

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

平成 31年 3月 31日

所属機関名 山梨大学ワイン科学研究センター

職名・氏名 研究員・ 榎 真一

応募分野	<input checked="" type="checkbox"/> 自然科学分野 <input type="checkbox"/> 人文・社会科学分野
研究分野	基礎生物学・農芸化学
研究テーマ	ブドウの茎伸長を決定する要因の解明

【背景と目的】

植物の茎の長さは、植物の大きさ（樹高・樹勢）を決定し、収量等の果実品質に直結する非常に重要な要因である。ブドウでは新梢（葉と茎）の樹勢に応じた栽培法が検討されており、慣行法として垣根栽培と棚栽培が存在する（表 1）。

表 1 ブドウ栽培法の違い

栽培法	垣根	棚
収量	↓	↑
糖度	↑	↓
作業	簡単	大変
適性	醸造用	食用

樹勢大 

樹勢の盛んな品種では一般に棚栽培が推奨される。棚栽培は食用ブドウの慣行法で、植物体をのびのび育てる事で多収量になるものの作業労力は多くなる。一方、垣根栽培は、ワイン醸造用ブドウでの慣行栽培法であり、果実収量を落とし糖度を上げる目的で用いられる。この方法は横一列に並べた支柱に沿い、各ブドウ樹を栽培するため栽培管理作業が非常に簡単となる。しかしながら、日本の醸造用ブドウ品種は樹勢が旺盛で垣根栽培に適さないという問題がある。そのような品種においてさらに茎の節間が長い品種では、垣根栽培において単位空間当たりの収量が減少するという問題も存在する（図 1）。したがって、樹高の小さい矮化した日本の醸造用ブドウ品種の開発や新梢長制御技術の開発が望まれる。

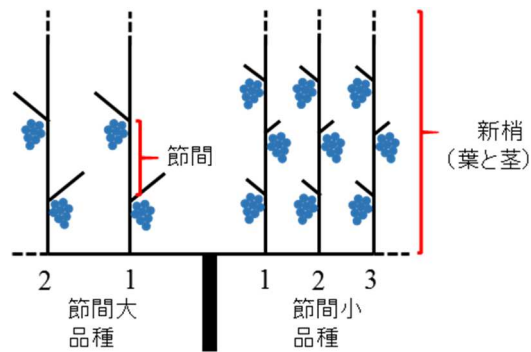


図 1 垣根栽培での新梢の節間の長さによる違い
節間の長い品種では限られたスペースでの栽培における収量性は低下する。

植物が成長するための現象の多くには植物ホルモンが大きく関わる。植物の大きさは主に細胞の数や長さにより決定され、オーキシシン、ジベレリン、ブラシノステロイド（以下 **BR** と略記）等の植物ホルモンは、単独または協調して働き、複雑な機構により細胞長を制御する。これらの働きはイネやシロイヌナズナで盛んに研究されているが、果樹では研究が進んでいない。植物ホルモンの中では比較的最近発見された **BR** は植物伸長機能を有することが明らかになっているものの、植物種ごとに合成経路、最終産物の違いが大きく、その作用は依然不明瞭である。ブドウでの **BR** の植物成長、特に新梢（茎）伸長への関与および **BR** 合成経路における各遺伝子の機能などの報告は存在しない。

申請者らはこれまでに、先行研究にてブドウの若い新梢における各種遺伝子発現の網羅的解析による甲州ブドウの特性評価により、ブドウの茎の伸長への **BR** 合成遺伝子の関与を示唆している（該当部分未発表）。このうち 3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase 酵素をコードする **Cytochrome P450 90D1 (90D1)** 遺伝子は、**90C1** 遺伝子と相同機能を持ち **BR** 合成経路の中流で多くの代謝産物の分岐合成反応に関係することがモデル植物では知られている（大西ら、2006）。

BR 生合成分岐経路の多くのルートで働くと考えられているブドウの **90D1** 遺伝子（*Vitis vinifera 90D1* : *Vv90D1*）の新梢（葉と茎）における発現量は、新梢の茎節間長の長い日本固有品種の甲州ブドウ（Koshu）と対照の節間の短い欧州のブドウ品種（Pinot Noir）で比較した場合、Pinot Noir よりも Koshu の特に茎において高発現している（図 2）。

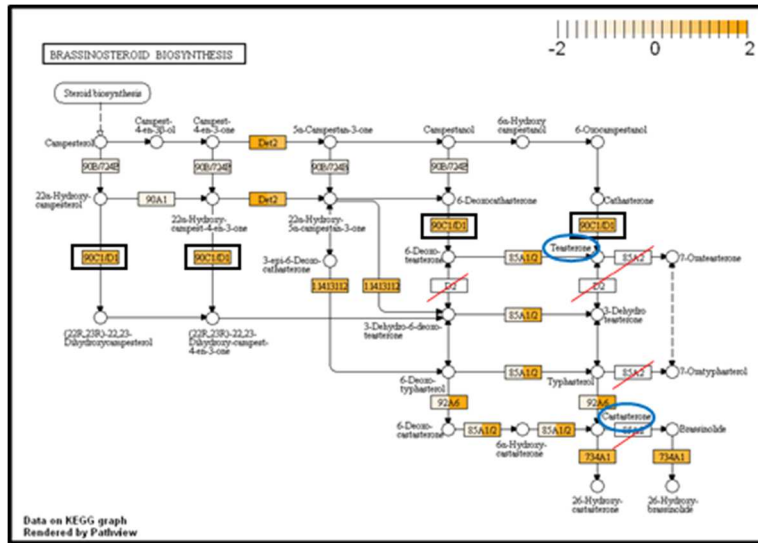


図 2 ブラシノステロイド (BR) 代謝経路における各種遺伝子の発現量比較。

植物サンプルとして、対照 (Pinot Noir) と茎の長い Koshu の新梢を用いた。ボックスは各産物の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の発現量を示す (左半分: 葉、右半分: 茎)。右上のカラーバーは Pinot Noir に対する Koshu の各遺伝子の発現量比を示し、正の値 (色がオレンジに近い) ほど Koshu で発現量が高いことを示す。

以上の知見から、*Vv90D1* 遺伝子が BR 合成に決定的な働きをしており、当該遺伝子の高発現により蓄積された BR によりブドウの茎伸長が起こっているのではないかと仮説を立てた (図 3)。

Vv90D1 遺伝子はブドウで未だ単離されておらず、機能や BR 合成への作用機構は不明である。そこで本研究では、*Vv90D1* 遺伝子の単離後に機能解析を含めた特性評価を行い、作用機構の解明という観点から、*Vv90D1* 遺伝子のブドウの茎伸長における影響を明らかにすることを目的に試験を行った。

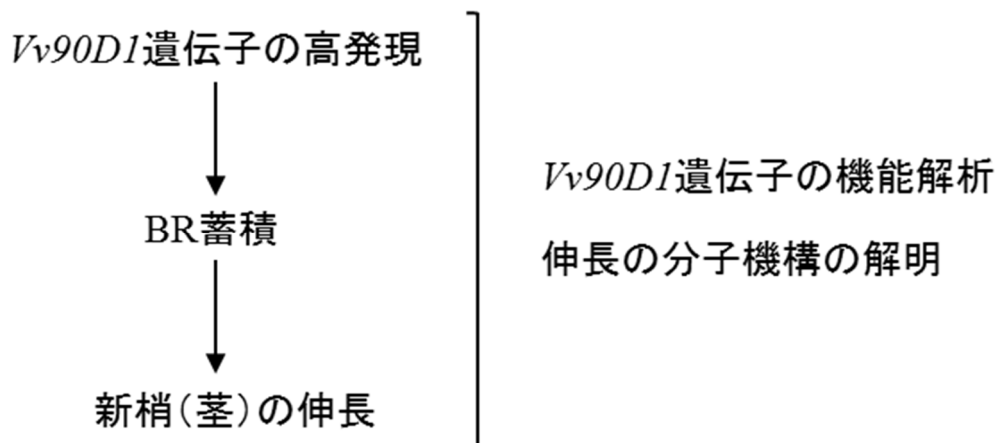


図 3 本研究におけるブドウの茎伸長機構の仮説

【ニーズと実社会への貢献】

当該遺伝子を含む BR 合成遺伝子のブドウ茎伸長機構への影響における理解不足は、茎長制御による栽培労力の軽減や、果実高品質化のための技術開発の遅延という弊害をもたらしている。

本研究では、*Vv90D1* 遺伝子の植物伸長への影響解明を目的として、当該遺伝子の特性評価と機能解析を行うことで、ブドウにおける新梢伸長の分子機構の解明という新規知見の獲得による基礎生物学分野への貢献が期待できる。

その成果は、種々の農芸科学分野での応用研究へと発展可能であり、得られた知見を活かし、ブドウの新梢の栄養成長量を調節し新梢を短くすることで、剪定などの農家の作業労力の軽減や、栄養成長から生殖成長への栄養分配を多くし、高品質、高収量の果実生産が可能になると考えられる。本研究の成果はそれらのブドウ生産向上のための新品種開発や栽培技術開発のための応用研究への基盤を与え得る。

このように本研究の成果は、一般科学分野へ新規知見を与え、ブドウの新梢伸長制御技術開発による果実の高品質化などの応用研究に展開可能である。それらはブドウを含む果樹園芸産業、ワイン産業へと貢献可能であり、社会的意義は非常に大きいと考えられる（図 4）。

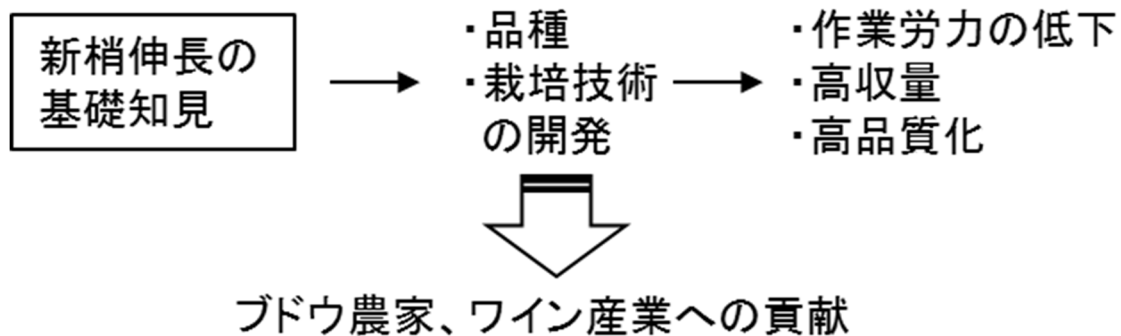


図 4 本研究のニーズと実社会への貢献

【研究方法と成果】

本研究ではブドウを用いた試験用ブドウ畑（圃場）での試験により BR とブドウの新梢伸長の関連性を明らかにする。その後 *Vv90D1* 遺伝子を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナを用いて、当該遺伝子の機能性評価を行い、図 3 の仮説のもとブドウにおける新梢伸長の作用機構の解明を行った。

1. ブドウ樹における *Vv90D1* 遺伝子と新梢伸長の関連性

2. *Vv90D1* 遺伝子の特性評価

・ブドウの各組織における *Vv90D1* 遺伝子発現量

結果を図 5 に示した。

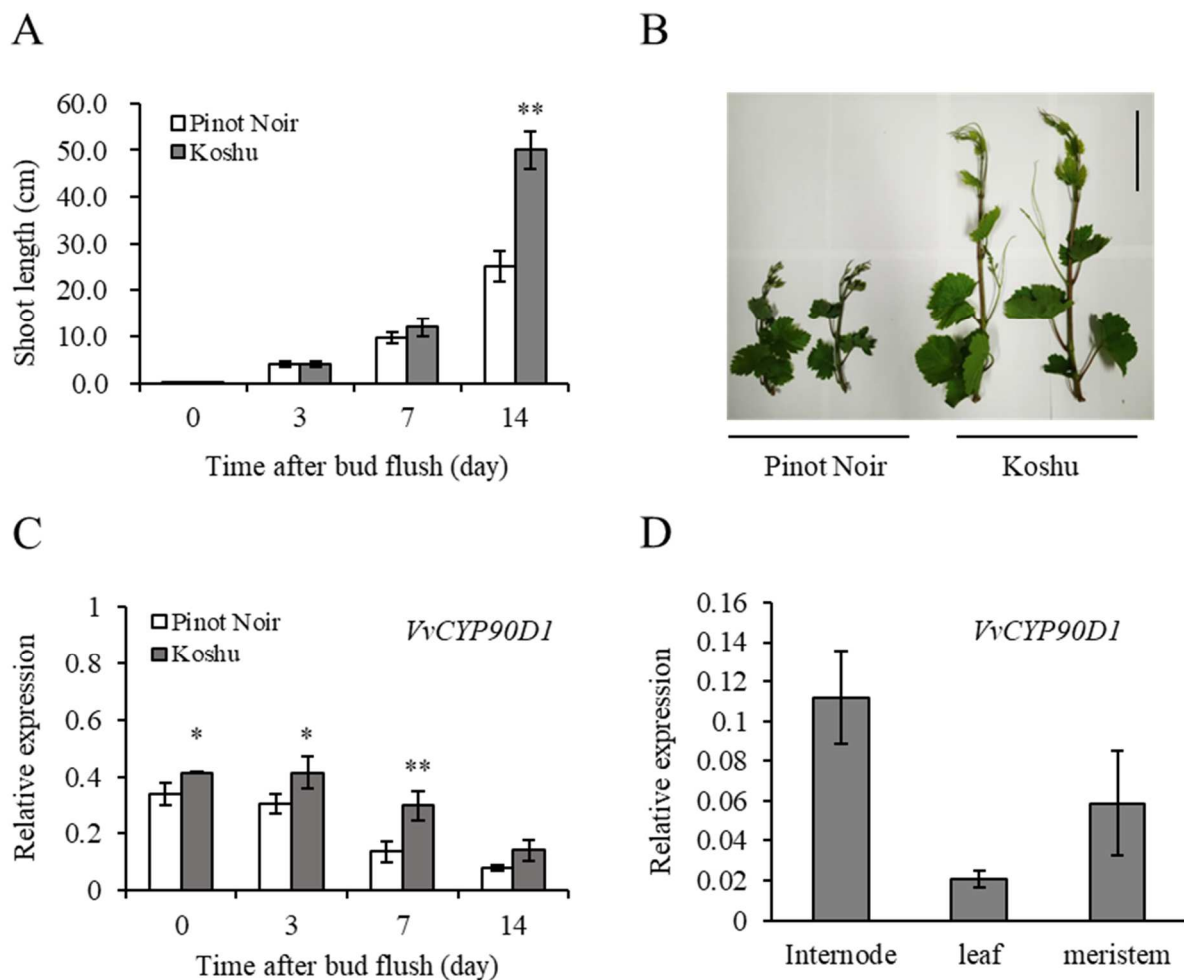


図 5 ブドウ品種（Pinot Noir ピノ・ノワールと Koshu 甲州の比較）における新梢伸長と BR 合成遺伝子の関係。A：新梢長（cm）、B：写真、C：BR 合成遺伝子発現量、D：組織別発現量（Internode 茎、leaf 葉、meristem 茎頂分裂組織）。

試験はまず圃場試験にて、新梢長が標準的な Pinot Noir を対照として、新梢長が長い Koshu を比較対象として用いた。新梢長の形質評価、当該遺伝子発現量の定量により、BR 合成関連遺伝子である *Vv90D1* と新梢長との関連を明らかにした。図 5 に示したブドウ樹 2 品種の比較により、新梢長の長い品種ほど (図 5A, B)、BR 合成遺伝子が高く発現している (図 5C) ことが確認された。

また先行研究では、ブドウの新梢において、特に茎での当該遺伝子の発現量が示唆されている。そこで本研究では、茎、葉、茎頂分裂組織など新梢の各組織のどの部位において当該遺伝子発現量が高いかを定量により明らかにし、当該遺伝子と伸長などの機能との関連性を検討した。図 5D に示した、組織別の遺伝子発現量の調査 (図 5D) は、当該遺伝子が茎 > 茎頂分裂組織 > 葉の順で高く発現していることを明らかにした。

以上より、茎伸長と当該遺伝子の正の相関性が示唆された。

2. *Vv90D1* 遺伝子の特性評価

・当該遺伝子の系統解析

着目しているブドウの *3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase* 遺伝子は本研究において、はじめて単離されたものであるため、この遺伝子のアミノ酸配列を他植物種の既知遺伝子のアミノ酸配列情報と生物情報学的手法により比較しグループ分けをした。これにより植物種ごとの分類を確認し、単離した当該遺伝子が 90C1 ではなく実際に 90D1 グループの遺伝子であることを同定し、他植物種の *90D1* 遺伝子との類縁性について評価した。

結果を図 6 に示した。本研究で単離した当該遺伝子の配列解析と他植物を含めた系統解析により、*3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase* 遺伝子は Cytochrome P450 *90D1* (*90D1*) グループに属することが明らかとなった。またブドウのこの遺伝子は果樹のリンゴ (*mdm*)、ポプラ (*pop*) の *90D1* グループと近縁にあり、続いてシロイヌナズナ (*ath*) の *90D1*、イネ (*dosa*) の *90D2* グループ、さらには各種の *90C1* グループと遠縁関係にあり、この系統解析の妥当性が示された。このため、本研究では引き続きこの *3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase* 遺伝子をブドウ属 (*Vitis Vinifera*) 由来の *Vv90D1* 遺伝子と呼称することとした。

この遺伝子は他の植物で BR 合成の促進機能が報告されているため、以降ではモデル植物のシロイヌナズナを用いて、より詳細な機能解析を試みた。

Aligner : Muscle
 Method : Maximum likelihood
 Model : JTT matrix
 Bootstrap: 1000

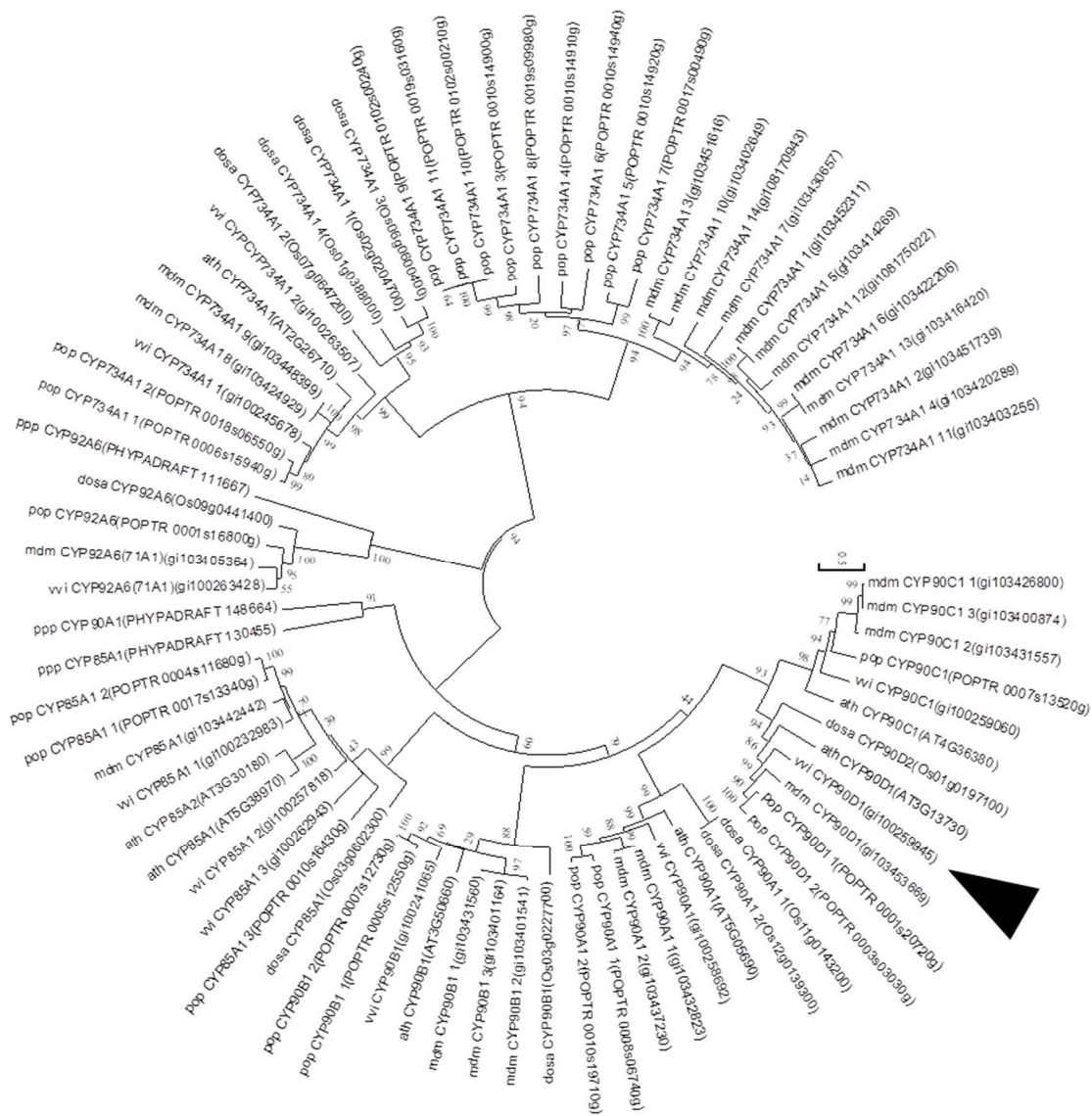


図6 ブドウ *3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase* 遺伝子のクラスター解析。Pop (ポプラ)、mdm (リンゴ)、vvi (ブドウ)、ath (シロイヌナズナ)、dosa (イネ)、ppp (コケ) の各種において、CYP グループ (C1,D1,D2 等) の塩基配列のグループ分けを行った。単離の当該遺伝子は▲で示す位置に属する。

3. *Vv90D1* 遺伝子の機能解析

・形質転換シロイヌナズナによる遺伝子機能解析

ブドウ圃場試験により当該遺伝子と新梢の茎伸長の関連性を示したものの、Pinot Noir と Koshu では遺伝的背景等のサンプル条件が異なる。そこで単離した *Vv90D1* 遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナに遺伝子導入し、*Vv90D1* 遺伝子以外は遺伝的背景が同じ形質転換シロイヌナズナを用いて、分子生物的手法による当該遺伝子の機能解析を行い、仮説の実証を試みた。

各種シロイヌナズナ（野生型 wild、*Vv90D1* 過剰発現体 (*Vv90D1*)、*90D1* 欠損体 (*At90d1*)) を用いて以下の手法により解析を試みた。各植物体の茎の長さを測定した。野生型に比べて過剰発現体では植物の茎の長さが伸びること、欠損体では長さが減少することを形質調査にて確認した。その後 *Vv90D1* 発現量を測定した。

上記の目的遺伝子の詳細な機能解析のために、生育が早いモデル植物のシロイヌナズナにこの遺伝子を導入させ過剰発現した形質転換体を作成し、形質転換第一世代 (T1) まで組み換えの成否を検定した。目的遺伝子以外の遺伝的背景が同じであるこのサンプル間比較により、*Vv90D1* 遺伝子と花序（茎）の伸長関係を調査した。茎長は *90D1* 遺伝子の発現量順に *Vv90D1* > wild > *At90d1* となり（図 7）、図 3 の仮説における *Vv90D1* 遺伝子の高発現→茎伸長というメカニズムの解明がされ、ブドウ *Vv90D1* 遺伝子が茎伸長機能を有することが明らかとなった。

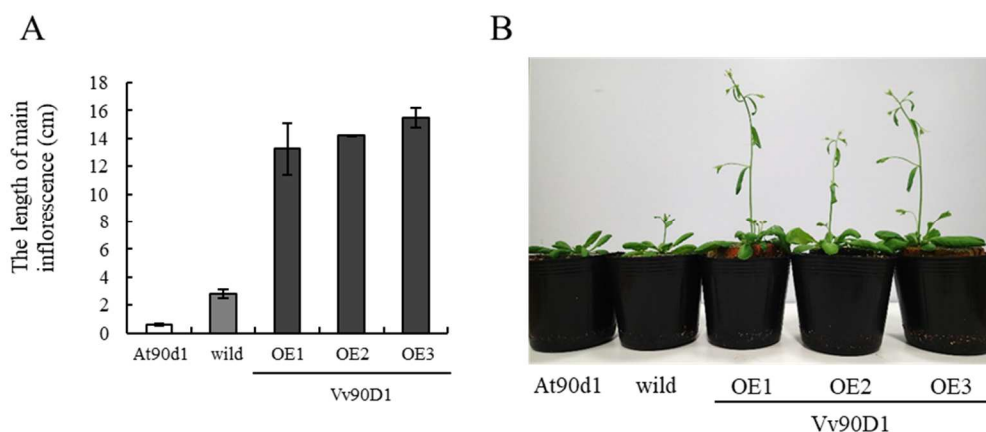


図 7 シロイヌナズナ形質転換体における茎長と BR 合成遺伝子の関係。At90d1 : 90d1 欠損体、wild : 対照区、Vv90D1 (OE1~3) : Vv90D1 形質転換体 3 系統。

【今後の展望】

3. *Vv90D1* 遺伝子の機能解析

・形質転換シロイヌナズナによる遺伝子機能解析（続き）

本研究は、ブドウの茎伸長現象のメカニズムの解明を目的に行ったものである。期間中には、上記の研究成果報告内容に記述したように、仮説（図3）における、当該遺伝子の高発現による茎伸長というメカニズムの一端を解明することができた。

しかしながら、上記3の試験は、遺伝子発現がまばらなヘテロ系統（T1世代）で行ったものであり、遺伝子機能解析データとして学術論文に投稿する際にはまだ不十分なものである。このため今後は遺伝子発現の安定したホモ系統 T2 世代を作成し、各植物体の茎の長さとして *Vv90D1* 発現量を変数とし、統計解析手法により、これらの相関を示し関係性を明らかにすることで、この遺伝子機能の証明を完全なものにする予定である。

3. *Vv90D1* 遺伝子の機能解析

・ *Vv90D1* の作用機構の解明（予定）

また当初の計画では、仮説の中間部分である BR 蓄積の箇所、すなわち実際にこの遺伝子の発現により、BR 含量が増えていること、BR 関連化合物の種類に変化があるかなどを外注分析により同定し、*Vv90D1* の作用点の解明を行う予定であった。しかし残念ながら、本研究期間中にはシロイヌナズナ形質転換体の準備の遅れから、計画の完遂には至らなかった。

今後は上記の内容について、別途資金を工面して研究を進め、結果を出していきたい。また資金調達がかなわなかった場合でも、現状までの遺伝子機能解析までの成果を完遂し学術論文として世に発表する所存である。

またその後は、これらの成果知見を活かし茎調整技術の開発による栽培省力化や果実高品質化など、農芸科学分野の応用研究に取り掛かりたい。それらは山梨の地場産業でもあるブドウ果樹、ワイン産業への貢献が可能であると考えられるため、積極的に推進していきたい。

【研究成果の発信方法（予定を含む）】

本研究の成果は、国内の農業関係者に向け植物科学や園芸分野での学会発表および世界中への成果発表を目的に海外の学術雑誌への投稿掲載を考えている。上記展望にある程度が目途が付いたら、これらの方法による発信は必ず行いたい。また併せて、今年県で行われる予定の成果報告会は当然の事、HP 等で県民や専門分野内外の関係者へ向けて、広い情報発信を行っていく予定である。