

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02126

研究課題名(和文) リンゴ柱状樹形誘導機構の解明と応用研究

研究課題名(英文) Elucidation and application on the mechanism of apple columnar tree induction

研究代表者

中嶋 正敏 (Nakajima, Masatoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50237278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：DOX-Co本来機能の解明では、特異的阻害化合物の取得を実施した。発現系を検討して酵素の増収を図り、化合物選抜用にGC-MSを効率化した。既知ジベレリン関連酵素を阻害しない特異的阻害化合物を選抜した。加えて、リンゴ以外の同機能酵素を検出し、当該遺伝子の発現様式の情報も得た。DOX-Co遺伝子異所発現制御機構の解明では、実施済みRNAseqデータを参照し、既存DNAコンテイク配列を対象とするタンパク質コード領域の探索を行った。遺伝子アノテーションを実施して、転写因子を含むDEG遺伝子リストを作成した。加えて、シス配列がレトロポゾンLTRに存在するか検証するためのレポーターアッセイ系を整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

側枝が短く棒状の樹形を呈するカラムナー性形質は、農産現場において剪定や収穫を容易にすることからリンゴ以外の果樹への導入が望まれる。本研究で得た化合物の使用でDOX-Coの機能解明に至れば、形質導入果樹の食としての安全性担保に一役買うことは間違いない。加えて、適度なDOX-Coの機能抑制に化合物を用いれば、緩やかなカラムナー性の提示に伴い果実の日照改善にも繋がること期待される。当該遺伝子の異所発現機構は形質導入に必要な不可欠な情報であることから、両者が揃って解明されることに大きな意義があるものと考えられる。学術的意義としては、酵素ファミリーに属する分子種の内在性基質特定の方法論を構築するものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the original function of DOX-Co, we obtained specific inhibitory compounds. We investigated expression systems to increase the yield of enzymes, and improved the efficiency of GC-MS for compound selection. We selected specific inhibitory compounds that do not inhibit known gibberellin-related enzymes. In addition, we detected enzymes with the same function in plants other than apples, and obtained information on the expression mode of the gene. To elucidate the regulatory mechanism of ectopic expression of the DOX-Co gene, we searched for protein coding regions in existing DNA contig sequences by referring to previously performed RNAseq data. Gene annotation was performed to create a list of DEG genes including transcription factors. In addition, we developed a reporter assay system to verify whether cis sequences exist in retroposon LTRs.

研究分野：生物制御化学

キーワード：カラムナー樹形 レトロポゾン ジベレリン 異所発現 ジオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

リンゴには枝が横に拡がらず、柱状(カラムナー性)を呈する突然変異種が知られるが、本研究着手前の時点で申請者らはこの樹形発現をもたらす原因遺伝子産物が「草丈を制御する植物ホルモン・ジベレリンに対する活性化妨害作用」を持つことを発見した。しかし、一般的なジベレリンの代謝および不活性化に関わる酵素群と系統学的に大きく隔たりが認められたことから、当該遺伝子産物は本来まったく別の機能を持つ可能性が高いと考え、その機能の解明を企画した(以下、アプローチ)。他方、カラムナー性のリンゴ品種では、レトロポゾンの挿入に起因して当該遺伝子の異所発現が生じており、その発現制御の機構解明もカラムナー性を理解する上で重要な要素と考えて企画した(以下、アプローチ)。それぞれのアプローチに関する背景事情を以下に記す。

### ：「DOX-Co 本来機能の解明」に関する背景事情

リンゴにカラムナー性を付与する *DOX-Co* 遺伝子産物は、 $\beta$ -ケトグルタル酸要求性のジオキシゲナーゼ群に属する。また、草丈の制御で知られるジベレリンの生合成および代謝の過程に寄与する酵素群も同じジオキシゲナーゼファミリーに属することがすでに広く知られていた。他方、研究代表者は、当時まだ同定されていなかったジベレリン受容体のモデルとしてジベレリン不活性化酵素の基質結合特性を永らく解析しており、この間に基質ジベレリンが結合したまま酵素反応が進行しない環境条件を精査した。後にこの知見は、生化学的にジベレリン受容体を特定するための決定打となった。そこで、おそらくジオキシゲナーゼに共通するであろうこの特性を用いて、リコンビナント *DOX-Co* 酵素との結合性を示すリンゴ内在性低分子物質を探索すれば、本来の *DOX-Co* 基質の候補物質を効率的に絞り込めるはずだと着想した。物質同定の経験もあり、酵素反応進行条件に切り替えて代謝変換される低分子物質こそ「本来の基質」と断定することが可能と考えた。加えて、基質と判明した物質あるいはその代謝物に関して、何らかの生理活性情報が既知であれば、*DOX-Co* 本来の機能推定も一層容易になるものと期待された。

他方、リンゴ *DOX-Co* ノックアウト形質転換体あるいはノックダウン形質転換体は作出しておらず、研究に用いるよう整備することは時間上現実的ではない。このため、これらと同質の化学的制御を狙うことにした。上記のとおり、内生ジベレリン量の制御過程の多くに *DOX-Co* と同様のジオキシゲナーゼ群が関わっており、それらにまったく影響せずに *DOX-Co* 特異的な阻害様式を持つ化合物が好ましいと考えられる。研究代表者はジベレリンの代謝酵素阻害剤であれば創製の経験があり立脚点を持つゆえに研究を有利に展開できると考えた。目的とする阻害剤創製のポイントは、ジオキシゲナーゼが酸化反応を触媒する部位近傍を有機合成的に構造変化できれば、ポケットに結合したまま代謝されないいわゆる”活性中心をロックする基質”となる例が知られており、これに倣う構造変化を検討すればよいと考えた。最終的に、リンゴの根への投与で生じる形態的あるいは物質変化を探り、*DOX-Co* 本来の機能の特定を期待する計画であった。

### ：「*DOX-Co* 遺伝子異所発現制御機構の解明」に関する背景事情

分裂の盛んな地上部での異所発現をもたらす原因として、レトロポゾン由来のゲノム挿入配列および *DOX-Co* 遺伝子のプロモーター領域に着目し、それらと相互作用する因子群の探索を行おうと計画した。その絞り込み方こそがポイントとみて、特に幼苗ではカラムナー品種であってもカラムナー性が現れない点を重要視した。なお、正常なリンゴ地上部では当該遺伝子の発現が抑制される状態が本来であり、カラムナー品種ではその解除に伴い異所発現している可能性も視野に入れた転写抑制因子の探索も織り込んでいた。

なお、申請者らはシロイヌナズナを用いて *DOX-Co* 過剰発現形質転換体を作成し、それらを用いて、*DOX-Co* のジベレリン活性化妨害作用を見出すに至ったが、これはリンゴ生体内においても同じ状況を引き起こしてカラムナー性を誘引したとする証明にはなっておらず、あくまでも推定の域を出るものではない。そこで、優先順位としては高くないもののリンゴ GA 生合成酵素遺伝子のクローニングも予定し、それら産物の性状解析も計画した。

## 2. 研究の目的

生化学的手法を用いて、リンゴのカラムナー性をもたらす原因遺伝子産物 *DOX-Co* 本来の触媒機能と基質を解明したい( )。もう一つは、カラムナー品種における *DOX-Co* 遺伝子の異所発現機構を明らかにしたい( )。

### 3. 研究の方法

：「DOX-Co 本来機能の解明」

- ・ DOX-Co 酵素に対する化合物投与に伴う反応阻害度モニター系を構築し、化合物ライブラリーの中から DOX-Co 阻害化合物のスクリーニングを計画した。DOX-Co 酵素への阻害効力を認めた化合物を対象として、ジベレリンの生合成酵素および代謝不活性化酵素に対する反応阻害状況も調べて、DOX-Co に対する阻害の特異性を評価して選抜に用いた。
- ・ リンゴ以外の種において DOX-Co 酵素と機能的に同質の DOX が存在するか精査した。そのために、発現用コンストラクトを整備してリコンビナント酵素を調製し、活性検出および産物同定を実施した。

：「DOX-Co 遺伝子異所発現制御機構の解明」

- ・ 実施済みリンゴ RNA-seq 情報を再利用して、リンゴカラムナー品種「ウイジック」に特異的に発現する遺伝子情報の中から、転写因子候補や関連する制御タンパク質因子等を対象として、リンゴ部位別（根、葉、茎頂等）の発現状況を調べ、カラムナー性発現との相関性を調べた。
- ・ 遺伝子発現量の観点からカラムナー性の樹形形成に対する寄与が大きいと考えられるジベレリンの生合成および代謝不活性化酵素の各遺伝子について、RNA-seq 情報の中から抽出を行い、クローニングおよびリコンビナント調製を計画した。

