

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21688002

研究課題名（和文） つぼみから開花に至る花弁成長機構の解明と切り花収穫後の開花制御

研究課題名（英文） Analysis for the mechanism of petal growth during flower opening and control for the cut flower opening in post-harvest conditions

研究代表者

山田 邦夫（YAMADA KUNIO）

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：30345871

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、花弁肥大成長の仕組みを明らかにし、つぼみからの花弁の成長つまり開花現象を解明することにある。さらにそのメカニズムを制御し、切り花などのつぼみから開花に至る過程を人為的にコントロールすることを目標としている。バラ切り花の開花にはエクспанシンや XTH が重要であることが、遺伝子やタンパク質の発現量変動を調べることで明らかとなった。また、XTH 活性に対する阻害剤である XG9 という糖の効果について、比較的高濃度の XG9 を切り花に処理すると花弁の成長を促進し、低濃度で処理すると逆に開花を阻害することが分かった。さらに、バラ切り花がつぼみから開花する際、一日のうちでも明期が始まった数時間しか花弁の成長が起こらず、それ以外の時間帯はほとんど成長していないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The aims of this project are to clarify the mechanism of petal growth during flower opening, and to control flower opening of cut roses in post-harvest conditions. I found that the Expansin and XTH play important roles for flower opening of cut roses by real-time PCR analysis and western blot analysis. And XG9 was analyzed as an inhibitor for XTH enzyme activity. XG9 promoted the flower opening of cut roses at high concentration, and in contrast, XG9 inhibited it at low concentration. Furthermore, it became clear that the petal of cut rose buds grew for only a few hours from the initiation of light period, and it hardly grew during the rest periods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	17,900,000	5,370,000	23,270,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：園芸学、バラ、ポストハーベスト、細胞壁、エクспанシン、XTH

1. 研究開始当初の背景

園芸産業として、開花現象の解明は非常に重要な意味を持つ。近年特に、「切り花の品質」が大きくクローズアップされており、消費者・市場・研究といったそれぞれの立場で関心が持たれている。現在切り花の品質としては「老化を遅らせる」ことがもっぱら注目されてきているが、私は特に「開花の調節」に注目している。バラなどはつぼみから徐々に成長してゆく花卉の展開を楽しむ花である。また一本の花茎に複数の小花を持つ花も、つぼみをいかに大きく開花させるかが重要な品質要素であると言える。これらの理由から、切り花の品質をより向上させるには「老化を遅らせる」だけでなく、「確実に大きく、そしてゆっくり開花させる」ことが重要となってくると考えている。

2. 研究の目的

バラ切り花では、余りにも小さなつぼみで収穫した場合（堅切りした場合）、切り花の収穫後での開花不良が起こってしまう。この問題を解決するには、「樹上での開花」と「切り花にしてからの開花」の仕組みを完全に明らかにする必要がある。開花現象は、細胞分裂後の花卉細胞が吸水により肥大成長をおこし、花卉が背軸側に反転する現象である。さらに、花卉細胞での糖代謝と細胞壁のゆるみが必要となることが私たちの研究により明らかとなっている (Yamada et al. 2007. *Postharvest Biol. Technol.* 43:174-177; Takahashi et al. 2007. *Acta Hort.* 755:483-488)。糖代謝に関しては、樹上の花では花卉中のインベルターゼ酵素活性が上昇しヘキソース蓄積を起こし、浸透圧上昇による吸水を促している。しかし、収穫後ではインベルターゼは活性化されずその結果、樹上の花ほど新鮮重は増加しない。これにはインベルターゼ活性化の仕組みが重要となる。一方細胞壁の緩みに関しては、私たちはバラ花卉の成長には細胞壁の物理的性質が変化していることを明らかにし、細胞壁の伸展性に関わるタンパク質としてエクспанシンおよびエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) の重要性を明らかにした。以上のように私は、バラの開花を制御している遺伝子について少しずつ解明してきている。

本研究の目的は、以上のようなこれまでの研究を進展させ花卉肥大成長の仕組みを詳細に明らかにすると共に、つぼみからの花卉の成長つまり開花現象を解明することにある。さらにそのメカニズムを制御し、切り花などのつぼみから開花に至る過程を人為的にコントロールすることを目標としている。その成果により、植物の開花を単純に制御できるだけでなく、園芸産業における切り花の

日持ち性を格段に延長させることが可能となる。

3. 研究の方法

リアルタイム PCR 解析や形質転換植物などを解析することで、バラやトルコギキョウでの開花関連遺伝子 (エクспанシンおよびエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) など) の機能について、それらの役割を調査した。次に、大腸菌や酵母など異種発現系を利用して合成したタンパク質 (エクспанシンおよびエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) など) に対する抗体を作り、ウエスタンブロット解析や抗体を用いた切り花への投与実験を行った。さらに、XTH 活性の阻害剤である XG9 を花卉細胞壁から抽出し、この阻害剤による花卉成長への効果を調査した。また、人工気象器を用いて様々な日長をコントロールした環境下で切り花を管理し、その成長の様子を詳細に調べた。

4. 研究成果

本研究の初めに、シロイヌナズナの開花が遅延する変異体を用いて、花卉成長と相関が深い遺伝子の網羅的探索を試みた。しかし、変異体の形質が安定せず、目的の遺伝子を明らかにするのは時間が必要であると判断した。そこで当初の計画に従い、細胞壁のゆるみに関係する「エクспанシン」と「XTH」の解析を進めた。まずトルコギキョウ花卉で発現するエクспанシンと XTH mRNA を単離し、RNAi 用のベクターに組み込み、アグロバクテリウム法によりトルコギキョウに遺伝子導入した。この組換えトルコギキョウでは、花卉特異的なエクспанシンもしくは XTH の mRNA 発現が抑えられている予定であり。現在も栽培を続けている。研究期間内での解析はできなかったが、今後開花に伴う花卉成長の変化を解析する予定である。また、エクспанシンおよび XTH のリコンビナントタンパク質を大腸菌によって発現させ、精製を行った。大腸菌により発現させたこれらのリコンビナントタンパク質を抗原として、それぞれの酵素に対する抗体を作製した。その抗体を用いて、エクспанシンおよび XTH のバラ切り花でのタンパク質量の変動、ならびにバラ切り花への抗体処理の影響を調査した。バラ切りバラへの抗体吸収実験は、切り花の切り口から処理することで、確実に花卉組織に到達することが確認できた。一方、XTH 活性に対する阻害剤として XG9 という糖を見出し、切り花に処理することで開花に対する阻害効果を調べた。その結果、XG9 が花卉の成長を濃度依存的に阻害している事を明らかとし、比較的高濃度の XG9 を切り花に処理すると花卉の成長を促進し、低濃度で処理すると逆に

開花を阻害することが分かった。この結果は、エンドウの実生を用いた実験報告と一致しており、バラ花卉の開花にともなう肥大成長も、エンドウ胚軸の伸長成長同様、外生的に与えた XG9 により制御可能であることを示唆するものである。さらに、バラ切り花がつぼみから開花する際、一日のうちでも明期が始まった数時間しか花卉の成長が起こらず、それ以外の時間帯はほとんど成長していないことが明らかとなった。この成長リズムはこれまで研究を進めてきた細胞壁関連酵素の発現及び活性制御機構では解釈が困難であり、アクアポリンの制御などと言った細胞壁関連酵素以外の因子によって開花リズムがコントロールされている可能性が示唆された。これらの課題は、今後別の研究課題を立ち上げることで研究を継続して行く予定である。

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 6 件)

- ① Hayashi, H., Yamada, K., Shiratake, K. and Matsumoto, S., Structural characteristics of *SLF/SFB*-genes in apple cultivars with similar *S*-RNase sequences, *Acta Horticulturae*, 査読有、929、2012、267-274.
- ② Ochiai, M., Takagaki, N., Takahashi, R., Fujitani, C. and Yamada, K., Role of expansin and XTH during rose flower opening, *Acta Horticulturae*, 査読有、870、2010、273-278
- ③ Horibe, T., Ito, M. and Yamada, K., Effect of plant hormones on invertase activity and on petal growth, *Acta Horticulturae*, 査読有、870、2010、279-283
- ④ Yamada, K., Norikoshi, R., Suzuki, K., Imanishi, H. and Ichimura, K., Changes in subcellular concentrations of soluble carbohydrates of petals during flower opening in rose determined by nonaqueous fractionation method combined with infiltration-centrifuged method, *Planta*, 査読有、230、2009、1115-1127
- ⑤ Yamada, K., Takahashi, R., Fujitani, C., Mishima, K., Yoshida, M., Joyce, D.C. and Yamaki, S., Cell wall extensibility and effect of cell wall-loosening proteins during rose flower opening, *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 査読有、78、2009、242-251

- ⑥ Yamada, K., Norikoshi, R., Suzuki, K., Nishijima, T., Imanishi, H. and Ichimura, K., Cell division and expansion growth during rose petal development, *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 査読有、78、2009、356-362

[学会発表] (計 7 件)

- ① Foucher, F., Sakr, S., Bendahmane, M., Smulders, M., Debener, T., Riek, J.D., Torres, A.M., Amaya, I., Millan, T., Zamir, D., Sargent, D., Nybom, H., Atanassov, A., Hokanson, S.C., Byrne, D., Sosinski, B., Main, D., Bruneau, A., Rees, J., Matsumoto, S. and Yamada, K., The rose genome sequence initiative, *Plant & Animal Genome XX*, 2012 年 1 月, San Diego, CA, USA
- ② 河村耕史、岩田光、山田邦夫、松本省吾、福井博一、Jeauffre, J., Thouroude, T., 栽培バラに四季咲き性をもたらしたトランスポゾン: バラゲノム内のコピー数と分布、園芸学会平成 23 年度秋季大会、2011 年 9 月、岡山大学
- ③ Ochiai, M., Matsumoto, ., Shiratake, K., Maesaka, M. and Yamada, K., Role of expansin and XTH during flower opening in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), 28th International Horticultural Congress, 2010 年 8 月、リスボン (ポルトガル)
- ④ Takagaki, N., Matsumoto, S., Shiratake, K., Maesaka, M. and Yamada, K., Regulation of rose petal growth by cell-elongation inhibitors, 28th International Horticultural Congress, 2010 年 8 月、リスボン (ポルトガル)
- ⑤ 落合正樹、松本省吾、白武勝裕、山田邦夫、トルコギキョウ花卉におけるエクспанシンおよびエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) の解析、園芸学会平成 21 年度秋季大会、2009 年 9 月、秋田大学
- ⑥ 高垣奈保、松本省吾、白武勝裕、山田邦夫、細胞伸長阻害剤による花卉成長制御、園芸学会平成 21 年度秋季大会、2009 年 9 月、秋田大学
- ⑦ Ochiai, M., Takagaki, N., Maesaka, M. and Yamada, K., Role of expansin and XTH during rose flower opening, 5th International Symposium on Rose Research and Cultivation, 2009 年 5 月、岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 邦夫 (YAMADA KUNIO)
中部大学・応用生物学部・准教授
研究者番号：30345871

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし