

サイトカイニンによる装飾的な花形の誘導機構の解明と育種への応用に関する研究：
トレニアをモデル系として

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): cytokinin, flower morphology, genetic modification, MADS-box genes, paracorolla, spatial distribution, torenia 作成者: 仁木, 智哉 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001445

特別報告

サイトカイニンによる装飾的な花形の誘導機構の解明と
育種への応用に関する研究

—トレンニアをモデル系として—[†]

仁木 智哉

(平成26年7月18日受付 平成26年10月21日受理)

[†]本論文は筑波大学学位審査論文(平成25年10月)を和訳し,編集・加筆したものである.

本報告の一部は, J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81, 204-212 (2012); J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82, 69-77 (2013);

J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82, 328-336 (2013) において発表した.

Molecular mechanisms underlying cytokinin-induced ornamental flower
morphology and its application in breeding

- Using torenia as a model floricultural plant -

Tomoya NIKI

Summary

For floricultural plants, flower morphology is one of the most important traits determining attractiveness and commercial value. Improvement of flower morphology toward more ornamental flowers is a major objective of breeding programs, but conventional breeding programs can be time-consuming, and the development of efficient breeding methods is desired. In recent studies, treatment with forchlorfenuron (CPPU), an inhibitor of the cytokinin degradation enzyme cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX), induces morphological changes in flowers of torenia (*Torenia fournieri* L.) depending on the floral stage of CPPU treatment.

In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism responsible for CPPU-induced morphological changes in torenia flowers. Furthermore, we employed floral organ-specific promotion of cytokinin biosynthesis using transgenic technologies to produce torenia with ornamental flower morphologies.

In the work described in Chapter 2, we investigated the temporal and spatial distributions of cytokinin signals in CPPU-treated flower buds as indicated by type-A response regulator (RR) and CKX gene expression. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of both *TyRR1* and *TyCKX5* was induced from 1 day after CPPU treatment in sepals, petals, stamens, and pistils and maintained at a high level until 5 days after treatment when the earliest morphological changes due to CPPU treatment were observed. *In situ* hybridization analysis showed weak expression of both genes in stamens and pistils through all floral stages of untreated flower buds. However, when CPPU was applied at the sepal development stage, expression of both genes was strongly induced at the abaxial side of the stamen primordia, which are sites of initiation of the wide paracorolla. When CPPU was applied during the early stage of corolla development, high expression of these genes was observed in the stamen and in the basal and middle parts of the petal, which are the sites of initiation of the narrow paracorolla. When CPPU was applied during the middle corolla

development stage, strong expression of these genes was detected in the middle to apical parts of the petal, which is the site of changes in the distribution pattern of vascular bundles and the resulting serrated margins.

In the work described in Chapter 3, we investigated the morphological properties and the role of floral homeotic genes in the formation of two CPPU-induced types of paracorolla, wide and narrow paracorolla. The morphology of epidermal cells and distribution pattern of vascular bundles were the same in wide paracorolla as in petals; however, in the narrow paracorolla, the morphology of epidermal cells was either petal-like or stamen-like, and the distribution pattern of vascular bundles was stamen-like. *In situ* hybridization analysis of floral homeotic genes showed that a class A gene, *T. fournieri* *SQUAMOSA* (*TfSQUA*), and the class B genes, *TfDEFICIENS* (*TfDEF*) and *TfGLOBOSA* (*TfGLO*), were expressed in the broad region of the primordia of the wide paracorolla, as in petals. Class C genes, *TfPLENA1* (*TfPLE1*) and *TfFARINELLI* (*TfFAR*), were only expressed at margins of the paracorolla primordia. However, in primordia of the narrow paracorolla, *TfSQUA* and one of the class C genes (*TfPLE1*) was expressed only at the margin of the primordia, whereas the class B genes were expressed in a broad region of the primordia, similar to the case of the primordia of the wide paracorolla. Thus, this expression pattern in the narrow paracorolla was intermediate between that of petals and stamens. Furthermore, these expression patterns were similar to those at the paracorolla initiation sites.

In the work described in Chapter 4, we introduced *Arabidopsis isopentenyltransferase 4* (*AtIPT4*) into *torenia* under the control of the *APETALA1* (*AP1*) or *APETALA3* (*AP3*) promoter to characterize the relationship between organ-specific promotion of cytokinin biosynthesis within flower buds and flower morphology. *AP1::AtIPT4* plants had an increased number of petals, whereas *AP3::AtIPT4* plants had expanded corolla, paracorolla, and serrated petal margins along with an increased number of petals. In *AP3::AtIPT4* plants, marked receptacle enlargement was observed when flower buds were in the early corolla development stage in which the paracorolla primordia differentiate. As expected, *AtIPT4* was expressed in the sepals and petals of *AP1::AtIPT4* plants and in the petals and stamens of *AP3::AtIPT4* plants. Cytokinin signals as revealed by *TfRR1* and *TfCKX5* expression were elevated in the floral organs in which the transgene was expressed.

The results described above suggest that the paracorolla and serrated petal margins are induced by high localized levels of cytokinin signals at the site of those morphological changes (Chapter 2). The expression patterns of floral homeotic genes at the early stage of paracorolla development determine paracorolla morphology, and the expression pattern is determined by the site within flower buds where the paracorolla is formed (Chapter 3). Localized cytokinin signals in sepals and petals increase in the petal number, whereas those signals in petals and stamens are necessary to induce corolla expansion, paracorollas and serrated petal margins (Chapters 4 and 5). Furthermore, both receptacle enlargement and localization of elevated cytokinin signals to the paracorolla initiation site are necessary for stable induction of the paracorollas (Chapter 5). These findings may aid in the development of efficient breeding methods for improvement of flower morphology.

Key Words: cytokinin, flower morphology, genetic modification, MADS-box genes, paracorolla, spatial distribution, *torenia*

目次

第1章 序論	11
第2章 CPPU処理により誘導される装飾的な花形とサイトカイニンシグナルの局在性の関係の解析	14
1. 緒言	
2. 材料および方法	
3. 結果	
4. 考察	
第3章 CPPU処理により誘導される副花冠の形態制御に対する花器官ホメオティック遺伝子の役割の解析	24
1. 緒言	
2. 材料および方法	
3. 結果	
4. 考察	
第4章 花芽におけるサイトカイニン生合成遺伝子の局所的な発現による装飾的な花形の誘導	32
1. 緒言	
2. 材料および方法	
3. 結果	
4. 考察	
第5章 総合考察	39
摘要	44
謝辞	45
引用文献	45

第1章 序論

花の形は、花色や香りと同様、花きの観賞価値を左右する重要な形質の1つである。野生種で目にするのは一重で小輪の花である場合が多いのに対し、日本の主要切り花であるキク、カーネーション、バラ等を見ると、八

重などの装飾的な花形を持つ大輪品種が主に流通している。例えば、カーネーションの起源の1つと考えられている原種 (*Dianthus caryophyllus* L.) の直径1-2cmの一重の花と、流通品種の直径8cmにもなる八重の花を比べれば、同じ品目でもその印象が全く異なるほど、花の形はインパクトを与える形質であると言える (西島, 2007; Nishijima, 2012)。また、消費者も多様な花形を求める傾向にあり、八重、大輪、副花冠など、育種によって装飾性の高い花形を付与することにより、同じ品目でも経済的価値が向上する例が多い。例えば、現在わが国での切り花生産額が5位となっているトルコギキョウは、50年前にはほとんど生産がなかったが、原種に近い一重で中輪の花形から、八重、花卉周縁の鋸歯、大輪など、様々な花形が育種されるとともに、花色が多様化したことにより、主要な花きに成長した (八代, 1994)。従って、花の形の改良は重要な育種目標である。

これらの多様な花形の獲得は、これまで突然変異育種ならびに交雑育種に依存して行われてきたが、交雑可能な遺伝資源に無い新たな花形は偶然に発生したケースが多く、また、それらの変異は程度が弱い、あるいは不安定であるのが普通である。さらに、育種現場で選抜したこのような変異から、安定した装飾的な花形を得るには長い年月を要するのが一般的である (西島, 2007)。例えば、カーネーションでは、小輪で一重の原種の花形から大輪で八重の品種を育種するのに、少なくとも1000年を要している (武田, 1996; Nishijima, 2012)。また、人工的な突然変異誘発法や受精胚培養法などの効率的な育種法が確立された時期に育種が開始されたトルコギキョウにおいてさえも、多様な花形の品種を育種するのに40年程度の年月を要し、現在でも変異が拡大中である (八代, 1994)。従って、花形を改良するための育種に要する時間を短縮することは、重要な課題である。装飾的な花形を短期間で計画的に得ることが出来れば、原種に近い花形しか存在せず、観賞価値が注目されていない品目から魅力的な花形を作り出し、新たな需要を開拓することが可能になると考えられる。そのためには、DNAマーカーによる有用形質の選抜や、遺伝子組換えなどの分子生物学的な手法の利用も有効な手段の1つであると考えられる。近年では、遺伝子解析技術が飛躍的に進歩し、これまでゲノム解析が遅れていた花きでも、キクやカーネーションなどのゲノム解析が進行し、ゲノム情報に基づく育種手法の開発も可能になろうとしている (Tanase et al., 2012; Wang et al., 2013)。また、花きにおける組換え体の作出あるいは遺伝子発現用のプロモーターの開発な

ども進歩している (Chandler and Sanchez, 2012; Potenza et al., 2004; Shibata, 2008). しかしながら, これらの技術を花形の改変に応用するためには, 装飾的な花形が発生するメカニズムの解明が不可欠となる.

装飾的な花形のうち, 雄蕊ならびに雌ずいの花弁化による八重化については, 花器官の形態形成に関わるホメオティック遺伝子の変異によって出現することが知られている. 基本的な花器官である萼片, 花弁, 雄蕊および雌ずいの形態形成については, シロイヌナズナおよびキンギョソウを中心として遺伝子レベルでの解析が進み, 転写因子をコードしている3つのクラスの花器官ホメオティック遺伝子によるABCモデルにより花器官のアイデンティティーの決定が説明されている (Fig. 1; Bowman et al., 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Rijpkema et al., 2007). 花器官を4つの花輪 (whorl) と見た場合, 一番外側の whorl 1では class A 遺伝子が単独で発現することにより萼片が, whorl 2では class A と B 遺伝子が重複して発現することにより花弁が, whorl 3では class B と C 遺伝子が重複して発現することにより雄蕊が, 最も内側の whorl 4では class C 遺伝子が単独で発現することにより雌ずいが形成される. また, class A と C 遺伝子は互いに発現を抑制することにより, 発現が重複しないように制御されている (Drews et al., 1991; Gustafson-Brown et al., 1994). シロイヌナズナの class C 遺伝子 (*AGAMOUS*; *AG*) の突然変異体では雄蕊が花弁に, また雌ずいが新たな花に変化することが示されているが (Yanofsky et al., 1990), この花形変化は, whorl 3および whorl 4において class C 遺伝子の発現が失われたことにより, class A 遺伝子が whorl 3および whorl 4でも発現し, これらの whorl における花器官ホメオティック遺伝子の組合せが, 花弁を誘導する class A と

B 遺伝子の組み合わせに変化することにより引き起こされている (Drews et al., 1991). キンギョソウでは2種類の class C 遺伝子 (*PLENA*; *PLE*, *FARINELLI*; *FAR*) が単離されているが, *ple* 突然変異体では雄蕊および雌ずいが花弁あるいは花弁様の花器官に変化し (Bradley et al., 1993), さらに, *ple/far* 二重変異体では, 雌ずいが完全に花弁化することが示されている (Davies et al., 1999). また, 遺伝子組換えにより, これらの遺伝子の発現を制御することによって花の形を変化させることも可能であり, シロイヌナズナの *ag* 突然変異体において, すべての whorl で2つの class B 遺伝子 (*APETALA3*; *AP3*, *PISTILLATA*; *PI*) を発現させることにより, 全ての花器官が花弁化した花も作り出されている (Krizek and Meyerowitz, 1996). 現在では, 雌ずいを細分化し, 最も内側を whorl 5として, whorl 5において発現して胚珠の形成に関わる class D 遺伝子, さらには whorl 2から whorl 5にかけて発現し, class A, B, C 遺伝子と相互作用することで, これらの遺伝子が機能するのに必要な class E 遺伝子が追加されたモデルも提唱されている (Fig. 1; Ferrario et al., 2004).

一方, 近年, 花の形の制御には, 植物ホルモンのサイトカイニンが関与することが明らかにされている. シロイヌナズナでは, 花芽に Benzylaminopurine (BA) を投与することにより, 花弁, 雄蕊, 雌ずいの各花器官数の増加が認められている (Lindsay et al., 2006; Venglat and Sawhney, 1996). これらの花形変化は, サイトカイニンにより茎頂分裂組織の活性に関わる遺伝子の発現が上昇することにより引き起こされていると考えられている (Lindsay et al., 2006; Rupp et al., 1999). ペチュニアでは, サイトカイニン処理により花冠の細胞数が増加し, 花冠が拡大することが示されている (Nishijima, 2012;

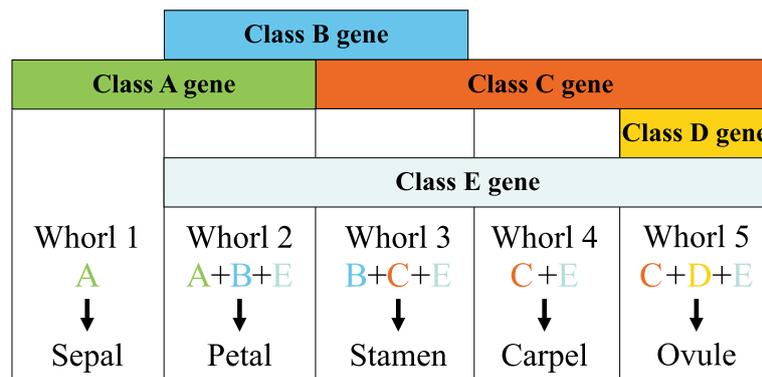


Fig. 1. The ABCDE model determining floral organ identity.

Former model, i. e., ABC model, did not include class D and E genes, and both of carpel and ovule belong to whorl 4.

Nishijima et al., 2006). さらに、大輪化の原因遺伝子である *Grandiflora* 遺伝子の遺伝子型が大輪化に重要であることが知られているが (Ewart, 1984), サイトカイニンの生合成経路および初期情報伝達経路に関わる遺伝子の発現も、この遺伝子型により影響を受けることが示されている (Nishijima, 2012; Nishijima et al., 2011a, b).

サイトカイニン生合成経路についてはすでに研究が進み、サイトカイニン生合成に関わる遺伝子も明らかにされている (Fig. 2; Frébort et al., 2011; Werner and Schmölling, 2009). 植物におけるサイトカイニンの生合成は、isopentenyltransferase (IPT) が触媒する dimethylallyl diphosphate を基質とした ATP および ADP のイソペンテニル化から始まり (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001), ヌクレオチド型の前駆体を経て、cytokinin nucleoside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase (LOG) による 1 ステップの反応により活性型のサイトカイニンである N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine (iP) や *trans*-zeatin (tZ) が合成される (Kurakawa et al., 2007). 一方、触媒する酵素の遺伝子は単離されていないもの

の、nucleotidation と nucleosidation の 2 ステップの反応により活性型サイトカイニンが合成されるとする説もある (Auer, 2002; Chen and Kristpeit, 1981). これらの活性型サイトカイニンは、サイトカイニンの分解を司るサイトカイニン酸化酵素 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase; CKX) により、イソプレノイド側鎖の酸化分解 (Schmölling et al., 2003), あるいは glycosyltransferase による配糖化によって不活性化される (Hou et al., 2004).

また、サイトカイニンシグナル伝達経路については、シロイヌナズナによる研究から、二成分制御系を介して伝達されることが明らかになっている (Fig. 2; Mizuno, 2005; Müller, 2011). サイトカイニンが受容体である Histidine kinase に結合することにより、受容体が自身の Histidine kinase により自己リン酸化された後、リン酸がリン酸転移因子に受け渡され、核内に移行後に転写因子である type-B response regulator (RR) をリン酸化する。これによって type-B RR が活性化され、標的遺伝子の転写が調節されることでサイトカイニンシグナルが

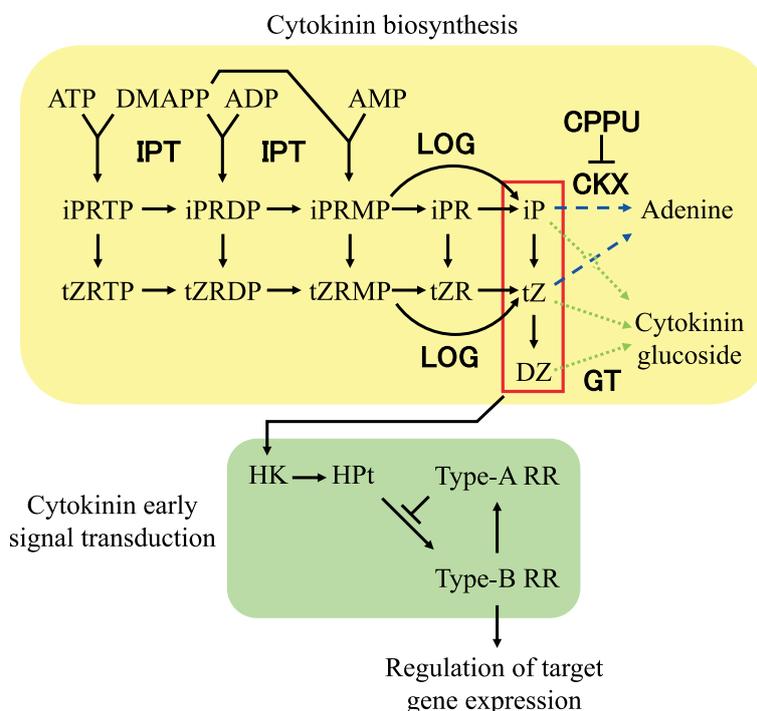


Fig. 2. Cytokinin biosynthesis and early signal transduction pathways.

Bold letters indicate catalytic enzymes. Biologically active cytokinins are boxed by red line. Broken lines indicate inactivation of biologically active cytokinins by CKX (blue line) or GT (green line). CPPU inhibits CKX activity. ADP, adenosine 5'-diphosphate; AMP, adenosine 5'-monophosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; CKX, cytokinin oxidase/dehydrogenase; CPPU, forchlorfenuron; DZ, dihydrozeatin; GT, glycosyltransferase; HK, receptor histidine protein kinase; HPT, histidine phosphotransfer protein; iP, N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenine; iPR, iP riboside; iPRDP, iPR 5'-diphosphate; iPRMP, iPR 5'-monophosphate; iPRTP, iPR 5'-triphosphate; IPT, isopentenyltransferase; phosphoribohydrolase; RR, response regulator; tZ, *trans*-zeatin; tZR, tZ riboside; tZRDP, tZR 5'-diphosphate; tZRMP, tZR 5'-monophosphate; tZRTP, tZR 5'-triphosphate.

伝達される。一方、type-A RR 遺伝子は type-B RR の標的遺伝子の1つとしてサイトカニンにより発現が誘導され、その翻訳産物は、type-B RR のリン酸化と競合することにより、サイトカニンシグナルの負のフィードバック調節に関与していると考えられている (Müller, 2011; Rashotte et al., 2003)。

トレニア (*Torenia fournieri* L.) では、花芽に CKX の阻害剤であるホルクロルフェニユロン (CPPU) を処理することにより (Bilyeu et al., 2001)、花卉数の増加、花弁周縁の鋸歯、副花冠の発生など、様々な装飾的な花形が誘導される (Nishijima and Shima, 2006)。この場合、CPPU 処理を行う花芽の発達ステージに依存して特定の花形が誘導される。つまり、花芽が未分化のステージ0から、花芽の原基発生期であるステージ1および萼片形成期であるステージ2において CPPU 処理した場合には花卉数の増加が、萼片伸長期であるステージ3から花弁、雄蕊および雌ずい形成期であるステージ4の処理では幅広い副花冠が、花弁伸長初期であるステージ5の処理では細長い副花冠が、花弁伸長中期であるステージ6および花弁伸長後期であるステージ7の処理では花弁周縁に鋸歯が、それぞれ誘導される (Nishijima and Shima, 2006)。CPPU は CKX の阻害剤であることから (Bilyeu et al., 2001)、花芽内の部位特異的にサイトカニンが蓄積し、そのために様々な花形変化が引き起こされていると考えられる。CPPU 処理を行ったトレニアで誘導される花形のうち、特に副花冠については、植物全体を見てもスイセン、トウワタ、キンギョソウ、トケイソウなど、ごく限られた種に特異的な花器官で、これらの種の観賞価値の形成に大きく貢献している (Troll, 1957)。

トレニアは、アゼトウガラシ科の1年生草本植物で (Huxley et al., 1992; Rahmzadeh et al., 2005)、耐暑性に優れ、花壇苗として生産・利用されている。ゲノムサイズは約171 Mbp 程度と (Kikuchi et al., 2006)、シロイヌナズナ (157 Mbp) と同程度に小さく (Bennett et al., 2003)、現在全ゲノム解析が進行しつつある (東山, 私信)。トレニアは形質転換効率がよく (Aida, 2008)、また、交配による後代の取得だけでなく、挿し芽で維持・増殖できることから、遺伝子組換えによる研究用花きとしても扱いやすい。これまでに、花の老化遅延 (Aida et al., 1998; Tanase et al., 2010)、花色の改変 (Aida et al., 2000; Ono et al., 2006)、わい化などの形質の付与が報告されている (Niki et al., 2006a)。トレニアは、播種から開花までの期間が3ヶ月程度と短いことから、短期間に

花形変化の有無を確認でき、また、花茎が2-3cm 程度と大きいこと、花形の変化が目で見えてわかりやすい。さらに、花形のバリエーションが少ないことから、サイトカニン生合成遺伝子を利用した遺伝子組換えによる花形改変のモデルとしても適していると考えられる。

そこで本研究では、まず第2章において、CPPU 処理によってトレニアに装飾的な花形が誘導される実験系を用いて、特定の花形変化が誘導される際の、花芽内におけるサイトカニンシグナルの空間的、時間的な分布パターンを解析することにより、装飾的な花形が誘導される分子機構を明らかにしようとした。次に、第3章では、CPPU 処理により誘導される副花冠の形態と花器官ホメオティック遺伝子の発現を解析することにより、副花冠の形態の制御機構を解析した。第4章では、これらの結果に基づいて、サイトカニン生合成遺伝子を用いたトレニアの遺伝子組換えにより、サイトカニンの蓄積を花芽の部位特異的に制御することによる、花形改良技術の開発の可能性について検討を行った。最後に第5章において、各章の結果を横断的に俯瞰し、装飾的な花形変化に関する、より普遍的な分子機構について考察するとともに、今後の基礎研究ならびに実用化を目指した応用研究の展開方向について考察した。

第2章 CPPU 処理により誘導される装飾的な花形とサイトカニンシグナルの局在性の関係の解析

1. 緒言

CPPU は、ジフェニルウレア系サイトカニンに分類される合成サイトカニンであり (Mok and Mok, 2001)、メロンの着果・肥大促進 (池田ら, 1990; 早田ら, 1990)、スイカの単為結果誘導 (早田ら, 1991)、トマトの空洞果抑制 (片岡ら, 1994)、ヤマブドウの単為結果誘導 (小岩井ら, 2012) などの効果が報告され、植物生長調節剤として利用されている。トレニアでは、花芽への CPPU 処理により、花芽発達ステージに依存して特定の花形が誘導される (Nishijima and Shima, 2006)。萼片伸長期 (ステージ3) から花弁、雄蕊および雌ずい形成期 (ステージ4) の花芽に CPPU 処理した場合には、ステージ4後期に、発達初期の花弁の基部から幅広い副花冠の原基が発生し、花弁伸長初期 (ステージ5) の花芽に CPPU 処理した場合には、花弁伸長中期 (ステージ6) 後半のやや発達した花弁の中央部から細長い副花冠の原基が発生する。また、ステージ6および花弁伸長後期 (ステージ7) の処理では、ステー

ジ7後期に花卉周縁に鋸歯が発生する。CPPUは活性型サイトカイニンを分解するCKXの阻害剤であることから (Bilyeu et al., 2001), CPPU処理したトレニアでは、処理を行う花芽発達ステージによって花芽内におけるサイトカイニン濃度の高い部位の分布が異なり、そのために処理時の花芽発達ステージに依存して特定の花形が誘導されると予想される。しかしながら、微小な花芽内のサイトカイニン濃度の分布を解析することは非常に困難である。そこで、サイトカイニン応答性遺伝子を解析することにより、サイトカイニンシグナルの分布を明らかにしようとした。

サイトカイニン応答性遺伝子として、*type-A RR* 遺伝子が挙げられる (Rashotte et al., 2003; Müller, 2011)。*type-A RR* 遺伝子の発現は、サイトカイニン処理により短時間に、かつサイトカイニンシグナルの強さに応じて誘導されることから、サイトカイニンシグナルの強さの指標になると考えられる (Brandstatter and Kieber, 1998; D'Agostino et al., 2000; Nishijima et al., 2011b; Taniguchi et al., 1998)。また、他の候補として、*CKX* 遺伝子が挙げられる。*CKX* 遺伝子もサイトカイニンにより著しく発現が誘導されるとともに、活性型サイトカイニンを不活性化することにより、サイトカイニン濃度のフィードバック制御に関与すると考えられている (Brugière et al., 2003; Kiba et al., 2005; Nishijima et al., 2011a)。従って、*CKX* 遺伝子の発現も、サイトカイニンシグナルの強さの指標になり得ると考えられる。

一方、トレニアにBAを処理した場合には、CPPU処理のような花形変化は誘導されない (Nishijima and Shima, 2006)。CPPUとBAの活性を比較した場合、タバコのカルスの増殖に対しては、BAに比べて、CPPUは1/10の濃度で効果を示す (Takahashi et al., 1978)。ペチュニアの花冠拡大作用においても、BAに比べて、CPPUは1/30の低い濃度で効果を示す (Nishijima et al., 2006)。トレニアの場合には、1000 μM のBA処理でも花形変化は誘導されないが、CPPUでは、0.3 μM の処理でも花形変化が誘導される (Nishijima and Shima, 2006)。従って、花形変化に対するCPPU処理とBA処理には、単に活性の違いだけでなく、質的な作用の違いがあると考えられる。その違いには、花芽内におけるサイトカイニンシグナルの挙動が関与すると予想される。

そこで、まずトレニアから、*type-A RR* 遺伝子および*CKX* 遺伝子をクローニングした。*type-A RR* 遺伝子、*CKX* 遺伝子とも、サイトカイニンにより誘導されることが知られているが、いずれも複数の遺伝子によるファ

ミリーを形成するとともに、遺伝子ごとにサイトカイニンに対する応答性が異なることも示されていることから (D'Agostino et al., 2000; Kiba et al., 2005)、サイトカイニン応答性が高く、サイトカイニンシグナルの指標として適したクローンを選定した。その上で、CPPU処理によって花形変化、特に形態の異なる副花冠および花卉周縁の鋸歯が誘導される際、これらの遺伝子の発現が花芽内で空間的、時間的にどのように変化するかを明らかにすることにより、副花冠ならびに花卉周縁の鋸歯の誘導に必要なサイトカイニンシグナルの局在パターンを明らかにしようとした。

2. 材料および方法

1) 植物材料

Torenia fournieri 'Dwarf White' (サカタのタネ) を供試した。種子を園芸培土 (Metro-Mix 350; Sun Gro Horticulture Canada) 中で発芽させた後、幼苗をプラスチックポットの園芸培土 (クレハ) に定植し、25°C / 20°C (昼/夜) に調節した蛍光灯下 (180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (12時間明期/12時間暗期)) のインキュベータ内で栽培した。

2) CPPU および BA 処理

CPPU (Sigma-Aldrich) およびBA (和光純薬工業) 溶液は20% (v/v) アセトン溶液として調整し (Nishijima and Shima, 2006)、8 μL の3 μM CPPUあるいは100 μM BA溶液を、マイクロピペットにより花房の先端部に点滴した。本研究で用いたCPPUの濃度は、トレニアの花形変化を誘導するのに十分な濃度であり (Nishijima and Shima, 2006)、BAの濃度については、ペチュニアの花冠拡大作用においてCPPUと同等の効果を示す濃度比とした (Nishijima et al., 2006)。なお、花形変化が誘導されない10 mm以上のつぼみは切除した。

3) *type-A RR* および *CKX* 遺伝子のクローニングと系統樹解析

若い花芽を液体窒素で凍結後、ジルコニアビーズを用いて破碎し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Sciences) およびRNase-Free DNase Set (Qiagen Sciences) を用いてtotal RNAを抽出した後、CapFishing Full-length cDNA Premix Kit (Seegene) を用いてcDNA合成を行った。*type-A RR* および*CKX* 遺伝子について、それぞれアミノ酸配列の保存性の高い領域においてディジェネレートプライマーを設計した (Table 1)。これらのディジェネレートプライマーを用いたPCRにより得られたcDNA断片をpGEM-T Easy vector (Promega) に挿入し、

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を解析した. これらの塩基配列を基に, それぞれの遺伝子特異的なプライマーを設計し, 5' および 3' RACE 法により上流および下流の塩基配列を解析した後, KOD Plus DNA polymerase (東洋紡) を用いて完全長の cDNA を増幅した (Table 2). これらの完全長 cDNA の塩基配列を解析し, DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録した. アクセション番号は Fig. 3 と Fig. 4 の脚注に記載した.

遺伝子の系統樹解析には CLUSTAL W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用い, クローニングした type-A *RR* および *CKX* 遺伝子の配列から推定される全長のアミノ酸配列とシロイヌナズナの遺伝子とを比較した. また, 系統樹は neighbor-joining 法により, NJplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) を用いて作成した.

4) 定量 PCR 解析

無処理および CPPU または BA 処理した花芽を用い, 萼片, 花弁, 雄蕊, 雌ずいのそれぞれの花器官から, 前項と同様の方法で total RNA を抽出した後, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて cDNA 合成を行った. トレニアの各 *TfRR* および *TfCKX* 遺伝子ならびに内部標準として *Actin* 遺伝子 (*TfACT3*; AB330989) について, オープンリーディングフレームの 3' 末端部および 3'-非翻訳領域に各遺伝子特異的なプライマーを設計した (Table 3). 各遺伝子の発現量は, SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用いて, LightCycler 350S (ロシュ・ダイアグノスティックス) による PCR により定量した. PCR 反応は, 95°C /10秒の前処理の後, 95°C /5秒, 60°C /10秒, 72°C /5-7秒の反応を50サイクル繰り返し, 非特異的な増幅産物の混入を防ぐために, 各サイクルの伸長期の最後に, *TfCKX1* および *TfCKX2* は73°C, *TfCKX3* は74°C, *TfRR2* は75°C, *TfRR1* は76°C, *TfACT3* は77°C, *TfCKX4*

Table 1. Degenerate primers used for isolation of cDNAs of *TfRR* and *TfCKX* genes.

Target gene	Direction	Primer sequence
<i>TfRRs</i>	forward	5-CAYGTIYTIGCIGTIGAYGA-3'
	reverse	5-YTSIGCICCYTCYTCIARRCA-3'
<i>TfCKXs</i>	forward	5-GTIKICIGCIMGIGGICAIGGICA-3'
	forward	5-TGGACIGAYTAYYTIYAYYTIACIGTIGG-3'
	forward	5-GGIGGIYTIGGICARTTYGGIRTIATHAC-3'
	forward	5-TGGGAIGTICCICAYCCITGGYTIAA-3'
	forward	5-CCIGTITCITGGACIGAYTAYTTRTA-3'
	reverse	5-TGICCIGGIGMIARIAKIGYYHKIGGRTC-3'
	reverse	5-TTIARCCAIGGRTGIGGIACITCCCA-3'
	reverse	5-GTDATIAYICCRAAYTGICCIARICCC-3'
	reverse	5-TGICCIGGIGAYAAIAGIITYTTIGGRTCRAA-3'

Table 2. Primers used for isolation of full-length cDNAs of *TfRR* and *TfCKX* genes.

Target gene	Direction	Primer sequence
<i>TfRR1</i>	forward	5-TTACCTCTCATCTACTGTAACGCA-3'
	reverse	5-AATGAAACAACACTGACTTGAAATTC-3'
<i>TfRR2</i>	forward	5-TACTATGATTCTGTAGTTGGCGT-3'
	reverse	5-GCAGCGCACCTCAATTATAAG-3'
<i>TfCKX1</i>	forward	5-TTCCCCTCCTCATCTTACACC-3'
	reverse	5-TTGCCATAAAGCGTCGAAAT-3'
<i>TfCKX2</i>	forward	5-CACAAAATCACGCACTGACACA-3'
	reverse	5-CAGAATAATTAACAATTACCATTGCG-3'
<i>TfCKX3</i>	forward	5-CTTTCCTTCTACGGTCAAATC-3'
	reverse	5-TGAAGCAAAGCAGGACTAAC-3'
<i>TfCKX4</i>	forward	5-ACTTTCAAGAATCTCGACAGCA-3'
	reverse	5-AATTCGATAGTAAAAGCGCATA-3'
<i>TfCKX5</i>	forward	5-ACCACACTAAAATCATACTCTCCTC-3'
	reverse	5-CCACTAATATTAATAAATGTAACTCCAC-3'

および *TfCKX5* は 78°C において、蛍光量を測定した。データは LightCycler software version 3.5 (ロシュ・ダイアグノスティックス) により解析した。 *TfRR* および *TfCKX* 遺伝子の全長 cDNA あるいは *TfACT3* 遺伝子の部分 cDNA を持つプラスミドを用いて検量線を作成し、各遺伝子の発現量は、 *TfACT3* に対する相対的な発現量で示した。これらの解析は、独立した 3 回の実験結果に基づく。

5) *in situ* ハイブリダイゼーション解析

無処理および CPPU 処理後 3 日目および CPPU による形態変化が現れる 7 日目の花芽を解析に用いた。花芽は、氷冷した FAA (50% (v/v) ethanol, 10% (v/v) formaldehyde, 5% (v/v) acetic acid) 中で減圧処理し、さらに 4°C で 4 時間以上固定後、2-methyl-2-propanol (2M2P) を含むエタノールシリーズ (0:30%, 0:50%, 10:50%, 20:50%, 35:50%, 50:40%, 75:25% (v/v)) で脱水し、2M2P に置換後、パラフィンで包埋した。ミクロトーム (RM2145, Leica biosystems) を用いて 8 μm 厚の切片を作製し、42°C のスライドガラス上で一晩乾燥させた。 *in situ* ハイブリダイゼーションは Hirai ら (2007) の方法に基づいて行った。切片は xylene 中で脱パラフィンし、エタノールシリーズ (100%, 90%, 80%, 70%, 50% (v/v)) 中で水和後、PBS バッファー (0.1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) 中で洗浄し、PBS バッファー中で 37°C、30 分間、1 μg·mL⁻¹ proteinase K (ロシュ・ダイアグノスティックス) 処理を行った。0.2% glycine を含む PBS バッファー中で proteinase K の反応を停止し、

PBS バッファー中で洗浄後、0.1 M triethanolamine HCl (pH 8.0) および 0.25% acetic anhydride 中で 20 分間アセチル化した。1% Triton X-100 を含む PBS バッファー中でアセチル化の反応を停止し、PBS バッファー中で洗浄後、スライドガラス当たり 150 μL のハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 4× saline-sodium citrate (SSC), 1× Denhardt's solution, 1 mg·mL⁻¹ *Escherichia coli* tRNA, 0.5 mg·mL⁻¹ salmon sperm DNA) を乗せ、室温で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、digoxigenin (DIG) ラベルした *TfRR1* または *TfCKX5* 遺伝子特異的な antisense 鎖または対照区として sense 鎖の RNA プロブを用いてハイブリダイゼーションを行った。RNA プロブは、クローニングした cDNA を鋳型とし、T7 または SP6 プロモーター配列を持ち、3'-非翻訳領域を中心とした各遺伝子特異的なプライマー (Table 4) を用いた PCR 断片から、DIG RNA Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて作製した。これらの PCR 断片から、T7 (sense プロブ用) または SP6 (anti-sense プロブ用) RNA polymerase により DIG ラベルした RNA を作製し、エタノール沈殿による精製後、各 RNA プロブとして用いた。スライドガラス当たりのプロブ濃度を 800 ng·mL⁻¹ に調整した 150 μL のハイブリダイゼーションバッファー中で、62°C で一晩、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、0.2× SSC 中、65°C で 2 時間洗浄し、続いて室温の NT バッファー (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) 中で洗浄した。さらに 1% blocking reagent (ロシュ・ダイアグノスティック

Table 3. Primers used for qPCR analysis of *TfRR* and *TfCKX* genes.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>TfRR1</i>	155 bp	forward	5'-AGATTATTAGTTGTCTCCTCTGT-3'
		reverse	5'-CTTGAAATTCAACCACATCA-3'
<i>TfRR2</i>	155 bp	forward	5'-GCTGCAATGTTGAAGAACATG-3'
		reverse	5'-CAGCGCACCTCAATTATAAG-3'
<i>TfCKX1</i>	124 bp	forward	5'-CCCATATCAGTTTTGTGACACA-3'
		reverse	5'-CATACTTACAGTTGTTGAGGAGGA-3'
<i>TfCKX2</i>	158 bp	forward	5'-CCGTTGATTAATCCTAGTG-3'
		reverse	5'-AGAGAGACAATCACGATACATC-3'
<i>TfCKX3</i>	169 bp	forward	5'-TCAAGAAATTGGAAGAAGGCC-3'
		reverse	5'-CCAATATATAATTCATTTCCCACT-3'
<i>TfCKX4</i>	146 bp	forward	5'-CCAAAGACTTGAACAACAGTG-3'
		reverse	5'-GATTGCTCTACATCTGAGAGACC-3'
<i>TfCKX5</i>	117 bp	forward	5'-AGAAAGTTGAAGTTCGATCCCG-3'
		reverse	5'-TTACATTCACAGACCACAACACTG-3'
<i>TfACT3</i>	145 bp	forward	5'-TGCAGTAAAGTGATTGTGGAAG-3'
		reverse	5'-GGAACATCTGGGTAGGATC-3'

ス) 中で室温で1時間の処理後, 1:500に希釈した anti-DIG-AP 抗体 (ロシュ・ダイアグノスティックス) で1時間反応させ, NBT/BCIP 溶液 (ロシュ・ダイアグノスティックス) による化学染色により, 各遺伝子の発現を検出した。これらの解析は, 独立に CPPU 処理した花芽を用いた3回の実験結果に基づく。

3. 結果

1) トレニアの type-A RR および CKX 遺伝子のクローニングと系統樹解析

トレニアから, 2種類の type-A RR 遺伝子, および5種類の CKX 遺伝子の全長 cDNA がクローニングされた。これらの遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST 検索により相同性検索したところ, いずれもシロイヌナズナの type-A RR 遺伝子および CKX 遺伝子と相同性が高かったことから, クローニングしたトレニアの遺伝子を, それぞれ *TjRR1*, 2および *TjCKX1*, 2, 3, 4, 5と名付けた。RR 遺伝子について推定されたアミノ酸配列には, サイトカニンシグナル伝達の際の His-Asp リン酸リレーに必要な Asp と Lys 残基が保存されるとともに (Fig. 3), C 末端側に type-B RR に見られる DNA 結合ドメイン (GARP ドメイン) を持たなかったことから (D'Agostino et al., 2000; Mizuno, 2005), クローニングした遺伝子はいずれも type-A RR 遺伝子であると考えられた。また, *TjRR1* の C 末端側には, シロイヌナズナの type-A RR 遺伝子の ARR7, ARR15に見られる Asp, Ser, Thr 残基に富む配列も見られた (D'Agostino et al., 2000)。また, CKX 遺伝子についても, いずれの推定されたアミノ酸配列において, FAD およびサイトカニン結合ドメインが保存されていたことから (Schmülling et al., 2003), いずれも CKX をコードしている遺伝子であるとと考えられた。

これらの遺伝子のアミノ酸配列を用いてシロイヌナズナの type-A RR および CKX との間で系統樹を作成した

ところ, *TjRR1* はサイトカニンで発現が誘導され, 茎頂部において *WUSCHEL* (*WUS*) 遺伝子により発現が抑制されることが示されているグループと (*ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15*; D'Agostino et al., 2000; Leibfried et al., 2005), また *TjRR2* は *ARR16* および *ARR17* と相同性が高いことがわかった (Fig. 4A)。一方, *TjCKX1* はシロイヌナズナの *AtCKX6* と, *TjCKX2* は *AtCKX5* と, *TjCKX3* は *AtCKX7* と, *TjCKX4* は *AtCKX1* と, *TjCKX5* は *AtCKX3* と, それぞれ高い相同性を示した (Fig. 4B)。

2) *TjRR* および *TjCKX* 遺伝子のサイトカニン応答性

リアルタイム定量 PCR による解析の結果, *TjRR1* は, 無処理の場合は, 萼片, 花弁, 雄蕊, 雌ずいのいずれの花器官においても同程度に発現していたが, CPPU 処理により雄蕊および雌ずいでは4倍以上に, 萼片でも8倍に, 花弁では10倍以上に, 大きく発現が誘導された (Fig. 5A)。これに対して, *TjRR2* の発現は, *TjRR1* に比べて無処理, CPPU 処理後の花器官とも非常に低く, CPPU 処理による発現変化も不明瞭であった (Fig. 5A)。*TjCKX* 遺伝子については, *TjCKX1*, 2, 3, 4に比べて, 無処理のいずれの花器官においても *TjCKX5* の発現がはるかに高かったことから, トレニアの花器官においては *TjCKX5* が中心的な役割を果たしていると考えられた (Fig. 5B)。さらに, *TjCKX5* については, CPPU 処理により, いずれの花器官でも3倍以上に発現が誘導されたが, *TjCKX1*, 2, 4では, いずれの花器官でも CPPU 処理による発現の誘導は見られなかった。また, *TjCKX3* についても, 萼片および花弁においてのみ, CPPU 処理による発現の誘導が見られたが, *TjCKX5* に比べて, その発現量は非常に低いものであった (Fig. 5B)。

以上の結果から, *TjRR1* および *TjCKX5* の発現は, CPPU 処理によりすべての花器官において強く誘導されることが明らかとなり, 両遺伝子を CPPU 処理後の各花器官におけるサイトカニンシグナルの変動を示す指

Table 4. Primers used to synthesize probes for *in situ* hybridization analysis of *TjRR1* and *TjCKX5* genes.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>TjRR1</i>	180 bp	forward	5'-GAATAATACGACTCACTATAGGGTCAGAG ATTTCTGTTATCAAAGGC-3'
		reverse	5'-TGCATTTAGGTGACACTATAGAAATGAAA CAACTGACTTGAAAATTC-3'
<i>TjCKX5</i>	154 bp	forward	5'-GAATAATACGACTCACTATAGGGCTGCTG TTGTACCAGATGAAGAC-3'
		reverse	5'-TGCATTTAGGTGACACTATAGAACCACTA ATATTAATAAATGTAAACTCCAC-3'

T7 and SP6 promoter sequences were underlined.

```

TfRR1  HVLAVDDSLVDRKVIEKLFKISSCKVTAVESGSRALQYLGL-----DGDL
TfRR2  HVLAVDNLIDRTIVEKLIKNSSCKVTTVENGRALEYLGL-----GD
ARR3    HVLAVDDSLVDRIVIERLLRITSCKVTAVDSGWRALEYLGL-----
ARR4    HVLAVDDSLVDRIVIERLLRITSCKVTAVDSGWRALEYLGL-----
ARR5    HVLAVDDSMVDRKFIERLLVSSCKVTVDSATRALQYLGL-----
ARR6    HVLAVDDSHVDRKFIERLLVSSCKVTVDSATRALQYLGL-----
ARR7    HVLAVDDSIVDRKVIERLLRISSSCKVTTVESGTRALQYLGL-----
ARR8    HVLAVDDSLFDRKMIERLIQKSSCQVTTVDSGSKALEYLGL--RVDDNDP
ARR9    HVLAVDDSLFDRKLIERLIQKSSCQVTTVDSGSKALEYLGLRQSTDSNDP
ARR15   HVLAVDDSFDRKVIERLLKISACKVTTVESGTRALQYLGL-----
ARR16   HVLAVDNLIDRKLVERLLKISCCKVTTAENALRALEYLGL-----GD
ARR17   HVLAVDNLIDRKLVERLLKISSCKVTTAENLRALEYLGL-----

```

```

TfRR1  NDANNSVGSYGVKLNLIVTDYSMPGMTCFELLIQKIKGSKALREIPVVVM
TfRR2  IQNISDDNAAASKVNMIITDYCMPGMTGYELLKKIKESSVMKDVPVVIM
ARR3    DDDKAA-VEFDRLKVDLIITDYCMPGMTGYELLKKIKESTSFKEVPVVIM
ARR4    INEKAS-AEFDRLKVDLIITDYCMPGMTGYELLKKIKESNFREVPVVIM
ARR5    DGENSSVGFEDLKINLIMTDYSMPGMTGYELLKKIKESAFREIPVVIM
ARR6    DVEEK-V-GFEDLKVNLIMTDYSMPGMTGYELLKKIKESAFREVPVVIM
ARR7    DCGKAS-NLKDLKVNLIVTDYSMPGLSGYDLLKKIKESAFREVPVVIM
ARR8    NALST-PQIHQEVEINLIITDYCMPGMTGYDLLKVKESAFFSIPVVIM
ARR9    NAFSKAPVNHQVVENLIITDYCMPGMTGYDLLKVKESAFFDIPVVIM
ARR15   DCDNGSS-GLKDLKVNLIVTDYSMPGLTGYELLKKIKESALREIPVVIM
ARR16   QNQHIDALTCNVMKVSLIITDYCMPGMTCFELLKVKESNLREVPVVIM
ARR17   GDPQQTDSLTNVMKVNLIITDYCMPGMTCFELLKVKESNLKEVPVVIL

```

```

TfRR1  SSENVIARIDRCLEEGAEEFLVKPVKLSDVKRLRD
TfRR2  SSENVPTRINKCLEEGAEMMLKPLKHSDMKKLKC
ARR3    SSENVMTRIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIS
ARR4    SSENVLTRIDRCLEEGAQDFLLKPVKLADVKRIS
ARR5    SSENIIPRIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIRD
ARR6    SSENIIPRIDRCLEEGAEDFLLKPVKLSDVKRIRD
ARR7    SSENIIPRIQECLKEGAEEFLLKPVKLADVKRIKQ
ARR8    SSENVPARISRCLEEGAEEFFLKPVKLADLTKLKP
ARR9    SSENVPARISRCLEEGAEEFFLKPVRLADLNKLKP
ARR15   SSENIQPRIEQ-MIEGAEEFLLKPVKLADVKRLKE
ARR16   SSENIPTRINKCLASGAQMMQKPLKLADVEKLKC
ARR17   SSENIPTRINKCLASGAQMMQKPLKLSDVEKLKC

```

Fig. 3. Amino acid sequence of receiver domain of torenia type-A response regulator (RR) and the sequence homology with *Arabidopsis* type-A RR.

Asterisks represent conserved amino acid sequences in RRs for phosphorelay. Accession numbers were as follows: torenia type-A RR genes, TfRR1, AB740033; TfRR2, AB740034; *Arabidopsis* type-A RR genes, ARR3, At1g59940; ARR4, At1g10470; ARR5, At3g48100; ARR6, At5g62920; ARR7, At1g19050; ARR8, At2g41310; ARR9, At3g57040; ARR15, At1g74890; ARR16, At2g40670; ARR17, At3g56380. Identical and homologous amino acid was indicated by light blue and blue letters, respectively.

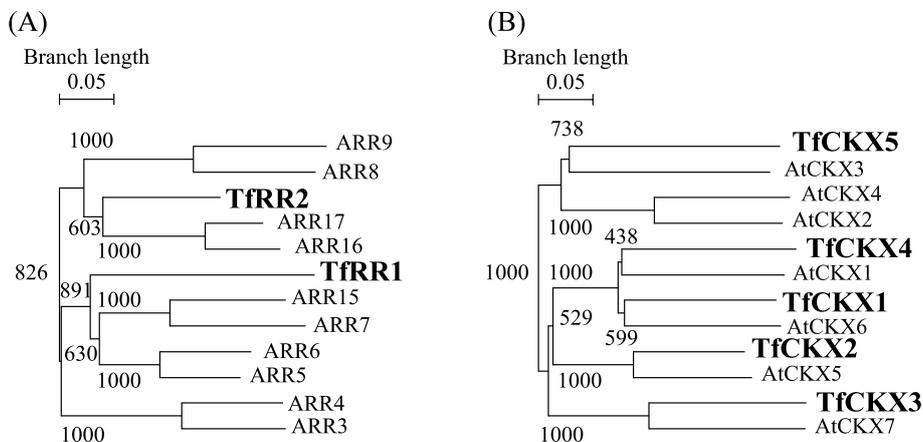


Fig. 4. Phylogenetic tree of type-A RR and CKX in torenia and *Arabidopsis*.

Bootstrap values from 1000 replicates are indicated near the branching points. Accession numbers of CKX genes were as follows: torenia CKX genes, TfCKX1, AB740035; TfCKX2, AB740036; TfCKX3, AB740037; TfCKX4, AB740038; TfCKX5, AB740039; *Arabidopsis* CKX genes, AtCKX1, At2g41510; AtCKX2, At2g19500; AtCKX3, At5g56970; AtCKX4, At4g29740; AtCKX5, At1g75450; AtCKX6, At3g63440; AtCKX7, At5g21482. Accession numbers of type-A RR genes were the same as described in legend of Fig. 3.

標として用いることとした。

3) CPPU および BA 処理による花形の変化と *TfRR1*

および *TfCKX5* 遺伝子の花芽内での発現変動の解析

CPPU あるいは BA 処理した各花器官における *TfRR1* および *TfCKX5* の発現変動を解析したところ、*TfRR1* は、萼片、花弁、雄蕊、雌ずいのいずれの花器官においても、CPPU 処理後 1 日目から発現が大きく上昇した (Fig. 6A)。この高い発現量は、花器官に CPPU 処理による初期の形態変化が認められる 5 日目まで維持され、処理後 7 日目には低下した (Fig. 6A)。また、*TfCKX5* についても同様の傾向で、萼片では 2 日目、花弁では 12 時間目、雄蕊と雌ずいでは 1 日目から発現が大きく上昇し、高い発現量が維持された後、処理後 7 日目には低下した (Fig. 6B)。これに対して、BA を処理した場合には、*TfRR1* および *TfCKX5* も、萼片では処理後 1-3 時間にかけて一過的に発現が上昇したが、処理後 6 時間後には無処理と同程度の発現量に低下した (Fig. 6A, B)。また、

花弁、雄蕊、雌ずいにおいては、両遺伝子とも BA 処理による発現上昇は見られなかった (Fig. 6A, B)。

4) *TfRR1* および *TfCKX5* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション解析

CPPU 処理により幅広い副花冠 (Fig. 7A-k)、細長い副花冠 (Fig. 7B-k) および花弁周縁の鋸歯 (Fig. 7C-k) が誘導される際の花芽内のサイトカイニンシグナルの分布を明らかにするために、幅広い副花冠が誘導される萼片伸長期 (ステージ 3)、細長い副花冠が誘導される花弁伸長初期 (ステージ 5) および花弁周縁に鋸歯が発生する花弁伸長中期 (ステージ 6) の花芽に CPPU 処理を行い、*in situ* ハイブリダイゼーションにより *TfRR1* および *TfCKX5* の発現部位を解析した。

無処理のステージ 3 および 4 の花芽では、*TfRR1* および *TfCKX5* も、雄蕊および雌ずいの原基で弱い発現が見られた (Fig. 7A-a, b, d, f, g, i)。これに対して、ステージ 3 の花芽に CPPU 処理を行った場合、処理後 3 日目

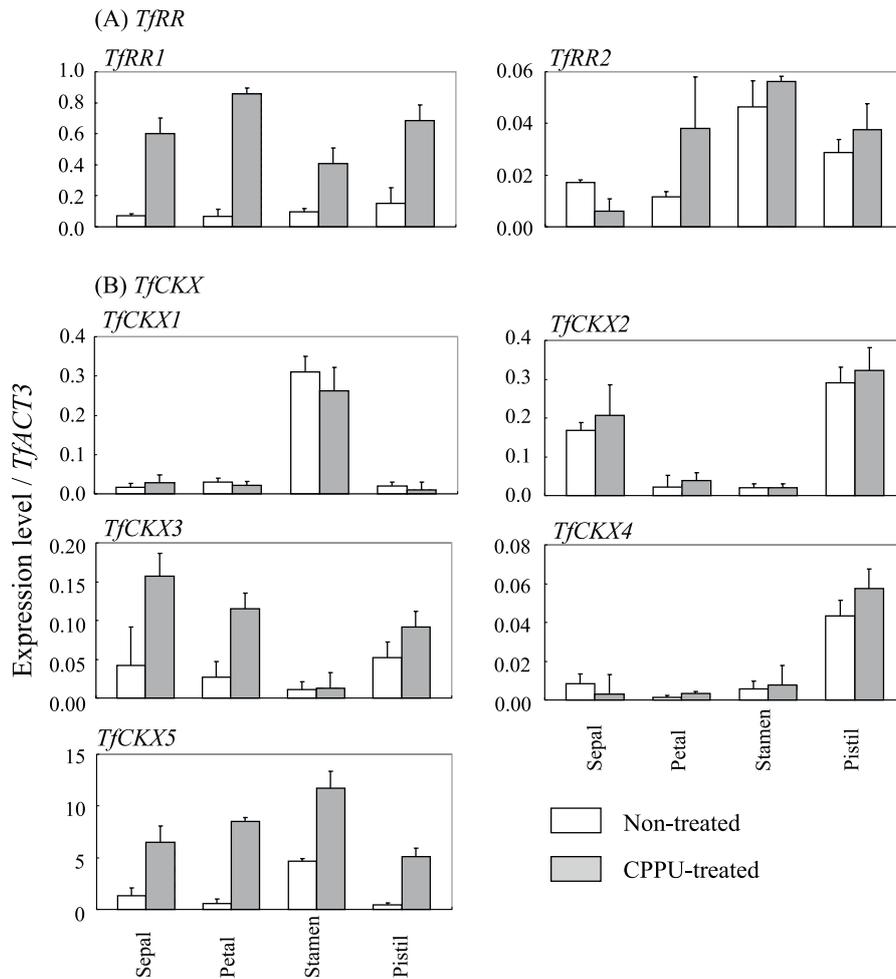


Fig. 5. Quantitative real-time PCR analyses of *TfRR* and *TfCKX* in floral organs 2 days after CPPU treatment. The expression levels of *TfRRs* (A) and *TfCKXs* (B) are shown as values relative to that of *TfACT3*, which was used as an internal standard. Open and gray columns indicate non-treated and CPPU-treated floral organs, respectively. Vertical bars indicate SE (n = 3).

では、*TfRR1*および*TfCKX5*とも、同じステージの無処理の花芽に比べて、雄蕊および雌ずいの原基での発現が強まるだけでなく、萼片の向軸側にまで発現領域が広がっていた (Fig. 7A-c, h). 特に、*TfCKX5*については、幅広い副花冠の発生位置である雄蕊の原基の背軸側で非常に強い発現が見られた (Fig. 7A-h). さらに、幅広い副花冠の原基が発生する処理後7日目でも、両遺伝子とも、無処理の花芽に比べて、雄蕊および雌ずいの原基における発現が強まるだけでなく、副花冠の原基でも強い発現が見られた (Fig. 7A-e, j).

無処理のステージ5の花芽でも、*TfRR1*および*TfCKX5*とも、雄蕊および雌ずいの原基で弱い発現が見られるが、ステージ7までの花芽の発達の過程で、これらの発現は葯および胚珠に限られていった (Fig. 7B-a, b, d, f, g, i). これに対して、ステージ5の花芽にCPPU処理を行った場合、処理後3日目では、*TfRR1*および*TfCKX5*とも、同じステージの無処理の花芽に比べて、雄蕊および雌ずい全体での発現が強まるだけでなく、*TfRR1*は花弁全体で発現が見られ、また*TfCKX5*は、細長い副花冠の発生位置である花弁の中央部に加えて、花弁の基部で強い発現が見られた (Fig. 7B-c, h). また処理後7日目では、両遺伝子とも、無処理の花芽に比べて、雄蕊および雌ずいでは強い発現が見られるものの、その発現部位は無処理と同様に葯および胚珠に限られていっ

た (Fig. 7B-d, e, i, j). また花弁における発現も、副花冠の発生位置である花弁の中央部に加えて、花弁の先端部で強い発現が見られたが、花弁の基部ではほとんど発現が見られなかった (Fig. 7B-e, j).

一方、ステージ6の花芽にCPPU処理を行った場合、処理後3日目では、両遺伝子とも、無処理の花芽では葯および胚珠で弱い発現が見られるのに比べ (Fig. 7C-a, b, d, f, g, i), 葯、雌ずいおよび花弁の中央部から先端部にかけて強い発現が見られたが、雄蕊の基部および花弁の基部ではほとんど発現が見られなかった (Fig. 7C-c, h). さらに、処理後7日目では、無処理の花芽に比べて、主に花弁の先端部で発現が強まっていたが、花弁の中央部から基部ではほとんど発現が見られなかった (Fig. 7C-e, j).

4. 考察

本研究の結果から、花形変化が誘導されるCPPU処理において、いずれの花器官でも*TfRR1*および*TfCKX5*の発現が大きく誘導されたことから、両遺伝子の発現がサイトカイニンシグナルの指標として利用できることが示された。両遺伝子の発現は、CPPU処理後、花芽内で初期の形態変化が現れる処理後5日目まで高い発現が持続されていたことから (Nishijima and Shima, 2006), 花芽内でサイトカイニンシグナルが持続的に上昇することが花形変化に必要であると考えられた。一方、本研究に

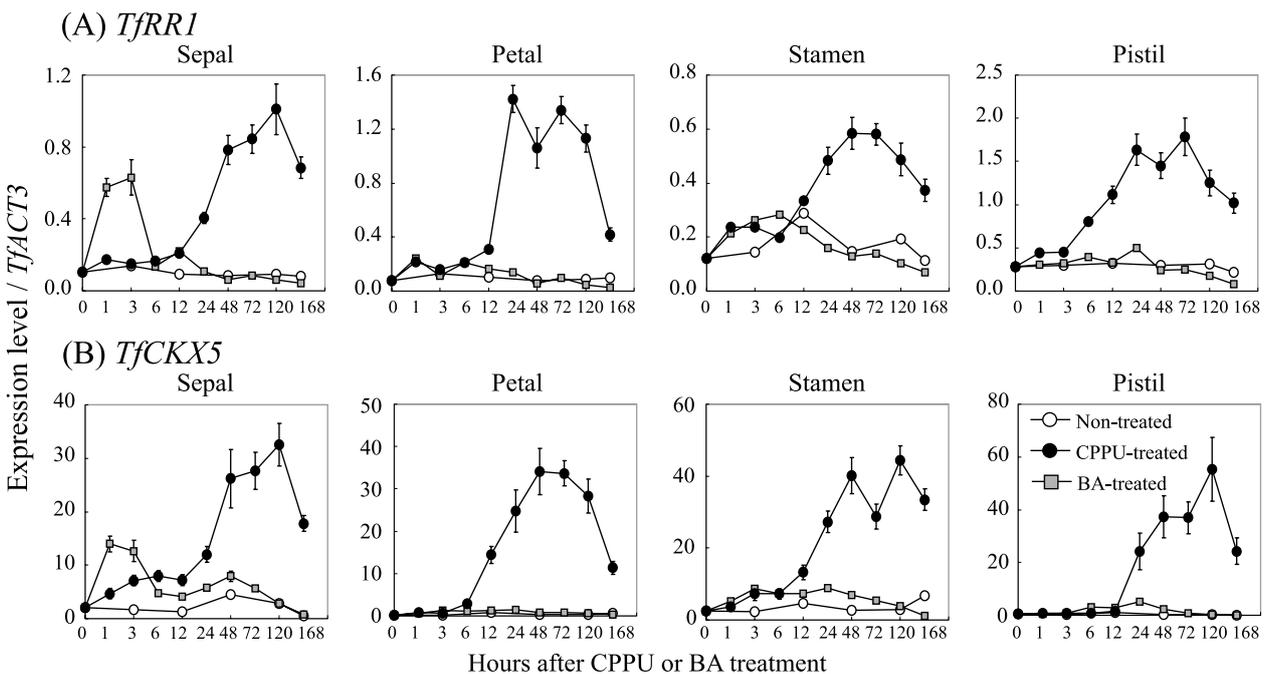


Fig. 6. Quantitative real-time PCR analyses of *TfRR1* and *TfCKX5* in CPPU or BA-treated floral organs. The expression levels of *TfRR1* (A) and *TfCKX5* (B) are shown as values relative to that of *TfACT3*, which was used as an internal standard. Open circles, closed circles, and gray squares indicate non-treated control, CPPU or BA-treated flower buds, respectively. Vertical bars indicate SE (n = 3).

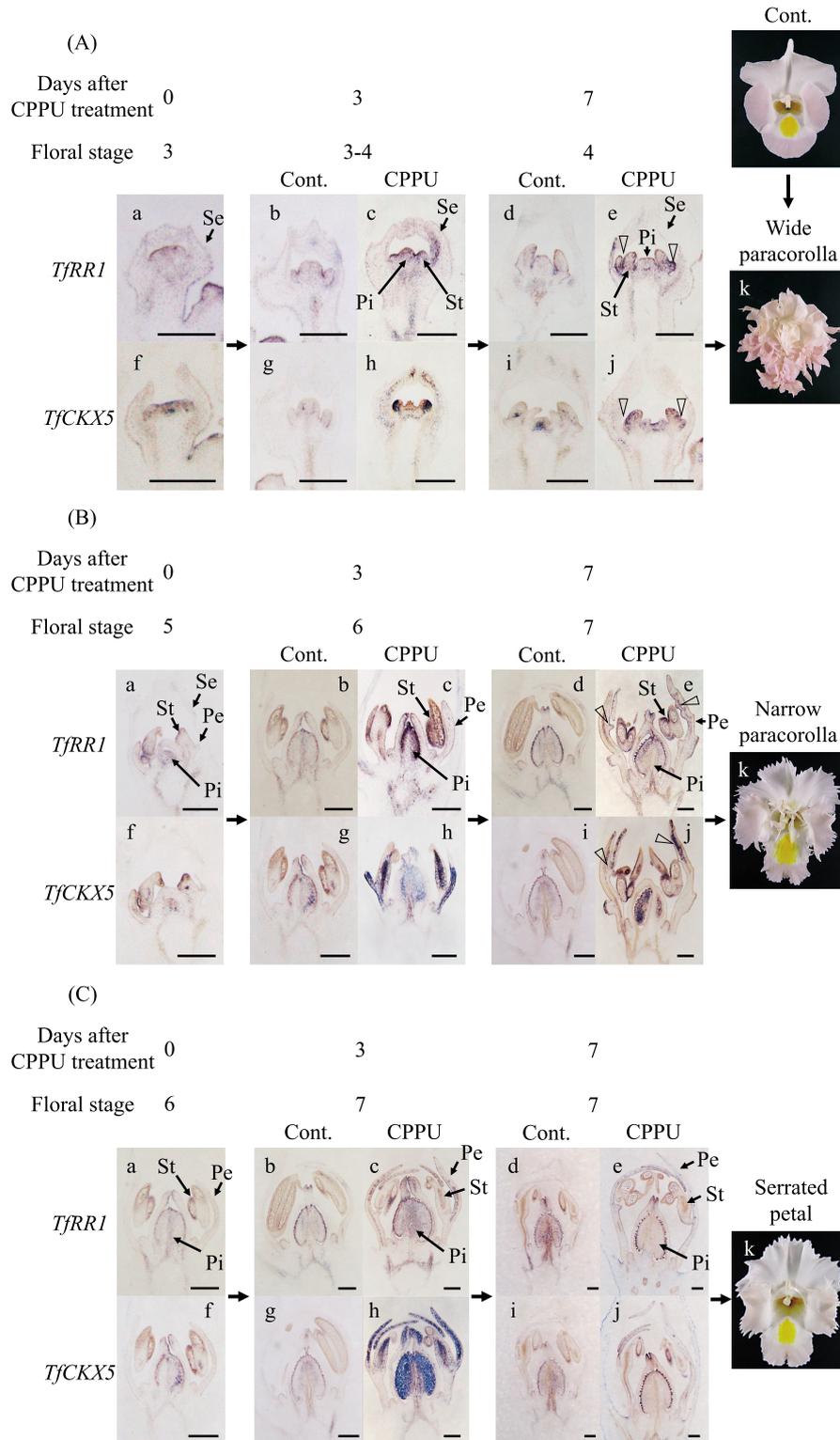


Fig. 7. *In situ* hybridization of *TfRR1* and *TfCKX5* in flower buds treated with CPPU.

CPPU treatment induces formation of a wide paracorolla in (A), a narrow paracorolla in (B), and a serrated petal margin in (C). CPPU-treated flower buds were collected at 3 (c, h) or 7 days (e, j) after the treatment, whereas non-treated flower buds were collected at the corresponding stage (a, b, d, f, g, i). The representative data at each floral stage inducing each flower morphology are shown. Panel k shows flower morphology induced by CPPU treatment at each floral stage. Panel b, d, g, and i in (B) are the same as a, b, f, and g in (C), respectively, because each shows the same stage of non-treated flower buds. Floral stages were defined as described in Nishijima and Shima (2006): Stage 3, development of sepals; Stage 4, initiation of sex organs and petals; Stage 5, early corolla development; Stage 6, middle corolla development; Stage 7, late corolla development. Triangles represent the initiation site of paracorollas. Scale bars = 200 μ m.

において、萼片以外では BA 処理によるサイトカイニンシグナルの上昇が見られなかったことは (Fig. 6A, B), BA 処理したトレニアでは花形変化が誘導されないという報告とも一致する (Nishijima and Shima, 2006). トレニアの花芽は、ステージ 4 以降は萼片に完全に覆われている状態になり、また、ステージ 3 以降の若いつぼみは、発達した毛じに取り囲まれているため、処理液は萼片に付着したままで、花芽内には到達しにくい状態にあると考えられる。そのため、BA 処理液は付着した萼片だけに留まり、他の花器官には移行せず、サイトカイニンシグナルが上昇しなかったものと考えられた (Fig. 6A, B). 一方、CPPU については、萼片から各花器官に移行し、その後、持続的にサイトカイニンシグナルを上昇させたと考えられた (Fig. 6A, B). BA と CPPU では化学的な構造が異なり (Mok and Mok, 2001), イソプレノイド側鎖を持つ BA の場合、植物の組織内に浸透しても、上昇した CKX により分解されてしまうと考えられる。これに対して、ジフェニルウレア化合物であり、CKX によって分解されない CPPU については (Bilyeu et al.,

2001), CKX 遺伝子の発現が高まっても分解が促進されず、持続的にサイトカイニンシグナルが上昇した可能性がある。

さらに、CPPU 処理により副花冠が発生する場合には、その発生位置でサイトカイニンシグナルが上昇していることも明らかになった。つまり、ステージ 3 の花芽に CPPU 処理を行った場合は、花卉の基部から幅広い副花冠の発生が誘導されるが、この場合、副花冠および花卉の発生位置である雄蕊の原基の背軸側でサイトカイニンシグナルが上昇していた (Fig. 7A-c, e, h, i, Fig. 8). また、ステージ 5 の花芽に CPPU 処理を行った場合は、花卉の中央部から細長い副花冠の発生が誘導されるが、この場合は、まず雄蕊および副花冠の発生位置を含めた花卉全体でサイトカイニンシグナルが上昇し、その後、サイトカイニンシグナルの高い部位は花卉の中央部に局在化した (Fig. 7B-c, e, h, i, Fig. 8). CPPU 処理したトレニアで誘導される副花冠のうち、幅広い副花冠は、雄蕊の基部の背軸側の側方から発生することが観察されている (Nishijima and Shima, 2006). 一方、細長い副花冠

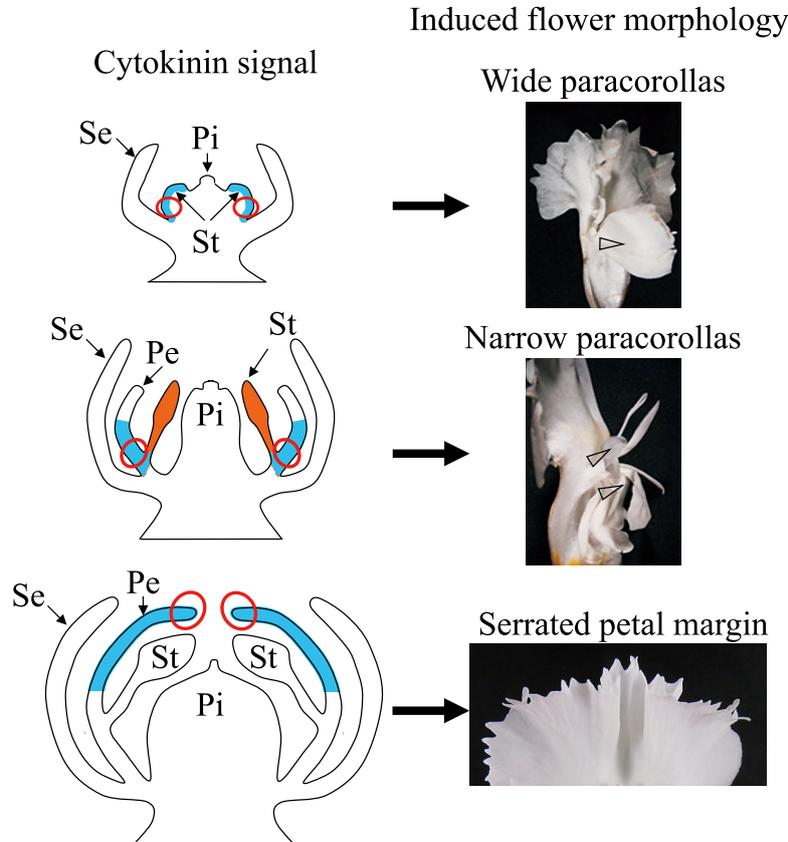


Fig. 8. Hypothetical model accounting for the effect of CPPU-induced localization of enhanced cytokinin signal in flower buds to flower morphology in torenia. Floral organ with enhanced cytokinin signal is colored with blue in the petal and orange in the stamen. Triangles and red circles indicate the site of paracorolla initiation and serrated petal margin. Pe, Petal; Pi, Pistil; Se, Sepal; St, Stamen.

