

題目：老化カーネーションの雌ずいのエチレン生成開始反応におけるアブシジン酸の役割

第1章 緒言

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は、花卉の老化時に急速かつ過剰にエチレンを生成するエチレン主導型老化花きである。内生エチレンが老化に主導的役割を果たす花きでは、受粉刺激によって雌ずいで誘導生成されたエチレンが、老化の「スターターエチレン」として働く。しかし、雄ずいが花弁化した八重咲きカーネーションでは、自家受粉は起こり得ず、何らかの別因子がエチレン生成の誘導に関与していると予想される。過去の研究から、この誘導因子として植物ホルモンのアブシジン酸(以下 ABA)の可能性が推定されていた。本研究は、カーネーションの花組織における ABA 含量の変動および ABA の生合成と作用に関与する遺伝子群の発現を、エチレン生成能の異なるカーネーション品種で比較検討することによって、雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割を検証することを目的にして行った。

第2章 老化花卉の遺伝子発現解析に使用する対照遺伝子の探索

花の老化は、花組織(特に花弁)の細胞が崩壊していく過程であり、RNA の急激な分解が起こる。カーネーションの花組織においても、老化の進行に伴い、rRNA やアクチン遺伝子の転写産物量の著しい減少が起きる。今まで、カーネーションでは、老化関連遺伝子の発現を解析する際に用いる対照遺伝子を、何にするかが未解決であった。ABA 関連遺伝子の発現解析に先立って、対照遺伝子を決めることを目的にして、カーネーションの花組織から7種類のポリユビキチン遺伝子 (*DcUbq1-7*) の cDNA をクローニングして構造と発現を調査した。7種類の遺伝子は3'-非翻訳領域の塩基配列の相同性から、*DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の3つのグループに分類された。そのうち、*DcUbq3-7* の転写産物量が花卉の展開と老化の過程を通じて変動しないことを見だし、対照遺伝子として使用できることを明らかにした。

第3章 アブシジン酸の生合成と作用・シグナル伝達経路に関与する遺伝子のクローニングと構造解析

ABA の生合成と作用に関与する遺伝子群の発現解析によって、エチレン生成開始反応における ABA の役割を推定することを計画した。発現解析の準備として、カーネーション‘ライトピンクバーバラ’の花組織から、ABA の生合成と代謝、受容、シグナル伝達、作用に関与する

遺伝子群の cDNA をクローニングし構造を解析した。その内訳は、ABA の生合成関連では 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 遺伝子 (*DcNCED1a*, -*b*, *DcNCED2a*, -*b*) と zeaxanthin epoxidase 遺伝子 (*DcZEP1*), ABA 代謝関連では ABA 8'-hydroxylase 遺伝子 (*DcCYP707A1*), ABA シグナリング関連では ABA 受容体遺伝子 (*DcPYRI*) と protein phosphatase 遺伝子 (*DcPP2C1*), protein kinase 遺伝子 (*DcSnRK2.1*, -*2.2*), ABA の作用関連では ABA 応答因子結合因子遺伝子 (*DcABERE1*) であった。本研究は、これらの遺伝子群をカーネーションでは初めて明らかにした。

第4章 開花と老化時のアブシジン酸含量の変動

開花期と老化期の花の各部位 [花弁, 雌ずい (子房および花柱, 柱頭からなる), 花托, がく片] から ABA を抽出・精製し, LC/MS/MS によって定量して含量の変動を調査した。品種材料には, 切り花老化時にエチレンを生成し約 1 週間の花持ち期間を示す 'ライトピンクバーバラ' と 'エクセリア', および老化時にエチレンを生成せず約 3 週間の花もち期間を示す 'ミラクルルージュ' を用いた。ABA は各花構成部位の中では子房に最も多く含まれていた。また, 子房の ABA 含量は, 3 品種で異なる変動パターンを示した。'ライトピンクバーバラ' では, 開花初期に多量に存在し開花後期にかけてわずかに増加した。'エクセリア' では, 開花期間を通じて 'ライトピンクバーバラ' の 1/2 量で推移したが, 老化初期に急激に増加した。'ミラクルルージュ' では, 開花期と老化期を通じて少量の ABA が存在していた。

第5章 アブシジン酸合成経路遺伝子の発現解析

3 品種のカーネーションにおける上記遺伝子の発現を, RT-PCR および real-time RT-PCR を行って, 開花期と老化期の花の部位別に比較し, 特に子房に注目して解析した。ABA 生合成関連遺伝子のうち *DcNCED1a/b* において 3 品種間に大きな差が見られた。'ライトピンクバーバラ' の子房では, 開花初期から多量の *DcNCED1a/b* 転写産物が蓄積していた。'エクセリア' の子房では, 転写産物量は開花期を通じて 'ライトピンクバーバラ' に較べて少なかったが, 老化初期に急速に増加した。'ミラクルルージュ' の子房では, 開花期から老化初期を通じて, 転写産物量は極めて少なかった。子房における *DcNCED1a/b* 転写産物量の変動は ABA 含量の変動と一致したことから, ABA の生合成において *DcNCED1a/b* の発現が主要な役割を果たしていることが推察された。

第6章 アブシジン酸作用経路遺伝子の発現解析

'ライトピンクバーバラ' と 'エクセリア' では, 開花期の子房で ABA が蓄積しているにも関わらず, エチレン生合成関連遺伝子の *DcACSI* と *DcACOI* の発現が誘導されない。この原因として開花期には ABA の作用が起きないことを予想し, ABA 作用経路遺伝子の発現を調べた。'ライトピンクバーバラ' では, ABA 受容体遺伝子 (*DcPYRI*) の転写産物量は, 開花期を通じて少なく老化初期に増加した。この結果から 'ライトピンクバーバラ' においては, 開花期には

ABA受容体タンパク質が不足しているため、ABAの作用が起きないことを推定した。‘エクセリア’では開花期から老化初期を通して、*DcPYRI*の転写産物が大量に存在していた。これから‘エクセリア’では開花期にABA受容体は十分量存在するが、ABA含量がABAの作用を誘導する閾値に達していないことを推定した。‘ミラクルルージュ’では*DcPYRI*の転写産物量が開花期と老化期を通じて極めて少なかった。この品種では、子房のABA含量とABA受容体量が少ないため、ABAの作用が現れないと推定した。

第7章 総合考察

カーネーションでは、開花期と老化期における雌ずい（特に子房）のABA含量が、*DcNCED1a/b*の発現量に依存して決まることが示唆された。このことは、ABA生合成の鍵酵素がNCEDであるという知見に一致するとともに、カーネーションでは複数あるNCED遺伝子のうち*DcNCED1a/b*の発現がABA生合成の律速因子になっていることが示唆された。今回の研究から、ABA含量と作用に関して、(1) ‘ライトピンクバーバラ’の子房では、開花期に多量のABAが存在するもののABA受容体が十分に存在しないためABAの作用が起きず、老化初期にABA受容体が増加すると作用が現れること、(2) ‘エクセリア’では開花期にABA受容体が存在するもののABA量が十分でないためABAの作用が現れないが、老化初期にABA含量が急速に増加するとABAの作用が現れること、また、(3) ‘ミラクルルージュ’では開花期と老化期を通じてABAとABA受容体の蓄積が十分でないため、ABAの作用が現れないことが推定された。以上の結果から、ABAが雌ずいにおける*DcACSI*と*DcACOI*の発現を誘導してエチレン生成を引き起こすこと、ABAの作用の発現にはABA含量と*DcPYRI*の発現量が、作用発現の閾値を超える必要があることが推定された。本研究の結果、カーネーションでは「雌ずいにおけるエチレン生成誘導因子がABAである」ことが遺伝子レベルで初めて明らかにされた。これらの知見は今後の花き園芸学の分野において花きの老化機構の理解を飛躍的に深め、新しい鮮度保持技術の開発に貢献することが期待される。