

令和 5 年 3 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18629

研究課題名(和文)ブドウ果皮アントシアニン高含有・果肉着色化の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of high anthocyanin accumulation and flesh coloration in grape

研究代表者

東 暁史(AZUMA, Akifumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員

研究者番号：00391475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：果皮が赤色で果肉が無着色のブドウ「紅高」から、果皮アントシアニン高含有(黒色)で果肉も着色する「ブラジル」への変異機構を解明するため、両品種の着色遺伝子領域のDNAメチル化レベルを解析した。「紅高」果皮と果肉のメチル化レベルは「ブラジル」よりも成熟期を通して明らかに高く、着色関連遺伝子群の遺伝子発現量は果皮、果肉ともに「ブラジル」で著しく高くなっていた。このことから、「紅高」から「ブラジル」が生じた原因は「紅高」果皮、果肉組織の着色遺伝子領域のメチル化レベルが著しく低下したことで、「ブラジル」果皮、果肉における着色遺伝子の発現量が増加し、アントシアニン合成系の活性が高まったためと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ブドウのアントシアニン合成を制御する着色遺伝子座のDNAメチル化レベルの解析を着色変異個体を用いて行い、果皮アントシアニン含有量ならびに果肉着色化の新たな制御機構を明らかにした初めての例であり、学術的な意義が高い。また、本研究は温暖化に対応した優良着色品種の開発、ならびに果肉着色個体の効率的な作出に寄与できると期待されることから、今後の我が国におけるブドウ産業の活性化につながる成果として社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of color mutation from red-skinned 'Benitaka' to black-skinned with red-fleshed 'Brazil'. The DNA methylation levels in the promoter region of VvMYBA1BEN allele in both cultivars were analyzed. Methylation levels of 'Benitaka' in skin and flesh were clearly higher than in that of 'Brazil' through the maturation stages. In addition, expression levels of VvMYBA1 and anthocyanin biosynthesis related genes were significantly higher in 'Brazil' for both skin and flesh than that of 'Benitaka'. These results suggest that the color mutation from 'Benitaka' to 'Brazil' was caused by the drastic decrease of DNA methylation level at the promoter region of VvMYBA1BEN. We concluded that this mutation accelerate the expression levels of anthocyanin biosynthesis related genes and anthocyanin accumulation in skin and flesh in 'Brazil'.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：アントシアニン ブドウ エピゲノム 着色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

研究実施者らは、これまでにブドウの着色遺伝子座のゲノム構造の変化による果皮色変異機構を解明してきた。しかし、果皮が赤色で果肉が無着色の「紅高」(べにたか)から、果皮アントシアニン高含有(黒色)で果肉も着色する「ブラジル」への変異機構は不明であった。

#### 2. 研究の目的

ブドウのアントシアニン合成を制御する着色遺伝子座の DNA メチル化レベルの解析を、「紅高」ならびに「ブラジル」を用いて行い、果皮アントシアニン含有量ならびに果肉着色化の新たな制御機構を明らかにする。本研究で「ブラジル」の出現機構を明らかにすることにより、果皮アントシアニン含有量および果肉着色の制御機構が解明され、優良着色ブドウの効率的な作出に寄与できると期待される。

#### 3. 研究の方法

平成 27 年度：「紅高」、「ブラジル」の果皮アントシアニン含量ならびに着色関連遺伝子群の経時的発現変動を調査した。また、両品種の着色遺伝子座に存在し、着色誘導機能を有する *VvMYBA1<sup>BEN</sup>* アレルのプロモーター領域の DNA メチル化レベルをバイサルファイトシーケンス法で解析するためのプライマー設計を行った。

平成 28 年度：平成 27 年度に「紅高」と「ブラジル」の着色遺伝子座に存在する *VvMYBA1<sup>BEN</sup>* アレルのプロモーター領域を網羅する 2 組のプライマーセットを設計し、想定サイズの PCR 増幅産物を得ることができた。平成 28 年度は、両品種の完全着色期果皮のバイサルファイト処理済 DNA から得た PCR 増幅産物を数十クローンずつクローニングし、シーケンス解析を行った。

平成 29 年度：両品種の DNA メチル化レベルの時期別、組織別変動を解析するために、多検体の DNA メチル化レベル解析に適した方法である quantitative methylation specific PCR (qMSP) 法の検討を行った。バイサルファイトシーケンスにより取得したバイサルファイト処理後の *VvMYBA1<sup>BEN</sup>* アレルのシーケンス情報を利用して、メチル化 DNA 検出用と非メチル化 DNA 検出用のプライマーを MethPrimer により設計した。

平成 30 年度：平成 29 年度に設計したプライマーは非特異的増幅産物が生じるなど、結果の安定性にやや問題があった。そこで平成 30 年度は、より精度の高いデータを得るためのプライマーの再設計を行った上で、「紅高」、「ブラジル」の各組織(果皮、果肉、葉)における DNA メチル化レベルの経時的変動を調査した。さらに同様のサンプルを用いて着色関連遺伝子の経時的発現量を調査し、DNA メチル化レベルとの関係を解析した。

#### 4. 研究成果

平成 27 年度：果皮アントシアニンの蓄積は両品種ともベレゾーン後から開始したが、その後のアントシアニン増加量は両品種間で大きく異なり、収穫時の「ブラジル」果皮のアントシアニン含量は「紅高」の約 3.6 倍となった。また、*VvMYBA1*、*CHS3*、*F3'5'H*、*AOMT* などの遺伝子発現量は両品種ともベレゾーン期に増加したが、いずれも「ブラジル」での発現量が「紅高」よりも著しく高く推移した。以上の結果から、「ブラジル」での果皮アントシアニン含量の増加は、*VvMYBA1* の転写能力が何らかの機構で向上し、それによりアントシアニン合成系酵素遺伝子群の働きが向上したためであると考えられた。次に、*VvMYBA1<sup>BEN</sup>* プロモーター領域の DNA メチル化レベル解析に用いるために設計した複数のプライマーセットのうち、Set1 と Set2 の領域で設計した 2 組のプライマーセットにより *VvMYBA1<sup>BEN</sup>* プロモーター領域を網羅できた。これらのプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った結果、Set1、Set2 ともに想定したサイズの PCR 増幅産物を「紅高」、「ブラジル」のバイサルファイト処理済 DNA から得ることができた。

平成 28 年度：得られたシーケンス情報を基に、両品種の DNA メチル化パターンやメチル化レベルの比較解析を行った結果、DNA メチル化が生じうる CpG サイトが Set 1 と Set 2 に存在することが分かった。CpG サイトのメチル化レベルを両品種間で比較すると、「紅高」の *VvMYBA1<sup>BEN</sup>* におけるレトロトランスポゾン (Gret1) の 3' LTR 領域に存在する CpG サイトのメチル化レベルが高く維持されていたのに対し、「ブラジル」では著しく低下していた。一方、3' LTR より下流のプロモーター領域における CpG サイトのメチル化レベルは両品種とも概ね 0.0% であった。以上のことから、「紅高」で高レベルに維持されていた 3' LTR 領域の DNA メチル化レベルが「ブラジル」では著しく低下した結果、近傍の *VvMYBA1* 遺伝子の発現量が増加し、これによりアントシアニン合成系の活性が高まったことで果皮色が紫赤色から紫黒色に変異した可能性が示唆された。

平成 29 年度：設計したプライマーを用いることで、増幅効率・特異性が比較的良好なデータを得ることができた。このプライマーを用いて、完全着色期における「紅高」と「ブラジル」の

果皮ならびに葉組織の DNA メチル化レベルを解析したところ、「紅高」果皮では高く維持されていたのに対し、「ブラジル」果皮ではバイサルファイトシーケンス法で得られた結果と同様に、DNA メチル化レベルが著しく低下していることが明らかになった。さらに、葉の DNA メチル化レベルは両品種とも著しく高く、葉組織においては DNA メチル化により *VvMYBA1* の発現が強く抑えられていることが示唆された。

平成 30 年度：果皮の DNA メチル化レベルは、両品種とも成熟が進むにしたがって低下する傾向があったが、「紅高」果皮のメチル化レベルは「ブラジル」よりも常に高く推移した。果肉のメチル化レベルは、「紅高」では収穫期以外は高く維持されていたのに対し、「ブラジル」では果皮と同様に成熟が進むにしたがって低下した。一方、葉のメチル化レベルは両品種ともに高く維持されていた。

果皮の *VvMYBA1* 発現量は、両品種ともベレゾーン期から増加したが、着色開始期以降は「紅高」よりも「ブラジル」の発現量が高くなった。果肉の *VvMYBA1* 発現量は、「紅高」ではほとんど発現していなかったのに対し、「ブラジル」では果皮と同様にベレゾーン期から急激に増加した。一方、葉においては両品種とも *VvMYBA1* の発現は認められなかった。アントシアニン合成系遺伝子群についても、*VvMYBA1* と同様に「ブラジル」果皮と果肉での発現量が「紅高」と比較して明らかに高くなった一方、葉では両品種とも発現が認められなかった。

以上の結果から、「紅高」から「ブラジル」が生じた原因は、「紅高」果皮、果肉組織の着色遺伝子座における *VvMYBA1<sup>BEV</sup>* 近傍のレトロトランスポゾン (3' LTR 領域) に存在する CpG サイトのメチル化レベルが何らかの原因で著しく低下したことで、果皮、果肉における *VvMYBA1* 遺伝子の発現量が増加し、その結果、アントシアニン合成系の活性が高まったためと考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

論文執筆準備中

〔学会発表〕(計 0 件)

学会発表(園芸学会)準備中

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。