

## 第 1 章

### 開花における糖代謝の役割

バラはスクロースを転流糖としており、シンク器官である花弁中には開花に伴い主にグルコースとフルクトースが蓄積する (Yamada et al., 2007a)。このような花弁中のヘキソースの蓄積には、転流してきたスクロースの分解に起因するものと、花弁に蓄積していたデンプン等の分解に起因するものと考えられる。スクロース代謝酵素としてはインベルターゼやスクロース合成酵素が挙げられ、デンプン代謝酵素としてはアミラーゼが挙げられる。これらの酵素の活性をバラ切り花において測定したところ、インベルターゼ活性が最もヘキソース蓄積に貢献していることが示された (中田, 2004)。インベルターゼは全ての植物において普遍的に存在する酵素で、スクロースを不可逆的にグルコースとフルクトースに分解する。またインベルターゼは細胞内局在性、至適 pH の異なるアイソザイムが複数存在することが知られている (Roitsch et al., 1995; Sturm and Chrispeels, 1990)。本研究中ではこれらアイソザイムを、至適 pH が酸性で液胞に局在している「液胞型インベルターゼ」、至適 pH がアルカリ性または中性で細胞質に局在している「細胞質型インベルターゼ」、至適 pH が酸性で細胞壁に局在している「細胞壁型インベルターゼ」と定義する。細胞壁型インベルターゼは細胞壁に結合しているのに対し、細胞質型および液胞型インベルターゼはどちらも可溶性である。

液胞型インベルターゼと細胞壁型インベルターゼの N 末端ドメインには、シグナルペプチドとタンパク質の折りたたみなどに関与するプロペプチドから構成される長くても 100 残基ほどのアミノ酸が存在する (Sturm, 1999)。また細胞壁型インベルターゼに比べ、液胞型インベルターゼは N 末端に 20~50 残基、C 末端に 3~10 残基長いアミ

ノ酸残基を持つ。液胞型インベルターゼと細胞壁型インベルターゼはいずれも N 末端付近に存在する  $\beta$ -フルクトシダーゼモチーフ (NDPD/NG) に特徴づけられる。しかし、液胞型インベルターゼのシステイン触媒ドメインは **WECYD** に、細胞壁型インベルターゼは **WECPD** に特徴づけられるという違いがある (Ji et al., 2005)。一方、細胞質型インベルターゼは液胞型インベルターゼや細胞壁型インベルターゼとは塩基配列の類似性が低く、また植物とシアノバクテリアにしか存在しない (Vagas et al., 2003)。

また、インベルターゼ活性を阻害する物質であるインベルターゼインヒビターがトマトやジャガイモなどの作物で見つかっており、このインヒビターはインベルターゼ活性の阻害を介して多様な生理現象に関与することが報告されている (Reca et al., 2008)。

以下、これらの糖代謝酵素とその阻害タンパク質に関する知見を述べる。

### 液胞型インベルターゼ

液胞型インベルターゼは液胞に取り込まれたスクロースを分解し、ヘキソースの蓄積に関与する。液胞型インベルターゼは細胞内の浸透圧を制御することで細胞肥大を制御していると考えられている (Roitsch and Gonzalez, 2004; Sergeeva et al., 2006)。この酵素は、取り込んだスクロース 1 分子を分解することで、2 分子のヘキソースを産生し、効率的に浸透圧を上昇させることで細胞内への水の流れを促すと考えられる。

果実成長の後期にスクロースを多く蓄積するニホンナシでは、果実成長の後期にかけて液胞型インベルターゼである *PsV-AIV1* と *PsV-AIV2* の発現量は減少した (Yamada et al., 2007b; 小島, 2005)。また、ヘキソース蓄積型のブドウにおいてヘキソースが蓄積するベレゾーン期の直前に液胞型インベルターゼの発現量、活性がともに上昇した (Davies and Robinson, 1996; Zhang et al., 2006)。これらは液胞型インベルターゼがニホンナシやブドウの果実において蓄積する可溶性糖の組成の決定に関わっている可能

性を示している。また、ヘキソース蓄積型のトマトに酸性インベルターゼ遺伝子のアンチセンスを導入したところ、トマトのヘキソース含量が減少し、スクロース含量が増加した (大山, 2000)。この結果からも、果実中の糖組成決定における本酵素の重要性が示されている。また、ニンジンに液胞型インベルターゼのアンチセンス遺伝子を導入した実験では、形質転換体における胚発生での子葉の発達が野生型より優れていたが、根や胚軸の生育は野生型に比べ劣っていた。さらに子葉が肥大するに従い、地下部の生育は著しく阻害された。転換体は培地にヘキソースを添加することで正常な生育を示したが、スクロースのみの培地では胚細胞の奇形は修復されなかった。また、成熟期において転換体では主根の成育が阻害されていたが、野生型と比較すると葉数も多く、旺盛な生育を示した (Tang et al., 1999)。これらの結果から、液胞型インベルターゼは糖の転流にも関与していることが示唆される。その他にも、液胞型インベルターゼがオーキシニンシグナリングや細胞壁の伸展性の変化を介して細胞肥大を促進するという報告もなされている (Kohorn et al., 2006; Mishra et al., 2009)。

### 細胞壁型インベルターゼ

細胞壁型インベルターゼは師部からのアポプラスティックなアンローディングに関わる (Roitsch et al., 2003)。本酵素は細胞壁に結合した状態で存在し、ソース器官から転流してきたスクロースを分解し、分解したヘキソースをヘキソーストランスポーターで細胞内に取り込むことで、師管内とアポプラストの間に濃度勾配を形成し、シンク能力を高める働きをしていると考えられる (Tymowska-Lalanne and kreis, 1998a, 1998b)。

これまでに本酵素がブドウ果実の糖集積において重要な役割を担っていることが示されている。ブドウではベレゾーンを境にヘキソースが急激に蓄積する。ベレゾーン期

前にタンパク質の発現および活性の上昇が見られる液胞型インベルターゼとは異なり、細胞壁型インベルターゼはベレゾーン期以降にそのタンパク質の発現と活性の上昇が見られた。また、細胞内局在を観察した結果、液胞型でベレゾーン期前の伴細胞内の液胞に多く蓄積し、細胞壁型はベレゾーン期以降の師部と伴細胞の間の細胞壁に多く蓄積することが確認された。以上の結果から、ブドウはベレゾーン期を境に果実における糖の集積経路が変わること、またその変化に液胞型と細胞壁型インベルターゼが関与していることが推察された (Zhang et al., 2006)。さらにタバコのタペート細胞と花粉における細胞壁インベルターゼの発現を、組織特異的プロモーターを用いて抑制すると花粉の発達が阻害されることから、本酵素の花粉発達における重要性が示されている (Goetz et al., 2001)。

またその他にも、細胞壁型インベルターゼは植物体の傷害や菌の感染によって傷害部や感染部位における酵素活性の上昇が誘導される (Siemens et al., 2011; Sturm and Chrispeels, 1990)、種子の発達や、大豆の穀粒の発達に必要とされる (Cheng et al., 1996; Weber et al., 1996)、サイトカイニンの制御下でタバコの老化に関与する (Lara et al., 2004) といった報告もなされている。

### 細胞質型インベルターゼ

細胞質型インベルターゼの研究は、その活性の低さなどから細胞壁型および液胞型インベルターゼと比べて遅れており、シロイヌナズナなどごく限られた植物でしか詳細な解析がなされていない (Roitsch and Gonzales, 2004; Ruan et al., 2003)。そのため、本酵素の生理的役割は未だ不明な点が多い。

近年シロイヌナズナから中性またはアルカリ性に至適 pH を持つ細胞質型インベルターゼ (*Atcvt-Inv1*) の欠損変異株が得られ、その表現型が調べられた。この変異体は

高濃度の塩またはマンニトールを含む培地中でも側根の形成が阻害されることなく、水ストレスに対して比較的非感受性の表現型を示した。また、通常の栽培条件下では地上部の成長が抑制されることが分かった。さらに GUS を用いたプロモーター解析から *AtCYT-INV1* は水ストレスに対して発現が上昇することが確認され、また根や長角果といったシンク組織で多く発現することが確かめられた。従って、*AtCYT-INV1* は水ストレスのシグナル伝達系、さらに地上部の成長に対して重要な役割を持っている可能性が示された (Xiaopeng et al., 2007)。その他にも、細胞質型インベルターゼの 2 つのアイソフォーム (*AtCYT-INV1*, *AtCINV2*) を発現抑制させた二重変異体では、成熟個体が野生型に比べ矮化する、根の成長が極端に悪くなる等の変化が見られた。また二重変異体の根における伸長領域の細胞は肥大して潰れやすくなり、中心柱、内皮、皮層の細胞分裂に異常が見られた。このように、細胞質型インベルターゼと細胞の肥大や成長との関連性が示されている (Paul et al., 2009)。

### インベルターゼインヒビター

インベルターゼインヒビターは 15-23 kDa のタンパク質で、これまでに細胞壁型インベルターゼに対する阻害作用を持つもの (CIF; cell wall inhibitor of  $\beta$ -fructosidase) と液胞型インベルターゼに対する阻害作用を持つもの (VIF; vacuolar inhibitor of  $\beta$ -fructosidase) が見つかっている (Rausch and Greiner, 2004)。インベルターゼインヒビターはインベルターゼの基質結合部位に結合することでその活性を阻害するが、細胞壁型インベルターゼに対するインベルターゼインヒビターの阻害活性は pH の影響を受け、pH 4.5 で阻害活性が最大になることが報告されている (Weil et al., 1994)。また、ペクチンメチルエステラーゼインヒビター (PMED) と構造が類似しているという特徴を持つ。例えば、タバコの CIF と VIF のアミノ酸配列は 47% の相同性を示し、キ

ウィフルーツの PMEI とはそれぞれ、28 %、25 %の相同性を示す (Camardella et al., 2000)。

これまでに、葉や花の老化とインベルターゼインヒビターとの関係が調べられており、トマトやタバコにおいて、老化に伴い発現量が上昇することが示されている (Greiner et al., 1998, 2000)。その他にも、ジャガイモの低温糖化やインベルターゼ活性を介した病害抵抗性にも関与するという報告がなされている (Bonfig et al., 2010; Brummell et al., 2011)。カーネーションでは花卉老化時のインベルターゼ活性の低下はインベルターゼインヒビターの働きによることが報告されており (Halaba and Rudnicki, 1989)、バラにおいても同様の制御機構の存在が示唆される。

植物におけるシンク機能とインベルターゼの関係はこれまでに果実において詳しく調べられている。成熟した果実の細胞は非常に大きく、リンゴやナシでは直径が 200-300  $\mu\text{m}$  にも達し、その 90%近くを液胞が占めている (金山・山木, 1993)。果実の液胞に蓄積される溶質の大部分は糖であり、成熟したリンゴの液胞内の糖濃度は 900 mM 以上にもなる (Yamaki and Ino, 1992)。果実では高濃度の糖を液胞に蓄積することによって非常に高い浸透圧が形成され、それによって形成される膨圧は果実肥大を促進する原動力となる。このように植物は液胞内に高い浸透圧を形成させ、細胞肥大を促しており、この浸透圧の形成にインベルターゼが関与していると考えられている。その他にも、トマトにおいて大きな果実を形成する品種と小さな果実を形成する品種の間でインベルターゼの活性を比較したところ、これら全ての品種で果実の成熟にともないインベルターゼ活性の上昇が確認されたが、大きな果実を形成する品種では小さな果実を形成する品種に比べ液胞型と細胞壁型のインベルターゼの活性が全てのステージにおいて高かった (Islam et al., 1996)。この結果は果実肥大にインベルターゼが関与して

いることを示唆している。

バラ花卉からは細胞壁型と液胞型のインベルターゼ活性がともに強く検出されており、バラにおいて転流糖であるスクロースを花卉でグルコースとフルクトースに代謝しているのは、主に酸性インベルターゼであると考えられている (伊藤, 2008)。バラの蕾を通常より少し小さい段階で収穫し、葉をすべて取り除くと、水を与えただけでは開花に至らない。このときスクロースを処理すると切り花は開花するが、花卉は樹上で開花させたものに比べ小さくなる。樹上についた状態で成長した花の花卉中酸性インベルターゼ活性は開花に伴い顕著に上昇するが、採花して開花させた花ではそのような活性の上昇が見られなくなる (Yamada et al., 2007a; 伊藤, 2008)。従って、この活性の減少が、切り花の花卉が樹上で開花させた花卉に比べ小さくなる一因であると考えられる。

また、インベルターゼ遺伝子の発現やタンパク質の活性は植物ホルモンや糖などにより誘導を受けることが知られている。トウモロコシの液胞型インベルターゼである *Inv2* は葉や、根において ABA を与えると発現が上昇し、活性も上昇することが知られている (Trouverie et al., 2004)。その他にも、トマトの細胞壁型インベルターゼをコードする *Lin6* はグルコースやゼアチン、ブラシノステロイド、エリシター、そして障害などの外的要因によってその発現が上昇することが報告されている (Godt and Roitsch, 1997; Goetz et al., 2000)。さらにトマトにおいて、IAA、GA、そしてエチレンは、細胞壁型インベルターゼのレギュレーターとしての働きを持つことが知られている (Linden et al., 1996; Weil and Rausch, 1990; Wu et al., 1993)。バラ花卉ディスクにおいても、植物ホルモン処理により花卉中のインベルターゼ活性が変化することが確認されている (Horibe et al., 2010; 伊藤, 2008)。

インベルターゼ活性は上記のようにシンク力に影響を与え、花卉細胞における吸水の原動力になっていると考えられている。切り花においても、外的処理などにより花卉中

のインベルターゼ活性を制御すれば、切り花品質を向上させることができるかもしれない。

本章では、開花過程における花弁中の糖代謝の役割を明らかにするため、芳香性バラ品種‘イブピアッチェ’ (*Rosa* ‘Meivildo’) を用いて、開花過程における花弁中の糖含量と酸性インベルターゼ活性の変化を調べた。また、切り花の開花制御を目指し、切り花に植物ホルモンを処理して開花と花弁中の糖代謝に与える影響を解析した。‘イブピアッチェ’はその他の芳香性バラと同様に花保ち期間が短いことが問題となっており、これは蕾が開花するまでの期間に芳香物質が生合成されることに因ると考えられている。近年、国内のバラ産業は輸入切り花に圧迫されているが、輸入切り花の多くは芳香性を持たない。その理由として芳香性バラは花保ち期間が短く、長期の輸送に適さないことが挙げられる。国内の芳香性バラに対する需要は高く、近年国内で育種された芳香性バラ品種は輸入バラに対し優位性を持っており、芳香性バラの花保ち性を高めるための生産技術や専用花保ち剤の開発は輸入バラに対する国内産バラの優位性を高める手段になると思われる。しかし、芳香性バラの開花過程における花弁中の糖代謝を調べた報告は少なく、解析は進んでいない。

また、これまでの研究でバラの開花や花弁成長とインベルターゼ活性との関係性が調べられているが、その活性抑制機構については詳しく調べられていない。インベルターゼの活性抑制機構を明らかにすることは、インベルターゼ活性の上昇を介して花弁のシンク力を上昇させ、切り花品質を向上させる技術の開発につながると思われる。そこでバラ花弁におけるインベルターゼ活性の抑制機構を調べるため、インベルターゼインヒビターの単離と機能解析を目的として研究を行った。



## 材料および方法

### 開花に伴う糖含量およびインベルターゼ活性の変化

#### 実験材料

実験材料には滋賀県の大井バラ園で栽培管理されているバラ ‘イブピアッチェ’ (*Rosa* ‘Meivildo’) と名古屋大学フィールド教育支援センター東郷フィールドで栽培管理されているバラ ‘プリティウーマン’ (*Rosa* ‘FEbesa’) を用いた。インベルターゼインヒビターのクローニングとその発現解析には ‘プリティウーマン’ を、その他の実験には ‘イブピアッチェ’ を使用した。

#### 切り花処理

‘イブピアッチェ’ を通常の出荷の目安となる収穫ステージ (切り前) で採花したものの (Mature Bud Stage, Fig. 1B) と、そのステージよりも 2 日早く採花したものの (Tight Bud Stage) を使用した (Fig. 1A)。収穫した切り花を実験室に運び、その後の実験に用いた。

Mature Bud Stage、Tight Bud Stage で採花したバラを、三枚葉を 2 節残し茎長 25 cm の長さに統一して水中で茎を切り戻した。その後 1% (w/v) グルコース溶液 (0.02% (w/v) 8-ヒドロキシキノリン硫酸塩を含む) に浸し、25°C・60%相対湿度・光量子束密度 75-90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ・16 時間日長の条件でグロースチャンバー (BioTron; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd., Japan) 内に置いた。1 日おきに外側から 5 枚の花弁を採取し、液体窒素で凍結させた後使用するまで -80°C で保存した。

#### 糖含量測定

可溶性糖の抽出と定量は Ichimura et al. (2005) の方法を一部改変して行なった。凍結させた試料 (新鮮重 2~3 g) を 80°C に熱した 80% (v/v) エタノール 8 ml 中に入れ、内部標準物質として マンニトール 50  $\mu$ mol 加え、ポリトロンミキサー (KINEMATICA, Switzerland) を用いて摩砕した。その後さらに 30 分間 80°C の加温を続けた。この試料を 3,280 $\times$ g で 10 分間遠心した。上清を回収し、沈殿に 80% (v/v) エタノールを 3 ml 加えよく懸濁した後、再び 3,280 $\times$ g で 10 分間遠心して上清を回収した。集めた上清を遠心エバポレーターにかけてエタノールを揮発させて乾固後、脱イオン水を 1.5 ml 加えて溶解した。この溶液を Sep-pak カートリッジ C18 (Millipore, USA) と 45  $\mu$ m Cellulose Acetate フィルター (ADVANTEC, USA) に通した。ろ液を遠心エバポレーターにより乾固後、脱イオン水を 2 ml 加えて溶解し、可溶性糖標品とした。この糖標品を HPLC システム (655 A-11 LC; Hitachi, Japan) にセットし、糖を分離・測定した。糖の分離には Shodex Sugar カラム 0810 (Showa Denko, Japan) を用いて、脱イオン水を溶媒として 80°C で分離した。HPLC システムによって得られたピークの面積より糖含量を測定した。

## インベルターゼ活性測定

### 酵素の抽出

酵素の抽出に用いた各花卉試料は収穫後もしくは各処理終了後直ちに外側から 5 枚の花弁を液体窒素により凍結させ、-80°C で保存した。凍結試料を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて摩砕した。そこに 10 ml の抽出緩衝液 (10 mM メルカプトエタノール、2 mM EDTA、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、100 mM リン酸ナトリウム酸緩衝液、pH 7.4) を加え、よく懸濁した後 3,280 $\times$ g で 20 分間遠心し、上清を集めた。沈殿には 5 ml の抽出緩衝液を加えて、懸濁・遠心の操作をさらに 2 度行って、回収した上

清を上記の上清と混合した。沈殿（細胞壁画分）に 3 ml の抽出緩衝液を加えて氷上に保管し、先に上清（可溶性画分）に硫酸を 80%飽和になるまで加え 30 分攪拌した後、3,280×g で 10 分間遠心した。この操作により生じた沈殿に抽出緩衝液を 3 ml 加え沈殿を溶解した。この溶液と、上述の沈殿懸濁液をそれぞれ透析緩衝液（2 mM メルカプトエタノール、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4）に対し一晩透析した。透析後、可溶性画分は 3,280×g で 25 分間遠心し、上清を粗酵素液とした。細胞壁画分はよく懸濁し粗酵素液とした。以上の操作は全て氷上または 4℃で行なった。

### 酵素活性測定

液胞型および細胞壁型インベルターゼの活性測定のため、粗酵素液と反応液を 33 mM スクロースを含む 33 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で 37℃に保ち 30 分間反応させた後、トリス塩酸緩衝液（pH9.0）を終濃度 40 mM になるように加え、100℃で 3 分間加温して酵素を失活させた。これらの反応で生じたグルコースの量をグルコース CII-テストワコー（Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan）を用いて測定した。またコントロールとして、粗酵素液を基質であるスクロースを含まない 33 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で上記と同様に反応させた。反応後、加温により酵素を失活させた後に、スクロースを終濃度 33 mM となるように加えた。

### 切り花への植物ホルモン処理

Tight Bud Stage で採花したバラを、三枚葉を 2 節残し茎長 25 cm に統一してから、水中で茎を切り戻した。その後、以下の溶液で保持した。

1 : 1% (w/v) グルコース + 0.02% (w/v) 8-ヒドロキシキノリン硫酸塩（対照区）

2 : 100 μM ナフタレン酢酸（NAA）+ 1% (w/v) グルコース+0.02% (w/v) 8-ヒドロキシ

キノリン硫酸塩 (NAA 区)

3:100  $\mu\text{M}$  ジヤスモン酸メチル (MeJA) + 1% (w/v) グルコース+0.02% (w/v) 8-ヒドロ

キシキノリン硫酸塩 (MeJA 区)

各処理区の個体は 25°C・60% 相対湿度・光量子束密度 75-90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ・16 時間日長の条件でグロースチャンバー (BioTron; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd.) 内に保持した。2 日おきに外側から 5 枚の花弁を採取して新鮮重を測定し、液体窒素で凍結させた後 -80°C で保存した。保存した花弁サンプルは、糖含量測定とインベルターゼの活性測定に使用した。

### インベルターゼインヒビターのクローニング

#### 実験材料

バラ花弁からの *XTH* cDNA の単離には、名古屋大学フィールド教育支援センター東郷フィールドで栽培管理されているバラ ‘プリティウーマン’ (*Rosa hybrid* ‘FEbesa’) を用いた。開花ステージは以下のように設定した。

Stage 1 つぼみの直径 7 mm 程度

Stage 2 つぼみの直径 12 mm 程度

Stage 3 つぼみが膨らみ、ガクの間から花弁の色が認められる状態 (開花直前)

Stage 4 ガクが先端まで完全に分離し、花弁がまだ剣弁状になっていない状態

Stage 5 外側の花弁が剣弁状になっている状態

Stage 6 露芯している状態

それぞれのステージにおいて外側から 5 枚の花弁を用いた。各試料は液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存したものを実験に用いた。

## Total RNA の抽出

CTAB 法 (Murry and Thompson, 1980) に従い、凍結保存した各試料の total RNA を抽出した。凍結試料を液体窒素存在下で乳鉢と乳棒を用いて、パウダー状に摩砕した。凍結試料 0.2-0.3 g に対し 800  $\mu$ l の抽出緩衝液 (2% (w/v) 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、1% (v/v) ポリビニルピロリドン K30、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、2 M NaCl、2%メルカプトエタノール) を加え激しく攪拌し、抽出緩衝液と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (クロロホルム:イソアミルアルコール = 24:1 (v:v)) を加え、再度激しく攪拌後、室温で 10,000 $\times$ g、10 分間遠心分離し、水層を回収した。回収した水層に同様の操作をもう一度繰り返した。次に、この水層に終濃度が 2 M となるように塩化リチウムを加えて 4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置し、10,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離を行った。得られた沈殿に 500  $\mu$ l の上記抽出緩衝液を加え沈殿を溶解させ、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加えて激しく攪拌後、室温で 15,000 $\times$ g、10 分間遠心分離し、水層を回収した。次に回収した水層に 1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と 2.5 倍容のエタノールを加えて転倒混和した後、-20 $^{\circ}$ C で 30 分以上静置し、4 $^{\circ}$ C で 10000 $\times$ g、15 分間遠心分離を行った。得られた沈殿を少量の 70% (v/v) エタノールで洗浄後、遠心エバポレーターによりエタノールを除去し、TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (ph 8.0), 1 mM EDTA (ph 8.0)) に溶解した。この溶液の 230nm、260nm、280nm における吸光度を測定し、核酸量の純度を確認して total RNA 標品とした。

## インベルターゼインヒビターcDNA のクローニング

バラは全ゲノムが解読されていないため、バラのインベルターゼインヒビターcDNA を単離するために、リンゴ (Genome Database for Rosaceae) とイチゴ (Strawberry

Genome Hybrid Gene Model Database - Version 2) のデータベースを利用した。具体的には、シロイヌナズナで既に機能が明らかとなっているインベルターゼインヒビター (*AtC/VIF1*, *AtC/VIF2*, *At3g17130*) の配列を元に、そのオーソログ (*MDP0000212539*, *MDP0000228407*, *MDP0000305934*) をリングで探し、さらにその配列を元にイチゴにおけるオーソログ (*gene05042*, *gene17889*, *gene05072*) を検索した。得られたイチゴにおけるオーソログの配列を元に、全長コード領域を増幅できる位置でプライマーを設計した (下記)。

