

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15220

研究課題名(和文) 多年生作物の成長相再転換制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of growth phase change from reproductive to vegetative in perennial plants

研究代表者

黒倉 健 (Kurokura, Takeshi)

宇都宮大学・農学部・講師

研究者番号：10650898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの花成に関する研究は「花芽ができる」ことについての研究が主であり、多年生草本で行われる「花芽の形成が終わり、再び成長を再開する」ことに関する研究事例は少なく、どのような遺伝子が花を作る期間を決めているのか不明であった。

本研究では、多年生植物の例として野生種イチゴを用い、これら遺伝子の解明を試みた。その結果、花芽を作る期間を決める遺伝子は複数存在し、その中に、花芽の形成を抑制する遺伝子が含まれることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの花成に関する研究は「花芽ができる」ことについての研究が主であり、多年生植物で行われる「花芽の形成が終わり、再び成長を再開する」ことに関する研究事例は少なく、真の意味で多年生を理解することにはつながっていなかった。

本研究により、多年生植物の生長再開のメカニズムの一端が明らかにされたとともに、実用植物(イチゴ)に近いモデルで研究が行われたことから、実用作物においても収穫期を延長するなどの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Current flowering research has focused on "How flower initiation takes place" but not "How perennial plants resume vegetative growth after flower formation", so genetic mechanisms to determine the flowering period is not clarified.

In this study, wild strawberry was used as a model of perennial plant and genetic locus and gene(s) were analysed.

As a result, we found that multiple genes were involved in the determination of flowering period and that a gene to repress the flower formation plays an important role to regulate the process.

研究分野：園芸学

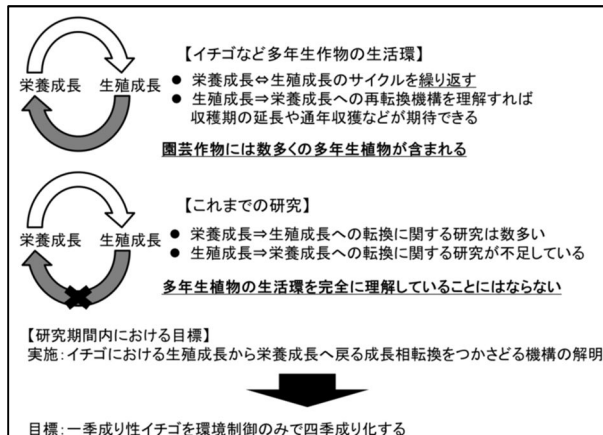
キーワード：多年生 Fragaria 野生種イチゴ

1. 研究開始当初の背景

植物がどのようにして季節・環境を認識し、どのように反応しているかを知ることがは広く植物の適応戦略を解明する上で重要なテーマの一つであるだけでなく、作物を季節に寄らず収穫することにつながる。多年生植物の場合は毎年繰り返される季節・環境の変化に合わせてこの反応を調節する必要があり、それは同一の植物における生長相のリセットが必要であることを意味する。

イチゴ(*Fragaria* spp.)はバラ科に属する多年生草本であり、花芽形成(花成)後は仮軸分枝の形態をとる。仮軸分枝とは下図に示されるように、茎頂の末端が花序に分化し伸長が停止したのち、新たな分裂組織(腋芽)がその花序の基部に形成されその芽が伸長・分化することを繰り返す分枝パターンのことである。現在の主力イチゴ品種の多くは短日一季成り性であり、秋の低温短日条件に反応して花芽を分化し仮軸分枝パターンを示し、複数の花序を分化する。初夏以降高温長日条件になると新たに形成される分裂組織は栄養成長芽となり、次の低温短日条件に遭遇するまで花序ではなく葉を分化し続ける。これまでの申請者の研究から、【イチゴを始めとするバラ科植物の花成には分裂組織における花成抑制遺伝子 TERMINAL FLOWER1 (TFL1) の発現抑制が必要である】ことが明らかとなっている。すなわち、高温長日条件に再び遭遇し、新たに形成された栄養成長芽では、TFL1 が再び高発現しているのだが、花成終了後の抑制機構、【多年生仮軸分枝植物において TFL1 がどのようにして「再び」発現誘導されるのかは不明である】。

果樹など多年生の植物の多くは温帯以北の原産であり季節・環境の変化に応じてその生活相を変化させ、栄養成長から生殖成長、そして再び栄養成長に戻るというサイクルを繰り返す。一方これまでの植物分子生理学的研究は主にシロイヌナズナやイネなど一年生植物を対象として行われてきた。このため栄養成長相から生殖成長相への変化、すなわち花成誘導機構に関する研究が主であり同一の植物における成長相のリセット機構の解明は研究課題として存在しえなかった。シロイヌナズナの多年生近縁種における解析が行われた例は存在するものの、分枝パターンが異なるため栄養成長芽がどのように維持されるかという視点からの研究であり、生殖成長相から栄養成長相への変化に着目した研究ではない。同様に仮軸分枝パターンを示す植物としてナス科植物があるが、その中で最も研究が進んでいるトマトは中性植物であり、日長や温度に関係なく花成するため季節・環境の変動に対して反応を調節しているかという視点からの研究ではない。本研究において対象とするイチゴにおいても数多くの研究が「いかにして花芽形成を誘導するか」に力点が置かれ、花芽が分化した後どのようにして栄養成長芽が形成されるのかを論じた研究は少ない。すなわち【既存の研究では多年生植物の生活環を完全に理解しているとは言えない】。多年生の有用作物をより効率良く栽培・利用するためには生殖成長から栄養成長に戻る成長相転換機構の詳細を解明しその制御法を確立することが重要である。



2. 研究の目的

多年生植物かつ仮軸分枝形態をとる植物であるイチゴにおいて、【生殖成長から栄養成長へ戻る成長相転換をつかさどる機構の解明】および環境調節によるその機構の制御を目的とする。具体的には【短日一季成り性のイチゴを環境調節のみで四季成り化することを目指す】。

季節に応じて成長相の転換がおきるということは、その制御機構の解明には、分子的な機構の解明に加え、その機構を制御する環境条件の詳細の解明も必要であることを意味する。また、栽培現場での実用を考えた場合、単に分子機構の解明や組み換え体・変異体の作出だけでは十分とは言えないことから、本研究においては環境制御によってその機構を制御することを目指す。

3. 研究の方法

生殖成長期間を制御する QTL の探索を行い、並行して生殖成長 栄養成長へ再転換する際に働く遺伝子を特定する。

【計画 1-1】

研究協力者が所有する欧州 2 倍体野生イチゴ(*F. vesca*)コレクションから収穫期間(花序の出現日を記録し、第一花序出現から最終花序出現までの日数と定義する)が長い系統および短い系統を選抜し、これらを母系統とし作成済みの FvTFL1 RNAi 組み換え *F. vesca*(作成済み)と交配し F1 種子を得る。このコンストラクトは選抜マーカーとして CaMV35S::GFP を保持しているため、得られた F1 種子のうち GFP を発現した個体は確実に両親間の交雑から生じた F1 であり、

RNAi コンストラクトによって常に開花する四季成り性を示す。この F1 を自家交配することにより F2 を得ることができるが、その中で GFP を発現していない個体は通常の手法で得られた F2 と同等のものであるため、この系を利用すれば通常の半分以下の時間で QTL マッピングの F2 集団を得ることができる。University of Helsinki にて両親系統を交雑し、得られた種子を日本に輸入する。輸入手続き完了後直ちに栽培を開始し、F2 集団を作成する。この計画には遺伝子組み換えイチゴ属植物種子の国家間輸送が必要となる為、関係機関への届け出など手続きを滞りなく進めるが、万が一検疫等で種子の輸入許可が得られない場合には集団の形質評価および各個体からの DNA 抽出は University of Helsinki にて行う事とする。また、輸入後の植物の一部はバックアップとして研究協力者（味の素株式会社）が維持管理する。

#### 【計画 2-1】

申請者が所有する 2 倍体イチゴ四季成り系統‘Hawaii-4’および短日一季成りフィンランド系統用い、花成誘導終了後、生殖成長から栄養成長に戻る際に発現量が変動する遺伝子を次世代シーケンサにより網羅的に解析する。四季成り系統は花成に長日を必要とする系統である。このため両系統で花成誘導に必要な条件が異なり、光合成関連遺伝子など無関係な遺伝子の発現変動が観測される恐れがある。そこで申請者が開発した薬剤処理花成誘導系を用い、短日一季成り系統を長日条件下で花成誘導することにより日長条件を揃える。花成誘導処理後、長日条件下で植物体を栽培し、定期的に茎頂をサンプリングし（1 週間毎を想定）茎頂における遺伝子発現変動を網羅的に解析する。これに加えて茎頂の形態的变化を顕微鏡観察することにより花成誘導状態および成長相の変化を確認する。

#### 【計画 1-2】

計画 1-1 で作成した各 F2 集団 94 個体を用い、この集団および親系統の開花期間を測定することで QTL マッピングを行う。各個体をランナー増殖し形質評価は 1 系統につき 4 植物体を評価する。同様の実験を 2 回以上繰り返すことで QTL 解析の正確性および解像度を担保する。マーカーの作成には Genome Database of Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>)において公開されているマーカー情報を利用するほか、研究協力者が所有している SNP データを利用する。QTL 候補領域が十分に狭まった際には、計画 2-1 で得られた発現変動の大きかった遺伝子（もしくはその関連遺伝子）がこの候補領域に含まれていることを全ゲノム情報を参照し確認し QTL 候補領域を絞り込む。

#### 【計画 2-2】

計画 2-1 で得られた遺伝子のリストについて、短日一季成り系統において、リアルタイム定量 PCR を用いて長日条件下、短日条件下、薬剤処理条件下における経時的発現変動（初回は 1 週間毎を想定）の詳細を解析する。また、同様の条件下でサンプリングされた茎頂の一部を in situ ハイブリダイゼーションに用い、遺伝子発現部位の詳細を解析する。特定された遺伝子は計画 1-2 ヘフィードバックすることで QTL 候補領域の絞り込みに利用する。

得られた候補遺伝子について、それらの発現を誘導・抑制する環境条件を明らかにすることにより、その環境条件下で栽培を継続することで生殖成長を継続し続けることが可能な栽培条件を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 開花期間を制御する遺伝子座の探索

研究協力者が所有する欧州産 *F. vesca* 系統の中から収穫期間が長い系統を数系統選びだし、これらを通常系統と掛け合わせることで F1 交雑系統を作り出し、その後の解析に用いるための材料を作成し、F1 の作成に用いた親系統については、次世代シーケンサ (PacBio) を用いてリシーケンスを行う事により F2 集団において期待される収穫期間の長さとの連鎖する変異の特定に向けた基盤構築を行った。

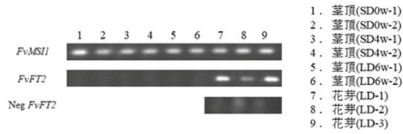
上記 F2 集団における収穫期間（開花期間）の長さを連続観察することにより QTL-Seq 法による原因遺伝子座の絞り込みを行うことを目指した。この結果、両親系統の組み合わせによっては F2 集団の形質に「幅（ばらつき）」が見られなかった（休眠状態となり開花が見られなかった）ため、花成をつかさどる遺伝子の組み合わせによる効果の可能性が示唆された。別の集団については開花期間のばらつきが見られたため、階層別にグループ化することにより、QTL-seq 法による原因遺伝子座特定のための材料として扱うこととした。

開花が見られなかった組み合わせについては、前年度取得したリシーケンスデータを用いることにより、花成および休眠にかかわる主な遺伝子に対する変異の有無を解析する体制を構築した。

### (2) 花成制御遺伝子の発現解析

茎頂における花成関連遺伝子のうち、相転換の指標となることが予想される *FvFT2* および 3 遺伝子並びに花成関連遺伝子の発現解析を行った。

B

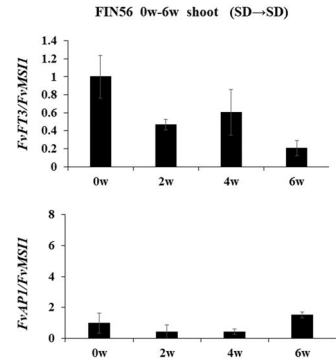


1. 茎頂(SD0w-1)
2. 茎頂(SD0w-2)
3. 茎頂(SD4w-1)
4. 茎頂(SD4w-2)
5. 茎頂(LD6w-1)
6. 茎頂(LD6w-2)
7. 花芽(LD-1)
8. 花芽(LD-2)
9. 花芽(LD-3)

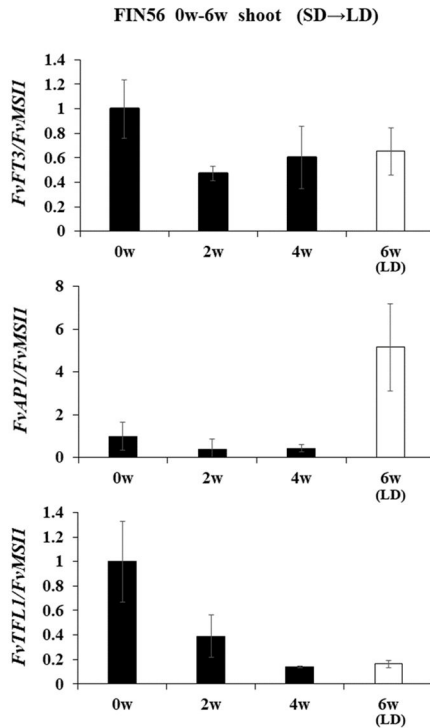
左図に示されるように *FvFT2* は花芽で発現が確認され短日条件下であっても形態的に未分化な茎頂では発現が見られなかった。また、*FvFT1* のように発現量の概日変動は認められなかった。

以上のことから、*FvFT2* は花芽分化の指標として利用が可能であるものの、本研究で用いる時間的指標としては不適當であることが示された。

右図に示されるように *FvFT3* は長日条件下の茎頂で発現が見られ、短日条件下で発現が低下した。したがって花成直前に *FT3* の発現がみられるとする近縁栽培種 *F. ananassa* の報告と異なり *FvFT3* は花成の指標としては不適當であることが示された。その一方で従来の報告で花成の指標として用いられていた *FvAP1* が本研究においても指標として用いることが可能であることが示された。



### (3) 生殖成長から栄養成長に戻る際の遺伝子発現変化



花成誘導条件である短日から、花成後に長日に植物体を移し、花成関連遺伝子の発現解析を行ったところ、左図に示すように、*FvTFL1* 発現量の再上昇が確認された。この時点では *FvAP1* の発現がみられることから茎頂は既に生殖成長に移行していると言える。よって、この時点での *FvTFL1* の上昇は茎頂直下に新たに形成された新たな成長軸での発現を示しているものと考えられる。

以上のことから、*F. vesca* の成長相再転換においては、*FvTFL1* の再発現が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水品貴宏 黒倉健
2. 発表標題 2倍体イチゴFragaria vescaのFLOWERING LOCUS T様遺伝子の発現解析
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒倉健
2. 発表標題 野生種イチゴの花成制御に関する研究
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Mizushima, Timo Hytonen, Takeshi Kurokura
2. 発表標題 Expression patterns and functional analyses of FT-like genes in Fragaria vesca
3. 学会等名 9th ISHS Strawberry Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ヒトネン ティモ  (Hytonen Timo)		