

キウイフルーツのエチレン誘導型成熟と低温誘導型成熟

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

久保 康隆

はじめに

果実の成熟・老化制御機構解明は、貯蔵・流通技術の開発・改善の鍵であるとともに、園芸生理研究の焦点の一つである。近年の次世代シーケンサーの登場により、キウイフルーツを含む多くの園芸作物でもゲノム情報が解読 (Crowhurst *et al.* 2008)、公開され、RNAseq による網羅的遺伝子解析、特定品種の全ゲノム解析なども可能となった。さらに、LC/MS を活用したメタボローム解析と併せたオミックス解析、システム解析によって総合的な信号伝達経路の解析も可能となっており、果実生理の研究でもこれらの技術を活用した新展開が期待されている (Giovannoni 2004)。

果実は成熟にエチレンを必須とする「クライマクテリック型果実」と必ずしもエチレンを必要としない「ノン・クライマクテリック型果実」に大別される (Seymour *et al.* 2013)。キウイフルーツはトマトやリンゴなどともに前者に、カンキツやブドウ、イチゴなどは後者に属する。キウイフルーツは成熟エチレン生成が始まる前、炭水化物の約半分がデンプンで酸含量が2%前後で、食味的にも生理学的にも未熟な段階で収穫される (McAtee *et al.* 2015; Richardson *et al.* 2011)。消費者が未熟な果実を入手した場合には、リンゴとともにポリ袋などに保持して成熟を促進する手法がよく知られている。これは、リンゴから放出され

ているエチレンが成熟を促進するためである。収穫後、1ヶ月以内の早期に出荷されるキウイフルーツ果実には成熟を誘導するためにエチレン処理がなされ、デンプンの糖化と減酸、果肉軟化が促進されている。果実を長期貯蔵する場合には0~5°C程度の低温下で保持された後、エチレン処理されずに出荷される場合が多い。これは、貯蔵環境中の微量なエチレンによって、成熟が徐々に進行するためであろうと考えられてきた。実際、キウイフルーツは人工的にはエチレンを添加しない通常の大気下 (図-1のAir区が相当)の低温貯蔵中に、徐々に果実成熟が進むこと、0.1~0.01ppmエチレンはそれをやや促進することが報告されている (図-1参照, Jabbar and East 2016)。この大気下のエチレン濃度はガスクロマトグラフでも検出限界以下

で0.001ppm相当と推定されている。これらの観察から、キウイフルーツはエチレンに対して超敏感に反応して成熟すると考えられてきた。ただし、大気下で長期貯蔵され、食味上成熟した果実のエチレン生成を測定しても、検出限界以下の場合が多い。トマトやリンゴ、バナナなどのクライマクテリック型果実では成熟すると例外なくエチレン生成が検出される。

キウイフルーツの主要品種は貯蔵性に優れ、果肉が美しい緑色を呈するがやや酸味が強い‘ヘイワード’である。近年、キウイフルーツでも品種改良が進み、高糖度で酸味が低く良食味で果肉色が黄色の‘さぬきゴールド’、‘Hort 16A’、‘サンゴールド’などの品種が開発され、市場で好評を得ている。これらの品種は、貯蔵期間が‘ヘイワード’よりも短いという欠点があり、中

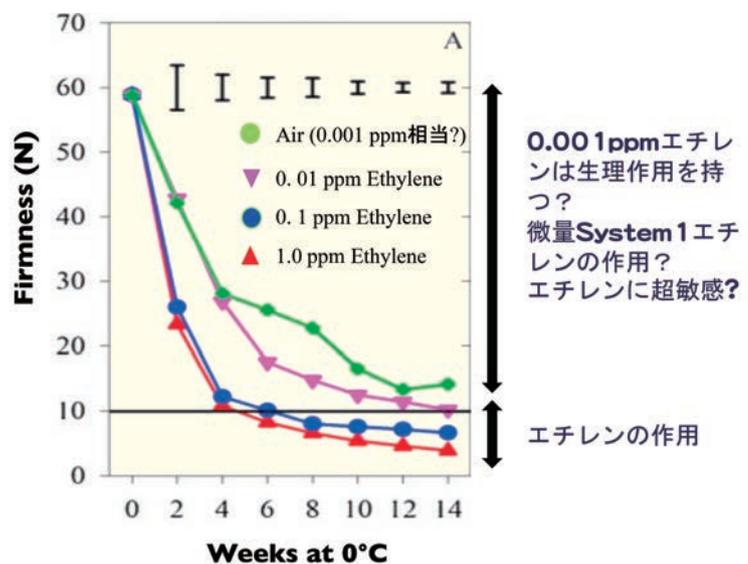


図-1 貯蔵庫のエチレン濃度が‘Hort16A’キウイフルーツの果肉軟化に及ぼす影響 (Abdul Jabbar and Andrew East 2016, 一部改変)



図-2 軟腐病発症果
(赤丸部の陥没が典型的症状)



密集配置(慣行法)
1容器に果実を10個



分散配置
果実を5cm以上間隔をあけて配置
エチレン生成果実は別室へ移動して、調査を継続

図-3 貯蔵実験における果実配置方法

でも香川県農業試験場で開発された4倍体で大果の‘さぬきゴールド’は貯蔵期間が2ヶ月程度と短いのが欠点とされている。

ノースカロライナ州立大学のSislerらによってエチレンの作用阻害剤として1-MCP(1-methylcyclopropene)が開発され、リンゴやカキの軟化抑制に卓効を示すことから広く利用されている(Sisler and Serek 1997)。現在では米国産リンゴの60%以上に1-MCPが処理されている。1-MCPはエチレンの受容体であるETR1に結合し、その複合体が高度にリン酸化され、エチレン信号伝達系を抑制すると考えられている(Kamiyoshihara *et al.* 2012)。1-MCPは広範な植物種で強力なエチレン作用抑制効果を示すので、筆者らはキウイフルーツ果実の成熟を遅延させ、貯蔵期間を飛躍的に延長させることを期待し、処理を行った(Asiche *et al.* 2018; Mitalo *et al.* 2018, 2019)。ところが、後述するように低温貯蔵果実には1-MCP処理による成熟抑制効果は全く見られなかった。

この意外な結果(失敗)を契機に、キウイフルーツ果実の成熟制御機構を1-MCPと次世代シーケンサーを活用して再検討した。その結果、同果実は低温環境に応答し、エチレン信号伝達系とは独立した成熟機構を持つことを初めて見出した。さらに、キウイフルーツだけでなく多くの果実種において低温遭遇の果実成熟における役割を見直

す必要があると考えるに至った。その詳細は以下の通りである。

1. キウイフルーツ軟腐病とエチレン生成

商業栽培でのキウイフルーツはエチレン生成が始まる前の未熟で果肉は硬い段階で収穫される。キウイフルーツはクライマクテリック型果実に属するので、未熟段階でも外生エチレンに晒されると自らのエチレン生成が誘導され、急速に成熟・軟化が進行する(後述2参考)。以前の研究では、収穫後に室温で保持すると1~2週間内に自然に成熟エチレン生成が開始し、果実の成熟・軟化が急速に進行すると報告されている(図-2参照)。いずれの植物、果実でも何らかの病原菌が侵入すると、防御のためのストレスエチレンが生成することが知られている。したがって、キウイフルーツの貯蔵生理実験の場合には、軟腐病発生によるエチレンの影響を見極めておく必要がある。

そこで、エチレン生成開始前の商業的収穫熟度のキウイフルーツを室温下(22°C)で密集配置(10果実を1箱)と分散配置(図-3参照)で貯蔵し、果実ごとのエチレン生成を測定した(Asiche *et al.* 2018)。なお、分散配置

において、わずかでもエチレン生成が見られた場合には、他の果実への影響を避けるために別室に移動させて、調査を進めた。その結果、密集配置では、同一箱内の果実のエチレン生成上昇時期は一致しており、典型的なクライマクテリックパターンを示した(図-4 密集配置)。ただし、箱ごとのエチレン生成上昇時期は大きく異なっており、早い箱と遅い箱では2週間以上の違いがあった。各箱の個々の果実のエチレン生成を詳細に見ると、1個の果実のエチレン生成がやや先行し、他の果実はそれを一斉に追うパターンを示した。エチレン生成が先行した果実では、その生成が増加し、果実軟化が進行すると軟腐病の兆候が認められた。分散配置した果実では、個々の果実のエチレン生成の増加時期は大幅に異なり、貯蔵1週間以内のものや80日後でもエチレン生成を示さないものもあった(図-4 分散配置)。分散配置した果実のエチレン生成果実の割合は貯蔵期間を通じて、ゆっくりと増加した。また、早期にエチレン生成を開始した果実は、いずれも後に軟腐病の症状を示した。したがって、密集配置した果実のシンクロナイズしたエチレン生成は、箱内の軟腐病発生果実から生成したエチレンが周辺の果実のエチレン生成を刺激した結果であると考えられた。これまでの果実貯蔵実験では、果実数を多く用いた密集配置により行

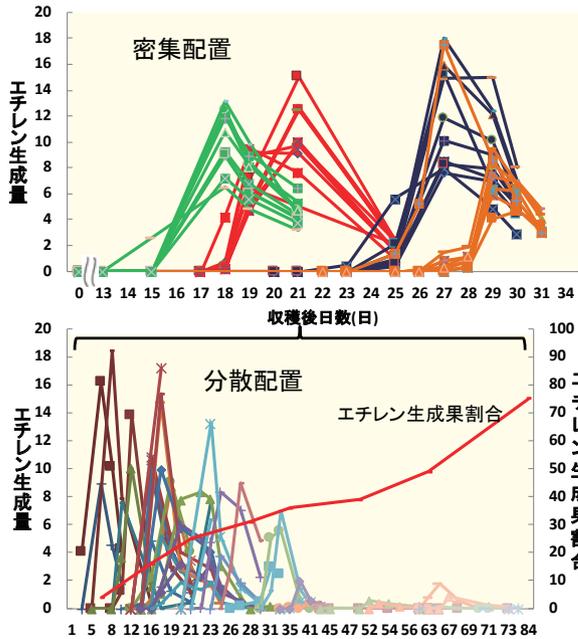


図-4 果実配置が‘さぬきゴールド’果実のエチレン生成に及ぼす影響 @ 22°C, 各線は果実ごとの値。
密集配置の赤、青、黄、緑線は別容器を示す。
(Asiche *et al.* 2018 より)

われていると思われるので、先行研究で報告されていた収穫後1週間以内でのエチレン生成と成熟の誘導には疑問があり、健全果実は室温下でも、かなり長期間にわたって、エチレンのクライマクテリックライズは起こらないと考えられた。そこで、今後の貯蔵実験では分散配置法を採用し、病害発生が認められたものは除外することとした。

2. エチレン処理, 1-MCP 処理および貯蔵温度がキウイフルーツの成熟に及ぼす影響

‘さぬきゴールド’キウイフルーツ果実をエチレンのアナログであるプロピレン (5000ppm, 50ppm エチレン当量, McMurchie *et al.* 1972) 処理およびその前処理として 2ppm 1-MCP 一夜処理を行い、室温下で保持した (Mworia *et al.* 2012)。エチレン処理によって果肉軟化が急速に進行し、2日目には適食段階に達し、4日目にはエチレン生成が誘導され、完熟段階に達した (図-5)。一方、エチレ

ン作用阻害剤である 1-MCP を前処理した果実は、プロピレン存在下でも果肉軟化、エチレン生成誘導のいずれでも対照区と比較して約5日間の遅れがみられた。すなわち、1-MCP はエチレン受容体に作用し、一度の処理で5日間程度はキウイフルーツ果実に対してもエチレン非感受性にする事が示された。

‘さぬきゴールド’キウイフルーツ果実の長期貯蔵について、貯蔵温度と 1-MCP 処理が成熟に及ぼす影響を調査した。貯蔵温度は室温として、

22°C, 低温貯蔵として 5°C に設定した。1-MCP 処理は前述のように一度の処理で5日間はエチレン非感受性となることから、毎週2度、処理を行い、実験期間を通じて果実がエチレン非感受性となるように配慮した。また、軟腐病によりエチレンを生成した果実は、貯蔵環境から取り除いた。すなわち、今回の実験では、軟腐病の影響を排除した。その結果、驚いたことに果実軟化と滴定酸含量の低下は低温貯蔵果実の方が室温貯蔵果実よりも明らかに促進された (図-6)。さらに、1-MCP 処理を繰り返したにもかかわらず、低温貯蔵果実の成熟進行を抑制することが全くできなかった。

これまでのキウイフルーツの長期貯蔵研究で、図-1の空気区で見られるように低温貯蔵中に果実軟化が進行することは知られている。この空気区のエチレンレベルはガスクロマトグラフでも検出限界以下のため、実証はされていないが、0.001ppm と想定され

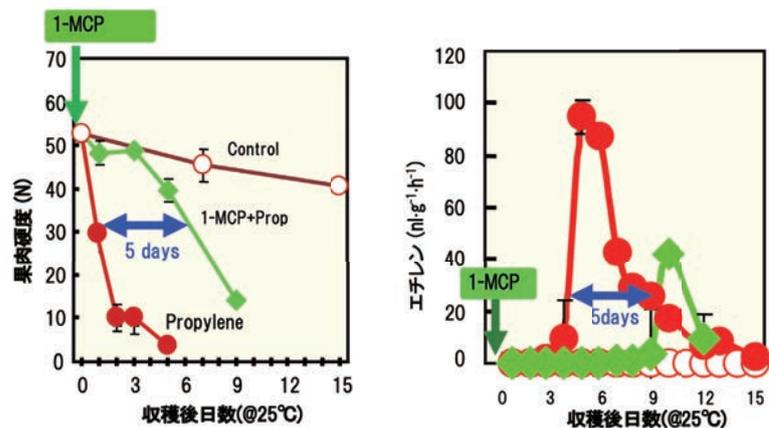


図-5 プロピレン処理及び 1-MCP 処理が‘さぬきゴールド’の果実軟化とエチレン生成に及ぼす影響 (Mworia *et al.* 2012 より)

