

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580059

研究課題名(和文) アブシシン酸(ABA)シグナル伝達系を介したブドウの着色機構の解明

研究課題名(英文) The coloring mechanism of the grapes mediated by abscisic acid signal transduction

研究代表者

児下 佳子(KOSHITA, Yoshiko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所栽培・流通利用研究領域・主任研究員

研究者番号：70355444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではABAを介したブドウの着色機構をさらに明らかにするために、2倍体黄緑色ブドウ「イタリア」とその着色変異体「ルビー・オクヤマ」の比較や、4倍体品種「巨峰」および「安芸クイーン」における果皮ABA含量の変化とABAシグナル伝達に関与する数種類の遺伝子の発現量の変化を調べることを通し、ABAシグナル伝達系を介したブドウの着色機構を解明する。

供試した品種では、PP2C-3,6,9およびSnRK5等、数種のABAシグナル伝達系遺伝子の果皮における発現量とABA含量とがよく一致することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The coloring mechanism of the grapes mediated by abscisic acid (ABA) signal transduction had been investigated. In this study, green-skinned Italia (*Vitis vinifera* L.) and red skinned Ruby Okuyama (*V. vinifera* L), which is bud sports of Italia, and tetraploid grape cultivars, Kyoho (*V. labruscana* L.) and Aki Queen (*V. labruscana* L.) had been used to demonstrate the relationship between maturation of the grapes and ABA content and the expression of the ABA signal transduction-related genes.

There were correlations between ABA content and expression of PP2C-3,6,9 and SnRK5 in the skins of *V. vinifera* and *V. labruscana*.

研究分野：果樹の栽培生理

キーワード：ブドウ 着色 アブシシン酸 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) ブドウの成熟とアブシシン酸 (ABA) との関係について

ブドウは世界で最も生産量の多い果樹であり、我が国におけるブドウの栽培面積は「巨峰」、「デラウェア」、「ピオーネ」、「キャンベルアーリー」、「マスカットベリー-A」の順に広く、上位5品種で全体の約8割を占め、これらは全て紫黒色ブドウである。紫黒色品種は、着色不良が発生すると外観が悪くなり、価格が暴落するため、理想的な着色に仕上げることは生産現場における重要課題である。

黒色、赤色などのブドウの果皮色はアントシアニンにより構成されており、ブドウ果皮におけるアントシアニンの生合成はアブシシン酸 (ABA) により制御されるとされている。例えば、ブドウ果房に対し ABA を処理すると、果皮のアントシアニン合成が促進され、アントシアニン含量が高くなる。この現象は、ABA 処理により、アントシアニン合成系の遺伝子の発現量が上昇することによって起こる。さらに、成熟期のブドウ果皮の ABA 含量は、果粒軟化期から着色期にかけて上昇する。これらのことからブドウの着色と ABA との関係は深いとされている。

近年、ABAのシグナル伝達に参与するタンパク質をコードする遺伝子が特定された。これら遺伝子の発現と温度環境等によるブドウ着色との関連が解明されれば、ABAを介したブドウの着色機構が一層明らかになると考えられる。

(2) 温度とブドウの着色、ABA との関係について

ブドウの着色は、成熟期の温度の影響を受ける。一般的に、着色期の温度が高いほど着色が抑制され、逆に低いほど着色が促進される。このことは、栽培現場の温度環境と着色との関連を調べても明らかであるが、温度環境を人工的に制御し、着色期に極端な高温や低温に遭遇させると、温度による着色の差が顕著にあらわれる。またこれらの処理個体からサンプリングした果皮における ABA 含量は、低温で高く、高温で低くなっており、アントシアニン含量とよく対応している。

その一方で、10日前後の短期間の温度処理により、ABA 含量の増加を伴わない着色の促進が観察されている。このことは ABA 含量のみがブドウの着色を決定する要因ではないことを示唆する。

温度以外の着色に参与する要因として、果粒糖度、着果量、光環境などがあげられるが、それらの条件が同一である場合、ABA 含量を伴わない着色促進機構の仮説の一つとして ABA シグナル伝達系遺伝子の発現が温度に影響を受け、それらの発現量の違いが着色の差となって現れていることが考えられる。しかし、温度とこれらの遺伝子の発現量の関係につ

