

イチジク (*Ficus carica* L.) の
分子マーカー育種に向けた基礎的研究

池上 秀利

2016

*京都大学大学院 農学研究科 審査学位論文

目次

第1章. 序論	1
第2章. 生態型が異なるイチジク果実のトランスクリプトーム解析 —カプリフィグ種と普通種の比較—	3
2.1 序	3
2.2 材料および方法	5
2.2.1. 材料と生育条件	5
2.2.2. 次世代シーケンス解析	5
2.2.3. <i>de novo</i> アセンブリ	6
2.2.4. 配列アノテーションとその評価	6
2.2.5. 果実成熟に関わる代謝経路上の遺伝子の同定	6
2.2.6. RT-PCR 解析	8
2.3 結果	8
2.3.1. シーケンスデータのアセンブリと機能解釈	8
2.3.2. 果実で検出される主要発現遺伝子	12
2.4 考察	13
2.4.1. エチレン合成とシグナル伝達	13
2.4.2. 糖合成	13
2.4.3. アントシアニン合成	16
2.4.4. GO ターム分布の生態型間比較	16
2.4.5. MADSbox 遺伝子	19
2.4.6. ジベレリン合成遺伝子およびカルコン合成酵素遺伝子	21
2.4.7. 生態型特異的に発現する遺伝子の探索	21
2.4.8. 結言	25
第3章. イチジクの花序分化に関連する <i>FT</i> ホモログ <i>FcFTI</i> の解析	26
3.1 序	26
3.2 材料および方法	28

3.2.1. 花序調査.....	28
3.2.2. RACE クローニング.....	28
3.2.3. DNA ゲルブロット分析.....	29
3.2.4. タバコ形質転換体を用いた遺伝子機能解析.....	29
3.2.5. リアルタイム RT-PCR 解析.....	31
3.3 結果.....	31
3.3.1. 花序の分化時期および期間.....	31
3.3.2. イチジク <i>FT</i> ホモログ <i>FcFTI</i> の同定.....	31
3.3.3. <i>FcFTI</i> 遺伝子上流のシス配列.....	32
3.3.4. <i>FcFTI</i> の機能解析.....	32
3.3.5. 成木における <i>FcFTI</i> mRNA の発現様式.....	39
3.4 考察.....	42
3.4.1. 花序分化の特異性.....	42
3.4.2. <i>FcFTI</i> のゲノム配列上の特徴.....	43
3.4.3. <i>FcFTI</i> は花成促進能を有する.....	43
3.4.4. <i>FcFTI</i> は葉で発現し、空間的に勾配する.....	43
3.4.5. <i>FcFTI</i> 発現の光による誘導.....	44
第4章. 総合考察.....	46
摘要.....	48
引用文献.....	50
謝辞.....	60

第1章 序論

イチジク (*Ficus carica* L.; $2n = 2x = 26$) はバラ (Rosales) 目クワ科 (Moraceae) のイチジク属として分類される (Angiosperm Phylogeny Group, 2009) 低木落葉果樹である。クワ科の種の半数以上がイチジク属に属しているが (Datwyler and Weiblen, 2004), イチジクはそのイチジク属の中で主要な種の一つである。イチジクは西アジアにおける伝統的な果樹であり, 原産は南アラビア (Condit, 1947; Zukovskij, 1950; Storey, 1975) あるいは, 野生イチジクが植生するトルコやイランを含む地中海沿岸部と推定されている (Khoshbakht and Hammer, 2006)。近年の研究では, ヨルダン渓谷に位置する約 11,400 年前の遺跡から単為結果性を有する種の実が発見されたことから, イチジクが世界最古の栽培植物であることが示唆されている (Kislev et al., 2006)。FAO の推定値 (FAO, 2012) によると 2012 年の世界のイチジク生産量は 109 万トン以上あり, 原産地に近い地中海沿岸部のトルコ, エジプト, アルジェリアを中心に多く栽培されている。

日本への導入については, 原産地から東進し中国を経て渡来したとする説と, 江戸時代初期の寛永年間にポルトガル人によって長崎に伝えられたとする説がある (菊池, 1951; 河瀬, 2000)。最初に導入されたイチジクは‘蓬莱柿’ (ホウライシ) (別名‘在来種’, ‘日本種’) であるとされる (菊池, 1951; 河瀬, 1983)。1868 年 (明治元年) には洋種イチジク 4 種が導入された記録があるが (竹中, 1884), 日本のイチジク栽培が本格的に普及したのは, 広島県の榊井光次郎氏がアメリカ, カリフォルニアから‘榊井ドーフィン’を持ち帰った 1908 年 (明治 41 年) 以降である。終戦後‘榊井ドーフィン’の栽培面積は徐々に拡大し, 昭和 50 年代には国内シェアの 80%以上を占めるに至っている (榊井農場, 1993)。その後, 近年まで‘榊井ドーフィン’と‘蓬莱柿’のみが主な経済品種であり (野方・栗村, 2005; 真野, 2012), 愛知, 和歌山, 大阪, 兵庫, 広島, 福岡を中心とした西日本の暖地で栽培されてきた。これら 2 つの品種は果実が大きく多収であるが, 糖度が低く肉質が粗いなど品質面に欠点が多い (栗村, 1997)。他の海外からの導入品種も収量性や品質面に問題があり, 経済栽培には至っていない (野方・栗村, 2005)。

近代以前イチジクの育種は, 自然実生や自生実生の中からの選抜育種が中心であった。20 世紀以降主にアメリカの研究者らによって人工授粉を用いた交雑育種が行われるようになった (Storey, 1975)。当時の指導者であった Condit (1883-1981) は 300 以上の交配を行い, 総計 30,000 以上の実生を作出しており, これらの中から経済品種‘コナドリア’が育成されている。日本では, 1921 年頃に農商務省興津園芸試験場の谷川氏が交雑育種により‘谷川’を育成したのが最初である (河瀬, 1983)。その後国内における交雑育種による品種育成は 70 年以上報告されなかった。栗村 (1997) は品種育成の効率化を目的として, 育種上重要な果実諸形質の評価方法を確立するとともに, 授粉条件の最適化による交配効率の向上及び果皮色等の重要形質の遺伝様式についても検討を加えた。これらの技術や知見に基づいて, 福岡県では 2000 年に‘姫蓬莱’ (栗村ら, 1998) の, 2006 年に‘と

よみつひめ’（野方・栗村，2005）の育成に成功した。特に‘とよみつひめ’は，その後栽培面積を大きく拡大させ，これらの成果は技術的・市場的に国内でも経済品種作出が可能であることを明らかにした。2015年現在，主産県を中心とする複数の自治体においてイチジク育種の継続的な取り組みが行われている（真野，2005）。

一方で，イチジク育種の実施においては未だいくつかの課題がある。例えば，木本作物・永年性作物であるため，実生養成から果実形質評価までに数年を要すること，個体あたりの占有面積が大きく形質評価に広大な圃場面積を要することなども，効率良くかつ省力的に育種を進めることを困難としている。

2000年以降のDNAシーケンス技術の飛躍的な発展に伴い，ゲノム情報を利用してそれぞれの個体の持つ形質特性を遺伝子型で判別する技術，すなわちDNAマーカー選抜技術（Marker Assisted Selection: MAS）が様々な作物で実用化されつつある。MASでは，目的形質の表現型評価を省略した選抜が可能となる。この利点は，結実を待たずに果実形質特性を判定できることから，特に結実までに年月を要する果樹においては利用価値が極めて高い。例えば，Terakamiら(2006, 2007)は，ニホンナシの黒星病や黒斑病の抵抗性または感受性に連鎖するDNAマーカーを特定し，病害抵抗性に関するMASを可能にした。Kanzakiら(2000, 2001)は，甘渋性を支配する遺伝子と連鎖するマーカーを特定し，DNAマーカーを用いた完全甘ガキと非完全甘ガキの判別を可能にした。イチジクの育種においてもMASの導入が有効であると考えられ，そのためには有用形質に連鎖するDNAマーカーの開発が急務である。

以上の観点から本研究では，イチジクの育種あるいは生産の場面において重要度が高いと考えられる果実品質，生態型の分化，花序分化・着果性等の果実に関連する主要形質と密接連鎖するDNAマーカーの開発のため，その基盤となる発現遺伝子情報および分子遺伝学的な知見を得ることを試みた。

第2章では次世代シーケンサーを利用して，カプリフィグ種と普通種（‘蓬莱柿’）の果実のトランスクリプトーム解析を行い，果実で発現している遺伝子の配列情報を網羅的に取得して果実品質の成立に関わる分子情報基盤を整備するとともに，生態型分類の基となっている雌雄性および単為結果性と連動する発現遺伝子について考察した。

第3章では，‘蓬莱柿’における花成ホルモン遺伝子（*FT* 遺伝子）ホモログの解析を通じて，イチジクの生産性に深く関わる花序(果実)の分化機構の解明を試みた。

第2章. 生態型が異なるイチジク果実のトランスクリプトーム解析

ーカプリフィグ種と普通種の比較ー

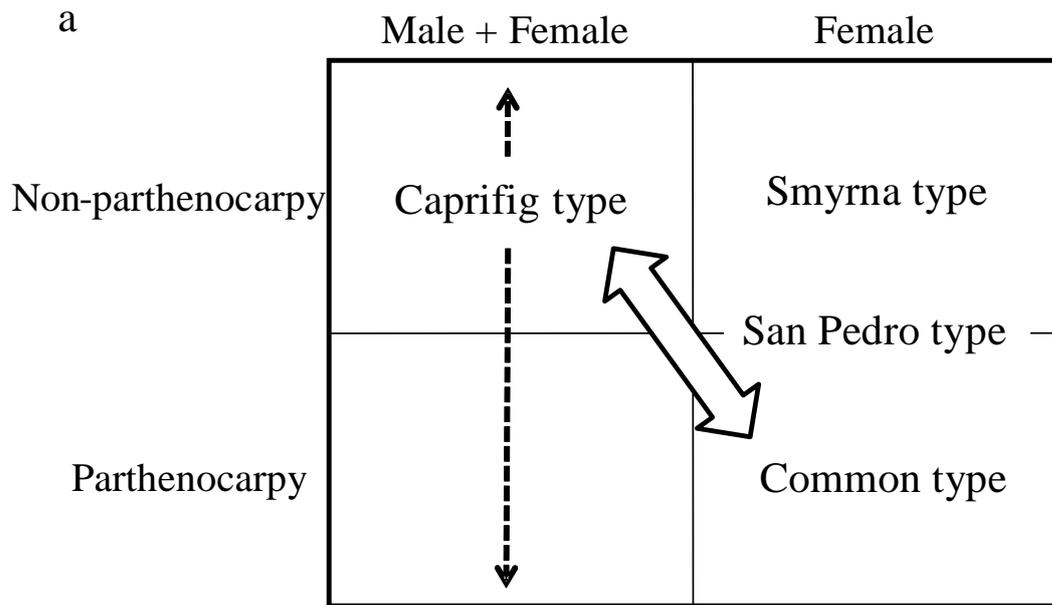
2.1 序

イチジクは雌性両性異株（機能的雌雄異株）の植物であり，雄花の発生の有無に基づいてカプリフィグ種とフィグ種に分類される。祖先と推定される雌雄同体のカプリフィグ種には，雄花と雌花（短花柱花）が存在するが，フィグ種には雌花（長花柱花）のみ存在する（Beck and Load, 1988; Dellaporta and Calderon-Urrea 1993; Stover et al., 2007）。フィグ種のイチジクは3種類の生態型，スミルナ種，サンペドロ種，および普通種に分類されている。スミルナ種は1期果および2期果とも単為結果せず，サンペドロ種は1期果のみ単為結果し，普通種は1期果および2期果ともに単為結果する（Storey, 1975）（Fig. 2-1.a）。イチジクはすべて，カプリフィグ種，スミルナ種，サンペドロ種または普通種のいずれかの生態型種に分類される。

花の雌雄と単為結果に関連する表現型の分化は植物-昆虫の生態システムおよび農耕の歴史と深い関係がある。雌雄両花着生と雄花無着生との分化はイチジクとイチジクコバチ (*Blastphaga*) との共生関係と密接に関連している。また，単為結果の出現はイチジクの栽培化を可能とする出来事であり，イチジクはヒトが最初に栽培化した植物であると推定されている（Kislev et al., 2006）。

イチジクは可食果実，特にフィグ種の果実に経済的価値がある。イチジク果実は独特の形状の果托（または陰花果）の中に無数の小花を内包している。可食部は花托と小花であり，主に乾燥状態（乾燥イチジク）として消費されるほか，加工果実や生鮮果実としても消費されている。乾燥イチジクはミネラルと繊維の含有量が多く，最も簡便で栄養価の高い保存食と見なされている（Vinson et al., 2005）。最近の研究ではイチジクの果実に含まれるシアニジン-3-ラムノグルコシド等のアントシアニン類には抗酸化力があり，線維芽細胞の酸化を防ぐ可能性があることが報告されている（Solomon et al., 2006; Duenas et al., 2008）。イチジク果実の成熟過程はクリマクテリック型であり（Watkins, 2002），他のクリマクテリック型果実と同様にエチレンが熟成過程を早める（Owino et al., 2006）。イチジク果実は成長段階後半の短い期間に劇的に成熟速度を速めることから，収穫前と収穫後の果実の品質管理は重要な課題である。

このようにイチジクでは特に果実に関連して農業上あるいは経済上の有用な多くの特徴を有している。しかしながら，イチジクにおける利用可能な分子情報は限られており，果実発育ならびに果実品質の基礎をなす遺伝的背景は十分に把握されていない。4種類の生態型の間では，雄株でかつ単為結果しないカプリフィグ種が機能的に普通種と最も大きく異なり，サンペドロ種とスミルナ種はカプリフィグ種と普通種の間中に位置している（Fig. 2-1a.）。したがって，単為結果しないカプリフィグ種と普通種の果実における遺伝



b



Fig. 2-1. Diagrammatic representation of gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruit-type differentiation and analyzed fruits. a Fig taxonomy matrix based on parthenocarpy and sex traits. The thick double-headed arrow indicates the comparison undertaken in this study. The dotted double-headed arrow indicates the parthenocarpy range of caprifig type. b Left: Caprifig 6085 first crop (caprifig type), right: Houraishi second crop (common type). The maturity stage of the displayed fruits was between periods II and III. Bar=2 cm

子発現の比較により、イチジク果実生理に関する遺伝子発現の総合的なデータがもたらされるだけでなく、生態型分化に関与する形質の遺伝要因の解明にもつながると期待される。

本章では、まずイチジクの果実品質および果実生理の遺伝学的解明に向けた基盤情報とするための網羅的かつ大規模な発現配列情報のタグデータを得るために、454 パイロシーケンスを用いてカプリフィグ種と普通種のトランスクリプトーム解析を行った。454 パイロシーケンスは他の高速シーケンス・プラットフォームに比べて、配列情報の正確性が高く、長い配列情報が得られることから、ブドウ (*Vitis vinifera* L.) (Bellin et al., 2009), オリーブ (*Olea europaea* L.) (Alagna et al., 2009), クリ (*Castanea crenata*) (Barakat et al., 2009) およびヒヨコマメ (*Cicer arietinum* L.) (Garg et al., 2011) などの非モデル植物種の *de novo* 解析で主に使用されている。得られたトランスクリプトームを比較することにより、イチジク果実の生態型分化の基礎となっている花の性および単為結果性を支配している原因遺伝子の解明を試みた。

2.2 材料および方法

2.2.1. 材料と生育条件

トランスクリプトーム解析のために、樹齢 15 年の ‘caprifig6085’ (カプリフィグ種, JP 登録ナンバー:113491) と、樹齢 24 年の ‘蓬莱柿’ (普通種) の果実を使用した。‘caprifig6085’ は、20 世紀中頃に日本国内に導入された遺伝資源である。その果実のほとんどは単為結実せず、単為結果する果実の割合は第 1 期果では約 10%, 第 2 期果ではほぼ 0% である (Awamura et al., 1996)。「蓬莱柿」は生産性が高く、また日本で最も古い代表的品種である (Ikegami et al., 2009a)。両品種は共に旧農林水産省果樹試験場 (つくば市) より提供され、福岡県農林業総合試験場豊前分場 (行橋市) に植栽されているものである。解析用果実は 2009 年および 2010 年に、カプリフィグ種の果実は第 1 期果を、普通種の果実は第 2 期果を採取した。通常、イチジク果実の発育ステージは、果実サイズの変化に基づいて 3 つの期間に分類される。最初の急激な細胞分裂、分化および急成長期間 (ステージ I), その後あまり変化のない長期停滞期間 (ステージ II), および 2 度目の急成長期間 (ステージ III) である。ステージ III では細胞が増殖し色と外観の変化が認められる (Chessa, 1997; Owino et al., 2006)。本研究では成熟過程にある遺伝子発現データを得るため、急速な果実成長とエチレン産生が開始するステージ II の終了間際に果実を収穫した。カプリフィグ種および普通種から収穫した各 2 個の果実を垂直にスライスし、液体窒素を用いて急速凍結した後、 -80°C で保存した。

2.2.2. 次世代シーケンス解析

凍結保存した果実を液体窒素中で磨り潰し、Fruit-mate (TakaraBio) と混合し、RNeasy MaxiKit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した (Ikegami et al., 2009b)。次に

MicroPoly(A)Puristkit (Ambion)を用いて total RNA から poly(A)-RNA を精製した。cDNA の合成とライブラリーの調整には、cDNA Synthesis System kit (Roche), random primers (Roche), GS FLX Titanium Rapid Library Preparation kit (Roche) を使用し、シーケンスには GS FLXTitanium Sequencer (Roche) を使用した。

2.2.3. *de novo* アセンブリ

Habu et al. (2012) の方法に従い、シーケンス・リードの前処理およびアセンブルを行った。まず、454 パイロシーケンスより得られた生配列データから単純配列 [poly(A)] を Seqclean ソフトウェア (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>) によって取り除いた。次に、データを RepBase (Jurka et al., 2005) と共に RepeatMasker (Smit et al., 1996~2010) (<http://www.repeatmasker.org>) を用いてミスアセンブリを避けられるようにマスクした。マスクしたリードデータは Perl スクリプトを用いて以下の処理を行った。すなわち、(1) 低品質領域のマスク、(2) 両端のマスク領域の除去、(3) 10 塩基未満のリードの削除、(4) マスク領域を 30%以上含んだリードの削除である。配列のアセンブリは MIRA v3.0.2 を使用した。なお、パラメーター設定は「de novo, accurate, EST, 454」、すなわち最短リード長 40bp, 最小配列重複 40bp, 重複領域の同一性の最小値 95%とした。

2.2.4. 配列アノテーションとその評価

アセンブルより得られたコンティグとシングルトンは、NCBI の非冗長タンパク質データベースおよび TAIR10 (Arabidopsis information resource protein database) の情報に対し、BLASTx プログラム v2.2.24+を使用してアノテーションを行った。アノテーションの閾値である E 値は 1e-5, 1e-10 あるいは 1e-100 とし、他のパラメーターは全てデフォルト値 (Altschul et al., 1990) を用いた。アセンブリしたユニジーン配列はさらに Blast2GO ツール (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) を用いて機能的 Gene Ontology (GO) (Ash., 2000) によるアノテーションを行った。割り当てられた GO タームは CateGORizer (Hu et al., 2008) による GO slims (<http://www.geneontology.org/GO.slims.shtml>) に基づいて分類した。カプリフィグ種と普通種の果実で発現している遺伝子の GO 分布の比較は、Fisher's Exact Test (R プログラム) により実施した。EC 番号は KEGG ENZYME と UniProt ENZYME から取得した。各ユニジーン ORF を ESTScan (Iseli et al., 1999) で予測し、開始コドンと終止コドンを含むと予測された ORF を全長配列の候補とした。

2.2.5. 果実成熟に関わる代謝経路上の遺伝子の同定

シロイヌナズナの遺伝子をクエリとし、トランスクリプトーム解析から得られたユニジーンセットを検索データベースとして用い、GENETYX (Genetyx) のローカル BLAST コマンドを用いてエチレン、糖およびアントシアニン合成に関わる遺伝子群を同定した。

Table 2-1. Sequence of the primers used in the type-specific RT-PCR studies

Detected type	Gene abbreviation	TAIR10 description		Sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)	Tm (°C)
caprifig	PL	Pectin lyase-like superfamily protein	forward	CGCTTGGGGTAAGCAATGCGATCATAACGGA	96	68
			reverse	ACGTCTCGGATTAGGGCATTGGTGACGGAAG		
caprifig	MFS-1	Major facilitator superfamily protein	forward	CTGCTGACGCTCTCACCTCATCCCTCTAC	84	68
			reverse	GCCGAAGACCCTAGTGATTGGAAAGCGAA		
caprifig	AT	HXXXD-type acyl-transferase family protein	forward	AAACACATGGCTGCGGTTCCAAGGAAGTG	177	68
			reverse	TTCTGCAATCCCGCTGGCTGCCATATC		
caprifig	PE	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	forward	TCGGCTTCTAGGAGAGACAGCATCGGAAA	92	68
			reverse	CCTTGGTCTGAAAAGCCATGAGCTTCTGT		
caprifig	bHLH	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	forward	CCGGAGGAACGAGAGAAAGCGAGACCA	117	68
			reverse	CCCTTCTGCCAAGCTGTGGTTGTCAGT		
caprifig	SKU5	SKU5 similar 13	forward	GGAAGAACTCTGGCAAGTGGAGTGCTTG	117	68
			reverse	ATGGCGTTGTGGGTAGTAGATGTAGCTC		
caprifig	HMT	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	forward	GATGATGGCTGTGAGCTCAAGGTCAA	116	68
			reverse	GTTTGCCTCCACATACCTGTCACT		
caprifig	PCR11	Plant cadmium resistance 11	forward	TGTGCCAAGAGTATCGACAGCTCCGAAAACC	79	68
			reverse	TTCTGCCTTGTACGTTTCCATGCCAACCT		
caprifig	TPC	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein	forward	AAACTGGTCTACTGAAGACGAAGCACGCC	110	68
			reverse	TGTTCCGAGAAAGGAGAAATTTTCAGTGGC		
caprifig	GR	Gibberellin-regulated family protein	forward	AGGACCCACACAGAAAGCTCTTGCCATTC	106	68
			reverse	CGTCCACATGCTCTTTCACACAGTTC		
common fig	MFS-2	Major facilitator superfamily protein	forward	CACGACCTGGATGAACACGGCGGTTCTCGT	86	68
			reverse	CTTTCAGAATCCCGGAGACCAGGCGCTCTGT		
common fig	PP2C	Highly ABA-induced PP2C gene 1	forward	TGTGGGATTGTAGAGCGTCAATGTCAAGG	115	68
			reverse	CAGTTAACACCCCTTCCACCAGCAGCTTCA		
common fig	PAR1	PAR1 protein	forward	GCCGACAAATGAACGACGTCATCGAAAACC	84	68
			reverse	CGAAGAGATTCCGAGAGTTTTCGGGTCAAG		
common fig	RTE1	Retrotransposon-like element 1	forward	GCCCTTTGGTTAACTAACGCCCTGCTAC	133	68
			reverse	ATGATCTGCAAGAGTCGGGCTGTACACAAC		
common fig	COP1	COP1-interactive protein 1	forward	TACAGGACACTTGGCCGAATCTAGTCAGT	123	68
			reverse	TCTATTCGAGCCGATGTCAGTCCCATGT		
common fig	NBS-LRR	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family	forward	GTTGGAAGATGATCCCTTGAAGTCC	170	68
			reverse	CTGTATCAGTGACCGACTCTACTC		
common fig	Xyl1	Beta-xylosidase 1	forward	GATGCCGCTAGATATGTTCCGGGACTCCA	87	68
			reverse	GCCGTGTAGTGTGCAACAAGCAGCAATC		
common fig	PR	Pathogenesis-related family protein	forward	AGGCACTGGGGTTCTTTGAAGGCCCTTAC	60	68
			reverse	AACAAGGTCCACAGTAGGAGCATGGCCTTT		

Table 2-2. Sequence of the primers used in the MADS-related RT-PCR studies

Gene		Sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)	Tm (°C)
CHS	forward	ACTCAAGGAGAAATTCAGCGAATGTGTGA	136	68
	reverse	GTCTTGTCTCGCGTCCAATGAAGGTGCCAT		
AP1	forward	CTTGCATGGAGAAGATACTGGAACGCTATG	130	68
	reverse	GTGAGTCTAGAATACTCCACGGTCCAGTTC		
AP2	forward	AGCAGGAGATAATGGGAGGCGTGGCTT	172	68
	reverse	CGGCTCTTCTTTAACGGCGCCTGAGAC		
AP3	forward	TCGCGAACGCAAGTACAAGGTGTTGTC	138	68
	reverse	CCAGGACCCTCAACTAACCCGTAGTCTG		
PI-1	forward	ATGGGACGCCAAGCATGAAAACCTCA	139	68
	reverse	CTCTAGAACCATGAGCTCTCTGTGGCTCAA		
PI-2	forward	GCTGAGGCACATGAAAGGGCAGGAA	198	68
	reverse	CCGCCTTGCATTTCCATCAACTCATGAGTG		
AG	forward	ACCAGCTTCTCCGAGCAAAGATAGCTGA	190	68
	reverse	ACTAATTGGAGGGCCATGGGATCTTGGTG		
STK	forward	CCTCTGTGATGCTGAAGTTGCTCTCA	105	68
	reverse	GCCTTCTTGTACCTGTCTATAGTTGACC		
SEP3	forward	TTCTGCAAGGGAGGCGTTGGAAGTACTGAGTAG	209	68
	reverse	GCTGATCAAGCATTGTCTGGGTCCGTGTTG		
AGL6	forward	GCTTACGAGCTCTGTCTTATGCGATGCT	184	68
	reverse	GGACTAAGTCCCTGGGCTTGATCATCTCCAA		
Actin	forward	GCTGGTCTGATCTCACTGAC	218	68
	reverse	TCAGCACCGATTGTGATGACC		

2.2.6. RT-PCR 解析

Fruit-mate (TakaraBio) と RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用してステージ I および II のイチジク果実から total RNA を抽出し、DNase I 処理 (TakaraBio) を行った。80ng の total RNA から RT-PCR 反応の鋳型となる cDNA を合成するために、SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いた。PCR は 0.25U の AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 0.5 μ M のプライマー, 2.0mM の dNTPs, および 1 μ l の鋳型 cDNA を含む 12.5 μ l の 1 \times PCR バッファーで行った。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C (2分間)の後、94 $^{\circ}$ C (1分), 68 $^{\circ}$ C (2分), 72 $^{\circ}$ C (2分)を 38~40 サイクル, 72 $^{\circ}$ C (7分)とした。遺伝子特異的プライマーは、獲得した配列情報に基づいて GENETYX で設計した (Table 2-1., Table 2-2.)。 *F. carica* の β -アクチン遺伝子 (登録番号: AY487315.1) を内在コントロールとした。

2.3 結果

2.3.1. シークエンスデータのアセンブリと機能解釈

シーケンスの結果、カプリフィグ種果実由来の 165,442 リードと普通種果実 125,152 リードの計 290,594 リードが得られた (Table 2-3.) (DRA000630, FX376975-FX394131)。リードの質は高く、平均 300bp 以上であり、QV40+値は 94 以上であった。前処理後のリード数は 270,268 であった。これらを生態型ごとにアセンブルし、カプリフィグ種からは 62,420 のユニジーン (コンティグ 17,454 とシングルトン 44,966), 普通種からは 49,491 のユニジーン (コンティグ 12,771 とシングルトン 36,720) を得た。次に両生態型のリードを組合せてアセンブルし、19,166 のコンティグと 52,289 のシングルトンからなる総ユニジーン 71,455 を得た (Fig. 2-2., Table 2-3.)。以降の解析では、組合せリードで得られたユニジーンセットを使用した。

BLASTx, GO タームおよび EC 番号の 3 つのパラメーターを使用してユニジーンの機能的アノテーションを行った。ユニジーン BLAST 検索のヒット率は E 値が $<1e-5$ で nrNCBI と TAIR10 でそれぞれ 60.6%と 57.8%であり、EC 番号に対するヒット率は 12.7%であった。生物学的過程 (biological process), 細胞組成 (cellular component) および分子機能 (molecular function) に割り当てられた GO slim タームの割合は、ユニジーンそれぞれ 34.9%, 30.4% および 38.3% であった。生物学的過程へアノテーションされたユニジーンは、代謝に 15.09%, 生合成に 5.96% を占め、5% に満たない GO カテゴリが全体のほぼ半数近くを占め、32.82% が分類されなかった (Fig. 2-3)。この結果はイチジク果実において、様々な過程に関わる広範な遺伝子および多くの機能未知遺伝子が発現していることを示唆している。ユニジーン 46.5% に少なくとも 1 つの GO slim タームが割り当てられ、全体の 61.7% にあたる 44,070 個のユニジーンは BLAST, GO タームまたは EC 番号のい

Table 2-3. Summary of de novo assembly results of 454-pyrosequencing data from gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruits: caprifig and common fig

Parameter	Type			
	Caprifig	Common fig	Total	
Sex	Hermaphroditic	Female	-	
Total Reads ^a	n	165,442	125,152	290,594
Low-Quality Reads ^b	n	10,051	10,275	20,326
High-Quality Reads ^c	n	155,391	114,877	270,268
LQR/HQR ^d	%	6.1	8.2	7.0
N50 ^e	bp	357	420	378
Average length ^f	bp	300.6	304.1	302.1
QV40+ ^g	%	94.59	94.68	94.63
Singletons ^h	n	44,966	36,720	52,289
Contigs ⁱ (Average length ^j)	n (bp)	17,454 (638)	12,771 (655)	19,166 (681)
Unigenes ^k (Average length ^l)	n (bp)	62,420 (384)	49,491 (357)	71,455 (363)

^aTotal number of reads separated for each tissue sample ^bNumber of low-quality reads (more than 30 % of the masked regions which consisted of the low QV bases or repeat sequences) removed
^cNumber of high-quality reads ^dLQR/HQR=low-quality reads/high-quality reads ^eLength of equal or longer contigs produces half of all bases ^fAverage length of high-quality reads in basepair
^gPercentage of QV40+ bases ^hNumber of singletons ⁱNumber of contigs ^jAverage length of contigs in basepair ^kNumber of unigenes ^lAverage length of unigenes in basepair

Table 2-4. Annotation information of the unigene set from gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruits: caprifig and common fig

Annotation tool	Value
GeneBank BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻⁵)	43,312 (60.6%)
GeneBank BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻¹⁰)	38,325 (53.6%)
GeneBank BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻¹⁰⁰)	3,552 (5.0%)
TAIR10 BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻⁵)	41,168 (57.8%)
TAIR10 BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻¹⁰)	35,680 (49.9%)
TAIR10 BLASTx (<i>E-value</i> < 1e ⁻¹⁰⁰)	2,905 (4.1%)
GO Term-associated (Biological Process)	24,921 (34.9%)
GO Term-associated (Cellular Component)	21,692 (30.4%)
GO Term-associated (Molecular Function)	27,332 (38.3%)
GO Term-associated total	33,244 (46.5%)
EC number-associated	9,076 (12.7%)
Unigenes with annotation	44,070 (61.7%)
Predicted ORFs	38,303 (53.6%)
Candidates of full-length	411 (0.6%)
Total number of unigenes	71,455 (100.0%)

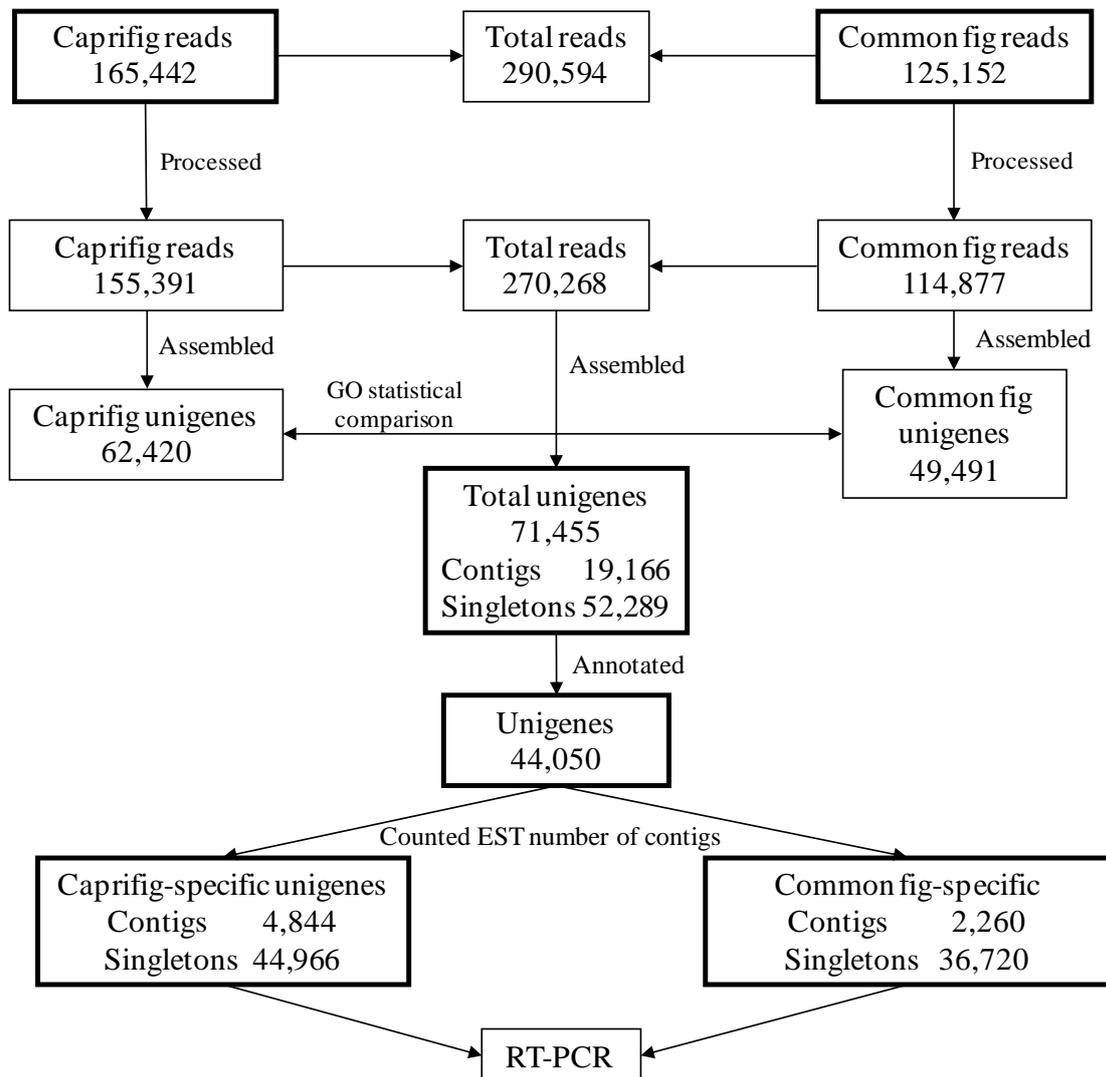
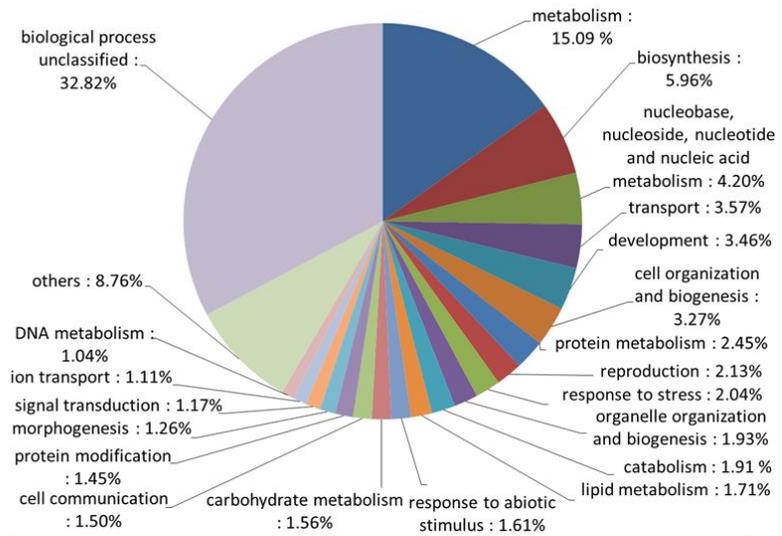
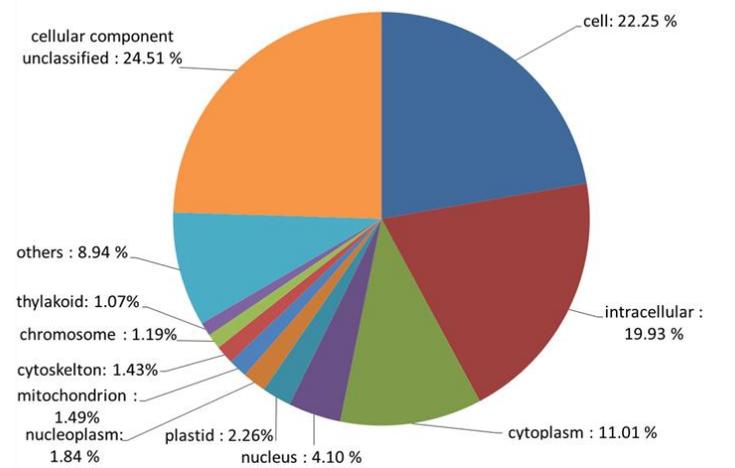


Fig. 2-2. Strategy for the assembly and identification of type-specific transcripts in gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruits. We first generated 290,594 total reads, with 165,442 from the caprifig and 125,152 from the common type using pyrosequencing. After pre- processing and assembly, we obtained a total of 270,268 reads and 71,455 unigenes with 19,166 contigs, and 52,289 singletons. We also assembled these pre-processed reads for each type and obtained 62,420 unigenes for caprifig and 49,491 unigenes for the common type. A statistical comparison of GO term distributions was conducted between each type's unigene set. Functional annotations and extractions of type-specific expressed genes were performed using the total unigene set.

Biological Process



Cellular Component



Molecular Function

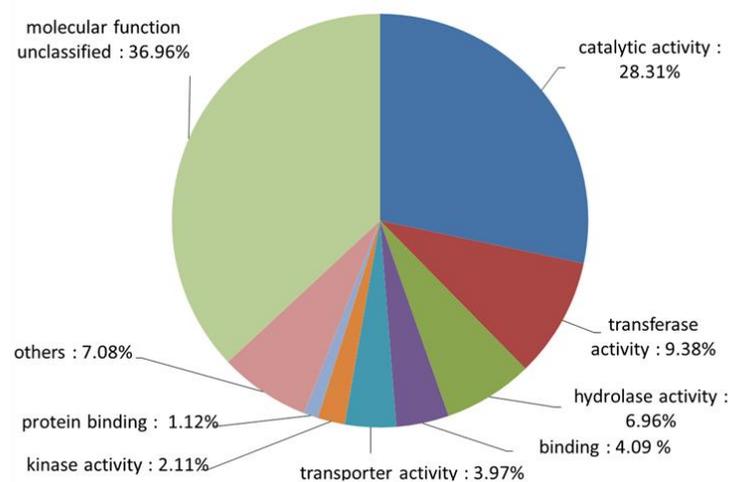


Fig. 2-3. Distribution of *F. carica* fruit unigenes from both caprifig and common fig types according to their associated biological process, cellular component, and molecular function GO terms. Fig EST sequences annotated by TAIR Gene Ontology were grouped by GO slim category.

れかにアノテーションされた (Table 2-4., Fig.2-2.)。ESTScan によって、合計 38,308 (53.6%) のユニジーンに ORF が予測されたが、全長配列候補とされたユニジーンは 1,303 件 (1.8%) にとどまった。全長配列候補中 411 (0.6%) のユニジーンは相同性のあるシロイヌナズナタンパク質配列の 80% 以上の長さをカバーした (Table 2-4.)。

本研究で取得したユニジーンには全長配列を含むものは少ないが、部分配列情報の多くは、イチジクの新規遺伝子の全長配列のクローニングおよび発現解析に役立つことが期待される。

2.3.2. 果実で検出される主要発現遺伝子

ステージ II 後期のイチジク果実における主要な発現遺伝子を特定するために、ユニジーン中でリード数が最上位の 20 件のコンティグを抽出した (Table 2-5.)。この中には 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸塩オキシダーゼ (エチレン合成酵素)、ペクチンリアーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびエクспанシンなど、既知の果実成熟関連遺伝子の発現が確認された。その他には、DNA 修復と耐病性の機能を持つ NBS-LRR ファミリー遺伝子やシンプラストによる水輸送を促進する *PIPIC* 遺伝子などが含まれていた。

異なる生態型の果実から得られた発現遺伝子のデータには、果実の成熟 (エチレン合成, 糖合成, アントシアニン合成), 果実 (花序) の発育, 生態型分化 (花の性および単為結果性の決定) に関与する遺伝子について多くの情報が含まれると考えられる。以下ではこれらの点についてデータが示す内容を検討した。

Table 2-5. The 20 most common transcripts detected in gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruits: caprifig and common fig

Contig ID	mapped reads	TAIR description	E-value	TAIR ID
FICAF00049	326	Ethylene-forming enzyme	3.00E-64	AT1G05010.1
FICAF02984	205	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	2.00E-46	AT3G47380.1
FICAF00071	158	Plasma membrane intrinsic protein 1C	1.00E-148	AT1G01620.1
FICAF00569	71	Sucrose synthase 3	0	AT4G02280.1
FICAF03477	68	Plasma membrane intrinsic protein 2	1.00E-125	AT2G37170.1
FICAF00323	64	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	1.00E-37	AT4G08685.1
FICAF00734	64	Endomembrane protein 70 protein family	0	AT4G12650.1
FICAF07417	62	Granulin repeat cysteine protease family protein	1.00E-103	AT1G47128.1
FICAF00442	59	Pectin lyase-like superfamily protein	8.00E-110	AT3G07820.1
FICAF00387	56	Calnexin 1	0	AT5G61790.1
FICAF00418	53	GTP binding Elongation factor Tu family protein	0	AT5G60390.3
FICAF00371	44	Tubulin alpha-2 chain	0	AT1G50010.1
FICAF00696	42	Homeobox 1	3.00E-38	AT3G01470.1
FICAF00308	41	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1.00E-44	AT3G26040.1
FICAF00512	40	Hyaluronan / mRNA binding family	1.00E-31	AT4G16830.3
FICAF04153	40	RAN GTPase 3	1.00E-122	AT5G55190.1
FICAF00333	39	Eif4a-2	1.00E-142	AT1G54270.2
FICAF00522	39	ADP-ribosylation factor A1B	3.00E-100	AT5G14670.1
FICAF00189	38	Late embryogenesis abundant protein, group 2	2.00E-101	AT2G44060.2
FICAF00423	37	Amino acid permease 6	2.00E-108	AT5G49630.1

2.4. 考察

2.4.1. エチレン合成とシグナル伝達

一般に果実が成熟する際には、糖度、酸性度、色、テクスチャーおよび芳香揮発性物質の変化を含む多くの生化学的なイベントが起こっているが、これらの変化は成熟関連遺伝子群の協調的な発現によって制御されている (Bouzayen et al., 2010)。果実成熟プロセスの第一段階はエチレンの合成である。エチレンを受容体が認識した後、その下流で多くの成熟プロセスがエチレンシグナル伝達経路を経由して起こる (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Solano 1998; Riechmann et al., 2000; Klee, 2004; Alba et al., 2005; Gupta et al., 2006; Kesari et al., 2007)。まず、果実成熟過程の基本部分はエチレン合成とシグナル伝達であるため、ユニジーン中からこれらの経路に関与する遺伝子の配列の抽出を試みた。その結果、エチレン合成の開始時に働く **SAMS** からシグナル伝達経路の末端で働く **ERF1** までの全過程の遺伝子を特定できた (Fig.2-4.)。この経路で発現する遺伝子で多くのリードが検出されたことから、ステージII 後半の果実ではエチレン合成とシグナル伝達が共に活性化していると推察された。

2.4.2. 糖合成

エチレン作用の下流における糖合成、アントシアニン合成及び細胞壁分解に関する詳細を理解することは果実の品質管理において極めて重要である。細胞壁分解のプロセスについては、Owino et al.(2006) が果実成熟中の細胞壁修飾酵素の働きについて既に報告があるので、糖とアントシアニンの合成経路に関連した遺伝子発現について検討した。

