

老化カーネーションの雌ずいのエチレン生成

開始反応におけるアブシジン酸の役割

野村 佳宏

2014



## 略語

aa	amino acid
AAPK	ABA-activated protein kinase
ABA	abscisic acid
ABA1	ABA deficient 1
ABA8OH	ABA 8'-hydroxylase
ABF	ABA responsive element binding factor
ABI	ABA insensitive
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
acc. no.	accession number
ACS	ACC synthase
ACO	ACC oxidase
ACT	actin
ADP	adenosine diphosphate
AHG	ABA hypersensitive germination
AI5L	ABA insensitive 5-like protein
ALF	ABI3-like factor
AP2C	<i>Arabidopsis</i> PP2C-type phosphatase
AREB	ABA responsive element binding protein
ARBF	ABA responsive element binding factor
AREBF	ABA responsive element binding factor
ATP	adenosine triphosphate

AVRRPM	avirulence resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. maculicola</i>
bp	base pair
BLAST	basic local alignment tool
b-ZIP	basic leucine zipper transcription factor
CAPIP1L	<i>Capsicum annuum</i> PIP1-like
C-ABI3	carrot homologue of the <i>Arabidopsis</i> ABI3
CBF	CRT/DRE binding factor
CBL	casitas $\beta$ -lineage lymphoma
CCD	carotenoid cleavage dioxygenase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CDPK	calcium-dependent protein kinase
CDS	coding sequence
CIPK	CBL-interacting serine/threonine protein kinase
CK II	casein kinase II
CP	cystein proteinase
CRT	C-repeat
CYP	cytochrome P450
DBF	DRE binding factor
DBP	DNA-binding protein phosphatase
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DPBF	Dc3 promoter-binding factor
DRE	dehydration-responsive element
DREB	DRE binding factor

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
EST	expressed sequence tag
FAD	flavin adenine dinucleotide
FHA	forkhead-associated
FID	flame ionization detector
FUS3	fusca 3
FW	fresh weight
GBF	G-box binding factor
GC	gas chromatography
HAB	hypersensitive to ABA
HAI	highly ABA-induced PP2C gene
HOPW1	HRP-dependent outer protein W family 1
HRP	hypersensitive response and pathogenicity
KAPP	kinase associated protein phosphatase
LC	liquid chromatography
MAX	more axillary branching
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS/MS	tandem mass spectrometry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCED	9- <i>cis</i> -epoxycarotenoid dioxygenase
NJ method	Neighbor-joining method
ORF	open reading frame
PAPP2C	phytochrome-associated protein phosphatase type 2C

PCR	polymerase chain reaction
PIA	PP2C induced by AVRRPM
PIP	plasma membrane intrinsic protein
PLL	poltergeist like
POL	poltergeist
PP2C	type 2C protein phosphatase
PPH1	protein phosphatase 1
PYL	PYR1-like
PYR	pyrabactin resistance
RACE	rapid amplification of cDNA end
RCAR	regulatory components of ABA response
r.e.l.	relative expression level
RMS	ramosus
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
RT	reverse transcription
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNF1	sucrose nonfermenting 1
SnRK1	subfamily 1 of SNF1-related serine/threonine protein kinase
SnRK2	subfamily 2 of SNF1-related serine/threonine protein kinase
SnRK3	subfamily 3 of SNF1-related serine/threonine protein kinase
SPK	serine/threonine protein kinase
SRK	S-locus family of receptor protein kinase

SRS	substrate recognition site
SUS	sucrose synthase
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ubq	ubiquitin
UTR	untranslational region
VP	viviparous
WIN	HOPW1-1-interacting
ZEP	zeaxanthin epoxidase

なお ‘abscisic acid’ は学術用語として通例「アブシシン酸」と表記されるが、本論文では「アブシジン酸」として記述することとした。

# 目次

第1章	緒言	
第2章	老化花卉の遺伝子発現解析に使用する対照遺伝子の探索...	11
2.1.	はじめに (ユビキチン遺伝子のクローニングと利用) .....	11
2.2.	材料と方法.....	12
2.3.	結果.....	16
2.4.	考察.....	20
第3章	アブシジン酸の生合成と作用・シグナル伝達経路に関する 遺伝子のクローニングと構造解析 .....	45
3.1.	はじめに.....	45
3.2.	材料と方法.....	46
3.3.	結果と考察.....	49
第4章	開花と老化時のアブシジン酸含量の変動.....	109
4.1.	はじめに.....	109
4.2.	材料と方法.....	109
4.3.	結果と考察.....	112
第5章	アブシジン酸合成経路遺伝子の発現解析.....	123
5.1.	はじめに.....	123
5.2.	材料と方法.....	124
5.3.	結果.....	126
5.4.	考察.....	129
第6章	アブシジン酸作用経路遺伝子の発現解析.....	139
6.1.	はじめに.....	139



6.2. 材料と方法.....	139
6.3. 結果.....	140
6.4. 考察.....	142
第7章 総合考察.....	147
摘要.....	157
引用文献.....	163
付表.....	185
謝辞.....	209



## 第 1 章 緒言

エチレンはカーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) の切り花の老化に関与する主要な植物ホルモンである (Abeles *et al.*, 1992; Borochoy and Woodson, 1989; Reid and Wu, 1992; Satoh, 2011). カーネーションの花の老化は、主として花弁で起こる自己触媒エチレン生成によって特徴づけられ、花弁で生成したエチレンが更なる花弁のエチレン生成を誘導し、その結果萎れを誘導する (Satoh, 2011). エチレン生成を引き起こす要因としては、外生エチレン処理、受粉および「内生プログラム」が挙げられる。内生プログラムに基づくエチレン生成によって誘導される老化過程を自然老化過程という。自然老化をするカーネーション切り花では、最初に雌ずいでエチレンが生成し、これが花弁での自己触媒的エチレン生成を誘導する (Shibuya *et al.*, 2000; ten Have and Woltering, 1997). 花弁で生成したエチレンは、最終的に花の萎れをもたらして、花弁のインローリングを加速する。以上の理由から、雌ずいは花弁の老化制御において、初発の反応が起きる場所として重要な役割を果たしている (Manning, 1985; Peiser, 1986; Woodson *et al.*, 1992).

カーネーションの花組織では、他の植物の経路と同様にエチレンは次の経路を介して合成される: L-メチオニン→S-アデノシル-L-メチオニン→1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC)→エチレン。ここでは ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素が最後の 2 つの反応を触媒する (Kende, 1993; Yang and Hoffman, 1984). これまでに、カーネーションでは ACC 合成酵素をコードする 3 つの遺伝子 (*DcACS1*, *DcACS2*,

*DcACS3*) と ACC 酸化酵素をコードする遺伝子 (*DcACO1*) が同定されている (Henskens *et al.*, 1994; Jones and Woodson, 1999; Park *et al.*, 1992; Wang and Woodson, 1991). これらの遺伝子は老化途上のカーネーションの花で組織特異的に発現する. すなわち *DcACS1* はカーネーションの花の雌ずいと花卉の両方で発現するが, これに対して, *DcACS2*, *DcACS3* は *DcACS1* ほど明確ではないが雌ずいでより発現する (Henskens *et al.*, 1994; Jones and Woodson, 1999; ten Have and Woltering, 1997). *DcACO1* は老化過程のカーネーションの雌ずいと花卉の両方で発現する (Park *et al.*, 1992). Nukui *et al.* (2004) は, 花からエチレンがほとんど生成せず, 長い日持ち性を示すカーネーション ‘ホワイトキャンドル’ の花を用いて, 遺伝子発現を調査した. その結果, ‘ホワイトキャンドル’ の花卉には *DcACO1* と *DcACS3* の転写産物が存在したが, *DcACS1* の転写産物は雌ずいにも存在しなかった. このことは *DcACS1* の発現が, この品種の雌ずいでのエチレン生成を制御する役割を果たしていることを示唆する. 現在 *DcACO1* と *DcACS1* は老化途上のカーネーションの花の雌ずいと花卉でエチレン生合成の鍵となる遺伝子であると考えられている.

カーネーションを含むナデシコ科の花きの多くは, 雌ずいでの受粉がエチレン生成を誘導すると考えられている. しかし, 多くのカーネーション品種は葯を持たず, 自家受粉は起きない (Jones and Woodson, 1997; Nichols, 1977). それにもかかわらず雌ずいでは, おそらく受粉以外の要因が関与してエチレン生成量が増加する. しかしこれまでのところ, 自家受粉が起きない花で雌ずいにおけるエチレン生成の開始機構に関する研究はほとんど行なわれていなかった.

外部から投与した植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) はエチレン生成の誘導を介してカーネーション切り花の老化を促進した (Mayak and Dilley, 1976a, b; Nowak and Veen, 1982; Ronen and Mayak, 1981). Nowak and Veen (1982) は、収穫後のカーネーション切り花の雌ずいでは ABA 含量が一過的に増加し、花全体のエチレン生成の開始前に最大量に到達すると報告している。加えてその一方で花卉における ABA 含量は、エチレン生成の開始と同時に有意な上昇を示し、その後も増加したとも述べている。カーネーション切り花の自然老化において、Onoue *et al.* (2000) は、花でのエチレン生成の開始前に、ABA が雌ずいや花卉で蓄積することを確認し、外部からの ABA 投与が花のエチレン生成を促進することを示した。さらに、Shibuya *et al.* (2000) は、カーネーションの茎の切り口から投与した ABA が、雌ずい群 (gynoecium: 雌ずい (pistil) が一花に複数存在する場合をまとめて雌ずい群と呼ぶ。カーネーションは通常 1 個の子房と 2 本の花柱を持つ) を未処理のまま残した花ではエチレン生成を誘導したが、雌ずい群を除去した花ではエチレン生成を誘導しないことを示した。この結果は ABA の作用は花卉では無く、雌ずい群で発現したことを示している。以上の結果はカーネーションの花では ABA がエチレン生成の誘導の重要な要因となることを示唆している。

植物では ABA はカロテノイド (C<sub>40</sub>) 経路を介して合成される (図 1-1)。この経路では、ゼアキサンチンエポキシ化酵素 (ZEP) が触媒する 2 段階のエポキシ化反応によって、ゼアキサンチンがアントラキサンチンを経由して *all-trans*-ビオラキサンチンに変換される。*all-trans*-ビオラキサンチンは 2 つの *9-cis*-エポキシカロテノイド (*9'-cis*-ネオキ

サンチン, 9-*cis*-ビオラキサンチン) に変換される. 2つの 9-*cis*-エポキシカロテノイドは, 9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) によって分解され, C<sub>15</sub> 前駆体であるキサントキシンを形成する. この反応は植物ではABA生合成の律速段階として認識されている (Burbidge *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000; Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). また, 植物組織のABA含量はABA 8'-水酸化酵素 (シトクロムP450 CYP707A酵素) が触媒する代謝反応によっても制御されている (Kushiro *et al.*, 2004). この酵素は 8'-水酸化ABAを生成するABAのC-8' 位の水酸化反応を触媒し, 8'-水酸化ABAはその後自発的にファゼイン酸に異性化する (Cutler and Krochko, 1999).

ABA シグナル伝達経路において, 中心的な役割を果たす構成要素はABA 受容体 (PYL: PYR/PYL/RCAR) (Ma *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009), 負の制御因子 (PP2C: タイプ 2C タンパク質脱リン酸化酵素), 正の制御因子 (SnRK2: SNF1 関連のリン酸化酵素のサブファミリー2) である. この伝達経路で, PYL (ABA 受容体) はABAと結合して複合体を形成し (Ma *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), 複合体はSnRK2を脱リン酸化するPP2Cの機能を阻害する (Fujii *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2006). そして, 脱リン酸化されて活性化されたSnRK2は下流のエフェクターをリン酸化することで, AREBF (ABA responsive element binding factor) のようなABA応答性の遺伝子の発現を誘導する (Furihata *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005). 近年, Sun *et al.* (2011) はトマトでPYL, PP2C, SnRK2に相同な多くの遺伝子を同定し, トマトの果実発達におけるそ

れら遺伝子の転写制御の特徴を明らかにした。

本研究は、カーネーションの花の開花過程から老化過程への切り替えに最も重要な役割を果たしている「エチレン生成の開始反応の分子機構の解明」に焦点をあて、雌ずいにおけるエチレン生成の開始反応が、花全体のエチレン生成のトリガーになる‘鍵反応’との考えに基づき、エチレン生成の誘導因子を明らかにすることを目的に行った。具体的には雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割を検証するため、ABA 含量の変動および ABA の生合成と作用に関与する遺伝子群の発現を、エチレン生成能の異なるカーネーション品種で比較検討することによって行った。

カーネーションの花弁の萎れは、多くの遺伝子の制御による細胞構成要素の分解によって起きると考えられている (Hoeberichts *et al.*, 2007; Lawton *et al.*, 1989; Otsu *et al.*, 2007; Satoh, 2011; Verlinden *et al.*, 2002)。通常、老化途上のカーネーションの花組織における老化関連の遺伝子の転写産物量の変化は、泳動試料の正規化を伴ったノザンブロット解析やリアルタイム RT-PCR 解析によって決定される。例えば RNA 試料の泳動の等量性を保証するために、アガロースゲル上には対照として標準となる RNA を同時に泳動する。これまでカーネーションにおける花の老化に関連した遺伝子の発現解析には rRNA が対照遺伝子としてしばしば使用されてきた (Hoeberichts *et al.*, 2007; Iordachescu and Verlinden, 2005; Jones, 2002; van der Kop *et al.*, 2003; Verlinden and Garcia, 2004; Verlinden *et al.*, 2002)。さらに RNA 試料の正規化のための

rRNAの代わりに対照遺伝子としてアクチン (*DcACT1*) の転写産物が使用された例もある (Harada *et al.*, 2011; Nukui *et al.*, 2004; Shibuya *et al.*, 2002; Sugawara *et al.*, 2002; Waki *et al.*, 2001).

しかし花の老化は、花組織 (特に花弁細胞) が崩壊していく過程であり、老化途上の花組織では、通常アクチンのmRNAやrRNAのようなRNAの顕著な分解が起こる。このため、老化途上の花組織ではノザンブロット解析においてアガロースゲル上で試料泳動を正規化するときや、リアルタイムRT-PCRでmRNAを正規化するとき、所定の標的のmRNA量が過大評価されることが懸念されている (Jones, 2004)。すなわち転写産物量が単に定常値で維持されるか、あるいは対照のRNAの転写産物と比較してゆっくりと減少するときには、老化途上の組織では、見かけ上特定の遺伝子の転写産物が蓄積しているようにみえたと予想される。

カーネーションの花組織においても、rRNAやアクチン (*DcACT1*) のmRNAの転写産物量が、老化の進行と共に著しく低下することが予想される。実際この欠点は老化途上のカーネーションの花弁におけるスクロース合成酵素 (*DcSUS1*) の転写産物量の変動を解析したとき、老化の最終ステージでのアクチン転写産物量の顕著な減少のために、見かけ上最終ステージで*DcSUS1*の相対蓄積量が増加したことで確認された (Morita *et al.*, 2011)。これまで、老化途上のカーネーションの花組織における老化関連遺伝子の変動を定量する場合、転写産物量を正確に定量するためのrRNAやアクチンの転写産物に代わる対照遺伝子を何にするかが未解決であった。そこで本研究では、ABA関連遺伝子の発現調査に先立って、転写産物量の変動がない対照遺伝子を探索しようと試



みた。

これまでユビキチンの転写産物は、カーネーションを含む多くの植物の遺伝子発現解析の正規化の標準として使用されてきた。例えば、フラボノイド生合成に作用する遺伝子の RT-PCR による発現解析もその一例である (Ogata *et al.*, 2004)。しかし、老化途上のカーネーションの花組織における遺伝子発現の解析に、ユビキチンの転写産物が使用された例はこれまで無かった。もしカーネーションのポリユビキチン遺伝子がシロイヌナズナに在るようなファミリーを構成する (Burke *et al.*, 1988; Callis *et al.*, 1995) ならば、それらの 1 つを老化途上のカーネーションの花弁の正規化の対照遺伝子として利用することができる可能性があると考えた。

このような理由から今回の研究では、まず対照遺伝子の候補としてユビキチン遺伝子をクローニングし、その特徴を明らかにした。次に開花過程及び老化過程における発現解析によって、カーネーションの花における花弁の成長や萎れの過程に対するユビキチン遺伝子の発現の関与を明らかにした。その上で老化途上のカーネーションの花弁においてスクロース合成酵素 (*DcSUS1*) の転写産物量を再検証することによって、ユビキチン遺伝子が正規化の標準とし利用可能かを評価することを目的として行った。

本論文ではまず第 2 章で老化花弁の遺伝子発現解析に使用するユビキチン対照遺伝子の探索について述べ、第 3 章では ABA 生合成と作用に関与する遺伝子遺伝子のクローニングと構造解析、第 4 章では開花と老化時の ABA 含量変動の調査について述べた。また第 5 章では第 3

章でクローニングした ABA 合成経路遺伝子, および第 6 章では ABA 作用経路遺伝子の発現解析について述べた.

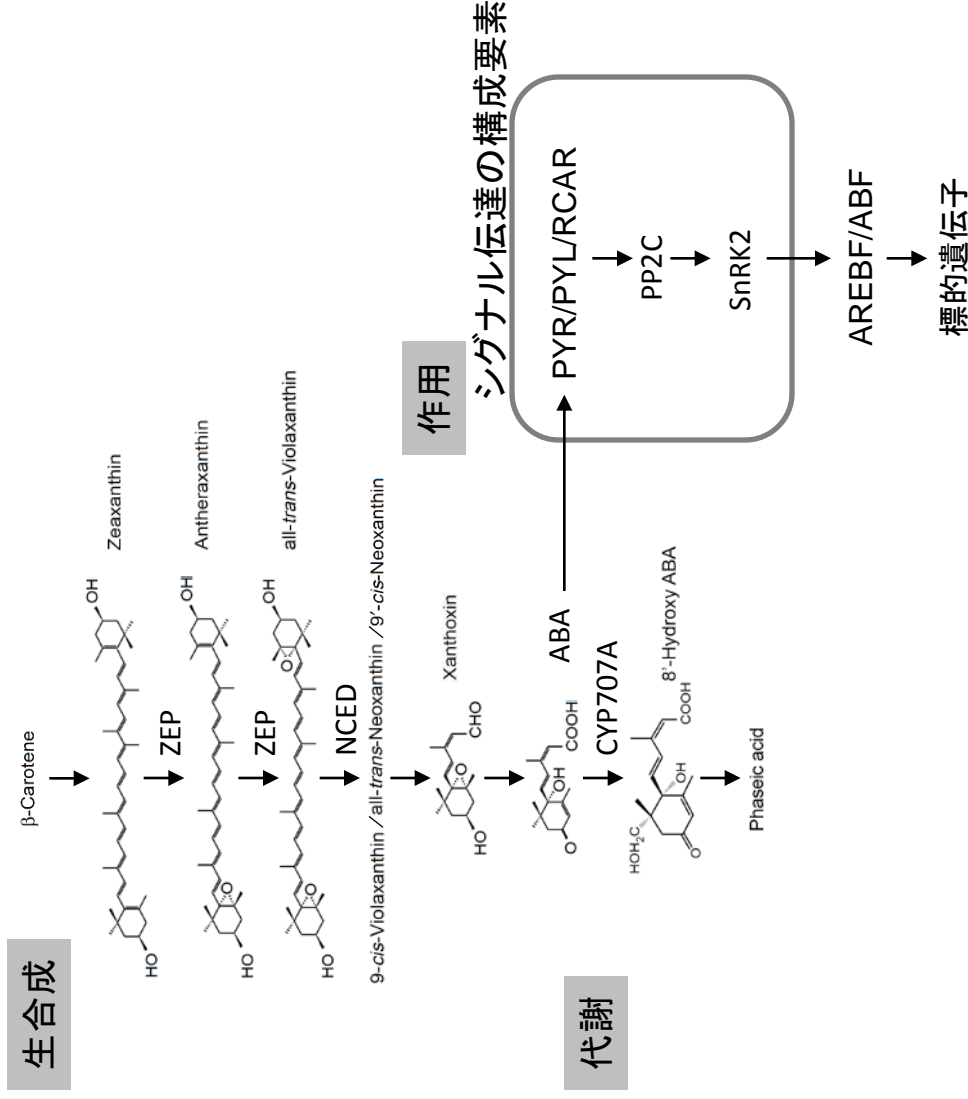


図 1-1. ABA 生合成, 代謝, 作用の経路. ZEP, ゼアキサンチンエポキシ化酵素; NCED, 9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ; CYP707A, ABA 8'-水酸化酵素; PYR/PYL/RCAR, ABA 受容体; PP2C, タイプ2Cタンパク質脱リン酸化酵素; SnRK2, SNF1関連のリン酸化酵素のサブファミリー-2; AREBF/ABF, ABA応答要素結合因子.



## 第2章 老化花卉の遺伝子発現解析に使用する対照遺伝子の探索

### 2.1. はじめに (ユビキチン遺伝子のクローニングと利用)

花の老化は、花組織（特に花卉細胞）が崩壊していく過程であり、花卉細胞内ではRNAの顕著な分解が起こる。カーネーションの花組織においても、rRNAやアクチン (*DcACT1*) の転写産物量が、老化の進行と共に著しく低下することが観測されていた。このため、カーネーションの花組織の老化関連遺伝子の変動を定量する場合、転写産物量を正確に定量するための対照遺伝子を何にするかが未解決であった。本章では、ABA関連遺伝子の発現調査に先立って、カーネーションの花の老化時に転写産物量の変動がない対照遺伝子を探索した。

初めに、対照遺伝子の候補として、ユビキチン遺伝子をクローニングし、その特徴を調べた。次に発現解析によって、カーネーションの花における開花過程および老化過程における発現量の変動を調べて、花卉の成長や萎れの過程に対するその関与を推定した。最後に以前報告された論文 (Morita *et al.*, 2011) の、老化途上のカーネーションの花におけるスクロース合成酵素 (*DcSUS1*) の相対蓄積量を再検証することによって、候補遺伝子が正規化の標準として利用可能か否かを評価した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 植物材料と試料調製

スプレー咲きカーネーションに属するカーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) ‘ライトピンクバーバラ’ の切り花は、宮城県名取市の栽培農家のガラス温室において、1本の花茎についた5から6個の花蕾の中の最初の花がほぼ開き始めたときに収穫した。収穫後の花は、京都府の京都府農林水産技術センター生物資源研究センターに乾燥状態で輸送され、翌日に到着した。到着後の花は切り口をプラスチックバケツ中の水に漬け、室温 23°C、白色蛍光灯の常光下 ( $14 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) に静置した。実験の時期によって同じ品種の花を、兵庫県と長野県の栽培農家から入手し実験を行った。その他の試料調製法は Morita *et al.* (2011) の方法と同様とした。

Harada *et al.* (2010) の方法に従い花の開花過程を6段階のステージ (Os 1 から Os 6) に分けた。また花の老化過程は Morita *et al.* (2011) の方法に従い4段階のステージ (Ss 1 から Ss 4) に分けた。それぞれのステージ分けの詳細および写真は Morita *et al.* (2011) に記載されている。RNAの抽出のために、それぞれのステージに対して、5輪の花から最外周の花弁10枚を採取し、1試料にまとめ、RNAの抽出まで-80°Cで保管した。

### 2.2.2. RNA 抽出

Harada *et al.* (2005) の方法に従い、標準的なフェノール-SDS法 (Ausubel *et al.*, 1987) により、上記のカーネーションの花弁から total RNA を抽出した。約 1 g の凍結花弁試料を液体窒素中、乳鉢と乳棒で

粉碎した。これに等量の水飽和フェノールを添加した 5 mL の抽出緩衝液 [1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA] を加え、懸濁後遠心分離し、上清を回収した。さらにフェノール-クロロホルム溶液 (1:1, v/v), 次にクロロホルム溶液を使用した同様の操作 (等量の溶液を加えた後に懸濁, 遠心分離し, 上清を回収) により total RNA を含む抽出液を精製した。最後は $-20^{\circ}\text{C}$ でイソプロパノール沈殿を行った。ここで抽出した各ステージの total RNA はリアルタイム RT-PCR 解析に使用した (図 2-4, 2-5, 2-6)。

### 2. 2. 3. ユビキチンをコードする cDNA の PCR クローニング

ユビキチン (実際は, ポリユビキチン) に対する全鎖長の composite cDNA を得るために, まず一般的な RT-PCR によってタンパク質コード領域からなる cDNA の部分断片を, 3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA end) によってタンパク質コード領域の下流部分と 3'-非翻訳領域および polyA 尾部からなる cDNA の部分断片を, 5'-RACE 法によってタンパク質コード領域の上流部分と 5'-非翻訳領域からなる cDNA の部分断片をそれぞれ取得した (Frohman *et al.*, 1988)。その後取得した 3 つの cDNA 断片を再構成し全鎖長の composite cDNA を作製した。具体例を挙げて説明すると, cDNA の部分断片は開花途上のカーネーションの花弁 (ステージ 5; Harada *et al.*, 2010, 2011) から得た total RNA を鋳型としてフォワードプライマー Ubq-F とリバースプライマー Ubq-R を使用した RT-PCR により増幅した。このプライマー対の核酸配列と増幅産物の大きさは表 2-1 に示した。プライマーの配列はカーネーションのポリユビキチンの EST クローン (acc. no. DK999743) (Harada *et*

*al.*, 2010) の配列を基に作製した. RT-PCR は標準的な手順に従って行ない, 必要に応じて最適化した. PCR 産物は配列決定のために, pGEM-T Easy Vector (Promega, Wisconsin, USA) にクローニングした. 決定した核酸配列を使用して, 3'-RACE および 5'-RACE のための配列特異的なプライマーを設計した (表 2-1). 3'-RACE はフォワードプライマーとして Ubq1f-F (あるいは Ubq2f-F), リバースプライマーとして 3' RACE primer の組み合わせで行った. 同様に, 5'-RACE はフォワードプライマーとして 5' RACE primer, リバースプライマーとして Ubq1f-R (あるいは Ubq2f-R) の組み合わせで行った. 異なる領域を持った 3 つの cDNA 部分断片を再構成し composite cDNA を作製した. その後, 全鎖長の cDNA の完全な核酸配列を確認するために, 上記の開花途上のカーネーションの花弁から抽出した total RNA を鋳型として composite cDNA の両末端の配列を基に作製したフォワードプライマーとリバースプライマーの組み合わせ (表 2-1) を使用して PCR 増幅を行った.

#### 2. 2. 4. リアルタイム RT-PCR

*DcSUS1* (Morita *et al.*, 2011), *DcACT1* (acc. no. Y0073415, Waki *et al.*, 2001) および *DcUbq* の転写産物量を定量するために, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit と LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, 東京, 日本) を使用してリアルタイム RT-PCR を行った. cDNA はマニュアルに従って ReverTra Ace (東洋紡, 大阪, 日本) を使用して合成した. リアルタイム RT-PCR には下記のプライマー対を使用した. *DcSUS1* はフォワードプライマー SUS3F とリバースプライマー SUS3R, *DcACT1* はフォワードプライマー DcACT1P51F と



DcACT1P229R, *DcUbq1* はフォワードプライマーUbq1F とリバースプライマーUbq1R, *DcUbq2* はフォワードプライマーUbq2F とリバースプライマーUbq2R), *DcUbq3-7* の混合物はフォワードプライマーUbq3F とリバースプライマーUbq3R とした. 今回カーネーションから取得したユビキチンに対して, 設定したそれぞれのプライマー対の cDNA 上の位置は図 2-1B に示した.

PCR条件は最初に 95°C で 10 分間加熱した後, (95°C で 5 秒, 53°C で 5 秒, 72°C で 8 秒) のサイクルを 40 サイクル繰り返した. ここで伸長時間は増幅産物の長さに応じて設定した ( $25 \text{ mer}\cdot\text{s}^{-1}$ ). 転写産物量の絶対値は, 標的配列の希釈系列を使用してこれを試料と同時に測定し, LightCyclerソフトウェア Ver. 3.5.3 (Roche Diagnostics K. K., 東京, 日本) を用いて算出した. ステージ毎に独立した 3 つの RNA 調製試料を分析に使用した, データはステージ毎に 3 つの試料の平均値 $\pm$ 標準誤差を示した.

### 2. 2. 5. 統計解析

統計解析はオンラインの統計解析プログラム MEPHAS

(<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/testdocs/tomocom/>) を使用し, Tukey の多重検定 ( $p<0.05$ ) を行った.

## 2.3. 結果

### 2.3.1. カーネーションのポリユビキチン遺伝子の cDNA クローニングと特性解析

最初に、RT-PCR により 206 bp と 203 bp の長さの 2 つの核酸配列を取得した。2 つの cDNA 断片の一方は DK999743 cDNA (Harada *et al.*, 2010) の部分的な核酸配列に対応していた。2 つの部分断片の核酸配列に基づいて RT-PCR, 3'-RACE, 5'-RACE の手法の組み合わせを使用してカーネーション ‘ライトピンクバーバラ’ からポリユビキチンをコードしていると推定される 2 つの composite cDNA を入手した。

核酸配列を確認するために、2 組の配列特異的プライマー対 (*Ubq1* に対しては 5'U-F1 と 3'U-R1, *Ubq2* に対しては 5'U-F2 と 3'U-R2) を使用して、開花途上のカーネーションの花弁から抽出した total RNA を鋳型にして全鎖長 cDNA を増幅しようと試みた (表 2-1)。しかし予想に反して、この増幅産物には長さの異なった cDNA 断片が複数含まれていた。その後、混合物からそれぞれの cDNA をクローニングし、核酸配列を決定した。その結果、取得した 7 つの別々の cDNA は核酸配列や大きさが異なったポリユビキチン遺伝子をコードする可能性のある cDNA であることが分かった。最終的に、上記の total RNA を鋳型として、それぞれの cDNA の核酸配列から設計したフォワードプライマーとリバースプライマーの対 (すなわち、5'U-F1 と 3'U-R1, 5'U-F2 と 3'U-R2 など、表 2-1) を使用して全鎖長 cDNA を増幅することによって、7 種類の cDNA の核酸配列を確認した。これらの 7 種類の cDNA からなる新規の遺伝子を *DcUbq1-7* (*Dianthus caryophyllus* ユビキチン 1-7) と命名した、そして acc. no. AB691230 から AB691236 として DDBJ に登

録した (表 2-2).

7 種類のユビキチン cDNA を表 2-2 にまとめた. 例えば, *DcUbq1* の cDNA は 53 bp の 5'-UTR, 231 bp の 3'-UTR および 1146 bp の open reading frame (ORF) を持ち全長 1430 bp であった (表 2-2). *DcUbq1* の cDNA は既報告の acc. no. DK999742 と DK999743 の EST クローン (Harada *et al.*, 2010) の両方の核酸配列を持っていた. これに対して, *DcUbq2* の cDNA は DK999742 のみを持っていた. ORF の推定アミノ酸配列の分析より 5 つの同一のタンパク質モチーフが存在することが明らかとなった. それぞれのモチーフの推定アミノ酸配列は, 異なった生物のユビキチンの中で保存されたモチーフと類似していた (図 2-1A). カーネーションのすべてのユビキチンモチーフ (モノマー) は 76 アミノ酸残基 (228 bp に対応し, 分子量は 8.5 kDa) から成りアミノ酸配列は同一だった. ただし 3'-UTR 配列の直前のモノマーだけは, C-末端側に余分に Cys 残基を持ち 77 アミノ酸残基から成っていた (図 2-1A). 核酸配列や推定アミノ酸配列のアライメントより, *DcUbq1, 2, 3* の 3 つの cDNA は 5 つのユビキチンモノマーが直列に並んだポリユビキチンをコードし, 他の *DcUbq4* は 3 つのユビキチンモノマーからなるポリユビキチンを, 残りの *DcUbq5, 6, 7* の 3 つの cDNA はモノマーをコードしていることが明らかとなった (図 2-1B).

表 2-2 にカーネーションそれぞれのポリユビキチン遺伝子の cDNA に対して DDBJ acc. no. と同様に 5'-UTR, ORF および 3'-UTR の核酸の数を示した. すべてのユビキチンモノマーの間にはその推定アミノ酸配列が同一であるにもかかわらず, それぞれのユビキチンモノマーの核酸配列の間には 228 bp の長さの核酸配列の中に 78.4%–100% の相同

性の差異があった (表 2-3).

5'-UTR の配列は開始コドン ATG の A の上流の約 50 塩基の核酸配列の相同性に従って *DcUbq1*, 2, 4, 6, 7 からなるグループと *DcUbq3*, 5 からなるグループの 2 つに分けることができた. なお *DcUbq3* と *DcUbq5* の間には 3 箇所違った核酸の欠失があった (図 2-3A). 2 つのグループの配列をそれぞれ 5A, 5B と命名した (図 2-1B). 3'-UTR の配列に関して, *DcUbq3* から *DcUbq7* 中の配列はほぼ共通した配列で高い相同性を有していた (相同性 99%以上). その一方で *DcUbq1* と *DcUbq2* の間では相同性が 89%, *DcUbq1* と *DcUbq3*–*DcUbq7* の間では 67%, *DcUbq2* と *DcUbq3*–*DcUbq7* の間では 68%であった. 5'-UTR と同様に 3'-UTR の配列を核酸配列の相同性から 3 つのグループに分類され, *DcUbq1* のグループを 3A, *DcUbq2* のグループを 3B, *DcUbq3*–7 のグループを 3C と命名した (図 2-1B, 2-3B).

### 2. 3. 2. 開花途上および老化途上のカーネーションの花弁の *DcUbq* の転写産物量の変化

今回カーネーションから取得したユビキチンに対して, 設定したそれぞれのプライマー対の cDNA 上の位置を図 2-1B に示した. 当初, それぞれの遺伝子の 3'-UTR 領域に位置するプライマー対を使用したりアルタイム RT-PCR によって 7 種類のポリユビキチン遺伝子の転写産物を個々に分離して検出しようとした. しかし, 3'-UTR の領域の核酸配列は *DcUbq3*–7 の間ではほぼ同一であったためこれらを分離することは困難であった (図 2-3B). そのために, ポリユビキチンの転写産物を *DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3*–7 の混合転写産物の 3 種類に分けて検出

した.

図 2-4 には開花途上のカーネーションの花弁における *DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の転写産物のコピー数の変化を示した. *DcUbq1* と *DcUbq2* の転写産物のコピー数は同じように変動した. それらの転写産物のコピー数は開花のステージ 1 (Os 1) から Os 2, Os 3 まで増加し, その後 Os 4 で減少した. それらは Os 5 で再び増加して, その後 Os 6 で減少した. 一方で, *DcUbq3-7* の転写産物の混合物では, 最終ステージ (Os 6) に僅かな増加があったが, 開花のステージ全体を通じて転写産物のコピー数はほぼ一定の値を示した. 開花過程の期間の転写産物のコピー数は *DcUbq1* が最も多く, 次に *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の順となった.

図 2-5 には老化途上のカーネーションの花弁の *DcUbq1*, *DcUbq2* と *DcUbq3-7* の転写産物のコピー数の変化を示した. *DcUbq1*, *DcUbq2* の転写産物のコピー数は同じような変動パターンを示した. Ss 1 と Ss 2 ではほぼ同じコピー数で, その後 Ss 3 で約 1.7 倍に増加し Ss 4 で僅かに減少した. その一方で, *DcUbq3-7* の転写産物コピー数は老化過程の間にほぼ一定に保たれた. 老化過程の間の花で転写産物のコピー数は *DcUbq1* が最も多く, 次に *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の順になった.

### 2.3.3. ユビキチンの転写産物を対照遺伝子として利用したときの 老化途上のカーネーションの花弁における *DcSUS1* の相対 蓄積量の再評価

*DcSUS1*, *DcACT1*, *DcUbq3-7* の転写産物のコピー数の変化は図 2-6 のパネル上段に示した. *DcSUS1* の転写産物のコピー数は Ss 1, Ss 2 では

多く, Ss 3, Ss 4 では顕著に減少した. *DcACT1* の転写産物のコピー数は老化過程の間に著しく変化し, Ss 4 では顕著に減少した. *DcUbq3-7* の転写産物のコピー数は Ss 1 から Ss 4 を通じて変化の無いままだった. *DcACT1* の転写産物で *DcSUS1* の転写産物のコピー数を正規化したとき, *DcSUS1* の相対蓄積量は Ss 4 で見かけ上顕著に増加したが, それに対して *DcUbq3-7* の転写産物で正規化したときは Ss 4 においても低いままであった (図 2-6 下段のパネル).

## 2. 4. 考察

### 2. 4. 1. 花の老化とタンパク質分解

花の老化は, 開花や発達の最終ステージに花卉の萎れ, あるいは脱落 (落下) が起きる連続した代謝および形態の変化で構成される. 花卉の萎れはタンパク質の分解によるアミノ酸の生成を伴う. これらのアミノ酸は花卉から成長途上の子房と種子へと輸送される (Nichols, 1976). これは, アミノ酸の形で窒素と炭素を再利用する花の老化過程における重要な代謝過程である.

花卉でのタンパク質分解は非プロテアソームシステムあるいは, プロテアソームシステムで起こることが実証されている (van Doorn and Woltering, 2008). 大部分のタンパク質分解は主に液胞で起こるが, 前者には, 液胞, ミトコンドリア, 核やプラスチドで起きるタンパク質分解も含まれる (van Doorn and Woltering, 2008). システインプロテアーゼは液胞でのタンパク質の加水分解に関与している主要なタンパク質分解酵素であると考えられている (Guerrero *et al.*, 1998; Tournaire *et*

*al.*, 1996; Valpuesta *et al.*, 1995). カーネーションのシステインプロテアーゼ (*DCCP1*) は、老化途上のカーネーションの花から同定された (Jones *et al.*, 1995). *DCCP1* 遺伝子は老化途上のカーネーションの花弁で発現が上昇することが示されている (Jones *et al.*, 1995).

その一方で、プロテアソームシステムでは、76 アミノ酸のポリペプチドであるユビキチンを標的タンパク質の特定のためのタグとして利用することで、タンパク質の選択的な分解を遂行している。ユビキチン-プロテアソーム経路を介した、タンパク質分解の開始では E1, E2, E3 と呼ばれる、3 つのタンパク質構成要素 (酵素) の作用によって標的タンパク質に数個のユビキチンモノマーが結合する (ユビキチン化)。そしてユビキチン化されたタンパク質はプロテアソーム複合体によって選択的に分解される (Park *et al.*, 2011)。

カーネーションの花の花弁老化のタンパク質分解におけるユビキチン-プロテアソーム経路の関与は、26S プロテアソームを構成する 19S 調節因子のサブユニットや、E3 の mRNA の発現が上昇することから示唆されている (Hoeberichts *et al.*, 2007)。

これらの先行する研究結果は、老化途上のカーネーションの花弁では、ユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク質の分解活性が増加していることを示唆する。以前に、Jiang *et al.* (1994) は、エチレンに曝したカーネーションの花弁で 62, 45, 34, 30, 26 kDa の分子量の特定のタンパク質が減少することを実証した。このことからプロテアソームはこれらの特定のタンパク質の分解に関与している可能性があると考えられる。

近年、Harada *et al.* (2010) は開花途上のカーネーションの花弁から 2

つのポリユビキチンをコードすると推定される cDNA 断片 (DDBJ acc. nos DK999742, DK999743) を取得した。これらの以前の知見に基づいて、開花過程と老化過程のカーネーションの花弁では、プロテアソームシステムを機能させるのに十分なユビキチンタンパク質を供給するために、DK999742, DK999743 に関連したユビキチン遺伝子の発現が増加することが予測できる。

#### 2.4.2. カーネーションのポリユビキチン遺伝子の cDNA

##### クローニングと特性解析

図 2-1B は 7 種類のポリユビキチン cDNA に対してそれぞれのユビキチンモノマーをコードする cDNA 構成単位間の対応関係を示している。図で同じ小文字を持つ構成単位は核酸配列が同一であることを示し、同じ小文字でプライムマークを持つ構成単位同士は 90–99% の相同性を持つことを示している (すなわち a に対して a')。データはいくつかの遺伝子間に密接な関係があることを示唆している。*DcUbq1* と *DcUbq2* は第 1 グループ、*DcUbq3* と *DcUbq4* は第 2 グループ、残った *DcUbq5-7* は第 3 のグループに分類された。

#### 2.4.3. 開花途上および老化途上のカーネーションの花弁の *DcUbq* の

##### 転写産物量の変化

ユビキチンは植物細胞の成長・発達過程で広汎な役割を果たすことが明らかになっている (Park *et al.*, 2011)。複数のポリユビキチンの転写産物の存在や、開花途上の花弁において特定時期に発現が増加した *DcUbq1* と *DcUbq2* の転写産物量の異なった変動様式は、カーネーション



ンの開花過程にそれらが関与していることを示唆する。その正確な役割は今後解明する必要がある。

また、花卉の老化過程のより後期のステージにおいて、*DcUbq1*, *DcUbq2* の転写産物が蓄積したのに対して、*DcUbq3-7* の転写産物はこの過程においても変動が無いままだったことは注目に値する。緒言で述べたように、このような変動様式は、これらのステージの間に減少する他の遺伝子の転写量とは対照的であり、花卉の老化の進行におけるユビキチンの積極的な関与を示唆している。このことからユビキチンタンパク質は、おそらくユビキチン-プロテアソームシステムを介して特定のタンパク質の分解に関与していると予想される。ポリユビキチン遺伝子の発現増加は、ユビキチンタンパク質の供給を増加させ、ユビキチン-プロテアソームシステム系の機能を増加させることに同調していると考えられる。今後の研究では、老化途上の花卉において、ユビキチン-プロテアソームシステムによって分解されるタンパク質を同定することが必要となると考えられる。

まとめると、今回の研究結果に基づいて、ユビキチン遺伝子の発現は、老化過程の間のカーネーションの花卉の萎れ（萎縮）と同様に開花過程の間の花卉成長にも関与していることが推定された。花卉の老化（萎れ）の過程へのユビキチン遺伝子の関与について、より詳細に解析することは大変興味深いことではあるが、今回の研究の主旨からは外れているためこれ以上の検討を行わないこととした。

#### 2.4.4. ユビキチンの転写産物を対照遺伝子として利用したときの 老化途上のカーネーションの花弁における *DcSUS1* の相対 蓄積量の再評価

老化途上の花組織では、通常アクチンの mRNA や rRNA のような RNA の顕著な分解が起こる。これが標的遺伝子の転写産物量を評価する際に正確な定量を困難にする場合がある。Morita *et al.* (2011) は以前に、老化途上のカーネーションの花弁において、*DcSUS1* の転写産物量を *DcACT1* の mRNA 量や total RNA 量で正規化することによって、*DcSUS1* の相対蓄積量の解析を行った。しかし、花の後期の老化ステージでは、*DcACT1* の mRNA の減少が *DcSUS1* の mRNA の過大評価をもたらしたことがわかった (図 2-6)。*DcUbq3-7* の転写産物は花弁の老化過程を通じて有意な変化が認められないことから、これらを花の老化途上の花弁における遺伝子発現解析の正規化の標準として利用することで、標的遺伝子の発現の定量性を確保できると予想した。この可能性を検証するために、以前の研究 (Morita *et al.*, 2011) で使用した total RNA 調製試料を使用して、老化途上のカーネーションの花の *DcSUS1* の相対蓄積量の変化を再度分析することによっての対照遺伝子としての *DcUbq3-7* の転写産物の有効性を評価した。

*DcUbq3-7* の転写産物を使用した正規化は、*DcSUS1* の転写産物について正規化の前後でほぼ同じ変化のプロファイルが得られた。これらの結果は *DcUbq3-7* の転写産物が老化途上のカーネーションの花弁において、*DcSUS1* の転写産物量の正規化のための対照遺伝子として *DcACT1* の転写産物より優れていることを明らかにした。今回の調査結果に基づいて、*DcUbq3-7* の転写産物が、*DcACT1* の転写産物の代わ

りに，老化過程のカーネーションの花弁や，おそらく他の組織においても老化関連遺伝子の発現を正規化する対照遺伝子としてより有効に活用できると考えられた．



表 2-1. PCR クローニングおよびリアルタイム RT-PCR 解析に使用したプライマー

標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>I 段階目の PCR</b>	Ubq-F ; TTGTCCTCCGCTTCGGTGGTG	Ubq-R ; CACCGATGCTACACACAACAGG	206/203
3'-RACE	Ubq1f-F ; GATTGATTGATGGCTTAAAGTTGGTGTG Ubq2f-F ; AGTTGATTGATGACTTTTAAAGTGTGGGTG	3' RACE primer ; GAAGAATTCCGGCCCGCAGGAA	218 209
5'-RACE	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	Ubq1f-R ; CACACCAAACTTAAAGCCATCAATCAATCAAC Ubq2f-R ; CACACCCACACTTAAAAAGTCATCAATC	1316 1317
<b>全鎖長 cDNA の増幅</b>			
<i>DeUbq1</i>	5'U-F1 ; CCTCTCCAAACTCTCTAATCAATCTTCC	3'U-R1 ; GACAACGTTACTTAGTACATACGGAGTAG	1430
<i>DeUbq2</i>	5'U-F2 ; CTCCAAATCTCTAATCAATCTCTCTCG	3'U-R2 ; GACAACGTTACTTAGTACAGAGTAGTAG	1417
<i>DeUbq3</i>	5'U-F3' ; CATCCTCCACGCTTAAATCTCTACATC	3'U-R3 ; CTACGGTAATTGAAAATTTCCACCCGAAAATG	1390
<i>DeUbq4</i>	5'U-F1 ; CCTCTCCAAACTCTCTAATCAATCTTCC	3'U-R3 ; CTACGGTAATTGAGAATTCACACCCGAAAATG	939
<i>DeUbq5</i>	5'U-F3' ; CATCCTCCACATCTTAATCTCTACATC	3'U-R3 ; CTACGGTAATTGAGAATTCACACCCGAAAATG	476
<i>DeUbq6</i>	5'U-F1 ; CCTCTCCAAACTCTCTAATCAATCTTCC	3'U-R3 ; CTACGGTAATTGAGAATTCACACCCGAAAATG	481
<i>DeUbq7</i>	5'U-F1 ; CCTCTCCAAACTCTCTAATCAATCTTCC	3'U-R3 ; CTACGGTAATTGAGAATTCACACCCGAAAATG	481
<b>リアルタイム RT-PCR 解析</b>			
<i>DeUbq1</i>	Ubq1F ; GATTGATTGATGGCTTAAAGTTGGTGTG	Ubq1R ; CGTTACTTAGTACATACGGAGTAGTAGTAG	183
<i>DeUbq2</i>	Ubq2F ; GTTAGTTGATTGATGACTTTAAAGTGTGGG	Ubq2R ; GACAAACGTTACTTAGTACAGAGTAGTAG	182
<i>DeUbq3-7</i>	Ubq3F ; GTTGTGGTTTCAGGGGCTGGTTTG	Ubq3R ; CTACGGTAATTGAGAATTCACACCCGAAAATG	178
<i>DeSUS1</i>	SUS3F ; AGATCGCTCGGTGATTAATGC	SUS3R ; CGGAACCTCAAGTGTCCCTCAC	196
<i>DeACT1</i>	DeACT1P51F ; CGT CAC CAA CTG GGA TGA CA	DeACT1P229R ; GAG AGA ACG GCC TCC ATG GC	198



表 2-2. ‘ライトピンクバーバラ’ から単離した *DcUbq1-7* の cDNA のまとめ

遺伝子名	ユビキチン モノマーの数	cDNA の塩基数 (bp)			DDBJ acc. no.
		5'-UTR	ORF	3'-UTR	
<i>DcUbq1</i>	5	53	1146	231	AB691230
<i>DcUbq2</i>	5	50	1146	221	AB691231
<i>DcUbq3</i>	5	48	1146	196	AB691232
<i>DcUbq4</i>	3	53	690	196	AB691233
<i>DcUbq5</i>	1	48	234	194	AB691234
<i>DcUbq6</i>	1	53	234	194	AB691235
<i>DcUbq7</i>	1	53	234	194	AB691236





表 2-3. 核酸配列に基づいたポリユビキチンを構成するモノマー間の相同性.

	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	4-1	4-2	4-3	5-1	6-1	7-1
1-1	100	92.1	85.5	80.7	78.9	100	92.1	85.5	80.7	78.9	87.2	83.8	81.6	78.9	79.3	98.7	78.9	79.3	85.0	87.2	89.0
1-2		100	89.0	83.3	82.8	92.1	100	89.0	83.3	82.8	88.1	85.1	84.2	81.5	81.1	90.8	81.5	81.1	86.3	85.5	85.0
1-3			100	83.8	84.1	85.5	89.0	100	83.8	84.1	88.5	86.0	84.6	81.9	82.8	85.1	81.9	82.8	86.3	85.5	84.6
1-4				100	85.9	80.7	83.3	83.8	100	85.9	84.1	84.6	83.3	85.9	81.1	80.3	85.9	81.1	82.4	82.4	80.6
1-5					100	78.9	82.8	84.1	85.9	100	85.5	85.5	85.0	85.1	84.6	79.3	85.1	84.6	85.0	83.7	83.7
2-1						100	92.1	85.5	80.7	78.9	87.2	83.8	81.6	78.9	79.3	98.7	78.9	79.3	85.0	87.2	89.0
2-2							100	89.0	83.3	82.8	88.1	85.1	84.2	81.5	81.1	90.8	81.5	81.1	86.3	85.5	85.0
2-3								100	83.8	84.1	88.5	86.0	84.6	81.9	82.8	85.1	81.9	82.8	86.3	85.5	84.6
2-4									100	85.9	84.1	84.6	83.3	85.9	81.1	80.3	85.9	81.1	82.4	82.4	80.6
2-5										100	85.5	85.5	85.0	85.1	84.6	79.3	85.1	84.6	85.0	83.7	83.7
3-1											100	86.8	86.8	85.9	83.3	87.7	85.9	83.3	93.0	90.8	89.0
3-2												100	91.7	85.0	85.0	84.2	85.0	85.0	85.0	85.5	85.0
3-3													100	86.8	86.8	82.9	86.8	86.8	85.5	83.7	83.7
3-4														100	85.0	78.4	100	85.0	82.8	81.1	80.2
3-5															100	80.6	85.0	100	88.2	87.7	87.3
4-1																100	78.4	80.6	86.3	88.5	90.3
4-2																	100	85.0	82.8	81.1	80.2
4-3																		100	88.2	87.7	87.3
5-1																			100	97.8	96.1
6-1																				100	98.2
7-1																					100

表中の '1-1' から '7-1' はそれぞれ図 2-2. に基づいた開始コドン (ATG) から228 bp毎の核酸配列に対応している. なお最も3'-UTRに近い構成単位に含まれる核酸配列TGTTAA (システイン残基+終止コドン) は除外して相同性 (%) を算出した.



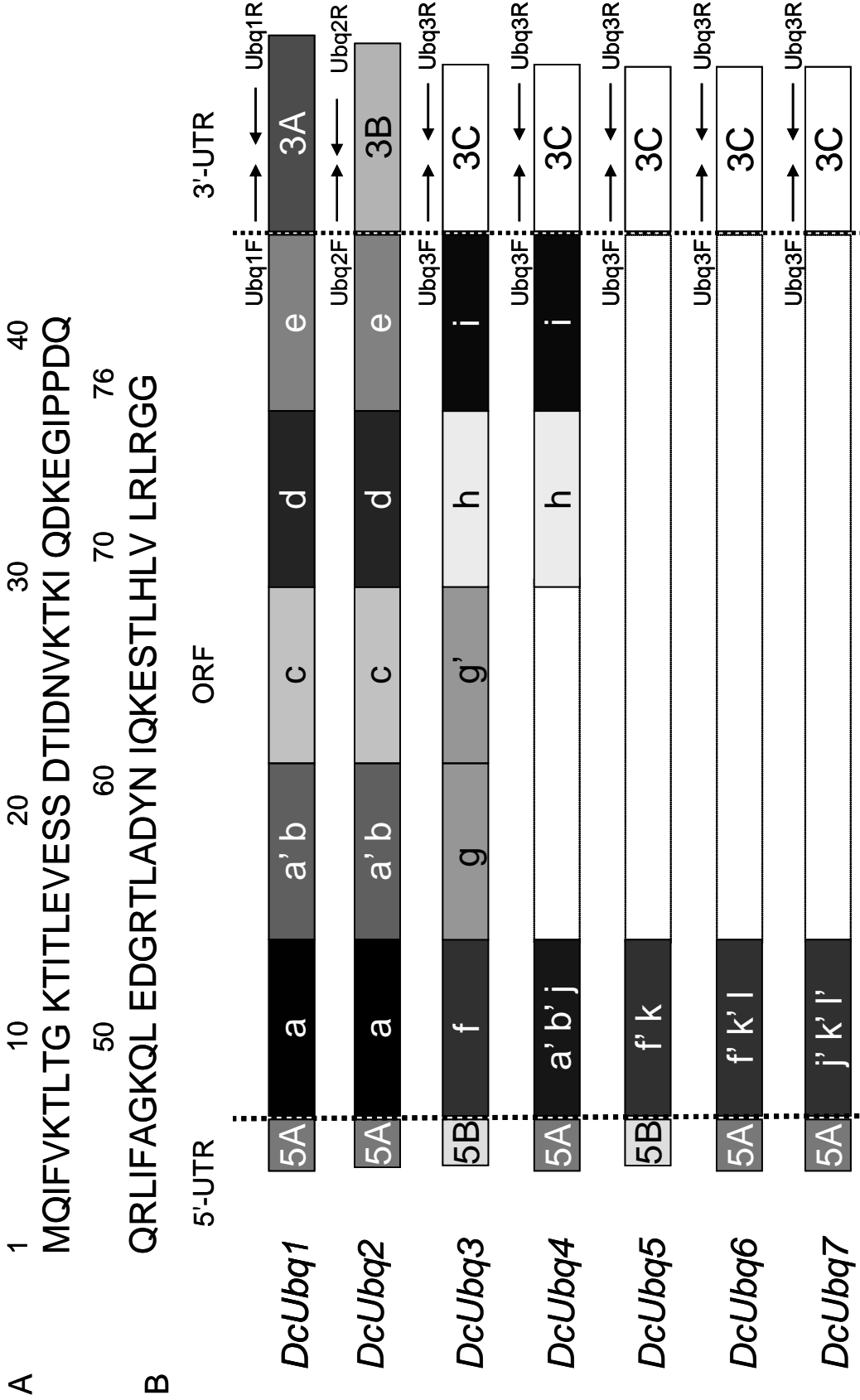


図 2-1. カーネーションのユビキチンモノマーの推定アミノ酸配列 (A) と核酸配列によって評価したカーネーションのポリユビキチン遺伝子の構造 (B). 同じ小文字を持つユビキチンモノマーは核酸配列が同一であることを示し、同じ小文字でプライムマークを持つモノマー同士は90-99%の相同性を持つことを示す (a対してa'). 各領域の核酸配列に基づいて5'-UTRは2つの異なったグループ (5A, 5B), 3'-UTRは3つのグループ (3A, 3B, 3C) に分類された。PCR増幅に使用したフォワードプライマー, リバーズプライマーの位置はUbq1FとUbq1R, Ubq2FとUbq2R, Ubq3FとUbq3Rとして示した。



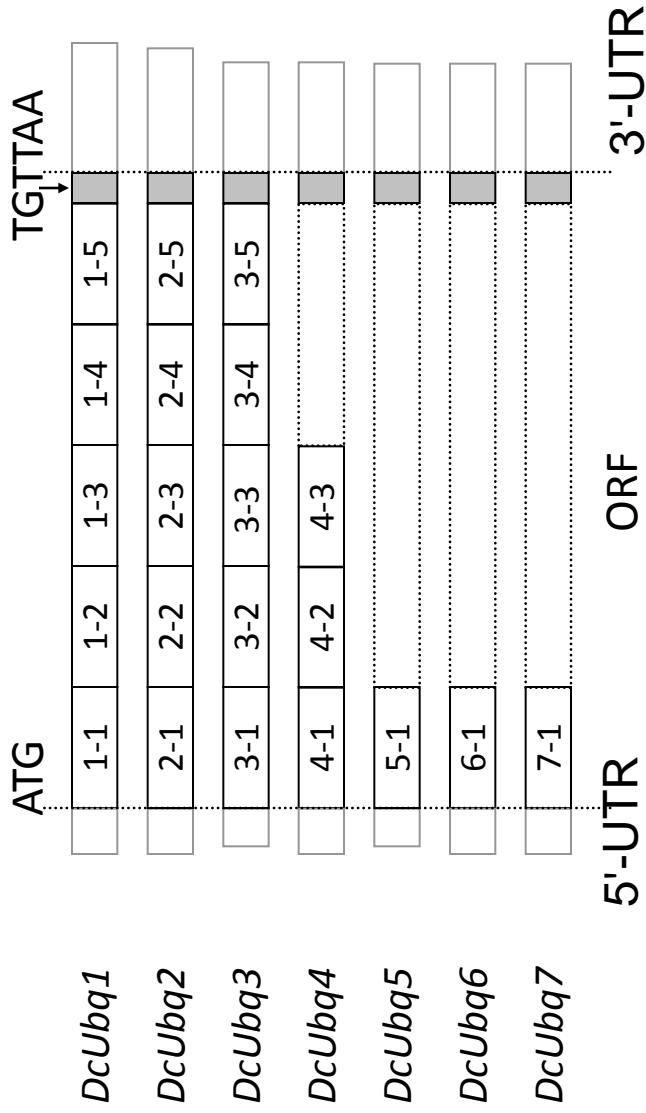


図 2-2. 核酸配列の相同性の算出 (表 2-3) で使用したカーネーションのポリユビキチン遺伝子の構成単位の位置. 図中の '1-1' から '7-1' はそれぞれ開始コドン (ATG) から 228 bp 毎の核酸配列に対応している. なお最も 3'-UTR に近い構成単位に含まれる核酸配列 TGT TAA (システイン残基+終止コドン) は除外して相同性を算出した.



## A. 5'-UTR

```

DcUbgq1 CCTCTCCAAACTCTCTAATCAATCTTCCCTCTCGAATTTAATCCTTCCTTCAAG 53
DcUbgq2 -----T-----
DcUbgq3 A..CT.C.CG..TA.T.--.A.A..C-.C..AA..T-----50
DcUbgq4 .....A.....C.....AA.....53
DcUbgq5 A..CT.C.CA..TA.T.--.A.A..C-.C..AA..--48
DcUbgq6 .....A.....C.....AA.....53
DcUbgq7 .....A.....C.....AA.....53

```

## B. 3'-UTR

```

DcUbgq1 GCCGGTCTGGGGCTGTTTGTCTGGGAACACGGTGTGGTTGGTTGATTGATGGCTTT--AAGTTTGG-TGTGTTGGTGTCT-AA-GAATAATGTTTTGT 96
DcUbgq2 -----C.G..A...T...G...G...T-----97
DcUbgq3 -----CA.C.T.T.T-----G...G...C.T.GGT.TC...T...70
DcUbgq4 -----CA.C.T.T.T-----G...G...C.T.GGT.TC...T...70
DcUbgq5 -----CA.C.T.T.T-----G...G...C.T.GGT.TC...T...68
DcUbgq6 -----CA.C.T.T.T-----G...G...C.T.GGT.TC...T...68
DcUbgq7 -----CA.C.T.T.T-----G...G...C.T.GGT.TC...T...68

DcUbgq1 TTGAAGTTTCGGGTATCAGTAATCTGTGAACATTTGTTTTAGTTTAATTTCCCT--AATTCCTGTT-GTGTGTAGCATCGGTGATAAATGATGCTAATA 193
DcUbgq2 -----G..T.....A.....A...A.T...G...T.GC.G..TT...T...TT.G...G...190
DcUbgq3 -----T...ATC.G...C...A.A..A.T...G...T.GC.G..T...T...T...T...G...158
DcUbgq4 -----T...ATC.G...C...A.A..C.A.T...G...T.GC.G..T...T...T...T...G...158
DcUbgq5 -----T...ATC.G...C...A.A..C.A.T...G...T.GC.G..T...T...T...T...G...156
DcUbgq6 -----T...ATC.G...C...A.A..C.A.T...G...T.GC.G..T...T...T...T...G...156
DcUbgq7 -----T...ATC.G...C...A.A..C.A.T...G...T.GC.G..T...T...T...T...G...156

```

```

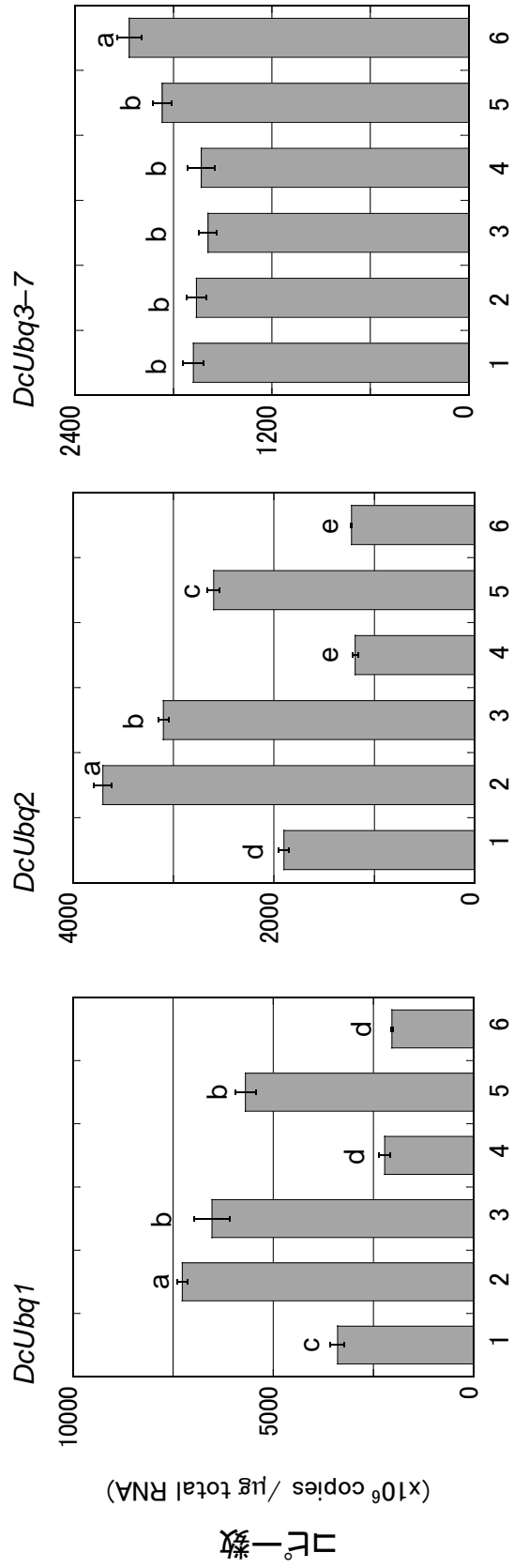
DcUbgq1 TTACTACTACTCCGGTATGTACT-----AAGTAACGTTGTC 231
DcUbgq2 -----C-----221
DcUbgq3 --GG.G...ATT.G.GG.A.T.TTC.T.C..A.--196
DcUbgq4 --G.G...ATT.G.G.A.T.CTC.T.C..A.--196
DcUbgq5 --G.G...ATT.G.G.A.T.CTC.T.C..A.--194
DcUbgq6 --G.G...ATT.G.G.A.T.CTC.T.C..A.--194
DcUbgq7 --G.G...ATT.G.G.A.T.CTC.T.C..A.--194

```

図 2-3. カーネーションのポリユビキチン遺伝子cDNAの5'-UTR (A) および3'-UTR (B) の核酸配列のアライメント。DcUbgq2-7の中のドットはDcUbgq1と同一の核酸であることを示し、太字のハイフンは、対応する核酸が欠失していることを示す。







開花ステージ (Os)

図 2-4. 開花途上のカーネーションの花弁における *DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の転写産物のコピー数の変化. データは独立した3つの試料の平均値 ± 標準誤差として示した. 同じ文字を持つバーは Tukey の多重検定 ( $p < 0.05$ ) によって有意差が無いことを示す.



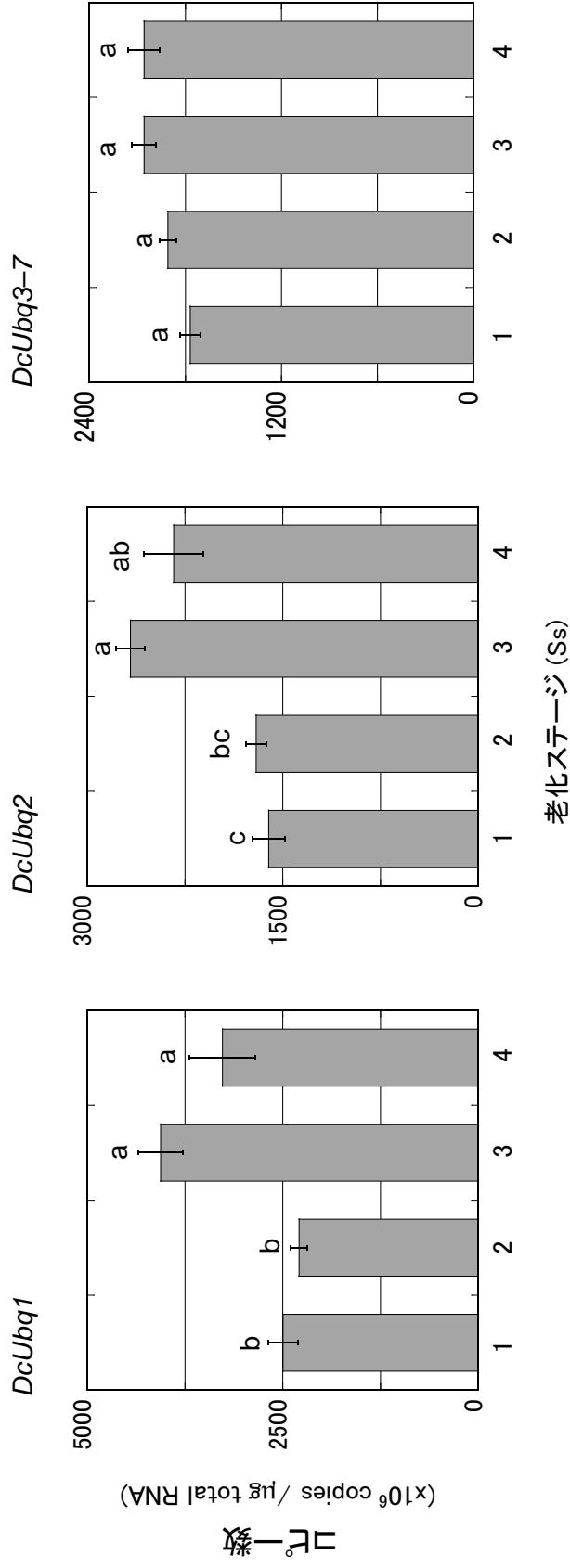


図 2-5. 老化途上のカーネーションの花弁における*DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3-7*の転写産物のコピー数の変化. データは独立した3つの試料の平均値±標準誤差として示した. 同じ文字を持つバーはTukeyの多重検定 ( $p < 0.05$ ) によって有意差が無いことを示す.



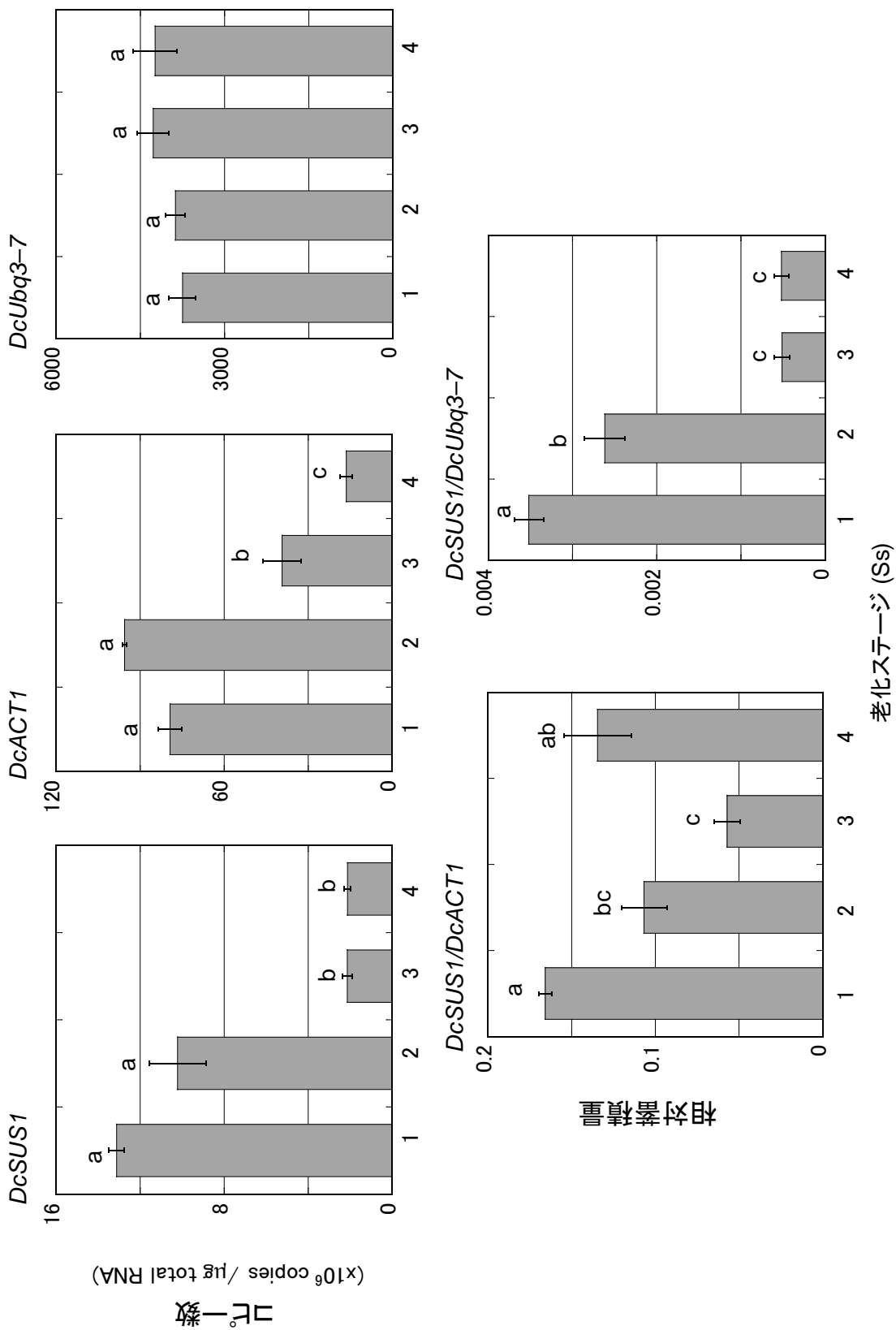


図 2-6. 老化途上のカーネーションの花弁において対照遺伝子としてユビキチンの転写産物を利用してときのDcSUS1の転写産物量の再評価. 各々の老化途上のステージにおけるDcSUS1の転写産物のコピー数は, 対応するステージのDcACT1の転写産物のコピー数あるいはDcUbq3-7の転写産物のコピー数を正規化し, 相対蓄積量として示した. 転写産物のコピー数のデータのデータは独立した3つの試料の平均値±標準誤差として示した. 同じ文字を持つバーはTukeyの多重検定 (p<0.05) によって有意差が無いことを示す.



### 第3章 アブシジン酸の生合成と作用・シグナル伝達経路に 関与する遺伝子のクローニングと構造解析

#### 3.1. はじめに

カーネーションの老化時には、初めに雌ずいにおいてエチレンが生成し、このエチレンが花弁に作用して自己触媒型エチレン生成を誘導する (Shibuya *et al.*, 2000; ten Have and Woltering, 1997). 一般に内生エチレンが老化に主導的役割を果たす花きでは、受粉刺激によって雌ずいで誘導生成されたエチレンが、老化の「スターターエチレン」として働く。しかし、雄ずいが花弁化した八重咲きカーネーションでは、自家受粉は起こり得ず、何らかの別因子がエチレン生成の誘導に関与していると予想される。緒言で述べた過去の研究結果 (Mayak and Dilley, 1976a, b; Nowak and Veen, 1982; Ronen and Mayak, 1981; Onoue *et al.*, 2000; Shibuya *et al.*, 2000) から、この誘導因子は ABA ではないかと推測される。

本研究では、カーネーションの雌ずいにおけるアブシジン酸 (ABA) の含量の変動と ABA の生合成とシグナル伝達および作用に関与する遺伝子群の発現の解析から、雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割に対する更なる支持を得ることを目指した。

そこで本章では ABA 関連遺伝子の発現解析の準備として、‘ライトピンクバーバラ’の花組織から、ABA の生合成と代謝、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群の cDNA をクローニングし、その構造や特徴を調査した。

## 3. 2. 材料と方法

### 3. 2. 1. 植物材料と試料調製

第2章 (2. 2. 1.) で採取した‘ライトピンクバーバラ’の花弁に加え、それ以外の組織 (萼片, 子房, 花柱) を満開の花から採取し, RNA 抽出まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した. ここで, カーネーションにおける花柱は構造的に柱頭+花柱を指している. なお試料の設置条件は第2章 (2. 2. 1.) の通りとした.

### 3. 2. 2. RNA 抽出

第2章 (2. 2. 2.) と同様に, フェノール-SDS 法により‘ライトピンクバーバラ’の各花組織から total RNA を抽出した.

### 3. 2. 3. ABA 生合成, 代謝, シグナル伝達, 作用に関する遺伝子の

#### cDNA の PCR クローニング

ABA 生合成 (*ZEP*, *NCED*), 代謝 (*CYP707A*), シグナル伝達 (*PYR*, *PP2C*, *SnRK2*), 作用 (*AREBF*) に関する全鎖長の composite cDNA を得るために, 第2章とほぼ同一の手法 (2. 2. 3.) を使用して実験を行った (Frohman *et al.*, 1988). ここで取得したタンパク質コード領域からなる cDNA の部分断片, およびタンパク質コード領域の下流部分と 3'-非翻訳領域および polyA 尾部からなる cDNA の部分断片, タンパク質コード領域の上流部分と 5'-非翻訳領域からなる cDNA の部分断片を再構成し composite cDNA を作製した.

その後, 全鎖長 cDNA の完全な核酸配列を確認するために, 上記の開花途上あるいは満開のカーネーションの各花組織から抽出した total



RNA を鋳型として composite cDNA の両末端の配列を基に作製したフォワードプライマーとリバースプライマーの組み合わせを使用して PCR 増幅を行った。

PCR に使用した cDNA の部分断片および全鎖長を得るためのフォワードプライマーとリバースプライマーの対、増幅産物の大きさ（塩基対の数）を表 3-1 に要約した。

*DcNCED1*, *DcNCED2* の cDNA を具体例として、PCR クローニングの詳細な手順を以下に示した。また図 3-1 には *DcNCED1* の cDNA の取得手順の概略図を示した。*DcNCED1*, *DcNCED2* の cDNA クローンに対して、公共のデータベースに登録された *NCED* の cDNA 配列を基に、フォワードプライマー (NCED-F) とリバースプライマー (NCED-R) を設計した (表 3-1)。次に開花したカーネーションの花弁から抽出した total RNA を使用し、RT-PCR によって最初の cDNA の部分断片 (743 bp) を増幅した。RT-PCR は標準の手順に従って行ない、必要に応じて最適化した。PCR 産物は配列決定のために pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) にクローニングし、塩基配列の異なる 2 つの配列 (いずれも 743 bp) を取得した。2 つ核酸配列の一方を使用して、配列特異的なプライマーを設計した。その後上流の 713 bp cDNA (これが 713 bp, 695 bp の混合物であったことは後に明らかになった) はフォワードプライマーの 5' RACE primer とリバースプライマーの *DcNCED1*-R1 を使用した 5'-RACE で増幅した。下流の 1019 bp cDNA (上記の断片と同様に、1019 bp, 1013 bp の混合物) は *DcNCED1*-F1 と 3' RACE primer を使用した 3'-RACE によって取得した。3 つの cDNA の部分断片を再構成し、約 2200 bp の *DcNCED1* の composite cDNA を作製

した. またもう一方の核酸配列からは, フォワードプライマーの 5' RACE primer と, リバースプライマーの DcNCED2-R1 を使用した 5'-RACE で上流の 1342 bp cDNA を, フォワードプライマーの DcNCED2-F1 リバースプライマーの 3' RACE primer を使用した 3'-RACE で下流の 813 bp cDNA を取得した. 取得した 3 つの cDNA の部分断片を再構成し, 約 2100 bp の *DcNCED2* の composite cDNA を作製した. 最終的に, *DcNCED1*, *DcNCED2* の全鎖長 cDNA は composite cDNA の両末端の配列に基づいて設計したプライマーを使用して total RNA から増幅した.

増幅した cDNA の全鎖長の核酸配列の決定の際に, *DcNCED1* の核酸配列に僅かな相違を持った 2 つの核酸配列が存在することを発見し, これらの 2 つの配列をそれぞれ *DcNCED1a*, *DcNCED1b* と命名した. これは *DcNCED2* に対しても同様で, 2 つの核酸配列の異なる cDNA を取得し, それぞれを *DcNCED2a*, *DcNCED2b* と命名した. 核酸配列は GENETYX-WIN によって編集し解析した. また相同性検索は, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のウェブサイトから入手可能なものについて, BLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を使用して行った.

#### 3. 2. 4. 推定アミノ酸配列のアライメントと系統樹解析

DDBJ (<http://www.ddbj.gov>) のウェブサイトからオンラインの Clustal-W プログラム Ver.2.1 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて, 今回取得したカーネーションの ABA 関連遺伝子の推定アミノ酸配列,

および他植物のホモログのアミノ酸配列に対してアライメントと分子系統樹の作成を行った。なおアライメントはの作成条件は初期設定値とし、系統樹はClustal-Wプログラムの近接接合法 (NJ法) を用いて作成した(Saitou and Nei, 1987)。また系統樹の信頼性を確認するためブートストラップ解析 (1000 反復)を行った (Felsenstein *et al.*, 1985)。系統樹の作成に使用した配列データはNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のウェブサイトから入手可能なものについて、BLASTプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を使用した相同性検索や、関連文献に記載された登録番号をもとに収集した。

### 3. 3. 結果と考察

‘ライトピンクバーバラ’の開花花卉から抽出した total RNA を鋳型にして、RT-PCR, 5'-RACE, 3'-RACE 法の組み合わせを使用して、ABA 合成 (4 つの *NCED*, 1 つの *ZEP*), シグナル伝達 (1 つの *PYR*, 1 つの *PP2C*, 2 つの *SnRK2*), 作用 (1 つの *AREBF*) に関わると予想される遺伝子の cDNA をクローニングした。他方、*CYP707A* (ABA の代謝酵素) をコードする cDNA に関しては、最初の部分鎖長の PCR 増幅産物は ‘ライトピンクバーバラ’の開花途上の花の雌ずいから抽出した total RNA を鋳型にしてクローニングした。composite cDNA を取得した後、それらの全体の核酸配列を PCR と配列決定による全鎖長の cDNA クローニングによって確認した。単離した cDNA をカーネーションにおける新規の遺伝子として以下のように命名し、その後 DDBJ に登録した；  
*DcNCED1a*, *DcNCED1b*, *DcNCED2a*, *DcNCED2b* [登録番号 (acc. no.)

AB750605–AB750608], *DcZEP1* (acc. no. AB750609), *DcCYP707A1* (acc. no. AB750610), *DcPYR1* (acc. no. AB750611), *DcPP2C1* (acc. no. AB750612), *DcSnRK2.1* (acc. no. AB750613), *DcSnRK2.2* (acc. no. AB750614), *DcAREBF1* (acc. no. AB750615).

