

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：85403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07306

研究課題名(和文)ブドウ果実における二次代謝産物の環境応答機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the environmental regulation of the secondary metabolism in grape berries

研究代表者

小山 和哉 (Kazuya, Koyama)

独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・主任研究員

研究者番号：30416424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブドウ果実中の二次代謝産物の環境応答機構の解明を目指し、はじめにブドウ果実中のフェノール化合物、テルペン類やノルイソプレノイド類の網羅的解析法を開発し、各種環境下での変動について解析を行った結果、品種や光照射等の環境条件の違いによる二次代謝成分の変動を微細に検出できることがわかった。次に、ジーンチップ解析により、異なる光環境下でのフェノール化合物やテルペン類等の変動と同調した発現を示すbZIP型転写因子をスクリーニングした、さらに、その機能について解析を行った結果、フェノール化合物の代謝系を制御していると示唆された。その作用の発現には他共役因子との相互作用が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した二次代謝成分の網羅的解析法(香気成分の前駆体の解析を含む)は、栽培法や気象の影響解析などの様々な課題に適用することによって、醸造用ブドウの品質評価が可能であり、実用的な面にも今後貢献できると期待される。また、ブドウにおける二次代謝成分の制御機構に関する知見は限られており、学術的にも新規性は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of environmental regulation of the secondary metabolism in grape berries, first, we set up the analytical method to analyze comprehensively the phenolics and the volatile compounds, both free and bound forms. By the method, we could detect the significant modulation of the composition of the secondary metabolites among the varieties as well as under different environmental conditions, such as light environment around the bunches. Genechip analysis screened a candidate bZIP transcription factor whose gene expression profile was coordinate to those of the phenolics and terpenoids under different environment and developmental stages. The functional analysis of this bZIP transcription factor revealed the regulation of the phenolic metabolism. For the regulation of the secondary metabolism by this factor, co-factor was considered to be necessary.

研究分野：園芸科学

キーワード：二次代謝 環境応答 フェノール化合物 香気成分前駆体 遺伝子発現解析 ブドウ

## 1. 研究開始当初の背景

ブドウ果実ではフェノール化合物群及びイソプレノイドであるモノテルペン、セスキテルペン、ノルイソプレノイドなど非常に多様な二次代謝産物を蓄積する。これらの化合物組成は、種々のストレス環境下において変動することから、植物にとって、生物的及び環境ストレスに対する防御化合物としての役割をもっていることが示唆されている。また、芳香、色、呈味性をもち、醸造用及び生食用ブドウ果実の品質にとって重要な因子でもある。テルペン化合物やノルイソプレノイドは主には配糖体として存在しているが網羅的な解析例は少なく、ストレス環境下における変動については不明な点が多い。

ブドウは、2007年に欧州系ブドウのピノノアール種を用いた全ゲノム配列の解読が終了し、これらフェニルプロパノイド・フラボノイド生合成系及びイソプレノイド生合成系構造遺伝子の多くは、同定されている(文献)。しかし、多様な最終代謝産物に至る経路が完全に明らかにされているとはいえず未同定遺伝子も多く存在すると考えられる。更に、その代謝経路の制御機構については、その重要性にも関わらず、不明な点が多い。

著者らは、これまでの研究から、フェノール化合物生合成系の環境制御に関して、発現部位、時期、及び環境応答性の異なる複数の MYB 型転写因子群によって協調的になされている様子が明らかとしてきた(文献)が、光など環境シグナルが同定された MYB 型制御因子群の転写誘導、ひいては、生合成系構造遺伝子群の発現誘導へ至るシグナル経路(制御機構)はこれまでに明らかとなっていない。近年、ブドウ及び他植物において、光や ABA のシグナル伝達に参与する bZIP 型転写因子がフラボノイドの制御に関与しており、構造遺伝子及び MYB 型転写因子の発現を転写レベルで制御しているとの報告(文献)があるが、ブドウにおける bZIP 型転写因子群によるその制御については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、ブドウ果実における二次代謝産物の環境応答機構の解明を目指して、各種環境下のブドウ果実におけるフェノール化合物、テルペン化合物やノルイソプレノイド類の変動について解析する。選抜したサンプルにおいて遺伝子発現のプロファイリングを行い、二次代謝産物の変動及び既知の生合成系構造遺伝子と同調した発現プロファイルをもつ未知制御因子を抽出し、その機能を明らかとする。

