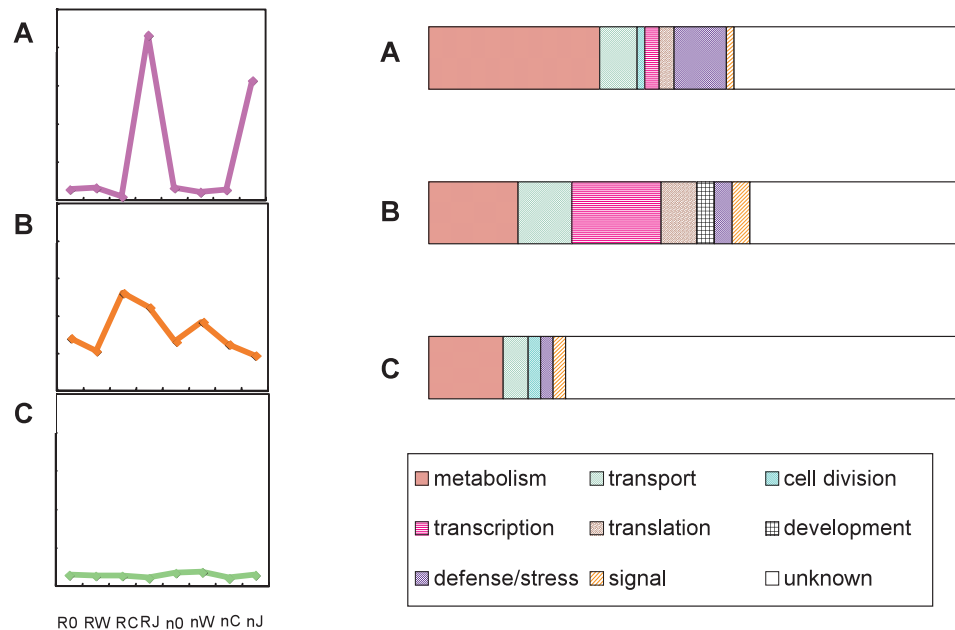


図3 多変量解析によって分類された遺伝子群の機能推定

LeACO1 (A), *LeACS2* (B), *LeACS4* (C) の発現パターン (左) と、それぞれ類似した発現パターンに分類された遺伝子群の機能を推定した (右)。グラフは R0, 野生型系統 (WT) 未処理; RW, WT 水処理; RC, WT エテフォン処理; RJ, WT MeJA 処理; n0, *nor* 未処理; nW, *nor* 水処理; nC, *nor* エテフォン処理; nJ, *nor* MeJA 処理時の発現レベルを表す。

nor 変異系統では見られない遺伝子が存在し、一部の MeJA 応答が *LeNOR* の支配下にあることが示唆される。

野生型系統および *nor* 系統における MeJA および エチレンに 応答した発現変動パターンを、多変量解析のひとつである Self-Organizing Map 法により 20x20 カテゴリーに分類すると、*LeACS2*, *LeACS4*, *LeACO1* と同じカテゴリーに分類されるのは、それぞれ 30, 43, 72 クローンであった (図 2, 図 3)。

野生型系統と *nor* 系統ともに MeJA で誘導される *LeACO1* のカテゴリーには、自己防衛・ストレス関連に加えて代謝関連遺伝子が、また、野生型系統でのみエチレンと MeJA で誘導される *LeACS2* のカテゴリーには、転写や翻訳に関連する遺伝子が多く含まれる (図 3)。野生型系統と *nor* 系統ともに植物ホルモンによる誘導を受けない *LeACS4* のカテゴリーには機能未知の遺伝子が多い (図 3)。これらは *LeACS4* 同様、植物ホルモンや *LeNOR* 遺伝子以外の、成熟トリガーとなるシグナルによって発現制御されることが示唆され、未知遺伝子の中に果実成熟に深く関わる遺伝子が含まれる可能性が示唆される。

3 今後の可能性

今後は、*nor* 以外の成熟変異系統や、異なった成熟ステージにおける遺伝子発現パターンの網羅的解析を行い、

さらに成熟制御に深く関わる遺伝子の候補をピックアップするとともに、それぞれの果実中の内生ジャスモン酸量やエチレン生成量を測定することにより、遺伝子発現および植物ホルモンの両面から、果実成熟生理機構のキーとなる因子を明らかにしていく予定である。得られる成果は、キー遺伝子を DNA マーカー化したマーカー育種による高日持ち性果実の分子育種だけでなく、キー因子を指標とした成熟度判定や効果的な流通条件の設定などに応用することにより、高品質化流通技術に資することができると思われる。(本研究は、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「DNA アレイを活用したトマト果実形質の育種選抜技術の開発」に基づいて行った。)

摘要

食生活ニーズに対応した高品質化流通技術を開発するためには、野菜の生理機構に則った技術開発を行うことが効率的である。果実成熟のように複雑な現象の解析において、数千個以上の遺伝子発現変動を同時に解析する DNA アレイ技術の有用性は非常に大きい。重複の無い 10,911 個のトマト cDNA クローンを搭載した DNA アレイを用いた網羅的解析により、成熟変異系統 *nor* 原因遺伝子およびエチレンに非依存的に発現する遺伝子群を検出できた。この遺伝子群は、成熟トリガーとなるシグナルによって発現制御されることが示唆され、果実成熟制御

に関わる遺伝子が含まれる可能性がある。果実成熟機構に深く関わる遺伝子が同定されれば、高日持ち性系統の分子育種、成熟度判定および高品質流通技術開発に利用できると考えられる。

引用文献

- 1) Alexander, L. and Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53:2039-2055
- 2) Creelman, R.A. and Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:355-381
- 3) Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y. and Nakamura, K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol. Biol.* 38:1101-1111
- 4) Imanishi, S. and Nagata, M. 2004. The effect of methyl jasmonate on the expression of ripening related genes in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* 45 (Suppl.):s78
- 5) Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell.* 16:S170
- 6) Imanishi, S., Noguchi, A., Hatakeyama, R. and Nagata M. 2005. Monitoring the effect of jasmonates on the expression of ripening related genes in tomato fruit disks by cDNA microarray. *Acta Horticulturae in press*