

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14659

研究課題名(和文)ニホンナシの花芽分化を誘導する要因の特定に向けた基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of platform towards the elucidation of factors involved in the induction of Japanese pear flower buds

研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・研究領域長

研究者番号：80343945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンナシでは花芽分化期にFTの発現が誘導されずTFL1の発現低下が鍵であると示唆された。TFL1の発現低下の原因を明らかにすることで花芽分化要因を解明するため、花芽分化期の発現遺伝子を網羅的に解析した。その結果、TFL1-1の発現低下に伴いApeta1、Fruitful 1、Leafy 1、サイトカイニン合成やアブシジン酸(ABA)の分解に関わる遺伝子は花芽分化に伴い発現が誘導され、エチレンやオキシン合成に関する遺伝子は発現が低下した。以上から、花芽分化に伴い、サイトカイニンの合成が高まり、ABAの分解が促進され、エチレンとオキシンの合成活性の低下する様相が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously showed no induction of Japanese pear FT in the flower buds at flower bud differentiation stage, instead, we observed the notable reduction of TFL1 expression level prior to flower bud differentiation, indicating that the down-regulation of TFL1 may be a trigger for flower bud differentiation in Japanese pear. Since no any precise environmental factors such as temperature for flower bud differentiation have been known, we tried to find such factors based on the TFL1 reduction as an indicator. To this end, RNA-seq analysis during flower bud differentiation was carried out. Resultantly, we found several genes showing similar or reverse expression patterns to TFL1, in which Apeta1, Fruitful 1, Leafy 1, and the genes related to plant hormone metabolizing enzymes were included. These results could provide useful platform for further elucidation of flower bud differentiation in Japanese pear.

研究分野：果樹園芸生理

キーワード：FLOWERING LOCUS T 花芽分化 ニホンナシ TERMINAL FLOWER1 RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナ等のモデル植物では、花芽分化に際して *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* の発現低下と、*FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現誘導が認められる。しかし、ナシではリンゴ等で認められる *FT* の花芽分化期での発現誘導は観察されない (図1)。一方、*TFL1* についてはリンゴやカンキツ等と同様に花芽分化に先立ち発現が低下する (図2)。そこで、ナシで *FT* の発現が高まらない理由として既にタンパク質として芽に存在している可能性を想定し、挑戦的萌芽研究の補助 (H25年~H26年) を受けて検証した。その結果、ナシでは *FT* は準備完了の状態にあり、*TFL1* の発現低下がスイッチになっている可能性が示唆された。事実、バラ科果樹では *TFL1* が栄養成長から生殖成長の主調節因子であるとの報告がある (Kurokuraら2013)。一方、ナシでは、花芽は夏から秋に分化するが、その誘導に必要な日長、温度等の条件はほとんど未解明である。しかし、温暖化に伴うナシやリンゴの花芽着生不良の発生や、後述するように遠赤外光によるナシの花芽誘導を考えると、これら要因が関与している可能性は高い。よって、*TFL1* の発現低下を引き起こす原因が分かればナシの花芽分化誘導要因の解明に繋がる可能性がある。そこで、本研究では次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにより花芽分化前、中、後の芽で発現している遺伝子を網羅的に解析することで、ニホンナシの花芽分化を誘導する要因の候補を後段で記す選抜基準と実験系で見定めるとともに、花芽分化過程を遺伝子レベルで俯瞰したいと考えている。温暖化に向かい、現場ではナシの花数の減少や花芽分化不良が問題となりつつあり、本研究は学術的のみならず果樹産業的にも極めて重要である。

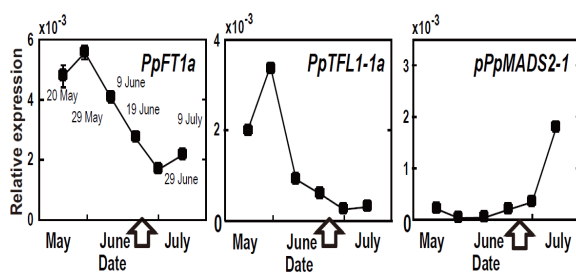


図1 「幸水」の長果枝頂芽の花芽分化過程における *FT*、*TFL1*、*APETALA1 (pPpMADS2-1)* の発現解析。発現解析データ中の矢印は花芽分化期を示す。花芽分化期に先立ち *TFL1* の発現は低下するが、*FT* の発現誘導はなく、*APETALA1* の発現は分化開始後に高まる。本傾向は再現性があり、短果枝でも認められる。

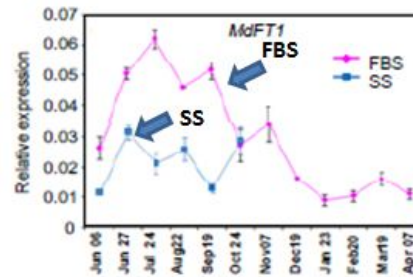


図2 リンゴではナシと異なり、花芽を着生する枝 (FBS) では花芽分化期 (矢印) に *FT* の発現誘導が認められる。SS (徒長枝) は花芽が着生しない枝 (Kotoda ら 2010)。

2. 研究の目的

本研究では、*TFL1* の発現を指標にして、ニホンナシの花芽分化を誘導する要因の候補を見定め、花芽分化過程を遺伝子レベルで俯瞰することを目的とする。ナシの花芽分化は7月中旬頃に始まるが、顕著な *FT* の発現が見られない。一方、*FT* と拮抗する *TFL1* の発現は花芽分化に先立ち低下する。以上より、ナシでは *FT* ではなく *TFL1* が花芽分化の引き金である可能性、すなわち、*TFL1* の発現低下により花芽分化が開始すると考えられた。そこで、*TFL1* の発現を指標に、花芽分化前、中、後に発現している遺伝子から候補遺伝子を選定し、当研究室で構築した人為的花芽誘導実験系で検証する。得られた成果は花芽分化を誘導する要因の解明に繋がる意義ある研究である。

3. 研究の方法

先行して「幸水」の花芽分化前、中、後のRNA-seqを行う。最初に、RNA-seqにより得られた発現遺伝子のアノテーションを行い、発現プロファイルを作製する。その中で、1) *TFL1* と同じ、あるいは逆の発現パターンを示す遺伝子、2) 1)のパターンは示さないものの日長や温度のシグナル伝達に関わると想定される遺伝子について選抜する。選抜した遺伝子について、より詳細に花芽分化過程での発現解析を定量PCRにて行う。選抜した遺伝子の発現パターンの再現性を確認する。続いて人為的な花芽誘導条件下 [ナシポット樹を遠赤外光で照射すると花芽形成が促進される (Itoら2014)] で育成したナシの芽を用いて、上述した1)や2)の基準で選抜し、再現性のある想定される候補遺伝子についても発現解析を行い、遠赤外光照射 (日長) による花芽形成との関係を明らかにする。以上より、ナシの花芽分化機構の全容に向けて、花芽誘導する要因の重要な候補遺伝子を見定める。

4. 研究成果

(1) 今回のRNA-seqに用いたサンプルは2012年度と2014年度の2カ年の芽で、花芽分化ステージは、分化前 (0)、分化始まり

(0.2)、分化中(2.0)に相当する(図3A)。各ステージとも、年度の関わらず1から10の発現量を示す遺伝子が最も多く、これに10から100の発現量を示す遺伝子が続いた。わずかであるが、*ADF3* (*Acting depolymerizing factor*) のように100以上の発現量を示す遺伝子もあった(図3B)。

ステージ0で特異的に発現している遺伝子の数が1764と最も多く、続いてステージ2.0であった。特徴的としてステージ特異的に発現している遺伝子よりも全てのステージで共通して発現している遺伝子の数が54059と非常に多いことであった(図3C)。

各ステージに特異的な遺伝子の数をより具体的に示すと、全体的にステージ0で発現している遺伝子数が他の2ステージよりも多かった。また、ステージ0.2や2.0で特異的に発現した遺伝子(+)と特異的でない(−)遺伝子数はほぼ同数であったが、ステージ0に特異的でない(−)遺伝子数が特異的に発現した遺伝子数(+)よりも明らかに多いことが明らかとなった。また、ステージ0、0.2、2.0にそれぞれ特異的な遺伝子として、例えば *MYB113* や *ACS* (ステージ0) *TCP9* や *NAC42* (ステージ0.2)、*API* や *CUC3* (ステージ2.0)などが同定できた(図3D)。

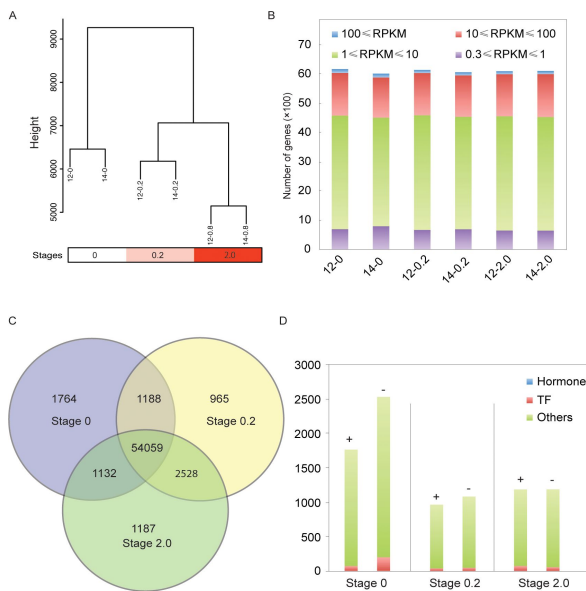


図3 「幸水」花芽分化期における3つのステージ(前, 分化ステージ0; 分化初期, 0.2; 分化中, 2.0)におけるRNA-seqの結果概要
A: 解析に用いた3つの花芽分化ステージ
B: 各ステージにおける遺伝子の発現量(RPKM)
C: 各ステージにおける遺伝子の数と各ステージで特異的に発現した遺伝子の数
D: 各ステージに特異的な遺伝子の数と、その中に占める転写因子遺伝子(TF)並びに植物ホルモン代謝やシグナル伝達に関する遺伝子の数(+: そのステージで特異的に発現した遺伝子, -: そのステージで発現しな

った遺伝子)

(2) 選抜した遺伝子の花芽分化期における発現解析を行ったところ、*TFL1-1a* は花芽分化に先立ち発現が低下した。もう一つある *TFL1-2a* は7月2日に一過的に高くなるが、それ以外の時期の発現は検出レベル以下であった。*TFL1-1a* の発現低下に伴い *API* (*Apetala1*)、*FUL1* (*Fruitful 1*)、*LFY1* (*Leafy 1*) の発現が高まり、シロイヌナズナで示されている結果と一致した。その他、サイトカニン合成やアブシジン酸(ABA)の分解に関わる遺伝子は *API*、*FUL1*、*LFY1* などと同じく花芽分化に伴い発現が誘導されたが、エチレンやオキシン合成に関する遺伝子はおおむね *TFL1-1a* と同じく、花芽分化に伴い発現が低下した(データ省略)。これらの結果から、花芽分化に伴い、サイトカニンの合成が高まり、ABAの分解が促進され、エチレンとオキシンの合成活性の低下する様相が明らかとなった。

(3) 我々は遠赤色光により人為的に花芽を誘導する形を確立している(Itoら2014)。そこで、本法により人工的に花芽を誘導させた芽での(2)で選抜した遺伝子の発現解析を行い、本当にこれら遺伝子が花芽化に参与している可能性を再検証することとした。*TFL1-1a*、*TFL1-2a* とともに、人工的に花芽誘導処理した花芽(SD+FR)で、発現が低下し、圃場での発現パターンを再現することができた(データ省略)。また、*LFY1* は明確でないが、*API* と *FUL1* は花芽を誘導した花芽で発現が高まった(データ省略)。

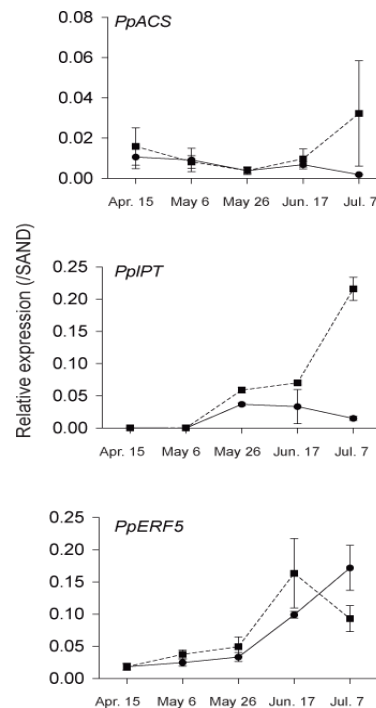


図4 遠赤色光で人為的に花芽誘導した芽(右)での遺伝子の発現解析。

解析日は左から 4/15、5/6、5/26、6/17、7/3。
PpIPT: adenylate isopentenyl transferase3,
PpACS: 1 aminocyclopropane 1 carboxylate
synthase 1-like mRNA, *PpERF5*: ethylene
responsive factor5. 実線 (SD) は短日条件の
みの対照、破線 (SD+FR) は短日条件に遠赤
外光処理。

一方、エチレン合成に関わる *PpACS*、サイ
トカイニン合成に関わる *PpIPT* は発現が高ま
り、*PpACS* については、圃場とは逆の発現パ
ターンとなった。一方、エチレン応答性の転
写因子である *PpERF5* は、処理による明確な
発現パターンを示さなかった (図 4)。サイ
トカイニン合成に関わる *PpIPT* の発現が人工
的に花芽誘導した芽で高まった理由につい
ては明らかでないが、人為的に枝を倒して花
芽を誘導した枝でサイトカイニン含量の増加
が報告されている (伊東ら 1999)。

以上の研究から、ナシの花芽分化時期には
顕著な *FT* 遺伝子の発現がみられないが、*FT*
と拮抗する *TFL1* の発現は花芽分化に先立ち
低下することからナシでは *TFL1* の低下によ
り花芽分化が開始すると推察した。その際
に、植物ホルモン代謝関連遺伝子やメチル化
の遺伝子などが複雑に関わっている様相が
明らかとなった。

<引用文献>

Kotoda N., H. Hayashi, M. Suzuki, M. Igarashi,
Y. Hatsuyama, S. Kidou, T. Igasaki, M.
Nishiguchi, K. Yano, T. Shimizu, S. Takahashi, H.
Iwanami, S. Moriya, K. Abe, Molecular
characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like
genes of apple (*Malus × domestica* Borkh.),
Plant and Cell Physiology, 51 巻、2010、561-575

Ito A, T. Saito, T. Nishijima, T. Moriguchi,
Effect of extending the photoperiod with
low-intensity red or far-red light on the timing of
shoot elongation and flower-bud formation of
1-year-old Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*), *Tree
Physiology*, 34 巻、2014、534-546

Ito A, E. Yaegaki, H. Hayama, S. Kusaba, I.
Yamaguchi, H. Yoshioka, Bending shoots
stimulates flowering and influences hormone
levels in lateral buds of Japanese pear,
Hortscience, 34 巻、1999、1224-1228

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Pham Anh Tuan, Songling Bai, Takanori Saito,
Akiko Ito and Takaya Moriguchi,
Dormancy-associated MADS-box (DAM) and

*abscisic acid pathway regulate pear
endodormancy through a feedback mechanism*,
Plant and Cell Physiology, 58:巻、2017、
1378-1390
DOI: 10.1093/pcp/pcx074

Songling Bai, Pham Anh Tuan, Takanori Saito,
Akiko Ito, Benjamin Ewa Ubi, Yusuke Ban and
Takaya Moriguchi, Repression of TERMINAL
FLOWER1 primarily mediates floral induction in
pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) concomitant with the
changes in gene expression of plant
hormone-related genes and transcription factors,
Journal of Experimental Botany, 68巻、2017、
4899-4914
DOI: 10.1093/jxb/erx296

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研
究機構・果樹茶業研究部門・研究領域長
研究者番号：8 0 3 4 3 9 4 5

(2)研究分担者

伊東 明子 (ITO, Akiko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研
究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員
研究者番号：3 0 3 5 5 3 8 3