### 4. 研究成果

：「DOX-Co 本来機能の解明」

ジベレリンへの水酸化能が認められたリンゴカラムナー樹形の原因遺伝子産物 DOX-Co は、本来はジベレリンとは関わりのない別の生理機能を持つと想定されることから、生化学的手法を用いた解明を展開した。DOX-Co 特異的阻害化合物の選抜系構築に着手するにあたり、材料供給面で第一にリコンビナント DOX-Co 酵素の大幅な増収を図る必要があったため、種々の大腸菌発現系を検討した。加えて、化合物選抜系として幾つかの手法を検討し、操作性・コスト面・ハイスループット効果等の観点から GC-MS を用いる系を化合物選抜試験系用に効率化した。化合物ライブラリーからの本格的な化合物選抜を展開し、候補化合物を数種見出した。これらを対象に、既知のジベレリン関連酵素 GA 3-oxidase や 2-oxidase など DOX-Co と同ファミリー酵素群も調製を図り、それらの酵素への影響も調べて阻害範囲を評価した。これにより、当面の達成目標と定めていた DOX-Co 特異的阻害化合物を 2 種手中にすることができた。加えて、リンゴ以外の植物体から DOX-Co と同機能を持つ分子種の存在も検出し、当該酵素をコードしている遺伝子の発現特性、すなわち時期や部位に関する情報も得られた。化合物とリンゴ以外の DOX-Co 様分子種を手に入れたことに伴い、本研究領域は大きな推進力が得られたと考えている

：「DOX-Co 遺伝子異所発現制御機構の解明」

リンゴカラムナー品種における DOX-Co 遺伝子の異所発現機構解明の足掛かりとして、当該遺伝子発現に関与し得る転写因子等の候補について慎重に精査した。その目的のため、すでに実施済みである RNA-seq データを参照して、得られていた既存 DNA コンティグ配列を対象とするタンパク質コード領域の探索、および BLASTp による比較を行った。遺伝子アノテーションを実施することにより、数種の転写因子を含む DEG 遺伝子リストを作成した。加えて、転写活性に必要なシス配列としての機能が「レトロポゾン LTR に存在する可能性」を検証することを目的として、ルシフェラーゼ(LUC)をレポーターとするレポーターアッセイ用コンストラクト(pGL4-LTRx2)の構築を完了した。同様に、リンゴ由来の発現制御機構の解明では RNA-seq データの参照から既知ジベレリン生合成酵素に相同性が高い配列情報を選抜した。アプローチと比較すると、は計画全体の後ろ倒し気配が感じられたが、解析対象とすべき因子の絞り込み自体は終了しており、ようやく検証する上での基盤が整った段階と理解している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Okada K and C. Honda	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Regulating the Columnar Tree Architecture in Apple.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forests	6. 最初と最後の頁 1084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/f13071084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Okamoto, T. Inoue, T. Nagano, S. Miyazaki, I. Takahashi, T. Asami, K. Okada, K. Okada, and M. Nakajima	4. 巻 88
2. 論文標題 Chemical screening of inhibitors specific for MdDOX-Co that causes apple columnar tree-shape.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biosci. Biotech. Biochem.	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中嶋 正敏, 渡辺 大智, 高橋 郁夫, Jaroensanti-Takana Naiyanate, 宮崎 翔, 姜 凱, 中安 大, 和田 雅人, 浅見 忠男, 水谷 正治, 岡田 和馬
2. 発表標題 リンゴ円柱状樹形の原因遺伝子産物はジベレリンの12位水酸化反応を触媒する
3. 学会等名 植物化学調節学会 第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masatoshi Nakajima, Daichi Watanabe, Ikuo Takahashi, Naiyanate Jaroensanti-Tanaka, Sho Miyazaki, Kai Jiang, Masaru Nakayasu, Masato Wada, Tadao Asami, Masaharu Mizutani, Kazuma Okada
2. 発表標題 The gene product linked to columnar tree shape in apples decreases the presence of biologically active gibberellin
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上太喜, 岡本啓佑, 長野玄知, 宮崎翔, 高橋郁夫, 岡田憲典, 浅見忠男, 岡田和馬, 中嶋正敏
2. 発表標題 棒状樹形を呈するリンゴ突然変異体原因酵素に対する阻害剤創製研究
3. 学会等名 植物化学調節学会 第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北島裕大, 川田紘次郎, 井上太喜, 浅見忠男, 中嶋正敏
2. 発表標題 棒状樹形を呈するリンゴ突然変異体原因酵素に対する阻害剤創製研究
3. 学会等名 植物化学調節学会 第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上太喜, 北島裕大, 岡本啓佑, 長野玄知, 高橋郁夫, 川田紘次郎, 宮崎翔, 岡田憲典, 浅見忠男, 岡田和馬, 中嶋正敏
2. 発表標題 棒状樹形を呈するリンゴ突然変異体原因酵素の選択的阻害剤創製研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 第100回記念大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 和馬  (Okada Kazuma)  (10547722)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員    (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡田 憲典  (Okada Kazunori)  (20312241)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授     (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関