

# リンゴ果実のエチレン生合成制御に 関する遺伝子工学

(研究課題番号：09660001)

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金  
基盤研究（C）（2）  
研究成果報告書

平成12年3月

---

研究代表者：原 田 竹 雄

(弘前大学農学生命科学部)  
助教授

77.7

72k

99/H

# リンゴ果実のエチレン生合成制御に関する遺伝子工学

## 研究組織

研究代表者：原田竹雄（弘前大学農学生命科学部助教授）

研究分担者：なし

研究経費：

平成 9 年度 1,700 千円

平成 10 年度 600 千円

平成 11 年度 800 千円

計 3,100 千円

## 研究発表等

### (1) 学会誌等

Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M and Harada T: An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119: 1297-1303. 1999.

Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T, Niizeki M: An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low level of ethyleneproduction in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor. Appl. Genet.* in press 2000.

Sunako T, Ishikawa R, Senda M, Akada S, Niizeki M and Harada T (2000) MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), Two Wound-Responsive Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Apple. (PGR00-030) *Plant Physiol.* 122: 620. 2000.

### (2) 口頭発表

桜庭和歌子・砂子智美・原田竹雄・千田峰生・赤田辰治・石川隆二・新関 稔：リンゴ ACC 合成酵素遺伝子の 5' 隣接領域に見出された SINE について。日本育種学会第 92 回講演会（鳥取大学） 1997 年 9 月。

砂子智美・原田竹雄・千田峰生・赤田辰治・石川隆二・新関 稔：リンゴ果実内の ACC 合成酵素遺伝子 (ACS) の発現解析。日本育種学会第 93 回講演会（横浜市立大学） 1997 年 4 月。

4327.7  
112k

原田竹雄・砂子智美・佐久間智宏・千田峰生・赤田辰治・石川隆二・新関 稔：リンゴ栽培品種の ACS1 遺伝子型と果実内エチレン濃度. 日本育種学会第 93 回講演会 (横浜市立大学) 1997 年 4 月.

砂子智美・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・新関 稔・原田竹雄：リンゴ各組織における ACC 合成酵素遺伝子 (ACS) の発現解析. 日本育種学会第 94 回講演会 (岩手大学) 1998 年 9 月.

桜庭和歌子・神 修平・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・新関 稔・原田竹雄：リンゴに見出されたレトロポゾン Md-SINE1 について. 日本育種学会第 94 回講演会 (岩手大学) 1998 年 9 月.

原田竹雄・砂子智美・佐藤 耕・副島淳一・新関 稔：リンゴにおける ACC 合成酵素遺伝子 (Md-ACS1) の対立遺伝子型とライプニング果実内エチレン量. 日本育種学会第 95 回講演会 (宇都宮大学) 1999 年 4 月.

砂子智美・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・新関 稔・原田竹雄：リンゴ ACC 合成酵素遺伝子 (ACS) ファミリーの発現解析. 日本育種学会第 95 回講演会 (宇都宮大学) 1999 年 4 月.

Harada,T, Sunako T, Soejima J, Sato T, Niizeki M.: Low ethylene production in the fruit of some apple cultivars is caused by a mutation in the ripening specific ACC synthase gene. XVI International Botanical Congress Abstracts, 604, (St. Rouis), 1999.

若佐雄也・神 修平・石川隆二・赤田辰治・新関 稔・原田竹雄：リンゴ果皮赤色化遺伝子 Rf に連鎖する DNA マーカーに見いだされたトランスポゾン Md-Tn1 について. 日本育種学会第 96 回講演会 (岡山大学) 1999 年 9 月.

### (3) 出版物

原田竹雄：リンゴの貯蔵性を高める ACC 合成酵素の変異遺伝子. 化学と生物. 37: 429-431. 1999 年 7 月.

Harada T, Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R and Niizeki M: Md-ACS1, a fruit ripening 1-aminocyclopropane-1-carboxylatesynthase gene of apple. Breeding and Biotechnology for FruitTrees. NIFTS/CISRO p42-45. 1998

## はじめに

リンゴは世界における生産高が約 4000 万トンに達し、ブドウ、バナナ、カンキツに次ぐ果実である。わが国においては約 100 万トンが生産されており、その 5 割は青森県によるものである（農林水産省統計情報部 1998）。リンゴは他の果実に比べ収穫後の日持ち性が高く、長期の貯蔵が可能であるという特徴がある。しかし、品種によって収穫後の商品価値を保持できる期間が異なり、短いものは長期貯蔵に不適當であって、収穫後すぐに出荷しなければならない。一方、長いものは常温貯蔵、冷蔵、CA 貯蔵などを行うことで、出荷時期を延長することができる。このような品種の多様性と産地による熟期のずれなどから、リンゴでは周年に近い出荷体制ができています。

ライプニングは果実の肥大生長が止まってからの有機酸の消失、細胞の軟弱化などの生理現象をいう。リンゴの成熟はライプニングに伴って呼吸量が急激に上昇するクリマクテリック型であり、エチレンがライプニング過程へのプログラムスイッチであることが判っていることから、リンゴの成熟や貯蔵性はエチレンの生合成と密接な関係にあると思われる。実際に、品種によりライプニング過程でのエチレン生成量はかなり異なり、ライプニングがゆっくりと進行する品種ではエチレン生成量が比較的少量であるという報告があることから（Chu 1988, Gessman et al. 1993, 壽松木ら 1997）、この品種のもつ遺伝的素質が注目されてきた。しかし、この様なエチレン生成量の品種間差の分子機構については不明であった。

エチレンの生合成は、メチオニン→S-アデノシルメチオニン (SAM) →1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) →エチレンの経路で行われ (Yang and Hoffman 1984)、SAM→ACC を触媒する ACC 合成酵素 (S-adenosyl-L-methylthioadenosinylase, EC4.4.1.14) がこの経路の律速酵素であることが明らかにされている。エチレンは果実のライプニングのみならず、植物生長の多くの過程を調節しているホルモンである。その生成は、時期および組織特異的に行われ、また、傷害、病原菌の感染、高温などのストレスによっても一過的に活性化する (Yang and Hoffman 1984)。この様な多くの生理現象に対応する形で、ACC 合成酵素 (ACS) 遺伝子は多重遺伝子族を構成している。トマトでは 8 つ (Shiu et al. 1998)、アラビドプシスでは 5 つ (Liang et al. 1996) の ACS が報告されており、それぞれの遺伝子は異なる発現調節機構で制御されていることが判ってきた。リンゴにおいては、*Md-ACS1* (Dong et al. 1991, Lay-Yee and Knighton 1995)、*Md-ACS2*、*Md-ACS3* (Rosenfield et al. 1996)、*Md-ACS4* (Kim et al. 1992) の 4 つの ACS 遺伝子の cDNA 塩基配列が既に報告されており、このうち、*Md-ACS1* についてはゲノミック DNA の配列 (Harada et al. 1997) が明らかにされている。しかし、これら *Md-ACS* の発現制御についてはほとんど報告がない。

本研究では、リンゴのライプニング果実でのこれら *Md-ACS* の発現について

解析を進めた。また、これらの解析結果とライプニング時のエチレン生成量の関係についても詳細に検討した。さらに、本研究を通して新たに単離された *Md*-ACS に関する特徴づけを進めた。

## I リンゴ果実内の ACC 合成酵素遺伝子 (ACS) の発現解析

リンゴ果実のクリマクテリック型ライプニングにおけるエチレンの関与は古くから知られており、果実の貯蔵性とエチレンに関する様々な研究が精力的に進められてきた (Chu 1988, Gessman et al. 1993, 壽松木ら 1997). しかし、エチレン生合成の制御機構については未だ不明の点が多い (Saymour et al. 1993). ライプニング時のリンゴ果実からは、これまでエチレン生合成系の律速酵素である ACS 遺伝子の cDNA が 3 クローン (*Md-ACS1*, *Md-ACS2*, *Md-ACS3*) 報告されている (Dong et al. 1991, Lay-Yee and Knighton 1995, Rosenfield et al. 1996). しかし、これらの発現についてはほとんど明らかにされていない. 我々は *Md-ACS1* のゲノミック構造解析を通して、*Md-ACS1* には基本型である 1-1 型と、そのプロモーター領域に 162bp の Md-SINE1 が挿入した 1-2 型の 2 つの対立遺伝子が存在することを明らかにした (Harada et al. 1998). 既報の *Md-ACS1* の cDNA の塩基配列 (Dong et al. 1991, Lay-Yee and Knighton 1995) は遺伝子型が 1-1/1-2 ヘテロ型であるリンゴ品種 ‘ゴールドデンデリシャス’ より単離されているが、いずれの cDNA も 1-1 型である. このことから、このプロモーター領域の差異により 1-1 型と 1-2 型では発現に違いが見られるのではないかと考えられた.

そこで本章ではこれらの遺伝子の発現様式について詳しく検討した. すなわち、*ACS1* の対立遺伝子の発現を調べるために、リンゴ栽培品種の中から、1-2/1-2 のホモ型である ‘ふじ’ と 1-1/1-2 のヘテロ型である ‘ゴールドデンデリシャス’ を用いて、*Md-ACS1* と *Md-ACS3* をプローブとしてノーザン解析を行った. また、1-2 型遺伝子の発現を RT-PCR 解析により検討した.

### 材料および方法

#### 1. 実験材料

弘前大学農学部付属藤崎農場よりサンプリングされた、リンゴ栽培品種 ‘ゴールドデンデリシャス’ および ‘ふじ’ のプレクリマクテリックとクリマクテリックの果実を用いた.

#### 2. 内部エチレン濃度 (IEC) の測定

果実内エチレン濃度は、果実の陽光面とその反対側から果実を切り取り、水の入ったデシケーター内で果実内の気体を回収し、注射器で採取した 1 ml を用いて、ガスクロマトグラフィー (SHIMADZU GC-8A GAS CHROMATOGRAPH) により測定した. 測定値は 5 個体の果実の平均により算出した.

#### 3. サザンハイブリダイゼーション

ゲノミック DNA は成葉から Varadarajan et al. (1991) の方法によって抽出し、CsCl<sub>2</sub>-EtBr 法で分画した. 各 DNA 5 μg に制限酵素を加え、全量 100 μl の反応液で消化した. 電気泳動は、0.8% 水平平板アガロースゲルを用いて 23 V 15 時間行った. 泳動終了後、Alkali transfer buffer (0.4 N NaOH) でナイロン

メンブレンフィルター (Hybond™ N<sup>+</sup>; Amersham) に約 24 時間ブロッティングを行い、その後、5×SSC 溶液で 5 分間、2×SSC 溶液で 5 分間メンブレンを洗浄した。ハイブリダイゼーションは、Hybridization buffer (6×SSC, 2 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5×Denhards, 0.2 mg Salmon Sperm DNA, 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Na N-Lauroyl Sarcosinate) へ Prime-It II Random Primer Labeling Kit (STRATAGENE) を用いて <sup>32</sup>P で標識した DNA プロブ (200 ng) を加え、65℃12 時間以上行った。洗浄は、Washing buffer (2×SSC, 0.1% SDS) で室温 20 分間の条件で 2 回行った。さらに、(0.2×SSC, 0.1% SDS) で 65℃, 20 分間 2 回洗浄した。その後、オートラジオグラフィーによるシグナル検出を行った。

#### 4. RNA 抽出

Dong et al. (1991) の方法を改良して、リンゴ果実より全 RNA を調製した。5 g の試料を液体窒素中で磨砕後、40 ml の緩衝液 (4.0 M guanidine isothiocyanate, 10 mM EDTA, 300 mM Tris pH7.5, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5% sodium lauroyl sarcosine) を加えた。室温で 10 分間放置後、polyvinyl pyrrolidone (1/10 FW) を加え、氷上で 2 時間放置した。これを 4℃, 8,000 rpm で 15 分間遠心し、上澄みを濾過した。これに CsCl<sub>2</sub> を加え、20℃, 25,000 rpm で 24 時間平衡密度勾配遠心した。沈殿物を滅菌水にとかし、フェノール/クロロフォルム処理した後、エタノール沈殿させた RNA 分画を滅菌水にとかした。

#### 5. ノーザン分析

全 RNA 20 μg を RNA 試料緩衝液 (1×MOPS, 50% formamide, 2.2 M formaldehyde, 10 mM EDTA) にとかし、65℃ 15 分間変性させた後、氷上で急冷させた。その中に、染色液 (0.01% BPB, 0.025% XC, 0.05 mg/ml EtBr) を加え、1.2%ゲル (1×MOPS, 0.66 M formaldehyde, 1.2% アガロース) で 40 V, 2.5 時間電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 10×SSC で 20 分間、2 回洗浄した後、20×SSC により一晩ブロッティングを行い、変性 RNA をナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N) 上にブロッティングした。UV で固定した後、50% formamide, 5×Denhardt's solution, 0.5% SDS, 5×SSPE, 20 μg/ml salmon sperm DNA を含む溶液中でプレハイブリダイゼーションを行い、<sup>32</sup>P でラベルしたプロブ DNA を加え、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンは 2×SSC/0.1% SDS で室温、5 分を 2 回、0.2×SSC/0.1% SDS で室温 10 分、0.2×SSC/0.1% SDS で 65℃, 1 時間洗浄した。

#### 6. RT-PCR 反応

Total RNA 10 μg を 20 μl の逆転写反応液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs, 1 μM Oligo(dT)Primer, 50units MuLV reverse transcriptase; PERKIN ELMER, 20units RNase Inhibitor; PERKIN ELMER) 中で、42℃, 1 時間→94℃, 5 分間反応させた後、氷上で急冷させて cDNA を合成した。この合成された cDNA をさらに 100 μl の PCR 反応液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 0.4 μM primers (ACS1-3'A),

5units Taq polymerase) 中で, 94°C, 2分→45°C, 1分→72°C, 3分の反応を30サイクル継続することにより, cDNAの増幅を行った. 増幅したDNAはさらに内側のプライマー (ACS1-3'B) を用いて PCR 反応を行った.

## 7. PCR 反応

ACS1-A, ACS1-Bの両プローブはプラスミド pAP1-6を, ACS3プローブはリンゴ品種‘旭’の葉から抽出したDNAをテンプレートとしたPCRの増幅産物を利用した. これらのDNAはPCR反応液 (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, 0.5μM primers, 2units Ampli Taq Gold™; PERKIN ELMER) 中で 94°C, 1分反応させた後, 94°C 1分, 55°C 2分, 72°C 3分のサイクルを40回行った. PCRとRT-PCRに用いたプライマーを下記に示す. 尚, 数値はACS1に関するものは Accession No. U89156, ACS3に関するものは U73816 に対応する番号である.

ACS1-AF	5' TACCATGAGGTCCACAACAC3'	2302-2321
ACS1-AR	5' GGTGAGCACTAAGTGGTTGGG3'	2813-2793
ACS1-BF	5' GATGAAAGGTAGCCTGGTCTGA3'	4056-4077
ACS1-BR	5' TACACTAATCACATTGTATAGAATC3'	4513-4489
ACS3-F	5' GACAAATAGAAAGAGACCTGAGGACG3'	1086-1110
ACS3-R	5' CCATCGATTATACAAACTGATTGTG3'	1573-1549
ACS1-3' AF	5' TCCACAACACAAACGGGATTATTCA3'	3312-3336
ACS1-3' AR	5' AGGCTACCTTTCATCTACCGGGA3'	4070-4048
ACS1-3' BF	5' ATCTTCTCGAGTCATGGCTGGC3'	2489-2510
ACS1-3' BR	5' TTTCATCTACCGGGAATAGGACCGCGG3'	4062-4036

## 結果

### 1. *Md-ACS1* および *Md-ACS3* に対する特異的なプローブの作製

PCRにより ACS1-A, ACS1-B, ACS3のDNAプローブの調製を試みた. ACS1プローブは *Md-ACS1* が挿入されているプラスミド (pAP1-6) を, また, ACS3プローブは品種‘旭’の葉から抽出した全DNAをテンプレートとしたPCRによる増幅産物を用いた. ACS3のPCR産物はプラスミドに挿入し, シークエンスすることで *Md-ACS3* の一部であることを確かめた. また, *Md-ACS2* (Rosanfield et al. 1996) についてもプローブを作製するため, 複数のプライマーを作製しPCRを行ったが, いずれも目的の長さの産物が得られず, プローブを得ることができなかった.

作製されたプローブはその特異性を調べるために, リンゴ品種‘ふじ’, ‘ゴールドデンデリシャス’, ‘印度’から抽出した全DNAを *EcoR* I で切断し, 上記のプローブによるサザン解析を行った (図 2-1). *Md-ACS1* 5' 末端側の他の *Md-ACS* と比較的相同性の高い ACS1-A をプローブとした場合, *Md-ACS1* である 1.5kb の



バンド以外にもシグナルが見られた。また、3'末端側の ACS1-B をプローブとした時は‘ふじ’および‘ゴールデンデリシャス’で *Md-ACS1* の 2.1kb のバンドのみがみられた。なお、‘印度’では *Md-ACS1* 以外のバンドがみられたので、今回の発現解析実験では使用しなかった。

*Md-ACS3* では *Md-ACS1* および *Md-ACS3* に対し、比較的相同性の低い 3'末端側をプローブとしてサザン解析を行った (図 2-2)。その結果、*Md-ACS3* と考えられるバンドに加え、弱いシグナルのバンドが検出された。しかし、ここで検出されるバンドが *Md-ACS1* 由来のものを含まないことから、このプローブが完全なものではないが、*Md-ACS1* 以外のプローブとして使用できると判断され、ACS3 プローブとして使用した。

## 2. *Md-ACS1* および *Md-ACS3* の発現解析

まず、*Md-ACS1* の対立遺伝子間の発現の違いを検討した (図 2-3)。*Md-ACS1* には基本型の 1-1 型と 5'隣接領域に SINE を有する 1-2 型に分類される。そこで、1-2/1-2 のホモ型である‘ふじ’と 1-1/1-2 のヘテロ型である‘ゴールデンデリシャス’を用いてノーザン解析を行った。‘ゴールデンデリシャス’と‘ふじ’の内部エチレン濃度 (IEC) は、それぞれ収穫直後では  $16\mu\text{l} / 1$ 、 $0.7\mu\text{l} / 1$  であり、 $20^{\circ}\text{C}$ 、12 日間静置後では  $298\mu\text{l} / 1$ 、 $57\mu\text{l} / 1$  という値を示した。そこで、収穫直後をプレクリマテリック、12 日間静置後をクリマテリックの果実とし、それぞれから RNA を抽出した。ACS1 をプローブとした場合、プレクリマテリック果実では両品種ともシグナルが認められなかった。一方、クリマテリック果実では‘ゴールデンデリシャス’では強い発現がみられたが、‘ふじ’では極微弱のシグナルが認められた。このメンブレンを用いて ACS3 をプローブとした場合、プレクリマテリック果実においても両品種でシグナルがみられ、さらに、クリマテリックでその量が明瞭に上昇することはなかった。このことから、ライプニング時に発現する ACS 遺伝子族の中で、ACS3 が常時発現を示すのに対し、ACS1-1 はクリマテリック特異的に発現することが判った。

次に、‘ふじ’で得られたシグナルが実際に ACS1-2 型由来のものであるかを確かめるために RT-PCR を行った (図 4)。図 4A の矢印で示すプライマー (ACS1-3'BF および ACS1-3'BR) を使用した増幅産物を *Hind* III と *Xho* I で切断した場合、1-1 型は 522bp となるが、1-2 型は 3'末端側に *Xho* I 認識部位が存在するため 447bp と 75bp に分断される。また、センスプライマーから *Hind* III までの長さはイントロンを含むゲノミック DNA では 1052bp であるのに対し、cDNA では 745bp となるので、得られた RT-PCR の産物が混入するゲノミック DNA 由来のものではないことが判定できる。図 4B で示した通り、‘ゴールデンデリシャス’では両遺伝子型を保有しているにもかかわらず、1-1 型のみが、一方の‘ふじ’では 1-2 型のみが確認された。

これらの結果から、1-2 型は 1-1 型に比べ発現量が極端に少なく、‘ゴール

デンデリシヤス’のように発現が認められない場合もあることが判明した。

## 考察

リンゴ栽培品種‘ゴールドデンデリシヤス’にはライプニング時に発現する ACS1 が1対の対立遺伝子として存在する。そこで、これら両遺伝子 (*Md-ACS1-1* と *Md-ACS1-2*) の転写について検討した。

RT-PCR の結果、‘ゴールドデンデリシヤス’では 1-1 型の転写物が確認されたが、1-2 型は検出されなかった。同様の結果は増幅プライマーの位置を変えた RT-PCR でも得られた (Harada et al. 1998)。Dong et al. (1991) および Lay-Yee and Knighton (1997) は‘ゴールドデンデリシヤス’由来の *Md-ACS1* cDNA の塩基配列を報告しているが、両者とも 1-1 型であり、本章の結果と符合するものである。一方、*Md-ACS1-2* をホモ型で有する栽培品種‘ふじ’についても同様の RT-PCR 解析を行ったところ、1-2 型の転写物が確認された。しかし、ノーザン解析によるこれらの転写量を調べてみると、‘ふじ’の 1-2 型は‘ゴールドデンデリシヤス’に比べ、圧倒的に少量であった。以上のことから、1-2 型遺伝子は 1-1 型に比べ発現が極端に低いことが明らかとなった。

*Md-ACS1-2* にはプロモーター領域に *Md-SINE1* が挿入されているが、その部位が転写開始点から -781bp であること、挿入配列は 162bp と短いことなどから、この挿入の遺伝子発現レベルへの影響がどの程度であるか注目される。5' 上流領域にトランスポゾンが挿入された *ACO* (Blume et al. 1997) や *ACS* (Shiu et al. 1998) が報告されているが、これらはトランスポゾン非挿入型との比較がないことから挿入への影響は不明である。両対立遺伝子間には 5' 上流域に塩基置換が複数あることから、シス因子の 1 塩基変異によって転写活性が異なることも予想される。1-2 型の転写能低下の原因を確かめるには 1-2 型から *SINE* を除去した際のプロモーター活性を測定する解析が必要となるだろう。

トマトでは 8 つある *ACS* ファミリーの中で 2 つがライプニング時に発現している (Lincoln et al. 1993, Nakatsuka et al. 1998)。リンゴでは 3 つの *ACS* がライプニング果実から単離されている (Rosenfield et al. 1996) が、これらの中で *Md-ACS1* のみノーザンハイブリダイゼーションによる転写解析が行われている (Dong et al. 1991)。我々のノーザン解析の結果、*Md-ACS1* は Dong et al. (1991) の報告同様、ライプニング時特異的に発現し、*Md-ACS3* は構成的に発現することが明らかとなった。しかし、*Md-ACS2* のプローブを得ることができなかったため、この遺伝子の発現については検討しなかった。

## II *Md-ACS1* の対立遺伝子型とリンゴ果実内エチレン濃度の関係

リンゴ栽培品種‘ゴールドデンデリシャス’のライプニング時に発現する ACC 合成酵素遺伝子 (*ACS1*) は基本遺伝子型である 1-1 型と、この 5' 上流域にレトロポゾン *Md-SINE1* が挿入した対立遺伝子 1-2 型の両者がヘテロ型の状態で存在する。この品種のクリマクテリック果実には 1-1 型の強い発現は認められるが、1-2 型からの転写物は検出されない。また、1-2 型ホモである‘ふじ’では 1-2 型の転写物が確認されるが、その転写量は低く、同時にクリマクテリック時果実の内部エチレン量も少ない。以上のことから 1-2 型遺伝子はプロモーター領域の変異によって *ACS1* の転写活性が低下しているものと考えられた。

リンゴ果実のエチレン生成量は品種によってかなり異なることが知られている (Chu 1988, Gessman et al. 1993, 壽松木ら 1997)。一方、リンゴの栽培品種は PCR 法により *Md-SINE1* 挿入の有無を診断することで、*Md-ACS1* の 1-1 型と 1-2 型の各ホモ型および両者からなるヘテロ型の 3 群に分類することができる。そこで、*Md-ACS1* の遺伝子型とライプニング時の果実内エチレン量との関係について検討するため、熟期が異なる 30 種以上の栽培品種を対照に果実内エチレン量を計測した。また、*ACS1* のヘテロ型同士、‘王林’×‘グラニースミス’の交雑実生群から得られた果実についても同様の検討を進めた。

### 材料および方法

#### 1. 実験材料

弘前大学農学部附属藤崎農場および青森県りんご試験場で栽植されているリンゴ栽培種を材料として使用した。また、‘王林’×‘グラニースミス’の  $F_1$  個体は外観、食味、日持ち性等の優れた晩生優良品種の育種事業の一環として、農林水産省果樹試験場りんご支場 (盛岡) にて 1989 年に交配された実生個体群を使用した。これらの個体から適期収穫された果実は 20°C 暗所に 12 日間静置することで、クリマクテリック段階へと誘導し、エチレン測定のための材料とした。以上の調査は 1998 年に行った。一方、1997 年の栽培種でのエチレン量測定には適期収穫果実を直ちに 4°C の大型貯蔵庫に保管したものを材料とした。1997 年 12 月 8 日に全品種を一斉に出庫し 20°C、12 日間静置後、エチレン量を測定した。

#### 2. 果実内エチレン量の測定

クリマクテリック果実の内部エチレン濃度の測定は果実の陽光面とその反対側より果肉の一部を包丁で切り取り (約 30 g)、このブロックをデシケーター

内の十分に脱気された蒸留水中に沈め、逆さにしたガラス製のロートを用いて減圧下で回収された果肉内のガスを注射器で 1 ml 採取し、これをサンプルとした。測定は FID-ガスクロマトグラフィー (島津 GC-8A), 直径 3 mm, 長さ 2 m の活性アルミナカラムにて行った。各品種ごと 5 個の果実を使用し、その平均を測定値とした。

### 3. *Md-ACS1* の対立遺伝子型の判定

各個体の成葉から全 DNA を抽出し (Varadarajam et al. 1992), これをテンプレートとして PCR を行った。用いたプライマーは下記に示した。

ACS1-F 5' AGAGAGATGCCATTTTTGTTCGTAC3' 861-887

ACS1-R 5' CCTACAAACTTGCGTGGGGATTATAAGTGT3' 1379-1350

数値は Accession No. U89156 の塩基配列番号に対応する。反応液の電気泳動像より、増幅産物のサイズの違いから 1-1 型, 1-2 型を判定し、各個体の *ACS1* の遺伝子型を決定した。

## 結果

### 1. *ACS1* 遺伝子型の分類

*Md-ACS1-1* の転写開始点より上流 781bp (この部位に *Md-ACS1-2* では *Md-SINE1* が挿入されている) の前後に設定したプライマー (ACS1-F, ACS1-R) を用いた PCR 実験により、リンゴ栽培品種および野生種の *ACS1* の遺伝子型を判定した。検定した材料の総てにおいて、基本型 (1-1 型) と SINE 挿入型 (1-2 型) に対応する 489bp と 655bp の PCR 産物のどちらか一方、もしくは両者が得られた (図 3-2)。これらの結果から、供試材料は 1-1 ホモ型, 1-1/1-2 ヘテロ型, 1-2 ホモ型の 3 つに分類された。調査した 11 種の野生種では 8 種が 1-1 ホモ, 3 種が 1-1/1-2 ヘテロ型であった。

### 2. リンゴ栽培品種の果実内エチレン量

*ACS1* の遺伝子型と果実内エチレン量の関係を明らかにする目的でライプニング果実内のエチレン量を測定した。熟期が異なる (7 月中旬から 11 月上旬まで) 栽培品種をそれぞれの適期に収穫し、さらにクリマクテリック段階へと到達させるために 20°C, 12 日間静置した後に、1 品種につき 5 個の果実についてエチレン量を測定した。その平均値を示したのが図 3-3 である。また、ここで得られたデータの一部を 1997 年の測定値と対比させ、その相関を表したものが図 3-4 である。両年の測定値には高い正の相関 ( $r = 0.76$ ) が得られたことから、各品種間の内部エチレン量の高低は遺伝的要因によるものと判断された。さらに、両図から判断されるように、*ACS1* の 1-2 型をホモ型で有する品種は 1-1 型を有する遺伝子型のそれらに比べ、明らかにエチレン量が低いことが判明した。

### 3. F<sub>1</sub> 個体による解析

‘王林’ × ‘グラニースミス’ の F<sub>1</sub> 個体群を用いてエチレン量の測定を行った。PCR で遺伝子型が判定された 16 個体中、13 個体より果実が収穫された。図 3-5 は F<sub>1</sub> 個体から得られた果実ごとの測定値をプロットしたものである。1-2 型と判定された個体の果実は明らかにエチレン量が少なかった。また、ヘテロ型の個体からの果実は 1-1 ホモ型に比べてエチレン量が少ない傾向が認められた。以上のことから、F<sub>1</sub> 個体群においても 1-2 型のリンゴは 1-1 型を有する個体に比べエチレン量が少ないことが明らかになった。

### 考察

エチレン生合成系の ACC 合成酵素遺伝子 (*Md-ACS1*) は対立遺伝子が存在し、その *ACS1-2* はプロモーター領域に *Md-SINE1* が挿入したことによって、転写量が低下した変異遺伝子であるものと考えられた。さらに、*ACS1-2* の変異遺伝子は転写量だけではなく、エチレン量にも影響することが明らかとなった。しかし、‘ゴールドデンデリシャス’ や ‘ふじ’ による 1-2 型の転写量の低下は *SINE* の挿入が原因であるとは断定されない。1-2 型の 5' 隣接領域には *SINE* 挿入以外にも基本の 1-1 型と異なる箇所がある。仮にそれが発現転写調節のシス因子に参与するボックス内の塩基置換であったとすれば、そのことが転写能に大きな影響を与えることになる。*ACS1-2* の転写量低下の原因が *SINE* 挿入の結果であることを証明するためには、詳細なプロモーター解析が必要となる。

果実内エチレン量の測定はリンゴの栽培品種と F<sub>1</sub> 個体群を対照とした。リンゴは他殖性であるため様々な遺伝子の変異が蓄積している。そこで、‘王林’ × ‘グラニースミス’ の F<sub>1</sub> 個体群を用い、他の遺伝的背景を少なくした実験材料を用いた。この結果においても、1-2 ホモ型では明らかにエチレン量が低いという結論が得られた (図 3-6)。さらに、1-1/1-2 ヘテロが 1-1 ホモに比べエチレン量が低い傾向を示したことから、*ACS1* の発現は半優性であるものと推測された。

