

学 位 論 文 要 旨

氏 名 稲福(寺本) さゆり

題 目 琉球列島在来カンキツ遺伝資源に関する研究
(Studies on *Citrus* genetic resources in the Ryukyu Islands)

沖縄を含む琉球列島には、在来カンキツ遺伝資源が多く残され、自生だけでなく、古くから栽培が行なわれている。本研究では、シークワサー類(*Citrus depressa* Hayata)を含め、研究があまりされていない在来カンキツ類について探索調査をするとともに、表現形質、機能性成分、DNA解析等の基礎的な知見を得ることにより、在来カンキツ遺伝資源の成立について考察し、今後の新たな用途開発や市場拡大、産業振興に寄与することを目的として研究を実施した。

1. 探索調査

カンキツ遺伝資源が集中している沖縄本島北部地方を中心に、八重山諸島にかけて残存する在来カンキツ遺伝資源の探索調査を実施し、シークワサー類、在来タチバナ(*C. tachibana* (Makino) Tanaka var. *attenuata*)を主体に、合計 56 系統の調査を行い表現形質を明らかにした。探索調査に並行して、自生地と自生地近くの園地の土壌分析を行い、カンキツ類は苦土や石灰含量の高い、古生代石灰岩盤の薄い土層に自生していることがわかった。また、沖縄における在来タチバナ自生地は黒潮の流れる東シナ海沿岸沿いに見られ、台湾から日本本土につながる黒潮の流れに沿ってタチバナが自生ラインを構成していることが確認できた。

2. 機能性成分分析

探索収集した在来カンキツ遺伝資源と沖縄で栽培される品種について、ポリメトキシフラボン類、フラバノン類、ならびにフェネチルアミン類のシネフリンを HPLC により、また香気成分については GC-MS によりそれぞれ分析を行なった。分析の結果、品種独特のフラボノイドならびに香気プロファイルが明らかとなり、成分の類似度は表現形質の類似度と比例することが示された。また、シークワサーをはじめ、カーブチー等の在来栽培品種は総じてポリメトキシフラボノイド類の含量が高かった。特に未熟果実が多いため、青切果実、摘果果実、未利用ジュース残渣を有効利用できることがわかった。カンキツ類として特徴的かつ機能的な香りを持つシークワサー、カーブチー(*C. keraji hort. ex Tanaka var. kabuchii*)、ケラジ(*C. keraji hort. ex Tanaka*)、シークワ(*C. spp.*)については、今後果皮(精油)だけでなく、花や葉の香気成分の利用も期待でき、特異的な香気成分による品種判別も可能であることが判明した。

3. DNA 解析

琉球列島在来カンキツ遺伝資源の由来や成立を明らかにするために SSR による DNA 解析を実施した結果、在来タチバナ、ニホンタチバナ(*C. tachibana* (Makino) Tanaka)とシークワサーは遺伝的距離が非常に近く、また現在残る在来の栽培品種の殆どは外来種であるクネンボ(*C. nobilis* Lour.)とシークワサーの組み合わせ、あるいは在来タチバナとその他の外来種との自然交雑から派生してきたことが示された。

