HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスパラガスにおける単性花形成機構の解明と雄性種子生産技術の改良に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	堀内, 和奈
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11821号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58634
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuna_Horiuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　堀内　和奈

学 位 論 文 題 名

アスパラガスにおける単性花形成機構の解明と
雄性種子生産技術の改良に関する研究

アスパラガス（*Asparagus officinalis*）の花芽は，発達初期には両性花様の形態を示しており，成熟する過程で性と対向する花器官，すなわち雌花の雄蕊，雄花の雌蕊が退化することにより単性花が形成することが知られている。花器官の退化による単性花の形成は，植物で広く見られる現象であり，キュウリ，メロン，トウモロコシなどの植物では，植物ホルモンレベルおよびホルモン情報伝達の両方の視点からの単性花形成メカニズムの研究が進んでいる。しかし，アスパラガスの雌雄性発現と植物ホルモンの働きに関する研究は進展していない。

食用アスパラガスは雌雄異株の多年生植物である。経済栽培では，若茎の大きさが斉一であり，収量性が高く，また落下種子による雑草化がないなどの理由から，主に雄性株が栽培されている。雄性の株は，開花後の個体の選抜や，PCR (polymerase chain reaction)を利用する DNA マーカーによって選別することができるが，最近では，播種した個体が全て雄性個体となる交雑種子集団（全雄種子）の利用が普及している。しかし，全雄種子を生産するためには雄性因子をホモ接合に持つ花粉親育成の長い期間が必要であり，検定に要する期間の短縮が雄性種子生産法改良の最も大きな課題となっている。

このような背景に立ち，本論文は、アスパラガス未熟雌性花の雄蕊において過剰に産生されるサイトカイニンが，雌性花の雄蕊退化に関わっていることを明らかにするとともに，雄性判別に用いられている DNA マーカーの定量解析が，雄性因子同形接合と異型接合を判定する方法として利用可能であることを立証したものである。以下はその概要である。

サイトカイニン代謝酵素関連遺伝子の単離・同定と発現解析

サイトカイニン代謝関連遺伝子の単離・同定：アスパラガスの発達初期の花芽は性に関わらず両性花様の形態を示しており，その後，雌雄花器官の退化が生じて単性花が形成されることがわかっている。実際にアスパラガス数品種を用い，組織標本を作製し，顕微鏡で観察したところ，初期の形態に雌雄の違いは観察されなかった。雌雄の違いは，雄蕊の発達に見られ，葯の側膜細胞層の死滅，花粉四分子の形成異常，花糸と葯の発育不全などが観察された。雄性花器官の形成にジベレリンとサイトカイニンが深く関わっていることが知られていることから，サイトカイニン代謝酵素関連遺伝子の発現解析を目的として，それらの遺伝子を同定した。サイトカイニンの代謝は，アデニンヌクレオチドにイソペンテニール基を付加するイソペンテニール転移酵素（IPT），リボチド型サイトカイニンから加水分解によって糖リン酸を除く加水分解酵素(LOG)，およびサイトカイニンから側鎖を除去するサイトカイニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ（CKX）によって調節されていることが明らかにされている。そこで，雌雄アスパラガスの発達段階にある花芽から RNA を抽出し，cDNA 遺伝子を単離・同定した。その結果，IPT の 1 遺伝子，CKX の 2 遺伝子および LOG の 1 遺伝子が同定された。IPT はイネの IPT6，CKX はトウモロコシの CKX4 および CKX6 との高い相同性を示した。

同定された cDNA 遺伝子の発現解析：　採取した'Limburgia'の花芽を，組織学的な判定に基づいて発達段階ごとに分け，さらに，解剖顕微鏡下で花被，雄蕊，雌蕊器官ごとに切り，それぞれの組織のサイトカイニン代謝関連遺伝子の発現を，転写産物の定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって解析した。その結果，雌花では退化が起きる時期の雄蕊で著しく

高いレベルの IPT の発現が検出された。一方，雄花の IPT 発現は，いずれの花器官も発達期間を通じて低いレベルで推移した。CKX 2 の発現は，発達期間を通して雌花の花被で高い値を示したが，大きな変動は認められなかった。雄性個体では雄蕊で高い値が検出された。さらに，*in situ* hybridization 法によって遺伝子発現部位を特定したところ，IPT は雌性花雄蕊の側壁細胞層で発現していることがわかった。
内生サイトカイニンの定量： 雌性花の内生サイトカイニン量を，花被，雄蕊，雌蕊に分け測定した。その結果，退化を開始する時期の雄蕊のイソペンテニールアデニンおよびそのリボチドのレベルが著しく高いことが明らかとなった。過剰のホルモンによって雄性不稔が起きることが知られており，アスパラガスの雌性花形成に雄蕊で過剰に産生されるサイトカイニンとそのシグナリングが関与していることが示唆された。

超雄性同定のための雄性判別 DNA マーカー定量法の確立
定量 PCR による雄性判別 DNA マーカーの定量：アスパラガスの性は XY 型様式で遺伝するので，雄性決定因子を同型接合として持つ個体の花粉を受粉に利用することにより，全雄性種子を得ることができる。花粉親のもつこの性質は超雄性と呼ばれる。超雄性系統は，葯組織から再生した植物体やごく稀に存在する雄性両性同株性（andromonoecy）個体の自殖後代から，同型接合体（YY）を選別することによって分離される。雄性決定因子の同型接合体と異型接合体（XY）は植物形態に基本的に違いが無いため，次世代が全て雄性個体になるか，あるいは雌性個体を含むかによって超雄性を判断する。しかし，判別に至るまでに花粉採取までの栽培や次世代の育成が必要であることなどから，より効率的な判別法の開発が望まれてきた。そこで，雄性因子と強く連鎖する判別 DNA マーカー*Asp1-T7* を利用し，複相ゲノム当たりのマーカー量を測定することにより，同型接合体を判別する方法を検討した。検討にはモデル品種として，栽培品種 'Gijnlim' から分離した雄性両性同株系統，およびその自殖後代個体を用いた。
生育したアスパラガス植物は多量の多糖類を含むので，磨細した試料について，核 DNA の抽出効率と定量性を高めるための処理を施し，抽出した DNA に含まれる Asp1-T7 量を策定した。測定は TaqMan probe 法によって行い，得られた測定値は，単一コピーである *AoDEF* の部分配列（*AoDEF-Taq1*）の増幅量を基準にして校正し，相対量として表した。'New Jersey 264' ('NJ264') 雄性個体（XY）の値（1.00）と比較し，Asp1-T7 の相対量を算出したところ，2 個体がほぼ 2 倍の値（1.91-1.94）となり，14 個体が近似した値（0.75-1.17）となった。一方，マーカーの増幅が検出されなかった 5 個体は雌性と判定された。さらに，Asp1-T7 と *AoDEF* 遺伝子の部分配列をそれぞれ 1 コピーずつ挿入したプラスミドを作製し，ゲノムに含まれる Asp1-T7 量を測定した結果，'NJ264'のほぼ 2 倍量の値が得られた個体では，複相ゲノムのそれぞれに Asp1-T7 が含まれていることが示唆された。
雄性決定因子の同型接合と超雄性の関係：マーカーの増幅が確認された個体から採取した花粉用い，雌性個体と交雑した。得られた後代の性を調べたところ，Asp1-T7 の相対値が 'NJ264' のほぼ 2 倍の値を示した 2 個体はいずれも超雄性を示した。この判定方法の有効性は，他の品種においても確認した。一方，定量 PCR による結果から異型接合と判別された雄性 13 個体のなかに超雄性を示す個体が確認された。この個体は通常と同数の染色体を持つとともに，雄性両性同体の性質を示した。この個体は結実性の雄性個体であったことから，自殖次世代の雌雄判別を行ったところ，Asp1-T7 の増幅が見られない個体が存在した。雄性決定因子と雄性判別マーカーとの間での組替え，あるいは雌性表現に関連する遺伝子領域あるいは発生障害をもたらす劣性の変異がその要因として推定され，植物における性表現の可変性が示唆された。