

氏 名	いた い あき ひろ 板 井 章 浩
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論農博第 2322 号
学位授与の日付	平成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Studies on fruit ripening of the Japanese pear with special reference to the genes associated with ethylene production (ニホンナシの果実成熟に関する研究—特にエチレン生成に関する遺伝子に着目して)
論文調査委員	(主 査) 教授 杉 浦 明 教授 泉 井 桂 教授 矢 澤 進

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、貯蔵性の優れたニホンナシの効率的な育種方法を開発することを目的として、成熟に関わるエチレンの生成機構の解明および成熟過程で特異的に発現する遺伝子の解析を行って、ニホンナシ果実の成熟・貯蔵特性並びにその遺伝について検討するとともに、貯蔵性の高い個体を早期選抜する方法を開発した結果を取りまとめたものである。得られた結果の概要は以下のとおりである。

1. ニホンナシ約50品種について果実成熟時のエチレン生成特性を調査しエチレン生成のほとんどみられないものから大量に生成するものまで、品種間で著しい差異があることを明らかにした。さらにその生成特性から高レベル (>10 nl/g/hr)、中レベル (0.5~10 nl/g/hr)、低レベル (<0.5 nl/g/hr) の3つのグループに品種を分類し、貯蔵性の良い品種はすべて低レベルのグループに属し、エチレン生成量と貯蔵性が密接に関わっていることを明らかにした。また、エチレン生成特性からみたニホンナシ品種の歴史の変遷について検討を加え、江戸時代にすでに栽培されていた品種のほとんどは高あるいは低レベルのどちらかに分類され、明治以降高レベルの品種は栽培されなくなり、中レベルに属する品種が増加してきたと考察している。

2. 上記3グループのニホンナシ成熟果実からエチレン生合成経路に存在する2つのkey酵素 ACC synthase および ACC oxidase の cDNA の単離を行い、3種類の ACC synthase cDNA (*PPACS1*, 2, 3) と1種類の ACC oxidase cDNA (*PPAOX1*) を得た。それらの発現の品種間差について調査したところ、*PPACS1* は高レベルの品種群に、*PPACS2* は中レベルの品種群に、それぞれ特異的に発現し、*PPACS3* はエチレン生成量に関係なくすべての品種で非常に低レベルで発現し、また *PPAOX1* はすべての品種で高レベルで発現しており、ACC synthase がエチレン生成の律速酵素であることを示唆した。さらに、3つの ACC synthase mRNA の発現量は *PPACS1* > *PPACS2* > *PPACS3* の順であり、発現量の差がエチレン生成量の差になっていることを示し、*PPACS1* は発現量が多いため *PPACS2* および *PPACS3* の作用をマスクすることを示した。

3. 上述の3つの ACC synthase cDNA と1つの ACC oxidase cDNA の断片をプローブとして、ニホンナシ品種のゲノム DNA の RFLP 解析を行った結果、*PPACS1* をプローブとしゲノム DNA を制限酵素 *Hind* III で消化した場合、エチレン生成量が高レベルの品種に特異的な 2.8 kb の DNA マーカーを同定した。さらに *PPACS2* をプローブとしゲノム DNA を同様に *Hind* III で消化した場合、エチレン生成量が中レベルの品種に特異的な 0.8 kb の DNA マーカーを同定した。ついで、この2つの DNA マーカーをサンプル量が少なく済み、簡便に検出できる PCR マーカー化することに成功した。本マーカーを用いた遺伝子診断により、交雑実生個体の結実を待たずにエチレン生成量の少ない貯蔵性の良い個体の早期選抜が可能であり、ニホンナシ新品種育成の効率化に貢献できることを示した。なお、交雑親の選定のため、現在栽培されている主要品種またはその親品種の遺伝子型の決定も行った。

4. エチレン生成のほとんどみられない品種においても、貯蔵中に徐々に軟化して品質の劣化がみられるのは、エチレンの関与しない成熟機構が存在することを示唆している。そこでニホンナシ果実の成熟中に発現が増大する遺伝子を Dif-

ferential display (DD) 法と Differential screening (DS) 法を用いて単離し、さらにその発現に対するエチレンシグナル伝達系の関与について調査した。DD 法により 3 種類の cDNA クローンおよび DS 法により 11 種類の cDNA クローンを単離した。DD 法により得られた *JPRXYL* 遺伝子はバクテリアの β -D-Xylosidase 遺伝子と相同性を持ち、植物由来では初めての単離であり、細胞壁成分のヘミセルロースに存在するキシランを分解し果実の軟化に関わっている可能性を示唆した。さらに、単離した合計 14 の cDNA クローンの発現についてエチレンレセプターの阻害剤である 1-methylcyclopropene を用いてエチレンシグナル伝達系の関与について調査し、そのうち 3 つの cDNA クローンの発現がエチレンシグナル伝達系の影響を受けることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ニホンナシはセイヨウナシとは異なり、収穫後の追熟を要しない果実であるため、果実の成熟や貯蔵性とエチレンとの関係はあまり論じられることがなかった。しかし、ニホンナシの成熟の早晩や貯蔵性には品種間で大きな差異があり、園芸利用の観点からエチレンの関与を見直す必要がある。本論文は、ニホンナシ果実のエチレン生成機構の解明と成熟過程で発現する遺伝子の解析を行って果実成熟と貯蔵性について検討を加えるとともに、エチレン生成に関連した遺伝子をマーカーにして貯蔵性の優れた個体を早期選抜する方法を開発した結果を取りまとめたもので、評価できる主な点は以下のとおりである。

1. ニホンナシ約 50 品種について果実成熟時のエチレン生成特性を調査し、エチレン生成量と成熟の早晩および貯蔵性が密接に関わっていることを明らかにした。また、エチレンの生成特性からみたニホンナシ品種の歴史の変遷について検討を加えた。

2. エチレン生成経路に存在する key 酵素 ACC synthase の cDNA (*PPACS1*, *PPACS2*, *PPACS3*) および ACC oxidase の cDNA (*PPAOX1*) の単離を行い、これらの遺伝子をプローブとしたサザン分析を行った結果、ACC synthase の cDNA (*PPACS1*, *PPACS2*) をプローブとした場合、ニホンナシ果実のエチレン生成量に対応した DNA マーカーが同定された。本マーカーを用いた遺伝子診断法により、交雑実生果実のエチレン生成量を結実期を待たずに判定できることになり、貯蔵性を目的としたニホンナシ品種育成の効率化が図れることを明らかにした。

3. 果実のエチレン生成について、*PPACS1* 遺伝子の作用が *PPACS2* および *PPACS3* の作用を覆い隠す優勢上位の遺伝子であることを示した。

4. 果実成熟中に発現が増大する遺伝子を Differential display (DD) 法および Differential screening (DS) 法を用いて単離した。DD 法により得られた *JPRXYL* 遺伝子はバクテリアの β -D-Xylosidase 遺伝子と相同性を持ち、細胞壁成分のヘミセルロースに存在するキシランを分解し果実の軟化に関わっている可能性を示唆し、さらに植物由来では初めての単離であることを明らかにした。

以上のように本論文は、分子生物学的手法を用いてニホンナシ果実の貯蔵性を目的とした効率的な育種方法の開発、並びに果実成熟に関わる新規遺伝子の解析から果実の成熟特性について検討を行ったものであり、果樹園芸学、園芸利用学並びに果樹育種の実践面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、平成 12 年 6 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。