トマトでは 8 つの *ACS* 遺伝子の内、2 つ (*LE-ACS2*, *LE-ACS4*) がライプニングに参与している (Oetiker et al. 1997)。リンゴの場合、*ACS1*, *ACS2*, *ACS3* の cDNA が果実から単離されている (Lay-Yee and Knighthon 1996, Rosenfield et al. 1997)。RNA ゲルブロット解析から、*ACS1* はライプニング果実に特異的に発現しているのに対し、*ACS3* は構成的であることが示された。*ACS2* を含め未単離の *ACS* 遺伝子の存在も予想されることから、各 *ACS* のライプニング時のエチレン生成への寄与率を明らかにするには発現解析を慎重に行う必要がある。しかし、*ACS1* の遺伝子型の違いのみでエチレン量に大きな差が認められたことは、*ACS1* の産物がクリマクテリック果実のエチレン生成における

主要な酵素はであることを示している。

トマトでは ACS や ACO (ACC 酸化酵素) のアンチセンス RNA を発現させることで、果実の日持ち性を大幅に高めた (Oeller et al. 1991)。リンゴにおいてもエチレン生成量が抑えらると、日持ち性 (貯蔵性) が高くなると予想される。実際、1-2 型と判定されたものは ‘ふじ’ をはじめとして、一般に貯蔵性が良いとされている品種である (佐藤 1999)。さらに、図 3-3 では ACS1-2 型が 1-1 に比べ、晩生の品種に多い傾向がみられる。エチレンの生成量を抑制することでライプニングが遅れ、収穫適期が後退することも考えられることから、ACS 遺伝子は貯蔵性だけではなく、収穫時期にも影響している可能性がある。

遺伝子型を分類したとき (表 1)、野生種では 1-1 ホモ型が最も多く、1-1/1-2 ヘテロ型は 3 種でのみ認められ、1-2 ホモ型が存在しなかった。このことは、リンゴ野生種では栽培種に比べ全体的に 1-2 ホモ型が少ないといえる。ACS1 の変異体は貯蔵性には有効であるが、ライプニングがゆっくり進行するために、香りが少なく、また成熟が遅れることから、野生種そのものにとっては、なんら有益な形質ではなかった可能性もある。一方、近年の育成品種の中には、‘さんさ’ や ‘青り 9 号’ など 1-2 ホモ型が多く、1-2 ホモ型が育種で優先的に選抜されてきたことを意味する。このことは逆に、ACS1 遺伝子を DNA マーカーとすることで、貯蔵性の ‘良し悪し’ を選抜できることも意味する。リンゴは交配してから結実するまで数年を要することから、果実形質 (果皮色、食味、貯蔵性など) の調査には膨大な時間と圃場スペースを必要とした。DNA マーカーによる貯蔵性診断は実生の段階で可能であることから、今後のリンゴ育種における有効な選抜手段となろう。

### Ⅲ リンゴ各組織における ACS の発現解析および新たに単離された *Md-ACS5A*, *Md-ACS5B* の解析

エチレンは植物のさまざまな成長を調節するホルモンであり、また、傷害やオーキシンの処理により、その生成量が一過的に増加する。さらに果実の追熟（ライプニング）を促進する作用は古くより知られている現象である。エチレン生成系の律速酵素は 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸合成酵素 (ACS) であること、また、その遺伝子はファミリーを構成し各遺伝子が機能を分担していることが判ってきた。リンゴでは、これまで 3 種類の ACS 遺伝子 (*ACS1*, *ACS2*, *ACS3*) がいずれもライプニング時の果実から cDNA として単離され、他の 1 種類 (*ACS4*) は培養シュートで IAA により誘導されることがわかっているが、その他についての発現はほとんど報告がない。リンゴ果実では *ACS3* がクライマクテリックの前後で比較的構成的に発現するのに対し、*ACS1* はクライマクテリック時に強く発現することを報告した。本章では *ACS1* および *ACS3* の両 ACS 遺伝子が果実以外の組織でどのように発現するのかを調べた。また、傷害によるエチレン生成にはこれらの遺伝子が関与しなかったため、ACS 遺伝子の degenerate primer を用いて新たな ACS 遺伝子 (*Md-ACS5A*, *Md-ACS5B*) を単離し、その発現パターンの解析も行った。

#### 材料及び方法

##### 1. 実験材料及びエチレン測定

リンゴ栽培品種‘王林’の培養シュートを用いた。シュートは継代培地 (MS 培地, 3% sucrose, 0.7 mg/l 6-benzylaminopurine, 100 mg/l inositol, 0.8% agar pH 5.8) で培養した。約 3 週間後のシュートを試験管に入れ、2 ml の buffer (5 mM MES, 0.55 M マンニトール pH 5.8) を加え、シリコン栓で密封し 25°C にて静置させた。2 時間ごとに注射器で 1 ml を採種し、ガスクロマトグラフィーでエチレン生成量 (nl/g/hr) を測定した。

##### 2. 5' RACE

前章と同様の方法で、エリシター処理した成葉から RNA を抽出し、1  $\mu$ g 相当の Total RNA 15  $\mu$ l を 70°C, 10 分間熱変性し氷上で急冷した後、全量 20  $\mu$ l の逆転写反応液 (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 1  $\mu$ M reverse primer, 1 mM dNTP, 50 units MuLV reverse transcriptase; PERKIN ELMER) 中で、42°C, 1 時間反応させて cDNA を合成した後、70°C, 15 分で反応を停止した。この合成された cDNA に 60 units/ $\mu$ l の RNaseH (TaKaRa) を 1  $\mu$ l 加えて RNA-DNA ハイブリットの RNA 鎖を分解した後、QIAGEN の PCR Purification Kit で DNA を精製した。これを 25  $\mu$ l の TdT 反応液 (0.1 M カコ

ジル酸ナトリウム, 0.1 mM DTT, 2 mM  $MnCl_2$ , 0.4 mM dCTP, 13 units Terminal Deoxynucleotidyl Transferase; TaKaRa) 中で 37°C, 15 分→65°C, 10 分反応させ cDNA の 5' 末端に C を付加させた. この反応液 5 $\mu$ l を全量 50 $\mu$ l の PCR 反応液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTP, 0.4  $\mu$ M Oligo-dG primer, 0.4 mM reverse primer, 2.5 units Ampli Taq Gold™; PERKIN ELMER) 中で PCR 反応を行った. 増幅した DNA はさらに内側のプライマーを用いて PCR 反応を行った.

### 3. TA クローニング

増幅した PCR 産物は PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後, TA クローニングを行った. TA ベクターは pBluescript II KS+ を *EcoRV* で切断した後, フェノール/クロロフォルム処理し, その上層をエタノール沈殿した. これを 40 $\mu$ l の反応液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM dTTP, 2.5 units Ampli Taq Gold™; PERKIN ELMER) 中で 75°C, 2 時間反応させてベクターに T を付けた. PCR 産物と, ベクターは DNA Ligation Kit II (TaKaRa) を用いて 16°C, 一晚ライゲーション反応を行った後, コロニートランスフォーメーション法によって形質転換した. 形質転換させた大腸菌は SOC 液体培地 (2% バクトトリプトン, 0.5% バクトイーストエキストラクト, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$ , 20 mM グルコース) で 37°C, 1 時間振盪培養を行った後, アンピシリン (終濃度 50 $\mu$ g/ml), X-Gal (終濃度 200 $\mu$ g/ml), IPTG (終濃度 200 $\mu$ g/ml) を LB 上層寒天培地 (1.0% バクトトリプトン, 0.5% バクトイーストエキストラクト, 1.0% NaCl, 0.8% 寒天) 上で 37°C 一晚培養し, コロニーを形成させ, この内, 白色コロニーを組換え体として選抜した.

### 4. プラスミド DNA 調製

目的のプラスミドの入った大腸菌を LB 液体培地 (終濃度 50 $\mu$ g/ml アンピシリン) 中で 37°C 一晚振盪培養した. 8,000 rpm で 5 分間遠心し, 集菌した後, 上清を捨て沈殿を TEG (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM グルコース) で懸濁し, リゾチーム-TEG (10 mg/ml リゾチーム) を加えて攪拌した. アルカリ SDS 溶液 (0.2 N NaOH, 1% SDS) を加え 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.5) を加え 10,000 rpm 10 分間遠心した. 上清を回収し等量のイソプロパノールを加えて, -20°C に 20 分間放置後, 15,000 rpm で 10 分間遠心し, プラスミド DNA を沈殿させた. 沈殿物を TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解し, RNase (0.1 mg/ml) で 37°C 30 分間 RNA を分解した後, フェノール/クロロフォルム処理して, 上層を回収し, エタノール沈殿させ, DNA を TE buffer に溶解した.

### 5. シークエンス反応



プラスミド DNA は, SequiTherm™ Cycle Sequencing Kit-LC (for LI-COR Sequencing) (Epicenter Technologies) を用いてシーケンス反応させた. シーケンス反応物を DNA sequencer Model 4000L (LI-COR) によって読みとった後, Base Image IR Software Version 2.10 (LI-COR) を用いて解析を行った.

## 6. サザン解析, ノーザン解析及び RT-PCR

サザン解析, ノーザン解析及び RT-PCR は第 2 章と同様に行った. ACS5 のプローブはエリシター処理した成葉から抽出した RNA を RT-PCR し, それをクローニングした ACS5A のプラスミドを PCR したものをを用いた. この PCR で用いたプライマーと RT-PCR に用いた degenerate primer を下記に示す. 尚, 数値は図 4-3 の ACS5A に対応する番号である.

degenerate F	5' TTYCARGAYTAYCAYGG3'	79-95
degenerate R	5' ACNARNCCRAARCTNGACAT3'	737-718
ACS5F	5' ACATCGAATGCAACCGCAACCTTA3'	592-616
ACS5R	5' TCTAAGTGGCTCGAACCAAGAGG3'	1276-1255

## 結果

### 1. ACS 遺伝子の各組織での発現

ACS1 および ACS3 の両 ACS 遺伝子が果実以外の組織でどのように発現するかを調べた. まず, リンゴの各組織より RNA を抽出し, ノーザン解析を行った (図 4-1). すなわち, クライマクテリック時の果実, 開花後約 70 日目の健全葉, 種子発芽時の幼根, 継代培養のシュートの茎, このシュートの葉, 結実後約 1 ヶ月後の離層形成が認められた果柄をそれぞれ, 果実, 成葉, 根, 茎, 幼葉, 離層として解析を行った. その結果, ACS1 は果実のみで発現が認められ, その他の組織ではシグナルが得られなかった. 一方, ACS3 をプローブとしたとき, 成葉, 幼葉で最も高く, 茎での発現も高かったが, 果実, 根, 離層では低い発現しかみられなかった.

次に, 成葉をみじん切りにしたものを傷害処理, 細胞壁分解酵素溶液 (セルラーゼオノズカ RS, マセロザイム R-10, ペクトリアーゼ Y-23 の混合液) に葉身を浸したものをエリシター処理として, 成葉でのエチレン生合成系の誘導を行った. これらの処理によるエチレン生成量を図 4-2 に示した. それぞれ, エリシター処理で 6 時間後, 傷害処理で 4 時間後に 205 nl/g/hr, 83 nl/g/hr という最大値を示し, その後減少した. これらの各処理組織から RNA を抽出し, ACS1 及び ACS3 の発現を検討したところ, 両遺伝子の発現は, 対照区と大きな差がなかった.

### 2. ACS5A, ACS5B の単離

傷害やエリシターによる誘導時のエチレン生成には他の ACS 遺伝子の関与が示唆されたため、ACS 遺伝子に共通な degenerate primer を用いて RT-PCR を行い、それをクローニングした。エリシター処理のサンプルから 5 クローン、離層のサンプルから 3 クローンの塩基配列を決定したところ、今までに報告されている ACS 遺伝子とは異なる新たな ACS が 2 種類確認された。さらに 3' RACE と 5' RACE を行い、ほぼ全長の塩基配列を決定した (図 4-3)。この 2 つは塩基配列全体では 85.9%，開始コドンから終止コドンまでは 93.3%，アミノ酸配列では 94.3% と非常に高い相同性を示したことから、それぞれを *Md-ACS5A*、*Md-ACS5B* とした。

これらのアミノ酸配列と既存のリンゴ ACS のアミノ酸を比較したのが図 4-4 である。*ACS5A* アミノ酸配列は *ACS1*、*ACS2*、*ACS3* のアミノ酸配列とそれぞれ 55.5%，74.5%，57.8%，*ACS5B* は 54.9%，75.3%，58.1% の相同性があった。また、この 2 つには ACS で保存されているアミノ酸や ACS の補酵素である PLP (pyridoxal-5-phosphate) の結合部位が保存されていた。

### 3. ACS5 のサザン解析

*ACS5A*、*ACS5B* の共通領域をプローブとしてサザン解析を行った (図 4-5)。図 4-5A は 'ゴールドデンデリシャス' のゲノミック DNA を *Ssp I*、*EcoR I*、*Hind III* で切断した。その結果、*Ssp I* で 2.25kb と 1.4kb の 2 本、*EcoR I* で 3.1kb と 1.8kb の 2 本、*Hind III* で 4.6kb の 1 本のバンドが検出された。用いたプローブ上にはこれらの制限酵素認識部位は存在しない。また、*Ssp I* 認識部位は *ACS5A* のプローブの外側の 3' 末端側に存在するが、*ACS5B* には存在しなく、結果として *Ssp I* 消化物での 2 本のバンドは *ACS5A* と *ACS5B* であることが示された。

図 4-5B はリンゴ 7 品種から抽出した DNA の *EcoR I* 切断によるサザン解析の結果であるが、いずれの品種においても共通する 2 本のバンドが観察され、品種間での多型が見られなかった。

### 4. ACS5 の発現解析

サザン解析に用いた *ACS5* のプローブで各組織及び各誘導条件下におけるノーザン解析を行った (図 4-1)。成葉や幼葉においては微量な発現が見られたが、果実や根、茎、離層ではほとんどシグナルが得られなかった。一方、成葉を用いたエリシターおよび傷害処理では発現量が増加していることが確認できた。このことから、*ACS5* は傷害誘導型の ACS と考えられ、また、果実では発現していないことが判った。

### 考察

リンゴ果肉以外の組織での ACS 遺伝子の発現について調査した。先ず、1-2 型 *ACS1* が果実以外の組織におけるエチレン生成に影響を及ぼす可能性について調査することを目的とした。トマトではライプニングに発現する遺伝子が 2

つ (*LE-ACS2* と *LE-ACS4*) 存在する (Lincoln et al. 1993, Nakatsuka et al. 1998) が, その内の 1 つ, *LE-ACS2* はライプニング以外でも発現が認められている (Spanu et al. 1993, Oetiker et al. 1997, Shiu et al. 1998). しかし, 本章の結果は少なくとも調査した組織および誘導条件下では *ACS1* の発現が認められないことが明らかになった.

調査した各組織の中で, 一般にエチレン生成が確認されている組織は果肉と離層組織だけである. 離層とは葉, 花, 果実が茎から脱離する場合, それらの器官の基部に形成される特殊な細胞層であり, この形成にはエチレンが関与することが知られている (近藤ら 1995, Clark et al. 1997, McManus et al. 1998). リンゴでは落花後 3-6 週間は早期落果 (ジュエンドロップ) という生理落果が起きやすく, この時期の果柄には離層形成が見られる. 早期落果は 'デリシャス' 系品種, 'つがる', '紅玉' で発生が多く, 1-2 ホモ型である 'ふじ' や '国光' では少ない (岡本 1996). そのため, 離層形成における *ACS1* の関与が予想されたが, この組織から抽出した RNA からは *ACS1* の転写が認められなかった.

