

ホメオティック変異リンゴの
単為結実性に関与する *MdPI* 遺伝子の
発現と機能解析に関する研究

2007

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻
(岩手大学)

田中 紀充

目 次

序論	1
第 1 章 クラス B 遺伝子変異品種の単為結実性調査	10
1. 緒言	10
2. 材料および方法	11
3. 結果	11
4. 考察	19
5. 摘要	21
第 2 章 リンゴのクラス B 遺伝子変異品種における	
クラス B 遺伝子変異要因の調査	22
1. 緒言	22
2. 材料および方法	23
3. 結果	27
4. 考察	32
5. 摘要	33
第 3 章 <i>MdPI</i> 遺伝子によるシロイヌナズナの相補実験	34
緒言	34
第 1 節 シロイヌナズナの形質転換	36
1. 材料および方法	36
2. 結果	38
第 2 節 形質転換体の遺伝子型確認	42
1. 材料および方法	42
2. 結果	43
第 3 節 形質転換体の走査型電子顕微鏡における詳細観察	46
1. 材料および方法	46
2. 結果	46
考察	51

摘要	-----	53
第4章	<i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによる	
	花器官形成遺伝子の発現解析	----- 55
緒言	-----	55
第1節	<i>MdPI</i> 遺伝子および <i>MdMADS5</i> 遺伝子の発現解析	----- 57
1. 材料および方法	-----	57
2. 結果	-----	59
第2節	<i>MdPI</i> 遺伝子の組織学的な発現解析	----- 63
1. 材料および方法	-----	63
2. 結果	-----	66
第3節	<i>MdMADS5</i> 遺伝子の組織学的な発現解析	----- 72
1. 材料および方法	-----	72
2. 結果	-----	72
考察	-----	76
摘要	-----	78
第5章	<i>MdPI</i> 遺伝子プロモーターの機能解析	----- 80
緒言	-----	80
第1節	<i>MdPI</i> 遺伝子プロモーターの単離とベクターの構築	----- 82
1. 材料および方法	-----	82
2. 結果	-----	83
第2節	<i>MdPI</i> 遺伝子プロモーターの機能解析	----- 87
1. 材料および方法	-----	87
2. 結果	-----	87
考察	-----	91
摘要	-----	93
第6章	リングにおける形質転換体作出	----- 94
1. 緒言	-----	94

2. 材料および方法	95
3. 結果	97
4. 考察	106
5. 摘要	108
総合考察	109
総摘要	117
謝辞	123
引用文献	124

序 論

我が国におけるリンゴ栽培は、同一ほ場内に異なる品種を混植することが多い。これは収穫時期をずらし販売戦略を有利にする目的以外に、他家受粉による結実確保を目的とする。栽培リンゴ(*Malus × domestica* Borkh.)は自家不和合性のため他家受粉を必要とする。他家受粉の方法として、人工授粉とミツバチやマメコバチ等の訪花昆虫の利用が行われている。近年は省力化のため訪花昆虫の利用が進んでおり、それにつれて異なる品種の混植栽培が増加している。しかし、2006年5月より施行されたポジティブリスト制により収穫時期の異なる品種の混植は、農薬ドリフトの問題が発生する危険性が高くなった。この問題の解決には、果実を食用としない受粉専用品種の混植、自家結実性品種の育成、および単為結実性品種の育成などが考えられる。受粉専用品種の混植についてはすでに研究が開始されており、クラブアップルなどのいくつかの品種選定が行われている(江口ら, 2006)。自家和合性品種の育成については、まだ着手されていないが、同質四倍体品種の自家和合性機構については解析が進んでいる(安達ら, 2004, 2005; 星川ら, 2006)。

一方、リンゴの単為結実性については、現在の栽培品種群の中にも‘恵’や‘王林’などある程度の単為結実性を示す品種が見られるものの、ほとんどの品種は単為結実性がなく、不受精により落果する。しかし、栽培品種ではないもののリンゴ品種群の中には‘Spencer Seedless’、‘Wellington Bloomless’、‘Noblow’および‘Wickson’など高い単為結実性を示す品種が存在する。ただし、これらは同じく単為結実性を示す‘恵’、‘王林’、‘印度’等の品種とは異なり、花器官の変異を伴っている(Fig. 1)。通常、リンゴの花器は子房下位花でがくの下で花床と子房が癒合し、果実肥大には花床の肥大がともなう(間苧谷, 2002; 志村, 1987)。その花器形態は5枚のがくと5枚の花弁、およそ20本の雄ずいと5本の雌ずいから構成されているが、上記の品種では花弁ががくに、雄ずいが雌ずいに入れ換わる形態を示している。このように本来あるべき位置とは異なった位置に器官が発生する突然変異はホメオティック変異と呼ばれている。

花の形態形成は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)やキ

ンギョソウ(*Antirrhinum majus* L.)で提唱された ABC モデルで説明されている(Bowman and Meyerowitz, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994). すなわち, 双子葉植物の花は花式図にするといずれの花も同心円状の領域(whorl もしくは花輪, 外側から順に, 第一, 第二, 第三および第四)からなり, 各 whorl には第一から順にがく, 花弁, 雄ずいおよび雌ずい(心皮)が形成される. これらの四つの器官は, A, B, C の三つの異なる遺伝子群活性の組み合わせで決定される(Fig. 2). クラス A 遺伝子だけではがくが, クラス A と B がともに働くと花弁が, クラス B と C がともに働くと雄ずいが, クラス C だけでは雌ずいが形成される. 花器官のホメオティック変異はこれらクラス ABC 遺伝子の欠如が原因とされている. リンゴのホメオティック変異品種群は, 花弁と雄ずいが, がくと雌ずいに入れ替わる変異であることからクラス B 遺伝子の機能欠如と考えられている.

ABC 遺伝子群については, シロイヌナズナにおけるクラス A 遺伝子として *APETALA1* (*AP1*) 遺伝子, *APETALA2* (*AP2*) 遺伝子, クラス B 遺伝子として *APETALA3* (*AP3*) 遺伝子, *PISTILLATA* (*PI*) 遺伝子, クラス C 遺伝子として *AGAMOUS* (*AG*) 遺伝子の存在が報告されている(Bowman and Meyerowitz, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994). これらの遺伝子は, *AP2* 遺伝子を除くすべての遺伝子は共通の MADS box と呼ばれる DNA 結合ドメインを有している(Riechmann *et al.*, 1996; Shore and Sharrocks, 1995; Theissen and Saedler, 1995). この MADS box ドメインは動物や酵母, 植物種に共通の約 60 のアミノ酸残基からなる高く保存された転写因子であり, 植物は MADS (M)ドメイン, intervening (I)ドメイン, keratin-like (K)ドメインおよび C-terminal (C)ドメインからなる MIKC タイプ MADS box 遺伝子を持っている(Münster *et al.*, 1997; Purugganan, *et al.*, 1995; Theissen *et al.*, 1996). さらに, クラス B 遺伝子の *AP3* 遺伝子と *PI* 遺伝子タンパクはヘテロダイマーを形成し, 機能していることが示され(Goto and Meyerowitz, 1994; Honma *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2003; Zik *et al.*, 2003), *PI* 遺伝子と *AP3* 遺伝子の K ドメインがヘテロダイマーを形成する要因となることが示唆されている(Riechmann and Meyerowitz, 1997; Shore and Sharrocks, 1995). つまり, *PI* 遺伝子と *AP3*

遺伝子の両方の発現が無ければクラス B 遺伝子として機能しないことになる。

植物のゲノム研究や分子生物学的研究は最近の 10 余年で急激に進んでおり、特に全ゲノム配列の解読が完了しているシロイヌナズナや、イネ(*Oryza sativa* L.)ではモデル植物として先端的な研究が行われている。花芽形成や花器官形成に関する研究分野の進歩は著しく、シロイヌナズナでは、長年の研究で特定できなかったフロリゲン物質に関する研究において、葉と茎頂分裂組織間のシグナル物質が明らかになりつつある。フロリゲンは植物において花芽形成を誘導するシグナル物質として提唱された植物ホルモン様物質である。最近、このフロリゲンの候補として *FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子が有力視され(Abe *et al.*, 2005; Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Wigge *et al.*, 2005), *FT* 遺伝子を過剰発現させた場合のシロイヌナズナでは日長に関係なく早期に花芽を形成することが報告されている。また、Huang *et al.* (2005) は *FT* 遺伝子の移動は mRNA の可能性があることを示している。その他、光周期を感受し *FT* 遺伝子の発現を促進させている *CONSTANS (CO)* 遺伝子、早期開花性などの花芽誘導に関与する遺伝子 *LEAFY(LFY)* 遺伝子、花芽形成を抑制する遺伝子 *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* 遺伝子などの同定や機能解析、さらには、花卉、雄ずいおよび雌ずい形成などの花器官形成に関与するホメオティック遺伝子の同定や機能解析に関する研究が進められている。

最近、リンゴでも花芽形成に関する研究が進められており、Kotoda *et al.* (2006)は花芽形成に係る遺伝子で、主に花芽の分化を抑制する遺伝子 *TFL1* 遺伝子のホモログである *MdTFL1 (Malus×domestica TFL1)* 遺伝子をリンゴにアンチセンスで導入し、遺伝子を発現抑制させることで早期開花に成功している。また、セイヨウナシではカンキツの *FT* 遺伝子ホモログである *CiFT* 遺伝子(Endo *et al.*, 2005)の導入により、*in vitro*での早期開花を引き起こしたことが報告されている(松田ら, 2004)。これらの花芽形成遺伝子の導入によって、早期開花を促進することで花器官形成に関与するホメオティック遺伝子の働きの調査や、育種年限の短縮などの効果が期待されている。リンゴでは他に花成制御遺伝子として、*AFL1* 遺伝子、*AFL2* 遺伝子

および *MdAP1* (*MdMADS5*) 遺伝子が単離され (Kotoda *et al.*, 2000, 2002, 2006; Kotoda and Wada, 2005; Sung *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 2002), 花器官形成に関与するホメオティック遺伝子として, *MdMADS1*~*MdMADS15* 遺伝子, *MdPISTILLATA* (*MdPI*) 遺伝子および *MdTM6* 遺伝子などが単離されている (Kitahara *et al.*, 2004; Linden *et al.*, 2002; Sung and An, 1997; Sung *et al.*, 1999, 2000; Yao *et al.*, 1999, 2001). これらの花器官形成に関与するホメオティック遺伝子は相互に作用し, リンゴの花器官を形作っていると考えられる. しかし, これらのリンゴでの花器官形成に関与するホメオティック遺伝子は, 数多くある花器官を形成する遺伝子群のほんの一部に過ぎず, 未だ単離されていない重要な遺伝子もあると考えられる.

遺伝子機能解析の研究手法として, 遺伝子の機能欠失もしくは獲得実験は重要な手法となっている. リンゴにおける形質転換技術は遺伝子の機能解析を行う上で必須の技術である. 果樹に特有の遺伝子の機能を解析するには, 同じ果樹で形質転換を行ってはいじめて判明する. また, 形質転換技術はこのような遺伝子の機能解析のみが目的ではなく, 育種技術面から品種育成の効率化に貢献できる. リンゴは開花から結実までの幼若期間が長く, ほとんどの品種が自家不和合性を有しているため, 雑種性が強く計画的育種が行い難い. しかし, 形質転換技術を用いることで交雑育種では長期間必要な耐病虫性といった有用形質の導入も可能となる. しかし, この実験は形質転換法の確立している植物でなければ行うことができない. 形質転換実験以外にも遺伝子の機能解析法として, プロモーター解析実験もしくは *in situ* ハイブリダイゼーション法があり, 遺伝子の発現部位を調査する方法として重要である. プロモーター解析は検出したいプロモーターの下流に Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子や β -glucuronidase をコードしている *uidA* (GUS) 遺伝子等のレポーター遺伝子を結合させ, 目的とする遺伝子の特異的な転写発現を調査する方法である. 一方, *in situ* ハイブリダイゼーション法は, 核酸の相補的結合を利用して, 組織中の生物個体内の本来あるべき場所における遺伝子の分布を調査する方法で, 任意の標識 RNA プローブを用いて組織中の調査したい目的遺伝子の RNA と結合させ, その遺伝子の特

異的な発現部位を調査する方法である。これらの方法は発色により検出できるため、目的遺伝子の発現場所を可視化することができる。

リンゴの花器官変異品種群は、花卉と雄ずいが、がくと雌ずいに入れ替わる花器官のホメオティック変異を示し、通常の花と形態が異なっている。これは ABC モデルのクラス B 遺伝子である *PI* 遺伝子と *AP3* 遺伝子のうち *PI* 遺伝子に相当する *MdPI* 遺伝子の発現が、長い末端同方向反復配列(LTR)を持つおよそ 10kb ほどのレトロトランスポゾン様の配列の挿入により抑制されているために生じる形態異常と推定されている(Yao *et al.*, 2001)。一方、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子の点突然変異体では二重のがくと一本の太い雌ずいとなる形態を示す。リンゴではこのような花器官の形態異常を示す一連の品種は単為結実性を有することが知られているが、シロイヌナズナではクラス B 遺伝子の変異と単為結実性との関係は認められていない。このリンゴ花器官の形態的特徴である *MdPI* 遺伝子の変異でがくと雌ずいが多重に形成されることおよび単為結実性との間には関係があると推定される。しかし、*MdPI* 遺伝子の発現部位と果実となる花床部では遺伝子の発現が異なっている(Fig. 3)、それにとまなう単為結実性の機構は全く解明されていない。リンゴなどの果樹栽培における重要課題は安定的な結実を確保することである。このような単為結実性の機構を解明し、実用化につなげることができれば、リンゴでの省力的・安定生産に貢献できるものと思われる。単為結実品種の実用化は、混植による作業効率の低下(摘果、収穫、薬剤散布等の品種別対応)を回避でき、作業効率を向上させるほか、農薬ドリフト問題の解決、結実安定による省力化等対応する技術の 1 つとなる。

そこで本研究では、単為結実性を有するリンゴのクラス B 遺伝子変異品種群の花器官形成に関するホメオティック遺伝子、特に花器官の形態異常と単為結実に影響していると推定されるリンゴ *MdPI* 遺伝子の発現と機能を解明するとともに、リンゴの子房下位花という花器官構造と可食部となる花床の肥大に関係する原因を推定することを目的に以下の実験を行った。

まず、第 1 章では、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種について無受粉による単為結実能力と、人工受粉による種子形成能力とそれに伴う果実の発達を調査した。第 2 章では、レトロトランスポゾン様配列の挿入により *MdPI*

遺伝子の発現が抑制されているクラス B 遺伝子変異品種の ‘Spencer Seedless’ や ‘Wellington Bloomless’ 以外の ‘Noblow’, ‘Wickson’ について、クラス B 変異の要因を調査した。第 3 章では、リンゴでは機能解析のための形質転換は難しく、開花までの期間が長いことから、形質転換が容易で開花までの期間が短いシロイヌナズナで機能解析を行った。リンゴでのクラス B 遺伝子変異の要因となっている *MdPI* 遺伝子の機能について、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの下流にセンス方向に *MdPI* 遺伝子を融合させたベクターを使用し、シロイヌナズナにおいて形質転換を行った。続いて、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体を用いた相補実験を行い、表現型の回復による *MdPI* 遺伝子の機能を調査した。第 4 章では、リンゴの花芽組織における *MdPI* 遺伝子と、がくの形成に関与する *MdMADS5* 遺伝子の組織レベルでの mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調査した。第 5 章では、*MdPI* 遺伝子の転写制御を行っているプロモーターを ‘紅玉’ のゲノム DNA から単離し、下流にレポーター遺伝子として GUS 遺伝子を融合させ、シロイヌナズナを用いて解析を行った。最後に第 6 章では、リンゴでの *MdPI* 遺伝子の発現解析を行うために、リンゴの台木品種 ‘JM2’ を使用して *MdPI* 遺伝子の機能欠失、ジーンサイレンシングおよびプロモーター解析を調査するため形質転換を行った。



A



B



C



D

Fig.1 Flower of normal and class B gene mutant cultivars

A, Flower of 'Jonathan'

B, Flower of 'Spencer Seedless'

C, Extension of 'Jonathan'

D, Extension of 'Spencer Seedless'

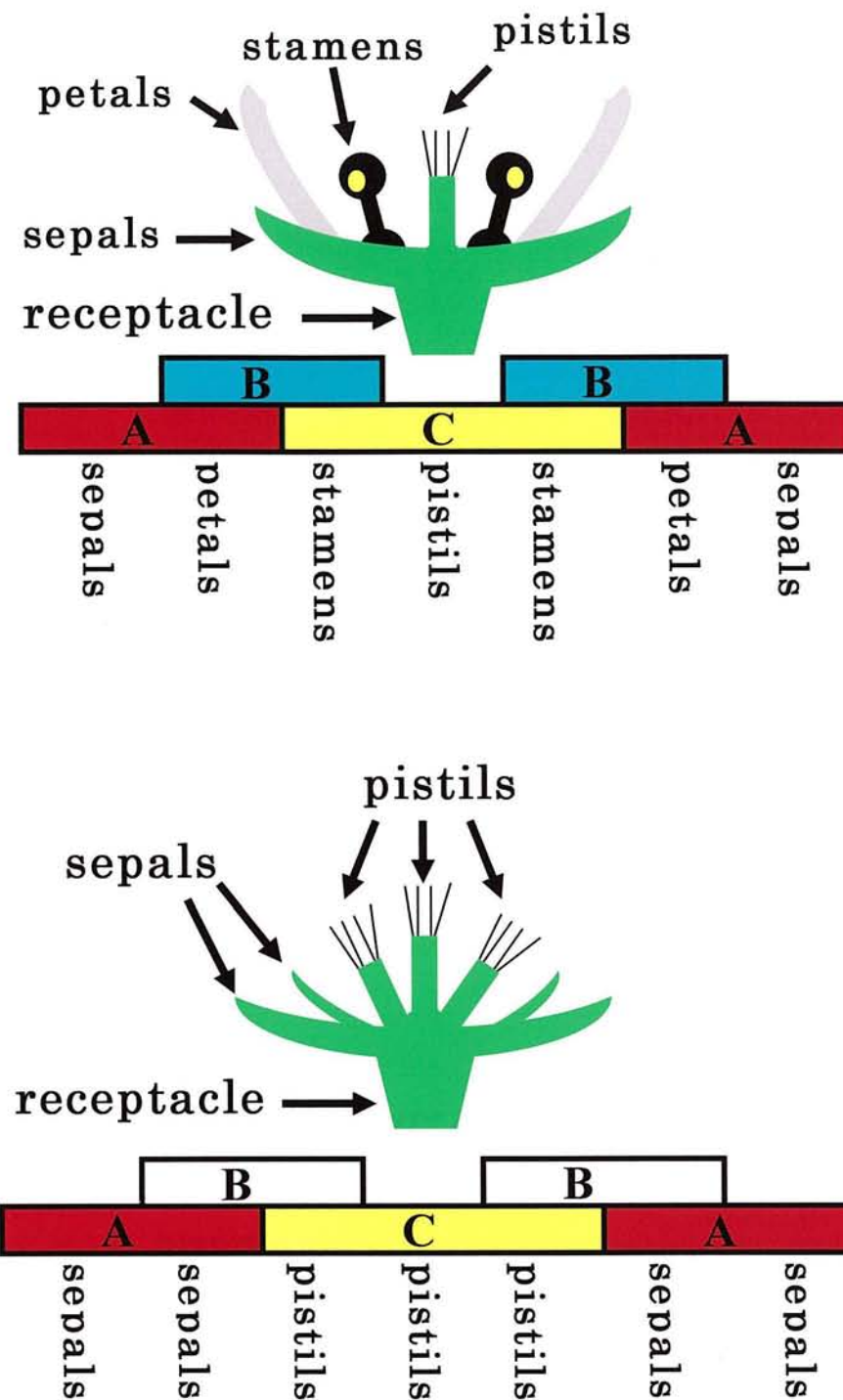


Fig. 2. ABC model in apple

Upper, Normal flower

Bottom, Class B gene mutant flower

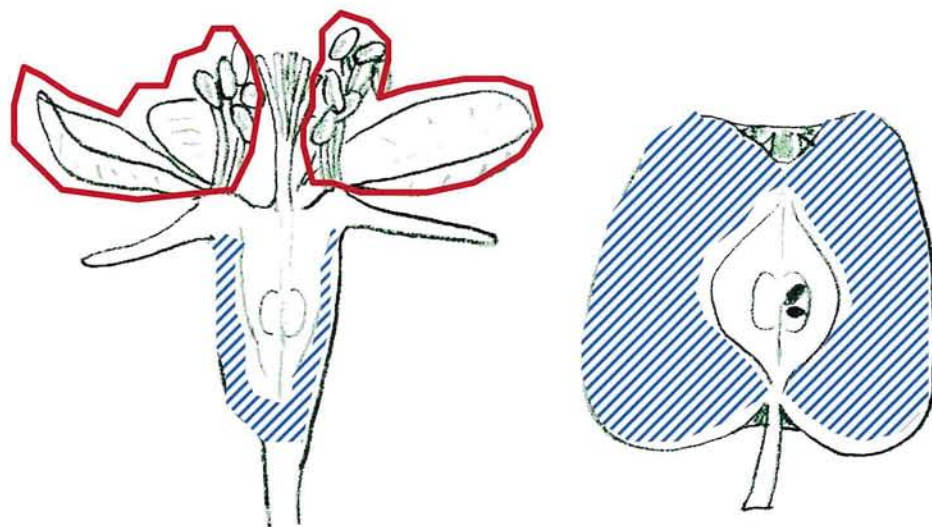


Fig. 3. Part of the *MdPI* expression (red circle)
and flesh development position of the fruit
blue slash in apple

第 1 章 リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の単為結実性調査

1. 緒 言

果樹にはリンゴやナシなど自家不和合性樹種とモモやブドウなどの自家和合性樹種がある。一方、カキやブドウの無核種、カンキツ、バナナおよびパイナップルなど単為結実性を示す樹種・品種がみられる。単為結実には受粉や薬剤の刺激なしで自動的に果実形成が誘導される自動的単為結実と受精は必要としないが受粉することや薬剤の刺激が必要な他動的単為結実とがあるが、いずれの場合も種子は形成されずに子房壁や花床が肥大して果実を形成する。また、ブドウ‘デラウェア’に対するジベレリン(GA)処理により単為結果を誘導する技術があるように、内生の植物ホルモンも影響していると考えられる。さらに、単為結果しやすい果樹は、子房内に多数の胚珠を含むといわれている(Nitsch, 1965)。

自家和合性や単為結実性は結実の安定確保のために利用価値がある。リンゴの自家和合品種は‘恵’や同質四倍体品種が高い自家和合を示すことが知られている(安達ら, 2004, 2005; 山田ら, 1971)。一方、商業的栽培品種における単為結実性品種は‘恵’, ‘王林’および‘印度’等がわずかに存在するだけである。

栽培品種以外のリンゴ属には‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’, ‘Noblow’および‘Wickson’等のクラス B 遺伝子変異品種が単為結実性を有することが知られている。‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’はクラス B 遺伝子である *MdPI* 遺伝子がゲノム DNA 中にレトロトランスポゾン様配列の挿入により発現抑制を引き起こしている(Yao *et al.*, 2001)。*‘Spencer Seedless’* の遺伝解析により、クラス B 遺伝子の遺伝様式は、単一の劣性遺伝であることが示唆され、これらの品種は無種子でも果実肥大するとされ、交配による種子は 2 つの核を合わせて 18 個程度形成されると報告されている(Tobutt, 1994)。しかし、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種である‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’, ‘Noblow’および‘Wickson’の 4 品種について、受粉操作における種子形成と果実肥

大および無受粉による単為結実能力に関する詳細なデータは無い。

そこで本章では、クラス B 遺伝子変異 4 品種を供試し、無受粉による単為結実能力と受粉による種子形成能力および果実肥大の影響を明らかにすることを目的に実験を行った。

2. 材料および方法

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点（以下リンゴ研究拠点）の品種保存園に栽植してあるリンゴのクラス B 遺伝子変異品種 ‘Spencer Seedless’，‘Wellington Bloomless’，‘Noblow’ および ‘Wickson’ をそれぞれ 1 樹供試した。受粉区と無受粉の放任区を設定した。交配に用いた花粉はバルーンステージの花から葯を取り出し、シリカゲルの入ったプラスチック容器内で、一日間室温で解葯後、交配に使用するまで 4℃で保存した。2003 年は ‘Golden Delicious’ の花粉を 1 花そうに 2 花となるように摘花後、30 花に受粉させ、2004 年は ‘Spencer Seedless’，‘Noblow’，‘Wickson’ に ‘Golden Delicious’ の花粉を，‘Wellington Bloomless’ に ‘ふじ’ の花粉を 2003 年と同様に受粉させた。受粉後は袋をかけ、3 週間後に袋を取り除くとともに結実率を調査した。収穫果実について、果実重を測定し、種子数を計測するとともに種子の形成される場所を確認した。

3. 結果

交配処理後 4 週間目に結実率を調査した。収穫果数は 2003 年の ‘Spencer Seedless’ が受粉区で 17 果，放任区で 40 果，‘Wellington Bloomless’ が受粉区で 1 果，放任区では果実が得られず，‘Noblow’ が受粉区で 20 果，放任区で 9 果，‘Wickson’ が受粉区で 6 果，放任区で 6 果だった。2004 年は ‘Spencer Seedless’ が受粉区では果実が得られず，放任区で 16 果，‘Wellington Bloomless’ が受粉区で 1 果，放任区で 3 果，‘Noblow’ が受粉区で 15 果，放任区で 19 果，‘Wickson’ が受粉区で 5 果，放任区で 20

果だった。それぞれ収穫後に果実形態の調査を行い、果実重および種子数を調査した(Table1)。2004 年は結実率の調査ができなかった。

‘Spencer Seedless’の果実の形態(Fig. 1.1A)は通常品種の果実と類似していたが、‘Noblow’の果実はていあ部が肥大していた(Fig. 1.1B)。
‘Wellington Bloomless’と‘Wickson’の果実形態も‘Noblow’と同様であった。また、クラス B 遺伝子変異品種はていあ部が通常品種と比較して開いていた(Fig. 1.1A, 1.1B, 1.2 and 1.3)。クラス B 遺伝子変異品種の果実は、人工授粉により種子の入る場所が本来の雌ずい由来の胚珠と、雄ずいが変化した雌ずい由来で形成された胚珠と上下 2 ヶ所あった(Fig. 1.2 and 1.3)。この結果から、雄ずいが変化した雌ずいでも正常に種子が形成されることが明らかとなった。クラス B 遺伝子変異品種の果実は、種子が入らなかった場合と入った場合の果実形態は品種によって異なった。‘Noblow’の果実は特にていあ部に種子が入ることで、がくの周辺が著しく肥大し果実中部がくびれ、ひょうたん型になった。‘Wellington Bloomless’や‘Wickson’でも同様の形態を示していた。一方、‘Spencer Seedless’の果実はがく付近の肥大が小さく、普通の品種と果実の形態は変わらなかった。クラス B 遺伝子変異品種の果実のいくつかは、本来の果芯部子室が 5 子室ではなく、6 子室を有している果実も観察された(Fig. 1.4A)。また、雄ずいが雌ずいに変化してきた子室は 10 であった(Fig. 1.4B)。

2003 年の結実率は、すべての品種で受粉により結実率が上昇した(Table1)。収穫果数は、‘Wellington Bloomless’と‘Wickson’で少なかった。また、結実調査時点で着果していた果実の多くが収穫期には落果していた。2004 年の‘Spencer Seedless’の受粉区と、2003 年の‘Wellington Bloomless’の無受粉区では収穫できた果実がなかった。1 果あたりの種子数は 2003 年、2004 年ともに受粉処理により種子が形成されていて、放任区と比較して有意に多く、受粉操作が種子形成を促進したことが明らかとなった。放任区では 1 果あたりの種子数が 1 個以下で、多く入っている場合でも 2 個以下であった。クラス B 遺伝子変異品種の種子数はいずれの年でも、ていあ部子室よりも本来の果芯部子室で多かった。受粉区では無種子で結実した果実はなく、放任区では、2003 年に比べて、2004 年で多くの果実が無種子で結実してい

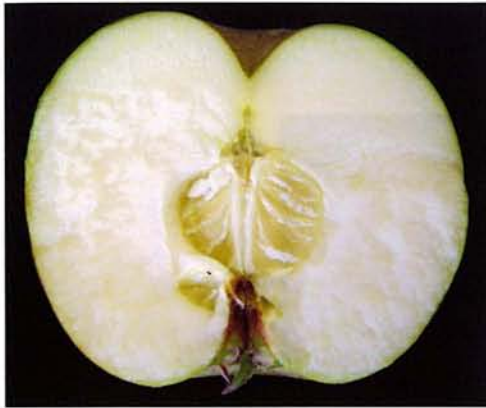
た．また，‘Wickson’では2年連続で，無種子で結実した割合が90%を超えていた．受粉操作における果実重の関係では2003年は‘Spencer Seedless’と‘Noblow’で受粉区よりも放任区で果実重が有意に大きかった．2004年の‘Noblow’には有意な差は認められなかった．一方，‘Wickson’は2003年には有意な差は認められなかったが，2004年は放任区で有意に大きくなった．

Table 1 Fruit set percentages, number of seed per fruit and fruit weight in class B gene mutant cultivars

	Fruit set (%)		Number of harvested fruits		Number of seed per fruit				Seedless percentage (%)		Fruit weight (g)	
	2003		2004		2003				2004		2003	
	2003	2004	2003	2004	Normal ovary	Calyx end	Sum	Normal ovary/ Calyx end	Normal ovary/ Calyx end	Sum	2003	2004
Spencer Seedless	91.3	17	-	5.59	2.94	8.5 b ^z	0.526	-	-	-	0	224.6 b
	66.6	40	16	0.80	0.25	1.0 a	0.313	0.06	0	0	47.5	93.8
											175.8 a	204.8
Wellington Bloomless	52.9	1	1			4.0		6.00	4.00	10.0 b	0	163.0
	26.7	-	3	-	-	-		0.67	0.33	1.0 a	-	66.7
		20	15	6.90	5.65	12.5 b	0.819	2.73	1.67	4.4 b	0	186.2 b
Noblow	100	9	19	0.67	0.22	0.9 a	0.328	0.26	0.05	0.3 a	33.3	73.8
	80.0	6	5	4.83	1.67	6.5 b	0.346	3.20	0.40	3.6 b	0	139.1a
											122.0 b	
Wickson	58.3	6	5	4.83	1.67	6.5 b	0.346	3.20	0.40	3.6 b	0	139.1a
	10.0	6	20	0	0	0 a		0.05	0.05	0.1 a	100	141.1 a
											200.7 a	

The fruits harvested in non-pollination treatment were mixed with open-pollination treatment and treated as the data of open-pollination treatment. -: no data

^z Same letters do not show significant differences in Tukey HSD test. The statistical processing was carried out during A pollination treatment and open-pollination treatment in each cultivar and each year.



A



B

Fig. 1.1 Fruit shape of class B gene mutant cultivars

A, The fruit of 'Spencer Seedless', The fruit of 'Spencer Seedless' resembled that of normal cultivars.; B, The fruit of 'Noblow', The calyx end around of 'Noblow' fruit was remarkably hypertrophied.



Fig. 1.2 Fruit cross section of class B gene mutant cultivars of 'Noblow'

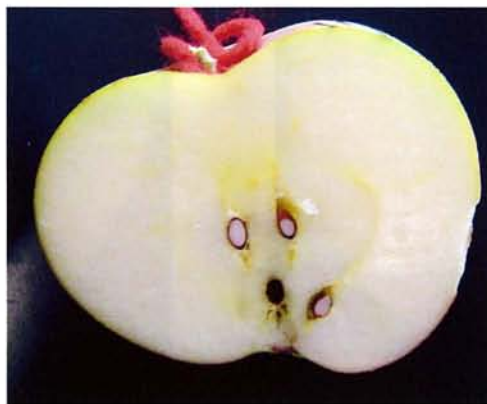
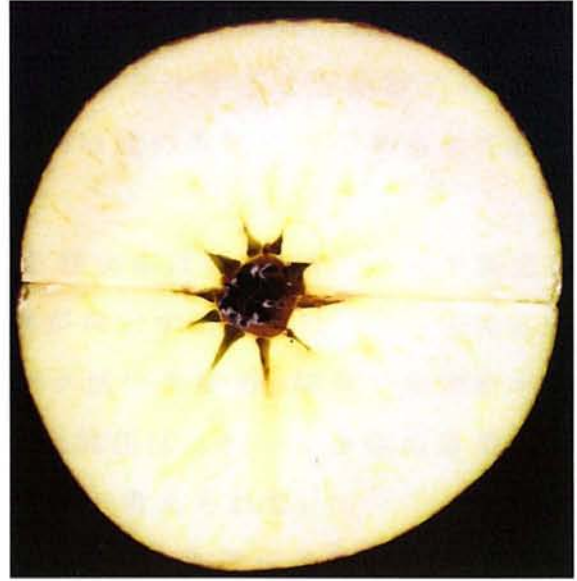


Fig. 1.3 Fruit cross section of class B gene mutant cultivars of 'Spencer Seedless'



A



B

Fig. 1.4 The position where the seeds of class B gene mutant cultivars is formed

A, Normal ovary of the fruit; B, Calyx end part of the fruit

4. 考 察

クラス B 遺伝子変異品種の果実形態は一樣ではなく、特に ‘Spencer Seedless’ は他品種と異なりていあ部の肥大が少なく円錐状の果形を示した。一方、その他の品種はていあ部周辺の肥大が顕著でそのために果実中央下部にくびれを生じた(Fig. 1.1B)．‘Spencer Seedless’ のていあ部の 1 果あたり種子数は ‘Noblow’ より少なく ‘Wickson’ より多かった(Table1)．また、ていあ部に種子が形成されなくてもがく周辺が肥大することが認められた。したがって、ていあ部周辺の果実肥大は種子形成のみに原因があるのではなく、品種特性も影響していると考えられる。

クラス B 遺伝子変異品種の無受粉による結実率は低く、結実花を予測することは困難であった。交配によって結実率が向上することは、これらの品種においても通常の品種と同様に果実のシンク活性を高め、結実や果実肥大を促進する機構が存在することを示しており、放任区において多数の落果が引き起こされる原因は養分競合の影響が大きいと考えられた。

2003 年と 2004 年の調査では、すべてのクラス B 遺伝子変異品種の放任区において、種子を伴わずに結実・収穫できた果実があったことから、これらの品種が単為結実性を有することが確認できた(Table1)．また、単為結実性を有するこれらの品種でも、受粉によって結実率が向上することが確認された。受粉を行った場合の種子形成能力に品種間差があることは、1 果あたり種子数およびていあ部の種子形成能力に品種間差があることから明らかである。通常のリンゴ品種は 1 子室あたり 4 個胚珠を形成するため、最大で 20 粒まで種子が入る可能性がある。しかし、リンゴで 15 粒以上の種子を含む場合はまれで、213 交雑の平均 1 果あたりは 6.05 個との報告がある(小森ら, 1999)．今回の交雑試験では、2003 年の ‘Noblow’ × ‘Golden Delicious’ で 23 粒(中心部 13 粒, ていあ部 10 粒), 22 粒(中心部粒, ていあ部 7 粒), 20 粒(中心部 10 粒, ていあ部 10 粒)と正常花ではあり得ない数の種子が 1 果中に形成されている。‘Noblow’ は特に種子形成能が高い可能性がある。クラス B 遺伝子変異品種の果芯部子室の形態が五角形の配置からはずれていることは注目すべきことである(Fig. 1.4A)．子室の形態異常、ホメオティ

ック変異等の形態変化と、子房下位花であるリンゴでのみクラス B 遺伝子の変異によって単為結実性が誘導されることとの間にどのような関係が存在するか、今後調査を行う必要がある。

クラス B 遺伝子変異品種の放任区でわずかながら種子形成が認められたことから、これらの品種が無種子で結実する原因がコンタミネーション、または偽単為結実さらには無配合生殖(アポミクシス)による可能性もある。クラス B 遺伝子変異品種の花は通常品種の花と異なり花弁と雄ずいを持たない。自然条件下ではリンゴは虫媒花で花弁が無い場合は、通常、昆虫が訪花しないと考えられる。また、リンゴ花粉は大きく、風媒では花粉の伝搬が起らない(副島、私信)。したがって、自花に花弁、花粉を有しないこれら 4 品種が無受粉で結実したことは単為結実である可能性が高い。当試験の調査圃場は品種保存園で、株間が 1m 離れた両脇の樹は他品種である。また、クラス B 遺伝子変異品種は花弁がなく開花時期の判定が難しい。したがって、袋かけ時点で柱頭に花粉が付着していた可能性も否定できない。これらの状況が花粉の混入を許している可能性がある。さらに、これらのコンタミネーションで生じた種子が、発育の初期に生育を停止し、偽単為結果となった可能性もわずかながら考えられる。

受粉区で収穫された果実は 4 品種ともすべて種子を含んでいた。このことはクラス B 遺伝子変異品種が受精・種子形成を排除して単為結実を優先的に行っているのではないことを示している。一般に多くの果樹では、単為結実性や無配合生殖性を有する果樹は雌雄配偶子に異常があり受精による種子形成を排除して結実するとされており、リンゴ属でも *Malus hupehensis* の無配合生殖では受粉による交雑が極めて起きにくいことを齋藤ら(1993)が報告している。リンゴ栽培種(*M×domestica*)での無配合生殖の可能性は極めて低いと推察されるが、今後、結実初期から経時的に種子の発達を調査する必要がある。

‘Noblow’ と ‘Spencer Seedless’ は通常の品種と同じように、種子形成によって果実肥大が促進されると考えられた。一方、‘Wickson’ は種子形成と果実重の間に相関が認められず、むしろ無種子のほうが果実が大きかった。‘Wickson’ では無種子で結実する果実の割合が ‘Noblow’ と ‘Spencer

Seedless' より 2 年間とも高いことから判断して, 'Wickson' の単為結実能力は 'Noblow' と 'Spencer Seedless' より高いことが推察された.

本実験では, 植物ホルモンに対する検討を行っていないが, カンキツにおいて単為結果を示す品種で子房内のオーキシン含量が高いこと (Gustafson, 1939) や, ジベレリンは種子で合成され果実の肥大や翌年の花芽形成を抑制することが知られている. よって, 今後, 無種子での結実における内性植物ホルモンの影響を調査する必要がある.

5. 摘 要

クラス B 遺伝子変異品種の単為結実能力と受粉による種子形成能力および果実肥大の影響を調査した. 本来の果実の中心部のみならず雄ずいに変化した雌ずい部でも正常に種子が形成されることが明らかとなった. クラス B 遺伝子変異品種の放任区では多数の花が落花するにもかかわらず, 無種子で結実・肥大する果実が 4 品種とも存在することから, これらの品種はいずれも単為結実性を有することが確認できた. また, 受粉により種子数が増加し, 中心部および形態変異したていあ部の 2 ヶ所の子室で 20 個以上ある果実がみられた. 種子の形成と果実重の関係は品種間差が認められたが, これは樹勢や着果量も影響していると考えられた. 'Wickson' の単為結実能力は 'Noblow' と 'Spencer Seedless' より高いことが推察され, クラス B 遺伝子変異品種間で単為結実性に品種間差があることが明らかになった.

第 2 章 リンゴのクラス B 遺伝子変異品種における クラス B 遺伝子変異要因の調査

1. 緒 言

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種のうち‘Rae Ime’, ‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’等は、花卉と雄ずいで発現するクラス B 遺伝子の *MdPI* 遺伝子の発現がレトロトランスポゾン様配列の挿入により抑制されると推定されている(Yao *et al.*, 2001). その *MdPI* 遺伝子の抑制機構は ‘Rae Ime’ ではイントロン 4 に, ‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’ ではイントロン 6 におよそ 10kb 程度のレトロトランスポゾン様配列の挿入があるため, 二通りのパターンがあると考えられる. レトロトランスポゾンとは長い末端同方向反復配列(LTR)を持ち, ゲノムに存在し RNA を解して転移する因子であり, ‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’ および ‘Rae Ime’ の *MdPI* 遺伝子ゲノム中に挿入されている配列もこの LTR を有している. ‘Noblow’ と ‘Wickson’ は, ‘Spencer Seedless’ と相同な花器官の表現型を示し, 単為結実性を有しているが *MdPI* 遺伝子の発現がどのように抑制されているかは明らかでない. Kitahara *et al.* (2005)の報告によると, ‘Rae Ime’ を除くクラス B 遺伝子変異品種と単為結実性を示す ‘王林’等の通常品種を用いた S 遺伝子解析と SSR マーカー解析を行ったところ, ‘Wellington Bloomless’ と ‘Wickson’ で S 遺伝子型が一致しており, ‘Spencer Seedless’ や ‘Noblow’ とは異なっていることが示された. また, SSR 座は ‘Wellington Bloomless’ と ‘Wickson’ で一致し, ‘Spencer Seedless’ や ‘Noblow’ とは遺伝的に異なっていることが示され, これらの 4 品種は単為結実性を有する他の栽培品種とは異なる分岐群を形成したことから, *MdPI* 遺伝子の変異と単為結実性との関連が改めて示唆されている.

シロイヌナズナにおける *PI* 遺伝子の変異体は *pi-1*, *pi-2* および *pi-3* がある(Goto and Meyerowitz, 1996). それぞれ表現型は同じだが, 一塩基の変異により, *pi-1* は 80 トリプトファンが終止コドンに変化し, *pi-2* は 75 セ

リンがフェニルアラニンに変化し、*pi-3* は 49 アラニンがバリンに変化して *PI* 遺伝子の発現が抑制されている。‘Spencer Seedless’ と ‘Rae Ime’ のように、‘Noblow’ および ‘Wickson’ も変異の表現型が同一でも遺伝子の抑制機構は異なっている場合が考えられる。

そこで本章では、第 1 章で用いたクラス B 遺伝子変異 4 品種のレトロトランスポゾン挿入部位を調査し、これらの品種の *MdPI* 遺伝子抑制機構の解明と *MdPI* 遺伝子変異の来歴を探ることを目的に、DNA プロット解析および *MdPI* 遺伝子ゲノムの PCR 産物の制限酵素処理を行った。

2. 材料および方法

DNA 抽出

リンゴ研究拠点に植栽してある ‘紅玉’、‘Spencer Seedless’、‘Wellington Bloomless’、‘Noblow’ および ‘Wickson’ の葉から改変 2×CTAB 法 (Kotoda *et al.*, 2000) により以下の手順でゲノム DNA を抽出した。試料を事前に滅菌済みの乳鉢、スパーテル、チューブを液体窒素で冷やしておき、液体窒素中で摩砕した。液体窒素につけてあるチューブに試料を入れ、試料の 10 倍量の氷冷 Isolation buffer (IB) (10% [w/v] polyethylene glycol 6000, 0.35M sorbitol, 0.1M Tris-HCl [pH8.0], 0.5% [v/v] β-mercaptoethanol) を加え、よく攪拌した。15,000rpm, 10 分間, 4℃で遠心分離を行い、上清を除いた。沈殿に試料の 5 倍量の Lysis buffer (LB) (0.35M sorbitol, 0.1M Tris-HCl [pH8.0], 0.5% [v/v] β-mercaptoethanol) を加え、よく攪拌し、液量の 1/10 倍量の 10% (w/v) sarcosine を加え、室温に 10 分間放置した。等量の 2×CTAB 液 (2% [w/v] cetyltrimethylammonium bromide [CTAB], 0.1M Tris-HCl [pH9.5], 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 0.5% [v/v] β-mercaptoethanol) を加え、65℃で 10 分間インキュベートした。等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1 [v/v]) を加え、ゆっくり攪拌した後、15,000rpm, 10 分間、室温で遠心分離した。水層を回収し、等量のイソプロパノールを加え、核酸を沈殿させた。沈殿をピペットチップの先で巻き取って回収した。真空乾燥は避け、沈殿を軽く風乾させた後、適量の TE バッファー (10mM Tris-HCl

[pH8.0], 1mM EDTA)に溶解した．等量の TE 飽和フェノール(pH8.0) (1:1 [v/v])を加えて攪拌した．15,000rpm, 10 分間, 室温で遠心分離し, 水層を回収した後, フェノール:クロロフォルム(1:1 [v/v])を加えて攪拌した．15,000rpm, 10 分間, 室温で遠心分離し, 水層を回収した．等量のイソプロパノールを加え, 核酸を沈殿させ, 70%(v/v)エタノールを加えて洗浄し, 15,000rpm, 10 分間, 室温で遠心分離により回収した．沈殿を真空乾燥し, 適量の TE に溶解した．

DNA プロット

上記で得られたゲノム DNA (約 10 μ g)を *Eco*RI, *Sph*I のそれぞれの制限酵素, H バッファー (50mM Tris-HCl [pH7.5], 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)を用いて 37℃, 1 時間切断し, 下記のフェノール・クロロフォルム処理, エタノール沈殿を行い, TAE (40mM Tris-HCl, 40mM Acetic Acid, 1mM EDTA)バッファーを含む 0.8% (w/v)アガロースゲルで電気泳動を行い, 10mg/mL 濃度のエチジウムブロマイド(EtBr)で染色後, ゲルプリンターGP-2000i (Taitec, Nagoya, Japan)で写真を撮影した．ゲルは 0.25N HCl に 15 分間浸し, 0.4N NaOH、1.5N NaCl を含むバッファーでナイロンメンブレン(Roche, Basel, Switzerland)に 1 晩ブロットした．ブロット後のメンブレンはウェルのあとを鉛筆で印をつけ, 2 \times SSC (0.3M NaCl, 30mM *Tri*-Sodium Citrate)で 2 回すすぎ, 風乾させ, 120℃で 30 分間ベーキングさせた．

フェノール・クロロフォルム処理

液量と等量のフェノール:クロロフォルム(1:1 [v/v])を加え, よく攪拌した．室温, 14,000rpm で 5 分間遠心分離した．中間層の白濁部を吸わないように注意し, 上の水層を回収した．液量と等量のクロロフォルム:イソアミルアルコール(1:1 [v/v])を加え, よく攪拌した．室温, 14,000rpm で 3 分間遠心分離し, 上の水層を回収した．

エタノール沈殿

20mg/ml 濃度のグリコーゲンを 1 μ L 加え, 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを加え, よく攪拌した. 2.5 倍量の 99.5% (v/v) 冷エタノールを加え, 転倒混和し, -80°C で 30 分間もしくは -20°C で一昼夜放置した. 4°C, 14,000rpm で 10 分間遠心分離後, 沈殿を吸わないように上澄み液を取り除いた. 適量の 70% (v/v) エタノールで洗浄した. 4°C, 14,000rpm で 3 分間遠心分離した. 沈殿を吸わないように上澄み液を取り除いた. チューブをパラフィルムで蓋をし, 注射針で穴をあけ, 3 分間真空乾燥した. 適量の TE バッファーまたは滅菌蒸留水に溶解した.

ハイブリダイゼーションと検出

100 μ g *MdPI* cDNA を鋳型に Digoxigenin (DIG) でラベルされた dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Roche), *MdPI* 特異的プライマー (センスプライマー 5'-CTGATGGCCTTAGAGGAAGC-3', アンチセンスプライマー 5'-CACAAACCGAGTTCATGCAC-3'), PCR バッファー (10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 1unit Ampli taq gold Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, USA) を用いて PCR を行った. PCR 反応は 95°C, 10 分間のホットスタート後, 94°C 1 分間, 50°C 1 分間, 72°C 2 分間の 30 サイクルで行った. 作成した PCR-DIG プローブを 5 分間熱湯でボイル後, 氷上保持させ, その PCR-DIG プローブ含む DIG EASY HYB (Roche) を用いて, メンブレンを 40°C で 1 晩ハイブリダイズさせた.

2 \times SSC, 0.1% (w/v) SDS で室温 5 分間 2 回, 0.5 \times SSC, 0.1% (w/v) SDS で 68°C 15 分間 2 回洗浄した. 洗浄 バッファー (0.1M Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.3% (w/v) Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate [Tween-20]) で 5 分間洗浄した. 電子レンジで融解したブロッキングバッファー (0.5% [w/v] blocking reagent [Roche], Maleic Anhydride, 150mM NaCl) で 30 分間浸した. ブロッキングバッファーに 10,000 倍量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体 (Roche) を加え反応させた後, 洗浄 バッファーで 15 分間 2 回洗浄し, バッファー 3 (0.1M Tris-HCl [pH9.5], 100mM

NaCl)で2分間洗浄した後、1/250倍量(v/v)の CDP-star (Roche)を含むバッファ-3と5分間反応させた。検出には LAS-1000 (Fuji Film, Tokyo, Japan)を使用した。

LA-PCR とその増幅産物の制限酵素処理

上記で得られたゲノム DNA を鋳型に *MdPI* 遺伝子を LA-PCR kit (Takara, Tokyo, Japan)によって増幅させた。LA-PCR 反応は 200µg ゲノム DNA, *MdPI* 遺伝子特異的プライマー(センスプライマー 5'-CTGATGGCCTTAGAG GAAGC-3', アンチセンスプライマー 5'-CACAAACCGAGTTCATGCAC-3'), PCR バッファ- (10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 200µM dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1mM MgCl₂, 1unit の LA-taq Polymerase (Takara)を用いて PCR を行った。PCR 反応は 94°C 1 分間のホットスタート後, 98°C 30 秒間, 68°C 15 分間の 40 サイクル行い, 72°C 10 分間行った。

LA-PCR 増幅産物を *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV, *Pst*I, *Sa*II, *Xba*I, *Xho*I, *Spe*I, *Cla*I, *Sac*I および *Sph*I の 12 種類の制限酵素を用いて, 反応条件は *Bam*HI は K バッファ- (20mM Tris-HCl [pH8.5], 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 100mM KCl), *Hind*III, *Spe*I, *Cla*I は M バッファ- (10mM Tris-HCl [pH7.5], 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 50mM NaCl), *Eco*RI, *Eco*RV, *Pst*I, *Sa*II, *Xho*I, *Sph*I は H バッファ-, *Xba*I は M バッファ-と 0.01% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA), *Sac*I は L バッファ- (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol)で 37°C 2 時間切断した。0.8% (w/v)アガロースゲルで電気泳動を行い, EtBr で染色後, 制限酵素の切断パターンをゲルプリンター GP-2000i (Taitec, Nagoya, Japan)で写真を撮影した。

3. 結 果

‘紅玉’, ‘Spencer Seedless’, ‘Wellington Bloomless’, ‘Noblow’ および ‘Wickson’ のゲノム DNA を鋳型に, Fig. 2.1 に示したプライマーを用いて *MdPI* 遺伝子を LA-PCR により増幅した. ‘紅玉’ で増幅された 1.7kb のバンドと比較して, リンゴのクラス B 遺伝子変異 4 品種はともに 10kb 以上のバンドの増幅が見られた (Fig. 2.2).

MdPI 遺伝子の cDNA を Fig. 2.1 に示したプライマーを用いて作成した PCR-DIG ラベルプローブによる DNA ブロット解析では, ‘紅玉’ 以外のクラス B 遺伝子変異 4 品種で同様なパターンを示した. ゲノム DNA を *SphI* 処理した場合, ‘紅玉’ のバンドは 1.7kb で, Fig. 2.1 で示したゲノムの制限酵素の位置と一致していたが, クラス B 遺伝子変異品種はそれとは異なり, 約 660bp バンドが確認された (Fig. 2.3A). また, 範囲を限定するため *EcoRI* 処理も行った. ‘紅玉’ のバンドは約 600bp で, Fig. 2.1 で示したゲノムの制限酵素の位置と一致していたが, クラス B 遺伝子変異品種はそれとは異なりおよそ 1.9kb のバンドが確認された (Fig. 2.3B). リンゴのクラス B 遺伝子変異 4 品種の *MdPI* 遺伝子を LA-PCR 増幅産物を 12 種類の制限酵素で処理した場合, クラス B 遺伝子変異品種すべてで同様な切断パターンを示した (Fig. 2.4).

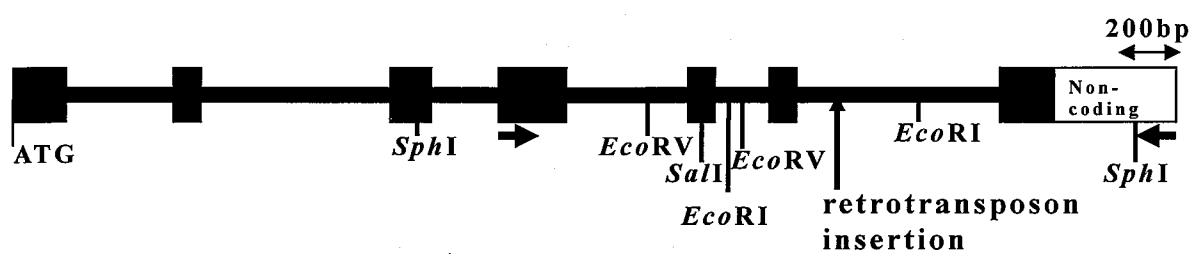


Fig. 2.1 *MdPI* genome model and restriction site
→ and ←; PCR primers

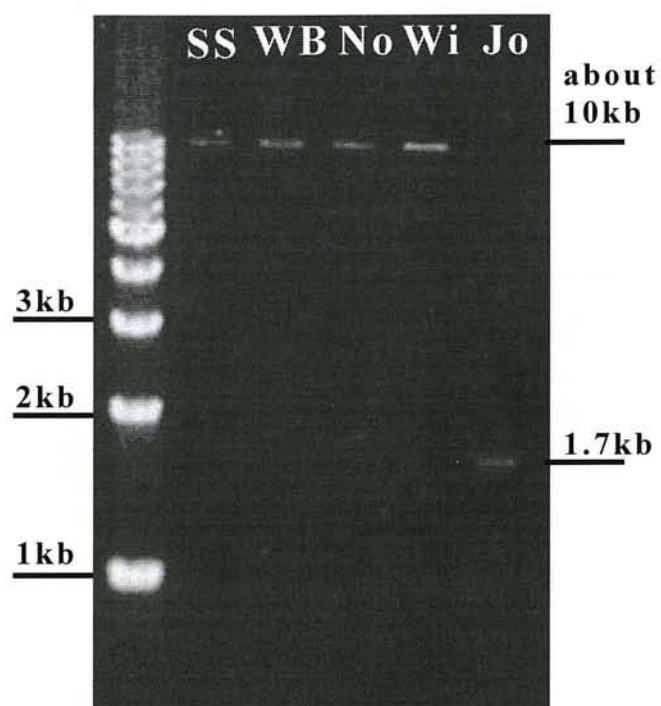


Fig. 2.2 LA-PCR of apple genomic DNA
by using *MdPI* specific primers

The class B gene mutation cultivars were amplified fragment of 10kb length in comparison with normal cultivar 'Jonathan'. SS; 'Spencer Seedless', WB; 'Wellington Bloomless', No; 'Noblow', Wi; 'Wickson', Jo; 'Jonathan'.

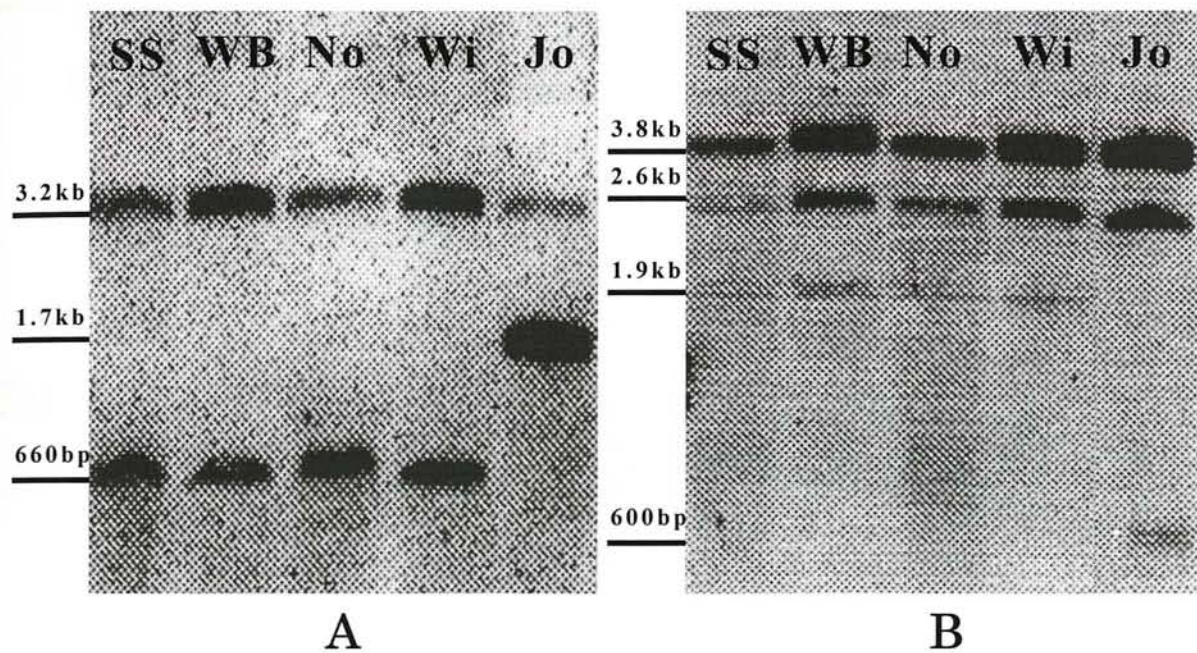


Fig. 2.3 DNA blot analysis of apple genomic DNA
using *MdPI* cDNA as a probe

A, *SphI* treatment, the band pattern of class B gene mutation cultivars differed from usual cultivar 'Jonathan'. B, *EcoRI* treatment, The band pattern of class B mutation cultivars differed from usual cultivar 'Jonathan'. SS; 'Spencer Seedless', WB; 'Wellington Bloomless', No; 'Noblow', Wi; 'Wickson', Jo; 'Jonathan'.

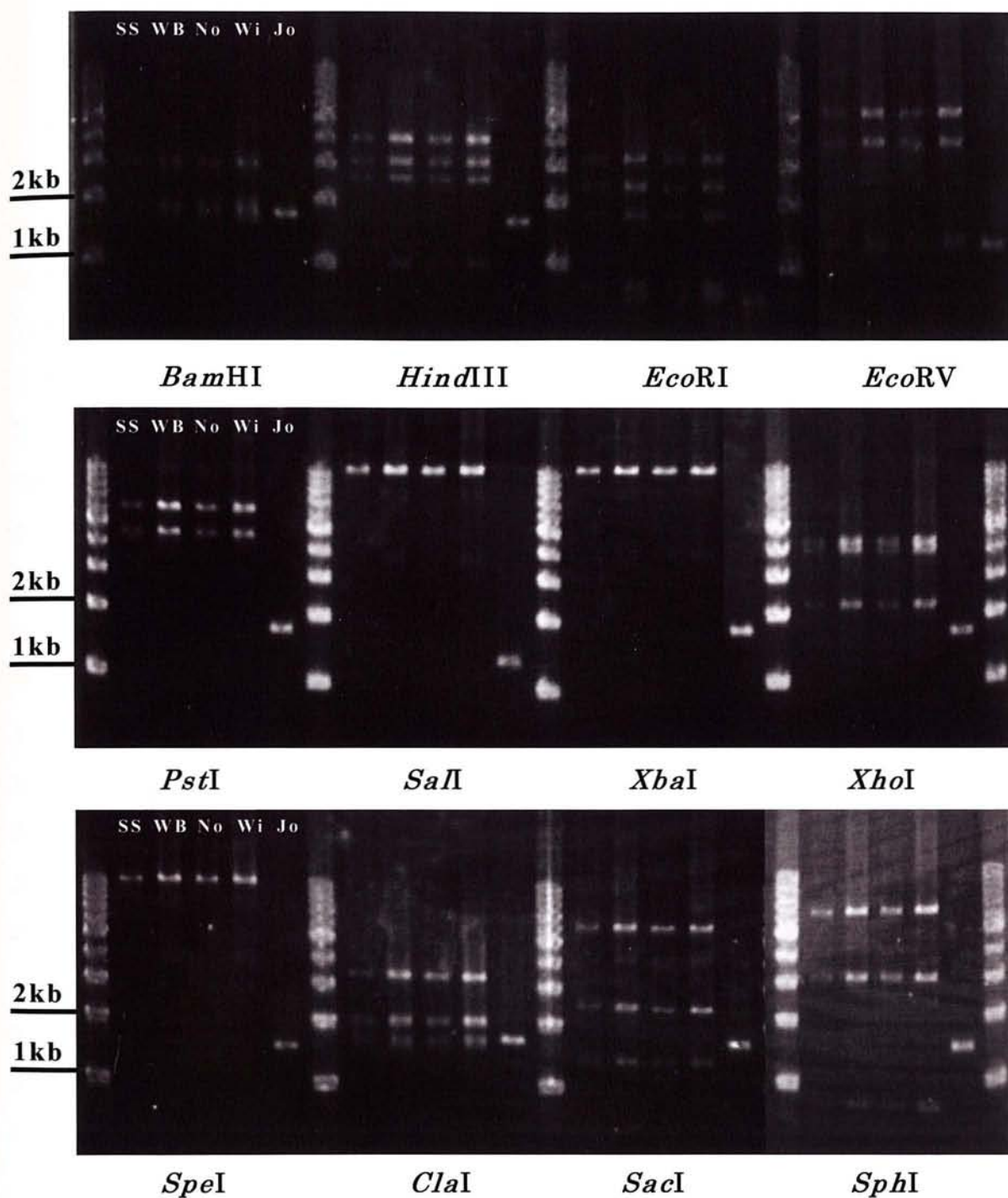


Fig. 2.4 Restriction enzyme treatment of
LA-PCR products from Fig. 2.2

The band pattern of four cultivars was the same in all restriction enzymes. SS; 'Spencer Seedless', WB; 'Wellington Bloomless', No; 'Noblow', Wi; 'Wickson', Jo; 'Jonathan'.

4. 考 察

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種ゲノムの LA-PCR により 4 品種すべてで 10kb 以上のバンドの増幅が確認できたことから、*MdPI* 遺伝子中にレトロトランスポソンの挿入が認められた。この結果から、これらの品種ではすべてレトロトランスポソンの挿入により *MdPI* 遺伝子の発現が抑制されていることが示唆された。

SphI を用いて切断した場合の DNA ブロット解析では、通常品種の‘紅玉’とクラス B 遺伝子変異品種ではバンドの大きさに違いが見られたことから、*SphI* サイト間にレトロトランスポソンの挿入があると推察された。しかし、この時点ではレトロトランスポソンの挿入が‘Rae Ime’のイントロン 4 もしくは‘Spencer Seedless’や‘Wellington Bloomless’のイントロン 6 どちらかの確認はできない。そこで、イントロン 6 にレトロトランスポソンの挿入があるかどうか、*EcoRI* を用いて切断した DNA ブロット解析を行ったところ、‘紅玉’とクラス B 遺伝子変異品種ではバンドの大きさに違いが見られた。このことから、リンゴのクラス B 遺伝子変異 4 品種は *EcoRI* サイトの間にレトロトランスポソンの挿入があると推察された。これらの結果により、クラス B 遺伝子変異 4 品種は同一部位のイントロン 6 にレトロトランスポソンが挿入されていることが判明した。

Fig. 2.1 の LA-PCR 産物の制限酵素処理では、使用した 12 種類でクラス B 遺伝子変異品種の電気泳動パターンがすべて一致していた。この結果も、クラス B 遺伝子変異品種がすべて同一のレトロトランスポソンの挿入により *MdPI* 遺伝子の発現が抑制されていることを示唆していた。

クラス B 遺伝子変異品種すべてで同一の部位に同じレトロトランスポソンが挿入されていることが推定されることから、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は同起源であることが示唆された。本来であれば、挿入されているレトロトランスポソン部位をクローニングし、シーケンスを行うことで挿入部位とレトロトランスポソンの配列を確認する必要があるが、LA-PCR による増幅産物をクローニングできなかったため、配列の確認まで行うことができず、同一のレトロトランスポソンかどうか判別できなかった。しかし、本

章で述べたように DNA ブロット解析や, LA-PCR 産物の 12 種類の制限酵素処理ですべて同一のパターンを示したことから, 調査に使用したリンゴのクラス B 遺伝子変異品種は 'Spencer Seedless' と発現抑制機構が同じであると判断した. なお, リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の親品種は不明であり, どのような経路で出現してきたのかは明らかでない. また, *MdPI* 遺伝子が単一の遺伝子で, 他に代替することができる遺伝子がないために, レトロトランスポゾンの挿入により発現が抑制されていると推察された. この *MdPI* 変異は劣性ホモにならないと出現しないことも報告されている (Tobutt, 1994). したがって, *MdPI* 遺伝子のアレルにレトロトランスポゾンの挿入がある品種を特定することができれば, リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の起源と来歴が明らかになると考えられた.

5. 摘 要

'Rae Ime' を除くクラス B 遺伝子変異 4 品種のレトロトランスポゾン挿入部位を調査し, これらの品種の *MdPI* 遺伝子抑制機構の解明を行った. DNA ブロット解析によりクラス B 遺伝子変異品種すべてで同一の部位にレトロトランスポゾンが挿入されていると推定できた. また, *MdPI* ゲノムの LA-PCR 産物の制限酵素処理を行い, すべて同じバンドパターンを示したことから同じレトロトランスポゾンが挿入されていることが推察された. これらの結果から, *MdPI* 遺伝子が単一の遺伝子で, 他に代替することができる遺伝子がないために, レトロトランスポゾンの挿入がある *MdPI* 遺伝子をホモに持つことで *MdPI* 遺伝子が発現抑制されていると推察された. 制限酵素処理パターンが同一なこれらクラス B 遺伝子変異 4 品種は同じ祖先から発生したことが示唆された.

第 3 章 *MdPI* 遺伝子によるシロイヌナズナの相補実験

1. 緒 言

リンゴの属するバラ科の果実は、その形態の豊富さでいくつかの種類に分類されるが、基本的には 5 枚のがくと花弁があり、がくの基部は筒状でしっかりした花床筒を作る。多数の雄ずいと花弁は花床筒の上部に付着する。雌ずいの数や形態は多様で雌ずいと花床筒の位置や合着の関係も様々に変化している。

リンゴやナシ等の仁果類の子房は、しっかりと花床筒にくるまれている子房下位花である。一方、シロイヌナズナの花は 4 枚のがくと 4 枚の花弁、6 本の雄ずいと 2 つの心皮からなる 1 本の雌ずいから構成されていて、子房上位花である。

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種群は、花弁と雄ずいが、がくと雌ずいに入れ替わる花器官のホメオティック変異を示し、通常の花と形態が異なっている。これはシロイヌナズナやキンギョソウで説明される ABC モデルのクラス B 遺伝子である *PI* 遺伝子と *AP3* 遺伝子のうち *PI* 遺伝子に相当する *MdPI* 遺伝子の発現が、レトロトランスポゾンの挿入により抑えられているために生じる形態異常と推定されている (Yao *et al.*, 2001)。また、シロイヌナズナには *PI* 遺伝子が点突然変異を起している変異体 *pi-1*, *pi-2* および *pi-3* が存在し、その形態は花弁と雄ずいが無く、二重に形成されたがくと 1 本の太い雌ずいからなる (Goto and Meyerowitz, 1996)。このシロイヌナズナ変異体は、*pi* が劣性ホモの遺伝子型の場合に表現型として現れるが、遺伝子型がヘテロの場合の表現型は野生型と変わらない。シロイヌナズナにおける *PI* 遺伝子の変異体は、それぞれ表現型は同じだが、塩基の変異部位が異なっている。

MdPI 遺伝子の発現確認、もしくは機能欠失・機能獲得実験を行うためには、リンゴにおける形質転換が必要となるが、形質転換体の獲得が困難なことで、また、形質転換体を得られても開花までの期間が長いために遺伝子の機能解析には長期間を要する。そこで、一世代にかかる期間が短く、形質転換

が容易なシロイヌナズナを用いて形質転換実験を行うことにした.

本章では, シロイヌナズナの野生型における表現型の変化を調査することを目的に CaMV35S プロモーターと融合させた *MdPI* 遺伝子を形質転換した. また, *PI* 変異体である *pi-1* において表現型回復させることを目的に, *MdPI* 遺伝子導入個体(T_0)と *pi-1* を交配させ, その F_1 世代をさらに自殖させた F_2 個体について表現型を調査し, *pi-1* バックグラウンドで *MdPI* 遺伝子導入によって表現型が回復したのか遺伝子型を調査した. さらに, F_2 個体の表現型回復個体について走査型電子顕微鏡を用いて詳細な観察を行った.

第 1 節 シロイヌナズナの形質転換

1. 材料および方法

形質転換ベクターの作成

*MdPI*cDNA の挿入されたクローニングベクターおよそ 1 μ g 相当を *Eco*RI と *Xho*I の制限酵素, H バッファーを用いて 37°C, 1 時間切断し, フェノール・クロロフォルム処理後, エタノール沈殿を行い, DNA Blunting kit (Takara, Tokyo, Japan)を用いて 65°C で 30 分間反応させ末端平滑化処理を行った. アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) 用ベクター pSMAK 251 (Kotoda *et al.*, 2002) を *Sma*I, T バッファー (33mM Tris-HCl [pH7.9], 10mM MgCl₂, 0.5mM Dithiothreitol, 66mM KCl), BSA と共に 30°C, 1 晩切断し, フェノール・クロロフォルム処理, エタノール沈殿を行った後, アルカリフォスファターゼ (CIAP) (Takara)を用いて 50°C で 30 分間反応させ脱リン酸化処理を行った. フェノール・クロロフォルム処理後, エタノール沈殿を行った. 処理後の *MdPI*cDNA コーディングとアグロバクテリウム用ベクターは DNA Ligation kit ver.2.1 (Takara)を用いて 16°C, 1 晩反応させ, センス方向に *MdPI*cDNA コーディングをアグロバクテリウム用ベクターに挿入した (Fig. 3.1). 得られたベクターは Freezing 法によりアグロバクテリウム GV3101 に導入した (Holster *et al.*, 1979; Koncz and Schell, 1986; Zahm *et al.*, 1984).

シロイヌナズナの播種

4°C で保存してある種子 (*Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype) を 95% (v/v) エタノールに 1 分間浸漬し, 2.625% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム, 0.05% (w/v) Tween-20 を含む溶液に 5 分間浸漬した後, 滅菌水で 3 回洗浄した. クリーンベンチ内で種子を 0.1% (w/v) アガロース液と懸濁し, 1,000 μ L ピペットチップの先端でホルモンフリーの 1/2 Murashige・Skoog (MS) + 0.8% (w/v) Agar 培地に置床し, 18 時間日長条件で, 10 日間グロースチャンバー内で培養した. その後, パーライトとバーミキュライトを 1:1 に混合したポ

ットに 1,000 倍希釈のハイポネックス液を十分に吸水させ、成葉が 3~5 枚に生長したシロイヌナズナを移植し、18 時間日長条件で栽培した。

シロイヌナズナの形質転換

シロイヌナズナの形質転換は Floral dip 法(Clough *et al.*,1998)により行った。アグロバクテリウムの培養は 25mg/mL カナマイシンを添加した LB 培地(10g/L NaCl, 10g/L bactotryptone, 5g/L yeast extract)で、28℃、1 晩行った。増殖後、5000rpm で 10 分間、室温で遠心分離し、上清を除いた後、Inoculation Medium (5% [w/v] sucrose, 0.05% [v/v] Silwet L-77)に懸濁した。懸濁液の O.D.₆₀₀ は最終的に 0.8 となるように調製した。ポットへ移植後、活着し、つぼみをつけ始めたシロイヌナズナの花序を、アグロバクテリウムの懸濁液に 3-5 秒間浸漬処理した。乾燥防止のためにプラスチックコップをかぶせて、24 時間弱光条件下においた後、プラスチックコップをはずし、通常と同様に栽培した。得られた種子(約 200 粒)をシリカゲル入りのデシケーターで 1 週間乾燥後、4℃で保存した。種子は上述の滅菌処理を行った後、1/2 MS, 50mg/L カナマイシン(Km), 50mg/L クラフォラン(Cla)の培地に置床し、形質転換体を選抜した。

pi 変異体の表現型回復実験

シロイヌナズナの野生種には Columbia だけでなく、Landsberg *erecta* (Ler)等のいくつかの ecotype がある。Ler には *PI* 遺伝子が点突然変異を起こしている *PI* 遺伝子変異体があり、この変異体は花卉と雄ずいが形成されないため自殖が不可能で、Floral dip 法により種子が得られない。そこで、上記で得られた Columbia(*PI/PI*バックグラウンド)の *MdPI* 遺伝子形質転換体 T₀ の 1 個体の花粉を Ler 由来の *PI* 遺伝子変異体(*pi-1 pi/pi*バックグラウンド)に交配し、得られた種子(F₁ *PI/pi*バックグラウンド)を 1/2 MS+Km+Cla 培地で選抜、生育し、種子(F₂ *PI/PI*、*PI/pi*、*pi/pi* バックグラウンド)を得た。得られた F₂ 種子を 1/2 MS+Km+Cla 培地で選抜し、生育させた後表現型を観察した。表現型回復のための形質転換体作出までの流れは Fig. 3.2 に示した。シロイヌナズナの栽培は上記と同様の方法で行った。

2. 結 果

MdPI 遺伝子の機能解析を行うため、*MdPI* cDNA から形質転換用ベクターの作成を行った。発現ベクターにはすべての部位で発現させる CaMV35S プロモーターの下流に *MdPI* 遺伝子をセンス方向に融合させた (Fig. 3.1). *MdPI* 遺伝子発現ベクターはシロイヌナズナの形質転換に用いるアグロバクテリウム GV3101 株に導入した。

シロイヌナズナ (Columbia) に 35S::*MdPI* を導入し、その種子を獲得した。得られた種子をカナマイシンを含む培地上で選抜したところ、16 個体 (T₀) が生存した。その形態を観察した結果、16 個体すべてでがくの周囲が花弁様に白く変化していた (Fig. 3.3C)。なお、他の花器官には変化は見られなかった。

次に、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* において、*MdPI* 遺伝子の導入を目的に 35S::*MdPI* 導入した T₀ 個体のうち 1 個体の花粉を使用し *pi-1* と交配を行った。得られた種子 (F₁) は 1/2 MS + Km + Cla 培地で選抜を行い、生育した個体を自殖させ、F₂ 種子を得た。得られた F₂ 種子は 1/2 MS + Km + Cla 培地で選抜を行い、生育した個体について表現型の観察を行った。F₂ 個体のいくつかは花弁が正常の野生型同様 4 枚に回復していた (Fig. 3.3D and 3.3E)。また、がくの周囲は T₀ 個体と同様に花弁様に白く変化していて、雄ずいは葯ではなく雌ずい様の器官を有しているものが 6 本形成されていた (Fig. 3.3D and 3.3E red arrows)。さらに、雌ずい様の雄ずいにならないものは花糸状のものが形成されていた。雌ずい様の雄ずいの側面には胚珠状の球体も形成されていた (Fig. 3.3E blue arrow)。

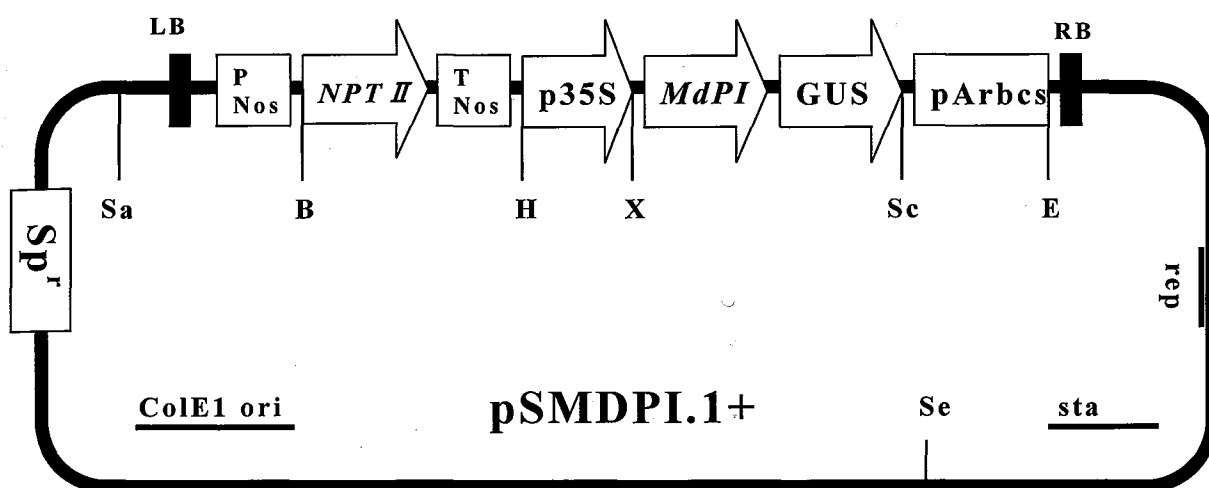


Fig. 3.1 Construct of the vector pSMDPI.1+
for the *MdPI* introduction

PNos, Nos promoter; *NPTII*, neophosphotransferase; TNos, Nos terminator; p35S, CaMV 35S promoter; *MdPI*, sense *MdPI* gene; GUS, *uidA* gene (β -glucuronidase); pArbcs, 3' region of rubisco small subunit; LB, left border; RB, right border; SP^r, streptomycin resistance gene; Sa, *Sa*II; B, *Bam*HI; H, *Hind*III; X, *Xba*I; Sc, *Sac*I; E, *Eco*RI; Se, *Spe*I; sta, region involved in plasmid stability; rep, essential region for plasmid maintenance

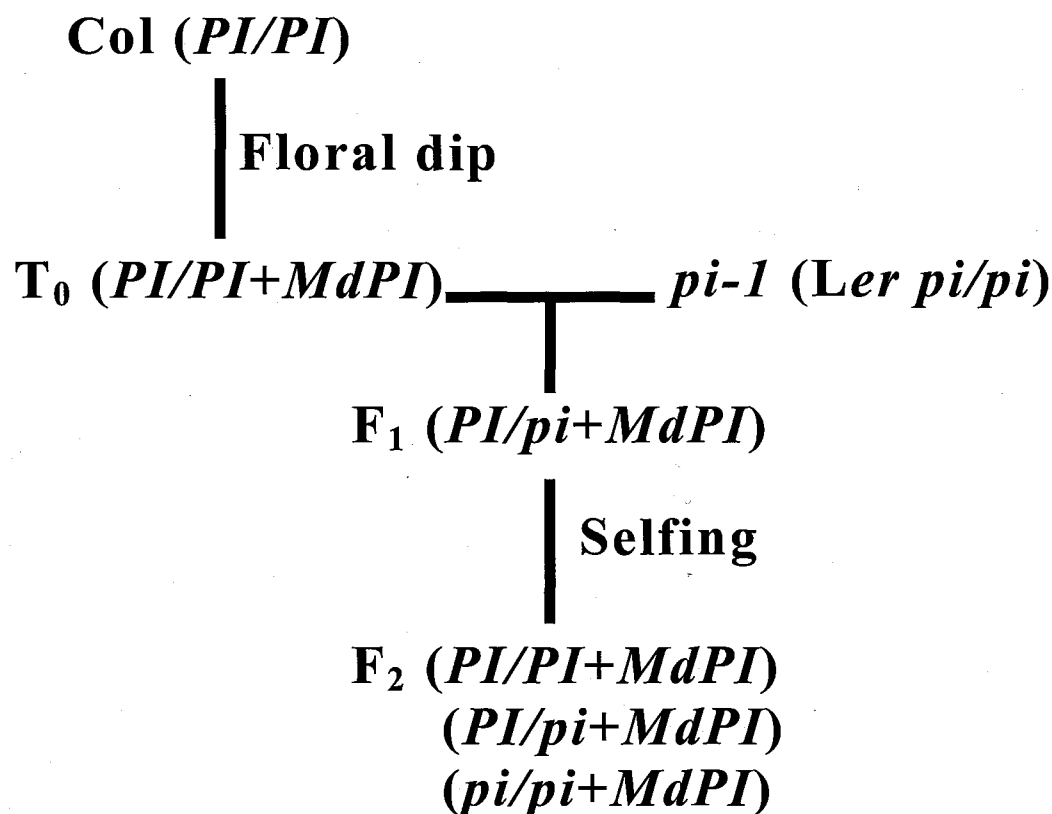


Fig. 3.2 Introduction method of *MdPI* gene to *Arabidopsis*.

The *MdPI* gene was introduced in *Arabidopsis* Col (genotype *PI/PI*) by the Floral dip method, and the T₀ (genotype *PI/PI+MdPI*) was obtained. This T₀ (genotype *PI/PI+MdPI*) was crossed with the *pi-1* mutant (*Ler* genotype *pi/pi*), and the F₁ plants (genotype *PI/pi+MdPI*) were obtained. The F₁ plants (genotype *PI/pi+MdPI*) were selfed, and the F₂ plants (genotypes *PI/PI+MdPI*, *PI/pi+MdPI*, *pi/pi+MdPI*) were obtained.

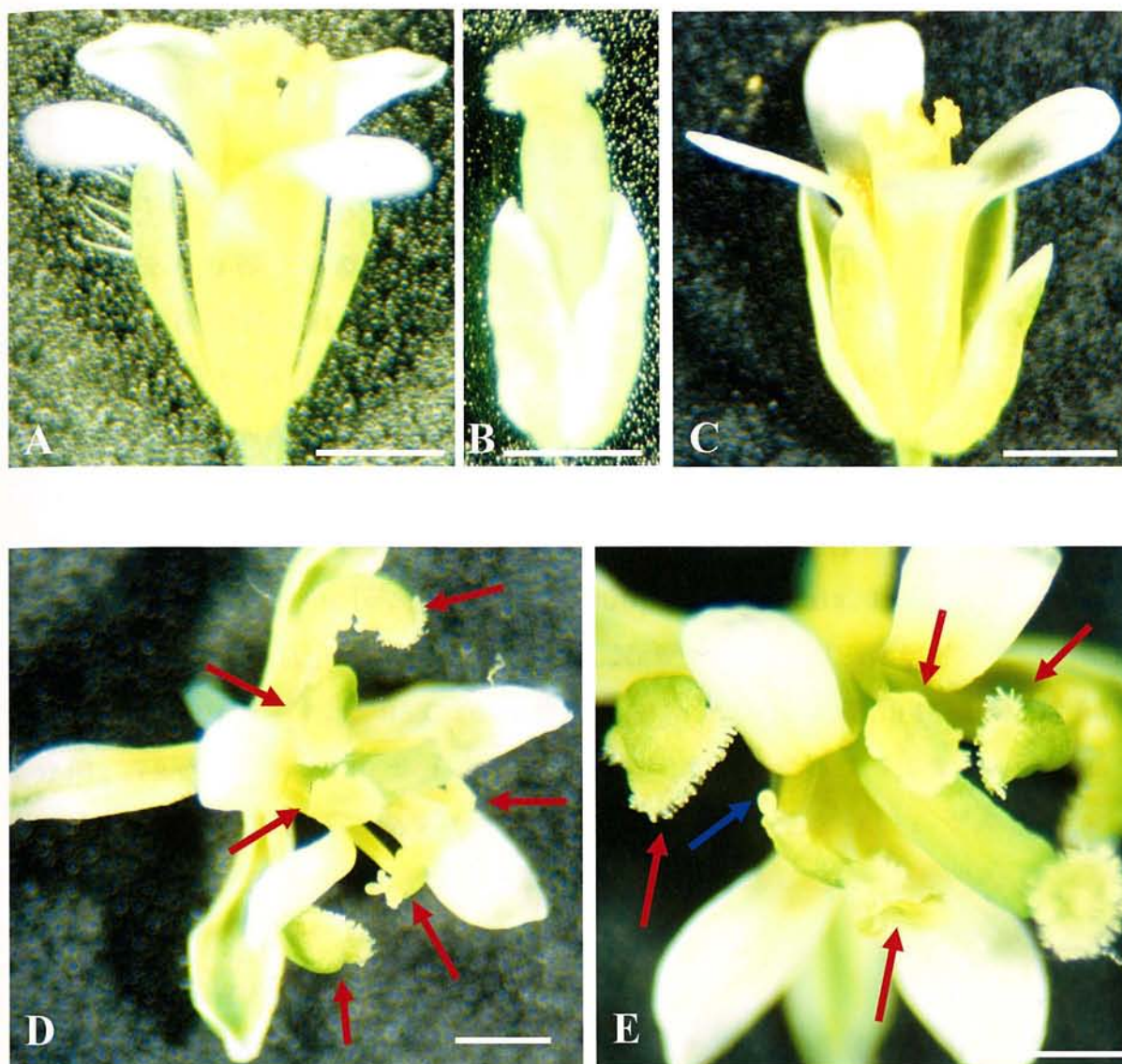


Fig. 3.3 Effect of 35S::*MdPI* introduction in *Arabidopsis*

A, Normal flower (Columbia); B, *pi-1* mutant flower : has a single big carpel and double sepals (Landsberg *erecta*); C, 35S::*MdPI* transformed Columbia flower (T_0), the margin of sepals showed white like petals; D, F_2 plants (*pi/pi+MdPI*) recovered normal four petals completely, but had carpel-like stamens (red arrows). The sepals also showed white margin same as petals of C. The carpel appeared no effects; E, Magnifying of D. Some carpeloid stamens showed unclosed and an ovule like sphere at the base of the carpeloid stamens. (blue arrow). Bars = 500 μm .

第 2 節 形質転換体の遺伝子型確認

1. 材料および方法

MdPI 遺伝子の導入確認

前節の実験で得られたいくつかの F_2 個体のロゼット葉からゲノム DNA を改変 2×CTAB 法 (Kotoda *et al.*, 2000) により単離した. *MdPI* 遺伝子の導入確認はゲノム DNA を *MdPI* 遺伝子特異的プライマー (センスプライマー 5'-CAGCCAAATCTCCAGGAGAG-3', アンチセンスプライマー 5'-CACAAACCGAGTTCATGCAC-3'), PCR バッファー (10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 200μM dNTP mix, 1unit の Ampli-taq gold Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, USA) を用いた PCR により行った. PCR 反応は 95°C 10 分間のホットスタート後, 94°C 1 分間, 50°C 1 分間, 72°C 2 分間の 30 サイクルで行った. PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後, EtBr で染色を行い, ゲルプリンター GP-2000i (Taitec, Nagoya, Japan) で写真を撮影した.

F_2 世代の遺伝子型確認

Col の遺伝子型を *PI/PI*, *Ler* 由来の *pi-1* の遺伝子型を *pi/pi* とする. この *PI* と *pi* にはイントロンに数塩基の違いが見られる. 両方に共通なプライマー (センスプライマー 5'-GTTATCTGGCAAGAACTATGGG-3', アンチセンスプライマー 5'-AGAATAATGACCTGAGCTCC-3') をデザインし, PCR バッファー (10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 200μM dNTP mix, 1mM MgSO₄, KOD-plus Polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いて PCR で増幅した. PCR 反応は 95°C 3 分間のホットスタート後, 94°C 30 秒間, 50°C 30 秒間, 72°C 90 秒間の 30 サイクルで行った. PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後, EtBr で染色を行い, ゲルプリンター GP-2000i (Taitec) で写真を撮影した. 次に, この増幅されたバンド (約 1.1kb) を *Bsr*I (NEW ENGLAND Bio Labs, UK) の制限酵素を用いて, 65°C で反応させ, *pi-1* 由来の *pi* の増幅バンドの

み切断した．切断されたバンドはそれぞれ 570bp と 530bp に分離する．Col の *PI* では切断されない．このことを利用し，F₂ の遺伝子型の分離(*PI/PI*，*PI/pi* および *pi/pi* の 3 通り)を区別した．

2. 結 果

MdPI 遺伝子の発現を確認するため，Col，*pi-1*，‘紅玉’ および F₂ 個体 1～6 についてゲノム DNA を用いて PCR を行った．F₂ 個体 1～6 の表現型は個体 1，3 および 5 で花卉が回復し，雌ずい様の雄ずいを有していた個体，個体 2，4 および 6 は通常の表現型を有していた個体である．シロイヌナズナの野生型 Col と *pi-1* では *MdPI* 遺伝子の増幅は確認されなかったが，‘紅玉’ と F₂ 個体 1～6 で *MdPI* 遺伝子の増幅が確認された(Fig. 3.4)．

また，同様に Col，*pi-1*，‘紅玉’ および F₂ 個体 1～6 について *PI* 遺伝子についてゲノム DNA を用いて PCR を行った．‘紅玉’ 以外のすべての個体で *PI* 遺伝子の増幅が確認された(Fig. 3.5A)．

上記で増幅された PCR 産物の *BsrI* 処理によりそれぞれの遺伝子型の確認を行った．Col は *PI/PI* のバックグラウンドを有しているため，切断されず，*pi-1* は *pi/pi* のバックグラウンドを有しているため，完全に切断されることになる．そこで F₂ 個体の *BsrI* での切断パターンを調べることで遺伝子型の判別を行った．個体 1～6 について調査した結果，個体 1，3 および 5 では *BsrI* 処理ですべて切断されたため，これらは *pi/pi* バックグラウンドで表現型が一部回復したことが判明した(Fig. 3.5B)．また，個体 2，4 では *BsrI* で切断されなかったため，*PI/PI* の遺伝子型を有していることが判明した．さらに，個体 6 では *BsrI* 処理により切断されたバンドと切断されなかったバンドの両方を有していたため，*PI/pi* の遺伝子型を有していることが判明した．

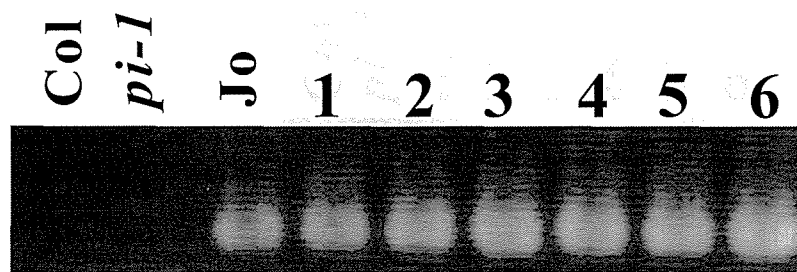


Fig. 3.4 Confirmation of *MdPI* gene

MdPI was amplified F₂ transgenic lines (lines 1 to 6) and 'Jonathan' (Jo) by PCR using the genomic DNA. The amplification of bands was confirmed in all investigated individuals with *MdPI*. Col; Columbia, *pi-1*; *Ler*.

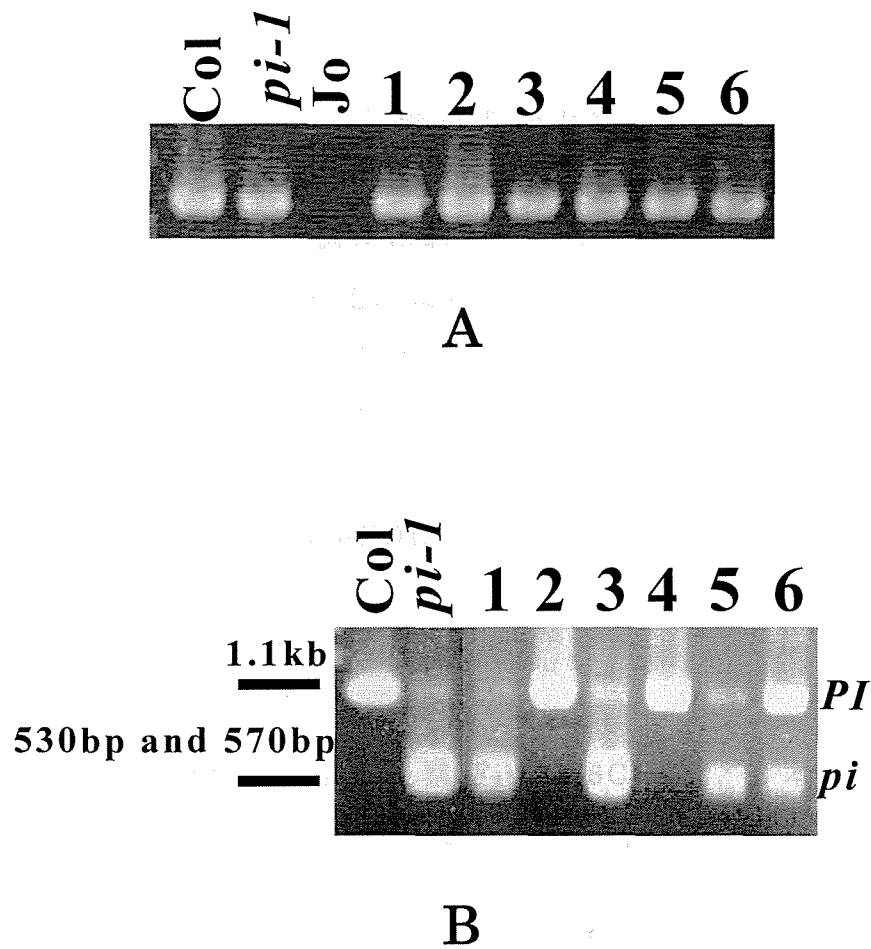


Fig. 3.5 Confirmation of the genotype

A, The F₂ transgenic lines (lines 1 to 6) and controls were amplified partially to both *PI* and *pi* genomic DNA. The band was amplified in all individuals except for 'Jonathan'; B, Investigation of the genotype of 35S::*MdPI*-transformed F₂ transgenic lines. The genomic PCR product of the Col (*PI/PI* background) was not digested by *Bsr*I, but *pi-1* (*Ler*) (*pi/pi* background) was digested. From the left, Columbia, *pi-1*, F₂ transgenic lines 1 to 6. Lines 1, 3, and 5 (*pi/pi* background) were digested by *Bsr*I. Lines 2 and 4 (*PI/PI* background) were not digested by *Bsr*I. Line 6 had the hetero genotype (*PI/pi* background). Col: Columbia; Jo: 'Jonathan'.

第 3 節 形質転換体の走査型電子顕微鏡における詳細観察

1. 材料および方法

前節の実験で得られた F₂ 個体において、花卉が正常に回復し、正常な雄ずいを有していない F₂ 個体の花および対照として *pi-1* と Col の花を採取し、5% (w/v) Glutaraldehyde で 4℃, 24 時間以上浸漬処理し固定した。その後、Kubono and Ito (2002) の方法に従い、試料を 0.1% (w/v) Osmium で 4℃, 90 分間処理し、アルコールシリーズで段階的に脱水した。臨界点乾燥後、金蒸着し、走査型電子顕微鏡 (JEOL) を用いて 5kV で観察した。

2. 結 果

走査型電子顕微鏡 50 倍による観察 (Fig. 3.6C) では、6 本に分離した雄ずいの数本は花糸と同様な形状を示したが、その他の雄ずいは雌ずい様に変化していることが確認された。雌ずい様に変化した雄ずいは、下部が花糸に、上部が心皮状に変化していた。500 倍での観察 (Fig. 3.7) により花糸と同様の形状を回復した雄ずいおよび雌ずい様雄ずいの最下部の花糸に相当する部位の細胞は、縦長な細胞が規則的に分布し、野生型の花糸の細胞と同じ形状であることが判明した。しかし、花糸と同様の形状を回復した雄ずいの先端部には気孔を有する雌ずいの細胞が形成されていた (Fig. 3.8)。

一方、雌ずい様雄ずいの葯に相当する部位の細胞も気孔を有しており、その最上部には柱頭の乳状突起が形成されていた。また、雌ずい様雄ずいの心皮状に肥大した葯の基部に相当する部位には、胚珠状の球体が形成されていた。この胚珠状の球体は胚柄を有し、珠孔が確認できた (Fig. 3.9B)。



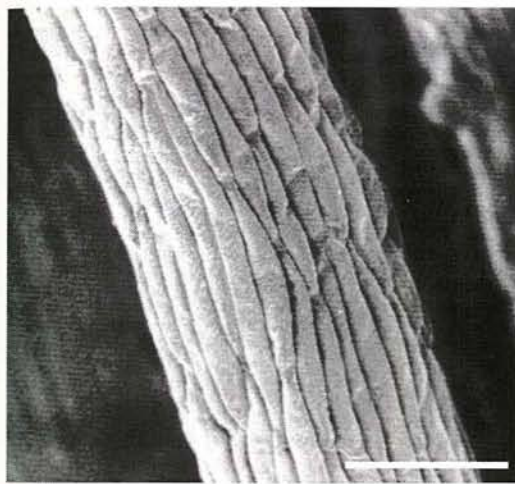
A

B

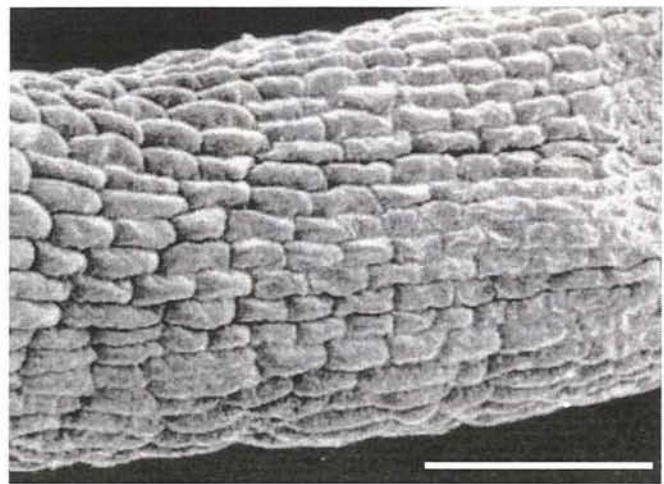
C

Fig. 3.6 Observations of floral surface
by scanning electron microscope (SEM)

A, Normal flower *Arabidopsis thaliana* (Columbia);
B, *pi-1* (Ler) flower; C, The flower of the F₂ plants (*pi/pi+MdPI*)
The tops of the recovered stamens showed carpeloid. The arrow is ovule.
A, B, C, bar = 500 μ m.



