

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年8月27日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07296

研究課題名(和文)イチゴの果実発達における brassinosteroid の役割解明研究

研究課題名(英文) Analysis of the role of brassinosteroid during strawberry fruit development

研究代表者

中村 郁子 (Nakamura, Ayako)

横浜市立大学・木原生物学研究所・助教

研究者番号：40585858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物ホルモンの一つである brassinosteroid (BR) について、二倍体イチゴを用いてイチゴ果実の着果から発達過程における役割を解析した。BRはイチゴにおいてはそれ自体による単為結果誘導能は持たないことがわかった。BR合成阻害剤を投与した個体では果実の長径方向の発達が阻害され、BRを投与した果実では長径方向の発達が促進された。これらの表現型が見られるのは発達中期の白い実のステージ以降であったことから、BRは果実の発達において後半の長径方向の肥大に関与していることが明らかになった。さらに阻害剤処理区では雌性稔性低下が見られたことから、現在この原因について解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果により、BRは単為結果を誘導する能力はないことが示唆されたが、遺伝子の発現と形態の解析から着果前後の発達に重要であることが初めて示された。今後の研究によりBR欠損により雌性稔性の低下する原因が特定できれば、着果不良が原因によってはBR投与により改善できる可能性が示された。また、BRは果実発達後期の長径方向の発達にも関与することが示唆され、さらに、BRにより通常受粉により発達した果実よりも肥大が促進されたことから、大粒イチゴを生産する際にBRが有用である可能性を示した。今後は我々が通常食している8倍体品種における応用研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal the role of brassinosteroid (BR) during fruit set and development. The fact that BR treated emasculated flower did not start developing its fruit suggesting BR does not have ability to induce parthenocarpic fruit development. The length of berries produced from the strawberry treated with BR biosynthesis inhibitor was shorter than that from mock treated ones. While, the BR treated strawberries produce longer berries. The difference in berry length was visible after white berry stage. These results suggest that BR regulated the length of berries during later fruit development. In BR biosynthesis inhibitor-treated strawberry, female fertility was much lower than in the mock treated plants. All the phenotypes affected by BR biosynthesis inhibitor treatment was recovered by BR treatment suggesting the phenotypes was caused by the lack of BR.

研究分野：植物生理学

キーワード：二倍体イチゴ 植物ホルモン 果実発達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは植物の生長や環境の変化に応じて遺伝子発現を制御する微量物質であり、果物の形成にも様々な過程で植物ホルモンの関与が示唆されている。ブラシノステロイド(BR)は植物ホルモンの一つであり、植物の生長を多岐にわたり制御する重要な物質の一つである。BR は別の植物ホルモンであるオーキシンと同時に投与することでたとえばイネの ラミナジョイントの屈曲などで相乗的な作用を示すこともよく知られている。また、キュウリでは細胞分裂と染色体の倍加を伴いながら BR の単独処理で単為結果を誘導するという報告もされている(Fu et al., 2008)。

イチゴはバラ科に属する果肉をもつ果実を形成する植物であるが、他のバラ科植物と異なり、草本であり、種子を果物の表面に形成する。このため種子の除去や、薬剤の直接塗布などが可能であり、種子と果実の発達における植物ホルモンの役割や相互作用を解析するには恰好の研究材料である。通常の栽培イチゴは 8 倍体であるが、2 倍体イチゴ(*Fragaria vesca*)最近全ゲノム配列が解読された。これまでにゲノムが解読された植物の中ではシロイヌナズナに次いでゲノムサイズが小さく、ゲノム重複も少ない植物であることが明らかになった(Shulaev et al., 2011)。2 倍体イチゴは個体サイズも小さいことから人工気象器でも生育でき、形質転換も可能である(Oosumi et al., 2006)。さらに、自家和合性の系統も多く四季成り品種ではほぼ一年を通して果実の収穫が可能であるという利点から イチゴや果実研究のモデル植物として最近注目を集めている。

一般に果実の肥大には受粉刺激後の種子の発達に伴い合成されるオーキシンや植物ホルモンのジベレリン(GA)が重要である。BR はイチゴではこれまで重要と考えられていたオーキシンや GA に先だてて受粉後最初期に内生量が最大になることが明らかにされた(Symons et al., 2012)。また、8 倍体イチゴでは BR を注入する、あるいはウイルスベクターを用いて BR の受容体である BRI1 を一過的に過剰発現することにより、果実の肥大や着果が促進され、逆に BR の生合成阻害剤である Brz を注入する、あるいは RNAi で一過的に BRI1 の発現を抑制すると逆の効果があることが分かっている(Chai et al., 2013)。最近、2 倍体イチゴで果実の発達のごく初期の各部位における遺伝子発現が網羅的に解析された(Kang et al., 2014)。この報告結果を用いた申請者の独自の解析によると、BR の最終産物を合成する DWARF という酵素が受粉後直ちにイチゴ果実の随とよばれる中心部分で最大に発現していることが分かった。これは上述の BR 内生量の変動と一致する結果であった。しかし BR の果実における作用に関する知見は大変乏しく、BR が果たす役割については分子レベルの解析はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

近年様々な果樹および果菜類においても次々と全ゲノムが解読され、果実の着果や発達に関する研究も盛んになっている。これまでの研究では果実の発達においては植物ホルモンであるオーキシンやジベレリンの重要性や、これらの処理により様々な植物で単為結果が誘発されることが分かっている。ブラシノステロイド(BR)はこれらのホルモンと密接に働くことが知られている植物ホルモンであり、最近の研究から、キュウリでは BR のみで単為結果が誘導されることも明らかになっている。イチゴでは BR がオーキシンやジベレリンより早い、果実の発達の最初期に内生量が最大となることが分かっているが、いまだに BR の果実形成における役割は果樹や果菜類ではほとんど明らかにされていない。そこで本研究はイチゴを用いて、着果および果実の発達における BR の役割と他の植物ホルモンとの関係を解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

全て二倍体イチゴ、*Fragaria vesca* cv. Baron solemacher を用いて解析を行った。

(1) BR の単為結果能の検討。開花(受粉)直前の花の花弁および雄蕊を除去し、BR でもっとも活性の高い BR、ブラシノステロイド(BL)を投与してその後の発達を調べた。単為結果を誘導することが明らかになっている合成オーキシンである NAA を処理した果実をポジティブコントロールとして準備した。

(2) BR 生合成関連遺伝子の発現解析。まずシロイヌナズナで明らかになっている BR 生合成遺伝子を元に二倍体イチゴのゲノムより BR 生合成遺伝子の相同遺伝子の探索を行った。その中でシロイヌナズナにおいて BR 生合成の鍵と考えられる *DWARF4* および *BR6ox* 遺伝子の相同遺伝子である *FvDWARF4* および *FvDWARF* について定量的 RT-PCR により発達ステージごとの発現解析を行った。

(3) BR 生合成阻害剤 PCZ 処理時の形態解析。BR 生合成阻害剤 PCZ を週に 2 回、スプレーにより投与し、形態観察を行った。

(4) BL による回復試験。BL を PCZ と同時に投与し、PCZ の影響により見られた形態を回復するか観察した。

(5) 交雑試験。PCZ 処理により PCZ 処理個体で稔性の低下が見られたため、PCZ 処理個体の雌しべと雄しべを mock 処理の個体由来の雌しべおよび雄しべと相互に交雑を行い、稔性低下の原因の特定を行った。

(6) 稔性の回復試験。(3)と同様に雌性稔性の低下が BL の同時処理により回復するかを PCZ と BL を同時に処理した個体由来の雌しべと雄しべを PCZ 処理個体のそれらと相互に交雑することにより検討した。

4. 研究成果

(1) BR の単為結果能の検討。除雄し BL 処理した果実の発達を調べたが、除雄し mock 処理した果実と同様発達は見られなかった。ポジティブコントロールとして行った NAA 処理によっては除雄した果実でも受粉せずに果実の発達が見られたことから、BR は 2 倍体イチゴにおいては単為結果誘導能を有していないことがわかった。

(2) BR 生合成関連遺伝子の発現解析。二倍体イチゴゲノムの解析の結果、BR 生合成に関わる遺伝子は、シロイヌナズナで明らかにされている BR 生合成遺伝子の相同遺伝子が全て二倍体イチゴで保存されていた。その中でシロイヌナズナで律速酵素遺伝子として考えられる *FvDWARF4* と *FvDWARF* に着目し、二倍体イチゴの発達ステージにおける遺伝子発現解析を行った。*FvDWARF4* および *FvDWARF* についてステージごとの発現解析を行ったところ、いずれの遺伝子についても開花前から開花直後の発現がもっとも高く、その後徐々に低下していくことがわかった。この結果からこれまでの知見とは異なり、BR は果実発達初期にも作用していることが示唆された。

(3,4) BR 生合成阻害剤 PCZ 処理時の形態解析および BL による回復試験。



(図 1) PCZ 処理した個体の形態と BL 処理による回復

PCZ 処理により個体全体としては葉が濃緑で丸みを帯びており、矮性などこれまでにシロイヌナズナの BR 欠損変異体で示されている特徴的な BR 欠損の表現型を示した(図 1)。BR はフィードバックにより生合成遺伝子の発現を制御するが、PCZ 処理により *FvDWARF4* および *FvDWARF* 遺伝子の発現増加が見られたことから、PCZ 処理により BR 生合成が抑制されていると考えられた。PCZ 処理個体の果実について観察したところ、着果率の減少が見られた。また、発達した果実は PCZ 処理により長軸方向の伸長が抑制され、全体的に小さくなる傾向が得られた。この身長抑制については果実の発達段階の中期の果実色が白くなる時期以降に顕著になった。このことから BR は着果後の果実発達においては発達の後半の果実の伸長に関与することが示唆された。また PCZ と BR の同時処理によって PCZ 処理のよって見られた上記の形態についていずれも回復傾向が見られた。

(5,6) 交雑試験。PCZ 処理による稔性低下について雌雄のどちらに原因があるかを特定するために mock 処理個体と相互に交雑した結果、PCZ 処理個体の雌しべを用いると mock 処理個体の雄しべの場合も PCZ 処理の雄しべの場合もいずれの受粉を行った果実も発達が悪いあるいは発達しないことが明らかになった。雌性稔性の低下は PCZ と同時に BL 処理することにより回復したことから BR 内生量の低下が雌性稔性に影響していると考えられた。これまでに BR が受粉後どの時点で稔性に影響しているかを検討するために、胚珠の形態および花粉管の伸長について観察を行ったところ、いずれも mock との間に違いは見られなかった。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

1. 石井 ひかり、中村 郁子、嶋田 幸久「ブラシノステロイド生合成阻害を用いた二倍体イチゴの果実発達機構の解析」日本植物学会第 81 回大会、2017 年、野田
2. 石井 ひかり、嶋田 幸久、中村 郁子「二倍体イチゴの果実発達におけるブラシノステロイドの作用解析」園芸学会平成 30 年度秋季大会、2018 年、鹿児島
3. 石井 ひかり、嶋田 幸久、中村 郁子「二倍体イチゴにおけるブラシノステロイドの作用解析」第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年、名古屋

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：筧 雄介

ローマ字氏名：KAKEI, Yusuke

所属研究機関名：公立大学法人横浜市立大学

部局名：木原生物学研究所

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：50636727

(2)研究協力者

研究協力者氏名：嶋田 幸久

ローマ字氏名：SHIMADA, Yukihiisa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。