いては調べられていない。

(3) 黄緑色ブドウの成熟と ABA 含量との関連について

黒色、赤色ブドウに関しては、これまでも果皮のアントシアニン含量と ABA 含量との関連が調べられ、報告されてきた。しかし、黄緑色ブドウの成熟と ABA との関連については報告がなく、着色促進以外の成熟に対する ABA の働きも明らかにされていない。

黄緑色ブドウの中には、着色変異体が存在するものがある。例えば、黄緑色品種「イタリア」の着色変異体として赤色品種の「ルビーオクヤマ」がある。

したがって、ABA を介した両者の成熟・着色の特徴を明らかにすることにより ABA がどの程度ブドウの着色に参与するのかが明らかとなり、ABA を介したブドウの着色機構が一層明らかになると期待される。

2. 研究の目的

(1) 4 倍体品種における ABA を介した着色機構を解明する

これまでに 2 倍体黒色品種においては ABA シグナル伝達系遺伝子の発現と着色・成熟との関連が調べられている。しかし、わが国で栽培実績が多い「巨峰」、「ピオーネ」等の 4 倍体品種においては、着色・成熟と ABA シグナル伝達系遺伝子の発現について調べられていない。

そこで、本研究では「巨峰」等の 4 倍体品種の着色に及ぼす ABA 含量と ABA シグナル伝達系遺伝子の発現について明らかにする。

(2) 成熟期の温度が ABA を介したブドウの着色に及ぼす影響を解明する

成熟期の温度は果皮の着色に影響し、一般的に成熟期の低温は着色を促進し、高温は阻害する。また着色期の低温は果皮の ABA 含量を増加させ、逆に高温は低下させる。したがって、ABA 含量の多少が着色に影響を及ぼすと考えられている。

しかし、短期間低温処理をした場合、ABA 含量の増加を伴わない着色の促進が観察されることがある。したがって、本研究では ABA シグナル伝達系遺伝子の発現解析を通し、ABA 含量の増加を伴わない着色促進機構を明らかにする。

(3) ブドウの ABA を介した着色機構を解明する

2 倍体黄緑色品種「イタリア」とその着色変異体である赤色品種「ルビーオクヤマ」の成熟過程を、ABA 含量および ABA シグナル伝達系遺伝子の発現量を比較することにより解明する。

(4) ブドウ果皮の ABA 含量が ABA シグナル伝達系遺伝子に及ぼす影響を解明する

ブドウ果皮の ABA 含量は、環境や生理活性物質等の処理によりある程度操作できる。したがって、果皮の ABA 含量を操作し、ABA シグナル伝達系遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにし、ブドウの着色に及ぼす ABA の働きを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 4 倍体品種におけるシグナル伝達系遺伝子の定量 PCR による発現解析のためのプライマーの設計

4 倍体赤色ブドウ「安芸クイーン」(*Vitis labruscana* L.)果皮から total RNA を抽出し、cDNA を合成し、既に公開されている *V. vinifera* の ABA シグナル伝達に關する遺伝子(*PP2C-3,6,9*, *SnRK5*)および ABA 生合成キーマンゼイム 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase(NCED)の遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、「安芸クイーン」果皮の cDNA を鋳型として PCR を行い、増幅した部分の塩基配列を決定する。決定した「安芸クイーン」果皮の cDNA 配列から *V. labruscana* において ABA シグナル伝達系遺伝子の発現解析のためのプライマーを設計する。

(2) 低温処理が 4 倍体品種の着色、ABA 含量および ABA シグナル伝達系遺伝子の発現量に及ぼす影響

2012 年：温室を 2 棟使用し、温室に設置したヒートポンプ(イーズ(株))により温度処理を行う。片方を 16 時から 20 時にかけて 20 に冷却する区(冷却区)もう片方を 30 で加温する区(加温区)とする。

温度処理後の果粒から果皮をサンプリングし、ABA シグナル伝達系遺伝子の発現量を定量 PCR により解析する。

2013 年：温室を 2 棟使用し、深夜 0 時から 4 時にかけて 20 に冷却する区(冷却区)と 18 時 30 分から翌朝の 6 時まで 26 で加温する区(加温区)を設置する。

温度処理前後の果粒から果皮をサンプリングし、果皮 ABA 含量を測定する。

(3) ブドウ果皮におけるアントシアニン含量の測定

ブドウ果皮のアントシアニンは、果皮約 0.5g を採取し、50%酢酸により暗所・4 で抽出する。抽出液の吸光度は 530nm で測定し、シアニジン-3-グルコシド等量として果皮 1g あたりのアントシアニン含量を求める。

(4) ブドウ果皮の ABA の抽出・定量

ブドウ果皮の ABA は果皮約 0.2g に既知量の内部標準を添加し、メタノール抽出した後、数種類のカラムを通し、常法により精製する。

精製した抽出物はメチル化後、GC/MS-SIM により同定・定量する。

(5) 温度、ABA および ABA 生合成阻害剤が 4 倍体ブドウの着色に及ぼす影響

着色開始期の「巨峰」(*V. labruscana* L.) 果粒を、蒸留水、500 μ MABA、500 μ M ノルジヒドログアイアレティック酸(NDGA)を満たした微生物培養プレートに果粒を置床後、15 $^{\circ}$ C と 30 $^{\circ}$ C で光条件下でインキュベートする。温度処理前と処理終了後の果皮をサンプリングし、ABA、アントシアニン含量の測定および ABA シグナル伝達系遺伝子発現解析のためのサンプルとする。

(6) 着色変異体の ABA および ABA シグナル伝達系遺伝子発現量の比較

2 倍体黄緑色ブドウ「イタリア」とその着色変異体の赤色ブドウ「ルビーオクヤマ」(ともに *V. vinifera* L.) の果皮を経時的にサンプリングし、ABA 含量および ABA シグナル伝達系遺伝子の発現量を解析する。サンプリングは開花後 35,51(果粒軟化後着色前),55(果粒軟化開始),62,77 および 92 日に行う。

4. 研究成果

(1) 着色期の温度処理が 4 倍体ブドウの着色と ABA シグナル伝達系遺伝子の発現量に及ぼす影響

温室内の温度変化を図 1、2 に示した。

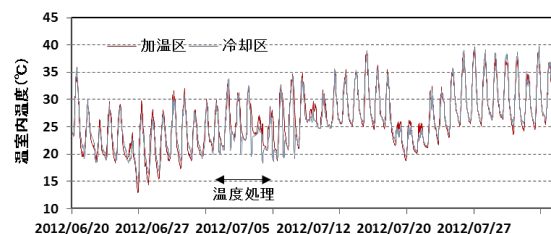


図 1 ガラス温室内の温度の変化(2012年)

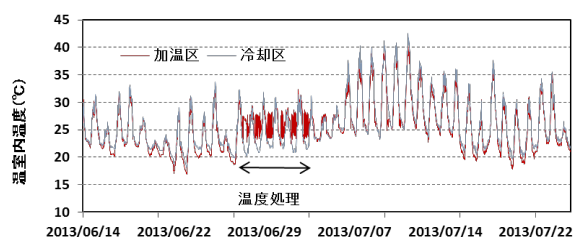


図 2 ガラス温室内の温度の変化(2013年)

図 3 に温度処理が「安芸クイーン」のアントシアニン含量に及ぼす影響を示した。いずれの年も冷却処理直後の果皮アントシアニン含量は加温区よりも高かったが、2012 年は温度処理直後は冷却区の方が加温区よりもアントシアニン含量が高かったが、収穫期には処理温度による違いは明らかでなかった。この原因として温度処理終了後、自然条件下で低温に遭遇し、アントシアニン合成が回復したことが考えられた。2013 年は温度処理後から収穫期まで、冷却区の方が加温区よりアントシアニン含量が高かった。

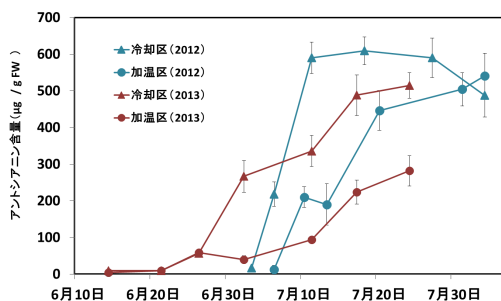


図3 果皮におけるアントシアニン含量の推移。2012年は7/4(冷却区)および7/6(加温区)、2013年は6/27から約1週間温度処理を行った。

2012年、処理開始7日後の果皮をサンプリングし、ABAシグナル伝達系遺伝子(*PP2C-3,4,6,9*, *SnRK5*および*PYL1*)の発現量を調べたところ、温度処理はこれらの発現量に影響を及ぼさなかった。

2013年に温度処理前後の果皮をサンプリングし、ABA含量を測定したところ、処理前後のABA含量に差異は認められなかった。

(2) 4倍体品種における成熟ステージ別のABA含量とABAシグナル伝達系遺伝子の発現との関係

「安芸クイーン」果皮を果粒軟化前、果粒軟化後着色前、着色開始後にサンプリングしABA含量を測定した。次に*PP2C-3,4,6,9*, *SnRK5*, *PYL1*, *RCAR5,6* 遺伝子の発現量を定量PCRにより調べ、ABA含量と比較した。その結果、ABAの増減と*PP2C-3,6,9*および*SnRK5*の発現量の増減がよく一致することが明らかとなった。

(3) 「イタリア」と「ルビーオクヤマ」の果皮におけるABA含量およびABAシグナル伝達系遺伝子の発現量の比較解析

両品種の果皮におけるABA含量は基本的に果粒軟化後急激に増加し、次第に減少した。ABAシグナル伝達系遺伝子として*PP2C-3,4,6,9*, *SnRK5*, *PYL1*および*RCAR6*の発現量を調査したところ、両品種において*PP2C-3,6*および*SnRK5*の発現量は着色開始期にあたる開花後55日で最大となり、ABAの増減とよく一致した。

(5) 温度とABAおよびABA生合成阻害剤が4倍体ブドウのアントシアニン、ABA含量およびABAシグナル伝達系遺伝子の発現量に及ぼす影響

「巨峰」果粒に対し、ABAおよびABA生合成阻害剤を処理し、15と30でインキュベートし、温度処理終了時のアントシアニン含量を比較した。すべての処理区において15区の方が30区よりもアントシアニン含量が高かった。

15でも30でもABAによる着色促進効果は顕著であったが、ABA生合成阻害剤であ

るNDGAによる着色の阻害は顕著ではなかった。すべての処理区において、ABA含量は15区の方が30区より高い傾向であった。*PP2C-3,4,6,9*および*SnRK5*はABA処理区で発現量が高い傾向がみられたが、15区と30区との間では発現量に差は認められず、低温によるABA含量の増加を反映していなかった。

以上の結果から、ブドウを着色開始から約1週間冷却処理すると、着色の促進は観察されるがABA含量の増加を伴わないこと、またアントシアニン含量の増加はABAシグナル伝達系遺伝子の発現量の増加によるものではないことが明らかとなった。

また*V. labruscana*および*V. vinifera*において果皮ABA含量とABAシグナル伝達系遺伝子、*PP2C-3,6,9*および*SnRK5*の発現量がよく対応することから、ABAはこれらの発現を介して着色に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

下佳子、朝倉利員、阪本大輔、杉浦俊彦、着色期の短期低温処理が「安芸クイーン」果皮のアントシアニンおよびABA含量に及ぼす影響、園芸学研究、第13巻、別冊1、p294、2014年3月29-30日、筑波大学(茨城県・つくば市)

下佳子、朝倉利員、阪本大輔、杉浦俊彦、着色期の低温処理が「安芸クイーン」の果実品質に及ぼす影響、日本ブドウ・ワイン学会誌23巻2号、p76、2012年11月17日、レンブラントホテル大分(大分県・大分市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

児下 佳子 (KOSHITA Yoshiko)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・果樹研究所・主任研究員
研究者番号：70355444