

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580029  
 研究課題名（和文） 高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死を制御する分子機構  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms regulating the high temperature-induced  
 blasting of *Cymbidium* flower buds

研究代表者  
 三田 悟 (FAMILY\_NAME FIRST\_NAME)  
 静岡大学・遺伝子実験施設・准教授  
 研究者番号：20273170

研究成果の概要（和文）：シンビジウムを 25 -30℃の高温ストレス下で生育すると花芽が壊死する。これを避けるために、シンビジウム生産者は植物体を標高 1,000 メートル程度の高い山に避暑させる。これを山上げ栽培といい、生産者にとっては重労働である。高温ストレス下で CyNAC1 遺伝子の発現レベルが顕著に高まった。CyNAC1 遺伝子を過剰発現させたトマトとシロイヌナズナでは顕著な生育障害が見られたことから、CyNAC1 遺伝子は高温ストレス下で、他の遺伝子群の発現を制御しつつ、シンビジウム花芽の壊死を促進する役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Flower bud blasting caused by high temperatures during the summer season is one of the most severe problems for Japanese growers of *Cymbidium*. All of the cultivars of *Cymbidium* are sensitive to high temperatures and growers must therefore transfer *Cymbidium* plants to the cool highlands to avoid the heat of lower elevations in Japanese summer. The expression of *CyNAC1* was significantly enhanced under the high temperatures. Overexpression of *CyNAC1* in tomato and Arabidopsis caused growth impediment and the failure of flowering. These results suggest that *CyNAC1* protein may be involved in the regulatory mechanisms of genes that are regulated during blasting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：生育障害、エチレン、NAC タンパク質、高温ストレス

#### 1. 研究開始当初の背景

シンビジウム生産者にとって、高温によって花芽が枯死する「花飛び」と呼ばれる現象

の存在が営利栽培上、最大のネックとなっている。花飛びとは、25℃以上の高温条件で、花茎長3.5～4.0cmの花芽が黄変し、

枯死してしまう現象を言う。シンビジウムは、9月や10月に開花しても需要が少ない上、高温期であるため花持ちが悪く、一番の需要期が年末であることから、生産者は花飛びを避けるため6月～9月の高温期にシンビジウムを標高1,000m前後の高冷地に避暑させる「山上げ栽培」を余儀なくされている。山上げ栽培には生育の促進や品質の向上などの利点もあげられているが、山への上げ下ろし、日常の栽培管理などに多大な労力・時間・経費がかかる。しかし、これに替わる低コストの花飛び回避法が知られていないため、大部分のシンビジウムが山上げされているのが現状である。花飛び現象は今のところ山上げなどの栽培技術によって克服されているが、栽培技術以外に花飛びを回復する方法として、花飛びを起こさない品種の育成が考えられる。しかし、これまでの育種は主として花の形や色、草姿等、見た目の良さを追求したもので、花飛びを起こさない栽培の容易な品種の育成といった観点からは行われていない。

## 2. 研究の目的

これまで、ディファレンシャルディスプレイ法により野生型株のシンビジウムの花芽において高温ストレスに応答して発現が誘導される遺伝子として CyNAC1 遺伝子を単離した。CyNAC1 遺伝子は NAC ドメインタンパク質をコードしており、その構造から、遺伝子発現を制御する転写因子をコードすると考えられる。すなわち高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死の過程における種々の遺伝子発現を CyNAC1 遺伝子が制御するものと考えられた。また、シンビジウムの高温耐性変異株 (nhn) においては、高温ストレスによる CyNAC1 遺伝子の発現の誘導が認められない。一方、CyNAC1 タンパク質とアミノ酸レベルで 4.3% の相同性を示すシロイヌナズナの AtNAP は葉の老化過程で発現レベルの顕著な上昇が見られる。AtNAP 遺伝子の発現を抑制した形質転換シロイヌナズナでは葉の老化が遅延し、逆に、AtNAP 遺伝子を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナでは葉の老化が促進される。こうしたことから、シンビジウム CyNAC1 遺伝子は高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死を促進する形で制御しているのではないかと考えられる。

そこで本研究では、CyNAC1 を過剰発現させた形質転換植物 (トマト・シロイヌナズナ) を作成し、形質転換植物の花や葉の高温ストレスに対する応答や老化を観察することを目的とした。申請者はこれまでに、ディファレンシャルディスプレイ法により野生株のシンビジウム花芽の高温ストレスによる枯

死の過程で種々の遺伝子発現レベルが増減し、また、高温耐性変異株 (nhn) とは異なる発現様式を示すことを確認しており、それらの遺伝子断片を単離した。それらの遺伝子断片の塩基配列を明らかにし、データベース検索をすることで高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死を制御している鍵遺伝子の候補をリストアップすることを目的とした。一方、これまで、野生株のシンビジウムの花芽をジベレリンで処理すると、未処理のシンビジウム花芽とは異なり、25℃以上の高温ストレスによる花芽の枯死が抑制されることが明らかになっている。よって、もしかするとシンビジウム高温耐性変異株 (nhn) は花芽におけるジベレリン活性が野生株とは異なり高まっている変異株かも知れない。そこで、本研究では、ジベレリンの生合成や不活性化、受容に関わる遺伝子を単離して構造や発現を解析することにより、ジベレリン活性とシンビジウム花芽の高温による枯死との関わりについて調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

平成19年度の実験方法

(実験1) シンビジウムの CyNAC1 遺伝子 (NAC ドメインタンパク質をコードする) の機能解析

野生型株シンビジウムの高温ストレスによる花芽の枯死の過程で CyNAC1 遺伝子の発現が顕著に高まるのに対し、高温耐性変異株 (nhn) においては 25℃～30℃の高温にさらされても野生型株とは異なりこの遺伝子の発現は高まらない。NAC ドメインタンパク質は他の遺伝子の発現の発現を制御する転写因子であるので、おそらく高温ストレスにさらされるとことで CyNAC1 遺伝子の発現が高まり、他の遺伝子群の発現を制御することで、シンビジウム花芽の高温ストレスによる枯死を促進するのではないかと推察される。CyNAC1 遺伝子は花芽の高温による枯死を制御する鍵遺伝子ではないだろうか？一方、CyNAC1 タンパク質とアミノ酸レベルで 44.3% の相同性を示すシロイヌナズナの AtNAP は葉の老化過程で発現が高まり、この AtNAP 遺伝子を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナにおいては葉の老化が促進され、この遺伝子の発現を抑制した形質転換シロイヌナズナにおいては葉の老化が遅延することから、AtNAP 遺伝子は葉の老化を促進すると考えられている。

本研究では、シンビジウムの CyNAC1 遺伝子を実験植物であるシロイヌナズナやトマト、タバコ等に導入して過剰発現させた形質転換植物を作成する。その花や葉の老化や高温ストレスによる枯死の様子を非形質転換植物と比べることで、植物の高温ストレス

に対する応答に、CyNAC1 遺伝子がどのような機能を有し関わっているのかを調べる。また、AtNAP 遺伝子の発現を抑制した形質転換シロイヌナズナに CyNAC1 遺伝子を導入することで葉の老化の速さが野生型株と同じになるかどうかを調べることで、CyNAC1 遺伝子と AtNAP 遺伝子が機能的に相同なのかどうかを調べる。

また、これまで同定されてきた種々の NAC ドメインタンパク質をコードする遺伝子の中で、エチレンにより発現が制御されているものは見つかっていない。そこで、本研究ではシンビジウム花序へのエチレン処理を24時間内という短い時間にわたり行い、その時の CyNAC1 の発現を調べることで、CyNAC1 遺伝子がエチレンにより発現が制御される遺伝子であるのかどうかを調べる。

(実験2) シンビジウム花芽の高温ストレスによる枯死過程で発現が増減する遺伝子群の同定

申請までに、ディファレンシャル・ディスプレイ法により、シンビジウム花芽の高温ストレスによる枯死の過程で発現が増減する遺伝子断片を約30種類単離した。それら遺伝子のほとんどが野生型株と高温耐性変異株 (nhn) の間で発現様式が異なると思われるのであるが、これらの遺伝子の中には高温ストレスによる花芽の枯死を促進的に制御するもの、もしくは抑制的に制御するものが含まれると考えられる。平成19年度はこれらの遺伝子断片の塩基配列を決定した。データベース検索することで、花芽の枯死を制御すると考えられる遺伝子の候補を絞り込む。また、ディファレンシャル・ディスプレイ法により、高温ストレスによる枯死の過程で発現が増減する遺伝子をさらに多く単離することを試みた。CyNAC1 遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法により単離するきおとができたのと同様に、こうした実験を進めることで、シンビジウム花芽の高温による枯死を制御する鍵遺伝子の候補が得られる。

平成20年度以降の実験方法

(実験1) シンビジウムの CyNAC1 遺伝子の機能解析

平成20年度中に植物組織のストレスによる枯死における CyNAC1 の役割を考察する。CyNAC1 遺伝子のエチレンによる発現制御に関しては、再現性を確かめる実験を行う。

(実験2) シンビジウム花芽の高温ストレスによる枯死過程で発現が増減する遺伝子群の同定

平成19年度に塩基配列を決定した遺伝子断片の中で、データベース検索により、植物種や組織の違いを超えて、枯死や老化を制

御している共通的な分子機構に関わるものと推定されるものについては cDNA の全鎖長を単離する。これらの遺伝子を過剰発現させた形質転換植物を作成し、高温ストレスに対する応答や老化の様子を観察することで、個々の遺伝子の機能を考察する。また、平成19年度中にディファレンシャル・ディスプレイ法により単離した、高温ストレスによる枯死の過程で発現が増減する遺伝子については、やはり同様に塩基配列を決定し、データベース検索を行う。そして、枯死や老化に何らかの形で関わっていると推定されるものについては全鎖長 cDNA の単離と、過剰発現させた形質転換植物の作成へと実験を進めてゆく。

(実験3) 高温ストレスによる花芽の枯死とジベレリンの関係性についての解析

平成20年度から21年度にかけて高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死の進行や nhn の高温耐性とジベレリン活性の関係性について調べる。申請時までに、共同研究者の大野により、シンビジウムの若い花序にジベレリンを与えると、25℃~30℃の高温にさらされても花芽の枯死が抑制され、生存率が高まることが高まることが明らかにされている。こうしたことから、もしかしたら高温耐性変異株 (nhn) では、野生型株とは異なり花序におけるジベレリン活性が高まっていることによって、高温に対して耐性を有し、枯死しないのかも知れない。

そこで、本実験では、ジベレリンの生合成・不活性化・受容・情報伝達に関わる遺伝子を野生型株と高温耐性変異株 (nhn) におけるこれらジベレリン活性に関わる遺伝子群の発現様式を比較する。以上の実験を行うことで、なぜ、nhn が高温耐性であるのか、そのメカニズムについて分子的な知見が得られ、将来的に高温耐性植物の開発に必要な何らかの有意義な情報が得られると期待される。

4. 研究成果

夏においてシンビジウム花芽は高温により枯死するため、シンビジウムの生産者は標高1000メートル程度の涼しい場所へ植物を移すことにより枯死を避ける。これを山上げ栽培といい、生産者にとっては重労働である。シンビジウム花芽が枯死する時にCyNAC1遺伝子の発現レベルが顕著に高まり、この遺伝子を過剰発現させたトマトは著しい生育障害を示し、またこの遺伝子を過剰発現させたやシロイヌナズナの葉は枯死することから、CyNAC1 遺伝子は高温ストレスによるシンビジウム花芽の枯死を促進する遺伝子だと考えられる。平成19年度は上記したCyNAC1を過剰発現さ

せたトマトの葉を用い、暗下での老化の葉の老化の様子や光合成活性について調べようとしたが、葉の葉柄を浸した水が腐敗してしまい成功しなかった。平成20年度はディフュージョン・ディスプレイ法によりシンビジウムの高温ストレス下で花芽が枯死する時に発現レベルが変化する遺伝子を単離しようとしたが、アッププライマー同士で増幅したPCR断片しか得られず失敗に終わった。そこで、cDNA-PCRサブトラクション法により、高温ストレスでシンビジウム花芽が枯死する過程で発現レベルが増減する遺伝子をそれぞれひとつずつ単離した。これらは機能未知なタンパク質をコードしていた。平成21年度はシロイヌナズナ野生型株の葉と、CyNAC1を過剰発現させたシロイヌナズナの枯死しつつある葉のそれぞれから抽出した全RNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、枯死しつつあるシロイヌナズナの葉で発現レベルが上昇するものとして、endopeptidase(8.8倍)、ALPHA-DOX1(8.9倍)、ORG2(7.5倍)、Transcription factor(6.1倍)、CYP71A18(8.7倍)、peroxidase(8.8倍)、hydrolase(5.6倍)、AT11(5.5倍)、SYN1.1(4倍)、ATOSM34(5.4倍)、CYP82C4(4.3倍)、GLP9(4.4倍)、NIT2(4.9倍)、AGL26(4.3倍)、transferase(4.8倍)、DIN2(4.3倍)、electron carrier(4.2倍)等を同定することが出来た。一方、発現レベルが落ちるものとしてはPCC1(0.15倍)、FSD1(0.17倍)、LHCb1(0.18倍)、lipid binding protein(0.18倍)、HEMA1(0.18倍)、transcription factor(0.22倍)、calcium ion binding protein(0.18倍)、PSI-N(0.19倍)等を同定した。さらに、CyNAC1がエチレンの作用がなくても高温だけによっても発現が誘導されることを明らかにした。また、CyNAC1遺伝子の発現がエチレン処理により3倍程度上昇することを明らかにした。本研究により、将来的にCyNAC1を植物バイオテクノロジーにより抑制することで、高温ストレスにより花芽の枯死する現象を抑え、山上げ栽培を必要としない、つまりは生産コストが低く生産者にとってやさしい遺伝子組み換えシンビジウムの分子育種を作出する基盤が整備された。

#### 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1件)

Mita S., Henmi R., Imanishi S., Kiriiiwa Y., Ohno H. Molecular mechanism regulating the high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of Cymbidium. Proceeding of Nagoya International Orchid

Congress. 14-19 (2009)

研究代表者の三田は代表研究者として名古屋国際蘭会議賞を受賞した

[学会発表] (計3件)

①三田 悟、逸見竜也、切岩祥和、今西俊介、大野 始

高温耐性突然変異体を用いたシンビジウム花序の高温ストレスによる壊死を制御する分子機構の解明、日本植物学会第73回大会、2009年9月17日～20日、山形

②Ohno H., Henmi R., Imanishi S., Kiriiiwa Y., Mita S. Molecular mechanism regulating the high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of Cymbidium.

第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月12日、神戸

③Mita S., Ohno H. Enhanced expression of genes for ACC synthase, ACC oxidase, and NAC protein during high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of Cymbidium.

2008年アメリカ植物生理学会、2008年6月26日～7月1日、メキシコ、メリダ

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三田 悟 (Mita Satoru)  
静岡大学遺伝子実験施設准教授  
研究者番号：20273170

##### (2) 研究分担者

大野 始 (Ohno Hajime)  
静岡大学農学部教授  
研究者番号：20126840

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：