

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14848

研究課題名（和文）完全甘ガキ性決定遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of genetic factors controlling fruit astringency in persimmon

研究代表者

西山 総一郎（Nishiyama, Soichiro）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50827566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：カキの完全甘ガキ性決定遺伝子座（AST）の解析とプロアントシアニジン蓄積制御メカニズムの解明を目指した研究を実施した。AST領域約900 kbの領域において、甘渋間で明確に発現変動するmRNA、smRNAは存在しなかった。また分離後代と品種群を用いた解析により完全甘ガキ性と連鎖する多型が134個得られたが、非同義置換は得られなかった。一方で多型のパターンから有力な候補遺伝子が同定された。ナノポア等を用いてAST領域の種間構造差異に関する情報を得た。さらに、カキ育種の課題である「渋残り」形質を示す個体を解析し、ASTの遺伝子型とは独立にPA含量により制御されていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、完全甘ガキ性を制御する有力な候補遺伝子を特定した。また、AST領域の多型パターンやゲノム構造の種間差異に関する情報を得た。さらに「渋残り」形質の制御メカニズムに関する知見を得た。これらの成果は、マーカー選抜やゲノム育種を通して効率的なカキ育種への応用が期待できる。また、得られた新たな材料や知見はカキの特異なプロアントシアニジン蓄積パターンの解明に今後展開される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to analyze the ASTRINGENCY (AST) locus determining the PCNA (non-astringent) trait in persimmons and elucidate the mechanism controlling proanthocyanidin accumulation. Within the approximately 900 kb AST region previously narrowed down, no mRNA or smRNA showed significant expression changes between PCNA and non-PCNA fruits. DNA sequence analysis using segregating progenies and cultivars identified 134 polymorphisms linked to the PCNA trait, but none resulted in nonsynonymous substitutions. However, a promising candidate gene was identified based on the polymorphism patterns. An interspecific structural comparison of the AST region was conducted using 10X Chromium and nanopore sequencing. Furthermore, analysis of ast-homozygous individuals exhibiting strong astringency in mature fruit, a challenge in persimmon breeding due to the difficulty in selecting against it, suggested that this trait is controlled by PA content independently of the AST genotype.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 プロアントシアニジン 倍数性 果実品質 ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

カキを特徴づける性質の一つに果実の渋味がある。これは、果実に大量に蓄積されるプロアントシアニジン (PA) に由来し、食用とするには干し柿にするなどして渋味を取り除く必要がある。栽培ガキの中には「完全甘ガキ (PCNA)」という成熟果を生食可能な PA 蓄積の変異体がある (図 1)。カキの生産では僅かな渋みも消費者に強く忌避されることから、PA 蓄積制御機構はカキの最も重要な園芸学的研究の対象の一つといえる。しかしその全容は明らかでなく、順遺伝学的解析も完了していない。

PA は幅広い植物が蓄積する二次代謝物であり、防御物質として幼果や種子に特に蓄積される。カキ属植物の PA 蓄積は特殊であり、多くの種の果実は幼果の段階で PA の蓄積を停止するが、カキは成熟に至るまで「継続して」蓄積を続けるため、成熟果には多量の PA が存在する。本研究で対象とする完全甘ガキは、PA の蓄積能は有するものの、果実生育の初期に蓄積を停止することから、完全甘ガキはカキ特異的な PA 蓄積の継続性を失った変異体と位置付けることができる。完全甘ガキ性は、二次代謝物の蓄積量の統御を担うメカニズムの解明につながる重要な研究対象でもあるといえる。

完全甘ガキのうち、これまで主に用いられてきた日本タイプ J-PCNA は単一の遺伝子座により制御される。栽培ガキ遺伝資源の大半は渋ガキであるため、完全甘ガキ性に関するマーカー選抜の効果が大きく、盛んに行われている。実際、この数年間に日本で開発されたカキ品種は全て完全甘ガキであり、選抜の重要性は非常に高い。しかし、栽培ガキは六倍体または九倍体の高次倍数性であり、遺伝解析が進んでいない。

カキの遺伝研究を最もチャレンジングにしている点は、その高次倍数性である。倍数体の遺伝・ゲノミクスは大変複雑であり、例えばメンデル遺伝を例にとると、二倍体では (AB x CD) の F1 は (AC:AD:BC:BD=1:1:1:1) となるのに対し、ヘテロな六倍体生物では (ABCDEF x GHIJKL) の組み合わせを考える必要がある。六倍体のカキでは、研究代表者らが J-PCNA 形質について、倍数体種に適したシャトルマッピングシステムを新たに適用することで、二倍体近縁種のゲノムベースで J-PCNA 形質決定遺伝子 *AST* の座乗領域を 900kb の領域に特定した (Nishiyama ら, 2018 Hort J)。一方、六倍体カキと二倍体種とゲノム構造の差異が課題となっており、決定遺伝子の同定には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、完全甘ガキ性を制御する遺伝子座における座乗遺伝子と決定遺伝子の候補を特定し、遺伝子座の配列多様性を明らかにし優良な完全甘ガキのマーカー育種の最適化を目指すこと、およびカキの特殊なメカニズムを例として二次代謝物の量的制御機構の進化と応用について考察することである。完全甘ガキ性は日本のカキ育種におけるスタンダードとなっており、本研究が成立すれば完全甘ガキ性のマーカー選抜を高度化できる。また、完全甘ガキ性は果実サイズ・果実形・樹勢等の育種形質とも関連する可能性が示唆されており (Sato・Yamada, 2016 Breed Sci など)、本研究を端緒として、多面発現メカニズムの解析と応用にむけた展開も想定する。

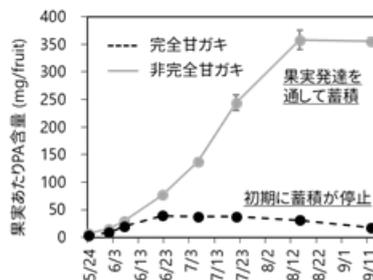


図 1 カキの PA 蓄積量計時変化

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現変動解析

‘太天’ (A<sup>224</sup>A<sup>240</sup>aaaa) × ‘甘秋’ (aaaaa) の分離後代と親の果肉サンプルより RNA-seq データを得た。2015 年の 6 月と 7 月、2016 年の 5-11 月にかけての 5 ステージでサンプリングしたものをを用いた。2015 年は毎月 PCNA7 個体と non-PCNA7 個体、2016 年は毎月 PCNA と non-PCNA 計 20 個体 (11 月のみ計 40 個体) から採取したものをを用いた。また、2015 年 6 月に採取した太天 × ‘甘秋’ の交雑後代 7 個体 (non-PCNA3 個体, PCNA4 個体) および親の 2 個体については、smRNA-seq による解読も行った。いずれについてもクオリティチェックとトリミングののち、カキの近縁二倍体種であるアブラガキのリファレンスゲノム配列 (Suo et al, 2020 GigaScience) にマッピングした。PCNA と non-PCNA で発現量が変化し、かつ *AST* 領域を含む前後 5Mbp に座乗する遺伝子を選抜した。発現量の有意差の閾値を FDR < 0.05 とし、甘渋間で有意に発現が異なる遺伝子に注目した。

#### (2) ゲノム多型解析

‘太天’ (non-PCNA) のゲノムを 10X chromium と Nanopore MinION で解読した。10X chromium のデータは Supernova によりアセンブルし、得られたコンティグをアブラガキの *AST* 領域に対して blastn (< 1e-100) 検索を行い、結果を D-GENIES により可視化した。MinION のシーケンスには Flow Cell R9 Version を用いた。このとき、Adaptive sampling 機能を用いて *AST* 領域に由来

するリードのみを選別してシーケンスを行った。公開されているスクリプト (<https://github.com/skovaka/UNCALLED/tree/master/masking>) によりリファレンス配列のリピートをマスクした。フローセル1枚につき2run行い、フローセル2枚分のシーケンスを行った。Flye (--keep-haplotypes オプション) で de novo アセンブリを行ったのち、D-GENIES で可視化した。

甘渋性分離後代10個体、および他12品種のゲノムDNAをilluminaシーケンスした。アブラガキのAST領域にマップし、samtools mpileup およびカスタムスクリプトにより、倍数性を考慮して多型をコールしたのち、PCNA でホモ接合かつ non-PCNA でヘテロ接合のパターンを示す多型を選択した。

### (3) 「渋残り」制御機構の解析

カキ育種ではPCNAの優良品種の育成が目標となっているが、甘渋性マーカーではastホモ接合を示すにも関わらず渋味を呈する「渋残り」個体が出現し、育種現場での課題となっている。‘太月’ (A1A3aaaa) x ‘甘秋’ (aaaaaa) の後代に出現した「渋残り」を示す個体540-1576について、A3ハプロタイプの有無を既存のAST領域を網羅するマーカー (Nishiyama et al 2018 Hort J) により調査した。A1ハプロタイプについては、マーカー開発がなされていないため、540-1576、およびA1を有しA3を有さない後代10個体のバルク (A1-bulk) の全ゲノムシーケンスを、AST領域にアラインして多型解析を行った。また集団の果実をサンプリングし、タンニン細胞数、サイズ、PA含量を測定した。さらに、甘渋間で異なる発現を示すDkMyb4の発現量をrealtime PCRにより測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 発現変動解析

AST周辺領域に座乗し甘渋間で発現変動する遺伝子を第1表に示す。2016年5月については、該当する遺伝子が存在しなかった。全体で13個の遺伝子が選抜されたが、AST領域内の遺伝子は2個しか存在しなかった。2015年と2016年で選抜された遺伝子が異なっていたが、わずかに共通する遺伝子も見られた。

AST領域周囲に座乗する発現変動遺伝子を表1にまとめた。このうちAST領域内に座乗する遺伝子として、kinase anchor protein (evm.model.fragScaff\_scaffold\_78.248) と Unknown gene (evm.model.fragScaff\_scaffold\_78.264) が検出された。いずれもPCNAで発現量が低下していたが、PA蓄積と直接関連するような発現変動は見られなかった。他に着目すべき遺伝子として、cytochrome b5 (evm.model.fragScaff\_scaffold\_78.194) が得られた。cytochrome b5は、フラボノイド代謝経路において不可欠な酵素である flavonoid 3’5’-hydroxylase (F3’5’H) および flavonoid 3’-hydroxylase (F3’H) の機能との関連が知られている。PCNAでは6月より発現量が減少し、8月の段階でほとんどない一方で、non-PCNAは6月から発現量が上昇し、8月時点でも一定の発現量を維持していた。PCNAは6月下旬頃にPA蓄積を停止することが知られており、この発現変動の様式はPCNA、non-PCNA間のPA合成の変動に一致している。一方でこの遺伝子は、これまでに特定したAST座乗領域の外側に位置しており、ASTの直接の候補となり得るかどうかは検討の余地がある。さらに、AST領域における網羅的なsmRNA蓄積量の解析では、FDR<0.1となる区間は存在しなかった。以上より、AST領域内にはPCNAとnon-PCNAの間で明確に蓄積量が異なるmRNAおよびsmRNAは存在せず、候補となるsmRNAおよびsmRNAのターゲット遺伝子も得られなかった。

表1. AST周辺領域における発現変動遺伝子

Date	Gene ID	Location in chromosome 5 of <i>D. oleifera</i> (AST region: 16537708-17469430)	avr.TPM		q value	log <sub>2</sub> FC(NP/P)	Annotation
			p	NP			
2015.jun	evm.model.fragScaff_scaffold_78.102	20,309,966-20,312,965	11.085	38.453	0.00364	1.812	low-temperature-induced cysteine proteinase-like
	evm.model.original_scaffold_171.117	12,960,190-12,968,530	17.032	4.308	5.01E-09	-1.940	Hippocampus abundant transcript 1 protein
2015.jul	evm.model.original_scaffold_171.192	11,824,260-11,830,358	11.439	6.133	0.0334	-0.843	plant regulator RWP-RK family protein
	evm.model.original_scaffold_171.117	12,960,190-12,968,530	28.655	11.951	0.0359	-1.226	Hippocampus abundant transcript 1 protein
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.202	17,935,092-17,936,962	36.526	71.298	0.0174	1.045	DNA polymerase III PolC-type
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.194	18,121,985-18,122,789	11.474	199.425	6.52E-07	4.185	cytochrome b5
2016.jun	evm.model.fragScaff_scaffold_78.102	20,309,966-20,312,965	9.735	32.028	0.00115	1.853	low-temperature-induced cysteine proteinase-like
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.33	22,322,282-22,325,737	16.577	8.927	0.0146	-0.061	Serine/threonine - prtein kinase
2016.jun	evm.model.original_scaffold_171.117	12,960,190-12,968,530	35.997	13.529	0.000984	-1.380	Hippocampus abundant transcript 1 protein
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.224	17,528,622-17,557,599	58.424	42.903	0.0347	-0.418	interferon-related developmental regulator 1-like isoform X1
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.194	18,121,985-18,122,789	123.052	268.238	0.000837	1.126	cytochrome b5
2016.jul	evm.model.original_scaffold_171.29	14,276,110-14,279,247	329.382	1571.859	0.000108	2.344	flavanone 3-hydroxylase
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.307	15,976,818-15,986,361	6.385	9.976	0.0336	1.015	Lipase
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.194	18,121,985-18,122,789	21.117	167.591	0.000696	3.410	cytochrome b5
2016.aug	evm.model.original_scaffold_171.124	12,756,061-12,756,237	5.943	2.973	0.0398	-0.978	mechanosensitive ion channel protein 6-like
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.307	15,976,818-15,986,361	6.115	10.658	0.00276	0.818	Lipase
	*evm.model.fragScaff_scaffold_78.248	17,257,298-17,279,216	29.437	46.786	3.39E-05	0.679	A-kinase anchor protein 17A isoform X1
2016.nov	evm.model.fragScaff_scaffold_78.194	18,121,985-18,122,789	0.807	41.238	6.24E-14	5.610	cytochrome b5
	*evm.model.fragScaff_scaffold_78.264	16,852,734-16,886,189	7.270	12.978	0.0447	0.738	uncharacterized protein KIAA0930 homolog isoform X1
	evm.model.fragScaff_scaffold_78.199	18,032,030-18,034,562	6.515	19.782	0.0144	1.565	Subtilisin-like protease

## (2) ゲノム多型解析

公開されているアブラガキゲノム (Suo et al, 2020 GigaScience) とマメガキゲノム (Akagi et al, 2020 PLOS Genet) の *AST* 領域におけるシンテニーを確認したところ inversion が存在する可能性があったが、研究代表者らが *AST* 領域の決定に用いたマメガキ BAC 配列 (Nishiyama et al, 2018 Hort J) を用いて詳細に解析した結果、その可能性は否定された (図 2)。10X chromium のアセンブルデータを用いてアブラガキとカキ間の多型性を比較したところ、両者でシンテニーがとれない領域が得られた (図 3)。

Adaptive sampling により、通常のシーケンスより約 6.1 (11/1.8) 倍の効率で *AST* 領域由来のリードを取得できたと考えられた。マップ後回収されたリードは 409 Mb であり、N50 は 24,882 bp であった。アセンブルの結果、1,141 個のコンティグが生成され、N50 は 44,125 bp であった。アブラガキゲノムとのシンテニー解析の結果、*AST* 座乗領域が複数本のコンティグでカバーされた。部分的なシンテニーと数か所の Indel の存在が確認できたが、1 本のコンティグで表すことのできなかつた領域において構造的な変異が存在する可能性も考えられた。今後データ量を増やすことで六倍体のハプロタイプレベルゲノムが効率的に構築できると考えられた。

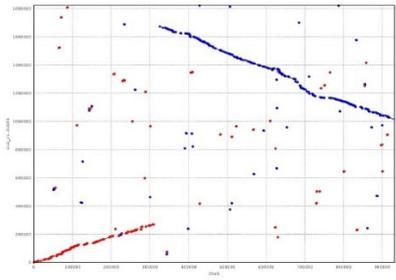
DNA-seq 解析の結果、*AST* 領域において完全甘ガキ性と連鎖する多型が 134 個得られた。このうち 80 個の多型が 7 個の遺伝子内部に座乗しており、うち 1 個がエキソン、残りの 79 個はイントロンに座乗していた。エキソン領域の多型は同義置換であった。またこのうち 60 個の多型が特定の遺伝子の内部に存在することが確認された。本研究により、*AST* 領域のゲノム特性および甘渋性決定遺伝子の候補が得られた。この成果を基に、その後引き続いて行った解析により、六倍体カキのハプロタイプレベルの *AST* 領域配列と、候補決定遺伝子・候補決定多型の同定に至っている。

## (3) 「渋残り」制御機構の解析

540-1576 では調査した領域全体にわたって A3 は検出されず、また A1-bulk がヘテロで有している多型を 540-1576 はほとんど持たなかった。つまり、540-1576 の *AST* 遺伝子型は aaaaaa であり、「渋残り」個体の表現型は *AST* 領域の遺伝子型では説明できないことが示唆された。また、540-1576 は、8 月の段階で PCNA と non-PCNA の中間付近の PA 含量を示した一方で、タンニン細胞数は non-PCNA 個体と同等かそれ以上の値を示し、7 月の段階で *DkMyb4* が non-PCNA 個体と同様に高発現していた。以上の結果から、(1) 「渋残り」個体は *AST* の制御下でない未知の機構によって 7 月の段階でも PA を蓄積する能力が高い、(2) *DkMyb4* の発現が高いとタンニン細胞数が増加する。つまり、*AST* の遺伝子型によらず、PA 蓄積能力がタンニン細胞の分化に寄与する、という可能性が考えられた。

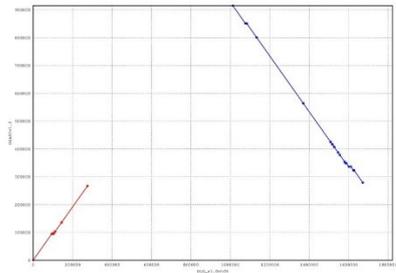
## <引用文献>

- Akagi, T., K. Shirasawa, H. Nagasaki, H. Hirakawa, R. Tao, L. Comai and I. M. Henry. 2020. The persimmon genome reveals clues to the evolution of a lineage-specific sex determination system in plants. PLoS Genet. 16: 1–26.
- Nishiyama, S., N. Onoue, A. Kono, A. Sato, K. Ushijima, H. Yamane, R. Tao and K. Yonemori. 2018. Comparative mapping of the *ASTRINGENCY* locus controlling fruit astringency in hexaploid persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with the diploid *D. lotus* reference genome. Hort. J. 87: 315-323.
- Sato, A. and M. Yamada. 2016. Persimmon breeding in Japan for pollination-constant non-astringent (PCNA) type with marker-assisted selection. Breed. Sci. 66: 60-68.
- Suo, Y., P. Sun, H. Cheng, W. Han, S. Diao, H. Li, Y. Mai, X. Zhao, F. Li and J. Fu. 2020. A high-quality chromosomal genome assembly of *Diospyros oleifera* Cheng. Gigascience. 9: 1-10.



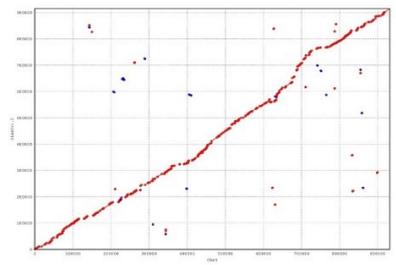
←AST領域に相当する  
マメガキゲノム

↑AST領域に相当するアブラガキゲノム



←マメガキのAST領域  
のBAC配列

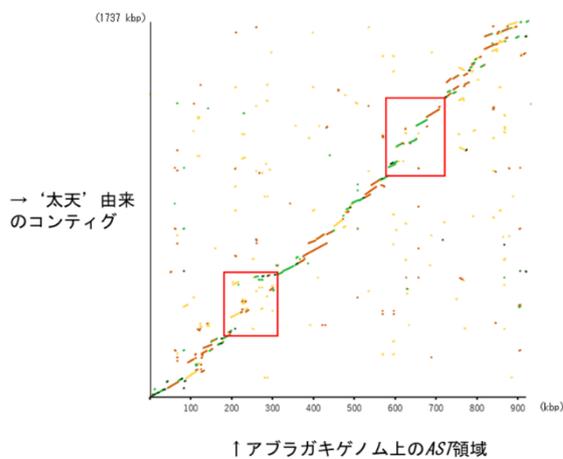
↑AST領域に相当するマメガキゲノム



←マメガキのAST領域  
のBAC配列

↑AST領域に相当するアブラガキゲノム

図2 AST領域に相当するマメガキゲノム、アブラガキゲノム、およびマメガキ BAC 配列間のシntenニー  
上：アブラガキゲノムとマメガキゲノムの比較  
中：マメガキゲノムとマメガキ BAC 配列の比較  
下：アブラガキゲノムとマメガキ BAC 配列の比較



↑アブラガキゲノム上のAST領域

図3 アブラガキゲノムのAST領域における配列と‘太天’由来コンティグ間のシntenニー  
赤枠は全長がアブラガキゲノムにヒットしないコンティグが多く見られた領域を示す。色合いは各コンティグとアブラガキゲノムとの配列類似性を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yosuke Fujiwara, Nishiyama Soichiro, Onoue Noriyuki, Matsuzaki Ryusuke, Yonemori Keizo, Tao Ryutaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Candidate gene analysis for the ASTRINGENCY locus controlling fruit astringency in Diospyros kaki based on mRNA- and small RNA-sequencing analyses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Soichiro, Kuramoto Akihide, Tao Ryutaro	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA sequence diversity of the astringency-controlling locus in Diospyros kaki	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤原陽介・西山総一郎・尾上典之・米森敬三・田尾龍太郎.
2. 発表標題 タンニン細胞の発達と完全甘ガキの「渋残り」との関連性
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山総一郎、田尾龍太郎、米森敬三
2. 発表標題 三次元電子顕微鏡法と機械学習によるカキタンニン細胞の微細構造イメージング
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujiwara Yosuke, Nishiyama Soichiro, Onoue Noriyuki, Matsuzaki Ryusuke, Yonemori Keizo, Tao Ryutaro
2. 発表標題 Candidate gene analysis for the ASTRINGENCY locus controlling fruit astringency in Diospyros kaki using mRNA-seq and small RNA-seq data
3. 学会等名 7th International Symposium on Persimmon (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原陽介、西山総一郎、尾上典之、松崎隆介、米森敬三、田尾龍太郎
2. 発表標題 カキ甘渋性を制御する候補遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tao Ryutaro, Kuramoto Akihide, Nishiyama Soichiro
2. 発表標題 DNA sequence diversity of the astringency-controlling locus in Diospyros kaki
3. 学会等名 7th International Symposium on Persimmon (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nishiyama, S., Yonemori, K.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer, Cham.	5. 総ページ数 176
3. 書名 Japanese PCNA. In: Tao, R., Luo, Z. (eds) The Persimmon Genome. Compendium of Plant Genomes.	

〔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
研究協力者	藤原 陽介  (Fujiwara Yosuke)		

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