

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780029

研究課題名(和文) 花卉開閉運動の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of petal movement

研究代表者

中塚 貴司 (Nakatsuka, Takashi)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60435576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウは、室内観賞において花冠が開かなくなることが問題になっている。本研究では、リンドウ花冠の開閉運動メカニズムの解明を目指した。開いた花冠は、25℃から15℃への温度シフトに伴い、30分で急速に閉じた。一方、15℃から25℃への温度上昇により2時間かけてゆっくりと開いた。この花冠開閉反応には、概日リズムや光による影響は受けなかった。分子機構を解明するために、リンドウcDNAライブラリーから15個のアクアポリン遺伝子を単離した。これらのうちPIP2ファミリーに属している遺伝子群が花器官で強く発現していた。しかし、開閉時でリン酸化されたPIP2タンパク質の蓄積量に変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The closure of petals is one of the problems in the potted gentian. This study was attempted to reveal the mechanism of petal movement. When the incubation condition was changed from 25 to 15 degrees, the petals of potted gentian closed rapidly. On the other hand, when it was changed from 15 to 25 degrees, the petals opened slowly throughout 2 hours. We identified 15 aquaporin genes, encoding water pump protein, from gentian petal cDNA library. The expressions of some aquaporin genes categorized into PIP2 subfamily were detected strongly in floral organs of gentian plants. However, the significant difference of PIP2 transcript and protein accumulations between opening and closure petals could not be observed.

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：開閉運動 アクアポリン リンドウ

## 1. 研究開始当初の背景

花は、植物が繁殖するうえで送粉者を惹きつける重要な役割があると同時に、観賞目的として古くから人々を魅了してきた。一般的に、花弁は開花後に萎れもしくは落花する。しかし、リンドウやチューリップなどの花弁は、開花後1週間以上にわたり開閉運動をする。花弁開閉運動の役割は、訪花昆虫の誘引であると考えられている。しかし、花弁開閉運動をほとんどしないエゾリンドウにおいても、ハチによる他殖が起こり、訪花昆虫の誘引と必ずしも相関がみられない。また、花弁の開閉運動の引き金となる刺激(概日リズム、温度、光、接触など)についても報告されている。チューリップの場合は、花弁表皮細胞が温度によって伸長または収縮することで花弁の開閉が起こる。しかし、花弁表皮細胞においてどのような生理的变化が起こっているかは明らかになっていない。

このような植物の動く現象の動力は、細胞の膨張と収縮である。膨張と収縮は、気孔の開閉や、オジギソウの接触刺激反応、マメ科植物の就眠運動などで解析が行われている。これらの場合、細胞の膨張は、液胞への水やカリウムイオン、リンゴ酸、糖などの浸透圧調節物質の流入によって引き起こされる。マメ科植物の就眠運動では、覚醒物質と就眠物質の量比がシグナルとなり葉の開閉運動を制御している。花弁開閉運動は、これらの動く現象と異なり広範囲の細胞で膨張が起こるが、類似点も多いと思われる。

開花に至る花弁伸長については、細胞膨張に関する報告が僅かにある。水の流入は、水チャンネルであるアクアポリンが関与している。バラの花弁伸長には、アクアポリンが活性化されることで細胞膨張が起こり、花弁が伸長する。水の流入以外に糖濃度の増加による浸透圧調整も影響している(Yamada et al. 2007)。一般的に花弁伸長にともない液胞のグルコースやフルクトースの蓄積が増加する。しかし、リンドウでは、それらの糖に代わりリンドウ(*Gentiana*)に特徴的な糖であるゲンチオビオースが蓄積するが、その役割は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

リンドウの花弁における開閉運動メカニズムを、アクアポリン、代謝物、遺伝子発現の変化を解析する事で明らかにする。浸透圧調節に関わる代謝物などの変化について、TOF-MS や HPLC を用いた全代謝物解析を行うことで、花弁開閉運動時に大きく変動する代謝物を同定する。また、水の流入については、阻害剤実験によりその関与が予想されたアクアポリンに注目して解析を行う。これら遺伝子発現と抗体を用いたウエスタン解析により、アクアポリンタンパク質の活性化および不活性化状態を明らかにする。花弁が開い

ているまたは閉じている時に特異的に発現している遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法で特定する。DD法で候補遺伝子が得られた場合においても、花弁EST情報を利用して全長cDNA情報とアノテーションを容易に獲得することができる。これまでの他植物の運動現象で報告されている遺伝子を解析するだけでなく、花弁開閉運動に関わる新規遺伝子についても特定できるような研究計画になっている。リンドウの花弁開閉運動は、概日リズムにも連動している。申請者は、リンドウの花成についての研究により、概日リズムに関わる遺伝子の同定および解析を行っており、概日リズムと花弁開閉運動との関連性も明らかにする。

蕾から開花までの一連の花弁展開過程について、生理的解析を行った研究は報告されている。しかし、展開した花弁が、概日リズムや温度、光に反応して、開閉運動を行う仕組みについては、これまでにほとんど研究されていない。リンドウの花弁開閉運動は古くから現象として注目されていたが、何故開閉運動を行うのかといった生理的意義も明らかにされていない。リンドウの花弁開閉機構を明らかにすることで、人為的に開閉を制御することが可能となれば、花弁開閉運動の役割を明らかにすることが可能となる。また、園芸的観点において、花弁が開くまたは閉じるといった現象は、花の観賞価値において重要な問題である。事実、リンドウを購入した消費者からは、「室内では花が開かない」といったクレームがあり、「開く花弁」や「動く花弁」は育種目標の一つとなっている。リンドウの育種素材に利用されている2種のうち、エゾリンドウは花弁が開かない、ササリンドウは花弁が開くことが知られている。両種を比較解析することは、花弁開閉機構を明らかにする有効な手段であるとともに、特定した因子に関与する遺伝子の多型をDNAマーカー化することで、育種目標に合ったリンドウの育成に貢献できる。また、将来的には、花弁開閉時に特異的な代謝物が同定できれば、花瓶に化合物を添加することによって、切り花の鑑賞品質を向上させることも期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 研究材料

エゾリンドウ(*Gentiana triflora*、品種マシリィ)とササリンドウ(*G. scabra*、品種アルタ)を用い、岩手生物工学研究センターまたは静岡大学の圃場にて栽培した。

### 2) 環境要因の探索

開花直後のリンドウ鉢を、植物インキュベーターに移した。高温(25℃)と低温(15℃)で、6もしくは12時間ごとに温度シフトした。花冠の開閉は、インターバルカメラを用いて連続的に撮影し、撮影のために連続光条件下で培養した。花冠の開閉度は、閉口時(index 0)

- 開口時 ( index 4 ) の 5 段階で評価した。

### 3 ) cDNA ライブラリーの構築

エゾリンドウ品種マシリの花弁 mRNA から平均化 cDNA ライブラリーを作成し、ロッシュ 454 シークエンサーを用いてシークエンス情報を取得した。

### 4 ) マイクロアレイ解析

リンドウ花弁 cDNA ライブラリー情報からユニジーンを抽出し、Agilent eArray プログラムを用いて設計した 4 × 44K カスタムアレイを作成した。マイクロアレイに対する遺伝子発現解析は、タカラバイオ株式会社に委託した。

### 5 ) アクアポリン遺伝子の単離

花弁 cDNA ライブラリーのアノテーション情報から、アクアポリン遺伝子配列を抽出した。ライブラリー情報に完全長配列が含まれていない場合は、RACE 法で完全長配列の決定を行った。

### 6 ) 遺伝子発現解析

開花後の閉口時と開口時の花弁をサンプリングし、すぐに液体窒素で凍結させ保存した。また花弁は、蕾から開花まで発達段階で 4 段階に分類した発達段階に従ったサンプリングも行った。雄蕊、雌蕊、葉、茎、根の器官別にもサンプリングした。

各サンプルから、total RNA を抽出し、逆転写反応後、Real Time PCR 法で解析した。各サンプル 5 反復実施した。

### 7 ) PIP2 抗体の作成と検出

リンドウ PIP2 ファミリーの GtAQP2 タンパク質配列に基づき、セリン 274 がリン酸化または非リン酸化された抗原に反応するペプチド抗体をシグマアルドリッチで委託作成した。また、セイヨウナシ S283-PIP2 抗体を名古屋大学農学研究科白武勝裕准教授から分譲していただいた。

粗抽出タンパク質から超遠心機を用いて膜たんぱく質を精製した。SDS-PAGE で分離後、PIP2 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

## 4 . 研究成果

### 1 ) 環境要因の探索

花冠開閉運動の環境要因を調査するために、開花直後のリンドウを 25/15 を 6 または 12 時間間隔で変化させた。その結果、25 で培養している場合は、花冠を開口していたが、温度が 20 以下に低下すると 30 分間で速やかに花冠の閉口が起こった ( 図 1 )。逆に温度上昇時は、2 時間程度の時間をかけて徐々に花冠を広げることが観察された。6 または 12 時間毎の温度変化周期に合わせて、開閉が繰り返されたため、概日リズムの影響は少ないと考えられた。また、今回撮影をす

るために連続光で観察した。連続暗黒条件においても、開閉運動が観察されたため、花冠開閉運動に及ぼす光の影響は小さいと考えられた。

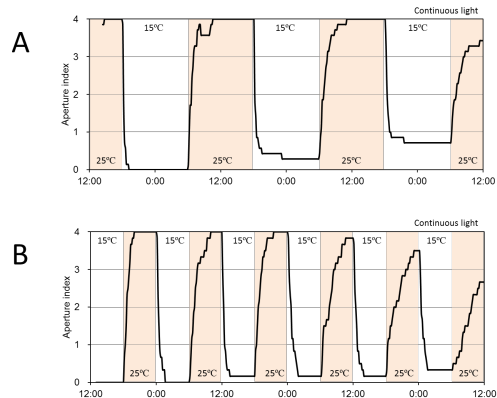


図 1 25/15 温度周期における花冠

### 2 ) 網羅的遺伝子発現解析

花冠の開口時および閉口時における花弁の遺伝子発現の変化についてマイクロアレイを用いて解析した。44,000 スポットの内 10 倍以上の発現変動は、5000 スポットで観察された。しかしながら、器官別や処理別で観察される遺伝子発現変動と比べるとわずかな差であった。このことから、花冠開閉には遺伝子発現ではなく、タンパク質の修飾変化などが関与しているのではないかと推定した。

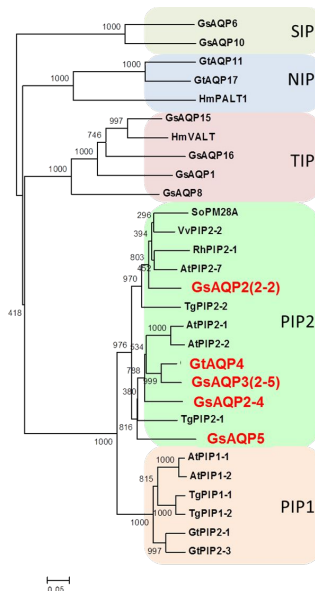


図 2 リンドウのアクアポリンタンパク質の分子系統樹

### 3 ) アクアポリン遺伝子の単離と発現解析

リンドウ cDNA ライブラリーのアノテーション情報に基づき、アクアポリン遺伝子を探索した。15 のアクアポリン遺伝子が得られ、推定アミノ酸配列を用いて、系統解析を行った ( 図 2 )。リンドウのアクアポリンは、5 つのサブファミリーに分類された。

遺伝子発現解析の結果、PIP2 ファミリーに

属するGsAQP12は花卉開閉時に強く発現していた(図3)。その他のAQP遺伝子については、花卉の発達に伴って遺伝子発現が変化していった。

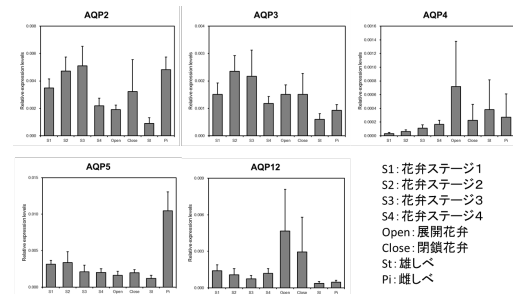


図3 PIP2 アクアポリン遺伝子の発現解析

4) PIP2ファミリーのAQPタンパク質の蓄積  
 有意な遺伝子発現の変化が観察されなかったため、PIP2ファミリーに対する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。アクアポリンは、C末端のセリン残基がリン酸化されることで活性型になることが報告されている。そこで、セイヨウナシ由来 PIP2リン酸化抗体を用いたところ、花卉の開口時と閉口時でリン酸化 PIP2タンパク質の蓄積には有意な差は検出されなかった(図4)。

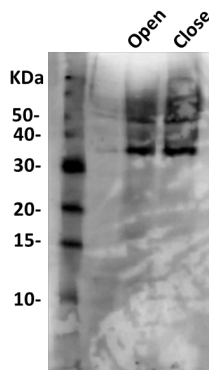


図4 ウエスタンブロット解析

5) まとめ

以上の結果から、リンドウの花冠開閉に影響を及ぼす環境要因として温度変化が重要であることが明らかになった。また、花冠開閉運動の原動力としてアクアポリンタンパク質に注目し解析を行い、リンドウ花卉から15個のアクアポリン遺伝子を単離した。そのうち PIP2ファミリーに属するアクアポリンが、花卉の発達段階で多く遺伝子発現していることが明らかになった。しかし、リン酸化アクアポリンを検出する抗体においてタンパク質の蓄積量の変化は観察されなかった。二次元電気泳動による膜タンパク質の蓄積には、わずかなスポットの違いが観察された。今後は、そのタンパク質に注目し、花冠発達段階におけるタンパク質蓄積の変動を調査する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, Fujita K, Nishihara M. (2013) Suppression of anthocyanin pigmentation by single MYB transcription factors from gentian, *Plant Cell Reports* 32: 1925-1937.

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/shizuokaflower/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中塚 貴司 (NAKATSUKA, Takashi)

静岡大学・農学研究科・助教

研究者番号: 60435576

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし