

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06043

研究課題名(和文)カーネーションの枝変わりを利用したエチレン応答機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of ethylene-response mechanism using bud mutation in carnation.

研究代表者

棚瀬 幸司 (TANASE, Koji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・グループ長補佐

研究者番号：30355713

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)：カーネーションではエチレンに対する応答反応が低下している品種が存在し、外生エチレンに対して萎れにくい特性を有している。我々は一つの花の中に「エチレン応答反応が通常」と「エチレン応答反応が低下している」花弁が存在する変異体を見いだした。このオレンジ系品種の枝変わりを材料とし、オレンジ色花弁と赤色花弁それぞれからRNAを抽出し、次世代シーケンサーによる解析を行った。オレンジ色花弁と赤色花弁それぞれ約32,500遺伝子が確認された。赤色の花弁とオレンジ色の花弁で発現量が2倍以上異なる503遺伝子を抽出した。これらの遺伝子にはアントシアニン合成遺伝子の他に輸送体などの遺伝子が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたデータを活用し、花弁の萎れ初期に起るインローリング(花弁が内側に巻き込む現象)が解明されると共に花持ち性育種が効率化される。これにより花持ち剤等の化学物質の低減や剤の処理による農家の労働時間の削減が可能となる。さらに鉢花などの花持ち剤の効果が高い品目の花持ち性が向上する。

研究成果の概要(英文)：In carnations, there are varieties with a reduced response to ethylene, which character is less susceptible to wilting in response to exogenous ethylene. We found a mutant with "normal ethylene response" red petals and "reduced ethylene response" orange petals within a single flower. We extracted RNA from the orange and red petals, respectively, and analyzed them by next-generation sequencing. Approximately 32,500 genes were identified for each petals. We extracted 503 genes whose expression levels differed more than 2-fold between red and orange petals. These genes include anthocyanin synthesis genes as well as transporters and other genes.

研究分野：園芸学

キーワード：カーネーション 枝変わり エチレン 次世代シーケンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーネーションは老化に関与する植物ホルモンのエチレンに老化が促進される、典型的なエチレン依存性花きである。カーネーション切り花の場合は輸送時などに外部からのエチレン(外生エチレン)にさらされるため、外生エチレンに対する抵抗性を付与するための薬剤処理が必要である。そのため切り花出荷時にエチレン作用阻害剤である STS (チオ硫酸銀錯塩) 処理を行っているが、これは農家の薬剤処理に要する労働負担の増加、薬剤の購入や薬剤の廃棄処理代金の負担などが問題点となっている。また、近年母の日の贈答用として需要が伸びているポット(鉢物)カーネーションは効果的な薬剤処理が困難であり、輸送中に花の萎れが生じるなどの問題が発生している。これらを解決するために遺伝的にエチレンに対する応答性が低下したカーネーションを育成する必要がある。

一方、植物ホルモンに対する植物の応答反応は多岐にわたる。これまで植物ホルモン応答に関して、情報伝達を中心に研究が進められ、受容体やそれに付随する因子が特定されている。農研機構 野菜花き研究部門では 1992 年から花持ち性向上を目的としたカーネーションの交配育種を行ってきた(Onozaki ら, 2001, Sci. Hort.)。この過程で、自然老化時にエチレンがほとんど生成しない花持ちに優れる実用品種「ミラクルルージュ」・「ミラクルシンフォニー」が 2005 年に品種化された。これらの品種は薬剤処理なしで花持ちが約 20 日と長く、実際、複数の公立試験場や種苗会社で育種素材として利用されている。これと平行してエチレン応答の一部が低下した系統も作出されており、有望な育種素材と考えられる。このエチレン応答が低下している系統は、エチレンを外生的に処理しても花卉が萎凋し老化するまでの時間が長い。その育種過程で一つの花の中に「エチレン応答性が通常の花弁(以後、エチレン応答花弁)」と「エチレン応答性が低下している花弁(以後、エチレン応答低下花弁)」が共存する変異体を見いだした。これは枝変わりと同様の変異を起こしており、基本的なゲノム配列は同じであるが、一部の遺伝子のみが変異したと考えられる。これを利用することによりエチレン応答反応の原因遺伝子を特定することができると考えられる。

本課題ではカーネーションにおいて、エチレン応答の一部だけが変異した枝変わり個体を利用し、エチレン応答における複数の応答反応のうち花弁の萎れのみに関与する遺伝子群を特定する。

2. 研究の目的

カーネーションの花の老化時のエチレンによる反応としては複数の過程があり、雌ずいからのエチレン生成、花弁からのエチレン生成(自己触媒的エチレン生成)、エチレンによる短時間で急激な花弁の萎凋(萎凋)、花弁が褐変し観賞価値を完全に消失する(褐変)が時系列で起こる。カーネーションの中にはエチレンに対して応答性が低い品種が存在し、萎凋が起こりにくい特性を有している。このエチレン応答性が低い品種は雌ずいからのエチレン生成、花弁からのエチレン生成は起こるが、萎凋のみが起こらない。すなわちエチレンの受容と転写因子の発現までは進むが、花弁におけるエチレン応答の一部だけが変異して表現型(萎凋)が現れない。

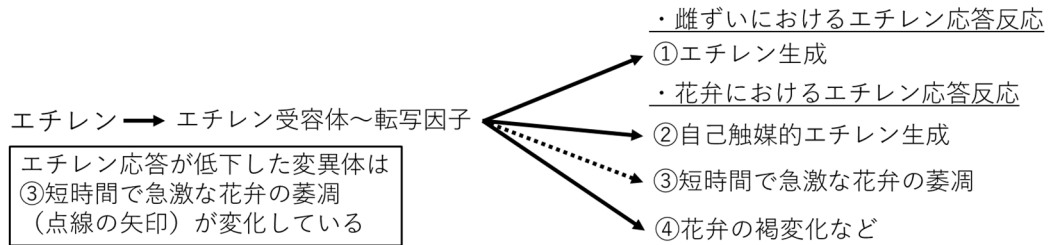


図1 エチレンのシグナル伝達経路と応答反応

これまでに我々はエチレン応答性が通常の品種と低い品種を比較することにより 萎凋にのみ関与する遺伝子の特定を進めてきた(Tanase and Onozaki, 2016)。しかし、カーネーションは遺伝的に雑ばくで自殖弱性のため固定系統の作出も困難であり、十分な解析には至っていない。またモデル植物のように遺伝子欠損の変異体を手に入れることも困難である。そこで有効な方法の一つとして枝変わりを利用した解析があげられる。我々は一つの花の中に「エチレン応答性が通常の花弁」と「エチレン応答性が低下している花弁」が共存する変異体を見いだした。この花はエチレン応答低下系統の選抜過程で発見したが、元々はオレンジ色の花弁でエチレン応答が低下している。原因は分からないが、まれに枝変わりが起こり、一部が赤色の花弁となり、エチレン応答が通常品種と同じになる。

これまでに、一つの花の中に「エチレン応答性が通常の花弁」と「エチレン応答性が低下している花弁」が共存する変異体の報告は無い。「エチレン応答性が通常の花弁」と「エチレン応答性が低下している花弁」が共存する変異体は枝変わりと同じ変異を起こしており、一部の遺伝子のみが変異したと考えられる。枝変わりを材料とした場合、別々の個体由来の材料を用いて遺伝子発現を比較する場合に比べ、同一個体であるために完全に生育条件や生育ステージをそろえることができ、差異の生じている形質に関与するもの以外の遺伝子発現のばらつきが極めて少なくなる。そこでこの変異体を利用し、「エチレン応答性が通常の花弁」と「エチレン応答性が低下している花弁」で発現している遺伝子を比較することによりエチレン応答変異花弁における遺伝子の動態を明らかにする。

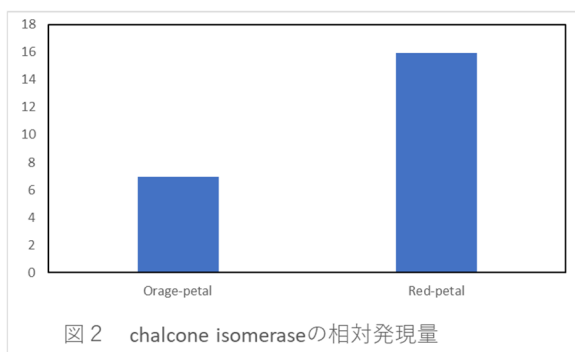
3. 研究の方法

カーネーションのオレンジ色花系統を材料に用いた。開花した花の中から一つの花の中に「エチレン応答性が低下している花弁」であるオレンジ色の花弁から変化した「エチレン応答性が通常の花弁」である赤色花弁を含む花を選び出した。メスを用いてオレンジ色の花弁と赤色花弁を切り分けた。それぞれを液体窒素で凍凍し、-80度の冷凍庫で保存した。凍凍した花弁から RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し、RNA の品質を確認後に次世代シーケンサー (HiSeq Platform, Illumina)を用いた解析を行った。カーネーションにおける遺伝子の機能解析のため、ウイルスベクターを用いた遺伝子組換え体の作出についてはリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) を用い、パーティクルガンによる組換え系により形質転換体を作成した。

4. 研究成果

(1) オレンジ色の花弁と赤色花弁から抽出した RNA は個別に次世代シーケンサーによる解析を行った。リード長は共に約 4.4Gb でカーネーションゲノムへのマッピングの割合は 87% と 88%、遺伝子数は共に約 32,500 であった。32,500 遺伝子のうち、既存の遺伝子は 29,300、新規の遺伝子は 3,200 であった。発現量の差が 2 倍以上の遺伝子を抽出したところ約 500 の遺伝子が確認され、そのうち約 450 は既存の遺伝子、約 50 は新規の遺伝子であった。

(2) 遺伝子の発現量を比較する網羅的な発現解析が想定通りに進行しているかを検証するため、オレンジ色の花弁と赤色花弁において発現しているアントシアニン生合成に関連する遺伝子について調査した。4種類のアントシアニン合成に関わる遺伝子(chalcone synthase、chalcone isomerase、flavonol synthase、2-hydroxyisoflavanone dehydratase)の発現量が2倍以上異なっていた。カーネーションの花弁において chalcone isomerase は赤色とオレンジ色で発現量が異なることが報告されており、今回の発現解析でも同様の結果が得られたことから網羅的な発現解析は想定通りであると考えられた(図2)。赤色の花弁とオレンジ色の花弁で発現量が2倍以上異なる503遺伝子を抽出し、アノテーションを基に解析を進めた。抽出した赤色の花弁とオレンジ色の花弁で発現量が異なる遺伝子にはアントシアニン合成遺伝子の他に輸送体や植物ホルモンの合成遺伝子、情報伝達に関わる遺伝子、形態形成に関わる遺伝子、細胞壁の合成遺伝子が複数個得られた。



503遺伝子のうちカーネーションゲノムにマッピングが出来なかった遺伝子が101存在し、これらについては以降の解析から除外した。402遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ、Cellular Component: 63遺伝子、Molecular Function: 107遺伝子、Biological Process: 69遺伝子(一部重複を含む)であった。細胞膜に関係する遺伝子が多く、70遺伝子が抽出された。そのうちレセプターをコードしている遺伝子が47と最も多く、19遺伝子が輸送に関連していた。転写因子は6遺伝子、植物ホルモンの関係する遺伝子は11遺伝子、キナーゼが57遺伝子、フォスファターゼが8遺伝子であった。このうち一部の遺伝子のゲノム配列を調べたが、赤色花弁とオレンジ色花弁でゲノム配列の違いは見られなかった。引き続きゲノム配列の違いがある遺伝子の探索を行う予定である。

一方、ウイルスベクター系による組換え体作成がカーネーションとその近縁のナデシコで可能となった。特にナデシコでは種子系品種を用いて実生にウイルスベクターを接種することにより簡便に短期間で組換え体を作成することが可能であった。今後はこの手法を前述の遺伝子に対して適用することにより、エチレン応答反応に関与する遺伝子を特定出来ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 棚瀬幸司	4. 巻 1
2. 論文標題 Cross-Breeding for Flower Vase Life and Their Molecular Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Carnation Genome	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 棚瀬幸司	4. 巻 1
2. 論文標題 Transcriptome Analysis in Carnation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Carnation Genome	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koji Tanase, Yosuke Matsushita, Tomofumi Mochizuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Silencing of the Chalcone Synthase Gene by a Virus Vector Derived from the Cucumber Mosaic Virus in Petunia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 507-513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 棚瀬幸司	4. 巻 55
2. 論文標題 植物ウイルスベクターによる花きの形質改変	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植調	6. 最初と最後の頁 82-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野崎 隆 (ONOZAKI Takashi) (90355719)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・グループ長補佐 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------