

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06018

研究課題名(和文)カンキツの花成誘導におけるジベレリンおよび糖シグナルの関与解明

研究課題名(英文)Elucidation of Gibberellin and sugar signals in flower induction in citrus

研究代表者

古藤田 信博 (Kotoda, Nobuhiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50355426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GAを散布した区画に翌春の着花数減少が確認でき、以前の報告結果を支持する結果となった。一方で新葉数が増加傾向にあったことから、GA散布によって樹勢の低下が緩和されたことが示唆される。アミノ酸・糖に関しては有意な差が出てこなかった。今後反復数を増やして分析する必要がある。RNAseqによる遺伝子発現解析では、発現が上昇した遺伝子の中にはPEBPファミリータンパク質をコードする遺伝子や植物ホルモン応答性遺伝子等が確認された。一方、発現が減少していた遺伝子の中には糖の代謝関連酵素遺伝子等が確認された。これらの遺伝子がGAにตอบสนองして花芽抑制に関与した可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果樹類の着果負担に対する花芽形成の反応は、果実形成による炭素源の減少や成熟果実に由来するジベレリン(GA)等のシグナル物質の放出に帰すると考えられているが詳しい分子メカニズムは分かっていない。本研究では、GAによる花成抑制効果を確認した上で、枝中における遊離糖や遊離アミノ酸の変動を調査したが有意差は見られなかった。しかし、遺伝子発現解析により、GA散布によりPEBPに属する遺伝子の発現上昇や糖関連遺伝子の発現低下が確認された。これらの結果はカンキツの花芽形成とジベレリンおよび糖との関係を明らかにする上で今後有用な情報となると思われる。

研究成果の概要(英文)：A decrease in the number of flowers in the following spring was confirmed in the plots sprayed with GA, supporting the results of previous reports. On the other hand, the number of new leaves tended to increase, suggesting that the decrease in tree vigor was alleviated by GA spraying. No significant difference was found for amino acids and sugars. It is necessary to increase the number of iterations and analyze in the future. Gene expression analysis by RNAseq confirmed that genes encoding PEBP family proteins and genes responsive to plant hormones were among the genes whose expression increased. On the other hand, among the genes whose expression was decreased, sugar metabolism-related enzyme genes were confirmed. These genes may have been involved in flower bud suppression in response to GA.

研究分野：園芸科学

キーワード：カンキツ 花成誘導 ジベレリン 糖 RNAseq アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

カンキツは世界で最も広く栽培されかつ経済的に重要な果樹作物の1つである。カンキツは約130属を包含するミカン科に属しており、経済的観点から世界で最上位に位置している (Choi, 2003)。カンキツ属植物は、毎年多くの花を着ける。例えばスイートオレンジは1樹につき25万花を開花期に着けるが、そのうちほんの僅か(たいてい1%以下)の数の花が果実となる (Goldschmidt and Monselise 1977)。そのため、カンキツ樹にとって花芽形成は大きな‘投資’であり、ある程度、資源の無駄遣いでもある。隔年結果のような、生産者にとって好ましくない開花特性は、開花を抑制したり促進したりすることにより部分的に緩和することができる。着果負担に対する花芽形成の反応は、果実形成による炭素源の減少や成熟果実に由来するジベレリン (GA) 等のシグナル物質の放出に帰すると考えられている (Monselise 1985; Garcia-Luis et al. 1986; Erner 1988; Koshita et al. 1999)。

ジベレリン (GA) は植物の生長や発達の多くの局面を制御する重要な植物ホルモンであり (Olszewski et al. 2002, Yamaguchi 2008)、果樹類のみならず他の木本植物においても GA の役割理解のために多くの努力が払われてきた。GA は開花に影響を及ぼすほか、エンドウマメでは側芽の伸長には抑制的に働き (Scott et al. 1967)、シロイヌナズナの GA 非感受性変異体 (gai) は頂芽優勢が抑制され、側芽の数が増加する (Koorneef et al. 1985) など多くの生理機能を持っている。ジベレリン処理は、カンキツ樹の開花抑制に使用される農業上の実用技術となっている。カンキツの花芽形成時期の GA 散布は、次の春における花芽の数を減少させ、有葉花率を上昇させることがよく知られている (Guardiola et al. 1982)。この事実は、GA によって開花が促進される1年生のモデル植物、シロイヌナズナと対照的である。GA によるカンキツの開花抑制メカニズムをうまく説明する仮説はないが、GA 生合成阻害物質であるパクロボトラゾールをカンキツ樹に散布すると花成誘導が促進されるため、GA が開花抑制機能を持っていることは確かである。さらに既に内生 GA 濃度が高い場合は、GA 生合成阻害剤の効果はないことが分かっている。また、枝への GA 処理は夏枝の発生も抑えることが知られている。一方、花成誘導に及ぼす糖の役割はほとんどの場合、状況証拠によって支持されている。例えば、‘環状剥皮’ (樹皮を輪状に剥ぎ取る) は花芽数を増加させることが知られているが、この刺激効果は、樹上の糖蓄積・利用を増加させる「篩管液移動の遮断」に起因することが示唆されている (Wallerstein et al. 1978; Yamanishi 1995)。

近年、カンキツの花成誘導に関与していることが明らかになった *CiFT3* 遺伝子 (Endo et al. 2005; Nishikawa et al. 2007) やジベレリン生合成遺伝子 (文献 3,4 ; 図1)、糖生合成遺伝子 (Islam et al. 2014) の解析が進んでいる。カンキツは主として非早期水酸化経路を利用しており、主要な活性型 GA は  $GA_1$  である (右図)。本研究では、カンキツの花芽形成とジベレリンおよび糖との関係を明らかにしたいと考えている。

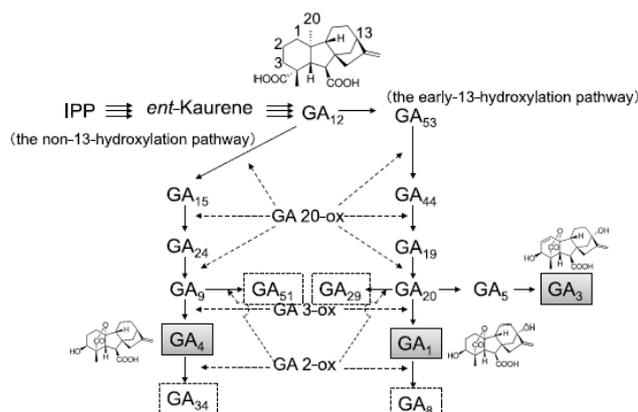


図. ジベレリンの生合成経路 (Kotoda et al. 2016)

## 2. 研究の目的

上述したように、冬季にカンキツ樹にジベレリンを散布すると翌春の着花数が減少する。また、表年と裏年のカンキツ樹体中のデンプン含量を測定すると裏年の樹 (その年は着果が少なく、翌春に花・果実をたくさん着ける樹) においてデンプン含量が高い (Monselise and Goldschmidt 1981)。「糖の蓄積が花成誘導に対して正の効果がある」と考えられる所以である。しかし、その分子メカニズムについては現在に至っても不明である。本研究では、代表者が単離・解析を行ってきた花成制御遺伝子、ジベレリン生合成関連遺伝子、糖合成関連遺伝子を用いて、目的1) および2) の解明を行う。特に代表者は果樹類の花成誘導遺伝子および花成抑制遺伝子の機能解析の蓄積があり、カンキツの *TFL1/FT* ファミリー遺伝子6種類 (野田ら 2016, 園芸学会)、さらにカンキツ FT タンパク質と相互作用する因子5つの機能解析を進めている (徳原ら 2019, 園芸学会九州支部会)。これらの花成関連遺伝子や GA・糖生合成関連遺伝子の発現と、ジベレリン処理あるいは糖蓄積との関連性を調べることにより、カンキツの花成誘導メカニズムの新たな一面が明らかになると考えている。糖やアミノ酸などの一次代謝産物分析や次世代シーケンスによる発現解析からも新たな知見を与えるだろう。

## 3. 研究の方法

### 1) 花成誘導と、GA を中心とした植物ホルモンとの関係を明らかにすること

GA を散布したウンシュウミカンの枝における *TFL1/FT* ファミリー遺伝子、ジベレリン生合成遺伝子、糖合成遺伝子の発現変化を経時的に調べていく。同時に同じサンプルを用い、糖やアミノ酸などの

一次代謝物の変動、RNA シークエンスによる網羅的な発現解析を行い、GA の散布あり、なし、における内的な遺伝子発現および代謝の変動を明らかにする。

2) 花成誘導と、カンキツ樹に蓄積している糖との関係を明らかにすること

秋季から翌春にかけて、カンキツ樹(ウンシュウミカン)の各部位について糖蓄積、アミノ酸蓄積の経時変動を調査する。同時にサンプリングした組織に対して、1)と同様に遺伝子の発現変化を経時的に調べていく。1)の対照実験区としても活用する。供試するカンキツは地植え樹とポット樹の両方を使用し、両者のデータを取得する。また、カンキツ *FT* 遺伝子のプロモーター解析 (GUS アッセイ) により、糖依存的な遺伝子発現があるのか、ないのかを明らかにする。

3年間の計画であるため、令和元年度(裏年)、R02年度(表年)、R03年度(裏年)を考慮し、地植え(佐賀県唐津市)とポット植え(佐賀大)のウンシュウミカンを用いて実験を行う(下図)。各年度の冬季に GA<sub>3</sub> 散布有り区(25ppm, 50ppm, 100ppm)、無し区を設けて調査およびサンプリングを行う。2)については少し早めに(11月頃)からサンプリングを開始しておく。取得サンプルに対して、まず糖(ポストカラム蛍光分析)およびアミノ酸の分析(プレカラム蛍光分析)を行う。カンキツの転流糖はショ糖であり、他に果糖やブドウ糖も含まれる。遺伝子発現解析は、RNA シークエンス(RNAseq)および定量PCRを用いて行う。*TFL1/FT*ファミリー遺伝子、ジベレリン生合成遺伝子は既に合成したプライマーを使用する。糖生合成遺伝子については新たにプライマー設計をして発現定量を行う。各処理区のRNAシークエンスデータを取得後、ゲノム解析用PC(Linux,メモリ64MB)を使用し、各組織における遺伝子の発現量解析を行う。アライメントは既に取得したウンシュウミカン全ゲノムデータを基に解析を進める。これらの実験は既に実施した2019年度の予備実験に加え、年次変動も考慮し令和2および3年度の年間(2回)行う。さらに、カンキツ *CiFT* のプロモーターをGUSと連結し、遺伝子導入したシロイヌナズナに糖を吸収させ *FT* 遺伝子の発現変動を調べる。

1)及び2)において、*CuGA20ox1*, *CuGA20ox2*, *CuGA20ox2/3*, *CuGA20ox8* のGA生合成関連遺伝子および *CuFT1*, *CuFT3*, *CuTFL1*, *CuCEN* の *TFL1/FT*ファミリー遺伝子に関しては、その発現変動を明らかにし、ジベレリン処理(開花抑制)との関連性を考察する。2)の糖蓄積と花成との関連については、糖組成まで考慮し、花成遺伝子発現との関連を明らかにする。代表者が現在解析を進めている *FT* 相互作用因子についても、花成誘導期前後におけるその発現プロファイルを明らかにし、糖と花成との関係理解に有用なデータとなるかどうか検討する。

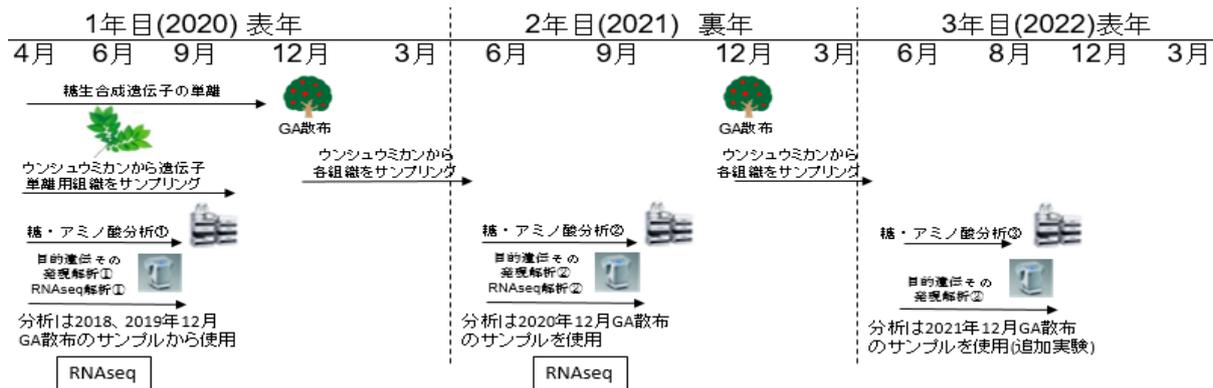


図. 3年間の研究実施スケジュール概要

#### 4. 研究成果

唐津上場営農センターのウンシュウミカン‘青島’を対象とし、2019年12月27日にGAを散布した。1本の樹を表(南側,FRONT)と裏(北側,BACK)に分け、各濃度(0,50,100 ppm)のGA溶液をそれぞれ散布した(図1)。散布はスプレーボトルを使い、葉の表と裏や枝全体に溶液がかかるように行った。また、2019年12月と2020年2月,3月に枝の採取を行った。花芽数調査は2020年4月に実施した。それぞれの区画から枝を3本選び、50cm長あたりの旧葉、花芽、果実、新葉数を数えた。アミノ酸と糖の分析には凍結乾燥後の枝粉末10mgを使用し、抽出・精製後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析を行った。

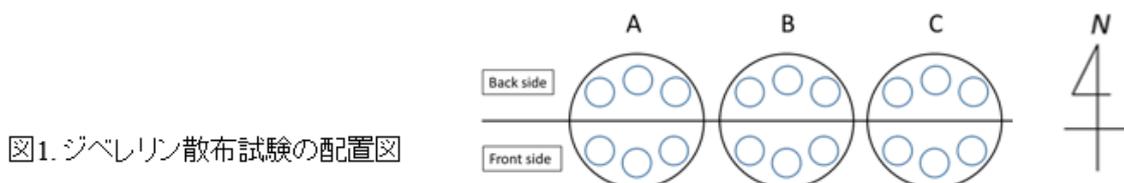


図1. ジベレリン散布試験の配置図

[結果1]4月27日に実施した花芽数調査では、旧葉に対する花芽数が表(南側)、裏(北側)ともにGA濃度が高くなるにつれて減少していた(図2)。また、表側の方が裏側よりもGA濃度の増加に伴う花芽数の相対的減少が大きくみられた。

【結果2】7月16日に実施した調査では旧葉に対する果実数が表側,裏側共にどの濃度においても変化がみられなかった(データには示していない)。さらに,同日に新葉数も調査した。旧葉に対する新葉数は,表側と裏側ともにGA濃度が高くなるにつれて増加する傾向にあった(図3)。

【結果3】枝中に含まれるアミノ酸含量は12月より2月,3月の方が高く,糖含量は12月より2月,3月の方が減少していた。しかし,いずれにしてもGA処理によるアミノ酸・糖の大きな変化はみられなかった。今後は,測定の反復数を増やして更に解析する必要がある。

【結果4】RNAseq解析の結果,5% FDRでコントロールと比較しGA処理の枝で発現に有意差がある遺伝子が91個見つかった。その中でも39遺伝子が有意に発現上昇し,52遺伝子が有意に発現減少していた(図6)。発現が上昇した遺伝子の中にはPEBPファミリータンパク質をコードする遺伝子や植物ホルモン応答性遺伝子等が確認された(表1)。一方,発現が減少していた遺伝子の中には糖の代謝関連酵素遺伝子等が確認された(表2)。これらの遺伝子がGAに反応して花芽抑制に関与した可能性がある。

【まとめ】予備試験に加え2回目の調査でもGAを散布した区画に翌春の着花数減少が確認でき,以前の報告結果を支持する結果となった。しかしながらその後の着果数にはコントロールと比べ,有意な差はみられなかった。一方で新葉数が増加傾向にあったことから,GA散布によって樹勢の低下が緩和されたことが示唆される。アミノ酸・糖に関しては有意な差が出てこなかった。今後反復数を増やして分析する必要がある。RNAseqによる遺伝子発現解析では,発現が上昇した遺伝子の中にはPEBPファミリータンパク質をコードする遺伝子や植物ホルモン応答性遺伝子等が確認された。一方,発現が減少していた遺伝子の中には糖の代謝関連酵素遺伝子等が確認された。これらの遺伝子がGAに反応して花芽抑制に関与した可能性がある。今後はこれらの遺伝子について更に定量PCRを用いて枝における遺伝子発現解析を行い,遺伝子発現様式を調査する必要がある。

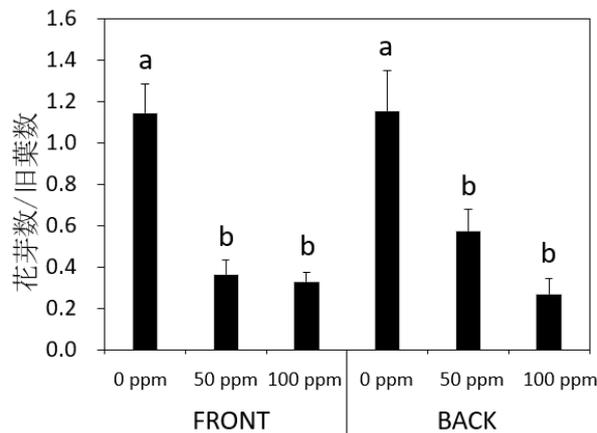


図2. 2020年4月27日に行った花芽数調査  
棒グラフの数値はシュート9本あたりの平均値を示し,誤差表示は標準誤差(SE)を示す.異なるアルファベット間には Tukey による有意差検定で5%水準の有意差が認められたことを示す.n=9

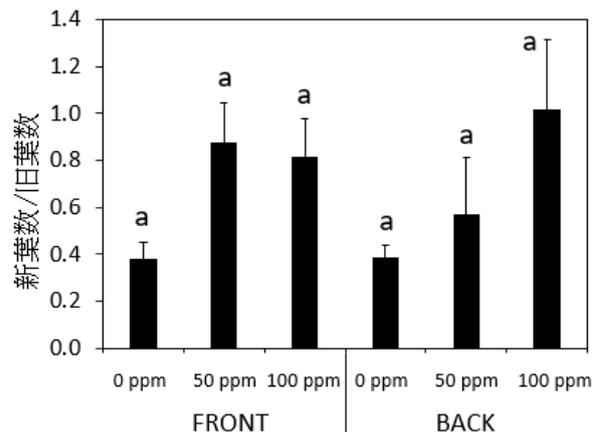


図3. 2020年7月16日に行った果実数調査  
棒グラフの数値はシュート9本あたりの平均値を示し,誤差表示は標準誤差(SE)を示す.異なるアルファベット間には Tukey による有意差検定で5%水準の有意差が認められたことを示す.n=9

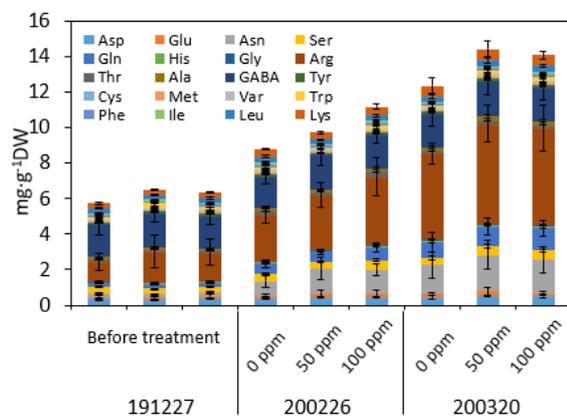


図4. 2019年12月27日,2020年2月26日,3月20日にサンプリングした枝の遊離アミノ酸含量  
誤差表示は標準偏差(SD)を示す.n=3

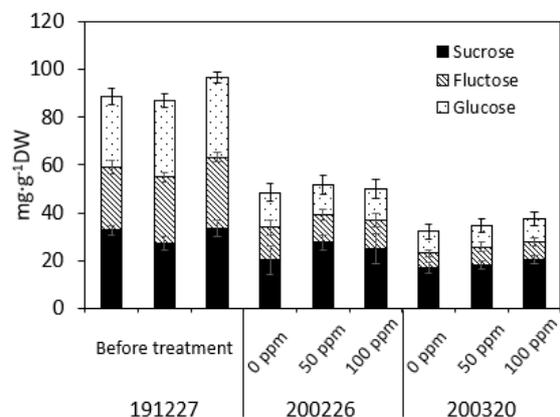


図5. 2019年12月27日,2020年2月26日,3月20日にサンプリングした枝の遊離糖含量  
誤差表示は標準偏差(SD)を示す.n=3

表1. GA散布によって発現が有意に上昇した遺伝子

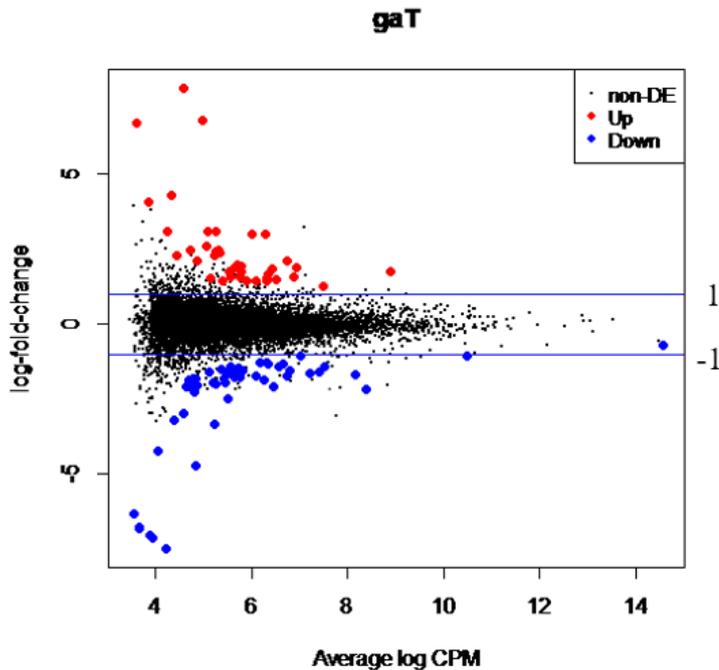
ID	logFC*	FDR	arabi-symbol	arabi-defline
Ciclev10019306m	6.82593	6.49E-12	0	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
Ciclev10001533m	3.10645	4.58E-02	GATA24,TIFY2B,ZML1	ZIM-like 1
Ciclev10001308m	3.02180	1.40E-07	AtGolS2,GolS2	galactinol synthase 2
Ciclev10016917m	2.09762	1.04E-05	E12A11,MFT	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein
Ciclev10031487m	2.42171	1.10E-02	0	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
Ciclev10028495m	1.96027	1.15E-03	HAI2	highly ABA-induced PP2C gene 2
Ciclev10020962m	1.84530	1.27E-03	EDL3	EID1-like 3
Ciclev10014333m	1.57686	1.49E-02	SIP1	Raffinose synthase family protein
Ciclev10032313m	1.51892	3.73E-02	MTN3	homolog of Medicago truncatula MTN3
Ciclev10019364m	1.45252	1.30E-02	ATNCD3,NCED3,SIS7,STO1	nine-cis-epoxycarotenoid doxygenase 3

\*logFCは対照枝に対するGA処理枝の遺伝子発現レベルをlog2値の比で示している

表2. GA散布によって発現が有意に減少した遺伝子

ID	logFC*	FDR	arabi-symbol	arabi-defline
Ciclev10007485m	-7.06948	2.01E-03	ATSUS4,SUS4	sucrose synthase 4
Ciclev10032777m	-2.07821	2.75E-02	AtbZIP58,bZIP58	basic leucine-zipper 58
Ciclev10021361m	-2.01442	1.15E-03	ATIPT3,IPT3	isopentenyltransferase 3
Ciclev10028422m	-1.95108	4.62E-03	UGT76E11	UDP-glucosyl transferase 76E11
Ciclev10009768m	-1.70650	2.97E-03	ATZFP2,ZFP2	zinc finger protein 2
Ciclev10011190m	-1.59049	4.42E-02	AMP1,COP2,HPT,MFO1,PT	Peptidase M28 family protein
Ciclev10015938m	-1.32871	8.59E-03	ATGPT2,GPT2	glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2
Ciclev10020821m	-1.29760	2.77E-02	ATOMT1,OMT1	O-methyltransferase 1
Ciclev10001526m	-1.07661	4.76E-02	SKP2A	F-box/RNI-like superfamily protein
Ciclev10006308m	-0.68051	2.23E-04	ATDI21,DI21	drought-induced 21

\*logFCは対照枝に対するGA処理枝の遺伝子発現レベルをlog2値の比で示している



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasan Nazmul, Tokuhara Naoki, Noda Takayuki, Kotoda Nobuhiro	4. 巻 310
2. 論文標題 Citrus VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 (VOZ1) interacts with CuFT1 and CuFT3, affecting flowering in transgenic Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 111702 ~ 111702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2022.111702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasan Nazmul, Tokuhara Naoki, Noda Takayuki, Kotoda Nobuhiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Molecular characterization of Satsuma mandarin (&lt;i>Citrus unshiu&lt;/i> Marc.) VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER2 (CuVOZ2) interacting with CuFT1 and CuFT3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 51 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.23.0122a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤山芽衣・田中美沙希・徳原尚樹・古藤田信博
2. 発表標題 ジベレリン散布によるウンシュウミカンの花成抑制
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤山芽衣・徳原尚樹・野田孝幸・古藤田信博
2. 発表標題 カンキツMFT遺伝子 (CuMFT) の機能解析
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Nobuhiro Kotoda	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 20
3. 書名 Flowering and juvenility in apple, The apple genome	

1. 著者名 Satoshi Watanabe, Yoshiyuki Yamagata, and Nobuhiro Kotoda	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Humana press	5. 総ページ数 12
3. 書名 Modified High-Resolution Melting (HRM) Marker Systems Increasing Discriminability Between Homozygous Alleles	

1. 著者名 金山 喜則	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 328
3. 書名 園芸学 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------