

氏名	こう りん ちん QIAO-LIN ZHENG
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第381号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Biochemical and molecular-biological studies on ethylene biosynthesis in Japanese persimmon (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) fruit (カキ果実におけるエチレン生成に関する生化学および分子生物学的研究)
学位論文審査委員	(主査) 板村裕之 (副査) 中務明 山内直樹 田邊賢二 細木高志

学位論文の内容の要旨

Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) is one of the important fruit crops and has long cultivation history in Japan. Since ethylene plays an important role in persimmon fruit softening, it is valuable to study ethylene biosynthesis and the characterization of enzymes related to its biosynthesis in persimmon. It has been established that ethylene is biosynthesized from methionine via S-adenosylmethionine (AdoMet) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). ACC synthase (EC 4.4.1.14) and ACC oxidase (EC 1.4.3) are two enzymes involved in the ethylene biosynthetic pathway. In this study, we analyzed the relationships between the ethylene biosynthesis and activities of ACC synthase and ACC oxidase and their gene expression in young intact persimmon fruit, and prolonged 'Saijo' persimmon fruit shelf-life through Ni²⁺ inhibiting ethylene production. Furthermore, we clarified wound-induced ethylene production through inducing ACC synthase activity and *DK-ACSI* gene expression, and the mechanism of wound-induced ethylene biosynthesis in persimmon fruit.

(1) Extraction and characterization of ACC synthase and ACC oxidase from wounded persimmon fruit

ACC synthase and ACC oxidase were extracted from wounded tissue of mature 'Saijo' persimmon fruit by using the polyethylene glycerol (PEG) acetone method and characterized. The optimum pH, concentration of pyridoxal-5-phosphate (PLP) for maximum ACC synthase activity, the K_m for AdoMet, and the half-life in the presence of AdoMet for persimmon ACC synthase were 8.5, 5 μ M, 10 μ M, and 21

min, respectively, whereas, the optimum pH for ACC oxidase was 7.2, the apparent K_m s for the substrate ACC and cofactor Fe^{2+} were 114 μM and 4 μM , respectively. The concentration of cofactor HCO_3^- for maximum activity was approximately 40 mM. The activity of ACC oxidase decreased in a non-linear manner during in vitro incubation, with a half-life of about 9 min; its activity was inhibited by various divalent cations, such as Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Mg^{2+} .

(2) Enzymatic activities and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase in persimmon fruit

Based on succeeding in extraction and assay of ACC synthase and ACC oxidase, we analyzed ethylene biosynthesis in young intact and mature wounded 'Hiratanenashi' persimmon fruit. In young intact fruit, ethylene production was detected 2 days after harvest, and peaked at 4 days. Little ACC content was detected at 1 day; rapidly increasing 4 days after harvest, and peaking at 7 days. *DK-ACS2* strongly expressed during almost all periods after it commenced at 3 days, followed by a rapid increase in ACC synthase activity at 4 days and a peak at 5 days. *DK-ACO1* mRNA accumulation initiated at harvest time, dramatically increased at 2 days; as a result, high ACC oxidase activity was detected at the beginning of harvest, and peaked at 3 days. *DK-ACO1* mRNA accumulation continued during the subsequent days, whereas ACC oxidase activity decreased to a low level.

Wounding treatment induced ethylene biosynthesis and ACC accumulation. The strongest *DK-ACS2* expression was induced 1 day after wounding, followed by the highest ACC synthase activity which paralleled ACC accumulation. Abundant *DK-ACO1* mRNA accumulation and high ACC oxidase activity were observed at the initiation of wounding and remained at high levels during the days that followed.

(3) Effect of 1-MCP on wound-induced ethylene biosynthesis in 'Saijo' persimmon fruit

Mechanical injury is one of the most severe stress for fruit in environment. We already analyzed wounding induced ethylene biosynthesis and enzymatic activity and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase above; later, we furthermore clarified the feedback mechanism of wound-induced ethylene biosynthesis in persimmon fruit. Pretreatment of 1-methylcyclopropene (1-MCP), the inhibitor of ethylene action, increased ethylene production at 48 h after wounding, and caused a maximum 1.8-fold increase in ethylene production, which suggested that wound-induced ethylene production was under a negative feedback regulation by ethylene. Wound-induced ACC content was also enhanced by 1-MCP pretreatment caused by inducing ACC synthase activity and *DK-ACS1* gene expression, indicating that *DK-ACS1* gene expression was negatively regulated by ethylene in wounded mature persimmon fruit. 1-MCP pretreatment had no effect on wound-induced *DK-ACO1* gene expression; whereas, ACC oxidase activity was enhanced by 1-MCP pretreatment at 48 h after wounding, with maximum of activity 1.5-fold higher than that in control wounded tissue at 60 h. It suggested that wound-induced *DK-ACO1* gene expression was independent on ethylene, but its post-transcriptional process was thought to be regulated by ethylene in mature persimmon fruit.

(4) Prolonging shelf-life of 'Saijo' persimmon fruit by spraying nickel ion to the calyx on the tree

'Saijo' persimmon fruit is the main astringent cultivar in Japan; whereas, it is easily softening on a tree during mature period and after harvest with the removal of astringency, which hinders the development and consumption of 'Saijo' persimmon fruit. It has been suggested that ethylene biosynthesis in persimmon was initially induced in calyx by water loss; this ethylene diffused to pulp tissue and acted as a secondary signal to stimulate autocatalytic ethylene biosynthesis in pulp tissues. It means that calyx plays important roles in ethylene biosynthesis in persimmon fruit. Meanwhile, Ni^{2+} could inhibit persimmon ACC oxidase activity by 89% in vivo, and by 75% in vitro, respectively. Based on these studies, to prolong the shelf-life of persimmon fruit, we sprayed 0.1% NiCl_2 solution to fruit calyx on the tree and elucidated the effect of Ni^{2+} on ethylene production, flesh firmness, ACC content, enzymatic activities and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase in detached fruit. In control, ethylene production and ACC content dramatically increased after the removal of astringency with dry-ice, followed by rapid fruit softening, ACC synthase activity and *DK-ACS1* gene expression also rapidly reached peaks at 5 days; whereas, ACC oxidase activity and *DK-ACO1* gene expression were constitutive.

In Ni^{2+} -treated fruit, ethylene production was delayed for 2 days, which effectively inhibited fruit softening and prolonged fruit shelf-life for 2 days, and ACC content was also obviously decreased. Meanwhile, ACC synthase activity and its gene expression (*DK-ACS1*) were delayed for 1 day in Ni^{2+} -treated fruit. However, *DK-ACS2* remained no changes and weakly expressed during the late shelf-life stage in control or Ni^{2+} -treated fruit. ACC oxidase activity showed no inhibition in Ni^{2+} -treated fruit; *DK-ACO1* expression was strongly promoted.

論文審査の結果の要旨

エチレンはカキの軟化に重要な役割を果たすため、エチレン生成とその関連酵素の性質を研究することは重要であり価値のあることである。傷害処理カキ '西条' 果実よりポリエチレングリコール (PEG) アセトン法を用いて 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素と ACC 酸化酵素を抽出し、これらの性質を調査した。カキの ACC 合成酵素活性における最適 pH は 8.5、ACC 合成酵素活性が最大となるピリドキサルリン酸 (PLP) 濃度および S-アデノシルメチオニン (AdoMet) に対する K_m 値はそれぞれ 5 μM および 10 μM 、AdoMet 存在下での ACC 合成酵素活性の半減期は 21 分であった。一方、ACC 酸化酵素の最適 pH は 7.2 であり、基質 ACC と補因子 Fe^{2+} に対する K_m 値はそれぞれ 114 μM および 4 μM であった。ACC 酸化酵素活性が最大となる補因子 HCO_3^- 濃度は 40 mM であった。さらに ACC 酸化酵素活性の半減期は約 9 分であり、in vitro でインキュベート中に非直線的に減少した。また ACC 酸化酵素活性は Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} などの二価の陽イオンによって抑制された。カキにおける ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素の抽出と測定法を確立したため、つづいてカキ '平核無' の無傷の幼果と傷害処理を行った成熟果でエチレン生成を分析した。無傷の幼果では、エチレン生成が採取後 2 日に始まり 4 日でピークに達し

た。ACCは採取後1日にわずかに合成され、4日後非常に速やかに増加した後、7日でピークに達した。*DK-ACS2* 遺伝子は採取後3日に発現した後、ほとんど全期間強く発現した。一方、ACC合成酵素活性は採取後4日に急速に増加した後、5日でピークに達した。*DK-ACO1* mRNAの蓄積は採取時に始まり、2日に急速に増加した。それに伴って、ACC酸化酵素活性は採取時に検出された後、3日でピークに達した。*DK-ACO1* mRNAの蓄積は数日間続いたが、ACC酸化酵素の活性は低いレベルまで減少した。一方、傷害処理ではエチレン生成とACCの蓄積が誘導された。*DK-ACS2* 遺伝子の最も強い発現は傷害処理後2日に誘導された。同時にACC合成酵素の活性が高くなり、ACCが蓄積した。傷害処理初期では、豊富な*DK-ACO1* mRNAの蓄積と高いACC酸化酵素の活性が検出され、その後、高いレベルを維持した。

自然環境下で機械的傷害は最も顕著なストレスの一つである。そこでカキ‘西条’果実の傷害処理によって誘導されるエチレン生成、ACC合成酵素とACC酸化酵素活性およびそれらの遺伝子発現を分析した。さらに、カキ果実の傷害処理によって誘導されるエチレン生成のフィードバック機構を明らかにした。傷害処理後48時間に、エチレン作用阻害剤の1-MCP前処理によりエチレン生成が最大1.8倍に増加したが、これは傷害処理誘導エチレンの生成は、エチレンによってネガティブフィードバック制御されていることを示唆した。1-MCP前処理によって傷害果のACC合成酵素活性と*DK-ACS1* 遺伝子の発現が促進されるためACC含量が高くなった。このことから傷害処理成熟果ではACC合成酵素の活性と*DK-ACS1* 遺伝子の発現は、ネガティブフィードバックに制御されることが示された。1-MCP前処理は*DK-ACO1* 遺伝子の発現に影響を及ぼさないが、傷害処理後48時間の果実で、ACC酸化酵素の活性が、60時間後の対照より1.5倍高くなった。このことから、カキ成熟果実において傷害処理で誘導される*DK-ACO1* 遺伝子の発現はエチレン非依存ではあるが、エチレンが*DK-ACO1* 遺伝子の翻訳後の過程を制御していることが示唆された。

カキ‘西条’は日本の主要な渋柿品種である。しかし、成熟期の樹上軟化や脱渋後の急速な軟化のため、西条柿産業の発展と消費拡大が妨げられている。カキ果実の日持ちの延長のため樹上でへた部に0.1%NiCl₂を噴霧し、採取果のエチレン生成、果肉硬度、ACC含量、ACC合成酵素とACC酸化酵素活性およびそれらの遺伝子発現におけるNi²⁺の効果を検討した。対照では、ドライアイス脱渋後エチレン生成とACC含量が急増し、急速な果実軟化を伴った。ACC合成酵素と*DK-ACS1*の遺伝子発現もまた5日後に急速にピークに達した。また、ACC酸化酵素活性と*DK-ACO1*の遺伝子発現は恒常的であった。一方、Ni²⁺処理果では、エチレン生成が対照より2日遅れたため、2日間の貯蔵性延長が認められた。その間ACC含量が対照より明らかに減少し、ACC合成酵素活性と*DK-ACS1*の遺伝子発現は対照より1日遅れた。しかし、Ni²⁺処理果、対照とも、*DK-ACS2*の遺伝子発現は弱く変化はなかった。Ni²⁺処理によって*DK-ACO1*の遺伝子発現が強く促進されたにもかかわらず、ACC酸化酵素活性には変化が認められた。

このように、本研究はカキ果実におけるエチレン生成の動態を、ACC合成酵素およびACC酸化酵素のカイネテイクスの観点から、生化学的にその性質を明らかにし、さらに、カキ果実の軟化過程におけるそれらの活性変化と、遺伝子発現を解明した。両酵素の生化学的性質は他の一般

的な果樹類と大差がないことが判明したが、カキでは初めて明らかにされた点が高く評価される。また、それらを解明する中で、急速な軟化が問題となるカキ‘西条’の貯蔵性延長のための基礎理論を確立した点も合わせて高く評価される。これらのことから、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。