表 3-2 に単離した cDNA の遺伝子名, 登録番号, 全鎖長の核酸数, 5'-非翻訳領域 (5'-UTR), ORF (open reading frame), 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) それぞれの塩基数, 推定アミノ酸配列のアミノ酸数及びタンパク質の推定分子量をまとめた. また今回得たのカーネーションの cDNA から推定されるタンパク質の構造と, 他の植物の対応するタンパク質との相同性を確認するため, 推定アミノ酸配列のアラインメントによる構造比較と (図 3-2a–g) と, 分子系統樹による推定アミノ酸配列に基づいた系統学的解析を行った (図 3-3a–g).

*DcNCED1a* の推定アミノ酸数は 592 アミノ酸残基であり, 65.5 kDa の分子量を持つと推定された (表 3-2). 一方で *DcNCED1b* は, *DcNCED1a* と比較して 6 アミノ酸残基の欠失と 4 アミノ酸残基の置換があり, 586 アミノ酸残基で 64.9 kDa と推定された. また *DcNCED2a* と *DcNCED2b* の推定アミノ酸数は共に 589 アミノ酸残基であり, 両者の間には 6 アミノ酸の置換があった (図 3-2a). それぞれの分子量は, 65.1 kDa, 65.2 kDa と推定された. これらアミノ酸残基の欠失と置換は, 以下に述べる酵素作用に必須の保存配列から外れた領域に位置するため, これらの *DcNCED* のアイソマー間の酵素活性に違いは無い, あるいはほとんどないと予想された. これらの *DcNCED* の 4 つのアイソマー間の推定アミノ酸配列の相同性を比較したところ, *DcNCED1a* と

DcNCED1b では 98.3%, DcNCED2a と DcNCED2b では 98.6%の相同性を示した. また DcNCED1a/b と DcNCED2a/b 間では 71.1–78.3%の相同性を示した.

BLASTによる相同性検索の結果, カーネーションDcNCED1aは, ロブスタ種コーヒーCcNCED3 (*Coffea canephora*: ABA43901: Simkin *et al.*, 2008), リンドウGINCED2 (*Gentiana lutea*: AAS47838: Zhu *et al.*, 2007), アサガオInNCED1 (*Ipomoea nil*: AEH41591: Pawelek *et al.*, 2010), レタスLsNCED1 (*Lactuca sativa*: BAE72090: Sawada *et al.*, 2008), トマトSINCED1 (*Solanum lycopersicum*: NP\_001234455: reference sequence), チリ産野生種トマトSoNCED1 (*Solanum ochrathum*: ADQ74072: Xia *et al.*, 2010), ジャガイモStNCED1 (*Solanum tuberosum*: AAT75151: Destefano-Beltran *et al.*, 2006) と相同性が高く, 推定アミノ酸配列でそれぞれ73.1%, 70.1%, 70.8%, 73.2%, 72.0%, 72.9%, 72.9%の相同性を示した. 同様にDcNCED2aに対してはそれぞれ67.0%, 72.7%, 71.7%, 62.9%, 71.8%, 73.9%, 73.4%と, こちらも高い相同性を示した.

DcNCED1a/b, DcNCED2a/bと他植物のNCEDのアミノ酸配列のアライメントの比較により, 4種類のDcNCEDは, 膜結合タンパク質に特有な両親媒性の $\alpha$ -ヘリックスを形成すると予想されるドメインをN末端側に (Tan *et al.*, 2001, 2003; Rodrigo *et al.*, 2006), (ジ)-オキシゲナーゼ (dioxygenase) 活性に必須の補因子の非ヘム鉄の結合に必要な4つの保存されたヒスチジン残基をC末端側に持っていた (Huang *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2012; Messing *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2003). またこれらの推定アミノ酸配列はNCEDファミリーが属するcarotenoid cleavage dioxygenase (CCD) で, 特徴的に保存された2つのMIAHPKXDP

とHDFAITENのアミノ酸配列からなる領域を持っていた (Bouvier *et al.*, 2003) (図3-2a).

DcNCED1a/b, DcNCED2a/bと主な他植物のNCEDファミリータンパク質に加え, NCEDファミリーとは二重結合の解裂特性の異なるCCDファミリータンパク質を含めて分子系統樹を作成したところ, NCEDファミリーとCCDファミリーは系統樹上で明確に異なったグループに分類された. また今回取得したDcNCED1a/b, DcNCED2a/bはいずれも双子葉植物NCEDのグループに属することが明らかとなった (図3-3a). 以上のことから今回取得した4種類のDcNCEDの塩基配列は, NCED遺伝子であると推定された.

DcZEP1の推定アミノ酸数は664残基であり, 72.6 kDaの分子量を持つと推定された (表3-2). BLASTによる相同性検索の結果, カーネーションDcZEP1は, キクCmZEP (*Crysanthemum×moriforium*: BAE79556: Kishimoto and Ohmiya., 2006), レタスLsZEP1 (*Lactuca sativa*: BAE72089: Toyomasu *et al.*, 2006), トマトSIZE (*Solanum lycopersicum*: ABQ52698: Wang *et al.*, 2008), ジャガイモStZEP1 (*Solanum tuberosum*: ADF28629: Wolters *et al.*, 2010), ブドウVvZEP (*Vitis vinefera*: AAR11195: Soar *et al.*, 2004) と相同性が高く, 推定アミノ酸配列ではそれぞれ76.8%, 76.3%, 75.9%, 75.9%, 76.5%の相同性を示した.

DcZEP1の推定アミノ酸配列と他植物のZEPのアミノ酸配列のアライメントの比較により, DcZEP1は, 他の植物のZEPで保存されたADP結合領域, FAD結合領域, リポカイン保存モチーフ, モノオキシゲナーゼドメイン, FHA (Forkhead 関連) ドメインを持っていた (Baroli *et al.*,

2003; Marin *et al.*, 1996) (図 3-2b).

また DcZEP1 と主な他植物の ZEP ファミリータンパク質とで分子系統樹を作成したところ, DcZEP1 は双子葉植物の ZEP のグループに分類された. また DcZEP1 はバラ科のウメ PrmZEP (*Prunus mume*: BAF49058: Kita *et al.*, 2007) およびスモモ PrarZEP (*Prunus armeniaca*: AAC24582: Mbeguie-A-Mbeguie and Fils-Lycaon, 1999) に隣接したクレードに属することが明らかとなった (図 3-3b). 以上のことから今回取得した *DcZEP1* の塩基配列は, *ZEP* 遺伝子であると推定された.

DcCYP707A1の推定アミノ酸数は466アミノ酸残基であり, 53.0 kDaの分子量を持つと推定された (表3-2). BLASTによる相同性検索の結果, カーネーションDcCYP707A1は, シロイヌナズナAtCYP707A3 (*Arabidopsis thaliana*: AED95234: Swarbreck *et al.*, 2011), オレンジ CtsCYP707A1 (*Citrus sinensis*: AEX15511: Ye *et al.*, 2011), アサガオ InCYP707A1 (*Ipomoea nil*: AEH41592: Pawelek *et al.*, 2010), レタス LsCYP707A3 (*Lactuca sativa*: BAG12743: Sawada *et al.*, 2008), ジャガイモ StCYP707A1 (*Solanum tuberosum*: ABA55732: Destefano-Beltran *et al.*, 2006) と相同性が高く, 推定アミノ酸配列ではそれぞれ79.8%, 78.2%, 76.3%, 75.4%, 79.7%の相同性を示した.

DcCYP707A1の推定アミノ酸配列と他植物のCYP707Aのアミノ酸配列のアライメントの比較により, DcCYP707A1は他の植物のCYP707Aに特有な6つの基質結合部位と推定された領域 (SRS-1, -2, -3, -4, -5, -6), プロリンに富んだ領域, K-領域, ヘム結合領域, 芳香族領域を持っており, SRS-4には2つの保存されたスレオニン残基が, ヘム結合領域には近

位のシステインと呼ばれるヘム鉄の結合に必要なシステイン残基が含まれていた (Gotoh, 1992; Li *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011) (図3-2c).

Nelson *et al.* (2004) と Li *et al.* (2007) が報告した、シロイヌナズナ CYP85 clan (P450 ファミリータンパク質の系統樹解析によりまとめられたクラスターの一つ. CYP702, CYP707, CYP708, CYP716, CYP718, CYP721, CYP722, CYP724, CYP85, CYP87, CYP88, CYP90 で構成される) に属する P450 ファミリータンパク質群と、主な他植物の CYP707A ファミリータンパク質を含めて DcCYP707A1 の分子系統樹を作成したところ, DcCYP707A1 は双子葉植物の CYP707A のグループに分類された (図 3-3c). また DcCYP707A1 はナス目に属する植物ヒルガオ科アサガオ InCYP707A1 (*Ipomoea nil*: AEH41592: Pawelek *et al.*, 2010), ナス科ジャガイモ StCYP707A1 (*Solanum tuberosum*: ABA55732: Destefano-Beltran *et al.*, 2006) で構成されたクレードに属することが明らかとなった (図 3-3c). 以上のことから今回取得した *DcCYP707A1* の塩基配列は, *CYP707A* 遺伝子であると推定された.

DcPYR1 の推定アミノ酸数は 197 アミノ酸残基であり, 22.2 kDa の分子量を持つと推定された (表 3-2). BLAST による相同性検索の結果, カーネーション DcPYR1 は, ラッカセイ AhPIP (*Arachis hypogaea*: ACG76109: Xie *et al.*, 2008), シロイヌナズナ AtPYL8, AtPYL9 (*Arabidopsis thaliana*: AED96316: Tabata *et al.*, 2000; AEE27277: Theologis *et al.*, 2000), トウガラシ CaPIP1 (*Capsicum annuum*: AAT35532: Lee and Hwang, 2009), タルウマゴヤシ MtPYL8 (*Medicago*



*truncatula*: AES72456: Young *et al.*, 2011) と相同性が高く、推定アミノ酸配列ではそれぞれ 74.6%, 83.7%, 78.9%, 81.1%, 83.2% の相同性を示した。

DcPYR1 の推定アミノ酸配列と他植物の PYR (別称 PYL, PIP) のアミノ酸配列のアライメントの比較により、DcPYR1 は、リガンド (ABA) 結合ポケットを形成するために保存されたドメイン I, II, III, およびゲート (Gate) と掛け金 (Latch) として機能する高度に保存された  $\beta$ -ループドメインを持っており、そこには ABA との相互作用に必要なアミノ酸残基が含まれていた (Klingler *et al.*, 2010; Melcher *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2009) (図 3-2d)。

DcPYR1 と主な他植物の PYR/PYL/RCAR ファミリータンパク質に関して分子系統樹を作成したところ、DcPYR1 は Sun *et al.* (2011) の分類に基づいて Subfamily-I に属することが明らかとなった。また DcPYR1 はマメ科ダイズ GmPYL8 (*Glycine max*: XP\_003541499: reference sequence) およびタルウマゴヤシ MtPYL8 (*Medicago truncatula*: AES72456: Young *et al.*, 2011), ナス科のジャガイモ StCAPIP1L (*Solanum tuberosum*: ABB29920: Nielsen *et al.*, 2005) およびトウガラシ CaPIP1 (*Capsicum annuum*: AAT35532: Lee and Hwang, 2009) の PYR/PYL/RCAR ファミリータンパク質で構成されたクレードに属することがわかった (図 3-3d)。以上のことから今回取得した *DcPYR1* の塩基配列は、*PYR* 遺伝子であると推定された。

DcPP2C1 の推定アミノ酸数は 286 アミノ酸残基であり、31.4 kDa の分子量を持つと推定された (表 3-2)。BLAST による相同性検索の結果、カ

一ネーションDcPP2C1は、シロイヌナズナAtPP2C39, AtPP2C58 (*Arabidopsis thaliana*: AEE75637: Salanoubat *et al.*, 2000; AEE85481: Mayer *et al.*, 1999), ミヤコグサLjPP2C (*Lotus japonicus*: AAD17805: Kapranov *et al.*, 1999), トウゴマRcPP2C (*Ricinus communis*: XP\_002533085: Chan *et al.*, 2008), トマトSlPP2C (*Solanum lycopersicum*: AAS86762: Tao *et al.*, 2004) と相同性が高く, 推定アミノ酸配列ではそれぞれ68.8%, 63.4%, 72.2%, 71.8%, 70.3%の相同性を示した.

DcPP2C1 の推定アミノ酸配列と他植物のPP2Cのアミノ酸配列のアライメントの比較により, DcPP2C1 は, ABA, PYL (PYR/PYL/RCAR),  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$ イオンとの相互作用に必要なアミノ酸残基やリン酸化部位に必要なアミノ酸残基を持っていた (Melcher *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Umezawa *et al.*, 2009) (図 3-2e).

続いて多くの遺伝子が同定されているシロイヌナズナ PP2C ファミリータンパク質をベースにして, これに DcPP2C1 と主な他植物のPP2C を加えて分子系統樹を作成した. Schweighofer *et al.* (2004), Komatus *et al.* (2009) の報告例に従って分類を行ったところ, DcPP2C1 はミヤコグサ LjPP2C (*Lotus japonicus*: AAD17805: Kapranov *et al.*, 1999), シロイヌナズナ AtPP2C39, AtPP2C58 (*Arabidopsis thaliana*: AEE75637: Salanoubat *et al.*, 2000; AEE85481: Mayer *et al.*, 1999) が属するグループ F に分類された (図 3-3e). 以上のことから今回取得した DcPP2C1 の塩基配列は, PP2C 遺伝子であると推定された.

DcSnRK2.1の推定アミノ酸数は361アミノ酸残基であり, 41.5 kDaの分子量を持つと推定された. 一方, DcSnRK2.2の推定アミノ酸数は361

アミノ酸残基で、38.1 kDaの分子量を持つと推定された (表3-2)。また DcSnRK2.1とDcSnRK2.2は推定アミノ酸配列では65.8%の相同性を示した。BLASTによる相同性検索の結果、カーネーションDcSnRK2.1は、シロイヌナズナAtSnRK2.4, AtSnRK2.10 (*Arabidopsis thaliana*: AEE28667: Theologis *et al.*, 2000; AEE33751: Theologis *et al.*, 2000), ジャガイモ StSnRK2.4, StSnRK2.7 (*Solanum tuberosum*: AFR68941: Mao *et al.*, 2012; AFR68944: Mao *et al.*, 2012), トウモロコシZmSAPK6, ZmSnRK2.1, ZmSnRK2.2 (*Zea mays*: ACG33803: Alexandrov *et al.*, 2009; ACG50005: Huai *et al.*, 2008; ACG50006: Huai *et al.*, 2008) と相同性が高く、推定アミノ酸配列ではそれぞれ81.4%, 81.4%, 71.5%, 85.2%, 66.4%, 82.2%, 70.1%, 71.4%の相同性を示した。同様にDcSnRK2.2に対してはそれぞれ63.4%, 64.6%, 74.9%, 66.6%, 73.7%, 69.8%, 74.0%, 73.4%の相同性を示した。

DcSnRK2.1, DcSnRK2.2の推定アミノ酸配列と他植物のSnRK2のアミノ酸配列のアライメントの比較により、2つのDcSnRK2は、共にGXGXXG配列からなるATP結合ドメイン、脱リン酸化酵素が作用する可能性のあるリン酸化に必要なアミノ酸残基が含まれた活性化ループ(T-ループ)を持っており、C末端領域には保存されたモチーフI, アスパラギン酸/グルタミン酸等の酸性アミノ酸に富んだドメインが含まれる制御ドメインを持っていた (Huai *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011; Umezawa *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2006; Yuasa *et al.*, 2007) (図3-2f)。

またHrabak *et al.* (2003), Sun *et al.* (2011) の報告例にならって、主な他植物のSnRK1, SnRK2, SnRK3型のセリン-スレオニンタンパク質リン酸化酵素を含めてDcSnRK2.1, DcSnRK2.2の分子系統樹を作成した。そ

の結果, SnRK1, SnRK2, SnRK3の各クラスは系統図上で明確に分類され, DcSnRK2.1, DcSnRK2.2はいずれもSnRK2-classに属することが明らかになった (図3-3f). またHuai *et al.* (2008), Umezawa *et al.* (2009) らの分類法に従って更に両者を詳細に分類したところ, DcSnRK2.1はSubclass-Iに, DcSnRK2.2はSubclass-IIに属することが分かった (図3-3f). 以上のことから今回取得した2種類のDcSnRK2の塩基配列は, SnRK2遺伝子であると推定された.

DcAREBF1の推定アミノ酸数は410アミノ酸残基であり, 44.3 kDaの分子量を持つと推定された (表3-2). BLASTによる相同性検索の結果, カーネーション DcAREBF1は, シロイヌナズナ AtABF2 (*Arabidopsis thaliana*: AEE32112: Theologis *et al.*, 2000), テンサイ BvAREB1 (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*: CAP66259: Schmidt *et al.*, 2008), シロイヌナズナの近縁種ソルトクレス EsABF2 (*Eutrema salsugineum*: AFN84601: Vysotskii *et al.*, 2012), ドロノキ PlsABF2 (*Populus suaveolens*: ABF29696: Lin *et al.*, 2006), ジャガイモ StARBF (*Solanum tuberosum*: AFA37978: Liu *et al.*, 2011) と相同性が高く, 推定アミノ酸配列でそれぞれ 50.8%, 57.8%, 51.8%, 55.0%, 55.8%の相同性を示した.

DcAREBF1の推定アミノ酸配列と他植物のAREBF (別称AREB, ABF) のアミノ酸配列のアライメントの比較より, DcAREBF1は, 他の植物のAREBFで特徴的に保存された領域C1, C2, C3, C4, グルタミンに富んだ領域, 塩基性の領域, ロイシンジッパー領域を持っていた. またC1, C2, C3領域にはカルモジュリン依存タンパク質リン酸化酵素 (CDPK) の標的部位と推定されるアミノ酸配列R-X-X-S/Tおよびカゼインリン酸化

酵素II (CK II) の標的部位と推定されるアミノ酸配列S/T-X-X-E/Dの両方が含まれ, C4領域にはR-X-X-S/Tが含まれていた (Choi *et al.*, 2000; Furihata *et al.*, 2006) (図3-2g).

次に主な他植物の AREBF/ABF ファミリータンパク質および Rock (2000) の総説に記述された他植物の ABA 応答遺伝子を加えて DcAREBF1 の分子系統樹を作成した. その結果, DcAREBF1 はシロイヌナズナ AtABF1, -2, -3, -4 (*Arabidopsis thaliana*: AEE32465: Theologis *et al.*, 2000; AEE32112: Theologis *et al.*, 2000; AEE86308: Mayer *et al.*, 1999; AAF27182: Choi *et al.*, 2000) のすべてが属する双子葉植物 ABF のグループに分類された. またナデシコ科カーネーションと同様にナデシコ目に属するアカザ科テンサイ BvAREB1 (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*: CAP66259: Schmidt *et al.*, 2008) は DcAREBF1 と同じクレードに属することが明らかとなった (図 3-3g). 以上のことから今回取得した *DcAREBF1* の塩基配列は, *AREBF* 遺伝子であると推定された.

本章では ABA 生合成, 代謝, シグナル伝達と作用に関与する遺伝子の cDNA をカーネーション (*Dianthus caryophyllus* L. ‘ライトピンクバーバラ’) の花組織からクローニングし, さらに塩基配列から推定したタンパク質を他の植物の対応するタンパク質と比較して, 特徴を明らかにした. これらの cDNA をクローニングして解析した遺伝子には, ABA の生合成関連では 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 遺伝子 (*DcNCED1a* および *DcNCED1b*, *DcNCED2a*, *DcNCED2b*) および zeaxanthin epoxidase 遺伝子 (*DcZEP1*), ABA 代謝関連では ABA 8'-hydroxylase 遺伝子 (*DcCYP707A1*), ABA シグナル伝達関連では ABA

受容体遺伝子 (*DcPYR1*) と Type 2C protein phosphatase 遺伝子 (*DcPP2C1*) および protein kinase 遺伝子 (*DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*: subfamily 2 of SNF1-related serine/threonine protein kinase), ABA の作用関連では ABA 応答要素結合因子遺伝子 (*DcAREBF1*: ABA responsive element binding factor) が含まれている. カーネーションでは初めてクローニングされ構造が明らかにされたこれらの ABA 関連遺伝子群の知見は, 本研究の大きな成果であると考えられる.

表 3-1. PCR クローニングに使用したプライマー

標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>PCR クローニング (I 段階目の PCR)</b>			
<i>DeNCED1a/b</i>	NCED-F ; TTYGAYGGNGAYGGNATGGINCA	NCED-R ; TCCANGCRITCCANARRIGRAA	743/743
<i>DeNCED2a/b</i>			
<i>DeZEP1</i>	ZEP-F ; AARAI GCARIGGIAYGCNITTYTA	ZEP-R ; GCRTCRICYTCRAACCACTT	668
<i>DeCYP707A1</i>	CYP707A-F ; TYTTYTYCAYCARGGWGAYTAYCAT	CYP707A-R ; CRAAWGGCATRAANGTRTSSGGYTT	876
<i>DePYR1</i>	PYR-F ; TTYGAYCARCNCARAARTAYAAARCC	PYR-R ; ACRAARTARCANGTYTCRICYTTNG	320
<i>DePP2C</i>	PP2C-F ; AATGYGGYGAYTCHMGDGCNGTKC	PP2C-R ; ACRTCCCAHAVNCCRTCRCTHGC	284
<i>DeSnRK2.1</i>	SNRK2-F ; GTNATGGARTATGCWKCTGGHGGWGARC	SNRK2-R ; GRICYTCRAANGGRIAHGCTCCMAC	382/380
<i>DeSnRK2.2</i>			
<i>DeAREBF1</i>	AREBF-F ; AIHTGGAAYGCNGARGARAAYCARAC	AREBF-R ; TTCATCAITYTCDATNACYTGRITYTYTTCG	983
標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>PCR cloning (3'-RACE)</b>			
<i>DeNCED1a/b</i>	DeNCED1-F1 ; GGTCTCCCGTGGTTTACGAC	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	1019/1013
<i>DeNCED2a/b</i>	DeNCED2-F1 ; CCGGTTGTGTACGACAAAGAG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	813/813
<i>DeZEP1</i>	DeZEP1-F1 ; GGATAGCTCATCCCGGAAGAG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	815
<i>DeCYP707A1</i>	DeCYP707A1-F1 ; CCTTTACATTTAGGGAGGCTGTGTG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	890
<i>DePYR1</i>	DePYR1-F1 ; GTTCTGTGGCTTCATCCAGAGATC	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	590
<i>DePP2C</i>	DePP2C1-F1 ; GATCACGAGCCTGATACCCGAAAG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	517
<i>DeSnRK2.1</i>	DeSNRK2.1-F1 ; GCTGGAAAATACCCCTTTGGATGGGTAG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	1011
<i>DeSnRK2.2</i>	DeSNRK2.2-F1 ; GTCCTGTACCACGTGTGAAGATATG	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	777
<i>DeAREBF1</i>	DeAREBF1-F1 ; CTCAGCAACAGTCAACAAAATACAGC	3' RACE primer ; GAAGAAATTCGGGGCCGCAGGAA	819

633 頁に続く





表 3-1. PCR クローニングに使用したプライマー (続き)

標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>PCR クローニング (5'-RACE)</b>			
<i>DeNCED1ab</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeNCED1-R1</i> ; GAAAAATGGGTCCGGCCCAAGG	713/695
<i>DeNCED2ab</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeNCED2-R1</i> ; CCAATTTCCCGCTCTTGGACC	1342/1342
<i>DeZEP1</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeZEP1-R1</i> ; ACAATTGTCGCACCACCACC	1067
<i>DeCYP707A1</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeCYP707A1-R1</i> ; GTAGGTTTTTCATTTCTTTGGAAAGGTGTTGA	554
<i>DePYR1</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DePYR1-R1</i> ; CTGCACCACAGATCTGTGATATAAAG	430
<i>DePP2C</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DePP2C1-R1</i> ; GACAGCTGTTTGGCCTCTCCATT	583
<i>DeSnRK2.1</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeSnRK2.1-R1</i> ; GAGAGGACTTTTGAGTAGCCAAAATCAC	631
<i>DeSnRK2.2</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeSnRK2.2-R1</i> ; ATACGCTGGTGTTCACACAGCG	632
<i>DeAREBF1</i>	5' RACE primer ; CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	<i>DeAREBF1-R1</i> ; GCAAAATACCCCTCCGCTATTATTCCC	569
標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>全鎖長 cDNA の増幅</b>			
<i>DeNCED1ab</i>	<i>DeNCED1-F0</i> ; CACTTTCATACATTATCTCTCCCTTCT	<i>DeNCED1-R0</i> ; ACTGCGGTAAATACACACAGGGTAA	2219/2195
<i>DeNCED2ab</i>	<i>DeNCED2-F0</i> ; CACTTTCCTCTCAACTCTCAACACT	<i>DeNCED2-R0</i> ; GGATTTGTAGCCCTTTGATCAATACAAAAGGT	2143/2143
<i>DeZEP1</i>	<i>DeZEP1-F0</i> ; CCAACCTTCAATTATCAAAAATCCTTAA	<i>DeZEP1-R0</i> ; ATTAGTGCAACTTAATATTTTCCCTCA	2268
<i>DeCYP707A1</i>	<i>DeCYP707A1-F0</i> ; CAFTTACACCTAAATAATCTAGATACTC	<i>DeCYP707A1-R0</i> ; CTCATTTCCATTTCCAGTACCTTACCGG	1967
<i>DePYR1</i>	<i>DePYR1-F0</i> ; AAGAGATGAGGCTCAGCTCACG	<i>DePYR1-R0</i> ; GATACCGACGAATACTAATTTACACGACTC	1176
<i>DePP2C</i>	<i>DePP2C1-F0</i> ; AAATTAGTTCTCTCTTTTGGTTTCCTATC	<i>DePP2C1-R0</i> ; CTGCAAGGTAAAAAGCGTTTCAAAAAGACG	1104
<i>DeSnRK2.1</i>	<i>DeSnRK2.1-F0</i> ; CAATCTATCTTTTGACCTCTACACAC	<i>DeSnRK2.1-R0</i> ; CATAGTACGTAGTAGTACTTAGTAGTAG	1565
<i>DeSnRK2.2</i>	<i>DeSnRK2.2-F0</i> ; TATCGTCTATACCATACTCTACGTCTCT	<i>DeSnRK2.2-R0</i> ; GGCAAAAATGCCACGATTTTCGAGG	1314
<i>DeAREBF1</i>	<i>DeAREBF1-F0</i> ; CATTGTCATTAACAACCAAAAACACTCC	<i>DeAREBF1-R0</i> ; GTCCTCGGAAGACTGACGTTTACAAG	1739



表 3-2. ‘ライトピンクパーバラ’ から単離した ABA 関連遺伝子の cDNA と推定タンパク質の性質

遺伝子名	DDBJ acc. no.	cDNA の塩基数 (bp)			タンパク質		
		全鎖長	5'-UTR	ORF	3'-UTR	アミノ酸 残基数 (aa)	分子量 (kDa)
<i>DcNCED1a</i>	AB750605	2219	101	1779	339	592	65.5
<i>DcNCED1b</i>	AB750606	2195	101	1761	333	586	64.9
<i>DcNCED2a</i>	AB750607	2143	122	1770	251	589	65.1
<i>DcNCED2b</i>	AB750608	2143	122	1770	251	589	65.2
<i>DcZEPI</i>	AB750609	2268	54	1995	219	664	72.6
<i>DcCYP707A1</i>	AB750610	1967	35	1401	531	466	53.0
<i>DcPYR1</i>	AB750611	1176	211	594	371	197	22.2
<i>DcPP2C1</i>	AB750612	1104	86	861	157	286	31.4
<i>DcSnRK2.1</i>	AB750613	1565	180	1086	299	361	41.5
<i>DcSnRK2.2</i>	AB750614	1314	137	1008	169	335	38.1
<i>DcAREBF1</i>	AB750615	1739	271	1233	235	410	44.3



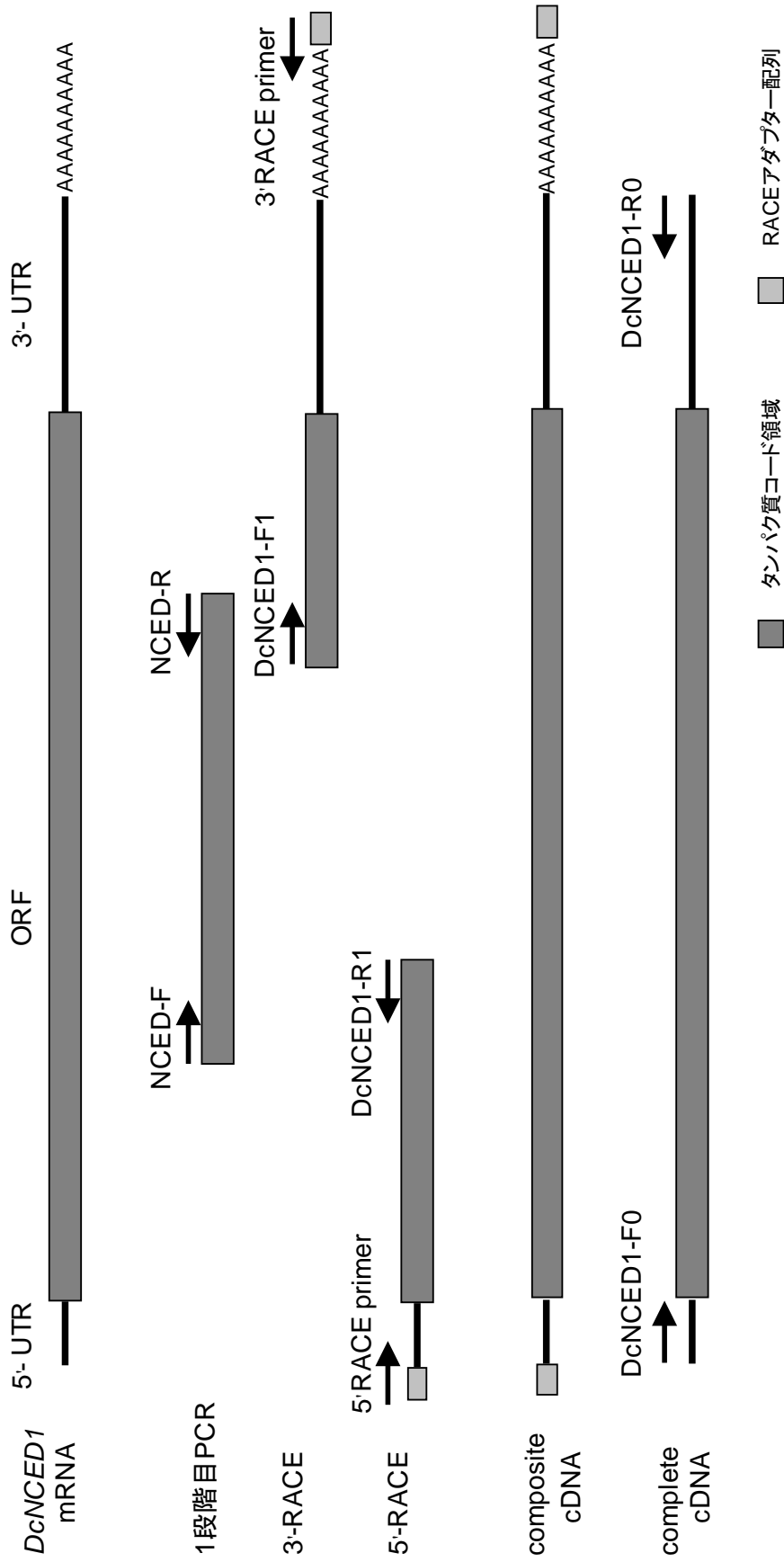


図 3-1. *DcNCED1* の全鎖長 cDNA 配列決定の概略. total RNA を鑄型にアダプター配列を付加した cDNA ライブラリーを作製し, それぞれのプライマー対を用いて cDNA 部分断片を取得した. 得られた 3 つの部分断片を再構成し, composite cDNA 配列を作製した. 最後は 5-UTR, 3-UTR 両末端に設定したプライマー対を用いて全鎖長 cDNA を増幅した.



DcNCED1a MA FTT ..... QLPDLDSPALSTPTTTTTHHRRHPITVYKKNNP ..... WNPLO 83  
 DcNCED1b ..... D ..... 100  
 DcNCED2a SIK ..... TR.NGLGRKK.HKLS..RL.SPDQK...VQRASIFP.GDHL ..... 77  
 DcNCED2b SIK ..... SN.TSTTV.RS.IQSD...TR.NGLGRKK.HKLS..RL.SPDQK...VQRASIFP.GDHL ..... 79  
 GINCED2 DCAY..ANTSSWLKPKLS..SQRDLAS...NLSFN...N.GK..RAQKNINCSLQTPS..NF.TG...PPS...LTSAA.YQTLTPTPTPSAPKL.L. 94  
 InNCED1 TNA...TTTTNPWWKPKLS..SLRRM.C.WNHL.LSPQ...KP...SQELR.KINGSAQSV..HF.KG.SAPP.VP.SNSTAITT.SCP.EEAKPKAOCFSGG...LV. 104  
 SINCED1 A...TSHATNTWIKTKLMPSSKEF.FASN.I.LLKN...Q...RQSLNINSSLOAP.I..HF.KG.SNYG.PKNN...T.SHP.QE.NNSSSTSK...LV. 95  
 SINCED1 A...TSHATNTWINPKLMPSSKEF.FASN.I.LLKN...G...RKSLNINSSLOAP.I..HF.KG.SNYG.PK.S...T.SHP.IQE.NNSSS...ISK...LV. 93

DcNCED1a KAAAALDAVENALTAFTKSPLPKTSPPAVQISGNFAPVTEHPVQHNLVPSGVIPACIKGAYVRNGANPLYAPSAGHHLFDGDGMLHTVNFQDGSASYACRFETNRLVQERALGRP I 203  
 DcNCED1b ..... T ..... 240  
 DcNCED2a L...A.QT.NSW.SST...S.VI...P.T...T.Q.K...H.L.L...H.H...E...E... 199  
 DcNCED2b L...A.QT.NSW.SST...S.VI...P.T...T.Q.K...H.L.L...H.H...E...E... 199  
 GINCED2 R..SM.M...S.N.R.L.H...A.K.A...P.Q.R.R...T.K.DS.Q...FE.A...F...I.A.Q.E.N...S...Q...V...L 213  
 InNCED1 .....GK..EH.LEH..R.A.R...A...P.Q.C.A...E.N.V...HFE.V...F...V.A.Q.K.N.A...Q...K...V 223  
 SINCED1 M...S...KH.LEH..A.R...P.N.COS...T.K.K.VQ.V...FE.T...F...V.A.Q.K.N...E...K...V 214  
 SINCED1 M...G...KH.LEH..A.R...P.N.COS...T.K.K.VQ.V...FE.T...F...V.A.Q.K.N...E...K...V 212

α-ヘリックス

DcNCED1a FPKAIGELHGHSGIGRLALFYTRSLGLLDHNSGIGVANAGVYVFNDRLLAMSEDDIPYHVKVTPSGDLVTEGRYDFDQGLDSTMIAPKVDPIVTEGELFALSVDVIKKPKYKFWFNADG 323  
 DcNCED1b ..... S ..... 360  
 DcNCED2a S...C.L.M.L...DK...F.G...V.Q.R.ST.K...F.H.K.S...I.S...G...RV.SE. 319  
 DcNCED2b S...C.L.M.L...DK...F.G...V.Q.R.ST.K...F.H.K.S...I.S...G...RV.SE. 319  
 GINCED2 .....A.G...A.G.F...TQ.L...L.N...L...S...K...K...L.S...Q...R.SQN. 333  
 InNCED1 .....A.M...A.G.F...T...L...N...L...S...K...K...L.S...Q...R.SKT. 343  
 SINCED1 .....A.M...A.G.F...V...K.T...L...N...L...S...K...K...L.S...Q...R.SKN. 334  
 SINCED1 .....A.M...A.G.F...I...R.T...L...N...L...N...L...S...K...K...L.S...Q...R.SKN. 332

(71頁に続く)

\* Fe<sup>2+</sup>が配位する保存されたHis

□ CCDで保存された領域

図 3-2a. DcNCED1a/b, DcNCED2a/bと他植物のNCEDファミリータンパク質の推定アミノ酸配列アライメント。CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイファンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2aに示した。





(69頁の続き)

```

DcNCE1a  SKAPDVDIELDTPMTMMIFDFAITENC* | IPDSQVYFKLQEMIRGGSPVVDKFKTSRFGILPKYARNSEDMQWIEYVDCFCFHLWNAWEPEPDEIVVIGSCTMPADSIFNECDE| NLSSV 442
DcNCE1b  V.SA.V.E.A.V.V.G..MH..N..E.ADSIE..E..N..E..N..S.L..S..KI 436
DcNCE2a  V.SA.V.E.A.V.V.G..MH..N..E.ADSIE..E..N..E..N..S.L..S..KI 438
DcNCE2b  V.SA.V.E.A.V.V.G..MH..N..E.ADSIE..E..N..E..N..S.L..S..KI 438
GINCED2  E.SE..PVSE..F.V.Q..MS..H.N.V..V.D..KDASGK..V..S..SE.EG.E 453
INCEDE1  K.S..E.PVPD..RF.V.Q..IS..N.V..V.N..KDASE.K.V..P..S..G.K..462
SINCEDE1 E.SN..E.PVED..F.V.Q..MS..N.V..V.D..KDGSL.K.V..A..P..G.K..453
SINCEDE1 E.SN..E.PVED..F.V.Q..MS..N.V..V.D..KDGSL.K.V..P..G.K..451

```

\*     \*     \*

```

DcNCE1a  LSEIRLNKRTGKSTREILKESD| QMNLEAGMVRNMLGRKTRYAYLAIAEPWPKVSGFAKVDFLTGNTKFI YGDNKYGGEPLFLP | REDGTSEDDGHILTFVHDEDKWESELQIVNAA 560
DcNCE1b  T..T..SG..K..K..K..E.S.YF..GE..E.S.YF..GE..A..KN.T..V 554
DcNCE2a  E..T..SG..K..K..K..E.S.YF..GE..E.S.YF..GE..A..KN.T..V 557
DcNCE2b  M.E..A.SSK..V..I..S.E.K.F.E..NDSNSEV..A..N.KT.K..R..M 572
GINCED2  L..L..KPIONPSEEV..K..E..K..RNS.SDA.Y.A..KTK..R..M 582
INCEDE1  L..L..KSIENPEEV..K..E..E..N.E.E..RDPNSKE..Y..A..KE.K..M 573
SINCEDE1 L..L..KAIENPEEV..K..E..E..Q..E..E..RDPNSKE..Y..A..KE.N..M 571

```

```

DcNCE1a  TMEVEALVQLPSRVPYGFHGTIFAANDLKTQA 592
DcNCE1b  DLV.T..TDQ..L..V..586
DcNCE2a  DLV.T..TDQ..L..V..589
DcNCE2b  L.E.T.K..MS.K.EN..604
GINCED2  LHL.T.K..T.T.S.V 615
INCEDE1  SKKL.T.K..N..AN..605
SINCEDE1 LKL.T.K..N..AN..603

```

\*     \*

- \* Fe<sup>2+</sup>が配位する保存されたHis
- CCDで保存された領域

図 3-2a. DcNCE1a/b, DcNCE2a/bと他植物のNCEDファミリータンパク質の推定アミノ酸配列アライメント。CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイファンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2aに示した。



```

DcZEP1 MASTLIYSTLTPSS-----KNYHENHYYN-----NNNTARSSKFKLMVKAAATPAAASSTTPTTTTSTATKAVEVEERLPPPPSRQLRVVVVAGGGIGGLVLALA 99
CmZEP  ..TSHV.C. ....TITLHSKTNLPVEFFSSI.YK.HHHL..KSKG.SF..LTNYG.IK.LVTETPPPK.EQS...GGEKE...KKI..L...F... 92
LsZEP1 ..NCNVFC.SIN..TATLHSHKTHLP.IEFLHSI..SK.HHGF..RSGSSSSSLF..LGVSSNVK.VL.ESPPOAER...GGEK...KNV..L...F... 97
SIZE  ..V.FYTSVH...TSVLSRKQLPLLIS.DFSAEL.HSLPCRSLG.HINKV.GV...VK...I..E.PV.P.EK.DSGANGDL.VPQ...KK.K.L...F... 103
VZEP  ..Y...VFY.SVH...TSVFSRKQLPLLIS.DFPAEL.HSIPCRSLE.GHIKKV.GV...VK...L.E.PV.P.EKDSGVNGDL.VPQ...KK.K.L...F... 103
VZEP  ..A.VFY.SVQ...IFSRTHIPIPI.S.DSF.EFGHSINYKHYFRSNPCGQ...RVAQVK..L.E.TPAPSAPS...LPS..IL...KRV..IL... 94

