

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07595

研究課題名(和文) 香りナシ育種の展開を目指した香気関連遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of flavor related genes to select the new Japanese pear cultivar with rich fruit flavor

研究代表者

片山 寛則 (KATAYAMA, HIRONORI)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50294202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：香りを持つニホンナシ栽培品種の育成にむけて、香り豊かなイワテヤマナシ「ナツナシ」とニホンナシ「幸水」との交配F1集団を用いて香気に関連する量的遺伝子座(QTL)の決定と候補遺伝子の同定を目指した。「ナツナシ」、「幸水」のSSRマーカーからなる連鎖地図を作成し、13種類の香気成分のQTLが「ナツナシ」の第2,9連鎖群(LG2,9)に複数年検出された。最も効果が大きい「ナツナシ」のLG2には9種類のエチルエステルのQTLが検出され、近傍の選抜SSRマーカーを決定した。またエステル合成関連候補遺伝子AAT1がLG2にマッピングされた。これらは香りナシ選抜マーカーとしての利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実の香りは消費者の購買意欲に直結する重要な農業形質である。ニホンナシはジューシーで甘く、日本を代表する果物の一つである。しかし香りに関してはセイヨウナシや一部のチュウゴクナシほどの特徴を持っていない。香りを持つニホンナシ栽培品種の育成にむけて、未利用遺伝資源である香り豊かなイワテヤマナシ「ナツナシ」とニホンナシ「幸水」との種間交配集団を用いて香気に関連する量的遺伝子座(QTL)の決定と候補遺伝子の同定を行った。本研究結果により香りを持つニホンナシ育種におけるDNAマーカー選抜が可能となり、かつナシ属の香気関連遺伝子の発現制御メカニズムを解明するための基盤情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The fruit flavor has an important influence on the consumer acceptance of fruits. The improvement of fruit flavor of Japanese pear is one of the important breeding program. To enhance flavor Japanese pear breeding via marker assisted selection (MAS), QTLs in the pear genome regions controlling flavor compounds were identified with F1 individuals derived from an interspecific cross between Japanese pear 'Kosui' and Iwateyamanashi 'Natusunashi'. Eighteen significant QTLs for 17 volatile compounds were revealed at LG2 and LG9 on linkage map of 'Natsunashi' for 2 years. Two MAS markers linked to 9 QTLs on LG2 in 'Natsunashi' were selected in the present study. Since previous reports of AAT1 gene encoding alcohol acyl transferase located on LG2 in apple, AAT1 genes from 'Kosui' and 'Natusunashi' were mapped on LG2 in linkage maps. These mapped genes and markers are expected for the utilization as MAS marker to select the new Japanese pear cultivar with rich fruit flavor.

研究分野：植物遺伝資源開発学

キーワード：香気関連QTL DNAマーカー選抜 エステル合成関連遺伝子 AAT遺伝子 ニホンナシ イワテヤマナシ 連鎖地図 ナツナシ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシは多くの有用形質を持っていた二十世紀を育種母本に多用しすぎたことでニホンナシ品種群の遺伝的多様性が低下している。ニホンナシの遺伝的多様性の拡大と持続的な新品种の育成のためには、育種母本として新規遺伝資源の利用が不可欠であり、未使用の在来種や野生種の利用が望まれている。

果実の香りは消費者の購買意欲を直接刺激することから注目されている。リンゴ、セイヨウナシ、ニホンナシなどの代表的な栽培品種を用いた香氣成分の化学分析は比較的研究され、主要香氣成分が同定されており合成、天然香料として食品や香水にも利用されている。申請者は豊かな果実香氣を有しながら未利用遺伝資源であるイワテヤマナシの香氣成分に注目し、官能評価により約 30 個体を選抜した。これらはリンゴ、スモモ、モモ、セイヨウナシに似た香りの個体もあれば、全く新規の香りを放つものも見つかり、驚くべき多様性を持つことが明らかとなった。なかでも最もフルーティーで爽やかな香りが強いイワテヤマナシ由来の在来品種「ナツナシ」はエチル・メチルエステル類が極端に多いことが明らかになった（参考文献 1）。そこで「ナツナシ」が持つ香りを香りの少ないニホンナシ「幸水」に導入することを目的として「幸水」×「ナツナシ」の種間交配 F1 集団 65 個体を養成した。これらの交配集団を用いて「幸水」、「ナツナシ」の DNA マーカーによる連鎖地図の作成と、香氣成分に関連した量的遺伝子座位の決定、DNA マーカー育種を行うための香氣 QTL に連鎖したマーカー選抜による香り豊かなニホンナシ育種の基盤的データの蓄積が必要と考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、香りナシの育成に向けて、未利用遺伝資源であるイワテヤマナシを活用する試みである。ニホンナシにはなく、イワテヤマナシが持つ有用形質の一つである果実の香氣成分合成系の分子メカニズムを明らかにする。イワテヤマナシとニホンナシの交配 F1 集団を用いて骨格連鎖地図を作成し、香氣に関連する量的遺伝子座 (QTL) を同定、香氣関連遺伝子群の分子メカニズムに関する基礎的な知見を得る。また香氣関連遺伝子座に連鎖した選抜マーカーを開発、育種利用 (MAS) することで香りナシ育種年限の短縮を図る。本研究によりイワテヤマナシやニホンナシの香氣関連遺伝子情報の取得が期待でき、香りナシ(香りを持つニホンナシ)育成の基盤技術となる。

3. 研究の方法

(1) 「幸水」および「ナツナシ」の骨格連鎖地図の構築

「幸水」×「ナツナシ」の F1 世代の 65 系統を用いて研究協力者の農研機構果樹研究所山本俊哉氏の協力のもと、ニホンナシ「豊水」およびセイヨウナシ「ラ・フランス」、リンゴ由来の SSR マーカー 200 種類についてフラグメント解析により多型を検出し連鎖解析を行い「幸水」および「ナツナシ」の骨格連鎖地図を構築する。他殖性植物であるサクラソウの連鎖地図の作成と QTL 解析に習熟している研究分担者の吉田助教からも指導を受ける。

(2) ヘッドスペース法 (HS) による F1 集団からの香氣成分分析

ガスクロマトグラフ (GC-FID、GC-MS) 分析により上記の香氣成分の定量を「幸水」、「ナツナシ」、F1 集団で行う。定量は年時間差を考慮して 2 ヶ年データを取得する。ダイナミックヘッドスペース法により発散香氣を捕集して申請者がすでにイワテヤマナシの主要香氣成分と決定済みのエチル・メチルエステル、アルコール類の 11 成分 (Katayama et al. 2013) とその他、ニホンナシの主要香氣成分であるアルデヒド類等の関連香氣成分を同定、定量し、量的形質遺伝子座 (QTL) の決定を行う。

(3) 「ナツナシ」、「幸水」の AAT 遺伝子の単離、同定とマッピング

リンゴではエステル合成酵素の AAT (Alcohol acetyl transferase) 遺伝子が単離されている。17 種類の AAT 遺伝子がゲノム中に確認されておりマルチジェンファミリーを形成しており、遺伝子間の相同性が 95% 以上と高い。そこで今回はリンゴの AAT 遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを作成して「ナツナシ」、「幸水」由来の PCR 産物のクローニングを行う。塩基配列を決め SNP や In/del 多型を検出してマーカー化する。これらの多型に基づき AAT 遺伝子を「ナツナシ」、「幸水」の連鎖地図上にマッピングして QTL が確認された遺伝子座に対応づける。

(4) 香氣関連遺伝子座に連鎖した選抜マーカー (MAS) の開発

香氣成分に関連した量的遺伝子座に連鎖した DNA 選抜マーカーを開発する。F1 分離世代の果実の芳香は系統間で大きく異なり、香氣成分の量比も多様である。香氣成分合成関連遺伝子がゲノム中に多数存在することからその組み合わせ次第で香氣の質、強さに大きな差異が生じていると予想される。そこで効果の大きい遺伝子座に連鎖した DNA マーカーを中心に開発し、F1 集団でジェノタイプングすることで MAS マーカーとしての有効性を検証する。

4. 研究成果

イワテヤマナシの在来品種「ナツナシ」とニホンナシ栽培品種「幸水」の種間交雑 F1 集団 65 個体を用いてナシおよびリンゴ由来の SSR マーカーによる骨格連鎖地図を作成した。「幸水」

<引用文献>

①Katayama, H., Ohe, M., Sugawara, E. Diversity of odor- active compounds from local cultivars and wild accessions of Iwateyamanashi (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) revealed by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *Breeding Science*, 63, 2013, Vol.1, 86-95

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① 片山 寛則、新規ナシ遺伝資源としてのイワテヤマナシ～保全と利用の両立を目指して～、作物研究、査読有、64巻、2019、1-9
DOI 10.18964/jcr.64.0_1
- ② 高田 惲帆、片山 寛則、村元 隆行、早生、中生、および晩生のイワテヤマナシの果汁への浸漬が牛肉の硬さに及ぼす影響、日本畜産学会報、査読有、90巻、2019、147-151
DOI 10.2508/chikusan.90.147
- ③ 片山 寛則、日本に自生する香りナシ (梨) 遺伝資源のイワテヤマナシ、香料、査読無、279巻、2018、59-64
- ④ Katayama, H., H. Amo, T. Wuyun, C. Uematsu and H. Iketani Genetic structure and diversity of the wild Ussurian pear in East Asia, *Breed. Sci.*, 査読有, Vol.66, 2016, 90-99
DOI 10.1270/jsbbs.66.90
- ⑤ 手塚 咲、片山 寛則、渡邊 学、村元 隆行、異なる品種のイワテヤマナシ果汁に浸漬させた日本短角種牛肉の理化学的特性、日本畜産学会報、査読有、87巻、2016、149-155
DOI 10.2508/chikusan.87.149
- ⑥ 手塚 咲・柴 伸弥・片山 寛則・渡邊 学・村元 隆行、浸漬液の違いが日本短角種牛肉のコラーゲン性状および酸化に及ぼす影響、日本畜産学会報、査読有、87巻、2016、157-163
DOI 10.2508/chikusan.87.157

[学会発表] (計7件)

- ① 岸本 祐子、関本 陽介、保坂 ふみ子、上野 真奈、山本 俊哉、吉田 康子、齋藤 寿広、名田 麻希子、片山 寛則、ナツナシにおいて香氣成分の QTL を示した領域への AAT (alcohol acyl transferase) 遺伝子のマッピング、園芸学研究、2019、第18巻別1、p40
- ② 大橋 亮太、布山 郁恵、齋藤 寿広、金沢 功、藤井 美穂、山本 俊哉、片山 寛則、官能評価・機器分析によるニホンナシおよびナシ遺伝資源の果実香氣特性プロファイリング、園芸学研究、2019、第18巻別1、p289
- ③ 片山 寛則、特別講演：「新規ナシ遺伝資源としてのイワテヤマナシ」～保全と利用の両立を目指して～、近畿作物・育種研究会、2018、第185回例会
- ④ 上野 真奈、関本 陽介、野村 啓一、吉田 康子、保坂 ふみ子、山本 俊哉、齋藤 寿広、片山 寛則、‘幸水’とイワテヤマナシの交雑集団を用いた果実形質に関する QTL 解析、園芸学研究、2018、第17巻別1、p293.
- ⑤ 布山 郁恵、齋藤 寿広、金沢 功、藤井 美穂、山本 俊哉、片山 寛則、官能評価・機器分析によるニホンナシおよびイワテヤマナシの果実香氣評価、園芸学研究、2017、第16巻別2、p363
- ⑥ 関本 陽介、山本 俊哉、保坂 ふみ子、吉田 康子、齋藤 寿広、片山 寛則、‘幸水’×‘ナツナシ’交雑集団を用いた果実由来揮発性成分の QTL 解析、園芸学研究、2017、第16巻別1、p39
- ⑦ 関本 陽介、山本 俊哉、保坂 ふみ子、吉田 康子、片山 寛則、イワテヤマナシとニホンナシの交雑集団を用いたナツナシと‘幸水’の骨格連鎖地図の作成、育種学研究、2016、第18巻別2、p225

[図書] (計1件)

- ① 片山 寛則、耕作放棄地でできる野生梨のジャムやシロップ。 “エシカルな農業”、伊藤一幸編、誠文堂新光社、2016、東京、pp.28-44

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~hkata/index.htm>

http://www.edu.kobe-u.ac.jp/ans-foodres/b_03_edu_03.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉田 康子

ローマ字氏名：YOSHIDA, YASUKO

所属研究機関名：神戸大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号（8 桁）：50582657

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山本 俊哉

ローマ字氏名：YAMAMOTO, TOSHIYA

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。