

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450048

研究課題名(和文) ラベンダーの低温要求性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cold requirement in *Lavandula X intermedia*

研究代表者

腰岡 政二 (KOSHIOKA, Masaji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80094340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： ラベンダー (*Lavandula x intermedia*) の低温要求性に関して、1. 花芽分化は低温遭遇温度、期間および低温遭遇後の日長により決定される。2. GAメタボロームは早期13位水酸化経路のみであり、花芽分化にはGAの発現が必要である。3. GAは低温遭遇不足株においては花芽分化促進効果を有するが、低温遭遇充足株においては花芽分化促進効果を示さない。4. GA生合成遺伝子とGA受容体遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定したが、GA関連遺伝子と低温要求性の関連は確認できなかった。5. 花芽分化を期待するには5、12週間以上の低温遭遇および12時間以上の日長と温暖条件が必要である。

研究成果の概要(英文)： The following things on flowering of *Lavandula x intermedia* related to cold-requirement were shown clearly. 1. Flower bud differentiation was determined by temperature and duration of cold treatment and day-length after cold treatment. 2. GA metabolome showed only the early 13-hydroxylation pathway and expression of GA was essential for flower bud differentiation. 3. GA showed promotive effect on flower bud differentiation under insufficient duration of cold treatment, but did not show any promotive effect under sufficient duration of cold treatment. 4. GA20oxidase-like, GA3oxidase-like, GA2oxidase-like and GID1-like genes were isolated and their nucleotide sequences were partially determined. However, any relationship between the genes and cold-requirement could not be confirmed. 5. Cold treatment of more than 12 weeks at 5 and day-length of more than 12 hours will be at least needed for flower bud differentiation.

研究分野：園芸学

キーワード：ラベンダー ジベレリン 低温遭遇

1. 研究開始当初の背景

高等植物に存在するジベレリン (GA) 類として現在 136 種類が単離・同定されており、近年の GA 研究から GA₁₂-aldehyde を出発物質とする包括的な GA メタボロームマップが推定されている。このような GA メタボロームの利用により、アラビドプシスやイネにおいて GA 生合成遺伝子の解析が飛躍的に進み、矮性イネの遺伝的背景の解明や草丈調節が可能になった。また、低温要求性草本花卉であるストックでは GA メタボローム解析から開花促進技術が確立され花卉生産現場で利用されている。しかし、木本花卉においては GA メタボローム解析やそれを利用した開花調節に関わる研究は少なく、GA メタボロームと花芽分化の関わりについては研究代表者らが数種の花木において報告しているにすぎない。一方、開花後の腋芽が低温要求性を獲得し、その後の低温遭遇で花芽分化を誘導する機構についての研究は、果樹木において休眠の観点からの分子生物学的研究が始まったばかりであり、花芽分化における GA メタボロームと GA 感受性との観点からの研究も未だ報告がない。

2. 研究の目的

ラベンダーは典型的な長日性の緑植物型春化植物であることを研究代表者らは明らかにしているが、花芽分化にかかわる低温要求性の制御機構は不明である。そこで、本研究では低温要求性の制御における GA の役割解明のため、(1) 低温要求性の制御における日長と温度刺激について明らかにする。(2) 低温要求性量と日長に対する GA 反応性を明らかにする。(3) 低温要求性にかかわる GA メタボロームと内生 GA の動態を解析する。(4)

低温要求性と GA 生合成酵素遺伝子および GA 受容体遺伝子遺伝子との関わりを明らかにする。以上から、ラベンダーの開花促進技術の開発に資する。

3. 研究の方法

(1) 低温要求性の制御における日長と温度刺激の解明

低温要求性を制御する機構を明らかにするために、低温貯蔵庫、ファイトトロン、一般温室などを用い、植物体に異なる日長や温度の環境刺激を与え、開花反応を調べた。毎年の実験において、前年度の 6 月から 7 月に緑枝を挿し木したものを当年度の 5 月に一株あたり 5 本に整枝し、1 区あたり 5 株を用いた。低温遭遇処理は 7 月から開始し、低温遭遇後は、昼温/夜温 (23 / 15) に設定した人工気象室で生育した。低温遭遇温度は 5 、低温遭遇時の日長は 8 時間 (白熱灯光) 低温遭遇期間は 0、6、9、12 および 15 週間、低温遭遇後の日長は、8、9、10、11 および 16 時間とした。日長は 8 時間のメタルハライドランプ光を基本とし、それに白熱灯光を加えることで最大 16 時間とした。メタルハライドランプの光強度は約 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。

(2) 低温要求量と日長に対する GA 反応性の解明

低温感受性と日長に対する GA 反応性を調べるために、異なる低温遭遇期間 (0、6、9、12、15 週間) および低温遭遇後に異なる日長で育てた植物体茎頂に GA₃ を処理し、花芽分化の誘導に及ぼす影響について調べた。GA₃ 処理は、低温遭遇終了後から 100 ppm の 10% アセトン水溶液 (0.025% の Tween20 含有) を 1 回につき 10 μL ずつ週 2 回、発蕾が確認さ

れるまで点滴した。

(3) 低温要求性にかかわる GA メタボロームと内生 GA の動態解明

GA メタボローム解析には、栄養成長時および生殖成長時の茎頂部組織を試料として用いた。GA の抽出・精製は常法に従い、GA の同定は既知 GA あるいは可能性のある合成 GA を標品として GC-MS で比較することで解析した。GA の定量は、重水素標識化した GA (GA₁、GA₁₉、GA₂₀、GA₅₃) を内部標準物質として試料に添加し、常法により抽出・精製した後、UPLC-MS-MS を用いて行なった。

(4) 低温要求性と GA 生合成酵素遺伝子および GA 受容体遺伝子のかかわりの解明

GA 関連遺伝子単離用試料には、栄養成長時および生殖成長時の茎頂部組織を用いた。GA 生合成酵素遺伝子として GA20oxidase、GA3oxidase および GA2oxidase 遺伝子を、GA 受容体遺伝子として GID1 遺伝子の単離を試みた。それぞれ NCBI ジーンバンクを検索し、常法に従いクローニング用のプライマーを作成した。RNA の抽出、cDNA の合成、大腸菌培養による増幅、DNA の抽出等は常法に従い市販 Kit 等を用いて行なった。塩基配列の解析は日本大学生物資源科学部総合研究所に依頼した。得られた塩基配列から定量用のプライマーを作成しリアルタイム PCR にて発現を確認した。また、アミノ酸配列を NCBI ジーンバンク中の既知植物と比較した。

4. 研究成果

(1) 低温要求性の制御における日長と温度刺激の解明

ラベンダーが長日性の緑植物型春化植物で

ることを明らかにしているが、低温要求性の制御における限界日長と温度要求量との関係は未知であった。表 1 に示すように、16 時間の日長があれば、5、9 週間の低温遭遇期間でも出蕾すること、反面、5、15 週間の低温遭遇期間を受ければ、9 から 11 時間という日長においても出蕾することが明らかになった。これは、日長反応性が低温要求性と密接に関連することを示すものである。一方、限界日長は低温遭遇期間によって変動するが、ほぼ 10 時間前後であることが明らかになった。

表 1 低温処理期間、日長および GA₃ 処理が開花に及ぼす影響

低温処理 (W)	日長 (hr)	GA ₃ 濃度 (ppm)	出蕾株率 (%)	出蕾日数 (日)
0	8, 9, 10,	0	0	-
	11, 16	100	0	-
6	8, 9,	0	0	-
	10, 11	100	0	-
	16	0	0	-
9	16	100	44.4	46
	8, 9,	0	0	-
	10, 11	100	0	-
12	16	0	73.3	36
	16	100	88.9	35
	8, 9, 10	0	0	-
15	11	0	0	-
	16	100	12.5	34
	16	0	100	22
15	16	100	100	21
	8	0	0	-
	10	100	0	-
	9	0	50	34
	10	100	50	35
	10	0	25	34
	10	100	62.5	34
16*	11	0	50	34
	11	100	100	34
	16*	0	100	30
16*	100	100	100	30

*: 低温温度 7

(2)低温要求量と日長に対するGA反応性の解明

ラベンダーの開花にはGAが不可欠であることを明らかにしたが、低温要求性に及ぼすGAの影響については不明であった。表1に示すように、GAは16時間日長では6週間の低温遭遇固体に対して花芽誘導効果を示すこと、低温遭遇期間6週間から12週間においては低温遭遇期間が長くなることによってGAにより出蕾株率が増加し出蕾日数が減少すること、しかし、低温15週間に遭遇した植物体の花芽分化にはGAの促進効果は全く認められないことが明らかになった。以上から、GAは低温遭遇未充足株に関しては低温の補完効果は見られるものの、低温遭遇充足株に関しては低温感受性に全くかかわらないものと思われた。この結果は、低温遭遇量が充足されることによって、内生GAに対する感受性が増加する、あるいは飽和するものと推測された。一方、春化型草本植物の花芽分化においても、低温遭遇量に対してGAの感受性が変化することを明らかにしているが、GA処理に対して感受性が消滅することはなく、GAによる花芽分化誘導機構は草本と木本では大きく異なるものと思われた。茎伸長においては、低温遭遇期間に関わらずGA処理は促進効果を示すことから、観賞用には適さないと考えられた。

(3)低温要求性にかかわるGAメタボロームと内生GAの動態解明

低温遭遇量および成長段階の異なる植物体の内生GAをGC-MSを用いて検索したが、既に報告した様にGA₁、GA₁₉、GA₂₀およびGA₅₃を同定したのみであった。これにより、成長段階にかかわらずGAメタボロームとし

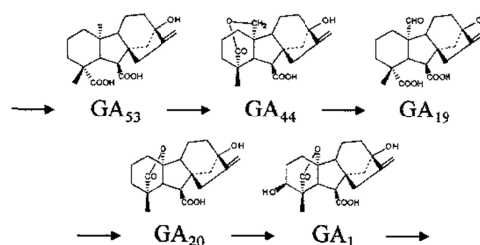


図1 ラベンダーのGAメタボローム (早期13位水酸化経路)

て、早期13位水酸化経路(図1)のみが機能しているものと思われた。一方、出蕾株におけるGAの動態について、GA₁₉、GA₂₀、GA₁は低温遭遇期間中にはほとんど検出されず、低温遭遇7日後から上昇し、低温遭遇30日目の出蕾前の21日目に最高値(50~150pmol/g f.w)に達し、その後減少した。一方、未出蕾株では、いずれのGAも痕跡程度しか確認できなかった。この様に、出蕾の見られた株のみで出蕾前にGAの発現が確認されたことから、内生GAの発現が花芽分化にかかわっていることが推測された。しかし、低温遭遇期間とGAの発現には関連が認められず、低温感受性とGA発現との関連性が確認できなかった。

(4)低温要求性とGA生合成酵素遺伝子およびGA受容体遺伝子のかかわりの解明

NCBI ジーンバンクから検索・作成したGA関連遺伝子用プライマー(表2)を用いて、図2、3、4に示すようにGA20oxidase様遺伝子の部分塩基配列508塩基、GA3oxidase様遺伝子の部分塩基配列598塩基お

表2 ラベンダー遺伝子のクローニングに用いたプライマー

GA20oxidase	F: 5'-CARTTYATNTGGCCNGANVA YGA-3'
	R: 5'-CKRTANTGYTTYTGNGTRAAATCNAR-3'
GA3oxidase	F: 5'-AARYWNATGTGGWSNGARGG-3'
	R: 5'-GCYTTNGTNCNARRTAYTCNNWCCA-3'
GA2oxidase	F: 5'-GCNTGYVRNCANTWYGGNTTYTYAA-3'
	R: 5'-RTTYTANYCNVACCANGTRAAATC-3'
GID1	F: 3'-RRDKSYGTTGKTGTVCYGTDA-5'
	R: 3'CNGGNRRRAWHGCTTCAR-5'

TTTGGCCAGACGAGGAGGAGCCAGCCCAATCCGCGGAGCTCGACGTCGCCCTT
 GATCGACCTAGGGCGCTCTCTCCGGGACCCCAACCGCTCCCTACGAGCATCC
 GAGCTAGTCGGCAACCGTTGCAAGCAGCAGCGGCTTCTTCTCGTCTCAATCAAG
 GCGTTCGACGGTGGCTCGTCTCCGACGCCACCGTTACATGGACCACTTCTTCT
 CGAACCCCTCCACAAAAGCAGCGCCAGCGCAAGCTCGGCGAGCATTTGGG
 CTACGCGACGAGCTTCCAGCGCGCTTCTCCACCAAGTACCGTGGAAAGAGACA
 TTCTCCTTTGAATTACCCCGCAAGCCAACTTGTGAGGACTACTTCAATAAGGC
 ACTCGTGAAGAATTCCACCACTTGGGAAAGTCTATGAAGAGTACTGCAACGAG
 ATGAGCAGATTGCTTTAGGGATCATGGAGCTACTAGCGATGAGCCTGGGAGTAA
 ATCGATCTCACTT

図2 GA2oxidase 様遺伝子の部分塩基配列 (508 塩基)

ATGGGGTTTTCGGCGCATAACAGACTCAACCATCTCACAATCTCCACCAGAGCA
 ACACGAGCGGTTGACAGGTGCTCCGGGAGGGCGGACCCGTTGGGTGACCCGTAC
 CGCCCAACCCGGTGGCTAGTATGATCCACGTGGGCGACTTGTATGCGCATACTGTC
 GAAACGGGTTTACTCGAGCGCACTCCACCGGCGCTGGTAAACCGGACCCGCAAG
 CCGTTTGTGCGTAGCTACTTGTATGGGCGCCACCGAGCGTGAATAATTAGCCCG
 GTGGTGAAGCTGGTGGACCACTTCCACCCCTCTGTATAGGCGGATTACGTGGA
 AGGAGTATCTGGGAACTAAGGCCAAGCAATTCGACAAGGCGCTGACGTGAGTACG
 GCTCTGCTCTCCGAAATGATTCGTGATAGCAACGACCACAATAGTTTACAAG
 TTGGATAGCTTTAATNAGGAAATATAGATATGTGTAATTAATCACTTGTGGTGT
 TTAGTTTGTATTAATTAACCTAGCTACCATCTTCTTCTTTTCTTAACAATGTCT
 ATTTCAATTAATTAATTTTCGGCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

図3 GA3oxidase 様遺伝子の部分塩基配列 (598 塩基)

TTAGGTGAGCATAACGATCTCAGATCATCTCCGTTTGGAGATCCAATGACACTTC
 CGGCCTTCAAATCTCCCTCAAGGATGGCCGCTGGATTAGCGTTCGCCCGATCAG
 AACTCTTCTTTCGTTAATGTTGGCGACTCGTTCAGGTTATGACCAATGGAAGGT
 TAAAGCGTACGACATAGAGTGTGGCCAAACAGTTCAAAATCGAGACTATCGATG
 ATCTAATTCGGAGGCC

図4 GA2oxidase 様遺伝子の部分塩基配列 (239 塩基)

よび GA2oxidase 様遺伝子の部分塩基配列 239 塩基を決定した。それぞれの塩基配列より推定されるアミノ酸配列から、GA2oxidase は *Nerium oleander*、GA3oxidase は *Prunus subhirtella* および GA2oxidase は *Nicotiana tabacum* の対応する遺伝子と相溶性が高いことが推測された。決定した塩基配列より定量用のプライマーを作成し(表3) 遺伝子発現を調べたが GA の推移との同調を確認しただけで、低温感受性との相関は確認できなかった。そこで、近年 GA 感受性とのかわりが重要視されている GA 受容体である GID1 遺伝子の単離を試みた。表3 に示すプライマーを用いて検索した結果、図5 に示す

表3 定量PCRに用いたプライマー

GA2oxidase F:	5'-GCTTCTTCTCGTCTCAAT-3'
R:	5'-ACGGTAGCTTGGTGGAGAAG-3'
GA3oxidase F:	5'-GTGAACCGACCCGACAC-3'
R:	5'-CGAATCCATTTTCGAGGAGAG-3'
GA2oxidase F:	5'-CGGATCCTCAGATCATCTCC-3'
R:	5'-TTGGCCATCACTCTATGTCG-3'
GID1 F:	3'-GGAAGCTTTGTCCATTCCTC-5'
R:	3'-GCCTCGAGTTGACCCAATTA-5'

TACTTTTCAGGAGGAGCTT TGTCCATTCC TCTGCCAATA GTGCTATCTA
 CGACACATTC TGTGCGCGCC TTGTCAAGAC TTGTAAGGTT GCAGTGGTAT
 CCGTTAACTA CCGGAGATCA CTTGAGCACC GCTACCCTGT TGCTTATGAT
 GATGGATGGA ACGCTCTTAA TTGGGTCAAC TCGAGGCCAT GGCTTCGCAG
 TGGGAAGGAA TGTAAAGTTC ATATGTATCT AGCAGGGGAT AGCTCTGGTG
 GTAATATAGC CCATCATGTT GCAGTAAGGG CTGCTGAAGA GGGTGTGGAG
 GTATTAGGCA ACATTTCTCT TCATCCGCTG TTTGGGGGGA AGCAGAGAAC
 AATC

図5 GA 受容体 GID1 様遺伝子の部分塩基配列 (354 塩基)

ように、GID1 様遺伝子の部分塩基配列 354 塩基を決定した。得られた塩基配列より推定されるアミノ酸配列から、*Medicago truncatula* の GID1 様遺伝子と相溶性が高いことが推測された。図6 は低温遭遇期間およびその後の温暖条件における GID1 様およびアクチン遺伝子の発現量の推移を示すが、GID1 の発現量は低温遭遇後の出蕾 34 日目に沿うように増加した。しかし、対照遺伝子も同様な挙動を示したことから、低温感受性とのかわりについては確認されなかった。このように、GAメタボロームとGA関連遺伝子の解析から、低温感受性の変化そのものには、GAおよびGA関連遺伝子は関与していないものと推定された。更なる解明のためには、アラビドプシスにおいて低温による花芽分化にかかわる FLC 遺伝子や果樹において休眠にかかわる DAM 遺伝子との関連を解明する必要があると考えられる。

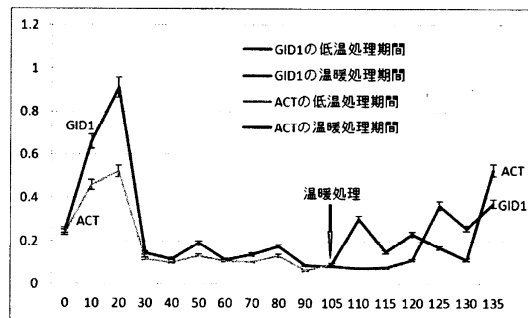


図6 GID1 および ACT の発現量の推移

(5) 低温要求性制御による開花調節技術

研究成果(1)および(2)から、ラベンダー *Lavandula × intermedia* は10時間前後の日長を限界とする低温要求性の長日植物で

あるといえるが、確実な開花を目指すには、少なくとも5、12週間以上の低温遭遇と12時間以上の日長が必要であると考えられる。一方、草本花卉では開花誘導促進が認められるGA処理は、ラベンダーにおいても花芽誘導効果は認められるものの低温感受性との関連性は解明されず、また茎伸長促進効果においては観賞用には適さないことから不適と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Masaji Koshioka, Tai G A Horimoto, Yoshiyuki Muramatsu, Satoshi Kubota and Tamotsu Hisamatsu, Florigenic Effect of Gibberellin on Flowering According to Period of Chilling Treatment in *Lavandula × intermedia*, The Horticulture Journal, 査読有, Vol. 85, 2016, No. 2, pp. 169-176, DOI: 10.2503/hortj.MI-053

6. 研究組織

(1) 研究代表者

腰岡 政二 (KOSHIOKA, Masaji)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：80094340