

氏名（本籍）	齋藤 隆徳（栃木県）		
学位の種類	博 士（ 農学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6967 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Mechanism for Endodormancy Phase Transition in Japanese Pear (ニホンナシの自発休眠の分子機構に関する研究)		
主査	筑波大学教授（連係大学院）	博士（農学）	森口卓哉
副査	筑波大学教授（連係大学院）	博士（農学）	山本俊哉
副査	筑波大学准教授（連係大学院）	理学博士	池谷祐幸
副査	筑波大学教授	博士（理学）	菅谷純子

論 文 の 要 旨

ニホンナシを含む落葉果樹では、冬季の厳しい環境下では自発休眠という生理的状态に入る。自発休眠から覚醒するためには冬季に一定量の低温（低温要求量）に遭遇する必要がある、その低温要求量は遺伝的に制御されており樹種や品種によって異なる。近年、温暖化に伴い、西南地域のナシの産地では低温不足が一因と考えられる花芽の萌芽不良が栽培現場で問題となっている。そこで、このような問題に対処する栽培技術を開発するためにも自発休眠機構の解明は必要である。

本研究ではまず自発休眠に関与する遺伝子である *dormancy-associated MADS-box (DAM)* 遺伝子のホモログとして *PpMADS13-1*, *PpMADS13-2* および *PpMADS13-3* をニホンナシ‘幸水’から単離し、葉芽における休眠期間中の発現パターンを調べた。*PpMADS13-1* と *-2* の発現は自発休眠の導入に伴い上昇し、自発休眠覚醒に向かって低下した。休眠打破剤（シアナミド）処理によって自発休眠覚醒を促進した‘幸水’葉芽では対照区（水）の葉芽と比較して早期に *PpMADS13* の発現が低下した。さらに、秋季にポット植えた‘幸水’を 25℃、自然日長下で育成して自発休眠導入を阻害したところ、短日下にもかかわらず *PpMADS13* の発現は上昇しなかった。このことはニホンナシの自発休眠は主に低温によって制御されていることを示唆している。以上の実験から、*PpMADS13* の発現はニホンナシの自発休眠相の変化と密接に関連していることが明らかとなった。さらに‘幸水’と少低温要求性タイワンナシ TP-85-119（‘横山梨’）の *PpMADS13-1* の発現パターンを比較したところ、‘横山梨’では‘幸水’よりも早期に *PpMADS13-1* の発現が低下したことから、*PpMADS13-1* の発現低下が起こるタイミングと低温要求量が一致する可能性が示唆された。‘幸水’と‘横山梨’のゲノム構造を比較したところ、‘横山梨’ゲノムの第一イントロンに 2,317 bp の挿入があり、この挿入が‘横山梨’の少低温要求性を特徴付けている可能性が示唆されたが、低温要求量の異なる 9 品種・系統を供し、*PpMADS13-1* イントロンの挿入の有無と低温要求量の多少について調査したが関係性を見出すことはできなかった。

次に *PpMADS13-1* の制御機構に関する知見を得るべく、プロモーター領域の DNA メチル化を調べた。休眠覚醒に伴ってメチル化の上昇が期待されたがその可能性は否定された。一方、ゲノム領域におけるヒストンメチル化状態を調べたところ、自発休眠の覚醒に向けてヒストン H3 の 4 番リジンのトリメチル化の減少がみられたが、ヒストン H3 の 27 番リジンのトリメチル化は自発休眠期を通じてほとんど変化はしなかった。さらに、*PpMADS13-1* の低下に伴い、ヒストン H2A の変異体であるヒストン H2A.Z が減少した。したがってヒストン H3 の 4 番リジンのトリメチル化およびヒストン変異体 H2A.Z の減少によって *PpMADS13-1* の低下が引き起こされ、自発休眠の覚醒に至ることが推察された。続いて *PpMADS13-1* を中

心としたシグナル伝達に着目した。*PpMADS13-1* の 5'上流領域を解析したところ C-repeated binding factor (CBF) タンパクが結合する箇所を見出した。そこで *PpMADS13-1* とニホンナシ CBF (PpCBF2) タンパクの関係性について transient reporter assay ならびに chromatin immunoprecipitation 法により解析したところ、PpCBF2 タンパクが *PpMADS13-1* の 5'上流領域に結合し、その発現を正に制御することが明らかとなった。さらに PpMADS13-1 タンパクとその下流遺伝子の候補である *FLOWERING LOCUS T (FT)* との関係についても調べたところ、ニホンナシ *FT (PpFT1a)* の 5'上流領域に MADS-box タンパク結合箇所を見出したものの、PpMADS13-1 タンパクの *PpFT1a* の 5'上流領域への結合および *PpFT1a* の発現への影響は認められなかった。

本研究において、*PpMADS13* がニホンナシの自発休眠現象に深くかかわっていること、*PpMADS13* の発現制御は少なくともヒストン修飾や上流の転写因子である PpCBF2 を介して行われていることを明らかにしたことは世界的にも評価される成果であり、将来的に自発休眠機構の全体像を解明するに当たり、基盤的な情報となる。

審 査 の 要 旨

本論文は、*dormancy-associated MADS-box* 遺伝子に着目してニホンナシの自発休眠機構の解明を試みたもので、1) *PpMADS13* の発現パターンがニホンナシの自発休眠相の変化に対応していること、2) ‘横山梨’の *PpMADS13-1* の第一イントロンの 2,317 bp の挿入は低温要求性とは関係していないこと、3) ‘幸水’の *PpMADS13-1* の自発休眠中・後のメチル化やヒストン修飾の解析から、ヒストン H3 の 4 番リジンのトリメチル化の減少とヒストン H2A の変異体であるヒストン H2A.Z の減少が休眠覚醒に伴う *PpMADS13-1* の発現低下に関わっていること、4) *PpMADS13-1* の発現が CBF を介して制御されていること、5) PpMADS13-1 は *FT* の発現を制御していないことなど、いずれも画期的な成果・知見である。特筆すべきは、モモや leafy spurge の *DAM* の発現低下への関与が示唆されているヒストン H3 の 27 番リジンのトリメチル化の休眠覚醒に伴う増大が、ニホンナシ‘幸水’では認められず、代わってヒストン H2A の変異体であるヒストン H2A.Z の減少が関与している可能性を示唆するとともに、これまで実験的な証拠のなかった *DAM (PpMADS13-1)* と CBF の関係、PpMADS13-1 と *FT* の関係をそれぞれ明確に示したことである。これらは、園芸学のみならず、植物生理学や分子生物学にも貢献する新規性の高い学際的な成果であると評価できる。

平成26年1月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。