ニホンナシ成熟果実のエチレン生成に関する DNA マーカーの開発

板井章浩

鳥取大学農学部 680-8553 鳥取市湖山町南4-101

Development of DNA Markers for Ethylene Production during Fruit Ripening in Japanese Pear

Akihiro Itai

Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553

はじめに

ニホンナシをはじめとする果樹育種の問題点として、実生が結実するまで長年月を要する、実生の管理に多大な面積、労力、経費を必要とするなど、1, 2年生草本に比べ不利な点が多い。DNA マーカーを利用した選抜 (Marker Assisted Selection: MAS) は、サンプルの採取部位、時期にかかわらず利用可能であり、1回の交雑サイクルが長年月を必要とする果樹においては特に利用価値が高いと考えられる。特に果実の重要遺伝形質については、結実を待たねばならず、開花・結実や果実の品質の向上に関与する DNA マーカーの開発が望まれている。ニホンナシにおける実用マーカー開発については、これまで自家不和合性に関する S 遺伝子マーカーの開発 (Sassa ら, 1997; Ishimizu ら, 1999; Takasaki ら, 2004) による ‘おさ二十世紀’ 由来の自家和合性個体選抜や黒斑病抵抗性に関する RAPD マーカーの開発 (Bannno ら, 1999) や黒星病抵抗性に連鎖する RAPD マーカーの同定 (Iketani ら, 2001) の他に報告はない。ニホンナシの育種目標において、果実の品質の改良は主要な目的の一つとなっている (Abe ら, 1995; 町田・小崎 1975)。しかしながら果実の品質についての遺伝様式の報告はほとんどなく、そのため果実重、硬度、糖度、有機酸含量、成熟時期、貯蔵性などの果実の品質に影響を与える遺伝子を同定することは、育種効率を上げるためにも非常に重要である。果実の成熟・貯蔵性に関して、成熟過程に最も影響を与える重要な植物ホルモンは、エチレンである。実際、ニホンナシ栽培においてもエチレンを放出するエスレルは熟期促進のために用いられており (林ら, 1976)、ニホンナシ果実の成熟とエチレンとの間には密接な関係がみられることが報告されている (北村ら, 1981)。また鳥取県の主力品種の ‘二十世紀’ 梨は世界 12 ヶ国以上に輸出されているが、そのもっとも大きな理由として、エチレン生成量が低く、貯蔵性が良いことが挙げられる。冷蔵庫の利用などの貯蔵技術の発達した現在においても、貯蔵性の悪

い ‘新水’ などの品種は淘汰され、貯蔵性の良い品種の栽培が望まれている。そこで「貯蔵性」という重要な育種目標のひとつについて、エチレン生合成経路の遺伝子を調査し、貯蔵性に関する遺伝子診断法の開発を行い、実生の結実を待たずにニホンナシ果実の貯蔵性を判定する事に成功したので、それらの結果について紹介する。

貯蔵性と果実成熟時のエチレン生成量の品種間差異

ナシ属植物における果実の成熟については、セイヨウナシは例外なくクライマクテリック型に属し、エチレン生成及び呼吸量の上昇がみられることが報告されている (Jackson, 2003)。ニホンナシ果実のエチレン生成については、一部の品種での報告 (北村ら, 1981; Downs ら, 1991) があるのみで、それによるとニホンナシにおいてはクライマクテリック型とノンクライマクテリック型の両方が存在し、‘二十世紀’ はノンクライマクテリック型であると報告されている (北村ら, 1981)。しかし、ほとんどの品種についての成熟特性は不明であった。そこでニホンナシにおいて、育成時期や栽培時代、成熟特性が、広範になるように品種を選出し、果実成熟時の最大エチレン生成量について調査を行った (第 1 図)。調査の結果、ニホンナシ品種の果実のエチレン生成量は、ほとんど生成のみられないもの ($0.1 \mu\text{l/kg/hr}$) から大量に認められるもの ($300 \mu\text{l/kg/hr}$) まで、著しい品種間差異の存在する事が明らかとなった。ニホンナシはさらにその生成特性から High level ($>10 \mu\text{l/kg/hr}$) (‘六月’, ‘晩六’, ‘二宮’, ‘二宮白梨’ など), Moderate level ($0.5 \mu\text{l/kg/hr} \sim 10 \mu\text{l/kg/hr}$) (‘長十郎’, ‘新水’, ‘幸水’, ‘菊水’, ‘巾着’, ‘真鍮’ など), Low level ($<0.5 \mu\text{l/kg/hr}$) (‘二十世紀’, ‘豊水’, ‘新高’, ‘新興’, ‘晩三吉’, ‘新雪’ など) の 3 つのグループに品種を分類した。早生品種においては、エチレン生成量が Low level グループに属するものはなく、すべての品種が High level あるいは Moderate level のグループに属した。また晩生品種においては、ほとんどの品種は Low level グループに属し、High level の品種に属するものはみられなかった。中生品種においては、

第1図 ニホンナシ果実成熟期のエチレン生成量

1: 二宮, 2: 六月, 3: 江戸屋, 4: 君塚早生, 5: 晩六, 6: 石井早生, 7: 翠星, 8: 赤穂, 9: 新水, 10: 真鍮, 11: 巾着, 12: 淡雪, 13: 八雲, 14: 幸水, 15: 独逸, 16: 衣通姫, 17: 早生幸蔵, 18: 幸蔵, 19: 祇園, 20: 長十郎, 21: 菊水, 22: 二十世紀, 23: 世界一, 24: 豊水, 25: 大広丸, 26: 犬殺, 27: 新高, 28: 金平糖, 29: 早生赤, 30: 横越, 31: 類産梨, 32: 晩三吉, 33: 今村秋, 34: 天の川, 35: 新雪

High, Moderate, Low すべてのグループが混在していた。リンゴにおいても早生品種においてはエチレン生成量が高く、晩生品種においてはエチレン生成量が低いことが報告されており (Hansen, 1945; Chu, 1981), ニホンナシにおいても同様の傾向がみられた。また貯蔵性の良いとされる品種はすべて Low level 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が明らかとなった。さらにエチレン生成特性からみたニホンナシ品種の歴史的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、High level あるいは Low level のどちらかのグループに分類され、明治時代以降、High level に属する品種が栽培されなくなり、Moderate level 以下に属する品種が増加していることが明らかとなった。

エチレン生合成関連遺伝子の単離と品種間の発現差異

ニホンナシ品種の果実のエチレン生成量に著しい品種間差異が存在することから、この差異の原因を明らかにすべくエチレン生合成経路の2つの key 酵素、ACC 合成酵素および ACC 酸化酵素に注目し、これらの遺伝子の解析を試みた。エチレン生成量の異なる品種の成熟果実由来 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、3つの ACC 合成酵素 (ACS) cDNA (*PPACS1*, 2, 3) と1つの ACC 酸化酵素の cDNA (*PPAOX1*) を得た。PPACS1, 2, 3 のアミノ酸配列は、それぞれ 50% 程度の相同性を示した。成

熟果実におけるそれらの発現の品種間差について調査したところ、*PPACS1* は High level の品種群に特異的に発現し、*PPACS2* は Moderate level の品種群と一部の High level の品種群 (‘二宮’, ‘二宮白梨’) に特異的に発現し、*PPACS3* はエチレン生成量の品種間差異に関係なくすべての品種で非常に低レベルで発現していた (第2図) (Itai ら, 1999; 2003a)。また ACC 酸化酵素遺伝子 *PPAOX1* はすべての品種で高レベルでの発現がみられた。このことより他の植物と同様に ACC 合成酵素がニホンナシ果実成熟時のエチレン生成の律速酵素であることが明らかになった。品種によって発現する ACC 合成酵素のアイソフォームが異なっているというのは、非常にユニークな例であり、リンゴの場合とは大きく異なっていた。リンゴにおいては、*PPACS1* 遺伝子と高い相同性 (97%) を示す

第2図 エチレン生成量の異なるニホンナシ各品種成熟果実における ACC 合成酵素遺伝子の発現

1: 二宮 (H), 2: 二宮白梨 (H), 3: 江戸屋 (H), 4: 六月 (H), 5: 淡雪 (H), 6: 新水 (M), 7: 菊水 (M), 8: 二十世紀 (L), 9: 長十郎 (M), 10: 新雪 (L), 11: 豊水 (L)

H: High, M: Moderate, L: Low

注: *PPACS3* の発現はノーザン解析では確認できないくらい低く、RT-PCR 解析ではすべての品種で発現が確認されている (Itai ら, 2003a)

MdACS1 が、成熟時のエチレン生成量の品種間差に大きく関与していることが報告されている (Sunako ら, 1999; Harada ら, 2000). それによると *MdACS1* 遺伝子には、5' 非転写領域にレトロトランスポゾンの 1 種の SINE (Short Interspersed Repetitive Element) が挿入されていない *ACS1-1* と挿入されている *ACS1-2* の存在が知られている (Sunako ら, 1999). SINE が挿入されている *ACS1-2* は転写活性が低く、そのため *ACS1-2* ホモ型の品種では、*MdACS1* 遺伝子の発現量が低く、成熟時のエチレン生成量が低いと考えられている (Harada ら, 2000). 一方、ニホンナシでは、3 つの ACC 合成酵素 (*PPACS1*, 2, 3) 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品種間差異になっており、*PPACS1* は発現量が多いため *PPACS2* および *PPACS3* の作用を mask する可能性が考えられた (Itai ら, 2003a). そこで GST (グルタチオン S トランスフェラーゼ) 大腸菌発現系を用い、3 つの ACC 合成酵素のアイソフォームの組み換えタンパク質を発現させ、その活性を測定した結果、*PPACS1*, 2, 3 それぞれの活性の差は 2 倍以下であったことから (板井ら, 未発表), 最大数百倍も異なるエチレン生成量の品種間差は、上述のように *PPACS1*, 2, 3 mRNA の発現量の差に由来するものと思われた. 特に主要要因は *PPACS1* の発現量によるものと思われた (第 2 図). またエチレン作用阻害剤である 1-メチルシクロプロペン (1-MCP) をすべてのアイソフォームが発現する '二宮' 成熟果実に処理を行い、3 つの ACC 合成酵素の発現をみたところ、*PPACS1* の発現が著しく低下した. このことから *PPACS1* 遺伝子は、果実成熟時ポジティブフィードバック制御を受けており、そのことがクライマクテリックエチレン生成の原因になっているものと思われた.

果実成熟時のエチレン生成量に関する 遺伝子診断法の開発

成熟果実での ACC 合成酵素遺伝子及び ACC 酸化酵素遺伝子の発現解析の結果、品種特異的発現がみられたことから、これら遺伝子のサザン解析を行うことにより、エチレン生成量の差に対応したマーカーが得られないかと考え以下の実験を行った. 3 つの ACC 合成酵素 cDNA (*PPACS1*, 2, 3) の全長断片及び 1 つの ACC 酸化酵素の cDNA (*PPAOX1*) 全長断片をプローブとし、ニホンナシ品種のゲノム DNA の RFLP 解析を行った. ノーザン解析において品種特異的な発現のみられなかった *PPACS3* および *PPAOX1* cDNA をプローブとした場合、品種のエチレン生成量の差に対応したマーカーが得られなかった. 一方、*PPACS1* cDNA をプローブとしゲノム DNA を制限酵素 *HindIII* で消化した場合、エチレン生成量が High level な品種群に特異的な 2.8 kb の DNA マーカー (A) を同定した (Itai ら, 1999). ノーザン解析において、*PPACS1*

の発現がみられた品種は、すべてマーカー (A) を有していた. さらに *PPACS2* をプローブとしゲノム DNA を同様に *HindIII* で消化した場合、エチレン生成量が Moderate level な品種群と一部の High level の品種群 ('二宮', '二宮白梨' など) に特異的な 0.8 kb の DNA マーカー (B) を同定した (Itai ら, 1999). *PPACS1* の場合と同様、ノーザン解析において、*PPACS2* の発現がみられた品種は、す

第 1 表 ニホンナシ品種のエチレン生成量と ACS 遺伝子のマーカー型

品種名	エチレン生成量	マーカー型
赤穂	Moderate	aB
淡雪	High	Ab
天の川	Low	ab
愛宕	Low	ab
長寿	Moderate	aB
長十郎	Moderate	aB
独逸	Moderate	aB
江戸屋	High	Ab
祇園	Moderate	aB
御前梨	High	Ab
伯帝龍	Moderate	aB
北海早生	Moderate	aB
豊水	Low	ab
市原早生	Moderate	aB
今村秋	Low	ab
犬穀	Moderate	aB
君塚早生	Moderate	aB
巾着	Moderate	aB
金平糖	Low	ab
幸水	Moderate	aB
幸蔵	Moderate	aB
新高	Low	ab
二十世紀	Low	ab
二宮	High	AB
二宮白梨	High	AB
大広丸	Moderate	aB
晩六	High	Ab
晩三吉	Low	ab
おさ二十世紀	Low	ab
力弥	High	Ab
六月	High	Ab
類産梨	Low	ab
清玉	Moderate	aB
世界一	Low	ab
真鍮	Moderate	aB
新興	Low	ab
新雪	Low	ab
新水	Moderate	aB
翠星	Moderate	aB
水秀	Moderate	aB
太白	Moderate	aB
多摩	Moderate	aB
早生赤	Low	ab
早生幸蔵	Moderate	aB
八雲	Moderate	aB
横越	Low	ab

第 3 図 ACC 合成酵素アイソフォームの発現とマーカータイプ
そしてエチレン生成量との関係

第4図 *PPACS1* 遺伝子の CAPS 分析

1.57 kb および 0.63 kb のバンドが High level な品種群に特異的であることを示している

第5図 *PPACS2* 遺伝子の CAPS 分析

0.83 kb および 0.35 kb のバンドが Moderate level な品種群に特異的であることを示している

べてマーカー (B) を有していた。両マーカー (A, B) の存在の有無からニホンナシ品種を (AB, Ab, aB, ab) の4つのマーカータイプに分類した (第1表)。ABおよびAbの品種群はエチレン生成量が High level なこと、aBの品種群はエチレン生成量が Moderate level なこと、abの品種群はエチレン生成量が Low level なことを明らかにした (第3図)。本マーカーを用いた遺伝子診断法により、交配した実生果実のエチレン生成量を実生の結実を待たずに判定することが可能になり、結果、エチレン生成量の少ない貯蔵性の良い品種を効率的に選抜できることから、貯蔵性を目的としたニホンナシ新品種育成の効率化に貢献できることを明らかにした。この2つの ACC 合成酵素を用いた RFLP 法は、チュウゴクナシ品種にも適用可能であることがわかっている (Itai ら, 2002)。さらにこの2つの DNA マーカー (A, B) をサンプル量が少なくすみ、迅速・簡便に検出できる PCR マーカーに変換するために、ゲノミク 라이브ラリーをスクリーニングあるいは Inverse PCR 法を用いて、5' 非転写領域を含む配列を解析した。*PPACS1* 発現品種においては、翻訳開始点から約 1.6 kb 上流に *HindIII* 切断サイトがみられるのに対し、非発現品種においては G→A の変異のために *HindIII* 切断

サイトが壊れ、そのことが High level な品種群に特異的な 2.8 kb の DNA マーカー (A) を生じる原因となっていた (Itai ら, 2003b)。一方、*PPACS2* においては、翻訳開始点から約 0.1 kb 下流に発現品種では *HindIII* 切断サイトがみられるのに対し、非発現品種では *PPACS1* の場合と同様に G→A の変異のために *HindIII* 切断サイトが壊れ、そのため Moderate level な品種群に特異的な 0.8 kb の DNA マーカー (B) が生じることが明らかとなった。以上の情報を基に、両マーカーの SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) を検出するために、変異を含む領域を増幅するプライマーを構築し、増幅した断片を *HindIII* で消化する CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 分析法を開発した (第4, 5図) (Itai ら, 2003b)。この CAPS 分析を用いて、両マーカー (A, B) の連鎖解析を行った。解析は「おき二十世紀」(ab) に「慈梨」(AB) を交配して得られた F1 個体のうち自家和性を有しかつマーカー A および B の両方を持つ個体 (OT-16) を自殖した F2 集団を用いた。F2 個体における両マーカーの分離比から、両マーカーは、20.8% の組み換え価で連鎖していることが判明した。

果実成熟エチレン生成に関する 遺伝子型の決定

上述の4つのマーカー型(AB, Ab, aB, ab)のうち, abを示す品種についてはその遺伝子型は *aabb* と決定されるのに対し, ABを示す品種については, *AABB*, *AABb*, *AaBB*, *AaBb* の計4通りの遺伝子型の可能性が, Ab, aBを示す品種についても2通りの遺伝子型の可能性が考えられる. そこで検定交雑を行い, A, B両マーカーの存在の有無から様々なニホンナシ品種のエチレン生成に関する遺伝子型の決定を行った. マーカー型 ab を持つ品種を父親または母親にして検定交雑を行い, 得られた種子を播種して得られた F1 個体の新葉から DNA を抽出した. 上述の CAPS 分析により, 両マーカーの分離比を調べ, 各品種の遺伝子型を決定した. その結果, エチレン生成量が High level でマーカー型 AB の品種では, ‘鴨梨’ が *AABb*, ‘慈梨’ が *AaBB* と決定され, 同じマーカー型でも ‘鴨梨’ が A のホモ接合型, ‘慈梨’ が B のホモ接合型を示した(板井ら, 未発表). ‘二宮’ は A, B それぞれヘテロ接合型の *AaBb* と決定された. マーカー型 Ab の品種では, ‘六月’ が A のホモ接合型の *AAbb*, ‘晩六’ はヘテロ接合型の *Aabb* と決定された. さらにマーカー型 aB でエチレン生成量が Moderate level の品種では ‘幸水’, ‘長十郎’, ‘巾着’, ‘真鍮’などは *aaBb*, ‘新水’は *aaBB* と決定された(板井ら, 未発表). なかでも A あるいは B マーカーをホモで持つ ‘鴨梨’, ‘慈梨’, ‘新水’などの品種は, その後代すべてが High level または Moderate level のエチレン生成を示すと考えられるため, 貯蔵性を目的とした育種を行う場合, これらの品種を育種親として用いるのは不適であると考えられる.

おわりに

現在, ニホンナシ品種の中で, エチレン生成量が低く収穫時期が最も早いのが中生の ‘二十世紀’, ‘豊水’である. 早生品種の中で, エチレン生成量が低く日持ちが良いものは, 見つかっていない. このことは早生であることと, 日持ちが良いことは矛盾する命題であることを示しているかもしれない. しかしながら, ニホンナシ果実の熟期の遺伝に関しては, 量的形質であることが報告されており(阿部ら, 1993), さらなる熟期の前進は可能であると考えている. そこで筆者らは, 現在, 開発したこの遺伝子診断法を用いて, エチレン生成量の少ない日持ちの良い早生品種の育成に取り組んでいる.

引用文献

- 阿部和幸・佐藤義彦・栗原昭夫・壽 和夫. 1993. ニホンナシ果実の熟期の遺伝. 育種. 43: 289–298.
- Abe, K., Y. Sato, T. Saito, A. Kurihara and K. Kotobuki. 1995. Narrow-sense of heritability of fruit characters in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) Breed. Sci. 45: 1–5.
- Banno, K., H. Ishikawa, Y. Hamazu and H. Tabira. 1999. Identification of a RAPD marker linked to the susceptible gene of black spot disease in Japanese pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 476–481.
- Chu, C. L. 1984. Use of internal ethylene concentration as a maturity index of eleven apple cultivars. Acta Hort. 157: 129–134.
- Downs, C. G., C. J. Brady, J. Campbell and W. B. McGlasson. 1991. Normal ripening cultivars of *Pyrus serotina* are either climacteric or non-climacteric. Sci. Hort. 48: 213–221.
- Hansen, E. 1945. Quantitative study of ethylene production in apple varieties. Plant Physiol. 20: 631–635.
- Harada, T., T. Sunako, Y. Wakasa, J. Soejima, T. Satoh and M. Niizeki. 2000. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. Theor. Appl. Genet. 101: 742–746.
- 林 真二・平田尚美・田辺賢二. 1976. ナシ果実成熟のケミカルコントロールに関する研究(第4報)エスレルの前期低濃度散布による熟期促進. 園学要旨. 昭51春. 34–35.
- Iketani, H., K. Abe, T. Yamamoto, K. Kotobuki, Y. Sato, T. Saito, O. Terai, N. Matsuta and T. Hayashi. 2001. Mapping of disease-related genes in Japanese pear using a molecular linkage map with RAPD markers. Breed. Sci. 51: 179–184.
- Itai, A., T. Kawata, K. Tanabe, F. Tamura, M. Uchiyama, M. Tomomitsu and N. Shiraiwa. 1999. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) Mol. Gen. Genet. 261: 42–49.
- Itai, A., K. Tanabe and F. Tamura. 2002. The mechanism of ethylene production during fruit ripening in Asian pears. Acta Hort. 587: 497–504.
- Itai, A., K. Tanabe, F. Tamura, and M. Tomomitsu. 2003a. Cloning and characterization of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (*PPACS3*) from ripening fruit of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 72: 99–106.
- Itai, A., T. Kotaki, K. Tanabe, F. Tamura, D. Kawaguchi, and M. Fukuda. 2003b. Rapid identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase genotypes in cultivars of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using CAPS markers. Theor. Appl. Genet.

- 106:1266–1272.
- Ishimizu, T., K. Inoue, M. Shimonaka, T. Saito, O. Terai and S. Norioka. 1999. PCR-based method for identifying S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 961–967.
- Jackson, J. E. 2003. *Biology of apples and pears.* p.344–348. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 北村利夫・岩田 隆・福島忠昭・古川良茂・石黒運弥. 1981. 果実・野菜の成熟生理と貯蔵に関する研究(第2報)ナシ果実の呼吸量及びエチレン生成量と種間及び品種間差異. *園学雑.* 49: 608–616.
- 町田 裕・小崎 格. 1975. ニホンナシ育種における果実品質の数量的研究(第1報)園学雑. 44: 235–240.
- Sassa, H., H. Hirano, T. Nishio and T. Koba. 1997. Syle-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Plant J.* 12: 223–227.
- Sunako, T., W. Sakuraba, M. Senda, S. Akada, R. Ishikawa, M. Niizeki and T. Harada. 1999. An allele of the ripening specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119: 1297–1303.
- Takasaki, T., K. Okada, C. Castillo, Y. Moriya, T. Saito, Y. Sawamura, N. Norioka, S. Norioka and T. Nakanishi. 2004. Sequence of the S-9-RNase cDNA. and PCR-RFLP system for discriminating S-1- to S-9-Allele in Japanese pear. *Euphytica* 135:157–167.