

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780020  
 研究課題名 (和文) 落葉果樹の休眠芽で発現する低温応答性転写因子の探索と機能解析  
 研究課題名 (英文) Identification and characterization of endodormancy-associated transcription factor in the deciduous fruit tree species  
 研究代表者  
 山根 久代 (YAMANE HISAYO)  
 京都大学大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：80335306

研究成果の概要： 本研究では、温帯果樹の自発休眠芽で特異的に発現量が多い遺伝子の単離に成功した。この遺伝子は、自発休眠期に高発現し、休眠覚醒にともなって発現量が低下する発現パターンを示した。また低温処理実験の結果、低温遭遇時間の増加に伴って発現量が低下する一方、高温条件下では発現量の低下がみられなかった。すなわち、この遺伝子は自発休眠芽において、自発休眠を維持する因子として機能している可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1900000	0	1900000
2008年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	390000	3590000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：休眠

## 1. 研究開始当初の背景

永年性温帯落葉果樹の1年のライフサイクルを制御する重要な生理現象のひとつに休眠があげられる。温帯落葉果樹類は分化した芽が生長を停止し“休眠”した状態で越冬し、そののち一定期間の低温に遭遇してはじめて発芽可能となる。これは植物が冬季の厳寒に適応するために進化させた生体防御機構であり、温帯地域に分布する越冬性二年生草本類や多年生植物特有の現象である。休眠現象は果樹栽培において果実収量に直接影響を及ぼす重要な性質である。たとえば、休眠から早く覚醒する樹体では、春の霜害に遭

遇する危険性が増大し、結果として収量が低下する。逆に休眠が深く低温要求性が強い樹体は、暖冬によって休眠の覚醒が不十分となり発芽が揃わず開花不良樹となる危険がある。また、休眠性を有しない一部の熱帯果樹や常緑果樹は、熱帯地域での栽培や温室での促成栽培によって年に2回収穫可能である一方、休眠性を有する落葉果樹の二期作はほとんど例がなく生産性に幅がない。そのため収穫は年に1回のきわめて限られた期間に集中する。さらには近年の地球温暖化の進行に伴い、温暖地域では低温要求量が満たされないため、休眠覚醒の攪乱による発芽の不揃

いや開花不良樹の発生、開花遅延による収量低下が問題となっている。

以上に挙げた課題を克服し、落葉果樹栽培の安定化を図るには、休眠の制御メカニズムを解明し、得られた知見を利用して環境変化に適応しうる休眠性をもたせた品種を育成することが急務である。しかしながら、落葉果樹の越冬芽の休眠に関するこれまでの研究は、休眠覚醒時の生理的変動を概略的にとらえるにとどまっており、もっぱら休眠覚醒の人為的制御という応用研究に終始している。そこで本研究では、様々な低温要求量を有する核果類とくにウメを材料として、落葉果樹の休眠を制御する機構の一端を解明することを目標に、特に形態形成を制御する転写因子に着目して研究を進めていくこととした。

## 2. 研究の目的

越冬芽の休眠制御には、以下に述べるような理由から、MADS-box 遺伝子をはじめとする転写因子が深く関与している可能性が高い。最近モモでマッピングされた、頂芽の休眠を制御する単一遺伝子座領域 (evergrowing locus) には6つの MADS-box 遺伝子がタンデムリピートで座乗していることが報告されている。また、休眠と同様、低温遭遇という環境シグナルによって制御される生理現象としてアブラナ科植物やムギ類にみられる春化があげられるが、これには数多くの MADS-box 遺伝子が関与していることが最近の研究より明らかとなっている。その中心を担うタンパク質として FLC (FLOWERING LOCUS C) がある。FLC は栄養生長する頂端分裂組織で発現し一定期間の低温に遭遇することで発現が抑制され春化にいたる花芽分化抑制因子である。またシロイヌナズナでこれまでに同定されている花芽分化抑制因子には MAF1 (MADS AFFECTING FLOWERING 1) や SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE) など多くの MADS-box 遺伝子が含まれている。これらのうち多年生ライ麦の SVP オートソログである LpMADS10 は低温遭遇により転写量が低下し春化に至ることが報告されている。

以上のような経緯により、転写因子とくに MADS-box 遺伝子に着目することで未知領域である越冬芽の休眠制御機構の一端を解明できるのではないかという着想に至った。本研究の目的は、自発休眠を制御する遺伝子の網羅的探索とその機能解明である。

## 3. 研究の方法

先述のとおり、相関休眠芽や他発休眠芽と比較して、自発休眠芽では内因性の何らかの因子によって休眠を維持する機構がはたら

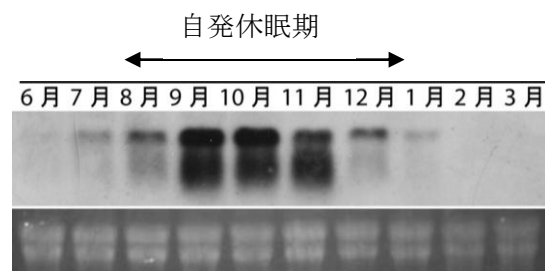
いている。その因子を探索するため、Suppression subtractive hybridization 法を用いて、自発休眠芽で特異的に発現量の多い遺伝子を網羅的に探索することとした。

自発休眠芽の休眠を制御する環境シグナルのキーワードは“低温”である。よって、自発休眠を制御する中枢遺伝子があるとすると、その遺伝子は低温に応答する発現パターンを示すはずである。そこで、網羅的に探索した遺伝子のうち、低温に応答する遺伝子をスクリーニングする。

以上の実験を2年間の研究期間中にとりおこなった。

## 4. 研究成果

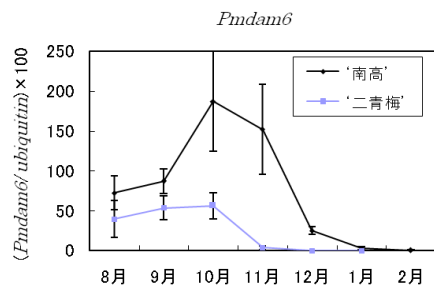
本研究ではまず、温帯果樹であるウメを供試し、サブトラクション法を用いて、自発休眠期でより特異的に発現量が多い遺伝子をスクリーニングしていった。その結果、StMADS11 タイプの MADS-box 遺伝子が自発休眠期で高発現していることをつきとめた (第1図)。



第1図 ウメ自発休眠芽で発現する MADS-box 遺伝子の検出

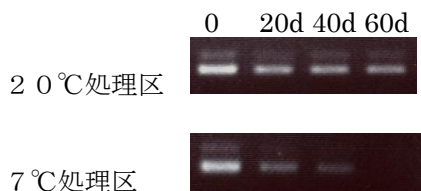
得られた遺伝子のゲノム構造を解析するにあたって、ウメ‘南高’よりゲノムライブラリーを作製して約 60kb にわたる領域の塩基配列をショットガンシーケンス法により決定したところ、6つの StMADS11 タイプの MADS-box 遺伝子 (PmDAM1-6) がタンデムリピートでウメゲノム上に存在することを明らかにした。次に、ウメを供試して、PmDAM1-6 遺伝子の発現パターンと休眠サイクルの季節的変動との関係を検証した。その結果、ウメ PmDAM5、6 遺伝子は、自発休眠期に高発現し、休眠覚醒にともなって発現量が低下することが示された。また、多低温要求性系統と少低温要求性系統を用いて発現変動を調査した結果、少低温要求性系統では、多低温要求性系統と比較して発現量が少なく、発現低下時期が約1ヶ月程度早かつ

た。低下時期は、休眠覚醒時期とほぼ同時期であった（第2図）。



第2図 ウメ多低温要求性品種‘南高’と少低温要求性品種‘二青梅’における PmDAM6 遺伝子の季節的発現変動

次に、ウメ PmDAM5、6 遺伝子の自発休眠覚醒時における発現量の低下と低温遭遇との関連性を明らかにするため、自発休眠覚醒期である11-1月の日長条件下(9時間日長)で人工的な低温処理を施して、発現量の変動を調査した。その結果、ウメ PmDAM5、6 遺伝子のうち、PmDAM6 遺伝子がより低温積算に対して敏感に反応し、休眠覚醒との相関もより密接であった。



第3図 ウメ PmDAM6 遺伝子の低温による発現変動

以上の結果より、StMADS11 タイプに属する MADS-box 遺伝子である、ウメ PmDAM6 遺伝子が自発休眠制御により深く関与している可能性が示された。

## 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 1 件)

Yamane, H. et al. Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated

expression of an SVP/AGL24-type MADS-box gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133, 1-9. 2008. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

① Yamane, H. et al. Identification and characterization of MADS-box gene expressed in endodormant winter buds of Japanese apricot (*Prunus mume*). *Plant & Animal Genome XVI*. 2008年1月14-17日. San Diego, USA.

② 山根久代ら. ウメ自発休眠芽で発現する低温応答性 MADS-box 遺伝子の単離と発現解析. 日本園芸学会平成 20 年度春季大会. 2008年3月28-29日. 東京農業大学.

③ Yamane, H. et al. Expression analysis of an endodormancy-related MADS-box gene in winter buds of fruit tree species of *Prunus*. *International symposium on Biotechnology of Fruit species*. 2008年9月1-5日. Dresden, Germany.

④ 大岡智美・山根久代ら. モモの自発休眠芽で発現する MADS-box 遺伝子の発現解析. 日本園芸学会平成 20 年度秋季大会. 2008年9月27-28日. 三重大学.

⑤ 山根久代ら. サクラ属果樹の自発休眠芽で発現する SVP タイプ MADS-box 遺伝子群の発現解析. 日本育種学会平成 20 年度秋季大会. 2008年10月11-12日. 滋賀県立大学.

⑥ Yamane, H. et al. Identification and characterization of the endodormancy-related SVP-type MADS-box genes in Japanese apricot. *Asian Horticultural Congress*. 2008年12月11-13日. Cheju, Korea.

⑦ 大岡智美・上達弘明・山根久代ら. ウメの自発休眠芽で発現する MADS-box 遺伝子の解析. 日本園芸学会平成 21 年度春季大会. 2009年3月19-20日. 明治大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 久代 (YAMANE HISAYO)

京都大学大学院農学研究科・助教

研究者番号：80335306

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし