

氏 名	チャロンチョンスック ノンラック CHAROENCHONGSUK, Nongluk
本籍（国籍）	タイ
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 629号
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	Studies on color and pigment changes during ripening in pear fruit (セイヨウナシ果実の追熟中における果皮色と色素の変化に関する研究)
学位審査委員	主査 教授 村山 秀樹 副査 教授 西澤 隆 副査 教授 荒川 修 副査 准教授 小森 貞男

### 論文の内容の要旨

Amounts and types of pigments are responsible for the color appearance of plant. Loss of green color is one of the ripening indexes in fruit, and it is caused by the degradation of chlorophyll. In pear fruit, there are three different types of colors at mature stage; green, red and russet color. In this thesis, color and pigment changes during ripening in pear fruit were studied.

Green pears usually turn yellow during ripening. 'La France' pears are the most popular cultivar and account for ~70% of pear production in Japan. This cultivar stays green even at the fully ripe stage. This causes judgment difficulties for the edible phase by consumers. In the first chapter, color and pigment changes, and the molecular mechanism of chlorophyll-degradation-related genes were studied using six green pear cultivars. 'Le Lectier', 'Gorham', 'Bartlett', 'Marguerite Marillat' and 'Michaelmas Nelis' pears lost their greenness and developed a yellow color during ripening, which was directly related to the decline in chlorophyll *a* concentration. Thus, the development of yellow color results from the masking of carotenoids with chlorophyll at harvest, and the unmasking by chlorophyll degradation. Otherwise, 'La France' pears remained green even at the fully ripe stage. The contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids in this cultivar changed little throughout the experimental periods. These results suggest that chlorophyll degradation does not occur in the 'La France' cultivar. This led to the stay-green appearance when the fruit fully ripened. Climacteric ethylene was normally observed in 'La France' pears, and was concomitant with fruit softening. Therefore, it was not the inability of fruit to produce ethylene that prevented chlorophyll degradation and the development of yellow color in 'La France' pears. Transcription levels of *chlorophyllase 1*

(*CLH1*), *pheophorbide a oxygenase (PAO)*, *non-yellow coloring 1 (NYC)*, and *NYC1-like (NOL)* genes in ‘La France’ pears were lower than those in fully yellow pears. Suppression of these genes in ‘La France’ pears might be related to the stay-green characteristics when fully ripened.

The russet pears resist to the stress or improper environment, i.e. temperature, humidity. Color changes can be observed during ripening even in the russet pears. In the second chapter, ripening characteristics and pigment changes in russet pear fruit were investigated. The green pears, ‘Gorham’ and ‘La France’ cultivars, and their russet spot ‘Grand Champion’ and ‘Gold La France’ cultivars were used. The delay of ripening occurred in russet pears compared with their wild types. These resulted from the delay of ethylene production. Even in russet pears, chlorophylls accumulated like green pears, although they were masked by russet. Moreover, pigment changes during ripening in russet ‘Grand Champion’ pears were the same as in ‘Gorham’ pears. Similarly, in another russet cultivar ‘Gold La France’, whose color was unchanged during ripening, chlorophyll level was the same as ‘La France’ fruit. These suggested that the pigment changes of russet mutant pears followed their wild types. ‘Gorham’ turned from green to yellow, while ‘Grand Champion’ developed light russet during ripening. The color change in ‘Grand Champion’ russet pears during ripening was caused by loss of chlorophylls. On the other hand, little change in chlorophylls level corresponded with the unchanged russet color in ‘Gold La France’ pears. Thus, chlorophyll degradation might imply to the color change not only in green pears but also in russet ones. Color changes in russet pears seemed to be similar to their wild types. The expressions of chlorophyll-degradation-associated genes in the russet mutant pears showed similar pattern to their wild types.

Ethylene is required for ripening of many fruit, particularly in climacteric fruit. In the third chapter, green and russet pears, ‘Gorham’, ‘La France’, ‘Grand Champion’ and ‘Gold La France’ cultivars, were treated with ethylene or 1-methylcyclopropene (1-MCP) to study the role of ethylene on fruit ripening and color changes. Ethylene production was inhibited by 1-MCP treatment in both green and russet pears. Interestingly, fruit softening was perfectly suppressed by 1-MCP treatment in ‘La France’ and ‘Gold La France’ pears, while softening gradually progressed in 1-MCP treated fruit in ‘Gorham’ and ‘Grand Champion’ pears. Ethylene or 1-MCP did not affect color and pigments in ‘La France’ and ‘Gold La France’ pears. In contrast, fruit yellowing and chlorophyll degradation was partially suppressed by 1-MCP treatment. These suggest that chlorophyll degradation was regulated by both ethylene dependent and independent manners. The influence of ethylene on the expressions of chlorophyll-degradation-related genes seemed to be similar in both russet and their wild types. *NYC1* and *SGR1* genes were stimulated by ethylene, while these expressions were suppressed by 1-MCP treatment. These indicated that these were ethylene dependent genes. *SGR* is the protein that participates in degradation of light harvesting chlorophyll-protein complex and acts upstream of chlorophyll degradation pathway. Ethylene treatment dramatically up-regulated the *SGR* gene expression not only in ‘Gorham’ and ‘Grand Champion’ pears, but also in ‘La France’ and ‘Gold La France’.

pears, in which chlorophyll levels did not change during ripening. Meanwhile, ethylene might have little effect on *CLH1*, *PPH*, *PAO* and *NOL* genes expression in both green and russet pears. Thus, these were thought to be ethylene independent genes.

Taken together, in the first chapter, it was found that yellowing resulted from the unmasked carotenoid by chlorophylls degradation, and that stay-green characteristic in 'La France' pears may be caused by suppression of *CLH1*, *PAO*, *NYC* and *NOL* genes. In the second chapter, the ripening of russet pears was delayed. The chlorophyll and carotenoid concentrations at harvest were the same level, and color and pigment changes were also similar in russet mutant pears and their wild types. The last chapter showed that chlorophyll degradation was regulated by both ethylene dependent and independent manners. It was suggested that *NYC1* and *SGR1* were ethylene dependent genes, while *CLH1*, *PPH*, *PAO* and *NOL* were ethylene independent ones.

植物の色は色素の種類と量によって変化する。果実においては、緑色の消失が成熟指標の1つであり、これはクロロフィルの分解によって生じる。セイヨウナシは、果皮色に関して緑色、赤色、サビの3つのタイプがある。本論文では、セイヨウナシ果実における追熟中の果皮色と色素の変化について検討した。

通常、緑色タイプのセイヨウナシは追熟中に果皮が黄化する。'ラ・フランス'果実は、日本で最も人気の高いセイヨウナシであり、日本におけるセイヨウナシ生産の約70%を占める。この品種は果実が完熟しても緑色を維持する。そのため、消費者が適食時期を判断することは困難である。本論文の第1章では、セイヨウナシ6品種を供試して、果皮色と色素、ならびに、クロロフィル分解にかかわる遺伝子の分子メカニズムについて検討した。'ル・レクチエ'、'ゴーラム'、'バートレット'、'マルグリット・マリーラ'および'ミクルマス・ネリス'は追熟中に緑色が消失し、黄化した。これは、クロロフィルaの減少と一致した。このことから、果皮色の黄化現象は、収穫時点においてクロロフィルでマスクされていたカロテノイドが、追熟中にクロロフィルが分解することによって現れる事によって生じると考えられた。一方、'ラ・フランス'は果実が完熟しても緑色を維持し、クロロフィルa、クロロフィルbおよびカロテノイド含量が追熟中ほとんど変化しなかった。これらの結果より、'ラ・フランス'ではクロロフィルが分解せず、このことが完熟しても果皮色が変化しない緑色維持特性にかかわっていることが示唆された。

'ラ・フランス'においても、クライマクテリックエチレンが正常に生成し、果実が軟化する時期と一致した。それゆえ、'ラ・フランス'果実においてエチレンの生成能の欠如がクロロフィルの分解、ひいては果皮の黄化を阻害している要因ではないと考えられた。

