

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4815587号  
(P4815587)

(45) 発行日 平成23年11月16日(2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月9日(2011.9.9)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 1 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2005-238855 (P2005-238855)                  (22) 出願日 平成17年8月19日(2005.8.19)                  (65) 公開番号 特開2007-49961 (P2007-49961A)                  (43) 公開日 平成19年3月1日(2007.3.1)                  審査請求日 平成20年5月12日(2008.5.12)</p>	<p>(73) 特許権者 504229284                  国立大学法人弘前大学                  青森県弘前市文京町1番地                  (74) 代理人 100106611                  弁理士 辻田 幸史                  (74) 代理人 100087745                  弁理士 清水 善廣                  (74) 代理人 100098545                  弁理士 阿部 伸一                  (72) 発明者 原田 竹雄                  青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人                  弘前大学農学生命科学部内                  審査官 名和 大輔</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンゴ果実の収穫時期の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リンゴの1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸合成酵素 (ACS) 遺伝子である Md ACS 3 a の、配列番号1で表される塩基配列の少なくとも一部を含んでなるプロモーターが活性化するタイミングを指標にして行うことを特徴とするリンゴ果実の収穫時期の判定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、簡易かつ精度よく適切なリンゴ果実の収穫時期を判定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

リンゴ果実の収穫時期は、果実品質や日持ち性(貯蔵性)に大きく影響し、商品価値を左右するので、その決定は慎重に行う必要がある。一般に、収穫が早すぎた場合には、食味が劣り、貯蔵中に糖度が不足するばかりでなくヤケ病発生といった生理障害が起こりやすい。一方、収穫が遅すぎた場合には、ボケ(老熟)しやすく、腐敗が進行し、老化による果心部褐変が生じやすい。しかし、果実の発育や成熟は、同一品種でも生育中の気象、地域、開花の時期、樹勢、栽培管理などの複合的要因に基づくことから、正確な収穫時期の把握は極めて困難である。従って、現状においては、満開期からの日数や成熟現象の把握などによって経験的に収穫時期が決定されているが、同一の樹内でも外側の枝と内側の

枝とでは成熟度は異なるので、このような方法は極めて大雑把なものであると言わざるを得ない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

そこで本発明は、簡易かつ精度よく適切なリンゴ果実の収穫時期を判定する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

リンゴは、果実完熟に伴いエチレン合成が急激に上昇し、それと同時に細胞壁分解酵素などが機能し、果実組織の軟化が始まることが知られている。これらの一連の生理現象を解明するため、関連する遺伝子の解析が本発明者らの研究グループを含め、いくつかの研究グループで行われているが、今般、本発明者らは、リンゴの完熟果実で特異的に発現していることが知られているエチレンの生合成に参与する1アミノシクロプロパン1カルボン酸合成酵素（ACS）遺伝子の1つであるMdACS3（Rosenfield C L, Kiss E, Hrazdina G (1996) MdACS2 (Accession No. U73815) and MdACS3 (Accession No. U73816): Two new 1 aminocyclopropane 1 carboxylate synthases in ripening apple fruit. Plant Physiol 112: 1735）のサブファミリー遺伝子であるMdACS3aが、果実が完熟を本格的に開始する少し前から発現することを突き止め、この現象を利用して、MdACS3aのプロモーター領域の機能発現タイミングを指標にすれば、簡易かつ精度よく適切なリンゴ果実の収穫時期を判定することができることを見出した。

【0005】

即ち、本発明のリンゴ果実の収穫時期の判定方法は、請求項1記載の通り、リンゴのACS遺伝子であるMdACS3aの、配列番号1で表される塩基配列の少なくとも一部を含んでなるプロモーターが活性化するタイミングを指標にして行うことを特徴とする。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、簡易かつ精度よく適切なリンゴ果実の収穫時期を判定する方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明のリンゴ果実の収穫時期の判定方法は、リンゴのACS遺伝子であるMdACS3aのプロモーター領域の機能発現タイミングを指標にして行うことを特徴とするものである。MdACS3aのプロモーター領域の塩基配列は、配列番号1で表される塩基配列の少なくとも一部を含んでなる。なお、MdACS3aのcDNAの塩基配列は配列番号2で表され、これは前述の文献で開示されているMdACS3のcDNAの塩基配列に相当するが、前述の文献にはプロモーター領域の塩基配列の開示はない。図1にMdACS3aのプロモーター領域の少なくとも一部を含む翻訳コドン上流域の塩基配列を示す（下線のない領域が配列番号1で表される塩基配列を有する領域であり下線部が転写領域であり太字が翻訳開始点である）。本発明者らの研究によれば、MdACS3にはMdACS3a、MdACS3b、MdACS3cの3種類のサブファミリー遺伝子が存在し、MdACS3aとMdACS3cは前述の文献で開示されている446個のアミノ酸からなる蛋白質を、MdACS3bはそれより1つ少ない445個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしているが、それぞれの遺伝子の第3エキソン領域のCAPSを利用して行った発現解析から、MdACS3aのみが果実の完熟過程を通して発現を示し、MdACS3bとMdACS3cは発現が認められないことが判明している。この原因として、MdACS3bとMdACS3cのプロモーター領域には、MdACS3aのプロモーター領域には存在しない333bpの挿入配列が存在することが考えられ、MdACS3bとMdACS3cはこの挿入配列の存在により発現が抑制されているものと推察される。従って、本発明にお

いては、MdACS3aのプロモーター機能のみが利用できることになる。

【0008】

本発明において、リンゴ果実の収穫時期であると判定するMdACS3aのプロモーター領域の機能発現タイミングは、後述する実施例の方法などにより、MdACS3aのプロモーターの本来の機能であるMdACS3aの発現をもとに知ることができるが、例えば、レポーター遺伝子としてブドウのmyb遺伝子VlmybA1 2 (Science 14 May 2004; 304: 982) を用い、自体公知の手法によりこれをMdACS3aのプロモーター領域 (プロモーター領域を含むDNAは例えば配列番号1で表される塩基配列の情報から適当なプライマーをデザインしてリンゴ由来のゲノムDNAライブラリーをテンプレートにPCRを行うことにより増幅させて調製することができる) の下流に連結するとともに、レポーター遺伝子の下流に適当なターミネータを付加し、アグロバクテリウム (EHA105株) のバイナリーベクター (pBI121) に組み込んで作製されるベクターを、自体公知の手法によりリンゴ栽培種に導入してこれを形質転換させ (必要であれば例えばMatsuda et al. Plant Cell Reports 24: 45 51 2005.を参照のこと)、果実が完熟を本格的に開始する少し前、即ち、収穫時期の直前におけるプロモーター機能の発現によって果実にVlmybA1 2の発現に基づくアントシアニンが蓄積することで果実の少なくとも一部に赤色の沈着が現れる現象をもとに知ることができる (図2参照)。なお、この方法は、赤色の沈着を確認しやすい黄色の果皮色品種 (例えば "王林" や "ゴールドデンデリシャス" など) に対してとりわけ有効である。赤色の果皮色品種 (例えば "ふじ" や "つがる" など) に対しては判定が難しいとも考えられるが、赤色の果皮色品種でも果実の下部分は黄色であることから、その部位での沈着から判定が可能である。この方法を赤色の果皮色品種に対して適用した場合、もともと果実全体が赤色なので、外観的な商品価値上の問題が発生することがないという利点がある。

【実施例】

【0009】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は、以下の記載に何ら限定して解釈されるものではない。

【0010】

参考例：リンゴ由来のゲノムDNAライブラリーの作製とゲノムクローンの選抜、MdACS3aのシークエンス・構造解析

(a) リンゴの幼葉 (品種：ゴールドデンデリシャス) 3gを用いてVaradarajan et al. (1991) 法によって全DNAを抽出した。得られたDNA 50  $\mu$ gをSau3AI 0.8unitで部分分解した後、0.5%アガロースゲル電気泳動によりサイズ分画した。19~23kbのDNA断片を含む領域を切り出し、GENECLEAN IIのプロトコールに従ってゲルからDNA断片を抽出した。これらのDNA断片をクレノー酵素存在下で FIX IIのpartial fill inベクターに組み込んだ。ベクターへのライゲーションは、TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2を用いて行った。反応は、16で1晩行った。パッケージングは、Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene社) のプロトコールに従って行った。

【0011】

(b) MdACS3のcDNA (Accession No. U73816) の1086 1573bpをPCRで増幅し、<sup>32</sup>Pでラベルした。それをプローブに上記のゲノムライブラリー $1 \times 10^5$ プラークを高いストリンジェンシー条件下 (0.1  $\times$  SSC, 0.1% SDS, 68 ) でスクリーニングし、3つの陽性クローンを取りだし、純化した。続いて、ファージDNAを精製し、そのゲノムクローンを切り出した。そして、各クローンの制限酵素地図を作製した。これらのクローンはpBluescriptにサブクローニングし、大腸菌よりアルカリSDS法を用いてプラスミド抽出し、シークエンス反応を行った。解析はLI COR社のDNAシークンサー "Model 40 シリーズ Based Image IR software" を用いた。また、一度で解析が完了しなかった塩基配列を再度サブクローニングし、シークエンス解析受託サービス (MACROGEN, Korea) 及びABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) を用いて解析した。以上の操作により、MdACS3aのプロモーター領域を含む塩基配列を明らかにした (配列番号1と配列番号2)。

【0012】

実施例1: RNAゲルプロットによるリンゴ果実の開花直後から収穫までの各種遺伝子の発現変動解析(果実の横径との関係)

(実験方法)

(1) 実験材料

リンゴ果実(品種: ゴールデンデリシャス)を国立大学法人弘前大学附属藤崎農場にて毎週(5月6日より11月4日まで)5果サンプリングした。これらのサンプルの発現解析には、6月3日までは花托全体、それ以降は果肉部分を用いた。

【0013】

(2) 追跡対象遺伝子

MdACS3aの他、リンゴの完熟果実で特異的に発現していることが知られている、MdACS1 (Oraguzie NC, Iwanami H, Soejima J, Harada T, Hall A: Inheritance of Md ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus X domestica* Borkh.). Theor Appl Genet 108: 1526 1533 (2004))、MdAC01 (Ross GS, Knighton ML, Lay Yee M (1992) An ethylene related cDNA from ripening apple. Plant Mol Biol 19: 231 238)、MdPG1 (Atkinson RG (1994) A cDNA clone for endopolygalacturonase from apple. Plant Physiol 105: 1437 1438)、MdERF2(育種学研究, 第6巻, 別冊2号, 182頁, 2004年)を追跡対象遺伝子とした。

(3) RNA抽出

Dong et al. (1991)の方法を改良して、リンゴ果肉組織よりTotal RNAを抽出した。即ち、5gの果肉を液体窒素を用いてパウダー化し、サンプルの1/10量のpolyvinyl pyrrolidoneを加え混合した。20mlのLysis buffer(4.0M guanidine thiocyanate, 10mM EDTA, 300mM Tris HCl, pH7.5, 1% 2 mercaptoethanol, 0.5% sodium lauroyl sarcosine)を加え、室温で30分間放置後、4℃の冷蔵庫内で2時間放置した。これを4℃, 8000rpmで15分間遠心し、上澄みをミラクロスにて濾過して回収した。CsClによる平衡密度勾配遠心で得られたペレットを滅菌水に溶解し、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿させたRNA分画を滅菌水に溶解した。

【0014】

(4) RNAゲルプロット解析

Total RNA 5µgをbuffer(1×MOPS, 50% formamide, 2.2M formaldehyde, 10mM EDTA)に溶解し、65℃, 15分間変性させた後、氷上で急冷した。これを1.2%アガロースゲル(1×MOPS, 0.66M formaldehyde)で40V, 3時間の電気泳動を行った。ゲルを10×SSCで20分間の洗浄を2回行った後、20×SSCによりナイロンメンブレン(Magna Nylon Transfer Membrane, MSI)上にトランスファーした。UVクロスリンカー(UV Stratalinker 2400, STRATAGENE)にて固定後、50% formamide, 5×Denhardt's solution, 0.5% SDS, 5×SSPE, 20µg/ml salmon sperm DNAを含むbuffer内でプレハイブリダイゼーションを行い、<sup>32</sup>PでラベルしたプローブDNAを加え、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。なお、各プローブの調製は、各cDNAクローンをテンプレートとしたPCR産物をPCR purification Kit(QIAGEN)により精製することで行った。各遺伝子のプローブ領域および使用したプライマーは次の通りである。MdACS3a(Accession No. U73816(MdACS3), 1086 1573bp, 5' GACAAATAGAAAGGACTGAGACG 3'(配列番号3)と5' CCATCGATTATACAACTGATTGTG 3'(配列番号4))、MdACS1(Accession No. U89156, 4056 4153bp, 5' GATGAAGGTACCTGTCTGA 3'(配列番号5)と5' TACTACTAATCACATTGTAG 3'(配列番号6))、MdAC01(Accession No. AF030859, 3558 3780bp, 5' TGAATCCAAGCCAAGGAG 3'(配列番号7)と5' TTCAACTACCAAACAGAGTGG 3'(配列番号8))、MdPG1(Accession No. L27743, 433 1650bp, 5' AGGTCATGGAATTGATCAGGCC 3'(配列番号9)と5' ATGCCATGCCATAATTATGACCC 3'(配列番号10))。MdERF2に関しては、Tournier et al. (2003)のdegenerate primer(5' CCRTGGGGRAAATKKKCGGCK 3'(配列番号11)と5' CATAAGCVAVAKBGCRGCTTCYTC 3'(配列番号12))を用い、適期収穫されたゴールデンデリシャス果実を24℃, 6日間完熟を進行させた果肉より抽出した全RNAをテンプレートとして、Gene Amp RNA PCR Kit(Perkin Elmer)を用いてRT PCRを行い、得られたcDNAをシーケンシングしてMdERF2であることを確認し、さらに3' RACE法によ

り3'非翻訳領域のクローニングを行い、この領域をプライマー(5' TATGCTGGCAATTGGCG AGC 3' (配列番号13)と5' ATGACCAATCCCGCACTCAC 3' (配列番号14))により増幅し、プローブとして用いた。

【0015】

(実験結果)

図3に果実の横径の変動(5果の平均値)と遺伝子の発現変動の関係を示す。図3から明らかのように、MdACS3aは、他の遺伝子に先行して完熟直前の10月7日あたりから発現することがわかった。

【0016】

実施例2: RNAゲルプロットによるリンゴ果実の収穫直前から収穫までの各種遺伝子の発現変動解析(エチレン生成量との関係) 10

(実験方法)

リンゴ果実(品種: ゴールデンデリシャス)を国立大学法人弘前大学附属藤崎農場にて10月1日より11月4日まで隔日で5果ずつサンプリングし、収穫後1時間以内にエチレン生成量を測定した。エチレン生成量の測定は、サンプリングした果実を1.3m<sup>3</sup>の容器に密封し、24時間の部屋に1時間静置した後、この容器内気体1mlを注射器で回収し、直径3mm、長さ2mのアルミナカラムのFIDガスクロマトグラフィー(GC 8A, Shimadzu, Japan)を用いて行った。エチレン生成量を測定した後、直ちに果肉をスライスして液体窒素で凍結した。果実個体間のバラツキを少なくする目的で、3日分のサンプル15果をまとめ、これを中間日で表す一つのサンプルとした。即ち、10月3日の結果は10月1日、3日、5日のエチレン測定量の平均値でもって表した。また、これらの凍結保存サンプルを均等に混合した材料から抽出したRNAでゲルプロットを実施例1と同様にしを行い、遺伝子の発現変動を解析した。

【0017】

(実験結果)

図4にエチレン生成量の変動と遺伝子の発現変動の関係を示す。図4から明らかのように、MdACS3aは、果実の完熟に伴うエチレン合成が本格的に始まる直前(10月3日)から他の遺伝子に先行して発現することがわかった。

【0018】

実施例1と実施例2の結果から、MdACS3aは、リンゴの果実が完熟してから発現するのではなく、その直前から発現することが明らかになった。この現象は、上記の実施例で用いた品種である"ゴールデンデリシャス"の他、"ふじ"、"ひめかみ"、"きたろう"、"こうたろう"などの13品種でも同様に起こることを別途の試験で確認した。従って、例えば、完熟前の果実のごくわずかな果皮を切り取ってMdACS3aの発現の有無を調べる方法や、レポーター遺伝子を用いてその発現の有無を調べる方法により知ることができる、MdACS3aのプロモーター領域の機能発現タイミングを指標にすれば、リンゴ果実の収穫時期を簡易かつ精度よく適切に判定することができることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0019】

本発明は、簡易かつ精度よく適切なリンゴ果実の収穫時期を判定する方法を提供することができる点において、産業上の利用可能性を有する。 40

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】MdACS3aのプロモーター領域の少なくとも一部を含む翻訳コドン上流域の塩基配列である。

【図2】レポーター遺伝子を用いて行うリンゴ果実の収穫時期の判定方法の概念図である。

【図3】実施例における果実の横径の変動(5果の平均値)と遺伝子の発現変動の関係を示す図である。

【図4】同、エチレン生成量の変動と遺伝子の発現変動の関係を示す図である。 50

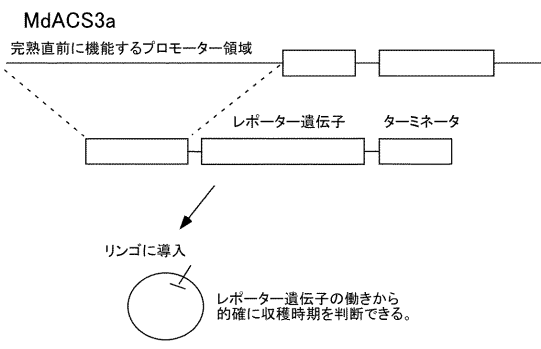
【 図 1 】

```

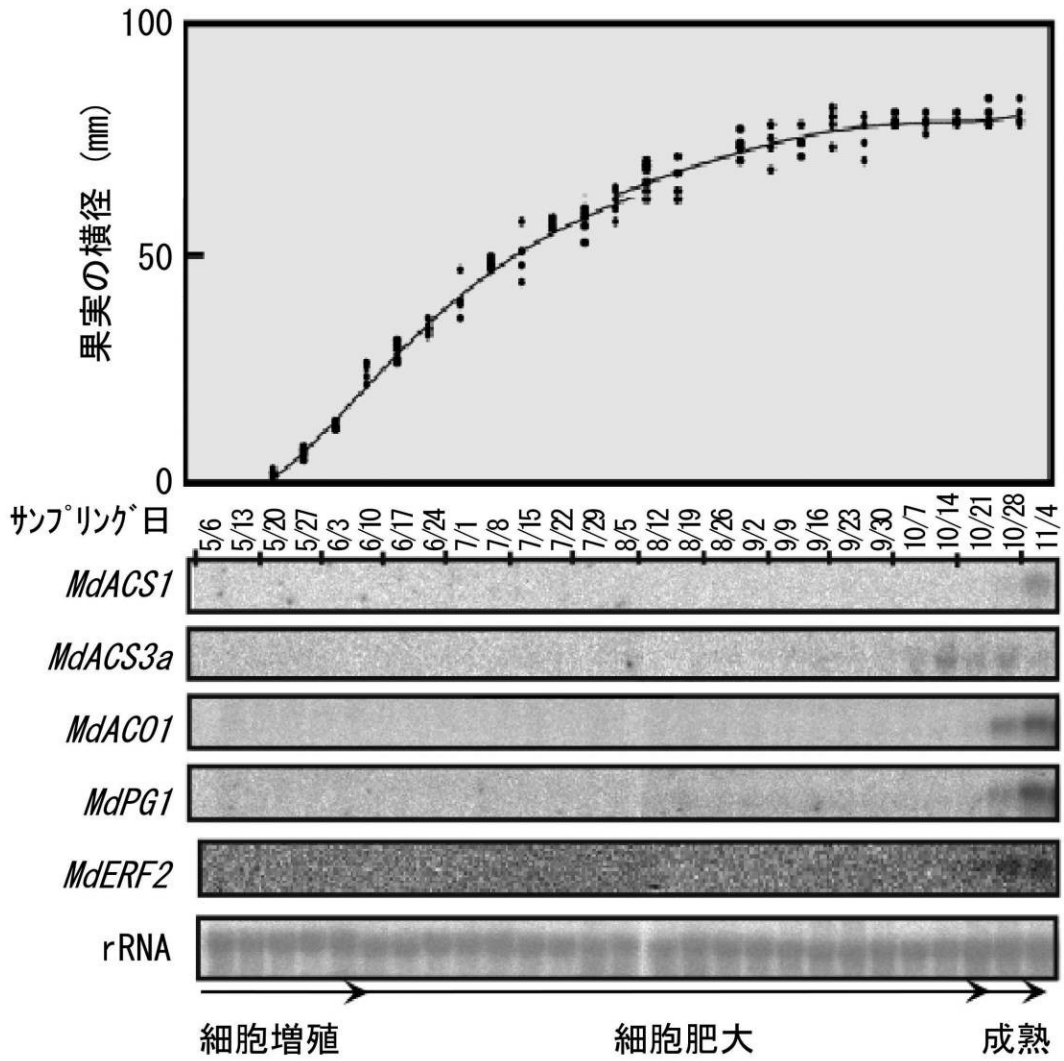
TCCTATCTATTTGAGTGATAAGTGTGATTTTGACTTAATTTATGTTAGCTTTAATTTTTTTTTATAGAGAAG
ATAAGTTAAAATCCGTAATCAAACACATAAAAAATCAAGACCAGATAACTAGGAAGTTTGATACCTTTTCTTAA
TTGCTCTATTTTCATTTTGAAGTCATCTTTCCGTTGCTGTTAAGTTTACATATCCAAGGATAAAAAGCACCTTC
CACTGAAAGAGTGAATTACCCATAATCACAATTAATTTAATTTGGCCATATGCACATATAAATGAAGTTCCATA
TCTGATGTAGACTTTTTGGTTGATACTGTCTCCCTTACAGGCTGAAGTGGCTGATCCAGTGTGCTCATCTC
ATGATTCCTTCCAGTTCAGTTCCTGTCTGTGTATGCATTAGGATTCACATATAAATGCAAATCTCATGTTATCTCT
TGCACATGGATTTTCAACATCTTGAGCCCCAAAAACCATATATCTCTATATATTTTTCCATTGAAACCAT
TTTTGTCTGCACAAATACACACATATGGACATATAGTAAAAACATTTGCTCATAAAGTATAACACATAGCTCTTAA
CAGAATTTAATTAGATTATGAGATTATTTGCTTTAAACCTCAAACCTAGTTATGATTTTGTGCTAGGTA
TTAATACAGATGCATGTGTGATGTGGGGTCAAGCATCTTCAATGGAGCTTCAATTGTATGCAGCCCTAGATAT
CTTGCACACAAATCAGAATCTTAATCTGGTATCTTTGTCGGCAATCAAACCTAACCCTATAAAGTCTCTTCA
AATAATAATTTTACAAGCATTTAATTTCAAGCATATTGGGATTTAGGGTTGCTCAGCAAGGATTTGACTT
GTCTAGGTTGGGAAGTACATTGGGATTTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAACCTAACCATATATTCTGTACCTAATCTTACTCTCATAGAGAGATTGAGAGAGAGAAGAGCGCTTTTG
AGCGCATCGCATAAAATTTGACAGTTGTTGGGTACATGTAGGTGATGAGATTAACCATTTTATGTATGTAA
AAGGCCAGCTTTGATGTATATTTGCTATGTACAGAAATCAACGATTGATTTCTCTTTTTGTTTTCTCAAT
ATACAGAACAGGCAAGTTGAGAGTACCATTTTGTATTATTGTTTTATGCCATTGCTCGCCAAAGCGTCCCTA
TATATAAAGTGGGTGATTTCAAAGGTTTTTCATTAACAATTTGGCAATCAACTCTTTCTCTCTATCTGAG
TCGCACCCACAGCTTTCTTGAAGGCCAAAGTGCCTTTACAAGAAACCTAGTTATG