イチジク果実の主要な糖はショ糖、ブドウ糖およびフルクトースである (矢羽田・野方, 1999)。今回作成したユニジーンにはこれらすべての多糖類の合成酵素の遺伝子 (Fig. 2-5.) に加え、Ersoy ら (2007) が報告しているガラクトース合成酵素遺伝子が含まれていた。また、多糖類合成酵素とは別に、葉から果実までの糖の転流および液胞内のブドウ糖貯蔵において機能する糖輸送体をコードする遺伝子の抽出を試みた (Yamaki, 2010)。その結果、**SUT**(ショ糖輸送体)、**SORT**(ソルビトール輸送体)、**MANT**(マンニトール輸送体) および **HEXT**(ヘキソース輸送体) を含む少なくとも 4 つのホモログ遺伝子群を同定できた (Fig.2-5.)。他の果樹では転流する多糖類として、ショ糖、ソルビトール、ラフィノース、スタキオースおよびマンニトールが知られている (Ziegler, 1975; Yamaki, 2010)。したがって、検出した糖輸送体コード遺伝子はイチジクにおいて該当する多糖類の転流に寄与している可能性がある。

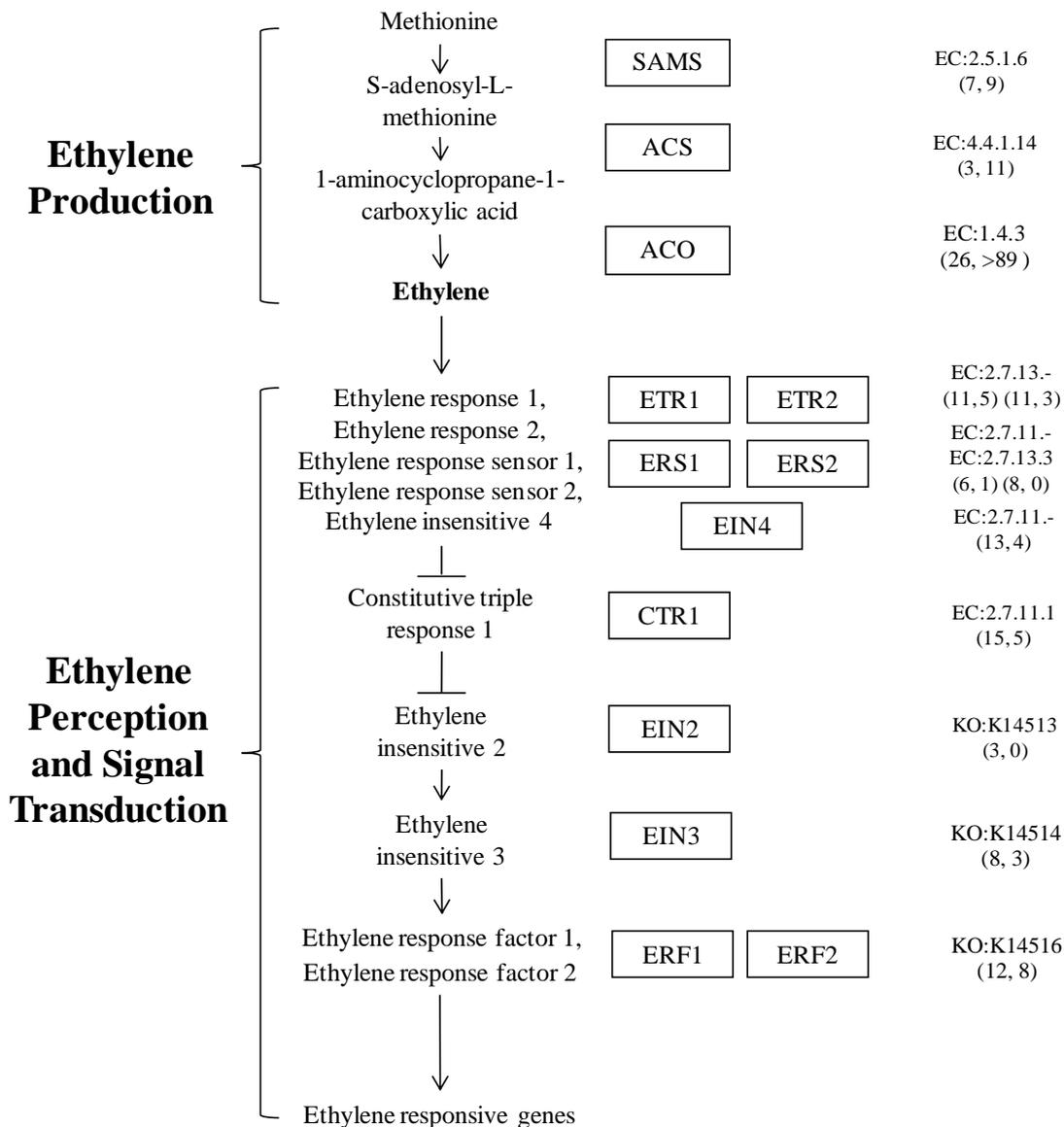


Fig. 2-4. Ethylene synthesis and signal transduction in *F.carica* fruit as inferred from Giovannori (2004) and Adams- Phillips (2004). The boxes show genes encoding enzymes that were isolated from fig fruit ESTs in this study (BLASTx, e- 05 cut-off). The first and second numbers in the parentheses refer to the number of contigs and singletons, respectively. SAMS, S-adenosylmethionine synthase; ACS, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase; ACO, neutral invertase; SS, ETR1, ethylene response 1; ETR2, ethylene response 2; ERS1, ethylene response sensor 1; ERS2, ethylene response sensor 2; EIN4, ethylene insensitive 4; CTR1, constitutive triple response1; EIN2, ethylene insensitive 2; EIN3, ethylene insensitive 3; ERF1, ethylene response factor 1; ERF2, ethylene response factor 2

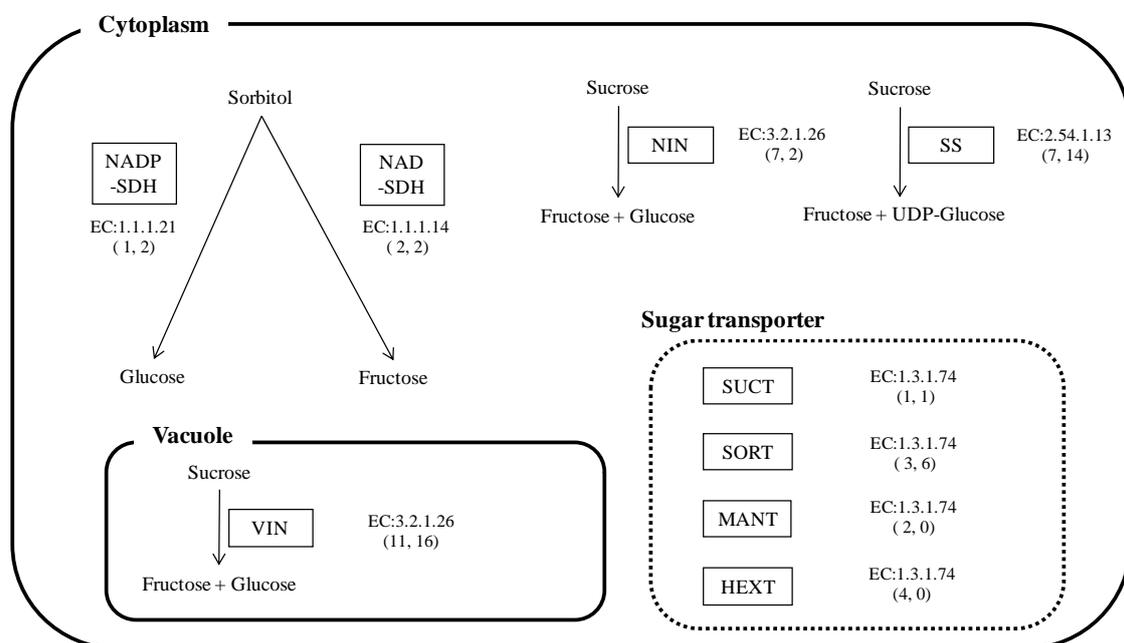


Fig. 2-5. The sugar metabolism pathway in *F. carica* fruit. The boxes show genes encoding enzymes that were isolated from fig fruit ESTs in this study (BLASTx, e-05 cut-off). The first and second numbers in the parentheses refer to the number of contigs and singletons, respectively. NADP-SDH, NADP-dependent sorbitol dehydrogenase; NAD-SDH, NAD-dependent sorbitol dehydrogenase; NIN, neutral invertase; SS, sucrose synthase; VIN, vacuolar invertase; SUCT, sucrose transporter; SORT, sorbitol transporter; MANT, mannitol transporter; HEXT, hexose transporter.

2.4.3. アントシアニン合成

イチジク果実中で合成されるアントシアニンにはシアニジンとペラルゴニジンが存在するが、果皮と小花の双方に高い割合でシアニジンが含まれている (Duenas et al., 2008)。今回の解析で確認されたシアニジン合成に関わる遺伝子を Fig.2-6.に示す。解析ではフェニルアラニンサイアジン-3-ラムノグルコシドおよびシアニジン-3-グルコシド等の合成に関わる全ての関連酵素の遺伝子を同定できた。一方で、デルフィニジン合成経路においてジヒドロケルセチンからジヒドロミリセチンへの転換を触媒するフラボノイド 3'5'水酸化酵素を同定できなかった。このことは、イチジク果実ではフラボノイド 3'5'水酸化酵素活性が認められないとする、これまでのイチジク果実における生化学的研究結果と一致していた (Solomonet al., 2006; Del Caro and Piga 2008; Duenas et al., 2008)。イチジク果実の果皮着色には大きな変異があり、果皮色には深紫、紫、赤、ピンク、緑、黄がある。アントシアニン合成関連経路と遺伝子の解析を進めることにより、今後多様な果皮着色の遺伝的制御機構の解明が期待できる (Kobayashi et al., 2004, Xie et al., 2011)。

2.4.4. GO ターム分布の生態型間比較

生態型の分類は基本的に着生花の雌雄性と単為結果性の差異に基づいている。これらの形質の遺伝は、異なる生態型間の交配から得られた形質分離データに基づいて 1 個または 2 個の遺伝子により説明される。花の性分化には強く連鎖する G 座および A 座の対立遺伝子が、単為結果性には P+座の対立遺伝子が関与している (Storey, 1975; Saleeb, 1965; Awamura, 1996)。したがって、生態型の分化は少数の遺伝子で制御されていると予想された。本解析では、実際にカプリフィグ種と普通種との間でトランスクリプトームを確認し、両者の GO ターム分布を比較した。その結果、両者の GO ターム分布に有意な差は認められなかった (Fig. 2-7.)。このことは、少なくともステージ II の段階にある両生態型果実がマクロレベルのトランスクリプトームパターンでは違いがなく、比較的少数の遺伝子の発現にのみ違いがあることを示唆しており、上記の予想を裏付けていた。

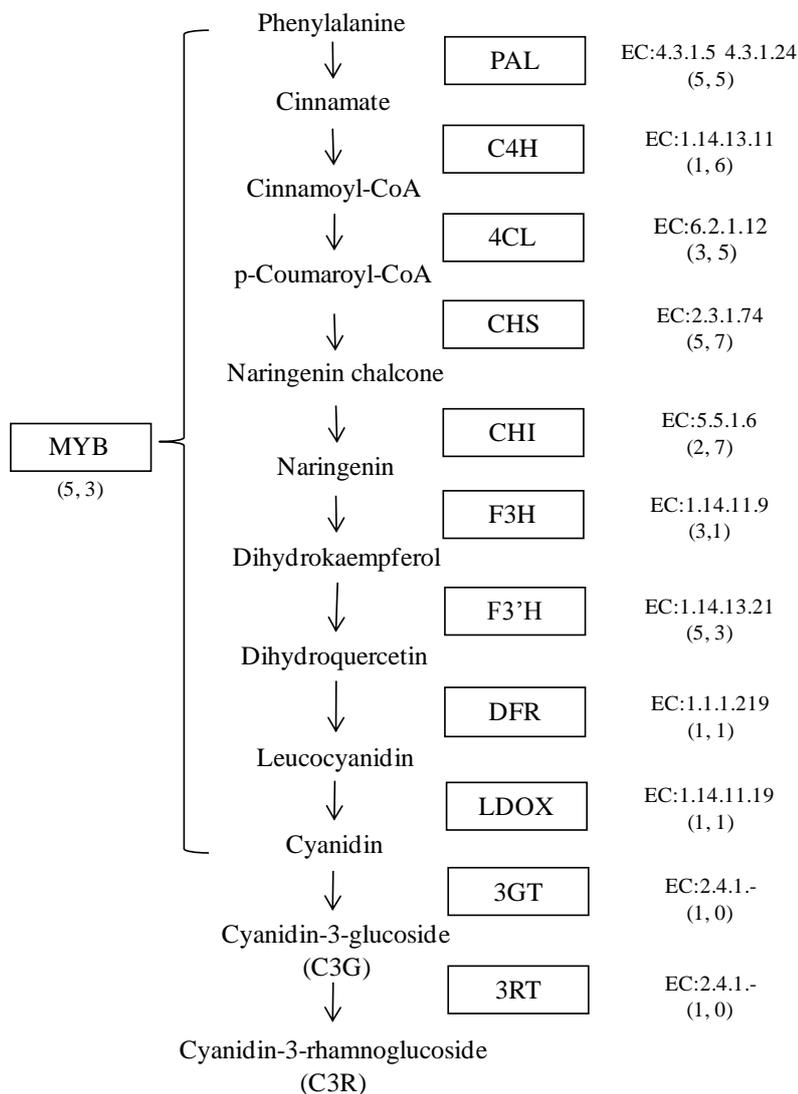


Fig. 2-6. Anthocyanin and anthocyanidin biosynthesis in *F. carica* fruit. The boxes show genes encoding enzymes that were isolated from fig fruit ESTs in this study (BLASTx, e-05 cut-off). The first and second numbers in the parentheses refer to the number of contigs and single-tons, respectively. MYB, Myb transcription factors; PAL, phenylalanine ammonia lyase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; C4H, cinnamate 4- monooxygenase (trans-cinnamate 4-monooxygenase); CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavonone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; 3GT, flavonoid 3-glycosyl-transferase; 3RT, anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase.

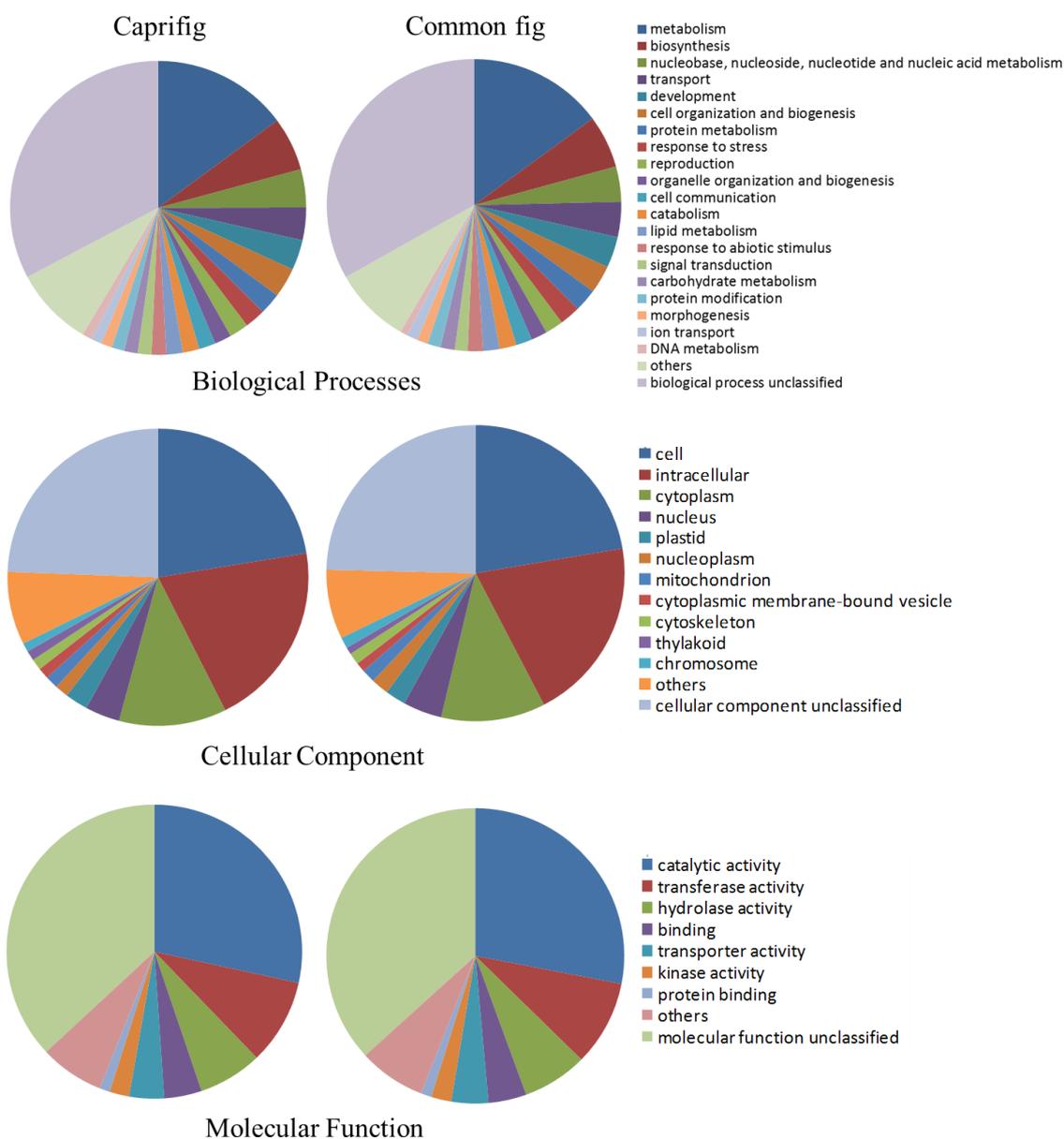


Fig. 2-7. Type-specific distribution of GO terms (GOSlim, Biological Processes, Cellular Component, Molecular Function assigned to each type of unigene dataset sequences.

2.4.5. MADSbox 遺伝子

イチジク果実の花の性の決定には 2 つの連鎖した対立遺伝子 (GA/ga) が関与すると考えられている。G 座の対立遺伝子が雌ずいの長さを制御し、A 座の対立遺伝子が雄ずいの存在/欠如を制御している (Storey 1975)。しかし、両遺伝子の生理学的な位置づけは不明である。

ABCDE モデルは花器官と遺伝子発現の関係を説明するモデルであり (Ferrario et al., 2003; Theissen, 2001; Theissen and Saedler 2001), 花の性との関連については多くの種で検討されてきた (Kater et al., 2001; Sather et al., 2010; Park et al., 2003; Eloet et al., 2001; Yu et al., 1999; Sheppard et al., 2000; Ainsworth et al., 1995; Hardenack et al., 1994; Heuer et al., 2001)。これらを参考にして、カプリフィグ種と普通種の果実において発現している遺伝子の中から ABCDE モデルの各クラスに対応する 9 種の MADS 遺伝子を抽出した (Table 2-2.)。両生態型種のステージ I および II において抽出した遺伝子の発現レベルを RT-PCR で解析した結果、クラス A, D および E の遺伝子ではステージまたは生態型種による遺伝子発現の相違は観察されなかった。一方、クラス B と C の遺伝子では発現レベルに明らかな違いが認められた。ステージ II のカプリフィグ種における *PISTILLATA* (B クラス) ホモログ *PI1* および *PI2* の発現レベルは普通種の 1.7~5.0 倍高くなった。また、*AGAMOUS* (C クラス) ホモログ *AG* には増幅産物サイズの違いが認められ、普通種の増幅産物サイズがカプリフィグ種よりわずかに小さかった (Fig. 2-8.)。

単性の発達は生殖器の退化または一方のみの生殖器の分化で説明できる (Heslop-Harrison, 1964)。イチジクは、雌雄同体果実が雌期から雄期に移行するため前者に分類され (Ramirez, 1974), MADS ボックス遺伝子は花の性分化に直接的に関係しないと考えられる。すなわち MADS ボックス遺伝子群の働きの違いは、性決定後の結果と考えられる (Golenberg and Freeman, 2006)。この点に関しては、生態型間の *PI* ホモログの発現レベルがステージ I で同じであるにもかかわらずステージ II では異なっていたことと一致する。また、*PI* ホモログの発現がカプリフィグ種で高いことから、*PI* 遺伝子の発現がカプリフィグ種の雄しべ形成に関与する可能性が高い。さらに、花器官形成において C-クラス遺伝子が多様な機能的役割を有することから (Drews et al., 1991; Mizukami and Ma, 1992; Busch et al., 1999; Lohmann et al., 2001), *AG* ホモログの発現多型性と花の性分化との関連についてはさらなる検討が必要である。今後は、*G* 遺伝子および *A* 遺伝子と、*PI* ホモログおよび *AG* ホモログの関連について詳細な調査が必要である。

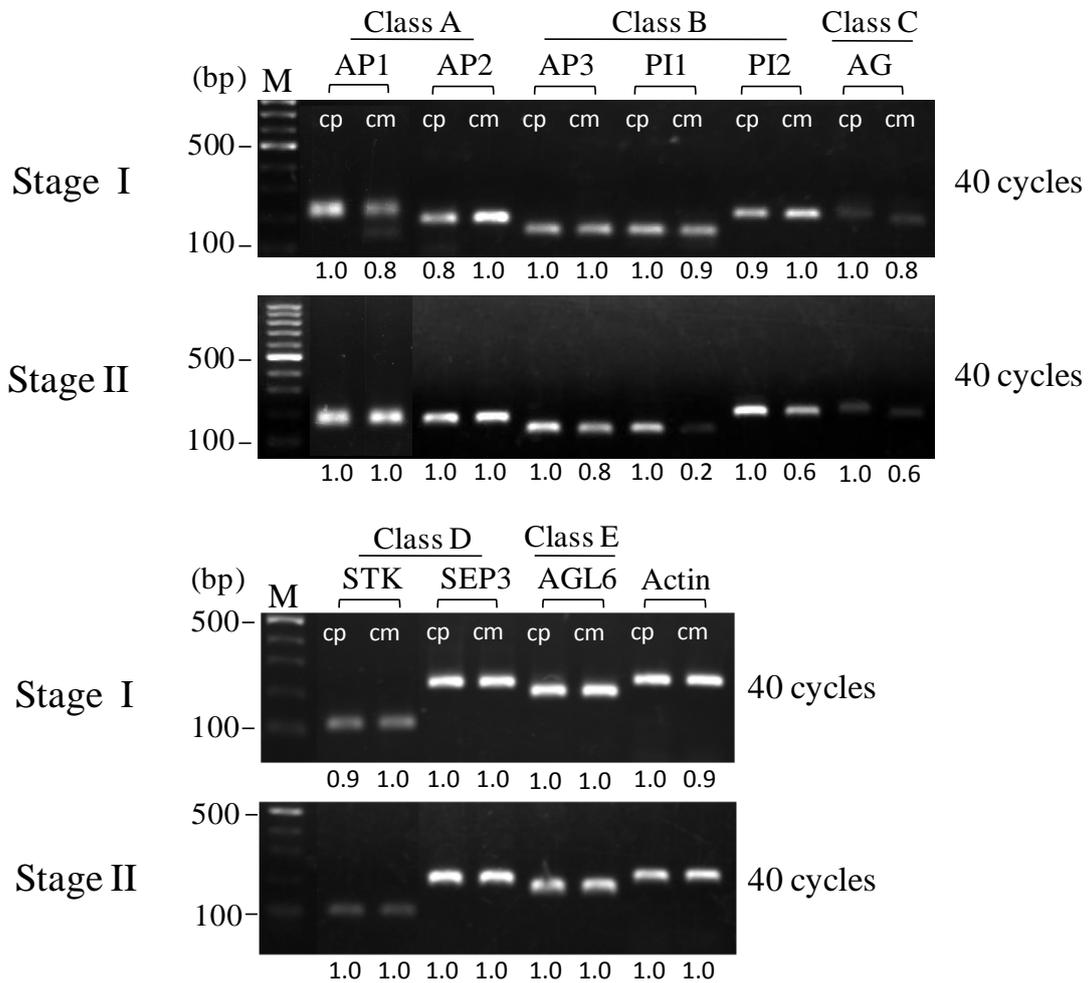


Fig. 2-8. RT-PCR analysis of ABCDE model MADS family genes in *F. carica* fruit (stages I and II). The abbreviations refer to fig homologs of each Arabidopsis MADS gene: AP1, APETALA1; AP2, APETALA2; AP3, APETALA3; PI1, PISTILLATA1; PI2, PISTILLATA2; AG, AGAMOUS; SHP, SHATTERPROOF; STK, SEEDSTICK; SEP1, SEPALLATA1; SEP3, SEPALLATA3; AGL6, AGAMOUS-like 6. Additional abbreviations: M, 100 bp molecular weight marker; Actin, β -actin. cp, caprifig type; cm, common type. The number under each lane indicates relative expression measured by AlphaEaseFC software v4.0.1 (Alpha Innotech, corp., SA).

2.4.6. ジベレリン合成遺伝子およびカルコン合成酵素遺伝子

イチジクの単為結果について、単為結果性と密接に関連する植物ホルモンであるジベレリン合成に関わる 8 つのホモログ遺伝子 (*GA20ox* を 1 個, *GIDI* を 2 個, *GAMYBI* を 1 個, *DELLAs* を 4 個) に注目した。ステージ II では、これらの遺伝子の中に生態型間における明瞭な差異は認められなかった。

また、カルコン合成酵素遺伝子 (*CHS*) ホモログの発現では、ステージ I における差異は検出されなかった。ステージ II においては、普通種における発現レベルの低下と転写産物サイズの減少が認められた (Fig. 2-9.)。 *CHS* と単為結果性との関連については、RNA 干渉による *CHS* の発現抑制が花粉管成長障害を介してトマトの単為結果をもたらすことが報告されている (Schijlen et al., 2007)。また、ブドウ由来のスチルベンシンターゼ遺伝子 (*STS*) を過剰発現したトマトでは、リグニンとスポロポレニンの生合成に必要なクマル酸およびフェルラ酸の不足により、雄性不稔と単為結果性が誘発されている (Ingrosso et al., 2011)。興味深いことに、*CHS* は普通種で特異的に発現している遺伝子の上位に位置している (Table 2-6., Table 2-7.)。 *CHS* と *STS* の産物による作用は構造的、機構的な側面で類似しており (Yamaguchi et al., 1999)、両者はフラボノイド合成代謝を通じて花粉の発達と植物の生殖に関与している (Mo et al., 1992; Ylstra et al., 1994; Hanhineva et al., 2009)。したがって、*CHS* の発現多型がフラボノイド合成代謝の変化を通じて、単為結果性と関連している可能性も考えられる。

2.4.7. 生態型特異的に発現する遺伝子の探索

ここまで解析に含まれない遺伝子の中に花の性の決定および単為結果形質における重要な因子が含まれる可能性を検討するために、カプリフィグ種または普通種のみから構成されるコンティグ配列を抽出した。その結果、カプリフィグ種特異的な 4,844 コンティグと普通種特異的な 2,260 コンティグが得られた (Table 2-6., Table 2-7.)。次に抽出された遺伝子の特異性を評価するため、これらコンティグからランダムに 18 件の遺伝子配列 (カプリフィグ種 10 件と普通種 8 件) を選択して RT-PCR による発現解析を行った。その結果、発現レベル、転写産物サイズのいずれかにおいて生態型間で差異が認められたのは 5 遺伝子であった (Fig. 2-10., Table 2-1.)。発現レベルの差異は、ペクチンリアーゼ様スーパーファミリータンパク質 (PG)、重金属輸送タンパク質 (HMT)、植物のカドミウム耐性タンパク質 (PCR11) およびジベレリン制御タンパク質 (GR) の遺伝子発現に、生態型に特異的な発現は NBS-LRR 遺伝子に認められた。

生態型の相違と 5 遺伝子との関連は明らかでないが、抽出された遺伝子の中には生態型分化に関連するものが含まれると考えられる。本研究では各生態型に対して 1 品種 (系統) のみを供試している。したがって、生態型間と遺伝子発現の多型との関連を裏付けるためには、同じ生態型に分類される他の品種を含めて検証する必要がある。また、生態型特異

的な遺伝子発現を精度良く漏れなく抽出するためには、多数の検体を供試した解析やゲノム情報、RNA-seq解析、マイクロアレイ解析等を併用したアプローチが必要である。

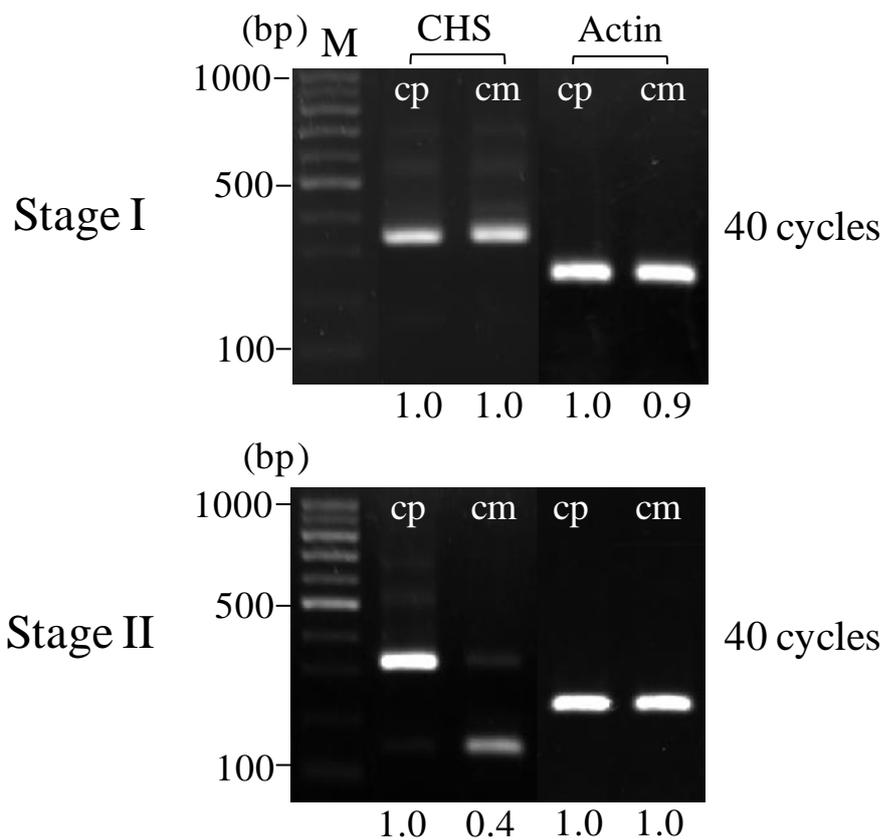


Fig. 2-9. RT-PCR analysis of Arabidopsis chalcone synthase (CHS)-homologous genes in *E. carica* fruit (stages I and II). M, 100 bp molecular weight marker; Actin, β -actin; cp, caprifig type; cm, common type. The number under each lane indicates relative expression measured by AlphaEaseFC software v4.0.1 (Alpha Innotech, corp., SA).

Table 2-6. The 20 most prevalent caprifig-specific transcripts

Contig ID	mapped reads	TAIR description	E-value	TAIR ID
FICAF00049	326	Ethylene-forming enzyme	3.00E-64	AT1G05010.1
FICAF02984	205	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	2.00E-46	AT3G47380.1
FICAF00071	158	Plasma membrane intrinsic protein 1C	1.00E-148	AT1G01620.1
FICAF00569	71	Sucrose synthase 3	0	AT4G02280.1
FICAF03477	68	Plasma membrane intrinsic protein 2	1.00E-125	AT2G37170.1
FICAF00323	64	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	1.00E-37	AT4G08685.1
FICAF00734	64	Endomembrane protein 70 protein family	0	AT4G12650.1
FICAF07417	62	Granulin repeat cysteine protease family protein	1.00E-103	AT1G47128.1
FICAF00442	59	Pectin lyase-like superfamily protein	8.00E-110	AT3G07820.1
FICAF00387	56	Calnexin 1	0	AT5G61790.1
FICAF00418	53	GTP binding Elongation factor Tu family protein	0	AT5G60390.3
FICAF00371	44	Tubulin alpha-2 chain	0	AT1G50010.1
FICAF00696	42	Homeobox 1	3.00E-38	AT3G01470.1
FICAF00308	41	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1.00E-44	AT3G26040.1
FICAF00512	40	Hyaluronan / mRNA binding family	1.00E-31	AT4G16830.3
FICAF04153	40	RAN GTPase 3	1.00E-122	AT5G55190.1
FICAF00333	39	Eif4a-2	1.00E-142	AT1G54270.2
FICAF00522	39	ADP-ribosylation factor A1B	3.00E-100	AT5G14670.1
FICAF00189	38	Late embryogenesis abundant protein, group 2	2.00E-101	AT2G44060.2
FICAF00423	37	Amino acid permease 6	2.00E-108	AT5G49630.1

Mapped reads means the number of uncorrected EST counts

Table 2-7. The 20 most prevalent common fig-specific transcripts

Contig ID	mapped reads	TAIR description	E-value	TAIR ID
FICAF00049	141	Expansin A8	1.00E-108	AT2G40610.1
FICAF02984	91	Plasma membrane intrinsic protein 1;4	2.00E-149	AT4G00430.1
FICAF00071	69	Actin 7	8.00E-95	AT5G09810.1
FICAF00569	54	Major facilitator superfamily protein	2.00E-178	AT4G34950.1
FICAF03477	48	Unknown protein	6.00E-06	AT1G03820.1
FICAF00323	44	SKU5 similar 5	2.00E-103	AT1G76160.1
FICAF00734	40	SOS3-interacting protein 4	1.00E-151	AT2G30360.1
FICAF07417	39	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	3.00E-67	AT3G53990.1
FICAF00442	37	Highly ABA-induced PP2C gene 1	1.00E-55	AT5G59220.1
FICAF00387	37	Regulatory particle triple-A 1A	0	AT1G53750.1
FICAF00418	35	Nucleotide-sugar transporter family protein	1.00E-11	AT4G09810.1
FICAF00371	34	Unknown protein	4.00E-29	AT1G54200.1
FICAF00696	34	Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	4.00E-146	AT4G33150.3
FICAF00308	32	Encodes a protein involved in salt tolerance, names SIS (Salt Induced Serine rich).	3.00E-27	AT5G02020.1
FICAF00512	31	Chalcone and stilbene synthase family protein	0	AT5G13930.1
FICAF04153	29	Glycosyl hydrolases family 32 protein	3.00E-96	AT1G62660.1
FICAF00333	28	Tonoplast intrinsic protein 1;3	7.00E-102	AT4G01470.1
FICAF00522	28	Protein of unknown function (DUF3537)	7.00E-159	AT3G20300.1
FICAF00189	27	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30	3.00E-129	AT1G32170.1
FICAF00423	26	No hit	No hit	No hit

Mapped reads means the number of uncorrected EST counts

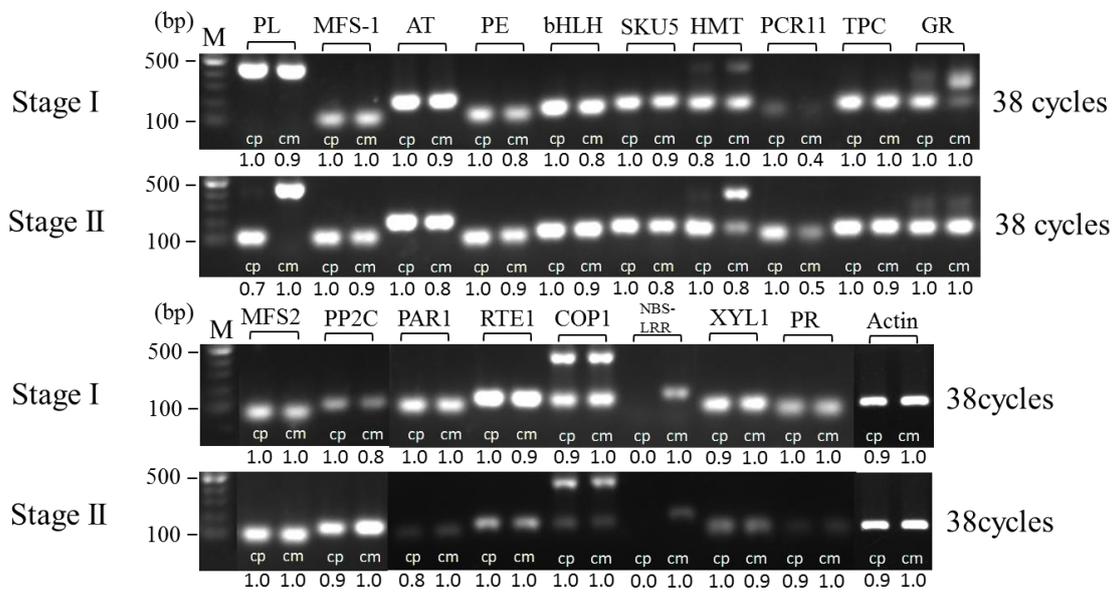


Fig. 2-10. RT-PCR analysis of 18 subtracted genes in caprifig and common fig fruits (stage I and II). The analyzed genes were preferentially selected from the subtraction lists on the basis of their read number ranking. The abbreviations refer to fig homologs of Arabidopsis genes: PL, pectin lyase-like superfamily protein; MFS-1, major facilitator superfamily-1; AT, HXXXD-type acyl-transferase family protein; PE, pectin methylesterase inhibitor superfamily; bHLH, basic helix-loop- helix DNA-binding superfamily protein; SKU5, SKU5 similar 13; HMT, heavy metal transport; PCR11, plant cadmium resistance 11; TPC, terpenoid cyclases; GR, gibberellin-regulated family protein; MFS2, major facilitator superfamily protein 2; PP2C, highly ABA- induced PP2C gene 1; PAR1, PAR1 protein; RTE1, reversion-to-ethylene sensitivity 1; COP1, COP1-interactive protein 1; NBS-LRR, disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family; XYL1, beta-xylosidase 1; PR; pathogenesis-related family protein. Additional abbreviations: M, 100 bp molecular weight marker; cp, caprifig type; cm, common type. The number undereach lane indicates relative expression measured by AlphaEaseFC software v4.0.1 (Alpha Innotech, corp., SA).

2.4.8. 結言

イチジクの果実生理及び生態型分化に関与する遺伝子群の同定を目的に、イチジク果実における発現遺伝子の網羅的な解析を行った。カプリフィグ種と普通種の果実に由来する cDNA ライブラリーを対象に次世代シーケンス解析を行い、トランスクリプトームの比較を行った。総計 290,594 のシーケンスリードのアセンブルを行い、71,455 のユニジーン (19,166 のコンティグと 52,289 のシングルトン)を得た。このユニジーンの中からエチレン、糖およびアントシアニンの合成等の果実成熟にかかわる遺伝子を多数同定できた。ユニジーンの中には機能不明なものも含まれていた。果実生態型間の GO ターム分布の比較では有意な差は認められなかったが、RT-PCR 解析では複数の遺伝子で発現多型を検出した。本解析で得られたデータ及び結果は、今後のイチジク果実生理の遺伝研究に貢献するとともに、イチジクの果実品質や生態型分化に係る形質のマーカー開発を進める上で有用と考えられる。

第3章. イチジクの花序分化に関連する *FT* ホモログ *FcFT1* の解析

3.1 序

イチジクは昔から豊穡と多産(高い生殖能力)の象徴として知られており, その言われの通りユニークな結実特性を有している。イチジク果実(花序)の成長および発達については過去に多くの詳細な研究が行われている(木村・菱谷, 1951)。イチジクでは前年の結果枝(2年生枝)の頂芽と腋芽が春に伸長すると, 鱗片が離脱した頂芽は新しい葉と花序を分化する新梢, すなわち結果枝となる(Flaishman et al., 2008)。花序の分化は結果枝の下位の節から高位の節に向かって順に進む。イチジクの果実は, 数百から数千の小花を内包する肥大した花托(花囊)からなるため, 果実の分化と花序の分化はほぼ同義である(平井, 1966)。花序の分化は環境条件が許す限り結果枝の下位節から先端に向かって継続する(Crane, 1986)。秋には当年結果枝(1年生枝)の先端付近の節で花序が分化し, その後休眠状態になる。分化後の花序は冬季の低温に入るため発育を停止し, 翌春に発育を再開して, 夏季に成熟した果実となる(Fig.3-1A., 3-1B.)。

イチジクは初夏の1回目の結果(第1期果)と初秋の2回目の結果(第2期果)の2種類の収穫果がある(Storey, 1975)。花序が年2回に分けて分化するように見えるが, 花序分化は新梢が伸長する期間を通じて継続する(Crane, 1986)。低温によって誘導される冬季休眠によって花序分化が区切られているために, 第1期果と第2期果が独立した時期に花序分化を開始したように見えるだけである(Fig.3-1A.)。

概して植物の花成誘導は日長時間, 温度および自律的要因などの一定の環境条件および内的条件のいくつかが同時に満たされた時に誘導されるため, 多くの植物の花成誘導は毎年特定の季節に起こる。例えばシロイヌナズナでは, 春季および夏季に長日条件に応じて花成が誘導される(Napp-Zinn, 1969)。イネでは夏季または秋季に短日条件によって出穂が促進される(Poonyarit et al., 1989)。また, 木本多年生のポプラでは低温となる冬季に生殖生長への転換が促進される(Yuceer et al., 2003)。対照的にイチジクの花序の分化は春季から秋季にわたって長期間継続する。つまりイチジクでは上記の植物種とは異なる光周期非依存的あるいは季節非依存的な花成機構の存在が推察される。

モデル植物であるシロイヌナズナ(Blazquez, 1997; Bladley et al, 1997; Kobayashi et al, 1999; Araki, 2001; Yoo et al, 2004; Abe et al., 2005)を含む様々な植物において花成誘導を制御する多くの遺伝子が明らかにされてきた。これらの遺伝子のうち, *FLOWERING LOCUS T (FT)* およびその関連ファミリーはフロリゲンタンパク質をコードし(Chailakhyan, 1936; Tamaki et al., 2007; Corbesier and Coupland, 2006; Corbesier et al., 2007), 光周性経路および春化経路を統合して(Corbesier and Coupland, 2006), 花成誘導刺激を茎頂分裂組織(生長点)に伝える。したがって, イチジクの花序分化においても *FT* 遺伝子が関与している可能性が高い。この点を明らかにするためには, まずイチジクの *FT* 遺伝子ホモ

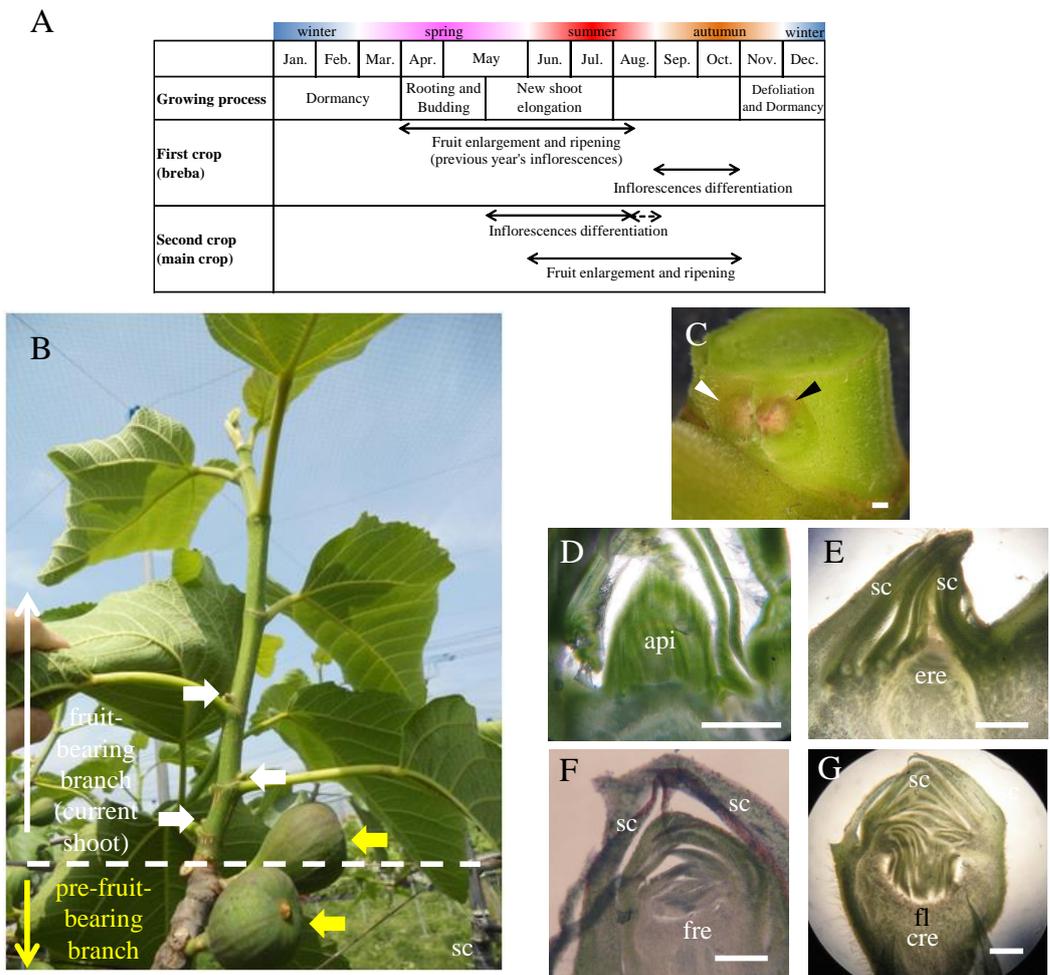


Fig. 3-1. Bearing style and flower bud differentiation in *Ficus carica* L. (A) Fig fruit ('Houraishi') production in Japan. The broken arrow indicates the period when inflorescences differentiate but most resulting fruits drop or decay because of winter low temperature. (B) First-crop fruits differentiate at nodes near the tip of 2-year-old pre-fruit-bearing branches (yellow arrows) and second-crop fruits differentiate at nodes near the base of 1-year-old fruit-bearing branches (white arrows). Inflorescences differentiate sequentially from lower nodes as a 1-year-old fruit-bearing branch develops. (C) Exterior appearance of leaf bud (left white arrowhead) and flower bud (right black arrowhead) at axillary position. (D) Histological sections of apical bud meristem (api). No inflorescences were observed before bud flushing. (E) Histological sections of a flower bud with an early receptacle (ere) and scales (sc). (F) Histological sections of a flower bud with a flat receptacle (fre) and scales (sc). (G) Histological sections of a flower bud with a curved receptacle (cre) surface on which floret (fl) differentiation begins. Bar = 500 μ m.

ログを明らかにして、その機能と特徴を調べることが重要である。

本章では、イチジクの着果と密接な関連がある花序分化を制御する遺伝要因を明らかにするために、イチジク由来の *FT* 様遺伝子 (*FcFTI*) をクローニングし、その特徴を分析した。さらに、*FcFTI* の花成誘導促進効果ならびに発現様式を確認して、*FcFTI* の発現とイチジク独特の花序分化ならびに着果特性との関連を検証した。

3.2 材料および方法

3.2.1. 花序調査

花序の分化が着果の前年ではなく当年であることを確認するために、2011年3月および5月に福岡県農林業総合試験場豊前分場（行橋市）で露地栽培された‘蓬莱柿’から、頂芽および腋芽（木村・菱谷，1951）を採取して光学顕微鏡で観察した。切片（厚さ 0.04~0.08 mm）は Desktohand microtome（Kennis, Osaka, Japan）を用いて作製し、0.05%（w/v）のトルイジンブルーで染色した。切片画像はパワーショット A590 イメージスタビライザー（IS）デジタルカメラ（Cannon, Tokyo, Japan）を搭載した BH-2 光学顕微鏡（Olympus, Tokyo, Japan）で撮影した。また、イチジクにおける着果の継続性を確認するため、‘蓬莱柿’成木の着果数を5月下旬から7月下旬にかけて調査した。なお、着果数の調査では、横径 2 mm 超の花序を果実と見なし、8枝の総着果数を数えた。

3.2.2. RACE クローニング

まず、*FT* 遺伝子特異的な縮重プライマーを用いた RACE 法（rapid amplification of cDNA ends）により、イチジクゲノムより *FT* 様遺伝子の増幅断片を得た。*FT* 遺伝子特異的な縮重プライマーは、他の植物種の *FT* 遺伝子ファミリーの保存領域から設計した。ゲノム DNA は、‘蓬莱柿’の挿し木苗の成葉から、DNeasyPlant Mini Kit（Qiagen）を用いて抽出した（Ikegami et al., 2009b; Ikegami et al., 2013）。RACE には、GeneRacerkit（Invitrogen）と Table 3-1. に示すプライマーを用いた。得られた 5' および 3' 断片をアライメントし、全 cDNA 配列を同定した。*FcFTI* コード領域は、cDNA およびゲノム DNA を鋳型として KOD プラスポリメラーゼ（Toyobo, Osaka, Japan）を使用した PCR によって増幅した。増幅された配列は、PCR-Script Amp SK (+) vector（Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA）にクローニングし、配列を決定した。塩基配列の解析には ABI Prism 310 sequencer（Applied Biosystems）で Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて行った。

FcFTI コード領域に隣接する 5' 上流配列を単離するため、Straight WalkKit（Bex, Tokyo, Japan）を用いて Straight Walk 法（Tsuchiya et al., 2009）によるゲノムウォーキングを行った。得られた 1664bp の 5' 上流配列中のシスエレメントを PLACESignal Scan Search (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) で予測した。

系統分類および分子進化解析は、GENETYX (Ver. 8.0; Genetyx, Tokyo, Japan) を用いて行った。系統樹を作成するために、見出された FT 様タンパク質のアミノ酸配列および他の植物種の FT 様タンパク質アミノ酸配列をマルチ配列アラインメントとした。なお、アラインメントにはデフォルトパラメータを用い、進化距離の推定と系統樹の計算にはアミノ酸近隣結合法を適用した。

3.2.3. DNA ゲルブロット分析

‘蓬莱柿’ ‘榊井ドーフィン’ ‘とよみつひめ’ の 3 品種のゲノムを用いて DNA ゲルブロット分析を Brown (2001) の方法により行った。プローブ A およびプローブ B には、それぞれ、*FcFTI* の第 1 エクソンから第 1 イントロンの領域、および第 3 イントロンから第 4 エクソンの領域を用いた (Fig. 3-3A., Fig3-4.)。ゲノム DNA の消化には制限酵素 *XbaI* および *HindIII* を用いた。

3.2.4. タバコ形質転換体を用いた遺伝子機能解析

XbaI と *SacI* のアダプターを付加した *FcFTI* の完全長配列を、PR1a プロモーター (Ohshima et al., 1990) または EL2-35S- Ω プロモーター (Mitsuhara et al., 1996) と連結して pE2113 ベクターにクローニングした。PR1a および EL2-35S- Ω プロモーターの利用により、それぞれ発現が弱い形質転換体および発現が強い形質転換体を作成した。作成したコンストラクトは、改変コールドショック法 (An, 1987) を用いてアグロバクテリウム EHA105 株に導入した。形質転換用アグロバクテリウム株はリーフディスク法 (MacKenzie and Tremaine, 1990) により *Nicotiana tabacum* ‘Sumsun NN’ の無菌苗に形質転換した。形質転換後の植物体は $50 \mu\text{g l}^{-1}$ のハイグロマイシンを添加した 3% スクロースと 0.3% ゲルライトを含む MS 培地上で選抜した後、16 時間明期/8 時間暗期の光環境で育成した。*FcFTI* 遺伝子の導入確認は、*FcFTI*-FL1 と *FcFTI*-RL1 のプライマー (Table 3-1.) を用いた PCR により確認した。

表現型解析のために、まず *FcFTI* 形質転換体の T1 植物から T2 種子を採種した。採取種子は MS 培地上で無菌的に育成し、播種 21 日後に園芸用媒土に移植した。移植した形質転換体について「播種から開花までの日数」、「葉数」および「播種から 70 日後の草丈」の 3 項目を調査した。野生型と形質転換体の形質値を、Tukey-Kramer 法を用いて比較した。

Table 3-1. Primer sequences used in this study.

	Primer name	Sequence (5' to 3')
PCR with genomic DNA		
FT forward	FTdg-F1	GTHATGGTKGAYCCWGA
FT reverse	FTdg-R1	CGCCAYCCYGGWGCATAMAC
FT forward	FTdg-F2	TTGGTKACYGATATYCCWGC
FT reverse	FTdg-R2	CCRCYCTCCCTYTGR CARTT
RACE		
First PCR		
FT 3'RACE forward	3'-RACE-GSP1	GCTATGAGAGTCCACGGCCGACTGT
FT 5'RACE reverse	5'-RACE-GSP1	ATCTCAGCAAAGTCTCTAGTGTGAAG
Second PCR		
FT 3'RACE forward	3'-RACE-GSP2	GGGGTGGCGCCAAAACCTTCAACACT
FT 5'RACE reverse	5'-RACE-GSP2	TTTTGGCGCCACCCCGGCGCGTACA
Full length PCR		
FcFT1 forward	FcFT1-FL1	ATGCCGAGAGAGAGAGACCCACTAGTGGT
FcFT1 reverse	FcFT1-RL1	TTATCTCCTTCTTCCACCGGAGCCACT
RT-PCR		
FcFT1 forward	FcFT1-QPCR-F1	GTTGGTGACTGACATTCCAGCAACTACAG
FcFT1 reverse	FcFT1-QPCR-R1	TTCTGGCGCCACCCCGGCGCGTACA
Actin forward	FcActin-QPCR-F1	GCTGGTCGTGATCTCACTGAC
Actin reverse	FcActin-QPCR-R1	TCAGCACCGATTGTGATGACC

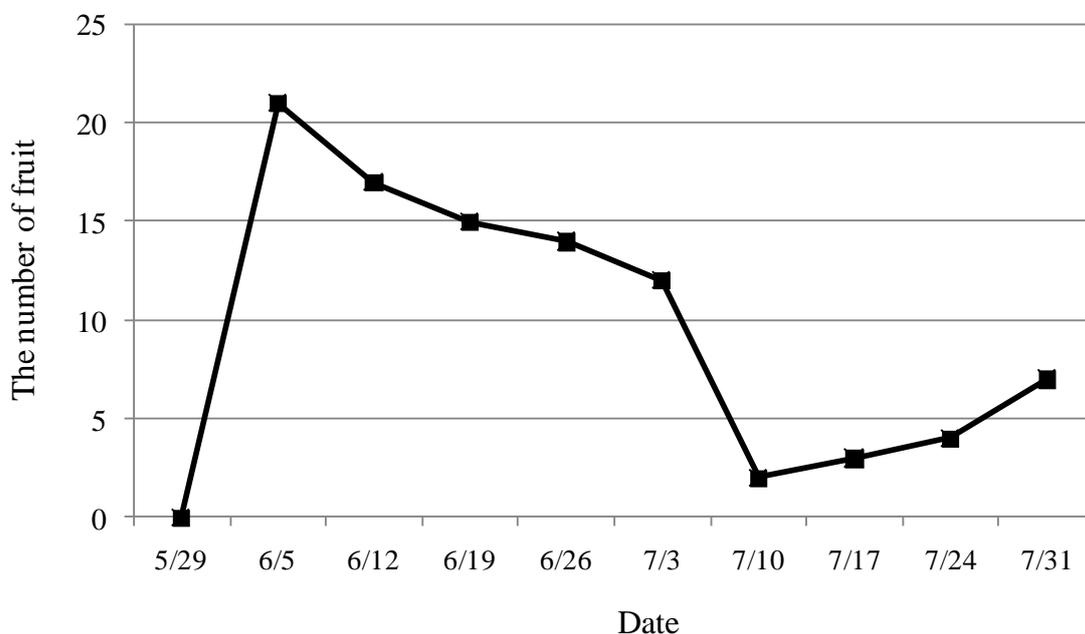


Fig. 3-2. Number of fruit set on eight bearing branches of an adult 'Houraishi' fig tree from late May to late July of 2011.

3.2.5. リアルタイム RT-PCR 解析

リアルタイム RT-PCR による *FcFTI*mRNA 発現レベルの解析には、人工気象室で栽培された‘蓬萊柿’の3年生の挿し木苗(果実ステージ I)の葉、莖、花托、果皮、小花を用いた。*FcFTI* mRNA の空間的および季節的発現の変化の解析には、福岡県農林業総合試験場に植栽の22-24年生‘蓬萊柿’の成木の結果枝から3つの葉の頂端側半分を採取して用いた。空間的解析には第10節まで伸長したシュートの各節から採取した葉を用いた。遺伝子発現レベルの比較は Tukey 検定 ($P < 0.05$) により行った。季節的変動の解析には2011年3月から10月まで、月に一度13:00–14:00に採取したものをを用いた。日変動の解析には、人工気象室(光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 温度 25°C) で生育した3年生の苗木から4時間毎に採取したものをを用いた。このとき、苗木は最初に12時間明期/12時間暗期(12L/12D)の光周期下で3日間栽培した後、長日条件(16L/8D)下、短日条件(8L/16D)下、および連続暗期条件(DD)下の3条件下で3日間栽培したものをを用いた。

リアルタイム RT-PCR の詳細は以下の通りである。最初に RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全試料から total RNA を抽出し DNase I (Takara) で処理した。材料が果実の場合には Fruit-mate for RNA Purification (Takara, Shiga, Japan) (Ikegami et al., 2009) を併せて使用した。PCR 条件は、ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR system (Life Technologies) を使用して、real-time RT-PCR Kit のプロトコール (One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II Perfect Real Time, Takara) に従った。各試料につき 25 ng の total RNA を使用し、 β -アクチン遺伝子 (DDBJ ID : AY487315) をコントロールとした (Ikegami et al., 2013)。使用したプライマー配列を Table 3-1. に示す。PCR は最初に 42°C (5分)および 95°C (10秒)、その後 95°C (5秒)と 68°C (4秒)を45サイクルとした。

3.3 結果

3.3.1. 花序の分化時期および期間

3月に行った観察では、平坦な形状の花托を有する花序は頂芽の生長点で認められず、結果の前年に分化した花序器官は確認できなかった。5月15日には、平坦な形状を示す花托を有する花序の分化が結果枝の下位節では認められた。この時点では上位節での花序の分化は認められなかった。円形状の小花原基の分化が特徴的な花序の分化は5月下旬には認められるようになった (Fig.3-1.C–G)。また、このような小花原基の分化を着果とみなせば、5月から始まった着果は7月以降にも継続して観察することができた (Fig. 3-2.)。

3.3.2. イチジク *FT* ホモログ *FcFTI* の同定

イチジクの *FT* 様遺伝子の完全長 cDNA を、イチジク葉の RNA サンプルから RACE 法を用いてクローニングした。得られた遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列を他の植物

種に由来する *FT* 様遺伝子がコードするアミノ酸配列とアラインメントした結果、クローニングした遺伝子は *FT* ファミリーの遺伝子であると推察できた。そこで、この遺伝子を *FcFTI* (GenBank 登録番号 AB457620) と名付けた。*FcFTI* は全長が 5,175-bp で、*FT* 遺伝子ファミリーの他の遺伝子と同様に 4つのエクソンと 3つのイントロンから構成されていた (Fig. 3-3.A)。2.9 kbp の第 2イントロンおよび 1.7 kbp の第 3イントロンは多くの連続モノヌクレオチド配列を含有していた。

全アミノ酸配列の比較では、*FcFTI* はシロイヌナズナの *FT* (DDBJ ID: AB027504) とは 74.5%、リンゴの *MdFT2* (DDBJ ID: FJ555224) と 92.5%が同一であった。アミノ酸配列に基づいた *FT* 遺伝子ファミリー系統樹には、3つの主要クレードが認められ、*TFL1*、*MFT* および *FT* サブファミリーに対応していた (Fig. 3-3.B)。さらに *FcFTI* 配列は *FT* 活性に不可欠な保存配列 Tyr85 および Gln140 を含んでおり *FT* タンパク質ファミリーの基本的な特徴を備えていた (Ahn et al., 2006; Hanzawa et al., 2005)。

DNA ゲルブロット分析では、プローブ A または B と *Hind*III 消化との組み合わせにおいて単一バンドが検出された。また、プローブ A または B と *Xba*I 消化との組み合わせでは 1 または 2 個のバンドが検出された (Fig. 3-4.)。

3.3.3. *FcFTI* 遺伝子上流のシス配列

Straight Walk Kit を続けて 2 度使用して、*FcFTI* の 5'上流側の 1,644-bp の塩基配列を決定した (Fig. 3-5.)。得られた配列を対象にして PLACE プログラムによるシス配列のモチーフ検索を行った結果、光応答性および組織特異的遺伝子発現に関する多くのシス制御エレメントが見出された。これらのエレメントには、DOFCOREZM (Yanagisawa and Sheen, 1998; Yanagisawa and Schmidt, 1999), CACTFTPPCA1 (Gowik et al., 2004), および CAATBOX1 (Wenkel et al., 2006) が含まれていた (Table 3-2.)。

3.3.4. *FcFTI* の機能解析

R1a プロモーターを含むコンストラクトと EI2-35S- Ω プロモーターを含むコンストラクトを用いた形質転換実験により、多数の遺伝子導入系統を獲得した。両コンストラクトを用いた形質転換実験から、3つの独立した形質転換系統を選び、*FcFTI* の導入と発現を確認するとともに表現型を観察した。PR1a::*FcFTI* および EI2-35S- Ω ::*FcFTI* 遺伝子導入系統は、それぞれ野生型よりも平均で約 17 日及び 23 日早く開花した。また、遺伝子導入系統は野生系統よりも葉数が少なく、草丈も低くなった (Table 3-3., Fig. 3-6.)。

Fig. 3-3 (continued)

Accession numbers of sequences used are as follows: *FcFT1* (AB457620) from *Ficus carica*; *AtFT* (*FT*) (AB027504), *AtTSF* (*TSF*), (NP_193770), *AtTFL1* (*TFL1*) (NM_120465), *AtBFT* (*BFT*) (NP_201010), *AtCEN* (*ATC*) (AB024715), *AtMFT* (*MFT*) (AEE29676) from *Arabidopsis thaliana*; *BvFT1* (HM448910), *BvFT2* (HM448912), *BvCEN1* (HM448914) from *Beta vulgaris*; *CiFT* (AB027456), *CiFT2* (AB301934), and *CiFT3* (AB301935) from *Citrus unshiu*; *InFT1* (ABW73562), *InFT2* (ABW73563) from *Ipomoea nil*; *MdFT1* (AB161112) and *MdFT2* (FJ555224) from *Malus × domestica*; *OsFTL1* (LOC_Os01g11940), *OsFTL2* (LOC_Os06g06320), *OsFTL3* (LOC_Os06g06300), *OsFTL4* (LOC_Os09g33850), *OsFTL5* (LOC_Os02g39064), *OsFTL6* (LOC_Os04g41130), *OsFTL9* (LOC_Os01g54490), *OsFTL10* (LOC_Os05g44180), *OsFTL11* (LOC_Os11g18870), *OsFTL12* (LOC_Os06g35940), *OsFTL13* (LOC_Os02g13830), *OsMFT1* (LOC_Os06g30370), *OsMFT2* (LOC_Os01g02120), *OsRCN1* (LOC_Os11g05470), *OsRCN2* (LOC_Os02g32950), *OsRCN3* (LOC_Os12g05590), *OsRCN4* (LOC_Os04g33570) from *Oryza sativa*; *PnFT1* (BAD01612), *PnFT2* (BAD01561), *PnFT3* (BAD02371), *PnFT4* (BAG12904), *PnFTL1* (BAD27481), *PnFTL3* (BAD22601), *PnFTL4* (BAD22677), *PnTFL1* (BAD22599) from *Populus nigra*; *PtrFT1* (XP_002316173), *PtrFT2* (XP_002334306), *PtrFT3* (XP_002311264), *PtrFTL1* (XP_002321903), *PtrFTL3* (XP_002312811), *PtrFTL4* (ABC26020), *PtrFTL9* (XP_002334492), *PtrTFL1* (XP_002328260) from *Populus trichocarpa*; and *VvFT* (ABF56526), *VvFT1* (ABI99465), *VvFT2* (ABL98120), *VvMFT* (ABI99469), *VvMFT2* (XP_002281565), *VvTFL1a* (ABI99466), *VvTFL1b* (ABI99467), and *VvTFL1c* (ABI99468) from *Vitis vinifera*.

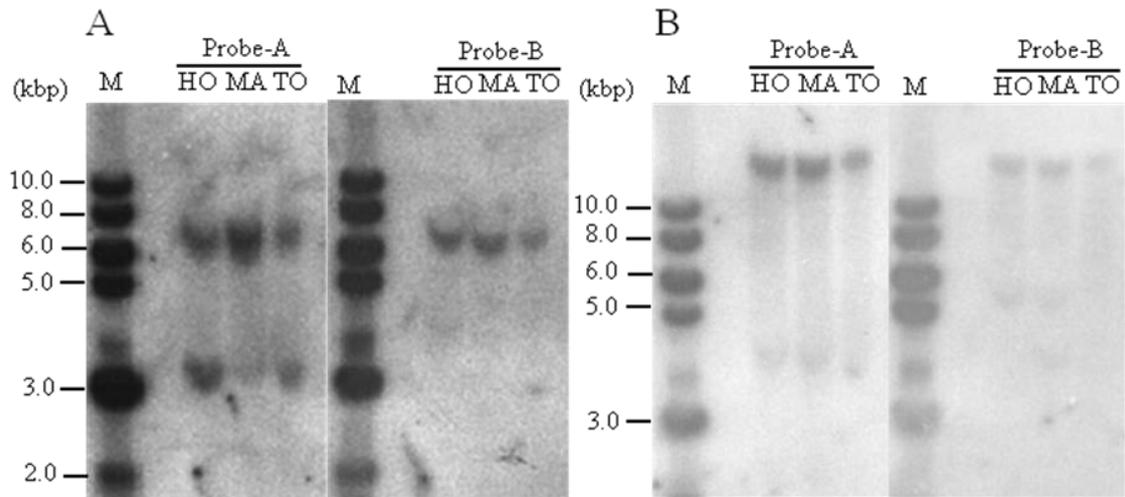


Fig. 3-4. Southern blot analyses of the *FT-like* gene, *FcFT1*, from *Ficus carica* L. in fig cultivars. Fig genomic DNA was digested with *Xba*I and *Hind*III. Two *FcFT1* genomic DNA fragments were labeled with 32 P and used as probes. Hybridization and washing were performed under highly stringent conditions as described by Brown (2001). Panel A, digestion with *Xba*I. Panel B, digestion with *Hind*III. Fig cultivars used were as follows: HO, 'Houraishi'; MA, 'Masui Dauphine'; TO, 'Toyomitsuhome'; M, 1 kb ladder marker. Accession numbers: probe-A (AB594722), probe-B (AB594723).

-1644 ATATATAAAATATATATAAAAATTTT

-1620 GGATTAGAGAGTTTCTGTCCATATTTGAGAGGGTCCACAACAATTGTGTGTGTGCGCAAA
-1560 CACTCACAAAATATATATAAAGTGTAATGATAGACGTAAGTTATCTTATATGCCAAAGCTA
-1500 GAAGCACTTTGTCAAAAATGGTTGTGGGAAGTGCTTGC TCGAATAGGGGTGGTTCTGAAGT
-1440 GACTACACATATAAGTAAATATCAAAGAACAACGAGATATGACTAGGTGATTGAAATAAT
-1380 CAACAAATAGTTGGTTCCAAGTCATGTACATATACCTCTTCTAGGATGTATAGAATATAA
-1320 AATATATATGTATATATATACATGTGCGTCTTGC ACTATTCATATGAAATTTTTTGGATA
-1260 TTTTTCAAATGTA AAAATTGACTTTTCATCCAAAAGATTGAACTATACTCAATACGGAATTT
-1200 CTAAC TTTTTTTTCTTTTTTAAACATGGACTTTATAAACTCATTGAGTCGTGGAGTCTAA
-1140 TTAATATCATACAAAAAAGAGTTTTATGCAGAGATAACATTAATCATCACAGTGAATTATT
-1080 ACGAAGGTTAAAAATAGAAAGTAATCTCATATTAAGGTGAAGCTATATAAAAAATTTACATA
-1020 TTTATGATTATTTATTTACTTTTTATGATTTTTATTGCTCTTAATGATTAAAGAATTAGGGC
-960 GTTAATTC TATTATAACTTTGCTAATTTTGAACAACACACCTCCGACAAATAGCGACCTGC
-900 ACATATTTTGATTCTTACAAACCCTAGCTAGCTAATTAGATGTATTTTTGTTTGTATGGTT
-840 GTGTGTGAATTAATTACGTACGTCTCTCTATATATATATACACACACACACATATAAAA
-780 ATATATATAAAATATATATACATACTCATAACAAGCACAGGAAACATATTTTATATAATGAAA
-720 TTTAAGCGGCTCTTTTCAACATTAATTTGGCATGAAATTAGAAAATATATCAAACCTTGGA
-660 AAACGTTTAGCTCTGGACGGATATGAGAAGGAGCTGATGAATTCGAATATTAATAATAT
-600 ATATATATGAGGGACCCTCCTCCACTTTACAGTTAGCATGAAAGAAGAAGAAAGGCATC
-540 CTCACTATATTTTCTTATTCATTTATTTTTTATTTTTTCAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAA
-480 AAAAAAAAAAGAGAAAACGAAGGGAATTACTAAGGCCTCGTTTGGCTCTTGAGTTTAACTC
-420 AAAATTTTCATATCAGTTTTTATCTTTTTCTGAAAAGTTTTTGTCTTTTTCTAAAAAAT
-360 TTTTGTCTTTTTTGA AAAAGCCAACAAAAATTTTCAAATCAAACCTCATTCACCAAACGGAC
-300 CCTAAAAATCAACAAAAAGAGATCTATTGATGTGTGTACAAAAGTGAGGGTAAACGCGGGC
-240 ATGCATGGAAGTGAATAAATAAATAGCAATTGCCTGATCTCTTGAATATATGAGCCACCG
-180 ATAAACTGTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAATAAACTTTCATTGGATTCTAAGAAAAG
-120 TTATAATATTATATAGTAAAAAGTAGTATTTTGTTAGTAGAGAGGGTGGGTTTTTTGATTGA
-060 TATATATACAGATATATTGGATATATA TATATA TATATATATA TATTCAAAGTTCGAAAAGAAGAAA
+1 A GAGAAAGAGAAAA GAAAAAGGAAAAAATT+28

Fig. 3-5. Promoter sequence of the *FT*-like gene, *FcFT1*, from *Ficus carica* L. The 1,644-bp genomic DNA fragment flanking the 5' end of the gene contains several putative regulatory elements including an underlined TATA-box.

Table 3-2. Cis-element sequences identified in the 5' upstream region of the *FT-like* gene *FcFT1* in *Ficus carica* L.

Signal PLACE ID	Site name	Keywords	Description	+	-	Total
S000265	DOFCOREZM	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;	Core site required for binding of Dof proteins in maize (Z.m.)	21	12	33
S000449	CACTFTPPCA1	mesohpyll; CACT;	a key component of Mem1 (mesophyll DE expression module 1) found in the cis-regulatory element in the DE distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of	10	13	23
S000098	ROOTMOTIFTAPOX1	root; rolD;	Motif found both in promoters of rolD;	11	12	23
S000039	GATABOX	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;	GATA motif in CaMV 35S promoter; Binding with ASF-2	9	6	15
S000198	GT1CONSENSUS	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;	Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes, e.g., RBCS from many species, PHYA from oat and rice, spinach RCA and PETA, and bean CHS15	6	9	15
S000067	MARTBOX	MAR; SAR; T-box; scaffold; matrix;	Motif found in SAR (scaffold attachment region);	1	14	15
S000245	POLLEN1LELAT52	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;	One of two co-dependent regulatory elements responsible for pollen specific activation of tomato (L.e.) lat52 gene	9	6	15
S000454	ARR1AT	ARR1; Response regulator;	"ARR1-binding element" found in Arabidopsis; ARR1 is a response regulator	9	5	14
S000028	CAATBOX1	CAAT; legA; seed;	"CAAT promoter consensus sequence" found in legA gene of pea;	3	11	14
S000378	GTGANTG10	g10; pollen; pectate lyase;	"GTGA motif" found in the promoter of the tobacco (N.t.) late pollen gene g10 which shows homology to pectate lyase and is the putative homologue of the	7	4	11
S000144	EBOXBNNAPA	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;	E-box of napA storage-protein gene of Brassica napus (B.n.)	5	5	10
S000407	MYCCONSENSUSAT	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1;	MYC recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in	5	5	10
S000415	ACGTATERD1	ACGT; etiolation; erd;	ACGT sequence (from -155 to -152) required for etiolation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration)	4	4	8
S000453	GT1GMSCAM4	GT-1 box;	"GT-1 motif" found in the promoter of soybean (Glycine max) CaM isoform, SCaM-4; Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression	3	5	8
S000462	NODCON2GM	nodulin	One of two putative nodulin consensus sequences	5	3	8

Table 3-3. Phenotypes of transgenic tobacco lines expressing constructs containing the *FT*-like gene, *FcFT1*, from *Ficus carica* L.

genotype	n	Days to flowering [§]	leaf number [#]	plant height
Wild type	15	62.6±0.9 ^a	22.0±1.5 ^a	53.9±1.3 ^a
PR1a:: <i>FcFT</i> no.3	14	45.5±0.9 ^b	6.1±0.4 ^b	30.4±1.2 ^b
PR1a:: <i>FcFT</i> no.6	15	44.1±1.4 ^b	6.6±0.9 ^b	19.2±1.4 ^c
E12Ω:: <i>FcFT</i> no.6	10	39.6±1.3 ^c	6.8±0.4 ^b	30.0±0.9 ^b

§ Days from sowing to petal opening (± SE). #Number of leaves on 70-day-old plants (±SE). a, b, and c: significantly different from wild-type Samsun NN (SNN) at 70 days of age (Tukey-Kramer method, P < 0.01). All plants (T2 generation) were first grown on MS medium and then transferred to pots containing horticultural soil.

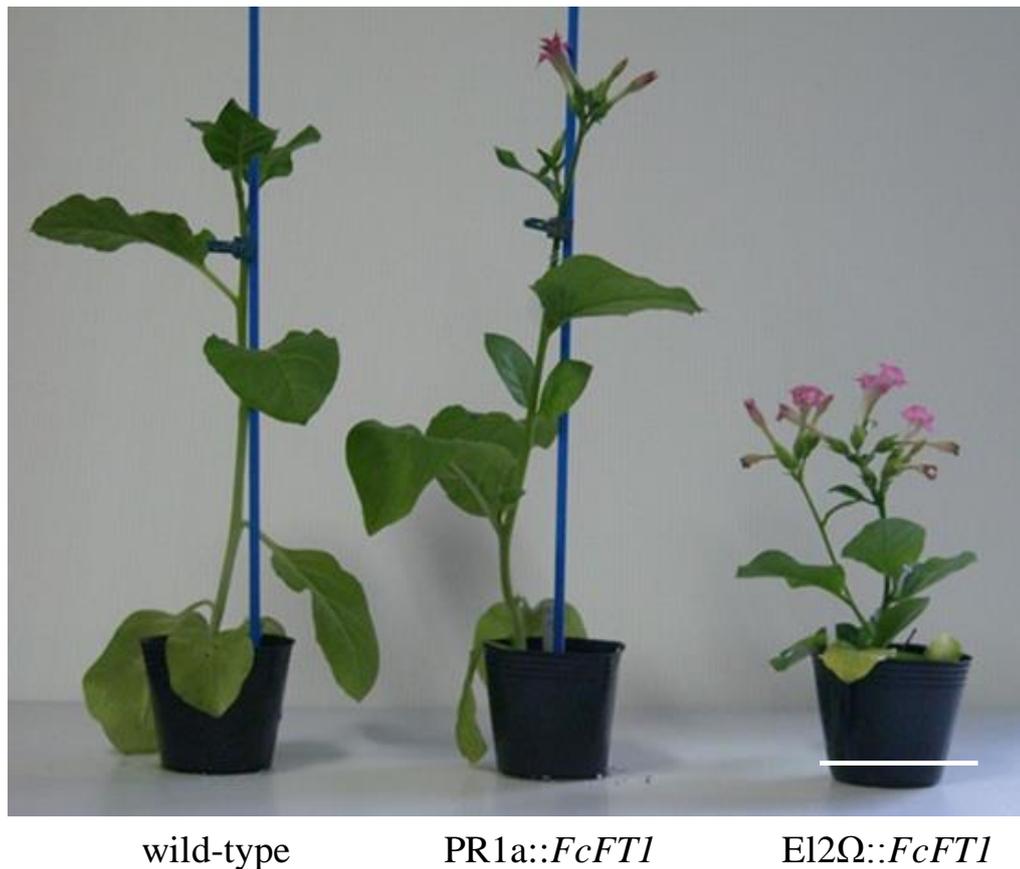


Fig. 3-6. Flowering phenotypes of transgenic tobacco lines expressing the cDNA of the *FT*-like gene, *FcFT1*, from *Ficus carica* L. E12Ω::*FcFT1* transgenic plant (T2) (right), PR1a::*FcFT1* transgenic plant (T1) (center), and wild-type (left) plant in pots 49 days after sowing. Scale bar = 9 cm.

3.3.5. 成木における *FcFTI* mRNA の発現様式

FcFTI mRNA の発現レベルは葉で最も高く、他の器官における発現はほとんど検出できなかった (Fig. 3-7.)。新梢の各節の葉を用いた空間的な発現解析 (Fig. 3-8.) では、第 1-6 節において第 7-10 節よりも高い *FcFTI* mRNA レベルが観察された。節位と観察された *FcFTI* 発現レベルとの間に認められる負の相関関係は有意ではなかった。発現の季節変化に関しては、発現レベルは 5 月に急激に上昇した後 8 月まで上昇を続け、その後 10 月にかけて減少した。一定レベル以上の発現が約 5 カ月間認められ、7 月と 8 月の発現レベルが最も高くなった (Fig. 3-9.)。発現の日変動に関しては、長日条件 (16L/8D) と短日条件 (8L/16D) 下との間に大きな差異はなく、どちらも明期開始後 12 時間目に発現のピークが検出された。一方、連続暗期 (DD) 下では発現は低水準で安定していた (Fig. 3-10.)。

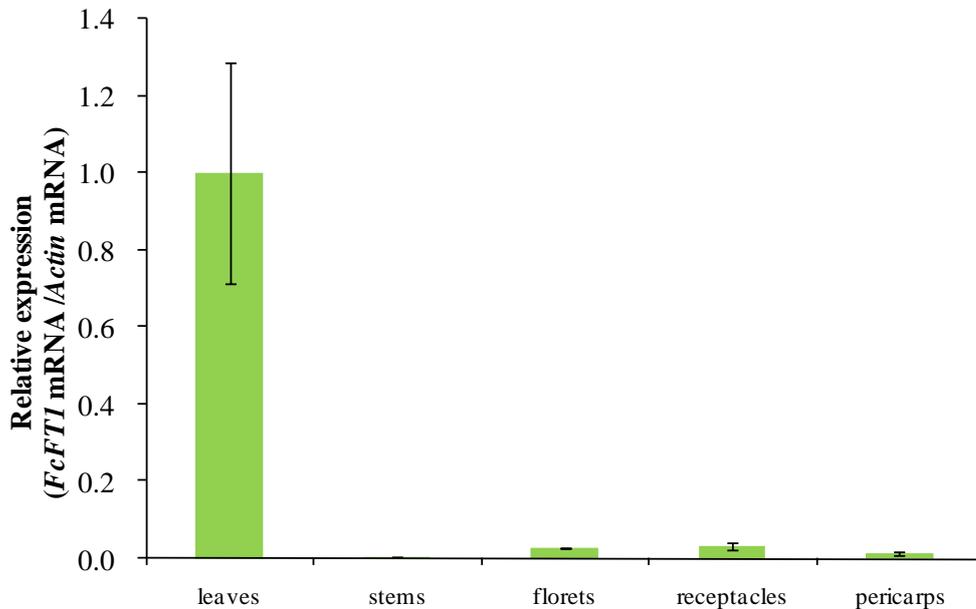


Fig. 3-7. Real-time RT-PCR analysis of expression of the *FT-like* gene, *FcFTI*, from *Ficus carica* L. in fig trees. The bar graph shows relative expression of *FcFTI* normalized to Actin. Leaves, stems, florets, receptacles, and pericarps (at the young fruit period) were collected from a 3-year-old 'Houraishi' fig tree. Error bars show SE (n = 3). Error bars for stems and florets are subsumed by symbols.

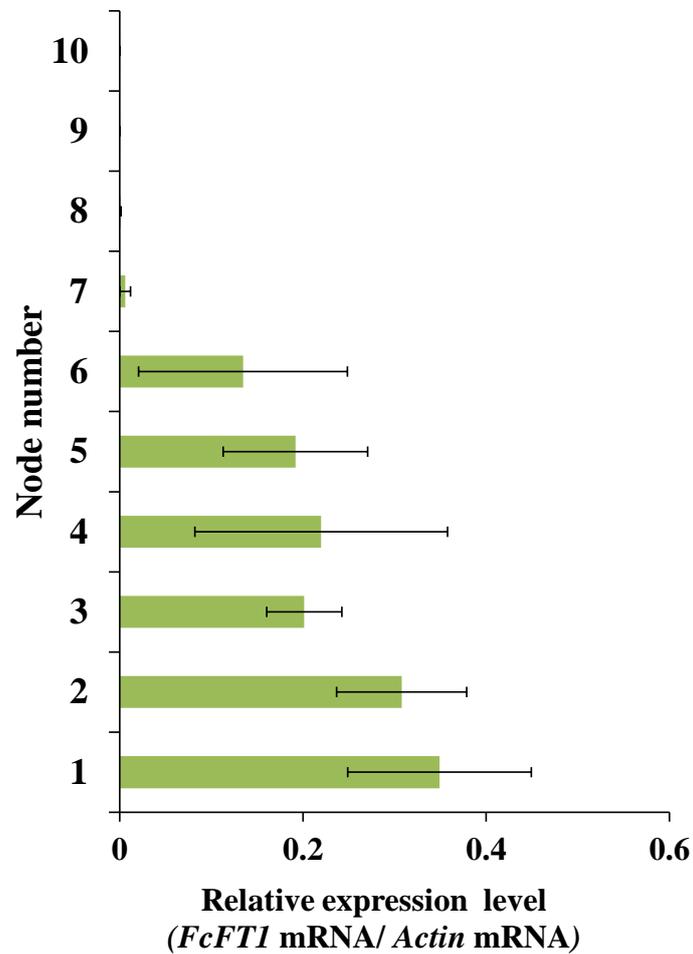


Fig. 3-8. Expression distribution of mRNA of *FcFT1*, the *FT-like* gene from *Ficus carica* L., from each node leaf on fruit-bearing branches of fig ('Houraishi' cultivar). Node numbering is from the basal node. *FcFT1* mRNA above a threshold level was observed in older nodes that bear fruit earlier (corresponding to the 1st through 6th nodes), while little or no expression was observed in younger nodes that bear fruit later (corresponding to 7th through 10th nodes). Error bars for 8th through 10th nodes are subsumed by the symbols.

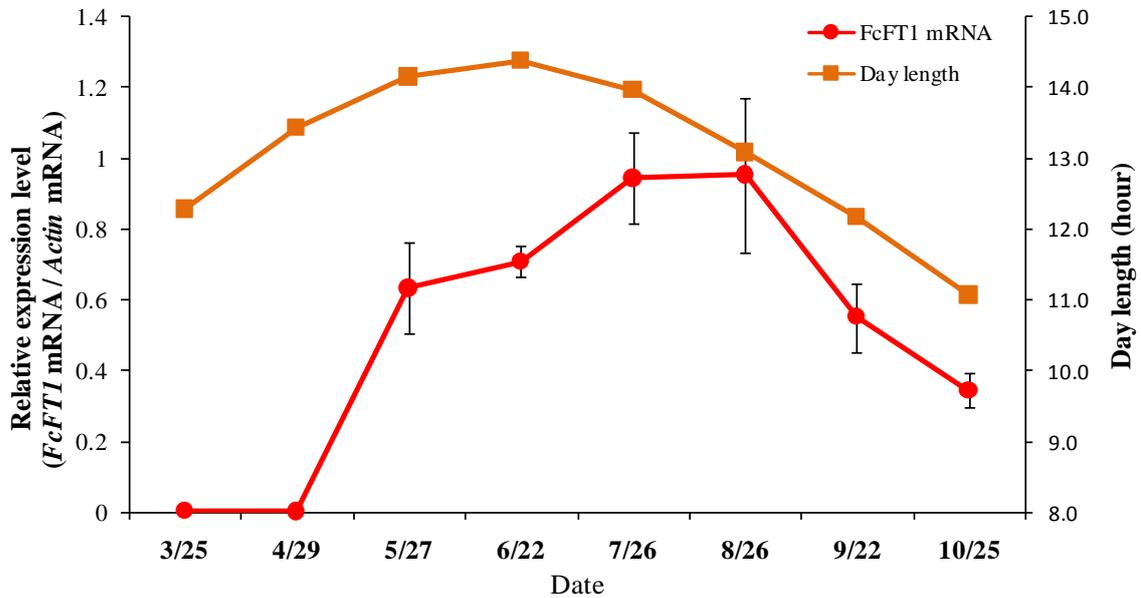


Fig. 3-9. mRNA expression analyses of *FcFT1*, the *FT-like* gene from *Ficus carica* L., in fig ('Houraishi' cultivar) over the 2011 season using real-time RT-PCR. Each point represents the average of values of the 5th node leaf positions derived from three biological replicates (22 to 24-year-old trees). During seasonal variations, expression levels rapidly increased in May, and continued increasing until August. They remained elevated for as long as 5 months (black arrow). Expression levels then decreased until October, when leaves yellowed. Error bars show SE (n=3). Error bars for March and April are subsumed by the symbols.

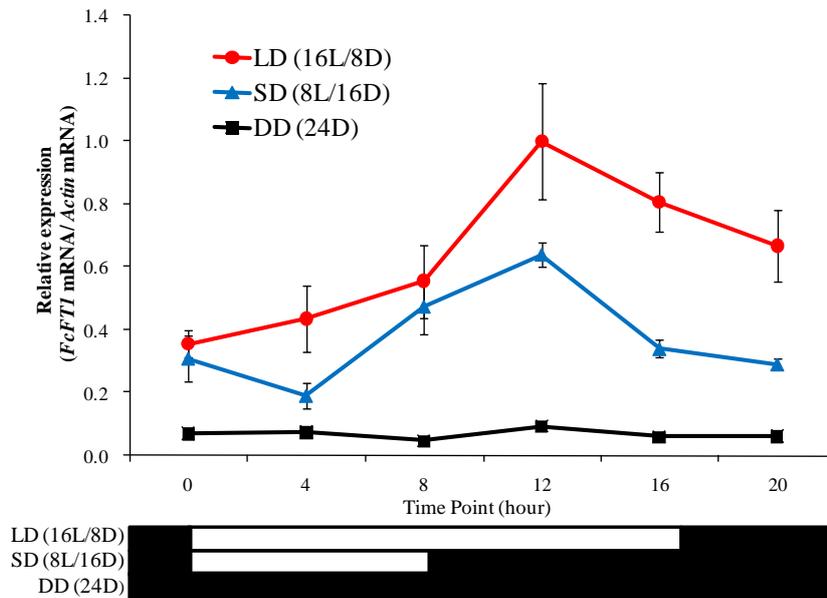


Fig. 3-10. Diurnal expression pattern of mRNA of *FcFTI*, the *FT-like* gene from *Ficus carica* L., in fig ('Houraishi' cultivar) under various photoperiods: 16-h light/8-h dark, LD (16L/8D); 8-h light and 16-h dark, SD (8L/16D); and continuous darkness, DD. Black boxes indicate darkness; white boxes indicate light. Leaf portions from the upper halves of mature leaves were used for the analyses. Leaves were collected from three independent clones and analyzed at different time points. Error bars show SE (n=3). Error bars for DD (24D) are subsumed by the symbols.

3.4 考察

3.4.1. 花序分化の特異性

リンゴ、ブドウ、カキなど多くの果樹では、花序は結実当年ではなくその前年に分化する (Ingel 2002; Koutinas et al., 2010; Agaoglu, 1971; Yonemori et al., 1993)。例えばリンゴでは、花の原基は夏に分化し花の各部分が最終的に形成されるのは翌春である。花器の発達サイクルは多くの場合 9–10 ヶ月間である (Koutinas et al., 2010)。イチジク花序の生長過程は木村と菱谷 (1951) によって研究されたが、この中には結果前年の花序分化を否定する直接的な証拠はない。本研究では萌芽前の頂芽分裂組織に花序の存在は認められないこと (Fig.3-1.D), 新梢の伸長後にのみ新しい花序の分化を確認できること (Fig.3-1.EFG), 最初の花序の分化後に長期間に亘って継続的に花序の分化が観察されること (Fig. 3-2.) が確認された。これらの結果は、花成誘導および花序の分化が結果当年の 5 月以降にのみ起こり、その後は長期間に亘って花序分化が継続することを示している (Fig. 3-2.)。

3.4.2. *FcFTI* のゲノム配列上の特徴

本研究はイチジク属の *FT* ファミリー遺伝子に関する最初の報告である。*FcFTI* がコードするアミノ酸配列は既知のリンゴ *MdFT2* (Kotoda et al.,2010) と最も類似していた。DNA ゲルブロット分析の結果, *XbaI* 認識部位がプローブ配列内に存在するプローブ A と *XbaI* 消化との組合せを除いては単一バンドが検出された。したがって, イチジクのゲノム中の *FcFTI* は単一コピーと考えられる。検出バンド数は 3 品種全てで同じであったが, ‘榊井ドーフィン’ の低分子側のバンドサイズは ‘蓬莱柿’ と ‘とよみつひめ’ とで異なっていた。この結果は, *FcFTI* 隣接領域において品種間多型が存在することを示唆している。3 品種間には *FcFTI* cDNA 配列と着果様式には違いは認められないことから, 検出された多型は非コード領域等の遺伝子機能に影響を与えない領域と推定された。

3.4.3. *FcFTI* は花成促進能を有する

PR1a::*FcFTI* および EI2-35S-Ω::*FcFTI* の両コンストラクトを導入したタバコ形質転換体の播種から開花までの日数, 葉数, および草丈は, 野生型と比較して減少した (Table 3-3, Fig. 3-6.)。さらに, *FcFTI* 形質転換タバコはシャーレ培養条件下でも小型の花芽をつくり, 以降何世代にもわたって安定した早期開花形質を示した。この結果は *FcFTI* がシロイヌナズナやその他の植物の *FT* 遺伝子 (Kobayashi et al., 1999; Endo et al., 2005) と同様の花成促進能を保有するという明確な証拠である。

3.4.4. *FcFTI* は葉で発現し, 空間的に勾配する

葉組織における *FcFTI* 発現レベルは, 茎および果実で検出されたレベルよりも 30 倍以上高く (Fig. 3-7.), さらに CACTFTPPCA1 などの多くの葉に特異的な発現モチーフが *FcFTI* 上流域配列中に見出された (Table 3-2.)。したがって, *FcFTI* はシロイヌナズナ *FT* と同様 (Teper-Bamnolker and Smach, 2005), 主に葉で機能していると推定された。ちなみに, *FcFTI* に最も類似している *MdFT2* (Kotoda et al., 2010) は生殖器官を中心に発現している。

イチジクの花序は下位節から上位節へと分化する。*FcFTI* mRNA レベルは, 上位の若い節 (第 7 から第 10 節) に比べて, 下位の花序を有する古い節 (第 1 から第 6 節) で高かった (Fig.3-8.)。この結果は花序分化と *FcFTI* 発現との間の連関を示唆している。しかし, 通常着果しない基部節でも *FcFTI* 発現が認められるなど, 着果節位と *FcFTI* が発現する節とは完全には対応していなかった。*FT* 遺伝子の空間勾配を示す発現パターンはトマトでも報告されている (Shalit et al., 2009)。下位節では栄養成長段階がより進行しているため, 栄養成長の程度が *FcFTI* 発現の調節要因である可能性も考えられる。

FcFTI mRNA レベルは展葉直後の 5 月に増加し, 10 月まで一定以上の水準であった

(Fig. 3-9.)。栽培地の環境条件下では‘蓬莱柿’が長期間にわたって着果し (Fig. 3-2.)、継続的な *FcFTI* 発現は着果とよく対応している。5 月中旬に *FcFTI* 発現レベルが増加し始めるのと同時に最初の明瞭な花托が分化することも、*FcFTI* 発現と花序分化との関係を支持している (Fig. 3-9.)。

3.4.5. *FcFTI* 発現の光による誘導

FcFTI は長日条件および短日条件では一定レベルを超える発現が認められたのに対して (Fig. 3-10.)、連続暗期下では発現上昇が認められなかった。この結果は *FcFTI* の発現が光刺激によって誘導されることを示している。明期開始後直ちに *FcFTI* 発現量が増加し始め、明期間が長いほど *FcFTI* 発現量が多いことから、*FcFTI* の発現は光によって直接に制御され、光量が多いほど *FcFTI* 発現が上昇する可能性が高い (Fig. 3-10., Table 3-2.)。さらに、*FcFTI* の日周発現パターンが日長時間に依存しないことは、日長時間が変化するにもかかわらず季節を通じて恒常的に発現する *FcFTI* の発現パターンを説明できる (Fig. 3-10.)。*FcFTI* は光周期応答性を有していない可能性があるが、発現レベルのピークが明期開始から 12 時間後となる理由は不明である。これらの特徴は、光を介した *FcFTI* の調節機構の解明の手掛かりとなると考えられる。

光条件とイチジクの着果との関係については、これまで多くの研究結果がある。松浦と荒木 (1995) は、75%遮光時には第 12 節より上位で花序の分化と成長がステージ I (約 2 mm, 葉芽と同サイズ) に到達しないことを見出した。さらに遮光率の増加によって、果実になる前に成長を止める花序、果実の黄変・落果、および結果枝の第 5 節より上位での不着果が増加することを認めた (松浦・荒木, 1995)。寺岸ら (1998) は育苗中に 8.5-klx の 14-h の光照射を行うことにより、特に第 5 節より下位で着果数が増加することを報告した。これらのことは、光による *FcFTI* の活性化が着果や花序の分化に不可欠であることを示唆している。一方、寺岸ら (1998) は苗への 10 h と 14 h の日長処理条件の間には着果率に関する差が認められないと報告した。したがって、一定量を超えた光量の増加は着果数の増加には繋がらないと考えられる。光合成により得られる同化産物は、イチジクの着果に重要と考えられている (松浦・荒木, 1995; 寺岸ら, 1998; Flaishman et al., 2008)。このことは、光合成と *FcFTI* 活性化の両方が光という同一の要因によって調節されることに関連しているかもしれない。

本研究結果は *FcFTI* がイチジクの花成において鍵となる遺伝子であることを強く示唆している。ポプラ (*PtFT1* および *PtFT2*) (Bohlenius et al., 2006; Hsu et al., 2006; Hsu et al., 2011) と柑橘類 (*CiFT1*, *CiFT2*, *CiFT3*) (Nishikawa et al., 2007) においては、これら *FT* 様遺伝子が多量に転写されるのは年間のうちわずか 1, 2 ヶ月間である。リンゴの *MdFT1* は比較的長期間発現するが、発現ピークは 7 月にある (Kotoda et al., 2010)。温度や日長条件によって制御されるシロイヌナズナの *FT* (Greenup et al., 2009) およびイネの

Hd3a (Kojima et al., 2002) は特定の季節に強く活性化される。*FcFT1* と他の植物種の *FT* 遺伝子の発現パターンの違いに着目すれば、イチジクのユニークな花成・着果特性は *FcFT1* の長期・安定的発現に起因するものと推察される。なお、イチジクにおいて *FcFT1* 以外に機能している *FT* 様遺伝子の存在については、本研究では明らかにできなかった。今後、新たに *FT* 様遺伝子が同定された場合には、それらの遺伝子とイチジク花序分化との関係を再度検証する必要がある。

第4章 総合考察

第2章では、イチジクの果実品質とその基礎となる生理機能の遺伝学的解明に有用な基盤分子情報の獲得、およびイチジクの各生態型に認められる雄花着生ならびに単為結果性の差に関与する遺伝子群の同定を目的に、果実における遺伝子発現の網羅的解析を行った。総計 71,455 のユニゾンセット (19,166 のコンティグと 52,289 のシングルトン) から、成熟過程に伴うエチレン応答性、糖代謝、および果皮・果肉のアントシアニンの合成等の果実成熟に関わる遺伝子を多数同定した。生態型間の比較では、GO ターム分布に有意な差異が認められず、生態型の分化に関わる遺伝子は比較的少数であるとする従来の結果を支持していた。一方で、雄花着生や単為結果性に関連すると考えられる遺伝子の転写産物には生態型間で特徴的な発現多型が検出され、その他にも少なくとも5種の遺伝子において発現レベルあるいは発現産物サイズの多型が認められた。本解析で得られたユニゾンデータおよび生態型間の発現多型の情報は、イチジク果実生理や生態型分化の遺伝的要因の解明に有用であり、有用形質と連鎖する DNA マーカーの開発基盤として育種への応用が大いに期待される。

本研究では、イチジクの4つの生態型のうち最も遠い関係にある「カプリフィグ種」と「普通種」との品種を用いた。このことは、イチジクで最初となる網羅的な発現遺伝子情報を得る目的において有効であった。一方で、雄花着生や単為結果性の制御に関与する遺伝子を精度よく絞り込むには至らなかった。この理由としては、各生態型を代表する単一品種間の比較であったこと、取得リード数が少なかったことが挙げられる。今後は、解析材料 (品種・系統) を生態型毎に複数とするとともに、解析するリード数を増やして生態型分化と関連する多型の検出精度を高めることが必要である。

本研究で得られた配列情報によって、SNPやSSR等のDNAマーカーの整備、およびマーカーを利用した様々な果実形質との連鎖解析も可能になった。既に筆者は本配列情報を利用して‘caprifig6085’と‘蓬莱柿’間で多型を示す100以上のSSRマーカーを開発して、連鎖地図作製に用いている。将来、イチジク全ゲノム配列情報が利用可能になれば、さらに多様な品種および条件に由来する遺伝子発現およびゲノム配列の情報解析が大幅に高速化・高度化され、イチジクの有用形質に関する遺伝的解明が大きく加速すると期待される。

第3章では、イチジクの果実 (花序) の分化制御メカニズムを明らかにするために、イチジクから *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 様遺伝子を単離し、その機能、特性、および発現パターンを調べた。単離された遺伝子 *FcFT1* は、イチジクゲノムに単一のコピーが存在すること、主に葉で発現すること、形質転換タバコの開花を促進することが確認でき、*FcFT1* がイチジクの *FT* 遺伝子ファミリーの一つであり花成促進機能を持つことが判明した。*FcFT1* mRNA の空間的、季節的発現パターンは花序分化が観察される部位や時期とよく対応し、日周変動パターンは *FcFT1* が日長応答性を有さず光刺激への応答性を示し

たことから、*FcFTI* の発現パターンによってイチジクのユニークな着果特性を説明できることが明らかになった。イチジクの着果と光との関係については、松浦と荒木（1995）や寺岸ら（1998）も考察しており、*FcFTI* がイチジクの花序分化に関与している可能性は極めて高い。ただし、*FcFTI* が花序分化の決定要因である直接的な証拠は得るためには、*FcFTI* の発現を抑制した場合の花序分化を確認する等の更なる検証作業が必要である。

本研究では主に *FcFTI* と光との関係を解析したが、*FcFTI* の発現量が節位によって異なることから、発育ステージ（栄養生長程度）、すなわち自律的要因による制御も受けることが想定される。このような特性を示す花成関連遺伝子として、Hiraoka et al. (2013) はシロイヌナズナの *TSF* (Yamaguchi et al., 2005) を報告している。*TSF* は長日条件下の葉、ならびに短日条件下の加齢した葉において発現が認められ、*FT* と協働して花成と側枝の発達に関与している (Hiraoka et al., 2013)。加齢した葉において長日・短日の両条件下で発現が認められる性質は *TSF* と同様に *FcFTI* でも認められる。イチジクの花序は花軸先端に小花が密生し壺状となったものであり形態学的には側枝と同等の器官であること、および腋芽部位にのみ花序が着生することから、*FcFTI* は *TSF* のオーソログである可能性が高い。既に別の実験から、*FcFTI* 発現レベルと花序の分化・発達段階との強い相関が見出されている (著者、未発表)。以上のことから、*FcFTI* はシロイヌナズナ *TSF* と同様に、各節位における花序分化の空間的な制御に関与していると考えられる。

イチジクの育種では、交雑後代において果実の着き方の分離が認められる。このような着果性の違いは、イチジクの生産性、収量性に直結する重要形質の一つであるが、生態型分類の基となっている単為結果性程度の違いに起因するものと、結果枝における花序の分化能力あるいは分化時期の差に起因するものがある。花序の分化部位が *FcFTI* に依存しており、後者の要因に起因する果実の着き方の差異が *FcFTI* の発現によって説明できるなら、*FcFTI* は生産性、収量性を判別するためのマーカーとして利用できる。一方で、結果枝の節毎の花序分化能力の違いには *FT* ファミリーの拮抗因子である *TFL1* ファミリー (Chung et al., 2010; Hanano et al., 2011; Yoo et al., 2010) の関与も想定されるため、*FT/TFL1* ファミリー全体と着果との関係についても検討する必要がある。

以上のように本研究では、果実品質、生態型の分化ならびに花序分化・着果性等のイチジク果実における諸形質に関して新たな分子遺伝学的知見が明らかとなった。本研究で得られた情報と知見を活用、または発展させることによって、今後果実における有用形質選抜に有効な DNA マーカーの開発が可能となり、MAS 等の基盤技術に基づいた省力的・効率的なイチジク育種の実現に大きく貢献できるものと期待される。

摘 要

イチジク (*Ficus carica* L.; $2n = 2x = 26$) はバラ目クワ科イチジク属の低木落葉果樹である。国内では福岡県における‘とよみつひめ’等の育成を契機として、主産県を中心にイチジク育種の継続的な取り組みが行われている。しかし、イチジクは木本作物・永年性作物であるため、実生養成から果実形質評価までに数年を要すること、個体あたりの占有面積が大きく形質評価に広大な圃場面積を要することなどが、効率良くかつ省力的に育種を進める上での障害となっている。他方で、2000年以降の DNA シークエンス技術の飛躍的な発展に伴い、ゲノム情報を利用してそれぞれの個体の持つ形質特性を遺伝子型で判別する技術、すなわち DNA マーカー選抜技術 (Marker Assisted Selection: MAS) が様々な作物で実用化されつつある。このような背景においてイチジクの育種においても MAS の導入が有効であると考えられ、そのためには有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発が急務である。

以上の観点から本研究では、イチジクの育種あるいは生産の場面において重要度が高いと考えられる果実品質、生態型の分化、花序分化・着果性等の果実に関連する主要形質と密接連鎖する DNA マーカーの開発のため、その基盤となる発現遺伝子情報および分子遺伝学的な知見を得ることを試みた。

第 2 章では、イチジクの果実品質とその基礎となる生理機能の遺伝学的解明に有用な基盤分子情報の獲得、およびイチジクの各生態型に認められる雄花着生ならびに単為結果性の差に関与する遺伝子群の同定を目的に、果実における遺伝子発現の網羅的解析を行った。カプリフィグ種と普通種の果実の次世代シークエンス解析により、総計 71,455 のユニゾンセット (19,166 のコンティグと 52,289 のシングルトン) を獲得し、成熟過程に伴うエチレン応答性、糖代謝、および果皮・果肉のアントシアニンの合成等の果実成熟に関わる遺伝子を多数同定した。両生態型の比較では、GO ターム分布に有意な差異が認められず、生態型の分化に関わる遺伝子は比較的少数であるとする従来の結果を支持した。一方で、雄花着生や単為結果性に関連すると考えられる遺伝子の転写産物には生態型間で特徴的な発現多型が検出され、その他にも少なくとも 5 種の遺伝子において発現レベルあるいは発現産物サイズの多型が認められた。ユニゾンデータおよび生態型間の発現多型の情報は、イチジク果実生理や生態型分化の遺伝的要因の解明に有用であると考えられた。

第 3 章では、花成ホルモン遺伝子 (*FT* 遺伝子) ホモログの‘蓬萊柿’における解析を通じて、イチジクの生産性に深く関わる花序(果実)の分化機構の解明を試みた。まずイチジクから *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 様遺伝子を単離し、その機能、特性、および発現パターンを調べた。単離された遺伝子 *FcFTI* は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンから構成される全長 5,175bp の遺伝子であり、イチジクゲノムに単一のコピーが存在していた。*FcFTI* は主に葉で発現しており、形質転換タバコの開花を促進することから、*FcFTI* がイチジクの *FT* 遺伝子ファミリーの一つであり花成促進機能を持つことが判明した。

FcFTI mRNA の空間的・季節的発現の解析では新梢の上位節に比べ下位節の葉で発現レベルが高く、また 5 月から秋期に向けて長期的発現が観察され、花序分化が観察される部位や時期と *FcFTI* の発現がよく対応していた。同じく日周変動解析では長日条件と短日条件の両区で明期開始からの *FcFTI* 発現レベルの上昇が観察され、*FcFTI* の光刺激への応答性を示していた。以上の結果は、*FcFTI* の発現パターンによってイチジクの下位から上位の節に向かって時期を異にして連続するユニークな着果特性を説明できることを示しており、*FcFTI* がイチジク花成の鍵遺伝子であることを強く示唆した。

本研究において明らかとなった果実品質、生態型の分化ならびに花序分化・着果性等のイチジク果実における諸形質に関する新たな分子遺伝学的知見は、果実の有用形質を選抜するための DNA マーカーの開発に利用可能であり、MAS 等の基盤技術に基づいた省力的・効率的なイチジク育種の実現に大きく貢献できるものと期待される。

引用文献

- Abe, M., Y. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Daimon, A. Yamaguchi, Y. Ikeda, H. Ichinoki, M. Notaguchi, K. Goto and T. Araki (2005). "FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex." *Science* **309**(5737): 1052-1056.
- Adams-Phillips, L., C. Barry and J. Giovannoni (2004). "Signal transduction systems regulating fruit ripening." *Trends Plant Sci* **9**(7): 331-338.
- Agaoglu, Y. S. (1971). "A study on the differentiation and the development of floral parts in grapes (*Vitis vinifera* L. var.)." *Vitis* **10**:20-26.
- Ahn, J. H., D. Miller, V. J. Winter, M. J. Banfield, J. H. Lee, S. Y. Yoo, S. R. Henz, R. L. Brady and D. Weigel (2006). "A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1." *EMBO J* **25**(3): 605-614.
- Ainsworth, C., S. Crossley, V. Buchanan-Wollaston, M. Thangavelu and J. Parker (1995). "Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression." *Plant Cell* **7**(10): 1583-1598.
- Alagna, F., N. D'Agostino, L. Torchia, M. Servili, R. Rao, M. Pietrella, G. Giuliano, M. L. Chiusano, L. Baldoni and G. Perrotta (2009). "Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development." *BMC Genomics* **10**: 399.
- Alba, R., P. Payton, Z. Fei, R. McQuinn, P. Debbie, G. B. Martin, S. D. Tanksley and J. J. Giovannoni (2005). "Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development." *Plant Cell* **17**(11): 2954-2965.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- An, G. (1987). "Binary T1 vectors for plant transformation and promoter analysis." *Methods Enzymol* **153**:292-305.
- Angiosperm Phylogeny Group (2009). "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III." *Bot J Lin Soc* **161** (2):105-121.
- Araki, T. (2001). "Transition from vegetative to reproductive phase." *Curr Opin Plant Biol* **4**(1): 63-68.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin and G. Sherlock (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet* **25**(1): 25-29.
- Awamura, M, K. Shoda, D. Yahata (1996). "Effect of various seed parentson frequency distribution of parthenocarpy among seedling progeniesof fig (*Ficus carica* L.)." *J Japan Soc Hort Sci* **65**:21-26.
- 栗村光男 (1997). イチジクの育種に関する基礎的研究. 九州大学博士 (農学) 博士論文
- 栗村光男・矢羽田二郎・野方仁・正田耕二・金房和己 (1998). イチジク新品種'姫蓬菜'の育成. 福岡県農総試研報 **17**:115 - 118.

