

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20580041  
 研究課題名（和文） カーネーション変異体を利用したエチレン生合成遺伝子抑制機構の解明  
 研究課題名（英文） Study of repression mechanisms for ethylene biosynthetic genes in mutant carnation.  
 研究代表者 棚瀬幸司（TANASE KOJI）  
 （独）農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所  
 新形質花き開発研究チーム 主任研究員  
 研究者番号：30355713

研究成果の概要（和文）：(1) 花持ちに優れるカーネーション‘ミラクルルージュ’は収穫後のエチレン生成量が極めて低い。エチレン関連遺伝子を解析したところ *Dc-ACS1*, *Dc-ACO1*, *Dc-EIL3*, *Dc-EIL4* の発現が低下しており、これがエチレン生成の低下に関与している可能性が示唆された。(2) 花持ちが約30日の超長命系統と花持ちに優れる品種を用いて遺伝子解析を行った。その結果、老化関連遺伝子のうち *Dc-CPIIn* の発現に違いが見出された。今後、*Dc-CPIIn* を導入した組換え体を作成し、さらに解析を進める。

研究成果の概要（英文）：(1) Long vase life cultivar, ‘Miracle Rouge’ showed little ethylene production during flower senescence. The level of *Dc-ACS1*, *Dc-ACO1*, *Dc-EIL3* and *Dc-EIL4* in long life cultivar was low compared to control cultivar. The finding suggests that low level of these genes relate to low ethylene production in long vase life carnation. (2) We found a carnation line with ultra-longevity which had vase life of about 30 days. Level of *Dc-CPIIn* gene was different between the line with ultra-longevity and the long life cultivar. In the near future, we will try making the transgenic carnation with modified *Dc-CPIIn* gene expression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：エチレン、カーネーション、花持ち、老化

## 1. 研究開始当初の背景

花きの商業需要が低迷する中、ホームユース需要の増大が望まれている。花の購入を習慣化するためのひとつの方法として、花持ちの保証販売が挙げられており、実際に成果を上げている。消費者が満足できる

ような観賞期間を提供することにより、リピーターが増え、切り花の消費が増大すると考えられる。また花きの輸出では、花持ちは重要な要因である。日本産の高品質でバラエティーに富んだ切り花を海外まで輸送するには、輸送期間に耐えられる十分な

花持ち性が必須であると考えられる。花持ち性を向上するにはいくつか方法があり、エチレン阻害剤、バクテリアの繁殖を抑制する抗菌剤、栄養源となる糖質の添加や遺伝的に花持ち性に優れる品種を育成などが挙げられる。

カーネーションは代表的なエチレン感受性花きであり、収穫後や受粉後に老化ホルモンのエチレン生成が自己触媒的に上昇し、花卉が萎れ老化する。そのため、エチレン作用阻害剤のチオ硫酸銀錯塩 (STS) を含む薬剤処理が不可欠であり、これは農家の労働負担を増し、不十分な処理によるクレームやロスの発生、STSに含まれる重金属による環境汚染をまねく恐れがある。(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所では1992年から花持ち向上を目的としたカーネーションの交配育種が行われている(小野崎ら, 2001)。この過程でエチレンがほとんど生成しない花持ちの良い品種‘ミラクルルージュ’と‘ミラクルシンフォニー’が作出された。これらは薬剤処理を必要としない、もしくは薬剤を軽減できる品種作出の可能性を秘めており、大変魅力のある育種素材である。実際、いくつかの公立試験場や種苗会社で育種素材として利用され始めている。

## 2. 研究の目的

これまでに研究代表者の研究グループでは花持ちの長い品種‘ミラクルルージュ’と‘ミラクルシンフォニー’(以下、ミラクルシリーズ)の解析を行い、これらの品種では開花後からエチレンをほとんど生成しないことが明らかとなっている。植物においてエチレンはアミノ酸の一つメチオニンを出発点とし、S-アデノシルメチオニン (SAM)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を介して生合成される。Admed から ACC に変換する酵素は ACC 合成酵素 (ACS)、ACC からエチレンを合成する酵素は ACC 酸化酵素 (ACO) である。これらの酵素はすでに多くの植物から cDNA がクローニングさ

れており、これらの遺伝子を不活化することによりエチレン生成を抑制し花の老化を遅らせることが可能である。カーネーションでもすでにこれらの遺伝子はクローニングされ、ACS は 3 種類、ACO は 1 種類公表されている。ミラクルシリーズにおいてエチレン生合成遺伝子 (*DC-ACSL1, 2, DC-ACO1*) の花における発現が極めて低く、特に *DC-ACO1* の発現が低いことが花持ちに重要であることを明らかにした(棚瀬ら, 2007)。しかし、これらの遺伝子の発現低下の要因は明らかになっていない。

そこで本研究では、(1) これらの生合成遺伝子を制御していると考えられるエチレン情報伝達関連遺伝子の解析 (2) ミラクルシリーズと対照品種で発現量に差がみられるエチレン生合成遺伝子およびエチレン情報伝達関連遺伝子のプロモーター領域をクローニングし比較する (3) ミラクルシリーズよりさらに花持ちに優れる、超長命系統の解析を行い、花持ち性向上のための育種研究、品質保持研究への有用な情報の提供を目指す。さらに、花きの育種や流通段階での問題解決や花持ち性向上につなげていくことを設定している。

## 3. 研究の方法

### (1) エチレン情報伝達関連遺伝子の解析

これまでに DDBJ のデータベースに登録されているカーネーションの遺伝子情報をもとに、エチレン受容体遺伝 (*DC-ETRI, DC-ERS2*)、転写因子 (*DC-EIL1/2, DC-EIL3, DC-EIL4*) をクローニングした。これらの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。花持ちに優れるカーネーション品種および対照品種の花から RNA を抽出し、cDNA を合成した。

### (2) プロモーター領域のクローニングと配列の解析

材料に用いたカーネーション品種の幼葉からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を用いて、改変インバース PCR 法によりプロモーター領域を増幅し、クローニングした。必要

であれば、さらに改変インバースPCR法を繰り返して、1 kb 程度のプロモーター領域をクローニングした。シーケンサーにより配列を確認し、品種間で配列の違いを検討した。

### (3) 老化関連遺伝子の解析

カーネーションでこれまでに明らかになっている老化関連遺伝子（システインプロテアーゼ (Dc-CP1, Dc-CP2), システインプロテアーゼインヒビター (Dc-CPI<sub>n</sub>), βガラクトシダーゼ (Dc-bGal), グルタチオントランスフェラーゼ (Dc-GST1), リパーゼ (Dc-Lip)) をクローニングした。これらの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 花持ちに優れるカーネーション品種および対照品種において、エチレン情報伝達関連遺伝子のうちエチレン受容体遺伝子 *Dc-ETR1*, *Dc-ERS2* の発現は老化の過程では大きな変化が見られなかった。また、これらの遺伝子の配列にも違いは見られなかったことから、エチレン生成の低下および ACS、ACO の発現低下には関与していないと考えられた。さらに、これらの下流に位置する転写因子のうち、*Dc-EIL3* と *Dc-EIL4* の発現が低下していた。これらのことから、*Dc-EIL3* と *Dc-EIL4* の発現低下が ACS、ACO の発現低下に関与している可能性が示唆された。

(2) 花持ちに優れるカーネーション品種および対照品種において発現量に差がみられた遺伝子に変異が挿入されていないかを確認するため、シーケンスを確認した。しかし、タンパク質のコード領域に大きな変異はみられなかった。そこで、*Dc-ACS1*, *Dc-ACO1*, *Dc-EIL3*, *Dc-EIL4* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、配列を比較した。しかし、対照品種と花持ちに優れる品種では配列の違いは見られなかった。したがって、ACS、ACO の発現低下には未知のエチレン情報伝達関連遺伝子が関与していると考えられた。

(3) 超長命系統と花持ちに優れるカーネーション品種において、老化関連遺伝子のう

ちシステインプロテアーゼインヒビター (*Dc-CPI<sub>n</sub>*) の発現が異なっていることが明らかとなった。市販されているシステインプロテアーゼインヒビターを花に処理し、花持ち延長効果があるかを検討したところ、若干の花持ち延長効果が見られるものの超長命系統と同じにはならなかった。従って *Dc-CPI<sub>n</sub>* 以外にも超長命形質と関連する遺伝子が存在する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 3 件)

- ① 棚瀬 幸司、小野崎 隆、佐藤 茂、柴田 道夫、市村 一雄.

Effect of age on the auto-catalytic ethylene production and the expression of ethylene biosynthetic gene *Dc-ACS1* in petals of long-life carnations.

JARQ 45:107-116. 2011. 査読あり

- ② 棚瀬 幸司、間 竜太郎、山口 博康、谷川 奈津、永田 雅靖、小野崎 隆、市村 一雄.

Heterologous expression of a mutated carnation ethylene receptor gene, *Dc-ETR1<sub>nr</sub>*, suppresses petal abscission and autocatalytic ethylene production in transgenic *Torenia fournieri* Lind. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 113-120. 2011. 査読あり

- ③ 原田 太郎、鳥居 由佳、村越 友衣乃、棚瀬 幸司、小野崎 隆、森田 重人、増村 威宏、佐藤 茂.

Analysis of genomic DNA of *Dc-ACS1*, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, expressed in senescing petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) and its orthologous genes in *D. superbus* var. *longicalycinus*. Plant Cell Reports 30: 519-527. 2011. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① 棚瀬 幸司

デルフィニウム等エチレン感受性花きの老化機構について

園芸学会2008年度秋季大会 第2回園芸生理ワークショップ

2008.9.26 三重大学

- ② 棚瀬 幸司、大津 佐和子、佐藤 茂、小

野崎 隆

超長命系カーネーション系統における老化  
関連遺伝子の発現解析

園芸学会 2009 年度秋季大会

2009. 9. 26 秋田大学

③ 棚瀬 幸司、小野崎 隆

ポットカーネーションにおけるエチレン生  
合成および老化関連遺伝子の発現解析

園芸学会 2010 年度秋季大会

2010. 9. 20 大分大学

④ 小野崎 隆、八木 雅史、棚瀬 幸司

カーネーションの花持ち性の育種に関する  
研究（第 14 報）各世代選抜系統における諸  
特性と花持ち日数との関係および花持ち性  
の遺伝率

園芸学会 2010 年度秋季大会

2010. 9. 20 大分大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：トマトのショ糖（スクロース）合成酵  
素遺伝子のプロモーターを使用したキクの  
雄ずい特異的発現システム

発明者：棚瀬 幸司、間 竜太郎、大山 暁  
男

権利者：農業・食品産業技術総合研究機構

種類：実用新案

番号：特願 2011- 77883

出願年月日：2011 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚瀬 幸司 ( TANASE KOJI )

農業・食品産業技術総合研究機構 主任研究  
員

研究者番号：30355713