

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380024

研究課題名(和文) カーネーションを用いたエチレン主導型老化花きの分子機構の研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ethylene-induced senescence in carnation flowers

研究代表者

佐藤 茂 (SATO SHIGERU)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40108428

研究成果の概要(和文)：

エチレン主導型老化花きであるカーネーションの開花と老化の分子機構を明らかにする研究を行い、主に以下の3点の成果を得た。

(1) 開花花弁細胞において発現が特異的に変化する遺伝子の解析を行い、花弁の伸長と展開時に特異的に発現する遺伝子群を明らかにした。これらの遺伝子群には、転写、シグナル伝達、細胞壁代謝、脂質代謝、輸送に関わる遺伝子が含まれていた。さらに、4種類のキシログルコシル転移酵素/加水分解酵素(XTH)遺伝子、3種類のエクспанシン(EXP)遺伝子、1種のスクロース合成酵素遺伝子(*DcSUS1*)を単離し、花弁の伸長成長と展開成長時における発現特性を明らかにした。

(2) カーネーションのACC合成酵素遺伝子(*DcACSI*)に、イントロンの構造(塩基配列)が異なる2つの遺伝子(genomic DNA, *DcACSIa* と *DcACSIb*)が存在することを明らかにした。*DcACSIa* と *DcACSIb*のプロモーター領域を含むゲノムDNAをAgrobacterium法によって導入した遺伝子組み換えタバコを作出した。この遺伝子組み換えタバコの解析は、クリマクテリック型エチレン生成の成立を解明する手掛かりを与えることが期待される。

(3) 花弁老化時に発現が低下する遺伝子としてglycine-rich RNA binding protein遺伝子(*DcGRPI*)を取得し、この遺伝子のプロモーター領域にエチレン応答配列(ERE)が存在することを明らかにした。これによって、プロモーター領域にEREをもち発現が増加するシステインプロテアーゼ1遺伝子(*CPase1*)との比較解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)：

In this research project, we have investigated the molecular mechanism of flowering and senescence of carnation flower, which is a typical ornamental showing ethylene-dependent senescence, and obtained the following results.

(1) We revealed several groups of genes which are up- or down-regulated in petal cells during flower opening by a suppressive subtractive hybridization technique. The putative functions of the translational products were classified into several categories including transcription, signaling, cell wall modification, lipid metabolism, and transport. Furthermore, four cDNAs encoding xyloglucantransglucosylase/hydrolase, three cDNAs encoding expansin and a cDNA encoding sucrose synthase were cloned from petals of opening carnation flowers. Real-time RT-PCR analyses revealed that respective genes are differently expressed during petal development (elongation, expansion and outward-bending), indicating regulated expression of these genes during this process.

(2) We revealed the presence of two genes of an ACC synthase (*DcACSI*), designated as *DcACSIa* and *DcACSIb* in the genome of 'Light Pink Barbara' carnation for the first time. They differ mainly in the nucleotide sequences of introns. Moreover, we cloned genomic DNAs of these genes, including their promoter region, and introduced them into tobacco plants. In the near future, it will be possible to see whether these genes will induce climacteric ethylene production in tobacco flowers undergoing senescence.

(3) We discovered a gene encoding glycine-rich RNA binding protein (*DgGRPI*), which has an ethylene

response element (ERE) in its promoter and is down-regulated during carnation flower senescence. This gene will be analyzed in the near future by comparing with cysteine proteinase 1 (*DcCPI*) gene, which has an ERE in its promoter but up-regulated during flower senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花き園芸学，カーネーション，開花，花卉細胞の成長，クリマクテリック型エチレン生成，花の老化と萎れ

### 1. 研究開始当初の背景

園芸花きのなかで重要なグループを構成する「老化にエチレンが主導的な役割を果たす花き(以下、エチレン主導型老化花き)」について、クリマクテリック型エチレン生成の成立、およびエチレンに誘導される老化、観賞期間の延長に関わる開花の分子機構の解明が求められていた。これらの解明によって、花きの開花と老化の基礎研究の進展、および高品質花きの作出と鮮度保持技術開発の応用研究の発展が期待されていた。

### 2. 研究の目的

エチレン主導型老化花きであるカーネーションを用いて、以下の3項目に焦点を当てた研究を行う。

(1) 開花花卉細胞において発現が特異的に変化する遺伝子の解析を行って、花卉の伸長と展開時に特異的に発現する遺伝子を明らかにする。この結果から、次世代型高品質花き「ゆっくり咲く花」の作出の標的遺伝子を提案する。

(2) カーネーションの ACC 合成酵素ゲノム DNA をタバコに導入する実験を行い、クリマクテリック型エチレン生成の成立を解明する。

(3) 花卉のエチレン依存性老化(萎れ, wilting)と非依存老化(萎縮, fading)の過

程で発現する遺伝子を比較し、エチレン主導型老化(萎れ)の花卉細胞崩壊に特異的に機能する分子機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 「ゆっくり咲く花の作出」を目指した、花卉の伸長と展開時に特異的に発現する遺伝子の研究

・花卉の伸長成長と展開成長時に、特異的に発現が変化する遺伝子群の網羅的解析を行う。サブトラクション法によって、開花ステージ1(花卉伸長初期)およびステージ5(花卉展開期)で発現が増加する遺伝子断片を取得する。得られた遺伝子群について塩基配列の決定とデータベースとの照合を行い、遺伝子の特定を行う。その後、花卉の伸張・展開と関連する可能性がある遺伝子について発現解析を行う。発現解析は、ノザンプロット法とreal-time RT-PCR法を併用して行う。

・キソグロルカンゲルコシル転移酵素/加水分解酵素(XTH)遺伝子(*DcXTHs*)、およびスクロース合成酵素遺伝子(*DcSUS1*)をクローニングして構造を明らかにする。さらに、花卉の伸長成長と展開成長時における発現解析を行い、発現特性を明らかにする。

## (2) クリマクテリック型エチレン生成・クリマクテリック型花きの成立の研究

・ACC合成酵素遺伝子(*DcACSI*)の獲得と機能が、クリマクテリック型エチレン生成・花き成立の第一義的要因であることを明らかにするため、カーネーションからこの遺伝子のプロモーターを単離し構造解析する。

・本酵素のゲノム(genomic) *DcACSI* 遺伝子をタバコに導入するためのコンストラクトを作成する。Agrobacterium法によってコンストラクトをタバコに導入し育成・開花させて花のエチレン生成と老化の性質を解析する。得られた遺伝子組み換えタバコのエチレン生成を調査する。

## (3) 花弁のエチレン依存性老化(萎れ, wilting)と非依存老化(萎縮, fading)の比較研究

・花弁のエチレン依存性老化(萎れ, wilting)と非依存老化(萎縮, fading)を比較して、花弁細胞の分解・崩壊過程における加水分解酵素群遺伝子の特異的発現を解析する。今までに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、システインプロテアーゼ1(CPase1)、遺伝子の両過程における発現の際を見出しているのをさらに確認する。

・老化時に発現が増加する遺伝子、発現が変化しない遺伝子、発現が変化しない遺伝子の発現を、これら遺伝子のプロモーター領域に含まれるエチレン応答配列(ERE)の機能と関連させて解析する。そのために、システインプロテアーゼ1(CPase1)遺伝子、同2遺伝子、および glycine-rich RNA binding protein 遺伝子を比較解析する。これから花弁老化関連遺伝子群の発現調節におけるEREの関与の違いとエチレンシグナル伝達の違いを考察する手がかりを得る。

## 4. 研究成果

### (1) 花弁の伸長と展開時に特異的に発現する遺伝子の研究

・開花花弁細胞で発現が変化する遺伝子を、サブトラクション法によって多数取得した。このうちの1000個について、塩基配列の決定を行った。この遺伝子群の中から、開花ステージ1(花弁伸長初期)およびステージ5(花弁展開期)で発現が増加する遺伝子断片をそれぞれ43, 44種単離し、相同性検索により機能を推定した。さらに、花弁伸長期と花弁展開期に特に発現量の変化が大きい遺伝子を、それぞれ6個ずつ選び、real-time PCRにより発現を解析した。これらの解析では、転写、シグナル伝達、細胞壁合成、脂質代謝、輸送に関

わる遺伝子が明らかにされた。特に新規性のある遺伝子群としてとして脂質合成(長鎖脂肪酸)に関わる遺伝子群が明らかにされた。この知見は、開花時の花弁成長におけるククラ合成の重要性を推定させた。本研究をとおして、花弁細胞の展開伸長に密接に関与する遺伝子群を明らかにした。

・キノログルコシル転移酵素/加水分解酵素(XTH) 遺伝子を4種(*DcXTH1, 2, 3, 4*), エクспанシン遺伝子を3種(*DcEXPI, 2, 3*), さらに1種類のスクロース合成酵素遺伝子(*DcSUSI*)をクローニングして、構造を明らかにした。これらの遺伝子について、花弁の伸長成長と展開成長時における発現特性を明らかにした。XTHについては*DcXTH2, 3*が、エクспанシンは*DcEXP2*が花弁成長に主に関わることが示唆された。また*DcSUSI*は花弁成長の全時期を通じて高い発現をしていた。これらの結果から、XTH遺伝子とSUS遺伝子を「ゆっくり咲く花」作出のための技術開発の標的にできることを明らかにした。

### (2) クリマクテリック型エチレン生成・クリマクテリック型花きの成立の研究

・カーネーション花弁からクリマクテリック型エチレン生成に関与するACC合成酵素遺伝子(*DcACSI*)のゲノムDNAをクローニングし構造を解析した。構造遺伝子は5つのエクソンと4つのイントロンからなること、1000bpのプロモーター領域の中にエチレン応答配列(ERE)が存在することを明らかにした。

・この過程で、*DcACSI*にはイントロンの構造(塩基配列)が異なる2つの遺伝子(genomic DNA), *DcACSIa*と*DcACSIb*が存在することを明らかにした。さらに、カーネーション品種は*DcACSIa*と*DcACSIb*の両方を持つものと*DcACSIa*しかもないものがあること、および2つの遺伝子の起源をカーネーション以外のDianthus属植物のACC合成酵素遺伝子と関連づけて推定できることを明らかにした。カーネーションのACC合成酵素遺伝子の研究に新しい視点を提供し、今後の興味深い研究の展開を示唆した。

・取得したACC合成酵素遺伝子(*DcACSIa*と*DcACSIb*)のプロモーター領域を含むゲノムDNAを元にしてコンストラクトを作成し、Agrobacterium法によってタバコに導入し、遺伝子組み換えタバコを作成し、現在育成中である。今後、T1種子を大量に取得して、個体を栽培・開花させ、花のエチレン生成がクリマクテリック型に形質転換するか否かを検討する。

### (3) 花弁のエチレン依存性老化(萎れ, wilting)と非依存老化(萎縮, fading)の比較研究

・エチレン誘導性老化時の、花弁細胞の分解・崩壊の制御に関与する転写因子 glycine-rich RNA binding protein 遺伝子 (*DcGRPI*) をクローニングし構造を解析した。 *DcGRPI* 遺伝子のプロモーター領域に エチレン応答性因子 (ERE) が存在することを見いだした。 *DcGRPI* は花弁老化時に発現が減少する。 これによって、ERE を持ち花弁老化時に発現が増加する *DcCPI* 遺伝子、および ERE をもたず発現が変化しない *DcCP2* 遺伝子との比較発現解析を行う準備が整った。

・花弁のエチレン依存性・非依存老化花弁における、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、システインプロテアーゼ (CPase1)、ヌクレアーゼ遺伝子の発現の違いを再確認した。

#### 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 8 件)

- (1) Harada, T., Torii, Y., Morita, S., Masumura, T. and Satoh, S. (2010) Differential expression of genes identified by suppression subtractive hybridization in petals of opening carnation flowers. *Journal of Experimental Botany* 61: 2345-2354 (査読有)
- (2) Iordachescu, M., Bowman, H., Sasaki, K., Imai, R., Satoh, S. and Verlinden, S. (2009) Subcellular localization and changes in mRNA abundance of CEBP, a nuclear-encoded chloroplast protein, during flower development and senescence. *Journal of Plant Biology* 52(5):365-373 (査読有)
- (3) Inokuma, T., Kinouchi, T. and Satoh, S. (2008) Reduced ethylene production in transgenic carnations transformed with ACC oxidase cDNA in sense orientation. *Journal of Applied Horticulture* 10(1): 3-7 (査読有)
- (4) Ebrahimzadeh, A., Jiménez, S., Teixeira da Silva, J., Satoh, S., Lao M.T. (2008) Post-harvest physiology of cut carnation flowers. *Fresh Produce* 2(2): 56-71 (査読有)
- (5) Satoh, S., Suetome, N., Namura, S. and Kuwabara, H. (2008) Prolonged vase life of *Dianthus superbus* by 2-aminoisobutyric acid and *cis*-propenylboric acid. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 2(1): 5-8 (査読有)
- (6) Tanase, K., Onozaki, T., Satoh, S.,

Shibata, M. and Ichimura, K. (2008) Differential expression levels of ethylene biosynthesis pathway genes during senescence of long-lived carnation cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 47: 210-217 (査読有)

(7) Otsu, S., Satoh, S. and Kosugi, Y. (2007) Expression of senescence related genes in carnation petals undergoing wilting and fading. *Acta Horticulturae* 763: 283-287 (査読有)

(8) Kosugi, Y., Matsui, T. and Satoh, S. (2007) Expression characteristics of two cysteine proteinase genes in petals of carnation flower. *Acta Horticulturae* 763:289-294 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 佐藤茂. カーネーションの老化誘導におけるエチレンの分子機構の解析と利用に関する研究 (園芸学会賞受賞講演). 平成 22 年度園芸学会春季大会. 2010 年 3 月 20 日. 日本大学湘南キャンパス.
- (2) 佐藤茂. カーネーションの開花と老化の分子機構 (招待講演). 香川園芸研究協議会平成 21 年度第 2 回例会. 2010 年 1 月 28 日. 香川大学農学部
- (3) 原田太郎, 鳥居由佳, 森田重人, 増村威宏, 佐藤茂. 平成 22 年度園芸学会春季大会. 2010 年 3 月 20 日. 日本大学湘南キャンパス.
- (4) 鳥居由佳, 原田太郎, 森田重人, 原吉直, 横山隆亮, 西谷和彦, 佐藤茂. カーネーション開花花弁におけるエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XHT) 遺伝子の発現解析および組織活性染色. 平成 21 年度園芸学会秋季大会. 2009 年 9 月 26 日. 秋田大学.
- (5) 原田太郎, 孟娜, 村越友衣乃, 佐藤茂. カワラナデシコにおける *DcACS1* オートログ遺伝子のゲノム DNA 構造の解析. 平成 21 年度園芸学会秋季大会. 2009 年 9 月 26 日. 秋田大学.
- (6) 棚瀬幸司, 大津佐和子, 佐藤茂, 小野崎隆. 超長寿命カーネーション系統における老化関連遺伝子の発現解析. 平成 21 年度園芸学会秋季大会. 2009 年 9 月 26 日. 秋田大学.
- (7) 佐藤茂. カーネーションの老化誘導におけるエチレンの分子機構 v 京都植物バイテク談話会 (第 14 回シンポジウム). 2010 年 1 月 14 日. 京都府立大学.
- (8) 鳥居由佳, 遠藤玲子, 森田重人, 原田太郎, 佐藤茂. カーネーション花弁におけるエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵

素 (XTH) 遺伝子およびスクロース合成酵素 (SUS) 遺伝子の発現解析. 平成 20 年度園芸学会秋季大会. 平成 20 年 9 月 28 日. 三重大学 (津市).

(9) 原田太郎, 森田重人, 佐藤茂. カーネーションの開花関連遺伝子のサブトラクション法による単離と発現解析. 平成 20 年度園芸学会秋季大会. 平成 20 年 9 月 28 日 v 三重大学 (津市).

(10) 原田太郎, 村越友衣乃, 棚瀬幸司, 小野崎隆, 佐藤茂. カーネーションの花弁老化時に発現する ACC 合成酵素遺伝子 *DcACSI* のゲノム DNA 構造の解析. 平成 21 年度園芸学会春季大会. 平成 20 年 3 月 20 日. 明治大学 (東京都千代田区).

[その他]

ホームページ等

[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environ/genetic\\_eng/index.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/genetic_eng/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 茂 (SATO SHIGERU)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40108428

### (2) 研究分担者

小杉 祐介 (KOSUGI YUSUKE)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：80325323