

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

山梨大学大学院
医学工学総合教育部
博士課程学位論文

2019年9月

服部 智輝

目次

ページ

| | | |
|-----|-----------------------------------------|----|
| 第一章 | 緒言 | 1 |
| 第二章 | バニリルアセトンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果 | |
| 第一節 | 序論 | 6 |
| 第二節 | 材料および方法 | 8 |
| 第一項 | 供試植物 | |
| 第二項 | 果房へのバニリルアセトン処理 | |
| 第三項 | VR 細胞へのバニリルアセトン処理 | |
| 第四項 | 糖酸比の測定 | |
| 第五項 | RNA 抽出 | |
| 第六項 | リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析 | |
| 第七項 | アントシアニン測定 | |
| 第八項 | 内在性 ABA 量の測定 | |
| 第九項 | 統計分析 | |
| 第三節 | 結果 | 12 |
| 第一項 | バニリルアセトンがブドウ果皮のアントシアニンおよび果実の糖酸比へ及ぼす影響 | |
| 第二項 | バニリルアセトンが VR 細胞の内在性 ABA へ及ぼす影響 | |
| 第三項 | バニリルアセトンが VR 細胞のアントシアニン合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響 | |
| 第四項 | バニリルアセトンが VR 細胞のアントシアニン蓄積に及ぼす影響 | |
| 第四節 | 考察 | 14 |
| | 図表 | 16 |

第二章 イソロイシンおよびフェニルアラニンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果

第一節 序論 26

第二節 材料および方法 28

第一項 試薬

第二項 供試植物

第三項 VR 細胞へのアミノ酸処理

第四項 VR 細胞へのイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理

第五項 ブドウ果粒へのイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理

第六項 ブドウ果房へのイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理

第七項 RNA 抽出

第八項 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

第九項 アントシアニン測定

第十項 統計分析

第三節 結果 32

第一項 アミノ酸が VR 細胞のアントシアニン蓄積へ及ぼす影響

第二項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が VR 細胞のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

第三項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果粒のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

第四項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果房のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

第四節 考察 35

図表 38

| | |
|--------------------------------|----|
| 第四章 総合考察 | 48 |
| 参考文献 | 51 |
| 摘要 | 58 |
| SUMMARY OF DISSERTATION | 61 |
| 既発表論文 | 64 |
| 謝辞 | 65 |

第一章 緒言

「良いワインは良いブドウから」と言われるように、上質なワインを造るにはブドウの品質向上は欠かせない。ワインは多種多様な化合物の集合体であるため、ワイン品質の向上に貢献する化合物を如何にブドウに賦与できるかがブドウ栽培における課題と言える。ローマ時代に Pinot ワインの色が言及されていたように (Hocquigny et al. 2004)、赤ワインにおいてワイン・カラーは非常に重要な意味を持つ。赤ワインの色を決定づける要素のひとつはブドウ果皮色に含まれる色素である。ブドウは一般的に白ブドウと呼ばれる黄緑色品種と、赤ブドウと呼ばれる赤色および黒色品種に大別できる。植物の色素はその化合物の違いにより様々な合成系からなるが、ブドウ果皮に蓄積する赤系の色素はアントシアニン類をその主成分とする (Glories 1978)。アントシアニンは植物に、紫外線に対する保護作用やフリーラジカル除去による抗酸化作用、病原菌に対する拮抗作用をもたらす (Chalker-Scott, 1999; Takahama, 2004)。アントシアニンは人体の健康増進にとっても有効とされ、抗酸化作用や、抗菌・抗ウイルス作用、心疾患や肝障害の予防、抗変異原活性を持つと報告されている (Bitsch et al., 2004; De Pascual-Teresa and Sanchez-Ballesta, 2008; Jing et al., 2008; Koide et al., 1996; Tedesco et al., 2001)。

アントシアニンはフラボノイド類に分類される化合物で、アグリコンであるアントシアニジンに糖が結合した構造をしている (Mazza, 1995)。アントシアニジンはフェニルアラニンからカルコンを経由し、フラボノイド合成経路を経て合成される (図1)。アントシアニンはアントシアニジン部位のヒドロキシ基やメトキシル基の数、糖鎖の構成によっていくつかの種類に分けられる。ブドウ果皮で一般的に合成されるアントシアニジンはシアニジン系およびデルフィニジン系からなり、シアニジン系としてシアニジン、ペオニジン、デルフィニジン系アントシアニンとしてデルフィニジン、ペチュニジンおよびマルビジンが合成される (Mazza, 1995; Holton and Cornish, 1995)。シアニジン系アントシアニンとデルフィニジン系アントシアニンの比率は、F3'H と F3'5'H の遺伝子発現比に影響を受ける (Bogs et al., 2006; Castellarin et al., 2006)。その後、UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) がアントシアニジンに糖を付加することでアントシアニンが生成される (図1)。

赤色および黒色品種のブドウにおいて、アントシアニンの合成はベレゼーンと呼ばれる

果実成熟開始期に始まる。対して、黄緑色品種ではベレゾーンになっても *UFGT* 遺伝子の発現が起こらず、アントシアニンの合成が開始されない。*UFGT* 遺伝子は Myb 様転写因子の *VvMybA1* によって発現が促進されるが、黄緑色品種のすべての品種において *VvmybA1* 遺伝子は全く発現していない (Kobayashi et al., 2005)。この分子メカニズムとして、黄緑色品種が有する 2 本の *VvmybA1* 対立遺伝子のいずれのプロモーター領域にもレトロトランスポゾン *Gret-1* が挿入されていることが明らかとなった (Kobayashi et al., 2004)。すなわち、レトロトランスポゾンの挿入に起因する *VvmybA1* のプロモーター不全是 *VvmybA1* の転写を完全に抑制することにより、*UFGT* 遺伝子の転写が起きず、結果としてアントシアニン合成が抑制されるのである。グリ色 (ピンク～薄紫) の果皮を持つ、日本固有の醸造用品種甲州では、*VvmybA1* 遺伝子の第 2 インtron への挿入配列が *VvmybA1* 発現量を調整することが示されている (Shimazaki et al., 2011)。第 2 インtron への遺伝子断片の挿入による *VvmybA1* 遺伝子発現の抑制メカニズムとしては、遺伝子断片が *VvmybA1* プレカーサー mRNA のスプライシングを阻害することにより *VvmybA1* mRNA の分解を促している可能性が提唱されているが、その明確な答えはまだ得られていない。以上の報告は、ブドウにおけるアントシアニン合成は *VvmybA1* 遺伝子の発現量によって普遍的に決定されることを意味する。

一方、ブドウ果皮におけるアントシアニン合成はブドウの生育環境によって多大な影響をうける。たとえば、日射量である。日光は適度な量であれば、ブドウのアントシアニン蓄積を促進するが、日射量が過度になるとブドウ果実は日焼けを起こしアントシアニンの蓄積量が減少してしまう (Chorti et al., 2010; Jeong et al., 2004)。ブドウ成熟期に土壌水分量が不足すると、アントシアニン合成が促進され、果皮のアントシアニン蓄積量が増加する (Lovisolo et al., 2010)。このような栽培特性を有するブドウにおいて中長期的なブドウ栽培を考慮した場合、地球温暖化がブドウ果皮のアントシアニン合成に及ぼす影響は計り知れない。世界レベルでの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°C 上昇すると推測されている (Jones et al., 2005)。甲府気象台の報告でも 1961 年から山梨県では年 0.042°C ずつ平均気温が上昇し続けており (Saito et al., 2008)、醸造用ブドウの生産地がより寒冷地へと北上し始めているのは周知の事実である (Tagami 2009)。25°C に比べ 35°C の高温下ではアントシアニン蓄積は阻害され、同時にアントシアニンの分解も引き起こされるため (Mori et al., 2005; Tarara et al., 2008; Yamane et al., 2006)、気温上昇によるブドウの着色不良は地球温暖化に直面する全世界での懸案事項と言える。この状況を鑑み、ブ

ドウ研究者はブドウ果皮の着色を促進するあるいは維持する技術の開発に余念がない。

ブドウの着色を改善するために、いくつかの栽培技術が提案され、そのいくつかは実用化されている。たとえば、除葉 (Matus et al., 2009) や摘房 (Guidoni et al., 2002)、環状剥皮 (Brar et al., 2008) はブドウ果皮に蓄積するアントシアニン量を向上する栽培技術である。しかし、これらの手法は、ブドウの生育状況により処理時期や処理レベルを最適化するなど、高い技術スキルを作業者に要求し、また作業に費やす時間が長いという欠点がある。一方、化学物質を散布することによりブドウの着色を改善する試みもなされている。たとえば、ジャスモン酸メチルを葉面散布することでブドウ果皮に蓄積するアントシアニン量が増加する (Portu et al., 2016)。化学物質の散布は誰にでも簡易に行える方法であるが、降雨などに影響を受けるため即効性の効果が出ない限り、その効果は不安定になってしまう。

上記で記した栽培技術の多くは、ブドウ果実にアブシジン酸 (abscisic acid、ABA) を誘導する。ABA は植物の老化や乾燥ストレス応答に関与する植物ホルモンであり (Bray, 1997)、ブドウ果実の成熟とともにブドウ果皮におけるアントシアニン合成にも密接に関わっている (Deluc et al., 2007)。ベレゾーン期を向かえたブドウ果実中の ABA 量は急激に上昇し (Gagné et al., 2006)、それと同時に果肉の成熟と果皮の着色が始まる (Coombe and Hale, 1973)。ブドウへの ABA 散布はブドウ果皮色の改善を促すことが報告されており (Peppi et al., 2008; Quiroga et al., 2009)、ブドウ培養細胞を用いた *in vitro* 実験においても ABA 処理したブドウ細胞中のアントシアニン量が増大したという報告がある (Hiratsuka et al., 2001)。ABA を処理したブドウ果実の果皮ではアントシアニン合成を律速する *UFGT* および *VvmybA1* の発現量が増加することも認められている (Jeong et al., 2004)。したがって、ブドウへの ABA 散布はブドウ果皮の着色改善に対して強力な手法になりうる。しかし、ABA は人工合成が難しいため非常に高価である。また、ABA はそもそも老化を促進する植物ホルモンでもあるため、ブドウ樹全体に散布すると早期落葉を誘導する恐れがある。このように、散布時期や散布方法を考慮する等の技術的課題も ABA 散布にはあるため、現状では ABA はブドウ栽培にほとんど利用されていない

本研究では、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を行った。第二章では、先行研究 (田中, 2013) によって生理活性ライブラリー (Sigma-Aldrich) からスクリーニングされた、ブドウの着色を向上する可能性が示唆されたバニリルアセトンを試供し、バニリルアセトンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果およびそのメカニズムについて検討した。第三章では、味の素株式会社との共同

研究により、20種のアミノ酸の中からABAと相互作用を引き起こし、ABAと相乗的にアントシアニン量を向上する可能性の高いイソロイシンおよびフェニルアラニンを供試し、イソロイシンあるいはフェニルアラニンをABAと併用することによりABA散布量を大幅に削減できる可能性を検討した。

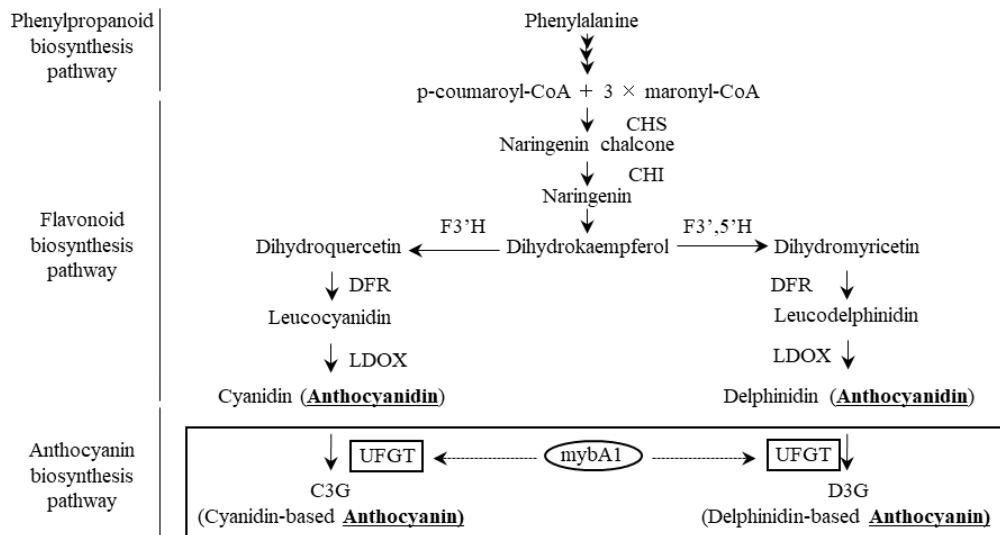


図1 ブドウにおけるアントシアニン生合成経路（概略図）

第二章 バニルアセトンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果

第一節 序論

天然生理活性物質とは生物に様々な生理活性を示す有機化合物の総称である。20世紀後半から天然生理活性物質の研究は急速に発展し、植物をはじめ動物や微生物、昆虫などから多種多様な天然生理活性物質が同定されてきた(秋久ら, 2002)。天然生理活性物質は、動物に対して抗炎症効果、解熱効果などの生理活性を示すことが報告されている(Ahmed et al., 2015)が、農業生産性を向上させる天然生理活性物質も存在している。たとえば、グルタチオンは植物の光合成効率を上げることにより、成長スピードおよび収穫量を向上させる天然生理活性物質であり、2015年には株式会社カネカにより農業用酸化型グルタチオンとしてライセンスが取得されている(<http://www.kaneka-gssg.com/>)。植物アルカロイドであるホルデニン进行处理することにより、難治性病害であるブドウべと病およびイチゴ炭疽病の防除も試みられている(Ishiai et al., 2016)。

我々のグループは、市販の生理活性ライブラリー(Sigma-Aldrich)からアントシアニン合成を促進する天然生理活性物質として、バニルアセトン、L-カルニチン塩酸塩、18-β-グリチルレチン酸およびケルセチン水和物を選抜した(田中, 2013)。いずれの天然生理活性物質も圃場散布試験によりブドウ果皮の着色を促進する効果が認められたが、水への溶解度およびこれまでに知られている生理活性効果(ヒトへの生理活性項があるものは実用化が難しいため)を鑑み、本章ではバニルアセトンのみに絞って、バニルアセトンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果およびその分子機構の解明を試みた。

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(図2)。人体に対しては無害とされる。一方で、バニルアセトンの植物に対する影響はほとんど研究されていない。

本章の試験に使用するブドウとして、マスカット・ベリーA (*V. labrusca* × *V. linsecumii* × *V. vinifera* cv. Muscat Baily A) を供試した。マスカット・ベリーAは1927年に日本人の川上善兵衛氏により交配されたブドウである。交配にはアメリカ系ブドウのベリー(Bai-ley)とヨーロッパ系ブドウのマスカットハンブルグ(Muscat Hamburg)が用いら

れた。2013年に国際ブドウ・ワイン機構（Office International de la vigne et du vin : OIV）に醸造用ブドウとして登録され、我が国では甲州に続き2番目に醸造量が多いブドウである。マスカット・ベリーAの果皮色は紫黒色であるが、ヨーロッパ系赤ワイン用品種に比べ果皮色は劣るため、マスカット・ベリーA果実の着色不良はマスカット・ベリーAワイン造りにとって致命的となり、着色不良の年は敢えて赤ワインにせず、ロゼワインとして醸造するワイナリーも少なくない。これらの状況を鑑み、本章では、日本を代表する赤ワイン用原料ブドウであるマスカット・ベリーAの着色促進・維持を目標に、天然生理活性物質バニルルアセトンの有効性を評価した。

第二節 材料および方法

第一項 供試植物

山梨大学ワイン科学研究センター前圃場に栽培されているブドウ (*V. labrusca* × *V. linsecumii* × *V. vinifera* cv. Muscat Baily A) を圃場散布試験に供試した。

V. vinifera cv. Bailey Alicante A 由来の高いアントシアニン蓄積能を持つ VR 細胞 (Yamakawa et al. 1983. 理研バイオリソースセンターにより分譲、BRC No. rpc00003) をラボ処理実験に供試した。VR 細胞は下記の LS 改変培地上で、25°C、暗所で継代培養を行った。

LS 改変培地組成：

| | |
|---------------------------|---------|
| ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (和光純薬工業) | 1 袋 |
| スクロース | 30 g |
| 塩酸チアミン | 1 mg |
| ミオイノシトール | 100 mg |
| カイネチン | 0.2 mg |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 0.05 mg |
| 寒天 | 8 g |
| 水 | 1 L |

(pH 6.1)

第二項 果房へのバニルルアセトン処理

2015年8月10日にベレゾーン期に入ったことを確認した。0.1%のアプローチ BI (丸和バイオケミカル) を添加した 1 mM のバニルルアセトンを調整し、果房へ噴霧した。対照区として、0.1%アプローチ BI を含んだ蒸留水を噴霧した。各果房への処理量は 5 mL とした。処理後 1、5 および 14 日目にサンプリングを行った。各日ごと 1 処理区あたり 5 房のブドウをサンプリングし、アントシアニン量および糖酸比を測定した。

第三項 VR 細胞へのバニリルアセトン処理

バニリルアセトン（東京化成工業）、ABA（東京化成工業）またはバニリルアセトンと ABA の混合液を濃度を変えて調整し、20 μ L を LS 改変培地（20 mL/plate）に塗布した。対照区として 20 μ L の滅菌水を LS 改変培地に塗布した。各培地上に約 0.1 g の VR 細胞を接種し、25°C、光照射下で 5 日間培養した。培養後所定の時間に VR 細胞をサンプリングし、アントシアニン量、アントシアニン合成関連遺伝子の発現量、内在性 ABA 量を測定した。

第四項 糖酸比の測定

果皮をむいた果実を搾汁し、ポケット糖酸度計（PAL-BX|ACID2, ATAGO）を用いて糖酸比を測定した。

第五項 RNA 抽出

果実からピンセットで剥いた果皮あるいは VR 細胞を液体窒素にて凍結し、手動式試料破砕器具 SK ミル（SK-200、トクケン）を用いて粉末になるまで破砕した。その後、Fruit-mate for RNA Purification（タカラバイオ）と NucleoSpin RNA Plant（タカラバイオ）のプロトコルに従って RNA を抽出した。

第六項 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser（タカラバイオ）のプロトコルに従って、RNA から cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ）のプロトコルに従い、Thermal Cycler Dice® Real Time System II（タカラバイオ）を用いてリアルタイム PCR を行った。cDNA 合成および PCR 条件は以下の通りである。

cDNA 合成 37 °C、15 min → 85 °C、5 s

PCR 反応 95 °C、5 s → 60 °C、30 s（40 cycles）

リアルタイム RT-PCR で発現定量を行った遺伝子は以下の通りである

MybA1 (*VvMybA1*, GenBank accession no. AB111101)
UDP glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (*VvUGFT*, GenBank accession no. AB047099)
chalcone synthase (*VvCHS*, GenBank accession AB015872) ,
chalcone isomerase primers (*VvCHI*, GenBank accession X75963)
flavonoid 3'-hydroxylase (*VvF3'H*, GenBank accession no. AB213605)
flavonoid 3',5'-hydroxylase (*VvF3'5'H*, GenBank accession no. ABAB213606)
dihydroflavonol 4-reductase (*VvDFR*, GenBank accession NM_001281215)
leucoanthocyanidin dioxygenase (*VvLDOX*, GenBank accession X75966)

内部標準プライマーとして β -actin プライマー (GenBank accession no. AF369524) を使用し、Thermal Cycler Dice Real Time System Single Software ver. 5.10A (タカラバイオ) を用いて各遺伝子の相対発現量を算出した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー配列を表 1 に示した。

第七項 アントシアニン測定

果皮あるいは VR 細胞を液体窒素にて凍結し、乳鉢と乳棒を用いて粉末になるまで破碎した。破碎した試料 1 g を 7 mL の 1% アセトン溶液 (アセトン : 水 = 2:1) に浸漬し、室温、暗黒下で一晩静置した。4,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を 0.1 M の塩酸で希釈した。520 nm における混合液の吸光度を測定し、下記の計算式を用いて、Malvidin-3-O-glucoside chloride 換算でアントシアニン量を算出した (Bakker et al., 1986)。

$$\text{アントシアニン量 (g/g-sample weight)} = (\text{A}_{520} * \text{MW} * \text{希釈率}) / [\varepsilon * \text{試料重量 (g)}]$$

A₅₂₀: 520 nm の吸光度
MW: Malvidin-3-O-glucoside chloride の分子量 (529)
 ε : Malvidin-3-O-glucoside chloride の分子吸光係数 (28,000)

第八項 内在性 ABA 量の測定

Plant Hormone Abscisic Acid, ABA ELISA Kit (CUSABIO) のプロトコルに従って、ABA

前駆体、ABA 分解産物、ABA 複合体を含む、内在性 ABA 量を測定した。0.1 g の VR 細胞を 0.9 mL sample extraction buffer（上記 ELISA kit に添付）に浸漬した。4°C、暗黒下で一晩振盪後、遠心分離を行い、上清を得た。上記 ELISA kit に上清を供試し、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し、検量線法によって ABA 量を算出した。

第九項 統計分析

得られたデータに関して、エクセル統計ソフト 2012（社会情報サービス）を用いて、Student's t-test あるいは Tukey 法で統計処理を実施した。

第三節 結果

第一項 バニルルアセトンがブドウ果皮のアントシアニンおよび果実の糖酸比へ及ぼす影響

バニルルアセトン処理を施したマスカット・ベリーA 果実の様子を図3に示した。バニルルアセトン処理したブドウ果実は処理後1日目から14日目までの間、対照区に比べ果皮におけるアントシアニン蓄積が促進された。併せて、果皮におけるアントシアニン量もバニルルアセトン処理により優位に高くなった(図4)。バニルルアセトン処理したブドウ果実の糖酸比は、処理後1日目から5日目まで対照区よりも有意に高い値を示し、有意差のないものの14日目も引き続き高い傾向を示した(図5)。

第二項 バニルルアセトンがVR細胞の内在性ABAへ及ぼす影響

バニルルアセトン処理したVR細胞に認められる内在性ABA量の変化を図6に示した。バニルルアセトン処理したVR細胞では、処理後3時間に内在性ABA量が急激に増加し、対照区に比べ有意に高い値を示した。

第三項 バニルルアセトンがVR細胞のアントシアニン合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響

バニルルアセトン処理したVR細胞における*CHS*および*CHI*遺伝子発現量は対照区と比べて有意な差は認められなかった(図7)。また、*F3'H*および*F3'5'H*遺伝子発現についてもバニルルアセトンの影響は認められなかった。一方、フラボノイド合成経路の下流遺伝子である*DFR*、*LDOX*、*MybA1*、*UFGT*遺伝子においては、バニルルアセトン処理区で対照区と比べ、有意に高い相対発現量を示した。

第四項 バニルルアセトンがVR細胞のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

アントシアニン蓄積に及ぼすバニルルアセトンの濃度依存的な影響を検討した(図8)。

バニリルアセトンの処理濃度が上がるにしたがって、VR 細胞に蓄積するアントシアニン量も増加した (図 8)。統計解析の結果、バニリルアセトンの処理濃度と細胞内アントシアニンには極めて高い正の相関関係 ($p=0.0131$) があることが示された。

VR 細胞を用いて、バニリルアセトン (1 mM) および ABA (1 mM) の相加効果を検討した。バニリルアセトン処理区、ABA 処理区、バニリルアセトンおよび ABA の併用処理区では、処理 5 日目において VR 細胞に蓄積するアントシアニン量が対照区と比べ有意に増加した (図 9)。しかしながら、バニリルアセトン処理区、ABA 処理区、バニリルアセトンおよび ABA の併用処理区の間で有意な差は認められなかったことから、本実験系ではバニリルアセトンおよび ABA の相加効果はないと判断した。

第四節 考察

本章では、バニルルアセトンがブドウのアントシアニン蓄積に及ぼす影響を見出し、ブドウのモデル系である VR 細胞を用いてその分子メカニズムを解明した。ベレゾーン開始とともにバニルルアセトン処理したブドウ果実は処理後 1 日目から 5 日目に糖酸比が増加し、処理後 1 日目から 14 日目にかけて果皮に蓄積するアントシアニン量も増加した。ブドウはベレゾーン後に糖酸比が急激に上昇し、同時にアントシアニン蓄積が始まる (Coombe, 1976; Hrazdina et al., 1984)。これらの知見と本章の結果は、バニルルアセトン処理がブドウ果実の成熟を早め、その結果としてアントシアニン合成も促進されることを示唆する。

バニルルアセトンはどのようにアントシアニン合成に関わっているのだろうか。植物ホルモンであるエチレンと ABA は果実成熟の制御物質であるが、ブドウは成熟時期に呼吸量が増大しない非クリマクテリック果実である (Coombe and Hale, 1973)。ブドウ果実ではベレゾーン開始期にエチレンの増加が認められないため、ベレゾーン後の果実成熟にエチレンが直接関わっているかは明らかでない (Weaver and Singh, 1978)。一方、ABA はベレゾーン開始期にブドウ果実内で増加し、それに伴って果肉内での糖の蓄積および有機酸の減少、果皮でのアントシアニン蓄積が始まる (Coombe and Hale, 1973; Kataoka et al., 1982; Peppo et al., 2008; Wheeler et al., 2009)。ABA は *MybA1* および *UFGT* 遺伝子といったアントシアニン合成関連遺伝子の発現量を増加することにより、アントシアニン合成を促進する (Jeong et al., 2004; Koyama et al., 2010; Peppi et al., 2008)。本章では、バニルルアセトンを果実に処理することにより果皮のアントシアニン蓄積量および果汁の糖酸比が増加することを示した。加えて、VR 細胞を用いたモデル実験により、アントシアニン蓄積量の増加は内在性 ABA 量の増加およびアントシアニン合成関連遺伝子 (*DFR*、*LDOX*、*MybA1* および *UFGT*) の発現量の増加に起因することを証明した。これらのことから、バニルルアセトンがアントシアニン合成を促進するメカニズムを図 10 のように推定した。すなわち、バニルルアセトンは内在性 ABA を誘導することによりアントシアニン合成関連遺伝子の発現を増大しアントシアニン合成を促進するのである。

一方、バニルルアセトンの影響はアントシアニン合成関連遺伝子の中でも *DFR*、*LDOX*、*MybA1* および *UFGT* 遺伝子に限定的であった。フラボノイド合成経路において、*DFR* はア

アントシアニジンの前駆体であるロイコアントシアニジンを合成し、続いて LDOX がアントシアニジンを合成する (図 1)。アントシアニン合成経路では、MybA1 によって発現が促進された UFGT がアントシアニジンに糖を付加し、アントシアニンを合成する (Ford et al., 1998; Kobayashi et al., 2005)。バニルルアセトンフラボノイド合成経路の上流遺伝子である *CHS* および *CHI* の発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、バニルルアセトンはアントシアニン合成の下流で働く酵素遺伝子の発現を促進することで、ブドウの着色を向上することが示唆された。また、バニルルアセトンは *F3'H* と *F3'5'H* 遺伝子の発現量にも影響を及ぼさなかった。*F3'H* および *F3'5'H* はシアニジン系およびデルフィニジン系アントシアニンの合成分岐に関わる酵素である (Bogs et al., 2006; Castellarin et al., 2006)。これらのことから、バニルルアセトンはブドウ果実中のアントシアニン量を増加するが、その構成比には影響を及ぼさないことが示唆された。

表 1 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーの配列

| Accession No. | Gene name | | Sequences |
|---------------|-----------------|----|-------------------------|
| AB111101 | <i>VvMybA1</i> | Fw | GCAAGCCTCAGGACAGAAGAA |
| | | Rv | ATCCCAGAAGCCCACATCAA |
| AB047099 | <i>VvUFGT</i> | Fw | CTTCTTGAGCACCAGCCAATC |
| | | Rv | AGGCACACCGTCGGAGATAT |
| AB015872 | <i>VvCHS</i> | Fw | TCTGAGCGAGTATGGGAACATG |
| | | Rv | CTGTGCTGGCTTTCCCTTCT |
| X75963 | <i>VvCHI</i> | Fw | GACGGGTCGCCAGTATTTCAG |
| | | Rv | GCTTTGGCTTCTGCGTCA |
| AB213605 | <i>VvF3'H</i> | Fw | TATGGGCTGACCCTACAACGA |
| | | Rv | CCTGGGCAAACAACCTCATT |
| AB213606 | <i>VvF3'5'H</i> | Fw | AGGGTCGGAGTCAAATGAGTTC |
| | | Rv | CGTGGGCAAACAACCTCATT |
| NM_001281215 | <i>VvDFR</i> | Fw | CCTCATAACTGCTCTTTCCCCGA |
| | | Rv | AACGTCCCTCTGCCTTAGGATTC |
| X75966 | <i>VvLDOX</i> | Fw | GCGATATGACCATCTGGCCTAA |
| | | Rv | ATCCCAACCCAAGCGATAGC |
| AF369524 | <i>VvActin</i> | Fw | CAAGAGCTGGAAACTGCAAAGA |
| | | Rv | AATGAGAGATGGCTGGAAGAGG |

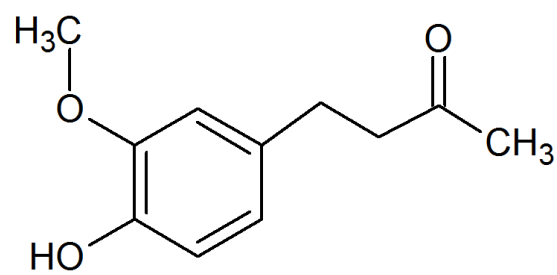


図2 バニリンアセトンの構造

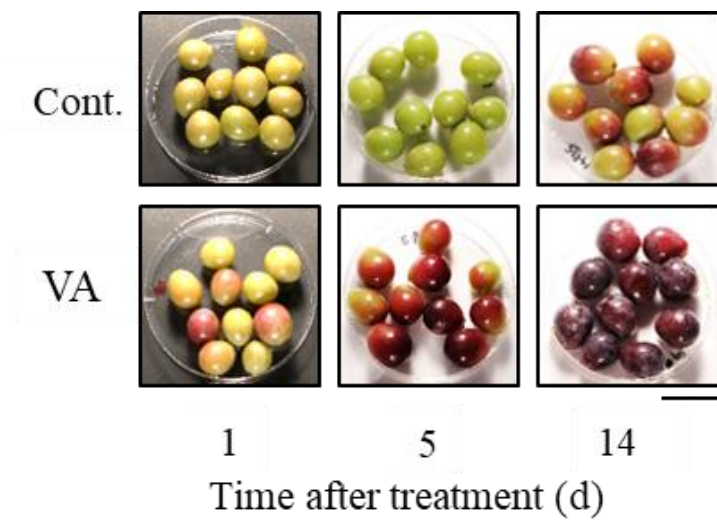


図3 バニリルアセトン処理したマスカット・ベリーA 果実

Cont. : 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニリルアセトン処理区
 バーは 3 cm を示す

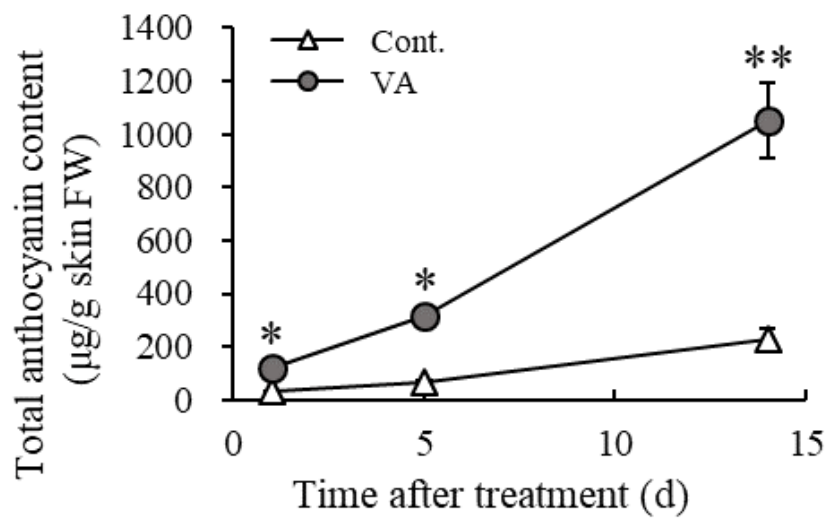


図4 バニルルアセトン処理したマスカット・ベリーA 果実の果皮アントシアニン量

Cont.: 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニルルアセトン処理区
 データは 平均値± S.E (n = 5) で示した

* P < 0.05 (t-test) ** P < 0.01 (t-test)

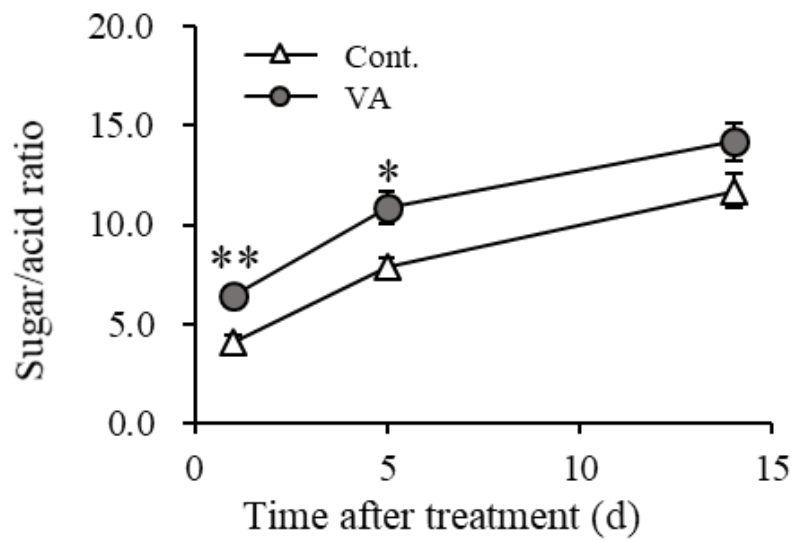


図5 バニリルアセトン処理したマスカット・ベリーA 果実の糖酸比

Cont. : 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニリルアセトン処理区
 データは 平均値 ± S.E (n = 5) で示した

* P < 0.05 (t-test) ** P < 0.01 (t-test)

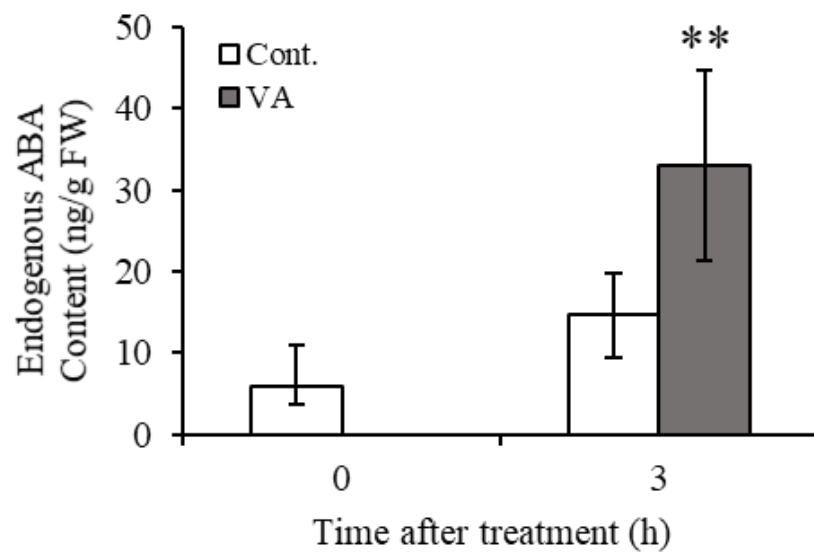


図6 バニリルアセトン処理したVR細胞内の内在性ABA濃度

Cont.: 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニリルアセトン処理区

データは 平均値± S.E (n = 8) で示した

** P < 0.01 (t-test)

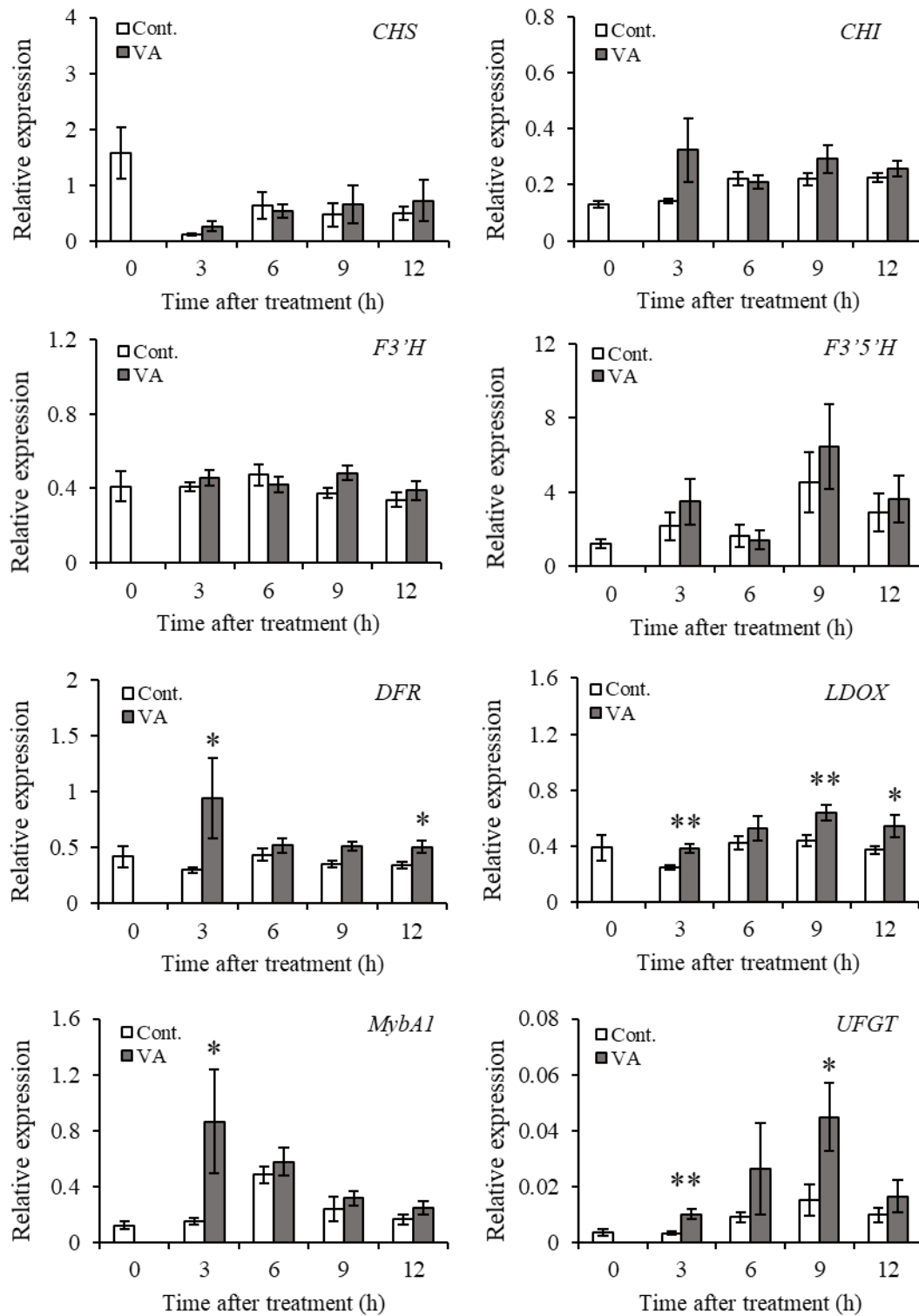


図7 バニルルアセトン処理したVR細胞におけるアントシアニン合成関連遺伝子群の発現量変化

Cont.: 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニルルアセトン処理区

データは 平均値 ± S.E (n = 8) で示した

* P < 0.05 (t-test) ** P < 0.01 (t-test)

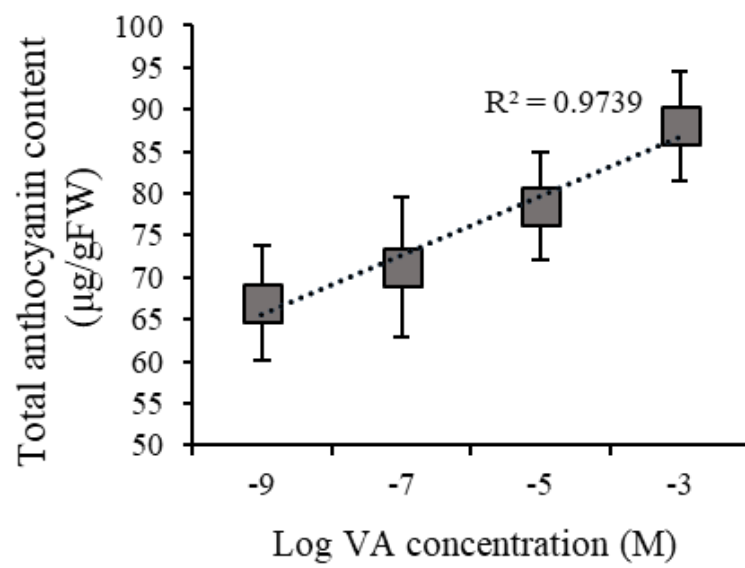


図8 バニリルアセトンの濃度依存的アントシアニン蓄積

VA: $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}$ Mバニリルアセトン処理

データは 平均値± S.E (n = 30) で示した

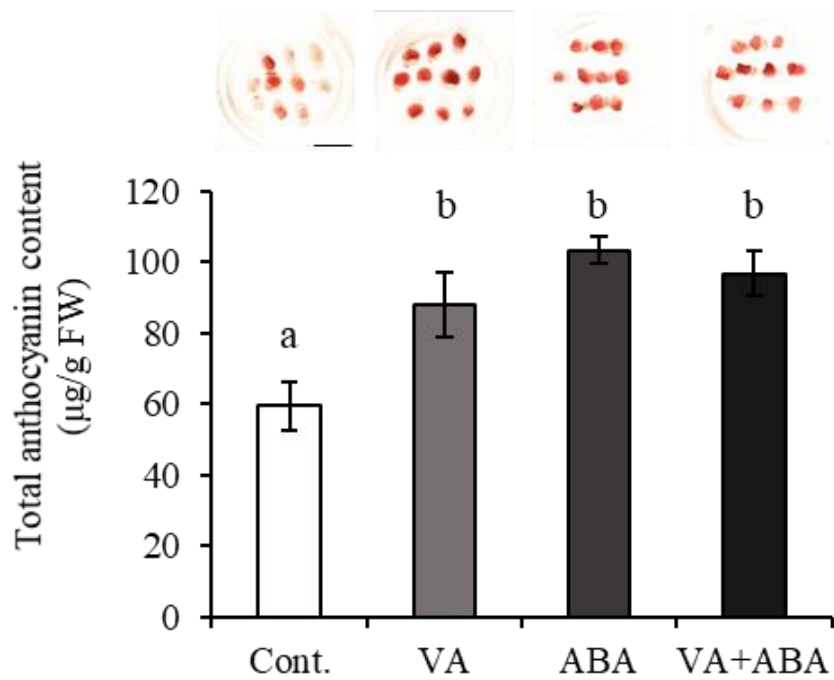


図9 VR細胞のアントシアニン蓄積に及ぼすバニリルアセトンおよびABA処理の相加効果

Cont.: 対照区 (水処理)、VA: 1 mM バニリルアセトン処理区

ABA: 1 mM ABA 処理区

VA+ABA: 1 mM バニリルアセトン + 1mM ABA 併用処理区

データは 平均値 ± S.E (n = 30) で示した

a、b: 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

グラフ上の図は VR 細胞の様子を示す (Bar = 3 cm)

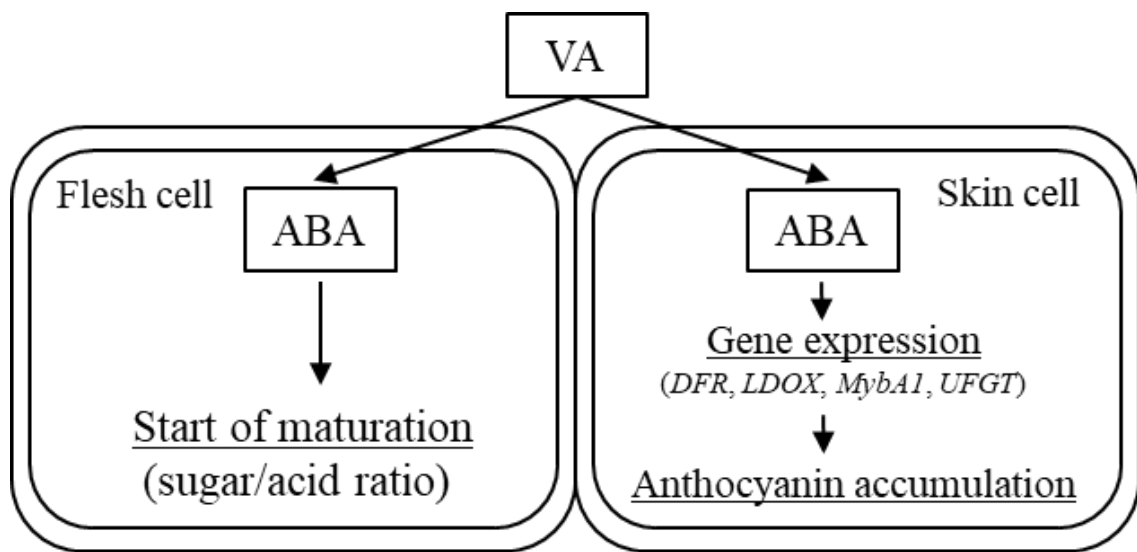


図 10 バニリルアセトンによるアントシアニン合成の促進モデル

バニリルアセトン (VA) は内在性 ABA を誘導することにより、果皮ではアントシアニン合成関連遺伝子 *DFR*、*LDOX*、*MybA1*、*UFGT* の発現を促す。一方、果肉では内在性 ABA により成熟が促進される。

第三章 イソロイシンおよびフェニルアラニンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果

第一節 序論

アミノ酸はあらゆる生物の構成要素であり、動物および植物の生育や二次代謝に重要な有機化合物である (Calvo et al., 2014)。細胞内生理に深く関与するアミノ酸を外的にブドウに処理することで、ブドウ細胞の生理状態を変えることが可能である。たとえば、ブドウにプロリンを処理することにより、ブドウ細胞内の過酸化水素が減少し、酸化ストレスを回避することができる (Ozden et al., 2008)。フェニルアラニンの葉面散布は、ブドウ果実内のフェノール類およびアロマ物質の合成に影響を与える (Portu e al., 2015)。また、フェニルアラニンをブドウ果実に処理することにより、細胞内のフェニルアラニン濃度が増加し、果皮のアントシアニンの蓄積が促進される (Garde-Cerdán et al., 2014; Portu et al., 2017)。このように、外的に与えたアミノ酸はブドウの代謝経路に影響を与える。

先に述べたように、ABA はブドウの果実成熟を制御する植物ホルモンである。ABA はアントシアニン合成関連遺伝子の発現を強く促進し、結果としてアントシアニン量を増加させる。ブドウ果皮色を促進・維持する散布材として ABA 剤が市販化されている。たとえば、Valent BioSciences 社は合成 ABA を含む ProTone をブドウ用資材として販売している (<https://www.valentbiosciences.com/cropenhancement/products/protone/>)。しかしながら、①合成 ABA は非常に高価である、②ABA は葉の老化を促進する、等の理由により、強力なアントシアニン促進効果を有しながら、実際には ABA 剤のブドウ栽培への導入は進んでいない。これを受け、本章では、ABA 散布量の低減を目的として、アントシアニン合成促進効果を有し、低用量の ABA と組み合わせることが可能なアミノ酸を選抜した。

本章の試験に使用するブドウとして、カベルネ・ソーヴィニヨン (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) を供試した。カベルネ・ソーヴィニオンはフランスのボルドー地方原産で、赤ワイン用原料ブドウの代表的品種であり、栽培面積は世界第 1 位を誇る。我が国でのカベルネ・ソーヴィニヨンの収穫量は 500 トン前後であり、長野県が最大生産地である (国税庁、平成 28 年調べ)。カベルネ・ソーヴィニオンは環境適応力が高い品種であるとされてきたが、そもそもが着色不良を起こしやすい品種であるため、収穫前に房付近の摘葉を行

いアントシアニンの蓄積を促すなどの栽培技術が必要である。加えて、地球温暖化の影響により山梨県で栽培されるカベルネ・ソーヴィニオンでは着色不良が認められるようになった。これらの状況を鑑み、本章では、世界的に栽培されているカベルネ・ソーヴィニオンを研究材料とし、アントシアニン蓄積量に及ぼす低濃度 ABA とアミノ酸の併用散布の有効性を評価した。

なお、本章は味の素株式会社との共同研究の成果である。

第二節 材料および方法

第一項 試薬

アミノ酸（20種、図1-1）は味の素株式会社から提供して頂いた。

第二項 供試植物

山梨大学ワイン科学研究センター前圃場で栽培されているカベルネ・ソーヴィニオンを供試した。ブドウ培養細胞‘VR細胞’は第二章第一項に従い継代培養した。

第三項 VR細胞へのアミノ酸処理

各アミノ酸あるいはABAを添加したLS改変培地上でVR細胞を培養した。各アミノ酸は0.2 mM、1 mM および 5 mM に、ABA は 100 μ M に調整し、1 mL を LS 改変培地（9 cm シャーレに 20 mL）に塗布した。また、コントロールとして滅菌した Milli-Q 水を塗布した。25°C、弱光下（50 μ E）で 5 日間 VR 細胞を培養した。

第四項 VR細胞へのイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理

後述するように、本章の研究目的に合うアミノ酸としてイソロイシンおよびフェニルアラニンを選抜した（図1-1）。本項では、低濃度 ABA とイソロイシンあるいはフェニルアラニンとの併用処理が VR 細胞のアントシアニン蓄積に如何なる影響を及ぼすかを検討した。

下記に示した処理液を調整した。LS 改変培地（9 cm シャーレに 20 mL）に各処理液 1 mL 塗布し、VR 細胞を播種した。25°C、弱光下（50 μ E）で 5 日間 VR 細胞を培養した。

各試験区の処理液および処理濃度

-
1. H₂O（コントロール）
 2. 100 μ M ABA
 3. 10 mM イソロイシン

4. 10 mM フェニルアラニン
 5. 10 mM イソロイシン + 100 μ M ABA
 6. 10 mM フェニルアラニン + 100 μ M ABA
 7. 10 mM イソロイシン + 10 mM フェニルアラニン
-

第五項 ブドウ果粒へのイソロイシンあるいはフェニルアラニン と低濃度 ABA の併用処理

2017 年 8 月 10 日に果粒の軟化が始まった未着色のブドウ果房から果粒を採取した。果粒を水道水で洗浄し、1% 次亜塩素酸含有 70% エタノールで滅菌処理を行った。メスを用いて果梗と果粒の接続部を切断し、0.3 M スクロース溶液および下記の試薬 2 mL をしみこませた濾紙に切断面が接するように果粒を静置した。その状態のまま、25°C、弱光下 (50 μ E) で 8 日間培養した。

各試験区の処理液および処理濃度

1. H₂O (コントロール)
 2. 100 μ M ABA
 3. 10 mM イソロイシン
 4. 10 mM フェニルアラニン
 5. 10 mM イソロイシン + 100 μ M ABA
 6. 10 mM フェニルアラニン + 100 μ M ABA
-

第六項 ブドウ果房へのイソロイシンあるいはフェニルアラニン と低濃度 ABA の併用処理

2015 年と 2017 年の 2 年に渡り、山梨大学ワイン科学研究センター前圃場のカベルネ・ソーヴィニオンに下記の処理を施した。なお、いずれの年も同じ樹に同じ処理を施すため、連続処理の影響を弱めるために、2016 年は実験を行わず 1 年の中休みを取ることにした。

ベレゾーン開始期 (2015 年 7 月 31 日および 2017 年 8 月 10 日) に、ブドウ果房を下記で示した処理液に浸漬した。定期的にブドウ果粒 30 粒をサンプリングし、果皮をアントシ

アニン測定に供試した。

各試験区の処理液および処理濃度

-
1. H₂O (コントロール)
 2. 380 μM ABA
 3. 10 mM イソロイシン
 4. 10 mM フェニルアラニン
 5. 10 mM イソロイシン + 380 μM ABA
 6. 10 mM フェニルアラニン + 380 μM ABA
-

*展着剤として 0.1%アプローチ BI をいずれの処理液にも添加した

第七項 RNA 抽出

VR 細胞を液体窒素にて凍結し、手動式試料破碎器具 SK ミル (SK-200、トッケン) を用いて粉末になるまで破碎した。その後、Fruit-mate for RNA Purification (タカラバイオ) と NucleoSpin RNA Plant (タカラバイオ) のプロトコルに従って RNA を抽出した。

第八項 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) のプロトコルに従って、RNA から cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) のプロトコルに従い、Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ) を用いてリアルタイム PCR を行った。cDNA 合成および PCR 条件は以下の通りである。

cDNA 合成 37 °C、15 min → 85 °C、5 s

PCR 反応 95 °C、5 s → 60 °C、30 s (40 cycles)

リアルタイム RT-PCR で発現定量を行った遺伝子は以下の通りである

MybA1 (*VvMybA1*, GenBank accession no. AB111101)

UDP glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (*VvUFGT*, GenBank accession no. AB047099)

内部標準プライマーとして β -actin プライマー (GenBank accession no. AF369524) を使用し、Thermal Cycler Dice Real Time System Single Software ver. 5.10A (タカラバイオ) を用いて各遺伝子の相対発現量を算出した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー配列を表 2 に示した。

第九項 アントシアニン測定

果実からピンセットで剥いだ果皮あるいは VR 細胞を液体窒素にて凍結し、乳鉢と乳棒を用いて粉末になるまで破碎した。破碎した試料 1 g を 10 mL の 1% HCl を含むメタノール溶液に浸漬し、室温、暗黒下で一晩静置した。4,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った後、520 nm における上清の吸光度を測定し、下記の計算式を用いて、Malvidin-3-O-glucoside chloride 換算でアントシアニン量を算出した (Bakker et al., 1986)。

$$\text{アントシアニン量 (g/g-sample weight)} = (A_{520} * MW * \text{希釈率}) / [\epsilon * \text{試料重量 (g)}]$$

A₅₂₀: 520 nm の吸光度

MW: Malvidin-3-O-glucoside chloride の分子量 (529)

ϵ : Malvidin-3-O-glucoside chloride の分子吸光係数 (28,000)

第十項 統計分析

得られたデータに関して、エクセル統計ソフト 2012 (社会情報サービス) を用いて、Tukey 法で統計処理を実施した。

第三節 結果

第一項 アミノ酸が VR 細胞のアントシアニン蓄積へ及ぼす影響

20 種のアミノ酸をそれぞれ VR 細胞に処理した時に VR 細胞に蓄積されるアントシアニン量を図 1 1 に示した。チロシンは難溶性のため本試験には供試できなかった。いずれのアミノ酸も ABA と比べ、VR 細胞に蓄積されるアントシアニン量は少なかった。しかし、1 mM および 5 mM アミノ酸処理において、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、ロイシンおよびアスパラギンで、他のアミノ酸に比べて高いアントシアニン蓄積量が認められた。これらの結果をもとに、1 mM および 5 mM 処理で安定して VR 細胞にアントシアニン蓄積を誘導したイソロイシンおよびフェニルアラニン（図 1 2）を選抜し、以降の試験に供試した。

第二項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が VR 細胞のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

低濃度 ABA (100 μ M)、イソロイシン (10 mM) あるいはフェニルアラニン (10 mM) を VR 細胞に単独で処理した試験区では、対照区と比べ VR 細胞のアントシアニン蓄積量に有意な差は認められなかった（図 1 3）。イソロイシンとフェニルアラニンを同濃度 (10 mM) で併用処理した試験区においても、アントシアニン合成の促進は認められなかった。対して、イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA を併用して処理した試験区では、対照区に加えて低濃度 ABA 処理区と比較しても有意に高いアントシアニン蓄積量を示した。

イソロイシンおよびフェニルアラニンがアントシアニン合成経路に及ぼす影響を調査するために、各処理を施した VR 細胞を用いてアントシアニン合成関連遺伝子の発現解析を行った（図 1 4）。

低濃度 ABA、イソロイシンあるいはフェニルアラニンを単独処理した試験区では *MybA1* 遺伝子の発現変動は認められなかった（図 1 4 A）。また、フェニルアラニンと低濃度 ABA を併用処理も同様に *MybA1* 遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった。対して、イソロイシンと低濃度 ABA を併用処理した試験区では、対照区および低濃度 ABA 処理区に比べて有

意に高い *MybA1* 発現量を示した。

MybA1 遺伝子と同様に、低濃度 ABA、イソロイシンあるいはフェニルアラニンを単独処理した試験区では *UFGT* 遺伝子の発現変動は認められなかった (図 1 4 B)。イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA を併用処理した試験区において、対照区および低濃度 ABA 処理区に比べて *UFGT* 遺伝子の発現量が高い傾向がみられたが、統計的な有意差は認められなかった。

第三項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果粒のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

果粒の軟化が始まった未着色のブドウ果房から採取した果粒を供試した。低濃度 ABA、イソロイシンあるいはフェニルアラニンを果粒に単独で処理した試験区では、対照区と比べ果粒果皮のアントシアニン蓄積量に有意な差は認められなかった (図 1 5)。対して、イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA を併用して処理した試験区では、対照区に比べ有意に高いアントシアニン蓄積量を示した。

第四項 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果房のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

ブドウ樹に形成された果房にイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理した時の果皮に蓄積するアントシアニン量の経時的变化を調査した。

2015 年シーズンにイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理を施した果房の様子を図 1 6 に示した。低濃度 ABA 処理区およびイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理区において、処理後 10 日目の果房では対照区および各アミノ酸単独処理区の果房に比べ多くの果粒が着色していた。果皮に蓄積するアントシアニン量を測定した結果、フェニルアラニンと低濃度 ABA を併用処理した試験区において、処理後 10 日目に対照区および低濃度 ABA 処理区と比較して有意に高いアントシアニン量を示した (図 1 7)。しかしながら、処理後 31 日目になると、フェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理効果は対照区とは引き続き有意差が認められたものの、低濃度 ABA 処理区とは有意差は認められなくなった。収穫時期である処理後 66 日目ではすべて

の処理区で同程度のアントシアニンが果皮に蓄積していた。一方、イソロイシンと低濃度 ABA との併用処理は圃場レベルでは果皮アントシアニン量の蓄積に効果を示さなかった。以上の結果から、2017年シーズンではフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理に絞り、併用処理が果房のアントシアニン蓄積に及ぼす影響を検討した。

2017年シーズンにフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理を施した果房の様子を図 18 に示した。低濃度 ABA 処理区およびフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理区において、処理後 3 日目および 10 日目の果房では対照区およびフェニルアラニン単独処理区の果房に比べ多くの果粒が着色した。果皮に蓄積するアントシアニン量を測定した結果、フェニルアラニンと低濃度 ABA を併用処理した試験区において、処理後 3 日目に対照区よりも有意に高いアントシアニン蓄積量を示した (図 19)。しかし、収穫時期の処理後 64 日目ではすべての処理区で同程度のアントシアニンが果皮に蓄積していた。

以上の結果より、フェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理区は処理後数日で果房のアントシアニン蓄積を促進することが示唆された。

第四節 考察

先行研究として、フェニルアラニンをブドウ樹に散布することにより果実のフェノール化合物およびアロマ化合物の組成が変化することが示されてきたが (Garde-Cerdan et al., 2014; Portu et al., 2015)、その散布効果は安定しておらず (Portu et al., 2017)、ブドウ栽培で実用化されるまでには至っていない。本章では、アミノ酸散布の不安定さおよび ABA 散布量の低減を目指し、アミノ酸を低濃度 ABA と併用することにより果皮のアントシアニン蓄積量が向上するかを評価した。

VR 細胞を用いたアミノ酸のスクリーニングにより、イソロイシンおよびフェニルアラニンはブドウ細胞のアントシアニン合成を促進すると予想された。しかしながら、脱硫した果粒およびブドウ樹の果房にイソロイシンおよびフェニルアラニンを単独処理しても果皮におけるアントシアニン蓄積誘導効果は認められなかった。一方、イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理は、果皮のアントシアニン蓄積量を有意に増加させた。したがって、イソロイシンおよびフェニルアラニンは ABA と相互作用し、ABA によるアントシアニン合成促進効果を補佐する役割を持つと推察された。前述したように、アントシアニン合成を促進する ABA は非常に高価であるため、実際のブドウ栽培では普及していない。ABA の一部をイソロイシンあるいはフェニルアラニンに置き換えることで ABA のアントシアニン合成促進効果を維持しながらも ABA の使用量を大幅に削減できる可能性を示唆したことは、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る。

イソロイシンおよびフェニルアラニンはどのようにして ABA を介したアントシアニン合成誘導に関与しているのだろうか。フェニルアラニンはフェニルプロパノイド経路の初期物質である (図 1、Dixon et al., 2002)。フェニルアラニンをブドウ果実に処理すると細胞内のフェニルアラニン濃度が増加する (Garde-Cerdán et al., 2014; Portu et al., 2015)。フェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理は *MybA1* 遺伝子と *UFGT* 遺伝子の発現量に影響を与えなかった。ABA はフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子の発現量を増加させる (Ban et al., 2003)。PAL はフェニルプロパノイド経路の上流でフェニルアラニンをトランス桂皮酸に合成する反応を触媒している (MacDonald and D’Cunha, 2007)。それゆえ、フェニルアラニンと ABA の併用処理はアントシアニン合成を直接的に促進したので

はなく、フェニルプロパノイド経路の上流を協同的に活性化したものと思われる。フェニルアラニンのブドウ樹への散布はワイン醸造に悪影響を与えないという報告もなされているため (González-Arenzana et al., 2017)、醸造用ブドウの栽培現場で実用化が見込まれる天然生理活性物質と言える。

イソロイシンと低濃度 ABA の併用処理もブドウ果粒の *MybA1* 遺伝子の発現量を増加し、アントシアニン量も向上させたが、イソロイシン自身が植物のアントシアニン合成に関わっているという報告は皆無である。一方、いくつかのイソロイシン派生化合物がアントシアニン合成の誘導に関与することが示唆されている。たとえば、インダノイルイソロイシン (Indanoyl isoleucine) はブドウ細胞にアントシアニン蓄積を促進する (Cai et al., 2012)。インダノイルイソロイシンは植物の食害抵抗シグナルのひとつであり、植物の二次代謝産物の生産に寄与している (Schuler et al., 2004)。また、ジャスモン酸シグナル伝達経路内で重要な役割を果たすジャスモノイルイソロイシン (Jasmonoyl-L-isoleucine) は植物の環境応答、抵抗性発現および着色に関わっている (Rudell et al., 2002; Shan et al., 2009; Turner et al., 2002)。これらのことから、イソロイシンはブドウ細胞内でイソロイシン派生化合物を代謝されることによりアントシアニン合成に関与しているのかもしれない。

昨今、地球温暖化が進む中でのブドウ栽培およびワイン醸造の先行きを懸念する声が多い (De Orduña, 2010)。高温下ではブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量が低下し、着色不良を起こしているという報告も枚挙に暇がない (Mori et al., 2007; Spayd et al., 2002; Tarara et al., 2008)。着色不良に対して環状剥皮および除葉などの耕種的栽培技術が適用されているが、これらの作業には時間や労力を要し、また効果も十分ではない (Carreño et al., 1997; Koshita et al., 2011; Tardaguila et al., 2010)。本章で実施したイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理はブドウ細胞にアントシアニン合成を促進させるが、野外で栽培したブドウ果実の果皮におけるアントシアニン合成促進効果は不安定であることが2年に渡る圃場試験から明らかとなった。フェニルアラニンが圃場散布試験で安定したアントシアニン合成促進効果を示さない理由として、個々の圃場あるいは栽培年におけるブドウ樹の窒素要求量などの生理的条件の相違が影響するのではないかと推察されている (Portu et al., 2017)。それゆえ、更なる圃場散布により、イソロイシン、フェニルアラニンおよび ABA の最適な処理濃度および処理時期を検討し、イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理がアントシアニン合成促進効果を再現性良く発揮する処理条件を見極める必要がある。

なお、本章の実験結果により以下の特許を取得している。

Agricultural and horticultural materials and plant cultivation method which promote coloring in fruit

国際出願番号 PCT/JP2016/0724990

国際公開番号 WO2017/026313 A1

国際出願日 平成 28 年 8 月 11 日

国際公開日 平成 29 年 2 月 16 日

アメリカ特許番号 US20180168153A1

表2 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーの配列

| Accession No. | Gene name | Sequences | |
|----------------------|------------------|------------------|--------------------------|
| XM_002282480 | <i>VvMybA1</i> | Fw | GAAGTCCTCTTCCAGCCATCTC |
| | | Rv | TTGACCCACCACTAAGCACAAT |
| XM_0022769994 | <i>VvUFGT</i> | Fw | TCACTCTCCACCCATGTTTACACT |
| | | Rv | AATTGAGCAGCTCGTCTTCACG |
| XM_010666609 | <i>VvActin</i> | Fw | ATTAGGCTTCACAATTTGTTGGGG |
| | | Rv | TATCTCTCCCTTCTTCCTGGAAC |

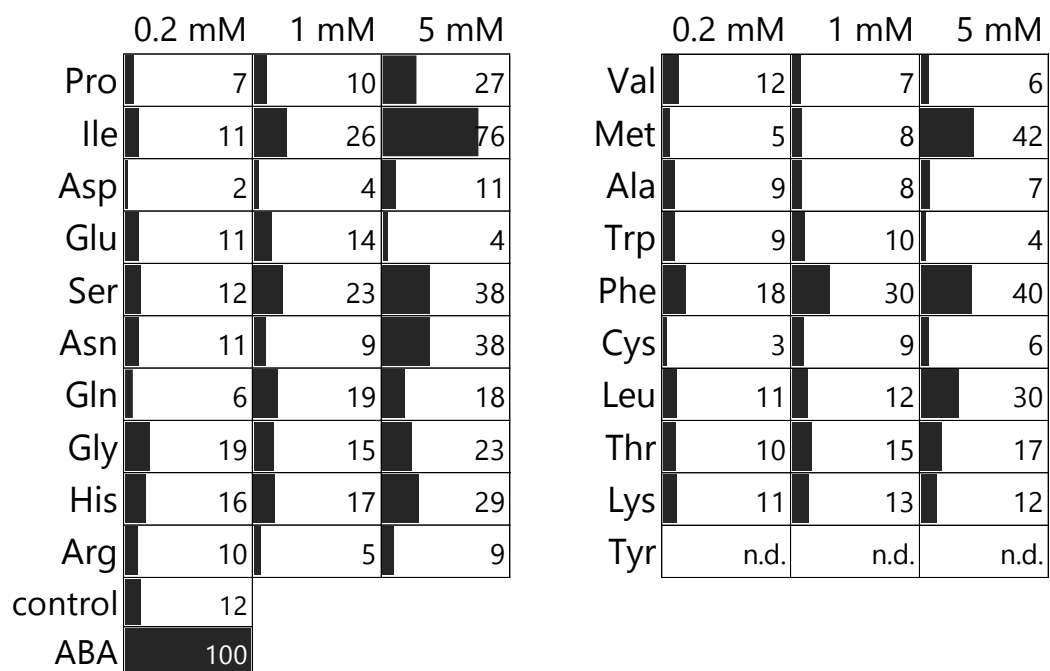


図 1.1 アミノ酸が VR 細胞のアントシアニン蓄積へ及ぼす影響

各アミノ酸は三文字表記で記した

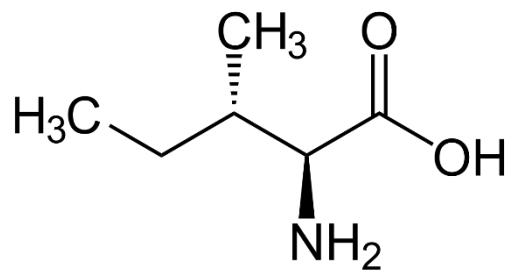
Contol: 対照区 (水処理)、ABA: 0.2 mM ABA 処理区

データは ABA 処理区で蓄積されたアントシアニン量を 100 と

し、その相対値 (%) で示した

n.d.: not detrmined

イソロイシン



フェニルアラニン

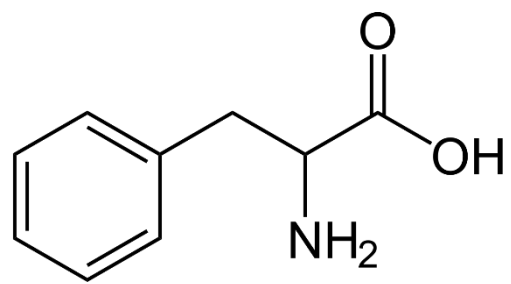
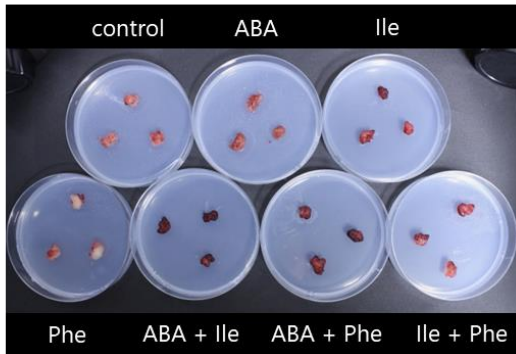


図 1 2 イソロイシンおよびフェニルアラニンの構造

(A)



(B)

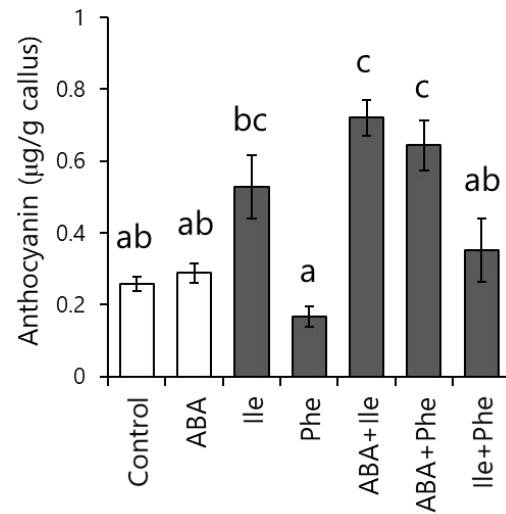


図 1 3 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が VR 細胞のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

(A) 処理後 5 日目の VR 細胞

(B) 処理後 5 日目のアントシアニン蓄積量

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 100 µM ABA 処理区

Ile: 10 mM イソロイシン処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Ile: 100 µM ABA + 10 mM イソロイシン併用処理区

ABA + Phe: 100 µM ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

Ile + Phe: 10 mM イソロイシン + 10 mM フェニルアラニン併用
処理区

データは 平均値 ± S.E (n = 3) で示した

a、b、c: 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

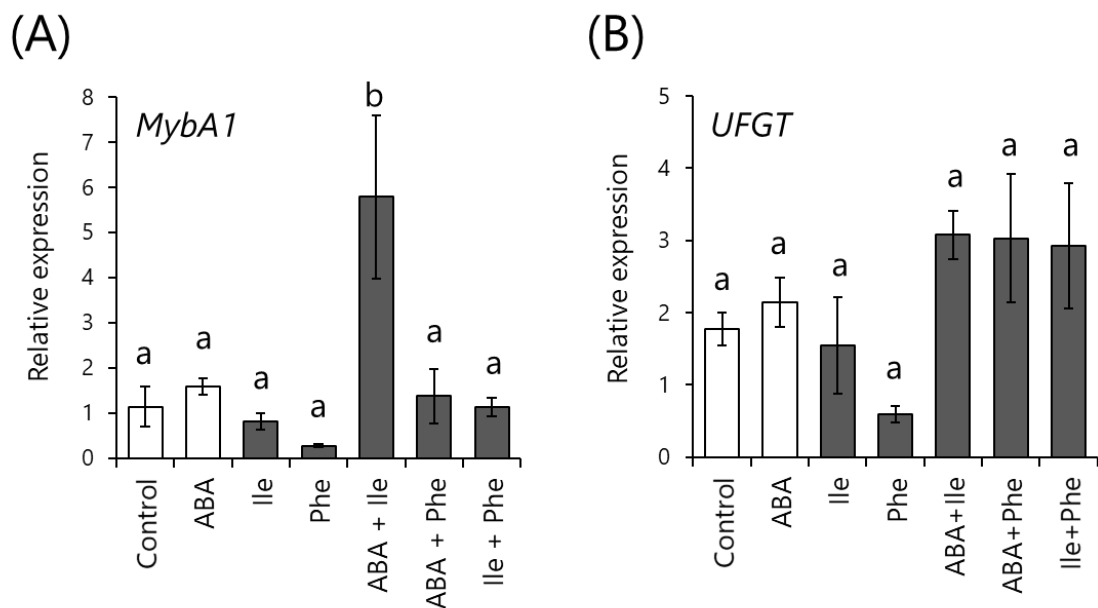


図 14 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が VR 細胞のアントシアニン合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響

処理後 5 日目に遺伝子解析を実施した (A) *MybA1*、(B) *UFGT*

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 100 μ M ABA 処理区

Ile: 10 mM イソロイシン処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Ile: 100 μ M ABA + 10 mM イソロイシン併用処理区

ABA + Phe: 100 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

Ile + Phe: 10 mM イソロイシン + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

データは 平均値 \pm S.E (n = 3) で示した

a、b: 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

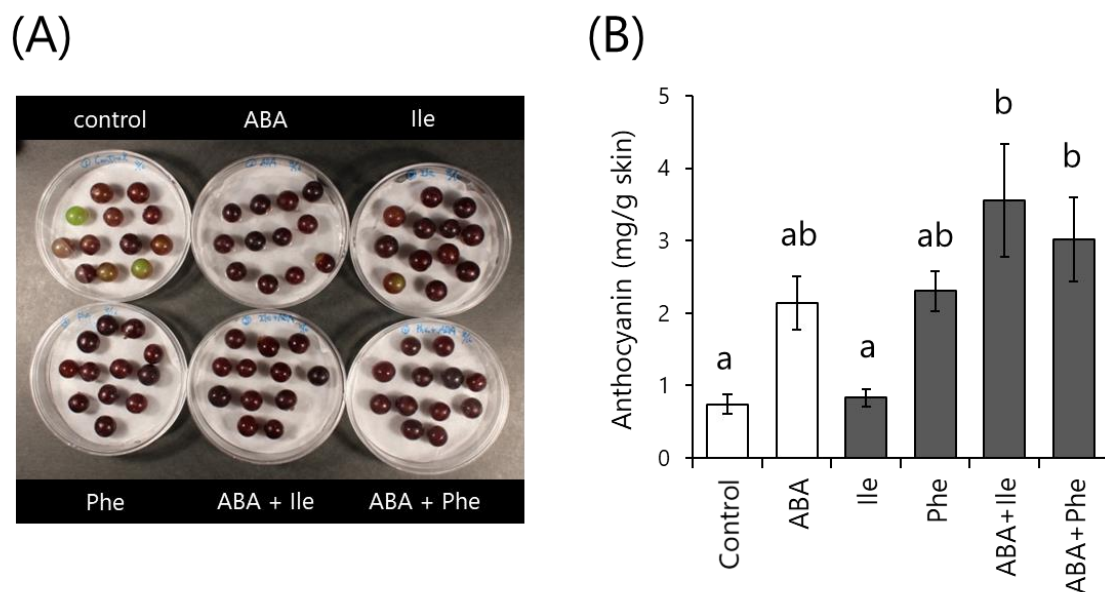


図 15 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果粒のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

(A) 処理後 8 日目の果粒

(B) 処理後 8 日目の 果粒果皮におけるアントシアニン蓄積量

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 100 μ M ABA 処理区

Ile: 10 mM イソロイシン処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Ile: 100 μ M ABA + 10 mM イソロイシン併用処理区

ABA + Phe: 100 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

データは 平均値 \pm S.E (n = 4) で示した

a、b : 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

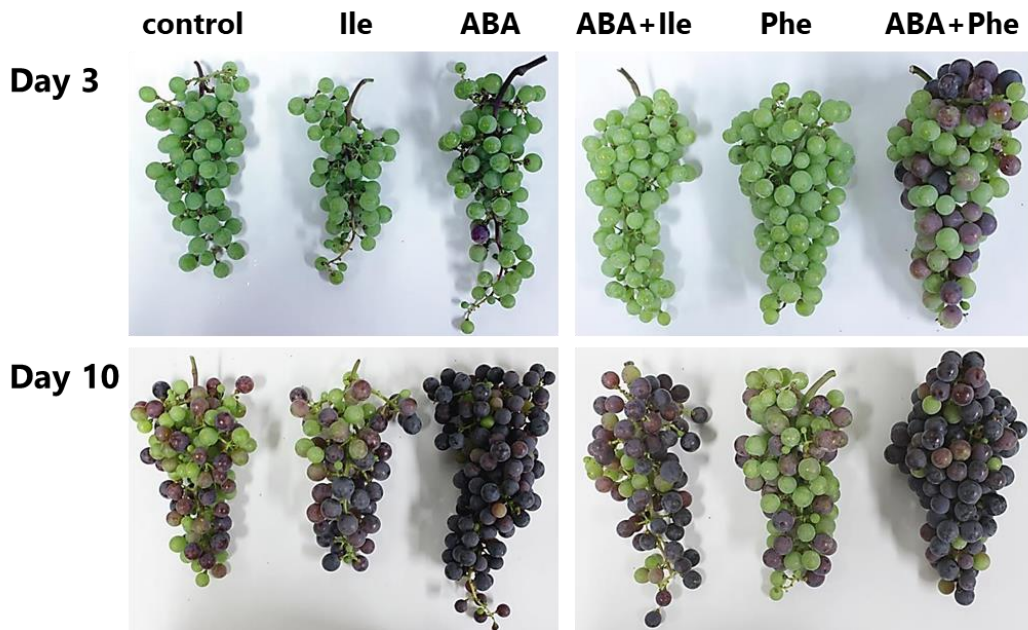


図 1 6 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理を施した果房（2015 年シーズン）

Control: 対照区（水処理）、ABA: 380 μ M ABA 処理区

Ile: 10 mM イソロイシン処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Ile: 380 μ M ABA + 10 mM イソロイシン併用処理区

ABA + Phe: 380 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

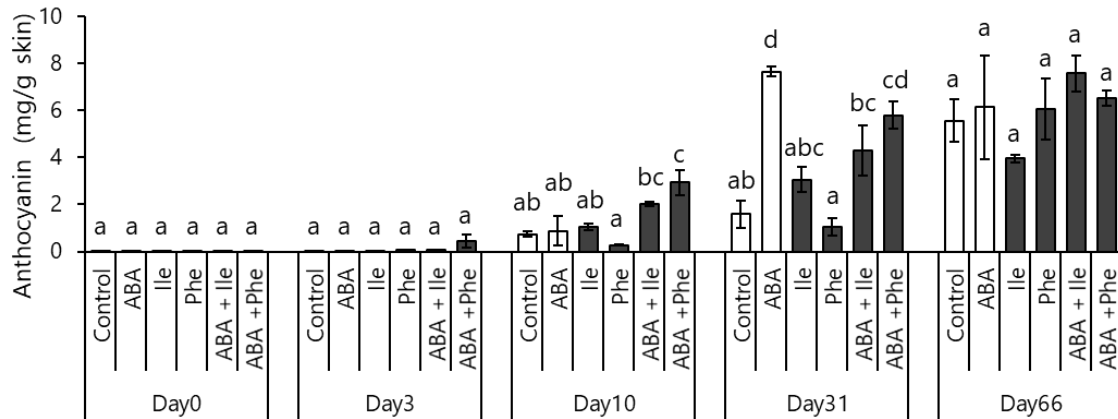


図 17 イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果房のアントシアニン蓄積に及ぼす影響 (2015 年シーズン)

Day 0: 処理開始日

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 380 μ M ABA 処理区

Ile: 10 mM イソロイシン処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Ile: 380 μ M ABA + 10 mM イソロイシン併用処理区

ABA + Phe: 380 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

データは 平均値 \pm S.E (n = 3) で示した

a、b、c: 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

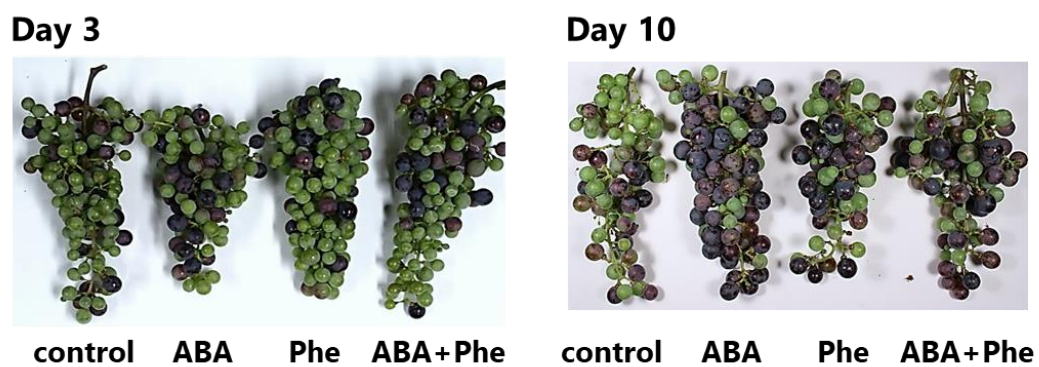


図 1 8 フェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理を施した果房
(2017 年シーズン)

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 380 μ M ABA 処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Phe: 380 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

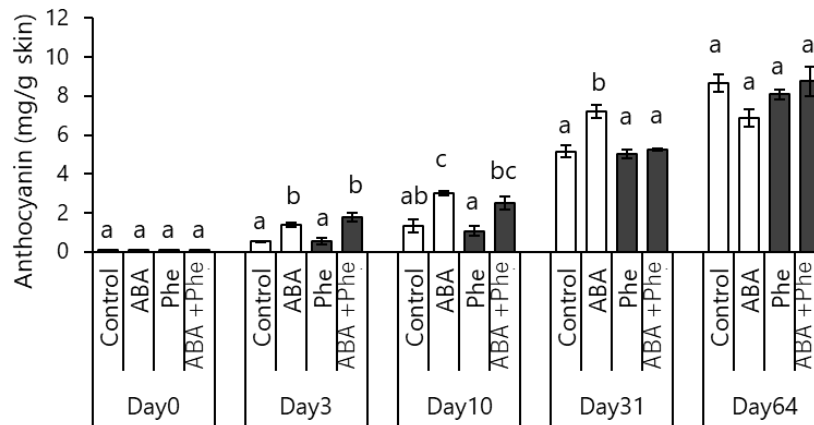


図 19 フェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理が果房のアントシアニン蓄積に及ぼす影響 (2017 年シーズン)

Day 0: 処理開始日

Control: 対照区 (水処理)、ABA: 380 μ M ABA 処理区

Phe: 10 mM フェニルアラニン処理区

ABA + Phe: 380 μ M ABA + 10 mM フェニルアラニン併用処理区

データは 平均値 \pm S.E (n = 3) で示した

a、b、c: 異なる文字間で有意差あり (P < 0.05、Tukey's test)

第四章 総合考察

ワインの色調（外観）は、香り、味、余韻などと共にワインを評価する重要な評価項目のひとつであり、そのワインの第一印象に強く貢献する。赤ワインの色調はブドウ果皮に含まれるアントシアニンに多くは委ねられるため、赤ワインの品質はブドウ果皮色に含まれるアントシアニン蓄積量によって決定すると言っても過言ではない。しかしながら、全世界的に認められる近年の気候変動の影響により、特に栽培環境の高温化により、果皮に蓄積するアントシアニン量が低下する現象が品パスしている (Downy, 2007)。着色不良の果実から醸造したワインは色調の観点から低品質と判断されるため、ワインの価格は低迷し、大きな経済的損失を生んでいる。

前述したように、現在までに様々な方法でブドウ果実の着色不良に対する対応策がなされてきた。現在、我が国で果皮の着色促進を促すために実用的に行われている対応策は、摘葉 (Chorti et al., 2010) および環状剥皮 (Brar et al., 2008) であろう。摘葉はフルーツゾーンの葉を除くことにより房に当たる日射量を増やす技術であるが、畑と太陽の位置および品種によって除葉する時期や除葉する葉の枚数などを微調整する必要がある、言うほどに簡単な技術ではない。環状剥皮は主に生食用ブドウで実用化されている栽培技術である。環状剥皮では樹皮を形成層の部分まで完全に剥ぎ取ることで師管を除去するが、樹皮を剥がす時に施術者の経験と腕を必要とする。すなわち、樹皮を深く剥いだ場合は木質部分の導管を傷つけてしまい、根からの水がブドウ樹に行き渡らなくなり、最悪の場合ブドウ樹が枯死する。一方、樹皮の剥ぎが浅いと師管を除去できず、環状剥皮の効果は見込めない。このように、現在の着色促進を促すための栽培技術はブドウ栽培家の負担が非常に大きい。上記の背景を鑑み、本研究ではブドウ栽培家の誰もが簡易にそして低コストで行えるブドウ果皮色促進技術として、天然物によるアントシアニン合成促進効果を評価し、その分子メカニズムの一端を解明することにより、新規技術としての基盤形成を試みた。

本研究において、バニルアセトン単独処理で、イソロイシンおよびフェニルアラニンは低濃度の ABA と併用処理することにより果皮におけるアントシアニン合成を促進することが示された。これら天然物はいずれも安価で無毒な物質である。したがって、圃場でこれらの天然物をブドウ樹に処理しても環境への負荷および人体への影響は極めて小さいと考えられるため、これら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と

言える。天然物の処理方法としては、本研究で行った散布法に加え、ジベレリン処理で実施される果房の浸漬法なども適応可能である。これらの処理方法は既に我が国で広く実用化されている、誰もが出来る簡易な方法である。以上のことから、本研究の当初目標であった「誰もが簡易にそして低コストで行えるブドウ果皮色促進技術」として、バニルアセトン散布およびイソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用散布は有効であると結論付けた。

しかしながら、これら天然物を圃場散布した場合、年によって天然物の着色促進効果は変動した。たとえば、2015 年の圃場散布試験ではフェニルアラニンと低濃度 ABA を併用処理したブドウ樹で低濃度 ABA に対するフェニルアラニンの相加効果が確認されたが、2017 年では併用処理区と低濃度 ABA 単独処理区では有意な差は認められなかった。この結果は栽培地域の気象条件により天然物の着色促進効果に差が生じる可能性を示唆する。フェニルアラニンを単独でブドウ樹に散布した場合、フェニルアラニンによるアントシアニン合成促進効果は安定せず、その原因はブドウ樹の窒素要求量などの条件ではないかと推察された (Portu et al., 2017)。ブドウ樹への窒素施肥は果皮に蓄積するアントシアニン量を増大するものの、過剰な窒素施肥は果皮のフラボノール蓄積を遅らせるという報告もある (Keller et al., 1998; Delgado et al., 2004)。本研究は山梨県甲府市の一圃場での、一品種を供試した試験結果であり、栽培環境および品種が異なる場合、本研究で認められた天然物によるアントシアニン合成促進効果は認められない場合も想定される。したがって、本研究で選抜した天然物散布をブドウの果皮色を促進する技術として実用化するためには、圃場の環境条件および土壌条件と天然物の果皮色促進効果との相関関係をモニタリングすると同時に、果皮色促進効果に最適な天然物の濃度範囲および散布時期、散布回数等を詳細に調査し、誰もが簡易に実行できる技術マニュアルを作成する必要がある。

また、本研究では天然物散布によるワイン醸造への影響は調査していない。本研究で選抜した天然物はフェニルプロパノイド経路を活性化し、アントシアニン合成を促進する。フェニルプロパノイド経路はアントシアニン合成経路につながる以外にも複数の経路に分岐する (Kobayashi et al., 2011)。加えて、アントシアニン合成経路からの分岐により quercetin、(2,3-trans) catechin、(2,3-cis) epicatechin、myricetin などが生産される (後藤, 2004)。本研究により、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が明らかとなったが、アントシアニン合成経路から分岐するカテキン類およびケルセチン類のバ

ニリルアセトンによる量的変化は検討していない。カテキン類およびケルセチン類ともに、ワインの呈味に影響するため (Kobayashi et al., 2011)、バニリルアセトンがワインの品質に影響する可能性は十分考えられる。これは、イソロイシンあるいはフェニルアラニンと低濃度 ABA の併用処理にも言えることである。したがって、これら天然物を散布したブドウ果実を用いてワイン醸造を行い、これら天然物がワイン品質へ負の影響を及ぼさないことを早急に明らかにする必要がある。

地球温暖化によりブドウ果実の着色は今後さらに悪化することが予想され、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。

参考文献

- 秋久俊博, 小池一男, 木島孝夫, 羽野芳生, 堀田清, 増田和夫, 宮澤三雄, 安川憲. (2009) 資源天然物化学 第 11 版 共立出版株式会社.
- Bakker J, Preston NW and Timberlake CF.** (1986) The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 37:121-126.
- Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N and Horiuchi S.** (2003) Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 586-589.
- Bitsch R, Netzel M, Frank T, Strass G and Bitsch I.** (2004) Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *BioMed Research International* 2004:293-298.
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D and Robinson SP.** (2006) Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology* 140:279-291.
- Brar HS, Singh Z, Swinny E and 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 Science* 175:885-897.
- Bray EA.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Cai Z, Knorr D and Smetanska I.** (2012) Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-L-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology* 50:29-34.
- Calvo P, Nelson L and Kloepper JW.** (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383:3-41.
- Carreño J, Faraj S and Martinez A.** (1998) Effects of girdling and covering mesh on ripening, colour and fruit characteristics of 'Italia' grapes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73:103-106.

- Castellarin SD, Di Gaspero G, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillaed S, Adam-Blondon AF and Testolin R.** (2006) Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.) : genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics* 7:12.
- Chalker-Scott L.** (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology* 70:1-9.
- Chorti E, Guidoni S, Ferrandino A and Novello V.** (2010) Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 61:23-30.
- Coombe BG and Hale CR.** (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51:629-634.
- De Orduña RM.** (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* 43:1844-1855.
- De Pascual-Teresa S and Sanchez-Ballesta MT.** (2008) Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews* 7:281-299.
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC and Cramer GR.** (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429.
- Delgado R, Martín P, Del Álamo M and González MR.** (2004) Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:623-630.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS and Wang L.** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3:371-390.
- Downey MO, Dokoozlian NK and Krstic MP.** (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:257-268.
- Ford CM, Boss PK and Høj PB.** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *Journal of*

Biological Chemistry 273:9224-9233.

- Gagné S, Estève K, Deytieux C, Saucier C and Gény L.** (2006) Influence of abscisic acid in triggering “véraison” in grape berry skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 40:7-14.
- Garde-Cerdán T, López R, Portu J, González-Arenzana L, López-Alfaro I and Santamaría P.** (2014) Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food Chemistry* 163:136-141.
- González-Arenzana L, Portu J, López R, Garijo P, Garde-Cerdán T and López-Alfaro I.** (2017) Phenylalanine and urea foliar application: Effect on grape and must microbiota. *International Journal of Food Microbiology* 245:88-97.
- Glories Y.** (1988) Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties. *Progress Clinical and Biological Research* 280:123-134.
- 後藤奈美. (2004) ブドウのアントシアニン合成系遺伝子とその発現制御. *日本醸造協会誌* 99:850-856.
- Guidoni S, Allara P and Schubert A.** (2002) Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 224-226.
- Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, Kubo T, Itoh H and Wada R.** (2001) ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 90:121-130.
- Hocquigny S, Pelsy F, Dumas V, Kindt S, Heloir MC and Merdinoglu D.** (2004) Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Gene* 47:579-589.
- Holton TA and Cornish EC.** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-1083.
- Hrazdina G, Parsons GF and Mattick LR.** (1984) Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 35:220-227.
- Ishiai S, Kondo H, Hattori T, Mikami M, Aoki Y, Enoki S and Suzuki S.** (2016) Hordenine is responsible for plant defense response through jasmonate-dependent defense pathway.

Physiological and Molecular Plant Pathology 96:94-100.

- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S and Esaka M.** (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167:247-252.
- Jing P, Bomser JA, Schwartz SJ, He J, Magnuson BA and Giusti MM.** (200) Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:9391-9398.
- Jones GV, White MA, Cooper OR and Storchmann K.** (2005) Climate change and global wine quality. *Climatic Change* 73:319-43.
- Kataoka I, Sugiura A, Utsunomiya N and Tomana T.** (1982) Effect of abscisic acid and defoliation on anthocyanin accumulation in Kyoho grapes (*Vitis vinifera* L. × *V. labruscana* Bailey). *Vitis* 21:325-332.
- Keller M and Hrazdina G.** (1998) Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 49:341-349.
- Kobayashi H, Suzuki Y, Ajimura K, Konno T, Suzuki S and Saito H.** (2011) Characterization of phenolic compounds biosynthesized in pink-colored skin of Japanese indigenous *Vitis vinifera* cv. Koshu grape. *Plant Biotechnology Reports* 5:79-88.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N and Hirochika H.** (2005) Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 74:196-203.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N and Hirochika H.** (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304:982.
- Koide T, Kamei H, Hashimoto Y, Kojima T and Hasegawa M.** (1996) Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 11:273-277.
- Koshita Y, Yamane T, Yakushiji H, Azuma A and Mitani N.** (2011) Regulation of skin color in 'Aki Queen' grapes: interactive effects of temperature, girdling, and leaf shading treatments on coloration and total soluble solids. *Scientia Horticulturae* 129:98-101.
- Koyama K, Sadamatsu K and Goto-Yamamoto N.** (2010) Abscisic acid stimulated ripening and

- gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional & Integrative Genomics* 10:367-381.
- Lovisol C, Perrone I, Carra A, Ferrandino A, Flexas J, Medrano H and Schubert A.** (2010) Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology* 37:98-116.
- MacDonald MJ and D’Cunha GB.** (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85:273-282.
- Matus JT, Loyola R, Vega A, Neira AP, Bordeu E, Johnson PA and Alcalde JA.** (2009) Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany* 60:853-867.
- Mazza G and Francis FJ.** (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Food Science & Nutrition* 35:341-371.
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M and Hashizume K.** (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under temperature. *Journal of Experimental Botany* 58:1935-1945.
- Mori K, Sugaya S and Gemma H.** (2005) Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105:319-330.
- Ozden M, Demirel U and Kahraman A.** (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae* 119:163-168.
- Peppi MC, Walker MA and Fidelibus MW.** (2008) Application of abscisic acid rapidly upregulated *UFGT* gene expression and improved color of grape berries. *Vitis* 47:11-24.
- Portu J, Gonzalez-Arenzana L, Hermosín-Gutiérrez I, Santamaría P and Garde-Cerdán T.** (2015) Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. *Food Chemistry* 180:55-63.
- Portu J, López R, Baroja E, Santamaría P and 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 Chemistry* 201:213-221.
- Portu J, Santamaría P, López R and Garde-Cerdán T.** (2017) Phenolic composition of

- Tempranillo grapes following foliar applications of phenylalanine and urea: A two-year study. *Scientia Horticulturae* 219:191-199.
- Quiroga AM, Berli FJ, Moreno D, Cavagnaro JB and Bottini R.** (2009) Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:28-35.
- Rudell DR, Mattheis JP, Fan X and Fellman JK.** (2002) Methyl jasmonate enhances anthocyanin accumulation and modifies production of phenolics and pigments in Fuji' Apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:435-441.
- Saito N, Inomata M, Tomita A, Tezuka T, Murakami Y, Hagihara E and Udo Y.** (2008) Global warming tendency in recent years and influence forecasts to fruit production in Yamanashi. In: *Proceedings of The annual conference for the Society of Agricultural Meteorology of Japan* 08sp(0):81 (in Japanese).
- Schuler G, Mithofer A, Baldwin IT, Berger S, Ebel J, Santos JG, Herrmann G, Holscher D, Kramell R, Kutchan TM, Maucher H, Schneider B, Stenzel I, Wasternack C and Boland W.** (2004) Coronalon: A powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Letter* 563:17-22.
- Shan X, Zhang Y, Peng W, Wang Z and Xie D.** (2009) Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 60:3849-3860.
- Shimazaki M, Fujita K, Kobayashi H and Suzuki S.** (2011) Pink-colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene. *PLoS ONE* 6:e21308
- Spayd SE, Tarara JM, Mee DL and Ferguson JC.** (2002) Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53:171-182.
- Tagami Y.** (2009) Study on the viticulture and climate change in central Japan. *Memoirs of the Faculty of Human Development University of Toyama* 4:83-105 (in Japanese).
- Takahama U.** (2004) Oxidation of vacuolar and apoplasmic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3:207-219.

田中紗弓. (2013) ブドウ栽培への応用を目指した天然生理活性物質の探索. 山梨大学卒業論文.

Tarara JM, Lee J, Spayd SE and Scagel CF. (2008) Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 59:235-247.

Tardaguila J, de Toda FM, Poni S and Diago MP. (2010) Impact of early leaf removal on yield and fruit and wine composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan. *American Journal of Enology and Viticulture* 61:372-381.

Turner JG, Ellis C and Devoto A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14:S153-S164.

Tedesco I, Russo GL, Nazzaro F, Russo M and Palumbo R. (2001) Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12:505-511.

Weaver R J and Singh IS. (1978) Occurrence of endogenous ethylene and effect of plant regulators on ethylene production in the grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 29:282-285.

Wheeler S, Loveys B, Ford C and Davies C. (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15:195-204.

Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T and Minoda Y. (1983) Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:2185-2191.

Yamane T, Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Koshita Y and Kobayashi S. (2006) Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:54-59.

摘要

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、これらの手法は高い技術を必要とし、また作業にかかる時間が極めて長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。

本研究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。天然物はいずれも自然界に存在する、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。

1. バニルルアセトンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果

バニルルアセトン [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) を本試験に供試した。ベレゾーン期を迎えた果房にバニルアセトン処理し、果皮アントシアニン蓄積量および糖酸比の測定を行った。バニルアセトン処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処理を行い、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。バニルアセトンの処理濃度が増加するにしたがって 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ていなかった。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。

2. イソロイシンおよびフェニルアラニンがブドウ果実の果皮アントシアニン蓄積量に及ぼす効果

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。たとえば、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を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

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る。

3. 結論

今後さらに進行すると予想される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ため、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。

SUMMARY OF DISSERTATION

TITLE Impact of natural products on the accumulation of anthocyanin in berry skin and the elucidation of their molecular mechanisms

Berry skin color is a crucial determinant of red/black grape berry and red wine qualities and mainly determined by anthocyanin contents. However, recently, grape berry coloration is influenced by global warming. Global warming is accelerating in major wine-producing countries. A simulation model has predicted an average temperature increase of 2 °C in viticulture regions in the next 50 years. That prediction has suggested that future warming may give rise to the shift of wine-producing areas worldwide. Similarly, a meteorological observatory in Japan has announced that the average temperature in Yamanashi Prefecture, the major producer of white and red wines in Japan, has been rising by 0.042 °C every year from 1961 to date.

A number of practical techniques have been developed to maintain and improve grape berry skin color. To maintain or improve berry coloration, girdling, leaf removal, and cluster thinning have been examined. However, these techniques will involve a labor, time and cost.

This study determined whether natural products can improve berry skin color. Natural products are chemical compounds found in nature and produced by living organisms. Use of natural products as one of viticultural practices will contribute to environmentally friendly agriculture. This study investigated the effects of vanillylacetone, isoleucine and phenylalanine on the anthocyanin accumulation in berry skin and also elucidated the molecular mechanisms related to upregulation of anthocyanin accumulation by these natural products.

1. Impact of vanillylacetone on the accumulation of anthocyanin in berry skin

Vanillylacetone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) butan-2-one, VA] is a pungent component in ginger and is widely known as a nontoxic and inexpensive bioactive natural product. This study investigated the effect of VA on anthocyanin accumulation with aim of improving grape berry coloration. Spraying the berries of Muscat Bailey A (*Vitis labrusca* × *V. linsecumii* × *V. vinifera*) with VA at veraison increased sugar/acid ratio, an indicator of maturation, and total anthocyanin

accumulation. To elucidate the molecular mechanism underlying the effect of VA on anthocyanin accumulation, in vitro VA treatment of a grapevine cell culture was carried out. Endogenous abscisic acid (ABA) content was higher in the VA-treated cell cultures than in control. Consistent with this, the relative expression levels of anthocyanin-synthesis-related genes, including *DFR*, *LDOX*, *MybA1* and *UFGT*, in VA-treated cell cultures were much higher than those in control, and higher total anthocyanin accumulation was noted in the VA-treated cell cultures as well. These results suggest that VA up-regulates the expression of genes leading to anthocyanin accumulation by inducing endogenous ABA. Thus, our findings point to the possibility of adopting VA treatment as a new, simple, and inexpensive technique for grape berry coloration.

2. Impact of isoleucine and phenylalanine on the accumulation of anthocyanin in berry skin

Amino acids are organic compounds and constituent elements of all organisms. Amino acids play important roles in plant growth and secondary metabolite production in plants. The application of amino acids to grapevine is generally accomplished through the use of fertilizers to increase nitrogen-containing substances in grape berry. Foliar treatment with phenylalanine affected phenolic content and aroma composition in grapevine. Based on these scientific findings, amino acids have been used in viticulture as biostimulants for physiological state or supplements for nitrogen source.

This study investigated the effects of combination treatment with amino acid and a low concentration of ABA on anthocyanin accumulation in grapes. Among the amino acids tested, isoleucine and phenylalanine induced anthocyanin biosynthesis in grape cell cultures. The combination treatment with isoleucine or phenylalanine and a low concentration of ABA enhanced anthocyanin accumulation in grape cell cultures and detached grape berries. The combination treatment with isoleucine, but not phenylalanine, and a low concentration of ABA upregulated *MybA1* expression. Field-grown grapevines received combination treatment with isoleucine or phenylalanine, and a low concentration of ABA in two growing seasons. The combination treatment with isoleucine or phenylalanine, and a low concentration of ABA accelerated anthocyanin accumulation in grape berry skins of field-grown grapevines. The effects on anthocyanin accumulation became negligible out at harvest period. ABA is a plant hormone and regulates the synthesis of anthocyanin in plants. Exogenous ABA application to grapevine stimulates berry ripening and anthocyanin accumulation in grape berry. However, ABA has not been widely applied

in viticulture, because synthetic ABA is expensive. This study demonstrated that exogenous isoleucine or phenylalanine interacted with ABA-mediated anthocyanin accumulation in grape berry skins of field-grown grapevines when the activity of ABA used to treat grapevines is inadequate. The combination treatment of isoleucine or phenylalanine, and a low concentration of ABA would be a new viticultural practice for maintaining or improving anthocyanin accumulation in grape berry skins.

3. Conclusions

Because global warming has resulted in loss of anthocyanin content in grape berry skin, viticulturists face the tough challenge of maintaining grape berry skin color. The goal of this study was to examine whether the application of natural products to grapevines can maintain and improve grape berry skin color. Practical techniques to maintain and improve grape berry skin color are required by viticulturists. This study proposes that the foliar treatment of inexpensive natural products would be a new tool for maintaining and improving anthocyanin accumulation in grape berry skins.

既発表論文

第二章

Enoki S, Hattori T, Ishiai S, Tanaka S, Mikami M, Arita K, Nagasaka S and Suzuki S. (2017) Vanillylacetone up-regulates anthocyanin accumulation and expression of anthocyanin biosynthetic genes by inducing endogenous abscisic acid in grapevine tissues. *Journal of Plant Physiology* 219:22-27.

第三章

Hattori T, Chen Y, Enoki S, Igarashi D and Suzuki S. (2019) Exogenous isoleucine and phenylalanine interact with abscisic acid-mediated anthocyanin accumulation in grape. *Folia Horticulturae* in press (accepted on 11-12-2018).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇意ご指導および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附属ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門の鈴木俊二教授に心より深謝致します。

本学位論文において副査を務めていただいた、柳田 藤寿教授、奥田 徹教授、望月 和樹教授、岸本 宗和准教授、久本 雅嗣准教授には数々のご助言とご指導を賜りました。この場を借りて深謝申し上げます。

本学位論文の研究に供試したブドウの栽培および管理を行って頂いた山梨大学工学部附属ものづくり教育実践センターの杉山 啓介氏、山本 哲楠氏および小林 勇太氏に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導およびご配慮を賜りました味の素株式会社イノベーション研究所 フロンティア研究所の五十嵐 大亮博士および陳 陽博士に感謝致します。

最後に、本学位論文の研究を行うにあたり苦楽を共にし、支え続けてくれた山梨大学ワイン科学研究センターの研究員、大学院生、学部4年生の皆様に深く感謝致します。

2019年9月 服部 智輝