

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号： 14101  
研究種目： 基盤研究 (B)  
研究期間： 2010 ~ 2012  
課題番号： 22380022  
研究課題名 (和文) 重金属塩によるナシ花柱内リボヌクレアーゼの不活化を利用した単一品種栽培法の確立  
研究課題名 (英文) Establishment of mono-cultivar cultivation in the pear through inactivating stylar RNase by heavy metal-salt application  
研究代表者  
平塚 伸 (HIRATSUKA SHIN)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授  
研究者番号： 10143265

## 研究成果の概要 (和文)：

ナシ花柱の RNase 活性は、1mM 以上の硫酸銅によって強く抑制され、‘幸水’への 2mM 溶液散布は 30%程度の着果を引き起こした。銅イオンを含むボルドー液でも同様な効果があることから、受粉・摘果に要する時間は大幅に削減できた。満開 1 ヶ月後にジベレリン処理を行うことにより、十分な果実肥大と収量が得られて熟期も促進された。Cu<sup>++</sup>による着果は単為結果であり、外生のエチレン合成阻害剤で着果が誘発されたが、Cu<sup>++</sup>によるエチレン合成系の抑制は証明できなかった。

## 研究成果の概要 (英文)：

The stylar RNase activity was lowered to less than 1/3 of control by adding 1 mM CuSO<sub>4</sub>, and enough fruit set was accomplished when 2 mM CuSO<sub>4</sub> was applied to the ‘Kosui’ flower buds. Bordeaux mixture application, a fungicide containing copper ions, also induced fruit set, and thus, the labor time necessary for pollination and fruit thinning was greatly reduced. The gibberellin paste treatment a month after anthesis promoted not only fruit growth but fruit maturation, resulted in enough fruit production. It was suggested that the copper ion does not overcome self-incompatibility of the pear but induce parthenocarpic fruit setting. Although the treatment of an inhibitor for ethylene biosynthesis accelerated fruit set, detectable inhibition of ethylene evolution, ACC synthase and ACC oxidase activities was not found in CuSO<sub>4</sub>-treated flower cluster.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：果樹

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシの自家不和合性は、一遺伝子座の複対立遺伝子系で制御されており、近年の精力的な分子生物学的研究によって、雌側の遺伝子産物は塩基性の RNase (S-RNase) であることが明らかとなった (Sassa et al., 1992; Hiratsuka et al. 1995; Ishumizu et al., 1996). また、不和合花粉管の伸長停止を引き起こすには、その RNase 活性自体が必須であり (Hiratsuka et al., 2001)、海外でのジャガイモを用いた不和合性研究においては、「S-RNase 活性が 1/3 以下になれば植物は和合性となる」とする報告がある (Qin et al., 2006).

一方、Kim ら (2001) は銅 (Cu<sup>++</sup>) や亜鉛 (Zn<sup>++</sup>) を含む塩がトマトの S-RNase 活性を阻害することを発見し、その後これら重金属塩を含むリンゴの自家不和合性打破剤として“アップルプラス”を開発・特許申請した (登録特許 10-0467936, 2005). そこで我々は、この薬剤の効果検証を行ったところ、ナシに対して効果はあるものの実用性には乏しいことが判明した (平塚ら, 2009). そのため、ナシの花柱 RNase 活性抑制を示す重金属塩をスクリーニングした結果、Cu<sup>++</sup>以外に新たに鉄 (Fe<sup>++</sup>) と亜鉛 (Zn<sup>++</sup>) を含む塩が効果のあることを発見し (堀川ら, 2007)、これらが自家受粉したナシに対して“アップルプラス”以上の着果促

進効果のあることを認めた (堀川ら, 2007).

以上の背景に基づき本研究では、1) 重金属塩処理によるナシの単一品種栽培の可能性の検証、2) 重金属塩による RNase 不活性化機構の解明、および、3) RNase 活性阻害による着果誘発の生理学的背景の検討、を目的としたものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ニホンナシの単一品種栽培法の確立である。ナシは、同じ品種の花粉では着果しない自家不和合性を有しており、従来、人手による人工受粉や他品種を受粉樹として混植して着果を確保してきた。しかし、近年のポジティブリスト制導入に伴い、受粉樹も栽培品種と収穫期や栽培条件が同じ品種である必要がある。一方、受粉して着果させた幼果は、なるべく早く除去 (摘果) しなければ食べられる果実は得られない。摘果すべき果実は咲いた花の 95%にも及び、これらの作業は機械化が極めて困難なことから、すべて手作業によって行っている。これらの理由により、果樹類のなかでのナシ栽培の管理労働時間は最も長く、従って労働単価も最も低い作目の一つである。以上の背景と現在あるナシの品種構成を考えると、咲いた花の 10%程度を着果させる単一品種栽培法の確立が最善と考えられる。

本研究の概要は、重金属塩溶液散布によっ

て、自家不和合性を雌側で制御している RNA 分解酵素 (RNase) の活性抑制を行い、部分的に自家不和合性を打破して 10% の着果を確保しようとするものである。

### 3. 研究の方法

まず、着果誘発に対する  $\text{CuSO}_4$  溶液処理の最適濃度、および、蕾の最適発育ステージを決定する。次に、圃場に開花前の無受粉ナシ樹を準備し、網室を作って昆虫飛来を完全防衛した圃場実験を行う。ここでは、 $\text{CuSO}_4$  溶液散布時間と人工受粉作業時間の比較を算出する。さらに、 $\text{CuSO}_4$  処理樹と人工受粉樹の摘果時間を比較し、 $\text{CuSO}_4$  処理栽培による労力的アドバンテージを明らかにする。なお、 $\text{Cu}^{++}$  の代わりに  $\text{Cu}^{++}$  を含む殺菌剤であるボルドー液の効果も検証し、開花前の病害防除と着果誘発を併せた栽培体系の確立も模索する。最後に、収穫期における単位面積当たりの収量と果実品質を調査し、単一品種栽培法に対する最終的評価を下す。この方法で果実肥大等の品質面で劣ることが明らかとなった場合、摘果後に幼果にジベレリン等のホルモン剤処理を施す。これらの処理を行ったとしても、労働時間的には従来の人工受粉・摘果栽培と比較して数段の軽減となるとともに、熟期が促進されて早期収穫が可能となる。

一方、1)  $\text{Cu}^{++}$  は RNase と結合して不活化するのか、2) 不活化は一時的なのか、3) 一時的とするなら、回復後の活性の程度や分子構造 (分子量, pI 等) に変化はあるのか、4) 不活化に必要な環境条件 (緩衝液の種類・濃度, 温度, 添加塩類の種類など) は何か、5)  $\text{Fe}^{++}$  による不活化はどんな RNase (エンドタイプ・エキソタイプ, 塩基識別タイプ, 高次構造認識タイプなど) に生じるのか、などの重金属が RNase 活性を阻害するための諸条件を明らかにする。

$\text{Cu}^{++}$  による着果誘発機構は、 $\text{Cu}^{++}$  処理後の

1) 雌蕊における花粉管伸長とエチレン生成活性, 2) RNase 活性抑制とエチレン生成活性, について調査し、その後の離層発達プロセスとの関連性を明確にする。

### 4. 研究成果

ナシ花柱の RNase 活性は 1mM 以上の硫酸銅や硫酸亜鉛によって 1/3 以下まで不活化され、‘幸水’ ナシの蕾 (開花 8~6 日前) への 1~2mM の溶液散布によって、高い着果率が得られた。 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  や  $\text{K}_2\text{SO}_4$  溶液散布によって着果が誘起されなかったことより、着果誘起するのはカチオンであり、銅イオンを含むボルドー散布でも同様な効果が確認された。従って、ボルドー殺菌剤を開花 8~6 日前に散布することにより、薬散・受粉・摘果に要する時間は従来の 1/3 以下となることが明らかとなった。但し、得られた果実は小さなものが多かったため、満開 1 ヶ月後に果梗にジベレリン処理を行った。その結果、受粉区と同程度の果実肥大と収量が得られて熟期も促進され、従来の栽培法に比べて 1.5 倍の収益増になるとの試算を得た。

$\text{Cu}^{++}$  などの重金属イオンが、どのようなメカニズムで RNase 活性を抑制しているかは不明である。 $\text{Cu}^{++}$  は RNase A, S および  $T_1$  を、 $\text{Fe}^{++}$  は RNase A, S, B および  $T_1$  を抑制することが確認された。また、 $\text{Cu}^{++}$  と花柱タンパク質は分子振るいカラムで容易に分離されること、 $\text{Cu}^{++}$  と花柱タンパク質混合溶液から硫酸沈殿によって単離したタンパク質の RNase 活性が回復することから、金属イオンは RNase と強固に結合することなく、溶液中でその三次構造 (水素結合やスタッキング構造) に作用しているものと推察された。

花柱内の花粉管伸長と収穫果中の完全種子数調査により、重金属イオンは不和合性打破ではなく単為結果により着果誘発する

ことが明らかとなった。重金属塩処理後の花そうと花台からのエチレン放出、それら器官中の ACC 合成酵素・酸化酵素活性を調査した結果、重金属イオンはエチレン生成系を抑制していなかった。但し、外生エチレンは落果を誘発し、エチレン合成阻害剤 (AVG) は落果を遅延させたことより、重金属イオンがエチレン生成を抑制する可能性は否定できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hiratsuka, S., M. Fujimura, T. Hayashida, Y. Nishikawa, K. Nada. (2012). Pollen factors controlling self-incompatibility strength in Japanese pear. *Sex. Plant Reprod.* 25: 347-352. (査読あり)

DOI: 10.1007/s00497-012-0202-7

[学会発表] (計 8 件)

- ① 林田大志, 三井友宏, 伊藤寿, 名田和義, 平塚 伸. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 62 報) ボルドー処理によるハウス ‘幸水’ の無受粉・無摘果栽培の検討. 園芸学研究 12 (別 1) : 55. (2013 年 3 月 23 日, 東京農工大学)
- ② 林田大志, 馬場史至, 名田和義, 平塚 伸. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 61 報) ‘幸水’ 花そうへの重金属塩処理がエチレン発生に及ぼす影響. 園芸学研究 11 (別 2) : 97. (2012 年 9 月 23 日, 福井県立大学).
- ③ 平塚 伸, 藤村 誠, 伊藤七重, 中嶋香織, 名田和義. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 60 報) 自家不和合性の品種間差には花粉プロテアーゼが関与する. 園芸学研究 11 (別 2) : 96. (2012 年 9 月 23 日, 福井県立大学).

- ④ 林田大志, 前川豊孝, 名田和義, 平塚 伸. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 59 報) ボルドー処理による ‘幸水’ の無受粉・無摘果栽培の検討. 園芸学研究 11 (別 1) : 44. (2012 年 3 月 29 日, 大阪府立大学)

- ⑤ 林田大志, 前川豊孝, 名田和義, 平塚 伸. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 58 報) 重金属塩処理による ‘幸水’ の無受粉・無摘果栽培に向けた数種の試み. 園芸学研究 10 (別 2) : 82. (2011 年 9 月 25 日, 岡山大学)

- ⑥ 平塚 伸, 藤村 誠, 西川 豊, 名田和義. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 57 報) 自家不和合性の強さを制御する花粉要因の証明. 園芸学研究 10 (別 2) : 81. (2011 年 9 月 25 日, 岡山大学)

- ⑦ 林田大志, 前川豊孝, 名田和義, 平塚 伸. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 56 報) 重金属塩処理による ‘幸水’ の無受粉・無摘果栽培の試み. 園芸学研究 10 (別 1) : 77. (2011 年 3 月 21 日, 宇都宮大学)

- ⑧ 平塚 伸, 堀川晃宏, 名田和義. ニホンナシの自家不和合性に関する研究. (第 55 報) 重金属塩処理による ‘幸水’ の着果促進と花柱 RNase 活性阻害. 園芸学研究 10 (別 1) : 76. (2011 年 3 月 21 日, 宇都宮大学)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平塚 伸 (HIRATSUKA SHIN)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・教授  
研究者番号: 10143265