

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660021

研究課題名(和文)ブルーベリーの二季成りおよび四季成りに関わる遺伝子発現と生物学的意義の解明

研究課題名(英文)Biological significance and gene expression in blueberry under conditions of twice harvesting and continuous harvesting

研究代表者

荻原 勲 (OGIWARA, Isao)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80204113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ブルーベリーを9月に開花させオフシーズンに果実を収穫する方法を開発した。ブルーベリーが二季成りや四季成りになる開花制御条件を明らかにしたうえで、cDNA塩基配列の網羅的解読と発現解析を行った。7月からの低温・短日条件で9月に新梢の頂芽に開花させることができる。開花後から低温・短日にすると連続開花性(四季成り)となり、高温・長日にすると二季成りなることが明らかとなった。RNA-Seqにより、四季成り条件下で栽培したブルーベリーの新葉では、シロイヌナズナの花成関連遺伝子と高い相同性を示す複数の遺伝子の発現が確認され、ブルーベリーにもシロイヌナズナと同様に複数の花成経路が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In Japan, the harvesting period of blueberries grown under natural conditions is from June to September. From the attempts of off-season production and continuous harvesting of some cultivars of southern highbush blueberries (SHB), results showed that it was possible to produce off-season fruits in a controlled environment. Therefore SHB that was treated with high temperatures and long-day lengths in September flowered on terminal bud in October. Flower bud differentiation was stimulated by low temperatures and short-day lengths after terminal bud flowering. Therefore, it is possible to harvest fruits continuously from December to July by subsequent flowering from the mother branch. RNA-Seq revealed that several genes showing high homology with flowering-related genes of Arabidopsis expressed in the new leaves of blueberry under the cultivation conditions of continuous harvesting. This observation suggests that blueberry have several flowering pathways as is the case of Arabidopsis.

研究分野：園芸学

キーワード：ブルーベリー 開花生理 連続開花 二季成り 四季成り 環境制御 遺伝子 日長

### 1. 研究開始当初の背景

東京農工大学では、春夏秋冬の環境を作り出す部屋(太陽光温室と人工光栽培室)を備えた「先進植物工場研究施設」を整備し、ブルーベリー果実の高収量化と周年化を目指して研究を行っている。この研究施設を使って、申請者の荻原は花芽形成に関しての実験を行い2つの発見をした。一つは、2010年の秋季に徒長枝に開花した品種があったので、その品種を休眠導入期前からハウス内で加温して栽培したところ、新梢の先端から基部に向かって開花が行われた。その後、新梢の葉腋から新たな新梢が発生し、その一部の頂芽からも開花・結実した。よって、一季成りのブルーベリー品種がトマトのように連続的(12月から翌年7月まで)に開花・結実した四季成りにすることに成功した。二つ目は、6月に果実を収穫したブルーベリー樹を8月から短日条件で低温の晩秋室に置いたところ、10月上旬から開花が見られ結実したことから、1年に2回収穫できる二季成りに成功した。そこで、二度目に開花結実したところで、12時間日長にするとその後発生した新梢から開花は見られず、11時間日長にしたところ新梢先端から開花が見られ、連続的な開花・結実する四季成りになった。一方、申請者の山田はアサガオの花弁老化に関する遺伝子の決定に、cDNA塩基配列の網羅的解読を行い、花弁のトランスクリプトームデータベースを構築し、そのデータベースを参照配列として、塩基配列データを用いた発現解析を行い、候補遺伝子を選抜する解析プロセスを開発している(Yamada,2012)。

### 2. 研究の目的

一連の実験結果から、四季成りの性質を具備していた品種が環境により一季成りや二季成りに変態していると考え、元来四季成り遺伝子群が備わっているが、それらがカバーされていると推察される。この仮説を遺伝子レベルで証明できれば、温帯性果樹の一季成りの理由や進化が明らかにできると考えられる。そこで、一季成り、二季成り、四季成りの開花制御を明らかにしたうえで、cDNA塩基配列の網羅的解読と発現解析を行い、一季成りや四季成りになる機構を解析し、生物学的意義を考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 四季成り個体の作成(日長と温度の影響)と花芽の形態観察

