

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780026

研究課題名(和文)キュウリの性分化における雄蕊・雌蕊原基の退化に働く新規MMP遺伝子の単離と解析

研究課題名(英文) Isolation and analysis of new MMP genes involving arrest of stamen or pistil primordia development 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・准教授

研究者番号：30363295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリの性分化機構解明のために、雄花、雌花の蕾において、プログラム細胞死(PCD)に關与するMMP遺伝子と7種類の細胞周期関連遺伝子群(CsCycA, CsCycB, CsCYD3:1, CsCYD3:2, CsCDKA, CsCDKB, CsCYR)の発現を解析した。その結果、MMP遺伝子は雄花の蕾では雌しべの退化領域で、雌花の蕾では雄しべの退化領域で強い発現を示した。CsCYR, CsCycA, CsCycB, CsCYD3:2遺伝子は、雌花の蕾において雄しべの退化領域で強い発現を示した。以上から、雌花の蕾における雄しべの発育抑制には細胞周期の促進とPCDが密接に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of sex differentiation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants, expression of programmed cell death (PCD) related gene, MMP gene, and seven cell-cycle-related genes (CsCycA, CsCycB, CsCYD3:1, CsCYD3:2, CsCDKA, CsCDKB, CsCYR) was analyzed in both male and female flower buds. MMP gene expressed at the region where pistil primordia arrested in male flower buds and at the region where stamen primordia arrested in female flower buds. CsCYR, CsCycA, CsCycB, CsCYD3:2 genes expressed at the region where stamen primordia arrested in female flower buds. It is possible that acceleration of cell cycle and PCD are involved in the inhibition of stamen development in female flower buds of cucumber.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：キュウリ 性分化 雄花 雌花 雄しべの発育抑制 細胞周期 PCD

1. 研究開始当初の背景

安全かつ効率的な農業の確立のためには、低農薬で多収となることが実証されている「雑種強勢」の利用が効果的である。雑種強勢は、両親が遠縁の時に顕著であるため、雑種強勢を農作物の品種開発に利用するには、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蕊(雄しべ)と雌蕊(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の開発を究極の目標として、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. 研究の目的

(1) 雌雄同株植物であるキュウリ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。しかしながら、このメカニズムの詳細は不明である。本研究では、このメカニズムにアプローチするための第一歩として、キュウリの雄花および雌花の蕾における以下の遺伝子の発現を明らかにする。

(2) マトリックス・メタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase; MMP) は、プログラム細胞死 (Programmed Cell Death; PCD)、細胞の増殖、細胞の分化、組織の三次元構築などに関与する細胞外マトリックス (Extracellular Matrix; ECM) の主要な分解酵素である。Delorme ら (2000) は、キュウリ子葉の老化期から PCD 期の遷移時において強い発現を示す遺伝子として MMP 遺伝子を単離した。そこで、キュウリの性分化に伴う生殖器官の発育抑制 (停止) における PCD の関与を調べるために、MMP 遺伝子の発現解析を行う。

(3) 近年、短日処理を行った混性型キュウリ品種 'Winter Long' の茎頂において強い発現を示す遺伝子として、*Cucumis sativus* cyclin-related (*CsCYR*)、*C. sativus* cyclophilin (*CsCYP*) の 2 つの遺伝子が単離された (Cho et al. 2005)。'Winter Long' は短日処理で雄花形成が促進される品種であるため、Cho ら (2005) は *CsCYR*、*CsCYP* の両遺伝子は、雄花形成に関与すると結論づけた。しかしながら、雄花の蕾におけるこれらの遺伝子の発現

場所や機能は不明である。そこで、キュウリの雄花形成におけるこれらの遺伝子の機能推定を目的として、これらの遺伝子の発現解析を行う。

(4) 前述の *CsCYR* 遺伝子は、細胞周期関連遺伝子である。そこで、これまでキュウリから単離されている 6 種類の細胞周期関連遺伝子群 (*CsCycA*, *CsCycB*, *CsCYD3:1*, *CsCYD3:2*, *CsCDKA*, *CsCDKB*) についても合わせて発現解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 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、吸水させた種子を水で湿らせたろ紙の上に並べた後、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℃ 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 (8cm) 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 (第四葉展開期の初期) まで育成した後、植物体を素焼きの鉢 (25cm) に移し替えて、さらに大きく育成し (1~2 ヶ月)、花芽 (蕾) を分化させた。

(2) 蕾のサンプリングの際、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。

(3) 上記サンプルについて、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、雄花の蕾では「がく、花弁、雄しべ、雌しべの退化領域」に、雌花の蕾では「がく、花弁、雄しべの退化領域、雌しべ」に切り分けた後、直ちに -80℃ 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) 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、前述の遺伝子群の塩基配列をもとに設計した各プライマーセットを用いて PCR 反応を行い、遺伝子の発現解析を行った (半定量的

RT-PCR 法)。

4. 研究成果

(1) *MMP* 遺伝子は、雄花の蕾(ステージ I, II, III)では「雌しべの退化領域」で、また、雌花の蕾(ステージ I, II, III)では「雄しべの退化領域」で強い発現を示した。このことから、雄花・雌花ともに、発育が抑制される方の生殖器官は、PCD によって退化することが示唆された。

(2) *CsCYP* 遺伝子の発現は、雄花と雌花の蕾で同程度であった。一方で、*CsCYR* 遺伝子は、雄花に比べて雌花の蕾で強い発現を示した。そこで、雌花の蕾(ステージ I)において *CsCYR* 遺伝子の発現場所をさらに詳細に解析した結果、強く発現している場所は「雄しべの退化領域」であった。これらの結果は、*CsCYR*、*CsCYP* の両遺伝子は雄花形成に関与すると結論づけた Cho ら(2005)の主張を支持しない結果となった。

(3) 6 種類の細胞周期関連遺伝子群(*CsCycA*, *CsCycB*, *CsCYD3:1*, *CsCYD3:2*, *CsCDKA*, *CsCDKB*)の中で、*CsCycA*, *CsCycB*, *CsCYD3:2* 遺伝子は、雄花に比べて雌花の蕾で発現が強く、かつ、雌花の蕾(ステージ I)において、「雄しべの退化領域」で強い発現を示した。

(4) *CsCYR*, *CsCYP* の両遺伝子と 6 種類の細胞周期関連遺伝子群(*CsCycA*, *CsCycB*, *CsCYD3:1*, *CsCYD3:2*, *CsCDKA*, *CsCDKB*)の発現解析の結果から、雌花の蕾において、雄しべの発育抑制には、細胞周期関連遺伝子である、*CsCYR*, *CsCycA*, *CsCycB*, *CsCYD3:2* 遺伝子が関与する可能性が示唆された。

(5) 以上の発現解析の結果から、キュウリの花の性分化時において、雌花の蕾における雄しべの発育抑制(停止)には、細胞周期の促進と PCD が密接に関連すると考えられる。キュウリの性分化に伴う、発育が停止した生殖器官における、細胞周期の促進と PCD の関係について今後さらに調査する必要がある。

〔引用文献〕

Delorme, V.G.R., McCabe, P.F., Kim, D.J., Leaver, C.J.: *Plant Physiol.*, **123**, 917-927 (2000).

Cho, J., Koo, D.H., Nam, Y.W., Han, C.T., Lim, H.T., Bang, J.W., Hur, Y.: *Euphytica*, **146**, 271-281 (2005).

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)

山崎聖司, 三巻耕太郎, 野口直人, 飯田弘, *Transcriptional activation of the *CsI-MMP* gene and its temporal correlation with tissue collapse in the UV-B-irradiated cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons.*, *Journal of Japan Society for Atmospheric Environment (大気環境学会)*, 査読有, 49 巻 2 号, 2014, 109-116

山崎聖司, 重藤宏彰, 芦原佑基, 野口直人, *Continuous long-term UV-B irradiation reduces division and expansion of epidermal cells in true leaves, but accelerates developmental stages such as true leaf unfolding and male flower bud production in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings.*, *Environmental Control in Biology (日本生物環境工学会)*, 査読有, 52 巻 1 号, 2014, 13-19

DOI: <http://dx.doi.org/10.2525/ecb.52.13>

山崎聖司, 真鍋和人, キュウリを用いた生物教材の検討—花の性表現を利用した遺伝教材を中心に—, *教育実践研究(福岡教育大学教育総合研究所紀要)*, 査読無, 第 21 号, 2013, 43-49

山崎聖司, 真鍋和人, 藤井伸治, 高橋秀幸, *ウリ科植物の花の性分化のエチレン制御と遺伝モデル、植物の生長調節(植物化学調節学会)*, 査読有, 47 巻 1 号, 2012, 24-33

http://ci.nii.ac.jp/els/110009457007.pdf?id=ART0009927233&type=pdf&lang=en&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1397794230&cp=

〔学会発表〕(計 2 件)

山中早織, 真鍋和人, 山崎聖司, キュウリの雄花および雌花の蕾における細胞死と細胞周期に関連した遺伝子の発現解析、園芸学会平成 25 年度秋季大会、2013 年 9 月 20-22 日、岩手大学 上田キャンパス

山中早織, 山崎聖司, キュウリの雄花および雌花の蕾における性分化関連遺伝子群の発現解析と機能推定、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 13-15 日、北海道大学 札幌キャンパス

〔図書〕(計 1 件)

山崎聖司, ニシダ出版, *教育現場で活用できる植物生理学実験—基礎から応用まで—*, 2013, 78

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：紫外線吸収剤およびそれを用いた野菜
類の栽培方法
発明者：山崎聖司
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012—135474 号
出願年月日：2012 年 6 月 15 日
国内外の別：国内

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・准教授
研究者番号：30363295