

平成 2 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：1 2 1 0 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：2 3 6 5 8 0 2 5

研究課題名（和文）青色光による果樹の着色制御とそのメカニズム

研究課題名（英文）Study on regulatory mechanisms of coloration of fruit of fruit trees by blue light

研究代表者

菅谷 純子（SUGAYA, Sumiko）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：9 0 3 0 2 3 7 2

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円、（間接経費） 870,000 円

研究成果の概要（和文）：ブドウ果実着色に対する青色LED照射の影響を明らかにするためブドウへの照射実験を行った結果、青色光によりデルフィニジン系アントシアニンの量の増加とアントシアニン生合成系の遺伝子発現の増加、および果粒内ABA含量の増加が認められた。さらに、F3'5'H（フラボノイド3'5'水酸化酵素）のプロモーター領域には、光、糖、アブシシン酸（ABA）誘導性などに関するシス配列が存在することが見出された。青色光は、成木においてもアントシアニン蓄積が増加しており、着色不良技術開発につながる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of blue light illumination on fruit color development after veraison of fruit development, anthocyanin accumulation and mechanisms of it were analyzed using 'Kyoho' (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.) plants. Grape berries were illuminated by blue LED and the effect on peel color of grapes was investigated. The result indicated that blue light promotes anthocyanin synthesis through biosynthetic enzyme activities, especially, flavonoid 3'5' hydroxylase (F3'5'H). An irradiation experiments using in vitro grape and soil planted grape trees revealed that anthocyanin accumulation was induced by blue light irradiation. The upstream region of the F3'5'H gene contains several motif sequences for cis-transcriptional factors. These results suggest that blue light irradiation would be a way to improve coloration of grape peel.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：アントシアニン ブドウ 青色光

1. 研究開始当初の背景

落葉果樹のリンゴやブドウなどの果皮着色は、果実の品質において、市場の価値に影響する大変重要な要因である。近年の温暖化や異常気象により、果実の着色時期の気温が高い地域や、夜温が高くなる生産地が増えつつある。それにより、果実の着色不良が大きな問題になっている。特に西南暖地ではブドウの着色不良が深刻で、その対策として環状剥皮などが行われているが、樹体の衰弱などの問題が生じており、改善方法が求められている。そのため、栽培温度がブドウ果皮のアントシアニンに及ぼす影響について、様々な研究が行われ、アントシアニン生合成や、アントシアニンの代謝に関与する遺伝子発現が高温で抑制されることや、光合成産物の果房への分配が減少することが示されてきた。しかしながら、果実着色不良を改善する実用的な方法などは環状剥皮以外にはほとんど見出されておらず、アントシアニン生合成制御機構についても、温度による制御に関するものがほとんどであった。一方、農作物の成長において、光は最も重要な環境要因であり、アントシアニン生合成に重要な役割を果たしていることが多くの植物で明らかにされ、光がアントシアニン生合成を制御するメカニズムについて、多くの研究が行われている。その中で、光がアントシアニン生合成を誘導する際の光受容体であるフィトクロームの関与などが報告され、光の情報伝達系について多くの知見が蓄積しつつある。また、近年、LED (Light emitting diodes) を用いた研究により、特定の波長の光に対する植物の反応についても研究が進んでおり、特定の波長の光、特に、赤色光や、青色光により制御される生理現象について園芸作物においても報告が増えつつある。前者は成長への影響が大きく、後者については、光形態形成、気孔への影響、代謝系への影響などが報告されている。その中で、青色光の作用とそのメカニズム、情報伝達系については、園芸作物ではほとんど明らかにされておらず、二次代謝系の変化についても明確になっていない。

果樹では、果実品質において、アントシアニン蓄積が大変重要であるが、光の影響については、栽培学的な研究は蓄積しているが、分子メカニズムに関する研究はほとんど行われておらず、着色不良改善や、効率的な着色管理、着色に関する育種を行うための知見を得るためには、果樹における光とアントシアニンの研究が必要であると考えられた。近年、LEDの普及により特定の波長域の光を用いた栽培方法が開発されつつあり、ブドウ栽培では、赤色光を用いた栽培が報告されつつあるが、青色光に関する研究はほとんど行われていない。これらのことから、果樹におけるアントシアニン蓄積に対する青色光によるアントシアニン生合成の誘導機構を解明すること、青色光の作用機構や情報伝達機構に関する研究を行うにより、今後の施設栽培

や、省力栽培に新たな技術の基礎的知見をもたらすと考えられた。また、アントシアニン蓄積には、植物ホルモンの影響が知られているが、果樹におけるアントシアニン蓄積との関連は不明な点が多い。これまでにアブシシン酸 (ABA) がアントシアニン蓄積に促進的に働くことが報告されているが、光照射との関連は明らかになっていない。青色光照射との関連において、植物ホルモンの関与の有無についても検討する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、果樹、特にブドウの着色に青色光がどのように影響するかについて、LEDを用いて補光を行い、その効果について明らかにし、アントシアニン生合成に対する青色光の影響について生理生化学的、分子生物学的に明らかにすることを目的とした。また、青色光により発現が制御されるアントシアニン生合成遺伝子についてその制御領域 (プロモーター領域) を単離することで、ブドウにおけるアントシアニン生合成の制御機構を解明しようとするもので、転写制御に関与する因子を見出し、青色光による遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目指した研究を行うものである。日本で生食用に栽培されているブドウとして生産量の多い「巨峰」などの黒紫系ブドウの着色は、マルビジンなどのデルフィニジン系アントシアニン蓄積に大きく影響をうけることが知られており、それを制御する酵素としてフラボノイド 3',5' 水酸化酵素が知られている。これまで、本酵素遺伝子の発現制御機構については、ワイン用品種や、欧州系品種での報告があるが、光制御に関する報告は行われていない。本研究では、本遺伝子を中心に、アントシアニン生合成経路において、その領域の発現制御に重要なプロモーター領域とされる遺伝子上流域を単離し、その配列について明らかにし、発現制御因子について検討する。その後、青色光制御領域、および青色光受容体との関連を検討することを目的として、研究を行った。また、青色光による補光処理が、実際の栽培現場と同様に圃場で行われた際の効果についても明らかにし、青色光処理の有効性についても検討することとした。

さらに、アントシアニン生合成には、植物ホルモンが影響することが、草本植物やモデル植物で報告されているため、ブドウ果実への青色光照射が、植物ホルモン、特にアブシシン酸 (ABA) の蓄積や、生合成への影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ポット樹「巨峰」果房の着色に対する青色 LED 照射の影響

農林技術センター内 4 年生、12 年生の「巨峰」(*Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L.) ポット樹 16 本を用いた。栽培管理は、1 新梢

を残し、1本に1果房を着生させ、葉果比を果房にアルミホイルで覆ったペットボトルを用いて、ベレーゾン開始日(7月19日)から青色LED、赤色LED、白色LEDのみが、果房に照射されるようにして、処理を行った。果房に当たる光強度は約 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ になるように調整し、5:30~18:30に照射した。果房付近の気温の変化を温度とりによりモニターした。照射開始後、7日おきに果粒をサンプリングし、果肉と果皮に分離した後、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。果実成長、糖度、果皮色を調査し、HPLCによるアントシアニンの分析を行った。

(2) LED照射によるブドウ「巨峰」果皮におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現解析

ポット植えブドウ「巨峰」の果房に 1 と同様に日光が入らないようにしたペットボトルで覆い、赤色、青色、白色のLED照射をベレーゾン開始直後から行った。処理後7日おきに果粒をサンプリングし、RNAを抽出しcDNAを作成した。反復は3回行った。アントシアニン生合成遺伝子である PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)、DFR(dihydroquercetin reductase)、F3'5'H、UFGT(UDP glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase)、mybA1 特異的なプライマーを用いて、それぞれの遺伝子発現を定量PCRにて行った。定量PCRには、アジレントテクノロジーの Mx3000P を用いて定法に基づき行った。

