

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	LI TAISHAN
論文題目	Molecular mechanisms underlying environmental and epigenetic fruit ripening control in highbush blueberry (環境制御とエピジェネティクス制御によるハイブッシュブルーベリー果実成熟促進の分子機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>ハイブッシュブルーベリー (<i>Vaccinium corymbosum</i>) (以下, HB) は, 抗酸化作用を示すポリフェノールを多量に含む高機能性果実として人気が高く, 近年世界的に生産量が伸びている. HB生産拡大を阻む要因のひとつが, 収穫に労力がかかることである. HBは果房内果粒が不斉に成熟することから, ブドウのような房取りではなく, 果粒ごとに個別収穫されており, このことがコスト増の要因となっている. よって, 果実成熟メカニズムの解明とそれに基づく人為成熟促進技術の開発が求められている. HBはノンクライマクテリック型果実に属し, その成熟プロセスには植物ホルモンであるアブシシン酸 (ABA) が関与するが, 過去に行われた研究ではHB果実に対するABA処理の成熟促進効果は限定的であった. 本研究では, 紫外線照射 (有効波長280-315nm; UV-B) やDNAメチル化阻害剤 (5-アザシチジン; 5-AzaC) 処理がHBの果実成熟を促進することを見だし, これらの処理がどのような分子メカニズムにより果実成熟促進効果をもたらすかを明らかにした.</p> <p>第1章では, 収穫前の長期間UV-B照射がHB果実成熟に及ぼす影響を調査した. 生物学的に有効な照射量を目安として, 3段階の照射強度を設定し, 緑色果実段階から収穫まで断続的に照射した. その結果, すべての強度のUV-B照射により果実発達が促進されるとともに, 果実着色や糖蓄積が促進された. UV-B照射はアントシアニン生合成律速酵素遺伝子のひとつであるUFGTの発現を増加させた. ベンサミアナタバコ (<i>Nicotiana benthamiana</i>) を用いたルシフェラーゼ一過性発現解析により, MYBA1ならびにMYBC2がUFGTの転写を, それぞれ正ならびに負に制御することを明らかにした. また, MYBPA1がMYBA1を正に制御することを明らかにした. さらに, UV-B照射がアントシアニン蓄積を誘導する分子機構が, 緑色果実と成熟果実で異なることを明らかにした. すなわち, 緑色果実においては, UV-B照射が光受容体HY5の発現を促進し, その結果MYBPA1の発現上昇とMYBC2の発現低下が引き起こされアントシアニン生合成が増加すると考えられた. 一方成熟果実においては, UV-B照射がMYBA1やMYBPA1の発現を促進するとともに, HY5非依存的経路によりMYBC2も発現促進することで, アントシアニン蓄積のバランスを維持することが示された. 以上より, 収穫前の長期間UV-B照射により, アントシアニン合成を制御するMYB転写因子の発現がステージ特異的に制御されることで着色が促進され, 果房内果粒成熟の斉一化が誘導されることを明らかにした.</p> <p>第2章では, HBの果実成熟におけるDNAメチル化の関与を検証した. 緑色前期 (SG), 緑色後期 (G), 着色期 (P), 成熟期 (M) の4つの果実ステージにおいて, 果皮と果肉からDNAとRNAを抽出し, 全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析とmRNA-seq解析をおこなった. 果実成熟に伴い果肉ではCHGおよびCHHのメチル化レベルが上昇し (hypermethylation), 一方果皮ではCHGおよびCHHのメチル化レベルが減少した (hypomethylation). Pステージにおいて, 果肉・果皮ともに, RNA依存型DNAメチル化 (RdDM) 関連遺伝子群の顕著な発現低下がみられた. 一方Mステージでは果肉特異的に, RdDM関連遺伝子群の発現が増加した.</p>			

このことが、Mステージの果肉における *hypermethylation* と果皮における *hypomethylation* を誘導すると考えられた。さらにエチレンが RdDM 経路に及ぼす影響を調査したところ、エチレンが RdDM 関連遺伝子群の発現低下を誘導することが明らかになった。すなわち、HB 果実成熟中に引き起こされるエチレン上昇が DNA メチル化の統御を担う可能性が示された。次に、5-AzaC 処理が果実成熟に及ぼす影響を調査した。その結果、Gステージ処理果実において、5-AzaC 処理は果実成熟を促進し、果房内果粒成熟が斉一化した。一方、この効果は SG ステージ処理ではみられなかった。SG と G ステージ間では ABA 生合成遺伝子の発現が顕著に異なったことから、ABA の有無が処理効果の違いの原因であると仮定し、SG ステージ果実に対して、ABA と 5-AzaC の複合処理をおこなった。その結果、果実成熟が顕著に促進された。さらに、複合処理によるアントシアニン蓄積には、*MYBA1* 発現上昇が、糖蓄積にはショ糖輸送体である *SWEET15* の発現上昇が関係していることを示した。以上より、DNA 脱メチル化は、エチレン刺激による ABA 誘導型果実成熟開始のハブ因子として機能するという新たな知見を得た。さらに、DNA 脱メチル化処理が HB の果房内果粒成熟の斉一化に有効であることを明らかにした。

第3章では、第2章で示された ABA と 5-AzaC の複合処理による果実成熟促進メカニズムについてさらに検討をおこなった。ABA 単独処理では ABA による ABA シグナル伝達抑制（ネガティブフィードバック）がみられたが、5-AzaC 単独処理では、CHG あるいは CHH 型メチル化シトシンの脱メチル化により、ABA シグナル伝達遺伝子群の発現が上昇した。すなわち、ABA と 5-AzaC の複合処理は、ABA によるネガティブフィードバックを抑制し、ABA シグナル伝達経路をより活性化させる可能性が推察された。また以下に示すように、ABA と DNA 脱メチル化のクロストークが遺伝子発現に及ぼす影響について新たな知見を獲得した。ABA シグナル伝達遺伝子のひとつである *WRKY24* には ABA 応答配列がプロモーターに存在する。G ステージ果実ではプロモーター領域のメチル化と発現抑制がみられる一方、M ステージ果実ではこの領域の脱メチル化と発現上昇がみられた。これは植物ホルモンと DNA メチル化のクロストークの存在を説明しうるはじめての知見である。以上より、ABA と 5-AzaC の複合処理による成熟促進には、*MYBA1* などの成熟関連遺伝子の発現上昇だけではなく、ABA シグナル伝達経路の活性化による ABA ホメオスタシスの変動が関与する可能性が推察された。

以上の通り、本研究により、環境制御ならびにエピジェネティクス制御により HB 果実成熟の人為制御が可能であることが示された。また、これらの制御が成熟関連遺伝子群や ABA シグナル伝達遺伝子群の発現変動を誘導することで果実成熟が促進されることを明らかにするとともに、果実成熟における DNA メチル化の役割について新たな知見が獲得された。本研究により、HB 果実の房取り収穫技術の開発に向けた基礎知見が得られた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ハイブッシュブルーベリー (*Vaccinium corymbosum*) (以下, HB) の不均一な果粒成熟は収穫労力を増大させる一因であり, 生産拡大を阻む要因となっている. よって, HBにおける果実成熟機構の理解および制御は, 園芸学的に重要な課題である. 本研究は, 近年モデル園芸植物の果実成熟においてその関与が指摘されてきているエピジェネティクス制御ならびに環境制御がHB果実の成熟に及ぼす影響を調査した. さらに全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析とmRNA-seq解析による統合的解析により, HB果実の成熟におけるDNAメチル化の関与について新たな知見を獲得した. 評価すべき点は以下の通りである.

1. UV-B照射はこれまで収穫後果実の成熟促進に適用されてきたが, 収穫前照射の影響を調査した報告は少ない. 本研究は, 収穫前UV-B照射がHB果実成長と果実成熟を促進することを明らかにした. UV-B照射による果実成長促進は他の植物種では報告されていない新たな発見である. また, UV-B照射が果実ステージ特異的に着色制御転写因子の発現を制御することを明らかにした. さらに, UV-B照射が果房内果実成熟斉一化に有効であることを示した.

2. 果実成熟に伴うDNAメチル化変動パターンは植物種によって異なることが知られている. 本研究では果皮と果肉でDNAメチル化変動パターンが異なること, およびDNAメチル化がエチレン上昇に伴う果実成熟制御のハブ因子として重要な役割をもつ可能性を示した. さらに, DNA脱メチル化処理が果実成熟促進ならびに果房内果粒成熟斉一化に有効であることを示した.

3. ABAにより果実成熟が促進されるノンクライマクテリック型果実の成熟において, ABAとDNA脱メチル化処理の複合処理によって果実成熟が劇的に促進されることを見いだした. 複合処理がABA単独処理よりも高い果実成熟促進効果をもつ要因として, ABA単独処理で引き起こされるABAシグナルのネガティブフィードバックがDNA脱メチル化処理により抑制される機構の存在を見いだした.

4. ABAシグナル伝達遺伝子のひとつである*WRKY24*は幼果段階の緑色果実では発現が低く, 成熟果では発現が高い. この遺伝子の発現制御に, ABAとDNAメチル化のクロストークが関与することを発見した. すなわち成熟果実におけるプロモーター領域の脱メチル化がABA応答性を高め, *WRKY24*の発現が促進される可能性を示した. これは植物ホルモンとエピジェネティクス制御のクロストークの存在を示唆する初めての結果である.

以上のように, 本研究は, 環境制御ならびにエピジェネティクス制御により, HBにおける果実成熟の促進と房取り収穫技術の開発が可能であることを示しており, 園芸産業の発展に寄与するものである. さらに, 本研究は果実成熟におけるDNAメチル化とABAのクロストークの役割に関して新たな基礎知見を提供しており, 果樹園芸学, 植物遺伝学, 植物生理学の発展に寄与するところが大きい.

よって, 本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める.

なお, 令和3年7月15日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた.

また, 本論文は, 京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し,

公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）