

博士論文

ブドウ果実における
フラボノールとフラバン-3-オール類の
蓄積と生合成遺伝子発現

Accumulation and Biosynthetic Gene Expression
of Flavonols and Flavan-3-ols in Grape Berries

国立大学法人 横浜国立大学大学院
環境情報学府

奥田 晃子
Akiko Okuda

2008年3月

目次

凡例	iii
序章	1
第1章　ブドウのフラボノール合成酵素遺伝子の器官特異的転写、 及びブドウ果皮におけるフラボノールの生合成に及ぼす 植物ホルモンと遮光の影響	
1.1. 緒言	8
1.2. 材料と方法	11
1.3. 結果	18
1.4. 考察	24
1.5. 要旨	27
第2章　ブドウ果実におけるアントシアニン還元酵素遺伝子の 発現とフラバン-3-オール類の蓄積	
2.1. 緒言	28
2.2. 材料と方法	31
2.3. 結果	34
2.4. 考察	39
2.5. 要旨	41
第3章　ブドウ果実におけるプロアントシアニジンの生合成に 及ぼす遮光の影響	
3.1. 緒言	42
3.2. 材料と方法	45
3.3. 結果	48
3.4. 考察	54
3.5. 要旨	57

総合考察.....	58
参考文献.....	60
公表論文.....	67
謝辞	68

凡例

本論文中に以下の略号を用いた。

ABA	abscisic acid
AMV	avian myeloblastosis virus
ANR	anthocyanidin reductase
ATA	aurintricarboxylic acid
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHS	chalcone synthase
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DFR	dihydroflavonol 4-reductase
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EST	expressed sequence tag
F3H	flavanone 3-hydroxylase
F3'H	flavonoid 3'-hydroxylase
F3'5'H	flavonoid 3',5'-hydroxylase
FLS	flavonol synthase
FNS	flavone synthase
FW	fresh weight
HPLC	high-performance liquid chromatography
LAR	leucoanthocyanidin reductase
LDOX	leucoanthocyanidin dioxygenase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAA	1-naphthaleneacetic acid
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

PAL	phenylalanine ammonia-lyase
PCR	polymerase chain reaction
PTFE	poly(tetrafluoroethylene)
PVPP	poly(vinylpyrrolidone)
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium chloride/sodium citrate
TIGR	The Institute for Genomic Research
UDP	uridine diphosphate
UFGT	UDP-glucose:flavonoid 3- <i>O</i> -glucosyl transferase

序章

「良いワインは良いブドウから」と言われるように、醸造技術が一定水準以上ならワインの品質はブドウそのものの品質で決まるとされている。すなわち、良いワインをつくるために最も重要なことは、原料に良いブドウを選択することである。

ワインには多くのフェノール化合物が含まれており、その種類や量によりワインの品質が大きく左右される。その大部分がブドウ果実に由来する。ワインのフェノール化合物には非フラボノイド化合物（ヒドロキシ桂皮酸エステル、ヒドロキシ安息香酸エステル、スチルベン）とフラボノイド化合物（フラバン-3-オール、フラボノール、アントシアニン）がある。ブドウ果汁のみを発酵させて造られる白ワインに比べ、赤ワインは果皮や種子と共に発酵（醸し発酵）させるため、フェノール化合物が果皮や種子から多く抽出されてワインに移行する。グラス1杯の白ワインに含まれるフェノール化合物の総量が40 mg程度であるのに対し、赤ワインは200 mgである。フェノール化合物は赤ワインの色、苦味・渋味に寄与している。また、フェノール化合物は容易に酸化するため抗酸化性があり、保存料としての役割を担って主に赤ワインの長期貯蔵を可能にしている。フェノール化合物がワイン中で空気に触れて酸化すると褐変する。

ワインのフラボノイド化合物は全て、水酸基をもつ複合的な芳香族環からなるポリフェノールである。特有の3つの環構造がフラボノイド化合物の特徴となっている（Fig. 1）。中央に酸素を含むピラン環（C環）があり、それが芳香族環（A環）と融合し、もうひとつの芳香族環（B環）に単結合でつながっている。ブドウやワインに含まれるフラボノイド化合物は全て、A環の5位と7位が水酸基で置換されている。フラボノイド化合物はC環における酸化状態と置換の違いによって分類される。例えば、C環が飽和していればフラバン（Fig. 1A, B）、4位がケトンで2位と3位の間が不飽和であればフラボン（Fig. 1D）、完全な芳香族環で正電荷を有していればアントシアニジン（Fig. 1E）になる。

フラバン-3-オールのように語尾にオールが付くと、C環が水酸基で置換されている (Fig. 1A, B)。また、B環の置換パターンによってフラボノイド化合物の種類がさらに分類される。通常は4位が水酸基で置換されており、さらに3位や5位が水酸基やメトキシル基で置換されている場合がある。

フラボノイド化合物は、赤ワインのフェノール化合物の大部分 (80~90%) を構成しており、発酵工程でブドウの果皮や種子から抽出される。赤ワインは、果皮と種子の存在下で4~10日あるいはそれ以上の期間、果汁の糖質をアルコール (ポリフェノール抽出の溶媒になる。) に変える発酵によって製造されるので、赤ワインには多量のポリフェノールが十分に抽出される。典型的なワイン製造において、ポリフェノールの約半分が醸し発酵中に抽出される。ポリフェノールが豊富に含まれる赤ワインは抗酸化性がある健康に良いとされ、1990年代後半の赤ワインブームを後押しした。ワインの主要なフラボノイド化合物はフラバノール類、アントシアニン類、フラボノール類である。

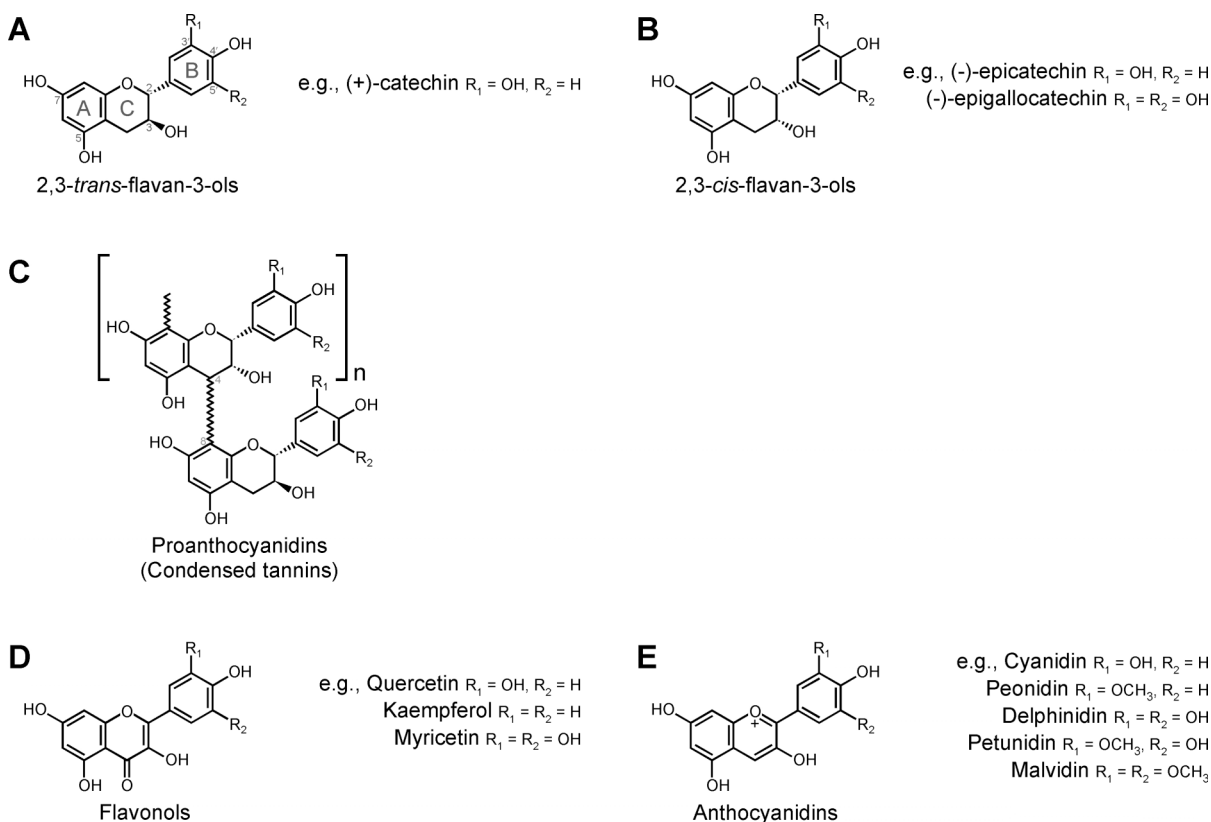


Fig. 1. Flavonoids in wine. R_1 and R_2 are H or OH.

フラバノールは、ブドウとワインにおいて最も豊富に含まれるフラボノイド化合物で、ブドウにおいては種子と果皮に含まれる。それは赤ワインの渋味や苦味の成分で、味わいの深さ（ボディ）を構成する重要な要素である。そして、C環におけるアルコール基の位置を示して、しばしば特にフラバン-3-オールと呼ばれる。フラバン-3-オールはフラボノイド化合物の中で最も還元された構造をとっている。C環の2位と3位が飽和しているため、立体異性体が存在する（Fig. 1A, B）。トランス型が（2R,3S）（+）-カテキン、シス型が（2R,3R）（-）-エピカテキンで、ブドウには両方が含まれている。カテキンとエピカテキンはB環に3',4'カテコール置換を有している。ワインのフラバン-3-オールに見られるもうひとつのB環置換パターンはガロカテキン類と呼ばれる3',4',5'トリヒドロキシ型である。いくらかのエピガロカテキンがブドウ果皮に存在するが、ガロカテキンはほとんど含まれていない。ワインのフラバン-3-オールは配糖体としては存在せず、代わりに没食子酸エステルが存在する。没食子酸はエピ-シリーズの3位にのみエステル化される。エピカテキンの没食子酸エステルはブドウ種子のフラバン-3-オールの中で、小さいが有意な割合を占めている。これらのフラバン-3-オールモノマーは時々カテキン類と呼ばれる。典型的な赤ワイン中の総フラバン-3-オールモノマーのレベルは40~120 mg/lであり、通常その大部分がカテキンである（Ritchey and Waterhouse, 1999）。そのレベルは種子の抽出技術によって強く影響され、醸し期間が長いと高くなる。

赤ワインのフェノール化合物の大部分はフラバン-3-オール単位の縮合によってもたらされるオリゴマーやポリマーで、プロアントシニジンあるいは縮合タンニンと呼ばれている。その縮合によりフラバン-3-オール単位の間には共有結合が形成される。最も一般的な結合は4→8と4→6である（Fig. 1C）。通常はエピカテキンがブドウやワイン由来の縮合タンニンの中で最も多い単位であり、カテキンが次に多い（しばしば末端の単位に見られ、4位に結合がない）。典型的な赤ワインにおいて、ポリマーとオリゴマーの合計量はフェノール化合物の総量のかなり大きな割合を占める。新酒では25~50%の割合であり、熟成が進んだワインでは割合が高くなる。一部の赤ワインにおいては0.5~1.5 g/lかさらに高い濃度であるが、白ワインにおいては10~50 mg/lの範囲のレベルであり、圧搾技術次第で高くなる。

カテキン類のモノマーは苦くて渋い。ポリマーは苦味が少ないが、渋味が残る (Robichaud and Noble, 1990)。ワインの長期熟成により、カテキン類に酸化を伴う不均化反応が起こり得る。そして、ポリマーが大きくなるとワイン中で溶解できなくなって、古い赤ワインによく見られるような沈殿を形成する。従って、長期熟成によってワインのフェノール類の量が減少する。

フラボノイド化合物の中で、最もよく研究されているのはアントシアニンである。アントシアニンは花や果物などに含まれる赤・紫・青を示す植物色素で、ワインレッドの主成分である。ブドウには果皮にアントシアニンを蓄積して赤～黒を示す品種 (赤ブドウ、黒ブドウ) とアントシアニンを蓄積しない品種 (白ブドウ) がある。赤ブドウや黒ブドウの果実は生育初期には緑色をしているが、ベレゾン期 (成熟開始期) に果皮にアントシアニンが蓄積し始め、やがて赤紫色に染まる。アントシアニンの蓄積は植物ホルモンや光や温度などの環境条件により影響を受けることが知られている。

アントシアニンは配糖体であり、アグリコン (フラボノイドの部分) はアントシアニジンと呼ばれる。ワインには5つのアントシアニジン (シアニジン、ペオニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、マルビジン) が存在し、赤ワインにはマルビジンが最も多い。アントシアニジンは不安定であるためにブドウやワイン中に単独ではほとんど存在しない。ヨーロッパ系のブドウ (*Vitis vinifera*) のアントシアニンは3-グルコシドであり、アメリカ系や雑種では3,5-ジグルコシドがみられる。

フラボノールは赤ワインの苦味成分である。フラボノールには目立った色はないが、アントシアニンと相互作用して赤ワインの色を強めたり、安定化したりする補助色素の働きがある。ブドウ果皮を含めて幅広い植物に配糖体で存在している。ブドウにはケルセチン (3',4'ジヒドロキシ)、ミリセチン (3',4',5'トリヒドロキシ)、及びケンフェロール (4'ヒドロキシ) の3種類のフラボノイドアグリコンがあるが、糖との多様な組み合わせで多くの異なった化合物が存在する。配糖体は多数のブドウの品種でまだ同定されていないが、ある品種では配糖体の大部分が3-グルコシドと3-グルクロニドであり、少量のジグリコシド

があることが示されている (Cheynier and Rigaud, 1986)。

‘ピノ・ノワール’の研究で、果皮への日光照射によりフラボノールのレベルが増加することが示されている (Price *et al.*, 1995)。フラボノールは 360 nm で UV 光を強く吸収し、その大部分が果実の細胞の最も外側の層に存在するので、植物は天然の日除け剤としてフラボノールを生産しているように思われる。ワインにおけるフェノール化合物のレベルの研究により、果実の日当たりが良くて収量が少ない木の果実から造られていると推定される高価な ‘カベルネ・ソービニオン’ のワインが少なくとも 3 倍高いレベルのフラボノールを含んでいることが示され、ブドウのフラボノールレベルがブドウの日照や品質の有用な指標になることが示唆されている。総フラボノールレベルは、よく出回っている ‘カベルネ・ソービニオン’ のワインで 53 mg/l であるが、より高価なワインでは 200 mg/l を超えている (Ritchey and Waterhouse, 1999)。

このように、フラボノイド化合物の量や組成がワインの品質を決める重要な要素となっている。従って、色や味のバランスの良いワイン造りのためにはブドウのフラボノイド化合物全体の生成機構を把握することが重要である。

美しい花の色の成分であるアントシアニンは、昔から花色の突然変異体が多数得られていたこともあり、植物の二次代謝産物の中では生合成系がよく研究され、観賞植物、トウモロコシ、その他のモデル植物において、関連酵素の遺伝子がクローニングされてきた。アントシアニン合成系は、アミノ酸のフェニルアラニンが脱アミノするフェニルアラニンアンモニア脱離酵素 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) の反応から始まるフェニルプロパノイド合成系と、フラボノイド骨格を形成するカルコン合成酵素 (chalcone synthase, CHS) の反応から始まるフラボノイド合成系からなる (Fig. 2)。ブドウのアントシアニン生合成酵素の遺伝子が Sparvoli ら (1994) によって単離されてからは、ブドウにおける遺伝子発現とアントシアニン蓄積に関する研究が活発に行われてきた。UDP-グルコース：フラボノイド 3-O-グルコシル基転位酵素 (UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase, UFGT) 遺伝子の mRNA が着色期の赤品種の果皮にのみ特異的に検出されたことから (Boss *et al.*, 1996a, 1996b; Kobayashi *et al.*, 2001)、UFGT 遺伝子の発現がブドウのアントシアニン

生合成の鍵を握っていると考えられている。Kobayashi ら (2002) は、転写制御因子 *Myb* 様の cDNA クローン、*VlmybA* を ‘巨峰’ からいくつか単離し、これらの発現が果実の着色と密接に関係していることを示した。Kobayashi ら (2004) はまた、あるレトロトランスポゾンが *VlmybA1-1* のホモログである *VvmybA1* の変異を誘導して *V. vinifera* の白品種における色素の喪失を引き起こしていることを報告した。こうして、*VvmybA1* がブドウの UFGT 遺伝子の転写制御遺伝子であることが示された。

一方、フラボノールやフラバン-3-オールを生合成に関しては生合成系の途中の経路を共有しているアントシアニンと比較して研究が遅れている。フラボノールはジヒドロフラボノールからフラボノール合成酵素 (flavonol synthase, FLS) によって合成される。FLS 遺伝子はペチュニアやシロイヌナズナを含むいくつかの植物から単離されている (Holton *et al.*, 1993; Pelletier *et al.*, 1997)。フラバン-3-オールを生合成経路は 2003 年になってようやく明らかにされた。マメ科植物やシロイヌナズナを用いた研究で、アントシアニン還元酵素 (anthocyanidin reductase, ANR) がアントシアニンから (-) -エピカテキンのような 2,3-シス-フラバン-3-オールへの反応を触媒すること (Xie *et al.*, 2003)、ロイコアントシアニン還元酵素 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) がロイコアントシアニンから (+) -カテキンのような 2,3-トランス-フラバン-3-オールへの反応を触媒すること (Tanner *et al.*, 2003) が分かった。このように、他の植物でそれぞれの酵素をコードする遺伝子が調べられたことで、本論文ではそれらを手がかりにブドウの FLS、ANR、LAR の各遺伝子の塩基配列を調べ、ブドウ果実におけるこれらの遺伝子の発現と成分の蓄積を比較し、さらに植物ホルモンや光がそれらに及ぼす影響を検討した。

本論文の第 1 章では、ブドウの FLS 遺伝子の複数のゲノム塩基配列を取得した。次に、ブドウ各器官における FLS 遺伝子の転写パターンを調べ、さらに果皮におけるフラボノールの蓄積と FLS 遺伝子の転写に及ぼす植物ホルモンと遮光処理の影響を検討した。第 2 章では、ブドウの ANR 遺伝子のゲノム塩基配列を取得し、果皮と種子における ANR 遺伝子の発現とフラバン-3-オール類の蓄積を調べた。第 3 章では、ブドウ果実におけるプロアントシアニジンの蓄積、及び ANR と LAR 遺伝子の転写に及ぼす遮光の影響を検討した。

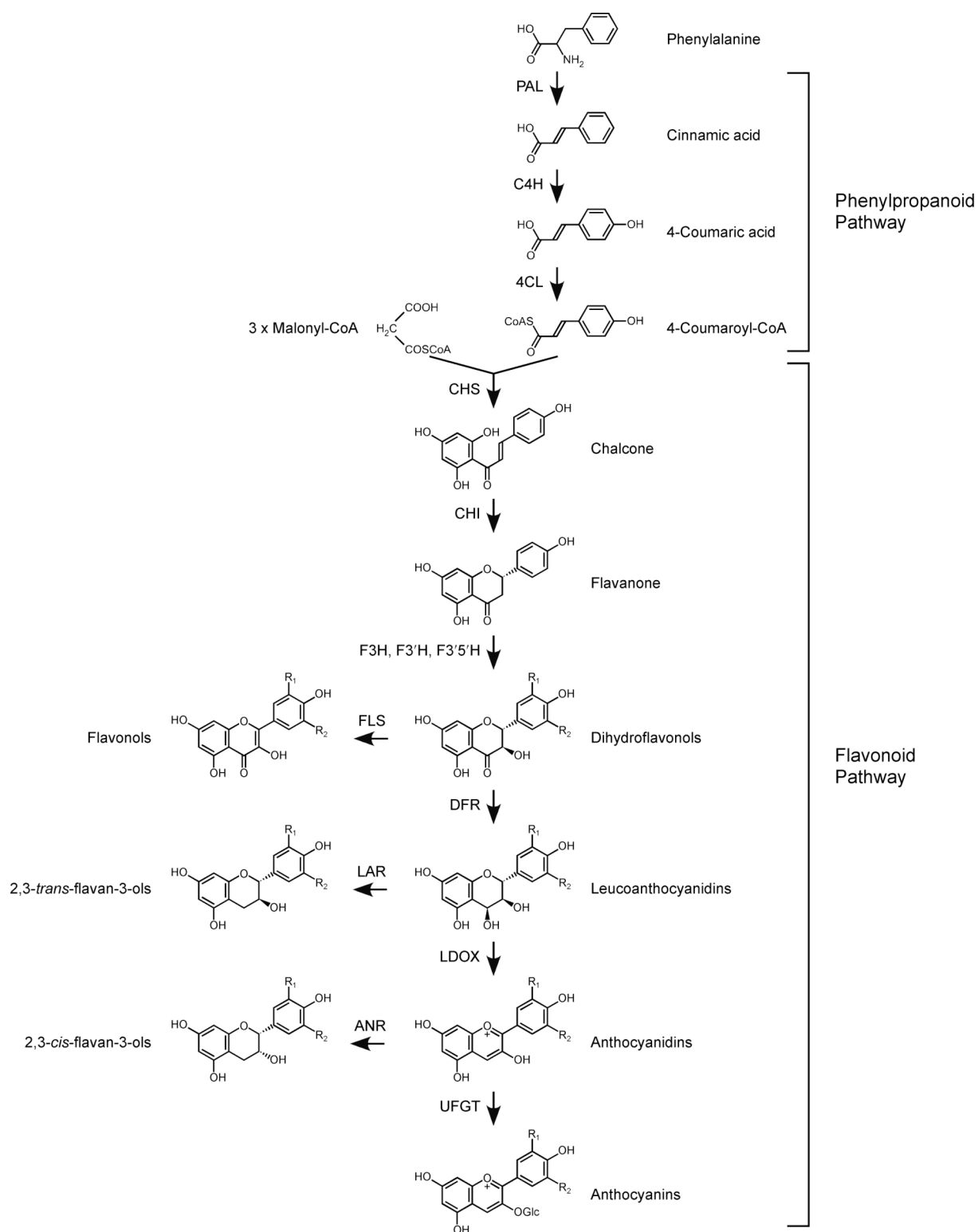


Fig. 2. Schematic representation of the anthocyanin biosynthetic pathway. Enzyme names are abbreviated as follows: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, anthocyanidin reductase; UFGT, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase. R_1 and R_2 are H or OH.

