

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780024

研究課題名(和文) キキョウ花弁の萎れにおけるシステインプロテアーゼ遺伝子の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of cysteine proteinase genes in wilting of balloon flower petals

研究代表者

小杉 祐介 (KOSUGI, Yusuke)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：80325323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：キキョウ花弁の急激な萎凋における複数のシステインプロテアーゼ遺伝子(PgCP)の関与について検討した。PgCP1は開花直後から萎凋開始時の花弁で上方制御された。一方、新規に同定したPgCP3、4、5は萎凋直前以降の花弁で強い上方制御を受けた。プロモーター解析より、PgCP1、4、5にはエチレン応答性因子(ERE)を介した発現制御が示唆され、PgCP3ではERE以外の他の発現制御系の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Involvement of four different genes encoding cysteine proteinase in the rapid wilting of balloon flower (*Platycodon grandiflorus*) petals was investigated. Expression of PgCP1 was up-regulated just after the flower opening stage and the expression remained until the onset of wilting. On the other hand, PgCP3, PgCP4 and PgCP5, which were newly identified from petals at the stage just before wilting, were markedly up-regulated from the stage just before wilting and the wilting stage. The promoter analysis indicated the possibility that the regulation via ethylene-responsive regulatory element (ERE) is involved in the expression of PgCP1, PgCP4 and PgCP5 in the petals whereas other unknown factors might be involved in regulation of PgCP3.

研究分野：園芸利用生理工学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：花持ち性 花弁 老化 エチレン システインプロテアーゼ 遺伝子発現 プロモーター キキョウ

### 1. 研究開始当初の背景

花卉の萎れ(萎凋)は、花き園芸生産物の品質に関わる「花持ち性」を損なう主要因である。萎凋は花卉組織の細胞死により生じる現象で、花卉細胞の崩壊を引き起こす加水分解酵素により進行すると考えられている。タンパク質分解酵素であるシステインプロテアーゼ(CPase)はこのような加水分解酵素の中でも中心的な役割を持つと考えられる。キキョウ(*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.)は花卉萎凋型の老化を示す花きであり、花持ち性はおおむね開花後数日間持続するが、一旦老化が開始した花では、花卉において急激に萎凋と枯死が進行する特徴を持つ。キキョウでは花卉で発現するCPaseが2種類単離されている(*PgCP1*ならびに*PgCP2*)。研究代表者はこのうち*PgCP1*について、転写物が開花直後から老化開始時の花卉で増加することを明らかにしている。しかし、*PgCP1*を含めたCPaseの花卉老化時における発現制御のメカニズムは未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、花卉の細胞死に関わる加水分解酵素の1つと考えられるCPaseに注目し、花卉の急激な萎凋と枯死が特徴的な花き品目の1つであるキキョウ(*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.)の園芸品種を材料に、CPase遺伝子の「花卉萎れ遺伝子」としての役割と発現調節要因を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究開始時点で同定済みであった*PgCP1*のcDNA(1,676 bp)ならびに新規に同定された*PgCP3*、*PgCP4*、*PgCP5*の各cDNA(それぞれ1,255 bp、1,238 bp、1,268 bp)の塩基配列および推定アミノ酸配列を、DDBJをはじめとする公開データベースに照会し、各CPase遺伝子の特徴付けを行った。さらにこれらcDNAを加工し、Tiプラスミドベクター-pIG121-Hm(Ohta et al. 1990, *Plant Cell Physiol.* 31:805-813)上にアンチセンスRNAを発現させるための組換え遺伝子を構築し組換え個体の作出を試みた。

既単離の*PgCP1*のプロモーター(662 bp)と、新規に同定された*PgCP3*、*PgCP4*、*PgCP5*各遺伝子プロモーターの特徴を比較するために、*PgCP3*、*PgCP4*、*PgCP5*のcDNAの塩基配列を参照して上流方向に伸長増幅させるためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、GenomeWalker Kit (TaKaRa Clontech)およびTAIL-PCR法(Liu and Whittier 1995, *Genomics* 25, 674-681)により、ゲノムDNA上の5'隣接領域を単離して塩基配列を決定した。これらの塩基配列から、公開されているPLACE(Higo et al. 1999, *Nucl. Acids Res.* 27: 297-300)等のデータベース等を参考に、各5'隣接領域に含まれるcis-制御因子配列の探索

と特徴づけを行った。さらにこれらの領域のプロモーター活性を検討するために、5'隣接領域をGUSレポーター遺伝子に連結した組換え遺伝子をTiプラスミドベクター-pIG121-Hm上に構築し一過性の発現による解析を試みた。

花卉老化時のこれらCPase遺伝子の発現制御における内生エチレンの関与を明らかにするため、ステージ(開花直前の蕾)に達した段階で採取した花に、エチレン作用阻害剤である0.1 mMチオ硫酸銀錯塩(STS)溶液または対照区としてイオン交換水を24時間前処理した後、各老化ステージに移行した時点の花卉から全RNAを抽出し、各遺伝子の転写物を測定した。転写物の測定にはリアルタイム定量RT-PCRを用いた。増幅産物はSYBR Green Iによる蛍光強度として検出し、内部標準として18SリボゾームRNAを定量することで検出値をノーマライズした後、相対値として転写物量を表した。

これらCPase遺伝子の花卉における外生エチレンに対する応答性の感度を比較するために、ステージ(開花直後)に達した花の花卉に、異なる濃度(0、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ )の外生エチレンの24時間処理、または2  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ の外生エチレンの異なる時間(0、1、2、4、8 h)での処理を行い、各遺伝子の転写物量を上記と同様に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

キキョウの花の開花から萎れまでの推移(以降、老化ステージとする)は図1のように6段階に区分することができる。本研究の開始時点で既に老化花卉から単離されていた*PgCP1*は、開花直後(ステージ)の花卉で発現増加し始まり、その発現が老化開始時(ステージ)まで維持されることから、花卉老化との関連性が示唆された。一方、*PgCP3*、*PgCP4*、*PgCP5*のcDNAが老化開始時(ステージ)の花卉で差次的に発現する遺伝子として新たに単離された。推定アミノ酸配列の解析から、*PgCP1*はシロイヌナズナの乾燥ストレス関連遺伝子の一つとして同定されたRD21(Koizumi et al. 1993, *Gene* 129:175-182)やカーネーション花卉老化時に発現増加するDcCP1(Jones et al. 1995, *Plant Mol Biol.* 28: 505-512; Kosugi

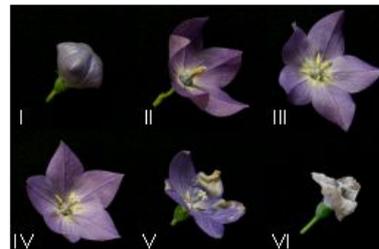


図1. キキョウの花の自然老化. 蕾(I), 開花直後(II), 雄ずい展開(III), 柱頭開裂(IV), 萎凋開始(V), 萎凋完了(VI)の6ステージに区分した。

et al. 2007, *Acta Hort.* 763:289-294) などの CPase のホモログであると考えられた。また PgCP3 はシロイヌナズナで老化関連遺伝子の一つとして同定された CPase である SAG12 (Lohman et al. 1994, *Physiol. Plant.* 92:322-328) と相同性を示した。PgCP4 と PgCP5 アミノ酸配列での相同性が約 90% と極めて類似している。C 末端にそれぞれ KDEL, RDEL のモチーフを含んでいた。この 2 つの CPase は、ヘメロカリスの花被片老化時に発現する SEN11 および SEN102 (Guerrero et al. 1998, *Plant Mol Biol.* 36:565-571)、サンダーソニアの花被片で発現する PRT5 (Eason et al. 2002, *Funct. Plant Biol.* 29:1055-1064) と類似性が認められた。

キキョウはエチレン依存型の老化を示すと考えられ、エチレンの作用阻害剤である STS を処理した花では、雄蕊展開 (ステージ I) 以降の老化ステージの進行が遅延し、花持ち期間が延長する (図 2)。内生エチレンの影響がある条件または無い条件で、老化ステージ進行に伴う CPase 遺伝子の発現レベルの推移を比較した (図 3)。PgCP1 と新たに単離された PgCP3、PgCP4、PgCP5 では花弁老化過程での発現動態が大きく異なっていた。即ち、PgCP1 は開花直後から発現し、それが老化開始に至るまで維持されたのに対し、PgCP3、PgCP4、PgCP5 は老化直前 (ステージ V) および老化開始時 (ステージ VI) の限られた段階の花弁で著しく上方制御された。また、STS 前処理により内生エチレンの作用を抑制した花における発現様式にも違いが認められ、PgCP1 では内生エチレンの作用の有無によって発現パターンに明確な違いが認められなかったのに対し、PgCP3、PgCP4、PgCP5 は内生エチレンの作用が抑えられた条件で発現レベルが著しく低下した。一方、開花直後 (ステージ I) の花弁に外生的なエチレン処理 (24 時間) を行ったところ、いずれの CPase 遺伝子も、 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  の処理濃度でわずかに発現増加が認められ、 $10 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  の処理濃度では発現量が著しく増加した (データ省略)。以上の結果より、花弁において PgCP1 の発現に対し外生エチレンはポジティブに作用するが、自然老化時の発現には内生エチレンより主要な発現調節

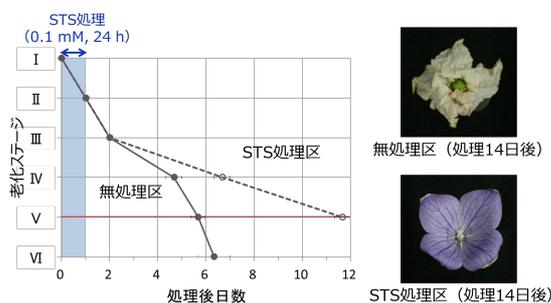


図 2. エチレン作用阻害剤 STS を前処理したキキョウの花の老化ステージの進行 (左図) と処理 14 日後の花の外観 (右図)。

要因がある可能性が考えられた。一方、PgCP3、PgCP4、PgCP5 の自然老化時の花弁における発現増加は内生エチレンが主要な役割を果たす可能性が考えられた。

エチレン応答に関わる cis 制御因子の中でも PgCP1 については研究開始時点で推定プロモーター領域を解析済みであり、既報告のエチレン応答因子 (ERE) (Itzaki et al. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:8925-8929) と一致する配列が認められている。本研究では新たに、PgCP3、PgCP4、PgCP5 のゲノム DNA 上の 5'隣接領域 (それぞれ、1,727 bp、1,431bp、2,287 bp) を単離して塩基配列を決定し、プロモーター領域の探索を行った。図 4 に推定プロモーター領域ならびに推定 cis 制御因子配列のうち上記の ERE または EIL タンパク質結合部位 (Kosugi and Ohashi 2000, *Nucl. Acids Res.* 28: 960-967) と一致した配列が認められた箇所を示した。PgCP3 の 5'隣接領域には既報告の ERE と一致する配列は認められなかった。一方、PgCP4 の 5'隣接領域では ERE と EIL タンパク質結合部位と一致する配列がそれぞれ 1 箇所、PgCP5 の 5'隣接領域には EIL タンパク質結合部位と一致する

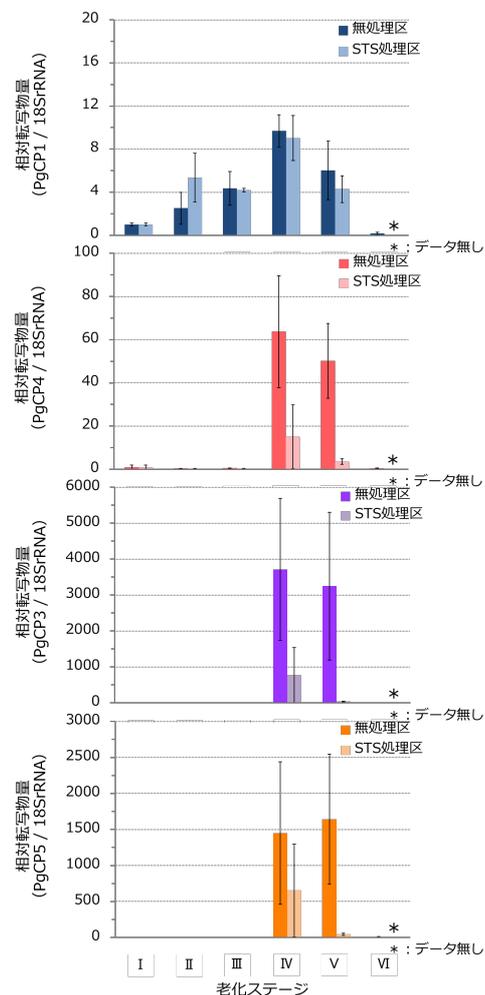


図 3. キキョウの花の老化ステージ進行にともなう PgCP1 遺伝子ならびに PgCP3、PgCP4、PgCP5 遺伝子の花弁における発現量の推移。

配列 2 箇所みとめられた。PgCP1、PgCP4、PgCP5 については、5'隣接領域上に存在するこれらの配列がエチレンによる発現制御に  
関与している可能性が考えられる。一方、PgCP3 については、本研究で決定した 5'隣接  
領域上にはエチレン応答性に関与する cis 制  
御因子と一致する配列は認められなかった。  
PgCP3 と類似性のあるシロイヌナズナの老  
化関連 CPase 遺伝子である SAG12 は、エチ  
レンを含む植物ホルモンによる調節を受け  
ないことが報告されている (Noh and  
Amasino 1999、Plant Mol. Biol. 41:  
181-194)。PgCP3、PgCP4、PgCP5 は老化  
ステージの移行時、またエチレンに対してほ  
ぼ同じ発現動態を示したが、エチレンによる  
発現調節のメカニズムは必ずしも同一でな  
い可能性があることが明らかになった。

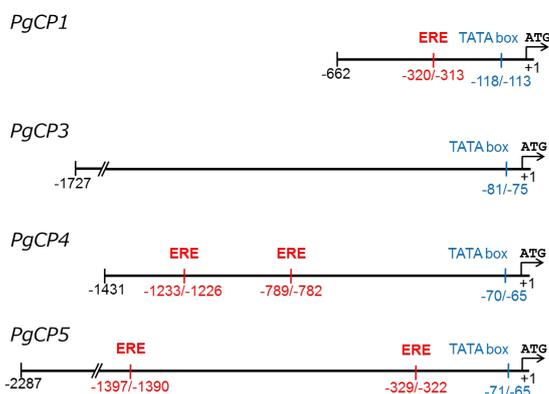


図 4. PgCP1 遺伝子ならびに PgCP3, PgCP4, PgCP5 遺伝子のゲノム DNA 領域 5' 隣接領域にお  
ける推定プロモーター構造. 推定開始コドンの第 1  
塩基を+1 とした. ERE は推定エチレン応答因子の  
配列が認められた位置を示す.

(2) 得られた成果の国内外における位置づ  
けとインパクトならびに今後の展望

本研究では、キキョウ花卉の萎れに関与す  
る遺伝子として、研究開始時点で注目した  
CPase 遺伝子である PgCP1 および、新規に  
同定された 3 種類の CPase 遺伝子 (PgCP3、  
PgCP4、PgCP5) について、自然老化過程の  
花卉における発現特性を明らかにし、またプ  
ロモーター領域を比較することにより、これ  
ら遺伝子の発現制御機構に踏み込んだ結果  
を得た。本研究ではさらにこれら遺伝子の発  
現を抑制するための組換え遺伝子ならびに、  
5'隣接領域の制御下にレポーター遺伝子を発  
現させるための組換え遺伝子を構築し、これ  
ら遺伝子の花卉老化における役割と制御機  
構を検証するための研究を進めた。一方、花  
器官の老化機構を明らかにする研究分野に  
おいては、近年、花器官老化時に差次的に発  
現する遺伝子群を解明する研究が進められ  
るようになった。本研究による複数の花卉老  
化関連遺伝子発現制御をプロモーター領域  
の特徴と関連付けた比較解析は、単離された

多岐にわたる遺伝子の役割を明らかにする  
研究の端緒として貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)  
Yusuke Kosugi、Identification of Genes  
Associated with Petal Senescence in  
Balloon Flower (*Platycodon grandiflorus*  
(Jacq.) A. DC.)、公開国際シンポジウム  
「ファイトジーンの可能性と未来 VI」香川  
大学農学部 植物ゲノム・遺伝子源解析セン  
ター主催、2013 年 10 月 28 日、サンポートか  
がわ国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
小杉 祐介 (KOSUGI, Yusuke)  
香川大学農学部・准教授

研究者番号：80325323

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：