```

ADP 結合領域

```

DcZEP1 AKKGFVEIVFEKDMAIRGEGOYRGP.IQISNALAALEAIDMDVAEEVMAAGCVTDGDRINGLVDVSGYGNWYIKFDFTTPAVEKGLPVTRVISRMTLQQLAKAVGEDILVNDSNVDFK 219
CmZEP  ..R...V...R.L.L...FG.D.K.I.Q...L.D.K.I.Q...R...R...K...D...DE...L.G...E 212
LsZEP1 ..R...D.L.R.L.L...L...DI.N.I.Q...L...DI.N.I.Q...C...C...R...R...E...M.E...E 217
SIZE  ..D.L.R.L.L...L...DI.N.I.Q...L...DI.N.I.Q...C...C...R...R...E...M.E...E 223
VZEP  ..D.V...F...V.E...R...I...D.V...A.R...R...R...M.G...E 214

```

ADP 結合領域

```

DcZEP1 DHGDKVTVTLNENGTTEYEGDLLVGGADGIWSKVRKNI.FGLTEPVYSGYTCYTG.IADFPADIDSVGRVYFLGHKQYFVSSDVGSGGKQWYAFHNESPGGVDGPNKQKQLRLLIFGGWCDNVV 339
CmZEP  ..S.V...S.V...ERF...PKDVT...I.P.N...I.P.N...PA.S.K...E... 332
LsZEP1 ..D.E.S...S.ERF...PKDVT...I.P.T...T...PA.S.K...E... 337
SIZE  ..D.E.S...S.ERF...PKDVT...I.P.T...T...Y.PA.A.A...E.K...I 343
VZEP  ..D.E.S...V...ERF...PKDVT...R...T...PS.AT...T...Y.PA.A.A...E.K...I 343
VZEP  ..D.N...I...QR...I...S...PK.AT...I...A...Y.PA...E...K...I 334

```

モノキシングナーゼドメイン

(75頁に続く)

..... リポカイン保存モチーフ

図 3-2b. DcZEP1と他植物のZEPファミリータンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント. CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイファンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2bに示した。



```

380         DL IQATDEDA I LRRDI YDRT P S F N W G K G R V T L L G D S I H A M Q P N M G O G G C M A I E D S Y Q L A L D L E K A W N K S V E S G T P V D V V S S L R S Y E G S R K L R V A V I H G M A R M A A I M A S T Y K A Y L G V G L G P 459
CmZEP  . . . . . F I . K . T . . . . . V . . . . . L . . . . . E . D . . . . . I O . T K . A . I . I O . . . . . R . N A . R . . . . . L . . . . . 460
LsZEP1  . . . . . F . . . . . V . . . . . V . . . . . E . D . . . . . S R . I . . . . . A R . I A T . . . . . R . D A . R . . . . . L . . . . . 462
SIZE    . . . . . P . T . S . R . . . . . V . . . . . L . . . . . E . . . . . C S R . A . S . . . . . I I . . . . . S A . . . . . G . . . . . 457
SIZEP1  . . . . . P . T . S . R . . . . . V . . . . . L . . . . . E . . . . . C S R . A . S . . . . . I I . . . . . S A . . . . . G . . . . . 463
VwZEP   . . . . . L . . . . . E . . . . . T . . . . . R . . . . . V . . . . . M E . D . . . . . E Q . I K . . . . . I . . . . . C . K . . . . . K A . R I . . . . . 464

```

モノキシングナーゼドメイン

FAD 結合ドメイン

```

500         L S F L T K F R I P H P G R V G G R V F I S O A M P L M L S W I L G G N S E R L E G R T P Q C R L S E R A S T Q L Q R W F E D D D A L E R A I S G E W F L F P L E K N S Q T S E S I S L N R N G D K Q Y I V G S V S H D D F P G T S I V L N S P 579
CmZEP  . . . . . N . . . . . F . . . . . D I G . . . . . V . . . . . G S K . . . . . P Q S . . . . . T D K . N D E . . . . . N . . . . . R . . . . . L T . . . . . L . I G S S N A D . A P V . . . . . S . D E K M P C . . . . . P . T S I . . . . . N . . . . . I S . . . . . 572
LsZEP1  . . . . . N . . . . . F . . . . . T I G . . . . . V . . . . . G A N . . . . . P Q . . . . . T D K . N D E . . . . . N . . . . . R . . . . . I . . . . . I L G . . . . . L . V G S Q N V G . D P . . . . . S . D E K . P C . . . . . P . T S I . . . . . N . . . . . I S . . . . . 577
SIZE    . . . . . Q Y . . . . . D L G . . . . . V . . . . . G D K . . . . . I K H . . . . . K . N D . . . . . R K . . . . . T D A . . . . . L . L . A G N G . S G L . A . V . S . D E . V P C T . . . . . I . . . . . T N I . . . . . K . . . . . V . . . . . P L . . . . . 583
SIZEP1  . . . . . Q Y . . . . . D L G . . . . . V . . . . . G D K . . . . . I H . . . . . K . N D . . . . . R K . . . . . T D A . . . . . L . L . A G N G T S G L . A . V . S . D E . V P C T . . . . . I . . . . . T N I . . . . . K . . . . . V . . . . . P L . . . . . 583
VwZEP   . . . . . L . . . . . F . . . . . D I . . . . . V . . . . . S K . . . . . P . S . . . . . D K . . . . . D . . . . . R . . . . . G . . . . . L . S G E . . . . . S G L Q P . C . S K D E N . P C . I . . . . . T . . . . . I . . . . . T . . . . . I P . . . . . 572

```

FHAドメイン

```

620         K V S V K H A V I S C K N G L F F L T D L G S E H G T W I T D N E G R R Y R L P P N F P S R F H P S D V L E F G P D R K V A F R V K V V K T D V N M T E . . . . . E R N A A L O T A 664
CmZEP  . . . . . E I . K L . . . . . R . . . . . D . A . Y V . . . . . R . . . . . Y . . . . . D . . . . . V . . . . . A . . . . . I R S O P K I . . . . . E G G D R . . . . . V . . . . . A V . . . . . 658
LsZEP1  . . . . . Q . . . . . E M . . . . . R . . . . . D . A . V . . . . . R . . . . . Y . . . . . D . . . . . V . . . . . A . . . . . M R E P P K . S K E G . N R . . . . . I . . . . . V . . . . . 663
SIZE    . . . . . Q . . . . . E M . . . . . R . . . . . D . A . V . . . . . Q . . . . . T S . . . . . T . . . . . T . . . . . S . K . A . . . . . A M . F P L K T S . R K . E R E . V E A . . . . . 669
SIZEP1  . . . . . Q . . . . . E M . . . . . R . . . . . D . A . V . . . . . Q . . . . . T S . . . . . T . . . . . T . . . . . I . . . . . S . K . A . . . . . A M . F P P K T . R K . E R E . V G A . . . . . 669
VwZEP   . . . . . K M . . . . . R . . . . . D . A . . . . . Q . . . . . V . . . . . Q . V S . . . . . T . . . . . T . . . . . E . I D . . . . . S E K . A S . . . . . R . P P D N A A K D . E S K L F . A V . . . . . 658

```

FHA (Forkhead-関連)ドメイン

■ ■ ■ ■ ■ リポカイン保存モチーフ

図 3-2b. DcZEP1と他植物のZEPファミリータンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント. CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った. 共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイフンで示した. 保存されたアミノ酸残基, モチーフ, ドメインは直接図に示した. アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2bに示した.



```

DcCYP707A1  MV I I VV A L M -- V I G V I F I V H R V L K S P A F A Y -- R N R -- K L P P G S L G Y P Y I G E T F Q L Y S E N P N F F S S K E K K Y P V F K T H I L G C P C V M I S S P E A A K F V L S T R S N L F K P T F P A S K E R M L 112
AicYP707A3  . D F S G L F . - - - - T L S A A A L F . C L L R . I A G V R . S S S T . T M . - - - - V . - - - - Q D . - - - - A A . O R R . S . - - - - V . - - - - V . K . H . - - - - V . K . H . - - - - V . K . H . 113
CbcYP707A1  . D F T F L F L L P F A S I C F I L C - - F Y L F L K . I S S N G . - - - - N . - - - - E . Q . - - - - A . V . R . S I . - - - - V . R . - - - - A . L . V . K . H . - - - - V . A H . - - - - V . A H . 113
LscYP707A3  . E L . T F V C S S F - - - - F I L L S T L F L F A S . F T S A A . R K . - - - - N . - - - - T . W . - - - - T . W . - - - - V . R . - - - - A . L . V . K . H . - - - - V . K . H . - - - - V . K . H . 114
IncYP707A1  . E F . M . M . - - - - - F L L A T I F F L K K W . C F G S - - - - K - - - - G . - - - - T . W . - - - - T . W . - - - - Q D . - - - - A . V . S I . - - - - V . V . K A H . - - - - V . V . K A H . 107
SicYP707A1  . E F V S M L C L F T F I S F T L L L I . S I F . F L . . S . - - - - K - - - - T . L . - - - - L . - - - - L . - - - - Q . - - - - Y . - - - - Y . - - - - Q . V . V . A . - - - - Q . V . V . A . 113

```

### Prorich 領域

```

DcCYP707A1  G K G Q I F F H Q N D Y H L K R L K V L K A F M P D A I R N F V S N I D S I A S R T L D S F D G S - L I N T F Q E M K T Y T F N V A L L S I L G K D E V Y R E D L K R C Y Y I L E K G Y N S M P I N L P G T L F N K S M K A R K E L A Q I V 231
AicYP707A3  . G . S . - - - - . M . P H . E . Q E S . N . W . T Q . - - - - Y . - - - - Y . - - - - Y . - - - - H . A . - - - - H . A . - - - - L . 232
CbcYP707A1  . G . S . - - - - . E . N K I I P D E C . K D S . Q . W G . R . - - - - Y . - - - - I . F . - - - - L . - - - - H . - - - - H . - - - - H . 234
LscYP707A3  . G . S . - - - - . R . T H E S . K I I P D E . V Q S . R G W E D Q Q . - - - - F . - - - - F . - - - - L . - - - - R . - - - - R . - - - - L . 234
IncYP707A1  . G . F . - - - - . R . L K . A . Q D . K H . V Q . W E . R . - - - - R . - - - - I . - - - - T . - - - - V . - - - - V . - - - - H . A . - - - - H . A . 226
SicYP707A1  . G . A . - - - - . Q . K . - - - - . S . I I P D E . - - - - I T S . E . E . R . - - - - Y . - - - - Y . - - - - I . F . - - - - F L . - - - - E . K . - - - - K . - - - - K . - - - - 232

```

### SRS-1

保存されたThr



### SRS-2

```

DcCYP707A1  A Q I I S T R R E M N D D H - - - - G D L L A S F M G D K E G L T D E Q I A D N V I G V I F A A R D T T A S V L T W I F K F L V D N P T V L Q S V T E E Q E A I I K E K E G K S E E R G L N W S D T K K M P Y T N K V I Q E T L R V A S I L S F 349
AicYP707A3  . N . L . K . Q . P S S . - - - - T . G . E . A . - - - - I . - - - - L . Y . A . - - - - E A . - - - - M . R . D . K . - - - - G E S . T . E . - - - - L . Y R . - - - - A . T . 345
CbcYP707A1  . K . L . L . - - - - Q . K L . - - - - N . G . - - - - G . - - - - V . Y . G E . G . A . - - - - A . - - - - G . E V . S . A . A . - - - - I . S R . - - - - A . 348
LscYP707A3  . K . L . L . - - - - K . K E E . - - - - K . E E . - - - - E . - - - - V . Y . A E . - - - - A . - - - - E . M . G . D . - - - - D K A . T . A . - - - - I . S R . - - - - A . 347
IncYP707A1  . G E . L . I . - - - - S T M K N D S P N . V G . - - - - N . - - - - W L . Y . A E . - - - - S . E A . - - - - L . G . - - - - G Q V . C . E H . - - - - L . S R . - - - - A . 341
SicYP707A1  . K . - - - - - K I . - - - - S . - - - - G . - - - - L . Y . G E . S . A . - - - - A . - - - - N . M R T . - - - - V N D . - - - - K V . - - - - Q . R Q . - - - - M . T R . - - - - A . 348

```

### SRS-3

### SRS-4

### K-領域 SRS-5

### 近位のCys

```

DcCYP707A1  T F R E A V E D V E Y E G Y L I P K G W K V L P L F R N I H H S P L N F E D P E K F D P S R F E V A P K P N T F L P F G N G I H S C P G N E L A K M E I L V M I H H L T T K Y R W S I V G P Q N E I Q Y G P F A L P Q N G L P I K I S S K 466
AicYP707A3  . - - - - - N A D I . S . G . - - - - M . S . - - - - L . S . L . - - - - L . S . L . - - - - S D G . - - - - A . E R . P . - - - - A . 463
CbcYP707A1  . - - - - - E I . P . - - - - S . - - - - T . - - - - L . L . - - - - L . L . - - - - T V . - - - - T N T G . - - - - M . - - - - R . A Q . S K D . 468
LscYP707A3  . - - - - - F . - - - - T E . - - - - M . - - - - M . - - - - T . - - - - L . L . M . - - - - M . - - - - H . V . - - - - R . F P . K Q . 466
IncYP707A1  . - - - - - F . - - - - E . - - - - M . S . A . - - - - L . I L V . - - - - M . - - - - M . - - - - G . - - - - R . L . E T P . 461
SicYP707A1  . - - - - - F . - - - - D . P E . - - - - S . - - - - M . - - - - V . - - - - L . - - - - I L V . - - - - M . - - - - M . - - - - G . - - - - L . L . T S . 467

```

### 芳香族領域

### へム結合領域

```

DcCYP707A1  - - - - - 466
AicYP707A3  - - - - - 463
CbcYP707A1  K S E I T I H N M I 477
LscYP707A3  - - - - - L 467
IncYP707A1  S T L I - - - - Q 466
SicYP707A1  - - - - - S T 469

```

### SRS-6

SRS: 基質結合部位 (推定)

図 3-2c. DcCYP707A1 と他植物の CYP707A フAMILY タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。CLUSTAL-W プログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイフンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表 2c に示した。





DcPYR1	MMMMRMNCNGCGG	--GGVED	EYVRRHHKHV	IADNQCTSV	LKH	I	KAPVPLVWS	LVRRFDQP	QKYKPF	I	SRCVVQGNLE	IGSLREV	VDYKSG	LPATTTSTERLE	LELLDDNEH	VLS	IR	IVGG	116					
AhPIP	-- --	NGSCGG	G...EAY	.AI	A	Q	I...R	EPR	...A	V	R	...H	...V	IM	D	G	...V	N	...Q	E	I	G	...117	
AiPYL08	EA	NGIEN	LTN	--P	NQ	R	...F	ELV	...S	T	V	...N	...HI	...K	IM	...TV	...R	...R	...113					
CaPIP1	NA	NGV	--FS	--K	I	K	L	QPKE	S	F	V	...R	...H	...V	IA	D	...V	IA	D	...E	I	G	...115	
MiPYL8	EK	NGTEN	VFN	--S	T	M	...I	NQQPE	S	A	V	...R	...V	...R	...V	...R	...V	...R	...V	...R	...V	...R	...V	...108

Gate

保存ドメイン I																	
保存ドメイン II																	

DcPYR1	DHRLK	NYSSV	VS	SLH	PEI	I	EGRPG	TMV	I	ESFV	VDVPE	GN	TKDET	CYF	VEAL	IKCN	LKSLAD	VSE	SERS	AVRDR	TEP	I	DRMP	...I	E	I	197	
AhPIP	R	...I	ITV	...V	...D	...X	...R	...S	...M	...Q	...D	...NQ	...D	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	193
AiPYL08	R	...I	ITV	...V	...D	...X	...R	...S	...M	...Q	...D	...NQ	...D	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	188
CaPIP1	R	...I	ITV	...V	...D	...X	...R	...S	...M	...Q	...D	...NQ	...D	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	187
MiPYL8	R	...I	ITV	...V	...D	...X	...R	...S	...M	...Q	...D	...NQ	...D	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	...RV	185

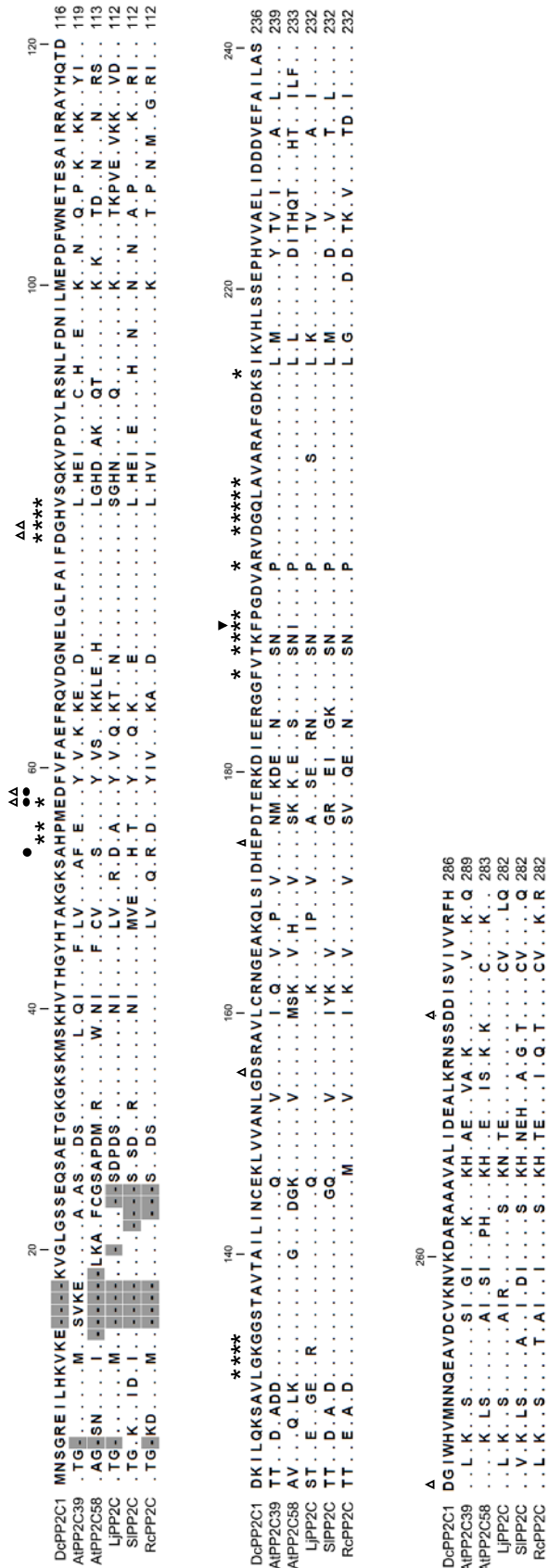
Latch

保存ドメイン I																	
保存ドメイン II																	
保存ドメイン III																	

▼ ABAとの相互作用に関わるアミノ酸残基

図 3-2d. DcPYR1と他植物のPYR/PYL/RCARファミリータンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント. CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイフンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2dに示した。





- \* PYR/PYL/RCARとの相互作用に関わるアミノ酸残基
- リン酸化に関わるアミノ酸残基
- △ Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>との相互作用に関わるアミノ酸残基
- ▼ ABAとの相互作用に関わるアミノ酸残基

図 3-2e. DcPP2C1と他植物のPP2Cファミリータンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。CLUSTAL-Wプログラムを使用し、アミノ酸配列に基づいたアライメントを行った。共通するアミノ酸残基はドットで示し、ギャップは灰色地にハイフンで示した。保存されたアミノ酸残基、モチーフ、ドメインは直接図に示した。アライメントの作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表2eに示した。



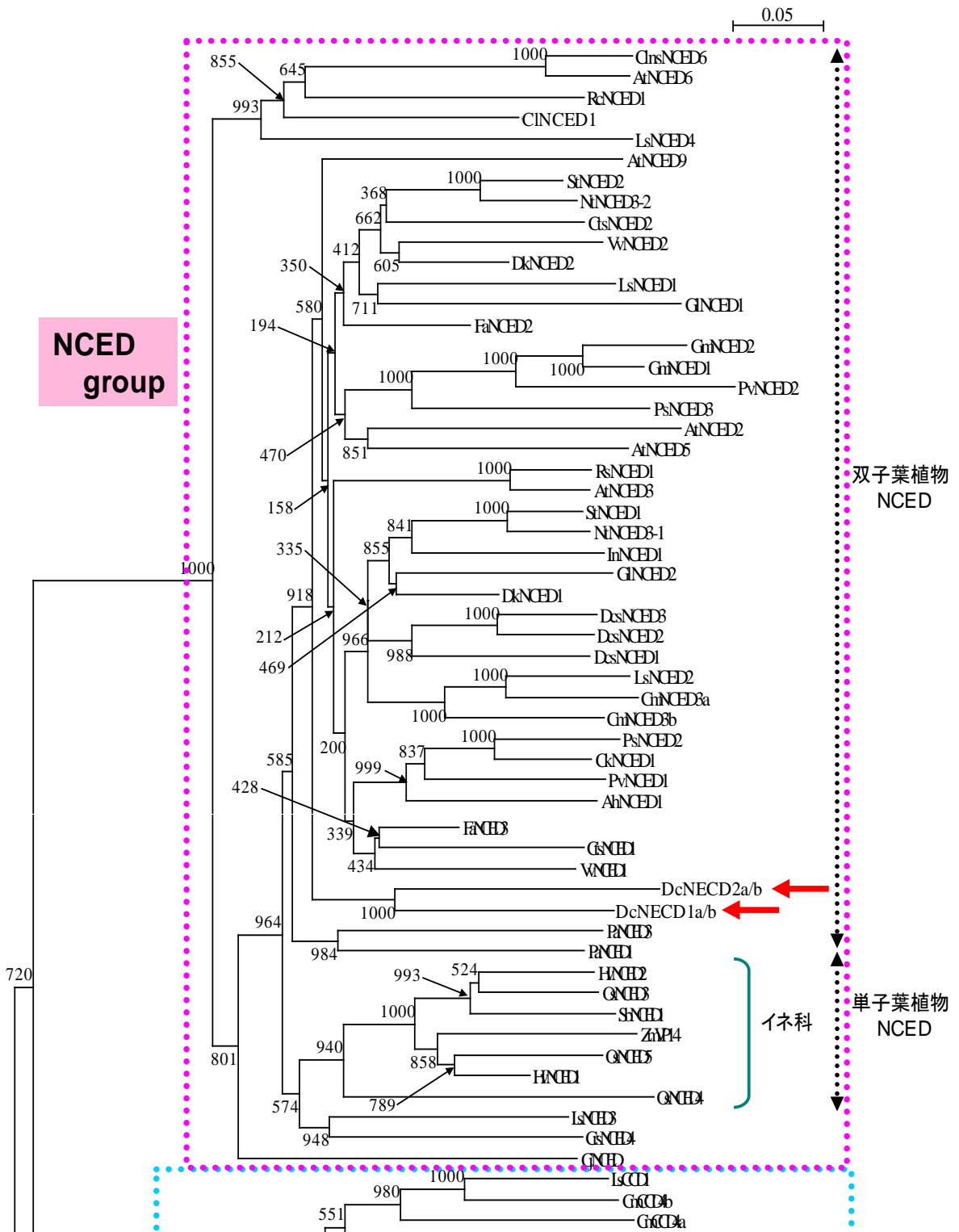












(89頁に続く)

図 3-3a. DcNCED1a/b, DcNCED2a/bと他植物のNCED, CCDファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3aに示した.



(87頁の続き)

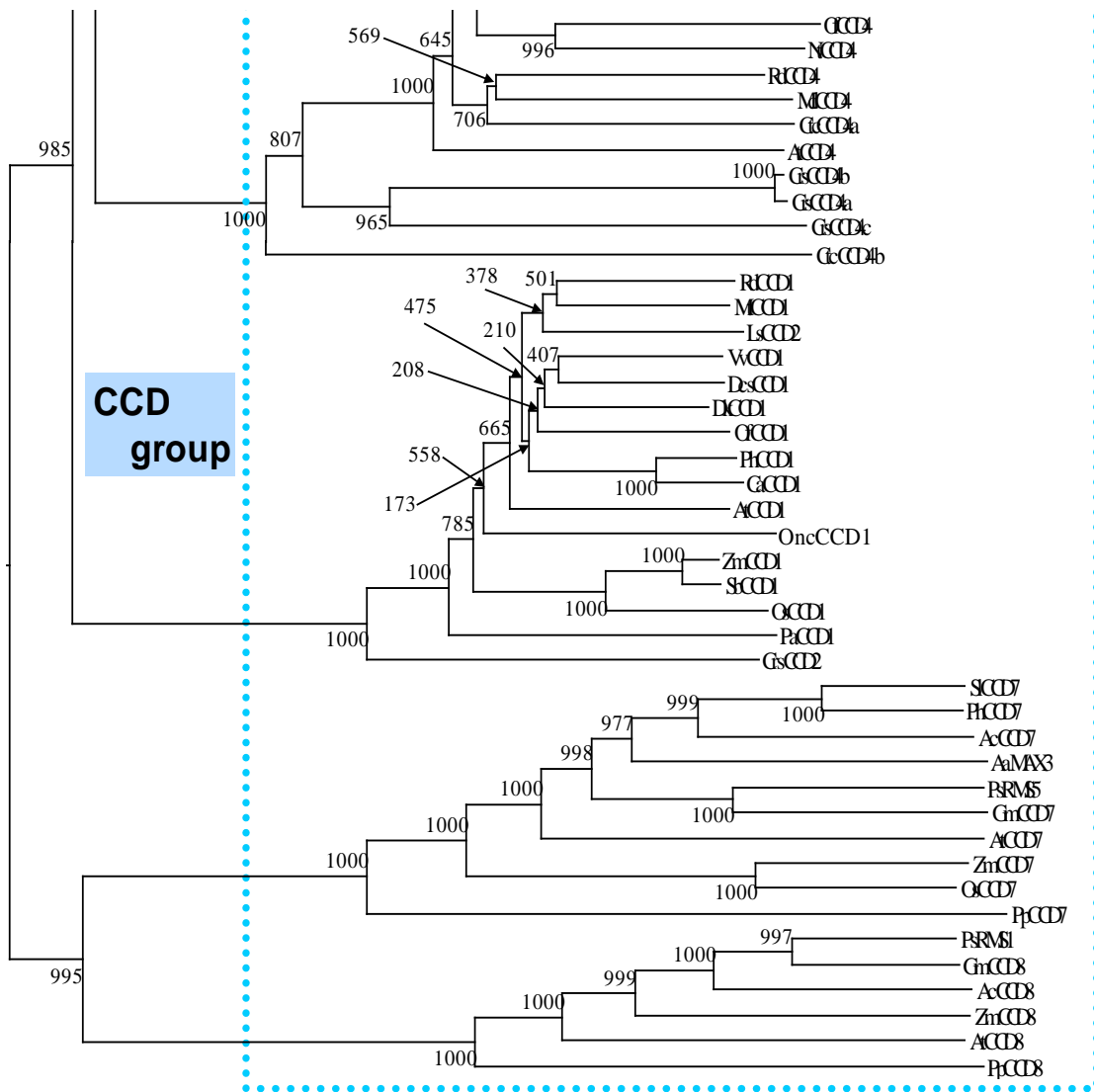


図 3-3a. DcNCED1a/b, DcNCED2a/b と他植物の NCED, CCD ファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-W プログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は 1000 反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表 3a に示した.



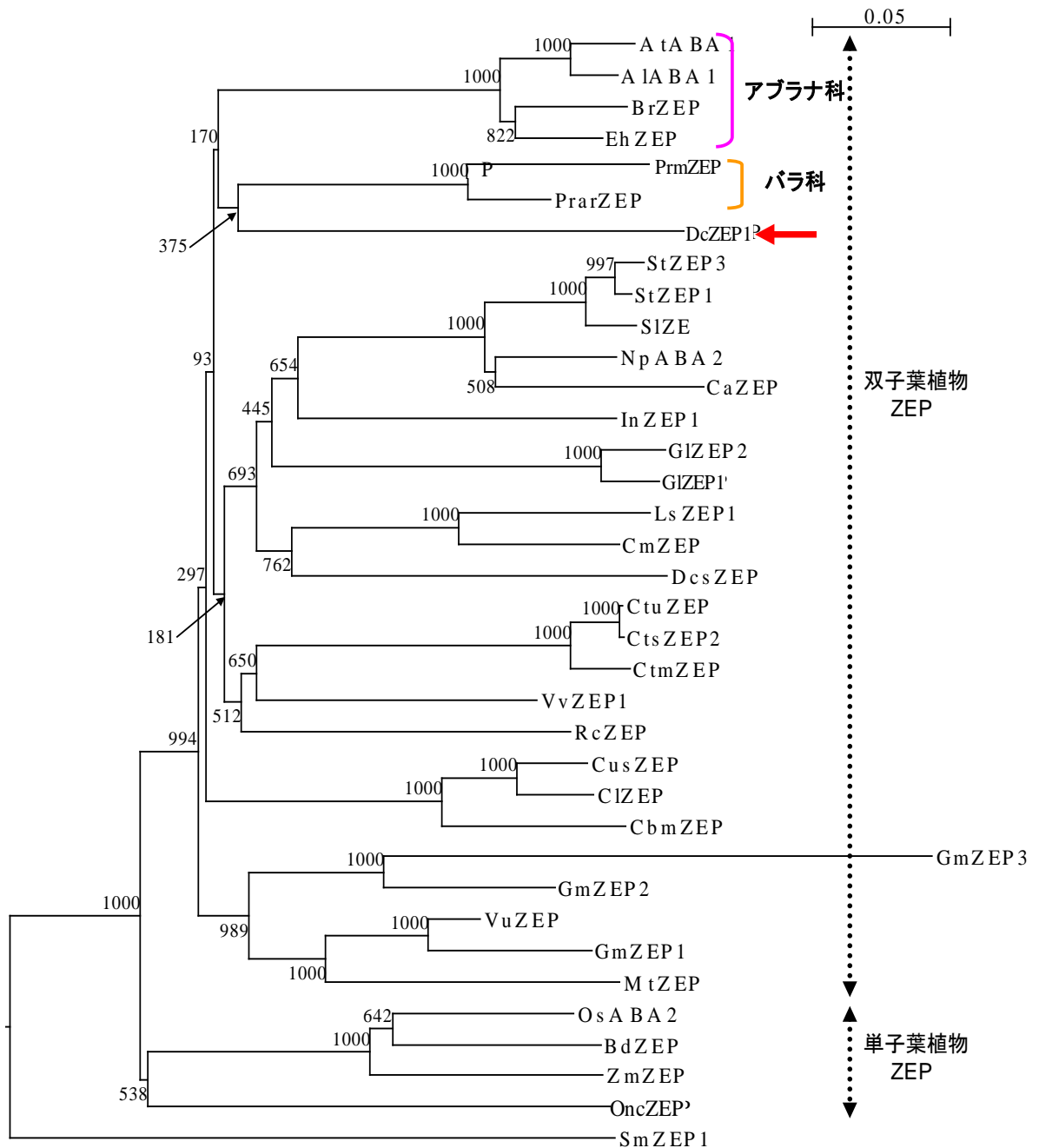
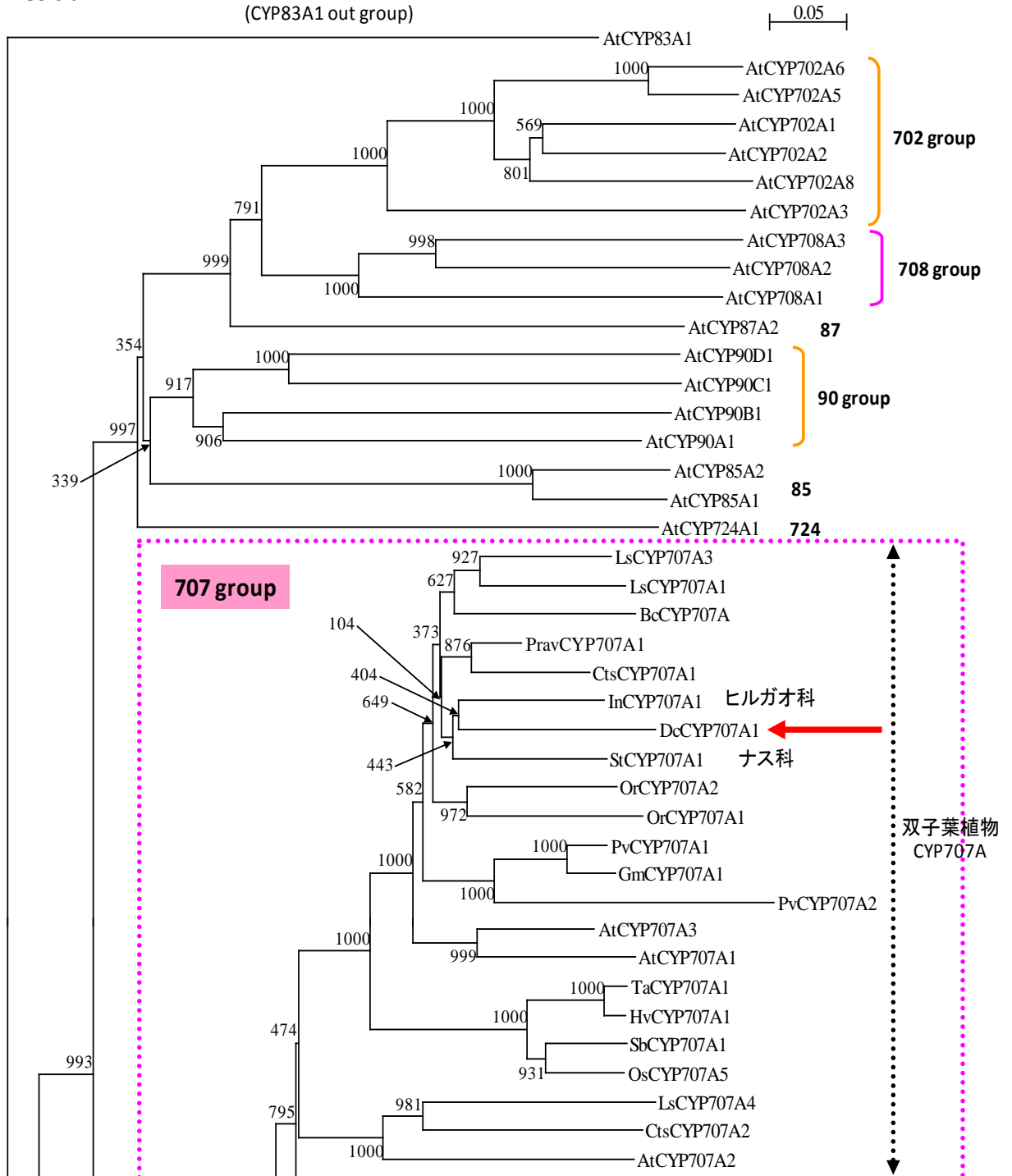


図 3-3b. DcZEP1と他植物のZEPファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3bに示した.



CYP85 clan



(95頁に続く)

図 3-3c. DcCYP707A1と他植物のCYP707Aファミリータンパク質およびシロイヌナズナ CYP85 clanに属するP450ファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブートストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3cに示した.





(93頁の続き)

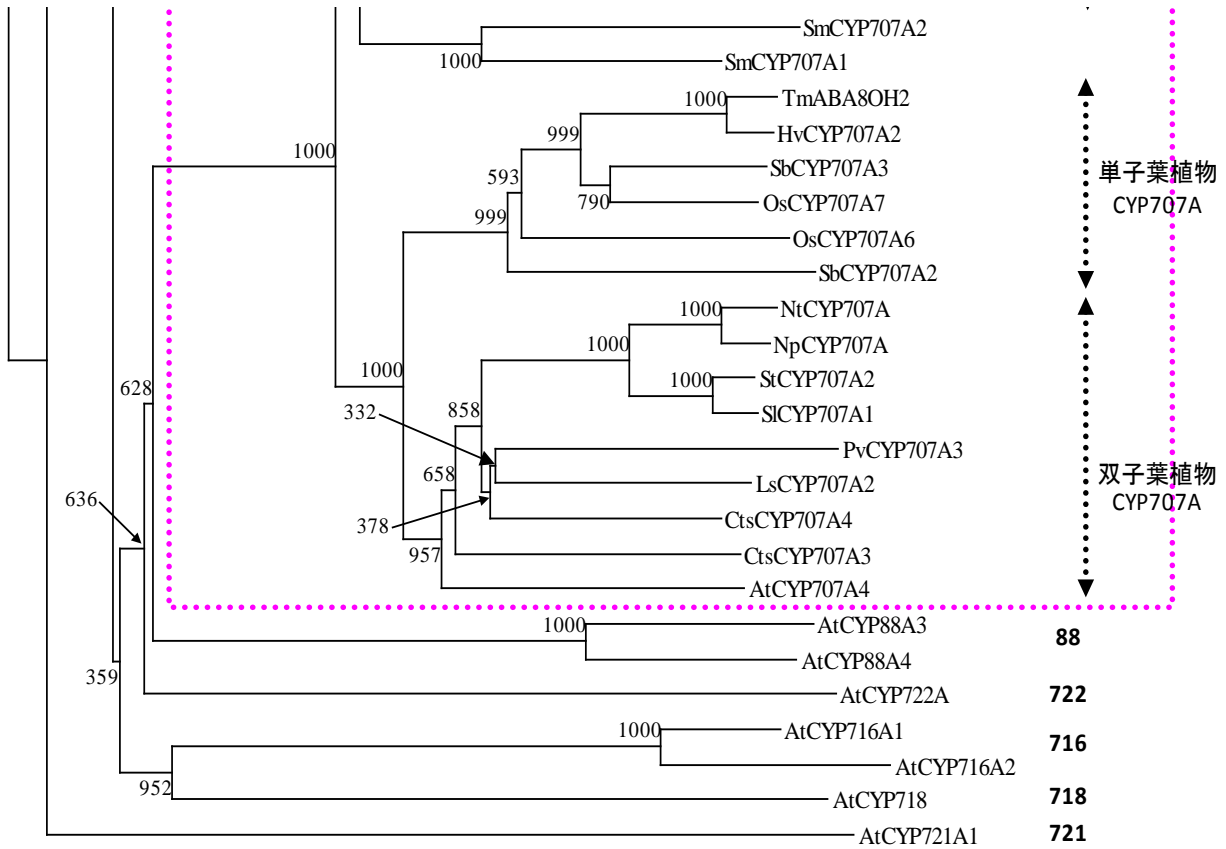


図 3-3c. DcCYP707A1と他植物のCYP707Aファミリータンパク質およびシロイヌナズナ CYP85 clanに属するP450ファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブートストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3cに示した.



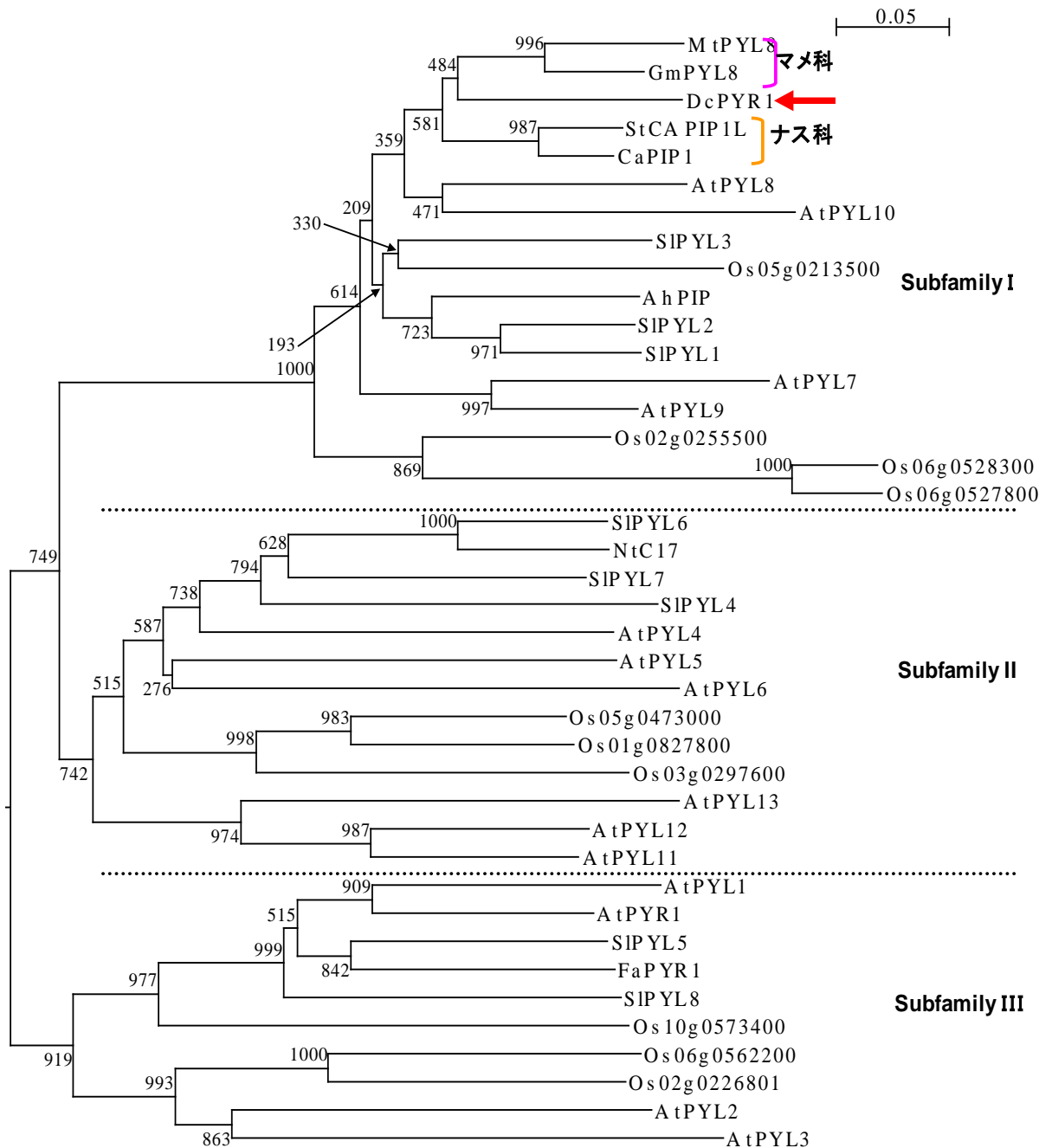
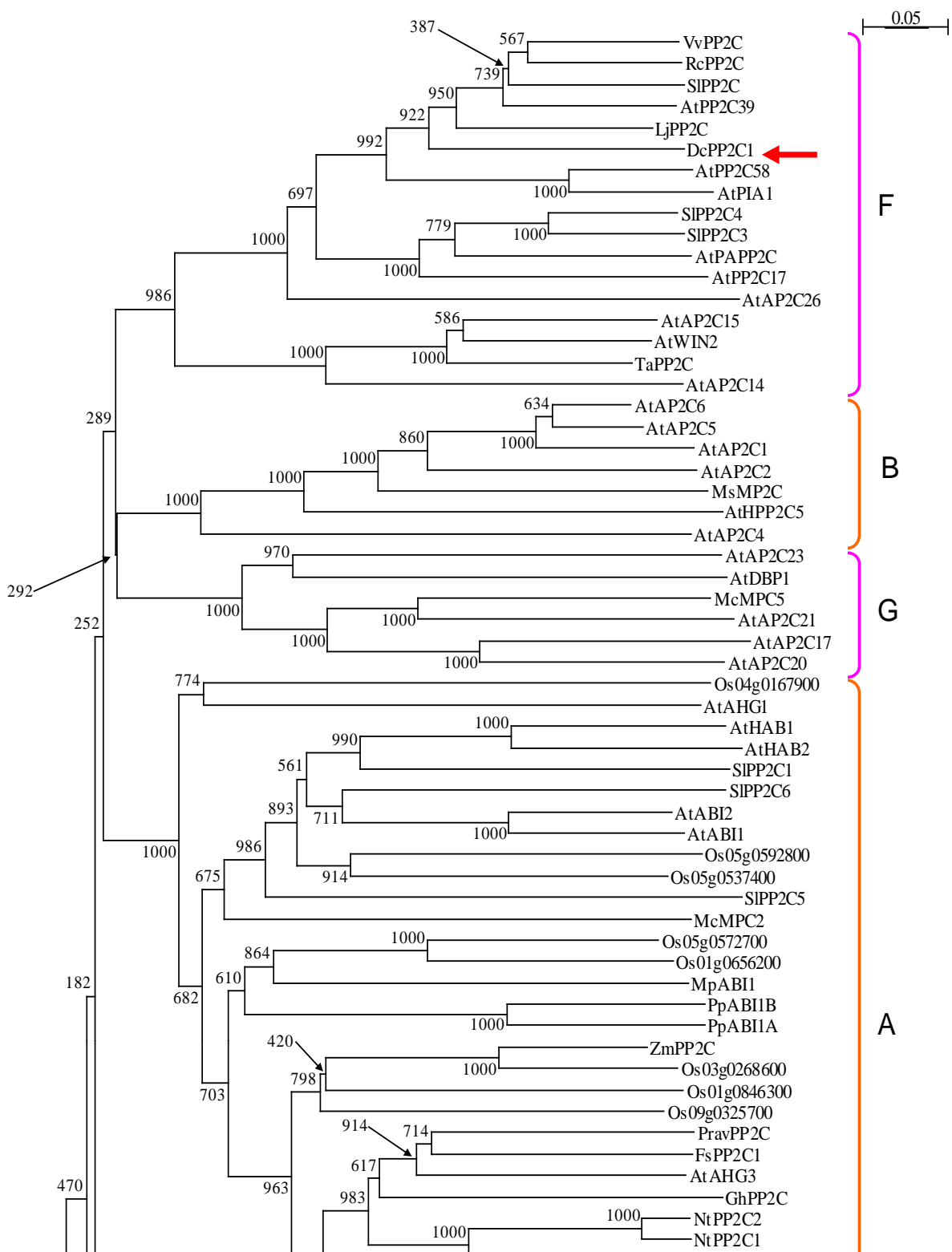


図 3-3d. DcPYR1と他植物のPYR/PYL/RCARファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-W プログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は 1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3dに示した.





(101頁に続く)

図 3-3e. DcPP2C1と他植物のPP2Cファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3eに示した.



(99頁の続き)

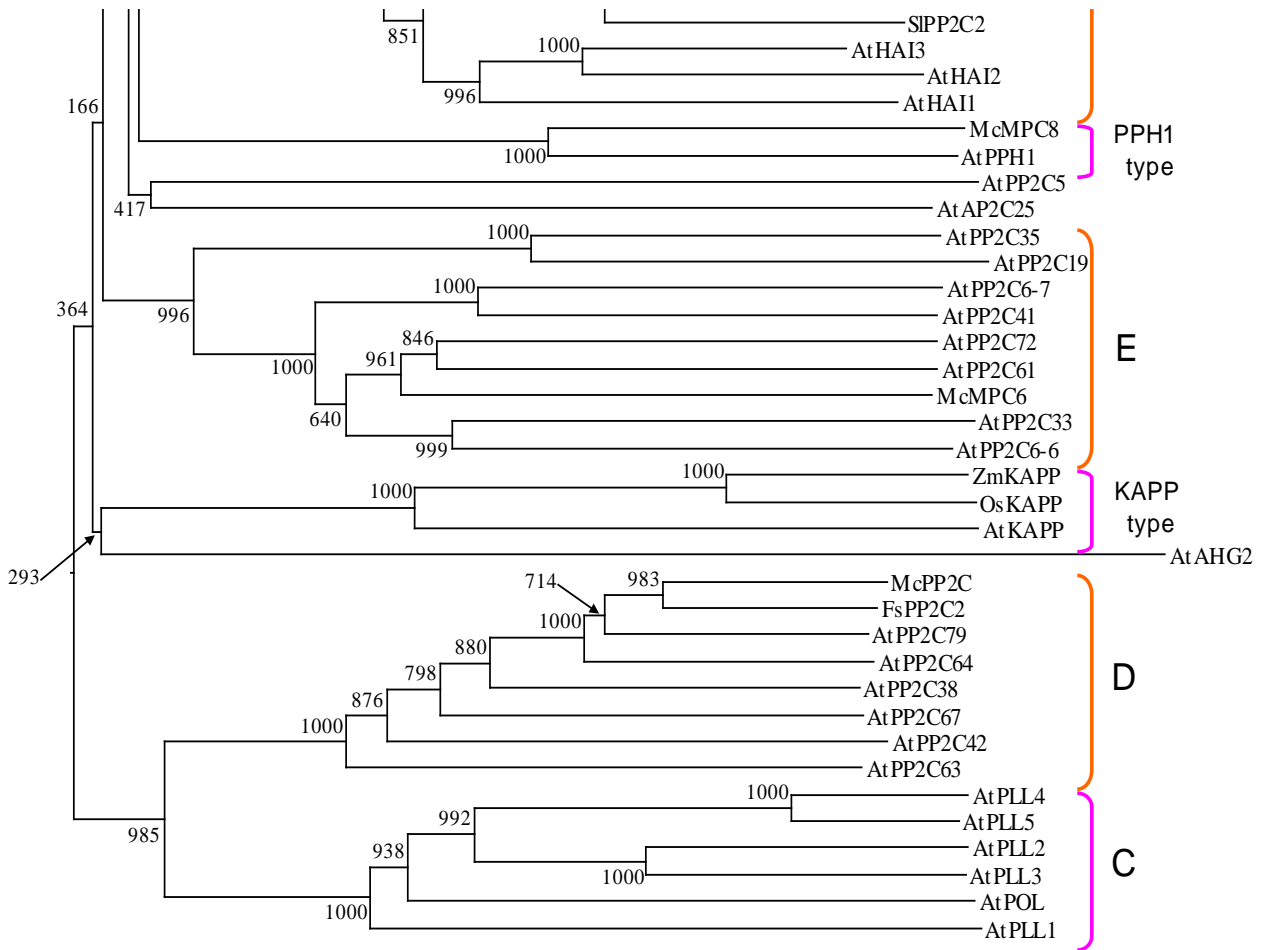
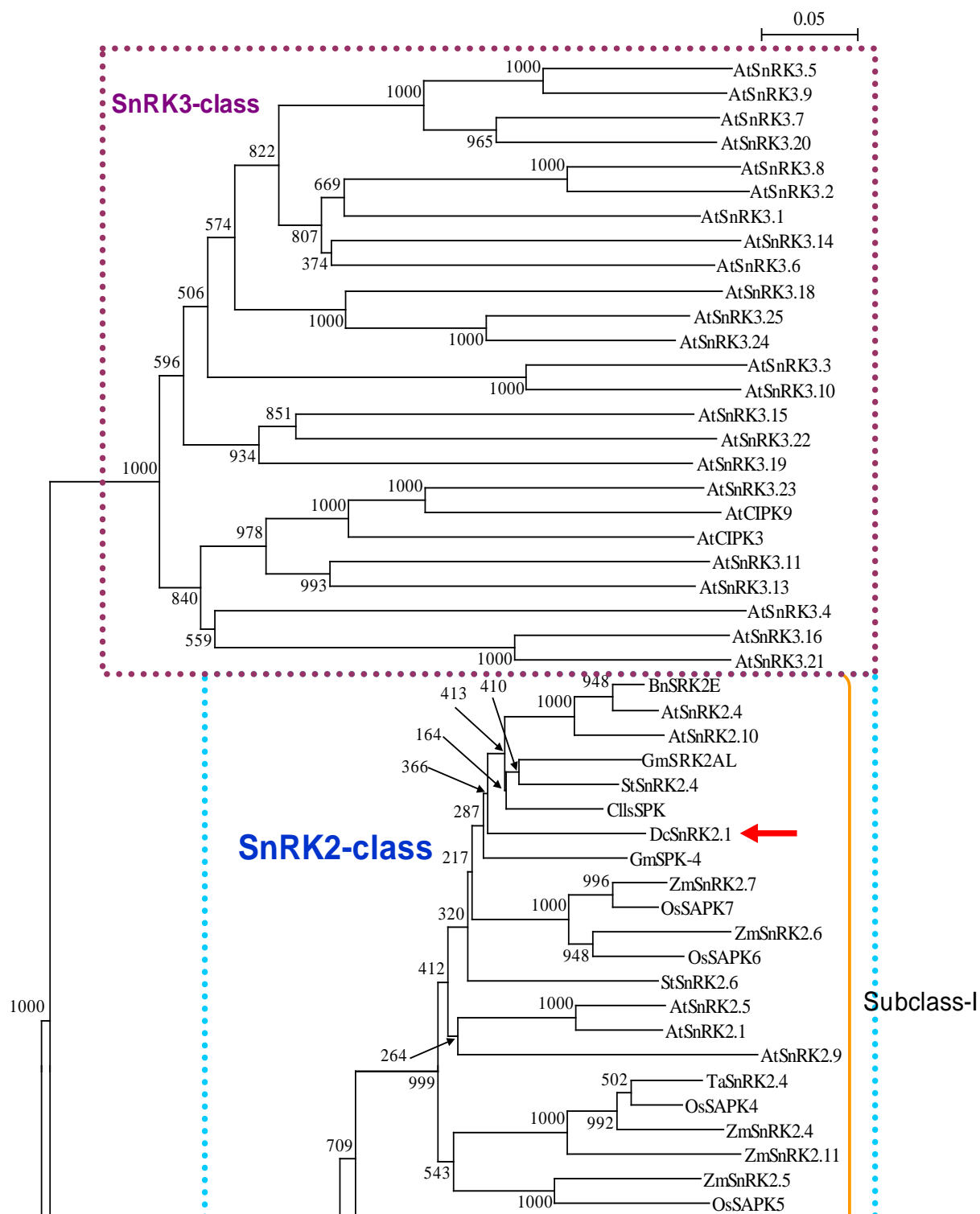


図 3-3e. DcPP2C1と他植物のPP2Cファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3eに示した.







(105頁に続く)

図 3-3f. DcSnRK2.1, DcSnRK2.2と他植物のSnRKファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3fに示した.



(103頁の続き)

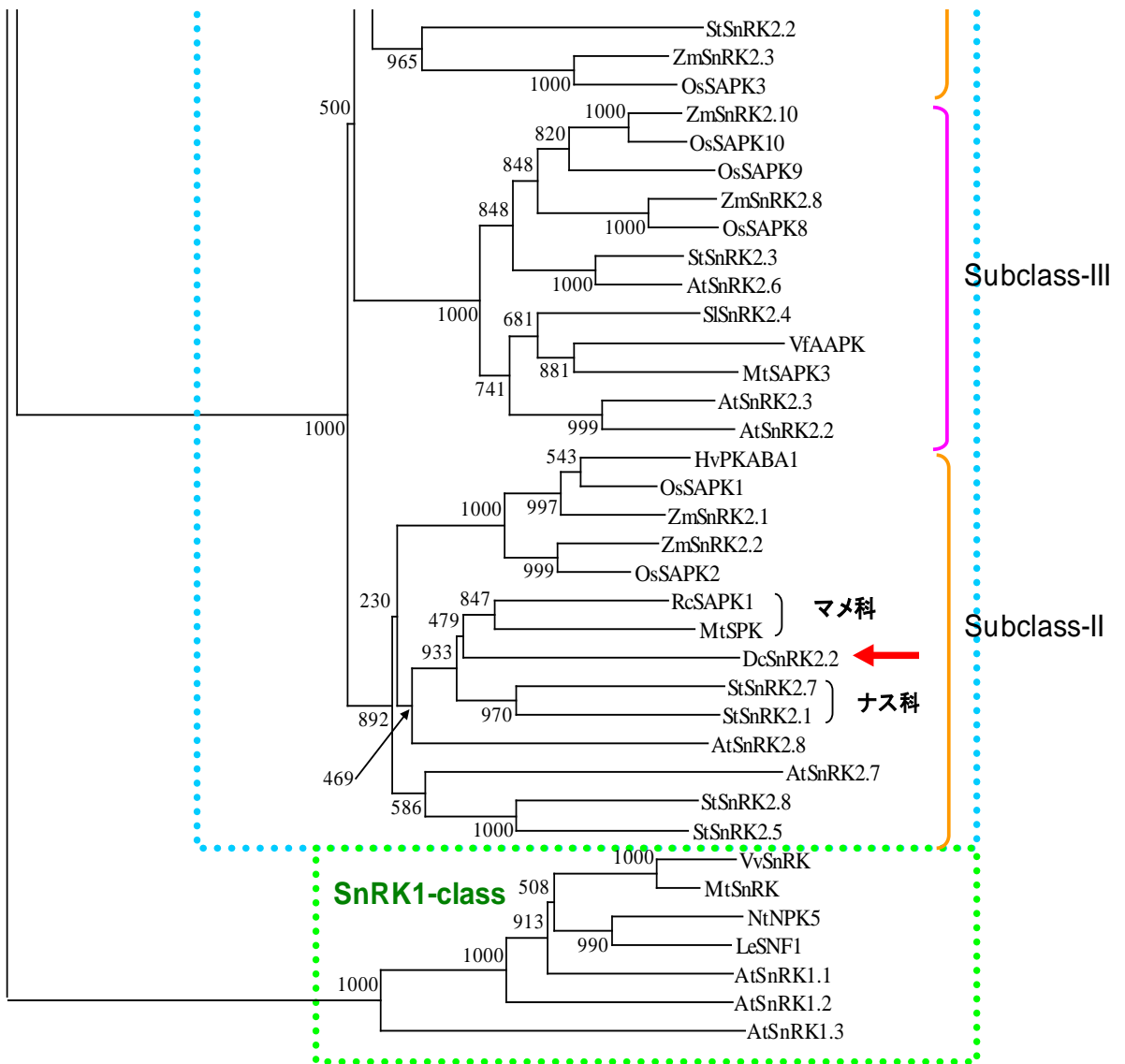


図 3-3f. DcSnRK2.1, DcSnRK2.2と他植物のSnRKファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3fに示した.



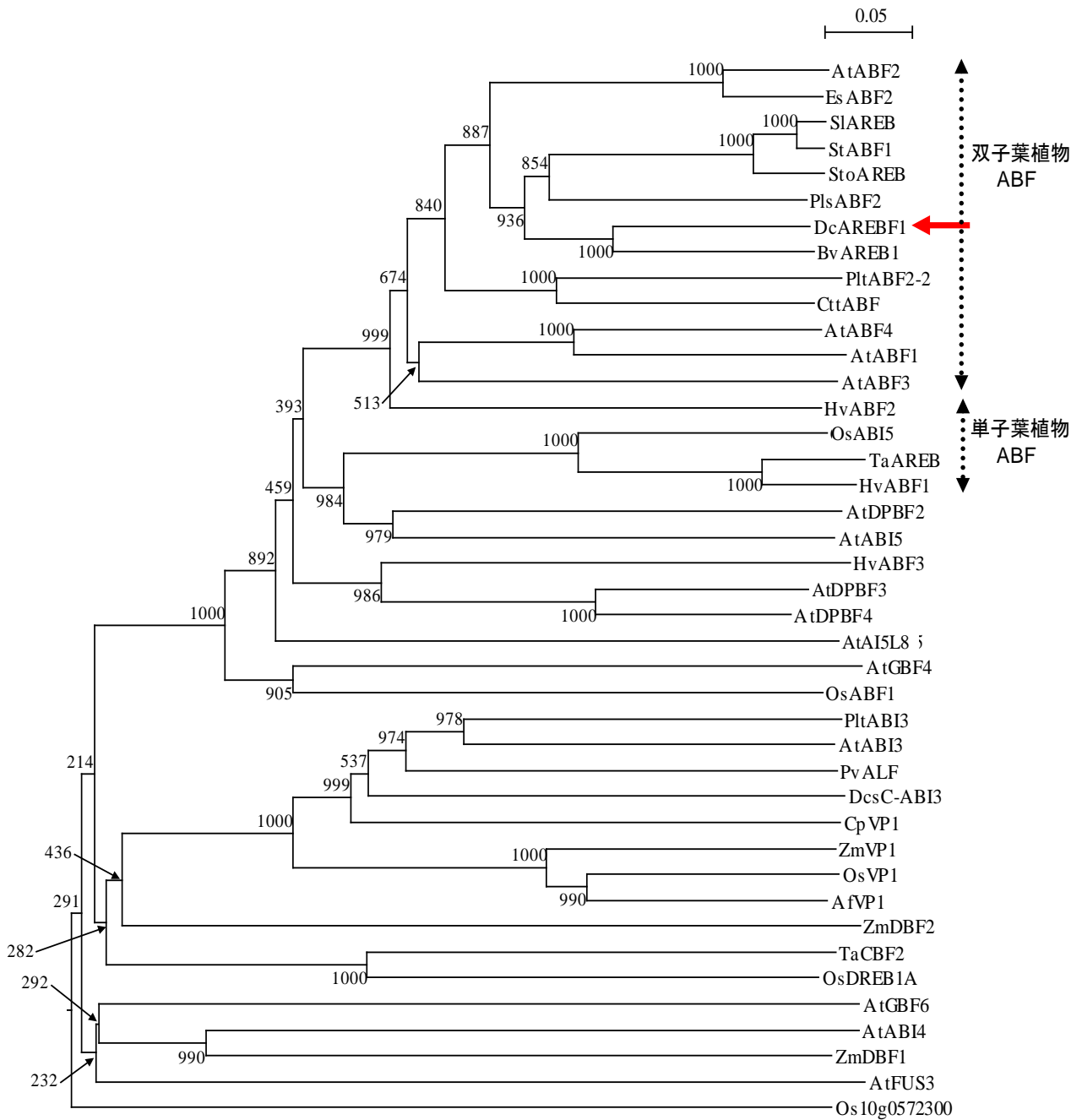


図 3-3g. DcAREBF1と他植物のAREBF/ABFファミリータンパク質の分子系統樹. Clustal-Wプログラムを使用して, 推定アミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作成した. 枝上の数字は1000反復に基づいたブート・ストラップ確率を示し, 枝の長さはアミノ酸置換速度に比例する. 分子系統樹の作成に使用した植物種名およびタンパク質名の略称と登録番号は付表3gに示した.



## 第4章 開花と老化時のアブシジン酸含量の変動

### 4.1. はじめに

第3章ではABAの生合成と受容およびシグナル伝達，作用に関与する遺伝子群の発現の解析のために，‘ライトピンクバーバラ’の花組織から，ABAの生合成と代謝，シグナル伝達，作用に関与する遺伝子群のcDNAをクローニングし構造を解析した．本章ではもう一方の解析の柱である，雌ずいにおけるアブシジン酸（ABA）の含量の変動を解析し，雌ずいのエチレン生成開始反応におけるABAの役割を明らかにすることを試みた．

開花期と老化期の花組織の各部位 [花弁，雌ずい（子房+花柱+柱頭），花托，萼片] からABAを抽出・精製し，LC/MS/MSによる定量を行ってABA含量の変動を調査した．なお本章からは品種材料として，切り花老化時にエチレンを生成し約1週間の花持ち期間を示す‘ライトピンクバーバラ’と‘エクセリア’，および老化時にエチレンを生成せず約3週間の花持ち期間を示す‘ミラクルルージュ’の3品種を使用し，ABA含量やその変動様式を比較した．‘ミラクルルージュ’は，近年，農研機構花き研究所で交配育種によって，作出された品種である (Onozaki *et al.*, 2006; Tanase *et al.*, 2008).

### 4.2. 材料と方法

#### 4.2.1. 植物材料と試料調製

スプレー咲きカーネーション品種‘ライトピンクバーバラ’の試料

採取および調製方法は第2章の方法(2.2.1.)と同様とした。またそれぞれの茎に1輪の頂花のみを持つように仕立てたカーネーション品種(スタンダード系と呼ぶ)、『エクセリア』、『ミラクルルージュ』の切り花は、筑波の農研機構花き研究所の栽培温室において収穫した(花茎長50 cm)。採取した切り花は切り口を蒸留水に漬け、第2章の設置条件下(2.2.1.)に静置した。『エクセリア』、『ミラクルルージュ』は花き研究所内で調製し同所で実験に使用した。

カーネーション切り花は1日に1回、開花した花卉の発達状態とインローリングの兆候を観察した。第2章の方法(2.2.1.)に準拠して、花の開花過程を6段階のステージ(Os 1からOs 6)、老化過程は4段階のステージ(Ss 1からSs 4)に分けた。また老化過程に関しては、老化ステージ(Ss 1からSs 4; 老化萎凋時の形態変化によって区別)に加えて花の満開(Os 6に対応)後の日数を示した(図4-1)。開花あるいは老化の所定のステージでそれぞれ3輪の花を採取した。子房および最外周の花弁1枚を対応する花から採取し、3個の独立した花から試料を調製した。花柱、花托、萼片組織は、必要に応じて採取した。それらを秤量し、ABA含量の測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。

#### 4.2.2. 花組織におけるABAの定量分析

ABAの抽出と分析は、Dobrev and Kaminek (2002)の方法に基づいて行った。なお必要に応じて改変した。具体的には採取直後の生の組織、あるいは凍結した組織(50–100 mg)を液体窒素中で粉碎し、抽出溶媒としてメタノール/水/ギ酸溶液(15:4:1, v/v/v)を使用してABAを抽出した。また内部標準として既知の量の $[^2\text{H}_6](+)\text{-2-cis, 4-trans-}^2\text{H-ABA}$



(OlChemIm Ltd., Olomouc, Czech Republic) を抽出液に加えた。抽出液 (抽出物) は減圧濃縮と乾燥, 固相カラムによるカラムクロマトグラフィーによってABAを段階的に精製した。まず上記のメタノール/水/ギ酸 (15:4:1, v/v/v) による抽出液をSep-Pak Plus C<sub>18</sub>カートリッジ (400 mg固定相; Waters Co., Milford, Massachusetts, USA) にかける, 通過溶出液を回収した。回収液を減圧濃縮により乾燥し, 1 Mギ酸で再溶解した。その後再溶解液をOasis MCXカラム (150 mg固定相; Waters Co.) にかける, 100%メタノールで溶出した。これを減圧濃縮した後に, 乾固試料を100%メタノールに再溶解した。再溶解した試料を, Bond Elut DEAカートリッジ (500 mg固定相; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA) にかける, 0.2%酢酸のメタノール溶液で溶出した。減圧濃縮後に, 試料を100%メタノールで再度溶解し, Sephadex G-25 (50 mg固定相; GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) で共雑物 (主にアントシアニン) を吸着除去した。溶出液を減圧下で濃縮し, 最後は20%メタノール 100 µlに溶解した。溶液の一部をLC/MS/MSによるABAの定量分析にかけた。なお測定はLC/MS/MS (UPLC/MS/MS Quattro premier XE, Waters Co.; カラム, ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 mm i.d.×50 mm; カラム温度 40°C; 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>) を使用して行った。LC溶離条件は0.5%酢酸を含むメタノール溶液による段階的な傾斜溶離 (0→5分, メタノール含有率 20%→80%; 5→5.01分, メタノール含有率 80→100%; 5.01→6分, 100%メタノール; 6→6.5分, メタノール含有率 100→20%) とした。LC/MS/MSは, イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法の負イオン測定モード (ESI<sup>-</sup>); コーン電圧は30 eV; 衝突エネルギーは30 eVの条件で測定した。所定の組織の

ABA含量は, 3つの独立した花による3反復の平均値±標準誤差を示した.

#### 4.2.3. エチレン生成量の測定

Morita *et al.* (2011) の方法に従い, 老化期の‘ライトピンクバーバラ’の花から生成するエチレン量を測定するために, 花を花茎 10 mm の長さに切り, 240 mL のプラスチックの密閉容器に1時間静置した. その後容器内の気体を1 mL 採取し, ガスクロマトグラフ (GC-8A, Shimadzu, 京都) を使用してエチレン濃度を定量した. なお分離カラムはアルミナカラム, 分離温度 80°C, 検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) とした.

#### 4.2.4. 統計解析

第2章の方法 (2.2.5.) と同様に, MEPHAS を使用し, Tukey の多重検定を行った.

### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1. ‘ライトピンクバーバラ’ および ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’ における開花と老化のプロフィール

‘ライトピンクバーバラ’ および ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’ の花組織における ABA 含量の変動の解析を行う前に, 3品種の開花と老化様式の比較を行い, 以降の解析に使用するステージ分けを行った.

‘ライトピンクバーバラ’ の開花過程を Harada *et al.* (2010) の方法に

従って6段階のステージ (Os 1 から Os 6) に、老化過程を Morita *et al.* (2011) に従って4段階のステージ (Ss 1 から Ss 4) に分けた。それぞれのステージの写真は図 4-1 に示した。Os 6 と Ss 1 は形態上分離することができないが、2つのステージは図 4-1 で解析の都合上別々に示した。老化過程における‘ライトピンクバーバラ’の花全体でのエチレン生成のプロフィールは Morita *et al.* (2011) に報告されている。今回もそれぞれのステージで、‘ライトピンクバーバラ’の花からエチレン生成量を計測し、以前の報告とほぼ同じエチレン生成のプロフィールを得た (図 4-2)。計測後の花は ABA 含量の決定のために使用した。

‘エクセリア’の開花と老化のプロフィールは、‘ライトピンクバーバラ’に類似していた (図 4-1)。すなわち‘エクセリア’の老化の進行は Os 6 の 6 日後に Ss 2 に達し、Os 6 の 5 日後に Ss 2 に達した‘ライトピンクバーバラ’と類似していた。また‘エクセリア’の切り花は満開の4日後にエチレン生成を開始し、6日後にエチレン生成が最高になること (Onozaki *et al.*, 2006; Tanase *et al.*, 2008)、および‘エクセリア’の花におけるエチレン生成の進行は収穫のロットによって2日間程度遅延することがこれまでに観察されている (Sato *et al.*, 私信)。

‘ミラクルルージュ’は‘ライトピンクバーバラ’や‘エクセリア’とほぼ同じ開花のプロフィールを示したが、老化プロフィールはまったく異なった (図 4-1)。「ミラクルルージュ」は Os 6 (18 日後) においても花卉の萎れを示さなかった (Onozaki *et al.*, 2006; Tanase *et al.*, 2008)。老化の期間中、花は実質的に Ss 1 の状態を保ったが、解析の都合上花を Ss 1 (Os 6 の 3 日後), Ss 2 (6 日後), Ss 3 (12 日後), Ss 4 (18 日後) に4ステージに分けた。

#### 4.3.2. ‘ライトピンクバーバラ’ および ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’ の花組織における開花初期から老化後期にかけての ABA 含量の変化

開花初期から老化後期にかけてのABA含量を測定した (図 4-3). ‘ライトピンクバーバラ’ では花弁, 子房, 柱頭+花柱, 花托, 萼片の中で子房のABA含量が最も多く, この傾向は他の2つの品種でも同様であった. また子房における時期別の変動では, ‘ライトピンクバーバラ’ が子房のABA含量は開花時期Os 2 (開花ステージ初期) で既に 550 pmol·g<sup>-1</sup>FW (fresh weight) であり, Os 4 で最大値 710 pmol·g<sup>-1</sup>FWに増加した. その後Os 6 (開花ステージの最終ステージ) には減少し, 老化ステージSs 2 では最少値 300 pmol·g<sup>-1</sup>FWとなった. ABA含量は, 柱頭+花柱ではOs 4 からSs 2 を通じて 70 pmol·g<sup>-1</sup>FW以下, 花弁ではOs 2 からSs 2 を通じて 40 pmol·g<sup>-1</sup>FW以下であった. しかし両組織では, Ss 3 でともに約 200 pmol·g<sup>-1</sup>FWに増加した. 花托, 萼片のABA含量はSs 2, Ss 3 でともに 50 pmol·g<sup>-1</sup>FW以下であった.

開花ステージの間の ‘エクセリア’ では, 子房のABA含量は他の組織の約2倍だった. 子房のABA含量はそれぞれOs 2 で 200 pmol·g<sup>-1</sup>FW, Os 4 で 380 pmol·g<sup>-1</sup>FW, Os 6 で 380 pmol·g<sup>-1</sup>FWであり, その後Ss 2 で 940 pmol·g<sup>-1</sup>FWに増加した. その一方で, 花弁のABA含量はOs 2 の 100 pmol·g<sup>-1</sup>FWからSs 2 の 220 pmol·g<sup>-1</sup>FWまで緩やかに増加した. 柱頭+花柱, 花托, 萼片のABA含量はいずれもSs 2 で 200 pmol·g<sup>-1</sup>FW以下であった.

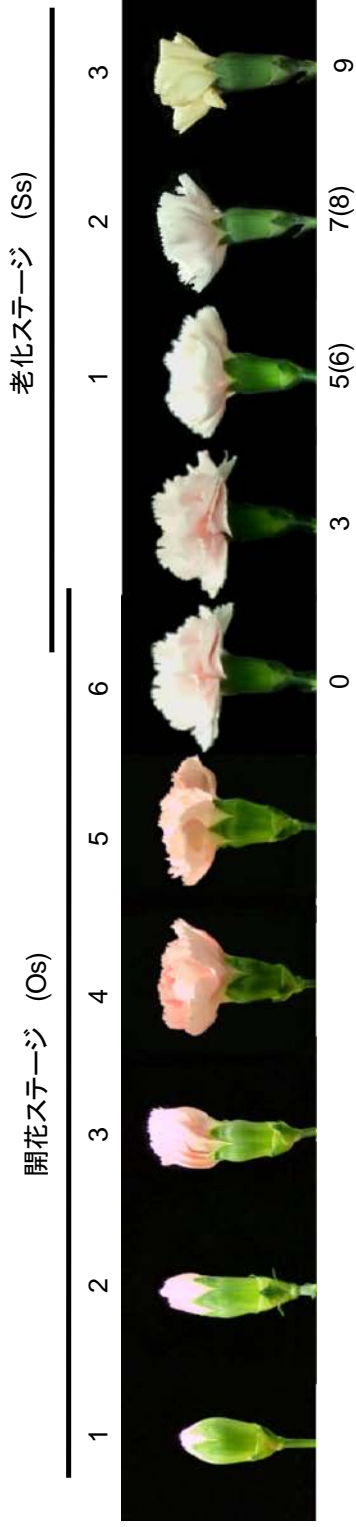
‘ミラクルルージュ’ の子房のABA含量はOs 2 の 70 pmol·g<sup>-1</sup>FWからSs 4 の 160 pmol·g<sup>-1</sup>FWまで開花と老化期を通じて緩やかに増加した.

開花ステージの間の花弁のABA含量は  $50 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 以下のままで、老化ステージの間のSs 4で  $100 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ に達し、僅かに増加した。柱頭+花柱、花托、萼片のABA含量はSs 2で  $50 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 以下であった。

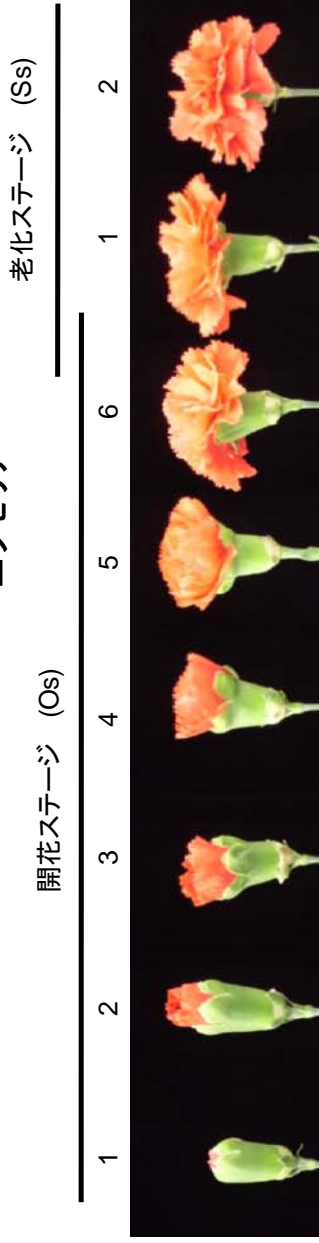
本研究では、老化過程のカーネーションの花の子房ではABAがエチレン合成 (*DcACO1* と *DcACSI*) 遺伝子の発現の誘導因子として作用することを予想して実験を開始し、‘ABAは雌ずいでのエチレン生成の誘導因子か否か?’を实証するために、開花初期から老化後期にかけての間に花組織のABA含量の変化を調査した (図 4-3)。この結果、本章では、(1) 3品種ともに各組織の中では子房のABA含量が最も多いこと、(2) 通常のエチレン生成を示す‘ライトピンクバーバラ’および‘エクセリア’では開花期に子房でのABA含量が増加すること、(3) エチレンを生成しない‘ミラクルルージュ’では開花と老化期を通じて子房でのABA含量が少ないまま維持されていることが明らかとなった。これらの結果は‘カーネーションの花への外部からのABAの投与が花でのエチレン生成を促進した’という結果を基本的に一致した (Onoue *et al.*, 2000)。結論として、子房における高いABA含量が、子房におけるエチレン生成と正の相関をしていることが示唆された。なおABA含量とエチレン生合成遺伝子の発現との関連に関しては、第5章の考察で併せて述べる。



## ライトピンクバーバラ



## エクセリア



## ミラクルージュ

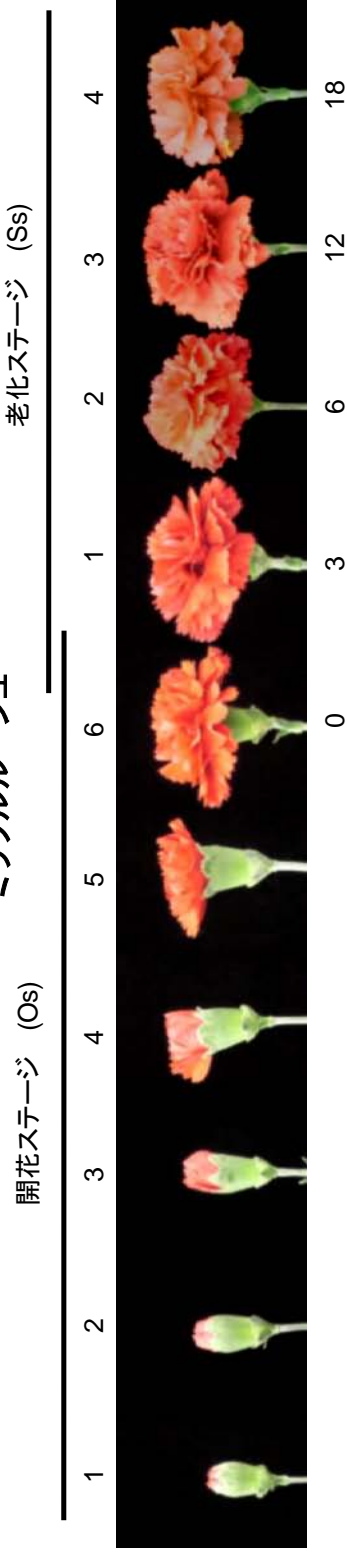


図 4-1. カーネーション 'ライトピンクバーバラ' および 'エクセリア', 'ミラクルージュ' における開花と老化のプロフィール. 老化の進行は品種間で異なっているため、満開 (Os 6) 後の日数をそれぞれの写真の下に示した. スケールバーは 1 cm を示す.





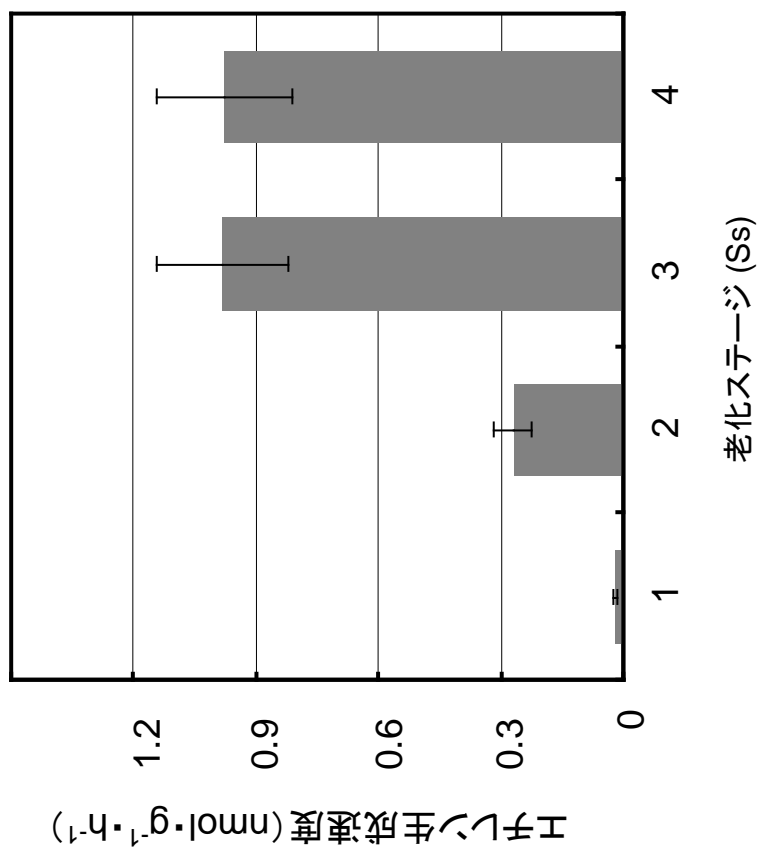
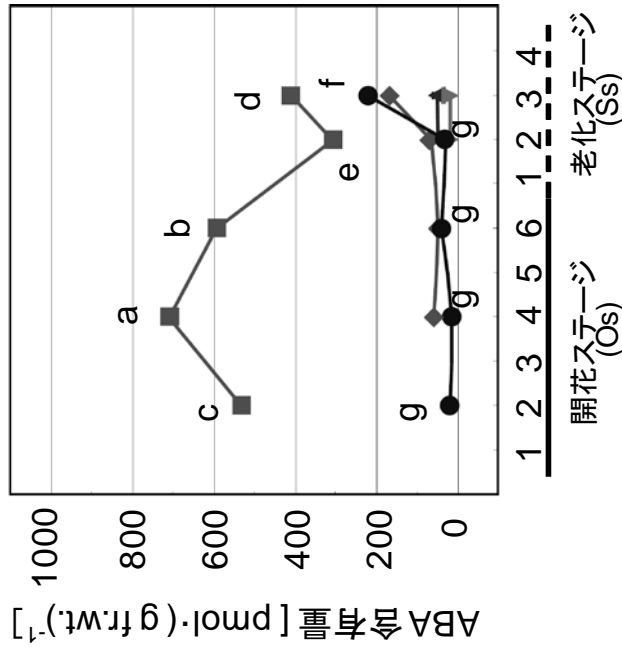


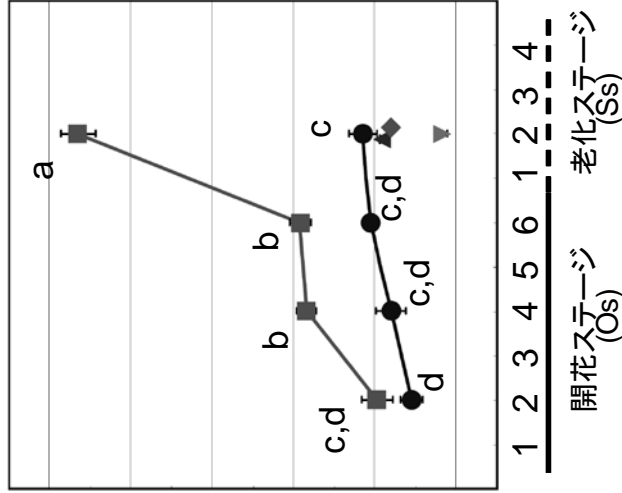
図 4-2. 'ライトピンクバーバラ' の老化時のエチレン生成のプロフィール. 各老化ステージに対して12輪の花のエチレン生成量を測定した. データは平均値±標準誤差を示す.



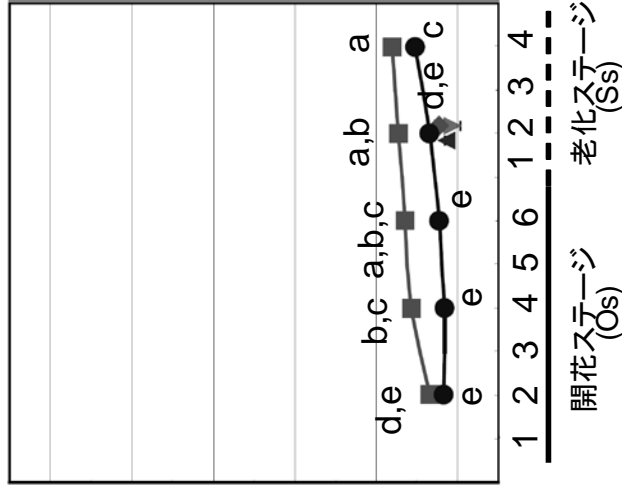
ライトピンクバーバラ



エクセリア



ミラクルージュ



■ 子房 ● 花弁 ▼ 萼片 ◆ 花柱 + 柱頭 ▲ 花托

図 4-3. 開花開始期から老化後期にかけての 'ライトピンクバーバラ' および 'エクセリア', 'ミラクルージュ' の花組織における ABA 含量の変化. データは独立した 3 つの試料の平均値 ± 標準誤差を示し, 標準誤差はそれらがシンボルの大きさより大きかったときのみ示した. 異なった表示の文字を持つ垂線のバーは Tukey の多重検定 ( $p < 0.05$ ) で有意差があったことを示す. 統計解析の結果は子房と花弁のみで示した.



## 第5章 アブシジン酸生合成経路遺伝子の発現解析

### 5.1. はじめに

本研究の目的は、カーネーションの雌ずいにおけるABA含量の変動とABAの生合成、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群の発現の解析から、雌ずいのエチレン生成開始反応におけるABAの役割に対する更なる証拠を得ることである。

先の第2章では、ABA関連遺伝子の発現解析に先立って、転写産物量の変動がない対照遺伝子として、*DcUbq3-7*の混合転写産物を正規化の補正遺伝子として使用することで、標的遺伝子の発現の定量性を確保できることを明らかにした。第3章では、‘ライトピンクバーバラ’の花組織から、ABAの生合成と代謝、受容、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群のcDNAをクローニングし構造と特徴を明らかにした。また第4章では、‘ライトピンクバーバラ’および‘エクセリア’、‘ミラクルルージュ’の花組織のABA含量の変動解析から、子房における開花期のABA含量が老化期の子房におけるエチレン生成と関係していることを明らかにした。

本章では、ABA関連遺伝子の発現解析として、第4章のABA含量の変動解析で使用した、‘ライトピンクバーバラ’および‘エクセリア’、‘ミラクルルージュ’の3品種のカーネーションを用いて、開花期と老化期の花組織の部位別のABA生合成に関与する遺伝子の発現を、RT-PCRおよびリアルタイムRT-PCRを行って比較した。

## 5. 2. 材料と方法

### 5. 2. 1. 植物材料と試料調製

‘ライトピンクバーバラ’ および ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’ の 3 品種のカーネーション切り花の試料採取および調製方法は第 4 章の方法 (4. 2. 1.) と同様とした. 開花過程および老化過程のステージ毎に, 3 輪の花から花組織 (花弁, 子房, 花柱, 花托, 萼片) を採取し, RNA の抽出まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した. これを 3 反復の分析試料にした.

### 5. 2. 2. RNA 抽出

‘ライトピンクバーバラ’ の各花組織については, 第 2 章の方法 (2. 2. 2.) と同様に, フェノール-SDS 法を使用して total RNA を抽出した. また ‘エクセリア’ と ‘ミラクルルージュ’ の花組織については, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して total RNA を抽出した.

### 5. 2. 3. RT-PCR

各花組織から抽出した total RNA をもとに cDNA を合成した. 逆転写反応は oligo dT プライマーを使用し ReverTra Ace (東洋紡, 大阪) により行った.

次に合成した cDNA を鋳型に, 対応するプライマー対および *Taq* DNA ポリメラーゼを使用して PCR 増幅を行った (表 5-1). PCR の条件は  $96^{\circ}\text{C}$  で 3 分間加熱した後, ( $96^{\circ}\text{C}$  で 30 秒,  $53^{\circ}\text{C}$  で 30 秒,  $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分) のサイクルを 38 回繰り返した. *DcUbq3-7* の cDNA も  $94^{\circ}\text{C}$  で 3 分間加熱した後, ( $94^{\circ}\text{C}$  で 30 秒,  $53^{\circ}\text{C}$  で 30 秒,  $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分) のサイクルを 36 回繰

り返して増幅した。増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって分離し、臭化エチジウムで染色後写真撮影した。

#### 5.2.4. リアルタイム RT-PCR

*DcNCED1a/b*と*DcNCED2a/b*の転写産物量を定量するため、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I KitとLightCycler Instrument (Roche, Basel, Switzerland) を使用して、リアルタイム RT-PCRを行った。*DcNCED1* の2つのアイソフォーム (*DcNCED1a*, *DcNCED1b*) と*DcNCED2* の2つのアイソフォーム (*DcNCED2a*, *DcNCED2b*) は、リアルタイムRT-PCRによって分離して分析することが難しかった。そのために、*DcNCED1a*と*DcNCED1b*の転写産物の混合物を*DcNCED1a/b*として、*DcNCED2a*と*DcNCED2b*の転写産物の混合物を*DcNCED2a/b*として分析した。cDNAはマニュアルに従ってReverTra Aceを使用して合成した。それぞれの遺伝子のcDNAに対するプライマー対と増幅産物のサイズは表 5-1 に示した。PCR条件は最初に 95°Cで10分間の加熱した後、(95°Cで5秒, 53°Cで5秒, 72°Cで10秒) のサイクルを40サイクル行った。ここで伸長時間は増幅産物の長さに応じて変更した (25 mer·s<sup>-1</sup>)。転写産物の絶対量は標的配列の希釈系列を試料と同時に測定し、LightCyclerソフトウェアVer. 3.5 を使用して算出した。その後、相対蓄積量は、それぞれの遺伝子の転写産物コピー数を*DcUbq3-7*の転写産物量で割ることによって算出した。第2章の方法(2.2.4.)と同様に、それぞれのステージで3つの独立した試料から花弁および子房を採取し、ステージ毎に3つのRNA試料を調製し、分析に使用した。データはそれぞれのステージで3つの独立した調製試料

の平均値±標準誤差を示した.

### 5.2.5. 統計解析

第2章の方法(2.2.5.)と同様に,MEPHASを使用し,Tukeyの多重検定を行った.

## 5.3. 結果

### 5.3.1. 開花期および老化期の‘ライトピンクバーバラ’,および

‘エクセリア’,‘ミラクルルージュ’の花におけるABAの  
生合成に関与する遺伝子のRT-PCR解析

ABA生合成経路の遺伝子の発現解析のために,開花過程および老化過程のカーネーションの花の子房と花弁で,RT-PCRによって調査した.同時にエチレン生合成の重要な酵素である,*DcACO1*と*DcACSI*の発現も合わせて解析した(図5-1).*DcUbq3-7*の転写産物量は各組織のステージ全体を通じて一定で,転写産物量を正規化するために使用した(第2章).

‘ライトピンクバーバラ’では,ABA生合成(*DcZEP1*,*DcNCED1a/b*,*DcNCED2a/b*)や代謝(*DcCYP707A1*)に関与する遺伝子の転写産物は,開花と老化のほぼすべてのステージにおいて子房と花弁の両組織で検出された.*DcNCED1a/b*の転写産物量は,子房では開花過程の特定時期(Os 2とOs 4)に増加したが,花弁ではOs 2以降からSs 3にかけて徐々に増加した.また*DcNCED2a/b*の転写産物量は,子房および花弁の両組織



ともに、開花過程で多く老化過程では減少した。*DcZEP1*の転写産物量は、開花初期から老化後期にかけて、子房と花弁の両組織において一定量で推移した。*DcCYP707A1*の転写産物量は、子房ではOs 6以降のステージで顕著な増加が認められたが、花弁では開花過程後期 (Os 4–Os 6) およびSs 3で増加した。

‘エクセリア’の*DcZEP1*, *DcNCED1a/b*, *DcNCED2a/b*の転写産物は開花初期から老化後期にかけての (Os 1 から Ss 2) 子房で花弁よりも多く検出された。子房の*DcNCED1a/b*の転写産物量は*DcNCED2a/b*の転写産物量より少なかった。その量はSs 2で明らかに増加した。また子房の*DcCYP707A1*の転写産物は開花初期から老化後期にかけて検出されたが、その量はOs 2, Os 3が高かった。他方、花弁では開花初期から老化後期にかけて*DcNCED2a/b*の転写産物が検出されたが、*DcZEP1*および*DcNCED1a/b*, *DcCYP707A1*の転写産物は検出されなかった。

‘ミラクルルージュ’の子房では*DcZEP1*および*DcNCED2a/b*の転写産物が、開花初期から老化後期にかけてのすべてのステージで検出された。これに対して*DcNCED1a/b*の転写産物はSs 3およびSs 4で、*DcCYP707A1*の転写産物はSs 1およびSs 3とSs 4で検出された。他方花弁では、*DcNCED2a/b*の転写産物が開花過程で検出され、*DcCYP707A1*の転写産物はOs 6の12日後以降 (老化過程の後期のステージ) に検出された。

### 5.3.2. 開花期および老化期の‘ライトピンクバーバラ’および

#### ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’の花におけるエチレン 生合成に関与する遺伝子の RT-PCR 解析

エチレン生合成遺伝子 (*DcACO1*と*DcACS1*) に関して, ‘ライトピンクバーバラ’の子房では, *DcACO1*と*DcACS1*の転写産物はSs 2とSs 3で検出された. 花卉では, *DcACO1*の転写産物はOs 6以降に, *DcACS1*はSs 1以降に検出された.

‘エクセリア’の子房では, *DcACS1*の転写産物がSs 2で検出可能になった. 他方*DcACO1*の転写産物は, Os 1からSs 1を通じて僅かに検出され, その後Ss 2で顕著に検出された. しかし, 花卉では*DcACO1*と*DcACS1*の転写産物はSs 2になっても検出できなかった.

‘ミラクルルージュ’の子房では,*DcACS1*の転写産物がSs 3とSs 4で,*DcACO1*の転写産物がSs 2とSs 3で少量検出された.花卉では*DcACO1*と*DcACS1*の転写産物は, 開花と老化期を通じて全く検出されなかった.

### 5.3.3. 開花開始期から老化後期の子房内の *DcNCED1a/b* と

#### *DcNCED2a/b* のリアルタイム RT-PCR による相対蓄積量の 解析

‘ライトピンクバーバラ’の子房の*DcNCED1a/b*の相対蓄積量は開花初期 (Os 1とOs 2)で0.07 r.e.l. (relative expression level)と高かった. 開花ステージの後期まで緩やかに減少した. その後Ss 2, Ss 3で増加した (図 5-2A). ‘エクセリア’では, *DcNCED1a/b*の相対蓄積量はOs 1からOs 6を通じてほとんど変動はなく0.02 r.e.l.のままであったが, その

後急速に増加し Ss 1 で 0.06 r.e.l., Ss 2 で 0.23 r.e.l.となった. ‘ミラクルルージュ’ では, *DcNCED1a/b* の相対蓄積量は Ss 3, Ss 4 で増加したが Ss 4 でも 0.03 r.e.l.を超えることはなく, Os 1 から Ss 1 を通じては無視できるほどしかなかった.

‘ライトピンクバーバラ’ の *DcNCED2a/b* の相対蓄積量は Os 1 で 0.03 r.e.l.であったが, Os 2 から Os 4 では 0.06–0.08 r.e.l.になり, その後開花開始期の値に低下して, Ss 3 まで低いままであった (図 5-2B). ‘エクセリア’ では *DcNCED2a/b* の相対蓄積量は開花初期から老化後期にかけて 0.02–0.04 r.e.l.に留まった. 同様に, ‘ミラクルルージュ’ では *DcNCED2a/b* の相対蓄積量は Ss 3 で増加したが, 開花初期から老化後期にかけて 0.01–0.02 r.e.l.に留まった.

#### 5. 4. 考察

##### 5. 4. 1. ABA 生合成と代謝に関与する遺伝子の発現

ABA 生合成に関与する遺伝子の RT-PCR 解析から, ‘ライトピンクバーバラ’ や ‘エクセリア’ の子房では, 開花過程の間に *DcZEP1* および *DcNCED1a/b*, *DcNCED2a/b*, *DcCYP707A1* の転写産物が蓄積し, その一方で ‘ミラクルルージュ’ の子房では, *DcZEP1* と *DcNCED2a/b* の転写産物の蓄積がみられたが, *DcNCED1a/b* の転写産物は開花過程の間や老化ステージの初期にはほとんど蓄積しないことが明らかとなった (図 5-1). 植物では NCED が ABA 生合成の律速段階を触媒する酵素として認識されていること (Burbidge *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000; Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011) と, 雌ず

いのエチレン生成開始反応における ABA の役割を検証する目的から、次に子房の *DcNCED* (*DcNCED1a/b* および *DcNCED2a/b*) に絞ってリアルタイム RT-PCR による発現解析を行った。

開花初期から老化後期にかけての *DcNCED1a/b* の相対蓄積量の変化は 3 品種ともに子房の ABA の含量の変動とよく一致していた。‘ライトピンクバーバラ’の子房では *DcNCED1a/b* の相対蓄積量が Os 1, Os 2 で 0.06 r.e.l. であり、この高い値は Os 2 から Os 6 にかけての大きな ABA 含量と一致するか、あるいはそれに先行していた (図 4-3, 5-2)。‘エクセリア’子房での *DcNCED1a/b* の相対蓄積量は Os 1 から Os 6 まで 0.03 r.e.l. 以下のままであったが、Ss 1 で 0.06 r.e.l., Ss 2 で 0.23 r.e.l. に顕著に増加した。そしてこの変化は ABA 含量の Os 2 から Os 6 の緩やかな変化と、その後の Ss 2 での急激な増加と一致した (図 4-3, 5-2)。  
‘ミラクルルージュ’の *DcNCED1a/b* の相対蓄積量は子房で非常に低いか、あるいは無視できる値であった。この結果は ABA 含量が開花初期から老化後期にかけての低く僅かながら増加したことと一致した (図 4-3, 5-2)。その一方で、*DcZEP1*, *DcNCED2a/b*, *DcCYP707A1* の転写産物量の変化は 3 品種すべてで、開花初期から老化後期にかけての子房で ABA 含量の変化と相関がみられなかった。これらの結果は 3 品種の子房でのエチレンに生成を誘導する ABA の生合成においては、*DcNCED2a/b* ではなく *DcNCED1a/b* の発現が主要な役割を果たしていることを示唆した (図 4-3, 5-1, 5-2)。他方、*DcNCED2a/b* の発現は開花初期から老化後期にかけての花組織で ABA の定常状態の増加に関与していると考えられた。その発現は ‘ミラクルルージュ’の子房と花弁の両方、‘エクセリア’の花弁で顕著であった (図 4-3, 5-2)。

#### 5.4.2. ABA 含量とエチレン生合成に關与する遺伝子の発現

以下では、第4章で述べなかつた、雌ずい、特に子房のABA含量とエチレン生合成遺伝子に着目し考察した。‘ライトピンクバーバラ’の子房のABA含量は*DcACO1*と*DcACS1*の転写産物がそれぞれOs 6, Ss 1で蓄積したより早く、Os 2からSs 1の間で500–700 pmol·g<sup>-1</sup>FWであつた。‘エクセリア’の子房のABA含量は200–400 pmol·g<sup>-1</sup>FWであつたが、老化ステージの初期にはSs 1では600 pmol·g<sup>-1</sup>FW、Ss 2では900 pmol·g<sup>-1</sup>FWと顯著に増加した(図4-3)。‘エクセリア’子房の*DcACO1*と*DcACS1*の転写産物はSs 2で多量に蓄積した(図5-1)。その一方で、‘ミラクルルージュ’の子房では、ABA含量はOs 2からSs 4を通じて50–150 pmol·g<sup>-1</sup>FWに留まり、*DcACO1*と*DcACS1*の蓄積はほとんどみられなかつた(図4-3)。

開花過程では‘ライトピンクバーバラ’の子房のABA含量は花卉より10–20倍多く、これは‘エクセリア’あるいは‘ミラクルルージュ’と比べても2倍以上多かつた。

‘ミラクルルージュ’[この品種の花は老化過程の間に検出可能なエチレンを生成しない(Onozaki *et al.*, 2006)]の子房の*DcACS1*の転写産物量はSs 3やSs 4(満開の12日後、18日後)では低く、*DcACO1*の転写産物量もSs 2(満開の6日後)Ss 3で低かつた。

これらの観察の結果は、一定量(仮に閾値、あるいはスレッシュホールレベルと呼ぶ)のABA含量がカーネーションの花の子房で*DcACO1*と*DcACS1*の発現を誘導するために必要であることを示唆する。ABA含量の閾値は500 pmol·g<sup>-1</sup>FW、あるいはそれより高い可能性があると推測される。



表 5-1. RT-PCR, リアルタイム RT-PCR 解析に使用したプライマー

標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>RT-PCR 増幅</b>			
<i>DeNCED1a/b</i>	DeNCED1-rF1 ; CACTCTCAAAGTCTCAACACACACAATTC	DeNCED1-rR1 ; CAGAAACAAGCTGAGCTTCGATCC	223/216
<i>DeNCED2a/b</i>	DeNCED2-rF1 ; GCTGAAGTTCAGTGTGATGGGTAG	DeNCED2-rR1 ; GGTGTCTCGGGGACGTATTC	194/194
<i>DeZEPI</i>	DeZEPI-rF1 ; GACAGAAAAGGTAGCGTTCGGAG	DeZEPI-rR1 ; CCAITGTATGAATGAAAGTTGCAACTAATAGC	229
<i>DeCYP707A1</i>	DeCYP707A1-rF1 ; GACTCGAATAAATTCACCCCGTAATCG	DeCYP707A1-rR1 ; GAGGCTGCTGTACAATTGCTGTG	190
<i>DePYRI</i>	DePYRI-rF1 ; CCAAAAAGCTTTGTGGTCTCGTGC	DePYRI-rR1 ; GATACCCGACGAAATACACTACACGACTC	197
<i>DePP2C</i>	DePP2C-rF1 ; GACCTCAITGTGCAATCTATCTCCC	DePP2C1-rR1 ; CTGCAAGGTAAAAAGCGTTTCAAAAAGACG	159
<i>DeSnRK2.1</i>	DeSnRK2.1-rF1 ; CTTCCTGTTGACCTCCGTTTCTC	DeSnRK2.1-rR1 ; CAIAGTACGTAGTAGTACTTACTGAGTJAG	297
<i>DeSnRK2.2</i>	DeSnRK2.2-rF1 ; CTGCTGATGGTAATTACATAAATGTTCCGG	DeSnRK2.2-rR1 ; GGC AAAATGCCACGATTTCCGAGG	154
<i>DeAREBF1</i>	DeAREBF1-rF1 ; GTTGGAAAGTTTACCGATGAGTGGACTAC	DeAREBF1-rR1 ; GTCCTCGGAAAGACTGACGTTTACAAG	207
<i>DeACSI</i>	DeACSI-rF1 ; CGAGGGCAAAATGGAGCTTCGA	DeACSI-rR1 ; CAICTGAAATGGTCTTTTCACACCCG	233
<i>DeACO1</i>	DeACO1-rF1 ; CGGGTCCCAITCCAACTGCTT	DeACO1-rR1 ; GTAGACCATAACAATCCATAGGACATGG	209
<i>DeUbq3-7</i>	Ubq-rF ; GCTCCATCTGCTGTGGTGTG	Ubq-rR ; GAGAAITCACACCGAAAATGTAGCAGC	183
標的遺伝子	フォワードプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	リバースプライマー (プライマー名称; 塩基配列, 5'→3')	増幅産物 (bp)
<b>リアルタイム RT-PCR 解析</b>			
<i>DeNCED1a/b</i>	DeNCED1-rF1 ; CACTCTCAAAGTCTCAACACACACAATTC	DeNCED1-rR1 ; CAGAAACAAGCTGAGCTTCGATCC	223/216
<i>DeNCED2a/b</i>	DeNCED2-rF1 ; GCTGAAGTTCAGTGTGATGGGTAG	DeNCED2-rR1 ; GGTGTCTCGGGGACGTATTC	194
<i>DePYRI</i>	DePYRI-rF1 ; CCAAAAAGCTTTGTGGTCTCGTGC	DePYRI-rR1 ; GATACCCGACGAAATACACTACACGACTC	197
<i>DeUbq3-7</i>	Ubq3F ; GTTGTGGTTCAGGGGCTGGTITG	Ubq3R ; CTACGGTAAATGAGAAITTCACACCGAAAATG	178





ライトピンクバーバラ                      エクセリア                      ミラクルルージュ

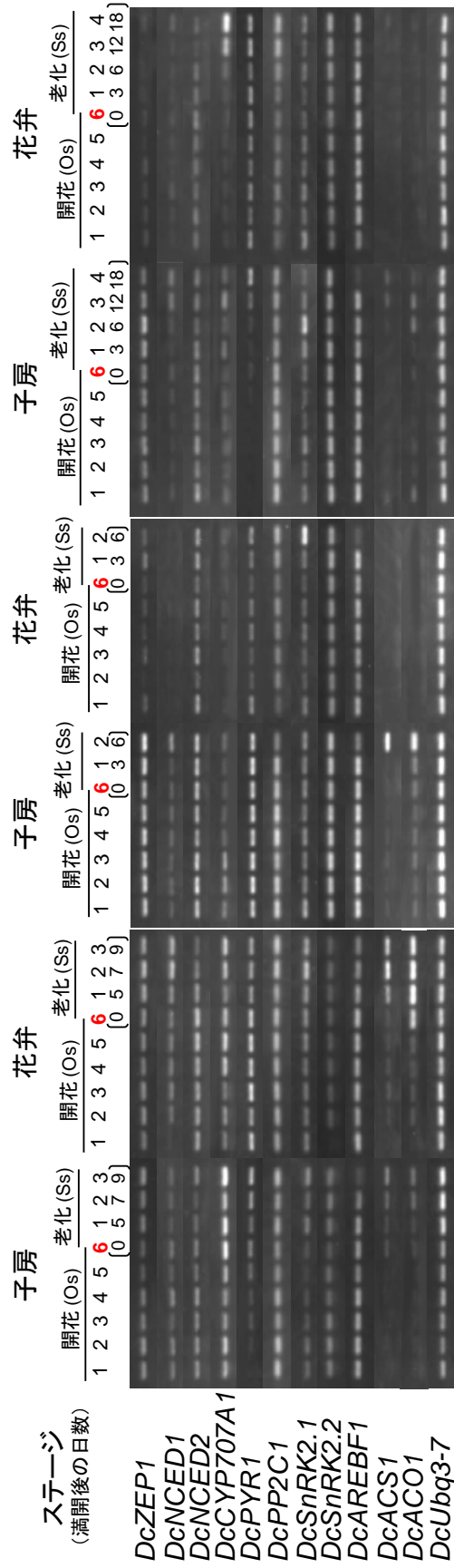


図 5-1. カーネーション 'ライトピンクバーバラ' および 'エクセリア', 'ミラクルルージュ' における ABA 関連遺伝子の転写産物の RT-PCR 解析。ユビキチン (*DcUbg3-7*) の転写産物は、泳動した DNA 試料の等量性を保証するために使用した。



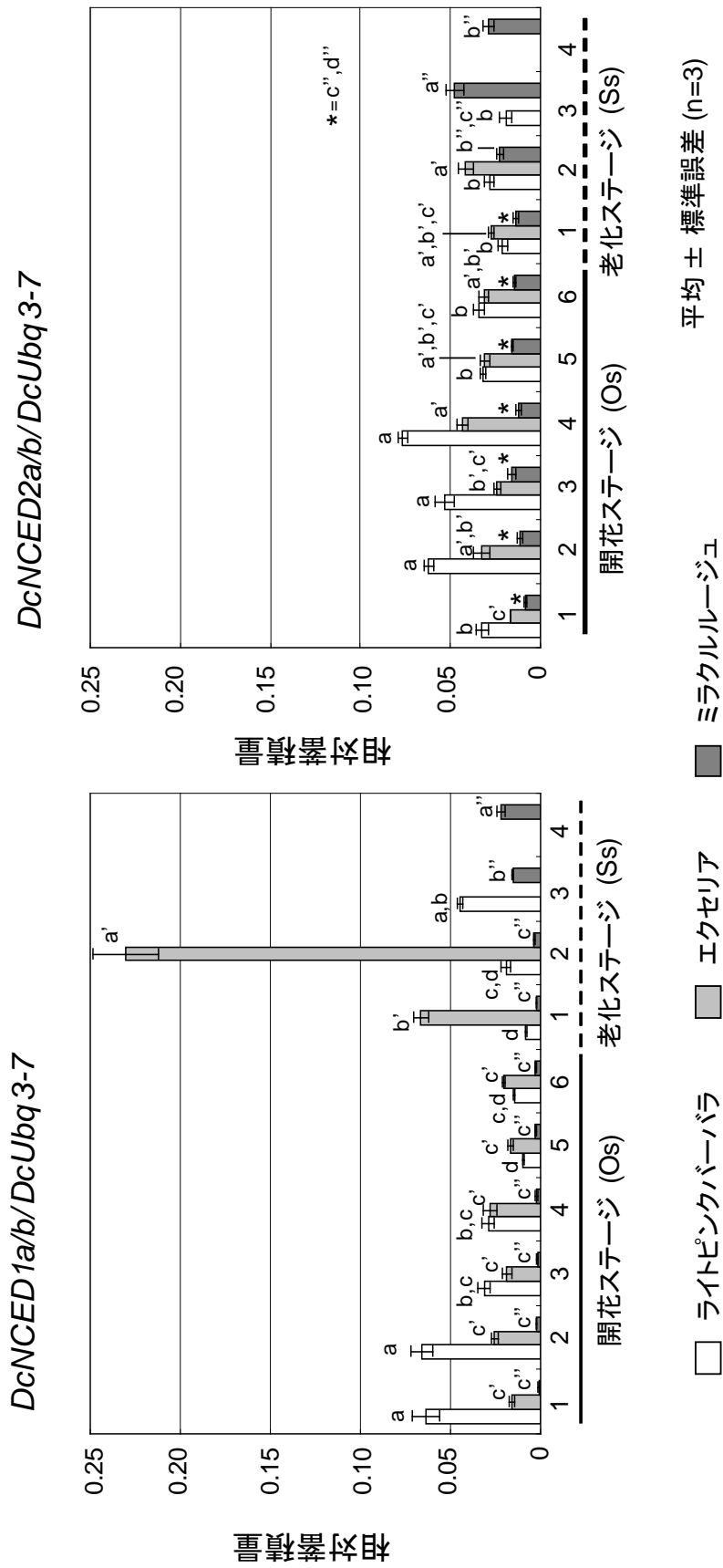


図 5-2. 'ライトピンクバーバラ' および 'エクセリア', 'ミラクルルージュ' の花の子房における開花開始期から老化後期にかけての *DcNCED1a/b* と *DcNCED2a/b* 遺伝子のリアルタイム RT-PCR による発現解析. 相対蓄積量はそれぞれの遺伝子の遺伝子の転写産物のコピー数を *DcUbq3-7* の転写産物量で割ることによって算出した. データは独立した 3 つの試料の平均値 ± 標準誤差を示す. 異なる文字を持つ垂直のバーは Tukey の多重検定 ( $p < 0.05$ ) で有意差があったことを示す. 統計解析は 3 品種でそれぞれ別々に行い, その結果は, プライム無, 一重プライム, 二重プライムの小文字によってそれぞれ示した. 所定の開花と老化ステージで棒グラフがない箇所は, 解析を行なわなかったことを示す.



## 第 6 章 アブシジン酸の作用経路遺伝子の発現解析

### 6. 1. はじめに

‘ライトピンクバーバラ’ と ‘エクセリア’ では、開花期に子房で ABA が蓄積しているにも関わらず、エチレン生合成関連遺伝子の *DcACO1* と *DcACSI* の発現が誘導されない。この原因として開花期には ABA の作用が起きないことを予想した。

そこで本章では、ABA の受容から作用の発現までの過程に関与する遺伝子群(ABA 作用経路遺伝子群)の発現解析を検討した。第 5 章と同様に ‘ライトピンクバーバラ’ および ‘エクセリア’, ‘ミラクルルージュ’ の 3 品種を使用し、開花期と老化期の花組織の部位別の ABA の受容およびシグナル伝達、作用に関与する遺伝子の発現を、RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR を行って比較した。

### 6. 2. 材料と方法

#### 6. 2. 1. RT-PCR

第 5 章で合成した cDNA (5. 2. 3.) を使用し、同章と同様の方法 (5. 2. 3.) で RT-PCR を行った。

#### 6. 2. 2. リアルタイム RT-PCR

*DcPYR1* の転写産物量を定量するため、第 5 章で合成した cDNA (5. 2. 3.) を使用し、同章と同様の方法 (5. 2. 4.) でリアルタイム RT-PCR を行った。

### 6.2.3. 統計解析

第2章の方法(2.2.5.)と同様に,MEPHASを使用し,Tukeyの多重検定を行った.

## 6.3. 結果

### 6.3.1. 開花期および老化期の‘ライトピンクバーバラ’および

‘エクセリア’,‘ミラクルルージュ’の花におけるABAの受容およびシグナル伝達,作用に関与する遺伝子のRT-PCR解析

ABA受容(*DcPYR1*)およびABAシグナル伝達(*DcPP2C1*,  
*DcSnRK2.1*,*DcSnRK2.2*)と作用(*DcAREBF1*)に関与する遺伝子の転写産物量の変動を,RT-PCRによって定性的に解析した結果を図5-1に示した.

‘ライトピンクバーバラ’の子房では,*DcPP2C1*および*DcSnRK2.1*,  
*DcAREBF1*の転写産物が検出され,その量は開花初期から老化後期にかけてほぼ一定量で検出された.一方で*DcPYR1*の転写産物はOs5以降に検出され始め,*DcSnRK2.1*の転写産物は開花初期から老化後期にかけて検出されたが,Os4からOs6まで転写産物の量は少なかった.また花卉では,*DcPYR1*および*DcPP2C1*,*DcSnRK2.1*,*DcSnRK2.2*,*DcAREBF1*のすべての転写産物が開花初期から老化後期にかけて,ほぼ一定量で検出された.

‘エクセリア’の子房では,*DcPYR1*および*DcPP2C1*,*DcSnRK2.1*,  
*DcSnRK2.2*,*DcAREBF1*の転写産物が開花期から老化期全体を通じて検出された.花卉でも同様に全ての転写産物が開花期から老化期全体を通じて検出された.*DcSnRK2.1*の転写産物はSs2で顕著な増加が,*DcAREBF1*の転

写産物は Ss 2 で顕著な減少が認められた。

‘ミラクルルージュ’の子房では, *DcPP2C1* および *DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*, *DcAREBF1* の転写産物は, 開花初期から老化後期にかけてほぼ全てのステージで検出された。しかし *DcPYRI* の転写産物は, Os 1 から Ss 2 では検出されず, Ss 3 以降に検出可能となった。他方, 花弁では, *DcPYRI* および *DcPP2C1*, *DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*, *DcAREBF1* すべての転写産物が開花初期から老化後期にかけて検出された。

### 6. 3. 2. 開花初期から老化後期にかけての子房の *DcPYRI* のリアルタイム RT-PCR による相対蓄積量の解析

図 6-1 は開花初期から老化後期にかけての子房の *DcPYRI* の相対発現量の変化をリアルタイム RT-PCR によって定量的に検出した結果である。‘ライトピンクバーバラ’では, ABA 受容体遺伝子 (*DcPYRI*) の相対蓄積量は開花初期には 0.004 r.e.l. (Os 1) から 0.007 r.e.l. (Os 3) まで緩やかに増加した。その後は Ss 1 までに急速に増加して 0.029 r.e.l. に達し, その後はその量が維持された。‘エクセリア’の開花期 (Os 1–Os 6) の子房では, *DcPYRI* の相対蓄積量は, Os 1 ですでに 0.025 r.e.l. と高く, Os 1 から Os 6 を通じて 0.025–0.037 r.e.l. で推移し, Ss 1 で再度 0.041 r.e.l. まで増加しその後減少した。それと対照的に, ‘ミラクルルージュ’の子房では, *DcPYRI* の相対蓄積量は Os 1 で 0.002 r.e.l. で, Ss 2 まで 0.005 r.e.l. 以下の量で推移し, その後 Ss 3 や Ss 4 で 0.006 r.e.l. と僅かに増加した。

#### 6.4. 考察

‘ライトピンクバーバラ’ と ‘エクセリア’ の子房には、開花ステージ Os 2 から Os 6 の間に相当量の ABA が存在した、しかし *DcACOI* と *DcACSI* はこの期間に子房では発現せず、Ss 1 あるいは Ss 2 で発現した (図 5-1). 開花ステージの間にエチレン生合成遺伝子、特にエチレン生合成に関与する鍵となる遺伝子 ‘*DcACSI* の発現がなぜ子房で誘導されなかったか?’ という理由は、開花ステージの間の子房で ABA の受容とシグナル伝達が抑制された可能性が高いためと考えられた. この可能性を調査するために、3 品種の子房で ABA 受容とシグナル伝達経路の中核を構成する因子の遺伝子の発現を調査した.

‘ライトピンクバーバラ’ の *DcPYR1* の転写産物は RT-PCR では Os 1 から Os 3 までは RT-PCR では検出できなかったが (図 5-1), リアルタイム RT-PCR で検出されて、0.004–0.007 r.e.l.と求められた (図 6-1). その後、Os 6 で 0.024 r.e.l., Ss 1 で 0.029 r.e.l.と緩やかに増加した. 他方、RT-PCR 解析によって *DcPP2C1* の転写産物は開花過程で検出された (図 5-1). *DcSnRK2.1* と *DcSnRK2.2* の転写産物は Os 1 でさえ検出された. *DcSnRK2.1* の転写産物量は Os 3 から Os 6 で減少した、しかし *DcSnRK2.2* の転写産物量は開花の期間に一定のままであった. Onoue *et al.* (2000) は満開のカーネーションの花に外から ABA を投与し、3 日後にエチレン生成が開始したことを示した. そのため、Os 4 で *DcPYR1* の発現が増加する、あるいはより後の Os 6 や Ss 1 で、*DcACOI* と *DcACSI* の発現を誘導すると予想することは合理的である (図 5-1). これらの調査結果に基づいて、‘ライトピンクバーバラ’ の花では、開花期に受容体タンパク質 *DcPYR1* が欠乏している、あるいは不足しているため



に ABA の作用が起きないことが示唆された。その結果として、エチレンの生合成遺伝子, *DcACO1* と *DcACS1* の転写産物の蓄積がみられなかったと推察できる。

‘エクセリア’の子房では相当な量の ABA の存在と 0.025–0.038 r.e.l. での *DcPYR1* (および *DcPYR1* タンパク質) の発現にもかかわらず開花過程の花では *DcACO1* と *DcACS1* が発現しなかった。さらに, この品種での ABA シグナル伝達と作用に関与する遺伝子, すなわち *DcPP2C1* および *DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*, *DcAREBF1* のすべての遺伝子が, 開花初期から老化後期を通じて発現していた (図 5-1)。開花過程の ‘エクセリア’ 子房での ABA 作用の欠如の理由は, 子房に十分な量の *DcPYR1* (および *DcPYR1* タンパク質) が存在したにもかかわらず ABA 含量が ABA の作用を誘導する閾値に達していないことが推定された。その後老化ステージの初期 (Ss 1) で, ようやく ABA 含量はその閾値を超え, *DcPYR1* への結合によって作用を発現したと考えられた。

‘ミラクルルージュ’の花の子房の ABA 含量は開花と老化の全過程を通じて閾値を超えないと示唆された (図 4-3)。そして *DcPYR1* の蓄積量も開花期と老化期を通じて低いままであった (図 5-1, 6-1)。これら 2 つの要因が, 子房で *DcACO1* と *DcACS1* の発現誘導が起きない原因と考えられた。結果としてこの品種の花は花持ちが延び, エチレンを生成しない。この品種では ABA 生合成における *DcNCED1a/b* の発現と ABA シグナル伝達における *DcPYR1* の発現が同時に欠損していた。これらの結果はカーネーションの花の子房で *DcNCED1a/b*, *DcPYR1* 両方の発現を制御する共通の上流の機構の存在を示唆している。この共通の機構はおそらくカーネーションの花で老化の開始を制御するマスタ

一遺伝子として機能する未知の遺伝子によって制御されていると考えられる.

# DcPYR1 / DcUbq 3-7

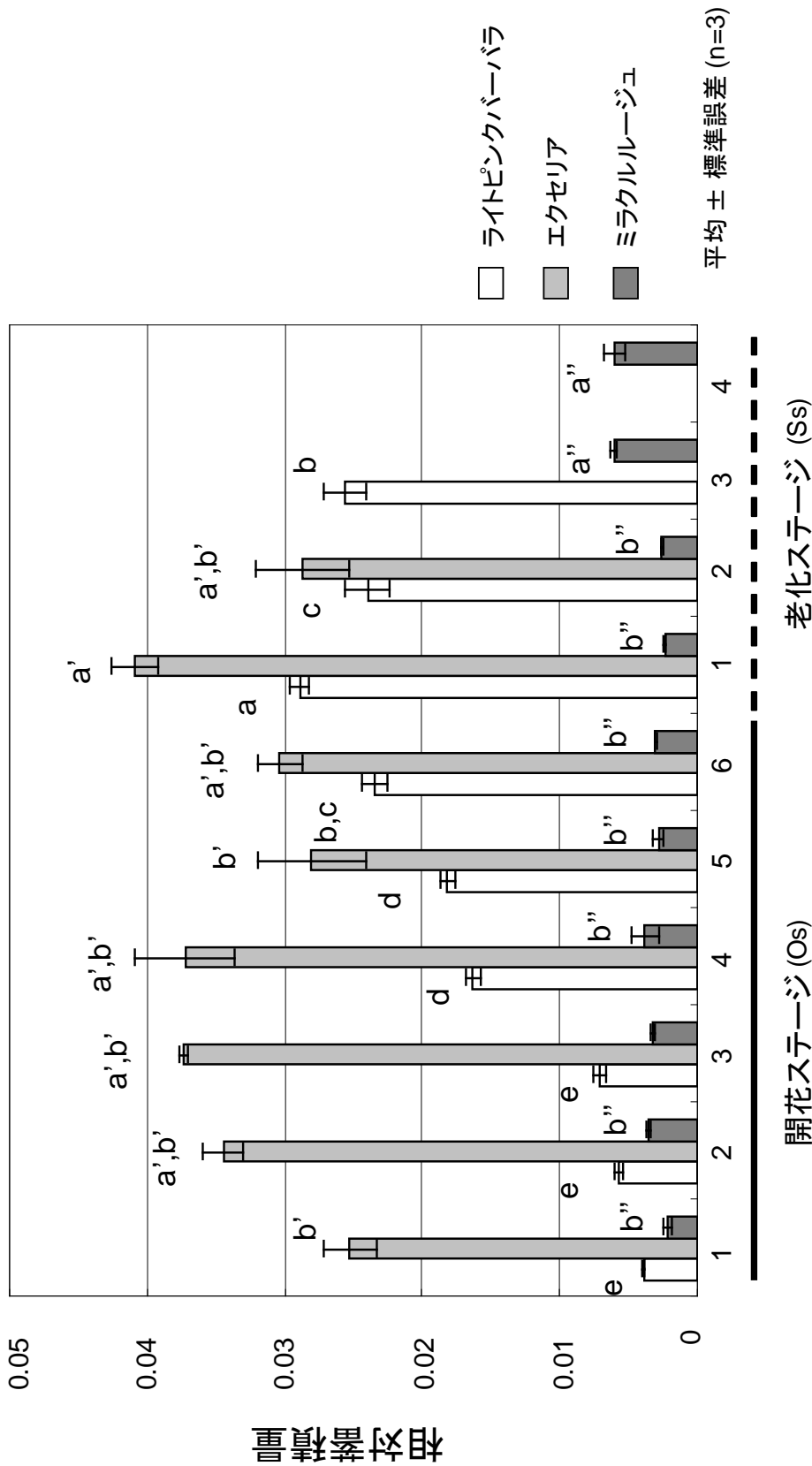


図 6-1. 開花開始期から老化後期にかけての‘ライトピンクバーバラ’および‘エクセリア’、‘ミラクルージュ’の子房における *DcPYR1* 遺伝子のリアルタイムRT-PCRによる発現解析。相対蓄積量はそれぞれの遺伝子の転写産物のコピー数を *DcUbq3-7* の転写産物量で割ることによって算出した。データは独立した3つの試料の平均値±標準誤差を示す。異なる文字を持つ垂直のバーはTukeyの多重検定 ( $p < 0.05$ ) で有意差が有ったことを示す。統計解析は3品種でそれぞれ別々に行い、その結果は、プライム無、一重プライム、二重プライムの小文字によってそれぞれ示した。所定の開花と老化ステージで棒グラフがない箇所は、解析を行なわなかったことを示す。



## 第7章 総合考察

エチレンはカーネーションの切り花の老化に関与する主要な植物ホルモンである (Abeles *et al.*, 1992; Borochoy and Woodson, 1989; Reid and Wu, 1992; Satoh, 2011). カーネーションの老化時には, 初めに雌ずいにおいてエチレンが生成し, このエチレンが花卉に作用して自己触媒型エチレン生成を誘導する (Shibuya *et al.*, 2000; ten Have and Woltering, 1997). 一般に内生エチレンが老化に主導的役割を果たす花きでは, 受粉刺激によって雌ずいで誘導生成されたエチレンが, 老化の「スターターエチレン」として働く. しかし, 雄ずいが花卉化した八重咲きカーネーションでは自家受粉は起こり得ず, 何らかの別因子がエチレン生成の誘導に関与していると予想される. 過去の研究結果 (Mayak and Dilley, 1976a, b; Nowak and Veen, 1982; Ronen and Mayak, 1981; Onoue *et al.*, 2000; Shibuya *et al.*, 2000) から, この誘導因子はABAではないかと予測されていた. そこで本研究では, カーネーションの花組織におけるABA含量の変動をABA抽出とLC/MS/MSによる定量分析で, ABA生合成および代謝に加えて, ABAの受容とシグナル伝達, 作用に関与する遺伝子群の発現を, RT-PCRおよびリアルタイムRT-PCRを行って解析した. また品種材料には, 切り花老化時にエチレンを生成し約1週間の花持ち期間を示す‘ライトピンクバーバラ’と‘エクセリア’, および老化時にエチレンを生成せず約3週間の花持ち期間を示す‘ミラクルルージュ’ (Onozaki *et al.*, 2006) を使用し, これら3種類のエチレン生成能の異なるカーネーション品種を比較解析することによって, 雌ずいのエチレン生成開始反応におけるABAの役割を検証することができるとの考

えのもとに研究を行った。

ABA 関連遺伝子の発現解析を行う上でまず問題となるのが、‘転写産物量を正確に定量するための対照遺伝子を何にするか?’ である。通常、花の老化は花組織（特に花弁細胞）が崩壊していく過程であり、RNA の顕著な分解が起こる。カーネーションの花組織においても、老化関連遺伝子の変動を定量する場合、rRNA やアクチン (*DcACT1*) の転写産物量が老化の進行と共に著しく低下することが見られていた (Jones, 2004)。そこで ABA 関連遺伝子の発現解析の調査に先立って、転写産物量の変動がない対照遺伝子を探索した。候補遺伝子としては、カーネーションを含む多くの植物の遺伝子発現解析の正規化の対照遺伝子として使用されてきた (Ogata *et al.*, 2004) ポリユビキチン遺伝子の可能性を調査した。

その結果、今回の研究ではカーネーションの花組織から 7 種類のポリユビキチン遺伝子 (*DcUbq1-7*) の cDNA をクローニングすることに成功し(表 2-2)、それらの構造と発現の特徴を明らかにした (図 2-1, 2-4, 2-5)。これら 7 種類の遺伝子は 3'-非翻訳領域の塩基配列の相同性から、*DcUbq1* および *DcUbq2*, *DcUbq3-7* の 3 つのグループに分類された (図 2-1, 2-3)。そのうち *DcUbq3-7* の転写産物量は、花弁の展開と老化の過程を通じて変化が認められないことを見出した (図 2-4, 2-5)。*DcUbq3-7* の転写産物量は、以前に報告されたスクロース合成酵素 (*DcSUS1*) の相対蓄積量 (Morita *et al.*, 2011) の再評価においても、正規化のための対照遺伝子として *DcACT1* の転写産物より優れていることを明らかにした (図 2-4, 2-6)。これらの結果に基づいて、*DcUbq3-7* の転写産物を ABA 関連遺伝子の発現解析のための対照遺伝子として使

用することに決定した。

ABA の生合成と作用に関与する遺伝子群の RT-PCR やリアルタイム RT-PCR による発現解析から、雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割が推定されるとの考えに基づき、次のステップとして、カーネーション ‘ライトピンクバーバラ’ の花組織から、ABA の生合成と代謝、受容、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群の cDNA クローニングを試みた。

その結果、ABA 生合成関連では 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 遺伝子 (*DcNCED1a* および *DcNCED1b*, *DcNCED2a*, *DcNCED2b*) および zeaxanthin epoxidase 遺伝子 (*DcZEPI*) を、ABA 代謝関連では ABA 8'-hydroxylase 遺伝子 (*DcCYP707A1*) をクローニングし構造を解析した。ABA の受容とシグナル伝達関連では ABA 受容体遺伝子 (*DcPYR1*) と Type 2C protein phosphatase 遺伝子 (*DcPP2C1*) および protein kinase 遺伝子 (*DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*: subfamily 2 of SNF1-related serine/threonine protein kinase) をクローニングし構造を解析した。ABA 作用関連では ABA 応答要素結合因子遺伝子 (*DcAREBF1*: ABA responsive element binding factor) のクローニングと構造解析に成功した (表 3-2)。これらのカーネーションの遺伝子群は、本研究で初めてクローニングし構造を明らかにした。

次に ABA 関連遺伝子の発現解析を行う前に、もう一方の解析の柱である、雌ずいにおける ABA 含量の変動を解析し、雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割を明らかにすることを試みた。

開花期と老化期の花組織の各部位 [花弁, 雌ずい (子房+花柱+柱頭), 花托, 萼片] から ABA を抽出・精製し, LC/MS/MS による定量を行

って ABA 含量と変動様式を調査した。なお品種材料として、切り花老化時にエチレンを生成し約 1 週間の花持ち期間を示す‘ライトピンクバーバラ’と‘エクセリア’、および老化時にエチレンを生成せず約 3 週間の花持ち期間を示す‘ミラクルルージュ’(Onozaki *et al.*, 2006) の 3 品種を使用した。また 3 品種では老化のプロフィールが異なるため、図 4-1 に示したステージ分けを設定し、時期別の変動解析を行った。

その結果‘ライトピンクバーバラ’では各組織中で子房の ABA 含量が最も多く、他の 2 つの品種でも同様であった (図 4-3)。また子房における時期別の変動では、通常のエチレン生成を示す‘ライトピンクバーバラ’および‘エクセリア’では開花期 (Os 2–Os 6) に子房での ABA 含量が多いこと (‘ライトピンクバーバラ’で  $530\text{--}710\text{ pmol}\cdot\text{gFW}^{-1}$ , ‘エクセリア’では  $200\text{--}380\text{ pmol}\cdot\text{gFW}^{-1}$ )、エチレンを生成しない‘ミラクルルージュ’では開花と老化期を通じて子房での ABA 含量が少ないまま ( $70\text{--}160\text{ pmol}\cdot\text{gFW}^{-1}$ ) 維持されていることを明らかにした (図 4-3)。これらの結果は‘カーネーションの花への外部からの ABA の投与が花でのエチレン生成を促進した’という結果と基本的に一致した (Onoue *et al.*, 2000)。

続いて、雌ずいのエチレン生成開始反応における ABA の役割に対する更なる証拠を得るために、今回の研究で新たにクローニングしたポリユビンキチン遺伝子 *DcUbq3-7* を正規化の対照遺伝子として、同じく新たにクローニングした ABA の生合成と代謝、受容、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群の発現解析を行った。ABA 含量の変動解析で使用した 3 品種のカーネーションを対象として、開花期と老化期の遺伝子発現を RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR により比較した。



まず ABA 生合成・代謝経路の遺伝子では、‘ライトピンクバーバラ’ と ‘エクセリア’ の子房において、開花初期から *DcZEP1* および *DcNCED1a/b*, *DcNCED2a/b*, *DcCYP707A1* の転写産物が蓄積していた (図 5-1). 他方、‘ミラクルルージュ’ の子房では、開花時期から Ss 2 まで *DcNCED1a/b* の蓄積がほとんどみられなかった (図 5-1). 子房における *DcNCED1a/b* の差異は、リアルタイム RT-PCR による相対蓄積量の比較でも明確に現れており、‘ライトピンクバーバラ’ では開花初期 (Os 1 と Os 2) ですでに高い値 (0.06 r.e.l.) を示し、‘エクセリア’ では老化初期 (Ss 1 から Ss 2 に 0.07 から 0.23 r.e.l.) に急速に増加した (図 5-2). また ‘ミラクルルージュ’ では開花初期から老化後期を通じて低い値を維持した (全体を通じて 0.03 r.e.l. 以下) (図 5-2). これらの *DcNCED1a/b* の発現変動は、子房における ABA 含量の変動とよく一致しており、今回比較したカーネーションの ABA 生合成においては、複数ある *NCED* 遺伝子のうち *DcNCED1a/b* の発現が ABA 生合成の律速因子になっていることを示唆する結果を得た (図 4-3, 5-1, 5-2). またこの結果は、ABA 生合成の鍵酵素が *NCED* であるという知見にも一致した (Burbidge *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000; Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). 他方、*DcNCED2a/b* の転写産物量の変化は、3 品種すべてで開花初期から老化後期にかけての子房で ABA 含量の変化と相関がみられなかった (図 4-3, 5-1, 5-2). このことから *DcNCED2a/b* の発現は開花初期から老化後期にかけての花組織で ABA の定常状態の増加に関与していると考えられた. その発現は ‘ミラクルルージュ’ の子房と花弁の両方、‘エクセリア’ の花弁で顕著であった (図 4-3, 5-1).

ここで、子房のABA含量とエチレン生合成遺伝子 (*DcACO1* と *DcACSI*) の発現の関係をみると、‘ライトピンクバーバラ’の子房では *DcACO1* と *DcACSI* の転写産物がOs 6やSs 1で蓄積したよりも早い時期 (Os 2–Os 6) からABA含量が多かった (500–700 pmol·g<sup>-1</sup>FW) (図 4-3, 5-1)。また ‘エクセリア’の子房では開花後期 (Os 6) から老化初期 (Ss 2) の間にABA含量が 400 pmol·g<sup>-1</sup>FW から 900 pmol·g<sup>-1</sup>FWに顕著に増加し、*DcACO1* と *DcACSI* の転写産物はSs 2以降で多量に蓄積した (図 4-3, 5-1)。その一方で、‘ミラクルルージュ’の子房では、ABA含量はOs 2からSs 4を通じて 50–150 pmol·g<sup>-1</sup>FWに留まり、*DcACO1* と *DcACSI* の転写産物の蓄積はSs 3やSs 4 (満開の 12 日後, 18 日後) においてもほとんどみられなかった (図 4-3, 5-1)。これらの結果から、カーネーションの花の子房において*DcACO1* と *DcACSI* の発現を誘導するためにはABA含量の閾値を越えることが必要でがあると推測される。その値は 500 pmol·g<sup>-1</sup>FW, あるいはそれより高い可能性があるかと推定される。

このように ‘ライトピンクバーバラ’ と ‘エクセリア’の子房には、開花期に相当量のABAが存在したにもかかわらず、*DcACO1* と *DcACSI* はこの期間に子房では発現せず、Ss 1あるいはSs 2で発現した (図 4-3, 5-1)。開花期にエチレン生合成の鍵となる遺伝子 *DcACSI* の発現が子房で誘導されない原因として、この期間に子房でABAの受容とシグナル伝達が抑制されたためABAの作用が起きないことが予想された。この可能性を調査するために、先の3品種を使用し、開花期と老化期の花弁および子房のABA受容とシグナル伝達経路の中心的な役割を果た

す構成要素の遺伝子発現を, RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR を行って比較した.

その結果 ‘ライトピンクバーバラ’ では, ABA 受容体遺伝子 (*DcPYR1*) の相対蓄積量は, 開花初期 (Os 1–Os 3) では 0.004–0.007 r.e.l.と低く, Ss 1 で 0.028 r.e.l.に増加した (図 6-1). 他方, RT-PCR 解析によって *DcPP2C1* および *DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2* の転写産物はいずれも開花過程で検出された (図 5-1). Onoue *et al.* (2000) は満開のカーネーションの花に外から ABA を投与し, 3 日後にエチレン生成が開始したことを示した. そのため, Os 4 で *DcPYR1* の発現が増加し, その数日後の Os 6 や Ss 1 で, *DcACO1* と *DcACS1* の発現を誘導すると予想することは合理的である (図 5-1). これらの結果から ‘ライトピンクバーバラ’ においては, 開花期には ABA 受容体タンパク質 *DcPYR1* が不足しているため, ABA の作用が起きないことが示唆された. その結果として, エチレンの生合成遺伝子, *DcACO1* と *DcACS1* の転写が起こらず, 転写産物の蓄積もみられなかったことが推察される.

‘エクセリア’ の開花期の子房では相当な量の ABA の存在 (200–380 pmol·gFW<sup>-1</sup>) と, 高い蓄積量での *DcPYR1* の推移 (0.025–0.038 r.e.l.) にもかかわらず, 開花期の花では *DcACO1* と *DcACS1* が発現しなかった (図 4-3, 5-1, 6-1). さらに, この品種において ABA シグナル伝達と作用に関与する遺伝子 (*DcPP2C1*, *DcSnRK2.1*, *DcSnRK2.2*, *DcAREBF1*) の発現には欠損がなかった (図 5-1) ことから, 開花期の ‘エクセリア’ 子房での ABA 作用の欠如の理由は, 子房に十分な量の *DcPYR1* が存在したにもかかわらず, ABA 含量が ABA の作用を誘導する閾値に達していないことが推定された. その後老化ステージの初期 (Ss 1) で, よう

やくABA含量はその閾値を超え(図 4-3), *DcPYR1* への結合によってその作用を発揮したと考えられた.

‘ミラクルルージュ’の花の子房のABA含量は開花と老化の全過程を通じて推定上の閾値を超えなかった(図 4-3). そして*DcPYR1*の蓄積量も開花期と老化期を通じて0.002–0.006 r.e.l.と低いままであった(図 6-1). これら2つの要因が, 子房で*DcACO1*と*DcACS1*の発現誘導が起きない原因と考えられ, 結果としてこの品種の花は花持ちが延び, エチレンを生成しないと推測された.

まとめると今回の結果は, 初期の花の老化ステージで子房におけるエチレンに生合成に先立って, ABAの作用の発現(すなわち*DcACO1*と*DcACS1*の発現誘導)には, ABA含量と*DcPYR1*(ABA受容体)の蓄積量の両方が特定の閾値を超える必要があることを示唆した. すなわち, ABAは老化ステージ初期の花でカーネーションの花の雌ずい(子房)におけるエチレン生成を誘導する役割を果たすと考えられる.

今回の研究から老化過程のカーネーションの花の子房において*DcACO1*と*DcACS1*の発現誘導によるエチレン生成に対するABAの役割の更なる支持を得ることができた. これらの結果は, 根底にある制御の過程(すなわち, 雌ずいでのエチレン生合成の誘導)に対して有用な理解を得るために, 異なった老化特性を持つカーネーション3品種を比較することによって得られた. しかし, この種の比較は常に最終的な証明ではない. この考えを念頭において, これらの品種でエチレン生成に外部からのABA投与とABA生合成の阻害剤の作用が調査されなければならない. この実験は老化途上のカーネーションの花の

雌ずいにおけるエチレン生合成の誘導機構に対する ABA の制御の役割の仮説が本当であるかどうかをさらに実証すると予想される。

園芸花きの老化におけるクライマクテリック型エチレン生成機構の研究は、花き園芸の振興に役立つ重要な課題である。今回の研究はカーネーションにおいて、「雌ずいにおけるエチレン生成誘導因子が ABA である」ことを遺伝子レベルで検証した初めての研究になる。ABA がエチレン生成誘導因子であることが実証されると、花きの老化機構の理解を飛躍的に深め、新しい鮮度保持技術の開発に貢献すると考えられる。



## 摘要

### 第1章 緒言

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は、花卉の老化時に急速かつ過剰にエチレンを生成するエチレン主導型老化花きである。内生エチレンが老化に主導的役割を果たす花きでは、受粉刺激によって雌ずいで誘導生成されたエチレンが、老化の「スターターエチレン」として働く。しかし、雄ずいが花卉化した八重咲きカーネーションでは、自家受粉は起こり得ず、何らかの別因子がエチレン生成の誘導に関与していると予想される。過去の研究から、この誘導因子として植物ホルモンのアブシジン酸 (以下ABA) の可能性が推定されていた。本研究は、カーネーションの花組織におけるABA含量の変動およびABAの合成と作用に関与する遺伝子群の発現を、エチレン生成能の異なるカーネーション品種で比較検討することによって、雌ずいのエチレン生成開始反応におけるABAの役割を検証することを目的にして行った。

### 第2章 老化花卉の遺伝子発現解析に使用する対照遺伝子の探索

花の老化は、花組織 (特に花卉) の細胞が崩壊していく過程であり、RNAの急激な分解が起こる。カーネーションの花組織においても、老化の進行に伴い、rRNAやアクチン遺伝子の転写産物量の著しい減少が起きる。今まで、カーネーションでは、老化関連遺伝子の発現を解析する際に用いる対照遺伝子を、何にするかが未解決であった。ABA関連遺伝子の発現解析に先立って、対照遺伝子を決めることを目的にして、カーネーションの花組織から7種類のポリユビキチン遺伝子

(*DcUbq1-7*) のcDNAをクローニングして構造と発現を調査した。7種類の遺伝子は3'-非翻訳領域の塩基配列の相同性から、*DcUbq1*, *DcUbq2*, *DcUbq3-7*の3つのグループに分類された。そのうち、*DcUbq3-7*の転写産物量が花卉の展開と老化の過程を通じて変動しないことを見だし、対照遺伝子として使用できることを明らかにした。

### 第3章 アブシジン酸の生合成と作用・シグナル伝達経路に関与する遺伝子のクローニングと構造解析

ABAの生合成と作用に関与する遺伝子群の発現解析によって、エチレン生成開始反応におけるABAの役割を推定することを計画した。発現解析の準備として、カーネーション‘ライトピンクバーバラ’の花組織から、ABAの生合成と代謝、受容、シグナル伝達、作用に関与する遺伝子群のcDNAをクローニングし構造を解析した。その内訳は、ABAの生合成関連では9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 遺伝子 (*DcNCED1a*, *-b*, *DcNCED2a*, *-b*) と zeaxanthin epoxidase 遺伝子 (*DcZEPI*), ABA代謝関連ではABA 8'-hydroxylase 遺伝子 (*DcCYP707A1*), ABAシグナリング関連ではABA受容体遺伝子 (*DcPYR1*) と protein phosphatase 遺伝子 (*DcPP2C1*), protein kinase 遺伝子 (*DcSnRK2.1*, *-2.2*), ABAの作用関連ではABA応答因子結合因子遺伝子 (*DcABERE1*)であった。本研究は、これらの遺伝子群をカーネーションでは初めて明らかにした。

### 第4章 開花と老化時のアブシジン酸含量の変動

開花期と老化期の花の各部位 [花卉, 雌ずい (子房および花柱, 柱頭からなる), 花托, がく片] からABAを抽出・精製し, LC/MS/MSによっ



て定量して含量の変動を調査した。品種材料には、切り花老化時にエチレンを生成し約1週間の花持ち期間を示す‘ライトピンクバーバラ’と‘エクセリア’、および老化時にエチレンを生成せず約3週間の花もち期間を示す‘ミラクルルージュ’を用いた。ABAは各花構成部位の中では子房に最も多く含まれていた。また、子房のABA含量は、3品種で異なる変動パターンを示した。‘ライトピンクバーバラ’では、開花初期に多量に存在し開花後期にかけてわずかに増加した。‘エクセリア’では、開花期間を通じて‘ライトピンクバーバラ’の1/2量で推移したが、老化初期に急激に増加した。‘ミラクルルージュ’では、開花期と老化期を通じて少量のABAが存在していた。

## 第5章 アブシジン酸合成経路遺伝子の発現解析

3品種のカーネーションにおける上記遺伝子の発現を、RT-PCRおよびreal-time RT-PCRを行って、開花期と老化期の花の部位別に比較し、特に子房に注目して解析した。ABA生合成関連遺伝子のうち*DcNCED1a/b*において3品種間に大きな差が見られた。‘ライトピンクバーバラ’の子房では、開花初期から多量の*DcNCED1a/b*転写産物が蓄積していた。‘エクセリア’の子房では、転写産物量は開花期を通じて‘ライトピンクバーバラ’に較べて少なかったが、老化初期に急速に増加した。‘ミラクルルージュ’の子房では、開花期から老化初期を通じて、転写産物量は極めて少なかった。子房における*DcNCED1a/b*転写産物量の変動はABA含量の変動と一致したことから、ABAの生合成において*DcNCED1a/b*の発現が主要な役割を果たしていることが推察された。

## 第6章 アブシジン酸作用経路遺伝子の発現解析

‘ライトピンクバーバラ’ と ‘エクセリア’ では、開花期の子房で ABA が蓄積しているにも関わらず、エチレン生合成関連遺伝子の *DcACS1* と *DcACO1* の発現が誘導されない。この原因として開花期には ABA の作用が起きないことを予想し、ABA 作用経路遺伝子の発現を調べた。‘ライトピンクバーバラ’ では、ABA 受容体遺伝子 (*DcPYR1*) の転写産物量は、開花期を通じて少なく老化初期に増加した。この結果から ‘ライトピンクバーバラ’ においては、開花期には ABA 受容体タンパク質が不足しているため、ABA の作用が起きないことを推定した。‘エクセリア’ では開花期から老化初期を通して、*DcPYR1* の転写産物が大量に存在していた。これから ‘エクセリア’ では開花期に ABA 受容体は十分量存在するが、ABA 含量が ABA の作用を誘導する閾値に達していないことを推定した。‘ミラクルルージュ’ では *DcPYR1* の転写産物量が開花期と老化期を通じて極めて少なかった。この品種では、子房の ABA 含量と ABA 受容体量が少ないため、ABA の作用が現れないと推定した。

## 第7章 総合考察

カーネーションでは、開花期と老化期における雌ずい (特に子房) の ABA 含量が、*DcNCED1a/b* の発現量に依存して決まることが示唆された。このことは、ABA 生合成の鍵酵素が NCED であるという知見に一致するとともに、カーネーションでは複数ある *NCED* 遺伝子のうち *DcNCED1a/b* の発現が ABA 生合成の律速因子になっていることが示唆された。今回の研究から、ABA 含量と作用に関して、(1) ‘ライトピンク

バーバラ’の子房では、開花期に多量のABAが存在するもののABA受容体が十分に存在しないためABAの作用が起きず、老化初期にABA受容体が増加すると作用が現れること、(2)‘エクセリア’では開花期にABA受容体が存在するもののABA量が十分でないためABAの作用が現れないが、老化初期にABA含量が急速に増加するとABAの作用が現れること、また、(3)‘ミラクルルージュ’では開花期と老化期を通じてABAとABA受容体の蓄積が十分でないため、ABAの作用が現れないことが推定された。以上の結果から、ABAが雌ずいにおける*DcACSI*と*DcACOI*の発現を誘導してエチレン生成を引き起こすこと、ABAの作用の発現にはABA含量と*DcPYRI*の発現量が、作用発現の閾値を超える必要があることが推定された。本研究の結果、カーネーションでは「雌ずいにおけるエチレン生成誘導因子がABAである」ことが遺伝子レベルで初めて明らかにされた。これらの知見は今後の花き園芸学の分野において花きの老化機構の理解を飛躍的に深め、新しい鮮度保持技術の開発に貢献することが期待される。



## 引用文献

Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltveit, Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl., eds. 1987. Phenol/SDS method for plant RNA preparation. pp. 4.3.1–4.3.4. in: Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

Baroli, I., A. D. Do, T. Yamane and K. K. Niyogi. 2003. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. Plant Cell 15: 992–1008.

Borochoy, A. and W. R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. Hort. Rev. 11: 15–43.

Bouvier, F., C. Suire, J. Mutterer and B. Camara. 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. Plant Cell 15: 47–62.

- Buchanan, B. B., W. Grussem and R. L. Jones. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. pp. 868–873. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists.
- Burbidge, A., T. M. Grieve, A. Jackson, A. Thompson, D. R. McCarty and I. B. Taylor. 1999. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant J.* 17: 427–431.
- Burke, T. J., J. Callis and R. D. Vierstra. 1988. Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 213: 435–443.
- Callis, J., T. Carpenter, S. C-W. Sun and R. D. Vierstra. 1995. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139: 921–989.
- Choi, H. I., J. H. Hong, J. O. Ha, J. Y. Kang and S. Y. Kim. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive elements binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723–1730.
- Cutler, A. J. and J. E. Krochko. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4: 472–478.

Dobrev, P. I. and M. Kaminek. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromat. A* 950: 21–29.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Frohman, M. A., M. K. Dush and G. R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998–9002.

Fujii, T., V. Chinnusamy, A. Rodrigues, S. Rubio, R. Antoni, S-Y. Park, S. R. Cutler, J. Sheen, P. L. Rodriguez and J-K. Zhu. 2009. In vitro reconstitution of an abscisic acid signaling pathway. *Nature* 462: 660–664.

Furihata, T., K. Maruyama, Y. Fujita, T. Umezawa, R. Yoshida, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006. Abscisic acid dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1988–1993.

Gotoh, O. 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYPP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 267: 83–90.

Guerrero, C., M. de la Calle, M. S. Reid and V. Valpuesta. 1998. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Heemerocallis* spp.) during flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 36: 565–571.

Harada, T., S. Satoh, T. Yoshioka and K. Ishizawa. 2005. Expression of sucrose synthase genes involved in enhanced elongation of pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions under anoxia. *Ann. Bot.* 96: 683–692.

Harada, T., Y. Torii, S. Morita, T. Masumura and S. Satoh. 2010. Differential expression of genes identified by suppression subtractive hybridization in petals of opening carnation flowers. *J. Exp. Bot.* 61: 2345–2354.



Harada, T., Y. Torii, S. Morita, R. Onodera, Y. Hara, R. Yokoyama, K. Nishitani and S. Satoh. 2011. Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening. *J. Exp. Bot.* 62: 815–823.

Henskens, J. A. M., G. J. A. Rouwendal, A. ten Have and E. J. Woltering. 1994. Molecular cloning of two different ACC synthase PCR fragments in carnation flowers and organ-specific expression of the corresponding genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 453–458.

Hoeberichts, F., W. G. van Doorn, O. Vorst, R. D. Hall and M. F. van Wordragen, 2007. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *J. Exp. Bot.* 58: 2873–2885.

Huai, J., M. Wang, J. He, J. Zheng, Z. Dong, H. Lv, J. Zhao and G. Wang. 2008. Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Rep.* 27: 1861–1868.

Huang, F. C., P. Molnar and W. Schwab. 2009. Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J. Exp. Bot.* 60: 3011–3022.

- Iordachescu, M. and S. Verlinden. 2005. Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *J. Exp. Bot.* 56: 2011–2018.
- Iuchi, S, M. Kobayashi, T. Taji, M. Naramoto, M. Seki, T. Kato, S. Tabata, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 325–333.
- Jiang, W. B., S. Mayak, D. Weiss and A. H. Halevy. 1994. Regulation of a petal-specific ethylene-induced 70-kDa protein from *Dianthus caryophyllus*. *Physiol. Plant.* 92: 219–226.
- Jiang, Y., J. Dong, R. Chen, X. Gao and Z. Xu. 2011. Isolation of a novel PP2C gene from rice and its response to abiotic stresses. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 7143–7154.

Jones, M. L., P. B. Larsen and W. R. Woodson. 1995.

Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. *Plant Mol. Biol.* 28: 505–512.

Jones, M. L. and W. R. Woodson. 1997. Pollination-induced ethylene in carnation. Role of styler ethylene in collolla senescence. *Plant Physiol.* 115: 205–212.

Jones, M. L. and W. R. Woodson. 1999. Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation. *Plant Physiol.* 119: 755–764.

Jones, M. L. 2002. Ethylene responsiveness in carnation styles is associated with stigma receptivity. *Sexual Plant Reprod.* 15: 107–112.

Jones, M. L. 2004. Changes in gene expression during senescence. pp. 51–72. In: L. D. Nooden (ed.). *Plant Cell Death Processes*, Elsevier Science, San Diego, CA.

Junling, H., M. Wang, J. He, J. Zheng, Z. Dong, H. Lv, J. Zhao and G. Wang. 2008. Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Rep.* 27: 1861–1868.

Kobayashi, Y., M. Murata, H. Minami, S. Yamamoto, Y. Kagaya, T. Hobo, A. Yamamoto and T. Hattori. 2005. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element binding factors. *Plant J.* 44: 939–949.

Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283–307.

Klingler, J. P., G. Batelli and J. K. Zhu. 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signaling. *J. Exp. Bot.* 61: 3199–3210.

Komatsu, K., Y. Nishikawa, T. Ohtsuka, T. Taji, R. S. Quatrano, S. Tanaka and Y. Sakata. 2009. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 70: 327–340.

Kushiro, T., M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi, S. Kitamura, T. Asami, N. Hirai, T. Koshihara, Y. Kamiya and E. Nambara. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23: 1647–1656.

Lawton, K. A., B. Huang, P. B. Goldsbrough and W. R. Woodson. 1989. Molecular cloning and characterization of senescence-related genes from carnation flower petals. *Plant Physiol.* 90: 690–696.

Li, L., H. Cheng, J. Gai and D. Yu. 2007. Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 gene in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 226: 109–123.

Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann and E. Grill. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.

Manning, K. 1985. The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. pp. 83–92. In: J. A. Roberts and G. A. Tucker (eds.). *Ethylene and Plant Development*. Butterworths, Boston, MA.

Marinn, E., L. Nussaume, A. Quesada, M. Gonneau, B. Sotta, P. Hugueney, A. Frey and A. Marion-Poll. 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15: 2332–2342.

Mayak, S. and D. Dilley. 1976a. Regulation of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus*). Effect of abscisic acid and carbon dioxide on ethylene production. *Plant Physiol.* 58: 663–665.

Mayak, S. and D. Dilley. 1976b. Effect of sucrose on response of cut carnation to kinetin, ethylene, and abscisic acid. *J. Amer.*

Soc. Hort. Sci.101: 583–585.

Melcher, K., L-M. Ng, X. E. Zhou, F-F. Soon, Y. Xu, K. M. Suino-Powell, S-Y. Park, J. J. Weiner, H. Fujii, V. Chinnusamy, A. Kovach, J. Li, Y. Wang, J. Li, F. C. Peterson, D. R. Jensen, E-L. Yong, B. F. Volkman, S. R. Cutler, J-K. Zhu and H. E. Xu. 2009. A gate-latch-lock mechanism for hormone signaling by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602–608.

Messing, S. A. J., S. B. Gabelli, I. Echeverria, J. T. Vogel, J. C. Guan, B. C. Tan, H. J. Klee, D. R. McCarty and M. Amze. 2010. Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22: 2970–2980.

Morita, S., Y. Torii, T. Harada, M. Kawarada, R. Onodera and S. Satoh. 2011. Cloning and characterization of a cDNA encoding sucrose synthase associated with flower opening through early senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 358–364.

Nelson, D. R., M. A. Schuler, S. M. Paquette, D. Werck-Reichhart and S. Bak. 2004. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.* 135: 756–772.

Nichols, R. 1976. Cell enlargement and sugar accumulation in the gynoecium of the glasshouse carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) induced by ethylene. *Planta* 130: 47–52.

Nichols, R. 1977. Sites of ethylene production in the pollinated and unpollinated senescing carnation (*Dianthus caryophyllus*) inflorescence. *Planta* 135: 155–159.

Nishimura, N., K. Hitomi, A. S. Arvai, R. P. Rambo, C. Hitomi, S. R. Cutler, J. I. Schroeder and E. D. Getzoff. 2009. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326: 1373–1379.

Nowak, J. and H. Veen. 1982. Effects of silver thiosulfate on abscisic acid content in cut carnations as related to flower senescence. *J. Plant Growth Regul.* 1: 153–159.



- Nukui, H., S. Kudo, A. Yamashita and S. Satoh. 2004. Repressed ethylene production in the gynoecium of long-lasting flowers of the carnation 'White Candle': role of the gynoecium in carnation flower senescence. *J. Exp. Bot.* 55: 641–650.
- Ogata, J., Y. Itoh, M. Ishida, H. Yoshida and Y. Ozeki. 2004. Cloning and heterologous expression of cDNA encoding flavonoid glucosyltransferase from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotech.* 21: 367–375.
- Onoue, T., M. Mikami, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Characteristics of the inhibitory action of 1,1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl)semicarbazide (DPSS) on ethylene production in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Plant Growth Regul.* 30: 201–207.
- Onozaki, T., H. Ikeda, M. Shibata, N. Tankikawa, M. Yagi, T. Yamaguchi and M. Amano. 2006. Breeding and characteristics of carnation Norin No. 1 'Miracle rouge' and No. 2 'Miracle symphony' with long vase life. *Bull. Natl. Inst. Floric. Sci.* 5: 1–16 (in Japanese with English summary)

- Otsu, S., S. Satoh and Y. Kosugi. 2007. Expression of senescence related genes in carnation petals undergoing wilting and fading. *Acta Hort.* 763: 283–287.
- Park, K. Y., A. Drory and W. R. Woodson. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol.* 18: 377–386.
- Park, S-Y., P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J-K. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman and S. R. Cutler. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071.
- Park, H. J., H. C. Park, S. Y. Lee., H. J. Bohnert and D-J. Yun. 2011. Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers in plants. *J. Plant Biol.* 54: 275–285.
- Peiser, G. 1986. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

- (ACC) synthase activity, ACC and ACC-conjugate in cut carnation flowers during senescence. *Acta Hort.* 181: 99–104.
- Reid, M. S. and M-J. Wu. 1992. Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regul.* 11: 37–43.
- Ren, J., L. Sun, J. Wu, S. Zhao, C. Wang , Y. Wang, K. Ji and P. Leng. 2010. Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8'-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions. *J. Plant Physiol.* 167: 1486–1493.
- Rock, C. D. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357–396.
- Rodrigo, M. J., B. Alquezar and L. Zacarias. 2006. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* 57: 633–643.
- Ronen, M. and S. Mayak. 1981. Interrelationship between abscisic acid and ethylene in the control of senescence processes in carnation flowers. *J. Exp. Bot.* 32: 759–765.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.

Santiago, J., A. Rodrigues, A. Saez, S. Rubio, R. Antoni, F. Dupeux, S. Y. Park, J. A. Marquez, S. R. Cutler and P. L. Rodriguez. 2009. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J.* 60: 575–588.

Satoh, S. 2011. Ethylene production and petal wilting during senescence of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) flowers and prolonging their vase life by genetic transformation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 127–135.