第1章 ブドウのフラボノール合成酵素遺伝子の器官特異的転写、及びブドウ果皮におけるフラボノールの生合成に及ぼす植物ホルモンと遮光の影響

1.1. 緒言

フラボノールは多くの高等植物にみられるフラボノイド化合物の一種で、しばしば配糖体 3-グリコシドとして存在する。ブドウ果実において、フラボノールは果皮に存在し、果肉や種子には検出されていない (Downey *et al.*, 2003)。ブドウ果皮に含まれる主要なフラボノールはケルセチン配糖体であるが、ミリセチン、ケンフェロール、イソラムネチンも含まれている (Cheynier and Rigaud, 1986; Downey *et al.*, 2003)。

フラボノールは赤ワインの苦味と色に関与していることが知られている。赤ワインの色は大部分がアントシアニン色素によるが、その色はアントシアニンとフラボノールの相互作用 (コピグメンテーション) によって安定に保たれたり増加したりする (Baranac *et al.*, 1997)。赤ワインに含まれるフラボノールの濃度はアントシアニンやプロアントシアニジンの濃度に比べて低いが、フラボノールは赤ワイン用ブドウにとって重要なフラボノイド化合物である。

フラボノールには紫外線保護剤としての機能がある (Flint *et al.*, 1985)。ブドウ果実のフラボノールの蓄積は日光によって増加することが知られている。Price ら (1995) は、‘ピノ・ノワール’の果実を日光に当てるとケルセチン配糖体の濃度が増加することを報告し、Spayd ら (2002) は、‘メルロー’の果実を日光に当てるとケルセチン、ケンフェロール、及びミリセチンの配糖体の濃度が増加する一方で、温度はそれらの濃度にほとんど影響を及ぼさないと報告している。

フラボノールはフラボノイド経路を経由して生成する (Fig. I-1)。フラボノール、アントシアニン、及びプロアントシアニジン (縮合タンニン) はジヒドロフラボノール生成の段階まで同じ経路を共有している。フラボノール合成酵素 (flavonol synthase, FLS) はジヒドロフラボノールからフラボノールへの反応を触媒し、フラボノール生合成の鍵酵素である (Holton *et al.*, 1993)。FLS はフ

ラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (flavanone 3-hydroxylase, F3H) やロイコアントシアニンジオキシゲナーゼ (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) と同様に 2-オキソグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼのファミリーに属している (Pelletier *et al.*, 1997)。FLS をコードする遺伝子は *Petunia* (Holton *et al.*, 1993)、*Arabidopsis* (Pelletier *et al.*, 1997)、*Solanum* (Van Eldik *et al.*, 1997)、*Citrus* (Moriguchi *et al.*, 2002) を含むいくつかの植物より単離されている。

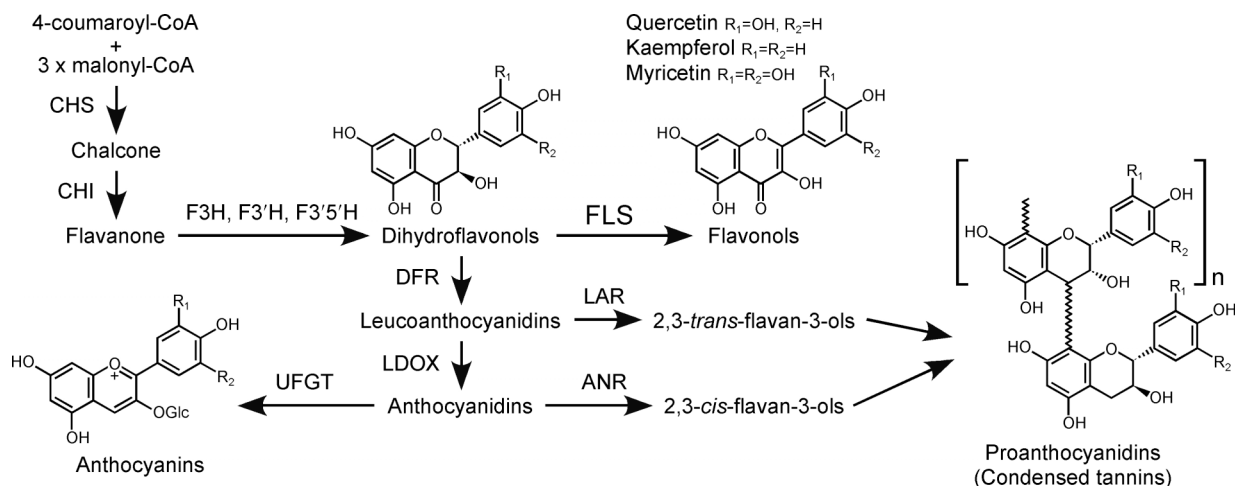


Fig. I-1. Schematic representation of the biosynthetic pathway of flavonoids. Enzyme names are abbreviated as follows: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, anthocyanidin reductase; UFGT, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase. R_1 and R_2 are H or OH.

2003年にブドウ‘シラー’の2つのFLS cDNAがDowneyらによって報告された。彼らはFLS遺伝子のひとつ、*VvFLS1*が果実と同様に葉、巻きひげ、小花梗、蕾、花に発現していることを示した。果皮において、*VvFLS1*の発現は開花と結実の間に最も高く、その後減少し、果実当たりのフラボノール量の増加にあわせて成熟期に再び増加した。もうひとつのFLS遺伝子である*VvFLS2*の発現は*VvFLS1*の発現に比べてかなり低く、一定であった。

本章においては、最もポピュラーな赤ワイン用品種‘カベルネ・ソービニオン’からFLS遺伝子の5つのゲノム配列(*FLS1*~*FLS5*)を得た。それらのうち2つは*VvFLS1*と*VvFLS2*に相当するものであった。その後、‘カベルネ・ソービニオン’のいくつかの器官における各々のFLS遺伝子のmRNAレベルを

測定した。また、成熟期の果皮における FLS 遺伝子の mRNA 蓄積に及ぼす植物ホルモン（アブシシン酸（abscisic acid, ABA）と 1-ナフタレン酢酸（1-naphthaleneacetic acid, NAA））や遮光処理の影響を調べた。そして、フラボノールとアントシアニン生合成の制御機構における相違を考察した。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 試薬

試薬類は特に断りのない限り、和光純薬工業社の特級を用いた。水溶液の調製には Milli-Q 水 (Millipore 社) を用いた。オリゴ DNA はシグマアルドリッチジャパン社または北海道システム・サイエンス社に合成と精製を依頼した。

1.2.2. 植物材料

広島県東広島市の酒類総合研究所の圃場で栽培されているブドウの赤ワイン用品種、*Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon (カベルネ・ソービニオン)’ と ‘Merlot (メルロー)’、それぞれ 4 本の木を用いた。

2002 年に ‘カベルネ・ソービニオン’ の生育と成熟の各段階で果実をランダムに採取した。まず、果皮の表面積を求めるためにノギスを用いて果実の直径を 1 粒ずつ測定した。次に、果実から皮を剥き、果皮を液体窒素の入ったデュワー瓶に入れて直ちに凍結し、使用まで -80°C に保存した。凍結果皮は使用前に砕いて均一にした。

2000 年には ABA、NAA、遮光、対照の 4 区分を設定し、‘カベルネ・ソービニオン’ と ‘メルロー’ それぞれ 1 区分 3、4 果房ずつを実験に用いた。ベレゾン期 (成熟開始期) の 8 月 12 日に 1000 mg/l の ABA (Sigma 社 A1049) と 200 mg/l の NAA (Sigma 社 N640) を果実に噴霧した。ABA と NAA はそれぞれ少量の 1N 水酸化カリウムに溶解し、蒸留水を用いて溶液を調製し、湿潤剤として Tween 80 を 0.1% (w/v) の濃度で添加した。また、同日、果房に寒冷紗を 3 重に被せて遮光を開始した。遮光区の昼間の光の強度は対照区の 18~20%であった。

また、2004 年に ‘カベルネ・ソービニオン’ から葉、蕾、花を採取して上記の方法で凍結保存した。

1.2.3. ブドウ DNA の抽出と FLS 遺伝子のゲノム塩基配列の決定

Couch と Fritz (1990) の方法を改変してブドウの葉から全 DNA を抽出した。まず、‘カベルネ・ソービニオン’ の新葉 2.5 g を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用

いて粉碎し、粉末を 25 ml の溶液 A (0.1 M クエン酸ナトリウム, 50 mM EDTA (pH 7-8), 0.35 M グルコース, 2.3% *N,N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム, 2% 可溶性ポリビニルピロリドン (Sigma 社 平均分子量 40,000), 0.7% BSA (Sigma 社 fraction V), 10 mM 2-メルカプトエタノール) に加えて攪拌した。7,200 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した後、上澄を捨て、沈殿をさらに 3 回溶液 A で洗浄した。次に、沈殿に 3 ml の溶液 B (0.1 M クエン酸ナトリウム, 50 mM EDTA (pH 7-8), 2% *N*-ラウリルサルコシン酸ナトリウム, 2.3% *N,N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム, 2% 可溶性ポリビニルピロリドン (Sigma 社 平均分子量 40,000), 0.7% BSA (Sigma 社 fraction V), 10 mM 2-メルカプトエタノール) を加え、一晩氷冷した後、遠心分離して上澄を回収し、沈殿に再度 3 ml の溶液 B を加えて繰り返し抽出を行い、2 回の上澄を混合した。抽出液約 6 ml に容量 ml \times 0.9 g の塩化セシウムを溶解し、3.3 ml 容超遠心用チューブ (Beckman 社) に入れ、10 mg/ml 臭化エチジウム 80 μ l を加えてチューブをシールして 100,000 rpm、20°C で一晩遠心分離を行った。翌日、チューブを取り出し、注射針をチューブに突き刺し、臭化エチジウムにより赤く染まった DNA の層を採取した。イソプロパノールを用いて 2~3 回抽出を行い、臭化エチジウムを除去した後、溶液を NAP カラム (Pharmacia 社) に供し、TE (10 mM トリス-塩酸, 1 mM EDTA, pH 8.0) で DNA の溶出を行い、塩化セシウムを除去した。最後に、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って DNA を精製し、1 mM DTT を含む TE に溶解した。

次に、全 DNA を用いて PCR で FLS 遺伝子のゲノム断片を増幅した。当初、ブドウの FLS 遺伝子が報告されていなかったため、他の植物のいくつかの既報の FLS 遺伝子配列の中で相同性の高い領域に PCR プライマー (Table I-1) を設計した。増幅断片を TA クローニングシステムで pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen 社) に挿入し、ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて挿入断片の塩基配列を決定した。さらに、各々の配列の上流と下流を Universal GenomeWalker Kit (BD Biosciences Clontech 社) を用いて DNA ウォーキングにより決定した。得られた配列は遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC (ゼネティックス社) を用いて解析した。

Table I-1. The first PCR primers for genomic sequencing of grape *FLSs*.

Gene name	Sequence of forward (F) and reverse (R) primers	Primer position ^a
<i>FLS1</i>	F 5' TCAATTACCGTTCTGGCC	428 to 446
	R 5' GGCCATGACATTCTTGTCTT	Compliments of 853 to 872
<i>FLS2</i>	F 5' ATCTGTTCCATAAGATTGGCC	395 to 416
	R 5' TCTGCTGGTGGCTCCAAGAA	Compliments of 877 to 896
<i>FLS3</i>	F 5' TTAACTATCAGTTCTGGCC	428 to 446
	R 5' ACTCTTGTACTIONGCCATTGCTCA	Compliments of 800 to 822
<i>FLS4</i>	F 5' TAGCAGGGATTGGGGGATGTT	189 to 209
	R 5' GGCGAGGACATGGTGGGTAATAAT	Compliments of 611 to 634
<i>FLS5</i>	F 5' AATTATTACCCACCATGTCC	610 to 629
	R 5' ACTCTTGTACTIONGCCATTGCTCA	Compliments of 800 to 822

^a Primer positions are corresponding to the base from the start codon of the citrus *FLS* cDNA (GenBank accession no. AB011796). The first nucleotide of the start codon was defined as position 1.

1. 2. 4. サザンブロット解析

1.2.3 で調製した ‘カベルネ・ソービニオン’ の全 DNA 5 µg を制限酵素 *Dra*I (タカラバイオ社) で消化し、1.0% アガロースゲルに供して電気泳動を行った。次に、アガロースゲルから正電荷ナイロンメンブレン (Roche Diagnostics 社) にブロットし、メンブレンを 558 塩基のプロープを用いてハイブリダイズした。プロープは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて *FLS2* の第 1 エクソンの 467 塩基のコード領域を含むゲノムクローンを鋳型にプライマー 5'-AGGCACAATGGCGGTAGAGA-3' (順方向) と 5'-GGATGAAGCAGTGTGTAAGAAAAGAAAGG-3' (逆方向) で増幅し、ジゴキシゲニンでラベルして調製した。ハイブリダイゼーションは、溶液 DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics 社) を用いて 42°C で行った。その後、メンブレンを 2×SSC (20×SSC: 3 M 塩化ナトリウム, 0.3 M クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS の溶液を用いて室温で 5 分間、2 回洗浄した後、さらに 0.1×SSC、0.1% SDS の溶液を用いて 65°C で 15 分間、2 回洗浄した。最後に、DIG-CSPD システム (Roche Diagnostics 社) と LAS-1000plus イメージアナライザー (富士写真フィルム社) を用いてハイブリダイズしたメンブレン上の断片を検出した。

1. 2. 5. RNA の抽出、RT-PCR、及び mRNA の定量

ブドウの葉、蕾、花、及び果皮から Geuna ら (1998) の方法を改変して全

RNA を抽出した。まず、1 g の凍結試料を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、粉末を 6 ml の RNA 抽出溶液 BEB、4 ml の BSA/ヘパリン溶液 (5% BSA (Sigma 社 A8022) と 10 mg/ml ヘパリン (Sigma 社 H9399) を含む BEB 溶液)、2 ml の不溶性 PVPP 懸濁液を含む遠沈管に移した。BEB は、0.1 M グリシン、0.001 M EDTA、2% SDS、1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、200 mM 塩化ナトリウムの水溶液を作成し、5 M 水酸化ナトリウムで pH を 9.5 に調整後、使用前に DTT を 16 mM の濃度になるように、また薬匙小 1 杯の ATA (Sigma 社 A1895) を添加して調製した。PVPP (Sigma 社 P6755) は使用 2 時間以上前に BEB に添加し、上澄を捨てて懸濁液とした。遠沈管を手で振って試料の粉末を完全に懸濁した後、400 μ l の 10 mg/ml プロテイナーゼ K (ナカライテスク社) を添加し、37°C で 20 分間振とうした。遠沈管を 14,000 \times g、室温で 5 分間遠心分離した後、上澄を新しい遠沈管に移し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24/1) で抽出を行った。14,000 \times g、室温で 5 分間の遠心分離の後、同条件で抽出をさらに 3 回繰り返した。上澄を新しい遠沈管に移して液量を記録し、0.9 g のセルロース繊維 (Sigma 社 C6288) と液量の 0.55 倍のエタノールを添加した後、遠沈管をロータリーシェーカーにかけて室温で 30~45 分間振とうし、核酸をセルロースに結合させた。5,000 \times g、室温で 3 分間の遠心分離を行ってセルロースを沈殿させ、沈殿に 4.5 ml の洗浄液 (35% エタノールを含む STE 溶液) を添加して懸濁した後、同条件で遠心分離を行い、セルロースを 3 回洗浄した。STE は 0.1 M 塩化ナトリウム、0.1 M トリス-塩酸 (pH 8.0)、0.002 M EDTA の水溶液である。次に、洗浄したセルロースを 4 ml の STE に懸濁して 2 分間放置した後、5,000 \times g、室温で 3 分間の遠心分離を行って上澄 (遊離した核酸を含む) を新しい遠沈管に移した。液量の 0.1 倍の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加して混合し、遠沈管を氷上に 15 分間放置してタンパク質と SDS を沈殿させた。14,000 \times g、4°C で 10 分間の遠心分離の後、上澄を新しい遠沈管に移し、液量の 2 倍のエタノールを添加して混合した。-30°C で 60 分間冷却し、14,000 \times g、4°C で 10 分間の遠心分離を行った。沈殿を 2 ml の 70% エタノールで洗浄し、乾燥後、400 μ l の滅菌水に溶解した。100 μ l の 10 M 塩化リチウムを加えて -30°C で 3 時間以上冷却し、14,000 \times g、4°C で 10 分間の遠心分離を行った。沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥後、50 μ l の 1 mM クエン

酸ナトリウム (pH 6.4) に溶解した。最後に、260 nm の吸光度を測定して RNA 濃度を決定した。

ブドウ各器官における FLS 遺伝子の転写を解析するために、FLS の mRNA を全 RNA から RT-PCR で増幅した。TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (タカラバイオ社) を用いて取扱説明書に従って RT-PCR を行った。AMV reverse transcriptase XL と 0.125 μ M のオリゴ dT プライマーを用いて 5 ng/ μ l の全 RNA の逆転写反応を行い、全ての RNA 試料から cDNA を調製した。PCR 反応液 (20 μ l) は 1 μ l の鋳型 cDNA と順方向・逆方向それぞれ 0.2 μ M のプライマー (Table I-2) を含んだ。PCR プライマーは各々の FLS 遺伝子に特異的な断片を増幅するようにコード領域に設計した。RT-PCR のコントロールとして、18S rRNA の 106 bp の断片をプライマー 5'-TTGGCCTTCGGGATCGGAGT-3' (順方向) と 5'-TTCGCAGTTGTTTCGTCTTTC-3' (逆方向) を用いて増幅した。それらのプライマーは *Vitis* 種の 18S rRNA 遺伝子 (GenBank accession no. AF207053) の配列に設計した。PCR は 94°C 15 秒→アニーリング温度 (FLS 遺伝子 60°C、rRNA 56°C) 15 秒→72°C 10 秒のサイクル条件で行った。PCR 反応液は 5 サイクルごとに数回に分けて採取し、5 μ l の試料を 2.0% アガロースゲル電気泳動により分析した。ゲルは臭化エチジウムで染色した。

次に、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社) と GeneAmp 5700 定量 PCR システム (Applied Biosystems 社) を用いて取扱説明書に従ってリアルタイム定量 PCR を行い、*FLS4* と *FLS5* の mRNA レベルを決定した。はじめに、上記の要領で 50 ng/ μ l の全 RNA の逆転写反応を行い、果皮の cDNA を調製した。リアルタイム定量 PCR には 1 μ l の鋳型 cDNA と順方向・逆方向それぞれ 0.3 μ M のプライマーを含む反応液 (20 μ l) を調製し、95°C 15 分に続いて 94°C 15 秒→アニーリング温度 30 秒→72°C 30 秒を 45 サイクル繰り返す条件で行った。定量 PCR のプライマーセットは RT-PCR のプライマーセットと同じものを使用した。また、ユビキチン遺伝子 (*Ubiquitin*) の mRNA を定量 PCR の内部コントロールとして定量した (Downey *et al.*, 2003)。 *Ubiquitin* のプライマーの設計は、The Institute for Genomic Research (TIGR) が構築したブドウ EST データベース (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape, Release 4.0, September 21, 2004) の配列 TC38636 に基づいて行った。プライマーの配列と

各々のプライマーセットに対するアニーリング温度を Table I-2 に示す。定量 PCR の検量線の作成のための標準 DNA は各プライマーセットを用いて次のように調製した。まず、単一バンドを形成した増幅断片を PCR 反応液から E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek 社) を用いて精製した。次に、精製した DNA の濃度を DyNA Quant 200 (Amersham Bioscience 社) を用いて決定し、それぞれの増幅断片の塩基組成に基づいてモル濃度に換算した。最後に、標準 DNA を適当な濃度に希釈した。リアルタイム定量 PCR は全 RNA 試料当たり 3 回行った。データの平均値は *FLS4* と *FLS5* の mRNA レベルの *Ubiquitin* に対するモル比で表したため、単位がない。

Table I-2. PCR primers for RT-PCR and real-time quantitative PCR and annealing temperature for real-time quantitative PCR.

Gene name and GenBank accession no.	Sequence of forward (F) and reverse (R) primers	Primer position ^a	Annealing temperature (°C)
<i>FLS1</i> (AB086055)	F 5' AATCCTCCTTCTTACAGGGA R 5' AGCCCTAACCCCTACCGACAA	451 to 752 Compliments of 811 to 830	
<i>FLS2</i> (AB086056)	F 5' AACCCACCTTCGTACAGGGC R 5' CCTAACCCCTAATGACAGCAA	451 to 1085 Compliments of 1141 to 1160	
<i>FLS3</i> (AB213565)	F 5' ACCATCTTACAGGGATGCTA R 5' TCGCCACCCACACTCTTCTT	456 to 1137 Compliments of 1227 to 1246	
<i>FLS4</i> (AB092591)	F 5' AAACCACCTACTTACAGAGC R 5' ACCTAACCCAGTGACAGAC	451 to 1632 Compliments of 1689 to 1708	60
<i>FLS5</i> (AB213566)	F 5' AACCAAGATGACTAAGAACC R 5' CTTCTGTGACTTCCCTGTAG	339 to 358 Compliments of 453 to 951	55
<i>Ubiquitin</i> ^b	F 5' TCTGAGGCTTCGTGGTGGTA R 5' AGGCGTGCATAACATTTGCG	210 to 229 Compliments of 289 to 308	57

^a Primer positions indicate the base from the start codon. The first nucleotide of the start codon was defined as position 1.

^b Ubiquitin primers were designed in the sequence (TC38636) in an EST database of grape (TIGR, http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape, Release 4.0, September 21, 2004).

1.2.6. 果皮からのフラボノールの抽出、加水分解、及び定量

まず、凍結果皮を凍結乾燥した後、マルチビースショッカー (安井器械社) を用いて破碎した。破碎した試料は分析まで -20°C に保存した。

次に、Häkkinen と Auriola (1998) の方法を改変してフラボノールの抽出、アグリコンへの加水分解を行った。1.2 M 塩酸、内部標準として 20 mg/l モリン (Merck 社)、及び酸化防止剤として 1 g/l *tert*-ブチルヒドロキノン

(Sigma-Aldrich Chemie 社) を含む 50% メタノール水溶液中で 200 mg の果皮試料の 85°C、2 時間の還流を行った。加水分解抽出液を冷却した後、HPLC 分析の前に 0.45 μm 親水性 PTFE フィルター (アドバンテック社 DISMIC-13HP) で濾過した。

フラボノール濃度は Hewlett-Packard HPLC システム (Agilent Technologies 社) を用いて測定した。そのシステムは 1100 シリーズのクォータナリポンプ、オートサンプラー、ダイオードアレイ検出器、及び ChemStation データ処理システムで構成された。逆相分離は Zorbax StableBond ガードカートリッジ (12.5 \times 2.1 mm I.D., SB-C18, 5 μm) (Agilent Technologies 社) で保護した Zorbax StableBond カラム (150 \times 2.1 mm I.D., SB-C18, 5 μm) (Agilent Technologies 社) を用いて行った。そして、溶媒 A に 1% ギ酸、溶媒 B にアセトニトリルを用意した。分析開始前には、溶媒 A を 90%、溶媒 B を 10% でカラムを平衡化したが、溶媒 B の割合を分析開始 10 分後に 20%、35~39 分後に 70%、40~45 分後に 10% と直線的に変えた。溶媒の流速は 0.3 ml/分、試料注入量は 5 μl とした。365 nm でフラボノールを検出し、標準物質の保持時間と紫外線スペクトルに基づいてピークを同定した。内部標準 (モリン) と同定した化合物の紫外線レスポンスの比からフラボノールの定量を行った。検量線はケルセチン (Sigma Chemical 社)、ミリセチン (Fluka Chemie 社)、ケンフェロール (Fluka Chemie 社) のメタノール溶液を用いて作成した。

フラボノール濃度は果皮の表面積 cm^2 当たりで示した。また、果皮におけるフラボノールの総量を果実当たりで示した。2002 年に採取した 'カベルネ・ソービニオン' の果皮については成分抽出、加水分解、分析を 3 回ずつ行った。

1.3. 結果

1.3.1. ‘カベルネ・ソービニオン’ の FLS 遺伝子の性質

PCR クローニングとゲノムウォーキングにより ‘カベルネ・ソービニオン’ から 5 クローンの FLS 遺伝子の塩基配列を決定し、GenBank/EMBL/DDBJ に AB086055 (*FLS1*)、AB086056 (*FLS2*)、AB213565 (*FLS3*)、AB092591 (*FLS4*)、AB213566 (*FLS5*) の番号で登録した。*FLS1*~*FLS4* のコード領域は 1005 bp、*FLS5* のコード領域は 9 bp 短い 996 bp と推定された (Fig. I-2)。これらの遺伝子にはそれぞれ長さの異なる 2 つのイントロンがあり、*Arabidopsis thaliana* の FLS 遺伝子 (*AtFLS*, AB006697 REGION: 71532 to 72698) のイントロンと同じ場所に位置していた。

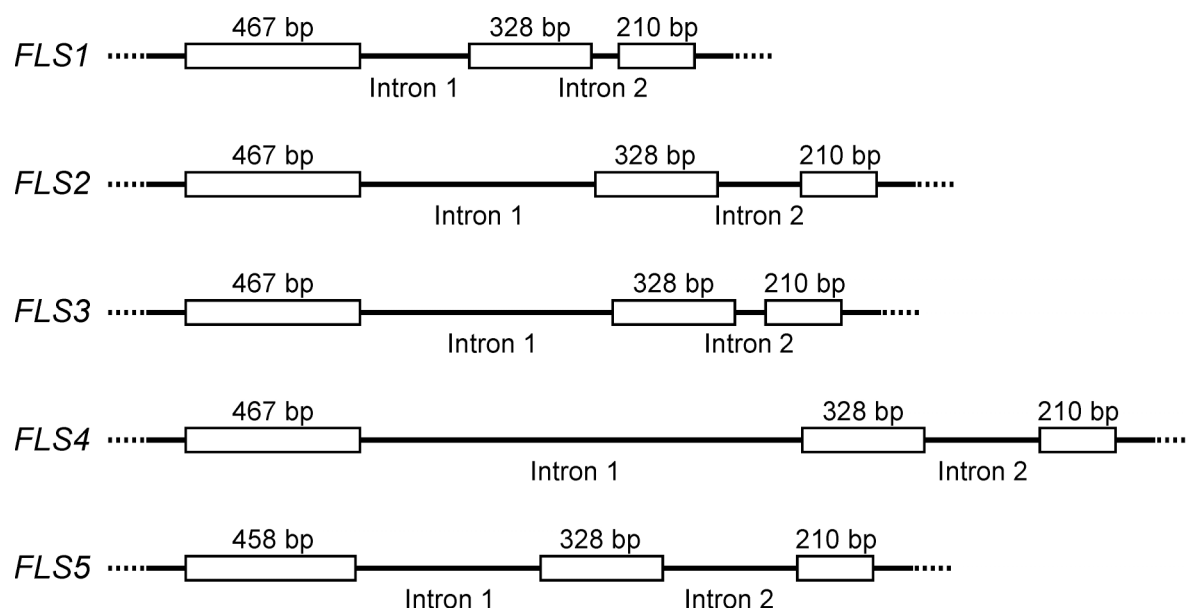


Fig. I-2. Genomic structures of five *FLS*s obtained in this study. The open boxes and solid lines indicate the coding and non-coding regions, respectively.

FLS1 と *FLS4* のイントロンを除いたヌクレオチド配列は、研究途中に報告された ‘シラー’ の cDNA 部分配列、*VvFLS2* (AY257979) と *VvFLS1* (AY257978) (Downey *et al.*, 2003) にそれぞれ 98.0%と 98.9%一致していた。*FLS1* と *FLS4* の推定アミノ酸配列は、‘シラー’ の *VvFLS2* と *VvFLS1* の推定アミノ酸配列にそれぞれ 95.1%と 100%一致していた。*FLS1*~*FLS4* は 335 アミノ酸残基から成り、互いに約 80%一致し、他の植物の FLS (*AtFLS*, *Citrus FLS* (AB011796), *Malus*

FLS (AF119095)) に対して約 60~70%一致した (Table I-3)。FLS5 は他の 4 つの FLS に対して相同性が比較的低かった。

Table I-3. Identity (%) of the deduced amino acid sequences of FLSs of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ to the FLSs of other plants, grape F3H, and grape LDOX.

	FLS2	FLS3	FLS4	FLS5	AtFLS ^a	CuFLS ^b	MdFLS ^c	F3H ^d	LDOX ^e
FLS1	78.2	83.3	77.3	49.6	62.6	66.6	67.6	30.2	44.7
FLS2	—	83.3	80.0	52.2	64.7	69.0	70.0	33.0	44.7
FLS3	—	—	81.8	52.5	65.0	71.3	70.8	31.7	46.3
FLS4	—	—	—	51.6	63.5	72.5	71.7	32.0	46.9
FLS5	—	—	—	—	50.6	55.5	50.6	31.0	46.6

^a *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia FLS (GenBank accession no. AB006697).

^b *Citrus unshiu* FLS (AB011796).

^c *Malus domestica* FLS (AF119095).

^d *V. vinifera* ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ F3H (X75965).

^e *V. vinifera* ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ LDOX (X75966).

FLS は F3H、フラボン合成酵素 I (flavone synthase I, FNS I)、及び LDOX と同様に 2-オキシグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼのファミリーに属する酵素であることが知られており、フラボノイド生合成に関連するこれら 4 酵素は相同性のある配列を有している。2-オキシグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼにおいてヒスチジン 2 残基とアスパラギン酸 1 残基は Fe^{II} の配位に必須であり、アルギニン 1 残基は 2-オキシグルタル酸の結合に関与している (Lukačičin and Britsch, 1997)。 *Citrus unshiu* の FLS の変異解析によりグリシン 2 残基が FLS ポリペプチドの適切な折りたたみに必要であることが示唆されている (Wellmann *et al.*, 2002)。*‘カベルネ・ソービニオン’* の 5 つの FLS にはこれらの保存されたアミノ酸残基が存在していた (Fig. I-3)。これらの配列はブドウの F3H (X75965) に対して約 30%、LDOX (X75966) に対して約 45%と低い相同性を示した (Table I-3)。ブドウ果実にはフラボンが含まれておらず、ブドウの FNS I についての報告もない。5 つの FLS は FNS I (データは示していない。) を含めた 2-オキシグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼの中で他の植物の FLS に対して最も高い相同性を示した。

		*				*	*
FLS1	68	GMFQIVNH	204	NYPPCPRPDLALGVVSHTD			
FLS2	68	GMFQIVNH	204	NYPPCPRPDLALGVVAHTD			
FLS3	68	GIFQIVNH	204	NYPPCPRPDLALGVVAHTD			
FLS4	68	GMFQIVNH	204	NYPPCPRPDLALGVVAHTD			
FLS5	65	GFFLLKDH	201	NMYPPCPQQLALGVVEPHTD			
AtFLS	68	GLFQVVNH	204	NYPPCPRPDLALGVPAHTD			
CuFLS	68	GIFQVTNH	204	NYPPCPRPDLALGVVAHTD			
MdFLS	66	GMYQIVNH	206	NYPPCPRPDLALGVVAHTD			
		*		*		*	
FLS1	261	GDQLEILSNGKYKSVLHRTTVKKDMTRMSWPVFLEP					
FLS2	261	GDQLEILSNGKYKSVLHRTTVTKEITRMSWPVFLEP					
FLS3	261	GDQLEILSNGKYKSVLHRTTVNKEMTRMSWPVFLEP					
FLS4	261	GDQLEILSNGKYKAVLHRTTVNKEKTRMSWPVFLEP					
FLS5	258	GDQIEVLSNGKYKSVLHRSTVNKERTRMSWAVFCAP					
AtFLS	261	GDQILRLSNGRYKNVLHRTTVDKKTRMSWPVFLEP					
CuFLS	261	GDQIEILSNGKYKAVLHRTTVNKKDKTRMSWPVFLEP					
MdFLS	263	GDQMEIMSNGKYTSVLHRTTVNKKDKTRISWPVFLEP					

Fig. I-3. Comparison of the deduced amino acid sequences of five grape FLSs and other FLSs. Three regions of high similarity among 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (Wellmann *et al.*, 2002) are shown. Six strictly conserved amino-acid residues (two histidines, an aspartic acid, an arginine, and two glycines) are marked by asterisks. FLS1 to FLS5, *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ FLSs (GenBank accession nos. AB086055, AB086056, AB213565, AB092591, AB213566); AtFLS, *Arabidopsis thaliana* FLS (AB006697); CuFLS, *Citrus unshiu* FLS (AB011796); MdFLS, *Malus domestica* FLS (AF119095).

ブドウゲノムにおける FLS 遺伝子のコピー数を決定するために、サザンブロット解析を行った。*FLS2* の第 1 エクソンを含む 558 塩基の断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションの結果、*DraI* により消化したゲノムで 4 本の断片が検出され (Fig. I-4)、他の数種の制限酵素により消化したゲノムでそれぞれ数本の断片が検出された (データは示していない)。

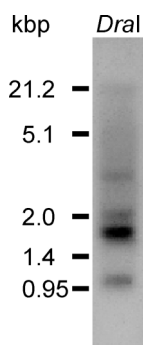


Fig. I-4. Southern blot analysis of the FLS gene from the grape genome. The total DNA (5 μ g) of ‘Cabernet Sauvignon’ was digested with *DraI* and blotted. Positions of the molecular size markers are shown at left.

1.3.2. 5つの FLS の器官と時期特異的転写

5つの FLS の転写パターンを調べるために、‘カベルネ・ソービニオン’の葉、蕾、花、果皮を用いて RT-PCR によりこれらの遺伝子の mRNA レベルを測定した。5つの FLS の転写パターンは器官と時期で異なっていた (Fig. I-5A)。葉においては小さい時に *FLS2*、*FLS3*、及び *FLS5* の mRNA が検出され、大きくなるにつれ減少した。一方、*FLS4* の mRNA は試験した全ての大きさの葉で検出

された。蕾と花においては5つの *FLS* 全ての mRNA が検出された。果皮においては *FLS2*、*FLS4*、及び *FLS5* の mRNA が生育初期 (6月28日) に検出された。しかし、その後蓄積が減少し、ベレゾン期前 (7月25日) にはほとんど検出されなかった。ベレゾン期 (8月7日) から収穫期 (9月18日) まで *FLS4* と *FLS5* の mRNA が果皮に再び蓄積した。

RT-PCR 解析では遺伝子間の転写レベルを比較することが一般的に不可能である。そこで、以後の実験ではリアルタイム定量 PCR 解析を行った。

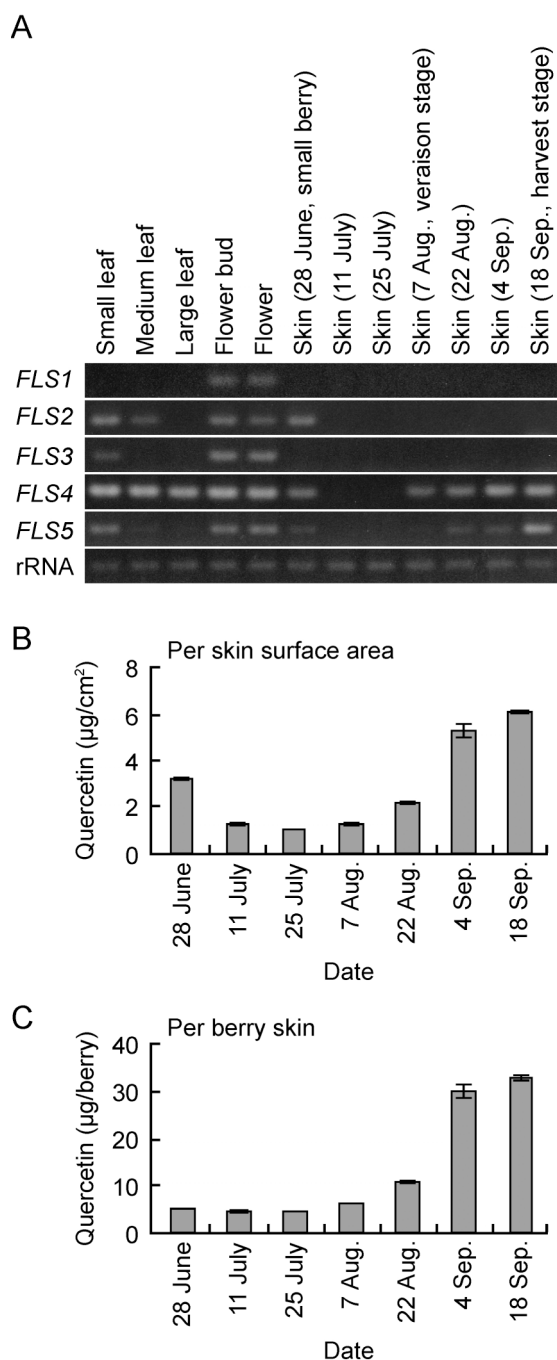


Fig. I-5. Accumulation of *FLS* mRNA and quercetin in ‘Cabernet Sauvignon’. A, RT-PCR analysis of the mRNA of *FLS*s accumulated in the leaves, flower buds, flowers, and berry skins. B, quercetin (µg/cm² skin surface area). C, quercetin (µg/berry skin). Vertical bars represent the standard deviation (n = 3). The standard deviation for some data is smaller than the thickness of the line.

1.3.3. 果皮におけるフラボノールの蓄積

RT-PCR と同じ果皮試料を用いて HPLC によりフラボノールの濃度を測定した。果皮において最も多いフラボノールはケルセチンであった。少量のケンフェロール（ケルセチン量の 4 分の 1 未満）が果皮に存在し、ケルセチンと同じ蓄積パターンを示した（データは示していない。）。少量のミリセチンも存在したが、HPLC のピークが未知ピークと重なっていたため濃度を測定することができなかった。従って、ここではフラボノールの濃度に代わってケルセチンの濃度を決定した。Fig. I-5B に果実の生育期と成熟期におけるケルセチンの濃度を示す。ケルセチンは生育初期にすでに果皮にある程度存在していた。ケルセチンの濃度はベレゾン期前（7 月 25 日）に向かって減少したが、果実が大きくなったため果実当たりの総量は生育の間にほとんど変化しなかった（Fig. I-5C）。ベレゾン期（8 月 7 日）の後、ケルセチンが果皮に再び蓄積した。

1.3.4. フラボノールの蓄積と *FLS4* の転写の NAA と遮光による抑制

Fig. I-6A と D は成熟期の‘カベルネ・ソービニヨン’と‘メルロー’の果皮におけるケルセチン蓄積に及ぼす ABA、NAA、及び遮光処理の影響を示している。各処理を行った果皮の試料が不足し、フラボノールの抽出、加水分解、及び定量を一度しか行うことができなかったため、ここでは棒グラフに標準偏差を示していない。しかしながら、先に示した Fig. I-5B と C のケルセチン量の標準偏差が小さかったことから、Fig. I-6A と D の誤差も小さいと考えられる。ケルセチンの蓄積は両品種とも NAA 処理により抑制され、遮光によりさらに強く抑制される傾向があった。‘メルロー’のケルセチンの蓄積は ABA 処理によって促進されたが、‘カベルネ・ソービニヨン’においては顕著な影響を受けなかった。両品種ともケルセチンの蓄積が *FLS4* の転写と一致していた（Fig. I-6B, E）。*FLS4* の転写は遮光によって強く抑制された。対照的に、*FLS5* mRNA は遮光果実と対照果実で同様に蓄積した（Fig. I-6C, F）。‘メルロー’においては *FLS4* と *FLS5* の転写が ABA 処理によって促進された（Fig. I-6E, F）。多くの場合、*FLS5* の転写レベルは *FLS4* の転写レベルより高かったが、全体としてケルセチンの蓄積は *FLS5* ではなく *FLS4* の転写と一致した。他の植物の FLS に対する *FLS5* の相同性が比較的低かったことに加えて、これらの結果は *FLS5* タンパク

質の FLS 活性を確認するためのさらなる研究の必要性を示す。

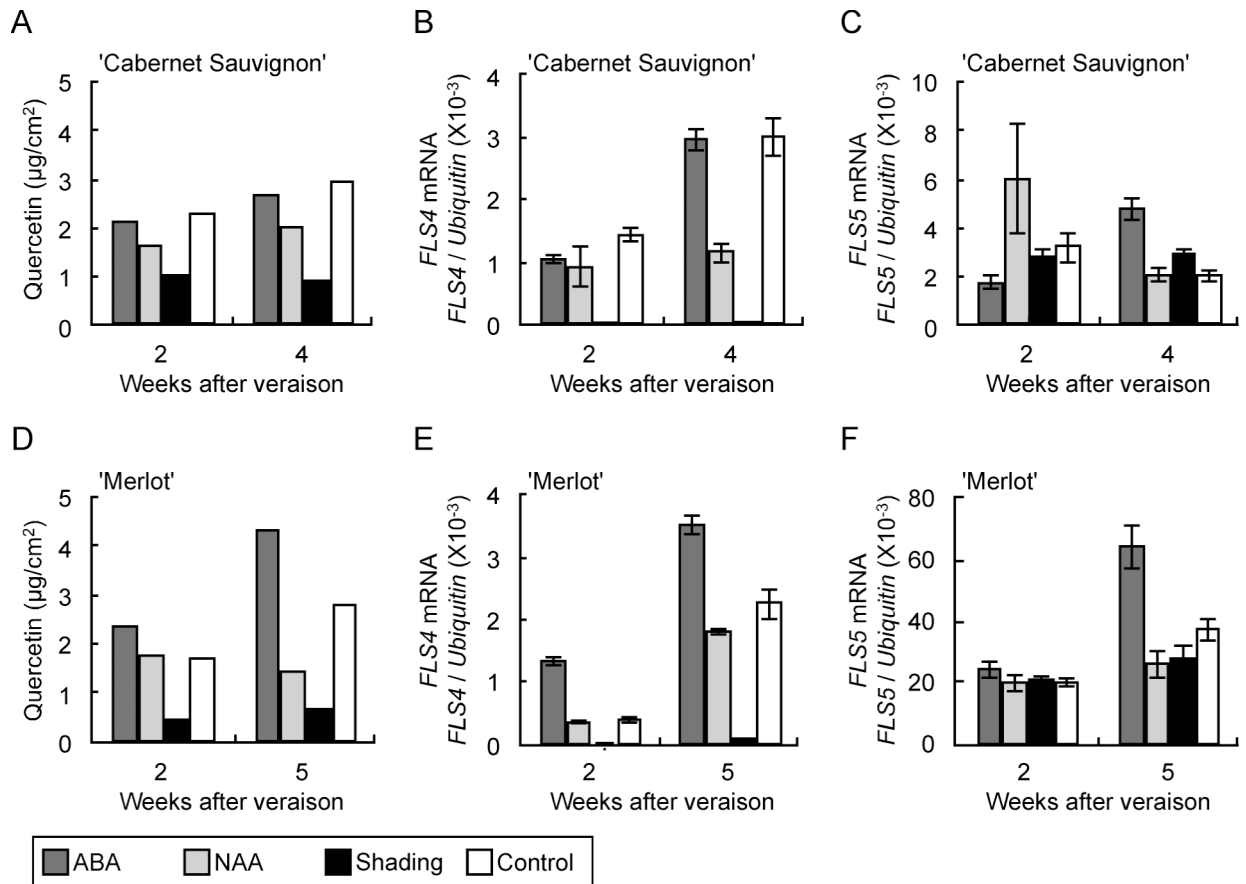


Fig. I-6. Quercetin concentrations and mRNA levels of *FLS*s in the skins of control berries and berries treated with ABA, NAA, and shading. A and D, quercetin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ skin surface area). B and E, the mRNA level of *FLS4*. C and F, the mRNA level of *FLS5*. For these analyses, 'Cabernet Sauvignon' (A-C) and 'Merlot' (D-F) were used. Results of a single measurement without replication were shown in A and D. Vertical bars represent the standard deviation ($n = 3$) in B, C, E, and F. The standard deviation for some data is smaller than the thickness of the line.

1.4. 考察

本章ではまず、‘カベルネ・ソービニオン’の5クローンのFLS遺伝子のゲノム塩基配列 (*FLS1*~*FLS5*) を決定した。このうち *FLS1* と *FLS4* のイントロンを除いたヌクレオチド配列が‘シラー’のcDNA部分配列、*VvFLS2* と *VvFLS1* とほぼ一致し、アミノ酸レベルでも高い相同性を示したことから、*FLS1* と *FLS4* はそれぞれ *VvFLS2* と *VvFLS1* のゲノム配列であると考えられた。また、*FLS4* と *FLS5* はそれぞれ TIGR のブドウ EST データベースに FLS 遺伝子として登録されている TC46143 と TC46972 のゲノム配列であると考えられた。*FLS1*~*FLS5* の推定アミノ酸配列が、FLS を含む 2-オキシグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼに保存されている重要なアミノ酸残基を有していたこと (Fig. I-3)、2-オキシグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼの中で他の植物の FLS に対して最も高い相同性を示したことから (Table I-3)、ブドウのゲノム DNA から得られた5つの遺伝子はそれぞれ FLS をコードしていることが示唆された。

サザンブロット解析の結果、*DraI* により消化したゲノムで4本の断片が検出された (Fig. I-4)。取得した *FLS* は全てプローブに相当する領域に *DraI* サイトを含まないことから、FLS 遺伝子がブドウのゲノム中に少なくとも4コピー存在することが示唆された。*FLS5* は相同性が低いために *FLS2* のプローブと結合しなかった可能性がある。

RT-PCR 解析の結果、果皮においては *FLS2*、*FLS4*、及び *FLS5* の mRNA が生育初期に検出され、その後蓄積が減少し、成熟期に *FLS4* と *FLS5* の mRNA が再び蓄積した (Fig. I-5A)。葉においては *FLS2*、*FLS3*、*FLS4*、及び *FLS5* の mRNA が検出された。蕾と花においては5つの *FLS* 全ての mRNA が検出された。Downey ら (2003) は、*FLS4* に相当する *VvFLS1* が‘シラー’と‘シャルドネ’の成熟期の果実と同様に葉、蕾、花にも発現すると報告している。従って、‘カベルネ・ソービニオン’の *FLS4* の転写パターンは‘シラー’と‘シャルドネ’の *VvFLS1* の転写パターンと一致した。彼らはまた、*FLS1* に相当する *VvFLS2* の発現は果実の生育と成熟の間、恒常的であるが *VvFLS1* の発現レベルよりもかなり低いと報告している。本解析において、*FLS1* の mRNA は蕾と花に検出されたが、果皮においてはおそらく mRNA 濃度が低すぎて検出されなかったの

であろう。

果皮におけるフラボノール量を測定した結果、最も多いフラボノールはケルセチンであった。ケルセチンは生育初期にすでにある程度存在しており、その後ベレゾン期まで果実当たりの総量はほとんど変化せず、成熟期に再び蓄積した (Fig. I-5B, C)。花に発現する 5 つの *FLS* 全てが開花期から生育初期までのフラボノールの生合成に関与しているようにみえた。ケルセチンの蓄積パターンは *FLS* の mRNA の蓄積の変化と一致した。同様に、*FLS* の mRNA が蓄積した葉は高レベルのフラボノールを含有していることが報告されている (Downey *et al.*, 2003)。これらの結果から、フラボノールの生合成が *FLS* の転写による制御を受けていることが示唆された。

‘カベルネ・ソービニオン’の果皮にはフラボノイド 3'-ヒドロキシラーゼ (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) よりフラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ (flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3'5'H) の遺伝子の mRNA が高レベルで蓄積すること、収穫期には高レベルのデルフィニジン系アントシアニン (F3'5'H 関連産物) が含まれるが、フラボノールとしてはミリセチン (F3'5'H 関連) よりケルセチン (F3'H 関連) が高レベルで含まれることを Jeong ら (2006) が報告している。従って、バラやペチュニアの *FLS* で報告されているように (Suzuki *et al.*, 2000)、ブドウの *FLS* は恐らくジヒドロケンフェロールやジヒドロミリセチンよりもジヒドロケルセチンに対して高い特異性を持っているのであろう。

アントシアニンはフラボノールと同様に果皮に蓄積し、果肉や種子には蓄積しない。そしてその蓄積は光により促進される。しかし、フラボノールとアントシアニンは果皮への蓄積の仕方が異なる。フラボノールは生育初期と成熟期に蓄積するのに対し、アントシアニンは成熟期にのみ蓄積する。‘カベルネ・ソービニオン’の果皮においてアントシアニンの蓄積とその生合成関連遺伝子の転写は ABA 処理により促進され、NAA と遮光により抑制された (Jeong *et al.*, 2004)。各処理を行った日から 4 週間後の果皮におけるおおよそのアントシアニン濃度は ABA 処理区 3.6 mg/g、対照区 1.9 mg/g、遮光区 1.0 mg/g、NAA 処理区 0.5 mg/g であり、NAA の影響は遮光の影響よりもやや強かった。対照的に、成熟期のフラボノールの蓄積と *FLS4* の転写に及ぼす遮光の阻害効果は NAA の影響よりもはるかに強かった (Fig. I-6A, B, D, E)。また、‘メルロー’においては

フラボノールの蓄積と *FLS4* の転写が ABA 処理により促進されたが、‘カベルネ・ソービニヨン’ においては促進効果がみられなかった。ABA の影響の品種による違いに関しては、今後検討する必要がある。

フラボノールとアントシアニンの蓄積の相違に関して、高温によりアントシアニン濃度が減少するがフラボノール濃度にはほとんど影響がないことを Spayd ら (2002) が報告している。彼女らはまた、紫外線遮蔽により個々のフラボノール濃度と総フラボノール濃度が顕著に減少するがアントシアニンモノマーの濃度は減少しないことを報告している。

彼女らの報告と本章で得られた結果は、アントシアニンとフラボノールの生合成経路の上流は共通であるが、それらの生合成が異なる制御を受けているということを強く示唆した。同様に、トルコギキョウの花色形成がアントシアニンとフラボノールに対するそれぞれ特有の機構により制御されると推定されている (Noda *et al.*, 2004)。さらに、ブドウの 5 つの *FLS* が異なる器官に異なるパターンで転写されたため、それらはそれぞれ異なる転写制御を受けていると考えられた。

1.5. 要旨

ブドウのフラボノールの生合成制御機構を解析することを目的として、赤ワイン用ブドウ品種‘カベルネ・ソービニオン’のフラボノール合成酵素 (FLS) 遺伝子と推定される 5 つのゲノム塩基配列 (*FLS1*~*FLS5*) を決定した。5 つの *FLS* の mRNA は蕾と花に蓄積した。また、*FLS2*、*FLS4*、及び *FLS5* の mRNA は幼果の果皮に蓄積した後、ベレゾン期にかけて減少した。成熟期には *FLS4* と *FLS5* の mRNA のみが再び蓄積した。mRNA 蓄積のこの変化は果皮におけるフラボノールの蓄積と矛盾しなかった。果実の遮光はフラボノール量の増加と *FLS4* の mRNA 蓄積を完全に阻害したが、*FLS5* の mRNA 蓄積には影響を及ぼさなかった。光と植物ホルモンのフラボノール蓄積に及ぼす影響はアントシアニン蓄積に及ぼす影響と異なっていた。従って、フラボノールはアントシアニンとは異なる生合成制御を受けていると考えられた。

第2章 ブドウ果実におけるアントシアニン還元酵素遺伝子の 発現とフラバン-3-オール類の蓄積

2.1. 緒言

縮合タンニンとして知られるプロアントシアニジンはフラボノイドの一種で、ブドウとワインの渋味や苦味に寄与し、ワイン、特に赤ワインの品質に重要な役割を果たす。プロアントシアニジンは C4-C6 や C4-C8 の炭素-炭素結合で繋がったフラバン-3-オール単位（例：(+) -カテキン、(-) -エピカテキン）のオリゴマーやポリマーである。ブドウのプロアントシアニジンは果皮と種子に蓄積することが知られ、果肉にはほとんど蓄積しない (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1992a, 1992b)。ほとんどのフラバン-3-オールはオリゴマーやポリマーとして蓄積し、ブドウの果皮と種子にモノマーとして蓄積するのはほんの僅かである (Monagas *et al.*, 2003)。ブドウの種子のプロアントシアニジンは (+) -カテキン、(-) -エピカテキン、及び (-) -エピカテキンの没食子酸エステルで構成されている (Prieur *et al.*, 1994)。一方、果皮のプロアントシアニジンにはさらにプロデルフィニジン (Escribano-Bailón *et al.*, 1995)、すなわち (-) -エピガロカテキン、及びごく少量の (+) -ガロカテキンや (-) -エピガロカテキンの没食子酸エステル (Souquet *et al.*, 1996) も含まれる。ブドウの果皮と種子のプロアントシアニジンポリマーを構成するフラバン-3-オール単位の 60~80%が (-) -エピカテキンであり、果皮のフラバン-3-オール単位の 10~30%が (-) -エピガロカテキンである (Monagas *et al.*, 2003)。

フラバン-3-オールは赤ワイン用ブドウや他の植物の重要な成分であるが、その生合成経路は 2003 年まで解明されていなかった。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *BANYULS* (*BAN*) 遺伝子が、ロイコアントシアニンから (+) -カテキンのような 2,3-トランス-フラバン-3-オールへの反応を触媒するロイコアントシアニン還元酵素 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) をコードすると最初は考えられていた (Devic *et al.*, 1999)。しかし、*BAN* がアントシアニンから (-) -エピカテキンのような 2,3-シス-フラバン-3-オールへの反応を触媒するアントシアニン還元酵素 (anthocyanidin reductase, ANR)

をコードすることが後に発見された (Xie *et al.*, 2003)。ANR 遺伝子はマメ科の *Medicago* からクローニングされた (Xie *et al.*, 2004)。同時期にマメ科の *Desmodium* から LAR タンパク質が精製され、その遺伝子がクローニングされた (Tanner *et al.*, 2003)。これらの新規に発見された還元酵素、ANR と LAR はジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) に似たアミノ酸配列を有している。ANR と LAR は DFR と同様に NADPH/NADH 要求性の還元酵素であり、レダクターゼ-エピメラーゼ デヒドロゲナーゼのタンパク質ファミリーに属している (Devic *et al.*, 1999; Tanner *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004)。従って、フラバン-3-オールはブドウの赤色色素であるアントシアニンと同じ上流の生合成経路を共有している (Fig. II-1)。フラバン-3-オールモノマーは重合してプロアントシアニジンになるが、プロアントシアニジンの重合のプロセスはまだ解明されていない。

ブドウやワインに含まれるプロアントシアニジンの成分分析は数多く行われてきたが、ブドウのプロアントシアニジン生合成に関与する酵素や遺伝子に関してはまだ詳細な研究が行われていない。本章では、*BAN* として登録されていたブドウの cDNA 配列に基づいて、‘カベルネ・ソービニヨン’ から ANR のゲノム DNA を得た。その後、(-)-エピカテキンと (-)-エピガロカテキンの生合成がブドウ ANR 遺伝子 (*VvANR*) の転写によって制御されているかを調べるために、ブドウ果実の生育と成熟中の‘カベルネ・ソービニヨン’の果皮と種子における *VvANR* の mRNA レベルとプロアントシアニジン濃度を測定した。

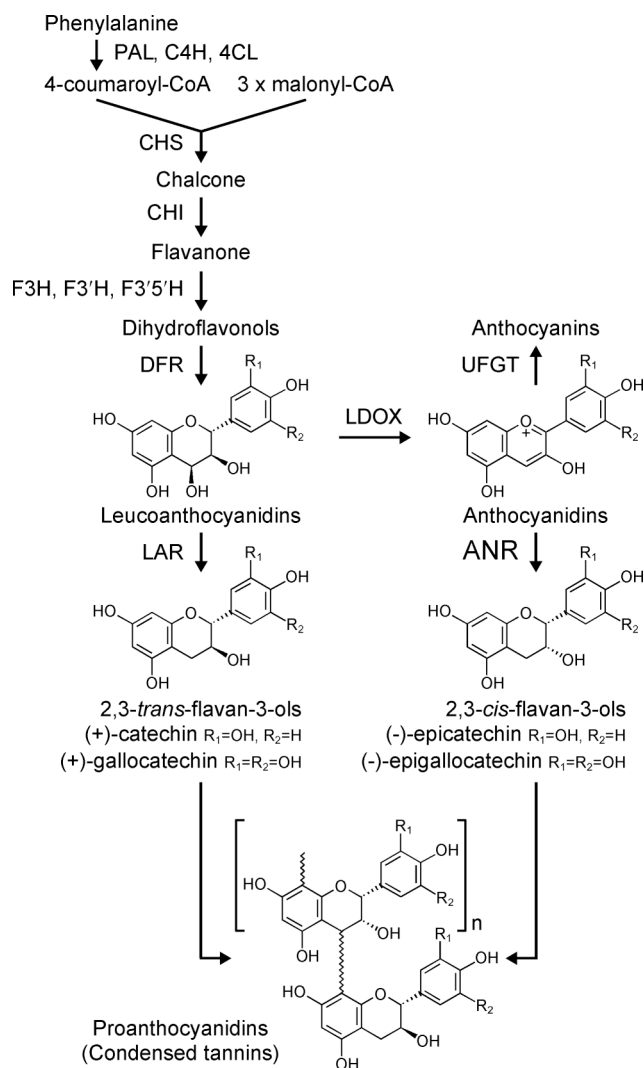


Fig. II-1. Schematic representation of the biosynthetic pathway of proanthocyanidin and anthocyanin. Enzyme abbreviations: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA-ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; UFGT, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; ANR, anthocyanidin reductase. R_1 and R_2 are H or OH.

2.2. 材料と方法

2.2.1. 試薬

試薬類は特に断りのない限り、和光純薬工業社の特級を用いた。水溶液の調製には Milli-Q 水 (Millipore 社) を用いた。オリゴ DNA はシグマアルドリッチジャパン社または北海道システム・サイエンス社に合成と精製を依頼した。

2.2.2. 植物材料

広島県東広島市の酒類総合研究所の圃場で栽培されているブドウの赤ワイン用品種 ‘カベルネ・ソービニオン’ の木 4 本を用いた。2003 年に生育と成熟の各段階で果実をランダムに採取した。果実から皮を剥き、種子を取り出した後、果皮と種子を液体窒素の入ったデュワー瓶に入れて直ちに凍結し、使用まで -80°C に保存した。

2.2.3. ブドウ ANR 遺伝子のゲノム塩基配列の決定

‘カベルネ・ソービニオン’ の全 DNA から *VvANR* のゲノム断片を PCR で増幅した。*BAN* として登録されているブドウの cDNA クローン VitiA765 (VitiGen 社) のコード領域に PCR プライマー、センス (5'-ACTTCAGATGTCCCCAGCAG-3') とアンチセンス (5'-CCCTTGGCCTTGAAATACTC-3') を設計した。PCR は 94°C 30 秒 \rightarrow 52°C 30 秒 \rightarrow 72°C 90 秒のサイクル条件で行った。約 900 bp の増幅断片を pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen 社) に挿入し、ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて挿入断片の塩基配列を決定した。さらに、その配列の上流と下流を Universal GenomeWalker Kit (BD Biosciences Clontech 社) を用いて DNA ウォーキングにより決定した。得られた配列は遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC (ゼネティックス社) を用いて解析した。

2.2.4. ANR、LAR、及び DFR の系統解析

ブドウと他の植物の ANR、LAR、及び DFR の推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行った。DDBJ の解析プログラム CLUSTALW (version 1.83) と英国グ

ラスゴー大学の Roderic Page 教授が提供している系統樹描画ソフトウェア TreeView (version 1.6.6) を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。CLUSTALW の解析には概ねデフォルトパラメーターを使用した。系統樹の計算時に Kimura の correction を使用せず、gap を無視した。

2.2.5. サザンブロット解析

‘カベルネ・ソービニオン’の全 DNA 10 µg ずつを制限酵素 *Bgl*III、*Bam*HI、*Sac*I、及び *Dra*I (タカラバイオ社) で別々に消化し、1.0% アガロースゲルに供して電気泳動を行った。次に、アガロースゲルから正電荷ナイロンメンブレン (Roche Diagnostics 社) にブロットし、メンブレンを 392 塩基のプローブを用いてハイブリダイズした。プローブは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて VitiA765 のクローンを鋳型にプライマー 5'-ACTTCAGATGTCCCCAGCAG-3' (開始コドンから 610 ~ 629) と 5'-CCCTTGGCCTTGAAATACTC-3' (開始コドンから 982~1001 の相補鎖) で増幅し、ジゴキシゲニンでラベルして調製した。ハイブリダイゼーションは、溶液 DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics 社) を用いて 40°C で行った。その後、メンブレンを 2×SSC (20×SSC:3 M 塩化ナトリウム, 0.3 M クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS の溶液を用いて室温で 5 分間、2 回洗浄した後、さらに 0.1×SSC、0.1% SDS の溶液を用いて室温で 15 分間、2 回洗浄した。最後に、DIG-CSPD システム (Roche Diagnostics 社) と LAS-1000plus イメージアナライザー (富士写真フイルム社) を用いてハイブリダイズしたメンブレン上の断片を検出した。

2.2.6. RNA の抽出と mRNA の定量

まず、Geuna ら (1998) の方法に従って果皮と種子から全 RNA を抽出して精製した後、260 nm の吸光度を測定して RNA 濃度を決定した。

次に、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社) と GeneAmp 5700 定量 PCR システム (Applied Biosystems 社) を用いて取扱説明書に従ってリアルタイム定量 PCR を行い、*VvANR* の mRNA レベルを決定した。はじめに、AMV reverse transcriptase XL (タカラバイオ社) と 0.125 µM のオリゴ dT プライマーを用いて 0.5 ng/µl の全 RNA の逆転写反応を行い、全ての RNA 試料から cDNA を調製

した。定量 PCR のプライマーには、5'-GCTGCTGTTACCATCAATCA-3' (開始コドンから 1774~1793 で、第 3 エクソンに位置する。) と 5'-GCAGGATAGCCCCAAGTAGG-3' (開始コドンから 1867~1993 の相補鎖で、第 3 エクソンから第 4 エクソンにまたがっている。) を使用し、113 bp の断片を増幅した。また、Downey ら (2003) によって報告された方法を参考にユビキチン遺伝子 (*Ubiquitin*) を定量 PCR の内部コントロールとして増幅した。*Ubiquitin* のプライマーの設計は、TIGR が構築したブドウ EST データベース (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape) の配列 TC38636 に基づいて行い、5'-TCTGAGGCTTCGTGGTGGTA-3' (順方向) と 5'-AGGCGTGCATAACATTTGCG-3' (逆方向) とし、99 bp の増幅産物ができるようにした。定量 PCR には 1.0 μ l の鋳型 cDNA と順方向・逆方向それぞれ 0.3 μ M のプライマーを含む反応液 (20 μ l) を調製し、95°C15 分→94°C15 秒→57°C30 秒→72°C30 秒を 45 サイクル繰り返す条件で行った。検量線の作成のための標準 DNA は 1.2.5 の方法に従って調製した。リアルタイム定量 PCR は全 RNA 試料当たり 3 回行った。データの平均値は *VvANR* の mRNA レベルの *Ubiquitin* に対するモル比で表したため、単位がない。

2.2.7. フラバン-3-オールとプロアントシアニジンの抽出、分画、及び定量

まず、マルチビーズショッカー (安井器械社) を用いて凍結果皮と種子を破碎した。破碎した果皮と種子から Bourzeix ら (1986) の方法に従って、メタノール、メタノール/水 (80/20, v/v)、メタノール/水 (50/50, v/v)、蒸留水、及びアセトン/水 (75/25, v/v) を用いてフェノール化合物を順次抽出した。次に、Sun ら (1998a) の方法に従って、混合した抽出液を Sep-Pak Plus 固相抽出カートリッジ tC₁₈ と C₁₈ (Waters 社) に供し、フラバン-3-オールモノマー (FI)、プロアントシアニジンオリゴマー (FII)、ポリマー (FIII) の 3 画分に分けた。

最後に、各々の画分のフラバン-3-オール濃度を改変バニリン法 (Sun *et al.*, 1998b) で測定した。フラバン-3-オール濃度は (+)-カテキン (Sigma Chemical 社) で作成した検量線を用いて決定し、果皮あるいは種子の重量グラム当たりの (+)-カテキン相当量で表した。果皮については最後の試料を除いて果実当たりの総量でも表した。分画と定量は 3 回ずつ行った。

2.3. 結果

2.3.1. ブドウ ANR 遺伝子の塩基配列と性質

ANR は DFR と類似する構造を持つことが知られているので、ANR 遺伝子に保存された塩基配列かつブドウの DFR 遺伝子 (*VvDFR*, GenBank accession no. X75964) に見られない配列上に PCR プライマーを設計した。PCR クローニングとゲノムウォーキングの後に得られた ‘カベルネ・ソービニオン’ の ANR ゲノム配列 (*VvANR*, AB199315) には 5 つのイントロン、及び 5' と 3' の非翻訳領域 (それぞれ 678 bp と 264 bp) が含まれた。*VvANR* の 5 つのイントロンは *Arabidopsis thaliana* の ANR 遺伝子 (*AtANR*, AC005882 REGION: complement [43221 to 44652]) や *VvDFR* のイントロンと同じ場所に位置していた。

VvANR のエクソン、及び 5' と 3' の非翻訳領域のヌクレオチド配列は VitiA765 に対して 98.8% の相同性を示し、*VvANR* の塩基配列決定中に ANR 遺伝子 (*BAN*) (BN000166; Tanner *et al.*, 2003) として登録された ‘シャルドネ’ の cDNA に対して 99.8% の相同性を示した。*VvANR* の推定アミノ酸配列は 338 アミノ酸残基から成り、VitiA765 と ‘シャルドネ’ の ANR のアミノ酸配列に対してそれぞれ 98.5% と 99.7% の相同性を示した。

Table II-1. Homology (%) of deduced amino acid sequences of *VvANR* (*Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’) to other anthocyanidin reductase (ANR) and dihydroflavonol 4-reductase (DFR).

	<i>VvANR</i>	<i>AtANR</i> ^a	<i>MtANR</i> ^b	<i>AtDFR</i> ^c
<i>VvANR</i>	—	65.2	74.7	45.5
<i>VvDFR</i> ^d	45.9	39.8	42.0	75.9

^a *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia ANR (GenBank protein_id NP_176365.1).

^b *Medicago truncatula* ANR (AAN77735.1).

^c *A. thaliana* ecotype Landsberg erecta DFR (BAA85261.1).

^d *V. vinifera* ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ DFR (CAA53578.1).

VvANR は *A. thaliana* や *Medicago truncatula* の ANR に対して約 65~75% の相同性を示し、DFR に対してより低い相同性を示した (Table II-1)。ANR と DFR は両方とも NADPH/NADH 要求性の還元酵素であることが知られている。*VvANR* は他の ANR や DFR と同様に 5' アミノ末端領域に GXXGXXG/A 配列 (Xie *et al.*, 2004) で保存される Rossmann NADPH/NADH 結合ドメインを有している。

VvANR は他の ANR と同様にその保存配列の最後が “A” であり、DFR はこの位置が “G” である (Table II-2)。従って、VvANR は他の ANR に対して高い相関性があり、ANR に特徴的な配列を保持している。

Table II-2. Amino acid sequence conservation between ANRs and DFRs at the 5' amino terminal regions, including the Rossmann dinucleotide (NADPH/NADH)-binding domain.

GenBank protein_id	Species	Enzyme		Sequence
NP_176365.1	At-Col ^a	ANR	12	KACVIGGGTGNLASILIKHLL
AAN77735.1	Mt ^b	ANR	13	KACVIGGTGFVASLLIKQLL
BAD89742.1	Vv-CS ^c	ANR	11	TACVVGGTGFVASLLVKLLL
BAA85261.1	At-Le ^d	DFR	7	TVCVTGASGFIGSWLVMRLL
AAR27014.1	Mt ^b	DFR1	7	TVCVTGASGFIGSWLVMRLM
AAR27015.1	Mt ^b	DFR2	7	TVCVTGASGFIGSWLVMRLM
CAA53578.1	Vv-LF ^e	DFR	7	TVCVTGASGFIGSWLVMRLL
Consensus				** * * * * *
NADPH/NADH-binding domain				GXXGXXG/A

^a *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia.

^b *Medicago truncatula*.

^c *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’.

^d *A. thaliana* ecotype Landsberg erecta.

^e *V. vinifera* ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’.

系統解析の結果、VvANR は他の植物の ANR とクラスターを形成しており、LAR や DFR のクラスターとは離れていた (Fig. II-2)。

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) という植物のシス制御 DNA 因子のデータベースを用いた相関性検索を行った結果、VvANR のプロモーター領域にいくつかのシス制御因子が存在することがわかった (Fig. II-3)。光に制御される遺伝子に保存されている因子として、1 カ所の G-box (CACGTG)、4 カ所の GT-1 site (GRWAAW)、1 カ所の I-box (GATAA) (Terzaghi and Cashmore, 1995)、及び 4 カ所の GATA box (Gilmartin *et al.*, 1990) が VvANR のプロモーターに存在した。VvANR のプロモーターには 4 カ所の Myc 認識部位 (CANNTG; Abe *et al.*, 2003) と 2 カ所の Myb 結合部位 (CNGTTR) も存在していた。

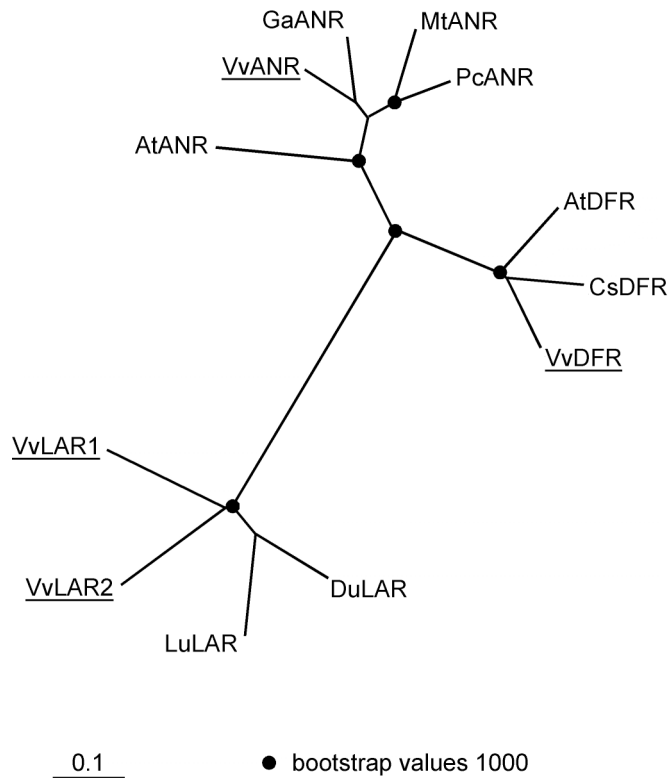


Fig. II-2. Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of ANRs, LARs, and DFRs. AtANR, *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia ANR (GenBank protein_id NP_176365.1); GaANR, *Gossypium arboreum* ANR (CAD91910.1); MtANR, *Medicago truncatula* ANR (AAN77735.1); PcANR, *Phaseolus coccineus* ANR (CAD91909.1); VvANR, *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ ANR (BAD89742.1); DuLAR, *Desmodium uncinatum* LAR (CAD79341.1); LuLAR, *Lotus uliginosus* LAR (AAU45392.1); VvLAR1 and VvLAR2, *V. vinifera* ‘Shiraz’ LARs (CAI26310.1 and CAI26308.1); CsDFR, *Camellia sinensis* DFR (BAA84939.1); AtDFR, *A. thaliana* ecotype Landsberg erecta DFR (BAA85261.1); VvDFR, *V. vinifera* ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ DFR (CAA53578.1). Grape ANR, LARs, and DFR are underlined.

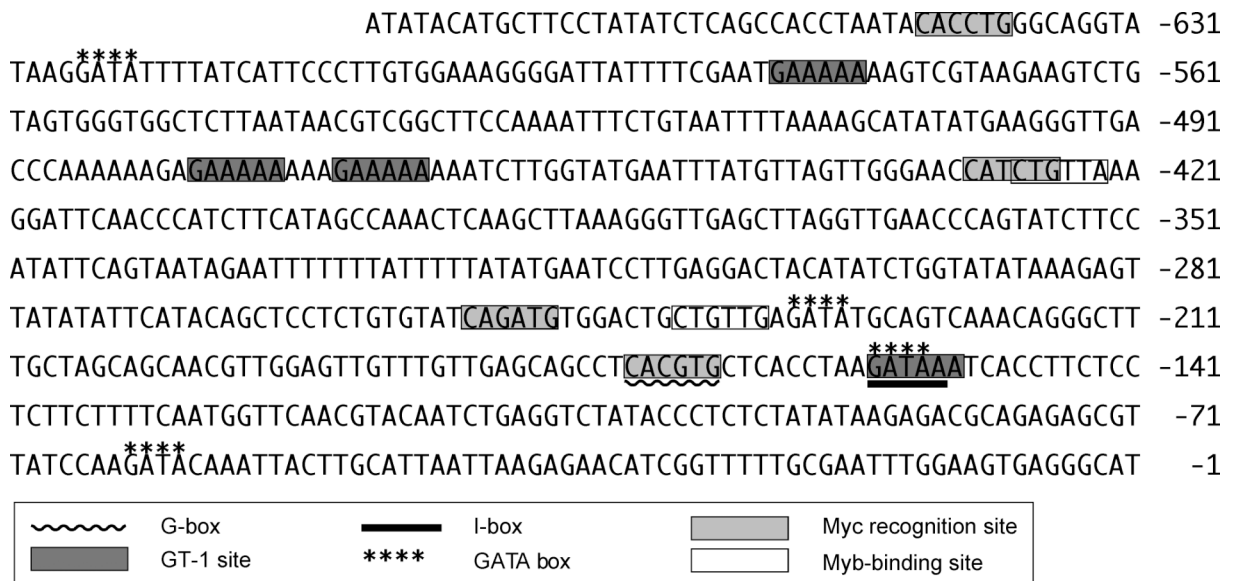


Fig. II-3. Nucleotide sequence of the grape ANR gene (*VvANR*) between -678 and -1 relative to the transcription start site. Several putative *cis*-acting regulatory elements in the *VvANR* promoter region are indicated.

ブドウゲノムにおける ANR 遺伝子のコピー数を決定するために、サザンブロット解析を行った。ANR cDNA の 3'末端領域にハイブリダイゼーションのプロローブを設計した。その領域が DFR cDNA の対応する配列に対して比較的低い相同性を示したからである。ハイブリダイゼーションの結果、*Bg*III、*Bam*HI、及び *Sac*I による消化で 1 本、*Dra*I による消化で 2 本の断片が検出された (Fig. II-4)。

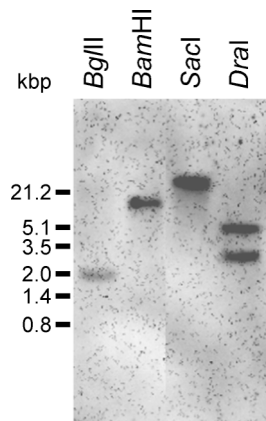


Fig. II-4. Southern blot analysis of the ANR gene from the grape genome. Each lane shows 10 μ g of DNA of 'Cabernet Sauvignon' digested with *Bg*III, *Bam*HI, *Sac*I, and *Dra*I. Positions of the molecular size markers are shown at left.

2.3.2. 'カベルネ・ソービニオン' の果皮と種子における *VvANR* mRNA の蓄積

'カベルネ・ソービニオン' の果皮と種子を用いてリアルタイム定量 PCR で *VvANR* の mRNA レベルを分析した。生育初期の果皮と種子に *VvANR* の mRNA の蓄積がみられたが、ベレズン期に向かって減少し、収穫期 (9月18日) にはほとんど検出されなかった (Fig. II-5)。「ピノ・ノワール」の果皮と種子においても ANR 遺伝子の mRNA の蓄積がベレズン期後にほとんどみられなかった(データは示していない)。

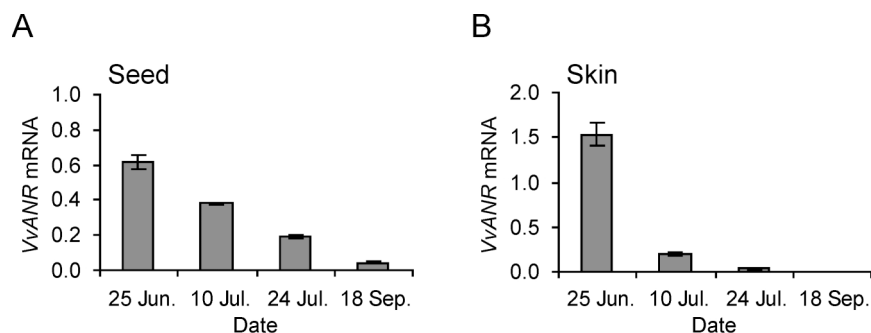


Fig. II-5. mRNA accumulation of the ANR gene (*VvANR*) in berry seeds (A) and skins (B) of 'Cabernet Sauvignon', 2003. The mRNA level of *VvANR* was measured by real-time quantitative-PCR analysis. Results are expressed as the molar ratio of the mRNA level of *VvANR* to that of the ubiquitin gene. Each bar represents the mean of triplicate analysis, and error bars represent the standard deviation of the mean.

2.3.3. 果実の生育期と成熟期のフラバン-3-オール濃度

‘カベルネ・ソービニオン’の果実の生育期と成熟期の果皮と種子におけるフラバン-3-オールモノマー、プロアントシアニジンオリゴマー、及びポリマーの濃度を Fig. II-6 に示した。全ての試料において、フラバン-3-オールモノマーの濃度が相対的に低く、ほとんどのフラバン-3-オールが重合し、オリゴマーやポリマーとして蓄積した。果皮におけるポリマー画分の割合は種子における割合よりも高かった。Monagas ら (2003) がこれと同じ傾向を報告している。HPLC 分析の結果、種子のモノマー画分に (+)-カテキン、(-)-エピカテキン、及び (-)-エピカテキンの没食子酸エステルが含まれた (データは示していない)。幼果の果皮と種子においてフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンがすでに蓄積していた。幼果期 (6月25日) からベレゾン期前 (7月24日) までの間、総フラバン-3-オール濃度 (mg/g) が種子で増加したが、果皮では減少した (Fig. II-6A, B)。しかし、その期間に果実の体積が大きくなったため、果実当たりのフラバン-3-オールの総量は増加した (Fig. II-6C)。ベレゾン期前から収穫期にかけては果皮でプロアントシアニジンポリマー画分の濃度が減少した。

2003年の夏は降水量が多く、ブドウが生育不良になったため、8月の試料採取を断念した。

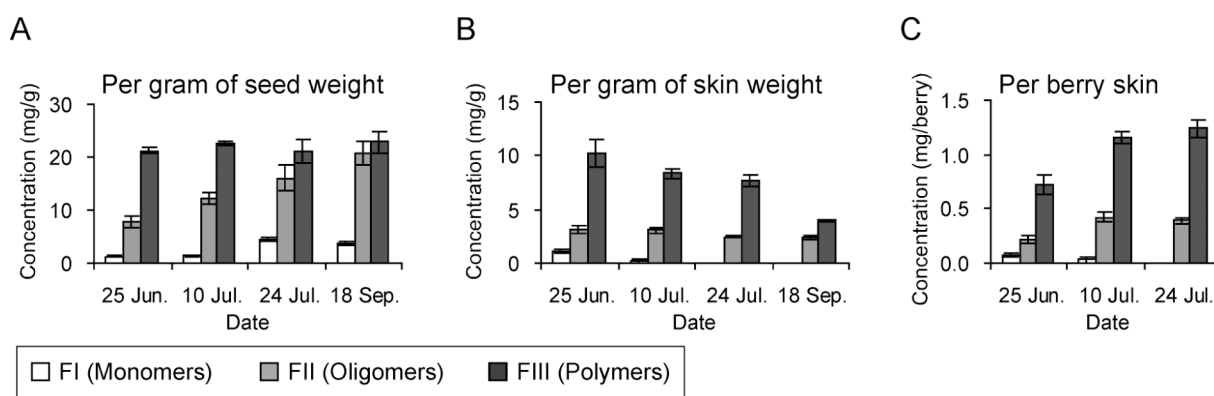


Fig. II-6. Accumulation of flavan-3-ols in the berry skins and seeds of ‘Cabernet Sauvignon’, 2003. Flavan-3-ol concentrations of the monomeric, oligomeric, and polymeric fractions were quantified by vanillin assay. Results are expressed in (+)-catechin equivalents per gram of fresh seed or skin weight (A, B) or per berry skin (C). Each bar represents the mean of triplicate analysis, and error bars represent the standard deviation of the mean. The data of 18 Sep. is missing from C.

2.4. 考察

本章ではまず、‘カベルネ・ソービニオン’の ANR 遺伝子のゲノム塩基配列 (*VvANR*) を決定した。*VvANR* のエクソン、及び 5' と 3' の非翻訳領域のヌクレオチド配列が VitiA765 や ‘シャルドネ’ の ANR cDNA とほぼ一致し、アミノ酸レベルでもほぼ一致したことから、*VvANR* を VitiA765 や ‘シャルドネ’ の ANR cDNA のゲノム配列とみなした。また、TIGR のブドウ EST データベースで ANR 遺伝子として登録されている TC45542 と同じ遺伝子とみなした。EST データベースには TC45542 が非生物的なストレスを受けた葉と同様に果実や花にも検出されると記されている。

VvANR のプロモーター領域には光に関係する多くのシス制御因子が存在したため (Fig. II-3)、*VvANR* の発現が光により制御されることが示唆された。また、*VvANR* のプロモーター領域には Myc 認識部位や Myb 結合部位もいくつか存在していた。アントシアニン生合成は Myc と Myb ファミリーの転写制御因子により制御されている (Dooner *et al.*, 1991; Roth *et al.*, 1991)。ペチュニアの Myb タンパク質 (MYB.Ph3) はフラボノイド生合成の制御に関与している (Solano *et al.*, 1995)。ブドウの Myb 関連遺伝子はアントシアニン生合成を制御している (Kobayashi *et al.*, 2002)。Baudry ら (2004) は、*A. thaliana* のヘリックス-ループ-ヘリックス Myc 様タンパク質と Myb タンパク質が *BAN* の適切な発現に必要であると報告した。従って、*VvANR* の転写とプロアントシアニジンの生合成はおそらく Myc と Myb タンパク質により制御されているのであろう。

サザンブロット解析の結果、*Bgl*III、*Bam*HI、及び *Sac*I による消化で 1 本、*Dra*I による消化で 2 本の断片が検出された (Fig. II-4)。*Dra*I による消化で生じた 2 本のバンドが対立遺伝子であると想定すると、ANR 遺伝子はハプロイドゲノム中に 1 コピーである。利用可能なブドウの EST データベースに他の ANR 遺伝子が見つからないので、たとえ *VvANR* がブドウの唯一の ANR 遺伝子でなくとも、主要な ANR 遺伝子であることに間違いはないであろう。

リアルタイム定量 PCR の結果、*VvANR* の mRNA レベルは幼果の果皮と種子で高いが、成熟期に向かってかなり減少することが分かった (Fig. II-5)。

果皮と種子のフラバン-3-オール類を定量したところ、幼果期にすでにフラバ

ン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンが蓄積しており、生育初期に増加した (Fig. II-6)。ベレゾン期前から収穫期にかけては果皮でプロアントシアニジン ポリマー画分の濃度が減少した。これは果実の体積の増加、プロアントシアニジンの分解、プロアントシアニジンを抽出不可能にする構造変化が原因ではないかと考えられる。成熟期のプロアントシアニジン濃度のデータをとることができなかったが、過去にフラバン-3-オール モノマーとオリゴマーの濃度は果実の果皮と種子 (Jordão *et al.*, 2001)、及び全果実 (De Freitas *et al.*, 2000) でベレゾン期後に減少すると報告されている。さらに Mateus ら (2001) は、果皮と種子においてフラバン-3-オールの 1~3 量体と同様に抽出可能な総プロアントシアニジンがベレゾン期後に減少すると報告した。

従って、ここで得られた結果と他のグループの報告はフラバン-3-オール類がベレゾン期前、特に生育初期に蓄積し、成熟期に濃度が減少することを示した。フラバン-3-オール濃度の変化は *VvANR* の mRNA 蓄積の変化と矛盾しなかった。これらの結果により (-) -エピカテキンと (-) -エピガロカテキンの生合成の少なくとも一部が *VvANR* の転写によって制御されている可能性が示唆された。

2,3-シス-フラバン-3-オールとアントシアニンは、それらの生成経路において PAL から LDOX までのフラボノイド生合成酵素を共有している (Fig. II-1)。ブドウ果皮におけるアントシアニン生合成に関するこれまでの研究は、これらの遺伝子の mRNA レベルが生育初期に高く、ベレゾン期に向かって減少し、成熟期に再び増加することを示した (Boss *et al.*, 1996c; Kobayashi *et al.*, 2001)。生育初期において PAL から LDOX までの酵素の mRNA はプロアントシアニジンと同時に果皮に蓄積する。従って、その時期に蓄積するいくつかの mRNA は 2,3-シス-フラバン-3-オールの生合成に加わっているであろう。

2003 年、Tanner らによってプロアントシアニジンのもうひとつの構成要素、(+)-カテキンに代表される 2,3-トランス-フラバン-3-オールの合成機構が *Desmodium* を用いて明らかにされた。(+) -カテキンの生合成と (-) -エピカテキンや (-) -エピガロカテキンの生合成は同等の制御を受けていると考えられる。ブドウのフラバン-3-オールとプロアントシアニジンの生合成とその制御機構を解明するためにはさらなる研究が必要である。

2.5. 要旨

プロアントシアニジン（フラバン-3-オール単位のオリゴマーとポリマー）は赤ワイン醸造用ブドウの重要な成分で、果皮と種子に蓄積する。ブドウのプロアントシアニジンを構成する主要なフラバン-3-オールは(-)-エピカテキンと(-)-エピガロカテキンである。(-)-エピカテキンと(-)-エピガロカテキンはアントシアニジンからアントシアニジン還元酵素（ANR）によって生合成される。本章においては、*Vitis vinifera* ‘カベルネ・ソービニオン’のANR遺伝子のゲノム塩基配列（*VvANR*）を取得した。*VvANR*の推定アミノ酸配列は他の植物のANRの特徴的な配列を保持していた。サザンブロット解析の結果、ブドウのANRはハプロイドゲノムにおいて単一コピーの遺伝子によってコードされていることが示された。果皮と種子を用いたリアルタイム定量PCRの結果、*VvANR*のmRNAは果実の生育初期に蓄積し、成熟期に向かって減少することがわかった。また、ここでの解析と他の報告はプロアントシアニジンがベレゾン期前、特に生育初期の果皮と種子に蓄積し、成熟期に濃度が減少することを示した。従って、果皮と種子においてmRNAの蓄積の変化がプロアントシアニジンの蓄積の変化と概ね一致した。以上の結果より、(-)-エピカテキンと(-)-エピガロカテキンの生合成の少なくとも一部が*VvANR*の転写によって制御されている可能性が示唆された。

第3章 ブドウ果実におけるプロアントシアニジンの生合成に及ぼす遮光の影響

3.1. 緒言

前述のように、プロアントシアニジンはフラバン-3-オール単位のオリゴマーやポリマーである (Fig. III-1)。フラバン-3-オール生合成の鍵酵素はアントシアニジンから 2,3-シス-フラバン-3-オールへの反応を触媒する ANR とロイコアントシアニジンから 2,3-トランス-フラバン-3-オールへの反応を触媒する LAR である (Tanner *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003)。プロアントシアニジンの開始単位はフラバン-3-オールであるとされているが、伸長単位の由来やプロアントシアニジン重合の機構はまだわかっていない。ロイコアントシアニジン由来のキノンメチドあるいはカルボカチオンが一般的に伸長単位の前駆体として受け入れられてきたが、ロイコアントシアニジンは 2,3-トランス立体化学をもつため、プロアントシアニジンの主な伸長単位が 2,3-シス配置であるということを説明できない (Xie and Dixon, 2005)。また、アントシアニジンも PA 重合の基質になる可能性があると考えられてきた。最近、タバコの花びらにおける ANR の発現によりプロアントシアニジンが蓄積したことから、2,3-シス-フラバン-3-オールが開始単位だけでなく伸長単位も構成しているというモデルが提案されている (Xie *et al.*, 2003, 2006)。ブドウ種子のプロアントシアニジンにおいて、末端単位の 60%と伸長単位の 90%が 2,3-シス-フラバン-3-オールであると報告されている (Kennedy *et al.*, 2000a, 2000b)。

ブドウに関して Bogs ら (2005) は、‘シラー’の ANR cDNA (*VvANR*) と LAR cDNA (*VvLAR1* と *VvLAR2*) を報告した。彼らは ANR と LAR の両方がブドウ果実のプロアントシアニジン合成に関与していること、プロアントシアニジンの蓄積が果実の生育初期に起こり、成熟が始まる頃に終わることを示した。ほぼ同時期に我々もまた、‘カベルネ・ソービニオン’の果皮と種子において *VvANR* の mRNA がプロアントシアニジンと共に生育初期に蓄積し、成熟期に向かって減少することを報告した (第2章)。

フラバン-3-オールとプロアントシアニジンはブドウの赤色色素であるアン

トシアニンやフラボノール（赤ワインの苦味に関与し、コピグメンテーション（Baranac *et al.*, 1997）により赤ワインの色を安定化または増強する。）と上流の生合成経路を共有している。ブドウ果実におけるフラボノイド蓄積に及ぼす光の影響について多くの研究が行われてきた。一般的に、光量の増加によりブドウ果実のアントシアニン蓄積が刺激される（Jeong *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2003）。一方で、過剰な日照はおそらく果実の温度上昇を招き、アントシアニン濃度を減少させると Bergqvist ら（2001）が報告している。果実の遮光により、果皮のフラボノール含量とフラボノール合成酵素遺伝子の mRNA の蓄積が著しく減少する（Downey *et al.*, 2004; 第 1 章）。Downey ら（2004）は、遮光が‘シラー’の成熟果実のアントシアニンあるいは縮合タンニンのレベルに有意な影響を及ぼさなかったと報告している。しかし、ブドウのフラバン-3-オール生合成に関与する酵素あるいは遺伝子に及ぼす遮光の影響はまだ研究されていない。

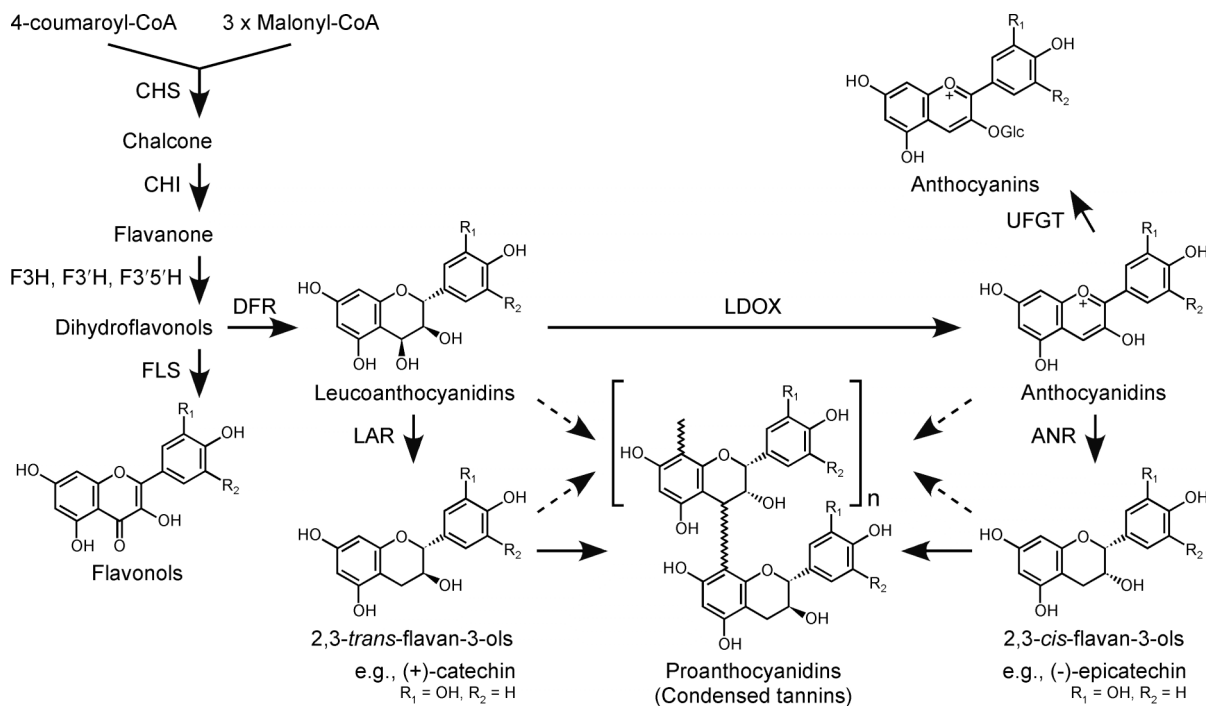


Fig. III-1. Schematic representation of the biosynthetic pathways of flavonoids. The condensation reactions indicated with broken arrows are speculative. Enzyme names are abbreviated as follows: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, anthocyanidin reductase; UFGT, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase. R₁ and R₂ are H or OH.

本章では、主要な赤ワイン用品種‘カベルネ・ソービニオン’のいくつかの器官におけるフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンの濃度、及び *VvANR*、*VvLARI*、*VvLAR2* の mRNA レベルを決定した。さらに、ブドウ果実におけるプロアントシアニジンの生合成が光によって制御されるかどうか調べるために、果実の生育と成熟中の果皮と種子におけるフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンの蓄積とこれらの遺伝子の mRNA 蓄積に及ぼす遮光の影響を調べた。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試薬

試薬類は特に断りのない限り、和光純薬工業社の特級を用いた。水溶液の調製には Milli-Q 水 (Millipore 社) を用いた。オリゴ DNA はシグマアルドリッチジャパン社または北海道システム・サイエンス社に合成と精製を依頼した。

3.2.2. 植物材料

広島県東広島市の酒類総合研究所の圃場で栽培されているブドウの赤ワイン用品種 ‘カベルネ・ソービニオン’ の木 4 本を用いた。

2004 年に遮光、対照の 2 区分を設定し、1 区分 40 果房ずつを実験に用いた。開花期の 6 月 7 日に果房に寒冷紗を 4 重に被せて遮光を開始した。遮光区の昼間の光の強度は対照区の 9%であった。

生育と成熟の各段階で各々 200 粒の果実をランダムに採取した。まず、果実の全重量を測定し、果粒数で割って 1 粒の平均重量を決定した。次に、果実から皮を剥き、種子を取り出した後、果皮と種子を液体窒素の入ったデュワー瓶に入れて直ちに凍結し、使用まで -80°C に保存した。最後に、果汁を混合し、デジタル屈折計 (アタゴ社) を用いて糖度 ($^{\circ}\text{Brix}$) を決定した。

また、葉、蕾、花を採取して上記の方法で凍結保存した。

3.2.3. フラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの抽出、分画、及び定量

まず、マルチビーズショッカー (安井器械社) を用いて凍結試料を破砕した。破砕試料から Bourzeix ら (1986) の方法に従って、メタノール、メタノール/水 (80/20, v/v)、メタノール/水 (50/50, v/v)、蒸留水、及びアセトン/水 (75/25, v/v) を用いてフェノール化合物を順次抽出した。次に、Sun ら (1998a) の方法に従って、混合した抽出液を Sep-Pak Plus 固相抽出カートリッジ tC_{18} と C_{18} (Waters 社) に供し、フラバン-3-オール モノマー (FI)、プロアントシアニン オリゴマー (FII)、ポリマー (FIII) の 3 画分に分けた。

最後に、各々の画分のフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニン

の濃度を改変バニリン法 (Sun *et al.*, 1998b) で測定した。濃度は (+) -カテキン (Sigma Chemical 社) で作成した検量線を用いて決定した。分画と定量は 3 回ずつ行った。各々の画分の濃度は重量グラム当たりの (+) -カテキン相当量で表した。果皮と種子については果実当たりの総量でも表した。

3.2.4. RNA の抽出と mRNA の定量

まず、Loulakakis ら (1996) の方法に従って葉、蕾、花、果皮、及び種子から全 RNA を抽出して精製した後、260 nm の吸光度を測定して RNA 濃度を決定した。

次に、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社) と GeneAmp 5700 定量 PCR システム (Applied Biosystems 社) を用いて取扱説明書に従ってリアルタイム定量 PCR を行い、*VvANR*、*VvLARI*、及び *VvLAR2* の mRNA レベルを決定した。はじめに、AMV reverse transcriptase XL (タカラバイオ社) と 0.125 μM のオリゴ dT プライマーを用いて 5 ng/ μl の全 RNA の逆転写反応を行い、全ての RNA 試料から cDNA を調製した。リアルタイム定量 PCR には 0.1 μl の鋳型 cDNA と 順方向・逆方向それぞれ 0.3 μM のプライマーを含む反応液 (20 μl) を調製し、95°C 15 分に続いて 94°C 15 秒→アニーリング温度 30 秒→72°C 30 秒を 45 サイクル繰り返す条件で行った。また、ユビキチン遺伝子 (*VvUbiquitin*) の mRNA レベルを定量 PCR の内部コントロールとして 2.2.6 の方法で定量した。プライマーの配列と各々のプライマーセットに対するアニーリング温度を Table III-1 に示す。検量線の作成のための標準 DNA は 1.2.5 の方法に従って調製した。リアルタイム定量 PCR は全 RNA 試料当たり 3 回行った。データの平均値は *VvANR*、*VvLARI*、及び *VvLAR2* の mRNA レベルの *VvUbiquitin* に対するモル比で表したため、単位がない。

Table III-1. PCR primers and annealing temperature for real-time quantitative PCR.

Gene name and GenBank accession no.	Sequence of forward (F) and reverse (R) primers	Primer position ^a	Annealing temperature (°C)
<i>VvANR</i> (AB199315)	F 5' GCTGCTGTTACCATCAATCA R 5' GCAGGATAGCCCCAAGTAGG	1774 to 1793 Compliments of 1867 to 1993	57
<i>VvLAR1</i> (AJ865336)	F 5' AAATGAACTCGCATCTGTGT R 5' CTGTGGGATGATGTTTTTCTC	690 to 709 Compliments of 779 to 798	57
<i>VvLAR2</i> (AJ865334)	F 5' GGTGATGGCTCTGTCAAAGC R 5' CTGGGAGGTTCGAAATGAAG	592 to 611 Compliments of 688 to 707	59
<i>VvUbiquitin</i> ^b	F 5' TCTGAGGCTTCGTGGTGGTA R 5' AGGCGTGCATAACATTTGCG	210 to 229 Compliments of 289 to 308	60

^a The primer positions indicate the base from the start codon. The first nucleotide of the start codon was defined as position 1.

^b Ubiquitin primers were designed in the sequence (TC38636) in an EST database of grape (TIGR, http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape, Release 4.0, September 21, 2004).

3.2.5. ブドウ LAR 遺伝子のプロモーター領域のゲノム塩基配列決定

ブドウ LAR 遺伝子のプロモーター配列を Universal GenomeWalker Kit (BD Biosciences Clontech 社) を用いて DNA ウォーキングにより決定した。最初の PCR のために、ブドウ cDNA クローン、*VvLAR1* (GenBank accession no. AJ865336) と *VvLAR2* (AJ865334) の 5' 領域にそれぞれ遺伝子特異的なプライマーを設計した。‘カベルネ・ソービニオン’ の全 DNA から *TaKaRa Ex Taq* ポリメラーゼ (タカラバイオ社) を用いて増幅したゲノム断片を TA クローニングシステムで pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen 社) に挿入し、ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて挿入断片の塩基配列を決定した。得られた配列は植物のシス制御 DNA 因子のデータベース (PLACE, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) を用いて解析した。

3.3. 結果

3.3.1. 果実の生育と成熟

果実の生育と成熟中、果実重量はダブルシグモイド曲線を描いて増加した (Fig. III-2A)。果実の生育中、対照区と遮光区の果実は同様に生長したが、ベレゾン期 (8月16日) 以降、遮光区の果実の重量が対照区より低くなった。収穫期 (10月12日) には遮光区の果実は対照区より 10% 軽かった。

両区の糖度はベレゾン期付近で著しく増加した (Fig. III-2B)。成熟中の遮光区の果実の糖度のレベルは対照区よりも低かったが、収穫期には両区のレベルが同様に (16.5°Brix) になった。

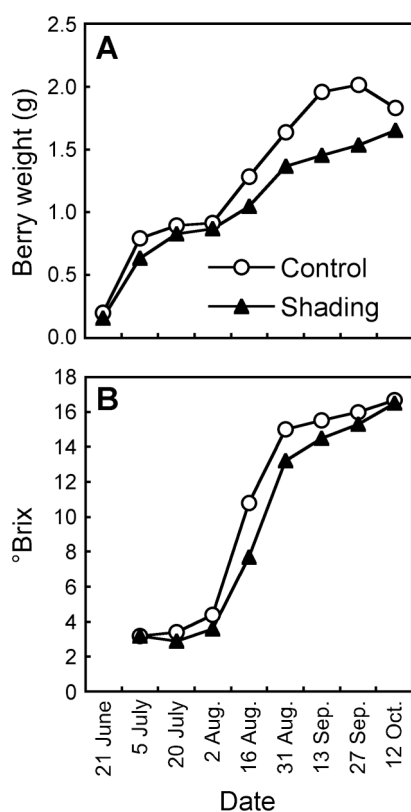


Fig. III-2. Effect of shading on berry development and ripening of *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon'. Berry weight (A) and total soluble solids expressed as °Brix (B) are shown.

3.3.2. フラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの蓄積

‘カベルネ・ソービニオン’の葉、蕾、花、果皮、及び種子におけるフラバン-3-オールモノマー、プロアントシアニジンオリゴマー、及びポリマーの濃度を Fig. III-3 に示した。全ての試料において、プロアントシアニジンオリゴマーとポリマーがフラバン-3-オールモノマーより多く蓄積した。幼葉、蕾、花 (Fig. III-3A)、及び幼果 (6月21日) の果皮と種子 (Fig. III-3B, D, F, H) に

においてフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンがすでに蓄積していた。幼果期からベレゾン期（8月16日）まで、果実当たりのフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの総量が果皮と種子で増加した（Fig. III-3B, D）。フラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンのレベルはベレゾン期付近で最高に達した。収穫期（10月12日）に向かって、果皮でプロアントシアニジン ポリマーが減少し（Fig. III-3B）、種子でフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンが減少した（Fig. III-3D）。

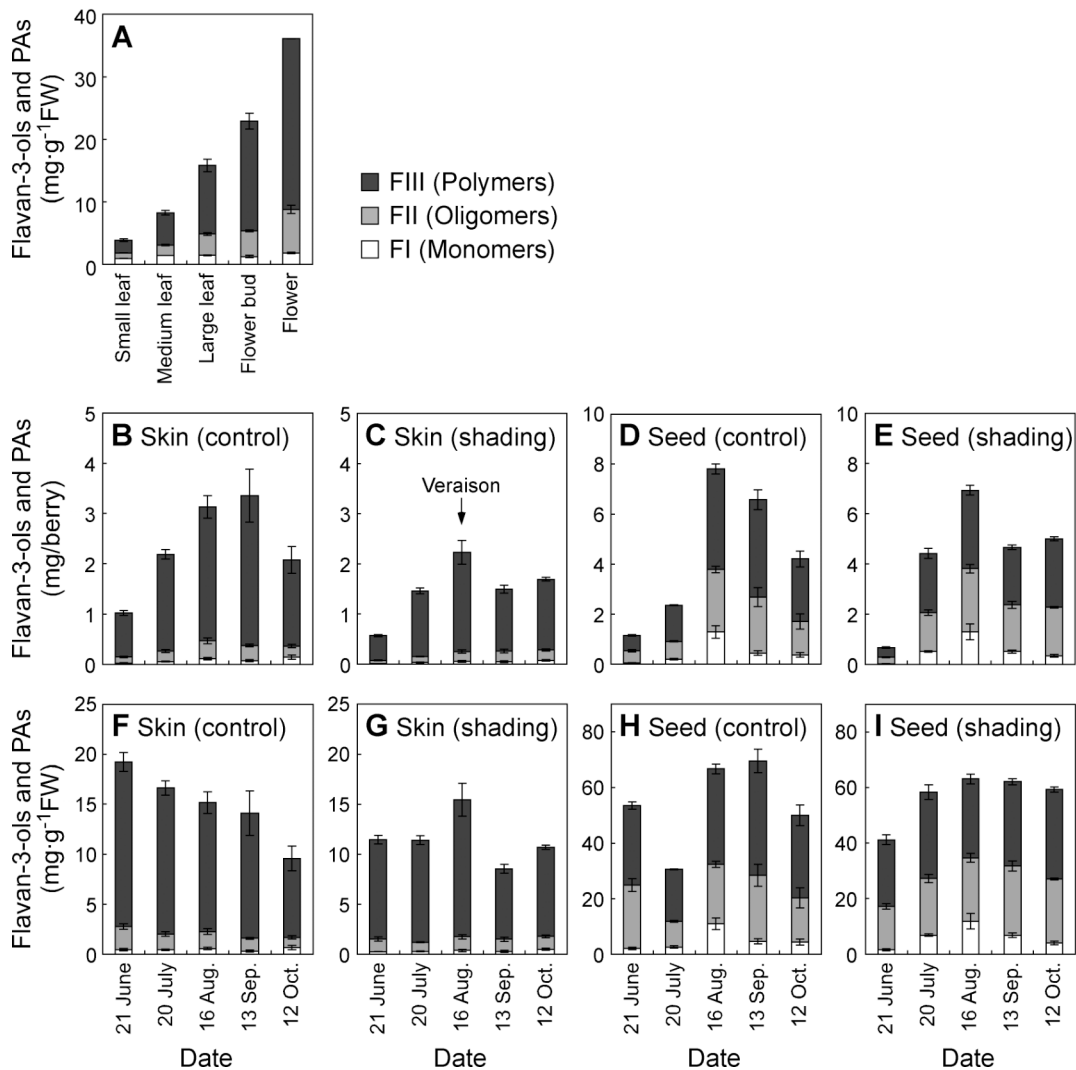


Fig. III-3. Accumulation of flavan-3-ol monomers and proanthocyanidins (PAs) in the leaves, flower buds, and flowers (A); berry skins (B, C, F, G); and seeds (D, E, H, I) of 'Cabernet Sauvignon'. The concentrations of flavan-3-ols and PAs in the monomeric, oligomeric, and polymeric fractions were quantified by a vanillin assay. The results are expressed in (+)-catechin equivalents per gram fresh weight (A, F-I) or per berry skin or seeds (B-E). The vertical bars represent the standard deviation (n = 3).

果皮においては、フラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンの蓄積が果実の生育中に遮光により抑制された (Fig. III-3B, C)。しかし、9月13日から10月12日にプロアントシアニジンポリマーが対照区において著しく減少した。従って、収穫期には対照区と遮光区の差が小さくなった。種子においては、果実当たりのフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンの総量がベレゾン期に最高に達した (Fig. III-3D, E)。そのレベルは遮光区で対照区よりわずかに低かった。9月13日から10月12日にプロアントシアニジンのレベルが対照区において著しく減少した。従って、果皮で観察されたように、収穫期には遮光区の種子におけるフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンのレベルが対照区の種子と同様になった。さらに、収穫期には遮光区の重量グラム当たりの濃度も対照区と同様になった (Fig. III-3F-I)。

3.3.3. ANR と LAR 遺伝子の転写

VvANR、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* の mRNA レベルをリアルタイム定量 PCR で分析した (Fig. III-4)。 *VvANR* の mRNA は生育中の葉、及び蕾と花に蓄積した (Fig. III-4A)。 *VvLAR1* の mRNA レベルは蕾と花で高く (Fig. III-4D)、 *VvLAR2* の mRNA レベルは葉で高かった (Fig. III-4G)。 *VvANR* の mRNA レベルは幼果の果皮と生育初期の種子で高く、その後減少した (Fig. III-4B, C)。 *VvLAR1* の転写は果皮と種子において *VvANR* の転写と同様のパターンを示したが (Fig. III-4E, F)、 *VvLAR1* の mRNA レベルは *VvANR* の mRNA レベルと絶対値が異なり、ベレゾン期の果皮において再び増加した。 *VvLAR2* の転写は果皮において *VvLAR1* の転写と同様のパターンを示したが (Fig. III-4H)、種子においては他の2遺伝子の転写と異なっていた。すなわち、 *VvLAR2* の mRNA レベルはベレゾン期に向かって増加し、その後減少した (Fig. III-4I)。従って、2つの LAR 遺伝子は器官や時期により異なる転写パターンを示した。

果皮においては、*VvANR*、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* が主に果実の生育初期に転写された (Fig. III-4B, E, H)。この時、*VvLAR1* の転写に及ぼす遮光の影響は比較的弱かったけれども、これらの遺伝子の mRNA レベルは対照区より遮光区で低かった。種子においては、*VvANR* と *VvLAR1* が主に生育初期に転写された (Fig. III-4C, F)。生育中、*VvANR* の mRNA レベルは遮光区の種子で低かったが、

VvLAR1 の転写は遮光により影響を受けないように見えた。

成熟中、ANR と LAR 遺伝子の mRNA レベルは比較的低かったが、対照区より遮光区で高かった (Fig. III-4B, C, E, F, H, I)。 *VvLAR2* の mRNA レベルは遮光区の種子でベレゾン期以降、特に高かった。

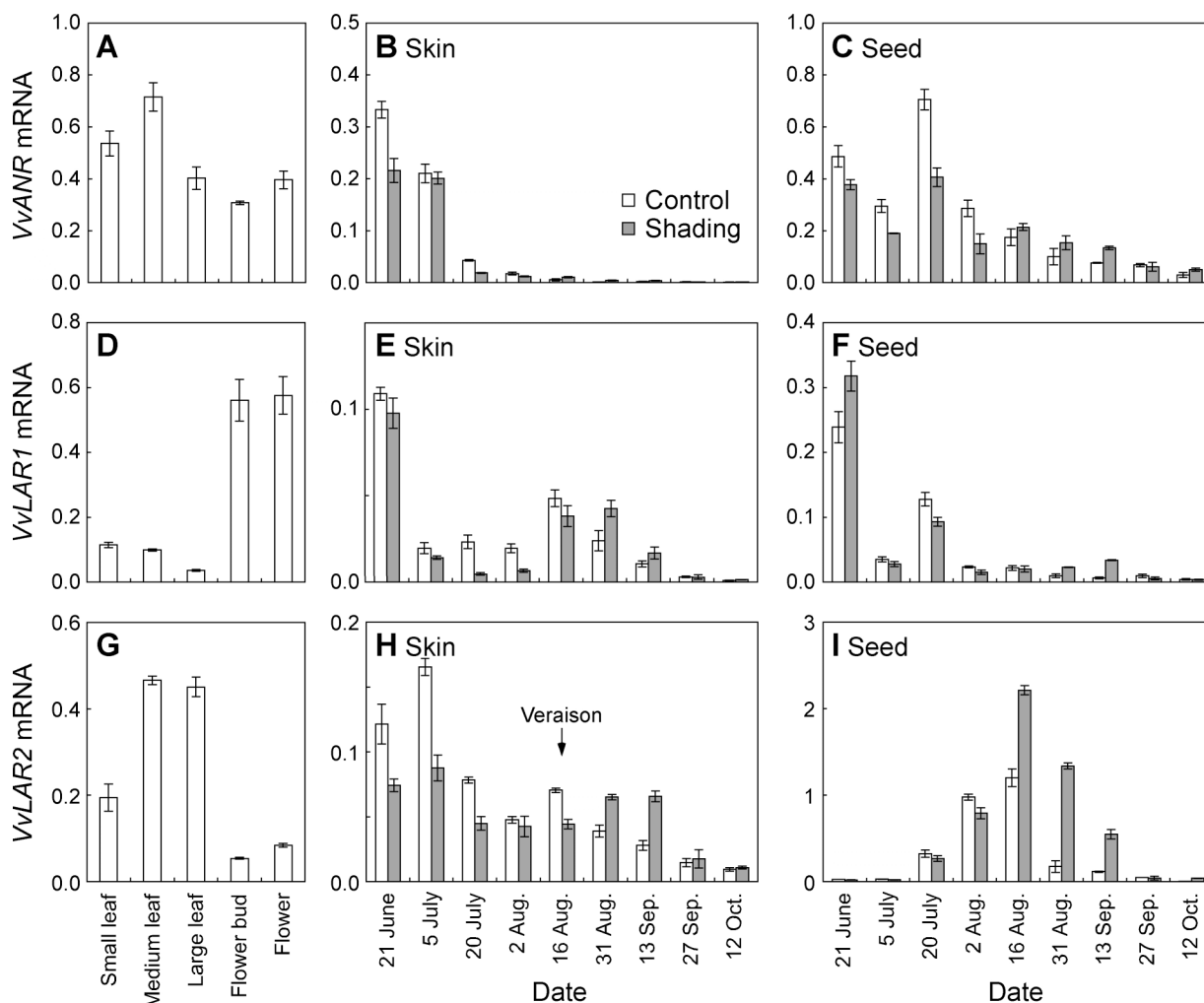


Fig. III-4. mRNA levels of *VvANR* (A-C), *VvLAR1* (D-F), and *VvLAR2* (G-I) in the leaves, flower buds, and flowers (A, D, G); berry skins (B, E, H); and seeds (C, F, I) of ‘Cabernet Sauvignon’. The mRNA levels were measured by real-time quantitative-PCR analysis. The results are expressed as the molar ratio of the mRNA level of *VvANR*, *VvLAR1*, or *VvLAR2* to that of the ubiquitin gene. The vertical bars represent the standard deviation (n = 3).

3.3.4. LAR 遺伝子のプロモーター配列

LAR 遺伝子の転写制御を調べるために、‘カベルネ・ソービニオン’の *VvLAR1* と *VvLAR2* の上流のゲノム塩基配列を決定し、それらを GenBank/EMBL/DDBJ にそれぞれ AB262457 と AB262458 の番号で登録した。Bogs ら (2005) は、‘シラー’の *VvLAR1* と *VvLAR2* のコード領域がタンパク質レベルで 60%の相同性

(77%の類似性) を共有すると報告しているが、2つのプロモーター領域のヌクレオチド配列は互いに類似した領域を持たなかった。

VvLAR1

ATTAAGATCGACATTCAAGCCAATCTCTATGATCTATCTGATGTTT^{****}GATAAAATCATGAATGGTGAGTCAA -841
 AAGAACTGTAATCGGGCTTATCATGGTCGGTAGCATTTTTTGTAAATGAGTCGTTGAGGCACATGATTTT -771
 TTTGTTAGGACGTGTTATGTGAGATGAAATGAAGCTGCTGTGTAGAACTGAGGTTGATGGAAAAATTAA -701
 CCAATACGAATGCGACATGCATTTAAGCATGCGAATA^{GGAAAT}TAAAGCTGAGAAGCAAGACCTTGTGAT -631
 TTGATCATTTGAATAAACGAGAGTGAGAAGTGGTGGTAGAGGCGTTGGCTACTTTTCAAGCATGCGGCTT -561
 ACCAAACCGCTCGATCACATTTCCCCAGAGTAGTAGTGGTGCACACAAACAGGGAAACCTACGCGTC -491
 AGTGACTCATGAGTCTATGACACAGGGCCCAGGGGGACCATCAGTGGGGTTAAGAAGAGACATTTTTTCC -421
 ATCGTTATATGGGCACCAAAACACTTGTACTGGAATATTAATAATTTCTAAATTTAGAATTTTTGGCAGA -351
 CACGGAACCATATTGGCCTAGATGGGAATTGGAAAGGGAGCGCCACGTTAGGAGTTTACGGTCATGAGCT -281
 ACCCTCCGATTGTCTCGGAGGAGTTTGTAGCCGGTGTGAGTATCTAGCTATCAGTCAAGGGTGGTAGC -211
 CAATGTGACCGTACTCAATGGACAGCGTTTGTGAAGGGTAGCTGAAATGCCAGGCCCAATCCCAGCAC -141
 TATATGTTCTCATCTCGATGTCAGCTTTAGTACCAAATCTCTTGGGAGACCATTTTCATGATCCATAACTC -71
 CGTGTGCTGTGTACGATCGATAGAAAAACAACATAAAGCAAAAAGAGTAGTAGAGAAGAAGCATCATCAGA -1

VvLAR2

ATCTCCAATTTGATAGTCTTATAAAGCACATGGAGTATATGGGG -701
 GTTGGGATTCATAAATTGTCCTTAATTAAGTTGGGCAAGGGAACATTTCAATAAA^{GGTAA}TTAATTTGG -631
 GGAAGAAGATACCTATTTATGGGCTCCATAATTTATTATTAATTAATTTATCAAATTAGAAATAATTAAT -561
 ATTACCATAGTTGACCTAAGAGAGGAAGTTTATAA^{GGTAAA}AGCATAAATGTTTTTACAATTATTAATA -491
 TGTAATTATGAATTTATCTTTTCGAGATGGACGACAACTGTACAAAAAGTTGAAAAGCATAAGTCTTTTT -421
 CCTTGGACTTGGAGACGAG^{GGAAAT}TTAAAAAAGTGCAGCTGAGTATTCATCTGAACATAAAAGTGATGG^{*} -351
^{****}
 ATATAATTATAAAAAAATTTAAAAAATTTGCTACCTTTAAGAAATCGGAAGGATTCCAGAG -281
 TTGAGTTGACTCGGAGGAATCCATCCGAGTTGCTGAGTCGGGAATGCAACAGAGTCATCTTCAACTACC -211
 AGTCCAAGTAGGGCATAACCTAACAATCAGAACAGTCAAACGCGCTAAAATACGCGGGGGTGTGCACAC -141
 TATCCTCCACCCTTTCCACCTTAAACTGCCTCTATTTAATG^{GTGACG}ACCCTGGTCATTTAGCCACCGCC -71
 ACCACCCTTTTCCCCCTCCTGCACACCCTCTTCTTTTCTTCTTTCTCA^{GAAAAAT}TAACACCGAT -1

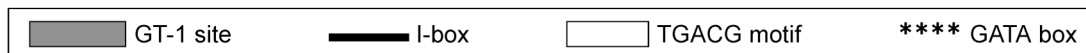


Fig. III-5. Nucleotide sequences of *VvLAR1* between -910 and -1 and *VvLAR2* between -744 and -1 relative to the transcription start sites. Several putative *cis*-acting regulatory elements conserved in light-regulated genes are indicated in the *VvLAR1* and *VvLAR2* promoter regions. The *VvLAR1* and *VvLAR2* sequences were obtained from the genomic DNA of ‘Cabernet Sauvignon’ (GenBank accession nos. AB262457 and AB262458), except that a sequence between -66 and -1 in *VvLAR1* is a cDNA sequence of ‘Cabernet Sauvignon’ (CF514437).

PLACE を用いた相同性検索を行った結果、光に制御される遺伝子に保存されているいくつかのタイプのシス制御因子が *VvLARI* と *VvLAR2* のプロモーター領域に存在することがわかった (Fig. III-5)。それらの因子は GT-1 site (GRWAAW)、I-box (GATAA)、TGACG motif (Terzaghi and Cashmore, 1995)、及び GATA box (Gilmartin *et al.*, 1990) である。

3.4. 考察

生育と成熟中の果実の重量と糖度を測定した結果、遮光によって果実の成熟が遅れるようにみえた (Fig. III-2)。

対照区の幼果の果皮と種子においてフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンがすでに蓄積していた (Fig. III-3B, D, F, H)。幼果期からベレゾン期まで、果実当たりのフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの総量が果皮と種子で増加した (Fig. III-3B, D)。フラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンのレベルはベレゾン期付近で最高に達した。収穫期に向かって、果皮でプロアントシアニジン ポリマーが減少し、種子でフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンが減少した。これらの結果は前年に栽培した‘カベルネ・ソービニオン’の果実から得られた第2章のデータ (Fig. II-6) と同様の傾向を示した。

果実の遮光により、生育期の果皮においてフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの蓄積が抑制された一方、種子においては顕著な影響がみられなかった (Fig. III-3B-E)。成熟期に対照区の果皮と種子でプロアントシアニジンが著しく減少したため、収穫期にはプロアントシアニジンのレベルが両区で同様になった。抽出可能なプロアントシアニジンがベレゾン期後に減少するという結果は他のグループの報告と一致した (Kennedy *et al.*, 2000a, 2000b; Mateus *et al.*, 2001)。プロアントシアニジンが抽出不可能になる機構はプロアントシアニジン重合の機構と同様にまだ明らかになっていないが、プロアントシアニジンの酸化、及び細胞壁多糖類や他のフェノール類との相互作用によりプロアントシアニジンが抽出不可能になると推定されている (Kennedy *et al.*, 2000b; Pourcel *et al.*, 2005)。

Downey ら (2004) は、‘シラー’果実におけるフラボノイド蓄積に及ぼす遮光の影響を調べ、ベレゾン期付近には遮光と対照の果皮の縮合タンニン含量に有意な差があったが、収穫期には同様のレベルになったと報告した。彼らはまた、種子のタンニン含量と組成に及ぼす遮光の影響はなかったと報告した。従って、‘カベルネ・ソービニオン’におけるフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの蓄積パターンは‘シラー’と概ね一致した。

果皮においては、*VvANR*、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* が主に果実の生育初期に転写された (Fig. III-4B, E, H)。種子においては、*VvANR* と *VvLAR1* が主に生育初期に転写された一方で、*VvLAR2* はベレゾン期に向かって mRNA レベルが増加し、その後減少した (Fig. III-4C, F, I)。果皮と種子における *VvANR*、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* の mRNA 蓄積の変化はフラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの蓄積と矛盾しなかった。‘カベルネ・ソービニヨン’ 果実における *VvANR*、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* の転写パターンは、*VvLAR1* が幼果の果皮に転写されることを除いて、‘シラー’ 果実における転写パターンと一致した (Bogs *et al.*, 2005)。

生育初期の果皮において *VvANR*、*VvLAR1*、及び *VvLAR2* の mRNA レベルが対照区より遮光区で低かった (Fig. III-4B, E, H)。種子においては、*VvANR* の mRNA レベルが遮光区で低かった (Fig. III-4C)。果実の生育初期の果皮においては、ANR と LAR 遺伝子の転写が遮光により多少抑制される結果、フラバン-3-オール モノマーとプロアントシアニジンの蓄積が制限されることが示唆された。これらの遺伝子の転写は果皮と種子で遮光による影響が異なっていた。光に直接さらされているために、おそらく果皮の遺伝子は種子の遺伝子より遮光に対して影響を受けやすいと考えられる。成熟中、ANR と LAR 遺伝子の mRNA レベルは比較的低かったが、対照区より遮光区で高かった (Fig. III-4B, C, E, F, H, I)。遮光区では成熟が遅いためにこれらの遺伝子の転写の減少が遅れるようにみえた。

VvLAR1 と *VvLAR2* のプロモーター領域には光に関係する多くのシス制御因子が存在した (Fig. III-5)。第 2 章で述べたように、*VvANR* のプロモーター領域には 1 カ所の G-box (CACGTG) (Terzaghi and Cashmore, 1995)、4 カ所の GT-1 site、1 カ所の I-box、及び 4 カ所の GATA box が存在した (Fig. II-3)。光に関係する因子の存在は、これらの遺伝子の転写が遮光により影響を受けた事実と矛盾しない。しかし、フラバン-3-オールの生合成遺伝子の転写に及ぼす遮光の影響は紫外線保護剤 (Flint *et al.*, 1985) の役割を果たすフラボノールの生合成遺伝子 (第 1 章) やアントシアニンの生合成遺伝子 (Jeong *et al.*, 2004) の転写に及ぼす影響より弱かった。

果皮において、フラボノールは生育のかなり早い時期と成熟期に蓄積するが、

アントシアニンは成熟期にのみ蓄積する。プロアントシアニジン、フラボノール、及びアントシアニンは生合成経路の大部分を共有しているが、各々の生合成は果皮においてさえ異なる制御系のもとにあるようにみえる。

本研究で、‘カベルネ・ソービニオン’の果実の遮光が生育期の果皮のフラバン-3-オールモノマーとプロアントシアニジンの蓄積、及び ANR と LAR 遺伝子の転写を抑制した。しかし、成熟期に抽出可能なプロアントシアニジンが対照区の果皮と種子で遮光区より著しく減少したため、収穫期にはプロアントシアニジンが両区で同様のレベルになった。Downey ら (2004) は、‘シラー’の成熟果実において遮光は縮合タンニンのレベルに有意な影響を及ぼさなかったが、遮光区の果皮の縮合タンニンの平均重合度が低かったと報告した。ここで得られた結果は、彼らの報告を支持し、光がプロアントシアニジンの質的な変化に影響を及ぼすことを示唆する。

3.5. 要旨

プロアントシアニジンは、(+)-カテキンや(-)-エピカテキンのようなフラバン-3-オール単位のオリゴマーやポリマーで、赤ワイン醸造用ブドウの重要な成分である。フラバン-3-オール類は、アントシアニン還元酵素 (ANR) やロイコアントシアニン還元酵素 (LAR) により生合成される。本章では、ブドウ‘カベルネ・ソービニオン’の果実におけるプロアントシアニジンの生合成に及ぼす遮光の影響を調査した。果実の遮光により、生育期の果皮においてプロアントシアニジンの蓄積、及び ANR と LAR 遺伝子の転写が抑制された一方、種子においては顕著な影響がみられなかった。成熟期に対照区の果皮と種子でプロアントシアニジンが著しく減少したため、収穫期にはプロアントシアニジンのレベルが両区で同様になった。

総合考察

色の濃い赤ワインほど渋味が強いフルボディタイプのもが多く、さらに、アントシアニン、フラボノール、カテキン類・プロアントシアニジンは生合成系の大部分を共有していることから、これまでブドウ果実におけるそれらのフラボノイド化合物の生合成は同じようにコントロールされていると考えられてきた。本研究では、赤ワインの品質に重要なそれらの成分のうち、研究が遅れていたフラボノールとカテキン類・プロアントシアニジンに注目し、他の植物の研究やブドウの EST 情報を基にこれらの合成酵素遺伝子のゲノム塩基配列を得て、ブドウ果実における各遺伝子の転写と各成分の蓄積を比較した。その結果、ブドウのフラボノイド化合物はそれぞれ果皮への蓄積パターンが異なり (Fig. 3)、それらの生合成は異なる制御を受けていることがわかった。カテキン類・プロアントシアニジンはブドウの果実がまだ緑色で硬い生育期に蓄積し、アントシアニンやフラボノールが増加するブドウの成熟期には増加せず、逆に減少していた。

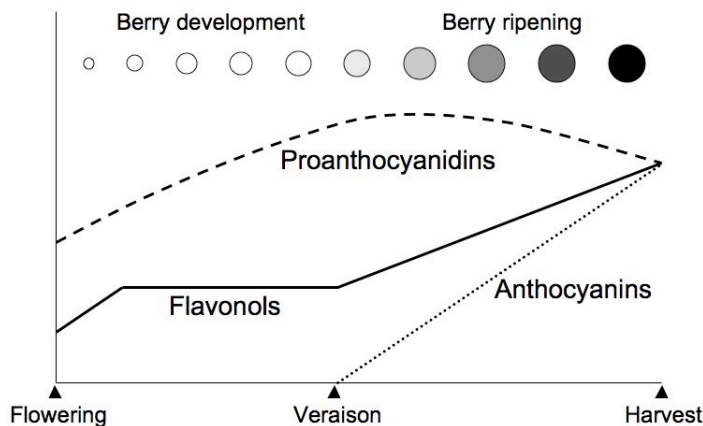


Fig. 3. Accumulation patterns of flavonoids in grape berry skins.

さらに、植物ホルモンや光の影響を検討した。フラボノールは光でその蓄積が大きく促進され、成熟期の果実を遮光するとほとんど増加しないことがわかった。一方、ブドウの成熟期におけるアントシアニンの蓄積が植物ホルモンの ABA (蓄積促進) やオーキシシン (蓄積抑制) の影響を強く受けるのに対し、フラボノールの蓄積はあまり強い影響を受けないようであった。従って、ブドウ

の成熟が始まるベレゾン期に植物ホルモンの ABA を散布すると、過剰な苦味や渋味（フラボノールとカテキン類・プロアントシアニジン）を増加させず、色（アントシアニン）を優先的に増加させることができると考えられる。近年、天然型の ABA を配合した散布肥料が登録され、栽培に利用できるようになったことから、赤ワイン用ブドウの着色が弱い傾向にある我が国では、ABA がブドウの着色を強める有効な手段になるかもしれない。このように、本研究が赤ワイン用ブドウのフラボノイド化合物の組成や量をコントロールするための栽培指標になり、ワインの品質設計に役立てられることを期待する。

技術の進歩により遺伝子の塩基配列の迅速で網羅的な解析が可能になり、遺伝子情報を利用して様々な生物のジーンチップが現在次々と開発されている。最近、ブドウ‘ピノ・ノワール’のゲノム解読結果が報告されたが (Jaillon *et al.*, 2007)、本研究を開始した当初は公開されているブドウの遺伝子情報が少なく、遺伝子発現を調べるためには目的遺伝子の塩基配列を取得することからスタートしなければならなかった。遺伝子の転写量はリアルタイム定量 PCR の手法を用いて個別に測定した。近年、ブドウのジーンチップが開発されている。これを利用すればフラボノイド合成系の遺伝子全体の転写パターンが一度に調べられるため、今後は様々な栽培条件による遺伝子発現の変化を素早く総合的に解析することが可能になるであろう。

ワインの品質を左右するのは第一に原料ブドウであると序章で述べたが、実際のワインのフラボノイド化合物の組成や量は原料ブドウの品質のみで決まるわけではない。発酵工程（ブドウからの成分の抽出）や製造後の熟成過程（成分の変化）も大いに関係している。果皮に含まれるアントシアニン、フラボノール、及びプロアントシアニジンは発酵初期に多く抽出され、種子のプロアントシアニジンは徐々に抽出されることが報告されている (Koyama *et al.*, 2007; Peyrot des Gachons and Kennedy, 2003)。Koyama ら (2007) は、醸し発酵初期に低温条件を保つと種子からのフェノール化合物の抽出が抑制されることを示した。このように、赤ワイン醸造中の温度条件が生成するワインのフェノール化合物の濃度に影響を及ぼす。今後はフラボノイド化合物のワイン熟成過程における変化（相互作用など）が解明されることを期待する。

参考文献

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 63-78.
- Baranac, J.M., Petranović, N.A. and Dimitrić-Marković, J.M.** (1997) Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1694-1697.
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L.** (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **39**, 366-380.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N. and Ebisuda, N.** (2001) Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 1-7.
- Bogs, J., Downey, M.O., Harvey, J.S., Ashton, A.R., Tanner, G.J. and Robinson, S.P.** (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.* **139**, 652-663.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P.** (1996a) Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2**, 163-170.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P.** (1996b) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 565-569.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P.** (1996c) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.
- Bourzeix, M., Weyland, D. and Heredia, N.** (1986) Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. OIV* **669-670**, 1171-1254.

- Cheyrier, V. and Rigaud, J.** (1986) HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 248-252.
- Couch, J.A. and Fritz, P.J.** (1990) Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Mol. Biol. Rep.* **8**, 8-12.
- De Freitas, V.A.P., Glories, Y. and Monique, A.** (2000) Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 397-403.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G. and Delseny, M.** (1999) The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.* **19**, 387-398.
- Dooner, H.K., Robbins, T.P. and Jorgensen, R.A.** (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 173-199.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. and Robinson, S.P.** (2003) Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**, 110-121.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. and Robinson, S.P.** (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **10**, 55-73.
- Escribano-Bailón, M.T., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C.** (1995) Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200**, 221-224.
- Flint, S.D., Jordan, P.W. and Caldwell, M.M.** (1985) Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: leaf optical properties and photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **41**, 95-99.
- Geuna, F., Hartings, H. and Scienza, A.** (1998) A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. *Plant Mol. Biol. Rep.* **16**, 61-67.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J. and Chua, N.-H.** (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, **2**, 369-378.

- Häkkinen, S. and Auriola, S.** (1998) High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J. Chromatogr. A*, **829**, 91-100.
- Holton, T.A., Brugliera, F. and Tanaka, Y.** (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.* **4**, 1003-1010.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., et al.** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **449**, 463-467.
- Jeong, S.T., 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 Sci.* **167**, 247-252.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K. and Esaka, M.** (2006) Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* **170**, 61-69.
- Jordão, A.M., Ricardo-da-Silva, J.M. and Laureano, O.** (2001) Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelão Francês and Touriga Francesa. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 230-234.
- Kataoka, I., Sugiyama, A. and Beppu, K.** (2003) Role of ultraviolet radiation in accumulation of anthocyanin in berries of 'Gros Colman' grapes (*Vitis vinifera* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **72**, 1-6.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A. and Waterhouse, A.L.** (2000a) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, **55**, 77-85.
- Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G. and Jones, G.P.** (2000b) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* **6**, 244-254.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C.K., Yakushiji, H. and Goto, N.** (2001) Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene

- sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* **160**, 543-550.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. and Honda, C.** (2002) *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, **215**, 924-933.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H.** (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, **304**, 982.
- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N. and Hashizume, K.** (2007) Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 958-965.
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A. and Kanellis, A.K.** (1996) Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**, 181-185.
- Lukačín, R. and Britsch, L.** (1997) Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **249**, 748-757.
- Mateus, N., Marques, S., Gonçalves, A.C., Machado, J.M. and De Freitas, V.** (2001) Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 115-121.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O. and Ricardo da Silva, J.M.** (2003) Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6475-6481.
- Moriguchi, T., Kita, M., Ogawa, K., Tomono, Y., Endo, T. and Omura, M.** (2002) Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* **114**, 251-258.
- Noda, N., Kanno, Y., Kato, N., Kazuma, K. and Suzuki, M.** (2004) Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal

- development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiol. Plant.* **122**, 305-313.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R. and Shirley, B.W.** (1997) Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**, 1437-1445.
- Peyrot des Gachons, C. and Kennedy, J.A.** (2003) Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5877-5881.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L. and Debeaujon, I.** (2005) *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, **17**, 2966-2980.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M. and Watson, B.T.** (1995) Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 187-194.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V. and Moutounet, M.** (1994) Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **36**, 781-784.
- Ricardo-da-Silva, J.M., Belchior, A.P., Spranger, M.I. and Bourzeix, M.** (1992a) Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *Sci. Aliments*, **12**, 223-237.
- Ricardo-da-Silva, J.M., Rosec, J.-P., Bourzeix, M., Mourgues, J. and Moutounet, M.** (1992b) Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and red wines. *Vitis*, **31**, 55-63.
- Ritchev, J.G. and Waterhouse, A.L.** (1999) A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 91-100.
- Robichaud, J.L. and Noble, A.C.** (1990) Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* **53**, 343-353.
- Roth, B.A., Goff, S.A., Klein, T.M. and Fromm, M.E.** (1991) *C1-* and *R-*dependent expression of the maize *Bz1* gene requires sequences with homology to mammalian *myb* and *myc* binding sites. *Plant Cell*, **3**, 317-325.

- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Cañas, L., Diaz, I. and Paz-Ares, J.** (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.* **14**, 1773-1784.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F. and Moutounet, M.** (1996) Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, **43**, 509-512.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G. and Tonelli, C.** (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* **24**, 743-755.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L. and Ferguson, J.C.** (2002) Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **53**, 171-182.
- Sun, B.S., Leandro, M.C., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, M.I.** (1998a) Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1390-1396.
- Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, M.I.** (1998b) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4267-4274.
- Suzuki, K., Tsuda, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y. and Kusumi, T.** (2000) Molecular characterization of rose flavonoid biosynthesis genes and their application in petunia. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* **14**, 56-62.
- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J. and Ashton, A.R.** (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **278**, 31647-31656.
- Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R.** (1995) Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 445-474.
- Van Eldik, G.J., Reijnen, W.H., Ruiter, R.K., Van Herpen, M.M.A., Schrauwen, J.A.M. and Wullems, G.J.** (1997) Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J.* **11**, 105-113.

- Wellmann, F., Lukačín, R., Moriguchi, T., Britsch, L., Schiltz, E. and Matern, U.** (2002) Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4134-4142.
- Xie, D.-Y. and Dixon, R.A.** (2005) Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. *Phytochemistry*, **66**, 2127-2144.
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D. and Dixon, R.A.** (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, **299**, 396-399.
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B. and Dixon, R.A.** (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, 91-102.
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Wright, E., Wang, Z.-Y. and Dixon, R.A.** (2006) Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *Plant J.* **45**, 895-907.

公表論文

第 1 章

Fujita, A., Goto-Yamamoto, N., Aramaki, I. and Hashizume, K. (2006) Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 632-638.

第 2 章

Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Shindo, H., Kakuta, T., Koizumi, T. and Hashizume, K. (2005) Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 336-342.

第 3 章

Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Mizuno, A., Kiso, K. and Hashizume, K. (2007) Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **76**, 112-119.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、国立大学法人横浜国立大学大学院 環境情報研究院 環境遺伝子工学研究分野 平塚和之教授に謹んで感謝の意を表します。また、有益なご助言とご指導をいただきました、同研究院 分子生命学研究分野 上杉晴一教授、環境遺伝子工学研究分野 笹本浜子教授、尾形信一准教授、中村達夫講師に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始多大なるご指導とご配慮をいただきました、独立行政法人酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門 後藤奈美副部門長、情報技術支援部門 橋爪克己部門長、研究企画知財部門 荒巻功部門長、醸造技術開発研究部門 水野昭博部門長、大阪国税局 課税第二部鑑定官室 木曾邦明室長に心より感謝いたします。

また、東京農業大学大学院 農学研究科 醸造学専攻の学生として本研究に共に取り組んでいただきました、相馬紀子氏、並びにご指導をいただきました、同大学 応用生物科学部 醸造科学科 小泉武夫教授、角田潔和教授、進藤斉講師に深く感謝いたします。

さらに、独立行政法人酒類総合研究所において惜しみないご協力と有益なご助言をいただきました、万光華博士、鄭碩泰博士、沼田美子代非常勤職員、森健太郎博士、島本敏博士に感謝の意を表します。