RT-PCR には PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio, Japan) を使用し、Stage 1 から 6 までのバラ花弁より抽出した total RNA を等量ずつ混ぜたものをキットに付属の oligo dT-Adaptor Primer を用いて逆転写した。

次に得られた逆転写産物を鋳型に各プライマーを使用して PCR を行なった。用いたプライマーと反応条件は以下のとおりである。

RhINH1-F      CCCTTTTGTCTTGCAAAGATG

RhINH1-R      TGCAGAAAATATGACACGAATAGTT

98°C 1分, {98°C 10秒, 54°C 30秒, 72°C 1分}40 サイクル

RhINH2-F      TCTAGAAGCTACAGATCCAAAAGAAA

RhINH2-R      TAGCAGTAGGAGTAAGCGAGGT

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 1分}35 サイクル

RhINH3-F      CAATCTTCGACTCCCCAGAA

RhINH3-R      TGAACTAAGATTACACAAGGAAAGCA

98°C 1分, {98°C 10秒, 57°C 30秒, 72°C 1分}35サイクル

反応後、PCR産物の電気泳動を行なって目的とする長さのバンドを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio) を用いて抽出・精製し、DNA Ligation kit, Mighty Mix (Takara Bio) を用いてプラスミドベクターpMD-20 Tベクター (Takara Bio) に組み込んだ。このプラスミド DNA を大腸菌 JM109 (Nippon gene, Japan) に導入した。形質転換した大腸菌を選抜し、目的の断片が導入されている大腸菌を 50 µg/ml アンピシリンを含む液体 LB 培地にて一晩培養し、High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Switzerland) を用いてプラスミド DNA を精製した。

#### 塩基配列の決定

cDNA の塩基配列は Big Dye Terminator v3.1 cycle sequence kit (Applied Biosystems, USA) を用いてシーケンス反応を行い、3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により配列を決定した。

得られた cDNA の塩基配列情報は Genetix ver.11 (Genetix corporation, Japan) を用いて推定アミノ酸配列に翻訳した。それらをこれまでに様々な植物から単離されているインベルターゼインヒビターおよび PME1 のアミノ配列と共に ClustalW (Thompson et al., 1994) を用いてマルチプルアライメントを作成し、得られた系統樹解析の結果を Tree View (win32) version 1.6.6 で表示した。

#### sqRT-PCR による樹上および切り花におけるステージ別発現解析

単離したそれぞれの遺伝子 (*RhINH1*, *RhINH2*, *RhINH3*) に特異的なプライマーを、それぞれの遺伝子間で相同性の低い部分でセンスプライマーとアンチセンスプライマ

ーを設計した。また、内部コントロールにはバラにおいて全ての器官でほぼ恒常的な発現を示す遺伝子である Translationally controlled tumour protein (TCTP) (Remay et al., 2009)を用いた。用いたプライマーと反応条件は以下のとおりである。

RhINH1-sqRT-F CGGGTTGATCATTGTCAGAA

RhINH1-sqRT-R ACAATTGCTGCAGCCACAAC

98°C 1分, {98°C 10秒, 54°C 30秒, 72°C 20秒}40 サイクル

RhINH2-sqRT-F TTAGAAGGTATCCGGCGTTG

RhINH2-sqRT-R GCGAGGTAGCTATGCAATCA

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 20秒}37 サイクル

RhINH3-sqRT-F AGGCTTGTGAGAAGGGGTTT

RhINH3-sqRT-R ATCTGCCACGGCCAAAAT

98°C 1分, {98°C 10秒, 57°C 30秒, 72°C 20秒}34 サイクル

Q-TCTP-S1 GAGGGAGCAACCAAGTTTCTG

Q-TCTP-AS1 TGTAGTAGGCAAAGACCAAAGC

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 20秒}32 サイクル

PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio) を用いて、各開花ステージの花弁から抽出した total RNA 500 ng を逆転写し RT-PCR を行った。得られた cDNA を鋳型として Table. 2 に示したプライマーを用いて発現量の解析を行った。



## 結果

### 花卉新鮮重の変化

樹上で開花させた花卉、そして採花し 1% (w/v) グルコース溶液に浸して開花させた花卉のいずれにおいても、開花に伴い 4 日までは新鮮重が増加し、その後減少した。この時、切り花の花卉新鮮重は樹上に保持した花卉に比べ低くなった。また、**Tight Bud Stage** で採花して開花させた花卉の方が、**Mature Bud Stage** で採花して開花させた花卉に比べ、4 日、6 日の時点で新鮮重が低くなった (Fig. 2)。

### 花卉中糖含量の変化

樹上および切り花のいずれにおいても、花卉中のグルコースとフルクトース含量はスクロース含量に比べ非常に高くなった (Fig. 3)。また、測定した全ての可溶性糖において、樹上の花は切り花の花卉中の糖含量を上回った。樹上で開花させた花の花卉中のスクロース含量は 5 日の時点で高く保たれていたが、切り花 (**Tight Bud Stage**、**Mature Bud Stage**) では処理後減少し続けた。**Mature Bud Stage** で採花した切り花のグルコースとフルクトース含量は処理 1 日後まで減少し、その後はおよそ一定の値を保った。一方、**Tight Bud Stage** で採花した切り花のグルコース含量は処理後減少する傾向を示したが、フルクトース含量は処理後あまり変化しなかった。

### インベルターゼ活性の変化

樹上で開花させた花の液胞型および細胞壁型インベルターゼ活性は、0 日から 2 日後にかけて上昇し、その後減少した (Fig. 4)。**Mature Bud Stage** で採花した切り花の液胞型および細胞壁型インベルターゼ活性は処理後すぐに減少した。また、樹上で開花さ

せた花弁における細胞壁型インベルターゼ活性は4日後に、Mature Bud Stageで採花した切り花に比べ高く保たれていた (Fig. 4A)。一方、Tight Bud Stageで採花した切り花では、液胞型および細胞壁型インベルターゼともに活性の上昇は見られず、処理後減少を続けた。

## 切り花への植物ホルモン処理

### 開花および花弁成長の変化

Tight Bud Stageで収穫した切り花へ植物ホルモンを処理したところ、ホルモン無処理区 (対照区)、NAA 処理区そして MeJA 処理区の間で、開花の様子に差が見られた (Fig. 5A)。NAA 処理区では1日後から顕著に差が見られ、開花が促進された。一方、MeJA 処理区では開花が遅延され、特に2日目以降で対照区およびNAA 処理区との差が明確になった。

### 花弁新鮮重の変化

対照区およびNAA 処理区では、花弁新鮮重は処理2日後まで増加し、その後減少に転じた (Fig. 5B)。このとき、NAA 処理区では処理2日後までは対照区より新鮮重が大きくなったが、4日後では急激に花弁新鮮重が減少した。一方、MeJA 処理区では処理4日後まで花弁新鮮重が増加し続け、処理4日後の時点では最も花弁新鮮重が高くなった。

### 花弁中糖含量の変化

対照区において、花弁中のスクロース含量は処理後1日にかけて大きく減少し、その後はおよそ一定の値を保った。一方、グルコース含量は処理後あまり変化せず、フル

クトース含量は処理後上昇する傾向を見せた (Fig. 6)。

NAA 処理区では、花弁中のスクロース含量は対照区と同様に処理後 1 日にかけて大きく減少した。また処理後 2 日目以降も対照区と MeJA 処理区に比べ低い値を示した。グルコースとフルクトース含量も処理後 4 日目の時点で対照区と MeJA 処理区に比べ低くなった。

MeJA 処理区では、花弁中のスクロース含量は処理後減少する傾向が見られたが、その他の処理区と比較し値は高く保たれていた。グルコースおよびフルクトース含量は処理 2 日後まではあまり変化しなかったが、4 日後にかけて上昇し、対照区と同程度の値を示した。

#### インベルターゼ活性の変化

細胞壁型インベルターゼ活性は、対照区では処理後上昇せず、減少し続けた (Fig. 7A)。NAA 処理区では処理 0 日から 1 日後にかけて活性が上昇したが、その後は減少に転じ、処理 4 日後には対照区と同程度の値を示した。MeJA 処理区では、処理 0 日から 1 日後にかけて活性は増減しなかったが、2 日後にかけて急激な活性の上昇を示し、処理 4 日後でも他の処理区に比べ高い値を保持していた。

液胞型インベルターゼ活性も、細胞壁型インベルターゼ活性と同様の傾向を示し (Fig. 7B)、対照区では処理後の活性は減少し続けた。また NAA 処理区では処理 0 日から 1 日後にかけて活性が上昇したが、その後は減少に転じ、処理 4 日後には対照区と同程度の値を示した。一方、MeJA 処理区では処理 0 日から 1 日後にかけて活性は減少したが、2 日後以降は緩やかに上昇した。

#### インベルターゼインヒビターのクローニング

## cDNA のクローニング

バラ花卉から 3 種類の インベルターゼインヒビター様 cDNA を単離した (*RhINH1*, *RhINH2*, *RhINH3*)。塩基配列を決定したところ、*RhINH1*, *RhINH2*, *RhINH3* はそれぞれ 605 塩基、637 塩基、633 塩基からなり、推定される翻訳領域は 181、183、174 のアミノ酸をコードしていた (Figs. 8, 9, 10)。

## 配列の解析

得られた塩基配列の予想コード領域を NCBI のデータベースで BLAST 検索したところ、*RhINH1* はイチゴ (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*) の機能未知遺伝子 (XM\_004296176.1) と 90% の割合で、またイチゴのインベルターゼインヒビター様遺伝子 (XM\_004298135.1) と 59% の割合で一致した。*RhINH2* はイチゴのインベルターゼインヒビター様遺伝子 (XM\_004288326.1) と 91%、*RhINH3* はイチゴのインベルターゼインヒビター様遺伝子 (XM\_004296183.1) と 92% の割合で一致した。

また、単離した遺伝子をシロイヌナズナのインベルターゼインヒビターや PME1 のアミノ酸配列とマルチプルアライメントを行ったところ、*RhINH2* と *RhINH3* はインベルターゼインヒビターと PME1 の双方に特徴的な 4 つのシステイン残基を有しているが、*RhINH1* では、4 つのうち 2 つのシステイン残基しかもっていなかった (Fig. 11)。

また、これまでに様々な植物から単離されているインベルターゼインヒビターや PME1 のアミノ酸配列と共に系統樹分析を行ったところ、インベルターゼインヒビターと PME1 は明確なクレードに分かれなかったが、*RhINH2* と *RhINH3* はシロイヌナズナのインベルターゼインヒビターと同じクレードに分類された。また、*RhINH1* はこれまでに単離されているインベルターゼインヒビターや PME1 とは全く別のクレードに分類された (Fig. 12)。

### 花卉の開花ステージ別の発現解析

sqRT-PCRにより、樹上および切り花の花弁における *RhINH1*、*RhINH2* および *RhINH3* の遺伝子発現を調べた (Fig. 13)。*RhINH1* は樹上および切り花のどの開花ステージにおいても発現がみられなかった。一方、*RhINH2* と *RhINH3* の花弁における発現は、開花が進むにつれて徐々に減少していた。また、切り花では樹上の花に比べ発現が低くなった。

## 考察

### バラ ‘イブピアッチェ’ の開花過程における糖代謝の役割

#### 切り花におけるスクロース代謝

収穫後の切りバラでは開花にともなってデンプンやスクロースの減少が見られる。これは樹体や葉からの光合成産物の転流がなくなったため、収穫されるまでに花弁や茎、葉に貯蔵された糖を代謝しているためと考えられる。今回の実験では **Mature Bud Stage** と **Tight Bud Stage** で収穫した切り花の花弁中のデンプン含量を測定したが、その後花弁に蓄積される可溶性糖含量の 30 分の 1 以下であった (**data not shown**)。そのため、花弁における可溶性糖含量の蓄積は、主に花弁に蓄積していたスクロースと、切り花にしたとき茎や葉に貯蔵されていたスクロースの転流により生じたものと思われる。

緒言で述べた通り、多くの切り花で生け水に加えた糖は老化を遅らせ、鑑賞期間を長くする働きがあることが明らかになっている。今回の実験では採花した切り花に 1% グルコースを処理したが、花弁中のスクロース含量は樹上で開花させたものに比べ著しく低くなった (**Fig. 3A**)。このような結果から、バラは切り花にすると花弁細胞内でのスクロース代謝に変化が生じ、葉に蓄積されたスクロースを効率よく花弁細胞に転流することができなくなっていることが考えられる。また、転流されてきたスクロースを分解する能力も減少し、そのためにスクロースの濃度勾配を維持出来ず、その結果花弁細胞内外の浸透圧差が形成されなくなり、花弁細胞の吸水力が減少していると思われる。このような花弁中の糖代謝における変化によって、切り花では樹上で開花させた花よりも花弁が小さくなると推察される。

**Mature Bud Stage** で採花し開花させた花弁の新鮮重は、**Tight Bud Stage** で採花し

開花させた花卉の新鮮重よりも高くなった (Fig. 2)。これは Mature Bud Stage で採花した花は Tight Bud Stage で採花した花よりも樹上に保持されていた期間が長く、採花した時点での糖含量が高かったことが一因と考えられる。しかし、Mature Bud Stage で採花した花に糖を加えても、そのまま樹上に保持した花に比べスクロース含量は低く、花卉新鮮重も小さくなった (Figs. 2, 3)。こうした結果は、採花する時期を変えることが花卉新鮮重や花卉中の糖含量などに影響を与えること、また、採花する時期を変えても、切り花にすることにより花卉細胞内でスクロース代謝に変化が生じ、生け水に糖を加えても切り花の花弁は樹上に保持した場合ほど大きくならないことを示していると思われる。

バラ花卉の糖代謝酵素はインベルターゼだけではないが、中田の実験ではバラ花卉中の  $\alpha$ 、 $\beta$ -アミラーゼ活性よりも酸性インベルターゼ活性がヘキソース蓄積に貢献していることが示されている (中田, 2004)。また、つぼみから開花するステージのバラ花卉ではスクロース合成酵素より酸性インベルターゼ活性がスクロース代謝に大きな役割を果たしていることが報告されている (Kumar et al., 2007)。その他にも、樹上で開花させたバラでは花卉の展開に伴い酸性インベルターゼ活性が上昇していることが報告されている (伊藤, 2008)。本実験でもスクロース合成酵素の活性を測定したが、細胞壁型インベルターゼの活性に比べ 6 分の 1 程度と低く、開花ステージによっても変化を示さなかった (data not shown)。従って、本実験で用いた芳香性バラ品種 ‘イブピアッチェ’ (*Rosa* ‘Meivildo’) のスクロース代謝においても、酸性インベルターゼが重要な働きをしていると思われる。

### 花卉中インベルターゼの変化

花卉中に多くの糖が蓄積することは花卉細胞の浸透圧を上昇させ、花卉の吸水力を向

上させると考えられている (Ho and Nichols, 1977)。グラジオラスでも小花の開花時の花被内に多くのヘキソースが蓄積することが知られている。開花における花被の長さの相対成長率は花被の圧力ポテンシャルとの間で正の相関が見られ、さらにその時の相対成長率と酸性インベルターゼ活性の間にも正の相関が見られることが示されている。こうした結果から、酸性インベルターゼの働きによってヘキソースが供給され、それらヘキソースの蓄積によって浸透ポテンシャルが形成されることで、花被の吸水力が生じているのではないかと考察されている (山根ら, 1991)。伊藤 (2008) も、酸性インベルターゼがバラ花卉のヘキソースの蓄積に関わっており、それらの蓄積は吸水の原動力となっていることを示唆している。

**Tight Bud Stage** で採花し 1% グルコースに浸して開花させた花卉では、液胞型および細胞壁型インベルターゼ活性はいずれも樹上で開花させた花卉に比べ著しく減少した (Fig. 4)。**Mature Bud Stage** で採花し 1% グルコースに浸して開花させた花卉でも、細胞壁型インベルターゼ活性は樹上で開花させた花卉に比べ著しく減少していた (Fig. 4A)。これら酸性インベルターゼの活性は花卉細胞内のヘキソース蓄積、ひいては花卉細胞の吸水力の原動力になっていると思われ、この酸性インベルターゼ活性の減少により、切り花の花卉成長の悪化が引き起こされているのではないかとと思われる。具体的には、切り花の花卉中酸性インベルターゼ活性が減少することで、葉や茎から転流してきたスクロースのアンローディングと液胞内でのスクロースの分解能力が低下し、花卉細胞内外における浸透圧差の形成が滞ってしまい、その結果花卉細胞の吸水力が低下したと考えられる。

**Tight Bud Stage** で採花し 2 日間処理した花と、樹上 0 日の花とは、同じ日数だけグルコース溶液もしくは樹上に置いたことになる。このとき、樹上で開花させた花では **Tight Bud Stage** で採花し 2 日間処理した花よりも花卉中の酸性インベルターゼ活性が



高いことから、樹上で開花させた花では蕾の成長に伴い酸性インベルターゼ活性が上昇していることがわかる (Fig. 4)。本実験では切り花にグルコースを処理しても酸性インベルターゼ活性の誘導は起こらなかったことから、主に茎や側芽から転流する物質が活性誘導を引き起こしていると思われる。

### 植物ホルモン処理の開花および花弁中の糖代謝への影響

切り花に各種植物ホルモン (ABA、BA、GA<sub>3</sub>、MeJA、NAA) を処理したところ、対照区と比較し NAA 処理区と MeJA 処理区で開花に顕著な差が見られた (data not shown)。そのため、以降の実験では NAA と MeJA に注目し、解析を進めた。

Tight Bud Stage で採花した切り花に NAA と MeJA を処理したところ、NAA 処理区では開花が促進され、MeJA 処理区では開花が遅延された (Fig. 5A)。また花弁新鮮重の変化をみると、NAA 処理区では対照区に比べ上昇が早まり、MeJA 処理区では処理 4 日後まで新鮮重が増加し続けた (Fig. 5B)。次に開花時の花弁中の糖含量を比較してみると、NAA 処理区では他の処理区に比べスクロースやグルコースの減少が早まり、MeJA 処理区では他の処理区に比べスクロース量は若干高く保たれた (Fig. 6A)。これらの結果は、植物ホルモン処理によって切り花の花弁におけるスクロース代謝に変化が起こったことを示していると思われる。

このときの酸性インベルターゼ活性を処理区間で比較したところ、処理区間で顕著な変化を示した。NAA 処理区では処理 1、2 日後の時点で液胞型および細胞壁型インベルターゼ活性がともに他の処理区に比べ高くなり、4 日後には対照区と同程度にまで減少した (Fig. 7)。インベルターゼ活性の上昇はヘキソースの蓄積を増やすことにより花弁細胞への吸水を促進する。しかし今回の実験では NAA 処理区の花弁中のヘキソース含量は処理 1、2 日後の時点で上昇しておらず (Fig. 6)、インベルターゼ活性の上昇によ

って生じたヘキソースは浸透圧調節物質としてではなく、呼吸や細胞壁合成の基質などとして利用されたと思われる。また、NAA 処理はインベルターゼ活性だけでなく、細胞壁の伸展性などその他の生理機能にも影響した可能性がある。細胞内外に浸透圧差が存在しても、細胞を覆う細胞壁が堅いままでは細胞肥大は生じないため、細胞壁の伸展性の上昇も不可欠となる。バラにおいても、我々のこれまでの研究で開花における花弁の力学的性質の変化や細胞壁関連タンパク質の重要性が示されている (Yamada et al., 2007a; Yamada et al., 2009b; 落合, 2012)。NAA 処理区の切り花は対照区と満開時の花の形状が異なっており (Fig. 5)、細胞壁の伸展性が影響を受けている可能性も考えられる。

一方、開花が遅延した MeJA 処理区では処理 4 日後まで新鮮重が増加し続けており、老化も遅れているように見える (Fig. 5)。また細胞壁型インベルターゼ活性が処理 2 日後に上昇し、処理 4 日後の時点でも高く保たれていた (Fig. 7A)。この細胞壁型インベルターゼの活性化は葉から花弁へのスクロースの転流を促進し、花弁でのヘキソースの蓄積につながったと思われる。この花弁中へのヘキソースの蓄積の結果、花弁細胞が吸水力を保持することができ、また老化も抑制されたのではないかと考えられる。花弁に転流してきたスクロースが、そのまま花弁細胞内に取り込まれるのか、若しくはアポプラストでヘキソースに分解されてから取り込まれるのかは、現在のところ詳しくは調べられていない。細胞壁型インベルターゼはアポプラスティックなスクロースの取り込みにおいて重要であると思われる。樹上に保持した花では **Mature Bud Stage** で収穫した花よりも細胞壁型インベルターゼ活性が高かったことから (Fig. 4A)、花弁の肥大生長において細胞壁型インベルターゼが果たす役割の重要性が伺える。しかし、MeJA 処理は花弁細胞壁の伸展性などに影響した可能性がある。従って今後は、各処理区における花弁の力学的性質を比較していく必要があると思われる。

以上のように本章の研究によって、酸性インベルターゼ活性と花卉成長との相関関係、また MeJA の品質保持剤としての有効性が示された。今後は他のバラ品種や花きの切り花における MeJA の品質保持剤としての効果を評価することで、実用性が確かめられるものと思われる。

### インベルターゼインヒビターcDNA のクローニング

#### 塩基配列の決定

バラ ‘プリティウーマン’ の花卉から 3 種類の cDNA を単離し、それぞれ *RhINH1*、*RhINH2*、*RhINH3* と名付けた (Figs. 8, 9, 10)。 *RhINH2* と *RhINH3* はイチゴのインベルターゼインヒビター様遺伝子と高い類似性を示し、インベルターゼインヒビターと PMEI に特徴的な 4 つのシステイン残基を有していた (Fig. 11)。一方、*RhINH1* ではそれら 4 つのシステイン残基のうち 2 つしか保存されず、またこれまでに機能が確認されているインベルターゼインヒビターとの類似性も低かった (Fig. 12)。従って、*RhINH1* はインベルターゼインヒビターではなく他の機能を持つ遺伝子であることも考えられる。

インベルターゼインヒビターと PMEI の基質特異性ははっきりと区別されるが、その構造は非常によく似ているため、現状では塩基およびアミノ酸配列から両者を明確に区別することは難しい (Hothorn et al., 2010; Rausch and Greiner, 2004)。 *RhINH2* と *RhINH3* は配列の類似性からはインベルターゼインヒビターであることが予想されるが、機能を確認するために、今後リコンビナントタンパク質を作製してインベルターゼの阻害活性を確認する必要がある。

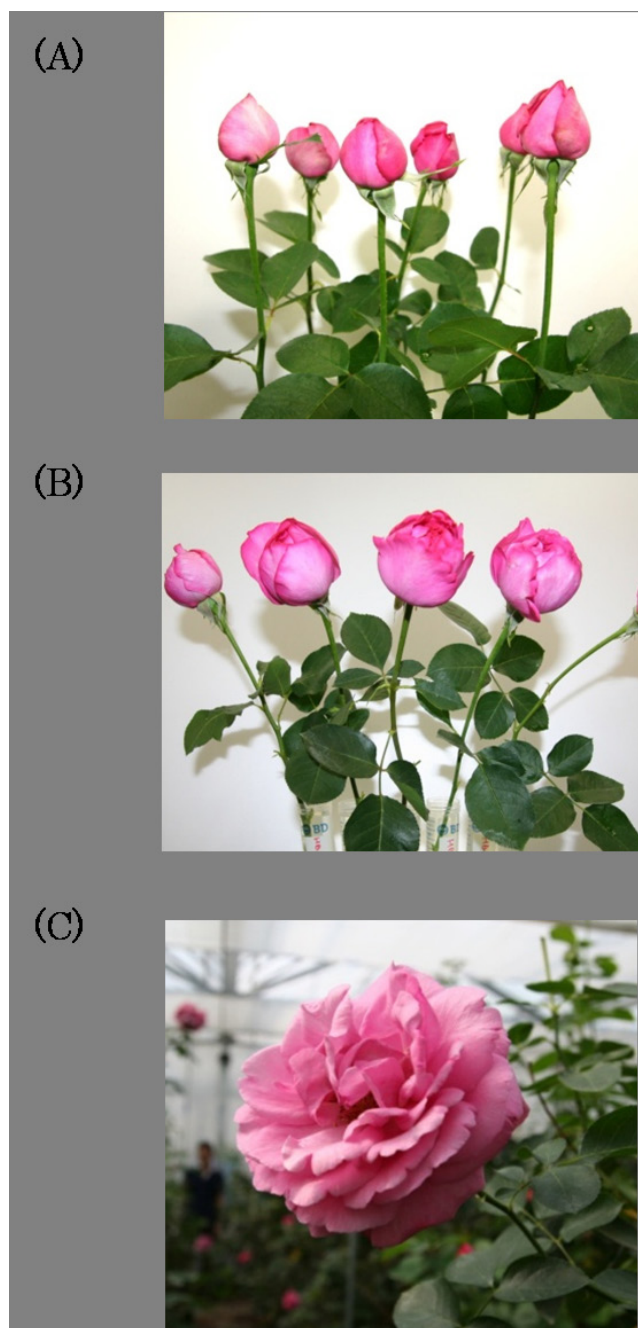
## 花卉の開花ステージ別の発現解析

*RhINH1* は樹上 (Stage3-6) および切り花 (Stage4, 5) のステージにおいても発現がみられなかった (Fig. 13B)。花卉中の mRNA を利用して *RhINH1* をクローニングした際には Stage1, 2 の花卉も使用しており、*RhINH1* は花卉成長の早い時期に機能しているのかもしれない。一方、*RhINH2* と *RhINH3* の花卉における発現は、開花が進むにつれて徐々に減少していた (Fig. 13B)。

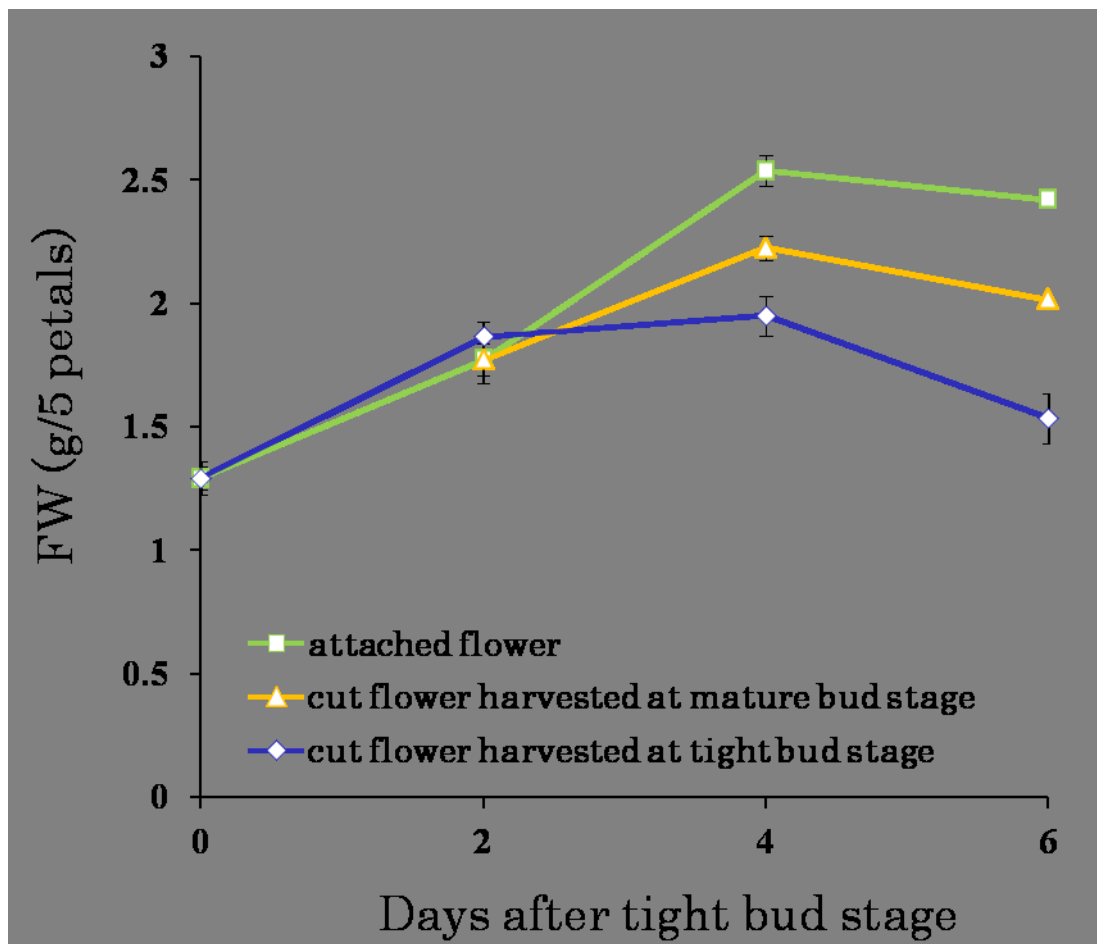
カーネーションでは花卉老化時のインベルターゼ活性の低下はインベルターゼインヒビターの働きによることが報告されている (Halaba and Rudnicki, 1989)。我々の研究で、バラにおいて花卉中の酸性インベルターゼ活性は花卉の老化に伴い減少することが示されており (Fig. 4; 伊藤, 2008)、インベルターゼインヒビターはこの活性の減少に関与していると考えられた。しかし、今回単離した遺伝子は開花初期に発現しており、老化に伴う酸性インベルターゼ活性の減少には関与していないと思われる。従って、老化時や切り花にした際のバラ花卉における酸性インベルターゼ活性の減少の原因としては、インベルターゼをコードする遺伝子発現量の低下、あるいはインベルターゼの分解などが考えられる。さらに、今回単離されていないインベルターゼインヒビターが活性を阻害している可能性も残る。これらの可能性を検証するため、今後は、液胞型および細胞壁型インベルターゼをコードする遺伝子の発現量の変化や、それらのタンパク質量の変化などを解析する必要がある。今回単離した *RhINH2* と *RhINH3* は、開花に伴い発現量が減少することで、インベルターゼ活性の抑制を解除し、開花時の酸性インベルターゼ活性上昇に関与しているかもしれない。

バラは、その形質転換効率の低さや再分化の難しさから、これまで形質転換体を用いた解析は行われていなかったが、最近では報告例が増えている (Zakizadeh et al.,

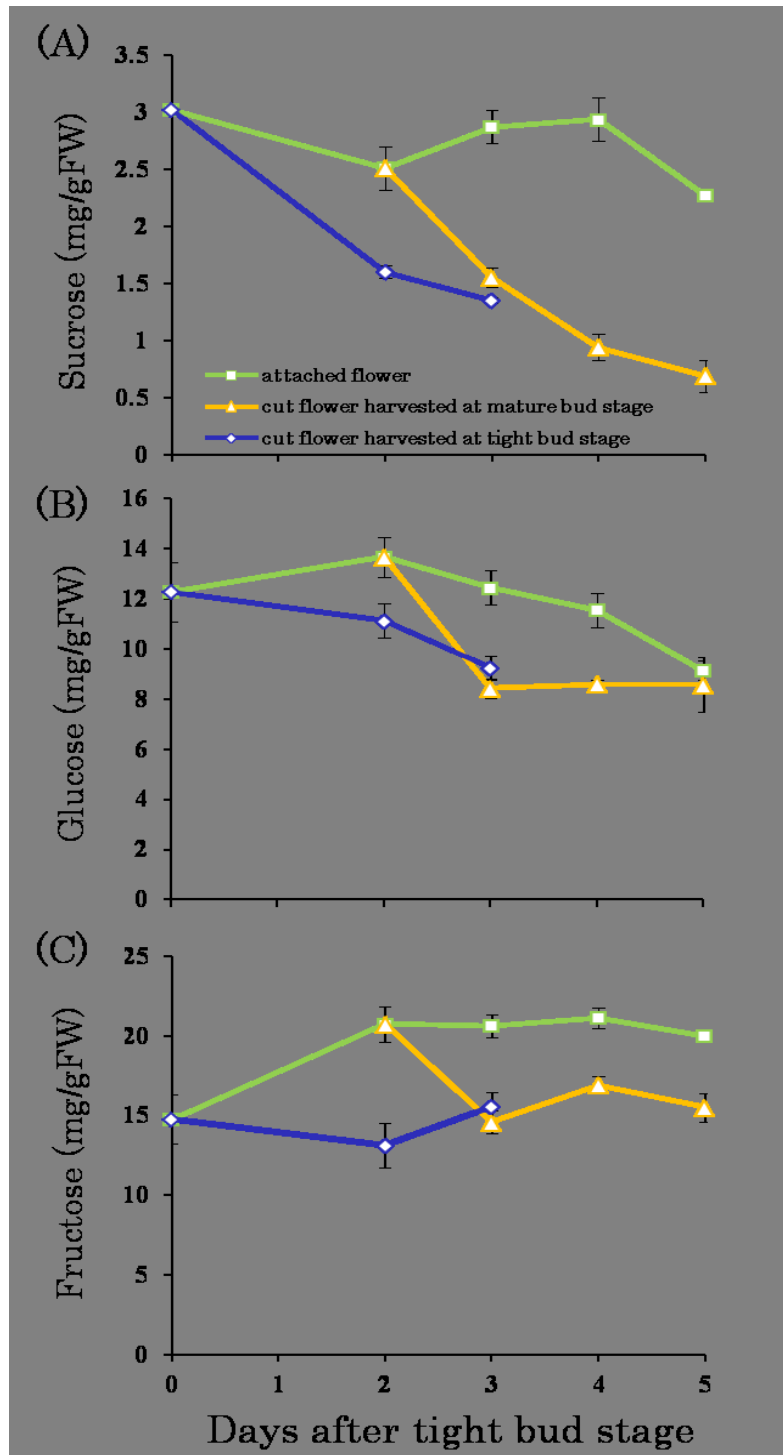
2013)。また全ゲノム解読が進行中であり、EST・トランスクリプトームなどのデータベースも整備されるなど (Dubois et al., 2012)、ゲノムリソースが充実しつつある。今後はバラにおいても形質転換体の作出など、逆遺伝学的なアプローチを取り入れることで、開花におけるインベルターゼやインベルターゼインヒビターの役割もより詳細に明らかになっていくと思われる。



**Fig. 1.** Flower opening stage of *Rosa* 'Meivildo'. A, Cut flowers harvested at tight bud stage (TB); B, cut flowers harvested at mature bud stage (MB, 2 days after TB); C, Flower opened fully on tree (6 days after TB).

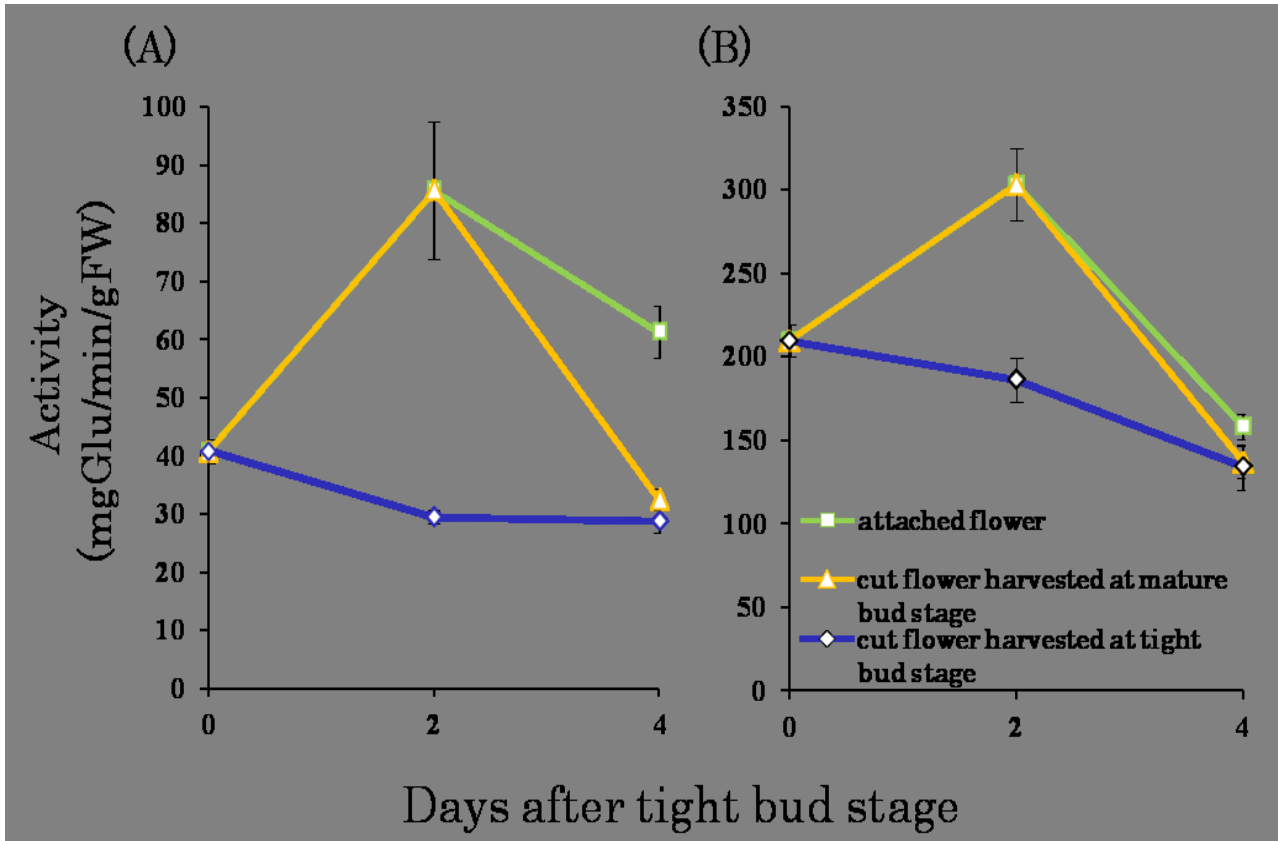


**Fig. 2.** Fresh weight of petals during flower opening. Petal fresh weight of attached flower (open square), cut flower harvested at MB (open triangle), and cut flower harvested at TB (open diamond) were measured. Values are means of 5 to 8 experiments  $\pm$ SE.

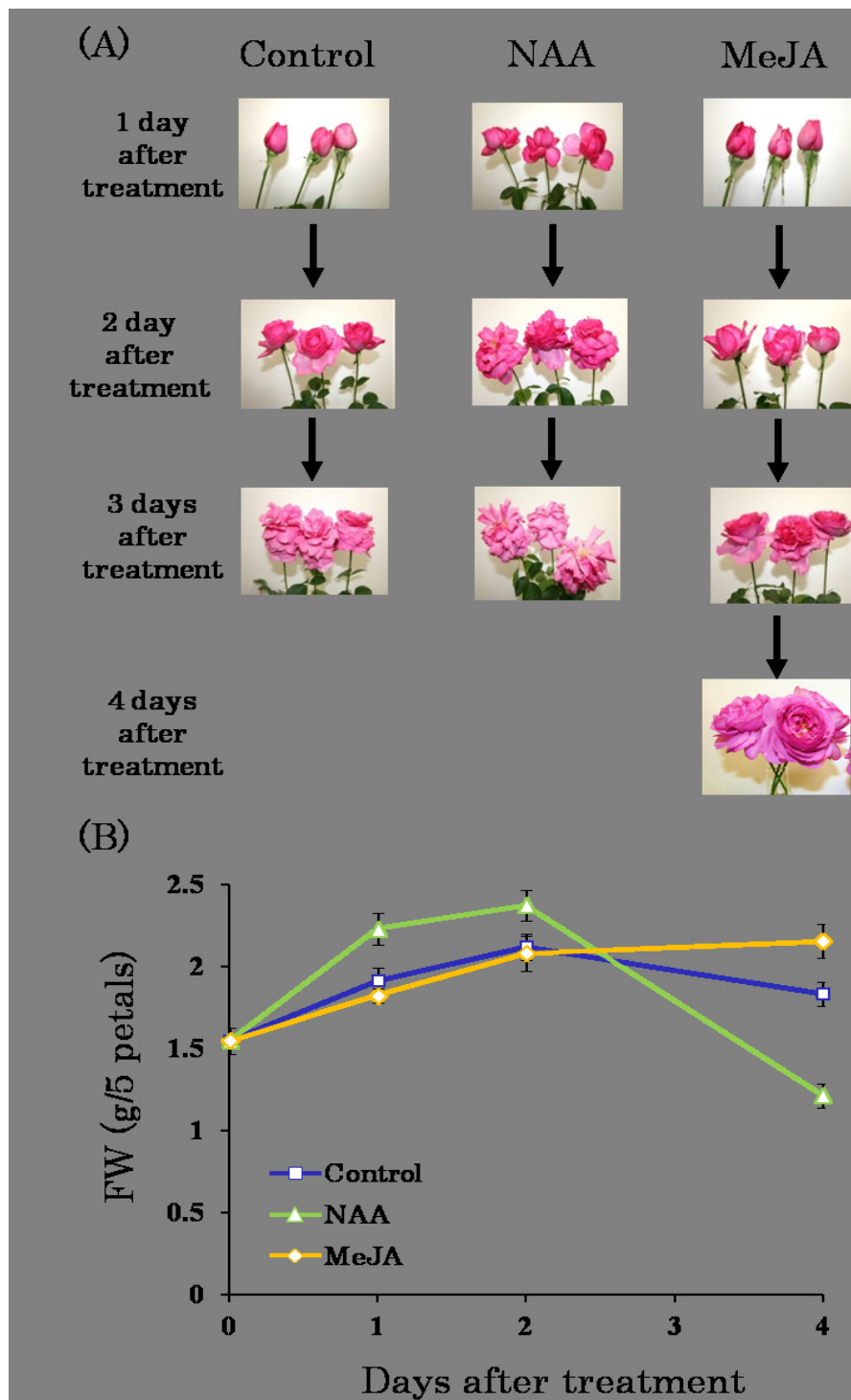


**Fig. 3.** Soluble carbohydrates in the petals during flower opening. Sucrose (A), glucose (B), and fructose (C) in petals of attached flower (open square), cut flower harvested at MB (open triangle), and cut flower harvested at TB (open diamond) were measured. Values are means of 4 experiments  $\pm$ SE.

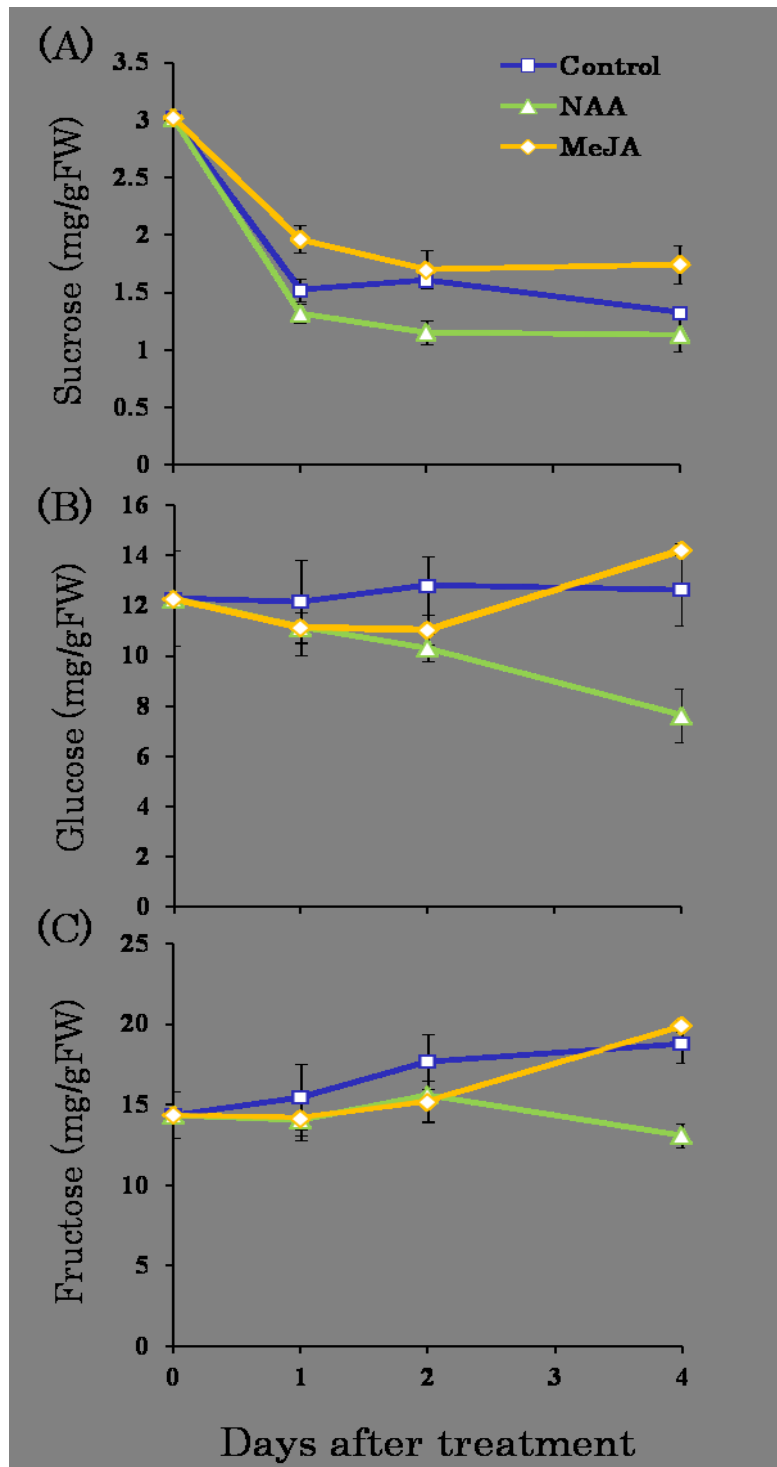




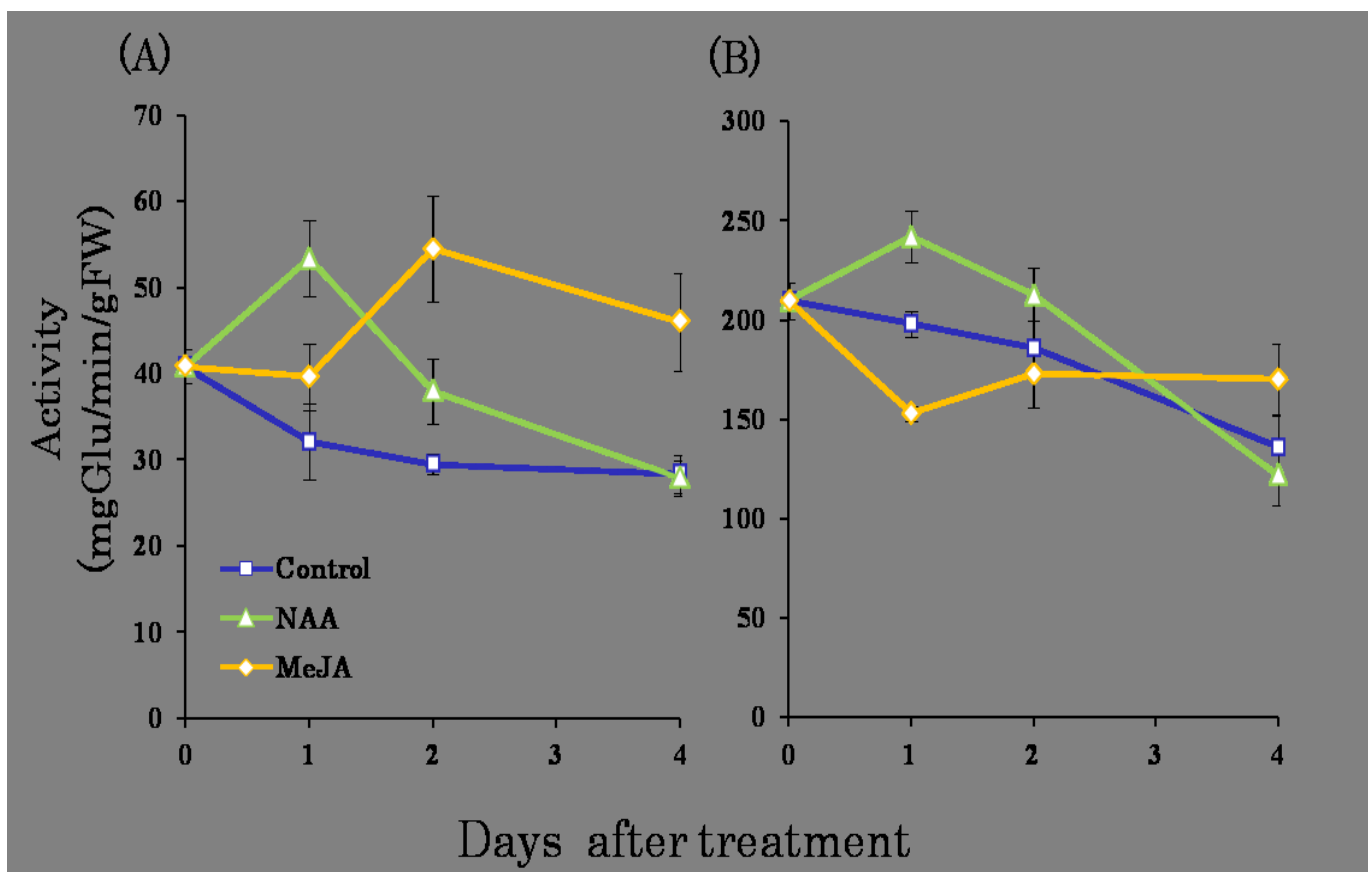
**Fig. 4.** Activities of invertases in the petals during flower opening. Cell wall invertase (A) and vacuolar invertase (B) activities in petals of attached flower (open square), cut flower harvested at MB (open triangle), and cut flower harvested at TB (open diamond) were measured. Values are means of 3 experiments  $\pm$ SE.



**Fig. 5.** Effects of plant growth regulators on petal fresh weight during flower opening. (A), Pattern of flower opening in each treatment. (B), Changes of petal fresh weight during treatments (Control; open square, NAA; open triangle, MeJA; open diamond). Values are means of 9 or 10 experiments  $\pm$ SE.

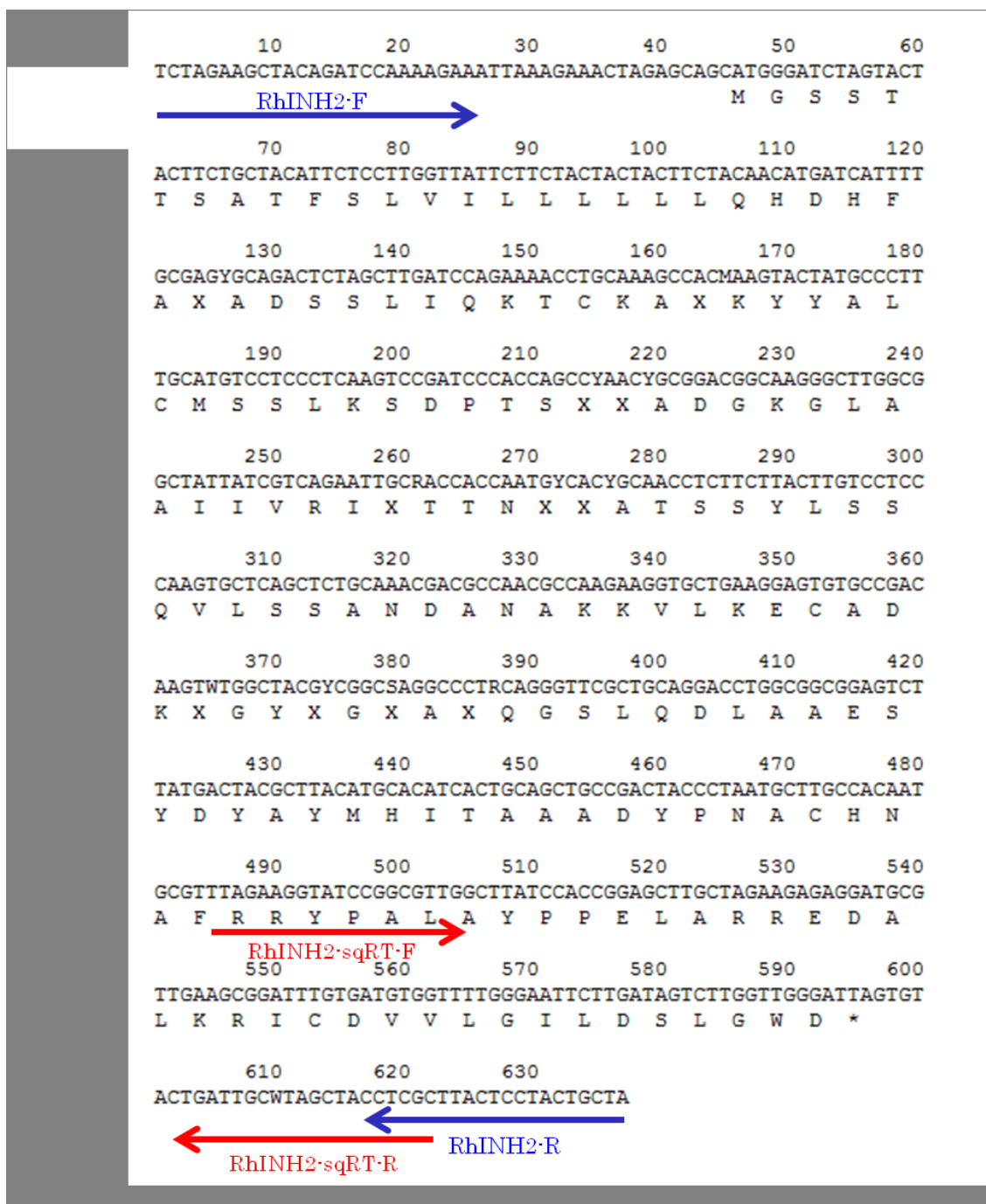


**Fig. 6.** Soluble carbohydrates in petals during flower opening in each treatment. Sucrose (A), glucose (B), and fructose (C) in petals of control cut flower (open square), cut flower treated with NAA (open triangle), and cut flower treated with MeJA (open diamond) were measured. Values are means of 3 experiments  $\pm$ SE.

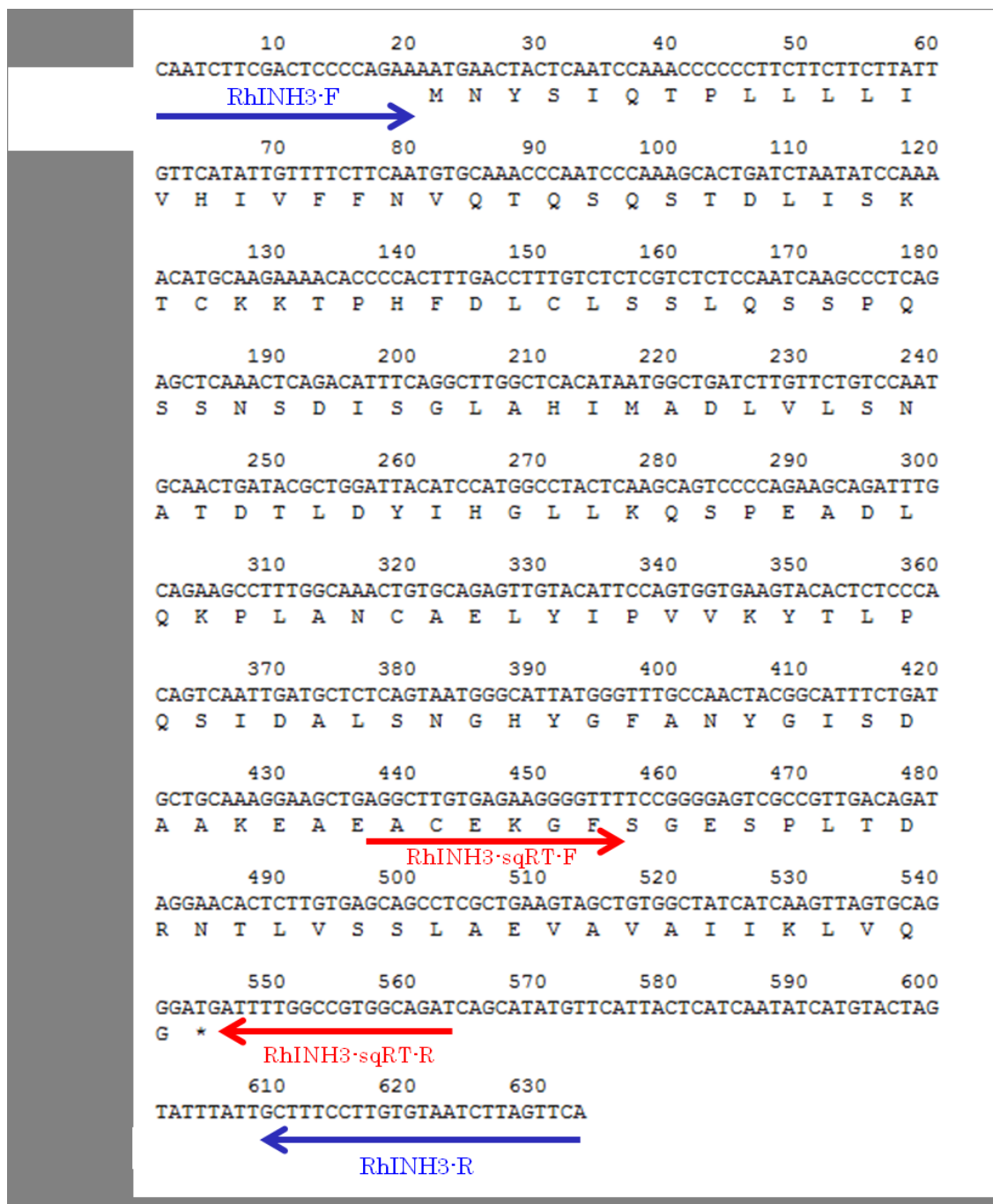


**Fig. 7.** Activities of invertase in petals during flower opening. Cell wall invertase (A) and vacuolar invertase (B) activities in petals of control cut flower (open square), cut flower treated with NAA (open triangle), and cut flower treated with MeJA (open diamond) were measured. Values are means of 3 experiments  $\pm$ SE.





**Fig. 9.** The nucleotide of *RhINH2* cDNA and deduced amino acid sequences. Deduced amino acids are shown in the one letter code. Arrows indicate gene-specific primer positions for cDNA cloning and sqRT-PCR.

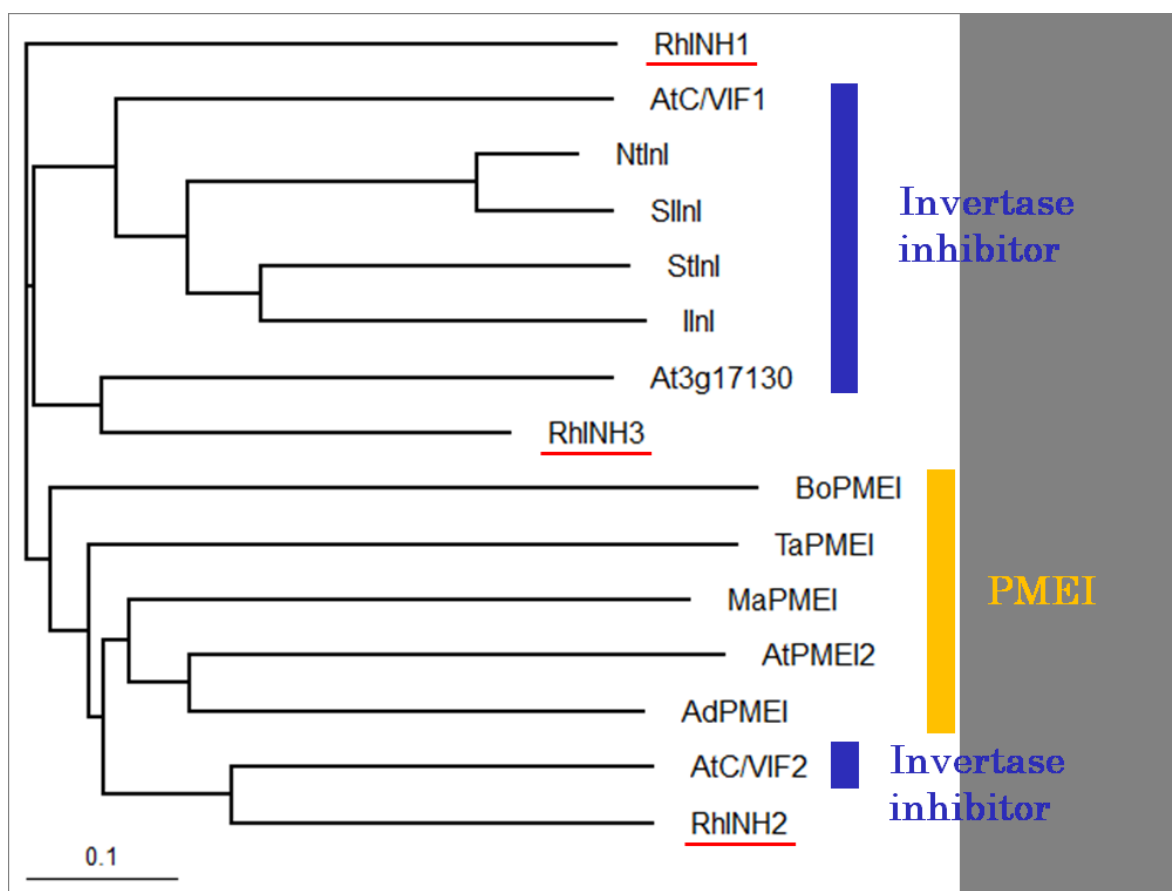


**Fig. 10.** The nucleotide of *RhINH3* cDNA and deduced amino acid sequences. Deduced amino acids are shown in the one letter code. Arrows indicate gene-specific primer positions for cDNA cloning and sqRT-PCR.

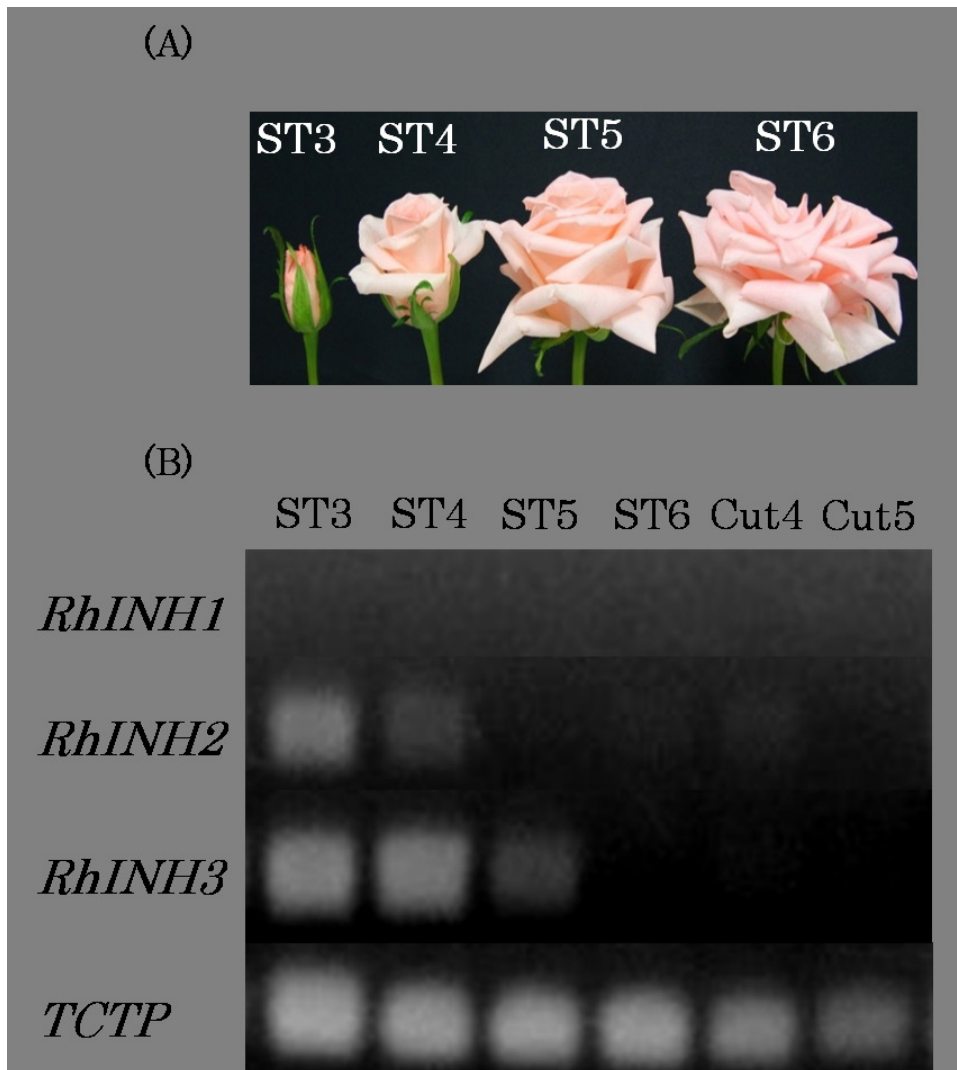
RhINH1	1	--MKIISISLPLLLTIFIIQNVFLPISHCRADLIDQTCCKQTPNYNLCVSSSLKSNPRSSAAD	58
RhINH2	1	MGSSTTSATFSLVILLLLLQHDHFASADSSLIQKTCCKATKYALCMSSSLKSDPTSLTAD	60
RhINH3	1	--MNYSIQTPLLLLIVHIVFVFNVTQSQSTDLISKTCCKT PHFDLCLSSLQSSPQSSNSD	58
AtC/VIF1	1	-----MMKMMKVMLIVMMMMVMMVSEGSII EPTCKETPDFNLCVSLNSDPRGSSAD	54
AtC/VIF2	1	-MMASSLIFLLLVTLTFSASTLISAKSNNTTIIESTCKTTNYYKFCVSALKSDPRSPAD	59
At3g17130	1	MMKRSSTVTSLPCLSLFLLLLLPSVQSSDDLIDKICQATPFCDLCEASLRPFSP-SD	59
AtPMEI1	1	--MAANLRNNAFLSSLMFLLLI GSSYAITSEMSTICDKT LNP SFCLKFLNT--KFASPN	56
AtPMEI2	1	--MAAYLTNRVLMSSLMFFVMTGS-LNAQVADIKAICGKAKNQSFCTSYMKSNPKTSGAD	57
RhINH1	59	VKGLAII MVEVVKSKANDTLNKIWAELLRHEDPVIRNCYDHYGYMVGAFIPDI YGDLTSR	118
RhINH2	61	GKGLAAIIVRIATTNATATSSYLSSQVLSSANDANAKKVLKECADKY-GYAGQALQGS LQ	119
RhINH3	59	ISGLAHIMADLVLSNATDTLDYIHG-LLKQSP EADLQKPLANCAELYIPVVKYTL P QSID	117
AtC/VIF1	55	TSGLALILIDKIKGLATKTLNEING-LYKKRPE--LKRALDECSRRYKTI LNADVPEAIE	111
AtC/VIF2	60	TKGLASIMVGVGMTNATSTANYIAGNLSATVKDTVLKVKVLDQCSEKY-ALAADSLRLTIQ	118
At3g17130	60	PKSLGAAMASVVLGNMTDTLGYIQS-LI KHAHDPAAERALAQCAELYRPFVVKFNIPQAME	118
AtPMEI1	57	LQALAKTTL DSTQARATQTLKKLQS-II DGGVDPRSKLAYRSCVDEYESAIG-NLEEA FE	114
AtPMEI2	58	LQTLANITFGSAQTSASEGFRKIQS-LVKTATNPTMKKAYTSCVQHYKSAIS-SLNDAKQ	115
RhINH1	119	GLGGRFVRYNPAQAERRLHNDIILRV DHCQNGFGQRRSPFAKENKATREAAVVAAAIVW	178
RhINH2	120	DLAESYDYAYMHITAAADYPNACHNAFRYPALAYPPELARREDALKRICDVVLGLD S	179
RhINH3	118	ALSNGHYGFANYGISDAAKEAEACEKGF S-----GESPLTDRNTLVSSLAEVAVAI I K	170
AtC/VIF1	112	AISKGVPKFGEDGVI DAGVEASVCQGGFNGSSPLTSLTKSMQKISNVTRAI FYSNSIVKE	171
AtC/VIF2	119	DLDEAYDYASHMVLAAQDYPNVCRNIFRRVKGLAYPVEIRREASLRRICGVVSGI LDR	178
At3g17130	119	AMQGGKFGFAIYVLGDAEKQTDSCQKGINAGADDESSVAVTARNKLVKNLCDVAISVLK	178
AtPMEI1	115	HLASGDGMGMNKVSAALD GADTCLDDVKKRLRSVDSVVNNSKTIKNLCGIALVINSMLP	174
AtPMEI2	116	SLASGDGKGLNIKVSAAMEGPSTCEQDMADFK-VDP SAVKNSGDFQNICGIVLVI SNMM-	173
RhINH1	179	ILI-----	181
RhINH2	180	LGWD-----	183
RhINH3	171	-LVQG-----	174
AtC/VIF1	172	EACGSSWPSLALNIDSKACVVSLQNIQFNRGRTCW	206
AtC/VIF2	179	LVE-----	181
At3g17130	179	SLMNGL-----	184
AtPMEI1	175	RN-----	176
AtPMEI2	173	-----	173

**Fig. 11.** Comparison of deduced amino acid sequences of rose invertase inhibitor like genes (*RhINH1*, *RhINH2*, *RhINH3*), invertase inhibitor (AtC/VIF1; At1g47960, AtC/VIF2; At5g64620, At3g17130) and PMEI (AtPMEI1; At1g48020, AtPMEI2; At3g17220) from *A. thaliana*. Identical amino acid residues are represented as white letters on black. A triangle (▼) indicates the Cys residue conserved between invertase inhibitor and PMEI.





**Fig. 12.** Phylogram of functionally characterized members of invertase inhibitors and PMEIs including the putative invertase inhibitors from rose (RhINH1, RhINH2, RhINH3). Invertase inhibitors from *N. tabacum* (spO49908), *S. lycopersicum* (spO82001), *I. batatas* (spQ8LJU6), *S. tuberosum* (ACO35698) and *A. thaliana* (At1g47960, At5g64620, At3g17130) and PMEIs from *M. acuminata* (ABC41689), *T. aestivum* (ACI01434), *B. oleracea* (AAZ20131), *A. deliciosa* (BAC54964), *A. deliciosa* (BAC54965), *A. thaliana* (At1g48020, At3g17220) were taken to construct phylogenetic tree. Phylogenetic analyses were conducted by ClustalW and TreeView (1.6.6) programs.



**Fig. 13.** Rose flower stage. (A) Flower stage of *Rosa hybrida* 'FEbesa'. Stage 3 (ST3), the expanded bud with the pinkish petal; Stage 4 (ST4), the opening flower with the completely separated sepal; Stage 5 (ST5), the opened flower with recurved outer petal; Stage 6 (ST6), fully opened flower with anther appearance. (B) Expression analysis of invertase inhibitor like genes (*RhINH1*, *RhINH2*, *RhINH3*) during flower opening in attached and cut rose. Cut 4, cut flower at Stage 4; Cut 5, cut flower at Stage 5. *TCTP* was used as the internal control.

## 要約

切り花は樹上で開花させた花に比べ花弁が小さくなり、また鑑賞期間も短くなることが知られている。開花における糖の役割を調べるため、バラの開花過程における花弁中の糖含量と糖代謝酵素であるインベルターゼの活性を切り花と樹上の花とで比較した。その結果、切り花では樹上で開花させた花よりも花弁新鮮重、花弁中の糖含量、そして花弁中の酸性インベルターゼ活性が低くなり、切り花における花弁成長の悪化とインベルターゼ活性の間には相関関係が見られた。樹上では花弁中のインベルターゼ活性が上昇しヘキソースの蓄積を引き起こし、浸透圧上昇による吸水を促していると思われる。

次に、インベルターゼ活性の制御により花弁の肥大成長を調節して鑑賞期間を延長させることができると考え、植物ホルモンなどの外的処理による切り花の花弁成長の制御を試みた。その結果、ナフチル酢酸 (NAA) を処理した区では開花が促進され、メチルジャスモン酸 (MeJA) を処理した区では開花が遅延した。またこの時、NAA 処理区では花弁中のインベルターゼ活性の減少が早まり、MeJA 処理区では処理後日数を経ても活性が高く保たれていた。従って、植物ホルモンによる開花や花弁成長の変化は、花弁中のインベルターゼ活性の変化と関係することが示された。また、このとき MeJA 処理による芳香成分の放出量の減少は見られなかった。そのため、MeJA は切り花品質保持剤としての利用が可能であると思われる。

また、このインベルターゼ活性を制御する物質としてインベルターゼインヒビターの存在がトマトやジャガイモなどの作物で報告されている。そこでバラ花弁からインベルターゼインヒビター様遺伝子 (*RhINH1*、*RhINH2*、*RhINH3*) を単離し、バラの開花過程における発現量の変化を調べた。その結果、*RhINH2* と *RhINH3* は開花に伴い発現が減少する傾向が見られた。バラ花弁中のインベルターゼ活性は開花に伴い上昇する

傾向を見せており、それぞれの遺伝子はこの活性の上昇に関与している可能性が示された。