

主論文の要約

本論文では、栽培イチゴにおける花芽分化機構解明と促成栽培への応用を目指して行った研究を報告している。栽培イチゴの旬は3月から5月であるが、出荷単価は一年の中で最も低い時期となる。そのため、イチゴの高収益化を目指し、通常の露地栽培であれば果実を収穫出来ず、出荷単価がピークとなる10月から11月にかけてイチゴを出荷する超促成栽培が行われている。この超促成栽培は本来ならば花芽をつけない長日高温期である7月に、暗幕と冷房を用いて人工的に短日と夜間低温環境を作り、花芽分化を8月上旬から中旬までにさせる栽培法である。花芽分化後は花芽と果実の発達のために高窒素環境である圃場に定植されるが、定植のタイミングが超促成栽培の問題点となっている。花芽分化前に定植すれば高温と長日、そして高窒素環境により花芽分化が抑制されて花芽分化が遅れ、早期出荷の失敗に繋がる。一方、花芽分化した後も短日低温、低窒素環境の育苗条件に置くと花芽発達が阻害され、イチゴの品質が低下してしまう。そのため、イチゴ花芽分化状況を知ることが超促成栽培では重要な課題となっている。現在の光学顕微鏡による花芽分化検定法は熟練を要することから、遺伝子やタンパク質診断による新たな検定法が求められている。しかしながら、栽培イチゴの花芽分化機構は未解明な点が多く、どの遺伝子が花芽分化と関連しているのか不明であった。そこで、シロイヌナズナ等で花芽分化に関わるとされる *FT/TFL1* ファミリー遺伝子群を栽培イチゴで解析し、イチゴの花芽分化機構の解明を目指した。実験材料には栽培イチゴ‘とちおとめ’と‘章姫’の最も若い展開葉とクラウンを用いた。

本論文での第二章では栽培イチゴにおける花芽分化関連遺伝子の同定と発現解析について述べた。栽培イチゴの cDNA から *FT* は 1 種類、*TFL1* は 3 種類クローニングされ、それぞれ *FaFT1*、*FaTFL1-1*、*FaTFL2*、*FaTFL3* と名付けた。クローニングされた 4 遺伝子の推定アミノ酸配列と他植物種の *FT/TFL1* ファミリーを用いて系統樹を作成したところ、*FaFT1* は *FT*、*FaTFLs* は *TFL1* のクレードに位置した。また、*FT/TFL1* の機能に関わるアミノ酸群も相同位置に保存されていたことから、*FaFT1* は花芽分化誘導機能を、*FaTFLs* は花芽分化抑制機能を持つと推測された。

花芽分化誘導機能を持つと推測された *FaFT1* の 4 時間毎の時間別発現解析を花芽分化誘導しない長日高温 5 日目と花芽分化誘導する短日夜冷 5 日目の葉で行ったところ、短日夜冷条件では *FaFT1* の発現が確認出来なかった。一方、長日高温では明期 8 時間目と、暗期直前となる明期 16 時間目に *FaFT1* の発現ピークが見られた。また、短日夜冷 0 日から 35 日目まで日別発現解析を行ったところ、長日条件でのみ *FaFT1* が発現し、短日夜冷条件では花芽分化前後を含め、*FaFT1* の発現は全く確認出来なかった。また、*FaFT2* および *FaFT3* についても同様に発現解析をおこなったが、長日高温条件、短日夜冷条件ともに発現が確認出来なかった。野生イチゴにおいて *FaFT2* のオルソログにあたる *FvFT2* はつぼみで発現していることが報告され、*FaFT3* のオルソログにあたる *FvFT3* は同様に発現が見られず、偽遺伝子として報告されている。

これらの結果から *FaFT1*、*FaFT2*、*FaFT3* は花芽分化と相関の見られない遺伝子と判断し、花芽分化抑制機能を持つ *FaTFLs* の発現解析を行った。

FaTFLs について経時的に日別発現解析を行ったところ、*FaTFL1-1* と *FaTFL3* は花芽分化する短日夜冷と花芽分化しない長日高温区の間で発現レベルに差が見られず、短日夜冷処理で花芽分化を確認した 35 日目の発現量と処理開始時の 0 日目の発現量に差が見られなかったことから、花芽分化と相関の見られない遺伝子と判断した。一方、*FaTFL2* は短日夜冷処理によって発現量が一度上昇した後低下していき、0 日目と比較して最初に花芽分化が確認された 30 日目の発現量が半減していた。また、長日高温区と比較しても発現量が低下しており、短日夜冷特異的かつ花芽分化初期に発現量の低下が見られることが示された。そして、花器官形成遺伝子である *FaAPI* が短日夜冷処理 35 日目に上昇しており、*FaTFL2* の発現低下は花器官形成遺伝子の発現上昇に先立って起こることが示唆された。これらの結果より、*FaTFL2* が花芽分化を制御する因子の 1 つであることが示唆された。また興味深いことに栽培イチゴでは短日夜冷処理で変化の見られなかった *FaTFL1-1* の野生イチゴオルソログにあたる *FvTFL1* は短日低温によって野生イチゴ内で発現量が減少することが報告されている。これらの結果より、栽培イチゴと野生イチゴでは花芽分化抑制に用いる *TFL1* が異なっていることが示唆された。原因として考えられることとして、野生イチゴは 2 倍体だが、栽培イチゴは倍数化と種間交雑を繰り返し 8 倍体となっているため、進化の過程でプロモーター領域が変化し、発現様式が変化した可能性が考えられた。

発現解析の結果花芽分化と相関が見られなかった *FaFT1* と *FaTFL1-1* のアミノ酸構造は機能性アミノ酸の部位で変異していなかったことから、何らかの異なる機能があるのではないかと考え、シロイヌナズナに形質導入し、機能解析を行うことにした。

第 3 章ではイチゴ *FaFT1*、*FaTFL1-1* 機能解析について述べた。*FaFT1* を野生型のシロイヌナズナに形質転換したところ、開花速度は内性の *FT* が存在する長日栽培条件、内性の *FT* が消失する短日栽培条件のどちらにおいても変化しなかった。一方、短日条件においてはエアリアルロゼットが形成され、茎成葉の増加が確認された。これらの結果から、*FaFT1* は花芽分化誘導ではない別の新奇機能を持つと推測された。芽の分化を変化させ、野生イチゴでは *FvFT1* が *SOC1* を介してランナー形成に関わることから、栽培イチゴの *FaFT1* も野生イチゴと同様に花芽分化誘導因子ではなく、ランナー形成に関わる因子であると考えられた。

FaTFL1-1 をシロイヌナズナの *TFL1* 変異体の *tfl1-2* に導入し相補実験を行ったところ、有限花序であった *tfl1-2* とは違い、無限花序が生じ、花器官の葉化、開花速度の遅延が確認された。これらの結果から、*FaTFL1-1* は花芽分化抑制機能を持つことが示唆された。前述の発現解析では *FaTFL1-1* は長日高温区と短日夜冷処理ともに恒常的に発現していたことから、短日夜冷で花芽分化することと矛盾が生じる。そこで、*FaTFLs* が発現部位で機能分化していると仮説を立て、クラウン先端 5mm を花芽分化する茎頂を含む頂部と定義し、先端と根を取り除いた残りのクラウンを基部と定義し発現解析を行った。その結果、*FaTFL1-1* は短日夜冷処理によって頂部では発現量が

低下するものの、基部では発現量が上昇していた。前述の日別発現解析では基部が含まれていたため、短日夜冷によって基部側で *FaTFL1-1* の発現量が上昇した結果、頂部で見られたはずだった *FaTFL1-1* の発現量低下がマスクされてしまい、恒常的に発現していたように見えたと考えられる。

また、短日条件であっても短日高温区では、頂部における *FaTFL1-1* の発現低下は短日夜冷区と比較して抑えられており、基部側では短日夜冷と比較して発現上昇は小さいが、0日目と比較して発現量が上昇していた。これらの結果から、短日が基部における *FaTFL1-1* の発現を誘導することが考えられ、低温によってさらに誘導されることが示唆された。

一方、*FaTFL2* は頂部と基部ともに短日夜冷処理によって発現量の低下が確認された。短日高温区での頂部は発現が微減しているが、短日夜冷区と比較して2倍ほどの発現量を示しており、短日に加えて低温が発現量を下げるのに関わっていることを示唆している。そして、基部側では発現量が0日目と変わらなかった。このことから、*FaTFL2* は短日だけだと頂部側で発現量が微減し、短日と低温に晒されることによってクラウン全体で発現量が低下するという温度応答性を持つことが示唆された。

これらの結果より、頂部では短日と低温を感知すると *FaTFL1-1*、*FaTFL2* の発現量が低下することによって、*FaTFLs* の総量が低下することで花芽分化の抑制が外れ、花芽分化が誘導可能な状態になると考えられる。そして、基部では短日を感知するとクラウンに存在するランナー芽や脇芽が花芽とならないように *FaTFL1-1* の発現量が上昇し、低温によってさらに上昇することで花芽分化を抑制し、クラウンの未分化性を維持することで次の栄養成長期に備えていると考えられる。*FaTFL2* は短日で発現量が大きく変わらず、低温によって低下することから、短日低温におけるランナー芽の維持は主に *FaTFL1-1* によってなされていると考えられた。

花芽分化指標として *FaTFLs* を用いる場合、*FaTFL1-1* は基部も含まれると発現量の減少が見られなくなるため、サンプリング部位を頂部に限定する必要があるが扱いにくい、*FaTFL2* はクラウン全体をサンプリングすれば良いため *FaTFL1-1* と比較してサンプリングが簡便であることから、*FaTFL2* が花芽分化指標として適していると考えられた。

発現解析と機能解析の結果より、花芽分化を誘導する因子は FT/TFL1 ファミリーから見つけることが出来なかった。花芽分化誘導を担う候補としては、時計遺伝子、FT/TFL1 と複合体を形成する FD や新奇タンパク質、糖シグナル経路、アブシジン酸とサイトカイニンで誘導される遺伝子群が挙げられる。第1の時計遺伝子は栽培イチゴが短日に応答し花芽分化することから、FT/TFL1 を介さず時計遺伝子が直接 *AP1* などの花器官形成遺伝子を誘導すれば、日長応答性があってもシロイヌナズナのように FT を介さない花芽分化誘導が可能であるためである。第2の複合体を挙げた根拠としては栽培イチゴにおける *FaFD* がシロイヌナズナと比較して、推定アミノ酸配列

が 60 アミノ酸ほど短いこと、14-3-3 結合ドメインにアミノ酸置換が入っていたことから FT/TFL1 との複合体形成せずとも、単独で機能する可能性や未知のタンパク質と複合体を作る可能性が考えられる。また、FD 以外にもシロイヌナズナでは BRC1 と名付けられた転写因子と FT が結合することが報告されたことから、未知のタンパク質が花芽分化誘導の機能を有していることが考えられる。第 3 の糖シグナル経路を挙げた理由としては栽培イチゴが短日と低温を花芽分化条件として要求するためである。長日高温と短日低温では日長の違いにより、光合成活性産物の量に変化する可能性が考えられる。また低温は呼吸量を変化させると考えられ、光合成産物の代謝量に変化している可能性が考えられる上に、短日と低温がランナーの伸長を抑制するため、クラウン内部における転流様式も変化することが考えられる。これらの可能性からクラウン頂部や葉における糖含量を測定すると花芽分化との相関が見られる可能性がある。その際に糖シグナル経路に存在する遺伝子が特異的な挙動を示す可能性があり、同定が出来れば花芽分化指標のポジティブマーカーとして有用な候補となりうると考えられる。第 4 に ABA とサイトカイニン候補としてあげた理由は、ABA の葉面施与が栽培イチゴの高温期での発根に影響を与えた報告があるためである (Yaoko et al. 2009) 。高温期におけるランナーの発根は 2 日間 5℃ の低温処理によって良く誘導されるが、ABA 処理によっても低温処理と同等の発根を誘導したことから、ABA が低温処理のシグナルを担うことが示唆された。2 つめの根拠として栽培イチゴにおいてサイトカイニン量が花芽分化直前に上昇し、一度減少するものの花器官形成時に再度上昇することと、ABA 施与によって花芽分化が一週間ほど早まる際には、サイトカイニンの増加が見られることが報告されている (Tomonori et al. 1993) 。さらにこの報告では ABA 処理によってジベレリンとオーキシンの量が減少したことも報告されており、ABA が花芽分化を抑制するジベレリンの抑制系として働くこと、器官形成に必要な細胞分裂を促すサイトカイニンを増加させたことから、ABA とサイトカイニンによって誘導される遺伝子にポジティブレギュレーターが存在する可能性を示唆している。ただし、内性 ABA は花芽分化時期に進むにつれ減少し花器官形成後に再度上昇するのに対して、サイトカイニンは花芽分化前に一度上昇し、花芽分化時に一度低下してから、花器官形成時に再度上昇すると報告されているため、ABA とサイトカイニンは互いに誘導しあうクロストーク経路が存在する可能性があり、経路は非常に複雑であることが予想される。ヘキソキナーゼによる糖シグナル経路は ABA の生合成経路の上流に位置し、ABA 合成酵素である *ABA2* や *ABA3* の転写を制御しているとシロイヌナズナで報告されていることと (Filip et al. 2002) 、栽培イチゴの果実成熟には ABA が関わっていてグルコースによって ABA が誘導されることも報告されていることから (Haifeng et al. 2013) 、糖シグナルによる経路と ABA、サイトカイニンによる経路はイチゴの中で繋がっている可能性が考えられる。これらの報告からイチゴにおいては ABA やサイトカイニンが花芽分化のポジティブレギュレーターを誘導することが考えられる。

第4章では本研究で得られた結果をもとに、イチゴ促成栽培技術への応用の題目のもと、*FaTFL2*の発現様式を花芽分化の指標とし、促成栽培への応用を目指した。栽培イチゴは気温と日長によって花芽分化が決定されており、25℃以上では日長にかかわらず花芽分化せず、15℃から25℃の間では短日条件のみで花芽分化し、15℃以下では日長にかかわらず花芽分化する。このように花芽分化条件が複雑なため、花芽分化指標として*FaTFL2*が様々な温度、日長条件で使えるかを検証したところ、8時間明期16時間暗期25℃一定条件でも花芽分化し、*FaTFL2*発現量は低下していることを見出した。そこで花芽分化の新条件として、短日夜冷処理の時間を16時間から8時間に半減した短日夜冷半減区を設定し、花芽分化の時期と*FaTFL2*の発現量の変化が短日夜冷区と同等であるかを確かめた。その結果、人工気象器の中では短日夜冷区と半減区の違いに花芽分化速度に差は無く、*FaTFL2*の発現様式もほぼ一致していた。一方、処理0日目や花芽分化を確認出来なかった明期30℃/暗期25℃に設定された短日高温区では、短日夜冷区と半減区に比べて*FaTFL2*の発現量が高かった。人工気象器内で見られた短日夜冷区の発現低下は野外で実施した短日夜冷区よりも早く見られたため、30℃を超える外気温が低温による*FaTFL2*発現低下を抑制する可能性が考えられたが、低温に対する応答性は夜冷時間を短くしても維持されたことから、短日夜冷処理の時間を野外でも半減できる可能性が示唆された。

本研究では、多くの植物で花芽分化誘導に関わる*FT*の栽培イチゴにおけるホモログである*FaFT1*が花芽分化誘導に関わっておらず、ランナー形成に関わる可能性があることを示し、花芽分化時に茎頂を含むクラウン全体で発現が低下し、花芽分化の指標となることが期待される*FaTFL2*を見出した。また、*FaTFL1-1*のクラウン頂部における発現量の低下も花芽分化誘導に寄与している可能性を示唆し、クラウン基部での短日低温による発現上昇はランナー芽の花芽分化を抑制していると考えられた。さらに、得られた花芽分化機構の情報から、現行の短日夜冷による超促成栽培法を改良しうることを示した。