

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06034

研究課題名(和文) エチレン応答因子で拓くカーネーションのポストゲノム収穫後生理研究

研究課題名(英文) Postgenomic study on postharvest physiology of carnation opened up by ethylene response factors

研究代表者

原田 太郎 (HARADA, Taro)

岡山大学・教育学域・講師

研究者番号：80468256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カーネーションのエチレン応答因子(ERF)の遺伝子ファミリーを全ゲノム情報を利用して解析した。第一に、遺伝子発現解析によりエチレン応答を示すメンバーを同定した。第二に、DcERF4のプロモーター解析により、そのエチレン誘導におけるエチレン応答性エレメント(ERE)の関与を検証した。第三に、ERFが植物の酸素センシング機構の重要因子であるとの知見に基づき、カーネーション小花のMA包装(MAP)の実験系を確立し、RNAシーケンシング(RNA-Seq)によりエチレン依存性花弁老化過程とMAP下での小花の保存過程における差次的発現遺伝子(DEG)を比較解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーネーションは、世界および国内における主要花き品目の1つであり、我が国の研究者がその研究を牽引してきたが、2013年の全ゲノム解読完了以降、その情報を利用した新たな研究が期待されている。本研究では、園芸学的に重要な花の老化過程における新たな研究対象となり得る遺伝子を提示するとともに、実用化が期待される切り花のMAP技術の効果に関する生理学的、分子生物学的根拠を提示することで、カーネーションの収穫後生理研究の新たな次元の開拓のための基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the ethylene response factor (ERF) gene family in carnation was analyzed with the whole genome information. First, the ERF members that show responses to ethylene were identified by gene expression analyses. Second, involvement of an ethylene response element (ERE) in the ethylene induction of DcERF4 was investigated by promoter assays. Third, based on the knowledge that ERF is an important factor in oxygen sensing mechanism in plant, experimental systems for modified atmosphere packaging (MAP) of carnation florets were established, and differentially expressed genes (DEG) during ethylene-dependent petal senescence and during preservation of florets under MAP were analyzed and compared by RNA-Seq.

研究分野：花き園芸学、植物生理学

キーワード：エチレン依存性花弁老化 エチレン応答因子 MAP RNA-Seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は、ナデシコ科ナデシコ属に属する植物種であり、キク、バラとともに三大切り花に数えられる主要花き品目の1つである。カーネーションの花は、花きの中でもエチレンに対する感受性が際立って高く、老化時にエチレンを引き金としてエチレンを多量に生成する特徴から、花におけるエチレン研究のモデルとして扱われてきた。このエチレン依存的な老化に伴い、花弁のインローリング (向軸側への湾曲) が生じることが知られており、これは不可逆的な過程であると信じられてきた。しかし、近年、エチレン曝露時間が短い場合にインローリング後に正常な形態への復帰が観察され、それが可逆的であることが見出されるなど、カーネーションのエチレン応答が従来考えられていたよりも柔軟な過程であることがわかりつつある。また、2013年には、花きとして初めてのゲノム解読が完了したが、ゲノム上の特徴からカーネーションのエチレン応答の特異性を説明するには至っていない (Yagi et al., 2014)。

(2) カーネーション花弁のエチレン応答の分子機構に関しては、まずエチレン生成に関与する2つの主要酵素、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (ACS) および ACC 酸化酵素 (ACO) の遺伝子の解析が行われ、花弁老化における主要遺伝子として *DcACS1* と *DcACO1* が同定された。その後、シロイヌナズナでの知見をもとにエチレンシグナル伝達系の構成要素の解析も行われ、エチレン受容体、負の制御因子 CTR およびマスター転写因子 EIN3/EIN-like (EIL) をコードする遺伝子がそれぞれ単離、同定された (Iordachescu and Verlinden, 2005)。一方、シロイヌナズナにおいては、EIN3 がさらに別の転写因子であるエチレン応答因子 (ERF) をコードする遺伝子 *ERF1* の発現を制御していることが判明している (Solano et al., 1998)。ERF は、保存された DNA 結合ドメイン (AP2/ERF ドメイン) を1個持ち、エチレンへの応答を特徴として同定された転写因子タンパク質の一群であり、他の遺伝子の発現調節により成長・発生制御、植物ホルモンのシグナル統合、環境ストレス耐性付与、防御応答などの機能を持つことが報告されている (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995)。シロイヌナズナでは122個もの ERF 遺伝子が見出され、アミノ酸配列をもとに12グループに分類されており、他の植物でも同規模の数の遺伝子が見出されている。カーネーションでは、開花過程の花弁で発現する ERF 遺伝子の存在が明らかにされているが (Harada et al., 2010)、花の老化に ERF が関与しているかどうかは調べられていない。そこで、ゲノムデータベースを用いた相同性検索を行った結果、カーネーションの推定 ERF 遺伝子の数は32個と他の植物に比べ非常に少ないことが見出された。

(3) 園芸学においては、CA (controlled atmosphere) 貯蔵や MA (modified atmosphere) 包装 (MAP) といったガス環境制御による収穫物の品質保持技術があり、低酸素による呼吸抑制がその要となっている。しかし、花の低酸素応答に関する基礎的知見は、カーネーションなどに関するいくつかの研究事例があるものの依然乏しい状況にあり、切り花の MAP の実用化事例はほとんどない (Trippi et al., 1988; Solomos, 1998)。植物が低酸素または無酸素条件下に置かれたとき、エネルギー危機への馴化のため代謝経路の切り替えや成長抑制が起こる。その起点となる植物の酸素センシング機構に関して、グループ VII に属する ERF の中に低酸素条件下で誘導され、細胞の生存に寄与するメンバーがあることや (Licausi et al., 2010)、ERF タンパク質の N 末端側にあるシステイン残基の酸化状態の制御 (N 末端法則経路) がその分子実体であることが見出されている。

(4) 転写因子は、植物の成長と発生、環境ストレス応答などの初期制御過程において主要な役割を果たしており、その欠損や過剰発現により表現型にしばしば劇的な変化が生じることから、園芸作物においても主要な研究対象分子となっている。近年、トマト、バナナ、リンゴといったクリマクテリック型果実の追熟過程において、ERF がエチレン生合成系遺伝子の発現を正または負に制御しているとの研究結果が次々に発表されている (Li et al., 2016)。また、カキにおいては、果実の軟化過程および脱渋処理 (高二酸化炭素・低酸素処理) 過程で特異的に発現する ERF 遺伝子が同定されている。このような果樹の研究事例からも、クリマクテリック型花きであるカーネーションにおいてその老化や低酸素応答への ERF の関与を検証する価値があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、カーネーションの ERF 遺伝子ファミリーの発現解析およびプロモーター解析、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析などにより、エチレン依存型花弁老化および MAP による小花の咲き進み抑制への ERF の関与を明らかにすることである。これにより、ERF ファミリーの機能分化の観点から、カーネーションのクリマクテリック型花きとしての成立過程や、MAP による切り花の品質保持の鍵となり得る花のエチレン応答と低酸素応答とのクロストークに迫り、カーネーションのポストゲノム収穫後生理研究の新たな次元を開拓する。

3. 研究の方法

(1) カーネーション ERF の発現プロファイルの獲得

カーネーションゲノムデータベース上で同定された 32 個の推定 ERF 遺伝子について、老化過程における発現パターンおよびエチレン処理に対する応答をリアルタイム RT-PCR 法を用いて明らかにする。

エチレン生成との相関性が高いメンバー (DcERF4) のタンパク質レベルの変化を、ウェスタンブロット解析により確認する。

(2) DcEIL による ERF 遺伝子の転写促進の検証

エチレン誘導を示す *DcERF4* のプロモーターには、エチレン応答に必要なシスエレメントとして同定されたエチレン応答性エレメント (ERE, Itzhaki et al., 1994) が存在することが確認された。ここに DcEIL が結合し、*DcERF4* の転写を促進しているかどうかを、シロイヌナズナプロトプラストを用いたルシフェラーゼアッセイにより調査する。

(3) カーネーション小花の MAP による保管条件の検討

カーネーション切り花の MAP による品質保持効果について、小花の咲き進みの抑制、エネルギーチャージおよび開封後の花持ち性などの観点から検証する。

他の植物で報告のある低酸素応答遺伝子をカーネーションにおいてクローニングし、低酸素条件下および MAP 下での発現解析を行う。

(4) カーネーションのエチレンおよび低酸素応答遺伝子のトランスクリプトーム解析

RNA シーケンシング (RNA-Seq) により、エチレン曝露後および低酸素培養後の小花花弁における差次的発現遺伝子 (DEG) を網羅的に調査し、両条件下における遺伝子発現プロファイルの差異を明らかにする。

4. 研究成果

(1) カーネーション ERF の発現プロファイルの獲得

カーネーション ‘ウェストダイヤモンド (WD)’ を供試材料として、32 個の ERF 遺伝子 (図 1) の cDNA 部分配列のクローニングおよび発現解析を行い、*DcERF4* を含む複数のメンバーの転写産物レベルが、老化過程およびエチレン処理後の花弁において上昇することを確認した。このことは、トランスクリプトーム解析 (後述) においても確認された。

抗体作製サービスを利用し、*DcERF4* を特異的に認識できる可能性の高い抗ウサギ抗体を得た。それを用いてウェスタンブロット解析を試みた結果、予測されるサイズとは異なる位置にバンドが得られ、その強度は対照 (満開小花の花弁) に比べ、エチレン処理した花弁および老化過程の花弁において同等であった。このことから、エチレンにより *DcERF4* がタンパク質レベルで誘導されるかどうかについての結論は得られなかった。

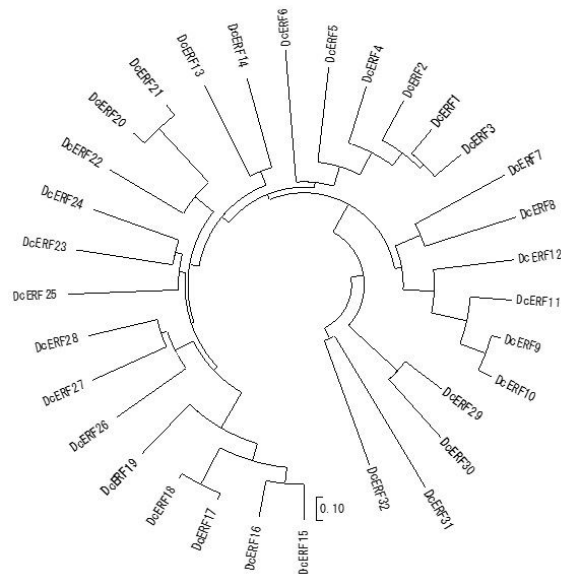


図 1 カーネーション ERF の分子系統樹

(2) DcEIL による ERF 遺伝子の転写促進の検証

エフェクタープラスミドとして、‘WD’ より *DcEIL1* および *DcEIL3* のコード配列 (CDS) をクローニングし、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流で発現させるコンストラクトを、レポータープラスミドとして、ERE を含む、または含まない *DcERF4* のプロモーター領域をクローニングし、その下流でルシフェラーゼ (LUC) 遺伝子を発現させるコンストラクトを作製した。Iwata et al. (2011) の方法に従い、シロイヌナズナ Col-0 系統の葉から得たプロトプラストにそれらを導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイにより *DcERF4* のプロモーター機能を解析したところ、DcEIL1 または DcEIL3 の存在下で、ERE を含むレポーターの LUC 活性の上昇は見られなかった。このことから、DcEIL が *DcERF4* のプロモーターに存在する ERE に結合し、その転写を促進しているという仮説は支持されなかった。比較対照として、同じくエチレンにより誘導され、プロモーターに ERE をもつ *DcACS1* および *DcACO1* についても同様の解析を行ったが、エチレン誘導への ERE の関与を支持する結果は得られていない。このようなカーネーションの花弁老化におけるエチレンによる転写調節カスケードについては、Verlinden et al. (2002)

により仮説が提示されて以降、未だ解明に至っていない。一方で、最近、異なるタイプの転写因子が関与する新たな機構も報告されていることから (Xu et al., 2021), ERF の転写調節機構についてもさらなる研究が必要である。

(3) カーネーション小花の MAP による保管条件の検討

ポリプロピレンバッグを用いたカーネーション切り花の MAP において、封入本数によりバッグ内の酸素濃度が変化すること、開花ステージ初期の小花をもつ切り花を適正な本数封入することで、咲き進みおよびエチレン生成が抑制され、品質保持効果が得られることが明らかとなった。また、カーネーション切り花を MAP 下で 7 日間保管した場合、花卉のアデニル酸エネルギーチャージ (Atkinson, 1968) が維持されること、市販の水揚げ促進剤により開封後の花持ち性が向上することも判明した。これらにより、以下の解析のための MAP 条件を決定するとともに、今後、包装資材などの検討を加えることで、MAP 保管条件を実用レベルで検討していくための基礎データを得た。

他の植物で低酸素条件下での発現上昇が知られているスクロース合成酵素 (SUS), アルコール脱水素酵素 (ADH), 低酸素応答性 ERF (HRE) およびフィトグロビン (PGB) をコードする遺伝子をそれぞれ 1 種類ずつ (*DcSUS2*, *DcADH1*, *DcERF19* および *DcPGB1*), 'WD' および 'えくぼ' の 2 品種から単離し、決定した配列を DDBJ に登録した (アクセッション番号は, *DcSUS2* ('WD'): LC659676, *DcADH1* ('WD'): LC659677, *DcERF19* ('WD'): LC659678, *DcPGB1* ('WD'): LC659679, *DcSUS2* ('えくぼ'): LC659680, *DcADH1* ('えくぼ'): LC659681, *DcERF19* ('えくぼ'): LC659682, *DcPGB1* ('えくぼ'): LC659683)。また、それらの発現レベルが MAP 下の花卉で顕著に上昇することを確認した。

(4) カーネーションのエチレンおよび低酸素応答遺伝子のトランスクリプトーム解析

'えくぼ' を供試材料として、(i)開花ステージ 2, (ii)低酸素培養 3 時間後 (低酸素培養システムを使用) および (iii)MAP 処理 7 日後の花卉, および (iv)老化ステージ 1, (v)エチレン処理 6 時間および (vi)老化ステージ 3 の花卉から抽出した RNA (6 実験区 × 3 反復) を用いて、RNA-Seq 解析を行った。その結果、サンプルごとに解析に十分な 14,464,871 ~ 40,384,537 のリードが得られた。次に、フィルタリング処理で品質が確保された配列を用いてアセンブルを行った結果、平均鎖長 671.9 bp, 145,279 種類の高発現転写産物が得られた。これらの配列から、34,608 個のコード領域が予測され、既知タンパク質との相同性から 28,979 個にアノテーション情報が付与された。

続いて、各配列のリードカウントおよび TPM 正規化を行い、発現量の 2 群間比較を行った。その結果、対照 (開花ステージ 2) 群と低酸素培養群との比較では、前者に対し後者で誘導される (平均 TPM 値が 2 倍以上に上昇する) 遺伝子が 1,553 個あり、そのうち有意な発現変動転写産物とみなされた配列は 220 個であった。一方、抑制される (平均 TPM 値が 0.5 倍以下に低下する) 遺伝子が 1,708 個あり、そのうち、有意な発現変動転写産物とみなされた配列は 214 個であった。また、対照群と MAP 群との比較では、前者に対する後者での発現変動転写産物 3,115 個のうち有意な発現変動転写産物は 1,249 個、抑制遺伝子 3,687 個のうち有意な発現変動転写産物は 993 個であった。低酸素培養群と MAP 群で共通して誘導または抑制される転写産物はそれぞれ 113 および 81 個であった (図 2)。他方、対照 (老化ステージ 1) 群とエチレン処理群との比較では、前者に対し後者で誘導される遺伝子が 2,494 個あり、そのうち有意な発現変動転写産物とみなされた配列は 1,580 個であった。一方、抑制される遺伝子が 3,725 個あり、そのうち、有意な発現変動転写産物とみなされた配列は 567 個であった。また、対照群と老化ステージ 3 群で

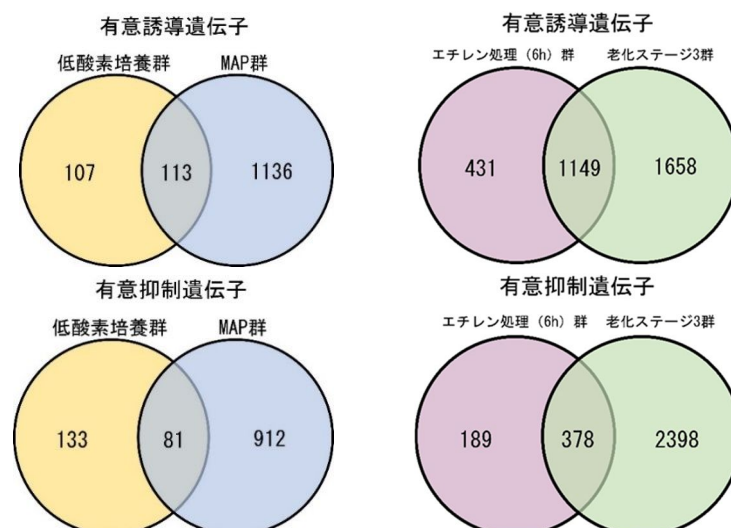


図 2 RNA-Seq により同定された DEG の数の比較

の比較では,前者に対する後者での誘導遺伝子 3,130 個のうち有意な発現変動転写産物は 2,807 個,抑制遺伝子 6,250 個のうち有意な発現変動転写産物は 2,776 個であった.エチレン処理群と老化ステージ 3 群で共通して誘導または抑制される転写産物はそれぞれ 1149 および 378 個であった(図 2).

低酸素培養群と MAP 群における有意誘導遺伝子には,既知のカーネーションの低酸素応答遺伝子として,前述の *DcADH1*, *DcSUS2*, *DcERF19* および *DcPGB1* が含まれていた.また,他の植物で低酸素誘導の報告がある発酵・解糖系酵素,システイン酸化酵素,ユニバーサルストレスタンパク質などをコードする遺伝子も見出された.一方,有意抑制遺伝子では,オーキシン関連遺伝子,細胞壁構築関連のエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素遺伝子やペクチン酸リアーゼ遺伝子,アクアポリン遺伝子,液胞インベルターゼ遺伝子など,花卉成長(開花)との関連で注目すべきものも多く見られた.一方,エチレン処理群と老化ステージ 3 群において,*DcERF* については,両者で共通して誘導されたものが 5 個,後者のみで誘導されたものが 1 個,共通してまたは後者のみで抑制されたものが 3 個であった.有意誘導遺伝子には,エチレン受容体遺伝子(*DcETR2*, 3),EIL 遺伝子(*DcEIL1/2*, 3)およびエチレン生合成系酵素遺伝子(*DcACS2*, *DcACO1*, 4), EIN3 結合 F ボックスタンパク質(*DcEBF1*) などのエチレン関連遺伝子が含まれていた.その他,最近エチレン応答が報告された WRKY 転写因子遺伝子(*DcWRKY75*)や老化関連遺伝子(*DcbGAL1*, *DcGST1*),細胞壁の緩みを引き起こすエクспанシンをコードする遺伝子なども誘導されており,これらの大部分はエチレン処理および老化ステージ 3 に共通であるのみならず,MAP 群でも誘導されていた.一方,有意抑制遺伝子には,オーキシン関連遺伝子,ERE 結合タンパク質遺伝子(*CEBP-1*),エチレン生合成に関与する S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子,システインプロテアーゼインヒビター遺伝子, *SUS* 遺伝子,細胞壁構築関連タンパク質遺伝子,原形質膜アクアポリン遺伝子などが含まれていた.

以上の結果から,カーネーションのエチレン依存性花卉老化過程に複数の *DcERF* メンバーが関与している可能性があること,カーネーションの MAP が花における低酸素応答とエチレン応答とのクロストークを調べる上で有用な実験系となることが示唆された.今後は,*DcERF4* 以外のメンバーに注目した解析や, RNA-Seq で同定された遺伝子群の詳細な解析を進めていく必要がある.

<引用文献>

- Yagi M, Kosugi S, Hirakawa H, Ohmiya A, Tanase K, Harada T, Kishimoto K, Nakayama M, Ichimura K, Onozaki T, Yamaguchi H, Sasaki N, Miyahara T, Nishizaki Y, Ozeki Y, Nakamura N, Suzuki T, Tanaka Y, Sato S, Shirasawa K, Isobe S, Miyamura Y, Watanabe A, Nakayama S, Kishida Y, Kohara M, Tabata S (2014) *DNA Research* 21, 231-241.
- Iordachescu M, Verlinden S (2005) *Journal of Experimental Botany* 56, 2011-2018.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) *Genes and Development* 12, 3703-3714.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) *The Plant Cell* 7, 173-182.
- Harada T, Torii Y, Morita S, Masumura T, Satoh S (2010) *Journal of Experimental Botany* 61, 2345-2354.
- Trippi VS, Paulin A, Pradet A (1988) *Physiologia Plantarum* 73, 374-379.
- Solomos T (1998) *Biology and Biotechnology of the Plant Ethylene II* (eds. Kanellis AK, Chang C, Klee H, Bleecker AB, Pech JC, Grierson D), pp. 313-319, Kluwer Academic Publishers.
- Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P (2010) *The Plant Journal* 62, 302-315.
- Li T, Jiang Z, Zhang L, Tan D, Wei Y, Yuan H, Li T, Wang A (2016) *The Plant Journal* 88, 735-748.
- Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8925-8929.
- Iwata Y, Lee MH, Koizumi N (2011) *Plant Transcription Factors, Methods and Protocols* (eds. Yuan L, Perry SE), pp. 107-117, Humana Press.
- Verlinden S, Boatright J, Woodson WR (2002) *Physiologia Plantarum* 116, 503-511.
- Xu H, Luo D, Zhang F (2021) *The Plant Journal* 108, 1473-1492.
- Atkinson DE (1968) *Biochemistry* 7, 4030-4034.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada Taro, Horiguchi Itsuku, Ueyama Sayaka, Murai Ai, Tsuzuki Chie	4. 巻 185
2. 論文標題 Comprehensive analysis of sucrolytic enzyme gene families in carnation (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112607 ~ 112607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2020.112607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taro Harada, Ryota Ichikawa, Sayaka Ueyama, Itsuku Horiguchi
2. 発表標題 Genome-wide analysis of genes related to postharvest physiology in carnation
3. 学会等名 The 3rd Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川涼太, 原田太郎
2. 発表標題 カーネーションのエチレン依存性花卉老化に関するエチレン応答因子遺伝子の同定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院教育学研究科・教育学部 理科教育講座 植物学研究室
https://edu.okayama-u.ac.jp/~rika/shokken/harada_lab.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	竹内 小百合 (TAKEUCHI Sayuri)		
研究協力者	市川 涼太 (ICHIKAWA Ryota)		
研究協力者	村井 亜衣 (MURAI Ai)		
研究協力者	中山 実咲 (NAKAYAMA Misaki)		
研究協力者	田中 希 (TANAKA Nozomi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 菜央 (HARADA Nao)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関