

塩ストレス応答性プロリン合成系を利用した国産ワイン品質向上戦略

鈴木 俊二

山梨大学大学院医学工学総合研究部附属ワイン科学研究センター

概要 ワイン醸造において、果汁に含まれるプロリンはワイン酵母によって資化されないため、ブドウ果実中のプロリン量がそのままワイン中に保持される。ワインの品質においてプロリンは厚みや苦み、甘味に関与しているといわれており、ワイン中のプロリン量がワインの品質に影響を及ぼすのは間違いない。一方、植物は環境ストレス下で細胞中のプロリン量を調整することで恒常性を維持するメカニズムを有している。本研究では、ワイン醸造用ブドウを材料とし、塩ストレスがプロリン合成をどのように制御しているのか、その分子メカニズムを解明することによって、ブドウ果実中のプロリン合成量を人為的に調節するブドウ栽培技術の基盤形成を目指した。

ブドウ培養細胞、切葉および鉢植えブドウ樹に NaCl 溶液を用いて塩ストレス処理を負荷した結果、いずれの供試材料においてもプロリン合成系のキー酵素である delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) をコードする遺伝子 (*P5CS1*, *P5CS2*) の発現が活性化され、供試材料のプロリン量もまた増加した。特筆すべき研究成果として、ベレブーン期 (果実の成熟開始期) を迎えたブドウ樹の土壌に NaCl (土壌 1 kg あたりの塩濃度 500 mg) を一度処理するだけで、収穫期の果実に含まれるプロリン量を増加させることが可能であることを見出した。一方、NaCl の葉面散布では葉の枯死や早期落葉が認められたため、葉面散布はブドウ樹への塩ストレス負荷方法としては適していないと判断した。*P5CS* プロモーターを用いたプロモーターアッセイを行った結果、*P5CS1* プロモーターは塩ストレス応答性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、*P5CS* の遺伝子発現は塩ストレス応答性プロモーターに制御されており、ブドウ樹に塩ストレスが負荷されると *P5CS* の発現が活性化され、その結果プロリン量が増加すると結論付けた。今後、本研究で得られた知見をブドウ栽培へ活用するために、圃場レベルで塩ストレス負荷方法あるいは塩ストレス緩和方法を検討する。これらの栽培技術によりブドウ果汁中に含まれるプロリン量を人為的に調節することができれば、高品質な国産ワイン醸造につながるものと確信する。

1. 研究目的

日本では、主に食用ブドウの栽培が盛んに行われており、毎年約 20 万トンものブドウが収穫されている。このうち山梨県は 25% のブドウ生産量を占め、全国 1 位である (農林水産省調べ)。海外からは、日本の食用ブドウは高品質であると評価されており、アジアへの輸出量が近年右肩上がり増加している。一方、日本ではワイン醸造も行われており、年間約 8 万キロリットルのワインが生産されている。山梨県はワインの名醸造地としても知られ、年間約 2 万キロリットルものワインを醸造している (国税庁調べ)。しかし、実のところ、国産ワインの原料の約 8 割程度は濃縮果汁な

どの輸入原料に頼っており、日本で消費されるワインのうち、原料ブドウから国内で生産されているものは一割にも満たない状況にある。

ワイン醸造に用いられるブドウ品種は、*Vitis vinifera* に属するブドウであり、シャルドネ、ピノ・ノールやカベルネ・ソーヴィニオンなど、フランスやイタリアなどのヨーロッパ各国、アメリカやチリなどのワイン新興国で活発に栽培されている。これらのブドウ品種は日本でも栽培されているが、世界的に有名な名醸造地と比較すると、決して高品質な醸造用ブドウ果実が我が国で生産されているとは言えない。そのため、日本のワイン生産は醸造技術により、

ワインの品質を支えてきた時代が続いた。しかし、日本で醸造されるワインの更なる品質向上のためには、良質な醸造用ブドウを栽培することから始めることが重要であった。このような背景を受け、近年において醸造用ブドウの栽培に力を入れるワインメーカーは枚挙に暇がなく、国産ワインの品質は年々向上している。

ブドウ栽培において、品種や系統、仕立て法、剪定法、台木の種類などの組合せは無限にあり、ブドウ栽培家、ワインメーカーによって様々工夫されている。例えば、仕立て法だけでも、垣根仕立て、棚仕立て、棒仕立て、株仕立てなど数種類の方法がある。これらの仕立て法の違いは、樹勢、葉面や果房への日射量、降雨後の果房の乾き具合などに影響を及ぼす(岡本 1998)。また、仕立て後の新梢の誘引方法の違いが光合成量や果汁の糖度に影響を与えるとも言われている(山川 1997)。これらの報告から類推すれば、ブドウの栽培方法の違いによりブドウ樹に負荷される紫外線や水分ストレス、温度などの環境ストレスに差が生じ、結果として環境ストレスの多少によりブドウ果実の品質に差が生じると推察できる。事実、白ワインに柑橘系の香りを付与する 3-メルカプトヘキサノールのブドウ果実における蓄積量は栽培環境により変化し(Kobayashi *et al.* 2010)、ブドウ樹へ環境ストレスを付加することによりその合成量を増加することが可能である(Kobayashi *et al.* 2011)。このように、良質な国産ワインの開発にはブドウ栽培に関する研究開発が必須であり、そのひとつのキーワードがブドウ樹への環境ストレス負荷技術の開発である。

本研究プロジェクトの最終目標は、塩ストレスがブドウのプロリン合成に及ぼす影響を検討し、塩ストレス応答性プロリン合成系を制御することにより国産ワインの品質向上に向けた技術開発を提案することである。プロリンは植物

細胞の浸透圧調節物質である。例えば、低温ストレスや塩ストレス等の浸透圧に関連する環境ストレスが植物に負荷されると、植物細胞のプロリン合成系に制御がかかる。その結果、プロリン量が調節され、植物細胞の浸透圧を適正化し、低温ストレスや塩ストレス等の環境ストレスが負荷される環境下であっても植物は恒常性を維持することができる。ワイン醸造において、ブドウ果実に含まれるアミノ酸はワイン酵母により資化されるが、プロリンはワイン酵母によって資化されることはないため、果汁中のプロリンはそのままワインに含有する(吉沢 1991, 大塚 1981)。ワインの品質におけるプロリンの評価は、科学的根拠が未だ報告されていないため、賛否両論ではあるが、ワイン中にある一定量プロリンが含まれていると、ワインに甘味や厚み(山口 1999)、あるいは苦み(河合 2006)を与えられている。したがって、ブドウ果実中のプロリン含有量はワインの味やワインを口に含んだ時の質感に直接的な影響を与えているのは間違いない。

本研究は、ブドウ果実中のプロリン合成量を調整することができる新たなブドウ栽培法の基盤を形成するために実施するものである。Fig. 1 に示したように、植物のプロリン代謝経路において、delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) はプロリン合成のキー酵素である。塩ストレスを負荷したシロイヌナズナでは P5CS 遺伝子発現量が増加し、プロリン量が増加する(吉羽ら 1997)。本研究では塩ストレスを負荷したブドウにおける P5CS 遺伝子発現量およびプロリン量の変化を検討し、塩ストレス応答性プロリン合成系がブドウにも備わっており、塩ストレスはプロリン合成系を活性化させることを証明した。次に、プロモーターアッセイにより、ブドウ P5CS 遺伝子プロモーターが塩ストレス応答性を示すことを証明した。



Fig. 1. Proline metabolism in plant. P5CS, delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase; P5CD, 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; P5CR, 1-pyrroline-5-carboxylate reductase; PDH, 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; Intermediate product, L-Glutamaye-5-semialdehyde/ L-1-Pyrroline-5-carboxylate

2. 研究方法

2.1 供試材料

山梨大学ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門にて継代培養しているブドウ培養細胞を用いた。ガンボーク B5(GB)液体培地で3日間培養した培養細胞を使用した。同センター附設育種試験地で栽培されているシャルドネ(樹齢25年)から採取した切葉(2013年8月14日に採取)と、同センター前で栽培されている鉢植えのシャルドネおよびカベルネ・ソーヴィニオン(いずれも樹齢3年)を供試した。

2.2 塩ストレス処理

2.2.1 培養細胞への塩ストレス処理

GB培地で3日間振とう培養した培養細胞30 mLに最終濃度が4 mMになるようNaClを添加し、1、4、10時間、塩ストレスを負荷した。コントロールとして無処理の培養細胞を用いた。

2.2.2 切葉への塩ストレス処理

葉柄から切り落とした葉を切葉とし、塩ストレス処理を行った。切葉は、16 day / 8 nightの光条件下、26°Cで1日水に挿した後、同様の光条件下で200 mM NaCl溶液に1、4、10時間挿し、塩ストレスを負荷した。コントロールとして水に挿した切葉を用いた。

2.2.3 鉢植えブドウへの塩ストレス処理

ベレーズン期の鉢植えブドウ樹(シャルドネおよびカベルネ・ソーヴィニオン)の土壤に塩ストレス処理を行った。ベレーズン期(シャルドネ:2013年7月23日、カベルネ・ソーヴィニオン:2013年8月2日)に入ったことを確認後、土壤1 kgあたりの塩濃度が100 mgあるいは500 mgになるようにNaCl溶液を土壤に添加した。コントロールとして、無処理の鉢植えブドウ樹を用いた。シャルドネでは、7月23日から収穫日の8月23日まで、葉はおおよそ1週間おきに、果実は7月23日、30日、8月6日、23日にサンプリングした。カベルネ・ソーヴィニオンでは収穫日である9月19日に果実をサンプリングした。

鉢植えのシャルドネに関しては、NaCl溶液の葉面散布処理も実施した。ベレーズン期に入った7月23日、8月2日、9日、19日に、100 mMあるいは500 mM NaCl溶液をブドウ樹1本あたり100 mL散布した。コントロールの鉢植えブドウ樹には水を散布した。8月23日に果実をサンプリングした。

2.3 RNA抽出および遺伝子発現解析

各サンプルを液体窒素下で破碎した。ブドウは多糖類、ポリフェノール類などの夾雑物が多いため、Fruit-mate for RNA Purification (TaKaRa)による前処理を行った後、NucleoSpin RNA Plant (TaKaRa)のプロトコールに従ってRNAを抽出した。Primer Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa)のプロトコールに従い、RNAからcDNAを合成した。

P5CS(*P5CS1* および *P5CS2*) 遺伝子の発現解析は、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)のプロトコールに従い、リアルタイム RT-PCRにより実施した。供試したブドウに塩ストレスが負荷されたかを判断するため、塩ストレスマーカーとして、*V. vinifera* acyl-CoA-binding protein (Takato *et al.* 2013, 以下、ACBPと略記) 遺伝子を用いた。内部標準として *V. vinifera* β-アクチン遺伝子の発現量もリアルタイム RT-PCRにより測定した。内部標準の発現量によりサンプル間の差を調整し、各遺伝子の発現量を相対値で表した。本研究で使用したプライマーの塩基配列は以下の通りである。

P5CS1-forward primer:

5'-ATCAGGTGCTGTTGGCCTTG-3'

P5CS1-reverse primer:

5'-GATGGTAAGGCGTGTGCAGC-3'

P5CS2-forward primer:

5'-CAGAAGTTTATGGGAGCGAAGAG-3'

P5CS2-reverse primer:

5'-TGAAGGTGGAGAGGGTGGGA-3'

ACBP-forward primer:

5'-GTGCCGGTTTTGCCTTC-3'

ACBP-reverse primer:

5'-TCCTCACTCTCCAACCTCCCTCT-3'

β-actin-forward primer:

5'-CAAGAGCTGGAACTGCAAAGA-3'

β-actin-reverse primer:

5'-AATGAGAGATGGCTGGAAGAGG-3'

2.4 プロリン量の測定

各サンプルを液体窒素下で破碎した。破碎物に0.1% HClを添加し、混和した後、50°C、暗所で4時間静置した。遠心後、上清を0.45 μm シリンジフィルターに通し、抽出液を得た。果汁に関しては、0.45 μm シリンジフィルターに

通した果汁濾液をアミノ酸分析に供試した。L-8900 高速アミノ酸分析計(HITACHI)に抽出液および果汁濾液を供試し、プロリンを含むアミノ酸を定量した。データの解析には EZ Chrome Elite (Scientific Software)を使用した。

2.5 P5CS プロモーターアッセイ

ピノ・ノアール (*V. vinifera* cv. Pinot Noir) の葉から DNeasy Plant Mini Kit (TaKaRa) を用いてゲノム DNA を抽出した。P5CS1 および P5CS2 プロモーター領域を増幅するプライマー (5'末端に *Hind* III あるいは *Xba* I の制限酵素サイトを付加) を用いてゲノム DNA からプロモーター領域を増幅した。増幅されたプロモーター領域は pBI121 プラスミドの *Hind* III および *Xba* I サイトにライゲーションし、プロモーターアッセイ用の形質転換ベクターを得た。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株) を用いて形質転換ベクターをタバコ培養細胞 BY-2 細胞 (理化学研究所から分譲) に導入した。4 mM NaCl が添加さ

れた液体培地中で形質転換された BY-2 細胞を 28°C、暗所で 4 時間培養し、塩ストレス処理を施した。BY-2 細胞を遠心により集め、90%アセトンを加えた。氷上で 15 分間静置した後、アセトンを取り除き、細胞を洗浄した。β-グルクロニダーゼ (GUS) 染色試薬を細胞に添加し、37°C の減圧下で 1 時間浸透させた。GUS 染色試薬を取り除き、100% エタノールを添加し 5 分間脱色した後、BY-2 細胞中のインジゴチン色素沈着量を評価した。

3. 研究結果

3.1 培養細胞における塩ストレス条件下での P5CS の発現変動とプロリン量の変化

塩ストレス処理を施した培養細胞では、無処理の培養細胞と比較し、塩ストレスマーカー遺伝子 *ACBP* の発現量が増加した (Fig. 2A)。この結果は、本研究で使用した塩ストレス処理方法により培養細胞に塩ストレスが負荷され

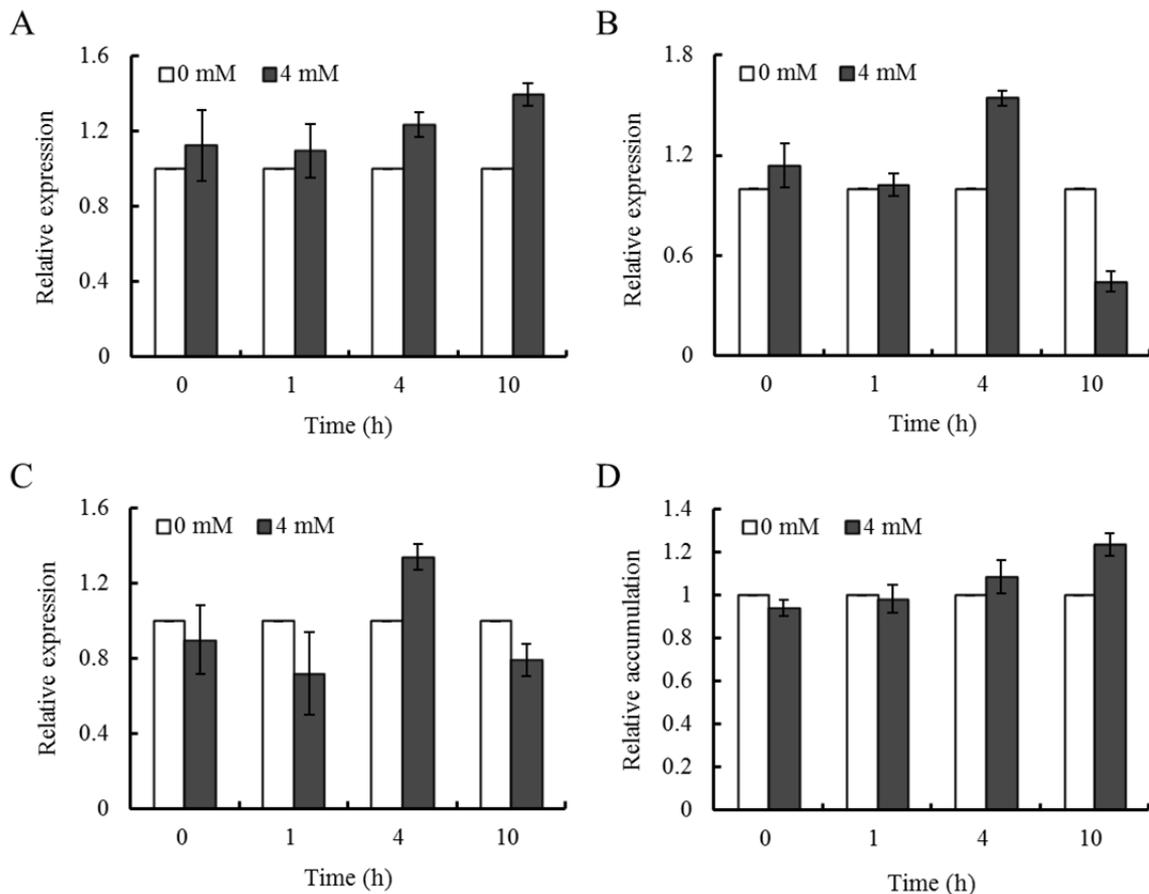


Fig. 2. P5CS expression and proline accumulation in grape cultured cells treated with NaCl. (A) *ACBP* expression. (B) *P5CS1* expression. (C) *P5CS2* expression. (D) Proline accumulation. Bars indicate means \pm standard deviations of three independent experiments.

たことを示唆した。ブドウの全ゲノム情報を解析した結果、ブドウには *P5CS1* (GenBank accession no. XM_002282319) と *P5CS2* (GenBank accession no. XM_002273220) の2つの *P5CS* 遺伝子が存在することが明らかになった。塩ストレス処理を4時間施した培養細胞における *P5CS1* 発現量は、無処理の培養細胞と比較し、1.6倍程度増加した (Fig. 2B)。同様に、*P5CS2* 発現量も無処理の培養細胞と比較し1.4倍程度高くなった (Fig. 2C)。塩ストレス処理を施した培養細胞におけるプロリン量の変化を Fig. 2D に示した。塩ストレス処理から4時間後にプロリン量が増加し始め、10時間後のプロリン量はコントロールと比較し約1.2倍であった。

以上の結果から、培養細胞に塩ストレスを負荷すること

により、*P5CS* 遺伝子の発現量が増加し、それに伴いプロリン量が増加することが明らかとなった。

3.2 ブドウ切葉における塩ストレス条件下での *P5CS* の発現変動とプロリン量の変化

塩ストレス処理を施した切葉でも、*ACBP* 発現量は増加した (Fig. 3A)。この結果は、本研究で使用した塩ストレス処理方法により切葉に塩ストレスが負荷されたことを示唆した。塩ストレス処理による *P5CS1* および *P5CS2* の発現量の増加は切葉においても認められた (Figs. 3B, 3C)。塩ストレス処理を施した切葉では、塩ストレス処理から4時間はプロリン量に変化は認められなかったが、10時間後には無処理の切葉と比較し2.5倍までプロリン量が増加した (Fig. 3D)。

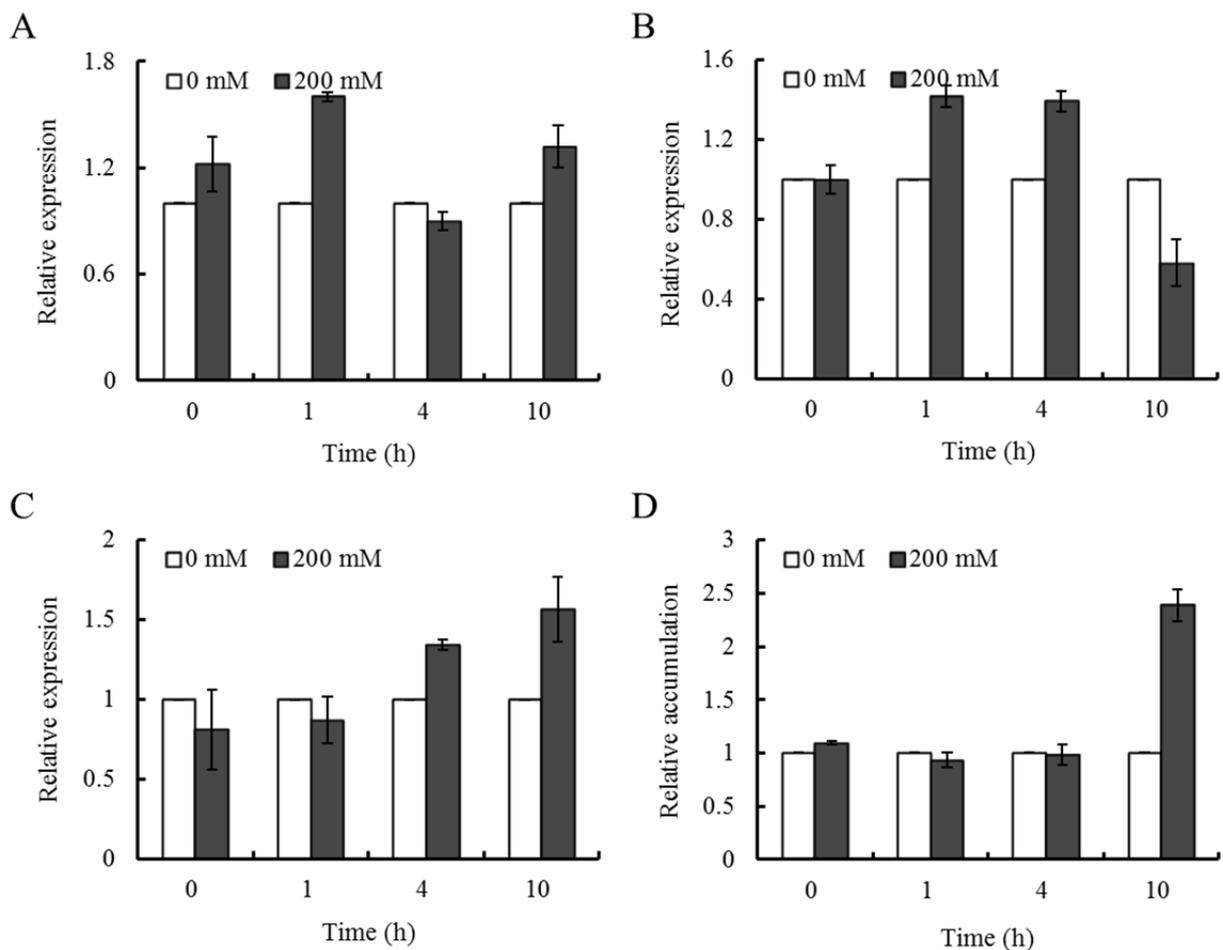


Fig. 3. *P5CS* expression and proline accumulation in detached grape leaves treated with NaCl. (A) *ACBP* expression. (B) *P5CS1* expression. (C) *P5CS2* expression. (D) Proline accumulation. Bars indicate means \pm standard deviations of three independent experiments.

