

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07648

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）Clarification of the mechanism of proanthocyanidin accumulation in fruits

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：果実発達に伴い蓄積するフラボノイド生合成に関する遺伝子やタンパク質の機能解析を行った。本研究ではカキの渋み物質であるプロアントシアニジンにおいて重要な没食子酸生成酵素の同定を試みたが、酵素活性を認めるに至らなかった。一方、ブドウ、マンゴーの成熟段階に蓄積されるフラボノイドであるアントシアニンの生成やポリフェノールの褐変に關与する、いくつかの重要な遺伝子の同定や酵素の特性化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の生存戦略として幼果期には渋み物質であるプロアントシアニジンを、成熟期には赤や紫などの色を決定するアントシアニンなどのフラボノイドを積極的に蓄積する果実において、同代謝経路の制御機構を解明することは、果実の成熟制御に関する基礎的な知見を与えるとともに、これらを活用した果実生産技術や果実の味、見栄えや機能性といった品質を高めるための育種に応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the function of the genes and/or proteins involved in flavonoid biosynthesis during fruits development. In this study, we tried to identify the enzyme for gallic acid synthesis, which is one of the major component of proanthocyanidins in astringent persimmon fruits, however, we could not detect the activity. On the other hand, in grape and mango fruits, we identified the several important genes involved biosynthesis of anthocyanins, one of the flavonoids accumulated during mature stage of fruit development instead of proanthocyanidins, and also characterized the enzymes activities for MiUFGT3 and VviPP02.

研究分野：園芸学

キーワード：フラボノイド 果実成熟 プロアントシアニジン アントシアニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、花や果実に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、特に茶に多く含まれるカテキン類やブドウのレスペ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。

フラボノイド生成(図1)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。また、モデル植物であるタルウマゴヤシにおいて、プロアントシアニジンのポリマー形成に関して、(-)-エピカテキン-システインから LAR がシステインを除去する役割をもち、後の非酵素的なポリマー形成に影響することが示された(Liu et al., *Nature Plants*, 2016)。しかしながら、スターターユニットとなるカテキン類-システインの形成を含めたポリマー形成過程や、何処でどのようにして多量な高分子二次代謝産物が形成され、最終的に液胞に蓄積するのかに関して未解明である。植物細胞においては、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点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えられる。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等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。

2. 研究の目的

(1) カキ果実のプロアントシアニジンの蓄積

カキは渋み成分である高分子の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

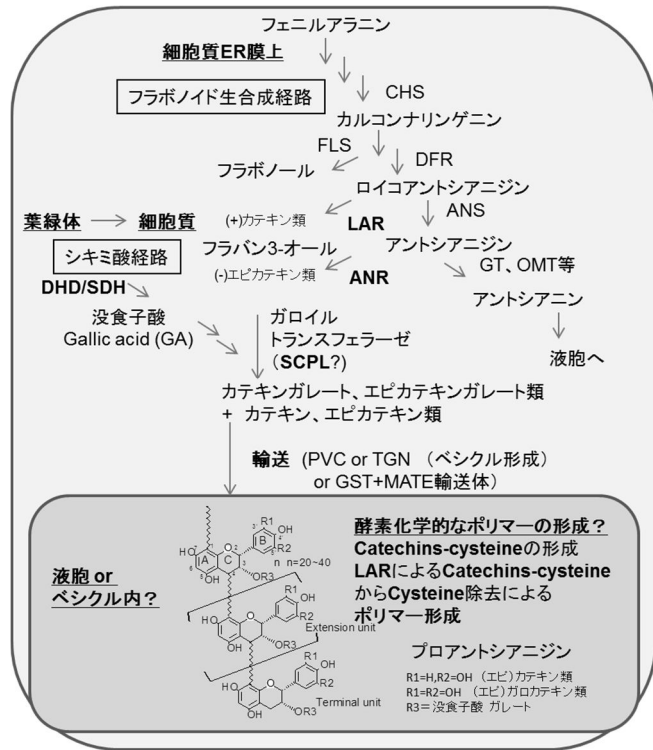


図1 フラボノイド生合成系路

特異的に蓄積する液胞をもつ異型細胞)に蓄積する。本研究では、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、シロイヌイ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した。

(2) ブドウのフラボノイド代謝

フラボノイドの一種であるアントシアニンは果実や花などの色を決定する重要な二次代謝産物である。プロアントシアニジンと同じ生合成経路をたどり、どちらも同じアントシアニンを基質とする。これまでに、どちらの化合物も高温により生合成が抑制されることや、ABA 処理により増加することが報告されている。一方で、ブドウの成熟期開始期であるベレゾーン期を境に起こる、プロアントシアニジンからアントシアニンへの代謝のシフトに関する制御は、種子散布のために進化的に獲得した果実の成熟機構を考えるうえで非常に興味深い。本実験では、ブドウの成熟開始に関わるメカニズムとそれに付随して起こるフラボノイドの代謝制御に関して知識を得ることを目的とした。

フラボノイドを含むポリフェノールは植物の防御を担う二次代謝産物であるが、ヒトが果実を利用する上では、渋みを呈し酸化により褐変するという面をもつ。本実験では果実(果皮)の褐変制御に関与するブドウのポリフェノールオキシダーゼ(PPO)について基礎的な知見を得ることを目的とし、酵素化学的な実験を行った。

これらは当初の研究目的とは異なるものの、プロアントシアニジンが属するフラボノイドの代謝制御に関して、ある程度共通のメカニズムを持つと考えられるため、当科研費の一部を用いて研究に取り組むこととした。

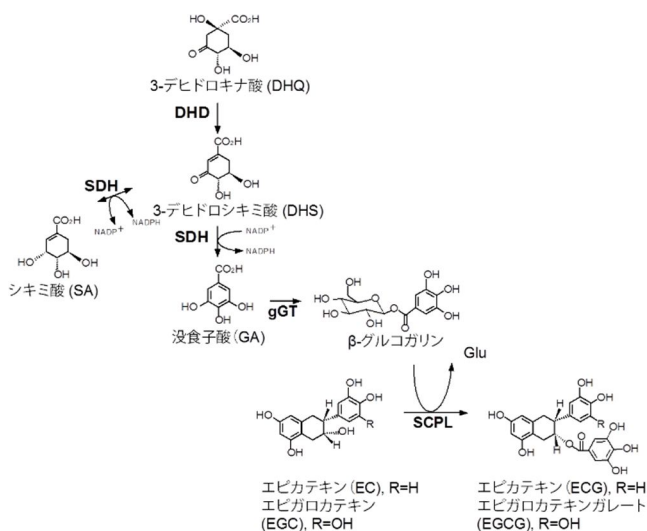
(3) マンゴーの果皮のアントシアニン蓄積に関与する UFGT の解析

アントシアニンを蓄積する赤色系マンゴーについて、これまでに報告された果皮着色に深く関与すると考えられる遺伝子の機能解析を目的として酵素化学的な実験を行った。マンゴーの果皮のフラボノイドは主にフラボノール(ケルセチンを主な骨格とした配糖体)により構成されるが、果皮が赤色に着色する品種では、光の照射により急激にシアニジン 3 ガラクトシドが蓄積される。光によって着色が誘導される多くの樹種間には、ある程度同様なメカニズムがあると考えられるが、これらのフラボノイドの最終産物が代謝される際の、特定の基質供給の制御によって成り立つ代謝メカニズムの解明は興味深い課題であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) カキ果実のプロアントシアニジンの蓄積

没食子酸の生合成酵素(没食子酸の生成を触媒することが報告されている DHD/SDH)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図のような経路が予測されている。ブドウなどでこれまでに没食子酸の生成に関与するという報告がされているものの、その報告の酵素化学的データから本酵素の直接の関与は明らかでなく、また、これまでに我々が行ったカキにおける試験からも DHD/SDH が没食子酸の生成酵素であるというデータは得られていないため、引き続き、宿主を変更して大腸菌での酵素の産生に取り組んだ。次に、DHD/SDH が没食子酸生成酵素ではないと仮定し、カバノキの葉において dehydroshikimate dehydrogenase (DSDG: 没食子酸生成酵素)を抽出し活性を測定した Ossipov ら(2003)の方法に従い、新たにカキ幼果および幼葉から DSDG の精製を試みたが、本方法では活性のある粗酵素抽出物は得られなかった。これらの器官に多量に含まれているプロアントシアニジンが抽出の妨げになったと考えられるため、今後、さらなる抽出法の改良が必要である。



第2図 DHD/SDH および SCPL の推定機能

(2) ブドウのフラボノイド蓄積

赤色系ブドウ‘安芸クイーン’および‘ルビーロマン’の成熟期におけるフラボノイド(特にアントシアニン)の蓄積に関して、その品種の着色特性に注目し、温度処理を中心とした調査を行った。ベレゾーン後およそ10日間隔で低温および高温処理を行い、ABAを中心とした内生植物ホルモンおよびその代謝産物、糖組成、フラボノイドおよびABA代謝に関わる遺伝子に関して量的リアルタイムPCRおよびRNAseqを用いた発現解析を行った。

