

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：34316

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660026

研究課題名(和文) カキ果実のプロアントシアニジンとそのポリマーの生成蓄積機構解明のための新技術開発

研究課題名(英文) Analysis on developmental processes of tannin cells for accumulating proanthocyanidins and their polymers in persimmon fruit

研究代表者

米森 敬三 (Yonemori, Keizo)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：10111949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カキ果実内でのタンニン細胞の分化・発達過程に関する基本的な知見を得るため、開花期のカキ子房を観察したところ、タンニン細胞はヘタ片と子房の接合部位から、小さなタンニン細胞が維管束に沿って子房中に向かって大きくなりながら分布していく過程が観察された。また、開花前の子房が未発達の段階では、まず花床部にタンニン細胞が分布していた。さらに、ゼラチンと蛍光色素を組み合わせた蛍光染色剤の有効性を調査したところ、切片を固定・作製する方法の工夫により、タンニン局在性の解析に使用できる可能性が示唆された。なお、カキのプロアントシアニジン合成に関与すると考えられる遺伝子は果実発育の初期に高い発現が認められた。

研究成果の概要(英文)：Ovary of persimmon fruit was observed by light microscope at the blooming stage to obtain the developmental process of tannin cells in the fruit, and it revealed that small tannin cells are firstly appeared at the junction of calyx lobe and ovary, and those are distributed toward upper parts of ovary with cell enlargement. At undevelopmental stages of ovary, i.e. 4 or 3 weeks before blooming, tannin cells are only observed in receptacle. When we tested an efficiency of a new fluorescent dye conjugated with fluorescent dye and gelatin to elucidate localization of condensed tannins in persimmon fruit, it showed a successful possibility if preparation method for sectioning was improved. In addition, high gene expression related to proanthocyanidin biosynthesis was detected in the early stage of fruit development in persimmon.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 果樹 タンニン細胞 渋味

## 1. 研究開始当初の背景

カキは日本に古くから存在する果樹で、各地の農家の庭先果樹として植栽されてきた。カキ果実にはタンニンと呼ばれる、プロアントシアニジンのポリマーからなる渋味物質が多量に存在している。このため、古くから渋ガキよりカキ渋を生産し、漁網や和紙などの耐水性加工、あるいは漆器の下地としての塗布などに幅広く利用されてきた。

カキ果実中でタンニンは、果実の発育とともに果肉柔細胞中のタンニン細胞と呼ばれる異形細胞の液胞中に特異的に蓄積されていく。しかしながら、タンニンの構成成分となるプロアントシアニジンがタンニン細胞内で特異的に合成されるのか、あるいは、タンニン細胞以外の細胞で合成されたプロアントシアニジンがタンニン細胞に輸送されてくるのかは現在まで全く明らかにされていない。さらに、何故タンニンはタンニン細胞のみに蓄積するのか、タンニン細胞はいつどこから分化・発生するのかという最も基本的な点についても現在に至るまで全く解明されていない。

しかしながら、近年、カキのタンニンの構成成分となるプロアントシアニジンに関する研究にはいくつかの進展が見られている。プロアントシアニジンはカテキンやエピカテキン等のフラバン-3-オール同士が架橋したダイマーやトリマーであるが、これらが重合を繰り返して高分子ポリマーとなることで縮合型タンニンが生成されると考えられている。このプロアントシアニジンの骨格の合成に関わる酵素として、ロイコアントシアニジンから2,3-トランス-フラバン-3-オール(カテキンなど)を合成するLAR (leucoanthocyanidin reductase) とアントシアニジンから2,3-シス-フラバン-3-オール(エピカテキンなど)を合成するANR (anthocyanidin reductase) がモデル植物から単離された。また、フラボノイド化合物合成のための鍵酵素の一つであるCHS (chalcone synthase) や近年単離されたANRの細胞内局在性を免疫組織学的に解析することで、プロアントシアニジンの細胞内での合成部位を特定しようとする試みもいくつかの植物で報告され、骨格となるフラバン-3-オールはゴルジ体や小胞体で合成されたものが液胞内に輸送され、液胞内でそれらが重合するというモデルも提唱されている。さらに最近(2013年)では、ゼラチンと蛍光色素を組み合わせた蛍光染色剤によるプロアントシアニジンポリマー(縮合型タンニン)の局在性を共焦点レーザー顕微鏡で解析する技術が報告

