

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660021

研究課題名(和文)メラトニンによる開花時刻の決定機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the decision mechanism of flower opening time by melatonin

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アサガオの切り花にメラトニンを処理すると花弁の展開時間が短縮され開花時刻が早まり、メラトニン合成阻害剤(N-アセチルトリプタミン)を処理すると花弁の展開時間が延長され開花時刻が遅延することを明らかにした。また、12時間の暗期を処理したアサガオの切り花では、展開中の花弁でメラトニン合成酵素遺伝子(InAAANAT, InASMT)の転写産物量およびメラトニン含量が増加することも確認した。以上から、アサガオの暗期誘導性の開花(花弁展開)にはメラトニンが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed that treatment of melatonin to the cut flowers of morning glory shortened the time of petal opening and hastened the clock time of flowering. Meanwhile, treatment of N-acetyl tryptamine, a melatonin synthesis inhibitor, was extend the time of petal opening and delayed the clock time of flowering. We also confirmed that transcript abundance of melatonin biosynthesis enzyme genes (InAAANAT, InASMT) and melatonin content were increased in opening petals of morning glory cut flowers treated with the dark period of 12 hours. From these results, it is suggested that melatonin is involved with the dark period induced flower opening of morning glory.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：アサガオ 開花時刻 メラトニン 花弁展開 AANAT ASMT

1. 研究開始当初の背景

植物の中には、特定の時刻に開花する種が存在する。その時刻は様々であり、これに基づき、リンネは‘花時計’を考案した (Linnaeus 1751)。特定の時刻に開花する性質は、虫媒受粉植物においては、花粉媒介昆虫の訪花を制限し、受粉を効率化するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。これまでの研究で、開花時刻は、光や温度などの外的要因および植物ホルモンなどの内的要因の影響を受けることが報告されている (van Doorn 2003)。しかし、それらの要因により開花時刻が決定される仕組みは未解明のままである。

アサガオの開花時刻は、開花前日に花弁が受ける暗期の長さで決定されている (Kaiharu 1980)。申請者は、開花直前のアサガオ花弁で暗期の長さに応答して転写量が変動する遺伝子群の中に概日時計に関わる遺伝子 (*PRR7*および*RVE1*) を検出した (篠崎 2012)。また、同時期の花弁で転写量が增大する遺伝子群の中に、メラトニン合成の調節に関与することが示唆される遺伝子 (*InPSR42*) を検出した (Yamada 2006)。さらに、*InPSR42* の発現抑制体では開花時刻が遅れ (小野 2011)、開花前の切り花にメラトニンを処理すると、開花時刻が早まることを確認した (小野 2013)。

メラトニンは、動物、植物、微生物に広く見られる化合物であり、哺乳類では、網膜で受容された光周期情報を概日時計を介して体内に伝えるホルモンの一種として働き、様々な生理現象の調節に関与する (飯郷 2011)。植物では、1995 年にメラトニンの存在が初めて確認され (Hattori 1995)、2012 年にはメラトニン合成の鍵酵素 (AANAT) をコードする遺伝子が同定された (Kang 2012)。しかし、植物におけるメラトニンの生理機能について明確な知見は得られていない。

先行研究から、(1) アサガオの開花時刻が開花前の花弁が受ける暗期の長さで決定され (暗期誘導性の開花)、(2) 一定時間の暗期を受けた花弁で転写産物量が変動する遺伝子群の中に概日時計やメラトニン合成への関与が示唆される遺伝子が存在し、(3) 切り花へのメラトニン処理が開花時刻を早めることが示されている。

そこで本研究では、「アサガオでは、概日時計を介して一定時間の暗期を認識した花弁でメラトニンが合成され、そのメラトニンが花弁の展開に関わる遺伝子群の発現を誘導することで開花時刻が決定されている」という作業仮説を設定し、その証明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、開花時刻の最適化による花の観賞期間の延長や結実率の向上につながる新知見を得るため、メラトニンによる開花時刻の決定機構を解明することを目的とした。具体的には、(1) メラトニンやその阻害剤が

アサガオの暗期誘導性の開花に及ぼす影響を調査し、メラトニンが開花時刻の決定に関与することを確認する。(2) 開花時のアサガオ花弁におけるメラトニン生合成酵素遺伝子の転写産物とメラトニンの量的変動を調査し、内生メラトニンレベルの変化と開花時刻との関係を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) アサガオ切り花へのメラトニンやメラトニン合成阻害剤 (N-アセチルトリプタミン) の処理が暗期誘導性の開花に及ぼす影響：開花に関して顕著な暗期応答性を示すアサガオ品種 ‘紫’ の実生を 24 に設定した恒温室内の植物培養棚に置き、12 時間日長 (明期 10:00 ~ 22:00) の蛍光灯照明 (光量子束密度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で栽培し、花芽形成を誘導した。この栽培条件下で形成された花蕾が花弁の展開 (開花) を開始する時刻は 10:00 であり、その 12 時間前の暗期開始時刻 (22:00) を本実験の基準時間 ($t = 0 \text{ h}$) とした。 $t = 0 \text{ h}$ に採取した花蕾を 1.8 ml の蒸留水、 $5 \mu\text{M}$ メラトニン水溶液または $200 \mu\text{M}$ N-アセチルトリプタミン水溶液を入れた 2 ml 容量のプラスチックチューブに挿し、24、相対湿度 70% に設定したインキュベーター内に静置して、0 または 12 時間の暗期処理を行った (以降、0 時間処理は 0D、12 時間処理は 12D と表記する)。暗期処理後の切り花は、同インキュベーター内の蛍光灯照明 (光量子束密度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で $t = 48 \text{ h}$ まで保持した。

各処理区の切り花を、上方に設置したデジタルカメラで $t = 48 \text{ h}$ まで 10 分毎にインターバル撮影した。この撮影で得た時系列画像中の切り花について、その花冠領域のピクセル値をデジタル画像解析システム (Flower Shape Analysis System) を用いてそれぞれ計測した。 $t = 0 \text{ h}$ を基準とし、各切り花の花冠領域のピクセル値がその最大値の 30% に到達するまでの時間を「花弁展開開始時間」、90% に到達するまでの時間を「開花時間」、最大値の 30% を超えて 90% に到達するまでの時間を「花弁展開の時間」とし、開花時刻の決定に関わる要因をそれぞれ評価した (図 1)。

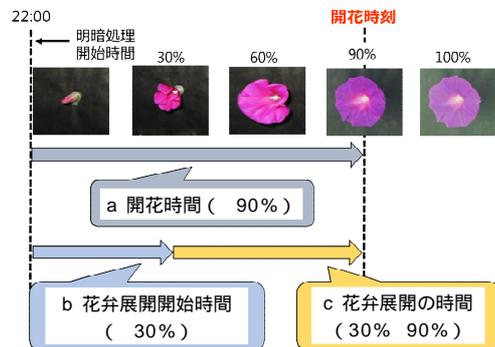


図 1 花冠面積の変化に基づき評価した開花時刻決定に関わる要因

(2) アサガオ切り花への暗期処理が花弁におけるメラトニン生合成関連遺伝子の転写量およびメラトニン含量に及ぼす影響： イネで同定されている4種類のメラトニン生合成酵素遺伝子 (*OsTDC*, *OsT5H*, *OsAANAT*, *OsASMT*) の推定アミノ酸配列を用い、アサガオ EST ライブラリーの推定アミノ酸配列群に対して相同性検索を行った。この検索で得たホモログ候補遺伝子の推定アミノ酸配列を用い、イネのタンパク質配列データベースに含まれるアミノ酸配列群に対して相同性検索を行った。検出されたアミノ酸配列のうち、相同性の最も高いものが検索に用いたイネのアミノ酸配列と一致した場合、その候補遺伝子をアサガオのホモログとした。

メラトニン生合成酵素遺伝子の転写量を調査するため、0D では $t=0$ h, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h, 40 h, 48 h および 56 h, 12D では $t=0$ h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h および 32 h に花弁を採取した。採取した花弁から RNAiso Plus (TAKARA) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA からの cDNA 合成には PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA) を用いた。合成した cDNA を鋳型とした定量的リアルタイム RT-PCR には Eco Real Time PCR System (Illumina) および KAPA SYBR Fast qPCR Universal (Invitrogen) を用いた。PCR の反応条件は、 95°C , 5 分間の初期変性処理後、 $\{ 95^{\circ}\text{C}$, 10 秒間の変性, 60°C , 30 秒間のアニーリングおよび伸長 $\}$ を 40 サイクル行った。転写産物の相対量 (相対転写産物量) を得るため、標的遺伝子と内部標準遺伝子 (*PP2A2*) の転写産物量の比を同一のサンプルについて算出した。相対転写産物量の平均値は独立した3回の反復実験から得た。

メラトニン含量の変動を調査するため、0D では $t=16$ h, 24 h および 32 h, 12D では $t=8$ h, 12 h および 16 h に花弁を採取した。また、12D では N-アセチルトリプタミン (200 μM) を処理した $t=16$ h の切り花でも花弁を採取した。花弁からのメラトニンの抽出は Shi and Chan (2014) の方法を改良して行った。上述の方法で経時的に採取した花弁サンプルを氷上で液体窒素を用いてホモジナイズし、抽出混合液 (体積比, アセトン:メタノール:水 = 89:10:1) を用いて懸濁化した。その後、遠心分離 (4500g, 5 min) し、上清をトリクロロ酢酸 (1%) が添加されたチューブに移した。上清を取り除いた残渣物に抽出混合液を加え、再懸濁化し、遠心した後、上清をトリクロロ酢酸 (1%) が添加されているチューブに再度加えた。この行程を再度繰り返した後、懸濁液を遠心分離 (2000g, 10 min) し、タンパク質を沈殿させた。上清をエバポレーター用いて乾固させた後、超純水 (Wako) で溶解した。その後、メラトニン ELISA キット (EK-DSM; Buhlmann Laboratories AG) を用いてメラトニンの定量を行った。

4. 研究成果

(1) 開花直前の明暗条件の違いがアサガオ切り花の開花に及ぼす影響： 0D または 12D の切り花の時系列画像における花冠面積を測定し、それらの値に基づき、開花時間、花弁展開開始時間および花弁展開の時間を評価した (図 2)。その結果、0D では開花時間、花弁展開開始時間および花弁展開の時間が 12D に比べていずれも有意に延長されていることを確認した。

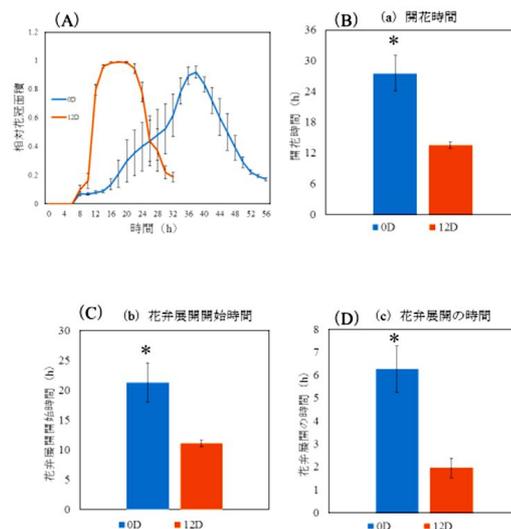


図 2 開花直前の明暗条件の違いがアサガオ品種‘紫’の開花に及ぼす影響
*は t 検定により 5%水準で有意差があることを示す。
小文字の英字 (a, b, c) は図 1 の記号を示す。

(2) アサガオ切り花へのメラトニンやメラトニン合成阻害剤の処理が暗期誘導性の開花に及ぼす影響： 12D のメラトニン処理区では、対照区と比較して、花弁展開開始時間には有意な差は検出されなかったが、開花時間および花弁展開の時間は有意に短縮されることを確認した (図 3)。

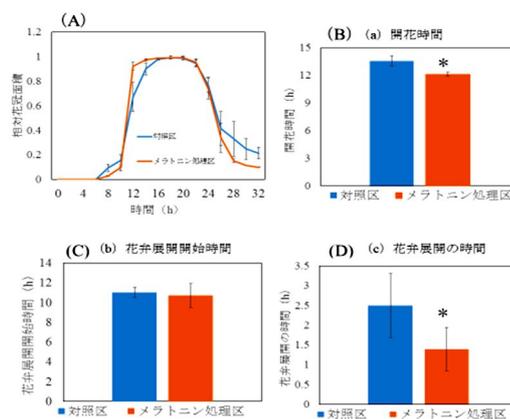


図 3 開花直前のメラトニン処理がアサガオ品種‘紫’の開花に及ぼす影響
*は t 検定により 5%水準で有意差があることを示す。
小文字の英字 (a, b, c) は図 1 の記号を示す。

一方、12Dのメラトニン合成阻害剤処理区では、対照区と比較して、花卉展開開始時間に有意な差は検出されなかったが、開花時間および花卉展開の時間が有意に延長することを確認した(図4)。以上から、アサガオの暗期誘導性の開花では、メラトニンが花卉展開を促進することで、開花時刻を早める役割を果たしていることが示唆された。

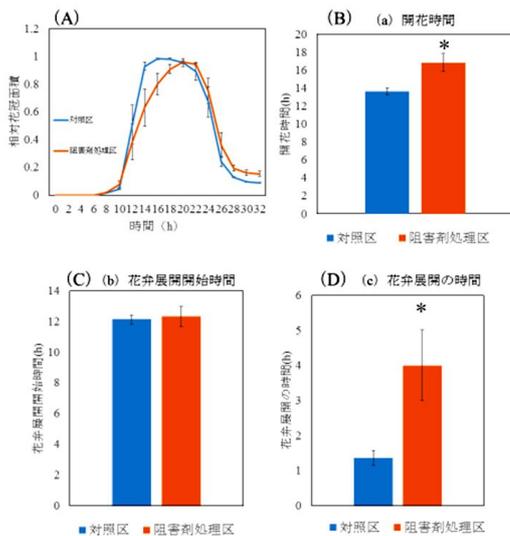


図4 開花直前のメラトニン合成阻害剤の処理がアサガオ品種‘紫’の開花に及ぼす影響
*はt検定により5%水準で有意差があることを示す。
小文字の英字(a, b, c)は図1の記号を示す。

(3) メラトニン生合成酵素遺伝子のアサガオホモログの同定: イネで同定されている4種類のメラトニン生合成酵素遺伝子についてtblastxプログラムを用い、アサガオのESTホモログを探索した。その結果、メラトニン生合成酵素遺伝子である*OsT5H*, *OsAANAT* および *OsASMT* のホモログとして、アサガオのcDNAクローンの中から*InT5H*(AK06036), *InAANAT*(AK059369) および *InASMT*(AK072740)を同定した。なお、*OsTDC*については、今回調査したアサガオのcDNAクローン中にホモログが存在しなかったため、以降の解析は行わなかった。イネのメラトニン生合成酵素遺伝子とアサガオで同定されたESTホモログの推定アミノ酸配列の相同性は*OsT5H*と*InT5H*との間で22%、*OsAANAT*と*InAANAT*との間で42%、*OsASMT*と*InASMT*との間で44%であった。

(4) アサガオ切り花の花弁におけるメラトニン生合成酵素遺伝子の転写産物量の変化: (3)で同定したイネのメラトニン生合成酵素遺伝子のアサガオホモログ(*InT5H*, *InAANAT*, *InASMT*)について、0Dまたは12Dに保持した切り花の花弁における転写産物量を経時的に調査した。その結果、*InT5H*の転写産物量は、12Dでは、暗期期間のt=0h~8hで減少し、明期開始後8~12時間(t=20h~24h)で増加した。一方、0Dでは、t=0h~8hで

増加し、その後は減少した。*InAANAT*の転写産物量は、12Dでは、花卉が展開し始めるt=8hの前後で著しく増加し、t=12hでピークを示した(図5)。一方、0Dでは、顕著な変動は認められず、12Dよりも低いレベルで推移した。

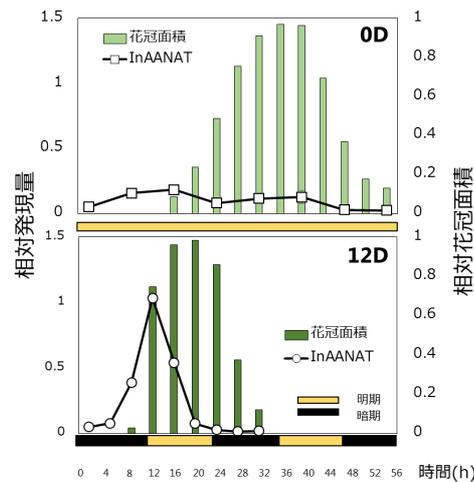


図5 開花直前の明暗条件の違いがアサガオ品種‘紫’の花弁における*InAANAT*の転写産物量に及ぼす影響

*InASMT*の転写産物量は、12Dでは、*InAANAT*と同様に花卉が展開し始めるt=8hの前後で著しく増加し、花卉の展開がほぼ完了するt=16hで転写量のピークを示した(図6)。一方、0Dでは、顕著な転写量の変動は認められず、12Dよりも低いレベルで推移した。

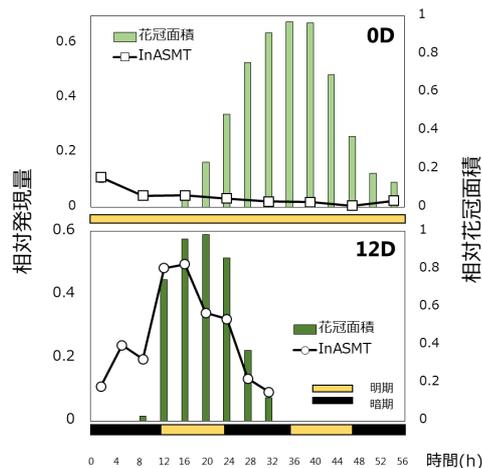


図6 開花直前の明暗条件の違いがアサガオ品種‘紫’の花弁における*InASMT*の転写産物量に及ぼす影響

(5) アサガオ切り花の花弁におけるメラトニン含量の変化: 0Dまたは12Dに保持した切り花の花弁におけるメラトニン含量を経時的に調査した。その結果、12Dでは、花卉が展開するt=8h~12hで増加し、花卉の展開がほぼ完了するt=16hでも高いレベルが維

持されていた(図7)。一方, 0Dでは, 花弁が展開する $t = 16 \text{ h} \sim 32 \text{ h}$ でメラトニン含量は減少した。また, 12DでN-アセチルトリプタミン(200 μM)を処理した切り花では, $t = 16 \text{ h}$ で対照区に比べメラトニン含量が有意に減少していることを確認した。

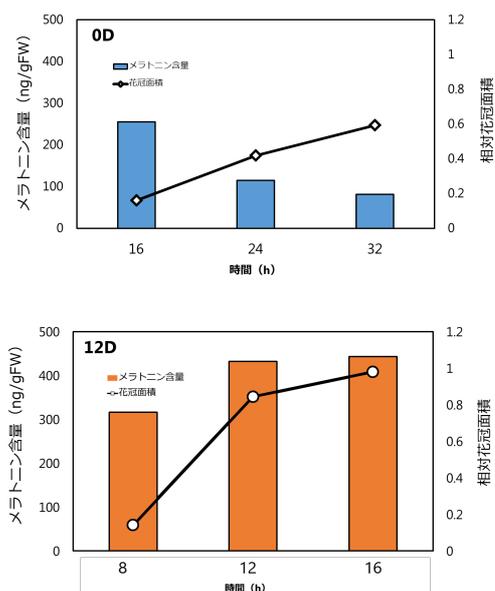


図7 開花直前の明暗条件の違いがアサガオ品種‘紫’の花弁におけるメラトニン含量に及ぼす影響

以上から, アサガオの暗期誘導性の開花では, 開花直前の12Dの暗期条件により花弁でのメラトニン合成酵素遺伝子(*InAANAT*および*InASMT*)の転写産物量が増加し, メラトニン含量が増加することで花弁展開が促進されていることが示唆された。これまで, 開花時刻に影響を及ぼす外的・内的要因や開花の実行過程に焦点を当てた研究は数多く行われてきたが, 開花時刻の決定機構に焦点を当てた研究は極めて少ない。本研究では, 一定時間の暗期を受けた花弁で合成されるメラトニンが花弁展開を促進する機能を持ち, 開花時刻を制御する役割を果たしていることがはじめて示唆された。今後はメラトニン合成酵素遺伝子の発現制御により内生メラトニン含量を人為的に調節することで作物の開花時刻を最適化し, 花の観賞期間の延長や結実率の向上が可能な新しい技術を開発するための応用的研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

山崎洋平, 山田哲也, アサガオにおける切り花の暗期誘導性の開花にはメラトニンが関与する, 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)。

山崎洋平, 小野華子, 金勝一樹, 山田哲也, 暗期誘導性のアサガオ開花時の花弁におけるメラトニン合成関連遺伝子群の特異的発現, 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)。

〔その他〕

山崎洋平, 富井綾菜, 山田哲也, 金勝一樹, メラトニンによる開花時刻の決定機構の解明, 東京農工大学科学技術展, 2015年11月13日~2015年11月15日, 東京農工大学(東京都・府中市)。

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