

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：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380017

研究課題名(和文) MADS-box転写因子を介したバラ科サクラ属果樹の休眠制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on MADS-box transcription factors associated with bud dormancy regulation in the fruit tree species of Prunus

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：永年生温帯落葉果樹の1年のライフサイクルを制御する重要な生理現象のひとつが休眠である。本研究では、サクラ属果樹の自発休眠に関わる主導遺伝子の単離を目的とし、ウメを材料に454-pyrosequencing法を利用したEST解析をおこなった。その結果、先行研究で単離したPmDAM6遺伝子に加えて、PmDAM4、PmDAM5遺伝子が自発休眠芽で多く発現する遺伝子として単離された。DAM遺伝子は低温に遭遇しなければ発現が低下しないこと、特にPmDAM4, 5, 6は品種特異的な低温要求量に遭遇することで発現が低下することが明らかとなり、ウメの低温要求性制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bud dormancy of temperate fruit trees is one of the important agronomic traits that affects next season's annual growth. In this study, we used 454-pyrosequencing technique to gather sequence information of dormant bud ESTs in Prunus mume and to search for the candidate genes that are involved in endodormancy regulation. As a result, PmDAM4 and PmDAM5 were found to be up-regulated in endodormant buds as is the case with PmDAM6 which has already been identified as endodormancy-related gene in our previous studies. All six PmDAM genes were up-regulated when chilling exposure was avoided and down-regulated during cold treatment. Among them, PmDAM4, PmDAM5, and PmDAM6 were down-regulated by cold treatment in chilling requirement-dependent manner. These results suggested that PmDAMs play roles in genetic control of chilling requirement of Prunus mume.

研究分野：園芸学

キーワード：果樹 休眠 転写因子

1. 研究開始当初の背景

永年性温帯落葉果樹の1年のライフサイクルを制御する重要な生理現象のひとつに休眠がある。温帯落葉果樹類は分化した芽が生長を停止し“休眠”した状態で越冬し、そののち一定期間の低温に遭遇してはじめて発芽可能となる。これは植物が冬季の厳寒に適應するために進化させた生体防御機構であり、温帯地域に分布する越冬性二年生草本類や多年生植物に特有の現象である。休眠現象は果樹栽培において果実収量に直接影響を及ぼす重要な性質である。たとえば、休眠から早く覚醒する樹体では、春の霜害に遭遇する危険性が増大し、結果として収量が低下する。逆に休眠が深く低温要求性が強い樹体は、暖冬によって休眠の覚醒が不十分となり発芽が揃わず開花不良樹となる危険がある。また、休眠性を有しない一部の熱帯果樹や常緑果樹は、熱帯地域での栽培や温室での促成栽培によって年に2回の収穫が可能である。一方、休眠性を有する落葉果樹の二期作はほとんど例がない。そのため収穫は年に1回のきわめて限られた期間に集中する。さらには近年の気候温暖化の進行に伴い、九州南部など一部の地域では低温要求量が満たされないため、休眠覚醒の攪乱による発芽の不揃いや開花不良樹の発生、開花遅延による収量低下が生じて問題となってきている(杉浦, 2009)。

以上に挙げた課題を克服し、落葉果樹栽培の安定化を図るには、休眠の制御メカニズムを解明し、得られた知見を利用して環境変化に適應しうる休眠性をもつ品種を育成することが急務である。しかしながら、落葉果樹の越冬芽の休眠に関するこれまでの研究は、休眠覚醒時の生理的変動を概略的にとらえるにとどまっており、もっぱら休眠覚醒の人為的制御を目指した応用研究が主流であった。申請者の研究グループはこれまでに、様々な低温要求量を有する核果類とくにウメを材料として、落葉果樹の休眠を制御する機構を解明することを目標に、形態形成を制御する転写因子に着目して研究を進めてきた。永年性作物の休眠現象解明という難題に対するブレークスルーをはかるため、申請者はかねてより低温応答を示す転写因子の探索に的をしぼって解析を続けてきた。植物が環境シグナルを形態形成につなげるには、受容した環境シグナルをなんらかのかたちで核に伝え、遺伝子のオンオフを制御しているはずであり、それには転写因子が関与している可能性が高いと考えたからである。申請者らは2008年に、低温応答性を示し休眠芽特異的に発現している転写因子(*PmDAM6*)を発見した(Yamaneら, 2008)。

本申請課題は、以上の研究から得た基礎的知見をさらに深めるとともに、園芸学的な応用をめざして研究を進展させるために計画されたものである。

2. 研究の目的

本研究では、自発休眠に関わる主導遺伝子の単離を目的とし、より網羅性を高めた手法である454-pyrosequencing法を利用したEST解析を進める。また、先行研究で単離された*SVP/AGL24-like MADS-box* 遺伝子の機能推定を目的としている。

(1) 454-pyrosequencing法を利用したウメ休眠芽のEST解析および発現解析

ウメ休眠芽で発現する遺伝子を網羅的に探索し、自発休眠期と非自発休眠期で比較することで、自発休眠に関与する遺伝子情報を得る。

(2) *SVP/AGL24-like MADS-box* 遺伝子の機能解明

申請者がウメより単離した*SVP/AGL24-like MADS-box* 遺伝子(*DAM* 遺伝子)について、ウメおよびモモの長休眠および短休眠性品種を用いた発現解析などから機能を推定する。またウメを用いた遺伝子組換え実験により、*DAM* 遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 454-pyrosequencing法を利用したウメ休眠芽のEST解析および発現解析

(詳しくはHabuら, 2012参照)

京都大学農学研究科附属京都農場植栽のウメ‘南高’を供試した。時期の異なる10サンプルの芽(相関休眠期:2サンプル、自発休眠期:5サンプル、他発休眠期:3サンプル)からトータルRNAを抽出し、3' ESTライブラリーを作製した。GS FLX(Roche)による454-pyrosequencing法により配列を決定した。得られたリードについては、アダプター配列によりソートしたのち、SeqCleanによりクリーン配列のみを選抜した。RepeatMaskerによりリピート配列をマスクしたのち、CAP3あるいはMIRAによりアセンブルをおこなった。DESeq(Rパッケージ)により発現変動遺伝子を抽出した。各コンテイングのアノテーションおよびgene ontology付加はTAIRのBLASTPあるいはBLASTnによりおこなった。

(2) ウメ *DAM* 遺伝子の発現解析および発現抑制体の作出

(詳しくはSasakiら, 2011; Yamaneら, 2013参照)

(実験1)

和歌山県暖地園芸センターあるいは京都大学農学研究科附属京都農場植栽のウメ‘南高’(長休眠品種)と‘二青梅’(短休眠品種)を供試した。10月に採取した中長果

枝あるいは鉢植え苗を、低温処理区（7℃）あるいは非低温処理区（25℃）で最大 64 日間処理した。適温下での萌芽速度により休眠深度を評価した。

（実験 2）

Gao ら(2010)の方法に則り、ウメ‘豊後’および‘薬師梅’の未熟子葉に対してアグロバクテリウム法により形質転換をおこなった。バイナリーベクターは、過剰発現を誘導する *35S:PmDAM6* バイナリーベクターと発現抑制を誘導する *35S:PmDAMs-RNAi* バイナリーベクターの 2 種類を用いた。どちらもマーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子を用いた。アグロバクテリウムは EHA105 株を用いた。アグロバクテリウム感染後、GFP 蛍光発色カルスのみを切り出し、不定胚を誘導した。得られた不定胚より不定芽を誘導し、適宜増殖培地や発根培地に移植し、形質転換体を得た。ゲノム DNA プロット分析ならびに定量 PCR により *PmDAM* 遺伝子の発現変動を確認した。

4. 研究成果

（1）454-pyrosequencing 法を利用したウメ休眠芽の EST 解析および発現解析

454-pyrosequencing により 485376 リードを得た。アッセムブリの結果、28382 コンテグと 85247 シングルトンが得られた。相関休眠期および他発休眠期と比較して自発休眠期で多く発現しているユニジーンは葉芽で 21 種類、花芽で 25 種類得られた。このうち、先行研究で自発休眠期の葉芽で特異的に発現が上昇する転写因子として単離していた *PmDAM6* (Yamane ら, 2008) が葉芽および花芽の両方に含まれていた。ウメゲノムには、*PmDAM1*, *PmDAM2*, *PmDAM3*, *PmDAM4*, *PmDAM5* の 5 つの *PmDAM6* パラログが存在する (Sasaki ら, 2011)。自発休眠芽で多く発現しているユニジーンの中には、*PmDAM6* 以外に葉芽では *PmDAM4*, *PmDAM5* が含まれていた。花芽では *PmDAM6* のみであった。一方、花芽と葉芽の両方の自発休眠芽で発現が多かったユニジーンは 3 種類に絞られ、1 つは *PmDAM6* でありもう 2 つは機能未知の遺伝子であった。

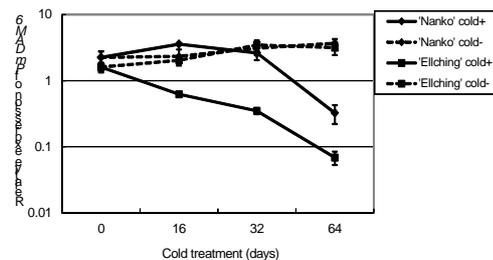
以上の結果より、先行研究で RNA サブトラクション法により単離された自発休眠特異的発現を示す *PmDAM6* は、より網羅性の高い 454-pyrosequencing 法による EST 解析によっても、自発休眠芽で発現が有意に多い遺伝子として同定された。一方、葉芽では *PmDAM4* および *PmDAM5* も自発休眠芽で発現が多い遺伝子として同定されたが、これは定量 PCR による解析 (Sasaki ら, 2011) によっても確認された。

（2）ウメ *DAM* 遺伝子の発現解析および発現

抑制体の作出

（実験 1）

非低温処理区と比較して、低温処理区ではすべての *PmDAM* 遺伝子群の発現が低下していた。‘南高’では 64 日目に、‘二青梅’では 32 日目に、休眠からの覚醒が観察された。*PmDAM4, 5, 6* の発現低下は両遺伝子型の休眠覚醒とよく同調していた。すなわち、発現量が約 10 分の 1 に低下したのは、‘南高’では 64 日目、‘二青梅’では 32 日目であった（第 1 図）。



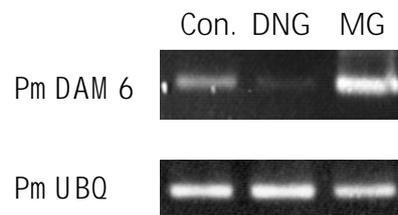
第 1 図 *PmDAM6* 遺伝子の低温処理による発現低下

以上の結果より、*PmDAM4*, *PmDAM5*, *PmDAM6* 遺伝子はウメにおいて、遺伝子型特異的な低温要求量の制御において重要な役割を担っている可能性が示された。

（実験 2）

‘豊後’および‘薬師梅’の未熟子葉にアグロバクテリウムを感染させたのち、不定胚誘導培地に置床したところ、不定胚形成率は 40% 程度と比較的高かった。GFP はそのうち約 20% の不定胚で観察されたが、不定芽形成率は低かった。結果として、*35S:PmDAM6* が‘豊後’から 1 系統 (MG 系統) のみ、*35S:PmDAMs-RNAi* は‘薬師梅’から 1 系統 (DN-G45) のみ得られた。

