

( 続紙 1 )

|   |  |    |         |
|---|--|----|---------|
| 京都大学  | 博士 ( 農 学 )   | 氏名 | 赤 木 剛 士 |
| 論文題目  | Molecular Basis and Control of the Astringency Trait in Persimmon Fruit<br>(カキ果実における渋渋性形質発現の分子機構と制御) |    |         |
| (論文内容の要旨)   |  |    |         |
| <p>カキ (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) 果実はその発育中に大量のプロアントシアニン (PA) を蓄積し、強い渋味を呈する。しかしながら、カキには果実のPA蓄積能力が果実発育初期に低下し、その渋味を果実発育にともなって樹上で消失する完全甘ガキ (PCNA) と呼ばれる品種群が存在する。この品種群は、果実発育中に果実へPA蓄積を続ける非完全甘ガキ (non-PCNA) 品種群から突然変異体として出現したと考えられており、PCNA/non-PCNA形質発現の差異は<i>ASTRINGENCY</i> (<i>AST</i>) と名付けられた単一の遺伝子座の制御下にあると仮定されている。しかしながら、カキ果実でのこの形質決定のための分子機構についての知見はこれまでにほとんど得られていない。本論文は今後の新たなPCNAタイプ品種育成のための基礎となる、<i>AST</i>遺伝子座制御下にあるPCNA/non-PCNA形質発現の決定機構を分子生物学的視点から解明することを目的としたものであり、論文は以下の3章よりなっている。</p> <p>第1章では、PCNA/non-PCNA 分離後代系統を用い、PCNA 個体での PA 蓄積低下が PA ポリマーを構成するエピガロカテキン、エピガロカテキンガレート量の低下によること、また、PCNA 個体では PA 合成経路およびその上流経路であるシキミ酸合成経路のいくつかの酵素遺伝子群が同調的に発現低下していることを明らかにした。さらに、カキ果実内で二次代謝経路の制御に関与する Myb 転写因子およびそれと相互作用する可能性を持った転写因子 (bHLH, WDR) を網羅的に単離・解析することで、カキの PA 蓄積制御に関与すると考えられる <i>DkMyb2</i>、<i>DkMyb4</i> を同定した。このうち、<i>DkMyb4</i> は多くの PA 経路酵素遺伝子と同調的に PCNA 特異的発現低下を示し、<i>DkMyb4</i> がカキ果実内において PA 合成経路酵素遺伝子やシキミ酸経路酵素遺伝子の発現を総括的に制御し、カキ果実の PA 蓄積制御に大きく関与していることを示唆した。</p> <p>第2章では、いくつかの温度処理区を設定し、果実内での <i>DkMyb4</i> の季節的発現への影響を調査している。その結果、PCNA 個体の <i>DkMyb4</i> 発現パターンは気温によって制御され、夏季の気温上昇によってその発現低下に至る可能性を示唆した。ただ、<i>AST/ast</i> 表現型マーカー遺伝子の発現解析から、気温はカキ果実内の <i>DkMyb4</i> 発現に直接影響するが、<i>AST</i> 遺伝子の直接的な制御要因ではない可能性を示し、<i>AST</i> 遺伝子の制御が機能する non-PCNA 個体では気温・<i>AST</i> 遺伝子双方の複合的な影響で持続的に <i>DkMyb4</i> が発現して PA 蓄積を続けるが、<i>AST</i> 遺伝子が機能しない PCNA 個体では <i>DkMyb4</i> の発現制御要因が気温のみとなり、夏季に PA 蓄積能を失うという仮説を提唱している。また、気温と果実内生アブシシン酸 (ABA) 濃度間に有意な相関があることを示し、ABA シグナリング関与因子群オーソログをカキ果実中から網羅的に単離することで、<i>DkMyb4</i> 発現制御に関与する候補因子の同定を試み、ABA response element (ABRE) 認識型と相同な bZIP 様転写因子 <i>DkbZIP5</i> が <i>DkMyb4</i> の転写制御因子として機能する可能性を示している。</p> <p>第3章では、ポジショナルクローニングによるカキの <i>AST</i> 遺伝子座の同定を目指</p> |  |    |         |

し、ヘテロ性の高い六倍体のカキの代わりにカキ (*D. kaki*) の二倍体近縁種であるマメガキ (*D. lotus*) を染色体歩行の材料として用い、カキとの比較ゲノム解析を行った。40 の Fosmid クローンおよび 2 つの BAC クローンからなる約 600kb の *AST* 遺伝子座領域の *D. lotus* コンティグを構築し、この領域内で *D. kaki* と *D. lotus* のゲノムシーケンス間には高い相同性が保存されていることを示すとともに、*D. lotus* 物理地図上から作製したマーカー群は *D. kaki* の遺伝地図上においてほぼ同順序に配置されていることを明らかにした。また、*D. lotus* コンティグ上から作製したこれらの多型マーカーを用い、PCNA/non-PCNA 形質の分離後代系統 ( $n = 296$ ) における組み換え調査を行なうことで、*D. kaki* における *D. lotus* コンティグ相同領域内の *AST* 遺伝子座存在領域を推定した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) には果実の渋味の原因であるプロアントシアニジン (PA) を蓄積する能力を果実発育初期に失い、渋味を果実発育にともなって樹上で消失する完全甘ガキ (PCNA) と呼ばれる品種群が存在する。この品種群は果実発育とともにPA蓄積を続ける非完全甘ガキ (non-PCNA) 品種群から突然変異体として出現したと考えられており、PCNA/non-PCNA形質発現の差異は単一の遺伝子座である *ASTRINGENCY* (*AST*) 遺伝子座の制御下にある。しかしながらこれまでに、カキ果実でこの形質を決定するための分子機構についての知見はほとんど得られていない。本論文は *AST* 遺伝子座制御下にある PCNA/non-PCNA 形質発現の決定機構を分子生物学的視点から解明することを目的としたもので、得られた主要な成果は以下のとおりである。

1. PCNA/non-PCNA 分離後代系統を用いて、PA 合成経路およびその上流経路であるシキミ酸合成経路の酵素遺伝子群の発現を調査し、PCNA 個体ではこれらの酵素遺伝子群が同調的に発現低下することを明らかにするとともに、カキ果実内でこれらの制御に関与する Myb 転写因子 *DkMyb4* を同定した。*DkMyb4* は多くの PA 経路酵素遺伝子と同調的に PCNA 特異的発現低下を示し、カキ果実の PA 蓄積制御に大きく関与していることを明らかにした。
2. PCNA 個体の *DkMyb4* 発現パターンが気温によって制御され、夏季の気温上昇によってその発現低下に至る可能性を示唆した。さらに、気温と果実内生アブシシン酸 (ABA) 濃度との有意な相関を明らかにし、ABA response element (ABRE) 認識型と相同な bZIP 様転写因子 *DkbZIP5* が *DkMyb4* の転写制御因子として機能する可能性を示した。
3. ヘテロ性の高い六倍体のカキ (*D. kaki*) の代わりに、二倍体近縁種であるマメガキ (*D. lotus*) から約600kbの *AST* 遺伝子座領域の *D. lotus* コンティグを構築し、この領域内の *D. kaki* と *D. lotus* のゲノムシーケンス間の高い相同性を明らかにするとともに、*D. lotus* コンティグ上の塩基配列から作製した多型性マーカーを用いて PCNA/non-PCNA 形質の分離後代系統における組み換え調査を行なうことで、*D. kaki* の *AST* 遺伝子座存在領域を同定した。

以上のとおり、本論文はカキ果実の甘渋性を決定するプロアントシアニジン蓄積制御の分子機構に関して、転写因子 *DkMyb4* が重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、その転写因子を制御し、果実の甘渋性を決定している *AST* 遺伝子の単離の可能性を示唆したものであり、果樹園芸学、果樹生理学並びに果樹育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降