

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06032

研究課題名（和文）花数決定メカニズムに基づく革新的なブドウ果粒数制御技術の開発

研究課題名（英文）An innovative cultivation technique for regulating grape berry number on bunch based on a mechanism for determining flower number in grapevine

研究代表者

鈴木 俊二（Suzuki, Shunji）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60372728

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）：花序につく花数がブドウ房の密着度を決定する。果皮が薄く、密着果房になりやすい醸造用ブドウ品種では裂果が頻繁に起き、日本のような高温多雨の栽培地でそれが顕著である。本研究では、マイクロシリンジを使用し萌芽直前の芽にトレハロースを注入することで房当たりの果粒数を減少させることに成功した。トレハロースは花序分岐ではなく花形成を制御した。さらに、房当たりの果粒数を決定するにあたりトレハロース代謝とサイトカイニン分解間のクロストークが関与するという新しい知見を見出した。ブドウ栽培にトレハロース注入技術を適応することにより、醸造用ブドウの密着果房を緩和するための省力栽培技術の開発に貢献することであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

萌芽直前のブドウ芽へトレハロースを注入することにより房あたりの果粒数を減らすことに成功した。加えて、「トレハロース代謝により生じたトレハロースがサイトカイニン分解を促進することで花芽分裂が抑制され、房あたりの果粒数が減少する」ことを見出した。今後、トレハロース処理による革新的な果粒数制御技術が確立されれば、これまで我が国では栽培が難しかった密着果房醸造用ブドウ品種、例えば「ピノ・ノワール」の栽培拡大および果実品質の向上並びに日本ワインの品質向上に貢献できるであろう。加えて、密着果房でない品種にも本技術を応用することにより房内の風通しがよくなり、病気の発生を抑えるという副次効果も想定される。

研究成果の概要（英文）：The number of flowers per inflorescence determines the compactness of grape bunches. Wine grape cultivars with tight bunches and thin-skinned berries easily undergo berry splitting, especially in growing areas with heavy rainfall during the grapevine growing season, such as Japan. We report herein decreasing the number of berries per bunch in field-grown Pinot Noir by injecting trehalose into swelling buds nearing bud break using a microsyringe. Trehalose did not affect pedicel branching on grapevine inflorescences, suggesting that trehalose regulates flower formation but not inflorescence branching. The findings may provide new information on the crosstalk between trehalose metabolism and cytokinin degradation for determining the number of berries per bunch. The applicability of trehalose injection in viticulture, contribute to popularizing this labor-saving technique to loosen tight bunches of wine grapes.

研究分野：園芸学

キーワード：醸造用ブドウ 果粒数制御 花数決定メカニズム 裂果 密着果房 栽培技術 トレハロース サイトカイニン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

『植物の花数はどのように決定されるのか?』農作物の収量を決定する要素に1個体あたりの花数がある。花数の決定メカニズムに関する研究は花数が収量に反映されるイネ、トウモロコシで進められているが、未だ不明な点が多い。密穂形質を示すイネ品種ハバタキにおいて密穂形質を決定する遺伝子 *OsCKX2* が同定された (Ashikari et al. 2005)。 *OsCKX2* 遺伝子は「茎頂分裂組織を正に制御する植物ホルモン」であるサイトカイニン分解酵素サイトカイニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ (CKX) をコードする。ハバタキでは *OsCKX2* 遺伝子が機能せず、密穂形質を示さない品種に比べ茎頂分裂組織のサイトカイニン量が増加していた。結果として、ハバタキでは花芽形成が促進され、密穂形質になる。しかしながら、すべての植物において CKX が花数を負に制御しているかは明らかでない。

花序の分岐も1個体あたりの花数を決定する要素のひとつである。トウモロコシでは RAMOSA ファミリーが花序分岐に関わる (Gallavotti et al. 2010)。RAMOSA3 は他の RAMOSA ファミリーと異なり、トレハロース代謝に関与する trehalose-6-phosphate phosphatase (以下、トレハロースホスファターゼ。[$\text{トレハロース-6-リン酸} + \text{水} = \text{トレハロース} + \text{リン酸}$] を触媒) であり、RAMOSA3 のホモログである SISTER OF RAMOSA3 (SRA) もまた花序分岐に関わるトレハロースホスファターゼである (Sato-Nagasawa et al. 2006)。植物の花序分岐メカニズム解明の糸口として「トレハロース」は重要なキーワードであるが、トレハロースが花序分岐、延いては花数の決定にどのように関与するかは明らかでない。

2. 研究の目的

ブドウの花序は果梗を主軸として小果梗が形成される。小果梗の先に花が形成されるため、小果梗の分岐はイネやトウモロコシの花序分岐に類似していると言える。1房あたり的小果梗の数は品種により大きく異なり、品種の形態的個性とされる。一方、果梗が短く小果梗が多いピノ・ノワールは密着果房になりやすく、果皮が薄いことも重なり、放射状の割れ目が果粒に入る「裂果」が起きやすいことが栽培の課題である。我が国は果粒肥大期に梅雨を迎えるため、さらに密着果房品種のピノ・ノワールでは果粒肥大および裂果が顕著である。裂果した果粒は腐敗し、ワインの品質を低下させる。密着果房および裂果の対応策として、ジベレリン処理により果梗を伸長させる方法が提案されたが (Miele et al. 1978) その効果は低く栽培技術として定着しなかった。そのため、我が国のピノ・ノワール栽培では醸造用ブドウでは異例の摘粒作業を行っている。

これらの背景を受け、本研究では醸造用ブドウの小果梗分岐の分子機構、すなわち「ブドウの花数決定メカニズムを解明」することにより、「ブドウの花数を制御する技術」の開発を目指す。これまでに、我々はトウモロコシの花序分岐を制御する *SRA* 遺伝子と相同性を有する *VvSRA* 遺伝子を醸造用ブドウからクローニングしている。ブドウ若齢花序における *VvSRA* 遺伝子発現量が多くなるに従い、房当たりの果粒数が減少することを見出した (Ishiai et al. 2016)。 *VvSRA* を高発現するシロイヌナズナでは花の数が激減し、CKX をコードする遺伝子 *AtCKX* 遺伝子発現量が増加した。また、醸造用ブドウの CKX をコードする *VvCKX5* 遺伝子の発現量がブドウの若齢花序で増加するに従い、房当たりの果粒数が減少する、若齢花序へのトレハロース処理は *VvCKX5* 遺伝子の発現量を増加することを見出した。これらの結果から、「*VvSRA* が制御するトレハロース代謝系により生じたトレハロースが *VvCKX5* 遺伝子発現量を増加させることでサイトカイニンが分解され、花芽分裂が抑制される。結果として果房当たりの果粒数が減少する」という独創的な仮説を立て、本研究では、*VvCKX5* 高発現シロイヌナズナの表現型解析、トレハロース処理による醸造用ブドウの果粒数制御技術の開発、を実施した。

3. 研究の方法

3 - 1. *VvCKX5* 高発現シロイヌナズナの表現型解析

ピノ・ノワールの若齢花序から RNA を抽出し、cDNA を合成した。 *VvCKX5* のコード領域の末端に *KpnI* および *EcoRI* 制限酵素サイトを付加した *VvCKX5* 遺伝子増幅プライマーを用いて cDNA から PCR 法により *VvCKX5* 遺伝子増幅産物を得た。これを *KpnI* および *EcoRI* で処理し、植物発現ベクター pRI101-AN ベクター (タカラバイオ) の *KpnI* および *EcoRI* 制限酵素サイトにクローニングし、 *VvCKX5* 遺伝子高発現プラスミドを作成した。アグロバクテリウム法により *VvCKX5* 遺伝子高発現プラスミドをシロイヌナズナ Col-0 へ形質転換し、 *VvCKX5* 遺伝子をホモで持つ T4 ホモ個体を得た。

表現型解析として、野生型 Col-0 と *VvCKX5* 高発現シロイヌナズナの形質 (主茎の長さ、第

二側枝の数、第二側枝上の花の数、第二側枝上の花の大きさおよび第二側枝上のさやの長さ)を比較とした。野生型と VvCKX5 高発現体の成長速度の違いから、各項目の測定日を以下のように定めた。野生型は播種後 44 日目に、VvCKX5 高発現体は 57 日後に主茎の長さを測定した。野生型は播種後 42 日目に、VvCKX5 高発現体は播種後 57 日目に第二側枝の数を測定した。野生型は播種後 35 日目に、VvCKX5 高発現体は播種後 52 日目に第二側枝上の花数と花の大きさを測定した。野生型は播種後 42 日目に、VvCKX5 高発現体は播種後 69 日目にさやの長さを測定した。

データは全て平均値±標準偏差で表した。Excel 統計ソフトウェア 2012 (社会情報サービス)を用いて、Dunnett 検定により統計解析を行った。

3 - 2 . トレハロース処理による醸造用ブドウの果粒数制御技術の開発

山梨大学ワイン科学研究センター実験圃場で栽培されているピノ・ノワール (*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir、樹齢は約 30 年、台木は Kober 5BB を使用、垣根仕立て)を供試した。10%トレハロース水溶液に 0.1%Approach BI (丸和バイオケミカル)を添加し、圃場試験用トレハロース溶液とした。ピノ・ノワールの新芽が萌芽直前となる 2020 年 4 月 8 日 (Eichhorn-Lorenz Stage 3) にトレハロース処理を実施した。トレハロースの処理方法として、高速液体クロマトグラフで試料のインジェクションに用いるマイクロシリンジニードル (伊藤製作所) を用いてトレハロース溶液 (250 μ L / 芽) を萌芽直前の新芽の内部に注入した (図 1)。対照区として水 (0.1%Approach BI を添加、250 μ L / 芽) をトレハロース溶液同様に新芽に処理した。また無処理区も設定した。各処理区につき、5 芽を供試した。

2020 年 8 月 9 日 (Eichhorn-Lorenz Stage 38) に果房および果実形態を評価した。各処理区からピノ・ノワール果房を 10 房サンプリングし、果房の形態を評価する指標として、房長、房重、果房当たりの果粒数および果梗当たりの小果梗数を、果粒の大きさの変化を確認するために 10 粒重 (果房上部から 2 粒、中部から 6 粒、下部から 2 粒ずつ採取) を測定した。

データは全て平均値±標準偏差で表した。Excel 統計ソフトウェア 2012 を用いて、Dunnett 検定により統計解析を行った。



図1 新芽へのインジェクション処理

4 . 研究成果

4 - 1 . VvCKX5 高発現シロイヌナズナの表現型解析

本研究において、VvCKX5 高発現シロイヌナズナ T4 ホモ個体を 3 系統得た (OE-3、OE-4 および OE-6 と命名)。播種後 44 日目のシロイヌナズナ (図 2) を観察したところ、いずれの VvCKX5 高発現体も野生型 Col-0 と比較して生長が遅れることが確認された。今回測定した各項目の結果を以下にまとめた。

- 1) 主茎の長さ: 野生型と比較して、VvCKX5 高発現体の主茎の長さは短かった (図 3A)。
- 2) 第二側枝の数: 野生型と VvCKX5 高発現体の第二側枝の数に違いは認められなかった (図 3B)。
- 3) 第二側枝上の花の数: 野生型と比較して、VvCKX5 高発現体の第二側枝上の花の数は減少した (図 3C)。
- 4) 花の大きさ: 野生型と比較して、VvCKX5 高発現体の第二側枝上の花はわずかに小さくなった (図 3D)。
- 5) さやの長さ: 野生型と比較して、VvCKX5 高発現体の第二側枝上のさやの長さはわずかに小さくなった (図 3E)。



図2 VvCKX5高発現シロイヌナズナ播種後44日目のシロイヌナズナCol-0系統 (WT) およびVvCKX5高発現シロイヌナズナT4ホモ個体3系統 (OE3、OE4、OE6) を撮影した。スケール・バー: 5 cm

