

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02974

研究課題名(和文)ウリ科の異属間単為結実に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms involved in intergeneric parthenocarpy in cucurbits

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：スイカの雌花にユウガオの花粉を受粉させると約50%の割合で単為結実が起こる。ユウガオ花粉によって特異的に生じるスイカ単為結実メカニズムの解明を目的として、RNA-seqを用いて単為結実に関わる遺伝子の網羅的探索を行った。経時的にサンプリングしたスイカ子房の遺伝子発現パターンから、特に、ブラシノステロイド情報伝達経路遺伝子の発現抑制とジベレリン合成遺伝子の促進が単為結実の進行に関わることが示唆され、ユウガオ花粉の受粉とブラシノステロイド合成阻害剤処理を併用することで単為結実を100%誘導できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウリ科では様々な異属の組み合わせで単為結実が誘導される場合があり、ユウガオ花粉はスイカ以外にも単為結実を誘導することが本研究で示された。ウリ科には独自の結実メカニズムがあると考えられ、今回のユウガオによるスイカ単為結実メカニズムの解明はスイカだけでなく他のウリ作物の種なし果生産にも応用できる知見となり得る。ブラシノステロイドは結実に促進的な作用の報告例はあるが、本研究で分かったような抑制的作用は知られていなかった。ユウガオ花粉による特異的な結実誘導メカニズムの解明はブラシノステロイドと他の植物ホルモンにおけるこれまで知られていないクロストークの存在を示す知見ともなり得る。

研究成果の概要(英文)：Seedless fruiting (parthenocarpy) of watermelon (*Citrullus lanatus*) is inducible at a rate of about 50% when the watermelon female flower is pollinated with the pollen of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*), and this parthenocarpy is specifically induced when pollinated with the pollen of bottle gourd and does not occur in pollination with other heterogeneous pollen in cucurbit plants. In this study, to elucidate the mechanism of passive parthenocarpy in watermelon, genes expressions involved in the parthenocarpy was comprehensively analyzed using RNA-seq. Gene expression patterns of watermelon in ovary tissues in time-course sampling suggested that downregulation of brassinosteroid signaling pathway genes and promotion of gibberellin synthesis genes were involved in the process of parthenocarpy. It was shown that parthenocarpy could be 100% induced by the combined use of pollination with bottle gourd pollen and treatment with brassinosteroid synthesis inhibitors.

研究分野：植物生理学、園芸学、

キーワード：スイカ ユウガオ 単為結実

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的な果実形成では、受粉および受精が成立した後、胚珠から種子が発達し、それに伴って子房やその周辺組織の細胞数の増加や肥大が起こって果実が発達していく。一方、受精を必要とせずに果実発達が起こる現象を単為結実といい、種なし果実が作られる。単為結実性は農作物において非常に利用価値が高い性質であり、様々な野菜や果樹で単為結実性の導入は望まれている。ウリ科植物は、スイカ、キュウリ、メロン、カボチャなど多くの主要な園芸作物を含む。キュウリでは受粉なしで単為結実する品種(自動的単為結実性)が見出され実用化されているが、他のウリ科作物で単為結実性が実用利用されているものは少ない。これまでに、スイカ (*Citrullus lanatus*) における単為結実の誘導法として、ユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の花粉をスイカ雌花に受粉させると約 50%の割合で種なしスイカができることが報告されている (Sugiyama et al. 2014 *Sci Hort*)。様々なウリ科植物の花粉を用いて検証したところ、スイカの単為結実を誘導できるのはユウガオ花粉だけであり、ユウガオ花粉が特異的に誘導する結実誘導メカニズムがあると予想されてきた。単為結実には植物ホルモン処理によって人為的に誘導できることが知られており、トマトではオーキシン、ブドウではジベレリンの作用によって単為結実が誘導され、特にトマトでは単為結実に関わる分子メカニズムの研究が進んでいる。スイカではサイトカイニン作用によって結実が生じるという報告があるが、スイカにおける単為結実誘導にどのような分子メカニズムが関わるのかはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

ウリ科植物でみられる他動的単為結実誘導の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、特に、異属種への単為結実誘導能が高いユウガオ花粉に着目し、ユウガオ花粉が特異的に誘導するスイカ単為結実に関わる遺伝子を RNA-seq を用いて網羅的に解析した。単為結実に関わる分子メカニズムとしてまず植物ホルモンの関わりが想定されることから、RNA-seq 解析から単為結実に関わると推定された植物ホルモンについて、直接処理を行いその効果を検証した。また、遺伝子の機能解析ではスイカへ外来遺伝子を導入する系が必要と考えられることから、茎頂組織への直接導入法 (iPB 法) がスイカで適用できるかについても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 異属花粉を受粉したときのスイカ子房における経時的なトランスクリプトーム解析