## 3. 研究の方法

実証圃場のブドウ樹を用い果房への遮光(日照条件が異なる)や植調剤散布などの栽培処理を行い、その果実を幼果期～収穫期にかけて経時的に採取した。また、各品種の収穫期における果実を得、フェノール化合物組成について詳細に解析した。テルペン類などの揮発性物質についてはブドウ果実中で遊離型、結合型として存在するため、両者について分析を行った。Ibarz らの方法(文献)を改変し、果粒抽出液を固層抽出カラムにて分画後、結合型揮発性成分については熱分解して遊離型とした後、SBSE-GCMS 法により網羅的な解析を行った。

二次代謝組成に違いのみられた果実サンプルより RNA を抽出し、Genechip を用い、網羅的な遺伝子発現解析を行った。発現プロファイルの比較は Genespring を用いた。また、各ブドウ器官、発達時期の果実組織における得られた候補遺伝子の発現について定量 PCR を行った。

35S プロモーターに *VvbZIP10* を連結したエフェクターコンストラクト(pB1221)を作成し、ブドウ培養細胞を用いパーティクルガンにて一過的に発現させた。さらに、アントシアニン及びプロアントシアニジン生合成系遺伝子群のプロモーター領域を luciferase 遺伝子に連結したレポータープラスミド pLuc を作成し、共発現させた後、レポーター活性を Dual-luciferase reporter assay system (Promega)にて測定を行った。

## 4. 研究成果

ブドウ果実における機能性成分であるフェノール化合物、テルペン、ノルイソプレノイド等の揮発性成分(香氣成分)を網羅的に解析できるようにするため、分析系の設定・妥当性の確認をはじめに行った。これらのうち、揮発性成分についてはブドウ中で結合型として存在している割合が高いため、酵素処理等(グルコシダーゼ)によって分解したのち、揮発した成分を SBSE-GCMS 法により解析を行った。2品種のブドウ果房への遮光処理、植物ホルモン(アブシジン酸、プロヒドロジャスモン酸)散布を行い、成熟期の果実を設定した分析法で解析したところ、フェノール化合物及び香氣成分(結合型及び遊離型)約 100 成分を仮同定することができた。品種や栽培処理によって有意に変動する成分を抽出することができた。特に光照射によりフェノール化合物、ノルイソプレノイド類、テルペン化合物が顕著に変動することがわかった(図1)。

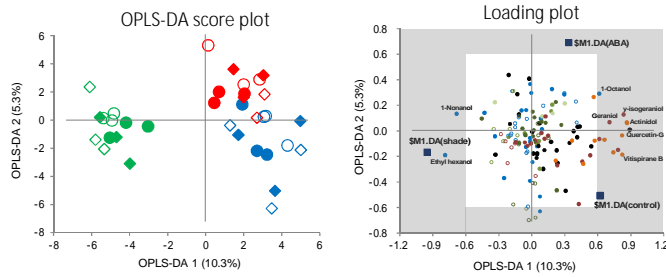


図1 異なる栽培処理条件下（対照区，青；遮光区，緑；ABA 処理区，赤）における成熟期のブドウ果実中の香気成分（遊離型，結合型）及びフェノール化合物組成の違い

赤ワイン用品種 16 品種のポリフェノール組成（ポリマー成分を含む）48 成分について測定比較を行ったところ、各品種及びヨーロッパ系品種、アメリカ系交配種、山ブドウ系交配種の特徴的な成分（プロアントシアニジン組成，アントシアニン，フラボノール）を抽出することができた。

次に、上記の検討において、二次代謝組成に違いのみられた果実サンプルを用いて RNA を抽出し、Genechip 解析を行った。果房周囲の光条件を完全遮光処理によって変更することによって、果実中では、フェノール化合物やテルペノイドの大幅な減少がみられたが、これらの成分は発達時期によっても変動した。光環境の変化に応じた変動を示す遺伝子群に着目し、その抽出を行った。近年、ブドウを含む植物において、bZIP 型の転写制御因子がフェノール化合物の生合成系構造遺伝子及びその制御因子（MYB 遺伝子）を制御しているという報告があることから着目して調べたところ、他植物で光応答に関連すると考えられる遺伝子のブドウのホモログ *WbZIP10* がフェノール化合物等の生合成系構造遺伝子の変動と同調した変動を示していた。そこで、定量 PCR にてブドウ組織での発現をみたところ、この遺伝子は、花、幼葉、幼茎、まきひげなどで発現が高く、果実中では果皮、種子で発現が高かったが、特にベレゾン期周辺で発現が極大となることがわかった（図2）。

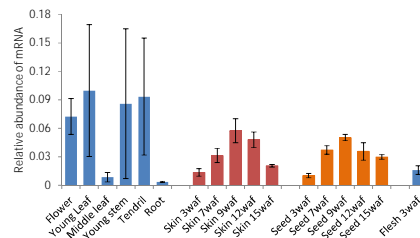


図2 bZIP 型制御因子の遺伝子発現プロファイル

また、果皮中で遮光、遮光解除処理に応答して発現量の変動がみられることが確認された。さらに、ブドウ細胞に一過的にこの bZIP 型制御因子を強制発現させ、ジーンチップ解析を行ったところ、特にフェノール化合物代謝に関連する遺伝子群の変動がみられることがわかった（図3）。

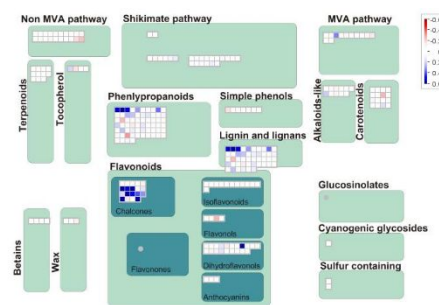


図3 bZIP 型制御因子の強制発現による二次代謝への影響 (MapMan3.6.0)

しかし、レポーターアッセイでは、アントシアニン，プロアントシアニジン経路の構造遺伝子のプロモーターを活性化しなかったことから、この bZIP 型転写制御因子による作用の発現には他因子との相互作用が必要であると考えられた。そこで、相互作用する因子の探索を酵母ツーハイブリッド法により行ったところ、ユビキチンリガーゼ等と相互作用がみられることが明らかとなった。

< 引用文献 >

R. Valasco *et al.*, A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS One, 2007, e1326.

K. Koyama *et al.*, Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin biosynthesis in grapes. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 4433-4449.

T. Akagi *et al.*, Seasonal abscisic acid signal and a basic leucine zipper transcription factor, DkbZIP5, regulate proanthocyanidin biosynthesis in Persimmon fruit. *Plant Physiology*, 158, 2012, 1089-1102.

M. J. Ibarz *et al.*, Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A*, 1116, 2006, 217-229.

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 Sharon Marie Bahena-Garrido, Tomoko Ohama, Yuka Suehiro, Yuko Hata, Atsuko Isogai, Kazuhiro Iwashita, Nami Goto-Yamamoto and Kazuya Koyama*	4. 巻 99
2. 論文標題 The potential aroma and flavor compounds in Vitis sp. cv. Koshu and V. vinifera L. cv. Chardonnay under different environmental conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the science of food and agriculture	6. 最初と最後の頁 1926-1937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sfa.9389	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 Kazuya Koyama*, Hiroshi Kamigakiuchi, Kazuhiro Iwashita, Ryosuke Mochioka, Nami Goto-Yamamoto	4. 巻 134
2. 論文標題 Polyphenolic diversity and characterization in the red-purple berries of East Asian wild Vitis species	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 78-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2016.10.003	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Garrido Sharon-Marie, Tomoko Ohama, Yuka Suehiro, Yuko Hata, Atsuko Isogai, Kazuhiro Iwashita, Nami Goto-Yamamoto, Kazuya Koyama
2. 発表標題 The effect of phytohormones and shading on the aroma and flavor characteristics in Koshu and Chardonnay varieties
3. 学会等名 ISHS 13th international symposium on plant bioregulators in fruit production (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山和哉*, 大浜友子, 末廣優加, 清水英明, 磯谷敦子, 江角智也, 後藤(山本)奈美
2. 発表標題 各種栽培処理が‘甲州’‘シャルドネ’果実のフェノール化合物及び香気成分組成へ及ぼす影響
3. 学会等名 日本ブドウ・ワイン学会2016大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazuya Koyama*, Hiroshi. Kamigakiuchi, Kazuhiro Iwashita, Ryosuke Mochioka, and Nami Goto-Yamamoto
2. 発表標題 Polyphenolic diversity and characterization in the red-purple berries of East Asian wild Vitis species
3. 学会等名 10th international symposium of grapevine physiology & biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>最近の研究成果  <a href="http://www.nrrib.go.jp/data/seika/NewSeika.htm">http://www.nrrib.go.jp/data/seika/NewSeika.htm</a></p>
---

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