

氏 名(本籍) おか だ ゆき お
岡 田 行 夫

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 9 7 号

学位授与年月日 平 成 17 年 9 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ホップにおける苦味成分，プレニルフラボノイドおよび
精油成分生合成遺伝子の解析並びに遺伝子発現系の構築

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是
(副 査) 教 授 前 忠 彦
教 授 勝 亦 瞭 一

論文内容要旨

第1章 緒言

アサ科で多年草、雌雄異株の蔓性草本植物であるホップ (*Humulus lupulus* L.) は、ビールに爽快な苦味や華やかな香りを与える、ビール醸造においては無くてはならない作物である。ビール醸造の原料として用いられるのは、雌株にのみ着生する球果であり、ビールの苦味の基となる苦味成分や香りの基となる精油成分は球果中の分泌腺であるルプリン腺毛で特異的に分泌、蓄積される。

苦味成分としてビール醸造上重要とされているのが、 α 酸と β 酸である。 α 酸の中で多くを占めるフムロンとコフムロンは、ビール製造工程中の煮沸工程において異性化し、イソフムロン、イソコフムロンとしてビールの苦味の主体となっている。これらイソフムロンやイソコフムロンなどのイソ α 酸同族体間には官能上の苦味の質的違いや強度の違いが論じられている。またイソコフムロンのイソフムロンに対する比が大きいと、ビールの泡持ちにも悪影響を及ぼすことが明らかとなっている。 β 酸は麦汁、ビールに対する溶解度が非常に低い為、ビールの苦味には直接的には関与していないと考えられているが、一方で β 酸が多くを占める β 区分(α 酸以外のヘキサン可溶性樹脂成分)とイソ α 酸の含量のバランスが苦味の質に影響を及ぼしている可能性も示唆されている。従ってフムロンとコフムロンの含量比や α 酸と β 酸の含量比はホップ育種における育種ターゲットのひとつとなっている。

ホップの精油成分については、これまでに 200 を超える成分が同定されているが、各精油成分とビールの香りとの関係についてはほとんど明らかにされていない。しかしながらホップ精油成分が直接的、または化学変化した形で間接的にビールの香りに影響を与えていることは共通の見解となっており、精油成分の含量や組成もホップ育種の重要なターゲットとなっている。

更に最近、苦味成分や精油成分と同じくルプリン腺毛に特異的に蓄積するプレニルフラボノイドに抗癌活性などの薬理活性が認められ、食品添加物や医薬品としての利用などホップにビール醸造用途以外の付加価値をつけるものとして期待されている。そのため、これらプレニルフラボノイドの含量や組成もホップ育種の重要なターゲットとなってきている。

これらの形質の改良を目指したホップ育種を行なう上で、現状の育種法には、1) 形質を評価できるまでに播種から約 3 年の生育期間が必要とされ、長い育種期間を要する、2) 作物体が巨大な為、扱える個体数が限られ、育種の規模を狭めている、3) 雄株は球果を着けないため、これらの形質に関するポテンシャルを把握することは難しく、交配において経験や勘に頼らなければならない、といった問題点が存在する。これらの問題点を解決する手段として期待されているのが形質転換技術や分子選抜技術を用いた育種法である。苦味成分、精油成分、プレニルフラボノイドの含量・組成の改良という見地から考えれば、これらの成分の生合成に関与する遺伝子を解明することは、形質転換技術や分子選抜技術を育種に用いる上でターゲットとすべき遺伝子に関する情報の取得に繋がると共に、単離した遺伝子を形質転換技術で必要とされる導入遺伝子や分子選抜技術で必要とされる DNA マーカーとして利用することも可能となる。

このような背景から、本研究では苦味成分、精油成分、プレニルフラボノイドの生合成に関与する遺伝子の単離とその機能の確認を行なうことにより、これらの成分の生合成系の一部を分子レベルで明らかにした。更にこれまで報告例がほとんどなかったホップの形質転換系を確立し、ルプリン腺毛に蓄積するこれらの成分の含量・組成を形質転換技術を用いて改良する上で必要不可欠なルプリン腺毛における遺伝子発現系を構築し、形質転換技術のホップ育種における利用の可能性を示した。

第 2 章 苦味成分およびプレニルフラボノイド生合成関連遺伝子の単離

第 2 章 第 1 節 苦味成分生合成に関与するバレロフェノンシンターゼ遺伝子の単離

苦味成分、精油成分、およびプレニルフラボノイドは、ルプリン腺毛中に特異的に蓄積することから、これらの成分の生合成に関与する遺伝子はルプリン腺毛中で特異的に発現しているという仮説のもと、ルプリン腺毛で特異的に発現している遺伝子の単離を試みた。球果を構成する組織のうち、主にルプリン腺毛からなるルプリン画分とルプリン腺毛をほとんど含まない主に外苞からなる非ルプリン画分を調製し、ルプリン画分で発現している遺伝子から非ルプリン画分においても発現している遺伝子をサブトラクション法により除くことにより、ルプリン特異的遺伝子 3 クローンを単離した。

この 3 クローンについて塩基配列を解析したところ、ひとつは未知遺伝子であったが、ひとつは植物広く一般に知られているカルコンシンターゼ遺伝子とホモロジーを持つ完全長と思われる遺伝子であったため、CHSL(chalcone synthase-like)遺伝子と名付けた。また残りのひとつは CHSL 遺伝子と 100%近いホモロジーを持つ遺伝子の部分断片であった。Fung らによれば苦味成分の生合成反応の一部をバレロフェノンシンターゼ(VPS)と呼ばれるカルコンシンターゼ様の酵素が触媒している(図 1)。そこでこの CHSL 遺伝子に着目し、更なる解析を行なった。まず CHSL 遺伝子が、ルプリン腺毛で特異的に発現していることを Northern hybridization 解析により確認した(図 2)。次に CHSL 遺伝子の発現産物がバレロフェノンシンターゼ活性を持っているか否かについて調べた。大腸菌で発現させた CHSL 遺伝子の発現タンパクを用いて、VPS 反応の基質であるマロニル-CoA とイソブチリル-CoA、およびマロニル-CoA とイソバレリル-CoA を用いて酵素反応を行ない、LC-MS によりその反応産物の同定を行なったところ、反応産物はそれぞれバレロフェノンシンターゼにより合成されるフロルイソブチロフェノン(PIBP)(図 3)およびフロルイソバレロフェノン(PIVP)(図 4)であった。これらのことから、CHSL 遺伝子はルプリン腺毛において苦味成分の生合成に関わるバレロフェノンシンターゼの遺伝子であることが確認された。以降 CHSL 遺伝子を VPS 遺伝子、その発現産物を VPS と呼ぶ。

第 2 章 第 2 節 プレニルフラボノイド生合成におけるバレロフェノンシンターゼ

薬理活性で注目されているホップ由来プレニルフラボノイドは、 α 酸や β 酸と同様ルプリン腺毛に特異的に蓄積しており、その前駆体はナリンゲニンカルコンであると考えられている。ナリンゲニンカルコンはポリフェノールの前駆体として、カルコンシンターゼによって合成されることが植物広く一般において知られている。ホップの VPS はカルコンシンターゼと高いホモロジーを持っていることから、カルコンシンターゼ活性を併せ持つプレニルフラボノイドの生合成にも寄与している可能性が考えられた。そこで第 2 章 第 1 節で調製した VPS タンパクを用いてカルコンシンターゼ反応およびバレロフェノンシンターゼ反応を行ない、反応産物を薄層クロマトグラフィーにより分析したところ、VPS はバレロフェノンシンターゼ活性の他、カルコンシンターゼ活性も併せ持つことが明らかとなった(図 5-A, B)。またこれらの活性の強さはバレロフェノンシンターゼ活性がカルコンシンターゼ活性の約 6 倍強く、

カルコンシンターゼ活性は微弱であることがわかった(図 5-C)。

更に複数の植物においてカルコンシンターゼ遺伝子にアイソザイム遺伝子が存在していることが知られていることから、Low-stringent な条件と High-stringent な条件で Southern hybridization 解析を行ない比較したところ、ホップにおいてもカルコンシンターゼ様遺伝子が VPS 遺伝子以外にも存在していることが判明した(図 6)。次節ではこれらの遺伝子の単離と機能解明を試みた。

第2章第3節 カルコンシンターゼ様遺伝子の単離と機能解明

VPS 遺伝子以外のカルコンシンターゼ様遺伝子を単離する為、VPS 遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し、PCR を用いることにより新たに CHS2 遺伝子と CHS3 遺伝子のふたつの CHS 様遺伝子を単離した。また、これとは別に VPS 遺伝子の塩基配列を基に、Novák らによって CHS4 遺伝子が、Matoušek らによって CHS_H1 遺伝子が新たに単離されていた。そこで、RT-PCR によりそれぞれの遺伝子の発現組織特異性を調べたところ、苦味成分やプレニルフラボノイドが蓄積するルプリン腺毛において有意に発現しているのは VPS 遺伝子、CHS4 遺伝子、CHS_H1 遺伝子の 3 種類であった(表1)。

次に各遺伝子が大腸菌で発現させ、その発現産物のカルコンシンターゼ活性とパレロフェノンシンターゼ活性の有無について、HPLC、LC-MS を用いて分析した。この結果、カルコンシンターゼ反応においてその反応産物であるナリングニンカルコン(ナリングニンとして検出される)を生成出来たのは CHS_H1 のみであり、またパレロフェノンシンターゼ反応においてその反応産物である PIVP を生成出来たのは VPS と CHS_H1 のみであった(図7)。第2章第2節においてはアイソトープを用いた分析により、VPS による反応でナリングニンが検出されたが、ナリングニンの収量は非常に少なかったことから、今回は感度の問題からナリングニンは検出できなかったと考えられる。これらの結果から苦味成分の生合成に主に寄与しているのは VPS と CHS_H1 であり、プレニルフラボノイドの生合成に主に寄与しているのは CHS_H1 であると考えられた。

第3章 精油成分生合成関連遺伝子の単離

本章では苦味成分と同様、ビール醸造において重要なホップの精油成分の生合成に関与する遺伝子のひとつであるファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子の単離とその翻訳産物の酵素活性の調査を行なった。ファルネシルピロリン酸シターゼは、ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) とイソペンテニルピロリン酸 (IPP) からゲラニルピロリン酸 (GPP) を合成するジメチルアリルトランスフェラーゼとしての働きと、GPP と IPP からファルネシルピロリン酸 (FPP) を合成するゲラニルトランスフェラーゼとしての働きを併せ持つ。ホップ球果において主要な精油成分であるミルセン、フムレン、カリオフィレンやファルネッセンは GPP または FPP から生合成されると思われる。それ故、分子選抜技術や形質転換技術を精油成分の改良に用いる上で、ファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子を単離することは重要と言える。

遺伝子の単離は他の植物由来のファルネシルピロリン酸シターゼのアミノ酸配列を比較し、その保存領域の配列よりプライマーを設計し、PCR によりホップ由来ファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子の部分断片を単離した後、Inverse PCR などにより全長遺伝子を単離した。単離した遺伝子を大腸菌で発現させて調製した発現タンパクの酵素活性を調査したところ、ファルネシルピロリン酸シターゼ活性が認められたことから、単離した遺伝子はファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子であることが確認された(図 8)。更に Northern hybridization 解析により本遺伝子の組織特異性を調査したところ、全ての組織画分において有意に発現が認められ、特に精油成分が多量に蓄積しているルプリン画分においては強い発現が認められた(図 9)。

第4章 ホップのルプリン腺毛における遺伝子発現システムの構築

ホップのルプリン腺毛に蓄積する苦味成分やプレニルフラボノイド、精油成分の含量や組成を形質転換技術を用いてコントロールするためには、それらの生合成に関わる遺伝子の単離に加え、ルプリン腺毛における遺伝子発現系を構築することが重要である。またルプリン腺毛における遺伝子発現系を構築することは、ビール原料としてのホップ育種へ

の応用に加え、有用成分を大量生産させる植物工場としてのホップの開発にも繋がる可能性がある。そこで本章ではホップのルプリン腺毛における遺伝子発現システムの構築を目的として研究を行なった。

まず、ルプリン腺毛における遺伝子発現系を構築するうえでルプリン腺毛で特異的に機能するプロモーターが必要である。そこでルプリン腺毛で特異的に発現する VPS 遺伝子に着目し、その上流域を単離した(図 10)。多くの植物のカルコンシンターゼプロモーターにおいて H-box や G-box と呼ばれるシスエレメントが認められている。これらは組織特異性や紫外線応答性などの発現調節に関わっているといった報告が為されているが、VPS 遺伝子上流域については類似の塩基配列は見られたものの、典型的な H-box や G-box は認められなかったことから、その組織特異的発現は H-box や G-box 以外のファクターにより調節されている可能性が示唆された。

次にVPS遺伝子上流域の機能を確認する為、レポーター遺伝子であるGUS遺伝子を連結し、ホップへの形質転換を行なった。形質転換には表2に示した培地(MSCO:アグロバクテリウムとの共存培養培地、MSRE:再分化培地、1/2 MS:育成培地)を用いた。MSREにおいて、50 mg/Lのカルベニシリンを含ませたが、これはアグロバクテリウムを感染させたカルスを二週間おきに新しい培地に移すという条件下においては、再分化効率に影響を与えることなくアグロバクテリウムを除くのに有効であった。今回のトライアルでの形質転換効率は1%(供試組織切片数 100 →再分化個体 1個体)であったが、その後行なった同様の実験における形質転換効率は最大で5%であった。

