

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380019

研究課題名(和文) 温帯落葉果樹の休眠制御における低温シグナルの機能に関する研究

研究課題名(英文) Study on function of low temperature signal on dormancy regulation in 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) 9,700,000円、(間接経費) 2,910,000円

研究成果の概要(和文)：低温が落葉果樹の自発休眠期に及ぼす影響について明らかにするため、様々な低温量に遭遇させたニホンナシ‘幸水’および‘豊水’における代謝の変化を検討した。0時間から750時間の低温に遭遇させた花芽における一次代謝産物についてメタボローム解析を行い、代謝産物の変化について検討した。主成分分析を行った糖リン酸、有機酸などが低温遭遇に伴い変化していたこと、また0時間から300時間の代謝産物と600時間、750時間の芽の代謝産物とで大きな違いがあることが明らかになった。さらに、花芽における糖代謝関連酵素、および糖含量を解析するとともに、シアナミドや硝酸カリウム処理の影響について解析した。

研究成果の概要(英文)：Effects of low temperature on physiology of flower bud during dormancy period were investigated using Japanese pears. Insufficient amount of low temperature during endo-dormancy, bud abortion and necrosis were found in flowering time. Metabolome analysis indicated that metabolites in flower buds of 600CH (chilling hours) and 750CH were different from those in 0CH and 300CH. PCA analysis revealed that phosphoric acids and organic acid contents would be related to chilling. Enzyme activities involved in sugar metabolism are studied during endo-dormancy and effects of hydrogen cyanamide and potassium nitrate were investigated.

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：果樹 休眠 低温

1. 研究開始当初の背景

果樹は、永年性植物であり栽培地の移動や改植が難しいため、地球温暖化や、異常気象の影響を最も受けやすい農作物の一つである。特に、冬期の低温が果樹の生理現象に及ぼす影響は大きく、地球温暖化や、異常気象は、落葉果樹における花芽の発芽異常や、花芽の枯死などを引き起こしており、高品質果実生産の低下につながる極めて深刻な問題である。

果樹の芽の休眠覚醒に対する低温の影響については、以前より、栽培学的研究や、生態学的研究が行われているが、休眠導入および休眠覚醒における低温の役割、およびそれらの現象のメカニズムは未だ明らかではない。また、低温不足による発芽の不揃いに対して、シアナミドなどの植物成長調節物質処理が行われているが、メカニズムに関しても不明な点が多い。植物ホルモンの生合成や代謝の変化、遺伝子発現変化など、どのような分子メカニズムが関与するかどうかについては不明である。

これまでに、ニホンナシやモモの休眠芽における生理的变化について分子生物学的アプローチや、MRI を用いたアプローチを行い、休眠打破時にレドックス関連の酵素活性とそれらの遺伝子発現の変化が起こること、また、水の分布や動態の変化と水チャネル遺伝子発現の変化などが起こることを明らかにしてきた。また、休眠芽の発芽異常については、低温遭遇に伴う糖や芽中の水分の変動などを研究してきた。一方、休眠打破を促進するシアナミド処理をした際に、休眠芽中でレドックス制御に関する多くの遺伝子や酵素活性が変動することを報告し、さらに、休眠の制御に関連する植物ホルモンである ABA 生合成遺伝子の変動などがあることを示してきている。

園芸学において、休眠打破の問題は、蔬菜、花卉、果樹において生産物の品質と生産量に直接かかわる重要なものである。特に果樹は永年性植物であり、芽の休眠に必要な低温が不足した際には、開花期の不揃い、芽の壊死を含む発芽異常など果実生産に深刻な影響を及ぼすことが知られている。近年顕在化してきている気候温暖化や、それに伴う異常気象などにより、既に冬期の低温不足がニホンナシやリンゴなどの重要な果樹の開花に影響してきており、国内外で注目される研究課題である。以前より多くの栽培学的知見が蓄積している芽の休眠現象において花芽および樹体の生理的变化を網羅的に解析し、レドックス制御や代謝制御について検討することや、植物ホルモンの動態について検討することが必要であると考えられる。これまで、果樹の休眠打破については、休眠打破に必要な低温要求量の解析や、休眠打破予測モデルの開発など多くの知見がある一方で、休眠導入および打破における生理的な変化については明らかになっていないところが多かつ

た。

近年、多くの複雑な生理現象について、代謝変化や遺伝子発現変化などを網羅的にとらえるオミックス解析が盛んになりつつある。休眠現象は、花芽の中で多くの変化が起こると考えられ、網羅的な解析が必要とされているがほとんど行われていなかった。そのため、複雑な生理生化学的変動が起こっていると考えられる休眠現象における低温の役割について検討するには、網羅的な解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、果樹の休眠における低温の役割について、植物の一次代謝や、植物ホルモン制御、エピジェネティック制御を含めて全体からアプローチし、休眠への導入および覚醒のメカニズムを解明することを目的とした。ニホンナシなどでは、自発休眠時に遭遇する低温量が不足すると、ねむり症などの発芽異常が起こることが問題になっている。すなわち、休眠芽の中の小花に何らかに理由で異常が生じる結果、ネクロシスを起こすなどして、結果的に小花の数が減少する、時には、芽全体が壊死してしまう現象があり、そのような異常が発生するメカニズムの解明と、発芽異常の発生を抑制する方法を明らかにすることが喫緊の問題であると考えられる。本研究では、はじめに、様々な量の低温に遭遇したニホンナシの花芽に生じる異常について生態学的調査を行い、低温と異常発生や生理的变化との関連について検討し、その後、低温に遭遇した休眠導入初期の代謝変動や、低温不足による発芽障害が生じる際の代謝の変化についてメタボローム解析を行うこととした。その後、代謝関連の変化について検討するため、糖代謝や植物ホルモンの代謝に対する低温遭遇の影響や、休眠打破に影響がある植物成長調節物質処理を行った際の代謝の変化について検討した。

3. 研究の方法

(1) 茨城県つくば市筑波大学農林技術センター内で育成したニホンナシ‘豊水’‘幸水’のポットを用いた。また、この材料は過去5年間も同様の温度処理を行っているものを用いた。

処理区は、自然条件下で栽培した無処理区と異なる時期に低温の遭遇させた処理区1から3の計4処理区を設けた。低温処理条件は、7.2 以下の低温を蓄積していく Chilling Hour (CH) モデルを使用した。データロガーで1時間おきに温度を測定し、低温要求量の8割ある600時間(CH)になるように露地で栽培した。

低温遭遇後、加温ハウスに移動した後から萌芽、開花、を2日おきに観察し、花そうあたりの花数、開花期間を調査した。また、異常花として花柄の長さをノギスで測定した。サンプリングは、‘豊水’の各処理区で休眠

芽を低温遭遇直前の 0CH および低温遭遇終了時の 600CH の 2 回と萌芽直前の計 3 回実施した。採取した休眠芽は FAA (ホルマリン) 液で固定した後、実体顕微鏡による小花観察、液体窒素で凍結乾燥した後、-80 のフリーザーで保存し、後日 HPLC による糖分析を行った。

低温処理に遭遇させなかった区として、低温遭遇前に加温ハウスに移行し、低温遭遇区と比較した。実験開始時に総芽数をカウントし、その後、萌芽、開花を 2 日おきに観察し、花そうあたりの花数、開花期間を調査した。サンプリングは、無処理区の低温蓄積量を基準に 0CH、300CH 時に休眠芽を採取し、低温遭遇の影響について検討した。また同時に成木から 10 芽以上をつけた側枝をサンプリングし、培養室で管理し、萌芽観察をすることで、低温と萌芽率の変化について確認した。

(2) '幸水' 花芽のメタボローム解析

筑波大学農林技術センターの果樹園に植栽された '幸水' 成木よりなりゆきで一定量の異なる低温量に遭遇した花芽を採取し、ただちに液体窒素にて凍結し-80 にて保存した。メタボローム解析は、キャピラリーMS(マスペクトロメトリー)にて行い、一次代謝産物について解析した。定量結果について主成分分析を行った。低温に遭遇しなかった区として、上記の加温ハウスに移動させた個体の芽をサンプリングし、代謝産物の解析を行った。

(3) ニホンナシとモモにおける植物ホルモンおよびレドックス関連遺伝子の上流域の単離

アブシシン酸 (ABA) 代謝関連、生合成関連遺伝子上流域をニホンナシ、およびモモゲノムから単離するため、genome walker kit により、アブシシン酸の生合成酵素 *9-cis epoxy carotenoid dioxygenase (NCED)* 遺伝子および ABA8' 水酸化酵素遺伝子上流域のクローニングを試みた。また、モモの休眠芽における NCED 遺伝子の発現様式について定量 PCR により解析した。

(4) ニホンナシゲノムからのレドックス関連遺伝子上流域の単離と解析

ニホンナシの '豊水' の幼葉より、ゲノムを単離し、Genome Walker kit を用いて、アダプターの付加されたライブラリーを作製した。それらを鋳型に AOX2 の遺伝子配列を含むプライマーを用いて、遺伝子上流域を含む断片の増幅を行った。

(5) シアナミドおよび硝酸カリウム処理が糖代謝に及ぼす影響について

ポット植えのニホンナシ '豊水' について、低温遭遇前に硝酸カリウム処理を行い、低温に 600CH 遭遇させ、その後ハウス内で加温し、花芽のサンプリングを行った。一方、シアナミド処理は、低温遭遇必要量の 80% で、低温不足とされる 600CH の低温に遭遇させた後に、1% シアナミドを処理し、その後、加温した。経時的に花芽をサンプリングし、80% エタノ

ールで可溶性糖を抽出して、HPLC で分析を行った。一方、デンプン含量については、エタノール抽出の残渣中のデンプン含量をデンプン量測定キット (メガザイム) にて定量した。糖代謝関連酵素活性については、スクロース合成酵素活性および酸性インペルターゼの活性を定量した。

4. 研究成果

(1) 異なる低温遭遇条件においた際の花芽の萌芽とネクロシス

休眠に必要な低温積算に寄与する 7.2 以下の低温遭遇開始時期をそれぞれ 11 月、12 月、1 月に設定した区を設け、休眠打破には不十分な 600CH に遭遇させた芽の萌芽、およびネクロシスについて調査した。その結果、低温遭遇開始時期が遅くなるほど花芽中の小花のネクロシスが増加することが明らかになり、さらに、12 月に低温に遭遇させ始めた花芽と 1 月に始めた花芽とでは、ネクロシスが発生する原因が異なる可能性が示された。

(2) 自発休眠導入初期のニホンナシ花芽におけるメタボローム解析

低温に一定期間遭遇させた後、サンプリングした花芽のメタボローム解析を行った。その結果、低温に遭遇した花芽では、遭遇しなかったものと比べて、TCA 回路を含む呼吸関連の代謝系その他、アミノ酸代謝等に変化が認められることが明らかになった。異なる低温量 (0CH, 300CH, 600CH, 750CH) に遭遇したニホンナシ '幸水' 花芽のメタボローム解析結果について、多変量解析を行い、主成分解析、階層的クラスター分析を行った。その結果、0CH、300CH と比較して、600CH、750CH に遭遇した芽では、大きく代謝物のパターンが変化していることが明らかになった。中でも、多くの核酸や糖リン酸において、増加傾向が認められた。リン酸化合物の中でも ADP、3PGA などは、低温処理依存的に増加している可能性が見出された。また、有機酸の中に、低温処理により増加しているものが複数見出され、代謝の変化が起きていることが予想された。休眠芽におけるアミノ酸含量については、低温処理により減少するものが多数見出された一方で、メチオニンなどの増加するアミノ酸も見出された。今回の解析の結果からは、0CH と 300CH との間の違いは大きくなかったが、300CH から 600CH との間には大きな代謝変化があることが考えられた。低温量が約 600CH では、低温遭遇量が正常な萌芽に不十分だとされたが、今回の結果からは、十分な低温量に遭遇した花芽 (750CH) の代謝物との違いは個体差も大きく明確ではなかった。今後は、300 時間と 600 時間の間で起こる代謝変化についてさらに詳しく調べることで、休眠打破に関連した変化が明確になると考えられた。

(3) 休眠芽における植物ホルモン関連遺伝子の発現解析および 5' 上流域の単離と解析
アブシシン酸生合成に重要な酵素とされ

る NCED 遺伝子上流域約 1 kbp をモモゲノムより単離し配列の決定を行った。また、本遺伝子の休眠芽における発現様式について定量 PCR を行った。

(4) ニホンナシゲノムからのレドックス関連遺伝子上流領域の単離と解析

シアン耐性呼吸末端酸化酵素 (Alternative Oxidase: AOX) 遺伝子の発現制御因子を明らかにするため、遺伝子配列を解析した。

(5) シアナミドおよび硝酸カリウム処理が糖代謝に及ぼす影響について

芽の休眠打破促進剤であるシアナミドや硝酸カリウム処理、および自発休眠時の異なる温度処理を行った際の休眠芽の糖代謝について検討した結果、シアナミド処理および硝酸カリウム処理はどちらも低温不足条件下の発芽を促進したが、その際に、芽内のグルコースとフルクトースの増加、およびソルビトールに変化が認められた。次に、異なる温度に一定時間遭遇させた際の糖代謝について調べたところ、自発休眠期の温度が 0、6 および 12 では、それぞれ糖代謝に違いがみられることが明らかになった。特に、可溶性酸性インペルターゼおよびショ糖合成酵素活性に違いがみられ、このことから、自発休眠期の低温遭遇温度が芽内の糖含量および糖代謝に作用することが示された。

以上より、自発休眠時の花芽では、代謝の変動、特に糖リン酸や、呼吸関連の有機酸、可溶性糖、デンプン代謝などが低温により影響を受けることが示唆された。これらのことが、低温不足の発芽異常などに関与すると考えられ、今後、低温シグナルと糖代謝や、呼吸、糖リン酸代謝関連酵素活性芽内の糖代謝との関連を精査する必要があると考えられた。

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)

[学会発表](計 1 件)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Sumiko Sugaya, Hiroshi Gemma, Effects of potassium nitrate and hydrogen cyanamide on bud dormancy of 'Housui' Japanese pear under mild winter conditions, 園芸学会、2013 年、9 月 20 ~ 21 日、岩手大学

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

弦間 洋 (GEMMA, Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70094406

(3) 連携研究者

瀬古澤 由彦 (SEKOZAWA, Yoshihiko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：90361310