

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580050

研究課題名(和文)カーネーション老化時のエチレン生成誘導におけるABAの役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of abscisic acid in the induction of ethylene biosynthesis in cut carnation flowers undergoing senescence

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(系)・教授

研究者番号：40108428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カーネーションでは、雌ずいで生成するエチレンが花の老化の「スターターエチレン」として働いている。本研究では、雌ずいのエチレン生成誘導因子がアブシシン酸(ABA)であることを、切り花の寿命の異なる3品種のカーネーションを用いてABA含量の変動、及びABA生合成と作用の鍵遺伝子の発現を調べて実証した。また、開花と老化を制御する薬剤の作用の解析を行い、ピリジンジカルボン酸が、スプレーカーネーションの老化を抑制すると共に蕾の開花を速めること、および本来開花せずに寿命を終わる蕾の開花を誘導することを発見し、この薬剤を「夢の薬剤」として提案した。

研究成果の概要(英文)：At the onset of senescence of cut carnation flowers, the gynoecium produces a small amount of ethylene, which acts as a starter ethylene for the production of a large amount of ethylene from petals. We examined changes in the content of abscisic acid (ABA) and in the expression of genes for ABA biosynthesis and action in the flower tissues, mainly gynoecium and petals, with three carnation cultivars, which have marked differences in their senescence characteristics. We demonstrated that abscisic acid is the key factor which induces ethylene production in the gynoecium of carnation flowers undergoing senescence. Moreover, we found that pyridinedicarboxylic acid (PDCA) has a remarkable activity on carnation flower opening and senescence; that is, PDCA accelerated the opening of flower buds, promoted the gross flower opening, and retarded senescence, resulting in a remarkable extension of vase life of cut carnation flowers.

研究分野：園芸学

キーワード：カーネーション アブシシン酸 ピリジンジカルボン酸 蕾の開花 花の老化 観賞期間

1. 研究開始当初の背景

カーネーション切り花の自然老化は、花が生成する多量のエチレンの作用により花弁が萎れるために引き起こされる。老化時のエチレン生成は、まず初めに雌ずいで少量のエチレンが生成し、これが老化の「スターターエチレン」として働いて花弁に働きかけることにより、さらに多量のエチレンが花弁から生成する(自己触媒のエチレン生成)。研究代表者は、カーネーションの雌ずいにおけるエチレン生成の誘導因子(物質)がアブシシン酸(ABA)であることを推定していた。この推定は次のような世界に先駆けて明らかにした研究成果に基づいていた。

- a 雌ずいを除去した切り花では、花弁のエチレン生成と萎れが起こらないことを明らかにした(Shibuya et al. 2000)。この発見は、雌ずいで生成したエチレンが、花弁のエチレン生成の「スターターエチレン」として働くことを明確にした。
- b ‘杓叶キャンドル’や‘クリームキャンドル’などの長寿命カーネーションでは、雌ずいのエチレン生成が起きないため花弁のエチレン生成が誘導されない、ことを明らかにした(Nukui et al. 2004)。
- c カーネーションでは、茎から投与した ABA が花のエチレン生成を促進する。雌ずい除去花では、ABA 処理が花弁のエチレン生成と萎れを誘導しないことを見だし、ABA の作用点が雌ずいであることを明らかにした(Shibuya et al. 2000)。
- d 特定の切り花鮮度保持剤(DPPS)が、花のエチレン生成の増加直前に起こる花弁と雌ずいの ABA 含量の一過的增加を抑制することを明らかにした(Onoue et al. 2000)。この結果は、内生 ABA が自家受粉に代わってエチレン生成を誘導することを示唆した。
- e 花弁における ABA 生成を誘導する要因として、蒸散によって引き起こされる花弁の乾燥(水分ストレス)が想定される。この場合、ワックス層が厚いほど乾燥が抑制されて ABA 生成量が少なく、最終的なエチレン生成の低下が予想される。実際に、申請者らは長寿命‘杓叶キャンドル’では花弁が厚いことを観察した(未発表)。
- f 開花花弁で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析によって、ワックス形成に関与すると予想される超長鎖脂肪酸合成に関与する酵素群(KCS, KCR)の遺伝子を取得した(Harada et al. 2010)。

上に述べた知見は、1900年代末から開始し現在まで継続している研究の成果として得られた。研究開始当初は、ABAの生合成と不活性化に関わる遺伝子群やクチクラ層ワックス成分の超長鎖脂肪酸合成遺伝子群について

の研究は未発達であり、カーネーション花器官における遺伝子レベルの研究は行えなかった。しかし、その後の10年の間に、高等植物におけるABA生合成に関わる鍵酵素(NCED, ZEP)と不活性化酵素(ABA 8'-hydroxylase)の遺伝子、ワックス成分の超長鎖脂肪酸合成遺伝子(KCS他)の解明とともに、少量植物組織を材料にしたLC/MS/MSを用いたABAの精密分析の一般化が進展し、本研究課題をさらに深化できる条件が整ってきた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、カーネーション切り花の老化時における雌ずいでのエチレン生開始に働くエチレン生成誘導因子が、アブシシン酸(ABA)であることを実証することである。そのために、カーネーション切り花の老化初期に働くABAの生合成と作用に関わる遺伝子群を単離同定し、それら遺伝子群の個々について、老化時の発現変動を明らかにする。さらに、その発現の変動を、老化時のエチレン生成量が異なる(したがって、老化の経時変化が異なる)カーネーション品種間で比較する。また、それぞれの品種の切り花の各組織におけるABA含量を精密に測定する。最終的に、特に、雌ずいにおけるABA含量の変動と、ABA関連遺伝子群の発現を、各品種ごとに対比考察して、ABAの役割を考察する。また、花弁からの蒸散による花組織の乾燥とABA生合成の関連性を明らかにするために、エチレン生成量が異なるカーネーション品種を用いて、花弁の厚さを顕微鏡観察し、さらに花弁展開時のクチクラ層ワックスの形成に関わる超長鎖脂肪酸合成関連酵素の遺伝子群の発現解析も行う。最後に、雌ずいのエチレン生成開始反応におけるABAの役割の解析が順調に進展した場合は、開花と老化の調節に関わる薬剤の探索および作用の解析を行い、カーネーション切り花の観賞期間の延長に寄与する新規薬剤開発の基礎知見を得ることも目的とする。

3. 研究の方法

(1)平成24年度

本助成研究以前に取得済みのABA生合成関連遺伝子群に加えて、ABAの作用(受容とシグナル伝達、作用)に関わる遺伝子群を取得し構造を解析した。短寿命性を示すカーネーション品種‘ライトピンクバーバラ(LPBB)’と‘エクセリア(Exc)’、及び長寿命品種‘ミラクルルージュ(MR)’における、開花と老化時の雌ずいおよび花弁のABA含量の変動をLC/MS/MS法によって精密分析した。さらに、上記3品種の各花組織(特に雌ずいと花弁)における、ABA生合成関連遺伝子群とABA作用系遺伝子群の発現を解析した。

カーネーションの花弁におけるクチクラ層の生成に関わるクチクラワックス超長鎖脂肪酸合成関連遺伝子群を単離同定した。この遺伝子群を使って、上記の品種を用いて花の短・長寿命性と、花弁のクチクラワックス超長鎖脂肪酸合成関連遺伝子群の発現の関わりを調査した。

(2)平成25年度

キシログルカンオリゴ糖とパラチノースのカーネーションの開花促進作用、及び2-アミノオキシイソ酪酸の老化抑制作用について、花弁の形態変化を観察し、さらにエチレン生成の推移を調査した。

2,4-ピリジンジカルボン酸(PDCA)の、カーネーション切り花の老化抑制効果を発見した。この薬剤の作用機構を明らかにするために、カーネーション由来の1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素とACC酸化酵素の遺伝子を、大腸菌内で発現させて両酵素タンパク質を取得した。この組み換え酵素を用いて、PDCAの作用の酵素学的検討を行った。

(3)平成26年度

PDCAの処理条件(濃度,処理時間)を検討するとともに、カーネーション品種(ライトピンクバーバラ,ミュール)を変えてPDCAの作用特性を調査した。

4.研究成果

カーネーションでは、雌ずいで生成するエチレンが花の老化の「スターターエチレン」として働いていることが明らかにされていた。本研究の当初の目的として、アブシシン酸(ABA)が雌ずいのエチレン生成誘導因子であることを実証することを取り上げた。平成24年度の研究では、カーネーションのABA合成ではカロチノイド開裂酵素遺伝子*DcNCED1*が、ABA作用ではABA受容体遺伝子*DcPYR1*が鍵遺伝子として機能することを明らかにした。さらに、短寿命性を示すカーネーション品種「ライトピンクバーバラ(LPB)」と「エクセリア(Exc)」,および長寿命品種「ミラクルルージュ(MR)」を用いて、開花と老化時の雌ずいおよび花弁におけるABA含量の変動調査とABA関連遺伝子発現の比較解析を行い、雌ずいのABA含量の多少と雌ずいのエチレン生成量の多少が、パラレルに相関することを明らかにした。この結果から、カーネーションにおいて、ABAがエチレン生成誘導因子としての機能していることを実証した。

ABA関連の研究が順調に進んだので、ABAのエチレン生成誘導における役割の解析を継続すると共に、平成25年度から開花と老化の機構の解析と応用に研究を展開した。平成25年度は、カーネーション切花を材料に用いて、

キシログルカンオリゴ糖とパラチノースによる開花促進作用、及び2-アミノオキシイソ酪酸の老化抑制作用を見出して、それら薬剤の分子作用機構を明らかにした。さらに、2,4-ピリジンジカルボン酸(2,4-PDCA)のスプレーカーネーション切り花の観賞期間延長作用を発見し、老化抑制作用の特性を明らかにすると共に、この薬剤が「ACC酸化酵素の活性を阻害してエチレン生成を抑制する」分子作用機構を明らかにした。

平成26年度(最終年度)は、PDCAの作用の解析をさらに進めて、この物質がスプレーカーネーションの老化を抑制すると共に蕾の開花を速めること、および本来開花せずに寿命を終る蕾の開花を誘導することを明らかにした。PDCAのスプレーカーネーションの観賞期間延長作用は、この3つの作用が合わさって発現されることを実証した。これらの結果をまとめて、「PDCAは花を早く咲かせて長持ちさせ、しかも、本来咲かない蕾も咲かせる夢の薬剤である」ことを提案した。

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10件)

Sugiyama, S., Morita, S. and Satoh, S. Three criteria for characterizing flower opening profiles and display values in cut spray-type carnation flowers. *Journal of Applied Horticulture* 17(1): (in press) (2015). (査読有)

<http://horticultureresearch.net/index.php>,

Sugiyama, S., Morita, S. and Satoh, S. Pyridinedicarboxylic acids prolong the vase life of cut flowers of spray-type 'Light Pink Barbara' carnation by accelerating flower opening in addition to an already-known action of retarding senescence. *The Horticultural Journal* 84(2): 172-177 (2015). (査読有) DOI:

<http://doi.10.2503/hortj.MI-025>,

佐藤茂.ピリジンカルボン酸類のスプレーカーネーション切り花の開花に対する作用. *植調* 49(1):28-31 (2015). (査読無)

<http://japr.or.jp/press/index.html>

Nomura, Y. and Satoh, S. Pathway and genes for the biosynthesis and action of abscisic acid in carnation flowers. *International Journal of Horticulture and Floriculture* 2(10):137-141 (2014). (査読有)

<http://internationalscholarsjournals.org/journal/ijhf>

Satoh, S., Kosugi, Y., Sugiyama, S. and Ohira, I. 2,4-Pyridinedicarboxylic acid prolongs the vase life of cut flowers of spray carnations. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 83(1): 72-80 (2013). (査読有)

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>
Satoh, S., Miyai, M., Sugiyama, S and Toyohara, N. Palatinose-hydrolyzing activity and its relation to modulation of flower opening in response to the sugar in *Dianthus* species. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 82(4): 337-343 (2013). (査読有)

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>
Satoh, S., Tateishi, T. and Sugiyama, S. Preparation of a xyloglucan oligosaccharide mixture from tamarind seed gum and its promotive action on flower opening in carnation cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 82(4): 337-343 (2013).
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>

Nomura, Y., Harada, T., Morita, S., Kubota, S., Koshioka, M., Yamaguchi, H., Tanase, K., Yagi, M., Onozaki, T. and Satoh, S. Role of ABA in triggering ethylene production in the gynoecium of senescing carnation flowers: changes in ABA content and expression of genes for ABA biosynthesis and action. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 82(3):242-254 (2013). (査読有)

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>
Tanase, K., Otsu, S., Satoh, S. and Onozaki, T. Expression and regulation of senescence-related genes in carnation flowers with low ethylene production during senescence. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 82(2): 179-189 (2013). (査読有)

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>
Kawarada, M., Nomura, Y., Harada, T., Morita S., Masumura, T., Yamaguchi, H., Tanase, K., Yagi, M., Onozaki, T. and Satoh, S. Cloning and expression of cDNAs for biosynthesis of very-long-chain fatty acids, the precursors for cuticular wax formation, in carnation petals. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 82(2): 161-169 (2013). (査読有)
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1>

〔学会発表〕(計8件)

Shigeru Satoh, Yusuke Kosugi, Akane Higashi and Noriko Toyohara. 2-Aminoxyisobutyric Acid (AOIB) inhibits ethylene production and extends vase life of cut carnation flowers. The 3rd Asia Pacific Symposium on Postharvest Research, Education and Extension (APS2014). 平成26年12月9-11日. Ho Chi Minh City, Vietnam

森田重人, 杉山想, 立石亮, 佐藤茂. カーネーションの開花過程におけるアクアポリンP1P遺伝子の発現. 園芸学会(平成26年度秋季大会)平成26年9月27-29日. 佐賀大学(佐賀市).

杉山想, 佐藤茂. スプレーカーネーションの開花評価法の適用による PDCA 類の作用解析. 園芸学会(平成26年度秋季大会)平成26年9月27-29日. 佐賀大学(佐賀市).

Shigeru Satoh and So Sugiyama. Concurrent analysis of PDCA's flower-opening and senescence-retarding activities in cut spray carnation flowers. The 3rd Symposium on Bioresource Sciences for Sustainable Development of Japan and Thailand. 平成26年8月23-25日. Phatthalung, Thailand.

佐藤茂. 園芸花きの開花と老化を制御する新規薬剤の探索. 近畿植物学会. 平成26年4月19日. 大阪市立大学(理学部附属植物園)大阪府交野市.

杉山想, 小杉祐介, 大平育実, 森田重人, 佐藤茂. PDCAのスプレーカーネーション切り花の観賞期間延長作用. 園芸学会(平成26年度春季大会). 平成26年3月29, 30日. 筑波大学(つくば市).

Shigeru Satoh. Search for new chemicals which modify flower opening and senescence in cut flowers of spray carnations. The 2nd Southeast Asia Symposium on Quality Management in Postharvest System (SEAsia2013). 平成25年12月4-6日. Vientiane, Lao RDR.

佐藤茂, 立石亮, 杉山想. キシログルカンオリゴ糖のカーネーションに対する開花促進作用. 園芸学会(平成25年度秋季大会). 平成25年9月21日. 岩手大学(盛岡市).

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

森田 重人 (MORITA, Shigeto)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号: 20205637