

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450048

研究課題名(和文)トランスクリプトームを用いたカーネーション変異体の解析

研究課題名(英文)Transcriptome analysis of flower life mutant in carnation

研究代表者

棚瀬 幸司 (Tanase, Koji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・花き連携調整役

研究者番号：30355713

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)：カーネーションは通常の品種では品質保持剤を処理しない場合、花持ち日数が約7日である。我々は花持ち性に優れる品種と系統を作出している。花持ち形質に関与する遺伝子の網羅的な情報を得るためこれらを材料に用いてトランスクリプトーム解析を行った。マイクロアレイ解析により、対照品種と日持ち性の優れる品種の老化時に発現が異なる遺伝子1253個を抽出した。その中で花の老化に伴って発現が上昇する遺伝子群の中にいくつかの興味深い遺伝子が含まれていた。さらに、リアルタイムPCRにより解析したところ、日持ち性の優れる品種と通常品種で発現の差が見られた遺伝子を複数獲得した。

研究成果の概要(英文)：In carnation, flower life of normal cultivars is 7days without using flower preservatives. Our research group develops several long-life flower lines and cultivars "Miracle Rouge" and "Miracle Symphony". To achieve comprehensive information regarding the long-life flower, we conducted a transcriptome analysis of long-life flower in these carnation lines. We obtained a total of 1253 genes which differentially expressed among normal life and long life flowers. These genes contained some ethylene production related genes as up-regulated genes. And they also contained some interesting genes which function is unknown. A further expression pattern analysis of these genes using quantitative real-time PCR revealed that the expression pattern differed among normal life and long life flowers. Further functional analysis of these genes help us to elucidate the mechanism of long flower life in carnation and may facilitate the breeding practices.

研究分野：園芸学

キーワード：カーネーション 花持ち トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

花きの消費需要が低迷する中、ホームユース需要の拡大が望まれている。さらには、高品質の花を海外に輸出することも試みられている。花の購入を習慣化するためのひとつの方法として、日持ち保証販売が有効とされている。また、近年急増している輸入花きに対抗するには、高品質化を目標とした育種を行う必要があり、花持ち性もその有力な目標の一つである。

カーネーションは花きの消費需要が低迷する中でもその流通量は横ばい~微増しており、主要品目の中では健闘している。しかし、輸入カーネーションが急増しており、流通量のほぼ半数が輸入カーネーションである。輸入カーネーションに対抗するため、高品質化を目標とした育種を行う必要があり、花持ち性は重要な目標の一つである。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が自己触媒的に上昇し、花卉が萎れ、開花後約7日には老化する。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る。しかし、これは農家の労働負担を増し、不十分な STS 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。研究代表者の所属機関では花持ち性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。

2. 研究の目的

研究代表者の所属機関では 1992 年から花持ち性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(Onozaki ら, 2001, *Sci. Hort.*)。この過程で、自然老化時にエチレンがほとんど生成しない花持ちの長い品種‘ミラクルルージュ’・‘ミラクルシンフォニー’(ミラクルシリーズ)が 2005 年に作出された。これらの品種は薬剤処理なしで花持ちが約 20 日と長く、今後、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親となる可能性を秘めており、大変魅力のある育種素材でもある。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ており、愛知県との共同研究では花持ちに優れた新品種‘ドリーミープロッサム’(愛農 1 号)が品種登録された。

これまでに、ミラクルシリーズの遺伝子解析を行い、開花後からエチレン生合成遺伝子(*DcACS1*, *DcACO1*)の花における発現が極めて低く、特に *DcACO1* 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(Tanase ら, 2007 *Postharvest Biol. Technol.*)。さらに交配育種を進めた結果、花持ち日数が約 30 日というこれまでは存在しなかった極めて花持ちに優れた超長命系統を作出した(Onozaki ら, 2011, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*)。

ミラクルシリーズは 20 日程度から花卉外縁

部の褐変が生じるが、超長命系統では見られない(図1)。これまでに明らかになっているカーネーション老化関連遺伝子の発現解析を行ったところ、超長命系統とミラクルシリーズではシステインプロテアーゼインヒビター遺伝子(*DcCPI*)の発現に差が見られた(棚瀬ら 2011, 園芸学研究 別冊)。市販薬品のシステインプロテアーゼ阻害剤をミラクルシリーズに投与したところ、若干花持ち日数が延長されるが、超長命系統と同等にはならず、*DcCPI*以外にも超長命形質に関連する要因が存在することが示唆された。



図1 超長命系統(左)、『ミラクルルージュ』(右：花卉の端が茶色く褐変)の収穫 25 日後の写真
超長命系統はミラクルシリーズよりもさらに花持ちが長い

これまでに我々は、基盤整備としていち早く次世代シーケンサーを利用し、カーネーションの EST (expressed sequence tag: 遺伝子転写産物配列) 情報の整備を行い、現在までに約 3 万 7 千の新たな EST 情報を得ている(Tanase ら, 2012, *BMC genomics*)。これを基に、マイクロアレイを作成し、超長命系統や低感受性系統で特異的に働く遺伝子を特定できると考えられる。そして、花の品質保持技術や花持ち性育種の基盤情報を獲得する。

3. 研究の方法

(1) 材料

対照品種(標準的な花持ちの品種)として‘フランセスコ’、花持ちに優れたカーネーション品種として‘ミラクルルージュ’・‘ミラクルシンフォニー’、超長命系統として 532-6 を材料として供試した。RNA 抽出には花の老化過程およびエチレン処理を行った花から花卉およびしずいを分離し、液体窒素で冷凍し -80 度で保存し用いた。

(2) マイクロアレイ

カーネーションの EST 情報をもとにアジレント社製の 44 k カスタムマイクロアレイを作成した。冷凍保存した材料をシェイクマスターを用いて磨砕し、キアゲン社の RNeasy Plant Mini kit を用いて RNA を抽出した。RNA を元にラベリングを行い、カスタムマイクロ

アレイにハイブリを行った。得られた結果は、アジレント社製の GeneSpring を用いて解析した。

(3) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は抽出した RNA からタカラバイオ社製の PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて 1st cDNA を合成し、タカラバイオ社製のリアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice Real Time System II) を用いて解析を行った。解析方法はインターカレーター法を SYBR Premix Ex Taq II を用いて行った。検量線にはあらかじめクローニングした目的遺伝子を組み込んだプラスミドを希釈して用いた。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析

EST データを整備した結果、37,937 個のコンティグと 276,561 個のシングルレットを得た。コンティグ配列の全てとシングルレット配列のうち本研究目的に沿うような遺伝子配列を抽出し、マイクロアレイ用のプローブ設計を行った。数個の遺伝子配列はプローブ設計が困難であったが、ほぼ全ての遺伝子配列についてプローブ設計が可能であった。最終的に 38,101 個の遺伝子が搭載されたアジレント社製の 44k カスタムマイクロアレイを作成した。

開花 0 日および 3 日、8 日 (老化時)、エチレン処理後の花からしずいと花弁を分離し、それぞれから RNA を抽出した。結果はアジレント社製の GeneSpring を用いて解析し、フィルタリングの結果から 34,431 個の遺伝子を解析対照となった (図 2)。

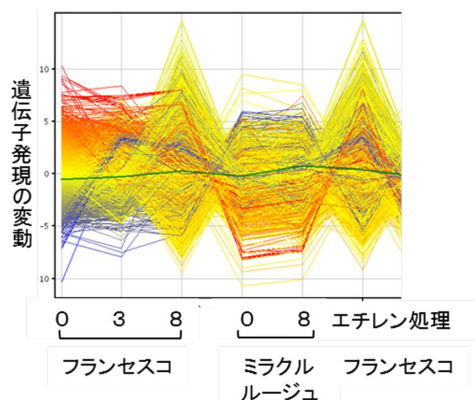


図 2 マイクロアレイ解析を行った遺伝子の発現変動

解析対照の遺伝子のうち、対照品種 'フランセスコ' の老化過程で発現が上昇する遺伝子、エチレン処理によって増加する遺伝子、花持ちに優れるカーネーション品種 'ミラクルルージュ' と比較し差がある遺伝子を抽出した。その結果、1253 個の遺伝子が老化過程で発現に変動がある遺伝子として抽出できた

(図 3)。これらの遺伝子の中には DcACS、DcACO、EIL3、CARSR12 (b-Gal)、DcGST 等これまでに老化や老化時のエチレン生合成に関与する遺伝子が含まれていたため、マイクロアレイによる解析は順調に進めることができた判断した。

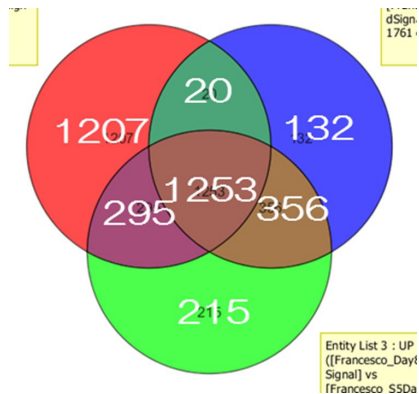


図 3 マイクロアレイ解析による遺伝子の抽出

(2) リアルタイム PCR による解析

マイクロアレイ解析から抽出した遺伝子のうち、AP2/EREBP (ERF) 転写因子、NAC 転写因子、MYB 転写因子、トランスポーターなど老化に関連する報告がある遺伝子を選択し、クローニングを行った。クローニングできた遺伝子についてリアルタイム PCR による解析を行った。その結果、通常品種と日持ち性の優れる品種、老化時、エチレン処理時で発現の差が見られた遺伝子を複数獲得できた。今後はこれらの遺伝子について遺伝子組換え等を用いて機能解析を行い、花持ち性のメカニズムを明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Umed Kumar Pun, Tetsuya Yamada, Mirai Azuma, Koji Tanase, Satoshi Yoshioka, Hiroko Shimizu-Yumoto, Shigeru Satoh, Kazuo Ichimura (2016) Effect of sucrose on sensitivity to ethylene and enzyme activities and gene expression involved in ethylene biosynthesis in cut carnations. Postharvest Biology and Technology. 121: 151-158. (査読有)

Koji Tanase and Takashi Onozaki (2015) Regulation of ethylene- and senescence-related genes in pot carnation flowers during flower senescence. The Horticulture Journal. 85: 254-263. (査読有)

Koji Tanase, Sawako Otsu, Shigeru Satoh,

Takashi Onozaki. (2015)
Expression levels of ethylene biosynthetic genes and senescence-related genes in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) with ultra-long-life flowers Original. *Scientia Horticulturae* 183: 31-38. (査読有)

Umed K. Pun, Tetsuya Yamada, Koji Tanase, Hiroko Yumoto, Shigeru Satoh, Kazuo Ichimura (2014)
Effect of ethanol on ethylene biosynthesis and sensitivity in cut carnation flowers. *Postharvest Biology and Technology* 98: 30-33. (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

棚瀬幸司, 松下陽介, 望月知史 (2016)
キュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターによるペチュニアの花色変化 園芸学会 2016.9.11 名城大学 (愛知県・名古屋市)

立石亮, 武内理香, 棚瀬幸司, 上吉原裕亮, 水野慎二, 渡辺慶一, 井上弘明
カーネーションの開花時に発現上昇する2つの -アラビノフラノシダーゼ様遺伝子 園芸学会 2016.3.27 東京農業大学 (神奈川県・厚木市)

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16報) 超長命性でかつエチレン低感受性の系統 806-46b の選抜 2015.9.26 徳島大学 (徳島県・徳島市)

棚瀬幸司
カーネーションの花持ち育種 大阪府立大学招待講演 2015.5.22 大阪府立大学 (大阪府・堺市)

Masafumi Yagi, Toshiya Yamamoto, Sachiko Isobe, Hideki Hirakawa, Satoshi Tabata, Koji Tanase, Hiroyasu Yamaguchi
Construction of genetic linkage maps for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) 2014.8.17 University of Queensland (Australia・Brisbane)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚瀬 幸司 (Tanase, Koji)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門 企画管理部
企画連携室・花き連携調整役
研究者番号：30355713

(3) 連携研究者

小野崎 隆 (Onozaki, Takashi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・野菜花き研究部門 花き遺伝育種研究領域・花き品質育種ユニット長
研究者番号：90355719

(4) 研究協力者

稲本 文野 (Inamoto, Fumino)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・花き遺伝育種研究領域・非常勤職員

上垣 弘子 (Uegaki, Hiroko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・花き遺伝育種研究領域・非常勤職員