

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660032

研究課題名(和文) 花弁柔細胞で早期老化を引き起こすヌクレアーゼ機構の解明

研究課題名(英文) Nuclease mechanism leading early senescence in mesophyll cells of petals

研究代表者

望月 寛子 (Mochizuki, Hiroko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門花き生産流通領域・上級研究員

研究者番号：60450318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チューリップやユリの花弁(内花被)の柔細胞において早期にDNAの断片化が起こっていることを確認した。チューリップ‘イルデフランス’を用いてESTを整備し、データ解析を行った。ESTデータベースからは64,922のコンティグが得られ、ヌクレアーゼ遺伝子のホモログが少なくとも65含まれていることが明らかとなった。マイクロアレイ解析をおこなったところ、花弁柔細胞で早期から発現が上昇するヌクレアーゼ遺伝子の候補が複数同定された。ユリ‘イエローウィン’の柔細胞ではS1/P1ヌクレアーゼ遺伝子のホモログの発現が柔細胞で開花後間もなく上昇することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In petals (inner tepals) of tulip and lily, we found signs of PCD, including DNA degradation and decreased protein content, earlier in mesophyll cells than in epidermal cells. We have generated an expressed sequence tag (EST) database by using a tulip cultivar ‘Ile de France’. From 64,922 contigs, we found at least 65 nuclease homologous. Based on the EST database, we arranged probes and examined a microarray analysis. Putative nuclease-associated genes were selected from the results of microarray analysis, which were up-regulated early in mesophyll cells. In lily petals (inner tepals), transcript level of S1/P1 type nuclease homolog was higher in mesophyll cells than epidermal cells after anthesis.

研究分野：園芸学

キーワード：チューリップ ユリ 花弁 老化 ヌクレアーゼ EST マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景

花卉において、萎れや変色といった可視的老化が観察される前から、花卉では DNA の断片化が起こり、プログラム細胞死 (PCD) が始まっている。我々はこれまでのチューリップ花卉 (内花被) を用いた研究において、早期に始まる PCD は花卉表皮細胞ではなく、柔細胞で特異的に生じていることを明らかにしてきた。ユリ、チューリップのようなエチレン非依存性花きでは、花卉柔細胞における PCD は花持ちを決定付ける重要な要因と考えられる。

プログラム細胞死 (PCD): あらかじめ決められた場所とタイミングで細胞自身が積極的に自らを消去する仕組みであり、細胞の自殺とも表現されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、この「PCD の開始と進行」について、表皮細胞と柔細胞に分けて検証し、とくに柔細胞で生じる PCD の実行因子であるヌクレアーゼ機構を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) 材料として、チューリップ 'イルデフランス' の他に、ユリ 'イエローウィン' の花被 (内花被) から表皮細胞と柔細胞をそれぞれ分離サンプリングし、老化様式を比較検証した。

老化の指標として、DNA 断片化、細胞の形態観察およびプロテイナーゼ活性の変化を検討した。DNA の抽出には CTAB 法を用いた。形態観察では、植物サンプルを FAA で固定し、樹脂包埋の後に厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を作成して、顕微鏡を用いて観察した。プロテイナーゼ活性ではアゾカゼイン法を用いた。

(2) 花卉柔細胞と表皮細胞におけるヌクレアーゼ活性の特徴を明らかにするために SDS-PAGE 法による In-gel DNase assay を行った。ゲルの SDS 濃度は 15 % とし、25 ~ 60 程度と予想される比較的小さな分子量のヌクレアーゼの検出を試みた。

(3) 花卉柔細胞において早期老化に関与するヌクレアーゼ関連遺伝子の同定を目指し、チューリップ花卉では世界で初めてとなる EST (expressed sequence tag) の整備を行った。材料はチューリップ切り花 'イルデフランス' を用いた。

チューリップを開花前から老化後の複数のステージに分け、各ステージの花卉から RNA を抽出した。若い葉と老化葉、雌ずい、雄ずい、茎、球根からも同様に RNA を抽出した。抽出 RNA より cDNA を合成し、断片化した後に次世代シーケンサーを用いて 40 万リード以上の配列を取得した。cDNA 配列決定にあたっては 1 リードで平均 350 塩基、また 1

ランで 100 万リード以上の配列を取得できるロシユ社 FLX Titanium を使用した。

(4) EST データベースをもとにアジレント社の eArray プログラムを用いてプローブを設計し、マイクロアレイ解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) ユリ 'イエローウィン' の花卉 (内花被) 柔細胞においてもチューリップ同様に早期から PCD が認められることを確認した。表皮細胞は開花 7 日目に一部の細胞で崩壊が認められるが (図 1 右) 落弁するまでに細胞数に明らかな減少は認められない。柔細胞は花卉の退色等が認められる前の開花 2 日目から細胞が崩壊し (図 1 左) 細胞数も有意に減少した (図 2)。

DNA 断片化は表皮細胞では開花 5 日目から認められるのに対し、柔細胞では 2 日目から顕著になった (図 3)。プロテイナーゼ活性は表皮細胞では開花 5 日目から、柔細胞では 1 日目から上昇した (図 4)。

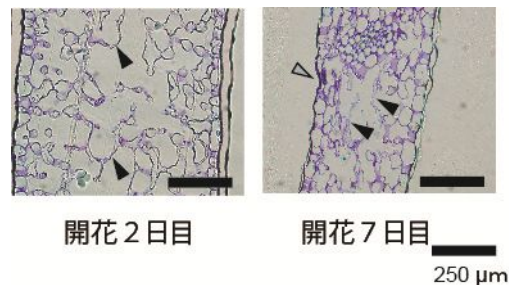


図 1 細胞の形態変化  
黒色矢印は崩壊した柔細胞、灰色矢印は崩壊した表皮細胞を指している。

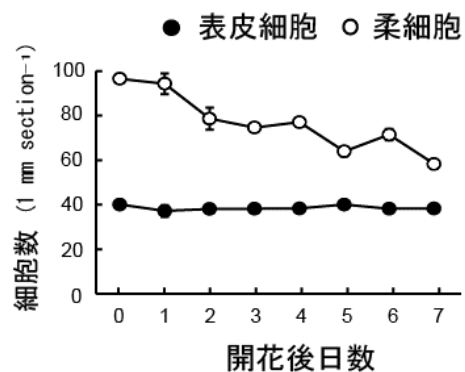


図 2 細胞数の変化

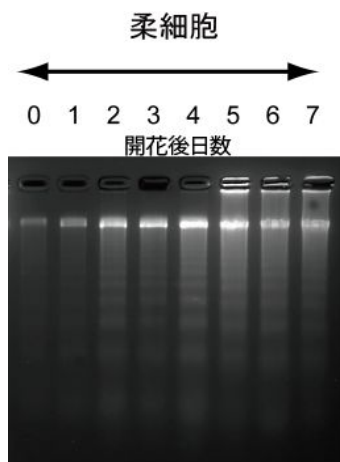


図3 DNA断片化

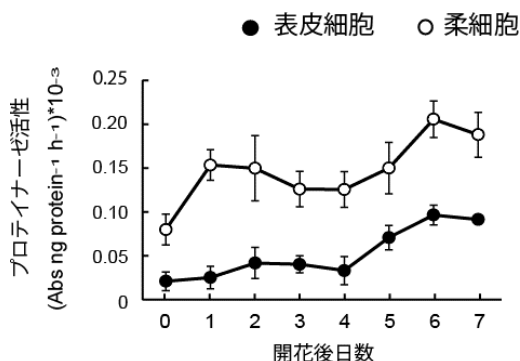


図4 プロテイナーゼ活性

以上の結果より、ユリ‘イエローウィン’の花弁においても表皮細胞に比べて柔細胞において早期からPCDが進行していることが示された (Mochizuki-Kawai H, et al, PLoS ONE, 2015)。

(2) チューリップ ‘イルデフランス’ から柔細胞をサンプリングし、In-gel DNase assay によってヌクレアーゼ活性を検証したところ、分子量 30kDa 付近にバンドを確認した。

(3) EST データベースを解析した結果、64,922のコンティグと3,712のシングルレットが得られた。5.6%のコンティグは1000bp以上の長さを有し、77.7%のコンティグは500-999bp、16.2%のコンティグは100-499bpであった。全体として、99.5%のコンティグが100bp以上の長さを有していた。

リード数	998167
コンティグ数	64922
シングルレット数	3712

64,922のコンティグのうち、アノテーションが得られたコンティグは92.4%の59,998であり、ヌクレアーゼ遺伝子のホモログが少なくとも65含まれていた。

(4) マイクロアレイの結果をもとに花弁柔細胞で早期から発現が上昇するヌクレアーゼ遺伝子の候補として複数のホモログを単離した。ホモログの中には、Rnase と DNase のいずれの活性も有する S1P1 タイプヌクレアーゼ、カルシウム依存性酵素であるブドウ球菌ヌクレアーゼ、その他に核外 DNA の分解に重要であることが指摘されているエキソヌクレアーゼなどが含まれていた。

それぞれのホモログに対する発現解析を行った結果、花弁柔細胞において表皮細胞より早期に発現が上昇しているホモログを確認した。

一方、ユリ ‘イエローウィン’ の柔細胞では S1P1type ヌクレアーゼ遺伝子ホモログの発現が柔細胞で上昇することを確認し、オープンアクセスジャーナルにて公表した (Mochizuki-Kawai H, et al, PLoS ONE, 2015)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mochizuki-Kawai H, et al., Programmed cell death progresses differentially in epidermal and mesophyll cells of lily petals. PLoS ONE. 10, e143502, 2015.  
doi:10.1371/journal.pone.0143502

〔学会発表〕(計1件)

望月寛子、仁木朋子、市村一雄、ユリ花被の表皮細胞と柔細胞における老化進行の違い、平成27年度園芸学会春季学会、平成27年3月28日、千葉大学(千葉県・千葉市)

〔図書〕(計1件)

望月寛子、一般社団法人農山漁村文化協会、花き園芸学の基礎、第5章、2015、182-184

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 寛子 (MOCHIZUKI, HIROKO)  
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・花き生産流  
通領域・上級研究員  
研究者番号：60450318