

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658011

研究課題名（和文）

カキエタノール生合成遺伝子発現に基づく新規脱渋理論の構築と渋ガキ品種の甘ガキ化

研究課題名（英文）Construction of the new theory for de-astringency based on the expression of genes involved in the ethanol synthesis pathway in persimmon

研究代表者

板井 章浩（ITAI AKIHIRO）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：10252876

研究成果の概要（和文）：

脱渋難易性の異なる品種を用いて、エタノール生合成経路遺伝子の発現解析を行い、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子とアルコール脱水素酵素遺伝子の脱渋における役割を明らかにした。またエタノール生合成経路遺伝子とくにアルコール脱水素酵素（ADH）遺伝子の発現抑制の形質転換体を得ることに成功した。この材料は、今後カキ果実の脱渋性を決定している要因解析に利用できる貴重な素材である。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the role of genes encoding the ethanol synthesis during natural and artificial de-astringency in persimmon fruit. We have clarified the cultivar differences in the expression of *DkPDC1*, *2*, and *3* and *DkADH1*. Moreover, we have gotten transgenic plants introduced with *DkADH1* in Hiratanenashi persimmon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：園芸利用学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：渋ガキ、遺伝子組み換え、アルコール脱水素酵素、ピルビン酸脱炭酸酵素

## 1. 研究開始当初の背景

カキには甘ガキと渋ガキの両タイプの品種が存在し、渋ガキにおいては、脱渋処理を行う必要がある。渋ガキにおいては、脱渋操作を要するため、育種の方向性として、完全甘ガキ品種が育成されている。しかしながら、完全甘ガキ品種は福島以北では、渋残りするため栽培地が限定されることや、また、長い栽培歴史に基づき地方に様々な優良な在来品種が存在するが、そのほとんどは渋ガキ品種であるため、依然として渋ガキの重要性が

高い。脱渋方法としては炭酸ガスあるいはエタノールの大きく2つの方法に分かれる。このうち、エタノール処理による脱渋にはこれまで、エタノールがアルコール脱水素酵素（ADH）によりアセトアルデヒドに転換され、それがタンニンを不溶化するという説が考えられ、教科書の常識とされてきた。カキ果実より ADH 遺伝子の単離を行い、脱渋難易性の異なる品種における発現解析を行ったところ、脱渋困難な品種ほど高い ADH 遺伝子の発現を示し、従来のアセトアルデヒドへの転

換説では説明できないことを明らかにした。さらに重水素ラベルエタノールにより脱渋を行い、エタノールからアセトアルデヒドへの変換がみられないことを明らかにし、従来のエタノール脱渋に関する考え方を根本的に見直す必要があるとの見解に至った。

## 2. 研究の目的

### (1) 脱渋難易性の異なる渋ガキ品種の脱渋処理におけるエタノール生合成経路遺伝子の発現特性

脱渋難易性の異なる、代表的地方在来渋ガキ品種および主要品種（‘西条’（中国地方）、‘愛宕’（愛媛県）、‘横野’（山口）、‘平核無’およびその早生突然変異体‘刀根早生’（奈良、和歌山他））を用い、異なる濃度のCO<sub>2</sub>脱渋処理を行い、各処理区からの果肉サンプルよりRNA抽出を行い、カキピルビン酸脱炭酸酵素（PDC）遺伝子（*DkPDC1, 2, 3*）およびアルコール脱水素酵素（ADH）遺伝子（*DkADHI*）のノーザン法またはリアルタイムPCR法での発現解析を行い、脱渋難易性と遺伝子発現レベルとの関連を調査する。さらに脱渋時や、果実にのみ発現する遺伝子の探索を行い、ゲノム配列の単離を試み、果実特異的、脱渋処理特異的プロモーターの開発を試みる。

### (2) アルコール生合成遺伝子組み換えカキの作出と培養

ピルビン酸脱炭酸酵素（PDC）遺伝子（*DkPDC2*）においては、35Sプロモーター下でセンス方向に接続したバイナリーベクターを構築する。渋ガキ品種‘平核無’、‘西条’、完全甘ガキ‘次郎’培養シュートを用いて、アグロバクテリウム法によってカキピルビン酸脱炭酸酵素（PDC）遺伝子の過剰発現個体を作製する。またアルコール脱水素酵素（ADH）遺伝子（*DkADHI*）をアンチセンス方向に接続コンストラクトを作製し、する。渋ガキ品種‘平核無’、‘西条’、完全甘ガキ‘次郎’培養シュートを用いて、アグロバクテリウム法によって、アルコール脱水素酵素（ADH）遺伝子（*DkADHI*）発現抑制個体を作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脱渋難易性の異なる渋ガキ品種の脱渋処理におけるエタノール生合成経路遺伝子の発現特性

#### ①植物材料

供試品種として脱渋難易性の異なる5品種、10月15日から18日にかけ収穫した‘刀根早生’、‘平核無’、‘西条’のカキ果実および11月19日から21日および26日に収穫した‘横野’、‘愛宕’のカキ果実を用いた。

#### ②脱渋処理

CTSD脱渋法（炭酸脱渋法）に従い脱渋処理を行った。25℃で、異なるCO<sub>2</sub>濃度（0%、20%、40%、60%および80%）条件下で24時間脱渋処理をおこなった。

#### ③可溶性タンニン含量の測定

果肉の可溶性タンニン含量の測定は以下の方法に従って行った。種子と果皮間の果肉5gを細かく切断したものを80%メタノールでホモジナイズし、遠心分離（20℃、7,000rpm、5分間）した。この上清を定溶したものを粗可溶性タンニン抽出液とし、Folin-Denis法に準じて可溶性タンニン含量を測定した。4.2ml 蒸留水、50μl 粗抽出液、250μl Folin&Ciocalteu phenol reagent、500μl 飽和炭酸ナトリウムを加えて混和し、30分間静置した。0.025%、0.05%、0.1%および0.2% Gallic AcidをStandardとし、OD<sub>725</sub>より可溶性タンニン含量を算出した。

#### ④アセトアルデヒドおよびエタノール含量の測定

種子と果皮間の果肉細片1gを5ml 100%冷アセトンに浸透させ、2分間超音波洗浄機でアセトアルデヒドを溶液中に溶かし出し、-20℃で保存した。

抽出液の上澄み1μlを直接ガスクロマトグラフでアセトアルデヒドおよびエタノール含量を測定した。

#### ⑤ノーザン解析

凍結粉碎した果肉5gより、Hot Borate法に従って、全RNAを抽出した。得られた全RNAは、濃度測定ならびに電気泳動によりチェックを行った後、実験に供試した。

*DkPDC1~3*および*DkADHI*のプロンプを用いて、果肉より抽出した10μg分の全RNAを全量5μlに調整した後、電気泳動を行いノーザン・ブロットィング法にてメンブレン作製した。その後、プロンプに用い、ハイブリダイゼーションならびにImage Analyzerにて発現解析を行った。

### (2) アルコール生合成遺伝子組み換えカキの作出と培養

#### ①植物材料

継代培地[MS、5μM Zeatin、1μM IBA、3% Sucrose、0.8% Agarose、pH5.8]にて27℃、16時間日長で一カ月培養したPCNAの‘次郎’、PVAの‘平核無’およびPCAの‘西条’のシュートを供試した。

#### ②方法

*DkADHI* および*DkPDC2* 全鎖長cDNAをもちいて挿入領域を増幅するために

KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR 産物は、回収精製後、pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、クローニングした後、Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、pGWB402 Binary Vector に再クローニングした。アグロバクテリウム EHA105 に形質転換した。継代培養シュートの上位展開葉を切り出し、葉脈を通るように直径 8mm の生検トレパンで外植片を作出した。共存培地 [MS (1/2NO<sub>3</sub>), 1□M Zeatin, 1□M NAA, 3% Sucrose, 0.8% Agarose, pH5.8] に 82mm の濾紙をひき、葉を裏向きに植えた。シャーレを閉じ、27°C、暗黒で一晩培養した。MS 誘導培地 [MS, 2% Sucrose, 1mM Proline, 100□M acetosyringone, pH5.2] を作製した。一晩培養したアグロバクテリウム菌を 4,000rpm、15 分、室温で遠心後、上層の培地を捨てた。沈殿した菌を感染誘導培地 (MS 誘導培地) で OD<sub>420</sub>=0.5 になるように調整し、28°C、5 時間、振とう培養した。

空のシャーレにリーフディスクののった濾紙ごと移し、新しい濾紙をかぶせた。5 時間培養したアグロバクテリウム菌液を流し入れ、泡を抜いて約 10 分間浸し、その間に前培養時の共存培地に新しい濾紙を敷いた。感染後、滅菌キムタオルで余分な菌液を吸い取り、濾紙を敷いた共存培地に置床した。27°C、暗黒で 3 日間共存培養した。以降、除菌培養、カルの誘導および選択培養、形質転換カルの増殖を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 脱渋難易性の異なる渋ガキ品種の脱渋処理におけるエタノール生成経路遺伝子の発現特性

脱渋処理後のカキ果実中の可溶性タンニン含量を測定した結果、‘刀根早生’および‘横野’で 80% 処理区でのタンニン含量の急激な減少が認められた。‘平核無’は‘刀根早生’、‘横野’ほどではないが 80% 処理区でのタンニン含量の減少が確認された。しかし、‘西条’および‘愛宕’では、他品種と比べて 80% 処理区で 1 日ではタンニン含量の顕著な減少はみられなかった。さらに、‘平核無’、‘横野’および‘愛宕’では濃度が低下するとタンニン含量は増加する傾向がみられた。脱渋処理後のカキ果実内のアセトアルデヒド含量の測定をした結果、全ての品種で 80% 処理区での蓄積量が高く、濃度が低下すると減少の傾向がみられた。全ての品種で 80% 処理区で最も脱渋されていたことから、アセトアルデヒド含量と可溶性タンニン含量との関連性がみられた。品種別にみても

と、‘刀根早生’では 80% 処理区でのタンニンプリントによりでの明らかなタンニンの消失がみられ、濃度が低下するとアセトアルデヒド含量は減少した。‘平核無’においてタンニンプリントは 80% 処理区でほぼ完全にタンニンの消失がみられ、‘西条’においてタンニンプリントで 80% 処理区で若干のタンニンの消失がみられたが、他の品種と比べて顕著なものではなかった。‘横野’においてタンニンプリントで 80% 処理区での明らかなタンニンの消失がみられ、濃度が低下するとタンニンは高い蓄積を示し、‘愛宕’においてはタンニンプリントでは明らかなタンニンの消失はみられなかったが、80% 処理区で若干ではあるが種子周辺でのタンニンの消失がみられた。

脱渋処理後のカキ果実のエタノール含量を測定した結果、全ての品種でアセトアルデヒド同様に、80% 処理区で最も蓄積量が多く、濃度が低下すると減少する傾向があった。

CO<sub>2</sub> 濃度の差により品種によって脱渋難易性が異なり、さらにアセトアルデヒドおよびエタノール生成量に明らかに品種間に差があることが示唆された。このことにより、脱渋処理における CO<sub>2</sub> 濃度の差が品種の脱渋難易性に大きな関わりがあることが示唆された。

*DKPDC1* の発現解析の結果、‘刀根早生’では 60% 処理区で発現が誘導され、80% 処理区でも高い発現が維持された。‘西条’では処理区 40% で低い発現が誘導され、80% 処理区で最も高い発現が誘導された。‘横野’では 60% 処理区で低い発現が誘導され、80% 処理区で高い発現が維持された。‘愛宕’では 20% 処理区からの発現がみられ、80% 処理区で最も高い発現が維持された。

*DKPDC3* の発現解析の結果、‘刀根早生’では 80% 処理区で高い発現が誘導された。20% 処理区～60% 処理区では発現の上昇はみられなかった。‘平核無’では 60% および 80% 処理区で低い発現がみられた。‘西条’ではどの処理区でもほとんど発現はみられなかった。‘横野’では 80% 処理区で高い発現が誘導された。‘愛宕’ではどの処理区でも発現の誘導はみられなかった。

*DKADH1* の発現解析の結果、‘刀根早生’では 60% 処理区および 80% 処理区で発現がみられたが、他の品種とくらべて低い発現だった。20% および 40% 処理区では発現はみられなかった。‘西条’では他の品種で 60% 処理区での発現の誘導がみられたにも関わらず、‘西条’でのみ 60% 処理区での発現の誘導がみられなかった。しかし、80% 処理区では高

い発現が誘導された。‘横野’では60%処理区で発現の誘導がみられ、80%処理区で発現は増大した。‘愛宕’では40%処理区で低い発現の誘導がみられ、60%および80%処理区では高い発現が維持された。

‘刀根早生’、‘平核無’、‘西条’、‘横野’および‘愛宕’において*DKPDC1*~*3* および*DKADH1* の発現を誘導する処理区がCO<sub>2</sub>濃度60%以上の処理区であり、さらにCO<sub>2</sub>濃度80%以上になると全ての品種でエタノール代謝系酵素遺伝子の発現が強くなったことから、カキ果実のどの品種の脱渋処理をおこなう際には最低でもCO<sub>2</sub>濃度が60%以上必要であることが示唆された。

## (2) アルコール生合成遺伝子組み換えカキの作出と培養

現在、‘平核無’、‘西条’および‘次郎’においては、選択培地にてカルスを選抜中であるが、その中で、‘平核無’由来カルスから2個体組み換え体の選抜に成功した(第1図)。組み換え体は非常に成長が遅く、これらは導入遺伝子の影響がかなり濃く出ているものと思われる。今後鉢上げし、その成長等および果実が着果したら、その脱渋特性を調査する予定である。



第1図 ‘平核無’由来 *DkADH1* 組み換え個体

## 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 Nakatsuka, A., T. Maruo, C. Ishibashi, Y. Ueda, N. Kobayashi, M. Yamagishi, and H. Itamura Expression of genes

encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase in ‘Saijo’ persimmon fruit during softening after deastringency treatment. POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY 62:89-92. 2011. 査読有  
[学会発表] (計7件)

① 板村裕之 カキ‘西条’系統の樹上軟化に関連する遺伝子候補の探索園芸学会、岡山大学 2011.9.25

② 江角智也 カキ‘西条’におけるFT/TFL相同遺伝子の解析と形質転換体の作出 園芸学会、岡山大学 2011.9.25

③ 田中佑季 カキわい性台木候補のシュート増殖・伸長に使用するサイトカイニンの種類が発根に及ぼす影響について 園芸学会、岡山大学 2011.9.25

④ 本勝千歳 カキわい性台木MKR1の樹皮および根からのDNA抽出とSSRマーカーによる品種識別 園芸学会、岡山大学 2011.9.25

⑤ 鉄村琢哉 挿し穂採取用母樹、培土および挿し木時期がカキわい性台木挿し穂の発根と翌年の成長に与える影響 国際植物増殖者会議日本支部、豊明花き市場(愛知県), 2010.10.24

⑥ 石村修司 台木の違いがカキ‘早秋’および‘太秋’の初期成長に与える影響 園芸学会、大分大学 2010.9.19

⑦ 原ノ後翔 台木の違いがカキ‘早秋’および‘太秋’の初期成長に与える影響 園芸学会、大分大学 2010.9.19

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板井 章浩 (ITAI AKIHIRO)  
鳥取大学・農学部・准教授  
研究者番号：10252876

### (2) 研究分担者

板村 裕之 (ITAMURA HIROYUKI)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：80109040

鉄村 琢哉 (TETSUMURA TAKUYA)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：00227498