

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：85403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780036

研究課題名(和文)ブドウ果実におけるフラボノイド代謝に関する遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the gene related with the flavonoid 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・その他部局等・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドはその機能性や色・呈味性から注目されている。異なる環境下で栽培したブドウ果実の各フラボノイドの量や組成とともに遺伝子発現について網羅的な解析を行った。異なる光環境下でのプロアントシアニジン(縮合型タンニン)含量の変化と呼応した発現を示す遺伝子群を抽出し、制御因子であるVvMYBPARを同定した。ブドウ培養細胞及びシロイヌナズナ・ブドウ形質転換体を用いた解析により、VvMYBPARはプロアントシアニジン特異的な制御因子であることが示された。また、既に報告のあるブドウの制御因子と異なる組織・時期特異性を示し、異なるプロアントシアニジン特異的生合成系遺伝子を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Flavonoids have received much attention for their potential contribution to human health. We performed the detailed analysis of the composition of each flavonoid as well as comprehensive gene expression analysis in the grape berries cultured in various environment. Genes which were coordinately expressed with proanthocyanidin (PA) accumulation under different light conditions, and a new PA regulator, VvMYBPAR, was identified. PA-specific regulation of VvMYBPAR was confirmed by VvMYBPAR constitutive expression in Arabidopsis and Grapevine as well as transient reporter assay using grapevine cells. VvMYBPAR showed a unique spatiotemporal expression during berry development as well as response to environmental stimuli, in contrast to already identified PA regulators, suggesting the regulation of different PA-specific branch genes. This new factor suggested the polygenic regulation of PA biosynthesis in grapes by closely related MYB transcription factors.

研究分野：園芸科学

キーワード：二次代謝 ブドウ ストレス応答 フラボノイド プロアントシアニジン 機能ゲノム科学

1. 研究開始当初の背景

植物の二次代謝産物であるフラボノイド化合物は 6000 種類以上存在するといわれ、抗酸化性、抗微生物性、抗ウイルス性、抗癌性など多くの機能性をもつことから、食品における高付加価値化という観点からも注目される化合物である。また、アントシアニン、プロアントシアニジン（縮合型タンニン）、フラボノールなどのフラボノイド化合物は色や呈味性をもつことから、ブドウ果実を利用した加工飲料など（特にワイン）における官能特性を決定づける重要な因子でもある。

ブドウにおけるフラボノイド生合成系については他の代謝経路と比較して理解が進んでおり、各フラボノイド前駆体生成に至る生合成系のすべての構造遺伝子が明らかとされている。しかし、最終代謝産物に至る経路が完全に明らかとされているとはいえず、複雑な修飾の生成機構、プロアントシアニジンの重合機構などについては、依然、未解明である。

近年、フラボノイド生合成系の制御因子としていくつかの MYB 型転写因子が同定され、その機能、及び環境応答性について明らかとされている。しかし、各種環境下におけるフラボノイドの含量・組成変化の制御機構の詳細については、まだ不明なところも多い。

2. 研究の目的

ブドウ果実におけるフラボノイド化合物の環境応答性に着目し、各フラボノイド（特にプロアントシアニジン）の量や組成に關与する生合成系遺伝子及び制御因子の機能を解明する。

3. 研究の方法

ワイン用ブドウ品種カベルネソーヴィニヨン樹を用い、花、開花後 2, 7, 9 週目の果皮及び種子を材料と用いた。また、果房を開花期より遮光箱、UV カットフィルムによる遮光処理/遮光解除処理を行い、受光環境の異なる果皮をサンプリングした。これらサンプルにおけるフラボノイドの量や組成の変動について解析を行うとともに、組成変化と呼応した変動を示す遺伝子を、網羅的遺伝子発現解析法であるスーパーセージ解析によりスクリーニングを行った。

スーパーセージ解析によってスクリーニングされた推定プロアントシアニジン制御遺伝子 *VvMYBPA* 全長配列を CaMV35S プロモーターに連結したコンストラクトを用い、シロイヌナズナ、ブドウの形質転換を行った。発芽後 3 週目のシロイヌナズナ幼植物体より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行って、変動する遺伝子群の同定を行った。さらに、35S プロモーターに *VvMYBPA* を連結したエフェクターコンストラクト (PBI221) 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。フラボノイド生合成系遺伝子群のプロモーター領域をルシフェ

ラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミドを作成し、レポーター活性を Dual-luciferase reporter assay system (Promega) にて測定した。

4. 研究成果

果房周囲の日照環境を変化させるため、果房へ遮光処理した果皮中のフラボノイドの変動について解析を行った。開花期からの遮光処理によって、ベレゾン期前のプロアントシアニジン濃度は対照区の約半分まで減少したが、処理後 14 日目で遮光解除すると、回復した。UV カット処理によってフラボノール濃度は著しく減少したが、プロアントシアニジンへは影響しなかったことから、UV 以外の主に可視光によって制御されていることが示唆された (図 1)。

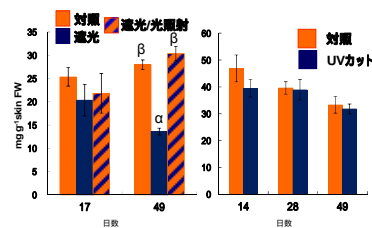


図 1 遮光処理による果皮中のプロアントシアニジンの濃度変化

次に、花、開花後 2, 7, 9 週目の果皮及び種子、及び遮光処理した果実の果皮を含む 9 サンプルを用いてスーパーセージ解析を行った (表 1)。サンプルあたり、6000~20000 の単一でないタグが得られ、これらのタグ (遺伝子) を用いた遺伝子発現プロファイルが得られた。

サンプル	インデックス配列	全タグ数	ユニークタグ数	単一でないタグ数
花	GCGA	276,935	64,586	20,122
果皮開花後2週目 (無遮光)	GCGT	342,655	45,252	16,008
果皮開花後2週目 (遮光)	GACC	96,905	20,401	6,595
果皮開花後2週目 (遮光 日照)	GACA	104,517	23,725	8,084
果皮開花後7週目	GACT	223,284	47,444	15,427
果皮開花後9週目	TCCA	249,251	49,244	16,328
種子開花後2週目	GCGG	85,312	23,520	7,699
種子開花後7週目	GACG	106,290	18,338	5,882
種子開花後9週目	GCCC	329,399	42,485	15,282

表 1 スーパーセージ解析サンプルの概要

プロアントシアニジンの濃度変化と呼応した発現を示す遺伝子をスクリーニングするため、主に幼果期の果皮に発現がみられ、かつ光応答を示すもの 233 個の遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子には、プロアントシアニジン生合成に關与すると考えられる遺伝子が高頻度で含まれていた (表 2)。

表 2 に含まれる新規な MYB 型転写因子について、フラボノイド制御に關連すると推定される MYB 型制御因子と系統解析を行ったところ、シロイヌナズナ TT2、ブドウ MYBPA2 などプロアントシアニジンの制御因子とクラス

ターを形成した。そこで、この MYB 型転写因子 (*VvMYBPAR*) について詳細な機能解析を行った。

MYBPAR	Transcription factor	制御因子
MYB5b	Transcription factor	制御因子
bZIP	Transcription factor	制御因子
DHD/SDH	3-dehydroquinate dehydratase/shikimate 5-dehydrogenase	シキメイト経路
SK	Shikimate kinase	シキメイト経路
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	ジェネラルフェニルプロバノイド経路
ANR(4)	Anthocyanin reductase	フラボノイド経路
LAR1	Leucoanthocyanidin reductase	フラボノイド経路
GT1	Glucosyltransferase	フラボノイド経路 (修飾・輸送)
GT2	Glucosyltransferase	フラボノイド経路 (修飾・輸送)
GT3	Glucosyltransferase	フラボノイド経路 (修飾・輸送)
SCP	Serine carboxypeptidase	フラボノイド経路 (修飾・輸送)
GST	Glutathione S-transferase	フラボノイド経路 (修飾・輸送)
MATE	Transporter	フラボノイド経路 (修飾・輸送)

表2 プロアントシアニン合成及び制御と関連する候補遺伝子

VvMYBPAR を強制発現させたシロイヌナズナ幼植物体は、アントシアニンを高蓄積する条件下でプロアントシアニンを蓄積することが DMACA 染色により観察された (図2)。また、マイクロアレイ解析により、プロアントシアニン関連遺伝子が特異的に誘導されていることが明らかとなった。



