

カキ果実におけるプロアントシアニジン蓄積制御機構の遺伝学的・細胞学的研究

京都大学農学研究科農学専攻 果樹園芸学分野 藤原 陽介

緒言

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.; $2n=6x=90$) は、渋味の原因であるプロアントシアニジン (PA) を、果実発育期間を通して継続して果実に大量に蓄積する。また、カキ果実はタンニン細胞と呼ばれる、特殊細胞の液胞に PA を蓄積することが知られている。カキ品種には、果実発育初期に PA 蓄積を停止する完全甘ガキ (Pollination Constant and Non-Astringent; PCNA) が存在する。PCNA と non-PCNA (PCNA 以外の全てのカキ品種) 間の質的な性質の違いを甘渋性と呼ぶ。甘渋性は単一の遺伝子座 *ASTRINGENCY* (*AST*) により制御され、PCNA 形質は潜性アレル (*ast*) により賦与されることが明らかになっている。PA 蓄積の制御はカキ育種における最重要目標の一つであり、育種現場では PCNA 形質を対象に分子マーカーによる選抜が実装されている。一方で、カキゲノムの複雑性が要因となり、*AST* 遺伝子はこれまで未同定であった。また、分子マーカーにより決定した *AST* 遺伝子型は PCNA であるが、生食に適さないほどの渋味を示す個体も育種集団において出現し、甘ガキ育種の障壁となっている。以上の背景から、本研究では「タンニン細胞の発達機序の解明」、「完全甘ガキが持つ渋味形質の発生要因の調査」および「*AST* の同定とその分子機能の解明」を通し、カキ果実における PA 蓄積制御機構を理解することを目指した。

第一章 カキ果実におけるタンニン細胞発達機序に関する解析

本章では、タンニン細胞の形態的観察から、カキ果肉細胞が持つ PA 隔離機構について調査した。PCNA と non-PCNA を含む 4 品種を供試し、果実あたりタンニン細胞数を経時的に計測したところ、果実の発達に伴いタンニン細胞数は増加する傾向にあった。

次に, *in situ* ハイブリダイゼーションにより, PA 合成経路の酵素遺伝子である *ANR* (*anthocyanidin reductase*) の発現部位をカキ果肉中で可視化したところ, タンニン細胞と隣接する柔細胞において局所的に発現していたが, 成熟タンニン細胞では発現していなかった. さらに, 集束イオンビーム-透過型電子顕微鏡 (FIB-SEM) によるタンニン細胞の三次元的解析の結果, タンニン細胞周囲の細胞壁には原形質連絡より発達した開口部が存在し, 柔細胞周囲よりも密度が高い傾向にあることが示唆された. また, PA 蓄積液胞の結合が観察されるなど, 開口部を通した隣接細胞間における相互作用の存在が確認された. 以上より, カキ果実において PA 合成は柔細胞で開始するが, 開口部を介した物質輸送により隣接する細胞に PA を蓄積する機構がはたらき, さらに合成細胞自身が PA を蓄積することで, 集合体を形成しながらタンニン細胞が増殖するというモデルが考えられた.

第二章 *ast* ホモ接合体における渋味形質およびその制御因子に関する解析

完全甘ガキ果実の渋味形質を制御する要因について, PA 関連形質や遺伝子発現の観点から調査した. ‘太月’ (non-PCNA) × ‘甘秋’ (PCNA) 後代において, 果実 PA 含量を調査したところ, *ast* ホモ接合であっても可溶性 PA 含量に大きなばらつきが観察された. 中でも, 甘渋性マーカーの遺伝子型は *ast* ホモ接合であるが, 官能評価では non-PCNA と同等の渋味スコアが付された 2 個体 (538-1136 および 540-1576) に着目し調査を行った. その結果, これらの個体では果実発達中期における可溶性 PA 含量が, 他の PCNA と non-PCNA 個体の中間程度であった. 次に, 発達中期の果実 RNA-seq から発現変動解析を行ったところ, 渋味形質を示す上記 2 個体では他の PCNA 個体と比較して, *ANR* や *WRKY44* 転写因子など PA 合成に関与する遺伝子の発現が有意に上昇していた. したがって, 上記の 2 個体では *AST* とは独立した遺伝子座の影響により PA 蓄積が上方制御され, 成熟果における渋味の要因となっていることが確認された. また, 渋味

形質が報告されている PCNA×PCNA 後代について、果実 PA 含量の測定と官能評価を同一サンプルで行ったところ、可溶性 PA 含量と渋味強度には正の相関が認められ、*ast* ホモ接合個体における渋味形質は主に果実 PA 蓄積によって制御されることが考えられた。

第三章 順遺伝学的アプローチによる AST 候補遺伝子の同定および機能検証

先行研究から、*AST* の座乗領域は近縁種二倍体で約 910 kb に相当する範囲まで絞り込まれていた。そこで本章では、*AST* 座乗領域において六倍体ゲノムをハプロタイプ別に構築し、多型解析を行い候補遺伝子の同定を試みた。non-PCNA の‘太天’より Pacbio HiFi ロングリードを取得し、リードを片親由来のハプロタイプ群ごとに分類する trio-binning を適用することで、*AST* 座乗領域について‘太天’の持つ 6 種類のハプロタイプ (A224, A240, a349, a353_2a, a353_2b, a355; *A* が顕性で *a* が潜性) のうち a355 以外の 5 種類をアセンブルできた。652-line (‘富有’×‘吉田御所’) の親を含む 12 個体および遺伝資源 11 品種についてゲノムシーケンスを実施し、‘太天’ハプロタイプ上で *AST* 連鎖多型を検出したところ、単一の遺伝子領域に多型が集中していた。この遺伝子はモデル生物においても機能未知であったため、ホモログを *TANNIN* (*TAN*) と命名し以降の解析を行った。初めに、652-line、カキ遺伝資源および他のカキ属 4 種を含む 147 系統を用い、*DkTAN* の CDS 全長を増幅するアンプリコンシーケンスを行った。果実で発現する転写産物配列を比較したところ、*DkTAN* には多様な転写産物バリエーションが存在していた。さらに、non-PCNA は全長が翻訳される機能型配列 (389-392 aa) が転写されているが、PCNA では全個体で機能型配列の割合が 1%前後と著しく低く、機能型配列の有無が甘渋性と完全に一致した。加えて、‘太天’のハプロタイプ配列から、バリエーション変異の原因多型は 2 種類存在し、a353, a355 については第 7 エキソン領域を含む約 1.5 kb の欠失、a349 については第 3 エキシソンの近傍に位置する単一の SNP であると考えられた。また、24 品種における *DkTAN* 座乗領域約 62kb の配列をロングリード

ターゲットエンリッチメント解析によって調査したところ, 調査したすべての PCNA 由来のアレル配列が 2 種類の原因多型のいずれかを持つことが確認された.

TAN はモデル植物においても機能不明であるため, PA 蓄積との機能的関連を調査した. 細胞内局在観察および相互作用タンパク質の Yeast two-hybrid スクリーニングの結果から, DkTAN は PA の液胞蓄積に関与する小胞輸送を制御している可能性が考えられた. 加えて, *AtTAN* のエキソン領域に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナ系統では, 未成熟種皮において野生型と比較して小型の PA 蓄積小胞が複数観察された. また, *AtTAN* の RNAi 系統においても類似した表現型が観察された. よって, *AtTAN* は PA 蓄積液胞の正常な発達に重要である可能性が示され, DkTAN の機能仮説を支持する結果が得られた. 以上の順遺伝学的解析および機能検証実験から, *DkTAN* が *AST* の本体遺伝子である可能性が強く支持された.

総括

本研究では, カキの PA 蓄積制御機構の包括的理解に向けた実験を行った. 果肉細胞の観察実験から, タンニン細胞の発達機序に関する知見が得られ, カキの PA 高蓄積性の背景にある細胞間隔離機構の存在が示唆された. また, *ast* ホモ接合個体集団における渋味形質の要因調査の結果, 渋味強度の多様性が PA 蓄積により概ね説明できることが明らかになり, PA 蓄積のさらなる人為的制御の必要性が確認された. さらに, 六倍体カキゲノムを対象とした順遺伝学的解析の結果, *AST* の有力な候補遺伝子として *TAN* を同定した. 加えて, PCNA 形質をもたらす異なる 2 種類の原因多型候補が同定され, 複雑な転写産物バリエーションによる変異が発生していることを明らかにした. 機能検証実験からは, *TAN* は PA の輸送経路および PA 蓄積液胞の発達に関与する可能性が考えられた. 以上の知見は, 効率的な甘ガキ育種の実現に貢献するだけでなく, 二次代謝産物研究の発展にも資するものである.