

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660031

研究課題名(和文)ニホンナシ花芽分化期にFT転写が誘導されない要因の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism underlying no induction of PpFT transcripts in the Japanese pear flower buds at flower differentiation stage

研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所栽培・流通利用研究領域・上席研究員

研究者番号：80343945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンナシの花芽分化期にFLOWERING LOCUS T (FT)の発現が誘導されない要因について解明すべく花芽分化期におけるin situ hybridizationによりFT転写物を解析したが、センスプローブによるバックグラウンドが高く明確なシグナルが検出できなかった。FTタンパク質については抗FT抗体の特異性が低く再確認の必要があるが、FTは花芽分化期を通して芽に存在している可能性が示唆された。他方、FTと拮抗するTERMINAL FLOWER1 (TFL1)の発現は花芽分化に先立ち低下することから、FTは準備万端の状態にありTFL1の低下により花芽分化が始まると推察した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanism underlying no induction of Japanese pear FT transcript in the flower buds at flower bud differentiation stage, we investigate the localization of FT mRNA at pre-differentiation, differentiation and post-differentiation by in situ hybridization. The signals of sense-PpFT1a-probe showed higher than those of anti-sense probe, indicating the presence of similar sequences to PpFT1a hybridized with sense-probe; thus, we have to give up the approach by in situ hybridization. Then, we try to detect FT protein by immunohistochemistry (IHC) using anti-PpFT1a antibody. Specificity of antibody was found to be not so high, but the results showed the presence of FT protein in apical portions irrespective of the flower bud differentiation stages, indicating that FT is already under the ready-to-go status. These results may suggest that the down-regulation of TFL1 could be a trigger to start flower bud differentiation in the Japanese pear.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：FLOWERING LOCUS T 花芽分化 ニホンナシ TERMINAL FLOWER1 LEAFY

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシの花芽分化は枝伸長の停止後に起こり、短果枝頂芽では6月中下旬頃に、長果枝頂芽では7月中旬頃に始まる。しかし、温度や日長がニホンナシの花芽分化に及ぼす影響については分かっていない。そこで、その端緒としてニホンナシの花芽分化機構解明のために、花成に関わる *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)、*TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*)、*APETALLA1* (*API*) のホモログを単離し、花芽分化中の頂芽(鱗片も含む)で発現を解析したところ、リンゴでの報告同様に花芽分化に伴い、*FT* と機能を相反する *TFL1* の発現低下と、花の形態形成の中核として機能している *API* の発現誘導は観察されるものの、リンゴ(Kotoda et al. 2010) やカンキツ(Nishikawa et al. 2007) で認められる *FT* の花芽での発現はニホンナシでは観察されなかった(図1)。また、*FT* は葉で転写された後にタンパク質と師部を通して茎頂に移行するため、茎と葉でも発現解析し他が、花芽分化に対応した発現誘導は確認できなかった(データ省略)。このことは、a) 茎頂の限られた部分で *FT* が転写され、そのため芽全体として解析しても低い *FT* の発現しか検出されない、b) *FT* の発現は低くとも、既に *FT* 蛋白質として *API* の発現誘導には十分量存在している、c) *API* を負に制御することが知られている *TFL1* の発現低下が主たる花芽分化の要因である、の3つの可能性が考えられる。そこで、この3つの可能性について検証し、ニホンナシの *FT* の新規な動態の可能性を提示することとした。

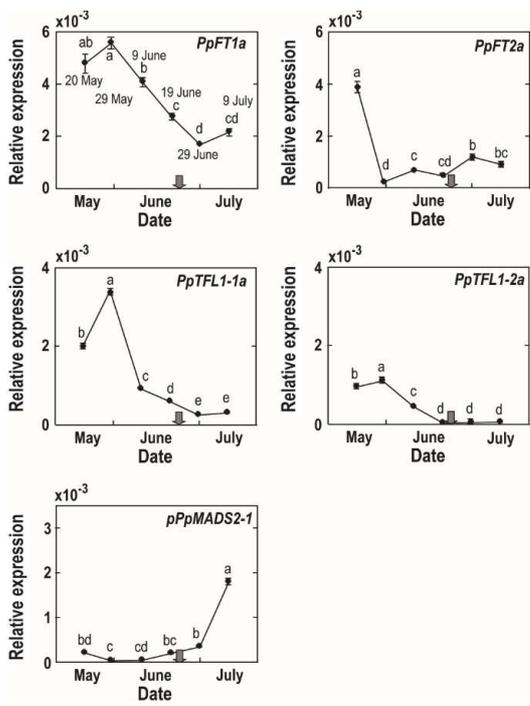


図1 「幸水」短果枝頂芽の花芽分化過程における *PpFT*、*PpTFL1*、*pPpMADS2-1* (*API*) の発現解析。花芽分化期(矢印)に向かい

PpTFL1 の発現低下と分化後の *pPpMADS2-1* の発現誘導が認められるが、*PpFT* の花芽分化に先立つ発現誘導が観察できない。

2. 研究の目的

フロリゲンの実体である *FT* 遺伝子は葉で発現して、蛋白質として師部伴細胞から師管を通して作用部位である茎頂に到達し花成を誘導することがモデル植物で明らかになった(Abe et al. 2005)。リンゴでは花芽分化時に *FT* 遺伝子の発現が誘導され、この茎頂の *FT mRNA* が花芽分化の鍵とされている(Kotoda et al. 2010)。一方、リンゴに近縁のニホンナシの頂芽(花芽)では、花芽分化に従いリンゴ同様に *TFL1* の発現低下と *API* の発現誘導は観察されるが、リンゴのような *FT* 遺伝子の発現誘導は見られない。また、花芽近傍の葉での *FT* の発現も低い。そこで、このニホンナシの花芽分化期の低い *FT* の発現の理由について解明し、モデル植物やリンゴとは異なる花芽分化過程における *FT* の機能について提示することを目的とする。

3. 研究の方法

ニホンナシ花芽分化における *FT* の機能を解析するため、以下に示す3つの実験を行う。

(1) ニホンナシから単離した *FT* と *TFL1* が機能を有するかをシロイヌナズナの変異体に導入して確認する。

ニホンナシの *FT* 遺伝子 (*PpFT1a*) をシロイヌナズナの *FT* 変異体に導入し、このシロイヌナズナの開花が早まるかを確認する。また、シロイヌナズナで早咲きを示す *TFL1* 変異体にニホンナシの *TFL1* 遺伝子 (*PpTFL1-1a*) を導入することで早咲き性が解消されるかを確認する。

(2) *FT* の局所的な発現を確認するため、花芽の *in situ hybridization* を行う。

花芽分化期が比較的揃うニホンナシ「ゴールド二十世紀」の短果枝の頂芽を用いる。花芽分化前・中・後のステージの芽を採取し、情報に従い固定後、パラフィンに包埋して、*anti-PpFT1a* をプローブに *in situ hybridization* を行う。また、「幸水」長果枝の頂芽(ほぼ確実に花芽へと発達する)を用いて同様に実験を行う。

(3) *FT* の下流遺伝子と考えられる *API* の花芽分化後の発現誘導は、*FT* タンパク質の存在を強く示唆している。そこで、*FT* 蛋白質の花芽中での存在について、免疫組織化学的手法により解析する。特に花芽分化期の茎頂での *FT* 蛋白質の存在と *FTmRNA* の関係に注目する。抗 *FT* 抗体は業者に委託して作成した。免疫組織化学的手法については、固定液として10%ホルムアルデヒド

パラホルムアルデヒド (PFA) とホルマリン/氷酢酸/エタノール (FAA) を比較検討した。また、抗原賦活化法としては酵素処理を採用した。

4. 研究成果

(1) ニホンナシから単離した *FT* 遺伝子 (*PpFT1a*) をシロイヌナズナの *FT* 変異体 (野生型) のシロイヌナズナに比べてロゼッタ葉の数が少なくても開花することが明らかとなった (図2)。また、シロイヌナズナで早咲きを示す *TFL1* 変異体にニホンナシの *TFL1* 遺伝子 (*PpTFL1-1a*) を導入すると、早咲き性が解消されて、野生型とほぼ同じ時期に開花するようになった (図3)。これらのことから、ニホンナシから単離した *FT* と *TFL1* は、シロイヌナズナ由来の *FT*、*TFL1* と同等の機能を有することが明らかとなった。

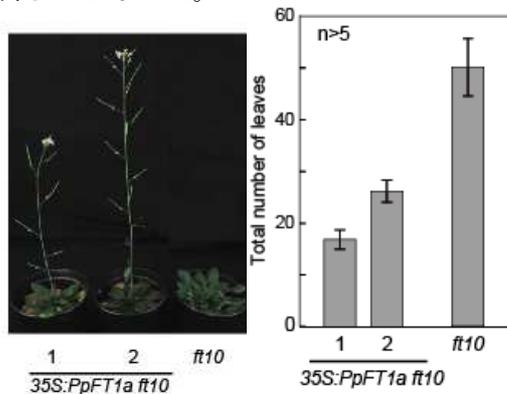


図2 シロイヌナズナ *FT* 変異体 (*ft10*) にニホンナシ *PpFT1a* を導入したシロイヌナズナでは、ロゼッタ葉が変異体よりも少ない枚数で開花にいたる。



図3 シロイヌナズナ *TFL1* 変異体 (*tf1*) にニホンナシ *PpTFL1* を導入したシロイヌナズナでは、ロゼッタ葉の枚数が増えても開花にいたらない。

(2) *FT* の局所的な発現を確認するため、花芽の *in situ hybridization* を行った。花芽分化期が比較的揃うニホンナシ「ゴールド二十世紀」の短果枝の頂芽を用いた結果を図4示す。花芽分化前・中・後の何れのステージにおいても、センスプローブを用いた時にもアンチセンスプローブ使用時以上に強いシグナルが検出された (図4)。センスプローブにより検出されるバックグラウンドを少なくすべく色々試みたが、抑えることができなかった。なお、*LEAFY* をプローブとして用いた時には、アンチセンス方向のプローブで明確なシグナルが検出できたことから (図5)、実験系には問題ないことが分かった。以上の実験から、ニホンナシ花芽分化期における *FT* の *in situ hybridization* は極めて難しいと判断した。

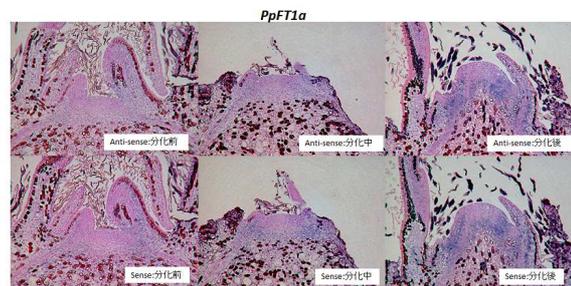


図4 花芽分化前 (左)・中 (真中)・後 (右) の「ゴールド二十世紀」短果枝頂芽における *PpFT1a* の *in situ hybridization*。上段が anti-sense プローブで、下段が sense プローブの写真を示し、下段で上段よりも強いシグナルが認められる。

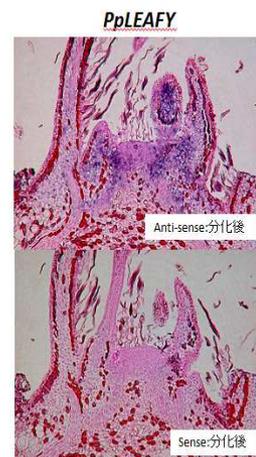


図5 花芽分化後の「ゴールド二十世紀」短果枝頂芽における *PpLeafy* の *in situ hybridization*。上段が anti-sense プローブで、下段が sense プローブの写真を示し、上段で下段よりも強いシグナルが認められる。

(3) *in situ hybridization* による *FT* mRNA

の検出は難しかったため、FT タンパク質の花芽分化過程における存在変化を組織化学的に検出するために、免疫組織化学的手法を用いた。その結果、FT タンパク質は花芽の分化前・中・後を通してナシの芽に存在していることが分かった(データ省略)。後日、抗FT抗体の特異性が低いことが判明。

以上の研究から、ナシの花芽分化は7月中旬頃に始まる。その時に顕著なFT遺伝子の発現がみられないが、抗FT抗体の特異性が低いため、再確認の必要があるもののFTは花芽の分化前、中、後を通してナシの芽で十分に存在している可能性が示唆された。他方、FTと拮抗するTFL1の発現は花芽分化に先立ち低下することが既に明らかになっている。このことかFTは準備完了の状態にあり、TFL1の低下により花芽分化が開始すると推察した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI, Takaya)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領
域・上席研究員
研究者番号：80343945