

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850026

研究課題名(和文) マイクロRNAによるエチレン非依存性花きの老化制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the regulatory mechanism of petal senescence by micro RNA in ethylene-independent flowers

研究代表者

渋谷 健市 (Shibuya, Kenichi)

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研究領域・上級研究員

研究者番号：10462532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：花弁の老化にエチレンが関与しない花(エチレン非依存性花き)では、有効な日持ち延長技術が開発されておらず、花弁老化の制御機構の解明が求められている。エチレン非依存的老化を示すアサガオ「紫」では、花弁の老化時にマイクロRNAの一種であるmiR156ホモログの蓄積量が増加していた。miR156の標的配列をもつSPL遺伝子の機能を解析した結果、花弁の老化制御における役割は確認できなかったが、予期せず、日長による花成誘導に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：While the phytohormone ethylene is known to play a crucial role in petal senescence in some plant species, little is known about the regulation of ethylene-independent petal senescence. In Japanese morning glory cv. Violet, an ethylene-independent flower, the abundance of microRNA156 (miR156) increased in senescing petals. We analyzed a role of potential target genes of miR156, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL) homologs, in petal senescence. The results suggest that the SPL genes are not involved in the regulation of petal senescence; however, the SPL genes may play a role in the regulation of flowering.

研究分野：花き園芸学

キーワード：花弁老化 アサガオ マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

花卉の老化がエチレンによって制御されている花き(エチレン依存性花き)では、老化機構の解明が進み、効果的な品質保持技術が開発されている。これに対し、エチレン非依存性花き(花卉の老化にエチレンの関与が小さい花き)の老化制御機構はほとんど分かっていない。我々は、アサガオを用いてエチレン非依存的老化の制御因子の特定を試みてきた。マイクロ RNA は 18~26 塩基からなる機能性低分子 RNA であり、遺伝子発現の転写後抑制機構として注目を集めている。マイクロ RNA は組織および時期特異的に発現し、相同性配列を含む遺伝子(標的遺伝子)の mRNA を分解、あるいは翻訳を阻害することで、様々な生理現象の調節に深く関与している。ヒトでは全遺伝子の 1/3 程度の遺伝子の発現がマイクロ RNA による制御を受けていると推測されている<sup>(1)</sup>。現在、シロイヌナズナでは、約 200 種のマイクロ RNA が同定され、成長・発達、形態形成、ホルモン応答、ストレス反応等において重要な役割を果たしていることが明らかになってきている<sup>(2)</sup>。

近年、葉の老化制御において、マイクロ RNA が重要な役割を果たしていることが見出された。シロイヌナズナのマイクロ RNA の一つである miR164 は、葉の老化に伴い発現量が減少し、その結果、標的遺伝子である ORE1 転写因子 mRNA の蓄積量が増加することで、葉の老化を誘導している<sup>(3)</sup>。また、miR319 の過剰発現変異体では、ジャスモン酸の生合成が低下し、葉の老化が遅延することが示されている<sup>(4)</sup>。花卉の老化制御にも、マイクロ RNA が関与している可能性がある。しかしながら、シロイヌナズナでは花卉の老化に関する研究がほとんど行われておらず、マイクロ RNA による花卉老化制御に関する知見は得られていない。

我々は、これまでに高速シーケンサーを用いてアサガオ花卉の老化時に発現するマイクロ RNA の網羅的な解析を行った。その結果、miR156/157 の蓄積量が花卉の老化開始期に急激に増加することを見出している。

シロイヌナズナでは、miR156 は *SPL* (*SQUAMOSA promoter-binding protein-like*) 遺伝子を標的としていることが知られている。*SPL* は生育相の転換や花器官の発達において重要な役割を果たしている転写因子である<sup>(5)</sup>。

本研究では、miR156 と *SPL* 遺伝子の花卉老化に果たす役割を明らかにする。

### 2. 研究の目的

エチレン非依存性花きでは、有効な品質保持技術が開発されておらず、花卉老化の制御機構の解明が求められている。本研究では、miR156 を介した花卉老化における遺伝子制御ネットワークを明らかにする。エチレン非依存性花きでは老化を制御する因子の手がかりさえつかめていなかったが、本研究により新しい原理に基づいた品質保持技術の開

発につながると期待される。

本研究では、miR156 と *SPL* 遺伝子に関する形質転換アサガオを作成し、マイクロ RNA を介した花卉の老化制御機構について解析を行う。これまでに得られている知見から、以下の作業仮説が考えられる。花卉の老化時には、miR156 の発現量が増加し、標的遺伝子である *SPL* の転写産物が分解される。この結果、*SPL* による老化の抑制が解除(脱抑制)され、老化が引き起こされる(図 1)。

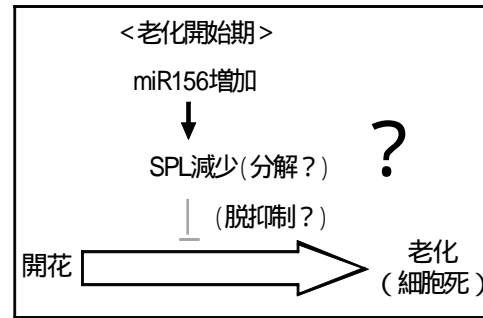


図 1 miR156 による花卉老化制御の作業仮説

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物材料

本研究では、アサガオ (*Ipomoea nil*) 「紫」を用いた。インキュベータ内で栽培し、播種後 1 ヶ月間は、24 ℃、相対湿度 70%、16 時間日長条件においた。その後、花芽を誘導するため日長を 12 時間に変更し、栽培を続けた。

#### (2) 方法

イルミナ社 GA II x シーケンサーを用いて、開花前 12 時間(蕾)、開花時、開花後 8 時間目の花卉サンプルについて、各サンプル当たり 1000 万リード相当の低分子 RNA シーケンス解析を行った。また、得られた cDNA 情報に関して miRBase マッピングを行った。

アサガオ EST データベース(ナショナルバイオリソースプロジェクト)における Blast 検索と、PCR を用いた RACE 法により、アサガオ *SPL* ホモログを単離した。得られた *SPL* ホモログの花卉老化時における発現様式を解析した。

miR156 の標的配列に同義置換を入れた miR156 耐性 *SPL* を過剰発現するコンストラクトを作製し、アサガオに導入した。得られた形質転換体について、花卉の老化特性を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) miR156 の花卉における蓄積量の推定

本研究に用いたアサガオ「紫」は、栽培室(24 ℃一定、相対湿度 70%、12 時間日長)で栽培した場合、開花後約 12 時間後から可

視的な花弁の老化（花弁の萎れ）が認められた（図2）。

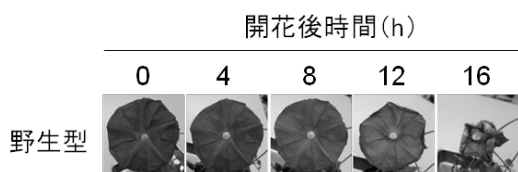


図2 アサガオ「紫」老化の様子

開花前12時間（蕾）、開花時、開花後8時間目の花弁サンプルについて、各サンプル当たり1000万リード相当の低分子RNAシーケンス解析を行った結果、シロイヌナズナのmiR156と同一の配列を持ったsRNA（miR156ホモログ）のリード数が開花後8時間の花弁サンプルで顕著に増加していた（図3）。これらの結果から、アサガオ花弁では、花弁の老化時にmiR156ホモログの蓄積量が増加すると推測された。

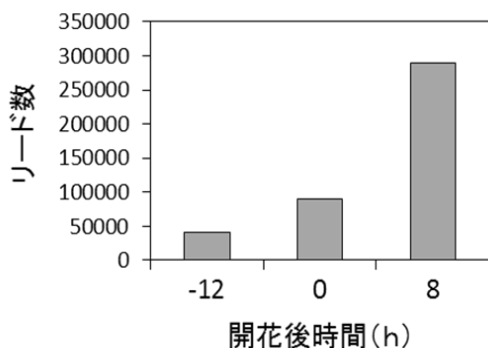


図3 アサガオ花弁老化時における miR156 ホモログのリード数の変化

(2) miR156 ホモログの標的遺伝子の単離  
アサガオ EST データベースにおいて、シロイヌナズナの *SPL* 遺伝子の配列をもとに Blast 検索を行った。さらに、miR156 の標的配列を含有する *SPL* ホモログを抽出し、RACE 法により 2 種の ORF 全長を含む *SPL* ホモログ (*InSPL1*、*InSPL2*) を得た。

*InSPL1* と *InSPL2* の発現量は、開花前の蕾および開花時の花弁に多く、花弁の老化に伴って減少した（図4）。

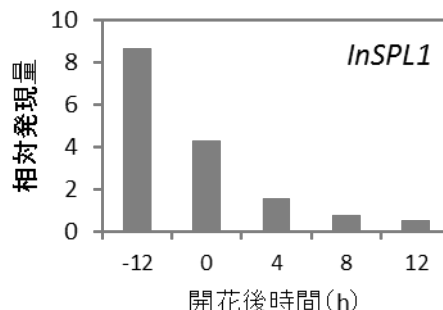


図4 花弁老化時における *InSPL1* の発現

(3) miR156 耐性 *SPL* 過剰発現体における花弁の老化

*InSPL1* と *InSPL2* の mRNA が miR156 による分解を受けないように、*InSPL1* と *InSPL2* 配列内の miR156 標的配列を同義置換し、アサガオで過剰発現させた形質転換体 (m*InSPL1* と m*InSPL2* 系統) を作出した。

m*InSPL1* および m*InSPL2* 系統と野生型の間で、花弁の老化様式を比較した結果、老化の進行に明確な違いは認められなかった。したがって、*InSPL1* および *InSPL2* mRNA の花弁老化時における減少は、花弁の老化調節には関連していないと推察された。

(4) miR156 耐性 *SPL* 過剰発現体における花成反応

m*InSPL1* と m*InSPL2* 系統では、予期せず、長日条件下 (16 時間日長) で花成が誘導される現象が観察された。アサガオは短日植物であるため、野生型では長日条件化では花成が誘導されない。そこで、本研究では *InSPL1* および *InSPL2* の、花成反応への関与について解析を行った。

m*InSPL1* と m*InSPL2* 系統の芽生えに対して、1 回の短日処理を与えた結果、m*InSPL1* 系統では効果が認められなかったが、m*InSPL2* 系統では terminal flower が形成された個体があった。これらの結果から、*InSPL2* がアサガオの日長による花成誘導に関与していることが示唆された。

#### < 引用文献 >

- (1) Farh KK et al. (2005) The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310: 1817-1821.
- (2) Willmann MR and Poethig RS (2007) Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 503-511.
- (3) Kim JH et al. (2009) Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science* 323: 1053-1057.

(4) Schommer C et al. (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. PLoS Biol. 6: e230.

(5) Chen X et al. (2010) SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. J. Integ. Plant Biol. 52: 946-951.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

渋谷健市、アサガオ *SPL* 遺伝子の花弁老化および花成反応における役割の解明、形質転換植物デザイン研究拠点平成27年度 成果報告会、平成27年12月19日、筑波大学

〔図書〕(計0件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渋谷 健市 (SHIBUYA, Kenichi)

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研究領域・上級研究員

研究者番号：10462532