また, 傷害やエリシターによるエチレン発生誘導時に関しても調査した. トマトでは果実に傷害を与えると *LE-ACS2* および *LE-ACS4* の発現が高まる (Lincoln et al. 1993). また, 懸濁培養細胞へのエリシター処理は *LE-ACS2* の発現を高める (Spanu et al. 1993, Oetiker et al. 1997). しかし, リンゴ成葉へのこれらの処理は一過性のエチレン生成を誘導するにも関わらず, *Md-ACS1* の発現が認められなかった.

以上の結果は *ACS1* がライプニング果実においてのみ特異的に発現していることを示唆する. リンゴ品種では *ACS1* の変異遺伝子型 (1-2 型) をホモ型でもっている品種が存在することから, もし *ACS1* が果実以外の組織においても発現され生理的に機能しているとすれば, 1-2 ホモ型品種の生育において何らかの障害が起こる可能性がある. トマトのエチレンレセプターの変異体 Nr (Never ripe) は果実のライプニングが進行しないと同時に, 離層形成や老化現象などへの多面発現が生ずる (Lanahan et al. 1994). しかし, *Md-ACS1* の発現がライプニング果実特異的であることから, 1-2 ホモ型の個体においても生育が正常に進行し, 育成途上で淘汰の対象とならなかったのかもしれない.

一方, *ACS3* は成葉ではかなりの発現が認められたが, それに比べ, 根や離層, 果肉では発現が低かった. 成葉における *ACS3* の高い発現の生理的な意義について興味もたれる.

新たに単離された遺伝子 *ACS5A* と *ACS5B* は相同性が高いことから, 対立遺伝子であることも予想された. しかし, 3' 非翻訳領域の相同性が低い (56.3%) こと, 品種間で RFLP 多型が見られなかったことから, *ACS5A* と *ACS5B* は別の遺伝子である可能性が高い. また, これらは傷害とエリシターで発現が誘導されることが明らかとなった. 傷害とエリシターの直接的な関係については報告されていないが, 傷害により細胞壁が分解され, これがシグナルとなる可能性も示

唆されており (Bowles 1997), ここではとりあえず, まとめて傷害誘導型とした. 本章でのノーザン解析においては両遺伝子の相同領域をプローブとしたので, ACS5A と ACS5B の転写物の識別はできない. しかし, RACE や degenerate primer を用いた RT-PCR 解析では両遺伝子がほぼ同じ割合でクローニングされたことから, 遺伝子間にはエリシター誘導時の発現量に大きな差はないと予想された.

おわりに

クリマクテリック果実におけるライプニング時のエチレン生成は 2 段階の調節を受けていることが古くから知られている (McMurechie et al. 1972). 先ず、基本となる低レベルのエチレンが生成されるシステム 1 と呼ばれる状態があり、これはクリマクテリック段階に入っても継続する。一方、クリマクテリックにおいては自己触媒的に活発なエチレン生成が行なわれるシステム 2 の新たな機構が作動する。システム 1 からシステム 2 への移行には何らかのライプニングに関連するシグナルの存在が考えられているが、この分化制御機構の詳細は解明されていない。トマトでは *rin* (*ripening inhibitor*) や *nor* (*nonripening*) と呼ばれる遺伝子座の関与が示唆されている (Yen et al. 1995, Giovannoni et al. 1995). また、Nakatsuka et al. (1998) はトマトの果実において、システム 2 では ACS (*LE-ACS2*, *LE-ACS4*), ACO (*LE-ACO1*, *LE-ACO4*), エチレンレセプター (*NR*) の発現が上昇することから、これらの positive feedback 機構を明らかにし、*NR* の発現がシステム 1 からシステム 2 への移行をコントロールしている可能性を考察している。リンゴにおいても *Md-ACS1* の発現がエチレンによって同様に positive に制御されている可能性があり、興味もたれる。

リンゴの野生種の一部に *Md-ACS1-2* 変異遺伝子型が正常型とのヘテロ型の状態で存在していた。現代リンゴの基本となった野生種が定かではないことから断定はできないが、野生リンゴにおいて存在していた *Md-ACS1-2* 変異遺伝子が現代リンゴの成立当初に持ち込まれていたものと推察される。また、本研究において調査した野生種には変異遺伝子のホモ型が存在しなかった。ライプニングがゆっくりと進行してしまう野生種では熟期が後退することが予想され、ホモ型は自然淘汰の対照となったかも知れない。しかし、リンゴ栽培種の中には極早生品種にも 1-2 ホモ型が存在することから、*Md-ACS1-2* が直接、果実の熟期に影響を及ぼすとは考えられない。

トマトにおける ACS (Oeller et al. 1991) や ACC 酸化酵素 (Hamilton et al. 1990) のアンチセンス遺伝子による形質転換体が、果実のエチレン生合成を抑制し日持ち性を向上させる手段として有効であることが実証されて以来、リンゴにおいてもこれらの形質転換体の作出が各国で進められている (Zamani and Godwin 1998). しかしながら、ライプニング時のエチレン生成を大幅に抑制する遺伝的特性が、既に *Md-ACS1-2* ホモ型の品種では備わっていることが本研究から判明した。調査された 83 種のりんご栽培品種および系統の中で 18 種がホモ型と確認されている (未発表). この中には、本研究においても使用した ‘ふじ’ が存在する。この品種の特性は食味が良好な上に貯蔵性が高いことである。また、晩生品種であることから CA 貯蔵は 7 月まで可能であるとされている (山田 1984). 1939 年に交配育成、1962 年 ‘ふじ’ と命名されて以来、急速にその栽培面積が拡大し、現在では全国生産量の約半数を占めている。さらに、アジアや欧米諸国においても栽培化が進み、最近では果実の逆輸入が行なわれよ

うとしている。また、次期の主要品種として普及が期待される青森県りんご試験場の新品種‘青り 9 号’や農林水産省果樹試による育成品種‘さんさ’も共に 1-2 型であった。一方、1-2 ホモ型品種群のエチレン生成量にも品種差があるものと判断された。例えば‘恵’は‘ふじ’などに比べるとさらに一桁低いエチレン量を示した。ACS1-2 型に加えて更なる変異の分子機構が存在する可能性がある。しかしながら、エチレン生成を極度に低下させることは果実からの甘味や芳香物の過度な減少をもたらす、本来の良好な食味特性を失うことも予想される。さらに、リンゴの貯蔵力には内部褐変などのいわゆる貯蔵障害に対する抵抗性も関与することから、Md-ACS1 の遺伝子型のみで貯蔵性が総て解決されるものではないだろう。しかし、Md-ACS1-2 ホモ型が日持ち性の大幅な向上を生み出した必要条件であったものと考えらる。

リンゴの育種は長年月と広大な圃場を必要とし多大な費用と人力が費やされてきた。そこで、交雑実生の幼苗段階での DNA マーカーによる選抜は大幅な育種の効率化をもたらすことになるだろう。リンゴにおいては既に病害抵抗性や果皮色の DNA マーカーが設定されてきた。本研究で明らかにされたライブニング果実内エチレン量制御遺伝子型の遺伝子診断は極めて優良な DNA マーカーを提供することになる。本研究の成果が世界各地のリンゴの育種において大いに活用されることを期待する。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、農林水産省果樹試験場りんご支場育種研究室の副島淳一室長、青森県りんご試験場育種部の佐藤耕研究管理員、弘前大学農学部附属藤崎農場の塩崎雄之輔教授には貴重な実験材料を提供していただきました。ここに謝意を表します。

また、本報告書は弘前大学農学生命科学部育種・遺伝学教室の大学院生砂子智美さん、桜庭和歌子さんの修士論文の研究成果を中心として作成したものであり、ここに記して心からお礼申し上げます。

## 引用文献

- Blume, B., C. S. Barry, A. J. Hamilton, M. Bouzayen, D. Grierson (1997) Identification of transposon-like elements in non-coding regions of tomato ACC oxidase genes. *Mol. Gen. Genet.* 254 : 297-303
- Bowles, D. J. (1997) The wound response of tomato plants: analysis of local and long range signalling events. *Essays in Biochemistry* 32 : 161-169
- Chu, C. L. (1988) Internal ethylene concentration of 'McIntosh', 'Northern Spy', 'Empire', 'Mutsu' and 'Idared' apples during the harvest season. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 : 226-229
- Clark, D. G., C. Richards, Z. Hilioti, S. Lind-Iversen and K. Brown (1997) Effect of pollination on accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts, ethylene production and flower petal abscission in geranium (*Pelargonium × hortorum* L.H.Bailey). *Plant Mol. Biol.* 34 : 855-865
- Dong, J. G., W. T. Kim, G. A. Thompson, L. Li, A. B. Bennet and S. F. Yang (1991) Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta* 185 : 38-45
- Giovannori, J. J., E. N. Noensie, D. M. Ruezinsky, Z. Lu, S. L. Tracy, M. W. Gannal, G. B. Martin, K. Pillen, K. Alpert and S. D. Tanksley (1995) Morecurar genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol. Gen. Genet.* 248 : 195-206
- Gussman, C. D., J. C. Goffreda, J. C. and T. J. Gianfagna (1993) Ethylene production and fruitsoftening rates in several apple fruit ripening variants. *HortScience* 28: 135-137
- Hamilton, A. J., G. W. Lycett, D. Grierson (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346 : 284-287
- Harada, T., T. Sunako, W. Sakuraba, S. Goto, M. Senda, S. Akada and M. Niizeki (1997) Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) in apple (Accession No. U89156)(PGR). *Plant Physiol* 113: 1465
- Harada, T., T. Sunako, W. Sakuraba, M. Senda, S. Akada and M. Niizeki (1998) *Md-ACS1*, a fruit ripening 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of apple. *Breeding and biotechnology for fruit trees NIFTS/CSIRO* : 42-45
- Kim, W. T., A. Silverstone, W. K. Yip, J. G. Dong and S. F. Yang (1992) Induction of

1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol.* 98 : 465-471

Kondo, S., Uthaibutra, J. And Gemma, H. (1991) Comparison of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, abscisic acid and anthocyanin content of some apple cultivars during fruit growth and maturation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60: 505-511

近藤悟, 早田保義 (1995) リンゴ ‘つがる’ の後期落果および貯蔵中の果実品質に及ぼすアミノエトキシビニルグリシン (AVG) ならびに 2, 4-DP の影響. *園学雑* 64 : 275-281

Lanahan, M. B., H-C. Yen, J. J. Giovanonni and H. J. Knee (1994) The never ripe mutant blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6 : 521-530

Lay-Yee, M. and M. L. Knighton (1995) A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (Accession No.L31347)(PID:g606759). *Plant Physiol* 107:1017-1018

Lincoln, J. E., A. D. Campbell, J. Oetiker, W. H. Rottmann, P. W. Oeller, N. F. Shen and A. Theologis (1993) LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Biol. Chem.* 268 : 19422-19430

McMurchie, E. J., W. B. McGlasson and I. L. Eaks (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237 : 235-236

McManus, M. T., D. S. Thompson, C. Merriman, L. Lyne and D. J. Osborne (1998) Transdifferentiation of mature cortical cell to functional abscission cells in bean. *Plant Physiol.* 116 : 891-899

Nakatsuka, A., S. Murachi, H. Okunishi, S. Shiomi, R. Nakano. Y. Kubo and A. Inaba (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase and ethylene receptor gene in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.* 118 : 1295-1305

農林水産省統計情報部 (1998) 農林水産統計速報

Oeller, P. W., L. Min-Wong, L. P. Taylor, D. A. Pike and A. Theologis (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254 : 437-439

Oetiker, J. H., D. C. Olson, O. Y. Shiu and S. H. Yang (1997) Differential induction of



seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol. Biol. 34: 275-286

岡本五郎 (1996) 果実の発育とその調節 養賢堂

Rosenfield, C-L., E. Kiss and G. Hrazdina (1996) MdACS-2 (Accession No. U73815) and MdACS-3 (Accession No. U73816): Two new 1-aminocyclopropane-1 carboxylate synthases in ripening apple fruit. Plant Physiol:1735

佐藤耕 青森りんご試験場 私信 (1999)

Saymour, G. B., J. E. Taylor and G. A. Tucker (1993) Biochemistry of fruit ripening. CHAPMAN&HALL, London.

Shiu, O. Y., J. H. Oetiker, W. K. Yip and S. F. Yang (1998) The promoter of *LE-ACS7*, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato is tagged by a Sol3 transposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10334-10339

Spanu, P., T. Boller and H. Kende (1993) Differential accumulation of transcripts of 1 aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in tomato plants infected with *Phytophthora infestans* and in elicitor-treated tomato cell suspensions. J. Plant Physiol. 141 : 557-562

壽松木章・高橋敦・青葉幸二・増田哲男・樫村芳記 (1997) リンゴ数品種の成熟期における樹上果実および収穫果実のエチレン生成の比較. 園学雑 66: 495-503

Varaderajan, G. S., and C. S. Prakash (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the potato and its related species. Plant Mol. Bio. Rep. 9 : 6-12

山田三智穂 (1984) リンゴ栽培技術 津川力編 養賢堂 : 1-37

Yang, S. F., N. E. Hoffman (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35 : 155-189

Yen, H-C., S. Lee, S. D. Tanksley, M. B. Lanahan, H. J. Knee and J. J. Giovannoni (1995) The tomato never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* gene. Plant Physiol. 107 : 1343-1353

Zamani, Z. and P. Goodwin (1998) Genetic transformation of 'Red Delicious' apple with antisense ACC oxidase gene. X X V International Horticultural Congress

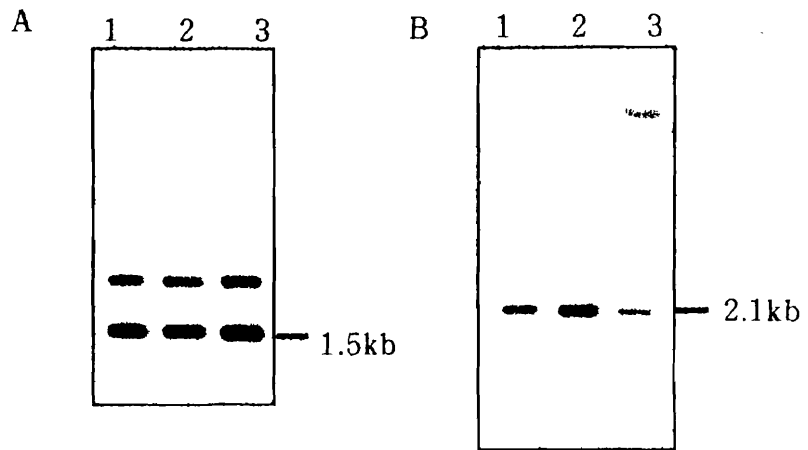


図 2-1 *Md-ACS1*の異なる領域をプローブとしたDNAゲルブロット解析. A. ACS1Aプローブ, B. ACS1Bプローブ. 1. ‘ふじ’ (1-2/1-2), 2. ‘ゴールデンデリシャス’ (1-1/1-2), 3. ‘印度’ (1-1/1-1). 制限酵素は*EcoR* Iを使用.

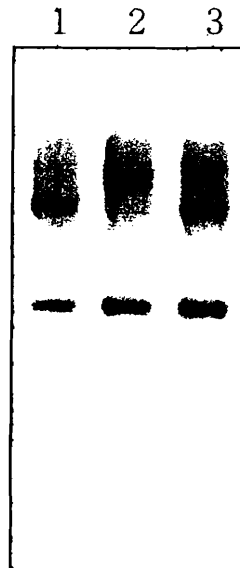


図 2-2 *Md-ACS3* の DNA ゲルブロット解析.  
1. ‘ふじ’, 2. ‘ゴールデンデリシャス’, 3.  
‘印度’. 制限酵素は *EcoR* I を使用.

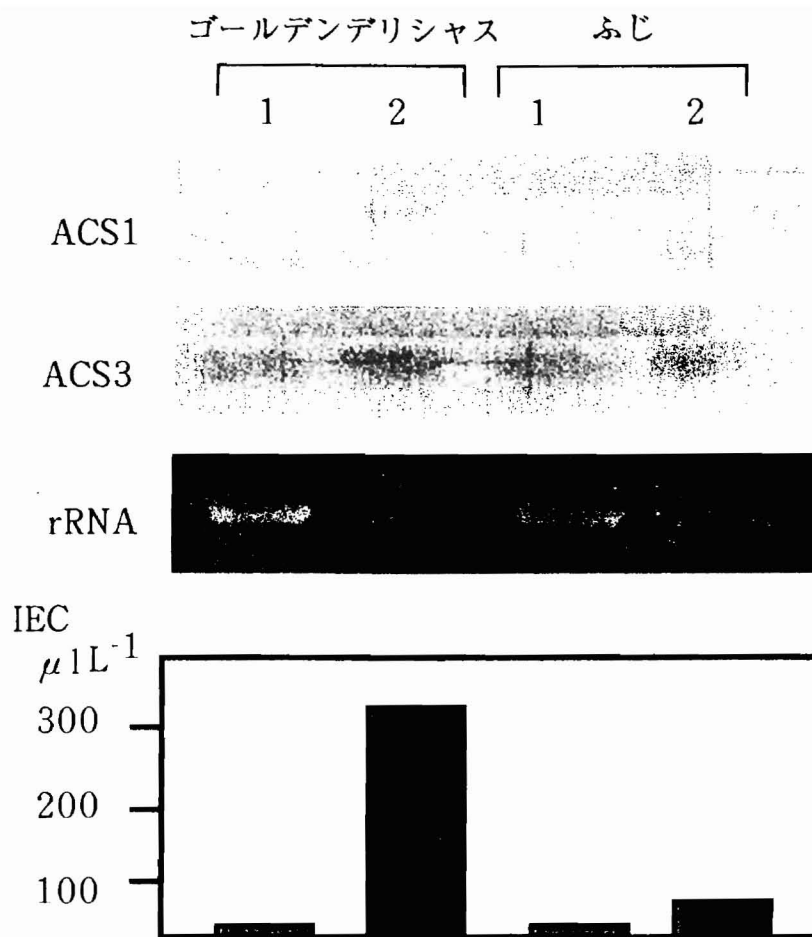


図 2-3 リンゴ果肉内のエチレン濃度と ACS1 と ACS3 の発現解析.  
1. プレクリマクテリック, 2. クリマクテリック

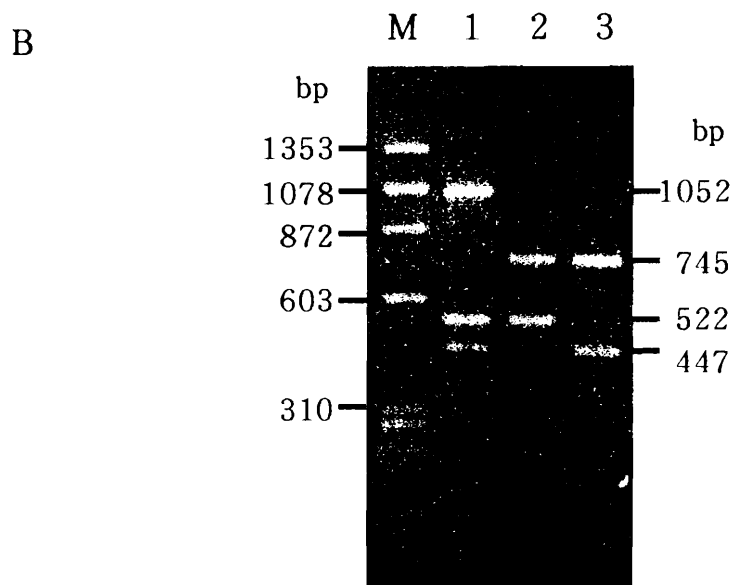
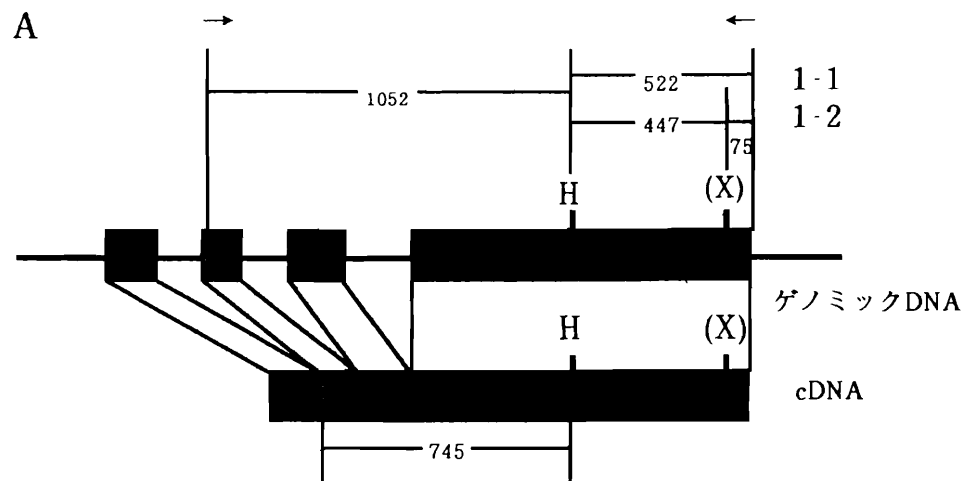


図2-4 RT-PCRによる*Md-ACS1*転写物の1-1型, 1-2型の判定.

A. *Md-ACS1*の構造. H; *Hind* III, X; *Xho* I. B. PCR産物の*Hind* III, *Xho* I消化物の電気泳動パターン. レーンM;  $\phi$  X174 *Hae* III, 1, 'ゴールドデンデリシヤス' ゲノミックDNA, 2; 'ゴールドデリシヤス' cDNA, 3; 'ふじ' cDNA.

表 3-1 リンゴ野生種の ACS1 遺伝子型

ACS1遺伝子型	種 名
1-1/1-1	<i>M*. baccata</i>
	<i>M. florentina</i>
	<i>M. floribunda</i>
	<i>M. hupehensis</i>
	<i>M. sargentii</i>
	<i>M. sieboldii</i>
	<i>M. spectabilis</i>
	<i>M. Pumila</i>
	1-1/1-2
<i>M. toringoides</i>	
<i>M. yunnanesis</i>	

\* *Malus*

表 3-2 リンゴ栽培種の ACS1 遺伝子型

遺伝子型	品種番号*	品種名
1-1/1-1	1	American Summer Pearmain
	2	Bancroft
	3	Fu Jin
	4	Indo
	5	Jerseymac
	6	Julyred
	7	McIntosh
	8	Puritan
	9	Viking
	10	Vista Bella
1-1/1-2	11	Beacon
	12	Golden Delicious
	13	Golden Melon
	14	Granny Smith
	15	Jonagold
	16	Jonathan
	17	Mikilife
	18	Mutsu
	19	Orin
	20	Raritan
	21	Starking Delicious
	22	Tangier
	23	Tsugaru
	24	Toko
1-2/1-2	25	Akane
	26	Discovery
	27	Fuji
	28	Himekami
	29	Himekomachi
	30	Iwakami
	31	Kaori
	32	Megumi
	33	Narihoko
	34	Sansa
	35	Ralus Janet

\*図 3-3～3-4 の品種番号を表す。

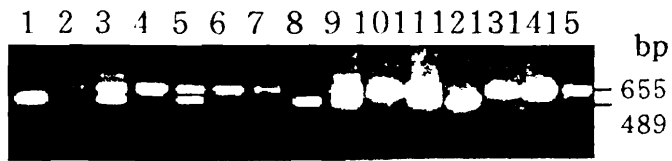


図 3-2 PCR による ACS1 遺伝子型の判定.

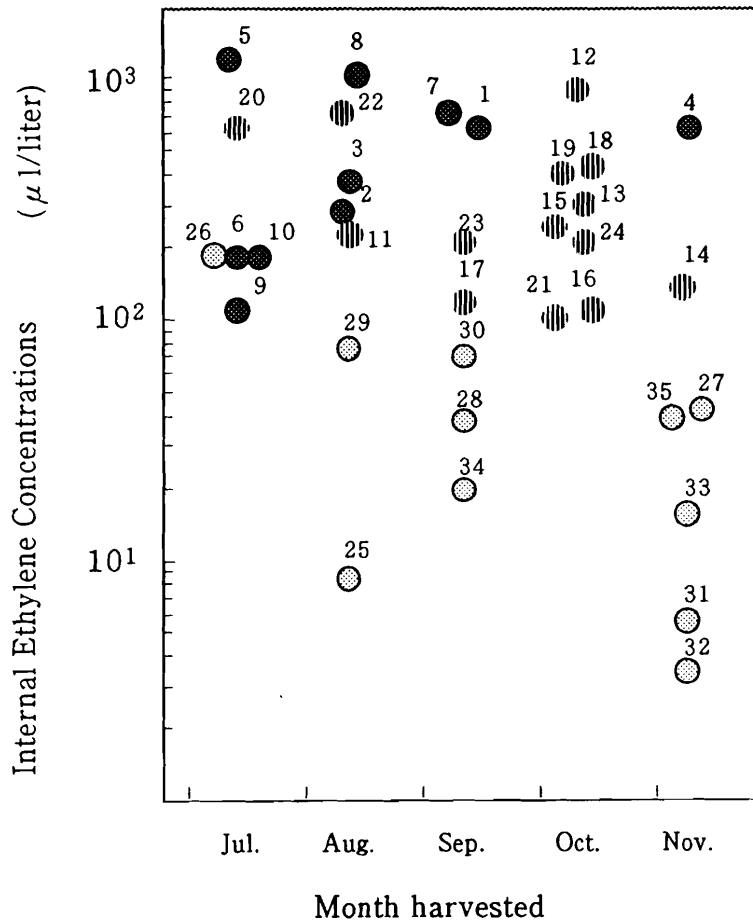


図 3-3 リンゴ栽培品種の内部エチレン量。  
 数値は表 3-2 の品種番号に対応する。●1-1 ホモ型, ▨  
 1-1/1-2 ヘテロ型, ⊙1-2 ホモ型。

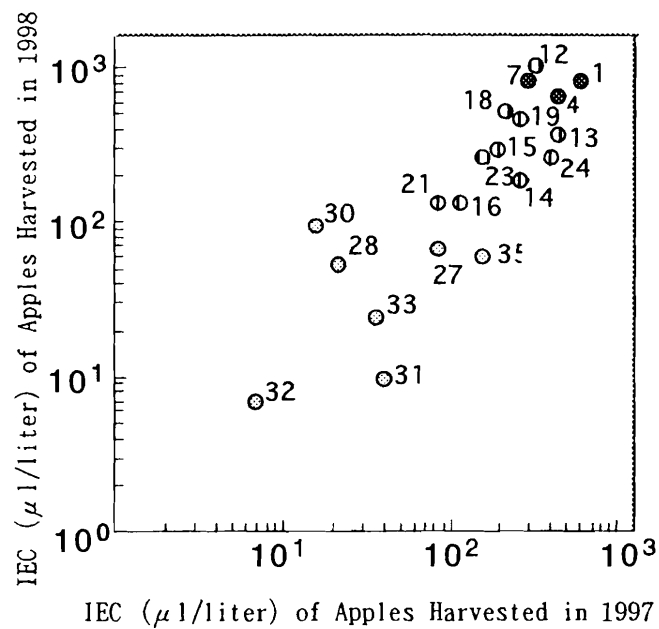


図 3-4 リンゴ栽培品種の内部エチレン量。  
 数値は表 3-2 の品種番号に対応する。● 1-1 ホモ型, ◐ 1-1/1-2 ヘテロ型, ○ 1-2 ホモ型。

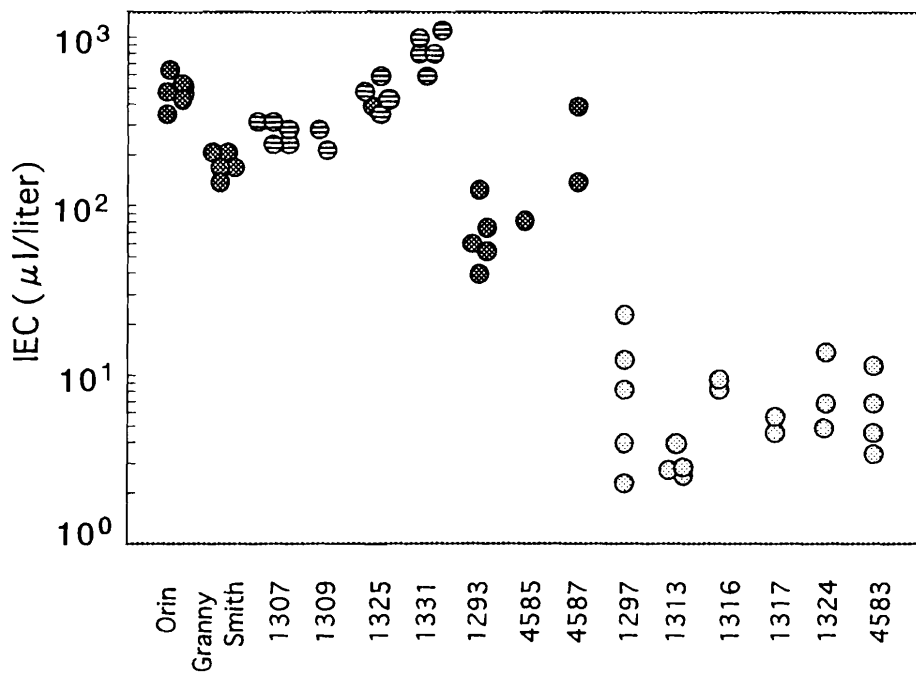


図 3-5 ‘王林’ および ‘グラニースミス’ とそれらのF<sub>1</sub> 個体群の内部エチレン濃度。数値はF<sub>1</sub> 個体番号。◐ 1-1 ホモ型, ● 1-1/1-2 ヘテロ型, ○ 1-2 ホモ型。



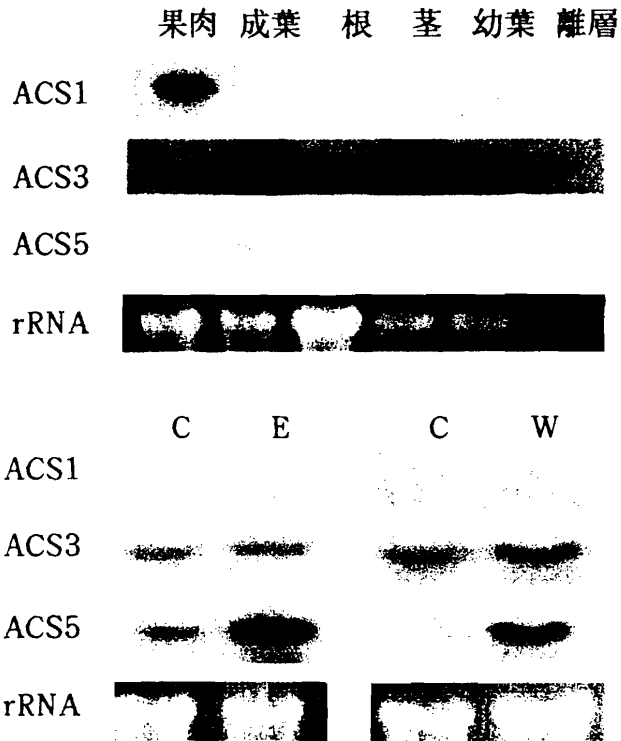
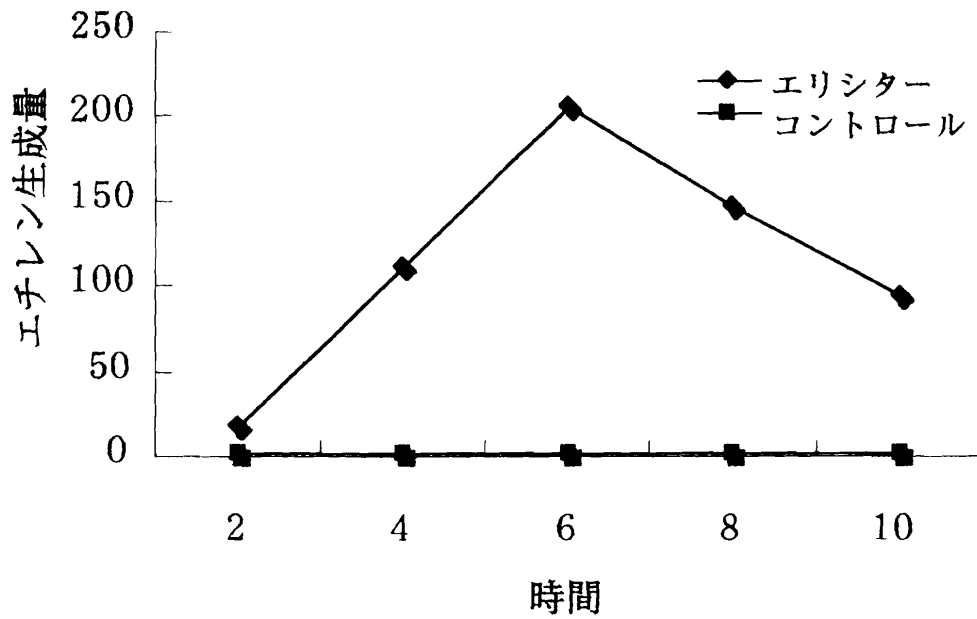


図 4-1 ACS1, ACS3, ACS5 のRNAゲルプロット解析.  
 C. コントロール, E. エリシター処理6時間後,  
 W. 傷害4時間後.

A nl/g/hr



B nl/g/hr

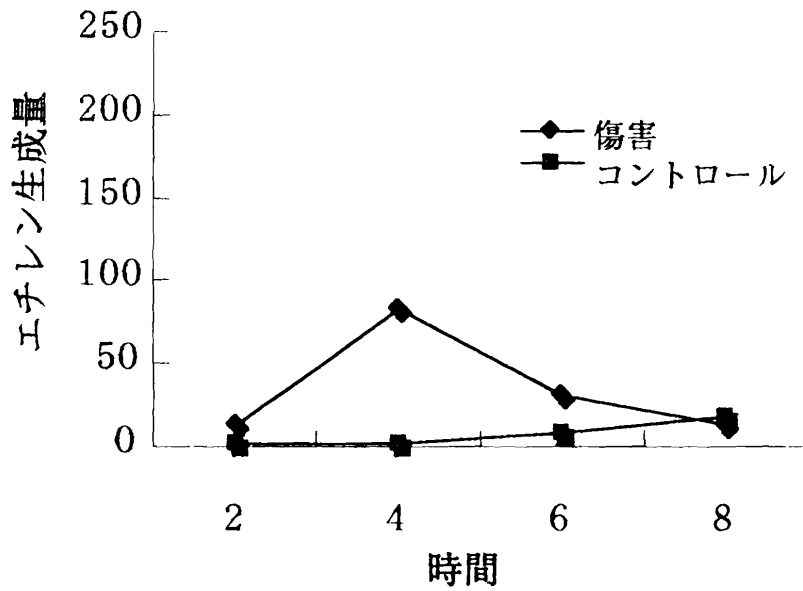


図 4-2 リンゴ成葉でのエリシター (A) および傷害 (B) 処理後のエチレン生成量の変化。

(A)

1 TAGAGATCTAGCTCCTCTATTCTCCATAGACTTTGATAGACTCCTCACAGCATTGCAGGG 60

61 ATTTTTTCAGGCGTTTAAAAAATGGGGTTTACTTTGAGCAACCAACAGCAACTGTTGTCTA 120  
1 M G F T L S N Q Q Q L L S 13

121 AGATAGCAACAAGCAATGGCCACGGCGAAAACCTCTCCATACTTTGATGGCTGGAAGGCTT 180  
14 K I A T S N G H G E N S P Y F D G W K A 33

181 ATGACAGTGATCCTTTTACCCACCAAGAACCCTAATGGGGTTATCCAGATGGGTCTTG 240  
34 Y D S D P F H P T K N P N G V I Q M G L 53

241 CAGAAAATGAAATGTGTTTTGATTTGATCCAAGAGTGGGTCTGAACAATCCAGAAGCCT 300  
54 A E N E M C F D L I Q E W V L N N P E A 73

301 CCATTTGCACAGCAGCAGGAGTAAATGAATTCAAGGACATAGCCATCTTTCAGGATTATC 360  
74 S I C T A A G V N E F K D I A I F Q D Y 93

361 ATGGATTGCCAGTATTCAGAAATGCTGTTGCAAACCTTTATGGGAAAAGTGAGAGGAAATC 420  
94 H G L P V F R N A V A N F M G K V R G N 113

421 GTGTCACATTCGACGCCGACCGGATTGTTATGAGCGGAGGAGCTACCGGAGCTCATGAGA 480  
114 R V T F D A D R I V M S G G A T G A H E 133

481 CGATCGCTTTTTGCTTGGCTGATCCTGGGGATGCATTTCTGGTGCCTGTTCTTATTATC 540  
134 T I A F C L A D P G D A F L V P V P Y Y 153

541 CAGGTTTTGACCGAGATTTGGGGTGGCGAACGGGAGTGCAACTGATGCCAGTTGCCTGTG 600  
154 P G F D R D L G W R T G V Q L M P V A C 173

601 ACAGCTCCAACAATTTCAAAGTCACCAGAGCAGCTTTGGAAGCTGCCTATGAGAAGGCTC 660  
174 D S S N N F K V T R A A L E A A Y E K A 193

661 AGAAGGCAAACATCAGAGTAAAGGGCTTGCTCATTACCAACCCCTCAAATCCGTTGGGCA 720  
194 Q K A N I R V K G L L I T N P S N P L G 213

721 CTGTCCTTGACAGAGACACCCTCAGAAGTCTAGTGACATTCATCAACGAAAAGAAAATCC 780  
214 T V L D R D T L R S L V T F I N E K K I 233

781 ACCTAGTGTGCGATGAAATCTACGCTGCCACCGTGTTTCAGCCAGCCAAGTTTCATAAGCA 840  
234 H L V C D E I Y A A T V F S Q P S F I S 253

841 TAGCCGAGATCATAGAGGAAAACATCGAATGCAACCGCAACCTTATTCACATTGTGTACA 900  
254 I A E I I E E N I E C N R N L I H I V Y 273

901 GTCTTTCTAAGGACATGGGGTTCCTGGCTTCAGAGTTGGCATTGTATTCCTACAATG 960  
274 S L S K D M G F P G F R V G I V Y S Y N 293

961 ATGATGTCGTTAATTGTGCGCGAAAAGATGTCAAGTTTTGGATTGGTTTCGACACAAACTC 1020  
294 D D V V N C A R K M S S F G L V S T Q T 313

1021 AGCATCTGATTGCATCAATGTTGTCAGACAATGAATTTGTCGAGAGGTTTATAGCACAAA 1080  
314 Q H L I A S M L S D N E F V E R F I A Q 333

**1081** GTGCTAAAAGGCTAAAAGCAAGGCACATGCGCTTCACAATGGAGCTTGATCAAGTCGGCA **1140**  
 334 S A K R L K A R H M R F T M E L D Q V G 353

**1141** CAAGCTGCTTGAATAGCAATGGTGGTCTTTTCGTATGGATGGACTTGCCTAGGCTGCTCA **1200**  
 354 T S C L N S N G G L F V W M D L R R L L 373

**1201** AGGAGCAGACGTTCTGAAGCTGAGATGGTGTGGCACACGATAATCCATGAAGTTAAGC **1260**  
 374 K E Q T F E A E M V L W H T I I H E V K 393

**1261** TCAATGTGTCACCAGGTTCTGTCGTTTCATTGCCCGAGCCAGGTTGGTTCAGAGTTTGCT **1320**  
 394 L N V S P G S S F H C P É P G W F R V C 413

**1321** TTGCCAACATGGATGACAAGACCATGGAAATTGCTTTGACACGAATCCGAAACTTTGTGG **1380**  
 414 F A N M D D K T M E I A L T R I R N F V 433

**1381** CTCAATACAAGGAGCCAATTGCACCGAGGAAGAACAACAGGTAAGTGGCAAAGCAACCTGA **1440**  
 434 A Q Y K E P I A P R K N N R Y W Q S N L 453

**1441** GGCTGAGCTTTTCAGTCTCGGCGAATGGATGACATCATGATGTCTCCGTGCATGATGTCAC **1500**  
 454 R L S F Q S R R M D D I M M S P C M M S 473

**1501** CTCATTACCGATACTCAATCGCCTCTTGTTCGAGCCACTTAGAGAAGTGACTGATCTC **1560**  
 474 P H S P I P Q S P L V R A T \* 488

**1561** TCAGTTTGAAATGTTGATGCATTTTTTGGGAATTGTTAGTAGTACTCCTAAAATTTTCATT **1620**

**1621** TGACACTCCAAACTTTCTATAATTAGAAAGAAAAATACGTTTATAAGGAGTGTAGAATGA **1680**

**1681** GATTTTTGAAGTGCTAATAATAGTTCCCATTTTTTACCTTAGTTTCTGAATTTTTATGA **1740**

**1741** TAGCAAGGTTCTTAATTAGATAAAATATCATTAAATTTGTTCTTAATTTTTCCCGTGGAA **1800**

**1801** TTTTGAGAGTGGTGGATACATTCTTTCATAGGATTAGAATTGTTCAATTTTACTCTCTTTA **1860**

**1861** GTCCATTTTTTTCTTTTTTCAATTCAATGAAAAAAGTTTGTATCTGTTTGAATAATTTTC **1920**

**1921** TCACAGAAGAGAATTGAATTAATTGTGAATTGTTTTACATCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA **1980**

(B)

<b>1</b>	ATTCTAACCGCATTGCGAGGATTTTCTAGGCATTTAAACAATGGGGTTTACTTTGAGCAA	<b>60</b>
1	M G F T L S N	7
<b>61</b>	CCAACAGCAACTGTTGTCTAAGATAGCAACAGGCAATGGCCACGGCGAAAACCTCTCCATA	<b>120</b>
7	Q Q Q L L S K I A T G N G H G E N S P Y	27
<b>121</b>	CTTTGATGGATGGAAGGCTTATGATAGTGATCCTTTTCATCCCACCAAGAACCCTAATGG	<b>180</b>
27	F D G W K A Y D S D P F H P T K N P N G	47
<b>181</b>	GGTTATCCAGATGGGTCTTGCAGAAAATCAAATGTGTTTTGATTTGATCCAAGAGTGGAT	<b>240</b>
47	V I Q M G L A E N Q M C F D L I Q E W I	67
<b>241</b>	TTTGAACAATCCAGAAGCCTCCATTTGCACAGCAGCAGGGGTGAATGAATCAAGGACAT	<b>300</b>
67	L N N P E A S I C T A A G V N E F K D I	87
<b>301</b>	AGCCATATTTTCAGGATTATCATGGATTGCCAGAGTTTAGAAAATGCTGTTGCAAATTTTAT	<b>360</b>
87	A I F Q D Y H G L P E F R N A V A N F M	107
<b>361</b>	GGGAAAAGTGAGAGGAAATCGTGTACATTCGATGCAGACCGGATTGTTATGAGCGGAGG	<b>420</b>
107	G K V R G N R V T F D A D R I V M S G G	127
<b>421</b>	AGCTACTGGAGCTCATGAGATGATAGCCTTTTGCTTGCTGATCCTGGAGATGCATTTCT	<b>480</b>
127	A T G A H E M I A F C L A D P G D A F L	147
<b>481</b>	TGTGCCCGTTCCTTATTATCCAGGTTTTGATCGAGATTTGGGATGGCGAACGGGAGTACA	<b>540</b>
147	V P V P Y Y P G F D R D L G W R T G V Q	167
<b>541</b>	ACTGATTCCGGTTGCCTGTGACAGCTCCAACAATTTCAAAGTCACCAGAGCAGCATTGGA	<b>600</b>
167	L I P V A C D S S N N F K V T R A A L E	187
<b>601</b>	AGCTGCCTATGAGAAAGCTCAGAAGGCAAACATCAGAGTAAAGGGCTTGCTCATTACTAA	<b>660</b>
187	A A Y E K A Q K A N I R V K G L L I T N	207
<b>661</b>	CCCCTCAAACCCCTTAGGTACTGTCCTTGACCGAGACACCCTCATAAGTCTAGTGACATT	<b>720</b>
207	P S N P L G T V L D R D T L I S L V T F	227
<b>721</b>	CATCAACGAAAAGAAAATCCATCTAGTCTGCGATGAAATCTATGCTGCCACCGTGTTTCAG	<b>780</b>
227	I N E K K I H L V C D E I Y A A T V F S	247
<b>781</b>	TCAGCCAAGTTTCATAAGCATAGCCGAGATCATAGAGGAAAACATCGGATGCAACCGCAA	<b>840</b>
247	Q P S F I S I A E I I E E N I G C N R N	267

