

平成21年 4月24日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18789006

研究課題名（和文） ブドウの着色に関連したmyb様遺伝子のプロモーター解析

研究課題名（英文） Analysis of promoter region of *VvmybA1* gene related to grape skin coloration

研究代表者

児下 佳子 (KOSHITA YOSHIKO)

農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・主任研究員

研究者番号：70355444

研究成果の概要：ブドウのアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現を制御する MYB 様転写因子の遺伝子、*VvmybA1* のプロモーター解析を行った。ブドウの着色は ABA により誘導されるため、ABA 受容体からのシグナル伝達系のタンパク質が結合すると思われる *VvmybA1* 遺伝子のプロモーターのシス領域の特定を試みた。その結果、ABA の有無にかかわらず、アントシアニン合成に不可欠な領域は *VvmybA1* 遺伝子 5' 上流約 0.7kbp～10bp の間にあると特定された。一方、ABA 受容体からのシグナルが結合し、*VvmybA1* の転写を促進すると思われる領域については、確実に特定するに至らなかった。以上より、アントシアニン合成に不可欠なおおよその領域を特定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：Myb, ブドウ, 果皮, アントシアニン

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) ブドウの果皮色について

ブドウは世界的に産業上大変重要な果樹である。ブドウの果皮色は黒紫色、赤色および黄緑色の3つに大別できる。このうち、黒紫色および赤色ブドウの果皮色はアントシアニン色素が果皮で合成・蓄積して生じたものである。ブドウの着色機構の解明は、植物生理学的にも産業的にも非常に意義が大き

い。これは、ブドウの着色は果実の品質や価格を左右するだけでなく、様々な環境および樹体要因によって制御されている、大変複雑な現象であることによる。

ブドウの着色に影響を及ぼす要因についてはこれまでも色々調べられてきたが、温度、光、炭水化物、そして植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) 等が着色に関連が深いとされている。

(2) ブドウ果皮におけるアントシアニン合成について

ブドウ果皮におけるアントシアニン合成は、*VvmybA1* 遺伝子により制御されている。一方、ブドウの着色程度は果皮の ABA 含量の増加とよく対応し、ABA が急激に増加する時期に着色が開始する。また ABA 処理により着色が良好となり、Myb 様遺伝子により制御を受けているアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現も上昇する。これらのことから、ブドウ果皮のアントシアニン合成は、主に ABA によって制御されている可能性が非常に高い。

(3) ABA により着色が誘導されるメカニズム (仮説)

ブドウ果皮の ABA によるアントシアニン合成は①ABA が受容体に結合する、②受容体からのシグナル伝達系のタンパク質が *VvmybA1* 遺伝子のプロモーターのシス領域に結合し *VvmybA1* 遺伝子の転写を誘導する、③転写・翻訳された *VvMYBA1* タンパク質がアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現を誘導し、アントシアニンが合成・蓄積し、着色する、の3段階が不可欠であると考えられる。

(4) 研究の現状

ブドウの *VvmybA1* 遺伝子が ABA 受容体からのシグナル伝達によって転写される機構に関する報告はこれまでにない。また ABA によるブドウの着色機構も依然として不明な部分が多い。

(5) 以上のことから、ブドウの着色を制御している *VvmybA1* 遺伝子のプロモーター領域を解析することにより、ブドウの着色に重要なプロモーター領域が特定され、ブドウの着色機構の解明につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) ブドウの着色に影響を及ぼす要因は様々あるが、ABA が担う役割は大きいと考えられる。したがって、*VvmybA1* 遺伝子のプロモーター領域のうち、ABA からのシグナル伝達系のタンパク質が結合する領域を特定する。

(2) ABA からのシグナル伝達系のタンパク質のうち、ブドウのアントシアニン合成の鍵を握っているものを特定する。

## 3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの構築

長さの異なるプロモーター領域を持つ *VvmybA1* 遺伝子の発現ベクターを5種類構築する。プロモーターの長さは *VvmybA1* 遺伝子上流からそれぞれ約 2.1kbp、2.0kbp、1.3kbp、0.6kbp、10bp とし、pBI101 ベクターのカナマイシン耐性遺伝子の下流に配置して、構築する。また、対照として上記遺伝子のかわりにカリフラワーモザイク (CaMV)35S プロモーターに連結させた *VvmybA1* 遺伝子をベクターに組み込んだものを用いる。これらをアグロバクテリウム (LBA4404) に導入する。