以上の結果から、ブドウ切葉に塩ストレスを負荷することにより、培養細胞と同様、*P5CS* 遺伝子の発現量が増加し、それに伴いプロリン量が増加することが明らかとなった。

3.3 鉢植えブドウ樹における塩ストレス条件下での *P5CS* の発現変動とプロリン量の変化

土壌 1 kg あたり 500 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのシャルドネの葉では、処理から 3 週間後の 8 月 13 日まで *ACBP* の発現量の増加が認められ、その発現量は無処理のブドウ樹の約 1.6 倍に達した (Fig. 4A)。一方、土壌 1 kg あたり 100 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのシャルドネの葉では、*ACBP* の発現増加は認められず、逆に NaCl 処理により *ACBP* の発現が減少した。以上の結果から、土壌 1 kg あたり 500

mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理することにより、鉢植えブドウ樹の葉に塩ストレスが負荷されることが示された。したがって、以下の実験では 500 mg/kg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのシャルドネを用いて検討した。

葉における *P5CS1* 発現量の増加は、塩ストレス処理を施してから 1 週間後の 7 月 30 日に認められた (Fig. 4B)。一方、塩ストレス処理による *P5CS2* の発現量の増加は認められず、逆に発現量は減少した (Fig. 4C)。葉におけるプロリン量の増加は塩ストレス負荷から 1 週間後の 7 月 30 日に認められたが (Fig. 4D)、プロリン量の増加は一時的なものであり、8 月 6 日以降はプロリン量の増加は認められなかった。

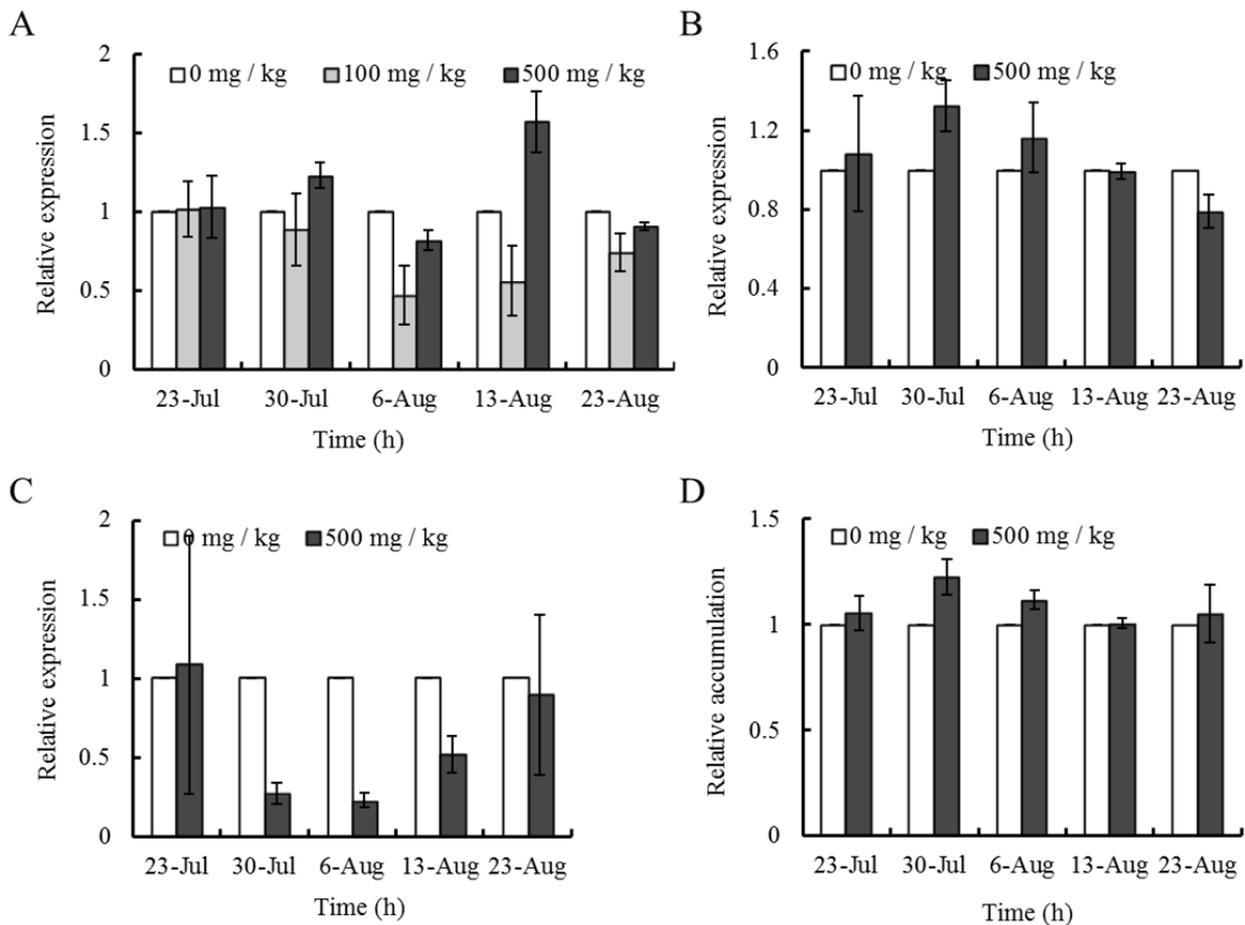


Fig. 4. *P5CS* expression and proline accumulation in grape leaves of potted grapevine treated with NaCl. (A) *ACBP* expression. (B) *P5CS1* expression. (C) *P5CS2* expression. (D) Proline accumulation. Bars indicate means \pm standard deviations of three independent experiments.

土壌 1 kg あたり 500 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのシャルドネ果実では、NaCl 処理から 1 週間後の 7 月 30 日から収穫日の 8 月 23 日まで *ACBP* の発現量の増加が認められた (Fig. 5A)。一方、土壌 1 kg あたり 100 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのシャルドネ果実では、葉と同様に *ACBP* の発現増加は認められなかった。以上の結果から、土壌 1 kg あたり 500 mg になるように NaCl 溶液を処理することにより、鉢植えブドウ樹の果実にも塩ストレスが負荷されることが明らかとなった。したがって、以下の実験では 500 mg/kg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えシャルドネを用いて検討した。

果実における *P5CS1* 発現量は、塩ストレス処理を施してから 1 週間後の 7 月 30 日に増加し始め、収穫日の 8 月 23 日には無処理のブドウ樹に比べ約 2.3 倍の発現量を示した (Fig. 5B)。*P5CS2* の発現量もまた塩ストレス処理から 1 週間後の 7 月 30 日から増加し始め、収穫日の 8 月 23

日には無処理のブドウ樹に比べ約 4.3 倍の発現量に達した (Fig. 5C)。果実(果汁)中のプロリン量は、塩ストレスを施してから 2 週間後の 8 月 6 日から増加し始め、収穫日である 8 月 23 日には無処理のブドウ樹に比べ 1.2 倍量のプロリンを蓄積した (Fig. 5D)。同様に、土壌 1 kg あたり 500 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えのカベルネ・ソーヴィニオン果実にも、収穫時期に無処理のブドウ樹に比べ 1.1 倍量のプロリンが蓄積したが、統計学上の有意差は得られなかった (data not shown)。

鉢植えのシャルドネに関しては、NaCl 溶液の葉面散布処理も実施した。収穫時期の果実におけるプロリン量は 500 mM NaCl 溶液処理を施した果実で水処理区に比べ約 1.3 倍増加した (data not shown)。しかしながら、100 mM および 500 mM NaCl 処理を施したブドウ樹では葉の枯れおよび早期落葉という葉への NaCl 処理による直接的な影響が観察された。

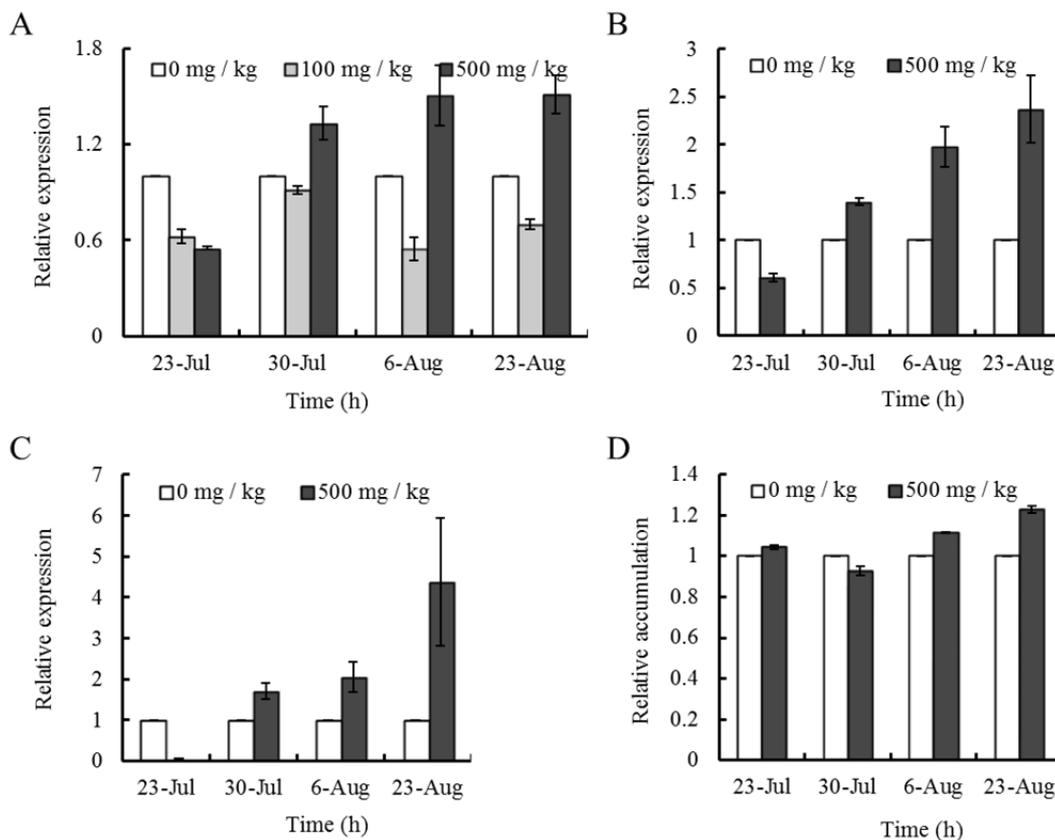


Fig. 5. *P5CS* expression and proline accumulation in grape berries of potted grapevine treated with NaCl. (A) *ACBP* expression. (B) *P5CS1* expression. (C) *P5CS2* expression. (D) Proline accumulation. Bars indicate means \pm standard deviations of three independent experiments.

3. 4 P5CS1 プロモーターは塩ストレス応答性を示す

P5CS1 プロモーターは P5CS1 の開始コドンより 10 bp 上流から、さらに上流の 1,974 bp の領域を、P5CS2 プロモーターは開始コドンから 9 bp 下流から上流の 1,185 bp の領域をアッセイに供試した (Fig. 6A)。CaMV35S プロモーター部位を制限酵素処理で欠損させた pBI121 ベクターにこれらプロモーターを連結させ、形質転換ベクターを構築した (Fig. 6A)。これらの形質転換ベクターをタバコ培養細胞 BY-2 に導入し、P5CS プロモーターの塩ストレス応答性を確認した (Fig. 6B)。野生型 BY-2 では、塩ストレスの有無に関わらず、インジゴチン色素沈着は認められなかった。一方、CaMV35S プロモーターで制御される GUS 遺伝子を導入した BY-2 形質転換体では、塩ストレスを負荷しなくても、多量のインジゴチン色素沈着が認められた。P5CS1

プロモーター形質転換体は、無処理でもわずかな青色を呈したが、塩ストレスを負荷すると、無処理と比較して、はるかに濃い青色を呈した。画像ソフト Image J を用いた画像解析の結果、塩ストレス負荷により P5CS1 プロモーター形質転換体は無処理の約 5 倍ものインジゴチン色素が沈着していることが明らかとなった (Fig. 6B)。この結果から、P5CS1 プロモーターは塩ストレス応答性を有することが示唆された。一方、P5CS2 プロモーター形質転換体は、塩ストレスが負荷されていない状態でも、多量のインジゴチン色素を沈着しており (Fig. 6B)、塩ストレスにより若干の色素沈着の増加も認められたが、無処理の細胞と比較してその量はわずかであった。この結果から、本研究で使用した P5CS2 プロモーター領域はプロモーターとしての活性はあるものの、塩ストレス応答性は示さないと判断した。

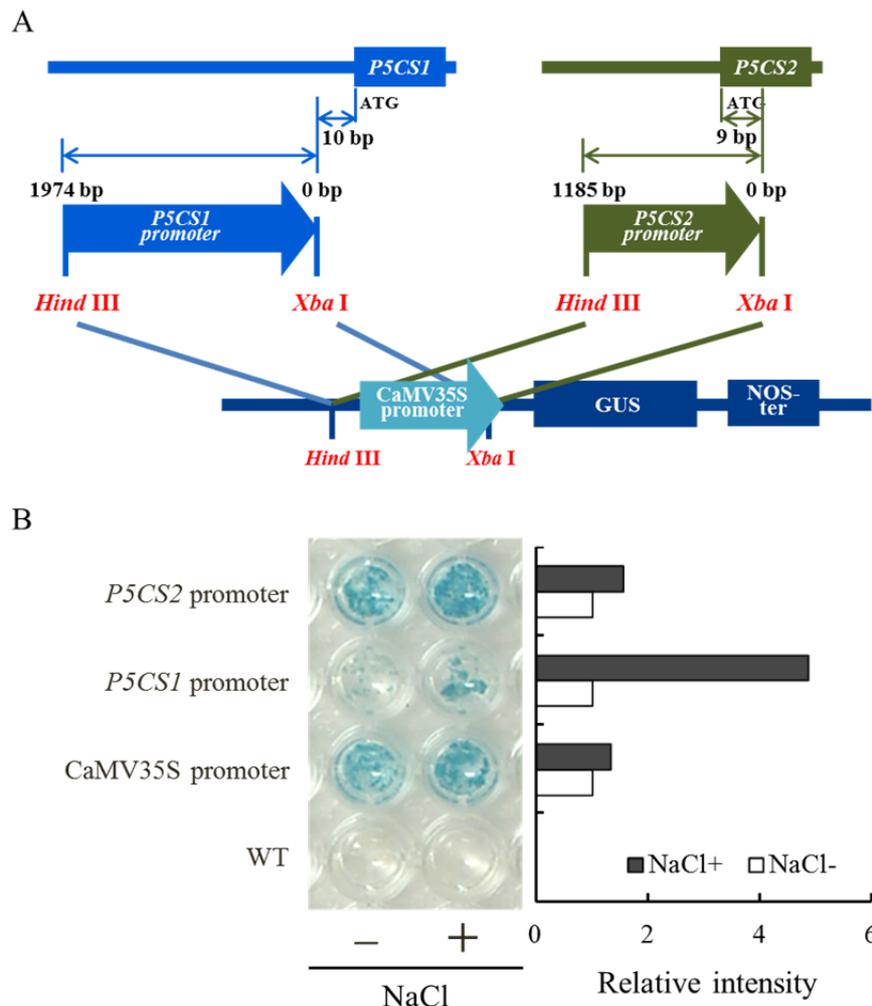


Fig. 6. P5CS promoter assay. (A) Construction of plant expression vectors for expressing P5CS promoter-driven GUS gene. (B) GUS expression by P5CS1 promoter in tobacco BY-2 cells treated with NaCl. WT, wild type.

4. 考 察

本研究では塩ストレス負荷によりブドウにおいてプロリン合成系が活性化されることを証明するために、培養細胞、切葉、鉢植えブドウ樹と3つのブドウ試料を用意した。結果として、いずれのブドウ試料においても、塩ストレスを負荷したブドウでは両 *P5CS* 遺伝子の発現量が増加し、それに伴い葉および果実中のプロリン量が増加することを見出した。これは、塩ストレスを負荷したシロイヌナズナの研究 (吉羽ら 1997) と同様の結果である。したがって、ブドウのプロリン代謝経路においても *P5CS* はプロリン合成に重要なキーストラスであり、これらの遺伝子発現が塩ストレス応答性を示すことで、塩ストレス下のブドウではプロリン蓄積量が上昇することが示唆された。

ブドウのプロリン量を調節する *P5CS* 遺伝子発現は塩ストレス応答性プロモーターに制御されているようである。本研究において、*P5CS1* プロモーターは塩ストレスに応答することが示された。一方、*P5CS2* の発現に関しては、塩ストレス応答性を判断できる直接的な結果は得られなかった。塩ストレスをブドウに負荷することにより、*P5CS2* の発現量も増加したことから、*P5CS2* 遺伝子もまた塩ストレス負荷に対する何らかの発現誘導機構を有しているのは間違いない。今回使用した *P5CS2* プロモーターは、実験に使用した制限酵素の関係上、開始コドンより約 1.2 kbp の領域しか使用できなかった (*P5CS1* プロモーターは約 2 kbp)。今後、*P5CS2* プロモーターのさらに上流の配列を解析することで、*P5CS2* プロモーターが塩ストレス応答性を有しているか再確認していきたい。

本研究では、塩ストレスマーカー *ACBP* の発現誘導によって、ブドウに塩ストレスが負荷されたか否かを判断した。したがって、*ACBP* の発現増加が認められなかった、土壌 1 kg あたり 100 mg になるように NaCl 溶液を土壌に処理した鉢植えブドウ樹は、塩ストレスが負荷されていないと判断した。この塩濃度によってブドウ樹に *ACBP* の発現増加が認められなかった要因として、ブドウは他の野菜や果樹よりも塩ストレスに強い植物であることが考えられる。一般的な野菜や果樹において、高塩濃度の目安は Cl 濃度が 500 mg/kg 土壌であると言われている。本研究ではこの塩濃度を目安として研究計画を組み立てたが、ブドウにとって土壌 1 kg あたり 100 mg の塩濃度では Cl 濃度が低かったために、*ACBP* が発現誘導される程の強いストレスが

負荷されなかったと推察した。

5. 今後の課題

本研究の成果として、土壌への NaCl 処理によりブドウ果実中のプロリン量が増加することを見出したことは非常に意義がある。本研究に係わるプロジェクトの最終目標はブドウ果実に含まれるプロリン量の人為的制御であるため、土壌の塩濃度をコントロールすることによりブドウ果実中のプロリン量を制御できる可能性を示した本研究は今後につながるものである。しかし、プロリン量の人為的制御を考えた場合、鉢植えブドウ樹を用いた解析においては更なる検討が必要である。すなわち、鉢植えブドウ樹は野外で栽培を行っていたため、*P5CS* の発現およびプロリンの生産は、塩ストレスが負荷されたことだけでなく、外的要因が影響していることも考えられる。ブドウの栽培方法はブドウ栽培家によって様々な工夫が施されている。日々の天候だけでなく、樹勢や葉面積だけに着目しても、これらの栽培環境は光合成や果汁の糖度に影響を与える外的要因となる (岡本 1998, 山川 1997)。したがって、鉢植えブドウ樹を用いた研究は、本研究の結果だけでなく、あと数回分のデータを別の年 (気象条件が異なると思われる) に取得することで、より信頼性の高いデータとして評価されるであろう。ただし、現時点においても、*P5CS* の遺伝子発現が塩ストレス応答性を有していること、塩ストレスによる *P5CS* の発現誘導がプロリン合成を促進することは間違いない。

本研究では、NaCl 溶液を混ぜた土壌でブドウ樹を栽培することにより塩ストレスを負荷した。しかし、今後、塩ストレス負荷をブドウ栽培へ活用していくためにはいくつかのハードルが存在する。例えば、土壌に添加した NaCl 溶液から遊離する Cl の残量を正確に測定できなければ、塩ストレス負荷状況を正しく把握することはできない。また土壌中の Cl がブドウ以外の環境へ与える影響についても検討が必要であろう。さらに、塩ストレス負荷技術について考えると、環境へ配慮した塩ストレスの負荷方法として、土壌へ NaCl 溶液を添加するのではなく、牡蠣殻などを土壌に埋めるなどして、安定的に塩ストレスをブドウ樹に負荷する技術開発が必要である。本研究では、手軽に NaCl を処理する方法として、NaCl 溶液の葉面散布処理を実施した。しかし、葉面散布法では葉の枯れや早期落葉を引き起こし、永年果樹であるブドウにとっては実用的な方法ではな

かった。一方、塩ストレスが負荷されない栽培環境や栽培技術が特定できれば、果汁中のプロリン量を軽減する栽培技術に結びつくことであろう。この技術開発において、ブドウ葉の *P5CSI* 遺伝子発現量を塩ストレスの負荷および低減化の指標として使用できることは本研究において証明済みである。

プロリンとワインの味に関しては、科学的根拠が未だ示されていない。しかし、ワイン中に含まれるプロリンは、厚みや甘味あるいは苦みに影響を与えられているとされており、ワインの品質に何らかの影響を及ぼしているのは間違いのない。いずれにしても、ワイン醸造用ブドウの果実中のプロリン合成量を人為的に調節することができる新たなブドウ栽培法の確立は、高品質なワイン生産に結びつくであろう。最後に、本研究は、ブドウのストレス応答性を利用した革新的ブドウ栽培技術の基盤形成に向けた第一歩になると確信する。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御助成頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究に関し多大な御助言を頂きました山梨大学ワイン科学研究センター技官 杉山啓介氏を始め、同センター果実遺伝子工学部門スタッフ一同に深謝致します。

7. 文献

河合美佐子. 2003. アミノ酸の味 その2. *Ajiko News*, No. 209.

Kobayashi H, Takase H, Kaneko K, Tanzawa F, Takata R, Suzuki S and Konno T. 2010. Analysis of S-3-(hexan-1-ol)glutathione and S-3-(hexan-1-ol)cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:176-185.

Kobayashi H, Takase H, Suzuki Y, Tanzawa F, Takata R, Fujita K, Kohno M, Mochizuki M, Suzuki S and Konno T. 2011. Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *J. Exp. Bot.* 62:1325-1336.

岡本五郎. 1998. ブドウ栽培の基礎知識. *J. ASEV Jpn.* 9:28-32.

大塚謙一. 1981. 醸造学. 養項堂.

Takato H, Shimidzu M, Ashizawa Y, Takei H and Suzuki S. 2013. An acyl-CoA-binding protein from grape that is induced through ER stress confers morphological changes and disease resistance in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 170:591-600.

山口静子. 1999. うま味の文化・UMAMIの科学. 丸善.

山川祥秀. 1997. ‘シャルドネ’の仕立て様式の違いが果汁成分の継時的変化およびマスト成分に及ぼす影響. *J. ASEV Jpn.* 8:79-86.

吉羽洋周, 清末知宏, 篠崎和子, 篠崎一雄. 1997. 総説: 植物におけるプロリン合成と水ストレス耐性. *蛋白質 核酸 酵素.* 42:842-855.

吉沢淑. 1991. *ワイン学*. 産調出版.

Quality Control of Japanese Wines by Salt-Regulated Proline Synthesis

Shunji Suzuki

The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi

Summary

A large proportion of proline in grape berries remains in wine, since wine yeasts can't assimilate proline in grape berries. Proline in wines seems to contribute to wine quality. In general, plants maintain their homeostasis by accumulating proline in the plant cells under environmental stresses. In the present study, we investigated the molecular mechanism of proline synthesis in wine grapes under salinity stress. Grape cultured cells, detached leaves and potted grapevines were treated with sodium chloride to load salinity stress. Proline concentration in the grape samples under salinity stress was higher than that of non-treated samples. The expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (*P5CS*) genes *P5CS1* and *P5CS2*, which are key enzymes of proline synthesis in plants, was upregulated in the grape samples under salinity stress. It was surprising that single soil application of sodium chloride (500 mg/kg of soil) to potted grapevines at véraison accumulated more proline content in grape berries as compared with control grapevines. In contrast, foliar application of 100 mM sodium chloride solution to potted grapevines from véraison to end of ripening induced leaf withering and early defoliation. Promoter assay demonstrated that *P5CS1* promoter is regulated by sodium chloride. Taken together, we concluded that grape cells accumulate proline by upregulation of *P5CS* transcription through salt-regulated promoter under salinity stress. The present results may provide the best information to us for improvement of cultural practices in vineyards to control proline content in grape berries.