



遺伝子マーカーを用いた梨果実 の生理障害の発生予察方法

茨城大学農学部生物生産科学科
准教授 井上 栄一

研究の背景

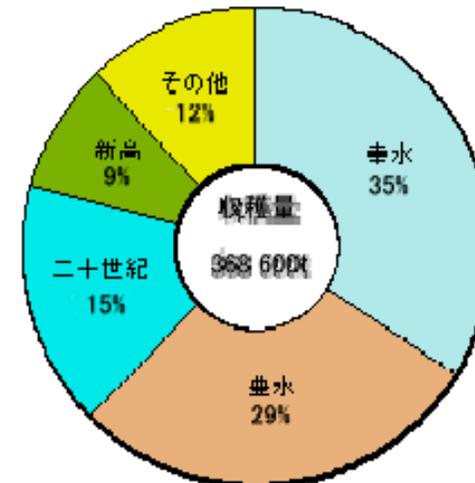
●梨(ニホンナシ)のみつ症状は、果肉が水浸状になり、症状が進むと果肉が褐変し、す入り状となり、特有の香りを放ち、果肉の軟化、貯蔵性の低下を招くため、著しく商品価値が低下する。

●特に我国におけるナシ収穫量の約3割を占める‘なかて’の主要品種‘豊水’において多発し問題となっている。

●このため、みつ症の発生の予測や、対処方法の開発が急務となっている。



品種別収穫量割合



これまでに報告されている、みつ症に関する研究

I. 栽培環境や耕種的要因

- **夏季の低温**によりみつ症状が**助長**される(猪俣ら, 1993)
- **摘果**によりみつ症発生が**助長**される(佐久間ら, 1998)
- **袋掛け**によりみつ症状の発生が**助長**される(猪俣ら, 1999; 佐久間ら, 2000)
- **断根処理**や**過剰施肥**はみつ症発生を**助長**する(佐久間ら, 1996)
- **摘葉**によりみつ症発生が**抑制**される(佐久間ら, 1998)

これまでに報告されている, みつ症に関する研究

Ⅱ. 発生に関連する物質

- **エテホン** 処理によりみつ症発生を**助長**される(猪俣ら, 1993)
- **ジベレリン** 処理によりみつ症発生を**助長**される(猪俣ら, 1993; 佐久間ら, 1995; Tamuraら, 2003)
- **アブシジン酸** 処理によりみつ症状が**助長**される(佐久間ら, 2000)
- **カルシウム** 処理によりみつ症発生を**抑制**される(田中ら, 1992 ;猪俣ら, 1999)

これまでに報告されている, みつ症に関する研究

Ⅲ. 遺伝的要因

- 遺伝形質であり, その感受性には品種間差がある(梶浦ら, 1982)
- 感受性品種間においてもその果実生理は異なる(Tamuraら, 2003)
- **発生に関連する遺伝子の報告はない**

従来技術とその問題点

従来技術:

予防手法

- 「みつ症」の抑制に関わる薬剤(特許)
- 果実袋(特許)の利用

調査手法

- 果実を切断して目視により果実内部を調査する方法
- 光を照射して果実内部の品質を評価する装置(特許)

問題点:

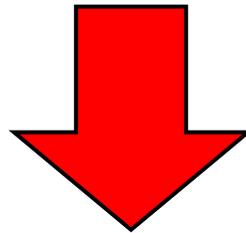
多方面からの基礎研究が行われ、いくつかの特許が申請されているが、**みつ症発生の決定的な原因や関与している遺伝子の情報はつかめていない。**



みつ症の発生を予測または予防することが困難である。

本研究の概要と成果の応用

みつ症発生およびその発達に関与する遺伝子を同定するために、cDNAサブトラクション法により、差時的、特異的に発現している遺伝子を探索した。



- みつ症の発生予察への応用(今回特許)
- みつ症の回避方法への応用

材 料

品 種 : 豊水

収穫日 : 2004年8月19日

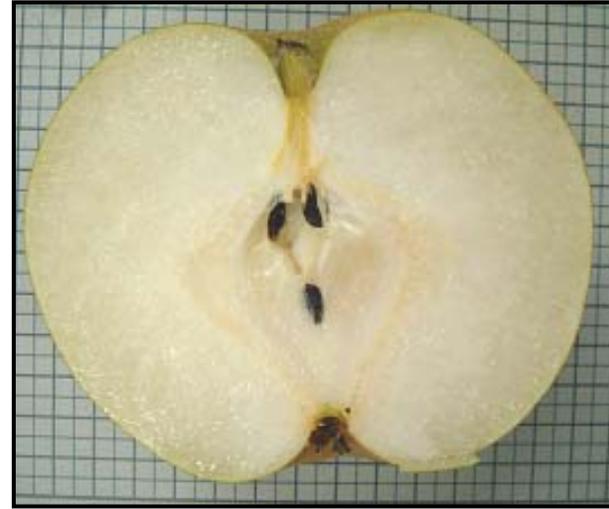
供試組織 : みつ症果 (みつ指数2~3)

健全果 (みつ指数1以下)

みつ指数の評価方法



みつ指数 0



みつ指数 1



みつ指数 2



みつ指数 3

方法

果肉からHot borate法によりTotal RNAを抽出



Poly (A)⁺ RNAに精製



cDNAサブトラクション



選抜したクローンのシーケンシング



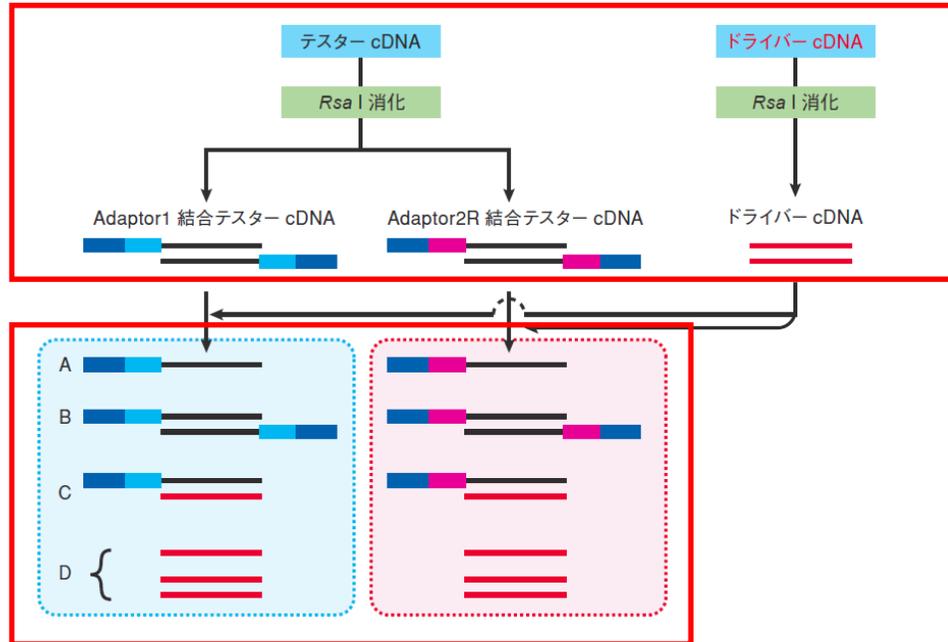
データベース解析による既知遺伝子との相同性の確認



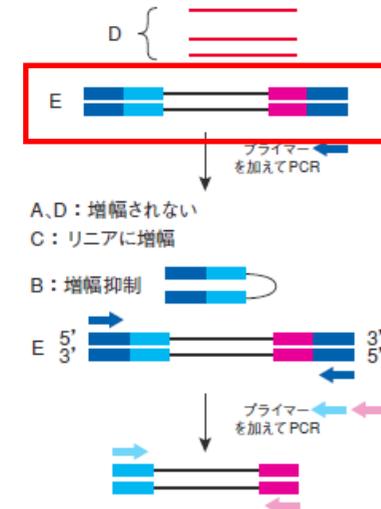
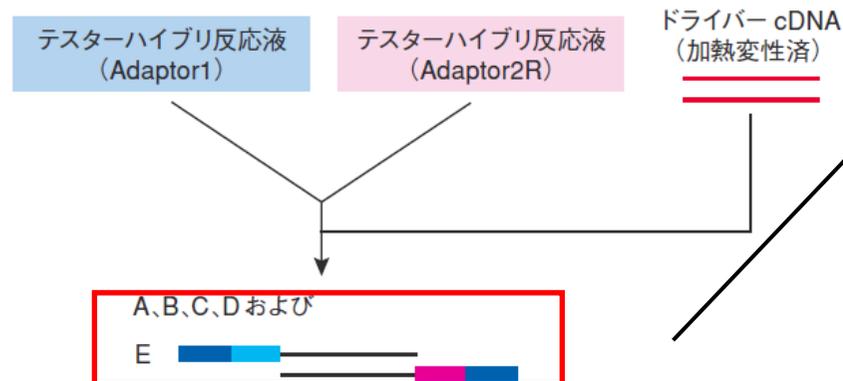
リアルタイムPCRによる果実での発現解析

cDNAサブトラクションとは？

1st ハイブリダイゼーション



2nd ハイブリダイゼーション



cDNAサブトラクションで得られた配列の解析

サブトラクションの 方向	特異性	報告されている配列		未報告の配列
		既知のタンパク質	未知のタンパク質	
フォワード サブトラクション	みつ症組織	2	0	0
リバース サブトラクション	健全組織	9	3	20

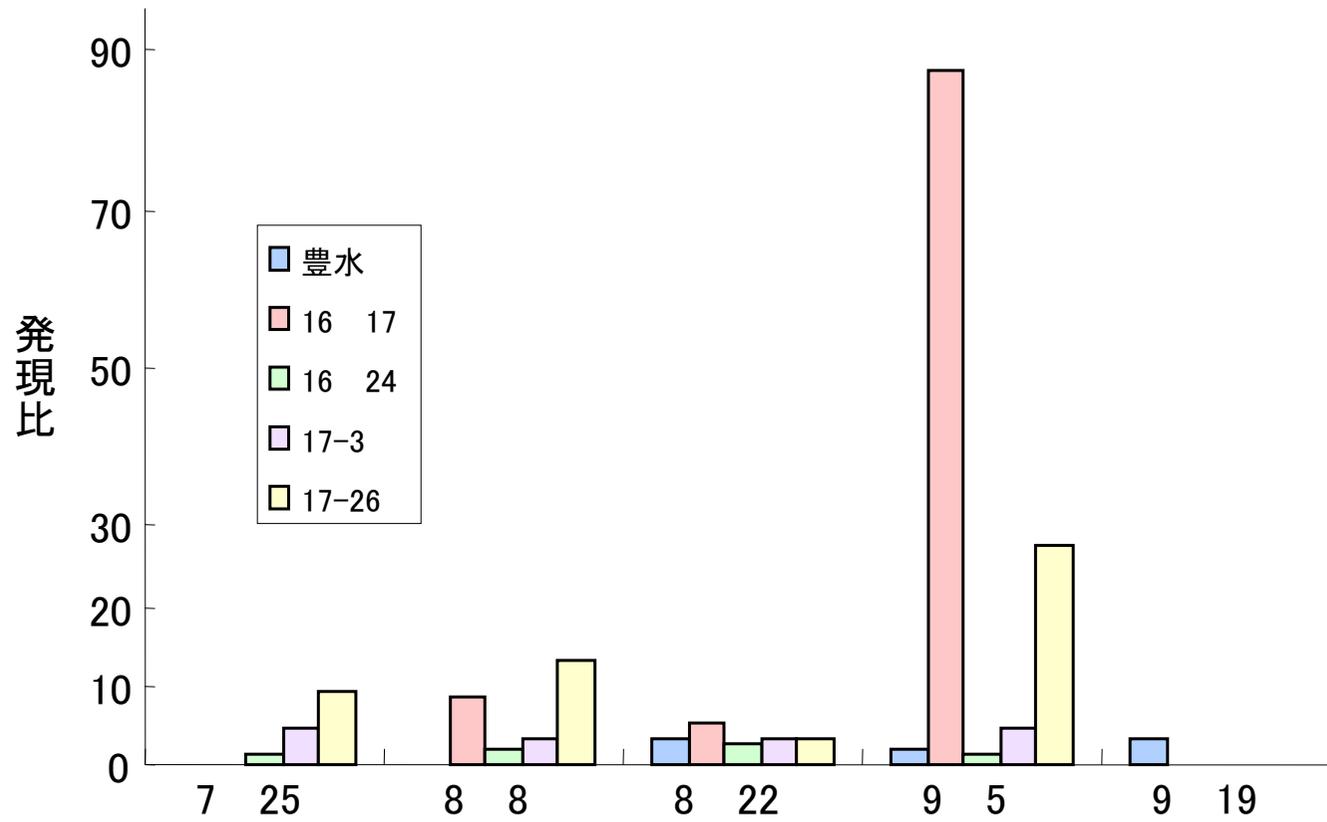
みつ症果実に特異的な遺伝子

相同性が見られた配列	植物種	BLASTN
メタロチオネイン様タンパク質	ニホンナシ	e^{-171}
リンゴ酸加水分解酵素	ブドウ	$9e^{-54}$

健全果実に特異的な配列

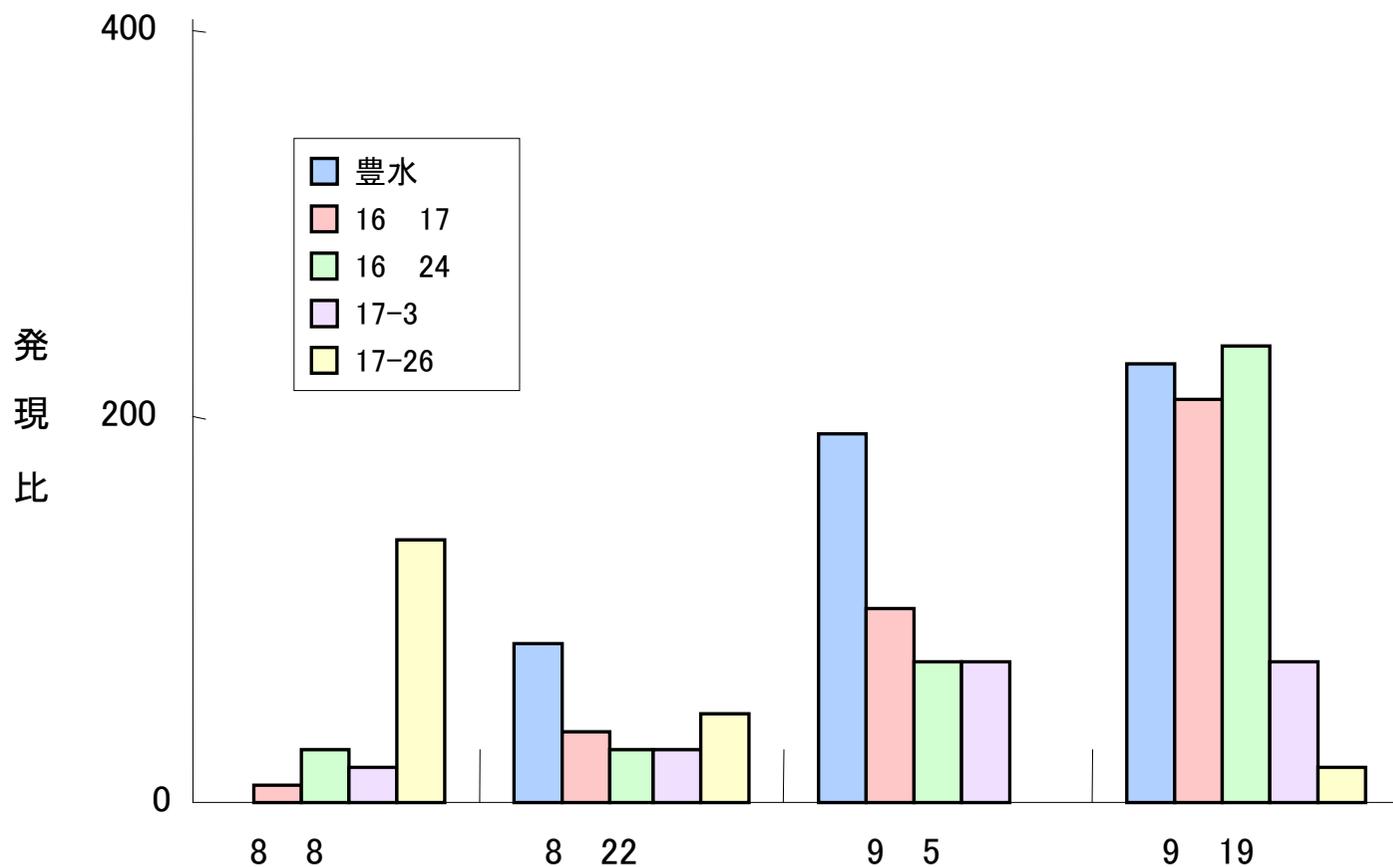
相同性が見られた配列	植物種	BLASTN
アルコールアシル基転移酵素	リンゴ	$4e^{-24}$
アスパラギン酸プロテナーゼ	カカオ	$2e^{-30}$
アスパラギン合成酵素	エンドウマメ	$2e^{-29}$
リブローズ1, 5 2リン酸カルボキシラーゼ スモールサブユニット	チャパラル	$6e^{-13}$
カゼインキナーゼ	シロイヌナズナ	$3e^{-16}$
真核生物由来翻訳開始因子 (eIF5A)	<i>Rosa chinensis</i>	$2e^{-65}$
伸長因子1の α サブユニット	ニホンナシ	$2e^{-52}$
Sec24様 COP II タンパク質	シロイヌナズナ	$4e^{-22}$
液胞関連アネキシン	タバコ	$7e^{-14}$

発育段階の果実におけるメタロチオネイン用タンパク質mRNAの発現



みつ症感受性系統: 16 17(‘豊水’ ‘水’), 17-26(‘豊水’ ‘豊 ’)
 みつ症抵抗性系統: 16 24(‘豊水’ ‘水’), 17-3(‘豊水’ ‘豊 ’)

発育段階の果実におけるアルコールアシル基転移酵素遺伝子の発現



みつ症感受性系統: 16 17(‘豊水’ ‘水’), 17-26(‘豊水’ ‘豊’)
 みつ症抵抗性系統: 16 24(‘豊水’ ‘水’), 17-3(‘豊水’ ‘豊’)

まとめ

- cDNAサブトラクションによりみつ症果実に特異的な2配列，健全組織特異的な32配列を得た.
- みつ症果に特異的な，リンゴ酸加水分解酵素およびメタロチオネイン様タンパク質は，みつ症感受性の品種・系統における発育段階の果実で高い発現を示した.
- これらの遺伝子をマーカーとして，みつ症を予察できる可能性が示された.

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術では予測不可能であった、みつ症の発生予察が可能となる。
- 本技術の適用により、みつ症の発生を予測し、みつ症の発生年では、果実を早期に収穫することによって、みつ症の発生を最低限に抑えて経済的な損失を軽減することができる。
- この方法は、収穫後の果実の品質の診断にも利用できる可能性がある。

想定される用途

- 試験研究機関で利用する**精度の高い発生予察装置**の開発.
- 一般の**梨園**でも利用可能な**簡易診断キット**の開発.
- みつ症の発症を抑える方法の開発.
- みつ症を発症しにくい**抵抗性品種**の開発.

想定される業界

- 想定されるユーザー

 - 農業関連試験研究機関

 - 一般の果樹農家

 - 試験研究機器メーカー

 - 化学農薬メーカー

 - 薬品メーカー

- 想定される市場規模

 - 全国梨栽培農家: 30000戸, 導入費用: 10万円と想定

 - 30億円の市場規模

実用化に向けた課題

- 現在、みつ症に関わる遺伝子を同定済み。しかし、今後、それらの取捨選択と優先順位付けが必要である。
- 今後、実際に収穫前の果実を用いて遺伝子発現に関する実験データを取得し、発生予察に適用していく際の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、遺伝子やタンパク質の発現のレベルを簡便に検出する技術を確立する必要がある。

企業への期待

- 疾病などの簡易検査薬やキットの技術を持つ、企業との共同研究を希望.
- また、農薬を開発中の企業、農業分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる.

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 梨果実のみつ症の発生予察方法および装置
- 出願番号 : 特願2008-74813
- 出願人 : 茨城大学
- 発明者 : 井上栄一

お問い合わせ先

茨城大学共同研究開発センター

知的財産Gr 片上 浩三

TEL 0294-38-7281

FAX 0294-38-5240

e-mail katakami@mx.ibaraki.ac.jp