

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658031

研究課題名(和文)フロリゲン直接注入法を活用したカンキツの幼若期短縮方法の開発

研究課題名(英文)Direct injection of florigen to reduce the juvenile phase of Citrus species

研究代表者

永野 幸生 (NAGANO, YUKIO)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：00263038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：開花のコントロールは農家の夢である。特に果樹では、幼若期(発芽から開花までの期間)が長い。カンキツでは、8年以上必要である。そのため、この期間を短くすることが重要である。FLOWERING LOCUS T (FT)タンパク質は開花ホルモン「フロリゲン」の最有力候補である。そこで、カンキツの幼若期を短くするために、細菌で生産したFTタンパク質の直接注入を行った。時々、開花誘導に成功するものの、常には成功しなかった。また、開花阻害タンパク質TFL1の阻害化合物の探索を行ったが、この試みは失敗した。

研究成果の概要(英文)：Control of Flowering is a dream of farmers. Especially in fruit trees, juvenile phase (the time between sowing and first flowering) is generally long. In the case of Citrus species, this period is more than 8 years. Therefore, to shorten this period is important for the cultivation of these trees. FLOWERING LOCUS T (FT) protein is the most potent candidate of flowering hormone "florigen". To reduce the juvenile phase of Citrus species, we directly injected bacterially-expressed FT protein into these plants. Although we sometimes succeeded to induce the flowering, we did not always do it. Alternatively, we searched the chemical inhibitors against the flowering inhibitor TFL1 protein. However, these attempts were failed.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：園芸学 バイオテクノロジー 発生・分化 蛋白質 植物

1. 研究開始当初の背景

カンキツなどの果樹は、発芽後一定の年数を経過しないと花を着けない。この期間のことを幼若期という。カンキツでは、幼若期は8~12年に及ぶ。幼若期間を短くすることは、育種上、農業上重要である。なぜなら、選抜個体を早期に得ることで、幼若期間が長い果樹の品種改良の効率化につながるからである。その結果、新しい品種を農業現場へ早期に投入できる。

花芽形成において、シロイヌナズナの「開花遺伝子座T (*Flowering Locus T*)」の遺伝子(以下、「FT」という)がコードしているFTタンパク質が重要な役割をしている。FTタンパク質は、日長などの環境の変化に応じて葉で合成された後、芽に移行し、花芽形成を誘導する(Science (2007) 316, 1030 - 1033など)。このように、葉で合成された後、芽に移行し、花芽形成を誘導する物質のことをフロリゲンというが、FTタンパク質はこのフロリゲンの本体であると考えられている。

私たちは、大腸菌で生産させたウンシュウミカン由来FTタンパク質を、カラタチ台木として成熟相のウンシュウミカンを穂木として接いだものに注入して、花芽形成が誘導されるかどうかを検討した。なお、この状態の穂木は、栄養的成熟期と呼ばれ、花芽形成能を潜在的に持つけれども、栄養生長(栄養器官のみを茂らせる生長)を続ける。注入実験の結果、花芽形成が劇的に誘導されることがわかった(特願 2009-260847)。一方、カラタチを台木として成熟期のウンシュウミカン穂木として接いだものに更にウンシュウミカンの実生樹を高接ぎしたもの、あるいは、いくつかの品種のカンキツ実生に、FTタンパク質の直接注入を行った場合、花芽形成には至らなかった。

このように、研究開始当初、「フロリゲン直接注入法」によって、栄養的成熟期のカンキツで花芽形成を誘導することに成功していたけれども、幼若期のカンキツでは成功していなかった。

2. 研究の目的

上述の「研究開始当初の背景」を踏まえて、私たちは果樹の幼若期を短くする方法を開発することにした。その際、幼若期のカンキツで花芽形成を誘導することに成功しなかった理由として、次の三つの可能性を考えた。

- (1) FTタンパク質の投与量・投回数十分でなかった。あるいは、FTタンパク質が不安定であったため生体内で十分な量が存在しなかった。
- (2) 実生樹がFTタンパク質の活性を阻害する物質を分泌している。
- (3) FTタンパク質とは独立の開花誘導経路の活性化も同時に重要である。

