

[2017年日本ブドウ・ワイン学会 論文賞 受賞講演要旨]

国産赤ワインブドウのフェノール化合物組成に関する研究
—プロアントシアニジン組成とそのコントロール

小山 和哉

独立行政法人 酒類総合研究所

2017 ASEV JAPAN JOURNAL AUTHOR'S AWARD
Study of Phenolic Compound in Domestic Red Wine Grape
—Diversity of Proanthocyanidin Compositions and Their Regulation

Kazuya KOYAMA

National Research Institute of Brewing, Hiroshima, Japan

Black and red grapes produce highly diverse phenolic compounds in berries, which are important contributors to the organoleptic qualities of wine. Proanthocyanidins, also called condensed tannins, contribute to the astringency and body of wine. Because of the complexity of their polymeric structures, the compositional differences among varieties as well as their regulation by environmental factors in the berries have not been fully investigated. In this study, first, the effect of light condition around bunches of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon on proanthocyanidin synthesis was examined and the positive influence of light exposure during early development on proanthocyanidin composition at harvest was elucidated. Different light regulations of the biosynthesis of phenolic compounds in young berry skins were found: visible light primarily induces the biosynthesis of proanthocyanidins and affects their composition, whereas UV light specifically induces the biosynthesis of flavonols. In addition, comprehensive gene expression analysis (SuperSAGE) was performed in berry samples cultured under different light conditions to screen for genes that are coordinately expressed with proanthocyanidin accumulation. From this analysis, a new transcription factor, VvMYBPAR, which specifically regulates proanthocyanidin biosynthesis, was found. Its transcript levels were relatively high in skins of young berries, whereas the levels were higher in the seeds and at a maximum around veraison. Among the proanthocyanidin-specific branch genes, the transcript profile of VvMYBPAR was not related to that of VvANR or VvLARI but closely related to that of VvLAR2, suggesting different regulation of proanthocyanidin-specific branch genes from that of a known proanthocyanidin regulator, VvMYBPA2. Multiple regulations by these regulators were considered to be related to the compositional difference between skins and seeds. Furthermore, we examined the polyphenolic profiles of 16 domestic red wine grapes, including *V. vinifera*, *V. × labruscana*, and wild grapes, such as *V. coignetiae* and *V. ficifolia* as well as their hybrids. Both skin and seed proanthocyanidin concentrations in *V. vinifera* were higher than those in *V. × labruscana* as well as the wild grapes and their hybrids. In addition, the percentage of epigallocatechin units was also significantly higher in *V. vinifera* than the other varieties, suggesting the preferable characteristics of *V. vinifera* as wine grape. On the other hand, some

of the hybrids domestically bred with wild grapes had markedly high concentrations of functional compounds, such as resveratrol and myricetin, a trihydroxylated flavonol.

赤ワイン用ブドウは多様なフェノール化合物と呼ばれる化合物を含有している。これらの化合物は、ワイン中に溶出し、ワインの色や呈味性に大きく寄与することから、醸造用ブドウの品質にとって重要な成分と考えられる¹⁾。また、抗酸化性、抗菌性、抗癌性など食品における機能性成分としても着目されている²⁾。主要なフェノール化合物として、色素であるアントシアニン、補助色素として色調や色の強度とも関連するフラボノール、様々な機能性をもつことで知られるレスベラトロール、渋みをもちワインのボディ感とも関連の深いプロアントシアニジンが存在する。プロアントシアニジンは縮合型タンニンとも呼ばれ、カテキン類が連なったポリマー構造を持つ。アントシアニンについてはその生成や制御機構に関して、比較的明らかとなっているが、その他のフェノール化合物、中でもプロアントシアニジンについてはその複雑さからその生成・制御に関して不明な点が多い³⁾。

プロアントシアニジンの量及び組成は、フロログルシノール存在下で酸熱分解し、各構成ユニット（ブドウでは主要なものとして4種類存在する）量を測定することより推定することができる（Fig. 1: フロログルシノール分解法）⁴⁾。果皮と種子のプロアントシアニジンは、官能的な違いが経験的に知られているが、フロログルシノール分解法で測定される組成には大きな違いがみられ、果皮プロアントシアニジンは、構成ユニットにエピガロカテキンを顕著に含んでおり、平均重合度が長いという特徴をもつ。エピガロカテキンユニットは官能的ななめらかさに関連があるとも言われ⁵⁾、ワインの品質との間で正の相関がみられるとの報告もある⁶⁾。

本研究では、ブドウ果実中のプロアントシアニジンの含量及び組成への環境要因（果房周囲の光環境）の影響について検討するとともに、その制御機構について明らかとする目的で、ブドウ果実における制御因子を同定し、機能解析を試みた。さらに、国産赤ワインブドウ品種の果実中のプロアントシアニジンを含むフェノール化合物組成の違いについて検討を行った。

赤ワインブドウ果実中のフェノール化合物組成に及ぼす果房周囲の光環境の影響

果実発育初期（ベレーゾン期以前）及び／又は成熟期の果房への受光量がカベルネソーヴィニオン果皮におけるフェノール化合物組成へ及ぼす影響について検討した。果実の発達初期では受光量増加によりプロアントシアニジンの濃度は増加した。プロアントシアニジン濃度は成熟期に減少したが、その減少率は発育初期に果房への受光量が多かった果房においてより顕著であった。その結果、発達初期の受光量増加は収穫期のプロアント

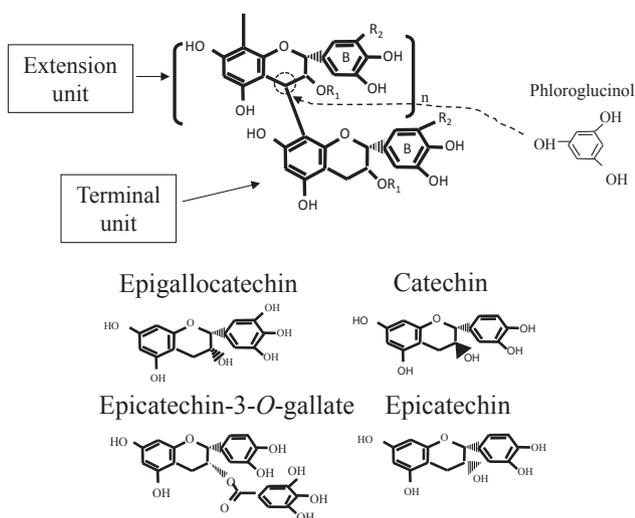


Fig. 1 Analytical method to determine proanthocyanidin composition (Phloroglucinolysis)

シアニジン濃度には影響を及ぼさなかった。一方、発育初期の受光量増加はプロアントシアニジンの組成の変化を誘導した。すなわち、果皮プロアントシアニジンの主な構成成分であるエピガロカテキンの割合の増加がみられた。従って、発育初期の果房への受光量は重要で、プロアントシアニジンの組成へ持続的な正の影響をもたらすことがわかった。

次に、同じく、カベルネソーヴィニオンを用いて、果実発育初期の果実の受光における光質（UV光、白色光）が、果皮フラボノイド（プロアントシアニジン、フラボノール）生成へ及ぼす影響について検討を行った。開花期から成熟期前までの果房への遮光処理によって、果皮のプロアントシアニジン濃度は部分的に減少したが、フラボノール濃度は完全に増加が抑制された。また、プロアントシアニジン構成成分のエピガロカテキンの割合及び平均重合度などのプロアントシアニジン組成に対し顕著な影響がみられた。しかし、UVカット処理によりプロアントシアニジン濃度及び組成には影響がみられず、白色光による影響が大きいことがわかった。一方、フラボノール濃度はUV光によって主に制御されていることがわかった。これらの結果より、果房周囲の光質に対するフラボノイド類の応答性の違いがみられ、フェノール化合物組成を変化させることができる可能性が示唆された。

プロアントシアニジン組成の制御機構の解析

プロアントシアニジンはアントシアニンの生成へと至るフラボノイド経路から分岐した経路より生成することが知られている。ブドウでは、ロイコシアニジンからカテキンを生合成する *Leucoanthocyanin Reductase (LAR)1*、*LAR2*⁷⁾ とシアニジン、デルフィニジンからそれぞれエピカテキン、エピガロカテキンを生合成する *Anthocyanin Reductase (ANR)*⁸⁾ があり、複雑な組成となると考

えられている。しかし、これらの酵素によって生じた構成ユニットからどのようにしてポリマーであるプロアントシアニジンが生成するのかなど詳細な分子機構については不明な点が多い。

これまでの検討で果実発育初期の果房周囲の日照条件の異なる果実ではプロアントシアニジン組成の変動とともに既知の生合成系遺伝子の発現変動が観察された。従って、各発達時期の果実、また、異なる光環境条件下で栽培した果実を用いて、網羅的な遺伝子発現解析 (*SuperSAGE*) を行い、プロアントシアニジンの変化と呼応した発現プロファイルを示す遺伝子のスクリーニングを行った。抽出された遺伝子群の中にはプロアントシアニジン生合成との関連が強く示唆される遺伝子が高頻度で含まれていた。これらの中に、プロアントシアニジンの制御因子と考えられる新規な *MYB* タイプの転写因子 (*VvMYBPAR*) が含まれていた。

この *VvMYBPAR* がプロアントシアニジンを特異的に制御していることを確認するため、モデル植物であるシロイヌナズナで *VvMYBPAR* を強制発現させたところ、プロアントシアニジン生合成系遺伝子群が特異的に誘導され、アントシアニン誘導条件下でプロアントシアニジンの蓄積がみられた。さらに、ブドウの培養細胞を用いたレポーターアッセイの結果、*VvMYBPAR* はプロアントシアニジン生成特異的な経路上の遺伝子のプロモーターを活性化するが、アントシアニン生成経路の遺伝子には影響がみられないことがわかった。

VvMYBPAR の発現は幼果皮で高いが、種子でより高い発現を示し、ベレーズン期付近で極大を示すことがわかったが、この遺伝子発現プロファイルは、構造遺伝子である *VvLAR2* と似ていた。一方、プロアントシアニジンの制御因子として報告⁹⁾ のある *VvMYBPA2* は果皮、種子において幼果の時期に最も発現が高く、他の構造遺伝子 *VvANR*、*VvLARI* の発現と対応していたことから

VvMYBPARは既知の制御因子とは異なるプロアントシアニジンの生合成系遺伝子を制御している可能性が高いと思われた。これら構造の似た複数の制御因子が関与しており、プロアントシアニジンの器官による組成の違いが生じていることが示唆された。

国産赤ワインブドウ品種のフェノール化合物組成の特徴

最後に、国産赤ワイン品種におけるポリフェノール組成の品種間の違いを明らかとするために、日本在来野生ブドウである、ヴィティス・フィシフォリア、ヴィティス・コアニティ（ヤマブドウ）、及びこれらと欧州系品種の交配品種、欧州系品種及びアメリカ系交配品種の計16品種の果実中のポリフェノール組成について調査を行い、プロファイルの比較を行った。検討した欧州系品種の種子及び果皮におけるプロアントシアニジン濃度はアメリカ系交配種、野生種及び交配品種より

も顕著に高かった。また、フロログルシノール法によって得られた組成では、エピガロカテキンユニットの割合が欧州種において顕著に高い傾向がみられ、醸造用ブドウとして好ましい性質であることが確認された。一方で、野生ブドウ及び交配品種では果皮に多量かつ多様なアントシアニンを含有している点に加え、一部の品種では、機能性の高いレスベラトロールが顕著に高まっているものが存在していた。また、フラボノールの中でも抗酸化性が高いといわれるミリセチン（フラボノイドB環の水酸基の数が3つ）の割合が顕著に高いなどの違いがみられ、これらの性質は今後の育種においても有用な形質と考えられた。ポリフェノール成分による主成分解析の結果、野生種及び交配品種、欧州系品種及びアメリカ系交配品種はスコアプロット上において明白に分離した (Fig. 2)。ローディングプロットでは、第一主成分の正の方向にプロアントシアニジン関連成分、第2主成分の正の方向にはフラボノール関連成分がみら

