

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580285

研究課題名（和文）キュウリ奇形果発生機構の動的解析

研究課題名（英文）Study on the dynamic mechanism of the formation of malformed fruit of cucumber

研究代表者

田附 明夫 (TAZUKE Akio)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70201613

研究成果の概要（和文）：キュウリの奇形果の発生への光合成産物の欠乏の関与を分子レベルで調べるため、光合成産物欠乏に伴って発現が増加する遺伝子を全摘葉処理及び連続暗黒処理により探索したところ、糖欠乏のよいマーカーとして知られるアスパラギン合成酵素遺伝子、キュウリの体細胞胚発生に伴って誘導されることが知られていた *CsSEF1*、および新規のジンクフィンガー様遺伝子の3つの遺伝子が得られ、そのうち後者2つは機能未知のものだった。特に *CsSEF1* は処理により約100倍も発現量が増加した。その発現は果実の成長速度に比例する呼吸速度の低下と時間的に相関しており、活発に成長する組織における成長停止に関与している可能性が考えられた。*CsSEF1* は植物では機能がよく分かっていないタンデム CCCH ジンクフィンガーファミリーに属し、植物特有のモチーフを有しており、今回の知見は有用なものである。

研究成果の概要（英文）：In order to access the involvement of photoassimilate starvation in the formation of malformed fruit in cucumber, genes whose expression is enhanced under photoassimilate starvation are sought. Three genes were obtained and the function of two of them was unknown. Their expression temporarily correlated with respiration rate of fruit which is proportional to the fruit growth rate. They were suggested to be involved in the growth cessation in rapidly growing tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：キュウリ、果実成長、奇形果、光合成産物欠乏、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

キュウリの尻細り、尻太りなどの奇形果は市場価値を低下させる。奇形果の発生は光合

成産物の欠乏が関与しているとされてきたが、厳密には証明されていない。これまでに、塩ストレスに伴って奇形果が多発する場合があります、光合成産物欠乏の関与が支持された

また、果実の成長速度の急激な変化が奇形果発生に関与する可能性が示唆された。しかし、これらについては証明には到らなかった。光合成産物の分配・転流の制御機構については、それが農作物の収量の重要な決定要因であることから 40 年以上の研究が行われてきており、一部遺伝子も同定されたが、不明な点が多い。そこで、光合成産物欠乏のマーカーとなる遺伝子を探索し、それを用いることによって分子、細胞レベルでの生理反応の検討を行えば、奇形果発生の機構のみならず、光合成産物の分配の制御機構にも示唆を与えうる可能性があると思われた。また、果実の呼吸速度は成長速度とほぼ比例するので、呼吸速度の測定によって非破壊的、連続的に果実の成長活性をモニターし、それとマーカー遺伝子の発現パターンを比較することによって、奇形果発生の動的機構が解析しうる可能性があると思われた。

2. 研究の目的

光合成産物の欠乏に伴って果実で発現する遺伝子を探索し、果実の成長速度と比例する呼吸速度の変化と遺伝子発現を比較し、光合成産物欠乏の奇形果発生への関与を検討し、奇形果発生の動的機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子クローニング

植物体を全摘葉したときに発現が増加する遺伝子をサブトラクション法でクローニングする。得られたクローンをデータベースで検索する。未知遺伝子に関しては 5'-RACE や 3'-RACE により全長 cDNA を得ることを試みる。

(2) 遺伝子の発現解析

得られたクローンからプライマーを設計して、その発現を定量 PCR で調べ、果実の遺伝子発現と呼吸速度の変化を比較する。

(3) 果実の呼吸速度の測定

コンプレッサーで環境制御室中の空気を吸引し、ソーダライムを通して脱炭酸したものの流速をサーマルマスフローコントローラーで制御して、着果状態の果実を入れた遮光した果実チャンバーに導入し、排出される空気の一部を吸引して赤外線ガス分析機に導入して二酸化炭素濃度を測定することによって果実の呼吸速度を測定する。ガス分析の出力はデータロガーに入力し、毎分の出力を記録する。

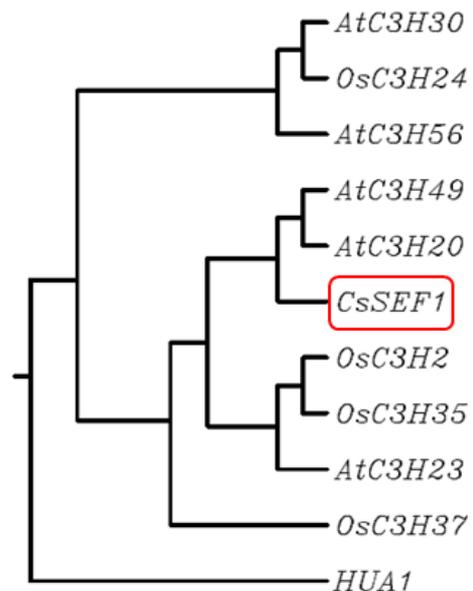
(4) 処理

全摘葉処理、暗黒処理、塩ストレス処理を行う。

4. 研究成果

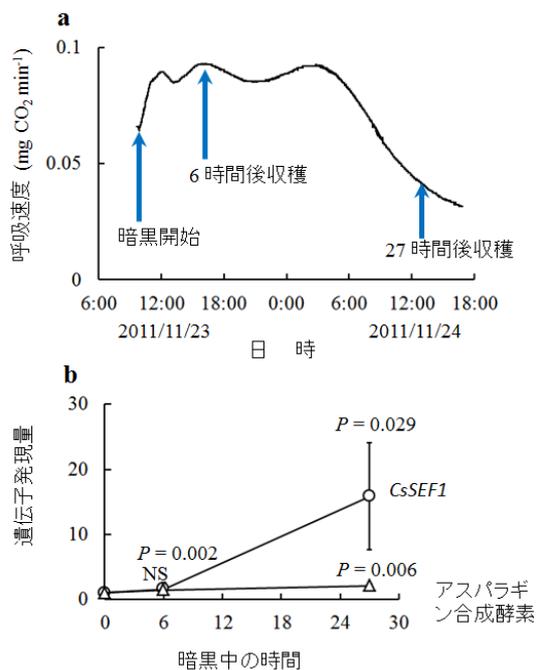
糖欠乏のよいマーカーとされるアスパラギン合成酵素、キュウリの体細胞胚発生で発現が増加することが報告されている *CsSEF1* および、新規に発見されたジンクフィンガー遺伝子（仮にクローン 40 と呼ぶ）が見出された。

CsSEF1 と極めて相同性が高いクローンを *CsSEF1* と同一であることを証明するために、5'-RACE を行ったところ、配列が一致した。また、キュウリは全ゲノムが解読されているので、キュウリゲノムを BLAST 検索したところ、相同な遺伝子は第 2 染色体上にある 1 つだけだった。これらから、得られた遺伝子が *CsSEF1* であることが示された。*CsSEF1* は CCCH モチーフを 2 つタンデムに持つ。このようなタンデムジンクフィンガー (TZF) は動物では比較的よく調べられており、RNA の分解に関与する場合があることなどが知られているが、植物ではほとんど機能未知である。また、本実験では、全摘葉または暗黒処理によって、発現量が約 100 倍も高まり、その反応が極めて顕著だった。アラビドプシスにおけるホモログである *AtTZF* は植物ホルモンによる制御が報告されている。本実験は光合成産物欠乏に伴って発現が高まることを見いだしたので、TZF の機能についての新たな知見を見いだしたことになる。

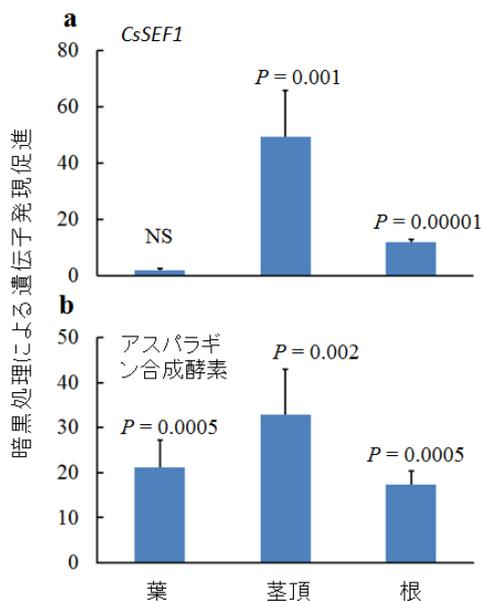


上図は *CsSEF1* と近縁遺伝子の系統樹である。アラビドプシスやイネで多くの遺伝子が

知られている。しかし、それらの機能はよくわかっていない。



上図は暗黒処理後の果実の呼吸速度と遺伝子発現を比較したものである。



暗黒処理によって、アスパラギン合成酵素遺伝子の発現は、成熟葉、果実、莖頂部、根のいずれにおいても高まった。これは、これらの組織で糖欠乏が生じていることを強く示唆する。一方、*CsSEF1* の発現は、暗黒処理によって果実、莖頂部、根で高まったが、成熟葉では高まらなかった。このことは、*CsSEF1* は急速に成長している組織でのみ発現が高まることを示す可能性があると思われた。また、*CsSEF1* の発現の促進は、果実の呼吸速度の低下と時間的に相関しているよ

うに思われた。このことは、*CsSEF1* の発現促進は糖欠乏を必要とするものの、活発に成長している組織に特有の因子をも必要とする可能性があると考えられた。また、*CsSEF1* は組織の成長停止に到る信号伝達経路のどこかに位置している可能性があると思われた。

温室で育てた植物体を環境制御室に運び、暗黒処理を行うと、室温 30℃では直ちに呼吸速度が低下したが、室温 25℃では、翌朝 6 時前後に呼吸速度が急激に低下し始めた。しかし、25℃暗黒条件で果実の糖やデンプンの濃度を測定したところ、変化が顕著だったのはデンプンだが、処理当日の午後 6 時に低くなり、翌日と差がなかった。このことは、糖濃度の測定よりも、マーカー遺伝子の発現量の方が組織の糖状態をよりよく反映することを示すと思われた。

一方、比較的弱光条件で育てた植物を環境制御室に運び、直ちに暗黒とすると、呼吸速度が直ちに低下し始めた。このことから、果実の呼吸速度は光合成産物の分配の動的制御のよい指標として用いられると思われた。一方、比較的弱光条件で育てた植物を朝 25℃の環境制御室に運び、午後 6 時まで人工光で照明し、以後暗黒にしたところ、果実の呼吸速度は翌日の午前 6 時頃急激に低下し始めた。同様の条件に植物をおき、果実をサンプリングして遺伝子発現を調べたところ、アスパラギン合成酵素遺伝子と *CsSEF1* の発現は、促進率は大きく違うものの、発現促進のタイミングは時間的に平行しており、いずれも翌日午前 6 時頃から発現量が高まった。このことは、アスパラギン合成酵素遺伝子と *CsSEF1* はいずれも組織の糖欠乏を引き金として発現が促進されることを示唆すると思われた。ただし、育成中の光条件によって呼吸のパターンは異なるので、十分な光の下で育った植物でも同様の相関があるかを検討する必要がある。

クローン 40 は EST から推定された配列とよく一致し、第 7 染色体のゲノム配列との比較により、イントロンを 1 つ持つと思われた。5' -RACE および 3' -RACE により、クローン 40 は複数の転写開始点と転写終了点を持つと考えられた。クローン 40 は新規の遺伝子であり、有用な知見である。クローン 40 の全摘葉および暗黒処理による発現促進は 5~10 倍程度であり、*CsSEF1* ほど顕著ではないが、その発現パターンは *CsSEF1* とよく一致していた。クローン 40 も果実、莖頂部、根では発現が促進されるが、成熟葉では発現が促進されなかった。また、暗黒中の発現パターンはアスパラギン合成酵素遺伝子および *CsSEF1* と類似していた。クローン 40 と *CsSEF1* の発現パターンが同様であることは、これらが糖欠乏によって誘導され、かつ急速

な成長に関与することを示唆するが、更に、いずれかが他方の上流に位置する可能性も考えられる。そこで、*CsSEFI* とクローン 40 の発現をノックダウンした組み替え植物を作成すれば、この可能性を調べることができると思われる。

これまでの研究から、キュウリを水耕栽培して培養液の NaCl 濃度を 60 mM にし、通気頻度を少なくすると、尻細り果が発生する場が多かったので、このようにして栽培したキュウリの果実の呼吸速度を調べたところ、顕著な呼吸速度の低下がみられ、尻細り果となった。ただし、実験を繰り返したところ、連続通気でも葉に塩害症状がみられる場が多かった。このことは、用いた純系品種が、耐塩性遺伝子を欠いている可能性があり、塩害の実験植物として有用である可能性がある。いずれにしても、より多く塩害条件での呼吸測定を行い、遺伝子発現との相関を調べる必要がある。

以上より、植物としてユニークな 2 つの遺伝子について多くの新規な知見が得られたとともに、光合成産物の欠乏から成長停止に到る信号伝達経路の解明にもつながりうると考えられる。本研究において、果実の呼吸速度と遺伝子発現の比較が非常に有効であった。ここで確立された方法を用いて、より詳細な現象記述を行う必要がある。また、これに更に組み替え植物の利用を加えれば、信号伝達経路の証明に到りうる可能性があると思われる。

本研究の実用的目的である奇形果発生機構に関しては、奇形果が発生する条件でアスパラギン合成酵素遺伝子の促進が認められたので、糖欠乏の関与の強い証拠になる。しかし、同様の条件でも、奇形果が発生せず、果実全体の成長が抑制される場合もあった。そこで、呼吸パターンと遺伝子発現パターンをより詳細に調べることによって、より詳細な奇形果発生機構を調べる必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tazuke, A., Asayama, M., 『Expression of *CsSEFI* gene encoding putative CCCH zinc finger protein is induced by defoliation and prolonged darkness in cucumber fruit』, *Planta*, 237 巻、681-691、2013、査読有、DOI 10.1007/s00425-012-1787-7
- ② Boonkorkaew, P., Mine, Y., Hikosaka, S., Tazuke, A., Amaki, W., Sugiyama, N.,

『Effect of the timing of defoliation on fruit growth and abortion in a parthenocarpic cucumber』, *Environ. Control Biol.*, 50 巻、313-317、2012、査読有

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/ecb/>

- ③ 田附明夫, 『水耕培養液へ添加する NaCl 濃度がインゲンの蒸散速度に及ぼす影響の記述モデル』, *植物環境工学*, 23 巻、18-22、2011、査読有
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/shita/-char/ja/>
- ④ Boonkorkaew, P., Tazuke, A., Hikosaka, S., Mine, Y., Sugiyama, N., 『Effects of fruit load on fruit growth, mesocarp starch grain appearance and sucrose catalyzing enzyme activity in gynoecious cucumber fruit』, *Environ. Control Biol.*, 49 巻、119-125、2011、査読有
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/ecb/>

[学会発表] (計 1 件)

- ① Tazuke, A. et al., 『Cloning of genes induced by photoassimilate starvation in cucumber fruit』, 28th International Horticultural Congress, 2010, Centro de Congressos de Lisboa, Portugal

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田附 明夫 (TAZUKE Akio)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70201613