



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11821
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60901
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuna_Horiuchi.pdf



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

北海道大学 大学院農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

堀内 和奈

目次

第1章 緒言	1
謝辞	4
第2章 研究史	5
第3章 雌性および雄性花におけるサイトカイニン代謝酵素遺伝子の 発現	16
3. 1 はじめに	16
3. 2 材料および方法	19
a 植物材料	19
b 組織化学	19
c RNA の抽出および cDNA の合成	24
d 遺伝子のクローニングとシーケンシング	25
e 定量 PCR	30
f <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	30
g サイトカイニンの定量	33
3. 3 結果および考察	34
a アスパラガスサイトカイニン代謝関連酵素遺伝子の 単離・同定	34
b 雌花および雄花の発達とサイトカイニン代謝関連酵素 遺伝子の発現	34

c 内生サイトカイニン量	43
第4章 超雄性同定のための雄性判別マーカー定量法の確立	52
4. 1 はじめに	52
4. 2 材料および方法	55
a 植物材料	55
b DNA 抽出	55
c リアルタイム PCR による定量	57
d ゲノムに含まれるマーカー数の測定	61
e 雄性判別マーカーAsp1-T7sp による雌雄判別	61
f ‘Gijnlim’ A13 の染色体	61
4. 3 結果および考察	65
a ‘Gijnlim’ 自殖後代における雄性決定因子同型接合体 の判別	65
b pT7DEF を使用した雄性決定因子同型接合体の判別	65
c 他品種への応用	69
d ‘Gijnlim’ A13 の特性	69
第5章 総合考察	77
摘要	81
参考文献	83

略語表

BSA	bovine serum albumin
CKX	cytokinin oxidase/dehydrogenase
DIG	digoxigenin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycoltetraacetic acid
FAA	formalin acetic acid alcohol
GA	gibberelin
IAA	indole-3-acetic acid
iP	isopentenyl adenine
iPRPs	isopentenyl adenine riboside phosphates
IPT	isopentenyl transferase
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LOG	cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
MES	morpholinoethanesulfonic acid
ORF	open reading frame
PBS	phosphate-buffered saline
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
tZ	trans-zeatin
tZRPs	trans-zeatin riboside phosphates

X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

本論文に使用した遺伝子の DDBJ/EMBL/GENBANK におけるアクセッション番号

イネ (*Oryza sativa*)

OsIPT1	AB239797
OsIPT2	AB239798
OsIPT3	AB239799
OsIPT4	AB239800
OsIPT5	AB239801
OsIPT6	AB239803
OsIPT7	AB239804
OsIPT8	AB853903

トウモロコシ (*Zea mays*)

ZmCKX1	AB044603
ZmCKX4	GU160398
ZmCKX5	GU160400
ZmCKX6	GU160401
ZmCKX8	GU160402
ZmCKX12	GU160403

トマト (*Solanum Lycopersicum*)

SlLog6	AB690818
SlLog7	AB690819
SlLog8	AB690820

第1章 諸言

食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は、地中海地方を原産とする雌雄異株の多年生草本植物である (Tutin TG et al., 1980)。植物分類学では、従来、ユリ科に分類されていたが、最近の分類体系 (APGIII) ではクサスギカズラ科として独立した分類群に分けられている (The angiosperm phylogeny group, 2009)。アスパラガスの中には観葉植物として利用される種があり、江戸時代に日本にもたらされたものはそれらの種である。食用の品種が導入されたのは明治時代に入ってからであり、それらは輸出向け缶詰用ホワイトアスパラガスとして栽培されていた。ホワイトアスパラガスは覆土によって萌芽を軟白化したものであり、大正時代になって栽培法の導入とともに本格的な栽培が始まった。その後、浴光栽培するグリーンアスパラガスの栽培法が導入され、今日では、緑色アスパラガスが生産の主流となっている。

ホワイトアスパラガスはデリケートな味覚の高級食材として利用されており、本邦では、高品質な加工商品が生産されている。特に冷涼地では、越冬した地下茎利用した高品質アスパラガスの生産が行われており、現在では、日常的に食卓に上る野菜として、グリーンアスパラガスが広く普及している。アスパラガスはアスパラギン酸や葉酸を多く含むほか、利尿効果のある成分が含まれている。

アスパラガスは、ハウレンソウなどとともに、雌雄異種植物として知られている。雌雄異株あるいは雌雄同株植物における単性花の形成は、遺伝的仕組みや発生の進化の過程で度重なる変異の結果起きたと推定されている (Miller and Diggle, 2007)。雄花や雌花で花器官退化の起きる発育ステージは植物種によってそれぞれ異なっていて、退化の起きる花の発育時期が多様である事実は、植物の性質とその雌雄性進化の特性を反映していると考えられている (Diggle et al., 2011)。花器官退化の

多様性は、その根底にある仕組みが多様であることを意味している。

単性花の形成は、花器官そのものが形成されないタイプ 2 と、花器官の退化によって単性花が形成される、すなわち雄蕊と心皮の分化が起きたのちに対向する器官の退化によって単性花が形成されるタイプ 1 に大きく分かれる (Darwin, 1877; Heslop-Harrison, 1958; Mitchell and Diggle, 2005)。しかし、解剖学的な判断によって、それぞれをまとめたグループとして分類してしまうと、単性花を形成する植物全体の根底にある性発現の多様性を見失ってしまう可能性がある。雄蕊と雌蕊の形成は多くの遺伝子がかかわる複雑な過程であり、どのステージにおいて発育不全が起きても最終的に単性花が形成されることを、常に考慮しておかなければならない。

これまでに報告された文献上の事例は、どの時期にどのようにして発育機能に不全がおきるのか、それらには植物種を超えた共通性があるのか、器官の生殖機能の消失を引き起す遺伝子、あるいはシグナル伝達物質は何か、という問いに答えるだけの多くの蓄積があるが、単性花形成と花の性決定の根底にある仕組みを理解し、より普遍的なモデルを構築するにはさらに多くの事例の蓄積と、詳細な解析、適合の検証が必要であることは言うまでもない。

本論文は、アスパラガスの性の発現がどのような仕組みでおきるのかを、特にサイトカイニン代謝酵素遺伝子の発現解析から明らかにするとともに、実際の農業技術として有用である雄性因子の同型接合個体の選抜を効率よく行うための方法を述べたものである。第 2 章では研究史を述べ、第 3 章では、雌性および雌性発現に関連する雄性花器官の退化が、サイトカイニンの生成に直接働く酵素遺伝子、(アデニンヌクレオチドイソペンテニル転移酵素, IPT) の過剰発現によって生じると推定する。第 4 章では、雄性因子の同型接合 (超雄性) 個体の選抜に、雌雄判別 DNA マー

カーの定量解析の利用が有効であることを明らかにする。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始適切かつ親身な御指導と御校閲の労を賜った北海道大学大学院農学院教授 増田清 博士に対し深く感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、御助言と御校閲の労を賜った同大学院農学院教授 近藤則夫 博士並びに同大学院農学院准教授 鈴木卓 博士に並びに 藤野介延 博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、御指導御鞭撻を頂きました北海道大学大学院農学院准教授 山岸真澄 博士、またアスパラガスを提供していただき、かつ多くの後指導と御助力の労を賜った北海道美瑛町農業技術研修センター元職員 皆川裕一 氏並びに北海道大学大学院元技官 笠井登 氏、同大学生物生産研究農場技官 中野英樹 氏、さらに植物ホルモンの定量解析にご尽力頂きました理化学研究所 榊原均 博士に心から感謝の意を表します。また植物機能開発学研究室卒業生 安達由美子 氏には多くの御助言を賜りました。深く感謝の意を表します。

本研究は北海道大学大学院農学院作物生理学研究室ならびに植物機能開発学研究室において行われた。本研究の完成に至るまで多くのご協力をいただいた同研究室の大学院ならびに学生諸氏に心からお礼申し上げます。

第2章 研究史

ヒロハノマンテマとスイバにおける性発現

ABC モデルは、花器官アイデンティティ遺伝子が発生の過程で時間的・空間的に正確に発現し、転写および転写後の活性を制御することによって、器官を形成する分裂組織を対応する適切な位置につくるとする一般例を提示している (Aukerman and Sakai 2003; Ng and Yanofsky, 2001; Chen, 2004)。花の形成に関わるもう1つの重要な制御は whorl (輪生) どうしの境界の維持であり、その機能にかかわる遺伝子が境界遺伝子 (cadastal gene) である。SUPERMAN (SUP) 遺伝子はその1つである (Bowman et al., 1992; Schultz et al., 1991; Sakai et al., 1995)。

植物では性染色体が形態的に識別できる種は限られている。そのなかで、ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) の雌雄は形態的に異なる X および Y 性染色体をもつことで知られている (Ming et al., 2011; Nicolas et al., 2005)。Arabidopsis で同定された SUP 遺伝子は雌性化を特徴づける働きがあり、雌性 *Silene* においても、花の形成過程で主要な役割を果たしていることが示唆されている (Kazama et al., 2009)。Arabidopsis thaliana の SUP は花の発育を通して、内部の2つの whorl における雄蕊と心皮との境界の維持にかかわっていると考えられている。これらの突然変異体の花のクラス B 遺伝子は whorl 2 と whorl 3 に加え、whorl 4 にまで発現の領域が拡張されている。その結果、過剰な雄蕊が形成される。心皮は発育しないか機能的に不全であり、機能を欠失した SUP 変異体は心皮に変わって多数の雄蕊を形成するので、SUP はこれらの whorl の細胞増殖領域を制御すると考えられている (Bowman et al., 1992; Schultz et al., 1991; Sakai et al., 1995)。

SUP 遺伝子を過剰発現したタバコの花芽は2および3の whorl が雌性化するとともに、萼片が花弁様に変化する。また、オーキシシンとサイトカイニンで制御される

過程を促進し、増殖と植物体への分化のホルモン要求性を低下させることがわかっており、発現が低レベルであった場合には細胞生長と増殖を促進し、高レベルの場合には阻害する (Nibau et al., 2011)。サイトカイニン は雄蕊の発育を抑制し、心皮様組織の分化を促進する。このことから、*SUP* は、サイトカイニンによるシグナル伝達を介して、雄性および雌性としての発育を制御していることが示唆されている (Nibau et al., 2011)。

雌雄異株植物であるスイバ (*Rumex acetosa*) の単性花形成は、タイプ 1 に属し、性染色体の形態に明瞭な区別がある (Ruiz Rejón, 2003)。雄性花と雌性花は、3 つの花被からなる 2 つの whorl と、6 本の雄蕊 (雄性) あるいは 2 つの不稔性心皮と 1 つの稔性のある心皮をもつ雌蕊群 (雌性) からなる。*Rumex* における *PLENA* ホモログ *RAP1* の発現は、雄性花と雌性花の若い心皮と雄蕊の whorl の花器官原基でおきるが、性に対向する花器官の生育が止まると、それらの器官での *RAP1* の発現が検出できなくなることが報告されている (Ainsworth et al., 1995)。*PLENA* はキンギョソウで同定された C 機能遺伝子であり、2 つある C 機能 MADS 遺伝子系列の一方に属する (Davies et al., 1999)。*Arabidopsis* の *SHATTERPROOF* (1 および 2) は *PLENA* と同一のグループに属する遺伝子である (Favaro et al., 2003; Liljegren et al., 2000; Davies et al., 1999; Kramer et al., 2004)。*PLENA* は、最近、果実の発達との関連が注目されている (Tadiello et al., 2009)。

Rumex acetosa と *Silene latifolia* の花の性決定は環境の影響を受けにくいといわれている (Grant et al., 1994)。加えて、*Rumex acetosa* とその類縁の雌雄同株種 *R. acetosella* では、外部から与えたホルモンが性の転換に効果がないことが報告されている (Culafic, 1999)。このことは、*Melandrium* (*Silene alba*) についても同様である (Ye et al., 1991)。これらの植物では遺伝的な要因が大きいことがその理由と考えられている (Grant et al., 1994)。

雄性器官の発達と植物ホルモン

外部から与えた成長調節物質の効果と、遺伝的な雄性不稔をもたらす植物ホルモンについての研究から、サイトカイニンやジベレリン (GA) が被子植物の雄性生殖成長に関与していることが明らかにされている (Sawhney and Shukla, 1994)。トマト (*Lycopersicon esculentum*) の *sl-2* (*stamenless-2*) やナタネ (*Brassica napus*), イネ (*Oryza sativa*) の遺伝的雄性不稔系統は、野生型のものより葯に含まれるサイトカイニンの量が低いことが知られている (Shukla and Sawhney, 1993; Sawhney, 1974, 1992; Nakajima et al., 1991)。さらに、オオムギの細胞質雄性不稔の回復にサイトカイニンが効果があることが報告されている。雌雄異株植物であるアサ (*Cannabis sativa*) , ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*), キュウリの雌性系統 (*Cucumis sativus*) では、GA の処理によって雄性花の形成が促進されることが報告されている (Mitchell and Wittwer, 1962; Pike and Peterson, 1969; Mohan Ram and Jaiswal, 1972; Chailakhyan and Khrianin, 1978a, 1978b)。また、GA にはオオムギ、コスモス (*Cosmos bipinnatus*), トマトの雄性不稔突然変異体の稔性を回復させる作用があり (Phatak et al., 1966; Kasembe, 1967; Rana and Jain, 1968; Sawhney and Greyson, 1973; Schmidt and Schmidt, 1981), GA 合成阻害剤である CCC (2-chloroethyl-trimethyl ammonium chloride) にはキュウリの雄性花の数を減少させる効果があることが報告されている (Mitchell and Wittwer, 1962)。

雄性器官の発達に GA が必要である事例は、シロイヌナズナの GA 欠損突然変異体でも報告されている。*Arabidopsis* の矮性変異体 *ga1* は雄蕊の発達が不十分で花粉に稔性がないが、活性ジベレリンである GA_{4+7} を与えることによって稔性を回復する (Koornneef and van der Veen, 1980)。類似の事例はトマトの *gib-1* および *gib-2* でも認められている (Nester and Zeevaart, 1988; Jacobsen and Olszewski, 1991)。

ペチュニア (*Petunia*) の葯で GA に反応して発現する遺伝子 *GIP* は、GA の施与によって発現誘導され、パクロブトラゾールによって阻害される (Izhaki et al. 2002)。葯と花粉が退化するシロイヌナズナ変異体の解析によって同定された遺伝子 *GAI* は GA への反応性を低下させる半優性遺伝子であり、GA 欠損変異体と類似した表現型を示す (Koornneef et al., 1985; Peng et al., 1997)。この変異体の雄蕊の稔性はチジアズロンやカイネチンで処理することによっても回復することから (Huang et al. 2003)、花器官の発育不全に GA とサイトカイニンが関わる情報伝達系に干渉があると推定される。

カボチャ (*Cucurbita maxima*) 雄花では開花直前に花芽の活性型ジベレリン (GA_4) 濃度が急激に上昇する。この上昇は *GA20ox3* と *GA3ox4* の発現による。その後、花芽の成熟にともなって *GA2ox2* と *GA2ox3* の発現によってジベレリンが不活性型に変換される (Lange et al., 2012)。雄蕊の発達にジベレリンの働きが必要であることは、除雄した花の発達が、 GA_4 の処理によって回復することによっても確かめられている (Lange et al., 2012)。糊粉層細胞でおきる PCD (programed cell death) の解析によって同定されたリプレッサータンパク質 DELLA は GA 作用を抑制する。この抑制は、GA-GID1-DELLA 複合体の形成とプロテアソームによる DELLA の分解によって解除されるが、雄性花の発達におけるジベレリンの活性化には、同様の仕組みによる DELLA 機能の抑制が働いていることが示唆されている (Plackett et al., 2014)。イネのタペート細胞の PCD と花粉壁エキシンの形成には、糊粉層細胞における GA シグナル伝達系の主要な因子である GAMYB による cytochrome P450 hydroxylase (CYP703A3) の活性化が関わっていることが明らかにされている (Aya et al., 2009; Plackett et al., 2011)。

一方、GA が雌性器官の発育を促進し、雄性不稔を引き起す事例も知られている (Sawhney and Shukla, 1994 の総説参照)。例えば、トウモロコシの GA 欠失突然変

異体 *an1*, *d1*, *d2*, *d3*, *d5* は雄性両性同株の表現型を示すことがわかっている (Neuffer et al., 1997)。*An1* と *D3* は *Arabidopsis* の GA 遺伝子のオーソログであるが (Bensen et al., 1995; Winkler and Helentjaris, 1995), それらの欠失は雌雄の花器官の発達に全く反対の効果を示す。

GA とサイトカイニン以外の植物ホルモンについては, *Mercurialis annua* でオーキシシン (インドール酢酸) が雄性の表現型と相関しているとする報告がある (Hamdi et al., 1987)。

以上述べた様に, 花の正常な発育にサイトカイニンと GA の生合成が必須であり, 雄性生殖器官の発達にそれら植物ホルモンのシグナル伝達系が関与していることを示唆する事例は少なくない。しかし, それらの植物ホルモンの雄性化にかかわる仕組みについては, 推測の域を出ていない。それぞれの事例の解析とホルモン作用の普遍化を困難にしている最も大きな理由は, 植物ホルモンが多面的な生育過程に同時に作用することである。多面的な作用は, 解析困難な複雑な状況をもたらすことになり, そのような状況は, 突然変異体を利用した場合でも特別ではなく, 外部から与えた植物ホルモンの効果が, 副次的な効果を生み出してしまうという点では, 野生型を用いた場合と同様である。

生殖成長におよぼす植物ホルモンの普遍的役割を理解するためには, 組織特異的な植物ホルモン作用の解析が必須である。そのためには, 局所的な植物ホルモンおよび植物ホルモンの代謝に関連する酵素遺伝子の発現解析, 植物ホルモン標的部位の特定と相互作用などの情報が必須である。花の雌雄性発現と植物ホルモンとの関連を理解する上で, これら基本的なアプローチは, 矛盾の無い結論を導きだすための, 確実に重要な情報を提供する。

ウリ科植物における雌雄性とエチレンの作用

ウリ科植物ではエチレンの働きに関連した研究が進んでいる。キュウリ (*Cucumis sativus*) やメロン (*Cucumis melo*) などの花の発達はタイプ1に属し、花芽には雄蕊と雌蕊の原基があり、単性花は一方の花器官が成熟途中で停止することによって生じる (Malepszy et al., 1991; Kater et al., 2001)。この過程は、2つの遺伝子、*andromonoecious A (a)* と *gynoecious G (g)* (キュウリの *M (m)*, *F (f)* がそれぞれに対応する) とそれらの相互作用によって制御され、いくつかの性表現の異なるタイプの個体が生育することになる。

メロンの性表現では、次のような遺伝子組成との関係が明らかにされている。すなわち、雌雄同株 (*A-G-*) と雄性両性同株 (*aaG-*) を遺伝子組成に持つ個体では、主軸に雄性花が着生し、側枝にそれぞれ雄性花と両性花が着生する。一方、雌性個体 (*AAgg*) と両性個体 (*aagg*) にはそれぞれ雌性の花と両性の花が着生する。これらの基本的な性質に加え、植物ホルモンのエチレンや環境要因が性表現に影響を与える (Byers et al., 1972)。すなわち、エチレン処理によって両性花から雌花へ、さらにエチレン阻害剤処理によって雌花から両性花への変化がおきる。

メロンの雄性両性同株は、*andromonoecious (a)* 遺伝子座に座乗する対立遺伝子によって制御されている。この領域の遺伝子解析から、雄性両性同株では、ACC (アミノシクロプロパン-1-カルボン酸) 合成酵素の活性部位に遺伝的変異が生じ、機能が抑制されていることが明らかになっている (Boualem et al., 2008)。ACC 合成酵素は、S-adenosyl methionine (SAM) からエチレンの前駆体である ACC を合成する。この酵素は補酵素として pyridoxal phosphate (PLP, ビタミン B₆) あるいは PLP と aminoethoxyvinylglycine (AVG) の両方を必要とする (Huai et al., 2001)。エチレンの合成は ACC 合成酵素によって律速されているので (Yu et al., 1979; Kende, 1993; Kevin et al., 2002), 酵素の活性化はエチレンの生成を促し、雄性器官の発

達を抑制する。逆に酵素の不活化は雄性器官の発達を促す。エチレンそれ自体は心皮の発達には直接には影響しないと言われている。*andromonoecious* のメロンの性表現は、ACC 合成酵素遺伝子 (*CmACS-7*) の一つの塩基に変異が生じた場合でも変化することが明らかにされていて、Boualem et al. (2008) は、メロンの *A* 遺伝子が *CmACS-7* であることを報告している。

このように、メロンの性表現は、主に 2 対の対立遺伝子 *A* (*a*) 遺伝子と *G* (*g*) 遺伝子によって遺伝的に制御されるが、エチレン処理によって生じる性表現の変化と遺伝子型による性表現の違いに矛盾が見られないのは、それぞれの遺伝子が、エチレンの生合成に関わる酵素遺伝子そのものだからである。

キュウリでは、雌性型に存在するが混性型には存在しない *CS-ACS1G* 遺伝子がキュウリの *F* 遺伝子と連鎖することが報告されている (Trebitsch et al., 1997)。*CS-ACS1G* 遺伝子は、ACC の合成酵素をコードする遺伝子 (*CsACS*) の一つである。*CS-ACS1G* 遺伝子は、混性型キュウリと雌性型キュウリに共通に存在する *CS-ACS1* 遺伝子の重複により生じたと考えられている (Knopf and Trebitsh, 2006)。キュウリからは同時に *CS-ACS2* が同定されている。

CS-ACS2 は、雌花形成と相関性の高い発現パターンを示すことがわかっている (Kamachi et al., 1997)。すなわち、*CS-ACS2* は、雌性型キュウリの茎頂で、*CS-ACS1* 遺伝子または *CS-ACS1G* に遅れて発現する (Kamachi et al., 2000)。ゲノムに *M* 遺伝子がある雌性型キュウリと混性型キュウリの茎頂では、その発現がエチレンによって誘導される (Yamasaki et al., 2001)。混性型キュウリおよび雌性型キュウリでは、雌花に分化する花芽で発現していることなどが明らかにされている (Saito et al. 2007)。その後の研究によって、*M* 遺伝子の実体は *CS-ACS2* 遺伝子であることが明らかにされている (Boualem et al., 2009)。カボチャ (*C. pepo*) でも、ACS 関連の遺伝子が同定され、性発現についての類似したモデルが提唱され

ている (Manzano et al., 2013)。

以上のように、エチレンの作用とウリ科植物の雌性発現との関係は明瞭である。しかし、エチレンの作用の結果生じる雌性原基と雄性原基の発育抑制の仕組みについては、多くが未解決のまま残されている。キュウリの雄蕊の発育不全の過程で DNA の損傷がおきることが、TUNEL (TdT-mediated dUTP-nick end labeling) アッセイとヌクレオソーム構造解析によって確認されており、細胞死に至る過程が PCD であることが示唆されている (Wang et al., 2010)。エチレン処理による DNA の損傷は、キュウリ子葉プロトプラストでも起きることから (Wang et al., 2010)、エチレンによる細胞死は、死滅することが運命付けられている細胞に見られる普遍的な現象であると推定され、エチレン作用機構の解明が望まれている。

アスパラガスの雌雄性と植物ホルモン

アスパラガスの花の発達過程はタイプ I に属する。すなわち、花の発達に伴って、雌性花では雄蕊の発育が停止し、雄性花では雌蕊に機能の不全がおきることによって、単性花が形成される (Lazarte and Palser, 1979)。アスパラガスの成熟した花では、雌花の場合、雄蕊の痕跡が残り、雄では成熟後に花柱の発達した大型の子房が見られる。性に対向する花器官の退化によって単性花を形成する植物種は少なくはないが、アスパラガスは花の発達が進んだ段階で花器官の発育不全がおこり、雌性花の場合、雄蕊は減数分裂が開始される前から減数分裂期にかけて退化が始まるということが報告されている (Caporali et al., 1994)。

アスパラガスの花における植物ホルモンの研究は、雌雄性ならびに花の発達と関連して早くから着手されていた。ホルモンとして、オーキシン、アブシジン酸、トランスゼアチンリボシド、ジヒドロゼアチン、イソペンテニールアデニンの内生レベルが調べられた結果、未熟な花のオーキシンレベルに雌雄で違いのあることが

わかっている (Marziani Longo et al., 1990)。しかし、分析技術の限界があり、ホルモンレベルについての研究はそれ以降進展していない。アスパラガスの花芽は小さく、花被で覆われていることに加え、ホルモンを外部から与え、分解を受けずに細胞内に取り込ませることは現時点では技術的に極めて困難である。アスパラガスではホルモン生成に関連する変異体が得られておらず、花器官の形成に関連する変異体として、クラス B MADS 遺伝子の変異と推定される一系統のみが存在するに過ぎない (Asada et al., 2006)。