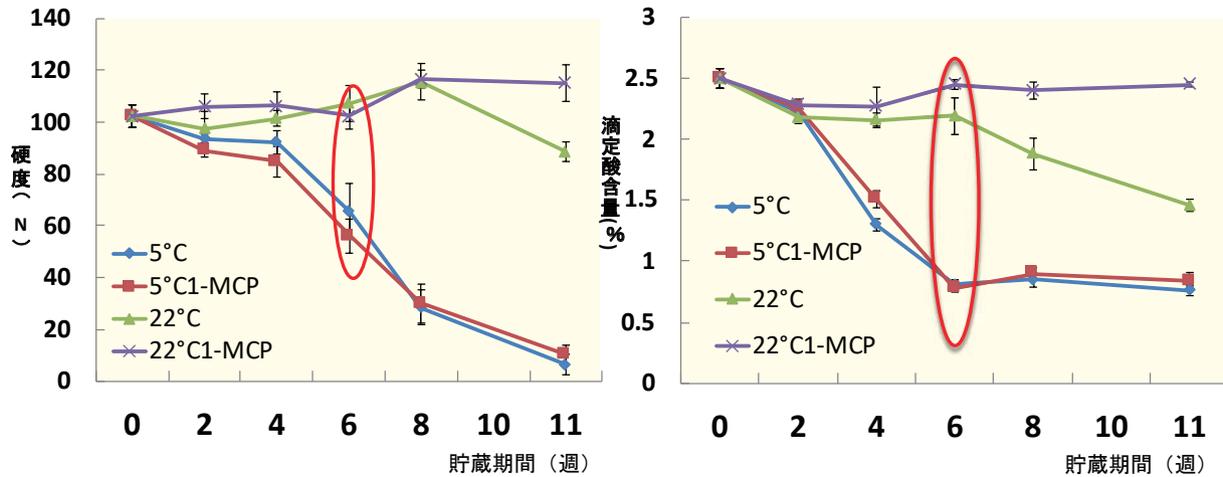


図-6 貯蔵温度と1-MCP処理が‘さぬきゴールド’の果肉硬度(果芯部)と滴定酸含量に及ぼす影響
赤囲いはRNAseq解析に使用した果実, Asiche *et al.* 2018より

てきた。すなわち、これまでの低温貯蔵中の果実軟化は極めて微量なエチレンによって誘導されると解釈され、キウイフルーツはエチレンに極めて敏感に反応して成熟すると考えられてきた (Richardson *et al.* 2011)。

今回の実験で見られた低温下での果実成熟進行は1-MCP処理による抑制が全く見られないこと、室温下の成熟進行は緩慢であることから、微量なエ

チレンに超敏感に反応した結果との仮定には適合しない。したがって、今回の意外な実験結果は、キウイフルーツ果実が低温に反応して、エチレンの作用とは独立に果実成熟が進行することを示唆している。

そこで、この仮説を実証するために、収穫時の未熟果実、プロピレン処理5日目の果実、1-MCPを繰り返して処理しながら室温及び低温下に4週間貯蔵

した果実から (図-6の赤楕円で囲んだサンプル) RNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたRNAseq解析による網羅的遺伝子発現解析を行った (Asiche *et al.* 2018)。RPKM値5以上、いずれかの処理間で3倍以上の発現差異を基準として成熟関連DEGを抽出したところ、3837遺伝子が検出された (図-7)。ヒートマップ解析を見ると収穫時の未熟果実と室温4週間

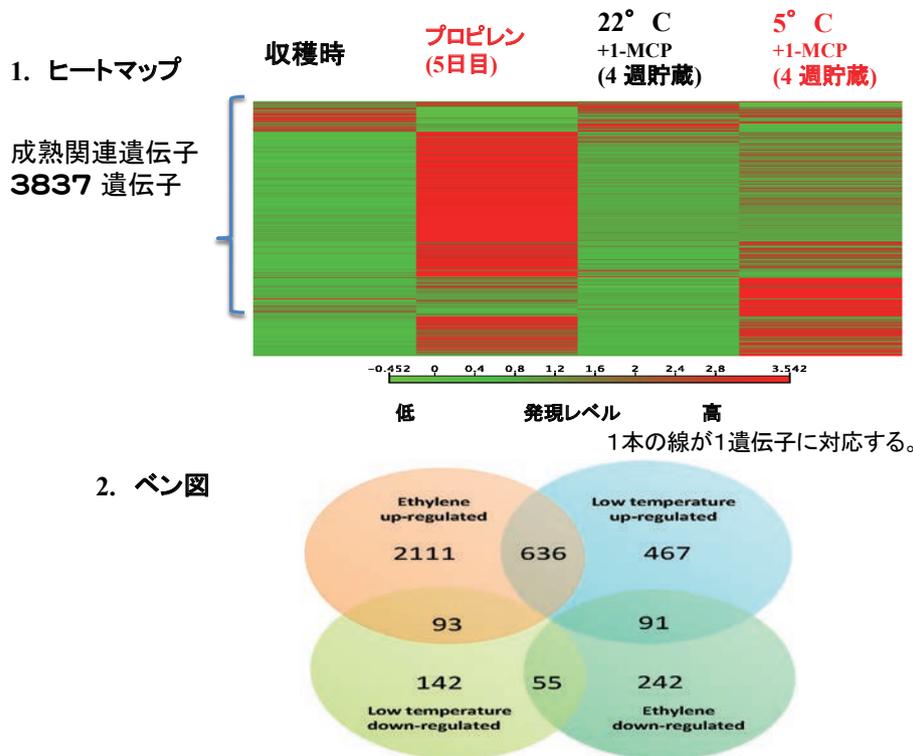


図-7 ‘さぬきゴールド’キウイフルーツにおける貯蔵温度及びプロピレン処理による遺伝子発現変化のRNA seq解析 (Asiche *et al.* 2018より)

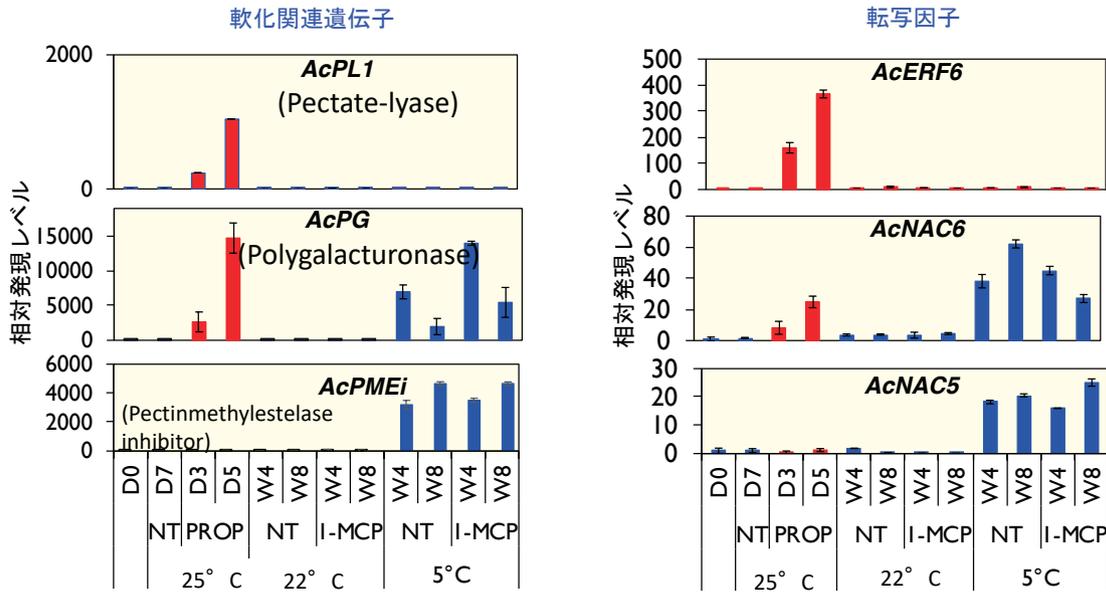


図-8 ‘さめきゴールド’キウイフルーツにおける貯蔵温度及びプロピレン処理が遺伝子発現に及ぼす影響 (Asiche *et al.* 2018 より)

貯蔵果実 (+I-MCP 処理) で類似プロファイルを示したのに対し、プロピレン処理果実では多くの遺伝子の発現が活性化された。果実軟化が促進された低温4週間貯蔵果実の遺伝子発現プロファイルは、他のいずれの処理区とも異なっていた。プロピレン処理果実と低温貯蔵果実で共通して遺伝子発現が促進された遺伝子は636個、抑制された遺伝子は55個が抽出された。RNAseq解析で特徴的な発現プロファイルを示した成熟関連遺伝子について、Real-Time PCR法を利用してより詳細な遺伝子発現解析を行った。細胞壁のペクチン分解への関与が想定されるPL1及びPGの遺伝子発現では、

前者はプロピレン処理のみによって活性化され、後者はプロピレン処理と低温処理の両方によって促進された(図-8)。また、PMEi遺伝子は低温処理によってのみ顕著に活性化した。転写因子ではERF6はプロピレン処理のみに、NAC6はプロピレン処理と低温貯蔵の両者に、NAC5は低温処理のみに応答した。これらの遺伝子発現結果は、前述の我々の仮説を支持するものである。

3. 樹上果実と収穫後低温貯蔵果実の成熟の類似性

貯蔵やその後の流通を前提としたキウイフルーツの商業的生産では未熟段

階で収穫される。ただし、その時期を過ぎた後も樹上に放置すると徐々に果実成熟が進行する。この樹上での果実成熟も微量なエチレンによるものと考えられてきた。しかし、キウイフルーツ果実の成熟が低温に応答してエチレン作用とは独立に進行するならば、秋の深まりに伴う樹上での成熟も低温に応答したものかもしれない。

‘レインボー・レッド’キウイフルーツ果実を用いて、種々の温度下での貯蔵果実の成熟と樹上果実の成熟を調査した(Mitalo *et al.* 2018)。前述の手法を用いて軟腐病の影響を除き、健全果のみを用いて貯蔵果実を調査すると、室温(22°C)下での果実軟化は極め

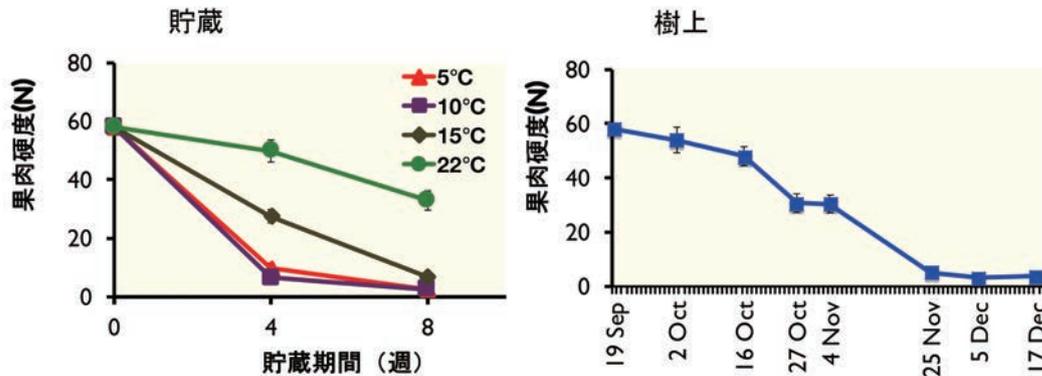


図-9 貯蔵中及び樹上での‘レインボー・レッド’キウイフルーツの果肉硬度の変化健全果のみでの解析。(Mitalo *et al.* 2018 より)

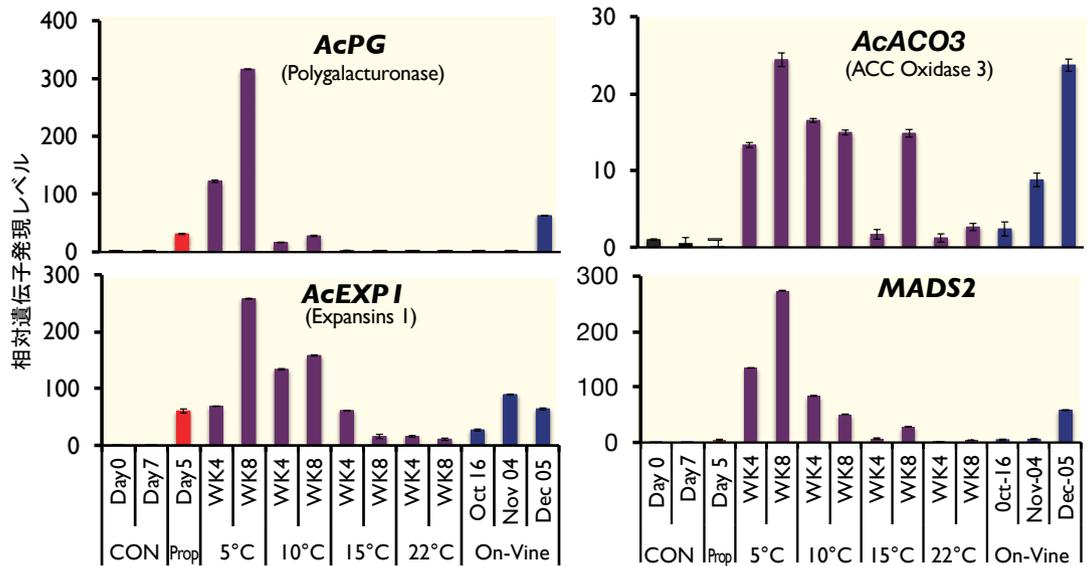


図-10 ‘レインボー・レッド’キウイフルーツにおけるプロピレン処理、貯蔵温度、樹上での成熟による成熟関連遺伝子の発現変化 (Mitalo *et al.* 2018 より)

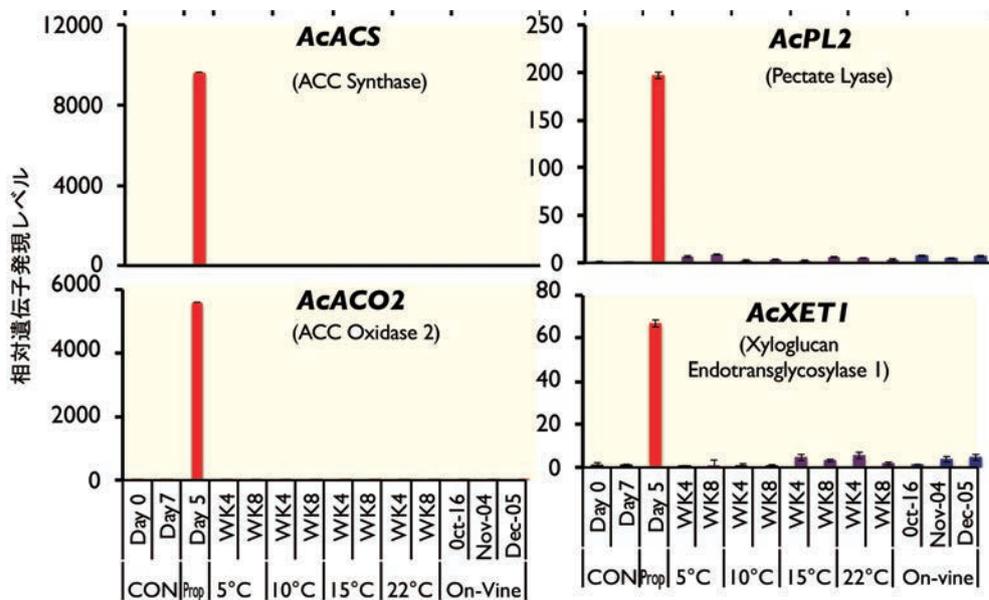


図-11 ‘レインボー・レッド’キウイフルーツにおけるエチレン生成及び軟化関連遺伝子の発現様相 (Mitalo *et al.* 2018 より)

て緩慢であったが、15°C下ではやや早まり、5、10°Cではほぼ同様に促進された(図-9)。樹上では、この品種の商業的収穫時期の10月上旬には果実は硬く約50Nを示していたが、徐々に軟化が進行し11月下旬には10N以下になった。これらに加えて、室温下でのプロピレン処理によって成熟を促進した果実も加えて、成熟関連遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞壁分解関連遺伝子であるPG、EXPI遺伝子発現はプロピレン処理、低温貯

蔵、樹上での果実成熟に伴って、いずれでも促進された(図-10)。ACO3、MAD2遺伝子の発現はプロピレン処理には応答せず、低温貯蔵と樹上での成熟に伴って促進された。一方、ACS、PL2、ACO2、XET1遺伝子の発現はプロピレン処理によってのみ誘導された(図-11)。以上の結果は、樹上での果実成熟は秋の深まりに伴う気温低下に応答したものであることを示している。

おわりに

以上を総合すると、キウイフルーツはエチレン制御系と低温制御系の二つの成熟システムを持っており、両者は一部の成熟関連遺伝子を共有するものの、それぞれの制御系はそれぞれに特異的に反応する遺伝子を持つことが示された(図-12)。エチレンはETR1受容体から始まりEIN3/EILをへてERF6などを介して、ACS、ACS2遺

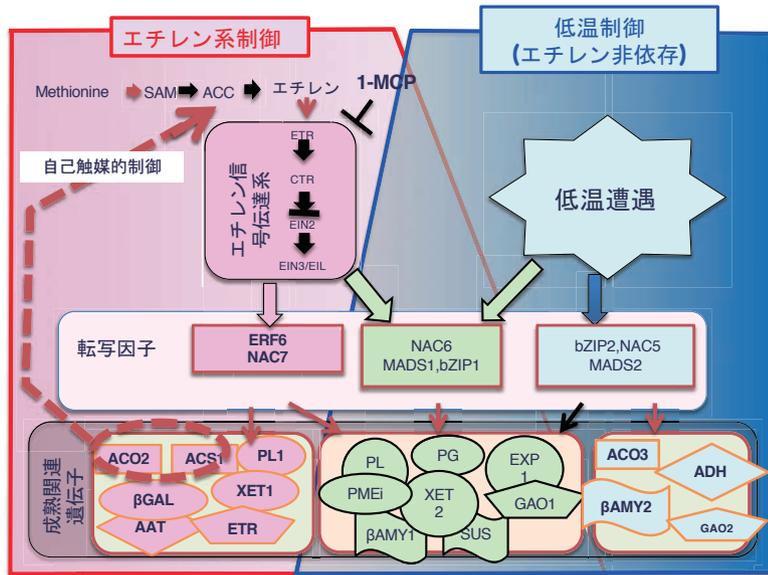


図-12 キウイフルーツの成熟制御モデル

伝子を活性化する自己触媒のエチレン制御系を含む多数の成熟関連遺伝子を制御している。一方、低温刺激は数週間をかけて MAD2 遺伝子などによる低温特異的遺伝子群と NAC6 などのエチレン制御系と共有する転写因子を介して、成熟関連遺伝子を制御すると考えられる。なお、低温による遺伝子制御は非エチレン依存性を示す。スーパーマーケットなどで市販されているキウイフルーツ果実を調査したところ、大部分の果実からはエチレン生成は検出されなかった。これらの果実は、収穫後に低温貯蔵されていたと推定された。すなわち、市場に出回っているキウイフルーツ果実の成熟の大部分は、低温貯蔵、流通中の低温制御によると考えられる。

商業的収穫時期以後も樹上に放置したキウイフルーツ果実の成熟は、エチレン生成を伴っておらず、周囲の気温低下に対する低温応答によるものと考えられる。ところで、秋季の気温低下に応じてカンキツ類やカキ、西洋ナシ、ブドウでも樹上での果実成熟や着色が促進することが経験的に知られている。すなわち、動物や昆虫に食べられて種子を運んでもらうために作られ

る果実が「冬の到来前に果実成熟が完了するために秋の低温を感じ、成熟を誘導する」のは目的のとも考えられる。これらの秋に成熟する木本性果実には共通する低温応答機構が存在するのかもしれない。今後の低温応答果実成熟機構研究の進展が期待される。

参考文献

- Asicche, W.O. *et al.* 2018. Comparative transcriptome analysis reveals distinct ethylene-independent regulation of ripening in response to low temperature in kiwifruit. *BMC Plant Biology* 18, 47. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1264-y>.
- Crowhurst, R.N. *et al.* 2008. *Analysis of expressed sequence tags from Actinidia: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavor, health, color and ripening.* *BMC Genomics* 9, 351
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, S160-S180.
- Jabbar, A. and A.R. East 2016. Quantifying the ethylene induced softening and low temperature breakdown of 'Hayward' kiwifruit in storage. *Postharvest Biology and Technology* 113, 87–94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.002>.
- Kamiyoshihara, Y. *et al.* 2012. Ligand-induced alterations in the phosphorylation state of ethylene receptors in tomato fruit. *Plant Physiology* DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.112.202820>.
- Mitalo, O.W. *et al.* 2018. Characterization of ripening-related genes involved in ethylene-independent low temperature-modulated ripening in 'Rainbow Red' kiwifruit during storage and on-vine. *The Horticulture Journal* OKD-035. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-035>.
- Mitalo, O.W. *et al.* 2019. Comparative analysis of fruit ripening and associated genes in two kiwifruit cultivars ('Sanuki Gold' and 'Hayward') at various storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 147, 20–28.
- Mworia, E.G. *et al.* 2012. Low temperature-modulated fruit ripening is independent of ethylene in 'Sanuki Gold' kiwifruit. *Journal of Experimental Botany* 63, 963–971. <https://doi.org/10.1093/jxb/err324>.
- McMurchie, E.J. *et al.* 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. *Nature* 237, 235–236. <https://doi.org/10.1038/237235a0>.
- McAtee, P.A. *et al.* 2015. The hybrid non-ethylene and ethylene ripening response in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) is associated with differential regulation of MADS-box transcription factors. *BMC Plant Biology* 15, 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0697-9>.
- Richardson, A.C. *et al.* 2011. Fruit development of the diploid kiwifruit, *Actinidia chinensis* 'Hort16A'. *BMC Plant Biology* 11, 1–14.
- Seymour G.B. *et al.* 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology* 64, 219-241.
- Sisler, E.C. and M. Serek 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum* 100, 577–582.