

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850023

研究課題名(和文)花きの生育・開花におけるスクロース代謝関連遺伝子の環境応答性と機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of responsiveness to the environment and function of the genes encoding sucrose-metabolizing enzymes during growth and flowering of ornamental flowers

研究代表者

原田 太郎 (HARADA, Taro)

岡山大学・教育学研究科・講師

研究者番号：80468256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：主要切り花品目の1つであるトルコギキョウにおいて、スクロース分解酵素をコードする遺伝子の単離およびそれらの環境応答性の調査、併せて酵素活性および糖代謝の解析を行った。その結果、多施肥条件下の葉で発現上昇するインベルターゼ遺伝子および低酸素包装下の花弁で発現上昇するスクロース合成酵素遺伝子の同定に成功し、生育・開花および収穫後生理過程においてスクロース分解経路の調節が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cloning and analysis of environmental responsiveness of the genes encoding sucrose-cleaving enzymes, together with analyses of enzymatic activities and carbohydrate metabolism, were conducted in *Eustoma grandiflorum*, a major ornamental crop for cut flowers. As a result, one gene encoding invertase that is up-regulated in leaves under heavy-manuring condition and another gene encoding sucrose synthase that is up-regulated in petals under low-oxygen packaging were successfully identified, indicating the modification of sucrose cleavage pathway during growth, flowering and postharvest processes of the crop.

研究分野：花き園芸学、植物生理学

キーワード：トルコギキョウ スクロース代謝 環境応答 遺伝子発現 形質転換

1. 研究開始当初の背景

(1) スクロースは、植物の成長、特に光合成産物の転流において主要な機能を担う糖である。切り花の栽培生理、収穫後生理過程においても、スクロース代謝がシンク器官である花弁の成長や品質保持に重要な役割を果たすこと示した研究がある (Yamada et al., 2007)。

(2) 植物体内におけるスクロース分解には、インペルターゼ (INV) およびスクロース合成酵素 (SUS) の 2 種類の酵素が関与することが知られている。INV には、細胞内局在の異なる 3 種類のアイソフォーム、細胞壁 INV (CWIN)、液胞 INV (VIN) および細胞質 INV (CIN) がある。一方、SUS は主に細胞質に局在する (一部は膜結合型として存在)。INV の各アイソフォームおよび SUS をコードする遺伝子はそれぞれ複数あることが知られており、スクロース分解酵素活性がシンク強度を左右することが、種々の作物の逆遺伝学的解析により明らかにされている (Ruan et al., 2010)。

(3) スクロース分解酵素遺伝子の中には、細胞内の糖レベルや環境ストレスなどに応答してその発現を変化させるものがあることが知られており、環境条件に応じたスクロース代謝の調節において、スクロース分解酵素の転写制御が重要な過程の 1 つであると考えられている (Koch, 1996)。

(4) 花きにおいて、スクロース分解酵素遺伝子の環境応答性や分子機能からスクロース代謝の生理的役割を明らかにした研究はない。

(5) 主要切り花品目の 1 つであるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) の生育・開花および収穫後生理過程において、以下の 4 つの知見から、スクロース分解過程の重要性が推察される。

トルコギキョウの生育過程では、3 種類の INV アイソフォームの活性が展開葉 (ソース器官) に比べ未展開葉 (シンク器官) において高く、また温度や灌水条件によって変動する (原田ら, 2014)。

トルコギキョウでは、低日照条件および多施肥条件下において、プラスチックとよばれる花蕾の発育停止現象が発生する。その原因が花蕾への光合成同化産物の分配の減少にあることが示唆されているが、スクロース代謝との関連については調査されていない (牛尾・福田, 2010)。

低酸素包装によりトルコギキョウの花蕾の咲き進みが抑えられることが報告されている (湯本・市村, 2009)。低酸素包装とは、

切り花をプラスチックバッグ中に脱酸素剤とともに封入して低酸素環境を作り出し、呼吸を抑制することにより品質保持効果を狙う技術である。一般に、低酸素条件下では SUS によるスクロース分解経路が活性化されることが知られているが、低酸素包装下の切り花のスクロース分解経路に関する報告はない。

トルコギキョウ由来 cDNA の塩基配列情報が、EST (Expressed Sequence Tag) または TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) として GenBank に数万件登録されている。相同性検索により、その中に INV および SUS をコードする遺伝子の断片が複数見出される。

2. 研究の目的

トルコギキョウの栽培生理、収穫後生理過程におけるスクロース代謝の役割を、その分子基盤すなわちスクロース分解酵素 (INV, SUS) をコードする遺伝子の環境応答性と機能の観点から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GenBank に登録・公開されているトルコギキョウ由来 cDNA の部分配列情報を利用し、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を用いて INV および SUS をコードする遺伝子を複数クローニングする。

(2) 以下の 2 つの実験系において、葉または花弁における糖含量およびスクロース分解酵素活性を測定する。また、上記(1)でクローニングした INV または SUS の遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて比較解析する。

施肥条件の影響

ポット苗を少施肥または多施肥条件下で培養し、栄養成長期の展開葉および未展開葉における還元糖、スクロース、デンプンの含量、各 INV アイソフォーム遺伝子の酵素活性および転写産物レベルを比較する。

酸素濃度の影響

単離した花蕾を単純包装 (脱酸素剤なし) または低酸素包装 (脱酸素剤あり) を施して保管した後、花弁における還元糖、スクロース、デンプンの含量、SUS の酵素活性およびの転写産物レベルを比較する。

(3) 上記(1)、(2)で植物体の環境応答との関連が示唆された遺伝子の過剰発現株を作成し、その表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) GenBank に登録されているトルコギキョウ由来 cDNA の部分配列の中から、既知のシロイヌナズナ由来 INV または SUS の cDNA 塩基配列を用いた相同性検索により、推定 INV 遺伝子断片および推定 SUS 遺伝子断片を同定

した。そのうち、比較的長い断片長をもつものからプライマーを設計し、RACE法により全コード領域(CDS)の決定を試みた。その際、'ピッコロサスノー'の葉または花蕾組織から抽出したRNAをもとに合成したcDNAを鋳型とした。その結果、2つの推定CWIN遺伝子、1つの推定VIN遺伝子、1つの推定CIN遺伝子および2つの推定SUS遺伝子の同定に成功し、それぞれ*EgCWIN1*、*EgCWIN2*、*EgVIN1*、*EgCIN1*、*EgSUS1* および *EgSUS2* と命名した。このうち、*EgCWIN1*、*EgVIN1*、*EgSUS1* および *EgSUS2* については全コード領域を含むcDNA断片が得られ、それぞれ578、584、806および807のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていると推定された。

(2) 上記7遺伝子のいずれについても、遺伝子間での配列の違いの大きいC末端側配列をコードする領域から3'-非翻訳領域にかけての配列が判明したことから、これらの領域から設計した遺伝子特異的プライマーを用いて発現解析を行った。

'ピッコロサスノー'のポット苗を人工気象器内に入れ、施肥量の異なる2つの条件下で2か月間栽培した。少施肥区(対照)は肥料分を予め培養土に含まれているもののみとし、多施肥区は水溶性園芸肥料を底面給液により継続的に施用した。また、前半の1か月間は12時間日長、後半の1か月間は8時間日長とし、多施肥区でプラスチングが誘発される条件とした。還元糖は展開葉に比べ未展開葉で多く、少施肥区に比べ多施肥区で多い傾向にあった。スクロースも還元糖とほぼ同様の变化を示したが、多施肥区では展開葉におけるその含量の高さが顕著であった。デンプン含量については、展開葉と未展開葉との間に差が見られなかったが、多施肥区では少施肥区の半分程度に低下していた。INV活性に関しては、CWIN、VIN および CIN のいずれも展開葉に比べ未展開葉で高い傾向が見られ、特に多施肥区の展開葉と未展開葉の間での差が顕著であった。*EgCWIN1* の転写産物レベルは、展開葉および未展開葉のいずれにおいても、少施肥区に比べ多施肥区で顕著に上昇した。*EgVIN1* の転写産物レベルは、展開葉に比べ未展開葉で高かったが、少施肥区と多施肥区の間でその傾向に変化は見られなかった。*EgCWIN2* および *EgCIN1* の転写産物レベルは、いずれの条件下でも同程度であった。これらの結果から、多施肥条件下では*EgCWIN1* が未展開葉のシンク強度上昇をもたらしていることが示唆され、このことが蕾の発達を阻害する原因となっていることも推察された。多施肥区の展開葉において、*EgCWIN1* の発現レベルが高かった一方でCWIN活性の上昇が見られなかったことは、INVインヒビタータンパク質等による翻訳後調節や未同定のCWIN遺伝子の関与を意味しているかもしれない。

併せて、灌水条件の影響についても調査した。'ピッコロサスノー'のポット苗を人工気象器内に入れ、原田ら(2014)の方法に従い、灌水量の異なる2つの条件下で37日間栽培した。少灌水区では、多灌水区(対照)に比べ葉のサイズが小さくなった。多灌水区では*EgCWIN1*、*EgCWIN2*、*EgVIN1* および *EgCIN1* のいずれの転写産物レベルも、展開葉に比べ未展開葉で高くなっていた。一方、少灌水区では、未展開葉における*EgCWIN1*、*EgCWIN2* および *EgVIN1* の転写産物レベルが相対的に低下した。また、*EgCIN1* の転写産物レベルは、展開葉および未展開葉のいずれにおいても、多灌水区に比べ低下していた。

以上の結果から、トルコギキョウの栄養成長過程において、施肥または灌水条件の違いによる生育の変化には、INV遺伝子のアイソフォーム特異的な発現変動が伴っていることが明らかとなった。これは、トルコギキョウの栽培生理および環境応答とスクロース代謝の分子機構との関連を初めて示した成果として位置づけることができる。今後、特に蕾の発達と*EgCWIN1* の発現との関連について調査していく予定である。

湯本・市村(2009)の方法に従い、花蕾の低酸素包装を行った。岡山県玉野市の生産者により栽培された'渚B'の切り花から未着色蕾(花弁長1.5cm)を採取し、蒸留水に生けて前培養した後、ポリエチレンバッグを用いて単包装または低酸素包装を施し、23℃暗所で保管した。保管開始後1日目で、低酸素包装バッグ内の酸素濃度は約1%に低下していた。保管開始後2日目では、いずれの包装方法でも花弁のスクロース含量が減少傾向にあり、単包装に比べ低酸素包装の方で減少幅が大きかった。保管開始後6日目ではデンプン含量が減少する傾向が見られた。SUS活性は、単包装および低酸素包装のいずれの場合でも、保管前に比べ40%程度低下した。一方、CIN活性は、単包装では保管前の半分近くにまで低下したが、低酸素包装では初期の水準を維持した。花弁における*EgSUS1* の転写産物レベルは、保管開始後6日目で単包装に比べ低酸素包装の場合に高かった。一方、*EgSUS2* の転写産物レベルには、包装方法による変化は見られなかった。これらの結果から、低酸素包装下の花弁ではスクロースのプールサイズが減少すること、保管初期にはCINの寄与が大きい一方、保管後期には*EgSUS1* の誘導によりSUSの寄与が増大する可能性が示唆された。低酸素条件下でのCINの寄与については、シロイヌナズナのスクロース分解酵素遺伝子変異体を用いた検証により近年になって提唱されたばかりである(Santaniello et al., 2014)。低酸素包装下の花弁においてスクロース分解経路の切り換えが起こっているかどうかについて、今後の研究で明らかにしていく必要がある。

併せて、切り花の低酸素包装による品質保持効果についても調査した。‘渚B’の切り花を1日水揚げした後、Shimizu-Yumoto and Ichimura (2016)の方法に従い、ポリプロピレンバッグを用いて単純包装または低酸素包装を施し、23℃で暗所で保管した。保管開始後6日目にバッグを開封し、抗菌剤を含む蒸留水に生けてその後の花持ちを調査した結果、開封後5日目までは、観賞価値を失った小花の割合が単純包装に比べ低酸素包装の方で低く推移したが、全ての小花が観賞価値を失うまでの期間には両処理間で差がなかった。

また、酸素コントローラーを用いて酸素濃度を制御できる低酸素培養システムを構築した。

以上のことから、低酸素包装下の花卉におけるスクロース代謝と遺伝子発現に関する一定の知見を提示できたことは本研究の成果と言える。一方で、低酸素包装の実用的効果や花卉の低酸素応答の分子機構について、今後他品目も含めた研究により明らかにしていきたい。

(3) まず、アグロバクテリウム法による‘ピッコロサスノー’の形質転換系の構築を試みた。バイナリーベクターpBI121を導入したアグロバクテリウム(LBA4404株)をリーフディスクへ感染させ、形質転換カルスの発生を試みた。これはThiruvengadam and Yang (2009)等の既報でも用いられている方法であるが、最初の試みでは形質転換カルスを得ることはできなかった。その後、リーフディスク培養条件の検討や形質転換の報告のある品種を用いた追試を加えた結果、形質転換カルスおよびシュートを得ることに成功した。次に、上記(1)、(2)で同定した*EgCW1N1*のコード領域をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下で過剰発現させる形質転換用コンストラクト(pBI121-EgCW1N1)を作製した。現在、これを導入したアグロバクテリウムを用いて、*EgCW1N1*過剰発現株の作出を試みている。

以上のように、本研究の期間内では*EgINV*または*EgSUS*の過剰発現株の作出に至らず、それを用いた機能解析も実施することができなかった。今後、上記の*EgCW1N1*過剰発現株が得られれば、栄養成長や蕾の発達におけるスクロース代謝の役割に関する新たな知見が得られるものと期待している。

<引用文献>

Yamada K, Ito M, Oyama T, Nakada M, Maesaka M, Yamaki S (2007) Analysis of sucrose metabolism during petal growth of cut roses. *Postharvest Biology and Technology* 43, 174-177.

Ruan Y-L, Jin Y, Yang Y-J, Li G-J, Boyer JS (2010) Sugar input, metabolism, and

signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to draught and heat. *Molecular Plant* 3, 942-955.

Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 509-540.

原田太郎・牛尾亜由子・福田直子 (2014) 温度および灌水条件が栄養成長期におけるトルコギキョウの糖含量およびインベルターゼ活性に及ぼす影響。園芸学研究 13(別1), 401.

牛尾亜由子・福田直子 (2010) トルコギキョウ冬季開花における発蕾前後の窒素施肥濃度が花蕾のプラスチックに及ぼす影響。園芸学研究 9, 191-196.

湯本弘子・市村一雄 (2009) 脱酸素剤を用いた切り花包装技術。園芸学研究 8(別2), 299.

Santaniello A, Loreti E, Gonzali S, Novi G, Perata P (2014) A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 37, 2294-2302.

Shimizu-Yumoto H, Ichimura K (2016) Effect of storage in packaging with oxygen absorbers on the quality of cut gladiolus ‘Princess Summer Yellow’ spikes. *Postharvest Biology and Technology* 111, 191-196.

Thiruvengadam M, Yang C-H (2009) Ectopic expression of two MADS box genes from orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*) alters flower transition and formation in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Cell Reports* 28, 1463-1473.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ

http://edu.okayama-u.ac.jp/~rika/shokken/harada_lab.pdf

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 太郎 (HARADA, Taro)

岡山大学・大学院教育学研究科・講師

研究者番号 : 80468256

(2)研究協力者

中野 善公 (NAKANO, Yoshihiro)

湯本 弘子 (YUMOTO, Hiroko)

菱川 皓太 (HISHIKAWA, Kota)

稲田 侑真 (INADA, Yuma)

大西 啓一 (ONISHI, Keiichi)

江口 優 (EGUCHI, Yu)