は、花冠の縁辺と筒部の境界において、雄蕊の側方から発生するが、トレニアの場合、雄蕊の基部と花弁の筒部は合着しているため、副花冠の基部も花弁の筒部と合着していると考えられる。従って、細長い副花冠も、雄蕊の基部の側方から発生するものと考えられる。本研究の結果から、CPPU 処理後に副花冠が誘導される際、サイトカイニンシグナルが上昇する部位は、幅広い副花冠が発生する場合は、雄蕊基部の背軸側で、また、細長い副花冠が発生する場合には、花弁の中央部から雄蕊の基部にかけてであったことから (Fig. 7A, B, Fig. 8), CPPU 処理後の花芽内においてサイトカイニンシグナルの高い部位は、副花冠が発生すると考えられる位置と合致している。

分裂組織からの器官分化には、器官分化の部位において 'auxin maxima' と呼ばれるオーキシニンシグナルの局所的な上昇が重要であることが知られている (Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2000)。一方、サイトカイニンが、オーキシニンの流出の制御を通してオーキシニンシグナルの分布パターンに影響を及ぼし、局所的なサイトカイニンの分布がオーキシニンシグナルの局所的な上昇に必要であることも示されている (Pernisová et al., 2009)。本研究において、CPPU 処理により、トレニアの花芽内においてサイトカイニンシグナルの局在化が見られたことから (Fig. 7), CPPU 処理によって、異所的にオーキシニンシグナルの局所的な上昇が生じ、そのことによって、新たな花器官である副花冠が誘導された可能性が考えられた。

一方、花弁周縁に鋸歯が誘導される場合のサイトカイニンシグナルの上昇部位は、副花冠が誘導される場合とは異なり (Fig. 7A-c, h, 7B-c, h, Fig. 8), 花弁の中央部から先端部に限られていた (Fig. 7C-c, h, Fig. 8)。CPPU 処理により発生する鋸歯は、花弁の縁辺における維管束の配列パターンの変化により生じていることから (Nishijima and Shima, 2006), 鋸歯の発生をもたらしている形態変化は縁辺部全体で起こっているものと考えられる。これらの部位は、CPPU 処理によりサイトカイニンシグナルが上昇する部位と一致している (Fig. 7C, Fig. 8)。

本研究の結果から、CPPU 処理による花形の変化には、持続的なサイトカイニンシグナルの上昇が必要であることが示された。さらに、CPPU 処理を行う花芽発達ステージに依存した花形変化は、その処理時期によって、花芽内においてサイトカイニンシグナルが上昇する部位が異なり、花形の変化が誘導される位置でサイトカ

イニンシグナルが高まることが重要であることが示された。従って、花芽発達時期に応じて、サイトカイニンを特定の部分に蓄積させることができれば、特定の花形を誘導できる可能性がある。つまり、サイトカイニンを、萼片伸長期に雄蕊の原基の背軸側に蓄積させれば幅広い副花冠を、花弁伸長初期に雄蕊の基部から花弁の中央部にかけて蓄積させれば細長い副花冠を、花弁伸長中期に花弁の先端に蓄積させれば鋸歯を、それぞれ誘導できると考えられる。

第3章 CPPU 処理により誘導される副花冠の形態制御に対する花器官ホメオティック遺伝子の役割の解析

1. 緒言

副花冠は、ごく限られた植物種に特異的な花器官であるが、それぞれの植物種によって、その形態は様々である。スイセンのようにラッパ状のもの、キンギョソウのように花弁状のもの、トケイソウのように細長いものなどがあり、その形態の違いがそれぞれの植物種を特徴付けるとともに、魅力を高めている。これらの副花冠は、形態的には花弁と類似しているが、その形態学的な由来は種によって異なり、スイセン、トウワタ、キンギョソウでは雄蕊の托葉が花弁状に変化したもの、トケイソウでは花托が花弁状に変化したものと考えられている (Troll, 1957; Yamaguchi et al., 2010)。キンギョソウの副花冠は、その由来が雄蕊の托葉であることから whorl 3 に属するが、組織学的特徴および花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンは花弁様であった。従って、副花冠の形態は、他の花器官と同様、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンにより規定されることが示されている (Yamaguchi et al., 2010)。

CPPU 処理したトレニアの場合、誘導される副花冠は雄蕊の基部の側方から発生してくることから、キンギョソウと同様に雄蕊の托葉に由来すると考えられるが、その形態には CPPU を処理する花芽発達ステージによって幅広いものと細長いものの2種類が存在する (Nishijima and Shima, 2006)。このうち、幅広い副花冠は、花弁と同様に幅広い形態で、着色も認められる。一方、細長い副花冠は、花弁と同様に着色が認められるものが多いものの、着色の薄いものも存在し、その形は細長く、雄蕊の形態に近い特徴も備えていることが観察される。従って、これらの2種類の副花冠の形態の違いには、花器官ホメオティック遺伝子が関与していることが

予想される。

そこで、CPPU 処理により誘導されるトレニアの 2 種類の形態の副花冠に着目し、これらの副花冠が花器官としてはどのような特徴を持つのかを検証するために、詳細な形態観察を行った。さらに、これらの副花冠の形態の違いの原因を明らかにするために、トレニアから各クラスの花器官ホメオティック遺伝子を単離して、CPPU 処理した各花器官における発現パターンを解析し、花器官ホメオティック遺伝子が副花冠の形態形成に果たす役割について検討を行った。

2. 材料および方法

1) 植物材料

第 2 章2-1) と同様の材料、栽培方法を用いた。

2) CPPU 処理

第 2 章2-2) と同様の調整、処理を行った。なお、確実に副花冠を誘導するために、8 mm 以上のつぼみは切除した。

3) 形態の観察

副花冠の誘導の有無の花芽を供試し、表皮の構造を観察するために、生の花器官を走査型電子顕微鏡 (SEM; VE-7800, キーエンス) で観察した。

組織観察については、第 2 章2-5) と同様の方法で、

花卉、副花冠、雄蕊の各花器官を固定、脱水後にパラフィン包埋し、ミクロトーム (Leica biosystems) を用いて 10 μm 厚の切片を作製し、42℃ のスライドガラス上で一晩乾燥させた。切片は第 2 章2-5) と同様の方法で脱パラフィン、エタノールシリーズで水和後、蒸留水中で洗浄し、0.5% (w/v) toluidine blue で染色したサンプルを実体顕微鏡で観察した。

維管束の観察については、組織観察と同様の方法で固定後、70% (v/v) ethanol 中で 1 時間、2 回処理し、抱水クロラル溶液 (chloral hydrate, 8 g; glycerol, 1 ml; distilled water, 4 ml) 中で 1 時間処理することにより組織を透明化したサンプルを、暗視野実体顕微鏡で観察した。

4) トレニアの花器官ホメオティック遺伝子のクローニングと系統樹解析

若い花芽から、第 2 章2-3) と同様の方法で total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。各クラスの花器官ホメオティック遺伝子について、それぞれアミノ酸配列の保存性の高い領域においてディジェネレートプライマーを設計した (Table 5)。PCR により得られた cDNA 断片の塩基配列は、第 2 章2-3) と同様の方法で解析した。これらの塩基配列を基に、それぞれの遺伝子特異的なプライマーを設計し、第 2 章2-3) と同様の方法で、5' および 3' RACE 法により上流および下流の塩基配列を解析

Table 5. Degenerate primers used for isolation of cDNAs of floral homeotic genes.

Target gene	Direction	Primer sequence
Class A genes	forward	5'-ATGGGIAGRGGIARRGTISARYTRA-3'
	reverse	5'-CATIAGRTTYTYCTIGWICGDAT-3'
Class B genes	forward	5'-ATGGCIMGWGGIAARATYCARATYAA-3'
	reverse	5'-TCITCICCYTTYARRTGCTIAG-3'
	reverse	5'-TTYTTYTRDWIGTTCRRTYTGRKT-3'
Class C genes	forward	5'-ATGGGIMGIGIAARATYGARATHAA-3'
	reverse	5'-ARBAIYTCRTTYTTYTTIGMYCKDA-3'
	reverse	5'-TCYCTYYTYTGCATRWRITCDAYYTC-3'

Table 6. Primers used for isolation of full-length cDNAs of floral homeotic genes.

Target gene	Direction	Primer sequence
<i>TJSQUA</i>	forward	5'-CCATTTTTAGGGATAACATCT-3'
	reverse	5'-CATAGGCATCTCATGTTTCGAT-3'
<i>TDEF</i>	forward	5'-TCTCTATACCTCACCTCGAGAGT-3'
	reverse	5'-AACAAAGCAACATTGCACC-3'
<i>TGLO</i>	forward	5'-TTCCTTGAGGGGTTTCTAGT-3'
	reverse	5'-GAAAACATGGGAACAACTCGT-3'
<i>TPLE1</i>	forward	5'-CTGCAACTCTCCTGTCCACAA-3'
	reverse	5'-GAACAAAAGCCATGCAATGA-3'
<i>TFFAR</i>	forward	5'-CTTTCTGCATCAACCATCCC-3'
	reverse	5'-GTAATAAATTGTCCCTTACTTC-3'

した後、完全長の cDNA を増幅した (Table 6)。これらの完全長 cDNA の塩基配列を解析し、DDBJ に登録した。アクセッション番号は Fig. 11 の脚注に記載した。

第 2 章 2-3) と同様の方法で遺伝子の系統樹解析および系統樹の作成を行い、クローニングした各花器官ホメオティック遺伝子の配列から推定される全長のアミノ酸配列と高等植物の遺伝子とを比較した。

5) *in situ* ハイブリダイゼーション解析

無処理および CPPU による形態変化が現れる CPPU 処理後 7 日目の花芽を解析に用いた。第 2 章 2-5) と同様の方法で、花芽を固定後にパラフィン包埋し、マイクロトーム (Leica biosystems) を用いて 8 μ m 厚の切片を作製し、DIG ラベルした各花器官ホメオティック遺伝子特異的な RNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。RNA プローブは、クローニングした cDNA を鋳型とし、オープンリーディングフレームの 3' 末端部および 3'-非翻訳領域に設計した各遺伝子特異的なプライマー (Table 7) を用いた PCR 断片を pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入し、DIG RNA Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて作製した。ベクターを *Nae* I および *Spe* I または *Nco* I およ

び *Pvu* II で切断後、前者は T7 RNA polymerase により、後者は SP6 RNA polymerase により DIG ラベルした RNA を作製し、エタノール沈殿による精製後、各 RNA プローブとして用いた。スライドガラス当たりのプローブ濃度を 800 ng·mL⁻¹ に調整し、65°C で一晚、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浄から検出は、第 2 章 2-5) と同様の方法で行った。これらの解析は、独立に CPPU 処理した花芽を用いた 3 回の実験結果に基づく。

6) 定量 PCR 解析

無処理および CPPU 処理した花芽を用い、萼片、花弁、雄蕊、雌ずいのそれぞれの花器官から、第 2 章 2-4) と同様の方法で total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。トレニアの各花器官ホメオティック遺伝子について、オープンリーディングフレームの 3' 末端部および 3'-非翻訳領域に各遺伝子特異的なプライマーを設計した (Table 8)。また、内部標準として第 2 章 2-4) と同様に *Actin* 遺伝子 (*TjACT3*) を用いた。定量 PCR は第 2 章 2-4) と同様の方法で行った。蛍光量の測定温度は、*TjSQUA* および *TjFAR* は 75°C、*TjDEF* は 76°C、*TjGLO* および *TjACT3* は 77°C、*TjPLE1* は 79°C とし、データ解析

Table 7. Primers used to synthesize probes for *in situ* hybridization analysis of floral homeotic genes.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>TjSQUA</i>	481 bp	forward	5'-AACCAGCTCATACAGGATTCA-3'
		reverse	5'-GCGTTGTTTTGTTGCATCT-3'
<i>TjDEF</i>	499 bp	forward	5'-ACAGGAATCTGAAGAGGGA-3'
		reverse	5'-GCCCTACGAAATTAGTAGTACC-3'
<i>TjGLO</i>	479 bp	forward	5'-GCAGATTGAGCTCAGGCA-3'
		reverse	5'-AAGGTTTTGGCTTAACGAGAG-3'
<i>TjPLE1</i>	498 bp	forward	5'-GGAAGTCAAGAACATGGAGTCA-3'
		reverse	5'-ACAAGTACGAGGAGAAATTGAGG-3'
<i>TjFAR</i>	481 bp	forward	5'-CATAACAAGAACATGCTCGGTG-3'
		reverse	5'-GAACAAACATAATCAGCAGAGGATC-3'

Table 8. Primers used for qPCR analysis of floral homeotic genes.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>TjSQUA</i>	151 bp	forward	5'-GCTTTGCTGCATGATGATATA-3'
		reverse	5'-GCGTTGTTTTGTTGCATCT-3'
<i>TjDEF</i>	103 bp	forward	5'-GGTACTACTAATTTCTAGGG-3'
		reverse	5'-TAATATGGATCGAAATCATC-3'
<i>TjGLO</i>	111 bp	forward	5'-CGAATCTTCAGGAACGTTTC-3'
		reverse	5'-AAGGTTTTGGCTTAACGAGAG-3'
<i>TjPLE1</i>	172 bp	forward	5'-CCTTTGGCTGTTAGGATG-3'
		reverse	5'-GACACAGCCCGAGTCGATGAG-3'
<i>TjFAR</i>	129 bp	forward	5'-ATGGGATCCTCTGCTGATTAT-3'
		reverse	5'-TTCAAATTGAACAACACATGG-3'

は第2章2-4)と同様の方法で行った。各花器官ホメオティック遺伝子の全長cDNAあるいは*TfACT3*遺伝子の部分cDNAを持つプラスミドを用いて検量線を作成し、各遺伝子の発現量は、*TfACT3*に対する相対的な発現量で示した。これらの解析は、独立した3回の実験結果に基づく。

3. 結果

1) 副花冠の形態的、組織学的特徴の解析

幅広い副花冠は花卉と類似した形態であり、アントシアニンによる着色も認められた (Fig. 9a, b)。一方、細

長い副花冠については、アントシアニンによる着色が認められるものと認められないものが存在し、また、その形態については平板状のもの、基部が筒状で先端部がさじ弁状になるもの、先端部が棒状で2つの裂片を生じるものが混在していた (Fig. 9a, c-e)。これらの副花冠は、雄蕊と同様、概ね細長い形であった。また、先端部の2つの裂片は、雄蕊において花糸の先端部に形成される2つの葯と形態的な共通性が認められた (Fig. 9e, f)。従って、これらの副花冠は、雄蕊の形態に近い特徴も備えていると考えられた。

これらの副花冠、花卉および雄蕊の表皮細胞について

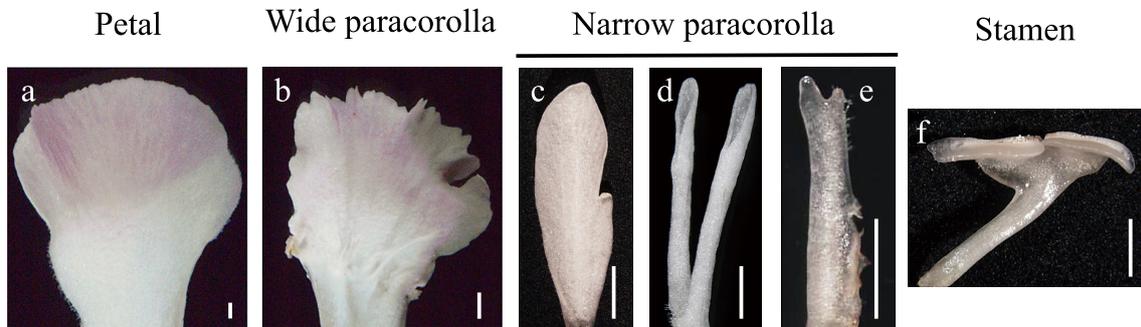


Fig. 9. Morphology of a CPPU-induced paracorolla compared with a petal and stamen.

The wide and colored paracorollas resembling the petal were grouped as 'wide paracorollas', while the narrow paracorollas resembling the filament were grouped as 'narrow paracorollas'. Samples are as follows: Petal (a); wide paracorolla (b); narrow paracorolla (c, d, e); stamen (f). Petals and stamens were collected from flowers not treated with CPPU. Scale bars = 1 mm.

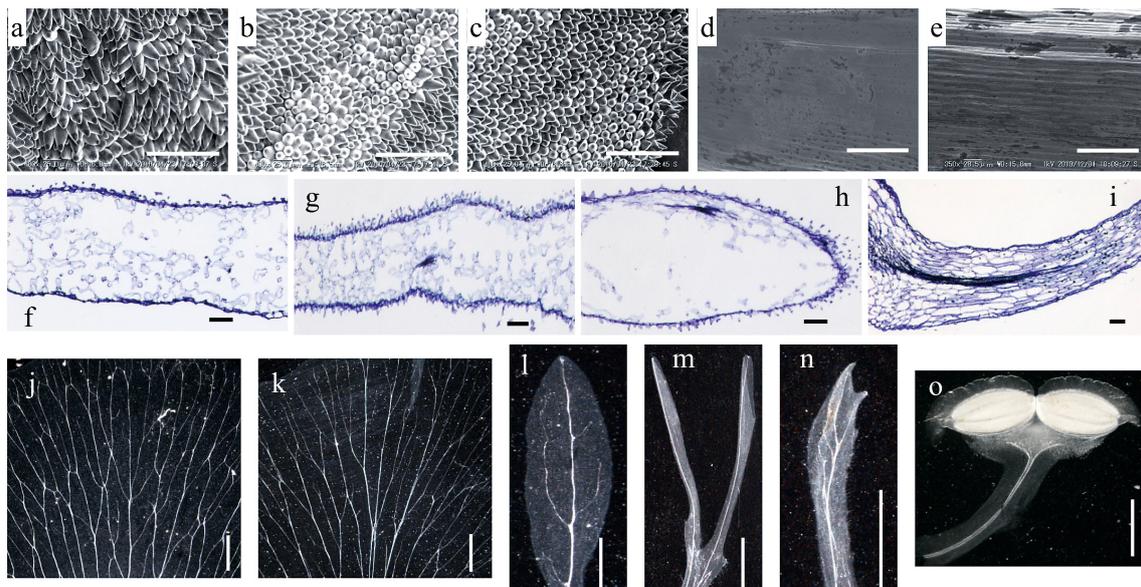


Fig. 10. Microscopic analyses of CPPU-induced paracorollas.

(upper row) Scanning electron micrographs of the adaxial face; (middle row) Photomicrographs of transverse sections; (lower row) Photo of vascular bundles. Samples are as follows: Petal (a, f, j); the wide paracorolla (b, g, k); the narrow paracorolla (c, d, h, l, m, n); stamen (e, i, o). Photo of c and g represents the narrow paracorolla of Fig. 9c, and photo of d and h represents the narrow paracorolla of Fig. 9d and e. Petals and stamens were collected from flowers not treated with CPPU. Scale bars = 100 μ m (a-i) and 1 mm (j-o).

SEMによる観察を行ったところ、花卉の表皮では円錐状の細胞が並んでいたのに対し (Fig. 10a), 雄蕊の花糸では細長い細胞が並び、表面に凹凸のないなめらかな構造を呈していた (Fig. 10e)。これに対して、CPPU処理により発生する副花冠のうち、幅広い副花冠では、花卉と同様に円錐状の細胞が並んでいた (Fig. 10b)。一方、細長い副花冠では、花卉と同様に円錐状の細胞が並んでいるものから花糸同様に細長い細胞が並んでいるものまで見られた (Fig. 10c, d)。また、細長い副花冠の中でも、Fig. 9cのような幅が広めのものでは円錐状の細胞が見られ、Fig. 9dや9eのような細めものでは細長い細胞が並んでいる傾向にあった。これらの結果は、細長い副花冠の表皮は、花卉様のものから花糸様のもので混在していることを示している。

これらの花器官の縦断切片を観察したところ、花卉では柔組織が粗な状態で、その中に丸みを帯びた細胞が存在していた (Fig. 10f)。一方、雄蕊の花糸の部分では柔組織に細長い細胞が密に存在していた (Fig. 10i)。これに対し、幅広い副花冠では柔組織に丸みを帯びた細胞が粗く存在し、花卉と同様の特徴を示していた (Fig. 10g)。一方、細長い副花冠でも柔組織に細胞が粗に分布していたが、その細胞の形は花糸で見られたように細長いものもあった (Fig. 10h)。また、細長い副花冠の中でも、Fig. 9cのような幅が広めのものでは幅広い副花冠と同様の特徴が見られ、Fig. 9dや9eのような細めものでは花糸と同様の特徴が見られる傾向にあった。

さらに、組織を透明化して維管束の特徴を調べたところ、花卉では細い維管束が網目状に分岐していたのに対し (Fig. 10j)、雄蕊の花糸では中心部に太く分岐の見られない維管束が観察された (Fig. 10o)。これに対して、幅広い副花冠では維管束は花卉同様に網目状に分岐していたが (Fig. 10k)、細長い副花冠では、花卉に近い丸みを帯びたものでも分岐はあまり見られず、中心部に太めの維管束が見られた (Fig. 10l)。さらに雄蕊の形態に近い円筒形あるいは先端部に欠刻の入る副花冠では、花糸と同様にほぼ中心部の維管束のみが観察された (Fig. 10m, n)。

以上の結果から、CPPU処理により誘導されるトレニアの副花冠のうち、花卉に近い形態を持つ幅広い副花冠は、組織も花卉に近い特徴を持つことが示された (Fig. 9b, Fig. 10b, g, k)。一方、雄蕊に近い形態を持つ細長い副花冠の組織は、花卉に近い特徴を持つものから雄蕊に近いものまで存在していることが示された (Fig. 9c-e, Fig. 10c, d, h, l-n)。

2) トレニアの花器官ホメオティック遺伝子のクローニングと系統樹解析

花器官ホメオティック遺伝子の発現が、CPPU処理により誘導される副花冠の形態の違いに果たす役割を明らかにするために、トレニアからA, B, C各クラスの花器官ホメオティック遺伝子を単離した。その結果、1種類のclass A遺伝子、2種類のclass B遺伝子、2種類のclass C遺伝子が単離された。それぞれの推定されたアミノ酸配列を他の花器官ホメオティック遺伝子のアミノ酸配列と比較したところ、いずれもMADS-box遺伝子で保存性の高いMADS-domainおよびK-domainを持っていた (Fig. 11)。これらの遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列に基づいて他の高等植物の花器官ホメオティック遺伝子との間で系統樹を作成したところ、それぞれ予想されるclassに分けられた (Fig. 12)。class A遺伝子は同じシソ目に属するキンギョソウの*SQUAMOSA*と、class B遺伝子はキンギョソウの*DEFICIENS*および*GLOBOSA*と、class C遺伝子はキンギョソウの*PLENA*および*FARINELLI*と相同性が非常に高かったことから、トレニアの遺伝子をそれぞれ*TJSQUA*, *TJDEF*, *TJGLO*, *TJPLE1*および*TJFAR*と名付けた (Fig. 11, Fig. 12)。class A遺伝子の*TJSQUA*については、C末端にeuAP1タイプのclass A遺伝子で保存されているeuAP1 motifおよびfarnesylation motifが見られた (Fig. 11A; Litt and Irish, 2003)。class C遺伝子の*TJPLE1*および*TJFAR*については、C末端にclass C遺伝子で保存されているAG motif IおよびIIが見られた (Fig. 11C; Kramer et al., 2004)。また、class B遺伝子については、*TJGLO*のC末端にPI motifが、*TJDEF*のC末端にはPI motif-derived sequenceとeuAP3 motifが保存されていることが示されている (Fig. 11B; Sasaki et al., 2010)。

以上の結果から、トレニアから単離したこれらの遺伝子は、それぞれのクラスのMADS-boxタンパク質をコードしている花器官ホメオティック遺伝子であると考えられた。

3) CPPU処理により誘導される副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現解析

副花冠形成初期の蕾における各花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンを、*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析したところ、解析した全ての遺伝子で、幅広い副花冠の原基が形成される花卉、雄蕊および雌ずい形成期 (ステージ4) の後期では、局在性の明瞭な強いシグナルが認められたが、細長い副花冠の原基が形成さ

れる花卉伸長中期（ステージ6）の後期では、シグナルが弱くなり、その局在性もややあいまいになった（Fig. 13）。幅広い副花冠では、class A 遺伝子の *TfSQUA* は副花冠の原基の基部で強い発現が見られ（Fig. 13A）、class B 遺伝子の *TfDEF* および *TfGLO* は副花冠の原基全体で強い発現が見られた（Fig. 13B）。これらの発現パターンは無処理の花弁と同様であった（Fig. 13A, B）。さらに、幅広い副花冠の原基では先端部で class C 遺伝子の *TfPLE1* および *TfFAR* の弱い発現が見られた（Fig. 13C）。一方、細長い副花冠では、class B 遺伝子の *TfDEF* および *TfGLO* は副花冠の原基全体で発現が見られたが（Fig. 13B）、class A 遺伝子の *TfSQUA* は副花冠原基の周縁部のみで弱い発現が見られ（Fig. 13A）、class C 遺伝子も *TfPLE1* のみ副花冠原基の周縁部で弱い発現が見られた（Fig. 13C）。なお、*in situ* ハイブリダイ

ゼーションの切片における各遺伝子の発現部位と各花器官および副花冠の発生位置が確かに一致していることを、同じ発達ステージの花芽を SEM 観察することにより確認している（Fig. 13D）。

さらに、発達したつぼみの各花器官における花器官ホメオティック遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR により解析したところ、CPPU 処理により発生する副花冠のうち、幅広い副花冠では class A 遺伝子の *TfSQUA* および class B 遺伝子の *TfDEF* および *TfGLO* は花弁並みに高い発現量が見られたが（Fig. 14A, B）、雄蕊および雌ずいでは発現量が高い class C 遺伝子の *TfPLE1* および *TfFAR* は発現量が低く、萼片および花弁並みであった（Fig. 14C）。一方、細長い副花冠では、class B 遺伝子の *TfDEF* および *TfGLO* は、幅広い副花冠と同様に花弁並みに高い発現量が見られたが（Fig. 14B）、class A 遺伝

(A) Class A genes

	MADS domain
TfSQUA	MGRGK V Q L R R IE N KINRQ V T F SKRRG L L K KA H E I SV L CD
AmSQUA	MGRGK V Q L K R IE N KINRQ V T F SKRRG L L K KA H E L SV L CD
AP1	MGRG R V Q L R K R IE N KINRQ V T F SK R R A G L L K KA H E I SV L CD
TfSQUA	AEVAL I V F SHK G K L FE Y
AmSQUA	AEVAL I V F S N K G K L FE Y
AP1	AEVAL V V F SHK G K L FE Y

	euAP1 motif	farnesylation motif
TfSQUA	I S N E L D L T L D S L S Y S C H L G C F A A	C F A A
AmSQUA	R R N E L D L T L D S L S Y S C H L G C F A A	C F A A
AP1	R R N D L E L T L E P V Y N C N L G C F A A	C F A A

(C) Class C genes

	MADS domain
TfPLE1	M---D F P N D E S S R K N G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R
TfFAR	M E I Q S D Q S R E I S T Q R K N G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R
AmPLE	M---E F P N Q D S E S L R K N G R G K I E I K R I E N I T N R Q V T F C K R
AmFAR	M A S L S D Q S T E V S T E R K I G R G K I E I K R I E N K T N Q V T F C K R
AG	M A Y Q S E L G G D S S P L R K S G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R

TfPLE1	R N G L L K K A Y E L S V L C D A
TfFAR	R N G L L K K A Y E L S V L C D A
AmPLE	R N G L L K K A Y E L S V L C D A
AmFAR	R N G L L K K A Y E L S V L C D A
AG	R N G L L K K A Y E L S V L C D A

	AG motif I	AG motif II
TfPLE1	Y D A R N F M A M N L I D P T D Q H --	Y S C Q D Q T P L R L V
TfFAR	A R S G N Y L Q V N L Q Q P T S T N N Y P A ^ H D Q T S I H L V	Y S F H D Q T A L Q L V
AmPLE	Y D V R N F L P M N L M E P N Q Q Q --	Y S F H D Q T A L Q L V
AmFAR	F D A R N Y L Q V N L Q Q P N N D ---	Y P R Q D Q L P L Q L V
AG	F D S R N Y F Q V A A L Q P N N H Y S S A G R Q D Q T A L Q L V	Y P R Q D Q L P L Q L V

(B) Class B genes

	MADS domain
TfDEF	M A R G K I Q I K R I E N Q T N R Q V T Y S K R R N G L F K K A H E L T V L C D
AmDEF	M A R G K I Q I K R I E N Q T N R Q V T Y S K R R N G L F K K A H E L S V L C D
AP3	M A R G K I Q I K R I E N Q T N R Q V T Y S K R R N G L F K K A H E L T V L C D
TfGLO	M G R G K I E I K R I E N S S N R Q V T Y S K R R N G I M K K A K E I S V L C D
AmGLO	M G R G K I E I K R I E N S S N R Q V T Y S K R R N G I M K K A K E I S V L C D
PI	M G R G K I E I K R I E N A N N R V V T F S K R R N G L V K K A K E I T V L C D
TfDEF	A K V S I I M I S S T Q K L H E Y
AmDEF	A K V S I I M I S S T Q K L H E Y
AP3	A R V S I I M F S S N K L H E Y
TfGLO	A R V S V I I F A S S G K M Q E Y
AmGLO	A H V S V I I F A S S G K M H E F
PI	A K V A L I I F A S N G K M I D Y

	PI motif-derived sequence	euAP3 motif
TfDEF	I A L R Y V P N H H H H P S L GGG G CGGS D L T T F A L L E	D L T T F A L L E
AmDEF	I A L R L P T N H H-----P T L H S G G G S D L T T F A L L E	D L T T F A L L E
AP3	Y A L R F H Q N H H H Y Y P - N G L H A P S A S D I I T F H L L E	D I I T F H L L E
TfGLO	-----Q M P F A F R V Q P M Q P N L Q E	
AmGLO	-----Q M P F A F R V Q P M Q P N L Q E	
PI	-----D G Q F G Y R V Q P I Q P N L Q E	

Fig. 11. Alignment of amino acid sequences of floral homeotic genes in torenia, *A. majus*, and *Arabidopsis*.

(A) Class A, (B) class B, (C) class C genes. Accession numbers were as follows: Class A genes; AmSQUA (*Antirrhinum majus*), X63701; AP1 (*Arabidopsis thaliana*), Z16421; TfSQUA (*Torenia fourmieri*), AB359949; Class B genes; AmDEF (*Antirrhinum majus*), X52023; AmGLO (*Antirrhinum majus*), X68831; AP3 (*Arabidopsis thaliana*), M86357; PI (*Arabidopsis thaliana*), D30807; TfDEF (*Torenia fourmieri*), AB359951; TfGLO (*Torenia fourmieri*), AB359952; Class C genes; AG (*Arabidopsis thaliana*), NM_118013; AmFAR (*Antirrhinum majus*), AJ239057; AmPLE (*Antirrhinum majus*), S53900; TfFAR (*Torenia fourmieri*), AB359953; TfPLE1 (*Torenia fourmieri*), AB359954. Motifs conserved in each class of floral homeotic genes were boxed. Identical and homologous amino acid was indicated by light blue and blue letters, respectively.

子の *TfSQUA* の発現量は低く、雄蕊に近い発現量を示した (Fig. 14A). また、class C 遺伝子の *TfPLE1* および *TfFAR* の発現量も幅広い副花冠と同様に低く、萼片および花弁並みであった (Fig. 14C).

4. 考察

本研究の結果、CPPU 処理により発生するトレニアの副花冠の場合、副花冠の形成初期では、その形態が発達後に幅広いになるか細長くなるかに関わらず、class A, B, C 遺伝子とも発現が見られるものの、幅広い副花冠では class A と B 遺伝子の発現が中心であった (Fig. 13A-C). 従って、class A と B 遺伝子が中心の発現パターンとなっていることが、幅広い副花冠が、形態的にも組織的にも花弁に近い状態に発達している原因であると考えられた (Fig. 15). これに対し、細長い副花冠の場合には、副花冠の形成初期では、class B 遺伝子の発現が中心となっている傾向が見られた (Fig. 13A-C). さらに、より発達の進んだ副花冠においては、この発現パターンがより明確になり、class B 遺伝子の発現は花弁や幅広い副花冠と同様に高いものの、class A 遺伝子の発現は

雄蕊と同様に、また class C 遺伝子の発現は花弁と同様に、ともに低くなっていた (Fig. 14). つまり、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンが、花弁パターンでも雄蕊パターンでもないため、副花冠のアイデンティティーが花弁になるか雄蕊になるかが不安定な状態になっていると考えられる (Fig. 15). そのために、細長い副花冠では、形態的にも組織的にも花弁に近いものから雄蕊に近いものまで様々なものが存在すると考えられた (Fig. 9c-e, Fig. 13A-C). 従って、副花冠の形態の決定には、原基形成からやや発達したステージにかけての花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンが重要な役割を果たしていると考えられた (Fig. 15).

CPPU は内生サイトカイニンを蓄積させることから、CPPU 処理したトレニアでは、内生サイトカイニンが蓄積することにより副花冠が誘導されると考えられる (Nishijima and Shima, 2006). 花器官ホメオティック遺伝子の発現は、サイトカイニンにより直接制御を受けている可能性がある (Estruch et al., 1993; Li et al., 2002). しかし、無処理のトレニアには副花冠が存在せず、比較実験ができないため、副花冠におけるサイトカイニンシ

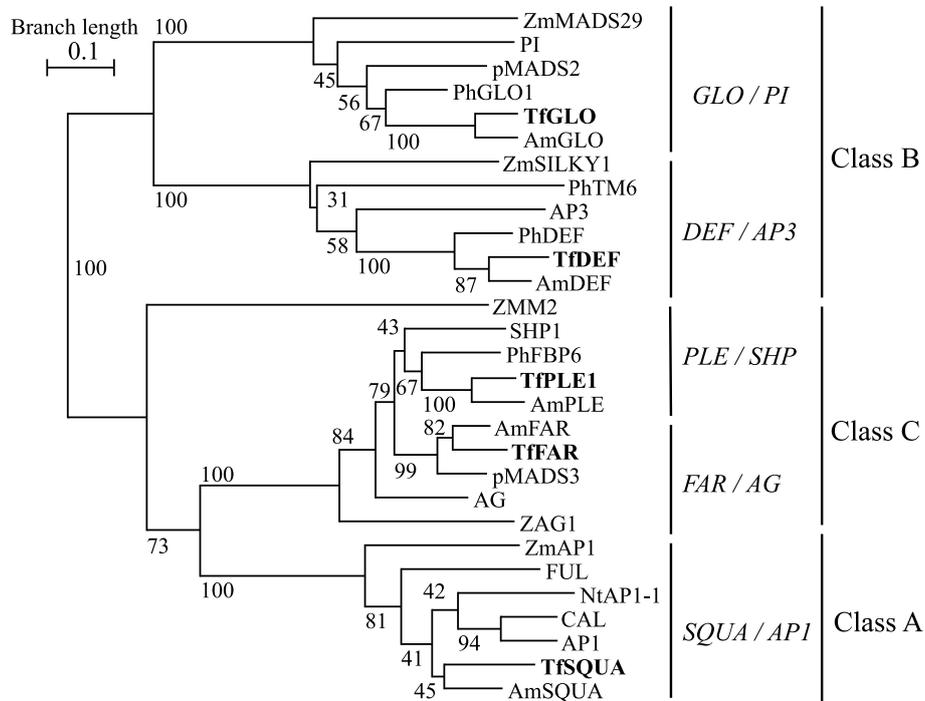


Fig. 12. Phylogenetic tree of homeotic genes in torenia and other plant species.

The neighbor-joining tree was generated based on amino acid sequences using CLUSTAL W, and was drawn with NJplot. Bootstrap values from 100 replicates are indicated near the branching points. Accession numbers were the same as described in legend of Fig. 11 and follows: Class A genes; CAL (*Arabidopsis thaliana*), L36925; FUL (*Arabidopsis thaliana*), U33473; NtAP1-1 (*Nicotiana tabacum*), AF009126; ZmAP1 (*Zea mays*), L46400; Class B genes; PhDEF (*Petunia hybrida*), DQ539416; PhGLO1 (*Petunia hybrida*), M91190; PhTM6 (*Petunia hybrida*), DQ539417; pMADS2 (*Petunia hybrida*), X69947; ZmMADS29 (*Zea mays*), AJ292961; ZmSILKY1 (*Zea mays*), AF181479; Class C genes; PhFBP6 (*Petunia hybrida*), X68675; pMADS3 (*Petunia hybrida*), X72912; SHP1 (*Arabidopsis thaliana*), NM_001084842; ZAG1 (*Zea mays*), L18924; ZMM2 (*Zea mays*), AF112149.

グナルの上昇が、花器官ホメオティック遺伝子の発現を直接制御しているか否かは不明である。しかしながら、本研究で副花冠以外の各花器官における花器官ホメオティック遺伝子の発現を CPPU 処理の有無で比較した場合、いずれの遺伝子においても発現パターンに差は見られなかった (Fig. 13, Fig. 14)。従って、形態の異なる副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンが、サイトカイニン処理によって制御されているとは考えにくい。

CPPU 処理したトレニアで誘導される副花冠は、雄蕊の基部の側方から発生してくることから、雄蕊の托葉、すなわち whorl 3 に由来すると考えられる (Nishijima

and Shima, 2006; Yamaguchi et al., 2010)。キンギョソウの場合、葯では class B および C 遺伝子が、花糸では雄蕊と花弁の中間的な class A, B および C 遺伝子が、花弁状の副花冠では花弁同様 class A および B 遺伝子が発現していることから、同じ whorl 内での花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンの勾配が、花の形態の変化に重要な役割を果たしていることが報告されている (Yamaguchi et al., 2010)。また、CPPU 処理したトレニアにおいても、花弁の基部と先端部で花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンが変化している (Niki et al., 2006b)。これらのことから、幅広い副花冠と細長い副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現パ

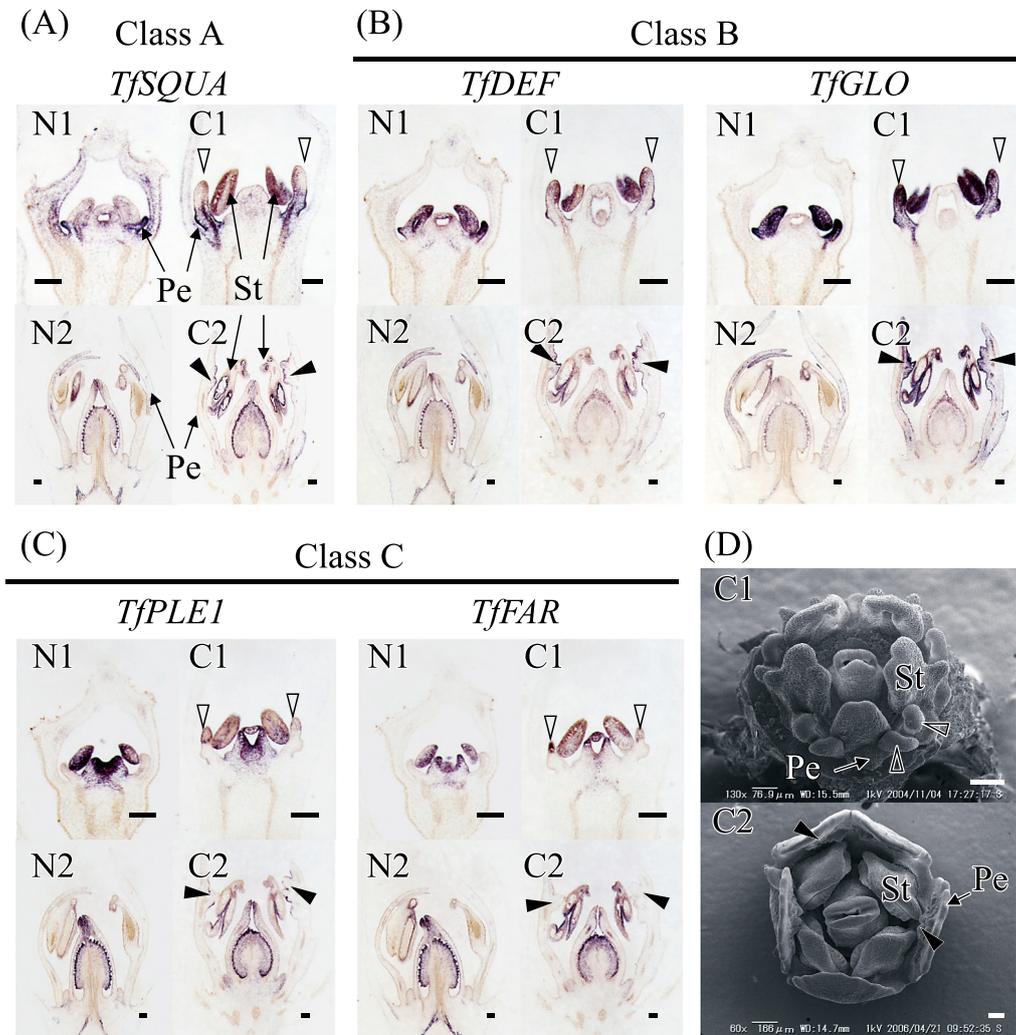


Fig. 13. *In situ* hybridization of homeotic genes in flower buds at paracorolla initiation. Gene-specific antisense RNA probes of a class A gene (A), class B genes (B), and class C genes (C) were used. Spatial distributions of floral organs at the paracorolla initiation stage are shown by scanning electron micrographs (D). CPPU-treated flower buds were collected at paracorolla initiation, while untreated buds were collected at the corresponding stage. N1, untreated flower buds at the same stage as C1; C1, CPPU-treated flower buds at wide paracorolla initiation; N2, untreated flower buds at the same stage as C2; C2, CPPU-treated flower buds at narrow paracorolla initiation. Triangles represent wide paracorollas (\triangle) and narrow paracorollas (\blacktriangle). Scale bars = 100 μ m. Pe, Petal; St, Stamen.

ターンの違いは、むしろ副花冠の発生する花弁上の位置の違いによる発現パターンの違いを反映しているものと考えられる。幅広い副花冠の発生位置は発達初期の花弁の基部であり (Fig. 13D), 副花冠の原基が形成される際、この部位における花器官ホメオティック遺伝子の発現は class A および B 遺伝子が中心となっている (Fig. 13A-C)。一方、細長い副花冠の発生位置はやや発達した花弁の中央部であり (Fig. 13D), 副花冠の原基が形

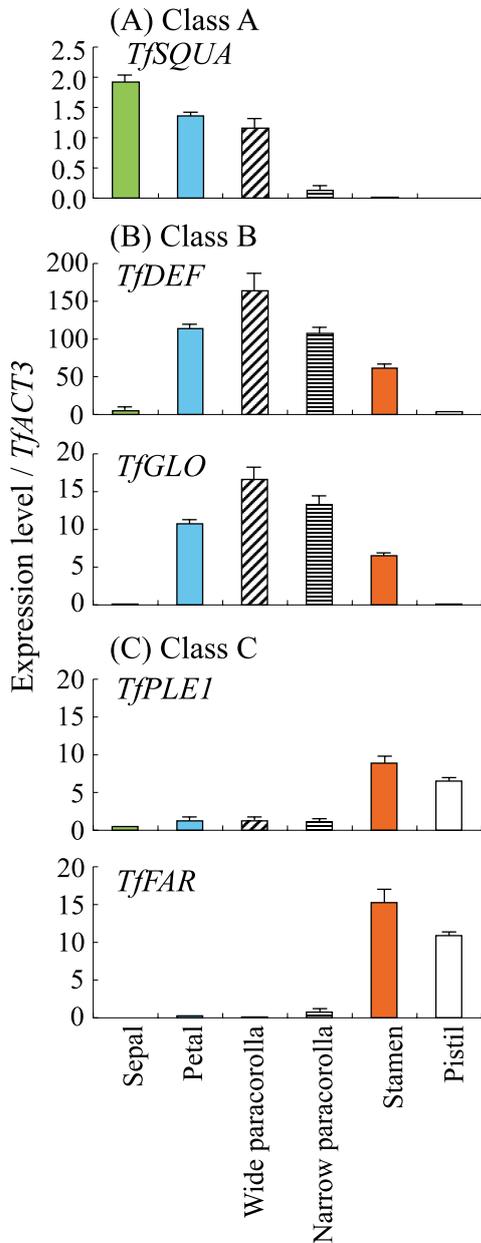


Fig. 14. Quantitative real-time PCR analyses of homeotic genes in CPPU-treated floral organs. The relative expression levels of class A (A), class B (B), and class C (C) genes are shown as values relative to that of *TfACT3*, which was used as an internal standard. Vertical bars indicate SE (n = 3).

成される際、この部位における花器官ホメオティック遺伝子の発現は class B 遺伝子が中心となり、class A 遺伝子の発現は雄蕊と同程度に、class C 遺伝子の発現は花弁と同程度に、ともに低くなっている (Fig. 13A-C)。これらの発現パターンは、その後の花芽の発達過程でも維持されている (Fig. 14; Niki and Nishijima, 2008)。従って、副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンは、その発生位置の器官における発現パターンを反映し、副花冠の発達初期における発現パターンが副花冠の形態を決定していると考えられた。

本研究の結果は、副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現が、その形態に重要な役割を果たすとともに、副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンは、その発生位置により決定されていることを示している。変異原処理あるいは遺伝子組換え技術により、それぞれの発生位置において花器官ホメオティック遺伝子の発現が変化した変異体が得られれば、これまでとは異なった形態の副花冠を持った花が得られる可能性がある。

第4章 花芽におけるサイトカニン生成遺伝子の局所的な発現による装飾的な花形の誘導

1. 緒言

第2章において、CPPU 処理により誘導されるトレニアの花形の違いは、処理時の花芽発達ステージによって、花芽内におけるサイトカニンシグナルが蓄積する部位の分布が異なるためであることを明らかにした。さらに、第3章において、副花冠の形態は、その発生位置の花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンにより決定付けられていることを明らかにした。従って、これら

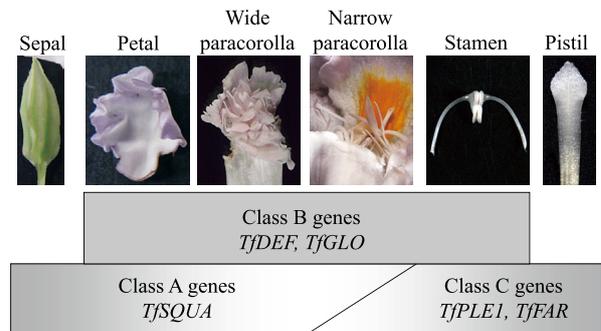


Fig. 15. Hypothetical role of floral homeotic genes in the identification of floral organs and the regulation of paracorolla morphology. The darkness of the belts indicates the extent of expression.

の結果を応用し、サイトカイニンを、萼片伸長期（ステージ3）から花弁、雄蕊および雌蕊形成期（ステージ4）に花弁および雄蕊原基の基部に蓄積させれば、class A および B 遺伝子の発現の組み合わせによる幅広い副花冠を、花弁伸長初期（ステージ5）から花弁伸長中期（ステージ6）に花弁の基部から中央部に蓄積させれば、class B 遺伝子の発現が中心となった細長い副花冠を誘導でき、またサイトカイニンを花弁の中央部から先端部に蓄積させれば、鋸歯を誘導できると考えられる。

しかしながら、これらの知見の花き育種および生産への応用を目指す場合、突然変異を中心とした個々の遺伝子の変異の集積によるこれまでの育種法では、花芽内の特定の器官にサイトカイニンを蓄積する個体を得ることは困難である。また、CPPU 処理によって特定の花形を得ようとする場合、特定の花芽発達ステージに処理することが必要であり、経済栽培に応用することは困難である。そこで、花器官特異的なプロモーターを用いてサイトカイニン生合成に関わる遺伝子を発現させる組換え体の利用が有効な手段として考えられる。

植物におけるサイトカイニンの生合成は、IPT が触媒する ATP および ADP のイソペンテニル化から始まるが (Fig. 2)、このステップは生合成全体の律速段階と考えられている (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001)。シロイヌナズナでは9つの *IPT* 遺伝子がクローニングされているが、これらを導入した組換え体では内生サイトカイニン濃度が上昇することが示されている (Sakakibara et al., 2005)。また、これらの遺伝子を特定の花器官で発現させるためには、花器官ホメオティック遺伝子のプロモーターの利用が考えられる。シロイヌナズナの花器官ホメオティック遺伝子である *APETALA1* (*API*) は whorl 1 および whorl 2 で、*APETALA3* (*AP3*) は whorl 2 および whorl 3 で特異的に発現する遺伝子であることから (Jack et al., 1992; Mandel et al., 1992)、これらの遺伝子のプロモーターで *IPT* 遺伝子の発現を制御した組換え体を作成することにより、萼片および花弁あるいは花弁および雄蕊特異的にサイトカイニンおよびサイトカイニンシグナルを蓄積させることが可能になると考えられる (Fig. 16)。

そこで、シロイヌナズナの *API* および *AP3* 遺伝子のプロモーターを用いてシロイヌナズナの *IPT* 遺伝子 (*AtIPT4*) をトレニアの花器官で発現させることにより、花芽内の器官特異的なサイトカイニンの上昇が、花の形態にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、遺伝子組

換えを利用した花形改良技術開発の可能性について検討を行った。

2. 材料および方法

1) 植物材料

Torenia fournieri 'Crown Violet' (タキイ) を供試した。組換え体の作出には、3% スクロースを含む1/2 Murashige and Skoog 培地を入れたプラントボックス内で、無菌的に継代した培養植物を用いた (Aida et al., 2000)。

遺伝子のクローニングには *Arabidopsis thaliana* を供試した。第2章2-1) のトレニアと同様の方法で育苗、定植し、20°C 一定に調節した蛍光灯下 ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (16時間明期 / 8時間暗期)) のインキュベータ内で栽培した。

2) プラスミドの構築とトレニアの形質転換

シロイヌナズナの *AtIPT4* 遺伝子 (AB061402) のクローニングには、若い花芽を用い (Miyawaki et al., 2004)、第2章2-3) と同様の方法で total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。シロイヌナズナの *API* 遺伝子 (*At1g69120*) および *AP3* 遺伝子 (*At3g54340*) のプロモーターのクローニングには、若い葉から ISOPLANT II (ニッポンジーン) を用いて抽出したゲノム DNA を用いた。各遺伝子に特異的な配列に *Eco* RI サイトを付加したプライマーを設計し (Table 9)、KOD Plus DNA

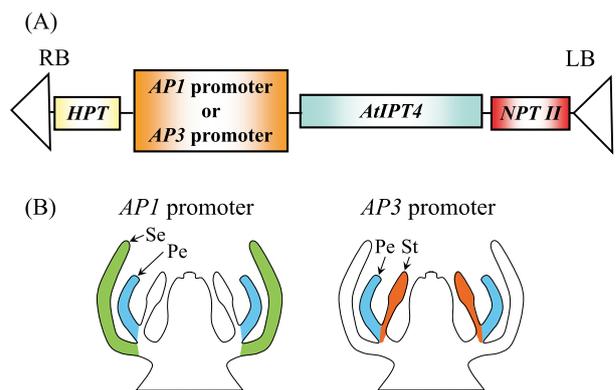


Fig. 16. Transgene construct for floral organ-specific expression of cytokinin biosynthesis gene. (A) T-DNA region of introduced vector (pGWB1). Hygromycin phosphotransferase (HPT) and neomycin phosphotransferase (NPT) II were used for transformant selection. (B) Predicted effect of the transgene. Floral organs expected to have elevated cytokinin production were colored with green in sepal, blue in petal, and orange in stamen. *API*, *APETALA1*; *AP3*, *APETALA3*; *AtIPT4*, *Arabidopsis thaliana isopentenyltransferase4*; LB, Left border; Pe, Petal; RB, Right border; Se, Sepal; St, Stamen.

polymerase (東洋紡) を用いて *AtIPT4* 遺伝子のオープンリーディングフレームおよび *API* および *AP3* 遺伝子の 5' 上流領域を増幅した。増幅した PCR 断片を *Eco* RI で切断し、*AtIPT4*断片を *API*あるいは *AP3*断片と連結した。さらに、上述の *API*用または *AP3*用の forward プライマーと、*AtIPT4*用の reverse プライマーの組み合わせにより (Table 9), KOD Plus DNA polymerase (東洋紡) を用いて各連結した各断片全体を増幅した。増幅した PCR 断片を pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen) に挿入後、Gateway LR clonase (Invitrogen) の反応により、植物の形質転換用ベクター pBI101に由来する destination vector pGWB1 (Fig. 16, Nakagawa et al., 2007) に挿入した。

トレニアの形質転換は、Aida and Shibata (1995, 2001) の方法に基づいて行った。25°C一定に調節した蛍光灯下 (85 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (16時間明期/8時間暗期)) のインキュベータ内で、挿し芽で増殖し、栄養生長状態を維持した培養植物の葉切片に、上述のように構築したベクターを導入したアグロバクテリウムを感染させ、カナマイシンおよびハイグロマイシンによる選抜を行い、形質転換体を得た。形質転換体は、プラスチックポットの園芸培土 (クレハ) に定植し、25°C/20°C (昼/夜) に調節した自然光下の温室内で栽培した。花形変化の見られた個体については自殖種子を採取し、 T_2 世代を得た。これらの種子は、第2章2-1) と同様の方法で育苗、定植し、上述温室内で栽培した。

3) 花芽発達期の形態観察

ステージ3, 4, 5および6の各ステージごとの花芽を、第2章2-5) と同様の方法で固定、脱水後、2M2P中で、減圧下で凍結乾燥し、SEMで観察した。

4) 定量 PCR 解析

ステージ6の非形質転換体および形質転換体の萼片、花弁、雄蕊、雌ずいのそれぞれの花器官から、第2章2-4) と同様の方法で total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。*AtIPT4*遺伝子について、オープンリーディングフレームの3'末端部および3'-非翻訳領域に遺伝子特異的なプライマーを設計した (Table 10)。また、サイトカイニンシグナルとして第2章2-4) と同様に *TyRR1*および *TyCKX5*を、また内部標準として *Actin* 遺伝子 (*TyACT3*) を用いた。定量 PCR は第2章2-4) と同様の方法で行った。蛍光量の測定温度は、*TyRR1*は76°C、*TyACT3*は77°C、*TyCKX5*は78°C、*AtIPT4*は80°Cとし、データ解析は第2章2-4) と同様の方法で行った。各遺伝子の全長 cDNA あるいは *TyACT3*遺伝子の部分 cDNA を持つプラスミドを用いて検量線を作成し、各遺伝子の発現量は、*TyACT3*に対する相対的な発現量で示した。これらの解析は、独立した3回の実験結果に基づく。

5) 内生サイトカイニンの分析

トレニアの内生サイトカイニンは、花弁伸長後期 (ステージ7) の萼片、花弁、雄蕊、雌ずいの各花器官に分けて抽出した。抽出は Dobrev and Kaminek (2002) の

Table 9. Primers used for transgene construction.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>AtIPT4</i>	970 bp	forward	5'-CTCAG <u>AATTC</u> GACATGAAGTGT-3'
		reverse	5'-CTAGTTAAGACTTAAAAATCT-3'
<i>API</i>	1729 bp	forward	5'-TGTATCGTTTCAAACTCAGG-3'
		reverse	5'-TACTGAATTCGAACCAACAAAAC-3'
<i>AP3</i>	1197 bp	forward	5'-GACCAGATCAAGAGTGCCTG-3'
		reverse	5'-GTTTGAATTCCTTTGTTGAAG-3'
<i>API::AtIPT4</i>	2689 bp	forward	5'-CACCTGTATCGTTTCAAACTC-3'
		reverse	5'-CTAGTTAAGACTTAAAAATCT-3'*
<i>AP3::AtIPT4</i>	2157 bp	forward	5'-CACCGACCAGATCAAGAGTGC-3'
		reverse	5'-CTAGTTAAGACTTAAAAATCT-3'*

Sequences of *Eco* RI site were underlined.

* Same primer used for isolation of *AtIPT4* gene.

Table 10. Primers used for qPCR analysis of *AtIPT4* gene.

Target gene	Product length	Direction	Primer sequence
<i>AtIPT4</i>	120 bp	forward	5'-ACAGCATCGTTTCGAGAGG-3'
		reverse	5'-GTGGCTCCTGACAATCTTCAC-3'

方法、定量は Nishijima ら (2011a) の方法に基づいて行った。液体窒素で凍結した各花器官 (0.2–0.6 gFW) を乳鉢、乳棒を用いて液体窒素中で破砕し、各 1 ng の重水ラベルした内部標準物質を加えた氷冷抽出液 (MeOH/water/formic acid (15/4/1, v/v/v)) 中に溶解後、 -20°C で一晚抽出した。加えた内部標準物質は、 $[^2\text{H}_6]$ N^6 - (Δ^2 -isopentenyl) adenine (iP), $[^2\text{H}_5]$ *trans*-zeatin (tZ), $[^2\text{H}_6]$ iP riboside (iPR), $[^2\text{H}_5]$ tZ riboside (tZR) である (OChemim)。遠心により上清を得た後、Sep-Pak $t\text{C}_{18}$ cartridge (Waters) により精製し、乾燥させた。残渣を 1 M formic acid で溶解し、Oasis MCX column (Waters) に通して吸着させ、MeOH, 0.35 M NH_4OH , 0.35 M NH_4OH を含む 60% (v/v) MeOH の順に溶出した。各溶出液のうち、cytokinin nucleobases, cytokinin nucleosides, cytokinin glucosides の溶出画分である 0.35 M NH_4OH を含む 60% (v/v) MeOH をエバポレーターで乾固した。続いて、0.05% acetic acid を含む 10% MeOH で溶解し、含まれるサイトカイニンを liquid chromatography-tandem mass spectrometry system (LC/MS/MS, model 2695/TSQ7000, Waters/Thermo Fisher Scientific) により解析した。各サイトカイニンは、 35°C に保持した ODS column (MD, $5\ \mu\text{m}$, $2.5\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$, 資生堂) を用い、流速 $0.2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の solvent A (0.05% acetic acid を含む MeOH) と solvent B (0.05% acetic acid を含む水) の濃度勾配により分離した。両溶媒の勾配は、0 min, 10% A + 90% B; 45 min, 80% A + 20% B; 55 min, 100% である。定量は selected ion recording mode (ionization voltage; 4.7 kV, キャピラリー温度; 200°C , collision energy; サイトカイニン種により -22 から $-34\ \text{V}$) で行った。データは Xcaliber software (Thermo Fisher Scientific) により解析し、内生サイトカイニン量は、内部標準との量比により定量した。これらの解析は、独立した 3 回の実験結果に基づく。

3. 結果

1) 花形の変化した組換え体の形態的特徴の解析

API および *AP3* プロモーターのいずれかを使用して *AtIPT4* を発現させた組換え体 (*API::AtIPT4*, *AP3::AtIPT4*) においても、正常型と比べて花形に変化が見られる個体が得られ、これらの自殖後代について、遺伝した花形の形質を調査した。正常型では花弁数が 5 枚であるのに対し (Fig. 17a), *API::AtIPT4* を導入した組換え体では花弁数が 6–7 枚へと増加した (Fig. 17b)。また、萼片は正常型では 5 枚であるのに対して 5–7 枚と増加傾向にあったが、雄蕊および雌ずいの数に変化は見られなかった。これに対して、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花弁数が 5–6 枚と増加傾向にあったが (Fig. 17c, d), *API::AtIPT4* を導入した組換え体に比べると増加の程度は小さかった (Fig. 17b)。さらに、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花弁数の増加だけでなく、花弁の大型化により花冠が拡大し、花弁周縁に鋸歯の発生が見られた (Fig. 17c, d)。さらに、花弁に細長い付属弁の発生も見られた (Fig. 17d)。また、雄蕊は正常型では 4 本であるのに対して 4–5 本であったが、萼片および雌ずいの数に変化は見られなかった。

これらの組換え体について、花芽の発達過程を観察したところ、ステージ 3 において、正常型および *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では萼片が 5 枚であるのに対し (Fig. 18a, o), *API::AtIPT4* を導入した組換え体では萼片の数が 6 枚以上に増加し (Fig. 18h), ステージ 4 においては、いずれの組換え体においても正常型と比べて花托が拡大していた (Fig. 18b, i, p)。さらに、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、ステージ 5 において、正常型 (Fig. 18c), さらに *API::AtIPT4* を導入した組換え体と比べても (Fig. 18j), 花托の拡大がより顕著になっていた (Fig. 18q)。*API::AtIPT4* を導入した組換え体では、ステージ 5 からステージ 6 に、花弁原基の数が増加していた (Fig. 18c, d, g, j, k, n)。また、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、ステージ 6 の初

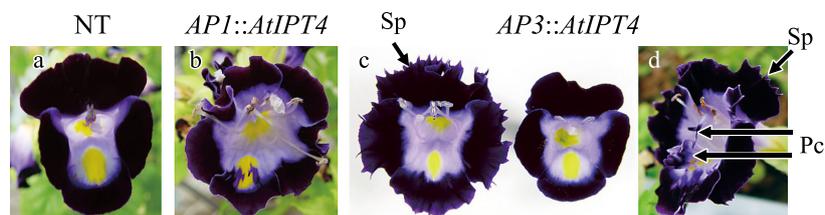


Fig. 17. Morphological changes in the flowers of torenia.

a, Normal type (NT); b, *API::AtIPT4*; c and d, *AP3::AtIPT4*. Pc, Paracorolla; Sp, Serrated petal.

期において、正常型および *API::AtIPT4* を導入した組換え体と比べて雄蕊様の器官が大きく発達してはただけでなく (Fig. 18d, k, r), ステージ6の後期において、花芽全体が拡大するとともに、付属弁の原基および花弁周縁に鋸歯の発生が見られた (Fig. 18s). この付属弁は、雄蕊の基部の背軸側の側方から発生し (Fig. 18t), 開花時は花弁の中央部に位置していた (Fig. 18u).

2) 組換え体のサイトカニンおよびサイトカニンシグナルの解析

これらの組換え体における花形の変化と花芽内におけるサイトカニンシグナルの分布の関係を解析するために、まず定量PCRにより各花器官における導入遺伝子の発現を解析した。予想されたように、導入した *AtIPT4* 遺伝子は、*API::AtIPT4* を導入した組換え体では萼片および花弁において、また *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では花弁および雄蕊で主に発現していた (Fig. 19).

各花器官における内生サイトカニン濃度については、正常型では、雄蕊において活性型の iP が多く蓄積していたが、萼片、花弁、雌ずいにおいては、iP および iP の前駆体である iPR とも蓄積量は少なく、特に、萼片および花弁では、iP および iPR は検出されなかった (Fig. 20A, B). これに対して、*API::AtIPT4* を導入した組換え体では、iP および iPR とも、萼片および花弁に蓄積が認められ、雄蕊および雌ずいでは正常型と同程度であった (Fig. 20A, B). 一方、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、iP および iPR とも、花弁では *API::AtIPT4* を導入した組換え体と同程度に蓄積が認められたものの、萼片では正常型と同様に検出されず、雄

蕊および雌ずいでは正常型と同程度であった (Fig. 20A, B). もう一方のサイトカニンの分子種である tZ およびその前駆体である tZR については、正常型では、主に雄蕊に蓄積していたが、萼片、花弁、雌ずいにおいても蓄積が見られた (Fig. 20C, D). また、正常型に比べて、*API::AtIPT4* を導入した組換え体の萼片では tZR の増加が見られたものの、それ以外の各花器官における tZ および tZR の蓄積パターンは、正常型と両組換え体で同様であった (Fig. 20C, D).

AP3::AtIPT4 を導入した組換え体では、雄蕊におけるサイトカニン濃度が正常型と同程度であったことか

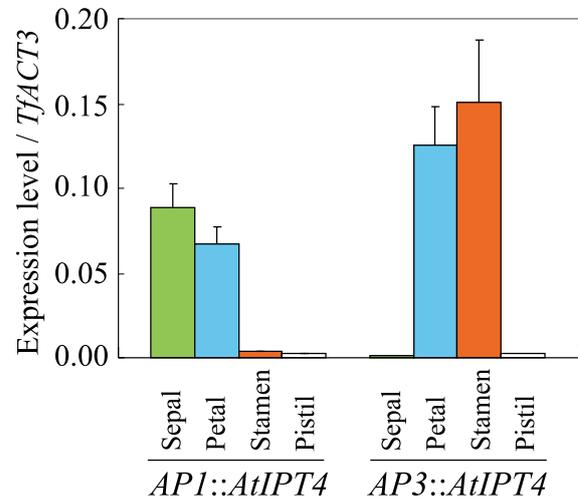


Fig. 19. *AtIPT4* expression in the floral organs of transgenic torenia.

The expression levels are shown as a value relative to that of *TjACT3*, which was used as an internal standard. Vertical bars represent \pm SE (n = 3).

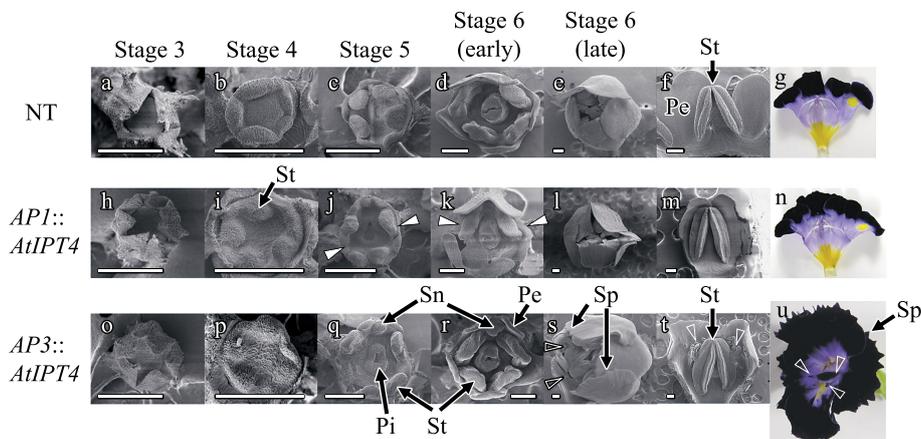


Fig. 18. Floral development of transgenic torenia.

a-g, Normal type (NT); h-n, *API::AtIPT4*; o-u, *AP3::AtIPT4*. Floral stages were defined as described by Nishijima and Shima (2006). Closed and open triangles represent lobes from a petal primordium and the site of paracorolla initiation, respectively. Pe, Petal; Pi, Pistil; Sn, Staminoid; Sp, Serrated petal; St, Stamen. Scale bars = 100 μ m.

ら、サイトカイニンシグナル強度の指標となる type-A RR の *TYRR1* および *TYCKX5* 遺伝子の発現を解析したところ、正常型では、いずれの花器官でも低いか検出されなかった (Fig. 21). *AP1::AtIPT4* を導入した組換え体では、*TYRR1* および *TYCKX5* 遺伝子とも、正常型に比べて萼片および花弁において10倍以上へと、大きく上昇していた (Fig. 21). これに対して、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、両遺伝子とも、正常型に比べて花弁および雄蕊において10倍以上へと、発現が大きく上昇していた (Fig. 21). 両組換え体の各花器官におけるこれらの発現パターンは、導入した *AtIPT4* の発現部位と一致していた。

4. 考察

本研究により、活性型サイトカイニンである iP の蓄積により、*AP1::AtIPT4* を導入した組換え体では萼片および花弁において、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では花弁および雄蕊においてサイトカイニンシグナルが上昇することにより、花形が変化したものと考えられた (Fig. 19, Fig. 20A, B, Fig. 21). また、もう一方の活性型サイトカイニン分子種であり、組換え体の各花器官における蓄積パターンに変化の見られなかった tZ は、花形の変化に関与していないと考えられた (Fig. 20C, D).

AP3::AtIPT4 を導入した組換え体において増加が予想された雄蕊の内生サイトカイニン濃度は、予想に反して

正常型と同程度であった (Fig. 20A, B). サイトカイニンは葯および花粉の発達に必要なであり、雄蕊がその生合成の場となっていると考えられる (Huang et al., 2003; Sawhney and Shukla, 1994). トレニアの正常型の花において、雄蕊のサイトカイニン濃度が著しく高かったことは、このことを反映していると考えられる (Fig. 20A, C). その一方で、葯特異的にアグロバクテリウムの *IPT* 遺伝子を発現させたタバコでは、葯の形態異常、花粉の量の減少および稔性の低下が報告されていることから (Geng et al., 2002)、葯における過剰なサイトカイニンシグナルは、雄蕊の正常な発達を阻害すると考えられる。従って、*AP3::AtIPT4* を導入したトレニアにおいても、雄蕊におけるサイトカイニンシグナルの上昇が、雄蕊の正常な発達に対して阻害的に働き、それがサイトカイニンの生合成に抑制的に作用した可能性がある。

AP3::AtIPT4 を導入した組換え体では付属弁の発生が見られ、その形態は CPPU 処理したトレニアで誘導される細長い副花冠と類似していた (Fig. 17d, Fig. 18u; Niki et al., 2012; Nishijima and Shima, 2006). この付属弁の発生位置は雄蕊基部の背軸側の側方であり、さらにその発生時期はステージ 6 であり、いずれも CPPU 処理により誘導される細長い副花冠と一致していた (Fig. 18s, t). 従って、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体で発生した付属弁は、雄蕊の托葉に由来する副花冠であると考えられた (Nishijima and Shima, 2006).

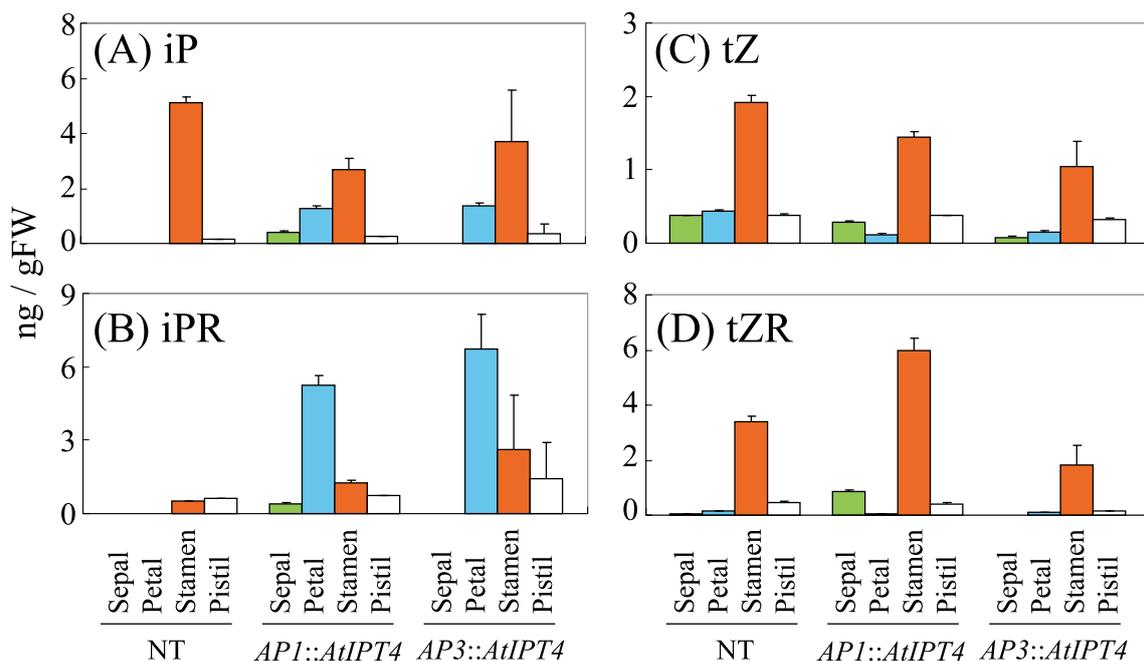


Fig. 20. Concentration of endogenous cytokinins in the floral organs of normal type (NT) and transgenic torenia. iP, isopentenyladenine; iPR, isopentenyladenine riboside; tZ, *trans*-zeatin; tZR, *trans*-zeatin riboside. Vertical bars represent \pm SE (n = 3).

シロイヌナズナでは、*API*プロモーターの制御下で *AtIPT4*を発現させることにより、萼片、花弁、雄蕊の数が增加することが示されている (Li et al., 2010). また、薬特異的にアグロバクテリウムの *IPT* 遺伝子を発現させることにより、花糸の先端の花弁化、花弁における欠刻の発生、萼片と花弁の間に花糸あるいは突起状の花弁様器官が形成されることが示されている (Geng et al., 2002). さらに、ペチュニアでは、*AP3*プロモーターの制御下でアグロバクテリウムの *IPT* 遺伝子を発現させることにより、花冠が拡大することが示されている (Verdonk et al., 2008). しかしながら、これまでに花器官におけるサイトカニンシグナルの上昇部位の違いが、花の形態に与える影響を、同じ植物種で同時に比較した研究はない. 本研究では、*AtIPT4*を花弁および雄蕊で過剰発現させることにより、花弁数の増加、花冠の拡大だけでなく、副花冠および花弁周縁の鋸歯が誘導され、*AtIPT4*を萼片および花弁で過剰発現させることにより、花弁数の増加だけが誘導されたことから (Fig. 17, Fig. 18), 花冠の拡大、副花冠および鋸歯の誘導には、雄蕊におけるサイトカニンシグナルの上昇が重要であ

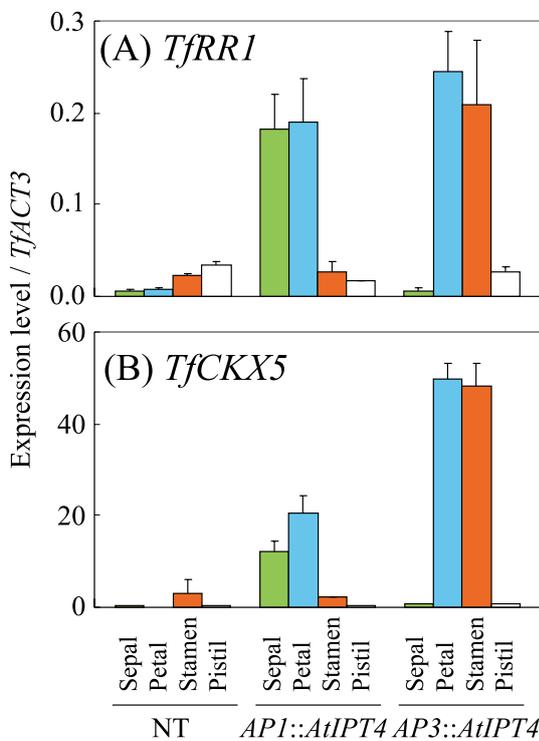


Fig. 21. Expression of *TfRR1* and *TfCKX5* in the floral organs of normal type (NT) and transgenic torenia.

The expression levels of *TfRR1* (A) and *TfCKX5* (B) are shown as values relative to that of *TfACT3*, which was used as an internal standard. Vertical bars represent \pm SE (n = 3).

ると考えられた (Fig. 22).

シロイヌナズナでは、サイトカニンによる花器官数の増加は、花芽分裂組織ひいては花托が拡大することにより生じることが示されている (Bartrina et al., 2011; Lindsay et al., 2006). さらに、*API::AtIPT4*を導入したシロイヌナズナ (Li et al., 2010), さらには CPPU 処理したトレンニアにおいて花器官数が増加する際にも花托が拡大することが示されている (Nishijima et al., 2007). これは、器官原基は一定の間隔で分化する傾向があるため、花托が拡大すれば、その分、分化できる器官数が増えるためである. 本研究におけるトレンニアにおいても、*API::AtIPT4*および *AP3::AtIPT4*のいずれを導入した組換え体においても、ステージ 4 において花托の拡大が見られたことから (Fig. 18i, p), whorl 2 におけるサイトカニンシグナルの上昇が花托の拡大を引き起こし、花弁数が増加したものと考えられた (Fig. 22). 一方、細長い副花冠が誘導される *AP3::AtIPT4*を導入した組換え体では、花托の拡大がステージ 5 まで続いたが (Fig. 18q), whorl 3 の拡大が顕著であった. whorl 3 における花托の拡大がステージ 5 まで続いた場合、雄蕊同士の間隔が広

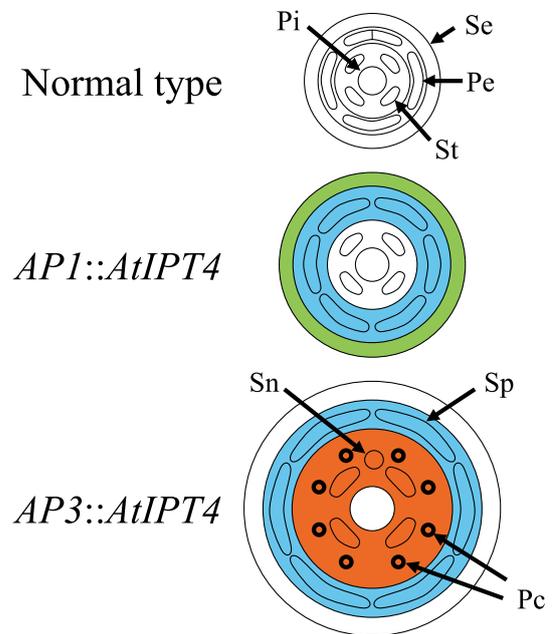


Fig. 22. Model accounting for the effect of localized elevation of cytokinin signal in flower buds on flower morphology.

API::AtIPT4 and *AP3::AtIPT4* indicate the transgenic plants promoted floral organ specific cytokinin biosynthesis described in Fig. 16. Whorls with elevated cytokinin levels are colored with green in whorl 1, blue in whorl 2, and orange in whorl 3. Pc, Paracorolla; Pe, Petal; Pi, Pistil; Se, Sepal; Sn, Staminoid; Sp, Serrated petal; St, Stamen.

がる (Fig. 22). 潜在的な雄蕊の托葉は雄蕊の側方に位置し, whorl 3に含まれると考えられることから, 雄蕊同士の間隔が広がることにより, 雄蕊の側部に器官分化に必要な空間を供給し, 副花冠の発達を促した可能性がある. 同様の現象は, CPPU 処理によって細長い副花冠が誘導される場合にも認められている (Nishijima and Shima, 2006). つまり, ステージ 5 の花芽に CPPU 処理を行った場合, 花托が拡大するとともに, 細長い副花冠が発生する. シロイヌナズナでは, サイトカイニンによる花托の拡大は, 分裂組織の活性に関わる *WUS* および *CLAVATA (CLV)* 遺伝子の発現調節を通じて引き起こされると考えられている (Bartrina et al., 2011; Clark et al., 1993; Lindsay et al., 2006). 両遺伝子による分裂組織の制御メカニズムについては, 茎頂分裂組織において詳細に解析されている (Schoof et al., 2000). すなわち, *WUS* は茎頂分裂組織の中心部で発現し, 分裂活性の維持に働いているが, *WUS* の発現は, 器官分化に関わる *CLV* により, 茎頂分裂組織の中心部に限定されている. サイトカイニンは, *CLV* の発現を抑制することにより, *WUS* の発現部位を拡大し, そのことにより分裂組織のサイズが拡大する (Bartrina et al., 2011; Lindsay et al., 2006). 同様のメカニズムが, 花托の大きさに関わる花芽分裂組織でも機能していると考えられる (Bartrina et al., 2011; Lindsay et al., 2006). 本研究の組換えトレニアにおいても, サイトカイニンシグナルが上昇した部位で *CLV* の発現が抑制されていると考えられる. その場合, whorl 3は, whorl 2と比較して, *WUS* の発現領域である花芽分裂組織の中心部に近いことから, whorl 3におけるサイトカイニンシグナルの上昇, ひいては *CLV* の発現抑制が, whorl 2におけるそれと比較して, 花托の拡大により効果的であると予想された. しかし, サイトカイニンシグナルの上昇は, その部位における器官の分化・発達を促進する作用を持つことから (Dewitte et al., 1999; Mok and Mok, 2001; Pernisová et al., 2009), *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体の whorl 3におけるサイトカイニンシグナルの上昇が, 花托の拡大を通じてではなく, 別のメカニズムで雄蕊の托葉の発達を促進し, 副花冠を発生させた可能性も排除できない.

花卉周縁の鋸歯については, 花卉の縁辺部においてサイトカイニンシグナルが上昇し, 維管束の配列パターンを変化させることにより誘導されることが示されている (Niki et al., 2013; Nishijima and Shima, 2006). 本研究の結果では, 雄蕊におけるサイトカイニンシグナルの上昇が鋸歯の発生に重要であることが示唆された. シロ

イヌナズナの whorl 3および whorl 4で発現・機能する *AG* 遺伝子に転写因子抑制ドメインをつなげたコンストラクト (*AG-SRDX*) をトレニアに導入し, class C ホメオティック遺伝子の機能を抑制した場合にも花卉に鋸歯の発生が報告されていることから (Narumi et al., 2008), whorl 3および whorl 4において発現する遺伝子の機能の変化が, whorl 2の花弁の維管束の配列パターンに影響を与えている可能性が考えられる. 従って, whorl 3におけるサイトカイニンシグナルの上昇が, whorl 3における遺伝子発現や遺伝子機能の変化を通じて花弁の維管束の配列パターンに影響を及ぼす可能性がある (Fig. 22).

一方, 過剰なサイトカイニン生合成により, サイトカイニンが whorl 3から whorl 2へ転流した可能性も考えられる. しかしながら, 発達したステージ 7 の花器官を用いて行った本研究におけるサイトカイニン濃度の測定では, 導入した *AtIPT4* 遺伝子によるサイトカイニン濃度の上昇が, 隣接した花器官, すなわち *AP1::AtIPT4* を導入した組換え体の雄蕊あるいは *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体の萼片および雌ずいのサイトカイニン濃度を上昇させる現象は認められなかった (Fig. 20A, B). しかし, 花器官の分化初期における微小な花芽においては, whorl 3で上昇したサイトカイニンが, ごく近接した whorl 2に転流することにより, 花弁の維管束の配列パターンに影響を与え, 鋸歯が発生した可能性も排除できない.

第 5 章 総合考察

本研究の結果から, 花芽内におけるサイトカイニンシグナルの空間的, 時間的分布が, トレニアに副花冠, 花弁周縁の鋸歯などの装飾的な花形変化を誘導することが明らかとなった. それぞれの花形の変化について, 前章までは CPPU 処理ならびに遺伝子組換えの結果に関して個々に考察したが, 第 5 章では, 各章の結果を横断的に俯瞰し, より普遍的な分子機構について考察するとともに, 今後の基礎研究ならびに実用化を目指した応用研究の展開方向について考察したい.

まず, サイトカイニンにより誘導されるトレニアの装飾的な花形のうち, 副花冠の発生については, 第 2 章において, CPPU 処理した花芽内のサイトカイニンシグナルの分布を解析した結果から, 副花冠の発生位置, すなわち幅広い副花冠の場合には雄蕊基部の背軸側で, 細長い副花冠の場合には花卉の中央部でサイトカイニンシグ

ナルが上昇することが重要であることが示された。一方、第4章における *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体の解析結果からは、雄蕊の原基が分化した後の花托の著しい拡大が、花芽内に副花冠の原基が分化するのに必要な空間を供給することにより、副花冠の発生が促されたと考察した。それぞれの結果を個別に考察する限りでは、CPPU 処理では花托の拡大は起こらず、また *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、副花冠の発生位置におけるサイトカイニンシグナルの局所的な上昇は起こらないように理解される。しかしながら、CPPU 処理したトレニアにおいて副花冠が誘導される際には、花托が拡大することが示されている (Nishijima et al., 2007)。一方、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花芽内のサイトカイニンシグナルの詳細な分布の解析は行っていないが、第3章において、*AP3* のオーソログである *TYDEF* の花芽内における発現部位から (Fig. 13B)、導入した *AtIPT4* 遺伝子は、*AP3* プロモーターにより花弁および雄蕊全体で発現し (Krizek and Meyerowitz, 1996)、副花冠の発生位置に局在化した発現状態にはなっていないと考えられる。

以上の結果から、副花冠の発生には、(1) 雄蕊の原基が分化した後の花托の拡大、ならびに、(2) 副花冠の発生位置におけるサイトカイニンシグナルの局所的な

上昇、の2つの要因が同時に関与しているという仮説が導き出される。この仮説は、CPPU 処理によって副花冠が安定的に発生し、その発生程度も著しいのに対して (Nishijima and Shima, 2006)、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、副花冠の発生は不安定で、その発生程度も低かったことと合致する。つまり、CPPU 処理では (1) と (2) の両者が同時に起きるため、副花冠が安定して強く誘導されるのに対し、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では (1) は起きているもの、(2) が不十分であったため、副花冠の誘導が不安定で弱かったと考えることができる (Fig. 23)。

この仮説を検証するためには、今後、花托の拡大だけ、ならびに副花冠の発生位置におけるサイトカイニンシグナルの上昇だけ、そしてその両者を選択的に誘導できる実験系を開発する必要がある。花托の拡大については、第4章でも述べたように、花芽分裂組織の拡大によって引き起こされ、その過程には分裂組織の活性に関わる遺伝子である *WUS* および *CLV* が関与していると考えられることから (Bartrina et al., 2011; Lindsay et al., 2006)、花芽分裂組織において *WUS* の発現を過剰発現させる、あるいは *CLV* の発現を抑制する組換え体を作成することにより誘導できる可能性がある。一方、副花冠の発生位置におけるサイトカイニンシグナルの上昇について

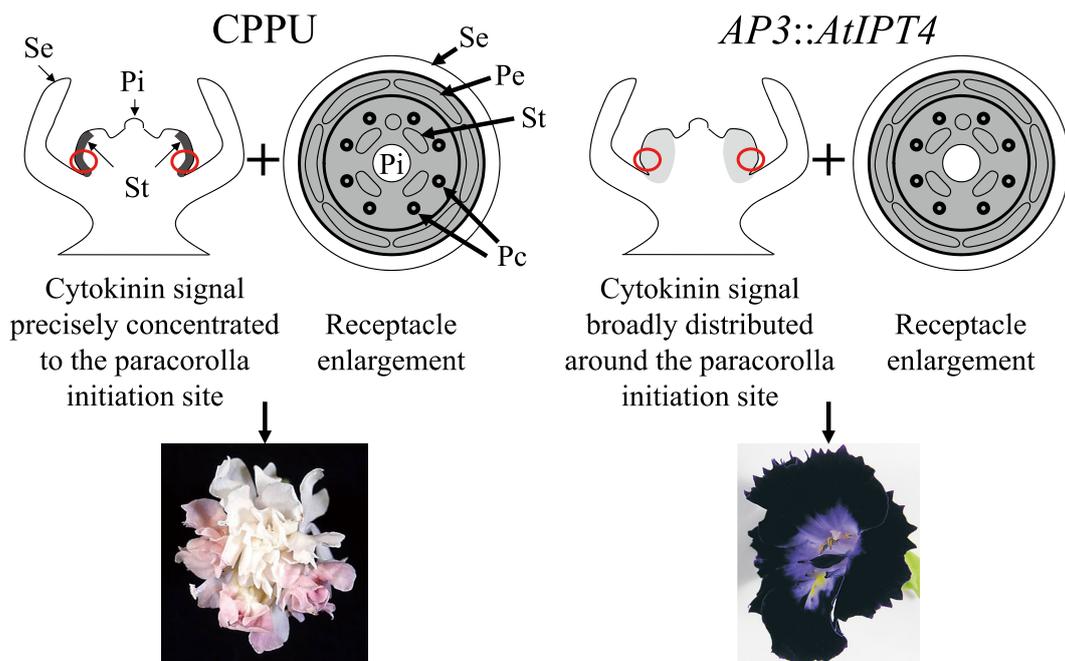


Fig. 23. Dual-factor hypothesis on paracorolla induction in torenia.

In this hypothesis, both cytokinin signal precisely localized to the site of paracorolla initiation and receptacle enlargement are necessary for stable and strong paracorolla induction. The floral organs and whorls with high level of cytokinin signal are indicated by gray. The darkness of shade gray area represents extent of cytokinin signal. Paracorolla initiation sites are indicated by red circle. Pc, Paracorolla; Pe, Petal; Pi, Pistil; Se, Sepal; St, Stamen.

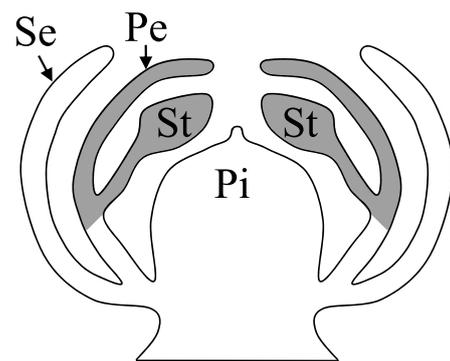
は、副花冠の発生位置に特異的に発現するプロモーターを用いて *IPT* 遺伝子を発現する手法が考えられるが、現在のところそのようなプロモーターは利用できず、今後の研究が必要である。

一方、遺伝形質として副花冠を有する植物においては、副花冠が発生する分子機構の研究は全く進んでいない。この分子機構を解明する糸口として、本研究の結果から直接的に考えられる研究方法としては、(1) トレニアと同様に雄蕊の托葉が副花冠として発達する場合、雄蕊の分化後に花托の著しい拡大が起こるか否かを解析する、(2) 副花冠の発生位置において、サイトカイニンシグナルが局所的に上昇するか否かを解析することが考えられる。このどちらか一方、あるいは両方が起きていれば、トレニアと同様の分子機構により、副花冠の分化・発達が制御されている可能性がある。(1) に関しては、唯一、キンギョソウにおいて副花冠の分化・発達の過程を詳細に解析した結果が報告されているが、副花冠の発生する系統と発生しない系統における、雄蕊分化後の花托の拡大程度の差異は不明瞭であった (Yamaguchi et al., 2010)。今後、遺伝形質として副花冠を有する他の植物種においても、このような観点からの研究が期待される。

遺伝形質としての副花冠の形態については、第3章の緒言で述べたように、植物種によって様々なものが存在する。これらの形態の違いについて、トレニアで認められたような花器官ホメオティック遺伝子の発現状態が関与しているか否かについても、今後の課題である。ただし、第3章における研究結果から、副花冠における花器官ホメオティック遺伝子の発現は、副花冠原基の発生位置の花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンによって制御されることが明らかになったことから、植物種によって異なる副花冠の発生位置が、副花冠の形態に影響を及ぼしていることは十分に考えられる。副花冠の発生位置は、キンギョソウではトレニアと同様に雄蕊基部の背軸側の側方である (Yamaguchi et al., 2010)。それ以外の植物種における副花冠の発生過程の詳細な解析については、今後の課題である。

CPPU 処理による花卉周縁の鋸歯の発生は、花卉の縁辺部における維管束の配列パターンの変化により生じていることが示されているが (Nishijima and Shima, 2006)、この部位は、第2章において示された CPPU 処理によるサイトカイニンシグナルの蓄積部位と一致している (Fig. 7C)。そのため、第2章では、花卉の縁辺部におけるサイトカイニンシグナルの蓄積が鋸歯を誘導し

たと考察した。一方、第4章におけるプロモーターの異なる組換え体の花形の違いからは、雄蕊におけるサイトカイニンシグナルの上昇が鋸歯の発生に重要であることが示された。これは一見矛盾する解釈である。しかしながら、第2章では、CPPU 処理によって花卉の縁辺部とともに、雄蕊でもサイトカイニンシグナルが高まる結果が得られている (Fig. 6)。また、第4章で鋸歯が誘導された *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、雄蕊とともに、花卉でもサイトカイニンシグナルが上昇していた (Fig. 21)。従って、鋸歯の発生には、花卉と雄蕊の両方でサイトカイニンシグナルが上昇することが必要であるという仮説が導き出される (Fig. 24)。この仮説については、第4章において、萼片および花卉でサイトカイニンシグナルを上昇させる *API::AtIPT4* を導入した組換え体で鋸歯の誘導は見られなかったことから、花卉のみのサイトカイニンシグナルの上昇では鋸歯の発生は誘導で



Cytokinin signal localized to both petal and stamen



Fig. 24. Hypothesis on induction of serrated petal margin in torenia.

In this hypothesis, cytokinin signal localized to both petal and stamen is necessary for the induction of serrated petal margin. The floral organs with high level of cytokinin signal are indicated by gray. Pe, Petal; Pi, Pistil; Se, Sepal; St, Stamen.

きないことがすでに示されている。今後さらに、雄蕊のみでサイトカニンシグナルを上昇させる組換え体を作成し、鋸歯が誘導されるか否かを解析することにより、この仮説を検証できる可能性がある。また、サイトカニンが維管束の配列パターンに及ぼす影響については、シロイヌナズナの突然変異体を用いた研究により、茎および根における維管束の配列パターンの変化にサイトカニンが関与することが報告されている (Cui et al., 2011; Pineau et al., 2005)。しかしながら、これまでのところ、サイトカニンが花器官の維管束の配列に及ぼす分子機構を解析した報告はなく、この点については今後の課題である。

本研究では、遺伝子組換え技術を用いて花器官特異的なプロモーターで、花芽内の部位特異的にサイトカニン合成を促進することにより、花卉におけるサイトカニンシグナルの上昇が花弁数の増加を、雄蕊におけるサイトカニンシグナルの上昇が花冠の拡大、副花冠および鋸歯を誘導できることが示された。これらの花形変化のうち、*AP3::AtIPT4*を導入した組換え体における花冠の拡大および鋸歯の誘導については安定した形質であった。花冠の拡大については、同様のコンストラクトを導入したペチュニアでも認められていることから (Verdonk et al., 2008)、種を超えて普遍的な現象であると考えられ、他の品目への応用可能な技術として実用化が可能であると考えられる。一方、鋸歯の誘導については、今後、種を超えて普遍的な現象であるか否かを検証する必要がある。

副花冠は観賞価値への貢献度が高いものの、これまでに遺伝子組換えにより副花冠が誘導された報告はなく、本研究において、*AP3::AtIPT4*を導入したトレニアが、遺伝子組換えにより副花冠を誘導した初めての例である。さらに、ペチュニアにおいても、トレニアと同じ *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体で、雄蕊基部の側方に、雄蕊の托葉が発達したと考えられる新たな花器官の発生が認められている (西島, 未発表)。このことは、サイトカニンシグナルの上昇による副花冠の誘導が、種を超えて普遍的な現象であることを示している。従って、花卉および雄蕊においてサイトカニンシグナルを上昇させることにより、他の園芸植物でも副花冠を誘導できる可能性がある。しかしながら、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では細長い副花冠が誘導されたものの、発生頻度は不安定であった。また、CPPU 処理では幅広い副花冠も誘導されるが (Niki et al., 2012; Nishijima and Shima, 2006)、本研究における組換え体では誘導されな

かった。遺伝子組換えによる副花冠の誘導を実用化するためには、これらの副花冠を安定的に発生させる必要がある。上述の通り、副花冠を安定的に誘導するためには、花托の拡大と花芽内の部位特異的なサイトカニンシグナルの上昇を同時に起こす必要があると考えられる。*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花托の拡大は見られたものの、*AP3* プロモーターは *whorl 2* および *whorl 3* 全体で、また花芽発達過程を通じて発現するため (Krizek and Meyerowitz, 1996)、第 2 章における研究結果で見られたような、萼片伸長期の雄蕊原基の背軸側あるいは花卉伸長初期の雄蕊の基部から花卉の中央部に、特異的にサイトカニンシグナルを蓄積することはできない。従って、花芽発達ステージに特異的で、なおかつ花芽内の部位特異的なプロモーターを組み合わせ、サイトカニンの蓄積時期および部位をさらに調節することができれば、副花冠が安定的に誘導される組換え体の作出も可能になると予想される。

以上の結果を総合すると、花芽発達ステージに依存した装飾的な花形誘導と、花芽内におけるサイトカニンシグナルの局所的な上昇の関係は次のようにまとめられる (Fig. 25)。花卉、雄蕊および雌ざい形成期 (ステージ 4) に雄蕊基部の側方においてサイトカニンシグナルが蓄積するとともに、花卉伸長初期 (ステージ 5) までの花托の拡大が同時に起きると、雄蕊基部の側方から副花冠の原基が発生し、この部位では花器官ホメオティック遺伝子の発現が class A および B 遺伝子が中心であるために幅広い副花冠へと発達する。また、ステージ 5 において、花卉中央部のサイトカニンシグナルの蓄積と花托の拡大が同時に起きると、花卉の中央部から副花冠の原基が発生し、この部位の花器官ホメオティック遺伝子の発現は class B 遺伝子が中心であるものの、class A および C 遺伝子は非常に低いために細長い副花冠となる。一方、花卉および雄蕊にサイトカニンシグナルが蓄積すると、ステージ 6 以降に花卉周縁部に鋸歯が誘導されると考えられる。

現在までに、花色を改変したカーネーションやバラを始めとして、遺伝子組換え技術の利用により、様々な花きの形質改変が試みられている (Chandler and Sanchez, 2012)。しかしながら、花形については、主要花きでは、大輪、八重等の観賞価値の高い花形が、突然変異育種や交雑育種等によってすでに作出されているため、実用化を目指した遺伝子組換え技術の利用例は少なく、シクラメンで花弁数の増加の例が報告されているだけである (Terakawa et al., 2010)。従って、本研究の実用化の主要

な対象としては、花形のバリエーションに乏しい品目があげられる。このような品目として、よく利用されている花きとしては、リンドウ、グロリオサ、ニチニチソウ、ブーゲンビリア、サルビア、キキョウ、マンデビラなどがあげられるが、他にも枚挙にいとまがない。ただし、このような品目は、花形改変によって、経済的価値が確実に、かつ大幅に増大する見込みがない限り、遺伝子組換え植物の実用化に必要な多大なコストに見合うだけの利益を得られない。今後、遺伝子組換え植物の普及を阻んでいる、生物多様性への影響評価にかかるコストの削減、ならびに特許の許諾料の低価格化が望まれる。このうち、生物多様性影響評価については、近縁野生種との

交雑性が最も大きな問題となり、交雑可能な近縁野生種が存在すると、それらの特定と交雑の程度の調査に多大な労力とコストが必要となる（吉倉，2006）。従って、そのような品目の場合には、不稔化も同時に付与する必要がある。これまでに不稔化手法として、雄蕊および雌蕊特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用し、これらの花器官で細胞死を誘導する手法が開発されている（Koltunow et al., 1990; Mariani et al., 1990; Xu et al., 1995）。このような不稔化の手法が様々な植物種で利用できるようになれば、遺伝子組換え植物の実用化のためのコストの削減につながると考えられる。一方、特許の許諾料の低価格化は、組換え体の普及・量産化による相

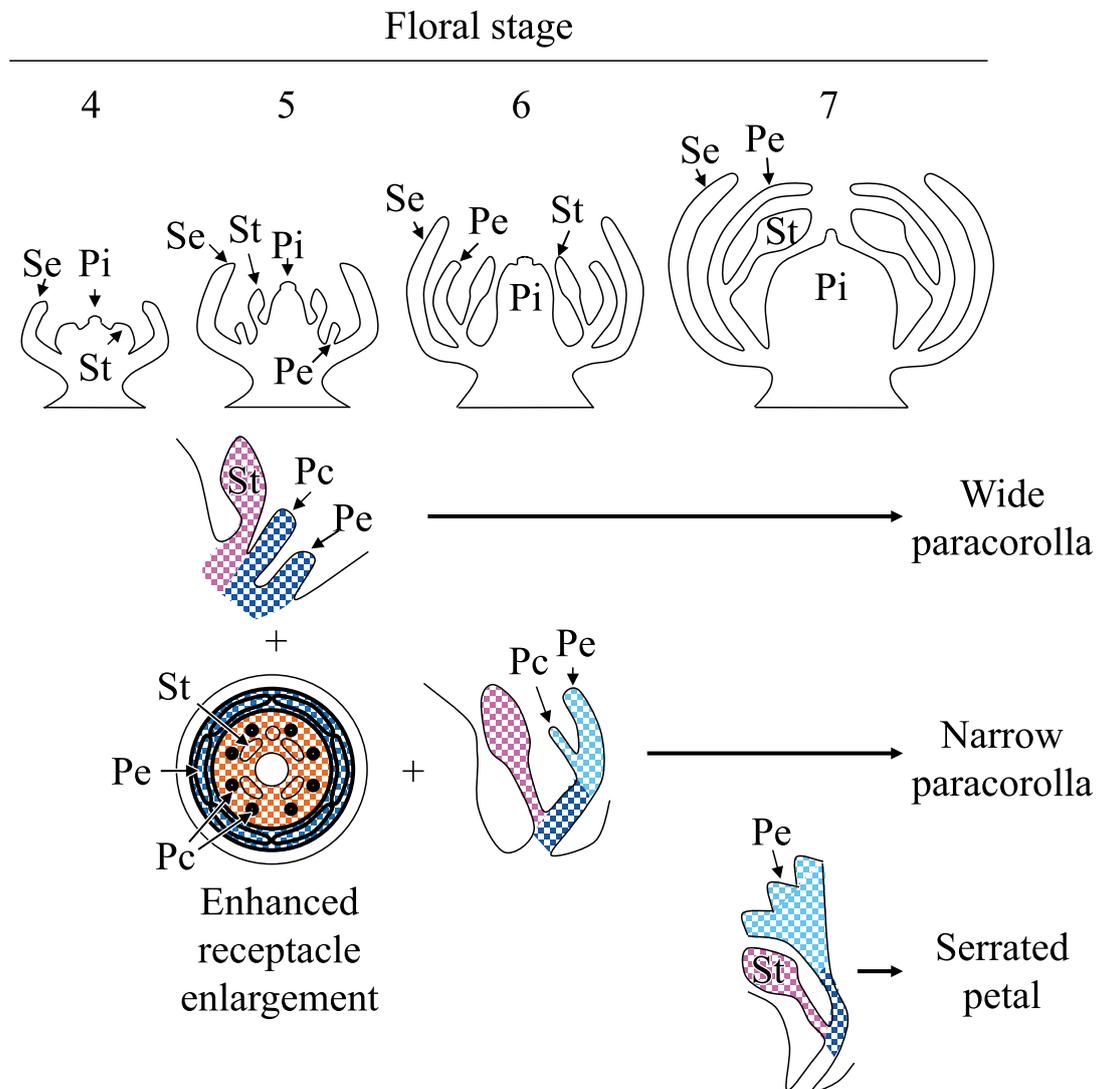


Fig. 25. Mechanism responsible for floral stage-dependent induction of paracorollas and serrated petal margins by elevated cytokinin signal.

Illustrations shown in the top row indicate normal type flower buds at the corresponding floral stage. The floral organ with high level of cytokinin signal is indicated by dotted pattern. Expression pattern of floral homeotic genes is indicated by coloring; class A alone (green), class A and B (blue), class B alone (light blue), class B and C (pink), and class C alone (orange). Pc, Paracorolla; Pe, Petal; Pi, Pistil; Se, Sepal; St, Stamen.

対的な低価格化が考えられる。さらに、これまでのところ、植物の形質転換に必要なベクター構築の際、植物で機能するプロモーター、薬剤耐性マーカーは種類が限られ、さらには形質転換についてもアグロバクテリウムの感染による遺伝子導入が主流であり、いずれも一部の海外の企業により基本特許が押さえられてきた。近年、これらの基本特許権は切れつつあるが、今後、これらの手法について国際的な技術開発競争が進むことにより、特許の許諾料の低価格化が進むことが期待される。

摘 要

花の形は花きの観賞価値を左右する重要な形質の1つであり、装飾的な花形を作出することにより、同じ品目でも観賞価値が向上する例が多い。しかしながら、これまでの突然変異ならびに交雑育種では、装飾的な花形を得るには長い年月を要することから、花形を効率的に改良する手法の開発が望まれている。一方、サイトカイニンの分解を司るサイトカイニン酸化酵素 (CKX) の阻害剤であるホルクロルフェニユロン (CPPU) 処理により、トレニアにおいて鋸歯、副花冠の発生など、装飾的な花形が誘導されるが、誘導される花形は CPPU 処理を行う花芽の発達ステージに依存して規則的に発生することが示されている。そこで本研究では、CPPU 処理したトレニアにおいて装飾的な花形が発生する分子生物学的なメカニズムを解明し、サイトカイニン生合成遺伝子を利用した遺伝子組換えによる効率的な花形改良技術に関する研究を行った。

CPPU 処理により花形の変化が誘導される際、サイトカイニンが必要とされる時期および部位と花形変化の関係を解析するために、サイトカイニンのシグナル強度の指標として、サイトカイニンの初期情報伝達に関わる *type-A response regulator (RR)* 遺伝子およびサイトカイニン量の調節に関わる *CKX* 遺伝子の発現解析を行った。定量 PCR による解析の結果、*TyRR1* および *TyCKX5* 遺伝子とも、いずれの花器官においても、CPPU 処理後 1 日目から発現が大きく上昇し、花芽に CPPU 処理による初期の形態変化が認められる 5 日目まで高い発現が維持された。*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析の結果、両遺伝子とも、幅広い副花冠が誘導される萼片伸長期の花芽に CPPU 処理した場合は、副花冠の発生位置である雄蕊原基の背側で強い発現が見られ、細長い副花冠が誘導される花芽伸長期の花芽に CPPU 処理した場合には、雄蕊の基部ならびに副花冠の発生位置

である花芽の基部から中央部にかけて強い発現が見られた。一方、花芽の鋸歯が誘導される花芽伸長期の花芽に CPPU 処理した場合には、鋸歯が形成される花芽の中央部から先端部にかけて強い発現が見られた。

CPPU 処理したトレニアで誘導される副花冠の形態の違いの原因を明らかにするために、これらの副花冠について、組織の特徴の解析および花器官ホメオティック遺伝子の発現解析を行った。花芽と類似した形態の幅広い副花冠では、表皮細胞の形および維管束の分布パターンとも花芽に近い特徴を持っていたが、雄蕊に近い形態の細長い副花冠では、表皮細胞は花芽に近い形のものから雄蕊に近い形を持つものまで存在した。*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析の結果、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンは、幅広い副花冠では花芽と同様に class A および B 遺伝子の発現が中心で、class C 遺伝子の発現は花芽の周縁部のみであったのに対し、細長い副花冠では class B 遺伝子の発現は見られたが、class A および C 遺伝子の発現は花芽の周縁部のみで見られ、花芽と雄蕊の中間的な発現パターンを示した。また、これらの発現パターンは、副花冠の発生位置の発現パターンと一致していた。

サイトカイニン在花芽内の部位特異的に蓄積させることによる、装飾的な花形誘導の可能性を検証するために、シロイヌナズナでサイトカイニン生合成の律速段階を触媒する酵素である *isopentenyltransferase* をコードする *AtIPT4* を、シロイヌナズナの *API* および *AP3* のプロモーターの制御下でトレニアに導入した。導入遺伝子が萼片および花芽で発現する *API::AtIPT4* を導入した組換え体では、花芽数の増加が見られたのに対し、導入遺伝子が花芽および雄蕊で発現する *AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花冠が拡大し、副花冠および花芽の周縁部に鋸歯が発生する個体が得られるとともに、副花冠の発生時期に、花托の顕著な拡大が見られた。サイトカイニンシグナル強度の指標となる *TyRR1* および *TyCKX5* の発現を解析したところ、*API::AtIPT4* を導入した組換え体では、萼片および花芽で、*AP3::AtIPT4* を導入した組換え体では、花芽および雄蕊で発現が上昇していた。これらの発現部位は、導入遺伝子の発現部位と一致していた。

以上の結果から、CPPU 処理による副花冠および花芽の鋸歯は、それらが形成される花芽内の特定の部位でサイトカイニンシグナルが持続的に高まることによって誘導されることが明らかとなった。また、副花冠の形態の違いは、副花冠形成初期において原基の発生位置の花器

官ホメオティック遺伝子の発現パターンによって制御されていることが明らかとなった。さらに、萼片および花弁におけるサイトカイニンシグナルの上昇は花卉数の増加を、花弁および雄蕊におけるサイトカイニンシグナルの上昇は花冠の拡大、副花冠、鋸歯の誘導が可能であるとともに、副花冠の安定的な誘導には、花托の拡大と副花冠の発生位置におけるサイトカイニンシグナルの局所的な上昇の両者が必要であることが示され、花きの花形改良のための育種技術の開発に役立つ知見が得られた。

謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、懇切丁寧なご指導・ご鞭撻とともに、深い議論をしていただきました農研機構花き研究所（筑波大学大学院生命環境科学研究科）西島隆明博士に心より感謝申し上げます。

また、本論文を取りまとめるにあたり、貴重なご意見・ご助言をいただきました農研機構花き研究所（筑波大学大学院生命環境科学研究科）大宮あけみ博士、中山真義博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科福田直也准教授に深くお礼申し上げます。

実験の遂行にあたり、*in situ* ハイブリダイゼーションの技術について懇切丁寧なご指導をいただきました東北大学大学院生命科学研究所菅野明准教授および平井雅代博士に、組換え体の作出についてご指導・ご協力をいただきました農研機構花き研究所間竜太郎博士に深く感謝申し上げます。また、pGWB1ベクターを分譲していただきました島根大学大学院生物資源科学研究科中川強教授に厚く感謝申し上げます。また、実験にご協力いただきました Yili Teachers' College の Taximaimaiti Mahesumu 氏、非常勤職員の大多和さと子氏、柏木好子氏、黒部知子氏、谷地保子氏、仁木朋子氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Aida, R. 2008. *Torenia fournieri* (torenia) as a model plant for transgenic studies. *Plant Biotechnol.* 25: 541-545.
- Aida, R. and M. Shibata. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of torenia (*Torenia fournieri*). *Breed. Sci.* 45: 71-74.
- Aida, R. and M. Shibata. 2001. Transgenic *Torenia fournieri* Lind (torenia). p. 294-305. In: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry, vol 48 transgenic crops III*. Springer, Berlin.
- Aida, R., S. Kishimoto, Y. Tanaka and M. Shibata. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci.* 153: 33-42.
- Aida, R., T. Yoshida, K. Ichimura, R. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating ACC oxidase transgene. *Plant Sci.* 138: 91-101.
- Auer, C. A. 2002. Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *J. Plant Growth Regul.* 21: 24-31.
- Bartrina, I., E. Otto, M. Strnad, T. Werner and T. Schumling. 2011. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and, thus, seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 69-80.
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens and J. Friml. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 15: 591-602.
- Bennett, M. D., I. J. Leitch, H. J. Price and J. S. Johnston. 2003. Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative of ~125 Mb. *Ann. Bot.* 91: 547-557.
- Bilyeu, K. D., J. L. Cole, J. G. Laskey, W. R. Riekhof, T. J. Esparza, M. D. Kramer and R. O. Morris. 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* 125: 378-386.
- Bowman, J. L., D. R. Smyth and E. M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20.
- Bradley, D., R. Carpenter, H. Sommer, N. Hartley and E. Coen. 1993. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell* 72: 85-95.
- Brandstatter, I. and J. J. Kieber. 1998. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1009-1019.
- Brugière, N., S. Jiao, S. Hantke, C. Zinselmeier, J. A. Roessler, X. Niu, R. J. Jones and J. E. Habben. 2003. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol.* 132: 1228-1240.
- Chandler, S. F. and C. Sanchez. 2012. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol. J.* 10: 891-903.
- Chen, C. M. and M. Kristopeit. 1981. Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiol.* 67: 494-498.
- Clark, S. E., M. P. Running and E. M. Meyerowitz. 1993. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119: 397-418.
- Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls:

- genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37.
- Cui, H., Y. Hao, M. Kovtun, V. Stolc, X-W. Deng, H. Sakakibara and M. Kojima. 2011. Genome-wide direct target analysis reveals a role for SHORT-ROOT in root vascular patterning through cytokinin homeostasis. *Plant Physiol.* 157: 1221–1231.
- D'Agostino, I. B., J. Deruère and J. J. Kieber. 2000. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124: 1706–1717.
- Davies, B., P. Motte, E. Keck, H. Saedler, H. Sommer and Z. Schwarz-Sommer. 1999. *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18: 4023–4034.
- Dewitte, W., A. Chiappetta, A. Azmi, E. Witters, M. Strnad, J. Rembur, M. Noin, D. Chriqui and H. Van Onckelen. 1999. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiol.* 119: 111–121.
- Dobrev, P. I. and M. Kaminek. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* 950: 21–29.
- Drews, G. N., J. L. Bowman and E. M. Meyerowitz. 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65: 991–1002.
- Estruch, J. J., A. Granell, G. Hansen, E. Prinsen, P. Redig, H. van Onckelen, Z. Schwarz-Sommer, H. Sommer and A. Spena. 1993. Floral development and expression of floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *Plant J.* 4: 379–384.
- Ewart, L. 1984. *Plant breeding*. p. 180–253. In: K. C. Sink (ed.). *Petunia*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ferrario, S., I. J. Leitch, R. G. H. Immink and G. C. Angenent. 2004. Conservation and diversity in flower land. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 84–91.
- Frébort, I., M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébortová and P. Galuszka. 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* 62: 2431–2452.
- Geng, S., M. Ma, H-C. Ye and G-F. Li. 2002. Anther-specific expression of *ipt* gene in transgenic tobacco and its effect on plant development. *Transgenic Res.* 11: 269–278.
- Gustafson-Brown, C., B. Savidge and M. F. Yanofsky. 1994. Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76: 131–143.
- 早田保義・新美善行・岩崎直人・青木真一. 1991. スイカの単為結果誘起及び着果促進に関する研究 (第1報) フルメットの処理効果. *園学雑.* 60 (別2): 304–305.
- 早田保義・新美善行・牧田勝紘・磯田竜三. 1990. メロン果実の着果及び糖蓄積に及ぼすサイトカイニンの影響. *園学誌.* 59 (別1): 370–371.
- Hirai, M., T. Kamimura and A. Kanno. 2007. The expression patterns of three class B genes in two distinctive whorls of petaloid petals in *Alstromeria ligtu*. *Plant Cell Physiol.* 48: 310–321.
- Hou, B., E. K. Lim, G. S. Higgins and D. J. Bowles. 2004. N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 47822–47832.
- Huang, S., R. E. Cerny, Y. Qi, D. Bhat, C. M. Aydt, D. D. Hanson, K. P. Malloy and L. A. Ness. 2003. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiol.* 131: 1270–1282.
- Huxley, A. J., M. Griffiths and M. Levy. 1992. *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*, The Macmillan Press Limited, London and Basingstoke, pp. 728–731.
- 池田隆政・田辺憲二・伴野 潔・田村文男・木村 靖. 1990. 4PU (フルメット液剤) にメロンの着果及び果実肥大の促進. *園学雑.* 59 (別2): 434–435.
- 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: 683–687.
- Kakimoto, T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677–685.
- 片岡圭子・伊達修一・後藤丹十郎・浅平 端. 1994. ホルクロルフェニユロンによるオーキシン誘導単為結果トマト果実の空どう果の発生抑制. *園学雑.* 63: 61–66.
- Kiba, T., T. Naitou, N. Koizumi, T. Yamashino, H. Sakakibara and T. Mizuno. 2005. Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicates in cytokinin responses through the His → Asp phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiol.* 46: 339–355.
- Kikuchi, S., H. Tanaka, T. Shiba, M. Mii and H. Tsujimoto. 2006. Genome size, karyotype, meiosis and a novel extra chromosome in *Torenia fournieri*, *T. baillonii* and their hybrid. *Chromosome Res.* 14: 665–672.
- 小岩井優・奥山史洋・田中健一・山崎彩香・本間英治・池田和生・平 智. 2012. ヤマブドウ雌株単植園における無種子果実の安定生産のための GA および CPPU 処理による単為結果の誘発. *園学研.* 11: 87–95.
- Koltunow, A. M., J. Truettner, K. H. Cox, M. Wallroth and R. B. Goldberg. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201–1224.
- Kramer, E. M., M. A. Jaramillo and V. S. Di Stilio. 2004. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the *AGAMOUS* subfamily of MADS Box Genes in Angiosperms. *Genetics* 166: 1011–1023.
- 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.
- Kurakawa, T., N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H. Sakakibara and J. Kyoizuka. 2007. Direct control of

- shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652-655.
- Leibfried, A., J. P. C. To, W. Busch, S. Stehling, A. Kehle, M. Demar, J. J. Kieber and J. U. Lohmann. 2005. *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172-1175.
- Letham, D. S. 1963. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* 8: 569-573.
- Li, Q. Z., X. G. Li, S. N. Bai, W. L. Lu and X. S. Zhang. 2002. Isolation of *HAG1* and its regulation by plant hormones during in vitro floral organogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. *Planta* 215: 533-540.
- Li, X. G., Y. H. Su, X. Y. Zhao, W. Li, X. Q. Gao and X. S. Zhang. 2010. Cytokinin overproduction-caused alteration of flower development is partially mediated by *CUC2* and *CUC3* in *Arabidopsis*. *Gene* 450: 109-120.
- Lindsay, D. L., V. K. Sawhney and P. C. Bonham-Smith. 2006. Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporary coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 170: 1111-1117.
- Litt, A. and V. F. Irish. 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics* 165: 821-833.
- Mandel, M. A., C. Gustafson-Brown, B. Savidge and M. F. Yanofsky. 1992. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360: 273-277.
- Mariani, C., M. De Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans and R. B. Goldberg. 1990. Induction of male sterility in plants by a ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741.
- Miller, C. O., F. Skoog, M. H. von Saltza and M. Strong. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1329-1334.
- Miyawaki, K., M. Matsumoto-Kitano and T. Kakimoto. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37: 128-138.
- Mizuno, T. 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: From hormone responses to circadian rhythms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 2263-2276.
- Mok, D. W. and M. C. Mok. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 89-118.
- Mok, D. W. S. and M. C. Mok. 1994. Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Müller, B. 2011. Generic signal-specific responses: cytokinin and context-dependent cellular responses. *J. Exp. Bot.* 62: 3273-3288.
- Nakagawa, T, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo and T. Kimura. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 34-41.
- Narumi, T., R. Aida, T. Niki, T. Nishijima, N. Mitsuda, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi and N. Ohtsubo. 2008. Chimeric *AGAMOUS* repressor induces serrated petal phenotype in *Torenia fournieri* similar to that induced by cytokinin application. *Plant Biotechnol.* 25: 45-53.
- 仁木智哉・西島隆明. 2008. CPPU 処理で発生するトレニアの副花冠の形態と MADS-box 遺伝子の発現パターンの解析. 園学研. 7 (別 2) : 347.
- Niki, T., M. Hirai, T. Niki, A. Kanno and T. Nishijima. 2012. Role of floral homeotic genes in the morphology of forchlorfenuron-induced paracorollas in *Torenia fournieri* Lind. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81: 204-212.
- Niki, T., T. Hisamatsu, R. Aida, M. Koshioka and T. Nishijima. 2006a. Production of dwarf plant by genetic engineering in transgenic torenia introduced GA 2-oxidase gene from torenia. 27th International Horticultural Congress & Exhibition. Abstract: 338.
- Niki, T., T. Mahesumu, T. Niki and T. Nishijima. 2013. Localized high expression of type-A response regulator and cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in relation to forchlorfenuron-induced changes in flower morphology in *Torenia fournieri* Lind. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 69-77.
- 仁木智哉・山口博康・西島隆明. 2006b. CPPU 処理したトレニアのつぼみにおける MADS-box 遺伝子の発現パターンの解析. 園学雑. 75 (別 2) : 326.
- 西島隆明. 2007. 花形. p. 37-43. 農山漁村文化協会編. 農業技術体系花卉編第 5 巻追録第 9 号. 農山漁村文化協会. 東京.
- Nishijima, T. 2012. Large flower size: Molecular basis and role of cytokinin. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81: 129-139.
- Nishijima, T. and K. Shima. 2006. Change in flower morphology of *Torenia fournieri* Lind. induced by forchlorfenuron application. *Sci. Hortic.* 109: 254-261.
- Nishijima, T., H. Miyaki, K. Sasaki and T. Okazawa. 2006. Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. *Sci. Hortic.* 111: 49-55.
- Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011a. Corolla of the large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) cultivars exhibit low endogenous cytokinin concentration through enhanced expression of the genes encoding cytokinin oxidases. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 334-342.
- Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011b. The large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) genotype promotes expressions of type-A response regulator and cytokinin receptor genes like cytokinin response. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 343-350.
- 西島隆明・山口博康・仁木智哉. 2007. サイトカイニン生合成阻害剤によるトレニア花芽の肥大と花形変化との関係. 園学研. 6 (別 1) : 250.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi

- and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11075–11080.
- Pernisová, M., P. Klíma, J. Horák, M. Válková, J. Malbeck, P. Soucek, P. Reichman, K. Hoyerová, J. Dubová, J. Friml, E. Zažímalová and J. Hejác. 2009. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 3609–3614.
- Pineau, C., A. Freyrier, P. Ranocha, A. Jauneau, S. Turner, G. Lemonnier, J.-P. Renou, P. Tarkowski, G. Sandberg, L. Jouanin, B. Sundberg, A.-M. Boudet, D. Goffner and M. Pichon. 2005. *hca*: an *Arabidopsis* mutant exhibiting unusual cambial activity and altered vascular patterning. *Plant J.* 44: 271–289.
- Potenza, C., L. Aleman and C. Sengupta-Gopalan. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 1–22.
- Rahmanzadeh, R., K. Müller, E. Fischer, D. Bartels and T. Borsch. 2005. The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biol.* 7: 1–12.
- Rashotte, A. M., S. D. B. Carson, J. P. C. To and J. J. Kieber. 2003. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 1998–2011.
- Reinhardt, D., T. Mandel and C. Kuhlemeier. 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12: 507–518.
- Rijkema, A. S., T. Gerats and M. Vandenbussche. 2007. Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 32–38.
- Rupp, H. M., M. Frank, T. Werner, M. Strnad and T. Schumlling. 1999. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNATI* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* 18: 557–563.
- Sakakibara, H., H. Kasahara, N. Ueda, M. Kojima, K. Takei, S. Hishiyama, T. Asami, K. Okada, Y. Kamiya, T. Yamaya and S. Yamaguchi. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 9972–9977.
- Sasaki, K., R. Aida, H. Yamaguchi, M. Shikata, T. Niki, T. Nishijima and N. Ohtsubo. 2010. Functional divergence within class B MADS-box genes *TYGLO* and *TYDEF* in *Torenia fournieri* Lind. *Mol. Genet. Genomics* 284: 399–414.
- Sawhney, V. K. and A. Shukla. 1994. Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *Am. J. Bot.* 81: 1640–1647.
- Schumlling, T., T. Werner, M. Riefler, E. Krupková and I. B. Manus. 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* 116: 241–252.
- Schoof, H., M. Lenhard, A. Haecker, K. F. X. Mayer, G. Jürgens and T. Laux. 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100: 635–644.
- Shibata, M. 2008. Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnol.* 25: 3–8.
- Takahashi, S., K. Shudo, T. Okamoto, K. Yamada and Y. Isogai. 1978. Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-(4-pyridyl)urea derivatives. *Phytochemistry* 17: 1201–1207.
- 武田恭明. 1996. 栽培・育種の歴史. p. 7–11. 農山漁村文化協会編. 農業技術体系花卉編第7巻. 農山漁村文化協会. 東京.
- Takei, K., H. Sakakibara and T. Sugiyama. 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 26405–26410.
- Tanase, K., R. Aida, H. Yamaguchi, N. Tanikawa, M. Nagata, T. Onozaki and K. Ichimura. 2011. Heterologous expression of a mutated carnation ethylene receptor gene, *Dc-ETR1nr*, suppresses petal abscission and autocatalytic ethylene production in transgenic *Torenia fournieri* Lind. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 113–120.
- Tanase, K., C. Nishitani, H. Hirakawa, S. Isobe, S. Tabata, A. Ohmiya and T. Onozaki. 2012. Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 13: 292.
- Taniguchi, M., T. Kiba, H. Sakakibara, C. Ueguchi, T. Mizuno and T. Sugiyama. 1998. Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett.* 429: 259–262.
- Terakawa, T., T. Yamamura, Y. Tanaka, M. Sugiyama, N. Mitsuda and M. Takagi-Ohme. 2010. The modification of flower traits in cyclamen using the CRES-T. *Abst. Annu. Meet. JSPF 2010*: P0384.
- Troll, W. 1957. *Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie* 2. Fischer, Jena. (Troll, W. 2004. 図説植物形態学ハンドブック 2. 中村信一・戸部博訳. 朝倉書店. 東京.)
- Venglat, S. P. and V. K. Sawhney. 1996. Benzylaminopurine induces phenocopies of floral meristem and organ identity mutants in wild-type *Arabidopsis* plants. *Planta* 198: 480–487.
- Verdonk, J. C., K. Shibuya, H. M. Loucas, T. A. Colquhoun, B. A. Underwood and D. G. Clark. 2008. Flower-specific expression of the *Agrobacterium tumefaciens isopentenyltransferase* gene results in radial expansion of floral organs in *Petunia hybrida*. *Plant Biotechnol. J.* 6: 694–701.
- Wang, H., J. Jiang, S. Chen, X. Qi, H. Peng, P. Li, A. Song, Z. Guan, W. Fang, Y. Liao and F. Chen. 2013. Next-generation sequencing of the *Chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) transcriptome permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *PLoS One* 8: e62293.

- Werner, T. and T. Schmülling. 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 527-538.
- Xu, H., R. B. Knox, P. E. Taylor and M. B. Singh. 1995. *Bcp1*, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2106-2110.
- Yamaguchi, H., T. Niki, T. Niki and T. Nishijima. 2010. Morphological property and role of homeotic genes in paracorolla development of *Antirrhinum majus*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79: 192-199.
- Yanofsky, M. F., H. Ma, J. L. Bowman, G. N. Drews, K. A. Feldman and E. M. Meyerowitz. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39.
- 八代嘉昭. 1994. 原産と来歴. p. 387-390. 農山漁村文化協会編. 農業技術体系花卉編第8巻. 農山漁村文化協. 東京.
- 吉倉 廣. 2006. 研究者のためのカルタヘナ法解説. 遺伝子組換え実験安全対策研究会編著. 出版社ぎょうせい. 東京.