

学 位 論 文 題 名

キュウリの発育と花芽形成過程における
ジベレリン合成系酵素遺伝子の発現に関する研究

学位論文内容の要旨

ジベレリン（GA）は植物ホルモンの1つであり、植物の生活環全体を通して様々な発育過程を調節することが知られている。キュウリでは、発育とGAとの関係について多くの知見が蓄積されているが、GA合成に関連する酵素遺伝子が単離された報告はなく、それら遺伝子の発現によるGA生合成調節を明らかにする試みは未だなされていない。

本研究は、キュウリからGA合成に関連する主要酵素遺伝子を同定し、それら遺伝子の発現量を解析することにより、キュウリの花における性発現とGAとの関係、ならびに花、果実および葉の発育過程におけるGA生合成活性の変動を明らかにしたものである。

1. GA合成系酵素遺伝子の単離と同定

GA生合成の初期過程を触媒するコバリル2リン酸合成酵素（CPS）およびカウレン合成酵素（KS）と、GA活性化を触媒するGA 3 β -水酸化酵素（3OH）のcDNA遺伝子を、カボチャとシロイヌナズナの類似遺伝子配列をもとに作成したPCRプライマーを用いて増幅することにより、キュウリから単離した。

単離に成功したcDNAクローン（CsCPS1, CsKS1, Cs3OH1）の配列は、これまでに単離されている植物種のCPS, KSおよび3OH遺伝子とそれぞれ高い相同性を示し、いずれも酵素の機能に関連する配列を含んでいた。キュウリゲノムにおけるCsCPS1, CsKS1およびCs3OH1遺伝子のコピー数は、他の植物種のCPS, KSおよび3OH遺伝子と一致していた。

以上の解析結果から、本研究で単離・同定されたCsCPS1, CsKS1, Cs3OH1は、それぞれキュウリのコバリル2リン酸合成酵素、カウレン合成酵素およびGA 3 β -水酸化酵素をコードする遺伝子であると結論した。

2. 植物体の性表現におよぼすGAおよびエチレン処理の影響

キュウリの花は雌雄異花であり、GAは花の雄性化を、エチレンは雌性化を促進することが知られている。本研究では、GAとエチレンが実際に花の性発現に関与していることを確認するために、発育時期の異なるキュウリ植物体をGA₃とエセフォン（エチレン発生剤）で処理し、これらホルモンの性表現に対する作用を比較検討した。その結果、GAは芽生えに処理した場合に雄花形成を、エチレンは第2本葉が展開した（2葉期）植物体に処理した場合に雌花形成を促進すること

が明らかとなった。組織学的な観察を行ったところ、芽生えではまだ花芽原基は分化しておらず、2葉期植物体の茎頂部には雄ずいと雌ずいが分化していない段階の花芽原基が観察された。

以上の結果から、GAは花芽形成に先立つ分裂組織に作用して雄花発生を促進し、エチレンは性発現前の花芽に作用して雌花形成を促進することが示唆された。

3. 植物体の性表現に関連するGA合成系酵素遺伝子の発現

混性型品種‘四葉’と雌性型品種‘れんせい’を用い、RT-PCR法によってCsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量を比較した。その結果、芽生え茎頂組織のCsCPS1発現量に品種間差が認められた。そこで、芽生え期の茎頂で合成されたGAの働きを調べるため、‘四葉’芽生えにGA生合成阻害剤（アンシミドール）を処理し、その後、植物体に着生した花の雌雄性を調査した。その結果、下位節における雄花形成が抑制され、代わりに雌花形成が促進された。しかし、本葉展開後の植物体では、アンシミドール処理により花が雌性化することはなかった。

これらの結果から、芽生え期の茎頂部における高いGA合成能がその後のキュウリ植物体の性表現に強く影響していること、芽生え茎頂におけるGA生合成はCPS遺伝子の発現を介して調節されていることが示唆された。

4. GA合成系酵素遺伝子の発現におよぼすエチレン阻害剤の影響

キュウリの花の雌性化を促進するホルモンであるエチレンがGAの合成活性を低下させるか否かを検討するために、エチレン阻害剤（硝酸銀）で処理した雌性型品種の植物体茎頂におけるCsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量の変動をRT-PCR法によって分析した。第2本葉が展開した時期に硝酸銀処理した植物体では、処理後、まず両性花が形成され、続いて雄花が形成された。すなわち、エチレン阻害によってキュウリ花芽の雄ずい発育が促進された。一方、処理後の植物体茎頂におけるCsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量は、茎頂に雄性花が形成されるまでの過程でほとんど変動しなかった。このことから、硝酸銀処理による雄花形成過程では、GA合成系は活性化しないと結論した。

以上の結果から、キュウリ花芽における雄ずい発育促進もしくは雌ずい発育抑制に、GAが直接関与している可能性は低いと考えられた。

5. 花、果実および葉の発育過程におけるGA合成系酵素遺伝子の発現変動

栽培の目的器官である果実とその初生器官である花、および植物体の主なGA生合成の場であるとされる葉について、CsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量をRT-PCR法によって解析し、それぞれの器官の発育にともなうGA合成活性の変化を推定した。

雄花では、CsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量は開花直前に最大となり、開花後には減少した。雌花では、CsCPS1、CsKS1およびCs3OH1の発現量は発達初期に増大し、開花前には減少した。これらの結果から、花の発達過程におけるGA生合成活性は、雄花では開花直前に、雌花では発達初期に高いことが示唆された。

果実では、閉花直後にCsCPS1とCsKS1の発現量が急激に増大したが、果実の肥大生長が始まってからは、CsCPS1の発現量のみが増大し、CsKS1の発現量は変化しなかった。この結果から、果

実の肥大生長期におけるGA生合成の初期過程は、主にCPSによって調節されていることが示唆された。Cs3OH1遺伝子の発現は、開花から果実の肥大生長が始まるまでの過程でほとんど検出されなかった。サザン解析により、キュウリゲノムには複数の3OH類似遺伝子が存在すると推定されたことから、キュウリ果実の肥大生長期におけるGA活性化段階は、Cs3OH1以外の3OH遺伝子の発現を介して調節されている可能性が示唆された。

葉におけるCsCPS1の発現量は、生長にともなって高まり、展開し終わる時期には減少したが、CsKSIの発現量は葉が生長する間、ほとんど変動しなかった。一方、Cs3OH1の発現量は、展開が終了する時期で急激に増大した。これらの結果は、葉におけるGA生合成の初期過程は主にCPSによって調節されていること、GA生合成活性は成熟葉で高いことを示唆した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大澤	勝次
副査	教授	幸田	泰則
副査	教授	岩間	和人
副査	助教授	増田	清

学位論文題名

キュウリの発育と花芽形成過程における ジベレリン合成系酵素遺伝子の発現に関する研究

本論文は全6章からなり、図33、表11、引用文献91を含む総頁数102の邦文論文であり、他に参考論文2編が付されている。

単性花を着生する作物における花の性表現と単為結実の機構解明は園芸学の主要テーマである。本論文は、キュウリの花芽形成および果実発育過程における内生ジベレリンの関与を、新たに単離・同定したキュウリジベレリン合成系酵素遺伝子の発現という視点から論じたものである。提出された論文には、研究史につづき、以下に示す研究の成果が記載されている。

1. GA 合成系酵素遺伝子の単離と同定

GA 生合成の初期過程を触媒するコパリル2リン酸合成酵素 (CPS) およびカウレン合成酵素 (KS) と、GA 活性化を触媒する GA 3 β -水酸化酵素 (3OH) の cDNA 遺伝子を、類似遺伝子の配列をもとに作成した PCR プライマーを用いて増幅することにより、キュウリから初めて単離した。

単離に成功した cDNA クローン (CsCPS1, CsKS1, Cs3OH1) の配列は、他植物種の類似遺伝子と高い相同性を示すとともに、酵素機能に関連する配列を含んでいた。ゲノムに含まれる遺伝子のコピー数も、他植物種における報告と一致していた。これらの解析により、単離された遺伝子は、それぞれキュウリのコパリル2リン酸合成酵素、カウレン合成酵素および GA 3 β -水酸化酵素をコードする遺伝子であると断定している。

2. 植物体の性表現におよぼす GA およびエチレン処理の影響

ジベレリンはキュウリの花の雄性化を、エチレンは雌性化を促進することが知られている。そこで、発育時期の異なるキュウリ植物体を GA3 とエセフォーン (エチレン発生剤) で処理し、これらホルモンの性表現に対する作用を比較検討した。その結果、GA は芽生えに処理した場合に雄花形成を、エチレンは

第2 本葉が展開した(2 葉期)植物体に処理した場合に雌花形成を促進することを明らかにした。さらに、組織学的な観察結果に基づき、GA 処理は花芽分化に先立つ茎頂分裂組織に作用して雄花発生を促進し、エチレン処理は性発現前の花芽に作用して雌花形成を促進すると示唆した。

3. 植物体の性表現に関連する GA 合成系酵素遺伝子の発現

雄性型品種‘四葉’と雌性型品種‘れんせい’における *CsCPS1*, *CsKS1* および *Cs3OH1* の発現量を RT-PCR 法により比較し、‘四葉’芽生え茎頂における *CsCPS1* 発現量が‘れんせい’のそれに比べ高いことを明らかにした。同時に、芽生え期および本葉展開後の‘四葉’植物体茎頂に GA 生合成阻害剤を施与することにより、芽生え期に処理した場合にのみ、下位節の雄花形成が抑制され、雌花形成が促進されることを確認した。この結果から、芽生え期の茎頂部で合成された GA が、その後のキュウリ植物体の雄花形成を促進していると推論している。

次に、キュウリの花の雌性化を促進するホルモンであるエチレンが GA の合成活性を低下させるか否かを検討した。雌性型キュウリ植物体は、エチレン阻害剤である硝酸銀で処理により、まず両性花を形成し、続いて雄花を形成するようになった。一方、処理後の植物体茎頂における *CsCPS1*, *CsKS1* および *Cs3OH1* の発現量は、茎頂に雄性花が形成されるまでの間ほとんど変動しなかった。この結果から、硝酸銀処理による雄花形成誘導では、GA 合成系は活性化しないと結論している。

4. 花、果実および葉の発育過程における GA 合成系酵素遺伝子の発現変動

生産に直接関係する器官である花と果実、ならびに GA 生合成の場であるとされる葉について、発育にともなう GA 合成系遺伝子の発現変動を RT-PCR 法により調査した。その結果、花の発達過程における GA 生合成は、雄花では開花直前に、雌花では発達初期に活発になることを明らかにした。一方、果実では、閉花直後から肥大生長期にかけて、*CsCPS1* の発現のみが増大することを明らかにし、その結果から、果実の肥大生長期における GA 生合成の初期段階は、主に CPS によって調節されていると推定している。*Cs3OH1* 遺伝子の発現は、開花から果実の肥大生長が始まるまでの間、ほとんど検出されなかったが、その理由として、キュウリ果実の肥大生長期における GA 活性化に、未知の 3OH 酵素が関与している可能性を論じている。

葉における *CsCPS1* の発現量は、生長にともなって高まり、展開し終わる時期には減少した。一方、*Cs3OH1* の発現量は、展開の終了とともに急激に増大した。この結果に基づき、葉における GA 生合成は成熟葉で活発であり、葉の GA 生合成初期過程は主に CPS によって調節されていると推定している。

以上のように本論文は、従来から信じられてきたキュウリの雄花形成とジベレリンとの関係を、新技法の駆使により解析したものである。結果は実証的であり、信頼性の高いものであると認められる。論文には新知見が多く含まれており、学術上および応用上高く評価される。よって、審査員一同は白井菊子が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。