(2) アントシアニン合成能を評価するための実験系の確立

アントシアニンを合成しない黄緑色ブドウ数品種の果実を用い、アグロバクテリウム法により一過性の発現を確認するための効率的な方法を確立する。アントシアニンの合成は、黄緑色ブドウ果皮にアントシアニンを合成する赤色細胞が出現することで確認するが、アグロバクテリウムの感染からアントシアニンが合成されるまで、約三週間程度を要する。したがってこの培養期間、果粒が健全に保持されることが重要となるため、果粒の培養条件や、果実の滅菌法における最適条件を実験に用いる品種ごとに検討する。

(3) プロモーター活性の検定

アグロバクテリウム法により、プロモーター領域の長さの異なる *VvmybA1* 遺伝子と CaMV35S プロモーターに連結した *VvmybA1* 遺伝子をブドウの果実に導入し、ABA の存在下、または非存在下で一過性の発現解析を行う。ブドウ果実へのアグロバクテリウムの感染は Kobayashi ら (2005) の方法に準じて行った。これにより、ABA 受容体からのシグナル伝達系のタンパク質が結合するプロモーター領域および、アントシアニン合成に不可欠な領域が特定される。

(4) ブドウ果実以外の植物におけるプロモーター解析

ブドウ果実を用いたプロモーター解析は一年のうちブドウのベレーゾン期のみしか行うことができないため、他の植物で本研究が可能かどうかを検討した。具体的にはキウイフルーツの培養物を用い、葉を用いてアントシアニンを合成する細胞の出現を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 効率的な培養条件の確立

果実の滅菌方法と培養条件を改良し、アントシアニンを合成する細胞を確認するため

の効率的な実験系を確立した(図1 a-c)。

本実験系では、果実をアグロバクテリウムに感染させてから3週間以上、植物の状態が健全に保たれており、アントシアニンの合成を肉眼で観察することができた。したがって、本実験系を用いれば、アントシアニン合成する細胞を指標としてプロモーター活性の検定が可能であると考えられる。

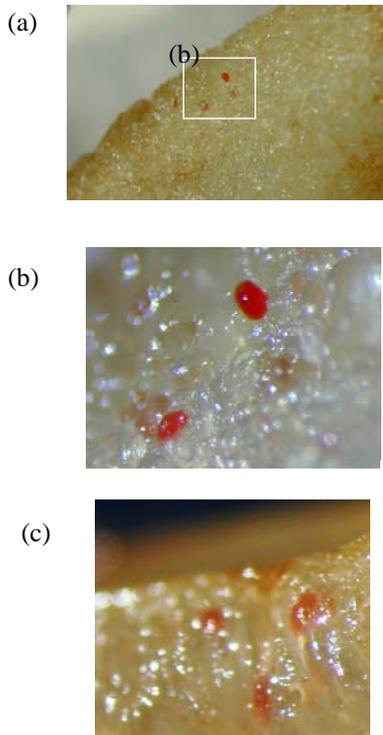


図1. ‘イタリア’ (黄緑色品種) 果皮(a, b)および果実の切り口の果皮部分(c)に形成されたアントシアニンを合成する細胞。導入した遺伝子は *CaMV35S-VvmybA1*。

#### (2) アントシアニン合成に関連のある領域の特定

(1)の実験系を用い、ブドウの着色を質的に制御する領域、すなわちアントシアニン合成に不可欠な領域を特定した。

実験材料には4倍体黄緑色品種の安芸津25号を用いた。その結果、*VvmybA1* 遺伝子の約0.7kbp~10bp 上流域が欠損すると、アントシアニン合成が起こらないことから、この領域がアントシアニン合成に不可欠であることが示唆された(図2 a, b)。同様の傾向は‘イタリア’果実を用いた実験からも明らかであった。

