

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15814

研究課題名（和文）リンゴの萌芽制御における冬の長さの認識に関わる脂質シグナルの解明

研究課題名（英文）Understanding of the lipid signalling involved in recognition of winter length for apple bud dormancy

研究代表者

齋藤 隆徳（Saito, Takanori）

千葉大学・大学院園芸学研究院・助教

研究者番号：20753479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では植物の細胞における記憶機構を担うとされているクロマチン構造の変化に着目し、リンゴの芽の休眠制御に関わる脂質の分子種およびその代謝に関わる遺伝子を特定することを目指した。休眠誘導期においてリンゴの腋葉芽では、低温やアブシシン酸を受容することで冬を認識し、1) クロマチン構造の変化により脂質代謝関連遺伝子のプロモーターにおいてMADS-box結合配列が表出することで、2) MADS-boxタンパクが表出した結合配列に結合し、3) その結果、ジャスモン酸を含む脂質代謝が変動することで、脂質蓄積を介した冬の長さの記憶と細胞分裂の低下が生じるといった細胞レベルでのモデルが提案できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの果樹の芽の休眠研究は、主に温度ストレス耐性や成長抑制の観点からの議論が中心となっており、エネルギー代謝の観点からの解析例はほとんどなかった。本研究の成果より、脂質代謝が細胞における記憶機構に含まれていることが明らかにできた。すなわち単なる成長停止ではなく、萌芽のエネルギーとしての脂質蓄積を行うための準備期間として、休眠を積極的に利用している可能性を見出した。したがって温暖化を含む気候変動に対応する果樹の育種の現場に対して、これまでとはまったく異なる観点を提示するとともに、関連する遺伝子の情報といった基盤的な知見を提供できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on changes in chromatin structure, which serve the cellular memory of prolonged cold perception. We especially examined to clarify the relationship between chromatin structure and lipids metabolism. Finally, we proposed the model of cellular machinery as below;

In the initial step of axillary bud dormancy, winter was perceived by low temperature and abscisic acid, and then 1) the chromatin opening of MADS-box binding sequences in the promoters of lipid metabolism relating genes is provoked, 2) which enhance the binding MADS-box protein, 3) resulting the lipid concentration induced, such as jasmonic acid, and reduced cell division via lipid accumulation.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：自発休眠 エピジェネティクス オミクス解析 低温記憶 温暖化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

温暖化をはじめとした気候変動によって生じる環境変化に適応する農作物の開発は、日本を含む世界的な食料問題の解決に不可欠である。とりわけリンゴなどの落葉果樹は、永年性作物という性質上、通年で気象変動の影響を受ける(杉浦ら 2007)。また数十年間は同じ樹で果実を生産するため、容易に品種・品目転換や更新ができない。落葉果樹の芽は、過酷な寒さに耐えるために休眠状態で越冬をする。休眠中は生育に適した環境条件でも萌芽せず、一定期間の冬の寒さにあうことで、萌芽できるようになる。萌芽に必要な冬の長さは樹種や品種で決まっており、例えばブドウのように数百時間でよい樹種もあれば、リンゴのように千時間以上を必要とする樹種もある。したがって温暖化で冬が短期化すると、リンゴのように長い冬が必要な樹種は、萌芽ができなくなる可能性がある。その一方で休眠状態の芽が、どのように冬の長さを認識し、萌芽できるようになるのかの仕組みは、これまでにほとんど明らかにされていない。

著者らのこれまでの研究を含めいくつかの研究から、休眠期の芽の細胞での脂質含量の増加や水分量の低下など様々な代謝の変化が示されており、また関連する遺伝子の発現変動も確認されている(Saitoら 2015)。このような背景から細胞内における代謝の変化が、冬の長さを感じ取る仕組みの一端を担っているのではと考えられた。実際に種子の場合では、発芽のプロセス(=光合成ができない期間)において、展葉までのエネルギー源として脂質を利用していることが知られている。しかし芽の休眠期における代謝変化については、著者らの研究も含めて温度ストレス耐性や成長抑制の観点からの議論が中心となっており(Saitoら 2013, 2015)、エネルギー代謝の観点からの解析例はほとんどなかった。ところがリンゴの芽においても、休眠中の芽の細胞で脂質含量の増加および脂質分解の抑制がみられた(Saitoら 2017)。すなわち萌芽に必要なエネルギー源を準備する期間が、萌芽に必要な冬の長さを決めている可能性が示唆されていた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、冬の長さを認識するシステムにおける脂質代謝の実態は何かという学術的な問いを明らかにすることを目的として、以下の点について解明することを目指した。

(1) 植物の細胞における記憶機構を担うとされているクロマチン構造の変化に着目し、実際に芽の休眠制御に関わる脂質の分子種およびその代謝に関わる遺伝子を特定する。

(2) 上述の(1)で特定をした脂質の分子種とその代謝に関わる遺伝子が、どのように低温シグナルを受容し、具体的にどのようなシグナル伝達が生じることにより制御されているかを解明する。

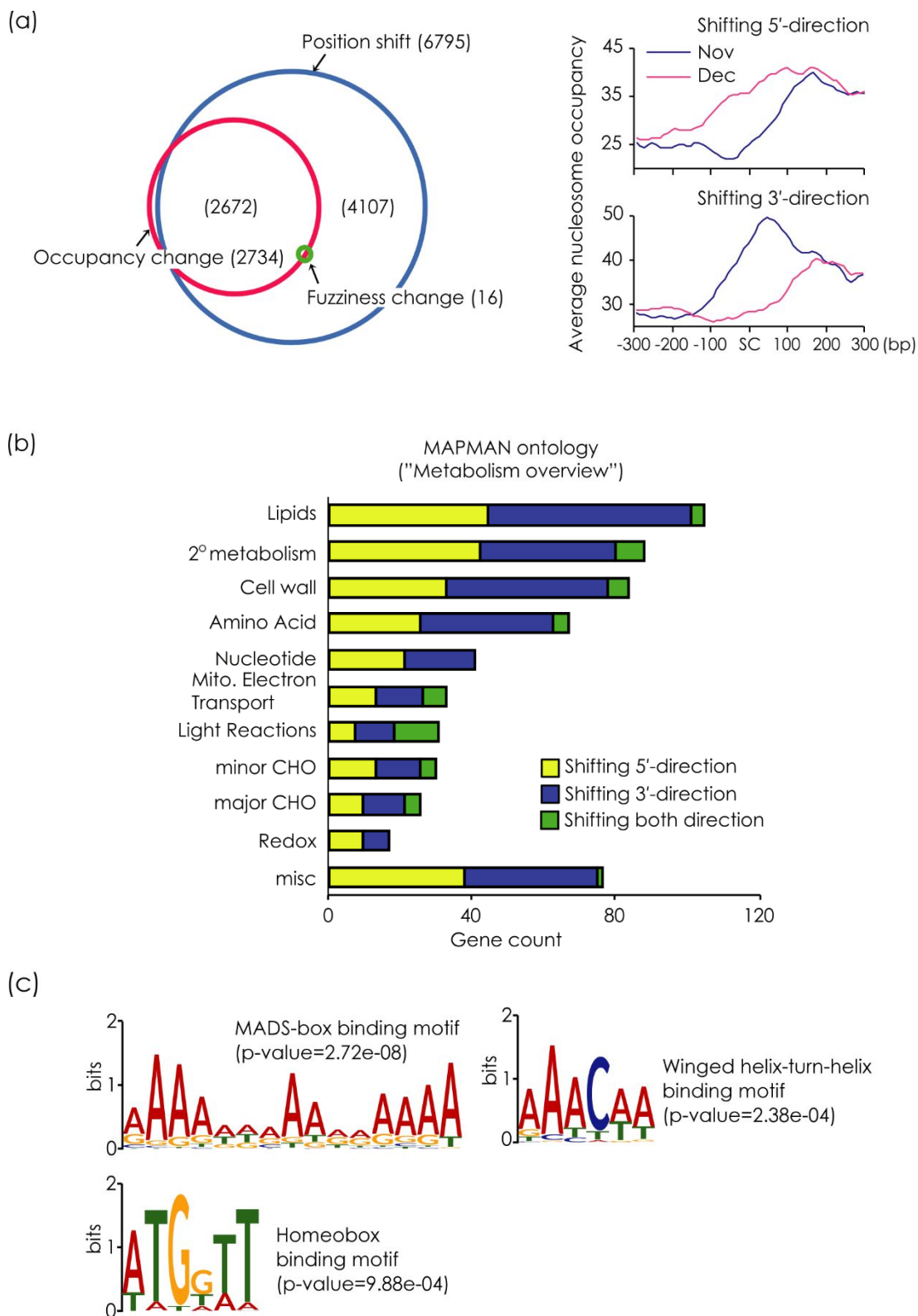
(3) さらに(2)で特定された制御メカニズムの細胞レベルでの役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

