

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
研究期間：2006～2009
課題番号：18208003
研究課題名 (和文) 温暖化時代における果樹生活環の安定化－休眠芽のレドックスと水の動態制御の分子機構
研究課題名 (英文) Stabilization of the life cycle of temperate fruit trees under irregular climates – elucidation of the molecular mechanism on water movement and redox regulation in the dormant buds
研究代表者 弦間 洋 (GEMMA HIROSHI) 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授 研究者番号：70094406

研究成果の概要 (和文)：休眠最深期から打破期にかけて芽内の還元型グルタチオン (GSH) の上昇や、GSH 合成酵素遺伝子や AOX (シアン耐性呼吸末端酸化酵素) などレドックス (酸化還元状態) 調節遺伝子発現が高まることを見出した。MRI 解析を用いて、休眠覚醒期にモモ休眠芽で水動態が顕著となり、水チャネル遺伝子発現とも一致すること、さらにニホンナシの混合花芽鱗片の自由水 ( $T_2$ )・水分含量 (PD) が暖冬条件で低位となりネクロシス発生に至り、連年同条件に遭遇すると芽基部からの求頂的な水移動に支障が生じて花芽不良の要因となることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The transition from bud endodormancy state was characterized by a significant increasing on glutathione content in dormant bud tissues. The GSH accumulation in the buds was coincided with major increases in transcript patterns of genes *GSH1* and *GSH2* and redox regulating enzyme genes such as the alternative oxidase (AOX). According to the findings by MRI observation, a gradual increase in water content to that required for peach dormant bud activity at the end of endodormancy was resulted from inter- and intracell communication through membrane transport properties of aquaporins. And also, the mixed buds of Japanese pear subjected to low chilling accumulation showed low water mobility and water content especially in scales. In contrast, increased water mobility and relative content were observed in specific portions, which was more accentuated in the mixed buds of plants grown for several seasons under mild winter conditions, resulting in the necrosis of floral primordia, and the development of new inflorescences which corresponds an irregular floral form.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	15,500,000	4,650,000	20,150,000
2007 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

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：環境、気候変動、温暖化、休眠生理、果樹、MRI、レドックス、水チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

地球規模での温暖化による負の影響が作物生産にも顕在化していた。例えば、開花期の高温による花器の生育不良や花粉不稔への影響で結実不良、さらには生育期の高温による果実品質低下などの外、温帯果樹での開花時期の遅延や生育不良の多発などである。これらは休眠芽が低温不足により休眠打破が十分にできていない、または低温順化の不足で発芽期の一時的低温遭遇で障害が発生し易い等、永年性作物の特徴である明確な生活環（生育期と休眠期）が不安定な状態、すなわち生理条件が充足していないことに起因する。さらに国内にとどまらず、熱帯・亜熱帯における低温要求性の少ない果樹の栽培技術の確立や、品種・系統の収集と育種事業の進展が望まれており、芽の休眠現象の分子メカニズムを解明し、休眠導入から打破（覚醒）に至る過程において、細胞内酸化還元状態（レドックス）の変化とそれに関連した活性酸素消去系酵素、及びABAや水分の変化とそれに関連した酵素等の動態について、生理生化学、分子生物学的に解析しようとした。すなわち、休眠打破に必要な低温要求量の異なる果樹の品種を用いて、レドックス関連酵素（SOD, Catalase, Ascorbate peroxidase, Glutathione reductase (GR), Glutathione synthetase (GSH-S), Alternative Oxidase (AOX) など）や、水の膜透過を制御する水チャネルなどの休眠時における遺伝子発現とその機能について解析し、休眠導入や打破との関連を精査しようとした。さらに当時、高度精密分析が可能となっていたNMRによるMRI画像解析と電子顕微鏡による微細構造の比較観察を用い、休眠芽の水分の動態について精査しようとした。

## 2. 研究の目的

シアン耐性呼吸末端酸化酵素（AOX）は、植物ミトコンドリアの電子伝達鎖のシアン耐性オキシダーゼとして同定されており、低温、乾燥などのストレス下では、植物はミトコンドリアの呼吸を阻害されるが、一方、電子伝達鎖から電子を排出することによって、シアン耐性経路はユビキノールの過剰な還元を防いで、有害な活性酸素種（Reactive oxygen species; ROS）蓄積を防

止する。このようにシアン耐性経路は、呼吸に対するストレスの有害な効果を軽減していると考えられている。

本研究は、休眠導入～打破（覚醒）に至る過程における果樹の芽内における上述の系を中心とした、細胞内酸化還元状態（レドックス）の変化とそれに関連した活性酸素消去系の動態、さらに水分の動態について7テスラの大型NMR装置（食品総合研究所設置）を用いた組織の拡散能を半定量的に評価可能であるMRI解析、すなわち<sup>1</sup>Hの横緩和時間（T<sub>2</sub>:transverse relaxation time）及びみかけの拡散係数画像（apparent diffusion coefficient map: ADC map）をパラメータとして水分子の拡散現象を解明しようとした。

果樹の芽の休眠期において、芽内では含水量の著しい変化が認められている。これまでに果樹の冬芽では休眠導入とともに自由水の減少が起こり、休眠打破に伴い著しい増加がみられることが核磁気共鳴（NMR）などの研究から示唆されている。しかし、芽内の水の動態と低温要求性の関係、休眠芽における水の局在性については明らかでない。そこで、本研究では低温要求性の異なるモノの休眠芽における水分の動態について非破壊的に磁気共鳴イメージング（MRI）を用いて解析し、芽の休眠打破に伴う水の動態と局在について検討しようとする。併行して水の膜透過を制御する水チャネル（アクアポリン）の遺伝子発現パターンについても検討した。

さらにニホンナシにおける暖冬条件下で頻発する花芽発育不良現象に関連して、温度感応シミュレーション試験を連年行い、休眠芽の微細構造変化・MRI観察等を通じて要因解析を行った。以上のように、本研究は果樹の安定的な生活環を維持するため、休眠生理・耐凍性の機構の解明を、生理生化学・分子生物学・形態及び生態学的アプローチで総合的に行おうとした。

## 3. 研究の方法

1. 温帯果樹における芽の休眠現象の分子メカニズム解明

(1) 細胞内酸化還元状態（レドックス）の変化と関連活性酸素消去系酵素の動態分析：休眠打破のために必要な低温要求量の異なる、ニホンナシ‘二十世紀’、‘豊水’、‘幸

水’、とモモ‘勘助白桃’と‘コーラル’、‘オキナワ’の休眠芽について、休眠導入時（9月以降）から休眠覚醒（12月～1月：自発休眠期）、さらには発芽に至る期間（他発休眠期）に経時的に冬芽を採取し、その休眠程度を強制発芽法によって調査すると同時に、レドックス関連酵素の活性とコードする遺伝子発現とその機能について解析した。既往の報告に基づきプライマーを設計し、またないものはデジェネレーションプライマーを設計して、芽由来の cDNA を鋳型に PCR を行い、クローニング後、配列決定した。

**(2) 休眠芽の水動態の MRI 観察と水チャネル遺伝子発現解析：**低温要求性の異なるモモの新梢上に着生する花芽および葉芽を経時的に採取し、リン片、芽原基、柔組織、茎部の各組織における水分動態を MRI 分析により画像化し、休眠芽における水の動態を精査する。MRI で計測される「拡散」(ADC 強調画像) では、同じくらの水分子の動き (移動) をひとまとめにして「拡散」として扱うので、休眠打破から発芽に至る期間における含水量の著しい変化の指標として有用できた。一方、 $T_2$  パラメータは芽内の自由水の動態を現す指標と活用できた。さらに、休眠芽の透過型電子顕微鏡観察と併せて、休眠期間の芽内水分の動態を明らかにし、細胞・組織・器官レベルでの水分の移動とその調節機能をもつ水チャネルタンパク (アクアポリン) とコードする遺伝子発現解析を行った。

**(3) 発芽不良現象の解明と低温要求性の異なる核果類台木の選抜・穂木の休眠打破に及ぼす影響：**ニホンナシ‘豊水’における暖冬条件下で発生する発芽不要現象の解明について、低温遭遇期間及び時期を調節した条件下で生育したポット植え樹を用い、連年 (4 年) 及び単年処理した場合の休眠打破・花芽発達等に及ぼす影響を調査するとともに、芽内の水動態について MRI 観察を行った。さらに、低温要求性の少ない核果類の品種を対象に人口気象室内での気候温暖条件下における、それぞれのフェノロジーを精査した。次いで、休眠打破剤を処理した個体 (シアナミド 1% 塗布処理) を供試して、①、②に示した遺伝子発現様式を比較検討した。

#### 4. 研究成果

**(1) 細胞内酸化還元状態 (レドックス) の変化と関連活性酸素消去系酵素の動態分析：**ニホンナシ‘幸水’休眠芽における呼吸活性を計測したところ、休眠最深期である 11 月下旬には、自発休眠打破後の 1 月下旬と比べ、明らかに活性量が低位であるが、シアン

耐性呼吸末端酸化酵素 (AOX) を指標とした、本呼吸経路も高い活性量で存在することが明らかとなり、休眠芽の枝上の位置、すなわち頂芽は打破し易く、基部の側芽は休眠が深い (打破し難い) ことと AOX 遺伝子の発現パターンが自発休眠打破期 (12 月下旬) に頂芽 > 中間部の側芽 > 基部の側芽の順に強いことを考えると、自発休眠打破が AOX によって制御されていると推察した。ニホンナシ‘幸水’休眠芽では、自発休眠期から還元型グルタチオン (GSH) が高まり、ほぼ同時期に GSH 合成酵素遺伝子である *GSH1* と *GSH2* の発現も認められた。さらにシアナミド処理によって休眠覚醒が早まるが、グルタチオンレベルの変化は自然条件下に置かれた休眠芽では差異が認められなかった。しかし、低温遭遇をさせずにシアナミド処理をした場合、明らかに処理によってグルタチオンレベルが増加することを認め、混合花芽・葉芽でも同様な傾向にあった。さらに自発休眠打破後、他発休眠段階に入った休眠芽においては、自然条件下の休眠芽でもシアナミド処理によってグルタチオンレベルが高まることを認めた。このように休眠段階によってシアナミド処理の効果が異なることと、グルタチオン生成の違いとの関連が推察された。ニホンナシ‘幸水’の休眠芽における経時的芽内酸化還元状態 (レドックス) を休眠打破剤のシアナミド処理との関連から、グルタチオン合成酵素遺伝子 (GS)、グルタチオン還元酵素遺伝子 (GR)、シアン耐性呼吸末端酸化酵素遺伝子 (AOX) の mRNA 転写物レベルで追跡したところ、12 月 4 日にシアナミド処理した芽では、明らかに処理 6 時間後にはいずれの酵素遺伝子レベルが上昇していた。対照区も上昇傾向にあるが、その相対的レベルはシアナミド処理で顕著に高く、処理 4 日後までに速やかに減少していた。12 月 18 日のシアナミド処理でも同様に処理 6 時間後に上昇する傾向にあったが、12 月 4 日処理に比べ低温遭遇が充足したことが要因と思われるが、対照区でも転写レベルがやや高くなる傾向にあった。

モモ‘日川白鳳’用い、上記‘幸水’と同様の実験を行った。すなわち、12 月 31 日にシアナミド処理を行い、23°C 一定の人口気象室に搬入し、2 週間後に芽内のレドックス状態を知るため還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG) を測定した。ここでは、さらにブドウにおいて Ca 機能を高めるとシアン化水素の効果が向上し、逆に Ca キレート剤で阻害するとシアン化水素効果が低下するという報告について、モモでも同様な結果が得られるかを試験した。シアナミ

ド処理は休眠打破に効果的であったが、Ca 処理についてはブドウの結果とは逆の結果となり、レドックスについてみるとシアナミド処理で総グルタチオン、GSH、GSSG とも最も多かったが、GSH の割合 (% 及び対 GSSG 比) からみると休眠覚醒率が低かった Ca 処理後にシアナミド処理したモモで高いことを認め、上記のニホンナシ結果を支持するものである。

**(2) 休眠芽の水動態の MRI 観察と水チャネル遺伝子発現解析:** 低温要求量の異なるモモ品種 ‘勘助白桃’ (1010CU) と ‘コーラル’ (300CU) の休眠芽を用い、その休眠段階ごとに形態変化を MRI (磁気共鳴イメージング) 画像解析と、休眠芽中の水の動態についてスピンスピン緩和時間 ( $T_2$ )、さらには水の自己拡散の速さを示すみかけの拡散係数 (ADC) を測定した。その結果、休眠芽の基部、茎頂部、鱗片部等の部位における  $T_2$  値は休眠段階により変化した。50%休眠打破時期は、それぞれの品種で1月下旬、12月上旬であったが、その時期には芽内の水分含量に関係する水の  $^1H$  密度の増加が、休眠芽基部で認められた。ADC 値は休眠期を通して基部で最も高く推移し、自発休眠打破後に徐々に増加した。他発休眠期で萌芽の1か月前から急速に増加した。水チャネル遺伝子は、*Pp δ TIP* の発現が ‘勘助白桃’ では休眠芽基部においては自発休眠打破時期から、上部においては萌芽の1か月前に増加しており、ADC の変化と一致した。

さらに ‘勘助白桃’ を用い、休眠期間中の温度変化、すなわち高温と低温の交互遭遇が休眠覚醒及び休眠芽の発育に与える影響を精査した。その結果、MRI 解析からスピンスピン緩和時間 ( $T_2$ ) が芽の上部 (花器-茎頂部、鱗片部等) で高まることを明らかにした。アクアポリン遺伝子の発現は高温で強く誘導され、低温によって抑制されることを繰り返した。このように急激な温度変化によって極端に休眠芽基部から水の移動が誘導され、その結果、異常発育をもたらす要因となると示唆できた。

**(3) 発芽不良現象の解明と低温要求性の異なる核果類台木の選抜・穂木の休眠打破に及ぼす影響:** ニホンナシ ‘豊水’ 休眠芽のネクロシス発生の要因解明に関して、休眠打破のための低温遭遇開始時期を異なる3段階を設定して、休眠芽の温度感応について精査した。すなわち、‘豊水’ ポット植え樹について暖冬条件を想定した低温 ( $\leq 7.2^\circ\text{C}$ 、600時間 (CH)) に秋季から冬季にかけて遭遇させた後、 $16^\circ\text{C}$  以上に制御した温室内へ搬入する

区、低温遭遇を1カ月間回避 ( $16^\circ\text{C}$  以上の温室内) 後に低温遭遇させて、再び温室内に搬入する区、同様に低温遭遇回避を2カ月間行い、低温遭遇後に温室搬入する区を設けた。これらは、同一の個体を用い2005年から2009年まで4年間にわたり行った。以上の実験条件で生物季節学的変化、すなわち萌芽・開花やネクロシス発生などの調査と同時に、低温遭遇前、0、300、600 CH、4000 及び 8000 GDH 等の異なるステージの休眠芽について MRI を用いて混合花芽中の水動態を計測、さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態学的解析を試みた。その結果、低温処理 (暖冬条件) は自発休眠打破には有効であったが、低温遭遇の開始時期が遅れるほど発芽不良・花芽のネクロシス現象が多発する傾向であり、混合花芽の基部の形態学的変化により異常小花形成、すなわち小花の数も増えた (子持ち花)。そして暖冬条件が累積するほど花芽のネクロシス現象が早く発生した。本研究の条件下では休眠中の小花の増加は開花数の増加をもたらさなかった。一方、水動態の MRI 観察から、十分に低温遭遇した樹の休眠芽に比べて、特に処理樹の鱗片の自由水 ( $T_2$ )・水分含量 (PD) とも明らかに低位であることが判明した。加えて、暖冬条件下の経年履歴が長くなるほど休眠芽基部において PD 値および  $T_2$  値が局所的に増加しており、その増加が子持ち花の形成と関連し、また、休眠芽内における求頂的水移動の支障がネクロシス発生と関係すると推察された。

低温要求性の異なる3種の台木及び穂木品種を組み合わせた4年生モモ樹について、切り枝を用いて  $-10^\circ\text{C}$  での凍害の発生程度の推移と台木による差異について検討を行った。その結果、凍害発生程度には時期及び台木による差異が認められた。一方、台木の穂品種の生育に及ぼす影響を明らかにするために、低温要求性の低い ‘オキナワ’、中程度の ‘ティムピータオ’ および高い低温要求性を有する ‘チュイルンタオ’ の3種の台木と低温要求性の異なる穂品種を組み合わせた3年生モモ樹について、開花期、発芽期、樹の生育等の差異を検討した。この結果、開花期等に及ぼす台木の低温要求性の差異は軽微であると推定された。穂品種の休眠覚醒時期に及ぼす影響をみたところ、‘オキナワ’ 台でわずかに低温要求時間が短くなることが判明した。

## 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 6 件)

1. Yamamoto, R. R. Y. Sekozawa, S. Sugaya and H. Gemma (2010) Influence of chilling accumulation time on “Flower bud abortion” occurrence in Japanese pear grown under mild winter conditions. *Acta Hortic.* 査読有 (In press)
2. Zanol, G. C., Y. Sekozawa, S. Sugaya and H. Gemma (2010) The glutathione accumulation on mixed bud tissues during the dormancy of Japanese pear. *Acta Hortic.* 査読有 (In press)
3. Yamamoto, R. R. Y., A. K. Horigane, M. Yoshida, Y. Sekozawa, S. Sugaya and H. Gemma (2010) Floral primordial necrosis incidence in mixed buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai var. *culta*) ‘Housui’ grown under mild winter conditions and the possible relation with water dynamics. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有 (In press)
4. Yooyongwech, S., Y. Sekozawa, S. Sugaya, and H. Gemma (2009) Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. *Plant Cell Reports* 28: 1709-1715. 査読有
5. Yooyongwech, S., A. Horigane, M. Yoshida, Y. Sekozawa, S. Sugaya, and H. Gemma (2008) Effect of oscillating temperature on the expression of two aquaporin genes (*Pp- $\delta$ TIPI*, *Pp-PIP2*) involved in regulating intercellular water status in flower buds of peach. *J. Hort. Sci. Biotech.* 査読有 83: 784-790.
6. Yooyongwech, S., A. Horigane, M. Yoshida, M. Yamaguchi, Y. Sekozawa, S. Sugaya, and H. Gemma (2008) Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiol. Plant.* 査読有 134: 522-533.

〔学会発表〕 (計 8 件)

1. 山本ロブソン隆・堀金明美・吉田充・瀬古澤由彦・菅谷純子・弦間洋 (2010) ニホンナシ ‘豊水’ における暖冬条件下で発生する発芽不良・花芽のネクロシス現象に関連する休眠芽中の水の動態について. 園芸学会 2010年3月21 - 22日 日本大学生物資源科学部
2. Zanol, G. C., Y. Sekozawa, S. Sugaya, and H. Gemma (2009) Effect of hydrogen cyanamide on dormancy release, budbreak and fruiting in Japanese pear. 11<sup>th</sup> Int. Sym. on Plant Bioregulators in

Fruit Production. September 20-23, 2009. Italy

3. Gemma, H. (2008) Elucidation of dormancy on temperate fruit trees with approaches of aquaporin gene expression and MRI observation in relation to water movement in the dormant bud. The first Asian Horticultural Congress December 11, 2008. Korea.
4. Yooyongwech, S・堀金明美・吉田充・瀬古澤由彦・菅谷純子・弦間洋 (2008) 変温条件下におかれたモモ花芽におけるアクアポリン (水チャネル) 遺伝子の発現. 園芸学会 2008年9月28日 三重大学
5. Yooyongwech S, A. K. Horigane, M. Yoshida, M. Yamaguchi, S. Sugaya, and H. Gemma (2007) Water behavior and water channel gene expression in vegetative and flower dormant buds of peaches having different chilling requirement during winter period. The 8<sup>th</sup> International Conference on Magnetic Resonance Microscopy. 2007年8月22~26日 宇都宮大学
6. Yooyongwech S, A. K. Horigane, M. Yoshida, S. Sugaya and H. Gemma (2007) Induction of water pump by fluctuating temperature for flower budburst of peach observed by aquaporin gene expression and MRI. The 5<sup>th</sup> International Conference of Aquaporin. 2007年7月13~16日 奈良先端科学大学院大学
7. Zanol Geni Carmen・瀬古澤由彦・菅谷純子・弦間洋 (2007) ニホンナシの休眠芽の自発休眠打破にともなうシアン耐性呼吸末端酸化酵素 (AOX) 活性とその遺伝子発現の変化. 園芸学会 2007年3月24・25日 京都テルサ (京都市)
8. スラウット ユーヨンウェーシ・堀金明美・吉田充・山口正己・瀬古澤由彦・菅谷純子・弦間洋 (2006) MRIによるモモの休眠芽の水の動態解析 (ADC) と水チャネル遺伝子の発現解析. 園芸学会 2006年9月23・24日 長崎大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弦間 洋 (GEMMA HIROSHI)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授  
研究者番号: 70094406

(2) 研究分担者

菅谷 純子 (SUGAYA SUMIKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90302372

瀬古澤 由彦 (SEKOZAWA YOSHIHIKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：90361310

吉田 充 (YOSHIDA MITSURU)

農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合  
研究所・食品分析研究領域・状態分析ユニット長

研究者番号：60353992

堀金 明美 (SHORIGANE AKEMI)

農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合  
研究所・食品分析研究領域・特別研究員

研究者番号：40414495

山口 正己 (YAMAGUCHI MASAMI)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：80355370