

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19780019

研究課題名 (和文) RNAi 法による花弁老化関連遺伝子の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of petal senescence-related genes using RNAi method

研究代表者

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・講師

研究者番号：20422511

研究成果の概要 (和文): 本研究では, RNAi 法による花弁老化関連遺伝子 (*InVPE*, *InPSR26*, *InPSR29*, *InPSR42*) の不活性化がアサガオの花弁老化に及ぼす影響を評価し, 2 種類の遺伝子 (*InPSR26*, *InPSR29*) が花弁老化を抑制する機能を果たしていることを明らかにした. 他の 2 種類の遺伝子 (*InVPE*, *InPSR42*) の機能は解明できなかったが, 相同性検索により, これらの遺伝子が花弁のプログラム細胞死に深く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 evaluated effects of knockout of petal senescence-related genes, *InVPE*, *InPSR26*, *InPSR29* and *InPSR42*, using RNAi method on petal senescence and showed that two genes of them, *InPSR26* and *InPSR29*, are carrying out a function to suppress senescence in the petals of Japanese morning glory. The function of the other two genes, *InVPE* and *InPSR42*, could not be clarified, but homology search of these genes suggested that they are deeply related to the programmed cell death in the petals of morning glory.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：植物遺伝育種学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：アサガオ, プログラム細胞死, 液胞プロセッシング酵素, アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

花弁の老化に関する研究は国内外で様々な観点から行われ, 花持ち性の改良に結びつく幾つかの成果が挙げられていた. 例えば, 生理・生化学的な研究により, 1) 花弁の老化

がエチレンにより促進・誘導されること, 2) 花弁が老化する過程で花弁内の糖やタンパク質, 核酸が減少すること, 3) 老化した花弁の細胞では生体膜が変化していることなどが明らかにされ, エチレン阻害剤や糖類など

を混合した薬剤（鮮度保持剤）を切り花の生け水に添加することで、花持ち性を改善する技術などが開発されていた。

また、細胞生物学的な研究により、老化した花卉細胞では、1) 液胞による細胞質の取り込みと消化が行われ、2) DNA のヌクレオソーム単位での断片化が生じ、3) 核やクロマチンが断片化することから、花卉の老化が遺伝的に制御された能動的な細胞死（プログラム細胞死）により誘導されていることが明らかとなり、その細胞死の誘導を分子レベルで人為的に抑制できれば、分子育種等による花持ち性の改良が可能であることが示唆されていた。

さらに、分子生物学的な研究として、1) サブトラクション法やディファレンシャルスクリーニング法により、老化した花卉で発現量が著しく変化する遺伝子（花卉老化関連遺伝子）が確認されたり、2) マイクロアレイ法により、花卉が老化する過程で生じる遺伝子の発現量の変化（遺伝子発現プロファイル）が網羅的に解析されたりして、花卉の老化メカニズムが分子レベルで明らかにされつつあった。

しかし、1) 花卉の老化にエチレンが関与する植物種は限定され、既存の鮮度保持剤では花持ち性が改善されない植物種が多く存在する。2) 植物ではプログラム細胞死に関与する分子種がほとんど同定されておらず、分子育種等により花卉の細胞死を抑制して花持ち性を改良することは現時点で困難である。3) これまでに確認されている花卉老化関連遺伝子は、発現量の変化が確認されただけで、老化への関与は証明されていない。4) 遺伝子発現プロファイルから花卉の老化誘導に関わる重要な遺伝子は同定されていない。

以上から、多くの植物種で花持ち性を改善することができる新たな技術を開発するため、花卉が老化する分子メカニズムをより詳細に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、RNAi 法を用いて花卉の老化に関与することが示唆されている遺伝子の機能を証明し、花卉が老化する分子メカニズムの一部を明らかにするとともに、同定した老化遺伝子の発現を抑制することで、花卉の老化が阻害されることを確認し、分子育種等による花持ち性の改良が可能であることを明らかにすることを目的とした。

これまでの研究で、1) アサガオの花に RNA 合成阻害剤を処理し、遺伝子の発現を非特異的に阻害すると、通常は 1 日で萎れる花が 3 日以上は萎れないままとなり、花卉の老化が著しく抑制されることを確認した。2) サブトラクション法を用い、開花後のアサガオの花卉で発現量が変化する 20 種類の花卉老

化関連遺伝子を単離した。3) 単離した老化関連遺伝子について、Real-time RT-PCR 法により発現解析を行い、器官特異性や花卉での発現プロファイルを明らかにした。

そこで、本研究では、1) これまでに単離したアサガオの花卉老化関連遺伝子群のうち、老化直前の花卉で発現量が著しく増加し、推定されるタンパク質の機能が不明な遺伝子（3 種類）およびプログラム細胞死関連遺伝子のアサガオホモログの中から新たに単離した花卉老化関連遺伝子（1 種類）について、RNAi による発現抑制型トランスジェニック植物をそれぞれ作出することを試みた。2) 1 で作出した各トランスジェニック植物について、各遺伝子の発現抑制が花卉の老化に及ぼす影響を評価し、花卉の老化に関わる各遺伝子の機能を証明することを試みた。3) アサガオと他の植物種との間で花卉老化に関わる細胞死の特徴を比較し、本研究で機能を明らかにした遺伝子が他の植物種の花卉老化にも関与している可能性を探った。

これらの研究の実施により、花卉が老化する分子メカニズムの一部を明らかにし、花持ち性を改良する分子育種技術を確立するための基礎的な知見を得ることを試みた。

3. 研究の方法

(1) RNAi 法による花卉老化関連遺伝子の機能解析

花卉老化関連遺伝子の新規探索：アサガオ EST データベースを用いた相同性検索により、他の生物種でプログラム細胞死への関与が示唆あるいは明らかにされている複数の遺伝子のホモログを探索した。探索により同定されたホモログについて、アサガオ花卉における転写産物量の変化を Real-time RT-PCR 法により調査した。老化前後の花卉で発現が大きく変化する遺伝子を確認し、アサガオの花卉老化に関与することが示唆される新たな候補遺伝子（花卉老化関連遺伝子）を得た。

RNAi ベクターの構築：新たに得た花卉老化関連遺伝子 (*InVPE*)、過去の研究でサブトラクション法およびディファレンシャルスクリーニング法により単離した花卉老化関連遺伝子 (*InPSR26*, *InPSR29*, *InPSR42*)、および花卉の色素合成に関わるアントシアニン合成酵素遺伝子 (*InANS*) について、各標的遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 増幅を行い、cDNA 断片を得た。得られた cDNA 断片を GATEWAY 法により市販のベクター (pH7GWIWG2(II); プロモーターとして CaMV 由来の p35S、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を含む) に導入し、5 種類の RNAi ベクターを構築した。

トランスジェニック植物の作出：構築した 5 種類の RNAi ベクターをアグロバク

テリウム法によりアサガオの不定胚形成カルスへ導入し、ハイグロマイシンを含む選抜培地上で培養して、ハイグロマイシン耐性の再分化個体を選抜した。選抜した植物体から抽出した Total DNA を用い、ハイグロマイシン耐性遺伝子の PCR 増幅を行うことで、RNAi ベクターの T-DNA 領域が導入されたトランスジェニック植物 (T₀ 系統) を選抜した (各遺伝子につき少なくとも 3 系統以上)。

トランスジェニック植物の評価： で作出したトランスジェニック植物の各 T₀ 系統について、自殖後代 (T₁ 系統) を育成し、PCR 増幅によりハイグロマイシン耐性遺伝子の有無を確認した。ハイグロマイシン耐性遺伝子が確認された T₁ 系統および野生型の個体について、花弁から Total RNA を抽出し、cDNA を合成して、各標的遺伝子に特異的なプライマーを用いて Real-time RT-PCR を行い、花弁における標的遺伝子の転写産物量を調査した。標的遺伝子の転写産物量が野生型に比べ有意に少ない個体を選抜し、*InANS* の発現を抑制した個体については、花弁におけるアントシアニン含量を調査した。花弁老化関連遺伝子 (*InVPE*, *InPSR26*, *InPSR29*, *InPSR42*) の発現を抑制した個体については、本研究の過程で新たに開発した画像解析ソフトウェアを用い、花弁の老化が開始する時間や老化が進行する早さを調査し、野生型と比較することで、標的遺伝子の発現抑制による花弁老化への影響を評価した。

(2) アサガオ以外の植物種の花弁老化に関わる細胞死の特徴づけ

実験材料の採取： 脱離型の花弁老化を示すサクラおよびデルフィニウムの小花を開花前日に採取し、水の入ったマイクロチューブに挿し、25℃、相対湿度 70% に設定したインキュベーター内に保持した。開花後、老化して脱離した直後の花弁、脱離後に乾燥して萎れ始めた花弁、完全に乾燥した花弁をそれぞれ採取し、以後の実験に供試した。

核の形態観察： パルテック社の試薬キットを用い、 で採取した花弁より核を単離した。単離した核を DAPI で蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察して、クロマチンの凝縮や断片化といった形態的变化の有無を確認した。

DNA 断片化の検出： CTAB 法を用い、 で採取した花弁から Total DNA を抽出した。抽出した DNA をアガロースゲルで電気泳動し、EtBr で染色したのち、UV イルミネーターを用いて泳動像を観察した。

4. 研究成果

(1) RNAi 法による花弁老化関連遺伝子の機能解析

InANS の結果： アントシアニン合成酵素遺伝子 (*InANS*) を標的とした RNAi ベク

ター (pH7-ANS) を導入した形質転換体について、花弁における *InANS* の発現抑制やアントシアニン含量の減少、花弁の白色化を確認し、アサガオ花弁でも RNAi による遺伝子発現の抑制が可能であることを確認した。その結果、pH7-ANS を導入した T₀ 植物の花弁では、野生型植物 (青色) とは異なり白色に変化することを確認した。また、その T₀ 植物の自殖後代である T₁ 植物では、花弁が青色と白色の個体が分離し、PCR 法により花弁が白色の個体では導入遺伝子の存在を確認した。花弁が白色の T₁ 植物では、花弁における *InANS* の発現が野生型植物に比べて著しく抑制され、アントシアニン含量も減少していることを確認した。以上の結果から、アサガオの花弁でも RNAi 法による遺伝子発現の抑制が可能であることを明らかにした。

InPSR26 の結果： 機能未知の膜タンパク質遺伝子 (*InPSR26*) を標的とした RNAi ベクター (pH7-LR4) を導入した T₁ 植物を 3 系統 (LR4-A, K, V 系統) 得た。野生種 (非形質転換体) の花は、午前 6 時頃に満開となり、午後 5 時ころから花弁先端部に萎れが認められ、インローリングが開始した。これに対し、LR4 系統ではいずれも、野生種とはほぼ同じ時間帯に開花したが、開花後 2 時間ほどで中肋間の花弁先端部に萎れが認められ、午前 10 時には、花弁全体に萎れが広がった (図 1)。インキュベーター内で栽培した T₂ 植物においても、同様の特性が認められた。LR4 系統ではいずれも、花弁における *InPSR26* の発現量が野生種に比べ低下していた。LR4 系統では、アサガオ花弁の老化の指標である水ポテンシャルの低下および色相角度の上昇は、野生種に比べ早まっていた。また、プログラム細胞死の指標である核の断片化および核サイズの減少は、野生種よりも開花後早い時間に始まっていた。プログラム細胞死関連遺伝子である *InATG4*, *InATG8* および *InBI* の花弁老化時の発現量は、野生種に比べ低下していた。以上の結果から、*InPSR26* がアサガオ花弁の老化を抑制する機能を持つことを明らかにした。

