

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292027

研究課題名(和文)ニホンナシ自発休眠期におけるDAMの発現制御とそのシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文)Histone modification and signaling cascade of the dormancy-associated MADS-box gene, PpMADS13-1, in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) during endodormancy

研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・領域長

研究者番号：80343945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：休眠に関与するDAM (PpMADS13-1)遺伝子の発現はニホンナシ芽の休眠相の転換と対応する。この発現変化の要因を明らかにする。本遺伝子のゲノムに関わるヒストン修飾の変化をみると、H3リジン残基4のトリメチル化とヒストン変異体H2A.Zの占有度減少が覚醒期の本遺伝子の発現低下の原因である可能性を示唆した。また、C-BFが本遺伝子の5'上流に結合してその発現を制御している可能性を示した。一方、本遺伝子の下流因子と想定されるFTの発現は制御していなかった。さらに、モモと異なりニホンナシ花芽は休眠覚醒期や覚醒後もあまり大きさに変化無く、萌芽直前に自由水の増加により急速に肥大することを示した。

研究成果の概要(英文)：To gain insight into the reduction of a Japanese pear DAM homolog (PpMADS13-1) expression toward endodormancy release, we investigated the histone modification in PpMADS13-1 locus via chromatin immunoprecipitation-quantitative PCR. Our results indicated that reduction in the active histone mark by trimethylation of the histone H3 tail at lysine 4 and loss of histone variant H2A.Z contributed to the reduction of PpMADS13-1 expression toward endodormancy release. Subsequently, we found that PpCBF2, a pear C-repeated binding factor, regulated PpMADS13-1 expression via interaction of PpCBF2 with the 5'-upstream region of PpMADS13-1. Furthermore, transient reporter assay confirmed no interaction between the PpMADS13-1 protein and the pear FLOWERING LOCUS T genes. We also showed that the size of flower buds did not change significantly during endodormancy, but rapid enlargement took place at the end of endodormancy concomitant with the increase in free water content.

研究分野：農学

キーワード：ニホンナシ 休眠 DAM遺伝子 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

一般にニホンナシを始めとする落葉果樹は、秋季に自発休眠に入る。その後、必要な低温要求量が満たされれば自発休眠から覚醒して他発休眠に移行し、春季の萌芽・開花に至る。しかし、近年、西南暖地のニホンナシ簡易被覆栽培地帯では、春季に正常に萌芽せず、被害が激しい場合は収穫皆無となる「眠り症」が問題となっている。これは、低温不足による不完全な休眠覚醒が一因と考えられている。温暖化に伴い、今後このような「眠り症」は西南暖地のニホンナシ簡易被覆栽培地帯に限らず、一般的な露地栽培地帯でも顕在化することが予想される。そのため、「眠り症」の適応技術を開発するためにもニホンナシの自発休眠機構の究明が求められている。

自発休眠の制御に関わる遺伝子として、モモの非休眠性変異体である *Evergrowing* (*Evg*) の研究からその原因遺伝子として *dormancy-associated MADS-box* (*DAM*) が同定された (Bielenberg ら 2008)。さらにモモでは自発休眠覚醒のための低温要求性と開花日の QTL 近傍に *DAM* 遺伝子が座乗していることも報告されている (Fan ら 2010)。我々も *DAM* 遺伝子に着目してニホンナシ「幸水」の自発休眠の分子制御機構について解析を行ってきた (Ubi ら 2010)。その結果、ニホンナシから単離した 2 種類の *DAM* (*PpMADS13-1* と *PpMADS13-2*) の発現は休眠導入 (萌芽率の低下) とともに誘導され、最深期にピークとなり、覚醒 (萌芽率の上昇) とともに低下することが明らかとなった。このように *DAM* (*PpMADS13*) の発現パターンは、自発休眠ステージ (休眠相の変化) に対応した *PpMADS13* の発現変化を引き起こす要因とその影響を解析することで、ニホンナシの自発休眠覚醒の機構の一端に迫ることが可能になると考えている。

2. 研究の目的

モモの非休眠性変異体の原因遺伝子として同定された *DAM* 遺伝子の発現は、ニホンナシにおいても芽の自発休眠導入 (萌芽率の低下) とともに誘導されて休眠最深期 (芽は全く萌芽しない) にピークとなり、休眠覚醒 (萌芽率の上昇) とともに低下することから、芽の自発休眠現象に深く関わっていると考えられる。そこで、この *DAM* の休眠ステージに対応した発現変化を引き起こす要因とその影響を解析することで、ニホンナシの自発休眠覚醒機構解明の一端に迫ることを目的とする。

具体的には、(1) ニホンナシの *DAM* 遺伝子 (*PpMADS13-1* を代表として扱い、ここでは *PpDAM13-1* と表記) は上流の遺伝子によりどのような制御を受け、(2) *DAM* 自身はどのようなエピジェネティックな制御下にあり、(3) *PpMADS13* 蛋白質は下流の遺伝子をどのよ

うに制御しているのか、これら 3 つの局面について解析する。

3. 研究の方法

(1) *PpMADS13* 遺伝子は上流の遺伝子 (蛋白質) によりどのような制御を受けているのか。*PpMADS13* の上流遺伝子としては、これまでに *PpMADS13* のプロモーター領域にその結合モチーフがあり、低温応答シグナル伝達に関わるとされている C-repeat binding factor (CBF) に着目する。我々は既に 5 種類の CBF 遺伝子をニホンナシから単離しており、その中で、休眠期間中に *PpMADS13* と同じような発現パターンを示す *PpCBF2* に焦点を絞る。材料は、以下の 2 つの理由からナシの葉芽とする。ナシの花芽は混合芽であるため、実験系をより単純にするために、葉芽を用いる。また、花芽は切り枝として水挿した場合に、萌芽が促進され、圃場の休眠状態を正しく反映しないことを経験している。一方、葉芽は圃場の休眠状態と切り枝での萌芽 (休眠) の進行状態がほぼ一致することを確認している。

PpMADS13 の上流因子として想定されている CBF との相互作用について、ルシフェラーゼ (LUC) 活性を指標に *in vitro* (タバコの葉) で解析する。

(2) *PpMADS13* 自身はどのようなエピジェネティックな制御下にあるのか。

DAM ゲノムに関わるヒストン H3 のリジン残基 4 番のトリメチル化 (H3K4me3) の状態、ヒストン変異体 H2A.Z の状態変化、さらに、ヒストン H3 のリジン残基 27 番のトリメチル化 (H3K27me3) の状態を、上述したようにそれぞれ抗 H3K4me3 抗体、抗 H2A.Z 抗体、抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-qPCR にて確認する。qPCR のために、*PpMADS13* の 5' 上流域を含む 4 カ所においてプライマーを作成し、その増幅程度を休眠中と休眠後で比較した。

(3) *PpMADS13* 蛋白質は下流の遺伝子をどのように制御しているのか。

PpMADS13 ホモログである *Short vegetative phase* (*SVP*) は *Flowering locus T* (*FT*) 遺伝子を負に制御するとの報告がある。そこで、*PpMADS13* と *FT* との相互作用についても (1) で記載した LUC 活性を指標に *in vitro* (タバコの葉) で解析する。

4. 研究成果

最初に休眠期間中の *PpMADS13* の発現について再度確認したところ、休眠導入 (萌芽率の低下) とともに誘導され、最深期にピークとなり、覚醒 (萌芽率の上昇) とともに低下することを確認することができた (図 1)。

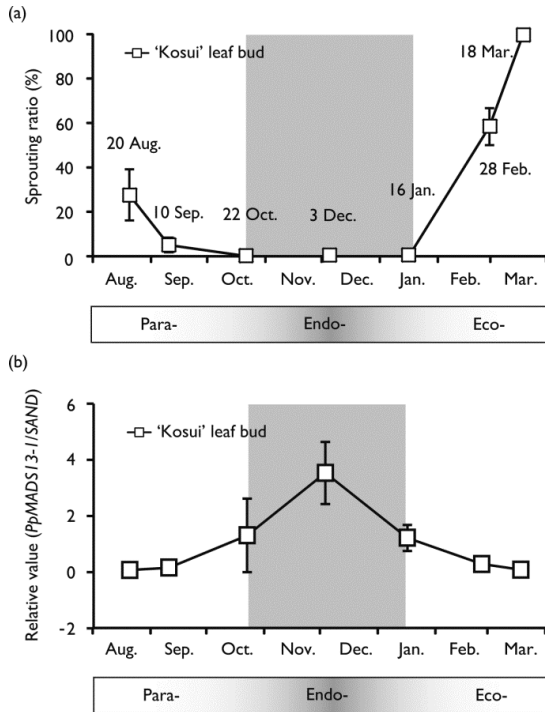


図 1 (a) ニホンナシ「幸水」の休眠期間中の葉芽の発芽率
(b) ニホンナシ「幸水」の休眠期間中の葉芽における *PpMADS13-1* 発現変化

次に *PpMADS13* の発現を制御する上流トランス因子と想定される CBF と *PpMADS13* との相互作用について解析した。*PpMADS13* の 5' 上流には 4 カ所の CBF が結合できるモチーフ配列 (CRT/DRE motif) が存在していた (図 2a)。その部分を 2 つに分けて、それぞれ下流に LUC 遺伝子を付けてタバコに導入した。この時に CBF も発現ベクターにてタバコに導入してタンパク質を作らせた。CBF タンパク質が *PpMADS13-1* 上流のモチーフに結合すれば LUC 活性が認められることから相互作用の有無を判定した。その結果、CRT2-4 の結合モチーフが存在するとき有意に LUC 活性が高まった (図 2b)。

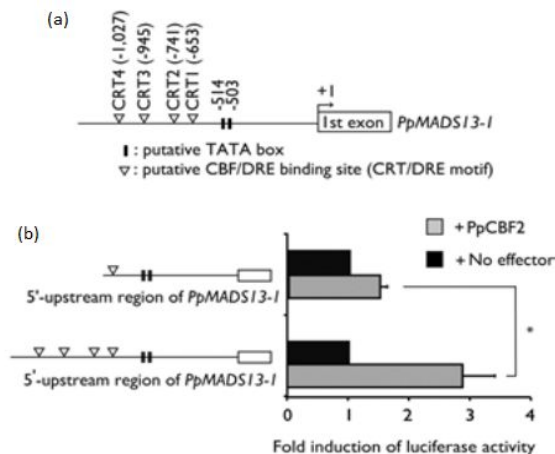


図 2 CBF タンパク質の *PpMADS13* プロモーター領域への結合

(a) *PpMADS13* の上流には 4 カ所の CBF が結合できるモチーフ配列がある
(b) ルシフェラーゼを指標とした一過的なプロモーター活性で PpCBF は *PpMADS13* の CRT2-4 のいずれかに結合している可能性を示す

ニホンナシの CBF (*PpCBF2*) も休眠中に同じような発現パターンを示すことから (図 3a), *PpCBF2* による *PpMADS13* の発現制御の可能性が強く示唆されるものの、発現パターンが完全に *PpMADS13* と一致しないため、*PpMADS13* は *PpCBF2* 以外の因子によっても制御されている可能性がある。

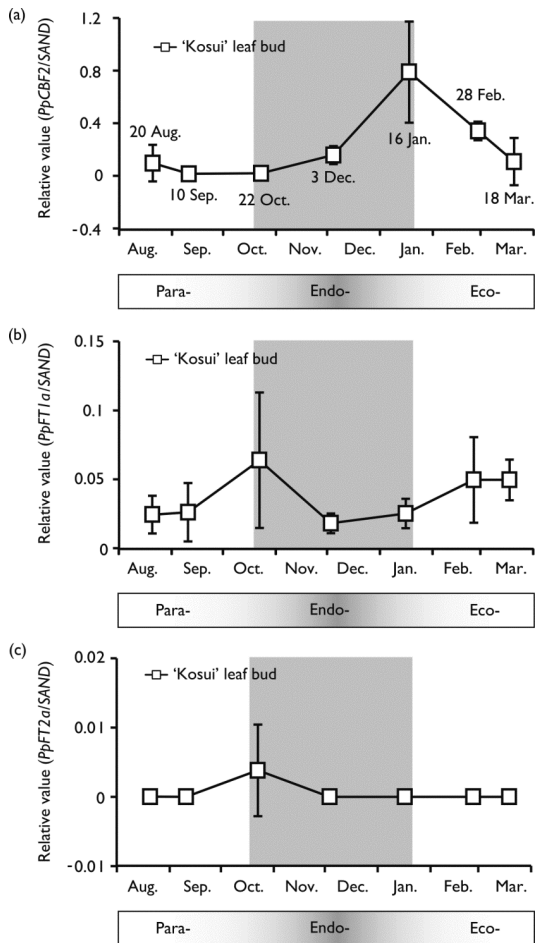


図 3 (a) ニホンナシ「幸水」の休眠期間中の葉芽における *PpCBF2* の発現変化
(b) ニホンナシ「幸水」の休眠期間中の葉芽における *PpFT1a* の発現変化
(c) ニホンナシ「幸水」の休眠期間中の葉芽における *PpFT2a* の発現変化

次に *DAM* ゲノムに関わるヒストン H3 のリジン残基 4 番のトリメチル化 (H3K4me3) とリジン残基 27 番のトリメチル化 (H3K27me3) の状態を *DAM* の 4 力所において (図 4a) 休眠中と休眠後と比較した。*DAM* の発現は休眠覚醒に向かい減少することから、H3K4me3 の状態が減り、H3K27me3 の状態が増加することが予想された。結果は H3K4me3 の状態が減少したが (図 4b)、H3K27me3 の状態は変化しなかった (図 4c、d)。

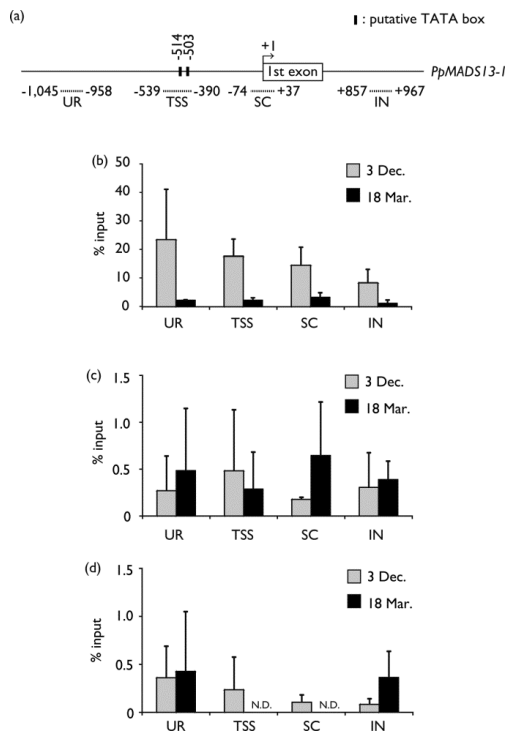


図 4 *PpMADS13* のヒストン修飾
(a) qPCR を行った *PpMADS13* の 4 力所 (UR, TSS, SC, IN) の位置関係
(b) 休眠前後 H3K4me3 の状態
(c) 休眠前後 H3K27me3 の状態
(d) 休眠前後 NM IgG (マウスの IgG 抗体で negative control) の状態

シロイヌナズナでは *DAM* のホモログである SVP が *FT* を負に制御していることが報告されている。そこで *PpMADS13* と *FT* の相互作用について解析した。*FT1a* には 5 力所の、*FT2a* には 2 力所の *PpMADS13* が結合できるモチーフ配列が上流に存在したが、いずれを導入しても *PpMADS13* タンパク質との相互作用は認められなかった (図 5)。

2 種類の *FT* の休眠期間中の発現パターン (図 3b, c) も *PpMADS13* のそれ (図 1b) とは対応しておらず (*PpMADS13* が負に制御しているなら *FT* の発現は *PpMADS13* の逆になると期待された) *PpMADS13* が *FT* を制御している可能性は低いと推察された。

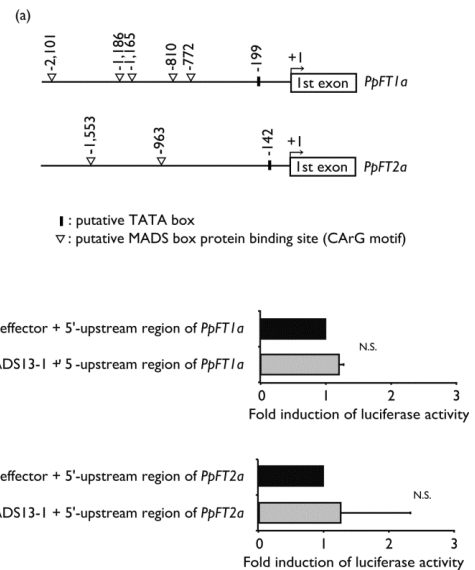


図 5 *PpMADS13*: タンパク質の *PpFT1a* と *PpFT2a* のプロモーター領域への結合
(a) *PpFT1a* の上流には 5 力所の *PpFT2a* には 2 力所の *PpMADS13* が結合できるモチーフ配列がある
(b) ルシフェラーゼを指標とした一過的なプロモーター活性で *PpMADS13* は *PpFT1a* と *PpFT2a* のいずれかにも相互作用していない可能性を示す

PpMADS13 が *FT* と相互作用しなかったため、*PpMADS13* タンパク質が制御すると考えられる遺伝子を ChIP-seq により網羅的に解析し、現在データを取りまとめ中であるが、複数年の結果から、*NCED* 等の遺伝子が候補として挙げられる。現在、これらの *PpMADS13* 下流遺伝子候補について、さらなる解析を行っているところである。

本プロジェクト予算の一部を活用して、ニホンナシ「幸水」の休眠期間中 (初秋から初春) の花芽の発育について Magnetic Resonance Imaging により解析を行い、自発休眠覚醒と芽の大きさの変化は対応しておらず、ニホンナシの花芽は開花前に急速に大きくなり、少なくともこの時に細胞分裂関連 (cyclase)、水チャネル関連 { tonoplast intrinsic protein (TIP) と plasma membrane intrinsic protein (PIP) }、そして細胞肥大関連 (expansin) の遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。モモの花芽では、自発休眠覚醒に対応して花芽が大きくなることから、同じバラ科果樹であっても休眠期間中の花芽の発育様式には違いのあることを示した。

また、休眠相の転換に small RNA (sRNA) が関与している可能性を探るため、small RNA-seq と分解物の網羅的解析 (degradome)

を行った。多くの既知の microRNAs (miRNAs) とナシ特異的な miRNAs は自発休眠期と他発休眠期でそれらの発現は大きく変化していなかった。一方、218,050 の中の 1,540 の sRNA 座は休眠期で発現レベルが変化していたことから、miRNA 以外に heterochromatic siRNA (hc-siRNA) や phased/secondary siRNA (pha-siRNA) 等が休眠相の変化に関与している可能性を示した。加えて、*MIR168* から 2 種類の miR168 (miR168.1 と miR168.2) が作られることや、*TAS3* trans-acting siRNA が AUXIN RESPONSE FACTOR 4 の ORF にある phased siRNA に作用することを示した。さらに、*EARLY BUD-BREAK (PpEBB)* 遺伝子についても解析を進め、*PpEBB* がサイクリン遺伝子の発現制御を介して萌芽に関わっている可能性を示した。

<引用文献>

Bielenberg, G. D., Y. E. Wang, Z. Li, T. Zhebentyayeva, S. Fan, G. L. Reighard, R. Scorza and A. G. Abbott, Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation, *Tree Genetics & Genomes*, 4 巻、2008、495-507

Fan, S., D.G. Bielenberg, T.N. Zhebentyayeva, G.L. Reighard, W.R. Okie, D. Holland and A.G. Abbott, Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*), *New Phytologist*, 185巻、2010、917-930

Ubi, B. E., D. Sakamoto, Y. Ban, T. Shimada, A. Ito, I. Nakajima, Y. Takemura, F. Tamura, T. Saito and T. Moriguchi, Molecular cloning of dormancy-associated MADS-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135巻、2010、174-182

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Pham Ahn Tuan, Songling Bai, Takanori Saito, Tsuyoshi Imai, Akiko Ito and Takaya Moriguchi, Involvement of *EARLY BUD-BREAK*, an AP2/ERF transcription factor gene, in bud break in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) lateral flower buds: expression, histone modifications, and possible target genes, *Plant & Cell Physiology*, 査読有、37 巻、2016、1038-1047

DOI: 10.1093/pcp/pcw041

Songling Bai, Takanori Saito, Akiko Ito, Pham Anh Tuan, Ying Xu, Yuanwen Teng and Takaya Moriguchi, Small RNA and PARE sequencing in flower bud reveals the involvement of sRNAs in endodormancy release of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* 'Kosui'), *BMC Genomics*, 査読有、17 巻、2016、230

DOI: 10.1186/s12864-016-2514-8

Takanori Saito, Pham Anh Tuan, Akemi Katsumi-Horigane, Songling Bai, Akiko Ito, Yasuyo Sekiyama, Hiroshi Ono and Takaya Moriguchi, Development of flower buds in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) from late autumn to early spring, *Tree Physiology*, 査読有、35 巻、2015、653-662
DOI: 10.1093/treephys/tpv043

Takanori Saito, Songling Bai, Tsuyoshi Imai, Akiko Ito, Ikuko Nakajima and Takaya Moriguchi, Histone modification and signaling cascade of the dormancy-associated MADS-box gene, *PpMADS13-1*, in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) during endodormancy, *Plant, Cell & Environment*, 査読有、38 巻、2015、1157-1166

DOI: 10.1111/pce.12469

〔学会発表〕(計 5 件)

齋藤隆徳、白松齡、今井剛、伊東明子、中島育子、森口卓哉、ニホンナシ '幸水' の dormancy-associated MADS-box 遺伝子、*PpMADS13-1* のシグナル伝達様式について、園芸学会平成 26 年度春季大会、平成 26 年 3 月 29 ~ 30 日、筑波大学 (茨城県・つくば市)

Saito T.・S. Bai・A. Ito・T. Imai・I. Nakajima・T. Moriguchi, Regulatory mechanism of *Dormancy associated MADS-box* gene in Japanese pear, Abstracts of Dormancy 2013 Symposium, 44、平成25年11月4~7日、オークランド(ニュージーランド)

齋藤隆徳、白松齡、阪本大輔、伊東明子、今井剛、中島育子、齋藤寿広、森口卓哉、シアナミド処理・秋~冬季加温処理下でのニホンナシ '幸水' の DAM 遺伝子の発現について、園芸学会平成25年度春季大会、平成25年3月22~24日、東京農工大学(東京都・小金井市)

齋藤隆徳、阪本大輔、伊東明子、今井剛、中島育子、齋藤寿広、森口卓哉、ニホンナシ '豊水' と '新高' の自発休眠期における DAM、FT および TFL1 の発現解析、園芸学会平成24年度秋季大会、平成24年9月22~24日、福井県立大学(福井県・吉田郡永平寺町)

斎藤隆徳, 阪本大輔, 伊東明子, 今井剛, 中島育子, 斎藤寿広, 森口卓哉、リンゴゲノム情報を利用したナシ *dormancy associated MADS-box (DAM)* 遺伝子のゲノム構造解析、園芸学会平成24年度春季大会、平成24年3月28~29日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

〔その他〕

ホームページ等

農研機構気候変動対応プログラム

<http://adpmiit.dc.affrc.go.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・領域長

研究者番号：80343945