

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780029

研究課題名(和文) 果実におけるフラボノイド蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Shed light on the flavonoid accumulation of fruit

研究代表者

片山 礼子(池上礼子)(Katayama-Ikegami, Ayako)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00549339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：プロアントシアニン蓄積に関与すると考えられるカキDkDHD/SDH、DkSCPL1とDkSCPL2の機能解析のため、アグロバクテリウム法を用いたカキの形質転換とDkDHD/SDHではBL21 aroE::KanR (DE3)を用いた相補実験を行った。DkSCPLについては結果が得られなかったが、DkDHD/SDHはシキミ酸経路における機能が確認された。次に、赤色系ブドウ品種にABAおよびIAA処理を行い果皮のアントシアニン蓄積に関する影響を調査したところ、ABAは赤色よりも青・紫色系のアントシアニンの蓄積を転写因子MybAを介して誘導すること、IAAはこれらの生成を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to characterize DkDHD/SDH, DkSCPL1 and DkSCPL2, which is supposed to be involved in proanthocyanidin accumulation in persimmon fruit, we tried transformation of persimmon leaf with these genes using *Agrobacterium tumefaciens*, and also production of DkDHD/SDH with *Escherichia coli* BL21 (DE3) for complementation assay. We could not obtain clear results for DkSCPLs. As for DkDHD/SDH, transformation by antisense DkDHD/SDH reduce the production of proanthocyanidin, and complementation of BL21 delta aroE::KanR (DE3) with pET3a-DkDHDSDH shows this protein works as SDH in shikimic pathway. Secondly, we applied ABA and IAA to red grape cultivars around varaison to clear the effect of these plant hormones at anthocyanin accumulation of berry skin. The results indicated that the ABA treatment induces the accumulation of blue-purple anthocyanins via MybA transcription factor, while the IAA treatment reduce s it.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：果樹 フラボノイド アントシアニン プロアントシアニン シキミ酸 カキ ブドウ ABA

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは植物の防御に関わる二次代謝産物であり、防虫・防菌効果やUV防止効果を持つ。また、アントシアニンなどの色を呈するものは、花や果実の色を鮮やかに魅力的にし、植物の生殖や種子の散布などに貢献する重要な要素である。一方、我々人間にとっても、抗酸化、抗ガン、抗アレルギー、抗炎症、血中コレステロール低下、抗菌・抗ウイルス作用など様々な機能性を持っており、薬理学的にも注目され研究されている。

フラボノイド合成については近年、モデル植物を用いて急速に研究が進み、多くの酵素や転写因子が単離・特性化されているものの、生合成経路の下流のステップ、特に液胞への輸送に関してはまだ未解明な部分が多い。植物細胞では、フラボノイドは小胞体の細胞質側に面した膜上で酵素複合体によって生成され、その後液胞へと輸送されることが仮定されているが、この酵素複合形成についても解明すべき部分が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 渋み物質である高分子の縮合型タンニンを果肉中に蓄積するカキ、(2) 果実成熟期に急激に果皮に色素であるアントシアニンを蓄積するブドウを材料として用い、果実における二次代謝産物であるフラボノイドの蓄積メカニズムを解明し、これらの知見を栽培生理に活かし果樹産業へ貢献することを大きな目的としている。

3. 研究の方法

(1) カキ これまでにプロアントシアニジン(PA)生合成と関与が示されていない遺伝子群、すなわち、2種類の *serine carboxypeptidase-like protein (DkSCPL1, DkSCPL2)*、*3-dehydroquininate dehydratase-shikimate:NADP oxidoreductase (DkDHD/SDH)* をベクター-pGWB2 に組み込み35S プロモーターに連結したセンス、アンチセンスの両コンストラクトを作製した。これをアグロバクテリウム法 (EHA101 株) により、カルスにプロアントシアニジンを多く蓄積するカキ、蓄積しないキウイフルーツに形質導入をした。

なお、DkSCPL1, DkSCPL2 については大腸菌での融合タンパク質の発現をいくつかの宿主で試みたが、いずれにおいても可溶性のタンパク質は発現しなかった。次に His タグを付加したコンストラクトを作製してウイルスベクターを用いたタバコ BY2 培養細胞の形質転換により、タンパク質を過剰発現させ、この培養細胞の粗抽出液と、β-glucogallin および(-)epigallocatechin を基質として *in vitro* アッセイを試みたが成功しなかった。

