

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

名古屋大学大学院生命農学研究科

生物機構・機能科学専攻

資源生物機能学講座

園芸科学研究分野

鈴木 真実

2015 年 3 月

略号

3MaT1; anthocyanin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase,
4CL; 4-coumarate: CoA ligase,
ABA; abscisic acid,
ABC; ATP-binding cassette,
ABCB; ATP-binding cassette B subfamily,
ABCG; ATP-binding cassette G subfamily,
ANR; anthocyanidin reductase,
BLAST; basic local alignment search tool,
BV; before veraison,
BZ1; anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase,
C4H; cinnamate 4-hydroxylase,
CAS; Chemical Abstracts Service,
cDNA; complementary DNA,
CDS; coding sequence,
CHI; chalcone isomerase,
CHS; chalcone synthase,
DDBJ; DNA Data Bank of Japan,
DFR; dihydroflavonol-4-reductase,
DNA; deoxyribonucleic acid,
EBI; European Bioinformatics Institute,
EST; expressed sequence tag,
F3'5'H; flavonoid 3',5'-hydroxylase,
F3H; flavanone 3-hydroxylase,
F3'H; flavonoid 3'-hydroxylase,
FC; fold change,
FLS; flavonol synthase,
FW; flesh weight,
GO; Gene Ontology,
GT1; anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase,
H; at harvest,
KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,
KaPPA-View 4; The Kazusa Plant Pathway Viewer, Version 4,
LAR; leucoanthocyanidin reductase,
LC-QTOF-MS; liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry,

LDOX; leucoanthocyanidin dioxygenase,
MATE; multidrug and toxic compound extrusion,
MS; mass spectrometry,
MS/MS; tandem mass spectrometry,
NBF; nucleotide binding fold,
NCBI; National Center for Biotechnology Information,
PAL; phenylalanine ammonia-lyase,
PCA; principal component analysis,
PDR; preiotropic drug resistance,
PGP; P-glycoprotein,
RNA; ribonucleic acid,
ROMT; resveratrol O-methyltransferase,
Ref seq; Reference sequence,
STS; stilbene synthase,
TMD; trans membrane domain,
UGAT; cyanidin-3-O-glucoside 2"-O-glucuronosyltransferase
UV-B; ultraviolet-B light,
UV-C; ultraviolet-C light,
UV; ultraviolet,
V0; grape genome 12X version 0,
V1; grape genome 12X version 1,
WBC; white-brown complex protein

目次

第一章 緒言	1
第二章 ブドウ PDR 型 ABC トランスポーターの解析	
緒言	3
材料および方法	5
結果	9
図表	11
考察	20
要約	24
第三章 紫外線を照射したブドウ果皮のマルチオミクス	
緒言	25
材料および方法	27
結果	31
図表	37
考察	52
要約	57
第四章 成熟果皮のメタボロミクス	
緒言	58
材料および方法	60
結果および考察	62
図表	66
要約	72
第五章 総合考察	73
謝辞	78
引用文献	80

第一章 緒言

ブドウ (*Vitis vinifera* L.) は生食用として、またワイン醸造の原料として、世界中で栽培されている重要な作物の一つである。そして果皮には多種多様な二次代謝産物を豊富に含んでいる。例えば果実の赤から黒い色を呈するアントシアニン、渋味に関わるカテキン、抗がん作用などヒトの健康によい機能性成分であるレスベラトロールなどが挙げられる。これら二次代謝産物は果実品質を決定する重要な要素であるため (Kader 2002)、その蓄積機構を理解することは、高品質なブドウの育種や栽培に役立つと考えられる。

ブドウは 2007 年にゲノムが解読された (Jaillon et al 2007, Velasco et al. 2007)。植物としてはシロイヌナズナ (Arabidopsis Genome Initiative 2000)、イネ (International Rice Genome Sequencing Project 2005)、ポプラ (Tuskan et al. 2006) につづき 4 番目の報告である。ブドウのゲノム解読は、園芸作物としては初めてであり、研究の加速が期待された。しかし当初はアセンブルなどの情報の精度が低く、アノテーションの整備もほとんど行われていなかった。2010 年以降に配列の情報量が 8X から 12X に増加し、2011 年にはアセンブル法の改善やアノテーションの充実化も進み、ようやく利用者に使い勝手のよい情報となってきた。2011 年に 12X version 1 (V1, Grimplet et al. 2012) が公開され、全ゲノムを対象としたマイクロアレイも設計・市販されるなど、ブドウ研究者が利用しやすい仕様に改善されつつある。ブドウ以外の園芸作物のゲノム解読も進み公開されつつある今、園芸作物におけるゲノム情報を活用した研究が脚光を浴びつつある。

近年、生体成分全体を網羅的に解析するオミクスと呼ばれる研究の発展が目覚ましい。ゲノム情報の精度の向上ばかりでなく、解析機器や測定技術、情報処理技術の向上もオミクスの後押しとなっている。具体的なオミクスとして、ゲノムを網羅的に解析するゲノミクス、転写産物を網羅的に解析するトランスクリプトミクス、タンパク質を大規模に解析するプロテオミクス、代謝産物を一斉に分析するメタボロミクス、表現型を網羅的に解析するフェ

ノミクスが挙げられる(白武 2007)。また最近では植物ホルモンを対象としたホルモノミクス、イオンを一斉分析するイオノミクスも登場した。さらにこれらのオミクスを複数種実施し、データを統合して形質や表現型を考察するマルチオミクスを行うことで、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。このようなオミクスは、シロイヌナズナなどのモデル植物では一般的であるが、園芸作物ではまだ緒に就いたばかりである。

そこで本研究では、ブドウの果皮に蓄積する二次代謝産物の蓄積機構の解明のため、ゲノム情報やオミクスを利用した解析を実施した。第二章では、二次代謝産物の輸送に関与することが知られている ABC 輸送体 (Yazaki 2006) に着目した。ゲノム情報をもとに、主要なサブファミリーの一つであるフルサイズ ABCG (PDR) サブファミリーの全分子種を検索し、その中でもレスベラトロール蓄積に関与することが予想された *ABCG44* の cDNA クローニングおよび遺伝子発現解析を行った。第三章では、紫外線を照射したときの代謝変化に着目し、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析の両方を組み合わせたマルチオミクスを実施した。第四章では果実成長における成熟への転換点 (ベレーゾン) 前後に蓄積する二次代謝産物に着目し、メタボローム解析でその蓄積傾向を確認した。さらに未知代謝産物ピークと既知化合物の MS/MS 情報を照合することで、ブドウ果実の成熟に関する新奇代謝産物を推定した。

第二章 ブドウ PDR 型 ABC トランスポーターの解析

緒言

第一章で述べたように、ブドウは果皮に多くの二次代謝産物を蓄積する。植物における二次代謝産物の蓄積を担うトランスポーターとしては、現在のところ multidrug and toxic compound extrusion (MATE, Omote et al. 2006) と ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター (Yazaki 2006) が存在する。MATE はプロトンの濃度勾配を利用するトランスポーターで、近年、液胞膜でアントシアニンやプロアントシアニジンの輸送に関わることが報告された (Petruzza et al. 2013)。一方、ABC トランスポーターは ATP 結合領域を持ち、ATP 加水分解エネルギーを利用して一次輸送を行うトランスポーターである (Rea 2007)。その多くは膜を介した輸送体として機能することが知られており、シロイヌナズナやイネでは 120 種以上の遺伝子が確認されている (Rea 2007, Yazaki et al. 2009, Kretzschmar et al. 2011)。

ABC トランスポーターのうち主要なサブファミリーである ABCG サブファミリーは、6 回の膜貫通領域から構成される trans membrane domain (TMD) を C 末側に、Walker A、Walker B、ABC signature を含む nucleotide binding fold (NBF) を N 末側に配置する構造的特徴 (NBF-TMD) を持ち、以前 WBC (white-brown complex protein) と呼ばれていた TMD と NBF を一つずつ持つハーフサイズのトランスポーターと、PDR (preiotropic drug resistance) と呼ばれていた TMD と NBF を二つずつ持つフルサイズのトランスポーターで構成される (Verrier et al. 2008)。このうちフルサイズの ABCG (PDR) は酵母の PDR5 が有名である (Lamping et al. 2010, Prasad and Goffean 2012)。PDR5 は細胞膜の排出型トランスポーターとして存在し、多剤耐性に関与することが報告されている (Decottignies and Goffean 1997, Golin et al. 2007)。植物でもファイトアレキシンの輸送や (Jasinski et al. 2001)、ABA や (Kang et al. 2010) ストリゴラクトン (Kretzschmar et al. 2012) の輸送に関与することが報告されており、細胞膜局在である場合が多く報告されていることから、基質を細胞内外へ輸送すると推定され

ている (Yazaki et al. 2009, Kretzschmar et al. 2011)。

これまでブドウの ABCG サブファミリーについてほとんど報告がない。一方で灰色かび病菌のフルサイズの ABCG と、ブドウ特有のファイトアレキシンであるレスベラトロールに関して興味深い報告がある。灰色かび病菌の ABC トランスポーターである BcatrB が欠損した変異株をレスベラトロール入りの培地で育てると、レスベラトロール感受性が高くなる (Schoonbeek et al. 2001)。またブドウ培養細胞にレスベラトロール蓄積を誘導するエリシターの一つであるシクロデキストリンを処理すると、発現が増加する遺伝子群の中からフルサイズ ABCG が見つかった (Zamboni et al. 2009)。以上の報告より、ブドウのフルサイズ ABCG は細胞質で合成されたレスベラトロールを細胞外へ分泌することで、果皮組織の蓄積に関与するのではないかと推察した。

そこで第二章では、ブドウゲノムより推定されたブドウのフルサイズの ABCG サブファミリーを検索した。このうち ABCG44 (VvPDR14) に着目し、果皮の cDNA を鋳型にしたクローニングと遺伝子発現解析を実施した。さらに果皮に紫外線を照射し、レスベラトロールの蓄積とレスベラトロール合成の鍵酵素であるスチルベンシンターゼ (STS) の遺伝子発現を誘導させ、ABCG44 の発現を確認し、レスベラトロール蓄積との関連を推察した。

材料および方法

材料

材料は(株)あずみアップル(長野県安曇野市)の栽培農場もしくは名古屋大学(愛知県名古屋市)内の圃場で育成されたブドウ‘ピノ・ノワール’(*Vitis vinifera* L. ‘Pinot Noir’)を用いた。cDNAのクローニングには紫外線を照射した未熟果の果皮を使用した。遺伝子発現解析に使用した幼葉、成葉、蔓、茎、種子、果肉、果皮は6月から7月に採取した。また6月から7月に収穫したベレーゾン期前の果房を用いて紫外線照射とABA処理を行った。処理はすべて3反復行った。処理方法については以下のとおりである。

紫外線照射

ベレーゾン期前の果房にUV-Cランプ(ピーク波長253.7 nm, GL-15, TOSHIBA, Japan)で照射距離50 cmをとり1時間照射した。コントロール(Dark)は処理区と同じ部屋で遮光して静置した。RNA抽出用は、照射1時間後すぐに果皮を回収し液体窒素で凍らせ、 -80°C で保存した。またレスベラトロール測定用は、照射1時間後暗所に23時間室温で静置したのち果皮を回収した。

ABA処理

960 mg L^{-1} ABA (0.05%(v/v) Tween20を含む)をベレーゾン前の未熟果果房にスプレーし、暗所にて2日間室温で静置した。コントロール(Water)には水(0.05%(v/v) Tween20を含む)をスプレーし、同様に静置した。処理後果皮を回収し液体窒素で凍らせ、 -80°C で保存した。

ゲノム V1 情報に存在する全フルサイズ ABCG トランスポーター遺伝子の同定

ブドウのフルサイズ ABCG トランスポーターは、NpPDR1 (CAC40990) のアミノ酸配列をクエリに、CRIBI (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>) が公開している 12X version 1 (V1)

の推定アミノ酸配列データベースに対して、NCBIのローカルBLASTを使用して検索した。フルサイズ ABCG トランスポーターは、平均 1,400 アミノ酸長であるため (Rea 2007)、400 アミノ酸以上の長さの配列をピックアップした。得られた配列に少なくとも 1 つの PDR モチーフ (van den Brule and Smart 2002) があることを確認した。遺伝子名は Çakır and Kılıçkaya (2013) を参照して命名した。

VvABCG44 の cDNA クローニング

Zamboni et al. (2009) によって見出された、シクロデキストリンによって発現が誘導されるフルサイズ ABCG (PDR) トランスポーターの部分長 cDNA (tentative consensus sequence (TC) ID, TC76318, the grape gene index database (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>) および紫外線によって誘導するブドウ ABC トランスポーターの EST (*PDR06*, Jasinski and Shiratake unpublished) と一致するゲノム配列を NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で Blast 検索した。得られたゲノム配列 (Accession number AM449250.2, IASMA Research Center (<http://genomics.research.iasma.it/>)) について翻訳領域推定ソフトウェア (Softberry <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) で開始コドンおよび終始コドンを予測し、ORF、3'UTR および 5'UTR を増幅させるプライマーを設計した (Table 1)。

ブドウ果皮 0.2 g より hot borate 法 (Wan and Wilkins 1994) で RNA を抽出し、この RNA を鋳型に Promescript High Fidelity RT-PCR kit (TaKaRa) を用いて使用説明書に従い逆転写反応および PCR 反応を行い、得られた cDNA の塩基配列を決定した。

Walker A、Walker B、ABC signature の 3 つのモチーフ配列の確認は van den Brule and Smart (2002) を参照した。TMD は疎水性領域推測サイト PHD (NPS@) (Rost and Sander 1993) で予測した。なお VvABCG44 の配列は DDBJ に accession 番号 AB910387 で登録した。

リアルタイム PCR による発現解析

各サンプルの total RNA は前述と同様に抽出した。total RNA 500 ng を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser (perfect realtime) (TaKaRa) を用いて DNase 処理および逆転写反応を行った。リアルタイム PCR には SYBER Premix EX Taq II (perfect realtime) (TaKaRa) を使用し、使用説明書に従って行った。検出は software ver. 3.00D が付属された Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa) を用いた。

PCR 反応は 95°C, 10 秒ののち、40 サイクル分を 2 ステップ PCR (変性 ; 95°C, 5 秒、伸長・アニーリング ; 60°C, 30 秒) で行った。転写レベルは検量線から計算し、内部コントロールであるアクチン (Reid et al. 2006) との相対値で算出した。レスベラトロール合成酵素 (STS) は Takayanagi et al. (2004) が解析に用いた配列 (accession number S63225) をもとにプライマーを設計した。VvABCG44、STS、アクチンのプライマーは Table 1 に示した。なお全ての反応は 3 反復を行った。

レスベラトロール含量の測定

レスベラトロール (CAS 番号 501-36-0) 含量の測定は、理化学研究所統合メタボロミクス研究グループに依頼した。

凍結保存した果皮サンプルを粉砕したのち、サンプル 100 mg に対して抽出液 (80% (v/v) メタノール, 0.1% ギ酸) 5 ml を加え、ミキサーミル (MM300, Verder Scientific) を用い、ジルコニアビーズと共に、振とう数 18Hz、4°C で、7 分間ホモジナイズした。この時、抽出液に内部標準としてリドカインと 10-カンファースルホン酸 が最終濃度 2.5 mM となるよう調整して加えた。12,000×g で 10 分遠心し、上清をフィルターろ過 (µelution plate, Waters) 後、LC-QTOF-MS (LC, Waters Acquity UPLC system; MS, Waters Xevo G2 QTof) で分析した。

分析条件は次のとおりである。LC カラム ; Acquity bridged ethyl hybrid (BEH) C18 (1.7 mm, 2.1 mm × 100 mm, Waters)、溶媒 ; 溶媒 A (100% 水、0.1% ギ酸)、溶媒 B (100% アセトニト

リル、0.1%ギ酸)、溶媒勾配プログラム ; 99.5%A/0.5%B で 0 分, 99.5%A/0.5%B で 0.1 分, 20%A/80%B で 10 分, 0.5%A/99.5%B で 10.1 分, 0.5%A/99.5%B で 12.0 分, 99.5%A/0.5%B で 12.1 分, 99.5%A/0.5%B で 15.0 分、流速 ; 0.3 ml/min で 0 分, 0.3 ml/min で 10 分, 0.4 ml/min で 10.1 分, 0.4 ml/min で 14.4 分, 0.3 ml/min で 14.5 分、カラム温度 ; 40°C、MS キャピラリー電圧 ; +3.0 keV, コーン電圧 ; 25.0 V, ソース温度, 120°C, 脱溶媒温度, 450°C, コーンガス流速, 50 l/h; 脱溶媒ガス流速, 800 l/h、衝突エネルギー ; 6 V、質量範囲 ; m/z 100–1,500、スキャン持続時間 ; 0.1 s、走査切り替え時間 ; 0.014 s、データ収集モード ; 質量中心モード、極性 ; ポジティブ/ネガティブ、ロックスプレー (ロイシン-エンケファリン) スキャン持続時間 ; 1.0 s、走査切り替え時間 ; 0.1 s。

定量は 100 µM 標品 (和光純薬工業) による一点定量で濃度を算出した。内部標準には 10-カンファースルホン酸を使用した。各処理につき 3 サンプルを 2 つに分けて合計 6 反復として測定を行った。

結果

ブドウにおける全フルサイズ ABCG サブファミリーの検索

V1 の CDS よりフルサイズ ABCG サブファミリーと推定された 34 種の配列を見出した (Table 2)。このうち NpPDR1 や MtABCG10 などスクラレオール輸送やフラボノイド輸送に関与する分子種が多く含まれるクラスターには 11 種が含まれた (Fig. 1)

VvABCG44 の cDNA クローニング

Zamboni et al. (2009) は、ブドウのフルサイズ ABCG の部分長 cDNA (TC76318) の遺伝子発現がシクロデキストリン処理で誘導されることを報告した。また Jasinski and Shiratake (unpublished) は紫外線で誘導されるブドウの EST (PDR06) を見出しており、PDR06 と部分長 cDNA (TC76318) の配列が一致した。この部分長 cDNA をクエリにブドウゲノム配列を検索してプライマーを設計し、コード領域を増幅させて目的の cDNA (VvABCG44、Fig. 2A) を得た (Fig. 2A)。コード領域は 4,350 bp で、予想されたアミノ酸配列 (1,450 aa) より Walker A、Walker B、ABC signature を含む 2 つの NBF と 2 つの TMD を確認し、NBF-TMD を 2 回繰り返した構造が推測された (Fig. 2B)。

VvABCG44 のアミノ酸配列 (VIT_09s0002g05560) を植物のフルサイズ ABCG の分子系統樹で確認すると、NpPDR1 (CAC40990)、NtPDR1 (BAD07483)、MtABCG10 (AES68070)、SpTUR2 (O24367) などと同じクレードに分類された (Fig. 1)。NtPDR1 (Crouzet et al. 2013) や NpPDR1 (Jasinski et al. 2001) はスクラレオールを含むジテルペンを輸送する。また MtABCG10 (Banasiak et al. 2013) はイソフラボノイドの輸送に関与する。SpTUR2 (van den Brule and Smart 2002) はスクラレオールを輸送する。他にも ABA 輸送に関与する AtABCG40 (AAF71978, Kang et al. 2010) やストリゴラクトン輸送に関与する PaPDR1 (JQ292812, Kretzschmar et al. 2012) も同じクレードであった (Fig. 1)。基質特異性は広く、系統樹から VvABCG44 の輸送基質を推定することは難しい。

VvABCG44 の遺伝子発現解析

VvABCG44 の器官・組織別遺伝子発現を確認するため、リアルタイム PCR による発現解析を行った (Fig. 3A)。最も発現が高かったのは成葉で、幼葉に比べ 9.6 倍高い発現を示した。蔓や茎は成葉より発現は低かったものの、幼葉より発現は高かった。また果実の発現は比較的 low、果皮、果肉、種子の組織で比較すると、果皮で高く種子で低い発現を示した。さらに同じ試料を用いてレスベラトロール合成の鍵酵素であるスチルベンシンターゼ (STS) の発現を確認すると、VvABCG44 と同様に成葉で高く、果皮での発現も確認できた (Fig. 3B)。STS も様々な器官・組織での発現が確認できたことから、VvABCG44 がレスベラトロールと関与することが推察された。

次に紫外線照射および ABA 処理をした未熟果実の果皮を用いて、VvABCG44 と STS の発現を比較した (Fig. 4, 5)。紫外線を照射すると VvABCG44 の発現がコントロールの暗処理区に比べて 2.7 倍増加し、STS も強く誘導された (Fig. 4A, B)。さらに照射後 23 時間暗所で静置させたところ、レスベラトロール含量が 159 倍に増加した (Fig. 4C)。STS と VvABCG44 の遺伝子発現とレスベラトロール蓄積が共に誘導されたことから、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。一方 ABA 処理を行った果皮では VvABCG44 の発現に変動はなかった (Fig. 5)。

Table 1 Primers used in this study.

Primer name	Purpose	Primer sequence (5'-3')
Take2_Forward	cloning	CAC CAT GGC GAC GGC TGA AAT TTA TAR AG
Take2_Reverse	cloning	TCG CCT TTG GAA GTT CAA TGC
VvABCG44_exp_Fw	gene expression	TAG GAG TGG TTG CAG CTG TG
VvABCG44_exp_Rv	gene expression	TTT TGC TCC GTG TGA CTT CTT
VvSTS_exp_Fw	gene expression	GGG TCA CTA AGA GCG AGC AC
VvSTS_exp_Rv	gene expression	GCT CCT CAA GCA TTT CTT CG
VvACT_Fw	gene expression	TCC TGT GGA CAA TGG ATG GA
VvACT_Rv	gene expression	CTTGCA TCC CTC AGC ACC TT

Table. 2 Full-size ABCG transporters in grape (*Vitis vinifera*). Columns contain the *Vitis Vinifera* 12X V1 ID, chromosome location, protein length, PDR signatures, annotated description by Tair10, protein acronym (name) and *Vitis Vinifera* 12X V0 ID for each gene are given.

12X V1 ID	Chromosome location				Protein length	PDR signatures**			Description of Tair10		Sanchez-Fernandez***	HGNC***	12X V0 ID
	Chr	Strand	Start	End		LLLGPP	GLDSSST	GLDARA - AAIVMR	AGI code	Short description	gene name	gene name	
VIT_11s0016g04540	11	+	3825506	3837079	1422	+	+	+	AT2G26910.1	pleiotropic drug resistance 4	VvPDR1	VvABCG31	GSVIVT01015456001
VIT_11s0016g04590	11	-	3891367	3898727	1478	+	+	-	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR2	VvABCG32	GSVIVT01015461001
VIT_09s0002g03550	9	+	3229012	3242582	649	+	+	-	AT1G15210.1	pleiotropic drug resistance 7	VvPDR3	VvABCG33	GSVIVT01016991001
VIT_09s0002g03560	9	+	3242583	3244574	427	-	-	+	AT3G16340.1	pleiotropic drug resistance 1	VvPDR4	VvABCG34	GSVIVT01016992001
VIT_09s0002g03580	9	+	3246544	3252734	691	+	+	-	AT3G16340.1	pleiotropic drug resistance 1	VvPDR5	VvABCG35	GSVIVT01016993001
VIT_09s0002g03630	9	-	3318732	3327354	1411	+	+	+	AT1G59870.1	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	VvPDR6	VvABCG36	GSVIVT01016998001
VIT_09s0002g03640	9	-	3328212	3336626	1494	+	+	+	AT3G16340.1	pleiotropic drug resistance 1	VvPDR7	VvABCG37	GSVIVT01016999001
VIT_09s0002g05360	9	-	5099146	5114849	1490	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR8	VvABCG38	GSVIVT01017184001
VIT_09s0002g05370	9	-	5115505	5122760	1422	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR9	VvABCG39	GSVIVT01017185001
VIT_09s0002g05400	9	-	5146167	5160090	1565	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR10	VvABCG40	GSVIVT01017187001
VIT_09s0002g05410	9	-	5169125	5176189	1438	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR11	VvABCG41	GSVIVT01017188001
VIT_09s0002g05490	9	-	5216536	5223507	1280	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR12	VvABCG42	GSVIVT01017196001
VIT_09s0002g05530	9	-	5259175	5266314	1460	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR13	VvABCG43	GSVIVT01017198001
VIT_09s0002g05560*	9	-	5281296	5288255	1455	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR14	VvABCG44	GSVIVT01017201001
VIT_09s0002g05570	9	-	5294437	5301677	1455	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR15	VvABCG45	GSVIVT01017202001
VIT_09s0002g05590	9	-	5316144	5323420	1455	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR16	VvABCG46	GSVIVT01017204001
VIT_09s0002g05600	9	-	5336090	5343699	1451	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR16	VvABCG46	GSVIVT01017204001
VIT_05s0020g00680	5	+	2548762	2557921	1438	+	+	+	AT3G53480.1	pleiotropic drug resistance 9	VvPDR17	VvABCG47	GSVIVT01017676001
VIT_06s0004g06560	6	+	7284901	7297724	1274	+	+	+	AT2G29940.1	pleiotropic drug resistance 3	VvPDR18	VvABCG48	GSVIVT01024743001
VIT_14s0060g00470	14	+	439701	448696	1449	+	+	-	AT3G53480.1	pleiotropic drug resistance 9	VvPDR19	VvABCG49	GSVIVT01031314001
VIT_06s0061g01490	6	-	19360703	19367987	1455	+	+	+	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR20	VvABCG50	GSVIVT01031377001
VIT_06s0061g01480	6	-	19347365	19360240	1461	+	+	+	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR21	VvABCG51	GSVIVT01031378001
VIT_06s0061g01470	6	-	19330683	19339761	1123	+	+	+	AT1G66950.1	pleiotropic drug resistance 11	VvPDR22	VvABCG52	GSVIVT01031380001
VIT_08s0007g03710	8	+	17660071	17669411	1452	+	+	+	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR23	VvABCG53	GSVIVT01033804001
VIT_13s0074g00660	13	-	8818113	8827874	1473	+	+	-	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR24	VvABCG54	GSVIVT01034741001
VIT_13s0074g00680	13	-	8859786	8867047	1477	+	+	-	AT1G66950.1	pleiotropic drug resistance 11	VvPDR25	VvABCG55	GSVIVT01034745001
VIT_13s0074g00690	13	-	8876000	8883078	1379	+	+	-	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR26	VvABCG56	GSVIVT01034746001
VIT_13s0074g00700	13	-	8897688	8904965	1481	+	+	-	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR27	VvABCG57	GSVIVT01034748001
VIT_04s0008g04230	4	-	3596683	3605452	1422	+	+	-	AT2G26910.1	pleiotropic drug resistance 4	VvPDR28	VvABCG58	GSVIVT01035715001
VIT_04s0008g04790	4	-	4227017	4234518	1437	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR29	VvABCG59	GSVIVT01035780001
VIT_04s0008g04820	4	+	4258541	4265241	1420	+	+	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR30	VvABCG60	GSVIVT01035784001
VIT_04s0008g04830	4	+	4282425	4286094	764	+	+	-	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR31	VvABCG61	GSVIVT01035785001
VIT_04s0008g04840	4	+	4286954	4295631	1120	-	-	+	AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	VvPDR32	VvABCG62	GSVIVT01035786001
VIT_06s0080g00040	6	+	19714042	19723700	1507	+	+	-	AT2G36380.1	pleiotropic drug resistance 6	VvPDR33	VvABCG63	GSVIVT01036184001

*VIT_09s0002g05560 is corresponded to VvABCG44.

**PDR signatures were reported by van den Brule and Smart (2002).

***Sanchez-Fernandez and HGNC subfamily names were reported by Çakır and Kılıçkaya (2013).

考察

ブドウのフルサイズ ABCG を単離し発現解析を行った。これまでブドウの ABC トランスポーターの報告はほとんどなく、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析で発現が誘導されることが示されただけであった。近年、ブドウの全 ABC トランスポーターをブドウゲノム 12X version 0 (V0) で検索した報告 (Çakır and Kılıçkaya 2013) があったほか、ABC トランスポーターの中で ABCC サブファミリーに属する ABCC1 が液胞膜で果皮色に関与するアントシアニンの anthocyanidin 3-O-glucosides を輸送することが報告された (Francisco et al. 2013)。しかしフルサイズ ABCG サブファミリーの個別解析の報告は本研究が初めてである。

これまでに植物のフルサイズ ABCG サブファミリーの遺伝子を単離した報告は多くない。例えば、シロイヌナズナには 15 種のフルサイズ ABCG サブファミリーが存在するが (van den Brule and Smart 2002) そのうち個別解析が報告されているのは 5 種 (AtABCG40, AtABCG37, AtABCG36, AtABCG32 および AtABCG30) のみである (Campbell et al. 2003, Lee et al. 2005, Ito and Gray 2006, Kobae et al. 2006, Stein et al. 2006, Kim et al. 2007, Badri et al. 2009, Strader and Bartel 2009, Kang et al. 2010, Kim et al. 2010, Ruzicka et al. 2010, Bessire et al. 2011, Underwood et al. 2013, Xin et al. 2013)。同様に、イネでは OsABCG36 と OsABCG43 の 2 種 (Moons 2003, Oda et al. 2011)、タバコ属では NpPDR1、NpPDR2、NtPDR1、NtPDR3 そして ABCG5/PDR5 の 5 種が報告されている (Jasinski et al. 2001, Sasabe et al. 2002, Schenke et al. 2003, Ducos et al. 2005, Stukkens et al. 2005, Trombik et al. 2008, Bultreys et al. 2009, Navarre et al. 2011, Bienert et al. 2012, Seo et al. 2012, Crouzet et al. 2013)。

なぜ報告が少ないのか。その理由として、ABC トランスポーターの単離が非常に難しいことが挙げられる。他のトランスポーターに比べてフルサイズ ABCG トランスポーターは cDNA の全長が長い (約 4,000 bp) うえに、クローニング時に宿主である大腸菌

に配列を導入すると増殖しにくい。このため、たとえ EST データベースが充実しているトマトでフルサイズの ABC トランスポーターを探しても、完全長 cDNA は少ない (水野 2013)。したがって解析を行うためには個別分子のクローニングが必要となってくる。

今回の cDNA クローニングではゲノム配列を参考に直接全長を増幅させるためのプライマーを設計し、ミスマッチが少なく長く正確に伸長させることができる PCR 酵素を用いた。大腸菌の培養温度を低め (28°C) に設定し、通常より大量に培養するなど工夫した結果、ブドウでも初めて単離することができた。

ブドウのゲノム解読は、最初にイタリアの IASMA 研究センター (<http://genomics.research.iasma.it/>) がブドウ ‘ピノ・ノワール’ の系統株 ENTAV115 のゲノム情報を公開したことから始まった (Velasco et al. 2007)。この情報は今回 VvABC44 の cDNA クローニングに用いた。続いてイタリアとフランスのコンソーシアムによって同じくブドウ ‘ピノ・ノワール’ の系統株 PN40024 のゲノムが解読された (Jaillon et al. 2007, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)。後者のデータは 8X から 12X に更新され、現在も広く研究者に利用されている。その後 2012 年にイタリアの CRIBI (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>) によって、アセンブルが見直された V1 が公開された。今回は V1 のコーディング配列 (CDS) を利用して、全フルサイズ ABCG トランスポーターを検索した (Table 2)。

シロイヌナズナには 15 種 (van den Brule and Smart 2002)、イネには 23 種 (Moons 2008) の ABCG が存在する。今回の検索で、ブドウゲノムに 34 種のフルサイズ ABCG が見出された (Table 2, Fig. 1)。数の多さから、ブドウのフルサイズ ABCG トランスポーターは他の植物種に比べて幅広く機能していると推察される。ABC トランスポーターの輸送基質はサブファミリーの中でも多様であることから、配列の類似性で推定することは難しい。しかしフルサイズ ABCG トランスポーターは二次代謝産物、植物ホルモン、クチンや重金属の蓄積に関与している (Fig. 1)。このためブドウでも重要な基質を輸送していることが推察される。

