

博士論文

電気刺激によるブドウ果実品質の改質に関する研究

国立大学法人 山梨大学大学院医工農学総合教育部
統合応用生命科学専攻

森 大輔

2023年3月

目次

第1章 序論.....	1
第2章 電気刺激による醸造用ブドウ品質の向上	
2-1 緒言.....	3
2-2 材料および方法.....	5
2-2-1 植物材料	
2-2-2 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激	
2-2-3 ブドウ培養細胞への電気刺激	
2-2-4 葉のクロロフィル含有量	
2-2-5 果実品質調査	
2-2-6 マイクロアレイ分析	
2-2-7 統計分析	
2-3 結果.....	8
2-3-1 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激の条件	
2-3-2 ブドウ樹の生育に対する電気刺激の影響	
2-3-3 光合成能に対する電気刺激の影響	
2-3-4 電気刺激がブドウ果実内のアントシアニンとレスベラトロールの蓄積に及ぼす影響	
2-3-5 電気刺激によるスクロース代謝並びにフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン生合成経路の活性化	
2-4 考察.....	11
2-5 要旨.....	14
第3章 電気刺激による生食用ブドウ品質の向上	
3-1 緒言.....	32
3-2 材料および方法.....	34
3-2-1 植物材料	
3-2-2 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激	
3-2-3 果実品質調査	
3-2-4 マイクロアレイ分析	
3-2-5 リアルタイム RT-PCR	
3-2-6 統計分析	
3-3 結果.....	37
3-3-1 電気刺激による圃場栽培のブドウ果実品質への影響	
3-3-2 電気刺激によるブドウ果皮表皮の細胞数の増加	
3-3-3 電気刺激による細胞分裂関連遺伝子の転写誘導	
3-4 考察.....	40
3-5 要旨.....	43
第4章 電気刺激によるブドウ樹の植物防御反応の強化	
4-1 緒言.....	51
4-2 材料および方法.....	53
4-2-1 植物材料	

4-2-2	圃場栽培のブドウ樹への電気刺激	
4-2-3	ブドウ苗への電気刺激	
4-2-4	シロイヌナズナへの電気刺激	
4-2-5	病気の評価	
4-2-6	リアルタイム RT-PCR	
4-2-7	統計分析	
4-3	結果	56
4-3-1	電気刺激によるかび病害の発病率減少	
4-3-2	電気刺激による植物防御反応の誘導	
4-3-3	電気刺激によるサリチル酸を介したシロイヌナズナの植物防御反応の誘導	
4-4	考察	58
4-5	要旨	60
第5章	総合考察	66
	参考文献	68
	公表論文	77
	謝辞	78

第1章 序論

日本のブドウ栽培は、鎌倉時代に現在の山梨県甲州市付近で、ヨーロッパブドウの一種である「甲州」種の栽培を行ったことに始まったとされている（農林水産省、2019）。日本の主要ブドウ生産地は、山梨県、長野県、岡山県、山形県が上位を占め、主に生食用ブドウ品種の栽培が行われている（農林水産省、2022）。ブドウを含めた果実は、形、色、味などの評価による等級格付と大きさによる階級格付けから総合的に果実品質が決定されるため、これらは生産性を高めるための極めて重要な要素である。

近年、醸造用ブドウ品種や生食用ブドウ品種に関わらず温暖化の影響を受けて、ベレゼーン期に着色に不適な高温にさらされることで、着色が不十分になり、成熟しても品種本来の色調にならない着色不良が問題となっている。気候変動の観測・予測及び影響評価統合レポート 2018 によると「日本の気温上昇は世界の平均より早い速度で上昇しており、100 年あたり 1.19℃の割合で上昇している。」と報告されている（環境省、2018）。温暖化による果実への影響は大きく 2 タイプに分類され、果実生育期前進タイプと果実生育期延長タイプがあり、ブドウは後者に分類される。これらの問題に対処する既存技術として、環状剥皮処理による着色促進技術があるが、樹勢の低下により顆粒肥大や Brix などの果実品質に影響が生じる場合がある（Kugimiya et al. 2011）。他にも果房部を直接冷却することで着色促進を行う技術（Hirase et al. 1999）があるが、これらの技術はコスト面などの問題もあり普及の妨げとなっている。このような状況から、温暖化対策として既存技術との併用効果やより生産性の高い新技術への転換に強い関心が集まっている。現在の日本の一次産業は、担い手不足と高齢化が深刻で労働力を省力化し且つ果実品質を維持する生産性の向上が急務である。日本の人口減少に伴い、国内の食料マーケット規模が縮小する一方、世界的には人口が増加し、今後も世界の食料マーケット規模は拡大する可能性が高い。日本政府は 2030 年までに農林水産物・食品輸出目標 5 兆円を掲げている（農林水産省、2020）。世界的に需要が大きく伸びる一方で担い手不足と高齢化に伴う、日本の一次産業の衰退を回避するには生産性を強化し、高品質な日本の果実を世界市場に訴求することが重要である。

このような背景から、植物生体に直接電気刺激を与えることで果実品質の向上や成長促進を促す「ニードル農法」という技術に注目した。ニードル農法とは、植物体内に特殊ネジを貫入させ、ソーラーパネルにより電気刺激を与えることにより、植物の様々な生理変化を

誘発する技術である（大塚. 2012）。古くから農業分野において、植物は外部からの電気刺激を受けることで成長促進や収穫量を増加させるといった事象が注目されていた（村本. 2010）。果実の生産過程で利用する刺激処理として、トマトのオーキシシン、ブドウのジベレリンのような植物ホルモン剤を用いた化学薬剤がある。しかし、化学薬剤の過剰な使用は、環境への影響が懸念される。対して、ニードル農法は環境を汚染する心配がなく、技術的にも比較的簡便に行うことが可能で現地応用に有効である。ブドウ栽培におけるニードル農法の有効性が明らかになれば、それを切り口に付加価値の高い果実に応用展開することができ、且つ農薬の多量散布による環境汚染などの問題を改善する一つのツールとなるため、現代農業が抱える大きな課題解決に寄与できると考えられる。

本研究では、ブドウ果実に限定し、ニードル農法による果実品質の影響調査及び原理の解明を目的とした。第2章では、露地栽培の醸造用ブドウ品種メルローに対しニードル農法を施し、収穫した果実の成分を定量し果実品質への影響を調査した。また、圃場試験結果の裏付けのため、ブドウ培養細胞を用いたマイクロアレイ分析も実施した。第3章では、ニードル農法の付加価値向上と普及を目指し、高単価な生食用ブドウ品種に絞り、果実品質への影響を調査した。生食用ブドウ品種の選定は、近年爆発的な人気を集めるシャインマスカットに加え、黒ブドウ品種で最も人気の高いピオーネを加えた。第4章では、露地栽培の醸造用ブドウ品種メルローに電気刺激を施し、ブドウの灰色かび、晩腐病およびべと病の発病調査およびブドウ苗を用いた病害抵抗性遺伝子解析を実施し、電気刺激が植物防御反応の非生物のエリシターとして作用するか調査した。

第2章 電気刺激による醸造用ブドウ品質の向上

2-1 緒言

醸造用ブドウ栽培の主要目標のひとつに、ワインを醸造するために果実品質を向上させることがある。醸造用ブドウの果実品質は、糖類、酸類、フェノール類のほか、各種アロマ化合物といった他の化学成分の影響を複雑なかたちで受ける (Lund and Bohlmann, 2006)。果汁中の可溶性固形物の含有量と滴定酸度は、醸造用ブドウの成熟度の基準として用いられる (Coombe et al. 1980)。果皮のアントシアニンは、水溶性フラボノイドであり、赤ワインの色に大きく寄与する因子である (Glories, 1978)。特に、アントシアニン分子の非糖部アグリコンであるアントシアニジンの種類によってブドウの色調が決定する (幸田、桃木, 2003)。青み、赤みやその濃淡は、アントシアニジンに結合した糖鎖および水素イオン指数 (pH) によって影響を受ける。また、ブドウ果実には、テルペノイド (Wirth et al. 2001)、チオール (Tominaga et al. 1998) などのさまざまなアロマ化合物が含まれており、ワインの品質に重要な役割を果たしている。このように、ワインはブドウ果実に含有されている化合物からなる複雑な混合物であるため、ブドウ果実に含有される化合物がワインの品質を決定づけると言える。

近年、醸造用ブドウの品質を向上させる実用的技術が多く開発され、例えば、摘葉 (Matus et al. 2009; Chorti et al. 2010) や摘房 (Guidoni et al. 2002) は果皮のアントシアニン組成を変化させた。摘葉は、房を太陽光にさらすことによってアミノ酸組成に作用することも知られている (Martínez-Lüscher et al. 2014)。仕立て方法によっても、脂肪酸組成の変化を介して果実のアロマ化合物である C6 及び C9 揮発性物質含有量が変化した (Xu et al. 2015)。収量を調整する剪定や摘房は、官能評価においてワインの特性に影響を及ぼし (Chapman et al. 2005)、果皮へのアントシアニン蓄積を促進する環状剥皮は、果実重量も増やすことが明らかになった (Brara et al. 2008)。

非生物 (化合物) および生物 (微生物) を誘導因子として外部から作用させブドウの品質向上を目指す研究も行われている。ジャスモン酸メチルおよび酵母抽出物による葉面散布処理によって果皮のアントシアニン含有量が増加し (Portu et al. 2016)、バチラス属細菌による房散布処理によってレスベラトロール (trans-3, 4', 5-トリヒドロキシスチルベン)

の蓄積が促進された (Aoki et al. 2017)。このような非生物的誘導因子や生物的誘導因子のブドウへの散布処理は化学薬剤と同程度簡便なため、ブドウ果実品質を向上する代替手段として普及する可能性はある。

本研究では、ブドウ果実品質を向上する非生物的誘導因子として電気刺激を利用できないか検討した。高等植物においては、特定の生理的条件下で電気信号を利用することが知られており (Pickard. 1973)、特に、電気興奮性は環境刺激に対する応答に関連していることが多い (Fromm and Lautner. 2007)。電気信号は、活動電位 (AP) と変動電位 (VP) に分類される。AP は電気信号を迅速に伝達するが、VP は電気信号をゆっくりと伝達する。例えば、オジギソウ (*Mimosa pudica*) の AP は、物が触れることによって機械的に葉の羽片を刺激した場合、20~30 mm/s の速度で葉軸内に伝達される (Fromm and Lautner. 2007)。オジギソウの葉を切断して刺激した場合は、VP が葉軸で生成され、5~6 mm/s の速度で羽片の基部にある二次葉枕を通過して隣接する羽片に伝達される (Fromm and Lautner. 2007)。一方、電気は植物の生理学的変化を誘発する。例えば、トマトの葉に電流を処理すると、プロテインアーゼ阻害剤 II (PINII) 遺伝子の転写が誘導され、気孔開口部に変化が生じた (Herde et al. 1995)。シロイヌナズナの葉が損傷した場合、その情報伝搬には電気信号が用いられ、結果として 2 種類のグルタミン酸受容体様遺伝子 (LR3.3 および LR3.6) の発現が誘導された (Mousavi et al. 2013)。以上の先行研究は、植物における電気信号は植物生理状態の変化を促すことができることを示唆している。

これまでにブドウ樹に電気刺激を処理した研究報告はなく、電気がブドウ樹の生育および果実品質にどのような影響を及ぼすかについては不明である。本研究では、日本振興株式会社が開発した電気刺激処理システムを用いて電気刺激処理したブドウ樹の生育調査および果実品質調査を実施することで、電気刺激処理が新たな非生物学的ストレスとして活用できるかを検討した。

2-2 材料および方法

2-2-1 植物材料

山梨大学ワイン科学研究センターの圃場で栽培されているメルロー (*Vitis vinifera* cv. Merlot、台木 Kober 5BB) を供試し、農薬散布などの管理作業は山梨大学ワイン科学研究センターの防除歴に従い実施した。樹齢はおよそ 30 年で、垣根栽培で仕立てた。このメルローの剪定枝から作出した自根のメルロー苗を約 2 ヶ月間ポットで栽培した。

マイクロアレイ分析では、甲州 (*Vitis sp.* cv. Koshu) の分裂組織から作製したブドウ培養細胞を供試した。これらの細胞は改変型ガンボーク B5 培地で暗所 27°C で維持した (Kato et al. 2009)。

2-2-2 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激

2015 年と 2016 年の生育期 (2015 年 5 月 20 日～9 月 9 日、2016 年 5 月 9 日～9 月 13 日) に電気刺激をブドウ樹に施した。電気刺激のために 6 本のブドウ樹を準備した。電気刺激は、開花 2 週間前に施した (図 1A)。電極 (ステンレス鋼のネジ、長さ 30 mm) 2 本をブドウの樹幹 (地上 20 cm 及び 60 cm) にねじ込み、ソーラーパネル 2 枚に接続した (上部は陰電極、下部は陽電極とした、図 1B)。ソーラーパネルは地上 2.5m に設置した (図 1A)。最大電圧 $5V \pm 5\%$ 、最大電流 $80mA \pm 5\%$ 、最大出力 $0.4W \pm 5\%$ の電気的特性を有するソーラーパネルを使用した。対照実験として、電極のみ (ソーラーパネルなし) を施したブドウ樹、何も処理しないブドウ樹も用意した。各ブドウ樹は、2 年とも同じ処理を行った。

2-2-3 ブドウ培養細胞への電気刺激

改変型ガンボーク B5 寒天培地でブドウ培養細胞を 27°C にて 2 週間培養した。電極 (直径 0.5 mm) 2 本をブドウ培養細胞の細胞塊に差し込み、電極にソーラーパネルを接続することによって電気刺激を施した (図 1C および 1D)。ソーラーパネルには蛍光灯を照射した。未処理の培養細胞を対照区として準備した。4 時間電気刺激を行った後直ちに細胞塊を液体窒素中で凍結させ、マイクロアレイ分析のために -80°C で保存した。

2-2-4 葉のクロロフィル含有量

電気刺激を施したブドウ樹の光合成能を評価するために、ベレブーン期（2015年7月24日及び2016年7月28日）および収穫期（それぞれ2015年9月9日、2016年9月13日）にブドウ樹から葉を採取した。12～16枚の葉が出ている新梢において下から数えて5番目の葉をサンプルとし、1本のブドウ樹から3枚の葉を採取した。ブドウ樹における新梢の位置は任意とした。各葉から葉片（約1 cm²）を3枚切り出し、1 ml のジメチルホルムアミド中で4℃にて24時間インキュベートした。分光光度計を用いて663.8 nmおよび646.8 nmの吸光度を測定し、クロロフィル a + b 含有量を既報（Porra et al. 1989）に従って算出した。

2-2-5 果実品質調査

電気刺激を施したブドウ樹の果実品質を評価するため、収穫期（Eichhorn-Lorenz 38、2015年9月9日および2016年9月13日）に各ブドウ樹から5房ずつ採取した。各房から果粒をランダムに50粒採取した。果粒重はこの50粒で測定し、1粒あたりの重量を計算した。残りの果粒を搾汁し、果汁を得た。果汁のBrixは、屈折計（株式会社アタゴ）を用いて測定した。総酸（酒石酸換算）は、自動滴定装置（自動的滴定装置 Auto Titrator COM-1600、平沼産業株式会社）を用いて測定した。果汁を16,000×gで遠心分離した後、上澄みを0.2 μm 膜フィルター（Pall 社）で濾過し、濾液をさらなる分析に供試した。濾液中の総フェノールの含有量測定は、既報（Singleton and Rossi. 1965）に従って実施した。レスベラトロールは、既報（Aoki et al. 2017）にあるとおりにトランス型レスベラトロール（Sigma 社）を標準物質として高速液体クロマトグラフィーで測定した。

果粒重測定に供試した50粒の果皮を剥がし、果皮のアントシアニン測定に供試した。測定法は、既報（Yokotsuka et al. 1999）とし、アントシアニン含有量は、果皮重量1グラムあたりに含まれるマルビジン-3-グルコシドの相当量に換算した。

2-2-6 マイクロアレイ分析

液体窒素を含む乳鉢に電気刺激を施したブドウ培養細胞を入れ、乳棒を用いてホモジナイズした。Fruit-mate for RNA Purification（タカラバイオ株式会社）および

NucleoSpin RNA Plant (タカラバイオ株式会社) を用いてメーカーのプロトコルに従いブドウ培養細胞から RNA を抽出した。

GeneChip *Vitis vinifera* (Grape) ゲノムアレイ (Affymetrix 社) を用いてマイクロアレイ分析を行った。GeneChip 3' IVT PLUS Reagent キット (Affymetrix 社) を用いたビオチン標識 complementary RNA 合成、GeneChip Hybridization、洗浄及び染色キット (Affymetrix 社) によるハイブリダイゼーションと GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix 社) によるシグナル検出をメーカーのプロトコルに従い実施した。各スポットのシグナル強度分析およびシグナルの評価・標準化は、GeneChip Command Console ソフトウェア 4.0 (Affymetrix 社) および Affymetrix Expression Console Software 1.4 (Affymetrix 社) を用いて実施した。バックグラウンド <100 、電気刺激/対照の発現量の比 (Fold change) > 2 (P 値 <0.01) となった遺伝子を、電気刺激によってブドウ培養細胞で発現が増大した遺伝子と定義した。

2-2-7 統計分析

データは、平均値±標準偏差として示した。統計分析は、Excel 統計ソフトウェア 2012 (株式会社社会情報サービス) を用いて Tukey の多重比較検定によって行った。

2-3 結果

2-3-1 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激の条件

2015年に2枚のソーラーパネルによってブドウ樹に負荷される電圧を電極部で測定した結果、電圧は太陽光の照度と相関した(図2)。8000 lxを超える照度では2枚のソーラーパネルは最大能力(約10 V)付近の出力となったが、照度が8000 lx未満では低電圧であった。ソーラーパネルを接続せず電極のみを施したブドウ樹では電圧は検出されなかった。2015年と2016年では気象条件によってソーラーパネルで生成されたエネルギーに差があった可能性も考えられるが、本研究で構築したシステムでは、開花2週間前から収穫期までの日中にブドウ樹に電気刺激が負荷されるものであった。

2-3-2 ブドウ樹の成育に対する電気刺激の影響

電気刺激がブドウの樹の成育に影響を及ぼすかどうかを評価するために、2015年および2016年に電気刺激を施したブドウ樹の生殖成長および栄養成長を観察した。いずれの年も電気刺激処理により、開花期、ベレゾーン期および収穫期の変化は起きず、無処理ブドウ樹および電極処理のみを施したブドウ樹と同等であった。電気刺激によりブドウ樹の新梢、葉および房の形態変化も観察されなかった。

これらの結果を総合すると、電気刺激を施したブドウ樹は生殖成長および栄養成長に悪影響なく正常に生育したことが示唆された。

2-3-3 光合成能に対する電気刺激の影響

電気は、植物の光合成応答に影響を及ぼすことが示されている(Koziol et al. 2004)ことから、電気刺激をブドウ樹に施した場合光合成能に影響が及ぶ可能性が予測された。電気刺激を施したブドウ樹の葉のクロロフィル含有量について2015年(図3A)および2016年(図3B)のベレゾーン期と収穫期に測定した。結果として、いずれの年も電気刺激を施したブドウ樹の葉のクロロフィル含有量は無処理のブドウ樹や電極のみを施したブドウ樹の葉と同程度であった。以上、電気刺激はブドウ樹の光合成能に影響しないことが示唆された。

2-3-4 電気刺激がブドウ果実内のアントシアニンとレスベラトロールの蓄積に及ぼす影響

電気刺激が果実品質にどの程度影響するのか評価した。2015年では、果粒重に有意性は認められなかった(図4A)が、2016年では電気刺激を施したブドウ樹の果粒重は、無処理や電極のみを施したブドウ樹に比べて有意に低かった(図4B)。2015年(図5A)および2016年(図5B)の両年において、電気刺激を施したブドウ樹のBrixは無処理のブドウ樹よりも有意に高かった。2015年の果汁酸度は、電気刺激を施したブドウ樹および電極のみを施したブドウ樹で無処理のブドウ樹よりも低かった(図6A)が、2016年にはそれらの差は認められなかった(図6B)。

電気刺激を施したブドウ樹の果皮アントシアニン含有量は、2015年(図7A)および2016年(図7B)のいずれの年においても、無処理および電極のみを施したブドウ樹に比べて150%程度増加した。2015年において果汁中の総フェノール含有量に処理間の差は認められなかったが(図8A)、2016年は電気刺激を施したブドウ樹の総フェノール含有量は無処理のブドウ樹よりも140%程度高かった(図8B)。電気刺激を施したブドウ樹の果汁中レスベラトロール含有量は、2015年で無処理のブドウ樹に比べて300%増加し(図9A)、2016年では200%増加した(図9B)。

これらの結果を総合すると、電気刺激による果実品質への影響は試験実施年によって若干の違いが認められたが、果皮のアントシアニン含有量および果汁中の糖度やレスベラトロール含有量といった、特定の果実品質は試験実施年に依存せずに電気刺激による影響を示した。つまり、圃場栽培のブドウ樹への電気刺激は分子レベルで果実の生理特性を変化させる可能性が示唆された。

2-3-5 電気刺激によるスクロース代謝並びにフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン生合成経路の活性化

電気刺激による果実の生理特性変化に関連する分子メカニズムを調査するために、電気刺激を施したブドウ培養細胞の遺伝子発現変化についてマイクロアレイ分析を用いて解析した。

スクロース代謝関連遺伝子に注目したところ、電気刺激を施したブドウ培養細胞では細胞壁アポプラストインベルターゼ (CWINV) の遺伝子発現量が無処理細胞に比べて 5.24 倍、ヘキソース転写トランスポーター様タンパク質をコードする HT6 の遺伝子発現量が 3.10 倍増大した (表 1)。スクローストランスポーターをコードする遺伝子の発現は、電気刺激により影響を受けなかった。以上の結果から、電気刺激はスクロース代謝のアポプラズミック経路を活性化するが、シンプラスミック経路は活性化しないことが示唆された (図 10)。

アントシアニンおよびレスベラトロール生合成経路に関連する遺伝子に着目したところ、フェニルプロパノイド、フラボノイドおよびスチルベノイド生合成に関連する遺伝子の発現が電気刺激によって増加していた (表 2)。詳しくは、フェニルプロパノイド生合成経路のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、トランス型シナメート 4-モノオキシゲナーゼ、4-クマレート:CoA リガーゼ、フラボノイド生合成経路のカルコンシンターゼ、カルコンイソメラーゼ、フラボノイド 3' ヒドロキシラーゼ、フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ、ジヒドロフラボノールレダクターゼ、スチルベノイド生合成経路のスチルベンシンターゼの遺伝子発現量が電気刺激により増加した。特に、フェニルアラニンアンモニアリアーゼおよびスチルベンシンターゼにおいては、無処理細胞の 40 倍以上の遺伝子発現量の増加を示した。果皮におけるアントシアニン蓄積を制御する UDP グルコース-フラボノイド 3-O-グルコシルトランスフェラーゼ (UFGT) をコードする遺伝子 (Boss et al. 1996) の発現量も電気刺激により著しく増加した (表 2)。

以上の結果から、電気刺激はそれぞれの生合成経路を転写レベルで活性化し、それにより糖、アントシアニンおよびレスベラトロールの蓄積を促進すると推察された (図 11)。

2-4 考察

植物ホルモンなどの化学シグナルに比べ、電気信号は外部刺激の情報を応答領域に迅速に伝達でき (Lautner et al. 2005)、植物の成育に関連する数多くの生理学的変化を誘発する (Fromm and Lautner. 2007)。低温ストレスによって誘導される AP は、ヘチマ (*Luffa cylindrica*) の茎伸長を抑制した (Shiina and Tazawa. 1986)。AP および VP は植物の呼吸 (Dziubinska et al., 1989; Fromm et al., 1995) とガス交換 (Fromm and Fei. 1998) を促進することや、VP により光合成が一時的に減少すること (Koziolek et al. 2004) も数種の植物で観測された。本研究では、ソーラーパネルを用いたブドウ樹への電気刺激は、ブドウ樹の成育および光合成能に影響することなく、ブドウ果実品質を向上させる効果を有することを示した。

AP は、タンパク質のデノボ合成を介して植物の生理学的状態を変化させる。例えば、熱ストレスにより誘導された AP は、トマト (Stankovic and Davies. 1996) およびジャガイモ (Fisahn et al. 2004) の葉で *PIN1* 遺伝子発現を増強し、気孔開閉メカニズムに影響を及ぼした。乾燥ストレスにより誘導した AP は、芽・種子の休眠や老化に関与する植物ホルモンであるアブシジン酸を誘導することにより、乾燥ストレスに応答した生理学的状態を誘導した (Skriver and Mundy, 1990; Bray 2002)。電気刺激を施したブドウ培養細胞では、スクロース代謝並びにフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン生合成経路に関与する遺伝子群の遺伝子発現を誘導した。これらの結果は、本研究でブドウ樹に採用した電気刺激システムがブドウ果実の味や色味といった重要な果実品質に影響する分子をデノボ合成したことを意味する。

2年間にわたる圃場試験において、本研究で採用した電気刺激システムは無処理のブドウ樹と比較して果実 Brix を増加する能力があった。この結果は、マイクロアレイ分析で明らかになった電気刺激によるスクロース代謝及びヘキソーストランスポーター関連遺伝子の発現増大の解析結果によって裏付けされた。しかし、電極のみを施したブドウ樹でも無処理のブドウ樹より果実 Brix が高かったことから、これら果実 Brix の増加はブドウ樹に電極としてステンレス鋼のねじを差し込むことに起因するものと考えられた。2本のステンレス鋼のねじをブドウ樹の樹幹に差し込むことは、ブドウ樹に傷をつけているのと同等の行為である。ブドウの葉の向軸面をサンドペーパーで擦ることにより、ヘキソーストランスポー

ター遺伝子である *VvHT5* と細胞壁インペルターゼ遺伝子 *VvcwINV* の遺伝子発現量が増大するという先行研究がある (Hayes et al. 2010)。本研究において、ブドウ培養細胞に電気刺激を施すことにより、*VvcwINV* (表1の *CWINV* に相当) およびヘキソーストランスポーター遺伝子 *HT6* の遺伝子発現量が増加することを確認した。電気刺激を施したブドウ樹と電極のみを施したブドウ樹の果実 Brix はいずれの年も同程度であった。以上のことから、ブドウ樹にステンレス鋼のねじを差し込む行為が傷ストレスとなりブドウ樹に認識された結果として果実 Brix が高くなったのであり、ソーラーパネルによる電気刺激自体は果実のスクロース代謝に影響しなかったものと推察された。

一方、アントシアニンおよびレスベラトロール含有量の変化は、電極のみを施したブドウ樹では認められず、電気刺激を施したブドウ樹のみで確認された。植物に傷をつけることでレスベラトロール含有量 (Langcake and Pryce. 1976) およびアントシアニン含有量 (Chalmers and Faragher. 1977) が増加することは知られている。しかしながら、本研究では、ステンレス鋼のねじの挿入による傷はアントシアニンおよびレスベラトロール生合成の活性化に関与しなかった。この結果から、ソーラーパネルによる電気刺激それ自体がブドウ果実におけるアントシアニンおよびレスベラトロール生合成の増強に関与しているものと結論づけた。

本研究では電気刺激をブドウ樹の樹幹に与えた。そして、その影響は樹幹から離れた果実で観察できた。これは、ブドウ樹の長距離シグナル伝達において電気シグナルが機能している可能性とあるいは他のセカンドメッセンジャーが機能している可能性を示唆する。前者では、樹幹から果実までの長い距離を電気シグナルの伝達だけで行えるのかという疑問が生じる。電気シグナルの長距離伝達の報告がなされている。例えば、再灌水によって生成される根から葉への師管経路を通じた電気シグナルの長距離伝達がトウモロコシで観察されており、結果として葉でガス交換が増大した (Fromm and Fei. 1998)。もうひとつの可能性であるセカンドメッセンジャーの長距離伝達は、サリチル酸やジャスモン酸などの多様な植物ホルモンで確認されている (Pieterse et al. 2009)。これら植物ホルモンによるシグナル伝達ネットワークは主に植物にストレス耐性を付与し、植物全体を外的ストレスから守る役割を果たす。例えば、ジャガイモにおいて熱ストレスによって誘導される電気シグナルはジャスモン酸生合成を活性化し、合成されたジャスモン酸が全身を伝達し熱ストレス耐性を賦与した (Fisahn et al. 2004)。今後の課題として、ブドウ樹において樹幹から果実に伝達されるシグナルを同定することを挙げる。これを確認するためには、微小電極を用

いた電気シグナルの電気生理学的モニタリングおよびセカンドメッセンジャーの時間・空間的な変化をイメージング手法で捉える研究を行う必要がある。

2-5 要旨

植物はストレス条件下で電気シグナルを利用し、生理学的変化を誘発する。これまで、ブドウの果実品質を向上させるため、植物ホルモンや化学農薬を用いた手法が採用されてきたが、これらの手法は常に環境汚染を促す懸念があった。本研究では、醸造用ブドウの果実品質を向上させるための環境に優しい技術としてソーラーパネルを用いた電気刺激システムを採用し、2015年と2016年の生育期に圃場試験を実施した。電気刺激はブドウ樹の成育および光合成能に対し負の影響を及ぼさなかった。また、電気刺激による果粒重、総酸含有量および総フェノール含有量の変化は認められなかった。一方、電気刺激を施したブドウ樹および電極のみを施したブドウ樹の果実 Brix は増加した。電気刺激を施したブドウ樹の果実では、果皮のアントシアニン含有量および果汁中のレスベラトロール含有量も無処理および電極のみを施したブドウ樹よりも有意に多かった。ブドウ培養細胞を用いたマイクロアレイ分析から、電気刺激はスクロース代謝並びにフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン生合成に関与する遺伝子群の遺伝子発現量を増加させることが実証され、圃場試験で観察された電気刺激による果実品質の変化を裏付けるものとなった。これらの解析結果から、電気刺激はアントシアニンおよびレスベラトロール生合成経路を活性化することで、関連物質の蓄積量を増強することが示唆された。地球温暖化など環境変化によるブドウ果実の品質低下への対策として、本研究で構築した電気刺激システムが有効であると思われた。

表 1 電気刺激を施したブドウ培養細胞におけるスクロース代謝関連遺伝子の転写変化

Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation /control)	Color bar (Log ₂ ratio) 4 0 -4
invertase			
CWINV	cell wall apoplastic invertase	5.24	
LOC100256970	beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I	1.00	
LOC100241232	acid beta-fructofuranosidase	0.56	
LOC100853849	acid beta-fructofuranosidase	n.d. ^c	
LOC100263168	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1	n.d.	
hexose transporter			
HT6	hexose transporter-like	3.10	
LOC100233083	hexose transporter	1.40	
HT18	putative hexose transporter	0.85	
LOC100232961	hexose transporter HT2	0.54	
HT7	hexose transporter 7	0.52	
sucrose transporter			
VVSUC12	sucrose transporter-like	0.84	
SUC12	sucrose transporter	0.72	
VVSUC11	sucrose transporter-like	0.69	
VVSUC27	sucrose transporter-like	0.62	

Fold change および Color bar: 電気刺激を施したブドウ培養細胞と無処理細胞の遺伝子発現の相対的变化を Log および色で示した

n. d., 未検出

表 2 電気刺激を施したブドウ培養細胞におけるフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン合成経路遺伝子の転写変化






Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation/control)	Color bar (Log2 ratio) 4 0 -4
<i>Phenylpropanoid biosynthesis</i>			
phenylalanine ammonia-lyase			
LOC100233012	phenylalanine ammonia-lyase	45.56	
LOC100241377	phenylalanine ammonia-lyase-like	42.02	
LOC100241575	phenylalanine ammonia-lyase-like	2.01	
LOC100240904	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d. ^c	
LOC100245997	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC100251137	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC100252889	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC100255939	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC100256293	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d.	
LOC100266224	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d.	
LOC100266593	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC100853659	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d.	
LOC100854997	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d.	
LOC100855356	phenylalanine ammonia-lyase	n.d.	
LOC104881994	phenylalanine ammonia-lyase 1-like	n.d.	
LOC109123362	phenylalanine ammonia-lyase-like	n.d.	
trans-cinnamate 4-monooxygenase			
LOC100253493	trans-cinnamate 4-monooxygenase-like	4.33	
LOC100251539	cytochrome P450 CYP73A100	n.d.	
LOC100267215	cytochrome P450 CYP73A100	n.d.	
coumaroylquinate 3'-monooxygenase			
LOC100265530	hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate /quinate hydroxycinnamoyltransferase-like	1.56	
LOC100253912	hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate /quinate hydroxycinnamoyltransferase-like	n.d.	
LOC100263633	cytochrome P450 98A2	n.d.	
LOC100246835	spermidine hydroxycinnamoyl transferase-like	n.d.	
LOC100250237	shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase	n.d.	
LOC100251863	spermidine hydroxycinnamoyl transferase	n.d.	
LOC100254574	vinorine synthase-like	n.d.	
LOC100255964	brassinosteroid-related acyltransferase 1-like	n.d.	
LOC100258760	hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate /quinate hydroxycinnamoyltransferase-like	n.d.	
LOC109123458	BAHD acyltransferase At5g47980-like	n.d.	

表 2 続き










Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation/control)	Color bar (Log2 ratio)
			4 0 -4
4-coumarate:CoA ligase			
4CL	4-coumarate:CoA ligase	12.26	
LOC100254698	4-coumarate--CoA ligase 1-like	5.20	
LOC100267198	4-coumarate--CoA ligase-like 7	0.75	
LOC100261471	4-coumarate--CoA ligase-like 6	n.d.	
LOC100265063	4-coumarate--CoA ligase 2	n.d.	
<i>Stilbenoid biosynthesis</i>			
stilbene synthase			
LOC100259169 /LOC100853406 /LOC100855299 /STS	stilbene synthase 2 /stilbene synthase 2-like /stilbene synthase 2-like /stilbene synthase	116.31	
LOC100259169 /LOC100853406 /LOC100855299	stilbene synthase 2 /stilbene synthase 2-like /stilbene synthase 2-like	89.36	
RS/STS/VINST1	resveratrol synthase/stilbene synthase /stilbene synthase	78.58	
LOC100253166/RS /STS/VINST1	stilbene synthase 1-like/resveratrol synthase /stilbene synthase/stilbene synthase	77.05	
LOC100253166 /VINST1	stilbene synthase 1-like /stilbene synthase	45.74	
LOC100241891 /LOC100853675	stilbene synthase 4 /stilbene synthase 4-like	0.70	
LOC104877274	stilbene synthase 1	n.d.	
LOC100240862	stilbene synthase 2	n.d.	
LOC100241164	stilbene synthase 6-like	n.d.	
LOC100242903	stilbene synthase 4	n.d.	
LOC100244220	stilbene synthase 2-like	n.d.	
LOC100244710	stilbene synthase 1-like	n.d.	
LOC100245181	stilbene synthase 5	n.d.	
LOC100246283	stilbene synthase 5	n.d.	
LOC100249839	stilbene synthase 3	n.d.	
LOC100251425	stilbene synthase 1-like	n.d.	
LOC100254045	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100258294	stilbene synthase 1-like	n.d.	
LOC100259991	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100261661	stilbene synthase 1	n.d.	
LOC100262321	stilbene synthase 2	n.d.	
LOC100263437	stilbene synthase 1	n.d.	
LOC100264173	stilbene synthase 5-like	n.d.	

表 2 続き






Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation/control)	Color bar (Log2 ratio) 4 0 -4
LOC100264844	stilbene synthase 5	n.d.	
LOC100266849	stilbene synthase 6	n.d.	
LOC100852886	stilbene synthase 1	n.d.	
LOC100853526	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100853590	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100853708	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100853745	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100853820	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC100854415	stilbene synthase 3	n.d.	
LOC109121404	stilbene synthase 4-like	n.d.	
LOC109124132	stilbene synthase 3-like	n.d.	
<i>Flavonoid biosynthesis</i>			
chalcone synthase			
CHS	chalcone synthase	3.60	
CHS3	chalcone synthase	2.07	
LOC100248612	chalcone synthase	n.d.	
LOC100261156	chalcone synthase	n.d.	
LOC100267962	chalcone synthase-like	n.d.	
chalcone isomerase			
CHI	chalcone isomerase	3.32	
flavonoid 3' hydroxylase			
LOC100263428	flavonoid 3'-monooxygenase	11.76	
LOC100232999	flavonoid 3' hydroxylase	n.d.	
LOC100263810	flavonoid 3'-monooxygenase-like	n.d.	
flavonoid 3,5'-hydroxylase			
F3'5'H	flavonoid 3'5' hydroxylase	0.95	
/LOC100232896	/flavonoid-3,5'-hydroxylase		
/LOC100241335	/flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like		
/LOC100243414	/flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like		
/LOC100852531	/flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like		
/LOC100853643	/flavonoid 3',5'-hydroxylase-like		
/LOC100854152	/flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like		
LOC100232896	flavonoid-3,5'-hydroxylase	0.86	
LOC100242945	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like	n.d.	
LOC100246462	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	
LOC100247021	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	
LOC100248071	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	
LOC100251607	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	

表 2 続き

Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation/control)	Color bar (Log2 ratio) 4 0 -4
LOC100256733	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	
LOC100266025	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2	n.d.	
LOC100267840	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like	n.d.	
LOC104877273	flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like	n.d.	
flavanone 3-hydroxylase			
F3H	flavanone 3-hydroxylase	2.09	
LOC100253950	flavanone 3-dioxygenase-like	1.54	
LOC104879126	naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase	n.d.	
dihydroflavonol reductase			
LOC100262839	dihydroflavonol-4-reductase-like	18.67	
LOC100253987	dihydroflavonol-4-reductase-like	8.65	
DFR	dihydroflavonol reductase	1.61	
LOC100249667	dihydroflavonol 4-reductase-like	n.d.	
LOC100259090	bifunctional dihydroflavonol 4-reductase /flavanone 4-reductase	n.d.	
LOC100267635	dihydroflavonol 4-reductase-like	n.d.	
leucoanthocyanidin dioxygenase			
LDOX	leucoanthocyanidin dioxygenase	1.91	
<i>Anthocyanin biosynthesis</i>			
UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyl transferase			
LOC100242982	UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase 6-like	26.44	
LOC100262128	putative UDP glucose-flavonoid 3-O -glucosyltransferase 3-like	4.31	
LOC100268157	anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase-like	2.35	
UFGT	UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase	0.99	
LOC100257268	anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase-like	0.44	

Fold change および Color bar: 電気刺激を施したブドウ培養細胞と無処理細胞の遺伝子発現の相対的变化を Log および色で示した

n. d., 未検出

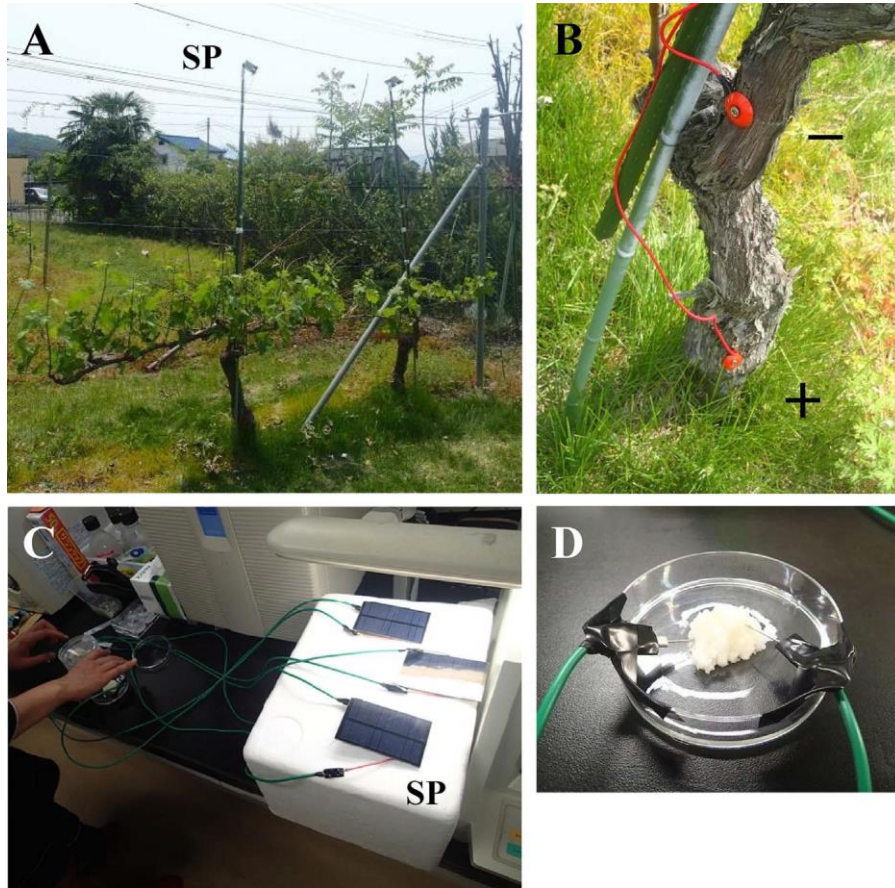


図 1. ブドウ樹およびブドウ培養細胞への電気刺激の実験デザイン

(A) 圃場試験における電気刺激システムの全景

(B) ブドウ樹への電気刺激で用いた電極の詳細

電極を地上 20 cm および 60 cm の位置に設置し、ソーラーパネルに接続した

(C) ブドウ培養細胞を用いた電気刺激システムの全景。SP=ソーラーパネル

(D) ブドウ培養細胞への電気刺激で用いた電極の詳細

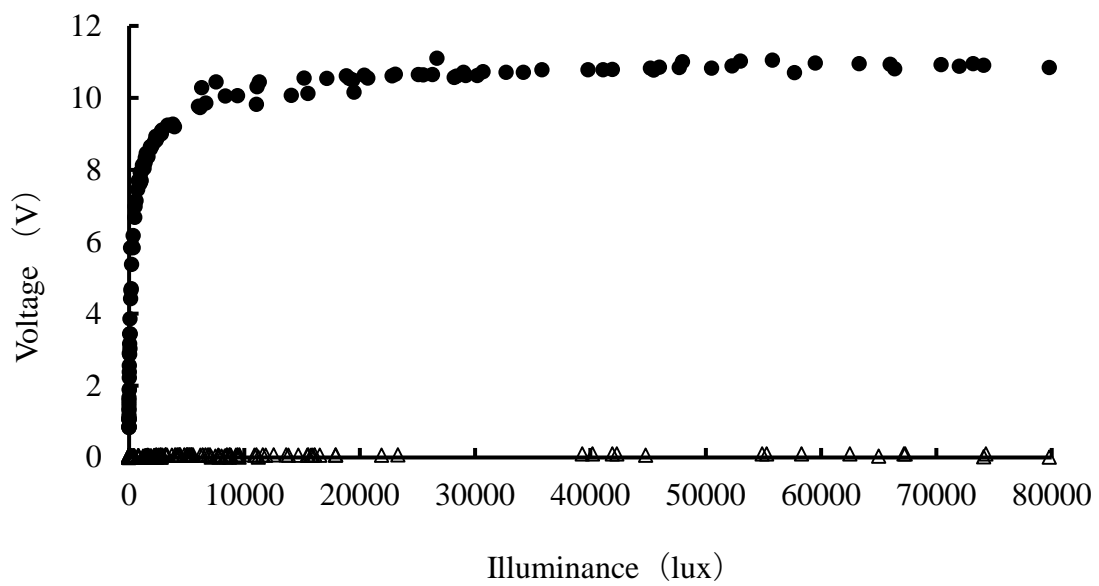


図 2. 電気刺激によってブドウ樹に印加される電圧と照度との相関
 ソーラーパネルの照度が 8,000 lx を超えると、2 枚のソーラーパネル
 の全容量（約 10V）の電圧がブドウ樹に印加された。
 丸印：ソーラーパネルあり、三角印：ソーラーパネルなし

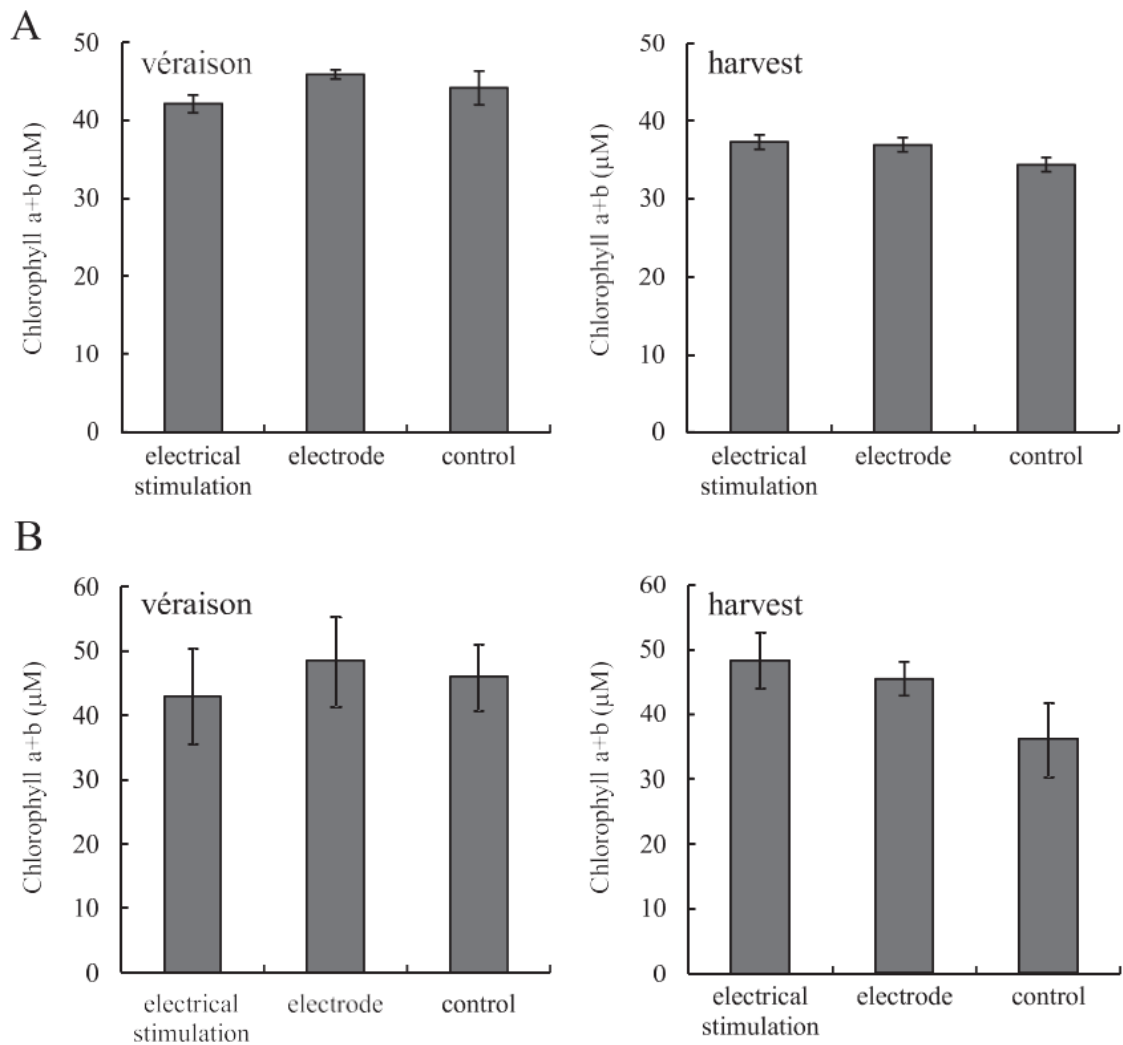


図 3. 電気刺激を施したブドウ樹の葉のクロロフィル含有量

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

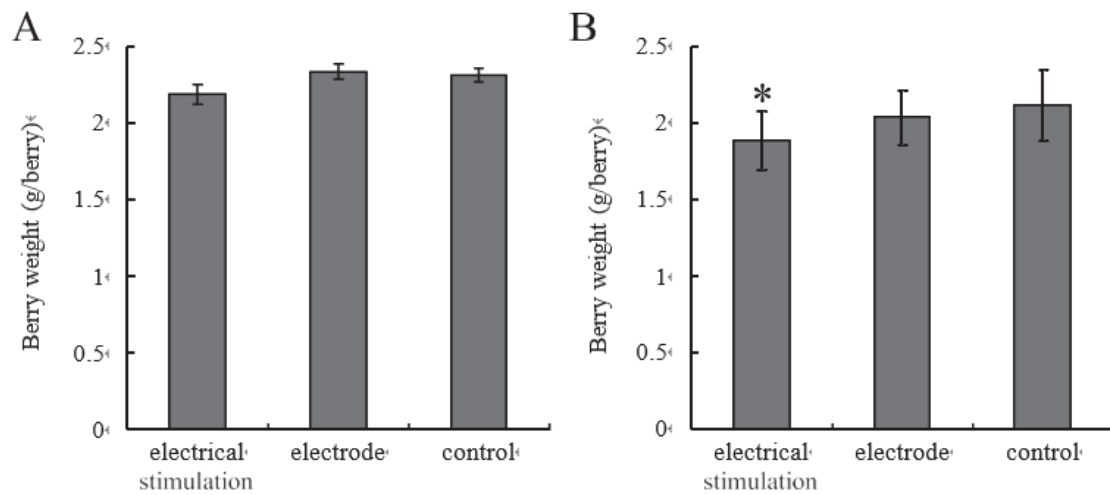


図 4. 電気刺激を施したブドウ樹の果粒重

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)。

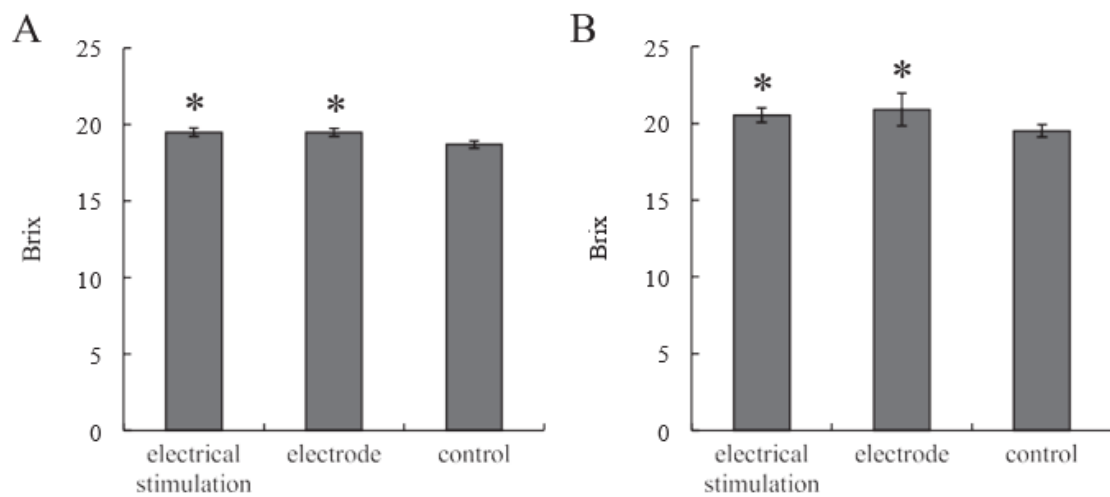


図 5. 電気刺激を施したブドウ樹の果実 Brix

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)。

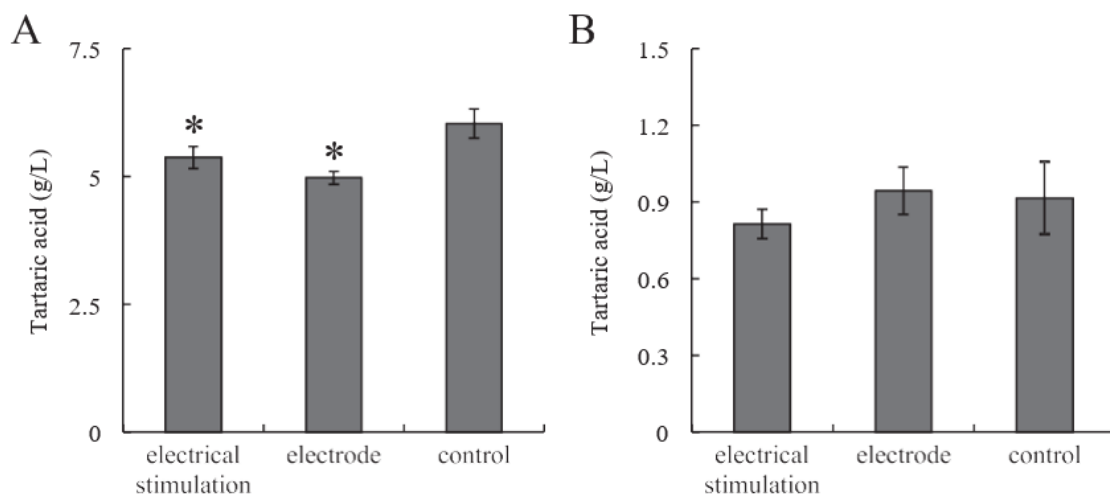


図 6. 電気刺激を施したブドウ樹の果実総酸含有量

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)。

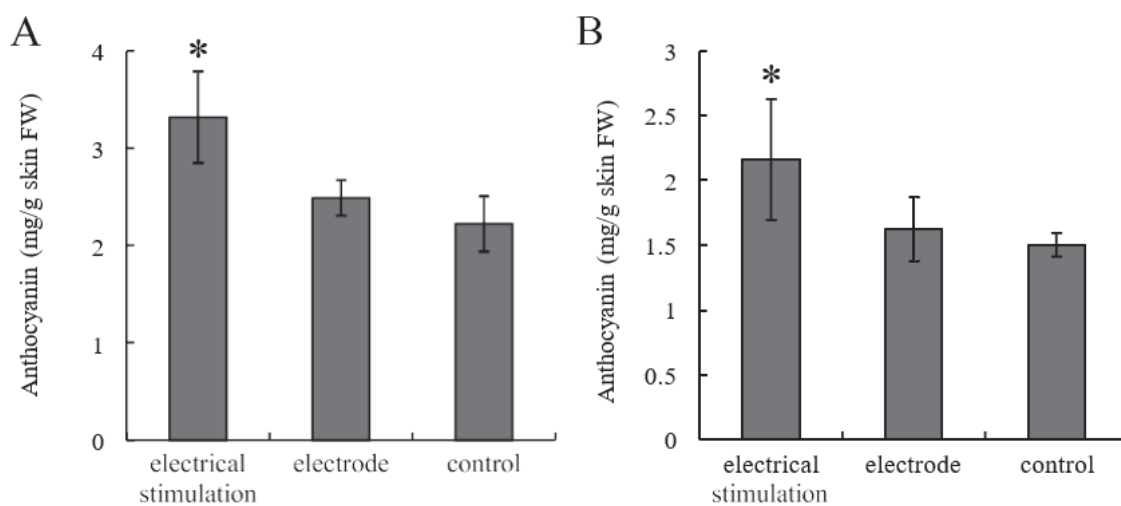


図 7. 電気刺激を施したブドウ樹の果皮アントシアニン含有量

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)。

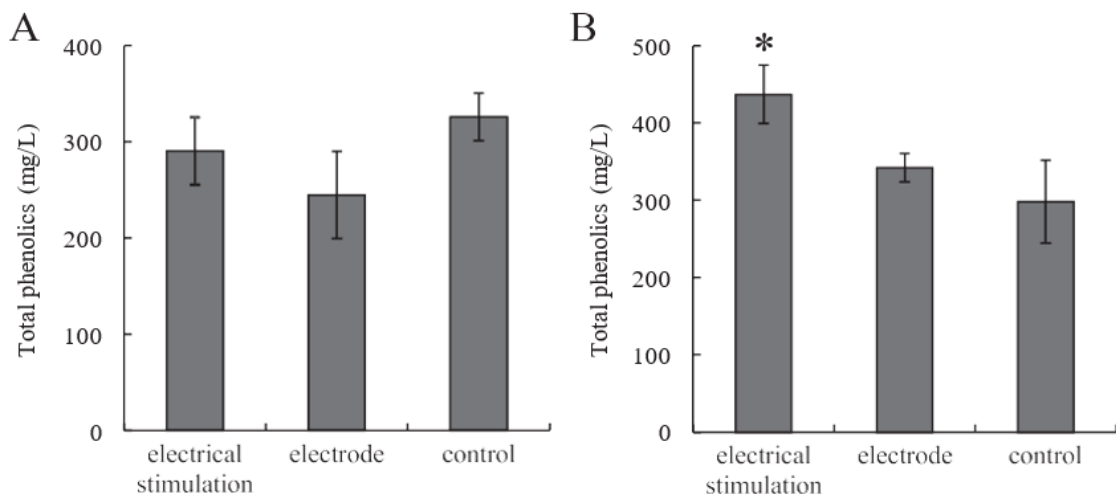


図 8. 電気刺激を施したブドウ樹の果実総フェノール含有量

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)。

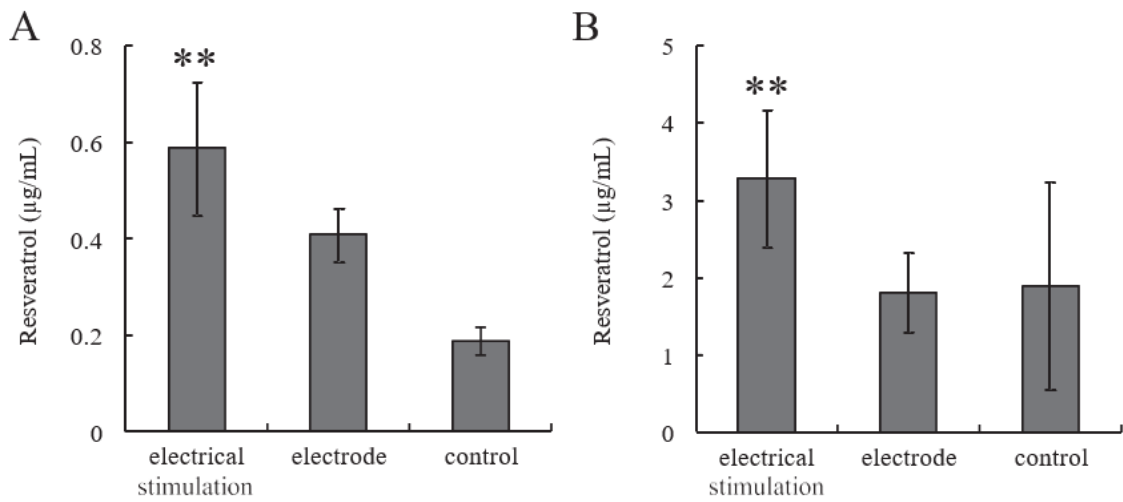


図 9. 電気刺激を施したブドウ樹の果実レスベラトロール含有量

(A) 2015 年

(B) 2016 年

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均値±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.01$)。

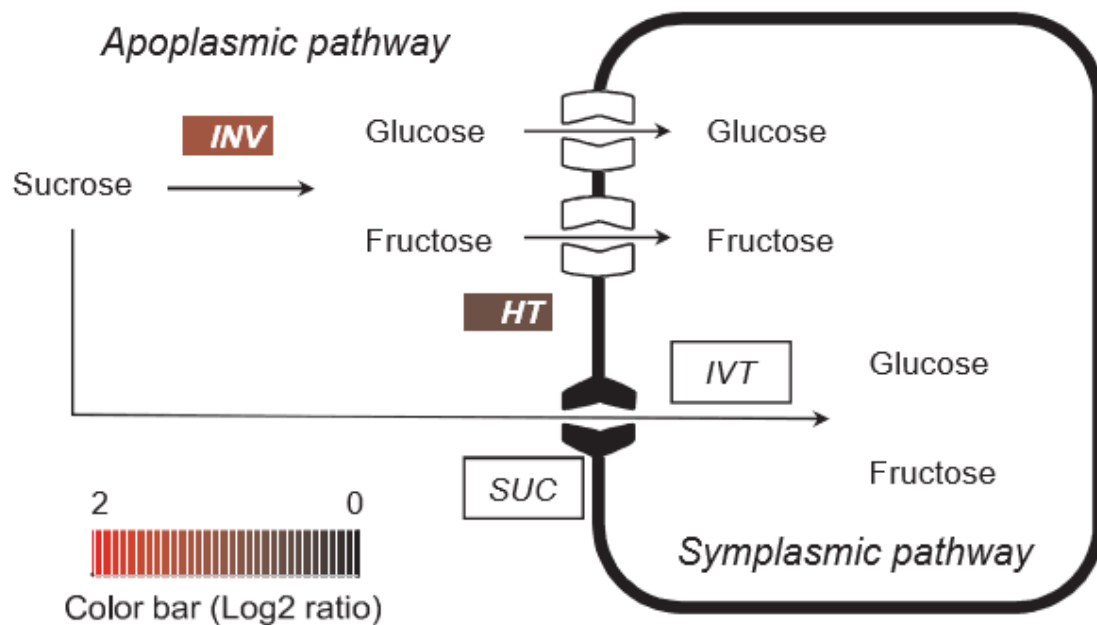


図 10. 電気刺激を施したブドウ培養細胞におけるスクロース代謝の活性化

ブドウ果実内でグルコースおよびフルクトースの蓄積につながるスクロース代謝のスキームを示す。

マイクロアレイ分析から電気刺激による遺伝子発現量の増大が無処理細胞の2倍を超えた遺伝子 ($p < 0.01$) をカラーバー (Log2 比) に対応した色でマーキングした。

INV : インベルターゼ (EC:3.2.1.26)

HT : ヘキソーストランスポーター

SUC : スクローストランスポーター

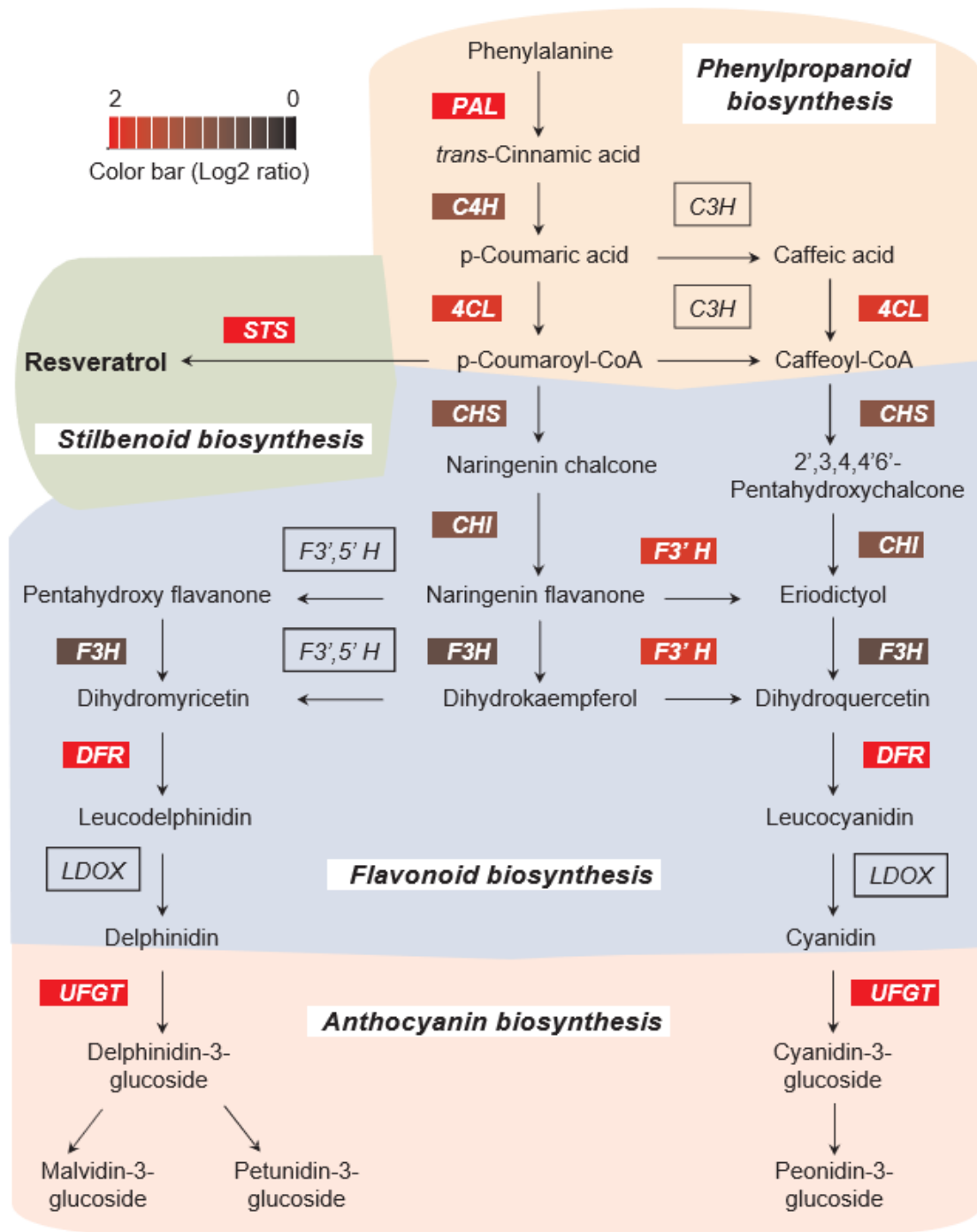


図 11. 電気刺激を施したブドウ培養細胞におけるフェニルプロパノイド、スチルベノイド、フラボノイドおよびアントシアニン生合成経路の活性化

図 11 続き

ブドウ果実にてアントシアニンおよびレスベラトロール生合成をもたらすフェニルプロパノイド、スチルベノイド、フラボノイドおよびアントシアニン生合成経路のスキームを示す。

マイクロアレイ分析から電気刺激による遺伝子発現量の増大が無処理細胞の2倍を超えた遺伝子 ($p < 0.01$) をカラーバー (Log2 比) に対応した色でマーキングした。

PAL : フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (EC:4.3.1.24)

C4H : トランスシンナメート 4-モノオキシゲナーゼ (EC:1.14.13.11)

C3H : クミロイルキナート 3'-モノオキシゲナーゼ (EC:1.14.13.36)

4CL : 4-クマレート:CoA リアーゼ (EC:6.2.1.12)

STS : スチルベンシンターゼ (EC:2.3.1.95)

CHS : カルコンシンターゼ (EC:2.3.1.74)

CHI : カルコンイソメラーゼ (EC:5.5.1.6)

F3'H : フラボノイド 3'-ヒドロキシラーゼ (EC:1.14.13.21)

F3',5' H : フラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ (EC:1.14.13.88)

F3H : フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (EC:1.14.11.9)

DFR : ジヒドロフラボンレダクターゼ (EC:1.1.1.219)

LDOX : ロイコアントシアニンジオキシゲナーゼ (EC:1.14.11.19)

UFGT : UDP グルコース-フラボノイド 3-O-グルコシルトランスフェラーゼ (EC:2.4.1.115)

第3章 電気刺激による生食用ブドウ品質の向上

3-1 緒言

果粒のサイズは、生食用ブドウの果実品質を決定する要素のひとつである。我が国の消費者は果粒サイズの大きな生食用ブドウ品種を好む傾向にある (Iwatani et al. 2011)。加えて、東アジアの生食用ブドウ市場における最も重要な考慮事項も果粒サイズであるため、他の特性を犠牲にしてまでも、理想の果粒サイズに近づける栽培方法が採用されている。特に、黒ブドウ品種で人気のある巨峰 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca* の4倍体交配種) や ピオーネ (*V. vinifera* × *V. labrusca* の4倍体交配種)、果皮ごと可食できる白ブドウ品種シャインマスカット (*V. vinifera* × *V. labrusca* の2倍体交配種) は糖度に加え果粒サイズが重視される。一方で、果粒サイズが大きくなると、糖度 (Brix) や果皮アントシアニン含有量が減少するため、一般的に大粒品種は醸造用ブドウに適さない (Roby et al. 2004)。

ブドウの果粒肥大は細胞分裂と増殖によって調節されており (Carmona et al. 2008)、有糸分裂による細胞分裂は、開花後直ぐに始まりその後約4~6週間で停止する。したがって開花後の細胞分裂および増殖速度は、果粒の新鮮重量を決定する主要な要因のひとつである (Houel et al. 2013)。これまでに果粒サイズを増大することを目指した既存技術がいくつか開発された。例えば、トンプソンシードレス (*V. vinifera*) では灌漑による水供給量を増やすことで果粒サイズが大きくなる (Zúñiga-Espinoza et al. 2015)。環状剥皮を施すことによりアーリーレッドシードレス (*V. vinifera*) の果粒重が1.5倍以上増加する (Crupi et al. 2016)。ベレブーン期に植物ホルモンであるエチレンを処理することにより細胞伸長を促進し果粒サイズを大きくする方法もある (Chervin et al. 2008)。エチレンは、水交換に関与するアクアポリンおよび細胞壁修飾に関与するポリガラクトクロナーゼ、キシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、セルロースシンターゼおよびエクспанシンをコードする遺伝子群の遺伝子発現を増大することで果粒肥大に寄与するようである (Chervin et al. 2008)。特に、細胞壁に局在し細胞壁を弛緩する働きを持つエクспанシンは、醸造用ブドウ (Schlosser et al. 2008, Suzuki et al. 2015) および生食用ブドウ (Ishimaru et al. 2007) の果粒肥大に

関与している。また植物ホルモンのジベレリン酸を処理することによりアーリーレッドシードレスのブドウ果粒重が130%増加したという報告もある (Crupi et al. 2016)。しかし、灌漑や環状剥皮などの栽培技術の適用には、栽培品種や圃場環境およびブドウ栽培者の専門知識に応じて、正確な処理タイミングと負荷量を調整する必要があり、高い技術スキルを必要とする。また、植物ホルモンを含め化学物質の適用による環境汚染への懸念は、世界中のブドウ栽培者を悩ませている。

これらの背景から、生食用ブドウの果粒サイズを大きくするための環境に優しく且つ技術スキルを必要としない代替技術への関心が高まっている。*Vitis davidii* Foex. から作出したブドウ培養細胞に異なった波長の光を照射したところ、波長によって着色や細胞増殖の度合いを変化させることができると報告された (Lai et al. 2022)。しかし、長期間 (45 日間以上) の光照射は逆に細胞増殖を抑制し、むしろ老化を促進することが示された。光照射技術は環境にやさしく、使用する装置も簡易であるが、現場応用を考慮すると光照射は露地栽培に適さない上、照射条件の調整など高度な技術スキルを要するという問題がある。

本研究では、ブドウ細胞の増殖あるいは伸長を促進する、簡易かつ効果的な外部刺激技術として電気刺激に着目した。シャインマスカットおよびピオーネの生食用ブドウ2品種を供試し、電気刺激が果粒サイズに影響を及ぼすか圃場試験で調査し、電気刺激による果粒肥大に関与する分子メカニズムを特定した。これらの解析データから、ブドウ樹への電気刺激が生食用ブドウの果実品質の向上に寄与できる技術であるかについて議論した。

3-2 材料および方法

3-2-1 植物材料

樹齢3年のシャインマスカットおよび樹齢10年のピオーネを供試した。いずれも山梨県笛吹市にある商業用ブドウ園で栽培したものをを用いた。シャインマスカットは、加温ハウスの棚仕立てで栽培し、ピオーネは、露地の棚仕立てで栽培した。

甲州 (*Vitis sp. cv Koshu*) の分裂組織から作製したブドウ培養細胞を改変ガンボークB5培地で暗所27°Cで維持した (Kato et al. 2009)。

3-2-2 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激

シャインマスカットのブドウ樹10本（電気刺激区5本および無処理区5本）およびピオーネのブドウ樹2本（電気刺激区1本、無処理区1本）を供試した。シャインマスカットへの電気刺激は、2018年2月20日および2019年1月18日に、ピオーネへの電気刺激は、2018年4月25日および2019年4月16日に施した。2つの電極（専用ネジ、長さ40mm）をブドウ樹の樹幹にねじ込み（正極は地上5cm、負極は地上130cm）、ソーラーパネルに接続した（図11）。最大電圧11.6V±5%、最大電流100mA±5%、動作温度-35°C～85°Cの電気的特性を有するソーラーパネルを使用した。ソーラーパネルは収穫後（シャインマスカットは5月末、ピオーネは8月末）にブドウ樹から取り外した。各ブドウ樹は、2年とも同じ処理を行った。

3-2-3 果実品質調査

シャインマスカット80房（ブドウ樹10本から各8房）およびピオーネ10房（ブドウ樹2本から各5房）をランダムに採取した。シャインマスカットは、収穫初期40房（2018年5月18日および2019年5月23日）と収穫中期40房（2018年5月21日および2019年5月27日）の2回に分けて採取した。ピオーネは、2018年8月21日および2019年8月23日に採取した。

電子天びん（EK2000i、株式会社エー・アンド・デイ）を使用して房重を計量した。各房からシャインマスカットは10粒（房の上部から3個、房の中央から4個および房の下部か

ら3個)、ピオーネからは7粒(房の上部から2個、中央から3個および下部から2個)を採取し、果粒の横径をデジタルノギス(AD-5764A-100、株式会社エー・アンド・デイ)で、果粒重を電子天びんで計測した。計測後これらの果粒を搾汁し果汁を得た。屈折計(PAL-BX/ACID2、株式会社アタゴ)を用いて果汁中の糖度(Brix)および総酸含有量(g/100 mL)を測定した。

新たにシャインマスカットの各房から10粒を採取し、カミソリを用いて各粒から果皮を薄くスライスした。光学顕微鏡(BX51、オリンパス株式会社)を用いて果皮切片から果皮厚(表皮および表皮下の細胞層の厚さ)を測定した。また各粒から果皮片(おおよそ5 mm²平方)をカミソリで切り出した。2.5 g/Lペクトリアーゼ(京和ケミカルプロダクツ)、91 g/Lマンニトールおよび5 g/Lデキストラン硫酸ナトリウムを含む酵素溶液(pH 5.6)で果皮片を4時間処理し、蒸留水で洗浄後、果皮片をスライドガラスに載せカバーガラスで覆った。果皮片の0.5mm²領域の細胞数を光学顕微鏡下で計測した。各果皮片について4地点の細胞数を計測した。

ピオーネの各房から新たに7粒を採取し果皮をピンセットで剥離した。液体窒素で凍結後、果皮に含まれるアントシアニン蓄積量を測定した。果皮からのアントシアニン抽出およびアントシアニン含有量の測定は、既報(Moriyama et al. 2020)の方法に準じた。簡単に説明すれば、凍結した果皮を乳鉢で手早く粉碎し、粉碎したサンプル1gを10 mLのHCl-メタノール[36:1(v/v)]中で室温にて暗所で一晩処理した。処理溶液の吸光度(OD₅₂₀)を分光計(UV-1800、島津製作所)にて測定した。アントシアニン含有量は、以前に報告された計算式(Bakker et al. 1986)に従って果皮重量1グラムあたりに含まれるマルビジン-3-グルコシドの相当量に換算した。

3-2-4 マイクロアレイ分析

第2章「2-2-6 マイクロアレイ分析」と同様の方法でマイクロアレイ分析を実施した。

3-2-5 リアルタイム RT-PCR

マイクロアレイ分析に用いたRNAの残りをを用いてcDNAを合成した。cDNA合成は、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(タカラバイオ株式会社)のプロトコル

に従って実施した。リアルタイム RT-PCR は、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社) を使用した。PCR 増幅のタイムスケジュールは、95°C で 30 秒間の初期変性後、95°C で 5 秒間、60°C で 1 分間を 40 サイクルとした。リアルタイム RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列は次の通りである。

V. vinifera kinesin-like protein KIN-5C

(5' -AATGGAGGCCCTTCTTGACG-3' および 5' -ACGAGTATGGAGCTGTCCCT-3'、LOC100240753)

V. vinifera transducin beta-like protein 3

(5' -TCAAAGGCCACAAAGGGGTT-3' および 5' -AGCACTGAGCAAGGTCCATC-3'、LOC100252767)

V. vinifera replication protein A 14 kDa subunit B

(5' -TGGATACATCAAGCCCTGCA-3' および 5' -ATTCCCCATTTGCAAGCAGG-3'、LOC100244193)

V. vinifera nuclear pore complex protein NUP88

(5' -ATGCAATGGTGGGAGGAAG-3' および 5' -CTGCAATCCAGACTGGCTGA-3'、LOC100265724)

V. vinifera β -actin

(5' -CAAGAGCTGGAACTGCAAAGA-3' および 5' -AATGAGAGATGGCTGGAAGAGG-3'、AF369524)

データの正規化は、解離曲線を評価して増幅反応の特異性を検証した。各遺伝子の発現量は、標準曲線法と Thermal Cycler Dice Real Time System Single ソフトウェア ver. 3.00 (タカラバイオ株式会社) を用いて一定の閾値に到達するために必要な増幅サイクルの数として決定した。データは β -アクチンに対する相対値として示した。

3-2-6 統計分析

データは、平均±標準偏差として示した。統計分析は、Excel 統計ソフトウェア 2012 を用いて ANOVA 分散分析およびスチューデント *t* 検定によって実施した。

3-3 結果

3-3-1 電気刺激による圃場栽培のブドウ果実品質への影響

シャインマスカットおよびピオーネへの電気刺激システムの全景を図 12 に示した。醸造用ブドウと同様に、晴天時の日中にはソーラーパネルの全容量の電圧（約 11.6 V）がブドウ樹に印加され、夜間は電圧が発生しなかった。電気刺激は、栽培品種や成育期のステージに関係なく、開花期、ベレゾーン期および収穫時期に顕著な影響を与えなかった。

シャインマスカットでは、2018 年の房重は電気刺激を施したブドウ樹で無処理のブドウ樹よりも有意に重かったが、2019 年に再現性は認められなかった（図 13A）。一方、2018 年（図 13A）および 2019 年（図 13B）の果粒重は、無処理のブドウ樹と比較し電気刺激を施したブドウ樹で 1 割程度重かった。2019 年には、電気刺激を施したブドウ樹の果粒直径は有意に大きかった（図 13B）。シャインマスカットの食感に影響する果皮厚は、2018 年で電気刺激を施したブドウ樹で無処理のブドウ樹よりも厚かった（図 13A）が、2019 年に再現性は得られなかった（図 13B）。電気刺激を施したブドウ樹の果実 Brix は、2018 年において無処理のブドウ樹よりも低かったが（図 13A）、2019 年では同程度であった（図 13B）。果実の総酸含有量は、2018 年では処理区間で統計的差異は認められなかったが（図 13A）、2019 年には電気刺激処理を施したブドウ樹で無処理のブドウ樹よりも高かった（図 13B）。

ピオーネでは、2018 年に電気刺激を施したブドウ樹の果粒重は無処理のブドウ樹よりも重かった（図 14A）。翌 2019 年における果粒重は処理間で同程度であったが（図 14B）、電気刺激を施したブドウ樹の果皮アントシアニン含有量、果実 Brix および総酸含有量は、無処理のブドウ樹よりも高かった。

以上の結果から、電気刺激処理を施したブドウ樹、少なくともシャインマスカットでは果粒サイズが 1 割程度大きくなる可能性が示唆された。

3-3-2 電気刺激によるブドウ果皮表皮の細胞数の増加

電気刺激がシャインマスカットの果粒サイズをどのように大きくしているのかを明らかにするため、ブドウ果皮の真皮細胞を光学顕微鏡で観察し、面積当たりの細胞数を計測した。電気刺激を施したシャインマスカットの果皮表皮には無処理のブドウ樹よりも単位面積当

たり多くの細胞が存在したことから、細胞面積が小さいことが示唆された (図 15A および 15B)。この結果は、電気刺激は果皮における細胞分裂を促進するが、細胞伸長は促進しない可能性を示唆した。

3-3-3 電気刺激による細胞分裂関連遺伝子の転写誘導

電気刺激による果粒肥大に関連する分子メカニズムを検討するため、ブドウ培養細胞を用いてマイクロアレイ分析による網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。なお、マイクロアレイデータは、PRJDB12347 (BioProject)、SAM00406430 および SAM00407628 (BioSample)、並びに E-GEAD-455 (GEA accession number) として DDBJ / ENA / GenBank に寄託した。

電気刺激を施したブドウ培養細胞では、多数の遺伝子が差次的に発現した。電気刺激は 1659 遺伝子の発現を抑制し、1071 遺伝子の発現を上昇した。以前の研究 (Mikami et al. 2017) で明らかにされたスクロース代謝並びにフェニルプロパノイド、フラボノイド、スチルベノイドおよびアントシアニン生合成に関連する遺伝子の発現が電気刺激により上昇されたことを確認した。本研究では、細胞分裂および細胞伸長に関与するタンパク質をコードする遺伝子に焦点を絞った。

細胞周期に関連する kinesin-like protein KIN- 5C (*KIN5C*) および transducin beta-like protein 3 (*TBL3*) の遺伝子発現は、無処理細胞と比較し、電気刺激を施したブドウ培養細胞で上昇した (表 3)。また、DNA 複製および細胞質分裂にそれぞれ関連する replication protein A 14 kDa subunit B (*RPA14*) および nuclear pore complex protein NUP88 (*NUP88*) においても、電気刺激によって発現上昇が誘導された (表 3)。いずれの遺伝子も無処理細胞に比べて電気刺激により 2 倍以上の発現上昇が認められた。マイクロアレイ分析の再現性を確認するため、これら遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて再確認した。電気刺激による *KIN5C* および *NUP88* 遺伝子発現の上昇は、リアルタイム RT-PCR 法でも再現され、それぞれ無処理細胞に比べ 5 倍、1.4 倍程度の発現上昇が示された (図 16)。一方、*TBL3* および *RPA14* については、リアルタイム RT-PCR 法にて再現性は認められなかった。

エクспанシンは植物の細胞伸長に関与する分子である (Shcherban et al. 1995; Suzuki et al. 2015)。マイクロアレイ分析では、電気刺激を施したブドウ培養細胞において expansin-A6、expansin-A1-like、expansin-A10、expansin-like などエクспанシンをコー

ドする遺伝子の発現上昇は認められなかったことから（表3）、電気刺激はブドウ細胞の細胞伸長に転写レベルで影響を及ぼさないことが示唆された。

3-4 考察

ブドウ果実が生育する過程において細胞分裂および細胞伸長は果粒サイズを決定づける重要な要因である (Houel et al. 2013)。例えば、エクспанシンは、細胞伸長により果粒サイズの肥大に関与しており (Ishimaru et al. 2007; Schlosser et al. 2008)、ゲノムワイド解析からもエクспанシン遺伝子の発現はブドウ果粒の生育と強い相関関係があることが確認されている (Dal Santo et al. 2013)。本研究から、電気刺激はシャインマスカット果粒重の増大に寄与することが確認された。さらに、ブドウ培養細胞を用いた遺伝子発現解析により、電気刺激は細胞周期及び細胞質分裂に関連する遺伝子の発現上昇を誘導したが、エクспанシン遺伝子については影響を示さないことが明らかとなった。これは、電気刺激によるシャインマスカット果粒肥大は、細胞伸長ではなく、細胞分裂の活性化に起因することを意味する。事実、電気刺激が細胞伸長に影響せず、細胞分裂を促進することは果皮細胞の顕微鏡観察によって裏付けられた。

一方、電気刺激によるピオーネの果粒肥大は 2018 年のみで観察された。2018 年と 2019 年で一致した結果が得られなかった原因のひとつに、ベレーゾーン前後における日射量の減少など (甲府地方気象台, 2019) が挙げられる。甲府市の 2018 年 7 月の日照時間合計は 237.1h であったのに対し、2019 年 7 月は 89.6h であった (図 17)。2019 年は前年と比較し、約 62%日照時間が少なかったことから果実成熟に不適な環境条件であったと言える。露地栽培のピオーネにおいて果粒肥大の再現性が得られなかった要因として気象条件が影響したことが考えられる。興味深いことに、2019 年のピオーネでは電気刺激によって果皮アントシアニン含有量並びに果実 Brix および総酸含有量が増大した。これらの結果は、悪天候によって果実品質が低下しても、電気刺激によって高水準に引き戻すことができる可能性を示唆している。以上をまとめると、電気刺激は如何なる気象条件下でもブドウの果実特性に悪影響を与えることなく、果実品質の向上を高めることが可能であると言える。

kinesin-like protein KIN-5C をコードする *KIN-5C* 遺伝子発現は電気刺激によって著しく上昇した。kinesin-like protein は、植物の有糸分裂、減数分裂および細胞成長に関連する微小管モーターである (Liu et al. 1996)。核および隔膜形成体に局在する protein kinase 1 による kinesin-like protein 1 のリン酸化はタバコ細胞における中期から細胞質分裂への移行に関与する (Nishihama et al. 2002; Sasabe et al. 2011)。対照的に、

kinesin-like protein SGL は、イネの細胞伸長を制御するジベレリン生合成における遺伝子発現を制御することにより穀粒長および草丈を調節する (Wu et al. 2013)。転写調節活性を有するイネカイネチン kinetin-like protein BC12 / GDD1 はジベレリン生合成遺伝子のプロモーターに結合し、イネのジベレリン生合成を調節することによって細胞伸長を促進する (Li et al. 2011)。本研究では、電気刺激は細胞伸長を促進しなかったことから、ブドウでは KIN-5C は果粒肥大の細胞周期の調節に関与するが、細胞伸長の調節には関わらないと考えられた。今後ブドウおよびモデル植物を用いて、KIN-5C の過剰発現または発現抑制実験を行うことによりブドウ果実の生育における KIN-5C の機能がさらに明らかにされることを期待する。

核膜孔複合体タンパク質 NUP88 をコードする *NUP88* 遺伝子発現もまた電気刺激によって上昇した。核膜孔複合体は、RNA およびタンパク質の移動のために核と細胞質を接続するチャネルであり、核膜孔複合体タンパク質を含む約 30 の異なるタンパク質が複数コピー結合して構成されている (Raices and D'Angelo. 2012)。シロイヌナズナでは NUP88 は配偶子形成の有糸分裂に必要であり、配偶子形成の有糸分裂を正しく促進する (Park et al. 2014)。また NUP88 はシロイヌナズナのロゼット葉における植物免疫調節因子の核内滞留を促進することにより植物免疫に寄与する (Cheng et al. 2009; Wiermer et al. 2010)。シロイヌナズナにおいて NUP88 の null 変異体 (全欠失変異体) は胚致死をもたらすため (Cheng et al. 2009)、NUP88 が細胞分裂を促進することによって植物の生育に寄与しているか否かはまだ明らかになっていない。シロイヌナズナのようなモデル植物における NUP88 の過剰発現は、植物の生育における NUP88 の生理学的機能の理解に役立つだけでなく、電気刺激によるブドウ果実品質向上の背景にある分子メカニズムの解明に寄与できると考えられる。

第 2 章で実施した醸造用ブドウへの電気刺激では果粒重は重くならず、軽くなる傾向を示した (第 2 章 図 4)。生食用および醸造用ブドウのいずれもブドウの樹幹に電気刺激を負荷したが、生食用ブドウは棚仕立てで、醸造用ブドウは垣根仕立てであり、樹体の大きさが大きく異なっていた。樹体の大きさの違いは電極から果実までの距離の違いを生み出す。いずれのブドウでも電気刺激システムは非生物的ストレス発生器として機能したが、ブドウ樹の仕立て方、すなわち樹体の大きさ、あるいは求める効果 (例えば、果粒サイズ肥大、糖度上昇、果皮アントシアニン蓄積量の増加など) で電気刺激の効果を最大化する処理条件を模索する必要があるのかもしれない。今後、電圧および電気刺激のタイミングとブドウ樹体の大きさとの相関により電気刺激の効果がどのように変動するかを把握するために、電気

刺激システムの最適条件を特定するための詳細な圃場試験が必要であるだろう。

3-5 要旨

生食用ブドウの食感を左右する果粒サイズは、東アジアの消費者にとって重要な購入動機であり、商業的価値に大きく影響する。本研究では、生食用ブドウ樹に電気刺激を施すことにより、果実の細胞分裂を促進し、果粒を肥大させることに成功した。山梨県で商業的に栽培されるシャインマスカット（ハウス栽培）とピオーネ（露地栽培）を供試し、2018 年および 2019 年の萌芽期から果実収穫期まで間ソーラーパネルを用いて電気刺激をブドウ樹に施した。電気刺激を施したブドウ樹の果実 Brix および総酸含有量は、無処理のブドウ樹と同程度であったが、果粒サイズは栽培品種に依存せず肥大した。加えて、2019 年のピオーネでは、果実 Brix および酸度も電気刺激によって改善した。ブドウ果皮の顕微鏡分析から、電気刺激を施したブドウ樹では果皮表皮の単位面積あたりの細胞数が無処理のブドウ樹よりも多いことが示された。ブドウ培養細胞を用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングから、電気刺激は細胞周期および細胞質分裂をそれぞれ調節する kinesin-like protein KIN-5C および nuclear pore complex protein NUP88 をコードする遺伝子の発現を上昇したが、植物の細胞伸長に関与するエクспанシンの遺伝子発現には影響しないことが明らかになった。これらのデータは、電気刺激を施したブドウ樹における果粒肥大は細胞伸長ではなく細胞分裂の促進を介した結果であることを示唆する。電気刺激システムのメリットは、果粒肥大を促進する他の栽培技術と比較して労働時間および労働負荷を減らすことができ、また環境汚染という懸念を排除できる点であろう。

表 3 電気刺激を施したブドウ培養細胞における細胞分裂および細胞伸長関連遺伝子の転写変化

Gene symbol ^a	Gene description	Fold change ^b (electrical stimulation /control)
cell cycle		
LOC100240753	kinesin-like protein KIN-5C	2.16
LOC100252767	transducin beta-like protein 3	2.13
DNA replication		
LOC100244193	replication protein A 14 kDa subunit B	2.23
cytokinesis		
LOC100265724	nuclear pore complex protein NUP88	2.41
cell expansion		
LOC100245911	expansin-A6	0.41
LOC100260158	expansin-A1-like	0.30
LOC100244103	expansin-A10	0.25
LOC100244917	expansin-like	0.10

Fold change: 電気刺激を施したブドウ培養細胞と無処理細胞の遺伝子発現の相対的变化を Log で示した

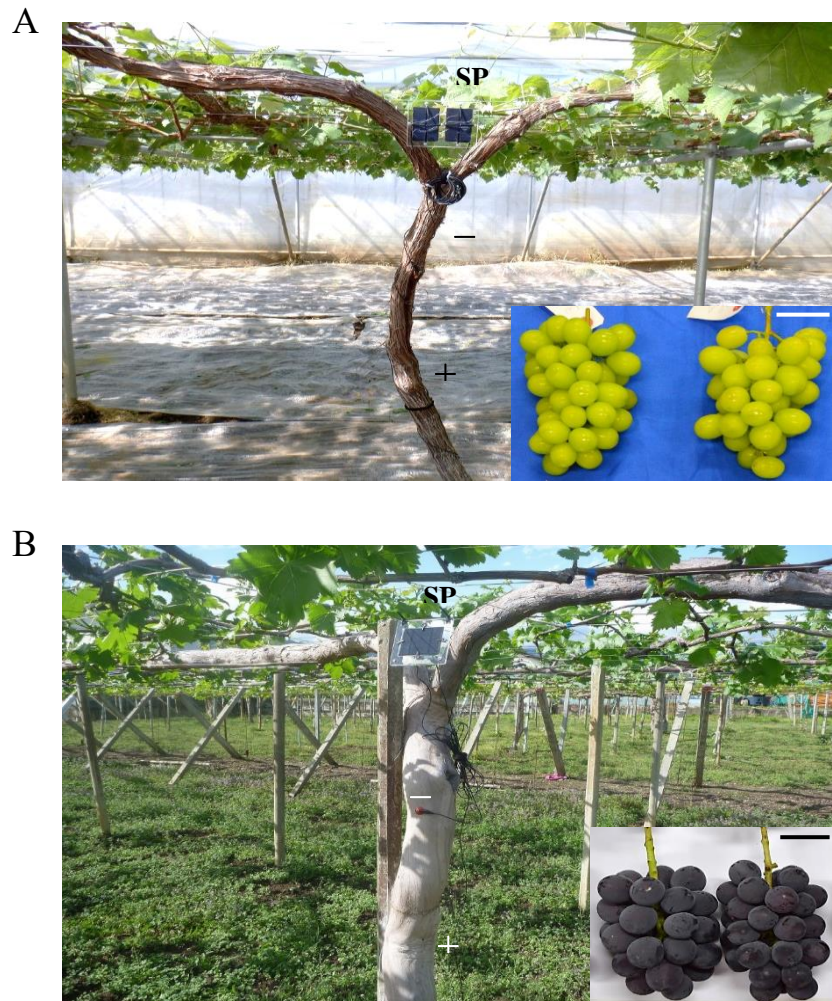


図 12. 生食用ブドウ樹へ施術した電気刺激システムの全景

(A) シャインマスカット（ハウス棚仕立て）へのシステム設置

(B) ピオーネ（露地棚仕立て）へのシステム設置

ソーラーパネル（SP）は地上約 1.5m に配置した。

正極（+）は地上 5 cm、負極（-）は地上 130 cm の位置に設置し、ソーラーパネルに接続した。

シャインマスカットおよびピオーネの房をそれぞれ図に加えた。

スケールバー = 5 cm

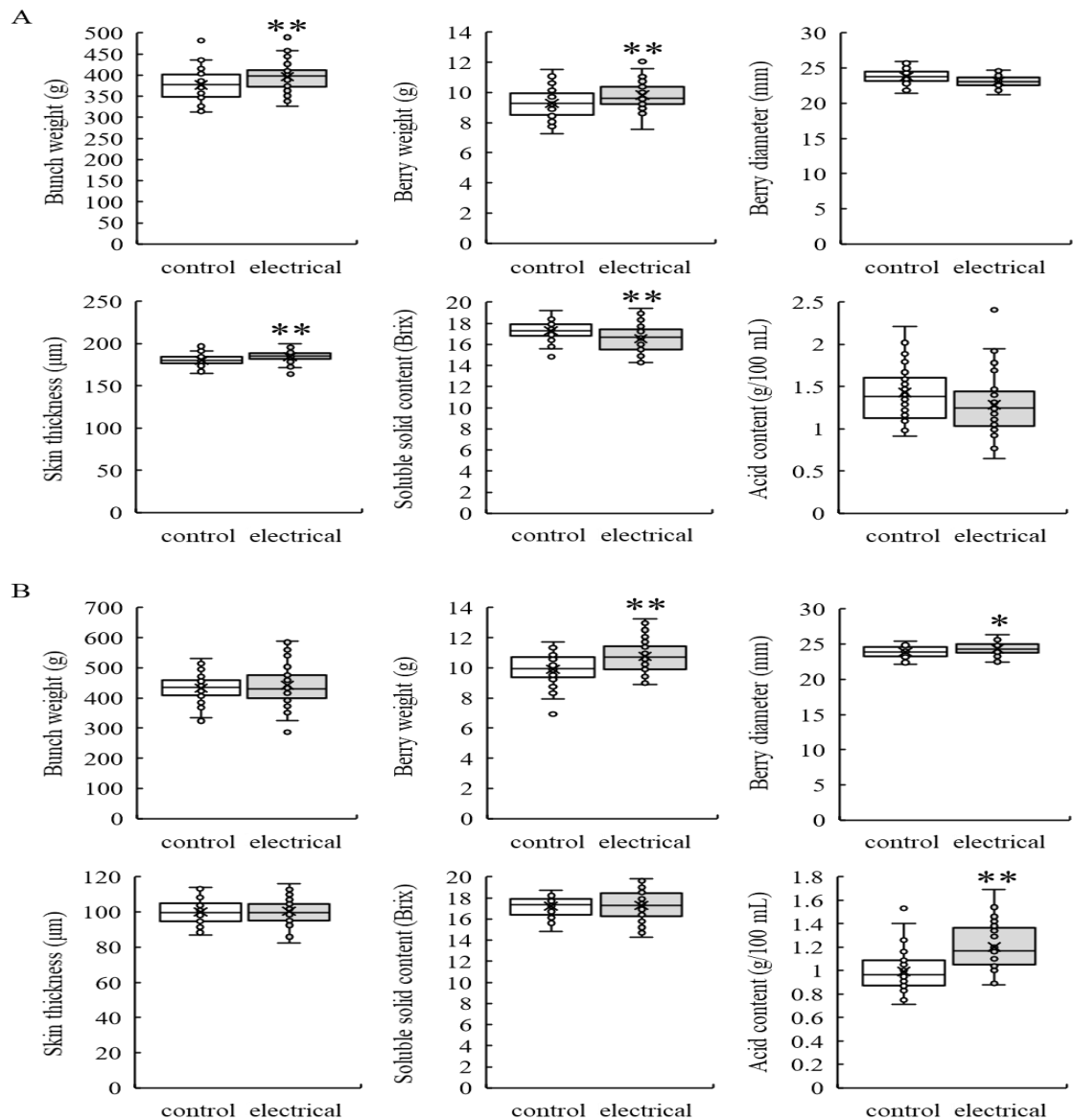


図 13. 電気刺激を施したシャインマスカットの果実品質

(A) 2018 年

(B) 2019 年

control, 無処理のブドウ樹; electrical, 電気刺激を施したブドウ樹
箱ひげ図中の×は、採取した 40 房の平均値を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

(* p < 0.05、** p < 0.01)。

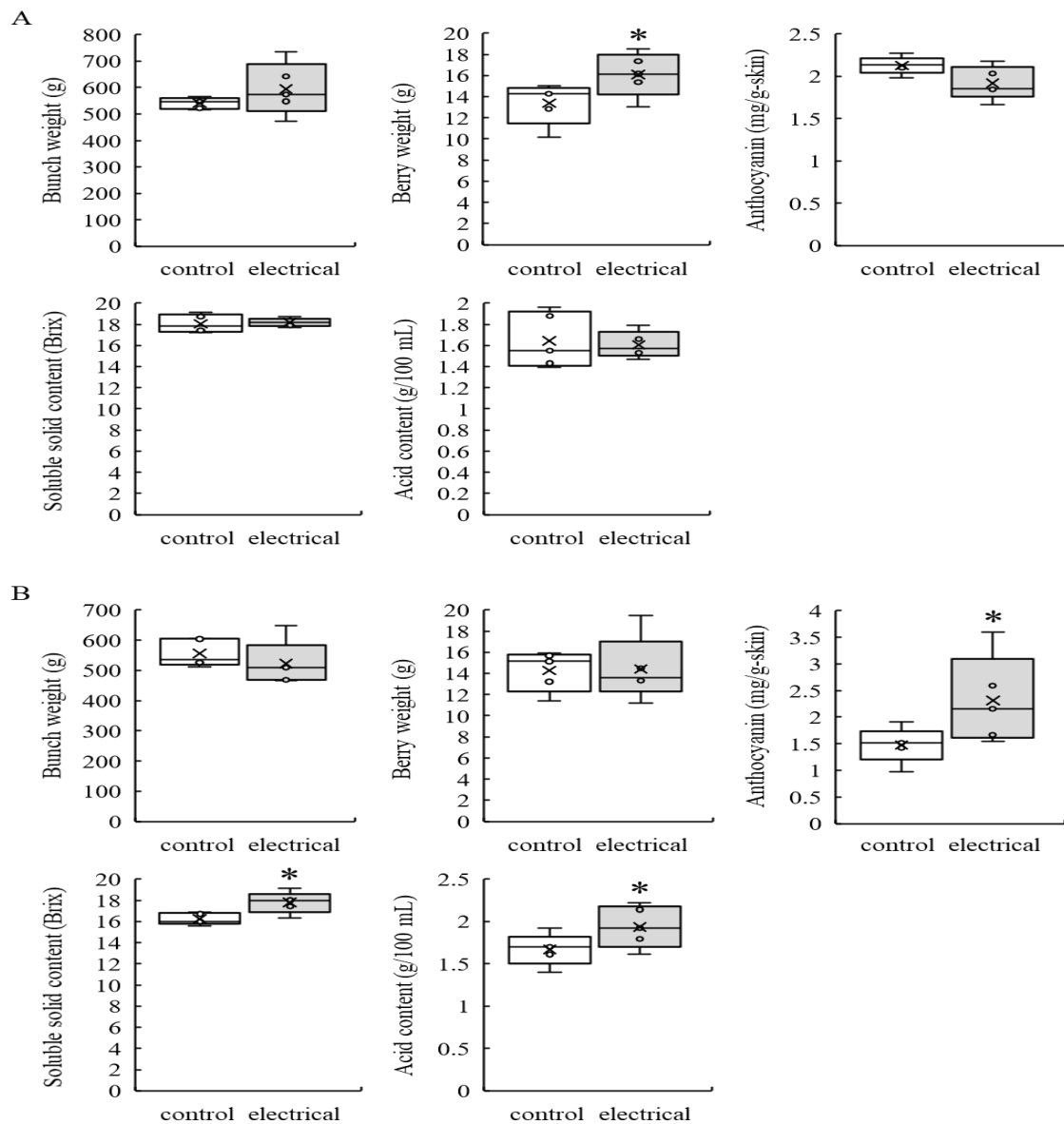


図 14. 電気刺激を施したピオーネの果実品質

(A) 2018 年

(B) 2019 年

control, 無処理のブドウ樹; electrical, 電気刺激を施したブドウ樹
箱ひげ図中の×は、採取した 5 房の平均値を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

(* $p < 0.05$)。

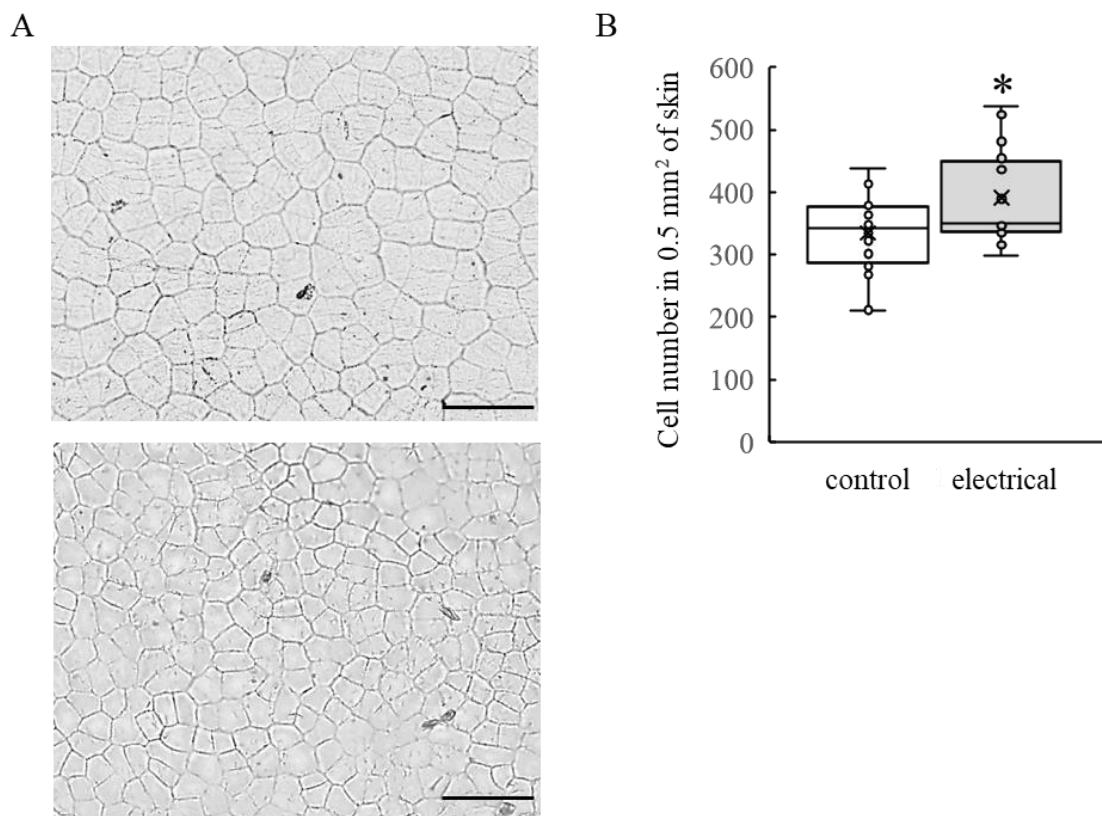


図 15. 電気刺激を施したシャインマスカット果皮表皮の細胞数

(A) 果皮表皮の顕微鏡写真

無処理のブドウ樹（上）および電気刺激を施したブドウ樹（下）

スケールバー = 100 μ m

(B) 果皮 0.5 mm² に存在する果皮細胞数

control, 無処理のブドウ樹; electrical, 電気刺激を施したブドウ樹

箱ひげ図中の×は、20 か所の平均値を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

(* $p < 0.05$)。

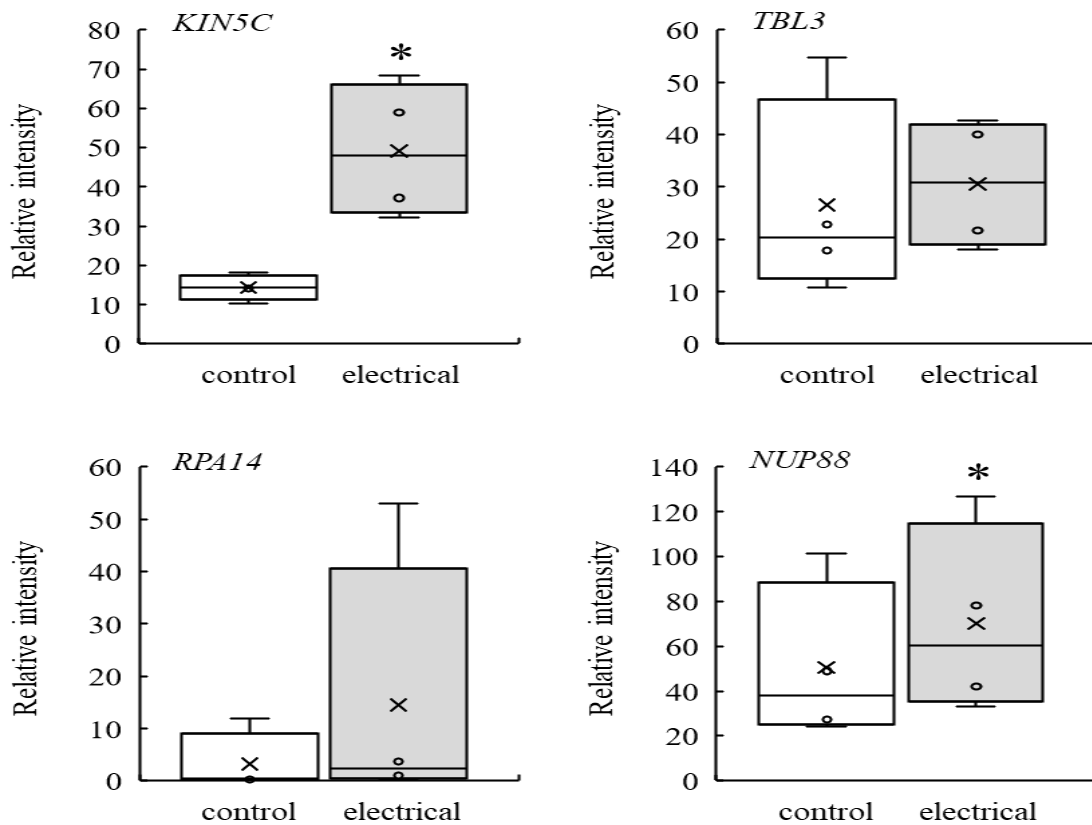


図 16. 電気刺激による細胞分裂関連遺伝子の転写変化

電気刺激を4時間処理したブドウ培養細胞をリアルタイム RT-PCR に供試し、アクチン遺伝子の発現量に対する相対値として各遺伝子の発現量を表した。

control, 無処理のブドウ樹; electrical, 電気刺激を施したブドウ樹
箱ひげ図中の×は、4回の独立した実験の平均値を示す。

KIN5C、キネシン様タンパク質 KIN-5C ; *TBL3*、トランスデューシンベータ様タンパク質 3 ; *RPA14*、複製タンパク質 A 14 kDa サブユニット B ; *NUP88*、核膜孔複合体タンパク質 NUP88

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した (* p 0.05)。

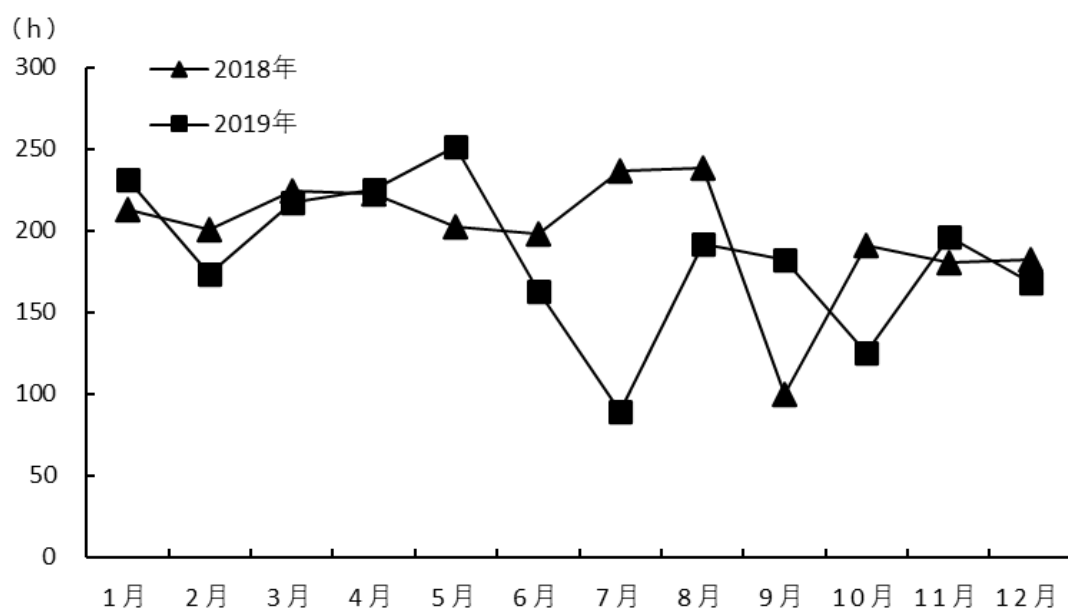


図 17. 甲府市日照時間合計 (2018 年および 2019 年)

甲府気象台の報告を基に作成

第4章 電気刺激によるブドウ樹の植物防御反応の強化

4-1 緒言

ブドウを植物病原菌から保護するための比較的簡便な戦略として、化学農薬散布が広く用いられている。しかし、現在、化学農薬耐性植物病原菌の出現によってブドウ栽培者は植物病原菌からブドウを保護することが難しくなっている。例えば、ブドウべと病菌は化学農薬耐性を獲得する可能性が高い植物病原菌である (FRAC, accessed on 29 October 2020)。ヨーロッパのブドウべと病菌個体群は、Quinone outside Inhibitors (QoI) 殺菌剤 (Heaney et al. 2010) およびカルボン酸アミド (CAA) 殺菌剤 (Gisi et al. 2007) に対する耐性を獲得している。日本でも2009年に特定のブドウべと病菌集団からQoI 殺菌剤耐性が検出された (Furuya et al. 2009)。CAA殺菌剤耐性ブドウべと病菌は日本では報告されていないが、CAA殺菌剤に対する耐性を付与するセルロースシンターゼ遺伝子 *PvCesA3* のコドン1105での単一点突然変異 (Blum et al. 2010) を有するヘテロ接合体が日本のブドウべと病菌集団から発見されている (Aoki et al. 2015)。現在の化学農薬は上市後直ぐに化学農薬耐性菌が出現することに加え、環境汚染の懸念から、ブドウ栽培でも化学農薬散布に代わる環境に優しい代替技術への関心が高まっている。

化学農薬散布に替わる代替技術のひとつとして、非生物的または生物学的エリシターによる植物防御反応の誘導が挙げられる (Atkinson et al. 2012)。オオムギに含まれるフェネチルアミンアルカロイドであるホルデニン、ブドウの植物防御反応を活性化することによりブドウべと病を抑制した (Ishiai et al. 2016)。この研究では、ホルデニンはジャスモン酸依存的シグナル経路を活性化し、防御関連遺伝子 PDF1.2 およびキチナーゼの遺伝子発現を向上した。糸状菌 *Trichoderma harzianum* T39 株はブドウの植物防御反応を活性化し、ブドウべと病菌の生育を直接阻害することなく、ブドウべと病の発症を軽減した (Perazzolli et al. 2008)。これら先行研究は、非生物的または生物学的エリシターがブドウに抵抗性を誘導することによりブドウ病害の発生を抑制できることを意味する。ブドウ栽培において植物防御反応を誘発するための実用的な技術導入は、化学農薬散布量を減らし、化学農薬耐性植物病原菌の出現を抑制すること、そして環境保全にも貢献できる。

植物防御反応のひとつとして抗菌性物質のファイトアレキシンがある。ブドウでもいくつかファイトアレキシンが同定されており、そのひとつがレスベラトロールである (Jeandet et al. 1995)。第2章で述べたように、電気刺激システムはスチルベノイド生合

成関連遺伝子の発現上昇を誘導し、果実のレスベラトロール含有量を増加した(Mikami et al. 2017)。これらの研究結果から、本章では「電気刺激はブドウ樹において非生物のエリシターとして機能し、ブドウの植物防御反応を増強する」という仮説を立てた。この仮説を実証するために、電気刺激を施したブドウ樹におけるかび病害の発病率を調査した。加えて、電気刺激により誘導された植物防御反応の分子メカニズムの解明を試みた。

4-2 材料および方法

4-2-1 植物材料

山梨大学ワイン科学研究センターの圃場で栽培されているメルロー (*Vitis vinifera* cv. Merlot、台木 Kober 5BB) を供試し、農薬散布などの管理作業は山梨大学ワイン科学研究センターの防除歴に従い実施した。樹齢はおよそ 30 年で、垣根栽培で仕立てた。また、同圃場で栽培されているカベルネ・ソーヴィニヨン (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) の剪定枝から作製したポット苗を供試した。ポット苗は約 2 ヶ月間栽培したものを試験に供試した。

野生型シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0) およびサリチル酸非感受性変異体 *npr1-5* (ストック番号 CS3724、Kawagoe et al. 2015) の種子は、The Arabidopsis Information Resource (TAIR) から入手した。ロックウールブロックに種子を播種し、インキュベーター内で 22° C で培養した (11.8 Wm⁻² で 1 日 16 時間照射)。土壤に植え替えた後、同条件のインキュベーター内で栽培した。

4-2-2 圃場栽培のブドウ樹への電気刺激

電気刺激のために 6 本のブドウ樹を準備した。電気刺激は、開花の約 2 週間前に施した (2016 年 5 月 20 日および 2020 年 5 月 12 日)。電気刺激システムは第 2 章 2-2-2 から若干改変した。具体的には、電極 (鋼製ネジ、長さ 40 mm、直径 3.3 mm) 2 本をブドウの樹幹 (地上 20cm および 60cm) にねじ込み、ソーラーパネルに接続した (上部は陰電極、下部は陽電極とした、図 18A)。ソーラーパネルは地上 2.5 m に設置した。最大電圧 11.6 V±5%、最大電流 100 mA±5%、動作温度-35°C~85°C の電気的特性を有するソーラーパネルを使用した。電極のみ (ソーラーパネルなし) を施したブドウ樹、何も処理しないブドウ樹も用意した。電気刺激は収穫期 (2016 年 9 月 9 日および 2020 年 9 月 17 日) まで施した。各ブドウ樹は、2 年とも同じ処理を行なった。

4-2-3 ブドウ苗への電気刺激

4~5 枚の葉を持つポット苗を 3 つ準備し、ソーラーパネルを用いて電気刺激を与えた。ブドウの樹幹に正極 (鋼釘、長さ 4mm、直径 1mm) をねじ込み、負極 (鋼針、長さ 2mm、直径 0.4 mm) をシュートに刺した (図 18A)。電極をソーラーパネルに接続し、電気刺激を施した。ソーラーパネルは、最大電圧 11.6 V±5%、最大電流 100 mA±5%、動作温度-35° C~

85° Cの電気的特性を有するソーラーパネルを使用した。苗は、27°Cのインキュベーター内で栽培した（11.8 Wm⁻²で1日16時間照射）。電気刺激を施術後0、10および20日後に下から3~5番目の葉を採取し、リアルタイム RT-PCRに供試するために液体窒素で凍結した。電極のみ（ソーラーパネルなし）を施したポット苗、何も処理しないポット苗も用意した。

4-2-4 シロイヌナズナへの電気刺激

38日齢のシロイヌナズナ3つ準備し、ソーラーパネルを用いて電気刺激を与えた。花序の基部に正極（鋼針、長さ1mm、直径0.4mm）を刺し、正極から上に15~20cm離れた花序に負極（鋼針、長さ1mm、直径0.4mm）を刺した（図20A）。電極をソーラーパネルに接続し、電気刺激を施した。最大電圧11.6 V±5%、最大電流100 mA±5%、動作温度-35° C~85° Cの電気的特性を有するソーラーパネルを使用した。シロイヌナズナは22° Cのインキュベーター内で栽培した（11.8 Wm⁻²で1日16時間照射）。電気刺激を施術後、12、24および48時間後にロゼット葉を採取し、リアルタイム RT-PCRに供試するために液体窒素で凍結した。電極のみ（ソーラーパネルなし）を施したシロイヌナズナ、何も処理しないポットシロイヌナズナも用意した。

4-2-5 病気の評価

房および葉に現れた病気を評価した。病気の評価は、2016年9月9日および2020年9月17日の収穫期に実施した。房の病気の評価においては、すべての房を採取し、ブドウ灰色かび病およびブドウ晩腐病に感染した房を目視で確認した。葉の病気の評価においては、ブドウべと病に感染した葉を目視で確認した。発病率は、次の式により計算し評価を行った。

$$\text{発病率 (\%)} = \text{病気の房または葉の数} / \text{ブドウ樹の房または葉の総数} \times 100$$

4-2-6 リアルタイム RT-PCR

液体窒素を含む乳鉢にブドウのポット苗から採取した葉およびシロイヌナズナのロゼッタ葉を入れ、乳棒を用いてホモジナイズした。Fruit-mate for RNA Purification（タカラバイオ株式会社）およびNucleoSpin RNA Plant（タカラバイオ株式会社）を用いてプロトコルに従いRNAを抽出した。

cDNA 合成は、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社) のプロトコルに従って行った。リアルタイム RT-PCR は、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社) を使用した。PCR 増幅のタイムスケジュールは、95°C で 30 秒間の初期変性後、95°C で 5 秒間、60°C で 1 分間を 40 サイクルとした。リアルタイム RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列は次の通りである。

V. vinifera クラス IV キチナーゼプライマー

(5' -CAATCGGGTCCTTGTGATTC-3' および 5' -CAAGGCACTGAGAAACGCT-3'、U97522)

V. vinifera β -1,3-グルカナーゼプライマー

(5' -GAATCTGTTCGATGCCATGC-3' および 5' -GCATTATCAACCGTAGTCCC-3'、DQ267748)

V. vinifera β -アクチンプライマー

(5' -CAAGAGCTGGAAACTGCAAAGA-3' および 5' -AATGAGAGATGGCTGGAAGAGG-3'、AF369524)

A. thaliana PR1 プライマー

(5' -CCTGGGGTAGCGGTGACTT-3' および 5' -CGTGTTCGCAGCGTAGTTGT-3'、NM_127025)

A. thaliana PDF1.2 プライマー

(5' -TCACCCTTATCTTCGCTGCTC-3' および 5' -ACCATGTCCCCTTGCTTC-3'、AY063779)

A. thaliana アクチンプライマー

(5' -GCCGACAGAATGAGCAAAGAG-3' および 5' -AGGTACTGAGGGAGGCCAAGA-3'、NM_179953)

データの正規化は、解離曲線を評価して増幅反応の特異性を検証した。各遺伝子の発現量は、標準曲線法と Thermal Cycler Dice Real Time System Single ソフトウェア ver. 3.00 (タカラバイオ株式会社) を用いて一定の閾値に到達するために必要な増幅サイクルの数として決定した。データは β -アクチン (ブドウ) あるいはアクチン (シロイヌナズナ) に対する相対値として示した。

4-2-7 統計分析

データは平均±標準偏差として表した。統計分析は、Excel 統計ソフトウェア 2012 を使用して実行した。房の発病率はカイ二乗検定にて、葉の発病率および各種遺伝子発現解析では Tukey の多重比較検定にて評価した。

4-3 結果

4-3-1 電気刺激によるかび病害の発病率減少

2016 年は試験圃場でかび病害が大発生した。房には多くのブドウ灰色かび病またはブドウ晩腐病が認められ、無処理のブドウでは 69.7%の房がいずれかの病気に罹病していた(表 4)。対して、電気刺激を施したブドウ樹では発病率が 44.9%と有意に減少した。無処理のブドウ樹の葉におけるブドウべと病の発病率は 89.8%であったが、電気刺激を施したブドウ樹の葉では 65.7%まで発病率が低下した(図 18B)。2020 年も試験圃場では房に多くの病気が発生した。無処理のブドウ樹では 90.4%の房がブドウ灰色かび病あるいはブドウ晩腐病に罹病していた(表 4)。対して、電気刺激を施したブドウ樹では 67.3%まで発病率が低下した。葉におけるブドウべと病の発病率も電気刺激により低下した(図 18B、無処理のブドウ樹 23.4% ; 電気刺激を施したブドウ樹 17.8%)。

以上の結果から、電気刺激は、かび病害の発病程度に関係なく、房および葉に生じるかび病害の発生を抑制する効果があることが示された。

4-3-2 電気刺激による植物防御反応の誘導

圃場栽培のブドウ樹の房および葉から RNA を安定して精製することができなかつたため、植物防御関連遺伝子の発現解析はポットで栽培したブドウ苗を使用した(図 19A)。ブドウの植物防御反応のひとつである PR タンパク質のうち、クラス IV キチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼをコードする遺伝子の発現レベルを調査した結果(図 19B)。クラス IV キチナーゼ遺伝子の発現は電気刺激による変化は確認されなかつた。対照的に、電気刺激を受けたブドウ苗では β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の発現が、電極のみを施したブドウ苗および無処理のブドウ苗と比較して、電気処理後 20 日で著しく上昇した。本解析結果から、電気刺激は植物防御関連遺伝子を相乗的に発現誘導させるのではなく、 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の発現に関わる特異的な植物防御反応経路を活性化する可能性が示唆された。

4-3-3 電気刺激によるサリチル酸を介したシロイヌナズナの植物防御反応の誘導

ブドウはエリシターに応答してジャスモン酸依存性防御経路およびサリチル酸依存性防御経路を介してそれぞれクラス IV キチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼを誘導する(Zipfel et al. 2004; Lorenzo et al. 2004)。電気刺激がいずれの経路を介してブドウ

樹に植物防御反応を誘導するかを判断するため、植物防御反応の誘導を分子レベルで解明可能なシロイヌナズナを本研究に供試した (図 20A)。電気刺激を施したシロイヌナズナでは、電極のみを施したシロイヌナズナおよび無処理のシロイヌナズナと比較して、処理後 12 および 48 時間後にサリチル酸依存性防御経路のマーカージン遺伝子である *PR1* (Kawagoe et al. 2015) の発現上昇が認められた (図 20B)。一方、ジャスモン酸依存性防御経路のマーカージン遺伝子である *PDF1.2* の発現は電気刺激により変化しなかった (図 20B)。サリチル酸非感受性変異体 *npr1-5* 変異体に電気刺激を施したところ *PR1* ジン遺伝子の発現誘導は起きなかったことから (図 20C)、電気刺激はサリチル酸を介した植物防御反応を誘導することにより、かび病害の発生を抑制すると推察された。

4-4 考察

農業において農作物を病原菌から守ることは極めて重要であるが、化学農薬には化学農薬耐性病原菌の出現および環境汚染などの懸念があり、病原菌対策には慎重な選択が必要となる。例えば、過剰な化学農薬散布は、土壌や水中の残留農薬を介して空気中へ蒸発し、また水産物に蓄積し我々ヒトおよび環境に多大な悪影響を与えるとされる(立川, 1970)。加えて、一般消費者は化学農薬に良いイメージを持っていないという課題もある。このため、ブドウ栽培でも化学農薬散布に代わるヒトおよび環境に優しい代替技術が求められている。本研究では、第一に、2年にわたる圃場試験にて電気刺激はブドウ病害を抑制するかを検討した。結果として、電気刺激はブドウ樹においてかび病害の発生を抑制した。興味深いことに、電極のみを施したブドウ樹ではかび病害の抑制は認められなかった。加えて、ブドウ苗およびシロイヌナズナを用いた植物防御関連遺伝子の発現解析でも、電極のみを施した植物では植物防御関連遺伝子の発現が誘導されないことが確認された。これらの結果は、電極として鋼製のネジや針を植物に挿入することによって生じる「傷」は植物防御反応を誘導する要因ではないことを示唆した。したがって、ソーラーパネルによる電気刺激が植物防御反応の誘導に不可欠であると言える。

次に、電気刺激が植物防御反応を誘導する非生物学的エリシターとして機能するかを評価した。本研究から予測された、電気刺激によって引き起こされる植物防御反応に関連するシグナル伝達経路を図 21 に示した。本研究により、電気刺激により誘導される植物防御反応は、サリチル酸依存性防御経路を介して誘導されると推察された。しかし、植物が如何に電気刺激を認識するのか、サリチル酸がどのように生成されるのか、その分子メカニズムまでは解明できなかった。サリチル酸は師部を通り他の組織へ長距離移動するため (Klessig et al. 1994; Uknes et al. 1992)、長距離移動したサリチル酸が植物に全身獲得抵抗性を誘発したと考えるのが妥当である。サリチル酸依存性防御経路では、Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1 がサリチル酸に応答して核に輸送され、PR1 や β -1,3-グルカナーゼなどの植物防御関連遺伝子の発現を上昇する (Fujimori et al. 2016)。 β -1,3-グルカナーゼはブドウ灰色かび病菌 (Bautista-Rosales et al. 2013)、ブドウ晩腐病菌 (Mestre et al. 2017) およびブドウべと病菌 (Herde et al. 1995) に対して直接的な抗菌活性を示すため、電気刺激によって誘導された β -1,3-グルカナーゼが房や葉におけるかび病害を抑制したことは合理的であると考えられる。しかし、先に述べたように、電気刺激がどのようにサリチル酸生合成を活性化するかは未だ明らかになっていない。機械的損傷

や傷によって植物で生成される電気シグナルは植物防御反応を全身的に誘発する (Duan et al. 1996)。ただし、この研究では電気シグナルがサリチル酸やジャスモン酸などのセカンドメッセンジャーを誘発する可能性については調査していない。本研究は、植物における電気シグナルとセカンドメッセンジャー間のクロストークが存在することを初めて実証した研究でもある。

圃場試験において、電気刺激はかび病害の発生をある程度抑制したが、化学農薬のような即効性は持っていないと考えられた。ブドウ苗を用いた試験では、電気刺激による β -1,3-グルカナーゼをコードする遺伝子の発現上昇には 20 日間の時間を要した。電気刺激の遅効性は、圃場で電気刺激を適用する際の課題のひとつになるであろう。すなわち、電気刺激は病気予防ツールとしては適しているが、発生した病気を治療するための即効的ツールとしては適していないことを意味する。今後、殺菌剤散布を含む一般的な植物病害防除技術と電気刺激システムの組み合わせをさらに調査することにより、ブドウ栽培において減化学農薬栽培に向けた実用的な病害虫管理戦略を考案できる可能性がある。

4-5 要旨

化学農薬による環境汚染への懸念および化学農薬耐性植物病原菌の出現は、新たな病害虫管理戦略を導入する必要性を示唆している。それら戦略のひとつに、非生物的小および生物的小エリシターによる植物防御反応の誘導が含まれている。先行研究においてブドウ樹への電気刺激はブドウのファイトアレキシンであるレスベラトールの合成を促進したことから、電気刺激は植物防御反応を誘導することができると考えられた。本研究では、電気刺激がブドウ樹のかび病害発生を抑えることができるか、どのような植物防御反応が電気刺激で誘導されるか、の解明を試みた。2016年および2020年に実施した圃場試験において、電気刺激は房ではブドウ灰色かび病およびブドウ晩腐病を、葉ではブドウベと病の発病率を減少させた。ブドウ苗を用いた遺伝子発現解析では、電気刺激により β -1,3-グルカナーゼをコードする遺伝子の発現が誘導されることが確認された。この結果は、電気刺激が植物防御反応の非生物的小エリシターとして機能することを示唆した。シロイヌナズナを用いた遺伝子発現解析により、電気刺激はサリチル酸依存性防御経路を介して植物防御反応を誘導することが明らかとなった。これらの研究結果は、ブドウ栽培における新たな病害虫管理戦略のひとつとして、本研究で構築した電気刺激システムが有効であることを示唆した。

表 4 ブドウ樹の房に発生するかび病害に及ぼす電気刺激の影響

Year	Treatment	Number of infected bunch	Number of healthy bunch	Incidence (%)
2016	control	23	10	69.7
	electrode	18	9	80.9
	Electrical stimulation	22	27	44.9*
2020	control	47	5	90.4
	electrode	38	12	76.0
	Electrical stimulation	33	16	67.3*

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation, 電気刺激を施したブドウ樹

カイ 2 乗検定によって control および electrode との統計的有意差がある場合にアスタリスクを付して示した。

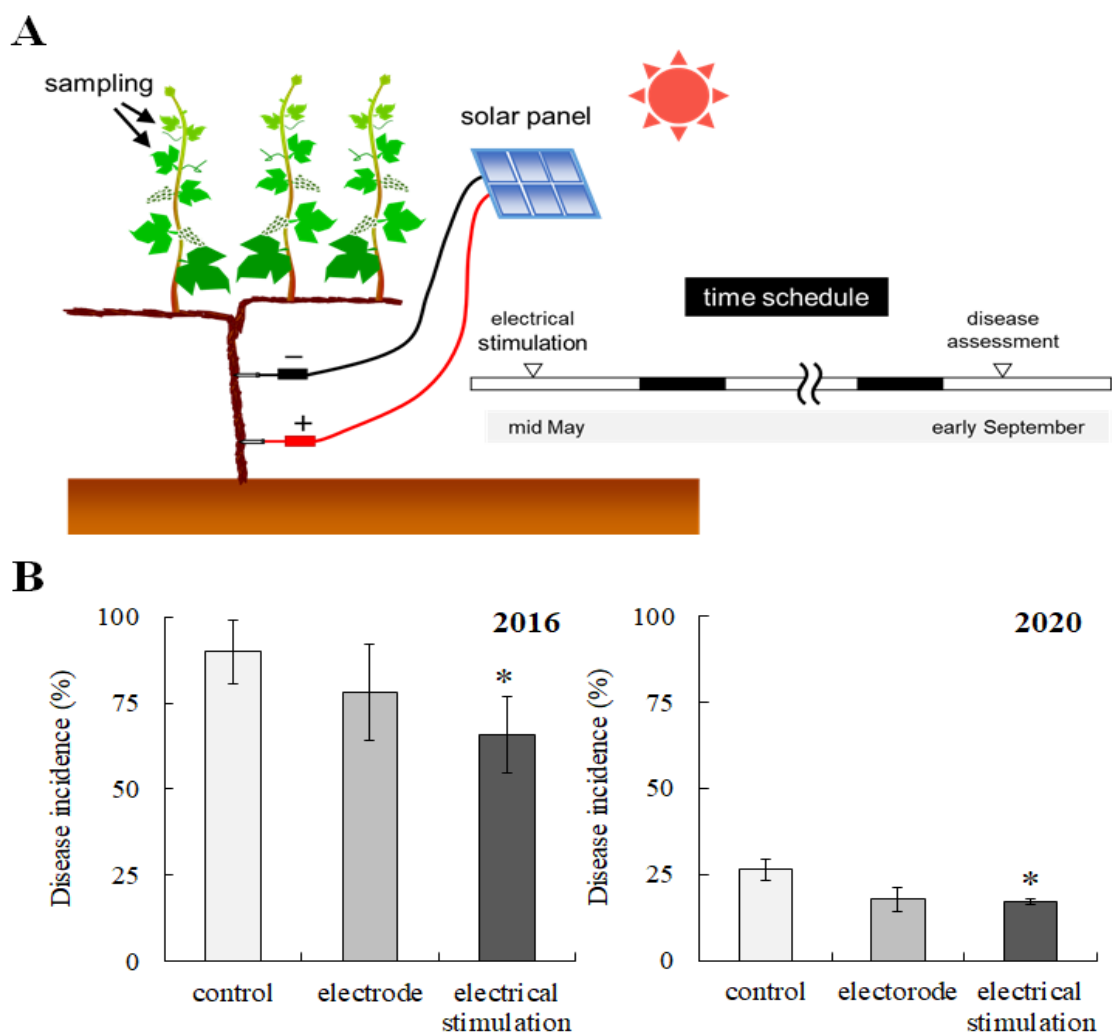


図 18. 電気刺激を施したブドウ樹のブドウべと病発病率

(A) 圃場栽培されたブドウ樹への電気刺激の実験デザイン

実験のタイムスケジュールも示した。

(B) 2016 年および 2020 年のブドウべと病発病率

control, 無処理のブドウ樹; electrode, 電極のみを施したブドウ樹;

electrical stimulation; 電気刺激を施したブドウ樹

バーは平均±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)

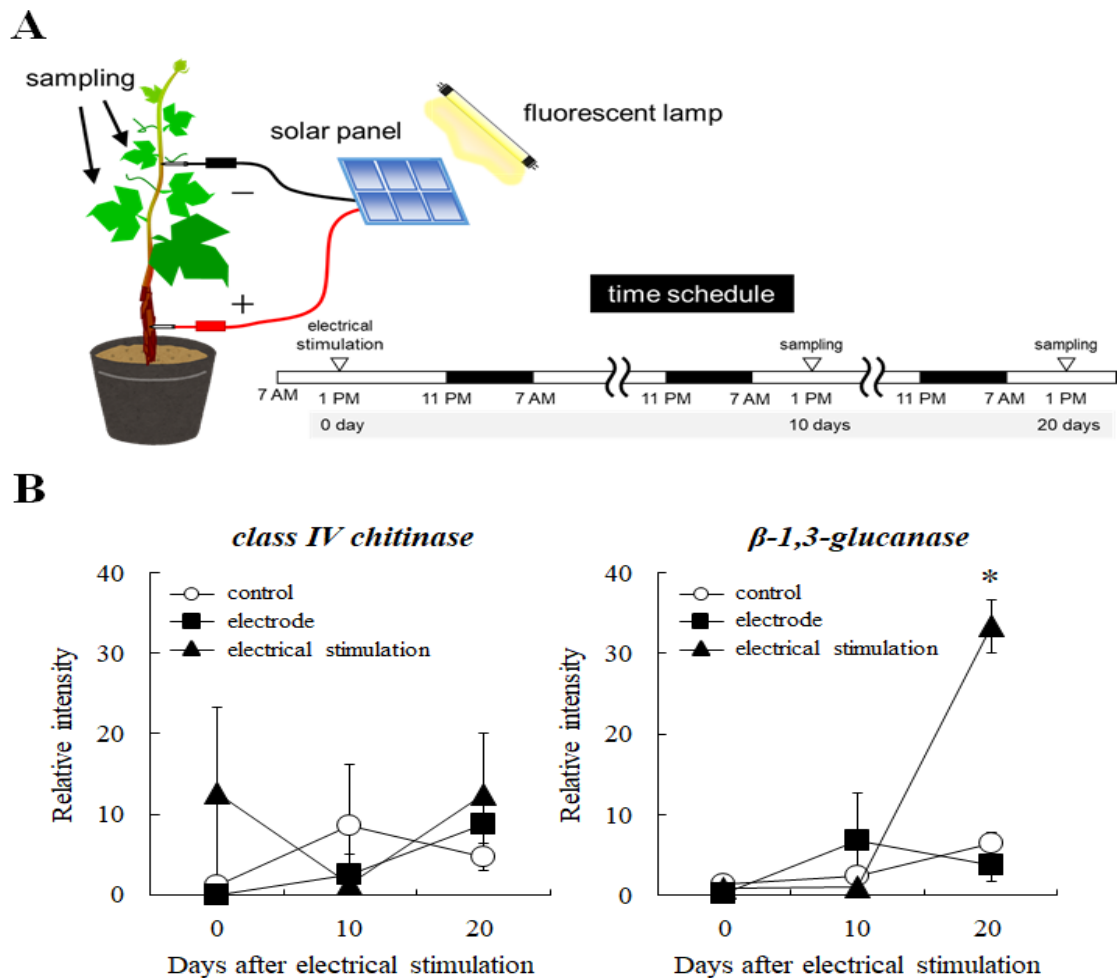


図 19. 電気刺激を施したブドウ苗における植物防御関連遺伝子の発現

(A) ポット栽培のブドウ苗への電気刺激の実験デザイン
実験のタイムスケジュールも示した。

(B) クラス IV キチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼをコードする遺伝子の発現

control, 無処理のブドウ苗; electrode, 電極のみを施したブドウ苗;
electrical stimulation; 電気刺激を施したブドウ苗
バーは平均±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した
($p < 0.05$)

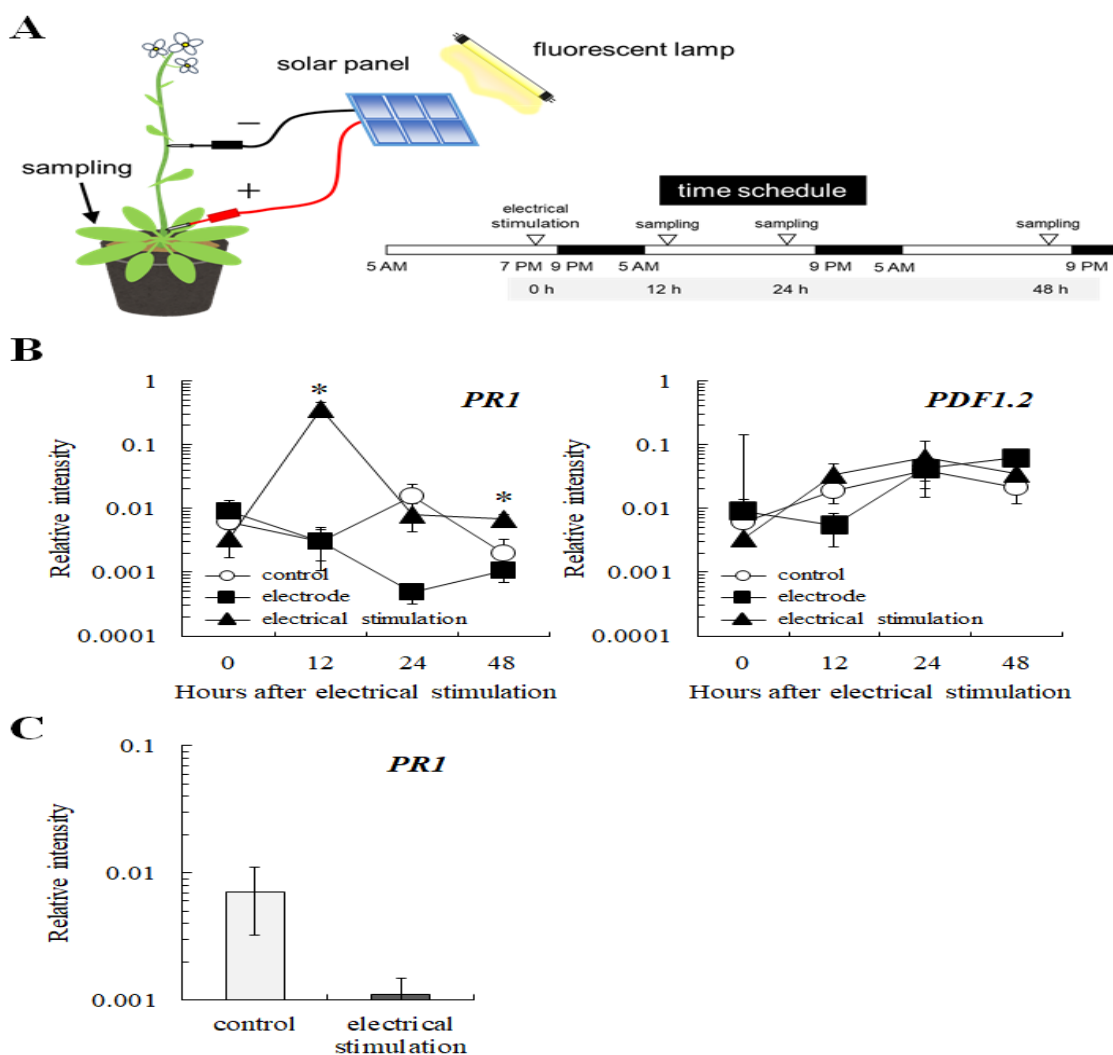


図 20. 電気刺激によるサリチル酸を介した植物防御反応の誘導

(A) シロイヌナズナへの電気刺激の実験デザイン

右下に実験のタイムスケジュールも示した。

(B) シロイヌナズナ (野生型) における *PR1* および *PDF1.2* 遺伝子の発現

(C) *npr1-5* 変異体における *PR1* 遺伝子の発現

control, 無処理のシロイヌナズナ; electrode, 電極のみを施したシロイヌナズナ; electrical stimulation; 電気刺激を施したシロイヌナズナ

バーは平均±標準偏差を示す。

control との統計的有意差がある処理区にアスタリスクを付した

($p < 0.05$)

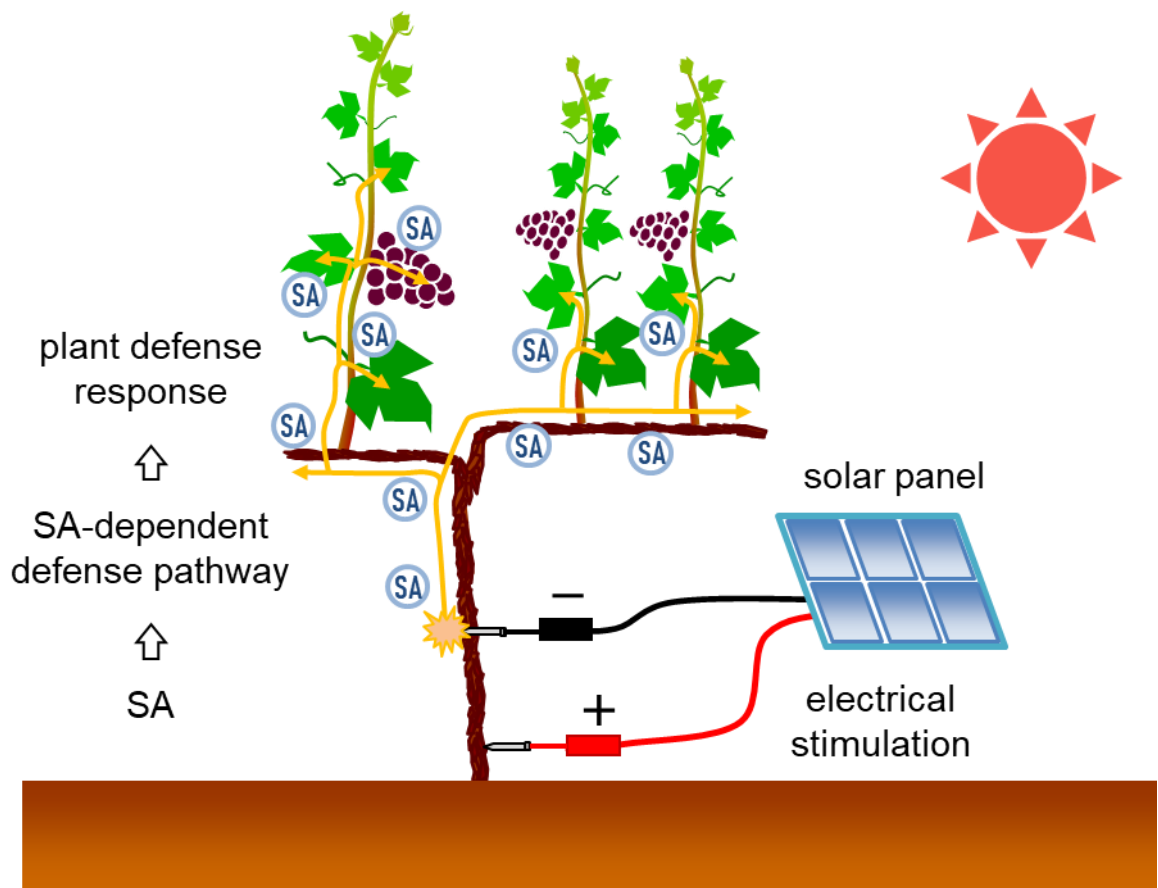


図 21. 電気刺激による植物防御反応誘導の予測モデル

第5章 総合考察

ブドウを含めた果樹の果実品質は、形、色、味などによって総合的に決定される。これらの因子は生産性を高めるため極めて重要な要素であるが、気候条件によって大きく影響を受ける。ブドウ果実では、ベレゾーン後に高温にさらされることによってアントシアニン分解メカニズムが活性化され、果皮内のアントシアニン蓄積が阻害され果皮アントシアニン蓄積量の損失が起こる (Mori et al. 2007)。この先行研究は、ブドウ果実の着色が温暖化の影響を受け易く、世界的に着色不良が深刻化することを予想している。また、温暖化によってこれまでかび病害の発生が少なかった地域でもかび病害の発生が増え、化学農薬の散布回数が増えてきている (青木ら, 2018)。本研究により、電気刺激は、1) 醸造用ブドウの着色を促進すること、2) 生食用ブドウの果粒サイズを肥大すること、3) 植物防御反応を誘導することによりかび病害を抑制すること、が明らかとなった。これらの研究成果は、本研究で検討した電気刺激システムが果実品質を改善・維持するブドウ栽培技術のひとつとして有用であることを示している。一方、本研究では、1) 圃場試験レベルが小さいこと、2) 電圧強度の検討および印加期間の検討を行っていない、という課題も残っている。ブドウ栽培への電気刺激システムの適用可能性をさらに探求するためには、広大なブドウ圃場でも1本1本のブドウ樹に設置できる電気刺激システムの開発が必要である。また電圧強度を容易に変更できるシステムの導入や露地栽培でも使用されるため、日射による劣化や化学農薬の飛散による性能低下を防ぐため、耐久性評価および性能評価を実施し、電気刺激システムの耐久性を高めるなどのハード面の整備も必要である。本研究では試験年ごとに電気刺激システムを交換した。加えて、利用者にニードル農法施術マニュアルを配布し、技術スキルがなくとも誰もがこの技術を利用できるよう実用化に向けたソフト面の整備も進めることが本技術の普及に繋がると思われる。これらの課題が解決された暁には、他の農作物への流用、特に病害防除技術としての適用も視野に入る。電気刺激の病害防除への適用性をさらに探求するには、様々な農作物を用いた圃場試験や農作物ごとに最適化された電圧条件および印加期間の調整を可能とする汎用的な電気刺激システムの開発が必須である。今後のシステム開発に期待したい。

今日の日本農業では、農業従事者の減少および高齢化が特に深刻な問題である。対策として、日本政府はロボット技術やICTを活用した超省力・高品質生産を可能とするスマート農業を推進している。電気刺激を利用する「ニードル農法」は、先に挙げたいくつかの課題を解決することにより将来的にスマート農業への活用が可能であり、生産労力の省力化および収益力の向上に貢献できる技術であると考えられる。ニードル農法を展開していく上で

の課題は、圃場条件などにより効果のバラツキが見込まれる点、間接的作用が故、即効性が見込めず利用者がニードル農法による効果を実感できるまでに期間を要する点が挙げられる。このように、多くの課題解決や既存技術×電気刺激システムによるシナジー効果の検証など、ニードル農法には多くの実証・検討・改良事項が残されている。しかし、本研究によりニードル農法は農作物の品質および生産性向上に大きく寄与できる革新的技術となり得ることを確信した。

参考文献

- Aoki, T., Aoki, Y., Ishiai, S., Otoguro, M., Suzuki, S. (2017) Impact of *Bacillus cereus* NRKT on grape ripe rot disease through resveratrol synthesis in berry skin. *Pest Manag. Sci.* 73, 174-180.
- 青木是直, 河西由喜, 池原作務, 笹田武志, 鈴木俊二. (2018) 北海道における QoI 剤耐性ブドウべと病菌の発生調査. *日本ブドウ・ワイン学会* 29, 113-118.
- Aoki, Y., Kawagoe, Y., Fujimori, N., Tanaka, S., Suzuki, S. (2015) Monitoring of a single point mutation in the *PvCesA3* allele conferring resistance to carboxylic acid amide fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Yamanashi prefecture, Japan. *Plant Health Prog.* 16, 84-87.
- Atkinson, N. J., Urwin, P. E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523-3543.
- Bakker, J., Preston, N. W., and Timberlake, C. F. (1986) The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 121-126.
- Bautista - Rosales, P. U., Calderon - Santoyo, M., Servín - Villegas, R., Ochoa - Álvarez, N. A., Ragazzo - Sanchez, J. A. (2013) Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol. Control* 65, 293-301.
- Blum, M., Waldner, M., Gisi, U. (2010) A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 499-510.
- Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* 32, 565-569.
- Brara, H. S., Singha, Z., Swinnya, E., Cameron, I. (2008) Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight: colour development and accumulation of anthocyanins in 'Crimson Seedless' grapes during maturation and ripening. *Plant Sci.* 175, 885-897.
- Bray, E. (2002) Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ.* 25, 153-161.
- Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M., Thomas, M. R. (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.* 59, 2579-2596.

- Chalmers, D.J., Faragher, J.D. (1977) Regulation of anthocyanin synthesis in apple skin. I. Comparison of the effects of cycloheximide, ultraviolet light, wounding and maturity. *Funct. Plant Biol.* 4, 111-121.
- Chapman, D.W., Roby, G., Ebeler, S.E., Guinard, J.X., Matthews, M.A. (2005) Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 339-347.
- Cheng, Y.T., Germain, H., Wiermer, M., Bi, D., Xu, F., García, A.V., Wirthmueller, L., Després, C., Parker, J.E., Zhang, Y., Li, X. (2009) Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 2503-2516.
- Chervin, C., Tira-umphon, A., Terrier, N., Zouine, M., Severac, D., Roustan, J.P. (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol. Plant.* 134, 534-546.
- Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A., Novello, V. (2010) Effect of different cluster sun- light exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 23-30.
- Coombe, B.G., Dundon, R.J., Short, A.W.S. (1980) Indices of sugar-acidity as ripeness criteria for winegrapes. *J. Sci. Food Agric.* 31, 495-505.
- Crupi, P., Antonacci, D., Savino, M., Genghi, R., Perniola, R., Coletta, A. (2016) Girdling and gibberellic acid effects on yield and quality of a seedless red table grape for saving irrigation water supply. *Eur. J. Agron.* 80, 21-31.
- Dal Santo, S., Vannozzi, A., Tornielli, G.B., Fasoli, M., Venturini, L., Pezzotti, M., Zenoni, S. (2013) Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals grapevine-specific structural and functional characteristics. *PLoS ONE* 8, e62206.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo - Ei - Saad, M., Xu, D., Wu, R. (1996) Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nat. Biotechnol.* 14, 494-498.
- Dziubinska, H., Trebacz, K., Zawadzki, T. (1989) The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol. Plant.* 75, 417-423.
- Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., Pena-Cortes, H. (2004) Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiol.* 45, 456-459.

- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee.** Available online: <https://www.frac.info/> (accessed on 29 October 2020).
- Fromm, J., Fei, H.** (1998) Electrical signaling and gas exchange in maize plant in drying soil. *Plant Sci.* *132*, 203-213.
- Fromm, J., Lautner, S.** (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ.* *30*, 249-257.
- Fromm, J., Hajirezaei, M., Wilke, I.** (1995) The biochemical response of electrical signaling in the reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiol.* *109*, 375-384.
- Fujimori, N., Enoki, S., Suzuki, A., Naznin, H.A., Shimizu, M., Suzuki, S.** (2016) Grape apoplasmic β - 1,3 - glucanase confers fungal disease resistance in *Arabidopsis*. *Sci. Hortic.* *200*, 105-110.
- Furuya, S., Suzuki, S., Kobayashi, H., Saito, S., Takayanagi, T.** (2009) Rapid method for detecting resistance to a QoI fungicide in *Plasmopara viticola* populations. *Pest Manag. Sci.* *65*, 840-843.
- Gisi, U., Waldner, M., Kraus, N., Dubuis, P.H., Sierotzki, H.** (2007) Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol.* *56*, 199-208.
- Glories, Y.** (1978) Evolution of phenolic compounds during wine aging. *Ann. Nutr. Aliment.* *32*, 1163-1169.
- Guidoni, S., Allara, P., Schubert, A.** (2002) Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.* *53*, 224-226.
- Hayes, M.A., Feechan, A., Dry, I.B.** (2010) Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol.* *153*, 211-221.
- Heaney, S.P., Hall, A.A., Davies, S.A., Olaya, G.** (2010) Resistance to fungicides in the QoI - STAR cross - resistance group: Current perspectives. In *The BCPC Conference: Pests and Diseases, Volume 2, Proceedings of an International Conference Held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 13-16 November 2000*; British Crop Protection Council: Farnham, UK; pp. 755-762.
- Herde, O., Fuss, H., Peña-Cortés, H., Fisahn, J.** (1995) Proteinase inhibitor II gene expression induced by electrical stimulation and control of photosynthetic activity in tomato plants. *Plant Cell Physiol.* *36*, 737-742.

- Hirase, S., Koike, A., Akai, T., Bandhou, S., Tamura, O. (1999) Effects of cluster and root cooling on grape cluster coloration. *Bull. Tokushima Hort. Exp. Sta.* 27, 31-39
- Houel, C., Martin-Magniette, M.-L., Nicolas, S., Lacombe, T., Le Cunff, L., Franck, D., Torregrosa, L., Conéjéro, G., Lalet, S., This, P., Adam-Blondon, A.-F. (2013) Genetic variability of berry size in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 208-220.
- Ishiai, S., Kondo, H., Hattori, T., Mikami, M., Aoki, Y., Enoki, S., Suzuki, S. (2016) Hordenine is responsible for plant defense response through jasmonate-dependent defense pathway. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 96, 94-100.
- Ishimaru, M., Smith, D.L., Gross, K.C., Kobayashi, S. (2007) Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. *J. Plant Physiol.* 164, 1675-1682.
- Iwatani, S., Yakushiji, H., Mitani, N., Sakurai, N. (2011) Evaluation of grape flesh texture by an acoustic vibration method. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 305-309.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P. (1995) Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *J. Phytopathol.* 143, 135-139.
- Katoh, H., Suzuki, S., Saitoh, T., Takayanagi, T. (2009) Cloning and characterization of VIGG a novel virus-induced grapevine protein, correlated with fruit quality. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 291-299.
- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., Suzuki, S. (2015) Cyclic peptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 1015-1020.
- Klessig, D.F., Malamy, J. (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458.
- 幸田 泰則., 桃木 芳枝. (2003) *植物生理学—分子から個体へ* 三共出版
- Koziolek, C., Grams, T.E.E., Schreiber, U., Matyssek, R., Fromm, J. (2004) Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytol.* 161, 715-722.
- Kugimiya, N., Imai, Y., Kawada, S., Kiohara, S., Ueyama, M. (2011) Methods for improving the coloration of the grape variety 'Pione'. *Bulletin of Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center 1*, 89-101.

- Lai, C.C., Pan, H., Zhang J., Wang, Q., Que, Q.X., Pan, R., Lai, Z.X., Lai G.T. (2022) Light quality modulates growth, triggers differential accumulation of phenolic compounds, and changes the total antioxidant capacity in the red callus of *Vitis davidii*. *J. Agric. Food Chem.* 70, 13264-13278.
- Langcake, P., Pryce, R.J. (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77-86.
- Lautner, S., Grams, T.E.E., Matyssek, R., Fromm, J. (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol.* 138, 2200-2209.
- Li, J., Jiang, J., Qian, Q., Xu, Y., Zhang, C., Xiao, J., Du, C., Luo, W., Zou, G., Chen, M., Huang, Y., Feng, Y., Cheng, Z., Yuan, M., Chong, K. (2011) Mutation of rice BC12/GDD1, which encodes a kinesin-like protein that binds to a GA biosynthesis gene promoter, leads to dwarfism with impaired cell elongation. *Plant Cell* 23, 628-640.
- Liu, B., Cyr, R.J., Palevitz, B.A. (1996) A kinesin-like protein, KatAp, in the cells of *Arabidopsis* and other plants. *Plant Cell.* 8, 119-132.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Saénchez - Serrano, J.J., Solano, R. (2004) Jasmonate - insensitive 1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate - regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1938-1950.
- Lund, S.T., Bohlmann, J. (2006) The molecular basis for wine grape quality—a volatile subject. *Science* 311, 504-805.
- Martínez-Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I., Gomès, E. (2014) Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry* 102, 106-114.
- 村本裕二. (2010) 電界による植物成長の促進 財団法人日比科学技術振興財団, 平成 21 年度研究助成研究報告書 2010, 69-76.
- Matus, J.T., Loyola, R., Vega, A., Neira, A.P., Bordeu, E., Johnson, P.A., Alcalde, J.A. (2009) Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* 60, 853-867.
- Mestre, P., Arista, G., Piron, M.C., Rustenholz, C., Ritzenthaler, C., Merdinoglu, D., Chich, J.F. (2017) Identification of a *Vitis vinifera* endo - β - 1,3 -

- glucanase with antimicrobial activity against *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Pathol.* 18, 708-719.
- Mikami, M., Mori, D., Masumura, Y., Aoki, Y., Suzuki, S. (2017) Electrical stimulation: an abiotic stress generator for enhancing anthocyanin and resveratrol accumulation in grape berry. *Sci. Hortic.* 226, 285-292.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K. (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under temperature. *J. Exp. Bot.* 58, 1935-1945.
- Moriyama, A., Yamaguchi, C., Enoki, S., Aoki, Y., 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.
- Mousavi, S.A.R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger S., Farmer, E.E. (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422-426.
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y., Machida, Y. (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109, 87-99.
- 大塚 具明. (2012) 特許情報プラットフォーム ニードル農法 (特願 2011-538253).
- Park, G.T., Frost, J.M., Park, J.S., Kim, T.H., Lee, J.S., Oh, S.A., Twell, D., Brooks, J.S., Fischer, R.L., Choi, Y. (2014) Nucleoporin MOS7/Nup88 is required for mitosis in gametogenesis and seed development in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 18393-18398.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y., Pertot, I. (2008) Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biol. Control* 47, 228-234.
- Pickard, B. (1973) Action potentials in higher plants. *Bot. Rev.* 39, 172-201.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308-316.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384-394.

- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2016) Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chem.* 201, 213-221.
- Raices, M., D'Angelo, M. (2012) Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 687-699.
- Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.A., Matthews, M.A. (2004) Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 100-107.
- Sasabe, M., Boudolf, V., De Veylder, L., Inzé, D., Genschik, P., Machida, Y. (2011) Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 17844-17849.
- Schlosser, J., Olsson, N., Weis, M., Reid, K., Peng, F., Lund, S., Bowen, P. (2008) Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma* 232, 255-265.
- Shcherban, T.Y., Shi, J., Durachko, D.M., Gultinan, M.J., McQueen-Mason, S.J., Shieh, M., Cosgrove, D.J. (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansins, a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9245-9249.
- Shiina, T., Tazawa, M. (1986) Action potential in *Luffa cylindrical* and its effects on elongation growth. *Plant Cell Physiol.* 27, 1081-1089.
- Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Skriver, K., Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2, 503.
- Stankovic, B., Davies, E. (1996) Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Lett.* 390, 275-279.
- Suzuki, H., Oshita, E., Fujimori, N., Nakajima, Y., Kawagoe, Y., Suzuki, S. (2015) Grape expansins, VvEXPA14 and VvEXPA18 promote cell expansion in transgenic *Arabidopsis* plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 120, 1077-1085.
- 立川 涼, (1970) 農薬による環境の汚染 化学と生物 8, 539-547.

- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. (1998) A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: *s*-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215-5219.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Wiermer, M., Germain, H., Cheng, Y.T., García, A.V., Parker, J.E., Li, X. (2010) Nucleoporin MOS7/Nup88 contributes to plant immunity and nuclear accumulation of defense regulators. *Nucleus* 1, 332-336.
- Wirth, J., Guo, W., Baumes, R., Günata, Z. (2001) Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2917-2923.
- Wu, T., Shen, Y., Zheng, M., Yang, C., Chen, Y., Feng, Z., Liu, X., Liu, S., Chen, Z., Lei, C., Wang, J., Jiang, L., Wan, J. (2013) Gene *SGL*, encoding a kinesin-like protein with transactivation activity, is involved in grain length and plant height in rice. *Plant Cell Rep.* 33, 235-244.
- Xu, X.Q., Cheng, G., Duan, L.L., Jiang, R., Pan, Q.H., Duan, C.Q., Wang, J. (2015) Effect of training systems on fatty acids and their derived volatiles in Cabernet Sauvignon grapes and wines of the north foot of Mt. Tianshan. *Food Chem.* 181, 198-206.
- Yokotsuka, K., Nagao, A., Nakazawa, K., Sato, M. (1999) Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 1-12.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J., Felix, G., Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nat. Cell Biol.* 428, 764-767.
- Zúñiga-Espinoza, C., Aspillaga, C., Ferreyra, R., and Selles, G. (2015) Response of table grape to irrigation water in the Aconcagua Valley, Chile. *Agronomy* 5, 405-417.

Web サイト

環境省. (2018) 気候変動の観測・予測及び影響評価統合レポート 2018

甲府地方気象台. (2018) 山梨県気象年報 (気象関連資料)

甲府地方気象台. (2019) 山梨県気象年報 (気象関連資料)

農林水産省. (2019) 奥深いブドウの世界

農林水産省. (2020) 農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略 ～マーケットイン輸出への転換のために～

農林水産省. (2022) 農林水産統計 作物統計調査 令和3年産日本なし、ぶどうの結果樹面積、収穫量及び出荷量

公表論文

第 2 章

Masachika Mikami, **Daisuke Mori**, Yoshiyuki Masumura, Yoshinao Aoki, and Shunji Suzuki.

Electrical stimulation: An abiotic stress generator for enhancing anthocyanin and resveratrol accumulation in grape berry. *Scientia Horticulturae* 226 (2017) 285-292.

第 3 章

Daisuke Mori, Norimichi Hanya, Hiroshi Kanamaru, Yoshiyuki Masumura, Yoshinao Aoki, and

Shunji Suzuki. Electrical stimulation as a potential technique for enlarging table grape berry size by enhancing cell division. *American Journal of Enology and Viticulture* 73 (2022) 106-115.

第 4 章

Daisuke Mori, Ayane Moriyama, Hiroshi Kanamaru, Yoshinao Aoki, Yoshiyuki Masumura and

Shunji Suzuki. Electrical stimulation enhances plant defense response in grapevine through salicylic acid-dependent defense pathway. *Plants (Basel)* 10 (2021) 1316.

謝辞

本論文は筆者が山梨大学大学院医工農学総合教育部統合応用生命科学専攻博士課程在学中の研究成果をまとめたものである。

本論文をまとめるにあたり、終始懇意ご指導、ご鞭撻を賜りました国立大学法人山梨大学大学院総合研究部の鈴木俊二教授に心より深謝致します。また、本研究の第3章の試験圃場をご提供いただいた山梨県笛吹市のブドウ園園主の松田勇雄氏、本田剛氏に深謝の意を表す。また、日本振興株式会社の伊達多聞社長には研究遂行にあたり日頃から多大なるご支援を賜り、ここに深謝の意を表す。

2023年3月 森 大輔