また DkDHD/SDH については *Escherichia coli* BL21(DE3) に *AroE::Kan<sup>R</sup>* を相同組換えにより導入した BL21 *aroE::Kan<sup>R</sup>* (DE3) を用いて、*pET3a-DkDHDSDH* (no-tag) による相補実験を行った。

次に、形質転換カルスの PA を抽出し、Folin Ciocalteu 法により可溶性フェノール含量 Acid Butanol 法により PA 量を測定した。をまた、PA の構成ユニットについて、フロログロシノールを用いた酸による PA の開裂を行い、これを HPLC を用いることで分析した。

なお、SCPL はこれまでにアシル基転移酵素として機能するという報告があり、他植物における形質転換体の発現解析においても PA の転写因子である Myb により制御されていると考えられるため、カキ果実におけるプロアントシアニジンのガレート生成に関連しているのではないかと仮定している。また、DHD/SDH はシキミ酸生合成系の 3 番目と 4 番目のステップを触媒する酵素であるが、ガレートの構成要素である没食子酸を 3 デヒドロシキミ酸からの直接の生成を触媒するという報告があるため(図 1)、DkDHD/SDH がこの反応を触媒するかを調査する。

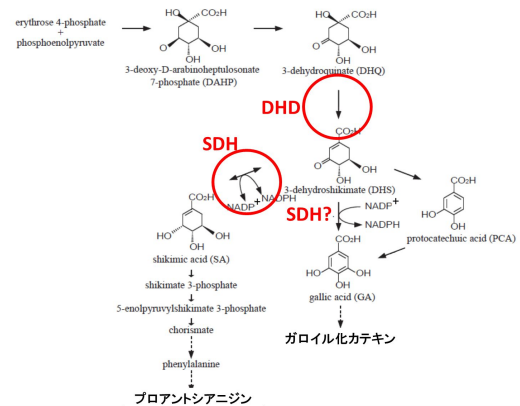


図1 シキミ酸経路

(2) ブドウ 石川県立大学附属農場に植栽されている赤色系品種である‘安芸クイーン’、‘ハニーレッド’、‘デラウェア’の各果房に ABA(ミヨビ、終濃度 400ppm, 200ppm)、あるいは ABA400ppm にオーキシンを加えた処理 (+IAA250ppm、‘ハニーレッド’には+CPA5ppm、+CPA50ppm、+CPA250ppm)を浸漬処理した。2009 年における各処理条件を表 1 から表 3 に示す。

表 1 ‘安芸クイーン’果房に対するホルモン処理(2009)

処理時期	45DAF	54DAF	61DAF
ABA400ppm	8 房	8	8
ABA200ppm	8	8	8
ABA400+IAA250ppm	8	8	-

表 2 ‘ハニーレッド’果房に対するホルモン処理(2009)

処理時期	45DAF	54DAF	61DAF
ABA400ppm	8 房	8	8
ABA200ppm	8	8	8
ABA400+IAA250ppm	8	8	-
ABA400+CPA5ppm	8	8	-
ABA400+CPA50ppm	8	8	-
ABA400+CPA250ppm	8	8	-

処理時期	43DAF	49DAF	58DAF
ABA400ppm	8房	8	8
ABA200ppm	8	8	8

また、2010年にも'安芸クイーン'、'ハニーレッド'および'デラウェア'に、ベレゾーン期のみ、'デラウェア'では50ppm、100ppm、200ppmのIAAを、'安芸クイーン'および'ハニーレッド'では200ppmと400ppmのABA、400ppmのABAに50ppm・100ppm・200ppmのIAAを混合したもの、200ppmのIAAを各8房ずつ処理した。さらに、石川県農業総合研究センター砂丘地試験場に植栽されている赤色系品種'ルビーロマン'について、ベレゾーン期に800ppmのABA、800ppmのABAに200ppmのIAAを混合したもの、200ppmのIAAを各4房ずつ処理した。

これらの果実について、果実肥大、糖度および酸度を経時的に調査すると共に、果皮を凍結、保存して後にアントシアニン含量、HPLCによるアントシアニン組成、'安芸クイーン'については量的リアルタイムPCR法によりフラボノイド生合成経路の構造遺伝子(*PAL*, *CHS*, *DFR*, *F3'H*, *F3'5'H*, *ANS*, *UFGT*, *ANR*, *FLS*)と下流の輸送に関わるもの(*GST*, *MATE*)、メチル化酵素(*OMT*)とアシル化酵素(*CaOMT*)と転写因子(*MybA*, *MybPA1*, *MybPA2*, *Myb5a*, *Myb5b*)についてq real-time-PCRにより調査した(図1)。実験に使用したプライマーセットはそれぞれ'安芸クイーン'配列を確認し設計し、解析は比較C<sub>T</sub>(C<sub>T</sub>)法により定量実験を行った。

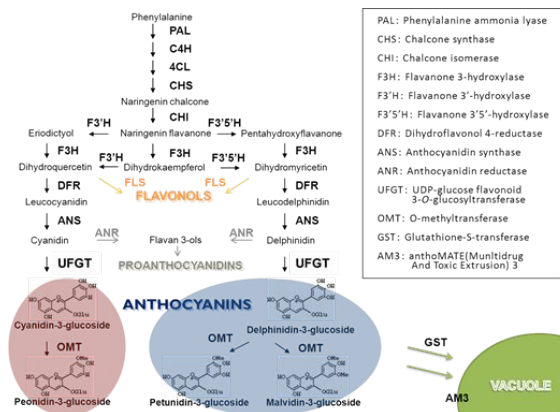


図2 アントシアニン生合成経路

#### 4. 研究成果

##### (1) カキ

*DkSCPL* および *DkDHD/SDH* の形質転換カルスについて分析を行ったところ、それぞれ、*DkSCPL1* はキウイの組換え体センス1個体、*SCPL2* はカキの組換え体センス1個体、アンチセンス4個体、キウイセンス1個体、*DkDHD/SDH* はカキアンチセンス4個体しか得られなかった。これらの組換え体についてFolin Ciocalteu法により可溶性フェノール含量(図3)、Acid Butanol法によりPA量(図4)

を測定したところ、可溶性フェノール含量については差が見られなかったものの、PA量については*DHD/SDH* アンチセンス個体で低下しており、*SCPL2* センス個体で増加していた。ただし、*SCPL2* については1個体しか得られていないため、さらなる形質転換体の獲得が必要である。次に、それぞれのPA構成について調査したところ、*SCPL2* はセンス、アンチセンスともに、大きな差が認められなかったが(図5)、*DHD/SDH* アンチセンス個体においては、得られた4つの形質転換体すべてにおいてPA量と共にextension unitの減少が見られており、*DkDHD/SDH* のPA生合成への関与が示唆された。

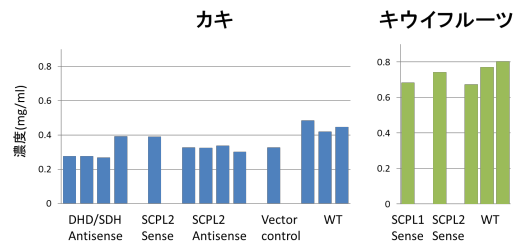


図3 形質転換カルスの可溶性フェノール含量

それぞれの棒グラフは形質転換体、ベクターコントロール、あるいはカキ'藤原御所'キウイ'ヘイワード'野生型(非組換えカルス)を示している。

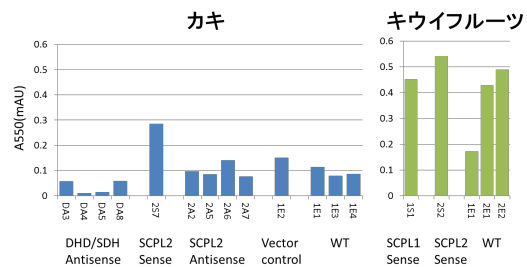


図4 形質転換カルスのPA含量

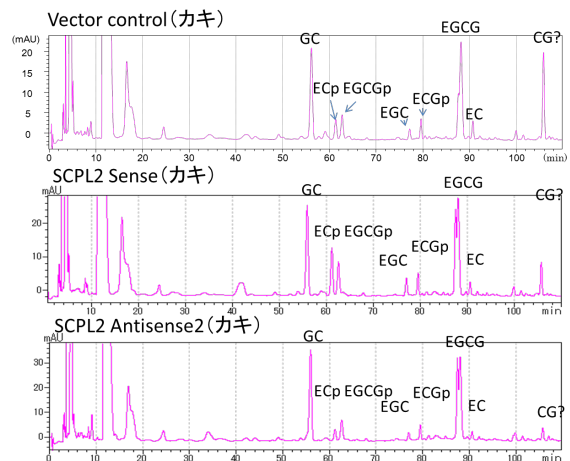


図5 *DkSCPL2* 形質転換カルスのPA組成(それぞれ1個体のみのPA組成を示した)

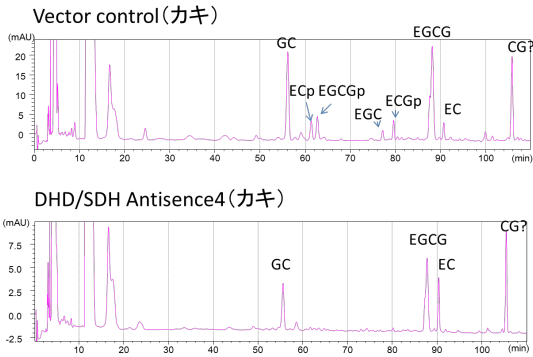


図6 DkDHD/SDH 形質転換カルスのPA組成(それぞれ1個体のみ)のPA組成を示した)

次に、DkDHD/SDH の BL21 *aroE::Kan<sup>R</sup>* (DE3) の *pET3a-DkDHDSDH* による相補実験を行った(図7)。DkDHD/SDH の N 末端領域の長さにより活性の強さが左右されたものの、このタンパク質にシキミ酸経路(図1)における本来の SDH 活性が確認された。通常、DHD/SDH は N 末端領域に葉緑体移行シグナルを有しているが、DkDHD/SDH はこれを有しているか否かがはっきりしておらず、今後全長をクローニングした上で、*in vitro* での機能を明らかにする必要があると考えられた。また、全長を明らかにした上で、いくつかの N 末端領域をもつ組換え体を作製し、詳細な SDH 活性を調査する予定である。

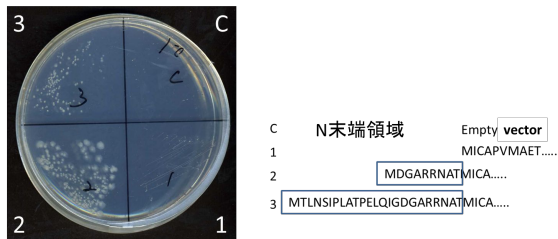


図7 BL21 *aroE::Kan<sup>R</sup>* (DE3) の *pET3a-DkDHDSDH* による相補

## (2) ブドウ

ABA およびオーキシシン処理用いた果実は通常の果実肥大、糖の増加と酸度の減少を示した。それぞれの処理を施したところ、2009年、2010年ともに‘安芸クイーン’と‘ハニーレッド’では ABA により着色促進、オーキシシンにより着色抑制が起こった(図8‘安芸クイーン’のみ)。また、‘ルビーロマン’では ABA による着色促進がおこったものの、IAA200ppm 処理では抑制が起らなかった。なお、デラウェアについてはいずれも処理効果が認められなかった。次に、アントシアニン含量を調査したところ、ABA によりアントシアニン含量が増加し、オーキシシンにより減少がみられた(図9)。また、ABA 処理では濃度が高くなると果皮の深色化がみられ、HPLC によりアントシアニン組成を調査すると、濃度依存的に青や紫を呈するアントシアニンの B 環が3つヒドロキシル化された delphinidin、あるいはそれらがメチル化された malvidin、petunidin を骨格とするものの割合が増加し

ていた(データ省略)。



(45DAF 処理)  
(54DAF 処理)



(61DAF 処理)

図8. ‘安芸クイーン’の ABA およびオーキシシン処理を行った果実の収穫時の写真 (2009)

1:control、2:ABA200ppm、3:ABA400ppm、4:ABA400ppm + IAA250ppm

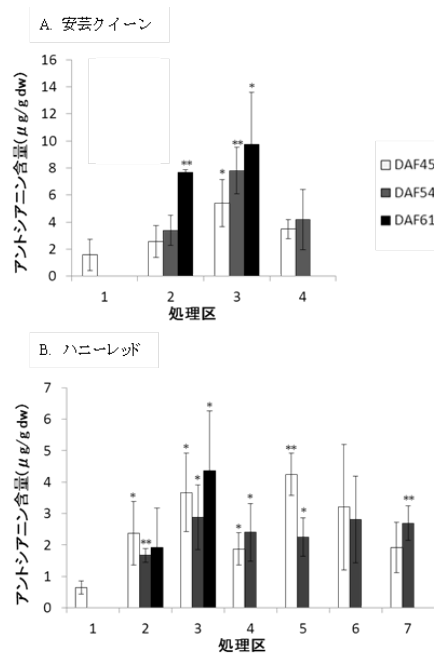


図9. 収穫果果皮の total アントシアニン (2009)  
(1:control、2:ABA200ppm、3:ABA400ppm、4:ABA400ppm + IAA250ppm) 範囲は標準偏差を表す (n=3)

\*:0.01<P<0.05 \*\*:P<0.01

次に、2009年の‘安芸クイーン’に、45DAF に 400ppm の ABA を処理した果実の果皮について、量的 real-time PCR によるアントシアニン生合成系遺伝子群の発現解



析を行った。測定した遺伝子群うち、アントシアニン生合成に関わる転写因子である *VIMyA1*、生合成キ酶素をコードする *VIUFGT*、アントシアニンの輸送に関わる *VIGST*、液胞への取り込みを行う *VIAM3*、フラボノイドの B 環のヒドロキシル化に関わる *VIF3'5'H* と *VIF3'H*、メチル化に関わる *VIOMT* の発現量が ABA 処理により有意に増加していた。これに対し、アントシアニンを基質として競合し、プロアントシアニジンの生合成のキ酶素をコードする *VIANR* やプロアントシアニン生合成の転写因子である *VIMyPA1*、*VIMyPA2*、アントシアニンとプロアントシアニン両生合成経路の転写因子である *VIMy5a*、*VIMy5b*、プロアントシアニン、アントシアニン両生合成経路で共通して働く *VIDFR* については ABA 処理、非処理果間における発現の有意差は見られなかった。このことから、ABA 処理は MybA を介してアントシアニン生合成経路下流の UFGT、液胞への輸送と B 環のヒドロキシル化およびメチル化を誘導し、より高い濃度で果皮の深色化を誘導する可能性が示唆された。なお、遺伝子の発現解析については 1 年度の実験しか遂行していないため、年次反復を行っての確認が必要であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- 1 Akagi, T., Y. Suzuki, A. Ikegami, H. Kamitakahara, T. Takano, F. Nakatsubo, and K. Yonemori. 2010. Condensed tannin composition analysis in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit by acid catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 79:275-281. DOI: 10.2503/jjshs1.79.275
- 2 Akagi T, A. Ikegami, T. Tsujimoto, and K. Yonemori. 2010. DkMyb2 wound-induced transcription factor of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), contributes to proanthocyanidin regulation. *Planta* 232:1045-59. doi:10.1007/s00425-010-1241-7.
- 3 Ikegami, A., S. Eguchi, T. Akagi, A. Sato, M. Yamada, S. Kanzaki, A. Kitajima, and K. Yonemori. 2011. Development of molecular markers linked to the allele associated with the non-astringent trait of the Chinese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 80:150-155. DOI: 10.2503/jjshs1.80.150
- 4 Akagi T, Tsujimoto T, Ikegami A, Yonemori K. 2011. Effects of seasonal temperature changes on DkMyb4 expression involved in proanthocyanidin regulation in two genotypes of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Planta* 233:883-94. DOI:10.1007/s00425-010-1346-z