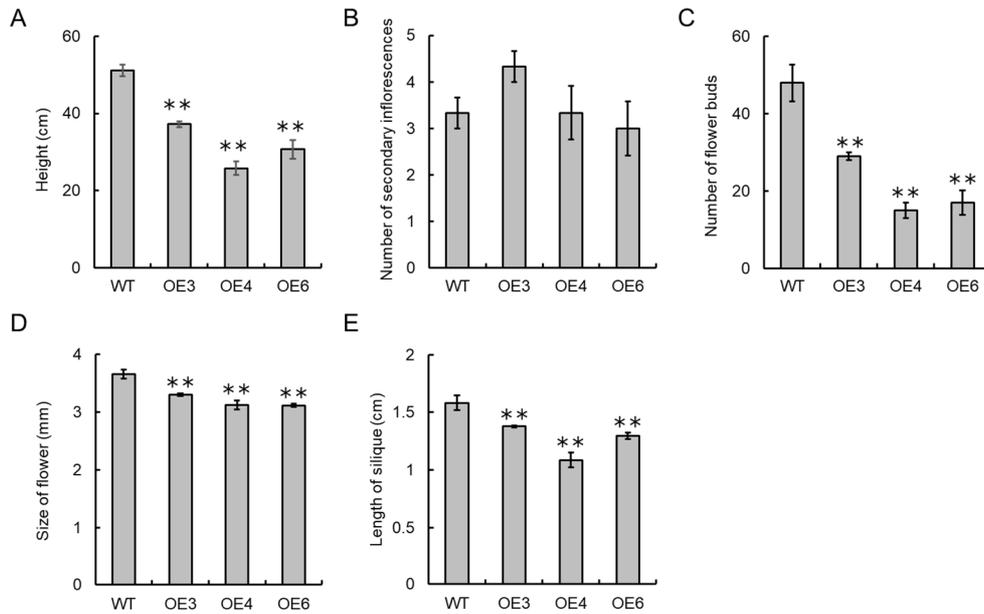


図3 VvCKX5高発現シロイヌナズナの表現型

シロイヌナズナCol-o系統 (WT) およびVvCKX5高発現シロイヌナズナT4ホモ個体3系統 (OE3、OE4、OE6) の表現型を測定した。

A: 主茎、B: 第二側枝の数、C: 第二側枝上の花の数、D: 花の大きさ、E: さやの長さ。データは平均値±標準偏差で表した (n=3)。

** WTに対して1%水準で有意差有り (Dunnett検定)

4 - 2 . トレハロース処理による醸造用ブドウの果粒数制御技術の開発

トレハロース処理による新梢成長、開花時期および葉の形態への影響は目視では認められなかった。収穫期にサンプリングしたピノ・ノワール果房の写真を図 4A に示した。トレハロース処理した果房は対照区および無処理区の果房と比較して小さくなっており、果粒をすべて取り除いた果梗の比較からも確認された (図 4B)。今回測定した各項目の結果を以下にまとめた。

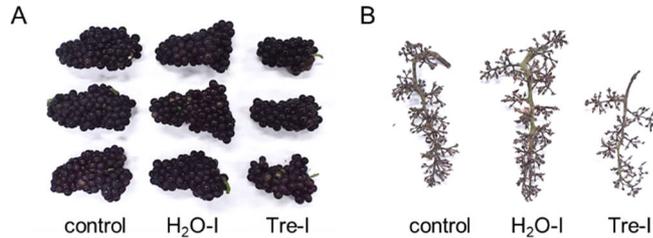


図4 収穫期の果房および果梗の表現型

A: 果房、B: 果梗。

control: 無処理、H₂O-I: 水処理、Tre-I: トレハロース処理

- 1) 房重: トレハロース処理した果房の房重が対照区、無処理区と比較して減少した (図 5A)。
- 2) 房長: トレハロース処理した果房の房長が対照区、無処理区と比較して減少した (図 5B)。
- 3) 果房当たりの果粒数: トレハロース処理した果房において、果房当たりの果粒数は対照区、無処理区と比較して 60%減少した (図 5C)。
- 4) 果梗当たりの小果梗数: いずれの処理区も差が認められなかった (図 5D)。
- 5) 10 粒重: いずれの処理区も差が認められなかった (図 5E)。

4 - 3 . まとめ

我々の研究室でこれまでに実施された研究から、シロイヌナズナにおいてトレハロースホスファターゼをコードしている *VvSRA* 遺伝子の発現により、サイトカニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼをコードしている *CKX* 遺伝子の発現が誘導されること、醸造用ブドウにおいてトレハロース処理により *VvCKX5* 遺伝子の発現が誘導されること、が示された (Ishiai et al. 2016, Moriyama et al. 2020)。これに加え、本研究により、醸造用ブドウにおいて *VvCKX5* 遺伝子の発現が花芽分化を負に制御していること、醸造用ブドウの新芽にトレハロースをイ

ンジェクション処理することで果房当たりの果粒数を減少できること、が明らかとなった。これらの結果は、「VvSRA が制御するトレハロース代謝系により生じたトレハロースが VvCKX5 遺伝子発現量を増加させることでサイトカニンが分解され、花芽分裂が抑制される。結果として果房当たりの果粒数が減少する」という我々の仮説（図 6）を実証するものである。しかしながら、本研究では各サンプルのトレハロース含有量やサイトカニン含有量を測定していないため、トレハロース代謝系とサイトカニン分解系以外の要素がシロイヌナズナおよび醸造用ブドウの花芽形成に参与している可能性を否定できない。今後、VvSRA あるいは VvCKX5 を高発現する醸造用ブドウを作成し、トレハロース含有量とサイトカニン含有量、そして花芽形成、果房当たりの果粒数に変化があるかを検証する予定である。

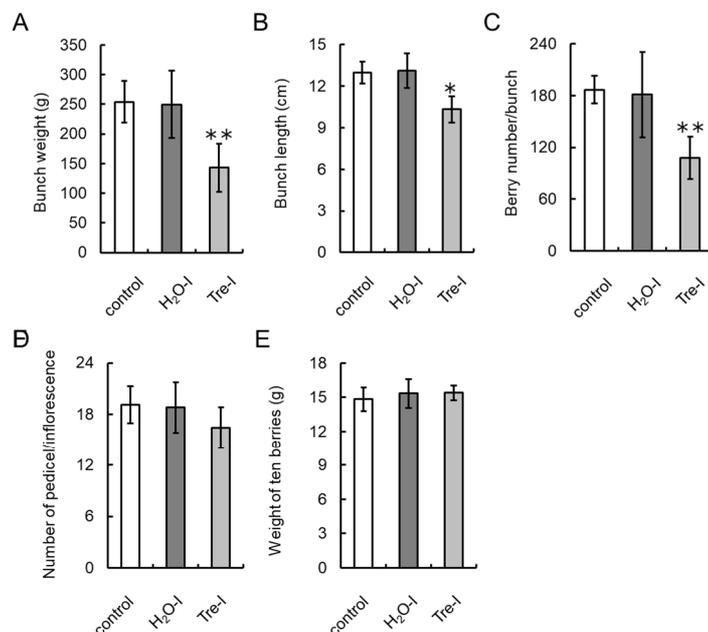


図5 トレハロース処理による果房および果実形態の変化
A: 房重、B: 房長、C: 果房当たりの果粒数、D: 果梗当たりの小果梗数、E: 10粒重。
control: 無処理、H₂O-I: 水処理、Tre-I: トレハロース処理
データは平均値±標準偏差で表した。
*controlに対して5%水準で有意差有り (Dunnnett検定)
**controlに対して1%水準で有意差有り (Dunnnett検定)

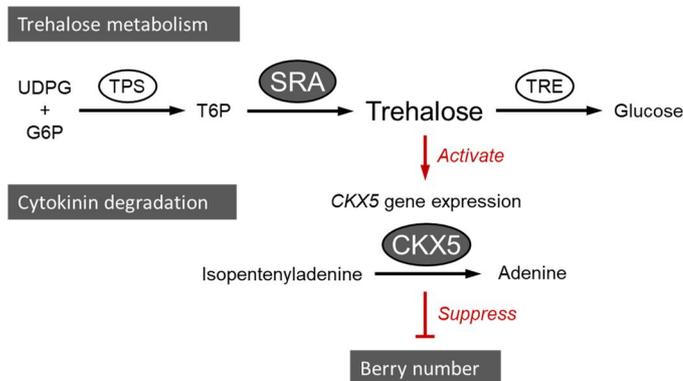


図6 醸造用ブドウにおける果粒数制御機構（仮説）

<参考文献>

- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E. R., Qian Q., Kitano H. and Matsuoka M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309, 741-745.
- Gallavotti A., Long J A., Stanfield S., Yang X., Jackson D., Vollbrecht E. and Schmidt R. J. (2010) The control of axillary meristem fate in the maize ramosa pathway. *Development* 137, 2849-2856.
- Ishiai S., Nakajima Y., Enoki S. and Suzuki S. (2016) Grape SISTER OF RAMOSA3 is a negative regulator of pedicel development of grape inflorescence. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 124, 217-225.
- Miele A., Weaver R. J. and Johnson J. (1978) Effect of potassium gibberellate on fruit-set and development of Thompson Seedless and Zinfandel grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 79-82.
- Moriyama A., Yamaguchi C., Enoki S., Aoki Y. and Suzuki S. (2020) Crosstalk pathway between trehalose metabolism and cytokinin degradation for the determination of the number of berries per bunch in grapes. *Cells* 9, 2378.
- Satoh-Nagasawa N., Nagasawa N., Malcomber S., Sakai H. and Jackson D. (2006) A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441, 227-230.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Moriyama, A., Yamaguchi, C., Enoki, S., Aoki, Y. and Suzuki, S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Crosstalk pathway between trehalose metabolism and cytokinin degradation for the determination of the number of berries per bunch in grapes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9112378	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森山綾音・山口千穂・榎真一・青木是直・鈴木俊二
2. 発表標題 トレハロース代謝系とサイトカイニン分解系のクロストークがブドウの果粒数を決定する
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山綾音・山口千穂・榎真一・青木是直・鈴木俊二
2. 発表標題 トレハロースを用いた革新的果粒数制御技術の開発に向けて
3. 学会等名 日本ブドウ・ワイン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木俊二
2. 発表標題 トレハロース代謝系とサイトカイニン分解系のクロストークがブドウの果粒数を決定する
3. 学会等名 第24回トレハロースシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------