図2 *VvMYBPAR* 強制発現シロイヌナズナの表現型

次に、*VvMYBPAR* をブドウ培養細胞に一過的に発現させ、プロモーター解析を行ったところ、*VvMYBPAR* は既報の *VvMYBPA1*、*VvMYBPA2* と同様にプロアントシアニン特異的な合成経路上遺伝子、共通経路の遺伝子、プロアントシアニン前駆体の修飾、輸送に関与すると考えられる遺伝子のプロモーターを活性化するが、アントシアニン特異的な合成系遺伝子 (*VvUGT*) のプロモーターは活性化しないことから、プロアントシアニン経路を特異的に制御していることがわかった (図3)。

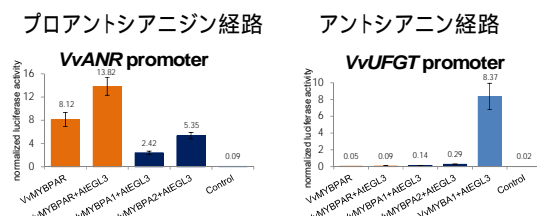


図3 ブドウ培養細胞を用いたプロモーターアッセイ

さらに、既報の制御因子 *VvMYBPA1*、*VvMYBPA2* との機能の違いを解析するため、ブドウの種々の部位、各発達時期の果皮・種子、遮光・ABA 処理した果皮サンプルなどにお

ける遺伝子発現を定量 PCR によって解析し、得られた遺伝子発現プロファイルと比較したところ、*VvMYBPAR* は *VvMYBPA1*、*VvMYBPA2* とは異なった発現プロファイルを示し、プロアントシアニン経路上の生合成系遺伝子である *VvLAR2* のそれと相関したのに対し、*VvMYBPA1*、*VvMYBPA2* は *VvANR*、*VvLAR1* と相関しており、それぞれ異なる生合成系遺伝子を制御していることが示唆された (図4)。これら機能の異なる複数の MYB 型遺伝子がブドウ果実では存在し、それぞれ異なる発現プロファイルをもつことから、部位、発達時期によるプロアントシアニンの組成の違い、環境応答性が決定されていると考えられた。

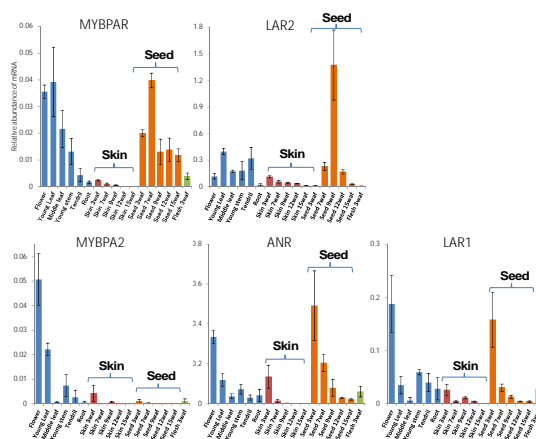


図4 プロアントシアニン生合成関連遺伝子の発現プロファイル

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)

Kazuya Koyama, Mineyo Numata, Ikuko Nakajima, Nami Goto-Yamamoto, Hideo Matsumura and Nobukazu Tanaka., Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin biosynthesis in grapes. Journal of Experimental Botany, 査読付, Vol. 65, No. 15, 2014, 4433-4449,

〔学会発表〕(計3件)

小山和哉, 池田博子, 後藤(山本)奈美, 紫外・可視光がブドウ幼果のフラボノイド合成に及ぼす影響, 日本ブドウ・ワイン学会, 2011年11月19日, 長野県塩尻市

Kazuya Koyama, Mineyo Numata, Nami Goto (Yamamoto), Hideo Matsumura and Nobukazu Tanaka, Identification of flavonoid biosynthesis genes in grape berries by using SuperSAGE analysis, 9th international symposium on grapevine physiology & biotechnology,

April 21th, 2013, La Serena, Chile.
小山和哉、沼田美子代、後藤（山本）奈美、松村英夫、田中伸和、スーパーセージ法によるブドウ果実中のプロアントシアニジン生合成関連遺伝子の同定、園芸学会秋季大会、2013年9月22日、岩手県盛岡市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nrib.go.jp/data/seika/NewSeika.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 和哉 (Kazuya Koyama)

酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門

主任研究員

研究者番号：30416424

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし