

ブドウの高温耐性メカニズムの解明

○小林正幸・加藤裕紀・鈴木俊二 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

背景および目的

現在、世界中で地球温暖化が深刻な問題となっている。特に気温の上昇が農作物に与える影響は多岐に渡り、ブドウ栽培にも影響を及ぼし始めている。温暖化の影響を受けやすいオーストラリアでは、内陸部の気温が2030年までに2.5℃上昇すると予想されており、ブドウ果実およびワインの品質の低下とともに、ブドウ栽培に適した土地がオーストラリアから、10%減少する可能性がある¹⁾。このような背景のもと、我々は遺伝子組換え技術を利用した高温耐性ブドウ樹の作出を目的とし、高温で誘導されるブドウ遺伝子の探索およびその機能解析を行った。本発表では、ブドウ樹から熱誘導される遺伝子を単離し、シロイヌナズナに遺伝子導入した。そこから熱耐性試験を行い単離した新規ブドウ遺伝子の熱耐性機能について検討した。

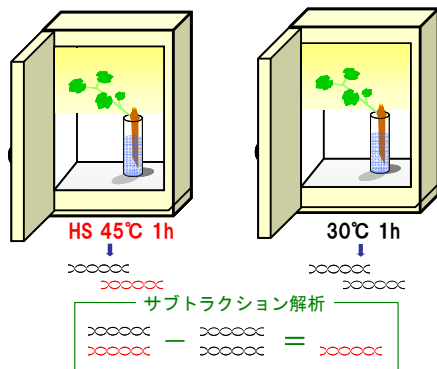


Fig. 1 実験方法

Vitis vinifera cv. ピノ・ノワール種の挿し木を製作し、45℃、1時間熱処理を行った。対照として、30℃、1時間培養した。培養後、RNAを抽出し、サブトラクション解析を行った。

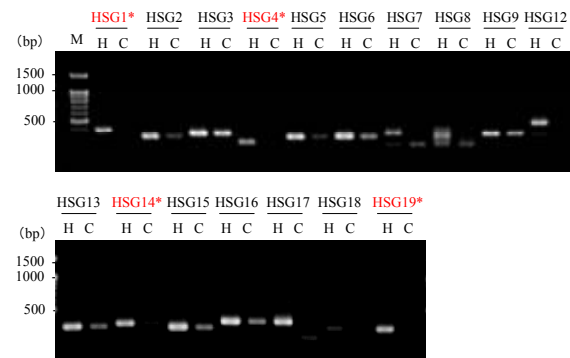


Fig. 2 熱処理で誘導されたブドウ遺伝子の発現解析

サブトラクション解析により、19個の遺伝子断片を得た。泳動結果から、HSG1, HSG4, HSG14, HSG19の4つのブドウ遺伝子を選抜した。

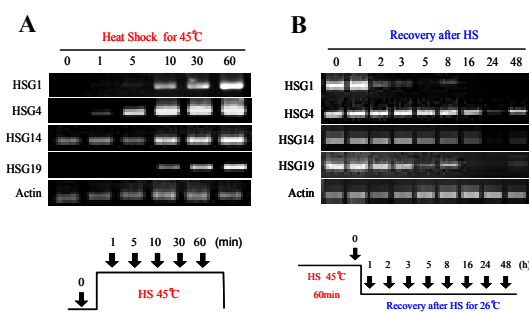


Fig. 3 選抜した4つのブドウ遺伝子の経時的変化

(A) ピノ・ノワール種の葉に45℃、0, 1, 5, 10, 30, 60分熱処理し、遺伝子発現をRT-PCR法で確認した。
(B) 45℃、60分熱処理した葉を室温(26℃)で1, 2, 3, 5, 8, 16, 24, 48時間静置し、遺伝子発現をRT-PCRで確認した。

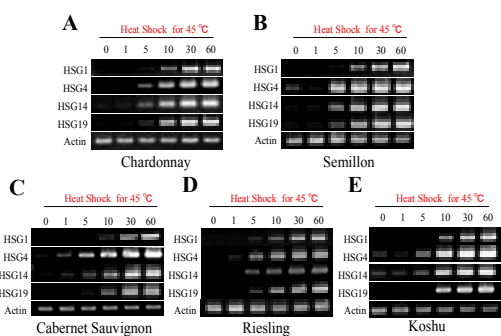


Fig. 4 品種間別の発現変化

各品種の葉に45℃、0, 1, 5, 10, 30, 60分熱処理し、遺伝子発現をRT-PCR法で確認した。以下の品種でも同様の実験を行った。(A) セミヨン種 (B) セミヨン種 (C) カベルネ・ソービニオン種 (D) リースリング種 (E) 甲州種

Table. 1 熱処理によって誘導された4つのブドウ遺伝子配列の解析

Gene segment	Homology	Identity (%)	Similar	Identity (%)
HSG1	<i>Vitis vinifera</i> , unnamed protein product	100	<i>Arabidopsis thaliana</i> BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 5	36
HSG4	<i>Vitis vinifera</i> , unnamed protein product	100	<i>Medicago sativa</i> heat shock protein	76
HSG14	<i>Vitis vinifera</i> , hypothetical protein	100	<i>Sponmoss nit</i> small heat shock protein	84
HSG19	<i>Vitis vinifera</i> , hypothetical protein	100	<i>Prunus dulcis</i> cytosolic class II low molecular weight heat shock protein	81

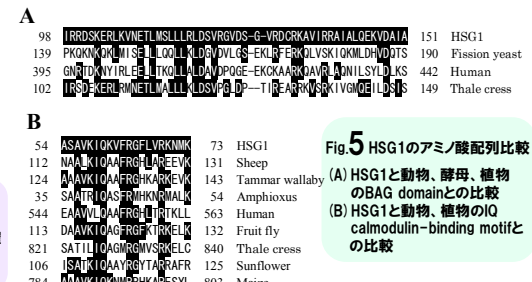


Fig. 5 HSG1のアミノ酸配列比較

(A) HSG1と動物、酵母、植物のBAG domainとの比較
(B) HSG1と動物、植物のIQ calmodulin-binding motifとの比較

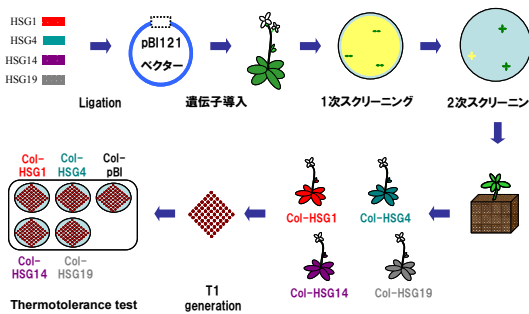


Fig. 6 シロイヌナズナへのブドウ遺伝子導入様式

選抜した4つのブドウ遺伝子をフローラルディップ法によりシロイヌナズナ (Col-0) に遺伝子導入した。そこから、選択培地を用いて、形質転換体を選抜した。

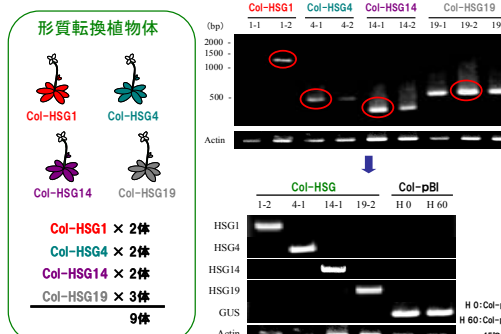


Fig. 7 形質転換したブドウ遺伝子の発現解析

形質転換体植物9個体の発現解析を行い、より高発現している個体を選抜した。

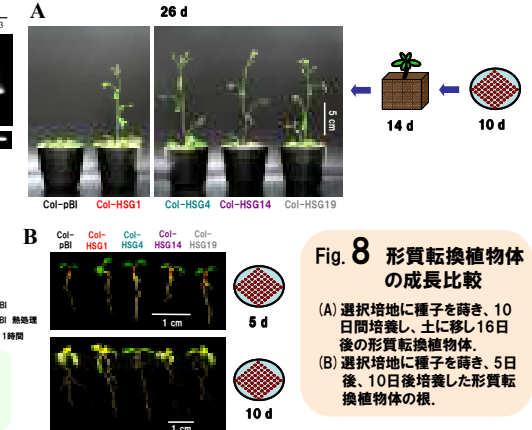


Fig. 8 形質転換植物体の成長比較

(A) 選択培地に種子を播き、10日間培養し、土に移し16日後の形質転換植物体。
(B) 選択培地に種子を播き、5日後、10日後培養した形質転換植物体の根。

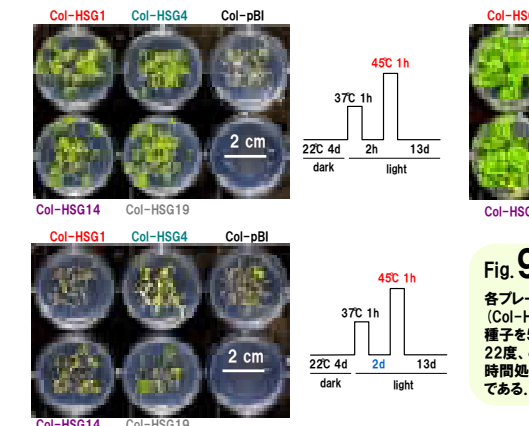


Fig. 9 形質転換植物体の熱耐性試験

各プレートを選択培地に4つのブドウ遺伝子形質転換植物体 (Col-HSG1, Col-HSG4, Col-HSG14, Col-HSG19) と Col-pBI の種子を50粒ずつ播種。春化処理を3日間、4℃で行い、遮光下で22度、4日間培養し発芽させた。熱処理の前段階として37度で1時間処理し、熱耐性試験を行った。条件は各図の右に示した通りである。

結果および考察

サブトラクション解析の結果から、19個の候補遺伝子断片を得た。2次スクリーニングを行い、最終的に4つのブドウ遺伝子を選抜した。単離したブドウ遺伝子を形質転換したシロイヌナズナでは、いずれのブドウ遺伝子もシロイヌナズナの生育を速めた。また、高温耐性試験では、いずれのブドウ遺伝子もシロイヌナズナに高温耐性を賦与した。以上の結果から、単離した4つのブドウ遺伝子は、シロイヌナズナに成長促進と高温耐性を賦与することを示した。
選抜したブドウ遺伝子の内、3つは他の植物の Small heat shock protein と相同性があり、植物に熱耐性を賦与することは推測できた。残りの1つ (HSG1) は、シロイヌナズナのカルモジュリン結合モチーフを有するタンパク質であり、ブドウのゲノム・データベース上機能未知タンパク質になっている。カルモジュリンが熱ストレスのシグナル伝達機構に関与しているという報告もなされている²⁾ ことから、今後はHSG1の機能解析を行い、ブドウの熱耐性のメカニズムの解明を試みる。