

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450044

研究課題名(和文) 花の開花における花弁細胞壁マトリックス多糖類の機能

研究課題名(英文) Function of petal cell wall matrix polysaccharide in flower opening

研究代表者

立石 亮 (TATEISHI, Akira)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30267041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カーネーション、バラならびにトルコギキョウの開花過程では、花弁細胞の細胞壁からアラビノースの遊離がみられ、同時にアラビノフラノシダーゼ活性の上昇がみられた。カーネーションには少なくとも9つの本酵素遺伝子が存在し、そのうち2つの発現が活性変動と一致した。また、これに先立ち、アクアポリン遺伝子の発現が観察された。キシログルカン由来のオリゴ糖を生け水とともに吸水させたところ、カーネーションとキクで開花促進効果が認められた。以上より、カーネーションの開花ではアクアポリンによる水の流入と特定の細胞壁マトリックスの分解およびキシログルカンの代謝が生じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Loss of arabinosyl residues from cell wall polysaccharides was observed in petals of carnation, rose and Eustoma during flower opening. Concomitantly, an increase in -arabinofuranosidase activity was observed. At least nine -arabinofuranosidase genes are present in carnation, the expression of two of them coincided with increase of the activity. When xyloglucan derived oligosaccharides were absorbed together with water, the flowering was promoted in carnation and chrysanthemum. It was suggested that water influx by aquaporin, degradation of arabinose-containing cell wall matrix and restructuring of xyloglucan occurred in flower opening of carnation.

研究分野：農学

キーワード：開花 細胞壁 多糖類

1. 研究開始当初の背景

園芸植物では品質の向上とその維持が重要である。切り花では観賞期間が花の品質を決める重要な要素の一つで、海外では、食品に表示されるような品質保持期限を提示し、品質保証を行っていることもある。切り花では蕾から開花するまでの過程が長時間であること、また、開花後老化し、萎れが生じるまでの時間が長いことが長期に花を觀賞することにつながる。これまでの研究では、開花後の花の老化を抑制することが注目され、老化関連ホルモンであるエチレンについての研究が数多くなされてきた。

生産現場では、花の日持ち性を向上させるために、一般的には蕾の段階で花を採取し、流通過程で開花させる。採取のステージや季節、その後の温度管理によっては、蕾のまま枯死してしまう例もある。また、多くの場合、蕾段階の花を冷蔵することで短期間の貯蔵（開花抑制）は可能であるが、葬祭に用いるなどの急な需要に対して、開花を早める技術の開発も期待されている。花の開花メカニズムの解明は、このような花卉流通産業への技術的開発の一助となる。

多くの花において、開花とは花弁を構成する細胞の肥大によって生じるとされている。数種の花においては、特定の単糖が開花のエネルギー源として働くとともに、花弁液胞に取り込まれ浸透圧調節物質として働くことで開花促進に作用する。この糖類による開花誘導は広く知られているが、花の種類によっては十分な効果が得られないこともある。また、植物細胞は細胞の周囲に細胞壁が存在することから、水の流入による細胞の肥大には細胞壁の構造変化、すなわち細胞壁の伸長やゆるみが必要である。しかしながら、花の開花における細胞壁研究は主にその代謝酵素遺伝子の発現レベルでの解析が中心で、花弁細胞での多糖類の変化や酵素タンパクとしての機能解析はほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、花の鑑賞期間を左右する開花について、花弁を構成する細胞の細胞壁マトリックス多糖類の動態を明らかにすること、マトリックス多糖類由来の糖類が開花に及ぼす影響について、また、開花時の花弁細胞内への水の流入について調べ、開花時花弁の変化を考察した。

バラやカーネーションの開花過程では、エンド型キシログルカン転移/加水分解酵素(XTH)やエクспанシン(Expansin)の遺伝子発現が、開花時特異的あるいは花弁の伸長部位特異的にみられることが示されている。これまでに花以外では植物の成長過程や果実の軟化・肉質形成過程でキシログルカン以外のマトリックス多糖類の変化がみられていることから、本研究では、開花時に生じる細胞壁(特にセルロースを除くマトリックス多

糖類)の再構築について着目した。この変化については、多糖類を構成する単糖組成を化学分析により調べるとともに、代謝酵素をタンパク質及び遺伝子レベルでその動態を明らかにする。また、同時に水の流入にかかわるアクアポリンについても解析し、開花との関係を調べた。一方、マトリックス多糖類由来のオリゴ糖を用いて、開花促進効果を検証し、新奇の開花促進剤としての利用を検討するとともに、マトリックス多糖類の開花における役割を考察することを目的とした。

3. 研究の方法

カーネーション、トルコギキョウならびにバラを用いて、開花時における花弁細胞壁の中性糖(アラビノース、ガラクトース、キシロース、フコース、グルコース、マンノースならびにラムノース)組成の変化を調べた。アルコール抽出残渣から細胞壁多糖類を得た。TFAで加水分解し、HPAEC-PADでその単糖組成を分析した。また、花弁より粗酵素液を抽出し、グリコシダーゼ活性の変化を調べた。これらについて、品種間あるいは別種の花を用いて、同様に分析した。また、マトリックス多糖類の変化にかかわる酵素遺伝子を定量PCRで発現解析を行った。さらに、開花時の水流入にかかわるアクアポリン遺伝子の発現も同様に調べた。一方、糖類が促進する開花に対して、細胞壁由来のオリゴ糖が開花誘導を引き起こすかについて調査するため、オリゴ糖を調製し、生け水とともに取り込ませ、開花に及ぼす影響を調査した。

4. 研究成果

キシログルカン以外のマトリックス多糖類を構成する中性糖組成の変化を調べるとともに、その代謝にかかわるグリコシダーゼ活性を測定した。カーネーション、トルコギキョウならびにバラを用いて、開花時における花弁細胞壁の中性糖(アラビノース、ガラクトース、キシロース、フコース、グルコース、マンノースならびにラムノース)組成の変化を調べたところ、各種の花で開花に伴ってアラビノースの遊離が認められた。また、一部の花ではガラクトースの遊離も認められた。その他の中性糖については開花に伴う増加・減少について一定の傾向はみられなかった。開花時における種々のグリコシダーゼ活性を測定したところ、 α -アラビノフラノシダーゼおよび β -キシロシダーゼ活性の上昇が共通してみられた。また、 β -ガラクトシダーゼの活性変動は花の種類によって異なった。前者両酵素活性の上昇から開花におけるこれらの酵素の重要性が示唆された。

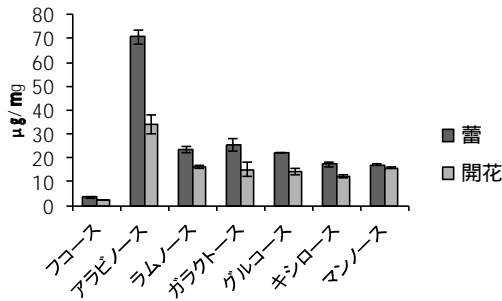


図 1. カーネーションにおける細胞壁構成糖の変化.

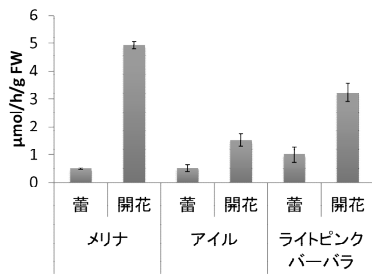


図 2. 開花に伴う酵素活性の変動.

これまでにエンド型キシログルカン転移・加水分解酵素 (XTH) やエクспанシン遺伝子の発現が数種の花の開花時にみられている。中性糖を主な構成糖とする細胞壁マトリックス成分について、開花時の花弁におけるその変化を調べたところ、特定の中性糖遊離が観察され、それを遊離する酵素活性の増大もみられた。これらの変化について品種間における違いを比較した結果、開花時におけるこれらの細胞壁成分 (中性糖組成) の変化や代謝酵素活性の増大は調べた品種間においては共通していた。一方、別種の花について同様に調査したところ、同様の変化を示すタイプと示さないタイプがあった。このことは、同一種の花の開花過程では、花弁を構成する細胞壁マトリックス多糖類に同じような変化が生じ、この花弁細胞壁の構造変化を引き起こすグリコシダーゼ類が開花を誘導している可能性が示唆されるが、花の種類によっては別の機構あるいは別の酵素が働いていることを示唆している。なお、切り花の開花時に誘導される本酵素や変化が生じるマトリックス多糖類の役割について、これまでに研究の進んでいる果実と比較するため、トマトを用いてこれらの役割や関連性について比較・検討した。その結果、開花期にみられる α -アラビノフラノシダーゼ活性の上昇は、特定のトマト品種果実においても生じることが明らかとなった。また、 α -アラビノフラノシダーゼのエチレン応答性について、クライマクテリック型果実を用いて検証したところ、エチレンに対する異なる応答性がイソ酵素間でみられ、花の開花でも同様

の現象が生じていると推察された。

カーネーションを材料として、 α -アラビノフラノシダーゼについてその遺伝子発現を調べた。ゲノム情報から、カーネーションには少なくとも9つの本酵素遺伝子が存在し、定量 RT-PCR の結果、開花の後半に2つの遺伝子の転写産物の蓄積量が増大した。この2つの α -アラビノフラノシダーゼは糖質加水分解酵素ファミリー3 に属し、系統樹解析の結果、本酵素活性のほかに キシロシダーゼ活性を持つことが推察され、開花時にマトリックス多糖類であるアラビナンやキシランの分解が生じることが示唆された。

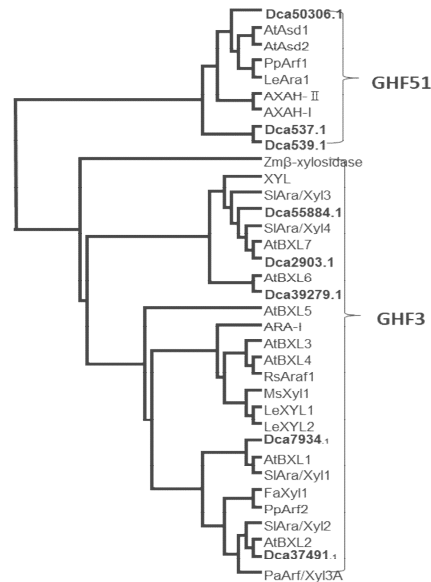


図 3. カーネーション及び他の植物種における α -アラビノフラノシダーゼの系統樹.

開花は花弁を構成する花弁細胞が肥大することによる花弁の伸長、展開、外側への反り返りにより生じるとされている。花弁の展開に伴う花弁の成長は、主に細胞肥大によって起こり、花弁細胞の肥大は、細胞壁のゆるみ他に細胞内への水の流入が必要となる。水の流入ではアクアポリンがその中核を担っているが、カーネーションでは、8個の PIP 遺伝子を含む 27 個のアクアポリン遺伝子が存在し、定量 RT-PCR の結果、花弁では DcPIP2;1 と DcPIP1;1 の2個の PIP 遺伝子が主に発現していた。これらの遺伝子の転写産物は他の組織でも蓄積していたが、花弁では開花過程を通じて高いレベルで維持されており、開花時の花弁の成長に関わっていることが示された。

以上のことから、カーネーションでは、特定の PIP が開花時における花弁細胞への水の流入に関わり、その後、細胞壁マトリックスのアラビナンやキシランが α -アラビノフラノシダーゼや キシロシダーゼアイソザイムによって分解され、細胞の肥大成長が生じ、開花を誘導していると考えられた。

ある種の糖質を切り花に処理すると浸透圧調節物質として、また、エネルギー基質として働くため、開花が促進されることが知られている。一方で、カーネーションの一部の品種において、細胞壁成分由来のオリゴ糖でも開花促進効果を示すことが報告されている。このオリゴ糖について、その開花促進効果を数種の花で検証した。市販のキシログルカンとキシログルカン特異的キシログルカナーゼで処理し、オリゴ糖を精製した。得られたキシログルカンオリゴ糖はキシロースおよびグルコースから構成される、7、8、9糖の混合物で、これを生け水とともに処理した。カーネーション品種のうち新たに2品種と、キクにおいて開花促進効果が観察された。

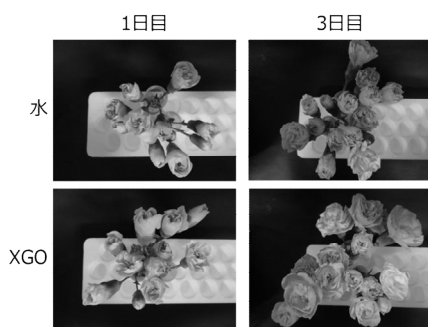


図4. オリゴ糖による開花促進効果.

また、バラやユリでは用いた品種では開花促進効果は認められなかった。一方、キチン由来のオリゴ糖溶液を吸水させても開花促進効果はみられなかった。これらの結果から、生け水とともに取り込まれたキシログルカンオリゴ糖が内在するキシログルカンの代わりに XTH のつなぎ換えの基質として働くために、既存のキシログルカン同士が再結合できずにゆるみが継続し、水の吸収に伴う細胞肥大（花弁の肥大・伸長）が進行して開花が促進されたことが示唆された。

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2件)

Yusuke Kamiyoshihara, Shinji Mizuno, Mirai Azuma, Fumika Miyohashi, Makoto Yoshida, Junko Matsuno, Sho Takahashi, Shin Abe, Hajime Shiba, Keiichi Watanabe, Hiroaki Inoue, Akira Tateishi. Opposite Accumulation Patterns of Two Glycoside Hydrolase Family 3 -L-Arabinofuranosidase Proteins in Avocado Fruit during Ripening. 2018. The Horticulture Journal. 査読有. In Press. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-142>

Shigeto Morita, So Sugiyama, Akira Tateishi, Shigeru Satoh. Identification and Characterization of Plasma Membrane Intrinsic Protein (PIP) Aquaporin Genes in Petals of Opening Carnation Flowers. 2017. The Horticulture Journal. 査読有. 86: 78-86.

<https://doi.org/10.2503/hortj.MI-127>

〔学会発表〕(計7件)

平野雅也・上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・佐藤 茂・立石 亮. 数種の花に対するキシログルカン由来オリゴ糖の開花促進効果. 2017. 一般社団法人園芸学会.

Akira Tateishi, Yusuke Kamiyoshihara, Yukihiisa Sawada and Masaya Hirano. A possible role of arabinose-containing polysaccharides in carnation flower opening. 2016. Cell Wall Meeting 2016. 聖代橋史佳・久保深雪・上西愛子・吉田誠・上吉原裕亮・立石 亮・井上弘明. 生食・加熱調理兼用トマト‘湘南ポモロンレッド’の肉質形成と -アラビノフラノシダーゼ. 2016. 園芸学会.

立石 亮・武内理香・棚瀬幸司・上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・井上弘明. カーネーションの開花時に発現上昇する2つの -アラビノフラノシダーゼ様遺伝子. 2016. 園芸学会.

聖代橋史佳・久保深雪・吉田誠・上吉原裕亮・立石 亮・井上弘明. トマト‘湘南ポモロン’における -アラビノフラノシダーゼ遺伝子の発現解析. 2015. 園芸学会.

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キュアポリン PIP 遺伝子の発現. 2014. 園芸学会.

武内理香・立石 亮・渡辺慶一・井上弘明. 数種の花の開花過程における花弁細胞壁多糖類のアラビノース代謝. 2014. 園芸学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 亮 (TATEISHI, Akira)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30267041