



Where we are ... トレンティーノ

ブドウ
10,000 ha
(イタリア全体の1%)
・0.8 百万hl
(イタリア全体の2%)
スーパーキングワイン(瓶内二次発酵
による)生産量の30%

リンゴ

ソフトフルーツ
10,000 ha
イタリア全体の2%の生産量

サンミケーレ アルト・アディジェ

30 ME



¥2000/2 Kgあたり

価値

- 果粒が大きい
- 健全なブドウ
- 最適な糖/酸 比
- 色 = フラボノイド


概要

- フラボノイドの紹介
 - 化学構造
 - 機能
 - ブドウに含まれるフラボノイド
- フラボノイド含量及び組成の遺伝的制御
 - 生合成経路
 - 遺伝的制御: 既知事項
 - 遺伝的制御: 私たちの研究成果
- 環境要因の影響
 - 異なる環境因子の影響 (要約)
 - 巨峰フラボノイド濃度への温度と光の効果
- 人的干渉の可能性

フラボノイド

- フラバン骨格をもつ二次代謝産物 (3 環)
- 酸化状態およびC環の修飾によってフラボノイドの種類がわかる。
- それぞれのフラボノイドにはB環の修飾が異なる種々の化合物が存在する。
- 色をもつ: UV、可視光を吸収する。
- 5000以上の植物フラボノイドが知られている。

フラボノイドの機能性



植物に対して

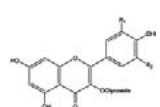
- ✓ UV光からの防御
- ✓ 受粉や種子拡散を促進するためのアトラクション
- ✓ 植物の防御: 被食への妨害物(タンニン)、抗菌性物質
- ✓ 栄養素

人類に対して

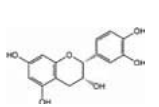
- ✓ 健康増進物質

177 FONDAZIONE EDUARDO MAESTRI

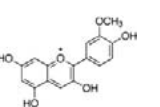
ブドウ・ワイン中のフラボノイド



フラボノール



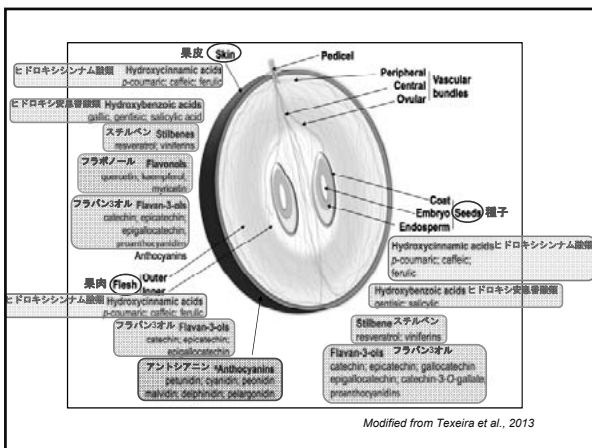
タンニン



アントシアニン

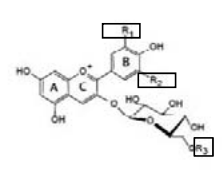
3ヒドロキシフラボン骨格	フラバン3オール モノマー類: カテキン, エピカテキン, エピガロカテキン, エピカテキンガレート プロアントシアニン, 縮合タンニン	デルフィニジン, シアニジン, ペチュニジン, ペオニジン, マルビジン, ペラルゴニン(モノグルコンド, アセチルモノグルコンド, p-ウマロイルモノグルコンド誘導体として存在)
UV-防御物質, フリーラジカル除去剤 無色	被食動物への摂食阻害物質 茶色	抗酸化物質 赤色~紫色
アントシアニンのコピグメント	ワインのボディ, 口内感, 安定性	ワインの赤色素

177 FONDAZIONE EDUARDO MAESTRI



Modified from Teixeira et al., 2013

化学的多様性: アントシアニン



Anthocyanidin	R ₁	R ₂	R ₃
Cyanidin シアニジン	OH	H	H
Delphinidin デルフィニジン	OH	OH	H
Peonidin ペオニジン	OCH ₃	H	H
Pelargonidin ペラルゴニン	OCH ₃	OH	H
Malvidin マルビジン	OCH ₃	OCH ₃	H

$R_1 = -CO_2CH_3$ (アセチル) $R_2 = -CO_2CH_3$ (アセチル) $R_3 = -CO_2CH_3$ (アセチル) $R_4 = -OCH_3$ (メチル) $R_5 = -OCH_3$ (メチル)