‘シャインマスカット’の果皮褐変障害であるかすり症に関与すると考えられる PPO2 遺伝子

について、大腸菌で His 融合タンパク質を生産し、その活性を確認するとともに、酵素の性状解析を行った。

(3) マンゴーの果皮のアントシアニン蓄積に関する UFGT の解析

赤色系マンゴー‘アーウィン’において、光により着色が促進される際に発現が上昇する遺伝子がコードする MiUFGT1 (*Mangifera indica* UDP:flavonoid 3-O- glycosyltransferase 1) および MiUFGT3 について、大腸菌で GST 融合タンパク質を生産・精製し、性状解析を行った。

4. 研究成果

(1) カキ果実のプロアントシアニジンの蓄積

上述のように、カキの DHD/SDH について GST 融合タンパク質の生産を試みるためにいくつかのコンストラクトを作成しと宿主についても検討したが、可溶化した融合タンパク質が得られなかった。また、カキ幼果および幼葉から DSDG の生成を試み、粗抽出液を用いて反応後、HPLC にて生成物の解析を試みたが、没食子酸の生成は確認できなかった。今後は多量に存在する縮合型タンニンの除去を含め、抽出法の改良を検討する予定である。さらに、カキ花の子房を用いて、組織学的観察を行ったところ、幼果期のタンニン細胞(タンニンを特異的に蓄積する細胞)の液胞に、タンニンを多く含む多数の小胞が存在することを確認している。今後は、カキの幼蕾とカルス等を用いて、カキのタンニン細胞の成立過程(planstid 由来の tannosome の存在の有無)を明らかにして行きたいと考えている。

(2) ブドウのフラボノイド蓄積

赤色系ブドウ‘安芸クイーン’および‘ルビーロマン’の成熟期、すなわちベレゾーン後およそ 10 日間隔で低温および高温処理を行い、ABA を中心とした内生植物ホルモンおよびその代謝産物、糖組成、フラボノイドおよび ABA 代謝に関わる遺伝子に関して量的リアルタイム PCR および RNAseq を用いた発現解析を行ったところ、これら 2 品種ともにアントシアニンの蓄積が低下したが、これまで他の品種において高温により減少すると報告があった ABA については特に‘ルビーロマン’においては、むしろ若干の上昇が観られ、それに伴って起こると考えられるアントシアニン生合成を上方制御する Myb 転写因子の発現の増加が観られた。従って、高温によるアントシアニンの蓄積低下は内生 ABA 含量の低下やそれに起因したアントシアニン生合成に関わる転写因子の発現の減少とは関係がない可能性が示唆された。

また、‘安芸クイーン’と‘ルビーロマン’では成熟期の ABA の蓄積パターンが異なり、着色が比較的収穫期近くまで続く‘ルビーロマン’では、ABA の蓄積が‘安芸クイーン’と比較して遅くまで続くことが明らかとなった。この傾向は、温度処理試験の際に顕著で、ストレス反応による増加すると考えられる内生 ABA 含量の反応性やそれに起因するアントシアニン生合成の蓄積にも両品種間で差があることが推察された。さらに温度処理を行った果粒の RNAseq のデータ解析より‘ルビーロマン’では‘安芸クイーン’と比較して ABA の生合成に関わる *VviNCED3* および *VviNCED6* の発現が着色に伴い増加することが明らかとなり、ABA の生合成に関与し、成熟後期の良着色形質を支配する因子の存在が示唆された。

‘シャインマスカット’の PPO2 遺伝子について、大腸菌で His 融合タンパク質を生産する際に塩化銅を加えることで、活性中心に銅を供給し、正しくファオルディングされたと考えられる活性のあるタンパク質の生成に成功し、その後の精製を経て酵素の特性化を行った。PPO2 は SDS の添加により修飾をうけて活性化するが、SDS 存在下では酵素が不安定であり、比較的速やかにターンオーバーが起こる可能性が示唆された。PPO2 のアミノ配列から、plastid(pH8 付近)での局在が予測されるが、*in vivo* では、細胞が障害を受けた際、ともに液胞(pH6 付近)が破壊され、pH の低下とともにそこに局在する基質であるポリフェノールを得初めて活性化されるという機作が考えられた。

(3) マンゴーの果皮のアントシアニン蓄積に関する UFGT の解析

大腸菌で発現させた組換え MiUFGT1 および MiUFGalT3 タンパク質の特性を解析した。基質としてのケルセチンの存在下で、組換え MiUFGT1 はごくわずかなグルコース転移活性を示したのに対し、組換え MiUFGalT3 は顕著なガラクトース転移活性を示し、そのガラクトース転移活性はグルコース転移活性より 20 倍高かった。精製 MiUFGalT3 を用いた特異性解析の結果、組換え MiUFGalT3 はアントシアニンとフラボノールに対して同程度の活性を有することが明らかとなった。一方、‘アーウィン’果皮から抽出したアントシアニンを分析したところ、cyanidin 3-O-galactoside と 7-methylcyanidine 3-O- galactoside であることが推定され、これまでに他の赤系マンゴー品種において報告されている結果と一致していた。これらの結果から、MiUFGalT3 はマンゴー‘アーウィン’果皮の赤色着色において重要な役割を担っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Gao-Takai M., A. Katayama-Ikegami, K. Matsuda, H. Shindo, S. Uemae, M. Oyaizu.	4. 巻 283
2. 論文標題 Low temperature promotes anthocyanin biosynthesis but does not accelerate endogenous abscisic acid accumulation in red-skinned grapes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 165-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2019.01.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gao-Takai, M., A. Katayama-Ikegami, S. Nakano, K. Matusda and H. Motosugi	4. 巻 86
2. 論文標題 Vegetative growth and fruit quality of 'Ruby-Roman' grapevines grafted on two species of rootstock and their tetraploids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 171-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.OKD-009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 片山 (池上) 礼子・高居 恵愛・松田 賢一・島田 稜・坂本 知昭	4. 巻 16
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 317-324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hrj.16.317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gao, M., A. Kaytayama-Ikegami, S. Nakano, K. Matusda and H. Motosugi.	4. 巻 1208
2. 論文標題 Comparison of vegetative growth, fruit quality and plant hormone content of 'Ruby Roman' grapevines grafted on diploid and tetraploid rootstocks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/ActaHortic.2018.1208.27	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayako Katayama-Ikegami, Yuka Suehiro, Takane Katayama, Kazushi Jindo, Hiroyuki Itamura and Tomoya Esumi	4. 巻 81
2. 論文標題 Recombinant Expression, Purification, and Characterization of Polyphenol Oxidase 2 (VvPP02) from 'Shine Muscat' (Vitis labruscana Bailey × Vitis vinifera L.)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 2330-2338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1381017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田賢一・片山(池上)礼子・東 成美・酒井賀乃子・中野眞一・玉村壮太・早川隆宏・伊達彩香・高居恵愛	4. 巻 19
2. 論文標題 ブドウ'ルビーロマン'のポット栽培における着色期の温度が果皮着色に及ぼす影響.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 29-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2503/hrj.19.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松田賢一・片山(池上)礼子・東 成美・酒井賀乃子・中野眞一・玉村壮太・早川隆宏・伊達彩香・高居恵愛	4. 巻 19
2. 論文標題 ブドウ'ルビーロマン'の培養果粒における温度処理が果皮着色に及ぼす影響.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 39-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2503/hrj.19.39	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katayama-Ikegami, A., Z. Byun, S. Okada, M. Miyashita, T. Katayama, T. Sakamoto, A. Ichihi, K. Shimizu and S. Kanzaki.	4. 巻 89
2. 論文標題 Characterization of the recombinant UDP:flavonoid 3-O-galactosyltransferase from <i>Mangifera indica</i> 'Irwin' (MiUFGalT3) involved in skin coloring.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片山礼子・高居恵愛
2. 発表標題 赤色系四倍体ブドウ‘ルビーロマン’と‘安芸クイーン’の果実着色とABA蓄積パターンの差異
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江角智也・松本一希・末廣優加・板村裕之・神藤和史・片山高嶺・片山（池上）礼子.
2. 発表標題 'シャインマスカット'の果皮褐変障害に関わるポリフェノールオキシダーゼ(VvPP02)の酵素活性.
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gao-Takai, M., A. Katayama-Ikegami, Z. Lin.
2. 発表標題 Grapevine rootstocks differentially affect genes expression and transcriptome profiling of ‘Ruby Roman’ berry skin grafted on diploid and tetraploid rootstocks.
3. 学会等名 IHC（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高居恵愛・片山礼子・松田賢一・高山典雄・上前慎太郎・林哲
2. 発表標題 ‘ルビーロマン’ブドウ果皮の着色に対する夜温の影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高居恵愛・片山（池上）礼子・松田賢一
2. 発表標題 温度処理がブドウ‘ルビーロマン’と‘安芸クイーン’果粒の着色と果皮における植物ホルモンに及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高木 宏樹 (Takagi Hiroki) (80616467)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授 (23303)	