

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850019

研究課題名(和文) 果実におけるプロアントシアニジン蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Shed light on the flavonoid accumulation in 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロアントシアニジン(PA)蓄積に関与すると考えられるカキDkDHD/SDH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およびタバコの形質転換を行った。カキカルスにおけるDkSCPL2の過剰発現体ではPAの全体的な増加が見られるがガレート割合に変化がなかった。またカキ果実で発現する3つのDkDHD/SDHsにはシキミ酸経路における機能が確認されたものの、没食子酸の生成活性は見られず、没食子酸の生成には異なる酵素が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to characterize DkDHD/SDH and DkSCPL2, which is supposed to be involved in proanthocyanidin(PA) accumulation in persimmon fruit, we tried transformation of persimmon and tobacco with these genes using *Agrobacterium tumefaciens*. The PAs in persimmon callus overexpressed DkSCPL2 showed higher amount, however, the ratio of flavan 3-ols-gallates were not altered. The DkDHD/SDHs showed activity in shikimic acid pathway to produce final product of phenylalanine as the precursor for flavonoid biosynthetic pathway. The activity as gallic acid biosynthesis, however, was not detected in our assay. Therefore, the other enzyme, but not DHD/SDH, for dehydroshikimate dehydrogenase should be involved in gallic acid biosynthesis.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：プロアントシアニジン カキ 没食子酸

1. 研究開始当初の背景

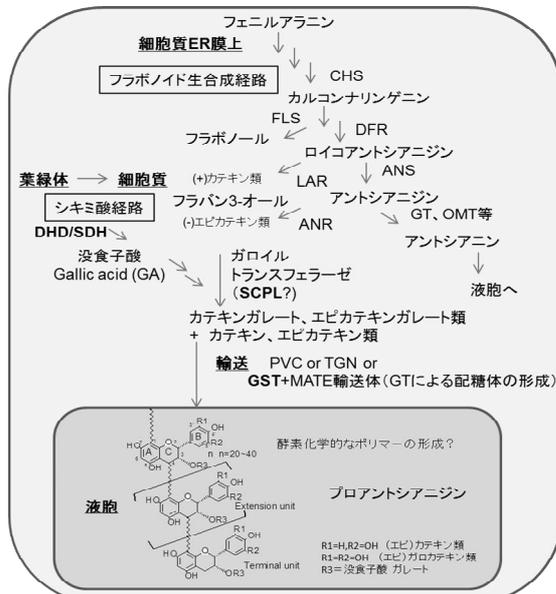
プロアントシアニジン（縮合型タンニン）はフラボノイドの一種であり、フラバン 3-オール（カテキン類）を構成単位としたポリマーで、強酸条件下でアントシアニジンを生ずるものとして定義されている。フラボノイドは一般的に植物の防御に関わる二次代謝産物であると考えられており、防虫・防菌効果や UV 防止効果を持つとともに、アントシアニンやフラボノールなど色を呈するものは、花や果実昆虫や鳥などの動物を魅きよせることで、種子の形成や散布に寄与している。また、我々人間にとっても、特にチャに多く含まれるカテキン類やブドウのレスベラトロールなどについて、血中コレステロール調節作用、抗酸化作用、老化抑制作用、抗癌、抗菌、抗アレルギー作用等種々の機能が注目されており、薬学、食品工学等の分野で研究が進められている。

フラボノイド生合成（第1図参照）は、植物において早い時期から盛んに研究が進んできた分野のうちの一つである。アントシアニン、フラボノールといったさまざまなプロダクトをもつフラボノイド生合成系において、ロイコアントシアニジンおよびアントシアニジンから、LAR(leucoanthocyanidin reductase)および ANR(anthocyanidin reductase)の触媒によりフラバン 3-オール類が生成されることによって、プロアントシアニジンの生成に特異な経路が分岐する。近年、シロイヌナズナの突然変異体を用いて急速に研究が進み、プロアントシアニジン生成に関わる多くの酵素や輸送体、転写因子が単離され、機能解析が進んでいる。しかしながら、生合成経路の後半のステップ、特に液胞への輸送やポリマーの形成に関しては未解明な部分が多い。また植物細胞では、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と仮定されているが、この酵素複合体形