農業技術としてのアスパラガス性判別の意義

アスパラガスの性は、L5 染色体上の *M*-locus と呼ばれる領域によって支配され (Loptien 1979; Uno et al., 2002)、対立遺伝子 *M* (優性) と *m* (劣性) の優劣によって決定されると考えられている (Sneep, 1953)。性染色体は形態的に判別されておらず、rDNA 領域を検出する FISH (fluorescence *in situ* hybridization) による識別が試みられてきた (Deng et al., 2012)。通常の雄性和雌性の交配では、理論的に雄性：雌性が 1：1 の割合で出現するはずであるが、その比率は、遺伝的以外の要因によって変動することが知られている (Moon, 1976; Bouwkamp and McCully, 1972)。

アスパラガスの経済栽培 (露地栽培) では専ら雄性株が利用されている。その理由として、大きさが均一な萌芽を生じることや、発育開始時期が揃うこと、落下種子による雑草化が無いことなどが挙げられる。アスパラガスの性の判別は花の形態によって行われるため、雄性株の選抜が可能になるまでには数年を要する。そこで、発育早期に性を判別する目的で、雄性因子と強く連鎖した PCR マーカーを利用した、アスパラガスの迅速な性判別法が検討され、有効な DNA マーカーが開発されている (Jamsari et al., 2004, Nakayama et al., 2006)。他方、対立因子 *m*

に連鎖するマーカーの開発も進められている (Gebler et al., 2007)。近年、アスパラガスの他、雌雄性の判別が果実生産と密接に関係するパパイヤ (*Carica papaya* L.) でも性染色体に連鎖した PCR マーカーの開発が報告されている (Deputy et al., 2002, Urasaki et al., 2002)。しかし、アスパラガスを含む雌雄異株植物の中で、性を決定する遺伝子が特定されているものはない (Jamsari et al., 2004; Telgmann-Rauber et al., 2007)。

アスパラガスでは雄性活性因子 *M* についての同型接合体 (MM) が存在し、超雄性系統と呼ばれている。その理由は、超雄性アスパラガスを花粉親として用い、雌性との間で交配すると、得られる次世代個体は全て雄性になるからである。すなわち、超雄性個体を花粉親として用いると雄性個体 (*Mm*) のみが生じるのである。このように、雄性個体の栽培が行われるアスパラガスでは、超雄性系統は種子生産上に特別の利用価値があり、そのような系統の選抜と育成が行われている。

超雄性系統を得るためには葯培養を利用する方法や、雄性でありながら雌蕊に受精能力をもつ株、雄性両性同株 (andromonoecy) を利用する方法がある。アスパラガスにはごく稀に結実性雄性花を着生する株が存在し、そのような株は自殖によって次世代をつくることができる。自殖次世代のなかには雄性決定因子を同型接合ゲノム (MM) として持つものが含まれているはずで、それを選抜するのである。

一方、別の方法として葯培養を利用する方法がある。葯培養は、ダイハプロイドが得られることから、大変魅力的な手法であるが、成功例が限られている (Inagaki et al., 1982)。超雄性系統の花は、表現型としては雄性の花との違いはない。そのため、結実性雄性花を利用する方法、あるいは葯培養を用いる方法のいずれにおいても、雌性花と交雑して得られる次世代個体の性表現をもとに、用いた親株 (花粉親) の超雄性を判断することになる。そのため、超雄性系統の育成には長い年月、多大な労力、広い試験圃場を要することになる。このことが、雄性両性同株アスパ

ラガスが少ないこととともに、優良な超雄性系統を育成する大きな障害となっている。

第3章 雌性および雄性花におけるサイトカイニン代謝酵素遺伝子の発現

3.1 はじめに

サイトカイニンは植物の成長と分化を制御するシグナル物質であり、その作用は細胞分裂、シュートと根の生長相関、シンク活性、種子発達、胚発生などにおよぶ (Noode'n and Leopold, 1978)。サイトカイニン作用の恒常性と細胞内での濃度調節に中心的な役割を持つ酵素として、イソペンテニール基転移酵素 (isopentenyl transferase, IPT) とサイトカイニン酸化酵素/脱水素酵素 (cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX) がある (O'Keefe et al., 2010)。IPT はアデノシンリン酸にイソペンテニール基を付加する反応を触媒することによって、サイトカイニン (イソペンテニールアデノシンリン酸) を生成する代謝反応を律速する (Kakimoto 2001; Miyawaki et al., 2004; 2006) (図 3-1)。それとは別に、イソペンテニールアデニン塩基配列の一部として tRNA に含まれていることから、それを起源とする可能性が示唆されている。

一方、植物がサイトカイニンを不活性化する最も普遍的な方法は、側鎖の切除である。CKX はサイトカイニンを構成するアデニンの N6 位の側鎖を切り離すことによって不可逆的に不活性化する酵素であり (Morris et al., 1999; Massonneau et al., 2004), トウモロコシにおいて初めてその遺伝子がクローニングされた (Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999)。多くの植物で、サイトカイニンの不活性化の主要な経路が酸化的分解であることから (Armstrong, 1994), CKX がその濃度調節を担っていることが示唆されている。生体内では IPT と CKX による拮抗する反応が、合成と分解を司り、サイトカイニンの細胞内における濃度調節に働いていると考えられている (Schmülling et al., 2003)。

サイトカイニンの代謝に働く酵素として LOG (サイトカイニン加水分解酵素)

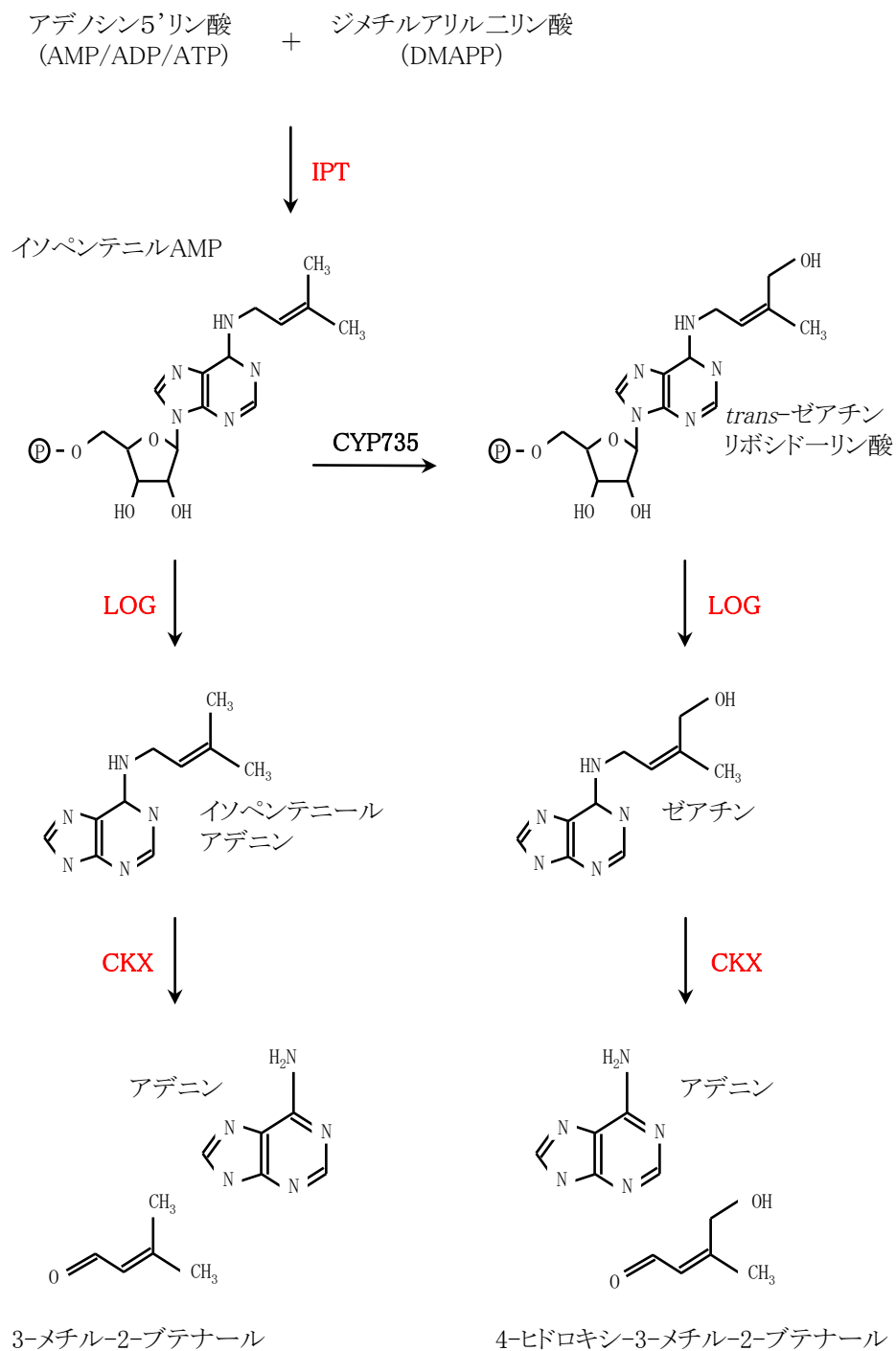


図 3-1 サイトカイニン合成および分解経路の概要

IPT: isopentenyl transferase, LOG: cytokinin riboside 5' -monophosphate phosphoribohydrolase, CKX: cytokinin oxidase/dehydrogenase, CYP735: cytochrome P450 monooxygenase

がある。LOG は茎頂分裂組織の維持に欠損があり、異常な花序を形成するイネの突然変異体 lonely guy (log) の解析によってその存在が明らかにされ、単離・同定された(Kojima et al., 2007)。LOG は、サイトカイニンヌクレオチドから糖リン酸部分を切り離すことにより、活性型遊離サイトカイニンを生成する。それゆえ、LOG タンパク質は活性型サイトカイニン合成の最終段階で働くと考えられている。

細胞内のそれぞれの活性は、定量 RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, qRT-PCR) による増幅量として測定できる。その結果をもとに、サイトカイニンの代謝が、合成系と分解系のどちらが勝っているのか、つまり、組織あるいは器官のサイトカイニンレベルが上昇傾向にあるのか下降傾向にあるのか、あるいは高いレベルで維持されているのか低いレベルにあるのかを推定することができる。

この章では、サイトカイニンの合成、分解、活性化に関連する酵素遺伝子の発現解析結果を示すとともに、細胞内サイトカイニンがアスパラガスの雌雄花器官の発達に果たす役割について考察する。

3. 2 材料および方法

a 植物材料

北海道大学農場で植栽された‘Limburgia’および‘New Jersey 264’（‘NJ264’）の雌雄花芽を用いた。カルス組織は‘UC-157’の種子を無菌播種し、得られた主茎組織から誘導した。定量PCRに用いるRNAは発育過程ごとに4つのステージ(図3-2)に分け、1ステージにつき6花ずつ採取し、液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。形態観察には図3-3, 4に示す雌雄花芽を用いた。

b 組織化学

組織の固定およびパラフィン包埋：

採取した初期の花芽は、FAA 固定液（40%ホルムアルデヒド：氷酢酸：50%エタノール=1：1：18）に浸漬し、数分間脱気した後、新しい固定液に移して4時間処理した。パラフィン包埋切片法はJensen（1962）の方法に準じた。固定した試料は、45%エタノールで3回洗浄後、脱水エタノールシリーズ（表3-1）のそれぞれの液に12時間ずつ浸漬して脱水した。脱水の終了した組織は、パラフィンに置換し、固化した。組織切片はロタリーミクロトーム（JUNG RM 2055, Leica）を用い、 $10\mu\text{m}$ の厚さの切片を作製した。

組織標本の染色：

標本の染色はJensen（1962）の方法を参考にした。薄切試料はキシレンで脱パラフィンし、99.5%，95%，70%，50%エタノールで加水した。サフラニン染色した試料を蒸留水で手早く洗浄し、70%，90%のエタノールで余分なサフラニンを洗い流した後、クローブ油：エタノール（1:1）に溶解した0.5%ファストグリーンに約4分間浸漬し、染色を行った。標本はクローブ油：エタノール：キシレン（2:1:1）の混合液に約5分間浸け、余分な染色液を除いた。最後にキシレンに約15分間浸

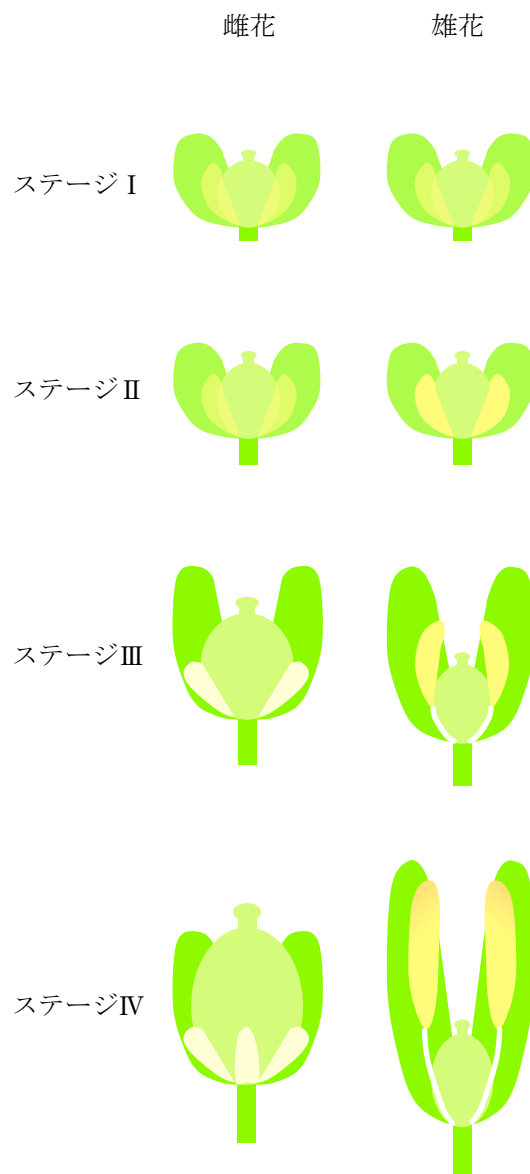


図 3-2 アスパラガス花芽の発達ステージ

雌雄花芽は発達段階ごとに 4 つのステージに分けた。

ステージⅠ：花柄が伸長していない時期（花芽の大きさは約 1mm）

ステージⅡ：花柄が伸長する時期

ステージⅢ：花柄の伸長が停止したのち，花芽が急速に生長するまでの時期

ステージⅣ：花芽が生長を停止してから開花するまでの時期

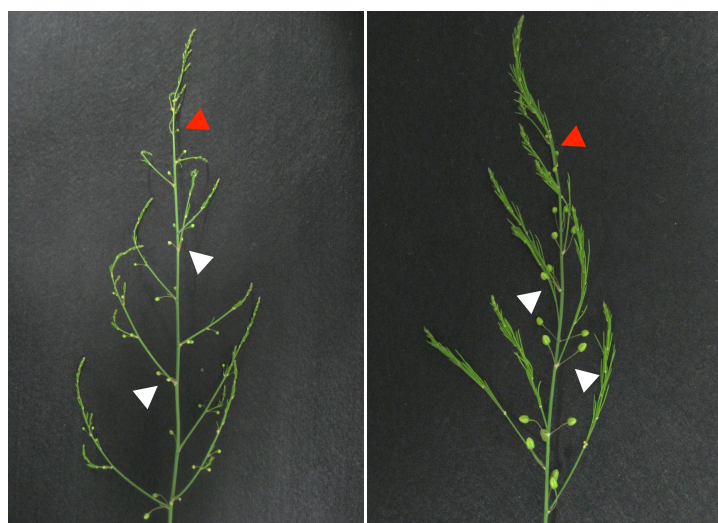


図 3-3 アスパラガスの側枝と側枝に着生した花芽

側枝の先端から順に花芽を採取し，発達ステージごとに分けた。側枝（赤）と花芽（白）

品種：‘Limburgia’

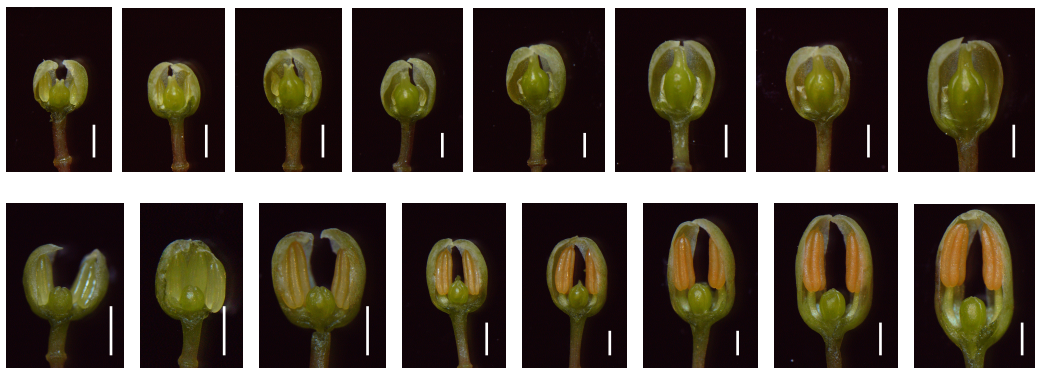


図 3-4 アスパラガス雌雄花芽の発達過程

図 3-3 の雌雄花芽を先端から順に採取し，実体顕微鏡の下で手前の花被および雄蕊を取り除き，CCD カメラを用いて画像を取得した。上) 雌花，(下) 雄花
品種：‘Limburgia’

表 3-1 組織の脱水に用いるアルコールシリーズ

名称	H ₂ O (mL)	95%エタノール (mL)	<i>tert</i> -ブチルアルコール (mL)
50	50	40	10
70	30	50	20
85 ¹⁾	15	50	35
95	–	45	55
100	–	25 (99.5%エタノール)	75
TBA	–	–	100

1) 少量のアルコール可溶性エオシンを含む

漬したのち、封入剤で封入した。観察は倒立顕微鏡 (Olympus) を用いて行い、画像を CCD カメラで取得した。

c RNA の抽出および cDNA の合成

RNase を失活させるために、乳鉢やピンセットは乾熱滅菌器で 200℃, 3 時間で処理した。乾熱滅菌処理できない器具類などは 120℃, 30 分間オートクレーブ処理した。ラージスケールの RNA 抽出には Trizol reagent (Invitrogen, <http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/brands/invitrogen.html>) を用いた。一方、少量の RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, <http://www.qiagen.com/jp/>) を用いた。

Trizol reagent による RNA 抽出は次の手順で行った。高速冷却遠心機用のチューブにカルス組織 (1 g) を入れ, 15mL の Trizol reagent (Invitrogen, <http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/brands/invitrogen.html>) を加え, polytoron (KINEMATICA, <http://www.kinematica.ch/>) を用いて, 30 秒間ずつ 3 回処理し, 細胞を破碎した。室温に 5 分間置いた後, 12,000rpm, 10 分間で遠心した。上清を別のチューブに移し, 3mL のクロロホルムを加え, よく混和した。室温で 3 分間保温後, 12,000rpm, 15 分間で遠心した。水相を別のチューブに移し, 8mL のクロロホルムを加え, よく攪拌した後, 12,000rpm, 10 分間で遠心した。水相を別のチューブに移し, 7.5mL の 2-プロパノールを加え, よく混和した後, 室温で 10 分間保温した。析出した RNA を 12,000rpm, 10 分間で遠心して集め, 沈殿を 15mL の 75%(v/v) エタノールで 2 回洗浄した。RNA の沈殿を減圧下で乾燥させ, 1mL の超純水に溶解し, 100 μ L の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え, チューブに分注した後, 3.5 倍量の 99.5%(v/v) エタノールを加え -80℃ で保存した。操作は特に記さない限り 4℃ で行った。

RNeasy Plant Mini Kit を用いた RNA 抽出は以下の手順で行なった。凍結保存した雌雄花芽を、 -30°C で冷却した 95% エタノール中で凍結し、実体顕微鏡下で雌蕊、雄蕊、花被に分解した後、氷冷アセトンに浸漬した。組織を BioMasher II (ニッピ, <http://www.nippi-inc.co.jp/>) に移し、アセトンを十分に揮発させ、磨砕した。磨砕した組織に β -Mercaptoethanol (Buffer の 1/100 量) を含む $450\ \mu\text{L}$ Buffer RLT を加え、よく懸濁した。 56°C の恒温器で 3 分間温め、附属のカラムキットを用いて RNA を精製した。RNase-free water に溶解した RNA は -80°C で保存した。

cDNA 遺伝子の単離は RACE 法の手順に従った。RNA ($8\ \mu\text{g}$) を $10\times 3'$ -CDS primer (表 3-2) と混ぜ、超純水を加えて液量を $11.6\ \mu\text{L}$ に調製した。 65°C で 10 分間加熱処理し、氷水で急冷した後、別途作成した RTase 反応液 ($5\times$ Transcriptor RT reaction buffer $8\ \mu\text{L}$, RNase inhibitor $1\ \mu\text{L}$, 100mM DTT $2\ \mu\text{L}$, 10mM dNTP mix $4\ \mu\text{L}$, RNase free water $11.2\ \mu\text{L}$) と混合した。Transcriptor reverse transcriptase $2.2\ \mu\text{L}$ を加え、 50°C で 20 分間反応させ、その後温度を 55°C に上げて 20 分間反応させた。反応終了後、 85°C , 5 分間の熱処理により酵素を失活させた。

qRT-PCR に用いる cDNA 溶液は Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo, <http://www.thermosci.jp/>) を用いて合成した。RNA ($1\ \mu\text{g}$) を超純水で $11\ \mu\text{L}$ になるように調整し、別途作成した混合液 ($5\times$ cDNA Buffer $4\ \mu\text{L}$, 10mM dNTPs $2\ \mu\text{L}$, oligo [dt] $1\ \mu\text{L}$, RT Enhancer $1\ \mu\text{L}$, Enzyme $1\ \mu\text{L}$) を加えた後、 42°C , 30 分間反応させた後、 95°C , 2 分間処理し、酵素を失活させた。

d 遺伝子のクローニングとシーケンシング

CKX cDNA 遺伝子

PCR プライマーは EST データベースの塩基配列 (Cv288363) を参考に作製した (表 3-2, 3)。3' 末端配列の増幅には、初めにセンスプライマー (AoCyo1) と

表 3-2 アスパラガスのサイトカイニン代謝酵素遺伝子の単離に用いた PCR プライマーとその配列

プライマー	塩基配列
3'-CDS ^{1, 2)}	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAG (T) ₃₀ VN-3'
UPM ^{2, 3)}	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3' (long)
	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (short)
NUP ²⁾	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'
5T	5'-GACTCGAGTCGACATCTATCCCCCCCCCCCCCCCC-3'
N5T	5'-GACTCGAGTCGACATCTAT-3'
AIT6f-N	5'-ATCAACTCCGACAAGATCCAGG-3'
AIT-6r2	5'-CCTTGATCTCGCGCACSGCG-3'
AoIPT-1f	5'-ACCGATATCGTGTCCTCGTAA-3'
AoIPT-1r	5'-TCGGATTCCGGGTCGAAACT-3'
CRP1	5'-GTTTCARGAGGATHGTGYGTCTTCTG-3'
CRP3	5'-GGHGGAGGSAGYATWGGVYTVATGGG-3'
CRP4	5'-CCRTCHACRTTCARCARCARYCCCACYGGTT-3'
AoLOG-1F	5'-AAGCTGAGATGGCTCGCCTA-3'
AoCyo1	5'-CCTACATCGGGACTTGATGA-3'
AoCyo9	5'-CTTGATGACCGACCGACCTT-3'
ACK-R1	5'-AGGAAGTCGACATACGGGAGGTCAG-3'
ACK1-R10	5'-AGAGGGTGCCCCAACGGTT-3'
DPF-01	5'-CTSRCGCCGSKSKYGTGGAC-3'
DPF-02	5'-CCGSKSKYGTGGACGGACTACCTC-3'
ACK-R1	5'-AGGAAGTCGACATACGGGAGGTCAG-3'
ACK-R2	5'-ATGAACGTCGTGCAGGGAGATTAG-3'

1) V=A/C/G, N=A/C/G/T, H=A/C/T, W=A/T, S=C/G, R=A/G, K=G/T, Y=C/T

2) Clontech, <http://www.clontech.com/>

3) UPMは0.2 μ MのLongと1 μ MのShortを含む

表 3-3 3'-RACE および 5'-RACE に用いた PCR プライマーの組合せ

目的配列	増幅領域	primary PCR ¹⁾	Nested PCR ¹⁾
AoCKX1	3'-RACE	AoCyo1 × UPM	AoCyo9 × NUP
	5'-RACE	5T × ACK-R1	N5T × ACK1-R10
AoCKX2	3'-RACE	DPf-01 × UPM	DPf-02 × NUP
	5'-RACE	5T × ACK-R1	N5T × ACK-R2
AoIPT	3'-RACE	AoIPT-1F × UPM	AoIPT-1F × NUP
	5'-RACE	N5T × AoIPT-1r	
AoLOG	3'-RACE	AoLOG-1F × UPM	AoLOG-1F × NUP
	5'-RACE	-	-

1) フォワードプライマー × リバースプライマー

アンチセンスプライマーUPM (Clontech) を用いて primary PCR を行った。次に primary PCR の PCR 産物を鋳型に用い、AoCyo9 と NUP (Clontech) を使用し、Nested PCR を行った。得られた PCR 産物は pGEM-T Easy Vector (Promega) に組み込み、大腸菌 DH5 α 株にクローニングした。cDNA 塩基配列の解析は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.jp/website/jp/home/index.jsp>) を用いてシーケンス反応を行った後、SIGMA-ALDRICH JAPAN (<http://www.sigmaaldrich.com/japan.html/>) の受託 DNA sequencing サービスに依頼した。

引き続き、3' -RACE 法により決定された塩基配列をもとに特異的プライマーを製作し、以下の手順で cDNA の 5' -末端側の塩基配列を増幅した。合成した cDNA を鋳型に用いて、センスプライマー5T とアンチセンスプライマーACKR1 による primary PCR を行い、次に PCR 産物を鋳型に用いて、N5T と ACK1-R10 による、Nested PCR を行った。増幅した DNA は、3' -RACE 産物の場合と同じ方法でクローニングし、塩基配列を決定した。

IPT cDNA 遺伝子

DDBJ/EMBL/GENBANK の既知配列を利用し、相同性が高い領域に縮重プライマーを設計した。まず、逆転写産物を鋳型にして、AIT6f-N と AIT6r2 (表 3-2, 3) をプライマーとした PCR を行い、遺伝子の内部配列を増幅した。PCR 産物は CKX の場合と同様の手順でクローニングした後、シーケンスを決定した。つづいて、塩基配列に特異的なプライマーAoIPT-1f と AoIPT-1r (表 3-2, 3) を利用し、RACE 法によって 3' -および 5' -末端の配列を増幅した。

LOG cDNA 遺伝子

DDBJ/EMBL/GENBANK の *LOG* 既知配列を利用し、相同性が高い領域に縮重プライマー

を設計した。逆転写産物を鋳型にして、CPR3 と CPR4 (表 3-2, 3) をプライマーとして用い、PCR を行い、以下に示す手順でクローニングし、シーケンスを決定した。次に決定した内部配列に特異的なプライマー (AoLog-1f) (表 3-2) を用いて、3' -RACE を行い増幅した cDNA について塩基配列を決定した。

PCR 産物の TA クローニング

Proofreading 活性のある DNA polymerase を用いて DNA を増幅した場合、Taq DNA polymerase を用いて A 突出末端を付加し、pGEM-T Easy Vector (Promega, <http://www.promega.co.jp/>) に挿入した後、大腸菌株 DH5 α コンピテントセル (TaKaRa, <http://www.takara-bio.co.jp/>) にクローニングした。大腸菌は IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) と X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indol-3- β -D-galactopyranoside) を塗布した LBA 寒天培地上で培養し、白色のコロニーを単離した。

5' -RACE のための dG オリゴマーの付加と 2 本鎖 cDNA の合成

TE に懸濁した 1st stranded cDNA を 1.5mL Microcon-100 (Millipore, <http://www.emdmillipore.com/JP/ja>) のサンプルリザーバーに入れ、500xg, 15 分間遠心し、濃縮した。さらに TE を添加し、内容物の洗浄と濃縮を行った。サンプルリザーバー内に濃縮した cDNA 溶液を回収し、cDNA (20 μ L) に 10 μ L の 5 $\times$ TdT buffer, 5 μ L の 2mM dGTP, 5 μ L の BSA を添加して、超純粋で 49 μ L に調整して、混和した。94 $^{\circ}$ C に 3 分間保温し、氷水中で急冷した後、1 μ L の Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、70 $^{\circ}$ C で 10 分間処理し、酵素を失活させた。この反応液 (30 μ L) に 100 μ L の 2X PCR Master Mix (Promega) と 10 μ M の 5T (表 3-2) および DNA 特異的な reverse プライマーを 4 μ L ずつ加え、超純水で 200 μ L に調整した。94 $^{\circ}$ C で 2 分間保温し、94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分間, 60 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分間, 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分間のサイクルを 3 回繰り返して、cDNA を増幅した。

アミノ酸配列の推定と解析

DDBJ/EMBL/GENBANK (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) を用い、FASTA と tBLASTn プログラムを利用し、相同性検索を行った。多重アライメントには Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いた。

e 定量 PCR

定量 PCR は SYBR *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, <http://www.takara-bio.co.jp/>) キットを用い、インターカレーター法で行った。増幅には、表 3-4 に示したプライマーを用いた。内部更正配列として、アスパラガス α -Tubulin (表 3-4) 遺伝子 と Ubiquitin 遺伝子 (表 3-4) を用いた。cDNA は oligo [dT] プライマーを用い、Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo) によって逆転写したものを用いた。内部更正配列 (α -Tubulin) の増幅には、標的遺伝子の増幅に用いた cDNA を 1/5 濃度に希釈して用いた。測定にはリアルタイム定量 PCR 解析システム CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/ja-jp/life-science-research>) と解析ソフトウェア Bio-Rad CFX Manager 3.0 を用いた。

f *in situ* ハイブリダイゼーション

材料とハイブリダイゼーションに用いる組織標本の作製：

採取した ‘Limburgia’ の雌雄花芽を FAA 液を用いて化学固定し、パラフィン切片にした。

プローブの作製

AoIPT の 711bp (226-936) と AoCKX2 の 758bp (920-1677) の領域をプローブとして使用した。プローブには相補的 (アンチセンス) RNA を用いた。それぞれのプロ

表 3-4 定量 PCR による遺伝子発現解析に用いたプライマーと
その配列

プライマー	塩基配列
AoIPT-1f	5' -ACCGATATCGTGTCCCGTAA-3'
AoIPT-3r	5' -TCCTATTCCGGAAATACCCCTCCA-3'
AoLog-1f	5' -AAGCTGAGATGGCTCGCCTA-3
AoLog-1r	5' -TCGCGACACGAACTCAATCAGGCTT-3
CKX2-4F	5' -TTTCAGGCACGGGCCTCAGA-3'
CKX2-3R	5' -TTGTTGATCAGGCCCTCGTC-3'
AoTub-F	5' -AAGGCCTACCATGAGCAGCTATC-3'
AoTub-R	5' -TGATACCGCACTTGAATCCAGTG-3'
AoUbiq-F	5' -ACAACATCCAGAAGGAGTCG-3'
AoUbiq-R	5' -AGTGACGGTCCTTGTGGTTC-3'

ープ配列を pGEM-T easy (Promega) に挿入し、プローブは *Nco* I 制限酵素 (CKX 2) あるいは, *Hind* III (IPT) で直鎖化した。直鎖化したプラスミドを Plant DNAzol (Invitrogen) で精製し, DIG RNA Labeling Kit [SP6/T7] (Roche) を用いて, 37°C, 2 時間反応させ, 標識プローブを合成した。

ハイブリダイゼーションとプローブの検出

スライドガラスに貼付した試料はパラフィンを除去するため, キシレンに 2 回, 20 分間ずつ浸漬した。キシレン : 99.5% エタノール = 1 : 1 に移し, 20 分間浸漬した後, 99.5%, 95%, 70%, 50% エタノールに 10 分間ずつ浸けて加水し, 1×PBS (pH7.4) に 5 分間浸漬した。Trypsin (Wako, <http://www.wako-chem.co.jp>) (1 μg/mL in 1×PBS) で, 37°C, 30 分間処理した後、滅菌した超純水で 5 分間ずつ 2 回洗浄し, 4% パラホルムアルデヒドを用いて, 室温, 5 分間で固定した。滅菌した超純水で 5 分間ずつ, 2 回洗浄した後, 50% フォルムアミド, 0.5% blocking reagent (Roche, <http://www.roche-diagnostics.jp/>), 4×SSC, 250 μg/mL tRNA から成る hybridization buffer をスライドガラス上の試料に滴下し, 密閉容器に入れて 1 時間, 45°C の恒温器の中で保温した。次に 1 枚のスライドガラスあたり 20 μL のプローブ液 (約 4ng のプローブを含む) を滴下し, 試料の上にパラフィルムを被せて密閉容器に入れ, 一晚, 45°C に保温した。その後, 2×, 1×, 0.1×SSC で 15 分間, 2 回ずつ洗浄しプローブを除去した。この時, 標本の温度が低下しないように恒温器の中で手際よく処理した。1×PBS で 10 分間, 2 回洗浄し, 0.5% ブロックエース, 0.5% BSA を含むブロック液で 1/500 に希釈した Alkaline phosphatase 結合抗 DIG 抗体液 (Roche) をのせ, 37°C, 2 時間処理した。1×PBS で 10 分間, 2 回洗浄し, Tris-HCl (pH9.5) で 10 分間, 室温で pH を調整した後, NBT/BCIP (Roche) を用いて染色した。適度に発色したら, スライドガラスを超純水に浸けて, 発色を止めた。

スライドガラスを十分に乾燥させてから、水溶性マウント剤で封入し観察した。

g サイトカイニンの定量

‘Limburgia’ の雌花を雄蕊の退化が見られる前と後に分け、それぞれの花芽を実体顕微鏡下で雌蕊、雄蕊、花被に分解した。花芽は、ドライアイス上に置いたφ3cmシャーレの中で分解した。試料は冷却したまま重量を測定した後、2mLのサンプルチューブに移し、液体窒素で凍結して、-80℃保存した。凍結した組織はマルチビーズショッカー（安井器機、<http://www.yasuikikai.co.jp/>）を用いて磨砕した。磨砕は speed, 1200rpm; on time, 15sec; off time, 1sec; cycle, 1times の磨砕条件を2回繰り返して粉碎した。その後、凍結乾燥し、再度、重量を測定した。解析は、独立行政法人理化学研究所（植物科学最先端研究拠点ネットワーク）の榊原博士に依頼した。

3. 3 結果および考察

a アスパラガスサイトカニン代謝関連酵素遺伝子の単離・同定

CKX

cDNA 遺伝子単離の結果、塩基配列の異なる 2 断片が確認され、それぞれ、*AoCKX1* および *AoCKX2* とした。*AoCKX1* は、1581bp の ORF (open reading frame) を持ち、527 アミノ酸残基をコードしていた (図 3-5)。トウモロコシ CKX とのアミノ酸配列の相同性を比較したところ、CKX6 と 56% の類似性を示した (図 3-6)。一方、*AoCKX2* には 1602bp の ORF があり、534 アミノ酸をコードしていた (図 3-7)。*AoCKX2* は、トウモロコシ CKX4 とアミノ酸レベルで 64% の高い相同性を示した (図 3-8)。*AoCKX1* と *AoCKX2* には、CKX に共通して見いだされる FAD 結合領域およびサイトカニン結合領域が存在した (図 3-5, 7)。

IPT

イネおよびコムギの既知 *IPT* cDNA 遺伝子をもとに相同性の高い領域に縮重プライマーを設計した。増幅された断片をシーケンス解析したところ、単離された DNA に 912bp の ORF 領域を確認した。この ORF は 304 アミノ酸配列をコードした (図 3-9)。イネの *ipt* との相同性を検索したところ、*IPT2* と 37% の類似性を示した (図 3-10)。

LOG

単離した cDNA を解析した結果、114 アミノ酸配列をコードする 344bp の塩基配列を同定した (図 3-11)。トマトの *LOG* 遺伝子のアミノ酸配列と相同性を示した (図 3-12)。同定された遺伝子配列は cDNA の部分配列であると推定された。

b 雌花および雄花の発達とサイトカニン代謝関連酵素遺伝子の発現

雌性花、雄性花とも、花芽が 1mm 程度以下の初期の発達段階では、器官の退化は

```

1  TGCAC TGTAG CCTCTAC CTGCTCATCCCAATGGAGCTCACCCAATTTTGCCCGAGGCTCAACTTCTTTCTCCTCCTCCTCCTAGCCCC
      M E L T Q F C P R L N F F L L L L L A P
91  TGCTCCCCCTGCAACTTCATACAGAGCCCAATGGATTTCGGGCCCCCTAAACCTCTCGCAGACGACCAGCAAAGCCTCGGTGGACTTCGGC
      C S P C N F I Q S P M D F G P L N L S Q T T S K A S V D F G
181 AGGATCCGCTTCAACAACCCGTCGGCGGTCTTAAGGCCCAAATCCCCCGCAGACATCTCCCTCCTCCTCGGCCCTCTCTCCTCGTCCCCC
      R I R F N N P S A V L R P K S P A D I S L L L G L L S S S P
271 TCCTCCTCCGGCGGGGTCGCCGTCGCAGCGAGGGGCGCGGCCACTCCATCCACGGCCAGGCTCAAGCCCCGACGGCATTGTCGTGGAC
      S S S G G V A V A A R G A G H S I H G Q A Q A P D G I V V D
361 ATGGGCTCTCTCCCTCCGCGGTGGAGGTTGACGAGCCCGGCTCCTTCGCCGACGTCAGCGGCGGAGCCCTCTGGTCCGAGCTCCTGGAG
      M G S L P S A V E V D E P G S F A D V S G G A L W S E L L E
451 GAGAGCCTGAAGTCTGGGCTCGCTCCGAGGTCTTGGACCGATTACCTCCATCTAACCGTTGGGGGACCCCTCTCTAACGCTGGGATCAGC
      E S L K S G L A P R S W T D Y L H L T V G G T L S N A G I S
541 GGGCAATCCTTCAAATTTGGACCCAGATCAGTAACGTTCTTTCAGCTCGACGTCGTCACGGGCAACGGAGAGCTTGTTCAGTCTCGCCC
      G Q S F K F G P Q I S N V L Q L D V V T G N G E L V T C S P
631 ACGGAGAGCTCCGACCTTTTCCACGCGGTGTTGGGTGGGCTGGGCCAGTTCCGCATCATAACAGAGCGAGAATCACGCTCCAAAAAGCC
      T E S S D L F H A V L G G L G Q F G I I T R A R I T L Q K A
721 CCCGCAAGGTGAAGTGGGTGAGGGCCTTCTACGACGACTTCGACAAATTTCCGAGGACAGGAGCTGCTGATCTCAATGCCAGAGGAG
      P E K V K W V R A F Y D D F D K F S E D Q E L L I S M P E E
811 GTGGACTACGTCGAGGGCTTCGTCGTCCTGAACGAGCAGTCTCTCCACAGCTCCTCCGTCGCCTTCCCTTCTCAACTCGACTTCGTCGCC
      V D Y V E G F V V L N E Q S L H S S S V A F P S Q L D F V A
901 GTGCTCGAGAGGGACGCTCCAGGGTTTACTACTGCATCGAGTTTGGCGTGCATGACTACCAACAAGGGCTCAAGCCGAACATGTAGAT
      V L E R D A S R V Y Y C I E F A V H D Y Q Q G L K P N N V D
991 CAAGTAGTGGAGGAGATTTTCGAGGAAAAATGAGCTACATGCCTCGTTATTTTACAGCGCAGAGGTTTCCTACTTTGATTTCATCAACAGG
      Q V V E E I S R K M S Y M P R Y F Y S A E V S D F I N R
1081 GTGACGATGGAGGAGTTGAGCCTGAGGAGGAGAGGGTTATGGGATGTACCCACCCCTTGGCTGAATCTGTTTGTGCCTAAATCAGGGATA
      V T M E E L S L R R R G L W D V P H P W L N L F V P K S G I
1171 ACCAAGTTCAAGGATTTGCTCTTGGGGAGCATCTCACCAAAGGAATTTGAGGGCCCTCTCCTAATTTACCCCTCCTAAGAGACAAGTGG
      T K F K D L L L G S I S P K E F E G P L L I Y P L L R D K W
1261 AATGCAAACTCGTCGGCTGTGCTGCCGGAGTCCGGCAAGTTTGATCGGGTCGTATACGTAGTGGGTATACTTAGATCCGCTAACCCGAAT
      N A N S S A V L P E S G K F D R V V Y V V G I L R S A N P N
1351 ACGTGTCTCTCCGGCTTGCTCCAGGACCTCCTTCGCCGCAACCGCCACATCGCGGAGGTTGCAAGCAGGCCAAACATCGGGGCAAAACAG
      T C S P A C L Q D L L R R N R H I A E V A S R P N I G A K Q
1441 TATCTAGCCCACCATCCGTCCCCGGGCCATTGGCGGGGCCATTTCGGGCCCAAATGGGACCGGTTTGCAACCCATAAAACCGGTTTCGAC
      Y L A H H P S P A H W R A H F G P K W D R F A T H K T R F D
1531 CGGTAAATATACCTTGCCTCCGGGCAAGGATATTTCCCAAGAGCTATCTTACAACCAAGATACTTCTTATTCTCTATAATAAGACTTG
      P L N I L A P G Q G I F P K S Y L T T Q D T S Y S L *
1621 GTATATATAAATAGAGATAAGTAGAGAGATTTGGGCGGTTATATAGTTTTTCATTTGGTTAATGAAGTTTAGAGGACGCGGGGATTTTGA
1711 CTTTTCTGTAAATTAATGGGAAATGAAAGAAAAGGTGCCATTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 3-5 アスパラガス *CKX1* 遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

赤はFAD binding domain, 青はcytokinin binding domainを示す。

*は終始コドン


```

A o CKX1 1 -----MELTQCPFRNFFILLAPQSECNFIOSEPMDFGLNLQTTT--KASV
Z m CKX1 1 -MAVVVYLLLAGIACSHAAGTPALGDDRGRWPASLAALDGLKRLTDSNATAAST
Z m CKX4 1 -----MTRCLFILLFLVSSLISTVGLPVEPPAELLQLGGGVGGRLSVDAADIAEASR
Z m CKX5 1 MARATTSTVAALCFLLLSCVSTPSTTAASSAIHDIIRGLATTAARVTRDAEATARAST
Z m CKX6 1 -----MEVAMVVSARASILLIVISLCSPYKFIQSPMDIQLNLPLTTSTAAASS
Z m CKX8 1 MARRTRFVAVAILASFLSVAAGHPREPAAG--LPGLDLGLGIASRIRTDSNSTAATAT
Z m CKX12 1 -----MEGVLCTYAGIVALLCSSVNFIOQSPSDVFGVALLEHFIAS--AAR

A o CKX1 48 DFGRIE----NNESAVLRPKSPADISHLLGLSSS--PSSSGGVAVAARGAGHSIHGQAC
Z m CKX1 60 DFGN----ITSALPAAVLYSSSTGDLVAM----SAANSTPGWPYTTIARRGFGHSILGQAE
Z m CKX4 56 DGGVAR----AEPAVFFHRAAGDVAGIV--GAAPFARG--FRVSARGHGSISGQAC
Z m CKX5 61 DGTNATADDAARPAVIFYSCADIAAM----RAS--SASAPFPVSARGFGHSTRGQAT
Z m CKX6 50 DGRNIF----RAPAVLRFGSEFIDISMLSPISCS--PELFR--VTVAAARGAGHSIHGQAC
Z m CKX8 59 DFGQMRV----AAPAVFFHATPADIAAV--RES--ATSAAPFVAIRGCGHSIRGQAL
Z m CKX12 46 DFGGVVS----EAAIAVMQEGSPADIAALLGALSSSTGPGPKAAVAARGAGHSIHGQAC

A o CKX1 103 APDGIVVMGSLSAVEVDEP-----GSFADVSGGALVELLEESL
Z m CKX1 113 AFGGVVVNASHLGDIAAPP-----RINVSADCRYVDAGCEQVMDVLRASL
Z m CKX4 108 AAGGVVVDMSRGRGPGAAVAR-----ALPVHSAALGCHYVDVGGGLVVDVLRNWL
Z m CKX5 117 AFGGVVVDMAHLAVAGRDETATTNASTSASARLAVSDCRYIDAGCEQLVVDVLRNWL
Z m CKX6 104 APDGIVVETRSLGEMFFHVR-----GGGEGRASVADGGGVLLIELERSL
Z m CKX8 111 AFGGVVVDMSGSLGRGPRIN-----VSAATGAEFVDAGCEQLVVDVLRATL
Z m CKX12 102 ARGGIVVETRALRIVLVVRRG-----DGDGGGAADVGGGALVVELLEECI

A o CKX1 144 RSG-LAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSPEFE
Z m CKX1 159 ARG-VAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSKOL
Z m CKX4 159 SHGCLAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSPEFE
Z m CKX5 177 AHG-LTPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSKEK
Z m CKX6 152 RUG-LAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSPEK
Z m CKX8 157 RHG-LAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSMOV
Z m CKX12 150 RAG-LAPRSWTDYLLTVGGTILSNAGISGCAFHHGPQISNVLELDVVTGGGVITCSMOV

A o CKX1 203 SSDLEFAVLGGGLGQFGIITRARIILCKAPEKVKWVRAFYDDDFKFSQDOELLISME----
Z m CKX1 218 NADLEFAVLGGGLGQFGVITRARIIVAPAPARARVRFVWTFDEAFSAQQRILTAPRGGG
Z m CKX4 219 NEDLEFGLGGGLGQFGIITRARIIVERAPKVRVRIALLSNSEFTADQQRILISGGGG
Z m CKX5 236 DADLEFAVLGGGLGQFGIITRARIIVAPAPARARVILLITGAADLTADQQRILADDERRG
Z m CKX6 211 EADLEFAVLGGGLGQFGIITRARIILCKAPEKVKWVRAFYDDLGAITQDOELLISME----
Z m CKX8 216 NEDLEFAVLGGGLGQFGVITRARIIVAPAPKVRVRFVLAIVATPKDOELLISNRTSQV
Z m CKX12 209 SPELEFAVLGGGLGQFGIITRARIILCVAPKVRVRFVLAIVATPKDOELLISNHP----

A o CKX1 259 ----EVDYVEGFFVLNEQSLH-----SSSVAFPSQLDFVMDERDAS----
Z m CKX1 278 GASFGPMYSYVEGSSVFLVOSLA--TDLAN-----TGFFTADDAVARIVADAGERNA--
Z m CKX4 279 RR----FDYVEGFFVVAEGLIN-----NWRSSFFSQNPVKLTSKHHS----
Z m CKX5 296 GALAGLMDYVEGSSVTDLQCG--LIGSWRSQPPPSSSSFYSATDAARILAAEELGG--
Z m CKX6 267 ----DSVDYVEGEMVLNERSLH-----SSSHAFPSVDESPDFGTRSP--
Z m CKX8 276 G----FDYVEGCVLLRSLVEGPKS-----TPFFSGADILARILASRTG--
Z m CKX12 265 ----EVDYVEGEMVLNEQSLR-----SSSVAFPAQVNERPFDGSDDGNTKK

A o CKX1 298 -RVYYCIEFAVHDMQGLKPNNVDOVDFEISRKMSYMERFYFSAEVSVDFFNRVIMEEL
Z m CKX1 325 -TTVYSIETATLYNDATAAAAAVDQELASVLGTLGVYEGFAFORDIAAFLDRVHGHEV
Z m CKX4 319 ----SVLYCLEVTKNYDDTAGSVDDQVDTLLGELNFIPTVFTTDLPLMDPLRVHKAEL
Z m CKX5 351 -VILFLEGAVYVGASDTTAADVKKRVDMILRELKARGFAVODVSEQLDRVSAGGR
Z m CKX6 307 -RIYYCFEFAVHHHG--YKQSQAAVEATSRMESHASQILSVESVLDPLNRVMEEV
Z m CKX8 318 -TAIYYIEGAMY--TEDTAISVKKMKALLDQISFEFGFPFTKDTFVQFLDRVREER
Z m CKX12 308 VCYYCIEFAVHDFQR--QDSAAHVVDLVSGILSVLRPHAVSEVAVWDFNRVMEEE

A o CKX1 357 SLRRRGLWDVP-HPWLNLFVPKSGITKPKDLLIGSISPKEFEG-----PLLIYPLL
Z m CKX1 384 ANKILGLMVEP-HPWLNLFVVERSRVADSDRGVFVKGLQGTD--IVG-----PLIYVPLN
Z m CKX4 376 KIRAKGMVEP-HPWLNLFVBASRIADSDRGVFVGVLGGRTAG-----AGGVLIYPMN
Z m CKX5 410 RUGEGGLWDVP-HPWLNLFIPRSRIIDAAGVFHGVLPLPTR--TAGGGGGGVLIYPMN
Z m CKX6 364 SLRSACMEEVH-HPWLNLFVVPKPCVAGFDLLMDNVSPDSFGQ-----LLLIYPLL
Z m CKX8 375 VLRSAQMVEP-HPWLNLFVVERSRVILDDGQVEKALLKANFAG-----ILMIYPMN
Z m CKX12 366 SLRRRGLWDVP-HPWLNLFVVERGVANMDLIMATLAQGHFEG-----PLMIYPLL

A o CKX1 407 RDKWNANSSAVLESEG---KFRVMYVVGILRSANPN-----TCSPACQDLRRNRHI
Z m CKX1 435 KSMDDGMSAATLESED-----VFMAVSLFSSVA-----ENDLARQEQNRRI
Z m CKX4 429 KHKWDPRSAVLEDEE---VFLLVALRLSLALPGA-----PESLEARONORI
Z m CKX5 466 KKWWDGATSAVLEDDGDGDGEVEFYVVGILRSAVA-----DGDIRMEEQNAEV
Z m CKX6 415 RDKWDINTSVVLEDSGPT-ADDFVMYVVGILRSANPGPEEDGDCSHRCHELLRSHRI
Z m CKX8 426 KRWDDRMATMTATD--DDNVFMAVSHLYSALS-----ADDVPOLEVMKAV
Z m CKX12 416 THRWDGNMAVVEAAP-----DGMVVFVSRSTDPAR-----CGFACMERILEOHRV

A o CKX1 458 EFAVSPNIGAKOYLAAHHPSPAHWRHFG-----FKWDRFATHKRPDPLNILAFOG
Z m CKX1 478 LRFCDLAGIYKTYLAHTDRS--DNVR-----HFGAAKWRHEVEMTKNYDKRILSPGO
Z m CKX4 474 LDFCAGTIGAKOYIPGLKARHEHAFHG-----AARWDRFARLAEFDPRAILLAGO
Z m CKX5 516 ARFCEAAGIPCTOYLPSYATQ--DWAARHFGPAGSGRNDIFLRKARKYDPMALLSRGO
Z m CKX6 474 ADAFEAR-LGAKOYIPHHYIPARVQOHLG-----RRWRFADRKFDPMLRLCPGO
Z m CKX8 473 LDFCDISGTECKOYILEHYISQDGWRR-----HFGAKWRIAEIKARYDPRAILSPGO
Z m CKX12 465 ADFCDIR-LGAKOYLARQPSHAHWRHFG-----ASWDRFVARKARFDEPMNLCPGO

A o CKX1 510 GIFPKSYITQDTSYSL-
Z m CKX1 531 DLEN-----
Z m CKX4 527 GIFRPPGPSALAAADS--
Z m CKX5 573 RIFSSPLIAS-----
Z m CKX6 525 GIFRFTAQDAAAAAAYGS
Z m CKX8 525 RIFVPVVESSGIIASA--
Z m CKX12 516 GIFRWTDSSSSPM-----

```

図 3-6 アスパラガス CKX1 とトウモロコシ CKX とのアミノ酸配列の相同性
アスパラガス CKX1 をトウモロコシ CKX との相同性を検索した。一致するアミノ酸を灰色のボックスで示す。

```

1  ATTCAAGAATCACCAAGTTCTCTCCTAATGGCTCACAAACGCTGCCTTCTCCTCTTTGTGTCATCTGCCCTCTAATCTCCACCGTCGGATTG
    M A H N A A F L L F V I C P L I S T V G L

91  ACCGTCGAGCCGACCGACCTCCTCCGCTCAACGTCGACGGCCGGCTCAGCCTTGACCCCTCTGACATCCACTCGGCCTCCATCGACTTC
    T V E P T D L L R L N V D G R L S L D P S D I H S A S I D F

181  GGCCGCATGACCCATTCTCCTCGCCGATGGCCGTCCTCCGCCCTCCTCCGGCGCAGACGTCGCCGCCCTAGTCGCCGCCGCTTACCGCTCC
    G R M T H S S P M A V L R P S S G A D V A A L V R A A Y R S

271  TCCGCTCATTTCCCGGTCTCCGCACGCGGGCACGGTCACTCGATCAACGGGCAGGCCAGGCAGCCGACGGGGTGGTCGTCGAAATGAGC
    S A S F P V S A R G H G H S I N G Q A Q A T D G V V V E M S

361  CACAGAGGCGGGGGCCAGCGGGCGAAGGCGAAGCGGAGTACTCGGCTGAATTGGGTGGGCATTACGTGGATGTCTGGGGTGGGGAGCTG
    H R G G G Q R A K A K P E Y S A E L G G H Y V D V W G G E L

451  TGGATAGATGTGCTGAATTGGACGCTGGCGAAGCGGGGCTGGCGCCACGGTCGTGGACGGACTACCTGTACCTGTCTGGGTGGGGGTACG
    W I D V L N W T L A N G G L A P R S W T D Y L Y L S V G G T

541  CTGTGCAATGCCGGGATCAGTGGACAGGCTTTCAGGCACGGGCCTCAGATCAGTAATGTCCATGAGCTTGACGTCGTACAGGGAGAGGT
    L S N A G I S G Q A F R H G P Q I S N V H E L D V V T G R G

631  GATCTCGTGACCTGCTCGGAGAAGGAGAAGTCAAGAGCTGTTTCATGGAGTTCTTGGAGGATTAGGGCAGTTTGGGATCATAACGCGGGCT
    D L V T C S E K E N S E L F H G V L G G L G Q F G I I T R A

721  AGAATTGCGTTGGAGCCTGCTCCCAAAAGAGTGAGATGGATTAGAGTTTTGTATTCCAACCTTCACTGCATTACAAAACGACCAGAAATAC
    R I A L E P A P K R V R W I R V L Y S N F T A F T N D Q K Y

811  CTAATCTCCCTGCACGACGTTTCATCCGTCAAAGAGTTTCGACTATGTGAGGGGTTTCGTCGTCGTCGACGAGGGCCTGATCAACAACTGG
    L I S L H D V H P S K S F D Y V E G F V V V D E G L I N N W

901  AGGTCCTCTCTTTTCTCTCCCAAGAAACCTGTCAAGATTAGCTCTATCGGAACATAAGGCGGAGTTCTTTACTGTTTAGAGATGACCAAG
    R S S F F S P R N P V K I S S I G T K G G V L Y C L E M T K

991  AACTACGATGAGTCCAATGCGGACTCACTAGACCAGGAAGTAGATGCACCTTCTCAAGGAACGGAACCTTCTGCCAGCTACAGACTTCACC
    N Y D E S N A D S L D Q E V D A L L K E L D F L P A T D F T

1081  ACTGACCTCCCGTATGTGCACTTCTCGACCGAGTTCACCGGGCCGAGGTGAAGCTCCGGGCAAGGGGCTGTGGGAGGTGCCCCACCCC
    T D L P Y V D F L D R V H R A E V K L R A K G L W E V P H P

1171  TGGCTCAATCTCTTCGTTCCCGGGTCCCGCATCTCGACTTCGACCGTGGGGTTTTCCGGGGAATCTTGGGAAACAAGACCAGTGGACCC
    W L N L F V P G S R I L D F D R G V F R G I L G N K T S G P

1261  ATCCTCATCTACCCTGTCAACAAGCACAAAGTGGGATGAGAGGAGCTCAGTGGTTACACCAAATGAGGAAGTATTCTACTTGGTGGCCTTC
    I L I Y P V N K H K W D E R S S V V T P N E E V F Y L V A F

1351  CTTAGAACTGCAGTCCCTGACTCTGTTGAGCCCAGCCAGCAATTAGAGTATTTGTACACACCAGAACCAGCGAATCCTTGACTTCTGCAAC
    L R T A V P D S V E P S Q Q L E Y L S H Q N Q R I L D F C N

1441  GACGCCGCGATTGACATCAAACAATACCTCCCCAATTACTCGACTCTCGATGACTGGCGGCGACACTACGGCGACCGGTGGCCGAGGTTTC
    D A A I D I K Q Y L P N Y S T L D D W R R H Y G D R W P R F

1531  TTGCGACGAAAAGCGGAGTTTCGATCCCCGGCGCATCCTTGGCACTGGCCAGGGAATATTCCGGCCTCAATCACCATCTGCTCTGTTTGAT
    L R R K A E F D P R R I L G T G Q G I F R P Q S P S A L F D

1621  TCGTCTGATTTCCTTAGGAGGACTACAAATTATTGACAATTTGTAGTTACTTTTTGAAGGTTTACACAATACGGAGAGGCTTATTAATC
    S S *

1711  TAATCATAGGATTATTTGCAGATGCATCCACTGTTCTACTTTATATGCCTAATTGATGATGTCTAGAGTTGTACATAAAAAAGAGAAATT

```

図 3-7 アスパラガス *CKX2* 遺伝子の塩基配列および推定される
アミノ酸配列

赤はFAD binding domain, 青はcytokinin binding domainを示す。

*は終始コドン

```

A oCKX2 1 ----MAHNAAFLEICPLISTVGLIVEPTDILRLNVD---RLSLDFSDIHSASI
Z mCKX1 1 -MAVVYLLHAGLIACSHALAAGPAIGDDRGRPWASLAALALDGGRDSNATAAAST
Z mCKX4 1 ----MTRCLMFTLFLVSSLISTVGLIVEPPAELLQLGGDVGGRLSDVDASDIAEASR
Z mCKX5 1 MARATTSVALCHFLSCVSATPSTLAASSAIIHDIIRGLADTTAAVRTDAEATARAST
Z mCKX6 1 -----MEVAMVSARASLLIVISLCSPYKFIQSPMDLGLNLPTTSTAAASS
Z mCKX8 1 MARRTRFVAVALIASFLSVAAGHPRLPAAG---PGDLFLGLIASIRTDSNSTAKAT
Z mCKX12 1 -----MEGKVLCTYAGIVALLCSSVNFIQSPSDVFGP-VALLEPTAEAR

A oCKX2 50 DFGRMTH---SSPMAVLRPSSGADVAALVRMY-----RSSAS---EPVSARGHGHSINGOAO
Z mCKX1 60 DFGN-----ITSALPAVLYPSSTGDLVALLSAAN-----STPGWPYTIARGCHGSLMGOAF
Z mCKX4 56 DFGGVAR---AEPMAVFHRAAGDVACLVGAMF---RSARG---EPVSARGHGHSISGOAO
Z mCKX5 61 DFGTNATADDAARPAAVFYPSCAADIAALIRAS---SSASPEVPVSARGFGHSTRGOAT
Z mCKX6 50 DFGRILF---RAPAAVLRPCSPRDISMLLSFLS---GSPSSRVTVAARGGHSHGOAO
Z mCKX8 59 DFGCMVR---AAPAAVFRPATHADIAALVRFS---ATSAPEPVAIRGCGHSWRGOAL
Z mCKX12 46 DFGGVVS---EAAIAVMCPGSADIAIRLGALLSSTGPGPGKAAAVAARGGHSHGOAO

A oCKX2 102 ADGVVVEMSHRC---GGORAKKE-----EYSAELGGHYVDVWGGELWDVLWMTL
Z mCKX1 113 APGVVVVNASLDAAAPP-----RINVSADGRYVDAGEOVWIDVLRASI
Z mCKX4 108 AGGVVVDNGRGRGHCAAVARTL---VFSALGGHYVDVWGGELWDVLWMTL
Z mCKX5 117 APGVVVDNASLAVARDET---TTNASSTSASARLAVSVDGRVDAGEOLWDVLHAAL
Z mCKX6 104 APGVVVETRSLPGEMEFHHV-----RGGCGRASADVGGVLWIELERSL
Z mCKX8 111 APGVVVDNGSLRGPRIN---VSATGAEPVDAGEOLWDVLRALL
Z mCKX12 102 ARGVVVETRALPRLVEVVR---GDGGGAADVGGGLWVEVLEEL

A oCKX2 151 ANGLAPRSWTDYLYLSVGGTLSNAGISGQAFRHGPQISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX1 159 ARC---VAPRSWNDYLYLVGGTLSNAGISGQAFRHGPQISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX4 159 SHGLAPRSWTDYLYLSVGGTLSNAGISGQAFHGPOISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX5 177 ARC---LAPRSWTDYLYLVGGTLSNAGISGQAFRHGPQISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX6 152 KLG---LAPRSWTDYLYLVGGTLSNAGISGQAFHGPOISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX8 157 RHG---LAPRSWTDYLYLVGGTLSNAGISGQAFRHGPQISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK
Z mCKX12 150 RAG---LAPRSWTDYLYLVGGTLSNAGISGQAFHGPOISNVHELDVVTGRGDLVTCSEEK

A oCKX2 211 NSELFFGVLGGLQFGLITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX1 218 NADLFDAVLGGLQFGVITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX4 249 NPDLFFGVLGGLQFGLITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX5 236 NADLFDAVLGGLQFGLITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX6 211 NADLFDAVLGGLQFGLITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX8 216 NSELFMAALGGLQFGVITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D
Z mCKX12 209 SFELFFAVLGGLQFGLITRARIALEPAPKRVIRWLYSNFTAFNDOKYLISH----D

A oCKX2 268 VHPSKSFDYVEGFVVVDEGLIN---NWRSFFSPPRNPVKISIGTKKGVLYC
Z mCKX1 298 GASFGPMSYVEGFVVVNOSA---TDLAN---TGFFTDADVAWALAGERNATTV
Z mCKX4 306 GG---GRRDYVEGFVVVAEGLIN---NWRSFFSPPRNPVKISIGTKKGVLYC
Z mCKX5 296 GALAGLDYVEGFVVVELQQ---LIGSWRSQPPPSSSEYATDAARAALAEEAGGVLY
Z mCKX6 267 ---DVDYVEGFMLNRSLS---SSIACPASVDFSPDFG---TRSSPR
Z mCKX8 276 G-----FDYVEGFMLNRSLS---SSIACPASVDFSPDFG---TRSSPR
Z mCKX12 265 ---ELVDYVEGFMLNRSLS---SSIACPASVDFSPDFG---TRSSPR

A oCKX2 317 LEMTKNYD-----SNACSLDQEVDALLKEDFLEADTTDLPYVDFLDRVBAEVKLRA
Z mCKX1 328 YSIEATLNYDNATAAAAAVDOELASVLGTSYVEGFAQROVAVAFLDRVGBEAVLNK
Z mCKX4 354 LEVTKNYD-----ETACSVDDVDTLGENFLEADTTDLPYVDFLDRVBAEVKLRA
Z mCKX5 354 LIEGAVYGGASDTTAADVKRVDMLREYARGAFYVQVSVEFLDRVBAEVKLRA
Z mCKX6 308 FYCVEFAVHHHGHYKOSAAFALSRRMSHASQLYSVESVLDFNRVMBESLSIS
Z mCKX8 321 YYIEGAMY---TEDTASVDKMKALDQSEFGFFAKVTVEFLDRVBAEVKLRA
Z mCKX12 310 YYICIEFAVHDQRDSAAPHVVLVSGKSYRPHAYSVEVAWDFLNRMBESLSIS

A oCKX2 373 KGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX1 388 LGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX4 410 KGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX5 414 LGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX6 368 KGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX8 379 KGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW
Z mCKX12 370 LGLWEVP---HPWLNLFVEGRILDEDRGVFRGLICNRKS---CPILLYFPNKHKW

A oCKX2 423 DERSSVTPNE-----VFYLVAFLETAVPDSVEES---COLEYLSHONRILDFC
Z mCKX1 439 DGMSAATFSED-----VFYLVAFLETAVPDSVEES---COLEYLSHONRILDFC
Z mCKX4 463 DERSSVTPNE-----VFYLVAFLETAVPDSVEES---COLEYLSHONRILDFC
Z mCKX5 470 DGATSAVFYDDGGDGBVEYLVGLSAVAGDLRS-----RMEEQAEVAREC
Z mCKX6 419 DTISWVFDSG---PTADDEWVFGLLSANGPEDGGCSHRCHELLRSHRTADAA
Z mCKX8 430 DDRNTAMTATD---DDNVFYVSLSLSALSADDVEA---QLERWAKAVDEFC
Z mCKX12 420 DGNSAVF---AAPDGVLVVSVLSTDEAR---CGRACHRILECHRVAEDEA

A oCKX2 471 NDAATDIKCYLENYSTD-----DWRYYGTR---WPRELRRKAEFDPRRILGTGOGIFR
Z mCKX1 482 DLACTQYLYLARHTDRS-----DWRYYGTR---WPRELRRKAEFDPRRILGTGOGIFR
Z mCKX4 508 AGTCLGAKCYLEGHKARH-----HWAEHGAAKWDREARKAEFDPRRILGTGOGIFR
Z mCKX5 520 EAGCTPCTQYLYLAQA-----DWAARHFGPASGRWDELRRKKYDPMAILSGQIES
Z mCKX6 478 EAR---LGAKCYLEHHPAPAR-----WQOHLGRWERAELKARYDPPLILSGQIES
Z mCKX8 477 DRSGLECKCYLEHVSQDGWRR-----HWGAKWSRIAELKARYDPPLILSGQIES
Z mCKX12 469 CRR---LGAKCYLERQPSLAH-----HWGHFGASWDREVAAKEDPMNVLGPSQIESIP

A oCKX2 523 DOSSALPDS-----
Z mCKX1 535 DOSSALPDS-----
Z mCKX4 561 DPGSPALADSS---
Z mCKX5 577 SPLLAS---
Z mCKX6 529 RTAODAAAAAYGS---
Z mCKX8 429 VPVESSGIASA---
Z mCKX12 520 WTDSSSSPM---

```

図 3-8 アスパラガス CKX2 とトウモロコシ CKX とのアミノ酸配列の相同性
アスパラガス CKX2 をトウモロコシ CKX との相同性を検索した。一致するアミノ酸を灰色のボックスで示す。

```

1 AGCATCATCGTCATCATGGGCGCAACCGGCACCGGCAAATCCAAGCTCTCCATAGACATCGCCACCCATCTCCGATCATCTGAGATCATC
  M G A T G T G K S K L S I D I A T H L R S S E I I
91 AACTCCGATAAGATCCAGGTCTACCGCGGCCTCGACATCACCACCAACAAAATCCCCGCCGCCGACCGCGGTGGCGTCCCCACCACCTC
  N S D K I Q V Y R G L D I T T N K I P A A D R R G V P H H L
181 CTAGGGTCCCACGACCCCGCCCGGAGAGCTCCCCGCCTCCGACTCCGCTCCCTCGCCGCCTCCGCGGTACCGATATCGTGTCCCGT
  L G S H D P A A G E L P A S D F R S L A A S A V T D I V S R
271 AACAAAGATACCGGTGATCGCCGGTGGATCCAATCCTTCATCCACGCGATGGTTTCGGATAGTTTCGACCCGGAATCCGACCCGTTTGGG
  N K I P V I A G G S N S F I H A M V S D S F D P E S D P F G
361 GGTGGGGTTCGAGTCCCGTCACCGCCTGCGGTTGCGTTACCGCTGCTGCTTCGTATGGGTTCGACGTGGAGAAGACGGCGCTGAGGGAGTAT
  G G V E S R H R L R L R Y R C C F V W V D V E K T A L R E Y
451 CTGGACAGGCGGGTGGATGAGATGGTGGGGTTCGGGGATGGTGGAGGAGCTGGAGGGGTATTTCCGGAATAGGACGGGGGCAGAATGGGAA
  L D R R V D E M V G S G M V E E L E G Y F R N R T G A E W E
541 CGGAACGTCGGGCTCAATAAGGCCATCGGAGTGCCGGAGTTTTCGGGGGTATTTTGGGGAGGGGAAGAAGTTCAGGAGGCGGTGGGGGAG
  R N V G L N K A I G V P E F R G Y F G E G K K F Q E A V G E
631 ATCAAGGAGAAACACGTGGCGGCTGGCGGTGGAGCAGGTGAGGAAGATCCGACGGCTGGGAGAGAGCGGGTGGTCCCTACGGAGGGTGGAC
  I K E N T W R L A V E Q V R K I R R L G E S G W S L R R V D
721 GCGACGGAGGTTCGTGAGGGCGAGGCTGGGCCTCTGTGGGGCCCAGGTGGAGGGTGAGAGGTGGGAGAGGGACGTGGCGGGGCCCCACTG
  A T E V V R A R L G L C G A Q V E G E R W E R D V A G P P L
811 CGGGCCGTTGAGAAATTTCTTGAGGAGGACAAGGCCCGGGGTTAATTACGCAGCAGCAGCAGCTCCCTGCTTCCCTGCGCTGCCTCCT
  R A V E K F L E E D K A R G L I T Q Q Q Q L P A S P A V P P
901 TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAGGAAAATTAAGTTAGGGGTATAGTGTAATTTTGTTTTTAATTACTTGTAAGTAAGTAAAT
  C C C C C C C *
991 GTGAAGGTTATGGGGGGGCTACCGGGCAAACCGGAGAGGAGGCGGCCGATTTTGGTGGGCTTAGGACGCCTCTGACACTGGTGGG
081 AGGGGCGGATACAGAAAAAGAAAAAGACAAAATTAGGGGTCAGTGTGGGCATTTTGGTCATTGTAATCTTTTTAAATTTTGTAGATTT
171 TTGCTTTTTTTTTTTTATTACCTAAAATGCAGAGTTTATTTATATGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 3-9 アスパラガス *IPT* 遺伝子の塩基配列および推定される
アミノ酸配列

```

AoIPT 1 -----MGA
OsIPT1 1 -----MEHCNGIAAVGRWLSTKPKVIFVLGA
OsIPT2 1 -----MEYHVGIVGQ----SPKPKVVFVLGA
OsIPT3 1 -----MEGSRGDKGKVVVMGA
OsIPT4 1 MQAYMAVAAPAPPASLTLLPRTTIVIRDRERFDAAPVAPLVLRHGAGVKKHAKVVVMGA
OsIPT5 1 MATSLSLAPKPAAVAVAAAAIPRLVPPPSIDMSALSPPPPLVSVSRSMVAKHKAVVMGA
OsIPT6 1 -----MLNFHPSCDCFLNMLGNKLVVITGA
OsIPT7 1 -----MTSVATRIATLVRAAAAASRFLRLHRRPGGEDTRMVIVGA
OsIPT8 1 -----MERSRVGDGCCCCSCSGRGVASTTAVRPSTGMVIVGA

AoIPT 4 TGTGKSKLSIDIAHLRSSEIINSDKIQVYRGLDITTNKIFAADRRGVPHHLLGSHDPAA
OsIPT1 27 TATGKSKLAIRLAARFDG-EVINSDKIQAHGDFPVITNKVTDEERAGVAHHLLGGVSPDA
OsIPT2 24 TATGKSKLAISIAERFGG-EVINSDKIQVHDGFFITTNKVTEERAGVPHHLLGLVHEDA
OsIPT3 18 TATGKSKLAIDLALRFGG-EVINSDKIQVHDGLDVVITNKVTDEERAGVPHHLLIGVFPEDA
OsIPT4 61 TGTGKSKLAIDLALRFGG-EVINSDKIQVHSGLDVVITNKVTEECAGVPHHLLISVARPDD
OsIPT5 61 TGTGKTRIAVDLALQFGG-EVINADKIQHRLGLDVITNKATADERAGVPHHLLIGVAHEDA
OsIPT6 39 TGTGKTRLSIEIAKAIGG-EVINADKIQHRLGLDITTNKVSLQDRCGISHHLLIASIPRNA
OsIPT7 26 TGTGKTKLSIDIAKVIGG-EVINADKIQHRLGLDVITTNKVSLADRRGVPHHLLCAIRPEA
OsIPT8 42 TGTGKTKLSIDIAQELAG-EVINADKIQHRLGLDVITTNKVSLADRRGVPHHLLCAIRAPEA

AoIPT 64 GELPASDFRSLAAAVTDIVSRNKIPVIAGGSNSFIHAWSDSFDPESDPFGGVEESR--
OsIPT1 86 -DFTAEDFRREAAVAVARVHAAGRLPVVAGGSNIYVEALVAGGGGA-----
OsIPT2 83 -DFTAEDFRREAAAVARVLAAGRLPVVAGGSNIYVEALVEGGGA-----
OsIPT3 77 -DYGVDFFRRDAARAVASVLAAGRPVVIAGGSNIYVEALLDGGGS-----
OsIPT4 120 -EFTAEDFRREAAAVAGVERGRLEPIAGGSNSYVEELVEGDGRA-----
OsIPT5 120 -EFTAEDFRREAAASRAAAVAAAGALPIAGGSNSYVEELVDGDRRA-----
OsIPT6 98 GDFVSVSFRSAAKTTINCIARRG TPLVVGGSNSLIHGLLVNFDSSIVDPFGQLEVS--
OsIPT7 85 GELPESSFRSLAAATAASTAARRLVPVIAGGSNSLIHALLADHFDASAGDPFSPAAAFV--
OsIPT8 101 GELPESSFRSLAAATAASTAARRLVPVIAGGSNSLIHALLADPIDAAPDPFADADV--

AoIPT 122 HRLRLRYRCCFVWVDVEKTALELYLDRRVDEMVGSGMVEELEGYFNRRTGAEWERNVGIN
OsIPT1 131 --FLAANDCLFLWIDVAPDLRLVYTAARVDDMVRRGLVGEARAGFDAGA----DYTRGVV
OsIPT2 128 --FRAAHDCFLWIDVAPGLRLVYTAARVDDMVRRGLVGEARAGFDGAGAADYYTRGVV
OsIPT3 122 --FRERHELCFLWVDSRAPALHRYVRHVRVDRMVEQGLVGEVRCLFRLDD---ADYSRGIR
OsIPT4 165 --FRERVECCFLWVDVLEVLGFVARRVDEMCRRLVREVAADDFRR---TDYSRGIV
OsIPT5 165 --FRDRVDCFLWVDVQLPVLHGFVGRVDDMCGRGMVAEIEAADFDPDR---TDYSRGIV
OsIPT6 156 YRPTPRSCCFLWVHVNEVLNEYLKHVRVDDMDAGLVEEIEEYFDTLSVNGHVVPVGLG
OsIPT7 143 YRPALRFCCLLWVHVDEALLDEYLDRRVDDMDAGMVEELEIEYFATTIAAERAAHSGLG
OsIPT8 161 YRPALRFCCLLWVDVDDVLEDEYLDRRVDDMDVGEGMVEELEIEYFATTSASRASHAGLG

AoIPT 182 KAIGVPEFRGYFGE-----GKKFCEAVGEIKENTWRLAVEOVRKIRRLGE
OsIPT1 185 KAIGLPEMHGYLLAEREGGAGAEDDDLLAGMLEAAVREIKNTFRITVSOVAKIRRLSA
OsIPT2 186 KAIGLPEMHGYLLAERSGGGAADDGE--LAAMLGAVREIKANTYRLAATQVAKIRRLSA
OsIPT3 177 RSIGVPEMDALRQEATG-ALLTHGDKYKVALLASAVGEIKANTWSLARROIRKIRRLRG
OsIPT4 220 KAIGVPELDALRLS-----RGDGADEEERARMLAAVAEIKNTFRACROHRIKIRRLR
OsIPT5 220 KAIGVPELDALRLS-----CAAAGGEEERARLLANAIEDIKANTRWLSRCRORAKIRRLR
OsIPT6 216 KAIGVPELSEYFTG-----RVSCSDALSMMKNTQTILARSQVTKIRRMVD
OsIPT7 203 KAIGVPELGDYFAG-----RKTISEAIDDIKANTRVLAAQVSKIRRMVD
OsIPT8 221 KAIGVPELGDYFAG-----RKSLDAIDEIKANTRVLAAQVSKIRRMAD

AoIPT 227 SG-WSLRRVDATVVRARLGLCAQVEGERWERDVAGPPLRAVEKFLEEDKARGLITQQQ
OsIPT1 245 LPGAIVRRVDATVVARMAEG---APHGETWREVWVEPCEEMVSRFLETPAAAAAVVANG
OsIPT2 244 LDGIVRRVDATVVARMAEG---APHRETWREVWVKPCEEMVGRFLEASAVDDDDN--
OsIPT3 236 LPGWSLRRLDVTRELELKVEARSEAECAAAWEADVIAPAAREVGMFLHGGNVVESGREG
OsIPT4 275 M--TRARRVDATVFRRGHAAD----DAWQRLVAAPCIDAVRSFLFEDQERSSIAAGK
OsIPT5 275 L--TRIRRVDATEAFRRRGGAAN----EAWERHVAAPSIDTVRSFLHGEFTTAAETTAA
OsIPT6 261 VWGTHVHALDCTETIAHLTGSNKYMDLVKVRDVSDEGTATIQDFI-----
OsIPT7 248 AWGTHPIHRLDASDTVRARLTRAGSAASASWERDVRGPGIATIRSLADQSPPPRSEGTN
OsIPT8 266 VWGTHPIRLDATATIRARLSGAGRAAEAAAWERDVRGPGIAMROTVGRADFNAAAVDCL

AoIPT 286 QLPASPAVPPCCCCCCCC-----
OsIPT1 302 KVDVNVGDAAGVPEAAAAAVVAGVV-----
OsIPT2 299 --AAAGSPAALAPMTAACRLRAQLVQLQY-----
OsIPT3 296 QPVVVEKMEVAAVVGAGAAAAAEKWCGRRLLETAAAYHGMEAAAAV
OsIPT4 328 PPLFAAGKATSGNISVFASAAAAAMAAAAI-----
OsIPT5 328 P-----VPPPPFLPMFALAAAGAGV-----
OsIPT6 321 -----
OsIPT7 295 DYLYAMETEPEPPPPPTLPPRLRLPRMQXCDMVG-----
OsIPT8 326 AARSRRQCLRGGMVAG-----

```

図 3-10 アスパラガス IPT とイネ IPT とのアミノ酸配列の相同性

アスパラガス IPT とイネとの IPT と相同性を検索した。一致するアミノ酸を灰色のボックスで示す。

```

1  AAGCTGAGATGGCTCGCCTAGCTGATGCTTTCATCGCTTTGCCCGGTGGATATGGGACTCTTGAGGAAGTGCCTTGAGGTGATCACTTGGG
  A E M A R L A D A F I A L P G G Y G T L E E L L E V I T W A

91  CTCAGCTCGGGATCCACAGTAAGCCGGTGGGGCTTTTGAATGTTGATGGGTTTTATGATTCAGTCTGCTCCTTCATTGATTTGGCTGTTG
  Q L G I H S K P V G L L N V D G F Y D S L L S F I D L A V G

181  GCGAAGGGTTTATATCAAGCAATGCAAGAAGCATCATAGTGTCTGCGCCGTCGGCTAAGGAATTGGTCATGAAGTTGGAGGAGTACGCGC
  E G F I S S N A R S I I V S A P S A K E L V M K L E E Y A P

271  CAAAGCCTGATGAGTTCGTGTCGCGACTGAGCTGGGATGTTGTAGAGACTGTCAAGTGTCAAGCTTGACCTGAAGTTGAACCAGGAATT
  K P D E F V S R L S W D V V E T V K C Q A C T *

361  GCATCTGCATCTTAAATCAGGAATTGCATCCGCATCTTAGAACTCTGATCAGGAGGCTCCTGTTACTTTTGGTGCTAACAAATGACATA

451  ATTTACAGTTTATACCTTGTCACGGGAAAGAGGATACAACCTTTTTTCGGGGTTTTGATATACATGTTATGTTGATTTTCTGAACTGTGAT

541  ATATTTAACATAAATATAAGCAGGTGTAGCTTTTTTCGTGGGGTAGGGGTGGTTGTGCGTTATGCAATCAAAATGCTTTAAAGTCAAAAT

631  TATACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGTTACCACTGCTTA

```

図 3-11 アスパラガス *LOG* 遺伝子の塩基配列および推定される
アミノ酸配列

```

AoLog1      0  -----
SlLog6      1  MERESGVVVKGSKFKRICVFCGSSQGKKSSYQDAAIELGKELVSRNIDL VYGGGSIGIMG
SlLog8      1  ----MENEIKESKFKRICVFCGSSAGKKS IYKEAAIELGREIVSRKIDL VYGGGSIGIMG
SlLog7      1  ----MEKVESKFNRICVFCGSSSGKKTSYQEA AIDL GKELVERRIDL VYGGGSVGLMG

AoLog1      1  -----AEMARLADAFIALPGG
SlLog6     61  LVSQAVHDGGRHVIGVIPKTLMPRELTGETVGEVKAVAGMHQRKAEMAKHSDAFIALPGG
SlLog8     57  LVSQEVHNGGRHVLGVIPKTLMPREITGETVGEVKAVADMHQRKAEMAKHSDAFIALPGG
SlLog7     56  LVSQAVHDGGRHVLGVIPKTLMPRELTGETIGELRAVSGMHQRKAEMARQADAFIALPGG

AoLog1     15  YGTLEELLEVI TWAQLGIH SKPVGLLNVDGFYDSL LSFIDLAVGEGFISSNARSIIVSAP
SlLog6    121  YGTLEELLEVI TWAQLGIH DKPVGLLNVDGYYN SLLSFIDKAVEEGFISPNARHIIVSAP
SlLog8    117  YGTLEELLEVI AWAYLGIHDKPVGLLNVDGYYN SLLTFIDKAVEEGFTCPNAPQIFVSAP
SlLog7    116  YGTLEELLEVI TWAQLGIH QKPVGLLNVEGYYN SLLSFIDKAVDEGFISPIARRIIVSAP

AoLog1     75  SAKELVMKLEEYAPKPDEFVSRLSWDVVETVKCQACT-----
SlLog6    181  SSKELVKKLEEYVPSHEGVASKLNWETEQLGYPQAQEISR--
SlLog8    177  NAKELLNKLEGYFSQ-----
SlLog7    176  TAKELIRELEEHVPEKDEIISKLIWEDEIQRYNYAPESTVPT

```

図 3-12 アスパラガス LOG とトマト LOG とのアミノ酸配列の相同性

アスパラガス LOG とトマトとの LOG と相同性を検索した。一致するアミノ酸を灰色のボックスで示す。

観察されなかった。しかし、花柄が伸長し始めると雄花の雌蕊は発育を停止し、雌花の雄蕊は退化し始めた。実体顕微鏡下での花芽の観察には限界があったため、初期の花芽は組織切片にして観察した。その結果を図 3-4, 13 に示す。

次に、アスパラガスの花芽におけるサイトカイニン代謝関連酵素遺伝子 *IPT*, *CKX1*, *CKX2*, *LOG1* の発現を解析した。*IPT* は退化が開始する時期（ステージ II）の雌花雄蕊で著しく高い値を示した。しかし、退化後の雄蕊での発現は低下した。雌蕊および花被での発現は、発達初期の雌蕊で比較的高い発現が検出されたが、その後は低い値で推移した。また、雄花においては、いずれの花器官でも発達期間を通して低いレベルの発現であった。*CKX2* は、雌花の花被で比較的高い値が検出された。雄花では雌蕊発育停止後の雄蕊において高い値が示された。また、*LOG* 遺伝子の発現は、雌雄どちらの花芽でも低い発現量だったが、雌蕊で比較的高い値が測定された（図 3-14, 15, 16）。雌花雄蕊での *IPT* の著しく高い発現は *in situ* hybridization による解析でも確認された（図 3-17）。

c. 内生サイトカイニン量

雄蕊退化前の雌花の雄蕊でヌクレオチド型サイトカイニン tZRPs や iPRPs の内生量が高いことが明らかとなった。この時期の雌花雄蕊は tZ および iP においても高い値を示した。しかし、これらの内生サイトカイニン量は、発達後期に低下した。この結果は、ステージ II の雌花雄蕊において、*IPT* 遺伝子の発現量が高かったことと一致する（表 3-5, 6）。その他の植物ホルモンについては、GA の一部や IAA および IAA 誘導体、ジャスモン酸、サリチル酸でも雄蕊で高い内生量が検出された（表 3-7, 8, 9）。

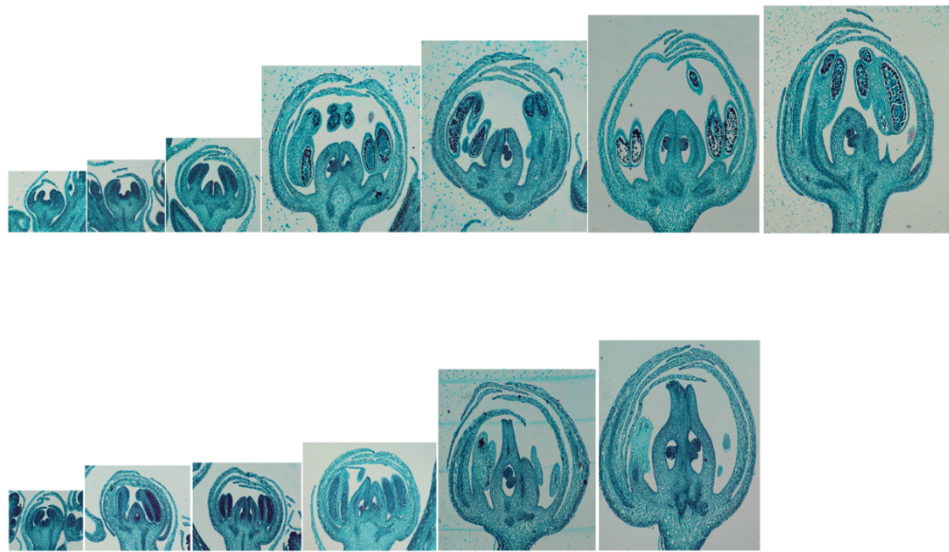


図 3-13 アスパラガス花芽の発達

花芽は固定液（FAA）で処理した後，脱水し，パラフィンに包埋した。組織は厚さ $10\mu\text{m}$ に薄切し，パラフィンを除去したのち，サフラニンとファストグリーンで二重染色した。（上）雄花，（下）雌花

品種：‘Limburgia’

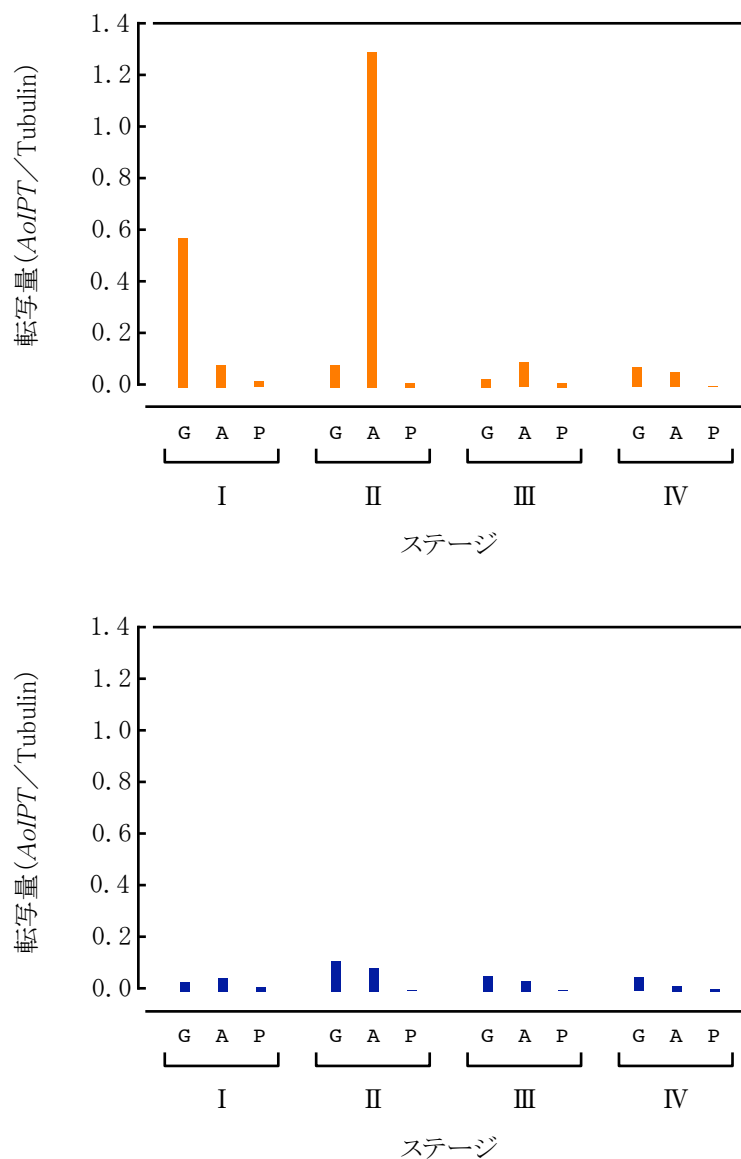


図 3-14 アスパラガス花芽における *IPT* 遺伝子の発現

雌雄花芽を採取し、ステージごとに分け（図 3-2 参照）、それぞれを雌蕊、雄蕊、花被に分解したのち、RNA を抽出した。転写量は α -Tubulin の転写量を基準として相対値で表した。（上）雌花、（下）雄花、G: 雌蕊、A: 雄蕊、P: 花被

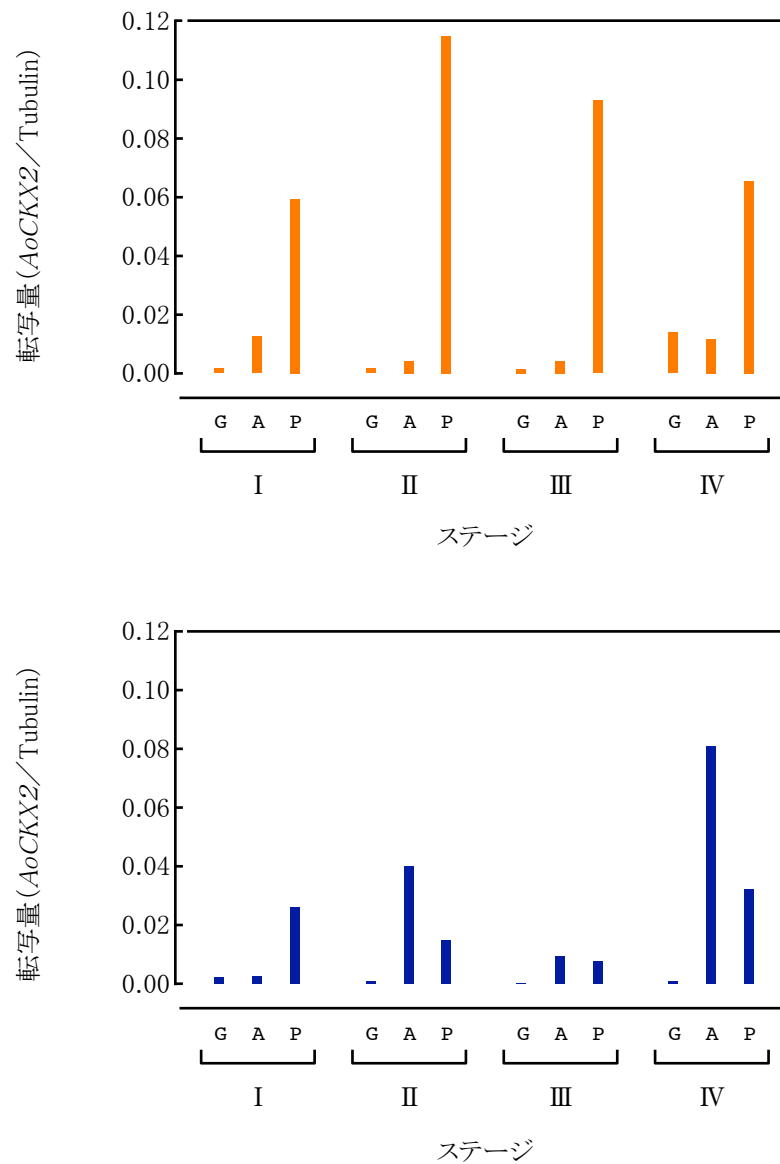


図 3-15 アスパラガス花芽における *CKX2* 遺伝子の発現

雌雄花芽を採取し、ステージごとに分け（図 3-2 参照）、それぞれを雌蕊、雄蕊、花被に分解したのち、RNA を抽出した。転写量は α -Tubulin の転写量を基準として相対値で表した。（上）雌花、（下）雄花、G: 雌蕊、A: 雄蕊、P: 花被

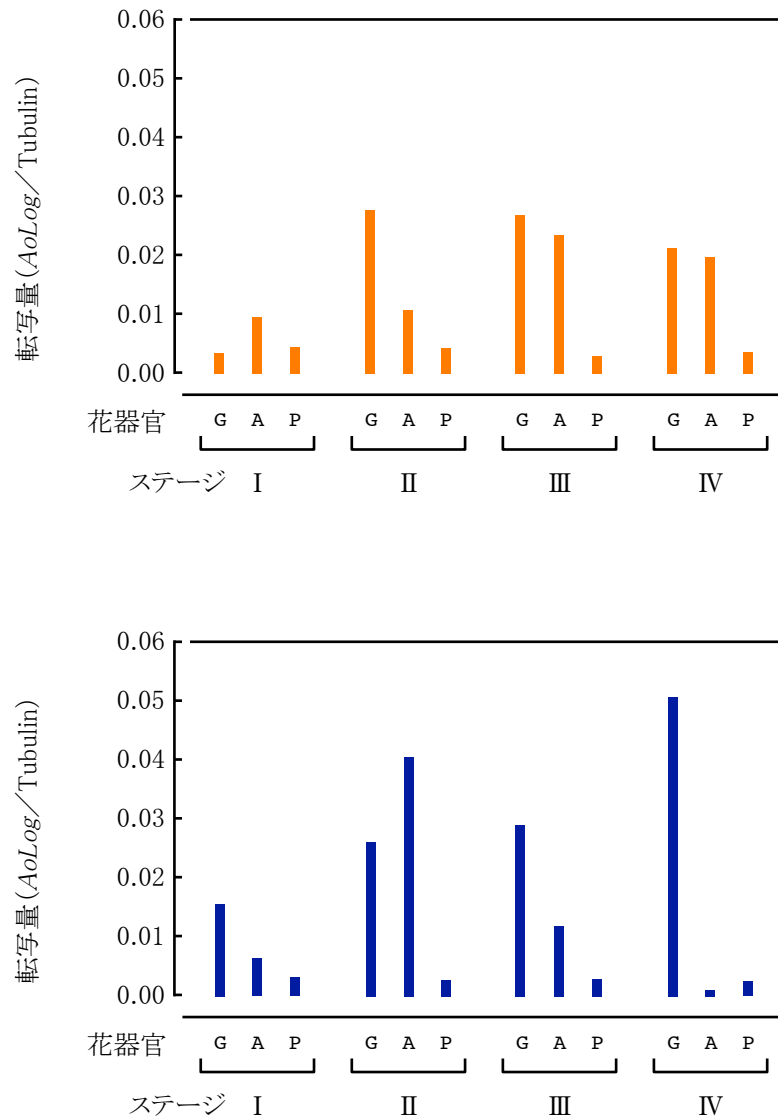


図 3-16 アスパラガス花芽における *LOG* 遺伝子の発現

雌雄花芽を採取し、ステージごとに分け（図 3-2 参照）、それぞれを雌蕊、雄蕊、花被に分解したのち、RNA を抽出した。転写量は α -Tubulin の転写量を基準として相対値で表した。（上）雌花、（下）雄花、G: 雌蕊、A: 雄蕊、P: 花被

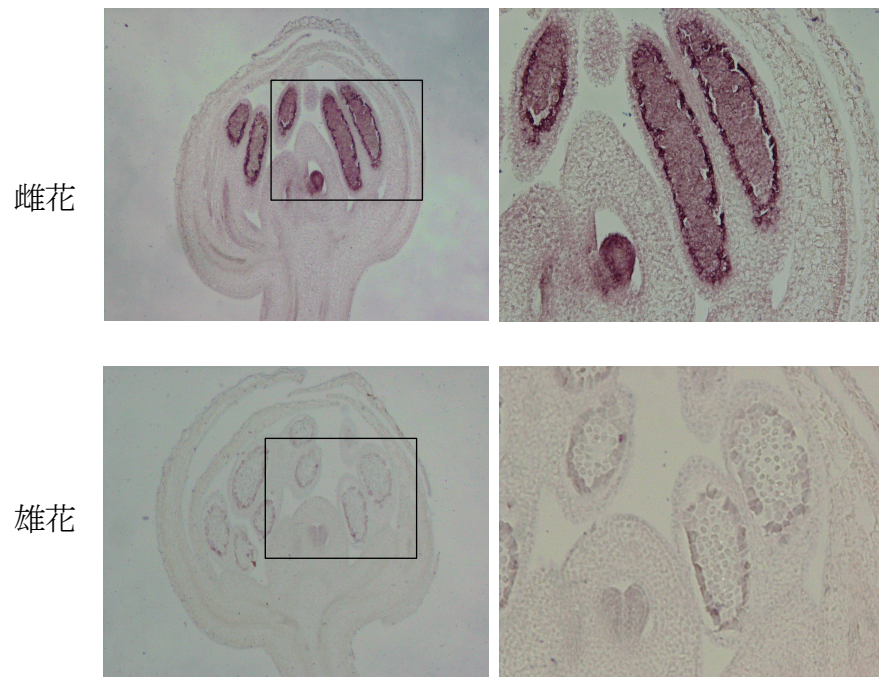


図 3-17 アスパラガス雌雄花芽の *IPT* 遺伝子発現の局在性

花芽の組織切片を作製し，*in situ* hybridization 法により *IPT* 遺伝子発現の局在性を調べた。DIG 標識したプローブを用い，アルカリフォスファターゼ標識した抗 DIG 抗体を用い，ハイブリダイズした DIG 標識プローブを検出した。染色には NBT/BCIP を使用した。

品種：‘Limburgia’

表3-5 アスパラガス雌性花器官における内生ゼアチン型サイトカイニン量

ステージ	花器官	tZ	tZR	tZRP _s	cZ	cZR	cZRP _s
Ⅱ	雌蕊	0.30	0.18	1.16	N.D.	N.D.	N.D.
	雄蕊	0.36	1.23	3.08	N.D.	N.D.	0.49
	花被	0.28	3.13	1.60	N.D.	N.D.	0.09
Ⅲ	雌蕊	0.45	1.83	2.62	N.D.	N.D.	0.11
	雄蕊	N.D.	1.39	0.86	N.D.	N.D.	0.09
	花被	N.D.	0.35	0.28	N.D.	N.D.	0.04

表3-6 アスパラガス雌性花器官における内生イソペンテニル型サイトカイニン量

ステージ	花器官	iP	iPR	iPRP _s	iP7G	iP9G
Ⅱ	雌蕊	0.16	0.32	20.27	N.D.	N.D.
	雄蕊	1.45	250.85	1499.56	N.D.	N.D.
	花被	0.12	16.25	165.96	N.D.	N.D.
Ⅲ	雌蕊	0.32	76.39	167.51	N.D.	N.D.
	雄蕊	0.06	4.59	28.76	N.D.	N.D.
	花被	0.08	8.48	42.69	N.D.	N.D.

表 3-7 アスバラガス雌性花器官における内生シバレリン量

ステージ	花器官	GA1	GA4	GA7	GA8	GA9	GA12	GA19	GA20	GA24	GA44	GA53
≧Ⅱ	雌蕊	N. D.	5. 22	N. D.	4. 89	N. D.	N. D.	69. 35	6. 57	6. 62	N. D.	112. 68
	雄蕊	N. D.	11. 22	N. D.	13. 17	55. 24	N. D.	210. 28	14. 55	31. 05	1. 95	508. 38
	花被	3. 43	4. 34	N. D.	N. D.	38. 00	N. D.	394. 51	20. 58	14. 28	0. 88	316. 06
Ⅲ≦	雌蕊	N. D.	7. 11	N. D.	4. 56	16. 49	N. D.	197. 32	8. 28	9. 92	1. 19	121. 53
	雄蕊	N. D.	1. 17	N. D.	2. 94	N. D.	N. D.	26. 77	2. 72	N. D.	N. D.	29. 57
	花被	N. D.	1. 71	N. D.	N. D.	4. 91	N. D.	148. 45	5. 36	3. 08	N. D.	28. 48

表 3-8 アスバラガス雌性花器官における内生オーキシシンおよびアブジジン酸量

ステージ	花器官	ABA	IAA
≦Ⅱ	雌蕊	4111. 14	431. 36
	雄蕊	8739. 83	1646. 01
	花被	10919. 34	365. 60
Ⅲ≦	雌蕊	14542. 39	791. 07
	雄蕊	5144. 35	339. 78
	花被	8864. 79	206. 76

表 3-9 アスバラガス雌性花器官における内生ジャスモン酸およびサリチル酸量

ステージ	花器官	JA	SA
≦Ⅱ	雌蕊	9300. 34	7796. 25
	雄蕊	15324. 74	17716. 92
	花被	5501. 04	10965. 85
Ⅲ≦	雌蕊	26926. 49	6021. 04
	雄蕊	10487. 47	12656. 73
	花被	1002. 19	3234. 77

アスパラガスにおいて、オーキシンによる雄性化が知られている。しかし、植物ホルモンと性発現の明確なメカニズムは明らかになっていない。雄性判別マーカーである Asp1-T7 の周辺領域の塩基配列を調べると、サイトカイニン酸化酵素／脱水素酵素と近似する配列が確認されるが、本研究から雄蕊退化（発育不全）と *CKX* との関連を示す結果は得られなかった。サイトカイニンの生理作用の 1 つに細胞分裂誘導作用がある。そのため、細胞の分裂が促進される発達中の雄花雄蕊および雌花雌蕊での *IPT* の強い発現が期待された。しかし、*IPT* は退化するはずの雌花雄蕊で高い発現が検出された。この結果からアスパラガスの雌花雄蕊でのサイトカイニンの過剰発現が雌花形成の直接の要因であることが示唆された。

第4章 超雄性同定のための雄性判別マーカー一定量法の確立

4. 1 はじめに

雌雄異株植物のアスパラガスでは、雄性は基本的に異型接合 (Mm) となる。

しかし、厳密には、アスパラガスの性表現は多様であり、雄性両性同株個体や雄性活性因子の同型接合個体 (MM) が存在する (Sneep, 1953)。同型接合の栄養繁殖個体は超雄性系統と呼ばれている。雄性の同型接合個体が自然界の繁殖において生じるかどうかは定かではないが、少なくとも自殖可能な個体 (雄性両性同株) が圃場で確認されているので、雄性因子の同型接合個体が存在する可能性は限りなく高い。

超雄性アスパラガスの有用性は、全てが雄性になる雑種次世代種子 (全雄種子) の生産に利用できるという点にある。雌性との交配によって得られる次世代個体は全て雄性になるからである。雄性の判別には薬剤による開花促進技術やPCRによって雌雄を判別するDNAマーカーの開発が行われたが (Restivo et al., 1995; Lewis and Sink, 1996; Jiang and Sink, 1997; Jiang et al., 1997; Reamon-Buttner et al., 1998; Reamon-Buttner and Jung, 2000; Jamsari et al., 2004), 現在では、雄性個体のみを栽培する場合には、専ら全雄種子 (all male hybrids) が利用されている。

超雄性株の植物体や花は、表現型としては雄性の花との違いはない (図4-1)。そのため、雌性花と交雑して次世代個体のすべてが雄性となる花粉親株を選ぶことによって超雄性の選抜が行われてきた。PCRによって雌雄を判別するDNAマーカーは、改良によって信頼性の高いものが確立され (Nakayama et al., 2006), 発育早期の段階での雌雄判別に寄与したが、次世代個体の判定を必要とするという点で、超雄性個体の選抜手順を短縮するには至っていない。また、想定される対立遺伝子 (m) と強く連鎖するPCRマーカーの探索も行われている

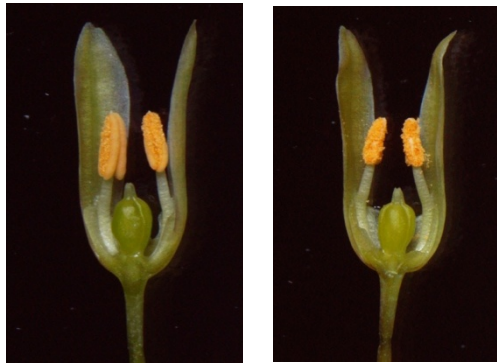


図 4-1 アスパラガス雄性決定因子同型接合体と異型接合体の花の形態

観察のため手前の花被および雄蕊を取り除き，実体顕微鏡を用い，CCD カメラで画像を取得した。‘Gijnlim’の雄性決定因子同型接合体（左）と異型接合体（右）

が (Gebler et al., 2007), 適用できる品種の範囲や再現性など, 実用化には検討しなければならない多くの課題が残されている。そのため, 現時点では, 超雄性系統の育成に長い年月を要する困難さは改善されていない。

アスパラガスの既存雄性判別マーカーである Asp-T7 およびその改良型は, 広範囲の品種で利用できる唯一のプライマーセットであり, 判定の信頼性の高いことが知られている。そこで, このマーカーを利用し, 複相ゲノムあたりのマーカー量(dose)を測定し, 雄性因子を同型接合 (*MM*) と異型接合 (*Mm*) としてもつ個体の判別を試みた。当然, 2 倍比の判別には精度の高い測定結果が必要とされた。そのため, 高純度鋳型 DNA の調製法の確立と, 正確な PCR 産物の定量法の選択が要求された。

本章では, 雄性判別マーカーの定量に基づく, 雄性決定因子同型接合と異型接合の判別法を述べるとともに, 実際に交配によって判別した個体の同型／異型性と本法で判定した結果との整合性, および超雄性選抜過程における利用法などについて考察する。

4. 2 材料および方法

a 植物材料

北海道大学農場に植栽されているアスパラガス品種 ‘New Jersey 264’ (NJ264) の雄性および雌性系統, ‘Gold Schatz’ (GS) の雄性系統, 超雄性系統 ‘MM’ を用いた。加えて, ‘Gijnlim’ 雄性両性同株性系統 A (北海道美瑛町農業技術研修センターにおいて育成された系統) の自殖によって得られた 21 個体 (A1~A21) を用いた。さらに, その他に ‘WS-3000’, ‘WS-3014’ および ‘NJ-1031’, ‘NJ-1050’, ‘NJ-1113’ (北海道美瑛町農業技術研修センターにおいて植栽されている系統) を用いた。

b DNA 抽出

それぞれの株から若いぎ葉 (60-100mg) を採取し, 液体窒素で凍結した後, -80°C に保存した。凍結したぎ葉はマルチビーズショッカー多検体細胞破碎機 (PAT) (安井器械, <http://www.yasuikikai.co.jp/>) で粉砕し (speed meter: 1500rpm, on time: 15sec, off time: 1sec, cycle: 3times), 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 20mM MES, 150mM KCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 1% Triton X-100 を含む緩衝液に懸濁した (表 4-1)。これを $12,000\times g$, 4°C で, 10 分間, 遠心し沈殿を得た。この沈殿から, Plant DNAzol (Invitrogen, <http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/brands/invitrogen.html>) を用い, 以下の方法によって DNA を抽出した。抽出した DNA は TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 液に溶解し, -40°C に保存した。

DNA 抽出

ボルテックスミキサーで沈殿壊した後, 0.6mL の Plant DNAzol を加え, ボルテックスミキサーを用いて, 完全に懸濁した。25 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間, 時々懸濁しながら保温し

表 4-1 粗核画分調整用の緩衝液

試薬	濃度
MES ¹⁾ -KOH (pH 5.8)	20mM
KCl	150mM
EDTA	2mM
EGTA	2mM
Spermidine	0.50mM
Spermine	0.15mM
Triton X-100	1% (W/W)

1) MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid

た。Plant DNAzol と同量のクロロフォルムを加え、ボルテックス処理し、25℃で5分間保温した。12,000rpm, 10分間, 4℃, スウィングロータリーで遠心し、水相をチューブに回収した。-20℃で冷却しておいた0.45mLの95%エタノールを静かに加えた。チューブをゆっくり転倒混和し、-20℃で15分間静置した。5000×gで遠心して回収した沈殿を、0.6mLの洗浄液(Plant DNAzol : 99.5%エタノール = 1 : 0.75)で洗浄した。液を取り除き、70%エタノールで沈殿をよく洗浄し、アスピレーターでエタノールを揮発させ、TE緩衝液を加えて、溶解したら-40℃で保存した。

c リアルタイム PCR による定量

TaqMan probe 法 (Roche, <http://www.roche-diagnostics.jp/>) によって行った (図 4-2, 表 4-2)。雄性判別 DNA マーカー Asp1-T7 の内部塩基配列 AspTaq1 プライマー (表 4-3) を設定し、その内部配列に 5' 端を FAM (carboxyfluorescein, SIGMA GENOSYS, http://www.genosys.jp/index_n.html) で標識し、3' 端にクエンチャーを付加したプローブを設定した。また、標準化を行うための DNA 配列として、アスパラガスに1コピー含まれる (Park et al., 2003) アスパラガス MADS-box 遺伝子 *AODEF* の部分配列 (AODEF-Taq1, 表 4-3) プライマーを用いた。AspTaq1 と AODEF-Taq1 の測定を同一試料で行うために、プローブ配列の 5' は HEX (2', 4, 4', 5', 7, 7' -hexachlorofluorescein, SIGMA GENOSYS, http://www.genosys.jp/index_n.html) で標識し、3' 端にクエンチャーを付加した。測定は1サンプルにつき3反応を3反復行い、その値をもとにゲノム中に含まれる AspTaq1/AODEF-Taq1 値を算出した。測定にはリアルタイム定量 PCR 解析システム Chromo4 (MJ Reserch Inc., <http://www.bio-rad.com/ja-jp/life-science-research>) と解析ソフトウェア Opticon Monitor Software ver 3.0 (BIO-RAD, <http://www.bio-rad.com/ja-jp/life-science-research>) を用いた。解析のパラメ

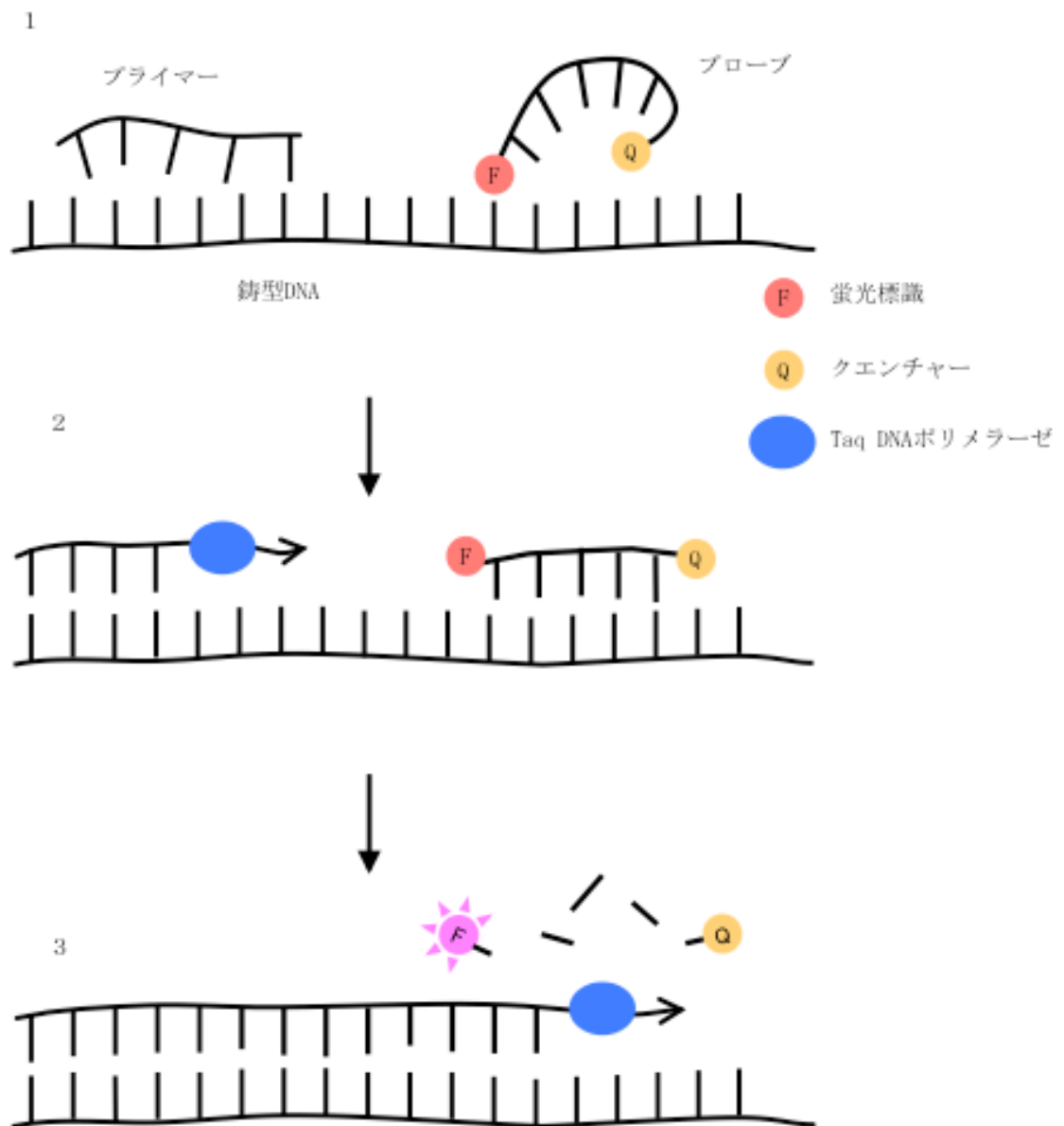


図 4-2 TaqMan プローブ法の原理

1. PCR プライマーとプローブ，鋳型 DNA を混合した反応液を作製する。2. PCR 反応を行うとプライマーおよびプローブが特異的な配列位置に結合し，プライマーの伸長が開始される。3. *Taq* DNA ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解され，抑制が解除された色素が蛍光を発する。

表 4-2 TaqMan プローブ法による定量 PCR の反応液組成

標的DNA	試薬	容量
AspTaq1	FastStart TaqMan Probe Master (mixture)	10 μ L
	Forward primer (10 μ M)	1.5 μ L
	Reverse primer (10 μ M)	1.5 μ L
	FAM-labeled probe ¹⁾ (10 μ M)	0.5 μ L
<i>AODEF</i> -Taq1	Forward primer (10 μ M)	1.5 μ L
	Reverse primer (10 μ M)	1.5 μ L
	HEX-labeled probe ²⁾ (10 μ M)	0.5 μ L
	Template DNA	1 μ L (70ng)
	H ₂ O	2 μ L
	Total	20 μ L

表 4-3 定量 PCR に用いた PCR プライマーとプローブの塩基配列

プライマー／プローブ	塩基配列
AspTaq1F	5' -GCGAGGCATTTGGAAGCAC-3'
AspTaq1R	5' -AAGGCTATCCACTCTCTCAACAG-3'
Asp-probe F	5' FAM-AAATCCGCACCCTACCGAGTACCCA-BHQ1-3' ¹⁾²⁾
AODEF-Taq1F	5' -CCATGATCTCCGTCTTGCATG-3'
AODEF-Taq1R	5' -AATTAAAGGTAGCAATAGTGGCTAG-3'
AODEF-probe H	5' HEX-AACAGTACTTCACCCTGCACCCTGC-BHQ1-3' ²⁾³⁾
FAM: carboxyfluorescein	
HEX: 2', 4, 4', 5', 7, 7' -hexachlorofluorescein	
BHQ1: Black hole quencher-1	

ーターは、Substract Baseline を Grobal Minimum, Threshold を FAM は Manual : 0.100, HEX は Manual : 0.010 に設定した。

d ゲノムに含まれるマーカー数の測定

ゲノム上のマーカーAsp1-T7 の位置(ゲノム当りのマーカー数)を推定するため、AspTaq1 と AODEF-Taq1 をそれぞれ 1 コピーずつ含む組換え DNA 配列を作製し、それを鋳型 DNA とした時の AspTaq1/AODEF-Taq1 値を測定した。AspTaq1 を含む領域と AODEF-Taq1 を含む領域は、*Hind*III 切断部位を PCR で付加し、pGEMT-Easy Vector に挿入し、クローニングした。この配列を大腸菌で増幅できるプラスミドに挿入し、(pT7DEF と呼ぶ) 大腸菌にクローニングした(表 4-4, 図 4-3)。

e 雄性判別マーカーAsp1-T7sp による雌雄判別

超雄性は、次世代が全て雄性となるかによって判定される。そこで、雄性決定因子同型接合体と推定された個体について、‘Franklim’ 雌性個体との交配を行い、次世代の雌雄の出現比を調査した。雌雄性の判別には jamsari ら (2004) によって報告された雄性判別マーカーAsp1-T7 の内部配列 Asp1-T7sp

(5’ -ATATGCGAGGCATTGGAAG-3’ と 5’ -CTGTAGCAGGGGTAGGTGA-3’) (Nakayama et al., 2006) を用いた。このマーカーは、雄性の個体 DNA の 308bp を増幅する。

f ‘Gijnlim’ A13 の染色体

染色体の顕微鏡観察

まず、A13 における染色体の欠損を調べるため、根端を採取し、染色体数を調べた。根端は、午前中に採取し、ファーマー固定液 (99.5%エタノール:酢酸=3:1) に浸漬した。冷所で 30 分間処理したのち、70%エタノールで数回洗浄し、保存した。

表 4-4 pT7DEF の作製に使用した PCR プライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
AoS3A-F	5' -GAGCTACTCCACGGTGCAAC-3'
AoS3A-RH	5' -GT AAGCTT TGCTATGGGTGAATAGTTGC-3'
Aodef-2FH	5' -TG AAGCTT ACACAGGAGTTTGCTGCGTG-3'
Aodef-2R	5' -GTGGTGGTTAATTCCTAGT-3'

赤 : *Hind*III 認識部位

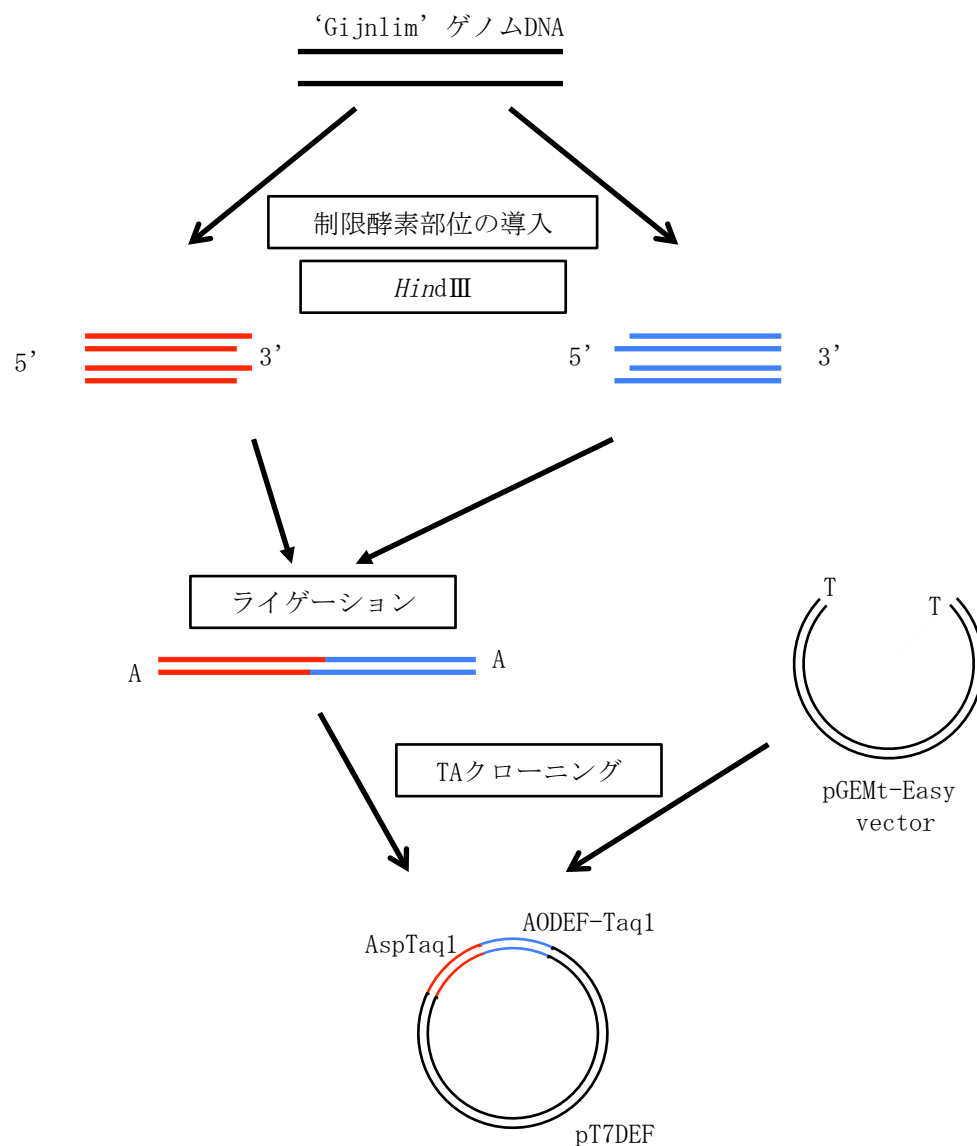


図 4-3 pT7DEF の作製

‘Gijnlim’ のゲノム DNA を鋳型にして，AspTaq1 の 3’ 末端および AoDEF-Taq1 の 5’ 末端に *Hind*III 制限酵素切断部位を挿入した。制限酵素処理によって切断し，リガーゼによって両者を結合した。結合した DNA 断片を TA クローニング法によって pGEMt-Easy vector に挿入し，AspTaq1 と AoDEF-Taq1 を 1 コピーずつ持つプラスミド pT7DEF を作製した。

根端は蒸留水で十分に洗浄した後、細胞を解離させるため Cellulase ‘ONOZUKA’ RS (YAKULT, <http://www.yakult.co.jp/ypi/product/laboratory.html>) と Pectoriase Y-23 (セイシン製薬) で処理し、5N HCl に浸漬し、室温で 1 時間処理した。Schiff reagent を用い室温のもとで 2.5 時間処理し、染色した。亜硫酸水で 1 時間洗浄した後、根端のみを切り取り、カバーガラスをかけ、押しつぶし標本を作製した。プレパラートを 1 分間液体窒素に入れ、メスを使ってカバーガラスを 99.5%エタノールに浸けた。キシレンに置換し、封入剤を数滴垂らして封入した。染色に用いた Schiff 試薬は、570nm 付近の緑色光によって励起され、620nm 付近の赤色蛍光を発するので、蛍光顕微鏡（共焦点顕微鏡; Leica, <http://www.leica-microsystems.com/>）を用いて観察した。

自殖後代の雌雄判別

A13 は結実性を示す雄性個体であったので、自殖によって結実した種子の雌雄性を雌雄判別マーカーで判別した。マーカーには雄性判別マーカーである Asp1-T7sp と雌雄判別マーカーである Asp4-sp6 (Jamsari ら, 2004) を用いた。Asp4-sp6 プライマーで増幅した産物は、*Taq* I 制限酵素で処理し、雌雄を判別した。雄性個体の場合 300bp 付近に制限酵素断片が見られる。

4. 3 結果および考察

a ‘Gijnlim’ 自殖後代における雄性決定因子同型接合体の判別

‘Gijnlim’ 雄性両性同体性個体 A 系統の自殖によって得られた 21 個体の AspTaq1 増幅率/AODEF-Taq1 増幅率を測定したところ, 増幅が見られなかった個体が A2, A4, A7, A14, A21 の 5 個体, 既存の雄性個体の約 2 倍の値を示した個体が A1, A15 の 2 個体, 同等の値を示した個体が 14 であった。判定に用いた方法は AspTaq1 の増幅率を根拠とする。このことから, ‘NJ264’ の 2 倍の値を示した 2 個体は雄性決定因子同型接合体であり, 同等の値を示した 14 個体は雄性決定因子異型接合体であると推定された。また AspTaq1 の増幅が見られなかった 5 個体は雌性個体と考えられた (図 4-4, 5)。

b pT7DEF を使用した雄性決定因子同型接合体の判別

既存の雄性個体を基準にしたときの雄性決定因子同型接合体の判別は, AspTaq1 量を相対的に表すもので, ゲノムに含まれる雄性マーカー量の相互関係から推定したものである。そこで, pT7DEF を用い, AspTaq1/AODEF-Taq1 の値を測定した。その結果, pT7DEF は既存の超雄性系統 ‘MM’ はほぼ等しい値を示した。一方, 異型接合雄性の AspTaq1/AODEF-Taq1 値の平均はほぼ 1/2 の値を示した。このことから, ゲノムの 1 か所に判別 DNA マーカー (Asp1-T7) が存在することが明らかになった (図 4-6)。また, 両者の閾値は平均 0.5, 1 に分散 0.01, 0.04 を加味することによって, dose が 0.693 以上の個体を雄性決定因子同型接合体, 未満の個体を異型接合体とし, 0.307 以下を示す個体は雌性個体とすることが適当と判断された。

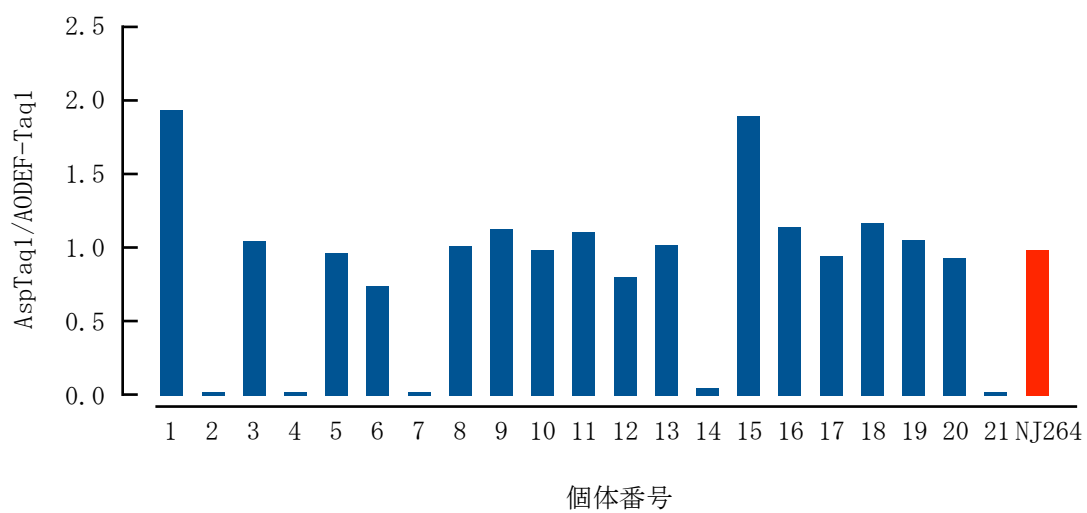


図 4-4 ‘Gijnlim’ 自殖後代の AspTaq1/A0DEF-Taq1 値

‘NJ264’ の既存の雄性個体における AspTaq1/A0DEF-Taq1 値を 1.0 として、
‘Gijnlim’ の自殖後代の AspTaq1/A0DEF-Taq1 量を算出した。

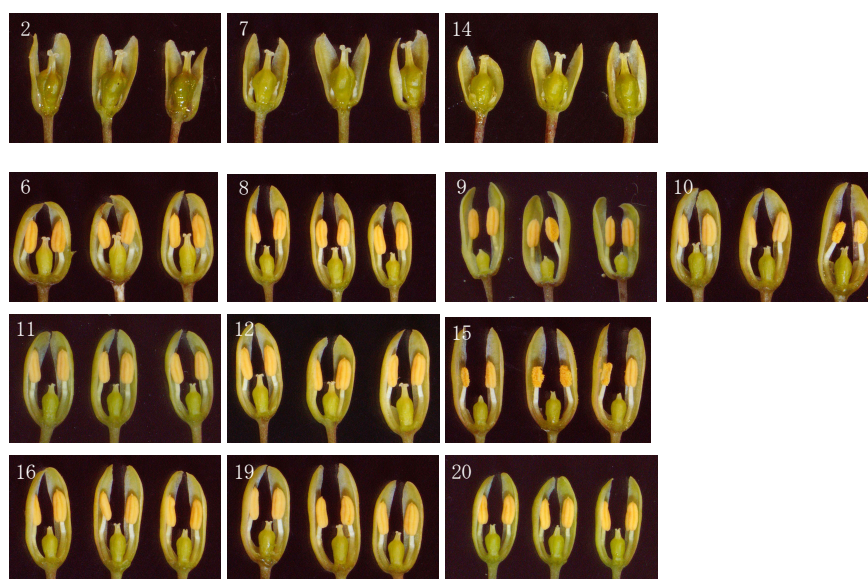


図 4-5 ‘Gijnlim’ 自殖後代の花器官の形態

AspTaq1/AODEF-Taq1 値の測定に用いた ‘Gijnlim’ 次世代個体に着生した花の形態。番号は図 4-4 の個体番号と一致する。

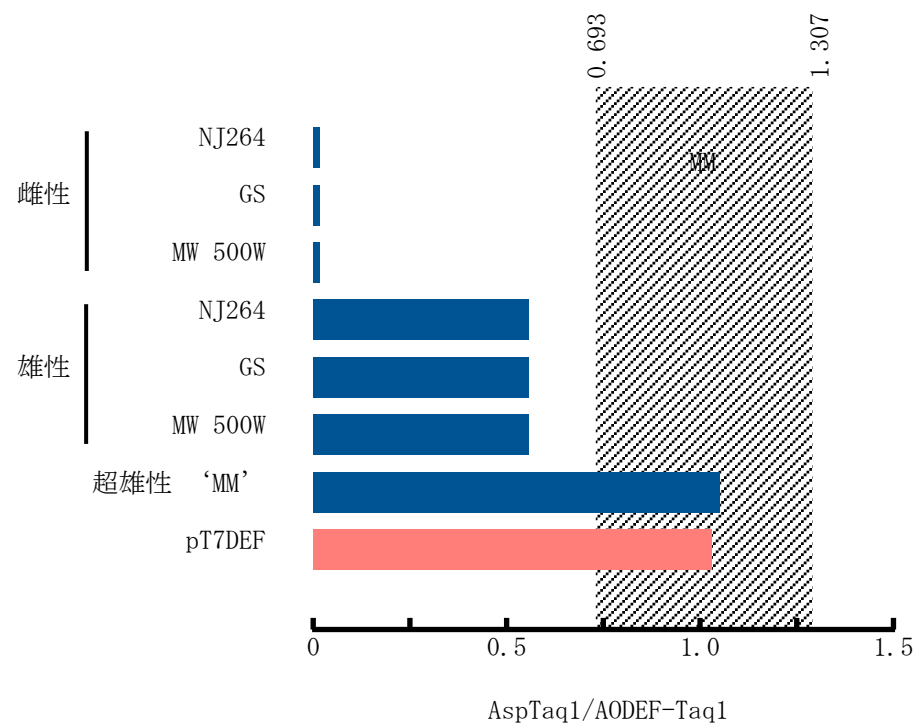


図 4-6 pT7DEF と雌性，雄性および超雄性アスパラガスの AspTaq1/AODEF-Taql 値の比較

pT7DEF は AspTaq1 と AoDEF-Taql 配列を 1 コピーずつ持つ。pT7DEF の AspTaq1/AODEF-Taql 値を 1.0 として，雌性，雄性および超雄性アスパラガスのゲノムを鋳型とした時の測定値を算出した。GS: ‘Gold Schatz’，NJ264: ‘New Jersey 264’，MW: ‘Mary Washington 500W’，MM: 超雄性系統 ‘MM’

c 他品種への応用

定量 PCR による雄性決定因子同型接合体の判別が、他の品種においても有効であることを証明するため、既存の品種（オランダ系 2 品種とアメリカ系 3 品種）の雄性両性同株性個体の自殖後代を利用し、AspTaq1/AODEF-Taq1 値と超雄性との関係を調べた。その結果、pT7DEF と同等の値を示す個体を得られた。これらは同型接合体であると判断される（図 4-7）。

雄性決定因子同型接合体と推定された個体のうち‘WS-3000’、‘WS-3014’、‘NJ-1113’の 3 品種の異なる 6 個体について‘Franklim’雌性個体と交配し、後代の PCR マーカによる雌雄判別を行った。その結果、6 個体全てにおいて、308bp の DNA 断片の増幅を確認することができた。これらのことから花粉親とした 6 個体のすべてが超雄性個体であることが示唆され、この技術の汎用性が示された（図 4-8）。

d ‘Gijnlim’ A13 の特性

定量 PCR による同型性判定と交配による結果が一致しなかった A13 について（図 4-9）、性染色体の欠損またはマーカー領域の部分的欠失が考えられたので、染色体の欠失が生じているか調べた。その結果、正常な個体と同数の 20 本の染色体を確認した（図 4-10）。このことから、A13 個体が性染色体を欠損しているのではないことが明らかとなった。また、A13 は雄性両性同株性個体であったので自殖後代における雄性判別マーカー Asp1-T7sp の増幅を調べた。雌性との交配の結果では、全ての次世代で Asp1-T7sp の増幅が見られたので、自殖後代でもすべてに雄性マーカーの出現が期待されたが、得られた 27 個体のうち 4 個体で雄性判別マーカーの増幅が見られなかった（図 4-11）。さらに、増幅が見られなかった 4 個体について、Asp1-T7 近傍に作製された雄性判別マーカー Asp4-sp6 を用いて、雌雄判別を行った。PCR によって増幅した DNA を、*Taq* I で消化したところ、雄性個体で見られるはずの 300bp

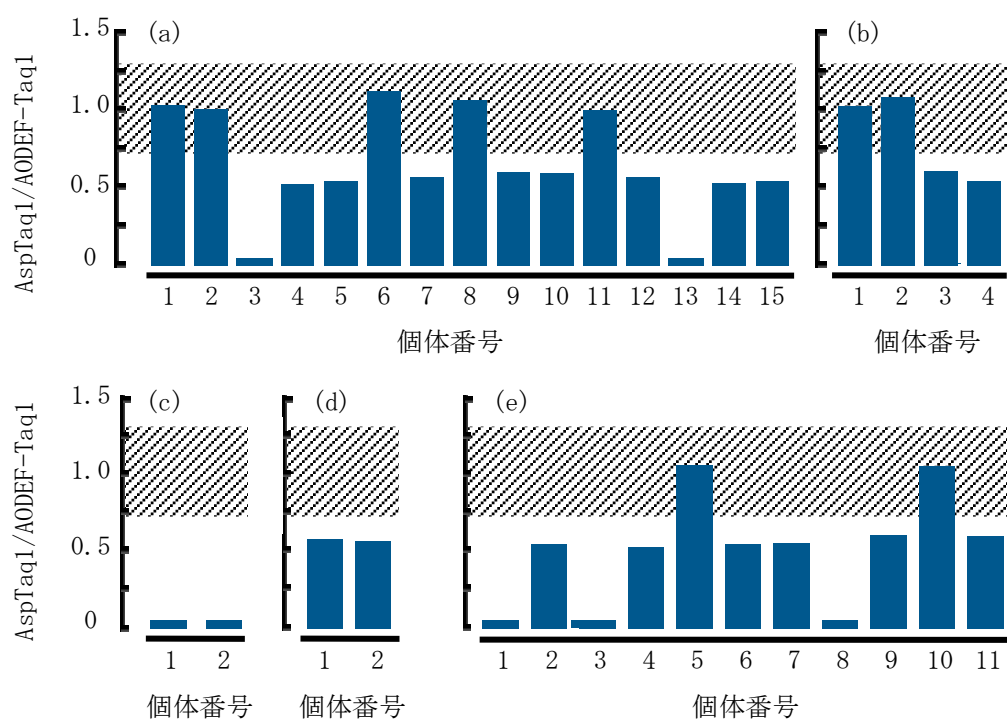


図 4-7 ‘WS’ および ‘NJ’ 系統次世代の AspTaq1/AODEF-Taql 値
 WS-3000(a) , WS-3014(b) , NJ-1050(c) , NJ-1031(d) , NJ-1113(e) における
 AspTaq1/AODEF-Taql 値

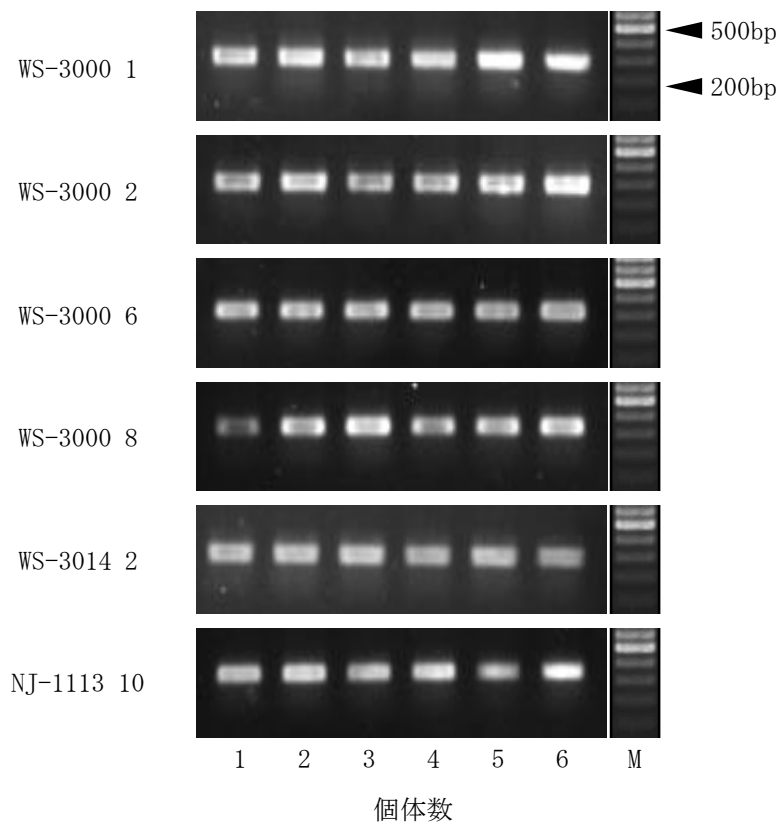


図 4-8 雄性決定因子同形接合体の超雄性検定

雄性決定因子同型接合体と判別された個体の花粉を‘Franklim’と交配した。Asp-T7sp マーカールを用いて次世代個体の雄性判別を行った。M:100bpDNA マーカール

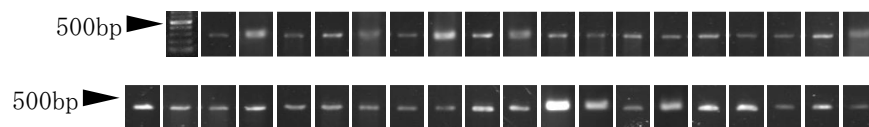
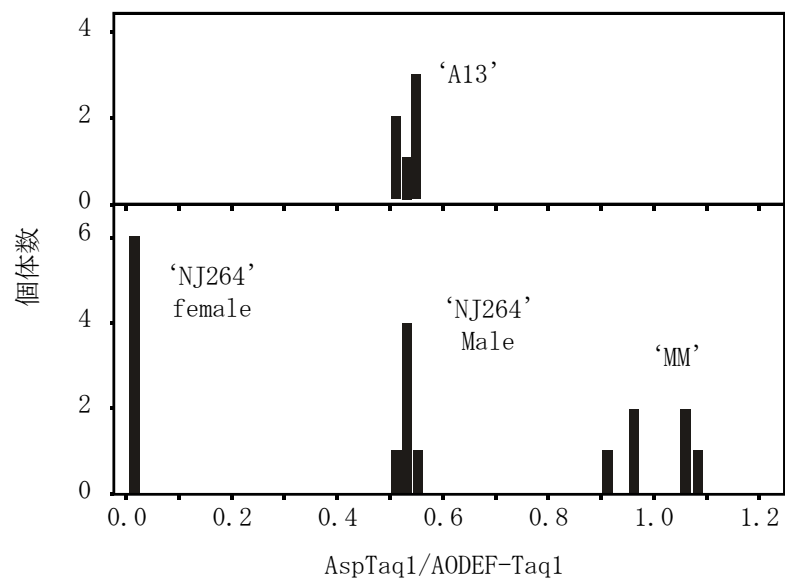


図 4-9 'A13' の ApTaq1/AODEF-Taq1 値と次世代の雌雄性

(a) 'A13', 'NJ264' 雄性, 'NJ264' 雌性, 'MM' の AspTaq1/AODEF-Taq1 相対値を 'MM' を 1.0 として算出した。(b) 'A13' の次世代個体を Asp1-T7sp マーカーを用いて雌雄判別を行った。

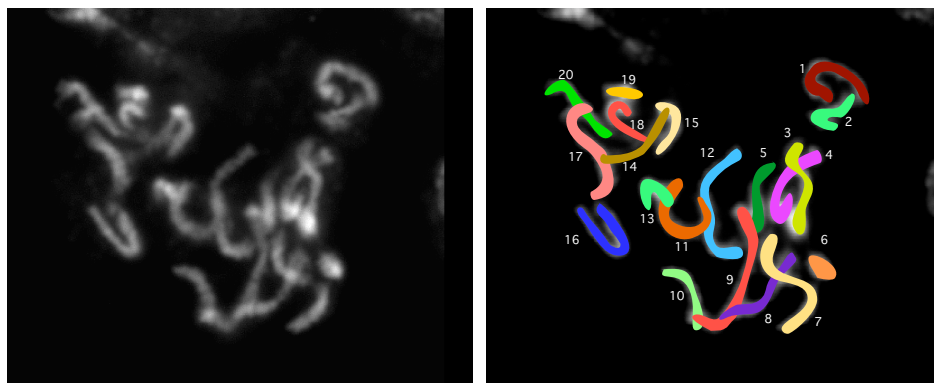


図 4-10 ‘A13’ における有糸分裂前期の染色体

‘A13’ のアスパラガス根端をエタノール：酢酸＝3：1 で固定し、フォイルゲン染色を施したのち、蛍光顕微鏡（共焦点顕微鏡）を用いて画像を取得した。（左）‘A13’ の染色体の画像とそれをトレースした画像（右）

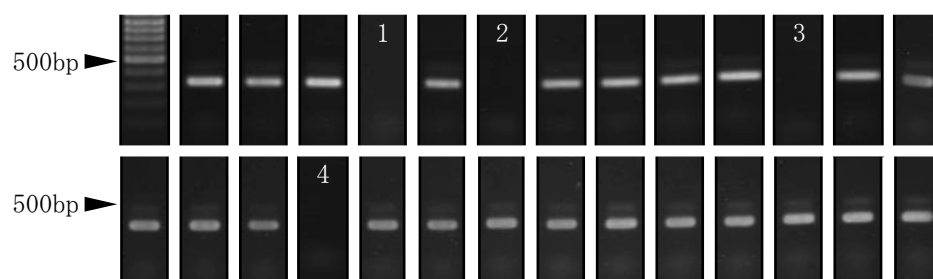


図 4-11 A13 自殖後代個体における Asp1-T7sp の分離

A13 の自殖によって得られた次世代の実生から DNA を抽出し，Asp1-T7sp プライマーを用い，PCR によって増幅を確認した。番号は断片が見られたかった個体を示す。

付近の断片が見られたものはなかった（図 4-12）。この結果は Asp1-T7sp による判別の結果と矛盾しない。これらの結果は、A13 の性染色体や性染色体のマーカ一領域に欠損がないことを示唆している。このことは、‘Franklim’ 雌性個体における受精あるいは発生の限定的な抑制が考えられる。従って、‘Franklim’ 以外の品種を種子親に用いた時も同様の結果が得られるか検討する必要がある。また、雄性マーカ一の増幅が見られなかった個体の雌雄を花の形態によって判定する必要がある。

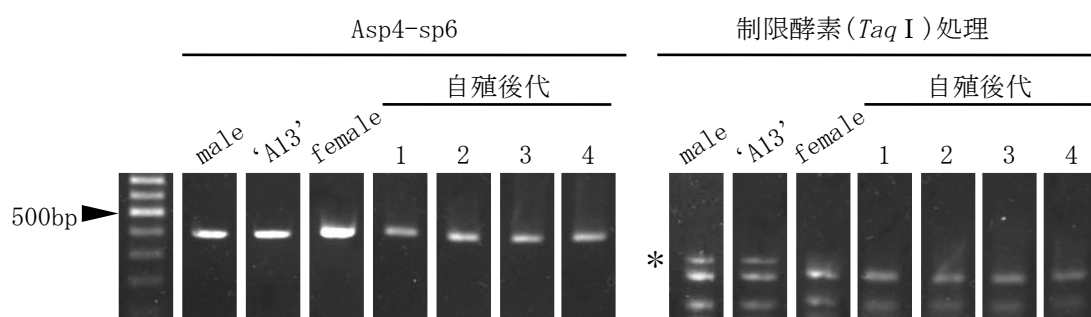


図 4-12 雄性判別マーカーAsp4-sp6 による雌雄判別

雄性判別マーカーである Asp1-T7sp により増幅が見られなかった A13 自殖後代のうちの4個体について、Asp4-sp6 マーカーを用いて増幅し（左：Asp4-sp6）、*Taq I* で切断した（右）。*は雄性個体に見られる断片を示している。

第5章 総合考察

植物の性決定は、植物ホルモンのレベルやホルモンの情報伝達と深く関係していることが知られており、花の雄性化にはジベレリンやサイトカイニンが重要であると言われていることから、サイトカイニン代謝酵素関連遺伝子を単離・同定し、花器官ごとの発現を解析した。サイトカイニンの合成・分解の過程を律速する酵素として、イソペンテニール転移酵素 (IPT)、加水分解酵素 (LOG)、およびサイトカイニン酸化脱水素酵素 (CKX) が知られていることから、まず、それらの cDNA 遺伝子を単離・同定した。その結果、1 種類の IPT および LOG、2 種類の CKX を同定した。

本研究では、逆転写に用いる RNA として、アスパラガスカルスから抽出した試料を用いたが、素材をカルスとした場合には、同定された以外の IPT および CKX 遺伝子を単離することはできなかった。データベースでは、イネゲノムには IPT1-8 が検索される。花芽でその全てが発現しているかどうかは明らかでないが、カルスと花で異なるタイプの IPT が発現している可能性がある。今後、アスパラガスゲノムにおける全 IPT オーソログの同定と花芽における IPT 発現のプロファイリングが必要であろう。

本研究によって、IPT6 と同属であると推定される IPT が同定され、退化時期にある雌花雄蕊での著しく高く発現していることが明らかとなった。この結果は、少なくともサイトカイニンの合成が雌花雄蕊で活発に起きていることを示している。一方、LOG の活性が低レベルであり、顕著な変化が見られなかったこと、遊離型イソペンテニールアデニンとそのリボチドおよびリボシドとの比率が特に花芽の発達ステージに変化しないことなどから、IPT がサイトカイニン合成を律速していると推察される。シロイヌナズナでは、IPT は師部組織や側根原基細胞、花粉管などでのサイトカイニン合成に関与していることがわかっている (榊原と経塚, 2007)。

サイトカイニンがアスパラガス雌花雄蕊の発達抑制に関与し、ホルモンの過剰産生が生育調節に働いていることを示唆する結果は、植物の雌性単性花形成メカニズムの解明に新たな糸口を与えるとともに、内在要因が細胞死を誘発する新たなシグナリングの具体例を提供する。サイトカイニンの過剰産生あるいは過度なサイトカイニン感受性によって細胞死がおこることがいくつかの事例で知られているほか

(Novak et al.,), 過剰の植物ホルモンによる雄性不稔の例が報告されており (Zhang et al., 2014), サイトカイニンやジベレリンの過剰産生による細胞死が普遍的な現象であることが示唆される。アスパラガス雌花雄蕊の細胞死には、ネクロシスを伴わないなど、プログラム細胞死 (PCD) としての特徴が見られ、組織学的には、葯の側壁細胞層の死滅、花粉四分子の形成異常、花糸と葯の發育不全が観察されたが、今後、サイトカイニンによるシグナル伝達系路の解明と細胞死標的の特定が必要であろう。

雌花での雄蕊退化に LOG によるサイトカイニンの生成および CKX によるサイトカイニン分解系が関与している可能性は低く、雄花形成におけるそれらの酵素の関与は、定量 PCR による発現解析データをみる限り限定的であると結論される。雄性花と雌性花における雌蕊の形態に顕著な違いはなく、雄性花雌蕊における卵装置の形成も確認された。本研究からは、細胞死に関連する兆候は見られず、雄性器官の細胞死による退化とは異なる仕組みが雄性花形成に働いていることが示唆された。

アスパラガスでは、信頼性の高い雄性判別 DNA マーカーが開発され、開花を待つことなく、雌雄を判別することが可能になった。しかし、全雄種子作出に必要とされる超雄性個体の判別には時間と労力が必要であった。定量 PCR を利用して雄性判別マーカー (Asp1-T7) 量の測定を行ったところ、定量 PCR によって雄性決定因子同型接合体と判定された個体は全て超雄性を示した。超雄性の判定には 2 倍量の鋳型

DNA を定量する精度が必要であり、分化した植物組織は細胞が肥大しているため DNA 含有量が低く、さらに、アスパラガスの茎葉のように糖類を含む組織を材料とする場合、純度の高い DNA を得ることが困難である。そこで、DNA 抽出方法を改良し、得られた DNA を用いることによって精度の高く、安定した判定結果が得られるようになった。また、測定法として TaqMan プローブ法を採用することにより、測定結果の再現性が改善された。本研究による結果から、一連の技術の確実性と汎用性が示唆される。

雄性決定因子が近接した（強く連鎖した）複数の遺伝子座に存在する可能性はこれまでの研究では検証されなかった。それを調べるため、Asp1-T7 と A0DEF の部分配列を 1 コピーずつ挿入したプラスミド（pT7DEF）を作製し、それを基準として、アスパラガスゲノム DNA における Asp1-T7/A0DEF-taq1 の相対値を算出した。その結果アスパラガス雄性個体の DNA の値はプラスミドを鋳型としたとき値のほぼ 1/2 であった。このことから、ASP1-T7 はゲノムの 1 か所にあり、近接した（強く連鎖した）位置にある単一の雄性決定因子によって雄性が制御されていると推定された。

定量 PCR に基づく方法で雄性決定因子同型接合体と判断された個体は全て超雄性個体であったが、雄性両性同株 'Gijnlim' の次世代個体の中に、雄性決定因子異型接合と測定されたにも関わらず、超雌性を示す個体が存在した。性染色体モノソミー (y-) によって、次世代に染色体欠損個体 (x-) が生じ、その致死が考えられたが、染色体の欠失はなかった。この個体 (A13) が雄性両性同株 (andromonoecy) であることも性表現の解析を困難にし、今後への課題を残した。

アスパラガスの花には、二型性を示す単性花と自殖可能な両性花がある。両性花の雌性器官の発達に関わる遺伝子およびその遺伝子が座乗する染色体を特定することができなかったが、少なくとも *m* が座乗する染色体の欠失によっても雌性器官の

発達が失われることはなかった。雌性器官の形成にはおそらく M の対立遺伝子 m にその働きはなく、 m には受精あるいは胚発生のプロセスに作用して、雌性器官の機能を抑制する働きがあると想像される。その抑制機能は塩基の修飾などによって解除されうる性質のものであるかもしれない。これまでにも、雄花の雌蕊は何らかの理由により、受精が抑制されていると言われているが、その仕組みは未だ解明されていない。アスパラガス雄花の雌蕊が機能しない原因が明らかになれば、アスパラガスの両性花発生のメカニズムを解明する手がかりになるはずである。サイトカイニンの発現解析は、雄性花雌蕊の機能不全が植物ホルモンのシグナリングを介しておきる現象ではないことを示唆している。アスパラガスにおける雌性表現のメカニズムを解明するうえで、特異な遺伝特性を示す 'A13' は貴重な素材を提供すると思われる。

摘要

アスパラガスの単性花形成と内生植物ホルモンとの関係を明らかにするために、サイトカイニン代謝関連酵素遺伝子の単離および同定を行い、花器官における花芽発達にともなう遺伝子の発現レベルの変化を解析した。あわせて雄性種子生産法の省力化を目的として定量PCRによる同型接合体判別法の改良を行った。

1 アスパラガスのサイトカイニン代謝関連酵素遺伝子の単離・同定を行いイソペンテニル転移酵素 (IPT), サイトカイニン加水分解酵素 (LOG), およびサイトカイニン酸化/脱水素酵素 (CKX) を単離・同定した。IPTはイネの *IPT6* と相同性が高く, CKXはトウモロコシの *CKX4* および *CKX6* と相同性が高かった。

2 ‘Limburgia’ の雄性系統および雌性系統の花芽を用いて調べたところ, IPT は, 雌花の退化し始めた雄蕊で著しく高い発現レベルを示した。また, 両性花様の時期および性が完全に成熟した花の器官では IPT の発現レベルは低かった。一方, 雄花においてはいずれの器官も発達器官を通じて低レベルで推移していた。CKX2 は, 発達期間を通して雌花の花被で高い発現を示したが, 大きな変動は見られなかった。LOG 遺伝子の発現は, 雌雄どちらの花芽においても低レベルであった。*in situ* hybridization 法によって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強く発現していた。

3 ‘Limburgia’ の雌花を雄蕊, 雌蕊, 花被の器官に分解し, 内生サイトカイニンの定量を行ったところ, 退化を開始する時期の雄蕊において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になった。

4 定量 PCR によって雄性決定因子と強く連鎖する雄性判別 DNA マーカー

(Asp1-T7) 量を測定することによって、雄性決定因子同型接合体と異型接合体を識別する方法を検討した。‘Gijnlim’の自殖後代を用いて測定したところ、前者は後者の2倍の値を示すことが明らかとなった。

5 雄性判別 DNA マーカーの Asp1-T7 はゲノムの1か所に単一の配列として存在していることがわかった。

6 定量 PCR による測定の結果では、雄性決定因子異型接合体と判定されたが、雌性個体との交雑の結果は、超雄性と判断された個体が存在した。この個体の染色体数は通常の雄性個体と同じであった。超雄性を示す要因として、雌性個体の受精あるいは発生過程における障害が考えられた。

7 以上の結果から、サイトカイニンがアスパラガスの雌花雄蕊の退化に関与していること、雄性判別 DNA マーカーの定量によって雄性決定因子同型接合体を効率的かつ正確に判別することができることが明らかとなった。

参考文献

- Ainsworth, C., S. Crossley, V. Buchanan-Wollaston, M. Thangavelu, and J. Parker. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *Plant Cell* 7: 1583-1598.
- Armstrong, M., K. Fairbrother, J. R. Idle, and A. K. Daly. 1994. The cytochrome-p450 cyp2d6 allelic variant cyp2d6j and related polymorphisms in a european population. *Pharmacogenetics* 4: 73-81.
- Asada, Y., N. Kasai, Y. Adachi, A. Kanno, N. Ito, P. Y. Yun, and K. Masuda. 2006. A vegetative line of asparagus (*Asparagus officinalis*) with a homeotic change in flower development is correlated with a functional deficiency in class-B MADS-box genes. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81: 874-882.
- Aukerman, M. J., and H. Sakai. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15: 2730-2741.
- Aya, K., M. Ueguchi-Tanaka, M. Kondo, K. Hamada, K. Yano, M. Nishimura, and M. Matsuoka. 2009. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of *GAMYB*. *Plant Cell* 21: 1453-1472.
- Bensen, R. J., G. S. Johal, V. C. Crane, J. T. Tossberg, P. S. Schnable, R. B. Meeley, and S. P. Briggs. 1995. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* 7: 75-84.
- Boualem, A., M. Fergany, R. Fernandez, C. Troadec, A. Martin, H. Morin, M. A. Sari, F. Collin, J. M. Flowers, M. Pitrat, M. D. Purugganan, C. Dogimont,

- and A. Bendahmane. 2008. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* 321: 836–838.
- Boualem, A., C. Troadec, I. Kovalski, M. A. Sari, R. Perl-Treves, and A. Bendahmane. 2009. A Conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two *Cucumis* species. *Plos One* 4: 10.
- Bouwkamp, J. C., and J. E. McCully. 1972. Competition and survival in female plants of *Asparagus officinalis* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97: 74.
- Bowman, J. L., H. Sakai, T. Jack, D. Weigel, U. Mayer, and E. M. Meyerowitz. 1992. *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* 114: 599–615.
- Byers, R. E., L. R. Baker, H. M. Sell, R. C. Herner, and D. R. Dilley. 1972. Ethylene – a natural regulator of sex expression of *Cucumis melo* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 717.
- Caporali, E., A. Carboni, M. G. Galli, G. Rossi, A. Spada, and G. P. M. Longo. 1994. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis* – Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. *Sexual Plant Reproduction* 7: 239–249.
- Chailakhyan, M. K., and V. N. Khryanin. 1978a. Effect of growth regulators and role of roots in sex expression in spinach. *Planta* 142: 207–210.
- Chailakhyan, M. K., and V. N. Khryanin. 1978b. The influence of growth regulators absorbed by the root on sex expression in hemp plants. *Planta*

138: 181–184.

Culafic, L. 1999. Photoperiodic and hormonal control of flowering and sex determination of monoecious and dioecious plants grown *in vivo* and *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 566– 577.

Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. . *John Murray , London*.

Davies, B., P. Motte, E. Keck, H. Saedler, H. Sommer, and Z. Schwarz-Sommer. 1999. *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18: 4023–4034.

Deng, C. L., R. Y. Qin, N. N. Wang, Y. Cao, J. Gao, W. J. Gao, and L. D. Lu. 2012. Karyotype of *Asparagus* by physical mapping of 45S and 5S rDNA by FISH. *Journal of Genetics* 91: 209–212.

Deputy, J. C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt, and J. I. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 107–111.

Diggle, P. K., V. S. Di Stilio, A. R. Gschwend, E. M. Golenberg, R. C. Moore, J. R. Russell, and J. P. Sinclair. 2011. Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends Genet* 27: 368–376.

Favaro, R., A. Pinyopich, R. Battaglia, M. Kooiker, L. Borghi, G. Ditta, M. F. Yanofsky, M. M. Kater, and L. Colombo. 2003. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2603–2611.

- Gebler, P., L. Wolko, and M. Knaflewski. 2007. Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants. *Journal of Applied Genetics* 48: 129–131.
- Grant, S., B. Hunkirchen, and H. Saedler. 1994. Developmental differences between male and female flowers in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Plant Journal* 6: 471–480.
- Hamdi, S., G. Teller, and J.-P. Louis. 1987. Master regulatory genes, auxin levels, and sexual organogeneses in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Plant Physiology* 85: 393–399.
- Heslop-Harrison, J. 1958. The unisexual flower – a reply to criticism. . *Phytomorphology* 8: 177–184.
- Houba-Herlin, N., C. Pethe, J. d’Alayer, and M. Laloue. 1999. Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant Journal* 17: 615–626.
- Huai, Q., Y. H. Xia, Y. Q. Chen, B. Callahan, N. Li, and H. M. Ke. 2001. Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5'-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 276: 38210–38216.
- Huang, S., R. E. Cerny, Y. Qi, D. Bhat, C. M. Aydt, D. D. Hanson, K. P. Malloy, and L. A. Ness. 2003. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology* 131: 1270–1282.
- Izhaki, A., A. Borochoy, E. Zamski, and D. Weiss. 2002. Gibberellin regulates post-microsporogenesis processes in petunia anthers. *Physiologia*

Plantarum 115: 442-447.

Jacobsen, S. E., and N. E. Olszewski. 1991. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiology* 97: 409-414.

Jamsari, A., I. Nitz, S. M. Reamon-Buttner, and C. Jung. 2004. BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1140-1146.

Jiang, C., M. E. Lewis, and K. C. Sink. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. *Genome* 40: 69-76.

Jiang, C. X., and K. C. Sink. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in *Asparagus*. *Euphytica* 94: 329-333.

Kakimoto, T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate : ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* 42: 677-685.

Kamachi, S., H. Sekimoto, N. Kondo, and S. Sakai. 1997. Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant and Cell Physiology* 38: 1197-1206.

Kater, M. M., J. Franken, K. J. Carney, L. Colombo, and G. C. Angenent. 2001. Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *Plant Cell* 13: 481-493.

Kazama, Y., M. T. Fujiwara, A. Koizumi, K. Nishihara, R. Nishiyama, E. Kifune, T. Abe, and S. Kawano. 2009. A *SUPERMAN*-like gene is exclusively expressed in female flowers of the dioecious plant *Silene latifolia*.

Plant Cell Physiol 50: 1127–1141.

- Knopf, R. R., and T. Trebitsh. 2006. The female-specific *Cs-ACS1G* gene of cucumber. A case of gene duplication and recombination between the non-sex-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene and a branched-chain amino acid transaminase gene. *Plant and Cell Physiology* 47: 1217–1228.
- Koornneef, M., A. Elgersma, C. J. Hanhart, E. P. van Loenen-Martinet, L. van Rijn, and J. A. D. Zeevaart. 1985. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 65: 33–39.
- Koornneef, M., and J. H. van der Veen. 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heyneh. *Theoretical and Applied Genetics* 58: 257–263.
- Kramer, E. M., M. A. Jaramillo, and V. S. Di Stilio. 2004. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the agamous subfamily of mads box genes in angiosperms. *Genetics* 166:1011–1023.
- Lange, M. J. P., N. Knop, and T. Lange. 2012. Stamen-derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 2681–2691.
- Lazarte, J. E., and B. F. Palser. 1979. Morphology, vascular anatomy and embryology of pistillate and staminate flowers of *Asparagus officinalis*. *American Journal of Botany* 66: 753–764.
- Lewis, M. E., and K. C. Sink. 1996. RFLP linkage map of asparagus. *Genome* 39: 622–627.

- Liljegren, S. J., G. S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J. L. Bowman, and M. F. Yanofsky. 2000. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Loptien, H. 1979. Identification of the sex-chromosome pair in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung* 82: 162-173.
- Malepszy, S., and K. Niemirowiczszczytt. 1991. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. *Plant Science* 80: 39-47.
- Manzano, S., C. Martinez, Z. Megias, D. Garrido, and M. Jamilena. 2013. Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in the transition from male to female flowering in the monoecious *Cucurbita pepo*. *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 789-798.
- Massonneau, A., N. Houba-Herin, C. Pethe, C. Madzak, M. Falque, M. Mercy, D. Kopečný, A. Majira, P. Rogowsky, and M. Laloue. 2004. Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany* 55: 2549-2557.
- McMurray, A. L., and C. H. Miller. 1968. Cucumber sex expression modified by 2-chloroethanephosphonic acid. *Science* 162: 1397.
- Miller, J. S., and P. K. Diggle. 2007. Correlated evolution of fruit size and sexual expression in andromonoecious *Solanum* sections *Acanthophora* and *Lasiocarpa* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 94: 1706-1715.
- Ming, R., A. Bendahmane, and S. S. Renner. 2011. Sex chromosomes in land plants. In *Annual Review of Plant Biology*, Vol 62, edited by S. S. Merchant,

- W. R. Briggs and D. Ort. Palo Alto, pp 485-514.
- Mitchell, C. H., and P. K. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany* 92: 1068-1076.
- Mitchell, W. D., and S. H. Wittwer. 1962. Response of plants to root-absorbed chemical growth substances applied in culture solutions. *Nature* 195: 725-726.
- Miyawaki, K., M. Matsumoto-Kitano, and T. Kakimoto. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* 37 (1):128-138.
- Miyawaki, K., P. Tarkowski, M. Matsumoto-Kitano, T. Kato, S. Sato, D. Tarkowska, S. Tabata, G. Sandberg, and T. Kakimoto. 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16598-16603.
- Mohan Ram, H. Y., and V. S. Jaiswal. 1972. Induction of male flowers on female plants of *Cannabis sativa* by gibberellins and its inhibition by abscisic acid. *Planta* 105: 263-266.
- Moon, D. M. 1976. Yield potential of *Asparagus officinalis* L. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 4: 435-438.
- Morris, R. O., K. D. Bilyeu, J. G. Laskey, and N. N. Cheikh. 1999. Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255: 328-333.

- Nakajima, M., I. Yamaguchi, S. Kizawa, N. Murofushi, and N. Takahashi. 1991. Semi-quantification of GA1 and GA4 in male sterile anthers of rice by radioimmunoassay. *Plant and Cell Physiology* 32: 511-513.
- Nakayama, H., T. Ito, Y. Hayashi, T. Sonoda, T. Fukuda, T. Oehiai, T. Kameya, and A. Kanno. 2006. Development of sex-linked primers in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Breeding Science* 56: 327-330.
- Nester, J. E., and J. A. D. Zeevaart. 1988. Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (*ga-2*) mutant. *Amerian Journal of Botany* 75: 45-55.
- Neuffer, M. G., E. Coe, and S. R. Wessler. 1997. Mutants of Maize. . *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Ng, M., and M. F. Yanofsky. 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Reviews Genetics* 2: 186-195.
- Nibau, C., V. S. Di Stilio, H. M. Wu, and A. Y. Cheung. 2011. *Arabidopsis* and Tobacco superman regulate hormone signalling and mediate cell proliferation and differentiation. *Journal of Experimental Botany* 62: 949-961.
- Nicolas, M., G. Marais, V. Hykelova, B. Janousek, V. Laporte, B. Vyskot, D. Mouchiroud, I. Negrutiu, D. Charlesworth, and F. Moneger. 2005. A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *Plos Biology* 3: 47-56.
- Peng, J., R. Carol P, D. E., K. E. King, R. J. Cowling, G. P. Murphy, and N. P. Harberd. 1997. The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway

- that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11: 3194–3205.
- Phatak, S. C., S. H. Wittwer, S. Honma, and M. J. Bukovac. 1966. Gibberellin-induced anther and pollen development in a stamenless tomato mutant. *Nature* 209: 635–636.
- Pike, L. M., and C. E. Peterson. 1969. Gibberellin A4/A7, for induction of staminate flowers on the gynoeceious cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 18: 106–109.
- Plackett, A. R., A. C. Ferguson, S. J. Powers, A. Wanchoo-Kohli, A. L. Phillips, Z. A. Wilson, P. Hedden, and S. G. Thomas. 2014. DELLA activity is required for successful pollen development in the Columbia ecotype of *Arabidopsis*. *New Phytologist* 201: 825–836.
- Plackett, A. R., S. G. Thomas, Z. A. Wilson, and P. Hedden. 2011. Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends in Plant Science* 16: 568–578.
- R., K. J. N. 1967. Phenotypic restoration of fertility in a male-sterile mutant by treatment with gibberellic acid. *Nature* 21:668.
- Rana, R. S., and H. K. Jain. 1968. Gibberellin-induced expression of male potential in a stamen-less mutant of Cosmos. *Naturwissenschaften*. 55: 301–302.
- Reamon-Buttner, S. M., and C. Jung. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 432–438.
- Reamon-Buttner, S. M., J. Schondelmaier, and C. Jung. 1998. AFLP markers

- tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Molecular Breeding* 4: 91-98.
- Restivo, F. M., F. Tassi, R. Biffi, A. Falavigna, E. Caporali, A. Carboni, M. L. Doldi, A. Spada, and G. P. Marziani. 1995. Linkage arrangement of rflp loci in progenies from crosses between doubled haploid *Asparagus officinalis* L clones. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 124-128.
- Saito, S., N. Fujii, Y. Miyazawa, S. Yamasaki, S. Matsuura, H. Mizusawa, Y. Fujita, and H. Takahashi. 2007. Correlation between development of female flower buds and expression of the *CS-ACS2* gene in cucumber plants. *Journal of Experimental Botany* 58: 2897-2907.
- Sakai, H., L. J. Medrano, and E. M. Meyerowitz. 1995. *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature* 378: 199-203.
- Sawhney, V. K. 1974. Morphogenesis of the stamenless-2 mutant of tomato: III. Relative levels of gibberellins in the normal and mutant plants. *Journal of Experimental Botany* 25: 1004-1009.
- Sawhney, V. K. 1992. Floral mutants in tomato: development, physiology, and evolutionary implications. 1992. *Canadian Journal of Botany* 70: 701-707.
- Sawhney, V. K., and R. I. Greyson. 1973. Morphogenesis of the stamenless-2 mutant in tomato: II. Modification of sex organs in the mutant and normal flowers. *Canadian Journal of Botany* 51: 2473-2479.
- Sawhney, V. K., and A. Shukla. 1994. Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *American Journal of Botany* 81: 1640-1647.

- Schmulling, T., T. Werner, M. Riefler, E. Krupkova, and I. B. Y. Manns. 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241-252.
- Schultz, E. A., F. B. Pickett, and G. H. Haughn. 1991. The *FLO10* gene product regulates the expression domain of homeotic genes *AP3* and *PI* in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* 3: 1221-1237.
- Sneep, J. 1953. The significance of andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis* L. *Euphytica* 2: 89-95.
- Tadiello, A., A. Pavanello, D. Zanin, E. Caporali, L. Colombo, G. L. Rotino, L. Trainotti, and G. Casadoro. 2009. A *PLENA*-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* 60: 651-661.
- Telgmann-Rauber, A., A. Jamsari, M. S. Kinney, J. C. Pires, and C. Jung. 2007. Genetic and physical maps around the sex-determining *M*-locus of the dioecious plant asparagus. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 221-234.
- Trebitsh, T., J. E. Staub, and S. D. Oneill. 1997. Identification of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female (F) locus that enhances female sex expression in cucumber. *Plant Physiol* 113: 987-995.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges N, Moore DM, V. DH., W. S., and W. DA. 1980. *Asparagus* L. . In: *Flora Europaea, vol 5. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Urasaki, N., K. Tarora, T. Uehara, I. Chinen, R. Terauchi, and M. Tokumoto. 2002. Rapid and highly reliable sex diagnostic PCR assay for papaya (*Carica papaya* L.). *Breeding Science* 52: 333-335.
- Vescovi, M., M. Riefler, M. Gessuti, O. Novak, T. Schmulling, and F. Lo Schiavo. 2012. Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4. *Journal of Experimental Botany* 63: 2825-2832.
- Wang, D. H., and S. N. Bai. 2010. Ethylene Perception is Involved in Female Cucumber Flower Development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 46:S96-S97.
- Winkler, R. G., and T. Helentjaris. 1995. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1307-1317.
- Yamasaki, S., N. Fujii, S. Matsuura, H. Mizusawa, and H. Takahashi. 2001. The *M* locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant and Cell Physiology* 42: 608-619.
- Ye, D., M. Oliveira, J. Veuskens, Y. Wu, P. Installe, S. S. Hinnisdaels, A. T. Truong, S. Brown, A. Mouras, and I. Negrutiu. 1991. Sex determination in the dioecious *Melandrium*. The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. *Plant Science* 80 93-106.
- Zhang, Y., X. L. Zhang, B. Liu, W. J. Wang, X. W. Liu, C. H. Chen, X. F. Liu, S. Yang, and H. Z. Ren. 2014. A *GAMYB* homologue *CsGAMYB1* regulates sex expression of cucumber via an ethylene-independent pathway. *Journal of Experimental Botany* 65: 3201-3213.

榑原均, 経塚淳子. 2007. サイトカイニンの生合成と新規の活性化経路. 蛋白質 核酸 酵素 52: pp 1322-1329.

柴田共一, 神谷勇治, 勝見允行. 2006. 植物ホルモンの分子細胞生物学. 講談社: pp. 17-32.