

〔 研究区分： 学際的・先端的研究 (A) 〕

研究テーマ： ブドウのアントシアニン生合成制御機構の解明に必要な培養細胞モデルの確立	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 助教・藤田景子	連絡先： fujitak@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
<b>【研究概要】</b> 本研究課題では、ブドウの着色制御機構を解明するために、着色を誘導できるブドウ培養細胞のモデル系の構築を目的とした。まず、欧州系黒色ブドウ品種‘カベルネ・ヴィニヨン’から培養細胞（CS 細胞）を作製し、安定して増殖する条件を決定した。通常の培養条件では、CS 細胞は着色しなかったため、アブシジン酸と乾燥を CS 細胞に曝露し、アントシアニンの生合成を誘導した。その結果、未処理 CS 細胞より処理を行った方がアントシアニンを蓄積し、生合成遺伝子の発現量が高くなった。以上より着色誘導モデルの構築に成功した。	

### 【研究内容・成果】

黒色系ブドウの着色は、ブドウ果実の外観やブドウから醸造されるワインの品質に影響を与える。ブドウの果皮色は赤い色素であるアントシアニンの含有量とその種類の違いに依存している。アントシアニンの生合成経路とそれを調節している酵素や遺伝子は、これまでの研究で既に単離されている（図 1）。しかし、アントシアニン生合成に関わる遺伝子が外的な刺激によって、どのような機構で制御・調節されているかは、まだ不明な点が多い。近年、温暖化による黒系ブドウの着色不良が問題になっており、これを解決するためにアントシアニン生合成経路の制御機構を解明することが重要であると考えている。しかし、ブドウは木本植物であり、「樹」を研究材料にすると、広い空間が必要となり、実験時期も限られるなど不都合が多い。そこで、黒色系ブドウから培養細胞を作製し、アントシアニンの生合成を誘導できるモデル系を構築することとした。

最初に、欧州系黒色ブドウ品種‘カベルネ・ヴィニヨン’の茎頂から培養細胞を作製し、安定して生育できる条件を決定した。このブドウの培養細胞を CS 細胞と名付けた。次に、通常の培養条件（継代培養）において着色するか否かを検討した。その結果、少なくとも培養 4 か月では培養細胞に着色は起こらず、アントシアニンの蓄積（図 2）やその生合成に関わる遺伝子の発現も変動しなかった。つまり、今回作製した CS 細胞は、自発的に着色できないブドウ培養細胞であると考えられた。次に、CS 細胞にアントシアニンの生合成を誘導するために、着色を誘導することができると報告されているアブシジン酸（ABA）を処理してアントシアニンの蓄積量の変化、さらに、アントシアニン生合成のキー酵素である UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase の遺伝子（*UFGT* 遺伝子）とその転写因子 *VvmybA1* 遺伝子の発現解析を行った。既報と同じように、ABA 処理を行った CS 細胞では、アントシアニンの蓄積量が高くなり、*VvmybA1*、*UFGT* 遺伝子の発現量も高くなった。さらに、ブドウ樹の果皮では、結実～成熟の期間に灌水を止め、乾燥条件で栽培すると着色が良くなることが広く知られている。そこで、CS 細胞をクリーンベンチ内に置き、直接空気を吹き付け、乾燥処理を行った。その結果、培養 2 週間目の CS 細胞に 2 時間以上の乾燥処理を行い 1 週間培養した場合、未処理の CS 細胞よりもアントシアニンの蓄積量が高くなった（図 3）。また、アントシアニン生合成関連遺伝子の発現量を検討した結果、乾燥処理によ

って、生合成経路の下流で働く遺伝子の発現量が未処理よりも高くなっていった。

以上の結果から、今回作製ブドウの培養細胞の CS 細胞は、①自発的なアントシアニン生合成を行わないこと、②条件が整えばアントシアニンの蓄積が起こることがわかり、ブドウの着色制御機構のモデル系として有用なツールになると期待できる。また、乾燥処理を行った培養細胞では、アントシアニン生合成経路の下流で働く酵素の遺伝子が発現していた。これまでの研究では、光や植物ホルモンなどは、*VvmybA1* 遺伝子の発現を介し、*UFGT* だけでなく、アントシアニンの生合成全体をコントロールしている可能性が示唆されていたが、今回の結果から、少なくとも乾燥の刺激では、一部の経路しか動かないことが明らかとなった。しかし、その誘導が *VvMybA1* を介しているのか、別経路なのか、また、乾燥に特徴的な誘導機構なのかは不明である。今後は、作製した培養細胞を用い、様々な刺激を与え、さらに詳細な遺伝子解析および物質の蓄積を検討していく予定である。

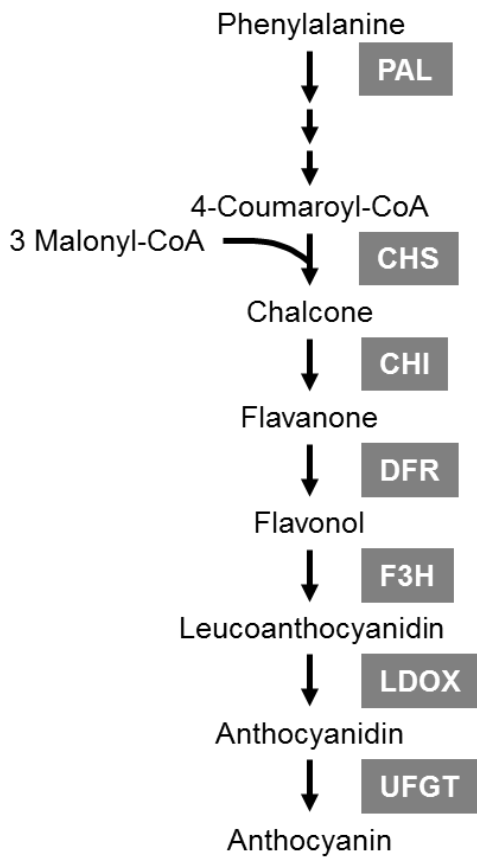


図1 アントシアニン生合成経路の概略。四角で囲まれた部分は関与する酵素を示す。

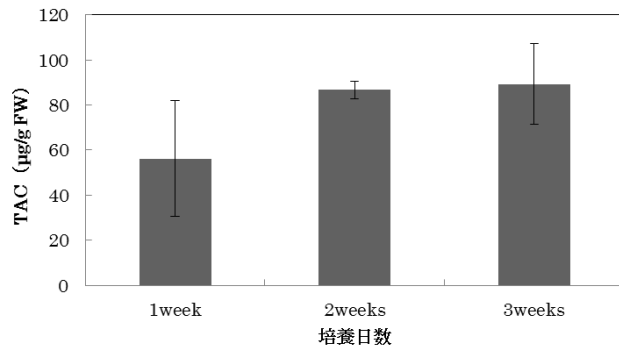


図2 継代培養1~3週間のCS細胞中のアントシアニン量の変化。アントシアニン量(TAC)はシアニジン3-モノグルコシド当量として算出。

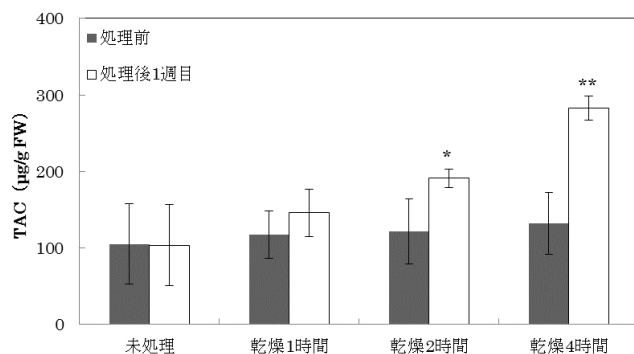


図3 乾燥処理を行ったCS細胞中のアントシアニンの蓄積量。アントシアニン量(TAC)はシアニジン3-モノグルコシド当量として算出。\*、\*\*は、処理前のCS細胞と比べて有意差があることを示す(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。