

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34316
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25292020
研究課題名(和文) 中国原産の完全甘ガキに存在する特異な甘渋性制御遺伝子の単離とその育種への応用

研究課題名(英文) Identification of genes controlling astringency in Chinese-type PCNA (pollination constant non-astringent) and its application to breeding for PCNA-type persimmon

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) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：中国の完全甘ガキに存在するタンニン蓄積を抑制する優性遺伝子座の同定を目的とし、これまでに構築したAFLPマーカーの有効性を確認した後、AFLPマーカーによる近縁二倍体種マメガキから構築したFosmid/BACライブラリーを利用した遺伝子座同定の可能性を検討した。その結果、カキとマメガキでのゲノム構成の違いが示唆され、fosmid/BACライブラリーを直接用いることの困難さが示された。次に、この遺伝子座が制御する機構を推定するためRNA-seq解析を実施したところ、中国の完全甘ガキで特異的に発現が変化する遺伝子として、フラボノイド生合成に関わる遺伝子とともに細胞内輸送に関わる遺伝子が認められた。

研究成果の概要(英文)：The accuracy of AFLP markers linked to the locus of natural astringency-loss in Chinese-type PCNA persimmon were confirmed and then, the markers were used as probes for fosmid/BAC library constructed from Diospyros lotus, which is a close diploid relative of D. kaki, for constructing contig to identify the locus of natural astringency-loss. However, the results showed that the fosmid/BAC library is hard to use directly for identifying the locus probably due to the difference of genome structure between D. kaki and D. lotus. On the other hand, RNA-seq analysis using segregated progeny between Chinese-type PCNA and non-PCNA indicated that the genes related to transportation in the cell were differently expressed among them, as well as the genes related to flavonoid biosynthesis pathway.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 果樹 甘渋性 タンニン

1. 研究開始当初の背景

カキには甘ガキと渋ガキが存在するが、同じ甘ガキでも、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* タイプの甘ガキ (PVNA) と種子の有無によって左右されない *pollination constant* タイプの甘ガキ (PCNA) に分類できる。

しかしながら、同じ甘ガキでも、両者の自然脱渋機構は全く異なっており、*variant* の甘ガキが果実発育中に種子から生成されるエタノールやアセトアルデヒドによって、タンニンが重合して不溶化することにより渋味が消失するのに対し、*constant* の甘ガキは、タンニンの生合成が果実発育初期に停止し、その後の果実肥大によるタンニン濃度の希釈効果によって渋味が感じなくあることが自然脱渋の第一の要因となっている。

これまで、この完全甘ガキは渋柿から生じた突然変異体であり、日本において偶発的に発生したと考えられ、古文書の記録から、17世紀に奈良に出現した‘御所’が最初の完全甘ガキであるとされていた。その後、岐阜において‘富有’をはじめとするいくつかの完全甘ガキ品種が出現し、静岡の‘次郎’、鳥取の‘花御所’などが出現したが、カキが六倍体という高次倍数体であること、この変異が劣性形質であること、完全甘ガキが突然変異で出現した時期が比較的最近であることなどから完全甘ガキは品種分化が進まず、明治時代に農総務省により実施されたカキの品種調査では、当時、日本には1000以上のカキ品種が存在したとされるが、完全甘ガキは6品種のみが記録されているにすぎない。ただ、いずれにしても、この完全甘ガキ品種群は日本にのみ存在するということが従来から定説とされてきた。

この定説が覆ったのは、1983年、中国でカキの研究に携わっていた陝西省果樹研究所の王仁梓氏が、中国羅田県に完全甘ガキ‘羅田甜柿’が存在することを報告したことによる。この品種はその後、農水省果樹試験場(当時)により日本への導入が実現し、その果実特性調査から、‘羅田甜柿’が完全甘ガキであることが確認された。このことによって、中国にも日本で生じた同様の突然変異が生じ、完全

甘ガキが出現したものと考えられていた。

しかしながら、果樹試カキブドウ支場(当時)において、この‘羅田甜柿’に日本の完全甘ガキ品種である‘太秋’を交雑した交雑実生の調査から、その後代に完全甘ガキ個体とともに不完全甘ガキ、不完全渋ガキ、完全渋ガキといった *non-PCNA* 個体が高率で出現することが明らかとなった。さらに、この事実は‘羅田甜柿’を種子親とし、日本の完全甘ガキである‘晩御所’、完全渋ガキである‘四つ溝’および‘岩瀬戸’を花粉親とする3つの交雑集団を育成し、育成した実生を高接ぎして結実を早め、その果実形質を調査することによって、日本の完全甘ガキを交雑した場合でも完全渋ガキを交雑した場合でも、その後代に完全甘ガキ (PCNA) と *non-PCNA* が出現すること、および PCNA 個体と *non-PCNA* 個体の分離比がいずれの交雑集団でもほぼ 1 : 1 に分離することが確認された。この結果は、‘羅田甜柿’の完全甘ガキ形質は後代に質的遺伝し、さらに‘羅田甜柿’はこの完全甘ガキとなる形質発現のための遺伝子 (*CPCNA*) をヘテロで有し、この *CPCNA* 遺伝子が優性であることを示唆しており、劣性形質である日本の完全甘ガキ形質とは異なり、‘羅田甜柿’が全く別の機作で完全甘ガキ形質を発現していることを示している。

さらに、これまでのプロアントシアニジン(タンニン)生合成に関与する果実内でのフラボノイド合成系関連遺伝子群 (*PAL*, *CAH*, *ACL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3' H*, *F3' 5' H*, *DFR*) の発現調査から、日本の完全甘ガキでは果実発育初期にこれら遺伝子群の発現が同調的に認められなくなるのに対して、‘羅田甜柿’では、果実柔細胞に存在するタンニン細胞へのタンニン蓄積が日本の完全甘ガキ同様、果実発育初期に顕著に低下しているにもかかわらず、果実発育期間中はフラボノイド合成系関連遺伝子群が一定の発現を保っていることが明らかとなっている。カキの渋味は縮合型タンニンであり、その生合成はフラボノイド合成系から派生する経路と考えられている。しかしながら、現在、その合成経路は殆ど解明されておらず、フラボノイド生合成経路からタンニン生合成への分岐となると考えられる2つの

酵素、ANR (anthocyanidin reductase)と LAR (leuco-anthocyanidin reductase)をコードする遺伝子が単離され、アントシアニンやロイコアントシアニンからタンニン生合成のスターターとなると考えられているフラバン-3-オール類 (カテキンやエピカテキンなど)の合成系が明らかになっているのみで、それ以降の重合過程およびこれらの細胞内輸送機構に関する詳細は未だに解明されておらず、タンニン蓄積の制御機構は全く未知の世界である。‘羅田甜柿’のタンニン蓄積が果実発育初期に低下するのは、この未知の部分の機構が関与している可能性が大きい。

2. 研究の目的

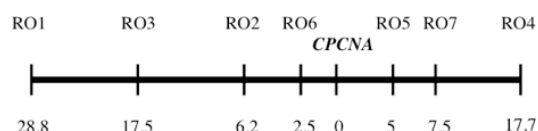
本研究の第一の目的は、中国の完全甘ガキ‘羅田甜柿’ (六倍体) に存在する、タンニン蓄積を抑制する機能を持つ特異な優性遺伝子 (*CPCNA* 遺伝子) の単離を目指すとともに、この遺伝子による果実でのタンニン蓄積過程に関わる液胞内でのプロアントシアニン (タンニン) の高分子化機構およびフラボノイドやプロアントシアニンの細胞内輸送機構に関する未知の律速段階を解明することである。このことによって、カキを含めた、果実でのタンニン蓄積過程を制御する技術の開発し、タンニン蓄積過程の制御による新品種育成のための基礎的知見が得られることが期待できる。

さらに、日本の完全甘ガキで生じた完全甘ガキ形質発現に関与する劣性の突然変異遺伝子の遺伝子座探索のためには、カキの近縁野生種である二倍体のマメガキ (*D. lotus*) のゲノムライブラリーを用いた、カキの甘渋性連鎖マーカー領域を起点とした染色体歩行の有効性が示されている。このため、本研究でも、これまでに発見した‘羅田甜柿’に存在する *CPCNA* 遺伝子に連鎖する AFLP マーカーを用い、日本の甘渋性制御因子の探索同様、二倍体近縁野生種マメガキ (*D. lotus*) のゲノムライブラリーを用いた解析による遺伝子座同定の可能性を検討することも目的とした。

3. 研究の方法

(1)構築した AFLP マーカーの有効性の検定

これまでに構築した 7 種類の AFLP マーカー (第 1 図) は RO 系統 (‘羅田甜柿’ × ‘晩御所’) の甘渋性分離集団を用いて構築したものであり、それ以外の交雑集団での有効性が検定されていなかった。そこで、構築したマーカーのうち、最も *CPCNA* に近いと考えられるマーカー RO-6 に関して、RI 系統 (‘羅田甜柿’ × ‘岩瀬戸’) 74 個体、および RY 系統 (‘羅田甜柿’ × ‘四ツ溝’) 109 個体においてマーカー RO-6 と甘渋形質との適合率を調査した。



第 1 図 これまでに構築した 7 つのマーカーでの *CPCNA* 遺伝子座周辺のマッピング
‘羅田甜柿’と‘晩御所’交雑集団 81 個体の組換え調査をもとに MAPL (鶴飼: 1995) を使用して作成。数字は *CPCNA* 遺伝子座からの推定距離 (cM)

(2)マメガキのゲノムライブラリーを用いた *CPCNA* 遺伝子座同定の可能性

カキの近縁二倍体野生種であるマメガキ (*D. lotus*) を用いてこれまでに作製した fosmid および BAC ライブラリーを用いた *CPCNA* 遺伝子座同定が可能かどうかを検討した。このために、まず *CPCNA* に連鎖する AFLP マーカー RO-2, RO-5, RO-6 の配列をもとにプライマーを作成し、マメガキゲノムでもこれらのマーカーが存在するかどうかを確認した。

次に、マメガキ中にも存在するマーカーをプローブとして fosmid および BAC ライブラリーからクローンのスクリーニングを実施した。さらに、単離したクローンのエンドシーケンスからそれぞれのマーカー領域のコンティグの構築を試みた。

最後に、これらのマーカーあるいはその周辺領域の塩基配列には特異的な SNPs があることが判明したので、この SNPs を利用して、マメガキの F₁ 交雑集団でのそれぞれのマーカーの有無と SNPs の有無を解析し、マーカー間関係を考察した。

(3) *CPCNA* 遺伝子の機能推定のための RNA-seq 解析

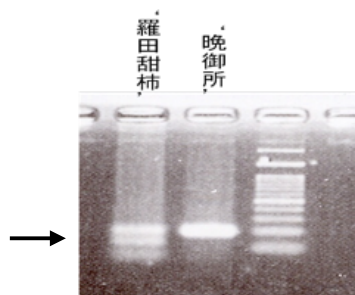
‘羅田甜柿’に日本の PCNA 品種を交雑した

集団で得られたスーパー甘ガキ果実（日本の完全甘ガキ形質を示す劣性の *ast* 遺伝子のみと中国の完全甘ガキ形質を示す *CPCNA* 遺伝子を合わせ持つ遺伝子型）と *CPCNA* 遺伝子を持たない日本タイプの完全甘ガキ果実、及び渋ガキ個体での RNA-seq 解析を実施することで、*CPCNA* 遺伝子が特異的に示す発現を明らかにし、その遺伝子機能を考察した。このために、カキ交雑集団 559 系統 [‘富有’ × (‘羅田甜柿’ × ‘太秋’)] 7 個体および‘羅田甜柿’を実験に供試した。食味試験およびタンニン細胞サイズにより表現型を確認した後 *AST/ast* および *CPCNA/cpcna* の遺伝子型を判定した。また、2015 年 7 月 14 日に採取した果実より RNA を抽出し、HiSeq2000 によりシングルエンド 50bp の mRNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

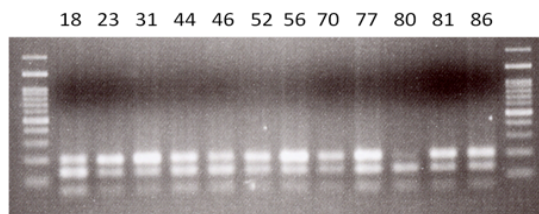
(1) これまでに構築した AFLP マーカーの有効性の検定

RO-6 マーカーは CAPS マーカーであるため、PCR による増幅後、制限酵素で PCR 産物を切断することによって、‘羅田甜柿’のみに存在するバンドが生じる。本研究でも、これまで同様の多型が確かめられた（第 2 図）。

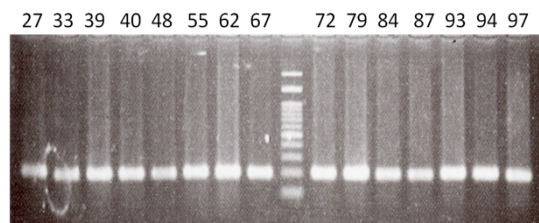


第 2 図 ‘羅田甜柿’および‘晩御所’における CAPS マーカー RO-6 の解析結果

次に、RI 系統（‘羅田甜柿’ × ‘岩瀬戸’）の解析では、PCNA 系統すべてで PCNA 特異的なバンドが得られた（第 3 図）。また、RY 系統（‘羅田甜柿’ × ‘四ツ溝’）においても RY22 個体を除く全ての PCNA 系統で PCNA 特異的なバンドが得られた。RO 系統を用いた解析では、RO-6 は *CPCNA* 遺伝子座に最も近いと判定されていたが、今回の結果から、CAPS マーカー RO-6 は RI 系統や RY 系統においても *CPCNA* 遺伝子座近傍において組み換えが抑制されていると示唆された。また、



第 3 図 RI 系統の PCNA 個体での解析結果（ゲル上部の番号は個体番号）

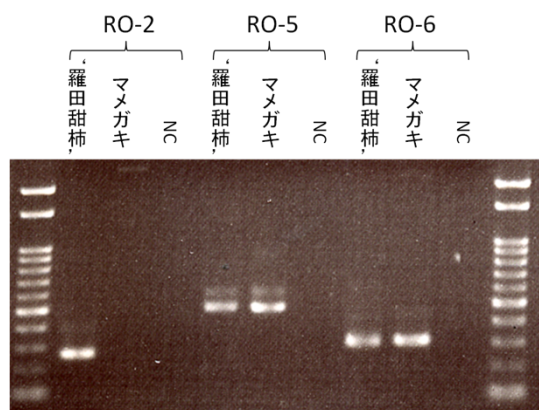


第 4 図 RI 系統の non-PCNA 個体での解析結果（ゲル上部の番号は個体番号）

今回の実験において RO 系統を用いた解析よりもマーカーと形質との適合率が高かったため、RO-6 と *CPCNA* 遺伝子座との遺伝距離はより近いのではないかと可能性が考えられた。なお両系統とも、non-PCNA 個体の分析では PCNA 個体で認められた多型は認められなかった（第 4 図）。

(2) マメガキのゲノムライブラリーを用いた *CPCNA* 遺伝子座同定の可能性

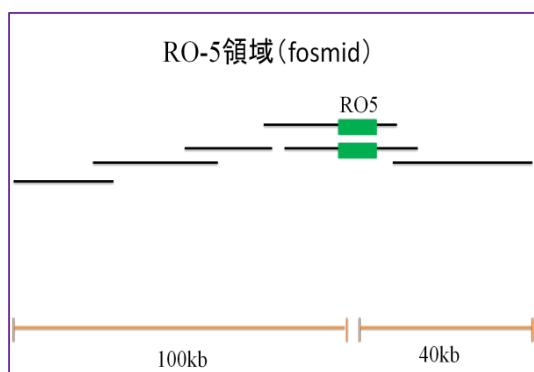
AFLP マーカー RO-2, RO-5, RO-6 の配列をもとにプライマーを作製し、マメガキ DNA サンプルを用いて PCR を行ったところ、マメガキにおいても RO-5, RO-6 マーカーの領域が増幅され、マメガキゲノム中にもそれらに相当する配列があることが示唆された（第 5 図）。ただ、RO-2 マーカーの領域は‘羅田甜柿’においては増幅されたが、マメガキで



第 5 図 RO-2, RO-5, RO-6 マーカーの PCR での解析結果

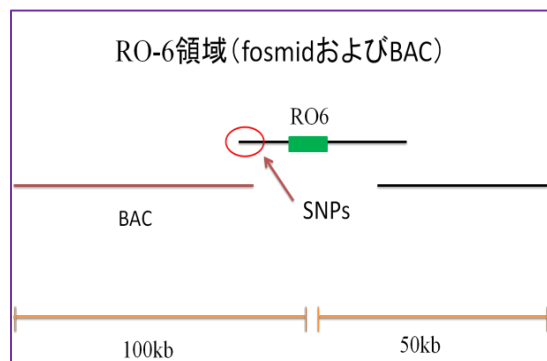
は増幅が見られなかった（第5図）。このことからマメガキゲノム中には RO-2 の相当領域は存在しない可能性が考えられた。

そこで、RO-3 と RO-6 それぞれの塩基配列からプローブを作製し、マメガキの fosmid および BAC ライブラリーによるクローンをスクリーニングした。その結果、RO-5 のシーケンスをプローブとした場合、RO-5 の領域を含んだ4個の fosmid クローンが単離された。また、それらのエンドシーケンスを利用してさらにクローンを単離し、RO-5 周辺約 140kb をカバーするコンティグを構築することができた（第6図）。



第6図 RO-5 マーカー領域を起点としたコンティグの構築

また、RO-6 のシーケンスをプローブとした場合には、RO-6 領域を含んだ1つのクローンを単離し、そのエンドシーケンスを利用して、RO-6 の周辺領域に関して、fosmid クローンと BAC クローンから、RO-6 周辺約 150kb をカバーするコンティグを構築することができた（第7図）。



第7図 RO-6 マーカー領域を起点としたコンティグの構築

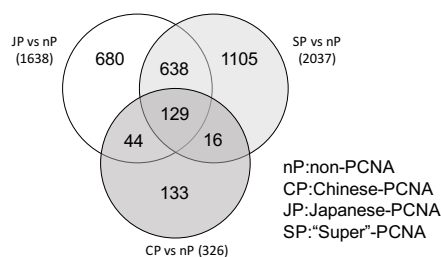
さらに、このそれぞれのマーカー領域のシーケンス解析の結果、RO-5 はそのマーカー領

域の中、RO-6 はマーカー領域付近のコンティグ内に、それぞれ SNPs が存在することが明らかとなった。そこで、マメガキ交雑後代 27 個体において、それぞれの SNPs の有無と RO-5 および RO-6 マーカーの有無を調査することで、RO-5 と RO-6 の関係を解析することを試みた。すなわち、この SNPs の有無とマーカーの有無についての一貫性 (RO-5 について SNPs アレルを持つ個体が RO-6 についても SNPs アレル持つかどうか) を RO-5、6 の間で調査した。その結果、一致したのは 27 個体中 15 個体であり、マメガキにおいては RO-5 と RO-6 が異なる染色体上にある、または同一染色体上にあってもかなり遠い位置にあると考えられた。このことは、マメガキゲノムにおいては RO-5 と RO-6 の遺伝距離は遠く、CPCNA 遺伝子座の単離にこれまでに構築したマメガキの fosmid あるいは BAC ライブラリーを直接用いることが困難である可能性を示した。今後、PCNA 遺伝子の単離を、マメガキゲノムライブラリーを利用して実施する場合には、カキとマメガキでのゲノム構成の違いを考慮する必要があることが示唆された。

(3)CPCNA 遺伝子の機能推定のための RNA-seq 解析

non-PCNA に対する中国の完全甘ガキ、日本の完全甘ガキ、スーパー甘ガキの発現変動遺伝子の数は第8図のようであった。また、トランスクリプトーム解析から、タンニン生合成に関わる遺伝子の発現はスーパー甘ガキと日本および中国タイプの完全甘ガキでは渋ガキと比較して強くおさえられていることが明らかになったが、スーパー甘ガキと日本タイプの完全甘ガキと比較すると、中国タイプの完全甘ガキではその抑制程度は若干弱かった。


<Comparison against non-PCNA>




第8図 559 系統トランスクリプトーム解析における non-PCNA に対する発現変動遺伝子数

第 1 表 中国の完全甘ガキで特異的に発現する遺伝子

GO term	FDR
shikimate biosynthetic process	0.03058
ESCRT I complex	0.03058
protein complex binding	0.03058
chorismate biosynthetic process	0.04253
3-dehydroquinate synthase activity	0.08625
peptide-transporting ATPase activity	0.08625
peptide transport	0.08625
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	0.08625
flavin adenine dinucleotide binding	0.08625
trans-Golgi network	0.08625
intramolecular transferase activity	0.08694

 : 細胞内輸送関連遺伝子

 : 生合成酵素関連遺伝子

ただ、中国の完全甘ガキで特異的に発現が変化する遺伝子として、フラボノイド生合成に関わる酵素とともに、細胞内輸送に関わる遺伝子発現が認められ(第1表)、タンニン細胞へのタンニン(重合した高分子のプロアントシアニジン)輸送への変化がタンニン蓄積制御機構に関与している可能性が認められた。この点が証明されれば、日本タイプの甘ガキ性発現に関わる *ast* 遺伝子の機能との大きな差異であり、中国タイプの甘ガキ発現機構の解明につながる事が期待できる。

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 1 件)

- ① Mitani, N., A. Kono, M. Yamada, A. Sato, S. Kobayashi, Y. Ban, T. Ueno, M. Shiraiishi, S. Kanzaki, T. Tsujimoto, K. Yonemori. 2014. Application of marker- assisted selection in persimmon breeding of PCNA offspring using SCAR markers among the population from the cross between non- PCNA 'Taigetsu' and PCNA 'Kanshu'. HortScience 49: 1132-1135 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nishiyama, S., N. Onoue, A. Kono, A. Sato, K. Yonemori, and R. Tao. 2017. Toward isolation of a gene conferring astringency loss in persimmon fruit. Plant & Animal Genome Conference XXV. Town & Country Convention Center, San Diego, USA.
- ② Yonemori, K., S. Nishiyama, K. Kono, N.

Onoue, and A. Sato. 2016. Differential expression analysis of the genes conferring non-astringent trait at the two loci in Japanese- and Chinese-type pollination constant non-astringent (PCNA) persimmon. VI International Symposium on Persimmon. Valencia, Spain.

- ③ 西山総一郎、尾上典之、河野淳、佐藤明彦、米森敬三、田尾龍太郎. 2016. カキ甘渋性に関するトランスクリプトーム解析. 園芸学会平成 28 年度秋季大会. 名城大学天白キャンパス.

- ④ Nishiyama, S., A. Kono, N. Onoue, A. Sato, K. Ushijima, H. Yamane, R. Tao, and K. Yonemori. 2016. Comparative genomics of the locus controlling astringency in *Diospyros* species. Plant & Animal Genome Conference XXIV. Town & Country Convention Center, San Diego, USA.

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

(2) 研究分担者

佐藤 明彦 (SATO AKIHIKO)
農研機構果樹茶業研究部門・ブドウ・カキ研究領域・ユニット長
研究者番号: 30355440

神崎 真哉 (KANZAKI SHINYA)
近畿大学・農学部・准教授
研究者番号: 20330243

山根 久代 (YAMANE HISAYO)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 80335306