

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	末廣 優加
審査委員	<p>主査 中務 明 (印)</p> <p>副査 江角 智也 (印)</p> <p>副査 竹村 圭弘 (印)</p> <p>副査 高橋 肇 (印)</p> <p>副査 松本 敏一 (印)</p>
題目	<p>Studies on physiological changes in skin during maturation and characterization of related genes in 'Shine Muscat' (<i>Vitis labruscana</i> Bailey × <i>V. vinifera</i> L.)</p> <p>ブドウ 'シャインマスカット' 果実の成熟に伴う果皮の生理学的変化とその関連遺伝子に関する研究</p>
<p style="text-align: center;">審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>‘シャインマスカット’は、日本で育成された生食用黄緑色系ブドウであり、近年、人気が高い品種の一つである。これまでブドウ果実の成熟に関する研究は着色系品種で多く行われてきたが、黄緑色系の品種は、その見た目から収穫期の判断が難しいなど課題もあり、成熟に関する知見が少ない。さらに、‘シャインマスカット’の栽培では、収穫期直前に果皮褐変が発生し、収穫物の市場価値を大きく下げってしまうことが問題となっている。果実の発育について、植物ホルモンによる生理作用を踏まえて、その成熟生理の理解を深めることは高品質な果実を生産する上で有益な情報となりうる。本研究では、黄緑色系の‘シャインマスカット’果実における果皮褐変の発生と成熟生理に及ぼす植物ホルモンの影響を分子レベルで検討している。</p> <p><b>成熟に伴う果皮の褐変現象「かすり症」の発生</b></p> <p>果皮褐変症は、収穫期直前の成熟ステージにおいて果粒表面に小さな赤褐色の染みが発生する生理障害であり、このメカニズムや原因はよくわかっていない。果粒発育において果皮褐変は満開後80日頃から発生が見られ、その後、成熟とともに褐変する果粒数や褐変部位の増大が見られた。褐変発生にはポリフェノール化合物の蓄積やそれらの酸化反応が関与していると考え、ポリフェノール生合成における重要な酵素であるスチルベン合成酵素 (STS) やカルコン合成酵素 (CHS)、またポリフェノール酸化酵素 (PPO) の遺伝子について、その発現量変化を調査した。褐変が発生した果皮では <i>VvPPO2</i> 遺伝子、<i>VvSTS</i> タイプ B 遺伝子および <i>VvCHS1</i> 遺伝子の発現量が増加し、<i>trans</i>-レスベラトロールやフラボノイドの含量も増加していた。果皮褐変の発生に伴いポリフェノールの生合成および酸化反応が活性化していることが示された。さらに、本研究で新たに同定された <i>VvPPO2</i> 遺伝子の発現量の上昇が褐変発生と一致していたことから、<i>VvPPO2</i> 遺伝子のプロモーター配列の特徴についても考察がなされている。</p>	

果皮褐変の発生との関係性が見出された VvPP02 遺伝子について、そのタンパク質（酵素）の特性評価を実施した。VvPP02 遺伝子の発現ベクターを数種類構築し、大腸菌に組み込み、組み換えタンパク質の発現誘導を行った。N 末端側の葉緑体移行部位をあらかじめ除いたタンパク質を発現するコンストラクト (VvPP02- $\Delta$ N) で、約 60 kDa の組み換えタンパク質を発現、精製することができ、PPO の活性も確認できた。VvPP02- $\Delta$ N は植物細胞の液胞内の pH 値である pH5.0~5.5 で最大活性を示し、界面活性剤の存在下でより高い活性を示すことが確認された。また、モノフェノールの p-クマル酸などよりも、ジフェノールのカフェ酸やメチルカテコールなどに基質特異性があることも確認でき、VvPP02 はジフェノラーゼ活性が高いことが明らかにされた。

### 成熟生理に及ぼす植物ホルモンの影響

水まわり期（満開後 45~50 日）の果房に ABA またはエテホン（エチレン発生剤）を散布処理したところ、その後の果粒成熟において、果皮の *trans*-レスベラトロールやフラボノールなどのポリフェノール含量が高まり、果皮色のくすみや褐変が引き起こされた。ポリフェノール類の蓄積や褐変程度の増大は、ポリフェノールの生合成や酸化関連遺伝子の発現量変化と対応していた。また、褐変した果皮では VvACO2 遺伝子や VvYUC1 遺伝子といったエチレンやオーキシンの生合成に関わる遺伝子の発現が高まっていた。ABA またはエテホンの処理はいずれも果粒成熟を促進したが、遺伝子発現の変化をみると、エテホン処理の方が ABA 処理よりも果粒成熟の生理的变化への影響が大きかった。一方、ABA 処理では果粒サイズが大きくなることや、エチレンの生合成に関わる VvACO3 遺伝子の発現量が特異的に増加することなどの違いも見られた。そのため ABA とエチレンで異なる応答メカニズムを介して、果粒成熟に影響を及ぼしていることが示唆された。

さらに水まわり期の果房にジベレリン酸 (GA) またはサイトカイニン (CK) を散布処理したところ、その後の果粒肥大が促進されたが、糖度上昇が抑制され、果実成熟は遅延した。さらに、果皮のクロロフィルが維持され、果皮褐変の発生が抑えられた。GA または CK の処理により、それぞれのシグナル伝達に関与する VvGIDI 遺伝子や VvCHK 遺伝子の発現量に変化が見られたことから、GA と CK の生理作用のクロストークや共通の遺伝子発現制御機構の存在が示された。また両処理により、果皮において ABA のシグナル伝達に関わる VvPP2Cs 遺伝子の発現量が減少しており、ABA の作用が弱まることで褐変発生が抑えられたものと考察されている。

以上のように、果実成熟のうち、特に果皮の褐変現象と植物ホルモンの作用について、これまでよくわかっていなかった黄緑色系ブドウ‘シャインマスカット’の果実成熟における生理的变化や複雑な生体反応に関する遺伝子の機能を明らかにした。本研究の成果は、黄緑色系ブドウの成熟生理の基礎を理解し、より高品質なブドウを生産するために有益な知見になる。