

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 13 日現在

機関番号：23805

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05517

研究課題名(和文) 環境に対応したMYBアレルの転写制御によるリンゴの着色機構

研究課題名(英文) Apple skin coloration by the transcriptional regulation of MYB alleles corresponding to environment

研究代表者

森口 卓哉 (Moriguchi, Takaya)

静岡県立農林環境専門職大学・生産環境経営学部・教授

研究者番号：80343945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴの着色に関わるMYBアレルのうち、機能がないアレルが、袋掛け処理で機能を有することが明らかになった。そこで、1)機能がないMYBアレルが袋掛け処理で転写誘導されるか、2)‘陸奥’での着色を可能とする(不活化が解除される)最短の袋掛けの期間について、3)他の青品種での袋掛けにより着色の可能性について調べた。結果として、1)袋掛けにより、転写されることを再確認した。2)‘陸奥’での慣行栽培より10日ほど早く徐袋しても十分に着色すること、3)品種間差はあるものの他の‘王林’、‘弘大-みさき’、‘印度’等では、袋掛けにより着色させることが可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本来は機能のないリンゴの着色にかかわるMYBアレルが、袋掛け処理でエピジェネティックな制御により機能を有するようになることが明らかになった。また、‘陸奥’以外の青い果皮のリンゴ品種においても、袋掛けにより果皮を赤く着色させることが可能になることが明らかとなった。そのため、青リンゴ品種に対して、袋掛け処理をすることで、同じ品種であっても2種類の果皮色を有するリンゴを生産することが可能となり、付加価値をつけて消費者にPRすることも可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Paper-bagging of apple fruit improves red pigmentation. Our previous study showed that paper-bagging treatment stimulated de novo anthocyanin synthesis of yellow/green apple via epigenetic change of non-transcription MdmMYB1 alleles. We aimed to clarify the biochemical aspect of red pigmentation by epigenetic change, DNA methylation. It was found that non-functional MYB alleles can be transcribed by paper-bagging treatment. Our results also suggested that paper-bagging treatment for at least 118 days including small paper treatment was sufficient for good red pigmentation in ‘Mutsu’, which was about 10 days earlier than the conventional cultivation (128 days). Except for ‘Mutsu’, other non-red type cultivars such as ‘Orin’, ‘Hirodai-Misaki’, ‘Indo’ and ‘Toki’ showed the red pigmentation by paper-bagging treatment, but ‘Golden Delicious’ and ‘Shinai-Gold’ tended to be difficult to induce red pigmentation by paper-bagging treatment.

研究分野：園芸

キーワード：リンゴ果皮色 MYBアレル 発現制御

1. 研究開始当初の背景

リンゴでは MYB 様転写因子 (MYB) の MYB1-1 アレルの転写が成熟期前に誘導されて、下流のアントシアニン合成に関わる遺伝子群を活性化して赤く着色するに至るが、リンゴの着色に関わる MYB アレルのうち、従来、機能がないとされたアレル (MYB1-2、1-3 および 1-4) が、袋掛け処理という特別な環境下で機能を有することが明らかになり、青色リンゴ「陸奥」を用いて、消費ニーズに対応した 2~4 色 (緑、赤、白、黄) の果皮色を持ったリンゴ生産が可能となった。機能がなく MYB アレルは、リンゴ組織内では不活化されており、袋掛け処理で不活化が解除されると推察されるが、機能がなくとされてきた MYB アレルが、本来、機能を有するかについては証明されていない。また、着色を可能とする (不活化が解除される) 最短の袋掛けの期間についても明らかとなっていない。

そのためには、次の 3 点の問いを明らかにすることが必要となる。

- ① MYB1-2 や MYB1-3 はそもそも機能があるのか、単離した遺伝子を 35S プロモーター下でタバコ等に導入して確かめる。
- ② 無袋栽培時では、MYB1-1 はメチル化されずに転写され、MYB1-2 や MYB1-3 はメチル化されているのかを確かめる。
- ③ 「陸奥」の MYB1-2 や MYB1-3 の転写誘導には、どれくらいの期間の袋掛けが必要なのか。また、MYB1-1 を持たない「陸奥」以外の品種も袋掛け処理で着色するのかを確かめる。

2. 研究の目的

本提案の目的は上記の①~③を通じて、「陸奥」およびそれ以外の青色リンゴを用いて、2 色~4 色 (緑、赤、白、黄) のリンゴ生産を可能とすることを目的とするともに、除袋が可能となる最短の袋掛け処理期間を明らかにして、栽培管理作業の競合を避けた労働力の均一化や分散化を目的とする。

3. 研究の方法

問い①：無袋栽培 (着色しない状態) の「陸奥」の果皮から、MYB1-2 および MYB1-3 を単離し、タバコ等で過剰発現させて着色が誘導されるかを確認する。

問い②：無袋栽培条件と袋掛け条件で栽培した「陸奥」を用い、着色時に転写されてくるのはもっぱら MYB1-1 であることをシーケンシングにより直接に確かめる。また、「」より DNA を抽出し、メチル化感受性酵素で切断し MYB 上流配列を基に作成したプライマーにて MYB の DNA 領域の PCR を繰り返す。メチル化されていないと切断されるため、その部分を挟むプライマーによる PCR では増幅しない。メチル化を受けているとメチル化感受性制限酵素で切断されないため PCR で増幅する。この実験から、無袋条件の「陸奥」の MYB はメチル化を受けていない (あるいは程度が低い) と想定しているため増幅せず (増幅しても僅か)、一方、袋掛けした「陸奥」ではメチル化によりメチル化感受性制限酵素で切断されないため、PCR で増幅することを期待している。

問い③：「陸奥」を用いて慣行法に準拠して、収穫 (10 月下旬) した果実を対照区とする。通常なら収穫前 1 カ月の 10 月上旬頃に三重袋を外すが、10 月上旬から、順次、約 15~20 日ごとに (9 月中旬、上旬、8 月中旬、上旬、7 月中旬、上旬、6 月下旬) 除袋の時期を前倒しし、最短で小袋掛け後 1 カ月 (6 月下旬の小袋掛けのみで三重大袋を掛けず) まで除袋する時期を早めて、着色するに要する最低限の袋掛け処理期間を明らかにする。処理した果実のアントシアニン量を測定するとともに、品質評価 (糖・酸量測定) や MYB とその下流で着色に関わるアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子等の発現を定量 PCR にて解析する。さらに、R3 年度の結果をもとに、袋掛け処理の時期の最適化を行いながら、「陸奥」以外の着色しないリンゴ、「王林」や「金星」等、数品種について、「陸奥」をベースに、品種に準じた袋掛け処理を行い、着色程度について明らかにする。

4. 研究成果

問い①：本来機能が無いとされる MYB1 のアレル (MYB1-2/1-3) が実際に袋掛け処理により転写されるかを証明すべく、ベクターの構築などを試みたが、うまくいかなかった。

問い②：機能がなくとされる MYB について、35S プロモーター下でドライブしてタバコに導入する実験は上手くいかず、代わりに直接に転写されているかをシーケンスデータから解析したところ、機能が無くとされていた MYB1-2/1-3 が確かに転写されていることが確認された (データ省略)。

リンゴ「陸奥」は青い果皮色を有するリンゴであるが、袋掛け処理により果皮色を赤くすることが可能となる。この原因は本来、機能がなくとされる MdMYB1 のアレル (MdMYB1-2/1-

3) が、袋掛け処理により、エピジェネティックな変化（メチル化やヒストン修飾の変化）を受けて、機能がなない MdMYB1-2 と MdMYB1-3 とともに転写可能な状態になることが想定された。そこで、この点を調査したところ、袋掛けした果実としない無袋の果実で、MYB1 の上流プロモーター領域を含む配列でのメチル化程度を調べたところ、「陸奥」では、上流-168~-45 の領域で、袋掛けして 10 月 1 日に除袋した果実（有袋）では有意にメチル化程度が無袋の果実よりも低下していた（図 1）。

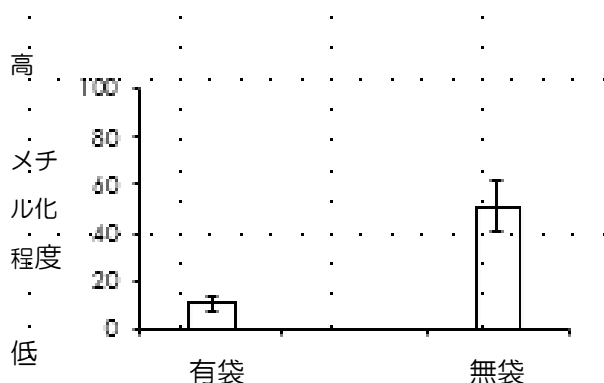


図 1 袋掛けした「陸奥」としない「陸奥（グリーン）」の MYB 上流域 (-168~-45) のメチル化感受性制限酵素処理後の PCR から算出

そこで、着色を誘導するために必要な最短の袋掛け処理の期間について、「陸奥」を用いて調査した。慣行栽培では一般に満開後 120 日間、リンゴに袋掛け処理を行い、収穫 1 か月前に除袋して太陽光にさらすことで着色（赤く）させている。一方、今回の研究により、100 日間の袋掛け処理 期間でも慣行栽培と比べても統計的に有意差がなく、十分に着色できることが明らかとなった。それよりも短い袋掛け処理では、慣行栽培と比べて有意に着色が劣った。また、「陸奥」以外の青い果皮色を有するリンゴ 4 品種を供して、袋掛け処理したところ、「ゴールデンデリシャス」以外の「王林」、「弘大みさき」、「印度」では、袋掛け処理により果皮色を赤くできる可能性が見いだした（後述）。また、袋掛け処理により機能がなない MdMYB1-2/1-3 に脱メチル化など、エピジェネティック制御が生じているかを確認するための試料の調整を行った。しかし、本来機能が無いとされる MdMYB1 のアレル（MdMYB1-2/1-3）が実際に袋掛け処理により転写されるかを証明すべく、ベクターの構築などを試みたが、うまくいかなかった。

問い③：着色を誘導するために必要な最短の袋掛け処理の期間について、「陸奥」を用いて 2 か年間にわたり調査した。慣行栽培では一般に満開後約 120 日間、リンゴに袋掛け処理を行い、収穫 1 か月前に除袋して太陽光にさらすことで着色（赤く）させている。

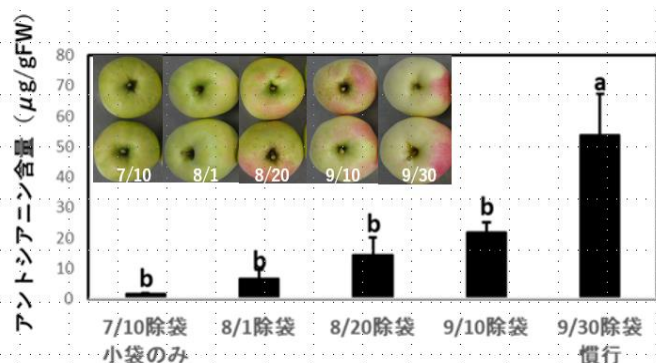


図 2 除袋時期が「陸奥」のアントシアニン含量に及ぼす影響（2021 年）

今回の研究では、袋を掛けることで、無袋に比べてアントシアニン含量は多くなり、有袋慣行の時期（9 月 30 日）に除袋するのが最もアントシアニン含量が多くなった（図 2）。この結果を受け、翌年、さらに詳しく調査したところ、慣行の除袋時期（10 月 1 日）に除袋する栽培管理と同等のアントシアニンを集積するには 9 月 10 日の除袋時期では早すぎ、9 月 16 日の除袋日まで待つ必要があった（図 3）。このように慣行の除袋日より約 1 週間程度早く除袋しても統計的には着色に有意な差異がないことが明らかとなった（図 3）。

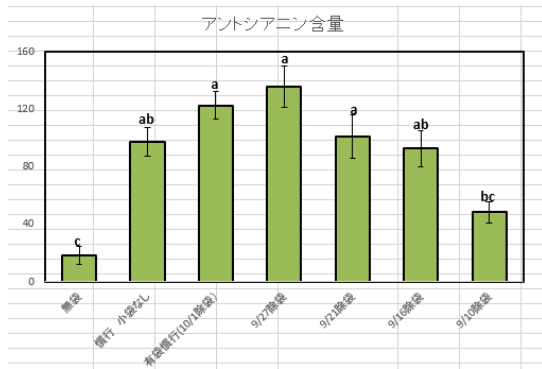


図3 除袋時期が「陸奥」のアントシアニン含量に及ぼす影響 (2022年)

「陸奥」を用いて袋掛け処理した果実の果皮ではアントシアニン合成経路にある CHS、ANS などの関連酵素遺伝子の発現は、無袋果に比して高く推移する傾向が認められたが、MYB については、発現の誘導が認められなかった (データ省略)。この原因として、果実の収穫から解析までの日数が経過したため、MYB の発現が既に高まった後のサンプルから調整した RNA を PCR に「供したためであることが推察された。

「陸奥」以外の着色しない品種である「印度」、「弘大みさき」、「王林」、「シナノゴールド」、「金星」、「こうこう」、「きおう」、「きみと」、「ゴールドデンリシャス」、「トキ」について、袋掛け処理を行った。袋掛けにより、糖度は低下傾向であるが、多くの品種 (「陸奥」、「トキ」、「王林」、「シナノゴールド」、「こうこう」、「弘大みさき」、「ゴールドデンリシャス」、「印度」) では、統計的には有意でなかった。一方、硬度は袋掛け処理により硬くなる傾向が見られたが、統計的に優位であった品種は、「弘大みさき」、「きおう」に限られた。これら着色しないリンゴ品種に小袋と大袋を掛けることで、品種間差異はあるものの、袋掛け処理によりより赤くすることが可能であった (図4)。

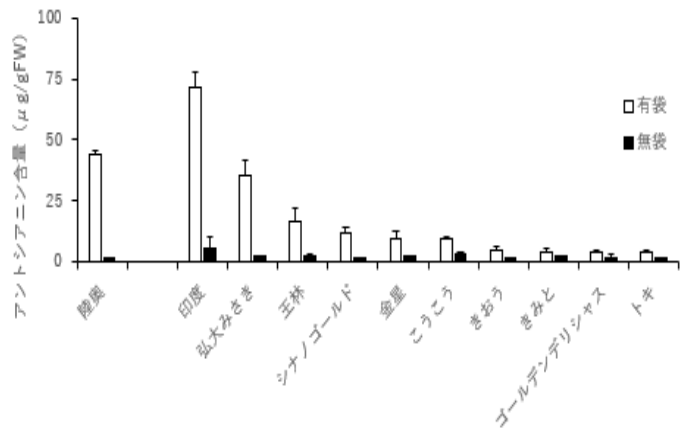


図4 青品種に対する袋掛け処理がアントシアニン含量に及ぼす影響

参考として、「印度」の袋掛け処理した果実と無袋果実の果皮の着色について写真を示す (写真1)。



写真1 「印度」に対する袋掛け処理の着色への影響
上：無袋、下：袋掛け

さらに精査したところ、「ゴールドデリシャス」については、袋掛け処理によっても無袋に比べて、有意に赤くすることが難しい品種であることが明らかとなった（写真2）。



写真2 「ゴールドデリシャス」に対する袋掛け処理の着色への影響 上：無袋、下：袋掛け

袋掛け処理による青品種群間に見いだされた品種間差異の原因について、倍数性の関与、b)アレルの組成も関与、c)クロロフィル含量の関与などについて調べたが、必ずしも品種間差の原因とは考えられなかった（データ省略）。

このように袋掛け処理によって、着色させることが可能な青品種を選抜し、袋掛け処理をすることで、同じ品種であっても果皮色の異なるリンゴを生産することが可能となり、付加価値をつけて消費者にPRすることも可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林田大志・佐藤早希・藤田知道・Yatin Naritsara・斎藤隆徳・森口卓哉
2. 発表標題 環境に対応したMYBアレルの転写制御によるリンゴの着色機構
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naritsara Yatin, Taishi Hayasida, Takanori Saito, Saki Sato, Tomomichi Fujita, Katsuya Ohkawa, Hitoshi Ohara, Satoru Kondo, Takaya Moriguchi
2. 発表標題 Epigenetic change by paper bagging treatment induced anthocyanin biosynthesis in the ten non-red apple cultivars.
3. 学会等名 アジア園芸学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 隆徳 (Saito Takanori) (20753479)	千葉大学・大学院園芸学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	林田 大志 (Hayashida Taishi) (90802017)	弘前大学・農学生命科学部・助教 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------