私たちの開発した「フロリゲン直接注入法」を育種及び農業に応用するためには、実

生樹の開花までの期間の短縮、すなわち、幼若期の短縮を行うことが重要である。そこで、本研究では、これら三つの可能性を念頭に置いて、ウンシュウミカンに代表されるカンキツを研究材料に、フロリゲン直接注入法の更なる改善を試み、更にフロリゲン直接注入法と他の手法を組み合わせることで、幼若期短縮方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

「研究の目的」で記した三つの可能性について、以下の方法で検討した。

(1) フロリゲン直接注入法の更なる改善

研究目的の(1)で示した課題は、「フロリゲン直接注入法の更なる改善」として捉えることが出来る。そこで、フロリゲン直接注入法について、様々な検討を行うことにした。具体的には、品種間差異の検討、および、注入を行った年による結果の変動の検討を行った。なお、カンキツでは表年・裏年という現象が知られているため、後者の実験は重要である。

また、FTタンパク質の自体の研究が重要である。具体的には、まず、安定且つ大量に高品質のものを供給できる技術の確立が重要である。また、FTタンパク質にはいくつか種類があるので、それら同士の差異の検討が重要である。そこで、それらの検討も合わせて行った。

(2) 開花阻害タンパク質の阻害剤の開発

研究目的の(2)で示した「FTタンパク質の活性を阻害する物質」の最有力候補はTFL1と呼ばれる開花阻害タンパク質である。実際、TFL1遺伝子をノックダウンすることで、果樹の実生で開花誘導されることが知られている。したがって、TFL1タンパク質の機能を阻害することができれば、すなわち、TFL1タンパク質阻害剤を開発することができれば、それは有望な開花誘導方法となる。そこで、その開発を行うことにした。

具体的には、コンピュータによるシミュレーションによる、TFL1タンパク質の機能的に重要なポケットに結合する低分子化合物の探索、コンピュータによるシミュレーションによる、TFL1タンパク質が他の蛋白質と相互作用する可能性のある領域に結合する低分子化合物の探索、化合物アレイを用いたハイスループットスクリーニング法によるTFL1タンパク質と結合する低分子化合物の探索である。これら探索の結果みつかった低分子化合物については、表面プラズモン共鳴法によって、TFL1タンパク質と直接結合するかどうかを検討する。

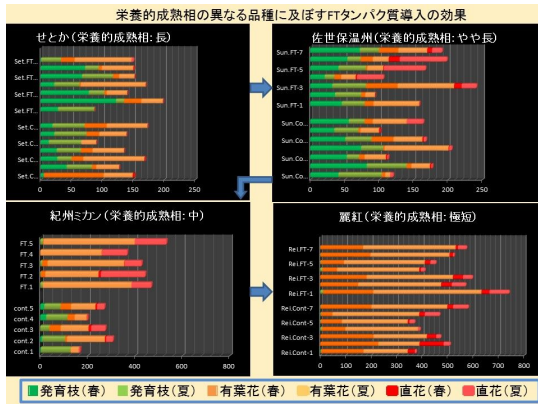
(3) FTタンパク質とは独立の開花誘導経路の活性化

FTタンパク質とは独立している可能性がある開花誘導経路に関わるmiRNAを注入して、その効果を検討した。

4. 研究成果

(1) フロリゲン直接注入法の更なる改善

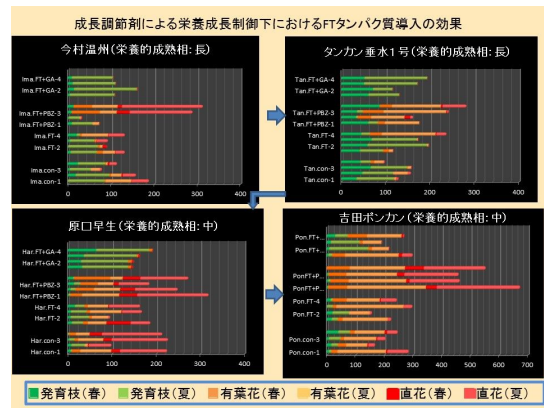
まず、フロリゲン直接注入法の更なる改善のために、品種間差異の検討を行った。栄養的成熟相の長さには品種間差異が見られる。まず、栄養的成熟相が長い「せとか」、「佐世保温州」、中位の「紀州ミカン」、きわめて短い「麗紅」の4品種を供試し、FTタンパク質を導入して、着花数を調査した。栄養的成熟相の短い「麗紅」では、無処理対照樹ですでに過剰な着花があり、FTタンパク質導入の効果は認められなかった。また栄養的成熟相の長い「せとか」、「佐世保温州」でも、FTタンパク質導入による着花の増加は認められなかった。一方、中位の「紀州ミカン」では、着花が増加した。この結果から、フロリゲン直接注入法には、品種間差異があることが判明した。実験結果を以下に示した。