Schweighofer, A., H. Hirt and I. Meskiene. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236–243.

Shibuya, K., T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Role of the gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *J. Exp. Bot.* 51: 2067–2073.

- Shibuya, K., M. Nagata, T. Tanikawa, T. Hashiba and S. Satoh.  
2002. Comparison of mRNA levels of three ethylene receptors  
in senescing flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) J.  
Exp. Bot. 53: 399–406.
- Sugawara, H., K. Shibuya, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh.  
2002. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the  
regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus  
caryophyllus* L.) flowers? J. Exp. Bot. 53: 407–423.
- Sun, L., Y. P. Wang, P. Chen, J. Ren, K. Ji, Q. Li, P. Li, S. J.  
Dai and P. Leng. 2011. Transcriptional regulation of  
*SIPYL*, *SlPP2C*, and *SlSnRK2* gene families encoding  
ABA signal core components during tomato fruit  
development and drought stress. J. Exp. Bot. 62:  
5659–5669.
- Sun, L., Y. Sun, M. Zhang, L. Wang, J. Ren, M. Cui, Y. Wang, K.  
Ji, P. Li, Q. Li, P. Chen, S. Dai, C. Duan, Y. Wu and P. Leng.  
2012. Suppression of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase,  
which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis,  
alters fruit texture in transgenic tomato. Plant Physiol. 158:

283–298.

Tanase, K., T. Onozaki, S. Satoh, M. Shibata and K. Ichimura. 2008. Differential expression levels of ethylene biosynthetic pathway genes during senescence of long-lived carnation cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 210–217.

Tan, B. C., S. H. Schwartz, J. A. D. Zeevaart and D. R. McCarty. 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12235–12240.

Tan, B. C., K. Cline and D. R. McCarty. 2001. Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J.* 27: 373–382.

Tan, B. C., L. M. Joseph, W. T. Deng, L. Liu, Q. B. Li, K. Cline and D. R. McCarty. 2003. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 35: 44–56.

ten Have, A. and E. J. Woltering. 1997. Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 34:

89–97.

Tournaire, C., S. Kushnir, G. Bauw, D. Inze, B. T. de la Serva and J-P. Renaudin. 1996. A thiol protease and an anionic peroxidase are induced by lowering cytokinins during callus growth in *Petunia*. *Plant Physiol.* 111: 159–168.

Umezawa, T., N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama and K. Shinozaki. 2009. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 17588–17593.

Umezawa, T., K. Nakashima, T. Miyakawa, T. Kuromori, M. Tanokura, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2010. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.* 51: 1821–1839.

Valpuesta, V., N. E. Lange, C. Guerrero and M. S. Reid. 1995. Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Heimerocallis*) flowers. *Plant Mol. Biol.* 28: 575–582.

van der Kop, D. A. M., G. Ruuya, D. Dees, C. Van Der Schoot, A. D. de Boer and W. G. van Doorn. 2003. Expression of defender against apoptotic death (DAD-1) in *Iris* and *Dianthus* petals. *Physiol. Plant.* 117: 256–263.

van Doorn, W. G. and E. J. Woltering. 2008. Physiology and molecular biology of petal senescence. *J. Exp. Bot.* 59: 453–480.

Verlinden, S., J. Boatright and W. R. Woodson. 2002. Changes in ethylene responsiveness of senescence-related genes during carnation flower development. *Physiol. Plant.* 116: 503–511.

Verlinden, S. and J. J. V. Garcia. 2004. Sucrose loading decreases ethylene responsiveness in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. White Sim) petals. *Postharvest Biol. Technol.* 31: 305–312.

Waki, K., K. Shibuya, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2001. Cloning of a cDNA encoding EIN3-like protein (DC-EIL1) and decrease in its mRNA level during senescence in carnation flower tissues. *J. Exp. Bot.* 52: 377–379.



- Wang, Z-Y., L. Xiong, W. Li, J-K. Zhu and J. Zhu. 2011. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1971–1984.
- Wang H. and W. R. Woodson. 1991. A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* 96: 1000–1001.
- Woodson, W. R., K. Y. Park, A. Drory, P. B. Larsen and H. Wang. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99: 526–532.
- Xian, L., J. Yi, X. H. Zhong, Q. L. Lian, M. A. Khan, X. Cao, X. X. Li, M. W. Gao, J. Wu, J. Chen and M. F. Yi. 2012. Cloning, characterization and expression analysis of key genes involved in ABA metabolism in *Gladiolus* cormels during storage. *Sci. Hortic.* 143: 115–121.

Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155–189.

Yoshida, R., T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi and K. Shinozaki. 2006. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281: 5310–5318.

Yuasa, T., Y. Tomikubo, T. Yamauchi, A. Inoue and M. Iwaya-Inoue. 2007. Environmental stresses activate a tomato SNF1-related protein kinase 2 homolog, SlSnRK2C. *Plant Biotech.* 24: 401–408.

Zhu, G., Y. Liu, N. Ye, R. Liu and J. Zhang. 2011. Involvement of the abscisic acid catabolic gene CYP707A2 in the glucose-induced delay in seed germination and post-germination growth of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 143: 375–384.

付表 1. アライメントおよび分子系統樹作成に使用した他植物種名と略称

略称	他植物種名
Ac	<i>Actinidia chinensis</i> (kiwi)
Al	<i>Arabidopsis lyrata</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (mouse-ear cress)
Ah	<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)
Aa	<i>Artemisia annua</i>
Af	<i>Avena fatua</i>
Bv	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>
Bd	<i>Brachypodium distachyon</i>
Bn	<i>Brassica napus</i> (rape)
Br	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>
Bc	<i>Bupleurum chinense</i>
Clns	<i>Camelina sativa</i>
Clls	<i>Camellia sinensis</i>
Ca	<i>Capsicum annuum</i> (bell pepper)
Ck	<i>Caragana korshinskii</i>
Cm	<i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i>
Cl	<i>Citrullus lanatus</i> (watermelon)
Ctc	<i>Citrus clementina</i>
Ctm	<i>Citrus maxima</i>
Cts	<i>Citrus sinensis</i> (orange)
Ctt	<i>Citrus trifoliata</i>
Ctu	<i>Citrus unshiu</i>
Cp	<i>Craterostigma plantagineum</i>
Crs	<i>Crocus sativus</i>
Cj	<i>Cryptomeria japonica</i>
Ccs	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber)
Cbm	<i>Cucurbita moschata</i>
Dcs	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> (carrot)
Dk	<i>Diospyros kaki</i> (persimmon)

次頁に続く

付表 1. アライメントおよび分子系統樹作成に使用した他植物種名と略称 (続き)

略称	他植物種名
Eh	<i>Eutrema halophilum</i>
Es	<i>Eutrema salsugineum</i>
Fs	<i>Fagus sylvatica</i> (beech)
Fa	<i>Fragaria ananassa</i> (strawberry)
Gl	<i>Gentiana lutea</i>
Gm	<i>Glycine max</i> (soybean)
Gh	<i>Gossypium hirsutum</i>
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> (barley)
In	<i>Ipomoea nil</i>
Ls	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)
Lj	<i>Lotus japonicus</i>
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Md	<i>Malus domestica</i>
Mp	<i>Marchantia polymorpha</i> (liverwort)
Ms	<i>Medicago sativa</i>
Mt	<i>Medicago truncatula</i> (barrel medic)
Mc	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (ice plant)
Np	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i> (common tobacco)
Onc	<i>Oncidium</i>
Or	<i>Orobanche ramosa</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>
Of	<i>Osmanthus fragrans</i>
Pa	<i>Persea americana</i> (avocado)
Ph	<i>Petunia hybrida</i> (petunia)
Pv	<i>Phaseolus vulgaris</i> (kidney bean)
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
Ps	<i>Pisum sativum</i> (garden pea)

次頁に続く

付表 1. アライメントおよび分子系統樹作成に使用した他植物種名と略称 (続き)

略称	他植物種名
Pls	<i>Populus suaveolens</i>
Plt	<i>Populus trichocarpa</i>
Prar	<i>Prunus armeniaca</i> (apricot)
Prav	<i>Prunus avium</i> (sweet cherry)
Prm	<i>Prunus mume</i>
Rs	<i>Raphanus sativus</i> (radish)
Rc	<i>Ricinus communis</i> (castor bean)
Rd	<i>Rosa damascena</i>
Sm	<i>Selaginella moellendorffii</i>
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato)
Sto	<i>Solanum torvum</i>
St	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)
Sb	<i>Sorghum bicolor</i> (sorghum)
Th	<i>Thellungiella halophila</i>
Ta	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)
Tm	<i>Triticum monococcum</i>
Vf	<i>Vicia faba</i> (broad bean)
Vu	<i>Vigna unguiculata</i> (cowpea)
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
Zm	<i>Zea mays</i> (maize)

付表 2a. アライメント作成に使用した他植物 NCED の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
GINCED2	<i>Gentiana lutea</i>	リンドウ	AAS47838
InNCED1	<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	AEH41591
SINCED1	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	CAB10168
StNCED1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AAT75151

付表 2b. アライメント作成に使用した他植物 ZEP の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
CmZEP	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	BAE79556
LsZEP1	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72089
SIZE	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	ABQ52698
StZEP1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ADF28629
VvZEP	<i>Vitis vinifera</i>	ブドウ	AAR11195

付表 2c. アライメント作成に使用した他植物 CYP707A の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
AtCYP707A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95234
CtsCYP707A1	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AEX15511
InCYP707A1	<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	AEH41592
LsCYP707A3	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAG12743
StCYP707A1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ABA55732

付表 2d. アライメント作成に使用した他植物 PYR/PYL/RCAR の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
AhPIP	<i>Arachis hypogaea</i>	ラッカセイ	ACG76109
AtPYL8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED96316
AtPYL9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE27277
CaPIP1	<i>Capsicum annuum</i>	トウガラシ	AAT35532
MtPYL8	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AES72456

付表 2e. アライメント作成に使用した他植物 PP2C の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
AtPP2C39	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75637
AtPP2C58	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85481
LjPP2C	<i>Lotus japonicus</i>	ミヤコグサ	AAD17805
RcPP2C	<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	XP_002533085
SIPP2C	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AAS86762

付表 2f. アライメント作成に使用した他植物 SnRK2 の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
AtSnRK2.10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE33751
StSnRK2.1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68938
StSnRK2.4	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68941
ZmSAPK6	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG33803
ZmSnRK2.1	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50005
ZmSnRK2.2	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50006

付表 2g. アライメント作成に使用した他植物 AREB/ABF の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号
AtABF2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32112
BvAREB1	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	テンサイ	CAP66259
EsABF2	<i>Eutrema salsugineum</i>	ソルトクレス	AFN84601
PlsABF2	<i>Populus suaveolens</i>	ドロノキ	ABF29696
StAREB	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFA37978



付表 3a. 分子系統樹作成に使用した他植物 NCED, CCD の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AaMAX3	<i>Artemisia annua</i>	クソニンジン	ACY74338	キク科
AcCCD7	<i>Actinidia chinensis</i>	キウイ	ADP37985	マタタビ科
AcCCD8	<i>Actinidia chinensis</i>	キウイ	ADP37984	マタタビ科
AhNCED1	<i>Arachis hypogaea</i>	ラッカセイ	CAE00459	マメ科
AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	CAA06712	アブラナ科
AtCCD4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE84154	アブラナ科
AtCCD7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC10494	アブラナ科
AtCCD8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86121	アブラナ科
AtNCED2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE84030	アブラナ科
AtNCED3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75526	アブラナ科
AtNCED5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE31178	アブラナ科
AtNCED6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE76875	アブラナ科
AtNCED9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE36100	アブラナ科
CaCCD1	<i>Capsicum annuum</i>	トウガラシ	CAC79644	ナス科
CjNCED	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ	BAF31898	スギ科
CkNCED1	<i>Caragana korshinskii</i>	イナゴマメ	ACU86971	マメ科
CINCED1	<i>Citrullus lanatus</i>	スイカ	ADC95722	ウリ科
ClnsNCED6	<i>Camelina sativa</i>	カメリナ	ADE80897	アブラナ科
CmCCD4a	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	ABY60885	キク科
CmCCD4b	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	BAF36656	キク科
CmNCED3a	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	BAF36655	キク科
CmNCED3b	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	BAF36657	キク科
CrsCCD2	<i>Crocus sativus</i>	クロッカス	ACD62475	アヤメ科
CrsCCD4a	<i>Crocus sativus</i>	クロッカス	ACD62476	アヤメ科
CrsCCD4b	<i>Crocus sativus</i>	クロッカス	ACD62477	アヤメ科
CrsCCD4c	<i>Crocus sativus</i>	クロッカス	AEO50759	アヤメ科
CtcCCD4a	<i>Citrus clementina</i>	クレメンタイン	ABC26011	ミカン科
CtcCCD4b	<i>Citrus clementina</i>	クレメンタイン	ABC26012	ミカン科

次頁に続く

付表 3a. 分子系統樹作成に使用した他植物 NCED, CCD の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
CtsNCED1	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AAY89370	ミカン科
CtsNCED2	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AAY89371	ミカン科
CrsNCED4	<i>Crocus sativus</i>	クロッカス	ACD44928	アヤメ科
DcsCCD1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	ABB52081	セリ科
DcsNCED1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	ABB52078	セリ科
DcsNCED2	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	ABB52079	セリ科
DcsNCED3	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	ABB52080	セリ科
DkCCD1	<i>Diospyros kaki</i>	カキ	AFC90006	カキノキ科
DkNCED1	<i>Diospyros kaki</i>	カキ	ADP20465	カキノキ科
DkNCED2	<i>Diospyros kaki</i>	カキ	ADP20466	カキノキ科
FaNCED2	<i>Fragaria ananassa</i>	イチゴ	AEK99069	バラ科
FaNCED3	<i>Fragaria ananassa</i>	イチゴ	AEK99070	バラ科
GINCED1	<i>Gentiana lutea</i>	リンドウ	AAS47837	リンドウ科
GINCED2	<i>Gentiana lutea</i>	リンドウ	AAS47838	リンドウ科
GmCCD7	<i>Glycine max</i>	ダイズ	ADK26570	マメ科
GmCCD8	<i>Glycine max</i>	ダイズ	ADK26571	マメ科
GmNCED1	<i>Glycine max</i>	ダイズ	AEK69514	マメ科
GmNCED2	<i>Glycine max</i>	ダイズ	AEK69515	マメ科
HvNCED1	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABB71583	イネ科
HvNCED2	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABB71584	イネ科
InNCED1	<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	AEH41591	ヒルガオ科
LsCCD1	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72094	キク科
LsCCD2	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72095	キク科
LsNCED1	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72090	キク科
LsNCED2	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72091	キク科
LsNCED3	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72092	キク科
LsNCED4	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72093	キク科
MdCCD4	<i>Malus domestica</i>	リンゴ	ABY47995	バラ科

次頁に続く

付表 3a. 分子系統樹作成に使用した他植物 NCED, CCD の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
MtCCD1	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	CAR57918	マメ科
NtCCD4	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	AEI61930	ナス科
NtNCED3-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	AFP57677	ナス科
NtNCED3-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	AFP57678	ナス科
OfCCD1	<i>Osmanthus fragrans</i>	ギンモクセイ	BAJ05401	モクセイ科
OfCCD4	<i>Osmanthus fragrans</i>	ギンモクセイ	ABY60887	モクセイ科
OncCCD1	<i>Oncidium</i>	オンシジウム	ACP27629	ラン科
OsCCD1	<i>Oryza sativa</i>	イネ	ABG22113	イネ科
OsCCD7	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF15405	イネ科
OsNCED3	<i>Oryza sativa</i>	イネ	AAW21319	イネ科
OsNCED4	<i>Oryza sativa</i>	イネ	AAW21320	イネ科
OsNCED5	<i>Oryza sativa</i>	イネ	AAW21321	イネ科
PaCCD1	<i>Persea americana</i>	アボガド	AAK00622	クスノキ科
PaNCED1	<i>Persea americana</i>	アボガド	AAK00632	クスノキ科
PaNCED3	<i>Persea americana</i>	アボガド	AAK00623	クスノキ科
PhCCD1	<i>Petunia hybrida</i>	ペチュニア	AAT68189	ナス科
PhCCD7	<i>Petunia hybrida</i>	ペチュニア	ACY01408	ナス科
PpCCD7	<i>Physcomitrella patens</i>	ヒメツリガネゴケ	ADK36680	ヒョウタンゴケ科
PpCCD8	<i>Physcomitrella patens</i>	ヒメツリガネゴケ	ADK36681	ヒョウタンゴケ科
PsNCED2	<i>Pisum sativum</i>	エンドウマメ	BAC10550	マメ科
PsNCED3	<i>Pisum sativum</i>	エンドウマメ	BAC10551	マメ科
PsRMS1	<i>Pisum sativum</i>	エンドウマメ	AAS66906	マメ科
PsRMS5	<i>Pisum sativum</i>	エンドウマメ	ABD67496	マメ科
PvNCED1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	AAF26356	マメ科
PvNCED2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	AAV82457	マメ科
RcNCED1	<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	EEF44272	トウダイグサ科
RdCCD1	<i>Rosa damascena</i>	バラ	ABY47994	バラ科
RdCCD4	<i>Rosa damascena</i>	バラ	ABY60886	バラ科

次頁に続く

付表 3a. 分子系統樹作成に使用した他植物 NCED, CCD の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
RsNCED1	<i>Raphanus sativus</i>	ハツカダイコン	BAF42336	アブラナ科
SbCCD1	<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	EER92880	イネ科
SbNCED1	<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	EER93751	イネ科
SICCD7	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	ACY39883	ナス科
StNCED1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AAT75151	ナス科
StNCED2	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AAT75152	ナス科
VvCCD1	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	AFJ94681	ブドウ科
VvNCED1	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	AAR11193	ブドウ科
VvNCED2	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	AAR11194	ブドウ科
ZmCCD1	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ABF85668	イネ科
ZmCCD7	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACR33784	イネ科
ZmCCD8	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACR33785	イネ科
ZmVP14	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG27830	イネ科

付表 3b. 分子系統樹作成に使用した他植物 ZEP の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AlABA1	<i>Arabidopsis lyrata</i>	ミヤマハタザオ	EFH41291	アブラナ科
AtABA1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED98292	アブラナ科
BdZEP	<i>Brachypodium distachyon</i>	セイヨウヤマカモジグサ	XP_003579861	イネ科
BrZEP	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	ハクサイ	ACM68704	アブラナ科
CaZEP	<i>Capsicum annuum</i>	トウガラシ	CAA62795	ナス科
CIZEP	<i>Citrullus lanatus</i>	スイカ	ADI56522	ウリ科
CmZEP	<i>Chrysanthemum × morifolium</i>	キク	BAE79556	キク科
CtmZEP	<i>Citrus maxima</i>	ブンタン	ACE79170	ミカン科
CtsZEP2	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	BAI79260	ミカン科
CtuZEP	<i>Citrus unshiu</i>	ウンシュウミカン	BAI79258	ミカン科

次頁に続く

付表 3b. 分子系統樹作成に使用した他植物 ZEP の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
CbmZEP	<i>Cucurbita moschata</i>	トウヨウカボチャ	AEN94901	ウリ科
CusZEP	<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	ADP69105	ウリ科
DcsZEP	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	ABB52077	セリ科
EhZEP	<i>Eutrema halophilum</i>	ソルトクレス	AAV85824	アブラナ科
GIZEP1	<i>Gentiana lutea</i>	リンドウ	BAA88841	リンドウ科
GIZEP2	<i>Gentiana lutea</i>	リンドウ	BAA88842	リンドウ科
GmZEP1	<i>Glycine max</i>	ダイズ	ADK26569	マメ科
GmZEP2	<i>Glycine max</i>	ダイズ	AEK69512	マメ科
GmZEP3	<i>Glycine max</i>	ダイズ	AEK69513	マメ科
InZEP1	<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	ADX99209	ヒルガオ科
LsZEP1	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAE72089	キク科
MtZEP	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AES85884	マメ科
NpABA2	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	タバコ	CAA65048	ナス科
OncZEP	<i>Oncidium</i>	オンシジウム	ACP27627	ラン科
OsABA2	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAB39765	イネ科
PrarZEP	<i>Prunus armeniaca</i>	スモモ	AAC24582	バラ科
PrmZEP	<i>Prunus mume</i>	ウメ	BAF49058	バラ科
RcZEP	<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	EEF38782	トウダイグサ科
SIZE	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	ABQ52698	ナス科
SmZEP1	<i>Selaginella moellendorffii</i>	イヌカタヒバ	EFJ26323	イワヒバ科
StZEP1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ADF28629	ナス科
StZEP3	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ABA55731	ナス科
VuZEP	<i>Vigna unguiculata</i>	ササゲ	BAB11934	マメ科
VvZEP1	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	AFP28801	ブドウ科
ZmZEP	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG42893	イネ科

付表 3c. 分子系統樹作成に使用した他植物 CYP707A, P450 ファミリーの詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtCYP702A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE34409	アブラナ科
AtCYP702A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83582	アブラナ科
AtCYP702A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83583	アブラナ科
AtCYP702A5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83593	アブラナ科
AtCYP702A6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83595	アブラナ科
AtCYP702A8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77630	アブラナ科
AtCYP707A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	CAB78925	アブラナ科
AtCYP707A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	CAB10309	アブラナ科
AtCYP707A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95234	アブラナ科
AtCYP707A4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AAM61624	アブラナ科
AtCYP708A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE33323	アブラナ科
AtCYP708A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95607	アブラナ科
AtCYP708A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE36112	アブラナ科
AtCYP716A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED94045	アブラナ科
AtCYP716A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED94048	アブラナ科
AtCYP718	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC10177	アブラナ科
AtCYP721A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE35675	アブラナ科
AtCYP722A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE29875	アブラナ科
AtCYP724A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED92026	アブラナ科
AtCYP83A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83323	アブラナ科
AtCYP85A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED94380	アブラナ科
AtCYP85A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77620	アブラナ科
AtCYP87A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28920	アブラナ科
AtCYP88A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE27796	アブラナ科
AtCYP88A4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08685	アブラナ科
AtCYP90A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90909	アブラナ科
AtCYP90B1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE78691	アブラナ科
AtCYP90C1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86649	アブラナ科

次頁に続く

付表 3c. 分子系統樹作成に使用した他植物 CYP707A, P450 ファミリーの詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtCYP90D1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75404	アブラナ科
BcCYP707A67	<i>Bupleurum chinense</i>	ヒロハミシマサイコ	AFK79028	セリ科
CtsCYP707A1	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AEX15511	ミカン科
CtsCYP707A2	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AEX15512	ミカン科
CtsCYP707A3	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AEX15513	ミカン科
CtsCYP707A4	<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	AEX15514	ミカン科
GmCYP707A1	<i>Glycine max</i>	ダイズ	ABQ65856	マメ科
HvCYP707A1	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABB71585	イネ科
HvCYP707A2	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABB71586	イネ科
InCYP707A1	<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	AEH41592	ヒルガオ科
LsCYP707A1	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAG12741	キク科
LsCYP707A2	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAG12742	キク科
LsCYP707A3	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAG12743	キク科
LsCYP707A4	<i>Lactuca sativa</i>	レタス	BAG12744	キク科
NpCYP707A	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	不明	CAR92131	ナス科
NtCYP707A	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	AAZ23260	ナス科
OrCYP707A1	<i>Orobanche ramosa</i>	ナンバンギセル	AFP74114	ハマウツボ科
OrCYP707A2	<i>Orobanche ramosa</i>	ナンバンギセル	AFP74115	ハマウツボ科
OsCYP707A5	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAD07562	イネ科
OsCYP707A6	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAD09367	イネ科
OsCYP707A7	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF25280	イネ科
PravCYP707A1	<i>Prunus avium</i>	オウトウ	ADP08624	バラ科
PvCYP707A1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	ABC86558	マメ科
PvCYP707A2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	ABC86559	マメ科
PvCYP707A3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	ABC86560	マメ科
SbCYP707A1	<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	EES05661	イネ科
SbCYP707A2	<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	EES15128	イネ科
SbCYP707A3	<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	EER99010	イネ科

次頁に続く

付表 3c. 分子系統樹作成に使用した他植物 CYP707A, P450 ファミリーの詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
SlCYP707A1	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	ABX38720	ナス科
SmCYP707A1	<i>Selaginella moellendorffii</i>	イヌカタヒバ	EFJ30794	イワヒバ科
SmCYP707A2	<i>Selaginella moellendorffii</i>	イヌカタヒバ	EFJ26974	イワヒバ科
StCYP707A1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ABA55732	ナス科
StCYP707A2	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ABA55733	ナス科
TaCYP707A1	<i>Triticum aestivum</i>	パンコムギ	ACB78189	イネ科
TmABA8OH2	<i>Triticum monococcum</i>	ヒトツブコムギ	BAI44032	イネ科

付表 3d. 分子系統樹作成に使用した他植物 PYR/PYL/RCAR の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AhPIP	<i>Arachis hypogaea</i>	ラッカセイ	ACG76109	マメ科
AtPYL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95426	アブラナ科
AtPYL2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07788	アブラナ科
AtPYL3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE35402	アブラナ科
AtPYL4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09522	アブラナ科
AtPYL5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90874	アブラナ科
AtPYL6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09815	アブラナ科
AtPYL7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE81969	アブラナ科
AtPYL8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED96316	アブラナ科
AtPYL9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE27277	アブラナ科
AtPYL10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85409	アブラナ科
AtPYL11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95308	アブラナ科
AtPYL12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95309	アブラナ科
AtPYL13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE84069	アブラナ科
AtPYR1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83959	アブラナ科
CaPIP1	<i>Capsicum annuum</i>	トウガラシ	AAT35532	ナス科

次頁に続く



付表 3d. 分子系統樹作成に使用した他植物 PYR/PYL/RCAR の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
FaPYR1	<i>Fragaria ananassa</i>	イチゴ	ADZ55282	バラ科
GmPYL8	<i>Glycine max</i>	ダイズ	XP_003541499	マメ科
MtPYL8	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AES72456	マメ科
NtC17	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	CAI84653	ナス科
Os01g0827800	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAB68102	イネ科
Os02g0226801	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAH91594	イネ科
Os02g0255500	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF08378	イネ科
Os05g0213500	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF16837	イネ科
Os05g0473000	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF17733	イネ科
Os06g0527800	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF19685	イネ科
Os06g0528300	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF19686	イネ科
Os06g0562200	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF19788	イネ科
Os10g0573400	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF27307	イネ科
SIPYL1	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK326186	ナス科
SIPYL2	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK324386	ナス科
SIPYL3	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK323787	ナス科
SIPYL4	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK326797	ナス科
SIPYL5	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	BT013073	ナス科
SIPYL6	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK328892	ナス科
SIPYL7	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK329986	ナス科
SIPYL8	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK329706	ナス科
StCAP1L	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ABB29920	ナス科

付表 3e. 分子系統樹作成に使用した他植物 PP2C の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtABI1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85155	アブラナ科
AtABI2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED96839	アブラナ科
AtAHG1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED96123	アブラナ科
AtAHG2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE33311	アブラナ科
AtAHG3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75044	アブラナ科
AtAP2C1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08336	アブラナ科
AtAP2C2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28084	アブラナ科
AtAP2C4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE34702	アブラナ科
AtAP2C5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE82615	アブラナ科
AtAP2C6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77272	アブラナ科
AtAP2C14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32006	アブラナ科
AtAP2C15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED91590	アブラナ科
AtAP2C17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75928	アブラナ科
AtAP2C20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32241	アブラナ科
AtAP2C21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE80329	アブラナ科
AtAP2C23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE78796	アブラナ科
AtAP2C25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09891	アブラナ科
AtAP2C26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09016	アブラナ科
AtDBP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07725	アブラナ科
AtHAB1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE35372	アブラナ科
AtHAB2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE29605	アブラナ科
AtHAI1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED97159	アブラナ科
AtHAI2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28124	アブラナ科
AtHAI3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08244	アブラナ科
AtHPP2C5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09793	アブラナ科
AtKAPP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED92680	アブラナ科
AtPAPP2C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE30222	アブラナ科
AtPIA1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07049	アブラナ科

次頁に続く

付表 3e. 分子系統樹作成に使用した他植物 PP2C の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtPLL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09098	アブラナ科
AtPLL2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90468	アブラナ科
AtPLL3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE74761	アブラナ科
AtPLL4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08185	アブラナ科
AtPLL5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28151	アブラナ科
AtPOL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC10773	アブラナ科
AtPP2C5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28405	アブラナ科
AtPP2C6-6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE27587	アブラナ科
AtPP2C6-7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED93745	アブラナ科
AtPP2C17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE36081	アブラナ科
AtPP2C19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC06959	アブラナ科
AtPP2C33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE73856	アブラナ科
AtPP2C35	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE74367	アブラナ科
AtPP2C38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75225	アブラナ科
AtPP2C39	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75637	アブラナ科
AtPP2C41	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75867	アブラナ科
AtPP2C42	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75902	アブラナ科
AtPP2C58	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85481	アブラナ科
AtPP2C61	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86151	アブラナ科
AtPP2C63	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86293	アブラナ科
AtPP2C64	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86941	アブラナ科
AtPP2C67	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90514	アブラナ科
AtPP2C72	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED93513	アブラナ科
AtPP2C79	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED98157	アブラナ科
AtPPH1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85395	アブラナ科
AtWIN2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85953	アブラナ科
FsPP2C1	<i>Fagus sylvatica</i>	ヨーロッパブナ	CAB90633	ブナ科
FsPP2C2	<i>Fagus sylvatica</i>	ヨーロッパブナ	CAB90634	ブナ科

次頁に続く

付表 3e. 分子系統樹作成に使用した他植物 PP2C の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
GhPP2C	<i>Gossypium hirsutum</i>	ワタ	ABD65465	アオイ科
LjPP2C	<i>Lotus japonicus</i>	ミヤコグサ	AAD17805	マメ科
McMPC2	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	アイSprラント	AAC36697	ハマミズナ科
McMPC5	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	アイSprラント	AAC36698	ハマミズナ科
McMPC6	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	アイSprラント	AAC36699	ハマミズナ科
McMPC8	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	アイSprラント	AAC36700	ハマミズナ科
McPP2C	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	アイSprラント	AAD11430	ハマミズナ科
MpABI1	<i>Marchantia polymorpha</i>	ゼニゴケ	ADB22517	ゼニゴケ科
MsMP2C	<i>Medicago sativa</i>	ムラサキウマゴヤシ	CAA72341	マメ科
NtPP2C1	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	CAC10358	ナス科
NtPP2C2	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	BAF43700	ナス科
Os01g0656200	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF05668	イネ科
Os01g0846300	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF06702	イネ科
Os03g0268600	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF11588	イネ科
Os04g0167900	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAH92493	イネ科
Os05g0537400	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF18083	イネ科
Os05g0572700	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF18292	イネ科
Os05g0592800	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF18412	イネ科
Os09g0325700	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF24795	イネ科
OsKAPP	<i>Oryza sativa</i>	イネ	AAC26828	イネ科
PpABI1A	<i>Physcomitrella patens</i>	ヒメツリガネゴケ	BAG12299	ヒョウタンゴケ科
PpABI1B	<i>Physcomitrella patens</i>	ヒメツリガネゴケ	BAG12298	ヒョウタンゴケ科
PravPP2C	<i>Prunus avium</i>	オウトウ	AAQ03211	バラ科
RcPP2C	<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	XP_002533085	トウダイグサ科
SIPP2C	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AAS86762	ナス科
SIPP2C1	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	BAI39595	ナス科
SIPP2C2	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	BAI39596	ナス科
SIPP2C3	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK321470	ナス科

次頁に続く

付表 3e. 分子系統樹作成に使用した他植物 PP2C の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
SIPP2C4	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK322432	ナス科
SIPP2C5	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK325872	ナス科
SIPP2C6	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK319182	ナス科
TaPP2C	<i>Triticum aestivum</i>	パンコムギ	ABS11093	イネ科
VvPP2C	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	XP_002285109	ブドウ科
ZmKAPP	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	AAB93832	イネ科
ZmPP2C	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG39816	イネ科

付表 3f. 分子系統樹作成に使用した他植物 SnRK の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtCIPK3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07919	アブラナ科
AtCIPK9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE27245	アブラナ科
AtSnRK1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE73608	アブラナ科
AtSnRK1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77543	アブラナ科
AtSnRK1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED94433	アブラナ科
AtSnRK2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED91326	アブラナ科
AtSnRK2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE78673	アブラナ科
AtSnRK2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED98274	アブラナ科
AtSnRK2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE28667	アブラナ科
AtSnRK2.5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED97781	アブラナ科
AtSnRK2.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86299	アブラナ科
AtSnRK2.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE87152	アブラナ科
AtSnRK2.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE36091	アブラナ科
AtSnRK2.9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07398	アブラナ科
AtSnRK2.10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE33751	アブラナ科
AtSnRK3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90395	アブラナ科

次頁に続く

付表 3f. 分子系統樹作成に使用した他植物 SnRK の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtSnRK3.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED91105	アブラナ科
AtSnRK3.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE83462	アブラナ科
AtSnRK3.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED96928	アブラナ科
AtSnRK3.5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95302	アブラナ科
AtSnRK3.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED95303	アブラナ科
AtSnRK3.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08929	アブラナ科
AtSnRK3.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED97046	アブラナ科
AtSnRK3.9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE84078	アブラナ科
AtSnRK3.10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE76704	アブラナ科
AtSnRK3.11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED93966	アブラナ科
AtSnRK3.13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE84899	アブラナ科
AtSnRK3.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE85835	アブラナ科
AtSnRK3.15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED90397	アブラナ科
AtSnRK3.16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE75963	アブラナ科
AtSnRK3.18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC07656	アブラナ科
AtSnRK3.19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09543	アブラナ科
AtSnRK3.20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE31063	アブラナ科
AtSnRK3.21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32269	アブラナ科
AtSnRK3.22	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC08375	アブラナ科
AtSnRK3.23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE31201	アブラナ科
AtSnRK3.24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED91610	アブラナ科
AtSnRK3.25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED93402	アブラナ科
BnSRK2E	<i>Brassica napus</i>	セイヨウアブラナ	ADP24128	アブラナ科
CllsSPK	<i>Camellia sinensis</i>	チャ	ABG81507	ツバキ科
GmSPK-4	<i>Glycine max</i>	ダイズ	AAB68962	マメ科
GmSRK2AL	<i>Glycine max</i>	ダイズ	XP_003540159	マメ科
HvPKABA1	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	BAB61735	イネ科
LeSNF1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	トマト	AAF66639	ナス科

次頁に続く

付表 3f. 分子系統樹作成に使用した他植物 SnRK の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
MtSAPK3	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AET04043	マメ科
MtSnRK	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AES74776	マメ科
MtSPK	<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	AES98115	マメ科
NtNPK5	<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	BAA05649	ナス科
OsSAPK1	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF12188	イネ科
OsSAPK2	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF22226	イネ科
OsSAPK3	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF27249	イネ科
OsSAPK4	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF06844	イネ科
OsSAPK5	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF16270	イネ科
OsSAPK6	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF09013	イネ科
OsSAPK7	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF14741	イネ科
OsSAPK8	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF13285	イネ科
OsSAPK9	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF30174	イネ科
OsSAPK10	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF12567	イネ科
RcSAPK1	<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	XP_002513955	トウダイグサ科
SlSnRK2.4	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AK329601	ナス科
StSnRK2.1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68938	ナス科
StSnRK2.2	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68939	ナス科
StSnRK2.3	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68940	ナス科
StSnRK2.4	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68941	ナス科
StSnRK2.5	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68942	ナス科
StSnRK2.6	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68943	ナス科
StSnRK2.7	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68944	ナス科
StSnRK2.8	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	AFR68945	ナス科
TaSnRK2.4	<i>Triticum aestivum</i>	パンコムギ	ACU65228	イネ科
VfAAPK	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	AAF27340	マメ科
VvSnRK	<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	CAI96818	ブドウ科
ZmSnRK2.1	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50005	イネ科

次頁に続く

付表 3f. 分子系統樹作成に使用した他植物 SnRK の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
ZmSnRK2.2	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50006	イネ科
ZmSnRK2.3	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50007	イネ科
ZmSnRK2.4	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50008	イネ科
ZmSnRK2.5	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50009	イネ科
ZmSnRK2.6	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50010	イネ科
ZmSnRK2.7	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50011	イネ科
ZmSnRK2.8	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50012	イネ科
ZmSnRK2.10	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50013	イネ科
ZmSnRK2.11	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	ACG50014	イネ科

付表 3g. 分子系統樹作成に使用した他植物 AREBF/ABF の詳細

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AfVP1	<i>Avena fatua</i>	カラスムギ	CAA04553	イネ科
AtABF1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32465	アブラナ科
AtABF2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE32112	アブラナ科
AtABF3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86308	アブラナ科
AtABF4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AAF27182	アブラナ科
AtABI3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE76933	アブラナ科
AtABI4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09798	アブラナ科
AtABI5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09226	アブラナ科
AtAI5L8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AED94886	アブラナ科
AtDPBF2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77905	アブラナ科
AtDPBF3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE79574	アブラナ科
AtDPBF4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEC09922	アブラナ科
AtFUS3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE77216	アブラナ科
AtGBF4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	ABD19676	アブラナ科

次頁に続く



付表 3g. 分子系統樹作成に使用した他植物 AREBF/ABF の詳細 (続き)

略号	植物種 (学名)	植物種 (和名)	登録番号	分類
AtGBF6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	AEE86397	アブラナ科
BvAREB1	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	テンサイ	CAP66259	ヒユ科
CpVP1	<i>Craterostigma plantagineum</i>	不明	CAA04184	ゴマノハグサ科
CttABF	<i>Citrus trifoliata</i>	カラタチ	ADM53098	ミカン科
DcsC-ABI3	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	ニンジン	BAA82596	セリ科
EsABF2	<i>Eutrema salsugineum</i>	ゾルトクレス	AFN84601	アブラナ科
HvABF1	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABH05131	イネ科
HvABF2	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABH05132	イネ科
HvABF3	<i>Hordeum vulgare</i>	シジョウオオムギ	ABH05133	イネ科
Os10g0572300	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF27299	イネ科
OsABF1	<i>Oryza sativa</i>	イネ	ADB23454	イネ科
OsABI5	<i>Oryza sativa</i>	イネ	ABM90395	イネ科
OsDREB1A	<i>Oryza sativa</i>	イネ	AAN02486	イネ科
OsVP1	<i>Oryza sativa</i>	イネ	BAF05548	イネ科
PlsABF2	<i>Populus suaveolens</i>	ドロノキ	ABF29696	ヤナギ科
PltABF2-2	<i>Populus trichocarpa</i>	ホワイトポプラ	ABN58426	ヤナギ科
PltABI3	<i>Populus trichocarpa</i>	ホワイトポプラ	CAA05922	ヤナギ科
PvALF	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	AAA87030	マメ科
SlAREB	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	AAS20434	ナス科
StABF1	<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	ADL70202	ナス科
StoAREB	<i>Solanum torvum</i>	スズメノナスビ	AFA37978	ナス科
TaAREB	<i>Triticum aestivum</i>	パンコムギ	AAM75355	イネ科
TaCBF2	<i>Triticum aestivum</i>	パンコムギ	AAT76662	イネ科
ZmDBF1	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	AAM80486	イネ科
ZmDBF2	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	AAA90947	イネ科
ZmVP1	<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	AAA33506	イネ科



## 謝辞

本論文の作成ににあたり，京都府立大学大学院生命環境科学研究科 遺伝子工学研究室教授 佐藤茂博士には，終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました．独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所様には，研究材料として‘エクセリア’および‘ミラクルルー ジュ’を提供頂きますとともに，山口博康博士，八木雅史博士には実験材料の採取をお手伝い頂きました．また日本大学生物資源科学部植物資源科学科花卉園芸学研究室教授 腰岡政二博士，准教授 窪田聡博士には ABA の抽出・精製法をご教授頂くとともに，ABA の定量分析をお引き受けいただきました．ここに記して，深く感謝の意を表します。