<b>841</b>	TCTTATTCACATTGTGTACAGTCTTTCAAAGACATGGGGTTCCTGGCTTCAGAGTTGG	<b>900</b>
267	L I H I V Y S L S K D M G F P G F R V G	287
<b>901</b>	CATCGTATATTCCTACAATGACGCTGTCGTTAATTGCGCACGAAAGATGTCGAGTTTTGG	<b>960</b>
287	I V Y S Y N D A V V N C A R K M S S F G	307
<b>961</b>	ATTGGTTTCGACACAAACTCAGCATCTGATTGCATCAATGCTGTCAGACAATGAGTTTGT	<b>1020</b>
307	L V S T Q T Q H L I A S M L S D N E F V	327
<b>1021</b>	GAAGAGATTTATAGCACAAAGTGCTAAAAGGCTGAAAAAAGGCACATGCGCTTCACAAT	<b>1080</b>
327	K R F I A Q S A K R L K T R H M R F T M	347
<b>1081</b>	GGGGCTTGCTCAAGTCAGCACAAACTGCTTGAAGAGCAATGGCGGTCTTTTTGTATGGAT	<b>1140</b>
347	G L A Q V S T N C L K S N G G L F V W M	367
<b>1141</b>	GGACTTGCGTAGGCTGCTCAAGGAGCAGACGTTTGAAGCTGAGATGGTGTGTGGCGTAC	<b>1200</b>
367	D L R R L L K E Q T F E A E M V L W R T	387
<b>1201</b>	AATAATCCATGAAGTTAAGCTCAATGTGTCACCAGGTTGTCATTTCACTGCCCCGAGCC	<b>1260</b>
387	I I H E V K L N V S P G S S F H C P E P	407
<b>1261</b>	GGGCTGGTTCAGAGTATGCTTTGCCAACATGGATGACAAGACCATGGAAGTTGCTTTGAC	<b>1320</b>
407	G W F R V C F A N M D D K T M E V A L T	427
<b>1321</b>	ACGAATCCGAACCTTTGTGCTACAAAAACAAGGAAGCAATTGTGCCGAGGAAGAGCAACAG	<b>1380</b>
427	R I R T F V L Q N K E A I V P R K S N R	447
<b>1381</b>	GTTATGGCACAGCAACCTTAGGCTCAGCTTTCAGTCTCGGCGAATGGATGACACCATGAT	<b>1440</b>
447	L W H S N L R L S F Q S R R M D D T M M	467
<b>1441</b>	GTCTCCGTGTATGATGTCTCCTCATACGCCGATACCCCAGTCACCTCTTGTTGAGCCAC	<b>1500</b>
467	S P C M M S P H T P I P Q S P L V R A T	487
<b>1501</b>	TTAGAGAAGTGACTGATCTCCCAGCTACAAATGTTGATCATGATGCATAATTCCCCCTTA	<b>1560</b>
487	*	488
<b>1561</b>	GTTTCTGGATTAATAATTTGTTTATTATTTCTTGTGGAATTTGAGTGTTGGATACCTTC	<b>1620</b>
<b>1621</b>	TTTCATAGGAAAAGAACTAAATGCCACAATGGGATTTTAGATGTTGGTTCATTTTATACC	<b>1680</b>
<b>1681</b>	CTCTCTTAAGTCTTACCTGAAGAGTTCATTTTTTTCTTTTTTACCTCAGTAAAAGGT	<b>1740</b>
<b>1741</b>	TTGATTTGTTTTTTGTACGACAAAAGTTTGTATCTGTTTGTAAACAATTTATCTTACAAG	<b>1800</b>
<b>1801</b>	AAACTGAATTTATTGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	<b>1838</b>

図4-3 (A) ACS5Aの塩基配列. (B) ACS5Bの塩基配列.

	10	20	30	40	50
Md-ACS5A	MGFTLSN000	---LLSKTAT	ENHGGENSPY	FDGWKAYDSD	PFHPTKPNPG
Md-ACS5B	MGFTLSN000	---LLSKTAT	GNGHGGENSPY	FDGWKAYDSD	PFHPTKPNPG
Md-ACS1	-----	-MRMLSRNAT	FNSHGQDSSY	FLGWQYEYKN	PYHEVHNTNG
Md-ACS2	-----	-----	-----	-----	-----
Md-ACS3	MAIDIEQRQQ	PSPGLSKIAV	SDTHGEDSPY	FAGWKAYDEN	PYHESSNPSG
Md-ACS4	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
Md-ACS5A	VIOMGLAENE	MCFDLIOEWV	LNNPEASICT	AAGVN---EF	KDIAIFODYH
Md-ACS5B	VIOMGLAENO	MCFDLIQEWI	LNNPEASICT	AAGVN---EF	KDIAIFODYH
Md-ACS1	IIOMGLAENO	LCFDLLESWL	AKNPEAAAFK	KNGES---IF	AELALFODYH
Md-ACS2	--OMGLAENO	PCFDLIQEWV	VNNPKASICT	YEGVQ---DF	QDIAIFODYH
Md-ACS3	VIQMGLAENQ	VSFDLLEKHL	EENSEASNWG	SKGSKGASGF	RENALFQDYH
Md-ACS4	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
Md-ACS5A	GLPVFRNAVA	NFMGKVRGNR	VTFDADRIVM	SGGATGAHET	IAFCLADPGD
Md-ACS5B	GLPEFRNAVA	NFMGKVRGNR	VTFDADRIVM	SGGATGAHEM	IAFCLADPGD
Md-ACS1	GLPAFKKAMV	DFMAEIRGNK	VTFDPNHLVL	TAGATSANET	FIFCLADPGE
Md-ACS2	GLPEFRKAVA	RFMEKVRGDR	VTFDPERIVM	SGGATGAHES	LAFCLADPGD
Md-ACS3	GLLSFRKAMA	NFMEQIRGGR	AKFDPVRVVL	TAGATAANEL	LTFIADPGD
Md-ACS4	-----	-----	-----	-----	-----
	160	170	180	190	200
Md-ACS5A	AFLVPVPPYP	GFDRDLGWRT	GVOLMPVACD	SSNNFKVTRA	ALEAAYEKAQ
Md-ACS5B	AFLVPVPPYP	GFDRDLGWRT	GVQLIPVACD	SSNNFKVTRA	ALEAAYEKAQ
Md-ACS1	AVLIPTPPYP	GFDRDLKWRT	GVEIVPIHCT	SSNGFOITET	ALEEAYQEAQ
Md-ACS2	AFLVPTPPYP	GFDRDLRWRT	GVQLFPVACE	SSNNFKVTKE	ALEEAYKKAQ
Md-ACS3	ALLVPTPPYP	GFDRDLRWRT	GVNIVPIHCE	SSNNFQITPQ	ALEAAYKEAQ
Md-ACS4	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
Md-ACS5A	KANIRVKGLL	ITNPSNPLGT	VLDRDTLRSL	VTFINEKKIH	LVCDEIYAAT
Md-ACS5B	KANIRVKGLL	ITNPSNPLGT	VLDRDTLISL	VTFINEKKIH	LVCDEIYAAT
Md-ACS1	KRNLRVKGVL	VTNPSNPLGT	TMTRNELYLL	LSFVEDKGIH	LISDEIYSGT
Md-ACS2	ESNIKVKGLL	INNPSNPLGT	ILDKETLKDI	LRFINDKNIH	LVCDEIYAAT
Md-ACS3	AKNMRVRGVL	ITNPSNPLGA	TIORAVLEEI	LDFVTQKNIH	LVSDEIYSGS
Md-ACS4	-----	-----	-LDKDTLES	VTFINQKNIH	LVCDEIYAAT
	260	270	280	290	300
Md-ACS5A	VFSOPSFISI	AEIIEENIEC	N----RNLIH	IVYSLSKDMG	FPGFRVGIYV
Md-ACS5B	VFSQPSFISI	AEIIEENIGC	N----RNLIH	IVYSLSKDMG	FPGFRVGIYV
Md-ACS1	AFSSPSFISV	MEVLKDRNCD	ENSEVWQRVH	VVYSLSKDLG	LPGFRVGAIV
Md-ACS2	ALCQPSFISI	SEVMNEVVG	N----DDLH	IVYSLSKDLG	FPGFRVGIIV
Md-ACS3	AFSSSEFISV	AEIIEDRQYK	D----AERVH	IVYSLSKDLG	LPGFRVGTIV
Md-ACS4	VFSSLKYTCI	TEVIQD-MDC	N----PNLIH	IVYSLSKDMG	LPGLRVGIYV
	310	320	330	340	350
Md-ACS5A	SYNDDVVNCA	RKMSSFGLVS	TOTOHLIASM	LSDNEFVERF	IAOSAKRLKA
Md-ACS5B	SYNDAVVNCA	RKMSSFGLVS	TOTOHLIASM	LSDNEFVKRF	IAQSAKRLKT
Md-ACS1	SNDDMVVAAA	TKMSSFGLVS	SOTOHLLSAM	LSDKKLTKNY	IAENHKRLKO
Md-ACS2	SYNDVVVNIA	RKMSSFGLVS	TOTORLIASM	LSDTIFVENF	IAKSAMKLSQ
Md-ACS3	SYNDKVVTTA	RRMSSFTLIS	SQTQHLLASM	LSDKEFTGNY	IKTNRKRLRT
Md-ACS4	SYNDDVVNIG	RK.....	.....	.....	.....

	360	370	380	390	400
Md-ACS5A	RHMRFTMELD	OVGTSCLNSN	GGLFVWMDLR	RLLKEOTFEA	EMVLWHTIIH
Md-ACS5B	RHMRFTMGLA	QVSTNCLKSN	GGLFVWMDLR	RLLKEOTFEA	EMVLWRTIIH
Md-ACS1	ROKKLVSGLQ	KSGISCLNGN	AGLFCWVDMR	HLLRSNTFEA	EMELWKKIIV
Md-ACS2	RHDLFTKGLG	QVEITTLKSN	AGLFIWMDLR	RFLNSTFDD	ELKLWHIIIN
Md-ACS3	RYDMIIEGLK	KSGIECLKGN	AGLFCWVWNL	PFLDEPTREC	ELTLWDSMLH
Md-ACS4	.....	.....	.....	.....	.....
	410	420	430	440	450
Md-ACS5A	EVKLVNVPGS	SFHCPEPGWF	RVCFANMDDK	TMEIALTRIR	NFVAOYKEPI
Md-ACS5B	EVKLVNVPGS	SFHCPEPGWF	RVCFANMDDK	TMEVALTRIR	TFVLQNKEAI
Md-ACS1	EVHLNISPGS	SCHCTEPGWF	RVCFANLPER	TLDLAMQRLK	AFVGEYYNVP
Md-ACS2	KVKLVNVPGC	SFHCSEPGWF	RVC.....	.....	.....
Md-ACS3	EVKLVNVPGS	SCHCSEPGWF	RVCFANMSEQ	TLGIALTRIH	NFMEKRERAC
Md-ACS4	.....	.....	.....	.....	.....
	460	470	480	490	500
Md-ACS5A	APRKNRYWO	SNLRLSFOSR	RMDDIMMSPC	MMSPHSPIPO	SPLVRAT*..
Md-ACS5B	VPRKSNRLWH	SNLRLSFQSR	RMDDTMSPC	MMSPHPTPIQ	SPLVRAT*..
Md-ACS1	EVNGGSQSSH	LSHSRRQSLT	KWVSRLSFDD	RGPIPGR*..	.....
Md-ACS2	.....	.....	.....	.....	.....
Md-ACS3	*.....	.....	.....	.....	.....
Md-ACS4	.....	.....	.....	.....	.....

図4.4 リンゴACSアミノ酸配列の比較.



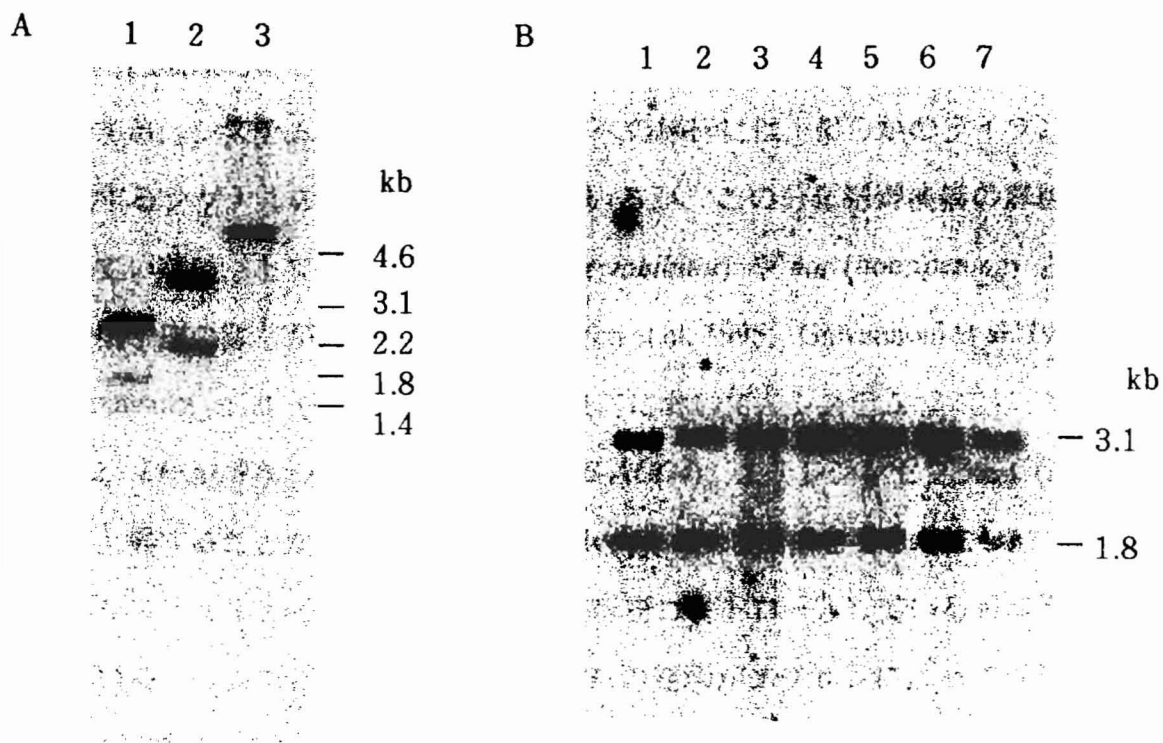


図4-5 ACS5 のサザン解析. A. 'ゴールドデンデリシャス' を各制限酵素で切断したもの. 1. *Ssp*I, 2. *Eco*R I, 3. *Hind*III. B. リンゴ各品種を *Eco*R I で切断したもの. 1. 紅玉, 2. ふじ, 3. つがる, 4. 成保光, 5. ゴールドデンデリシャス, 6. 印度, 7. 旭.

## ▶ PLANT GENE REGISTER PGR00-030

Tomomi Sunako, Ryuji Ishikawa, Mineo Senda, Shinji Akada, Minoru Niizeki and Takeo Harada (2000) MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), Two Wound-Responsive Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Apple. (PGR00-030) Plant Physiol. 122: 620

### **MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), Two Wound-Responsive Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Apple.**

Tomomi Sunako, Ryuji Ishikawa, Mineo Senda, Shinji Akada, Minoru Niizeki and Takeo Harada\*

Laboratory of Plant Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture and Life Science (T.S.,R.I.,M.N.,T.H.) Gene Research Center (M.S.,S.A.), Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan

\*Corresponding author; E-mail: tharada@cc.hirosaki-u.ac.jp; FAX: 81-172-39-3750

## ▶ REPORT

Ethylene is one of the five known naturally occurring plant hormones. Its synthesis is induced during unique developmental stages, such as seed germination, fruit ripening and leaf and flower abscission (Rodrigues-Pousada et al., 1993; Ky et al., 1992). Ethylene is also produced in response to many environmental stimuli including stress (Yang and Hoffman, 1984). The enzyme that limits ethylene production is 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (EC 4.1.1.14), which catalyzes the formation of ACC, the immediate precursor of ethylene (Yu et al., 1979). Based on an analysis of cDNA sequence homologous, it has been revealed that ACC synthase gene (ACS) in many plants is encoded by a multigene family of several members which appear to be differentially expressed in response to different stimuli or at different stages of development (Oetiker et al., 1997).

In apple (*Malus domestica*), there have been reports identifying ripening-related (Lay-Yee and Knighton, 1995), auxin-related (Kim et al., 1992) and constitutively expressed (Rosenfield et al., 1996; Sunako et al., 1999) genes for Md-ACS (*M. domestica* ACS). Here we report the isolation and characterization of two wound-induced cDNAs encoding Md-ACS.