得られた 1 個体について球果を着生するまで育成した。導入された遺伝子の状態を調べるために行なった Southern hybridization 解析の結果を図 11-B、C に示す。これらの結果から導入された遺伝子は個体内に 2 コピー存在し、インタクトな状態で組み込まれているものと推察された。更に各組織について GUS 染色を行ない、VPS 遺伝子上流域のプロモーター活性とその組織特異性について確認した(図 12)。この結果、単離した VPS 上流域にはプロモーター領域が含まれており、ルプリン腺毛に加え葉や茎の分泌腺においても機能しており、VPSプロモーターは分泌腺特異的プロモーターであることが示された。即ち、VPS 遺伝子上流域はルプリン腺毛における遺伝子発現系のプロモーターとして利用出来ることがわかった。

まとめ

1. ルプリン腺毛で特異的に発現する遺伝子をスクリーニングすることにより、苦味成分の生合成に関与するバレロフェノンシンターゼ(VPS)遺伝子を単離した。
2. VPS がカルコンシンターゼと高いホモロジーを持つことから、VPS のカルコンシンターゼ活性について調査したところ、弱い活性が検出された。これは VPS がプレニルフラボノイドの生合成にも関与している可能性があることを示唆している。またホップには VPS 遺伝子以外にもカルコンシンターゼ様遺伝子が存在していることが明らかとなった。
3. VPS に加え、2 種類のホップ由来カルコンシンターゼ様遺伝子(*CHS2*、*CHS3*)を単離した。更にこれら 3 遺伝子およびチェコのグループによって単離された *CHS4*、*CHS_H1* の 5 種類の CHS 様遺伝子の発現産物の酵素活性を調査した。その結果バレロフェノンシンターゼ活性を持つものは VPS と *CHS_H1* のみであった。また VPS と *CHS_H1* は共にカルコンシンターゼ活性も併せ持つが、VPS のカルコンシンターゼ活性の強さは *CHS_H1* に比べかなり弱いものであった。従ってホップの苦味成分の生合成には VPS と *CHS_H1* が主に関わっており、プレニルフラボノイドの生合成には *CHS_H1* が主に関わっていることが推察された。
4. 精油成分の生合成に関わるファルネシルピロリン酸シンターゼ遺伝子を単離した。本遺伝子は葉、茎、非ルプリン画分、ルプリン画分の全てにおいて発現が見られたものの、精油成分の蓄積するルプリン画分においては特に発現が強く見られた。
5. VPS 遺伝子上流域を単離し、レポーター遺伝子として GUS 遺伝子を連結し、形質転換によりホップに導入することで、単離した上流域のプロモーター活性とその組織特異性を確認した。この結果、VPS 遺伝子上流域はルプリン腺毛における発現系のプロモーターとして利用出来ることがわかった。

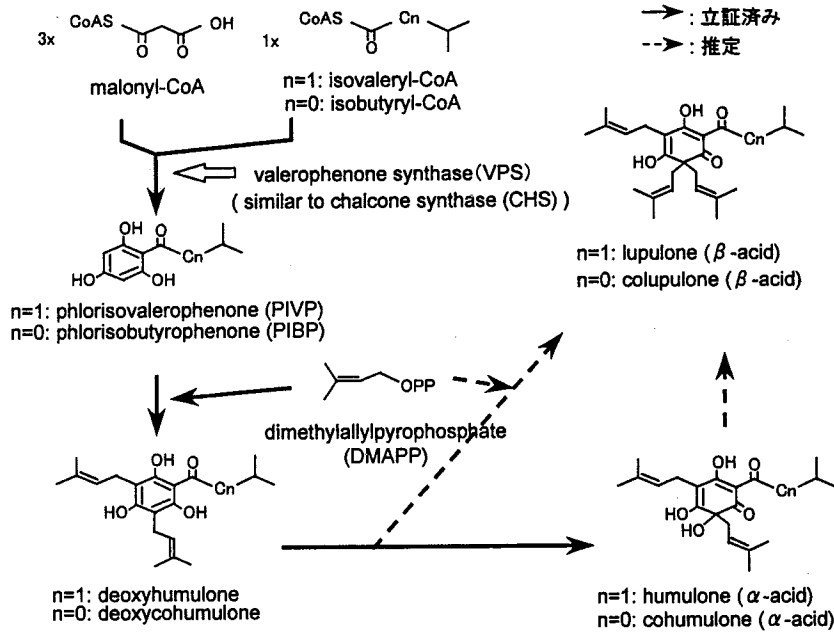


図1 α 酸・ β 酸の生合成経路

出典: S. Y. Fung et al., European Brewery Convention, Proceeding of The 26th Congress, 215-221 (1997)

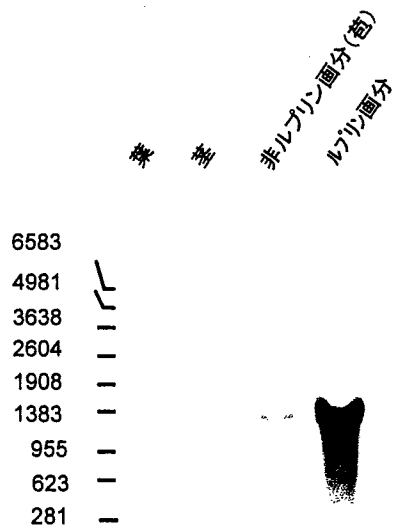


図2 CHSL遺伝子の組織特異的発現

発現組織特異性はNorthern hybridization 解析により確認した。各組織画分で泳動した total RNA量は各 $5\mu\text{g}$ とした。葉、および茎は成長過程の若いものを用いた。非ルプリン画分およびルプリン画分は開花後15日程度の球果より調製した。

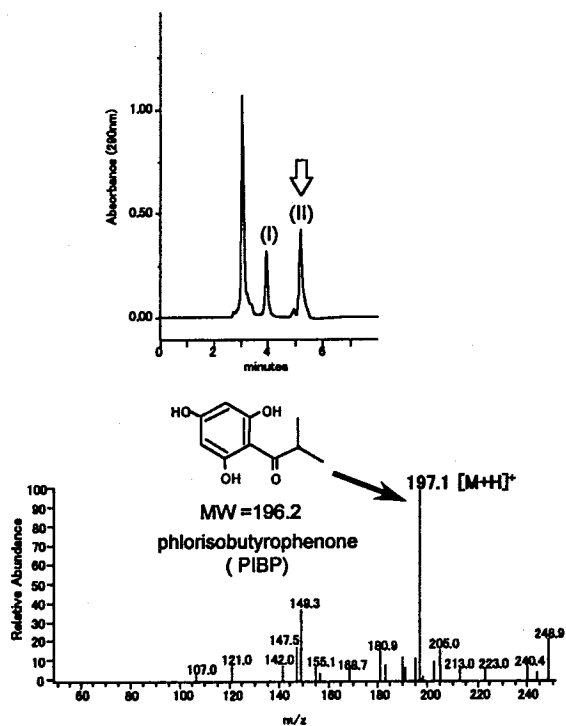


図3 マロニルCoAとイソブチリルCoAを基質としたCHSLタンパクによる反応産物の同定

MSチャート(下)はHPLCチャート(上)のIIのピークのもの表している。IのピークはVPS反応の反応副産物である6-isopropyl-4-hydroxy-2-pyroneと思われる(第2章第3節参照)。

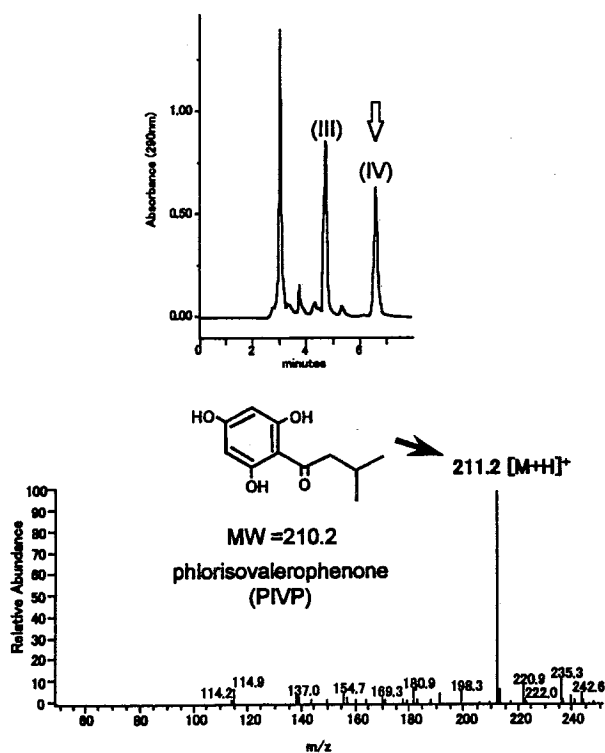
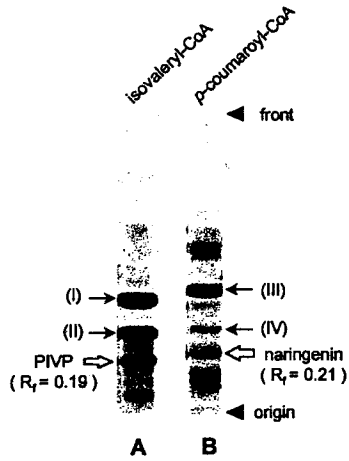


図4 マロニルCoAとイソバレルリルCoAを基質としたCHSLタンパクによる反応産物の同定

MSチャート(下)はHPLCチャート(上)のIVのピークのもの表している。IIIのピークはVPS反応の反応副産物である6-isobutyl-4-hydroxy-2-pyroneと思われる(第2章第3節参照)。



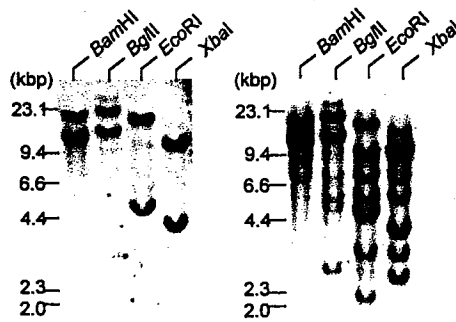
C

	isovaleryl-CoA (VPS activity)	p-coumaroyl-CoA (CHS activity)
specific activity (pkat /mg)	35.76	6.05

図5 バレロフェノンシンターゼのバレロフェノンシンターゼ活性とカルコンシンターゼ活性

反応産物は薄層クロマトグラフィーを用いて同定し、合成活性は反応産物の放射活性の測定により求めた。
 A: PIVP合成活性(バレロフェノンシンターゼ活性); [2-¹⁴C] malonyl-CoAとisovaleryl-CoAを基質とした。
 B: ナリンゲニンカルコン合成活性(カルコンシンターゼ活性); [2-¹⁴C] malonyl-CoAとp-coumaroyl-CoAを基質とした。ナリンゲニンカルコンは自然環化によりナリンゲニンとして検出される。
 C: PIVP、ナリンゲニンカルコンの合成活性の比較

図中(I)、(II)はそれぞれVPS反応の反応副産物である6-(4-methyl-2-oxopentyl)-4-hydroxy-2-pyroneと 6-isobutyl-4-hydroxy-2-pyrone、(III)、(IV)はそれぞれCHS反応の反応副産物であるp-coumaroyltriacetic acid lactone(CTAL)とbisnoryangonin(BNY)と思われる(第2章第3節参照)。



High stringency Low stringency

図6 Southern hybridization 解析によるホップゲノム中のカルコンシンターゼ様遺伝子の確認

プローブにはバレロフェノンシンターゼcDNAを用い、High StringencyとLow stringency のふたつのWash条件で解析を行なった。

表1 各CHS遺伝子の発現組織特異性

遺伝子	葉	茎	非ルプリン 画分	ルプリン 画分
VPS (CHS 1)	±	±	+	++
CHS 2	±	±	±	±
CHS 3	-	-	-	-
CHS 4	-	-	+	++
CHS_H1	+	+	+	++

発現組織特異性はNorthern hybridization 解析およびRT-PCRにより調べた。断片の増幅程度から一、±、+、++の四段階に分類した。

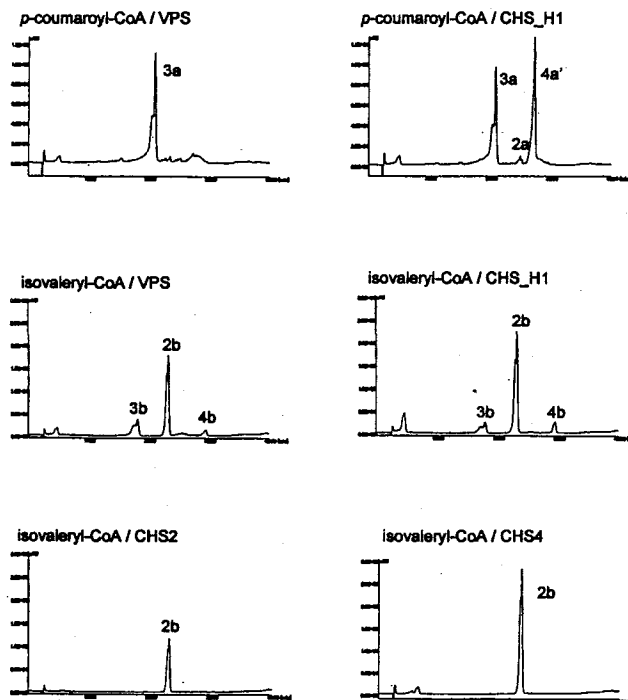


図7 malonyl-CoAと*p*-coumaroyl-CoA / isovaleryl-CoAを基質とした、ホップ由来各CHSホモログによる反応産物のHPLC分析

2a; BNY, 3a; CTAL, 4a'; naringenin, 2b; 6-isobutyl-4hydroxy-2-pyrone, 3b; 6-(4-methyl-2-oxopentyl)-4-hydroxy-2-pyrone, 4b; PIVP.

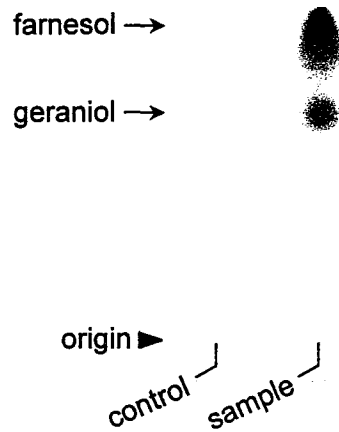


図8 単離したファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子の発現産物におけるファルネシルピロリン酸シターゼ活性の検出

基質としてDMAPPと $[^{14}\text{C}]$ IPPを用いた。コントロールは発現産物の代わりに蒸留水を用いた。反応産物はアルカリリフォスファターゼで処理してアルコール体とし、TLCシリカプレートによる薄層クロマトグラフィーにより検出した。ゲラニオールおよびファルネソールの標準品の位置を矢印で示した。

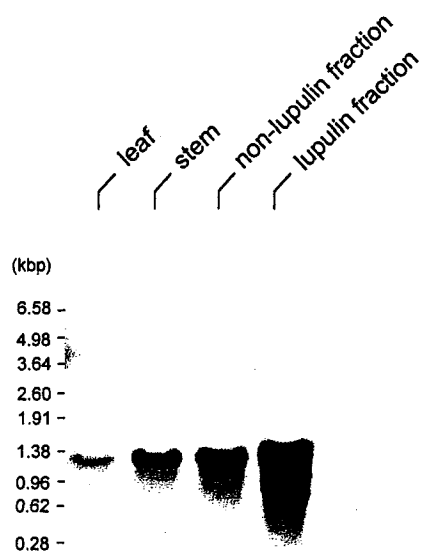


図9 ファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子の組織特異的発現

発現組織特異性は葉、莖、非ルプリン画分、ルプリン画分の全RNA (各 $10\ \mu\text{g}$)を用い、Northern hybridization 解析により確認した。プローブにはファルネシルピロリン酸シターゼ遺伝子のcDNAを用いた。

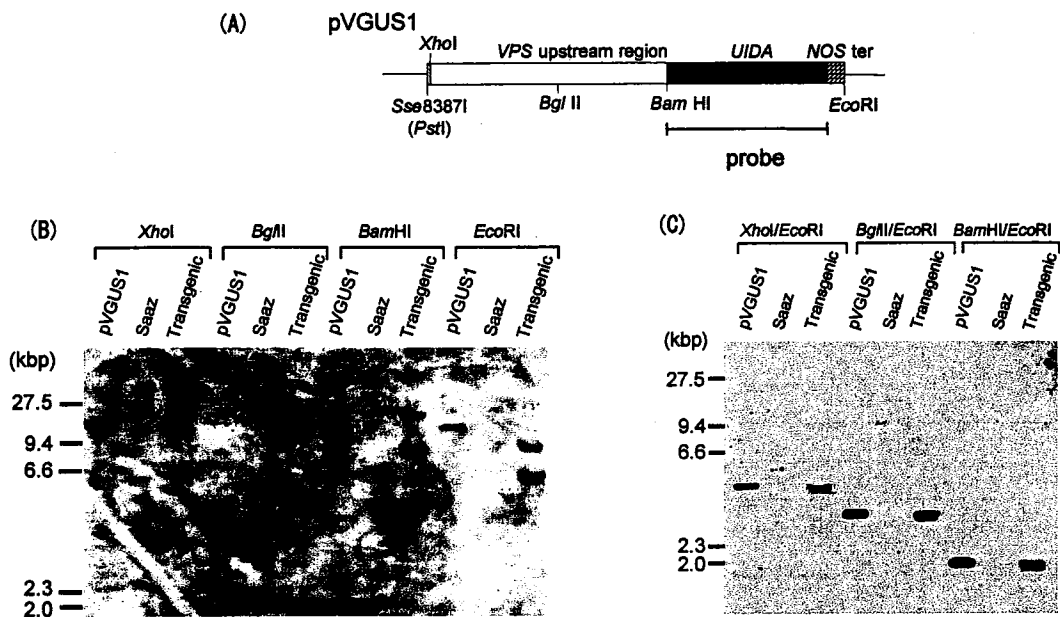


図11 得られた形質転換体のSouthern hybridization 解析による導入遺伝子の確認

- (A) 導入したベクターpVGUS1とプローブとして用いた領域
- (B) 1種類の制限酵素で消化したサザン解析結果
- (C) EcoRIと他の制限酵素による二重消化によるサザン解析結果

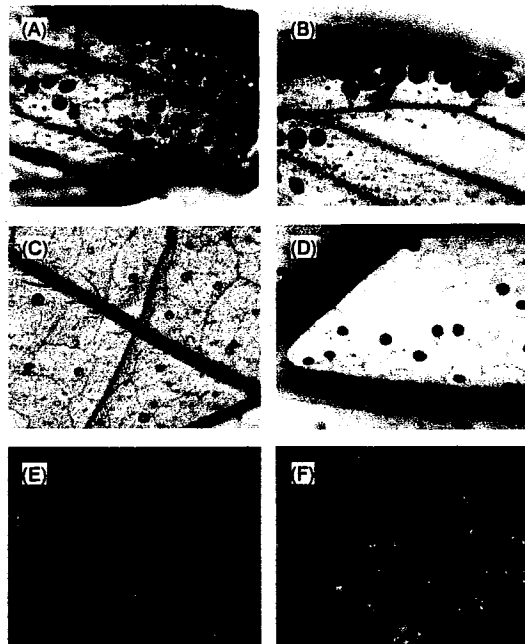


図12 pVGUS1を導入した形質転換ホップのGUS アッセイ

- (A) 非形質転換体 (cv. Saazer (Oswald's clone 72))の内苞およびルプリン腺毛(コントロール)
- (B) 形質転換体の内苞およびルプリン腺毛
- (C) 非形質転換体の葉
- (D) 形質転換体の葉
- (E) 非形質転換体の茎
- (F) 形質転換体の茎

論文審査結果要旨

ホップ (*Humulus lupulus L.*) はアサ科に属する雌雄異株の多年生蔓植物である。その雌株だけに着生する球果中に存在するルプリン腺毛に蓄積している苦味成分や精油成分は、ビールの苦味成分、香り成分として、またプレニルフラボノイドはその抗癌作用などの薬理活性から、ホップ育種における重要な育種ターゲットのひとつとなっている。形質転換技術や分子選抜技術を利用した育種技術の開発は、これらの成分をターゲットとしたホップ育種を効率化する上で重要である。本博士論文では、これらの成分をターゲットとした形質転換技術や分子選抜技術を用いた育種技術開発を目指し、その基盤作りを行なった。

最初に、カルコンシンターゼ様遺伝子であり苦味成分の前駆体の合成に関わるバレロフェノンシンターゼ遺伝子 (VPS 遺伝子) を単離し、本遺伝子がルプリン腺毛で特異的に発現していることを示した。また VPS が、微弱ではあるがプレニルフラボノイドの前駆体であるナリングニンカルコンの合成を触媒するカルコンシンターゼの活性を併せ持つことを明らかにした。更に同じくカルコンシンターゼ様遺伝子である CHS2 遺伝子および CHS3 遺伝子を単離し、これらの発現産物と、チェコのグループにより単離された CHS4 遺伝子と CHSH1 遺伝子のふたつのカルコンシンターゼ様遺伝子の発現産物との酵素活性を比較することにより、ホップにおいて苦味成分の生合成には VPS 遺伝子と CHSH1 遺伝子が大きく寄与しており、またプレニルフラボノイドの生合成には CHSH1 遺伝子が大きく寄与していることを示した。

次に本研究者は精油成分の生合成に関わる遺伝子の単離を試みた。本博士論文においては精油成分生合成系の源流の反応を触媒し、且つ他植物からの情報も多く利用出来るフェルネシルピロリン酸シンターゼ遺伝子を単離し、本遺伝子が VPS 遺伝子と同様ルプリン腺毛で強く発現していることを示した。

最後に本研究者は、形質転換技術によるルプリン腺毛中成分の改良を行なう上で必要不可欠であるルプリン腺毛における遺伝子発現系を構築した。ここで本研究者はルプリン腺毛で特異的に発現する VPS 遺伝子のプロモーターを利用することを検討し、VPS 遺伝子の上流域の単離を行なった。更に単離した上流域がプロモーター活性を持つことを確認する為に、レポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼをコードする UIDA 遺伝子を連結し、これをホップに形質転換することで、GUS 染色による確認を行なった。この結果、単離した VPS 遺伝子の上流域にはプロモーター領域が含まれ、この VPS プロモーターをルプリン腺毛における遺伝子発現系として利用することが可能であることを示した。

本博士論文で単離された遺伝子および得られた知見は、今後苦味成分や精油成分、プレニルフラボノイドをターゲットとした形質転換技術や分子選抜技術を用いた育種技術開発を行なう上で、重要なツール、情報となる。即ち、本博士論文はホップ育種の基盤作りに貢献したもので、審査員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するのに値するものと認定した。