

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580038

研究課題名(和文)ブドウの香り生合成調節機構の解明とその応用：革新的ブドウ栽培技術への展開

研究課題名(英文) Biosynthesis of aroma compounds in grape berries: development of a novel practice for aroma compounds in wine

研究代表者

鈴木 俊二 (SUZUKI, Shunji)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60372728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グレープフルーツ様のアロマを持つ3-メルカプトヘキサノール(3MH)の前駆体として、システニルグリシン抱合体を果実から検出し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼVvGST3およびVvGST4を本生合成系の鍵酵素として特定した。環境ストレス処理によって3MH前駆体生合成は促進され、併せてVvGST3、VvGST4の発現量も増加した。果実に含まれる3MH前駆体の推移は、栽培地域の標高に大きく左右されたが、いずれの栽培地域においても3MH前駆体蓄積量のピークは開花後16-18週頃であった。3MH前駆体の蓄積は日周性を示し、日の出付近の果実で最も多く蓄積し、日中から日の入りにかけて減少した。

研究成果の概要(英文)：S-(3-hexan-1-ol)cysteinyglycine, which are proposed as the flavor precursors of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) in grape berries, was detected using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Synthesis of 3MH precursors was catalyzed by glutathione S-transferases (VvGST3 and VvGST4). Accumulation of 3MH precursors was enhanced in berries treated with various environmental stresses in accordance with upregulation of VvGST3 and VvGST4 gene expression. 3MH precursors were highly accumulated at 16-18 weeks post-flowering. The accumulation of 3MH precursors in berries increased in early morning and decreased during the day.

研究分野：園芸学

キーワード：ブドウ 香り 3-メルカプトヘキサノール 環境ストレス 日周性 ワイン

1. 研究開始当初の背景

ワインの品質を決定する重要な表現型の一つは香りである。ブドウ果実由来の香りはブドウ果実アロマと呼ばれ、ブドウが共通にもつ香りと、ブドウ品種独自の香りとに二分される。後者は「品種香」「特徴香」と呼ばれ、ブドウ品種に由来するワインの個性として表現される。例えば、'カベルネ・ソーヴィニオン'は「カシス」、'メルロ'は「プラム」、'ソーヴィニオン・ブラン'は「パッションフルーツ」の香りが品種香である。ブドウ果実アロマはブドウ果実の品質に大きく影響されるため、ブドウ果実アロマに着眼したブドウ栽培技術が求められているが、ブドウ果実アロマに関する科学的知見から新規栽培技術の開発を目指す研究は数少ない。その理由として、ブドウ果実において多くのブドウ果実アロマの生合成過程が未解明であることが挙げられる。

日本固有醸造用ブドウ品種'甲州'の果実品質向上のため、'甲州'ワインに潜む'甲州'果実の特徴香を探索した結果、パッションフルーツの香りを持つ3-メルカプトヘキサノール(3MH)が同定された(Kobayashi et al. Am. J. Enol. Vitic. 2010)。3MHは世界で広く栽培されている'ソーヴィニオン・ブラン'の品種香でもあることから、'ソーヴィニオン・ブラン'の栽培が盛んなフランス、オーストラリア、ニュージーランドではこの香りに関する研究が非常に盛んである。ボルドー大学の研究チームと研究代表者らの研究から、グルタチオン抱合体 S-3-(hexan-1-ol)-glutathione、システイン抱合体 S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine が3MH前駆体としてブドウ果実で生合成され、ワイン醸造中のワイン酵母の働きにより、これら3MH前駆体から3MHが合成される「3MH生合成経路」が提唱された(図1)。しかし、この生合成経路には推察部分(図1の枠内)が多く、その全容解明に向け、世界の研究者が今まさに競い合っている。

本研究では、世界に先駆け、3MH前駆体の生合成過程の全容を解明することを目指し、加えて、それら知見を応用し、3MH前駆体をブドウ果実に多く蓄積させるための新規ブドウ栽培技術の開発へと展開することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、以下に掲げる研究項目および各研究項目における解決すべき具体的な問題点を解決することにより、3MHの生合成過程の全容解明を目指す。その後、ブドウ果実に3MH前駆体を多く蓄積させるためのブドウ栽培技術開発へと展開する。