近年、植物のフルサイズ ABCG トランスポーターは ABA (Kang et al. 2010)、ストリゴラクトン (Kretschmar et al. 2012)、オーキシン前駆体 (Ruzicka et al. 2010) など植物ホルモンの輸送に関与していることが明らかとなってきた (Fig. 1)。ブドウ果実では、果実が成熟に移行するステージを指す「ベレーゾン」と呼ばれる時期に ABA がトリガーとなって成熟を誘導することが知られている (Coombe and Hale 1973, Davies et al. 1997)。ベレーゾンの後、果実にはアントシアニンや糖が豊富に蓄積する (Coombe 1992, Davies et al. 1997, Deluc et al. 2007)。VvABCG44 が成熟前の果実で ABA 蓄積に関与するか否かを検証するため、ブドウ果皮で ABA 処理による VvABCG44 の誘導を確認した。しかし VvABCG44 は誘導されなかった (Fig. 5)。

一方、植物のフルサイズ ABCG トランスポーターは、生物的・非生物的なストレスにも関与しており、特に病原菌によって引き起こされるファイトアレキシンの蓄積に関与していることが報告されている (Fig. 1)。VvABCG44 はブドウ培養細胞において、レスベラトロールが蓄積するエリシター処理で遺伝子発現が増加したことが報告されている (Zamboni et al. 2009)。また紫外線によって誘導された EST としても見つかっている (Jasinski and Shiratake unpublished)。そのため VvABCG44 もファイトアレキシンの輸送に関与する可能性が推察された。

紫外線照射によってブドウ果皮にレスベラトロールが蓄積することは知られている (Douillet-Breuil et al. 1999, Adrian et al. 2000, Versari et al. 2001, Takayanagi et al. 2004)。このため VvABCG44 の遺伝子発現を、レスベラトロール合成の鍵酵素であるスチルベンシンターゼ (STS) の発現やレスベラトロール蓄積量とともに確認した。STS の発現やレスベラトロール蓄積に比べて変化は少ないものの、紫外線照射によって VvABCG44 も誘導された (Fig. 4)。そして VvABCG44 と STS の器官組織別発現解析では、類似した発現傾向を示した (Fig. 3)。これらの結果から VvABCG44 がレスベラトロールの蓄積に関与することが推測された。

VvABCG44 のホモログで解析が進んでいるもののうち、輸送基質を確認すると、ジテ

ルペノイド、イソフラボノイド、ABA、ストリゴラクトンを輸送することが報告されている (NtPDR1, Crouzet et al. 2013、 NpPDR1, Jasinski et al. 2001、 SpTUR2, van den Brule and Smart 2002、 MtABCG10, Banasiak et al. 2013、 AtABCG40, Kang et al. 2010、 PaPDR1, Kretschmar et al. 2012)。これらは分子構造が全く異なる。一方、レスベラトロールはスチルベノイドであり、フラボノイドと同様にフェニルプロパノイドに分類される。VvABCG44 のホモログである MtABCG10 はイソフラボノイドの輸送に関与している (Banasiak et al. 2013)。

これまで輸送を直接証明していないものの、フルサイズの ABCG トランスポーターがスチルベノイドを輸送する可能性を示唆した報告はある。灰色かび病菌のフルサイズ ABCG トランスポーターである BcatrB が欠損した変異株は、レスベラトロール感受性が高くなる (Schoonbeek et al. 2001)。この結果は BcatrB がレスベラトロールを排出するトランスポーターとして機能していることを示唆している。よって VvABCG44 の輸送基質の候補としてレスベラトロールが有望であると推察できる。

VvABCG44 のレスベラトロール輸送活性を測定するために、8 種の ABC トランスポーターが欠損した酵母 (Kang et al. 2010) に VvABCG44 を異種発現させようと試みた。しかし大腸菌と同様に酵母に発現させることは難しく、未だ成功していない。

今回はブドウゲノムより、VvABCG44 を含む 34 種のフルサイズ ABCG トランスポーターを見出した。これらは二次代謝産物の蓄積や植物ホルモン、クチン、重金属の蓄積への関与が期待されるため、植物の成長やストレス耐性に関わる重要なトランスポーターであると推察された。今後のさらなる解析が待たれる。

要約

二次代謝産物の輸送に関与する ABC トランスポーターのうち、レスベラトロール蓄積に関与すると推察されるフルサイズ ABCG トランスポーターに着目した。ブドウゲノム V1 でブドウのフルサイズ ABCG サブファミリーを検索したところ、32 種のフルサイズ ABCG を見出した。このうち紫外線やエリシターによって誘導されることが報告されていた VvABCG44 (VvPDR14) について、ブドウ果皮の cDNA を鋳型に cDNA のクローニングを行った。VvABCG44 のコード領域は 4,350 bp で、予想されたアミノ酸配列 (1,450 aa) より Walker A、Walker B、ABC signature を含む 2 つの NBF と 2 つの TMD を確認し、NBF-TMD を二回繰り返したフルサイズの ABCG サブファミリーに属するトランスポーターであることを確認した。植物のフルサイズ ABCG の分子系統樹を作成すると、NpPDR1、NiPDR1、MtABCG10、SpTUR2 などと同じクレードに分類された。器官・組織別遺伝子発現解析で、VvABCG44 は成葉で最も発現が高く、果皮での発現も確認された。果皮に ABA 処理を行っても VvABCG44 の誘導は確認されなかった。一方、果皮に紫外線を照射すると、レスベラトロールの蓄積やレスベラトロール合成の鍵酵素である STS の発現とともに VvABCG44 の発現も誘導された。このことから、VvABCG44 はレスベラトロールの蓄積に関与することが示唆された。

第三章 紫外線を照射したブドウ果皮のマルチオミクス

緒言

第一章で述べたように、ブドウは果皮にフェノール性化合物を豊富に蓄積する。これらフェノール性化合物は果実成熟にともない蓄積するものもあれば、光、ABA、病原菌接種などの刺激によって急激に誘導されるものもある。特にレスベラトロールやその類縁体の蓄積は葉や果実への病原菌接種や紫外線照射によって誘導されることが報告されている (Aziz et al. 2003, Pezet et al. 2003, Adrian et al. 2000, Versari et al. 2001, Takayanagi et al. 2004, 西川ら 2011)。

ブドウは以前よりESTの解析も盛んで (Quackenbush 2001)、2007年にはゲノムも解読され (Jaillon et al. 2007, Velasco et al. 2007)、二次代謝産物に関するオミクスが実施されるようになった。しかし遺伝子発現解析では、EST情報を基に設計されたマイクロアレイを使用するなど全遺伝子が網羅されていない限定的なトランスクリプトーム解析が多い。また代謝産物についてもターゲットを絞った分析が中心であり、全ゲノム・全代謝産物を対象とした解析や複数のオーム解析を統合する研究は少なく (Zamboni et al. 2010) まだ始まったばかりである。

今回の研究で、我々はUV-Cを照射した果皮を用いてマルチオミクス解析を実施した (Fig. 6)。全ゲノム対象のマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析では、複数のデータベースを検索し機能を推定したほか、Gene Ontology (GO) によるエンリッチメント解析を行い、紫外線で特異的に発現が誘導されるGOタームを抜き出した。また同サンプルで高性能なLC-QTOF-MSを使用したメタボローム解析を行い、2,000種以上の代謝産物ピークの中から主成分分析 (PCA) で全代謝産物から紫外線照射区に特有の化合物を抽出した。両データはKaPPA-View 4 KEGGのシステム (Sakurai et al. 2011, <http://kpv.kazusa.or.jp/kpv4-kegg-1402/>) を更新したのち、代謝マップに統合した。代謝マップから、ブドウ果皮にUV-Cを照射するとレスベラトロール代謝系が際立って誘導され

ることを明確に示した。

材料および方法

材料および処理方法

2011年8月に(株)あずみアップル(長野県安曇野市)の栽培農場で育成された、ブドウ‘ピノ・ノワール’(*Vitis vinifera* L. ‘Pinot Noir’)成木よりベレーゾン直前の果房を採取した。紫外線照射は果房ごと UV-C lamp (253.7 nm, GL-15, TOSHIBA)で照射距離 50cm をとり(強度 $0.25 \mu\text{W cm}^{-2}$)1時間照射した。コントロールは処理区と同じ部屋で遮光して静置した。RNA 抽出用サンプルは、照射1時間後すぐに果皮を回収した。またメタボローム解析用サンプルは、照射1時間後暗所に23時間静置したのち果皮を回収した。回収した果皮サンプルはすぐに液体窒素で凍らせ、 -80°C で保存した。4本の異なる樹から1果房ずつ収穫し、紫外線照射は3反復行った。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析

RNA は第二章と同様 hot borate 法 (Wan and Wilkins 1994) で抽出したのち RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で精製した。RNA の量および品質は吸光度計と Bioanalyzer 2100 instrument (Agilent) で確認し、Nimblegen microarray 090818 Vitis exp HX12 (Roche, NibleGen Inc., W1) を用いた解析を北海道システム・サイエンス(株)に委託した。cDNA 合成、ラベリング、ハイブリダイゼーションおよび精製の方法は Nimblegen Arrays User’s guid (V3.2) に従った。

生データには各遺伝子に対する4つのプローブのシグナル強度を平均した値を使用した。標準化は Subio platform (Subio) を使用した。4プローブを平均した値について、全サンプルでシグナル強度 3,000 以下であったシグナルをノイズと決めて除去したのち、Global normalization 法で標準化を行った。UV-C とコントロール間の発現比 (FC) と p-value を算出し、FC が 5.0 以上、0.2 以下であった遺伝子を有意に発現が変動した遺伝子として volcano plot より抽出した。

すべてのデータはエントリーコード GSE59436 で GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

geo) に公開している。

アノテーション検索と GO 解析

CRIBI (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>) が公開しているブドウゲノム 12X version 1 (V1) の CDS について、最も相同性の高いホモログを NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の the basic local alignment search tool (BLAST) で検索した。クエリに V1 の CDS (V1_mRNA.fa) を、データベースにシロイヌナズナの CDS (Tair10, <http://arabidopsis.org>) または全生物のアミノ酸配列 (Uniprot KB, <http://www.uniprot.org>) を指定した。また Vitisnet (<http://www.sdstate.edu/ps/research/vitis/pathways.cfm>) が公開している VitisNet ID やネットワーク名も引用した。Gene Ontology (GO) による機能分類およびエンリッチメント解析は Blast2GO v.2.5.0 (www.blast2go.org/) をデフォルトで使用した。Blast2GO によるアノテーション付与はデフォルト (blastx against NCBI non-redundant protein database, E-value filter 1.0E-3, 20 BLAST hits per sequence to sequence description tool and annotation cutoff of 55) で行った。エンリッチメント解析はマイクロアレイ上全遺伝子に対し発現比 5 倍以上発現が増加した遺伝子群を選択し統計処理を行った。GOslim による機能分類は goslim_plant.obo のアノテーションを付与した。

メタボローム解析

サンプル調製および分析は、第二章と同様に理化学研究所統合メタボロミクス研究グループに依頼した。代謝産物の抽出と LC-QTOF-MS の測定条件は第二章のレスベラトロール測定と同様に実施した。

データマトリクスは MassLynx ver. 4.1 software (Waters) を使用して作成した。作成後、低い強度値 (500 以下) であったピークを削除し、ノーマライズのため強度値をポジティブモードではリドカイン ($[M+H]^+$, m/z 235.1809)、ネガティブモードには 10-カンファースルホン酸 ($[M - H]^-$, m/z 231.0689) の強度値で割ることで相対値を示した。ノ

ーマライズ後のデータは SIMCA-P 11.5 program (Umetrics, Sweden) で PCA を実施した。また一部の化合物 (Table 3) は標品による定性と 100 μ M 標品による一点定量を行った。なお実験の反復は、サンプリング 3 反復分の試料を 2 つに分け、一処理区に計 6 反復で解析を行った。

化合物

標品は次のメーカーの製品を使用し、リストを Table 3 に示した。和光純薬工業 (株)、東京化成工業 (株)、ナカライテスク (株)、Sigma-Aldrich、ChromaDex、Cayman Chemical Company、Polyphenols Laboratories AS、EXTRASYNTHESE S.A.。

果皮の蛍光観察

紫外線照射 23 時間後、果皮の蛍光を観察した。果実を 5% (w/v) ager で包埋し、ビブラトーム (VT1000 S, Leica) で厚さ 100 μ m の切片を作製した。切片作製後すぐに蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) で 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) フィルター (OP-66834 BZ filter, KEYENCE) を使用し果皮蛍光を観察した。

遺伝子発現と代謝産物のプロファイリング

フェニルアラニンから合成されるレスベラトロール、フラボノール、プロアントシアニジン、アントシアニンを含むフェノール性化合物の代謝マップは KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>, Kanehisa 2000) のブドウの代謝マップをもとに作成した。この際 V1 ゲノムに対応した代謝マップの更新を、京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターに依頼した。トランスクリプトームデータとメタボロームデータを統合するために、Kappa-View 4 KEGG (<http://kpv.kazusa.or.jp/kpv4-kegg-1402/>, Sakurai et al. 2011) を使用した。こちらについても、更新後の KEGG の代謝マップに対応できるように、システムの更新をかずさ DNA 研究所に依頼した。実験データとして、トランスクリ

プトームデータは 10 を底とする対数に変換し、メタボロームデータはネガティブイオンモードで測定解析したノーマライズ後の強度値をそのまま使用した。

結果

ブドウ遺伝子のアノテーション検索

第二章でも述べたように、ブドウのゲノムは2つの研究チームが別々に解読し (Velasco et al. 2007, Jaillon et al. 2007)、うち一方は CRIBI ウェブサイト (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>) でV1を発表した (Grimplet et al. 2012)。今回使用したマイクロアレイはV1の配列をもとに設計されている。そこでまずは遺伝子の機能を推定するため、ブドウV1ゲノムのCDSに対してアノテーション付与を行った。

CRIBIウェブサイトよりマイクロアレイの設計に使用された推定mRNAの配列をダウンロードし、プローブIDに対応する遺伝子IDを確認した。そしてブドウ遺伝子配列をクエリに設定し、シロイヌナズナのCDSやUniprotKBよりダウンロードした全生物のアミノ酸配列データに対しBlast検索を行い、ブドウ遺伝子IDと各データベースのIDやディスクリプションを対応させた (Dataset 1)。マイクロアレイ上に搭載されている29,549遺伝子のうち、28,801遺伝子についてシロイヌナズナのAGIコードが対応し、28,322遺伝子についてUniprotKBのaccession numberが対応した。これにより植物の中で最も解析が進んでいるシロイヌナズナホモログが分かり、シロイヌナズナにない遺伝子についても全生物を対象としたUniprotKBでホモログを推定できるようになった。また、UniprotKBのBlast結果からブドウの配列に該当したものを抜き出すと、1847個が対応した。加えて、ブドウのオーム解析を対象としたアノテーションツールvitisnet (Grimplet et al. 2009) のネットワーク名も検索した。これはゲノムやESTの配列に独自にアノテーションを付加し219のネットワークに分類したもので、オミクス研究のツールとして使用できるよう公開している (<http://www.sdstate.edu/ps/research/vitis/pathways.cfm>)。今回、13,651遺伝子についてvitisnetのネットワーク名が付けられた。さらにBlast2GO (Conesa and Götz 2008) を用いて、NCBIのタンパク質データベースに対してBlast検索した結果をもとにGOアノテーション付与を行った。20,302遺伝子についてBlast2GOで抽出したディスクリプションと対応するGO slim タームをリストに加えた (Dataset 1)。複数のBlast結果を並べること

で、機能推定を充実させることができた。

トランスクリプトーム解析

紫外線照射区と暗処理区のブドウ果皮を比較したトランスクリプトーム解析を、全ゲノムを網羅したマイクロアレイを使用して行った。マイクロアレイ 29,549 遺伝子のうち、238 遺伝子が発現比 5 倍以上に上昇し、24 遺伝子が 1/5 倍以下に減少した (Fig. 7)。減少した遺伝子には cytochrome P450、Wax2、pleiotropic drug resistance 4 などが見つかった (Dataset 1)。上昇した遺伝子群は Blast2GO で GOslim による機能分類を確認した。このうちレベル 3 の biological process のタームを抜き出しマイクロアレイ上の全遺伝子と比較したところ、response to stress (GO:0006950) と secondary metabolic process (GO:0019748) が有意な差は見られなかったものの割合が増加したタームとして見つけることができた (Fig. 8)。各 GO タームを詳細に見ると、response to stress を持つ遺伝子として bacterial-induced peroxidase (Chassot et al. 2007)、calmodulin binding protein (Wang et al. 2011, Wan et al 2012)、stilbene synthase (Delaunoy et al. 2009) など病害抵抗性に関与する遺伝子が多数見つかった。また secondary metabolic process を持つ遺伝子として laccase-14-like (Turlapati et al. 2011)、phenylalanine ammonia lyase (Huang et al. 2010) など二次代謝産物の生合成に関わる遺伝子が見つかった。

さらに発現比5倍以上に増加した238遺伝子について、Blast2GOでGOのエンリッチメント解析を行ったところ、biological process で2種、molecular functionで11種のGOタームを得ることができた (Table 4)。biological processではcell wall modification (GO:0042545) と lipid glycosylation (GO:0030259) が見出された。一方molecular functionのGOタームのエンリッチグラフを作成し (Fig. 9)、最下層のGOタームと遺伝子のアノテーションをみると、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) が見出された。このうちpectinesterase

activity (GO:0030599) と aspartyl esterase activity (GO:0045330) には pectinesterase 2-like (Louvet et al. 2006) が含まれた (Table 5)。transferase activity, transferring hexosyl groups (GO:0016758) を含むカテゴリーには細胞壁や細胞版の形成に関わる UDP-glycosyltransferase (Eudes et al. 2008) が含まれており、trihydroxystilbene synthase activity (GO:0050350) は stilbene synthase (STS) が含まれていた (Table 5)。STS は coumaroyl-CoA と malonyl-CoA からレスベラトロールを合成する鍵酵素である (Delaunoy et al. 2009)。上述の GOslim による機能分類で、紫外線照射区で見つかった response to stress にもこのレスベラトロール合成遺伝子が含まれている。我々のトランスクリプトーム解析では、強く顕著にレスベラトロール合成酵素の遺伝子発現が誘導されていた。

メタボローム解析

次に同処理サンプルを用いて、主に二次代謝産物をターゲットとした LC-QTOF-MS によるメタボローム解析を行った。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、ネガティブモードで 2,012 ピークが検出できた。このうちネガティブモードで測定した強度値と保持時間と質量電荷比 (m/z) のデータマトリクスを用い、ノイズ除去およびノーマライズを行ったのち PCA を行った (Fig. 10)。PCA の score scatter plot では暗処理区は左側に、紫外線照射区は右側にサンプルがグループ化されることを確認した (Fig. 10A)。score scatter plot に影響を及ぼす代謝物ピークを loading scatter plot で確認したところ、興味深いことに、紫外線照射区側に突出した代謝産物ピークが 1 種発見できた (Fig. 10B)。標品による同定の結果、マイクロアレイ解析で見いだされた STS が合成する、レスベラトロールであることが判明した。強度値も高く、紫外線によってレスベラトロールの蓄積が強く誘導されたことが示された。なおポジティブモードで測定し PCA を行った場合も同様の結果となった (データ非掲載)。

メタボローム解析ではさらに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 24 種を用いて代謝産物の同定と一点定量を試みた。24 種の

うちポジティブモードで12種、ネガティブモードで17種類の代謝物ピークが同定された。このうち同定数の多かったネガティブモードについてノイズレベル以下であった7種を除き、ノイズレベル以上の強度値が確認された10種の代謝産物の濃度を算出した (Table 6)。

カテキンは暗処理区と紫外線照射区の両方で強度値が高く、新鮮重あたりの濃度も暗処理区で $3,771 \mu\text{g g}^{-1}$ FW、紫外線照射区で $4,043 \mu\text{g g}^{-1}$ FW、と10種のうち最も多く含まれていた (Table 6)。しかし処理前後での蓄積量には差がなかった。過去にもカテキン類・プロアントシアニジンなど渋味に関わるフラバノールは、ベレーゾン前の未熟果で多く蓄積することが報告されており (Bogs et al. 2005, Fujita et al. 2007)、それと合致する結果であった。

一方レスベラトロールは、暗処理区では強度値が低いものの、紫外線を照射するとカテキンと同程度まで強度値が高まり、シグナル強度比も355倍と非常に高かった。一点定量で濃度を算出すると $3,492 \mu\text{g g}^{-1}$ FWと高濃度で蓄積していたことが分かった (Table 6)。さらに、紫外線を照射した果実で切片を作製し、果皮の蛍光を観察したところ、レスベラトロールだと想定される蛍光 (Del Nero and de Melo 2002) が、暗処理区に比べて紫外線照射区の果皮で強いことを確認した (Fig. 11)。観察結果 (Fig. 11) とメタボローム解析の結果 (Fig. 10, Table 6) が一致したことから、紫外線照射によってレスベラトロールが特異的に大量に蓄積したことが判明した。なおトランス型に比べて微量に蓄積するシス型のレスベラトロール (De Nisco et al. 2013) も別に測定したが、既存の報告と同様、トランス型より少なく $6.3 \mu\text{g g}^{-1}$ FW であった (Table 6)。加えてレスベラトロール類縁体である *viniferin* と *piceid* については、強度値は低いものの暗処理区に対して紫外線照射区でシグナル強度が検出可能なレベルまで上昇しており (Table 6) 他に定性した化合物より蓄積が誘導されていた。これらもトランス型のレスベラトロールが大量に合成された結果、一部が修飾されて蓄積したと推測される。

以上のトランスクリプトーム解析およびメタボローム解析の結果から、ブドウの果皮に紫外線を照射すると、レスベラトロール合成酵素遺伝子 (STS) が強く誘導され、それにともない紫外線照射区にレスベラトロールが特異的かつ大量に蓄積することを示した。

代謝マップの更新とデータの統合

代謝マップはKEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg>, Kanehisa 2000) で公開されているブドウの代謝マップを参照しKaPPA-View 4 KEGG (<http://kpv.kazusa.or.jp/kpv4-kegg-1402/>, Sakurai et al. 2011) を利用して作成した。ブドウのゲノムは2007年に解読完了後、GENOSCOPEにより version 0 (V0, Jaillon et al. 2007) が公開されていたが、その後CRIBIがアセンブル方法を変更して新たにV1 (Grimplet et al. 2012) を公開するようになった。しかし三大データベースの一つであるNCBIが提供するReference sequence (Ref seq) の情報はV0のまま依然更新されていない。このためRef seqをもとに設計されているKEGG PATHWAYのブドウ代謝マップもV0のままであり、KaPPA-View 4 KEGGもV1に対応していなかった。

一方、NimbleGen のマイクロアレイはV1をもとに設計されている (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>)。このためNimbleGenのマイクロアレイを用いた解析結果をそのままKaPPA-View 4 KEGGで解析することができなかった。そこで本研究において、KaPPA-View 4 KEGGのシステムをV1に対応できるように、更新することとした。まず、V1の翻訳されたCDS (V1_prot.fa, <http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/>) 29927配列に自動アノテーションサーバーKAAS (Moriya et al. 2007) でアノテーションを付与したのち、KEGG PATHWAYのDGENESに登録した (Tnumber; T10027)。そして、DGENESに登録したV1 CDSをもとに作成された新しい代謝マップを、KaPPA-View 4 KEGGに登録した。この代謝マップにはV1 CDSの5440遺伝子が反映されている。更新後のシステムは、KaPPA-View 4 KEGGのウェブページ (<http://kpv.kazusa.or.jp/kpv4-kegg-1402/>) で公開されている。

トランスクリプトームデータやメタボロームデータを、KaPPA-View 4 KEGG を使用して代謝マップに統合した。そしてその結果をもとにオリジナル代謝マップを作成した (Fig.12)。Figure 12 は KEGG PATHWAY の 4 マップ (Fig. 13) を参考に描かれており、73 遺伝子と 17 化合物が含まれている。

フェノール性化合物の合成はフェニルアラニンから coumaryl-CoA まで共通の代謝経路を通り、coumaryl-CoA からレスベラトロールを含むスチルベノイドとアントシアニンを含むフラボノイドに分岐する。レスベラトロールは coumaroyl-CoA を基質に STS によって合成されるが、STS の代わりに CHS が触媒すると naringenin chalcone が合成され、naringenin chalcone は CHI によって naringenin が合成される。そしてその先にフラボノール、フラバノール、アントシアニンの合成経路が続く。今回の実験で、STS の発現だけではなくフェニルアラニンから coumaryl-CoA までの代謝経路上の遺伝子 (PAL; phenylalanine ammonia-lyase、4CL; 4-coumarate:CoA ligase、C4H; cinnamate 4-hydroxylase) も紫外線によって誘導していた。一方で、CHI (chalcone isomerase) や F3'5'H (flavonoid 3',5'-hydroxylase) などレスベラトロール以外のフェノール性化合物の合成経路上遺伝子は発現が変動しなかった。つまり Figure 11 では紫外線照射によってレスベラトロールやその類縁体の生合成のみが誘導され、他のフェノール性化合物は誘導されなかったことが示された。本代謝マップは、紫外線照射によるブドウ果皮の特異的代謝変化を表現することができた。

Table 3. Chemical compounds used to identify metabolites.

CAS No.	Name
#63-91-2	L-Phenylalanine
#140-10-3	trans-Cinnamate
#501-36-0	Resveratrol
#537-42-8	Pterostilbene
#61434-67-1	cis-Resveratrol
#27208-80-6	Piceid
#62218-08-0	epsilon-Viniferin
#6906-38-3	Delphinidin 3-glucoside
#7228-78-6	Malvidin 3-glucoside
#6988-81-4	Petunidin 3-glucoside
#7084-24-4	Cyanidin 3-glucoside
#68795-37-9	Peonidin 3-O-glucoside
#16727-30-3	Malvidin 3,5-diglucoside
#132-37-6	Peonidin 3,5-diglucoside
#18466-51-8	Pelargonidin 3-O-glucoside
#154-23-4	(+)-Catechin
#490-46-0	(-)-Epicatechin
#970-74-1	Epigallocatechin
#989-51-5	Epigallocatechin 3-O-gallate
#1257-08-5	(-)-Epicatechin 3-O-gallate
#117-39-5	Quercetin
#520-18-3	Kaempferol
#529-44-2	Myricetin
#482-35-9	Quercetin-3-glucoside

Table 4. List of enriched GO terms

GO-ID	Term	Category	FDR	P-Value
GO:0052689	carboxylic ester hydrolase activity	F	1.E-05	2.13E-09
GO:0050350	trihydroxystilbene synthase activity	F	7.E-05	2.10E-08
GO:0030599	pectinesterase activity	F	1.E-03	5.25E-07
GO:0045330	aspartyl esterase activity	F	2.E-03	8.89E-07
GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	F	3.E-03	2.35E-06
GO:0016758	transferase activity, transferring hexosyl groups	F	3.E-03	2.90E-06
GO:0016746	transferase activity, transferring acyl groups	F	5.E-03	4.71E-06
GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	F	6.E-03	6.62E-06
GO:0042545	cell wall modification	P	6.E-03	8.19E-06
GO:0016740	transferase activity	F	7.E-03	9.57E-06
GO:0030259	lipid glycosylation	P	2.E-02	2.45E-05
GO:0047746	chlorophyllase activity	F	2.E-02	2.62E-05
GO:0003824	catalytic activity	F	2.E-02	4.38E-05

Thirteen GO terms were picked out at enrichment analysis graph by Blast2GO. Category F; molecular function, P; biological process.

Table 5. List of enrichment GO terms and gene annotations for the molecular function ontology.

GO	Gene ID	Fold Change (UV/Dark)	Annotation of Blast2GO (NCBI, Blastx)
GO:0030599 pectinesterase activity	VIT_06s0009g02630	14.9	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02590	39.5	pectinesterase 2-like
	VIT_03s0038g03570	5.6	l-ascorbate oxidase homolog
	VIT_02s0154g00600	8.6	probable pectinesterase 68-like
	VIT_06s0009g02570	9.8	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02600	18.6	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02560	6.0	pectinesterase 2-like
	VIT_07s0005g00720	7.5	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 41-like
GO:0047746 chlorophyllase activity	VIT_07s0151g00210	12.9	chlorophyllase 1
	VIT_07s0151g00130	10.2	chlorophyllase 1
	VIT_07s0151g00270	10.2	chlorophyllase 2
GO:0045330 aspartyl esterase activity	VIT_06s0009g02630	14.9	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02590	39.5	pectinesterase 2-like
	VIT_02s0154g00600	8.6	probable pectinesterase 68-like
	VIT_06s0009g02570	9.8	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02600	18.6	pectinesterase 2-like
	VIT_06s0009g02560	6.0	pectinesterase 2-like
	VIT_07s0005g00720	7.5	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 41-like
	GO:0050350 trihydroxystilbene synthase activity	VIT_16s0100g01000	6.5
VIT_16s0100g01140		6.2	stilbene synthase 1
VIT_16s0100g01130		6.0	resveratrol synthase
VIT_10s0042g00890		5.4	stilbene synthase 1
VIT_10s0042g00870		6.1	stilbene synthase
VIT_16s0100g00770		9.9	stilbene synthase
VIT_16s0100g01190		9.3	resveratrol synthase
GO:0016758 transferase activity, transferring hexosyl groups	VIT_05s0062g00310	5.6	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_05s0062g00270	8.0	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_05s0062g00700	8.0	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_05s0062g00660	5.6	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_05s0062g00300	7.8	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_03s0017g01990	7.6	udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 6-like
	VIT_17s0000g08100	5.7	udp-glycosyltransferase-like protein
	VIT_06s0004g07250	6.0	udp-glycosyltransferase 87a1-like
	VIT_06s0004g07240	6.1	udp-glycosyltransferase 87a1-like
	VIT_12s0034g00030	5.2	udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 6-like
	VIT_04s0023g01120	6.1	cazy family gt8
	VIT_18s0041g00740	5.3	udp-glycosyltransferase 88a1-like
	VIT_15s0021g02060	17.8	hydroquinone glucosyltransferase
	VIT_03s0017g02000	5.8	udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 6
	VIT_01s0011g03850	6.3	protein
	VIT_06s0004g01670	8.2	udp-glycosyltransferase 92a1-like
	VIT_05s0062g00340	6.2	udp-glycosyltransferase 75d1-like
	VIT_17s0000g04760	6.5	udp-glycosyltransferase 89b1-like
	VIT_02s0025g01860	5.1	cellulose synthase-like protein g3

Five GO terms were picked out as terms of the lowest level of the hierarchy in enrichment graph (Fig. 4).

Table 6. List of metabolites identified by one-point calibration in darkness and after treatment with UV-C.

Category	KEGG ID	Compound	Intensity		UV/Dark	Conc.($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$)	
			Dark	UV	Ratio	Dark	UV
	C00079	L-Phenylalanine	0.152	0.103	0.678	61.8	41.9
Resveratrol	C03582	trans-Resveratrol	0.091	32.43	355.176	9.8	3492.3
	-	cis-Resveratrol	*0.051	0.088	1.724	-	6.3
	C10275	Piceid	*0.051	0.171	3.35	-	45.3
	C10289	epsilon-Viniferin	0.389	2.273	5.839	79.2	462.3
Anthocyanin	C12138	Delphinidin 3-glucoside	*0.051	*0.052	1.008	-	-
	C12140	Malvidin 3-glucoside	*0.051	*0.052	1.008	-	-
	C12139	Petunidin 3-glucoside	*0.051	*0.052	1.008	-	-
	C08604	Cyanidin 3-glucoside	*0.051	*0.052	1.008	-	-
	C12141	Peonidin 3-O-glucoside	*0.051	*0.052	1.008	-	-
Proanthocyanidin	C06562	(+)-Catechin	21.313	22.85	1.072	3771.2	4043.3
	C09727	(-)-Epicatechin	0.635	0.598	0.942	114.6	108
	C12136	Epigallocatechin	0.061	0.062	1.005	17.9	18
	-	Epicatechin 3-O-gallate	*0.051	*0.052	1.008	-	-
Flavonol	C00389	Quercetin	*0.051	0.073	1.42	-	8.2
	C10107	Myricetin	*0.051	*0.052	1.008	-	-
	C05623	Quercetin 3-glucoside	0.946	1.162	1.228	227.6	279.4

*Low intensities (≤ 0.052) were detected at background noise levels.

考察

紫外線照射によるブドウ果皮の影響を調査するため、マイクロアレイを使用したトランスクリプトーム解析と二次代謝産物をターゲットとしたメタボローム解析を統合したマルチオミクスを実施した。

これまでのブドウのオミクス研究

Jaillon et al. (2007) や Velasco et al. (2007) によってブドウのゲノムが解読される以前から、ブドウではいくつかのオミクス研究が報告されていた。例えば、病原菌を接種した葉のトランスクリプトーム解析 (Fung et al. 2008, Polesani et al. 2010) や、果実成長に焦点を当てたトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析 (Deluc et al. 2007, Negri et al. 2008, Lückner et al. 2009) である。特に二次代謝産物の蓄積はオミクスにおいて注目されるテーマの一つである (Ali et al. 2011)。しかし、これまでのトランスクリプトーム解析のほとんどが、EST情報をもとに作られたマイクロアレイを使用しており、全ゲノムを網羅できていない。ブドウのゲノムデータが更新されてから (Gimplet et al. 2012) ようやく全ゲノムを網羅したマイクロアレイを用いた解析が主流になってきた (Pastore et al. 2011, Fasoli et al. 2012, Gambino et al. 2012, Young et al. 2012, Dal Snto et al. 2013, Pastore et al. 2013, Dai et al. 2014, Carbonell-Bejerano et al. 2014a, Carbonell-Bejerano et al. 2014b, Rienth et al. 2014a, Rienth et al. 2014b)。また最近ではRNAシーケンスの解読によるトランスクリプトーム解析の報告も増えつつある (Zenoni et al. 2010, Fasoli et al. 2012, Perazzolli et al. 2012, Sweetman et al. 2012, Venturini et al. 2013, Chitwood et al. 2014, Li et al. 2014, Vitulo et al. 2014, Xu et al. 2014)。

一方で植物のメタボローム解析も発展を続けているが (Saito and Matsuda 2010)、ブドウにおいて1,000以上の代謝産物ピークを扱うような大規模なメタボローム解析はまだ少なく (Zamboni et al. 2010, sternad et al. 2013, Marti et al. 2014)、数える程度の代謝産物をターゲットとした報告が多い (Dai et al. 2013)。

ブドウにおいてもトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を組み合わせれば、マルチオミクス解析を実施することは可能であるが、ブドウのマルチオミクス研究は緒に就いたばかりである (Zamboni et al. 2010, Agudelo-Romero et al. 2013b)。本研究では、29,549 遺伝子の発現と 2,012 の代謝産物ピークを解析し、両者の解析データを一つの代謝マップに投影した。したがって、本研究はブドウ研究の中でも、最も包括的にマルチオミクスを行った研究の一つだと言える。本研究において、二次代謝産物蓄積の鍵となる遺伝子や蓄積した化合物を代謝マップから導き出したことは、ブドウ果皮における二次代謝産物蓄積機構の解明において有益であり、また、園芸作物の代謝変化を理解するためのパイロット研究としても価値ある研究だと言える。

ブドウ果皮を用いたオミクス研究の展開

本研究ではブドウの果皮を研究ターゲットとした。ブドウの果皮は、葉や果肉など他の組織に比べ多様かつ高濃度の二次代謝産物を蓄積している (Kader 2002, Steyn 2009)。果皮の二次代謝産物は、果肉の二次代謝産物とともに、果実品質を決定する上で重要であるため、果皮の二次代謝産物を扱うトランスクリプトーム解析も珍しくない。例えば、果実の成熟前後の果皮のトランスクリプトーム解析 (Waters et al. 2005)、果皮特異的な転写産物のプロファイリング (Grimplet et al. 2007)、ベレーゾン期にABA処理をした時の果皮における遺伝子発現の変動 (Koyama et al. 2010)、果皮と果肉を比較したトランスクリプトーム解析 (Ali et al. 2011) などである。

最近、紫外線の影響を見たブドウ果皮のトランスクリプトーム解析について報告された (Carbonell-Bejerano et al. 2014a)。彼らは、太陽光中の紫外線によって果皮にフラボノイドとスチルベノイドの両方が蓄積し、両者の合成遺伝子が誘導されることを報告している。一方、本研究において人為的に UV-C を照射したところ、果皮にスチルベノイドの蓄積と生合成が特異的に起こり、フラボノイドの蓄積や合成遺伝子の発現は誘導されなかった (Fig. 9,

Table 5)。

二次代謝産物の蓄積に関する転写因子

Carbonell-Bejerano et al. (2014a) は、太陽光中の紫外線によって、MYB や bHLH などいくつかの転写因子の発現が誘導されることを報告している。しかし、本実験ではこれらの転写因子は誘導されなかった (Dataset 1)。Pontin et al. (2010) は、ブドウの葉への UV-B 照射によって発現が誘導する転写因子として、エチレン応答因子 (ERF)、WRKY、NAC を挙げている。興味深いことに、本実験でも ERF、WRKY、NAC の発現が増加していた (Dataset S1)。Carbonell-Bejerano et al. (2014a) は自然光に含まれる紫外線に対する応答を、Pontin et al. (2010) と我々は人工光 (UV-B または UV-C) を照射したときの応答をそれぞれ見ている。このため、異なる質と量の紫外線は、異なる転写因子の発現を誘導すると考えられる。Pontin et al. (2010) や我々の強力な紫外線照射は、植物にとってストレスであり、ストレス応答に関連する転写因子が誘導されたのであろう。

Höll et al. (2013) は、STS と共発現し、レスベラトロール生合成を誘導する転写因子として R2R3 タイプの MYB 転写因子である MYB14 と MYB15 を同定した。しかし本実験や他者の報告では MYB14 と MYB15 のどちらも紫外線によって誘導されなかった (Pontin et al. 2010, Carbonell-Bejerano et al. 2014a, Dataset 1)。この違いは恐らく実験に使用した品種や組織、実験条件の違いによるものと推察される。異なる刺激に対して、異なる転写因子がレスベラトロール合成系の制御に関与していることが推察される。

UV-B と UV-C でフェノール性化合物の蓄積は異なる

植物は紫外線から身を守るためフェノール性化合物を蓄積する (Caldwell et al. 1983)。本実験ではレスベラトロール蓄積の誘導は観察されたが (Fig. 11)、アントシアニン、フラバノール、フラボノールの蓄積は誘導されなかった (Table 6)。

UV-B と UV-C では、フェノール性化合物の蓄積パターンが異なることが、報告されている。ブドウ果皮において、フラボノールは太陽光に含まれる紫外線によって誘導されるが、アントシアニンやフラバノールの蓄積量は変化しない (Carbonell-Bejerano et al. 2014a)。Martínez-Lüscher et al. (2014) は、UV-B 照射がフラボノール蓄積を増加させるが、アントシアニン量は変化しないことを報告している。Berli et al. (2010) は、ブドウの葉におけるアントシアニンの蓄積は UV-B の照射では誘導されず、ABA 処理と併せて照射すると蓄積が誘導すると報告している。これらの報告をまとめると、アントシアニン蓄積は UV-B 照射だけでは誘導されないこと、そしてアントシアニンを蓄積させるには ABA が必要だと推察される。ABA はブドウ果実の成熟のトリガーとして知られる植物ホルモンである。そして ABA によってアントシアニンの蓄積が誘導されることも報告されている (Coombe and Hale 1972, Koyama et al. 2010)。このため ABA は UV-B によるアントシアニン蓄積に必須な因子だと言える。

スチルベノイドの生合成は、UV-C だけではなく、病原菌接種、エリシター処理、メチルジャスモン酸処理によっても誘導される (Adrian et al. 2000, Versari et al. 2001, Aziz et al. 2003, Pezet et al. 2003, Takayanagi et al. 2004, Bru et al. 2006, 西川ら 2011, Belchi'-Navarro et al. 2012)。UV-C は、pathogenesis-related (PR) proteins の蓄積 (Colas et al. 2012)、抗酸化物質の蓄積 (Xie et al. 2012)、DNA 修復機構 (Molinier et al. 2004)、プログラム細胞死 (He et al. 2008)、そしてスチルベノイドを含むフェノール性化合物の蓄積 (Douillet-Breuil et al. 1999, Adrian et al. 2000, Versari et al. 2001, Pezet et al. 2003, Takayanagi et al. 2004, 西川ら 2011)、などを誘導する。上述のとおり、今回の UV-C 処理はストレスとして、スチルベノイド蓄積を含めたストレス応答を引き起こしたと言える。

本研究において、我々はブドウ果皮の代謝の概要を示し、UV-C 照射に対する応答を含めた鍵因子を同定した。まずトランスクリプトーム解析では、GO タームによるアノテーション付与を行い、全ゲノム情報と比較したエンリッチメント解析を行った。その結果、我々は

レスベラトロール合成の鍵遺伝子である STS を含む trihydroxystilbene synthase activity (GO:0050350) という GO タームを見出した。そしてこの GO タームが付与された遺伝子群の発現が有意に増加したことを示した (Table 5)。またメタボローム解析では、サンプル間の違いを決める代謝産物を抽出する PCA によって、2,000 以上の代謝産物ピークのプロファイルを示した (Fig. 10)。するとレスベラトロールのみが UV-C を照射したサンプルの特異性を決める化合物として見つかった。これらの結果は、ブドウ果皮でレスベラトロールの蓄積によって引き起こされる一つの代謝変化が、STS の発現によって誘導されたことを明らかにした。

加えて我々が更新した代謝マップは UV-C によるフェノール性化合物の代謝変化を視覚的に示した (Fig. 12)。V1 の CDS で解析できるよう KaPPA-View 4 KEGG を更新したため、この KaPPA-View 4 KEGG システムはよりブドウオミクス研究において強力なツールとなった。NimbleGen のマイクロアレイデータも直接アップロードできるため、代謝マップ上にトランスクリプトーム解析データを簡単に投影することができるようになった。

本研究は UV-C によって誘導されるブドウ果皮のフェノール性化合物の蓄積に焦点を当て、全ゲノムに対応したマイクロアレイと高性能な LC-QTOF-MS を使用して、レスベラトロール蓄積の特異的な誘導を明確に示した。本研究は作物特有の形質を解析するオミクスによる研究手法の有用性を示す一つの事例である。

要約

紫外線 (UV-C) を照射したブドウ果皮を用いてトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を組み合わせたマルチオミクスを実施した。全ゲノムを対象としたマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析では、複数のデータベースを検索して機能を推定したほか、Gene Ontology (GO) によるエンリッチメント解析を行い、紫外線で特異的に発現が誘導される GO タームを biological process で 2 種、molecular function で 11 種得ることができた。その中にはレスベラトロール合成の鍵酵素である stilbene synthase (STS) を示すターム trihydroxystilbene synthase activity (GO:0050350) が含まれていた。また同サンプルで LC-QTOF-MS を使用したメタボローム解析を行い、2,012 種の代謝産物ピークの中から主成分分析 (PCA) で全代謝産物から紫外線照射区に特有の代謝産物を抽出し、標品との照合によりレスベラトロールであることが同定できた。KaPPA-View 4 KEGG のシステムをブドウゲノム V1 でも解析できるよう更新したのち、両データを一つの代謝マップに統合した。これにより、ブドウ果皮に UV-C を照射すると、レスベラトロール代謝系が他の代謝系に比べて際立って誘導されることが示された。

第四章 成熟果皮のメタボロミクス

緒言

第一章で述べたように、ブドウは果皮に多くの二次代謝産物を蓄積する。ブドウは果実成長における成熟への転換点「ベレーゾン」において、ABA の増加がトリガーとなり (Coombe and Hale 1973)、着色とともに果実軟化、糖蓄積、減酸など代謝が劇的に変化する (Kanellis and Roubelakis-Angelakis 1993)。このときの代謝変化を理解することは、果実品質の向上のため重要である。

果皮に蓄積する代謝産物の分析は昔から実施されてきたが、その多くは主要代謝産物のみにターゲットを絞った分析がほとんどである (Dai et al. 2013)。近年の分析技術の発展により (Saito and Matsuda 2010)、代謝産物を一斉に分析するメタボロミクスが行われるようになり、中には 1000 以上の代謝産物ピークを検出した報告もある (Zamboni et al. 2010, Sternad et al. 2013, Marti et al. 2014)。しかし大量のデータが得られても、標品で同定された代謝産物に限定して議論する報告がほとんどであり、未同定のピークを含めて、成熟を特徴付ける代謝産物を探索する研究は少ない (Zamboni et al. 2010)。

植物分野においても質量分析計を使用したメタボローム解析の報告は増加し、MS 解析データが集約されデータベース化されている (Smith et al. 2005, Saito and Matsuda 2010, Horai et al. 2010, Sawada et al. 2012)。この情報を活用すれば、たとえ標品を用いなくとも、検出された代謝産物の特徴を推定することができるため、実験前に注目していなかった代謝産物についても議論できる。

そこで本研究では、収穫直前のブドウ果皮とベレーゾン前の果皮より代謝産物を抽出し、高性能な LC-QTOF-MS によるメタボローム解析を実施した。標品で同定した代謝産物の蓄積を確認するとともに PCA により、成熟に関わる代謝産物を見出した。特徴的な未同定代謝産物については MS/MS フラグメントをもとにデータベースと照合し、その特徴を推定し

た。本研究でブドウの果実成熟過程での二次代謝産物の蓄積傾向を確認するとともに、成熟や品質に関わるいくつかの代謝産物を推定することができた。

材料および方法

材料

2010年7月23日（ベレーゾン直前）および9月16日（収穫直前）に、(株)あずみアップル（長野県安曇野市）の栽培農場で育成された、ブドウ‘ピノ・ノワール’（*Vitis vinifera* L. ‘Pinot Noir’）成木より果房を採取した。異なる3樹から1果房ずつ3果房を収穫し反復の実験材料とした。収穫後ランダムに果皮を回収し、液体窒素で凍らせ、 -80°C で保存した。

メタボローム解析およびPCA

代謝産物の抽出、分析、データマトリクスの作成、PCAは第三章と同様に実施した。またポジティブモードで同定できた代謝産物（Table 7）は100 μM 標品による定性と一点定量を行った。各ステージにつき3サンプルを2つに分けて合計6反復として測定を行った。

化合物

標品は次のメーカーより購入した。和光純薬工業（株）、東京化成工業（株）、ナカライテスク（株）、ChromaDex、Cayman Chemical Company、Enzo Life Sciences、Polyphenols Laboratories AS、EXTRASYNTHÈSE S.A.。

MS/MS フラグメント検索

PCAで見出された代謝産物はMS/MSフラグメントをもとにMETLIN (<http://metlin.scripps.edu/index.php>)、MassBank (<http://www.massbank.jp/>) および ReSpect (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/respect/index>)にて代謝産物の構造を推測しアノテーションを付与した。アノテーションのレベルはSumner et al. (2007)を参照した。標品で同定した代謝産物はIdentified、二種以上のデータベースでヒットした化合物のなかから化合物を1種に絞り込めた場合はannotated、候補化合物が複数種見つかри、化合物の特徴が絞り込

めた場合は、**characterized** とレベル付けを行った。最終的には、理化学研究所で以前別の研究チームが同条件で測定したシロイヌナズナのデータと照合し、アノテーションを判断した。候補化合物が見つからなかった代謝産物は **unknown** とした。

結果および考察

ベレーズン期と収穫期のブドウ果皮代謝産物のプロファイリングからその違いを見つけるため、成熟果皮 (H) と未熟果皮 (BV) を比較したメタボローム解析を実施した (Fig. 14A, B)。実験スキームは Fig. 14C に示した。1,000 以上の化合物ピークの中から、未熟果皮と成熟果皮の違いを見出し、未知代謝産物ピークの特徴を推定したのは、本報告が初めてである。

本実験において、未同定ピークを含む 1,197 ピークをポジティブモードで検出した (Dataset 2)。なお解析にはノーマライズしたデータを使用した。Table 7 に標品による定量結果を示した。BV のシグナル強度はフェニルアラニン、カテキン以外は検出限界以下であったが、H では全て検出された。

果皮色を決定するアントシアニン類の中で、ブドウで主要なアントシアニンであるマルビジン 3 グルコシド (CAS 7228-78-6) (Quintieri et al. 2013) が H で $7.44 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ であり最も多く蓄積していた (Table 7)。他のペオニジン 3 グルコシド、ペチュニジン 3 グルコシドも成熟果皮に蓄積し、他のフェノール性化合物に比べてその蓄積量はきわめて多かった。果皮の色は緑から紫に変化している (Fig. 14A, B)。本実験で示されたアントシアニンの蓄積誘導が果皮色に貢献したと考えられる。

Table 7 より、フラバノール類のカテキンは BV で確認された ($2.03 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$) が、H では少なかった ($0.18 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$)。ブドウ果皮のフラバノールは大部分がカテキンである (Bogs et al. 2005)。カテキンや、フラバノールが重合したプロアントシアニジン (縮合タンニン) は渋味に関わり (Jaakola 2013)、成熟すると減少することが多く報告されている (Bogs et al. 2005, Fujita et al. 2007, Sternad Lemut 2013)。今回観察された、H におけるカテキンの減少は、ベレーズン後にカテキンの重合や沈着が進んだことが原因だと推察される。

レスベラトロールを含むスチルベノイド類は、H で若干増加していたものの、アントシアニンのような劇的な変化はなかった (Table 7)。スチルベノイドはファイトアレキシンであり (Lamgcake and Pryce 1977) 病原菌や環境ストレスで蓄積が誘導され蓄積することが知ら

れている (Adrian et al. 2000, Aziz et al. 2003, Pezet et al. 2003, Takayanagi et al. 2004, Belchi'-Navarro et al. 2012, 第三章)。レスベラトロール生合成は未熟果で誘導されやすいことも報告されている (Takayanagi et al. 2004)。本解析の結果は、スチルベノイド類の生合成が環境ストレスによって引き起こされるものであり、果実の成熟によって誘導されるものではないという、これまでの結果と一致する。

以上の結果をまとめると、未熟果皮ではカテキンを除いたほとんどのフェノール性化合物が蓄積しておらず、ベレーゾン後にカテキンが減少し、他のフェノール性化合物、特にアントシアニンは大量に蓄積することが確認できた。

次に得られた 1,197 ピーク (Dataset 2) で H と BV を比較する PCA を実施した (Fig. 15)。サンプル間の関係を示す score scatter plot では、BV と H が、それぞれグループ化された。score scatter plot を決定づけた全代謝産物ピークの関係を示す loading scatter plot では、H 側に代謝産物ピークのプロットが寄る傾向があった。代謝産物ピークのうち、H と相関の強いピークが 4 種プロットされた。一方、BV と相関があるピークは少なかったものの、比較的相関が高いピーク 3 種を抽出できた。これらピーク 7 種の詳細を Table 8 に示した。抽出したピークの強度値は H と BV の間で有意に差があった。これら代謝産物ピークのうち、標品で定性・定量できた化合物は 3 種 (ペオニジン 3 グルコシド、マルビジン 3 グルコシド、カテキン) で、他は標品との照合ができなかった。そこでピックアップした未同定ピークの MS/MS データを取得し (Fig. 16)、MS データベース 3 種 (MassBank, Respect, MEDLIN) に対して、フラグメントの m/z が一致するスペクトルデータを検索し、化合物を推定した。

未同定ピーク 4 種のうち 1 種 (No. 1049) は、ピークトップのイオンではなかった (Table 8)。これは質量電荷比が一致することから、マルビジン 3 グルコシド (No. 1050) のピークであると予想される。残り 3 種の MS/MS フラグメントは得ることができたのでデータベースの MS/MS フラグメントと照合させ Sumner et al. (2007) に従いアノテーションを付与した。

このうち、H側の1ピーク (No. 0300) は、アミノ酸であるアルギニンと推察された (Table 8)。ブドウ果実に含まれる主要なアミノ酸の一つであるアルギニンは、果肉と果皮に蓄積し、成熟にもなって増加することが報告されており (Lamikanra and Kassa 1999)、今回の結果と一致した。アルギニンはポリアミン (Agudelo-Romero 2013a) の基質となる。ポリアミンは、果実成熟 (Aziz 2005, Mattoo and Handa 2008) や葉の老化 (Pandey et al. 2000) に関わっていることも報告されている。アルギニンは、ブドウ果汁中では酸味を抑え甘みを増し、食味を向上させることが報告されていることから (平野ら 1998)、今回、成熟果皮において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、園芸学上興味深い。

未同定ピークのうち BV 側のピークの一つ (No 0102) はデータベースを検索すると複数のアミノ酸が候補として挙げられた (Table 8)。MS の保持時間を確認すると、No. 0191 のグルタミン ($m/z=147$) および No. 0195 のグルタミン酸 ($m/z=148$) と推定される MS の保持時間が一致した。このため分析中にグルタミン酸やグルタミンが開裂して生じたニュートラルロスイオンである可能性が高いことが分かったため、アノテーションレベルを Characterized とした (Table 8)。ブドウのアミノ酸組成は品種によって大きく異なるが、‘ピノ・ノワール’ の成熟果汁においては、グルタミン酸が総アミノ酸でも 5 番目に多いアミノ酸だと報告されている (佐藤ら 1994)。グルタミン酸はアンモニア代謝経路の中でも最初に合成されることから、時にはワイン酵母のアルコール発酵にも関わる (Castor 1953) 窒素代謝の中心的役割を担っている (Forde and Lea 2007)。グルタミン酸は主要なアミノ酸であるアルギニンやプロリンの基質となる (Forde and Lea 2007)。このアミノ酸はアルギニン生合成で代謝された可能性が推察される。

興味深いことに、BV 側の未同定ピークの一つ (No 1088) はデータベースで検索すると、クマル酸が類似した MS/MS フラグメントとしてヒットしたものの、一致する MS スペクトルデータが見つからなかったためアノテーションが付与できなかった (Table 8)。このため本実験でベレーゾン期のブドウ果皮で成熟を特徴づける新奇化合物の代謝産物ピークを見

つけた可能性が示唆された。

今回のブドウ果皮におけるメタボローム解析において、標品で同定した化合物の中で、**BV** を特徴づける化合物としてカテキンを、**H** を特徴づける化合物としてアントシアニン（ペオニジン 3 グルコシドとマルビジン 3 グルコシド）を見出すことができた。また未同定代謝産物ピークの **MS/MS** フラグメントを **MS** スペクトルデータベースと照合し、**BV** を特徴づける代謝産物としてグルタミン酸やグルタミンのニュートラルロスイオンを、**H** を特徴づける代謝産物としてアルギニンが推定できた。ブドウ果皮におけるアミノ酸蓄積の知見は少ないが、ブドウの食味やワインの品質に影響する成分であるため、未知化合物とともに果実品質を決定する化合物の一つとして着目したい。

Table 7. List of metabolites identified by one-point calibration before veraison and at harvest time.

Category	CAS	Compound			Intensity ^{a,b}		H/BV	Concentration (mg g ⁻¹ FW)	
			Ret. Time	m/z	BV	H	Ratio	BV	H
	63-91-2	L-Phenylalanine	2.3187	166.0866	0.204	0.632	3.1	0.05	0.16
Resveratrol	501-36-0	Resveratrol	5.0021	229.0862	*0.021	0.185	8.9	—	0.11
	27208-80-6	Piceid	4.0155	391.1389	*0.021	0.033	1.6	—	0.29
	62218-08-0	epsilon-Viniferin	5.775	455.149	*0.021	0.037	1.8	—	0.02
Anthocyanin	6906-38-3	Delphinidin 3-glucoside	2.6328	465.1032	*0.021	0.306	14.8	—	1.33
	7228-78-6	Malvidin3-glucoside	3.1703	493.1344	*0.021	5.184	250.8	—	7.44
	6988-81-4	Petunidin3-glucoside	2.9103	479.1182	*0.021	0.776	37.6	—	5.07
	7084-24-4	Cyanidin3-glucoside	2.8531	449.1081	*0.021	0.530	25.7	—	0.54
	68795-37-9	Peonidin 3-O-glucoside	3.1179	463.1238	*0.021	4.444	215.0	—	5.62
Proanthocyanidin	154-23-4	(+)-Catechin	3.0985	291.0863	1.476	0.134	0.1	2.03	0.18
	490-46-0	(-)-Epicatechin	3.42	291.0868	0.027	0.194	7.3	—	0.22
Flavonol	482-35-9	Quercetin-3-O-glucoside	4.0242	465.1027	*0.021	0.166	8.0	—	0.54

^a values represent the means of six intensities, ^b *: low intensities (≤ 0.021) were detected at background noise levels.

Table 8 List of metabolites picked up by PCA with speculated annotations.

No. ^a	Sam- ple ^b	Ret. Time	m/z	Intensity (normalized) ^c			Metabol- ite name	Identifi- cation level ^e	MS/MS fragments ^f	MS/MS Fragment search ^g			Chemical Search			Formura	CAS
				BV	H	t-test ^d				METLIN	ReSpect	MassBank	KEGG	KNAPSAcK	PubChem		
0102	BV	0.8373	130.0501	2.18±0.17	0.83±0.15	**	Amino acid (Glutamate and Glutamine)	C	130.0499, 84.0438, 147.0761, 102.0565, 131.0483, 101.0652, 148.0681,	(R)-(+)-2- Pyridone-5- carboxylic acid (D- Pyroglutamic acid),	L-Glutamic acid, N-acetyl-L-Glutamic acid, S-Lactoylglutathione, L-Glutamine, L-lysine, L-Lysine monohydrochloride, L-Pyroglutamic acid	5,6- Dimethylbenzimidazol Glutamate Glutamine L-(+)-Lysine Lysine Beta Ala-Lys	C00025(Glu), C00064(Gln)	C00001358(Glu), C00001359(Gln)	3327(Glu), 3364(Gln)	C5H9NO4(Glu), C5H10N2O3(Gln)	56-86-0(Glu), 56-85-9(Gln)
0188	BV	3.1979	147.0443	1.61±0.18	0.45±0.06	**	—	U	147.0450, 119.0519, 91.0547, 148.0398, 120.0394, 92.0587, 149.1320, 125.4183, 101.0375, 65.0399, 189.3775,	Coumarin, p-coumaric acid	4-Hydroxy-3- methoxycinnamaldehyd e, Hinokitol, 4-coumaric acid	No candidate compound	—	—	—	—	—
0300	H	0.8185	175.1192	0.06±0.01	4.56±0.39	**	L-Arginine	A	175.1162, 116.0716, 158.0942, 70.0664, 176.0891, 112.0876, 130.0993, 60.0532, 71.0610, 159.0900, 157.1024, 177.5481, 143.1008, 117.0753, 98.0651,	L-Arginine	L-Arginine, L-Arginine monohydrochloride, N-alpha-Acetyl L- ornithine, L-Arginine, L-Arginine monohydrochloride, N-alpha-Acetyl L- ornithine, Octopine, Phosphoarginine,	L-Arginine, L-Arginine monohydrochloride, N-alpha-Acetyl L- ornithine, Octopine, Phosphoarginine,	C00062	C00001340	6322	C6H14N4O2	74-79-3
0668	BV	3.0924	291.0867	1.48±0.13	0.13±0.01	**	Catechin	I	139.0394, 291.0867, 147.0431, 165.0542, 292.0917, 293.0883, 1235.2754	Epicatechin	(+)-Epicatechin, (-)-Epicatechin	(+)-Catechin, (+)-Epicatechin, (-)-Epicatechin	C06562	C00000947	—	C15H14O6	154-23-4
1008	H	3.1148	463.123	0.02±0.00 ^h	4.44±0.52	**	Peonidin 3- O- glucoside	I	301.0703, 463.1241, 302.0737, 286.0466, 464.1260, 258.0474, 465.1449, 303.0702	No candidate compound	Peonidin-3-O-beta- galactopyranoside, peonidin-3-o-beta-d- glucopyranoside	Peonidin-3-O-beta-D- glucoside, Peonidin-3-O-beta- galactopyranoside	C12141	—	—	C22H23O11	68795-37-9
1049	H	3.1357	493.1338	0.02±0.00 ^h	4.68±0.30	**	—	N	—	—	—	—	—	—	—	—	
1050	H	3.192	493.1338	0.02±0.00 ^h	5.18±0.28	**	Malvidin-3- glucoside	I	331.0812, 493.1340, 332.0858, 494.1374, 315.0506	Malvidin 3-O- glucoside	Malvidin-3-galactoside chloride, Oenin	Malvidin 3-O-beta- galactoside, Oenin	C12140	C00006735	—	C23H25O12	7228-78-6

^a the number of compounds were showed in Supplemental Data 1. ^b BV: before veraison, H: at harvest. ^c values represent the means of six intensities ± standard deviation. ^d **: significant difference by t-test between BV and H at P<0.01. ^e annotation levels were proposed by Sumner et al. (2007). A; annotated, C; Characterized, I; Identified, U; unknown, N; no peak top. ^f MS/MS fragment spectrum were showed in Supplemental Data 2. ^g databases were introduced in material and method. ^h low intensities (≤0.02) were detected at background noise levels.

要約

成熟時に蓄積する代謝産物をプロファイルするため、収穫直前のブドウ果皮とベレーゾン前の果皮より代謝産物を抽出し、LC-QTOF-MS によるメタボローム解析を実施した。ポジティブモードで未同定ピークを含む 1,197 ピークを検出し、そのうち 12 種の代謝産物は標品で同定・定量した。成熟時にはカテキンを除くフェノール性化合物のほとんどが増加しており、特にブドウで主要なアントシアニンであるマルビジン 3 グルコシドの蓄積量が最も多かった。カテキンの蓄積量は成熟時には減少した。一方で PCA では成熟に関わる代謝産物 7 種を見出した。特徴的な未同定代謝産物について MS/MS フラグメントをもとにデータベースと照合したところ、成熟時のサンプル特異的にアミノ酸のアルギニンと推定された代謝産物ピークが見つかり、ベレーゾン前のサンプルでグルタミン酸またはグルタミンのニュートラルロスイオンであると推定されたピークが見出された。本研究でブドウの果実成熟過程での二次代謝産物の蓄積傾向を確認するとともに、成熟や品質に関わるアミノ酸をいくつか見出すことができた。

第五章 総合考察

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の解明のため、ゲノム情報を利用した ABCG トランスポーターの探索とマルチオミクスを実施した。

レスベラトロールトランスポーターの探索

第二章と第三章では、どちらも紫外線照射による果皮へのレスベラトロール蓄積に着目した。レスベラトロールは、フランス人が高脂肪食品を食べていても心臓病になりにくい「フレンチパラドックス」の鍵成分として一躍注目された成分である (Renaud and De Lorgeril 1992)。ブドウの二次代謝産物の中でも、抗がん作用 (Jang et al. 1997) やアルツハイマー病の予防 (Marambaud et al. 2005) など、人の健康に効果がある機能性成分として着目されている。ブドウにレスベラトロールを効率よく多量に蓄積することができれば、園芸産業だけではなく、ワイン醸造業や医薬品開発など、多分野での応用が期待できる。よってレスベラトロールの蓄積誘導やレスベラトロールトランスポーターの特定は、重要な研究課題である。

第二章では文献、EST 情報、植物のフルサイズ ABCG トランスポーターの分子系統樹 (Fig. 1) をもとに、レスベラトロール蓄積に関わるトランスポーターの候補として VvABCG44 を絞り込み、解析を実施した。これまでにレスベラトロールを輸送するトランスポーターの報告はない。本研究では、レスベラトロールの輸送能力は確認できなかったものの、紫外線によって遺伝子発現が誘導されることが明らかとなったため、VvABCG44 がレスベラトロール蓄積に関与することが示唆され、今後の研究の発展を期待したい。

ABC トランスポーターの輸送基質に関する報告を見ると、1種の基質に対して複数のトランスポーターが輸送に関与することが分かる。例えば、ワックスやクチンモノマーなどのクチクラ成分の輸送には、フルサイズ ABCG トランスポーターの AtABCG32 やハーフサイ

ズの AtABCG11、AtABCG12、AtABCG13 が関与することが報告されている (Bessire et al. 2011, Panikashvili et al. 2011)。他にも、オーキシンの輸送には、ABC トランスポーターの PGP1 (ABCB1)、PGP4 (ABCB4)、PGP19 (ABCB19) と PIN タンパク質の PIN1、PIN3、PIN7 が同定されており、それぞれ独立にまたは協調してオーキシンの極性移動を担っている (Bandyopadhyay et al. 2007)。

今回、ゲノム情報をもとにブドウのフルサイズ ABCG を検索したところ、34 種が見つかった (Table 2, Fig. 1)。この数は、シロイヌナズナの 12 種やイネの 23 種よりもはるかに多い (Crouzet et al. 2006)。これら 34 種のブドウのフルサイズ ABCG のうち、タバコ NpPDR1 のオルソログと推察されるフルサイズ ABCG は、VvABCG44 の他にも 10 種見つかった (Fig. 1)。一方、第三章のトランスクリプトーム解析において、紫外線照射により発現が 3 倍以上増加した ABC トランスポーターと MATE が 8 種見つかった (Dataset 1)。これらのことを考えると、ブドウ果皮には VvABCG44 以外にも、レスベラトロール蓄積に関与するトランスポーターが複数種存在すると推察される。

ただし、レスベラトロール蓄積に関わるトランスポーターの網羅的探索を行うためには、第三章のトランスクリプトーム解析の結果だけでは十分とは言えず、プロテオーム解析などのアプローチも検討すべきである。当研究分野の阪本 (2015) は、ブドウ培養細胞のプロテオーム解析によりレスベラトロールトランスポーターを特定する研究を進めている。Tohge et al. (2011) は、ATTED II に登録されている複数のマイクロアレイによる発現解析データやメタボローム解析データを統合し、ターゲットと共発現する遺伝子を見出すネットワーク解析から複数のトランスポーターを見出している。レスベラトロールトランスポーターの同定においても、このようなアプローチが有効であると考えられ、この後の研究の展開が楽しみである。

園芸作物のゲノム解読

第二章と第三章では、ブドウのゲノム情報を利用して、解析を進めた。ブドウは第一章でも述べたように、園芸作物の中で最初にゲノムが解読された作物である。ただし、世界各国の研究者が一丸となりコンソーシアムを結成したわけではなく、研究チームの競争の中で解読が進められたため、公開の経緯は複雑である。ブドウゲノムを解読したチームは、イタリアの IASMA 研究センター (<http://genomics.research.iasma.it/>) と、イタリアとフランスのコンソーシアム (Jaillon et al. 2007, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) の 2 グループが存在する。現在は、後者が主体となって情報を公開しており、後者のコンソーシアムに参加する CRIBI (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>) が、アセンブルを見直した V1 を独自に公開している。三大国際 DNA データバンクのうち、V1 が登録されているのはヨーロッパの EBI が提供する EMBL のみで、アメリカの NCBI が提供する Genbank や日本の DDBJ は、古いバージョンの V0 のままである。このような状況の事情は不明であるが、情報を利用する側からみると、どの情報を利用したらよいのか判断が難しく、混乱を招いている。

ゲノム解読の複雑な状況は他の作物でも見受けられる。例えばトマト (*Solanum lycopersicum*) の場合、国際コンソーシアムによって各国が分担し栽培品種‘Heinz1706’と野生種 *S. pimpinellifolium* LA1589 のゲノムが解読された (Tomato Genome Consortium, 2012)。しかし、この公開の前にかずさ DNA 研究所は主要遺伝子が 8 割含まれるゲノム情報を先行公開している (Tomato SBM DataBase, http://www.kazusa.or.jp/tomato_sbm/index.html)。さらに、最近、わい性品種マイクロトムのゲノムが解読された (Kobayashi et al. 2013)。次世代シーケンサーの普及や低コスト化もあり、個々の研究室で多種多様なゲノムが解読できる時代になった。園芸作物でも、今後、独自に公開されるゲノム情報が爆発的に増加するため、現在起きている以上の情報の混乱が予想される。今後、作物のゲノム公開のためのルールの整備や情報の管理が課題となるだろう。

代謝マップ作成ツール更新の意義

ゲノム解読データの増加と情報公開は利用側だけではなく、解析ツールの作成や更新にも大きく影響する。KEGG PATHWAY は通常 NCBI が提供する Reference sequence (Ref seq) をもとに作成され、更新されてきた。一方、KaPPA View 4 KEGG も、KEGG PATHWAY をもとに作成され、更新されている。本研究の第三章において、ブドウの KEGG PATHWAY に、ブドウゲノム V1 の情報を追加し、Ref seq をもとに作成された代謝マップとは別に、新たに代謝マップを作成した (Fig. 12)。さらに KaPPA View 4 KEGG のマップ作成ツールも、併せて V1 に対応できるように更新した (Fig. 13)。これにより、今後は Ref seq 情報だけではなく、V1 ゲノム情報をベースに解析した情報も、KEGG PATHWAY や KaPPA View 4 KEGG で利用できることになった。今回使用した KaPPA View 4 KEGG のような代謝マップ作成ツールは、トランスクリプトーム解析やメタボローム解析に不可欠であり、多くの研究者が利用できるよう、システムを随時更新することが求められている。一方で、解析ツールの作成側は、個々の種の公開情報の事情を全て把握しているわけではない。このため、今回の更新のように、解析ツールの利用側が作成側に働きかけ、利用者が使いやすいツールに改変することが大切である。今回の KaPPA View 4 KEGG の更新は、ブドウオミクスの発展に貢献できるであろうと自負している。

MS/MS 情報を利用した未同定代謝産物の推定

第三章と第四章のメタボローム解析では、ブドウ果皮の代謝産物をプロファイルした (Fig 10, 15)。その結果、第三章では紫外線によりレスベラトロールのみが特異的に誘導されることが示され、第四章では成熟果実の果皮に特異的な代謝産物ピークを 3 種見出した。これらの結果は、予想に反して、環境ストレスや果実成熟を特徴付ける代謝産物の種類は、それほど多くないことを示している。

ブドウのメタボローム解析の報告は、他のオミクスに比べて少ない。その理由の一つとして、代謝産物の同定が難しいことと、標品を用いて同定できる代謝産物が少ないため、解析しても得られる情報が少ないことが挙げられる。そこで第四章では、これまで既存の化合物データベースを利用した代謝産物の推定を試みた (Table 8)。その結果、当初注目していた二次代謝産物の他にも、果実やワインの旨みに関与するアミノ酸であるアルギニンを見出した。これにより、ブドウのメタボローム解析における新しい解析法を提案することができた。シロイヌナズナなどのモデル植物の化合物の質量分析データは、MassBank や ReSpect などのデータベースに集積しつつある。このようなデータベースを参照すれば、標品がない代謝産物についても類似化合物を見つけることができるため、解析を諦めざるを得なかった未知の代謝産物ピークのアノテーションを推定し考察することができる。化合物データベースの充実により、メタボローム解析も、今後、ますます研究しやすくなると考えられる。

本研究は、レスベラトロールトランスポーターの候補としてフルサイズ ABCG サブファミリーに属する VvABCG44 に着目して遺伝子の発現解析を行ったほか、紫外線におけるブドウの果皮のレスベラトロール蓄積の誘導を、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を組み合わせたマルチオミクスで明らかにし、代謝マップに投影した。さらに果実の成熟過程で果皮に蓄積する代謝産物を、メタボローム解析によってプロファイルした。ブドウをはじめ園芸作物のオミクス研究は、これからさらに加速するだろう。本研究で得られた成果や更新したオミクスツールが、園芸作物におけるオミクス研究の発展やブドウ育種や品質向上のために貢献できれば幸いである。

謝辞

本研究を行うにあたり、名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座園芸科学研究分野白武勝裕准教授には、終始ご指導賜りましたこと厚く御礼申し上げます。同研究分野の松本省吾教授ならびに太田垣駿吾助教には本論文をまとめるにあたり多大なご助力をいただきましたこと深く感謝いたします。

メタボローム解析における代謝産物抽出から分析・データ解析についてご助力いただきました理化学研究所環境資源科学研究センターの斉藤和季教授、中林亮博士、森哲哉氏に感謝いたします。また退職直前まで分析を続けてくださった元理化学研究所植物科学研究センターの鈴木実氏に感謝いたします。代謝マップの作成にご助力いただいた大阪府立大学の尾形善之准教授、ブドウ V1 ゲノム情報の KEGG への追加を実施していただいた京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターの五斗進准教授ならびにライフサイエンス統合データベースセンターの時松敏明博士、KaPPA View 4 KEGG のシステム更新を行っていただいたかずさ DNA 研究所の櫻井望博士に感謝いたします。ABC トランスポーターの解析についてご指導いただきました University of Zurich の Enrico Martinoia 教授ならびに Polish Academy of Sciences の Michal Jasinski 博士に感謝いたします。果皮の蛍光観察にご協力いただきました名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座植物育種学研究分野の中園幹生教授ならびに同研究科植物生産科学第 2 研究分野の西内俊策助教に感謝いたします。ブドウサンプルを毎年提供していただきました(株)あづみアップルの斉藤洋也氏ならびに内方知春氏に感謝いたします。ブドウ果実への紫外線照射についてご助言をいただきました三重県農業研究所の西川豊氏ならびに輪田健二氏、元名古屋大学情報科学研究科の手塚修文博士に感謝いたします。

学内のブドウの栽培管理を続けてくださった名古屋大学技術部の伊藤耕技官ならびに名古屋大学技術部の榊原孝平氏に感謝いたします。英文表現を丁寧に校正していただきました名古屋大学生物機能開発利用研究センター高次生体分子機能研究分野の Stefan

Reuscher 博士に感謝いたします。

研究遂行にあたり様々なご助言をいただきました中部大学の山木昭平教授ならびに山田邦夫准教授に感謝いたします。論文執筆中に研究員として勤務させていただき、学位取得を応援していただきました農研機構野菜茶業研究所の岩崎康永博士をはじめ武豊研究拠点の皆様にご礼申し上げます。

最後になりましたが、トランスクリプトーム解析についてご助言いただきました農研機構果樹研究所の奈島賢児博士、データベースの集約にご協力いただきました岐阜大学応用生物科学部の落合正樹博士、そして名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座園芸科学研究分野の皆様にご厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R (2000) Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agric Food Chem* 48: 6103–6105
- Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Paos MS, Tiburcio AF, Fortes AM (2013a) Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism *Plant Physiol Biochem* 67: 105–119
- Agudelo-Romero P, Erban A, Sousa L, Pais MS, Kopka J, Fortes AM (2013b) Search for transcriptional and metabolic markers of grape pre-ripening and ripening and insights into specific aroma development in three Portuguese cultivars. *PLoS One* 8: e60422
- Ali MB, Howard S, Chen S, Wang Y, Yu O, Kovacs LG, Qiu W (2011) Berry skin development in Norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biol* 11: 7
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815
- Aziz A (2005) Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L.: possible relationships with initial fruitlet abscission. *J Exp Bot* 54: 355–363
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1118–1128
- Badri DV, Quintana N, El Kassis EG, Kim HK, Choi YH, Sugiyama A, Verpoorte R, Martinoia E, Manter DK, Vivanco JM (2009) An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiol* 151: 2006–2017
- Banasiak J, Biala W, Staszaków A, Swarcewicz B, Kepczynska E, Figlerowicz M, Jasinski M (2013) A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *J Exp Bot* 64: 1005–1015
- Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Lee OR, Mravec J, Sauer M, Titapiwatanakun B, Makam SN, Bouchard R, Geisler M, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS (2007) Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochem Soc Trans* 35: 137–141

- Belchí-Navarro S, Almagro L, Lijavetzky D, Bru R, Pedreño MA (2012) Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Rep* 31: 81–89
- Berli FJ, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant Cell Environ* 33: 1–10
- Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraça L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter R, Jacquat AC, Métraux JP, Nawrath C (2011) A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 1958–1970
- Bienert MD, Siegmund SEG, Drozak A, Trombik T, Bultreys A, Baldwin IT, Boutry M (2012) A pleiotropic drug resistance transporter in *Nicotiana tabacum* is involved in defense against the herbivore *Manduca sexta*. *Plant J* 72: 745–757
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol* 139: 652–663
- Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem* 54: 65–71
- Bultreys A, Trombik T, Drozak A, Boutry M (2009) *Nicotiana plumbaginifolia* plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene NpPDR1 show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens. *Mol Plant Pathol* 10: 651–663
- Çakır B, Kılıçkaya O (2013) Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera*. *PLoS One* 8: e78860
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD (1983) Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant* 58: 445–450

- Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, Penninckx IAMA, Anderson JP, Maclean DJ, Cammue BPA, Ebert PR, Manners JM (2003) Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 1272–1284
- Carbonell-Bejerano P, Diago MP, Martínez-Abaigar J, Martínez-Zapater JM, Tardáguila J, Núñez-Olivera E. (2014a) Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biol* 14: 183
- Carbonell-Bejerano P, Rodríguez V, Royo C, Hernáiz S, Moro-González LC, Torres-Viñals M, Martínez-Zapater JM (2014b) Circadian oscillatory transcriptional programs in grapevine ripening fruits. *BMC Plant Biol* 14: 78
- Castor JGB (1953) The free amino acids of musts and wines. II. The fate of amino acids of must during alcoholic fermentation. *J Food Sci* 18: 146–151
- Chassot C, Nawrath C, Métraux JP (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J* 49: 972–980
- Chen G, Komatsuda T, Ma JF, Nawrath C, Pourkheirandish M, Tagiri A, Hu YG, Sameri M, Li X, Zhao X, Liu Y, Li C, Ma X, Wang A, Nair S, Wang N, Miyao A, Sakuma S, Yamaji N, Zheng X, Nevo E (2011) An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 12354–12359.
- Chitwood DH, Ranjan A, Martinez CC, Headland LR, Thiem T, Kumar R, Covington MF, Hatcher T, Naylor DT, Zimmerman S, Downs N, Raymundo N, Buckler ES, Maloof JN, Aradhya M, Prins B, Li L, Myles S, Sinha NR. (2014) A modern ampelography: a genetic basis for leaf shape and venation patterning in grape. *Plant Physiol* 164: 259–272
- Colas S, Afoufa-Bastien D, Jacquens L, Clément C, Baillieul F, Mazeyrat-Gourbeyre F, Monti-Dedieu L (2012) Expression and in situ localization of two major PR proteins of grapevine berries during development and after UV-C exposition. *PLoS One* 7: e43681
- Conesa A, Götz S (2008) Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics* 2008: 619832

- Coombe BG (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *Am J Enol Vitic* 43: 101–110
- Coombe BG, Hale CR (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol* 51: 629–634
- Crouzet J, Roland J, Peeters E, Trombik T, Ducos E, Nader J, Boutry M (2013) NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Mol Biol* 82: 181–192
- Crouzet J, Trombik T, Fraysse AS, Boutry M (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett* 580: 1123–1130
- Dai ZW, Léon C, Feil R, Lunn JE, Delrot S, Gomès E (2013) Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *J Exp Bot* 64: 1345–1355
- Dai ZW, Meddar M, Renaud C, Merlin I, Hilbert G, Delrot S, Gomès E (2014) Long-term in vitro culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. *J Exp Bot* 65: 4665–4677
- Dal Santo S, Tornielli GB, Zenoni S, Fasoli M, Farina L, Anesi A, Guzzo F, Delledonne M, Pezzotti M (2013) The plasticity of the grapevine berry transcriptome. *Genome Biol* 14: r54
- Davies C, Boss PK, Robinson SP (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant physiol* 115: 1155–1161
- De Nisco M, Manfra M, Bolognese A, Sofo A, Scopa A, Tenore GC, Pagano F, Milite C, Russo MT (2013) Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L (cv Aglianico). *Food Chem* 140: 623–629
- Decottignies A, Goffeau A (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15: 137–145
- Del Nero J, de Melo CP (2002) Quantum chemistry calculation of resveratrol and related stilbenes. *Opt Mater* 21: 455–460

- Delaunoy B, Cordelier S, Conreux A, Clément C, Jeandet P (2009) Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol J* 7: 2–12
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8: 429
- Douillet-Breuil AC, Jeandet P, Adrian M, Bessis R (1999) Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *J Agric Food Chem* 47: 4456–4461
- Ducos E, Fraysse S, Boutry M (2005) NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett* 579: 6791–6795
- Eichhorn H, Klinghammer M, Becht P, Tenhaken R (2006) Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid. *J Exp Bot* 57: 2193–2201
- Eudes A, Bozzo GG, Waller JC, Naponelli V, Lim EK, Bowles DJ, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2008) Metabolism of the folate precursor p-aminobenzoate in plants: glucose ester formation and vacuolar storage. *J Biol Chem* 283: 15451–15459
- Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, Tornielli GB, Farina L, Zamboni A, Porceddu A, Venturini L, Bicego M, Murino V, Ferrarini A, Delledonne M, Pezzotti M. (2012) The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell* 24: 3489–3505
- Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J Exp Bot* 58: 2339–2358
- Francisco RM, Regalado A, Ageorges A, Burla BJ, Bassin B, Eisenach C, Zarrouk O, Vialet S, Marlin T, Chaves MM, Martinoia E, Nagya R (2013) ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-Glucosides. *Plant Cell* 25: 1840–1854
- Fujita A, Soma N, Goto-Yamamoto N, Mizuno A, Kiso K, Hashizume K (2007) Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *J Japan Soc Hortic Sci* 76: 112–119
- Fung RW, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E, McIntyre LM, Schachtman DP, Qiu W (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not

in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 146: 236–249

Gambino G, Cuzzo D, Fasoli M, Pagliarani C, Vitali M, Boccacci P, Pezzotti M, Mannini F (2012) Co-evolution between Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *J Exp Bot* 63: 5919–5933

Golin J, Kon ZN, Wu CP, Martello J, Hanson L, Supernavage S, Ambudkar SV, Sauna ZE (2007) Complete inhibition of the Pdr5p multidrug efflux pump ATPase activity by its transport substrate clotrimazole suggests that GTP as well as ATP may be used as an energy source. *Biochemistry* 46: 13109–13119

Grimplet J, Cramer GR, Dickerson JA, Mathiason K, Van Hemert J, Fennell AY (2009) VitisNet: “Omics” integration through grapevine molecular networks. *PLoS One* 4: e8365

Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2007) Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8: 187

Grimplet J, Van Hemert J, Carbonell-Bejerano P, Díaz-Riquelme J, Dickerson J, Fennell A, Pezzotti M, Martínez-Zapater JM (2012) Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Res Notes* 5: 213

He R, Drury GE, Rotari VI, Gordon A, Willer M, Farzaneh T, Woltering EJ, Gallois P (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283: 774–783

平野健・窪田澄子・西敏明・岡本五郎 (1998) ブドウ果汁の食味に及ぼすアミノ酸組成の影響. *JASEV Jpn* 9: 89–96

Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, et al (2010) MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom* 45: 703–714

Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol* 153: 1526–1538

- Höll J, Vannozzi A, Czemplin S, D'Onofrio C, Walker AR, Rausch T, Lucchin M, Boss PK, Dry IB, Bogs J (2013) The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell* 25: 4135–4149
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793–800
- Ito H, Gray WM (2006) A gain-of-function mutation in the Arabidopsis pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant physiol* 142: 63–74.
- Jaakola L (2013) Phenylpropanoid metabolism and biosynthesis of anthocyanins. In: Seymour GB, Poole M, Giovannoni J, Tucker GA (eds) *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*, Blackwell Publishing, Oxford, pp 117–134
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463–467
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218–220
- Jasiński M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13: 1095–1107
- Kader AA (2002) Fruits in the global market. In: M. Knee (ed). *Fruit quality and its biological basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp 1–16
- Kanehisa M (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27–30
- Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1993) Grape. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA (eds) *Biochemistry of fruit ripening*. Springer Netherlands Press, London, pp 189–234
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2355–2360

- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50: 207–218
- Kim DY, Jin JY, Alejandro S, Martinoia E, Lee Y (2010) Overexpression of AtABCG36 improves drought and salt stress resistance in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 139: 170–180
- Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* 47: 309–318
- Kobayashi M, Nagasaki H, Garcia V, Just D, Bres C, Mauxion JP, Le Paslier MC, Brunel D, Suda K, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Toyoshima H, Suzuki T, Igarashi K, Rothan C, Kaminuma E, Nakamura Y, Yano K, Aoki K (2013) Genome-wide analysis of intraspecific DNA polymorphism in 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Physiol* 55: 445–454.
- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct Integr Genomics* 10: 367–381
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323 :1360–1363
- Kretzschmar T, Burla B, Lee Y, Martinoia E, Nagy R (2011) Functions of ABC transporters in plants. *Essays Biochem* 50: 145–160
- Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341–344
- Lamikanra O, Kassa AK (1999) Changes in the free amino acid composition with maturity of the noble cultivar of *Vitis rotundifolia* Michx. Grape. *J Agric Food Chem* 47: 4837–4841
- Lamping E, Baret PV, Holmes AR, Monk BC, Goffeau A, Cannon RD (2010) Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function. *Fungal Genet Biol* 47:127–142
- Langcake P, Pryce RJ (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33:151–152

- Lee M, Lee K, Lee J, Noh E, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138: 827–836
- Li Q, He F, Zhu BQ, Liu B, Sun RZ, Duan CQ, Reeves MJ, Wang J (2014) Comparison of distinct transcriptional expression patterns of flavonoid biosynthesis in Cabernet Sauvignon grapes from east and west China. *Plant Physiol Biochem* 84: 45–56
- Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D, Gillet F, Guérineau F, Pelloux J (2006) Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 782–791
- Lücker J, Laszczak M, Smith D, Lund ST (2009) Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (*Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. *BMC Genomics* 10: 50
- Marambaud P, Zhao H, Davies P (2005) Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 280: 37377–37382
- Marti G, Schnee S, Andrey Y, Simoes-Pires C, Carrupt PA, Wolfender JL, Gindro K (2014) Study of leaf metabolome modifications induced by UV-C radiations in representative *Vitis*, *Cissus* and *Cannabis* species by LC-MS based metabolomics and antioxidant assays. *Molecules* 19: 14004–14021
- Martínez-Lüscher J, Torres N, Hilbert G, Richard T, Sánchez-Díaz M, Delrot S, Aguirreolea J, Pascual I, Gomès E (2014) Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry* 102: 106–114
- Mattoo AK, Handa AK (2008) Higher polyamines restore and enhance metabolic memory in ripening fruit. *Plant Sci* 174: 386–393
- 水野彩夏 (2014) トマトにおける ABC トランスポーターのゲノムワイド解析および個別機能解析 名古屋大学大学院生命農学研究科 修士論文
- Molinier J, Ramos C, Fritsch O, Hohn B (2004) CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 1633–1643

- Moons A (2003) Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Lett* 553: 370–376
- Moons A (2008) Transcriptional profiling of the PDR gene family in rice roots in response to plant growth regulators, redox perturbations and weak organic acid stresses. *Planta* 229: 53–71
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35: W182–W185
- Navarre C, Sallets A, Gauthy E, Maîtrejean M, Magy B, Nader J, Pety de Thozée C, Crouzet J, Batoko H, Boutry M (2011) Isolation of heat shock-induced *Nicotiana tabacum* transcription promoters and their potential as a tool for plant research and biotechnology. *Transgenic Res* 20: 799–810
- Negri AS, Prinsi B, Rossoni M, Failla O, Scienza A, Cocucci M, Espen L (2008) Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics* 9: 378
- 西川 豊・富森聡子・輪田健二・近藤宏哉 (2011) 栽培条件の違いがブドウ果皮中のレスベラトロール含量に及ぼす影響. *園学研*. 10: 249–253
- Oda K, Otani M, Uraguchi S, Akihiro T, Fujiwara T (2011) Rice ABCG43 is Cd inducible and confers Cd tolerance on yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1211–1213.
- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci* 27: 587–593.
- Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci* 25: 291–299
- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A (2011) The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol* 190: 113–124.
- Pastore C, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M, Tornielli GB, Filippetti I (2013) Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine. *BMC Plant Biol* 13: 30
- Pastore C, Zenoni S, Tornielli GB, Allegro G, Dal Santo S, Valentini G, Intriери C, Pezzotti M, Filippetti I

- (2011) Increasing the source/sink ratio in *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening. *BMC Genomics* 12: 631
- Perazzolli M, Moretto M, Fontana P, Ferrarini A, Velasco R, Moser C, Delledonne M, Pertot I (2012) Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* 13: 660
- Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A (2013) Plant flavonoids--biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int J Mol Sci* 14: 14950–14973
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O (2003) Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J Agric Food Chem* 51: 5488–5492
- Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 11: 117
- Pontin MA, Piccoli PN, Francisco R, Bottini R, Martinez-Zapater JM, Lijavetzky D (2010) Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L) cv Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biol* 10: 224
- Prasad R, Goffeau A (2012) Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 66: 39–63
- Quackenbush J (2001) The TIGR gene indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Res* 29: 159–164
- Quintieri AM, Baldino N, Filice E, Seta L, Vitetti A, Tota B, De Cindio B, Cerra MC, Angelone T (2013) Malvidin, a red wine polyphenol, modulates mammalian myocardial and coronary performance and protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *J Nutr Biochem* 24: 1221–1231
- Rea PA (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347–375.

- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* 6:27
- Renaud S, De Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523–1526
- Rienth M, Torregrosa L, Kelly MT, Luchaire N, Pellegrino A, Grimplet J, Romieu C (2014a) Is transcriptomic regulation of berry development more important at night than during the day? *PLoS One* 9: e88844
- Rienth M, Torregrosa L, Luchaire N, Chatbanyong R, Lecourieux D, Kelly MT, Romieu, C (2014b) Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biol* 14: 108
- Rost B, Sander C (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 232: 584–599
- Ruzicka K, Strader LC, Bailly A, Yang H, Blakeslee J, Langowski L, Nejedlá E, Fujita H, Itoh H, Syono K, Hejácíko J, Gray WM, Martinoia E, Geisler M, Bartel B, Murphy AS, Friml J (2010) Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10749–10753.
- Saito K, Matsuda F (2010) Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol* 61: 463–489
- 佐藤充克・長尾明利・西裕・有泉一征・八木佳明・大塚謙一 (1994) ブドウ果汁のアミノ酸組成による品種類縁生およびアンペログラフィーによる分類との相関. *ASEV Jpn Rep* 5: 202–214
- 阪本浩嗣 (2015) マルチオミクスによるブドウ二次代謝産物蓄積機構の解明および新奇輸送体の探索 名古屋大学大学院生命農学研究科 修士論文
- Sakurai N, Ara T, Ogata Y, Sano R, Ohno T, Sugiyama K, Hiruta A, Yamazaki K, Yano K, Aoki K, et al (2011) KaPPA-View4: a metabolic pathway database for representation and analysis of correlation networks of gene co-expression and metabolite co-accumulation and omics data. *Nucleic Acids Res* 39: D677–D684

- Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* 518: 164–168
- Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, Akiyama K, Sakurai T, Matsuda F, Aoki T, Hirai MY, Saito K (2012) RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* 82: 38–45
- Schenke D, Sasabe M, Toyoda K, Inagaki YS, Shiraishi T, Ichinose Y (2003) Genomic structure of the NtPDR1 gene, harboring the two miniature inverted-repeat transposable elements, NtToyal and NtStowaway101. *Genes Genet Syst* 78: 409–418
- Schoonbeek H, Del Sorbo G, De Waard MA. (2001) The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 562–571
- Seo S, Gomi K, Kaku H, Abe H, Seto H, Nakatsu S, Neya M, Kobayashi M, Nakaho K, Ichinose Y, Mitsuhara I, Ohashi Y (2012) Identification of Natural Diterpenes that Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 53: 1432–1444
- 白武勝裕 (2007) ポストゲノム時代の園芸学. 山木昭平 編. 園芸生理学. 文永堂出版: pp. 289-293
- Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G (2005) METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Therapeutic Drug Monitoring* 27: 747–751
- Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18: 731–746
- Sternad Lemut M, Sivilotti P, Franceschi P, Wehrens R, Vrhovsek U (2013) Use of metabolic profiling to study grape skin polyphenol behavior as a result of canopy microclimate manipulation in a “Pinot noir” vineyard. *J Agric Food Chem* 61: 8976–8986
- Steyn WJ (2009) Prevalence and Functions of Anthocyanins in Fruits. In: Winefield C, Davies K, Gould K, (eds), *Anthocyanins*, Springer, New York, pp 45, 86–105

- Strader LC, Bartel B (2009) The Arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Plant Cell* 21: 1992–2007
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* 139: 341–352
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, et al. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3: 211–221
- Sweetman C, Wong DC, Ford CM, Drew DP (2012) Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics* 13: 691
- Takayanagi T, Okuda T, Mine Y, Yokotsuka K (2004) Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. *J Japan Soc Hortic Sci* 73: 193–199
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739
- Tohge T, Kusano M, Fukushima A, Saito K, Fernie AR (2011) Transcriptional and metabolic programs following exposure of plants to UV-B irradiation. *Plant Signal Behav* 6: 1987–1992
- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641
- Trombik T, Jasinski M, Crouzet J, Boutry M (2008) Identification of a cluster IV pleiotropic drug resistance transporter gene expressed in the style of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 66: 165–175
- Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, Lewis NG (2011) The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta* 233: 439–470
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S,

Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Lepié JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604.

Underwood W, Somerville SC (2013) Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the Arabidopsis PEN3 transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 12492–12497

Van den Brûle S, Smart CC (2002) The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* 216: 95–106

van den Brûle S, Müller A, Fleming AJ, Smart CC (2002) The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J* 30: 649–662

Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, et al (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326

Venturini L, Ferrarini A, Zenoni S, Tornielli GB, Fasoli M, Dal Santo S, Minio A, Buson G, Tononi P, Zago ED, et al (2013) De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity. *BMC Genomics* 14: 41

Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL (2008) Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* 13: 151–159

Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulivo C (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem*

49: 5531–5536

- Vitulo N, Forcato C, Carpinelli EC, Telatin A, Campagna D, D'Angelo M, Zimbello R, Corso M, Vannozzi A, Bonghi C, et al (2014) A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. *BMC Plant Biol* 14: 99
- Wan CY, Wilkins TA (1994) A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Anal Biochem* 223: 7–12
- Wan D, Li R, Zou B, Zhang X, Cong J, Wang R, Xia Y, Li G (2012) Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 31: 1269–1281
- Wang L, Tsuda K, Truman W, Sato M, Nguyen le V, Katagiri F, Glazebrook J (2011) CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *Plant J* 67: 1029–1041
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2005) cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv Shiraz) berry skin. *Funct Integr Genomics* 5: 40–58
- Xie Y, Xu D, Cui W, Shen W (2012) Mutation of Arabidopsis HY1 causes UV-C hypersensitivity by impairing carotenoid and flavonoid biosynthesis and the down-regulation of antioxidant defence. *J Exp Bot* 63, 3869–3883
- Xin XF, Nomura K, Underwood W, He SY (2013) Induction and suppression of PEN3 focal accumulation during *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection of Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 861–867
- Xu W, Li R, Zhang N, Ma F, Jiao Y, Wang, Z (2014) Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress. *Plant Mol Biol* 86: 527–541
- Yazaki K (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* 580: 1183–1191
- Yazaki K, Shitan N, Sugiyama A, Takanashi K (2009) Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. *Int Rev Cell Mol Biol* 276: 263–299

- Young PR, Lashbrooke JG, Alexandersson E, Jacobson D, Moser C, Velasco R, Vivier MA (2012) The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genomics* 13: 243
- Zamboni A, Di Carli M, Guzzo F, Stocchero M, Zenoni S, Ferrarini A, Tononi P, Toffali K, Desiderio A, Lilley KS, et al (2010) Identification of putative stage-specific grapevine berry biomarkers and omics data integration into networks. *Plant Physiol* 154: 1439–1459
- Zamboni A, Gatto P, Cestaro A, Pilati S, Viola R, Mattivi F, Moser C, Velasco R (2009) Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC genomics* 10: 363
- Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, Xumerle L, Fasoli M, Malerba G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M (2010) Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant Physiol* 152: 1787–1795

報文目録

主論文

- (1) Mami Suzuki, Michal Jasinski, Enrico Martinoia, Ryo Nakabayashi, Makoto Suzuki, Kazuki Saito and Katsuhiko Shiratake. Molecular cloning and characterization of ABCG/PDRtype ABC transporter in grape berry skin. *Advances in Horticultural Science* 28; 53-63
- (2) Mami Suzuki, Ryo Nakabayashi, Yoshiyuki Ogata, Nozomu Sakurai, Toshiaki Tokimatsu, Susumu Goto, Makoto Suzuki, Michal Jasinski, Enrico Martinoia, Shungo Otagaki, Shogo Matsumoto, Kazuki Saito and Katsuhiko Shiratake. Multi omics in grape berry skin revealed specific induction of stilbene synthetic pathway by UV-C irradiation. *Plant Physiology* (provisional acceptance)
- (3) Mami Suzuki, Ryo Nakabayashi, Tetsuya Mori, Kazuki Saito and Katsuhiko Shiratake. The metabolic profile of grape berry skin and a comparison of metabolomes before and after ripening. (submitted)

参考論文

- (1) 鈴木真実, 松尾誠治, 梅田大樹, 岩崎泰永. (2014) CO₂施用時の高い相対湿度がキュウリの生育や、光合成速度、窒素含量に及ぼす影響. *日本冷凍空調学会論文集* 31: 331-337.