

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380019
 研究課題名（和文）カキのタンニン蓄積制御遺伝子の探索とそれを利用したゲノム構成の解析と実生選抜
 研究課題名（英文）Search of the gene conferring tannin accumulation in persimmon fruit and its utilization for the analysis of genome composition and the seedling selection
 研究代表者
 米森 敬三 (YONEMORI KEIZO)
 京都大学・農学研究科・教授
 研究者番号：10111949

研究成果の概要(和文):日本タイプのカキの渋性発現に関与する遺伝子の遺伝子座を調査し、近縁二倍体種であるマメガキのゲノムライブラリーから構築したコンティグの端から、さらに100kb はなれたところに存在する可能性が明らかとなった。また、この遺伝子が単一で渋性を制御し、六倍体のカキゲノム中に6アレル存在していること、タンニン生合成を総括的に制御する転写因子 *DkMyb4* が渋性発現を制御している可能性を示した。さらに、この遺伝子に連鎖する領域から、日本タイプの完全甘ガキを簡便に選別できる分子マーカーを構築した。なお、中国タイプの完全甘ガキ形質に連鎖する AFLP マーカーを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文): The gene conferring the trait of astringency-loss in Japanese-type PCNA is shown to be located at 100kb away of fosmid contig constructed from *Diospyros lotus*, a close relative of *D. kaki*. This single gene controls the astringency trait in persimmon fruit and 6 alleles are responsible for the appearance of this trait. The *DkMyb4*, a regulatory gene, is also found to control tannin biosynthesis in the fruit and is indicated to determine whether an individual is PCNA or non-PCNA due to its strength of expression. Using the DNA sequences linked to this gene, we could construct a primer pair for PCR analysis for selecting PCNA offspring of Japanese-type. In addition, we also found an AFLP marker to distinguish Chinese-type PCNA among breeding population.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：マメガキ、倍数体、甘渋性決定遺伝子、転写因子、定量 PCR、DNA マーカー

1. 研究開始当初の背景

カキはその果実の脱渋性が種子の有無によって左右される **pollination variant** タイプと種子の有無によって左右されない **pollination constant** タイプとに分類され、それぞれのタイプに甘ガキと渋ガキが存在するため、**pollination variant** の甘ガキ・渋ガキ、**pollination constant** の甘ガキ・渋ガキという4つの品種群に分類される。しかしながら、遺伝形質としてこれらの脱渋性を考察したとき、これまでの交雑試験から **constant** の甘ガキ（完全甘ガキ；PCNA）品種群とそれ以外の3タイプの品種群（非完全甘ガキ；non-PCNA）との間には明瞭な質的差異が存在しており、完全甘ガキ/非完全甘ガキの形質発現は単一遺伝子座によって制御され、関与する対立遺伝子すべてが劣性となって初めて完全甘ガキ形質（PCNA 形質）が発現することがわかっている。

従来、PCNA 品種群は日本においてのみ出現したとされ、17世紀の文献に記載されている、奈良で出現した‘御所’が最初の完全甘ガキ品種であるとされてきた。研究代表者らは日本でのPCNAの出現は、タンニン蓄積を促進する調節遺伝子の欠損（突然変異）によって生じたと考えており、これまでの実験結果からもこのことが裏付けられている。

一方、日本でのみ存在すると考えられていた完全甘ガキ（PCNA）の中国での存在が報告され、これまでの研究代表者らの調査から、中国のPCNA品種は日本のPCNA品種とは全く別の機構でタンニン蓄積を制御していることが明らかとなってきた。すなわち、中国の完全甘ガキ形質

（PCNA 形質）は優性であり、日本の完全甘ガキのPCNA形質が劣性であることと大きく異なっていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

（1）日本および中国の完全甘ガキにおいて果実でのタンニン蓄積を制御する、2つの異なる遺伝子を探査すること。このために、日本および中国の完全甘ガキ形質に強く連鎖する分子マーカーを構築し、これらのマーカーを用いて、目的遺伝子の遺伝子座を特定する。

（2）カキのゲノム構成を解明すること。カキは六倍体という高次倍数体であるが、そのゲノム構成に関しては同質倍数体であるのか異質倍数体であるのかさえ明らかにされていない。そこで、本研究で構築する分子マーカーの多様性を利用して、カキのゲノム構成を推定する。

（3）分子マーカーを利用して、新たな日本タイプの完全甘ガキ品種を育種すること。この目的に関してはすでに数年前より、果樹研究所カキ・ブドウ研究チーム（安芸津）との共同研究として実施しており、現在、安芸津には多くの育種集団実生が育成されている。本研究では、完全甘ガキ実生の選抜効率を向上させるため、簡便かつ確実な甘渋性判別マーカーを構築する。

3. 研究の方法

（1）日本および中国のカキ果実での甘渋性形質の発現に関与する遺伝子の探索

日本のカキの甘渋性発現に関与する遺伝子の探索のため、二倍体の近縁野生種であるマメガキ（*D. lotus*）のゲノムライブラリーを用いて、研究代表者らがこれまで

に構築した甘渋性発現に関連する AFLP マーカーを利用してシードクローンを単離し、コンティグを構築後、これを詳細に解析することでカキのタンニン蓄積を促進する遺伝子の遺伝子座を探索する。さらに、この遺伝子が作用していると考えられるプロアントシアニジン生合成系に関連する転写因子の解析を実施する。

また、中国のカキの甘渋性発現に関与する遺伝子の探索のため、中国の完全甘ガキ品種‘羅田甜柿’と日本のカキ品種‘晩御所’、‘四溝’および‘岩瀬戸’の交雑実生で甘渋性が分離した雑種第一代の集団を用い、AFLP 分析により甘渋性に連鎖する分子マーカーを探索する。

(2) 定量 PCR によるカキのゲノム構成の解析

日本のカキの完全甘ガキ形質に連鎖する領域および非完全甘ガキ形質に連鎖する領域それぞれをターゲット遺伝子、その周辺領域で完全甘ガキおよび非完全甘ガキ双方が共通して持つ領域をリファレンス遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) とみなし、その両者の遺伝子の存在比を調査することで、その遺伝子のアレル数を推定し、カキのゲノム構成を解析する。

(3) 甘渋性判別マーカーの構築と実生個体の識別

現在まで日本タイプの完全甘ガキを得るための BC₁ 実生集団が安芸津で存在しているため、これらから完全甘ガキ個体を簡便かつ確実に選別するための PCR マーカーをマメガキとカキのゲノミッククローンの塩基配列を利用して構築する。

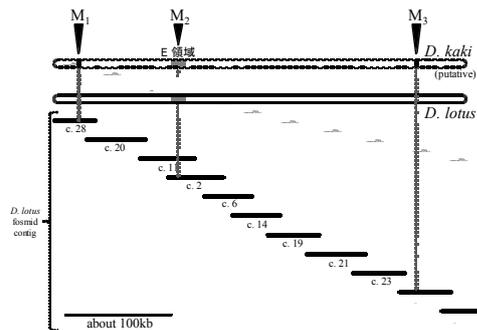
4. 研究成果

(1) 日本および中国のカキ果実での甘渋性形質の発現に関与する遺伝子の探索

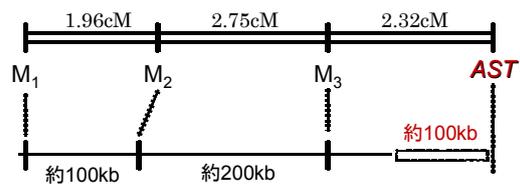
① 日本のカキ果実での甘渋性決定遺伝子 (*AST* 遺伝子) の遺伝子座の推定

マメガキのコンティグ内の塩基配列から

3 つのマーカーを作成し(第 1 図)、それらのマーカーとカキ育種集団の甘渋性形質との連鎖関係を調査して、(2) のカキのゲノム解析の実験結果でカキが同質六倍体である可能性が高いとの結果を得たことから、カキが同質六倍体であると仮定して組換え価を算出したところ、目的遺伝子は構築したコンティグから約 100kp はなれたところに存在する可能性が示唆された(第 2 図)。



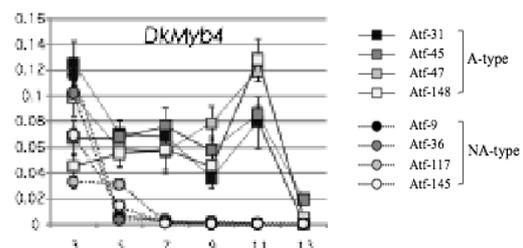
第 1 図 マメガキのコンティグと分子マーカーの作出部位



第 2 図 *AST* 遺伝子座領域のマッピング (計算上はあと 100kb 付近に *AST* 遺伝子がある)

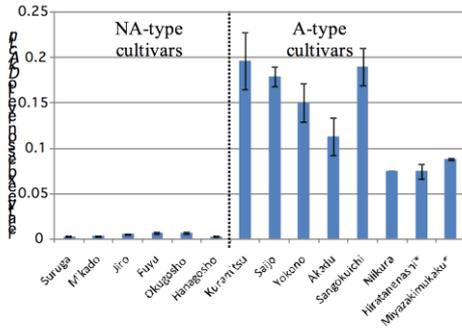
② 日本タイプのカキのタンニン生成を総括的に制御する転写因子の同定

日本タイプのカキで果実のタンニン蓄積を包括的に制御する転写因子として *DkMyb4* を同定した。この転写因子は完全甘ガキにお



第 3 図 交雑集団で分離した完全甘ガキと非完全甘ガキの果実中の *DkMyb4* の経時的変化
A-type : 完全甘ガキ個体、B-type : 非完全甘ガキ個体

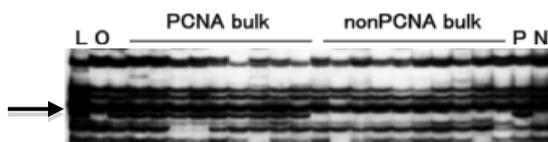
いて、タンニン蓄積が停止する直前に完全甘ガキ個体で発現を停止し（第3図）、さらに完全甘ガキ品種でのみ発現がみられなくなることが明らかになり（第4図）、形質転換実験からもこの転写因子のカキ果実でのタンニン蓄積への重要な役割が確認できた。



第4図 完全甘ガキ品種と非完全甘ガキ品種での *DkMyb4* の発現
NA-type : 完全甘ガキ品種、A-type : 非完全甘ガキ品種

③中国のカキの甘渋性関与遺伝子

中国のカキの甘渋性形質が分離した交雑集団を用いて、BSA法による AFLP 分析によってマーカーを探索し、中国タイプの甘渋性に連鎖する AFLP マーカーを単離した（第5図）。



第5図 中国タイプの完全甘ガキ形質に連鎖する AFLP マーカー(矢印)

(2) 定量 PCR によるカキのゲノム構成の解析

完全甘ガキ‘次郎’の形質転換体を用い、導入した *S6PDH* 遺伝子をリファレンス遺伝子、完全甘ガキ形質発現に関与する遺伝子に連鎖するマーカー領域をターゲット遺伝子として real-time PCR によりその存在比を計算することで、カキが甘渋性に関与する遺伝子を6アレル持っていることを明らかにし、カキが同質6倍体である可能性が高いことを明らかにすることができた（第

1表）。また、完全甘ガキ形質に連鎖する領域と非完全甘ガキ形質に連鎖する領域の存在比を real-time PCR で測定することにより、その遺伝子型を推定することができることも示した（第2表）。

Table 1. Estimated copy number of the *ast*-linked marker in the genome of transformed 'Jiro'

sample name	Ct-value		R_{ast}/R_{S6PDH} *	Introduced <i>S6PDH</i> site number	Estimated number of the <i>ast</i> marker
	<i>ast</i> marker	<i>S6PDH</i> marker			
PS1	21.46±0.08	24.19±0.02	6.43±0.03	1	6
PS4	19.84±0.06	22.31±0.02	5.93±0.04	1	6
PS5	20.77±0.07	22.37±0.06	3.03±0.03	2	6
PS6	19.99±0.06	22.9±0.02	6.1±0.03	1	6

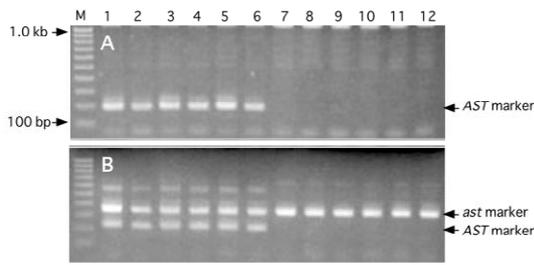
* R_{ast}/R_{S6PDH} is the ratio of the number of *ast*-linked markers to *S6PDH* sites.

Table 2. Estimated allelic ratio of the *AST:ast* and proposed genotype at the *AST* locus of N-line progeny, 170-26 and 'Nishimura-wase'.

Progeny sample name	Ct-value		R_{ast}/R_{AST}	Estimated ratio of <i>AST:ast</i>	Estimated genotype in the <i>AST</i> locus
	<i>ast</i> marker	<i>AST</i> marker			
N3	20.66±0.13	22.54±0.13	4.95±0.003	1:5	AAAAA
N7	23.73±0.043	24.82±0.12	2.15±0.22	1:2	AAaaaa
N8	20.16±0.066	20.95±0.11	2.29±0.29	1:2	AAaaaa
N9	19.37±0.0017	19.8±0.01	1.75±0.01	1:2	AAaaaa
N13	19.25±0.011	21.14±0.15	4.91±0.47	1:5	AAAAA
N18	21.76±0.074	23.53±0.089	4.8±0.26	1:5	AAAAA
N21	20.31±0.02	22.19±0.1	4.92±0.27	1:5	AAAAA
N29	21.47±0.15	22.07±0.14	2.02±0.32	1:2	AAaaaa
N33	28.37±0.033	30.18±0.22	5.05±0.98	1:5	AAAAA
170-26	22.37±0.007	22.06±0.1	1.07±0.067	1:1	AAAAAA
Hanagosyo	23.19±0.18	N.D	N.D	0:1	aaaaaa
Okugosyo	23.37±0.29	N.D	N.D	0:1	aaaaaa
Jiro	21.23±0.12	N.D	N.D	0:1	aaaaaa
Fuyu	20.79±0.073	N.D	N.D	0:1	aaaaaa
Nishimura-wase	25.92±0.17	23.38±0.15	0.206±0.036	5:1	AAAAAa

(3) 甘渋性判別マーカーの構築と実生個体の識別

マメガキのゲノミッククローンの塩基配列とそれに対応する領域のカキのゲノミッククローンの塩基配列から、非完全甘ガキ形質に密接に関与しているマーカー領域を特定し、そのマーカーの有無により完全甘ガキ個体を PCR 分析で確実に識別できる DNA マーカーを構築した（第6図A）。また、完全甘ガキ形質に連鎖する領域をポジティブコントロールとして利用することで、より確実に PCR 分析を実施できることを示した（第6図B）。



第6図 マーカーによる完全甘ガキ個体の識別
1-6: non-PCNA 個体, 7-12: PCNA 個体

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① S. Kanzaki, T. Akagi, T. Masuko, M. Kimura, M. Yamada, A. Sato, N. Mitani, N. Utsunomiya, K. Yonemori, SCAR markers for practical application of marker-assisted selection in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) breeding, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 79, 2010, 150-155
- ② T. Akagi, Y. Takeda, K. Yonemori, A. Ikegami, A. Kono, M. Yamada, S. Kanzaki, Quantitative genotyping for the astringency locus in hexaploid persimmon cultivars using quantitative real-time PCR, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 査読有, 135, 2010, 59-66
- ③ T. Akagi, A. Ikegami, T. Tsujimoto, S. Kobayashi, A. Sato, A. Kono, K. Yonemori, *DkMyb4* is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit, Plant Physiology, 査読有, 151, 2009, 2028-2045
- ④ K. Yonemori, T. Akagi, S. Kanzaki, Construction of a reliable PCR marker for selecting pollination constant and non-astringent (PCNA) type offspring among breeding population of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), Acta Horticulturae, 査読有, 839, 2009, 625-629
- ⑤ T. Akagi, S. Kanzaki, M. Gao, R. Tao, D.E. Parfitt, K. Yonemori, Quantitative real-time PCR to determine allele number for the astringency locus by analysis of a linked marker in *Diospyros kaki* Thunb., Tree Genetics & Genomes, 査読有, 5, 2009, 483-492
- ⑥ S. Kanzaki, M. Yamada, A. Sato, N. Mitani, N. Utsunomiya, K. Yonemori, Conversion of RFLP Markers for the

Selection of Pollination-Constant and Non-Astringent Type Persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) into PCR-Based Markers, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 78, 2009, 68-73

- ⑦ T. Akagi, A. Ikegami, Y. Suzuki, J. Yoshida, M. Yamada, A. Sato, and K. Yonemori, Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit, Planta, 査読有, 230, 2009, 899-915
- ⑧ S. Kanzaki, A. Sato, M. Yamada, N. Utsunomiya, A. Kitajima, A. Ikegami, and K. Yonemori, RFLP markers for the selection of pollination-constant and non-astringent (PCNA)-type persimmon and examination of the inheritance mode of the markers, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 77, 2008, 28-32

[学会発表] (計 7 件)

- ① T. Tsujimoto, T. Akagi, A. Kono, N. Mitani, K. Yonemori, Identification of the genetic region including astringency (*AST*) locus in hexaploid persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by positional cloning in a diploid relative, *D. lotus*, Plant and Animal Genome XVIII, 2010. 1. 11, San Diego, USA
- ② 赤木剛士・池上礼子・小林省三・佐藤明彦・米森敬三, カキの甘渋性を決定する *DkMyb4* の季節的発現制御因子についての解析、園芸学会平成21年度秋季大会、平成21年9月26日、秋田大学手形キャンパス
- ③ 赤木剛士・池上礼子・佐藤明彦・小林省三・米森敬三, カキの甘渋性決定に関与する転写因子 *DkMyb4* の同定、園芸学会平成21年度春季大会、平成21年3月19日、明治大学駿河台キャンパス
- ④ A. Ikegami, T. Akagi, M. Yamada, A. Kitajima, K. Yonemori, Analysis of differentially expressed genes in astringent fruit using suppression subtractive hybridization, 4th International Symposium on Persimmon, 2008. 11. 10, Faenza, Italy
- ⑤ S. Kanzaki, T. Akagi, M. Yamada, N. Mitani, and K. Yonemori, Molecular characterization of a marker locus linked to the *AST* gene in persimmon, Plant & Animal Genome XVI, 2008. 1. 14, San Diego California, USA
- ⑥ 赤木剛士・吉田純一・山田昌彦・米森敬三, カキ果実で発現するフラボノイド合成

系に関連した転写因子群の単離とタンニン蓄積への関与、園芸学会平成19年度秋季大会、平成19年9月29日、香川大学幸町キャンパス

- ⑦ K. Yonemori, S. Eguchi, A. Ikegami, Y. Sakaguchi, T. Akagi, A. Kitajima, M. Yamada, and Dan E. Parfitt, Molecular marker linked to natural astringency-loss in Chinese-type PCNA persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit, 104th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science, 2007.7.18, Scottsdale, Arizona, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米森 敬三 (YONEMORI KEIZO)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10111949

(2) 研究分担者

山田 昌彦 (YAMADA MASAHIKO) (2007年度のみ分担)

果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・上席研究員

研究者番号：00355439

佐藤 明彦 (SATO AKIHIKO) (2008, 2009年度分担)

果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・上席研究員

研究者番号：10111949

田尾 龍太郎 (TAO RYUTARO)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10211997

山根 久代 (YAMANE HISAYO)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80335306

(3) 連携研究者

神崎 真哉 (KANNZAKI SHINYA)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：3441950122