

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292019

研究課題名(和文) 温帯落葉果樹休眠芽の代謝制御 低温シグナルの機能に関する研究

研究課題名(英文) Metabolic regulation in dormant buds of deciduous fruit tree-Study of function of low temperature signal

研究代表者

菅谷 純子(SUGAYA, Sumiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：90302372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：休眠期の低温が不足した際の、落葉果樹の開花異常や芽の壊死などの発生機構を明らかにするため、ニホンナシの花芽の休眠期における温度条件が代謝などに及ぼす影響についてメタボローム解析や遺伝子解析、植物ホルモン分析を行った。その結果、自発休眠期の低温遭遇時間が短い場合や他発休眠期の変温条件は、芽の壊死、植物ホルモン量、アミノ酸や糖などに代謝を変化させることが示された。また、休眠打破剤のシアナミド処理は、花芽の代謝に影響した。さらに、休眠関連遺伝子であるDAM遺伝子や、植物ホルモン関連遺伝子の発現にも変温条件が影響していた。以上より、休眠期の温度条件は芽の多くの代謝に影響することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate mechanisms of occurrence of necrosis and abnormal flowering of dormant buds in deciduous fruit tree, changes in metabolome including a metabolome analysis, phytohormone analysis, bud burst and dormancy related gene expression analysis were performed using Japanese pear under different temperature conditions. From the results of these analysis, temperature fluctuation (TF) during both endodormancy and ecodormancy periods affected on many pathways of metabolism including sugar, organic acids, amino acids. Especially, pentose phosphate pathway was affected by TFs. In addition cyanamide treatment affected on beta-alanine, proline, glucose-6-phosphate. These results indicated that supply of energy source and oxidative stress would be factors involved in dormancy breaking. Gene expressions of DAM, gene expressions related phytohormone synthesis and metabolism were changed by TF treatments.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：休眠 ニホンナシ メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシやモモは、多くの国において重要な落葉果樹であるが、近年、ブラジルや日本国内の温暖な生産地において、自発休眠打破に必要な低温量不足が要因の一つとされる花芽の壊死(ネクロシス)や、発芽異常が報告されつつある。これらの発生メカニズムについては、明らかになっておらず、低温遭遇時の降雨や、一時的な高温なども要因として考えられているが、生理生化学的研究は限定したものである。加えて、休眠打破剤として知られているシアナミド等が花芽に及ぼす影響や、他発休眠時の温度条件に関する影響も明らかでない。一方、近年、休眠期の低温遭遇により、休眠芽中のアミノ酸の変化や休眠の深度を制御する転写制御因子である *Dormancy-Associated MADS-BOX (DAM)* の遺伝子産物が増加することなどが報告されている。また、植物ホルモンとの関連についてもジベレリンやアブシジン酸(ABA)などとの関連が報告されている。しかしながら、休眠期の低温遭遇に伴う詳細な代謝の変化や、植物ホルモンとの関連、シアナミド処理時の代謝の変化などについては、明らかになっておらず、詳細に検討する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ニホンナシの花芽における低温遭遇時の温度条件が発芽やネクロシスに及ぼす影響、および花芽中の代謝変化、植物ホルモン変化などについて、生理生化学的、分子生物学的に検討する。そのために、ニホンナシの花芽を低温が必要な自発休眠期およびその後の他発休眠期に、異なる温度条件に遭遇させ、メタボローム解析、植物ホルモン分析、および休眠関連遺伝子発現解析等を行い、考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

筑波大学におけるつくば植物イノベーション研究センター(T-PIRC)(旧農場農林技術センター)内の果樹園およびセンター内の加温温室で栽培された、ニホンナシ‘幸水’成木、‘豊水’成木、およびポット植えの‘豊水’樹を用いた。

(2) 萌芽率の測定

花芽のある長果枝の切り枝を、水が入った容器に入れ吸水させ、25℃の温室もしくは恒温器にて加温し、萌芽した花芽数を測定した。

(3) 糖分析およびデンプン量の測定

花芽もしくは枝を80%メタノール溶液とともに、破碎し可溶性の糖を抽出した。その後、減圧濃縮器にて濃縮した後、フィルターにかけHPLCにて分離・定量した。デンプン含量はデンプン測定キットを用いて定法により定量した。

(4) メタボローム解析

メタボローム解析は、凍結保存した花芽の抽出物をGC-TOF-MSにて分析した。得られた結果については、主成分分析等を行った。

(5) 植物ホルモン含量の定量

液体窒素で凍結し-80℃で保存した花芽を低温下で破碎し、重水素ラベルされた植物ホルモンを内部標準として抽出の際に一定量加え、精製後UPLC/MS/MSにて分析し、定量した。

(6) 遺伝子発現解析

花芽からの全RNA抽出を行い、得られたRNAを鋳型とし逆転写酵素を用いてcDNAを合成した後、定量PCRを行った。それぞれの遺伝子について既に他の論文で報告されている配列を基にプライマーを合成した。

4. 研究成果

(1) 他発休眠期の温度条件がネクロシスおよび糖代謝に及ぼす影響について

圃場にて900CHに遭遇させた‘幸水’の長果枝を用いて、25℃一定区、25℃/15℃(12h/12h)区、25℃/15℃+5℃(一定時間ごとに低温に遭遇させる)区を設けて、それぞれ恒温器の中で一定時間処理を行い、花芽をサンプリングした。萌芽率、芽のネクロシス発生率、および花芽中の糖含量を測定した。その結果、25℃一定条件ではほとんどネクロシスは発生しなかったのに対し、変温条件である25℃/15℃区、および25℃/15℃+5℃区ではネクロシスが発生することが明らかになった。特に、変温条件に一時的な低温条件が加わることによりネクロシスが発生していた。花芽中の可溶性糖および水分含量を調べたところ、変温条件ではグルコース含量が低くなり、スクロースが多い傾向が認められた。水分含量は変温区や25℃/15℃+5℃区で少ない傾向が認められた。これらのことから、他発休眠期の変温条件により花芽の糖代謝や水の動態に変化が生じ、ネクロシスが生じることが示唆された。

(2) 他発休眠期におけるシアナミドおよび低温遭遇前の硝酸カリウム処理が花芽の代謝に及ぼす影響について

7.2 以下の低温に遭遇していない‘豊水’のポット植え樹体を用いた。硝酸カリウム処理区については4%硝酸カリウム処理を行い、その後600 Chilling Hour(CH)の低温に遭遇するまで圃場にて、低温に静置した。シアナミド処理区については、0CHには処理を行わず圃場にて低温に遭遇させた後、600 CHの植物体の花芽に1%シアナミド処理を行った。硝酸カリウム+シアナミド処理区については、両処理をそれぞれ0 CH、600 CH時点で行った。無処理区は、どちらも処理を行わなかった。全ての処理において、低温遭遇は圃場で行い、600 CH以降は13℃以上に保つ

ことができる温室に静置した。

その結果、低温遭遇前の4%硝酸カリウム処理、および600Chilling Hour(CH)遭遇後の1%シアナミド処理は、どちらも萌芽を促進した。また、両処理により加温開始後の花芽中のフルクトースやグルコース含量の増加や水分含量の増加が認められた。ソルビトールの減少はシアナミド処理で明確であった。これらの変化は、特に両処理を組み合わせた際に最も顕著であった。‘豊水’では750CHが必要とされているが、600CHのように低温量が不足した際には、両処理を組み合わせることで、萌芽が促進され、糖代謝に影響があることが示唆された。

(3) 自発休眠期の温度が花芽の糖代謝に及ぼす影響について

低温遭遇前の‘豊水’の成木より80cmの長果枝をサンプリングし、水を入れた容器に入れた後、一定の温度(0、6、12)に設定した恒温器にてそれぞれの温度に遭遇させた。

その結果、12区で他の区より早い萌芽が認められた。糖代謝については、12区では加温開始後のデンプンおよびスクロース含量の低下が他の区より早くなっていた。0区では、ソルビトールおよびスクロース含量が低温遭遇後より増加しており、低温により蓄積が促されたことが示唆された。一方、6区では、酸性インペルターゼ(AI)酵素活性が他の区より加温開始後に早く増加している傾向があり、グルコースやフルクトースの増加が促進されていた。このことは、6の条件では、還元糖の増加が促進されやすいことが考えられた。特に、加温開始後のスクロース合成酵素の活性が他の区では増加していたのに対し、0区では増加していなかったことから、自発休眠期の低温に質的な違いが生化学的に存在し、糖代謝に関する酵素活性などが大きく異なることが示唆された。

(4) 自発休眠期の変温条件が糖代謝に及ぼす影響

ポット植え4年生の‘豊水’樹を用いて、600CH(必要量750CH)の低温に圃場で遭遇させた区(Thermal Fluctuation 0: TF0)および100CH遭遇毎に高温条件(温室処理)に1日置く変温区1(TF1)および100CH毎に3日間の温室処理を行う変温区2(TF2)を設けた。経時的に温度および湿度を測定し、萌芽率、開花率、花芽のネクロシス、糖含量、デンプン含量、および-アマラーゼ活性を測定した。

その結果、萌芽の時期はTF2、TF1、TF0の順で早くなり、花そうあたりの小花数は、T2が他の区よりも少ない傾向が認められた。低温遭遇時のネクロシスの発生は、TF1とTF2では認められたが、TF0では認められなかった。これらのことから、自発休眠期の温度変化は、ニホンナシの花芽の萌芽を早める

が、花芽のネクロシスの発生率を高めることが示唆された。

次に花芽および枝における糖含量を比較したところ、300CHのスクロース含量がTF2、TF1、TF0の順で少なくなっていた。また、グルコースおよびフルクトース含量については300CHにおいて、変温区(TF1、TF2)でTF0よりも少なくなっていた。一方、花芽のついた長果枝の糖含量は、全体的に300CH、600CHのどちらにおいても変温区において恒温区(TF1)よりも少ない傾向が見られたが、特に、グルコースおよびフルクトース、ソルビトールで有意な違いが認められた。それに対して、デンプン含量は変温区で多く、恒温区で少なくなっていた。

-アマラーゼ活性を測定したところ、花芽および枝において恒温区が高く、変温区で低くなっていた。特に、300CHにおける花芽中の活性は有意に変温区で低くなっていた。

これらの結果から、低温遭遇量が十分でないときのニホンナシ花芽では、変温条件によりネクロシスの発生が増加すること、また、変温条件では花芽や枝の-アマラーゼ活性が減少し、花芽や枝の中の可溶性糖含量が低下することが示された。このような糖代謝の変化は花芽の低温耐性や萌芽時の糖含量に影響することが示唆され、休眠期の温度条件の重要性が明らかになった。

(5) 自発休眠期の変温条件が‘豊水’の花芽の代謝プロファイルに及ぼす影響について

自発休眠期における比較的長期の高温処理が‘豊水’の代謝プロファイルに与える影響についてメタボローム解析により検討した。そのために、低温遭遇前の‘豊水’の成木より90cmの長果枝をサンプリングし、6一定区(恒温区)および6/18(150時間/150時間)(変温区)の条件で静置し、300CH、600CH、1200CH遭遇した時点で花芽をサンプリングし、萌芽率、花そうたりの小花数、代謝物について調査した。代謝物は、メタボローム解析により分析した。

その結果、どの時点でも恒温区の方が変温区よりも萌芽率が高かった。特に1200CHでは、有意に恒温区で高い結果になった(図1)。

次に、代謝物を調べたところ、91種類の代謝物を同定・定量することができた。それらの代謝物についてKEGGやHMDBなどのデータベースを参考に、代謝経路等について調べたところ、アミノ酸(21種類)、アミノ酸関連物質(4種類)、有機酸(25種類)、糖およびポリオール(16種類)、脂肪酸およびステロール(5種類)、フェノールおよび脂質(6種類)、フェニルプロパノイド(3種類)、その他(11種類)に分類できた(図2)。

その中で、グルタミン酸やピログルタミン酸、リンゴ酸、クエン酸、2オキシグルタミン酸、トランス3カフェオイルキナ酸などは

変温区で恒温区よりも少ないことが示された。スクロース、ラクトース、トレハロース、グルコース、フルクトースは変温区で恒温区よりも量が少なかった。さらに、グルコース 6 リン酸、フルクトース 6 リン酸や、ラクチトール、 シトステロール、 ステイグマステロールなどの脂質も変温区で少なかった。フェニルプロパノイドでは、カテキンが変温区で少ないことが示された。

