

‘Pinot Gris’で起こる枝変わりの分子機構

○降矢映美¹・鈴木俊二¹・末田有²・高柳勉¹ (1山梨大ワイン研セ, 2丹波ワイン)

局的突然変異である枝変わりは特定の形質のみ変化するため、ブドウの新品種育種に大きな役割を果たしてきた。しかし、枝変わりの頻度は非常に低く、その分子機構も未解明であるため、分子機構解明による新品種育種への応用が期待される。本研究では、Pinot Grisで起こる枝変わりの分子機構に関する知見を報告する。赤ブドウ品種であるPinot Gris (P.G)において、部分的に白ブドウが実る枝変わり(P.GW)を材料とした(Fig.1)。P.G、P.GWの成分分析を行った結果、アントシアニン量の違いが認められた(Fig.3)。遺伝子発現解析により、P.GWではアントシアニン合成酵素UFGTが発現していないことが明らかとなった(Fig.4)。UFGTの発現は、転写因子Mybによって制御されるため、次にMyb遺伝子VvmybA1の構造解析を行った。その結果、P.GWはVvmybA1の前にレトロトランスポゾンのような挿入がある、もしくはMyb alleleの一部が欠失していることが推測された(Fig.6)。加えて、マイクロサテライト分析から、P.G、P.GWの果粒ともL1細胞とL2細胞が存在することが明らかとなった。そこで、CAPSマーカー20D18CB9を用いてMyb alleleの解析を行ったが、P.GとP.GWで違いが認められなかった(Fig.8)。次に、CAPSマーカー103K2CB10を用いて解析を行った。その結果、P.Gでは赤ブドウ由来alleleのバンドが認められたが、P.GWでは赤ブドウ由来alleleのバンドが検出されなかった(Fig.8)。最近、ブドウ果皮色の枝変わり分子機構として、白ブドウ由来allelesのみを持つL2細胞が赤ブドウ由来alleleを持つL1細胞に転位することによって、果皮色の変化が引き起こされるというメカニズムが提唱された(Amanda R et al.2006)。しかし、P.G.WはL1細胞に赤ブドウ由来alleleを持っていることから、L2細胞の転位ではなく、赤ブドウ由来Myb alleleの一部に欠失が起きたことで、転写因子VvmybA1の発現が抑えられ、その結果アントシアニン合成の抑制、果皮色の変化が誘導されたと結論付けた。



Fig.1 実験材料
Vitis vinifera cv. Pinot Gris (P.G)の一部の枝に、白色の果皮を持つ房が実る枝変わり(P.GW) (矢印)。

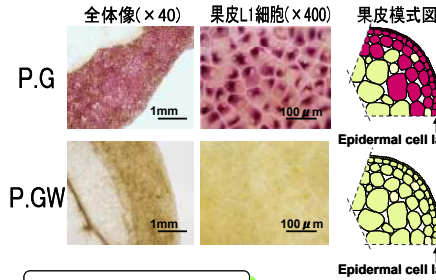


Fig.2 果皮の顕微鏡写真

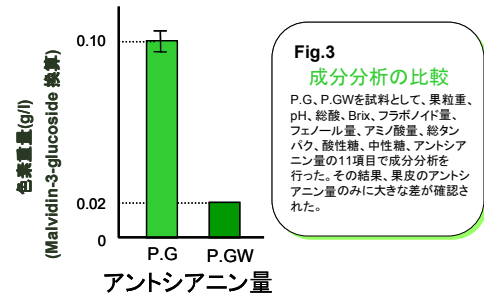


Fig.3 成分分析の比較
P.G、P.GWを試料として、果粒重、pH、総酸、Brix、フラボノイド量、フェノール量、アミノ酸量、総タンパク、酸性糖、中性糖、アントシアニン量の11項目で成分分析を行った。その結果、果皮のアントシアニン量の違いが確認された。

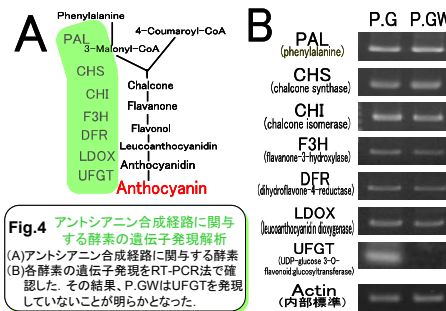


Fig.4 アントシアニン合成経路
(A)アントシアニン合成経路に参与する酵素の遺伝子発現解析 (B)各酵素の遺伝子発現をRT-PCR法で確認した。その結果、P.GWではUFGTを発現していないことが明らかとなった。

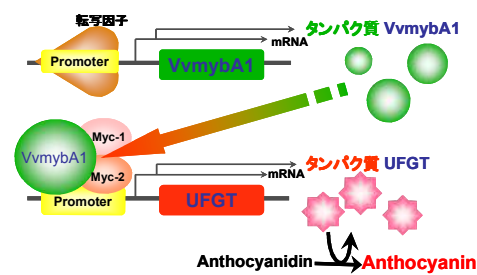


Fig.5 UFGTの発現様式

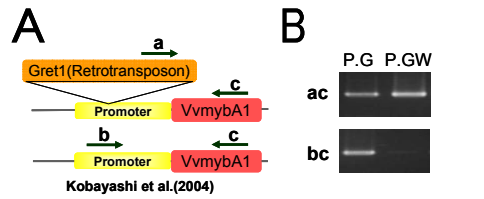


Fig.6 Myb遺伝子解析
(A)UFGTの制御遺伝子VvmybA1におけるPrimer地図 (B)(A)で示したPrimer ac、Primer bcの組み合わせによるPCRの結果。Primer acではP.G、P.GWともバンドが増幅されたが、P.GWではPrimer bcによる増幅は認められなかった。

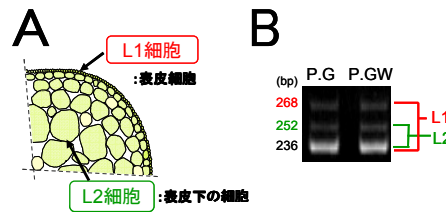


Fig.7 マイクロサテライトマーカー-VVMD32を用いたMyb対立遺伝子表現型の解析
(A)ブドウにおけるL1細胞とL2細胞の関係 (B)VVMD32を用いたマイクロサテライト分析からP.G、P.GWの果粒ともL1細胞とL2細胞から構成されている。0.6%アクリルアミドを使用。

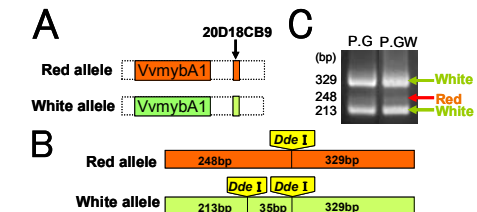


Fig.8 CAPSマーカー-20D18CB9を用いたMyb対立遺伝子表現型の解析
(A)赤あるいは白ブドウ由来Myb対立遺伝子と連座するCAPSマーカー20D18CB9 (B)20D18CB9の制限酵素切断サイトとサイズ (C)2.5%アガロースゲル泳動結果

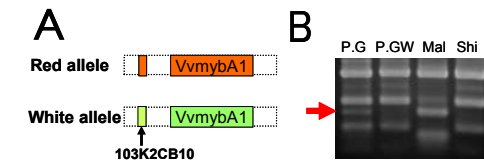
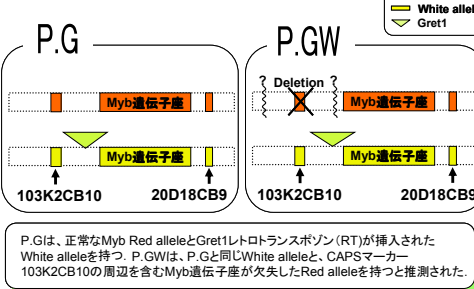
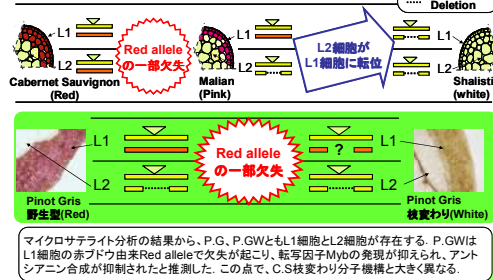


Fig.9 CAPSマーカー-103K2CB10を用いたMyb対立遺伝子表現型の解析
(A)赤あるいは白ブドウ由来Myb対立遺伝子と連座するCAPSマーカー103K2CB10(Amanda et al. 2007) (B)2.5%アガロースゲル泳動結果。103K2CB10をPCRで増幅後、制限酵素Taq Iで切断した。Malbec (Mal)は、Red allelesのパターン、Shiraz (Shi)はWhite allelesのパターンを示す(Amanda R.Walker et al. 2007)。PGIは、Malbecと同じ位置にバンドが見られるが(矢印)、PGWIにはこのバンドは認められなかった。

Conclusion 1



Conclusion 2



Reference:

- A.R. Walker, E. Lee, S.P. Robinson (2006) Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-colored berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry color locus. *Plant Mol. Biol.* 62:623-635
- A.R. Walker, E. Lee, J. Bogs, D.A.J. McDavid, M.R. Thomas, S.P. Robinson (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.* 49:772-785
- S. Kobayashi, N. Goto-Yamamoto, H. Hirochika (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304:982-982