

アスパラガスにおける性発現に関わる遺伝指標の探索

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 作物生理学 林 将人

1. はじめに

雌雄異株植物である食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は遺伝解析によって XY 型の遺伝様式を示すことがわかっている。しかし、性を決定している遺伝子の実体は不明である。アスパラガスの雄性決定因子は *M* と呼ばれ、雄性は *Mm*、雌性は *mm* の接合型となる。また、接合型が *MM* の株は超雄性と呼ばれる。食用アスパラガスの露地栽培では専ら雄性株が用いられ、市販のアスパラガス種子はすべて雄性で維持されているが、これは超雄性株を花粉親とした交配により実現される。したがって *M* 遺伝子の同定とその発現機構の解明は、学術的な意義があるだけでなく、超雄性株の生産や育種の効率化にも寄与すると考えられる。先行研究 (Jamsari ら 2004) により、雄性特異的ゲノム領域 Asp1-T7 が特定され、*M* 遺伝子座の近傍に位置すると報告されている。一方、花芽におけるサイトカニン代謝の調節機構を明らかにする一連の研究の中で、サイトカイニンの生合成を律速する酵素 isopentenyl transferase (IPT) をコードする遺伝子 *AoIPT* が同定され (堀内 2015)、発現解析の結果、これが雌花における退化前の雄蕊で高い発現を示すことが明らかにされた。本研究では、性発現に関わる遺伝指標を得ることを目的として、Asp1-T7 周辺領域の塩基配列の解読を進めた。また、*AoIPT* の発現制御機構について新たな見地を得るため *AoIPT* のプロモーター領域を単離し、これと転写因子との相互作用について解析を行った。

2. 材料及び方法

1) アスパラガス栽培品種 'Gijnlim' から分離した超雄性個体および雌性個体からゲノム DNA を抽出し、TAIL-PCR (Liu ら 1995) を行い、Asp1-T7 に隣接する DNA 領域の塩基配列を決定した。これをもとに、食用アスパラガスの RNA-Seq データベース及び DDBJ/EMBL/GenBank の EST (expressed sequence tag) データベースを用いて相同性検索を行い、Asp1-T7 近傍領域に含まれる遺伝子を推定した。

2) 超雄性個体と雌性個体から抽出したゲノム DNA を用いてインバース PCR を行い、*AoIPT* のプロモーター領域を含む DNA 断片を取得し、塩基配列を決定した。PLACE データベースを用いて、解読した配列中に存在するシス因子を予測した。

3) 2) より *AoIPT* プロモーターは MYB 結合領域を持つと予測された。この領域を用いてジゴキシゲニン標識 DNA プローブを作製した。*AtMYB2* (シロイヌナズナの *MYB2*) の cDNA を単離し、これを用いて Maltose Binding Protein-*AtMYB2* 融合タンパク質を大腸菌の系を用いて発現させ、精製した。作製したプローブと精製タンパク質を用いて、ゲルシフトアッセイを行い、両者が相互作用するか調べた。

3. 結果と考察

Asp1-T7 周辺に、発現遺伝子を複数見出した。ゲルシフトアッセイにおいては *AtMYB2* 存在下でのみプローブがシフトした。このことから *AoIPT* プロモーター領域と MYB が相互作用することが示唆された。