

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580469

研究課題名(和文) 対立遺伝子間相互作用が関与する新しい耐寒性制御モデルの検証と機構解明

研究課題名(英文) Involvement of allelic-interaction-mediated gene regulation in cold-tolerance: elucidation of the mechanism

研究代表者

堤 賢一 (Tsutsumi, Ken-ichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40113964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウのエステラーゼ遺伝子W14/15の機能を解析し、耐寒性を亢進(W15a型)および低下(W14b型)させる変異型アレルを同定した。遺伝子型W14b/W15aリンドウではW14b型がW15a型を抑制し耐寒性が低下する。この現象には両アレルで時期特異的に異なるクロマチン構造変換が関与することが示唆された。本成果は育種技術開発に有用な耐寒性に関わる新しいタイプの遺伝子制御の存在を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Function and regulation of the gentian W14/15 gene variants in cold-tolerance were analyzed. The variant types that increase (W15a type) and repress the cold-tolerance (W14b type) were identified. In gentian plants carrying W14b/W15a genotype, the W14a allele inhibited the other W15a allele, leading to the lowered tolerance. This seemed to be caused by temporally different alteration of chromatin structure between each allele. The results present a new type of gene regulation in cold-tolerance, which can be applied for breeding strategy in gentian cultivars.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：リンドウ 越冬芽 耐寒性 遺伝子多型 対立遺伝子間不均等発現 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

リンドウの育種および育種用親株の開発・維持における重要形質の1つは越冬芽の耐寒性である。耐寒性の強い既存株を交配親に用いても交配相手によって耐寒性の弱いF₁株が生じるので、越冬芽の耐寒機構の解明は重要課題となっている。越冬芽(冬芽)の耐寒機構はポプラなどの樹木で研究されているが草本での例は極めて少ない。

これまでの研究から、我々が同定したリンドウ越冬芽に蓄積する新規エステラーゼ(W14/15)には多型(バリエーション)が存在すること、耐寒性低下と相関するバリエーションが存在すること、そのようなバリエーション対立遺伝子を一方にもつヘテロ2倍体では他方の対立遺伝子が抑制されることなどが示唆されていた。本研究開始当時、対立遺伝子間相互作用が関与すると思われるこのような耐寒性制御機構は他に例がなかったため、W14/15 バリエーション遺伝子の遺伝様式、バリエーション遺伝子・タンパク質の機能、およびクロマチン構造変換について解析し、新しいモデルの提示につなげようとした。

2. 研究の目的

園芸植物リンドウの育種において重要形質である越冬芽の耐寒性の機構およびその遺伝的背景を解明する。申請者は耐寒機構への関与が示唆される越冬芽特異的タンパク質 W14/15 を同定した。W14/15 遺伝子には12種類の多型(バリエーション)が存在し、耐寒性低下をもたらすバリエーションアレルの存在や、それを対立遺伝子の一方にもつヘテロ2倍体では他方の対立遺伝子が抑制され、これが耐寒性低下をもたらすことなどが示唆されていた。対立遺伝子間相互作用が関与するこのような耐寒機構は他に例がない。本研究は W14/15 遺伝子バリエーションの遺伝学的(遺伝様式)、生化学・生理学的(バリエーション

タンパク質の機能)および分子生物学的解析(シトシンメチル化、クロマチン構造変換など)を行い、上記のような耐寒性獲得様式の確認とその制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は W14/15 遺伝子多型タイプの組合せによる対立遺伝子間相互作用(トランスに働く抑制)が耐寒性に関与する機構を知るために、以下の解析を行う。

(1) 遺伝学的解析(交配実験)

相手対立遺伝子からトランスに抑制されたバリエーション対立遺伝子が次世代でどのように働くか(相手対立遺伝子を抑制するか)を交配実験によって検証する。これにより耐寒性・越冬生存率低下をもたらすバリエーションアレルとその遺伝様式を確認する。

(2) W14/15 バリエーション遺伝子・タンパク質の機能

W14/15 タンパク質は α/β ハイドロラーゼスーパーファミリーに属するが、このグループの植物酵素は、植物ホルモンの代謝・シグナル伝達に関与すると考えられている。そこで、各 W14/15 バリエーションタンパク質の生化学的機能について組換えタンパク質を用いて解析する。

(3) 各対立遺伝子のクロマチン構造

各対立遺伝子の発現制御に関し、クロマチン構造の変換が関与するか、DNA シトシンメチル化を中心に解析する。メチル化状態は重亜硫酸塩による化学修飾法で解析する。

これらの解析により、対立遺伝子抑制の遺伝様式、対立遺伝子抑制と相関するクロマチン構造、および W14/15 タンパク質(エステラーゼ)多型タイプの機能を明らかにする。

4. 研究成果

W14/15 バリエーションアレルの遺伝様式と機

能について以下(1)および(2)の成果が、クロマチン構造変換については(3)の成果が得られた。

(1) 耐寒性・越冬生存率低下をもたらすバリエーションアレルの確認と遺伝様式

耐寒性低下アレルを持つ品種 GSW (遺伝子型: W14b2/W14b2)とそれを持たない品種 Aki-6PS (W15a'/W15a')を交配したヘテロ 2 倍体 (W14b2/W15a')を萌芽させ越冬率を解析したところ、親株 Aki-6PS よりも低い越冬生存率を示した。この系統の越冬前の対立遺伝子各々の mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した結果、個体差が大きいものの、全体として対立遺伝子間で不均等が見られた。この耐寒性低下アレル W14b2 と通常アレル W15a'を持つ F₁ の自殖から得た F₂ 集団の遺伝子型-耐寒性の相関を解析した結果、W14b2 アレルは耐寒性低下にドミナントに働くことが確認された。

(2) W14/15 バリエーション遺伝子の機能の解析

種々の交配実験から、W15a 型アレルの発現が越冬生存(耐寒性)に不可欠であること、W14b 型 (W14b1 および W14b2) は越冬率低下にドミナントに働くことが明らかになった。そこでさらに、本遺伝子の発現を抑制することにより機能を直接解析した。リンゴ潜在型小球形ウイルス (ALSV) ベクターを用いて W15a 遺伝子の発現を抑制した個体を作成し、越冬芽の形成率と越冬後 (5 月以下、約 4 ヶ月) の生存率 (萌芽率) を調べた。この解析から、W15a 型の発現は越冬芽の形成には影響しないが、越冬生存に直接関与することを明らかにした。

W14/15 タンパク質の生化学的機能については、大腸菌で発現させたタンパク質と合成基質を用いて *in vitro* での解析を行ったが、バリエーションタイプの間で有意な酵素化学的

違いは見られなかった。

(3) クロマチン構造変換と機能発現の相関

耐寒性付与に負および正にそれぞれ関与する W14b2 遺伝子および W15a' 遺伝子プロモーターのシトシンメチル化 (5mC) 状態の季節変動を解析した。この領域には MADS box 転写因子 AGL2 結合配列および転写因子 Myb 結合配列がある。両遺伝子とも発現量の少ない葉では高度にメチル化されていた。休眠誘導前後 (10 月) 休眠時 (11 月) 休眠越冬時 (12 月) の越冬芽での W15a' 遺伝子の 5mC 頻度は 11 月が最も低く、プロモーター全領域が低メチル化状態であった。その後 (12 月) 低メチル化領域は狭まり、転写開始点上流 (-)600~500 bp 領域、-300~-200 bp 領域 (AGL2 結合領域) および myb 結合領域を含む -100~+50 領域が低メチル化領域として残った。W14b2 遺伝子も同様の領域が低メチル化状態であったが、その変化は W15a' 遺伝子と少しずれ、11 月の越冬芽よりも 12 月の方が低メチル化状態であった。両遺伝子間でクロマチン構造の変換時期が異なることから、対立遺伝子間不均等発現はそれぞれの対立遺伝子が異なる時間的制御を受けることによる現象であることが考えられた。

研究成果のまとめ

(1) および (2) の研究成果から、耐寒性付与に直接関与する W14/15 バリエーションタイプが存在すること、2 倍体においてはそのようなバリエーションの機能発現は対立遺伝子の組み合わせによって抑制される場合があることを明らかにした。この成果はリンゴの育種戦略の上で極めて有用である。また、(3) の成果から、2 倍体において W14/15 対立遺伝子の各々が個別に制御されている可能性が示唆された。詳細な機構の解明には至らなかったが、対立遺伝子間で異なる制御を受け

ることが異なる生理機能発現につながる例はこれまであまり例がないタイプの遺伝子制御といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

高橋 由衣, 日影 孝志, 若目田 圭祐,
斎藤 靖史, 堤 賢一
エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var.
japonica) と亜種エゾオヤマリンドウ (*G.*
triflora var. *japonica* f. *montana*) の地域
集団間の形態的変異 .
育種学研究 (Breeding Res.), 査読有、
16 巻, 2014, 1-6.

〔学会発表〕(計 6 件)

山岸 紀子, 日影 孝志, 斎藤 靖史,
堤 賢一
リンドウ W14/15 遺伝子は越冬芽の越冬
生存に關与する . 日本育種学会第 125 回
講演会 平成 26 年 3 月 22 日
東北大学川内キャンパス (宮城県)
高橋 由衣, 千葉さくら, 日影 孝志,
久米 浩平, 斎藤 靖史, 堤 賢一
野生リンドウの W14/15 エステラ - ゼ遺
伝子に見られる地理的変異 . 日本育種学
会第 125 回講演会 平成 26 年 3 月 22
日 東北大学川内キャンパス (宮城県)
ハニエ ビダディ, 久米 浩平, 若目田圭
佑, 日影 孝志, 斎藤 靖史, 堤 賢一
SVP-like flowering-related genes in
Gentiana: structure and expression.
日本育種学会第 125 回講演会 平成
26 年 3 月 22 日 東北大学川内キャンパス
(宮城県)
日影 孝志, 久米 浩平, 斎藤 靖史,
堤 賢一
W14/15 遺伝子マーカーを用いたリンド

ウ品種の越冬率の評価 . 日本育種学会第
123 回講演会 平成 25 年 3 月 28 日 東京
農大世田谷校 (東京都)

高橋 由衣, 日影 孝志, 若目田 圭祐,
斎藤 靖史, 堤 賢一
野生エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var.
japonica) およびその変種の形態的差異と
地理的変異 . 日本育種学会第 123 回講演会
平成 25 年 3 月 28 日 東京農大世田谷校 (東京
都)
山崎美幸, 千葉さくら, 土井寿子, 日影
孝志, 斎藤 靖史, 高畑義人, 堤 賢一
リンドウ属植物 エステラ - ゼ 遺伝子
W14/15 の種特異的変異, 種内変異および
地理的変異 . 日本育種学会 121 回講演会
平成 24 年 3 月 30 日 宇都宮大学 (栃木
県)

〔図書〕(計 1 件)

K. Tsutsumi and T. Hikage (2014)
Genes Expressed in the Overwinter
Buds of Gentian (*Gentiana* spp.):
Application to Taxonomic, Phylogenetic
and Phylogeographical Analyses.
in The Gentianaceae (Rybczynski J.J.,
Davey, M.R. and Mikula, A. eds.), vol 1
Characterization and Ecology,
chapter 9. pp251-265,
Springer-Verlag, Germany.

〔その他〕
寒冷バイオフィロンティア研究センター
<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~icg-1/CFRC/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
堤 賢一 (Tsutsumi, Ken-ichi)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 40113964

(2)研究分担者

斎藤 靖史 (Saitoh, Yasushi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号： 70287100