

氏名	服部 智輝
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	医工博甲第460号
学位授与年月日	令和元年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	環境社会創生工学専攻
学位論文題目	天然物がブドウ果皮のアントシアニン蓄積に及ぼす影響とその分子機構の解明
論文審査委員	主査 教授 鈴木 俊二 教授 柳田 藤寿 教授 奥田 徹 教授 望月 和樹 准教授 岸本 宗和 准教授 久本 雅嗣

## 学位論文内容の要旨

赤ワインの品質を決定づけるブドウ果実品質の中でも果皮色は最も重要な要素と言える。一方、地球温暖化およびそれに伴う豪雨などの異常気象は我が国のブドウ栽培において深刻な問題となっており、特に昨今の気温上昇によるブドウ果実の着色不良は喫緊の課題となっている。全世界を対象とした気候変動シミュレーションによると、今後50年で平均気温が2℃上昇すると推測されている。甲府気象台の報告では、1961年から現在まで、山梨県では年0.042℃ずつ平均気温が上昇し続けており、我が国では醸造用ブドウの生産地が北上し始めている。ブドウの着色を改善するためにブドウ栽培家によっていくつかの耕種的栽培技術が開発されている。たとえば、除葉、摘房および環状剥皮は果皮に蓄積するアントシアニン量を向上することが知られている。しかし、これらは高い技術を必要とし、また作業時間が極めて長いという欠点もあり、導入が進んでいるとは言えない現状である。このような状況からブドウ栽培家は誰もが簡易に行えるブドウ果皮色促進技術を待ち望んでいる。

本論文では上記の背景を鑑み、天然物をブドウに散布することによりブドウの着色を改善する技術の基盤形成を試みることにした。天然物は自然界に存在する、生物が産生する物質

であり、環境に負荷を与えにくいと考えられるため、天然物の圃場散布は環境保全型農業に寄与するものである。本研究では、先行研究によってブドウの着色を向上すると示唆された天然物、バニルアセトンとイソロイシン、フェニルアラニンに着目し、ブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼすそれらの効果およびその分子機構を調査した。

バニルアセトン [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) butan-2-one] はショウガの辛味成分として知られる、植物由来の天然生理活性物質である。天然生理活性物質とは自然界に存在し様々な生理的作用を及ぼす物質の総称である。バニルアセトンの生理活性効果は動物においては認められているが、植物における報告は数少ない。我が国で育種された赤ワイン用ブドウ品種マスカット・ベリーA (*Vitis labrusca* × *V. linsecumii* × *V. vinifera* cv. Muscat Baily A) を用いて、ベレゾン期を迎えた果房にバニルアセトン进行处理し、果皮アントシアニン蓄積量および糖酸比を測定した。バニルアセトン进行处理した果房では対照区に比べ果皮に蓄積されるアントシアニン量および糖酸比が有意に高かった。バニルアセトンによるアントシアニン蓄積量の増加にどのような分子機構が関与しているか解析するために、アントシアニン蓄積能を維持するブドウ培養細胞 VR 細胞にバニルアセトン进行处理し、アントシアニン蓄積量およびアントシアニン合成関連遺伝子の発現量を測定した。バニルアセトン処理濃度が増加するに従い VR 細胞が合成するアントシアニン量が増加した。バニルアセトン処理した VR 細胞では、アントシアニン合成関連遺伝子 *DFR*、*LDOX* および *UFGT* 遺伝子、アントシアニン合成関連遺伝子の転写を制御する *MybA1* 遺伝子の発現量が無処理の VR 細胞に比べ有意に増加していた。一方、アントシアニン合成経路の上流に位置するアントシアニン合成関連遺伝子の発現はバニルアセトン処理の影響を受けなかった。バニルアセトン処理した VR 細胞内では ABA 合成が活性化されたことから、バニルアセトンは細胞内 ABA の合成を活性化させることにより、主にアントシアニン合成経路下流の遺伝子群を活性化し、果皮にアントシアニン蓄積を促すと推察された。

アミノ酸はあらゆる生物の構成要素であり、動植物の生育およびそれらの二次代謝に不可欠な天然物である。アミノ酸はブドウにおいて生理活性物質としての働きをもつ。例えば、プロリンをブドウに処理することにより細胞内に発生する過酸化水素（活性酸素種のひとつ）が減少する。また、フェニルアラニンの葉面散布はブドウ果実に蓄積されるフェノール化合物およびアロマ化合物のプロファイルに影響を与える。本研究では、ブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量を増加する活性を有するアミノ酸をスクリーニングし、2年に渡る圃場試験でその効果を実証した。VR 細胞を用いたアミノ酸のスクリーニング実験において、イソロイシンおよびフェニルアラニンが VR 細胞のアントシアニン合成を促進することを見出した。次に、ヨーロッパ系赤ワイン用ブドウ品種カベルネ・ソーヴィニヨンにこれらの

アミノ酸を処理したが、ベレゾーンを迎えた果粒にイソロイシンおよびフェニルアラニンそれぞれ単独で処理しても着色促進効果は認められなかった。低濃度のアブシジン酸をイソロイシンあるいはフェニルアラニンと併用処理したところ、併用処理した果粒では無処理区に比べ有意に高い果皮アントシアニン蓄積量を、併用処理した VR 細胞では低濃度 ABA 処理区と比較してもアントシアニン蓄積量が有意に増加した。イソロイシンと低濃度 ABA を併用処理した試験区では MybA1 遺伝子の発現量が有意に増大していた。以上の結果から、圃場レベルにおいてイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低用量 ABA を併用処理することにより果皮の着色が促進される可能性が示された。ABA は植物ホルモンとしてアントシアニン合成を正に制御するため、ABA をブドウに散布した場合、ブドウ果皮のアントシアニン蓄積が促進される一方、老化現象も促進される。加えて、ABA は化学合成できるものの製造コストが高いため、ABA 散布は現在まで実用化に至っていない。本研究は、イソロイシンあるいはフェニルアラニンを低濃度 ABA と併用することにより、ABA の着色促進効果を損ねずに ABA の使用量を大幅に削減できる可能性を示唆した点で、今後の果皮着色向上技術の開発に貢献できるものと思われた。

今後、地球温暖化によりブドウ果実の着色はさらに悪化する恐れがある。ブドウ栽培家は果皮の着色を良好に維持するための難しい局面を迎えており、果皮の着色を維持および向上する栽培技術を求めている。本研究の目的は、天然物をブドウに散布することによりブドウの着色を改善できるかを検討することであった。天然物をブドウ樹に散布するブドウ果皮色促進・安定技術の開発において、本研究が技術基盤の礎となることを期待する。

## 論文審査結果の要旨

醸造用ブドウ栽培の目標のひとつは、高品質なワイン醸造に耐えうる品質を有する果実を育てることである。醸造用ブドウの品質は、糖、酸、フェノール等、様々な化合物によって複雑に構成されているが、これら果実内で蓄積される化合物の蓄積量を人為的に制御する手法を科学技術のもと開発することが現実的な研究課題である。特に、地球温暖化およびそれに伴う豪雨などの異常気象による着色不良は喫緊の課題と言える。我が国で最もブドウ栽培が盛んな山梨県においても 1961 年から現在まで年あたり  $0.042\text{ }^{\circ}\text{C}$  ずつ平均気温が上昇し続けており、醸造用ブドウの生産地が北上し始めている。これまでに除葉、摘房および環状剥皮などの耕種的栽培技術が開発されたが、これらの手法は高い技術スキル

を必要とし、また労働力負荷が大きいという欠点もあり、広く導入が進んでいるとは言えない現状がある。本学位論文は、地球温暖化の影響を直接被るブドウ栽培家が待ち望む「誰もが簡易に行えるブドウ果皮色促進技術」の基盤技術形成を目的とし、本学位論文では 2 種類の天然物に着目し、ブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼすそれら天然物の効果およびその分子機構を調査した。

バニルアセトン [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) butan-2-one] はショウガの辛味成分として知られる、植物由来の天然生理活性物質である。本学位論文では、アントシアニン蓄積能を維持するブドウ培養細胞 VR 細胞をモデルとし、ラボレベルでアントシアニン蓄積に及ぼすバニルアセトンの影響を検討した。その結果を受け、圃場においてバニルアセトン散布試験を実施した。結論として、バニルアセトンは細胞内 ABA の合成を活性化させることにより、主にアントシアニン合成経路下流の遺伝子群を活性化し、果皮にアントシアニン蓄積を促すことを示した。

アミノ酸はあらゆる生物の構成要素であり、動植物の生育およびそれらの二次代謝に不可欠な天然物である。本学位論文では、VR 細胞を用いてブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量を増加する活性を有するアミノ酸をスクリーニングし、2 年に渡る圃場試験でその効果を実証した。結論として、イソロイシンあるいはフェニルアラニンを低濃度 ABA と併用することにより、ABA の着色促進効果を損ねずに ABA の使用量を大幅に削減できる可能性を示唆した。

本学位論文は、ブドウ培養細胞を用いたモデル実験系により得られた仮説を圃場試験により実植物であるブドウで実証する戦略を取っており、1 年に一度しか実施できない圃場試験を計画的に推し進めている点で優れていると言える。これらの研究内容は、英文論文 2 報として国際学術誌に発表され（1 報：第一著者、1 報：第二著者）、その新規性から高い評価を受けている。なお、アミノ酸に関する研究は企業との共同研究であり、今後の実用化が期待される。

以上のことから、本学位論文は博士（工学）の学位論文に値すると博士論文審査委員一同が認め、合格と判定した。