着色品種のみに存在

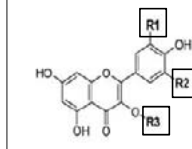
177 FONDAZIONE EDUARDO MAESTRI

化学的多様性の効果

- ✓ **色強度:** アシル化アントシアニン(AVI(液胞内アントシアニン凝集))に取り込まれる (濃色)
- ✓ **ワイン醸造中の色素の抽出率:** アシル化されていないアントシアニン またアセチル化されたアントシアニンはより容易に抽出される。一方、p-ウマロイル化されたアントシアニンは抽出されにくい。
- ✓ **ワイン中の色素安定性:** シアニジン、デルフィニジン、ペチュニジンはマルビジンやペオニジン (メチル化の度合い) よりも酸化されやすい。アシル化されたアントシアニンはより酸化に対して強い。
- ✓ 健康増進効果の結果、**生物学的利用能や生理活性に影響**

177 FONDAZIONE EDUARDO MAESTRI

化学的多様性: フラボノール



Flavonols	R1	R2	R3
Kaempferol	H	H	H
Quercetin	OH	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isorhamnetin	OCH ₃	H	H
Laricitrin	OH	OCH ₃	H
Syringetin	OCH ₃	OCH ₃	H


アシル化はされていない。

* 白ワイン用品種では存在しない。

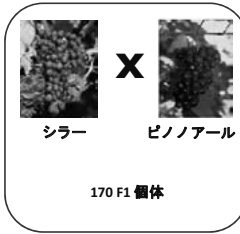
177 FONDAZIONE EDUARDO MAESTRI

その他? 未解決な問題

- ✓成熟期後半のアントシアニンの蓄積を制御する転写因子
- ✓アントシアニンアシル基転移酵素
- ✓その他のフラボノイド液胞輸送体 (基質特異的な)
- ✓液胞でのフラボノイドの分解に関連する酵素



実験方法




1. 代謝産物解析
収穫期の果皮 (18° Brix), 4 シーズン
HPLC-DAD-MS, 21 代謝産物

2. 遺伝子地図
JoinMap 4.0

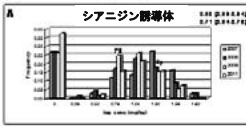
3. 量的形質遺伝子座(QTL) 解析
MapQTL 6.0, SIM and MQM, Kruskal-Wallis
83 形質, 4 ヶ年

4. 遺伝子発現解析
低- & 高- フラボノール・アントシアニン 蓄積個体
3 発達時期 (PV, VER, 18°Brix)

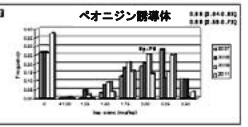
5. データ統合
候補遺伝子のリスト



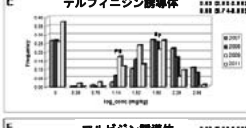
代謝産物解析



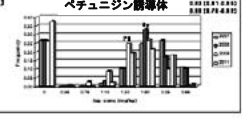
シアニン糖導体



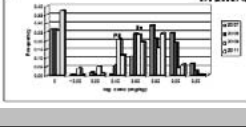
ペオニン糖導体



デルフィンジン糖導体




ペチュニン糖導体



マルビジン糖導体

✓ 抽出及びHPLC-DAD-MS分析 (Mattivi et al., JAFc 2006)
 ✓ 誘導体=3-モノグルコシド、アセチルモノグルコシド、p-クマロイルモノグルコシドの合計

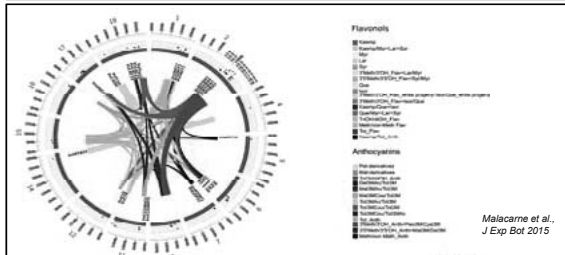
Costantini et al., J Exp Bot 2015



遺伝解析

遺伝地図: 170 F1個体, 654 SSRs and SNPs, 平均距離 = 2cM. 遺伝マーカーの並びは物理的距離を用いて確認。


QTL 解析: アントシアニン・フラボノールに共通する領域 (LGs 1, 2, 5, 6, 10, 11a, 12a, 17, 18b), それぞれに特異的な領域 (Anth: 3, 4b, 7b, 8a, 8b, 9, 12b; Flav: 4a, 7a, 11b, 14, 15, 16, and 18a)



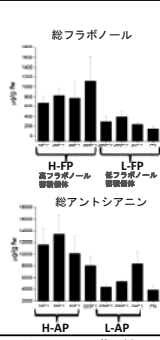
Flavonols
 Name
 Description
 Location
 ...