通常の果実形成が起こるスイカ花粉、単為結実が起こるユウガオ花粉、ユウガオ花粉同様の花粉管伸長があるが単為結実しないニガウリ (*Momordica charantia*) の花粉を受粉試験に用いた。開花前日のスイカ雌花に上記の花粉を受粉し、受粉後 24 時間から経時的に子房を採取した。無受粉のスイカ子房も同様に採取した。子房から、将来的に果皮となる部分は含まないように、花痕側の胎座組織を採取して RNA 抽出を行い、RNA-seq に供試した。サンプリングした子房は形態観察の材料としても用いた。RNA-seq で得られたショートリードはスイカゲノム配列 ('Charleston Gray', WCG_genome_v2.fa.gz, 22,546 遺伝子) にマッピングして各遺伝子ごとのカウント数や TPM 値を得た。得られたリードカウントを用いて、R pvclust により遺伝子発現量の階層クラスター解析、edgeR により発現変動遺伝子 (DEG) 解析を行った。検出された DEG については GO エンリッチメント解析を行いそれらの機能を推定した。

(2) 植物ホルモン処理がユウガオ花粉誘導性スイカ単為結実に及ぼす影響

植物ホルモンまたは植物成長調節剤として、ナフタレン酢酸 (NAA)、ブラシノライド (BL)、ブラシノステロイド合成阻害剤であるブラシナゾール (BZR)、ナシで単為結実誘導の報告があるメラトニンを用いて、受粉と組み合わせた場合の結実への影響を観察した。受粉なしの場合は処理後 96 時間後に子房を採取して肥大の有無を判定した。受粉ありの場合は受粉 24 時間後 (開花当日) に各薬剤を処理し、さらに 72 時間後 (受粉から 96 時間後) に子房を採取して肥大の有無を判定した。

(3) スイカ種子胚への外来遺伝子直接導入の検討

コムギで報告されている茎頂組織への直接導入法 (iPB 法) (Hamada et al. 2017 *Sci Rep*) をスイカへ応用し、遺伝子導入法として利用できるかについて検討した。吸水後のスイカ種子から子葉を除去し、茎頂を露出させて GFP 発現プラスミドをコートした金粒子を打ち込んだ。ボンバードメントの圧力は 1100 または 1350 psi とし、金粒子サイズは 0.6、1.0、1.6 μm の 3 種類を用いた。各条件において、蛍光観察を用いた茎頂での一過性 GFP 発現率および PCR による葉での GFP 遺伝子導入率を評価した。

4. 研究成果

(1) スイカ、ユウガオ、ニガウリの受粉区および無受粉区において、受粉後の子房を時間ごとに採取し、子房の形態観察や RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。受粉 72 時間後までは、無受粉区も、また、いずれの花粉を受粉した区でも同様に子房の肥大は起こり、肥大

傾向に違いはみられなかった。受粉 96 時間後、無受粉区やニガウリ受粉区の子房ではさらに肥大することはなく、スイカ受粉区やユウガオ受粉区の肥大するもののみ継続的な肥大成長を示した。このことから、肥大するかどうかを視覚的に判定できるのは受粉 96 時間後（受粉 4 日目）以降であることが確認できた。ユウガオ受粉区において、肥大個体（6 個）/非肥大個体（8 個）間の縦径および横径の肥大比（受粉 1 日目の子房の縦または横径との比）を比べた。その結果、受粉後 72 時間まで縦径の肥大比に有意差は検出されなかったが横径の肥大比には有意差が認められ、ユウガオ花粉の受粉後、単為結実するかどうかは受粉から 72 時間の時点ですでに決まりつつあると予想された。受粉経過時間（24、36、48、72、96 時間）ごとの各受粉区における全遺伝子のリードカウント値についてクラスター解析を行い、遺伝子発現パターンの類似性をみた。受粉からの経過時間ごとで大まかにクラスターリングされたが、無受粉区は 36 時間後以降、各受粉区とは異なるクラスターに分かれた（図 1）。ユウガオ花粉受粉 96 時間後の肥大区（L96○）は、スイカ花粉受粉 96 時間区（C96）と同じクラスターに分かれ、異属花粉の受粉であっても同様の遺伝子発現パターンにより子房肥大が起こっていると考えられた。ユウガオ花粉受粉 96 時間後の非肥大区（L96×）は受粉後 72 時間区と同じクラスターに含まれ、受粉 72 時間までに子房肥大を導く遺伝子発現変動が起こるかがユウガオ花粉による単為結実に関わると考えられた。

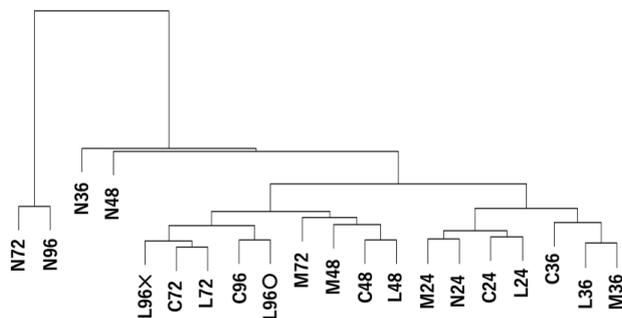


図1. 受粉の有無、花粉の種類、受粉経過時間が異なるスイカ子房における遺伝子発現パターンのクラスター解析
 C: スイカ花粉受粉, L: ユウガオ花粉受粉, M: ニガウリ花粉受粉, N: 無受粉
 アルファベットに続く数字は受粉後の経過時間を示す。
 L96のうち、肥大している個体をL96○、肥大していない個体をL96×とした。

ユウガオ受粉 72 時間区の個体数をさらに増やし（9 個体）、受粉 96 時間のものとともにクラスター解析を行ったところ、ユウガオ花粉受粉区の個体の中に、肥大することが確定しているスイカ受粉 72 時間区や 96 時間区と同じクラスターに含まれるもの、また、肥大しないことが確定しているニガウリ受粉区やユウガオ受粉 96 時間の非肥大区と同じクラスターに含まれるものもあった（図 2）。ユウガオ花粉の受粉 72 時間時点でも肥大/非肥大個体を推定できると考え、これらを用いてユウガオ受粉 72 時間個体間における DEG 解析を進めることにした。また、受粉後 36、48、60 時間でも、解析個体数を増やすことで肥大/非肥大でクラスターリングされるか確認したが、これらのタイミングではクラスターリングと結実の可否は関わらない挙動を示した。受粉後経過時間ごとに無受粉区と比較し、各受粉区で検出された DEG について行った GO エンリッチメント解析では、スイカ受粉後 24 時間とユウガオ花粉受粉 36~48 時間において防御応答、S-RNase、MAPK 経路などの GO term が共通してエンリッチされていた。また、スイカ受粉区では受粉後 72 時間、ユウガオ受粉区では受粉後 96 時間で GA 合成に関わる GO term が検出されていた。

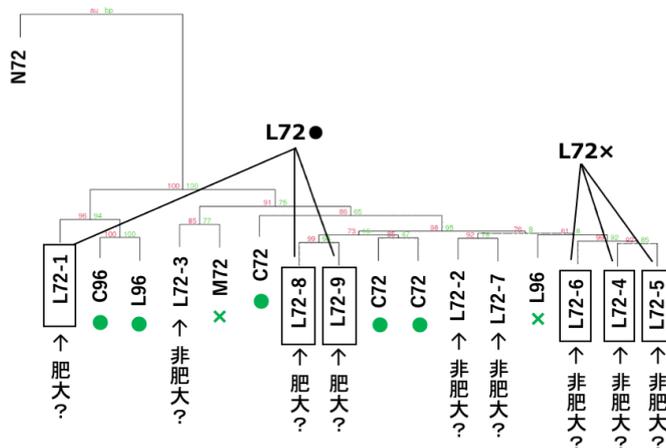


図2. 受粉後72時間サンプルのクラスター解析による分類
 C: スイカ花粉受粉, L: ユウガオ花粉受粉, M: ニガウリ花粉受粉, N: 無受粉
 アルファベットに続く数字は受粉後の経過時間を示す
 ● 肥大して結実することが確定なサンプル
 × 肥大せず結実しないことが確定なサンプル

受粉後 72 時間や 96 時間のユウガオ花粉受粉個体の（推定を含む）肥大/非肥大個体間や、ユウガオ花粉受粉区とスイカ花粉受粉区を用いた DEG 解析から、単為結実に関わる遺伝子として 11 遺伝子を絞りこんだ。これらの遺伝子の中には、受粉後 48 時間で結実の可否と関わるような変動を示すものもあった。11 遺伝子には、細胞壁分解関連の酵素遺伝子のほか、オーキシン応答性遺伝子、ジベレリン合成遺伝子やブラシノステロイド (BR) 情報伝達制御遺伝子などが含まれていた。

(2) 各受粉区における経時的なトランスクリプトーム解析から、単為結実に関連すると推定された遺伝子がいくつか検出されたが、特に、植物ホルモンに関わる遺伝子に着目し、それら植物ホルモンや植物成長調節剤を処理したときの単為結実への影響をみた。ジベレリンは自動的単為結実を誘導しないという知見が得られていたので今回は用いなかった。スイカ子房への直接処理実験の結果、合成オーキシン (NAA) は受粉なしでスイカ子房に単為結実を誘導した。メラトニンは受粉なしでのみ供試したが、単為結実の誘導はみられなかった。活性型 BR であるブラシノライド、BR 阻害剤であるブラシナゾールの影響をみたところ、ブラシノライドはユウガオ花粉が誘導する単為結実を大きく阻害した (図 3)。一方、ブラシナゾールはユウガオ花粉による単為結実を促進し、結実率は 100%まで向上した (図 3)。このことから、ユウガオ花粉が誘導する単為結実誘導には、オーキシンやジベレリン作用の他に、BR 量の低下や情報伝達経路の抑制が関わることが分かった。

(3) iPB 法の検討では、ボンバードメント後 24 時間で茎頂組織における一過性 GFP 発現が観察され、一過性発現効率率は 1350psi、0.6 μ m の条件に最も高く、60%程度の導入率だった。一方、伸長した葉について PCR により GFP 導入率を調べたときには導入率は 20%程度になっていた。外来遺伝子の導入はキメラであり、伸長した葉での導入率の低下がみられたことから、最初の導入効率の向上を検討するとともに、外来遺伝子が導入したシュートを効率的に選抜する方法が必要であると思われた。

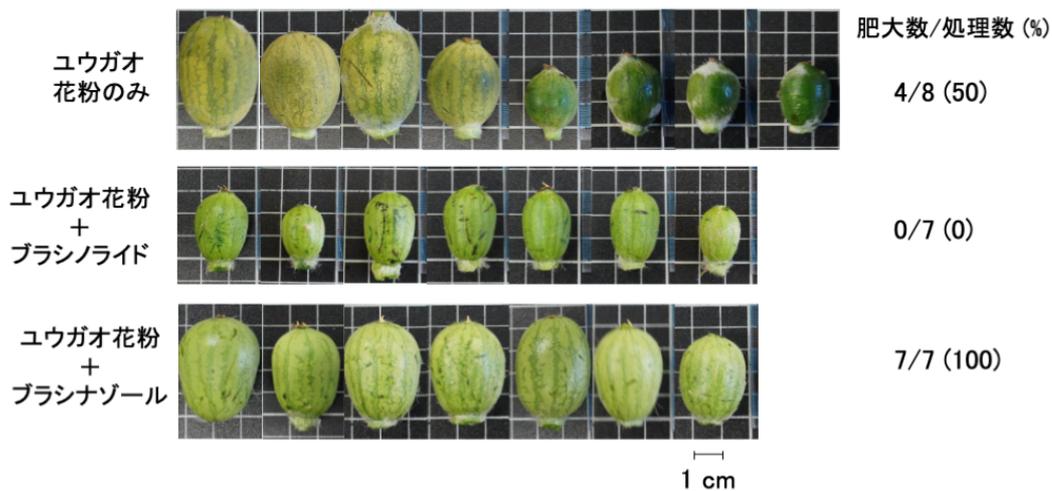


図3. ユウガオ花粉が誘導する単為結実へのブラシノステロイド処理の影響
受粉後96時間の子房の様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiyama Keita, Shimura Hanako, Kami Daisuke, Murata Naho, Yoshida Midori, Suzuka Akihiro, Nagaoka Kohei, Jitsuyama Yutaka, Suzuki Takashi	4. 巻 289
2. 論文標題 Phylogenetic analyses and agronomical characteristics on parthenocarpy in different Cucurbitaceae genera using cross-pollination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 110210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2021.110210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田寛也・杉山慶太・藤野介延・志村華子
2. 発表標題 異属花粉で誘導されるスイカ単為結果のRNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長岡恒平・杉山慶太・鈴鹿明広・藤野介延・志村華子
2. 発表標題 スイカにおける単為結実関連遺伝子の経時的解析及び遺伝子導入法の検討
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021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	鈴木 卓 (Suzuki Takashi) (30196836)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	実山 豊 (Jitsuyama Yutaka) (90322841)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	杉山 慶太 (Sugiyama Keita) (30414767)	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・研究領域長 (82111)	2020年度のみ研究分担者として参加

	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
研究協力者	杉山 慶太 (Sugiyama Keita)		2020年度末で定年退職したため、2021年度と2022年度は研究協力者として参加。実験の遂行に助言を行った。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関