

氏名(本籍)	ぼん 　　　　　ゆう すけ 伴 　　　　　雄 介 (愛知県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4721 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Mechanisms for Anthocyanin Accumulation in Apple (<i>Malus × domestica</i>) Skin (リンゴ果皮におけるアントシアニン集積機構に関する研究)		
主査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (農学)	森 口 卓 哉
副査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (農学)	山 本 俊 哉
副査	筑波大学准教授 (連係大学院)	理学博士	池 谷 祐 幸
副査	筑波大学教授	農学博士	西 村 繁 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年の地球規模での温暖化は、農業の生産体系に多大な影響を与え始めている。果樹栽培について各県の試験場に対して行われた温暖化に関するアンケートにおいても、果実の着色不良、発芽・開花期の前進、果肉の軟化、凍害の増加などにその影響が現れているとする調査報告書が取りまとめられている。この中でも、果実着色不良を挙げた事例が最も多く、その影響の深刻さがうかがえる。

果実の着色は、リンゴの商品価値を左右する重要な形質の一つである。リンゴの赤い着色は、アントシアニン色素が果皮の細胞に蓄積することによってもたらされる。アントシアニンの合成は適度な低温によって誘導されるため、温暖化によって収穫期が高温になると果皮のアントシアニン合成が減少して着色不良果が増加する可能性が指摘されている。さらに、高温によって果実の着色が不十分である場合、着色が進むまで長く樹に成らせておくため収穫期が遅くなり、収穫時には果実が過熟となるおそれが生じる。このように収穫期の気温は着色などの果実品質に大きな影響を与えることから、今後温暖化が進むとリンゴの栽培適地が北上し、リンゴの主産県が変化する可能性が指摘されている。そこで本研究では、リンゴ果実の着色の要因を分子レベルで解明し、着色不良対応技術の開発に資するために、1) リンゴ果実のアントシアニンによる着色を誘導する MYB 様転写因子の単離と機能解析、並びに 2) リンゴ果実のアントシアニンである cyanidin 3-galactoside の合成に関わると推察された *UDP-glucose 4-epimerase* (UGE) の単離と機能解析を行った。

アントシアニンの生合成では、生合成系酵素遺伝子の上位に位置してこれらの発現制御に関わる MYB 様転写因子の存在が他の植物の研究から知られている。MYB 様転写因子はアントシアニン生合成系酵素遺伝子のプロモーター領域に直接結合することにより転写を制御し、遺伝子発現に影響を与える。リンゴ (*Malus × domestica*) 品種「つがる」の果皮から MYB 様転写因子の保存領域である R2R3 配列を基に縮合プライマーを合成し、RT-PCR と RACE 法により、他の植物で着色を制御する既知の MYB 様転写因子と高い相同性を示す遺伝子 (*MdMYBA*) を単離することに成功した。*MdMYBA* をリンゴ子葉やタバコに導入するとアントシアニン生合成を誘導することが明らかとなった。*MdMYBA* は「つがる」や「紅玉」の成熟果の果皮のみで発現し、「メイポール」の果皮や果肉では発現しないことから、*MdMYBA* の発現は時期・部位・品種に特

異的であった。*MdMYBA* は「つがる」よりも「紅玉」で強く発現し、低温（17℃）や紫外線照射によりその発現が誘導されることなどを明らかにした。また、アントシアニン生合成の一反応を担うアントシアニン合成酵素遺伝子のプロモーターに直接結合することをゲルシフトアッセイによって示した。リンゴの果皮色に関しては、果皮色と強く連鎖する STS マーカー（BC266-STS）が Cheng らにより 1996 年に報告されている。今回、「デリシャス」×ミツバカイドウの F₁ 集団を使って *MdMYBA* のマッピングを行った。*MdMYBA* の 5' 上流と第 2 イントロン部分の配列からプライマーを設計して PCR を行うと、「デリシャス」は 723bp と 656bp の 2 本のバンドをヘテロで持っていたが、ミツバカイドウはこれらのバンドを持っていなかった。F₁ 集団における 723bp または 656bp のバンドを持つ F₁ の数から連鎖関係を調べた結果、*MdMYBA* は「デリシャス」の第 9 連鎖群の下部に座乗し、この近傍に BC266-STS マーカーが存在していた。さらに、Cheng らの A¹ 対立遺伝子は 723bp のバンドに、a¹ 対立遺伝子は 656bp のバンドに対応していた。しかし、a² 対立遺伝子を持つ品種で PCR を行うと A¹ 対立遺伝子と同じ 723bp のバンドが得られ、今回のプライマーの組合せでは両者を区別できなかった。

リンゴの着色には、樹体の窒素、糖などの栄養条件や温度条件を始めとして様々な要因が関与している。紫外線 B 領域（UV-B）もその一つであり、栽培現場では日当たりを良くして着色を向上するために、玉回しや葉摘みなどの栽培管理が行われている。これまでの研究からアントシアニンの生合成に関わる酵素の活性や遺伝子の発現、並びに MYB 様転写因子（*MdMYBA*）遺伝子の発現は、UV-B 照射により高まることが知られている。しかし、アントシアニン生合成系酵素遺伝子や MYB 様転写因子遺伝子以外でリンゴの着色に関わり、しかも UV-B 照射により発現が誘導される遺伝子についてはほとんど知見がない。そこで、このような遺伝子を suppression subtractive hybridization（SSH）により単離することを試みた。48 時間 UV-B 照射した果皮および照射していない対照の果皮から抽出した RNA からサブトラクティブライブラリーを構築し、UV-B 照射にした果皮で発現が高い遺伝子を単離した。既知のアントシアニン生合成系酵素遺伝子を含めて 11 種類の遺伝子が得られたが、その中で低温（17℃）条件によっても発現が誘導される遺伝子は、アントシアニン生合成系酵素遺伝子以外では 5 種類であった。さらに、「つがる」と「紅玉」での発現を調べると、5 種類のうち、1 種類（A10E）のみがアントシアニン含有量の高い「紅玉」で発現が高く、着色と発現パターンが対応していた。A10E は、UDP-glucose と UDP-galactose を可逆的に触媒する UDP-glucose 4-epimerase（UGE）をコードしていた。UDP-galactose はリンゴのアントシアニンである cyanidin 3-galactoside の合成に関わると推察されたため、この遺伝子の全長を RACE 法により単離した（*MdUGE1*）。*MdUGE1* の発現は成熟した果皮で認められ、また、酵素活性もアントシアニンの量の多少と対応していたことから、cyanidin 3-galactoside の基となる UDP-galactose の合成を介してリンゴの着色に関与していると推察された。

本研究により、MYB 様転写因子遺伝子 *MdMYBA* が単離され、その機能解析と遺伝解析からリンゴの着色に重要な役割をはたしていることが明らかとなった。また、SSH により、リンゴから始めて *UGE* 遺伝子（*MdUGE1*）が単離された。*MdUGE1* は cyanidin 3-galactoside の基となる UDP-galactose の供給を介してリンゴの着色に関与していると推察された。本研究により得られた成果は、リンゴのアントシアニン集積機構の分子メカニズムの解明やマーカー化を介してリンゴ着色系統の早期選抜を可能とするとともに、最近急速に発展しているリンゴのゲノム情報、バイオインフォマティクスなどの研究手法を組み合わせることで、より詳細な機構解明に向けた基盤的な成果となるものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、リンゴ果皮におけるアントシアニン集積機構に関する研究で、1) リンゴ果実のアントシアニ

ンによる着色を誘導する MYB 様転写因子遺伝子 (*MdMYBA*) の単離と機能解析, 2) リンゴ果実のアントシアニンである cyanidin 3-galactoside の合成に関わると推察される *UDP-glucose 4-epimerase* (*MdUGE1*) の単離と機能解析を行ったものである。特に, *MdMYBA* については, アントシアニン集積における生理的な機能解明のみならず, 連鎖地図上にマップし, これまで報告されていた果皮色と強く連鎖する STS マーカー (BC266-STs) との関係は初めて明らかにした。一方の *MdUGE1* は, これまで知られていた直接的にアントシアニンの生合成に関わる遺伝子以外で, リンゴの着色に直接的に関与していることが明らかにされた最初の遺伝子である。また, 新規な遺伝子を効果的に単離する方法として, SSH の有効性を実証した点においても高く評価できる。いずれの成果についてもリンゴのアントシアニンの集積機構全体の解明につながるもので, 国際的に評価の高い学術雑誌に掲載されていることからその新規性, 重要性をうかがい知ることができる。さらには得られた知見を基にすることで, 今後のリンゴの着色系統の選抜のための新たなマーカーの構築にもつながる成果である。

よって, 著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。