

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580030
 研究課題名（和文）切りバラ収穫後の開花制御を目指した花卉細胞壁の緩みに関する研究
 研究課題名（英文）Analysis of cell wall loosening of petals aiming for regulation of flower opening in postharvest condition
 研究代表者 山田邦夫（YAMADA KUNIO）
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
 研究者番号：30345871

研究成果の概要：

本研究では、細胞壁強度の調節によるバラの切り花品質の向上をめざし、細胞壁の緩みとバラ花卉細胞の肥大成長の関係を明らかにすることを目的とした。これまでの報告で、トマトの頂端分裂組織では「細胞壁の緩み」が葉の原基形成の引き金になっていることが分かっている。その頂端分裂組織には、細胞壁関連のタンパク質として「エクспанシン」や「エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)」の存在が確認されている。つまりこれらのタンパク質は組織の形態形成に重要な機能があるものと思われる。これらタンパク質・酵素の花弁での働きを解明し、細胞壁の緩みと花卉肥大成長との関係を詳細に明らかにすることを本研究では目指してきた。本研究により、バラ花弁から3種類の α エクспанシンと4種類のXTHのcDNAを単離することが出来た。それぞれのmRNAの発現をバラ花弁の発育ステージ別に解析した結果、それぞれのパラログは異なった発現パターンを示しており、バラ花弁肥大成長に対しパラログ間で異なった時期に機能している可能性が示唆された。また、これらのタンパク質を含む細胞壁局在タンパク質画分がバラ花弁の細胞壁強度を緩める働きがあることを示した。さらに、XTHの特異的な阻害剤であると推定されているフコシルラクトースがバラ花弁におけるXTH遺伝子の発現を制御している可能性を見出した。しかし、フコシルラクトースは今回の実験では切りバラ花弁成長そのものは制御できなかった。一方、遺伝子組換えによる機能解析実験は、バラは遺伝子組み換え作出が困難であるため、遺伝子組み換えが可能な花きとしてトルコギキョウを用いた。導入遺伝子としてエクспанシンやXTHをターゲットとしたRNAiベクターを用いて、アグロバクテリウム法により感染させ、現在選抜段階にある。残念ながら研究期間内には開花させるまでは生育に至らなかったが、実際に植物体を作製できたことは大きな進展であり、今後の解析のための重要な材料を提供できたといえる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：バラ、花卉成長、エクспанシン、キシログルカンオリゴ糖、XTH、細胞壁、フコシルラクトース、RNAi

1. 研究開始当初の背景

切り花は私たちの生活において様々な場面で欠かせないものとなっている。切り花が用いられる場面を考えたとき、主として冠婚葬祭と個人消費の2つを挙げることができる。冠婚葬祭の場を引き立てる切り花は、長い期間飾られ鑑賞されるものではないため、日持ち性の良さよりも、その瞬間の豪華さや美しさといった見た目が重要視される。また、好まれる見た目は、結婚式であれば白色で豪華なもの、葬儀であれば白色で清楚なもの、といったように枠にはまっている傾向にある。一方、個人消費向けの切り花は、求められる見た目については、購買者の好みが反映されるため、実に多岐にわたり、目新しい形質をもつものの需要も高い。そのため、新しい品種の登場は消費者の購買意欲の向上に直結することが予想され、見た目に着目した品種開発は盛んに行われ、新しい育種技術の開発も求められている。市場規模こそ冠婚葬祭用には劣るが、切り花の消費拡大に向けての将来性はより大きいように思われる。日持ちの観点から見ても、冠婚葬祭用の切り花と異なり、長い期間飾られ鑑賞される傾向があるため、日持ちの良い品種の登場もまた消費者の購買意欲の向上に直結する。加えて、購入者を満足させることができれば、リピーターを確保し、更なる購買意欲の向上、ひいては、切り花の消費拡大を狙えるのではないだろうか。また、日持ちという観点は、花形や花色のように好き嫌いや当たり外れがないので、切り花の消費を拡大するうえで、その改善は新奇性のある花形や花色の育種以上に重要な課題だと言える。

切り花の日持ちは、つぼみからの開花現象と密接に関係している。「花が開く」と言う現象は、簡単なようで実はその機構は良く知られていない。開花はシンク器官である花卉に糖質と水が蓄積し、花卉細胞が急激に肥大する反応である。その花卉細胞の肥大成長の仕組みはほとんど研究されていないのが現状である。

園芸産業として、開花現象の解明は非常に重要な意味を持つ。近年特に、「切り花

の品質」が大きくクローズアップされており、消費者・市場・研究といったそれぞれの立場で関心が持たれている。しかし現在、切り花の品質としては「老化を遅らせる」ことがもっぱら注目されてきている。確かに、これらの研究は切り花取扱技術の向上に大きく貢献している。しかし私は、特に「開花の調節」をターゲットとして研究を進めている。バラなどはつぼみから徐々に成長してゆく花卉の展開を楽しむ花である。また一本の花茎に複数の小花を持つ花も、つぼみをいかに大きく開花させるかが重要な品質要素であると言える。これらの理由から、切り花の品質をより向上させるには「老化を遅らせる」だけでなく、「確実に大きく、そしてゆっくり開花させる」ことが重要となってくると考えている。そして花卉成長の調節が可能になれば、切り花の市場流通段階での不必要な花卉展開を抑え、繁忙期の出荷調整も容易となる。切り花品質としても、観賞期間中に確実に、そしてより大きく開花させるといった高品質化にもつながり、消費拡大に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

開花はシンク器官である花卉に糖質と水が蓄積し、花卉細胞が急激に肥大する反応である。そしてこの肥大成長には細胞壁強度の変化が不可欠である。本研究では、細胞壁強度の調節によるバラの切り花品質の向上をめざし、細胞壁の緩みとバラ花卉細胞の肥大成長の関係を明らかにすることを目的とした。これまでの報告で、トマトの頂端分裂組織では「細胞壁の緩み」が葉の原基形成の引き金になっていることが分かっている。その頂端分裂組織には、細胞壁関連のタンパク質として「エクспанシン」や「エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)」の存在が確認されている。そこで本研究ではこれらタンパク質・酵素の働きを解明を通して、細胞壁の緩みとバラ花卉肥大成長との関係を詳細に明らかにすることを目的とした。さらに、それらの発現や活性を制御することで、実際に花卉の成長をコントロールし、花

き産業における流通段階での問題解決や切花品質の向上につなげて行くことを研究の出口として設定している。

3. 研究の方法

1) エクспанシン及びエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) の全長 cDNA クローニングとリアルタイム PCR による遺伝子発現解析

すでにバラ花卉からのクローニングが済んでいるエクспанシンの3種 cDNA について、各クローンのバラ花卉成長にともなう詳細な遺伝子発現についてリアルタイム PCR により解析した。また、バラ花卉の XTH cDNA については全長配列のうち後半の配列が明らかになっており、まずは全長配列のクローニングを行った。その後、肥大成長と遺伝子発現との関係をリアルタイム PCR により解析を行った。

2. エクспанシン等の細胞壁の緩みに関わるタンパク質のバラ花卉における機能解析とその応用

細胞壁内のセルロースとヘミセルロースの水素結合を切断すると言われているエクспанシンであるが、その機能を直接的に証明した報告は少ない。トマトにおいて、エクспанシンを外生的に茎頂に添加した結果その形態が変化したという報告 (Fleming et al., Science (1997) 276: 1415- 1418) がある。本研究では、バラ花卉の肥大成長に細胞壁関連タンパク質がどのように関与しているかについて直接的な証明を試みた。つまり、花卉細胞壁画分からタンパク質を抽出し、その抽出タンパク質が花卉細胞壁の強度にどのような影響を与えるかを調べた。さらに、RNAi を用いた遺伝子発現抑制個体を作成し、エクспанシンや XTH などの機能解析を試みた。さらに、XTH の機能を抑えることで花卉の成長をコントロールすることを目的とし、XTH に対する各種阻害剤をバラ切り花に処理することで、切り花への効果を検討した。

4. 研究成果

バラ花卉から3種類の α エクспанシン cDNA を単離した。それぞれのエクспанシンについて mRNA の発現をバラ花卉の発育ステージ別に解析した結果、3つのエクспанシンは異なった発現パターンを示しており、バラ花卉肥大成長に対しそれぞれ異なった時期に機能している可能性が示唆された。さらに、エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) について、バラ花卉から4種類の cDNA を単離した。それらの mRNA の発現を花卉の発育段階別に解析した結果、蕾から開花する段階で発現が急激に上昇しており、開花に XTH が関与していることが示唆された。

また、バラ花卉の成長が著しいステージから細胞壁局在のタンパク質を抽出し、若いステージの花卉に処理すると、細胞壁強度が緩むことが示唆された。この結果により、肥大成長中の花卉の細胞壁タンパク質は、細胞壁をゆるませる機能があることが示唆された。

さらに阻害剤処理実験により、XTH の特異的な阻害剤であると推定されているフコシルラクトースがバラ花卉における XTH 遺伝子の発現を制御している可能性を見出した。しかし、フコシルラクトースは今回の実験では切りバラ花卉成長そのものは制御できなかった。このことは今後の課題の一つである。

一方、遺伝子組換えによる機能解析実験は、バラは遺伝子組み換え作出が困難であるため、遺伝子組み換えが可能な花きとしてトルコギキョウを用いた。導入遺伝子としてエクспанシンや XTH をターゲットとした RNAi ベクターを用いて、アグロバクテリウム法により感染させ、現在選抜段階にある。RNAi による発現抑制個体は、各パラログ毎に厳密に発現をノックダウンできることが予想されるため、これら個体の開花様式や花卉細胞壁強度などを解析することで、XTH やエクспанシンの花卉組織における機能を直接的に解析できると思われる。残念ながら本研究期間内にはそれぞれの個体を開花させるまでは生育に至らなかったが、実際にこれらの植物体を作製できたことは大きな進展であり、今後の解析のための重要な材料を提供できたといえる。

以上の結果から、本研究の目的であった「エクспанシンおよび XTH の花卉成長における役割の解明」はほぼ達成することが出来、細胞壁の緩みとバラ花卉肥大成長との関係を詳細に明らかにすることが出来た。さらに今後の研究の材料として有用な遺伝子組換え個体の作出にも成功しており、今後の発展的な研究のための貴重な材料を作り出すことが出来た。今後は、本研究での知見を元に、実際に切り花花卉の成長をコントロールし切り花品質の向上につながる技術開発が期待できる。

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 5件)

1. Kunio Yamada, Rei Takahashi, Chiharu Fujitani, Keiko Mishima, Masato Yoshida, Daryl C. Joyce and Shohei Yamaki
Cell wall extensibility and effect of cell-wall-loosening proteins during rose flower opening.

Journal of Japan. Soc. Hort. Sci., 78,
242-251. 2009
査読有り

(2)研究分担者
なし

2. Rei Takahashi, Chiharu Fujitani,
Shohei Yamaki and Kunio Yamada
Analysis of the cell wall loosening
proteins during rose flower opening.
Acta Horticulturae, 755, 483-488, 2007
査読有り

(3)連携研究者
なし

3. Masakazu Ito, Shohei Yamaki and Kunio
Yamada
The role of invertase in rose flowers
in postharvest conditions.
Acta Horticulturae, 755, 489-494, 2007
査読有り

[学会発表] (計 7件)

1. 山田邦夫
切りバラの花弁成長制御を目指した
園芸生理学的研究
第2回園芸生理ワークショップ
園芸学会 2008年度秋季大会
2008.9.26 三重大学
2. Rei Takahashi, Chiharu Fujitani,
Shohei Yamaki and Kunio Yamada.
Analysis of the cell wall loosening
proteins during rose flower opening.
International Conference on Quality
Management in Supply Chains of
Ornamentals.
2007. 12. 4 バンコク、タイ
3. 高橋 励、藤谷千春、前坂昌宏、白武勝裕、
山木昭平、山田邦夫
バラ花弁成長におけるエクспанシンの
役割
2007. 9. 30 香川大学
4. 藤谷千春、高橋 励、前坂昌宏、白武勝裕、
山木昭平、山田邦夫
バラ花弁肥大成長におけるエンド型キシ
ログルカン転移酵素/加水分解酵素の役
割
平成 19 年度園芸学会秋季大会
2007. 9. 30 香川大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 邦夫 (YAMADA KUNIO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
30345871