

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380019

研究課題名(和文) 統合オミクス解析によるブドウの二次代謝産物蓄積機構のプロファイルと応用展開

研究課題名(英文) Multi-omics study for understanding of secondary metabolite accumulation in grape berry and its application

研究代表者

白武 勝裕 (Shiratake, Katsuhiro)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウには、アントシアニン、タンニン、レスベラトロールなどの二次代謝産物が蓄積する。本研究では、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスを融合した「統合オミクス解析」により、ブドウにおける異なる二次代謝産物の誘導をプロファイルすることに成功した。すなわち、ブドウ果皮では紫外線照射によるレスベラトロール合成系の誘導と、果実成熟にともなうアントシアニン合成系の誘導を、培養細胞では光照射によるアントシアニンの合成系の誘導と、エリシター+ジャスモン酸処理によるレスベラトロール合成系の誘導を確認した。また、膜画分のプロテオミクスによりこれら二次代謝産物の輸送体の候補を見出すことにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Grape accumulates several secondary metabolites, such as catechin, resveratrol and anthocyanin. In this study we profiled inductions of different secondary metabolite accumulations by different stimuli in grape berry skins or in grape culture cells using multi-omics, i.e. combination of transcriptomics, proteomics and metabolomics. This study revealed clear inductions of anthocyanin synthetic pathway in grape skin during berry ripening and in grape cells by light irradiation, and resveratrol synthetic pathway in grape skins by ultra violet irradiation and in grape cells by elicitor+jasmonic acid treatment.

研究分野：園芸生理・生化学

キーワード：ブドウ 二次代謝 アントシアニン レスベラトロール トランスクリプトミクス プロテオミクス
メタボロミクス 代謝マップ

1 . 研究開始当初の背景

近年の健康志向の高まりにより、果実や野菜の二次代謝産物の機能性が一般の消費者にも認知され、機能性成分を高含有な果実や野菜の生産が、高付加価値で高価な農産物の生産戦略として重要視されている。ブドウには、カテキン、アントシアニン、レスベラトロールといったポリフェノール類が多く含まれ、赤ワインの効能を中心とした健康増進効果が一般にも広く知られている。特にレスベラトロールはフレンチパラドクスの原因物質として知られ、心臓病予防、動脈硬化予防、抗ガン作用、寿命延長効果、アルツハイマー病予防などの効果が報告され、特に注目を集めている。

ブドウの二次代謝産物の合成は、果実の成熟や、病原菌感染、紫外線などの「刺激」により誘導される。その重要性からブドウの二次代謝に関する研究は古くから行われてきたが、それらは一部の物質、一部の合成反応に限定されている。また、二次代謝産物の蓄積には合成酵素だけでなくそれを適切な場所に輸送するための「輸送体」の機能が重要であるが、ブドウの二次代謝産物の輸送体に関する報告はほとんどない。

2007年にブドウの全ゲノムが解読され、ブドウではマイクロアレイ解析やプロテオミクスなど、オミクスの手法を用いた研究がさかに行われつつある。しかしながら、実際にどのような代謝産物「メタボローム」が蓄積しているの、その合成・蓄積に関わる遺伝子発現「トランスクリプトーム」、そして酵素や輸送体などのタンパク質の発現「プロテオーム」を統合した「統合オミクス研究」については、これからの段階である。

ブドウの二次代謝産物の合成・蓄積メカニズムの全貌を明らかにするには、「統合オミクス解析」の実施が最も合理的かつ近道である。統合オミクス解析により、レスベラトロールなどの既知の機能性物質の合成・蓄積システムの全容が明確にできるだけでなく、機能性を持つ新奇な二次代謝産物とその合成・輸送系の発見にもつながり、本研究で実施する統合オミクス解析の結果から、新たな研究シーズや産業シーズを発掘できる可能性が高い。

研究代表者はこれまでに、トマトをモデルとした二次代謝産物の輸送システムの解析や、ブドウのレスベラトロール輸送体に関する研究を行ってきた。一方で、シロイヌナズナの液胞膜のプロテオミクスを実施し、さらにセイヨウナシの大果変異機構の解明に向けた「統合オミクス解析」を実施中である。