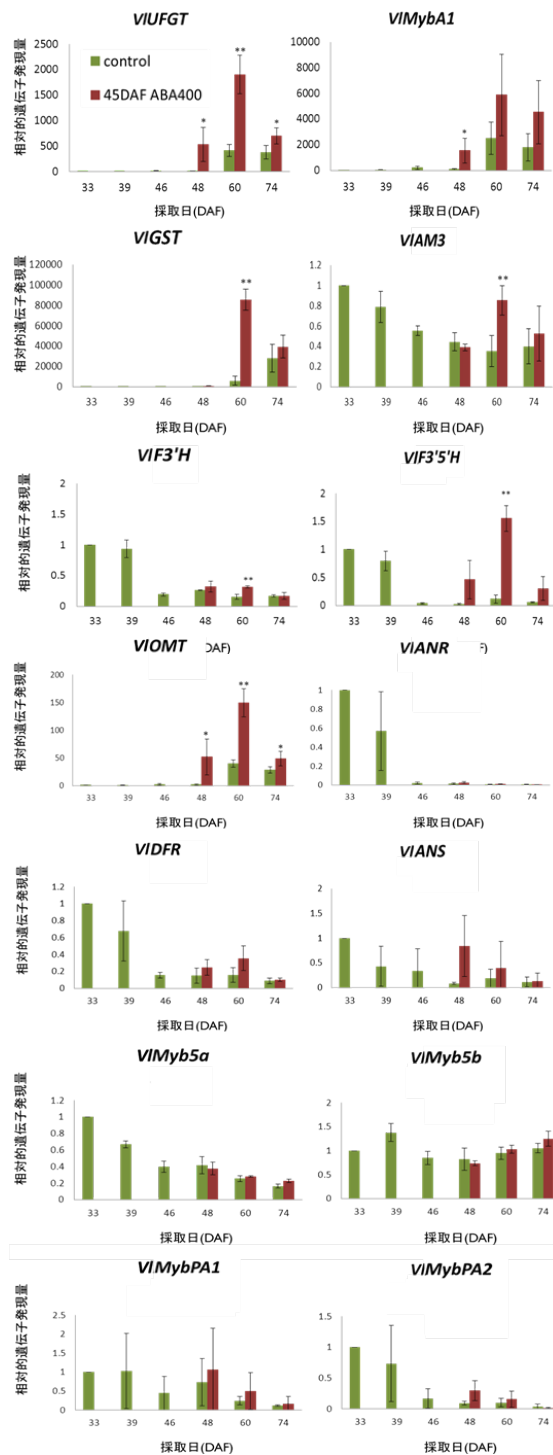


図 10. ‘安芸クイーン’で経時的に採取した果皮における遺伝子および転写因子の発現解析 (生物学的反復=3、実験反復=2)

- 5 Akagi, T., A. Katayama-Ikegami\*, and K. Yonemori. 2011. Proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Scientia Horticulturae* 130:373-380. (\*corresponding author). DOI:10.1016/j.scienta.2011.07.021

- 6 Akagi, T., A. Katayama-Ikegami, S. Kobayashi, A.Sato, A.Kono, and K. Yonemori. 2012. Seasonal abscisic acid signal and a basic leucine zipper transcription factor, DkbZIP5,

regulate proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. *Plant Physiol.* 158: 1089–1102.

DOI:10.1104/pp.111.191205

- 7 片山(池上)礼子・米森敬三・佐藤明彦・山田昌彦・羽生 剛・北島 宜. 2013. 中国の完全甘ガキ後代における甘渋性と果形との関連性. *園芸学研究*. 12:29-34. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/hrj/12/1/12\\_29/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/hrj/12/1/12_29/_pdf)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1 澁谷佳奈・高居恵愛・片山礼子. 2011. 赤色系ブドウにおける植物生長調節物質(アブシジン酸およびオーキシン)処理の影響. 平成 23 年度園芸学会北陸支部会.
- 2 武石浩二・高居恵愛・片山礼子・田尾龍太郎. 2011. 花成関与遺伝子である *FT* および *TFL1* によるカキおよびキウイフルーツの形質転換. 平成 23 年度園芸学会北陸支部会.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山 礼子 (KATAYAMA, Ayako)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00549339