(3) In vitro における「巨峰」果粒の着色に対する青色光照射の影響

農林技術センター内4年生、12年生の「巨峰」ポット樹の果房からベレーゾン開始日に果粒を採取し、70%エタノールおよび1%次亜塩素酸にて滅菌処理をして赤道面で分割してから3%スクロース寒天培地に置床した。インキュベータ内で青色LED、赤色LED、白色LED、蛍光灯をそれぞれ果粒に当たる光強度が約 $65 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ になるように調整し、25℃にて24時間連続照射した。経時的に果粒をサンプリングし、果皮色及びアントシアニンの分析を行った。

(4) 「巨峰」ブドウ成木に対する青色LED補光の影響

農林技術センター果樹園内「巨峰」成木を材料とした。処理区は、青色LED補光区とし、対照区として自然光区を設けた。ベレーゾン開始日(7月19日)から青色LEDを地面から垂直に果房に当て、光強度が約 $65 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ になるように調整し、5:30~18:30に補光した。照射開始後、7日おきにサンプリングを行い、果実品質を調査した後に、果粒を液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。調査項目は実験1と同様に、果実成長および果肉糖度、アントシアニン組成とし、アントシアニン組成はHPLCを用いて分析した。

(5) F3'5'H 遺伝子の5'上流配列の単離とその塩基配列の解析

「巨峰」若葉よりCTAB法により、のゲノムDNAを単離した。上流域の単離には、genome walker kit を用いた。Dra^I、EcoRV、Pvu^{II}、Stu^I の4つの制限酵素で切断し、DNAを精製後、アダプターを両端に連結させた。次にF3'5'Hのプライマー2種を用い、primary PCR、secondary PCRを行って増幅した断片をゲルより切り出して精製し、ベクター(pCR2.1)とライゲーションして、大腸菌に導入しクローニングした。その後、塩基配列を決定した。

(6) 青色光がブドウ「巨峰」果実の着色および植物ホルモン含量に及ぼす影響について

青色光照射を行った「巨峰」果粒を用いてメタノール抽出を行い、カラムによる前処理を行った後、UPLC-MSにより分析を行った。

4. 研究成果

(1) 青色光がブドウ「巨峰」果実の着色に及ぼす影響について

波長の異なる光が、「巨峰」果実の着色に及ぼす影響について検討するため、ポット植えの「巨峰」を用いて、LEDによる照射実験を行った。青色光、赤色光、白色光について、果実形質に対する影響を調べたところ、白色光と比較して、青色光照射を行った果房では、アントシアニンの蓄積量が多く、特にデルフィニジンの果皮含量が多いことが明らかになった。一方、赤色光の照射では、果実の着色は遅れ、最終的な蓄積量も少ないことが示された。このことは、青色光はブドウ「巨峰」果皮におけるアントシアニン生合成を増加することを示唆しており、シアニン系からデルフィニジン系アントシアニンを行う酵素であるフラボノイド3'5'水酸化酵素の活性が増加したことが示唆された。この照射実験は黄色のLEDを用いた際には、着色が抑制されていた。照射方法については、果房を全て覆い、LED照射のみで果房を着色させる方法でも、日中の照射は太陽光で、朝と夕方にそれぞれの光を照射する補光でも効果が認められることが明らかになった。

(2) LED照射によるブドウ「巨峰」果皮におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現解析

赤色光照射を行ったブドウ果皮では、アントシアニン蓄積が劣っていたが、その際にアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現は、同様に低くなっていた。それに対して、青色光照射によりアントシアニン蓄積が増加しており、その際に生合成酵素遺伝子はアントシアニン蓄積に影響が大きいことが多くの植物で報告されているUFGTの発現、およびデルフィニジン系アントシアニンの蓄積に重要なF3'5'Hの発現が増加していることが明らかになった。

(3) in vitro における「巨峰」ブドウ果粒に対するLED照射の影響

青色光LEDによるブドウ「巨峰」果皮の着

色に対する影響を環境要因や、樹体の影響を除いて比較するために、ブドウの果粒を樹体より分離し、in vitro の培地に置床した後に、LED 照射下で培養し、果皮の変化について検討を行った。青色光に加え、白色光および赤色光の影響についても比較検討した。その結果、白色光や赤色光ではほとんど着色が行われなかったのに対し、青色光の照射では、アントシアニンの蓄積が認められた。HPLC でアントシアニンを分析した結果では、多くのアントシアニンがデルフィニジン系アントシアニンであることが示された。しかしながら、果皮色は、ブドウの果皮にみられる黒紫とは異なっており、アントシアニン以外のポリフェノール類の蓄積があると考えられた。本研究では、LED の光強度を合わせて比較を行っているものの、ブドウ果皮への影響は、青色光の LED と赤色光、白色光の LED とで大きな違いが認められ、光の波長の作用メカニズムが異なることが示唆された。

(4) '巨峰' ブドウ成木に対する青色 LED 補光の影響

ハウス内に植栽されたブドウ '巨峰' 成木に対して、樹体の下方より青色 LED を設置、照射した結果、照射しないブドウと比較して、青色 LED 補光区で果皮のアントシアニン蓄積が多くなった。したがって、青色 LED による補光は着色不良が生じやすい地域での栽培に利用できる可能性があると考えられた。しかし、成木は樹木の状態や環境要因が大きく影響するため、光や温度、土壌条件等を十分考慮して今後さらなる検討が必要であると考えられた。

(5) F3'5'H 遺伝子のプロモーター領域の単離とその遺伝子発現制御因子候補の探索

ブドウ '巨峰' の葉より DNA を単離し、Genome Walker kit を用いて、F3'5'H の上流域のクローニングを試みた。数種類の断片が得られ、それらの遺伝子配列より約 1kbp の上流域をクローン化し、遺伝子配列を解析した。その結果、今回単離された上流域の配列は、他の品種である 'シラズ' で単離された F3'5'H 遺伝子と比較的高い相同性が認められることが明らかになった。

F375'H の上流域には、多くの転写制御因子と考えられる配列が存在していた。特に、光に誘導される遺伝子のシス配列およびフィトクローム A により誘導される遺伝子に共通に認められるシス因子などが存在していることが明らかになり、本プロモーター領域もそれらのシグナルにより制御される可能性が見出された。糖誘導性、ジベレリン誘導遺伝子に見られるシス配列、およびフラボノイド生合成遺伝子の上流域にあることが報告されたシス因子が存在することが明らかになった。これらのことから、'巨峰' の F3'5'H 遺伝子のプロモーター領域には、光、糖、ジベレリンなどにより制御される可能性が示唆された。本研究に続いて、それらの領域が、光や糖などのシグナルにより制御される

ことを明らかにするために、さらなる実験を試みている。

(6) LED 照射を行ったブドウ果粒における ABA 含量の変化について

ポット植えのブドウ '巨峰' において赤色光、青色光、および白色光照射をベレーゾン開始後行った果粒について、ABA 含量を UPLC-MS にて定量した。その結果、照射後 21 日目においては、赤色光や白色光ではほとんど ABA 含量が変化していなかったが、青色光照射で増加していることが明らかになった。このことから、青色光照射によるアントシアニン含量、特にデルフィニジン含量の増加は、ABA 含量の増加を伴っている可能性が示唆された。

以上より、青色光はブドウ '巨峰' において、アントシアニン生合成遺伝子である UFGT や F3'5'H の発現を増加させ、アントシアニン蓄積量を増加させることができることが明らかになった。その際に、黒紫色に深く関与する F3'5'H 遺伝子の発現調節に関与する上流域に存在する糖、ABA、フィトクローム関連の cis 因子が制御に関与する可能性が示された。また、青色光により ABA 量が増加しており、そのことがアントシアニン増加に寄与した可能性が示された。これらの研究を進めることで、青色光によるアントシアニン蓄積の情報伝達系が明らかにできると考えられる。さらに、青色光の補光により圃場の成木でのアントシアニンが増加したことから、高温などの着色不良を改善するための技術開発につながる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 純子 (SUGAYA, Sumiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：90302372

(2) 連携研究者

瀬古澤 由彦 (SEKOZAWA Yoshihiko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：90361310

