

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688004

研究課題名(和文)花の寿命を支配している遺伝子群の同定

研究課題名(英文)Identification of genes involved in flower longevity

研究代表者

山田 哲也(Yamada, Tetsuya)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20422511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA-Seq法およびRT-qPCR法による比較発現解析により、アサガオの花持ち性の系統間差異に転写因子遺伝子(InNAP)やエチレン関連遺伝子が関与することを明らかにした。また、14-3-3タンパク質遺伝子(InPSR42)の発現抑制体を用いた解析により、花弁老化の制御に関わる複数の遺伝子を確認した。さらに、SSH法により、アサガオの花弁展開開始時刻の決定に関与する暗期応答遺伝子(DR03, DR11)を検出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed comparative expression analysis by using RNA-Seq and RT-qPCR methods in the petals of morning glory and revealed that transcription factor gene, InNAP, and ethylene-related genes were associated with the strain difference of flower longevity. We also confirmed that several genes involved in the control of petal senescence by using transgenic plants which reduced expression of 14-3-3 protein gene, InPSR42. In addition, we detected dark-responsive genes, DR03 and DR11, involved with the determination of petal opening time of morning glory by SSH methods.

研究分野：植物育種学

キーワード：細胞老化 プログラム細胞死 花弁老化 花持ち性 アサガオ 花弁展開 次世代シーケンサー トランスクリプトーム

### 1. 研究開始当初の背景

植物の葉や花弁、果実などの器官は、形成されてから一定の期間が過ぎると、萎れや変色、軟化などの変化を生じる。植物器官の寿命が尽きる過程で生じるそのような変化は、多くの植物で共通に観察される老化現象であり、主に“細胞老化”によって誘導されている。近年の研究により、この細胞老化は「プログラム細胞死(PCD)」と呼ばれる現象と同一の現象であることが確認されている。

細胞老化は、収穫後の作物の「日持ち」を低下させる主な要因である。細胞老化を抑制し、日持ちを低下させない手段としては、低温下での貯蔵や輸送技術などが開発されているが、これらは環境への負荷が大きく、設備投資や運用に莫大なコストがかかるという欠点がある。そこで、環境への負荷が小さく、負担するコストも低く、作物の日持ち性の向上に最も有効な手段として期待されているのが“品種改良”である。

作物の日持ち性を効率的に改良するためには、収穫対象となる植物の各器官で細胞老化が開始されるプロセスに関与する遺伝子(群)を同定し、各植物器官の寿命を支配している分子機構を明らかにしていく必要がある。植物器官に現れる細胞老化については、これまで様々な観点から研究が行われている。特に、花弁の細胞老化は、短期間で同調的に開始される特徴があるため、細胞老化の研究モデルとされており、比較的多くの知見が得られている。

特に、アサガオでは、花蕾が形成された後、花弁が展開して、老化が開始するまでの時間が短く、その間に生じる組織・細胞レベルでの形態的ならびに生理的变化が詳細に調査されている。また、我が国では、江戸時代より多様なアサガオ品種が育成され、今日まで数多くの品種・系統が保存されており、それらの中には花弁の細胞老化に差異のある系統も見いだされている。

しかし、これまでの研究で得られた知見は、いずれも細胞老化が開始された後の細胞に生じる“細胞老化の実行プロセス”に関するものであった。本研究で調査対象とする“細胞老化の開始プロセス”に関する研究はこれまで全く行われておらず、花の寿命を支配する分子機構も明らかにされていなかった。従って、花きの日持ち性改良に利用可能な有用遺伝子も得られていないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、花弁の細胞老化に関する知見が集積されているアサガオを実験モデルとし、RNA-seq法やSSH法などを用いて花弁における網羅的な比較発現解析を行うことで、細胞老化の開始プロセスに関与する遺伝子を

特定し、花の寿命を支配している分子機構を解明する手掛かりを得るとともに、花きの日持ち性改良に利用可能な有用遺伝子の候補を選定することを目的とした。

これまでの研究で、1) アサガオ自殖系統‘北京天壇’と‘獅子牡丹’では、花弁が展開している時間が大きく異なり、花弁の細胞老化の開始時期に顕著な差異のあることを確認した。2) アサガオ品種‘紫’の花弁では、シロイヌナズナの葉の老化に関与することが報告されている転写因子遺伝子 *AtNAP* のホモログ(*InNAP*)や14-3-3タンパク質をコードした遺伝子(*InPSR42*)の転写量が老化前の花弁で増大することを確認した。3) アサガオ品種‘紫’では、花弁展開が開始される時刻の制御に開花直前の花蕾が受ける暗期の長さが関与し、その時刻が遅延すると花弁が展開している時間が延長されることから、花弁の展開と細胞老化の開始に関連性があることを確認した。

そこで、本研究では、(1)‘北京天壇’と‘獅子牡丹’の花弁について次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法による比較トランスクリプトーム解析を行い、転写産物量に差異のある遺伝子を同定することで、花弁の細胞老化開始時期の系統間差異に関わる遺伝子を検出することを試みた。(2)‘紫’と‘北京天壇’の花弁における *InNAP* やエチレン受容体遺伝子(*InETR2*)の転写産物量の差異をRT-qPCR法で検出し、花弁の細胞老化開始時期やエチレン感受性の系統間差異へのそれらの遺伝子の関与を明らかにすることを試みた。(3)RNAi法により *InPSR42* の発現を抑制した‘紫’の形質転換体系統(42r)を作出し、それらの花弁で転写産物量に変動が見られる遺伝子群を比較トランスクリプトーム解析により明らかにすることで、花弁老化の制御に関わる遺伝子を特定することを試みた。(4)‘紫’の花蕾に異なる長さの暗期を与え、その後の花弁で差別的な発現を示す暗期応答遺伝子をSSH法により同定した。また、それらの遺伝子について、開花前後の花弁における発現変動をRT-qPCR法で検出し、花弁展開の開始時刻の決定に関わる遺伝子の特定を試みた。

これらの研究を実施することにより、アサガオの花の寿命すなわち花弁細胞の老化開始プロセスに関わる遺伝子を特定し、花きの日持ち性改良に利用可能な有用遺伝子の候補を選定することを試みた。

### 3. 研究の方法

(1)‘北京天壇’と‘獅子牡丹’の花弁における比較トランスクリプトーム解析：アサガオ自殖系統‘北京天壇’および‘獅子牡丹’の実生を24、12時間日長(明期10:00~22:00、

蛍光強度  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に設定した恒温室内で育成した。老化開始前後の花弁サンプルから total RNA を抽出し, TruSeq RNA Sample Preparation Kits を用いて cDNA ライブラリーを作成して, 次世代シーケンサー (GAIIx) による RNA-Seq を行った。シーケンスで得られた全花弁サンプルの断片的な cDNA 塩基配列 (リード) を de novo アセンブラ (Trinity) を用いて連結し, cDNA 塩基配列の再構築 (アセンブル) を試みた。アセンブルにより得られた配列群 (コンティグ) について, シロイヌナズナの全 cDNA 情報 (33,602 配列) をデータベースとした相同性検索を行い, 冗長性の除去および遺伝子機能の情報付加を実施した。また, リードマッピングプログラム (Bowtie) を用い, 各コンティグの RPKM 値を求めた。それらの値から '北京天壇' および '獅子牡丹' の老化開始前後の花弁における遺伝子の発現変動を評価した。さらに, パスウェイ解析ツール (MapMan) を用い, シロイヌナズナの生物学的経路を参照経路としたパスウェイ解析を行い, 老化開始前後の花弁での発現変動に系統間差異が示された遺伝子の関わる生物学的経路を特定した。

(2) '紫' と '北京天壇' の花弁における *InNAP* 等の比較発現解析: アサガオ品種 '紫' および '北京天壇' の実生を 24, 12 時間日長 (明期 10:00 ~ 22:00, 蛍光強度  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に設定した恒温室内で育成した。開花当日の明期開始 12 時間前に採取した花蕾を蒸留水に挿し, 12 時間後にエチレン (0, 0.1 または 1 ppm) を満たした密閉容器内に静置して, 画像解析法により花弁老化の開始時期を評価した。対照区とエチレン処理区 (1 ppm) の花弁における *InNAP* および *InETR2* の転写産物量の変動を RT-qPCR 法で検出した。また, *InNAP* のプロモーターの塩基配列を品種間で比較し, 一塩基多型 (SNP) やシス配列の違いを検出した。

(3) アサガオの花弁老化関連遺伝子 *InPSR42* の機能解析: アサガオ品種 '紫' の野生型 (WT) および *InPSR42* の発現抑制系統 (42r) の実生を 24, 12 時間日長 (明期 10:00 ~ 22:00, 蛍光強度  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に設定した恒温室内で育成した。開花当日の 10:00 を基点 ( $t = 0$  h) として,  $t = -12$  h に切り花を採取した。画像解析法により, 花弁展開, 開花, 萎れの時間を評価した。 $t = 24$  h の花弁から単離した核を DAPI で染色し, 蛍光顕微鏡および画像解析ソフトを用いて面積を計測した。また,  $t = 18$  h の花弁から単離した核を PI で染色し, Muse Cell Analyzer で DNA 量を測定した。 $t = 0, 6, 18$  h の花弁から total RNA を抽出し, GAIIx による RNA-Seq を行った。シーケンス

ングで得たリードを Trinity でアセンブルしてコンティグを作成し, Bowtie2 でマッピングを行い, 各コンティグの RPKM 値を求めた。WT と 42r との間で各ステージの花弁における各コンティグの RPKM 値を比較し, 開花前後の花弁での発現変動に差異のみられる遺伝子を推定した。

(4) アサガオの花弁展開開始時刻の決定に関与する暗期応答遺伝子の探索: アサガオ品種 '紫' の実生を 24, 12 時間日長 (明期 10:00 ~ 22:00, 蛍光強度  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に設定した恒温室内で育成した。開花前日の 22:00 を基点とし ( $t = 0$  h),  $t = -4$  h に切り花を採取し,  $t = 0$  h から 8 時間の暗期 (8D) または明期 (CL) を与え,  $t = 8$  h に花弁を採取した。採取した花弁から poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し, PCR-select cDNA subtraction kit を用いた SSH により, 8D と CL の花弁間で差別的な発現を示す 12 種類の遺伝子を暗期応答遺伝子とした (表 1)。

表 1 SSH法により単離されたアサガオ花弁の暗期応答遺伝子

Gene ID	Accession	Putative protein function
DR01	AB849965	Protein kinase family protein
DR02	AB849966	POZ/BTB containing protein
DR03	AB849967	Myb family transcription factor
DR04	AB849968	Regulator of chromosome condensation domain-containing protein
DR05	AB849969	Bifunctional Glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase/phosphatase
DR07	AB849970	V-type proton ATPase subunit
DR08	AB849971	E3 ubiquitin-protein ligase
DR11	AB849972	Pseudo-response regulator
DR12	AB849973	ATP-dependent Lon protease
DR13	AB849974	Homogentisate 1,2-dioxygenase
DR14	AB849975	Zinc finger CCH domain-containing protein
DR15	AB849976	Gamma-glutamyl hydrolase

$t = 0$  h に採取した切り花について 4 時間または 8 時間の暗期処理 (4D, 8D) を行い, 花弁展開時の中肋および花弁 (中肋以外の花弁部分) における細胞の浸透圧を VAPRO オズモメーター 5520 型で測定した。また, 暗期応答遺伝子の転写産物量の変化を RT-qPCR 法で検出した。PCR 反応には KAPA SYBR Fast qPCR Kits および Eco Real-Time PCR System を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) '北京天壇' と '獅子牡丹' の花弁における比較トランスクリプトーム解析: RNA-Seq により各系統の花弁サンプルの cDNA 塩基配列を 4 G base ずつ解読し, 合計 200 M リードの配列データを得た。それらのリードをアセンブルし, 69,703 のコンティグを得た。得られたコンティグについて相同性検索を実施したところ, 21,663 (64.5%) のコンティグがシロイヌナズナの cDNA と高い相同性を示した。また, 各コンティグに各サンプルのリードをマッピングして得た RPKM 値に基づき, 老化開始前後の花弁において 2 倍以上の発現変動を示すコンティグを検出した。その結果, 花持ちの悪い '北京天壇' では 5,510, 花持

ちの良い‘獅子牡丹’では29,412のコンティグで発現変動が確認され、系統間で約6倍の差異がみられた(図1)。

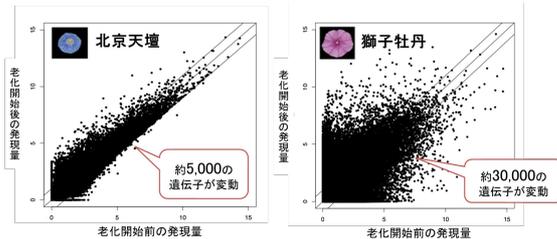


図1 老化前後の花弁で発現変動した遺伝子の数

さらに、系統間で発現変動に差異が見られた遺伝子についてパスウェイ解析を実施したところ、エチレン、アブシジン酸 (ABA) および老化関連遺伝子に大きな差異が見られた。エチレン関連遺伝子では、35 種類のうち21 種類が‘獅子牡丹’の老化開始前後の花弁で発現変動していたが、‘北京天壇’では9種類のみであった。‘獅子牡丹’で特に顕著な差異が示されたのは、エチレン受容体遺伝子や ABA により発現が抑制されるエチレン応答遺伝子であった。また、‘獅子牡丹’の花弁では ABA 代謝関連遺伝子も発現変動 (増加) していることを確認した。以上から、花持ちの良い‘獅子牡丹’の花弁では、エチレンと ABA の機能が抑制的に制御されていることが示唆された。一方、老化関連遺伝子では、PCD の実行に関わるタンパク質分解酵素や PCD の進行に伴い発生する金属の毒性を抑えるキレート物質をコードした遺伝子の発現が‘北京天壇’の老化開始後の花弁で増加していたが、‘獅子牡丹’ではそのような傾向が見られなかった。以上から、花持ちの良い‘獅子牡丹’の花弁では、PCD の抑制が遺伝子の発現レベルで行われていることが示唆された。

(2) ‘紫’と‘北京天壇’の花弁における *InNAP* 等の比較発現解析: 0.1 ppm のエチレン処理区では‘北京天壇’でのみ花弁老化の開始時期が有意に短縮された。また、‘北京天壇’は‘紫’に比べ、対照区やエチレン処理区の花弁で *InETR2* の転写産物量の増加時期が早い傾向が示された(図2)。以上から、‘北京天壇’と‘紫’では、花弁のエチレン感受性が異なり、その違いにはエチレン受容体の数の違いが関与することが示唆された。一方、エチレン処理区の花弁における *InNAP* の転写産物量は‘紫’では増大し、‘北京天壇’では減少する傾向が示された。また、*InNAP* のプロモーターには転写開始点の上流 -267 bp の位置に SNP があり、‘紫’ではその領域にエチレン応答性のシス配列 (ERELEE4) が検出された。以上から、*InNAP*

は、エチレン処理した‘紫’の花弁における老化促進には関わらないが、‘北京天壇’とのエチレン感受性の違いには関わらないことが示された。

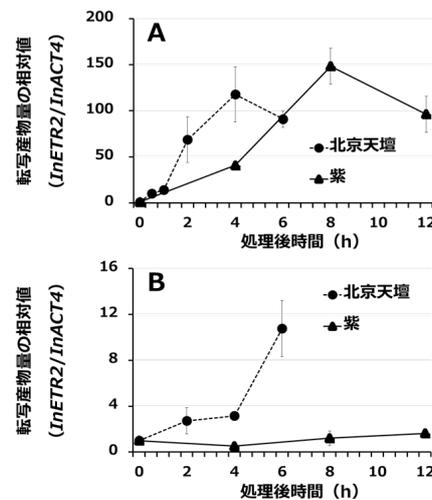


図2 花持ち性に差異のあるアサガオ2品種の花弁における *InETR2* の転写産物量の変動  
「紫」および「北京天壇」の花弁における内部標準遺伝子 *InActin4* に対する *InETR2* の相対発現量を qPCR 法で調査した結果 (n=3)。  
A: エチレン処理区 (1 ppm), B: 対照区。

(3) アサガオの花弁老化関連遺伝子 *InPSR42* の機能解析: WT に比べ、42r では、花弁の萎れが促進されることを確認した(図3)。

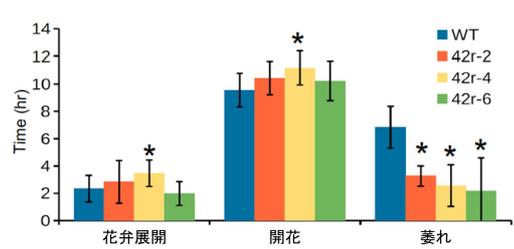


図3 アサガオの野生型 (WT) および *InPSR42* 発現抑制系統 (42r) の花弁展開、開花、萎れの時間

一方、RNA-Seq で得られた 286 M リードの配列データからは 64,170 コンティグが形成された。これらのコンティグの RPKM 値から、WT に比べ、42r の花弁で発現量が減少していることが示唆された遺伝子には、CPT5 や aspartic protease をコードするものが含まれていた。このうち、CPT5 は細胞膜の維持に関与することが示唆されているドリコールの合成に関与する酵素であり、aspartic protease は老化花弁で生じるタンパク質分解に関与することが報告されている酵素である。一方、42r の花弁で発現量が増加していることが確認された遺伝子には、GDSL lipase/hydroxylase などが含まれていた。GDSL lipase/hydroxylase は老化花弁で生じる脂質分解に関与することが推定されている酵素である。以上から、

*InPSR42* の発現を抑制した花弁では、細胞老化 (PCD) の初期段階で起こるタンパク質分解が抑制され、最終段階で生じる脂質分解や膜系の崩壊が促進されることで、可視的老化 (萎れ) が進行していることが示唆された。

(4) アサガオの花弁展開開始時刻の決定に関与する暗期応答遺伝子の探索: 4D および 8D 処理区の切り花では、花弁に比べ中肋細胞の浸透圧が高い傾向が示されたが、いずれの処理区 (4D, 8D) および部位 (中肋, 花弁) の細胞でも、花弁の展開に伴って浸透圧が低下することを確認した。従って、4D と 8D 処理区の切り花では、花弁展開時刻に差は見られるが、開花時の中肋および花弁の細胞における浸透圧の変化には違いのないことが示唆された。暗期応答遺伝子のうち、*DR03* は 8D 処理区の展開直前 ( $t = 4 \text{ h} \sim 8 \text{ h}$ ) の花弁で部位特異的に転写産物量が増加し、*DR11* は 4D 処理区の  $t = 4 \text{ h} \sim 8 \text{ h}$  の花弁で転写産物量が増加していることを確認した (図 4)。

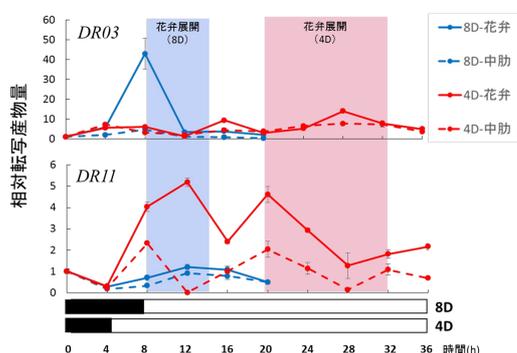


図4 異なる暗期を処理したアサガオ切り花の花弁における暗期応答遺伝子 (*DR03*, *DR11*) の転写産物量の変化

*DR03* は RVE1 という MYB 転写因子をコードした遺伝子と相同性を示し、概日時計やオーキシンとの関与が示唆されている。一方、*DR11* は中心振動体遺伝子である *PRR7* をコードする遺伝子と相同性のあることが確認された。これらの遺伝子と花弁展開との関連性はこれまで報告されておらず、本研究ではじめて暗期誘導性の花弁展開に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Ono H, Ishii K, Kozaki T, Shimizu K, Shibuya K, Ichimura K, Kanekatsu M, Yamada T (2015) *InPSR42*, a putative 14-3-3 protein, regulates petal opening and senescence in Japanese morning glory. *Acta Horticulturae*. 印刷中. 査読有.  
Shinozaki Y, Tanaka R, Ono H, Ogiwara I, Kanekatsu M, van Doorn WG, Yamada T

(2014) Length of the dark period affects flower opening and the expression of circadian-clock associated genes as well as xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes in petals of morning glory (*Ipomoea nil*). *Plant Cell Report* 33: 1121-1131. 査読有.

DOI: 10.1007/s00299-014-1601-z

Shinozaki Y, Tanaka T, Ogiwara I, Kanekatsu M, van Doorn WG, Yamada T (2014) Expression of an AtNAP gene homolog in senescing morning glory (*Ipomoea nil*) petals of two cultivars with a different flower life span. *Journal of Plant Physiology* 171: 633-638. 査読有.

DOI: 10.1016/j.jplph.2014.01.008

[学会発表] (計 8 件)

田中龍佑, 篠崎良仁, 山田哲也, アサガオの花弁展開に関する細胞・分子生物学的研究, 第 8 回アサガオ研究集会, 2015 年 3 月 6 日 ~ 2015 年 3 月 7 日, 筑波大学 (茨城県・つくば市).

田中龍佑, 篠崎良仁, 小野華子, 渋谷健市, 市村一雄, 金勝一樹, 山田哲也, 開花時のアサガオ花弁で部位特異的な発現変動を示す遺伝子群の同定, 園芸学会平成 26 年度秋季大会, 2014 年 9 月 26 日 ~ 2014 年 9 月 29 日, 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市).

Ono H, Ishii K, Kozaki T, Shimizu K, Shibuya K, Ichimura K, Kanekatsu M, Yamada T, *InPSR42*, a putative 14-3-3 protein, regulates petal opening and senescence in Japanese morning glory, The 29th International Horticultural Congress, 2014 年 8 月 17 日 ~ 2014 年 8 月 23 日, Brisbane (Australia).

石井裕也, 田中俊光, 篠崎良仁, 金勝一樹, 山田哲也, 花持ち性に差異のあるアサガオ 2 品種間の花弁に見出されたエチレン感受性の違い, 日本育種学会第 125 回, 2014 年 3 月 20 日 ~ 2014 年 3 月 22 日, 東北大学 (宮城県・仙台市).

田中龍佑, 篠崎良仁, 小野華子, 山田哲也, 金勝一樹, 暗期応答性を示すアサガオの開花に伴う花弁でのエクспанシンおよびエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素遺伝子の発現変動, 園芸学会平成 25 年度秋季大会, 2013 年 9 月 20 日 ~ 2013 年 9 月 22 日, 岩手大学 (岩手県・盛岡市).

小野華子, 石井一夫, 古崎利紀, 山田哲也, 金勝一樹, 花持ち性に差異のあるアサガオ 2 系統間の花弁における次世代シークエンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析, 園芸学会平成 25 年度秋季大会, 2013 年 9 月 20 日 ~ 2013 年 9 月 22 日, 岩手大学 (岩手県・盛岡市)

小野華子，山田哲也，金勝一樹，メラトニン処理がアサガオの葉や花弁の老化に及ぼす影響，園芸学会平成 25 年度春季大会，2013 年 3 月 23 日～2013 年 3 月 24 日，東京農工大学（東京都・府中市）。  
小野華子，石井一夫，古崎利紀，福原敏行，船田良，山田哲也，金勝一樹，アサガオ花弁の新規 mRNA アセンブルによる次世代シーケンス解析用参照配列の構築，園芸学会平成 24 年度秋季大会，2012 年 9 月 22 日～2012 年 9 月 23 日，福井県立大学（福井県・永平寺町）。

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山田 哲也（YAMADA TETSUYA）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20422511