

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450053

研究課題名(和文)カンキツ類の花成促進遺伝子CiFTの発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism regulating gene expression of CiFT in flowering control of citrus

研究代表者

遠藤 朋子 (ENDO, Tomoko)

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・上級研究員

研究者番号：50355400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カンキツ類のCiFT(Citrus FT)遺伝子は花成(栄養生長から生殖生長への移行)を促進する機能を持ち、幼木から成木への移行や周年的な開花誘導に重要である。このため本研究では、CiFT遺伝子の発現制御機構をカンキツ類の花成誘導に重要な低温や乾燥により誘導される植物ホルモン、アブシジン酸(ABA)に着目して解析した。

その結果、CiFTのプロモーター配列を同定し、低温条件に対して発現応答性を有することを確認した。またABAの外生処理がカンキツ類に花成誘導効果をもつ可能性を見いだした。これらの成果は今後、カンキツ類の花成制御等の生理研究及び新たな開花制御技術開発における基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：CiFT(Citrus FT), gene promotes floral induction, the transition from vegetative to reproductive growth, is important for the transition from the juvenile to the adult tree phase and annual seasonal flowering in citrus. In this study, the mechanism regulating gene expression of CiFT was analyzed, focusing involvement of abscisic acid (ABA) which is a phytohormone, known to be induced by low ambient temperature or drought. These environmental conditions are important for citrus floral induction. As a result, we have identified a promoter sequence of CiFT and found it responds to low ambient temperature. We also found that exogenous ABA treatment have potential to induce flowering of citrus tree. These results provide basic information for physiological study and development of novel technique in flowering control of citrus.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：花成制御 カンキツ プロモーター

1. 研究開始当初の背景

カンキツ類は長い幼若期の間は開花せず、成木においても周年的な開花が不安定になりやすい。このため、栄養生長から生殖生長への変換である花成の制御は、交雑育種や果実生産等において非常に重要な課題である。

我々は、カンキツ類の *FLOWERING LOCUS T (FT)* ホモログ、*Citrus FT (CiFT)* が花成促進機能を持ち (Endo et al., 2005)、花成誘導と *CiFT* の発現量上昇の時期が一致することから (Nishikawa et al., 2007; 2009)、カンキツ類の花成には *CiFT* 遺伝子の発現誘導が重要であることを明らかにした。また、*FT* ホモログがコードするタンパク質は、葉から茎頂へ移動して開花を誘導する「フロリゲン」の主要構成成分であると考えられている (Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007)。

シロイヌナズナやイネでは、日長によるシグナル受容から *FT* とオルソログ遺伝子の発現誘導に至る主要経路等が明らかにされている (Kobayashi & Weigel, 2007)。しかし、カンキツ類の花成を誘導する環境条件は、日長よりも低温や乾燥が重要であるため、*CiFT* の発現は未知の機構により制御されると考えられる。このため、本研究では *CiFT* の発現制御機構を解明する。

2. 研究の目的

本研究では、低温や乾燥により誘導されるアブシジン酸 (ABA) に着目し、ABA を介した制御を中心に *CiFT* 遺伝子の発現制御機構を解明する。ウンシュウミカンに存在する *CiFT* cDNA のうち、成木の葉や茎で蓄積する *CiFT3* のプロモーター領域にレポーター遺伝子を連結し、シロイヌナズナ形質転換体を用いて、低温、外生 ABA 等に対する応答性を明らかにする。また、ウンシュウミカン成木の低温による花成誘導処理時に、ABA 合成阻害剤を外生処理し、内生 ABA 量の増加を抑制して、着花量への影響を明らかにする。さらに応答性が確認されたプロモーター領域と、ABA 合成阻害剤への反応から推定されるトランス因子との相互作用を明らかにする。これらの解析により得られた知見は、低温による花成誘導の制御機構解明と共に、カンキツ類の栽培生理研究上重要な情報となる。また、将来的に内生 ABA 含量を樹体に影響の少ない薬剤により制御することが可能になれば、新たな花成制御技術開発への発展も期待できる。

3. 研究の方法

(1) ウンシュウミカン成木の葉や茎で蓄積する *CiFT3* の 5' 上流域を含むゲノム領域をレポーター遺伝子 (*uidA*) と結合した遺伝子導入用コンストラクトを作成し、シロイヌナズナ形質転換体を作成する。通常の生育条件および低温条件下において、レポーター遺伝子の発現を解析する。