一般的に、休眠期にはアミノ酸が減少し、そのエネルギーが休眠打破に利用されるという報告があるが、本実験でピルビン酸が両処理区で自発休眠期に増加しており、アミノ酸が減少していることはそのような変化を示しているのかもしれないと考えられた。また、リンゴ酸、クエン酸、2 オキソグルタミン酸などは、TCA 回路における重要な中間代謝産物であり、それらの物質が少ないことは、休眠打破時のエネルギー低下に関わることが示唆された。また、グルタミン酸やピログルタミン酸は、休眠打破において重要な機能を果たしていることが他の文献等で示唆されていることから、これらの物質が、変温区で少ないことは、萌芽率に影響していると考えられる。

一方、ガラクトキノールやラフィノースは両処理区で自発休眠期に増加していた。これらの物質は、活性酸素による休眠打破に関連することが文献等で報告されている。また、スクロースなどの糖が低温蓄積中に見られたことは、低温耐性と関係すると考えられた。

以上の物質について、定量した結果と代謝経路との関係について検討した。その結果、ペントースリン酸経路や糖代謝は、変温処理により代謝物の大きな影響を受けており、抑制されていることが示唆された。この実験結果より、低温蓄積によりクロロゲン酸が増加していることも示唆された。ペントースリン酸経路や、クロロゲン酸は、活性酸素消去系との関連が示唆されており、低温などのストレスや、休眠打破時に伴い増加すると報告されている。さらに、バリン、ロイシン、イソロイシン合成が変温区で抑制されていること、また、グルタミン酸、ピログルタミン酸合成が抑制されていることが示唆された。

以上より、自発休眠期の変温条件は、恒温条件よりも、TCA 回路やペントースリン酸経路、糖代謝などを抑制し、花芽の休眠打破に必要なエネルギー産生が抑制される可能性が示唆された。また、活性酸素に関連する代謝物が変温区では少ない傾向が認められた。このことから、変温区では恒温区よりも休眠打破に必要なエネルギーや休眠打破時の活性酸素が関わるシステムに必要な代謝が十分でないことが示唆された。

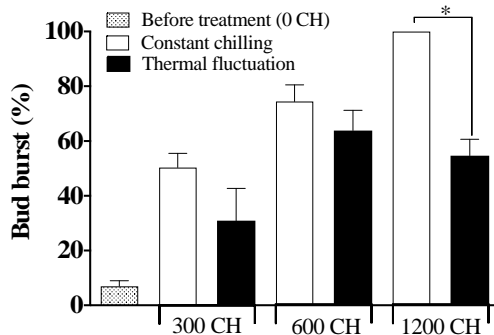


Figure 1. Bud burst (%) in 'Housui' Japanese pear flower buds before treatment (0 CH) and after being exposed to constant chilling at 6 °C and thermal fluctuations of 6 °C/18 °C (150 h/150 h) for 300 CH, 600 CH, and 1,200 CH during endodormancy. Asterisks (*) indicate significant differences between treatments at 300 CH, 600 CH, or 1,200 CH determined by an unpaired t-test at $p < 0.05$.

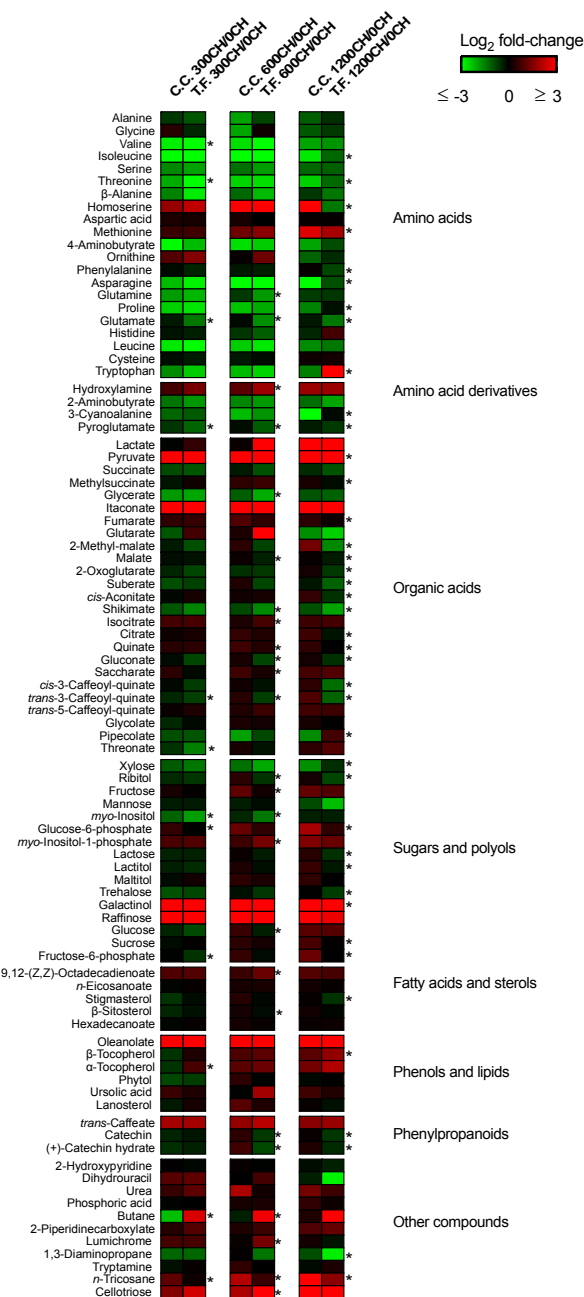


Figure 2. Heat map of fold-changes relative to 0 CH for 91 detected metabolites in flower buds exposed to constant chilling at 6 °C, which are represented by the letters C.C., and thermal fluctuation conditions of 6 °C/18 °C (150 h/150 h) are represented by the letters T.F. for 300 CH, 600 CH, and 1,200 CH. Values represent the means of log₂-transformed fold-changes from three biological replicates relative to the 0 CH (before treatment). Asterisks (*) indicate significant differences between treatments at 300 CH, 600 CH, or 1,200 CH determined by an unpaired t-test at $p < 0.05$.

(6) 自発休眠期のシアナミド処理による代謝変化について

低温遭遇前の‘豊水’の成木より90cmの長果枝をサンプリングし、水を入れた容器に入れ、6にて0 CH、600 CH、1200CH低温に遭遇させ、それぞれの低温遭遇後に、1%シアナミド処理を行った。その後、25±1°C (16:8 h light: dark)の恒温器に入れ加温し、経時的に花芽をサンプリングし、メタボローム解析を行った。

その結果、ほとんどのアミノ酸、糖とポリオール、有機酸の変化パターンに影響が認められた。特に、シアナミド処理により、低温遭遇量にかかわらず、加温開始後のアラニン、プロリン、ピログルタミン酸、尿素量が増加していることが明らかになった。これらのことから、自発休眠打破のメカニズムに、これらの物質が関与することが示唆された。また、シアナミド処理はグルコース-6-リン酸やフルクトース-6-リン酸を増加させたことから、ペントースリン酸経路の活性化を促すことで休眠打破を促進した可能性が考えられた。

本実験により、シアナミド処理による自発休眠打破に伴う花芽の代謝変化を網羅的に明らかにすることができた。

(7) 休眠期の花芽における植物ホルモン量の変化と温度の影響

自発休眠期および他発休眠期における植物ホルモン量の変動とそれに対する温度の影響を調べるため、植物ホルモン量を定量した。

その結果、低温蓄積に伴い、統計的に有意ではないものの、ABAの増加、GA1、GA19、GA20の増加、GA8の減少およびIAAの増加が認められた。低温遭遇時に一時的な温度上昇を行う変温処理を行った際には、GA1、GA20、IAAの増加とGA8の減少とが抑制されていた。これらのことから、変温処理が花芽の休眠打破に伴う植物ホルモン量に影響を与えることを示唆していると考えられた。

また、他発休眠期の二ホンナシ花芽にシアナミド処理を行った際の植物ホルモン量を

行った結果、休眠打破がシアナミド処理を行い萌芽が促進された芽において、GA4の一時的な増加が認められた。また、サイトカニンであるトランスゼアチン量が処理を行っていない対照区で増加していたのに対し、シアナミド処理区では増加が認められなかった。

これまでに、種子の休眠打破における植物ホルモンの機能との関係が数多く報告されてきたが、落葉果樹の花芽における植物ホルモン量の変化や、その休眠との関連については、ほとんど明らかになっていなかった。本実験で得られた結果により、自発休眠期の低温蓄積や休眠打破と植物ホルモンの変化について新たな知見を得ることができた。

(8) 自発休眠期における低温蓄積と植物ホルモン関連遺伝子、休眠関連遺伝子発現と温度の影響について

その結果、*PpMADS13-1*、および*PpMADS13-2*の発現は300CHの低温蓄積時に増加しており、600CHでは低下していた。変温条件では、300 CHから600 CHにおいてそれらの遺伝子に発現量の違いが認められなかった。しかしながら、低温に長く遭遇させた1200 CHでは、低温蓄積に伴い低くなるDAM遺伝子発現量が、変温処理区でやや多い傾向が認められた。低温が不足した花芽において、DAM遺伝子の発現量は十分に低下していない可能性が考えられ、このことが、低温不足に伴う花芽の異常に関わる可能性が考えられた。

次に、植物ホルモンの生合成や代謝に関わる遺伝子発現については、ABA生合成酵素遺伝子の*NCED*や、ABA代謝酵素遺伝子の*CYP707A*やGA代謝に関わる*GA2oxidase*遺伝子は低温遭遇期に増加していたが、変温条件にした際には抑制されていた。それに対して、IAA合成関連遺伝子*YUC7*は300 CH低温に遭遇した際に、高い発現が認められ、DAM遺伝子の発現様式とやや似ていた。

これらのことから、植物ホルモンのABA、GAは、低温遭遇に伴い生合成や代謝に変化が見られることや、変温処理に影響を受けることが明らかになった。それに対して、DAM遺伝子や*YUC7*の発現は低温蓄積に伴う大きな変動が認められた一方で、変温条件に置かれた花芽の休眠生理の変化との関連が明確にできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Makoto Kobayashi, Kazuki Saito, Miyako Kusano, Sumiko Sugaya, Metabolomics analysis of 'Housui' Japanese pear flower buds during endodormancy reveals metabolic suppression by thermal fluctuation, *Plant Physiology and Biochemistry*, 126: 134-141.2018. (査読有)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Sumiko Sugaya,
Inhibition of carbohydrate metabolism by thermal fluctuations during endodormancy lead to negative impacts on bud burst and incidence of floral necrosis in 'Housui' Japanese pear flower buds,
Scientia Horticulturae, 224: 324-331. 2017. (査読有)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Sumiko Sugaya, Robson Ryu Yamamoto, Herter Gilberto Flavio Different thermal conditions during ecodormancy in Japanese pear affect floral bud necrosis, water and carbohydrate dynamics. Acta Hort. 1160, 221-226. 2017. (査読有)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Sumiko Sugaya
Effects of pre-chilling potassium nitrate and post-chilling hydrogen cyanamide application on carbohydrate and water dynamics of 'Housui' Japanese Pear spur buds during dormancy under mild winter conditions. Revista Eletrônica Científica da UERGS. 2: 217-225 .2016. (査読有)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Sumiko Sugaya. Carbohydrate metabolism in 'Housui' Japanese pear floral buds exposed to different temperatures during endodormancy. Revista Eletrônica Científica da UERGS. 2: 249-258. 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Humberto Mitio Horikoshi, Yoshihiko Sekozawa, Miyako Kusano, Sumiko Sugaya,
Metabolic profiling of 'Hosui' Japanese pear flower buds treated with hydrogen cyanamide. XIII International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production. 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 純子 (SUGAYA, Sumiko)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：90302372

(2) 研究分担者

瀬古澤 由彦 (SEKOZAWA, Yoshihiko)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：90361310

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし