

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06044

研究課題名(和文)モモ果皮着色の分子機構と品種多様性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism and varietal variation of flesh reddening in peach fruit

研究代表者

小田 賢司(Oda, Kenji)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：10344409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モモの赤色着色に関し、遺伝子レベルでの解析を行った。特に、着色形質の品種間多様性の原因となる遺伝子変異を明らかにした。

モモの中には、赤色素アントシアニンを合成せず、赤くならない果実や真っ白な花をつけるものがある。照手白、関白など16種類の樹を調査し、そのすべてが、GST遺伝子の4種類の変異のいずれかを有することを見出した。

さらに、モモには、花弁に白い部分と赤い部分が混在する、絞り咲きと呼ばれる花をつける品種がある。源平枝垂、箆桃など3種5本の樹を調査し、上で見出した変異の一つである、GSTに挿入されたトランスポゾンが離脱することで、絞り咲き形質が生まれることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、モモの着色について、品種間差が生じる遺伝的要因を明らかにしたものである。モモは、食用に供される果樹であると同時に、観賞に利用される花木でもあるが、その両方において、着色形質は重要形質である。この研究では、赤味を完全に失う白花形質と、白と赤が入り混じる絞り咲き形質を引き起こす遺伝子変異を同定した。この成果は、着色の多様化に関する学術的な意義を有するだけでなく、上記の形質を有する個体を、DNAを調べるだけで予測することを可能とし、多様な着色形質を有するモモ品種を効率的に育成することにも利用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the red coloration of peach at the genetic level. In particular, we identified genetic variants responsible for inter-varietal diversity in coloration traits.

Some peach trees do not synthesize the natural red pigment anthocyanin, producing fruits that do not turn red and pure white flowers. We studied 16 species of trees, including 'Terute Shiro' and 'Kanpaku', and found that all of them have one of four mutations in the GST gene.

Furthermore, there is a variety of peach with white-and-red variegated coloration of petals. By studying five trees of three species, including 'Genpei Shidare' and 'Houkimomo', we found that they have one of the mutations identified above, a transposon insertion in the GST, and that the release of the transposon results in the variegated flower trait.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：モモ アントシアニン 着色 絞り花 GST トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

モモは、赤色色素であるアントシアニンを合成し、成熟期の果実や、開花期の花弁、主に陽の当たる側の枝、落葉期の葉、葯や花糸など、さまざまな組織が赤くなる。アントシアニンは、紫外線に対するサンスクリーンとしての機能や抗酸化能があり、ストレス防御の生理的役割があると考えられている。また、果実の着色は、鳥などの捕食者をひきつけ種子を広く撒いてもらう生物学的役割があるとされる。人も真っ赤なモモに惹かれ、購買意欲を強く刺激される傾向があり、農学的にも重要な現象である。アントシアニンは抗酸化能のある機能性物質であり、栄養学上からも注目される。さらに、花弁の着色は観賞という点においても重要で、日本では江戸時代頃から、多様な違いのある品種の育成が行われてきた。アントシアニン合成・制御の基本的メカニズムは植物種間で広く保存されており、多くの知見が蓄積しつつある。一方、果樹あるいは花木としてのモモに着目すると、果皮が成熟期に着色する機構や、着色の品種間多様性の遺伝的要因など、解明すべき点が多数残されている。

2. 研究の目的

本研究は、モモを研究対象として、赤色着色に関する分子機構の理解を深めることを目指した。特に、品種間での多様性の解明で進展があり、主にその点に注力した研究を進めた。モモには、もちづきや華清水といった、果皮が特異的に着色しない品種が存在するが、その原因は、アントシアニン合成酵素を誘導する *MYB10.1* 転写因子の変異により起こることを明らかにしている。それとは異なり、あらゆる組織でアントシアニンを蓄積しない品種があり、これらは特に花弁が真っ白であるという分かりやすい特徴を有する。また、同じ組織内にアントシアニンを蓄積する細胞と蓄積しない細胞の混在する品種があり、これらはいわゆる絞り咲きまたは源平咲きと呼ばれる花弁を付けるのが特徴である。これら白花および絞り咲きの品種が示す着色多様性に焦点を当て、遺伝子レベルでその原因の解明を行った。

3. 研究の材料

実験材料は、アントシアニン欠損の解析用に、照手白、残雪枝垂、白楽天、白枝垂、楽翁枝垂、中生白、寒白、白雪一歳桃、払子台、初雪一歳桃、台木白花、秩父 4、寿星桃白花八重の品種・系統、および、入野枝垂、更紗雲竜枝垂、幸ホワイトの実生苗を用いた。これらの一部は苗販売会社から購入し、残りは岡山県農林水産総合センター農業研究所、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、飯坂温泉はなももの里、神奈川県在住の花モモ愛好家の方より分譲いただいた。この他、岡山県内に自生し、白花をつける野生モモも実験に用いた。

また、絞り咲きの解析用に、源平枝垂、箒桃、京更紗の 3 品種を実験材料として用いた。これらは苗販売会社から購入、あるいは飯坂温泉はなももの里より分譲いただいた。

4. 研究成果

(1) アントシアニン欠損の解析

図 1 の照手白、寒白、寿星桃白花八重が示すように、モモの中には赤味のない真っ白な花弁をつける品種があるが、このようなモモの多くは、白花の観賞用花モモとして利用される。観賞用品種だけでなく、台木品種（台木白花）や野生に自生するモモの中にも、同様に真っ白な花をつけるものを見出すことができる。これらのモモは、花弁だけでなくあらゆる組織で赤味を失っていることから、赤色色素であるアントシアニンを欠損した変異体と考えられる。



図 1. モモ品種間にみられる花弁着色の多様性の例

アントシアニン欠損の原因遺伝子の同定

アントシアニンは、アミノ酸のフェニルアラニンから多段階の経路を経て生合成される。アントシアニンを欠損するモモは、この合成経路のどの段階に異常があるのかを明らかにするため、アントシアニンと合成経路が大部分重なっているカテキンおよびエピカテキンの量を測定した。台木白花を材料に測定したところ、カテキンおよびエピカテキンは着色品種と同様に、蓄積していることが分かった。このことから、台木白花のアントシアニン欠損は、カテキンおよびエピカテキンの合成経路との分岐以降にあると推察された。分岐後にアントシアニン合成に関わる遺伝子として知られている *ANS*、*UFGT* および *GST* について、その配列を調べたところ、*GST* 遺伝

子の第3エクソンにフレームシフトを引き起こす5bpの欠失変異が唯一の変異として見つかった(図2)。同様に、寒白、照手白、寿星桃白花八重についてもアントシアニンの合成異常が生じる原因を調べたところ、興味深いことに、いずれも同じGST遺伝子に異なる変異を有することが分かった。すなわち、寒白はGSTの第1イントロンにトランスポゾンの挿入変異を、照手白は第3エクソンにトランスポゾンの挿入変異を、寿星桃白花八重は第3エクソンにフレームシフトを引き起こすCからTAへの置換変異を有していた。見出された4種類の変異を、ここではそれぞれ変異型 ~ とする。これらの変異によりGST遺伝子は機能を喪失し、白色化していると推察される。

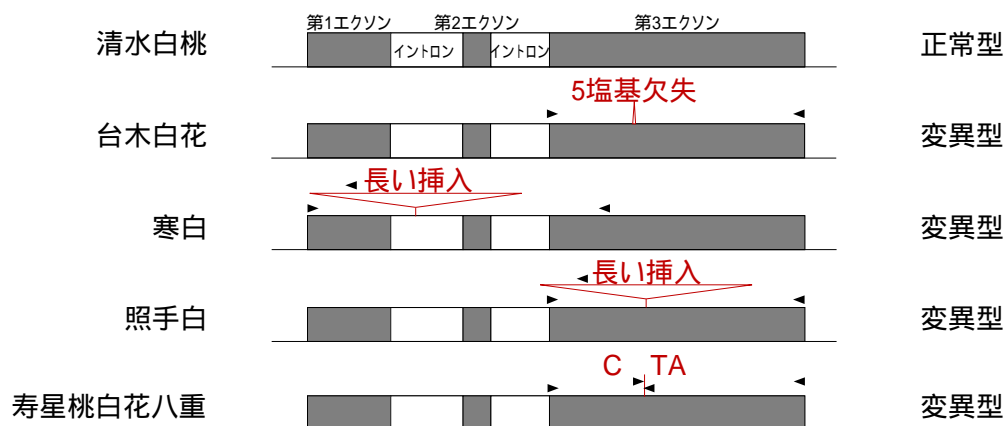


図2. 白花モモに見出されたGST遺伝子の4種類の変異の模式図

▲は変異検出マーカー作成の際のプライマーの位置

アントシアニン欠損判別DNAマーカーの開発

次に、~の変異を特異的に検出するDNAマーカーの開発を行った。図3のパネルAは、台木白花の変異(変異型)の検出の様子で、PCRの後、制限酵素処理を行っている。PCR産物は制限酵素で切断されて2本のバンドに分かれるが、変異があると認識部位が失われて切断されず、サイズの大きなバンドが一つだけ検出される。照手白はPCRの領域内に長い挿入変異をもつためPCRでDNAが増幅できず、シグナルが検出されない。パネルB、Cは、寒白の変異(変異型)および照手白の変異(変異型)の検出の様子である。変異の有無によってバンドサイズが異なっている。パネルDは寿星桃白花八重の変異(変異型)の検出の様子で、変異箇所がCに特異的なPCRの結果(上)とTAに特異的なPCRの結果(下)である。照手白はPCRの領域内に長い挿入変異をもつためDNAが増幅できず、シグナルが検出されない。

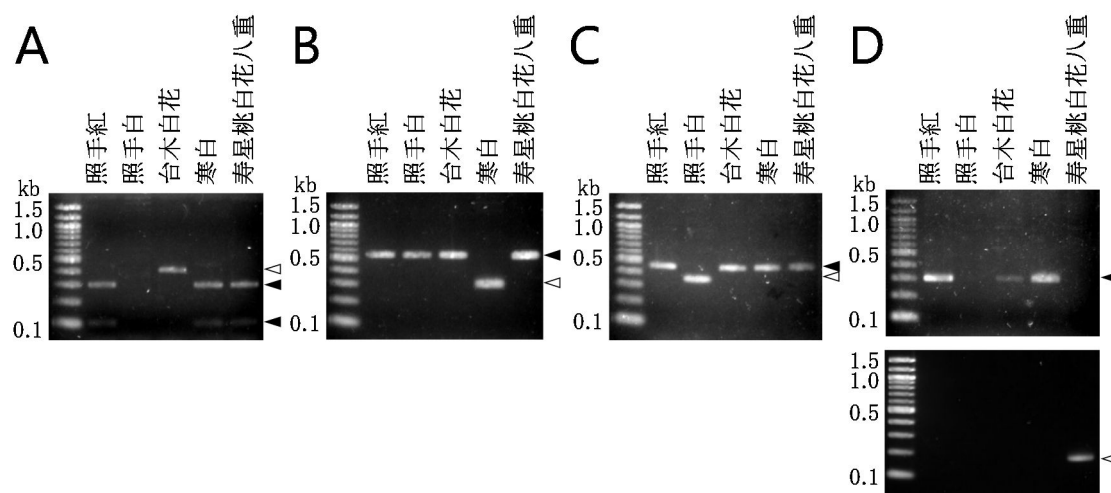


図3. GST遺伝子に見つかった4種類の変異を特異的に検出するDNAマーカー

A、B、C、Dは、それぞれ変異型、~、~、~の変異を検出するマーカー検出の様子。~は正常型、~は変異型の遺伝子の存在を示すシグナル。

開発したこれらのDNAマーカーを用い、他のアントシアニン欠損の品種や実生の変異を調査した。その結果を表1に示す。実験に供した17の品種・系統、実生等は、本研究で見出した~のいずれかの変異をホモに有していた。実験に供したすべての材料で、一つの遺伝子

GST に変異が集中したことは、合成経路のほとんど重なるカテキン、エピカテキンなどのポリフェノールがモモの生育において重要な生理的役割を有していることを示唆するのもも知れない。

表 1. アントシアニン欠損モモの変異型による分類

変異型	変異の種類	品種、実生等
第 3 エクソンの 5 塩基欠失変異		台木白花、払子台、初雪一歳桃、入野枝垂実生、更紗雲竜枝垂実生、秩父 4
第 1 イントロンの長い挿入変異		寒白、中生白、白雪姫一歳桃、野生モモ
第 3 エクソンの長い挿入変異		照手白、残雪枝垂、白楽天、白枝垂、楽翁枝垂
第 3 エクソンの C TA の置換変異		寿星桃白花八重、幸ホワイト実生

(2) 絞り咲きの解析

モモの中には、図 1 の源平枝垂や箒桃のように、大部分の細胞がアントシアニンを欠損して白いものの、一部の細胞ではアントシアニンが蓄積して赤いものがあり、このような形質は特に花卉で目につきやすく、いわゆる絞り咲き（源平咲き）といわれる。絞り咲きの白色部分のアントシアニン欠損形質がどのように生じているかを明らかにするため、箒桃、入手先の異なる 3 本の樹の源平枝垂（～）京更紗の 3 種 5 本の絞り咲き樹の成熟葉からゲノム DNA を抽出し、4 種類の GST 遺伝子の変異の有無をマーカーを用いて調査した。その結果、調べた 5 本すべての樹から、白花モモ品種の照手白に見出された第 3 エクソンのトランスポゾン挿入変異が検出され、この変異が白色化と関係することが示唆された。

そこで、花卉の赤い部分の細胞と白い部分の細胞から別々に DNA を抽出し、このトランスポゾン挿入変異の有無が着色の有無と相関するかを調べた。その結果を図 4 に示す。箒桃および源平枝垂を材料として用いた場合、白色細胞ではほぼトランスポゾン挿入変異のシグナルのみが検出されたのに対し、赤色細胞ではトランスポゾン挿入変異をもつシグナルとまたないシグナルの両方が検出された。トランスポゾンをもたない GST 遺伝子が正常な機能をもつために、赤く着色したと考えられる。このようなトランスポゾンをもたない正常遺伝子は、成長の過程でトランスポゾンが部分的に離脱したために生まれたと考えられる。

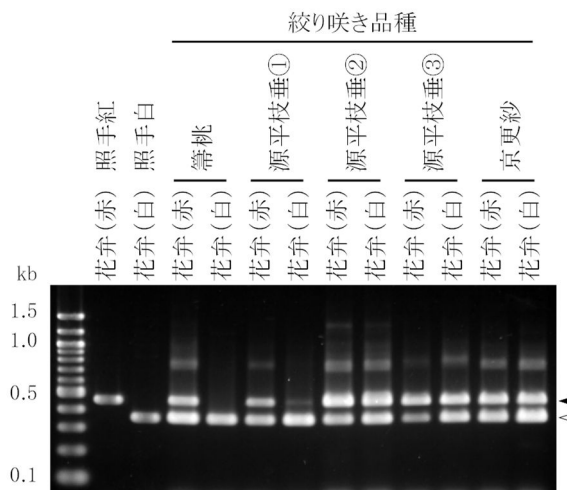


図 4. 花卉の白い部分と赤い部分の細胞を用いたトランスポゾン挿入変異の検出

一方、源平枝垂、箒桃、京更紗の 3 サンプルでは、赤色細胞、白色細胞のいずれでも、トランスポゾン挿入変異をもつシグナルとまたない正常サイズのシグナルの両方がはっきり検出された。白色細胞でトランスポゾンをもたない正常サイズのシグナルが検出されているが、この細胞はアントシアニンを欠損していることから、サイズは正常でも遺伝子機能を失っていると推察された。そこで、トランスポゾンをもたない正常サイズのシグナル部分の DNA を回収し、塩基配列を確認した。その結果、源平枝垂、箒桃、京更紗の 3 サンプルのいずれもトランスポゾン挿入変異をもっていなかったが、トランスポゾンの挿入されていた部位付近に別々のフレームシフト変異（それぞれ+4、+2、-1bp）を有することが分かった。このフレームシフト変異により遺伝子の機能が失われていると考えられた。トランスポゾンは離脱する際、数塩基の挿入・欠失変異が時に起こることがあり、これはフットプリントと呼ばれる。源平枝垂、箒桃、京更紗にみられるフレームシフト変異は、トランスポゾンの離脱に伴うフットプリントによる

と考えられる。源平枝垂や京更紗は江戸時代に作られた品種であり、接木を繰り返して現在に伝えられてくる歴史的過程の中で、一部の樹でトランスポゾンの離脱とフットプリントの形成が起こったのであろう（図 5）。一方、赤色細胞のトランスポゾンをもたないシグナル部分について塩基配列を調べたところ、フレームシフト変異のある配列とない配列の両方が検出された。赤色細胞では、篝桃、源平枝垂と同様に、トランスポゾンをもつ機能欠損遺伝子から成長の過程で一部細胞でトランスポゾンの離脱が起こり、遺伝子の機能が復活して着色するようになったと考えられる。なお、赤色細胞では、トランスポゾンをもつ機能欠損遺伝子のシグナルも検出されているが、これは、今回のサンプル調整は簡便な手法により行ったため、赤色細胞のサンプルに白色細胞が混じったためと推察している。

以上のように、*GST* 遺伝子第 3 エクソンに挿入されたイントロンは、離脱することができると考えられる。しかし、トランスポゾン自身の離脱に働く転移酵素をコードする正常な ORF はない。離脱に働く酵素は、ゲノム中の別のトランスポゾンから供給されているのではないかと予想される。

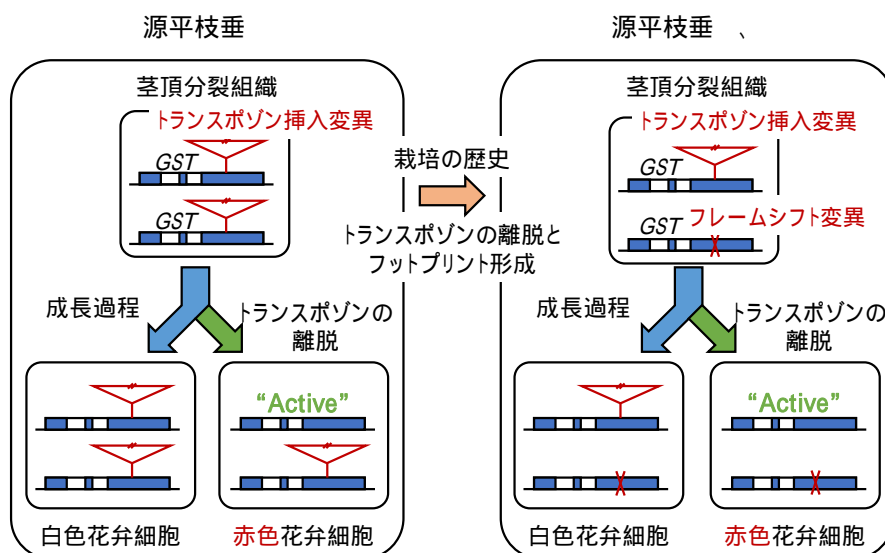


図 5. 源平枝垂 の絞り咲きのメカニズム

同じトランスポゾをもちながら、絞り咲き形質を示す品種と照手白のように白花形質を示す品種がある。また、絞り咲き品種の間でも、図 1 に示す源平枝垂と篝桃のように、赤い部分が出現する頻度は異なっている。このような違いは、トランスに働く他のトランスポゾンの転移酵素に規定されるのかも知れない。すなわち、他のトランスポゾンがなければ *GST* のトランスポゾンは脱離できず、白花形質を示す。他のトランスポゾンがあっても、その活性の強さの違いにより、*GST* の正常型への復帰頻度が異なり、見た目には赤色部分の出現頻度の違いとなって現れているという可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田朗晴・原美由紀・田村勝徳・鶴木悠治郎・小田賢司
2. 発表標題 ハナモモにおける白花および絞り花の成立機構の解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------