成や輸送形態についても解明すべき部分が多く残されている。

カキ果実において甘渋性、すなわち脱渋性は最も重要な形質のうちの一つである。樹上で安定して自然に脱渋がおこる完全甘ガキは収穫後の脱渋処理が必要でないため、現在、品質の優れた完全甘ガキを得ることが育種の第一の目標となっている。通常、カキは果実発達の初期に渋み物質であるプロアントシアニジンを果肉中のタンニン細胞に多量に蓄積する。完全甘ガキはこの蓄積が果実発達の初期で停止するため、渋ガキから発生したプロアントシアニジンの蓄積異常を示す変異体と捉らえている。プロアントシアニジンは、これまで分子量が不均一であり非常に高分子であること、フェノール性水酸基を多く含んでいるという性質から分析が困難で、研究対象として敬遠されてきた。先述のように、近年、シロイヌナズナ種皮のプロアントシアニジン蓄積に異常を示す突然変異体を用いた研究により、生合成に関わる酵素や輸送体、6つの転写因子が単離され、機能解析が行われている。しかしながら、カキを始めとしてチャやブドウのプロアントシアニジンは、構成単位であるフラバン 3-オールそのものの構造やそれらの構成、縮合度などが異なっている。すなわち、シロイヌナズナのプロアントシアニジンは(-)-エピカテキンのみで構成されたおよそ 5 量体であるのに対し、ブドウやカキでは(+)-カテキン、(+)-ガロカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンとそれらに没食子酸が転移したガレート類により構成された 20~40 量体であり、シロイヌナズナと比較して複雑な構造を持っている。したがって、これらの栽培作物はより進化した生合成系を持つと考え、生合成系を明らかにし、耕種的あるいは育種的に応用することを考えた場合、シロイヌナズナを用いた研究からの知識のみでは事足りない。例えば、これらの作物には機能性成分としても注目度が高い(-)-エピガロカテキンガレートなどが多く含まれているが、ガレートの生成などに関する知見はその成分を生成する能力を持たないシロイヌナズナを用いた研究からは得ることが出来ない。

申請者らはこれまでに、カキ果実においてプロアントシアニジンの蓄積異常を示す 2 種類の変異体、すなわち、その蓄積異常が優性形質である中国起源の完全甘ガキ、劣性形質である日本起源の完全甘ガキ、およびエタノールを用いた樹上での脱渋処理、計 3 種類を材料としてサブトラクション法によりカキ果実におけるプロアントシアニジン蓄積に関連すると考えられる遺伝子群を単離し、これらの遺伝子発現がプロアントシアニジン蓄積の季節的な変動や、変異体における蓄積パターンと一致して変化することを確かめている。また、カキは非常に高分子のプロアントシアニジンを多量に蓄積するが、その成分のほとんどは(-)-エピガロカテキンガレ-



第1図 プロアントシアニジンの生合成経路

トで構成されていることを明らかにしている。プロアントシアニジンの生成に必要な酵素としては、現在のところ LAR, ANR, SCPL(serine carboxipeptidase-like protein), PE (polymerization enzyme)の4つが想定されているが、LAR はカキ果実におけるプロアントシアニジンの多量な蓄積には深く関わっていないことが明らかであり、また PE については酵素の存在さえ未解明である。

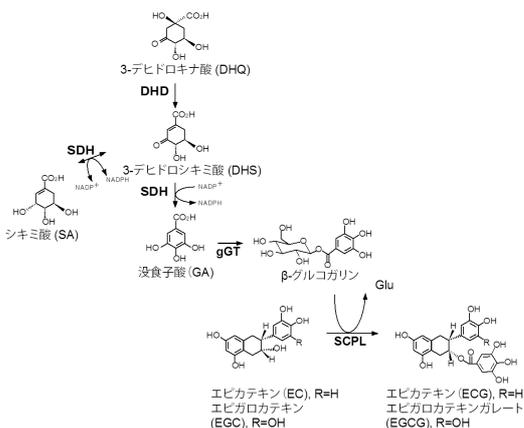
2. 研究の目的

カキは渋み成分である高分子の縮合型タンニン(プロアントシアニジン)を幼果期にタンニン細胞(タンニンを特異的に蓄積する液胞をもつ異型細胞)に蓄積する。本研究は、カキの脱渋に関連する諸問題の解決や完全甘ガキの育種に向けた知見を得るため、カキ果実におけるタンニンの蓄積に関わる重要なステップであるガレート形成について明らかにする。同時に、シロイヌナズナなどのモデル植物にはないブドウやカキの果実に特異な高分子のプロアントシアニジンの生合成や蓄積メカニズムに関する基礎的な知見を得ることを目的とする。

本研究で得られる成果は、カキの品質を左右する脱渋特性や甘渋性の制御法の開発に結びつけることができる。また、蓄積を抑制することを目的とした園芸学的な応用だけでなく、むしろタンニンの蓄積を促進しそれを機能性物質として利用する可能性も考えられる。

3. 研究の方法

生合成酵素(SCPL および没食子酸の生成を触媒することが報告されている DHD/SDH(dehydroquinate dehydratase-shikimate dehydrogenase)について解析を行った。なお、それぞれの酵素については、第2図のような機能を予測し解析を進めた。



第2図 それぞれの酵素の推定される機能

SCPL(DkSCPL2)については 35S プロモーター連結下のセンス、アンチセンス両コンストラクト(pGW2)を作成し、アグロバクテリウム法を用いてカキに形質転換をし、形質転換カルスにおけるプロアントシアニジン

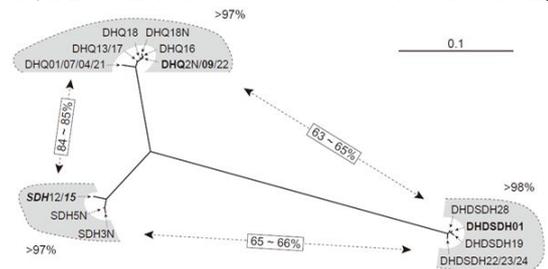
の量と組成の分析を行なった。

DkDHD/SDH については、以前の研究からこれまでにカキ果実の DkDHD/SDH01 について、*E. coli* BL21(DE3)に *AroE::Kan^R* を相同組換えにより導入した BL21 *aroE::Kan^R* (DE3) を用いて、*pET3a-DkDHDSDH* (no-tag) による相補実験を行ったところ、シキミ酸生成活性は確認したものの、セルフリーでの *in vitro* assay では没食子酸生成活性が認められなかったため、データベース上の‘西条’果実 EST のアイソフォームの配列を用いて、‘倉光’幼果より2つの *DkDHD/SDH* (*DkDHD/SDH02*, *DkDHD/SDH03*) を新たに単離した。これらの遺伝子発現を渋ガキである‘倉光’、中国の完全甘ガキ‘羅田甜柿’および‘天宝蓋’、日本の甘ガキ‘駿河’について、経時的な発現解析を行った。また、SCPL と同様に 35S プロモーター連結下のセンス、アンチセンス両コンストラクト(pBI121)を作成し、アグロバクテリウム法を用いてカキに形質転換をし、形質転換カルスにおけるプロアントシアニジンの量と組成の分析を行なうとともに、同コンストラクトによるタバコの形質転換体を作成し、幼葉のタンパク質粗抽出液 (CellLytic P, Merk) によりシキミ酸およびデヒドロシキミ酸を基質とした酵素活性を測定した。

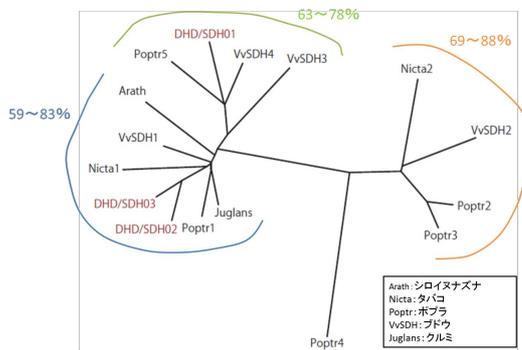
4. 研究成果

SCPL(DkSCPL2)については、アンチセンスに対してセンス個体における PA 含量は増加しているものの、ガレートの割合に有意差は認められなかったため、ガレートの形成よりはむしろ PA の蓄積に関わっている可能性が考えられたが、得られた系統数が少ないため再度試験を行う必要があると考えられた。

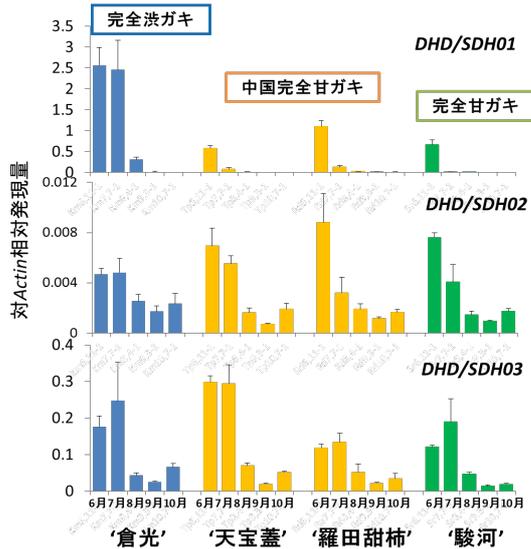
DkDHD/SDH については、新たに単離した2つのアイソフォーム DkDHD/SDH02、DkDHD/SDH03 と DkDHD/SDH01 は他科植物間での系統解析により、DkDHD/SDH01 が属すクラスターと DkDHD/SDH02、DkDHD/SDH03 とが分かれた(第3、4図)。また、渋ガキである‘倉光’、中国の完全甘ガキ‘羅田甜柿’および‘天宝蓋’、日本の完全甘ガキ‘駿河’の果実発達における経時的な発現解析(第5図)や‘倉光’における器官別の発現解析を行ったところ、果実においては、どの遺伝子も幼果実で発現が高い傾向が見られたが、プロアントシアニジンの蓄積量に対応した変化が見られたのは *DkDHD/SDH01* のみであった。



第3図 DkDHD/SDHs の相同性



第4図 DHD/SDHs の系統樹

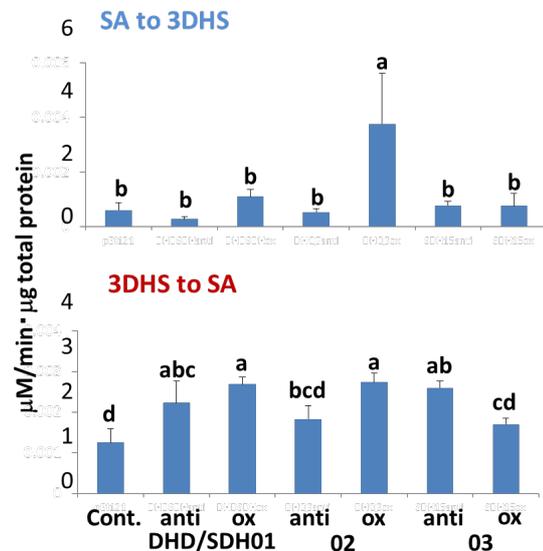


第5図 果実発達における経時的な発現解析

器官別の発現解析では、*DkDHD/SDH01* が幼葉や幼果で相対的な発現が高いのに対し、*DkDHD/SDH02* では花蕾、種子、果実での発現が茎葉よりも高く、*DkDHD/SDH03* は果実よりも茎葉で発現が高くなっていた（データ略）。

次に、タバコの形質転換体の粗抽出タンパク質を用いシキミ酸やデヒドロシキミ酸をもちいた酵素アッセイを行ったところ、*DkDHD/SDH01*、*DkDHD/SDH02* については過剰発現体においてシキミ酸からデヒドロシキミ酸の正逆反応が増加する傾向が見られた（第6図）が、没食子酸の生成活性はこの酵素についても見られなかった（データ略）。

以上の結果から、カキ果実で発現する *DkDHD/SDH* には、没食子酸の生成活性は見られないと考えられた。*DkDHD/SDH01* の発現の増加により、シキミ酸経路におけるオリジナルの活性が高まることで、フェニルプロパノイド生合成の最初の基質となるフェニルアラニンの生成が増加し、それがプロアントシアニンの蓄積増加に関与すると考えられた。今後は、大腸菌で融合タンパク質を生産し *in vitro* assay によりその機能を確認するとともに、カキ果実から没食子酸生成活性を示す新たな酵素の単離実験を進める。



第6図 タバコ形質転換体の粗抽出タンパク質を用いた酵素アッセイ

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 5 件)

A. Katayama-Ikegami, T. Sakamoto, K. Shibuya, T. Katayama, and M. Gao-Takai. 2016. Effects of abscisic acid treatment on berry coloration and expression of flavonoid biosynthesis genes in grape. *American Journal of Plant Science*. 7: 1325-1336.

A. Katayama-Ikegami, T. Sakamoto, T. Katayama, and M. Gao-Takai. 2016. Reference gene validation for gene expression studies using quantitative RT-PCR during berry development of 'Aki Queen' grapes. *Vitis*. 55, 157-160.

Gao-Takai, M., A. Katayama-Ikegami, S. Nakano, K. Matusda and H. Motosugi. 2016. Vegetative growth and fruit quality of 'Ruby-Roman' grapevines grafted on two species of rootstock and their tetraploids. *The Horticulture Journal*. 86:171-182.

C. Yamada, A. Gotoh, M. Sakanaka, M. Hattie, K. A. Stubbs, A. Katayama-Ikegami, J. Hirose, S. Kurihara, T. Arakawa, M. Kitaoka, S. Okuda, T. Katayama and S. Fushinobu. 2017. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chemical Biology*. 24:515-524

片山(池上) 礼子・高居 恵愛・松田 賢一・島田 稜・坂本 知昭. 2017. 成熟後期でのアブシジン酸含有肥料処理によるブドウ'安芸クイーン'および'ルビーロマン'の着色特性の差異. 園芸学研究 in press

〔学会発表〕(計 6 件)

島田稜・高居恵愛・片山礼子. 成熟後期に

おける‘安芸クイーン’と‘ルビーロマン’への
アブシジン酸およびオーキシン処理の影響.
園芸学会北陸支部、2014年11月28日、本
多の森会議室（石川県・金沢市）.

高居恵愛・内藤光・片山礼子・本杉 日野.
2014.ブドウ台木‘5BB’,‘Hybrid Franc ’およ
びそれらの4倍体に接木した‘ルビーロマ
ン’の生育と果実品質. 園芸学会北陸支部、
2014年11月28日、本多の森会議室（石川
県・金沢市）.

片山（池上）礼子・高居恵愛・松田賢一・
玉村壮太・早川隆宏・伊達彩香.着色期の温
度処理がブドウ‘ルビーロマン’のABA蓄
積とアントシアニン生合成に与える影響.
平成27年園芸学会秋季大会、2015年9月
27日、徳島大学（徳島県・徳島市）.

片山（池上）礼子・高居恵愛.2015.ABA処
理による赤色系ブドウ‘安芸クイーン’の
深色化とフラボノイド生合成経路の発現解
析.平成28年園芸学会春期大会、2016年3
月27日、東京農業大学（神奈川県・厚木市）.

Gao, M., A. Katayama-Ikegami, S. Nakano, K.
Matusda and H. Motosugi. Effect of tetraploid
rootstock on the growth and fruit quality of
‘Ruby Roman’ grapevine. Second Asian
Horticultural Congress, September 26, 2016,
Century City International Convention Center
(China, Chengdu).

後藤愛那・阪中幹祥・片山礼子・廣瀬潤子・
加藤紀彦・栗原新・北岡本光・片山高嶺.母
乳オリゴ糖分解酵素 LnbX からみるビフィ
ズス菌-ヒトの共生関係.日本応用糖質科学
会平成28年度大会、2016年9月15日、広
島県民文化センターふくやま（広島県・福
山市）.

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山（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