科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　２９　日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2010～2013
課題番号：２２３８００２３

研究課題名（和文）カキの甘渋性決定遺伝子の単離とその機能解析によるタンニン蓄積制御機構の解明

研究課題名（英文）Isolation of the gene conferred astringency in persimmon and its functional analysis for the mechanisms on tannin accumulation.

研究代表者
米森　敬三（Yonemori, Keizo）

京都大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：１０１１１９４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,800,000円、（間接経費）　　4,440,000円

研究成果の概要（和文）：　日本のカキの甘渋性を決定するAST遺伝子の単離を目的として、カキ（六倍体）の二倍体近縁野生種マメガキから作製したフォスミド・ライブラリーを用い、AST遺伝子マーカー領域をプローブとしてシードクローンを単離後、コンティグを構築した。さらに、マメガキのBACライブラリーを構築し、BACクローンを用いたコンティグも作製した。これらのコンティグ内にはAST遺伝子が存在している可能性が高く、AST遺伝子単離の実現性が大きく前進した。さらに、中国タイプの甘渋性を決定するPCNA遺伝子の単離においても、マメガキのBACクローンが有効である可能性が示され、CPCNA遺伝子単離のための方向性が示された。

研究成果の概要（英文）：Fosmid library was constructed by a diploid relative, Diospyros lotus, of D. kaki (hexaploid) for isolation of AST gene which confers astringency trait in persimmon. After screening seed clone from fosmid library by using a probe of AST-linked marker, fosmid contig was developed by further screening of the library using end-sequences of the clone. In addition, BAC library of D. lotus was constructed and BAC contig was also developed. Each contig seemed to contain AST locus there, so that we were approaching very near to isolate the AST gene. Furthermore, this BAC library was shown to be effective to isolate the CPCNA gene which confers the trait of non-astringency in Chinese-type non-astringent persimmon. Using the BAC library, isolation of CPCNA gene may also be possible.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：園芸学　プロアントシアニジン　タンニン　ゲノム

１．研究開始当初の背景

カキに甘ガキと渋ガキが存在することは周知の事実であるが、園芸学的には従来、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 タイプとに分類している。さらに、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、constant の甘ガキ（完全甘ガキ；PCNA）以外の品種（非完全甘ガキ；non-PCNA）は基本的には渋ガキである。すなわち、non-PCNA 品種は果実発育とともに果実中にタンニンを多量に蓄積するが、PCNA 品種はその蓄積を果実発育初期に停止する。non-PCNA 品種群のうち、variant の甘ガキに属する品種群の渋味が種子の存在した場合のみ樹上で消失するのは、種子中からエタノールやアセトアルデヒドが生成され、タンニンが不溶化することによっている。この揮発性成分の生成量によってタンニンの不溶化程度が異なり、variant の甘ガキになるか渋ガキになるかが決定されている。このため、両品種群とも種子がない場合には渋味は全く消失しない。また、constant の渋ガキは種子からの揮発性成分の生成がみられないため、種子があっても樹上での渋味の消失がおこらない。これに対して、PCNA 品種群は種子の有無にかかわらず樹上で渋味が消失するが、この原因はタンニン生成が果実発育初期に停止する一方、果実肥大が進むことによってタンニン濃度が希釈されることが第一の要因となっている。

さらに遺伝形質としてこれら品種群の脱渋性を考察したとき、これまでの交雑結果から PCNA 品種とそれ以外の３タイプの品種（non-PCNA）との間には明瞭な質的差異が存在していることが示されている。これまでの交雑結果によれば、カキは六倍体であるが、PCNA か non-PCNA かの甘渋性決定の形質発現は単一遺伝子座（*AST* 遺伝子座）によって制御されており、関与する対立遺伝子すべてが劣性となってはじ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。

一方、*AST* 遺伝子の存在とは無関係に、カキの甘渋性を決定する別の機構が存在することも我々の研究から明らかになっている。すなわち、これまで日本でのみ存在すると考えられていた PCNA（完全甘ガキ）品種の中国での存在が、1983 年、陝西省果樹研究所の王仁梓氏により報告され、中国で起源した PCNA ‘羅田甜柿’が発見された。我々は中国起源のこの PCNA が、日本の PCNA とは異なり、タンニン蓄積を律速していると考えられる制御系の、ある一点に働くことでタンニン蓄積を制御し、果実内でのタンニン蓄積を抑制していることを明らかにした。すなわち、中国の完全甘ガキでは、日本の完全甘ガキで認められるようなタンニン生合成系遺伝子群全ての発現が低下するのではなく、既知の遺伝子群の発現は低下していないことを確認しており、タンニン蓄積を抑制する未知の代謝過程を制御する遺伝子（*CPCNA* 遺伝子）の発現によりタンニン生成が制御されていると考えられるデータを得ている。また、‘羅田甜柿’と日本の PCNA ‘晩御所’あるいは non-PCNA ‘岩瀬戸’の交雑により、いずれの交雑によっても PCNA と non-PCNA 個体がほぼ 1：1 で出現することから、‘羅田甜柿’が有する *CPCNA* 遺伝子は優性であることを確認している。

２．研究の目的

本研究の第１の目的は、日本の完全甘ガキの出現に関与した *AST* 遺伝子の単離を目指し、六倍体のカキ（*Diopsyros kaki*）の近縁二倍体種であるマメガキ（*D. lotus*）のゲノムライブラリーから、*AST* 遺伝子座を含んでいると思われるゲノム領域のコンティグを構築することである。また、これと同時に、そのタンニン生成・蓄積に関わる機構を人為的に制御する可能性を探ることである。もしこの制御技術の開発が可能であれば、優良な形質を持った完全甘ガキの新品種作出の可能性につながるだけでなく、成熟期に渋味成分がその果実品質に大きな影響を及ぼす果樹、例えばモモ果実では品種・系統によっては渋味が収穫期に存在し、その品質を著しく損なう場合があること、あるいは、ブドウではその果皮のタンニン含量が、赤ワインの生産においてその品質を左右する重要な要因であることを考慮すると、このタンニン蓄積制御機構の解明およびその制御技術の開発は学問上だけではなく、実際の果樹産業上にも非常に大きな貢献をもたらす。

さらに、本研究の第２の目的は、中国の完全甘ガキ出現に関わった果実へのタンニン蓄積制御機構に関わる遺伝子 *CPCNA* とその機構を解明することである。さらに、中国の完全甘ガキ形質は優性であることから、この遺伝子に連鎖した分子マーカーを構築することで、今後の完全甘ガキ育種にも大きく貢献することも目的としている。

３．研究の方法

(1) マメガキのゲノムライブラリーからの *AST* 領域を含むコンティグの構築

六倍体のカキ（*Diospyros kaki*）の二倍体近縁野生種マメガキ（*D. lotus*）からフォスミドライブラリーを作製し、これまでに AFLP 分析により発見した *AST* 遺伝子座に非常に強く連鎖しているマーカー領域（E 領域）をプローブとして、その相同領域（LE）を含むマメガキのシードクローンを単離した。その後、そのクローンのエンドシークエンスをプローブとして新たなクローンを単離することを繰り返し、フォスミドライブラリーを用いたコンティグを構築した。また、このコンティグ内に *AST* 遺伝子座が存在するかどうかを甘渋性が分離したカキ育種交雑後代個体（約 300 個体）を用いて調査した。

さらに、先の実験とは異なるマメガキから BAC ライブラリーを作製し、このライブラリーから上述したフォスミドクローンのエンドシークエンスより発見した、カキ属植物内で非常に相同性の高い領域（5R 領域）をプローブとして用いることで、*AST* 遺伝子単離のためのシードクローンを単離した。その後、このクローンのエンドシークエンスを用い、さらに BAC クローンを単離し、上述したフォスミドコンティグとほぼ同等の長さの BAC クローンによるコンティグの構築を検討した。

(2) *AST* 連鎖マーカー領域を利用したカキの遺伝様式の調査

日本のカキの甘渋性に連鎖するマーカー領域には多型（SNPs）がいくつか存在することが明らかとなっていたため、この SNPs を利用して交雑後代の多型の分離と親個体の多型との関係を調査することで、六倍体のカキの遺伝様式を調査した。

(3) 中国の完全甘ガキ形質を支配する遺伝子 *CPCNA* に連鎖する分子マーカーの作出

中国の完全甘ガキ形質に連鎖する分子マーカーを作出するため、‘羅田甜柿’と‘晩御所’の交雑後代で分離した完全甘ガキと非完全甘ガキ個体を用いて、Bulk segregant 分析と AFLP 分析を組み合わせて、中国の完全甘ガキ形質に連鎖する分子マーカーを探索した。

(4) *CPCNA* 単離のためのマメガキ BAC ライブラリー利用の可能性

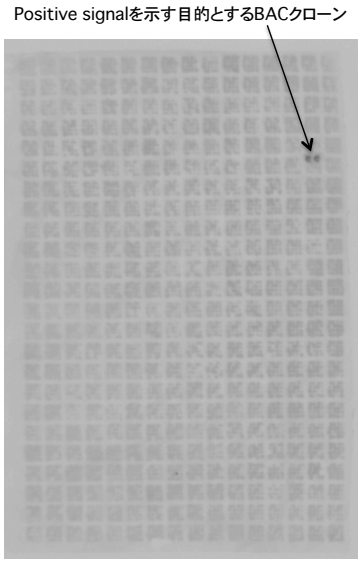
前述の実験で見出した中国の完全甘ガキ形質に連鎖する分子マーカーのうち、*CPCNA* 遺伝子に最も近いと考えられた分子マーカーである RO6 のシークエンスが、マメガキに存在するかどうかをまず調査した。次に、このマーカー領域をプローブとして、マメガキの BAC ライブラリーをスクリーニングして BAC クローンを単離し、単離されたそれぞれの BAC クローンのエンドシークエンスを解析することによって、これらのクローンを整列化した。

４．研究成果

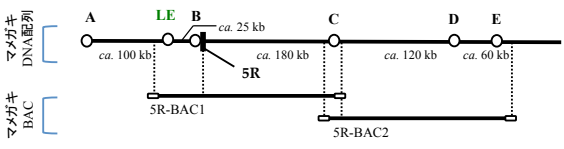
(1) マメガキのゲノムライブラリーからの *AST* 領域を含むコンティグの構築

E 領域を含むシードクローンを起点として、フォスミドライブラリーを用いた約 450kb のコンティグを構築した。また、これらコンティグを構成するフォスミドクローンのエンドシークエンスを利用して A から E までの 5 つの領域を検出できるプライマーを作出し、カキ育種交雑後代個体で PCR 分析を行い、その表現型（甘渋性）との比較により、組換え個体を検出することで *AST* 遺伝子座領域の特定を試みたところ、構築したフォスミドコンティグ内にその遺伝子座が存在している可能性が考えられた。

さらに、5R 領域をプローブとして異なるマメガキ個体より作製した BAC ライブラリーからのスクリーニング（第 1 図）により、6 クローンを単離した。その後、これら 6 クローンのエンドシークエンスと既存のフォスミドコンティグの塩基配列を利用して、6 つの BAC クローンの位置関係を決定し、*AST* 遺伝子座に最も近づいていると考えられるクローン 5R-BAC1 をシードクローンとして決定した。



第1図 BACクローンのスクリーニング



第2図 マメガキのマーカーの物理的地図とBACコンティグの関係

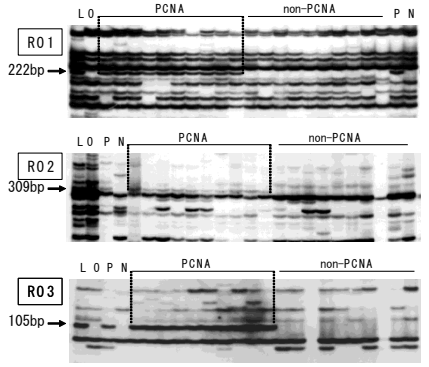
また、このBACシードクローンのエンドシークエンスを利用して、さらなるスクリーニングを実施し、BACクローン5R-BAC2を単離することで、上述のフォスミドコンティグ領域をほぼカバーすると考えられるBACコンティグを構築することができた（第2図）。今後このBACコンティグを利用して*AST*遺伝子の単離を目指したい。

(2)A*ST* 連鎖マーカー領域を利用したカキの遺伝様式の調査

AST 遺伝子座に連鎖する領域に存在する多くの SNPs 多型を利用し、交雑親とその後代での SNPs 解析による多型の分離比をいくつかの交雑組み合わせで調査した。その結果、一部の交雑組み合わせで例外が見られたものの、ほとんどの組み合わせでは同質六倍体遺伝であると考えられる分離比に符合し、カキの*AST*遺伝子座に関する遺伝は同質六倍体的であることが示唆された。

(3)中国の完全甘ガキ形質を支配する遺伝子*CPCNA*に連鎖する分子マーカーの作出

中国の完全甘ガキ‘羅田甜柿’と日本の完全甘ガキ‘晩御所’の交雑後代集団（F_1集団）で分離したPCNA個体とnon-PCNA個体を用い、Bulk segregant分析とAFLP分析を組み合わせて*CPCNA*遺伝子に連鎖する7マーカー(RO1～RO7）を見出すことができた（第3図）

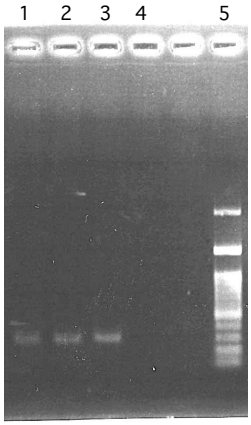


第3図 *CPCNA*に連鎖するAFLPマーカーの一例

さらに、これらのマーカーのうち、RO2をSCARマーカー化し、‘羅田甜柿’に‘晩御所’を交雑したF_1集団（81個体）、‘四つ溝’を交雑したF_1集団（98個体）、‘岩瀬戸’を交雑したF_1集団（49個体）、‘太秋’を交雑したF_1集団（36個体）でそのマーカーの有効性を調査したところ、86%～96%の確立で甘渋性を判別することが可能であり、このマーカーを用いた育種集団でのPCNA個体選抜が実用的に可能であることが明らかとなった。

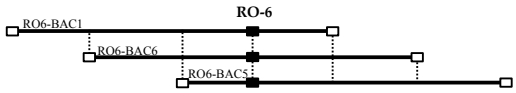
(4)*CPCNA*単離のためのマメガキBACライブラリー利用の可能性

マメガキにRO6領域が存在することをPCR分析により確認した（第4図）。そこでこのマーカー領域をプローブとして、マメガキのBACライブラリーをスクリーニングし、3クローンを単離した。その後、これらの単離したクローンのエンドシークエンスを解析し、これらのクローンを整列化して第5図のような BAC コンティグを構築することができた。今後、このコンティグを起点に*CPANA*遺伝子の単離の可能性を検討したい。



第4図 PCRによるRO6マーカーの検出

1:‘羅田甜柿’、2:‘晩御所’、3:マメガキ、
4: Negative control、5: Size marker



第5図 RO-6マーカー領域を起点とするBACコンティグの作製

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4件）

①Ikegami, A., S. Eguchi, T. Akagi, A. Sato, M. Yamada, S. Kanzaki, A. Kitajima, K. Yonemori. 2011. Development of molecular markers linked to the allele associated with the non-astringent trait of the Chinese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 80:150-155（査読あり）

②Akagi, T., A.Ikegami, K. Yonemori. 2011. Proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruits. Scientia Horticulturae 130:373-380 （査読あり）

③Akagi, T., R. Tao, T. Tsujimoto, A. Kono, K. Yonemori. 2012. Fine genotyping of a highly polymorphic *ASTRINGENCY*-linked locus reveals variable hexasomic inheritance in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars. Tree Genomics & Genomes 8:195-204（査読あり）

④Mitani, N., A. Kono, M. Yamada, A. Sato, S. Kobayashi, Y. Ban, T. Ueno, M. Shiraishi, S. Kanzaki, T. Tsujimoto, K. Yonemori. 2013. Practical marker-assisted selectiom using two SCAR markers for

fruit astringency type in crosses of 'Taiten' X PCNA cultivars in persimmon breeding. Scientica Horticulturae 170:219-223（査読あり）

〔学会発表〕（計 5 件）

①K. Yonemori, S. Kanzaki, T. Akagi, T. Tsujimoto, A. Sato, M. Yamada. 2010. Molecular marker for selecting pollination constant and non-astringent (PCNA) type persimmon. 28th International Horticultural Congress. Losbon Congress Centre, Portuguese.

②辻本誠幸、赤木剛士、神崎真哉、米森敬三. 2010. カキの遺伝学的解析におけるマメガキの有用性. 園芸学会平成 22 年度秋季大会. 大分大学旦野原キャンパス

③辻本誠幸、赤木剛士、河野淳、三谷宣仁、佐藤明彦、米森敬三. 2011. カキの甘渋性制御遺伝子（*AST*）のマッピング. 園芸学会平成 23 年度春季大会. 宇都宮大学農学部

④三谷宣仁、河野淳、山田昌彦、神崎真哉、佐藤明彦、小林省蔵、伴雄介、上野俊人、白石美樹夫、赤木剛士、辻本誠幸、米森敬三. カキの甘渋性識別SCARマーカーを利用した完全甘ガキの選抜. 園芸学会平成23年度春季大会. 宇都宮大学農学部

⑤T. Akagi, T. Tsujimoto, A. Sato, A. Kono, R. Tao, K. Yonemori. 2011. Diploid/hexaploid syntenic shuttle mapping for the fruit-specific proanthocyanidin regulating gene (*Astringency* gene) in persimmon (*Diopsyros kaki* Thunb.). International Plant & Animal Genomes XIX. Town & Country Convention Center, San Diego, USA.

６．研究組織

(1)研究代表者

米森　敬三（YONEMORI KEIZO）
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10111949

(2)研究分担者

佐藤　明彦（SATO AKIHIKO）
農研機構果樹研究所・ブドウ・カキ研究領域・上席研究員
研究者番号：30355440

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

(3)連携研究員

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