(2) ウンシュウミカンの鉢植え成木接ぎ木苗を 15 定温の花成誘導条件下に置くとともに、ABA 合成の律速酵素の 1 つである 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) の阻害剤 NDGA (Nordihydroguaiaretic acid) を処理する。継時的にサンプリングを行って内生 ABA 含量を測定すると同時に、摘葉高温処理により発芽を促進して着花状況を調査する。

と同様の成木苗を、25 定温条件下に置いて花成を抑制すると共に、ABA を外生処理する。処理開始から一定期間後にサンプリングを行い、内生 ABA 含量を測定すると同時に、摘葉高温処理により発芽を促進して着花状況を調査する。

4. 研究成果

(1) *CiFT* の発現制御領域を同定するため、上流域約 3.7kb を含むゲノム領域をレポーター遺伝子 (*uidA*) と結合したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに導入した。導入遺伝子を 1 コピー保有すると推定される 10 系統の、T₃ 世代ホモ個体を用いて、組織染色により *uidA* の発現を調査した。供試した 10 系統のうち 6 系統で、ロゼット葉および莢の基部で GUS 染色が確認されたため (図 1)、この上流域約 3.7kb はプロモーター活性を有し、22 °C、長日の生育条件下でロゼット葉および莢において *uidA* の発現を誘導すると考えられた。

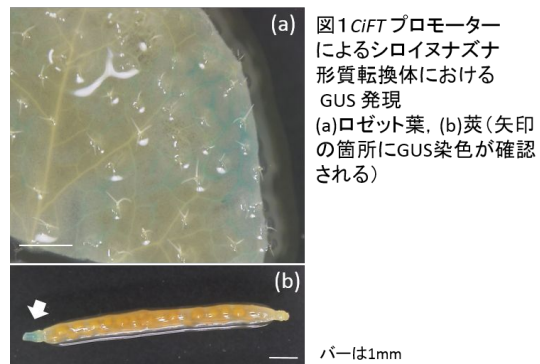


図1 *CiFT* プロモーターによるシロイヌナズナ形質転換体における GUS 発現 (a)ロゼット葉、(b)莢(矢印の箇所にGUS染色が確認される)

さらに、これらの *CiFT* プロモーターを有するシロイヌナズナ形質転換体を、通常の生育条件 (22 °C) よりも低い温度条件 (15 °C) 下に置いたところ、根における GUS 活性増が確認されたため、このプロモーター配列は、15 °C 程度の温度条件に応答性があると考えられた。これらの結果から、このプロモーター領域をさらに詳細に解析することで、低温および ABA 誘導性に関わるシス領域等が明らかになると考えられることから、低温による花成誘導機構に関する重要な知見が得られたとともに、今後の研究材料となる。

(2) ウンシュウミカンの花成誘導における ABA の関与について、および NDGA の試験を実施し、以下の結果が得られた。

ABA 合成の律速酵素 NCED の阻害剤

NDGA を用いて着花への効果を調査した。ウンシュウミカンの鉢植え成木接ぎ木苗を、15 恒温室に搬入して花成誘導を開始する 5 日前から NDGA 処理を開始し、搬入後 1 週間ごとに 5 週目まで 100 μ M 溶液を散布した。0.5 ヶ月ごとにサンプリングを行い、茎の内生 ABA 含量を、 $[^2\text{H}_6]$ -ABA を内部標準に用いて GC-MS により測定した。その結果、NDGA 処理区の茎の ABA 含量は、溶媒のみを処理した対照 (CNT) と同様に、低温処理開始後 0.5 ヶ月後に極大を示し (図 2)、また 2 ヶ月目までの測定期間中の積算量も、対照と比較してほとんど差がなかった。サンプリングと同時に全摘葉および 25 恒温室への搬入により発芽を誘導して、着花状況を観察したところ、NDGA 処理区と対照区の間で、期間中の着花量にも差異が認められなかった (図 3)。

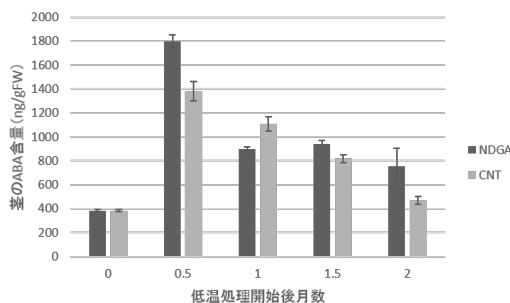


図2 低温による花成誘導条件下における茎のABA含量へのNDGA処理効果

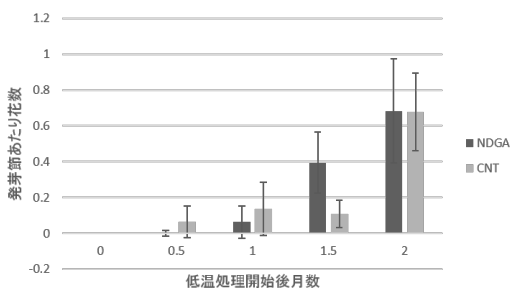


図3 低温による花成誘導による着花へのNDGA処理効果

本試験では、NDGA 処理により内生 ABA 合成および ABA 蓄積を阻害出来なかったため、着花への効果も確認されなかったと考えられ、内生 ABA 量の花成誘導への影響を評価出来なかった。

ウンシュウミカンの花成を抑制した条件下において、ABA の外生処理による着花への効果を調査した。ウンシュウミカンの鉢植え成木接ぎ木苗を、外気温が低下し始める 10 月中旬に 25 恒温室に搬入した。ABA 処理区は、搬入 1 週間後より 2 日ごとに 10 回 500 μ M 溶液を散布した。ABA 処理開始より 1 ヶ月および 1.5 ヶ月後に、茎の内生 ABA 含量を測定したところ、ABA 処理区の茎の ABA 含量は、溶媒のみを処理した対照区 (CNT) と比較して、1 ヶ月後で約 100 倍、1.5 ヶ月後で約 30 倍高い値を示した。また、処理開始より 1.5 ヶ月後に全摘葉および 25 恒温室へ

の搬入により発芽を誘導して、その後の発芽を観察したところ、対照区は葉芽のみであったのに対し、処理を行った 1 個体で着花が観察された (図 4)。

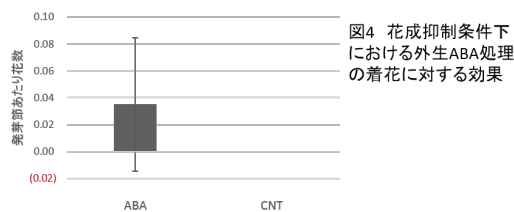


図4 花成抑制条件下における外生ABA処理の着花に対する効果

これらの結果から、ABA の外生処理により、着花が誘導される可能性が示された。しかし、着花状況の誤差が大きい等検討の余地を残しているため、今後、処理個体数を増やして結果を確認する、あるいは遺伝子発現への影響を調査する等、実験の再現性を確認する必要がある。

以上の様に本研究では、カンキツの花成誘導に重要な *CiFT* のプロモーター配列を同定し、このプロモーターが低温条件に対して発現応答性を有することを確認した。また、ABA の外生処理が、カンキツ類に花成誘導効果を持つ可能性を見いだした。これらの結果は、従来ほぼ明らかにされていなかったカンキツ類の花成誘導における ABA の関与について得られた新規知見であるため、独創的な成果であるとともに、カンキツ類の花成制御等の生理研究における基礎的知見となる。また、得られた知見を利用して今後薬剤処理による新規開花制御技術が実用化されれば、従来にない新たな技術として産業への貢献が期待できる。

<引用文献>

Endo T.ら、Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), *Transgen. Res.* 14, 2005, 703-712

Nishikawa F.ら、Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), *J. Exp. Bot.* 58, 2007, 3915-3927

Nishikawa F.ら、Differences in seasonal expression of flowering genes between deciduous trifoliolate orange and evergreen Satsuma mandarin, *Tree Physiol.* 29, 2009, 921-926

Corbesier L.ら、FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*, *Science* 316, 2007, 1030-1033

Tamaki S.ら、Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice, *Science* 316, 2007,

1033-1036

Kobayashi Y., Weigel D., Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering, Gene. Dev. 21, 2007, 2371-2384

5. 主な発表論文等

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：カンキツの着花制御法
発明者：遠藤朋子、島田武彦、生駒吉識
権利者：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
種類：特許
番号：特願 2014-117322 号
出願年月日：平成 26 年 6 月 6 日
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 朋子 (ENDO, Tomoko)
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・上級研究員
研究者番号：50355400

(2) 研究分担者

島田 武彦 (SHIMADA, Takehiko)
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・ユニット長
研究者番号：10355399