

論文の内容の要旨

論文題目 「*rin* (*ripening inhibitor*) ヘテロ変異型高日持ち性トマトの特性と
rin の機能に関する研究」

氏名 北川 麻美子

トマトの日持ち性を向上させることは、最も食味に優れ、栄養価の高い状態（完熟）で収穫し、その品質を長く保持することを可能とし、廃棄率の削減という消費者側の利点以外に、収穫効率の上昇、出荷から陳列・販売までのロス率の低減、さらには流通コストの削減という生産者や流通業者にとっても大きな利点を有する。筆者が所属するカゴメ（株）総合研究所のグループは従来品種に比べ、日持ち性を大幅に向上させたトマト品種名“KGM011”を、従来の交配育種により育成した。この果実は最適保存条件下では収穫後1ヶ月以上萎びることなくその姿を保持する。本品種は、果実の成熟が進まない*ripening inhibitor* (*rin*) 変異体と通常の成熟を示す正常型系統との交配により得られたF₁品種である。

本研究では、この品種の特性を明らかにし、日持ち性の向上につながる因子を解明することにより、果実の日持ち性をコントロールする技術の開発を目指すとともに、果実一般の成熟メカニズムに関しても新たな知見を得ることを目的とした。

1. 高日持ち性 *rin* F₁ 系統果実の生理学的特性の解析ならびに成熟関連遺伝子の発現解析

rin 変異は隣接する 2 つの MADS ボックス遺伝子、*LeMADS-RIN* と *LeMADS-MC* の一部がそれぞれ欠損して融合した構造をもつ転写産物からなり、*LeMADS-RIN* は果実成熟期に特異的に発現し、果実の成熟を制御していることが示されている。

さまざまな品種の *rin* ホモ変異体 (*rin/rin*) と正常型 (*RIN/RIN*) を交配して、F₁ 系統 (*RIN/rin*) の育種を行い、日持ち性および果皮色の評価を行った結果、すべてのラインにおいて果実の日持ち性が改善された。しかし、各々 F₁ 系統の果皮色、日持ち性の程度はさまざまであり、日持ち性と果皮色の赤みとの間には明確な相関が見られなかった。このことは日持ち性及び着色に関して、*LeMADS-RIN* 遺伝子以外のいくつかの遺伝的要因の関与、さらに、適切な交配親の選択による日持ち及び着色性に優れた、高品質な F₁ 系統の育種の可能性を示唆している。これらの F₁ 系統のうち、日持ち性、着色性に加え、食味、生産性なども勘案して 1 系統 (Kc01-6) を選抜し、*RIN/rin* 遺伝子型が果実成熟に与える影響に関して検討を行った。

果実の成熟の特徴であるリコピン生合成、細胞壁分解、エチレン生成に関して、生理学的特性の解析及び関連する遺伝子の発現解析を行った結果、リコピン生合成に関して、*PSY* 遺伝子が *LeMADS-RIN* 遺伝子によって制御されており、*PSY* 遺伝子の転写が F₁ 系統におけるリコピン生合成の制限要因であることが示唆された。細胞壁分解に関しては *PG*、*TBG4*、*LeEXPI* の発現量が F₁ 系統において、正常型よりも明らかに低下していた。F₁ 系統果実においては、本研究で解析した遺伝子を含め果実の軟化に関わる多くの遺伝子の発現が部分的に抑制され、その複合的な相互作用の結果として、果実軟化が抑制されると考えられた。さらに、果実の成熟を制御するエチレンについては、正常型果実では成熟過程でエチレンの顕著な上昇が見られたのに対し、F₁ 系統果実ではエチレン生成の顕著な上昇は見られなかった。そして、このエチレン生合成における制御機構は転写レベルで行われていることが示唆された。

2. *rin* F₁ 系統果実の低アレルギー性の評価

成熟果実に対する *rin* 遺伝子型の影響を解析するために、トマトの cDNA マイクロアレイを用いて桃熟期の正常型果実の遺伝子発現パターンを F₁ 系統果実および *rin* 変異型果実と比較した。その結果、F₁ 系統果実においてアレルギータンパク質をコードする *-fructofuranosidase* と *PG-2A* の発現量が減少していた。また、F₁ 系統果実において、これらのアレルギータンパク質量は低下していた。さらに、F₁ 系統果実においてトマトアレルギー患者血清の IgE 反応性が正常型に比べ明らかに低下していた。これらの結果は、成熟制御因子としての *LeMADS-RIN* およびその変異 *rin* 遺伝子とは別に、トマト果実のアレルゲンの制御因子という新たな観点から *rin* の利用の可能性を提示した。

3. MADSボックス転写因子 RIN の果実成熟における機能解析

LeMADS-RIN によって多くの成熟関連遺伝子の発現が制御されているにも関わらず、RIN タンパク質の MADS ボックス転写因子としての機能については、直接転写を制御するターゲット遺伝子に関する知見を含め、未知な部分が多い。そこで、正常型 RIN および変異型 *rin* の MADS ボックス転写因子としての機能を追究すべく、それらが認識するシス配列の探索ならびに転写活性化能の可能性を検討した。MADS ボックスファミリーは、10 bp の保存性の高いコア配列を含む CArG モチーフと呼ばれる、AT リッチなコンセンサス配列を認識し、そのモチーフは CC(A/T)₆GG と CTA(A/T)₄TAG の 2 種類に分けられる。正常型 RIN および変異型 *rin* が認識するシス配列を探索すべく、*in vitro* で正常型 RIN および変異型 *rin* タンパク質を合成し、CArG モチーフとの結合能をゲルシフトアッセイにより解析した結果、正常型 RIN は CTA(A/T)₄TAG の配列に結合することが明らかとなり、その配列をシス領域にもつ遺伝子の転写を制御することが示唆された。また、正常型 RIN が認識する配列を変異型 *rin* も認識した。第 1 章、第 2 章で RIN によって発現が制御されていることを示した成熟関連遺伝子のうち、*PG*、*LeACO1*、*-fructofuranosidase* において、シス領域に CTA(A/T)₄TAG の配列が存在していたことから、これら 3 遺伝子については RIN の直接のターゲット遺伝子である可能性が示唆

された。

Two-hybrid法に用いられるBaitベクターを用いて酵母内で転写活性化能の可能性を検討した結果、正常型RINには転写活性化能が認められたが、変異型*rin*には認められなかった。このことから、*rin*変異体において成熟が進行しないのは、変異型*rin*が転写活性化能を持たないため、正常型RINが転写を活性化していた遺伝子の転写が活性化されないためであるという可能性が示唆された。そして、*RIN/rin*遺伝子型のF₁系統における成熟関連遺伝子の転写量の変化の原因として、変異型*rin*が正常型RINと競合してターゲットのシス配列に結合し、それによって正常型RINの転写活性化能を阻害するためではないかという可能性が考えられた。また、正常型RINの種々の部分領域の転写活性化能を検討した結果、正常型RINのうち変異型*rin*で欠損しているC末端の 27 アミノ酸残基内に転写活性化に必要な部分が存在することが示唆された。さらに、変異型*rin*が転写活性化能を持たないのは、正常型RIN由来の断片の後方にMC由来の断片が融合したことが原因というより、むしろ、正常型RINのC末端の 27 アミノ酸残基が欠損してしまったことが原因であると示唆された。

果実の成熟に関する研究において、これまで、*rin*変異体を含む数多くの成熟変異体はその一端を解明するために重要な役割を果たしてきた。一方、*RIN/rin*遺伝子型のF₁系統は成熟研究の材料としてあまり扱われてこなかったが、不完全優性の形質を示すそのユニークな性状は注目に値する。果実の成熟制御機構は複雑であり、F₁系統のさらなる解析が、その解明の一端となることを期待する。また、遺伝子配列情報から、RINの機能は広範囲の種で保存されていることが示唆されており、トマト果実におけるRINの機能の解明は、果実の成熟制御機構や成熟調節における普遍的に重要な情報をもたらし、さらに様々な果菜類へ適用され、生産者と消費者に大きな利益をもたらすものと期待される。