By using degenerated oligonucleotide primers corresponding to conserved regions of ACS and RNA fraction from apple wounded leaves, two new members of Md-ACS family were cloned. Sequences analysis showed 85.9% homologous between these two cDNAs. Furthermore, very high homology (93.3%) between their predicted coding regions resulted in 94.3% amino acid identity. Thus, these genes were esignated Md-ACS5A and Md-ACS5B in accordance with standard nomenclature. Comparison with that of other reported Md-ACS showed ca. 55%, 75% and 58% amino acid identity to Md-ACS1 ([L31347](#)), Md-ACS2 ([U73815](#)) and Md-ACS3 ([U73816](#)), respectively. Both of Md-ACS5A and B were appeared to function because the wound-induced accumulation of these transcripts was observed by northern analysis.

## ► ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

## ► TABLE I

### Characteristics of the *Malus domestica* ACS5 genes

**Organism:**

*Malus domestica* cv Golden Delicious (n = 17)

**Gene product and Function:**

Encodes an ACC synthase (E.C [4.4.1.14](#)) which catalyzes the conversion of SAM to ACC

**Sources:**

cDNA synthesized with poly(A)+RNA isolated from leaves which were incubated with an enzyme solution ( 1% Cellulase Onozuka, 0.2% Macerozyme and 0.01% Pectolyase in 0.5 M Mannitol).

**Techniques:**

RT-PCR, RACE

**Method of Identification and Homology:**

Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences.

**Features of the cDNA:**

Md-ACS5A;The cDNA is 1980 bp long with 80 nucleotides of 5' untranslated region, a 1464bp:ORF, and a 436 nucleotide of 3' untranslated region with a 18 bp poly(A) tail.

Md-ACS5B; The cDNA is 1838 bp long with 40 nucleotides of 5' untranslated region, a 1464bp:ORF, and a 334 nucleotide of 3' untranslated region with a 22 bp poly(A) tail.

### **Characteristics of Deduced Amino Acid Sequence:**

The deduced amino acid sequence contains the highly conserved amino acid residues comprising the ACC synthase active site and 11 invariant amino acids highly conserved among the aminotransferases and ACC synthase isozymes.

## **► LITERATURE CITED**

- Kim WT, Silverstone A, Yip WK, Dong JG, Yang SF (1992)** \$B!! (J)Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol* **98**: 465-471
- Ky YP, Drory A, Woodsson W (1992)** Molecular cloning of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol Biol* **18**: 377-386
- Lay-Yee M, Knighton ML (1995)** A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (Accession No. [JL31347](#), PID:[G606759](#)). *Plant Physiol* **107**: 1017-1018
- Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY, Yang SF (1997)** Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* **34**: 275-286
- Rodrigues-Pousada RAR, Rycke RD, Dedonder A, Caeneghem WV, JEngler G, Montagu MV, Straeten VD (1993)** The Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell* **5**: 897-911
- Rosenfield CL, Kiss E, Hrazdina G (1996)** MdACS-2 (Accession No. [U73815](#)) and MdACS-3 (Accession No. [U73816](#)): Two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruit ([PGR96-122](#)). *Plant Physiol* **112**: 1735
- Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M, Harada T (1999)** An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol* **119**: 1297-1303
- Yang SF, Hoffman NE (1984)** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 155-189
- Yu YB, Adams DO, Yang SF (1979)** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archi Biochem Biophys* **198**: 280-286

Other Formats: FASTA Graphic

Links: Protein

LOCUS AB034993 1838 bp mRNA PLN 09-MAR-2000  
 DEFINITION *Malus domestica* MdACS-5B mRNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, complete cds.

ACCESSION AB034993  
 VERSION AB034993.1 GI:7209852  
 KEYWORDS 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase.  
 SOURCE *Malus domestica* cDNA to mRNA.

ORGANISM *Malus x domestica*  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; *Malus*.

REFERENCE 1 (sites)  
 AUTHORS Sunako,T., Ishikawa,R., Senda,M., Akada,S., Niizeki,M. and Harada,T.  
 TITLE MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), two wound-responsive genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in apple. (PGR00-030)

JOURNAL Plant Physiol. 122, 620 (2000)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1838)  
 AUTHORS Harada,T.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (16-NOV-1999) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases. Takeo Harada, Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science; Bunkyocho 3, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan (E-mail:tharada@cc.hirosaki-u.ac.jp, Tel:81-172-39-3777, Fax:81-172-39-3750)

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..1838  
 /organism="Malus x domestica"  
 /db\_xref="taxon:3750"  
 gene 41..1504  
 /gene="MdACS-5B"  
 CDS 41..1504  
 /gene="MdACS-5B"  
 /codon\_start=1  
 /product="1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase"  
 /protein\_id="BAA92351.1"  
 /db\_xref="GI:7209853"  
 /translation="MGFTLSNQQQLLSKIATGNGHGENSPYFDGWKAYDSDPFHPTKN  
 PNGVIQMGLAENQMCFDLIQEWILNNPEASICTAAGVNEFKDIAIFQDYHGLPEFRNA  
 VANFMGKVRGNRVTFDADRIVMSGGATGAHEMIAFCLADPGDAFLVPVPPYPGFDRDL  
 GWRTGVQLIPVACDSSNNFKVTRAALAAEYKAQKANIRVKGLLITNPSNPLGTVLDR  
 DTLISLVTFINEKKIHLVCDEIYAATVFSQPSFISIAEIIIEENIGCNRLIHIVYSLS  
 KDMGFPGRVIVYSYNDAVVNCARKMSSFGLVSTQTQHLIASMLSDNEFVKRFIAQS  
 AKRLKTRHMRFTMGLAQVSTNCLKSNGGLFVWMDLRLLKEQTFEAEMLVRTIIHEV  
 KLVSPGSSFHCPEPGWFRVCFANMDDKTMEVALTRIRTFVLQNEAIVPRKSNRLWH  
 SNLRLSFQSRMDDTMMSPCMSPHTPIQSPVLRAT"



BASE COUNT 528 a 371 c 412 g 527 t  
 ORIGIN

1 attctaaccg cattgcgagg attttctagg catttaaaca atgggggttta ctttgagcaa  
 61 ccaacagcaa ctgttgctta agatagcaac aggcaatggc cacggcgaaa actctccata  
 121 ctttgatgga tgggaaggctt atgatagtga tccttttcat cccaccaaga accctaattg

181 ggttatccag atgggtcttg cagaaaatca aatgtgtttt gatttgatcc aagagtggat  
241 tttgaacaat ccagaagcct ccatttgcac agcagcaggg gtgaatgaat tcaaggacat  
301 agccatattt caggattatc atggattgcc agagttaga aatgctgttg caaattttat  
361 gggaaaagtg agaggaaatc gtgtcacatt cgatgcagac cggattgtta tgagcggagg  
421 agctactgga gctcatgaga tgatagcctt ttgcttggct gatcctggag atgcatttct  
481 tgtgcccgtt ctttattatc caggttttga tgcgagattg ggatggcgaa cgggagtaca  
541 actgattccg gttgcctgtg acagctccaa caatttcaaa gtcaccagag cagcattgga  
601 agctgcctat gagaaagctc agaaggcaaa catcagagta aagggcttgc tcattactaa  
661 cccctcaaac cccttaggta ctgtccttga ccgagacacc ctcataagtc tagtgacatt  
721 catcaacgaa aagaaaatcc atctagtctg cgatgaaatc tatgctgcca ccgtgttcag  
781 tcagccaagt ttcataagca tagccgagat catagaggaa aacatcggat gcaaccgcaa  
841 tcttattcac attgtgtaca gtctttcaaa agacatgggg ttccctggct tcagagtgg  
901 catcgtatat tcctacaatg acgctgtcgt taattgcgca cgaagatgt cgagtttgg  
961 attggtttcg acacaaaactc agcatctgat tgcataatg ctgtcagaca atgagtttgt  
1021 gaagagattt atagcacaaa gtgctaaaag gctgaaaaca aggcacatgc gcttcacaat  
1081 ggggcttgct caagtcagca caaactgctt gaagagcaat ggcggtcttt ttgtatggat  
1141 ggacttgctg aggctgctca aggagcagac gtttgaagct gagatgggtg tgtggcgta  
1201 aataatccat gaagttaagc tcaatgtgtc accaggttcg tcatttcact gccccgagcc  
1261 gggctgggtc agagtatgct ttgccaaatc ggatgacaag accatggaag ttgctttgac  
1321 acgaatccga acctttgtgc taaaaacaa ggaagcaatt gtgccgagga agagcaacag  
1381 gttatggcac agcaacctta ggctcagctt tcagtctcgg cgaatggatg acaccatgat  
1441 gtctccgtgt atgatgtctc ctcatagcc gataccccag tcacctcttg ttcgagccac  
1501 ttagagaagt gactgatctc ccagctacaa atgttgatca tgatgcataa tccccctta  
1561 gtttctggat taaaatttgt tcattatttt cttgtggaat tttgagtgtt ggatacctc  
1621 tttcatagga aaagaactaa atgccacaat gggattttag atgttgggtc attttatacc  
1681 ctctctctta agtcttacct gaagagttca ttttttctt ttttcacctc agtaaaaggt  
1741 ttgtatttgt tttttgtacg acaaaagttt gtatctgttt gtaacaattt atcttacaag  
1801 aaactgaatt tattgttgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

//

---

Save the above report in Macintosh  Text  format

---

Other Formats:

FASTA

Graphic

Links:

Protein

LOCUS AB034992 1980 bp mRNA PLN 09-MAR-2000  
DEFINITION *Malus domestica* MdACS-5A mRNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, complete cds.  
ACCESSION AB034992  
VERSION AB034992.1 GI:7209850  
KEYWORDS 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase.  
SOURCE *Malus domestica* cDNA to mRNA.  
ORGANISM *Malus x domestica*  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; *Malus*.  
REFERENCE 1 (sites)  
AUTHORS Sunako,T., Ishikawa,R., Senda,M., Akada,S., Niizeki,M. and Harada,T.  
TITLE MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), two wound-responsive genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in apple. (PGR00-030)  
JOURNAL Plant Physiol. 122, 620 (2000)  
REFERENCE 2 (bases 1 to 1980)  
AUTHORS Harada,T.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (16-NOV-1999) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases. Takeo Harada, Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science; Bunkyocho 3, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan (E-mail:tharada@cc.hirosaki-u.ac.jp, Tel:81-172-39-3777, Fax:81-172-39-3750)  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1980  
/organism="Malus x domestica"  
/db\_xref="taxon:3750"  
gene 81..1544  
/gene="MdACS-5A"  
CDS 81..1544  
/gene="MdACS-5A"  
/codon\_start=1  
/product="1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase"  
/protein\_id="BAA92350.1"  
/db\_xref="GI:7209851"  
/translation="MGFTLSNQQQLLSKIATSNGHGENSPYFDGWKAYDSDPFHPTKN  
PNGVIQMGLAENEMCFDLIQEWVLLNPEASICTAAGVNEFKDIAIFQDYHGLPVFRNA  
VANFMGKVRGNRVTFDADRIVMSGGATGAHETIAFCLADPGDAFLVPVPPYYPGFDRL  
GWRTGVQLMPVACDSSNNFKVTRAALAAEYKAQKANIRVKGLLITNPSNPLGTVLDR  
DTLRLVTFINEKKIHLVCDEIYAATVFSQPSFISIAEIIIEENIECNRLIHIVYSLS  
KDMGFPGRVGVIVSYNDDVVNCARKMSSFGLVSTQTQHLLIASMLSDNEFVERFIAQS  
AKRLKARHMRFTMELDQVGTSCLSNNGGLFVWMDLRLLKEQTFEAEMLWHTIIHEV  
KLVNVPSSFFHCPEPGWFRVCFANMDDKTMEIALTRIRNFVAQYKEPIAPRKNRRYQW  
SNLRLSFQSRMDDIMMSPCMSPHSPIPQSPLVRAT"  
BASE COUNT 574 a 388 c 440 g 578 t  
ORIGIN  
1 tagagatcta gtcctctat tctccataga ctttgataga ctctcacag cattgcaggg  
61 atttttcagg cgtttaaaaa atggggttta ctttgagcaa ccaacagcaa ctgttgctca  
121 agatagcaac aagcaatggc cacggcgaaa actctccata ctttgatggc tggaggctt

181 atgacagtga tccttttcac cccaccaaga accctaattgg ggttatccag atgggtcttg  
241 cagaaaatga aatgtgtttt gatttgatcc aagagtgggt tctgaacaat ccagaagcct  
301 ccatttgcac agcagcagga gtaaatgaat tcaaggacat agccatcttt caggattatc  
361 atggattgcc agtattcaga aatgctgttg caaactttat gggaaaagtg agaggaatc  
421 gtgtcacatt cgacgccgac cggattgtta tgagcggagg agctaccgga gctcatgaga  
481 cgatcgcctt ttgcttggct gatcctgggg atgcatttct ggtgcctggt ccttattatc  
541 caggttttga ccgagatttg ggggtggcga cgggagtgca actgatgcca gttgcctgtg  
601 acagctccaa caatttcaaa gtcaccagag cagctttgga agctgcctat gagaaggctc  
661 agaaggcaaa catcagagta aagggttgc tcattacca cccctcaaat ccgttgggca  
721 ctgtccttga cagagacacc ctcagaagtc tagtgacatt catcaacgaa aagaaaatcc  
781 acctagtgtg cgatgaaatc tacgctgcca ccgtgttcag ccagccaagt ttcataagca  
841 tagccgagat catagaggaa aacatcgaat gcaaccgcaa ccttattcac atttgttaca  
901 gtctttctaa ggacatgggg ttccctggct tcagagttgg cattgtatat tctacaatg  
961 atgatgtcgt taattgtgctg cgaagatgt caagttttgg attggttctg acacaaactc  
1021 agcatctgat tgcataaatg ttgtcagaca atgaatttgt cgagaggttt atagcacaaa  
1081 gtgctaaaag gctaaaagca aggcacatgc gcttcacaat ggagcttgat caagtccgca  
1141 caagctgctt gaatagcaat ggtggtcctt tcgtatggat ggacttgcgt aggctgctca  
1201 aggagcagac gttcgaagct gagatggtgt tgtggcacac gataatccat gaagttaagc  
1261 tcaatgtgtc accaggttcg tcgtttcatt gccccgagcc aggttggttc agagtttget  
1321 ttgccaacat ggatgacaag accatggaaa ttgctttgac acgaatccga aactttgtgg  
1381 ctcaatacaa ggagccaatt gcaccgagga agaacaacag gtactggcaa agcaacctga  
1441 ggctgagctt tcagctctcg cgaatggatg acatcatgat gtctccgtgc atgatgtcac  
1501 ctcaattcacc gataacctcaa tcgctctctg ttcgagccac ttagagaagt gactgatctc  
1561 tcagtttgaa atgttgatgc attttttggg aattgttagt agtactccta aaatttcatt  
1621 tgacactcca aactttctat aattagaag aaaaatacgt ttataaggag tgtagaatga  
1681 gatttttgaa gtgtaataa tagttcccca tttttacct tagtttctga atttttatga  
1741 tagcaagggt ctttaattaga taaaatatca ttaatttgtt cttaatattt tcccgtggaa  
1801 ttttgagagt ggtggataca ttcttcata ggattagaat tgttcatttt actctcttta  
1861 gtccattttt ttcttttttc aattcaatga aaaaagtgtg tatctgtttg taataatttc  
1921 tcacagaaga gaattgaatt aattgtgaat tgttttacat cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa

//

---

the above report in   format

---