

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 鈴木 真実

論 文 題 目

ブドウにおける二次代謝産物蓄積機構解明に向けたPDR型ABCトランスポーターの解析およびマルチオミクス

論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	白武	勝裕
委員	名古屋大学教授	松本	省吾
委員	名古屋大学教授	森	仁志
委員	名古屋大学助教	太田垣	駿吾

論文審査の結果の要旨

ブドウは、生食用として、また醸造の原料として、世界中で栽培されている重要な作物の一つである。ブドウの果皮には、アントシアニン、タンニン、レスベラトロールなど多様な二次代謝産物が豊富に含まれている。これらは、果実の色や味を決定するだけでなく、機能性成分としても働くため、果実品質を決定する重要な要素である。このため、これら二次代謝産物の蓄積の理解は、高品質なブドウの育種や栽培につながる。ブドウは2007年に園芸作物として初めて全ゲノム塩基配列が解読された。2012年にはブドウゲノム情報 12X version 1 (V1) が発表され、全遺伝子を搭載したマイクロアレイが設計・販売されるなど、研究者が利用しやすいように情報や研究ツールの改善が進んでいる。一方、近年、植物研究分野においても、遺伝子発現や代謝産物の網羅的研究、すなわちオミクスの発展が目覚ましい。最近ではオミクスを複数種実施し、データを統合して形質を考察するマルチオミクスにより、生命現象の理解をより深めることができるようになった。本研究ではブドウの果皮に蓄積する二次代謝産物の蓄積機構を解明するため、ゲノム情報やオミクス研究を利用した解析を実施した。

まず、細胞内外へ二次代謝産物を輸送するトランスポーターのうち、PDR型ABCトランスポーターに着目してゲノム情報をもとに全PDRを検索し、その中の一つ *VvABCG44* の cDNA クローニングおよび遺伝子発現解析を行った。タバコ *NpPDR1* のアミノ酸配列をクエリに、ブドウゲノム V1 の coding sequence (CDS) をデータベースに設定し、NCBI ローカル Blast を使用して PDR を検索したところ、400 アミノ酸以上の長さで、かつ 1 個以上の PDR モチーフを持つ CDS を 34 種得た。これらのうち、過去にエリシター処理で誘導されることが報告された EST と一致する CDS (*VIT_09s0002g05560*) をターゲットに絞り、RT-PCR 法による cDNA 全長クローニングを実施した。単離した PDR (*VvABCG44*) は、コード領域が 4,350 bp で、予想されたアミノ酸配列に Walker A、Walker B、ABC signature を含む Nucleotide-Binding Fold (NBF) を 2 つ、6 回膜貫通領域を 2 つ確認した。植物の PDR の分子系統樹を作成したところ、*VvABCG44* は、スクラレオールを含むジテルペンを輸送する *NtPDR1* や *NpPDR1*、イソフラボノイドの輸送に関与する *MtABCG10*、ABA 輸送に関与する *AtABCG40*、ストリゴラクトン輸送に関与する *PaPDR1* と同じクレードに分類された。リアルタイム PCR による器官・組織別発現解析では、*VvABCG44* は葉、茎、果皮などブドウの様々な器官・組織で発現が確認されたが、レスベラトロールの合成の鍵酵素であるスチルベン合成酵素 (*STS*) と同じく、成葉で高い発現を示した。また、紫外線を照射した果皮では、*VvABCG44* および *STS* の遺伝子発現がレスベラトロール蓄積が共に誘導された。以上から、*VvABCG44* がレスベラトロール蓄積に関与する可能性が示唆された。

次にトランスクリプトミクスとメタボロミクスを組み合わせたブドウ果皮のマルチオミクスを実施し、紫外線によって二次代謝産物の蓄積を誘導した時の代謝変化をプロファイルした。ブドウ未熟果に紫外線を1時間照射したのち、果皮を回収し、両オミクスの分析に使用した。対照区は1時間暗所に静置した果実の果皮を使用した。

トランスクリプトミクスには、ブドウの全遺伝子を網羅したマイクロアレイを使用した。マイクロアレイに搭載された29,549遺伝子のうち、対照区に比べて発現が5倍以上増加した遺伝子が238遺伝子、1/5以下に低下した遺伝子が24遺伝子見出した。個々の遺伝子機能を推定するため、ブドウCDSをクエリに、Tair 10やUniprotKBに登録されている配列データをデータベースに設定してBlastを行い、アノテーションを付与したところ、発現が低下した24遺伝子には、クチクラやワックス成分の合成や蓄積に関与するcytochrome P450、Wax2、pleiotropic drug resistance 4などが含まれていた。一方、発現が増加した238遺伝子には、ストレス応答に関与する転写因子NAC、WRKY、ERFが含まれていた。さらに発現が増加した238遺伝子の遺伝子機能とその傾向を見出すため、Gene Ontology (GO) による解析を実施した。GO slimタームを比較すると、biological processのうちresponse to stress(GO:0006950)とsecondary metabolic process (GO:0019748)の割合が増加した。さらにGOエンリッチメント解析ではbiological processで2種、molecular functionで11種のGOタームが見つかった。molecular functionのエンリッチされた階層グラフで、最下層のGOタームはpectinesterase activity (GO:0030599)、chlorophyllase activity (GO:0047746)、aspartyl esterase activity (GO:0045330)、trihydroxystilbene synthase activity (GO:0050350)、transferase activity, transferring hexosyl groups (GO:0016758)であった。trihydroxystilbene synthase activityはSTSを示しており、以上のトランスクリプトミクスから、果皮に紫外線を照射するとレスベラトロールの合成系遺伝子が強く誘導されることが明らかとなった。

一方、メタボロミクスは、二次代謝産物をターゲットとして、LC-QTOF-MSによる分析を実施した。その結果、未同定のピークも含めてネガティブモードで2,012ピークが検出できた。測定した強度値、保持時間および質量電荷比のデータマトリクスを用いて主成分分析を行ったところ、loading scatter plotで紫外線照射区特有の代謝産物ピークが1種発見でき、標品との照合によりレスベラトロールであることが判明した。さらに紫外線照射後、果実表面にレスベラトロールと推定される蛍光物質が多く蓄積していることも確認した。一方で、フェニルアラニンから合成される代表的なフェノール性化合物とその中間産物の標品を用いて、代謝産物の同定と定量を試みた。ネガティブモードで同定された17種の代謝物ピークのうち、カテキンは、紫外線照射区と対照区の両方で強度値が高かった。一方、レスベラトロールは、対照区と比較して、紫外線照射区のシグナル強度比が355倍高かった。レスベラトロール類縁体も、

強度値は低かったものの、対照区に比べてシグナル強度が増加していた。以上、メタボロミクスによって、紫外線照射によってブドウ果皮にレスベラトロールが大量に蓄積することを示した。

さらにトランスクリプトミクスとメタボロミクスの両データを代謝マップに統合した。マイクロアレイの設計にも使用されているブドウゲノム V1 に対応した代謝マップを作成するため、代謝マップを提供している KEGG に V1 の CDS 情報を登録し、新しく代謝マップを作成した。さらに、KEGG の代謝マップを描画するウェブツールである KaPPA-View 4 KEGG で、新しく作成した KEGG 代謝マップが利用できるよう、システムを更新した。この更新した KaPPA-View 4 KEGG を用い、両オミクスデータを代謝マップ上に統合したところ、レスベラトロール代謝系が際立って誘導されることを明確に示すことができた。

ブドウは果実の成熟過程で、ベレーゾンと呼ばれる時期を境に、果実の糖蓄積、軟化、着色が急速に進むことが知られている。この時期における果皮の代謝変化を網羅的に分析するため、ベレーゾン前の果実と収穫期の果実から果皮を回収し、LC-QTOF-MS によるメタボロミクスを実施した。その結果、未同定のピークも含めてポジティブモードで 1,197 ピークを検出した。これらのうち、標品で 12 種類の代謝物を同定・定量したところ、ベレーゾン前の果皮では、ほとんどフェノール性化合物が蓄積しておらず、カテキンのみが蓄積していた。一方、収穫期の果皮ではカテキンが減少し、アントシアニンが大量に蓄積し、特にマルビジン 3 グルコシドは $7.44 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ と、最も多く蓄積していた。次に 1,197 ピークを用いて主成分分析を実施し、ベレーゾン前の果皮と相関の強いピークを 3 種、収穫期の果皮と相関の強いピークを 4 種、それぞれ抽出した。これらのうち、標品と照合できなかった代謝物ピークについて、MS/MS データを取得し、MS データベース 3 種においてフラグメントの質量電荷比が一致するスペクトルデータを検索し、代謝物を推定した。ベレーゾン前の果皮と相関が高かった代謝物ピークのうち、1 種はグルタミン酸やグルタミン由来のイオンである可能性が示唆された。収穫期と相関の高かった代謝物ピークのうち、1 種はアミノ酸であるアルギニンと推察された。アルギニンは、果肉と果皮に蓄積し、成熟に伴って増加することが報告されており、今回の結果と一致する。またブドウ果汁中では、酸味を抑えて甘みを増し、食味を向上させることが報告されていることから、収穫期の果皮でアルギニンが特徴的に増加する成分として見出されたことは興味深い。本研究では、ブドウ果実の成熟過程における二次代謝産物の変動を確認するとともに、果実の食味に影響するアミノ酸を見出すことにも成功した。

以上のように、本研究では、ブドウの PDR 型 ABC トランスポーターの解析、紫

外線を照射した時のブドウ果皮のマルチオミクス、果実成熟前後のブドウ果皮のメタボロミクスを実施し、レスベラトロール蓄積に関与することが示唆されるトランスポーターVvABCG44を見出すとともに、紫外線によるレスベラトロール蓄積の誘導をマルチオミクスによって示し、そして果実の成熟過程で果皮に蓄積する代謝物のプロファイルを明らかにした。また本研究では、KEGGのブドウの代謝マップの作成や、KEGG代謝マップの描画ウェブツール KaPPA-View 4 KEGGの更新を行うなど、ブドウ研究に大きく貢献する研究にも取り組んだ。本研究の結果は、ブドウをはじめとする園芸作物のオミクス研究や二次代謝産物蓄積機構の解明に大きく貢献するものであり、審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査に合格と判定した。