ところで、開花現象における品種間差異、あるいは、種間差異を検討するためには、あらかじめ品種間あるいは種間の遺伝的差異の情報をもっておくことが重要である。そのための研究を実施し、発表論文と発表論文を発表した。発表論文は、カンキツおよびその近縁属100系統以上の遺伝的分化を葉緑体遺伝子 *matK* の DNA 配列を推定したものである。また、発表論文は、ライムの種内分化を次世代 DNA シークエンサーを用いて明らかにしたものである。特に、後者の研究は、開花の研究のみならず、クローンで増殖するカンキツの品種内分化を明らかにするために有効であり、農業条の応用範囲が広い。

また、併行して、栄養的成熟相が長い「タンカン垂水1号」、「今村温州」、中位の「原口早生」、「吉田ポンカン」の4品種を供試し、栄養成長を左右する植物ホルモン、ジベレリン (GA) および、内生 GA 代謝を阻害するパクロブトラゾール (PBZ) の散布を加味した FT タンパク

質の導入試験を行った。その結果、4品種すべて、FTタンパク質単独処理樹では、無処理対照樹との間に、着花数の差異は認められなかった。また、4品種すべて、FT + PBZ 処理により大幅な着花数の増加が認められた。一方、FT + GA 処理では、「吉田ポンカン」を除き、ほぼ完全に着花を抑制した。実験結果を以下に示した。フロリゲン直接注入法よりも、以前から知られていた、内生 GA 代謝の阻害剤パクロブトラゾール (PBZ) の散布が最も効果的であるという結果であった。GA はカンキツでは開花阻害に働くが、植物種によっては GA はフロリゲンとして働く。したがって、GA 代謝経路を操作することで劇的な効果が現れることは驚くべき事ではない。



カンキツでは表年・裏年という現象が知られているので、フロリゲン直接注入を行った年による結果の変動の検討を行った。「特願 2009-260847」で用いた青島温州を用いて、2012 年度に、この実験を行ったが、フロリゲン直接注入法による花芽形成は観察されなかった。ネガティブデータなので、実験結果は示さない。

以上のように、フロリゲン直接注入法は極めて不安定な技術である可能性が高い。そのため、FTタンパク質を高品質且つ大量に供給できる技術の確立が重要である。そこで、その技術開発を併行して行った。

この技術開発の過程で盛んに組換えタンパク質を使うけれども、そのために有効な研究手法を開発し、発表論文として発表した。また、大腸菌のシステムより、大量にタンパク質を調製できるされるブレヴィパチルス分泌発現システムで、FTタンパク質の生産を試みた。実際、このシステムで生産が出来るようになったが、生産量は大腸菌システムより劣った。また、FTタンパク質にはいくつか種類があるため、それら同士の差異の検討が重要であることから、その検討も合わせて行った。その結果、ウンシュウミカンの FT 遺伝子のアレルの一つを発現に用いれば、大量精製が可能ながわかった。

なお、この技術の確立が、2013年度であったため、このタンパク質を直接注入した場合の効果を見ることは出来ていない。

(2) 開花阻害タンパク質の阻害剤の開発

上記のように、フロリゲン直接注入法は極めて不安定な技術である可能性が高いことが徐々にわかってきたため、「開花阻害タンパク質の阻害剤の開発」が最も力を入れて行った研究である。フロリゲン直接注入法とは独立して効果もある可能性があるため、有望な方法である。

コンピュータによるシミュレーションにより、TFL1の機能的に重要なポケットに結合する低分子化合物候補7種類を見いだした。また、TFL1タンパク質が他の蛋白質と相互作用する可能性がある領域に結合する低分子化合物の探索を行い、約20種類の候補化合物を見いだした。併行して化合物アレイを用いたハイスループットスクリーニング法を行い、TFL1タンパク質と結合する化合物1種類を見いだした。この化合物アレイで見つかった化合物については、そのアナログも入手した。

これら化合物がTFL1タンパク質と結合するかどうかを表面プラズモン共鳴法により調べた。しかし、全ての化合物において結合を観察することが出来なかった。

また、これら化合物のうち大量に入手できるものについては、植物への投与実験を行ったが、効果がなかった。特に、表面プラズモン共鳴法では結合が見られなかったけれども、化合物アレイによって結合が見いだされている化合物1種類およびそのアナログについては植物を枯死させたことは残念な結果であった。

(3) FTタンパク質とは独立の開花誘導経路の活性化

FTタンパク質とは独立している可能性がある開花誘導経路に関わるmiRNAを注入して、その効果を検討したが、効果が見られなかった。

以上をまとめると、少なく我々の研究グループにおいては、フロリゲン直接注入法が現実的方法ではないことがわかってきた。また、他の方法による試みも概ね失敗したが、内生GA代謝の阻害剤パクロトラゾール(PBZ)の散布が有効である可能性を示した。このように、研究計画は概ね成功しなかったけれども、この研究を遂行する過程で、特に園芸学分野ではハイインパクトな論文を3件発表することが出来た。

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3件)

Tshering Penjor, Takashi Mimura, Ryoji Matsumoto, Masashi Yamamoto, Yukio Nagano (2014) Characterization of limes (*Citrus aurantifolia*) grown in Bhutan and Indonesia using high-throughput sequencing. Sci. Rep. 4, 4853; doi:10.1038/srep04853. (査読有)
Tshering Penjor, Miki Uehara, Manami Ide, Natsumi Matsumoto, Ryoji Matsumoto, Yukio Nagano (2013) Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. PLoS ONE 8(4): e62574. (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0062574
Kenta Goto K, Yukio Nagano (2013) Ultra-Low Background DNA Cloning System. PLoS ONE 8(2): e56530. doi:10.1371/journal.pone.0056530 (査読有)

[学会発表](計21件)

永野幸生、三村高史、松本亮司、ウンシュウミカンのトランスクリプトーム解析、日本農芸化学会2014年度大会、2014年03月27日~2014年03月30日、明治大学農学部
Yukio Nagano, Genomics and Transcriptomics of Citrus species, The 8th Joint Seminar between Daegu University and Saga University, 2013年10月27日~2013年10月29日、大韓民国・大邱大学校
Kenta Goto, Yukio Nagano, Ultra-Low Background DNA Cloning System, The 8th Joint Seminar between Daegu University and Saga University, 2013年10月27日~2013年10月29日、大韓民国・大邱大学校
永野幸生、Tshering Penjor、三村高史、松本亮司、山本雅史、奇怪な植物を発見!、第37回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2013年09月26日~2013年09月28日、ゆやど雲仙新湯(長崎県雲仙市)
後藤健太、永野幸生、“Ultra-Low Background DNA Cloning System” THE FINAL、第37回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2013年09月26日~2013年09月28日、ゆやど雲仙新湯(長崎県雲仙市)
永野幸生、Tshering Penjor、三村高史、松本亮司、山本雅史、ブータン王国のライムのRAD-seq解析、NGS

現場の会 第三回研究会、2013年09月04日～2013年09月05日、神戸国際会議場
三村高史、松本亮司、永野幸生、ウ
ンシュウミカンのゲノム解析とRNA
シーケンシング解析、NGS 現場の会
第三回研究会、2013年09月04日～
2013年09月05日、神戸国際会議場
永野幸生、Tshering Penjor、三村高
史、松本亮司、山本雅史、ライムの
分子歴史地理学、平成25年度日本生
化学会九州支部例会、2013年05月
18日～2013年05月19日、佐賀大学
農学部
後藤健太、永野幸生、バックグラウ
ンドがゼロのDNAクローニング法、
平成25年度日本農芸化学会大会、
2013年03月24日～2013年03月27
日、宮城
後藤健太、永野幸生、Zero
Background Cloning System、第35
回日本分子生物学会年会、2012年12
月11日～2012年12月14日、福岡
Takashi Mimura, Hiroaki Suzuki,
Ryoji Matsumoto, Yukio Nagano,
Whole genome and transcriptome
sequencing in Citrus leaves to
search floral genes, The 7th Saga
University-Daegu University Joint
Seminar, 2012年11月12日～2012
年11月12日、佐賀
Kenta Goto, Yukio Nagano, Zero
Background Cloning System, The 7th
Saga University-Daegu University
Joint Seminar, 2012年11月12日
～2012年11月12日、佐賀
三村高史、鈴木裕明、松本亮司、永
野幸生、RNAシーケンシングによる
カンキツ遺伝子の網羅的発現解析お
よび開花関連遺伝子の探索、九州育
種談話会、2012年10月11日～2012
年10月11日、福岡
後藤健太、永野幸生、「組換えプラス
ミド構築において偽陽性発生を極限
まで低下させる技術の開発、平成24
年度日本農芸化学会西日本支部およ
び日本栄養・食糧学会九州・沖縄支
部合同大会、2012年09月27日～
2012年09月29日、鹿児島
三村高史、鈴木裕明、松本亮司、永
野幸生、カンキツにおける開花関連
遺伝子の探索および機能解析、第36
回蛋白質と酵素の構造と機能に関す
る九州シンポジウム、2012年09月
06日～2012年09月08日、宮崎
後藤健太、永野幸生、多重宿主組換
え法：組換えDNA構築において偽陽
性発生を極限まで低下させる方法、
第36回蛋白質と酵素の構造と機能
に関する九州シンポジウム、2012年

09月06日～2012年09月08日、宮
崎

三村高史、鈴木裕明、松本亮司、永
野幸生、カンキツの開花制御に関わ
るタンパク質間の相互作用、第30
回日本植物分子細胞生物学会、2012
年08月03日～2012年08月05日、
奈良

後藤健太、永野幸生、Zero
Background Cloning System、平成
24年日本生化学会九州支部例会、
2012年05月26日～2012年05月27
日、福岡

Takashi Mimura, Hiroaki Suzuki,
Ryoji Matsumoto, Yukio Nagano,
Comparison of the model of
flowering regulation systems
between Citrus and Arabidopsis,
The 6th Daegu University-Saga
University Joint Symposium, 2011
年11月1日、大韓民国・大邱大学校
三村高史、鈴木裕明、松本亮司、永
野幸生、カンキツとシロイヌナズナ
の開花制御モデルの比較、平成23
年度日本農芸化学会西日本支部・中
四国支部合同大会、2011年9月17
日、宮崎大学

21 三村高史、鈴木裕明、松本亮司、永
野幸生、カンキツにおける開花制御
モデルの検討、平成23年度日本生
化学会九州支部例会、2011年5月22
日、久留米大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計4件)

名称：開花誘導剤
発明者：永野幸生、松本亮司
権利者：同上
種類：特許
番号：特願2011-540549
出願年月日：2012年05月08日
国内外の別：国内

名称：開花誘導剤
発明者：永野幸生、松本亮司
権利者：同上
種類：特許
番号：10830010.4 (ESへの出願)
出願年月日：2012年05月25日
国内外の別：外国

名称：開花誘導剤
発明者：永野幸生、松本亮司
権利者：同上
種類：特許
番号：10830010.4 (ITへの出願)
出願年月日：2012年05月25日
国内外の別：外国

名称：開花誘導剤
発明者：永野幸生、松本亮司
権利者：同上
種類：特許
番号：10830010.4 (US への出願)
出願年月日：2012 年 05 月 25 日
国内外の別： 外国

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.iac.saga-u.ac.jp/lifescience/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 幸生 (NAGANO, Yukio)
佐賀大学・総合分析実験センター・准教授
研究者番号：00263038

(2) 研究分担者

松本 亮司 (MATSUMOTO, Ryoji)
佐賀大学・総合分析実験センター・客員研究員
研究者番号：40355409

(3) 連携研究者

()

研究者番号：