

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02193

研究課題名（和文）温帯落葉果樹休眠芽における情報伝達機構の解明 - ROSの機能とその制御 -

研究課題名（英文）Function of ROS on signal of bud dormancy of deciduous fruit trees

研究代表者

菅谷 純子 (Sugaya, Sumiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：90302372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：落葉果樹の開花異常のメカニズムを明らかにするためニホンナシの花芽に対する温度処理の影響を生理生化学的、および分子生物学的に検討した。特に過酸化水素のシグナルに関して検討を行うとともに、低温遭遇中の高温条件の影響について検討を行うため、自発休眠に導入した時期の花芽を異なる温度条件に遭遇させたところ、花芽中の過酸化水素量や、サイトカニンやアブシシン酸量に影響があることが明らかになった。さらに、網羅的な遺伝子発現解析から、低温遭遇中の高温条件が、休眠関連遺伝子や酸化還元関連遺伝子、DNAのメチル化関連遺伝子に影響を与えており、ニホンナシの開花異常に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

落葉果樹の花芽の開花異常は、花芽の休眠時の温度環境などが関わることを示唆されているが不明な点が多い。本研究では、温度条件が花芽や樹体の植物ホルモンや休眠関連遺伝子を含む多くの遺伝子発現に影響すること示し、花芽の開花異常のメカニズムに関わる多くの要因を示した点で学術的な意義があると考えられる。また、ニホンナシなどの落葉果樹の生産現場では、近年の異常気象や温暖化により、花芽の開花異常が報告されている。そのため、本研究の知見は、これらの課題を解決するための基礎的知見として意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of abnormal flowering in deciduous fruit trees, effects of temperature on flower bud dormancy of the Japanese pears were investigated. Especially, effects of the hydrogen peroxide and fluctuation of the temperature during endodormancy period were investigated. From the results of the experiments, it was suggested that fluctuation of temperature on hydrogen peroxide, cytokinin and abscisic acid contents of the flower buds resulted on endodormancy breaking. Furthermore, results of the RNA-seq analysis indicated that high temperature conditions during low temperature exposure affect on dormancy-related genes, redox-related genes, and DNA methylation-related genes. It was suggested that these factors would relate to abnormal flowering of Japanese pears.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 ニホンナシ 休眠 花芽 温度環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む温帯地域の果樹生産地では、温暖化や異常気象によるニホンナシやモモなどの開花や萌芽の異常が報告されている。このような花芽の異常には、花芽の休眠打破に必要な低温量の不足が関与すると考えられているが、そのメカニズムは明らかになっていない。花芽の自発休眠打破には、一定量の低温に遭遇することが必要とされており、これまでの研究から、低温が不足した花芽は、萌芽率が低下し、小花の壊死による開花異常などが生じることが示されており、代謝物の変化や、酸化還元状態の変化が関与することが示唆されている。しかしながら、そのメカニズムは明らかになっておらず、花芽の休眠期に起こる植物ホルモン量や、近年報告されている休眠関連遺伝子への影響も明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、温暖化で顕在化している春季の落葉果樹に発生する萌芽異常や壊死の現象を解決するため、果樹の休眠芽が低温に遭遇した際の花芽の酸化還元状態および植物ホルモンの制御について検討し、低温不足や温帯果樹の休眠期の花芽における情報伝達機構を解明するために、レドックスや植物ホルモンの低温遭遇との関係について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験材料

自発休眠打破に有効とされる低温に遭遇していないと想定される 10 月下旬に、ポット植えのニホンナシ '豊水' を 3 つのグループに分け、それぞれ低温区 (露地なりゆき)、高温区 (加温ハウス、12 以上に加温)、変温区 (高温、低温、高温と 2 週間おきに移動する区) に設定した。それぞれ経時的に萌芽率を求め、花芽と根を採取して植物ホルモン含量測定に用いた。

植物ホルモン量の測定

重水素ラベルされた安定同位体を用いた内部標準法を用いて、花芽および根に含まれるジベレリン A1、A4、およびインドール酢酸 (IAA)、アブシシン酸 (ABA)、トランスゼアチン (tZ)、イソペンテニルアデニン (iP) 量を測定した。すなわち、内部標準物質と植物サンプルを破碎した後メタノールを含む抽出液で植物ホルモンを抽出し、C18 カラムおよび逆相強陽イオン交換ポリマー、DEA カラム等を用いて精製・分画した後、UPLC-MS/MS にて定量分析を行った。

RNA-seq

低温に遭遇しない 0H 区、7.2 一定 300 時間処理区 (300LT) および変温処理区として 300LH 区 (低温 150H + 高温 150H + 低温 150H) を設け、それぞれの花芽から RNA を抽出し、ライブラリを作製した後、Illumina NovaSeq 6000/PE150 で RNA-seq データを得た。Quality check 後に、リード配列を参照配列 ('二十世紀ナシ') にマッピングした。その後、各転写物のアノテーションを行い、さらに遺伝子発現量解析を行った。遺伝子発現量 (FPKM) を利用して、Ballgown で各処理区間の差次的発現遺伝子 (DEG) を FDR (false discovery rate) が、0.1 未満の閾値で検出した。

4. 研究成果

(1) 異なる温度条件に遭遇したニホンナシ '豊水' 花芽の萌芽率と植物ホルモン含量について
10 月下旬の花芽および 2 週間後の花芽では萌芽率はどの区でも 0% で推移したが、低温区では 4 週間後に萌芽率が増加した。変温区および高温区では 6 週間後 (12 月上旬) に初めて萌芽が認められたが、変温区の方が高温区より萌芽率が高かった。

それぞれの温度処理を行った花芽における植物ホルモン量は、露地に置かれた低温区では、2 週間から 4 週間後 (約 150CH) で ABA 含量と *t*-Zeatin 含量が高くなっていることが明らかになった。6 週間後 (300CH) では、*t*-Zeatin 量と iP 量が高いことが示された。

(2) 異なる温度条件に遭遇したニホンナシ花芽中の過酸化水素量の変化について

150 時間の低温が蓄積した花芽では過酸化水素量が高温区より高くなっていた。一方、高温区では過酸化水素量の変動は低温区と比較して小さかった。変温区では、低温蓄積が進むと、過酸化水素量は増加したが、その後高温区に置かれた後減少し、その後低温に遭遇した後も低温区より少ない傾向が見られた。これらのことから、花芽中の過酸化水素量は低温により増加し、休眠打破後に減少する傾向があるが、高温に一過的に遭遇した条件や、高温条件下では、その量は少ないことが明らかになった。

(3) 異なる温度条件に遭遇したニホンナシ花芽における網羅的遺伝子発現解析

自発休眠期のニホンナシの花芽が遭遇する温度条件を一定温度の低温区と、一時的な高温に遭遇させる変温区とに分け、それぞれが、低温積算時間 300 時間となった際の遺伝子発現について網羅的に解析した。

はじめに、0H 群と比較して 300LT 群と 300LH 群で Up regulate または Down regulate した遺伝子の共通性/非共通性について解析した (図)。300LT 群と 300LH 群において、2670、1885 の遺伝子が 0H と比較して有意に変動していた。その中で、共通して増加した遺伝子が 473 見いだされ、共通して減少した遺伝子が 301 遺伝子見いだされた。このことから、7.2 以下の低温で維

持された花芽と、低温から 18 に遭遇した花芽とでは、発現様式が明らかに異なることが示唆された。

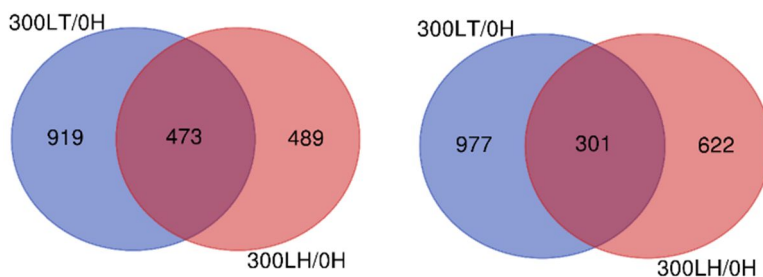


図 1 異なる温度条件に遭遇した花芽における遺伝子発現の共通性と非共通性 左図:OH 群と比較して 300LT 群と 300LH 群で Up regulate した遺伝子の共通性/非共通性、右図:OH 群と比較して 300LT 群と 300LH 群で Down regulate した遺伝子の共通性/非共通性

次に、これらの遺伝子の中で、休眠の制御に関わる転写制御因子 *dormancy-associated MADS-box(DAM)* の遺伝子に発現量を比較した。その結果、低温が蓄積していない OH では低い発現量であったが、300LT では高い発現が認められたのに対して、高温条件に 150 時間遭遇した花芽では、その発現レベルが比較的低いことが明らかになった(図 2)。

また、レドックス関連の遺伝子で、温度条件により違いの見られた遺伝子について比較したところ、NADPH 酸化酵素遺伝子や、ペルオキシダーゼ遺伝子が、変温区が低温区より高く発現しており、グルタチオン酸化酵素遺伝子やカタラーゼ遺伝子は低温による変化が変温区で少ないことが示された。これらのことから、花芽の酸化還元状態の違いがこれらの遺伝子の発現量の違いに関わる可能性が考えられた。

その他、OH 群と比較して 300LT 群と 300LH 群で Up regulate または Down regulate した遺伝子群ごとに、TAIR の GO Term Enrichment for Plant にて解析を行った結果、異なる温度条件において遺伝子発現量に違いが認められた遺伝子の中には、ヒストンアセチルトランスフェラーゼやなどが見出され、異なる温度条件下では、エピジェネティックな違いが生じる可能性が示唆された。今後、これらの遺伝子について注目し、自発休眠期の温度条件との関連や、植物ホルモンとの関連について詳細に検討することが必要と考えられる。

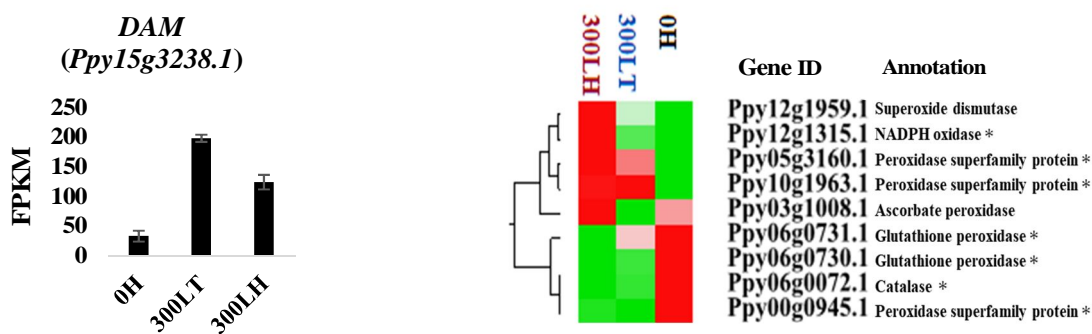


図 2 . 異なる温度条件に遭遇した花芽における DAM 遺伝子の発現量

図 3 . 異なる温度条件に遭遇した花芽における酸化還元関連遺伝子の発現量の違いを示すヒートマップ

赤 : 高発現 緑 : 低発現 * は OH と比較して 300H ならびに 300LH 間で有意に発現量が異なることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	瀬古澤 由彦 (Sekozawa Yoshihiko) (90361310)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関