され、プロアントシアニジン生合成に葉緑体や白色体などの色素体が深く関係していることが示唆されている。

カキ果実において、タンニン細胞がどの部位から発生して来るのか、あるいは発生したタンニン細胞にどのようにタンニンが蓄積されていくのかを明らかにするための手法はこれまでに報告されておらず、先にも述べたように、この点に関しての知見は全く得られていない。近年のタンニン生合成に関する知見の進展や組織学的解析法の有効性を調査し、カキにそれらを応用することで、タンニン細胞の液胞へのプロアントシアニジンあるいはそのポリマーの輸送機構を推測し、タンニン細胞へタンニン蓄積がどのような機作で生じているのかを解明するための手掛かりを得ることができれば、カキ以外の果樹にもこの手法を適用することが可能であり、さまざまな機能的役割を示すプロアントシアニジンの果実内での生成を制御する技術開発につながる事が期待できる。

## 2. 研究の目的

カキ果実は、柔細胞の異型細胞であるタンニン細胞を有し、この細胞の液胞内にプロアントシアニジンのポリマー(縮合型タンニン)を多量に蓄積するために強い渋味を呈する。しかしながら、カキ果実内でのプロアントシアニジンの生成部位やタンニン細胞そのものの分化・発達過程に関する基本的な知見はこれまでにほとんど得られていない。本研究は、このカキ果実のタンニン細胞の分化・発達過程を組織学的に調査すること、およびプロアントシアニジンの生成部位の解析のためのゼラチンと蛍光色素を組み合わせた蛍光染色剤の有効性を調査することを第1の目的とした。

さらに、タンニン生合成に関与すると考えられる遺伝子の発現を調査することで、タンニンの基本骨格を形成するプロアントシアニジンの生成・蓄積機構を類推し、縮合型タンニン(プロアントシアニジンのポリマー)の組織・細胞内での生合成を制御する機構を解明することを第2の目的とした。すなわち、これまでに、カキ果実のタンニン生合成に関わるAST遺伝子探索の過程で、甘ガキ・渋ガキ間でのRNA-seq解析からプロアントシアニジン生合成に関与する可能性が考えられるいくつかの候補遺伝子を同定しており、特にそのうちのABAシグナリングに関与すると考えられる遺伝子発現を調査することで、タンニン細胞でのプロアントシアニジン生合成の

制御機構を解析することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) カキ果実中でのタンニン細胞の分化・発達過程の組織学的調査

これまでのカキ果実におけるタンニン細胞の研究は、古く徳川と湯浅が1936年に発表した「柿の単寧細胞に関する知見」に溯ることができるが、その報告によれば、「子房内に強く染色される細胞（タンニン細胞）が突然あらわれる」とタンニン細胞の出現を記載している。また、カキの花の開花2~3週間前頃には、カキ果実中にタンニン細胞が存在していることが知られている。そこで、カキ‘平核無’鉢植え個体の開花4週間前、3週間前の蕾の出現が認められた時期、および開花期と開花2週間後の子房が完成した時期に、それぞれ蕾（あるいは花）を採取し、FAA固定後、クライオトームを用いて作製した凍結切片を、トルイジンブルーで染色して光学顕微鏡で観察することで、子房内でのタンニン細胞の出現様式とその発達過程を調査した。

#### (2) ゼラチンと蛍光色素を組み合わせた蛍光染色剤の有効性の調査

Brillouet らが発表した論文（Annals of Botany, 112: 1003-1014, 2013）で、プロアントシアニジンのポリマー（タンニン）の局在性解析に、Molecular Probes から市販されている Oregon Green 488-conjugated gelatin による染色が有効であることが報告されている。そこで、この蛍光染色剤（Oregon Green 488-conjugated gelatin）での染色が、カキ果実中でのタンニンの局在性解析にどの程度有効であるかを調査するとともに、この染色剤の使用により、カキ果実中でのタンニンの生成部位を解析できる可能性があるかどうかを渋ガキ‘倉光’果実を用いて検討した。

#### (3) プロアントシアニジンの生合成に関連する遺伝子の発現解析

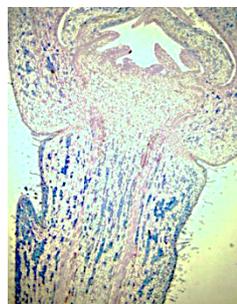
これまでに、甘ガキ・渋ガキの果実間でのRNA-seq解析から、発現が甘ガキ・渋ガキ間で変動する遺伝子を同定しており、これらがプロアントシアニン生合成に関与する可能性が考えられる。一方、ABAシグナリングが*DkMYB4*を介してプロアントシアニン蓄積に関与している可能性があるとの報告がある。そこで、RNA-seq解析から同定した遺伝子からABAシグナリングに関与する可能性のある遺伝子として、ABA receptor 遺伝子

PYL2-like としてアノテーションが付与された Contig33925 に着目し、‘太天’と‘甘秋’の交雑により得られていた甘渋性分離個体の渋ガキ個体を用い、6月と7月の幼果中でのその発現を調査した。

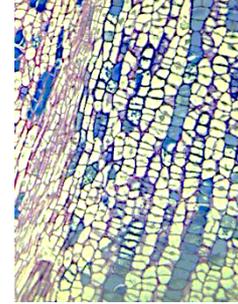
### 4. 研究成果

#### (1) カキ果実中でのタンニン細胞の分化・発達過程の組織学的調査

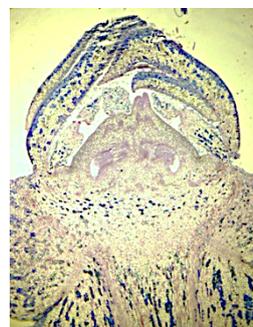
蕾の出現が確認できる非常に初期のステージである開花4週間前のサンプルでは、子房はまだ発達しておらず、花床部分が認められるのみで、この花床部分にもタンニン細胞は認められなかった（第1図）。しかしながら、花弁やガク片の部分にはすでにタンニン細胞が認められ、特に果梗部分には多くのタンニン細胞が維管束に沿って列状に存在していた（第1、2図）。さらに、開花3週間前のサンプルでは、子房はかなり完成していたが、まだタンニン細胞は子房中にはほとんど存在せず、花弁やガク片に多くのタンニン細胞が存在していた（第3図）。また、開花4週間前のサンプルと異なり、花床部には多くのタンニン細胞が分化していた（第3、4図）。



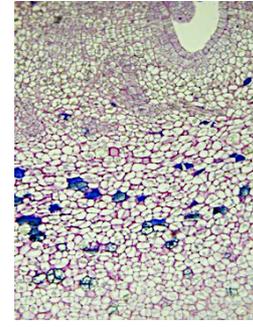
第1図 開花4週間前の蕾



第2図 開花4週間前の果梗



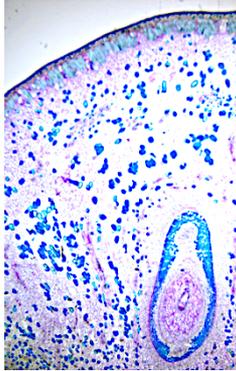
第3図 開花3週間前の蕾



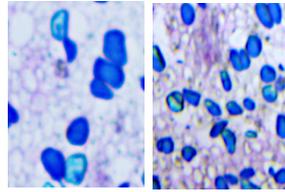
第4図 開花3週間前の花床

次に、開花期のサンプルでは、子房全体にタンニン細胞が分布しており（第5図）、子房中央部ではへた片部分より大きなタンニン細胞に発達していた（第6図）。また、開花2週間後の子房には広くタンニン細胞が分布して

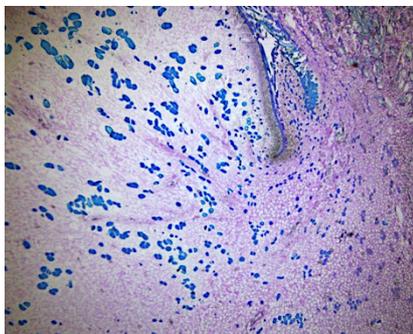
おり、特にタンニン細胞はへた片と子房の接合部から、小さな細胞が維管束に沿って子房中に向かって大きくなりながら分布していた（第7図）。



第5図 開花期の子房



第6図 開花期の子房の中心部のタンニン細胞群（左）とへた片との接合部付近のタンニン細胞群（右）



第7図 開花2週間後の子房とへた片との接合部でのタンニン細胞群

これらの調査より、タンニン細胞は非常に小さな花蕾の段階から花床部にまず分化し、子房中へのタンニン細胞は開花3週目頃より分化を開始すること、また、タンニン細胞は開花前には子房中に広く分布し、特にへた片と子房の接合部で、小さなタンニン細胞が分化し、その細胞が維管束に沿って子房赤道面に向かって子房の発達とともに、肥大しながら子房内に分布していくことがわかった。

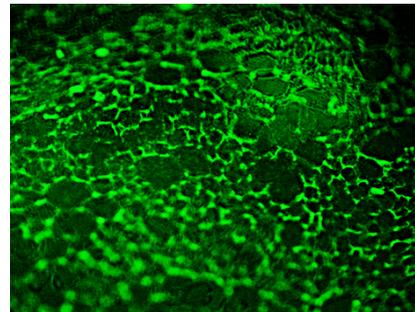
## (2) ゼラチンと蛍光色素を組み合わせた蛍光染色剤の有効性の調査

渋ガキである‘倉光’の幼果期果実の子房から、マイクロスライサーを用いて切片を作出し、軽く水洗した後、縮合型タンニンの局在性解析に有効性であると報告されていた蛍光色素 Oregon Green 488-conjugated gelatin により切片を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、切片中ではこの色素によって局所的に染色される部位は認められず、さらに細胞壁での自然蛍光がこの色素の蛍光観察を妨げ、この方法ではカキ果実のプロアントシアニジン局在性の解析への有効性が認められな

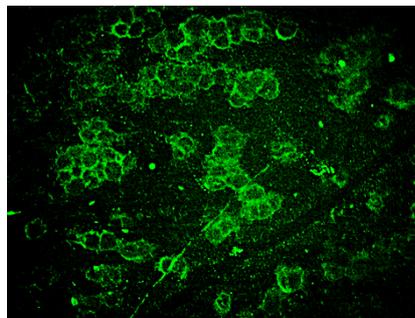
かった。

そこで、組織を FAA 固定後、水溶性樹脂で包埋した試料から薄切切片を作製し、同様にこの蛍光色素で染色して観察したが、この場合もやはりこの色素を利用したプロアントシアニジンの局所性解析への有効性は認められなかった。

ただ、組織を固定せずにクライオトームで氷結切片を作成し、それをこの蛍光色素で染色する方法を試したところ、無染色でも露光時間を長くすると細胞壁の自然蛍光が認められるもの（第8図）、染色切片では自然蛍光よりも強い蛍光が認められ、タンニン細胞を特異的に染色すること、およびその液胞中に局所的にプロアントシアニジンが集結しているような様子が認められるなど、この色素の優位性が若干認められた（第9図）。



第8図 無染色で露光時間を長くして観察した組織の細胞壁の自然蛍光



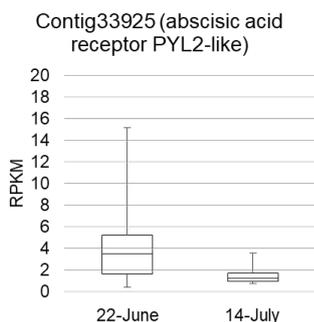
第9図 Oregon Green 488-conjugated gelatin 染色して観察したタンニン細胞群

今後、この切片作成法と染色を用いて、さらに調査を進め、局所性解析への有効性を判断する必要がある。なお、果実以外からプロアントシアニジンが送られてくる可能性に関しても、今後検討していきたい。

## (3) プロアントシアニジンの生合成に関連する遺伝子の発現解析

タンニン細胞へのタンニン蓄積とともに、6月にはすでにカキのプロアントシアニジン合成に関与すると考えられる ABA receptor 遺

伝子 PYL2-like としてアノテーションが付与された Contig33925 の高い発現が認められた (第 10 図)。



第 10 図 渋ガキ個体での Contig33925 の 6 月と 7 月での発現

ただ、7月に入るとこの発現は低下しており、かなり早い時期でのこの遺伝子発現が重要であることが示唆された。今後、部位別の発現差異などを調査することで、タンニン生合成部位を解明する可能性が期待出来る。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

米森 敬三 (YONEMORI KEIZO)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号 : 10111949