- Barakat, A., D. S. DiLoreto, Y. Zhang, C. Smith, K. Baier, W. A. Powell, N. Wheeler, R. Sederoff and J. E. Carlson (2009). "Comparison of the transcriptomes of American chestnut (*Castanea dentata*) and Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) in response to the chestnut blight infection." *BMC Plant Biol* **9**: 51.
- Beck, N. G., E. M. Load (1988). Breeding system in *Ficus carica*, the common fig. II. Pollination events. *Am J Bot* **75**:1913–1922.
- Bellin, D., A. Ferrarini, A. Chimento, O. Kaiser, N. Levenkova, P. Bouffard and M. Delledonne (2009). "Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species." *BMC Genomics* **10**: 555.
- Blazquez, M. A. (1997). "Illuminating flowers: CONSTANS induces LEAFY expression." *Bioessays* **19**(4): 277-279.
- Bohlenius, H., T. Huang, L. Charbonnel-Campaa, A. M. Brunner, S. Jansson, S. H. Strauss and O. Nilsson (2006). "CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees." *Science* **312**(5776): 1040-1043.
- Bouzayen, M., A. Latché, P. Nath, J. C. Pech (2010). Mechanism of fruit ripening. *Plant developmental biology—biotechnological perspectives*, 1st edn. Heidelberg, Springer.
- Bradley, D., O. Ratcliffe, C. Vincent, R. Carpenter and E. Coen (1997). "Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*." *Science* **275**(5296): 80-83.
- Brown, T. (2001). Southern blotting. *Curr Prot Mol Biol* 2.9.1-2.9.20.
- Busch, M. A., K. Bomblies and D. Weigel (1999). "Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*." *Science* **285**(5427): 585-587.
- Chailakhyan, M. K. (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Proc USSR Acad Sci* **13**:79-83.
- Chessa, I. (1997). *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits*. Wallingford, CAB International.
- Chung, K. S., S. Y. Yoo, S. J. Yoo, J. S. Lee and J. H. Ahn (2010). "BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT), a member of the FT/TFL1 family, shows distinct pattern of expression during the vegetative growth of *Arabidopsis*." *Plant Signal Behav* **5**(9): 1102-1104.
- Condit, I. J. (1947). *The fig*. Waltham, Mass, Chronica Botanica Co.
- Corbesier, L. and G. Coupland (2006). "The quest for florigen: a review of recent progress." *J Exp Bot* **57**(13): 3395-3403.
- Corbesier, L., C. Vincent, S. Jang, F. Fornara, Q. Fan, I. Searle, A. Giakountis, S. Farrona, L. Gissot, C. Turnbull and G. Coupland (2007). "FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*." *Science* **316**(5827): 1030-1033.
- Crane, J. C. (1986). *Fig*. In: *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. FL, CRC Press.
- Datwyler, S. L. and G. D. Weiblen (2004). "On the origin of the fig: phylogenetic relationships of Moraceae from *ndhF* sequences." *Am J Bot* **91**(5): 767-777.
- Del Caro, A., A. Piga (2008). Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars

- (*Ficus carica* L.). Eur FoodRes Technol **226**:715–719.
- Dellaporta, S. L. and A. Calderon-Urrea (1993). "Sex determination in flowering plants." Plant Cell **5**(10): 1241-1251.
- DeYoung, B. J. and R. W. Innes (2006). "Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense." Nat Immunol **7**(12): 1243-1249.
- 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**(6): 991-1002.
- Duenas, M., J. J. Perez-Alonso, C. Santos-Buelga, T. Escribano-Bailon (2008). Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). J Food Composit Anal **21**:107–115.
- Elo, A., J. Lemmetyinen, M. L. Turunen, L. Tikka and T. Sopanen (2001). "Three MADS-box genes similar to APETALA1 and FRUITFULL from silver birch (*Betula pendula*)." Physiol Plant **112**(1): 95-103.
- Endo, T., T. Shimada, H. Fujii, Y. Kobayashi, T. Araki and M. Omura (2005). "Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.)." Transgenic Res **14**(5): 703-712.
- Ersoy, N., K. L. GözlekçiŞ (2007). Changes in sugar contents of fig fruit (*Ficus carica* Cv. Bursa Siyahi) during development. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi **2**:22-26.
- FAO. (2012). FAO Statistical yearbook. [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>]
- Ferrario, S., R. G. Immink, A. Shchennikova, J. Busscher-Lange and G. C. Angenent (2003). "The MADS box gene FBP2 is required for SEPALLATA function in petunia." Plant Cell **15**(4): 914-925.
- Flaishman, M., V. Rodov, E. Stover (2008). Fig (*Ficus carica*): botany, horticulture and breeding. In Horticultural Reviews. Volume 34. NJ, USA, John Wiley and Sons.
- Galil, J (1977). Fig biology. Endeavour **1**:52–56.
- Garg, R., R. K. Patel, S. Jhanwar, P. Priya, A. Bhattacharjee, G. Yadav, S. Bhatia, D. Chattopadhyay, A. K. Tyagi and M. Jain (2011). "Gene discovery and tissue-specific transcriptome analysis in chickpea with massively parallel pyrosequencing and web resource development." Plant Physiol **156**(4): 1661-1678.
- Giovannoni, J. J. (2004). "Genetic regulation of fruit development and ripening." Plant Cell **16** **Suppl**: S170-180.
- Golenberg, E. M., D. C. Freeman (2006). Environmental sex expression, sexual lability, biased sex ratios and other X-rated stories from the far-red side of the garden. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. Ikenobe, Global Science Books.
- Gowik, U., J. Burscheidt, M. Akyildiz, U. Schlue, M. Koczor, M. Streubel and P. Westhoff (2004). "cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant Flaveria trinervia, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene." Plant Cell **16**(5): 1077-1090.
- Greenup, A., W. J. Peacock, E. S. Dennis and B. Trevaskis (2009). "The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals." Ann Bot **103**(8): 1165-1172.
- Gupta, S. M., S. Srivastava, A. P. Sane, P. Nath (2006). Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: presence of distinct fruit specific, ethylene induced and

- ethylene repressed expression. *Postharvest Biol Technol* **42**:16–22.
- Habu, T., H. Yamane, K. Igarashi, K. Hamada, K. Yano, R. Tao (2012). 454-pyrosequencing of the transcriptome in leaf and flower buds of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) at different dormant stages. *J Japan Soc Hort Sci* **81**:239–250.
- Hanano, S. and K. Goto (2011). "Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression." *Plant Cell* **23**(9): 3172-3184.
- Hanhineva, K., H. Kokko, H. Siljanen, I. Rogachev, A. Aharoni and S. O. Karenlampi (2009). "Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*)." *J Exp Bot* **60**(7): 2093-2106.
- Hanzawa, Y., T. Money and D. Bradley (2005). "A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7748-7753.
- Hardenack, S., D. Ye, H. Saedler and S. Grant (1994). "Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion." *Plant Cell* **6**(12): 1775-1787.
- Heslop-Harrison, J. (1964). Sex expression in flowering plants. Brookhaven symposia in biology. Upton, New York, Brookhaven National Laboratory.
- Heuer, S., S. Hansen, J. Bantin, R. Brettschneider, E. Kranz, H. Lorz and T. Dresselhaus (2001). "The maize MADS box gene ZmMADS3 affects node number and spikelet development and is co-expressed with ZmMADS1 during flower development, in egg cells, and early embryogenesis." *Plant Physiol* **127**(1): 33-45.
- 平井重三 (1966). イチジク果実の発育に関する研究. 大阪府大紀要 18: 169-218.
- Hiraoka, K., A. Yamaguchi, M. Abe and T. Araki (2013). "The florigen genes FT and TSF modulate lateral shoot outgrowth in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* **54**(3): 352-368.
- Hsu, C. Y., J. P. Adams, H. Kim, K. No, C. Ma, S. H. Strauss, J. Drnevich, L. Vandervelde, J. D. Ellis, B. M. Rice, N. Wickett, L. E. Gunter, G. A. Tuskan, A. M. Brunner, G. P. Page, A. Barakat, J. E. Carlson, C. W. DePamphilis, D. S.
- Luthe and C. Yuceer (2011). "FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(26): 10756-10761.
- Hsu, C. Y., Y. Liu, D. S. Luthe and C. Yuceer (2006). "Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering." *Plant Cell* **18**(8): 1846-1861.
- Hu, Z. L., J. Bao, J. M. Reecy (2008). CateGORizer: a web-based program to batch analyze gene ontology classification categories. *Online Journal of Bioinformatics* **9**:108–112.
- Ikegami, H., H. Nogata, K. Hirashima, M. Awamura, T. Nakahara (2009a). Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genet Resour Crop Evol* **56**:201–209.
- Ikegami, H., Y. Koshita, H. Yakushiji, K. Hirashima, C. Hirata, T. Nakahara (2009b). Simple and efficient RNA extraction and gene analysis in vegetative organs of Japanese persimmon. *Plant Biotechnol* **26**:427–429.

- Ikegami, H., T. Habu, K. Mori, H. Nogata, C. Hirata, K. Hirashima, K. Tashiro, S. Satoru (2013) De novo sequencing and comparative analysis of expressed sequence tags from gynodioecious fig (*Ficus carica* L.) fruits: caprifig and common fig. *Tree Genet and Genom* **9**:1075-1088.
- Ingels, C. (2002). ANR Publication 8057, University of California: Fruit Trees: Training and Pruning Deciduous Trees. [<http://homeorchard.ucdavis.edu/8058.pdf>]
- Ingrrosso, I., S. Bonsegna, S. De Domenico, B. Laddomada, F. Blando, A. Santino and G. Giovinazzo (2011). "Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarpy and causes abnormal pollen development." *Plant Physiol Biochem* **49**(10): 1092-1099.
- Iseli, C., C. V. Jongeneel and P. Bucher (1999). "ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*: 138-148.
- Jarvie, T. (2008). Transcriptome sequencing with the Genome Sequencer FLX system. *Nature Methods* **5**
- Jurka, J., V. V. Kapitonov, A. Pavlicek, P. Klonowski, O. Kohany and J. Walichiewicz (2005). "Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements." *Cytogenet Genome Res* **110**(1-4): 462-467.
- Kater, M. M., J. Franken, K. J. Carney, L. Colombo and G. C. Angenent (2001). "Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls." *Plant Cell* **13**(3): 481-493.
- 河瀬憲次 (1983). XIイチジク(無花果). 果樹品種名雑考. 東京, 農業技術協会.
- 河瀬憲次 (2000). 来歴と原産地. 園芸大百科 13 イチジク. 東京, 農文協.
- Kanzaki, S., K. Yonemori, A. Sato, M. Yamada, A. Sugiura (2000). Evaluation of RFLP analysis for discriminating PCNA genotype in some persimmon cultivars. *J Japan Soc Hort Sci* **69**:702-704.
- Kanzaki, S., K. Yonemori, A. Sugiura, A. Sato, M. Yamada (2001). Identification of molecular markers linked to the trait of natural astringency loss of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *J Amer Soc Hort Sci* **126**:51-55.
- Kesari, R., P. K. Trivedi, P. Nath (2007). Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. *Postharvest Biol Technol* **6**:136-143.
- Khoshbakht, K. and K. Hammer (2006) Savadkouh (Iran) – an evolutionary center for fruit trees and shrubs. *Genet Resour Crop Evol* **53**:641-651.
- 菊池秋雄 (1951). 第12章無花果果樹園芸学. 上巻(果樹種類各論) 訂正第2判. 東京, 養賢堂.
- 木村光雄・菱谷啓三 (1951). 無花果の花托の分化. 及び其發育温程に就いて. 園芸学研究集録 **5**: 41-44.
- Kislev, M. E., A. Hartmann and O. Bar-Yosef (2006). "Early domesticated fig in the Jordan Valley." *Science* **312**(5778): 1372-1374.
- Klee, H. J. (2004). "Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis." *Plant Physiol* **135**(2): 660-667.
- Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto and H. Hirochika (2004). "Retrotransposon-induced mutations in grape skin color." *Science* **304**(5673): 982.
- Kobayashi, Y., H. Kaya, K. Goto, M. Iwabuchi and T. Araki (1999). "A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals." *Science* **286**(5446): 1960-1962.

- Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, T. Sasaki, T. Araki and M. Yano (2002). "Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions." *Plant Cell Physiol* **43**(10): 1096-1105.
- Kong, F., B. Liu, Z. Xia, S. Sato, B. M. Kim, S. Watanabe, T. Yamada, S. Tabata, A. Kanazawa, K. Harada and J. Abe (2010). "Two coordinately regulated homologs of FLOWERING LOCUS T are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean." *Plant Physiol* **154**(3): 1220-1231.
- Kotoda, N., H. Hayashi, M. Suzuki, M. Igarashi, Y. Hatsuyama, S. Kidou, T. Igasaki, M. Nishiguchi, K. Yano, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Iwanami, S. Moriya and K. Abe (2010). "Molecular characterization of FLOWERING LOCUS T-like genes of apple (*Malus x domestica* Borkh.)." *Plant Cell Physiol* **51**(4): 561-575.
- Koutinas, N., G. Pepelyankov, V. Lichev (2010). Flower Induction and flower bud development in apple and sweet cherry. *Biotechnol and Biotechnolq* [http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view_article.php?journal_id=1&archive=1&issue_id=26&article_id=891]
- Lodhi, F., M. V. Bradley and J. C. Crane (1969). "Auxins and Gibberellin-like Substances in Parthenocarpic and Non-parthenocarpic Syconia of *Ficus carica* L., cv. King." *Plant Physiol* **44**(4): 555-561.
- Lohmann, J. U., R. L. Hong, M. Hobe, M. A. Busch, F. Parcy, R. Simon and D. Weigel (2001). "A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis." *Cell* **105**(6): 793-803.
- MacKenzie, D. J. and J. H. Tremaine (1990). "Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection." *J Gen Virol* **71 (Pt 9)**: 2167-2170.
- 真野隆司 (2012). イチジク低温障害軽減のための栽培技術開発に関する研究. 筑波大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻博士(農学)学位論文.
- 榎井農場 (1993). 榎井ドーフィン物語 榎井農場85年史. 広島, 中国新聞社.
- 松浦克彦・荒木斉 (1995). 遮光がイチジク"榎井ドーフィン"の樹体生長, 着果, 収量および果実品質に及ぼす影響. 兵庫県農技セ研報 **43**:21-26.
- Mitsuhara, I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki and Y. Ohashi (1996). "Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants." *Plant Cell Physiol* **37**(1): 49-59.
- Mizukami, Y. and H. Ma (1992). "Ectopic expression of the floral homeotic gene AGAMOUS in transgenic Arabidopsis plants alters floral organ identity." *Cell* **71**(1): 119-131.
- Mo, Y., C. Nagel and L. P. Taylor (1992). "Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 7213-7217.
- Napp-Zinn, K. (1969). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. In *The Induction of Flowering. Some Case Histories*. New York, Cornell University Press.
- Nelson, N. (1999). "Metal ion transporters and homeostasis." *EMBO J* **18**(16): 4361-4371.
- Nishikawa, F., T. Endo, T. Shimada, H. Fujii, T. Shimizu, M. Omura and Y. Ikoma (2007). "Increased CiFT

- abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)." *J Exp Bot* **58**(14): 3915-3927.
- 農林水産省 (2014). 平成23年産特産果樹生産動態等調査. [http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020101.do?_toGL08020101_&tstatCode=000001020907&requestSender=dsearch]
- 野方仁・栗村光男 (2005). イチジク新品種 'H156-70' の育成. 福岡農総試研報 **24**: 104-107.
- Ohme-Takagi, M. and H. Shinshi (1995). "Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element." *Plant Cell* **7**(2): 173-182.
- Ohshima, M., H. Itoh, M. Matsuoka, T. Murakami and Y. Ohashi (1990). "Analysis of stress-induced or salicylic acid-induced expression of the pathogenesis-related 1a protein gene in transgenic tobacco." *Plant Cell* **2**(2): 95-106.
- Owino, W. O., Y. Manabe, F. M. Mathooko, Y. Kubo and A. Inaba (2006). "Regulatory mechanisms of ethylene biosynthesis in response to various stimuli during maturation and ripening in fig fruit (*Ficus carica* L.)." *Plant Physiol Biochem* **44**(5-6): 335-342.
- Park, J. H., Y. Ishikawa, R. Yoshida, A. Kanno and T. Kameya (2003). "Expression of AODEF, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* L." *Plant Mol Biol* **51**(6): 867-875.
- Poonyarit M, D. J. Mackill, B. S. Vergara (1989). Genetics of photoperiod sensitivity and critical daylength in rice. *Crop Sci* **29**:647-652.
- Ramirez, B.W. (1974). Coevolution of *Ficus* and *Agaonidae*. *Ann MoBot Gard* **61**:770-80.
- Riechmann, J. L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman and G. Yu (2000). "Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes." *Science* **290**(5499): 2105-2110.
- Saleeb, W. F. (1965). Genetics and cytology of syconium persistence in *Ficus carica*. Unpublished PhD thesis. University of California
- Sather, D. N., M. Jovanovic and E. M. Golenberg (2010). "Functional analysis of B and C class floral organ genes in spinach demonstrates their role in sexual dimorphism." *BMC Plant Biol* **10**: 46.
- Schijlen, E. G., C. H. de Vos, S. Martens, H. H. Jonker, F. M. Rosin, J. W. Molthoff, Y. M. Tikunov, G. C. Angenent, A. J. van Tunen and A. G. Bovy (2007). "RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits." *Plant Physiol* **144**(3): 1520-1530.
- Shalit, A., A. Rozman, A. Goldshmidt, J. P. Alvarez, J. L. Bowman, Y. Eshed and E. Lifschitz (2009). "The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(20): 8392-8397.
- Sheppard, L. A., A. M. Brunner, K. V. Krutovskii, W. H. Rottmann, J. S. Skinner, S. S. Vollmer and S. H.

- Strauss (2000). "A DEFICIENS homolog from the dioecious tree black cottonwood is expressed in female and male floral meristems of the two-whorled, unisexual flowers." *Plant Physiol* **124**(2): 627-640.
- Smit A. F. A., R. Hubley, P. Green (1996–2010). RepeatMasker Open-3.0.(<http://www.repeatmasker.org>). Accessed 10 Jan 2013
- Solano, R., A. Stepanova, Q. Chao and J. R. Ecker (1998). "Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1." *Genes Dev* **12**(23): 3703-3714.
- Solomon, A., S. Golubowicz, Z. Yablowicz, S. Grossman, M. Bergman, H. E. Gottlieb, A. Altman, Z. Kerem and M. A. Flaishman (2006). "Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.)." *J Agric Food Chem* **54**(20): 7717-7723.
- Storey, W. B. (1975). *Figs. Advances in fruit breeding*. Indiana, Purdue University Press.
- Stover, E., M. Aradhya, L. Ferguson, C. H. Crisosto (2007). The fig: overview of an ancient fruit. *Hortscience* **42**:1083–1087.
- 竹中卓郎 (1884). 漿類果無花果. 舶来果樹要覧. 東京, 大日本農会三田育種場.
- Tamaki, S., S. Matsuo, H. L. Wong, S. Yokoi and K. Shimamoto (2007). "Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice." *Science* **316**(5827): 1033-1036.
- Teper-Bamnolker, P. and A. Samach (2005). "The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves." *Plant Cell* **17**(10): 2661-2675.
- Terakami, S., Y. Adachi, H. Iketani, Y. Sato, Y. Sawamura, N. Takada, C. Nishitani and T. Yamamoto (2007). "Genetic mapping of genes for susceptibility to black spot disease in Japanese pears." *Genome* **50**(8): 735-741.
- Terakami, S., M. Shoda, Y. Adachi, T. Gonai, M. Kasumi, Y. Sawamura, H. Iketani, K. Kotobuki, A. Patocchi, C. Gessler, T. Hayashi and T. Yamamoto (2006). "Genetic mapping of the pear scab resistance gene Vnk of Japanese pear cultivar Kinchaku." *Theor Appl Genet* **113**(4): 743-752.
- 寺岸明彦・神原嘉男・小野 浩 (1998). 養液栽培イチジクの着果・生長および果実品質に及ぼす苗質の影響. *園芸学会雑誌* **67**:715–720.
- 寺岸明彦・神原嘉男・小野 浩 (1998). 穂木の低温貯蔵, 穂木径, 培養液濃度が養液栽培におけるイチジク挿し木苗の生長と着果に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* **67**:386–390.
- Theissen, G. (2001). "Development of floral organ identity: stories from the MADS house." *Curr Opin Plant Biol* **4**(1): 75-85.
- Theissen, G. and H. Saedler (2001). "Plant biology. Floral quartets." *Nature* **409**(6819): 469-471.
- Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford and J. I. Schroeder (2000). "Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4991-4996.
- Tsuchiya, T., N. Kameya and I. Nakamura (2009). "Straight walk: a modified method of ligation-mediated

- genome walking for plant species with large genomes." *Anal Biochem* **388**(1): 158-160.
- Valverde, F., A. Mouradov, W. Soppe, D. Ravenscroft, A. Samach and G. Coupland (2004). "Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering." *Science* **303**(5660): 1003-1006.
- Vinson, J. A., L. Zubik, P. Bose, N. Samman and J. Proch (2005). "Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants." *J Am Coll Nutr* **24**(1): 44-50.
- Watkins, C. B. (2002). Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. Fruit quality and its biological basis. Sheffield, Sheffield Academic Press.
- Wenkel, S., F. Turck, K. Singer, L. Gissot, J. Le Gourrierc, A. Samach and G. Coupland (2006). "CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis." *Plant Cell* **18**(11): 2971-2984.
- Wiebes, J. T. (1979). Co-evolution of figs and their insect pollinators. *A Rev of Ecol Syst* **10**:1-12.
- Xie, R., L. Zheng, S. He, Y. Zheng, S. Yi, L. Deng (2011). Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: genes and their regulation. *African J Biotechnol* **10**:19890-19897.
- 矢羽田二郎・野方仁 (1999). イチジク果実の糖含量・糖組成比の品種, 果実内部位および結果節位間における相違. *園芸学会雑誌* **68**:987-992.
- Yamaguchi, T., F. Kurosaki, D. Y. Suh, U. Sankawa, M. Nishioka, T. Akiyama, M. Shibuya and Y. Ebizuka (1999). "Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **460**(3): 457-461.
- Yamaki, S. (2010). Metabolism and accumulation of sugars translocated to fruit and their regulation. *J Japan Soc Hort Sci* **79**:1-15.
- Yanagisawa, S. and R. J. Schmidt (1999). "Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors." *Plant J* **17**(2): 209-214.
- Yanagisawa, S. and J. Sheen (1998). "Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression." *Plant Cell* **10**(1): 75-89.
- Ylstram, B., J. Busscher, J. Franken, P. C. H. Hollman, J. M. M. Mol, A. J. van Tunen (1994). Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant J* **6**:201-212.
- Yonemori, K., A. Sugiura, K. Tanaka, K. Kameda (1993). Floral ontology and sex determination in monoecious-type persimmons. *J Amer Soc Hort Sci* **118**:293-297.
- Yoo, S. J., K. S. Chung, S. H. Jung, S. Y. Yoo, J. S. Lee and J. H. Ahn (2010). "BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) has TFL1-like activity and functions redundantly with TFL1 in inflorescence meristem development in Arabidopsis." *Plant J* **63**(2): 241-253.
- Yoo, S. Y., I. Kardailsky, J. S. Lee, D. Weigel and J. H. Ahn (2004). "Acceleration of flowering by overexpression of MFT (MOTHER OF FT AND TFL1)." *Mol Cells* **17**(1): 95-101.
- Yu, D., M. Kotilainen, E. Pollanen, M. Mehto, P. Elomaa, Y. Helariutta, V. A. Albert and T. H. Teeri (1999). "Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae)." *Plant Cell* **11**:101-111.

Plant J **17**(1): 51-62.

Yuceer, C., S. B. Land, Jr., M. E. Kubiske and R. L. Harkess (2003). "Shoot morphogenesis associated with flowering in *Populus deltoides* (Salicaceae)." Am J Bot **90**(2): 196-206.

謝 辞

本研究をまとめるにあたり，終始適切なお指導，ご鞭撻を賜り，また多大なる御校閲の労をとっていただいた京都大学大学院農学研究科・奥本裕教授に心から感謝を申し上げます。

また，本研究の遂行にあたり，深遠なるご助言と温かい激励を賜った吉備国際大学地域創成農学部・谷坂隆俊教授に深謝の意を表します。

農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・薬師寺博上席研究員および福岡県京築普及指導センター・野方仁技術主査には，本研究の遂行にあたり，多くの研究材料のご提供とイチジク栽培生理に関する専門的な見地からの終始適切なお助言を賜りました。これまでの惜しみないご協力に対して，ここに深く感謝申し上げます。

九州大学大学院農学研究科・久原哲教授，田代康介准教授，森 一樹博士には，シーケンス解析と情報解析の実施において甚大なるご協力を賜りました。ここに心から感謝申し上げます。

愛媛大学農学部・羽生剛准教授には，情報解析の実施と関係論文の作成において甚大なるご協力を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

また，研究を実施するにあたって有益なお助言とご激励を賜りご協力を惜しまれなかった，元福岡県農業総合試験場八女分場長・中原隆夫氏，福岡県農林業総合試験場企画部知的財産活用課長・平島敬太氏，福岡県農林業総合試験場豊前分場長・堤 隆文博士，元福岡県農業総合試験場研究企画部バイオテクノロジー課・職員一同，福岡県農林業総合試験場豊前分場果樹チーム・職員一同，ならびにこれまでご協力くださった各研究機関研究者の方々に対し，心から謝意を表します。