連続開花性3品種と非連続開花性2品種における花芽の発育形態

供試材料には、連続開花性を示す SHB 'Sharpblue'、'Emerald' および 'Sunshineblue'、連続開花性を示さなかった NHB 'Blueray' および RB 'Tifblue' の4~5年生樹を用いた。花芽の発育調査は、7月~12月までの5ヶ月間行い、品種ごとに花

芽の発育時期の推移を比較した。

短日処理が1年生枝の開花誘導および果実品質に及ぼす影響

供試品種には、SHB 'Sharpblue' および 'Sunshineblue' 4年生樹を用いた。処理区は、対照区の長日区と短日処理した短日区の2処理区を設け、2012年3月28日まで日長14時間のガラス室内で育てた個体を用い、そのまま継続して栽培した区を対照区(長日区)とし、短日区は、2012年3月28日から日長8時間の短日処理を行った。1年生枝の開花誘導と果実品質に及ぼす影響について調査した。

(2) 次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析によるブルーベリーの四季成り性遺伝子群候補の選抜

ブルーベリー品種 'Misty' の4~5年生の個体を供試した。東京農工大学先進植物工場内の早春部屋(12時間日長、昼温28℃、夜温18℃、湿度40%~80%)を対照区、晩秋部屋(8時間日長、昼温21℃、夜温16℃、湿度40%~80%)を花成誘導区とし、各処理区で2か月半栽培した個体から新葉を採取した。採取した新葉サンプル(300mg)から Nucleospin RNA XS (TaKaRa Bio) を用いて total RNA を抽出し、Dynabeads mRNA DIRECT MicroKit (VERITAS 社) で mRNA を単離した。単離した mRNA を鋳型とし、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (VERITAS 社) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、Ion PI Sequencing 200 Kit v2 (Life technologies) および次世代シーケンサー (Ion Proton, Life technologies) を用いて RNA-Seq 解析を行った。RNA-Seq 解析により得られた全ての新葉サンプルの断片的な cDNA 塩基配列(リード)を de novo アセンブラ (Trinity) を用いて連結し、cDNA 塩基配列の再構築(アセンブル)を行った。アセンブルにより産出された配列(コンティグ)群について、シロイヌナズナの全 cDNA 情報をデータベースとした相同性検索を行い、遺伝子機能の情報付加を実施した。また、シロイヌナズナで花成誘導への関与が報告されている21個の遺伝子と相同性を示すコンティグを検出した。さらに、リードマッピングプログラム (Bowtie) を用い、対照区と花成誘導区の新葉サンプルより得られたリードをコンティグ群にそれぞれマッピングして、各コンティグの RPKM 値を求めるとともに、処理区間の log2 比を算出した。

### 4. 研究成果

(1) 四季成り個体の作成(日長と温度の影響)と花芽の形態観察

連続開花性3品種と非連続開花性2品種における花芽の発育形態

'Emerald' および 'Sharpblue' は、他の3

品種と比較して花芽の発育が早期から開始することが分かった。したがって、Emerald および 'Sharpblue' が高温長日処理によって連続的な開花結実性を示した原因は、花器の発育が極めて早い品種であったためであるといえる。また、この2品種の共通親として *V. darrowi* という野生種が存在することから、*V. darrowi* が花芽の発育が早期から生じる形質に関与している可能性が示唆された。

短日処理が1年生枝の開花誘導および果実品質に及ぼす影響

短日処理による1年生枝の開花誘導は両品種に効果的であった。短日の効果は、両品種で処理開始から1ヶ月後に顕著に現われ、開始後2ヶ月目まで継続した。したがって処理を行う期間は2ヶ月間が適当であると示唆された。果実品質は、酸度が短日処理により高まったが、他の項目に相違はなかった。短日処理下で成育した果実は、酸度の上昇により長日条件下のそれより多少品質は劣るが、ほぼ同等の品質を保持しているといえた。以上の結果より、短日処理は1年生枝への連続的な開花結実の誘導を促進し、さらなる収穫期の延長および収量増加が可能であると示唆された。

(2) 次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析によるブルーベリーの四季成り性遺伝子群候補の選抜

RNA-Seq 解析により、各処理区の新葉サンプルの cDNA 塩基配列を解読し、対照区では72 M リード、花成誘導区では93 M リード、合計165 M リードの配列データを得た。それらのリードをアセンブルし、83,682 コンティグを得た。得られたコンティグのN50は1,101 base、平均コンティグ長は697 base、最短コンティグ長は201 base、最長コンティグ長は14,264 base であった。それらのコンティグの中には、シロイヌナズナの21個の花成誘導関連遺伝子のうち13個と高い相同性(e-value が  $1.00E-15$  以下、BitScore が80以上)を示すものが27個含まれていた。これら27個のコンティグは、ブルーベリーの花成に関与する遺伝子群に由来するものであると考えられる。一方、各コンティグに対照区と花成誘導区のリードをそれぞれマッピングしたところ、処理区間でRPKM値のlog2比が2以上のコンティグが検出された。それらのコンティグの中には、シロイヌナズナの11個の花成関連遺伝子と高い相同性を示すものが23個含まれていた。これら23個のコンティグと相同性が認められたシロイヌナズナの花成関連遺伝子が関わる花成経路は複数であったため、ブルーベリーにも複数の花成経路が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Thanda Aung, Yukinari Muramatsu, Naomi Horiuchi, Jingai Che, Yuya Mochizuki and Isao Ogiwara. Plant Growth and Fruit Quality of Blueberry in the Controlled Room under Artificial Light. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 査読有. 83(4):273-281. 2014.

堀内尚美・車 敬愛・星野裕昭・荻原 勲・休眠前の高温・長日処理がブルーベリー3種の形態および生態に及ぼす影響。園芸学研究。査読有。12(3):281-288。2013。

〔学会発表〕(計5件)

荻原 勲。先進植物工場の新技術(6)先進果樹苗生産工場との連携によるブルーベリーのオフシーズン出荷技術の実証研究(福島ブルーベリープロジェクト)。東京農工大学ブルーベリー研究会。2015年1月10日。東京農工大学(東京都府中市)。

Ogiwara, I., J., Che, N., Horiuchi and T., Aung. Features of Blueberry Plant Factory with Rooms of Controlled Environment representing Four Seasons. ITRI 研究会。2014年9月24日。新竹市(台湾国)

N. Horiuchi, J. Che, T. Aung, Y. Mayumi, Y. Muramatsu, T. Hoashi, M. Yamazaki, H. Hoshino, A. Odachi, M. Watanabe and I. Ogiwara. Features of blueberry plant factory with rooms of controlled environment representing four seasons. The 29th International Horticultural Congress. 2014. 8. 17-22. Brisbane(Australia)

荻原 勲。四季を再現した植物工場におけるブルーベリーの周年化と高収穫化の取り組み。農工大セミナー植物工場を核とした技術革新による新しい農業。2014年3月10日。東京農工大学(東京都府中市)

荻原 勲。植物工場によるブルーベリーの周年生産。日本農学アカデミー・(公財)農学会公開シンポジウム。2013年11月9日。東京大学(東京都文京区)

〔図書〕(計3件)

荻原 勲・車 敬愛・堀内尚美・三橋行夫。技術情報協会。10年後の市場・技術予測とそこから読み解く必然の研究開発テーマ。2014。433(421-425)。

荻原 勲。情報機構。植物工場経営の重要課題と対策～経営戦略・設備管理・栽培技術・高付加価値化・マーケティング～。2014。

464(299-306) .

荻原 勲・車 敬愛・堀内尚美・NTS 社・  
植物工場 生産システムと流通技術の最前  
線 . 2013. 517(307-315) .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：植物の栽培方法  
発明者：荻原勲・車敬愛・堀内尚美・村上拓  
也・関口紗央織  
権利者：同上  
種類：特許 PCT  
番号：JP2014/057716  
出願年月日：2014 年 3 月 20 日  
国内外の別： 外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~engei/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

荻原 勲 (OGIWARA, Isao)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：80204113

### (2)研究分担者

山田 哲也 (YAMADA, Tetsuya)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20422511