

## 小課題「果実成熟関与遺伝子発現を抑制した組換え体の作出とその評価」

### 研究の背景とねらい

山形県の特産果樹である西洋ナシは、全国の60%以上が山形県で生産されている。なかでも、‘ラ・フランス’は独特な香りと滑らかな肉質が消費者から高く評価され、生産量と消費量ともに増加している品種である。西洋ナシは、樹上で完熟せず、収穫後に追熟を必要とする果実であるが、いったん可食状態に達した果実は、その日持ちがきわめて悪く、このことが西洋ナシの消費拡大のネックになっている。

これまでの研究により、西洋ナシなどのクライマクテリック型果実では、追熟中に果実の成熟や老化に密接に関わっている植物ホルモンのエチレンが生成され、その働きにより、成熟と軟化が進行すると考えられている。このことから、西洋ナシ果実の日持ちを向上させるためには、収穫後のエチレン生成に関わる遺伝子と果実の軟化に関わる遺伝子の発現を抑制することが有効であると考えられる。そこで本研究では、遺伝子導入により西洋ナシ果実の成熟過程を制御し、日持ち性の良い西洋ナシを作出することを目指した。

### 共同研究の体制と役割分担

松田成美，黒田 潤，西村幸一（山形県立園芸試験場）

遺伝子導入系の開発ならびに組換え体の育成

高 マイ（山形企業振興公社）

再分化培養系と遺伝子導入系の開発ならびに組換え体の作出と解析

村山秀樹（山形大学農学部）

果実の成熟関与遺伝子の単離ならびに成熟過程の解析

### 研究の経過

#### フェーズ 段階

##### i 果実の成熟関与遺伝子の単離

‘ラ・フランス’果実から、エチレン生合成関与遺伝子の ACC 合成酵素遺伝子 (LF-ACS1) と ACC 酸化酵素遺伝子 (LF-ACO1) の全鎖長 cDNA を単離することに成功した。また、ACS 遺伝子については、LF-ACS2 と LF-ACS3 の2つの cDNA 断片を単離した。

次に、果実軟化関与遺伝子については、細胞壁の分解に関わる遺伝子のポリガラクトナーゼ遺伝子を3つ (PG1, PG2, PG3)、アラビノフラノシダーゼ遺伝子を1つ (Ab1)、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子を4つ (PME1, PME2, PME3, PME4)、セルラーゼ遺伝子を2つ (Cel1, Cel2)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を3つ (Gal1, Gal3)、あわせて13個の遺伝子を‘ラ・フランス’から単離した。

##### ii 西洋ナシ遺伝子導入系の開発

本事業を開始した時点では、西洋ナシの遺伝子組換えに関する研究例はほとんどなく、特に商業的な品種での遺伝子導入系は確立されていなかった。そこで、最初に遺伝子導入系の開発に着手した。その結果、腋芽、子葉あるいは葉片を外植体とする遺伝子導入系を確立することに成功した。また、これらの遺伝子導入系における形質転換効率は、それぞれ4～5%、4%および1%ときわめて高かった。

### iii 目的遺伝子の導入および組換え体の獲得

日持ち性の良い西洋ナシを作出する戦略としては、果実のエチレン生成を抑制する方法と果実の軟化を遅延する方法の2つが考えられる。本研究では、果実のエチレン生成を制御するために、エチレン生成に関わるACSとACOを導入することに着手した。これらの2つの遺伝子のcDNA配列を反対方向に(アンチセンス技術)、あるいは、正方向に(コサプレッション技術)導入した。その結果、'ラ・フランス'、'ゼネラル・レクラーク'、'シルバーベル'および'コンファレンス'の4品種において、ACOとACS遺伝子を導入した組換え体が合計73系統得られた。なお、そのうち39系統は'ラ・フランス'の組換え体である。

## フェーズ 段階

### i 組換え体の検定および導入遺伝子の発現解析

作出した'ラ・フランス'の組換え体のうち、センスACOを導入した4系統[ACO(+)]、アンチセンスACO[ACO(-)]を導入した9系統、センスACS[ACS(+)]を導入した4系統およびアンチセンスACS[ACS(-)]を導入した3系統について、遺伝子の解析を行った。PCR法を用いた解析により、外来ACOあるいはACSのcDNA配列がそれぞれ'ラ・フランス'のゲノムに挿入されていることを確認した。また、サザン解析により、導入遺伝子のコピー数はそれぞれの個体で異なり、1コピーから5コピーまで多様であること、さらに、それぞれの組換え体のゲノムに挿入された外来遺伝子の位置も異なることが判明した。

次に、ノーザン法により、導入遺伝子の発現および導入遺伝子と同一の内生遺伝子の発現を解析した。アンチセンス遺伝子を導入した多数の組換え体では、内生遺伝子の発現が抑制された個体が多数みられた。これに対して、センス遺伝子を導入した組換え体では、内生遺伝子の発現が増加した個体が多くみられたものの、逆に内生遺伝子の発現が抑制された個体もみられた。後者の組換え体は、導入遺伝子の導入位置やコピー数の影響で内生遺伝子の発現が抑制されたと推察された。

### ii 有望組換え体の選抜

本研究の目標は、遺伝子を導入することにより、エチレン生合成関与遺伝子の発現を抑制し、日持ち性の良い西洋ナシを作出することである。この点で、本研究で獲得したACOあるいはACS遺伝子の発現が抑制された組換え体は有望であると考えられる。今後、

これらの個体を育成し、結実した果実のエチレン生成量を調査するとともに、果実の日持ち性が優れた個体を選抜する予定である。しかしながら、果実が結実するまでには時間がかかり、しかも、組換え体を育成する広い場所(隔離温室)を必要とする。そこで、培養段階でエチレン生成量の少ない個体を選抜できる可能性があるか検討した。組換え体の培養シュートのエチレン生成量を測定した結果、遺伝子発現が抑制された個体では、非組換え体‘ラ・フランス’と比較してエチレン生成量が少ないことが判明した。

次に、追熟中の果実と葉などの栄養器官のエチレン生成量との間の関係を検討するために、セイヨウナシ5品種を用いて、追熟中の果実と培養シュート由来の葉片のエチレン生成量を測定した。その結果、追熟中の果実のエチレン生成量は、葉片のエチレン生成量と一致する傾向が認められた。このことから、培養シュートでのエチレン生成量が少ない組換え体は、果実のエチレン生成量も少なくなる可能性があると考えられた。これまでに、ACO(-)NO.5, ACO(+)NO.1 と ACS(-)NO.2 の3系統の組換え体を有望系統として選抜した。

### iii 西洋ナシ果実のエチレン生成と日持ち性との関係

クライマクテリック型果実において、エチレンは果実の成熟に重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、西洋ナシにおいて、果実のエチレン生成量と日持ち性との関係を検討した研究はない。そこで、日持ち性が異なる5品種の西洋ナシを用いて、果実の追熟開始から過熟状態に達するまでのエチレン生成量を測定するとともに、食味試験により果実の日持ち期間を調査した。その結果、エチレンの生成量が最も高い‘パートレット’で果実の日持ち期間が3日間と最も短いのに対して、エチレンの生成量が最も少ない‘パス・クラサン’で日持ち期間が15日間と最も長いことが判明した。

### iv 果実の軟化および肉質のメルティング質化に関わるメカニズムの分子生物学的解析

西洋ナシの果実は追熟が進むにつれて、果実が軟化し、メルティング質と呼ばれる西洋ナシ独特の滑らかな肉質になる。これらのメカニズムを解明するために、本研究で単離した細胞壁分解に関わる遺伝子の果実軟化過程における発現パターンを解析した。その結果、これまで混同されてきた果実軟化と肉質のメルティング質化の2つの現象は、異なるメカニズムで生じていることが示唆された。また、PME1 と PG3 遺伝子が西洋ナシ果実の肉質のメルティング質化に緊密に関与していると考えられた。

### v 有望組換え体の育成

選抜した組換え体の無菌培養シュートを発根、馴化し、ポットに鉢上げした。また、早期開花を図るために、ナシ台木への接木を行った。現在、これらの組換え体は隔離温室で育成されており、2, 3年後に開花・結実すると予想される。

成果とその意義

(フェーズ )

- i 'ラ・フランス' からエチレン生合成遺伝子の ACC 合成酵素 (ACS) 遺伝子を 3 つ, ACC 酸化酵素 (ACO) 遺伝子を 1 つ単離することに成功した。
- ii 'ラ・フランス' へ, エチレン生合成遺伝子を導入することに成功した (図 1, 2)。
- iii 'ラ・フランス' から果実軟化関与遺伝子のポリガラクトツロナーゼ (PG) 遺伝子を初めて単離した。

(フェーズ )

- i 西洋ナシにおいて, 高効率な遺伝子導入系を確立し, 特許出願した (表 1)。これは果樹では現在もっとも効率の良い導入系である。
- ii 西洋ナシにおいて, 子葉あるいは葉片から効率的な再分化培養系を確立した。
- iii 作出した組換え体の培養シュートにおいて, エチレン生成量が抑制された個体を獲得した (図 3, 4)。
- iv 'ラ・フランス' から果実軟化関与遺伝子の PG 遺伝子を 3 つ, PME 遺伝子を 4 つ, セルラーゼ遺伝子を 2 つ, -アラビノフラノシダーゼ遺伝子を 1 つ, -ガラクトシダーゼを 3 つの計 13 個の遺伝子の単離に成功した。
- v 西洋ナシ果実の軟化とメルティング質化が異なるメカニズムで制御されていることを明らかにした (図 5)。
- vi 単離した果実軟化関与遺伝子のうち, PG 遺伝子および PME 遺伝子が西洋ナシの肉質のメルティング質化に関与していることが示唆された (図 5, 6)。

表 1 本事業で開発した遺伝子導入系の特徴

導入材料	形質転換効率	組換え体の作出に必要な期間
腋芽を含む茎	4~5%	3ヶ月
子葉	4%	1.5ヶ月
葉片	1%	3~12ヶ月

; 特許申請した技術



図 1 西洋ナシ由来の ACO (左) ACS (右) 遺伝子を導入した 'ラ・フランス'

a b c d e f g h i j k



← 内生 ACO 遺伝子  
← 導入遺伝子

図 2 組換え西洋ナシにおける導入遺伝子の確認

a-l : ACO遺伝子をアンチセンス方向で導入した組換え西洋ナシNo.1 ~ No.9 ,  
j : 導入遺伝子 (pDU-ACO(-)), k: 非組換え西洋ナシ

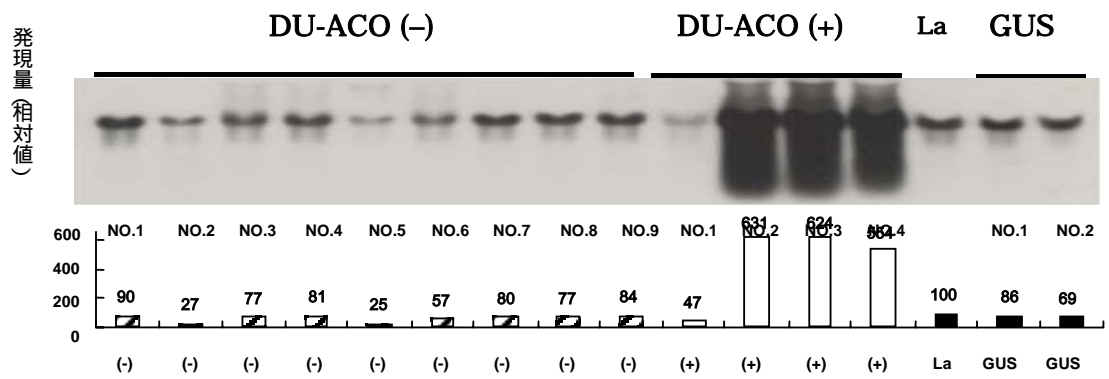


図3 組換え西洋ナシにおける ACC 酸化酵素遺伝子の発現解析

縦軸は、非組換え西洋ナシ‘ラ・フランス’ (La) の mRNA を 100 とした場合の相対発現量。  
 DU-ACO(-) : ACC 遺伝子をアンチセンス方向で導入した組換え‘ラ・フランス’, DU-ACO(+):  
 ACC 遺伝子をセンス方向で導入した組換え‘ラ・フランス’, La : 非組換え西洋ナシ, GUS : GUS  
 遺伝子を導入した西洋ナシ

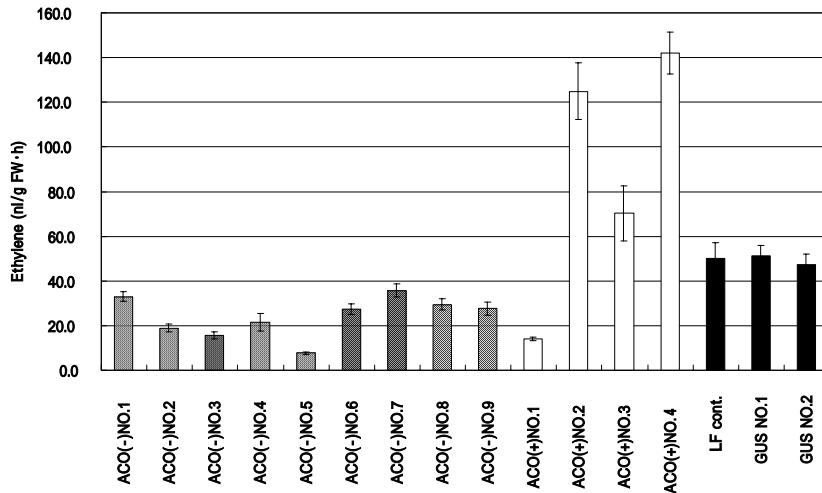


図4 組換え西洋ナシの培養シュートにおけるIPL生成量

培養シュートへ ACO の基質である 1mM ACC を処理した場合のエチレン生成量 .培養シュートでのエチレン生成量は、図3のmRNA の発現量と対応している

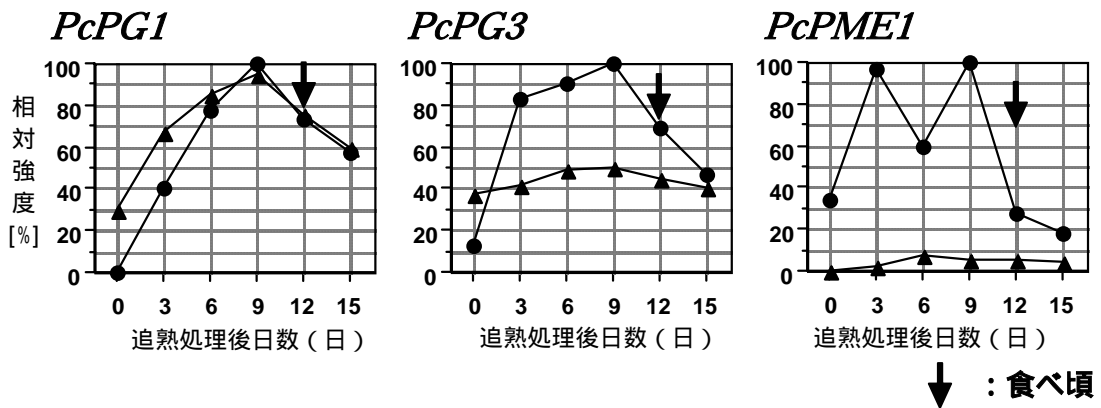


図5 貯蔵期間が西洋ナシの軟化関連遺伝子の発現におよぼす影響

冷蔵処理 5 ヶ月後 ( ) および冷蔵処理 1 ヶ月後 ( ) に追熟処理に移した果実の mRNA の発現量を示す .西洋ナシ果実は 5 ヶ月間冷蔵処理すると、1 ヶ月間の場合と同様に軟化するが、西洋ナシ独特のとろみ (メルティング性) を失う .PcPG3, PcPME1 は、メルティング性を示す果実にのみ発現している

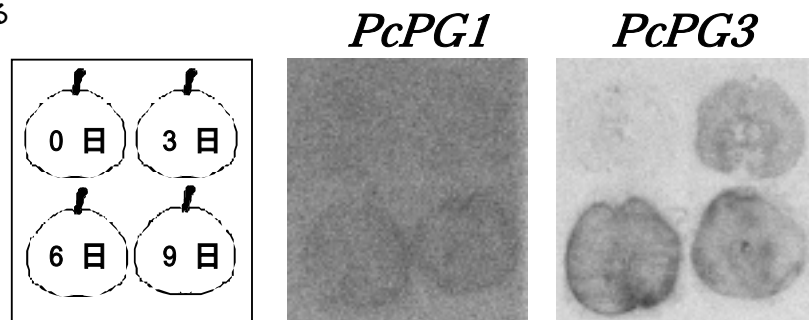


図6 Tissue Print 法による軟化関連遺伝子の発現局在解析

PcPG1, PcPG3 は、追熟処理後、日数が経過するとともに果肉の部分に強く発現してくる

#### 成果の意義：

- i 今後、日持ち性の良い系統が選抜されれば、流通上の大きな問題が一つ改善され、西洋ナシの消費の拡大につながると考えられる。
- ii 西洋ナシにおける遺伝子導入系の開発は、果実の日持ち性のみならず、機能性、早期開花性、耐病性などの有用形質の付与も可能になるため、西洋ナシにおける新品種の開発に応用することが可能である。
- iii 単離した遺伝子についても、遺伝子組換えの導入遺伝子として利用するほか、DNA マーカーの開発、果樹におけるゲノム解析など、従来の交配育種の効率化へも応用することが可能である。
- iv 単離した遺伝子は、日持ち性の優れた果実や肉質の良否などの遺伝子診断技術として応用することが可能である。
- v 単離した遺伝子は、西洋ナシに限らず他の果実の発育中あるいは収穫後の成熟生理に関する遺伝子レベルの基礎研究に資すると考えられる。

#### 今後の研究展開

作出した組換え体を早期に開花、結実させ、果実での日持ち性を調査し、遺伝子組換えによる日持ちの良い西洋ナシの開発を完成させる。

また、開発した遺伝子導入系により、他の有用遺伝子（日持ち性、耐病性、自家結実性等）の導入も可能となるため、様々な育種目標に基づく新品種開発にも応用していく。また、単離した遺伝子についても、遺伝子組換えの導入遺伝子として利用するほか、DNA マーカーの開発など、従来の交配育種の効率化へも応用する。

これらの技術を利用して新品種・素材の開発など食品産業との連携も図り、地域 COE 形成を目指す。