

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	HSIANG Tzu-Fan
論文題目	Molecular and genetic basis of bud dormancy regulation in Japanese apricot (<i>Prunus mume</i>) (ウメ (<i>Prunus mume</i>) 越冬芽における休眠制御に関する分子生物学的・遺伝学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ウメをはじめとした温帯落葉性果樹にみられる越冬芽の休眠は、植物が冬の極寒期を生き延び、春に生長を再開するために発達させてきた環境適応機構である。越冬芽の休眠覚醒には、遺伝的に決定されている一定量の低温に遭遇する必要がある、これを低温要求性とよぶ。低温要求が満たされた後、ある一定量の高温に遭遇すると萌芽し開花に至るが、これを高温要求性とよぶ。これまでの研究により、ウメをはじめとするサクラ属果樹の休眠ならびに温度要求性には植物ホルモンレベルの変動やDORMANCY-ASSOCIATED MADS-box (DAM) の発現変動が関連していることが示されているが、それらが相互にどのように関わって機能して休眠を制御しているのかについてはほとんど明らかにされていなかった。またウメの休眠打破を制御するゲノム領域に関する情報も皆無であった。本研究では、ウメを材料にして、休眠制御因子と考えられているアブシシン酸 (ABA) をはじめとした植物ホルモンおよびDAM遺伝子群のひとつであるPmDAM6が関与する越冬芽における休眠制御の分子機構を明らかにした。加えて、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施し、休眠を制御するゲノム領域と遺伝要因を探索した。</p> <p>第1章では、ウメの栄養芽および花芽における内生ABAレベルを調査し、ABA内生量の減少がウメの休眠覚醒と関連することを確認した。次いで、mRNA-seq解析により、ABA生合成の鍵となる9-cis-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE (NCED) とABAのシグナル伝達に関与するABA RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR 2,3 (ABF2,3)の転写レベルが多低温要求性の‘南高’で高く、またこれらの転写レベルの変化が内生ABAレベルの消長とよく呼応していることを明らかにした。さらに栄養芽と花芽における低温要求量の違いには、内生ABAレベルならびにNCEDとABFの転写レベルの差異が関連することも明らかにした。一方、ABAとABA阻害剤であるフルリドンのウメへの外生的な処理により、ABAがPmDAM6の転写を制御している可能性を示した。以上のことから、NCED-ABA-ABF-DAMはウメの休眠と低温要求性を制御する中心的な因子・経路であることが示唆された。</p> <p>第2章では、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモータに制御されたPmDAM6を導入したリンゴ (<i>Malus × domestica</i>) (35S:PmDAM6) ならびにDEX誘導型のPmDAM6を導入したリンゴ、および多低温要求性と少低温要求性のウメ2品種の mRNA-seq 解析を行い、休眠芽における PmDAM6 の機能を解明した。先行研究により、野生型と比較して35S:PmDAM6の休眠芽ではサイトカイニン (CK) 内生量が低いことが明らかになっている。CK代謝遺伝子を解析し、形質転換体ではCK分解に関わるCYTOKININ DEHYDROGENASE (CKX) のmRNAの転写レベルが高く制御されていることを明らかにした。またポプラの休眠に密接に関与するジベレリン (GA) 代謝遺伝子の解析も行い、形質転換体ではGA分解に関わるGA 2-OXIDASE (GA2ox) の転写レベルが野生型より高く制御されていることも明らかにした。さらに本章では休眠中の頂端分裂組織の細胞構造の透過型電子顕微鏡による観察も行った。野生型と比較して、形質転換体は休眠期の分裂組織に</p>			

より多くのリピッドボディー（油滴、脂質滴）を蓄積していた。また細胞密度は低かった。同様の傾向は多低温要求性の‘南高’を少低温要求性の‘二青梅’と比較した場合にもみられた。mRNA-seq解析によって、PmDAM6は休眠中に脂質分解酵素をコードする*GDSL ESTERASE/LIPASEs*や細胞周期タンパク質をコードする*CYCLINs*を下方制御する可能性を明らかにした。これら遺伝子がPmDAM6の制御下にあることは、DEX誘導型のPmDAM6形質転換体を用いた解析でも支持された。以上、本章で得られた結果より、PmDAM6は活性型CKとGA含量の低下を誘導し、細胞分裂を抑制し、細胞内へのリピッドボディーの蓄積を促す機能をもつと考えられた。さらに、それらの機能制御におけるPmDAM6の役割についても明らかにした。

第3章では、「日本グループ」と「台湾グループ」のウメ117品種を用いて、6種類の休眠関連形質（萌芽日、開花日、栄養芽と花芽の低温要求量と高温要求量）に関するGWASを実施した。少なくとも2つの異なる年度で、表現型を調査した。その結果、1番染色体、2番染色体、7番染色体のそれぞれ1つの遺伝子座が、調査年に関わらず一貫して栄養芽の低温要求量の制御に関わることを明らかにした。他の休眠関連形質に関連する遺伝子座は調査年度で一貫して検出されなかったが、DAMはそれぞれ、葉芽の高温要求量と花芽の低温要求量に関連する遺伝子座上およびその近傍に同定された。さらに、ABAトランスポーターとシロイヌナズナの開花関連遺伝子のオルソログが花芽の低温要求量に関連する遺伝子座に位置していた。これらの結果は、第1章や第2章で示されたDAMや内生植物ホルモンレベルの制御を通じた休眠制御機構の存在を支持するものであると同時に、ウメにおいて初めて休眠打破関連形質を支配するゲノム領域を明らかにしたものである。

以上のとおり、本研究は、ウメにおけるABAとDAMsが関与する越冬芽休眠制御経路の分子機構の一端を明らかにした。また、休眠打破に関連するゲノム領域を初めて同定し、今後のウメの育種に利用可能な貴重な情報を提供した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

近年の気候変動は、ウメを含む広範囲の温帯落葉果樹において、越冬芽の低温要求量や高温要求量の蓄積、すなわち休眠覚醒や発芽と開花に大きく影響を及ぼしている。将来にわたって安定した果実生産を続けるためには休眠制御機構を理解することが急務である。本研究では、バラ科果樹やポプラの越冬芽の休眠制御への関与が指摘されている*DAM*や植物ホルモンに着目して、分子生物学的・遺伝学的な研究を進め、ウメ越冬芽の休眠制御機能に関する新たな知見を獲得している。評価すべき点は以下の通りである。

1. 越冬芽の休眠覚醒において内生ABAレベルが低下することは知られていたが、その背景にある分子機構に関する知見は十分ではなかった。本研究では、ABA生合成の律速酵素をコードする*NCED*の転写レベルの低下が内生ABAレベルの低下要因となっていることを明らかにした。またバラ科果樹の休眠制御因子と考えられている*DAM*の発現が内生ABAレベルによって制御されていることも明らかにした。すなわち、*NCED*によって制御される内生ABAレベルの増減によって*DAM*の発現制御が行われ、結果として休眠の制御が行われている可能性が示された。

2. *DAM*の機能に関する知見は限られている。本研究では、*DAM*の過剰発現体や薬剤誘導型*DAM*を導入した形質転換体の越冬芽を用いて、*DAM*がCKやGAの不活化を誘導すると同時に細胞分裂を抑制し、さらに脂質蓄積を誘導することを明らかにした。*DAM*による脂質代謝制御に関する知見は、本研究によって初めて得られたものである。

3. GWASにより、ウメの休眠関連形質を支配する複数のゲノム領域が初めて明らかにされた。それらゲノム領域のうちひとつは、*DAM*が座乗する領域であった。*DAM*の越冬芽休眠制御に果たす機能については議論が分かれていたが、本研究によって*DAM*がウメの休眠を制御する重要な遺伝子であることが明確になった。GWASによって休眠関連形質を支配するゲノム領域が同定され、また*DAM*の休眠への関与が明確にされたことは、これらを標的とした休眠形質に関する分子育種が可能であることを示すものである。

以上のように、本研究は、ウメを材料に温帯落葉果樹の休眠制御の分子機構を明らかにし、新たな基礎知見を提供した。さらに休眠関連形質を支配するゲノム領域を同定し、また*DAM*の休眠への関与を明確にした。これらの知見は、園芸産業の発展に寄与するのみならず、果樹園芸学、植物遺伝学、植物生理学の発展にも寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和5年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに

掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）