

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12201  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26850013  
研究課題名(和文)2倍体イチゴを利用したバラ科成長相制御遺伝子の抑制機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of suppression mechanisms of growth phase control gene of Rosaceae by using diploid Fragaria

研究代表者  
黒倉 健 (KUROKURA, Takeshi)  
宇都宮大学・農学部・講師

研究者番号：10650898  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で制御機構の詳細が不明であったFragaria属TFL1について、上流遺伝子SOC1の組み換えタンパク質を用いた結合配列の探索、および薬剤処理による花成制御遺伝子の発現変動解析を通じて、SOC1とTFL1は直接的な制御関係ではなく、未知の遺伝子が関与している可能性を得た。また、次世代シーケンサのデータ解析手法の比較を通じて、全ゲノム配列が公開されているFragaria属の解析においても、モデル植物において通常用いられている手法ではなく、ゲノム配列が不明である生物種と同様の解析手法を用いることが有効であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Global analysis of binding site of SOC1, which is thought to control TFL1 in Fragaria, as well as chemical applications, revealed that the control of TFL1 by SOC1 may not be direct manner. In addition, the comparison of NGS data analysis strategies indicates that the analysis of Fragaria data should be done by de novo assembly method rather than mapping based method, even though whole genome is publicly available.

研究分野：園芸学

キーワード：成長相制御 バラ科 イチゴ SOC1 TFL1

### 1. 研究開始当初の背景

バラ科果樹は数年に渡る幼若期があり、この間は低温/短日条件に遭遇しても花成しないことから、この間生産者は未収益となり、新品種導入の妨げになっているうえ、新品種の開発にも時間がかかる原因となっている。また、早晩性の制御は市場における商品単価を決定する要因となるが、その制御や、それに適した品種の開発はさらに改良の余地がある。

バラ(*Rosa* spp.)およびイチゴ(*Fragaria* spp.)には四季咲き、四季成りと呼ばれる、成長相の切り替えに低温/短日を必要としない系統が存在する。近年これらの形質はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* 相同遺伝子の機能欠損によるものであること、バラ科 *TFL1* の発現は日長および温度によって制御されており、低温/短日に遭遇した植物体では *TFL1* の発現が抑制されることが示された。すなわちイチゴをはじめとするバラ科植物の成長相の切り替えは共通の抑制遺伝子 *TFL1* の発現量の季節変動によって制御されている。

現在用いられているイチゴ促成技術は、夏季に低温/短日処理を与えることで市場価格の高い年内の果実生産を可能としているが、この手法は冷蔵設備の使用や、高冷地での育苗をするためエネルギー効率が悪い。一方、端境期である夏季の果実生産のために四季成り性系統が導入されているが、栽培種イチゴにおける四季成り性の制御機構は不明なため育種が効率化されていない。また果樹の場合、植物体の移動や果樹園の日長および温度を安価な方法で制御することは不可能である。そこで日長・温度による成長相切り替えの機構を分子レベルで解明することにより、効率良く *TFL1* を発現制御し、成長相を制御出来れば、任意の時期に収穫可能な作型の開発や、それに適した新品種の育種が可能になると考えた。

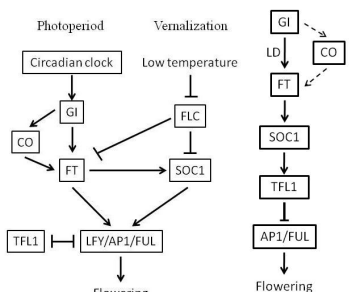
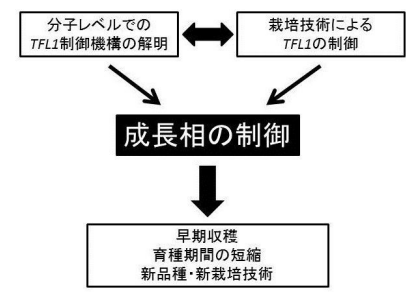


図1 シロイヌナズナ(左)、*F. vesca* (右)の花成経路モデル  
矢印は正の制御、|—は抑制を表す。

これまでの研究で、*F. vesca* (2倍体野生種イチゴ)において、成長相制御経路の一部を明らかとした(研究業績1)。すなわち *F. vesca* において、FTはMADS-box遺伝子である *SOC1* を日長依存的に制御し、その発現量変化は *TFL1* の発現量変化と正の相関が見られることから、シロイヌナズナとは異なる、バラ科特有の成長相切り替え制御経路の存在が示された(図1)。しかし、*SOC1* がどのように *TFL1* を制御しているか、*SOC1* と *TFL1* の間に別の因子が介在しているかは不明である。また、バラ科 *TFL1* の低温による制御機構は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

*F. vesca* *SOC1* による *TFL1* の制御機構の解明、*TFL1* の発現制御領域、および温度依存的な *TFL1* の発現抑制を解析することで *TFL1* を制御している機構を解明する。これにより、早晩性・四季成り性のマーカーや環境負荷の少ない開花調節技術の開発にもつなげる。



本研究の目的と展開のイメージ

### 3. 研究の方法

#### (1) *SOC1* タンパク質の *TFL1* プロモーター配列への結合検出

*F. vesca* においてMADS-box遺伝子である *SOC1* の過剰発現は *TFL1* を発現上昇させる。一方、*TFL1* の上流にはMADS-box転写因子の結合配列に類似した配列が存在すること、*TFL1* の抑制がみられない‘Alta’ではこの配列に変異がみられることから、この配列に *SOC1* タンパク質が結合している可能性がある。そこで *SOC1* 強発現ベクターと、‘Alta’または通常系統の *TFL1* 上流配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターでシロイヌナズナを二重に形質転換し、ルシフェラーゼアッセイにより *SOC1* タンパク質の *TFL1* 上流配列への結合を検出する。

#### (2) *SOC1* 結合配列の網羅的探索に向けたクロマチン免疫沈降法の開発

*F. vesca* *SOC1* による *TFL1* の間接的な制

御の可能性を考慮し、また、計画1の補完として糖質コルチコイド受容体(GR)融合SOC1タンパク質(GR::SOC1)を組み込んだ*F. vesca*形質転換体(ヘルシンキ大学において申請者が作成済み)と抗GR抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、SOC1タンパク質が結合するDNA配列を直接的に検出する。結合配列は次世代シーケンサで網羅的に探索する。

### (3)薬剤処理による花成誘導遺伝子の発現調節

DNAおよびヒストンのメチル化による花成誘導遺伝子の発現制御の可能性を明らかにするため、DNAメチル化阻害剤を直接散布することにより花成誘導遺伝子の発現が変動するかを解析する。また、果樹において落葉剤・休眠打破剤として用いられているシアナミド剤を同様に散布することで花成誘導遺伝子および休眠関連遺伝子の発現変動を解析する。

### (4)*F. vesca*におけるRNA-seqデータ解析手法の比較

一般的にRNA-seq解析手法として用いられている、公開全ゲノムデータに対するTopHat-Cufflinksを用いたリファレンスマッピングによる手法と、Trinityを用いた*de novo*アセンブルと、得られたデータベースに対する再マッピングによる手法について、検出されたDEGの数を指標としてそれぞれの手法の評価を行う。

### (5)SELEX-seq法によるSOC1結合DNA配列の探索

ChIPによるSOC1結合に困難を生じたため、合成DNAと*in vitro*翻訳SOC1を用いた、*in vitro*系でのSELEX-seq法を行った。

## 4. 研究成果

### (1) SOC1タンパク質の*TFL1*プロモーター配列への結合検出

SOC1をはじめとするMADS-boxタンパク質はCArG-boxと呼ばれる結合配列を持つことが知られており、現在公開されている*F. vesca*全ゲノム配列データベース探索の結果、*FvTFL1*の上流にもCArG-boxに類似した配列が存在することが明らかとなったため、SOC1による*TFL1*の直接的制御を検出する系の構築を試みた。ルシフェラーゼをレポーターとして組み込んだコンストラクトを作成し、シロイヌナズナを用いた系を構築した。また、研究協力者のグループが同じコンストラクトを*F. vesca*に導入することにより、より直接的に*F. vesca*における*TFL1*の制御機構を明らかにすることが可能となった。

### (2) SOC1結合配列の網羅的探索に向けたクロマチン免疫沈降法の開発

SOC1タンパク質の結合配列を生体内でグローバルに解析するため、クロマチン免疫沈降法の開発を試みた。シロイヌナズナにおいて開発されたKaufman *et al.* (2010; *Nature Protocols* 5, 457-472)の手法を参照し、*F. vesca*におけるChIP-seq系の構築を行おうとしたが、*F. vesca*特有の2次代謝物によると思われるDNA抽出効率の悪さおよびホルムアルデヒド浸透効率がサンプル毎に異なることなどが原因と思われるサンプル間のばらつきが大きすぎるため、同手法によるタンパク質結合配列の網羅的解析は困難であると思われた。その後、同様に*F. vesca*における同手法の開発に携わっていたスペインマラガ大学のDr. D. Poseとの意見交換からも、早期にChIP-seqの手法を開発することは困難であることが予想されたため、SOC1の結合配列の探索は別の手法を用いることとした。

### (3) 薬剤処理による花成誘導遺伝子の発現調節

*F. vesca*における花成誘導機構にDNAおよびヒストンのメチル化が関与している可能性を検証するため、数種のメチル化阻害剤(コーヒー酸、ゲニステイン)、メチル化剤(プロカイン)および休眠打破剤(萌芽促進剤)として用いられているシアナミド剤を葉面に散布し、茎頂において発現している開花関連遺伝子の解析を行った。

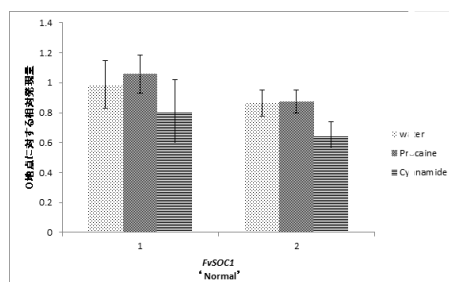


図2 プロカインおよびシアナミド剤処理による野生型*F. vesca* SOC1の発現量の変化

そのうち、図2および図3に示されるように、シアナミド剤を散布した試験区では、SOC1の発現量減少を伴わずにその下流遺伝子である*TFL1*の発現量が有意に低下することが明らかとなった。また、図4に示されるように、'Alta'系統においても同様の傾向がみられたことから、SOC1による*TFL1*の制御は未知の因子を介した間接的な制御である可能性、また、SOC1以外の因子による*TFL1*の制御の可能性が示唆された。また、この薬剤処理系は温度非依存的であるため、この系により、温度依存的な*TFL1*の発現制御機構

の解明が可能となった。

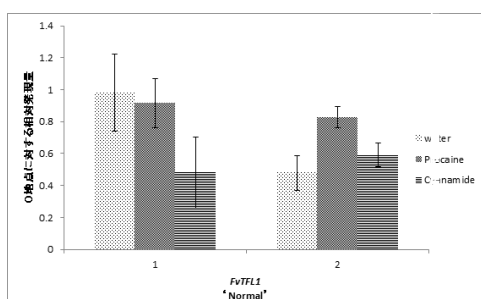


図 3 プロカインおよびシアナミド剤処理による野生型 *F. vesca* *TFL1* の発現量の変化

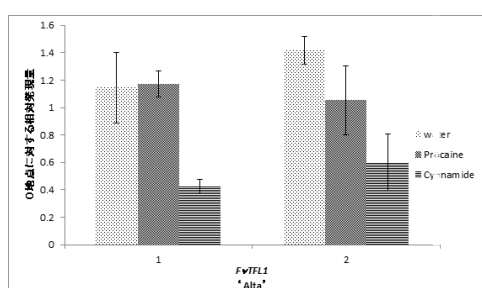


図 4 プロカインおよびシアナミド剤処理による *F. vesca* 'Alta' *TFL1* の発現量の変化

#### (4) *F. vesca* における RNA-seq データ解析手法の比較

ChIP-seq や RNA-seq 等、次世代シーケンサを利用した大量解析を行う手法は、モデル植物においてはスタンダードとなる解析手法が確立されつつあるが、必ずしも *Fragaria* 属において確立した手法があるとは言えない状況である。そこで公開されているゲノム情報を利用した、TopHat-Cufflinks によるリファレンスマッピングによる手法(一般的な手法)と、Trinity を利用した de novo アセンブルを行い、それに対して TopHat-Cufflinks を使用し、リードカウントを取得する手法の比較を行った。

	TopHat (手法1)	Trinity/TopHat (手法2)	手法によるトランスクリプトアセンブル (参考)
Average N of reads used (n=6)	37,526,898	37,526,898	26,666,662
Average N of reads mapped	28,479,713	36,478,617	25,539,890
Percentage of reads mapped	76.0%	94.6%	96.6%
N of Contigs to be mapped	8	60,966	1,968
N of DEG detected (FDR<0.05)	648	1,493/1,940	-

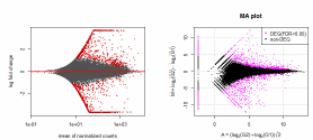


Figure MA plots generated by DeSeq2 (left) or edgeR (Right)

図 5 RNA-seq 解析手法の比較

その結果、Trinity を使用した解析手法の方が、マッピングの効率と、発現変動遺伝子 (DEG) の検出力に優れることが明らかとなった。一方で、コントロール実験として行ったモデルコケ植物ヒメツリガネゴケ (*P. patens*) の解析においては、TopHat を用いた手法でも十分なマッピング効率を得られていることから、今後、ゲノム情報の整備が進むことにより、*F. vesca* においても TopHat (Bowtie) を使用した一般的な解析手法が有効となることも考えられるが、それまでは得られたシーケンスデータ毎に Trinity を用いた系で解析を行う事が必要であると考えられた。また、リードカウントの統計処理に用いるプログラムパッケージについても、その種類により検出される DEG の数に大きな差が見られたことから、マッピング手法だけではなく、その後の解析手法においても、適切な手法を選択する必要がある事が示唆された。

#### (5) SELEX-seq 法による SOC1 結合 DNA 配列の探索

ChIP-seq 法による、SOC1 タンパク質の結合配列の網羅的解析が困難であることが予想されたため *in vitro* 系である SELEX-seq 法の系の構築を行った。

#### 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 3 件)

1. Samad, S., Kurokura, T., Koskela, E., Toivainen, T., Patel, V., Mouhu, K., Sargent, D. J., Hytönen, T. 2017. Additive QTLs on three chromosomes control flowering time in woodland strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Horticulture Research* **4**, 17020. 【査読有】
2. 黒倉 健. 2016. *Fragaria vesca* RNAseq 解析手法の比較. 2016. 園芸学研究 **15** 別 2, 431. 【査読無】
3. 寺崎万智子, 山根健治, 黒倉 健. 2016. シアナミド剤の散布が *F. vesca* 花成遺伝子の発現に及ぼす影響. 園芸学研究 **15** 別 1, 318. 【査読無】

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒倉 健 ( KUROKURA, Takeshi )

宇都宮大学・農学部・講師

研究者番号：10650898

(4)研究協力者

Timo Hytönen

Univ. Helsinki, Finland