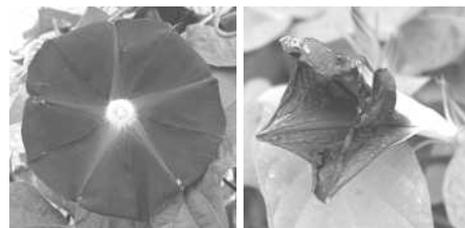


図 1 午前 10 時におけるアサガオ野生種 (左) と LR4-A5 (右) の花の様子

InPSR29 の結果： 機能未知の膜タンパク質遺伝子 (*InPSR29*) を標的とした RNAi ベク

ター (pH7-LR3) を導入した T₁ 植物を 2 系統 (LR3-A, C) 得た。全ての LR3 系統でハイグロマイシン耐性遺伝子の増幅断片が検出され、アグロバクテリウム法による pH7-LR3 の導入を確認した。LR3-A 系統では、野生型に比べ、花弁老化の開始時間が有意に短いことを確認し、この系統では花弁老化が促進されていることを明らかにした。LR3-C 系統も野生型に比べ、花弁老化が促進されている傾向が示された。また、LR3-A 系統は、野生型に比べ、花弁における *InPSR29* の発現量が有意に少ないことを確認し、これらの個体では、*InPSR29* の発現が抑制されていることを明らかにした。LR3-C 系統も野生型に比べ *InPSR29* の発現が抑制されている傾向が示された。さらに、野生型と LR3 系統の花弁における老化の開始時間と *InPSR29* の発現量には有意な正の相関が認められ、アサガオの花弁では *In29* の発現抑制により老化が促進されることが示された (図 2)。以上から、RNAi 法により *InPSR29* の発現を抑制したアサガオ花弁では老化が促進されることを確認し、*InPSR29* がアサガオ花弁の老化を抑制する機能を持つことを明らかにした。

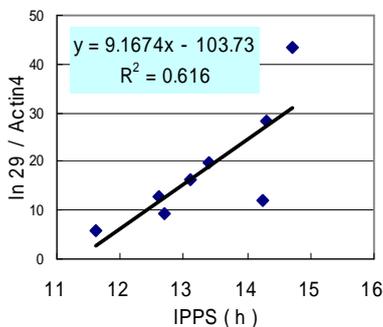


図 2 アサガオ花弁における老化の開始時間 (IPPS) と *InPSR29* の発現量との関係

InPSR42 の結果: BLAST 検索により、*InPSR42* がコードするタンパク質は 14-3-3 タンパク質のホモログであることが分かった。また、14-3-3 タンパク質はファミリーを形成しており、様々な生命現象に関与することが報告されているが、*InPSR42* がコードするタンパク質はプログラム細胞死のプロセスであるアポトーシスに関与するヒトやラットの 14-3-3 タンパク質と高い相同性を示すことを明らかにした。一方、*InPSR42* を標的とした RNAi ベクター (pH7-LR14) をアサガオに導入し、T₁ 植物を 3 系統 (LR14-2, 4, 6) 得た。全ての LR14 系統で pH7-LR14 の導入および花弁における *InPSR42* の発現抑制を確認した (図 3)。しかし、LR14 系統と野生型との間で、開花からインローリングが開始するまでの時間に有意な差は認められなかった (図 4)。以上から、*InPSR42* はアサガオの

老化花弁に生じるプログラム細胞死のアポトーシスプロセスに関与している可能性が示唆されたが、老化花弁に生じるインローリングには関与していないことが示唆された。

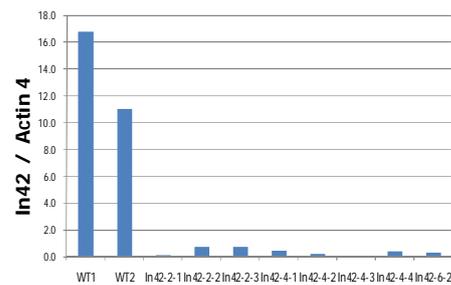


図 3 LR14 系統の開花 18 時間後の花弁における *InPSR42* の転写産物量

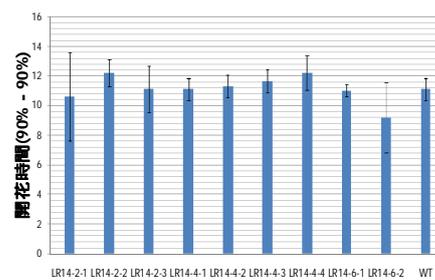


図 4 LR14 系統の開花から花弁老化が開始するまでの時間

InVPE の結果: *InVPE* がコードする *InVPE* は他の生物種で単離・同定された既知の *VPE* で確認されている切断部位や活性部位などをすべて含むことを確認した。また、生物学的な機能が明らかにされている既知の *VPE* との相同性から、*InVPE* はプログラム細胞死に関与する可能性の高いタンパク質であることが推察された。一方、*InVPE* を標的とした RNAi ベクター (pH7-VPE) を導入した形質転換体の T₂ および T₃ 植物では、約 67% および 43% の個体で導入遺伝子が確認された。しかし、野生型と比較し、花弁における *InVPE* の発現量および花弁老化の開始時期に有意な差異は検出されなかった。以上から、調査した T₂ および T₃ 植物には、*InVPE* の発現抑制系統が含まれていないことが示唆された。

(2) アサガオ以外の植物種の花弁老化に関わる細胞死の特徴づけ

サクラとデルフィニウムの脱離後の老化花弁から単離した核を蛍光顕微鏡で観察した結果、プログラム細胞死の形態学的特徴であるクロマチンの凝縮や断片化は検出されなかった。また、その老化花弁でこれまでに報告のない新たな形態的变化を示す核の崩壊現象を確認した。一方、老化花弁から抽出した DNA をアガロースゲルで電気泳動した結果、プログラム細胞死の生化学的特徴であ

る DNA のヌクレオソーム単位での断片化を示唆する電気泳動像は観察されなかった。以上から、サクラやデルフィニウムのように花弁が脱離するタイプの老化にはプログラム細胞死が関与しないことを明らかにした。また、そのようにプログラム細胞死が関与していない植物種の花弁老化には、本研究で機能を明らかにした遺伝子が関与している可能性は低く、分子育種による花持ち性の改良には利用できない可能性が示唆された。

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6件)

七夕高也, 山田哲也, 清水悠介, 篠崎良仁, 金勝一樹, 高野 誠 (2010) 植物器官のデジタル画像面積を効率的に計測できる領域抽出ソフトウェアの開発. 園芸学研究, 印刷中, 査読有.

Shibuya K, Yamada T, Shimizu K, Ichimura K (2009) *InPSR26* encoding a putative membrane protein is involved in programmed cell death during petal senescence of Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). *Acta Horticulturae* 847: 275-278. 査読無.

Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG (2009) Homologues of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* petals. *Plant Cell Physiology* 50: 610-625. 査読有.

Shibuya K, Yamada T, Suzuki T, Shimizu K, Ichimura K (2009) *InPSR26*, a putative membrane protein, regulates programmed cell death during petal senescence in *Ipomoea nil*. *Plant Physiology* 149: 816-824. 査読有.

Yamada T, Ichimura K, van Doorn WG (2007) Relationship between petal abscission and programmed cell death in *Prunus yedoensis* and *Delphinium belladonna*. *Planta* 226: 1195-1205. 査読有.

Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG (2007) Gene expression in opening and senescing petals of morning glory (*Ipomoea nil*) flowers. *Plant Cell Report* 26: 823-835. 査読有.

[学会発表](計6件)

篠崎良仁, 山田哲也, 金勝一樹, アサガオの花弁老化におけるオートファジーと老化関連遺伝子の発現との関係, 園芸学会平成 22 年度春季, 日本大学, 2010

年 3 月, 園学研 9 別 1: 222.

李マイ, 鈴木智子, 清水圭一, 七夕高也, 篠崎良仁, 高橋彩佳, 渋谷健市, 市村一雄, 山田哲也, 金勝一樹, 膜貫通型 LRR プロテインキナーゼ遺伝子のホモログ *In29* はアサガオの花弁老化に関与する, 日本育種学会第 116 回, 北海道大学, 2009 年 9 月, 育学研 11 別 2: 345.

篠崎良仁, 山田哲也, 七夕高也, 宮村浩子, 斎藤隆文, 金勝一樹, アサガオ花弁における老化関連遺伝子の発現量の系統間差異, 日本育種学会第 114 回, 滋賀県立大学, 2008 年 10 月, 育学研 10 別 2: 336.

渋谷健一, 山田哲也, 鈴木智子, 清水圭一, 市村一雄, アサガオの膜タンパク質をコードする *InPSR26* 遺伝子は花弁老化時のプログラム細胞死に関与している, 園芸学会平成 20 年度秋季, 三重大学, 2008 年 9 月, 園学研 7 別 2: 329.

篠崎良仁, 山田哲也, 金勝一樹, 葉の老化関連転写因子 NAP の遺伝子ホモログは老化誘導期のアサガオ花弁で発現量が著しく増加する, 日本育種学会第 113 回, 明治大学, 2008 年 3 月, 育学研 10 別 1: 292.

鈴木智子, 山田哲也, 清水圭一, 市村一雄, 金勝一樹, RNAi 法によるアサガオのアントシアニン合成酵素遺伝子の発現抑制, 日本育種学会第 112 回, 山形大学, 2007 年 9 月, 育学研 9 別 2: 216.

[その他]

開発したソフトウェアのサイト

<http://www.kazusa.or.jp/picasos/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・講師

研究者番号: 20422511