

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03768

研究課題名(和文) ユウガオ花粉の受粉によるスイカ単為結実誘導機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of parthenocarpic fruit induction in watermelon by pollination with bottle gourd pollen

研究代表者

杉山 慶太 (Sugiyama, Keita)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・領域長

研究者番号：30414767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユウガオ花粉の受粉によってスイカが単為結実する現象の解明を行った。ユウガオの花粉はIAA、イソペンテニルアデニン含量が多かった。ユウガオ受粉後のスイカ子房内のABAの変動はスイカ受粉処理と類似していた。また、プロテオーム解析からオーキシン応答に関わる転写抑制因子、転写因子が検出され、単為結実との関連が考えられた。RNAseqでは、受粉により誘導される遺伝子発現パターンはスイカとユウガオで類似しており、受粉48時間以降に単為結実に関わる遺伝子発現変動があることが示唆された。ウリ科植物において、異属の受粉で単為結実を誘導する様々な組合せが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在における単為結実に関する研究は受粉を介しない自動単為結実による現象であり、異属花粉の受粉による単為結実現象を物質レベルで解明する研究は皆無である。本単為結実のメカニズムを解明することは、単為結実の現象全体を明らかにする上で極めて重要である。本研究では異属花粉の受粉後の単為結実に関連するホルモン、タンパク質、遺伝子発現について示すことができた。さらなる解明により、果実の生産に効果的な着果剤の開発や廃棄物の軽減につながる「種なし果実」生産及び単為結実品種の作出が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We studied the phenomenon of parthenocarpy of watermelon induced by pollinating with bottle gourd pollen. Bottle gourd pollen had high contents of IAA and isopentenyl adenine. The change in ABA in watermelon ovary after pollination with bottle gourd pollen were similar to that of pollination of watermelon pollen. In addition, auxin response factor (ARF) and auxin/indole 3-acetic acid (AUX/IAA) were detected by proteomic analysis, and it was considered to be related to parthenocarpy. The gene expression patterns in the ovary of watermelon induced by pollination of watermelon pollen and bottle gourd pollen were similar, it was shown that gene expression changes related to parthenocarpy occurred 48 hours after pollination. In the family Cucurbitaceae, we revealed that there were many combinations of parthenocarpy induced by pollinating using another genus pollen.

研究分野：野菜育種

キーワード：単為結実 スイカ ユウガオ 花粉 ウリ科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の花粉をスイカ (*Citrullus lanatus*) に受粉することによって、スイカ果実が単為結実する現象を発見した。この場合、スイカはユウガオ以外のウリ科花粉の受粉によって単為結実を生じない。また、ユウガオの花粉管はスイカ雌蕊の胚珠に到達しないことから、偽受精による現象ではない。さらに、ユウガオ花粉はスイカ以外に単為結実を引き起こすことはなく、ユウガオ花粉とスイカの雌蕊には単為結実を誘導する特異的な応答機構が存在すると推測された。異種(属)花粉による単為結実には花粉管の伸長による刺激、あるいはホルモンの分泌が引き金となると考えられてきた。そこで、既知の植物ホルモン剤による適用を試したがスイカ果実は十分に肥大しなかった。このことから、ユウガオ花粉からの既知のホルモンが着果、肥大を促進させている可能性は低く、ユウガオ花粉にあるこれまで知られていないシグナル物質(ペプチドホルモン等)が単為結実を誘導するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、スイカの単為結実の引き金となっているユウガオ花粉からの物質を検索し、その物質に反応するスイカ雌蕊内の受容物質及び関連遺伝子を明らかにする。ユウガオ花粉の受粉によってスイカは単為結実が誘導され、ユウガオ花粉はスイカ花粉による受粉と同様なサイズまで果実を肥大させるが、他のウリ科植物の花粉ではスイカは単為結実しない。ユウガオの花粉の中には、これまで知られていない単為結実を誘導するシグナル物質(ペプチドホルモン等)が想定され、スイカ雌蕊内の受容体と結合することにより結実と果実肥大を促す植物ホルモンを働かせていると推測した。そこで、単為結実を誘導する花粉からの物質及び受粉後の結実・肥大に関連すると推定されるホルモン、タンパク質、遺伝子を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 花粉管の動態と植物ホルモン解析

スイカ雌蕊とユウガオ花粉の組み合わせに限定してみられる異属花粉による単為結実の発生メカニズムを解明するため、通常の結実を誘導するスイカ、単為結実を誘導するユウガオ、結実を誘導しないニガウリなどのスイカへの受粉後の花粉管の動態および子房の細胞を観察した。また、植物ホルモンの関与を明らかにするために、スイカ、ユウガオ、ニガウリなどの花粉のホルモン含量およびこれら作物のスイカへの受粉後の子房内の植物ホルモン変動について解析を行った。

(2) 雌蕊内のタンパク質解析

スイカ、ユウガオ及びニガウリ等の受粉後および無受粉のスイカ雌蕊をサンプリングし、それぞれの雌蕊内におけるタンパク質の網羅的な解析を行い、単為結実で特異的に発現するタンパク質を検索した。

(3) 雌蕊内の単為結実誘導遺伝子の解析

無受粉のスイカ雌蕊およびスイカ、ユウガオ、ニガウリの花粉で受粉した雌蕊の遺伝子発現解析では、RNAseq によって転写産物の網羅的解析を行った。単為結実に関与すると思われる候補遺伝子が得られた場合には、qRT-PCR によって実際の発現量に違いがあるのかを確認する。

(4) 異属間受粉による単為結実の誘導組合せ

これまでユウガオ花粉はスイカ以外に単為結実を引き起こすことはなく、スイカとユウガオ間の特異的な反応と思われた。しかし、ユウガオ花粉がスイカ以外の作物も単為結実させる現象が観察されたことから、様々なウリ科植物を用いて属間での受粉を行い単為結実を誘導する組合せを調査した。

4. 研究成果

(1) 花粉管の動態と植物ホルモン解析

スイカまたはユウガオ花粉受粉後のスイカ子房の縦径及び横径は、受粉 4 日以降に無受粉及びニガウリ花粉に比べ有意に大きくなった。しかし、ユウガオ花粉を受粉したスイカ子房の横径の増加程度はスイカ花粉の場合よりも小さかった。細胞径を観察すると、ユウガオ花粉はスイカ花粉に比べ胎座組織の細胞肥大の遅れが検出された。スイカ子房への花粉管進入率を見たところ、全ての受粉処理区で子房への花粉管伸長が確認できたが、スイカ花粉区で最も早く、それに比べユウガオ花粉区とニガウリ花粉区では遅延した(図 1)。また、胚珠への花粉管の伸長は受粉後 48 時間以降のスイカ花粉区でのみ見られた(図 2)。このことから、ユウガオ花粉やニガウリ花粉では、スイカ雌蕊との自家不和合性を示したことにより花粉管伸長が停止したと考えられ、異属花粉の受粉では受精が成立しなかったと考えられた。また、花粉管伸長が停止したにも関わらず結実が誘導されたユウガオ花粉では、ニガウリ花粉とは異なる特異的な果実肥大メカニズムを持つと予想された。

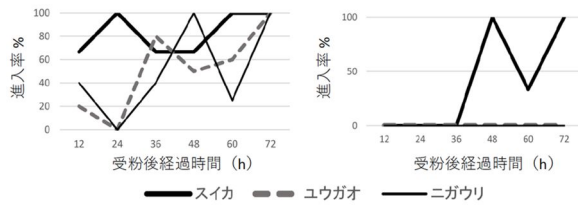


図1 受粉花粉別の花粉管の子房(左)及び胚珠(右)内部への進入率

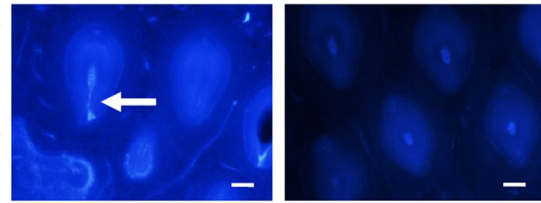


図2 受粉後48時間のスイカ子房内の花粉管の蛍光観察画像
スイカ花粉区(左)、ユウガオ花粉区(右)
矢印(→)は花粉管の蛍光の位置を示す。スケールバーは200 μ mを示す。

ユウガオ花粉の IAA はスイカや他の作物より多かったが、IAA-Asp はスイカよりは低く、ニガウリと同程度であった(表1)。ジベレリンはスイカ、ヘチマと同程度であった。サイトカニンでは、isopentenyladenine (IP) の量が多く、特に iPR、iPRPs が多いのが特徴であった。ユウガオ花粉の ABA は他種の花粉の中で最も低量であった。オーキシンに関しては、プロテオーム解析においてユウガオの花粉にニガウリ花粉にはない IAA-アミノ酸複合体を加水分解する IAA-amino acid hydrolase ILR1 がみられ、花粉及び子房内の IAA 増加に寄与している可能性があった。

スイカ子房内の植物ホルモン含量の変化についてみると、オーキシンは全ての受粉区でほとんどみられなかったが、夾雑物による影響でマスキングされた可能性があった。ABA は、果実が肥大しない無受粉区とニガウリ受粉区、果実肥大が生じるスイカ受粉区とユウガオ受粉区で類似の傾向が認められた(図3)。すなわち、無受粉区とニガウリ受粉区では、24 時間、60 時間後にピークがみられ、スイカ受粉区とユウガオ受粉区では、受粉後 60 時間までは低レベルで推移し、72 時間後に急激な増加が認められた。このことから、ユウガオ花粉の受粉後の初期における ABA 量の抑制が、その後の果実の肥大に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

植物ホルモン	スイカ	ユウガオ	ニガウリ	トウガン	ヘチマ
オーキシン量	>24500	12000.0	9849.2	6740.2	2216.5
IAA	1440.2	3147.1	641.7	2140.9	2216.5
IAA-Asp	23116**	8853.0	9207.5	4599.3	IS.N.D.
ジベレリン量	74.0	48.2	452.5	299.0	56.3
サイトカニン量	352.2	187.4	37.8	93.6	128.8
trans-zeatin	265.5	54.4	2.9	8.5	71.2
cis-zeatin	55.9	44.4	12.4	77.2	37.2
isopentenyladenine	22.0	85.3	22.0	7.5	15.0
ABA	638.8	52.4	932.6	404.8	111.3
JA	480.6	1348.2	7605.7	1231.8	282.2

**検量線の上限を超えたサンプルを含む。IS.N.D.内部標準が定量下限以下。

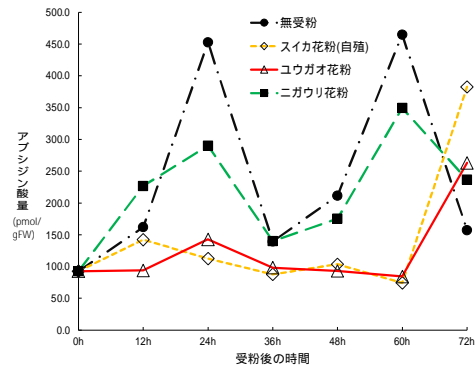


図3 受粉後のスイカ子房内におけるABA含量の変化

(2) 雌薬内のタンパク質解析

スイカ子房のコピキチン化タンパク質の解析では、ニガウリ花粉受粉の子房よりもユウガオ花粉を受粉した子房において、オーキシン応答に関わる転写抑制因子(AUX/IAA)が高いスペクトルで検出された。また、転写因子 ARF も低レベルあるが検出され、これらがユウガオ花粉による単為結実誘導の特異的なタンパク質である可能性が考えられた。リン酸化タンパク質の解析では、ニガウリ花粉の受粉ではみられなかった 14-3-3-like protein がユウガオ花粉の受粉で検出され、オーキシン応答による細胞壁弛緩、細胞伸長への関与も考えられた。ブラシノステロイド関連としては、Serine/threonine-protein kinase BSK、Serine/threonine-protein phosphatase BSL、BES1/BZR1 homolog protein、エチレン関連では ethylene-insensitive protein のリン酸化がみられ、これらホルモンの情報伝達系の活性化が生じていると思われた。ABA に関しては、ユウガオ受粉子房内のリン酸化タンパク質として NAC domain-containing protein 2、SNW/SKI-interacting protein が検出されたが、ABA の活性化との関連は不明であった。

(3) 雌薬内の単為結実誘導遺伝子の解析

スイカ、ユウガオまたはニガウリ花粉を受粉または無受粉の子房から RNA を抽出して転写産物の網羅的解析を行った。RNAseq を行って得られたリード配列はスイカゲノムで推定される 22567 遺伝子にマッピングし、サンプルごとに全遺伝子の発現量を算定した。各サンプルの全遺伝子発現量についてクラスター解析を行ったところ(図4)、無受粉区は、受粉後 24 時間では受粉区と同じクラスターに含まれたものの、それ以降は大きく異なるクラスターに分かれた。受粉後 36 時間では、スイカ区はユウガオおよびニガウリ区と分かれてクラスターを形成した。受粉後 48 時間では、スイカおよびユウガオの頂部サンプルは、基部のサンプルやニガウリ受粉区とは異なるクラスターを形成した。受粉後 72 時間では、スイカ花粉区は受粉後 96 時間のものと同じのクラスターに含まれたが、ユウガオ花粉区は無受粉区のクラスターに含まれた。これは、受

粉 72 時間目ではユウガオ区の子房は肥大するかどうか判別困難であり、最終的に肥大しない子房を採取してしまったためと考えられた。一方、肥大を確認して採取した受粉後 96 時間では、ユウガオ受粉区の小さい(肥大していない)サンプルは受粉後 48 時間のスイカ区と同じクラスターに、大きい(肥大している)サンプルは受粉後 96 時間のスイカ区と同じクラスターに分かれた。

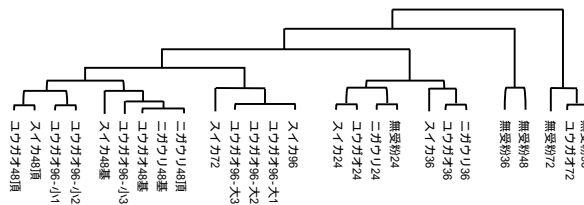


図 4 処理区におけるスイカ全遺伝子発現量のクラスター解析
植物名の横の数字は受粉後時間を示す。48時間後のサンプルは頂部と基部に分けて採取し、ユウガオ区の受粉後96時間では大きい子房と小さい子房を3個ずつ採取してRNAseqに用いた。

これらのことから、受粉 24 時間後では受粉刺激による遺伝子発現変動の影響はそれほど小さくなく、受粉 36 時間後になって受粉刺激による発現変動が大きくなると推察された。また、受粉後 48 時間になると、24 または 36 時間のものとは異なる遺伝子発現パターンとなるが、この時、スイカとユウガオ区では子房頂部と基部で異なる発現パターンを示し、ニガウリ区では頂部と基部における違いは生じていないと考えられた。また、受粉 48 時間以降、遺伝子発現パターンはさらに変化するが、ユウガオ花粉を受粉した場合、果実肥大に必要な遺伝子発現変動が受粉 48 時間以降に起こらないものでは果実肥大に至らず、スイカ区で起こるものと同様の発現パターンを誘導できた場合に果実肥大(単為結実)すると考えられた。

植物ホルモンに関わる遺伝子に注目すると、スイカとユウガオ区ではオーキシンとエチレンに関わる遺伝子について発現変動するものが多かった。また、ABA 合成遺伝子の低下がユウガオ区で特異的にみられた。植物ホルモンに関わる遺伝子発現変動は、qRT-PCR でも RNAseq と同様の傾向となることを確認できた。

(4) 異属間受粉による単為結実の誘導組合せ

スイカはユウガオ花粉の受粉で単為結実するが、試験で用いた他属の花粉では単為結実はみられなかった(図 5)。ユウガオはスイカ、トウガン、ヘビウリ、トカドヘチマの花粉でも単為結実し、トウガン、ヘビウリ、トカドヘチマも他属の花粉によっても単為結実した。ウリ科植物の属間での単為結実は、類縁に関係なく誘起されることが明らかとなった。花粉側からみると、いずれの植物も他の属を単為結実させた。花粉の単為結実の誘導に関する物質は異属でも類似であると考えられ、同じ花粉を用いても単為結実の誘導には子房親の属による違いが認められることから、花粉からのシグナル物質を受け取る子房側の応答機構の差異が関与している可能性が示唆された。

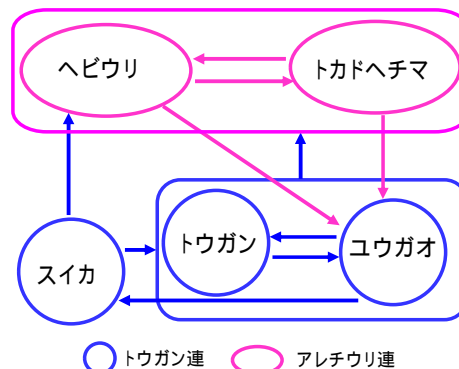


図 5 ウリ科の異属間受粉による単為結実の関係
矢印方向は花粉を受粉して単為結実した植物

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山慶太、小嶋美紀子、竹林裕美子、榊原均
2. 発表標題 ウリ科花粉および受粉後のスイカ子房内のホルモン解析
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山慶太、嘉見大助、村田奈芳、鈴鹿明広、志村華子、実山 豊、鈴木 卓
2. 発表標題 ウリ科作物の属間の受粉による単為結実誘導
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴鹿明広、志村華子、実山 豊、鈴木 卓、杉山慶太
2. 発表標題 異属花粉を受粉したスイカの子房肥大および花粉管伸長の特徴
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ウリ科作物の単為結実を誘起する属間交配組合せに関する考察
2. 発表標題 杉山慶太、嘉見大助、村田奈芳、鈴鹿明広、志村華子、実山 豊、鈴木
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴鹿明広、杉山慶太、長岡恒平、志村華子、実山 豊、藤野介延、鈴木 卓
2. 発表標題 ユウガオ花粉の受粉で誘起されるスイカ単為結実関連遺伝子のRNA-seq解析を用いた探索
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴鹿明広、杉山慶太、志村華子、実山 豊、鈴木 卓
2. 発表標題 スイカの単為結実に関するRNA-seqを用いた遺伝子発現プロファイリング
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志村 華子 (Shimura Hanako) (20507230)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	鈴木 卓 (Suzuki Takashi) (30196836)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	実山 豊 (Jitsuyama Yutaka) (90322841)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	