

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780025

研究課題名(和文) 老化特異的プロモーターにより IPT 遺伝子の発現を誘導した組換え花きの作成と解析

研究課題名(英文) Regulation of IPT gene under control of senescence activated promoter

研究代表者

中野 龍平 (NAKANO, Ryohei)

岡山大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：70294444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：サイトカイニン合成に関連する IPT 遺伝子を老化開始時に遺伝子発現を誘導する PSARK プロモーターの制御下で誘導するキメラ遺伝子 PSARK-IPT を導入した花き類を育成し、その老化を調査した。その結果、流通中の葉の黄化が問題となるキク「精興の誠」において、PSARK-IPT を導入個体では黄化が著しく抑制された。さらに、黄化が発生しやすい条件であるエチレン存在下や暗黒下にて調査したところ、いずれの条件でも黄化が著しく抑制された。花持ち期間が長く、低コスト・省エネルギーの流通を可能とする切り花の育成における基礎的知見としての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chimeric gene that induced cytokinin biosynthesis regulating gene IPT under the control of senescence activated promoter PSARK (PSARK-IPT) was introduced into floricultural plants such as petunia and chrysanthemum and their shelf-life were observed. As results, in 'Seikonmakoto' chrysanthemum which has a problem of leaf-yellowing during storage and transportation, cut flowers harvested from PSARK-IPT introduced transgenic plants showed markedly delayed leaf-yellowing. They also showed delayed leaf-senescence even under dark condition and ethylene exposure. These results provide valuable information for breeding floricultural plants with stress-tolerance and long-self life that would lead to low cost, energy saving and economical transportation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸・造園学

キーワード：サイトカイニン 老化特異的プロモーター IPT 花持ち

1. 研究開始当初の背景

現在、切り花の貯蔵・輸送にはその鮮度を保持する目的で、3～4℃程度の低温が広く用いられている。さらには、従来の段ボール箱を用いる乾式輸送から保存剤の入ったバケツで輸送するバケツ輸送へと切り替えられつつある。しかしながら、これらの輸送形態は多大なコストとエネルギーを必要としており、CO₂削減や省エネルギーが叫ばれる近年の世界情勢に逆行している。また、これら高エネルギー消費技術の利用にも関わらず、切り花の花持ち期間は消費者を満足させるのに十分なレベルには達しておらず、収穫後のストレスに強く、花持ち期間が長く、低コスト・省エネルギーでの輸送を可能とする花き類の育種・開発が望まれている。青いカーネーションに象徴されるように、花き類では遺伝子組換え体がすでに消費者の理解を得ており、有用な遺伝子組換え体の作成は問題解決の一つとして有効である。

これまでの花き類の老化に関する遺伝子レベルの研究では、植物ホルモンエチレンの関与やエチレン合成、エチレン感受性に関して重きがおかれており、エチレン生成能やエチレン感受性を抑制し、野生型より花持ちの良い組換え体が作成されている。しかしながら、実用上はSTSなどエチレンの作用を抑制する技術はすでに発達しており、省エネルギーの観点からも、むしろ、乾燥にともなう萎れなどエチレン非依存的な老化現象も含めて包括的に老化を抑制する遺伝子組換え花き類の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

老化を遅延させることを目的とし、サイトカイニン合成系の律速段階を担う酵素であるIPT (isopentenyl transferase) を老化時に誘導する遺伝子組換え体の作成が試みられているが、形態の異常などが発生し、これまで有用な組換え体は得られていなかった。近年、代表者の研究協力者、Blumwald 博士は、老化開始時に一過的に遺伝子の発現を誘導するダイズ由来のプロモーター (P_{SARK}) 制御下でIPTを発現させたタバコの遺伝子組換え体を作成した。この P_{SARK} -IPT タバコでは著しい形態異常は見られず、老化の遅延だけでなく、強い乾燥ストレス耐性を示した。 P_{SARK} -IPT タバコでは、ペルオキシソームが発達し、活性酸素消去系が著しく強化されていることが観察されており、乾燥以外にも様々なストレスに対して耐性を示す可能性が考えられた。

そこで、本研究では、1) サイトカイニン合成系の律速段階を担う酵素であるIPTをコードする遺伝子を老化開始時に一過的に遺伝子発現を誘導する P_{SARK} プロモーターの制御の基に発現させる花き類を作成・栽培し、その老化やストレス耐性を調査した。また、2) 花卉老化特異的に遺伝子発現を誘導する新たなプロモーターを単離するとともに、その制御下でIPT遺伝子を発現させる花き類の作

成を試みた。さらに、3) サイトカイニンの花における合成の変化は、花器官の形態形成やエチレン感受性に影響することが報告されているので、花器官の形態形成やエチレン感受性の変化が花き類の老化に及ぼす影響に関して合わせて調査した。

これらより、遺伝子組換え技術や育種技術による、老化が抑制され、ストレスに強い花き類を作成し、花持ち期間が長く、低コスト・省エネルギーの流通を可能とする切り花の提供に向けて、基礎的知見の修得を目的とした。なお、ペチュニアは切り花ではないが、花の老化研究においてモデルとして扱われており、本研究でも、同様の位置づけにて調査に用いた。

3. 研究の方法

1) P_{SARK} -IPT組換え花き類の作成とその解析

すでにペチュニア‘ミッCHEL’、キク‘神馬’、キク‘精興の誠’などにおいて、 P_{SARK} -IPT 導入個体の作成を進めていた。これらの個体・系統を育成するとともに、新たに、老化が早く、ストレスに弱いとされているキク‘カナリア’やカーネーション‘ノラ’への P_{SARK} -IPT の導入を試みた。

さらに、先に P_{SARK} -IPT 導入個体の作出を始めていたペチュニア‘ミッCHEL’、キク‘神馬’、キク‘精興の誠’については、これらの組換え体を栽培・収穫し、花持ちの調査を行った。特に、キクでは、品種により、流通中の葉の黄化が問題となっているので、暗黒下やエチレン存在下での貯蔵等、黄化が発生しやすい条件下での葉の品質維持に関して調査した。

2) 花卉老化特異的プロモーターを用いたIPT誘導組換え花き類の作成とその解析

オートファージに関わるATG8遺伝子の一つがアサガオ花卉の老化開始時に発現量が急増することが知られている。Database解析の結果、このアラビドプシスのホモログの一つの発現も同様に花の老化時に誘導されることが分かった。そこで、このアラビドプシスATG8のプロモーター領域を単離し、IPT遺伝子と繋げたキメラ遺伝子 (P_{ATG8} -IPT) を作成した。アグロバクテリウム法により花き類への導入を試み、得られたカルスより組織培養により、個体の再分化を試みた。

3) 花器官形成およびエチレン感受性の変異と花持ちの関連性解析

サイトカイニンの合成変化により誘導される可能性がある花の形態形成の変化やエチレン感受性の変化が花持ちに及ぼす影響を、ペチュニアをモデルとして用いて、調査した。つまり、形態形成に関わるMADS-Box転写因子の内AGグループに属するpMADS3とFBP6、エチレン感受に関わるエチレン情報伝達系因子のPh-EIN2とPh-EILsについて、Virus Induced Gene Silencing (VIGS) 法を

用いたサイレンシングを誘発し、その花器官形成や花持ちに及ぼす影響を調査した。なお、Ph-EILs は5つの isogene が報告されているので、保存領域を用いて、5つすべてを同時に抑制することを試みた。

4. 研究成果

1) P_{SARK} -IPT 組換え花き類の作成とその解析

いずれの P_{SARK} -IPT 導入花き類においても形態異常などは発生せず、外観上は通常の花き類が得られた (図1)。



図1 キク‘神馬’ P_{SARK} -IPT導入系統

P_{SARK} -IPT を導入した、ペチュニア ‘ミツヘル’ 15 系統では、いずれも葉の老化が著しく抑制された。花持ちには大きな差はみられなかった。

キク ‘神馬’ 10 系統、‘精興の誠’ 5 系統に関して、組換え体を栽培・収穫し、花持ちの調査を行った。その結果、‘神馬’ では、大きな葉の老化抑制や花持ちの向上は見られなかった。高温条件下 (37) や低湿度条件下での調査も行ったが、WT でもストレスに強く、 P_{SARK} -IPT の導入によるさらなる耐性の強化はなかった。

一方、‘精興の誠’ では、切り花においても調査期間中の葉の黄化が著しく抑制された。また、葉の黄化は下部の葉ほど起こりやすいことが明らかとなった。このことより、下部と上部のサイトカニン含量のバランスが下部葉の黄化に関係すること、‘神馬’ ではもともと葉の老化が起りにくいが、それは下部葉であってもサイトカニン含量の低下が起こらないためではないかと予想された。

‘精興の誠’ では、流通中の葉の黄化が問題となっているので、 P_{SARK} -IPT を導入した ‘精興の誠’ に関して、流通上の問題を想定し、特に黄化が起こりやすい条件であるエチレン存在下および暗黒下での葉の老化を調査した。その結果、エチレン存在下において葉の黄化が著しく抑制された (図2) また、暗黒化に保存すると、3日程度で非組換え体の葉は黄化するのに対して、 P_{SARK} -IPT を導入した ‘精興の誠’ では、このような黄化は2週間経っても起こらなかった (図3)。

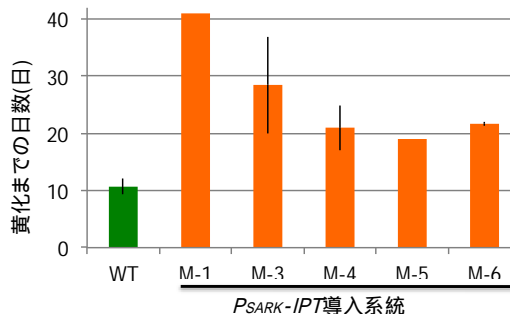


図2 キク‘精興の誠’ P_{SARK} -IPT導入系統のエチレン存在下における葉の黄化抑制



WT M4 M3
暗黒下3日目 (WTは黄化)



M3 M4 M5
暗黒下15日目 (P_{SARK} -IPT導入系統はまだ黄化せず)

図3 キク‘精興の誠’ P_{SARK} -IPT導入系統の暗黒下における葉の黄化抑制

ストレスに弱いことが問題となっているキク ‘カナリア’ およびカーネーション ‘ノラ’ に関しては、GFP をマーカーとした検査の結果から、 P_{SARK} -IPT を導入した組換えカルスが得られており、今後、このカルスより個体の再生が期待できる。

以上より、 P_{SARK} -IPT を導入した組換え体では、特に、葉の黄化が起こりやすい品種において、その黄化発生が抑制されることが明らかとなった。特に、キク精興の誠’ では、流通中の葉の黄化が問題となっているので、黄化の起こりやすい条件下 (エチレン存在下や暗黒下) でも黄化が抑制されたことから、有望な形質を示している。

2) 花弁老化特異的プロモーターを用いた IPT 誘導組換え花き類の作成とその解析

Database 解析の結果、アラビドプシス ATG8 の 1.8kb 上流には別の遺伝子のコーディング領域が存在していた。そこで、この隣接する遺伝子までの 1.8kb をプロモーター領域として単離した。さ

らに、Fusion PCR により、IPT 遺伝子と繋げたキメラ遺伝子 (P_{ATG8} -IPT) を作成し、選抜用のカナマイシン耐性遺伝子と組換え確認用マーカーとして GFP を持つバイナリーベクターに挿入した。このコンストラクトを用い、花き類への導入を試みた。

その結果、カルスのさかんな増殖のみがみられ、個体の再生効率が低く、ペチュニアにおいて1系統のみ組換え体が得られた。しかし、組換え体の解析の結果、この個体では、明確な IPT 導入と誘導が検出できず、また、培養変異の結果と思われる、種子形成不全が観察された。アラビドプシスを用いて、組織培養を介さない系により複数系統が得られたが、老化の遅延は観察されなかった。以上より、今回単離した 1.8kb の ATG8 のプロモーター領域での IPT の発現制御では老化抑制には不十分である可能性が示唆された。

3) 花器官形成およびエチレン感受性の変異と花持ちの関連性解析

サイトカイニンによる花器官形成やエチレン生成・感受性の変異誘導が一部の花きで報告されている。そこで、ペチュニアをモデルとして用い、VIGS 法により MADS-Box 転写因子の AG グループに属する FBP6 と pMADS3、および、エチレンシグナル伝達因子 EIN2 と EIN3 を抑制した場合の花器官形成と花持ちを調査した。

