

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660025

研究課題名(和文) MicroRNAによる果樹の相転換制御の検証および新規花成制御法の模索

研究課題名(英文) Studies on microRNAs involved in vegetative phase change of fruit trees

研究代表者

山根 久代 (Yamane, Hisayo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80335306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：果樹の成長相制御機構の解明は新たな花成制御法の確立につながる。樹木の栄養生長における相転換に関わるmiR156/miR172が果樹の相転換制御を担っているかどうかを検証した。落葉果樹のウメと常緑果樹のカンキツを材料に、miR156/miR172の発現変動を調査した。その結果、幼木相ではmiR156の発現が多く、miR172の発現が少ない一方、成木相ではその逆のパターンがみられた。さらに、挿し木発根性で評価した樹体内の生育相の違いとmiR156/miR172の発現量にも相関がみられた。以上の結果より、果樹の生長相制御においてmiR156/miR172が何らかの役割を担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)： Long period of juvenile phase (several years) in fruit tree species inhibits their rapid breeding. Understanding the internal control mechanism of phase transition from juvenile phase to adult phase would provide new insights to control flowering time in fruit tree species. Recently, two microRNAs such as miR156 and miR172 were reported to control phase transition in woody perennials. Here, we examined whether the same control mechanisms exist in deciduous fruit tree, Japanese apricot (*Prunus mume*) and evergreen fruit tree, grapefruit (*Citrus paradisi*). We found that miR156 and miR172 was up- and down-regulated, respectively, in juvenile phase whereas the opposite expression patterns were found in adult phase. Correlation between miR156/miR172 expressions and internally-regulated juvenility in adult tree was also found. Taken together, these results suggested that miR156/miR172 might be involved in internal control mechanism of vegetative phase transition in fruit trees.

研究分野：園芸学

キーワード：果樹 花成 相転換

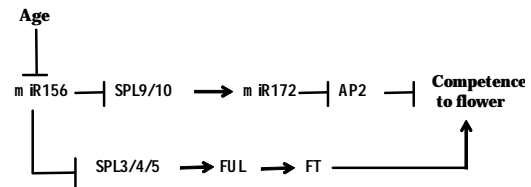
1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーを利用した deep sequencing によるトランスクリプトーム解析で得られた大きな発見のひとつは、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA; ncRNA) が予想以上に多く存在し、特に遺伝子がないとされるゲノム領域からの配列が多いということである。100 塩基以下の small RNA に分類される機能性 ncRNA のひとつが microRNA (miRNA) である。20-30 塩基からなる miRNA は、自身の塩基配列の相補配列部位をもつ標的遺伝子に対して、転写産物の分解や翻訳阻害によって標的遺伝子の発現を抑制する働きをもち、植物の生長発達制御に重要な役割をはたしていることが明らかになってきた (Chen, 2009)。現在、モデル植物であるシロイヌナズナでは 338 の MIR 遺伝子が同定され (www.mirbase.org)、各々について機能解析が進められており、今後より多くの分子種の同定や多岐にわたる生理現象への関与の検証が進むものと予想される。

一方、果樹の育種や遺伝解析を阻む最大の障壁が開花・結実まで長期間を要する幼木相の存在である。一年生モデル草本類の知見に基づいて、木本作物の花成に関する研究が近年すすみ、フロリゲンである *FLOWERING LOCUS T (FT)* や *FT* と拮抗的に作用する *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* が木本作物の花成のスイッチとして機能していることが明らかにされた。現在では、カンキツやリンゴ、セイヨウナシにおいて、*FT* の過剰発現あるいは *TFL1* の発現抑制による早期開花が可能とされている。しかしながら、この技術による早期開花性誘導には一定量以上の *FT* の発現が必須で、早期開花を誘導しにくいこと (Srinivasan ら, 2012) が報告されている。したがって、新たな視点から花成制御メカニズムを究明し、より安定した早期開花技術を模索し続けることが実用化促進のために有効である。

近年、miR156/miR172 が樹木の栄養生長における相転換を制御するという報告がなされた (Wang ら, 2011)。すなわち、miR156 が相転換に関与する遺伝子の幅広い制御を行うマスター因子として機能し、age を重ねるにつれ miR156 が減少し、かわって miR172 が増加し adult phase にいたるといふ一連のモデルが提唱されている (第 1 図)。樹体が adult phase に相転換した結果のひとつが花成であるため、果樹の相転換の機構解明は花成制御につながる。しかしながら、果樹の栄養生長の相転換そのものについて miRNA に焦点をあてて機構を解明しようと試みた研究報告例はこれまでのところ見当たらない。そこで本研究では、果樹の相転換制御機構に関する基礎的知見を得るため、相

転換制御候補因子である miR156, miR172 について解析を進めることとした。



第 1 図 シロイヌナズナにおける miR156 および miR172 を介した相転換制御のモデル図

2. 研究の目的

本研究では、落葉果樹であるウメ、常緑果樹であるカンキツを対象に、juvenile phase と adult phase における miR156 と miR172 の発現様式、季節的な発現変動、あるいは花成との発現同調性について調査する予定である。最終的に、果樹の相転換における miRNA の関与、あるいは miRNA による花成制御の可能性を探求するにあたっての基礎的知見を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(実験 1) Juvenile phase/adult phase におけるウメおよびカンキツの miR156, miR172 の発現解析

miRNA は RNA ポリメラーゼ II により転写されると miRNA 配列とその逆相補配列が相補的に結合して 2 本鎖となったヘアピンループ構造をとる。これを pri-miRNA とよぶ。Pri-miRNA は一部が切断され pre-miRNA (miRNA precursor) となり核外に輸送され、miRNA/miRNA* の状態を経て、1 本鎖の成熟 miRNA となる。miRNA の発現量測定方法は、pri-あるいは pre-miRNA の発現量を測定する方法と成熟 miRNA のみを測定する方法がある。本研究では、生物学的機能を発揮する実体である成熟 miRNA のみの蓄積量を測定する方法を採用して実験をすすめる。具体的には、stem-loop RT プライマーを利用した逆転写と Taqman プロブを利用したリアルタイム PCR 法を用いる予定である。3 つの樹種について、juvenile phase サンプル (子葉、発芽 1 ヶ月後 ~ 6 ヶ月後の葉) と adult phase サンプル (接ぎ木後数年、あるいは 10 年以上経過した樹由来の葉) を用意し、発現解析を行う。

(実験 2) 生育相の異なる樹体部位間の miR156, miR172 の蓄積量の比較

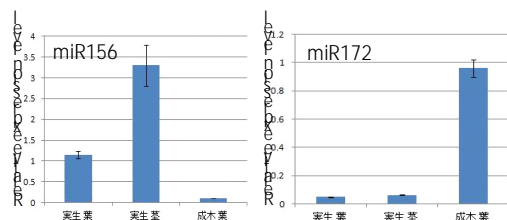
一般に栄養生長期における相の変化は、葉形やさし木難易性が指標となる。実際、幼木相の樹は葉形に形態的な特徴がみられるが、開花結実がおこる段階の実生苗においても、

地下部に近い部位は幼木相の葉形に近いことが知られている。本実験では、主幹形に仕立てた4年生ウメ実生苗において、樹体の下位（ひこばえを含む）および上位より発生したシュートより葉をサンプリングする。このとき、生育相の指標としてさし木発根性について調査する。miR156あるいはmiR172の発現解析は、リアルタイムPCR法でおこなう。2つの部位間で絶対量を比較し、生育相（juvenile/adult）とmiRNAとの関連を調査する。

4. 研究成果

（実験1）Juvenile phase/adult phaseにおけるウメおよびカンキツのmiR156, miR172の発現解析

CTAB法によってtotal RNAを抽出し、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kitを用いて逆転写を行った。次いでTaqman probeを用いたリアルタイム定量PCRを行い、miR156, 172の検出を試みた。ウメおよびカンキツの両種において、miR156は成木より実生で発現が高く（第2図）、miR172は実生より成木で発現が高くなっていった（第2図）。



第2図 ウメの幼木相および成木相におけるmiR156およびmiR172の発現解析
（リファレンス遺伝子による補正なしの結果）

以上の結果より、これまでに報告のあるモデル植物（シロイヌナズナ）や木本植物（アカシア、ユーカリなど）を用いた研究（Wangら, 2011）と同様に、本実験で供試したウメおよびカンキツでも、miR156は成木より実生で発現が高く、miR172は実生より成木で発現が高くなっており、果樹類でもmiR156およびmiR172による相転換制御の可能性が示唆された。これらの遺伝子がウメやカンキツの生育相の指標として応用できる可能性が示された。

（実験2）生育相の異なる樹体部位間のmiR156, miR172の蓄積量の比較

京都大学農学研究科附属高槻農場植栽のウメ品種‘南高’と‘SC’を交雑して得られた5年生F₁個体を3個体（個体番号3-1 5-1, 5-3）供試し、それぞれの樹体の主幹の上位、下位から発生したシュートを採取し、葉をサ

ンプリングしたのち、各シュートから挿し穂を調整し挿し木実験に供試した。葉は液体窒素で凍結して-80℃で保存し、発現解析に供試した。また、各シュートから挿し穂（3節、葉2枚）を調整し、挿し床に挿し木して、30日間ミストハウスに置き、挿し木発根率を調査した。

上位と下位シュートで挿し木発根率に有意差がみられた系統において、miR156とmiR172の発現を調査した。その結果、下位シュートではmiR156の発現が有意に高く、上位シュートではmiR172の発現が有意に高かった。

以上の結果から、ウメにおいては、樹体内の生育相の違いとmiR156, miR172の発現量には相関がみられた。すなわち、樹体内の生育相制御において、これらのmicroRNAが何らかの役割を果たしている可能性が示された。

（引用文献）

- Chen, 2009. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev.* 25: 21-44.
- Srinivasan ら, 2011. Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar *FT1* result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS One:* e40715.
- Wang ら, 2011. miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genetics* 7: e1002012.

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 1 件)

山根久代、温帯果樹の開花特性、査読無、京大農場報告、第22巻、2013、7-11

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 久代 (YAMANE Hisayo)
京都大学・大学院農学研究科・講師
研究者番号：80335306

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

羽生 剛 (HABU Tsuyoshi)
愛媛大学・農学部・准教授
研究者番号：60335304

(4) 研究協力者

田中 勇介 (TANAKA Yusuke)