本研究においては、オミクス解析に必要なゲノムリソースが充実している「ブドウ」をモデルとし、二次代謝産物の合成・蓄積機構のプロファイルを目標とし、さらに、その応用として、ブドウの培養細胞に二次代謝産物を合成させることを目標に研究を行った。

2 . 研究の目的

ブドウに蓄積するアントシアニン、タンニン、レスベラトロールなどの二次代謝産物は、果実やワインの色や味を決定するとともに機能性成分としても重要である。また、それらの二次代謝産物は、植物のストレス耐性や病害抵抗性にも大きく関わっている。本研究ではブドウの果皮および異なる二次代謝産物を蓄積するブドウの培養細胞 (VR, VW) を研究材料に、果樹分野では先駆的研究となるトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスを融合した「統合オミクス解析」を実施する。

統合オミクス解析により、光、紫外線、エリシター、植物ホルモンなどの異なる外部刺激や果実の成熟によって誘導されるブドウの二次代謝産物の合成・蓄積システムを明らかにし、二次代謝産物合成の鍵遺伝子と未同定の二次代謝産物輸送体の候補を探索する。特に、紫外線照射時のブドウ果皮における二次代謝産物の蓄積、果実成熟時の果皮における二次代謝産物の蓄積、そしてブドウ培養細胞 (VR, VW) に、光照射またはエリシター + ジャスモン酸 (JA) 処理した時の二次代謝産物の代謝のスイッチングに着目する。また、異なる二次代謝産物を蓄積する時の膜画分の疎水性タンパク質のプロテオミクスを行うことにより、新奇な二次代謝産物の輸送体の探索にも取り組む。それら遺伝子をブドウの培養細胞へ形質転換することにより、候補遺伝子の機能を証明したり、その遺伝子を過剰発現させたりすることで二次代謝産物を高蓄積するブドウ培養細胞を作出することも目標とする。

3 . 研究の方法

(1) ブドウへの二次代謝産物の誘導処理

ブドウ未熟果への紫外線照射

ベレーゾン期 (ブドウの果実成熟の転換点) の直前のブドウ果実に UV-C ランプ 1 時間照射した。トランスクリプトミクスには照射 1 時間後の果皮を、メタボロミクスには照射 1 時間後に 23 時間暗所・室温で静置した果実の果皮を回収して使用した。

果実成熟時の果皮の二次代謝産物の誘導

2010 年 7 月 23 日 (ベレーゾン直前) および 9 月 16 日 (収穫直前) の果皮を用いた。

ブドウ培養細胞への光照射

遮光下で 1 週間培養した培養細胞 (VR および VW, RIKEN BRC より分譲) に蛍光灯光を射下し、3 日後の細胞を用いた。

ブドウ培養細胞へのエリシター + JA 処理

遮光下で 1 週間培養した培養細胞の培地に、10 mM 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, 20 μ M methyl jasmonate, 0.4% ethanol (いずれも終濃度) を加え、遮光下で 3 日間培養をした細胞を用いた。

(2) オミクス解析

トランスクリプトミクス

試料から RNA を hot borate 法で抽出したのち, RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で精製し, Nimblegen microarray 090818 Vitis exp HX12 (Roche, NibleGen Inc) を用いたマイクロアレイ解析を行った. データの解析は Subio platform (Subio) を使用した.

プロテオミクス

試料を緩衝液中で摩砕し, 1,000xg の沈殿と, 上清を 10,000xg で遠心分離した上清 (可溶性画分) と沈殿 (粗膜画分) の 3 画分に分け, プロテオミクスに供試した. 粗膜画分は膜表面タンパク質を除去するために, 界面活性剤と塩による洗浄を行った. プロテオミクスは, LTQ-Orbitrap 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用い, ブドウゲノム 12X version 1 (v1) (CRIBI) データベースに対して, MASCOT (Matrix Science) を行い同定した.

メタボロミクス

試料から代謝産物を 0.1%ギ酸を含む 80%メタノールで抽出し, LC-QTOF-MS (Waters) で分析した.

統合オミクス (代謝マップの作成)

トランスクリプトームデータ, プロテオームデータ, メタボロームデータを, 代謝マップ投影ツール KaPPA-View 4 KEGG (<http://kpv2.kazusa.or.jp/kpv4-kegg/>) を用いて統合した. その際, KaPPA-View 4 KEGG および KEGG の情報が古いままであったため, 最新のゲノム情報 v1 への更新作業を行った.

(3) ブドウ培養細胞への形質転換

ブドウの培養細胞への形質転換系を確立するために, 懸濁培養細胞およびカルスへの形質転換を試みた. CaMV 35S pro::GUS を含む pBI121 ベクターおよびアグロバクテリウム GV3101 株を用いた.

4. 研究成果

(1) 紫外線照射時のブドウ果皮における二次代謝産物の蓄積

紫外線を照射したブドウ果皮を用いてトランスクリプトミクスとメタボロミクスを実施した. 全ゲノムを対象としたマイクロアレイを用いたトランスクリプトミクスでは, 遺伝子の機能分類である Gene Ontology (GO) によるエンリッチメント解析を行い, 紫外線照射特異的に誘導される GO タームを biological process で 2 種, molecular function で 11 種得た. その中にはレスベラトロール合成の鍵酵素であるスチルベン合性酵素 (STS) を示すターム trihydroxystilbene synthase activity が含まれていた. 一方, LC-QTOF-MS によるメタボロミクスの結果, ブドウ果皮に 2,012 種の代謝産物ピークを見出し, 主成分分析 (PCA) の結果から, 紫外線照射により特異的に蓄積する代謝産物と

してレスベラトロールを同定した. ブドウゲノム v1 情報を KaPPA-View 4 KEGG でも解析できるようにシステムを更新したのち, トランスクリプトームデータとメタボロームデータを 1 枚の代謝マップに統合した (図 1). その結果, ブドウ果皮に紫外線を照射するとレスベラトロール代謝系が際立って誘導されることが示された.

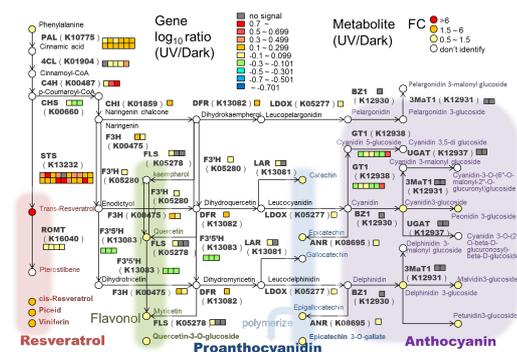


図 1, 紫外線照射時のブドウ果皮の代謝マップ

(2) 果実成熟時の果皮における二次代謝産物の蓄積

果実成熟時においてブドウの果皮に蓄積する代謝産物をプロファイルするために, 収穫直前のブドウ果皮とベレーゾン直前の果皮から代謝産物を抽出し, LC-QTOF-MS によるメタボロミクスを実施した. その結果, 未同定ピークを含む 1,197 代謝物ピークが検出され, そのうち 12 種の代謝産物について標品を用いて同定・定量した. その結果, 果実の成熟時にはカテキンを除くフェノール性化合物のほとんどが増加しており, 特にブドウの主要なアントシアニンであるマルビジン 3 グルコシドの蓄積量が最も多かった. 一方, カテキンの蓄積量は成熟時に減少した. また, PCA により, 成熟に関わる代謝産物 7 種を見出した. 7 種の代謝産物のうちの特徴的な未同定代謝産物について MS/MS フラグメント情報をデータベース照合したところ, 成熟後に特徴的な代謝産物としてアルギニンが見出され, 成熟前に特徴的な代謝産物としてグルタミン酸またはグルタミンと推定される化合物が見出された. 本研究において, ブドウの果実成熟過程で既知の二次代謝産物の蓄積傾向を確認するとともに, 果実の成熟や品質に深く関わるアミノ酸を見出すことができた.

(3) ブドウ培養細胞に光照射またはエリシター + JA 処理した時の二次代謝産物の蓄積

RIKEN BRC から, ブドウの葯壁由来のひとつのカルスから分離された, VR と VW の 2 種類の培養細胞が提供されている. これら 2 種類の細胞系統における二次代謝産物合成の誘導を, プロテオミクスとメタボロミクスにより明らかにした. その結果, VR では光照射によるアントシアニンの蓄積が, VW ではエリシター + JA 処理によるレスベラト

ールの蓄積が誘導された。

それぞれの誘導条件下でプロテオミクスとメタボロミクスを行ったところ、前者では合計 1,680 種類のタンパク質が、後者では合計 793 種類の代謝産物ピークが見出された。また、メタボロミクスにおける標品を用いた一点定量から 10 種類のフェノール性化合物を同定・定量した。GO によるエンリッチメント解析から、光照射を行った VR でのみ同定されたタンパク質には flavonoid metabolic process と flavonoid biosynthetic process のタームを持つタンパク質がエンリッチされており、chalcone synthase, flavonoid 3'-hydroxylase, leucoanthocyanidin dioxygenase, anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase などのアントシアニンの合成酵素が特異的に同定された。また、メタボロミクスにより、この時の細胞には cyanidin 3-glucoside と peonidin 3-glucoside が高濃度で蓄積していることが確認された。

一方、エリシター+JA 処理を行った VW においてのみ、レスベラトロール合成の鍵酵素であるスチルベン合成酵素 (STS) が複数種類プロテオミクスにおいて同定され、同時にレスベラトロールの顕著な蓄積がメタボロミクスにより確認された。

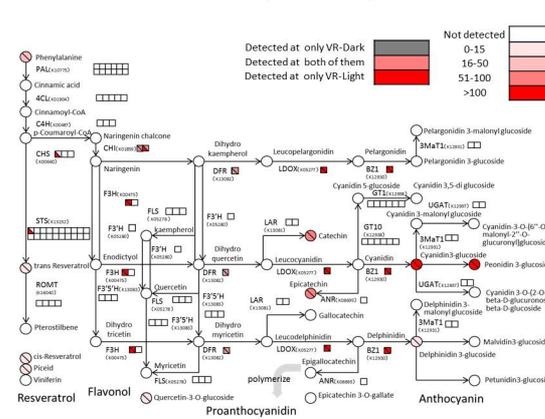


図 2, VR に光照射した時の代謝マップ

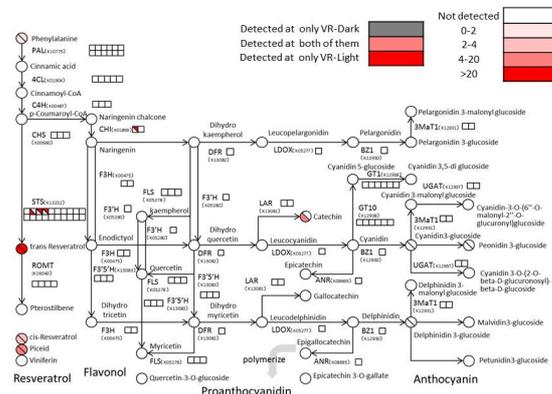


図 3, VW にエリシター+JA 処理した時の代謝マップ

(4) ブドウ培養細胞を用いた新奇二次代謝産物輸送体の探索

上記(3)の研究において、新奇アントシアニン輸送体とレスベラトロール輸送体の探索を目指し、アントシアニンやレスベラトロールを誘導した時の VR と VW の膜タンパク質のプロテオミクスを行った。その結果、合計 1,437 種類のタンパク質が同定され、MAPMAN オントロジーの“transport”のアノテーションを持つものが、121 種類存在した。これらの中に、複数の既知のアントシアニン輸送体が同定されていたことから(図4)、プロテオミクスによる二次代謝産物輸送体探索の有効性が示された。一方で、輸送体は誘導処理よりむしろ二種類の細胞系統特異的に同定されており、細胞系統固有に恒常的に発現していることが示唆された。機能未同定の ABC 輸送体と MATE は、既知の輸送体との分子系統解析によって、未知タンパク質については膜貫通領域の数の推定から輸送体である可能性を判断し、複数のアントシアニン輸送体とレスベラトロール輸送体の候補を見出した。

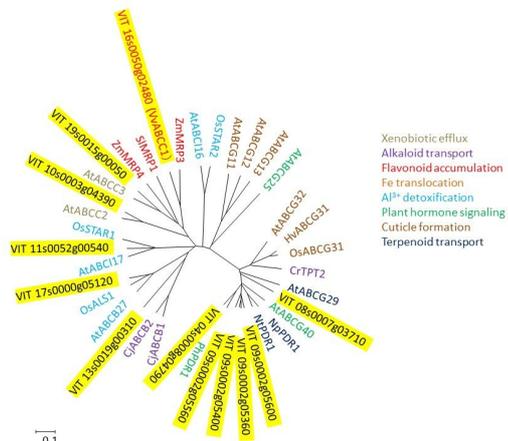


図 4, プロテオミクスで同定された ABC 輸送体

(3) ブドウ培養細胞への形質転換
ブドウの培養細胞への形質転換系の確立を目指し、様々な試行錯誤を行ったが、残念ながら実験系を確立することができなかった。

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 6 件)

Suzuki M., Nakabayashi R., Ogata Y., Sakurai N., Tokimatsu T., Goto S., Suzuki M., Jasinski M., Martinoia E., Otagaki S., Matsumoto S., Saito K. and Shiratake K. (2015) Multi omics in grape berry skin revealed specific induction of stilbene synthetic pathway by UV-C irradiation. *Plant Physiol.* 査読有. 168: 47-59.
DOI: 10.1104/pp.114.254375

Suzuki M., Jasinski M., Martinoia M., Nakabayashi R., Suzuki M. and Shiratake K. (2014) Molecular cloning and characterization of ABCG/PDR-type ABC transporter in grape berry skin. *Adv. Hortic. Sci.* 査読有. 28: 53-63.
<http://www.fupress.net/index.php/ahs/issue/current>

Reuscher S., Isuzugawa K., Kawachi M., Oikawa A. and Shiratake K. (2014) Comprehensive element analysis of fruit flesh from European pear 'La France' and its giant fruit bud mutant indicates specific roles for B and Ca in fruit development. *Sci. Hortic.* 査読有. 176: 255-260.
DOI: 10.1016/j.scienta.2014.07.019

Nashima K., Terakami S., Nishitani C., Yamamoto T., Habu T., Takahashi H., Nakazono M., Isuzugawa K., Hanada T., Takashina T., Matsumoto S., Otagaki S., Mori H., Oikawa A. and Shiratake K. (2014) Transcriptome analysis of flower receptacles of the European pear (*Pyrus communis* L.) 'La France' and its giant fruit sport using next-generation sequencing technology. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 査読有. 89: 293-300.
http://www.jhortscib.org/Vol89/89_3/9.htm

Nashima K., Takahashi H., Nakazono M., Shimizu T., Nishitani C., Yamamoto T., Itai A., Isuzugawa K., Hanada T., Takashina T., Kato M., Matsumoto S., Oikawa A. and Shiratake K. (2013) Transcriptome analysis of giant pear fruit with fruit-specific DNA reduplication on a mutant branch. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有. 82: 301-311.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1/82/4/82_301/_pdf

Nashima K., Shimizu T., Nishitani C., Yamamoto T., Takahashi H., Nakazono M., Itai A., Isuzugawa K., Hanada T., Takashina

T., Matsumoto S., Otagaki S., Oikawa A. and Shiratake K. (2013) Microarray analysis of gene expression patterns during fruit development in European pear (*Pyrus communis*). *Sci. Hortic.* 査読有. 164: 466-473.
DOI: 10.1016/j.scienta.2013.09.054

[学会発表](計 14 件)

Katsuhiro Shiratake, Mami Suzukia Ryo Nakabayashib Yoshiyuki Ogatac Nozomu Sakuraid Toshiaki Tokimatsu, Susumu Goto and Kazuki Saito. Update of the KEGG database and the KaPPA-View 4 KEGG system of grape and multi-omics study of grape berry skin. 2nd Plant Genomics Congress Asia, Kuala Lumpur, 19-20 March 2015.

戸田奈津実, 松本省吾, 白武勝裕, 太田垣 駿吾. 異なる二次代謝産物蓄積様式を示すブドウ培養細胞の性状解析. 平成 26 年度園芸学会秋季大会, 佐賀, 2014 年 9 月 27 ~ 29 日

Hiroshi Sakamoto, Mami Suzuki, Ryo Nakabayashi, Yoichiro Fukao, 他 11 名, Katsuhiro Shiratake. Multi-Omics for Understanding Anthocyanin and Resveratrol Accumulation in Grape. The XXVIIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference, Nagoya, 2-6 September 2014.

阪本浩嗣, 深尾陽一郎郎, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. プロテオミクスによるブドウの新規アントシアニントランスポーターの探索. 第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 盛岡, 2014 年 8 月 21 日 ~ 22 日

白武勝裕, 阪本浩嗣, 他 9 名. トマトのゲノムデータベースおよび EST データベースにおける ABC トランスポーターの探索と発現解析果実の成長と品質に関わるトランスポーターの探索 - トマトにおけるゲノムワイド解析およびセイヨウナシとブドウにおけるマルチオミクス -. 第 9 回トランスポーター研究会年会, 名古屋, 2014 年 6 月 14 ~ 15 日

阪本浩嗣, 深尾陽一郎郎, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. プロテオミクスによるブドウを用いた新規アントシアニントランスポーターの探索. 第 9 回トランスポーター研究会年会, 名古屋, 2014 年 6 月 14 ~ 15 日

Katsuhiro Shiratake. Multi-omics for fruit developmental study. 2013 International

Symposium on Biodesign. Busan, 14-16 October 2013.

阪本浩嗣, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. 光刺激またはエリシター処理によるブドウ懸濁培養細胞の二次代謝誘導. 平成 25 年度園芸学会秋季大会, 盛岡, 2013 年 9 月 20~21 日

白武勝裕. セイヨウナシおよびブドウにおける果実形質解析のためのマルチオミクス解析. 平成 25 年度園芸学会秋季大会シンポジウム, 盛岡, 2013 年 9 月 20~21 日

阪本浩嗣, 鈴木真実, 中林亮, 鈴木実, 尾形善之, 櫻井望, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. ブドウ果皮および培養細胞におけるアントシアニンおよびレスベラトロールの誘導とマルチオミクス解析. 第 31 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 札幌, 2013 年 9 月 10 日~12 日

Katsuhiko Shiratake, Kanji Isuzugawa, Akira Oikawa, 他 34 名, Multi-omics of pear fruit and grape berry. 7th EPSO Conference "Plants for a Greening Economy", Porto Heli, 1-4 September 2013.

阪本浩嗣, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. ブドウ懸濁培養細胞の増殖特性および光刺激による二次代謝産物蓄積の誘導. 平成 25 年園芸学会春季大会, 東京, 2013 年 3 月 23~24 日

尾形善之, 櫻井望, 鈴木秀幸, 白武勝裕, 柴田大輔. 実用化植物での GO 解析・パスウェイ解析用データベースの整備. 第 53 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21~23 日

Katsuhiko Shiratake, Masahito Akiyama, Kenji Nashima, Mami Suzuki, Akira Oikawa and Kanji Isuzugawa. Multi-Omics to Understand Growth and Character of Fruit. International Symposium on Japanese Solanaceae Genomics Initiative 2013, Tsukuba, 8-9 February. 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白武 勝裕 (SHIRATAKE, Katsuhiko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 90303586

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(3) 研究者協力者

中林 亮 (NAKABAYASHI, Ryo)

深尾 陽一朗 (FUKAO, Yoichiro)

MARTINOIA, Enrico

JASINSKI, Michal