

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22319

研究課題名(和文) プラズマ法を用いたフロリゲンタンパク質直接導入による早期開花誘導系の確立

研究課題名(英文) Establishment of early flowering system using direct introduction of florigen by plasma induced protein transporationt

研究代表者

光原 一郎(MITSUHARA, ICHIRO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長

研究者番号：80370683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：フロリゲン(FT)導入による早期開花誘導系のモデルとして、リンゴ培養shootへの常温大気圧プラズマ処理を介したFT導入を試みた。FTの導入により花芽形成に特徴的な遺伝子応答が起こることを確認したが、この効果は照射後3日目をピークとし、7日後には定常状態に戻った。そこで、連続してFT導入を行うことで遺伝子発現応答を持続的に誘導することで早期開花の実現を目指したが、プラズマ照射を連続して行うことが植物体にとってストレスとなりその後の生育が激しく抑制された。照射強度の調節や酸化防止剤の添加などを行い、ダメージを最小化するための処理条件の検討を行ったが有効な条件を見つけることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ法を用いてFTをタンパク質として直接導入することで、茎頂を遺伝子発現レベルで早期開花の方向に誘導できる可能性が示された。ただし、実際に早期開花を実現するためには、プラズマ処理による植物体へのストレスを最小化する条件を見つけ出す必要がある。プラズマ処理による酸化ストレスに感受性の低い植物体を用いて再検討することも考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish early flowering inducing system using direct introduction of florigen protein (FT) by plasma induced protein uptake into shoot apex of apple. Introduction of FT induce characteristic expression profile for flowering on apple shoot, but the effect is peaked at 3 day and return to basal level at 7 days after treatment. So, we assessed whether repetitive introduction of FT induce sustained expression profile for flowering, but repeated plasma treatment result in severe stress on shoot and growth of the shoot was severely suppressed. We tried to optimize condition for FT introduction reducing damage induced by plasma treatment but could not find better condition at present.

研究分野：植物生理学

キーワード：フロリゲン(FT) 常温大気圧プラズマ 花芽形成 早期開花

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

花芽形成促進は植物生理学上の重要テーマの一つであり、特に開花まで数年を要する果樹などの早期開花による世代期間の短縮による育種の効率化への応用が期待される。交配による有用形質の導入は育種の基本であるが、通常で1年・促成栽培すれば年に3回程度の世代を経ることのできるイネのような作物と違い、果樹類ではその過程に何年もの年月が必要となる。また、育種の基盤となる遺伝子地図の作製にも多数の年数を要するため、早期開花技術は木本類育種の悲願の一つである。

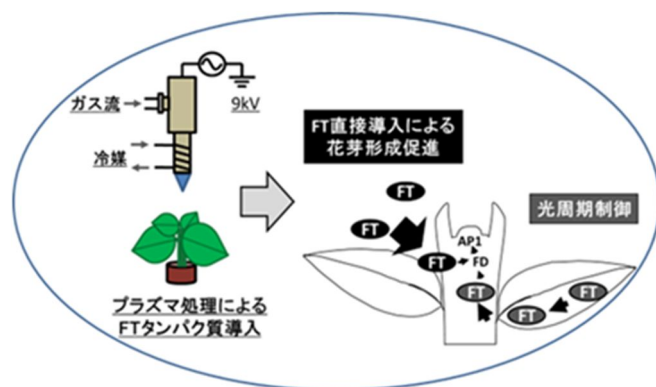
近年、花芽形成ホルモンが FT タンパク質として同定されたことから、FT 遺伝子を過剰発現させることで早期開花が可能となっているが、いずれの方法も、アグロバクテリウムやウイルスを用いた発現法を介した遺伝子導入を伴うため、カルタヘナ法の制約を受ける。さらに、実用化の前には導入遺伝子を排除し、さらに「導入遺伝子や組換えウイルスが残っていないことを証明する」という困難な過程が必要となる。FT 遺伝子の導入ではなく、FT タンパク質の直接導入による早期開花誘導が可能となればこのような制約はなくなるが、実際に FT の直接導入による早期開花誘導の成功例は知られていない。

### 2. 研究の目的

花芽形成ホルモン(フロリゲン、FT)がタンパク質として同定されたことから、FT 遺伝子の過剰発現による花芽形成の促進が可能となっている。FT を利用した花芽形成促進は、開花までに数年以上を要する果樹類などの育種年限短縮への応用が期待されるが、FT 遺伝子の過剰発現はアグロバクテリウムやウイルスによる一過的発現系を用いたとしても、遺伝子が導入される組換え実験となる。本課題では、提案者らの開発したプラズマ処理によるタンパク質導入技術を利用したフロリゲンタンパク質(FT)直接導入により、遺伝子導入を経ない花芽形成促進法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

FT の直接導入による花芽形成促進のモデル植物として、代表的な果樹で実生からの開花に数年を要するリンゴをもちいる。品種としては、王林をもちいて無菌培養中の黄化 shoot を材料として用いる。



#### 1) リンゴ成長点周辺への効率的なタンパク質導入法の開発

植物成長点付近への照射に適したプラズマ生成装置を作成し、GFP等のレポータータンパク質を用いて導入効率を評価することで、タンパク質導入効率が高く、かつ植物へのストレスの少ない照射条件を検討する。

#### 2) リンゴ(王林)の培養 shoot への FT 導入による花芽分化促進の実証

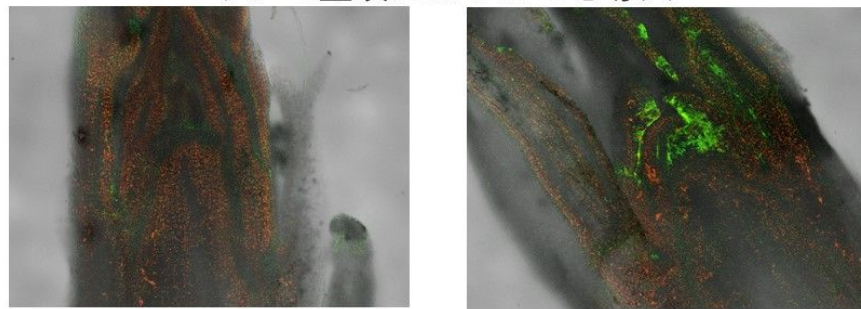
リンゴ(王林)の培養 shoot にプラズマ法を用いて FT を導入し、花芽形成促進の実証を目指す。FT 導入後の shoot をサンプリングして、花芽形成に特徴的な遺伝子発現パターンの変動がみられるかどうかを qRT-PCR 法によって確認する。特徴的な発現変動が見られたら、処理した shoot の培養を継続し、花芽形成までの期間をコントロールと比較する。

#### 4. 研究成果

##### 1) リンゴ成長点周辺への効率的なタンパク質導入法の開発

プラズマの温度を 25 前後に制御できる大気圧プラズマ装置を用いて、リンゴの shoot にプラズマ照射を行いレポータータンパク質として、GFP とフロリゲンとの融合タンパク質(GFP:: $FT$ )した。無菌培地上で育成した Shoot にプラズマを照射後、GFP:: $FT$  融合タンパク質溶液に浸漬することでタンパク質を Shoot 細胞内に取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察することで GFP の取り込みを評価した。暗黒下で育成した黄化 Shoot を材料とし、窒素プラズマを照射することで Shoot の細胞に GFP:: $FT$  融合タンパク質を取り込ませることができた。

##### リンゴ茎頂にGFP:: $FT$ を導入

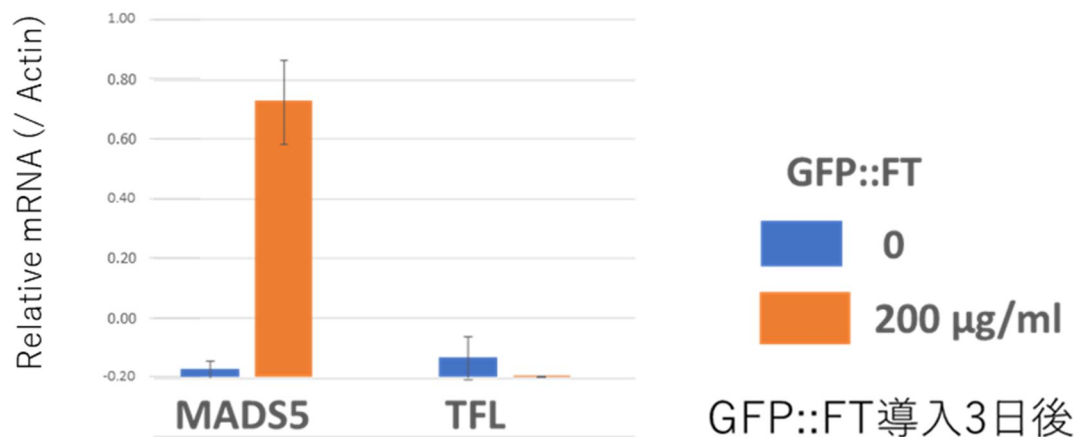


N2 Gas

N2 plasma

##### 2) リンゴ(王林)の培養 shoot への FT 導入による花芽分化促進の実証

プラズマ法で GFP:: $FT$  を導入後、花芽形成が誘導されるかどうかを評価するために、処理後の Shoot から mRNA を抽出して qRT-PCR 法により花芽形成に特徴的な遺伝子発現変動がみられるかどうかを検討した。処理後 3 日後のサンプルで、花芽形成に特徴的な MADS5 遺伝子の発現誘導と、TFL 遺伝子の発現抑制が確認できたことから、導入された FT が機能して shoot の生理状態が花芽形成に近づいたと考えられる。



しかしながら、この発現変動は一過的で 7 日後には基底状態に戻ってしまうことから、一回の導入だけでは花芽形成の促進につなげることは難しいと考えられた。そこで、リンゴ Shoot に週毎に連続して GFP:: $FT$  の導入を行い、発現変動(MADS5 の誘導と TFL の抑制)を持続させることを試みたが、2 回以上導入処理を受けると Shoot が激しく褐変してしまい、その後の生育が見られなくなった。プラズマ処理による酸化的ストレスが主な原因と考えられたため、Shoot を事前に酸化防止剤で処理する、GFP:: $FT$  に浸漬する際の溶液に還元剤を添加するなどを試みたが、改善は認められなかった。

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西谷千佳子
2. 発表標題 果樹のゲノム編集技術の確立に向けた課題
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	西谷 千佳子  (NISHITANI CHIKAKO)  (10370553)	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    (82111)	
研究分担者	沖野 晃俊  (OKINO AKITOSHI)  (60262276)	東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授    (12608)	
研究分担者	柳川 由紀  (YANAGAWA YUKI)  (90432591)	千葉大学・大学院園芸学研究院・特任研究員    (12501)	

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