本研究の結果から、在来カンキツ類の成立にはシークワサーとクネンボの著しい関与が示唆され、特異的な香気や高い機能性成分についての基礎的なデータを得ることができた。これらの貴重な情報は、今後の在来カンキツ利用拡大、加工用途開発の際に不可欠なものであり、新たな市場拡大やカンキツ産業の振興に寄与できると考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Sayuri INAFUKU-TERAMOTO
題 目	Studies on <i>Citrus</i> genetic resources in the Ryukyu Islands (琉球列島在来カンキツ遺伝資源に関する研究)
<p>The Ryukyu Islands are home to many <i>Citrus</i> genetic resources, both in wild and under cultivated for several hundred years. Because information about these local citrus was limited, this study comprised explorations, phenotype observations, phytochemicals analyses and DNA analyses of citrus accessions in the Ryukyu Islands that including shiikuwasha (<i>Citrus depressa</i> Hayata). The purpose of this study was to contribute to revealing the derivation of these citrus accessions, increasing market demand, and developing a citrus processing industry in Okinawa.</p> <p>1. Exploration studies</p> <p>The exploration citrus genetic resources were explored in the northern part of Okinawa Island., on the Yaeyama Islands, and on Nekumatidi and Kugani mountains, Ogimi village, Okinawa. The survey returned 56 of both introduced and wild citrus accessions including shiikuwasha and a local form of tachibana (<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka var. <i>attenuata</i>). In addition, the soils of the collection sites were analyzed. The results show that some of the citrus grow on Paleozoic limestone-derived soil high in Mg and Ca and covered with leaf mold. All naturally growing tachibana plants were found on the East China Sea side of the islands, where the Kuroshio Current that flows from Taiwan to Japanese mainland.</p> <p>2. Phytochemicals analyses</p> <p>HPLC and GC-MS analysis of local accessions and major cultivars on Okinawa revealed species specific flavonoids and aromatic profiles, and similarities among these phytochemicals matched phenotype similarities. Most of local cultivars, including 'Kabuchii' (<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka) and shiikuwasha, had high contents of polymethoxyflavones and flavanones, especially in immature peel. These findings suggest a use for un-utilized juice residues, immature harvested fruits and thinned fruits. The unique aroma profiles found in 'Keraji' (<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka), shiikuwasha, 'Kabuchii' and 'Shiikuu' (<i>C. spp.</i>) suggest new sources of aromatic compounds, not only in peel but also in flowers and leaves. In addition, the specific aroma compounds can distinguish cultivars, for example, shiikuwasha and shikikitsu (<i>C. madurensis</i> Lour.).</p> <p>3. DNA analysis</p> <p>SSR analysis was carried out in local citrus accessions to measure their genetic relationships and to suggest their derivation. The very close genetic distance between tachibana and shiikuwasha found here was also suggested by previous research. The results suggest that most local accessions in the Ryukyu Islands were derived from shiikuwasha and 'Kunenbo' (<i>C. nobilis</i> Lour.) or tachibana and other introduced citrus species.</p> <p>These studies confirmed the high possibilities in these citrus genetic resources, and the data of genetic and phytochemicals provide basic information for various citrus industries and will contribute to the development of products, the expansion of market demand and the advancement of the citrus industries.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	稲福(寺本) さゆり
審査委員	主査 琉球大学 教授 川満 芳信
	副査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 佐賀大学 教授 野瀬 昭博
	副査 鹿児島大学 教授 富永 茂人
	副査 鹿児島大学 准教授 山本 雅史
審査協力者	
題目	琉球列島在来カンキツ遺伝資源に関する研究 (Studies on <i>Citrus</i> genetic resources in the Ryukyu Islands)
<p>沖縄を含む琉球列島には、在来カンキツ遺伝資源が多く残され、自生のみならず数百年の栽培の歴史がある。本研究では、シークワサー類 (<i>Citrus depressa</i> Hayata) を含め、これまでほとんど研究されて来なかった在来カンキツ類について探索調査をするとともに、表現形質、機能性成分、DNA解析等の基礎的な知見を得ることにより、在来カンキツ遺伝資源の成立について考察し、今後の新たな用途開発や市場拡大、産業振興に寄与することを目的として研究を実施した。</p> <p>1. 探索調査</p> <p>カンキツ遺伝資源が集中している沖縄本島北部地方を中心に、八重山諸島にかけて残存する在来カンキツ遺伝資源の探索調査を実施し、シークワサー類、在来タチバナ (<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka var. <i>attenuata</i>) を主体に、合計56系統の調査を実施し表現形質を明らかにした。探索調査に並行して、自生地と自生地近くの園地の土壌分析を行い、カンキツ類は苦土や石灰含量の高い、古生代石灰岩盤の薄い土層に自生していることがわかった。また、沖縄における在来タチバナ自生地は黒潮に沿った西海岸沿いに見られ、台湾から日本本土につ</p>	

