ブドウ果実品質に関連するERストレス誘導タンパク質 VIGG の機能解析

山梨大学 ワイン科学研究センター 果実遺伝子工学研究部門　○ 加藤裕紀・宅原由起・鈴木俊二・高柳勉

背景および目的

ウィルスがブドウに感染すると，果実成熟期の遅延，着色不良，樹勢の低下が引き起こされる．これはウィルス感染により何らかの細胞生理障害が引き起こされているためである(Espinoza *et al.* 2007)．近年，植物とウィルスの相互作用に関する研究は多種の植物で行われている．特に，タバコ(*Nicotiana tabacum*)では，宿主細胞レベルでウィルスとの相関関係が明らかにされてきており，植物の過敏感反応による全身枯死誘導の分子機構の制御を目指した研究が盛んに行われている(Hasugai et al. 2003)．ブドウではウィルス感染により光合成に関与する遺伝子群や老熟に関連するプロテアーゼやリパーゼなどの酵素遺伝子群が発現抑制または誘導されることが明らかにされた(Christov et al. 2007, Lim et al. 2005)．しかしながら，ブドウのような果樹植物で最も重要である「ウィルス感染による果実品質の低下」に関する分子レベルでの知見は皆無である．本研究は，ウィルス感染による生的変動を研究し，果実品質の低下に関する分子機構を解明を目指す．すなわち，ウィルス感染により特異的に発現するタンパク質が関与するメカニズムを明らかにすることで，果実の品質低下を引き起こす機構を解明する．我々は，これまでにウィルス感染によるブドウの生理的変動を解析し，ウィルス感染特異的に誘導されるvirus-induced grapevine protein (VIGG, accession no. EF212291)を同定した(園芸学会春季大会，2007年)．本発表では，VIGGの更なる機能解析を行った結果を報告する．

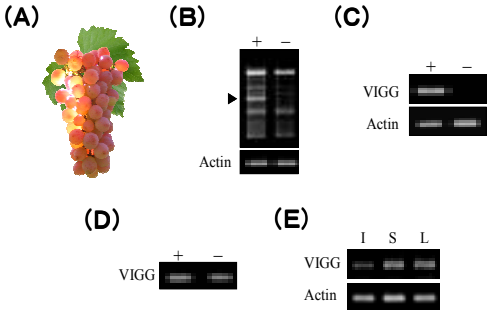


Fig. 1 VIGG gene expression in virus-infected grapevine.
(A) Virus-infected (Virus+) and virus-free (Virus-) *Vitis vinifera* cv. Koshu were collected from an experimental vineyard at University of Yamanashi. Virus+ grapevine was infected by Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB) and Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV). (B) RT-PCR-based differential display was performed using total RNA isolated from vein of Virus+ or Virus- grapevine leaf. Arrowhead, *vigg*. (C) RT-PCR analysis was performed using *vigg*-specific primers. *vigg* was expressed in Virus+. (D) Genomic DNA was extracted from the Virus+ or Virus- garapevine. PCR analysis was performed using *vigg*-specific primers. (E) Tissue distribution of VIGG in virus-infected grapevine. Total RNA was isolated from inflorescence (I), stem (S), and leaf (L) in Virus+ grapevine and subjected to RT-PCR analysis. β-actin primers (Actin) were used as an internal control for RT-PCR. +, Virus+ grapevine; –, Virus– grapevine.

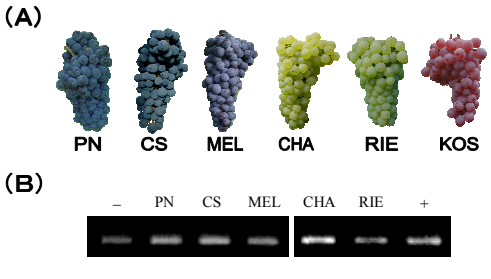


Fig. 2 Genomic PCR analysis
(A) Cultivers used in this analysis, Pinot Noir (PN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MEL), Chardonnay (CHA), and Riesling (RIE). (B) Genomic DNA was isolated from PN, CS, MEL, CHA, and RIE and subjected to PCR using *vigg*-specific primers. +, Virus+ grapevine; –, Virus– grapevine.

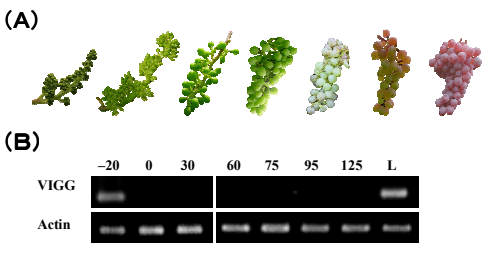


Fig. 3 Timing of VIGG expression during berry development.
(A) Developmental stages used in this analysis. (B) Total RNA was isolated from berries at the indicated stages and subjected to RT-PCR analysis. Numbers on top indicate days before or after anthesis (0). Leaf (L) was used as control for VIGG gene expression. β-Actin primers (Actin) were used as internal control for RT-PCR. +, Virus+ grapevine; –, Virus– grapevine.

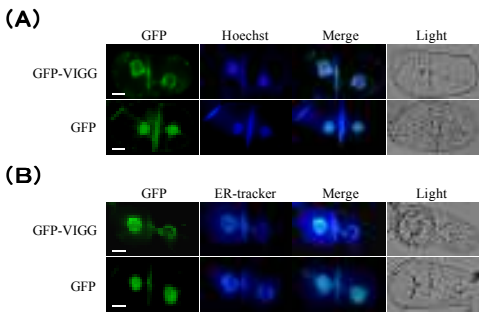


Fig. 4 Subcellular localization of VIGG.
(A) GFP-VIGG fusion protein was localized in the periphery of the nucleus. The fluorescent signal did not overlap with that of Hoechst 33258 (Hoechst). (B) GFP-VIGG fusion protein overlapped with the ER-specific probe, ER-tracker blue-white DPX (ER-tracker). GFP protein (GFP) was used as control for subcellular localization. Green color shows the fluorescence of GFP. Merge, a merged image. Light, an image observed using a microscope. Scale bar, 10 μm.

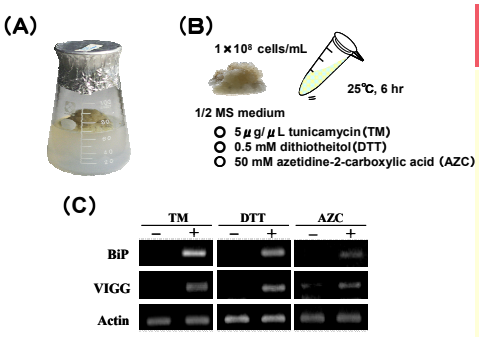


Fig. 5 Induction of VIGG expression by ER stresses.
(A) Cultured cells were prepared from a virus-free meristem culture. (B) The cells were treated with tunicamycin (TM), dithiothreitol (DTT), and azetidine-2-carboxylic acid (AZC). (C) Total RNA was isolated from treated-grapevine cells. RT-PCR was performed using *vigg* or luminal binding protein (BiP)-specific primers. BiP was used as a ER-stress marker of grapevine. β-actin primers (Actin) were used as an internal control for RT-PCR. +, treated; –, not treated.

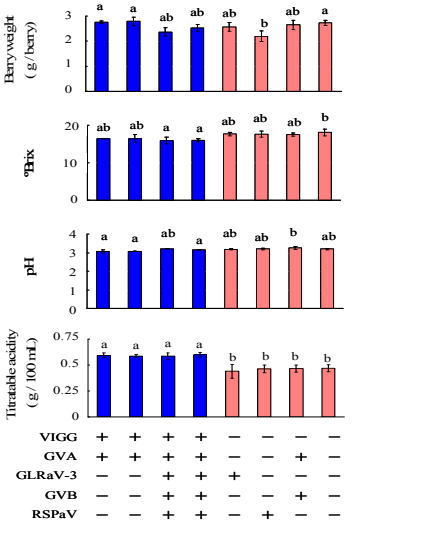


Fig. 6 Correlation of VIGG expression with fruit composition.
Fruit composition (berry weight, °Brix, pH, and titratable acidity) was measured and compared between VIGG-expressing grapevines (blue columns) and control grapevines that did not express VIGG (red columns). The characteristics of each grapevine are indicated under each bar. +, expressed or infected; –, neither expressed nor infected. Bars indicate means ± standard errors of triplicate experiments, and those followed by a different letter are significantly different according to the Tukey-Kramer multiple comparison test at $p < 0.05$.

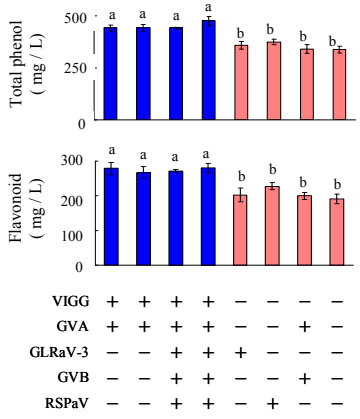
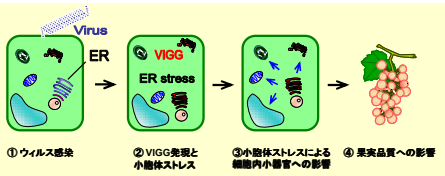


Fig. 7 Effect of VIGG expression on total phenol and flavonoid phenol contents in fruits.
Total phenol and flavonoid phenol contents in fruits were measured and compared between VIGG-expressing grapevines (blue columns) and control grapevines that did not express VIGG (red columns). The characteristics of each grapevine are indicated under each bar. +, expressed or infected; –, neither expressed nor infected. Bars indicate means ± standard errors of triplicate experiments, and those followed by a different letter are significantly different according to the Tukey-Kramer multiple comparison test at $p < 0.01$.

結果および考察

differential display法により，ウィルス感染特異的に誘導されるブドウ遺伝子を見出した．植物モデル培養細胞BY-2にGFP-VIGGの融合タンパク質を発現させたところ，VIGGは小胞体への局在性を示した(Fig. 4)．小胞体は分泌タンパク質の修飾を行うオルガネラであるとともに，タンパク質のアンフォールディングやミスフォールディングを認識する小胞体ストレスセンサーでもある．植物の小胞体ストレスに関する研究は乏しいが，動物では神経疾患，代謝系疾患，そして病原ウィルスにより小胞体ストレスが誘引され，各々の症状が引き起こる(Hiramatsu *et al.* 2006)．そこで，VIGGが小胞体ストレスに相関するタンパク質であるのか，ブドウ培養細胞に小胞体ストレス誘発剤のツニカマシン(TM)，ジチオトレイトール(DTT)およびアゼチジンカルボン酸(AZC)で処理し，人為的に小胞体ストレスを誘導した．その結果，小胞体ストレス発生時にVIGGは誘導されることが示された(Fig. 5)．これは，VIGGが小胞体ストレス応答または小胞体ストレスを誘導する分子機構で機能するタンパク質である可能性を示している．VIGGが発現することにより，ブドウ果実に含まれる総酸量およびフラボノイド量が有意に増加した(Fig. 6, Fig. 7)．これらの果実成分の上昇はブドウ果実の品質低下を示す．しかし，現段階ではVIGGが真意に小胞体ストレスへ関与し，果実品質低下分子機構に係わるのかは明らかでない．「ウィルス感染」，「VIGG発現」，「小胞体ストレス」の三者間の相互作用を更に検討し，VIGGによる果実品質低下分子機構を明確にするには，VIGGを導入した遺伝子組換え植物での研究が必須である．しかしながら，ブドウはライフサイクルが長いという問題点があるため，現在，VIGG発現シロイヌナズナおよびトマトを作出している．今後は，2 種類のVIGG組換え植物を用いて，1)ウィルス感染、2)VIGG発現、3)小胞体ストレス、4)ブドウ果実品質低下という果実品質低下分子機構について、更なる解析を行う予定である．

Conclusion #1



Future studies

References

(1) Christov et al. J Plant Physiol. 164 (2007)1124-1133.
(2) Espinoza et al. J Exp. Bot. 58 (2007) 3197-3212.
(3) Hasugai et al. Science 305 (2003) 855-858.
(4) Hiramatsu et al. Nucleic Acids Res. 34 (2006) 13.
(5) Lim et al. Top. Dev. Biol. 67 (2005) 49-83.

Molecular cloning and characterization of VIGG, ER stress-induced grapevine protein, correlated with fruit quality in Vitis vinifera
Laboratory of Fruit Genetic Engineering, The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi　Katoh, H., Y. Takuhara, S. Suzuki and T. Takayanagi