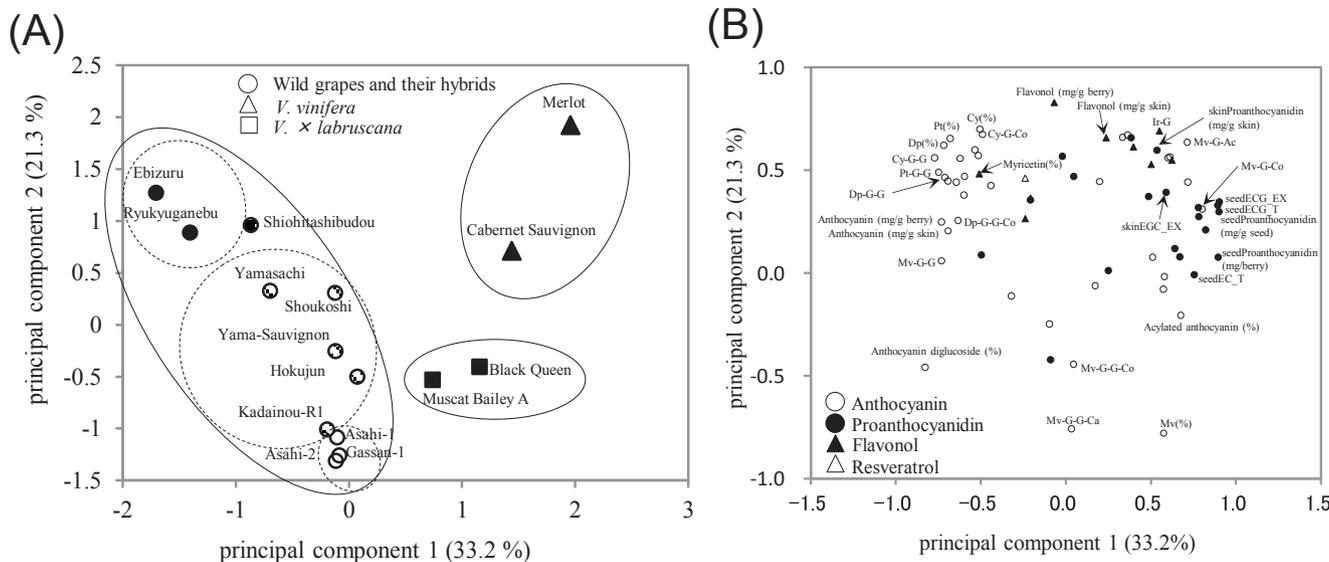


Fig. 2 Principal component analysis of polyphenolic constituents in berries of 15 grape accessions. (A) The first two component scores for *V. vinifera* (filled triangles), *V. × labruscana* (filled squares), *V. ficifolia* (filled circles), *V. coignetiae* (open circles) and hybrids with wild grape accessions (other circles) (B) Loading plot of the variables, showing the positions of the components related to anthocyanin, proanthocyanidin, flavonol, and resveratrol as open circles, filled circles, filled triangles, open triangles, respectively.

れ、これらの成分が大きく影響していることが示唆された。また、野生種中ではヴィテイス・フィシフォリア及びヴィテイス・コアニティが分離を示したことから、特徴的なポリフェノールプロファイルを示すことがわかった。さらに、これらの野生ブドウと欧州系品種との種間交雑品種は中間的な組成を示した。

今後、品種や栽培環境の違いによるプロアントシアニジン量や組成の制御機構に関して、更に知見を集めていきたい。

謝辞

論文賞の授与にあたり、松本会長をはじめ、推薦や選考に携わっていただきました皆様にお礼を申し上げます。

また、共同研究者である広島大学自然科学研究支援開発センター 田中伸和教授、信州大学基盤研究支援センター 松村英生准教授、香川大学農学部附属農場 望岡亮介教授に感謝いたします。後藤理事長をはじめとした酒類総合研究所成分解析研究部門ワイングループ（旧原料研究室）のメンバーに感謝いたします。

さらに、研究材料であるブドウを無償でご提供いただきましたワイナリーの多くの方々に感謝いたします。

なお、本研究の一部は科研費JP23780036及びJP15K07306の助成を受けて実施されました。

受賞対象論文

1. Kazuya Koyama, Hiroko Ikeda, Puspa Raj Poudel, and Nami Goto-Yamamoto. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry* 2012, 78, 54–64.
2. Kazuya Koyama, Mineyo Numata, Ikuko Nakajima, Nami Goto-Yamamoto, Hideo Matsumura, and Nobukazu Tanaka. Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin

biosynthesis in grapes. *Journal of Experimental Botany* 2014, 65(15), 4433–4449.

3. Kazuya Koyama, Hiroshi Kamigakiuchi, Kazuhiro Iwashita, Ryosuke Mochioka and Nami Goto-Yamamoto. Polyphenolic diversity and characterization in the red-purple berries of East Asian wild *Vitis* species. *Phytochemistry* 2017, 134, 78–86.

引用文献

1. Cheynier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 223S–229S.
2. Jackson R.S. 2000. *Wine, health, and food*. In: Taylor S. (Eds.), *Wine Science*, Chapter 12, pp591–607. Academic press, San Diego.
3. Dixon R.A., et al. 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165: 9–28.
4. Kennedy J.A., et al. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1740–1746.
5. Vidal S., et al. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* 83, 564–573.
6. Kassara S., et al. 2011. Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannin composition and size. *J. Agric. Food Chem.* 59: 8409–8412.
7. Fujita A., et al. 2007. Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *J. Soc. Hort. Sci.* 76: 112–119.
8. Fujita A., et al. 2005. Anthocyanin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 336–342.
9. Terrier N., et al. 2009. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant. Physiol.* 149: 1028–1041.