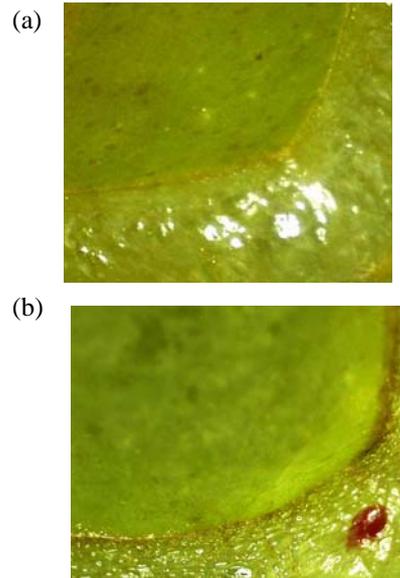


図2. *VvmybA1* 遺伝子上流0.7 kbp~10bp を含まない(a)および、含む(b)*VvmybA1* を導入した果実。(a)では赤色細胞は出現しなかったが、(b)では赤色細胞が確認された。したがって、*VvmybA1* 遺伝子の約0.7kbp~10bp 上流域がアントシアニン合成に不可欠な領域として特定された。

#### (3) ABA 受容体からのシグナル伝達系のタンパク質が結合する領域の特定

ABA 受容体からのシグナル伝達系のタンパク質が結合すると思われる領域、すなわち ABA の有無によりアントシアニン合成が制御される領域は、形質転換により生じた赤色細胞の数や、アントシアニン総量から特定できると考えられた。ABA を添加していない培地より添加した培地でアントシアニン合成が盛んとなることを指標に本領域の特定を試みたが、そのような領域の特定はできなかった。

#### (4) 他の双子葉植物への *VvmybA1* 遺伝子の導入

キウイフルーツ培養物の葉を用いて、構築した遺伝子を導入し、アントシアニン合成を観察した。その結果、*VvmybA1* 遺伝子上流約1.3kbp のプロモーター領域を持つものは、キウイフルーツ培養物に導入してもアントシアニンを合成する赤色細胞の出現が確認された。他のベクターでは検討していないため、今後検討が必要である。構築したベクターをすべてキウイフルーツ培養物に導入し、ブドウと反応が同じであれば、キウイフルーツを用いたプロモーター解析が可能であると考えられる。キウイフルーツを用いたプロモ-

ター解析は、現在継続中である。

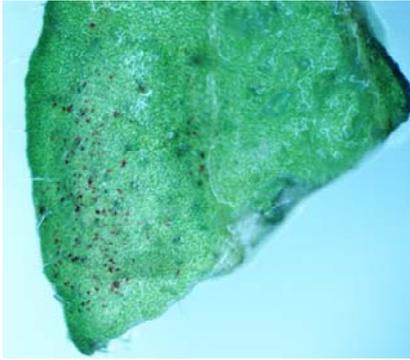


図3. キウイフルーツ培養物に生じたアントシアニンを合成する赤色細胞。導入した遺伝子は、5'上流約1.3kbpのプロモーター領域を持つ *VmybA1*。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yoshiko Koshita, Shozo Kobayashi, Megumi Ishimaru, Yoshio Funamoto, Mikio Shiraishi, Akifumi Azuma, Hiroshi Yakushiji, Masayoshi Nakayama  
An anthocyanin regulator from grapes, *VlmybA1-2*, produces reddish-purple plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 77, 33-37, (2008) 査読 (有)

〔学会発表〕(計1件)

児下佳子、小林省蔵、石丸恵、船本佳央、白石美樹夫、薬師寺博、東暁史、ブドウの *VlmybA1-2* cDNA の導入による形質転換体の作出、園芸学会雑誌、第75巻、別冊2、115、2006年9月23-25日、長崎大学

〔その他〕

雑誌論文は平成20年度園芸学会賞年間優秀論文賞を受賞した。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児下 佳子 (KOSHITA YOSHIKO)  
農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・主任研究員  
研究者番号：70355444

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：