Anthocyanins
 Name
 Description
 Location
 ...

Malacarne et al., J Exp Bot 2015




遺伝子発現解析



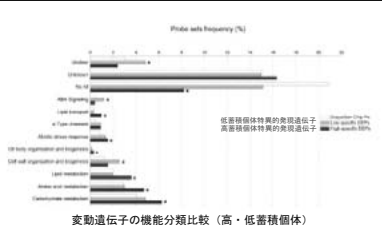
総フラボノール

H-FP 高フラボノール 蓄積個体 | L-FP 低フラボノール 蓄積個体



総アントシアニン

H-AP 高アントシアニン 蓄積個体 | L-AP 低アントシアニン 蓄積個体




Whole leaf frequency (%)

変動遺伝子の機能分類比較 (高・低蓄積個体)

Total DEPs in LAPs	Total DEPs in HAPs	Unique DEPs in LAPs	Unique DEPs in HAPs	Common
3755	2933	1841	1029	1314
Total DEPs in LFPs	Total DEPs in HFPs	Unique DEPs in LFPs	Unique DEPs in HFPs	Common
3930	4834	675	1579	3109


Custom Affymetrix GeneChip®
 (GRAPEGEN project annotated by Grimplet et al. (2012))

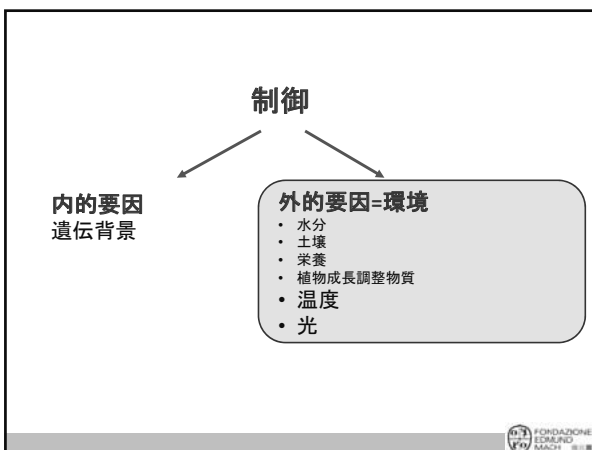
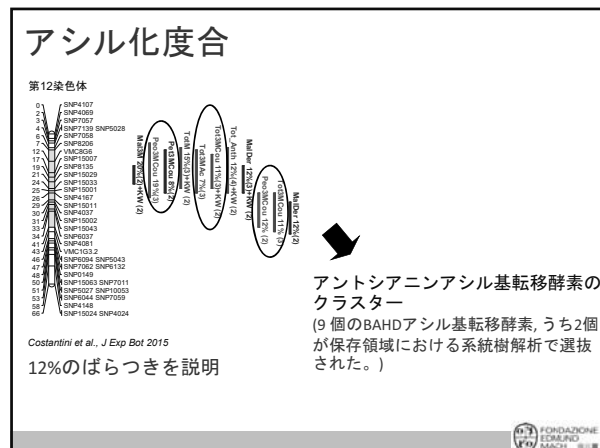
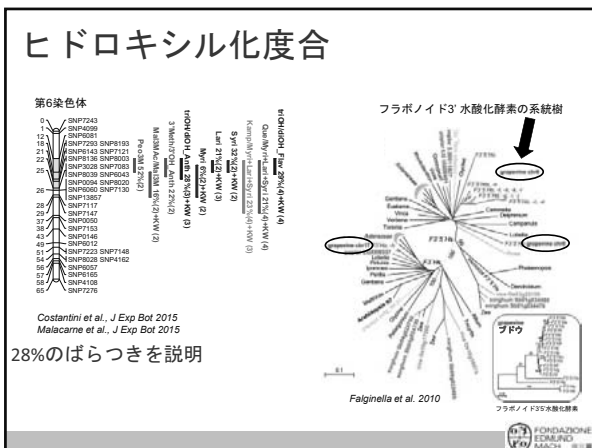
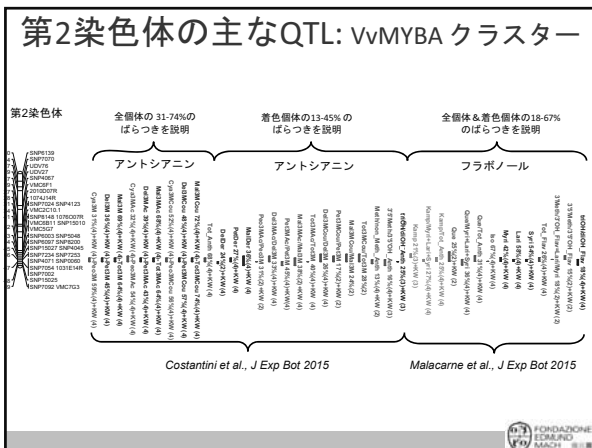


データ統合と候補遺伝子の選抜

候補遺伝子は **12Xv1 予測** (<http://genomes.cripi.unipd.it/>; Lijavetzky et al. 2012) に従って、それぞれの形質 (例: アントシアニン含量) の QTL 領域から、少なくとも以下の1つの根拠をもつものが選抜された。

- ✓ その形質の制御への関与が文献で報告されている
- ✓ 高蓄積個体と低蓄積個体で異なった遺伝子発現をしている
- ✓ 遺伝子発現パターンが果実発達時期のアントシアニン/フラボノールの蓄積パターンと一致する。果皮での発現が果肉より高い。
- ✓ アントシアニン生成に含まれる遺伝子と発現パターンが共通する。





フラボノイドの環境による制御

	アントシアニン	フラボノール	タンニン	注記	文献
栄養素					
>窒素	↓	n.d.	不明	樹勢過多	1)Delgado, R. 2004. J. Sci. Food Agric. 84:623-630.
>カリウム	↓	n.d.	不明	樹勢過多	2)Jackson, D.J., et al 1993. Am. J. Enol. Vitis. 44:409-430.
>リン酸塩	n.d.	n.d.	n.d.		3)Cornell, J.M., et al. J. Agric. Food Chem. 53:5789-5797
土壌					
水分	↓	n.d.	↓	水分保持能力や土壌年齢が大きな影響	4)Kennedy, J.A., et al 2002. Am. J. Enol. Vitis. 53:268-274.
成長調整物質				水分は多くの植物代謝に影響	5)Roby, G., et al 2004. Aust. J. Grape Wine Res. 10:100-107.
>ABA	↑		↑	n.d.	6)Mitsushima, J., et al 1989 J. Jap. Soc. Hort. Sci. 58:551-555.
>GA3	↓		n.d.	発芽効果?	7)Koyama, K., et al. Funct Integr Genomics 2010. 10: 367.
>オーキシン	↓		n.d.		8)Dan, D.H., et al 2004. Acta Hort. (ISHS) 653:193-197.
>サイトカイニン	↓		n.d.		9)Bar, T., et al 2003. J. Hort. Sci. Biotech. 78:586-589.
>エチレン	↑		n.d.	ベレーゾン片	10)Kereamy, A., et al 2003. Physiol. Plant. 119:178-182.
高度				異なる気象条件の影響	
日照(光)	↑	↑	抽出率		11)Koskitalo, N.K., and W.M. Kilewe. 1996. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121:869-874.
温度	↑↓	↑↓	不明	極めて重要な温度 T=30°C	12)Roway, S.E., et al 2002. Am. J. Enol. Vitis. 53:171-181.
					13)Roway, M.G., et al. 2004. Aust. J. Grape Wine Res. 10:55-73.

「ブドウにおけるフラボノイド含量や組成に影響する多くの因子のうち、土地や年次は最も大きな影響をもつ。この影響については他の多くの条件は比較的一定であることから、大きくは光と温度の影響と要約できる。」
From Downey M.O. Am. J. Enol. Vitic. 2006

巨峰ブドウへの光と温度の影響
(R. Shinomiya et al. / Scientia Horticulturae, 2015)

20年で2.1°Cの温度上昇

研究目的

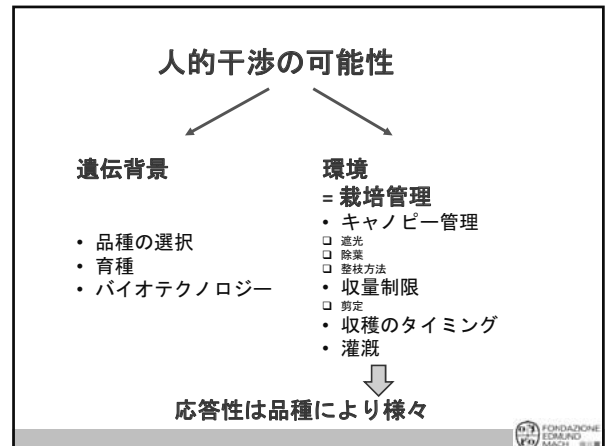
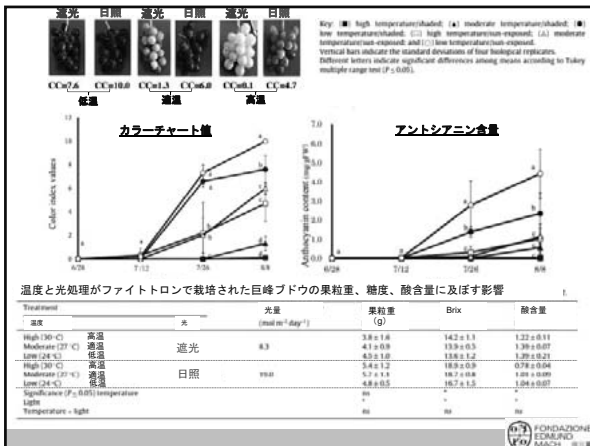
1. 成熟期における巨峰ブドウ果皮の着色への光と温度の影響について評価すること
2. 消費者が許容できない着色不足に対する温度閾値を推定すること。

材料と方法

24巨峰ポット樹 (樹齢3年)。1樹あたり3果房、福岡県(33-50-N, 130-57-E)で栽培された。
25 mg L⁻¹ (GA3)を開花後3日後に処理
1か月後(7月28日)にファイトロンに移され、温度処理及び遮光処理が行われた。

実験区は以下の温度と光条件の異なる6処理区 (n = 4 vines per treatment).
温度: 高温 (30 °C一定), 適温 (27 °C一定), 低温 (24 °C一定).
光: 遮光区 (クレモナ寒冷紗 (60%の日照を吸収) でブドウ樹を遮光)、日照区 (無遮光).

果実採取日: 6月28日, 7月12日 (ベレーゾン), 7月26日, 8月8日



結論

- ❖ フラボノイドは重要な植物二次代謝産物であり、ブドウでは果実色、UVからの防御など植物の防御の働きがある。また、ワインの特性にとって重要である。
- ❖ 果実中のフラボノイド含量及び組成は遺伝的、また、環境によって制御されている。
- ❖ 多様なMYBタイプ制御因子がフラボノイド合成系を制御していることが知られている。
- ❖ 私たちの研究結果:
 - ・ アントシアニンとフラボノールの遺伝的制御に関しては種々の共通する遺伝子座の存在が示唆された。
 - ・ アントシアニンとフラボノールの組成の違いを説明する候補遺伝子が同定された (水酸化酵素、グルコース転移酵素、メチル基転移酵素、アシル基転移酵素、輸送体)。
- ❖ 種々の環境因子が異なるクラスのフラボノイドに影響する。温度と光は最も重要である (巨峰にとっても同様)。
- ❖ 遺伝背景や栽培管理方法を変更することによる人為的干渉の可能性が示唆されている。

Team

Genomics and Biology of Fruit Plants Department

- Plant Biology & Physiology
 - Malacarne Giulia
 - Moser Claudio
- Applied genomics to grapevine
 - Costantini Laura
 - Battilana Juri
 - Lorenzi Silvia
 - Grando Stella
- Structural Genetics
 - Troggio Michela
 - Velasco Riccardo

Food Quality and Nutrition Department

- Metabonomic platform
 - Masiero Domenico
 - Vrhovsek Urska
 - Mattivi Fulvio
- Computational Biology Unit
 - Coller Emanuela

Autonomous Province of Trento



なお、本セミナー報告の和訳は、編集委員の小山和哉（酒類総合研究所）が担当しました。