MG4 の葉における *PmDAM6* の発現量はコントロール (‘豊後’由来の実生) と比較して高かった (第 2 図)。



第 2 図 *PmDAM6* の RT-PCR 結果

Con ; コントロール
DNG ; *35S:PmDAMs-RNAi*
MG ; *35S:PmDAM6*

35S:PmDAMs-RNAi 個体では、コントロールと比較して、*PmDAM3, 4, 5, 6* の発現は 2 分の 1

から 5 分の 1 程度に発現が低下していたが、*PmDAM1* と *PmDAM2* では発現に変化はみられなかった。*35S:PmDAMs-RNAi* は落葉が極端に遅くなり、かつ腋芽の萌芽が早いという特徴がみられた(第 3 図)。これは、モモの *evg* 変異体の特徴 (Rodriguez ら, 1994) と類似したものだ。ウメでは、前年枝の下位節において落葉せずに腋芽が発芽することはない。ただし、この表現型が *PmDAMs* の発現低下によるものかどうかは、形質転換個体数を増やして評価する必要がある。



第 3 図 *35S:PmDAM-RNAi* でみられる落葉前の腋芽の発芽

以上より、ウメの自発休眠芽で発現が多い *PmDAM4*, *PmDAM5*, *PmDAM6* 遺伝子は、ウメの低温要求量制御に対して重要な役割を担っている可能性が示された。ウメにおける機能評価のため、形質転換実験をおこなったが、得られた系統数が少なかったため機能の評価することはできなかった。現在、モデル植物であるポプラやリンゴで形質転換実験を続けており、今後これらの個体の機能評価により生物学的機能が明らかになることが期待される。

(引用文献)

Gao ら, 2010. *Sci. Hort.* 124: 360-367.
 Habu ら, 2012. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81: 239-250.
 Rodriguez ら, 1994. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 789-792.
 Sasaki ら, 2011. *Plant Physiol.* 157: 485-497.
 杉浦ら, 2009. *地球環境*. 14: 207-214.
 Yamane ら, 2008. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 708-716.
 Yamane ら, 2013. *J. Beijing Forestry Univ.* 35 (Suppl.1): 33-37.

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 8 件)

山根久代、田尾龍太郎、大岡智美、上達弘明、佐々木隆太、米森敬三、Comparative analyses of dormancy-associated MADS-box genes, *PpDAM5* and *PpDAM6*, in low- and high-chill peaches (*Prunus persica* L.), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有、第 80 巻、2011、276-283
 DOI: 10.2503/jjshs1.80.276

山根久代、大岡智美、上達弘明、保坂友香里、佐々木隆太、田尾龍太郎、Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent, *J. Exp. Bot.* 査読有、第 62 巻、2011、3481-3488
 DOI: 10.1093/jxb/err028

山根久代、大岡智美、上達弘明、佐々木隆太、田尾龍太郎、Expression analysis of *PpDAM5* and *PpDAM6* during flower bud development in peach (*Prunus persica*), *Sci. Hort.* 査読有、129 巻、2011、844-848
 DOI: 10.1016/j.scientia.2011.05.013

佐々木隆太、山根久代、大岡智美、上達弘明、北村祐人、赤木剛士、田尾龍太郎、Functional and expressional analyses of *PmDAM* genes associated with endodormancy in Japanese apricot, *Plant Physiology*, 査読有、第 157 巻、2011、485-497
 DOI: 10.1104/pp.111.181982

羽生剛、山根久代、五十嵐香里、浜田和輝、矢野健太郎、田尾龍太郎、454-pyrosequencing of the transcriptome in leaf and flower buds of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) at different dormant stages, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有、第 81 巻、2012、239-250
 DOI: 10.2503/jjshs1.81.239

山根久代、高居恵愛、田尾龍太郎、An attempt to control expression of *PmDAMs* in *Prunus mume* by *Agrobacterium*-mediated transformation, *J. Beijing Forestry Univ.* 査読有、第 35 巻、2013、33-37

山根久代、サクラ属果樹の休眠制御機構解明にむけた遺伝子解析、*果実日本*、査読無、第 11 巻、2011、103-106

山根久代、ウメの休眠覚醒を制御する要因探索～人為的休眠制御にむけて～、*植調*、査読無、第 47 巻、2013、181-187

〔学会発表〕(計 14 件)

佐々木隆太、羽生剛、矢野健太郎、清水徳郎、山根久代、田尾龍太郎、米森敬三、ウメ自発休眠芽における AP2/ERF 転写制御因子の発現解析、園芸学会平成 23 年度秋季大会、2011 年 9 月

長山枝里香、高居恵愛、安達栄介、山根久代、田尾龍太郎、米森敬三、休眠関連遺伝子を制御した形質転換ウメの作出、園芸学会平成 23 年度秋季大会、2011 年 9 月

佐々木隆太、山根久代、田尾龍太郎、米森敬三、ポプラ形質転換体を用いたウメ *DORMANCY-ASSOCIATED MADS* 遺伝子の機能評価、園芸学会平成 24 年度春季大会、2012 年 3 月

保坂友香里、赤木剛士、山根久代、田尾龍太郎、米森敬三、低温要求性の異なるモモ品種におけるシアナミド処理の休眠打破効果と *PpDAM5,6* の発現解析、園芸学会平成 24 年度春季大会、2012 年 9 月

佐々木隆太、羽生剛、山根久代、田尾龍太郎、季節的発現変動を示す DREB サブファミリー転写制御因子のウメにおける機能、園芸学会平成 24 年度秋季大会、2012 年 9 月

田中勇介、山根久代、田尾龍太郎、低温およびその後の加温処理がウメ花芽の発達に及ぼす影響、園芸学会平成 24 年度秋季大会、2012 年 9 月

山根久代、佐々木隆太、田尾龍太郎、花成関連遺伝子による木本作物栄養成長の季節的制御の可能性、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月

山根久代、佐々木隆太、羽生剛、田尾龍太郎、Functional studies of Japanese apricot *DAM* genes、Plant and Animal Genome Conference XX、2012 年 1 月

羽生剛、山根久代、佐々木隆太、矢野健太郎、藤井浩、清水徳郎、山本俊哉、田尾龍太郎、Custom oligo DNA microarray analysis for transcript profiling of dormant buds of Japanese apricot (*Prunus mume*)、Plant and Animal Genome Conference XX、2012 年 1 月

保坂友香里、山根久代、和田雅人、本多親子、田尾龍太郎、リンゴ形質転換体を

用いたウメ *PmDAM6* 遺伝子の機能評価、園芸学会平成 25 年度春季大会、2013 年 3 月

山根久代、横山峰幸、田尾龍太郎、KODA slightly enhanced dormancy breaking effects of cyanamide on peach (*Prunus persica*) leaf buds、IX International symposium on temperate zone fruits in the tropics and subtropics、2013 年 3 月

山根久代、Transgenic studies of *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box* genes、5th Plant Dormancy Symposium、2013 年 11 月

山根久代、高居恵愛、田尾龍太郎、An attempt to control expression of *PmDAMs* by *Agrobacterium*-mediated transformation of *Prunus mume*、10th International Chinese mei flower symposium、2014 年 1 月

山根久代、田尾龍太郎、温帯果樹の季節的休眠制御に関する *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box* 遺伝子の機能解析、日本植物生理学会年会、2014 年 3 月

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

田尾 龍太郎 (TAO, Ryutaro)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10211997

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

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

赤木 剛士 (AKAGI, Takashi)
長山 枝里香 (NAGAYAMA, Erika)
保坂 友香里 (HOSAKA, Yukari)
佐々木 隆太 (SASAKI, Ryuta)
竹内 希 (TAKEUCHI, Nozomi)