A



B

Fig. 3.7 Observations of filament in wild type and
(filament) in recovered stamen by SEM

A, Filament cells of wild type (Col);

B, Filament cells of the F₂ plants (*pi/pi+MdPI*) in recovered stamens

The filaments had normal cells same as wild type. A, B, bar = 50μm

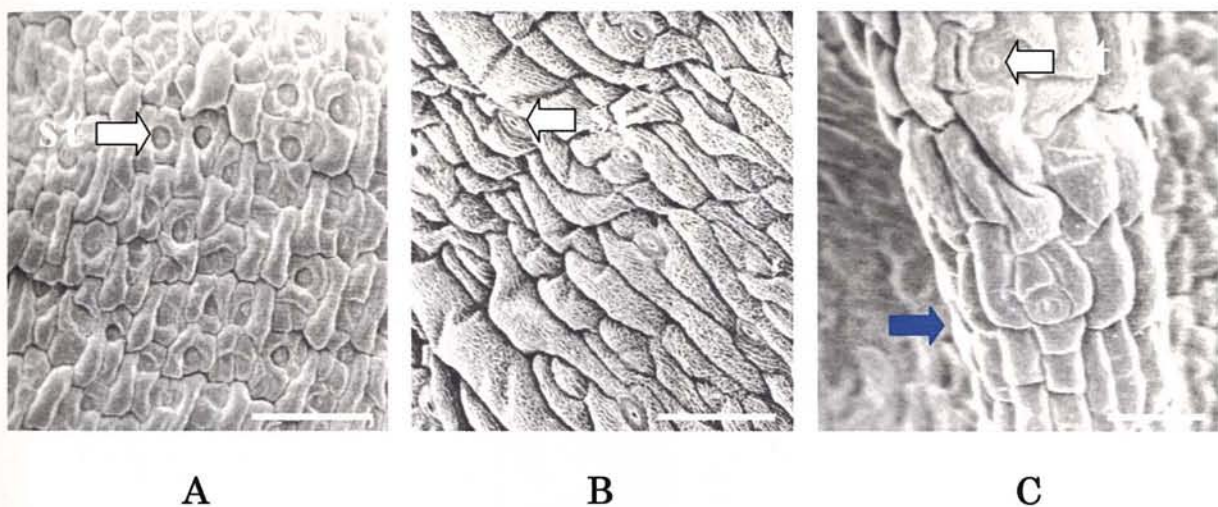


Fig. 3.8 Observations of cells in carpel, cells in carpeloid stamen and cells in filamentous stamen by SEM

A, Carpel cells of wild type; B, Cells of the F₂ plants (*pi/pi+MdPI*) carpeloid stamen; C, Boundary of filament and carpeloid tissues in filamentous stamen (Blue arrow)

st:stomata; A, B, bar = 50µm; C, bar = 20 µm.

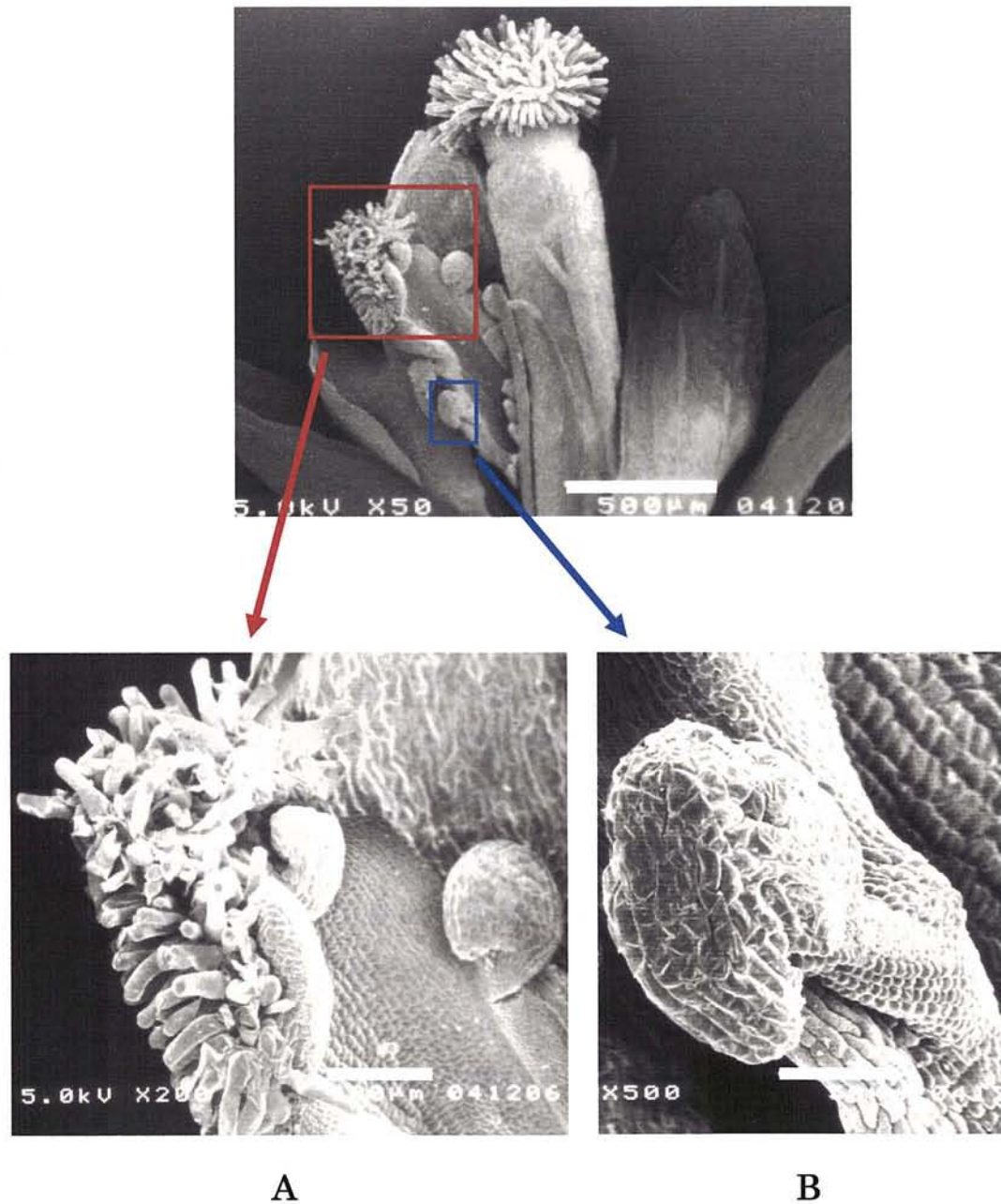


Fig. 3.9 Observations of ovule exposed outside by SEM

Top, The flower of the F₂ plants (*pi/pi+MdPI*). The tops of the recovered stamens showed carpeloid.; A, Carpeloid stamen of the F₂ plants (*pi/pi+MdPI*). Their tips had normal carpel cells. The ovule exposed outside and was formed on the carpeloid stamens.; B, The ovule had a micropyle and suspensor. Top, bar = 500 μm; A, bar = 100 μm; J, bar = 50 μm.

考 察

シロイヌナズナ Col に 35S::*MdPI*を導入したところ、その T₀ 個体のすべての個体でがくが花弁様に白く変化した、他の花器官に変化は見られなかった (Fig.3.3C)。また、シロイヌナズナに 35S::*PI*を導入すると、がくが花弁様に変化することが確認されている (Lamb and Irish, 2003)。この結果は、*MdPI* 遺伝子が *PI* 遺伝子と同様にクラス B 遺伝子としての機能を有していることを示した。がくの周囲が白く花弁様に変化したことは、*AP3* 遺伝子がわずかにがくで発現するため (Krizek and Meyerowitz, 1996)、*AP3* 遺伝子と *MdPI* 遺伝子との相互作用によりがくの周囲が花弁化したと推察された。また、雄ずいと雌ずいには全く変化が見られなかったことから、*MdPI* 遺伝子が *AP3* 遺伝子、*AG* 遺伝子、*SEP* 遺伝子との相互作用 (Ditta *et al.*, 2004; Theissen, 2001; Theissen and Saedler, 2001) が弱いために表現型に変化が現れなかったと推察された。この形質転換体について、DNA プロット解析による *MdPI* 遺伝子の導入確認は行ってはいないが、カナマイシンの培地上で生育できる個体であることと、F₂ 個体に *MdPI* 遺伝子の導入が認められたことから、T₀ 個体に *MdPI* 遺伝子が導入されたと推察された。また、T₀ 個体は全個体とも同じ形態であったことから、コピー数の差は事実上影響しないと考えられた。

シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体 (*pi-1*) については、形質転換方法として Floral dip 法を用いることができない。それは *pi-1* には花弁と雄ずいがないために、自家受粉させることができないためである。本実験では、仮に表現型が回復したとしても、遺伝子型がヘテロで野生型の表現型を示しているのか、劣性ホモにもかかわらず *MdPI* 遺伝子の作用で、野生型と同じ表現型になっているのか判別できない。そこで、*MdPI* 遺伝子形質転換 Col と *pi-1* との交雑に由来する F₂ 分離世代での *MdPI* 遺伝子の表現型回復への関与を確認する方法を考案した。Col 由来の *PI/PI* バックグラウンドと *Ler* 由来点突然変異体 *pi-1* の *pi/pi* バックグラウンドの識別方法を確立する必要がある。まず、*pi-1* は *PI* 遺伝子が 1 塩基の置換により、*PI* 遺伝子が機能しなくなっている突然変異であることを利用して、1 塩基の違いを識別できる *pi-1*

のみで増幅可能なプライマーと、野生型のみで増幅可能なプライマーをデザインした。ところが、1塩基の違いではPCRによる増幅に差は見られなかった(データなし)。次に、Akama *et al.* (1992), Huang and Ma (1992)および Valvekens *et al.* (1988)の方法を参考に、*pi-1*に *MdPI*遺伝子を組み込んだアグロバクテリウムを感染させて、形質転換体を獲得することを試みた。しかし、シロイヌナズナの再分化能は *ecotype* によって異なり、*pi-1*のバックグラウンドとなっている *Ler*は、再分化が困難な系統であることから再分化個体が得られなかった。次に、*Col*と *Ler*の *PI*遺伝子中のイントロンに数塩基の違いがあることを利用する方法を考案した。PCR法により、*Col*と *Ler*共通のプライマーでコーディング領域とイントロンを含む *PI*遺伝子および *pi*遺伝子の特定の断片を増幅する。この断片は、*Col*と *Ler*のイントロンで、数塩基の違いがあるため、*Ler*は *BsrI*で切断できるが、*Col*は切断できない。*pi-1*は *Ler*由来のため、すべての断片が切断された場合 *pi*をホモで有していることになる。*pi*をホモで有しながら表現型が野生型と同様の場合は、*MdPI*遺伝子によって表現型が回復したと確認できる。この方法の有効性を確認するために、*pi-1*と *Col*のゲノムを抽出し、PCRにより、約1kbのバンドを増幅し、*BsrI*で切断したところ、*pi-1*でのみ切断されることが判明した。

育成した F_2 個体のうち上記の方法で6系統の遺伝的バックグラウンドを調査した。その結果、*PI/PI*バックグラウンドが2個体、*PI/pi*のバックグラウンドが1個体でこれらのバックグラウンドを持つ個体の表現型は野生型と同じだった。*pi/pi*バックグラウンドの個体はすべてが Fig. 3.3D, 3.3Eのような形態を示し、表現型の回復と *pi*または *PI*のバックグラウンドが大きく関係していることが判明した。また、*pi/pi*バックグラウンドの表現型がすべて同じであったことから、コピー数は仮に差があったとしても事実上表現型に影響しないと考えられた。走査型電子顕微鏡を用いての詳細な観察では、葯に相当する部位は雌ずい様の組織で、この雌ずい様組織は本来の雌ずいと融合せず、その周縁部に外部に露出した胚珠を形成したと推定された。さらに花糸の細胞は本来の花糸の細胞に回復していた。このことから、*MdPI*遺伝子は雄ずいで花糸を正常に回復させ、雄ずい上部では雌ずいから雄ずい

を 6 本に分離するように機能することが判明した。しかし、*MdPI* 遺伝子では葯は回復せず、雄ずい上部には雌ずい様の細胞および器官が形成された。*MdPI* 遺伝子はシロイヌナズナのクラス B 花器官形成遺伝子 *PI* 遺伝子ホモログで、花弁と雄ずいの形成に働くことが推定されている。*MdPI* 遺伝子は花弁の形成に働くが、雄ずいの形成には全く働いていないことが第 3 章、第 1 節の結果から推察されたが、走査型電子顕微鏡の結果で花弁の形成に加えて雄ずいの花糸の形成にも機能していることが明らかとなった。

これらの F_2 個体を生育させる際、培養室で育てた場合は雄ずいとして花糸状のものが 6 本形成された。一方、グロースチャンバー内で育てた場合は雄ずい部位に雌ずい様の器官が形成されていた。この形態の差異はグロースチャンバー内の温度が 22°C で、培養室の温度がそれよりも低いために引き起こされた現象と考えられた。シロイヌナズナの花器官形成には温度も重要な要因になっていることが推察される。

また、今回の実験で使用した *pi-1* はシビアな表現型を持ち、*pi-2* はそれよりもマイルドな表現型を持ち(Bowman *et al.*, 1991)、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子と同じくクラス B 遺伝子である *AP3* 遺伝子とともに 35S プロモーターで導入した場合、表現型は野生型に戻ると報告されている(Krizek and Meyerowitz, 1996)。よって、*MdPI* 遺伝子をリンゴの *AP3* ホモログである *MdMADS13* 遺伝子もしくは *MdTM6* 遺伝子(Kitahara *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 1999)とともにシロイヌナズナの *PI* 変異体(*pi-2*)に導入することで表現型は回復すると考えられる。リンゴのクラス B 遺伝子変異品種で表現型回復実験を行う場合、*MdPI* 遺伝子とともに、*MdMADS13* 遺伝子もしくは *MdTM6* 遺伝子を同時に導入することで表現型が回復する可能性が考えられる。仮に表現型が回復した場合、単為結実性を有しているのか非常に興味深い。

摘 要

本章では、リンゴでは機能解析のための形質転換が難しく、開花までの期間も長いため、形質転換が容易で開花までの期間が短いシロイヌナズナで機

能解析を行った．シロイヌナズナの野生型における表現型の変化を調査することを目的に *MdPI* 遺伝子を形質転換した．また，*PI* 遺伝子変異体である *pi-1* において表現型回復させることを目的に，*MdPI* 導入個体と *pi-1* を交配させ，その F₁ 世代をさらに自殖させた F₂ 個体について表現型を調査すると同時に，*PI* および *pi* に関する遺伝子型を調査した．さらに，表現型回復個体について詳細な観察を目的に，走査型電子顕微鏡を用いて行った．

(1) 35S::*MdPI* を導入したシロイヌナズナは，得られた個体 (T₀) のすべてがくの周囲が花卉様に白く変化していた．また，シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* に *MdPI* 遺伝子の導入を目的に，35S::*MdPI* を導入した T₀ 個体の花粉を交配させ F₁ 個体を得た．この F₁ 個体を生長させ，自殖させることにより F₂ 個体を得ることに成功した．この F₂ 個体には正常の花器官を有しているものと，正常な花卉はあるが，雄ずいが雌ずい様に変化している個体があった．この雄ずいが変化している個体が，*MdPI* 遺伝子の影響で表現型が回復したものと考えられた．また，この個体の雌ずい様の雄ずいの表面には胚珠状の球体が観察できた．

(2) シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* と 35S::*MdPI* を導入した T₀ 個体との交配により得られた F₂ 個体について，そのバックグラウンドを調査した．正常な花卉を有しているものの雌ずい様の雄ずいを持っている個体 1, 3 および 5 では *pi-1* 由来であることが確認できた．

(3) シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* と 35S::*MdPI* を導入した T₀ 個体との交配により得られた F₂ 個体について，走査型電子顕微鏡による詳細な観察を行った．正常な花卉を有しているものの雌ずい様の雄ずいを持っている個体は，花糸の細胞が正常に近く回復していたが，雌ずい様になっている葯の部分の細胞は，正常な雌ずいの細胞と同一で，細胞中に気孔を有していた．雌ずい様の部分に観察された胚珠状の球体は，珠孔と胚柄が確認できたため胚珠であることが判明した．

第 4 章 *in situ* ハイブリダイゼーションによる 花器官形成遺伝子の発現解析

緒 言

リンゴの花芽は 7 月頃、がくから花弁、雄ずい、雌ずいの順に分化が始まり、休眠前までそれぞれの花器官原基が形成されていく。休眠後はゆっくりと花器官が成熟していき、岩手県においては 5 月上旬に開花に至る。すなわち、モデル植物であるシロイヌナズナに比べると 6 ヶ月近くの長期間にわたって花器官形成の過程を詳細に観察することが可能である。*MdPI* 遺伝子の発現は、9 月下旬ごろから始まり、5 月上旬の開花を迎えるころピークに達する(和田ら 2004)。このように世代サイクルが 3 ヶ月と短く、花器官発達が数百 μm 以下でしか観察できないシロイヌナズナと比較し、木本植物では花芽形成から開花までの期間が長く、花芽組織が大きいため花器官発達の各ステージで遺伝子発現の様相を詳細に解析可能と考えられる。

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は単為結実性を有し、*MdPI* 遺伝子の発現抑制により花器官変異が引き起こされていることが示されている(Yao *et al.*, 2001)。また、これらの品種の単為結実性は‘恵’や‘王林’などの栽培品種の単為結実性と異なることが示唆されている(Kitahara *et al.*, 2005)。このことは正常な花器官が形成されないことと単為結実性が関係していることを示唆しているが、二重に形成されるがく、もしくは多数形成される雌ずいのどちらが関係しているのか明らかになっていない。シロイヌナズナでがくの形成に関与する遺伝子は *AP1* 遺伝子と *AP2* 遺伝子が知られており(Coen and Meyerowitz, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994)、そのうち *AP1* 遺伝子と相同な *MdMADS5* 遺伝子がリンゴで単離されている(Yao *et al.*, 1999)。*AP1* 遺伝子はがくの形成だけではなく、CaMV35S プロモーターで過剰発現させることにより、リンゴでの早期開花を引き起こすことが報告されている(古藤田ら 2001; 古藤田ら 2002)。*MdMADS5* 遺伝子はリンゴにおける果実の肥大に関係していることも示唆されている(古藤田ら 2005)。多数の雌ずい形成と単為結実性との関係については明らかでないが、第 1 章で示

したように雄ずいが雌ずいに変化している場所でも胚珠は正常に機能していたことから、雌ずいが多数形成されることよりはむしろ、多数形成される胚珠の関与が推察される。

リンゴの花器官は子房を包む花床の上にかく、花弁および雄ずいが着生している。この子房を包んでいる組織が、かく、花弁および雄ずいが形成した花床筒が子房と合着して形成されたものか、花床部が花床筒形態に分化して子房と合着し、その上部にかく、花弁および雄ずいが形成されたものか明らかではない。また、リンゴの果実は子房が発達するのではなく、花床部の発達によるものである。よって、*MdPI* 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察することで、花弁と雄ずいがどのように形成されているのか調査が可能で、*MdPI* 遺伝子の消失により引き起こされる単為結実性との関係を解明できる可能性がある。

そこで本章では、*MdPI* 遺伝子と *MdMADS5* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に RNA ブロット解析と RT-PCR を行った。また、‘紅玉’の花芽を用いた組織での各器官の *MdPI* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に、花器官の発達組織で *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。さらに、‘紅玉’とリンゴのクラス B 遺伝子変異品種である ‘Spencer Seedless’ の花芽を用いて *MdMADS5* 遺伝子の各器官での発現部位を調査することを目的に、花器官の発達中の花芽ステージで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

第 1 節 *MdPI* 遺伝子および *MdMADS5* 遺伝子の発現解析

1. 材料および方法

リンゴからの RNA 抽出

リンゴ研究拠点に植栽してある‘紅玉’および‘Spencer Seedless’の花を供試材料とした。‘紅玉’の花はがく，花弁，雄ずい，雌ずいおよび子房を含む花床部に切り分け，‘Spencer Seedless’の花はがく(外がく)，花弁が変化したがく(内がく)，雌ずいおよび子房を含む花床部に切り分け，液体窒素で凍らせた後，使用時まで-80℃で保存した。全 RNA の抽出は改変 2×CTAB 法(Kotoda *et al.*, 2000)により以下のように行った。事前に 180℃，4 時間乾熱滅菌済みの乳鉢，スパーテルおよびチューブを液体窒素で冷やした後，それぞれの器官を液体窒素中でよくすりつぶした。液体窒素中のチューブに試料を入れ，試料の 10 倍量の 2×CTAB 液(2% [w/v] CTAB, 0.1M Tris-HCl [pH9.5], 20mM EDTA, 4M NaCl)を加えてよく攪拌し，65℃で 10 分間インキュベートした。等量のクロロフォルム・イソアミルアルコール(24:1 [v/v])を加えて攪拌した。15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離し，水層をとり除いた。再び，等量のクロロフォルム・イソアミルアルコール(24:1 [v/v])を加えて攪拌し，15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離し，水層をとり除いた。1/4 量の 10M LiCl 液を加え，-20℃に 2 時間以上放置した。15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離後，水層をとり除き，沈殿を適量の TE バッファーに溶解した。等量の TE 飽和フェノール(pH9.5)を加えて攪拌し，15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離後，水層をとり除いた。等量のフェノール・クロロフォルム(1:1 [v/v])を加えて攪拌し，15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離後，水層をとり除いた。等量のクロロフォルム・イソアミル(24:1 [v/v])を加えて攪拌し，15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離後，水層をとり除いた。再び，1/4 量の 10M LiCl 液を加え，-20℃に 2 時間以上放置した。15,000rpm，10 分間，室温で遠心分離後，水層をとり除き，沈殿に 70% (v/v)エタノールを加え，15,000rpm，4℃で 5 分間遠心分離した。上清を除き，真空乾燥し，適量の滅菌水に溶解した。

***MdPI* 遺伝子の RNA ブロット解析**

各器官それぞれ 10 μ g 相当の全 RNA を 1.85% (v/v) フォルムアルデヒドを含む 1.5% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、20 \times SSC でナイロンメンブレンにブロットした。ブロット後のメンブレンはウェルのあとを鉛筆で印をつけ、2 \times SSC で 2 回すすぎ、風乾させ、120 $^{\circ}$ C で 30 分間ベーキングさせた。メンブレンは *MdPI* 遺伝子のアンチセンス DIG-RNA プローブを含む DIG EASY HYB (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、68 $^{\circ}$ C で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後の洗いと検出は第 2 章の手順で行った。

***MdMADS5* 遺伝子の RNA ブロット解析と Reverse Transcription (RT)-PCR**

ハイブリダイゼーションと検出は *MdPI* 遺伝子の RNA ブロット解析で記した方法で行った。

RT 反応は RT-PCR high (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いて行った。PCR 反応は *MdMADS5* 特異的プライマー(センスプライマー 5'-GGGAGAGGTAGAGTTCAGC-3' とアンチセンスプライマー 5'-GATCAAGCAGCAAAGCATCCG-3') をデザインし、PCR バッファー (10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 200 μ M dNTP mix, 1mM MgSO₄, KOD-plus Polymerase (Toyobo) を用いて PCR で増幅した。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C 3 分のホットスタート後、94 $^{\circ}$ C 30 秒間、50 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 90 秒間の 30 サイクルで行った。PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、EtBr で染色を行い、ゲルプリンター GP-2000i (Taitec, Nagoya, Japan) で写真を撮影した。

2. 結 果

MdPI 遺伝子の cDNA を用いたアンチセンス DIG-RNA プローブで、‘紅玉’の花の各器官から抽出した全 RNA を使用した RNA ブロット解析を行った結果、花弁と雄ずいで強い発現が認められ、子房を含む花床部でも弱い発現が認められた(Fig. 4.1). この結果は *MdPI* がリンゴのクラス B 遺伝子で、花弁と雄ずいで発現することを裏付けた.

一方、*MdMADS5* 遺伝子の cDNA を用いたアンチセンス DIG-RNA プローブで、‘紅玉’の花の各器官から抽出した全 RNA を使用した RNA ブロット解析を行った. その結果、がくおよび花柱、子房を含む花床部で発現が観察され、花弁での発現は認められなかった(Fig. 4.2). また、リンゴのクラス B 変異品種である ‘Spencer Seedless’ の花の各器官から抽出した全 RNA を用いて、RT-PCR を行った結果、花柱を除く外がく、内がく、子房を含む花床部で *MdMADS5* 遺伝子の増幅が確認できた(Fig. 4.3).

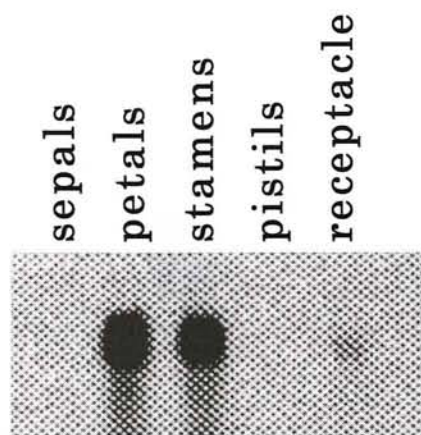


Fig. 4.1 RNA blot analysis of floral organs
of 'Jonathan' by using *MdPI* RNA probe

The *MdPI* gene expression was strongly detected in petals and stamens,
and weakly detected in receptacle.

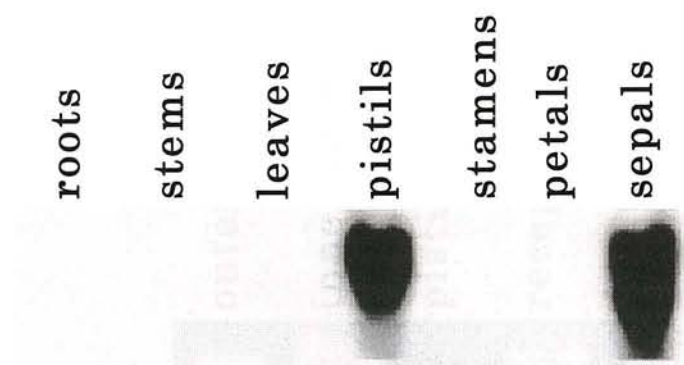


Fig. 4.2 RNA blot analysis of floral organs
of 'Jonathan' by using *MdMADS5* RNA probe

The *MdMADS5* gene expression was strongly detected in pistils and sepals.

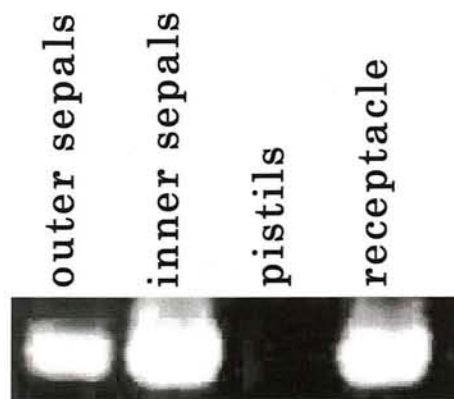


Fig. 4.3 RT-PCR of floral organs of 'Spencer Seedless'
by using *MdMADS5* specific primers

The *MdMADS5* gene was amplified in outer and inner sepals and receptacle.

第 2 節 *MdPI* 遺伝子の組織学的な発現解析

1. 材料および方法

サンプルの固定

リンゴ研究拠点に植栽してある‘紅玉’の花芽を時期別にサンプリングした。サンプリング直後に花芽の二分割，側面を三分の一切除等のトリミングを行った。トリミング後直ちに 50mL の遠心チューブ中で FAA 液(1.48% [v/v] Formaldehyde, 5% [v/v] Acetic Acid, 50% [v/v] エタノール, 0.1% [w/v] Tween20)を液量がチューブ内の花芽の高さの 2 倍(以下液量は花芽の高さの 2 倍)となるように加え，30 分間脱気した。脱気は花芽が底に沈むまで気泡が残らないよう振動を与えながら行った。FAA 液を取り除いた後，氷冷した FAA 液を加え，4℃で 30 分間静置し，再び 30 分間同様に脱気した。FAA 液を取り除いた後，再び氷冷した FAA 液と完全に交換し，4℃で 1 晩静置した。50% (v/v)エタノール 4℃半日間，60% (v/v)エタノール 4℃半日間，70% (v/v)エタノール 4℃半日間，85% (v/v)エタノール 4℃半日間，95% (v/v)エタノール 4℃1 晩それぞれ液を完全に交換し静置した。無水エタノールを室温半日間，それぞれ 4 回液を完全に交換し静置した。無水エタノールは 99.5% (v/v)エタノールに 30g/L となるようにモレキュラーシーブスを加え，2～3 時間攪拌後，濁りが完全になくなるまでおよそ 2 週間静置して作成した。25% (v/v)レモゾール(Wako, Osaka, Japan): 75% (v/v)無水エタノール，50% (v/v)レモゾール: 50% (v/v)無水エタノール，75% (v/v)レモゾール: 25% (v/v)無水エタノール，100%レモゾール 2 回液を完全に交換し室温で半日間静置した。レモゾールを交換し，10 分間脱気した後，液量の 4 分の 1 のパラプラスチック粒を加え，室温で 1 晩静置した。これを 60℃に数時間置き，パラプラスチックを完全に融解させ，さらに液量の 4 分の 1 のパラプラスチック粒を加え，60℃で数時間静置した。続いて混合液を捨て，融解したパラプラスチックに交換し，60℃で 1 晩静置した。再びパラプラスチック液を交換し，60℃で半日間静置し，これを 6 回繰り返したのち，切片作成まで 4℃で保存した。

切片スライドの作成

4℃保存の花芽を再び融解し、切片を作成しやすいように向きを整えてパラフィンブロックを作成した。ブロックは余分なパラフィン部分をトリミングした後、ミクロトーム(Carl Zeiss, GmbH)を用いて 10 μ m 厚の連続切片にし、滅菌水を乗せたシランコート済みのスライドガラス上で伸展させた。42℃で温め切片が完全に伸展した後、水分を除き、そのまま 42℃で 1 晩ベークさせた。

RNA プロブの作成

MdPI 遺伝子がクローニングされているベクター 1 μ g 程度をセンスプロブは *Eco*RI で、アンチセンスプロブは *Sa*II (Takara, Tokyo, Japan)でそれぞれ H バッファーを用いて 37℃, 1 時間切断した。マイクロコン EZ カラム(Millipore, Massachusetts, USA)にのせ、14,000rpm 30 秒間遠心し、制限酵素を除いた。この液をエタノール沈殿させた後、沈殿を 14 μ L の滅菌蒸留水に融解させ、2 μ L の 10 \times バッファー, 2 μ L の DIG RNA Labeling Mix (Roche, Basel, Switzerland), センスプロブは 2 μ L の T7 ポリメラーゼ, アンチセンスプロブは 2 μ L の T3 ポリメラーゼを加え、37℃, 90 分間インキュベートした。その後、1 μ L の DNase を加え 37℃, 15 分間インキュベートし、10mg/mL の tRNA を 1 μ L 加えエタノール沈殿させた。沈殿を 50 μ L の滅菌蒸留水に融解させ、200mM Na₂CO₃を 30 μ L, 200mM NaHCO₃を 20 μ L 加え、60℃で 150base 程度となるように時間を調整して加水分解を行った。その後、サンプルを氷上に置き、10% (v/v)酢酸を 10 μ L, 3M 酢酸ナトリウム 12 μ L 加え、気泡が出たことを確認後、エタノール沈殿させ、沈殿を 50 μ L の滅菌蒸留水に融解させた。

スライドの調整

レモゾールに 10 分間浸し、脱パラフィンさせた。染色つぼを交換して再度繰り返した。99.5% (v/v)エタノールに 1 分間浸し、染色つぼを交換して再度繰り返した。95% (v/v)エタノール, 85% (v/v)エタノール, 50% (v/v)エタノール, 30% (v/v)エタノール, 滅菌蒸留水にそれぞれ 1 分間ずつ浸し水和

させた。PBS (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.15g/L Na₂HPO₄, 0.2g/L KH₂PO₄) に 2 分間浸した。10μg/mL proteinase K, 0.1M Tris-HCl (pH7.5), 50mM EDTA を含む液中で 37℃, 30 分間インキュベートした。0.2% (w/v) グリシンを含む PBS 液中で proteinase K の反応を停止させた。PBS に 2 分間浸し, PBS 処理を再度繰り返した。0.1M トリエタノールアミン (pH8.0) 液中に浸し, 攪拌しながら 1% (v/v) 濃度になるように無水酢酸を加え, 10 分間攪拌し続けた。PBS に 2 分間浸し, 30% (v/v) エタノール, 50% (v/v) エタノール, 85% (v/v) エタノール, 95% (v/v) エタノール, 無水エタノールに 2 回それぞれ 1 分間ずつ浸し脱水させた。ハイブリダイゼーションまでスライドは風乾させた。プローブ液は 1 スライドあたり 2μg のプローブを含む液 50μL と脱イオン化フォルムアミド 50μL を混ぜ, 80℃で 2 分間インキュベートした後氷上で保持した。1 スライドあたり終濃度 1.5M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH6.8), 5mM EDTA, 50% deionized formamide, 10% (w/v) sodium dextran sulfate, 1mg/mL tRNA, 1 × denhardt's solution, 10unit RNase inhibitor に調整したハイブリダイゼーションバッファー 400μL とプローブ液 100μL を混合させ, スライド上の切片上に滴下し, 気泡が入らないようカバーガラスをかぶせた。乾燥しないよう底に湿らせた紙を敷き, プラスチック容器内に静置し, 蓋をビニールテープでよく巻いた後, 40℃で 1 晩ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイゼーション後の検出

50℃で温めた 2×SSC を用いてハイブリダイゼーションの終了したスライドからカバーガラスをはずした。この操作はプローブ毎に液を交換して行った。2×SSC で 50℃, 60 分間インキュベートした。20μg/mL の濃度になるよう RNase A を NTE (0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM EDTA) と混合させスライドを 37℃, 30 分間インキュベートした。NTE で 37℃, 5 分間インキュベートを 3 回行った。再び 2×SSC で 50℃, 60 分間インキュベートした。PBS に 5 分間浸し, DIG1 バッファー (0.1M Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl) に 5 分間浸した後, ブロッキングバッファー (0.5% [w/v] blocking reagent [Roche], Maleic Anhydride, 150mM NaCl) に 60 分間浸した。ブロッキングバッファーに終濃度 0.3% (w/v) TritonX-100 を加え, 1,000

倍濃度となるように抗 DIG アルカリフォスファターゼ 標識抗体(Roche)を加えた液をスライド上の切片上に滴下し、気泡が入らないようカバーグラスをかぶせた。乾燥しないよう底に湿らせた紙を敷き、プラスチック容器内に 60 分間静置した。DIG1 バッファーに終濃度 0.3% (w/v) Triton X-100 を加えた液中でカバーグラスをはずした。DIG1 バッファーに終濃度 0.3% (w/v) の Triton X-100 を加えた液で 20 分間 3 回インキュベートし、発色バッファー(0.1M Tris-HCl [pH9.5], 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂)で 5 分間浸した。発色バッファー 1mL に NBT/BCIP stock solution (Roche)を 20 μ L 加え、この液をスライド上の切片上に滴下し、気泡が入らないようカバーグラスをかぶせた。乾燥しないよう底に湿らせた紙を敷き、プラスチック容器内に静置し、蓋をビニールテープでよく巻いた後、28℃で 1 晩静置した。

染色後の洗い

蒸留水中でカバーグラスをはずし、70% (v/v)エタノールに 5 分間浸し、95% (v/v)エタノールに 5 分間浸し、70% (v/v)エタノールに 5 分間浸し、蒸留水に 5 分間浸した後、風乾させた。風乾後 Entellan をスライド上の切片上に滴下し、気泡が入らないようカバーグラスをかぶせた。乾燥後、スライド切片を光学顕微鏡(Leica, Wetzlar, Germany)で観察した。

2. 結 果

発育中の‘紅玉’の花芽について *MdPI* 遺伝子の RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。December. 1, 2005 の花芽は NBT の青色染色による *MdPI* 遺伝子の発現がわずかながら花弁原基と雄ずい原基で特異的に確認することができた(Fig. 4.4B)。January. 31, 2006 の花芽は December. 1, 2005 よりも花器官、特に雄ずいの葯壁が発達していた(Fig. 4.4C)。また、青色で示される *MdPI* 遺伝子の発現は花弁原基と雄ずい原基で濃く、花床部の雄ずい維管束でも特異的に青色染色が見られた。March. 7, 2006 の花芽は January. 31, 2006 よりも青色染色による *MdPI* 遺伝子の発現が花弁原基と雄ずい原基、雄ずい維管束で特異的に濃くなっていた(Fig.

4.5B). April. 13, 2006 の花芽は葯の発達が顕著に観察でき、*MdPI* 遺伝子の発現を示す青色が花弁原基と雄ずい原基、雄ずい維管束でさらに特異的にはっきりと観察できた (Fig. 4.5C). April. 26, 2006 の花芽の縦断面は花器官が開花に向けて発達していた (Fig. 4.6). *MdPI* 遺伝子の発現は花弁と雄ずいの葯壁、花糸、花床内の維管束で特異的な青色染色が見られた。April. 26, 2006 の花芽の横断面の調査を行い、立体的な *MdPI* 遺伝子の発現を観察した (Fig. 4.7). *MdPI* 遺伝子の発現を示す青色は花弁と雄ずいの葯壁、花糸、花床内の雄ずい維管束で特異的に確認され (Fig. 4.7C), 花床内の花弁の維管束では *MdPI* 遺伝子の発現は認められなかった。雄ずい維管束での *MdPI* 遺伝子の発現は胚珠の近傍ではなく、花床内の途中で発現がなくなっていた (Fig. 4.7C, 4.7D and 4.7E).

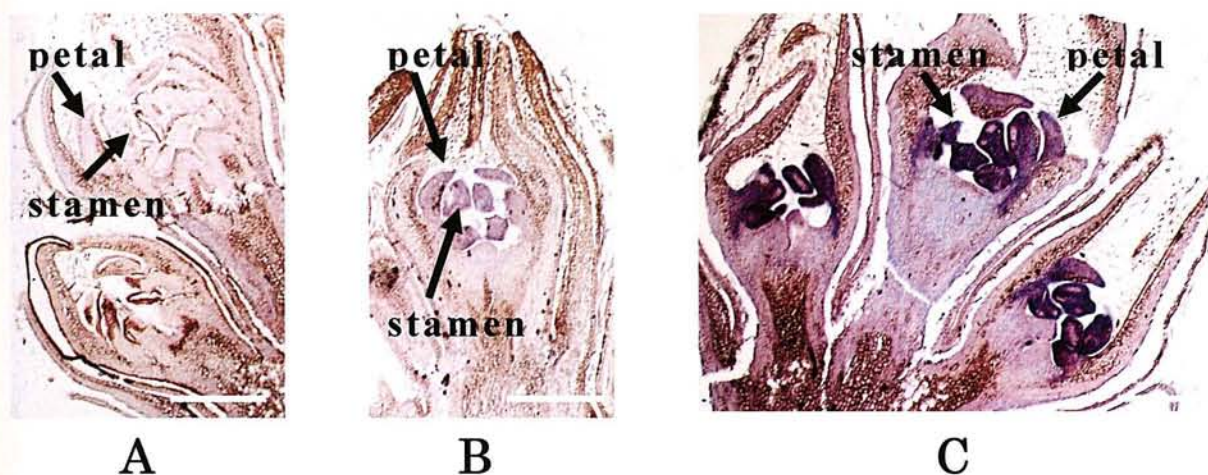


Fig. 4.4 *in situ* hybridization of *MdPI* expression
in flower buds of 'Jonathan'
on December. 1, 2005 and January. 31, 2006

A, Control; the sample collected on March. 7, 2006, detected by *MdPI* sense probe; B, December. 1, 2005 sample *MdPI* antisense probe; The *MdPI* gene expression was detected in petals and stamens primordium. C, January. 31, 2006 sample *MdPI* antisense probe. The *MdPI* gene expression was detected in petals, stamens and vascular bundle of stamen. bar=500µm

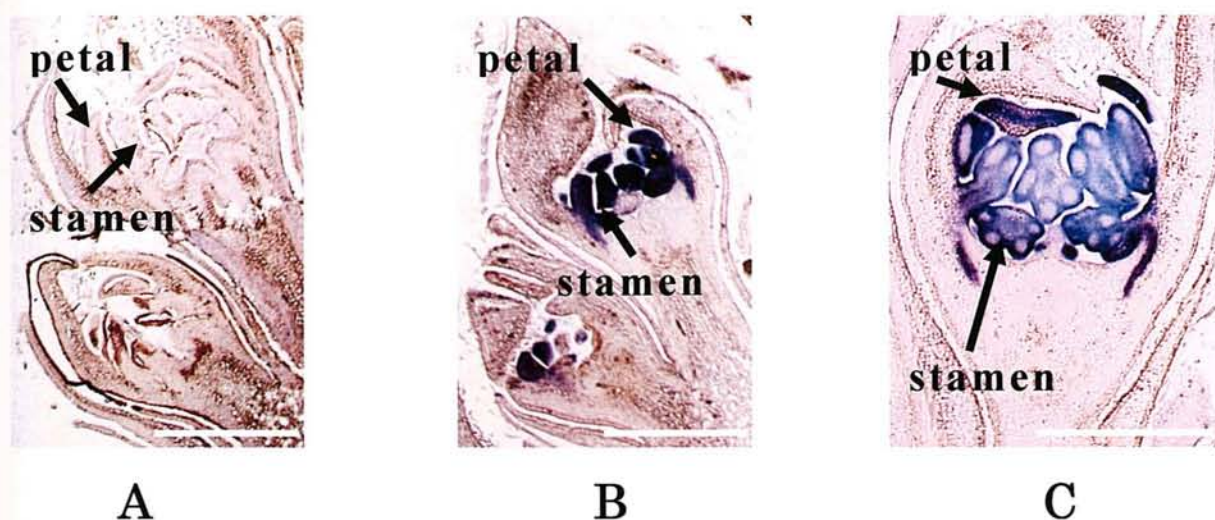
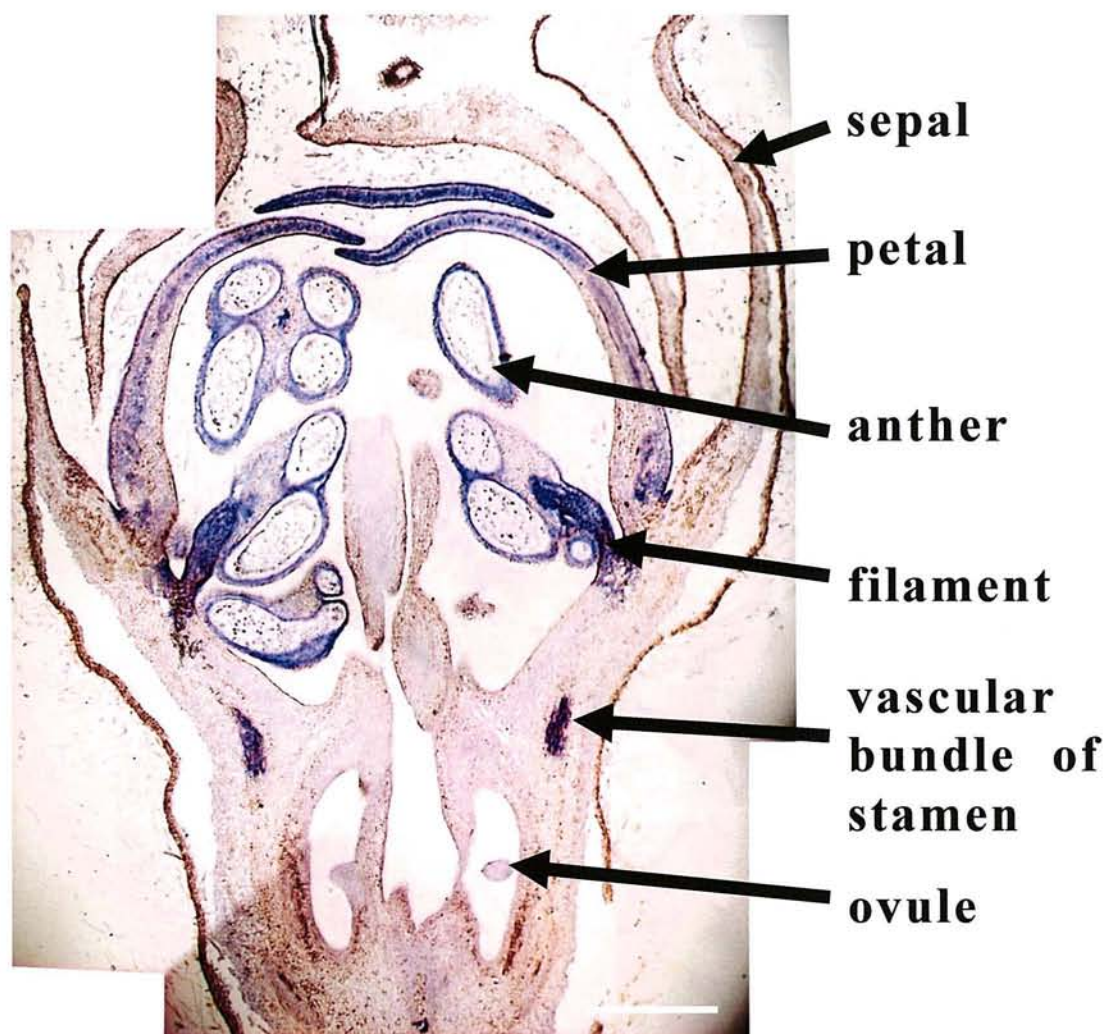


Fig. 4.5 *in situ* hybridization of *MdPI* expression
in flower buds of 'Jonathan'
on March. 7, 2006 and April. 13, 2006

A, Control; the sample collected on March. 7, 2006, detected by *MdPI* sense probe; B, March. 7, 2006 sample using *MdPI* antisense probe; The *MdPI* gene expression was detected in petals, stamens and vascular bundle of stamen. C, April. 13, 2006 sample using *MdPI* antisense probe. The *MdPI* gene expression was detected in petals, stamens and vascular bundle of stamen. bar=500µm



**Fig. 4.6 *in situ* hybridization of *MdPI* expression
in flower buds of 'Jonathan' on April. 26, 2006**

The sample was collected on April. 26, 2006 detected by *MdPI* antisense probe; The *MdPI* gene expression was detected in petals, stamens and vascular bundle of stamen. bar=1mm

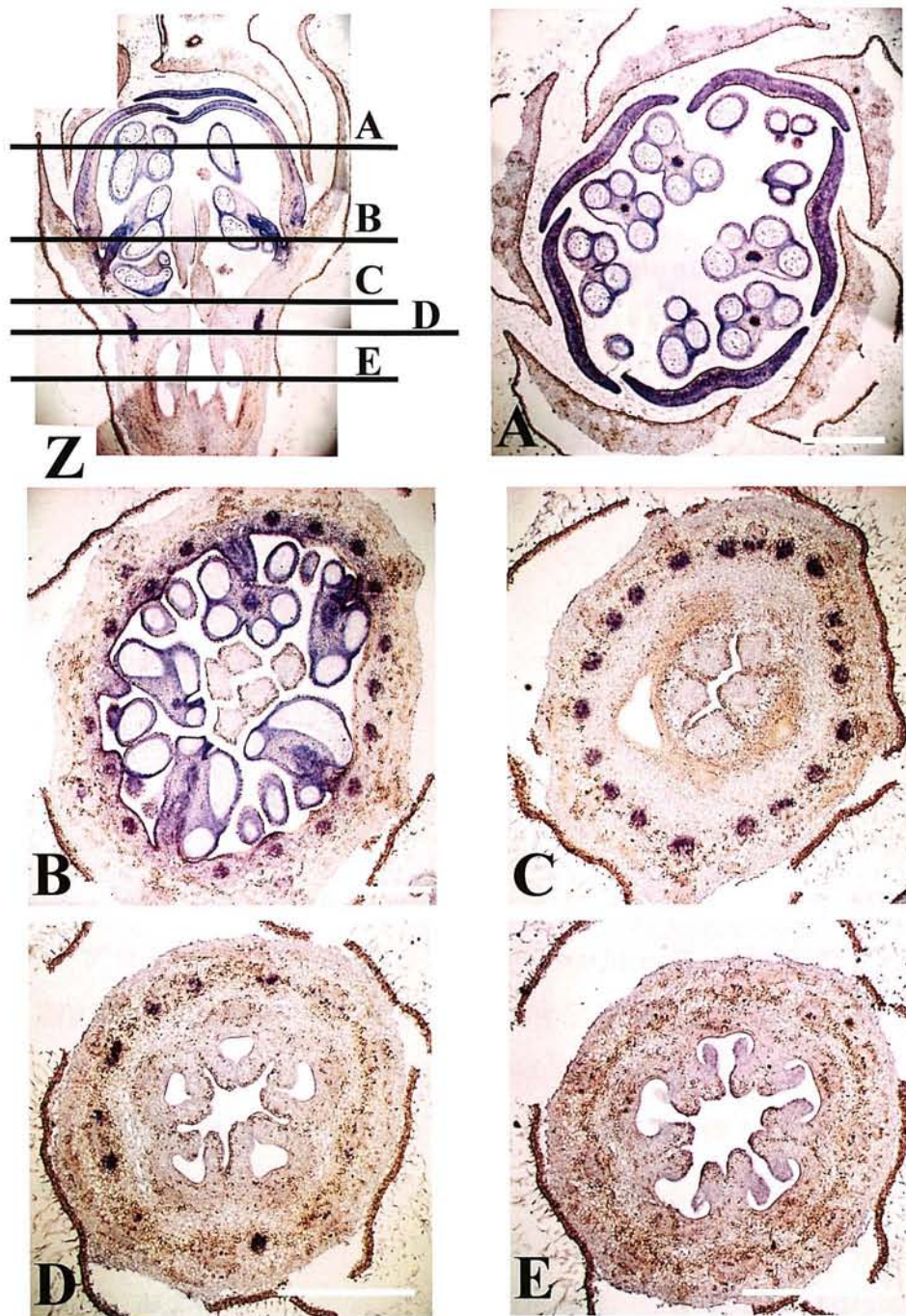


Fig. 4.7 *in situ* hybridization of *MdPI* expression
in flower buds of 'Jonathan' on April. 26, 2006

Z; The sample was collected on April. 26, 2006. The cross sections from A to E were correspondent with each A to E Figure; The *MdPI* gene expression was detected in petals, stamens and vascular bundle of stamen. bar=1mm

第 3 節 *MdMADS5* 遺伝子の組織学的な発現解析

1. 材料および方法

リンゴ研究拠点に植栽してある‘紅玉’と‘Spencer Seedless’の花芽を時期別に採取し使用した。プローブは *MdMADS5* 遺伝子がクローニングされている cDNA ベクター 1 μ g 程度使用し、センスプローブは *Xho*I で、アンチセンスプローブは *Hind*III で 37°C、60 分間切断した。本章、第 2 節の方法と同様に RNA の転写はセンスプローブが T3 ポリメラーゼ、アンチセンスプローブが T7 ポリメラーゼを用いて 37°C、90 分間行った。

花芽の固定からハイブリダイゼーション、洗いから検出、観察までは本章、第 2 節の方法と同様に行った。

2. 結 果

‘紅玉’の花芽を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを *MdMADS5* 遺伝子の RNA プローブを用いて行った。December. 1, 2005 の花芽は青色染色による *MdMADS5* 遺伝子の発現は、がく、花床部および花柄に至るまで外側の部位で特異的に確認した (Fig. 4.8B). January. 31, 2006 および April. 13, 2006 の花芽も December. 1, 2005 の花芽と同様な発現を示した (Fig. 4.8C and 4.9). また、‘Spencer Seedless’の花芽を用いた April. 13, 2006 の切片では、外がく、内がくおよびがくから花床部、花柄に至るまで外側の部位で特異的な *MdMADS5* 遺伝子の発現を確認した (Fig. 4.10).

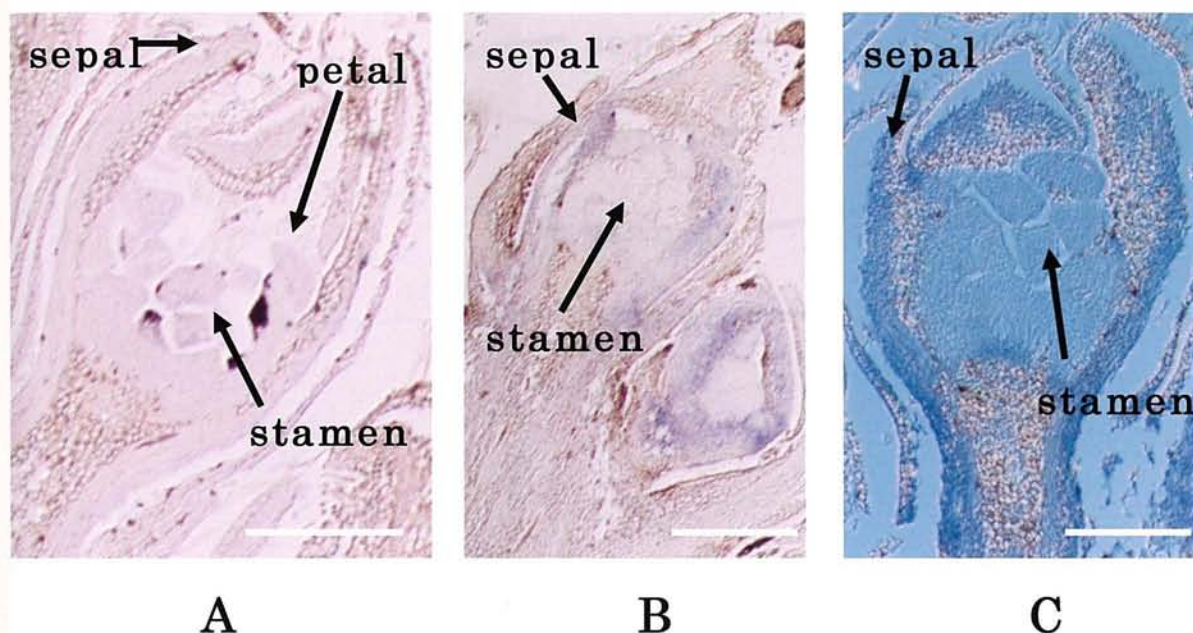


Fig. 4.8 *in situ* hybridization of *MdMADS5* expression in flower buds of 'Jonathan'

A, Control; the sample collected on December. 1, 2005 detected by *MdMADS5* sense probe; B, December. 1, 2005 sample using *MdMADS5* antisense probe; The *MdMADS5* gene expression was detected in sepals and outside of receptacle. C, January. 31, 2006 sample using *MdMADS5* antisense probe. The *MdMADS5* gene expression was detected in sepals and outside of receptacle. bar=500μm

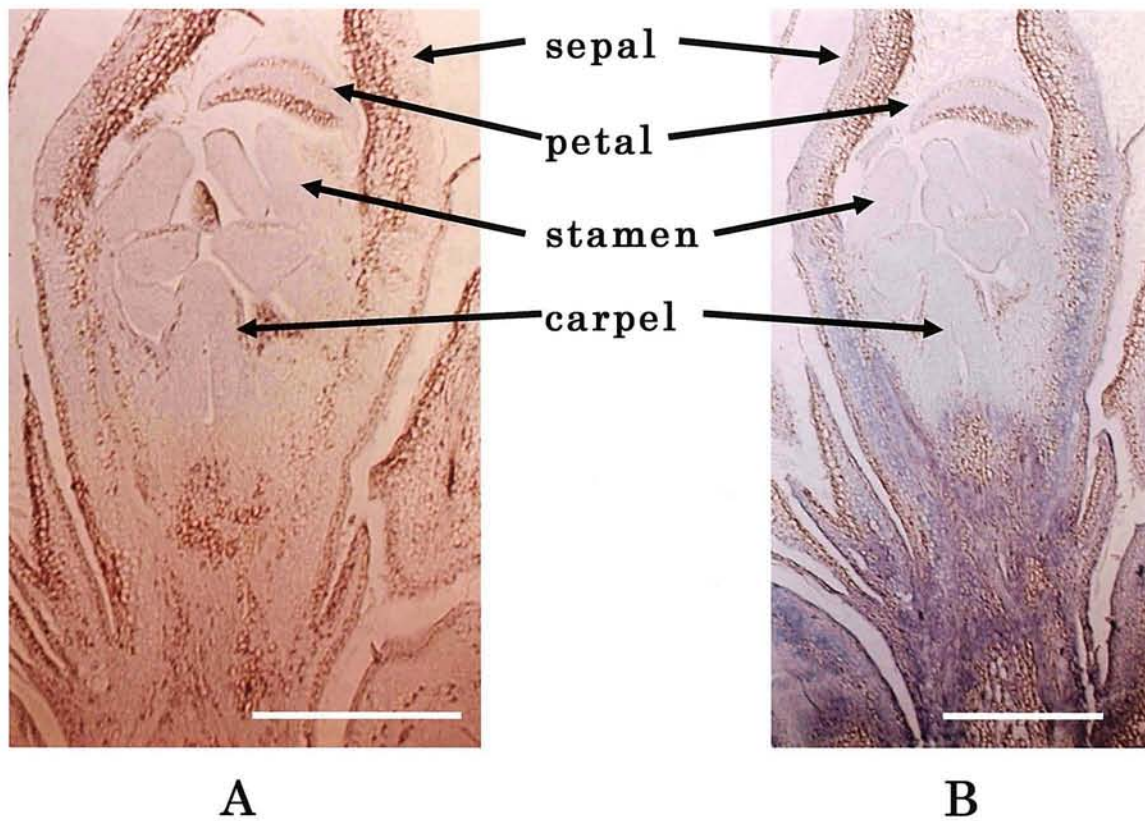


Fig. 4.9 *in situ* hybridization of *MdMADS5* expression
in flower buds of 'Jonathan'

A, Control; the sample collected on April. 13, 2006 detected by *MdMADS5* sense probe; B, April. 13, 2006 sample using *MdMADS5* antisense probe. The *MdMADS5* gene expression was detected in sepals and outside of receptacle. bar=500µm

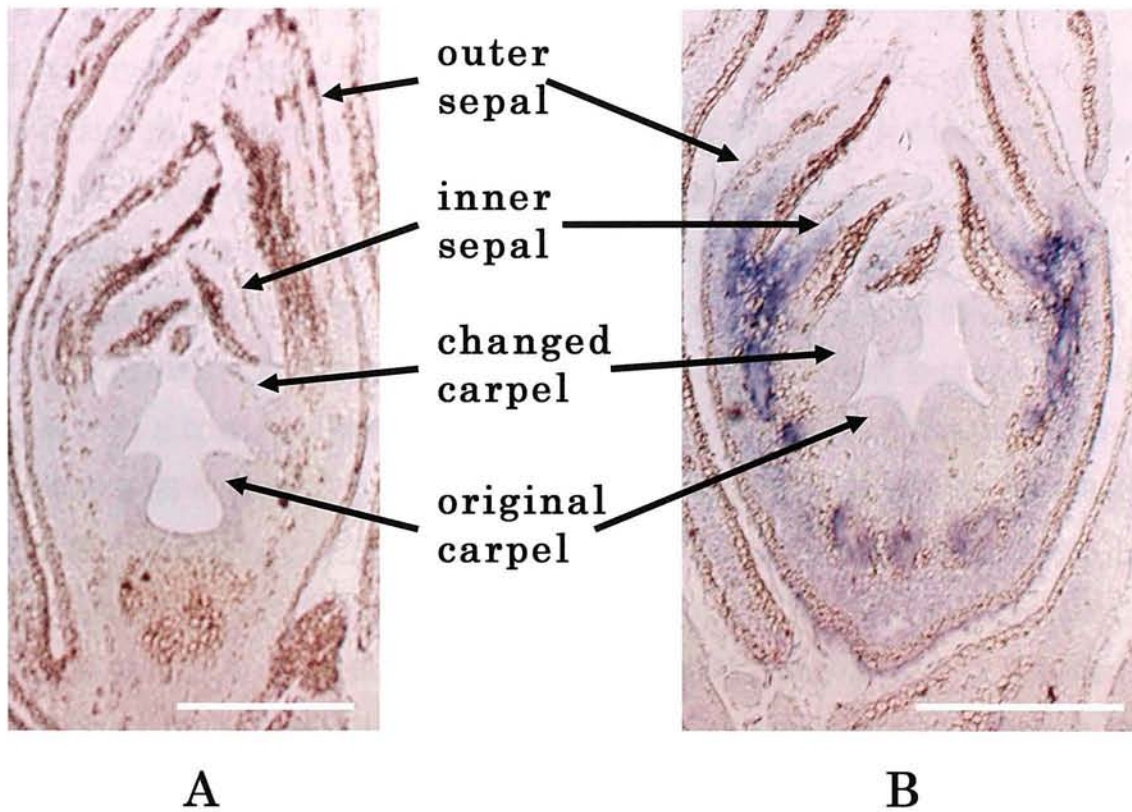


Fig. 4.10 *in situ* hybridization of *MdMADS5* expression
in flower buds of 'Spencer Seedless'

A, Control; the sample collected on April. 13, 2006 detected by *MdMADS5* sense probe; B, April. 13, 2006 sample using *MdMADS5* antisense probe. The *MdMADS5* gene expression was detected in outer and inner sepals and receptacle. bar=500μm

考 察

MdPI 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションにおける mRNA の発現は主に花弁と雄ずい原基で観察された (Fig. 4.4、4.5、4.6 and 4.7). また、花床内の雄ずい維管束でも発現が観察された. この組織学的な発現パターンは Fig. 4.1 で示した RNA プロット解析の結果と一致していた. RNA プロット解析における子房を含む花床内での *MdPI* 遺伝子のわずかな発現は、花床内にある雄ずい維管束で発現があるために検出されたものと推察された. *MdPI* 遺伝子の発現が花床内上部の維管束でも観察されたことから、染色された場所まで雄ずいのアイデンティティを有していると判明した. これまでリンゴ花床部における雄ずい維管束の配置についての報告はないが、本実験結果をもとに雄ずい維管束の配置を突き止められると考えられる. また、モモ等の子房中位花における *MdPI* 遺伝子の雄ずい維管束での発現を調査・比較することで、子房下位花の形成を明らかにできる可能性があると考えられる.

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の花器官は二重のがくと多数の雌ずいから構成されている. Fig. 4.2 の結果から、シロイヌナズナのクラス A 遺伝子 *AP1* 遺伝子と相同な遺伝子である *MdMADS5* 遺伝子はがくの形成に関与していることが再確認された. シロイヌナズナの *AP1* 遺伝子はがくと花弁の形成に関与している他、花器官の分化を決定する機能、花序から花芽分裂組織への分化方向を決定する機能を持つことが報告されている (Mandel and Yanofsky, 1995). 本実験結果 (Fig. 4.2) では、*MdMADS5* 遺伝子はがくおよび雌ずい、子房を含む花床部で発現が見られたが、花弁の形成には関与していないことが示唆された. *AP1* 遺伝子はがくと花弁の whorl1 と 2 で発現しているが、*MdMADS5* 遺伝子の RT-PCR の結果 (Fig. 4.3), 通常品種では、がくのみ (whorl1 だけ) の発現だった. リンゴのクラス B 遺伝子変異品種では花弁が変化したがく (whorl2) でも発現が見られたため、whorl1 と 2 で発現があることになる. シロイヌナズナの ABC モデルで示されたパターンと違い、花弁の形成には全く関与せずがくの形成のみに働いていることが示唆された. また、第 1 章の結果からリンゴのクラス B 遺伝子変異品種の

二重に形成するがくが単為結実性に関与している可能性が示唆されたことから、がくが二重に形成されることと単為結実性との関係を調査するため、*MdMADS5* 遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーションによる組織学的な調査を行った。*MdMADS5* 遺伝子の発現は‘紅玉’ではがくのみならず、それに続いて花柄部にまで観察され、‘Spencer Seedless’では花卉が変化したがくでも発現が見られたが、その他の場所での発現は‘紅玉’と同様であった。この結果は Fig. 4.3 の RT-PCR の結果と一致していた。*MdMADS5* 遺伝子の発現部位は序論の Fig. 3 で示した模式図の青い斜線部と一致していることから、果実の肥大に関係している遺伝子であると考えられた。シロイヌナズナでは *AP3/PI* のヘテロダイマーは *API* 遺伝子の転写を調節するターゲット因子であると報告されている (Sundström *et al.*, 2006)。リンゴでも *MdPI* 遺伝子が *AP3* 遺伝子ホモログである *MdMADS13* 遺伝子もしくは *MdTM6* 遺伝子とダイマーを形成し、がくの形成に関与している *MdMADS5* 遺伝子の転写を調節している可能性が考えられる。しかし、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種では *MdPI* 遺伝子の発現が抑制されているため、この遺伝子調節経路は機能しておらず、がくの発達には他の経路による *MdMADS5* 遺伝子の調節が重要であると考えられた。また、‘紅玉’と‘Spencer Seedless’での *MdMADS5* 遺伝子の発現の違いは、花卉が置き換わったがくのみであったことから、がくが二重に形成されることと単為結実性との関係は弱いと考えられ、胚珠、心皮および子房の形成(に関与する遺伝子)と単為結実性との関係が強いと推察される。

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は雄ずいが雌ずいに変化しているため、雄ずい部位には雌ずいおよび胚珠とそれを包む子房が形成されていると考えられる。この胚珠は第 1 章で示したように正常に機能している。したがって、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種では、本来雄ずいとなる部位が雌ずいおよび胚珠とそれを包む子房に置き換わることと単為結実性との間に関係があると推察された。一方、リンゴのもう一つのクラス B 遺伝子で、シロイヌナズナの *AP3* 遺伝子のリンゴホモログの *MdMADS13* 遺伝子は、通常品種とクラス B 遺伝子変異品種の花において、発現量と発現部位が異なっていることが示されている (和田ら 2006, 2006)。このことは、*MdPI* 遺伝子によ

る発現制御を受けていて、*MdMADS13* 遺伝子が *MdPI* 遺伝子と共同で働いていることを示唆している。また、*MdMADS13* 遺伝子の発現は通常品種では花弁と雄ずいだけでなくの胚珠で発現が見られ、花器官が発達してくると徐々に発現が減少するが、リンゴのクラス B 変異品種では子房壁および花床部で通常品種よりも強い発現が認められている。このことは *MdMADS13* 遺伝子がリンゴのクラス B 遺伝子変異品種と単為結実性の関係づけている遺伝子の 1 つである可能性を示唆している。シロイヌナズナの *AP3* 遺伝子ホモログであるトマトの *TM6* 遺伝子の発現部位は *MdMADS13* 遺伝子と同様に子房壁と胚珠で、この遺伝子を導入することで単為結実性が引き起こされることも報告されている (Martino *et al.*, 2006)。他の花器官形成遺伝子との相互作用はどのような機構で行われているか未だ解明されていないが、シロイヌナズナの *AP3* ホモログ遺伝子が単為結実性を解決できる遺伝子である可能性が考えられた。

摘 要

本章では、クラス B 遺伝子の *MdPI* 遺伝子と、クラス A 遺伝子でリンゴのクラス B 遺伝子変異品種で二重のがく形成に関係していると推察される *MdMADS5* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に、RNA プロット解析と RT-PCR を行った。また、‘紅玉’花芽の各器官での *MdPI* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に、花芽の各発育ステージで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。さらに、‘紅玉’とリンゴのクラス B 遺伝子変異品種である ‘Spencer Seedless’ の花芽の各器官での *MdMADS5* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に、花芽の各発育ステージで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(1) ‘紅玉’の花器官を用いて RNA プロット解析を行った。*MdPI* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した場合、花弁と雄ずいで特異的な発現が見られたが、子房を含む花床部でもわずかな発現が見られた。また、*MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した場合、がくおよ

び花柱，子房を含む花床部で発現が見られた．また，リンゴのクラス B 遺伝子変異品種 ‘Spencer Seedless’ の花器官を用いて *MdMADS5* 遺伝子特異的プライマーを使用した RT-PCR を行ったところ，がく(外がく)と花弁が変化したがく(内がく)と子房を含む花床部で発現が確認された．

(2) ‘紅玉’ の *MdPI* 遺伝子発現開始から開花直前までの花芽を用いて，*MdPI* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．花弁と雄ずいで特異的な発現が観察されたが，花床部内の雄ずい維管束でも発現が見られた．これは第 4 章，第 1 節の RNA プロット解析の花床部でわずかな発現が見られた結果と一致していた．*MdPI* 遺伝子の発現が花床内上部の維管束でも観察されたことから，染色された場所まで雄ずいのアイデンティティを有していると判明した．

(3) 第 4 章，第 2 節と同じ花芽を用いて *MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．がくとがくからつながっている花床部の外側から花柄までの外側の細胞で発現が観察された．これは第 4 章，第 1 節の *MdMADS5* 遺伝子プローブを使用した RNA プロット解析の結果と一致していた．また，リンゴのクラス B 遺伝子変異品種 ‘Spencer Seedless’ の花芽を用いて *MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．がく(外がく)と花弁が変化したがく(内がく)で発現が見られ，がくから続いている花床部の外側から花柄までの外側の細胞で発現が観察された．この結果も第 4 章，第 1 節の *MdMADS5* 遺伝子プライマーを使用した RT-PCR の結果と一致していた．

第 5 章 *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析

1. 緒 言

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の *MdPI* 遺伝子は、レトロトランスポゾンの挿入があるために mRNA に転写されていない。10kb ほどのレトロトランスポゾンがゲノム DNA 上に存在するため転写が途中で止まってしまうか、もしくは転写後のスプライシングがうまく働いていないことが考えられる。

シロイヌナズナの花器官形成に関与するホメオティック遺伝子である *AP1* 遺伝子、*AP3* 遺伝子および *AG* 遺伝子は転写因子である MADS ドメインをエンコードしている (Goto and Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992)。これらの遺伝子産物は CArG box (CC(A/T)₆GG) と呼ばれる DNA 配列と結合することが明らかとなっている (Hill *et al.*, 1998; Riechmann *et al.*, 1996; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992)。これらの遺伝子は正のフィードバック機構によりお互いの発現を制御している (Goto and Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992)。シロイヌナズナの *AP3* 遺伝子プロモーターの活性は *AP3/PI* ヘテロダイマーによる結合とプロモーター機能を持つ少なくとも 2 つの CArG box により媒介されている (Hill *et al.*, 1998; Riechmann *et al.*, 1996; Tilly *et al.*, 1998)。しかし、*PI* 遺伝子プロモーターには CArG box が存在せず、自己調節により転写を制御していると示唆されている (Chen *et al.*, 2000; Honma and Goto, 2000)。一方、キンギョソウの *AP3* 遺伝子と *PI* 遺伝子のオーソログである *DEFICIENS* (*DEF*) 遺伝子と *GLOBOSA* (*GLO*) 遺伝子では、両遺伝子のプロモーターが CArG box を持ち、*DEF* 遺伝子と *GLO* 遺伝子のヘテロダイマーと結合している (Davies *et al.*, 1996; Zachgo, 1995)。また、*AP3* 遺伝子プロモーターもしくは *PI* 遺伝子プロモーターの下流に β -glucuronidase (*GUS*) 遺伝子を融合させ、シロイヌナズナに形質転換させた場合は、花卉と雄ずいで特異的に *GUS* 活性があることが報告されている (Hill *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2000)。リンゴのクラス B 遺伝子である *MdPI* 遺伝子のプロモーターもシロイヌナズナと同様に、花卉と雄ずいで特異的に働くことが予想される。

そこで本章では、*MdPI* 遺伝子の発現を制御していると推定される *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離することを目的に、ゲノムライブラリー作成後、スクリーニングを行った。また、単離した *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析を行うことを目的に GUS と融合させた発現ベクターを作成し、これをシロイヌナズナに形質転換し、GUS 活性の発現部位を観察した。

第 1 節 *MdPI* 遺伝子プロモーターの単離とベクターの構築

1. 材料および方法

ゲノムライブラリーの作成

リンゴ研究拠点に栽植してある‘紅玉’の葉を使用した。5月に新葉を採取し、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。ゲノム DNA の抽出は改変 2×CTAB 法(Kotoda *et al.*, 2000)で行った。抽出したゲノム DNA 約 5μg を *Sau*3AI の制限酵素を用い、M バッファーと共に 37℃で 5 分間ずつ 40 分間 インキュベートし部分的に切断後、フェノール・クロロフォルム処理、エタノール沈殿後、Lambda EMBL3/*Bam*HI ベクター(Stratagene, La Jolla, CA)を用いて DNA Ligation kit ver.2.1 (Takara, Tokyo, Japan)で 26℃, 10 分間 ライゲーションを行い、Gigapack III gold packaging extract (Stratagene)で 22℃, 2 時間パッケージングしゲノムライブラリーを作成した。

スクリーニング

MdPI 遺伝子上流 cDNA を PCR により増幅した DIG でラベルしたプローブを用いてスクリーニングを行った。NZY 培地(5g/L NaCl, 2g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5g/L Bacto Yeast extract, 10g/L NZ amine, 15g/l Agar, [pH 7.5])に 1 プレートにつき 5 万プラークとなるように XL1-Blue MRA P2 コンピテント大腸菌とともに NZY top agar (NZY 培地, 0.7% [w/v] Agarose)を用いてプレート上で培養し、100 万プラークをスクリーニングに使用した。*MdPI* 遺伝子のクローンと推定されるファージを QIAGEN Lambda kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan)を用いて精製し、*Sa*II で切断後、pBluescript II SK+に DNA Ligation kit ver.2.1 (Takara)を用いて 16℃, 30 分間ライゲーションし、コンピテント大腸菌 DH5α と混合後 10 分間氷冷し 42℃で 30 秒間のヒートショックの後、SOC 培地(20g/L Bacto tryptone, 5g/L Bacto Yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 20mM MgSO₄ · 7H₂O, 20mM MgCl₂ · 6H₂O, 20mM Glucose)で 37℃, 60 分間培養を行い形質転換させた。培養液を、4% (w/v)

5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (X-gal)と 0.1M Isoprpyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)を塗布したアンピシリン添加 LB 培地に塗り広げ、37℃で 1 晩培養後、白いコロニーを選抜し、形質転換大腸菌を増殖させた。大腸菌のプラスミドは QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。コーディング領域を含んだプロモーター部分(約 4.3kb)の塩基配列は HITACHI SQ 5500 S (Hitachi, Ibaraki, Japan)オートマチックシーケンサーを用いて、ダイデオキシ法によって決定した。ヌクレオチドシーケンスは GENETYX-MAC ソフトウェアを用いて解析した。

プロモーター解析用ベクターの作成

プロモーター解析のため、*MdPI* 遺伝子プロモーターの位置に相当する ATG 転写開始点の上流 1kb, 2kb の断片を増幅するプライマーを作成した。センスプライマー(p1S:ATTCTAGATAAATTTGGAGTCCCCTTCC, p2S:ATTCTAGAGGTTCGAGGAGTGTAAGTTGC)には *Xba*I サイト, アンチセンスプライマー(ATCTCGATCTCTCAGTATTCTTGTCTCTCTATTTTCTCC)には *Xho*I サイトをつけ、LA-PCR キット(Takara)を用いて PCR を行い、それぞれの大きさの断片を増幅した。反応条件は 94℃ 1 分間, 60℃ 1 分間, 72℃ 2 分間の 25 サイクルで行った。それぞれの断片について M バッファーと BSA を加えた *Xba*I と *Xho*I で切断し、下流に GUS 遺伝子と NOS ターミネーターを融合させ、アグロバクテリウム用のベクター(pSMAK312 Blue)に DNA Ligation kit ver.2.1 (Takara)を用いて 16℃で 30 分間ライゲーションした。

3. 結 果

ゲノムライブラリーからのスクリーニングの結果、3つのクローンが得られ、スクリーニングに使用したプローブと同じ *MdPI* 遺伝子の上流域のプライマーを用いた PCR で、2つのクローンの増幅が認められた。*MdPI* 遺伝子のコーディング領域及び、プロモーター領域のシーケンスの結果、コーディング領域の配列は *MdPI* 遺伝子ゲノムと 98%の相同性が見られた。そのため、その上流域をプロモーター領域と同定した。クローニングできた *MdPI*

遺伝子コーディング領域上流の長さはおおよそ 4kb であり, *MdPI* 遺伝子プロモーターの塩基配列を Fig. 5.1 に示した. このプロモーター領域の相同性を検索した結果, 他の遺伝子プロモーターと明確な相同性は見られず, CArG box も存在しなかった. *MdPI* 遺伝子プロモーター領域は, コーディング領域の直前の -90bp 付近に TATA box が存在し, それをはさむように GA と CT の繰り返し配列が見られた. さらに *MdPI* 遺伝子プロモーター領域の場合, -310bp 付近の CAAT box の上流におおよそ 46bp の GA の繰り返し配列が見られたことが特徴的だった.

MdPI 遺伝子プロモーターのアグロバクテリウム用ベクターとして, 1kb の長さのプロモーター部分を用いた p1SMdPI::GUS と, 2kb の長さのプロモーター部分を用いた p2SMdPI::GUS の 2 種類を構築した (Fig. 5.2).

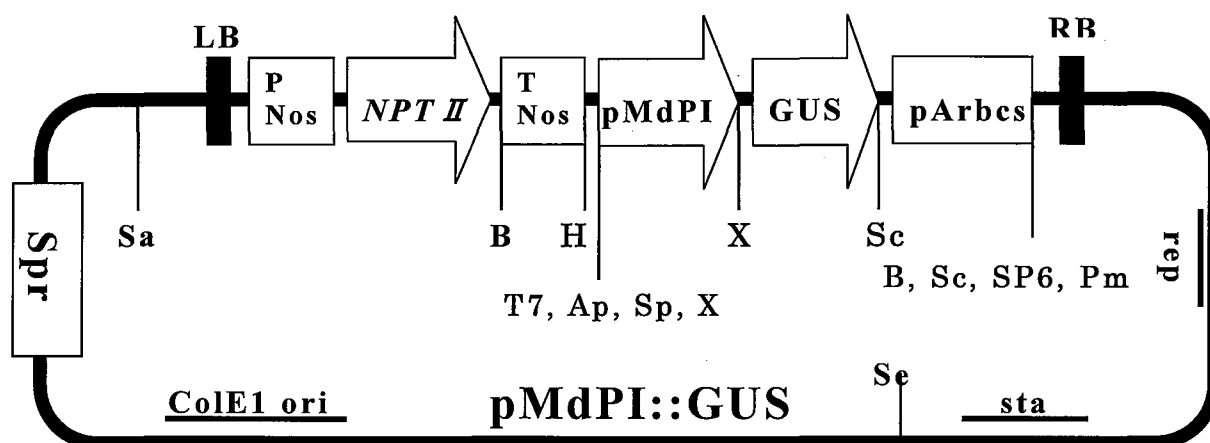


Fig. 5.2 Construct of the vector pMdPI::GUS
with *MdPI* promoter

pNos, Nos promoter; *NPTII*, neophosphotransferase; Tnos, Nos terminator; pMdPI, 1kb or 2kb length of *MdPI* gene promoter; GUS, *uidA* gene; LB, left border; RB, right border; Sa, *SaII*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; T7, T7 promoter; Ap, *Apal*; Sp, *SpeI*; X, *XbaI*; Sc, *SacI*; SP6, SP6 promoter; Pm, *PmeI*. sta, region involved in plasmid stability; rep, essential region for plasmid maintenance

第 2 節 *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析

1. 材料および方法

リンゴでの *MdPI* 遺伝子プロモーター活性の解析は困難なため、シロイヌナズナ *Columbia ecotype* (Col) を使用して Floral dip 法により形質転換を行った。第 5 章、第 1 節で作成したベクターを Freezing 法でアグロバクテリウム GV3101 に導入した。シロイヌナズナの培養や形質転換方法は第 3 章に記述の通り行った。1/2 MS, 50mg/L カナマイシン(Km), 50mg/L クラフォラン(Cla)の培地に置床し選抜を行った。

カナマイシンを含む培地上で生育できた形質転換植物の花序や花について GUS 染色を行った。GUS 染色は以下の手順で行った。サンプリングした植物体を氷冷した 90% (v/v) アセトンに浸漬し、10 分間脱気した。液を完全に取り除き、染色バッファー (10 μ M NaPO₄ [pH7.4], 500 μ g/mL 5-Bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide cyclohexylammonium salt [X-glucuronidase], 500 μ M ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム[フェリシアン化カリウム], 500 μ M ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム三水和物[フェロシアン化カリウム], 0.1% (w/v) Triton X-100) を加え 10 分間脱気した。その後、37°C で 1 晩インキュベートした。液を完全に取り除き、70% (v/v) エタノールで数回すすぎ、液を完全に取り除き 70% (v/v) エタノールを加え 1 晩インキュベートした。抱水クロラル溶液 (8g/10mL 抱水クロラル, 1mL/10mL グリセロール, 2mL/10mL 滅菌蒸留水) でマウントし、実体顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) で観察した。

2. 結 果

シロイヌナズナ Col で形質転換を行い、カナマイシンを含む培地上で選抜した。p1SMdPI::GUS 導入個体は 9 系統得られ、p2SMdPI::GUS 導入個体は 15 系統得られた。

p1SMdPI::GUS 導入系統は、生育したすべての系統で GUS 染色を行った

ところ、花弁と雄ずいのみ特異的に GUS 発現が見られた(Fig. 5.3C). また、若いステージの花でも花弁、雄ずい特異的に GUS 活性が観察できた。この結果は、クラス B 遺伝子として *MdPI* 遺伝子が花弁と雄ずい特異的に働くことを裏付け、この上流部位が花弁と雄ずいで発現がある *MdPI* 遺伝子のプロモーター活性を持つ配列を有していることが判明した。

p2SMdPI::GUS 導入系統では、生育したすべての系統で GUS 染色を行ったところ、p1SMdPI::GUS 導入系統の GUS 発現パターンとは異なり、幼植物では葉と茎頂部で GUS 活性が見られた(Fig. 5.4A). また、花序では花序全体で GUS 活性が観察できた(Fig. 5.4B). 花器官では花弁、雄ずいのみではなく、雌ずいとがくでも GUS 活性が確認でき (Fig. 5.4C), *MdPI* 遺伝子の上流部 2kb を用いた場合では、花弁と雄ずい特異的でなく、花器官や葉、茎頂部でもプロモーター活性が見られた。

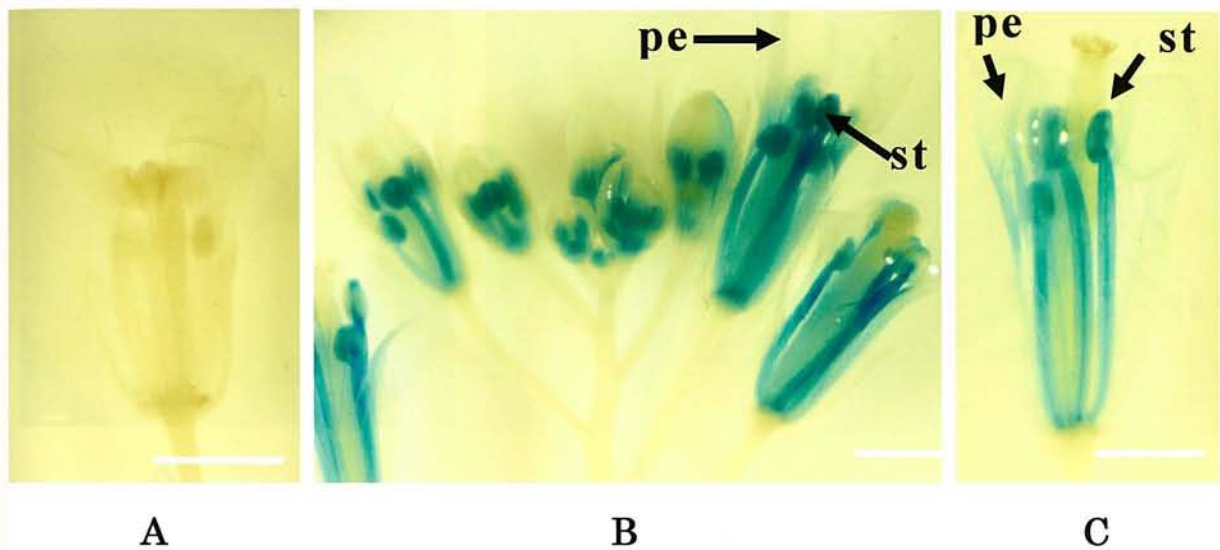


Fig. 5.3 GUS expression patterns conferred
by 1kb *MdPI* promoter

Inflorescence and flowers of *Arabidopsis* with the p1SMdPI::GUS. The transgenic plants showed GUS activity only in petals and stamens. A, Non transgenic flower (Columbia); B, p1SMdPI::GUS transformed *Arabidopsis* inflorescence; C, p1SMdPI::GUS transformed *Arabidopsis* flower. pe: petal, st: stamen. Bars = 500 μ m.

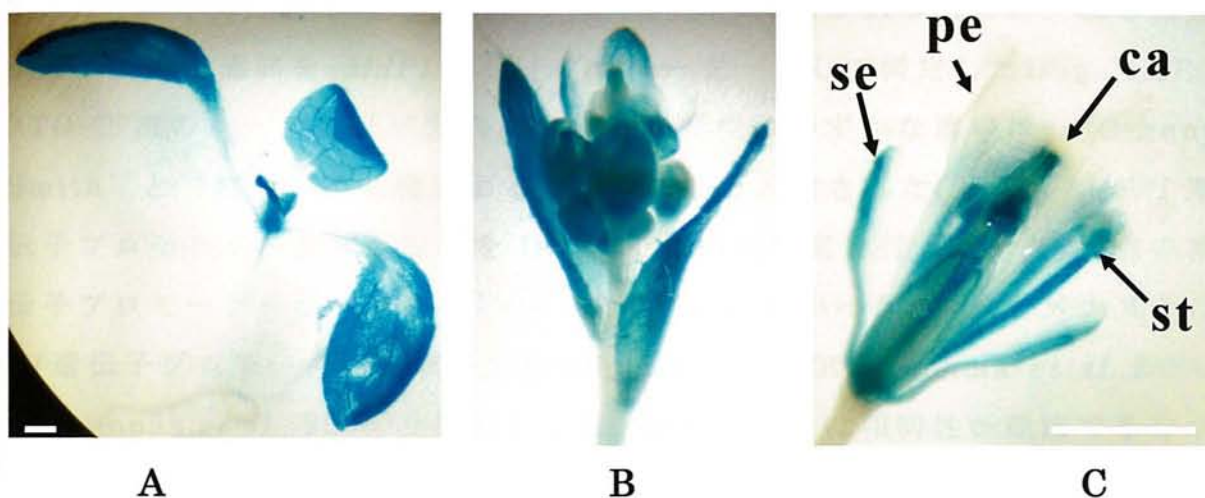


Fig. 5.4 GUS expression patterns conferred
by 2kb *MdPI* promoter

Inflorescence and flowers of *Arabidopsis* with the p2SMdPI::GUS. The transgenic plants showed GUS activity in leaves and all floral organs. A, Non transgenic flower (Columbia); B, p2SMdPI::GUS transformed *Arabidopsis* inflorescence; C, p2SMdPI::GUS transformed *Arabidopsis* flower. se, sepal; pe, petal; st, stamen; ca, carpel. Bars = 1 mm.

考 察

本章では，‘紅玉’のゲノムライブラリーから *MdPI* 遺伝子のプロモーターの単離と解析を行った．単離した *MdPI* 遺伝子プロモーター領域は ATG 下流のコーディング領域の配列が 98%の相同性を有していて，上流には TATA box や CAAT box などのプロモーターの特徴があったため，転写開始点 ATG の上流部を *MdPI* 遺伝子プロモーターとして同定した (Fig. 5.1)．ATG 下流のコーディング配列における相同性のわずかな違いは，‘Granny Smith’ と ‘紅玉’ の品種による違いであると推定された．一方，*MdPI* 遺伝子プロモーター領域の配列を DDBJ で相同性検索を行ったところ，他の遺伝子プロモーター配列との相同性は全く見られなかった．シロイヌナズナの *PI* 遺伝子プロモーター領域の配列 (Chen *et al.*, 2000; Honma *et al.*, 2000; Länneppää *et al.*, 2005) と比較しても，配列自体には相同性が確認できなかった．*MdPI* 遺伝子プロモーター領域の塩基配列を見てみると，コーディング領域の -90bp 付近に TATA box が存在し，それをはさむように GA と CT の繰り返し配列が見られた．さらに *MdPI* プロモーター領域の場合，-310bp 付近の CAAT box の上流 -370bp 付近におよそ 46bp の GA のマイクロサテライト様の繰り返し配列が見られたことが特徴的だった．シロイヌナズナの *PI* 遺伝子プロモーター配列には転写開始点 ATG の直前に GA の，TATA box をはさむように CT の数塩基の繰り返し配列が見られたため，*MdPI* 遺伝子プロモーターとは塩基配列に相同性はなくとも類似性が認められた．この配列の存在によって互いに対合し，RNA ポリメラーゼが結合するためのループ構造をとっている可能性が考えられた．

p1SMdPI::GUS と p2SMdPI::GUS を組み込んだシロイヌナズナ (Col) の形質転換体をカナマイシンで選抜した．p1SMdPI::GUS 導入系統は，花卉と雄ずいのみで GUS 発現が見られ，クラス B 遺伝子として *MdPI* 遺伝子が働くことを裏付け，この上流部位が *MdPI* 遺伝子のプロモーター活性を持つことが判明した (Fig. 5.3)．この結果は，シロイヌナズナの *PI* 遺伝子プロモーターに GUS を融合させ，形質転換させた個体のものと一致していた (Honma and Goto, 2000; McGonigle *et al.*, 1996)．しかし，p2SMdPI::GUS 導入系

統は、葉と花器官全体および茎頂部で GUS 発現が見られた (Fig. 5.4). これは、*MdPI* 遺伝子プロモーターの 1kb と 2kb の間に花卉と雄ずいのみならず、花器官すべてと葉、茎頂部で発現を促す配列が存在することが原因と考えられた。すなわち、*MdPI* 遺伝子プロモーターの 1kb-2kb 間の配列はエンハンサーとして働いている可能性があり、通常はリンゴのゲノム中にある配列が 1kb と 2kb の間の活性を打ち消していると考えられた。第 4 章で示した RNA ブロット解析と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果と本章のプロモーター解析の結果から、*MdPI* 遺伝子は花卉と雄ずいの形成に重要な役割をしており、花卉と雄ずい特異的に発現し、機能していることが明らかとなった。

現在、アグロバクテリウム法を用いた形質転換体の選抜には一般的にカナマイシンが使用されている。最近、この形質転換体の選抜に、酵母の *DAO1* 遺伝子を用いる方法がシロイヌナズナで報告された (Erikson *et al.*, 2004; Scheid, 2004)。これは、野生型植物は通常 D 型アミノ酸の D-セリンもしくは D-アラニン代謝できず、D-イソロイシンもしくは D-バリンは代謝できることを利用している。*DAO1* 遺伝子を導入した形質転換体は、D-セリンもしくは D-アラニンを代謝できる形質を付与されるが、逆に別の D 型アミノ酸の D-イソロイシンもしくは D-バリンを代謝できなくなる。また、培地中に含ませるだけでなく、成育した植物体に散布することでも効果が得られるとされている。人間をはじめとして動物は L 型アミノ酸と D 型アミノ酸の両方を代謝できるので、抗生物質抵抗性や除草剤抵抗性などと比較して、安全に使用できると考えられる。そこで、*DAO1* 遺伝子と 1kb の *MdPI* 遺伝子プロモーターとを融合させた形質転換体を作出した場合、*MdPI* 遺伝子プロモーター発現時期に D 型アミノ酸処理を行うことにより花卉や雄ずいが消失する可能性が考えられる。その場合に、リンゴの形質転換体の果実が単為結実性を示すかを検討することは非常に興味深い。また、単為結実性と花器官のホメオティック変異が同時に示されれば、花卉ががくに変化することと、雄ずいが雌ずいと胚珠に変化することが単為結実性を与えている根拠となる可能性がある。現在、シロイヌナズナでの形質転換体を作成したため、D 型アミノ酸の花弁もしくは雄ずいへの影響を調査中である。果樹に特有のプロモーターを用いて果樹に特有の事象の発現解析を行うことは、果樹研究

の発展につながると考えられる。

摘 要

本章では、*MdPI* 遺伝子の発現を制御していると推定される *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離することを目的に、ゲノムライブラリー作成後、スクリーニングを行った。また、単離した *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析を行うことを目的に GUS と融合させた発現ベクターを作成し、これをシロイヌナズナに形質転換し、GUS 活性を観察した。

(1) ‘紅玉’ から作成したゲノムライブラリーを使用したスクリーニングにより *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離した。*MdPI* 遺伝子のコード領域はデータベース上に報告のある配列と 98% の相同性が見られたことから、その上流域を *MdPI* 遺伝子プロモーターと断定した。

(2) *MdPI* 遺伝子プロモーターに GUS 遺伝子を融合させ、シロイヌナズナで機能解析を行った。*MdPI* 遺伝子のコード開始点 ATG より上流 1kb の *MdPI* 遺伝子プロモーターを用いた形質転換シロイヌナズナの花器官を GUS 染色したところ、花弁と雄ずいで GUS 活性が見られた。*MdPI* 遺伝子のコード開始点 ATG より上流 2kb の *MdPI* 遺伝子プロモーターでは葉、茎頂部および花器官すべてで GUS 活性が見られたことから、*MdPI* 遺伝子の上流 1kb が重要な働きをしていることが示された。

第 6 章 リンゴにおける形質転換体作出

1. 緒 言

リンゴは開花から結実までの幼若期間が長く、ほとんどの品種が自家不和合性を有しているため、雑種性が強く計画的育種が難しい。しかし、近年遺伝子工学的手法が進歩したことにより、形質転換技術を用いた育種が可能になってきている。形質転換技術は品種の遺伝子構成を変えることなく有用形質遺伝子の組み込めるため、育種年限の大幅な短縮のみならず、交雑育種では不可能な異種の生物から耐病虫性といった有用形質の導入も可能となる。リンゴではアンチセンス *MdTFL1* 遺伝子を導入することにより幼若期間を大幅に短縮させ、早咲きとなった系統の作出に成功している (Kotoda *et al.*, 2006)。このように、アンチセンス導入による遺伝子発現の抑制は有用形質の導入のみならず、リンゴの育種を行う上でも重要となる。また、センス *MdTFL1* 遺伝子を導入したリンゴの形質転換体では、コサプレッションにより早期開花を誘導した報告もある (古藤田ら 2005)。

リンゴにおける遺伝子組換え技術は、シロイヌナズナやタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) などと比較すると非常に困難である。遺伝子組換えにはアグロバクテリウム法、エレクトロポーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が用いられるが、アグロバクテリウム法は遺伝子が染色体に組み込まれることで導入形質が後代に受け継がれ易いため、現在様々な植物種で形質転換の主流となっている。しかし、リンゴにおける形質転換では葉切片からの直接再分化が困難なことや、アグロバクテリウムの感染から除菌の操作でシュート再分化が著しく低下することなど問題が多く (辻村ら 2004)、海外での形質転換効率はシュート再分化しやすい品種を用いた場合でも 2~3% 程度である (Bolar *et al.*, 1999)。

この形質転換技術は有用遺伝子の付与による実用品種の開発という産業的な側面だけでなく、遺伝子の機能解析や植物の生理生殖的特性の解明を目的とした研究面でも不可欠な技術である。目的とした遺伝子、特にリンゴ特有の遺伝子の機能を正確に知るにはリンゴでの表現型の変化を見ることが

重要である。第 3 章や第 5 章ではシロイヌナズナを用いて *MdPI* 遺伝子の機能解析を行なったが、果実形質や永年性に関する遺伝子の機能解析は、アブラナ科のシロイヌナズナにバラ科のリンゴ遺伝子を形質転換体する方法では解析できない可能性がある。

そこで本章では、リンゴでの *MdPI* 遺伝子抑制あるいはプロモーター解析を行うことを目的に、リンゴの台木品種 ‘JM2’ を用いて形質転換を行い、同時に早期開花させることができるアンチセンス *MdTFL1* 遺伝子(A/MTF) (Kotoda *et al.*, 2006)を同時に導入することにより早期開花を引き起こし花器官への影響と、遺伝子導入の確認と導入遺伝子発現について調査を行った。

2. 材料および方法

形質転換体の作成

リンゴの形質転換にはリンゴ研究拠点で継代培養している ‘JM2’ を使用した。導入遺伝子には、CaMV35S プロモーターに融合させたアンチセンス *MdPI*を組み込んだ p35S::anti *MdPI* A/MTF, CaMV35S プロモーターに融合させた RNAi (RNA 干渉)を引き起こすように *MdPI*遺伝子が *AFL1* 遺伝子の第 1 イントロンをはさむように構築した p35S::±*MdPI* A/MTF および第 5 章、第 1 節で作成した p1SMdPI::GUS A/MTF と p2SMdPI::GUS A/MTF を使用した。それぞれのベクターには早期開花を引き起こすことができると報告のある 35S プロモーターに連結させた A/MTF を同時に導入した。これらのクローニングされているアグロバクテリウム用ベクターを Freezing 法によりアグロバクテリウム LBA4404 に導入した。

アグロバクテリウムの感染法は高橋ら(2004)の方法に従った。

カナマイシン 50mg/L を含む MS 培地上で生育したシュートをアグロバクテリウムの除菌を確認後、MS 発根培地に移植し順化させた。順化後のシュートをポットに移植し、隔離温室 20℃で生育させた。それぞれの写真はデジタルカメラ (SONY, Tokyo, Japan)を用いて撮影を行った。

DNA プロット解析

形質転換した‘JM2’を発根処理後、ポットに移植して順化した(p35S::anti *MdPIA*/MTF 8 系統, p35S:: \pm *MdPIA*/MTF 2 系統, p1SMdPI::GUS A/MTF 6 系統, p2SMdPI::GUS A/MTF 4 系統). それらの葉から第 2 章で示した改変 2 \times CTAB 法(Kotoda et al., 2000)により DNA を抽出した. メンブレンへのプロットから, ハイブリダイゼーション, 検出は第 2 章の方法と同様に行った. 使用したプローブは第 2 章で使用した *MdPI* 遺伝子特異的プローブ, もしくは GUS 特異的プローブである. GUS 特異的プローブの合成は, GUS 遺伝子がクローニングされているプラスミドを鋳型に, プライマーにはセンスプライマー 5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC-3' とアンチセンスプライマー 5'-AATAACATACGGCGTGACATCGG-3' を使用し, PCR は第 2 章で記述した方法と同様に行った.

RT-PCR による発現解析

上述の植物体から改変 2 \times CTAB 法(Kotoda et al., 2000)により RNA を抽出した. RT 反応は RT-PCR high (Toyobo, Tokyo, Japan)を用いて RNA を逆転写反応させ, cDNA を合成した. PCR 反応は *MdPI* 遺伝子特異的プライマー(センスプライマー 5'-ATGGGACGTGGGAAGGTTGAG-3' とアンチセンスプライマー 5'-GATCAAGCAGCAAAGCATCCG-3'), もしくは *MdTFL1* 遺伝子特異的プライマー(センスプライマー 5'-CTCTTAAAATGAAAAGAGC C-3' とアンチセンスプライマー 5'-TTCTCACATGTCAATAAGTT-3'), PCR バッファー(10mM Tris-HCl [pH8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% [w/v] Gelatin), 200 μ M dNTP mix, 1mM MgSO₄, KOD-plus polymerase (Toyobo)を用いて PCR で増幅した. PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C 3 分間のホットスタート後, 94 $^{\circ}$ C 30 秒間, 50 $^{\circ}$ C 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C 90 秒間の 30 サイクルで行った. PCR 産物は 1.5% (w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後, EtBr で染色を行い, ゲルプリンター GP-2000i (Taitec, Nagoya, Japan)で写真を撮影した.

3. 結 果

p35S::anti *MdPI* A/MTF (Fig. 6.1), p1SMdPI::GUS A/MTF (Fig. 6.2), p2SMdPI::GUS A/MTF (Fig. 6.2), p35S:: \pm *MdPI* A/MTF (Fig. 6.3)を構築し、バイナリーベクターに組み込んだ。これらのベクターをアグロバクテリウム LBA4404 に組み込み、‘JM2’ に形質転換した。p35S::anti *MdPI* A/MTF で 8 系統, p1SMdPI::GUS A/MTF で 6 系統, p2SMdPI::GUS A/MTF で 4 系統, p35S:: \pm *MdPI* A/MTF で 2 系統の形質転換体を得られた (Fig. 6.4A)。これらのシュートを増殖 (Fig. 6.4B), 順化させた後 (Fig. 6.4C), ポットへ移植した (Fig. 6.4D)。

順化後の植物体の葉から DNA および RNA を抽出し、DNA ブロット解析と RT-PCR をそれぞれ行った。DNA ブロット解析では、p35S::anti *MdPI* A/MTF の 8 系統は *MdPI* 遺伝子特異的プローブを使用して行った。これら 8 系統では、本来の *MdPI* 遺伝子のバンド以外にもバンドが確認され、系統 2, 4 では 2 本以上のバンドと共に濃く検出されたことから、アンチセンス *MdPI* 遺伝子が 2 つ以上導入され、その他の系統では 1 つ導入されていることが確認できた (Fig. 6.5)。p1SMdPI::GUS A/MTF 6 系統, p2SMdPI::GUS A/MTF 4 系統では GUS 特異的プローブを使用して行った。p1SMdPI::GUS A/MTF の 1~3 系統ではバンドが検出されたが、4~6 系統ではバンドが検出されなかった (Fig. 6.6)。p2SMdPI::GUS A/MTF の 4 系統ではバンドが検出された (Fig. 6.6)。したがって、バンドが検出された系統ではゲノム DNA に目的とする遺伝子が導入されていることが確認できた。

導入遺伝子の発現を確認するため RT-PCR を行った。p35S::anti *MdPI* A/MTF は *MdPI* 遺伝子特異的プライマーを使用し、その他は *MdTFL1* 遺伝子特異的プライマーを使用した。それぞれの RT-PCR の結果、p35S::anti *MdPI* A/MTF の 8 系統ではすべての系統で *MdPI* 遺伝子の約 870bp のバンドの増幅が確認できた (Fig. 6.7)。その他の系統では、*MdTFL1* 遺伝子の約 550bp のバンドの増幅が確認できた (Fig. 6.8)。したがって、本章で獲得できた形質転換体では導入遺伝子が発現していることが確認できた。

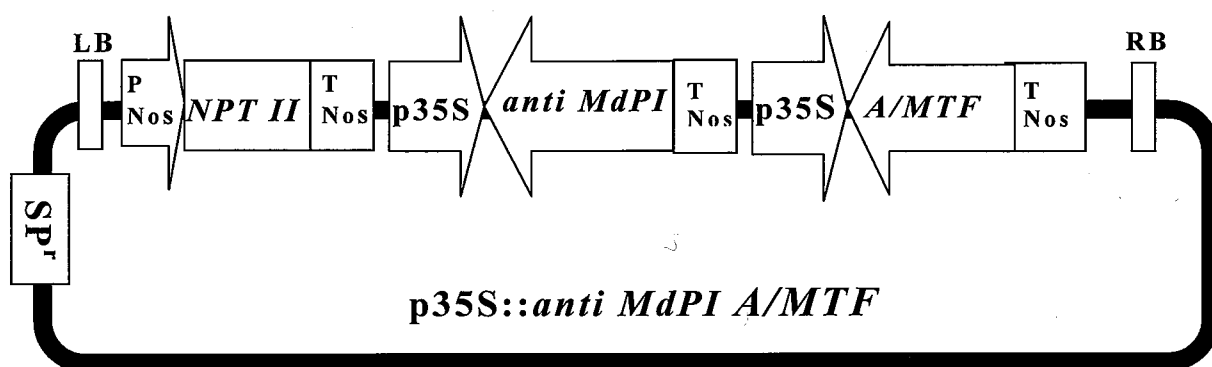


Fig. 6.1 Construct of the vector p35S::*anti MdPI A/MTF*

PNos, Nos promoter; *NPTII*, neophosphotransferase; TNos, Nos terminator; p35S, cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *anti MdPI*, antisense *MdPI* gene; *A/MTF*, antisense *MdTFL1* gene; LB, left border; RB, right border; SP^r, streptomycin resistance gene.

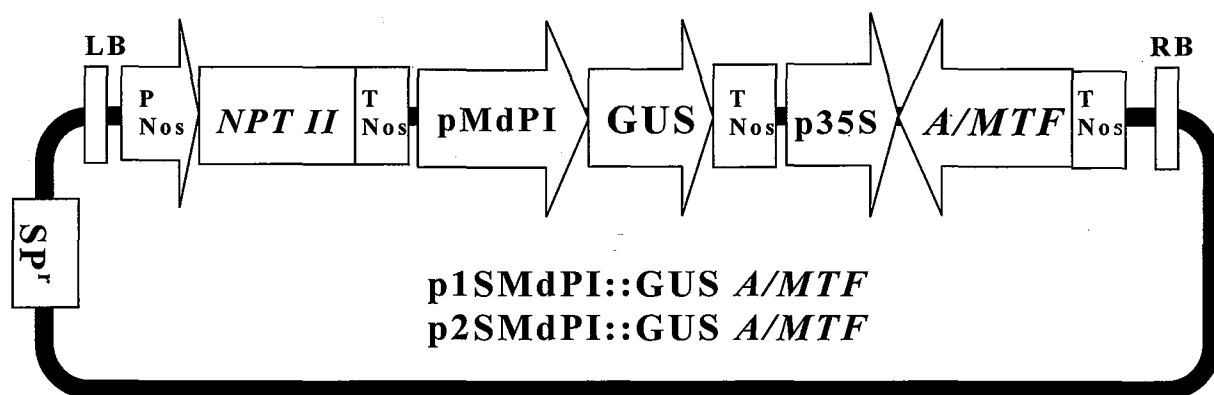


Fig. 6.2 Construct of the vector p1SMdPI::GUS *A/MTF* and p2SMdPI::GUS *A/MTF*

PNos, Nos promoter; *NPTII*, neophosphotransferase; TNos, Nos terminator; pMdPI, 1kb or 2kb length of *MdPI* gene promoter; GUS, *uidA* gene (β -glucuronidase; p35S, cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *A/MTF*, antisense *MdTFL1* gene; LB, left border; RB, right border; SPr, streptomycin resistance gene.

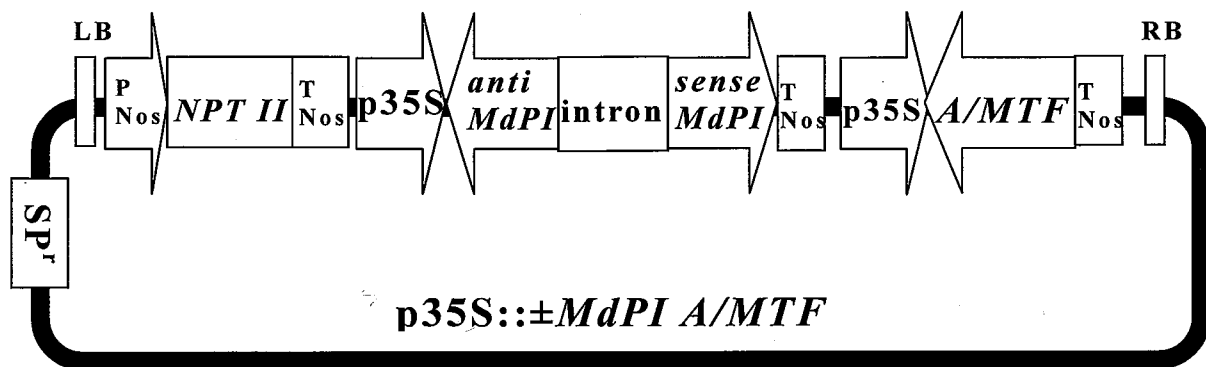


Fig. 6.3 Construct of the vector p35S::±*MdPI A/MTF*

PNos, Nos promoter; *NPTII*, neophosphotransferase; TNos, Nos terminator; p35S, cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *anti MdPI*, antisense *MdPI* gene; intron, *AFL1* first intron; *sense MdPI*, sense *MdPI* gene; *A/MTF*, antisense *MdTFL1* gene; LB, left border; RB, right border; SP^r, streptomycin resistance gene.



A



B



C



D

Fig. 6.4 Procedure the transformation plants acquisition

A, Shoot regeneration; B, Shoot propagation;

C, Shoot acclimatization; D, Transplantation to the pot

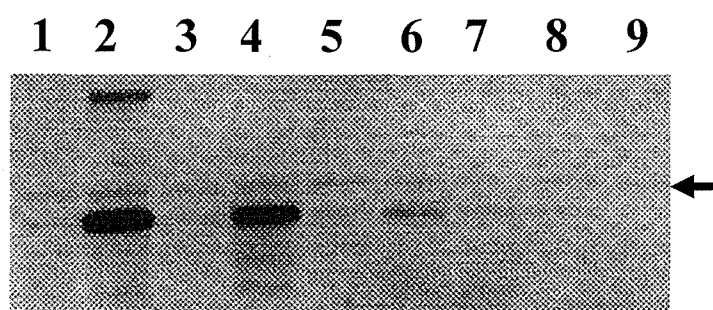


Fig. 6.5 DNA blot analysis using *MdPI* probe

Lines 1 to 8, 35S::anti MdPI A/MTF lines 1 to 8; Lane 9, 'JM2'
 Arrow, original *MdPI* gene

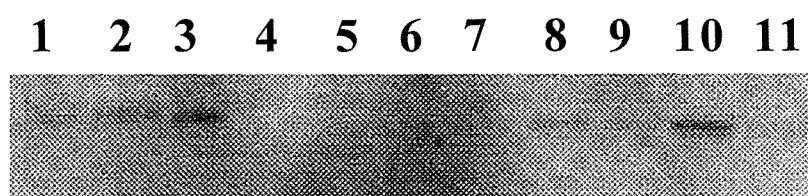


Fig. 6.6 DNA blot analysis using GUS probe

Lines 1 to 6, p1SMdPI::GUS A/MTF lines 1 to 6; Lane 7, 'JM2';
Lines 8 to 11, p2SMdPI::GUS A/MTF lines 1 to 4.



Fig. 6.7 Expression analysis of the antisense
MdPI gene by RT-PCR

Lanes 1 to 8, 35S::anti MdPI A/MTF lines 1 to 8; Lane 9, 'JM2'

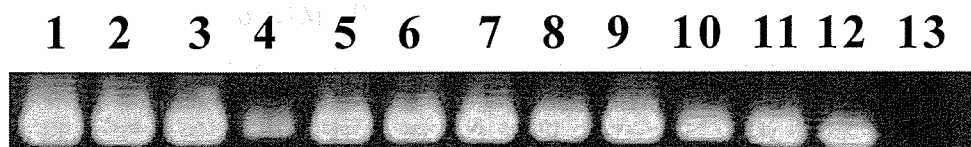


Fig. 6.8 Expression analysis of the antisense
MdTFL1 genes by RT-PCR

Lanes 1 to 6, p1SMdPI::GUS A/MTF lines 1 to 6

Lanes 7 to 10, p2SMdPI::GUS A/MTF lines 1 to 4

Lines 11 and 12, 35S:: \pm MdPI A/MTF lines 1 and 2

4. 考 察

リンゴの台木品種‘JM2’に、発現抑制用アンチセンス *MdPI* 遺伝子(Fig. 6.1), ジーンサイレンシング *MdPI* 遺伝子(Fig. 6.2), プロモーター解析用の 1kb と 2kb の長さの *MdPI* 遺伝子プロモーターに GUS を融合させた(Fig. 6.3)コンストラクトを導入した. アグロバクテリウム法により形質転換を行い, カナマイシンを含む選抜培地上で生育したシュートを得ることができた. これらの形質転換シュートを発根させ, 順化後, ポットへ移植した. ポットへ移植したシュートの p35S::anti *MdPI* A/MTF の 8 系統, p1SMdPI::GUS A/MTF 6 系統および p2SMdPI::GUS A/MTF 4 系統は DNA ブロット解析で導入コピー数の確認を行った. p35S::anti *MdPI* A/MTF の系統 2, 4 はバンドが 2 本以上で濃く検出されたため, 2 つ以上のコピー数を持っており, その他の系統は 1 本のバンドが検出されたことから 1 つのコピーを持っていると判明した(Fig. 6.5). p1SMdPI::GUS A/MTF の 4~6 系統ではバンドの確認ができなかった(Fig. 6.6). p2SMdPI::GUS A/MTF の 4 系統では 1 本のバンドの確認ができ, シングルコピーだった(Fig. 6.6). バンドが確認できなかった系統は電気泳動に用いたゲノム DNA の量が少なかったか, あるいはゲルの塩酸処理が不十分で DNA が分解されず, メンブレン上にうまくブロットできなかったと考えられた. p35S:: \pm *MdPI* A/MTF の系統はゲノム DNA の制限酵素処理で DNA を切断することができなかったため, DNA ブロット解析を行うことができなかった.

また, これらの系統での導入遺伝子の発現確認は RT-PCR を用いて行った. ポットへ移植したすべての系統で遺伝子が増幅されたため, 発現が確認された(Fig. 6.7 and 6.8). *MdPI* 遺伝子は第 4 章, 第 1 節と第 2 節の結果から花弁と雄ずいで発現していて, 葉では発現がない. 葉から抽出した RNA で行った RT-PCR ではアンチセンス *MdPI* の発現が確認でき, 内生の *MdPI* 遺伝子は検出されなかった. したがって, これらの系統ではすべてアンチセンス *MdPI* 遺伝子の発現があるため, *MdPI* 遺伝子の発現抑制を受けていると考えられた. *MdPI* 遺伝子プロモーターを用いた発現解析は第 5 章の形質転換シロイヌナズナのように花が咲かなければ GUS 遺伝子の活性を検出できな

い。葉から抽出した RNA による RT-PCR で確認することはできないため、共導入した A/MTF の検出を行った。遺伝子の増幅が確認できたことと、カナマイシンで生存できたことから、pMdPI::GUS の部分も同時にゲノム中に組み込まれていると考えられた。p35S::±*MdPI* A/MTF の系統も同様に、二重鎖の *MdPI* 遺伝子 RNA の検出が難しいため、A/MTF の検出を行い、遺伝子の増幅が確認できたことと、カナマイシンで生存できたことから形質転換できていると考えられた。

MdPI 遺伝子はリンゴのクラス B 遺伝子で、第 4 章、第 1 節と第 2 節の結果から花弁と雄ずいで特異的に発現していることが確認できている。*MdPI* 遺伝子プロモーターの働きもシロイヌナズナでは花弁と雄ずいで機能していることが第 5 章、第 2 節の結果から判明している。*MdPI* 遺伝子のアンチセンス抑制、ジーンサイレンシング、および *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能についてリンゴでの調査は必要不可欠であるが、通常のリンゴ品種において、*MdPI* 遺伝子をノックダウンさせた系統の花の表現型と、それらの系統の単為結実性の有無を確認、プロモーターの機能解析等を行うには開花するまで調査ができない。そこで、これらの形質転換体を早期開花させ、機能解析することを目的にアンチセンス *MdTFL1* 遺伝子を共導入した。リンゴで接木後、最短 8 ヶ月で早期開花する方法である (Kotoda *et al.*, 2006) が、本章で作成した系統はポットへ移植後 20 ヶ月経過しても開花に至っていない。Kotoda *et al.* (2006) の用いた形質転換体の品種は ‘王林’ であるが、本実験で用いた品種は台木品種なので形質転換が容易とされる ‘JM2’ である (高橋ら 2004) ことから、開花に至るには品種間に差があると考えられた。仮にこれらの形質転換体が開花した場合、*MdPI* 遺伝子の発現抑制個体は花弁と雄ずいが欠如し、単為結実性を有しているかどうか興味深い。また、*MdPI* 遺伝子プロモーターを使用した GUS 活性が第 4 章、第 2 節のように花床内にある雄ずいの維管束でも発現が見られるのか興味深い。これらの形質転換体において *MdPI* 遺伝子の働きを調査することで、単為結実性との関係をより明らかにできると考えられる。リンゴの台木を使用することで、遺伝子のサイレンシングや発現抑制が穂木を接いだ場合に受け継がせることも考えていたが、開花に至らなかったため、行うことはできなかった。今後、本章

で作成した形質転換体について開花後の表現型解析や、GUS 染色によりリンゴにおける *MdPI* 遺伝子の影響を調査する必要がある。

5. 摘 要

リンゴでの *MdPI* 遺伝子抑制あるいはプロモーター解析を行うことを目的に、リンゴの台木品種 ‘JM2’ を用いて形質転換を行った。 *MdPI* 遺伝子等とアンチセンス *MdTFL1* 遺伝子を同時に導入することにより、早期開花を誘導し短期間で花器官への影響を確認する方法を試みた。

リンゴでの *MdPI* 遺伝子の発現解析を行うために、リンゴ台木品種の ‘JM2’ での形質転換体作出を試みた。その結果、カナマイシンを含む選抜培地で生育したシュートを得ることができた。35S::anti *MdPI* A/MTF を導入した個体は 8 系統、p1SMdPI::GUS A/MTF を導入した個体は 6 系統、p2SMdPI::GUS A/MTF を導入した個体は 4 系統、35S::±*MdPI* A/MTF を導入した個体は 2 系統獲得することができ、順化後ポットで生育させている。

順化後ポットで生育させている形質転換系統について導入遺伝子の確認を行った。DNA プロット解析の結果では、p1SMdPI::GUS A/MTF の 3 系統について確認ができなかった。RNA への転写を RT-PCR を用いて調査した結果、順化させてポットで生育させている系統すべてで、導入遺伝子の転写を確認した。

総 合 考 察

リンゴには花弁ががくに、雄ずいが雌ずいに変化する花器官のホメオティックな形態変異を伴い、受精せずに単為結実する品種がいくつか存在する。これらの品種における変異の原因は、シロイヌナズナなどの ABC モデルで説明されるクラス B 遺伝子のひとつである *PI* 遺伝子のリンゴのホモログである *MdPI* 遺伝子にある。この *MdPI* 遺伝子のゲノム中に、長い末端同方向反復配列(LTR)を持つおよそ 10kb ほどのレトロトランスポゾン様の配列が挿入されていることで発現抑制が引き起こされている(Yao *et al.*, 2001)。

リンゴでは、これらの形態異常を示す品種は単為結実性を有することが知られているが、シロイヌナズナではクラス B 遺伝子の変異と単為結実性との関係は認められていない。リンゴは子房下位花で、花床と子房が癒合した花器官を有している。*MdPI* 遺伝子変異でがくと雌ずいが多重に形成されることと、単為結実性との間には関連があると推察される。したがって、*MdPI* 遺伝子の変異が引き金となり単為結実性を誘導していることが強く示唆されるが、*MdPI* 遺伝子変異することにより、どのようなメカニズムで単為結実性を誘導するのかは明らかになっていない。また、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は、わが国ではリンゴ研究拠点に保存されている 4 品種のみで、ほとんど研究が行われていない。果実の肥大にはジベレリン等の植物ホルモンの影響や、*MdPI* 遺伝子と相互作用する遺伝子の働きが変化することによる影響などが考えられる。そこで、本研究では単為結実性の引き金となる *MdPI* 遺伝子の分子生物学的なメカニズムの調査、組織での発現調査、機能解析を目的に実験を行った。

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種について無受粉による単為結実能力と、人工受粉による種子形成能力とそれに伴う果実の発達を調査した。本来ある器官が別の器官に置き換わることをホメオティック変異というが、雄ずいが雌ずいに置き換わった部位は、胚珠が正常に形成され、本来の果芯部のみならず雄ずいが変化した雌ずい部でも受精すると種子が正常に形成されることが明らかとなった。クラス B 遺伝子変異品種は無受粉では多数の花が落果するにもかかわらず、無種子で結実・肥大する果実が調査した 4 品種すべて

で認められたことから、クラス B 遺伝子変異品種はいずれも単為結実性を有することが確認できた。受粉操作は種子形成を促進し、種子が形成される部位が通常品種よりも多いため(中心部、ていあ部)、20 個以上形成される個体があった。種子の形成と果実重の関係を調査したところ、‘Wickson’の単為結実能力は‘Noblow’と‘Spencer Seedless’より高いことが推察され、クラス B 遺伝子変異品種間で単為結実性に品種間差があることが明らかになった。ただし、これらについては供試樹が品種保存樹のため、通常の栽培樹のような管理がされておらず、樹勢や着果量の影響も考えられることから、より適正な樹での反復試験が必要である。リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の交配実験では、雄ずいが雌ずいに置き換わったていあ部のいくつかの子室に種子が形成されていた。一般品種のリンゴの種子は、花柱下部で五裂している雌ずいのうち 4 本を切除し、1 本のみを残して受粉させた場合でも、雌ずいが下部で融合しているため 1 つの子室だけでなく 5 子室に種子が形成される(Sheffield *et al.*, 2005)。リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は、本来の 5 裂した 1 本の雌ずいに加えて 20 本の雄ずいが 10 本の雌ずいに変化しており、10 の子室が形成されていたことから、10 本の雌ずいに対応して 10 の子室が別々に形成されていると推察される。どのような機構でこのような花器官形成をしているのか明らかではないが、*MdPI* 遺伝子の変異により本来 20 本の雄ずい部位に半数の 10 本の雌ずいが形成されることも単為結実性に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

レトロトランスポゾン様配列の挿入により *MdPI* 遺伝子の発現抑制が報告されているクラス B 遺伝子変異品種の‘Spencer Seedless’や‘Wellington Bloomless’(Yao *et al.*, 2001)以外の‘Noblow’、‘Wickson’について、クラス B 遺伝子変異の要因を調査した。リンゴのクラス B 遺伝子変異品種におけるレトロトランスポゾン様配列の挿入は‘Rae Ime’ではイントロン 4 に、‘Spencer Seedless’、‘Wellington Bloomless’ではイントロン 6 にあるという報告があるため、異なるバックグラウンドで変異が引き起こされていると考えられる。‘Rae Ime’を除くクラス B 遺伝子変異 4 品種は DNA ブロット解析により、これらの品種すべてで同一の部位にレトロトランスポゾン様配列が挿入されていることが推定できた。また、*MdPI* 遺伝子ゲノム

の LA-PCR 産物の制限酵素処理を行い、すべて同じバンドパターンを示したことから同じレトロトランスポゾン様配列が挿入されていることが推察された。これらの結果により、レトロトランスポゾン様配列の挿入がある *MdPI* 遺伝子をホモに持つことで発現抑制されていることが示され、パターンが同一なこれら 4 品種は同じ祖先から発生した可能性が高いことが示唆された。

リンゴでは機能解析のための形質転換は難しく、開花までの期間も長いいため、形質転換が容易で開花までの期間が短いシロイヌナズナで、リンゴから単離した遺伝子の機能解析を行った。リンゴでのクラス B 遺伝子変異の要因となっている *MdPI* 遺伝子の機能について、CaMV35S プロモーターを使用した野生型のシロイヌナズナ(Col)の形質転換を行った。続いて、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体(*pi-1*)を用いた *MdPI* 遺伝子の導入による相補実験を行い、表現型の回復による *MdPI* 遺伝子の機能を調査した。その結果、花弁と雄ずいの花糸の回復を確認したが、葯と花粉の回復は見られなかった。シロイヌナズナの *pi-1* に *PI* 遺伝子を導入した場合でも、今回の表現型回復実験と同様に葯の形成と花粉の形成は確認されていない(Lamb and Irish, 2003)。近年、4 つの *SEPALLATA1, 2, 3, 4* (*SEP1, 2, 3, 4*) 遺伝子(Ditta *et al.*, 2004; Pelaz *et al.*, 2000)と ABC 遺伝子が相互作用するカルテットモデルが報告されていて(Theissen, 2001; Theissen and Saedler, 2001), *SEP* 遺伝子は *SHATTERPROOF1, 2* (*SHP1, 2*) 遺伝子と *SEEDSTICK* (*STK*) 遺伝子とも相互作用し胚珠を形成することが報告されている(Favaro *et al.*, 2003)。これらの相互作用する遺伝子が新たに見つかったことから、現在では ABC+DE モデルが考えられている。このクラス ABC+DE 遺伝子によるカルテットモデルでシロイヌナズナの *MdPI* 遺伝子による相補実験について説明を試みるならば、過剰発現させた *MdPI* 遺伝子と *AP3* 遺伝子、*AG* 遺伝子および *SEP* 遺伝子との相互作用がうまく働かないために雄ずいの不完全な回復が起こったと考えられた。これは *AP1* 遺伝子、*AP3* 遺伝子および *SEP* 遺伝子の相互作用により形成される花弁が回復していることから、雄ずいが完全に回復しなかった原因は *AG* 遺伝子との相互作用に問題があると推察された。その他に、クラス B 遺伝子の制御や whorl のパターン決定に関わるとされている *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) 遺伝子(Levin and Meyerowitz,

1995)の働き、雄性器官を多数形成し、細い雌ずいを形成させる *SUPERMAN* (*SUP*)遺伝子(Bowman *et al.*, 1992)の働きが何らかの影響を与えていると考えられた。

‘紅玉’の花器官を用いて、*MdPI* 遺伝子 RNA プローブを使用した RNA ブロット解析を行った結果では、花卉と雄ずいで特異的な発現が見られたが、子房を含む花床部でもわずかな発現が見られた。同じく‘紅玉’の花器官を用いて、*MdMADS5* 遺伝子 RNA プローブを使用した RNA ブロット解析を行った場合、がくおよび花柱、子房を含む花床部で発現が見られた。また、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種‘Spencer Seedless’の花器官を用いて *MdMADS5* 遺伝子特異的プライマーを使用した RT-PCR を行った結果、通常のがく(外がく)と花卉が変化したがく(内がく)と子房を含む花床部で発現が確認された。‘紅玉’の *MdPI* 遺伝子発現開始から開花直前までの花芽を使用し、*MdPI* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、花卉と雄ずいで特異的な発現が観察されたが、花床部内の雄ずい維管束でも発現が見られた。この結果は RNA ブロット解析の花床部でわずかな発現が見られた結果と一致した。‘紅玉’の花床部内の雄ずい維管束で RNA の発現が見られたことから推察して、クラス B 遺伝子変異品種はホメオティック変異により、本来雄ずい維管束が形成されるべき花床の該当部に多数の胚珠が形成されていると考えられる。このことが単為結実性と関係があると推察された。*MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した‘紅玉’の花芽の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、がくとがくから続いている花床部から花柄までの外側の細胞で発現が観察された。これは *MdMADS5* 遺伝子のアンチセンスプローブを使用した RNA ブロット解析の結果と一致した。また、*MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した‘Spencer Seedless’の花芽の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、花卉が変化したがく(内がく)で発現が見られた他は、‘紅玉’の発現部位と一致していた。この結果も *MdMADS5* 遺伝子プライマーを使用した RT-PCR の結果と一致した。*MdMADS5* 遺伝子は果実の肥大に影響を及ぼしていることが推察されたが、単為結実性との関係は明らかにはならなかった。

‘紅玉’から作成したゲノムライブラリーを使用したスクリーニングにより *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離した。*MdPI* 遺伝子のコード領域はデータベース上に報告のある配列と 98%の相同性が見られたことから、その上流域を *MdPI* 遺伝子プロモーターと断定した。*MdPI* 遺伝子プロモーターに GUS 遺伝子を融合させ、シロイヌナズナで機能解析を行った。形質転換シロイヌナズナの花器官を GUS 染色したところ花弁と雄ずいで特異的な GUS 活性が見られた。したがって、*MdPI* 遺伝子プロモーターは花弁と雄ずいで発現を調節していることが明らかとなった。

リンゴでの *MdPI* 遺伝子の発現解析(機能欠失、ジーンサイレンシングおよびプロモーター解析)を行うため、リンゴ台木品種の‘JM2’での形質転換を行った。リンゴの形質転換では、カナマイシンを含む選抜培地で生育したシュートを得ることができた。35S::anti *MdPI* A/TF を導入した個体は 8 系統、p1SMdPI::GUS A/TF を導入した個体は 6 系統、p2SMdPI::GUS A/TF を導入した個体は 4 系統、35S:: \pm *MdPI* A/TF を導入した個体は 2 系統をそれぞれ獲得できた。各系統は順化後ポットで生育させている。‘JM2’の形質転換系統について導入遺伝子の確認を行った。DNA ブロット解析の結果では、p1SMdPI::GUS A/TF の 3 系統について確認ができなかった。mRNA への転写を RT-PCR を行い調査したところ、順化させてポットで生育させている系統すべてで、導入遺伝子の転写を確認することができた。リンゴにおける花器官形成に関与するホメオティック遺伝子の働きやそのプロモーター機能の調査でリンゴの形質転換体を作成した場合、花が咲かないと導入遺伝子の解析ができない。リンゴの花芽形成はステージ 0 の茎頂分裂組織の広いメリステムが、花芽形成に移行するとステージ 1 の狭いメリステムとなり花器官の発達が始まる(Foster *et al.*, 2003)。この花芽への転換には *AFL1* 遺伝子、*AFL2* 遺伝子および *MdTFL1* 遺伝子などの拮抗作用により形成されていると考えられる(Kotoda *et al.*, 2000, 2006; Kotoda and Wada, 2005; Wada *et al.*, 2002)。そこで、形質転換体を早期に開花させる目的で、花芽形成抑制遺伝子である *MdTFL1* 遺伝子をアンチセンスで導入し発現抑制を試みた。しかし、現時点(ポットへ移植後 20 ヶ月目)では作成した形質転換体で早期開花した個体は確認されていない。*TFL1* 遺伝子の上位に位置する

遺伝子である，シロイヌナズナの *FT* 遺伝子，もしくはそのリンゴホモログによる早期開花系遺伝子の導入による早期開花性も注目される．カンキツから単離された *FT* 遺伝子ホモログの *CiFT* 遺伝子を導入したカンキツでは早期開花性が付与され，セイヨウナシの形質転換体は *in vitro* での開花を示す (Endo *et al.*, 2005; 松田ら 2004)．したがって，果樹における早期開花性を付与することを目的に行うには，*FT* 遺伝子の導入が最も効果的であると考えられる．

リンゴ果実の形態は，ナシ，マルメロ，ビワ等と同じく仁果類に分類され，可食部のほとんどは花床に由来する偽果で，その内部の子房壁に由来する組織が種子の周囲にわずかに形成される．一方，モモ，カキ等は子房壁が肥大して食用部分になる真果であり，シロイヌナズナなどの植物種と同様である．バラ科の果実の基本形はシモツケ，ナナカマドなどの袋果である．袋果は5本の雌ずいに多数の胚珠を持ち腹側で裂開する．この形を基本形にそれぞれの部位の減少や，合着が生じてバラ科の果実の多様な形態が形成される．リンゴのようなナシ状果は，子房が花床と融合し，子房の上部で花床筒が閉じる子房下位花である．したがって，リンゴなどの仁果類の果実肥大は，子房の発達ではなく花床の発達によるものである．

リンゴのクラス B 遺伝子変異品種群は単為結実性を示す (Tobutt, 1994, Yao *et al.*, 2001) が，シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体は単為結実性を示さない．このことは，リンゴの果実形成がシロイヌナズナの果実形成と異なるメカニズムによって引き起こされていることを示唆している．果実形態の異なる，様々な植物が含まれるバラ科植物の形態の多様さは，*PI* 遺伝子や *AP3* 遺伝子のような花器官形成遺伝子の発現の差や，種類の違い，複数の遺伝子による相互作用によって制御されている可能性が考えられる．また，リンゴの *MdPI* 遺伝子変異体とシロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体は同様の表現型の変化をしているにもかかわらず，リンゴのみ単為結実性を示すことから，リンゴの子房下位花で花床筒の上部に花器官が形成されることと，花床の肥大による果実形成のしくみに単為結実能力があると考えられた．

以上の結果から，リンゴのクラス B 遺伝子である *MdPI* 遺伝子は花弁と雄ずいで特異的に発現し，それぞれの器官の形成に作用していると考えられ，

シロイヌナズナの *PI* 遺伝子のオーソログであることが明らかとなった。また、この *MdPI* 遺伝子がレトロトランスポソンの挿入により発現抑制されている品種群は、来歴は未だ不明確であるが、ゲノム上の同じ部位に同じレトロトランスポソンの挿入が見られたため、同じバックグラウンドで変異が現れていることが示唆された。リンゴのホメオティックな花器官変異と単為結実性との関係は、ホメオティック果実では花床内の雄ずい維管束部位に相当する付近に胚珠が形成されること、および子房下位花で果実は花床が発達することで形成されることに関係があると考えられた。

単為結実する果樹はバナナ、パイナップル、イチジク、カキ、ブドウおよびカンキツに例がある。一般的にこれらの果樹は雌性器官あるいは雄性器官が不完全なものが多く、種々の遺伝的な不稔現象が無核の原因となっている(間苧谷, 2002)。リンゴのクラス B 遺伝子変異品種は花卉ががくに、雄ずいが雌ずいに入れ替わっており、ABC モデルで説明されるクラス B 遺伝子の花器官変異と相同な雄性器官を備えていない不完全花である。果実の肥大に関して、通常品種では受精によって形成された種子でジベレリンが生成され、そのジベレリンの作用で結実が維持され果実が肥大するといわれているが、クラス B 遺伝子変異品種の単為結実性とジベレリン等の植物ホルモンの関係は明確になっていない。

ジベレリン(GA)は茎の伸長促進、種子発芽誘導、花芽形成などの生理作用を持つ植物ホルモんで、シロイヌナズナの *LEAFY(LFY)* の遺伝子活性を促進する働きをもち、*LFY* が活性化することにより花器官の更なる発達を促している(Weigel *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 2004)。GA はイネの馬鹿苗病菌から単離されて以来、単離された順番に番号が振られ、100 種類以上が確認されており、現在も単離され続けている。この GA のうち、*LFY* に作用するのは GA₃ もしくは GA₄ という報告がある(Blázquez and Weigel, 2000; Eriksson *et al.*, 2006)。リンゴの果実の発達には通常、受精後の種子でつくられる GA が重要となっている。1 樹で着果量が多く相対的に種子量が多くなった場合、翌年の花芽形成を阻害し、隔年結果を引き起こす原因となっていることが知られている。リンゴで活性のある GA は GA₁, GA₃, GA₄ および GA₇ といわれ、特に GA₃ もしくは GA₄ の内生レベルが高いとされている(Stephan *et al.*,

1999, 2001). ブドウのデラウェアの種無し果実生産には、配偶子形成阻害による単為結実の誘導と果実肥大を目的として GA_3 が用いられている。リンゴにおける結実と果実の発達についても種子から産出される GA と何らかの関係があると考えられ、単為結実性とも少なからず関係があると考えられる。また、その他の植物ホルモンも関係している可能性がある。したがって、遺伝子的なメカニズムの解明のみならず、内生植物ホルモンの調査も重要項目であると考えられた。

最近、シロイヌナズナでは受精せずにさやが肥大し、単為結実性を持つ変異体の解析が行われ、AUXIN RESPONSE FACTOR8 (*ARF8*) 遺伝子が原因で引き起こされていることが突き止められた (Goetz *et al.*, 2006)。 *ARF8* 遺伝子はオーキシン応答に関与する転写因子の遺伝子で *Aux/IAA* 遺伝子と複合体を形成し、IAA 早期応答遺伝子の転写を低く抑えている。シロイヌナズナでは胚珠における *ARF8* 遺伝子の欠如により単為結実性を付与していることが示されており、リンゴでもこのような機構で単為結実する可能性が考えられる。リンゴでは *ARF8* 遺伝子に相当する遺伝子の単離は行われておらず、今後この遺伝子のホモログの単離と機能解析が必要である。

リンゴの結実安定と省力化のためには、栽培品種に自家和合性や単為結実性を付与することが望ましい。自家和合性の場合、花粉が柱頭に確実に付着する必要があるため、受粉そのものは必要でありハチの飼育や人工交雑は必要となる。しかし、単植園化が可能となり、農薬の散布や作業効率の面で大幅な省力化が期待できる単為結実性はさらに受粉そのものが不必要となる。リンゴの単為結実性については‘恵’、‘プリンセス’および‘Early Harvest’が自動的単為結果性を有すると報告されている (齋藤ら, 1993) が、‘恵’の単為結実性については佐藤・石山 (1993) が調査し、二つの遺伝子の劣性ホモで表現される可能性を示している。一方、今回調査したホメオティック変異を伴う単為結実性については、遺伝解析によりクラス B 遺伝子の一つの劣性ホモで遺伝することが示されている (Tobutt, 1994)。したがって、この二つの単為結実性は別の遺伝子で支配されていることが推定される。両者の単為結実性の機構を解明することでリンゴの省力・安定生産体系を開発できる可能性がある。

総 摘 要

リンゴには、花卉と雄ずいが、がくと雌ずいに入れ替わる、花器官のホメオティック変異を示す品種群が存在し、それらは通常の花と形態が異なることが知られている。これは、シロイヌナズナやキンギョソウの ABC モデルで説明されるクラス B 遺伝子である *PISTILLATA* (*PI*) 遺伝子と *APETALA3* (*AP3*) 遺伝子のうち、*PI* 遺伝子に相当する遺伝子 *MdPISTILLATA* (*MdPI*) 遺伝子の発現が、レトロトランスポゾン様配列の挿入により抑えられているために生じる形態異常と推定されている (Yao *et al.* 2001)。リンゴでは、これらの形態異常を示す品種は単為結実性を有することが知られているが、シロイヌナズナではクラス B 遺伝子の変異と単為結実性との関係は認められていない。リンゴは子房下位花で、花床と子房が癒合している。この花器官の形態的特徴とクラス B 遺伝子の変異でがくと雌ずいが多重に形成されることと、単為結実性との間には関連があると推定される。ところが、*MdPI* 遺伝子の変異が、どのようなメカニズムで単為結実性を誘導するのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種群の花器官形成に関するホメオティック遺伝子でシロイヌナズナの *PI* 遺伝子と相同の *MdPI* 遺伝子の発現解析と機能解析を目的に以下の実験を行った。

1. リンゴのクラス B 遺伝子変異品種の単為結実性調査

クラス B 遺伝子変異品種の単為結実能力と受粉による種子形成能力および果実肥大の影響を調査した。本来の果実の中心部のみならず雄ずいが変化した雌ずい部でも正常に種子が形成されることが明らかとなった。クラス B 遺伝子変異品種の放任区では多数の花が落花するにもかかわらず、無種子で結実・肥大する果実が 4 品種とも存在することから、これらの品種はいずれも単為結実性を有することが確認できた。また、受粉により種子数が増加し、中心部および形態変異したていあ部の 2 ヶ所の子室で 20 個以上ある果実がみられた。種子の形成と果実重の関係は品種間差が認められたが、これは樹

勢や着果量も影響していると考えられた．‘Wickson’の単為結実能力は‘Noblow’と‘Spencer Seedless’より高いことが推察され，クラス B 遺伝子変異品種間で単為結実性に品種間差があることが明らかになった．

2. リンゴのクラス B 遺伝子変異品種における

クラス B 遺伝子変異要因の調査

‘Rae Ime’を除くクラス B 遺伝子変異 4 品種のレトロトランスポゾン挿入部位を調査し，これらの品種の *MdPI* 遺伝子抑制機構の解明を行った．DNA ブロット解析によりクラス B 遺伝子変異品種すべてで同一の部位にレトロトランスポゾンが挿入されていると推定できた．また，*MdPI* ゲノムの LA-PCR 産物の制限酵素処理を行い，すべて同じバンドパターンを示したことから同じレトロトランスポゾンが挿入されていることが推察された．これらの結果から，*MdPI* 遺伝子が単一の遺伝子で，他に代替することができる遺伝子がないために，レトロトランスポゾンの挿入がある *MdPI* 遺伝子をホモに持つことで *MdPI* 遺伝子が発現抑制されていると推察された．制限酵素処理パターンが同一なこれらクラス B 遺伝子変異 4 品種は同じ祖先から発生したことが示唆された．

3. *MdPI* 遺伝子によるシロイヌナズナの相補実験

リンゴでは機能解析のための形質転換が難しく，開花までの期間も長いいため，形質転換が容易で開花までの期間が短いシロイヌナズナで機能解析を行った．シロイヌナズナの野生型における表現型の変化を調査することを目的に *MdPI* 遺伝子を形質転換した．また，*PI* 遺伝子変異体である *pi-1* において表現型回復させることを目的に，*MdPI* 導入個体と *pi-1* を交配させ，その F₁ 世代をさらに自殖させた F₂ 個体について表現型を調査すると同時に，*PI* および *pi* に関する遺伝子型を調査した．さらに，表現型回復個体について詳細な観察を目的に，走査型電子顕微鏡を用いて行った．

(1) シロイヌナズナの形質転換

35S::*MdPI*を導入したシロイヌナズナは、得られた個体(T₀)のすべてのがく周囲が花弁様に白く変化していた。また、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* に *MdPI* 遺伝子の導入を目的に、35S::*MdPI*を導入した T₀ 個体の花粉を交配させ F₁ 個体を得た。この F₁ 個体を生長させ、自殖させることにより F₂ 個体を得ることに成功した。この F₂ 個体には正常の花器官を有しているものと、正常な花弁はあるが、雄ずいが雌ずい様に変化している個体があった。この雄ずいが変化している個体が、*MdPI* 遺伝子の影響で表現型が回復したものと考えられた。また、この個体の雌ずい様の雄ずいの表面には胚珠状の球体が観察できた。

(2) 形質転換体の遺伝子型確認

シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* と 35S::*MdPI* を導入した T₀ 個体との交配により得られた F₂ 個体について、そのバックグラウンドを調査した。正常な花弁を有しているものの雌ずい様の雄ずいを持っている個体では *pi-1* 由来であることが確認できた。

(3) 形質転換体の走査型電子顕微鏡における詳細観察

シロイヌナズナの *PI* 遺伝子変異体である *pi-1* と 35S::*MdPI* を導入した T₀ 個体との交配により得られた F₂ 個体について、走査型電子顕微鏡による詳細な観察を行った。正常な花弁を有しているものの雌ずい様の雄ずいを持っている個体は、花糸の細胞が正常に近く回復していたが、雌ずい様になっている葯の部分の細胞は、正常な雌ずいの細胞と同一で、細胞中に気孔を有していた。雌ずい様の部分に観察された胚珠状の球体は、珠孔と胚柄が確認できたため胚珠であることが判明した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションによる花器官形成遺伝子の発現解析

クラス B 遺伝子の *MdPI* 遺伝子と、クラス A 遺伝子でリンゴのクラス B 遺伝子変異品種で二重のがく形成に関係していると推察される *MdMADS5*

遺伝子の発現部位を調査することを目的に，RNA ブロット解析と RT-PCR を行った．また，‘紅玉’花芽の各器官での *MdPI* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に，花芽の各発育ステージで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．さらに，‘紅玉’とリンゴのクラス B 遺伝子変異品種である ‘Spencer Seedless’ の花芽の各器官での *MdMADS5* 遺伝子の発現部位を調査することを目的に，花芽の各発育ステージで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．

(1) *MdPI* 遺伝子および *MdMADS5* 遺伝子の発現解析

‘紅玉’の花器官を用いて RNA ブロット解析を行った．*MdPI* 遺伝子の アンチセンス RNA プローブを使用した場合，花弁と雄ずいで特異的な発現が見られたが，子房を含む花床部でもわずかな発現が見られた．また，*MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した場合，がくおよび花柱，子房を含む花床部で発現が見られた．また，リンゴのクラス B 遺伝子変異品種 ‘Spencer Seedless’ の花器官を用いて *MdMADS5* 遺伝子特異的プライマーを使用した RT-PCR を行ったところ，がく(外がく)と花弁が変化したがく(内がく)と子房を含む花床部で発現が確認された．

(2) *MdPI* 遺伝子の組織学的な発現解析

‘紅玉’の *MdPI* 遺伝子発現開始から開花直前までの花芽を用いて，*MdPI* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．花弁と雄ずいで特異的な発現が観察されたが，花床部内の雄ずい維管束でも発現が見られた．これは第 4 章，第 1 節の RNA ブロット解析の花床部でわずかな発現が見られた結果と一致していた．*MdPI* 遺伝子の発現が花床内上部の維管束でも観察されたことから，染色された場所まで雄ずいのアイデンティティを有していると判明した．

(3) *MdMADS5* 遺伝子の組織学的な発現解析

第 4 章，第 2 節と同じ花芽を用いて *MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．がくとがく

からつながっている花床部の外側から花柄までの外側の細胞で発現が観察された。これは第4章、第1節の *MdMADS5* プローブを使用した RNA プロット解析の結果と一致していた。また、リンゴのクラス B 遺伝子変異品種 ‘Spencer Seedless’ の花芽を用いて *MdMADS5* 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。がく(外がく)と花卉が変化したがく(内がく)で発現が見られ、がくから続いている花床部の外側から花柄までの外側の細胞で発現が観察された。この結果も第4章、第1節の *MdMADS5* 遺伝子プライマーを使用した RT-PCR の結果と一致していた。

5. *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析

MdPI 遺伝子の発現を制御していると推定される *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離することを目的に、ゲノムライブラリー作成後、スクリーニングを行った。また、単離した *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析を行うことを目的に GUS と融合させた発現ベクターを作成し、これをシロイヌナズナに形質転換し、GUS 活性を観察した。

(1) *MdPI* 遺伝子プロモーターの単離とベクターの構築

‘紅玉’ から作成したゲノムライブラリーを使用したスクリーニングにより *MdPI* 遺伝子プロモーターを単離した。*MdPI* 遺伝子のコード領域はデータベース上に報告のある配列と 98% の相同性が見られたことから、その上流領域を *MdPI* 遺伝子プロモーターと断定した。

(2) *MdPI* 遺伝子プロモーターの機能解析

MdPI 遺伝子プロモーターに GUS 遺伝子を融合させ、シロイヌナズナで機能解析を行った。*MdPI* 遺伝子のコード開始点 ATG より上流 1kb の *MdPI* 遺伝子プロモーターを用いた形質転換シロイヌナズナの花器官を GUS 染色したところ、花卉と雄ずいで GUS 活性が見られた。*MdPI* 遺伝子のコード開始点 ATG より上流 2kb の *MdPI* 遺伝子プロモーターでは葉、茎頂部およ

び花器官すべてで GUS 活性が見られたことから、*MdPI* 遺伝子上流 1kb が重要な働きをしていることが示された。

6. リンゴにおける形質転換体作出

リンゴでの *MdPI* 遺伝子抑制あるいはプロモーター解析を行うことを目的に、リンゴの台木品種 ‘JM2’ を用いて形質転換を行った。*MdPI* 遺伝子等とアンチセンス *MdTFL1* 遺伝子を同時に導入することにより、早期開花を誘導し短期間で花器官への影響を確認する方法を試みた。

リンゴでの *MdPI* 遺伝子の発現解析を行うために、リンゴ台木品種の ‘JM2’ での形質転換体作出を試みた。その結果、カナマイシンを含む選抜培地で生育したシュートを得ることができた。*35S::anti MdPI A/MTF* を導入した個体は 8 系統、*p1SMdPI::GUS A/MTF* を導入した個体は 6 系統、*p2SMdPI::GUS A/MTF* を導入した個体は 4 系統、*35S::±MdPI A/MTF* を導入した個体は 2 系統獲得することができ、順化後ポットで生育させている。

順化後ポットで生育させている形質転換系統について導入遺伝子の確認を行った。DNA ブロット解析の結果では、*p1SMdPI::GUS A/MTF* の 3 系統について確認ができなかった。RNA への転写を RT-PCR を用いて調査した結果、順化させてポットで生育させている系統すべてで、導入遺伝子の転写を確認した。

以上の結果から、リンゴのクラス B 変異品種での *MdPI* 遺伝子は、花弁と雄ずい特異的に発現しており、シロイヌナズナの *PI* 遺伝子オーソログであると示唆された。また、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、花床部内の雄ずい維管束で RNA の発現が見られたことから、これら花器官のホメオティック変異により花床部で多数の胚珠が形成されていることが単為結実性と関係があると推察された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導を戴いた岩手大学農学部教授 壽松木章博士に厚く御礼申し上げます。数多くのご助言とご指導を戴いた同大学農学部助教授 小森貞男博士，同大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター助手 渡邊 学博士に御礼申し上げます。本論文をまとめるにあたりご指導，御校閲頂いた弘前大学農業生命科学部教授 原田竹雄博士，山形大学農学部教授 三橋 渉博士に御礼申し上げます。

数多くの御協力とご指導を頂いた，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点リンゴ研究チーム 和田雅人博士に厚く御礼申し上げます。本研究におけるすべての実験はリンゴ研究拠点で行わせていただいた。実験に際し，御許可下さった前リンゴ研究部長 後藤明彦博士，壽 和夫氏およびリンゴ研究拠点研究管理監 増田哲男博士に対して深く御礼申し上げます。様々な形でご協力戴いたリンゴ研究拠点リンゴ研究チーム長 別所英男氏はじめ同研究室の諸氏に御礼申し上げます。走査型電子顕微鏡の使用に関して，多大なるお世話を戴いた独立行政法人森林総合研究所森林微生物研究領域森林病理研究室 窪野高德室長に御礼申し上げます。

実験におけるサポートをして頂いた滋田徳美さん，佐藤智子さんならびに岩手大学農学部農業生命科学科果樹園芸学研究室の皆さんに深く感謝致します。

引用文献

- Abe, M., Y. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Daimon, A. Yamaguchi, Y. Ikeda, H. Ichinoki, M. Notaguchi, K. Goto and T. Araki. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 309 : 1052-1056.
- 安達義輝・小森貞男・阿部和幸・別所英男・壽松木章. 2004. リンゴ同質 4 倍体品種の自家結実性. 園学雑. 73 (別 2) : 318.
- 安達義輝・小森貞男・阿部和幸・別所英男・高橋佐栄・壽松木章. 2004. 自家和合性を示すリンゴ同質 4 倍体品種の花粉管伸長特性. 園学雑. 74(別 1) : 78.
- Akama, K., H. Shiraishi, S. Ohta, K. Nakamura, K. Okada and Y. Shimura. 1992. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. *Plant Cell Rep.* 12 : 7-11.
- Blázquez, M. A. and D. Weigel. 2000. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404 : 889-892.
- Bolar, J. P., S. K. Brown, J. L. Norelli and H. S. Aldwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55 : 31-38.
- 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.

- Bowman, J. L., D. R. Smyth and E. M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. Development 112 : 1-20.
- Chen, X. M., J. L. Riechmann, D. X. Jia and E. M. Meyerowitz. 2000. Minimal regions in the *Arabidopsis PISTILLATA* promoter responsive to the *APETALA3/PISTILLATA* feedback control do not contain a CArG box. Sex Plant Reprod 13 : 85-94.
- Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16 : 735-743.
- Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353 : 31-37.
- Davies, B., M. Egea-Cortines, E. de A. Silva, H. Saedler and H. Sommer. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. EMBO J. 15 : 4330-4343.
- Ditta, G., A. Pinyopich, P. Robles, S. Pelaz and M. F. Yanofsky. 2004. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. Curr. Biol. 14 : 1935-1940.
- 江口隆寛・北原健太郎・阿部和幸・別所英男・松本省吾. 2006. リンゴ授粉樹・栽培種の S 遺伝子型の同定と確認. 園学雑. 75 (別 1) : 91.
- Endo, T., T. Shimada, H., Fujii, Y., Kobayashi, T., Araki and M., Omura. 2005. Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliate* L.

- Ref.). Transgenic Research 14 : 703-712.
- Eriksson, S., H. Böhlenius, T. Moritz and O. Nilsson. 2006. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. Plant Cell 18 : 2172-2181.
- Erikson, O., M. Hertzberg and T. Näsholm. 2004. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. Nature Biotechnology 22 : 455-458.
- 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.
- Foster, T., R. Johnston and A. Seleznyova. 2003. A morphological and quantitative characterization of early floral development in apple (*Malus×domestica* Borkh.). Annals Botany 92 : 199-206.
- Goetz, M., A. Vivian-Smith, S. D. Johnson and A. M. Koltunow. 2006. *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. Plant Cell 18 : 1873-1886.
- Goto, K. and E. M. Meyerowitz. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. Genes Dev. 8 : 1548-1560.
- Gustafson, F. G. 1939. [間亭谷 徹(2002)新編 果樹園芸学. 化学工業日報社 : 183 より引用].

- Hill, T. A., C. D. Day, S. C. Zondlo, A. G. Thackeray and V. F. Irish. 1998. Discrete spatial and temporal *cis*-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. Development 125 : 1711-1721.
- Holsters, M., D. Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Montagu and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 163: 181-187.
- Honma, T. and K. Goto. 2000. The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and maintenance signals. Development 127 : 2021-2030.
- 星川義真・小森貞男・安達義輝・別所英男・阿部和幸・壽松木章. 2006. リンゴの同質四倍体品種の受精に関与する花粉の S 遺伝子型に関する調査. 園学雑. 75 (別 1) : 264.
- Huang, H. and H. Ma. 1992. An improved procedure for transforming *Arabidopsis thaliana* (Landsberg *erecta*) root explant. Plant Mol. Biol. Rep. 10 : 372-383.
- Huang, T., H. Böhlenius, S. Eriksson, F. Parcy and O. Nilsson. 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. Science 309 : 1694-1696.
- Jack, T., L. L. Brockman and E. M. Meyerowitz. 1992. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. Cell 68 : 683-697.

- Kardailsky, I., V. K. Shukla, J. H. Ahn, N. Dagenais, S. K. Christensen, J. T. Nguyen, J. Chory, M. J. Harrison and D. Weigel. 1999. Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286 : 1962-1965.
- Kitahara, K., S. Matsumoto, T. Yamamoto, J. Soejima, T. Kimura, H. Komatsu and K. Abe. 2005. Molecular Characterization of apple cultivars in Japan by *S*-RNase analysis and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130 : 885-892.
- Kitahara, K., T. Ohtsubo, J. Soejima and S. Matsumoto. 2004. Cloning and characterization of apple class B MADS-box genes including a Novel *AP3* homologue *MdTM6*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73 : 208-215.
- Kobayashi, Y., H. Kaya, K. Goto, M. Iwabuchi and T. Araki. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286 : 1960-1962.
- 小森貞男・副島淳一・伊藤祐司・別所英男・阿部和幸・古藤田信博. 1999. 種子数および結実率によるリンゴの交雑不和合性の判定. 果樹試報告. 33 : 97-112.
- Koncz, C. and J. Schell. 1986. The promoter of *Ti*-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204 : 383-396.
- Kotoda, N., H. Iwanami, S. Takahashi and K. Abe. 2006. Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1*-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131 : 74-81.

- 古藤田信博・本田親子・耳田直純・鈴木基子・嶋田雅史・森口卓哉・阿部和幸. 2005. *MdAP1 (MdMADS5)*遺伝子プロモーターの組織特異性. 園学雑. 74 (別 1) : 223.
- 古藤田信博・加藤秀憲・阿部和幸・岩波宏・和田雅人・増田哲男・M. F. Yanofsky・S. Kempin・副島淳一. 2001. シロイヌナズナ *APETALA1(API)*を導入したリンゴの発現解析. 園学雑. 70 (別 1): 125.
- 古藤田信博・鈴木基子・岩波宏・阿部和幸. 2005. *MdTFL1* 遺伝子を導入した形質転換リンゴのコサプレッションによる早期開花. 園学雑. 74 (別 2) : 610.
- 古藤田信博・和田雅人・加藤秀憲・岩波宏・阿部和幸・副島淳一・M. F. Yanofsky・S. Kempin・増田哲男. 2002. *APETALA1(API)*遺伝子を導入した形質転換リンゴの早期開花性. 園学雑. 71 (別 1) : 377.
- Kotoda, N., and M. Wada. 2005. *MdTFL1*, a *TFL1*-like gene of apple, retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis*. Plant Sci. 168 : 95-104.
- Kotoda, N., M. Wada, S. Komori, S. Kidou, K. Abe, T. Masuda and J. Soejima. 2000. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *API* during flower development in apple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125 : 398-403.
- Kotoda, N., M. Wada, S. Kusaba, Y. Kano-Murakami, T. Masuda and J. Soejima. 2002. Overexpression of *MdMADS5*, an *APETALA1*-like gene of apple, cause early flowering in transgenic *Arabidopsis*. Plant Sci. 162 : 679-687.

- Krizek, B. A. and E. M. Meyerowitz. 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122 : 11-22.
- Kubono, T. and S. Ito. 2002. *Raffaelea quercivora* sp. nov. associated with mass mortality of Japanese oak, and the ambrosia beetle (*Platypus quercivorus*). *Mycoscience* 43 : 255-260.
- Länneppää, M., S. Parkkinen, P. Järvinen, J. Lemmetyinen, S. Vepsäläinen, T. Savola, K. Keinonen, M. Keinänen and T. Sopanen. 2005. The expression and promoter specificity of the birch homologs for *PISTILLATA/GLOBOSA* and *APETALA3/DEFICIENS*. *Physiol. Plantarum* 125 : 268-280.
- Lamb, R. S. and V. F. Irish. 2003. Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 6558-6563.
- Levin J. Z. and E. M. Meyerowitz. 1995. *UFO*: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* 7 : 529-548.
- van der Linden, C. G., B. Vosmen and M. J. M. Smulders. 2002. Cloning and characterization of four apple MADS box genes isolated from vegetative tissue. *J. Exp. Bot.* 53 : 1025-1036.
- Mandel, M. A. and M. F. Yanofsky. 1995. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377 : 522-524.
- 間 亭谷 徹. 2002. 新編 果樹園芸学. 化学工業日報社 : 180-189.

- Martino, G., I. Pan, E. Emmanuel, A. levy and V. F. Irish. 2006.
Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell* 18 : 1833-1845.
- 松田成美・五十鈴川寛司・遠藤朋子・大村三男・高品善・西村幸一. 2004.
カンキツ *CiFT* 遺伝子を導入したセイヨウナシの *in vitro* 開花性. 園学
雑. 73 (別 2) : 284.
- McGonigle, B., K. Bouhidel and V. F. Irish. 1996. Nuclear localization of
the *Arabidopsis APETALA3* and *PISTILLATA* homeotic gene
products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.* 10 :
1812-1821.
- Münster, T., J. Pahnke, A. Di Rosa, J.T. Kim, W. Martin, H. Saedler and G.
Theissen. 1997. Floral homeotic genes were recruited from
homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of
ferns and seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 2415-2420.
- Nitsch, J. P. 1965. [中川昌一(1978)果樹園芸原論. 養賢堂 : 172 より引用].
- Pelaz, S., G. S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman and M. F. Yanofsky. 2000.
B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA*
MADS-box genes. *Nature* 405 : 200-203.
- Purugganan, M.D., S.D. Rounsley, R.J. Schmidt, M.F. Yanofsky. 1995.
Molecular evolution of flower development: Diversification of the
plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140 : 345-356.

Riechmann, J.L. and E.M. Meyerowitz. 1997. MADS domain proteins in plant development. Biol. Chem. 378 : 1079-1101.

Riechmann, J. L., M. Wang and E. M. Meyerowitz. 1996. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. Nucleic Acids Res. 24 : 3134-3141.

齋藤健一・新関稔・原田竹雄・石川隆三. 1993. 自家結実性品種育成母本としての *Malus hupehnsis* の特徴. 弘大農報. 56 : 1-13.

齋藤健一・新関稔・原田竹雄・石川隆三・佐藤耕・石山正行. 1993. *Malus* 属における自家結実性の遺伝変異と環境変異. 弘大農報. 57 : 9-24.

佐藤耕・石山正行. 1993. リンゴ‘恵’の後代における自家結実性の遺伝. 育雑. 43 (別 2) : 317.

Scheid, O. M. 2004. Either/or selection markers for plant transformation. Nature Biotechnology 22 : 398-399.

Schwarz-Sommer, Z., I. Hue, P. Huijser, P. J. Flor, R. Hansen, F. Tetens, W.-E. Lonng, H. Saedler and H. Sommer. 1992. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. EMBO J. 11 : 251-263.

Sheffield, C. S., R. F. Smith and P. G. Kevan. 2005. Perfect syncarpy in apple (*Malus×domestica* ‘Summerland McIntosh’) and its implications for pollination, seed distribution and fruit production (Rosaceae: Maloideae). Annals Botany. 95 : 583-591.

志村 勲. 1987. 果樹園芸. 文永堂出版 : 1-90

Shore, P., and A. D. Sharrocks. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229 : 1-13.

Stephan, M., F. Bangerth and G. Schneider. 1999. Quantification of endogenous gibberellins in exudates from fruits of *Malus domestica*. *Plant Growth Reg.* 28 : 55-58.

Stephan, M., F. Bangerth and G. Schneider. Transport and metabolism of exogenously applied gibberellins to *Malus domestica* Borkh. cv. Jonagold. *Plant Growth Reg.* 33 : 77-85.

Sundström, J. F., N. Nakayama, K. Glimelius and V. F. Irish. 2006. Direct regulation of the floral homeotic *APETALA1* gene by *APETALA3* and *PISTILLATA* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 46 : 593-600.

Sung, S. - K. and G. An. 1997. Molecular cloning and characterization of a MADS-box cDNA clone of the Fuji apple. *Plant Cell Physiol.* 38 : 484-489.

Sung, S. - K., G. - H. Yu and G. An. 1999. Characterization of *MdMADS2*, a member of the *SQUAMOSA* subfamily of genes, in apple. *Plant Physiol.* 120 : 969-978.

Sung, S. - K., G. - H. Yu, J. Nam, D. - H. Jeong and G. An. 2000. Developmentally regulated expression of two MADS-box genes, *MdMADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta* 210 : 519-528.

高橋佐栄・副島淳一・小林省蔵・岩波宏・古藤田信博・阿部和幸. 2004. リンゴ台木へのブドウ *MybA* 遺伝子の導入. 園学雑. 73 (別 2) : 284.

Theissen, G., 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. Curr. Opin. Plant Biol. 4 : 75-85.

Theissen, G., and H. Saedler. 1995. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 628-639.

Theissen, G., and H. Saedler. 2001. Plant biology. Floral quartets. Nature 409 : 469-471.

Theissen, G., J.T. Kim and H. Saedler. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. J. Mol. Evol. 43 : 484-516.

Tilly, J. J., D. W. Allen and T. Jack. 1998. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. Development 125 : 1647-1657.

Tobutt, K. R., 1994. Combining apetalous parthenocarpy with columnar growth habit in apple. Euphytica 77 : 51-54.

辻村匡・小森貞男・壽松木章・千葉しず香・滋田徳美. 2004. Agrobacterium 感染字のリンゴの再分化におよぼす共存培養器官および除菌操作の影響. 園学雑. 73 (別 1) : 194.

Valvekens, D., M. V. Montagu and M. V. Lijsebettens. 1988. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using Kanamycin selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5536-5540.

和田雅人・嬉野紋乃・田中紀充・松本省吾・小森貞男・別所英男. 2006. リンゴ単為結実品種の花器官におけるクラス B 遺伝子の発現解析. 園学雑. 75 (別 1) : 97.

和田雅人・嬉野紋乃・田中紀充・松本省吾・小森貞男・別所英男. 2006. リンゴ単為結実品種の花器官におけるクラス B 遺伝子の発現解析 II. 園学雑. 75 (別 2) : 127.

Wada, M., Q. Cao, N. Kotoda, J. Soejima and T. Masuda. 2002. Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. Plant Mol. Biol. 49 : 567-577.

和田雅人・田中紀充・壽松木章・小森貞男・別所英男. 2004. リンゴ花器官形成に關与する MADS 遺伝子の解析. 園学雑. 73 (別 1) : 201.

Weigel, D., J. Alvarez, D. R. Smyth, M. F. Yanofsky and E. M. Meyerowitz. 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. Cell 69 : 843-859.

Weigel, D., and E. M. Meyerowitz. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. Cell 78 : 203-209.

Wigge, P. A., M. C. Kim, K. E. Jaeger, W. Busch, M. Schmid, J. U. Lohmann and D. Weigel. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. Science 309 :

1056-1059.

山田三智穂・鈴木長蔵・石山正行・佐藤耕・中村喜治・石沢清. 1971. リンゴ品種相互ならびに自家受粉による結実率について. 東北農業研究. 12 : 282-285.

Yao, J. - L., Y. - H. Dong, A. Kvarnheden and B. Morris. 1999. Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124 : 8-13.

Yao, J. - L., Y. - H. Dong and B. Morris. 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 : 1306-1311.

Yu, H., T. Ito, Y. Zhao, J. Peng, P. Kumar and E. M. Meyerowitz. 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 : 7827-7832.

Zachgo, S., E. de A. Silva, P. Motte, W. Trobner, H. Saedler and Z. Schwarz-Sommer. 1995. Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. Development 121 : 2861-2875.

Zahm, P., C. Hohmeyer, K. Geider. 1984. Site-specific mutagenesis of the Ti plasmid by transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with mutagenized T-DNA fragments cloned in *E. coli* plasmids. Mol. Gen. Genet. 194: 188-194.

Zik, M., and V. F. Irish. 2003. Global identification of target genes regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action. *Plant Cell* 15 : 207-222.