

第2章 第4節

ブドウゲノム・遺伝子発現解析による果実成熟機構に関する研究の進展

農研機構果樹研究所 ブドウ・カキ研究領域 東 暁史

1) ブドウ果実成熟の基本機構

ブドウ (*Vitis* spp.) は果実成熟に伴う呼吸量の増加や、エチレン (ethylene) の放出がきわめて少ない非クライマクテリック型果実 (non-climacteric fruits) である。また、ブドウ果実の成長を果粒肥大の変化で表すと、モモ、オウトウ等の核果類やカキ、イチジクと同様の二重S字型成長曲線 (double sigmoid growth curve) を示す (図2-4-1)。果実の肥大過程は、開花以降に肥大が進行する第1期、肥大が停滞する第2期、再び肥大が進行する第3期の3つに分けられる。第1期では、液胞内への有機酸 [リンゴ酸 (malic acid)、酒石酸 (tartaric acid) 等] の蓄積、フラボノール (flavonol) の合成が進行する。第2期から第3期に移る時期にベレーゾン (veraison) と呼ばれる果実成熟の転換期があり、これを境に糖蓄積、有機酸含量の低下、果肉の軟化、着色系ブドウにおけるアントシアニン (anthocyanin) の蓄積が開始する (図2-4-1)。ベレーゾン以降の急激な果実内成分の変化は、様々な植物ホルモンの相互作用により制御されているが、その中でもアブシシン酸 (abscisic acid, ABA) は、果皮の着色をはじめとする果実成熟の主要な役割を担う植物ホルモンとされている。

ブドウの果実内成分は、成熟期の環境要因の影響を強く受ける。例えば、光照射は果皮アントシアニンやフラボノール等のフラボノイド (flavonoid) 合

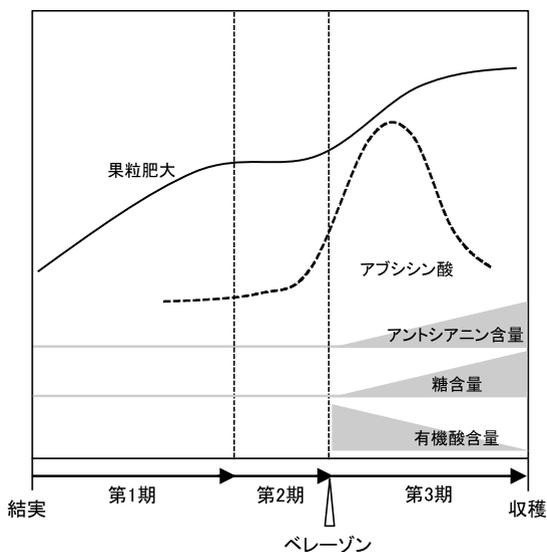


図2-4-1 ブドウの果粒肥大および果実内成分の経時変化（模式図）

果実肥大過程の第2期から第3期に移る時期にベレーゾンと呼ばれる果実成熟の転換期があり、これを境にアントシアニン蓄積、糖蓄積、有機酸含量の低下が開始する。また、アブシシン酸は果実成熟の主要な役割を担う植物ホルモンとされている。

成を促進する。また、気候温暖化による着色不良果の発生が近年問題となっているように、気温も果実成熟に大きな影響を与える。成熟期の高温による着色不良（アントシアニン蓄積の抑制）に加え、ブドウ果房の収穫期の前進（Webb *et al.* 2007）や、地中海地方におけるブドウ栽培適地の変動（Hannah *et al.* 2013）が報告されている。

2) ブドウ果実内成分の制御

2007年にヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera* L.) ‘ピノ・ノワール’ の全ゲノムシーケンス (Genoscope Grape Genome Browser, URL2-4-1, Jaillon *et al.* 2007) が公開されて以来、ブドウゲノム情報を利用した遺伝子構造解析や、マイクロアレイ、RNAシーケンシング (RNA-seq) による遺伝子の網羅的発現

解析が盛んに行われるようになった。特に、ブドウの果実成熟に関する遺伝学・生理学的研究において、ゲノム情報や網羅的発現解析により得られた膨大な遺伝子データを統合・整理し、パイオインフォマティクス手法を用いて解析することで、これまで未解明だった重要な知見が数多く得られている。その詳細は以下の通りである。

(1) アントシアニン合成の制御

a. アントシアニン含量

フラボノイドの一種であるアントシアニン色素の含量と組成はブドウ果皮色の主な決定因子であり、アントシアニンが果皮に蓄積されると赤色や紫黒色のブドウ、蓄積されなければ黄緑色のブドウとなる。アントシアニンの蓄積はベレーゾン後から開始し、成熟に伴って着色が進行する。アントシアニンは小胞体の細胞質表面においてフラボノイド生合成経路の合成系酵素が複合体 (multienzyme complex) を形成することで合成が進行する (Boss *et al.* 1996)。ブドウにおいては多くのフラボノイド合成系酵素遺伝子群が単離されており、その中でもUDPグルコース：フラボノイド3'-O-糖転移酵素 (UDP glucose : flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT) はブドウのアントシアニン合成における鍵酵素 (key enzyme) とされている (図2-4-2) (Boss *et al.* 1996)。これら合成系酵素遺伝子群の働きはVvMYBA1, VvMYBA2, VIMYBA1-2, VIMYBA1-3, VIMYBA2等のMYB (ミブ) とよばれる転写因子 (transcription factor, DNAに結合して遺伝子の発現を制御するタンパク質性の因子) によって制御されている (Azuma *et al.* 2008 ; Kobayashi *et al.* 2002, 2004 ; Walker *et al.* 2007)。MYB転写因子遺伝子の発現量はベレーゾン後の着色開始期頃に急激に高くなり、それに伴ってアントシアニン合成系酵素の発現が誘導されアントシアニンが合成される (Kobayashi *et al.* 2002)。また、紫黒色・赤色ブドウではMYB転写因子遺伝子が転写・翻訳されることによってUFGT遺伝子の発現が誘導されアントシアニンが合成されるのに対し、黄緑色ブドウではMYB転写因子遺伝子が転写されないためにUFGT遺伝子の発現が

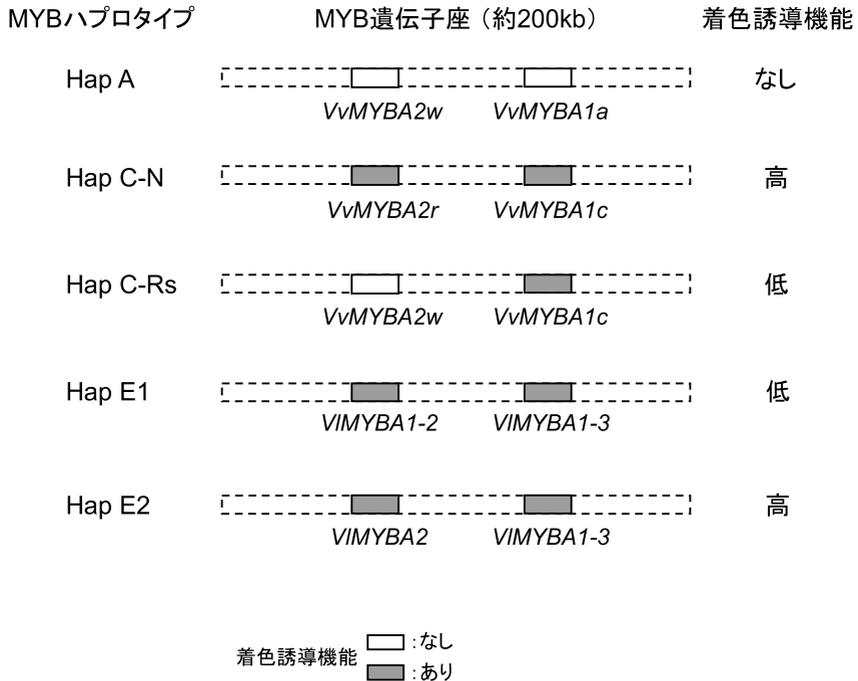


図2-4-3 MYB遺伝子座のハプロタイプ構造と着色誘導機能

MYB遺伝子座には機能の異なる二つのMYB転写因子遺伝子がタンデムに並んだMYBハプロタイプが存在し、これらのハプロタイプの組合せ方（MYB遺伝子型）によって果皮色が遺伝的に決定される。

然変異（frame shift mutation）により転写能力を失ったVvMYBA2wと、ウイルスが起源といわれるレトロトランスポゾン（retrotransposon）がVvMYBA1遺伝子のプロモーター領域（promoter region）に挿入し、転写能力を失ったVvMYBA1aが存在する（Kobayashi *et al.* 2004；Walker *et al.* 2007）。一方、着色誘導機能のあるHapC-Nには転写能力を有するオリジナルのVvMYBA2r、VvMYBA1cが存在する（Kobayashi *et al.* 2004；Walker *et al.* 2007）。さらに、着色誘導機能のあるHapE1にはVIMYBA1-2とVIMYBA1-3が、HapE2にはVIMYBA2とVIMYBA1-3が存在する（Azuma *et al.* 2008, 2011）。そして、これら

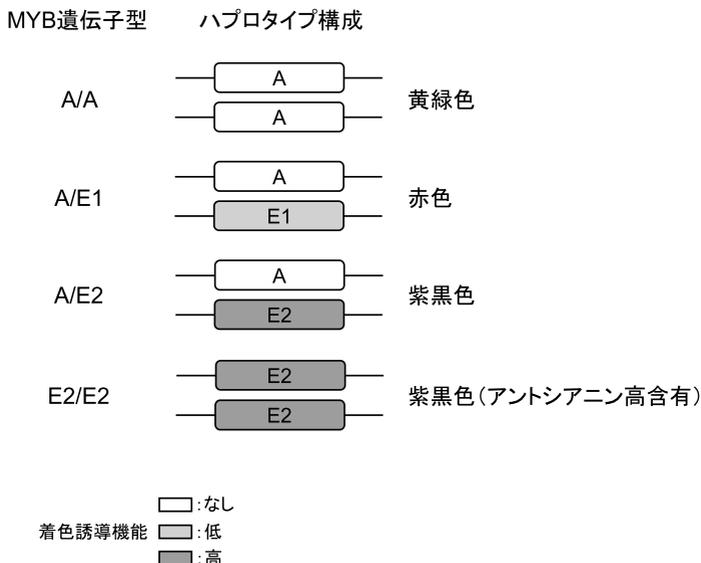


図2-4-4 MYB遺伝子型とブドウ果皮色の関係（二倍体）

着色誘導機能の無いHapAと、機能のあるHapE1からなるA/E1遺伝子型の個体はアントシアニンを蓄積するが、HapAのみからなるA/A遺伝子型の個体では着色誘導機能のあるMYBハプロタイプが存在しないためアントシアニンが合成されず、黄緑色となる。また、A/E2の個体で紫黒色となるのに対し、A/E1の場合はアントシアニン含量が少ない赤色個体が生じる。さらに、E2/E2の個体等、着色誘導機能のあるハプロタイプを多く有するほどアントシアニン含量が高くなる。

のハプロタイプの組合せ（MYB遺伝子型）によって果皮色が遺伝的に決定される。例えば二倍体ブドウの場合、MYB遺伝子座が着色誘導機能の無いHapAと、機能のあるHapE1からなるA/E1遺伝子型の個体はアントシアニンを蓄積するが、HapAのみからなるA/A遺伝子型の個体では、着色誘導機能のあるMYBハプロタイプが存在しないためアントシアニンが合成されない（図2-4-4）（Azuma *et al.* 2008, 2011）。

四倍体ブドウでは、MYB遺伝子座に存在する四つのハプロタイプのうち、HapE1等一つでも着色誘導機能のあるハプロタイプを有する個体はアントシアニンを蓄積し、着色誘導機能の無いHapAのみからなる個体はアントシアニ

表2-4-1 四倍体ブドウ品種のMYB遺伝子型と果皮色の関係

品種	果皮色	MYB遺伝子型			
白峰	黄緑	A	A	A	A
翠峰	黄緑	A	A	A	A
巨峰	紫黒	A	A	E1	E2
紫玉	紫黒	A	A	E1	E2
ピオーネ	紫黒	A	A	E1	E2
藤稔	紫黒	A	A	E1	E2
ナガノパープル ²	紫黒	-	C-Rs	E1	E2
安芸津30号	紫黒	A	E1	E1	E2
石原早生	紫黒	E1	E1	E2	E2
ブラックビート	紫黒	E1	E1	E2	E2
陽峰	赤	A	A	A	E1
安芸クイーン	赤	A	A	A	E1
ゴルビー	赤	A	A	A	E1
竜宝	赤	A	A	A	E1
ルビーロマン	赤	A	A	A	E1
クイーンニーナ	赤	A	A	A	E1

² 三倍体品種

‘巨峰’等の主要な紫黒色品種のMYB遺伝子型はA/A/E1/E2と、着色誘導機能のあるハプロタイプが二つ存在する。アントシアニン含量が高く、高温下でも安定着色する‘ブラックビート’等では全て機能のあるハプロタイプで構成される。‘安芸クイーン’等の赤色品種ではA/A/A/E1と、機能の低いHapE1が一つだけ存在し機能の高いHapE2等を有していない。

ンを蓄積せず黄緑色となる（表2-4-1）（Azuma *et al.* 2011）。紫黒色と赤色の違いについてもMYBハプロタイプによって主要な機構が説明できる。着色誘導機能のあるハプロタイプ（HapC-N, HapC-Rs, HapE1, HapE2など）の中でも着色を誘導する能力にはハプロタイプ間で差があり、HapC-NとHapE2は機能が高く、HapC-RsとHapE1は機能が低い（図2-4-3）。二倍体ブドウにおいてはMYB遺伝子型がA/E2の個体で紫黒色となるのに対し、A/E1の場合はアントシアニン含量が少ない赤色個体が生じる（図2-4-4）（Azuma *et al.* 2011）。また、MYBハプロタイプには量的効果があり、MYB遺伝子型がE2/E2の個体等、着色誘導機能のあるハプロタイプを多く有するほどアントシアニン含量が高くなる（図2-4-4）。四倍体においてはハプロタイプの量的効果がさらに顕著に表れ、‘巨峰’、‘ピオーネ’等のMYB遺伝子型はA/A/E1/E2と、

着色誘導機能のあるハプロタイプが二つ存在するのに対し、アントシアニン含量が高く、高温下でも安定着色する‘ブラックビート’、三倍体で着色が優良な紫黒色品種‘ナガノパープル’ではそれぞれE1/E1/E2/E2, C-Rs/E1/E2と、全て機能のあるハプロタイプで構成される(表2-4-1)。一方、‘安芸クイーン’、‘クイーンニーナ’等の赤色品種のMYB遺伝子型はA/A/A/E1と、着色誘導機能の低いHapE1が一つだけ存在し、機能の高いHapE2等を有していない(Azuma *et al.* 2011)。このように、着色誘導機能を有するMYBハプロタイプの種類と数がアントシアニン含量の遺伝的決定に寄与する。

MYB遺伝子座はアントシアニン含量を制御する主要な遺伝子座であるが、同じMYB遺伝子型を持つ個体でも、アントシアニン含量にはばらつきが見られる(Ban *et al.* 2014)。このことから、MYB遺伝子座以外の遺伝子座もアントシアニン含量に関与している可能性がある。二倍体欧米雑種ブドウの実生集団から作成した連鎖地図を用いてアントシアニン含量の量的形質遺伝子座(quantitative trait locus, QTL)解析を行い、新たな着色関連遺伝子座の探索を行った結果、アントシアニン含量に関与する三つのQTL領域が第2連鎖群、第8連鎖群、第14連鎖群に検出された(図2-4-5)(Ban *et al.* 2014)。検出された三つのQTLのうち、最も寄与率の高い第2連鎖群のQTLはMYB遺伝子座にあり、MYB遺伝子座がアントシアニン含量の遺伝的決定に寄与することがQTL解析でも確認されている。一方で、第8連鎖群と第14連鎖群に検出されたQTLについてはこれまでに報告がなく、これらのQTL領域内にアントシアニン含量に関与する新たな遺伝子座が存在する可能性がある。

b. アントシアニン組成

ブドウでは大きく分類して5種類のアントシアニン色素が存在する。シアニン系アントシアニン(Cy)のシアニン(cyanidin)、ペオニン(peonidin)は赤色系の色素であるのに対し、デルフィニン系アントシアニン(Dp)のデルフィニン(delphinidin)、ペチュニン(petunidin)、マルビジン

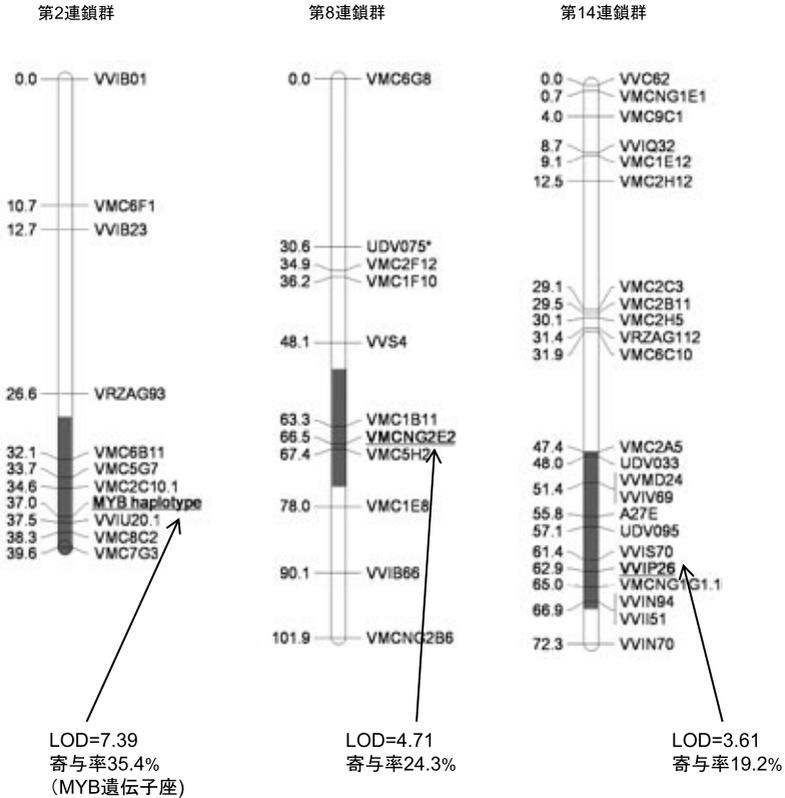


図2-4-5 アントシアニン含量に関連するQTLの連鎖地図上の位置

アントシアニン含量に関連する三つのQTLのうち、最も寄与率の高い第2連鎖群のQTLはMYB遺伝子座にあった一方で、第8連鎖群、第14連鎖群に検出されたQTLについてはこれまでに報告がなく、これらのQTL領域内にアントシアニン含量に関与する新たな遺伝子座が存在する可能性がある。

灰色はQTLの1-LOD信頼区間を示す。下線は最大のLOD値を示したDNAマーカーを示す。

(malvidin) は紫系の色素である (図2-4-2)。これらのアントシアニンの組成比は、着色系ブドウ品種やワインにおける赤～紫黒色の色調のバリエーションに影響する。DpとCyの合成は競合関係にあり、DpとCyの組成比 (Dp/Cy比) は、フラボノイド合成系酵素であるフラボノイド-3', 5'-水酸化酵素 (F3' 5'

H) と、フラボノイド-3'-水酸化酵素 ($F3'H$) の遺伝子発現量比 ($F3'5'H/F3'H$ 発現量比) によって制御される (図2-4-2) (Castellarin *et al.* 2006 ; Jeong *et al.* 2006). また, これら5種類のアントシアニンは, メチル化アントシアニン (M) のペオニジン, ペチュニジン, マルビジン (深赤色化, 安定化) と非メチル化アントシアニン (NM) のシアニジン, デルフィニジンに分類でき, メチル化アントシアニンと非メチル化アントシアニンの組成比 (M/NM比) は, アントシアニンのメチル化に関与するアントシアニン-O-メチルトランスフェラーゼ (*anthocyanin O-methyltransferase, AOMT*) の遺伝子発現量の影響を受ける (Castellarin *et al.* 2007a).

近年, アントシアニン組成のQTL解析により, 第2連鎖群に座乗するMYB遺伝子座周辺にDp/Cy比 (この値が高いほど紫色, 低いと赤色になる) に関連する主要なQTLが存在することが解明された (図2-4-6) (Azuma *et al.* 2015a). また, 第2連鎖群のMYB遺伝子座と, 第1連鎖群のAOMT遺伝子座周辺にM/NM比 (この値が高いほど深赤色化・安定化する) に関連する主要なQTLが存在することも明らかになっている (Azuma *et al.* 2015a ; Fournier-*Level et al.* 2011). MYBハプロタイプとアントシアニン組成との関係も解明されており, MYB遺伝子座にHapE1が存在するとDp/Cy比が高くなり, HapC-Rsが存在すると低くなる (Azuma *et al.* 2015a) (図2-4-7). M/NM比についても, MYB遺伝子座にHapE1が存在すると高くなり, HapC-Rsが存在すると低くなる (図2-4-7). また, AOMT遺伝子座にはa, b, cのアリルが存在し, 遺伝子型がa/bの個体群では, MYB遺伝子型に関わらず, メチル化アントシアニンがほとんど蓄積しない (図2-4-8). 一方, AOMT遺伝子型がc/cの個体群ではM/NM比が高くなる (Azuma *et al.* 2015a).

MYB遺伝子型と, Dp/Cy比に影響する $F3'5'H/F3'H$ 発現量比, M/NM比に影響するAOMT発現量の関係も明らかになった. Dp/Cy比, M/NM比が高いMYB遺伝子型A/E1, C-Rs/E1の個体群では $F3'5'H/F3'H$ 発現量比, AOMT発現量がともに高く, 遺伝子型と遺伝子発現量との間に相関がある (Azuma *et al.* 2015a). また, メチル化アントシアニンをほとんど蓄積しないAOMT遺伝

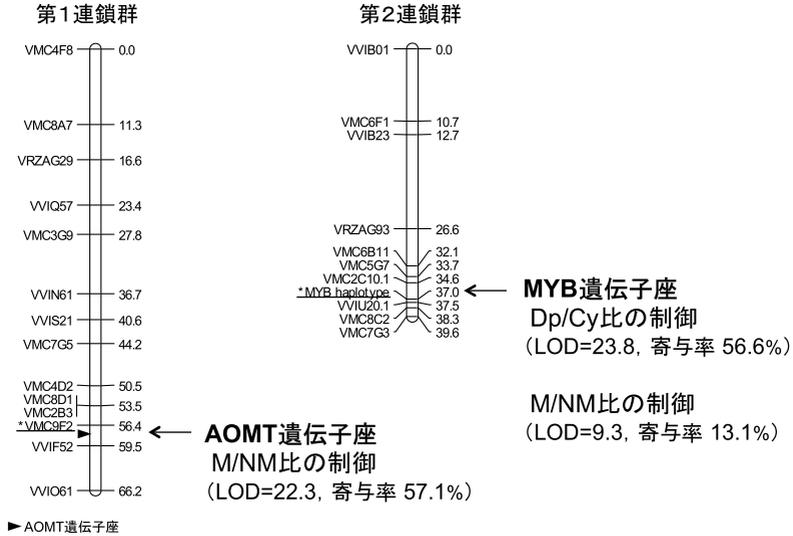


図2-4-6 アントシアニン組成に関連するQTLの連鎖地図上の位置

第2連鎖群に座乗するMYB遺伝子座にDp/Cy比（この値が高いほど紫色，低いと赤色になる）に関連するQTLが存在する。また，第2連鎖群のMYB遺伝子座と，第1連鎖群のAOMT遺伝子座周辺にM/NM比（この値が高いほど深赤色化・安定化する）に関連するQTLが存在する。下線は最大のLOD値を示したDNAマーカーを示す。

子型a/bの個体群ではAOMTがほとんど発現しない一方で，M/NM比が高いc/cの個体群ではAOMT発現量も高くなっており，M/NM比との相関が認められる。以上のことから，MYB遺伝子座はF3' 5' H/F3' H発現量比とAOMT発現量のトランス制御を介してDp/Cy比，M/NM比を遺伝的に制御し，AOMT遺伝子座はAOMT発現量のシス制御を介してM/NM比を制御していると考えられる（図2-4-9）。

(2) 糖蓄積の制御

ブドウ果実の糖含量は環境条件や栽培条件に影響される一方，糖組成の決定には遺伝的な要因が深く関わっている。Shiraishi *et al.* (2010) は，生食用ブドウの糖組成を調査し，グルコース (glucose)/フルクトース (fructose) 比が

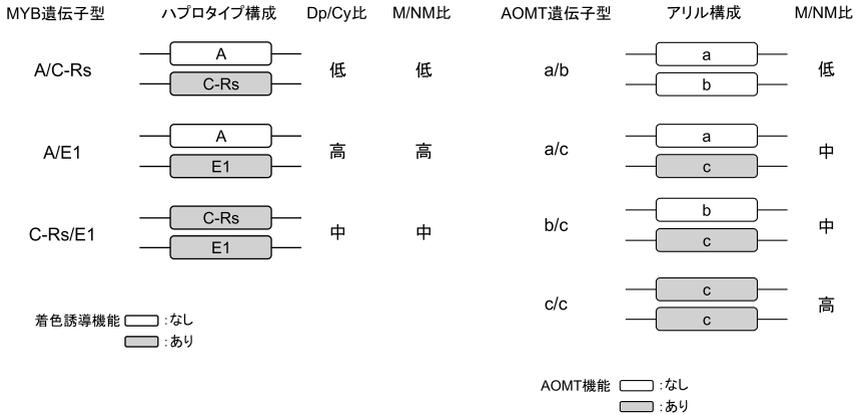


図2-4-7 MYB遺伝子型とアントシアニン組成 (Dp/Cy比、M/NM比) の関係
 MYB遺伝子座にHapE1が存在するとDp/Cy比が高くなり、HapC-Rsが存在すると低くなる。M/NM比についても、HapE1が存在すると高くなり、HapC-Rsが存在すると低くなる。

図2-4-8 AOMT遺伝子型とアントシアニン組成 (M/NM比) の関係
 AOMT遺伝子座にはa, b, cのアリルが存在し、遺伝子型がa/bの個体群ではMYB遺伝子型に関わらず、メチル化アントシアニンがほとんど蓄積しない。一方、AOMT遺伝子型がc/cの個体群ではM/NM比が高くなる。

0.8以上の還元糖型（‘巨峰’，‘ピオーネ’をはじめとする多くの品種）と、グルコース/フルクトース比が0.8以下の非還元糖型（‘バッファロー’，‘スチューベン’等の北アメリカ品種の一部）の2種類の糖組成タイプに分類できることを示した。また、ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera*) は、スクロース (sucrose) をほとんど蓄積しないのに対し、欧米雑種ブドウ (Interspecific hybrids) ではスクロースを蓄積する。さらに、多くのヨーロッパブドウのグルコース/フルクトース比は1程度であるのに対し、野生種ブドウのそれは0.47から1.12と幅広く分布しており、ブドウの栽培品種

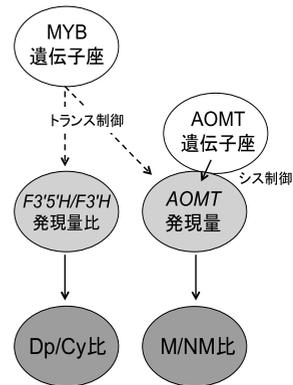


図2-4-9 MYB遺伝子座、AOMT遺伝子座によるアントシアニン組成の制御機構
 MYB遺伝子座はF3'5'H/F3'H、AOMT発現量のトランス制御を介してDp/Cy比、M/NM比を遺伝的に制御する。AOMT遺伝子座はAOMT発現量のシス制御を介してM/NM比を遺伝的に制御する。

化 (domestication) による糖組成の固定化が見られる (Dai *et al.* 2011). Xin *et al.* (2013) は, 野生ブドウ13種とヨーロッパブドウ14品種のリシークエンス (resequencing) を行い, 糖合成と輸送に関連する138個の遺伝子構造を解析した. 解析を行った138個の遺伝子のうちヨーロッパブドウの栽培種において, おそらく栽培品種化の結果により, 一塩基多型と挿入/欠失 (InDels) の数が野生種のそれと比べて1.65倍少なくなっていた. さらに, 糖代謝に関連する3つのモノサッカライド輸送体 (*monosaccharide transporters*; *HT8/HT1*, *HT15*, *PMT3*), ヘキソキナーゼ (*hexokinase*; *HT4*), スクロースシンターゼ (*sucrose synthase*), 6つのホスホフルクトキナーゼ (*phosphofructokinase*) 遺伝子において, 野生種に比べて栽培品種のアリル多様性 (allelic diversity) が有意に低いことが分かり, これらが栽培品種における高糖度化に関連する可能性が示唆されている.

(3) 有機酸含量の制御

ブドウ果実にはリンゴ酸, 酒石酸, クエン酸 (citric acid), コハク酸 (succinic acid), フマル酸 (fumaric acid) 等が含まれるが, 主に蓄積されるのはリンゴ酸と酒石酸であり, この二つの有機酸で全酸の90%以上を占める. 一般に, ヨーロッパブドウは欧米雑種ブドウよりも有機酸含量が高く, リンゴ酸を多く含む傾向がある. また, ヨーロッパブドウにおいては, 生食用ブドウよりもワイン用ブドウの有機酸含量が高い傾向がある (Liu *et al.* 2006). 果実中のリンゴ酸濃度は, ベレーゾン前にピークとなり, 成熟の後半にかけて急激に減少する (Sweetman *et al.* 2009). この減少は, 主にミトコンドリアのリンゴ酸酸化 (malate oxidation) と関連しているといわれる. RNA-seqにより, ベレーゾン後のリンゴ酸減少は細胞質 (cytoplasm) のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (*malate dehydrogenase*, *MDH*) 遺伝子とミトコンドリアのリンゴ酸酵素遺伝子の発現量の減少, ならびにMDH酵素の機能をリンゴ酸異化作用にシフトするホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (*phosphoenolpyruvate carboxylase*, *PEPC*) とPEPCキナーゼ (*PEPC kinase*, *PEPCK*) 遺伝子の発現量の増加による

表2-4-2 網羅的遺伝子発現解析によるブドウ果実成熟に関する研究例

品種	方法	処理	主な解析対象	アクセッション番号
カベルネソービニオン	マイクロアレイ (Affymetrix社) 16,436プローブ	果実への ABA処理	ABA関連遺伝子	
カベルネソービニオン	マイクロアレイ (Operon社) 14,562プローブ	果房への エチレン処 理	エチレン関連遺伝子	
カベルネソービニオン	マイクロアレイ (NimbleGen社) 29,549プローブ	果実成熟 の経時変 化	エチレン関連遺伝子	GSE55302 (GEO) ²
メルロー	マイクロアレイ (Operon社) 14,562プローブ	果房への オーキシン 処理	オーキシン関連遺伝子	GSE37341 (GEO)
マスカットハンプルグ	マイクロアレイ (Affymetrix社) 23,096プローブ	果房への 光、温度処 理	高温反応性遺伝子	GPL11004 (GEO)
Microvine	マイクロアレイ (NimbleGen社) 29,549プローブ	樹体全体 への高温 処理	高温反応性遺伝子	GSE53409 (GEO)
テンブラニリーヨ	マイクロアレイ (NimbleGen社) 29,549プローブ	UV選択性 フィルム処 理	光(UV-B)反応性遺伝子	GSE54636 (GEO)
ビオーネ	マイクロアレイ (Agilent社) 38,549プローブ	果粒への 光、温度処 理	光・低温反応性遺伝子	GSE64153 (GEO)
カベルネソービニオン シャルドネ	マイクロアレイ (Affymetrix社) 16,436プローブ	土壌乾燥 処理	水分ストレス反応性遺伝子	VV5 (PLEXdb)
カベルネソービニオン	マイクロアレイ (NimbleGen社) 29,549プローブ	果粒への 糖処理	糖関連遺伝子	E-MTAB-1634 (ArrayExpress database)
シラー	RNA-seq (Illumina社)	果実成熟 の経時変 化	有機酸関連遺伝子	

解析された主な遺伝子(候補)	主なインフォマティクスツール、データベース	引用元
フェニルアラニンアンモニリアアーゼ (PAL)	T-Mev software	Koyama <i>et al.</i> 2010
MYB転写因子 (VvMYBA1, VvMYBA2, VvMYBPA1)		
9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ 4 (NCED4)		
アクアボリン (AQUA)	DFCI Grape Gene Index, Genoscope Grape Genome Browser, TAIR	Chervin <i>et al.</i> 2008
ポリガラクチュロナーゼ		
エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH)		
エチレン応答性転写因子 (ERF)	MUSCLE software, FigTree, V1 annotation of the 12x grapevine genome	Cramer <i>et al.</i> 2014
ポリガラクチュロナーゼ		
ACCオキシダーゼ		
トリプトファン合成酵素 β サブユニット1 (TRYPS)	MapMan software, Blast2GO software, HORMONOMETER tool	Ziliotto <i>et al.</i> 2012
Transport inhibitor response 1 (TIR1)		
インドール-3-酢酸アミドシンターゼ (GH3)		
エチレン応答性転写因子 (ERF)	MapMan software, Grape GenDB database, PlexDB	Carbonell-Bejerano <i>et al.</i> 2013
熱ショックタンパク質 (HSP)		
転写コアクチベーター multiprotein bridging factor (MBF)		
アントシアニン合成関連遺伝子群	Multiple Experiment Viewer, FatiGO analysis tool, NCBI RefSeq database	Rienth <i>et al.</i> 2014
熱ショックタンパク質 (HSP)		
エチレン応答性転写因子 (ERF)		
Elongated hypocotyl 5 (HY5)	MeV, Acuity 4.0, Genoscope Grape Genome Browser	Carbonell-Bejerano <i>et al.</i> 2014
UV resistance locus 8 (UVR8)		
MYB24		
Elongated hypocotyl 5 (HY5)	GeneSpring GX 10 software, Subio Platform, Genoscope Grape Genome Browser	Azuma <i>et al.</i> 2015
Open stomata 1 (OST1)		
Enhanced response to ABA 1 (ERA1)		
9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ 1, 2 (NCED1, NCED2)	R, MeV3.1, PLEXdb	Deluc <i>et al.</i> 2009
UDP-グルコース:グルコシルトランスフェラーゼ (UGT)		
ゼアキサチンエポキシダーゼ (ABA1)		
ヘキシキナーゼ	R, MapMan software, LIMMA package	Dai <i>et al.</i> 2014
WRKY型転写因子		
リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)	CLC Genomic Workbench, PlexDB, NCBI RefSeq V. vinifera mRNA dataset	Sweetman <i>et al.</i> 2012
ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)		
PEPCキナーゼ (PEPCK)		

ことが示されている (表2-4-2) (Sweetman *et al.* 2012). リンゴ酸の分解は液胞膜 (tonoplast) におけるジカルボン酸輸送体 (*dicarboxylate transporter*) 遺伝子の発現量増加によって促進される可能性も示されている (Sweetman *et al.* 2012). また, Regalado *et al.* (2013) は, リンゴ酸, クエン酸のミトコンドリアへの輸送の関与が推定される3つのジカルボン酸/トリカルボン酸輸送体 (*VvDTC1-VvDTC3*) を見出した. これら3つの*VvDTC*遺伝子は成熟期間において特徴的な発現パターンを示し, 特に*VvDTC2*と*VvDTC3*の遺伝子発現は, 成熟開始直後の中果皮 (mesocarp) において急激に発現量が増加していることから, ミトコンドリアへのリンゴ酸の輸送に関連している可能性が示されている.

3) 果実成熟における植物ホルモンの役割

(1) アブシシン酸

非クライマクテリック型果実であるブドウでは, 果実成熟期のエチレン合成量の増加は少なく, 果実成熟にはいくつかの植物ホルモンが関わっていると考えられている. その中でも, ABAはブドウの果実成熟を制御する主要な植物ホルモンとされており, 果実中のABA含量はベレーゾン期頃に急激に増加する (図2-4-1) (Giribaldi *et al.* 2010 ; Lacampagne *et al.* 2010 ; Sun *et al.* 2010 ; Wheeler *et al.* 2009). ‘カベルネソービニオン’ 果実では, ベレーゾン期あるいはベレーゾン2週間後頃の内生 (endogenous) ABA含量が最も高くなり, この時期の急激なABA含量の増加は果皮アントシアニンの蓄積と一致する (Giribaldi *et al.* 2010 ; Lacampagne *et al.* 2010 ; Wheeler *et al.* 2009). また, 果実成熟期の外生 (exogenous) ABA処理は, 果実重の増加 (Peppi *et al.* 2008 ; Wheeler *et al.* 2009), 有機酸含量の減少 (Peppi *et al.* 2008), アントシアニン含量の増加 (Berli *et al.* 2010 ; Gambetta *et al.* 2010 ; Hiratsuka *et al.* 2001 ; Jeong *et al.* 2004 ; Wheeler *et al.* 2009) をもたらす (表2-4-3). このことから, ABAはアントシアニン合成をはじめとする成熟開始のトリガーの役割を担っていると考えられる. 一方で, 果実糖度の上昇開始はABA含量の

増加時期と一致するが (Wheeler *et al.* 2009), 着色開始期の外生ABA処理による糖度の上昇は見られず, ABAが糖度に与える影響については判然としていない (Peppi *et al.* 2008 ; Wheeler *et al.* 2009).

ABAは多くの果実成熟関連遺伝子の発現量を増加させることがマイクロアレイを用いた網羅的発現解析により明らかになっている。例えば, ベレーゾン期の‘カベルネソービニオン’果実にABA処理を行うと, フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (*phenylalanine ammonialyase, PAL*), カルコンシンターゼ (*chalcone synthase, CHS*), フラバノン-3-ジオキシゲナーゼ (*flavanone 3-hydroxylase, F3H*), *VvMYBA1*, *VvMYBA2*等の着色関連遺伝子の発現量がアントシアニン含量とともに総じて増加する (表2-4-2) (Koyama *et al.* 2010). また, ABA処理によりエチレン合成関連遺伝子の発現量が増加するとともに, オーキシン (auxin) 反応性遺伝子群の発現量が減少することが示されており, 果実成熟はABA単独で制御されているのではなく, 他の植物ホルモンとの相互作用により制御されていると考えられている。

(2) エチレン

ブドウ果粒におけるエチレン含量は, ABA含量のピークに先立ってベレーゾン前にピークとなる (Chervin *et al.* 2004 ; Sun *et al.* 2010). また, エチレン放出物質であるエテホン (ethephon) をベレーゾン期の‘カベルネソービニオン’果粒に処理すると, アントシアニン合成が促進する (表2-4-3) (El-Kereamy *et al.* 2003). 一方, エチレン受容体阻害剤である1-メチルシクロプロペン (1-methylcyclopropene, 1-MCP) のブドウ果実への処理は, 果粒肥大の抑制, アントシアニン蓄積の抑制, 有機酸含量の増加をもたらす (Chervin *et al.* 2004). マイクロアレイ解析を用いた網羅的発現解析により, エチレン処理はアクアポリン (*aquaporin*), ポリガラクトンナーゼ (*polygalacturonase*), エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (*xyloglucan endotransglucosylase, XTH*), セルロースシンターゼ (*cellulose synthase*), エクспанシン (*expansin*) 遺伝子等の細胞肥大に関連する遺伝子発

現量の増加を介して果粒径の増加を誘導することが示されている (表2-4-2) (Chervin *et al.* 2008). また, 高温処理によりエチレン合成を制御するエチレン応答性転写因子 (*ethylene response factor, ERF*) の遺伝子発現量が増加すること (表2-4-2) (Carbonell-Bejerano *et al.* 2013), 成熟期の果実では*ERF*をはじめとするエチレン関連遺伝子群の発現量が全体的に増加することがマイクロアレイ解析により明らかになっており (Cramer *et al.* 2014), 非クライマクテリック型果実であるブドウの成熟におけるエチレンの役割は, これまで考えられていたよりも重要である可能性が示されている.

(3) オーキシシン

オーキシシンはアントシアニン蓄積, 糖蓄積の抑制等, ブドウ果実の成熟においては主に負の影響を及ぼす (表2-4-3) (Böttcher *et al.* 2011a ; Davies *et al.* 1997 ; Ziliotto *et al.* 2012). 果実肥大過程の第1期では果粒中のオーキシシン含量は高いが, ベレーゾン期に急速に減少し, その後は低く維持される (Böttcher *et al.* 2010). オーキシシンにはブドウ果実の成熟開始時期を遅延させる効果があることが知られている (Böttcher *et al.* 2011b). 例えば, ブドウ果粒に合成オーキシシン剤である2-ベンゾチアゾリルオキシ酢酸 (benzothiazole-2-oxyacetic acid, BTOA) を処理すると果粒中のABA含量の増加が約2週間遅れ, 成熟が遅延する (Davies *et al.* 1997). ベレーゾン1週間前にナフタレン酢酸 (naphthalene acetic acid, NAA) を処理したブドウ果粒ではアントシアニン合成と糖蓄積の遅延が起こり, 同時にABAならびにエチレン合成関連遺伝子群の発現量増加の遅延が起こることがマイクロアレイ解析によって示されている (表2-4-2) (Ziliotto *et al.* 2012). これらの結果は, オーキシシンはABAやエチレンによる果実成熟誘導に対して負の働きを持っていることを示唆する. また, オーキシシン処理が果実成熟に与える影響は, 果実に対する遮光処理が成熟に与える影響と似ている (表2-4-3, 4). 例えば, NAA処理, 遮光処理は果皮のフラボノール含量を減少させ, フラボノール合成において重要なフラボノールシンターゼ (*flavonol synthase, FLS*) の遺伝子発現量を著しく減少

表2-4-3 植物ホルモンが果実内成分に及ぼす影響

	アントシアニン 含量	フラボノール 含量	果粒重(肥大)	糖含量	有機酸含量
アブシシン酸	↑		↑	↓=	↓
エチレン	↑		↑		↓
オーキシシン	↓	↓	↓↑	↓	↑
ブラシノステロイド	↑			↑	
ジャスモン酸	↑				
サイトカイニン	↓		↑	↓	=

↑, 促進; ↓, 抑制; =, 有意な変化なし

表2-4-4 環境要因が果実内成分に及ぼす影響

	アントシアニン 含量	フラボノール 含量	果粒重 (肥大)	糖含量	有機酸含量	アブシシン酸
光照射	↑	↑	↑↓=	↓=	↓	=
遮光	↓	↓		↓		
低温	↑			↑		↑
高温	↓	↓=	↓	↓	↓	↓
乾燥	↑	↓=	↓	↑	=	↑

↑, 促進; ↓, 抑制; =, 有意な変化なし

させる (Fujita *et al.* 2006). さらに, NAA処理, 遮光処理はアントシアニン合成に関連するロイコアントシアニンジオキシゲナーゼ (*leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX*), *UFGT*, *VvMYBA1*の遺伝子発現量を著しく減少させ, アントシアニン合成を抑制する (Jeong *et al.* 2004). 一般に, オーキシシンは果粒肥大を抑制すると言われているが, 一方で, 細胞肥大の誘導に関連し, 成熟期に発現が誘導される *cell elongation bHLH protein 1 (CEB1)* の遺伝子発現量は, 低濃度のオーキシシン処理によって増加するという報告もある (Nicolas *et al.* 2013). このことは, 低濃度のオーキシシンが *CEB1* の発現を誘導し, 細胞肥大と果実生育を促進する働きを持つことを示唆する. したがって, オーキシシンは果実成熟を単に阻害しているだけではなく, 低濃度のオーキシシン処理は, 細胞肥

大と果実肥大に関しては促進的に作用する可能性がある。ブドウの果実成熟におけるオーキシンの役割は未解明な部分が多く残されており、ABA, エチレンとの相互作用を含めた、より包括的な研究が求められる。

(4) その他の植物ホルモン

内生ブラシノステロイド (brassinosteroid) 含量は果実成熟の開始に伴い増加する (表2-4-3)。また、外生ブラシノステロイド処理により成熟が誘導されるのに対し、ブラシノステロイド合成阻害剤であるブラシナゾール (brassinazole) 処理は成熟を遅延させる (Symons *et al.* 2006)。マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、ブラシノステロイドはエチレン合成に関連する遺伝子発現の制御を介して、果実成熟に関与している可能性が示唆されている (Ziliotto *et al.* 2012)。また、内生ブラシノステロイド含量は外的要因の影響を受けやすいとされており (Symons *et al.* 2006)、ブラシノステロイド合成や受容に関連するいくつかの遺伝子の発現は、水分条件によって変動する (Gambetta *et al.* 2010)。ブラシノステロイド合成系酵素遺伝子であるブラシノステロイド-6-酸化酵素 (*brassinosteroid-6-oxidase 1, BR6OX1*) と、ブラシノステロイド受容体である *protein brassinosteroid insensitive 1 (BR1)* の遺伝子発現量は通常の栽培条件でも成熟期に増加するが、乾燥ストレスによりさらに発現量が増加する。このように、乾燥ストレス条件下でのブラシノステロイド含量の増加を介して、成熟関連遺伝子群の発現が誘導されている可能性がある。主に病原体に対する防御に関連するとされているジャスモン酸 (jasmonic acid) もアントシアニン含量を増加させる働きを持つとされる (表2-4-3) (Belhadj *et al.* 2008)。一方、サイトカニン (cytokinin) は果粒重を増加させるが糖含量とアントシアニン含量を減少させるという報告がある (表2-4-3) (Peppi *et al.* 2008)。以上のように、ABA, エチレン, ブラシノステロイドは、これらが相互に関与しながらブドウ果粒の成熟を促進するのに対して、サイトカニンはいくつかの成熟関連プロセスを主に遅延させる働きを担っている。

4) 果実成熟に関与する環境要因

果実成熟に関連する主な環境要因として、光条件 (Azuma *et al.* 2012 ; Berli *et al.* 2010 ; Downey *et al.* 2004 ; Matus *et al.* 2009), 温度条件 (Azuma *et al.* 2012 ; Cohen *et al.* 2012 ; Pillet *et al.* 2012 ; Spayd *et al.* 2002 ; Tarara *et al.* 2008 ; Yamane *et al.* 2006), 水分条件 (Deis *et al.* 2011 ; Deluc *et al.* 2009) がある (表2-4-4)。適度な光照射, 低温, 乾燥はアントシアニン含量や糖含量の増加等, 果実成熟に正の影響を与える (Berli *et al.* 2010 ; Castellarin *et al.* 2007b ; Mori *et al.* 2005)。一方, 成熟期の日照不足や高温, 多雨はアントシアニン含量や糖含量の減少等, 果実成熟に負の影響を与える (Carbonell-Bejerano *et al.* 2013 ; Greer *et al.* 2010 ; Jeong *et al.* 2004 ; Lorrain *et al.* 2012 ; Mori *et al.* 2007 ; Pillet *et al.* 2012 ; Vega *et al.* 2011)。また, 環境要因は成熟を制御する植物ホルモンの合成やシグナル伝達に対しても影響を与えている。

(1) 光条件

光照射は植物体のフラボノイド含量を増加させるが, その中でもフラボノールは光の影響を強く受ける (表2-4-4)。Downey *et al.* (2004) は, 通常栽培条件下の黄緑色ブドウ果房と比較して, 果房を遮光箱内に入れて栽培するとフラボノール合成に関与する *FLS* の発現量が著しく減少し, 果皮フラボノール含量が減少することを示した。同様に, 遮光条件下で栽培した紫黒色ブドウ果房においても *FLS* の発現量が減少し, フラボノール含量が減少する (Fujita *et al.* 2006 ; Koyama *et al.* 2008 ; Matus *et al.* 2009)。アントシアニン含量についても, 果房の遮光により *UFGT*, *VvMYBA1*, *VvMYBA2* 等のアントシアニン合成関連遺伝子の発現量が減少し, アントシアニン含量が著しく減少する (Azuma *et al.* 2012 ; Koyama *et al.* 2008 ; Matus *et al.* 2009)。一方, 果房へのUV-B照射は *FLS*, 糖転移酵素 (*glycosyltransferase 5, GT5*), *VvMYBF1* 等のフラボノイド合成に関連する遺伝子の発現量を増加させ, フラボノールやアントシアニンの蓄積を促進する (Carbonell-Bejerano *et al.* 2014)。このように, 光条件はフラ

ボノイド合成関連遺伝子群の発現量の制御を介して、フラボノールやアントシアニン等のフラボノイド合成に深く関与している。

最近、着色期のブドウ果皮における光シグナル伝達に関連する候補遺伝子の探索を目的に、異なる光・温度条件で培養したブドウ果実のマイクロアレイ解析が行われ、光照射特異的に発現が誘導される40個の遺伝子が単離された(表2-4-2) (Azuma *et al.* 2015b)。これらには*CHS*や*FLS*等の既知のフラボノイド合成系酵素遺伝子群に加え、光シグナル伝達系に関連する転写因子*elongated hypocotyl 5 (HY5)* や*constitutive photomorphogenic 1 (COPI)* 等が含まれていた。また、*HY5*は成熟期の果皮で発現量が高く、白色光や紫外線B波(UV-B)の照射により発現量が増加する(Azuma *et al.* 2015b; Carbonell-Bejerano *et al.* 2014)。これらの結果から、*HY5*はブドウ果皮における光シグナル伝達を介したフラボノイド合成に関与している可能性がある。ブドウ果皮のフラボノイド合成制御に関与する、光シグナル伝達系の構成要素についてはまだ不明な点が多いため、*HY5*以外に単離された残りの候補遺伝子についても解析を進める必要がある。

(2) 温度条件

温度も果実成熟に影響を与える主要な環境要因の一つである。成熟期の低温は果実の内生ABA含量を増加させ、アントシアニン合成、糖蓄積を促進する(表2-4-4) (Koshita *et al.* 2007; Mori *et al.* 2005; Yamane *et al.* 2006)。一方、成熟期の高温はアントシアニン含量(Azuma *et al.* 2012; Carbonell-Bejerano *et al.* 2013; Mori *et al.* 2007; Tarara *et al.* 2008)、糖含量(Carbonell-Bejerano *et al.* 2013; Greer *et al.* 2010)、果実重(Greer *et al.* 2010)を減少させる(表2-4-4)。さらに、高温は果実中のABA含量を低下させるとともに、*PAL*、*CHS*、*VvMYBA1*、グルタチオンS-転移酵素(*glutathione S-transferase, GST*)等のアントシアニン合成に関連する遺伝子の発現量を全体的に減少させることがマイクロアレイ解析により明らかになっている(表2-4-2) (Azuma *et al.* 2015b; Rienth *et al.* 2014)。また、果実成熟期の低温により発現が誘導される

遺伝子が55個単離されている (Azuma *et al.* 2015b). これらには*CHS*, ジヒドロフラボノール-4-還元酵素 (*dihydroflavonol reductase, DFR*) 等のフラボノイド合成系酵素に加え, *open stomata 1 (OST1)*, プロテインホスファターゼ2C (*protein phosphatase 2C, PP2C*), *responsive to desiccation 22 (RD22)* 等のABAのシグナル伝達に関連する遺伝子が多く含まれたことから, ブドウ果実におけるABA関連遺伝子の発現変動は温度の影響を強く受けると考えられる. 単離された遺伝子のうち, *OST1*はABA誘導性のプロテインキナーゼ (SNF1-related protein kinase 2; SnRK2.2/SnRK2.3のホモログ) であり, ABAシグナル伝達における正の制御因子であることがシロイヌナズナにおいて報告されている (Mustilli *et al.* 2002; Yoshida *et al.* 2002). また, *OST1*の発現量はベレーゾン後のブドウ果皮で特異的に高くなることから, *OST1*は低温によりABAシグナル伝達を介して誘導されるフラボノイド合成に関わっている可能性がある. 低温により誘導されるABA合成およびシグナル伝達系を介した果実成熟機構のさらなる解明が期待される.

(3) 水分条件

一般に, 土壌乾燥条件でブドウを栽培すると, 通常もしくは過湿条件で栽培したブドウ果実よりもアントシアニン含量や糖含量が高くなる (表2-4-4) (Castellarin *et al.* 2007b; Deluc *et al.* 2009, 2011). 一方で, フラボノール含量は品種間で乾燥ストレスへの反応が異なるとされ, 黄緑色品種の‘シャルドネ’ではフラボノール含量ならびに*FLS*の発現量がベレーゾン期以降の乾燥により高くなるのに対し, 紫黒色品種の‘カベルネソービニオン’ではフラボノール含量の増加は見られない (Deluc *et al.* 2009). ベレーゾン期以降の乾燥はフラボノイド合成関連遺伝子群の*LDOX*, *DFR*, *UFGT*, *VvMYBA1*等の発現量を増加させるとともに, 糖蓄積や細胞壁インベルターゼに関連する遺伝子の発現量を増加させる (Castellarin *et al.* 2007b). さらに, マイクロアレイ解析ならびにブドウゲノム情報を利用して取得したABA合成関連遺伝子の解析により, 乾燥条件下のブドウ果実では9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ

(*NCED*), ゼアキサンチンエポキシダーゼ (*ABA1*) 等のABA合成に関連する遺伝子の発現量が増加するとともに, 果実中のABA含量が増加することが明らかになっている (表2-4-2) (Deluc *et al.* 2009 ; Gambetta *et al.* 2010). このように, 乾燥ストレスはABA合成やABAシグナル伝達系を介してアントシアニン合成の促進や糖蓄積の促進等, 果実成熟を正に制御する働きを持つと考えられる.

5) 今後の研究の展望

全ゲノムシーケンスが公開されたブドウは, 非クライマクテリック型果実における成熟機構の解明に向けたモデル植物としての利用価値が高く, マイクロアレイやRNA-seqを用いた遺伝子の網羅的発現解析と, バイオインフォマティクスツールを用いたデータ解析により, 前述のとおり多くの新知見が得られている. しかし, ブドウ果房内における果実成熟期の不均一性や果房間の微気象の違い等の問題から, 遺伝子の網羅的発現解析を行うに当たってのデータの信頼性, 再現性の確保が課題となっている. この問題を解決する一つの実験系として, 成熟期のブドウ果粒を採取し, これを各種処理条件のインキュベーター内で培養する果粒培養法がある. この方法は果実成熟の状態や光・温度等の環境条件を均一にできること, 果実への植物ホルモン処理や糖処理等を容易に行えることから, ブドウ果実の成熟機構の解明を目的とした研究で広く用いられている (Azuma *et al.* 2012 ; Gambetta *et al.* 2010 ; Kataoka *et al.* 2003). 近年では, 果粒培養法により処理を行ったブドウ果粒を用いてマイクロアレイ等の網羅的発現解析を行い, 果実成熟に関与する新規遺伝子の探索や成熟に関連するシグナル伝達系, 二次代謝産物合成系の挙動解析が行われている (表2-4-2) (Azuma *et al.* 2015b ; Dai *et al.* 2014 ; Koyama *et al.* 2010 ; Mori *et al.* 2007).

ブドウ果実成熟の複雑な制御機構を分子レベルでより深く理解するためには, ブドウゲノム情報や網羅的発現解析手法による遺伝子情報のさらなる蓄積が必要不可欠である. そして, 得られた大規模発現データの統合解析等による

システムバイオロジー的アプローチは、ブドウの果実成熟に関する包括的な制御機構の解明に向けて、今後さらにその重要性を増していくものと考えられる。

引用文献

- Azuma, A. *et al.* (2008) Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin. *Theoretical and Applied Genetics*. 117 : 1009-1019.
- Azuma, A. *et al.* (2009) Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Science*. 176 : 470-478.
- Azuma, A. *et al.* (2011) Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis* × *labruscana* grapes. *Theoretical and Applied Genetics*. 122 : 1427-1438.
- Azuma, A. *et al.* (2012) Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*. 236 : 1067-1080.
- Azuma, A. *et al.* (2015a) MYB diplotypes at the color locus affect the ratios of tri/di-hydroxylated and methylated/non-methylated anthocyanins in grape berry skin. *Tree Genetics and Genomes*. 11 : 31.
- Azuma, A. *et al.* (2015b) Microarray analysis for the screening of genes inducible by light or low temperature in post-veraison grape berries. *The Horticulture Journal*. 84 : 214-226.
- Ban, Y. *et al.* (2014) Exploring quantitative trait loci for anthocyanin content in interspecific hybrid grape (*Vitis labruscana* × *Vitis vinifera*). *Euphytica*. 198 : 101-114.
- Belhadj, A. *et al.* (2008) Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46 : 493-499.
- Berli, F. J. *et al.* (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 and Environment*. 33 : 1-10.
- Boss, P. *et al.* (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*. 111 : 1059-1066.
- Böttcher, C. *et al.* (2010) Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany* 61 : 3615-3625.
- Böttcher, C. *et al.* (2011a) Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *Journal of Experimental Botany* 62 : 4267-4280.
- Böttcher, C. *et al.* (2011b) Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 17 : 1-8.
- Carbonell-Bejerano, P. *et al.* (2013) Thermotolerance responses in ripening berries of *Vitis vinifera* L. cv Muscat Hamburg. *Plant and Cell Physiology* 54 : 1200-1216.
- Carbonell - Bejerano, P. *et al.* (2014) Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology*. 14 : 183.
- Castellarin, S. D. *et al.* (2006) Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.) : genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genetics*. 7 : 12.
- Castellarin, S. D. *et al.* (2007a) Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology*. 7 : 46.
- Castellarin, S. D. *et al.* (2007b) Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*. 227 : 101-112.
- Chervin, C. *et al.* (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167 : 1301-1305.
- Chervin, C. *et al.* (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiologia*

- Plantarum. 134 : 534-546.
- Cohen, S. D. *et al.* (2012) Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes. *Journal of Experimental Botany*. 63 : 2655-2665.
- Cramer, G. R. *et al.* (2014) Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC Plant Biology*. 14 : 370.
- Dai, Z. W. *et al.* (2011) Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition : a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62 : 413-425.
- Dai, Z. W. *et al.* (2014) Long - term in vitro culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 65 : 4665-4677.
- Davies, C. *et al.* (1997) Treatment of grape berries, a nonclimateric fruit, with a synthetic auxin retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology*. 115 : 1155-1161.
- Deis, L. *et al.* (2011) Water deficit and exogenous ABA significantly affect grape and wine phenolic composition under in field and *in-vitro* conditions. *Plant Growth Regulation*. 65 : 11-21.
- Deluc, L. *et al.* (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*. 10 : 212.
- Deluc, L. *et al.* (2011) Water deficit increases stilbene metabolism in Cabernet Sauvignon berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 : 289-297.
- Downey, M. O. *et al.* (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 10 : 55-73.
- El - Kereamy, A. *et al.* (2003) Exogenous ethylene stimulates the long - term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*. 119 : 175-182.
- Fournier - Level, A. *et al.* (2009) Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. sativa) berry : a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics*. 183 : 1127-1139.

- Fournier-Level, A. *et al.* (2010) Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) . *Heredity*. 104 : 351-362.
- Fournier-Level, A. *et al.* (2011) Genetic mechanisms underlying the methylation level of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) . *BMC Plant Biology*. 11 : 179.
- Fujita, A. *et al.* (2006) Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70 : 632-638.
- Gambetta, G. A. *et al.* (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta*. 232 : 219-234.
- Giribaldi, M. *et al.* (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany*. 61 : 2447 - 2458.
- Greer, D. H. *et al.* (2010) Heat stress affects flowering, berry growth, sugar accumulation and photosynthesis of *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevines grown in a controlled environment. *Functional Plant Biology*. 37 : 206-214.
- Hannah, L. *et al.* (2013) Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 110 : 6907-6912.
- Hiratsuka, S. *et al.* (2001) ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*. 90 : 121-130.
- Jaillon, O. *et al.* (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. 449 : 463-467.
- Jeong, S. T. *et al.* (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*. 167 : 247-252.
- Jeong, S. T. *et al.* (2006) Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*) . *Plant Science*. 170 : 61-69.
- Kataoka, I. *et al.* (2003) Role of ultraviolet radiation in accumulation of anthocyanin in berries of 'Gros Colman' grapes (*Vitis vinifera* L.) . *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 72 : 1-6.
- Kobayashi, S. *et al.* (2002) Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*. 215 : 924-933.

- Kobayashi, S. *et al.* (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*. 304 : 982.
- Koshita, *et al.* (2007) Nighttime temperature treatment of fruit clusters of 'Aki Queen' grapes during maturation and its effect on the skin color and abscisic acid content. *Vitis*. 46 : 208-209.
- Koyama, K. *et al.* (2008) Bunch shading during different developmental stages affects the phenolic biosynthesis in berry skins of 'Cabernet Sauvignon' grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133 : 743-753.
- Koyama, K. *et al.* (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics*. 10 : 367-381.
- Lacampagne, S. *et al.* (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin : new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation*. 29 : 81-90.
- Liu, H. F. *et al.* (2006) Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 : 1526-1536.
- Lorrain, B. *et al.* (2012) Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 18 : 64-72.
- Matus, J. T. *et al.* (2009) Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany*. 60 : 853-867.
- Mori, K. *et al.* (2005) Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis*. 44 : 161-165.
- Mori, K. *et al.* (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*. 58 : 1935-1945.
- Mustilli, A. C. *et al.* (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*. 14 : 3089-3099.
- Nicolas, P. *et al.* (2013) The grape berry-specific basic helix-loop-helix transcription factor VvCEB1 affects cell size. *Journal of Experimental*

- Botany. 64 : 991-1003.
- Peppi, M. C. *et al.* (2008) Effects of forchlorfenuron and abscisic acid on the quality of 'Flame Seedless' grapes. *Hortscience*. 43 : 173-176.
- Pillet, J. *et al.* (2012) VvGOLS1 and VvHsfA2 are involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant and Cell Physiology*. 53 : 1776-1792.
- Regalado, A. *et al.* (2013) Characterization of mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporters from grape berries. *Planta*. 237 : 693-703.
- Rienth, M. *et al.* (2014) Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biology*. 14 : 108.
- Shiraishi, M. *et al.* (2010) Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries. *Euphytica*. 174 : 1-13.
- Spayd, S. E. *et al.* (2002) Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*. 53 : 171-182.
- Sun, L. *et al.* (2010) Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology*. 10 : 257.
- Sweetman, C. *et al.* (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*. 70 : 1329-1344.
- Sweetman, C. *et al.* (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.
- Symons, G. *et al.* (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*. 140 : 150-158.
- Tarara, J. M. *et al.* (2008) Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*. 59 : 235-247.
- Vega, A. *et al.* (2011) Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology*. 77 : 261-274.
- Walker, A. R. *et al.* (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal*. 49 : 772-785.
- Webb, L. B. *et al.* (2007) Modelled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 13 : 165-175.

- Wheeler, S. *et al.* (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 15 : 195-204.
- Xin, H. *et al.* (2013) The effects of artificial selection on sugar metabolism and transporter genes in grape. *Tree Genetics and Genomes*. 9 : 1343-1349.
- Yamane, T. *et al.* (2006) Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57 : 54-59.
- Yoshida, R. *et al.* (2002) ABA - activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 43 : 1473-1483.
- Ziliotto, F. *et al.* (2012) Grape berry ripening delay induced by a pre - véraison NAA treatment is paralleled by a shift in the expression pattern of auxinand ethylene - related genes. *BMC Plant Biology*. 12 : 1-15.