研究項目(1)  
3MH前駆体の生合成過程の全容解明

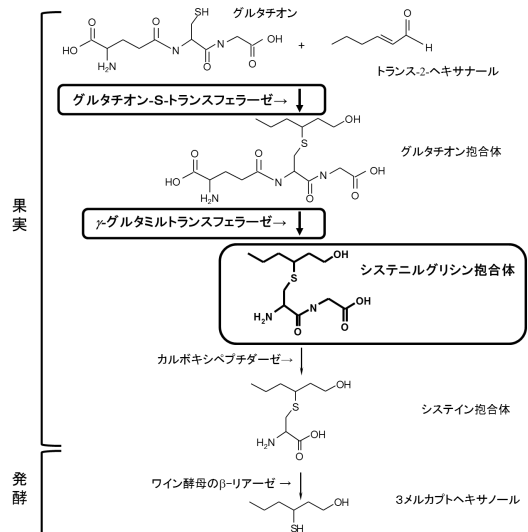


図1 現在までに提唱されている3MH生合成過程  
枠: 本研究で解明する未解明なポイント

現在提唱されている3MH前駆体生合成過程の一部は、反応生成物の化学構造式から単に推定されたものである(図1)。本研究では、未だ解明されていない以下の2点を明らかにする。

1. システニルグリシン抱合体をブドウ果実およびワイン中から検出する
2. グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびγ-グルタミルトランスフェラーゼが3MH前駆体生合成反応を触媒することを証明する

研究項目(2)

3MH前駆体の生合成を調節する分子機構の解明

ストレス応答性を示すグルタチオン-S-トランスフェラーゼの関与が推察される生合成系であることから、3MH前駆体生合成系を調節する分子機構の一つとして、ブドウ果実の環境ストレス応答性に注目する。事実、ボトリチス菌が感染したことによって造られる貴腐ワインは3MH含有量が非常に高いことが報告されている(Sarrazin et al. J. Agric. Food Chem. 2007)。

研究項目(3)

3MH前駆体生合成量を増大する栽培環境の特定

栽培環境(気候条件、土壌条件、肥料施肥や仕立て方法などの栽培条件)による3MH前駆体生合成量の違いを検討する。

研究項目(4)

3MH前駆体生合成を活性化する栽培技術の確立

基礎的研究で明らかになる3MH前駆体生合成調節機構と3MH前駆体が蓄積しやすい栽培環境を組み合わせ、3MHを多く

蓄積する‘甲州’果実の生産に向けた栽培技術の開発を行う。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目(1)

##### 3MH前駆体の生合成過程の全容解明

本実験では、‘甲州’よりも3MH前駆体を多く含む‘ソーヴィニヨン・ブラン’を用いた。LC/MS/MS分析[LC-20A Prominence HPLCシステム(島津製作所)、API 3200 QTRAP LC/MS/MSシステム(Applied Biosystems)]にて、人工合成したシステニルグリシン抱合体を検出することを試みた。

次に、上記方法により、‘甲州’、‘シャルドネ’、‘ソーヴィニヨン・ブラン’、‘リースリング’などの白ブドウの果実に含まれるシステニルグリシン抱合体を検出した。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼが3MH前駆体生合成系に参与することを証明するため、Hisタグ融合タンパク質として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼを大腸菌から精製した。精製タンパク質と基質を反応させ、3MH前駆体合成量により、触媒活性を評価した。

#### 研究項目(2)

##### 3MH前駆体の生合成を調節する分子機構の解明

本実験では‘甲州’、‘シャルドネ’、‘ソーヴィニヨン・ブラン’、‘リースリング’など白ブドウの果実および苗木を用いた。これらブドウ試料に環境ストレスを負荷した。負荷した環境ストレスは、乾燥ストレス、高温ストレス(40度)、低温ストレス(4度)、UV照射、そして、ボトリチス菌およびべと病菌感染ストレスである。各環境ストレスが正確に負荷されているか否かは、各環境ストレスに呼応して発現が誘導されるストレスマーカー(例えば、乾燥ストレスであれば水ポテンシャルおよびアブシジン酸量、高温ストレスであればHeat Shock Proteinの発現)で判断した。環境ストレスを負荷したブドウ試料における3MH前駆体量およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびγ-グルタミルトランスフェラーゼ遺伝子発現量を測定した。

#### 研究項目(3)

##### 3MH前駆体生合成量を増大する栽培環境の特定

本実験では、標高が異なる産地を設定する必要があるため、山梨県内で広く栽培されている‘甲州’を研究対象品種とした。栽培環境として、気候条件(標高を含む)が異なる実験圃場を設定し、その他の栽培条件は出来る限り均一にした。

開花後一定期間ごとに、各栽培環境で栽培された‘甲州’果実を採取し、3MH前駆体量を測定した。

#### 研究項目(4)

##### 3MH前駆体生合成を活性化する栽培技術の確立

3MH前駆体生合成を活性化する栽培技術として、ナイトハーベストを検討した。山梨県甲州市勝沼町および長野県須坂市高山村にあるブドウ畑を試験圃場とした。

開花後16週目にかけて勝沼町の圃場から‘シャルドネ’果粒を1日の中で数時間おきにサンプリングした。別圃場から‘シャルドネ’、‘ソーヴィニヨン・ブラン’、‘リースリング’果粒をそれぞれ1日の中で2から4時間毎にサンプリングした。ブドウ果実を搾汁した後、果汁中の3MH前駆体量を測定した。

高山村の圃場で栽培した‘シャルドネ’は、早朝(AM 5:00前後)と日中(PM 12:00前後)に収穫した。ブドウを搾汁した後、3MH前駆体量を測定した。ワイン酵母を用いて各果汁からワインを醸造した後、ワイン中の3MH含有量を測定した。

### 4. 研究成果

#### 研究項目(1)

##### 3MH前駆体の生合成過程の全容解明

LC/MS/MS分析により、人工合成したシステニルグリシン抱合体と同じEPIのフラグメントパターンをブドウ試料から検出することに成功した。この結果は、グルタチオン抱合体、システニルグリシン抱合体、システイン抱合体の順に生合成過程が進むことを示唆した。グルタチオン抱合体およびシステイン抱合体に比べ、検出されたシステニルグリシン抱合体は微量であったことから、グルタチオン抱合体から変換されたシステニルグリシン抱合体は直ぐにシステイン抱合体に転換されると推察された。

ブドウにはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子が5つ(VvGST1~VvGST5)-グルタミルトランスフェラーゼ遺伝子

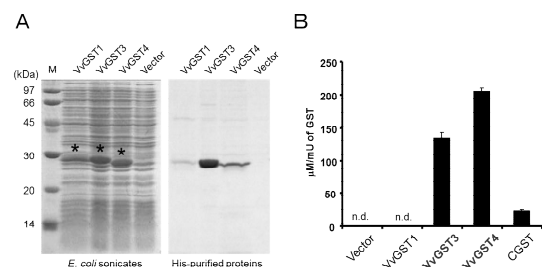


図2 VvGST3およびVvGST4は3MH前駆体生合成系の鍵酵素である

A: 大腸菌に作らせたVvGST酵素

B: 触媒活性(CGST、ウマ肝臓由来GST酵素)

(VvGGT)は1つ存在する。大腸菌に作らせたVvGST1~VvGST5タンパク質のうち、VvGST3およびVvGST4がグルタチオン抱合体生合成を触媒した(図2)。以上の結果から、グルタチオンとトランス-2-ヘキサナールにVvGST3およびVvGST4が働きグルタチオン抱合体が生合成されることが示唆された。

### 研究項目(2)

#### 3MH前駆体の生合成を調節する分子機構の解明

環境ストレスをブドウ苗木に与え、ブドウの葉および果実におけるグルタチオン抱合体およびシステイン抱合体量を測定した。ブドウ葉ではUV-C照射、微生物接種、乾燥処理によって高く3MH前駆体合成が促進された(図3)。果実でも同様の結果が得られた。UV-C照射、微生物接種、乾燥処理を施したブドウ葉では、VvGST3、VvGST4およびVvGGTの発現量が増加していた。以上の結果から、ブドウ葉および果実中の3MH前駆体生合成は環境ストレス処理により調節できることが示唆された。

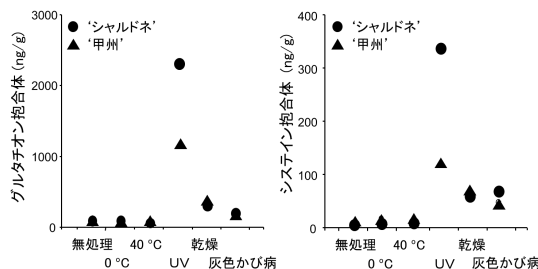


図3 環境ストレスによる3MH前駆体生合成系の促進

### 研究項目(3)

#### 3MH前駆体生合成量を増大する栽培環境の特定

‘甲州’ブドウ果実に含まれるグルタチオン抱合体およびシステイン抱合体の推移は、栽培地域の標高および成熟ステージに大きく左右された(図4)。一方、基本的な栽培方法を同じにすることで、標高(すなわち、気象条件)が異なっても3MH前駆体量には大きな差がないことが明らかとなった。興味深いことに、いずれの栽培地域においても3MH前駆体も開花後16-18週頃が蓄積量のピークであった。

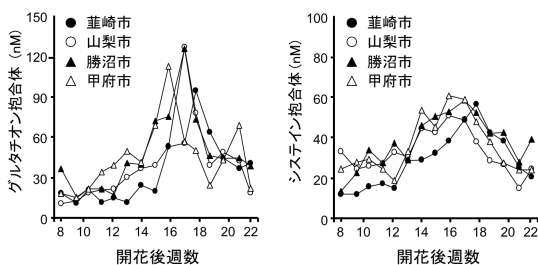


図4 栽培環境による3MH前駆体蓄積量の比較

ークであった。従って、畑ごとに収穫時期を適正化すれば3MH前駆体を多く含む果実が収穫できる一方、収穫時期を間違えば香りの乏しい果実になることが示唆された。

### 研究項目(4)

#### 3MH前駆体生合成を活性化する栽培技術の確立

山梨県甲州市勝沼町の‘シャルドネ’果実に含まれる3MH前駆体量(グルタチオン抱合体とシステイン抱合体を合わせたものを図に表示)を経時的に検討した結果、3MH前駆体は日の出付近の果実に最も多く蓄積し、日中から日の入りにかけて果実内の3MH前駆体は減少することが明らかとなった(図5)。

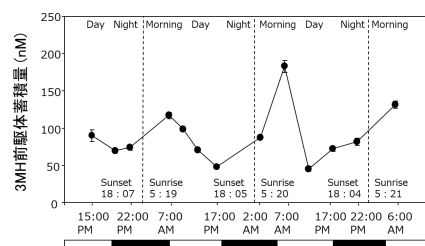


図5 3MH前駆体蓄積は日周期性を示す

本知見の再現性および他のブドウ品種でも同様の結果が得られるかを確認するために、異なる圃場から‘シャルドネ’、‘ソーヴィニヨン・ブラン’および‘リースリング’果実で調査した結果、3MH前駆体蓄積量はいずれの品種においても日の出付近で最も多く、日中にかけて減少した(図6)。これらの結果は、ブドウ果実における3MH前駆体蓄積量は日周期性を示すこと、ナイトハーベスは3MH前駆体を豊富に含む果実を得ることができることを示唆した。

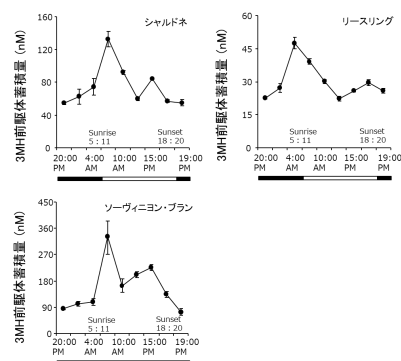


図6 3MH前駆体蓄積の日周期性は品種に依存しない

長野県須坂市高山村の圃場で早朝(AM 5:00前後)と日中(PM 12:00前後)に収穫した‘シャルドネ’果実を搾汁し、3MH前駆体(グルタチオン抱合体とシステイン抱合体を合わせたもの)量を測定した。早朝に収穫した果汁中には178.2 nMの3MH前駆が含まれていたのに対し、日中に収穫した果汁中の

3MH 前駆体蓄積量は 95.8 nM と早朝に比べ約 2 倍量少なかった。早朝に収穫した果汁から醸造したワイン中の 3 MH 量は 5.79 nM であり、日中に収穫した果汁から醸造したワイン中の 3 MH 量は 3.72 nM であり、果実中の 3 MH 前駆体と同様に両者間には約 2 倍の相違が認められた。

これらの結果は、果実に含まれる 3 MH 前駆体蓄積量が最終的にワインに含まれる 3 MH 量を決定すること、ナイトハーベストあるいは早朝に収穫したブドウ果実から醸造したワインは柑橘系の芳醇なワインになる可能性が高いことを示唆した。

近年、ブドウ栽培技術として夜中から早朝に果実を収穫するナイトハーベストを実施するワイナリーが日本でも増加している。本研究により得られた知見は、アロマ前駆体を例として、ナイトハーベストの科学的有意性を世界で初めて明らかにしたものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

著者名: Kobayashi, H., Matsuyama, S., Takase, H., Sasaki, K., Suzuki, S., Takata, R. and Saito, H.

論文標題: Impact of harvest timing on the concentration of 3-mercaptohexan-1-ol precursors in *Vitis vinifera* grape berries.

雑誌名: American Journal of Enology and Viticulture

査読: 有

発行年: 2012 年

号・ページ: 63: 544-548

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名: 小林弘憲、松山周平、高瀬秀樹、佐々木佳菜子、高田良二、鈴木俊二、齋藤浩  
発表標題: ブドウ収穫タイミングの違いが前駆体 3MH (3mercaptohexan-1-ol precursors) 濃度へ与える影響

学会等名: 日本ブドウ・ワイン学会

発表年月日: 平成 24 年 11 月 17 日

発表場所: レンブラントホテル大分 (大分県・大分市)

発表者名: 小林弘憲、松山周平、高瀬秀樹、佐々木佳菜子、生駒元、味村興成、高田良二、金野知典、鈴木俊二、齋藤浩

発表標題: 甲州ブドウにおける気象条件および栽培方法の違いが果実成分へ与える影響

学会等名: 日本ブドウ・ワイン学会

発表年月日: 平成 23 年 11 月 19 日

発表場所: ホテル中村屋 (長野県・塩尻市)

〔図書〕(計 1 件)

著者名: Suzuki, S. and Kobayashi, H.  
書名: Physiological and molecular characteristics of Japanese indigenous *Vitis vinifera* cv. Koshu grape.  
ISBN: 978-1-62100-535-3  
出版社名: Nova Science Publishers Inc

〔その他〕

山梨大学ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門ホームページ

<http://www.wine.yamanashi.ac.jp/fruitgenetic/index.htm>

キリン株式会社ニュースリリース

<http://www.kirin.co.jp/company/news/2012/12047.html>

マイナビニュース

<http://news.mynavi.jp/news/2012/11/15/092/>

日本経済新聞

<http://www.nikkei.com/article/DGXNZ046502370U2A920C1TJM000/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 俊二 (SUZUKI, Shunji)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 60372728

##### (2) 研究分担者

藤田 景子 (FUJITA, Keiko)

県立広島大学・生命環境学部・助教

研究者番号: 50467726

##### (3) 連携研究者

なし