FBP6 と pMADS3 を抑制すると雄ずいが花弁化した。従来のアラビドプシスでの報告と異なり、特に、両遺伝子を同時に抑制すると顕著な花弁化が誘導され、八重花となり、全く花粉が形成されなかった (図4)。これにより受粉に伴う花老化の促進が抑えられる可能性が示唆された。

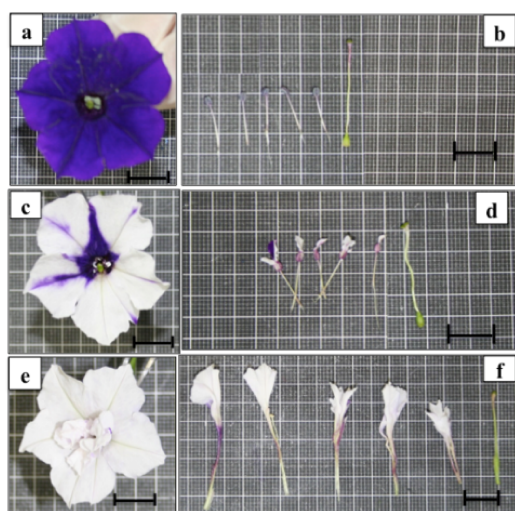


図4 VIGS処理によるAGグループMADS-Box転写因子の抑制がペチュニアの花器官形成に及ぼす影響
a, b; VIGS処理なし、c, d; pMADS3のみVIGS処理、e, f; pMADS3とFBP6を同時にVIGS処理
注: マーカーとしてアントシアニン合成に関わるCHSも同時に抑制しているため、VIGS花は白花となっている

Ph-EIN2 や Ph-EILs を抑制すると、受粉の有無に関わらず花弁の老化が1週間程度、抑えられた (図5)。外生的にエチレン類似物であるプロピレンを処理しても老化は抑制されており、エチレン感受性が低下した結果、花弁の老化が抑制されていることが示唆された (図6)。

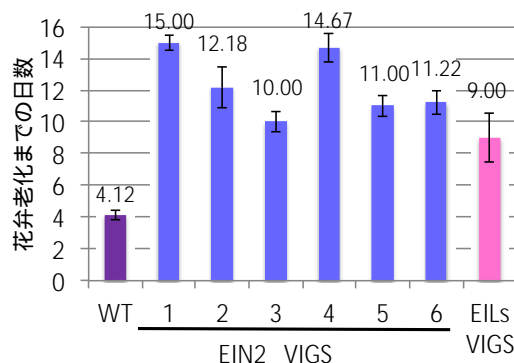


図5 VIGS処理によるPh-EIN2遺伝子あるいはPh-EILs遺伝子の抑制がペチュニア花弁の老化に及ぼす影響 (受粉した場合)

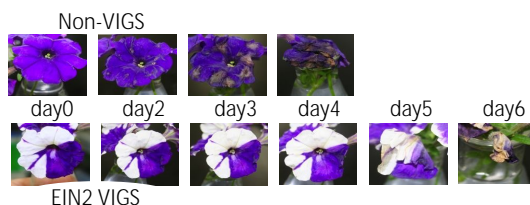


図6 VIGS処理によるEIN2遺伝子の抑制がプロピレン処理後のペチュニア花弁の老化に及ぼす影響
上段; VIGS処理なし、下段; EIN2のVIGS処理
注: マーカーとしてアントシアニン合成に関わるCHSも同時に抑制しているため、花の白い部分が抑制されている。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1件)

村田綾花・Siti Hajar Noor・牛島幸一郎・久保康隆・中野龍平、VIGS法を用いた花器官の老化および形態形成関連遺伝子の機能解析、園芸学会中四国支部平成25年度大会、2013年7月20日、香川大学、高松市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 龍平 (NAKANO, Ryohei)
岡山大学・環境生命科学研究科・准教授
研究者番号: 70294444

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久保 康隆 (KUBO, Yasutaka)
岡山大学・環境生命科学研究科・教授
研究者番号: 80167387

牛島 幸一郎 (USHIJIMA, Koichiro)
岡山大学・環境生命科学研究科・助教
研究者番号: 20379720