

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07292

研究課題名(和文)キュウリの性分化時の雄しべ原基の退化に関する細胞周期関連遺伝子群の網羅的解析

研究課題名(英文) Exhaustive analysis of cell cycle-related genes involving arrest of stamen primordia development of female flowers in cucumber sex expression

研究代表者

山崎 聖司 (Yamasaki, Seiji)

福岡教育大学・教育学部・教授

研究者番号：30363295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリゲノムDBからCyclin様遺伝子5種類とCDKs様遺伝子2種類を見出した。Cyclin様遺伝子2つの発現は雄花に比べて雌花の蕾で強く、特にACASPで強かった。他の5種類の遺伝子については、雌花の蕾において、雌しべに比べてACASPで強い発現を示した。全ての遺伝子の発現量はEthephon処理後6時間以内に2-5倍に増加した。以上の結果から、7種類の細胞周期関連遺伝子は雌花において、雄しべの退化に関与する可能性が示唆された。キュウリの雌花において、ACASPでは細胞分裂活性が高いにも関わらず、細胞の成長が抑制され、結果的に退化するメカニズムを今後明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：We found five cyclin-related genes and two cyclin-dependent kinases (CDKs) genes from data base of cucumber (*Cucumis sativus* L.) genome. Two cyclin-related genes were expressed specifically in the area containing arrested stamen primordia (ACASP) in female flower buds, but was barely detected in male flower buds in monoecious cucumber. Expression of the other five genes was detected in the ACASP but not in pistils of female flower buds. Expression of all seven genes was elevated 2-5 times within 6 hours transiently following the application of ethephon, an ethylene-releasing agent, to the shoot apices. These results suggest that these seven cell cycle-related genes play a role in the arrest of stamens of female flowers in monoecious cucumber. The mechanism that cell growth is restrained and finally cells die although cell division rates remained high in ACASP of female flowers should be clarified.

研究分野：農学・園芸科学

キーワード：キュウリ 性分化 細胞周期関連遺伝子 サイクリン サイクリン依存性キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 安全で効率的な農業の確立のためには、低農薬で多収となる「雑種強勢」の利用が有効である。雑種強勢は両親が遠縁の時に顕著であるため、農作物の品種開発に雑種強勢を利用するには、自殖を避け、他殖を促進させる必要がある。そのためには、植物の生殖器官である雄しべと雌しべの発育を人為的に制御する技術の確立が不可欠である。このような背景から、本研究では、雄しべと雌しべの発育を分子レベルで人為的に制御する技術開発を目標として、植物の性分化の分子メカニズムを解明する。そのために、最も多様な性表現型を示す品種が存在するキュウリ (*Cucumis sativus* L.) を実験材料に用いて研究を行う。

(2) キュウリの性表現には二つのユニークな特徴がある。一つ目は、*F* および *M* 遺伝子によって遺伝的に制御されており、その優劣性によって雌性型 (*M-F-*)、混性型 (*M-ff*)、両性型 (*mmF-*)、雄性両性同株型 (*mmff*) の性表現型を示す 4 品種が生み出される。二つ目は、植物ホルモンの一つである  $C_2H_4$  (エチレン) によって変化することである。つまり、エチレンは雌花の出現を促進し、逆に、エチレン阻害剤は雄花の出現を促進する。このように、キュウリの性表現は、二つの遺伝子とエチレンによって制御されることは古くから知られているが、そのメカニズムの全貌は未解明である。

## 2. 研究の目的

(1) 雌雄同株植物であるキュウリ (混性型) の雄花または雌花への分化は、がく、花弁、雄しべ、雌しべの各原基を形成する両性花的な発育段階の花芽を経た後、雄しべ原基または雌しべ原基のいずれか一方の原基の選択的な発育抑制によって起こる。そのため、雌花には雄しべ原基の痕跡が、また、雄花には雌しべ原基の痕跡が認められる。従って、キュウリの性分化の本質は、生殖器官原基の選択的な発育抑制である。

(2) これまでにキュウリの雌花において、雄しべ原基はプログラム細胞死 (PCD) により退化することが報告されている (Hao et al. 2003)。また、応募者は、これまでにキュウリの雌花の雄しべの退化領域 (Area containing arrested stamen primordia; ACASP) において、PCD に深く関わるマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) をコードする遺伝子である *Cs1-MMP* の発現が強いことを明らかにしている (Yamasaki and Manabe 2009)。このように、キュウリ雌花の雄しべ原基は PCD により

退化すると考えられる。

(3) 一般的に、植物は、細胞分裂に引き続き、細胞伸長、器官分化により成長していく。そのため、PCD により退化する雌花の雄しべ原基でも、最初は、細胞分裂により細胞を生じているはずである。そこで、キュウリの性分化における細胞分裂活性の関与を明らかにすることを目的として、キュウリにおいて細胞周期関連遺伝子群を探索し、キュウリの茎頂と、雄花および雌花の蕾において、細胞周期関連遺伝子群の発現解析を行う。また、雌花の雄しべ原基の痕跡における表皮細胞数の解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) キュウリの性分化における細胞周期関連遺伝子群の関与を明らかにするために、キュウリゲノムのデータベース (DB) から、サイクリン (Cyclin) およびサイクリン依存性キナーゼ (CDKs) をコードする遺伝子群の探索を行ない、得られた候補遺伝子群において、プライマーの設計を行った。

(2) 植物材料には、混性型キュウリ (品種 山東四葉 2 号、中原採種場、福岡) を使用した。まず、10 分間吸水させた種子を水で湿らせた紙の上に並べた後、シャーレに入れてアルミホイルで遮光した。その後、シャーレを人工気象器 (LH-200RDS、日本医化器械製作所、大阪) に入れて 26°C で発芽させた。2 日後、発芽した種子を、くみあい園芸培土 (0.4g N, 1.9g P, 0.6g K/kg, 清新産業、北九州) とパーミキュライトを等量混ぜた土を入れたプラスチックポット (φ8cm) に移し替えた。このプラスチックポットを大学構内にあるガラス温室内に静置し、自然光の下でキュウリ個体の第四葉の葉身が 2.0cm 展開する時期 (第四葉展開期) まで育成した後、植物体を素焼きの鉢 (φ25cm) に移し替えて、さらに大きく育成し (1~2 ヶ月)、花芽を分化させた。

(3) 第四葉展開期の植物体の茎頂に対して、エチレン発生剤である Ethephon 処理を行い、0.5、6、24 時間後にサンプリングを行った。その後、すぐに -80°C のディープフリーザー (マイバイオ VT-78、日本フリーザー、東京) に保存した。

(4) 雄花の蕾については、蕾長に応じてステージ I (3.0~6.9mm)、ステージ II (7.0~11.9mm)、ステージ III (12mm~) に、雌花の蕾については、蕾長に応じてステージ I (5.0~15.9mm)、ステージ II (16.0~30.9mm)、ス

テージ III (31mm~) に分けてサンプリングを行った。

(5) (4) のサンプルについて、実体顕微鏡 (SPZT-50FTM、カートン光学、東京) の下で、片刃のカミソリとピンセットを用いて、雄花の蕾では「がく、花弁、雄しべ、雌しべの退化領域 (Area containing arrested pistil primordia; ACAPP)」に、雌花の蕾では「がく、花弁、雄しべの退化領域 (Area containing arrested stamen primordia; ACASP)、雌しべ」に切り分けた後、すぐに $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーに保存した。

(6) 上記のサンプルから、RNA 抽出試薬 (Tri Reagent、コスモ・バイオ、東京) を用いて Total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、前述の候補遺伝子群のプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、クローニングを行い、塩基配列の決定を行った。また、遺伝子の発現解析を行った (半定量的 RT-PCR 法)。

(7) 雌花の雄しべ原基の痕跡における表皮細胞数の解析を行うために、実体顕微鏡の下で、片刃のカミソリとピンセットを用いて、雄花の蕾 (ステージ I) から花弁と雄しべを、また、雌花の蕾 (ステージ I) から花弁と ACASP を切り分けた。これらのサンプルを 50% 漂白剤に 30 分間浸して脱色した。その後、サンプルを蒸留水でよく洗い、実体顕微鏡および光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W、ニコン、東京) を用いて細胞の観察を行った。表皮細胞の面積の算出には、フォトメジャーソフト (ケニス、大阪) を使用した ( $n=30$ )。そして、単位面積 ( $1.0\text{mm}^2$ ) あたりの表皮細胞数は、表皮細胞 30 個の面積の平均から算出した。これらの解析は、雄花の蕾 (ステージ I) 3 個と、雌花の蕾 (ステージ I) 3 個について行った。

#### 4. 研究成果

(1) キュウリゲノム DB を探索した結果、Cyclin 様遺伝子 5 種類と、CDKs 様遺伝子 2 種類を見出すことができた。

(2) 7 種類の細胞周期関連遺伝子の中で、Cyclin 様遺伝子 2 つの発現は雄花に比べて雌花の蕾で強く、かつ、雌花の蕾 (ステージ I) の ACASP で強かった。また、他の 5 種類の遺伝子については、雌花の蕾 (ステージ I) において、雌しべに比べて ACASP で強い発現を示した。さらに、7 種類の細胞周期関連遺伝子の発現量は、Ethepon 処理後 6 時間以内に 2-5 倍に増加した。以上の結果から、これら 7 種類の細胞周期関連遺伝子は雌花にお

いて、雄しべの退化に関与する可能性が示唆された。

(3) 雄花と雌花の蕾の各器官における表皮細胞数の解析を行った結果、雄花の蕾 (ステージ I) では、花弁と雄しべにおける単位面積 ( $1.0\text{mm}^2$ ) あたりの表皮細胞数は、500-600 個で同程度であり、有意差は認められなかった。一方、雌花の蕾 (ステージ I) では、花弁における単位面積 ( $1.0\text{mm}^2$ ) あたりの表皮細胞数が約 900 個であったのに対して、ACASP における単位面積 ( $1.0\text{mm}^2$ ) あたりの表皮細胞数は約 3900 個であり、花弁に比べて ACASP における表皮細胞数は、有意に多かった ( $P<0.01$ )。以上の結果から、ACASP では細胞分裂活性は高いが、細胞の成長が抑制されている可能性が示された。

(4) 以上のことから、キュウリの雌花において、ACASP では細胞分裂活性が高いにも関わらず、細胞の成長が抑制され、結果的に退化するメカニズムについて今後明らかにする必要がある。

#### 〔引用文献〕

Hao, Y.J., Wang, D.H., Peng, Y.B., Bai, S.L., Xu, L.Y., Li, Y.Q., Xu, Z.H., Bai, S.N. (2003) *Planta* **217**, 888-895.

Yamasaki, S., Manabe, K. (2009) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **78**, 195-199.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 山口流正、山中早織、山崎聖司、キュウリの雄花・雌花の蕾における細胞死関連遺伝子の発現解析、日本生物環境工学会 2017 年松山大会、2017 年 8 月 30 日-9 月 4 日、愛媛大学 樽味キャンパス

② 山口流正、山中早織、山崎聖司、キュウリの性分化における細胞周期関連遺伝子群の発現解析、日本生物環境工学会 2016 年金沢大会、2016 年 9 月 12-15 日、金沢工業大学 野々市キャンパス

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 聖司 (YAMASAKI, Seiji)  
福岡教育大学・教育学部・教授  
研究者番号：30363295

(2)研究協力者

山口 流正 (YAMAKUCHI, Ryusei)