'ラ・フランス'では、クロロフィラーゼ1(*CLH1*)、フェオホルバイトaオキシゲナーゼ(*PAO*)、non-yellow coloring 1(*NYC1*)、および、*NYC-like*(*NOL*)の発現レベルは、黄化する品種と比較して低かった。'ラ・フランス'におけるこれらの遺伝子の抑制が緑色維持特性に関与していることが示唆された。

サビ品種はストレスおよび温度や湿度などの不適な環境に対する耐性をもつ。このサビ品種においても追熟中に果皮色が変化する。第2章では、サビ品種の追熟特性と色素変化について検討した。緑色品種として'ゴーラム'と'ラ・フランス'、サビ品種としてそ

これらの芽条変異種の‘グランド・チャンピオン’と‘ゴールド ラ・フランス’を供試した。サビ品種は、それらの原品種と比較して追熟が遅れた。この追熟遅延は、エチレン生成の増加する時期の遅延によると考えられた。サビ品種においても、緑色品種と同様にクロロフィルが蓄積した。ただし、このクロロフィルはサビによってマスクされた。さらに、サビ品種‘グランド・チャンピオン’において、追熟中の色素濃度の変化は、原品種の‘ゴーラム’と同様のパターンを示した。同様にもう1つのサビ品種である‘ゴールド ラ・フランス’では、追熟中果皮色は変化せず、クロロフィル含量は原品種の‘ゴールド ラ・フランス’と同レベルであった。これらのことから、サビ品種の色素含量は原品種に準じることが示唆された。‘ゴーラム’は黄化し、‘グランド・チャンピオン’は適食時に明るいサビ色に変化した。‘グランド・チャンピオン’の果皮色の変化は、追熟中のクロロフィル濃度の低下によると考えられた。一方、‘ゴールド ラ・フランス’において果皮色が変化しないのは、クロロフィルが追熟中に変化しないためと思われた。以上の結果より、クロロフィル分解は緑色品種の果皮色変化のみならず、サビ品種の果皮色変化にもかかわっていること、また、サビ品種の果皮色変化パターンは原品種に準じることが判明した。サビ品種におけるクロロフィル分解関連遺伝子の発現は、原品種と同様のパターンを示した。

エチレンは多くの果実、とりわけクライマクティック型果実の成熟に必要である。第3章では、緑色品種として‘ゴーラム’と‘ラ・フランス’、サビ品種としてそれらの芽条変異種の‘グランド・チャンピオン’と‘ゴールド ラ・フランス’を供試し、果実成熟と果皮色変化におけるエチレンの役割を調べるために、エチレンあるいは1-メチルシクロプロパン(1-MCP)処理を施した。緑色品種とサビ品種の両方において、エチレン生成が1-MCP処理によって抑制された。‘ラ・フランス’と‘ゴールド ラ・フランス’では、果実軟化が1-MCP処理によって完全に阻害されたのに対して、‘ゴーラム’と‘グランド・チャンピオン’では1-MCP処理した果実でも軟化が徐々に進行した。‘ラ・フランス’と‘ゴールド ラ・フランス’では、果皮色および色素の変化にエチレンあるいは1-MCP処理の影響は認められなかった。これに対して‘ゴーラム’と‘グランド・チャンピオン’では、黄化とクロロフィルの分解が1-MCP処理によって部分的に抑制された。このことは、クロロフィル分解がエチレン依存性と非依存性の両方の様式で起こることを示している。エチレンがクロロフィル分解関連遺伝子の発現におよぼす影響は、緑色品種とその芽条変異種で同じであった。NYC1とSGR1遺伝子の発現はエチレンによって促進されたのに対して、1-MCP処理によって抑制された。このことは、この2つの酵素がエチレン依存性の遺伝子であることを示している。SGRはクロロフィル-タンパク質複合体の分解にかかわり、クロロフィル分解経路の上流で作用するタンパクである。エチレン処理は果皮色が変化する‘ゴーラム’と‘グランド・チャンピオン’のみならず、果皮色が変化しない‘ラ・フランス’と‘ゴールド ラ・フランス’において、SGRの遺伝子発現を劇的にアップレギュレートした。一方、CLH1, PPHおよびNOL遺伝子の発現に対するエチレン処理の影響は緑色品種とサビ品種の両方でわずかであった。このことから、これらの遺伝子はエチレン非依存性の遺伝子であると考えられた。

以上の結果をまとめると、第1章では、セイヨウナシ果実の黄化はクロロフィルの分解によってマスクされていたカロテノイドが現れることによって起こること、また、‘ラ・フランス’では、CLH1, PAO, NYC1、および、NOLの発現レベルが黄化する品種と比較

して低く、このことが完熟時の緑色維持特性に関与していることが示唆された。第2章では、サビ品種の成熟がそれらの原品種と比較して遅いことが判明した。また、サビ品種とそれらの原品種では、収穫時のクロロフィルとカロテノイドは同じレベルであり、追熟中の果皮色と色素の変化パターンも同様であった。第3章では、クロロフィル分解がエチレン依存性と非依存性の両方の様式で起こることが示された。*NYC1*と*SGR1*遺伝子はエチレン依存性であり、*CLH1*、*PPH*および*NOL*遺伝子はエチレン非依存性であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

セイヨウナシは、果皮色に関して緑色、赤色、サビの3つのタイプがある。追熟中に果皮が黄化する品種において、色素含量を調べた研究例があるものの、分子メカニズムはわかっていない。また‘ラ・フランス’のように、果実が完熟しても緑色を維持する品種や‘ゴールドラ・フランス’のようなサビ品種では、果皮色に関する情報がない。そこで本論文は、セイヨウナシ果実を供試して、①6品種の果皮色変化について、②サビ品種における追熟特性と色素変化について、③果皮色変化におけるエチレンの役割について検討した。その結果、以下に示す新しい知見が得られた。

- (1) 果皮が黄化する品種では、追熟中にクロロフィルが急激に、また、カロテノイドが徐々に減少した。
- (2) ‘ラ・フランス’では、追熟中にエチレンが正常に生成したものの、クロロフィルとカロテノイド含量は追熟中ほとんど変化しなかった。
- (3) ‘ラ・フランス’では、クロロフィラーゼ1(*CLH1*)、フェオホルバイトaオキシゲナーゼ(*PAO*)、*non-yellow coloring 1*(*NYC1*)、および、*NYC-like*(*NOL*)の発現レベルが、黄化する品種と比較して低かった。
- (4) サビ品種においても、緑色品種と同様にクロロフィルが蓄積し、色素とクロロフィル分解関連遺伝子の発現は、原品種と同様の変化パターンを示した。
- (5) ‘ゴールム’と‘グランド・チャンピオン’では、黄化とクロロフィルの分解が1-メチルシクロプロパン(1-MCP)処理によって抑制された。
- (6) *Stay Green*遺伝子の発現は、エチレン処理によってアップレギュレートし、逆に1-MCP処理によってダウンレギュレートした。
- (7) *CLH1*、*PPH*および*NOL*遺伝子の発現に対するエチレン処理の影響は小さかった。

以上の結果より、セイヨウナシ果実の黄化はクロロフィルの分解によってマスクされていたカロテノイドが現れることによって起こること、また、サビ品種とそれらの原品種では、収穫時のクロロフィルとカロテノイドは同じレベルであり、追熟中の果皮色と色素の変化パターンも同様であることを明らかにした。一方‘ラ・フランス’では、*CLH1*、*PAO*、*NYC1*、および、*NOL*の発現レベルが黄化する品種と比較して低く、このことが完熟時の緑色維持特性に関与している可能性を示した。さらに、セイヨウナシ果皮におけるクロロフィル分解がエチレン依存性と非依存性の両方の様式で起こることを明らかにした。

これらの研究内容に基づき、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

- 1 . Charoenchongsuk, N., Ikeda, K. Itai, A., Oikawa, A. and Murayama, H. (2015) Comparison of the expression of chlorophyll-degradation- related genes during ripening between stay-green and yellow-pear cultivars. *Scientia Horticulturae* **181**, 89–94.