```

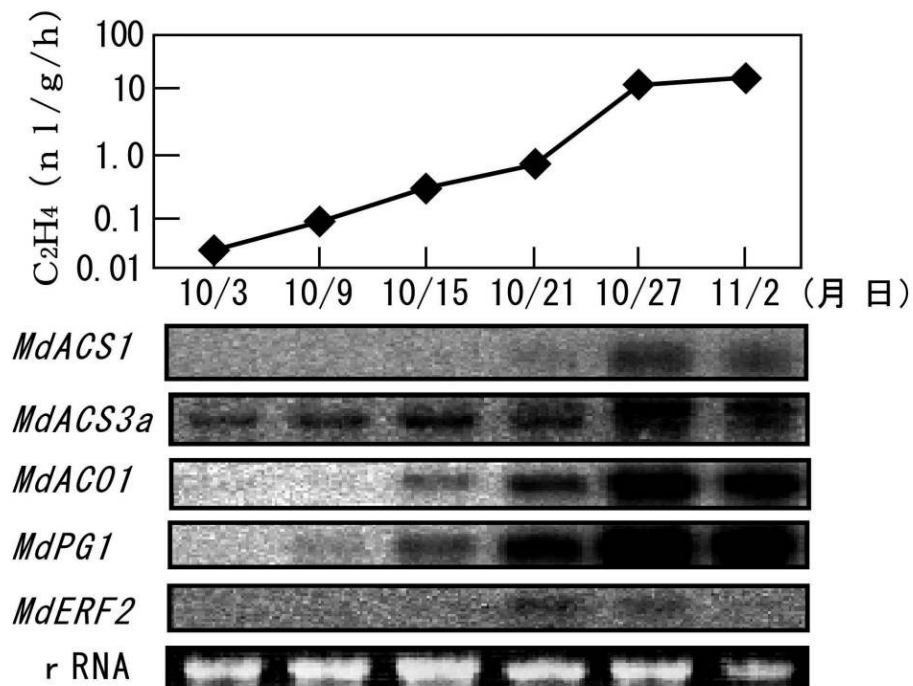
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

0004815587000001.app



---

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第98/045445(WO, A1)

Plant Physiol.,1996,112(4),p.1735-6

Plant Physiol.,1999,119(4),p.1297-304

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

CAplus/BIOSIS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

WPI