ながる黒潮の流れに沿ってタチバナ自生ラインを構成することが確認できた。

2. 機能性成分分析

探索収集した在来カンキツ遺伝資源と沖縄で栽培される品種について、ポリメトキシフラボノイド類、フラバノン類、ならびにフェネチルアミン類のシネフリンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、また香気成分についてはガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) によりそれぞれ分析を行なった。分析の結果、品種独特のフラボノイドならびに香気プロファイルが明らかとなり、成分の類似度は表現形質の類似度と比例することが示された。また、シークワサーをはじめ、カーブチー等の在来栽培品種は総じてポリメトキシフラボノイド類の含量が高かった。特に未熟果実が多いため、青切果実、摘果果実、未利用ジュース残渣を有効利用できることがわかった。カンキツ類として特徴的かつ機能的な香りを持つシークワサー、カーブチー、ケラジ (*C. keraji hort. ex Tanaka*)、シークー (*C. spp.*) については、今後果皮(精油)だけでなく、花、葉の香気成分の利用も期待でき特異的な香気成分による品種判別も可能であることが判明した。

3. DNA 解析

琉球列島在来カンキツ遺伝資源の由来や成立を明らかにするために SSR (Simple Sequence Repeat) 法による DNA 解析を実施した結果、在来タチバナ、ニホンタチバナ (*C. tachibana* (Makino) Tanaka) とシークワサーは遺伝的距離が近く、また、現在残る在来の栽培品種の殆どは外来種であるクネンボとシークワサーの組み合わせ、あるいは在来タチバナとその他の外来種との自然交雑から派生してきたことが示された。

本研究の結果から、在来カンキツ類の成立にはシークワサーとクネンボの著しい関与が示唆され、特異的な香気や高い機能性成分についての基礎的なデータを得ることができた。これらの貴重な情報は、今後の在来カンキツ利用拡大、加工用途開発の際に不可欠なものであり、新たな市場拡大やカンキツ産業の振興に寄与できると考えられる。

以上のことから、本研究において琉球列島在来のカンキツ遺伝資源の概要が明らかになり、今後の加工利用に際して重要な知見を得ており、固有の地域植物資源の利用に大きく貢献するものと期待される。よって博士(農学)の学位を与えるに足る資格を持つものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	稲福(寺本) さゆり
審査委員	主査 琉球大学 教授 川満 芳信
	副査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 佐賀大学 教授 野瀬 昭博
	副査 鹿児島大学 教授 富永 茂人
	副査 鹿児島大学 准教授 山本 雅史
審査協力者	
実施年月日	平成23年 1月12日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
(口答)・筆答	
<p>主査および副査は、平成23年1月12日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足ができる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに見識を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

稲福(寺本) さゆり

【質問1】伊豆味クガニーの特異性について、またタンカンフラボノイド含量も高く、商品性も高く、在来の商品性はやはり劣ると考えられるがどう思うか？

【回答1】伊豆味クガニーは表現形質も他種と異なっており、果実も大きく、青果用に優れると考えられるが、今回はSSR解析にかけておらず、遺伝的背景は不明であるが、おそらく交雑種であると考えており、青果として今後期待できると考えられる。タンカンについては未利用摘果果実の利用が現場で要望されていたが、シークワサーの価格暴落が問題になっていたため、あまり研究対象としなかった。在来の食味のよい品種は生産が低く出回っていない、今後更新して、生食用として市場へとだすべきだと考えている。

【質問2】DNA解析の結果と香気成分やフラボノイド類分析結果との間の相関についてはどうか？

【回答2】フラボノイド類や香気成分の分析結果からもクネンボの関与やカーブチー等在来品種の相関関係が示唆されていた。またシークワサーの関与についてはDNA解析により裏付けられたと考えられる。

【質問3】SSRのデンドログラムでは、在来タチバナよりも日本タチバナのほうがシークワサーに近いが、その点について考察をどう考えるか？

【回答3】在来タチバナがさきに存在し、その後のシークワサー出現の時期の問題によってこの結果になったと考察した。タチバナのだいぶ後になってからシークワサーが栽培種として成立したと考えている。

【質問4】在来タチバナとシークワサーと交雑してイシクニブがでたという仮説は考えられないか？

【回答4】その可能性はあると考えているが、自生地状況と表現形質の連続性を確認できたことにより、在来タチバナからイシクニブが発生したという仮説を考察した。

【質問5】在来タチバナから突然変異でイシクニブが出現した可能性は低いと思うがどうか？

【回答5】ご指摘のとおりで突然変異よりも、多胚性の系統が交雑したと考える方が妥当であるとする。しかし、自生地においては在来タチバナとシークワサーの自生は混在せずに、イシクニブと混在していた。

【質問6】沖縄本島のシークワサーと離島のシークワサーとでは表現形質が異なっている理由はどう考えるか？

【回答6】果実のサイズが大きいことから、優良系統が持ち込まれたと考えている。シークワサーは琉球王朝の影響が強かった範囲に分布していることから、まだ不明な部分が多いが、本島付近で成立したと考えている。

【質問7】果実の成熟に伴いポリメトキシフラボンが果汁では増加する傾向にあることについてはどう考えているか？

【回答7】果皮のフラバドのみ分析しているため、分析していなかったアルベド部分のポリメトキシフラボンの果汁への移行が文献によっても示唆されていることから、このような結果になったと考えている。

【質問8】香気成分の定量分析を実施したのか？また、ヘキサンの影響はなかったのか？

【回答8】定性分析のみを行なって香気成分プロファイルを取得した。また花と葉はヘッドスペースにより分析しており、ヘキサンの影響は認められなかった。

【質問9】 タンカンの未熟のリナロールが多いが、香りが良くない。なぜだと考えるか？

【回答9】 脂肪族化合物の含有量が高いことから、あのような香りになると考えられる。

【質問10】 在来カンキツがどこからきたのか、福州など、もっと海外を含めた広い範囲を調査してほしい。

【回答10】 福州は沖縄とも深いつながりがあり、今後調査していきたい。

【質問11】 遺伝資源の保存継承について、特にシークワサー類はトカラ以南にあるため、グリーンング病の制約があり、本土では保存できない。ぜひ沖縄で保存していただきたい。

【回答11】 本来は県で取り組むべき問題であるが、農家レベルでの意識向上なども必要と考えている。

【質問12】 シキキツの混入の判別法は特許などの取得が考えられるか？

【回答12】 現在、考慮はしていない。既に他の技術が確立されており、GCだけでなくHPLCでの分析も可能である。

【質問13】 未利用残渣の利用としてサプリメントにするとコストが高いのでは？

【回答13】 粗精製した高価な製品がよく売れており、ユーザーの要望にあった形での提供が重要だと考えられる。

【質問14】 これらのデータをふまえてカンキツ産業への具体的な提言があるか？

【回答14】 近赤外線選果による伊豆味クガニーなど優良系統出荷や、異業種と連携することで、精油や粗抽出物といった原材料の製造やマーケティングの問題をクリアできると考えている。

【質問15】 シークワサーなどの香気成分が、温度の影響によって変わることはあるのか？

【回答15】 品種特有のプロファイルが大幅に変化することはないが、台木や土壌による多少のぶれは認められている。

【質問16】 青果としては種なしシークワサーもあるが、他に優良系統があるか？

【回答16】 小核系として名護の試験場にあるウンジュヤ、小核系のシークワサーが育てやすく、有望ではないかと考えている。

【質問17】 シークワサーの起源についてフィリピンであると考えられることはできるか？

【回答17】 シークワサーはあるが、分布が限られており、またシキキツが優勢になることもあり、今後調査をしてみないとはっきりしたことは言えないが、黒潮の発生ポイントでもあるので、可能性が全くないとは言えないと考えている。

【質問18】 在来のタチバナがタチバナではない別種と考えて考察することはできないか？

【回答18】 DNA解析の供試数も少なかったため、今後の検討課題としたい。

【質問19】 シキキツが沖縄にないのはなぜか？

【回答19】 シキキツの古木はあるが、すでにシークワサーがあり、普及しなかったのではと考えられる。