

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14849

研究課題名（和文）ブドウのジベレリン高感受性変異体におけるGID1遺伝子の発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Revealing the regulatory mechanism of GID1 gene expression in a gibberellin high sensitive mutant of grapevine.

研究代表者

渋谷 知暉（Shibuya, Tomoki）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：60818219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ブドウ‘デラウェア’の突然変異体であるジベレリン（GA）高感受性系統において、GID1遺伝子の発現制御に寄与している因子を探索するためにトランスクリプトーム解析を行った。発達期の果粒で‘デラウェア’とGA高感受性系統との間に検出された発現変動遺伝子のうち、異なる果粒発達段階で共通して検出された発現変動遺伝子に注目した。予測される遺伝子機能の面から転写因子OFP、極端な発現変動を示していることからFEZをGID1遺伝子の制御因子の候補として見出した。また、本研究を進めるための基盤的情報を得るために‘デラウェア’ゲノムの解析をロングリードシーケンサーによって進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってOFPやFEZといった転写因子がジベレリン受容体遺伝子の発現制御に関与する可能性が示されたことは植物生理学的にも新しい発見である。特にNAC転写因子であるFEZは、シロイヌナズナでは根での発現と機能を報告した研究があるが、果実発達のモデルであるトマトを含め、他の植物で果実器官における発現および機能が報告されておらず興味深い知見と言える。また、多数の突然変異系統が存在するブドウ‘デラウェア’はブドウにおける形質と遺伝子機能の関連について研究する上で重要な品種であり、そのゲノム情報が得られたことで、育種利用可能な新規知見の開拓に大きく貢献すると思われる。

研究成果の概要（英文）：Transcriptome analysis was performed to investigate factors contributing to the regulation of GID1 gene expression in gibberellin (GA)-high sensitive mutant of 'Delaware' grape. Among the expression variation genes detected between 'Delaware' and GA-high sensitive mutant in developing berries, I focused on expression variation genes that were commonly detected at different stages of grape development. I found ovate family protein based on its predicted gene function and FEZ based on its extremely variable expression, as a candidate regulator of the GID1 gene. In addition, the 'Delaware' genome was analyzed by long read sequencing to obtain basic information for further research.

研究分野：園芸科学

キーワード：ジベレリン 受容体 ブドウ 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生食用ブドウ (*Vitis* sp.) の生産においては、様々な品種において単為結果の誘発による無種子化および果実肥大の促進を目的として2回のジベレリン (GA) 処理を行う方法が普及しており、品種によって最適な処理方法が研究・確立されてきている。一方、モデル植物においてはGAシグナリングについての研究が進んでおり、GA INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) がGAを受容することで、GAシグナリングが活性化する (Sun, 2010)。

ブドウ‘デラウェア’ (*Vitis x labruscana*) の突然変異系統でGA感受性が高い‘大粒系デラウェア’ (以下、GA高感受性系統) においてはGID1の相同遺伝子であるVIGID1A, VIGID1Bの発現が顕著に高い。GA高感受性系統においては、GA受容体をコードする遺伝子の発現を促進する遺伝子変異がGA高感受性をもたらすと考えられた。しかし、GAシグナリングの入力部を担う受容体遺伝子の発現制御機構については、ブドウのみならずモデル植物においても知見が少なく理解が進んでいない。

2. 研究の目的

GA受容を担うGID1遺伝子の発現調節メカニズムについての理解を深めるためのアプローチとして、前述のブドウ‘デラウェア’における遺伝子変異を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網羅的な遺伝子発現解析による発現変動遺伝子の探索

GA高感受性系統と通常系統において、発現変動がみられる遺伝子を探索し、推定される遺伝子機能に基づいて重要な発現変動遺伝子を絞り込んだ。

(2) 塩基配列の変異が生じている遺伝子の探索

発現変動が原因でない場合を想定し、アミノ酸配列の変異などを引き起こす重要な塩基配列の変異を有する遺伝子の探索を行った。ショートリードを用いたゲノムリシーケンスによる変異配列の同定は、k-merを用いた変異配列の絞り込み、ロングリードシーケンサーを用いた‘デラウェア’ゲノムの解読を行った。

(3) 形質転換実験による候補遺伝子の機能解析

果実発達のモデルであるトマト‘Micro-Tom’において、候補遺伝子の一つであるOFP遺伝子を過剰発現させる形質転換体を作成し、形質への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 発達期の果粒において網羅的な遺伝子発現解析を行い、GA高感受性系統と‘デラウェア’との間にみられる発現変動遺伝子を探索した。その結果、GA高感受性系統で発現が上昇している遺伝子よりも発現が低下している遺伝子の方がより多く検出された。また、GA高感受性系統においてはGA受容体遺伝子の発現が高いことを再確認できた。次に、GA受容体遺伝子の発現を制御している因子としては転写因子が有力な候補であると考えられるため、発現変動遺伝子の中から転写因子に絞って推定される機能と実際の発現レベルを検証した。その中でも、特に顕著な発現変動を示し、果実や器官の発達に関連が深い機能を有すると推定される2つの遺伝子FEZおよびOFPを見出した(図1)。FEZはシロイヌナズナの根における細胞分裂に参与するNAC転写因子 (Willemsen et al., 2008) であり、OFPは果実をはじめとする器官サイズを抑制する転写抑制因子 (Wang et al., 2016) であることから両者が重要な候補遺伝子であると考えられた。

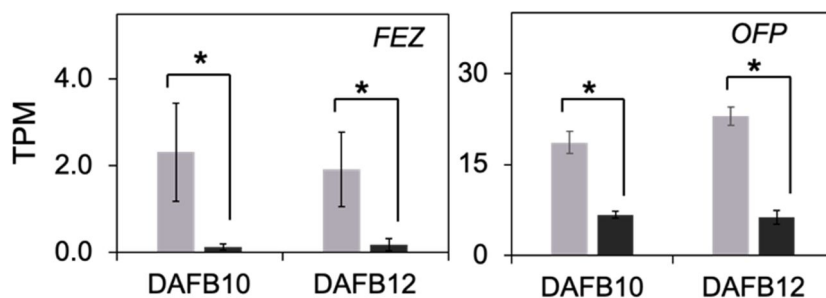


図1. 各候補遺伝子の発達期果粒における発現。

■: ‘デラウェア’, ■: GA高感受性系統,
DAFB: 満開後日数, *: FDR P -value < 0.05.

(2) GA高感受性系統において塩基配列の変異が生じている遺伝子の探索のために複数のアプローチで研究を進めた。まず、ショートリードを用いたゲノムリシーケンス解析を実施して変異配列を探索した。しかし、検出される変異数が数万にのぼり、実際にリードが有する多型と検出変異の不一致がみられるなど、正確な解析ができなかった。これは参照配列に用いたのが純粋なヨーロッパブドウである‘ピノ・ノワール’の倍過半数体ゲノムであったことによる可能性が考えられた。次に、k-mer分解したリードを用いてGA高感受性系統に特異的な配列を探索する手法

を検討した。しかし、保有する RNA-Seq リードを用いた k-mer 解析では GA 高感受性系統が有する変異配列を絞り込むことはできなかった。そこで、‘デラウェア’そのもののゲノム情報をもとに変異配列の解析を行うべく、ロングリードシーケンサーを用いたゲノム解析を行い、‘デラウェア’ゲノムの構築を試みた。

(3)GA 受容体の発現制御を担う因子の候補の 1 つである OFP について、果実発達のモデルであるトマト ‘Micro-Tom’ に導入して機能解析を試みた。OFP を過剰発現させた ‘Micro-Tom’ の形質転換当代個体は極端な矮化形質を示し、次世代の種子を取得することができなかった。OFP が何らかのプロセスを経て ‘Micro-Tom’ の器官サイズを抑制した事は明らかであるが、それがジベレリンシグナリング経路を経たものであるかは GID1 遺伝子の発現レベルに OFP が及ぼす影響を検討するには、OFP の発現レベルを抑えてよりマイルドに形質に影響する形質転換体を作成するか、In vitro なレポーターアッセイなどの手法を用いて検証する必要があると考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hikaru Ishikawa, Yasuyuki Togano, Tomoki Shibuya	4. 巻 92
2. 論文標題 Effect of GA3 Treatment on Berry Development in the Large Berry Mutant of 'Delaware' Grapes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 236 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.qh-054	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 Hikaru Ito, Yoshinori Kanayama, Tomoki Shibuya, Seedahmed A. Mohammed, Manabu Nishiyama, Kazuhisa Kato	4. 巻 300
2. 論文標題 Effect of short-term temperature stress on fruit set and the expression of an auxin reporter gene and auxin synthesis genes in tomato	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 111039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hikaru Ishikawa, Yasuyuki Togano, Tomoki Shibuya
2. 発表標題 Profile of gene expression at berry enlargement phase in the large berry mutant of 'Delaware'
3. 学会等名 The 4th Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川ひかる, 梅野康行, 渋谷知暉
2. 発表標題 ブドウ 'デラウェア' の大粒系統における果粒発達とGA応答性に関する研究
3. 学会等名 第40回植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川ひかる, 梅野康行, 渋谷知暉
2. 発表標題 ブドウ‘デラウェア’の大粒系統におけるジベレリン応答と果粒発達の特性
3. 学会等名 園芸学会東北支部令和5年度青森大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川ひかる・梅野康行・渋谷知暉
2. 発表標題 ブドウ‘デラウェア’の大粒系統におけるGAシグナリングと果実発達の関係
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikaru Ishikawa, Yasuyuki Togano, Tomoki Shibuya
2. 発表標題 GA signaling and pericarp tissue structure of the large berry mutant of ‘Delaware’
3. 学会等名 The 31st International Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川ひかる・梅野康行・渋谷知暉
2. 発表標題 GA受容体遺伝子VvGID1の高発現がブドウの果実肥大におよぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川ひかる・梶野康行・渋谷知暉
2. 発表標題 ブドウ‘デラウェア’の大粒系統の果粒肥大期における遺伝子発現プロファイル
3. 学会等名 園芸学会令和 5 年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川ひかる・梶野康行・渋谷知暉
2. 発表標題 ブドウ‘デラウェア’の大粒系統におけるGAシグナリングと果実発達の関係
3. 学会等名 園芸学会令和 4 年度春季大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------