一般的な栽培リンゴである‘ふじ’を材料として供し、一年生枝から腋葉芽を採取した。このときに腋葉芽を1芽含む節を切り出し、25℃で培養したときの萌芽の有無・萌芽までの日数を測定することでその休眠の深さを評価した。採取した腋葉芽のうち、休眠のステージが明らかに異なる試料について、マイクロコックアルヌクレアーゼシークエンス法にて、全ゲノムレベルでのクロマチン構造の比較を行った。これらのデータについて代謝経路解析ソフトウェア・MAPMANによりその機能推定を行うことで、芽の休眠誘導期に変化する脂質の分子種の特定とその代謝に関わる遺伝子を調べた。さらに特定された脂質代謝に関わる遺伝子について、そのプロモーター領域におけるクロマチン構造の変化を抽出し、芽の休眠誘導期に表出をする転写調節配列を調査した。またRNAシークエンス法にて、特定した転写調節配列に結合し、環境シグナル伝達の実体を担う遺伝子の変動について評価した。最後に低温シグナル伝達の実体を担う遺伝子が受容する環境因子について、細胞レベルでどのような役割を果たしているのかを培養細胞を用いることで評価をした。

### 4. 研究成果

落葉果樹類の低温遭遇の指標とされる 7.2℃以下の低温は、11/17においては0時間だったが12/15では117時間であった。このときに‘ふじ’一年生枝のから腋葉芽を1芽含む節を切り出し、25℃下における萌芽までの所要日数を測定したところ、11/17に採取した腋葉芽のうち約8割について2週間以内で萌芽に至った。一方で12/15に採取した腋葉芽では約8割が萌芽に3週間以上を要したことから、冬を認識して萌芽能の喪失を起こし始めたことを確認した。そこで11/17および12/15に採取をした腋葉芽を用いて、全ゲノム領域におけるクロマチン構造の変化を比較したところ、6000を超える箇所にてクロマチン構造変化、特にクロマチンの移動(Position shift)が生じていた(Figure 1a左)。また休眠誘導期において、翻訳開始点が露出する(発現が誘導される)遺伝子では、クロマチンの移動だけではなく、密度変化(Occupancy change)も生じていた(Figure 1a右のShifting 3'-direction)。

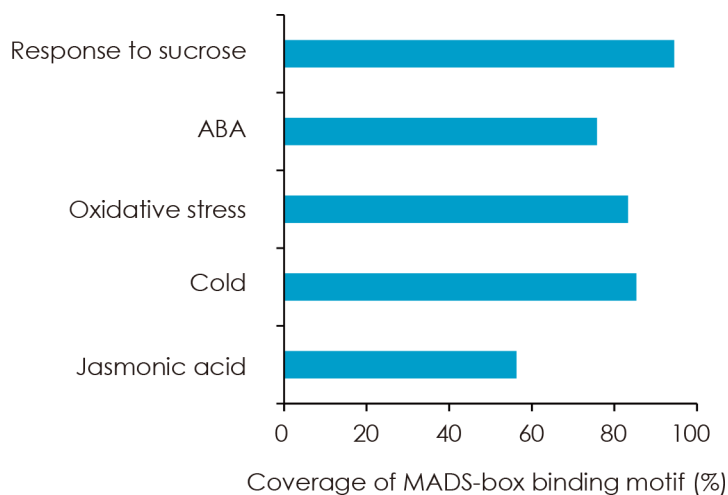


**Figure 1.** (a) Venn diagram showing the overlap 3 different types of nucleosome dynamics (left panel). The number of genes exhibiting nucleosome dynamics near SCs is shown in parentheses. Average nucleosome occupancy around SCs of genes categorised as 'Position shifting', further classified by the direction of shifting (right panel). (b) Distribution of genes classified as 'Metabolism overview' by MAPMAN analysis. (c) Signature motifs frequently across the putative promoters of metabolism-related genes. The motifs identified as known TFs binding sequence by TOMTOM analysis showing are shown.

#### 4. 研究成果 (つづき)

そこでクロマチン構造変化の変化のうち、翻訳開始点 (Figure 1a 右の SC) におけるクロマチンの移動が認められた遺伝子について、MAPMAN を用いて機能推定を行った。その結果、200 を超える脂質代謝関連遺伝子のゲノム領域についてクロマチンの移動が確認でき、特に翻訳開始点での変化に注目すると、約 100 の遺伝子が重要な遺伝子であることを特定した (Figure 1b の Lipids)。すなわちこれらの遺伝子とクロマチン構造の変化に関連がみられたことは、脂質代謝が植物の細胞での記憶機構に含まれていることを示唆しており、研究開始当初の仮説を支持する結果となった。さらにこれらの脂質代謝関連遺伝子について、プロモーター領域における構造変化を解析したところ、MADS-box、Homeobox および Winged helix-turn-helix と呼ばれるタンパクが結合する転写調節配列が表出していることを見出した (Figure 1c)。このことはこれらのタンパクが環境シグナルを受容し、脂質代謝関連遺伝子の発現量を調節することで、休眠期の芽の細胞での脂質含量が調節されているという仮説が推定された。そのため RNA シークエンス法にてこれらのタンパクをコードする転写産物量を比較した。その結果、Homeobox および Winged helix-turn-helix については、明確な休眠誘導との関係を見出すことはできなかった (データ省略)。その一方で、MADS-box については 124 個がリンゴゲノム上に存在することを確認できた。これらの MADS-box タンパクについて、クロマチン構造の観点からデータを統合して発現応答を精査したところ、DORMANCY ASSOCIATED MADS-box および AGAMOUS-like 79 について脂質代謝を調節する有力な候補としてスクリーニングすることができた。

これらのデータを基盤として実際に脂質代謝関連遺伝子との関連を精査したところ、脂質代謝の中でもジャスモン酸の代謝に関わる遺伝子が特に MADS-box との関わりが強いことも見出した (Figure 2 の Jasmonic acid)。さらに脂質代謝と同様に、低温・低酸素・アブシシン酸および糖代謝についても、MADS-box との関連が疑われた。そこでリンゴ・ふじの芽から確立した培養細胞に対して、低温・低酸素・アブシシン酸および糖代謝が変化するように培養環境および培地条件を変更したところ、細胞分裂の低下と関連する遺伝子の発現量の増減がみられた (データ省略)。また MADS-box タンパクとの関連についても評価したところ、低温とアブシシン酸に反応していることを明確にすることができた。すなわちこれらの結果を総合すると、リンゴの腋葉芽の休眠誘導期においては、低温やアブシシン酸を受容することで冬を認識し、1) クロマチン構造の変化により脂質代謝関連遺伝子のプロモーターにおいて MADS-box 結合配列が表出し、2) 次に DORMANCY ASSOCIATED MADS-box を中心とした MADS-box タンパクが表出した結合配列に結合する、3) その結果、ジャスモン酸を含む脂質代謝が変動することで、脂質蓄積を介した冬の長さの記憶と細胞分裂の低下が生じるといった細胞レベルでのモデルが提案できた。



**Figure 2.** Coverage of MADS-box binding motif in the promoter regions of DEGs annotated as “response to sucrose”, “Abscisic acid (ABA)”, “Oxidative stress”, “Cold”, and “Jasmonic acid” by gene ontology analysis.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤隆徳, 大川克哉, 小原均, 近藤悟
2. 発表標題 培養細胞を利用した自発休眠打破剤の in vitro スクリーニングの可能性について
3. 学会等名 園芸学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------