



Title	レタスの抽苔と花成に関する生理学的研究
Author(s)	福田, 真知子
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第7018号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.r7018
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/65635
Type	theses (doctoral)
File Information	Machiko_Fukuda.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文

レタスの抽苔と花成に関する生理学的研究

北海道大学 大学院農学院

福田 真知子

謝辞

本論文の取りまとめに際し、懇切なるご指導とご校閲をいただいた北海道大学大学院農学研究院教授，増田清博士，准教授，藤野介延博士に心から感謝の意を表します。また，本論文をご校閲いただいた同大学大学院農学研究院教授，近藤則夫博士に厚く御礼申し上げます。

野菜茶業研究所機能解析部生育生理研究室本多一郎室長（現前橋工科大学教授），菊地郁主任研究員（現宮城大学准教授），松尾哲主任研究員の各位には，研究を進める過程において終始的確なご指導，ご助言をいただきました。また，同研究室真川せつ子さん，松田繁美さん，荒木照代さん，技術支援センターの皆さんには植物の栽培，調査へのご支援をいただきました。山形大学農学部教授，三橋渉博士，同大学農学部教授，豊増知伸博士には，ジベレリン関連遺伝子解析に関してご指導をいただきました。野菜花き研究部門ウリ科ユニットの野口祐司ユニット長には，レタス品種・系統の種子を分譲していただき，ご指導，ご助言をいただきました。野菜花き研究部門生産生理ユニットの筒井美奈さんには，実験遂行にあたり多大なご協力をいただきました。野菜花き研究部門露地生産ユニット佐々木英和ユニット長，生産生理ユニット浦上敦子ユニット長には，論文執筆に際しご助言と激励をいただきました。野菜花き研究部門野菜生産システム研究領域の皆様には，実験遂行のための便宜を図っていただきました。以上の各位に対し，心から感謝の意を表します。

2016年12月

福田 真知子

「レタスの抽苔と花成に関する生理学的研究」

目次

緒言	1
第一章 本研究における花芽の分化・発達段階の分類および形態観察	
1-1 花芽の分化・発達段階の分類	14
1-2 本研究で用いる品種・系統の茎頂の形態観察	16
第二章 レタス高温抽苔におけるジベレリン動態の解析	25
2-1 ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析	27
2-2 内生ジベレリンの動態解析	36
2-3 ジベレリン関連物質がレタスの生育に及ぼす影響	48
2-4 第二章における総合考察	63
第三章 レタス花成経路統合遺伝子 <i>LsFT</i> の単離と高温抽苔における発現解析	
3-1 レタス花成経路統合遺伝子 <i>LsFT</i> の単離	65
3-2 リーフレタス高温抽苔における レタス花成経路統合遺伝子の発現解析	75
第四章 レタス花成関連遺伝子の単離とレタス花成における発現解析	
4-1 レタス花成関連遺伝子の単離	83
4-2 リーフレタスおよび結球性レタスにおける レタス花成関連遺伝子の発現解析	95

緒言

レタス (*Lactuca sativa* L.) はキク科 (Asteraceae) の野菜であり、地中海沿岸、西アジアが原産とされる一年生植物である。栽培化の歴史は非常に古く、紀元前 2500 年頃にはメソポタミアにおいて食用に栽培されていたと考えられている。この頃栽培されていたのは伸長、肥大する茎を食用とするステムレタスタイプであったと推察される。その後レタスの栽培は周辺地域に拡大していくが、古代ローマ帝国で主に栽培されたのは非結球性もしくは半結球性で、肉厚で幅の広い葉を食用とするコスレタスタイプであったとされる。これらは結球しないタイプのレタスであったが、16 世紀頃には結球するレタスが生まれ、アメリカや中国でも栽培させるようになった(Lebeda et al., 2006; Ryder, 1999)。

日本に初めてレタスが持ち込まれたのは奈良時代であるといわれる。江戸時代末期に結球性レタスが導入されるまではステムレタス、かきちしゃといわれる順次葉を収穫していくタイプのレタスが栽培された。結球性レタスの本格的な栽培は明治時代以降であり、サラダの主演として定着したのは 1950 年代以降である。現在国内では多くの都道府県において生産が行われ、平成 26 年度の総収穫量は 577,800 トンである(農林水産省, 2015)。1 月どりから 12 月どりまで一ヶ月ごとの作型が成立しているが、大きくは露地での栽培 (図 0-1A) と、露地圃場にトンネルなどの被覆を行う栽培の二つに分けられる。国内生産のうち約 9 割が結球性レタスであり、残りの 1 割がリーフレタス等の非結球性レタスとなっている(農林水産省, 2015)。

レタスの栄養成長から生殖成長への移行は、花芽分化と花茎伸長がともなう。レタスにおいてこの相の転換 (花成) には、温度が重要な役割を持つと考えられており、高温条件により花成が促進される(Thompson.H.C and Knott.J.K., 1933)。日長も花成に影響を及ぼし、長日ほど花成が促進されるが、短日条件下

A



B



図 0-1. レタス栽培の様子

- A. 高標高地での盛夏期のレタス栽培. 長野県川上村にて撮影 (2005年8月).
B. 栽培中に観察された抽苔. 農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門 (三重県津市) にて撮影 (2008年5月).

でも開花に至る(Rappaport and Wittwer, 1956). 花成が起こり、花芽が発達して花茎が伸長することを抽苔という(図 0-1B). 我々が利用しているのは、栄養成長中のレタス植物体である。茎が伸長してしまった、抽苔した植物体は市場価値を失う。作物としてのレタスは冷涼な気候での栽培が望ましく、上述の周年供給は適切な品種選択、産地、標高利用の組み合わせにより達成している。しかしながら、近年の異常気象による栽培中の高温条件により、収穫前に花成が誘導されてしまうことがある。また、中長期的にみれば、地球温暖化による気象変動により気温は現在よりも上昇することが予測され、すでに発生している抽苔による収量や品質の低下が、将来的にも多発する危険性があり、レタス栽培現場においては抽苔回避という課題が常在する。

結球性レタスの品種育成はアメリカにおいて精力的に行われ、低温伸長性、耐暑性等、地域によって異なる気候に対応できる形質を持った品種群が開発されてきた。現在利用されている品種のほとんどが、50~70年代にかけて育種された品種‘サリナス’や‘バンガード’、‘エンパイア’等の交雑後代であり、主要な特徴から「○○(品種名)タイプ」と標記されることもあるが遺伝背景は複雑化していると考えられる(Mikel, 2007)。日本における品種育成は、昭和50年代ごろまではアメリカで利用されている品種群から比較的適応性の高いものを選択し、そのまま利用された。その後様々な組み合わせで後代が育成され品種化が進んだ。抽苔性に関しては現行の晩抽性品種‘パトリオット’から導入されている品種が多いとされ、この品種を上回る晩抽性を導入するためには新たに近縁野生種を素材として利用しなければならないと考えられる。

国内のレタス栽培におけるこれらの背景から本研究では、レタスの安定生産につながる栽培管理技術や効率的な晩抽性品種開発に貢献するためにレタス抽苔の生理機構を解明することを目的とし、多くの植物で抽苔との関連が示唆されている植物ホルモン、ジベレリンのレタス抽苔における動態解析を行った。

またレタスにおいては、抽苔は花成によって引き起こされる現象であることから、花成に関する遺伝子群を単離し、レタス花成におけるこれらの遺伝子群の発現・機能解析を行った。

1) ジベレリンと抽苔

ジベレリン (GA) は、イネ馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) の生産する病徴誘起物質として単離され、その後広く高等植物中にも分布することが明らかになり植物ホルモンとして扱われるようになった。現在、130種類以上のジベレリンが単離、構造決定されている(Hedden and Sponsel, 2015; MacMillan, 2001)。その生理作用としては、葉や茎の伸長成長促進、花芽分化促進、休眠打破、単為結果、雄花形成促進、加水分解酵素の活性化等が知られる。

ジベレリンの代謝経路 (図 0-2) は、反応を触媒する酵素の性質から大きく、(1) メバロン酸から *ent*-カウレンまでの生合成、(2) *ent*-カウレンから GA₁₂ アルデヒドまでの生合成、(3) GA₁₂ アルデヒドから各種ジベレリンの生合成、不活化、の3つの段階に分けられる。(1) の *ent*-カウレンまでの生合成には、テルペン合成酵素であるコパリルニリン酸合成酵素 (copalyl diphosphate synthase; CPS) と *ent*-カウレン合成酵素 (*ent*-kaurene synthase; KS) が関与している。(2) の *ent*-カウレンから GA₁₂ までの生合成には、シトクロム P450 一原子酵素添加酵素 (P450) が作用し、(3) の GA₁₂ アルデヒドから各種ジベレリン合成には二原子酸素添加酵素 (2-oxoglutarate dependent dioxygenase; 2ODD) が関与する。2ODD には、20位および3位を酸化する GA₂₀-酸化酵素

(GA₂₀ox) および GA₃-酸化酵素 (GA₃ox) が含まれる。また、このグループには活性型ジベレリンの2位を酸化して不活性化する GA₂-酸化酵素

(GA₂ox) も含まれる。GA₁₂ は、続く代謝経路により活性型ジベレリンである GA₄ へと変換される。また、GA₁₂ は13位の水酸化酵素により GA₅₃ となり、

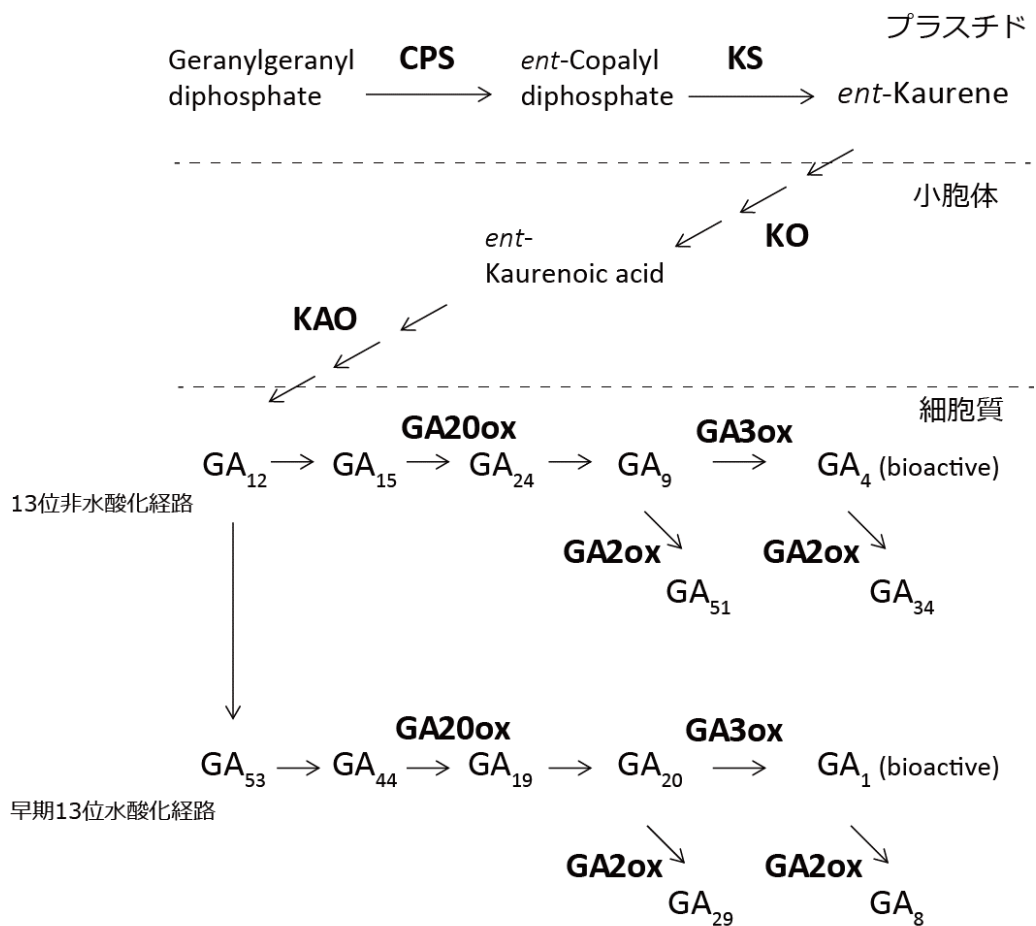


図 0-2. 一般的なジベレリン代謝経路

太字は反応を触媒する酵素名を表す。图中酵素のうち、CPS, KS はテルペンサイクラーゼに属し、KO, KAO はチトクロム P450, GA20ox, GA3ox, GA2ox は 2-オキシグルタル酸依存ジオキシゲナーゼに属する。

この分岐経路により活性型ジベレリンのひとつである GA_1 が生成される (Hedden and Thomas, 2012; Yamaguchi, 2008). 前者は 13 位非水酸化経路, 後者は 早期 13 位水酸化経路として区別され, どちらの経路が主要であるかは, 植物種あるいは組織毎に異なることが知られる (Dayan et al., 2012; Rebers et al., 1999; Xu et al., 1997).

ジベレリン代謝酵素遺伝子は, 1990 年代半ば以降相次いで報告されている. シロイヌナズナおよびイネにおいては, ジベレリン生合成の初期段階を触媒する酵素は一つもしくは二つの遺伝子によりコードされ, 欠損変異体はジベレリン欠損によるシビアな矮化表現型を示す (Fleet, 2003; Koornneef and van der Veen, 1980). これに対して, 生合成後半の反応に関与する 2ODD は, 多重遺伝子族によりコードされている. 各パラログは発達段階や環境条件依存的に制御されていることがわかってきており, 活性型ジベレリンの調節は主としてこの段階で行われていると考えられる. 例えば, シロイヌナズナの *GA3ox* である *AtGA3ox1* と *AtGA3ox2* は, 栄養成長中の発達においては役割が区別されている場合とオーバーラップしている場合とがあるが, 生殖成長における発達においては両者が同じ作用を示すことができる (Mitchum et al., 2006). また発芽時の *AtGA3ox* の発現誘導において, *AtGA3ox1* は全てのフィトクロムにより誘導されるのに対し, *AtGA3ox2* はフィトクロム B のみに応答し誘導される (Yamaguchi et al., 1998). このように, 植物種によっては各パラログの組織特異的発現と特異的作用がある一方で, 多重遺伝子族内のすべてが欠損しない限りマイルドな表現型の変化にとどまることが多く (Plackett et al., 2012), 植物体内の活性型ジベレリン量はこれらの遺伝子によって精密に制御されていることがうかがえる (Coles et al., 1999; Huang et al., 1998).

外生のジベレリンは, 花茎伸長や花芽分化を誘導することが知られている. ホウレンソウでは, 長日処理によって短日条件に比べて開花が早まるが, 短日

条件下の植物体に GA_3 を処理することにより、長日処理と同程度の開花促進が起こる。また、長日条件下の植物体に GA_3 を処理すると、その後短日条件下で栽培しても開花は促進され、花茎は長日処理単独よりも伸長する(Zeevaart, 1971)。またドクムギ (*Lolium tenulentum*) においては、外生の GA_5 と GA_6 は花茎伸長なしに花芽分化のみを誘導し、 GA_1 、 GA_3 、 GA_4 は茎の伸長のみを引き起こす(King et al., 2006)。このように活性型ジベレリンの投与は花成を誘導するが、植物種によっては効果を持つジベレリンの種類が異なり、影響を受ける発達過程が限定される。さらに、植物によって活性型ジベレリン類の効果の程度は異なる。シロイヌナズナ実生へのジベレリン処理は、 GA_1 に比べて GA_4 でその伸長効果が大きい(Xu et al., 1997)。 *Polianthes thberosa* においては、ジベレリンの花芽分化への効果は GA_1 が最も大きく、 GA_3 、 GA_4 と続く(Chang et al., 2001)。ストックでは、 GA_4 が開花と花茎伸長するのに対し GA_1 は効果を持たない(Hisamatsu et al., 2000)。さらにいくつかの植物種においては、ジベレリン生合成がどのような要因によってどのステップで律速されているかが示されている。Talon ら(1991)はハウレンソウのセルフリー系を用いて、短日条件から長日条件に移した際に促進されるのは $GA_{20}ox$ が触媒する反応のうち GA_{53} から GA_{19} までであることを報告している。タバコの KNOTTED-type のホメオボックス遺伝子である *NTH15* は、 GA_{19} から GA_{20} への変換を特異的に調節していると考えられている(Tanaka-Ueguchib et al., 1998)。

2) 花成制御の分子機構

野菜にとっての花成は、栄養成長中の植物体を利用することが多い葉根菜類栽培では収量や品質の低下につながる生理現象であり、果実を利用する果菜類栽培では生産のための最も根本的な生理現象であって、どちらの場合においても安定生産に深く関与するといえる。植物としてみても、花を咲かせることは

次世代を生み出し種の維持を図るための重要なイベントである。生存をかけたこの生理現象を成功させるには、適切な周辺環境であるかどうかを正しく感知する必要がある。さらに環境条件と相互あるいは独立に作用する、内生状態の感知が重要である。

花成制御の分子メカニズムの解明は、モデル植物であるシロイヌナズナを中心に進行している。主だったものとして光周性、春化反応、ジベレリン、自律的、等による花成制御経路が存在することがシロイヌナズナにおいて明らかにされている（図 0-3）。これらの経路による花成制御は、最終的に「花成経路統合遺伝子」と呼ばれる、*Suppressor of Overexpression of CONSTANS 1* (*SOCI*) (Lee et al., 2000; Samach, 2000)や *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Kardailsky, 1999; Kobayashi, 1999)といった遺伝子に集約される。これらの遺伝子の下流で、「花芽形成決定遺伝子」と呼ばれる、*APETALA1* (*API*) (Mandel et al., 1992)や *LEAFY* (*LFY*) (Weigel et al., 1992)といった茎頂の形態、生理状態の変化を引き起こす遺伝子が作用することで、茎頂は花芽へと分化していく。

花成を制御する経路のうち、周辺の環境条件により駆動される経路としては、温度（低温）が因子となる春化経路、日長が因子となる光周性経路がある。春化経路のシグナル統合遺伝子は、*FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) である。この遺伝子は通常、発現状態にあり、葉での *FT* の作用、茎頂での *SOCI* の作用を抑制することで花芽を遅らせる。植物が低温に遭遇し春化反応がおこると発現が抑制され、花成が進行する。日長の変化は、長日植物であるシロイヌナズナではジンクフィンガータンパク質と CCT ドメインを有する転写因子、*CONSTANS* (*CO*) 遺伝子によって感知される (Putterill et al., 1995)。 *CO* の発現量は、光受容体である *PHYA*, *PHYB*, *CRY2* および *Flavin-Binding Kelch Repeat F-Box 1* (*FKF1*) によって調節される。*PHYB* は赤色光を感知すると *CO* の mRNA 転写を減少させ (Halliday et al., 2003), *CRY2* や *PHYA* は転写を促進す

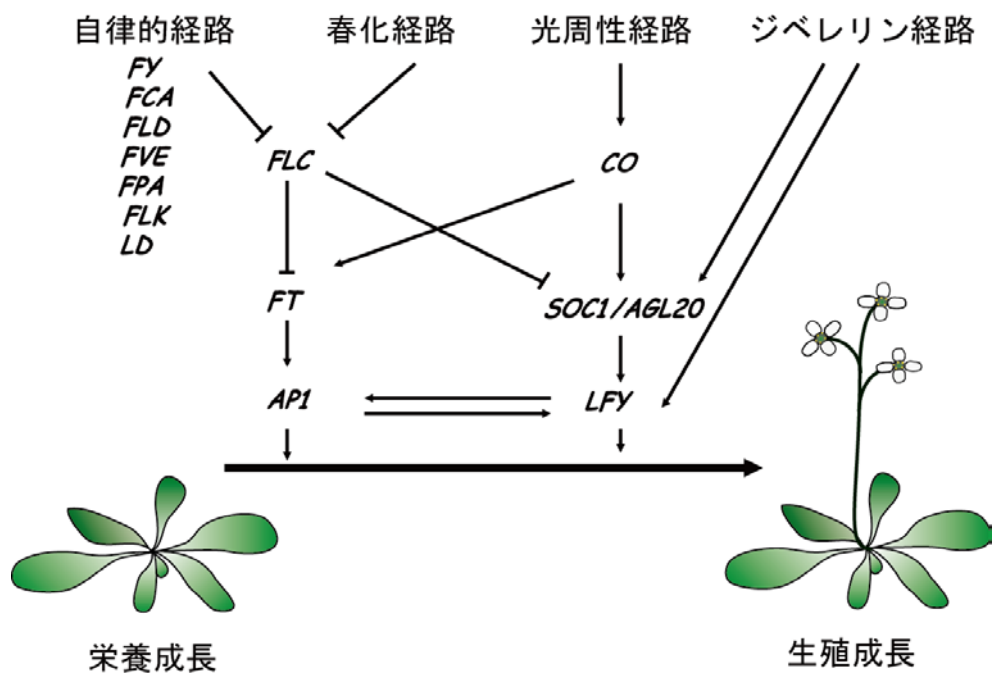


図 0-3. シロイヌナズナにおける花成制御と主な制御因子

シロイヌナズナは成長過程で栄養成長相から生殖成長相に転換する。この時、自律的経路、春化経路、光周性経路、ジベレリン経路等の花成制御経路によって生成される制御シグナルは *FT* や *SOC1* に集約され、花成が進行する。各因子間の促進 (→) と抑制 (⊣) を示した。

る(Guo et al., 1998; Valverde, 2004). *FKF1* は青色光下において *CO* の mRNA 転写を促進する(Sun et al., 2012). これらの因子によって調節される *CO* の mRNA レベルが高い状態で維持されると *CO* タンパク質量が安定することで *FT* の発現を誘導すると考えられている(Valverde, 2004). 長日植物に位置づけられるシロイヌナズナは、短日条件でも最終的には花成が起こる(Gregory and Hussey, 1953). 日長に関する因子は、長日および短日条件下における植物体の表現型を詳細に解析し長日条件下における表現型のみ作用するものを光周性経路上の因子として定義している. また成長速度が変化する表現型のように、長日、短日どちらの条件下でも作用があるものについては後に定義される自律的経路上の因子として考えられている.

多くの植物は、幼若相から成熟相への転換がなければ花成は起こらないが、植物体の成長にともなって自律的に起こるこの相転換は植物が持つ自律的なメカニズムの一例である(Simpson and Dean, 2002). 自律的経路は、環境要因からは独立して花成を誘導することを指す(Amasino, 2010). 長日、短日どちらの条件でも花成が遅延する変異体から単離・同定された遺伝子のうち、現在までに7つの遺伝子が自律的経路上の遺伝子として考えられている. その多くは RNA 代謝に関与すると考えられており、*FCA*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS K* は RNA 結合ドメインを含んでおり、*FY* は mRNA のプロセッシングに関与していると考えられている *LUMINIDEPENDENS (LD)* は RNA 結合に関係すると推定されるホメオドメインをコードしている. *FLOWERING LOCUS D (FLD)* と *FVE* はヒストン脱アセチル化酵素コリプレッサー複合体と類似の構造を持っており、ヒストンのアセチル化反応に関与していると考えられる(Ausín et al., 2004; He, 2003; Kim et al., 2004). 自律的経路の遺伝子はいずれもそのシグナルを春化経路のシグナル統合遺伝子 *FLC* に集約し花成の調節を行う. しかしながら自律的経路上の遺伝子の多重欠損変異は致死や深刻な表現型変化を引き起こされること

が示されている(Henderson et al., 2005; Koornneef et al., 1998). これらのことから自律的経路上の遺伝子は *FLC* 発現レベルの基部を担うとともに、植物の成長における遺伝子発現に広く関与すると考えられる.

植物ホルモンのひとつであるジベレリンは、植物自身が生成する花成シグナルである. ジベレリンの外生処理による花成誘導は前述の通りであるが、ジベレリンが作用し発現が制御されると考えられる遺伝子は、ジベレリンの生合成経路上流で作用する酵素遺伝子の欠損変異体 *gal-3* を用いた解析によって明らかにされている. 変異体 *gal-3* は花成誘導条件である長日条件下において花成が遅延し、短日条件下では花成がおこらない. この変異体に外生的にジベレリンを処理すると花成が誘導され、このとき花成経路統合遺伝子 *FT* の発現量は劇的に上昇する(Hisamatsu and King, 2008). *FT* と同様に、*SOCI* 遺伝子の発現量も外生のジベレリンで増加する(Moon et al., 2003). さらに、花芽形成決定遺伝子 *LFY* は、*gal-3* にとって非誘導条件である短日条件下において、外生ジベレリンによってプロモーター活性が上昇する(Blázquez, 1998; Blázquez et al., 1997). これらの遺伝子は、シロイヌナズナ野生型や *gal-3* 以外の変異体においても同様の応答を示し、ジベレリン経路は主要な花成制御経路と独立的または協調的に作用していると考えられる.

これまでに明らかになっているこれらの経路によって生成される花成シグナルは、花成経路統合遺伝子群に集約される. *FT* はいくつかの経路の花成制御情報を統合することから、花成において非常に重要な役割を果たしていると考えられる(Corbesier and Coupland, 2006). *FT* は葉の師部組織で発現し(Takada, 2003)、茎頂へと移行していることが接ぎ木実験により示された(Notaguchi et al., 2008). このことから *FT* は Chailakhyan が提唱した花成誘導因子 ‘フロリゲン’ (Chailakhyan and Krikorian, 1975) の有力な候補遺伝子である. *FT* 遺伝子は、成長や発達を制御するシグナル伝達において重要な働きを持つと考えられ

るフォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質の遺伝子ファミリーに属している。Kardailsky ら(1999), Kobayashi ら(1999)によりシロイヌナズナの *FT* が報告されて以来, トマト *SFT* (Lifschitz et al., 2006), イネ *Hd3a* (Hayama et al., 2007), リンゴ *MdFT* (Kotoda et al., 2010)等多くの植物において *FT* 相同性遺伝子が単離され, 発現動態や過剰発現形質転換体の解析により, *FT* 相同性遺伝子は植物種に広く存在し花成に深く関与していることが示されている。

本研究では, レタスの安定生産と品質の維持に欠かせない花成および抽苔の制御について研究を行った。レタスの花成は抽苔を引き起こすが, この抽苔にはジベレリンが関与していることが多くの植物種で明らかになっている。レタスにおける抽苔回避技術開発を目指す場合, レタス抽苔現象におけるジベレリン動態の解明および分子レベルでの情報集積が必要不可欠である。ジベレリンの生合成酵素遺伝子等の発現動態を調べることで生合成の制御を解析することが可能となってきたことから, 本研究ではレタスが高温で抽苔する際のジベレリン動態を明らかにするとともに, 内生ジベレリン量変動に寄与すると思われる 2 ODD の分子種を明らかにし遺伝子発現動態を解析した。またモデル植物では花成における重要な分子メカニズムが明らかになりつつあるが, レタスにおいてはゲノム情報が十分とはいえず, 花成の制御に関連する遺伝子の報告がない。*FT* は花成シグナル伝達を主導する有力な候補因子であることから, 本研究ではレタスの *FT* 相同性遺伝子に着目し, 単離・同定を行うとともに他の花成関連遺伝子についても単離を行い, これらの遺伝子について解析を行った。本研究におけるレタス花成機構解析においても一つの着眼点は, 制御環境下で得られる知見をいかに自然条件に展開していくか, ということである。人工気象装置等を用いた制御環境下での精密栽培が正確な反復実験と環境条件設定を可能にし, それにより植物の生理メカニズムが解明されてきた。このよ

うにして蓄積していく知見を基に，モデル植物やモデル品種で得られた研究結果をどのように自然条件，実用品種に応用していくかが，特に農業研究には重要な視点であると考えられる．このような近年の研究動向から，本研究においても，環境要因を一定条件に近づけることができる人工気象環境下において得られる基礎的知見と，様々な要因が変動する自然条件下において栽培される植物を解析した場合に得られる結果を比較・考察し，将来的な発展の方向性の一例となることを目指した．

第一章 本研究における花芽の分化・発達段階の分類および形態観察

抽苔は、花成の際に、花芽分化をともなって花茎が伸長する現象である (Atherton et al., 1990; Heath and Hollies, 1965). 花芽分化および抽苔に関する研究を行うにあたっては、花芽の発達段階を分類しておく必要がある。レタスの花芽については、岩間と甕(1954)や岩見(1958)により報告がある。これらの報告を参考に、本研究における花芽の発達段階を定義した。また、本研究で供試した品種、系統の茎頂の経時的な形態観察の結果を示した。

1-1 花芽の分化・発達段階の分類

材料および方法

レタス品種‘リーフレタスグリーン’ (サカタのタネ (株), 日本) を、園芸培土, ナブラ, プリティソイル=4:2:1の混合培土を充填した200穴セルトレイ (30 cm×60 cm) に播種し, 25/15°C (昼/夜温) に設定したグロースチャンバー内で3週間育苗した。混合培土を充填した7 cmの不織布ポットに移植し, 35/25°C (昼/夜温), 14 時間日長に設定したグロースチャンバーに移した。茎頂部分をサンプリングし, 観察を容易にするためメチルブルー (1%水溶液) により染色し, 実体顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて形態観察を行った。

結果

本研究におけるレタスの花芽発達段階を以下の4段階に分類した。各段階の観察結果は図 1-1 に示す。

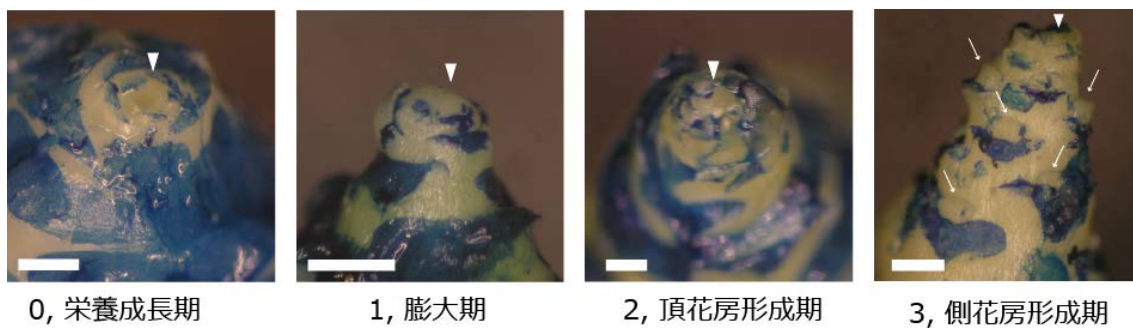


図 1-1. レタスの花芽発達過程

‘リーフレタスグリーン’の茎頂部分をメチルブルーで染色し、実体顕微鏡（倍率 6.3–25 倍）により観察した。矢頭は茎頂を示し、矢印は側花房を示す。スケールバー：0.5 mm.

0：栄養成長期

成長点は葉に覆われており，平らである．

1：膨大期

成長点がドーム状に膨張する．

2：頂花房形成期

成長点がさらに肥大し，葉原基から露出する．

3：側花房形成期

頂花房以下の葉の基部に花芽が形成される．

本研究では，1：膨大期に入った時点で花芽分化を開始したとみなした3：側花房形成期より後の発達段階は，茎頂を成長点から葉を分離せずに肉眼により花芽が確認できるため，3より後の状態は「出蕾」とした．

1-2 本研究で用いる品種・系統の茎頂の形態観察

本研究で供試した品種・系統は表 1-1 のとおりである．非結球性のリーフレタス‘リーフレタスグリーン’は，歴史的にレタスの生理研究に用いられている‘グランドラピッド’ (Frankland and Wareing, 1960; Toyomasu et al., 1992)の販売品種である．結球性レタスである‘テキサスグリーン’は，結球性レタスの中では比較的早抽性である．‘パトリオット’ (日東農産，日本)は，現行栽培品種のうち最も晩抽性である品種のひとつであり，国内育成品種の晩抽性形質の導入親となっている．レタス近縁野生種 *Lactuca virosa* L.との交雑後代である晩抽性育成系統 [農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構)，野菜花き研究部門育成] は，‘パトリオット’よりもさらに晩抽性を示す育成系統である．これらについて茎頂観察を行った．

表 1-1. 本研究で供試したレタス品種および系統

品種・系統名	葉姿	タイプ・由来		抽苔特性
リーフレタスグリーン	非結球性	グランドラピッド	栽培品種	早抽性
テキサスグリーン	結球性	マック	栽培品種	↑ ↓
パトリオット	結球性	エンパイア	栽培品種	
晩抽性育成系統	結球性	近縁野生種	育成系統	

材料および方法

2016年5月16日にレタス品種‘リーフレタスグリーン’，‘テキサスグリーン’，‘パトリオット’，および晩抽性育成系統を，園芸培土，信濃培度=1:1の混合培土を充填した200穴セルトレイ（30 cm×60 cm）に播種し，茨城県つくば市の農研機構野菜花き研究部門（36° 1'45" N，140° 6'14" E）のガラス室（28℃で天・側窓開閉，日長はなりゆき）で育苗した．6月15日に同研究部門圃場に移植した．圃場は10 aあたりでN=18 kg，P=18 kg，K=18 kgの化成肥料を投入し，移植は白黒ダブルマルチの白面を展張した60 cm幅の畝に，株間25 cmで2条千鳥とした．栽培期間は8月18日までとした．移植後適当な間隔で植物体の生育調査とサンプリングを行った．茎頂を実体顕微鏡（Leica Microsystems）下で観察した．

結果

各品種系統のサンプリング日は図1-2のとおりである．‘リーフレタスグリーン’においては，移植後28日（7月13日）には膨大期（スコア1）にさしかかり，移植後34日（7月19日）に頂花房形成期（スコア2）となり，移植後40日（7月25日）に側花房形成期（スコア3），移植後44日（7月29日）には出雷に至った（図1-3）．‘テキサスグリーン’においては，移植後35日（7月20日）には頂花房形成期にあったと思われ，移植後42日（7月27日）には側花房形成期となった（図1-4）．‘パトリオット’においては，移植後56日（8月10日）には膨大期にあったと思われ，移植後64日（8月18日）には頂花房形成期となった（図1-5）．晩抽性育成系統については，非常に花成が遅く，移植後64日（8月18日）において膨大期にさしかかったと思われた（図1-6）各品種・系統の栄養成長期（スコア0）の茎頂サイズは約0.3–0.4 mmであり，試験終了までのサイズ変化は，‘リーフレタスグリーン’では頂花房形

	播種	移植	(22)	(28)	(34)	(40)	(44)	
'リーフレタス グリーン'	5/16 ▼	6/15 ▼	7/7 ▽	7/13 ▽	7/19 ▽	7/25 ▽	7/29 ▽	
'テキサス グリーン'	▼	育苗 ▼	(22) 7/7 ▽	(28) 7/13 ▽	(35) 7/20 ▽	(42) 7/27 ▽		
'パトリオット'	▼	育苗 ▼		(29) 7/14 ▽	(41) 7/26 ▽	(48) 8/2 ▽	(56) 8/10 ▽	(64) 8/18 ▽
晩抽性 育成系統	▼	育苗 ▼		(29) 7/14 ▽	(41) 7/26 ▽	(48) 8/2 ▽	(56) 8/10 ▽	(64) 8/18 ▽

図 1-2. 茎頂観察を行ったレタスのサンプリング状況

'リーフレタスグリーン'、'テキサスグリーン'、'パトリオット' および晩抽性育成系統を 5 月 16 日に播種し、6 月 15 日に圃場に移植した。▽はサンプリングを行った時点（月/日）である。括弧内数字は移植後日数（日）を示す。

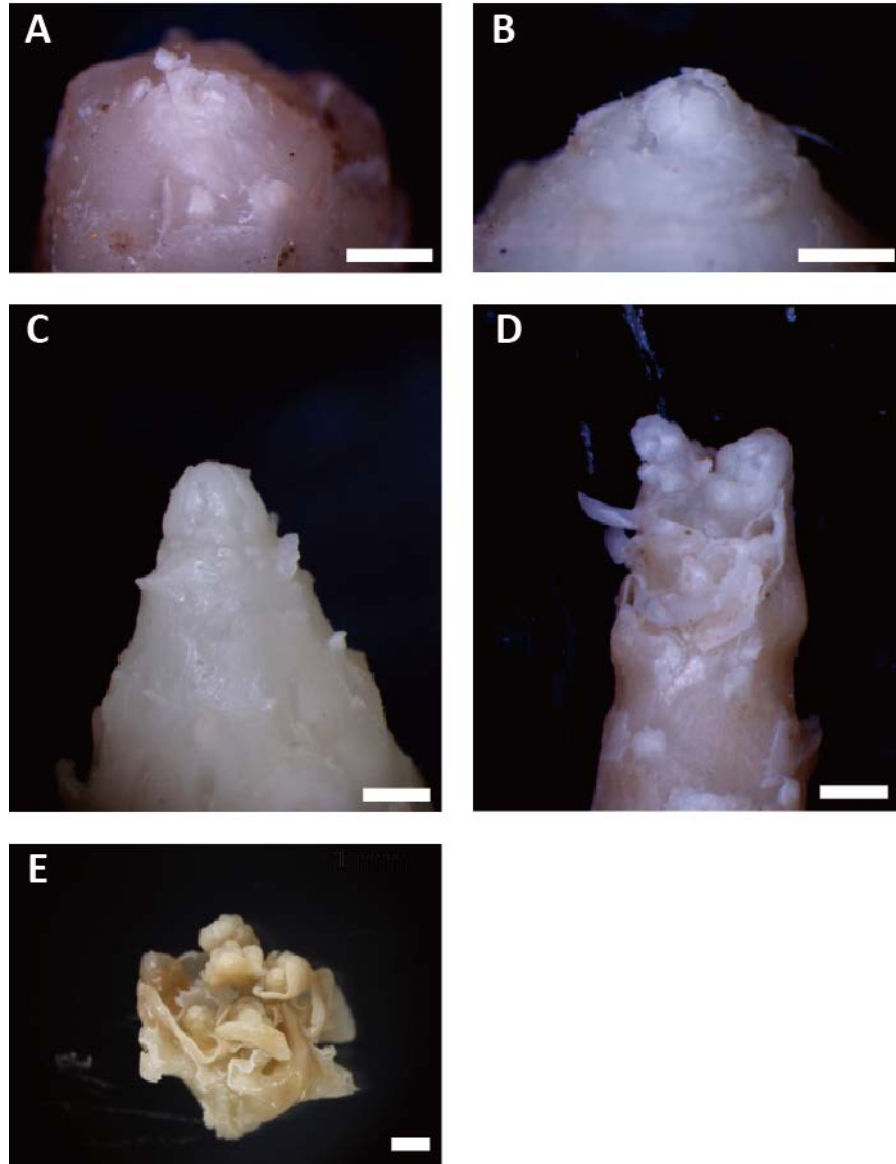


図 1-3. 'リーフレタスグリーン'の茎頂観察

移植後 22 日 (A), 28 日 (B), 34 日 (C), 40 日 (D), 44 日 (E) の'リーフレタスグリーン'茎頂の様子. スケールバー:1 mm.

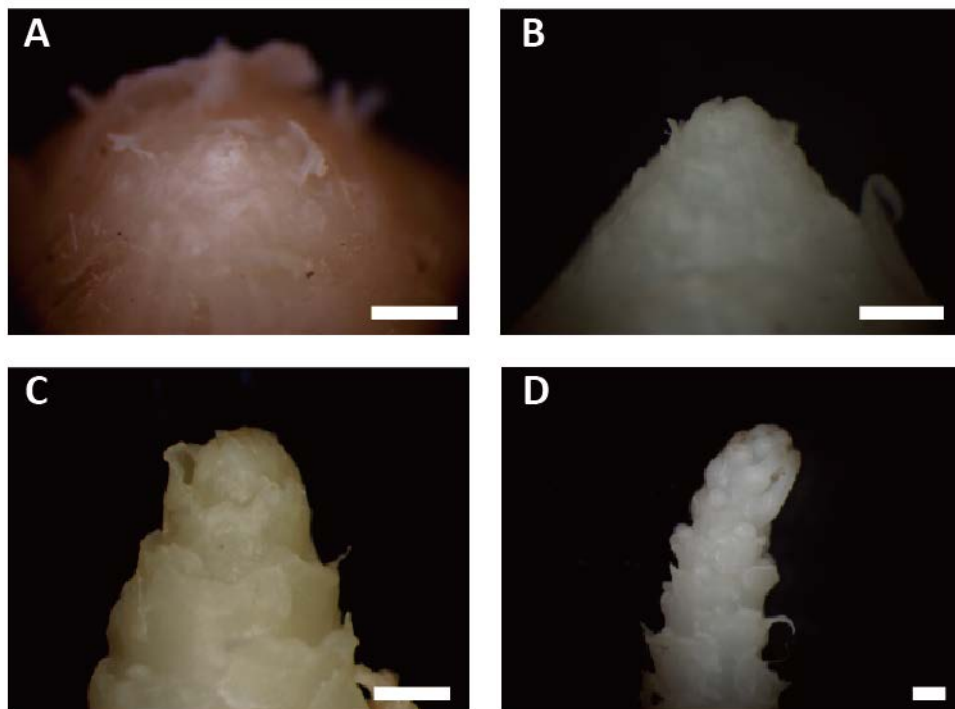


図 1-4. 'テキサスグリーン'の茎頂観察

移植後 22 日 (A), 28 日 (B), 35 日 (C), 42 日 (D) の
'テキサスグリーン'茎頂の様子. スケールバー:1 mm.

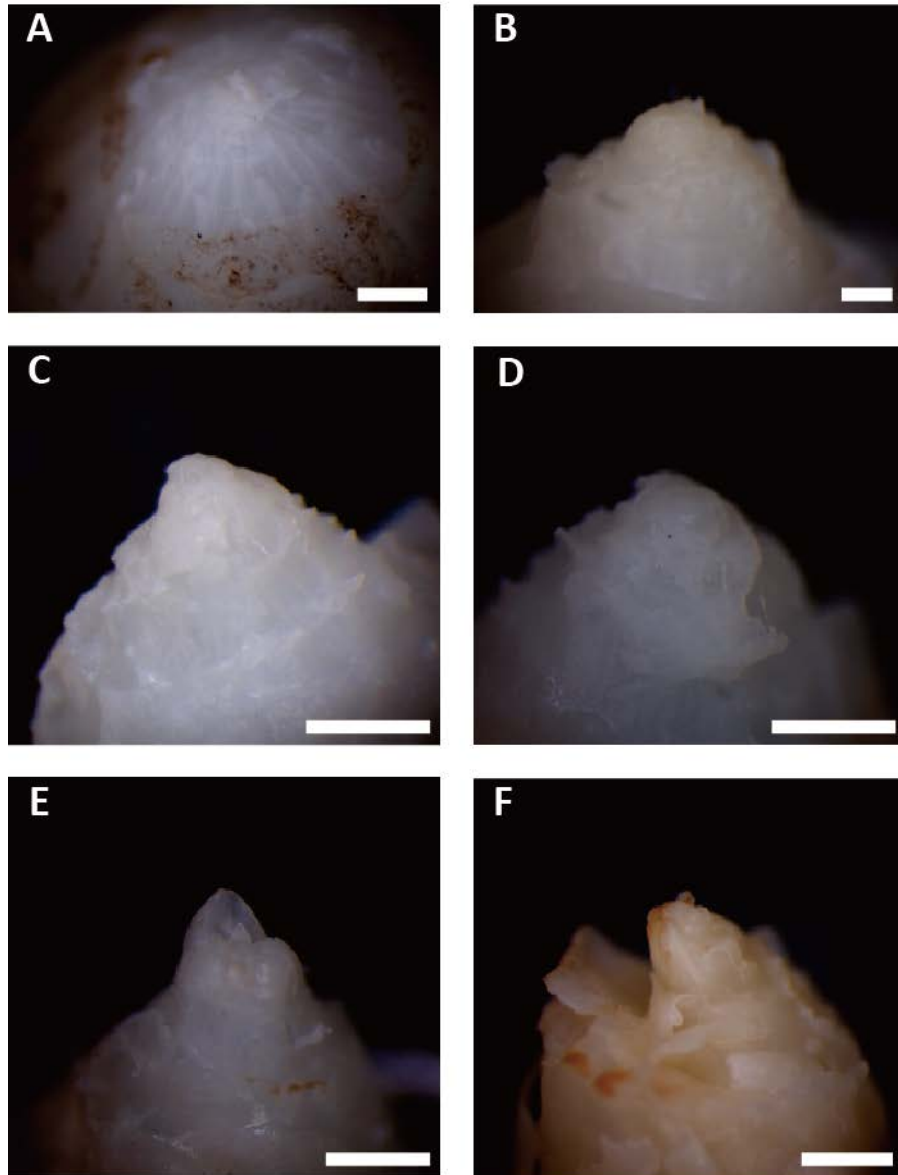


図 1-5. 'パトリオット'の茎頂観察

移植後 29 日 (A), 41 日 (B), 44 日 (C, D), 56 日 (E), 64 日 (F) の
'パトリオット'茎頂の様子. スケールバー:1 mm.

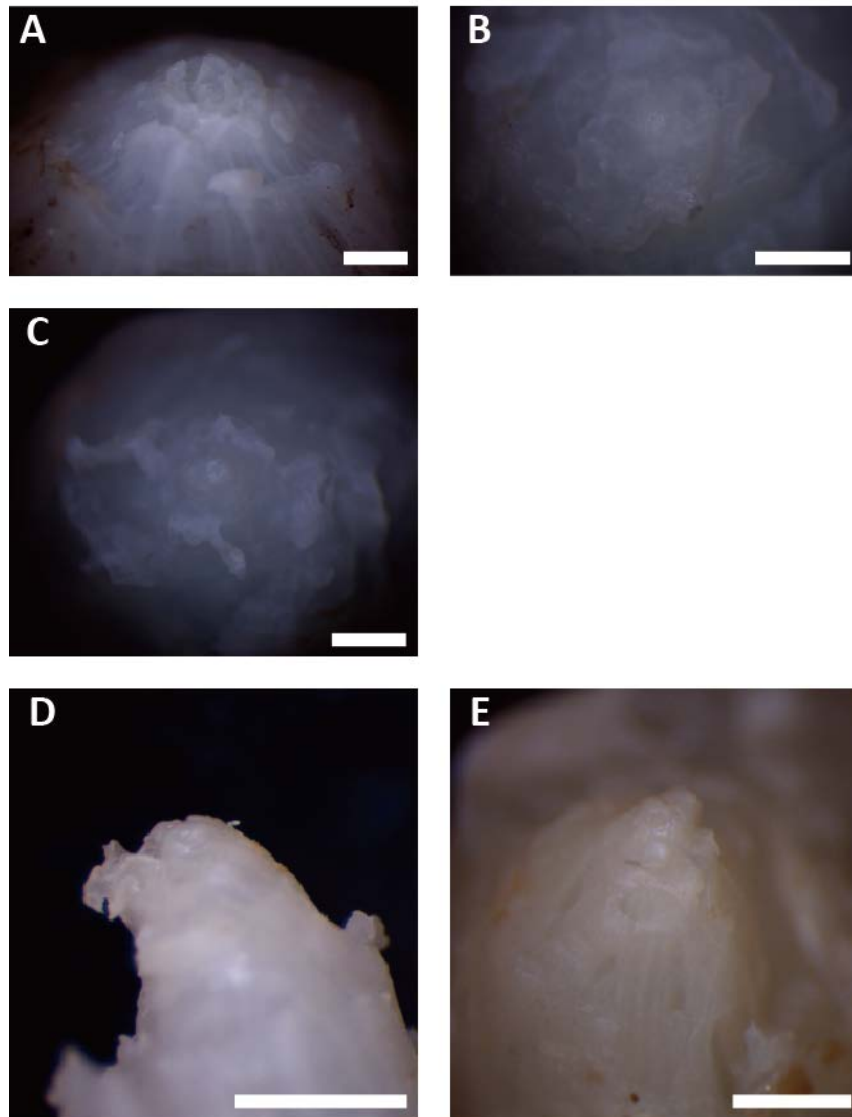


図 1-6. 晩抽性育成系統の茎頂観察

移植後 29 日 (A), 41 日 (B), 44 日 (C), 56 日 (D), 64 日 (E) の
晩抽性育成系統茎頂の様子. スケールバー:1 mm.

成期（スコア 2）で約 0.7 mm, ‘テキサスグリーン’ の頂花房形成期で約 0.8 mm, ‘パトリオット’ 試験終了時に膨大期（スコア 1）であり約 0.7 mm, 晩抽性育成系統では試験終了時にもスコアは 1 未満であったと思われ, 約 0.3 mm であった.

考察

本実験は盛夏期の栽培試験となり, 8 月 18 日以降に生育中の株においては茎頂部分が壊死した個体が増加し, 全ての品種・系統において, 花芽が目視可能な発達段階まで観察できなかったが, 少なくとも花芽分化前までの茎頂の大きさについては, 用いた品種・系統間では大きく違いはないと思われ, その後のサイズ変化も同様に進行すると推測された.

第二章 レタス高温抽苔におけるジベレリン動態の解析

レタス抽苔とジベレリンについての研究の歴史は古く、1960年代に Wittwe ら(1957)が外生のジベレリンによってレタスの抽苔が引き起こされることを報告している。レタスには発芽に光を必要とする性質があることから、分子生物学的研究は主に種子発芽におけるジベレリンの機能解明を中心として研究が進んできた。Toyomasu ら(1992)により、レタスの内生ジベレリンとしてレタス実生胚軸から GA₁, GA₁₉, GA₂₀ が同定された。Niki ら(2001)はレタス葉から GA₁, GA₁₉, GA₂₀ および GA₄ を同定したが、GA₄ 量は極微量であったことから、レタス葉における主要な活性型ジベレリンは GA₁ であると考えられる。2ODD である GAoxidase は Toyomasu ら(1998)により単離、同定され、後にテルペン合成酵素および P450 についても Sawada ら(2008)によって単離、同定された。レタスのジベレリン代謝酵素遺伝子は現在までに、テルペン合成酵素遺伝子および P450 遺伝子として *LsCPS*, *LsKS*, *LsKO1*, *LsKO2*, *LsKAO* が、2ODD 遺伝子として *Ls20ox1*, *Ls20ox2*, *Ls20ox3*, *Ls3ox1*, *Ls3ox2*, *Ls3ox3*, *Ls2ox1*, *Ls2ox2* が単離、同定されている (図 2-1)。光による発芽制御では、吸水と赤色光照射により *LsGA3ox1* および *LsGA3ox2* の発現量が特異的に増加し、*LsGA2ox2* の発現量が減少することでジベレリン生合成が促進されていると考えられる(Sawada et al., 2008)。

このように、レタス発芽時のジベレリンおよびジベレリン代謝酵素遺伝子発現の動態については解析が進んでいるところであるが、実生より大きい植物体の生育におけるジベレリン動態は解明されていない。そこで本章では、抽苔特性が異なる 2 つのレタス品種を用い、レタスの抽苔誘導条件として知られる高温処理によりレタスの生育がどのように推移するかを調査するとともに、ジベレリンの動態がどのように変化するかを酵素遺伝子の発現解析、内生量の両面

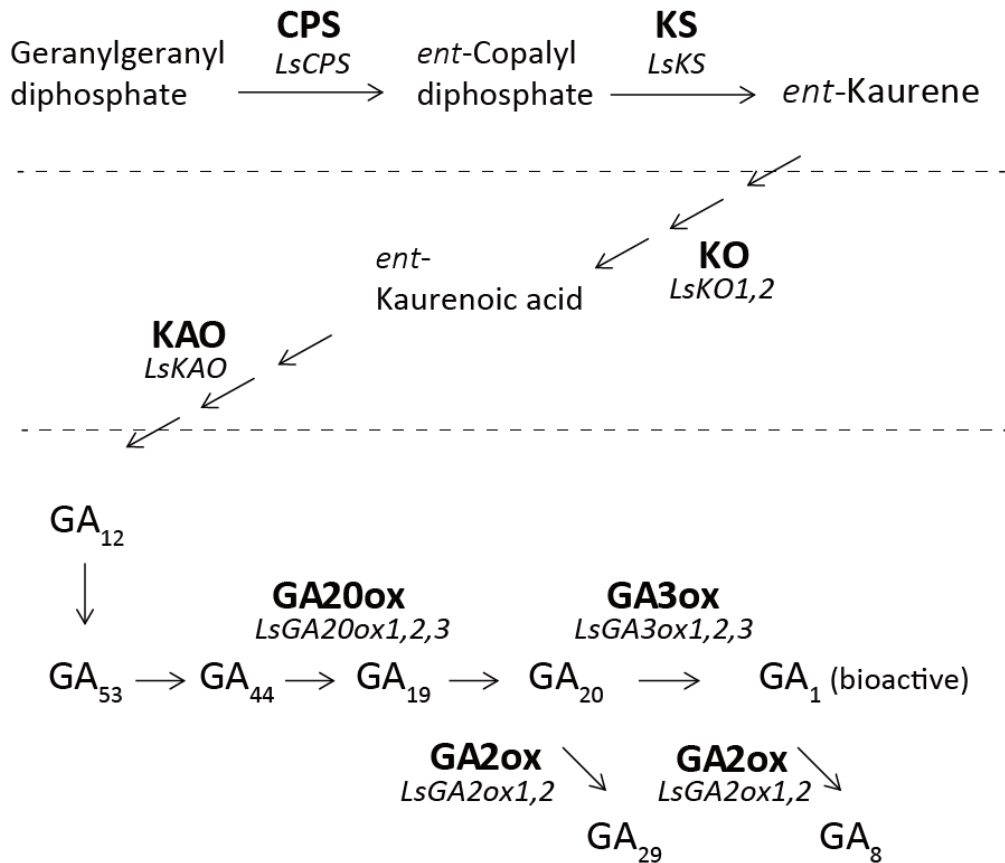


図 2-1. レタスにおいて同定されている内生ジベレリンと代謝酵素遺伝子

太字は反応を触媒する酵素名，斜体は酵素の遺伝子名を表す。
 図中酵素のうち，CPS，KS はテルペンサイクラーゼに属し，KO，KAO はチトクロム P450，GA20ox，GA3ox，GA2ox は 2-オキシグルタル酸依存ジオキシゲナーゼに属する。レタスにおいては GA_1 が活性型ジベレリンである。

から解析した。

2-1 ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析

本項では、ジベレリン代謝調節への関与が予想されるレタスの 2ODD 遺伝子について、報告されている塩基配列をもとに各パラログを認識できる特異的プライマーを作成し、quantitative real time (qRT) -PCR 法を用いてレタスが高温により抽苔する際のジベレリン代謝酵素遺伝子発現について解析した。

材料および方法

1. 植物材料

前述の方法 (1-1) により育苗したレタス品種 ‘リーフレタスグリーン’ および ‘パトリオット’ を、混合培土を充填した 7 cm の不織布ポットに移植し、35/25°C (昼/夜温) および 25/15°C (昼/夜温) に設定したグロースチャンバーに移して栽培した。以下 25/15°C 区を低温区、35/25°C 区を高温区とした。いずれの温度処理区も日長は 14 時間とした。1 週間毎に茎長を調査し、移植後 2 週の茎を採取、凍結した。茎長調査においては、地際で地上部を切り取り、下位から葉長 5 mm 以上の葉を茎から取り除いた。胚軸との境目から、茎先端部分に残る葉の節までを茎長として測定した。

2. 遺伝子発現解析

収穫した茎は茎頂を取り除き液体窒素で凍結し粉碎した。約 100 mg を秤量して以下の手順で遺伝子発現解析に用いた。

(1) 全 RNA の抽出

全 RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用い、RNase-

free DNase (QIAGEN)で処理した。RNA Nano Chips (Agilent Technologies, USA)を用いて RNA 濃度とクオリティを測定した。

(2) qRT-PCR

First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を用いて、1 μ g の全 RNA から一本鎖 cDNA を合成し、10 倍希釈溶液を鋳型とした。GA-oxidase 遺伝子パラログを判別できる特異的プライマーを設計した (表 2-1)。PCR 反応は 2×LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (LightCycler 480 SYBR Green 1 Maser Kit, Roche Diagnostics, Switzerland), 0.5 μ M フォワードプライマー, 0.5 μ M リバースプライマー, 鋳型 DNA 1 μ L を含む 10 μ L 反応液中において、94°C で 10 分を 1 サイクルの後、94°C で 10 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 1 分のサイクルを 40 回行った。増幅された配列が単一産物であるかどうかは、溶解曲線解析により確認した。PCR 反応および溶解曲線解析は LightCycler 480 および LightCycler 480 Software により行った。各遺伝子のプラスミド DNA 希釈系列を用いて作成した検量線により発現量を算出し、さらに *Actin* (Accession No.AY260165) 遺伝子によりノーマリゼーションした。

結果

1. 温度によるレタス生育の変化

栽培温度がレタス抽苔に及ぼす影響を調査するため、ポットへの移植後、1 週間毎に生育調査を行った。‘リーフレタスグリーン’において、高温区では移植後 1 週から 4 週にかけて茎が急激に伸長した。一方、低温区では、茎伸長の程度はゆるやかであり、移植後 4 週においても約 2cm であった (図 2-2)。花芽発達は、高温区の移植後 4 週間において出蕾が観察された。‘パトリオット’においては、高温区でも茎伸長速度は遅く、移植後 4 週で約 6 cm であった。低温区ではさらに茎伸長速度は遅く、移植後 4 週でも約 1 cm であった

表 2-1. qRT-PCR に使用したプライマーセット

遺伝子		配列
<i>LsGA20ox1</i>	Forward	5'- TGAGTTCACCTCAGAAGCATTAC -3'
	Reverse	5'- CTAGTTGACATTGATGGATGTG -3'
<i>LsGA20ox2</i>	Forward	5'- GAACTAGTGGACGAAAAGAAC -3'
	Reverse	5'- TCTGCTGAATCCAGTTGGTG -3'
<i>LsGA20ox3</i>	Forward	5'- TGACTCCCTTGCAGTGTGCA -3'
	Reverse	5'- GAGCTTCATTTATCAACCTCTG -3'
<i>LsGA3ox1</i>	Forward	5'- CGGTTGGGTGACAGTCCC -3'
	Reverse	5'- GATAAGCGACTGACAAGCGG -3'
<i>LsGA3ox2</i>	Forward	5'- CGTTTGTGTGCACCTATCACT -3'
	Reverse	5'- GAAATAATTAGATCCATAAACCTG -3'
<i>LsGA3ox3</i>	Forward	5'- TCATGGGTTCTTGTGTTGATG -3'
	Reverse	5'- AAGAGTTTGTGGCAAGTAGT -3'
<i>LsGA2ox1</i>	Forward	5'- GAAGTTGGATGTCTGTTCCCTG -3'
	Reverse	5'- ACCCTATGCTTTACACTCTTG -3'
<i>LsGA2ox2</i>	Forward	5'- TCAACATGAGACAGTACGAG -3'
	Reverse	5'- GATACTCGATCCATCCAACG -3'
<i>Actin</i>	forward	5'- AGGGCAGTGTTCCTAGTATTGTTG -3'
	reverse	5'- CTCTTTTGGATTGTGCCTCATCT -3'

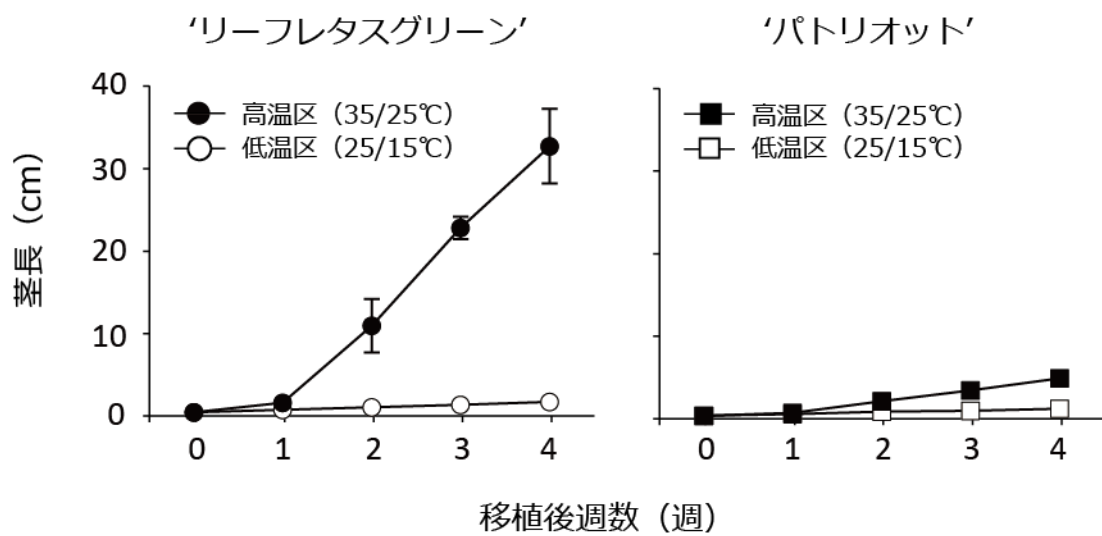


図 2-2. 温度がレタス茎伸長に及ぼす影響

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 茎長を調査した.
縦棒線は標準偏差を示す (n=5).

(図 2-2). 花芽発達は高温区, 低温区ともに移植後 4 週においても栄養成長期 (スコア 0) であった.

2. 茎において主要に発現している *GA-oxidase* の分子種の特異

各 *GA-oxidase* のうち, 茎において主要に発現している分子種を明らかにするため, 茎頂部分を取り除いた移植後 2 週間後の茎における, *LsGA20ox1*, *LsGA20ox2*, *LsGA20ox3*, *LsGA3ox1*, *LsGA3ox2*, *LsGA3ox3*, *LsGA2ox1*, *LsGA2ox2* の発現量を解析した. ‘リーフレタスグリーン’ において, 高温区, 低温区ともに, *LsGA20ox* では *LsGA20ox1* の発現量が多く, *LsGA3ox* では *LsGA3ox1* の発現が多く *LsGA3ox3* は検出限界以下であった. *LsGA2ox* では *LsGA2ox1* の発現量が多かった (図 2-3). ‘パトリオット’ においても, 高温区, 低温区ともに *LsGA20ox* では *LsGA20ox1* の発現量が多かった. *LsGA3ox* では, *LsGA3ox1* の発現量が多かったが, 低温区においては *LsGA3ox2* も多く発現していた. *LsGA3ox3* は検出限界以下であった. *LsGA2ox* については, 高温区, 低温区ともに *LsGA2ox1* の発現量が多く, *LsGA2ox2* は検出限界以下であった (図 2-4).

3. 茎で主要に発現している *GA-oxidase* の経時的発現動態の解析

温度による抽苔誘導時のレタス茎内において主要に発現している *GA-oxidase* について経時的な発現解析を行うため, 移植後 0 週から 4 週の植物体の茎をサンプリングした. 高温区では, 茎長が 2cm 以上となる移植後 2 週以降は, 茎頂を除いた上部 2cm と 2cm 以下に分けた. 図 2-5 に示すように, ‘リーフレタスグリーン’ の *LsGA20ox1* は温度処理間で明確な差はなく, 移植後 1 週で減少し, 移植後 4 週にかけてわずかに増加がみられた. 高温区 2cm 以下においても, 発現量は徐々に増加した. *LsGA3ox1* については, 高温区の上部 2cm にお

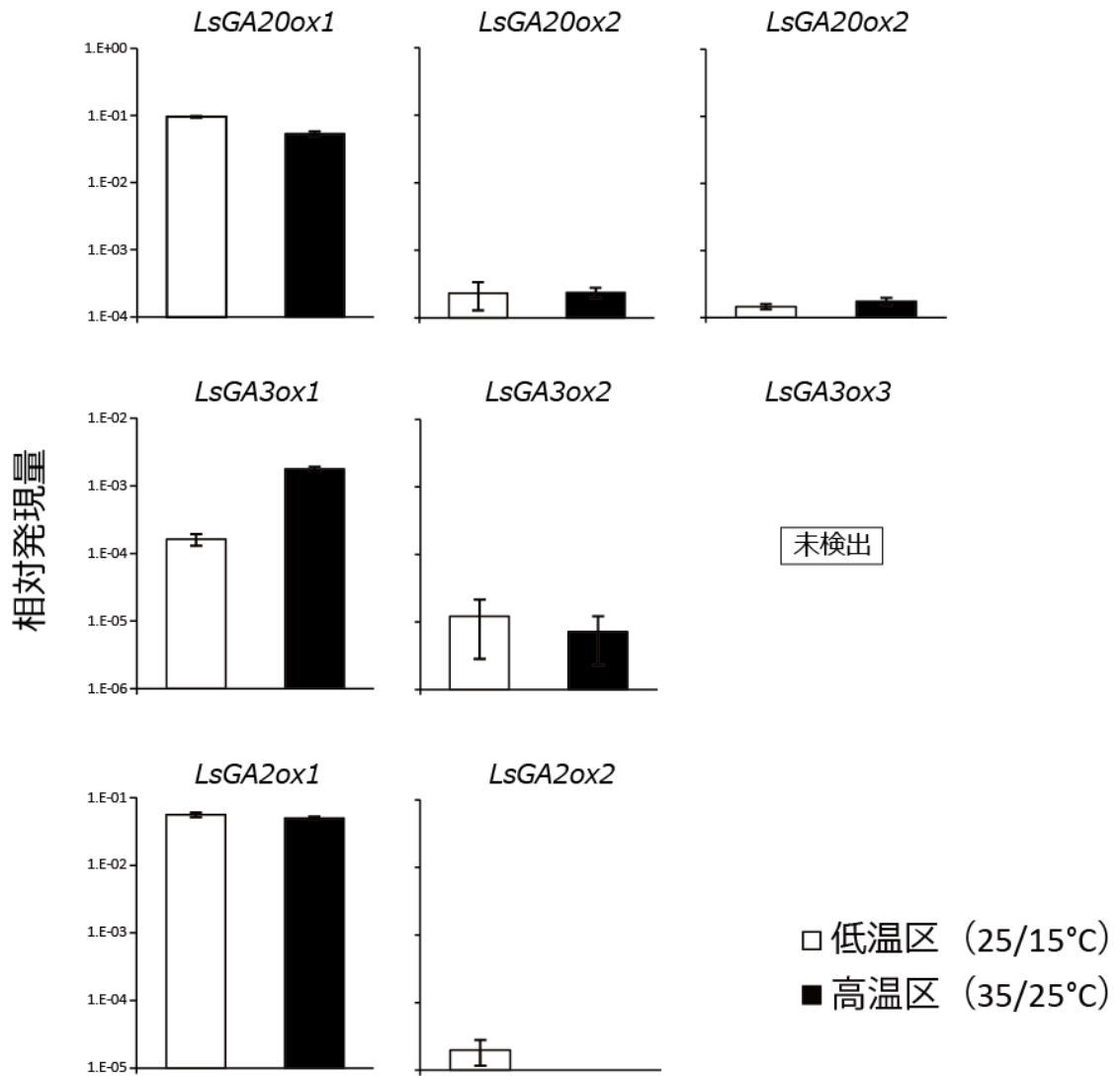


図 2-3. レタス茎（‘リーフレタスグリーン’）におけるジベレリン代謝酵素遺伝子の発現

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C (□) および 35/25°C (■) で生育させ 2 週間後にサンプリングし, ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析を行った. *LsGA3ox3* は検出されなかった. 図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=3).

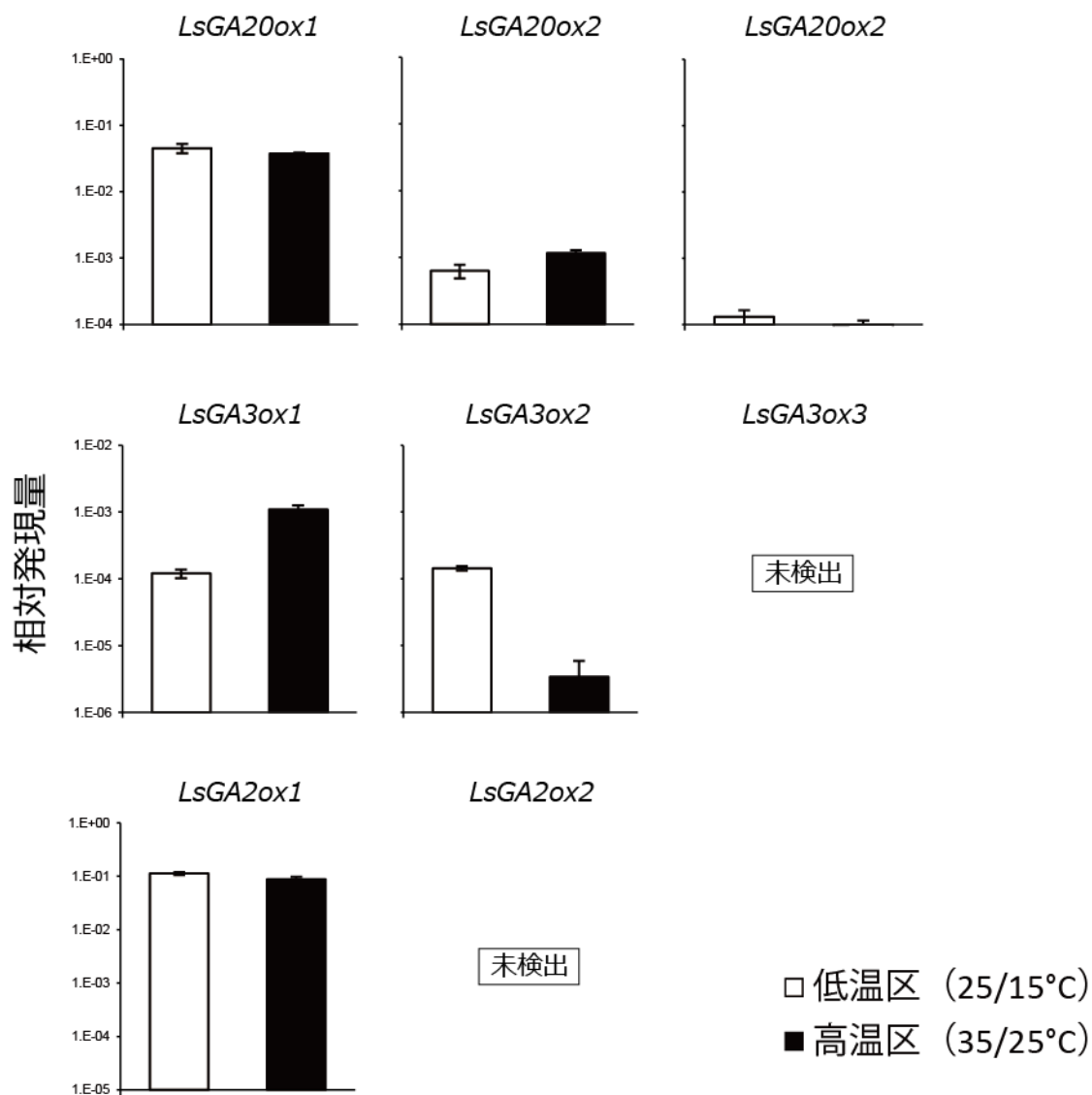


図 2-4. レタス茎（‘パトリオット’）におけるジベレリン代謝酵素遺伝子の発現

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C (□) および 35/25°C (■) で生育させ 2 週間後にサンプリングし, ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析を行った. *LsGA3ox3* および *LsGA2ox2* は検出されなかった. 図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=3).

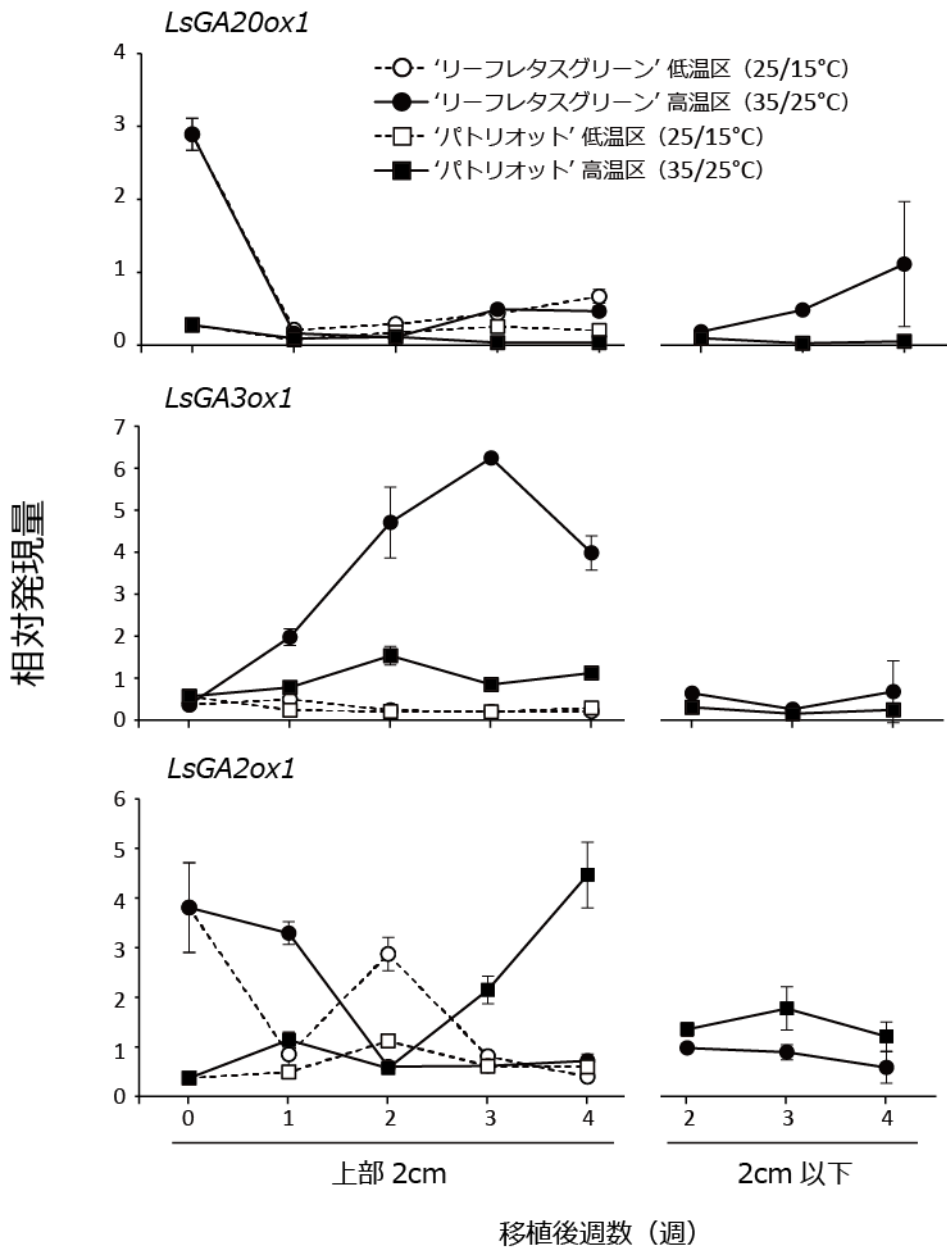


図 2-5. 温度がジベレリン代謝酵素遺伝子の発現量に及ぼす影響

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させた. 1 週間階毎にサンプリングし, ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析を行った. 茎頂を除いた茎の上部 2 cm を '上部 2 cm' サンプルとし, 残りを '2 cm 以下' とした. 25/15°C 区では, 両品種とも茎が 2 cm 以下であったため, '2 cm 以下' はない. 図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=3).

いて移植後 1 週から 3 週にかけて劇的な発現上昇がみられた。低温区では発現量は低いまま推移した。また高温区 2 cm 以下では発現量は低かった。

LsGA2ox1 については、高温区の上部 2cm では、移植後 1 週から 2 週の間には発現量が減少し、低温区の上部 2cm では、移植後 2 週から 3 週の間には発現量が減少したが、両温度処理区とも移植後 3 週、4 週で発現量が低下した。高温区 2 cm 以下でも発現がみられたが、発現量はほぼ一定で推移した。‘パトリオット’では、*LsGA20ox1* は移植直後から発現量が低く、‘リーフレタスグリーン’同様に生育温度による明確な違いがみられなかった。*LsGA3ox1* の発現量は、高温区の上部 2 cm において増加がみられたが‘リーフレタスグリーン’の高温区よりも少なかった。低温区では発現量は低いまま推移した。*LsGA2ox1* の移植後 0 週のは発現量は‘リーフレタスグリーン’より少なく、わずかに増加し、特に移植後 3 週から 4 週にかけて高温区の上部 2 cm で多くなった。低温区では移植後 2 週にわずかに発現量が増加したが、期間を通して発現量は低く推移した。高温区 2 cm 以下では若干の発現がみられたが、発現量は‘リーフレタスグリーン’よりも少なかった。

考察

移植後の栽培温度が高温の場合、茎の伸長が促進され花成が確認されたことから、既報のとおり(Thompson.H.C and Knott.J.K., 1933), 高温によりレタスの抽苔が誘導されることが本試験で供試した品種、使用した環境条件においても確認された。本試験において解析したジベレリン代謝酵素遺伝子は small gene family を形成しており、空間的および時間的に発現が異なることが知られている(Coles et al., 1999; Itoh et al., 2001; Mitchum et al., 2006)。レタスの茎においては、GA-oxidase は各酵素遺伝子パラログのうち、*LsGA20ox1*, *LsGA3ox1*, *LsGA2ox1* がそれぞれ主要に発現していると考えられ(図 2-3, 2-4), これは抽

苔特性の異なる品種間でも共通すると考えられた。ジベレリン代謝酵素遺伝子のうち、高温により茎伸長が起こる際に *LsGA3ox1* の発現量が増加したが、*LsGA20ox1* にはこの特異的増加はみられなかった (図 2-5)。シロイヌナズナおよびハウレンソウにおいては、日長により抽苔が誘導される条件下において *GA20ox* の発現量が増加することで内生ジベレリンレベルが上昇することが知られる (Wu et al., 1996; Xu et al., 1997)。 *Carrizo citorange* においては、温度により枝の伸長が促進される際 *CcGA20ox* 発現が増加することで内生ジベレリン量が増加すると考えられている (Vidal et al., 2003)。これらの報告とは異なり、レタスの茎伸長の場合は *GA20ox* ではなく *GA3ox* がキーとなって内生ジベレリン量を増加させるものと考えられる。Mazier (2007)は、タバコのレトロトランスポゾン *Tnt1* を用いて作出したレタス *LsGA3ox1* 欠損変異体が、野生型と比較して節間長が短く、葉が小さく根が短いことを報告している。この結果および本試験結果は、*LsGA3ox1* がレタス茎伸長に必要なキー酵素をコードしていることを示唆している。しかしながら、高温による茎伸長誘導時の *LsGA3ox1* 発現量の増加は抽苔特性の異なる品種間でも確認されたが、抽苔の早い‘リーフレタスグリーン’に比べて抽苔の遅い‘パトリオット’ではその増加量が小さかった。また、不活化酵素遺伝子である *LsGA20ox1* は、‘パトリオット’の高温区の茎上部 2 cm で経時的に発現量が増加した。これらのことは、抽苔性の異なる品種間でジベレリン代謝に対する遺伝子レベルの応答性が異なることを示していると考えられた。

2-2 内生ジベレリンの動態解析

レタスについては、早期水酸化経路により合成されるジベレリン類が主要内生ジベレリンであると考えられ、Niki ら(2001)により GA_1 、 GA_4 、 GA_{19} 、 GA_{20}

が同定されているところである。本項ではまず、リーフレタスである‘リーフレタスグリーン’と結球性レタスである‘パトリオット’における内生ジベレリンの抽出、生物検定、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）による同定を行い、本研究で供試するレタス品種における内生ジベレリン構成にこれまでの報告と相異がないことを確認することとした。次に高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MS/MS）により、両品種の内生ジベレリンの変動を定量した。

材料および方法

1. 植物材料

内生ジベレリンの同定には、前述の方法（1-1）で育苗したレタス‘リーフレタスグリーン’および‘パトリオット’を、混合培土を充填した7 cmの不織布ポットに移植し、ガラス室（28℃で天・側窓開閉、日長はなりゆき）で生育させた。移植後38日後に収穫し、葉と茎に分けサンプリングした。

主要内生ジベレリンの精密定量には、同様に育苗した苗を移植したポットを35/25℃（昼/夜温）および25/15℃（昼/夜温）に設定したグロースチャンバーに移して栽培した植物体を用いた。以下35/25℃区を高温区、25/15℃区を低温区とした。いずれの温度処理区も日長は14時間とした。

2. 内生ジベレリン分析

(1) ジベレリン抽出および精製

収穫した茎は茎頂を取り除き液体窒素で凍結した。葉および茎各200 gを秤量し、以下の手順でジベレリンを抽出した。

試料に約5倍量の80%メタノールを加え、ホモジナイザーで摩砕したのち室温で30分静置した。減圧濾過機を用いてフィルターろ過し、残渣に80%メタ

ノールを加え再抽出し、ろ過した。これを2回繰り返す、通過した溶液をエバポレーターにより減圧濃縮した。約100 mlほどになったら分液漏斗に移し、ヘキサンを加えて溶媒分画し、水層を回収した。ヘキサンによる溶媒分画は3回行った。回収した水層は塩酸を用いてpH=3以下になるように調整し、分液漏斗に移した。塩酸でpH=2に調整した蒸留水で飽和した酢酸エチルを加え、溶媒分画し酢酸エチル層を回収した。酢酸エチルによる溶媒分画は3回行った。回収した酢酸エチル層にリン酸緩衝液(pH=8.3)を加え、分液漏斗で溶媒分画しリン酸緩衝液層を回収した。リン酸緩衝液による溶媒分画は3回行った。

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を10 g 加え攪拌したのち、減圧濾過器を用いてろ過した。塩酸を用いて溶液のpHを3以下にし、分液漏斗に移した。酢酸エチルを加え溶媒分画し、酢酸エチル層を回収した。この操作は3回行った。

無水硫酸ナトリウムを30 g程度加えて脱水し、脱脂綿をつめた漏斗を通過させてろ過した。エバポレーターを用いて溶液を乾固し、約1 mlの80%メタノールに溶解した。100%メタノールを3回、80%メタノールを3回通して前処理した逆相カラム(Bond Elut C18, Agilent Technologies)に、溶解した溶液を通した。約2 mlの80%メタノールで溶出した。計3回行い、総量7 mlとした。エバポレーターを用い溶出液を乾固し、約1 mlの100%メタノールに溶解した。100%メタノールを3回通して前処理したイオン交換カラム(Bond Elut-DEA, 500 mg/3 ml, Agilent Technologies)に、溶解した溶液を通した。0.5%酢酸を含むメタノール約2 mlで溶出した。計3回行った。100%メタノールおよび0.5%酢酸を含むメタノールの溶出液をあわせ、エバポレーターを用いて乾固した。

1%酢酸を含む30%メタノール溶液で溶解し、液体高速クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)により精製した。カラムはODS-4253-D(内径15 mm, 長さ250 mm, センシユウ科学, 日本)を用い、カラム温度は40°Cとした。移動相は1%酢酸を含む30%メタノール溶液、流速は

2 ml · min⁻¹ とし、溶出プログラムは、当初 2 分間を 1%酢酸を含む 30%メタノール溶液、その後 28 分間を 1%酢酸を含む 30%メタノール溶液から 100%メタノールとの直線勾配、その後 20 分間を 100%メタノールとした。試料注入の 4 分後から 1 分毎に 35 画分を得た。

(2) 生物検定

矮性イネ‘短銀坊主’を用いた改良点滴法(Nishijima and Katsura, 1989)による生物検定を行った。種籾を水洗いし、1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬して 30°Cで 24 時間静置した。水洗いした後 20 μg/ml ユニコナゾール P 溶液に浸漬し、暗黒下 30°Cで 24 時間静置した。これを水洗いした後、水を張ったシャーレに入れ暗黒下 30°Cで 2 日間静置した。催芽した植物体 6 個体を、0.8%寒天を満たした円筒形のガラス管ビン（内径 28 mm×深さ 58 mm）に植えつけた。植え付け後、連続照明下 30°Cで 2 日間生育させ、HPLC で得られた各分画を 200 μl の 50%アセトンに溶解し、植物体 1 個体当たり 1 μl を子葉鞘と第 1 葉の間に点滴した。30°C、連続照明下で 3 日間生育させた後、第 2 葉鞘長を測定した。

(3) GC-MS によるジベレリン同定と定量

HPLC で得られた各分画を再度少量のアセトンで溶解し、ジアゾメタンエーテル溶液を加えメチルエステル誘導体に変換した。これを減圧乾固し、MSTFA (N-Methyl-N-TMS-trifluoroacetamide) を 20 μl 加え、80°Cで 30 分間反応させ、トリメチルシリル化を行った。

誘導化した試料を GC-MS (GC: 6890N, Agilent Technology, MS: JMS-700, JEOL, 日本) にて分析した。カラムは DB-1 キャピラリーカラム（内径 0.25 mm, 長さ 15 m, 膜厚 0.25 μm, Agilent Technology), キャリアガスには高純

度ヘリウムガスを流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で用いた。カラムの温度制御は以下の昇温プログラムとした。注入後の2分間は 130°C で保ち、その後 $32^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ で 220°C まで、続いて $8^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ で 270°C まで昇温させた。標品ジベレリンの保持時間およびマススペクトルとの比較により内生ジベレリンを同定した(Gaskin and MacMillan, 1991)。

(4) 主要内生ジベレリンの精密定量

収穫した茎は茎頂を取り除き液体窒素で凍結した。凍結後粉碎し、凍結乾燥機により乾燥させた。0.05–0.2 g を秤量し、以下の手順でジベレリンを抽出した。

試料に約5倍量のアセトンと、内部標準として各 1 ng の $[17, 17\text{-}^2\text{H}_2]$ -GA₁, GA₈, GA₁₉, GA₂₀ (Olchemim Ltd., Czech Republic) を加え混合し、室温で30分静置した。フィルターろ過し、残渣にアセトンを加え再抽出し、ろ過した。これを2回繰り返す。通過した溶液をエバポレーターにより乾固した。塩酸で pH=2 に調整した蒸留水 (蒸留水 (pH=2)) で飽和した酢酸エチルで溶解し、試験管に移した。蒸留水 (pH=2) を加え溶媒分画し、酢酸エチル層を回収した。再度酢酸エチルを加え溶媒分画し、酢酸エチル層を回収した。これを2回繰り返す。エバポレーターを用いて溶液を乾固し、約 1 ml の 80%メタノールに溶解した。100%メタノールを3回、蒸留水を3回通して前処理した逆相カラム (Oasis HLB, 60 mg/3 ml, Waters, USA) に、溶解した溶液を通した。約 2 ml の 80%メタノールで溶出した。計3回行い、総量 7 ml とした。エバポレーターを用い溶出液を乾固し、約 1 ml の 100%メタノールに溶解した。100%メタノールを3回通して前処理したイオン交換カラム (BondElut-DEA, 500 mg/3 ml) に、溶解した溶液を通した。2%酢酸を含むメタノール約 2 ml で溶出した。計3回行った。100%メタノールおよび2%酢酸を含むメタノールの溶出液

をあわせ、エバポレーターを用いて乾固した。0.05%酢酸を含む20%メタノール溶液で溶解し、PTFE フィルターで前処理した後 LC-MS/MS (Prominence 20A 型, 島津 (株); 3200QTrap 型, AB Sciex, Co., Ltd.) を用いて内部標準との比較により内生ジベレリン量を測定した。

結果

1. 生物検定

‘リーフレタスグリーン’の葉からの抽出液による生物検定では、分画 24, 25, 28 においてジベレリン様活性がみとめられ、茎からの抽出液による生物検定では同分画においてさらに強いジベレリン様活性が認められた。‘パトリオット’においては、葉からの抽出液による生物検定では、明確なジベレリン様活性を示す分画はみられなかったが、茎からの抽出液による生物検定では分画 24, 26, 28 においてジベレリン様活性が認められた (図 2-6)。

2. GC-MS によるジベレリン同定

標品ジベレリンとのマススペクトルの比較により、‘リーフレタスグリーン’および‘パトリオット’から GA₁, GA₁₉, GA₂₀ が同定された (表 2-2)。生物検定において‘リーフレタスグリーン’および‘パトリオット’の 28 画分でジベレリン様活性が認められたが (図 2-6), この画分からジベレリンを同定することはできなかった。

3. 主要内生ジベレリンの精密定量

‘リーフレタスグリーン’において、GA₅₃, GA₄₄, GA₁₉ は低温区で内生量が多い傾向がみられた。GA₁₉ から GA_{20x} によって合成される GA₂₉ は、移植後 0 週および移植後 1 週の高温区の上部, 移植後 2 および 3 週の高温区の 2 cm 以

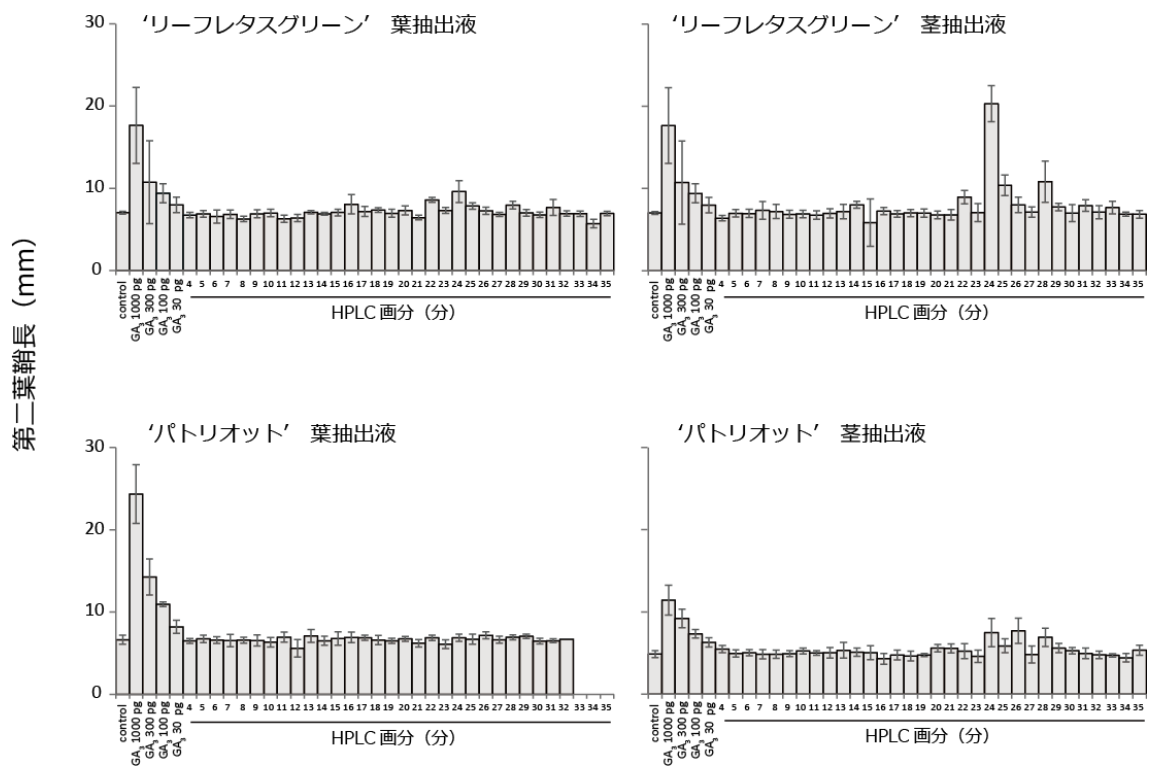


図 2-6. レタス茎および葉から抽出した画分のジベレリン様活性

イネ'短銀坊主'に 50%アセトンのみを点滴した区を対照 (control) とした。

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=6)。

表 2-2. GC/MS によるレタスのジベレリン同定

品種	GAs	HPLC 画分 (分)	主要なイオン (*イオン強度)
'リーフレタスグリーン'	GA ₁	16	506(100), 491(11), 448(17), 376(11), 313(9)
	GA ₂₀	22-23	418(100), 403(18), 375(57), 359(14), 301(14)
	GA ₁₉	24-25	434(100), 402(27), 375(38), 345(18)
'パトリオット'	GA ₁	16	506(100), 491(12), 448(24), 376(11), 313(7)
	GA ₂₀	22-23	418(100), 403(18), 375(52), 359(16), 301(14)
	GA ₁₉	24-25	434(100), 402(29), 375(43), 345(23)

*イオン強度はベースピークを 100 とした相対値を示す。

下において検出された (図 2-7). 'パトリオット' において GA_{29} は, 移植後は
いずれの温度区, 部位においても検出されなかった (図 2-7). GA_{29} 以降の内生
量を図 2-8 に示す. 'リーフレタスグリーン' において, GA_{20} は, 両処理区で
移植後 1 週から 2 週にかけて増加し, 特に移植後 2 週の高温区上部 2 cm, 高温
区 2 cm 以下で多かった. $LsGA3ox$ の作用により GA_{20} から合成される GA_1 は,
移植後 2 週以降の高温区上部 2 cm で有意に増加した. 高温区 2 cm 以下では内
生量はわずかだった. $LsGA2ox$ の作用により GA_1 が不活化した型である GA_8
においても移植後 2 週から高温区上部 2 cm において増加し, 高温区 2 cm 以下
では内生量はわずかだった. 'パトリオット' においては, GA_{20} は移植後 1 週
および 2 週の高温区上部 2 cm で増加した. GA_1 は移植後 1 週の両温度区上部 2
cm において増加し, その後は減少し内生量は少なくなった. GA_8 の内生量は移
植後 1 週の高温区上部 2 cm で増加し, その後減少した. 高温区 2 cm 以下では
 GA_{20} , GA_1 , GA_8 いずれも内生量はわずかだった. 両品種の高温区上部 2 cm
において GA_1 および GA_8 の増加がみられたが, その増加程度は 'パトリオッ
ト' に比べて 'リーフレタスグリーン' で大きかった.

考察

レタスの内生ジベレリンに関する報告としては, 葉から GA_1 , GA_4 , GA_{19} ,
 GA_{20} が同定されている (Niki et al., 2001). また, Niki ら (2001) の報告では, 微
量の GA_4 がレタス葉から検出されているが, 同時に早期 13 位水酸化経路の物
質が同定されており内生量も多い. また Toyomasu ら (1993, 1992) によるレタス
の光発芽の解析において, GA_1 , 3epi- GA_1 , GA_{17} , GA_{19} , GA_{20} , GA_{77} が同定さ
れている. 本実験においても, 用いた両品種において GA_1 , GA_{19} , GA_{20} が同定
されたこと (表 2-2) はこれらの報告と一致しており, レタス茎においても早
期 13 位水酸化経路が作用し, 本経路で生合成されるジベレリンが存在して

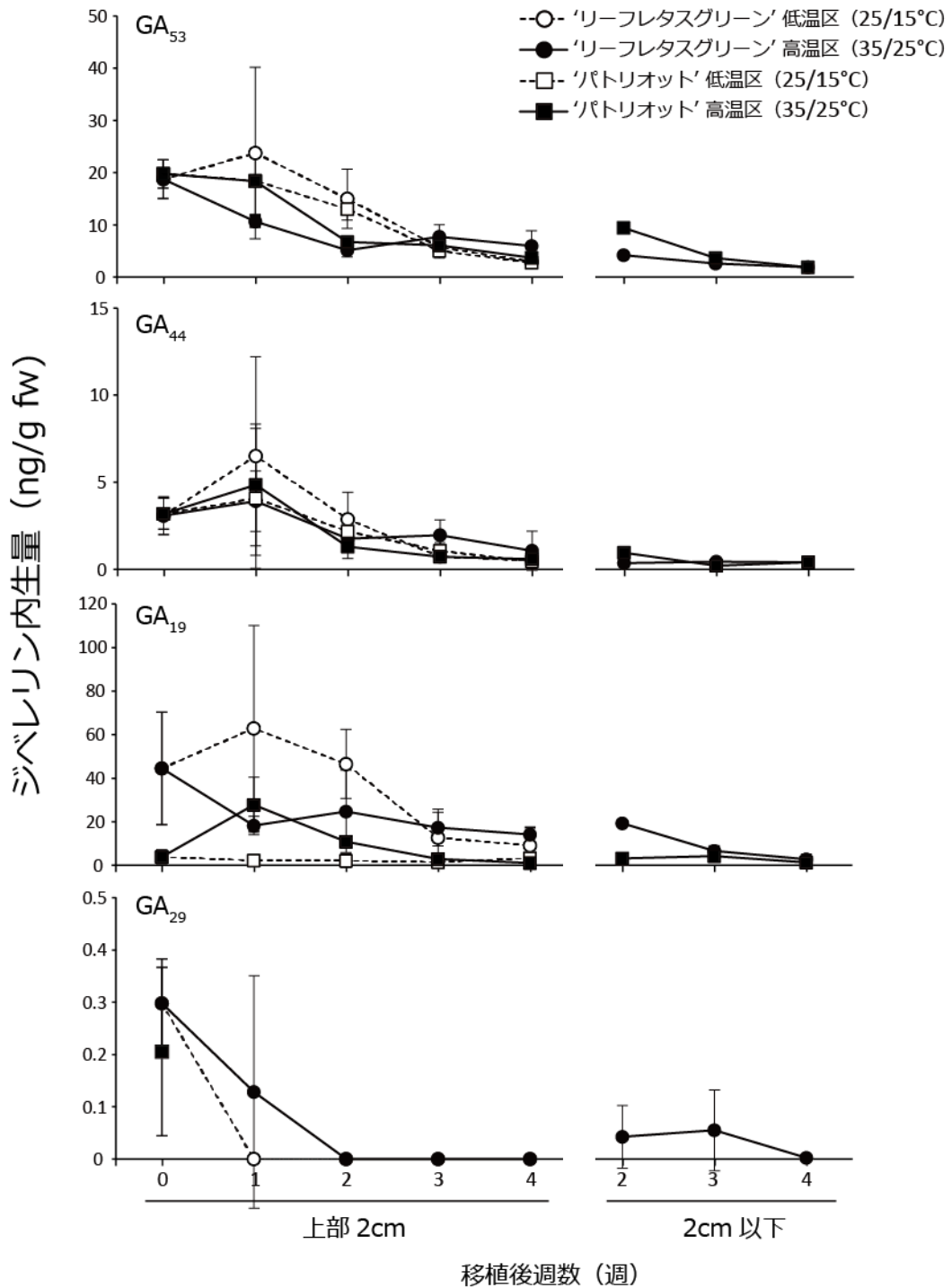


図 2-7. レタス茎におけるジベレリン内生量の変動と品種間差

遺伝子発現解析 (図 2-5) に用いたサンプルの一部を秤量し, ジベレリン内生量分析に用いた.

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=3).

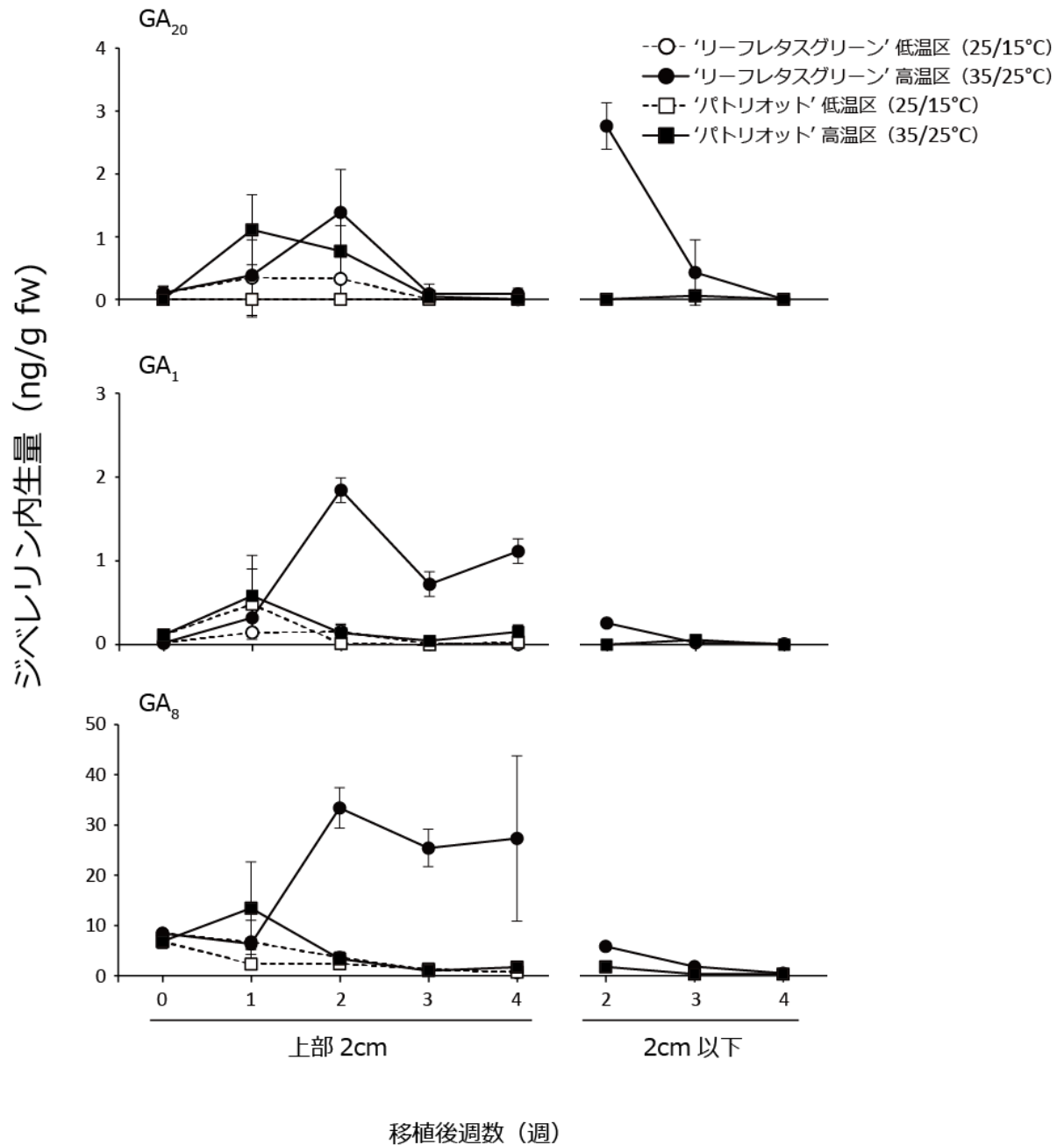


図 2-8. レタス茎におけるジベレリン内生量の変動と品種間差

遺伝子発現解析 (図 2-5) に用いたサンプルの一部を秤量し, ジベレリン内生量分析に用いた.

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=3).

いることが示された。

レタスにおける内生ジベレリンはこれまでに同定されているが、抽苔における変動を解析した例はない。本実験では、レタス茎における内生ジベレリンの変動を部位別に解析した。‘リーフレタスグリーン’においては、GA₅₃からGA₁₉までは低温区の内生量が高温区と同等か多い傾向がみられ、GA₂₀以降は高温区で内生量が多かった。一方‘パトリオット’では、GA₅₃およびGA₄₄では高温区、低温区で明確な内生量の差はみられないが、GA₁₉以降に高温区で内生量が多くなった(図 2-7)。GA₅₃からGA₄₄、GA₁₉、GA₂₀と続く反応は、GA_{20ox}により触媒される。同一酵素による複数段階の制御機構についての知見は多くないが、ハウレンソウの同反応において、GA₁₉からGA₂₀への変換のみが光の影響を受けることが知られており(Talon et al., 1991)、両品種間で前駆体の蓄積パターンが異なったことから、GA_{20ox}の作用機構もしくは制御機構が品種により異なる可能性が考えられた。レタスにおける活性型ジベレリンであるGA₁は‘リーフレタスグリーン’において、茎伸長が促進される高温区の茎上部 2 cm において有意に増加した(図 2-8)。矮性および野生型エンドウを用いた接ぎ木実験により、エンドウにおける活性型ジベレリンの前駆体、GA₂₀は台木と穂木の間を移動するのに対し、活性型のGA₁の移動は極少量であることが示されている(Lockard and Grunwald, 1970; Proebsting et al., 1992)。本実験の結果から、高温に応答したレタスの茎伸長において、GA₁の増加は茎頂の直下に位置する急激に伸長している部位で起こっていると考えられた。‘パトリオット’の高温区においては、‘リーフレタスグリーン’で観察されたような劇的なGA₁の増加はみられなかったが、前駆物質であるGA₂₀、およびGA₁が不活化された型のGA₈の内生量が低温区に比べて多く(図 2-8)、代謝経路のフローが増加していることが推察される。本実験結果は、高温によるジベレリン代謝応答は品種によらず引き起こされると考えられるが、その程度は品種間で

異なり，早抽性のものほど内生量増加が著しいことを示唆している。

2-3 ジベレリン関連物質がレタスの生育に及ぼす影響

2-1 および 2-2 において，高温条件により生育しているレタスが抽苔する際のジベレリン代謝酵素遺伝子の発現動態および内生ジベレリン動態が明らかとなり，茎伸長へのジベレリンの関与が示された。本項では，ジベレリン関連物質の投与がレタス生育に与える影響を調査した。これまでに述べているように，ジベレリン処理はレタスの茎伸長を促進することが知られている。そこでまず，本研究で供試している品種におけるジベレリンの応答性を調査することとした。GA₁の代用としてGA₃を用い，またもう一つの活性型ジベレリンであるGA₄を用いて，レタス生育に及ぼす影響を調査した。ジベレリンの阻害剤はこれまでも多く知られており，生合成の初期段階であるテルペンサイクラーゼ（CPS，KS）に作用するトリアゾール系薬剤や生合成の後期段階である 2ODD に作用するプロヘキサジオンカルシウム塩を主成分とした「ビビフルフロアブル」やトリネキサパックエチルを主成分とする「プリモマックス」などがある。これらは，水稻の倒伏軽減や果樹の新梢伸長抑制，キャベツ，イチゴ等野菜苗の徒長抑制を目的として農薬登録がなされている。前項において高温に応答したレタスの茎伸長においては，GA_{3ox} をコードする *LsGA3ox1* の特異的発現増加がみられられたことから，特に GA_{3ox} の作用を阻害するとされる薬剤を用いて，複数濃度の薬剤の連続処理による形態変化を調査し，さらに高濃度薬剤のスポット処理による形態変化を調査した。

材料および方法

1. 植物材料

活性型ジベレリン処理試験には、前述の方法（1-1）で育苗したレタス品種‘リーフレタスグリーン’および‘パトリオット’を、2004年12月9日に、間口5 m、長さ16 mのビニールハウス内に移植した。ハウス内土壌は10aあたりでN=25 kg、P=25 kg、K=25 kgの化成肥料を投入し、移植は白黒ダブルマルチの白面を展張した60 cm幅の畝に、株間30 cmで2条千鳥とした。

ジベレリン生合成阻害剤の連続処理試験には、前述の方法（1-1）で育苗したレタス品種‘リーフレタスグリーン’および‘パトリオット’を、混合培土を充填した7 cmの不織布ポットに移植し、35/25°C（昼/夜温）および25/15°C（昼/夜温）に設定したグロースチャンバーに移して栽培した。いずれの温度処理区も日長は14時間とした。

ジベレリン生合成阻害剤のスポット処理試験には、前述の方法（1-1）で育苗したレタス品種‘リーフレタスグリーン’を、混合培土を充填した7 cmの不織布ポットに移植し、30/15°C（昼/夜温）に設定した人工気象室内に移して栽培した。日長は14時間とした。

2. 薬剤処理

ジベレリン処理試験では、GA₃（ジベレリン協和粉剤，協和発酵バイオ，日本）およびGA₄（Olchemim,Ltd.）含有量が1 μg/mlとなるように溶液を調整し、これを100 ml/m²となるように、処理区（10個体）に葉面散布した。コントロールとして溶液を調整した蒸留水を用いた。散布は、移植後2週から1週間毎に行った。‘リーフレタスグリーン’は移植後15週に、‘パトリオット’は移植後14週に収穫し、莖長を調査した。

ジベレリン生合成阻害剤の連続処理試験では、高温区で栽培するレタス個体に、薬剤処理を行った。GA₃oxの作用阻害を利用した矮化剤「ビビフルフロアブル」（クミアイ化学工業，日本）を、プロヘキサジオンカルシウム塩（3-

oxido-5-oxo-4-propinylcyclohex-3-enecarboxylic acid calcium salt; プロヘキサジオン Ca 塩) 含有量が 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml となるように溶液を調整し, これを 100 ml/m² となるように, 処理区 (6-8 個体) に葉面散布した. コントロールとして溶液を調整した蒸留水を用いた. 散布は, 移植した日から 1 週間毎に行った. 茎長と, 矮化程度の指標として鉛直方向からみた植物体直径を, 1 週間毎に調査した. 統計解析には分散分析 (JMP, SAS Institute, USA) を用い, 事後検定には Tukey 法を用いた.

ジベレリン生合成阻害剤のスポット処理試験では, 「ビビフルフロアブル」を, プロヘキサジオン Ca 塩含有量が 1000 μ g/ml, 2000 μ g/ml となるように溶液を調整した. また, 「ビビフルフロアブル」と同様に GA3ox の作用阻害を利用した矮化剤「プリモマックス」(Syngenta、Swiss Confederation) を, トリネキサパックエチル (Trinexapac-ethyl) 含有量が 1000 μ g/ml, 2000 μ g/ml となるように溶液を調整した. この 2 剤について, 移植後 0 週は 50 ml/m², 移植後 1 週および 2 週は 100 ml/m² となるように, 処理区 (6 個体) に葉面散布した. コントロールは無処理とした. 散布回数は, 移植後 0 週, 1 週, 2 週のレタス個体に, 各濃度 1 回とした. 移植後 4 週までは茎長と葉数を一週間毎に調査し, 移植後 9 週で栽培を終了した. 栽培終了時に, 第一花が開花するまでに要した日数, 最終的な茎長, 鉛直方向からみた植物体直径を調査した.

結果

ジベレリン処理試験では, ‘リーフレタスグリーン’ においては, 収穫時の対照区の茎長が約 5 cm であったのに対し, GA₃ 処理区では約 15 cm となった. 一方, GA₄ 処理区では約 6 cm であった. ‘パトリオット’ においては, 対照区の茎長が約 3 cm だったのに対し, GA₃ 処理区で約 11 cm であった (図 2-9). GA₄ 処理区では約 3 cm であった. ‘パトリオット’ では, 対照区が結球してい

たのに対し、GA₃処理区では葉が展開し、結球体勢をとらなかった（図2-10）。ジベレリン生合成阻害剤の連続処理試験における、試験終了時（移植後4週）の植物体の様子を図2-11に示す。成長の推移としては、‘リーフレタスグリーン’においては、低温区の移植後4週の茎長は5 cm未満であり、抽苔はおこらなかった。鉛直方向からの植物体直径は、移植後1週で約16 cmで、移植後3週で最大となり約24 cmであった。一方高温区のコントロールでは、移植後2週以降は急激に茎伸長がおこり、移植後4週では約50 cmとなった。鉛直方向直径は移植後1週の時点で20 cmを超えており、変動した後移植後4週では約23 cmであった。高温区で栽培中の植物体に薬剤を処理したところ、茎長は1000 μg/ml処理区で著しく伸長が阻害され、移植後4週でも10 cm未満となった。10 μg/ml処理区、100 μg/ml処理区では、移植後3週までの茎伸長はコントロールと同様であったが、最終的な茎長は濃度依存的となった。薬剤処理による鉛直方向直径に対する影響はいずれも有意な差とはならなかったが、1000 μg/ml処理区で移植後1週では約19 cmであり、コントロールおよび他濃度処理区に比べて小さかった。この直径は移植後4週まで継続し、最終的な鉛直方向直径は薬剤濃度が濃いほど小さくなる傾向となった（図2-12）。‘パトリオット’においては、低温区では茎長は非常に短いまま推移し、移植後4週でも2 cm未満となった。鉛直方向直径は移植後1週で約17 cmであり、移植後4週まで増加し続けて約24 cmとなった。高温区のコントロールでは、茎長は経時的に増加し、移植後4週で約6 cmとなった。鉛直方向直径は、移植後1週で約24 cmであり、多少の変動を経て移植後4週で約25 cmとなった。‘リーフレタスグリーン’と同様に、高温区で栽培している植物体に薬剤を処理したところ、10 μg/ml処理区では移植後2週以降コントロールよりも長く、移植後4週には大きく伸長し約11 cmとなった。100 μg/ml処理区、1000 μg/ml処理区では、茎頂が壊死してしまい茎長は移植後2週以降計測不可能であった。鉛直

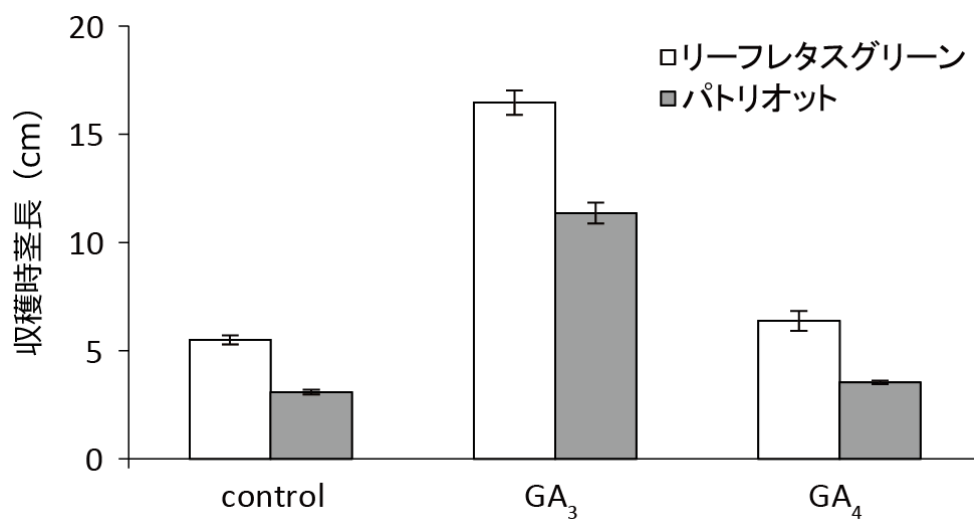


図 2-9. 活性型ジベレリンがレタス茎伸長に及ぼす影響

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗を 2004 年 12 月 9 日に無加温のビニールハウス内に移植した。移植後 2 週から毎週, 薬剤処理を行い, 'リーフレタスグリーン'は移植後 15 週, 'パトリオット'は移植後 14 週に収穫し, 調査した。

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=10)。

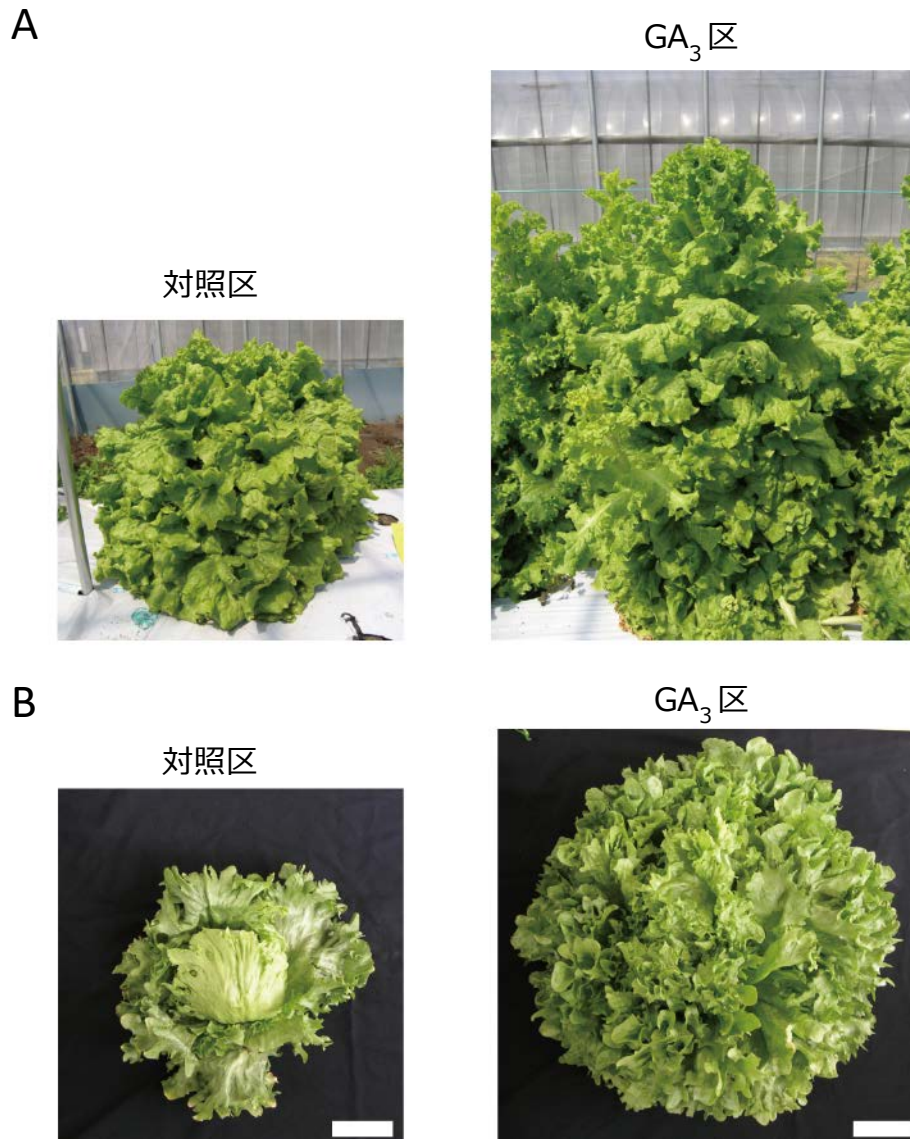


図 2-10. ジベレリン (GA₃) によるレタスの形態変化

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗を 2004 年 12 月 9 日に無加温のビニールハウス内に移植した. 移植後 2 週から毎週, 葉剤処理を行い, 'リーフレタスグリーン' (A) は移植後 15 週, 'パトリオット' (B) は移植後 14 週収穫時に撮影した. スケールバー : 10 cm (B).

‘リーフレタスグリーン’



1000 µg/ml 100 µg/ml 10 µg/ml 対照区

‘パトリオット’



1000 µg/ml 100 µg/ml 対照区 10 µg/ml

図 2-11. プロヘキサジオン Ca 塩のレタス茎伸長に対する効果

高温区で栽培するレタス個体にプロヘキサジオン Ca 塩を連続処理した。写真は実験終了時（移植後 4 週）に撮影した。

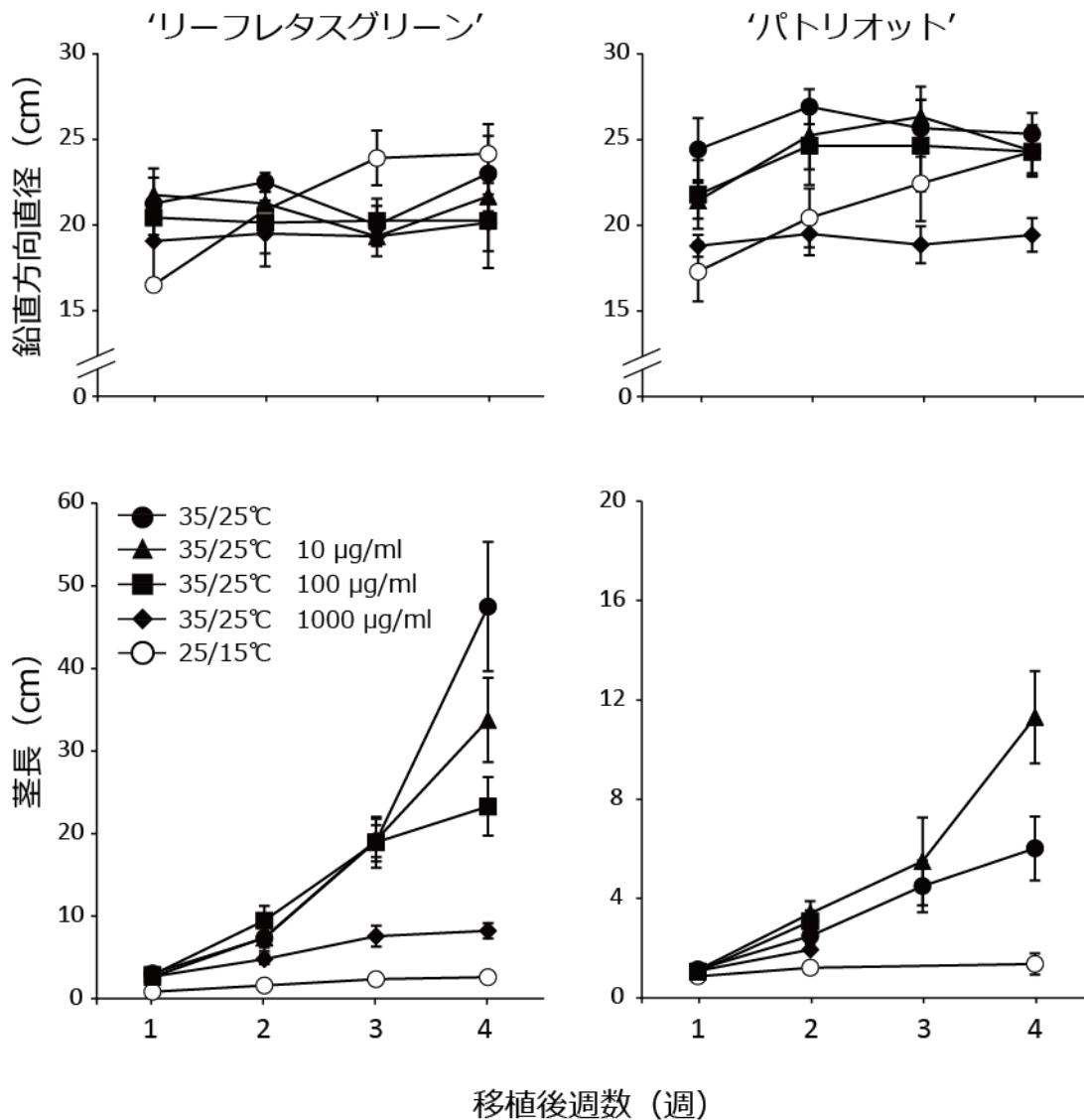


図 2-12. プロヘキサジオン Ca 塩のレタス莖伸長に対する効果

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗を, 25/15°C および 35/25°C で生育させた. 35/25°C で生育するレタスに移植後 1 週から一週間毎に 10, 100, 1000 µg/ml のプロヘキサジオン Ca 塩溶液を 100 ml/m² となるように散布した. 図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=6-8).

方向直径は、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 処理区において移植後 1 週で約 22 cm であったが、わずかに増加し移植後 4 週で約 24 cm となった。 $100\ \mu\text{g/ml}$ 処理区における鉛直方向直径の推移は、移植後 2 週までは $10\ \mu\text{g/ml}$ 処理区と同様であった。 $1000\ \mu\text{g/ml}$ 処理区では、移植後 1 週で約 18 cm と、低温区に比べると大きかったがその後の増加はみられなかった。最終的な鉛直方向直径は、 $1000\ \mu\text{g/ml}$ 処理区で有意に小さかった (図 2-12)。

ジベレリン生合成阻害剤のスポット処理試験では、‘リーフレタスグリーン’の栽培終了時の茎長は、無処理区で約 110 cm であり、コントロールに対してすべての薬剤処理区で有意に茎伸長が抑制されていた。処理のタイミングが早いものほどコントロールに近い数値となった (図 2-13A)。葉数には、コントロールと薬剤処理で有意差がみられなかった (図 2-13B)。鉛直方向からみた直径は、移植後 0 週のプロヘキサジオン Ca 塩 $2000\ \mu\text{g/ml}$ 処理および移植後 0 週のトリネキサパックエチル $2000\ \mu\text{g/ml}$ 処理でコントロールに比べて有意に小さくなった。移植後 2 週のトリネキサパックエチル $1000\ \mu\text{g/ml}$ 処理および $2000\ \mu\text{g/ml}$ 処理では、コントロールに比べて有意に大きくなった (図 2-14A)。乾物重は、移植後 2 週のトリネキサパックエチル $2000\ \mu\text{g/ml}$ 処理でのみ有意に減少したが、プロヘキサジオン Ca 塩およびトリネキサパックエチルともに、 $2000\ \mu\text{g/ml}$ の処理区で減少する傾向が見られた (図 2-14B)。第一花が開花するまでに要した日数は、移植後 0 週のトリネキサパックエチル $1000\ \mu\text{g/ml}$ 処理、移植後 0 週、1 週、および 2 週のトリネキサパックエチル $2000\ \mu\text{g/ml}$ 処理で、コントロールに比べて有意に多くなった (図 2-15)。

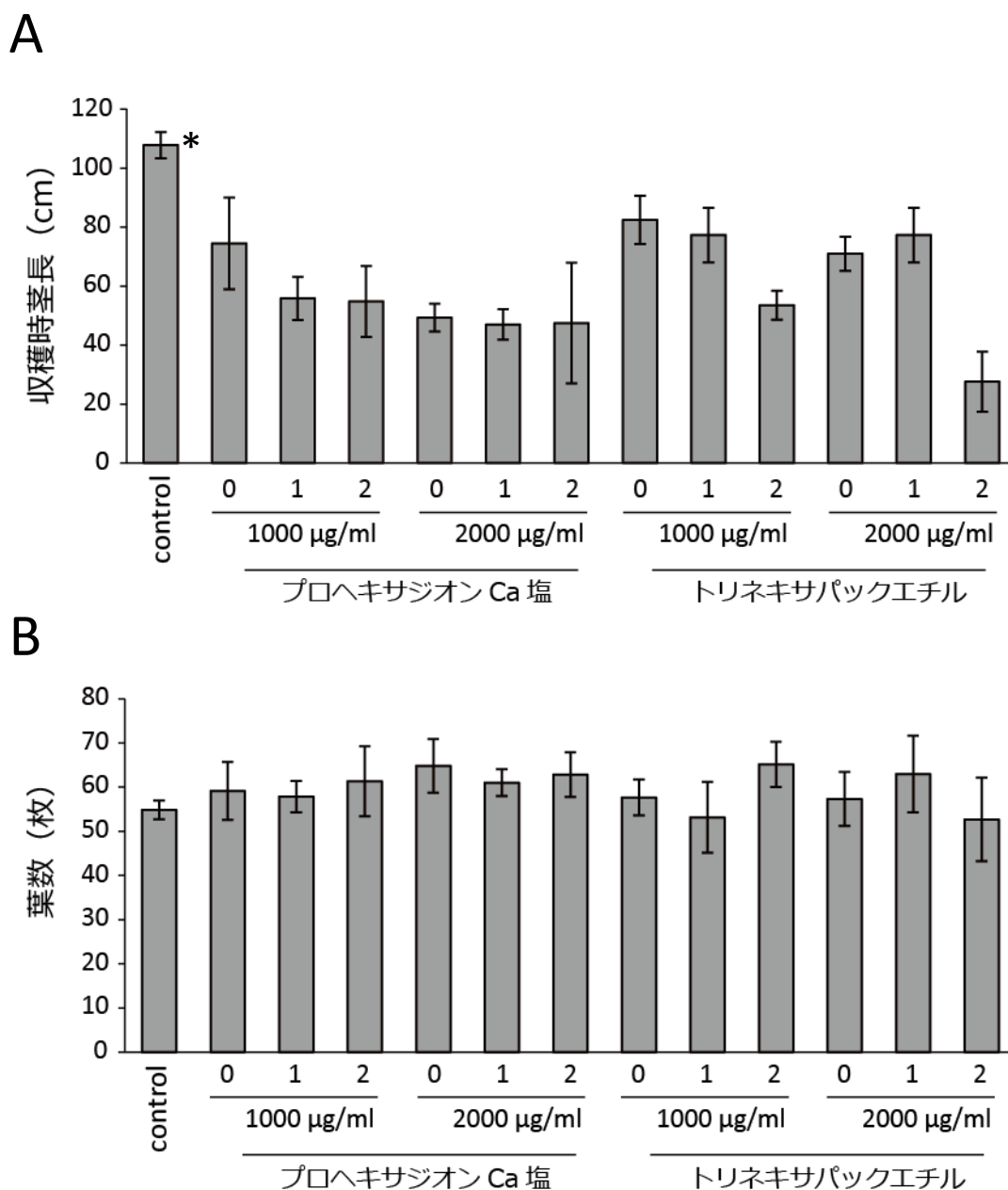
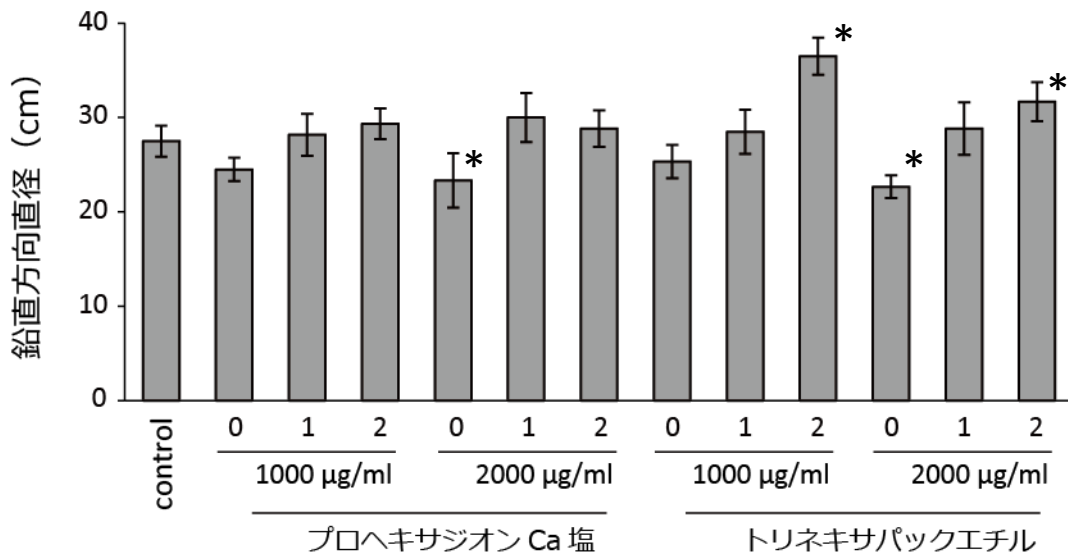


図 2-13. プロヘキサジオン Ca 塩およびトリネキサパックエチルのレタス生育に対する効果

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した「リーフレタスグリーン」の苗をポットに移植し, 30/15℃で生育させた. 移植後 0, 1, 2 週のレタス個体に 1000 および 2000 µg/ml のプロヘキサジオン Ca 塩溶液および 1000 および 2000 µg/ml のトリネキサパックエチル溶液を 100 ml/m² となるように散布した. 移植後 9 週に収穫し生育調査を行った. 図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=6).

*: 5%水準で有意差あり.

A



B

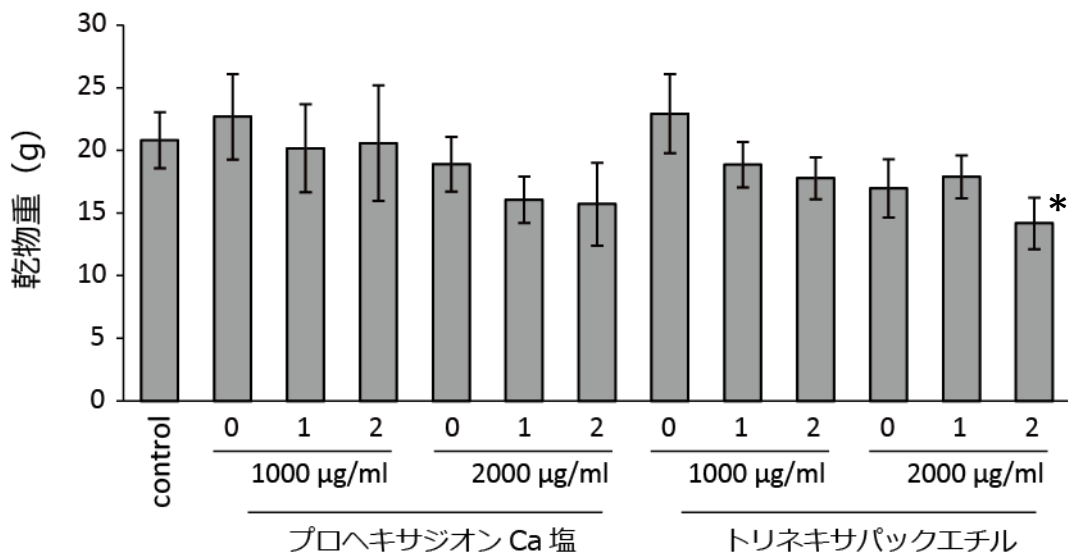


図 2-14. プロヘキサジオン Ca 塩およびトリネキサパックエチルのレタス鉛直方向直径および乾物重に対する効果

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した'リーフレタスグリーン'の苗をポットに移植し, 30/15℃で生育させた. 移植後 0, 1, 2 週のレタス個体に 1000 および 2000 µg/ml のプロヘキサジオン Ca 塩溶液および 1000 および 2000 µg/ml のトリネキサパックエチル溶液を 100 ml/m² となるように散布した. 移植後 9 週に収穫し生育調査を行った.

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=6).

*: 5%水準で有意差あり.

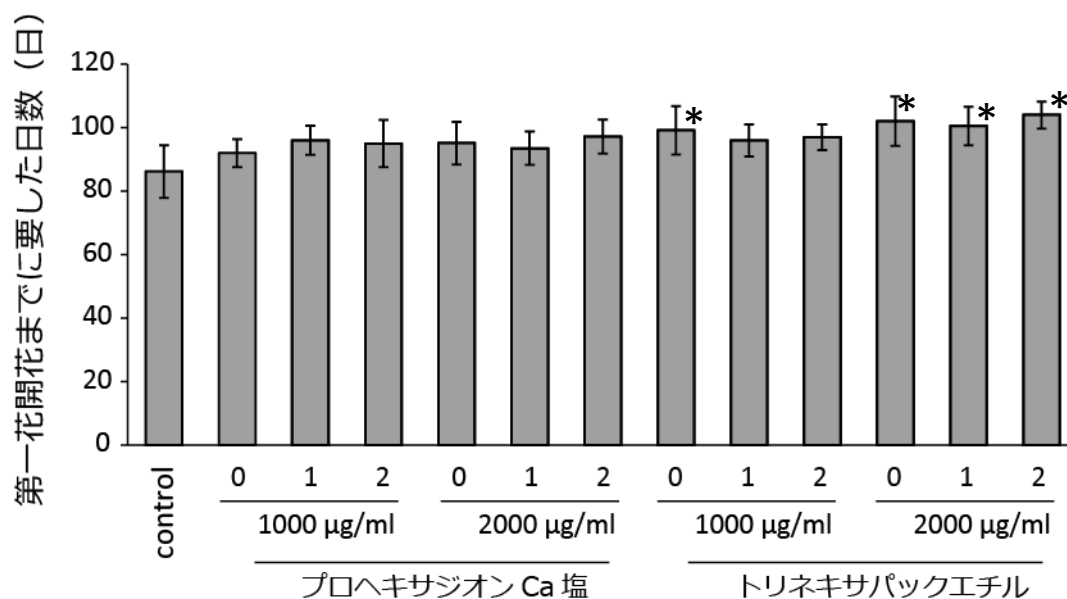


図 2-15. プロヘキサジオン Ca 塩およびトリネキサパックエチルのレタス開花に対する効果

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で3週間育苗した'リーフレタスグリーン'の苗をポットに移植し, 30/15℃で生育させた. 移植後0, 1, 2 週のレタス個体に 1000 および 2000 µg/ml のプロヘキサジオン Ca 塩溶液および 1000 および 2000 µg/ml のトリネキサパックエチル溶液を 100 ml/m² となるように散布した.

図中の縦棒線は標準偏差を示す (n=6).

*: 5%水準で有意差あり.

考察

レタスへのジベレリン処理は花茎伸長や開花を促進することが報告されている。本実験結果は既報と一致し、ジベレリン処理により両品種は茎長が増加した(図 2-9)。本実験の栽培期間は 12 月から 2 月で、最も気温が低く日長も短い時期にあたり、通常は抽苔を誘導しない条件下であるが、特に‘リーフレタスグリーン’については収穫時の時点で花芽が確認されたことから、GA₃はレタス抽苔の非誘導条件下においても茎伸長を促進することが示された。また、活性型ジベレリンのひとつである GA₄は、レタスにおいて明確な効果を持たなかった。前述のとおり、植物種によってどの活性型ジベレリンが内生的に主動であるかが決まっていると考えられている。コショウノマイ

(*Bryophyllum crenatum* Baker) やポインセチア (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klorzsch) では外生の活性型ジベレリンのうち同等の効果をもつものがあり (Evans et al., 1992; Michniewicz et al., 1962), シロイヌナズナや *Polianthes thberosa* では効果に順位があるが、ストックのように活性型ジベレリンでも外生では効果を持たない例もある (Chang et al., 2001; Hisamatsu et al., 2000)。レタスにおいて、特に GA₃ と GA₄ で比較した場合、GA₄ は外生ジベレリンとしての効果をほぼ持たないと推測された。

高温により茎伸長が促進される条件下において‘リーフレタスグリーン’では、ジベレリン生合成阻害剤の連続処理により茎伸長が濃度依存的に抑制された(図 2-11, 2-12)。また、鉛直方向直径には薬剤処理による有意差はなかったが、処理濃度が大きいほど直径が小さくなる傾向がみられた。またこの時上位葉においては顕著な矮化がみられた(図 2-11, 2-12)。以上の結果から、‘リーフレタスグリーン’においてプロヘキサジオン Ca 塩処理は茎伸長を抑制するが、茎伸長を十分に抑制する濃度では矮化の影響も大きいことが示された。

‘パトリオット’においては、最も低濃度の薬剤処理においてコントロール

よりも茎伸長が促進されるという結果となった (図 2-11, 2-12). プロヘキサジオン Ca 塩は GA3ox に強く作用し作用阻害を引き起こすが特異性が十分ではなく, GA20ox の一部, および GA2ox にも作用するとされる(Griggs et al., 1991; Hisamatsu, 1999; Nakayama et al., 1990a, 1990b). 本実験で観察された現象は, 低濃度のプロヘキサジオン Ca 塩が GA2ox の作用を阻害し活性型ジベレリンの蓄積が起こった結果, コントロールよりも茎が伸長したと推測される. 鉛直方向直径による矮化程度については, 100 μ g/ml, および 1000 μ g/ml 処理区において移植後 3 週以降に茎頂部分が壊死してしまったため, 移植後 3 週および 4 週の数值は植物体としてのデータではなく 2 週までに分化していた葉の矮化程度と考えるべきであるが, 1000 μ g/ml 処理区では, コントロールおよび 10 μ g/ml 処理区に比べて鉛直方向直径が試験期間を通して有意に小さく, 矮化することが示された (図 2-11, 2-12). 以上, ‘パトリオット’ においてもプロヘキサジオン Ca 塩は茎伸長を阻害すると考えられる. 低濃度に対する反応性は ‘リーフレタスグリーン’ と異なっていたが, 高濃度処理の場合は ‘リーフレタスグリーン’ と同様に, 植物体の矮性への影響が大きいことが示唆された. これまでにジベレリン処理による形態変化について複数レタス品種が用いられて試験されており(Wittwer.S.H. et al., 1957; Wittwer and Bukovac, 1957; 中山, 1962 等), 本実験結果とあわせて考察すると, ジベレリンの茎伸長への関与は, レタス品種間において共通していると考えられることができる. 一方, 分子レベルや微量の内生量に加え, 外生の関連物質に対する反応性は品種間で異なっていた. 本試験結果は, 各品種におけるジベレリン代謝の制御機構の違いが, 抽苔誘導条件下における茎伸長応答性の品種間差意を引き起こしている可能性を示唆している.

ジベレリン生合成阻害剤のスポット処理試験では, この処理方法が茎伸長抑制に効果的であるかどうか, また, 有効成分が異なる剤を用いてその効果の程

度を調査することとした。‘リーフレタスグリーン’を用いた本実験では、最終的な茎長はいずれの処理日、濃度、薬剤においてもコントロールに対して有意に茎伸長を抑制した（図 2-13A）。一方、第一花開花までに要した日数は、有意差があったのは移植後 2 週のトリネキサパックエチル 2000 $\mu\text{g/ml}$ のみであった（図 2-15）。また葉数には有意差がみられなかった（図 2-13B）。これらのことから、高濃度の GA3ox 阻害剤のスポット処理は茎長のみを変化させることができる可能性が考えられた。茎長は、処理のタイミングが早い区ほどコントロールに近い数値となったことから、薬剤の効果は長期に持続するものではないと考えられた。プロヘキサジオン Ca 塩とトリネキサパックエチルの分子量は 250.3 および 252.26 であることから、溶液濃度とモル濃度ほぼ等しい。同じ溶液濃度で比較した場合、プロヘキサジオン Ca 塩で茎伸長抑制効果が大きい傾向がみられた（図 2-13A）。‘リーフレタスグリーン’に 10 $\mu\text{g/ml}$ から 1000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でプロヘキサジオン Ca 塩およびトリネキサパックエチルを処理したところ、プロヘキサジオン Ca 塩では 10 $\mu\text{g/ml}$ から茎伸長抑制が始まっていたのに対し、トリネキサパックエチルでは 30 $\mu\text{g/ml}$ で茎伸長が促進され、100 $\mu\text{g/ml}$ で茎伸長抑制が始まった（データ略）。これらのことから、作用機作が同じ剤であっても効果の最適量は異なると考えられる。本実験により、高濃度のジベレリン生合成阻害剤の投与でもレタスの茎伸長が抑制できる可能性が示されたが、本実験で用いた剤は前述のとおり、低濃度側では GA2ox の作用を阻害し、活性型ジベレリンを蓄積させることで伸長反応を促進するという効果があるため、形態変化を期待する場合は詳細な条件検討により注意して使用する必要があると考えられる。

2-4 第二章における総合考察

活性型ジベレリン含量が増加すると考えられる代謝経路の制御としては、

1. 生合成の促進、と 2. 不活化の抑制、のふたつが考えられる。本実験では

‘リーフレタスグリーン’の高温区において生合成酵素遺伝子である *LsGA3ox1* の発現量が増加（1. 生合成の促進）し、不活化酵素遺伝子である *LsGA2ox1* が減少（2. 不活化の抑制）した。レタスにおいては、 GA_1 を合成する早期 13 水酸化経路が主要なジベレリン代謝経路であると考えられている。本実験においても、 GA_4 は検出されなかったため、高温による *LsGA3ox1* の発現増加は GA_1 の増加に寄与したと考えることができる。組換えタンパク質 *LsGA2ox1* は、 GA_1 と GA_{20} の両方を基質とし、それぞれ GA_8 と GA_{29} へと不活化することが示されている(Nakaminami et al., 2003)。 *LsGA2ox1* の発現量減少は、 GA_1 から GA_8 への変換の減少を引き起こす場合と、 GA_{20} から GA_{29} への変換の減少を引き起こす場合のふたつが考えられ、どちらかもしくは両方の場合の結果として GA_1 が増加すると予想される。本実験では、 GA_{20} の内生量は高温区で若干多い傾向がみられたが、 GA_8 の増減の動態が GA_1 と類似していたこと（図 2-8）から、*LsGA2ox1* の作用に対し積極的な制御はなされていないものと推察し、*LsGA3ox1* の発現量増加（1. 生合成の促進）（図 2-5）が、‘リーフレタスグリーン’の茎伸長時のジベレリン内生量増加に主として作用していると考えられる。また、‘パトリオット’においても、移植後 1 週の GA_1 量に有意差がないものの、*LsGA3ox1* の発現量および GA_1 前後のジベレリン内生量が高温区で多いこと（図 2-5, 2-8）から、‘リーフレタスグリーン’と同様に、高温による *LsGA3ox1* の発現量増加により内生ジベレリン量が増加していると思われた。しかしながら、*LsGA3ox1* の増加量が‘リーフレタスグリーン’に比べて小さく、 GA_1 内生量が少ないこと、高温処理後期に *LsGA2ox1* が特異的に増

加することなどが明らかとなり，遺伝子レベルの応答性，ジベレリン内生量の差異は抽苔特性との関連性を示唆していると考察された。

遺伝子発現解析実験では，キー遺伝子の発現が茎の上部で増加することを示し，内生量分析により活性型の GA_1 は茎の上部で増加し，前駆体である GA_{20} は茎下部で多く存在することを示した（図 2-5, 2-8）。これらの結果から，高温時のレタス茎伸長では，ジベレリンの生合成酵素遺伝子の発現量増加と活性型ジベレリン内生量の増加は伸長の著しい茎上部という同じ場所で起こっていると考察された。

第三章 レタス花成経路統合遺伝子 *LsFT* の単離と高温抽苔における発現解析

第二章においてジベレリン代謝酵素遺伝子発現および内生量動態を解析し、高温によりレタスの抽苔が誘導され茎が伸長する際の分子メカニズムについて考察した。その結果、抽苔抑制の方法としては、茎伸長のキー因子である *LsGA3ox1* の発現量を減少させる、もしくは *LsGA3ox1* の活性を減少させる、といった方法が考えられた。しかしながら抽苔現象の定義にあるように、抽苔を誘起する要因である花成についても理解を深めることが、根本的な抽苔制御には必須であると考えられる。

そこで第三章では、レタスの花成経路統合遺伝子に着目し、遺伝子の単離、同定と発現解析を行った。これまでにレタス花成関連遺伝子に関する報告がないことから、他の植物種において最も研究が進んでいる *FT* 遺伝子に着目し、他の植物の塩基配列を基に設計した縮重プライマーを用いた Degenerate PCR 法および Rapid amplified cDNA ends (RACE) 法によってレタスの *FT* 相同遺伝子の単離を試み、同定、解析を行った。

3-1 レタス花成経路統合遺伝子 *LsFT* の単離

材料および方法

1. 植物材料

前述の方法 (1-1) で育苗したレタス ‘リーフレタスグリーン’ を、混合培土を充填した 7 cm の不織布ポットに移植し、35/25°C (昼/夜温) に設定したグローブスチャンバーに移して栽培した。日長は 14 時間とした。

2. 遺伝子の単離、同定

収穫した地上部を液体窒素で凍結し粉碎した。約 100 mg を秤量して以下に用いた。遺伝子の単離，同定に用いたプライマーセットは表 3-1 に示した。

(1) 全 RNA の抽出

前述 (2-1) と同様の方法により全 RNA を抽出し，クオリティをチェックした。

(2) cDNA 合成と PCR クローニング

(1) により得られた 1 μ g の DNase-free RNA を用いて，Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) により一本鎖 cDNA を合成した。シロイヌナズナ (NM_105222.2)，リンゴ (AB161112)，ウンシュウミカン (AB027456.1)，ポプラ (AB109804.1) およびトマト (AY186735.1) の *FT* 相同遺伝子配列から Degenerate プライマーを作成し，Nested PCR を行った。PCR は，98°C で 30 秒の加熱後，98°C で 10 秒，55°C で 30 秒，72°C で 1 分 30 秒のサイクルを 35 回行った後，72°C で 10 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物はアガロースゲルを用いた電気泳動により分離し，Wizard SV Purification Kit (Promega, USA) により精製した。精製した DNA 断片を Acceptor Vector Kit (Novagen, Germany) を用いて TA クローニングし，Qiaprep Mini Kit (Qiagen) によりプラスミドを精製した。DNA の塩基配列は Big Dye terminator cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)，3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により決定し，MEGA4 ソフトウェア (Tamura et al., 2007) により解析した。得えられた DNA 断片を用いて Marathon cDNA Amplification Kit および Advantage cDNA PCR Kit (どちらもタカラバイオ (株)) により RACE 反応を行った。DNA 断片の塩基配列情報から 5' エンドプライマー，3' エンドプライマーを設計し，PCR により全長 cDNA を得た。得られた PCR 産物は前述の方法

表 3-1. *LsFT* の単離, qRT-PCR に使用したプライマーセット

遺伝子		配列
LsFT fragment	Forward	5'-TGGTTGGTBACYGATATHCCWGC-3'
	Reverse	5'-GTRTTGAAVTTCTGRCGCCAYNCC-3'
LsFT fragment (nested)	Reverse	5'-DGSATAMACHGTYTGCCKNCC-3'
RACE	Sense	5'-CCACGGGAGCACGTTTTGGCCAAGA-3'
	antisense	5'-GGAATAACACAAAAACCATGCGATGA-3'
LsFT full-length cDNA	Forward	5'-CCACGGGAGCACGTTTTGGCCAAGA-3'
	Reverse	5'-GGAATAACACAAAAACCATGCGATGA-3'
LsFT genomic DNA	sense	5'-AATATAGTGATAGACAATGGATTGCTCC-3'
	antisense	5'-CTTCGGTTTAACCCCACTATTAAGG-3'
LsFT transformation	forward	5'-ATTCTAGAATGATGCCTAGGGAGAGGA-3'
	reverse	5'-GAGCTCTTATCTTCTCGCCCAACAAAC-3'
Tubulin qRT-PCR	forward	5'-GGCAAATGAGCACGAAAGAG-3'
	reverse	5'-GATCCATTCCACAAAGTAAGACGAG-3'
LsFT qRT-PCR	forward	5'-CGATATACCAGCGACCACGGGAGCA-3'
	reverse	5'-TGACGCCATCCAGGGGCATACACA-3'

下線はそれぞれ制限酵素サイト *Xba*I, *Sac*I を示す.

で精製し、pCR-Blunt-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングし、前述と同様の方法でレタスの *FT* 相同性遺伝子の全長 cDNA の塩基配列を決定した。

(3) ゲノム DNA の単離

ゲノム DNA 抽出には ISOPLANT (ニッポンジーン, 日本) を用いた。全長 cDNA 単離に用いた遺伝子特異的プライマーを用いてゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、前述の方法でゲノム塩基配列を決定した。

(4) 塩基配列解析

FT 遺伝子の配列は Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) から入手し、ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) によりアライメントを行った。アミノ酸ベースの系統樹作成は Neighbor-joining 法を用いて MEGA4 ソフトウェア上で行った。本実験で得られた cDNA 配列情報およびゲノム配列情報は Accession No.AB602322 おおび AB602323 にて DNA Data Bank of Japan に登録した。

(5) サザンハイブリダイゼーション

ゲノム DNA 抽出には CTAB 法(Rogers and Bendich, 1989)を用いた。約 10 μ g のゲノム DNA を *EcoRV* および *BglIII* により消化し、アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。キャピラリーブロッキング (Sambrook and Russell, 2001) により Hybond N+メンブレン (GE Healthcare, UK) に転写し、AlkPhos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare) を用いてアルカリフォスファターゼ標識した *LsFT* のコード配列をゲノム DNA にハイブリダイズさせた。

(6) *LsFT* 過剰発現コンストラクトの作成と形質転換シロイヌナズナの作出

LsFT のタンパク質コード領域に *Xba*I および *Sac*I の制限酵素切断配列を付加した DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片は pSTBlue ベクターに TA クローニングし塩基配列を確認した。このベクターを *Xba*I および *Sac*I で処理し *LsFT* タンパク質コード領域を切り出し、あらかじめ β -glucuronidase 遺伝子を除去した pBI121 へ導入した。コントロールとして、シロイヌナズナの *FT* 遺伝子を用い、同様に pBI121 へ導入した (図 3-1)。作成した *FT* 過剰発現コンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、floral dipping method(Clough and Bent, 1998)によりシロイヌナズナ (エコタイプ: Colombia) を形質転換した。22°C, 長日条件 (16 時間日長) 条件下でカナマイシン耐性植物体を選抜し、世代を促進した。形態観察には T₂ 種子を用い、22°C, 長日条件および 22°C, 短日条件 (8 時間日長) で栽培した。花成のタイミングは、開花までの葉数および日数により定義した。統計には分散分析 (SAS, SAS Institute) を用い、事後検定として Tukey 法を行った。

結果

1. レタスにおける *FT* 様遺伝子の同定

他の植物の *FT* 相同遺伝子配列を用いて設計した縮重プライマーにより PCR クローニングを行ったところ、一種類の cDNA 部分配列が得られ、RACE 法により全長を決定し、これを *LsFT* と命名した。*LsFT* によりコードされる推定アミノ酸配列は 175 アミノ酸で、他の植物の *FT* 相同性遺伝子、*Chrysanthemum morifolium CmFTL3*, トマト *SP3D*, リンゴ *MdFT1*, ウンシュウミカン *CiFT*, およびシロイヌナズナ *AtFT* とそれぞれ 97, 86, 82, 80, 76% の相同性を示した (図 3-2A および B)。 *LsFT* の全長 cDNA をプローブとしたサザンブロットティングの結果、*BGI*III 消化で 1 本のバンド、*EcoRV* 消化で 2 本のバンドが検出さ

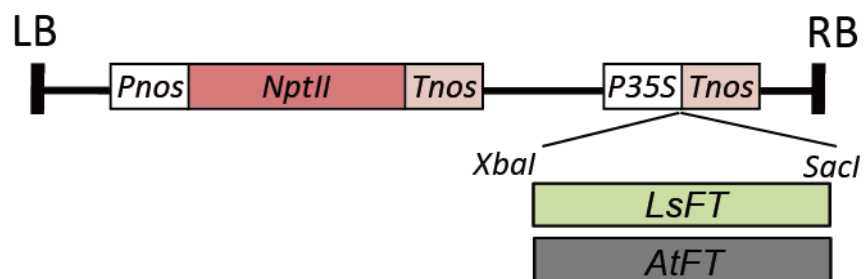


図 3-1. 形質転換に用いたベクターコンストラクトの概要図

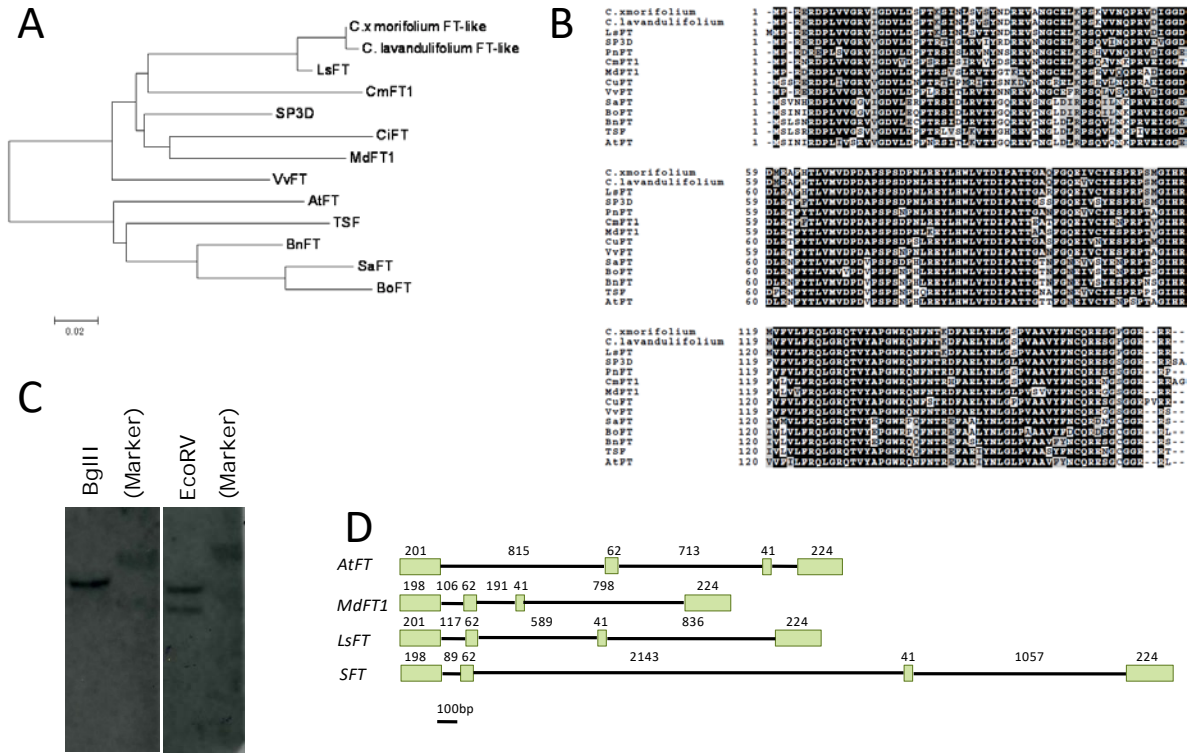


図 3-2. レタスにおける FT 様遺伝子

(A) 単離した *LsFT* と他の植物の *FT* 遺伝子のアミノ酸配列に基づく Neighbor-Joining 法による系統樹。解析に用いた遺伝子; *Chrysanthemum x morifolium* (GQ925916.1), *Chrysanthemum lavandulifolium* (GU120195.2), pumpkin (DQ865291.1), black poplar (AB109804.1), *Arabidopsis* (*AtFT* NM_105222.2; *TSF* NM_118156.1), tomato (AY186735.1), grape (XM_002270372.1), apple (AB161112), citrus (AB027456.1), *Brassica napus* (FJ848913.1), *Brassica oleracea* (EU984306.1)

(B) *LsFT* と他の植物の相同性遺伝子の推定アミノ酸配列比較。(C) *LsFT* のサザンブロット解析。ゲノム DNA (10 μ g) を *Bgl*II, *Eco*RV により消化し, 電気泳動により分離後, アルカリフォスファターゼ標識した *LsFT* のコーディング領域をハイブリダイズさせた。(D) *LsFT* と他の植物の *FT* 遺伝子のゲノム構造。ボックスはエクソンを, ラインはイントロンを示す。図中数字は塩基数を示す。

れた (図 3-2C). *LsFT* のゲノム配列は 201, 62, 41, 224 bp のエクソンで構成されており, 他の植物の *FT* 遺伝子に類似したゲノム構造であった (図 3-2D).

2. シロイヌナズナ形質転換体を用いた *LsFT* の機能解析

LsFT の生体内機能を解析するため, CaMV35S プロモーターによる *LsFT* および *AtFT* の過剰発現コンストラクトを作成し, シロイヌナズナに導入した (図 3-3). いずれも 10 個体以上の形質転換体を得, 以降の解析に用いた. 長日条件下における開花までに要する日数は, 野生型で 30 日であったのに対し, *AtFT* 過剰発現体で 20-23 日, *LsFT* 過剰発現体で 26-28 日であった. 短日条件下においては, 野生型が 64 日であったのに対し *AtFT* 過剰発現体で 22-29 日, *LsFT* 過剰発現体で 42-58 日であった (図 3-4).

考察

1. レタスの *FT* 相同性遺伝子の単離状況

本実験において, 塩基配列およびゲノム構造によりレタスの *FT* 相同性遺伝子 *LsFT* を同定した. 近年の全ゲノム解析により, 進化過程でゲノム重複が起こった結果として遺伝子重複がみられることがいくつかの植物種で報告されている (Igasaki et al., 2008; Tränkner et al., 2010). ポプラやリンゴでは, *FT* 相同遺伝子はそれぞれ 2 種類存在していることが報告されている (Hsu et al., 2011; Kotoda et al., 2010). *LsFT* 同定の過程では, cDNA およびゲノム DNA を鋳型として Degenerate PCR, Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL) PCR, RACE 法を行ったが, variant と思われるクローンは検出されなかった. レタスにおけるゲノム重複については明確な結論が得られていないが (Blanc, 2004; Van de Peer et al., 2009), いくつかの単離手法を用いても類似配列が得られなかったこと, サ

A 長日条件



B 短日条件



図 3-3. *LsFT* 過剰発現シロイヌナズナの表現型

シロイヌナズナ野生型 (WT) と *LsFT* 過剰発現体 (*LsFT*OE) および *AtFT* 過剰発現体 (*AtFT*OE) を長日条件下 (A) および短日条件下 (B) で生育させた。播種後 23 日に撮影。

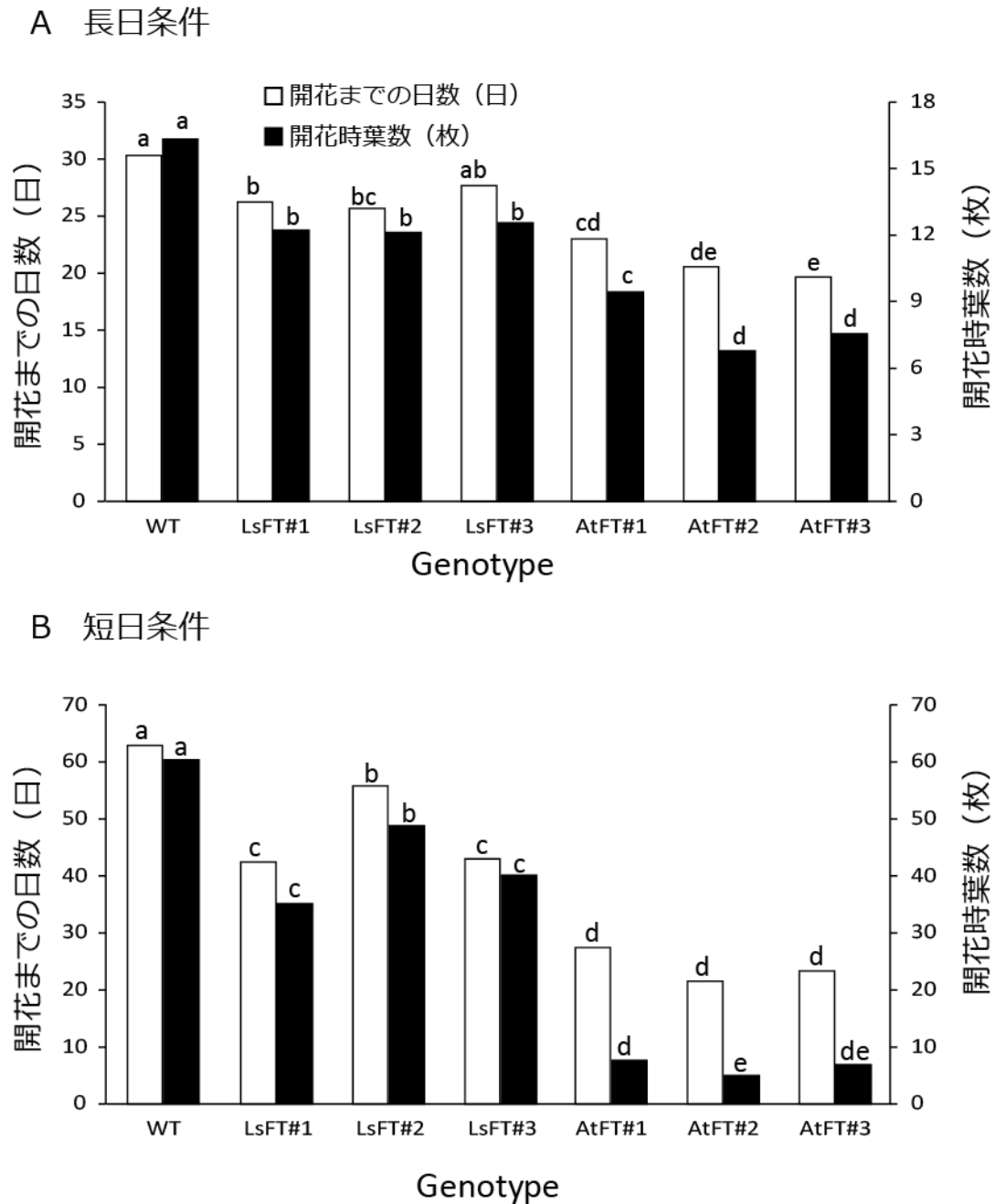


図 3-4. *LsFT* および *AtFT* の過剰発現がシロイヌナズナ花成に及ぼす影響

シロイヌナズナ野生型 (WT) と *LsFT* 過剰発現体 (*LsFT*#1-3) および *AtFT* 過剰発現体 (*AtFT*#1-3) を 22°C 長日条件下 (A) および 22°C 短日条件下 (B) で生育させたときの開花までの日数 (日) と開花時の葉数 (枚) を調査した。

開花までの日数および開花時葉数は分散分析を行い、事後検定として Tukey 法を用いた。それぞれについて、異なるアルファベット間には有意水準 5% で有意差があることを示す (n=9)。

ザンハイブリダイゼーションの結果がシングルバンドであること（図 3-2C）から、*LsFT* がシングルコピーであると推論する。

2. *LsFT* の機能解析

本実験ではシロイヌナズナの *LsFT* 過剰発現形質転換体を作成し、花成誘導における *LsFT* の機能解析を行った。*LsFT* の過剰発現体は、*AtFT* 過剰発現体と同様に花成が早まる表現型を示した（図 3-3）。他の植物の *FT* 相同性遺伝子においても、過剰発現により花成が早まることが多数報告されており (Li et al., 2009; Lifschitz et al., 2006; Oda et al., 2012 他多数), *LsFT* はこれらと同様に花成制御において *FT* 様の作用を持っていると考えられる。しかしながら、*AtFT* の過剰発現シロイヌナズナは、生育の日長条件に関わらず野生型に比べて早期開花性を示したのに対し、*LsFT* 過剰発現シロイヌナズナは、野生型に比べて有意に花成が早まったが、その効果の程度は *AtFT* 過剰発現よりも効果は小さかった（図 3-4）。同様の現象はウメ (Esumi et al., 2009) やラン (Hou and Yang, 2009) で報告されている。本実験結果および既報の結果から、*LsFT* はシロイヌナズナの花成制御において *AtFT* を完全に補完できるものではないと考えられた。

3-2 リーフレタス高温抽苔におけるレタス花成経路統合遺伝子の発現解析

材料および方法

1. 植物材料

前述の方法 (1-1) で育苗したレタス ‘リーフレタスグリーン’ を、混合培土を充填した 7 cm の不織布ポットに移植し、35/25°C（昼/夜温）および 25/15°C（昼/夜温）に設定したグロースチャンバーに移して栽培した。以下 35/25°C 区を高温区、25/15°C 区を低温区とした。日長は 14 時間とした。

2. q RT-PCR

チャンバー内にて生育させたレタスの葉をサンプリングし、液体窒素で凍結後粉砕した。約 100 mg を秤量し、前述の方法 (3-1) により鋳型を作成した。PCR 反応は前述 (2-1) と同様の機器および方法で行った。遺伝子のプラスミド DNA 希釈系列を用いて作成した検量線により発現量を算出し、さらに *Tubulin* (Accession No.AB232704) 遺伝子によりノーマリゼーションした。

結果

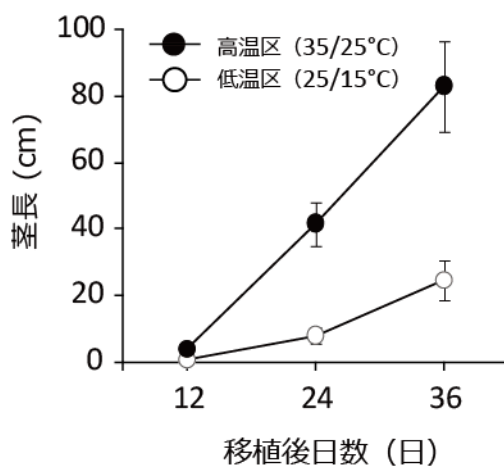
1. 植物の生育状況

LsFT の発現解析に用いたレタスの生育状況を図 3-5 に示す。茎長は、高温区においてポット移植後 24 日には約 40 cm となり、36 日には約 80 cm となった。一方低温区では移植後 24 日で約 10 cm、36 日で約 25 cm であった。高温区の移植後 24 日において花芽分化が認められたことからスコアは 0.2 となり、移植後 36 日には目視により花序が確認された。低温区の移植後 24 日では花芽分化は認められずスコアは 0 であり、移植後 36 日に 5 個体中 1 個体で花芽分化が確認されたことからスコアは 0.2 となった。

2. 葉位による発現量の多寡

発現の分布を確認するための葉位別のサンプリングは、図 3-6A および C に示すとおりである。高温区の移植後 24 日においては、全葉数は 16.2 ± 1.79 枚であり、最大葉は下位から数えて 7 ± 0.71 枚目であった。下位から数えた葉位、4, 7, 11 枚目を採取した。移植後 36 日においては、全葉数は 28.4 ± 2.07 枚であり、最大葉は下位から数えて 8.6 ± 1.34 枚目であった。下位から数えた 8, 13, 20 枚目を採種した。各葉位を用いて *LsFT* の発現解析を行ったところ、

A



B

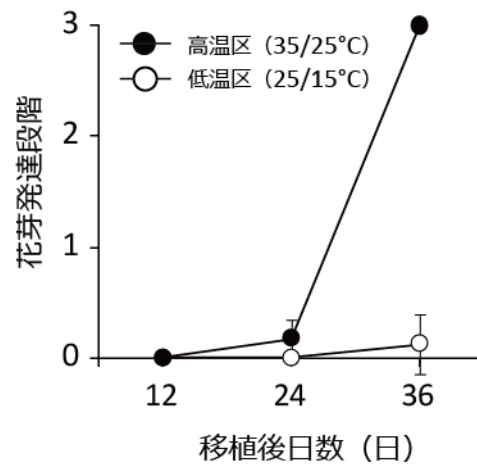


図 3-5. *LsFT* 発現解析に用いたレタスの生育状況

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した 'リーフレタスグリーン' の苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 茎長 (A) および茎頂の花芽発達段階 (B) を調査した.

縦棒線は標準偏差を示す (n=5).

花芽発達段階のスコアは 0; 栄養成長期, 1; 膨大期, 2; 頂花房形成期, 3; 側花房形成期である.

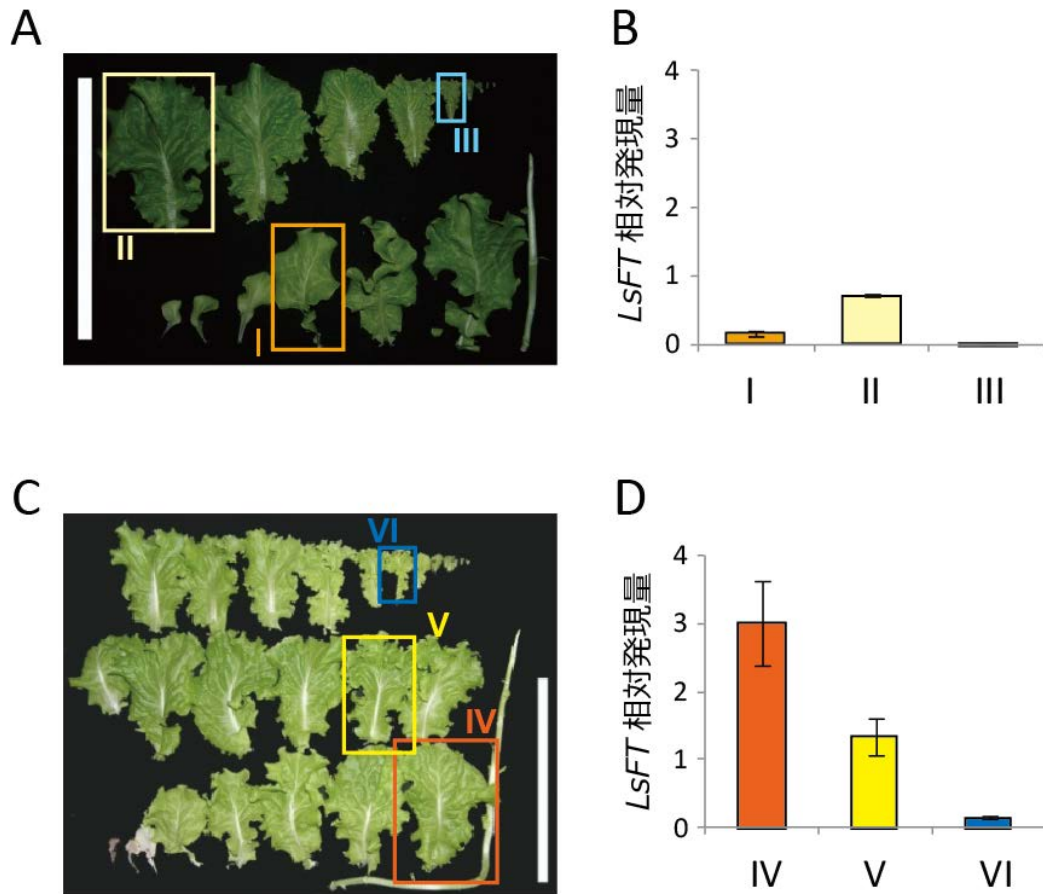


図 3-6. 葉位による *LsFT* 発現の差異

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した'リーフレタスグリーン'の苗をポットに移植し, 35/25°C で生育させ, 移植後 24 日 (A) および移植後 36 日 (C) に収穫した. A のうち, I, II, III (下位から 4, 7, 11 枚目) をサンプリングし, *LsFT* の発現量を解析した (B). C のうち, IV, V, VI (下位から 8, 13, 20 枚目) をサンプリングし, *LsFT* の発現量を解析した (D).
 スケールバー: 30 cm (A, C).
 縦棒線は Biological replicate を示す (n=3). (B, D).

体においては、下位 (IV) で最も発現が多く、中間の葉位 (V)、上位 (VI) と、発現量は減少した (図 3-6D). すなわち、移植後 24 日および 36 日の両サンプリングポイントにおいて、*LsFT* の発現が最も多くみられるのは最大葉であった。このことから、以下の解析には最大葉を用いた。

2. 最大葉における発現量の変化

FT 遺伝子の発現は植物体内において日周変動を示すことがいくつかの植物で報告されていることから、レタス葉における *LsFT* の 6 時間ごとの発現量の変動を解析した (図 3-7). 移植後 12 日においては、高温区、低温区ともに *LsFT* の発現レベルは低かった。花成が開始していると思われる高温区の移植後 24 日においては、*LsFT* の発現レベルはわずかに上昇し、明期開始直後および明期終了直前に増加する変動を示した。この間、低温区では発現レベルは低いままであった。花芽の発達が確認できた高温区の移植後 36 日では、*LsFT* の発現レベルは大きく上昇し、明期開始直後に最も多くなり、その後一度減少し、明期終了前にまた増加するという変動を示した。この間、花芽発達段階のスコアから低温区では花成が開始していると思われ、*LsFT* の発現量および変動は高温区の移植後 24 日と類似していた。

考察

葉における *FT* 遺伝子の発現は、花成における誘導シグナルであると考えられている。すなわち、CO による *FT* 遺伝子の活性化もしくは *FT* タンパク質が葉維管束の伴細胞からシグナル分子として放出され、茎の維管束を通過して茎頂分裂組織へと移行し、花成を誘導していると考えられている (Turck et al., 2008). 図 3-5A および B に示すように、本実験における高温区では茎が急激に伸長し、花芽分化していることが確認できることから、この条件下においては

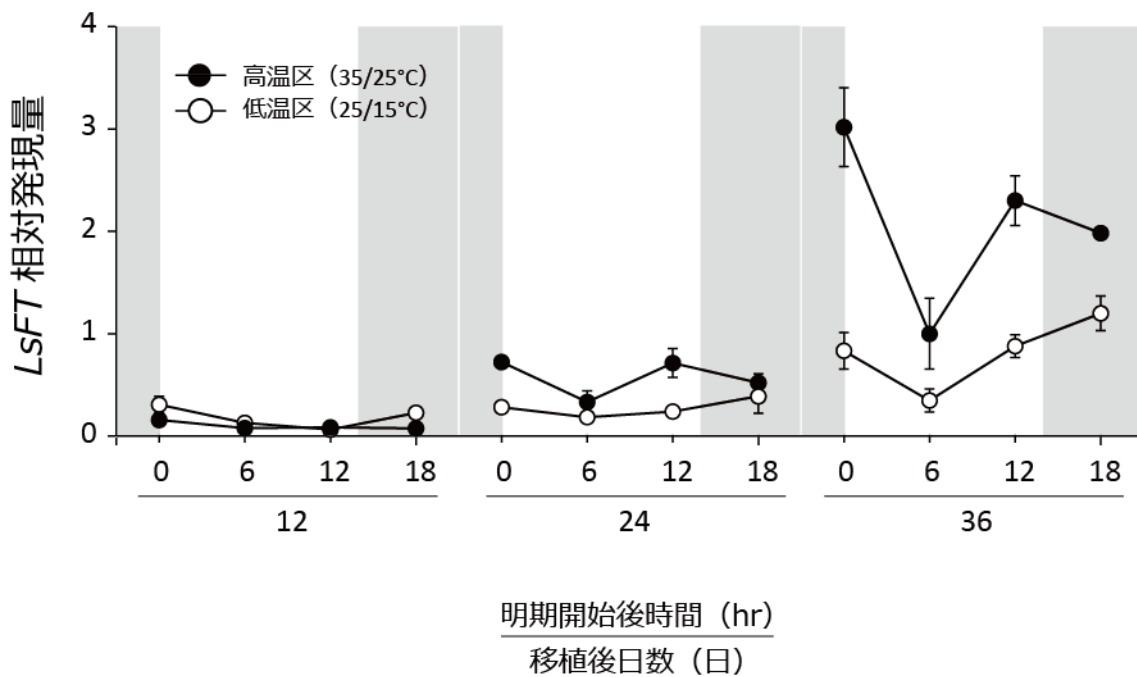


図 3-7. 最大葉における *LsFT* の発現変動

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した 'リーフレタスグリーン' の苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 移植後 12, 24, 36 日に最大葉を収穫し, qRT-PCR により *LsFT* の発現量を解析した.

グラフ背景は日長を模式的に示し (□; 明期 [14 時間], ■; 暗期 [10 時間]), 縦棒線は Biological replicate を示す (n=3).

花成誘導シグナルが存在していると考えられた。葉位別に葉をサンプリングし *LsFT* の発現を解析したところ、*LsFT* は最大葉において多く発現していた (図 3-6)。トマトの *FT* 相同遺伝子である *SFT* は、第一花房の分化期において、葉の *age* に依存して発現量が変化することがわかっており、十分に展開した成熟葉で発現量が多く、上位の葉ほど発現量が低いことが示されている (Shalit et al., 2009)。*SFT* と同様に、*LsFT* の移植後 36 日の発現は葉位に従い段階的な発現量を示しており (図 3-6D)、これらのことから、レタスにおける花成を促進するシグナルは十分に展開した葉位で生成されると推察できる。

花芽分化が確認され花成が進行していると思われる高温区移植後 24 日においては、最大葉において *LsFT* がわずかに増加した (図 3-7)。発現量の多寡は移植後 36 日においてさらに明確になり、花芽発達段階とよく一致した (図 3-7)。この結果は、*LsFT* の発現量がレタスの花成に何らかの関与があることを示唆している。花成と協調して増加した *LsFT* の発現量は、明期の開始後および終了直前にピークがある変動パターンを示した (図 3-7)。この結果から、他の植物の *FT* 遺伝子と同様に、*LsFT* も光周期による発現制御を受けていることが考えられた。*FT* の発現量の変動パターンは、シロイヌナズナの *AtFT* は明期終了直前にピークがあり (Fujiwara et al., 2008)、イネの *Hd3a*、ポプラの *FT2*、アサガオの *PnFT* では明期開始直前にピークがある (Hayama et al., 2007; Hsu, 2006; Tamaki et al., 2007)。さらに、オンシディウムの *OnFT* では明期中間に発現のピークがあり明期開始直前が最も少なく (Hou and Yang, 2009)、トマトの *SFT* およびリンゴの *MdFT1* では明期開始直後および明期終了直前にピークがある (Shalit et al., 2009; Tränkner et al., 2010)。これらの報告から、*FT* の一日のうちの発現パターンはその植物の光周性 (長日, 短日, 中性) や、草本, 木本などの性質の違いにより異なることが推察される。シロイヌナズナ, ノルウェースギでは光周性と独立した、温度による経路によっても *FT* 発現量が調節されることが示

されている(Gyllenstrand et al., 2007; Schwartz et al., 2009). レタスは量的長日植物に位置づけられているが, 温度による花成誘導効果も大きい(Rappaport and Wittwer, 1956; Thompson.H.C and Knott.J.K., 1933). 長日植物であるシロイヌナズナとは変動のパターンが一致しなかったのは, このようなレタスの性質によるものと思われた.

本実験では, レタスの花成誘導に関与していると思われる, レタス *FT* 相同性遺伝子, *LsFT* を単離, 同定した. これはレタスで初めての, 花成における分子生物学的研究報告となった(Fukuda et al., 2011), 当遺伝子の詳細な解析は, レタス花成メカニズムのさらなる解明に貢献できると考える.

第四章 レタス花成関連遺伝子の単離とレタス花成における発現解析

第三章において、様々な植物で花成制御物質であると考えられている花成経路統合遺伝子 *FT* のレタス相同性遺伝子 *LsFT* を単離し、形質転換体解析および発現解析により、この遺伝子がレタス花成に関与していることを明らかにした。温度条件はレタスの花成誘導に最も重要な環境要因であるが、レタスは高温条件下に比べてより長い期間を必要とするものの、低温条件下でも花を咲かせることができ、また短日条件下でも最終的には花成が起こる(Hiraoka, 1967a, 1967b)。こうしたことから、レタスにおいても環境要因に関わらず植物が自律的に花成へと移行するための経路が作用していると推察される。本章では *LsFT* に加え、花成に関連する遺伝子の相同性遺伝子をレタスより単離し、レタス花成におけるこれら遺伝子群の発現動態を明らかにすることを目的とした。

4-1 レタス花成関連遺伝子の単離

材料および方法

1. 植物材料

3-1 にて記述した同様の方法により植物体を準備した。

2. 花成関連遺伝子の単離

収穫したレタス葉および茎頂を液体窒素で凍結し粉砕した。約 100 mg を秤量して以下に用いた。

(1) 全 RNA の抽出

全 RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、RNase-free DNase (QIAGEN) で処理した。Qubit RNA BR Assay Kit および Qubit フルオロ

メーター (Thermo scientific) を用いて RNA 濃度とクオリティを測定した.

(2) cDNA 合成と PCR クローニング

(1) により得られた 0.5 μ g の DNase-free RNA を用いて, PrimScript RT reagent Kit (タカラバイオ (株)) により一本鎖 cDNA を合成した. 表 4-1 に示す他の植物種で報告されている相同遺伝子配列を用いて Degenerate プライマーを作成し, Nested PCR を行った. PCR は, 98°C で 30 秒の加熱後, 98°C で 10 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 1 分 30 秒のサイクルを 35 回行った後, 72°C で 10 分間の伸長反応を行った. 得られた PCR 産物はアガロースゲルを用いた電気泳動により分離し, Wizard SV Purification Lit (Promega) により精製した. 精製した DNA 断片を pGEM-T easy vector (Promega) もしくは pCR-Blunt-TOPO vector (ThermoFisher Scientific) を用いてクローニングし, Qiaprep Mini Kit (Qiagen) によりプラスミドを精製した. DNA の塩基配列は Big Dye terminator cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), 3130 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により決定し, MEGA6 ソフトウェア (Tamura, 2012) により解析した. 得えられた DNA 断片を用いて Marathon cDNA Amplification Kit および Advantage cDNA PCR Kit (どちらもタカラバイオ (株)) により RACE 反応を行った. DNA 断片の塩基配列情報から 5' エンドプライマー, 3' エンドプライマーを設計し, PCR により全長 cDNA を得た. 得られた PCR 産物は前述の方法で精製し, pGEM-T easy vector もしくは pCR-Blunt-TOPO vector を用いてクローニングし, 前述の方法で塩基配列を決定した. 各遺伝子塩基配列の増幅に使用したプライマー, およびプライマーデザインに用いた他の植物の相同性遺伝子については表 4-1 に示した.

結果

他の植物の相同遺伝子配列を用いて設計した縮重プライマーにより PCR クロ

表 4-1. 遺伝子群の単離, qRT-PCR に使用したプライマーセット

遺伝子		配列
LsAP1L fragment	Forward	5'-AGGAGGATAGAGAACAAGATTAACAG -3'
	Reverse	5'-GTGTTCTGCTCYGTATGGCCTTTCC-3'
LsAP1L fragment (nested)	Forward	5'-GATTAACAGRCARGTWACTTTTCTCRAAG-3'
LsAP1L qRT-PCR	Forward	5'-CGAAGAGGAGAGGAGGGTTG -3'
	Reverse	5'-AGAGCTTTCCTTTGTTGGAGAAG -3'
LsLFYL fragment	Forward	5'-ATGTGTGAGAAAATAAAAATGGACCC -3'
	Reverse	5'-AGCACTGCTGCGTTCAGCATGAC -3'
LsLFYL fragment (nested)	Forward	5'-GAAAATAAAAATGGACCCTGATGCAC -3'
LsLFYL qRT-PCR	Forward	5'-GCGAAAGAGAGGGTGAAAA -3'
	Reverse	5'-CGAAGCAACCTCATCAAGACA -3'
LsFVEL fragment	Forward	5'-GTBCCRTTCTSTAHGACTGGC -3'
	Reverse	5'-CCCARATRTTCAARMVACCATC -3'
LsFVEL fragment (nested)	Reverse	5'-TRTTCAARMVACCATCYTCWGC -3'
LsFVEL RACE	Sense	5'-CGTTTGTGTTGATCGTCAAACCTTAC -3'
	Antisense	5'-ATCAGATCAGGACGCGACTCTGTG -3'
LsFVEL full-length cDNA	Forward	5'-AGAAAAACATAGGGCAGAGAGAGG -3'
	Reverse	5'-TAAATCATAATTGATGTATGATAATGAATC -3'
LsFVEL qRT-PCR	Forward	5'-GATCATATATCAACATTGGTTGG -3'
	Reverse	5'-AGATCCCACGTGGGCCAAG -3'
LsLDL fragment	Forward	5'-AGRGAYTTRWTRAAYCCDAAGGCTG -3'
	Reverse	5'-WAWWRNGCACGCATYTTTGCTTTYTG -3'
LsLDL fragment (nested)	Reverse	5'-CGCATYTTTGCTTTYTGDATAATCATC -3'
LsLDL qRT-PCR	Forward	5'-AGGAGTGGAGTGTGTGTATGGA -3'
	Reverse	5'-CTTTGGGATTTGCTGGGATTC -3'
LsFLDL fragment	Forward	5'-AYCARGAYGAYCCRTATGAYATGGG -3'
	Reverse	5'-YADYCTCWBTBCTATCRCCCHCTC -3'
LsFLDL fragment (nested)	Reverse	5'-TGHTGRTRRAARTGWGAYTSDAGYTG -3'
LsFLDL qRT-PCR	Forward	5'-AACCTCAAATGCCCGAAGAA -3'
LsFT qRT-PCR	Forward	5'-CGATATACCAGCGACCACGGGAGCA-3'
	Reverse	5'-TGACGCCATCCAGGGGCATACACA-3'
Tubulin qRT-PCR	Forward	5'-GGCAAATGAGCACGAAAGAG-3'
	Reverse	5'-GATCCATTCCACAAAGTAAGACGAG-3'

相同配列を単離するために利用した他の植物の塩基配列は以下のとおり。

AP1: *A. thaliana* (NM_105581), *Brassica rapa* L. (XM_009129455), *V. vinifera* (NM_001281281), *Chrysanthemum seticuspe* f. boreale (AB679273), *P. trichocarpa* (XM_002311317).

LFY: *A. thaliana* (NM_125579), *B. oleracea* (Z18362), *M. truncatula* (XM_003602697), *Solanum lycopersicum* L. (AF_197936).

FVE; *A. thaliana* (AF498102), *Dimocarpus longan* L. (FJ862913), *Glycine max* (L) Merr. (NM_001289270), *Ipomoea nil* L. (DQ250682), *Pisum sativum* L. (AY830931).

LD: *A. thaliana* (NM_001203731), *G. max* (XM_003553599), *M. truncatula* (XM_003625840), *P. trichocarpa* (XM_006386702), *V. vinifera* (XM_010653752).

FLD: *A. thaliana* (AY849997), *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. (XM_014896047), *G. max* (XM_003520213), *Hordeum vulgare* L. (AK368737), *Oryza sativa* L. (AK073751), *P. trichocarpa* (XM_002311957), *V. vinifera* (XM_010660054), *Zea mays* L. (XM_003520213).

ーニングを行い cDNA 部分配列を取得したのち RACE 法を用いて、花成関連遺伝子の塩基配列を決定した。 *APETALA1* (*API*) の相同性配列および *LEAFY* (*LFY*) の相同性配列と推定される、452 bp および 1218 bp の断片を単離し、それぞれ *LsAPIL* (Accession No.LC164344), *LsLFYL* (Accession No.LC164345) とした。 のちに 736 bp および 1261 bp のコード領域を得た。 *LsAPIL* をもとに得られたコード領域から推定されるアミノ酸配列は、ヨーロッパブドウ *API*, ブラックコットンウッド *API-like protein gene*, シロイヌナズナ *API* とそれぞれ 73.0, 70.4, 69.2%の相同性を示した (図 4-1)。 *LsLFYL* をもとに得られたコード領域から推定されるアミノ酸配列はイエギク *LFY*, トマト *LFY*, ウマゴヤシ *LFY* とそれぞれ 77.7%, 67.9%, 67.4%の相同性を示した (図 4-2)。

FVE の全長 cDNA と推定される相同性配列を単離し, *LsFVE* (Accession No.LC164348) と命名した。 *LsFVE* によりコードされる推定アミノ酸配列は 486 アミノ酸で、他の植物の *FVE* 相同性遺伝子、シロイヌナズナ *FVE*, アサガオ *FVE*, ダイズ *FVE* とそれぞれ 74.3, 73.8, 73.4%の相同性を示した (図 4-3)。

LUMINIDEPENDENS (*LD*) の相同性配列として 1268 bp の断片を単離し *LsLDL* (Accession No.LC164346) と命名した。 RACE 法により得られたコード領域から推定されるアミノ酸配列は 912 アミノ酸で、他の植物との相同性はダイズ *LD* と 57.2%, ヨーロッパブドウ *LD* と 57.0%, ブラックコットンウッド *LD* と 56.3%であった (図 4-4)。

FLOWERING LOCUS D (*FLD*) の相同性配列と推定される 635 bp の断片を単離し, *LsFLDL* (Accession No.LC164347) と命名した。 *LsFLDL* はヨーロッパブドウ *FLD*, ブラックコットンウッド *FLD*, およびシロイヌナズナ *FLD* とそれぞれ 58, 58, 55%の相同性を示した (図 4-5)。

Genbank から得られる既報の他の植物の相同性塩基配列情報, マルチプルア

A

CsAP1	1	MGRGRVTLKRIENKINRQVTFSKRRFGLLKKAHEISVLCDAVGLVFSKRGKLCFPA
LsAP1L	1	MGRGAVQLKRIENKINRQVTFSKRRFGLLKKAHEISVLCDAEVALVFSKRGKLFEPST
AtAP1	1	MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRFAGLLKKAHEISVLCDAEVALVFSHKGKLFYSTD
BrAP1	1	MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRFAGLLKKAHEISVLCDAEVALVFSHKGKLFYSTD
VvAP1	1	MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRFGLLKKAHEISVLCDAEVALVFSKRGKLFYSTD
PtAP1	1	MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRFGLLKKAHEISVLCDAEVALVFSHKGKLFYSTN
CsAP1	61	ASMEKILERYERYSYAERQLTATDNESSHCRWVLEHAKLRCRFELLCQTQRHLKGEDLDSI
LsAP1L	61	SCMEKILERYERYSYTERQLVARDAA-PRSWWLEYNKLSRAELLQRNHRHYMGEDTFESI
AtAP1	61	SCMEKILERYERYSYAERQLIAPESDVNTNWSMEYNLAKIQLLERNQRHYLGEDLQAM
BrAP1	61	SCMEKILERYERYSYAERQLIAPESDVNTNWSMEYNLAKIQLLERNQRHYLGEDLQAM
VvAP1	61	SCMEKILERYERYSYAERQLTATDPEISQGNWSLEYSLKAKIQLLQRSHRHLGEDLDSI
PtAP1	61	ACMEKILERHERYSYAERQLVATDDISQGNWVLEYNLAKAVELLQRNHRHYLGEDLDSV
CsAP1	121	SLKELQNLHQDITALKHIRLRKNQMFESISVLQKKDELQNNVLSKRVKEVEKIDIA
LsAP1L	120	SLKELQNLQQLDTGLKNIIRTRKNQLHESISELQKKEKAIQEQNITLTKRIKEKEKKT
AtAP1	121	SKKELQNLQQLDTALKHIRTRKNQLMYESISELQKKEKAIQEQNSMLSRQIKEREKILR
BrAP1	121	SKKELQNLQQLDTALKHIRSRKNQLMYESISELQKKEKAIHEQNSMLSKRIKEREKILR
VvAP1	121	SLKELQNLQQLDSALKHIRSRKNQLMYESISELQKKEKAMQEQQNMLAKRIKEKERTV
PtAP1	121	SLKELQNLQQLDTALKLIRERKNHLMYQSISELQKKEKAIKEQNNMLVRQIKEREKAI
CsAP1	181	AQQPLVEQONPKMLHLDEY-----ISAPCQVGDGVVEK-----
LsAP1L	180	VTQNAHQDWHHNYMETDPS-----FLME-PEEPLSHMGGNYNQGGGGGGGGEG
AtAP1	181	AQQ---EQWDQQNQHNMFPPLPPQQHQIQHPYMLSHQESPFPLNMGGLYQEDD-----
BrAP1	181	AQQ---EQWDQQNHGHNVPPPPPPQQHQIQHPYMLSHQESPFPLNMGGLYQEDD-----
VvAP1	180	AQQ---THWEQQNHGINTSS-----FLLPQ-QLPCLNMGGLYQGEFA-----
PtAP1	180	AQP---ALWDQQDHGPNASS-----FLLPQLHLPCLNLS--YQEDD-----
CsAP1	216	--IPC-QAQPSTVLPFWMLQHMNE---
LsAP1L	227	EAAEGRTNELDLSLOPIYSCHMRCFPS
AtAP1	231	-PMARRNDLLELTLEPVVYCNLGCFFAA
BrAP1	231	-SMARRNDLDSLEPVVYCNLGCFFAS
VvAP1	217	--HGARRNELDLTLEPIYPSHLGCFET
PtAP1	216	-PEARRRNYELDLTLEPIYSCHLGCFT

B

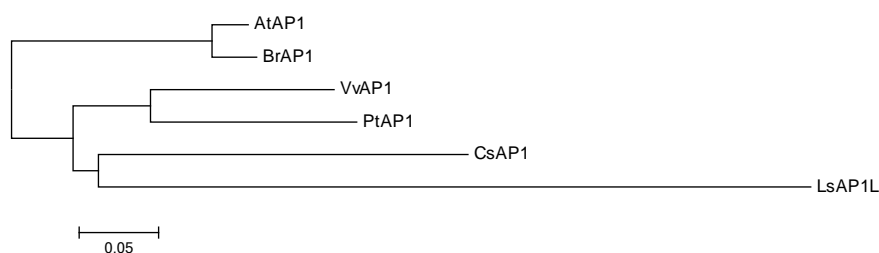


図 4-1. レタスにおける AP1 様遺伝子

A. レタスおよび他の植物の AP1 様遺伝子の推定アミノ酸配列比較. 黒色は共通配列, 灰色は類似配列を示す.

B. 推定アミノ酸配列による系統樹. AtAP1:シロイヌナズナ AP1, BrAP1:セイヨウアブラナ AP1, VvAP1:ヨーロッパブドウ AP1, PtAP1:ブラックコットンウッド AP1, CsAP1:キクタニギク AP1, LsAP1L:レタス AP1.

A

```

AtLFY 1 ----MDPEGFTSGLFRWNETRALVQAPP-----FVPPPLQ-----Q----QEVV
BoLFY 1 ----MDPEGFTSGLFRWNETRVMVQAPF-----FVPPPLQ-----Q----SEAA
CmLFY 1 MCEKIKMDPDALGANLFWNDETRMILAPPASRIWEPIILHC-----PQSMVAASAFMG
LsLFYL 1 ----MDPDALGANLFWNDETRMILAPPASRIWEPIILQCPQQPPFPFSMVATSAAGG
MtLFY 1 ----MDPDAFTASLFWKDPRTVL--PFA-----FELREQLLDYAVI--PSTAFSP
SILFY 1 ----MDPDAFTASLFWKDPRTVAM--PFSRLDEPFAFPQPPFSLPFPFP---PQPTPTP

AtLFY 37 PQDAFGMRLGGLEGLFGFYGRHYTAAKIAELGFTASTLVGMKDEELDMMNSLSHIFR
BoLFY 37 PQDAFGMRLGGLEGLFGFYGRHYTAAKIAELGFTASTLVGMKDEELDMMNSLSHIFR
CmLFY 54 SYLVRESRDLGGLEEVFAYGVRYTAAKIAELGFTASTLVGMKDEELDMMNSLSHIFR
LsLFYL 55 GYLVRDNRDLGGLEEVFAYGVRYTAAKIAELGFTASTLVGMKDEELDMMNSLSHIFR
MtLFY 43 YVPARLPRDLGGLEELFQAYGRVYTAAKIAELGFTVSTLVGMKDELDDMMNSLSIFR
SILFY 51 SYVRSSTRDLGGLEELFQAYGRVYTAAKIAELGFTVSTLVGMKDEELDDMMNSLSIFR

AtLFY 97 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQE----
BoLFY 97 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQEDDWI
CmLFY 114 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQE----
LsLFYL 115 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQE----
MtLFY 103 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQE----
SILFY 111 WLLVGERYGIIKAAVRAERRRLOEEPEEESRRRRLLSFAGDSGTHALDALSQE----

AtLFY 153 GLSEEPVQQDQIDAAAGNNGGGSCHWDAAGQK----MKKQQQRFRKEM----TSV
BoLFY 157 GLSEEPVQDQIDAAAGNNGGGSCHWDAAGQK----MKKQQQRFRKEM----YVS
CmLFY 161 GLSEEPVQDQENFAA-----SGGGGAWEWAAVSCAGGKAKQSKRRRQIRVKGRISS-H
LsLFYL 162 GLSEEPVQDQENFAA-----SGGGGAWEWAAVSCAGGKAKQSKRRRQIRVKGRISS
MtLFY 150 GLSEEPVQDQENFAA-----SGGGGAWEWAAVSCAGGKAKQSKRRRQIRVKGRISS
SILFY 159 GLSEEPVQDQENFAA-----SGGGGAWEWAAVSCAGGKAKQSKRRRQIRVKGRISS

AtLFY 204 ETDDELVNEGEIDIDGMNGNGSSCHLGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC
BoLFY 206 ETDDELVNEGEIDIDGMNIVN--GSGGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC
CmLFY 216 AHHVGV---DENESEDDPDNG---GSAERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC
LsLFYL 218 SQVVGDDNYENBSIEDDPENGEGGGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC
MtLFY 198 D-HGNEEGDEEEDENIS----GGGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC
SILFY 209 D-EETEELGEEDDENMNGGEGGGSERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQC

AtLFY 264 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS
BoLFY 265 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS
CmLFY 270 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS
LsLFYL 278 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS
MtLFY 252 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS
SILFY 268 REFLLQVQTIAKERGEKCPTRVNTQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEAS

AtLFY 324 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARHGWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH
BoLFY 325 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARHGWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH
CmLFY 330 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARQWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH
LsLFYL 338 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARQWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH
MtLFY 312 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARQWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH
SILFY 328 NALRRAFKRGENVGSRQACYKPLVNTAARQWDIDAIFNAHPRLSIWYVPTKLRQLCH

AtLFY 384 LERNNAFAAAATVGGISCTGSSTSGRGGCEGDDIRE-
BoLFY 385 LERNNAFAAAATVGGISCRDRLRLDALGFN-----
CmLFY 390 AERSAFAVAVTGTIVVGGANDA-----GVGHILE-
LsLFYL 398 AERSAFAVAVTGTIVVGGANDA-----GVGHILE-
MtLFY 372 AERNNAFAAAATVGGISCTGSSTSGRGGCEGDDIRE-
SILFY 388 SERSNAFAAAATVGGISCTGSSTSGRGGCEGDDIRE-
3.51

```

B

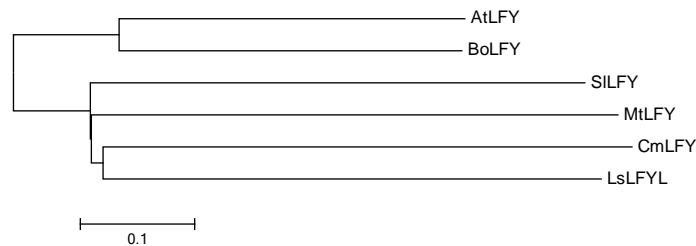


図 4-2. レタスにおける LFY 様遺伝子

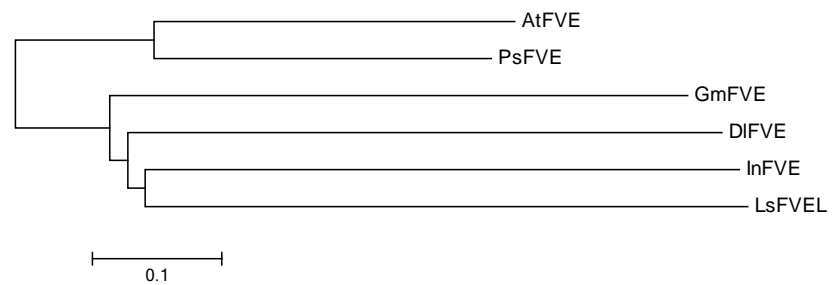
A. レタスおよび他の植物の LFY 様遺伝子の推定アミノ酸配列比較。黒色は共通配列，灰色は類似配列を示す。 B. 推定アミノ酸配列による系統樹。 AtLFY: シロイヌナズナ LFY, BoLFY: カリフラワー LFY, SILFY: トマト LFY, MtLFY: ウマゴヤシ LFY, CmLFY: イエギク LFY, LsLFYL: レタス LFY。

A

LsFVEL	1	-----
InFVE	1	-----
AtFVE	1	MESDEAAAVSPQATITPSSGGTGASGPKRRGRKPKKEDSSQTPSS-----QQQSDV
DlFVE	1	-----MT-----FQAPKRRGRKPKPRE-----
GmFVE	1	-----METTTPQQGVVKKETGRKPKPKDTHAK----ALKEGRKTQ----QQQ
PsFVE	1	-----METTTPSQQGVVKKETGRKPKPKDTHAKQQTPAKTLKEAKKALQQQQQQ
LsFVEL	1	---KERGGKGGQPSVNEKYSQWKLVPVLYDLANHNLLWPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
InFVE	1	--MKERTGKGQPSVDEKYTQNKSLVFLVLYDLANHNLLWPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
AtFVE	50	KIKESGKKTQSPVDEKYSQWKLVPVLYDLANHNLLWPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
DlFVE	18	-----DKKDEPQPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
GmFVE	42	HDQQQQQQQPSVDEKYTQNKSLVFLVLYDLANHNLLWPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
PsFVE	50	QHQQQQQQQPSVDEKYTQNKSLVFLVLYDLANHNLLWPSLSCRWGPQLEQATYKNRQ
LsFVEL	60	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEIVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
InFVE	59	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
AtFVE	110	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
DlFVE	45	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
GmFVE	102	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
PsFVE	110	RLYLSEQTDGSPVNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEARS PFVKKYKTI IHPGEVNR
LsFVEL	120	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAILGATE SRPDLILTGHQDNAE FALAMC
InFVE	119	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAVLGAWASRPDLILTGHQDNAE FALAMC
AtFVE	170	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAVLGAWASRPDLILTGHQDNAE FALAMC
DlFVE	105	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAVLGAWASRPDLILTGHQDNAE FALAMC
GmFVE	162	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAVLGATNSRPDLILTGHQDNAE FALAMC
PsFVE	170	IRELPQNSKIVATHDSDPVL IWDVEAQPNRHAVLGATNSRPDLILTGHQDNAE FALAMC
LsFVEL	180	QSEPFVLSGGKDKSVLWSIQDHIISTIDTSGATPSGSGGKSPKTEKVTSSPKIKAR
InFVE	179	PTEPFVLSGGKDKSVLWSIQDHIISTIDTAQKPSGFIKPAITS----IKAGDNPSTQAR
AtFVE	230	PTEPFVLSGGKDKSVLWSIQDHIITIGTDSKSSGSIHKQIG---EGIDKNSPTVGPGR
DlFVE	165	PTEPFVLSGGKDKSVLWSIQDHIAS-----SGGSIHKQNS---GNDKNDGPTVGPGR
GmFVE	222	PTEPFVLSGGKDKSVLWSIEDHITSPATDSKSGGSIHKQNSKSGEGNDKNDGPTVGPGR
PsFVE	230	PTEPFVLSGGKDKSVLWSIEDHITSPATDSKSGGSIHKQNSKSGEGNDKNDGPTVGPGR
LsFVEL	240	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
InFVE	235	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
AtFVE	286	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
DlFVE	217	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
GmFVE	282	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
PsFVE	289	GIYSGHEDIVEDVAFCPSSAQEFCSVGDDSCILLWDARVGSPPVVKVEKAHNADLHCVDW
LsFVEL	300	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
InFVE	295	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
AtFVE	346	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
DlFVE	277	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
GmFVE	342	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
PsFVE	349	NPHDDNLIITGSADNIVRLFDRRNLTSNGVGSPIHKFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSS
LsFVEL	360	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
InFVE	355	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
AtFVE	406	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
DlFVE	337	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
GmFVE	402	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
PsFVE	409	AEDGLNINWYDKVGGKTEKSGP---ASKFAPGLFQFAGHRDKVDFHWNADPWTIVSVSD
LsFVEL	417	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---
InFVE	410	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---
AtFVE	463	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---
DlFVE	397	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---
GmFVE	462	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---
PsFVE	469	DCESTGGGGTLQIWRMSDLIYRPEEVLAELEKFKSHVWSCASKP---

図 4-3. レタスにおける FVE 様遺伝子

B



- A. レタスおよび他の植物の *FVE* 様遺伝子の推定アミノ酸配列比較。黒色は共通配列，灰色は類似配列である。
- B. 推定アミノ酸配列による系統樹。AtFVE:シロイヌナズナ *FVE*, PsFVE:エンドウ *FVE*, GmFVE:ダイズ *FVE*, DIFVE:リュウガン *FVE*, InFVE:アサガオ *FVE*, LsFVEL:レタス *FVE*.

A

```

LsLDL 1 MAHSNPAHQALVWFSNMTTSEGLLESQKELLSKQICELQNTVSRQCKLIGVNPLSQEM
AtLD 1 --MTAFK---EPEIGSSVESLMEILLDSQVLFHSQIDQLQDVVAQCKLIGVNPLAQEM
GmLD 1 --MFAWNEDESVMEIGSSVESFQKFLVSKQELFHSQIDQDFQEVVIVQCKLIGVNPLSQEM
MtLD 1 --MELTNDGLSPEIGSSVESFQFLASQKELVHSQIDQDFQNTIVTQCKLIGVNPLAQEM
PtLD 1 -----MEDLPEIGSSVESFQKFLDSQKELFHSQIDQLQRIQVIVVQCKLIG-----
VvLD 1 --MVLRENISPHIIGTSTASPRKFWDSQNELENSQVDQLGSIIVLRQCKLIGVNPLSQEM

LsLDL 61 AAGALSIKIGKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS
AtLD 56 AAGALSIKIGKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS
GmLD 59 AAGALSIKIGKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS
MtLD 59 AAGALSINIKKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS
PtLD 47 AAGALSIKIGKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS
VvLD 59 AAGALSIKIGKRPRDLLNPKAVKYMOSVFSKDAISKKELPATSALFGITVQVRDFEFS

LsLDL 121 QRSRVRFIRLSREKATCSSECVQIQDGEHSSNVDTLNHEVPLNSVGFPSVDA-----
AtLD 116 QTRVRRKQVRLSREKAVMSNTHALQDDGVENNNATNHEVPLNSVGFPSVDA-----
GmLD 119 QRSRVRFIRLSREKATCSSECVQIQDGEHSSNVDTLNHEVPLNSVGFPSVDA-----
MtLD 119 QRSRVRFIRLSREKATCSSECVQIQDGEHSSNVDTLNHEVPLNSVGFPSVDA-----
PtLD 107 QTRVRRKQVRLSREKATVNAHKGQDGVETTSIDAMPVIVPLNSVGFPSVDA-----
VvLD 119 QRSRVRFVRLSREKATVNAHKGQDGVETTSIDAMPVIVPLNSVGFPSVDA-----

LsLDL 174 -PSCSTQDEVLPDHDDSDKYFLENIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQSFSVILWFLN
AtLD 176 TVALIPEDIPPDHDDSDKYFVENIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQDASVILWFLSK
GmLD 172 -ASCSTQDEVALPDLDSDKYFVFNIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQSFSVILWFLSK
MtLD 172 -ASCSTQDEVALPDLDSDKYFVFNIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQSFSVILWFLSK
PtLD 166 NFAPIINADIVLHGLDDEEYFLENIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQSFSVILWFLSK
VvLD 173 VPSCSTQDEVALHGLDDEEYFLENIFSLMRKEETFSGQVKLMEWILQIQSFSVILWFLSK

LsLDL 233 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI
AtLD 236 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI
GmLD 231 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI
MtLD 231 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI
PtLD 226 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI
VvLD 233 GGVMIILATWLSQAAHEEQTSVLEVILKVLCHLPLHKAEPHMSAILQSVNLRFYRTSDI

LsLDL 293 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA
AtLD 296 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA
GmLD 291 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA
MtLD 291 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA
PtLD 286 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA
VvLD 293 SNRARSLLSWSKMFARSAQAKKPNANISAWDAQNEILLKQSIGEIMENESHSRIENEA

LsLDL 353 PLYSTLEN-SENS---RSCSKLISSEDDSNMGLHGVSSSHGRERRKQVLEQPGQR
AtLD 350 DILSLSNGKSENWRRIESSQKELILTASDDSEKHLGSENFYNERRKQVLEQPGQR
GmLD 351 DILSLSNGKSENWRRIESSQKELILTASDDSEKHLGSENFYNERRKQVLEQPGQR
MtLD 349 DILSLSNGKSENWRRIESSQKELILTASDDSEKHLGSENFYNERRKQVLEQPGQR
PtLD 345 GVALSSESENWRRIESSQKELILTASDDSEKHLGSENFYNERRKQVLEQPGQR
VvLD 353 QRLAPFOENSETWRRIESSQKELILTASDDSEKHLGSENFYNERRKQVLEQPGQR

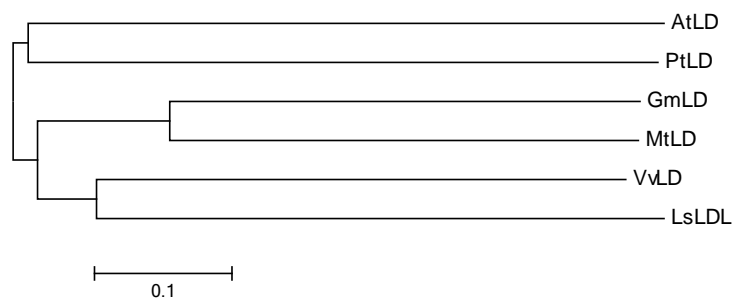
LsLDL 408 AGRGFCQVTELEFETAQGRFLSADDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-
AtLD 410 PAGRSPQTVRIETSGRSRPMASDDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-
GmLD 411 EVRSSEQVTRAGPVSGRPMASDDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-
MtLD 407 -VRSRSPQATLIGPVSGRPMASDDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-
PtLD 405 IAGRSPQATLIGPVSGRPMASDDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-
VvLD 413 IAGRILCEGRAPVSGRPMASDDIQKAKMRAQFMQSKYGFSSYVGSHPHV--KIVVERV-

LsLDL 465 --LMSATS-----SSSSSKAHVHPKV-----EEHATSSSM
AtLD 470 LALHSKADSPPIQNNEAKEDDIPVISTVQPVNGFSTIQPVNGPSAVQPVNGFLAVQPVNG
GmLD 469 F-----QNPASIA-----
MtLD 464 S-----LNGSIA-----
PtLD 463 K-----PSMIPST-----
VvLD 473 S-----SSQIST-----

```

図 4-4. レタスにおける LD 様遺伝子

B



- A. レタスおよび他の植物の *LD* 様遺伝子の推定アミノ酸配列比較.
黒色は共通配列, 灰色は類似配列を示す.
- B. 推定アミノ酸配列による系統樹.
AtLD:シロイヌナズナ *LD*, PtLD:ブラックコットンウッド *LD*,
GmLD:ダイズ *LD*, MtLD:ウマゴヤシ *LD*, VvLD:ヨーロッパブドウ
LD, LsLDL:レタス *LD*.

LsFLDL	1	-----
OsFLD	1	DLNPHQIYRAGABALP P P P P A T M S D Q P P P Y T E L P L L S S F P N P Y E D Q T P D P A S T P T L V L E N
HvFLD	1	-----MSDQQPPSTLLPL-ASLPPNPNENPTPSP--VPALHISA
AtFLD	1	-----MVS
PtFLD	1	-----
VvFLD	1	---MSHIFPSAKSRRLNRS-----KPL-SCPTKKTNETITLN---VWHAKLD
GmFLD	1	-----MDFP-----LQF-SSPQ-NPNENFNHN---VFLDPTS
LsFLDL	1	-----
OsFLD	61	P A F E N K R R R T C F R R -----K L P S G S P A P V A V A A
HvFLD	37	L P S E S K R R R T C F R R -----K V P S A A -----
AtFLD	4	F S A E - K K R R R C R S Q R S M S -----S L N S L P V P N V G L L P G N S N F V S S A S S S G R F N V E V V N
PtFLD	1	-----
VvFLD	41	G E A S R W K R R R C R P R S A A T T P S Q N Q V F Q I P H T S N G T I N G N - N Y L A G A S S S T S F S K S L S E
GmFLD	28	D S I E -----N L L Q N P I H Y L S F S V P K R R R -----G R S Q R N P A S F R L P L P T
LsFLDL	1	-----ND
OsFLD	90	S P S A Q P P P R A S A A D I I T W I N R E P T A E A V T A L T A G F P A D S L T E E I E A G V S D V G G I E Q V N
HvFLD	57	S P A H P P V E S A A D I I T W I N R E P T A E A V T A L T A G F P A D S L T E E I E A G V S D V G G I E Q V N
AtFLD	57	G S N Q I V K S Y E G I G D E I I T I N K P A T T E A L T A L T A G F P A D S L T E E I E A G V P I V G G I E Q V N
PtFLD	1	-----
VvFLD	100	N P T S S T A A V E D I S D E I I T W I N R E P T A E A V T A L T A G F P A D S L T E E I E A G V S I V G G I E Q V N
GmFLD	68	T L P T A A N P S E S A S D E I I T I N K P K T E A L T A L T A G F P A D S L T E E I D A A V P V I V G G I E Q V N
LsFLDL	3	Y I V V R N H I L S R W R A N V H A W S G E I K E T V S N E F N H L L S A Y D F L F N G Y I N F G V S P T E R P
OsFLD	150	Y I L I R N H I L T R W R E T F N S W L A K E S F A I L I P P H C D E L L A A H S F L V S H C E I N F G V A F A I K E
HvFLD	117	Y I L I R N H I L T R W R E T F N S W L A K E S F A I L I P P H C E R L L S A Y N F L V S H C E I N F G V A F A I K E
AtFLD	117	Y I L I R N H I L S K W R E N I S S W I T K E M F L N S I P K H C S L L S A Y N L V T H G Y I N F G V A F A I K D
PtFLD	1	-----M F L N S V P K H C H C L L S A Y N L V S E G Y I N F G V S Q S I K E
VvFLD	160	Y I L I R N H I L A K W R E N V S S W L A K E M F L G S V P S H C H L L S A Y N F L V T H G Y I N F G V A F A I K E
GmFLD	128	Y I L I R N H I L A K W R E N V S N W S K K T F L D Y I P P P H S L L S A Y N L V S H G Y I N F G V A S S I K E
LsFLDL	63	Q M P E S T E G S - V I V V G A G L A G L A A A R Q L A F G F K V I V L E G R K R E G G R V Y T K K M E G G - N R
OsFLD	210	R I P P E P T R N D V I V V G A G L A G L A A A R Q L A F G F K V W V L E G R K R C G G R V Y T K K M E G G - -
HvFLD	177	R I P P E P T R N D V I V V G A G L A G L A A A R Q L V S G F K V I V L E G R K R C G G R V Y T K K M E G G - -
AtFLD	177	R P P A Q S S K S S - V I I V G A G L S G L A A A R Q L M R F G F K V I V L E G R K R E G G R V Y T K K M E A - - N R
PtFLD	38	Q P P Q D T K S N - V I V V G A G L A G L S A A R Q L M R I G F K V I V L E G R K R A G G R V Y T K K M E G G A N R
VvFLD	220	K I P P E S K Q N - V V V V G A G L A G L A A A R Q L M R F G F K V I V L E G R K R A G G R V Y T K K M E G G - - N R
GmFLD	188	R V P P A S R P A - V I V V G A G L A G L A A A R Q L M R F G F K V I V L E G R K R A G G R V Y T K K M E G G - - N R
LsFLDL	121	N Y A V D L G G S V L T G I H A N P L G I V A R Q L S I P L H K V R D K C P L Y D P E G K P V E K T D S K V E I F
OsFLD	267	R S A A G D L G G S V L T G I F G N P L G I V A R Q L G L P M H K T R D K C P L Y R P D G S F V D P E V D K V E G T F
HvFLD	234	R S A A A D L G G S V L T G I S G N P L G I V A R Q L G L P M H K T R D K C P L Y R P D G S F V D P E V D R E V E G T Y
AtFLD	233	V G A A A D L G G S V L T G T L G N P L G I V A R Q L G S S I Y K V R D K C P L Y S V D G K P V D P M D K V E V A F
PtFLD	97	V S A S V D L G G S V L T G T L G N P L G I V A R Q L G S S I Y K V R D K C P L Y S V D G K P V D P M D M K V E T A F
VvFLD	277	T - A A A D L G G S V L T G I F G N P L G I V A R Q L G Y L H K V R D K C P L Y S V D G K P V D P M D K V E A D F
GmFLD	245	M C A A A D L G G S V L T G T L G N P L G I V A R Q L G E L L H K V R D K C P L Y Q V N G M F V D P D M D K V E S A F
LsFLDL	181	N R L L D K A S L R Q L M G E V S V D V S L G A A L E T F R Q Y R D A V S D E E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
OsFLD	327	N R L L D K S L L R A S M G D V M D V S L G A A L E T R Q T G D L S T D Q E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
HvFLD	294	N R F L D K A S H R E K M G D V M D I S L G A A L E T R Q S D G G I S S E E E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
AtFLD	293	N R L L D K A S L R Q L M G D V S M D V S L G A A L E T F R Q V S N D V A T E E M G L F N W H L A N L E Y A N A G L
PtFLD	157	N R L L D K A S L R Q L M G D V S V D V S L G A A L E T F R Q Y R D A V N R E E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
VvFLD	336	N R L L D K A S L R Q L M G E V S V D V S L G A A L E T F R Q V G D A V N R E E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
GmFLD	305	N R L L D K A S L R Q L M G E V S V D V S L G A A L E T F S Q Y Y R D A V S D E E M N L F N W H L A N L E Y A N A G L
LsFLDL		-----
OsFLD	387	L S K L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q A L A E N V P I V Y E R T V H T I R Y G S D G V Q V V
HvFLD	354	S S R L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q A L A E N V P I V Y E R T V H T I R Y G S D G V Q V V
AtFLD	353	V S K L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q A L A E N V P I L Y E K T V H T I R Y G S N G V R V T
PtFLD	217	L S K L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q A L A E N V P I L Y E K T V H T I R Y G S D G V R V T
VvFLD	396	L S K L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q L S E N V P I L Y E K T V H T I R Y G S D G V Q V T
GmFLD	365	L S N L S I A F W D Q D D P Y D M G G D H C F L P G G N G R L V Q A L S E N V P I L Y E K T V H T I R Y S D G V Q V T

図 4-5. レタスにおける FLD 様遺伝子

レタスおよび他の植物の FLD 様遺伝子の推定アミノ酸配列比較。黒色は共通配列、灰色は類似配列を示す。

ライメント解析の結果から、単離された配列はそれぞれ *API*, *LFY*, *FVE*, *LD*, *FLD* の相同性遺伝子および相同性遺伝子の部分配列であると考えられた。

4-2 リーフレタスおよび結球性レタスにおけるレタス花成関連遺伝子の発現解析

4-2-1 露地圃場におけるレタス花成関連遺伝子の発現解析

材料および方法

1. 植物材料

2013年4月1日にレタス品種‘リーフレタスグリーン’，‘テキサスグリーン’，‘パトリオット’，および晩抽性育成系統を，園芸培土，信濃培度=1:1の混合培土を充填した200穴セルトレイ（30 cm×60 cm）に播種し，茨城県つくば市の農研機構野菜花き研究部門（36° 1'45" N, 140° 6'14" E）のガラス室（28℃で天・側窓開閉，日長はなりゆき）で育苗した。5月2日に同研究部門圃場に移植した。圃場は10 aあたりでN=18 kg，P=18 kg，K=18 kgの化成肥料を投入し，移植は白黒ダブルマルチの白面を展張した60 cm幅の畝に，株間25 cmで2条千鳥とした。栽培期間は7月17日までとした。移植後適当な間隔で植物体の生育調査とサンプリングを行った。茎頂を実体顕微鏡（Leica Microsystems）下で観察して花芽発達段階を決定した。

2. 栽培環境の気象データ

栽培圃場の気象データとしては，気象観測データシステム（<http://www.niaes.affrc.go.jp/niaesaes/>）（36° 1'29" 140° 6'41"）より得られる地上2m気温および降水量データを利用した。

3. qRT-PCR

遺伝子発現解析に用いるサンプルとして、各調査ポイントにおける最大葉を採取し液体窒素で凍結後粉砕した。約 100 mg を秤量し、前述の方法 (4-1) により鋳型を作成した。PCR 反応は SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ (株))、0.4 μ M フォワードプライマー、0.4 μ M リバースプライマー、鋳型 DNA 1 μ L を含む 10 μ L 反応液中において、94°C で 10 分を 1 サイクルの後、94°C で 10 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 40 回行った。プライマーは、用いた品種・系統における各遺伝子の増幅断片をシーケンスし、保存されている領域から設計した。さらに qRT-PCR において増幅された断片が単一産物であるかどうかを溶解曲線解析により確認した。PCR 反応および溶解曲線解析は Mx3000P および MxPro QPCR Software (いずれも Agilent Technologies) により行った。各遺伝子のプラスミド DNA 希釈系列を用いて作成した検量線により発現量を算出し、さらに *Tubulin* (Accession No.AB232704) 遺伝子によりノーマリゼーションした。

結果

1. 圃場での植物の生育状況

栽培地における気温は、5月から7月下旬にかけて徐々に増加した (図 4-6)。本実験実施中の日平均気温は 23.2°C であり、平年値 (1981 年から 2010 年までの観測平均値) (21.3°C) と比較すると若干高温であった。‘リーフレタスグリーン’の茎長は、移植後 41 日から急激に伸長し、移植後 50 日には 30 cm となった。‘テキサスグリーン’は、他の結球性品種・系統と比較すると茎長は長く推移し、移植後 69 日で 10 cm を越えた。晩抽性品種である‘パトリオット’および晩抽性育成系統は、試験期間を通して茎長は 10 cm 未満にとどま

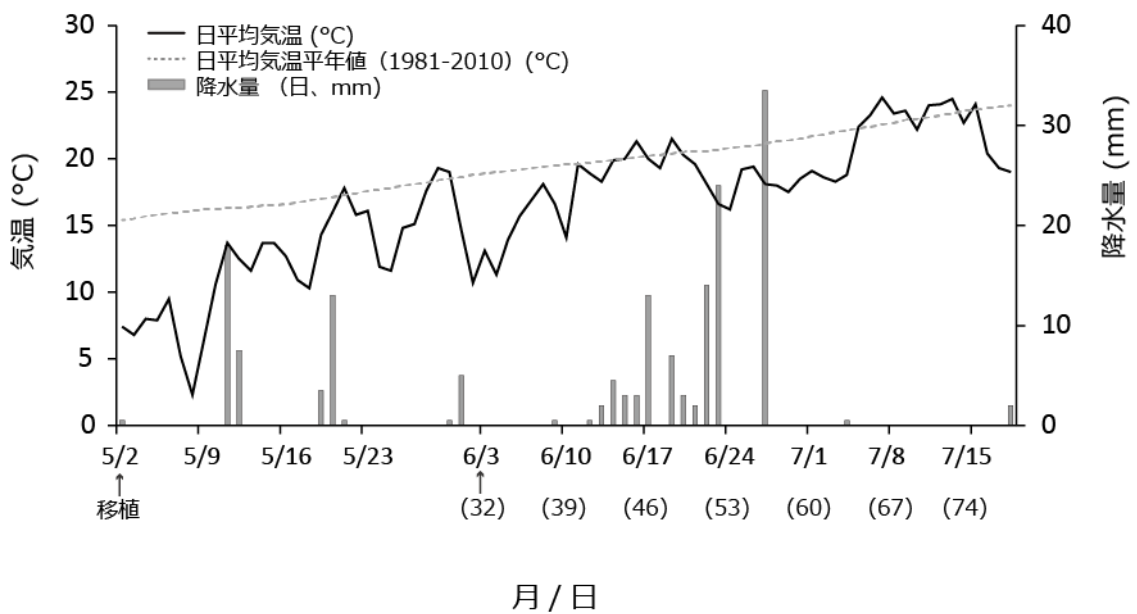


図 4-6. 農研機構野菜花き研究部門露地圃場における日平均気温および降水量の推移

本実験におけるレタス栽培は4月1日に播種し、育苗後5月2日に露地圃場に移植した。グラフ横軸は月/日を示し、括弧内数字は移植後日数(日)を示す。

った。‘リーフレタスグリーン’と‘テキサスグリーン’では、栽培中に花芽分化が確認され、‘リーフレタスグリーン’では移植後 41 日に、‘テキサスグリーン’では移植後 62 日に、花芽発達段階が 1 以上となった（図 4-7）。‘リーフレタスグリーン’および‘テキサスグリーン’の、栽培期間中の茎伸長の様子を図 4-8A, B に示す。試験終了時（移植後 76 日）の‘リーフレタスグリーン’は、花茎伸長が終了し花が咲いており（図 4-8C）、‘テキサスグリーン’は花茎が結球部から露出して伸長中であった（図 4-8D）。

2. 花成関連遺伝子の発現量の変化

2-1 花芽形成決定遺伝子 *LsLFYL*, *LsAPIL*

栄養成長から生殖成長への相転換の間に、花芽形成決定遺伝子がどのような発現様式を示しているのかを調査するため、茎頂における *LsLFYL* および *LsAPIL* の発現解析を行った。図 4-9 に示すように、‘リーフレタスグリーン’および‘テキサスグリーン’において *LsLFYL* と *LsAPIL* の急激な発現上昇が確認された。発現上昇のタイミングは、‘リーフレタスグリーン’は移植後 47 日、‘テキサスグリーン’は移植後 69 日であり、これはそれぞれの品種の花芽発達段階が 2 以上となった時点（図 4-7B）であった。

2-2 花成経路統合遺伝子 *LsFT*

前章での検討により、*LsFT* は最大葉で発現量が多いことが明らかになっているため、本試験においても最大葉をサンプリングし発現解析を行った。移植後 41 日の‘リーフレタスグリーン’および移植後 62 日の‘テキサスグリーン’において、*LsFT* の急激な発現上昇が観察された。一方、‘パトリオット’および晩抽性育成系統における *LsFT* の発現量は栽培期間を通してわずかに上昇したのみであった（図 4-10）。

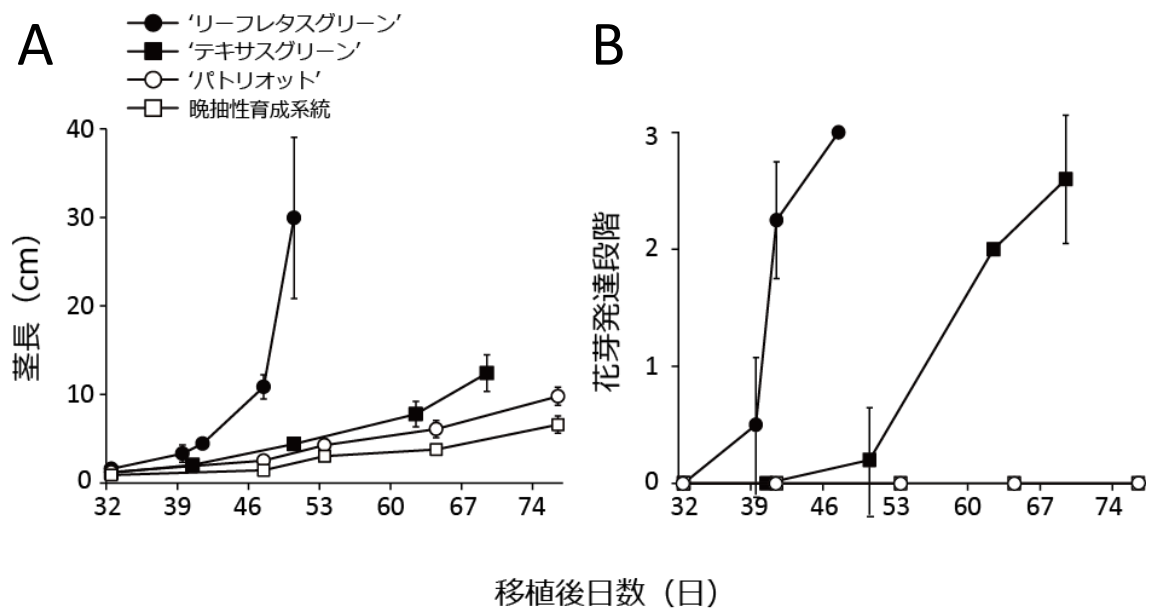


図 4-7. 圃場での栽培における複数レタス品種・系統の生育状況

約 4 週間育苗した苗を露地圃場に移植し経時的にサンプリングを行い、
 茎長 (A) および茎頂の花芽発達段階 (B) を調査した。
 縦棒線は標準偏差を示す (n=5)。
 花芽発達段階のスコアは 0 ; 栄養成長期, 1; 膨大期, 2; 頂花房形成期, 3;
 側花房形成期である。

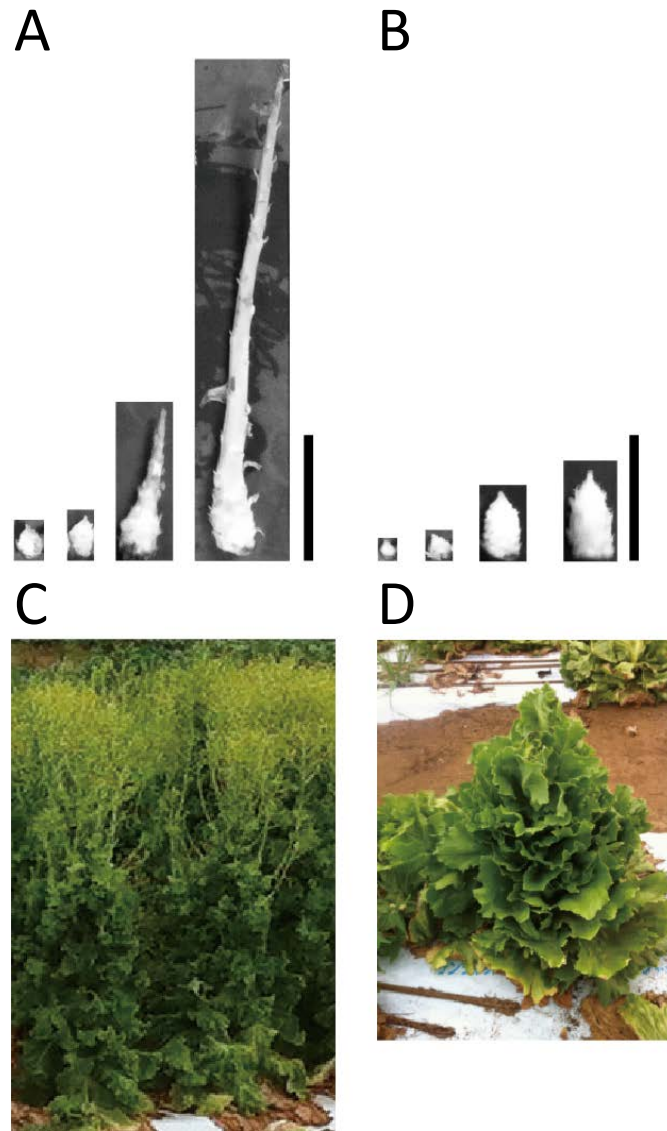


図 4-8. 'リーフレタスグリーン'および'テキサスグリーン'の表現型

'リーフレタスグリーン' (A) および'テキサスグリーン' (B) の茎長の変化の様子. スケールバー : 10 cm. 試験終了時 (移植後 76 日) の'リーフレタスグリーン'は花が咲いており (C), 'テキサスグリーン'は花茎が結球部から露出して伸長中であった (D).

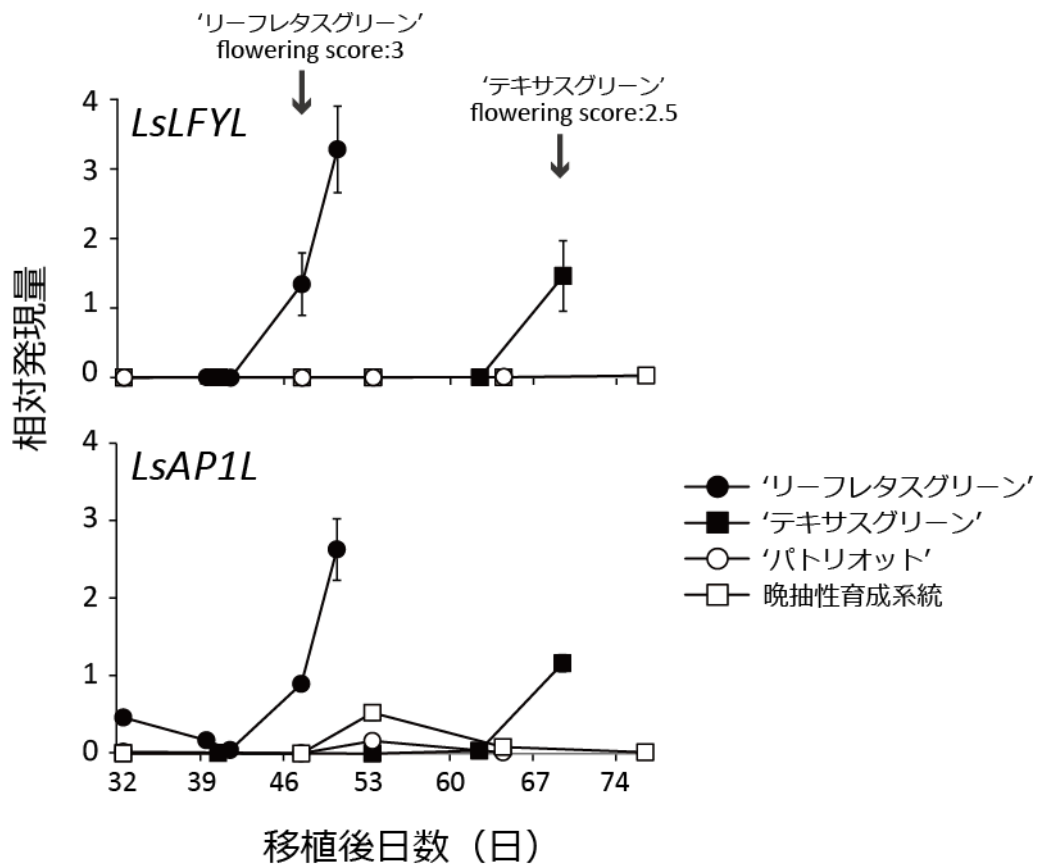


図 4-9. 圃場で栽培したレタス茎頂における花芽形成決定遺伝子の発現動態

圃場で生育させたレタスを経時的にサンプリングし、茎頂における *LsLFYL* および *LsAP1L* の発現量を qRT-PCR により解析した。

図中縦棒線は Biological replicate を示す (n=3)。

花芽発達段階のスコアは 0 ; 栄養成長期, 1; 膨大期, 2; 頂花房形成期, 3; 側花房形成期である。

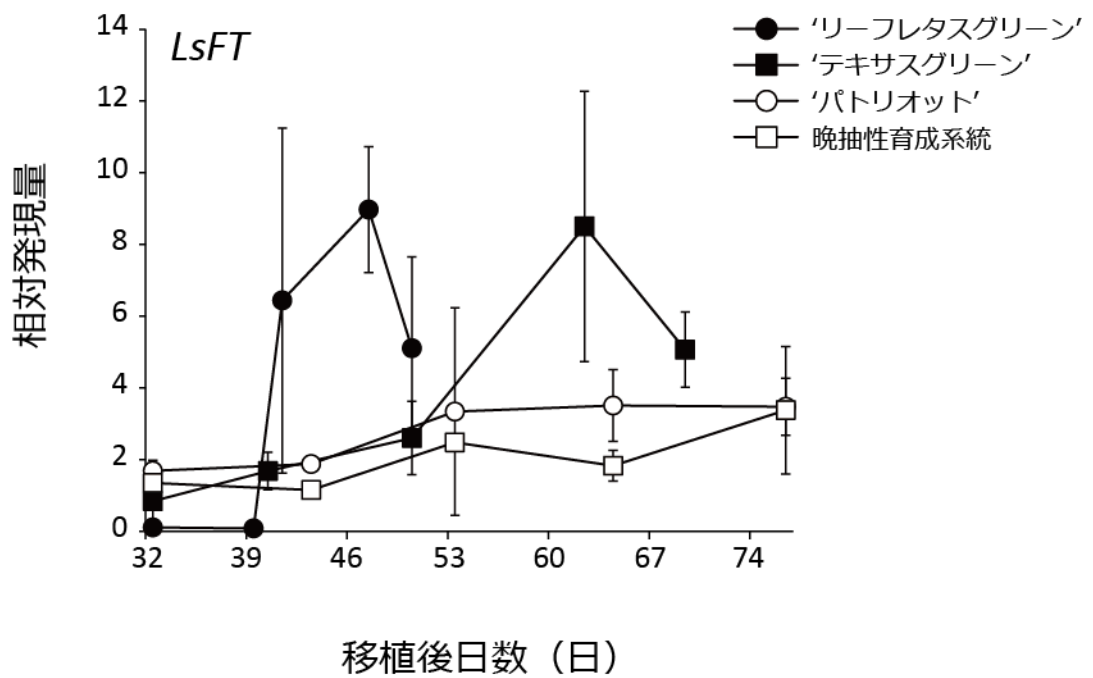


図 4-10. 圃場で栽培したレタス最大葉における
花成経路統合遺伝子の発現動態

圃場で生育させたレタスを経時的にサンプリングし、最大葉における *LsFT* の発現量を qRT-PCR により解析した。
 図中縦棒線は Biological replicate を示す (n=3)。

2-3 自律的経路に関与する遺伝子 *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL*

自律的経路上で作用していると考えられている遺伝子の発現解析結果は、
1) 早抽性品種で高発現しており、晩抽性品種で発現が低い、2) 花成の進行に伴い発現量が上昇する、3) 遺伝子発現と花成に関連性が見出せない、の3つのグループに分類できた。そのうち、‘リーフレタスグリーン’における *LsFVEL* の発現レベルは移植時に高く移植後 39 日で最大量に達し、花芽が目視で確認できる大きさになった移植後 47 日には減少した。‘テキサスグリーン’における *LsFVEL* の発現量は、実体顕微鏡下で頂花房の分化が確認された移植後 62 日に増加した。*LsFLDL* の発現レベルは‘リーフレタスグリーン’および‘テキサスグリーン’においてそれぞれ移植後 47 日、69 日にピークがあった。*LsLDL* については、‘リーフレタスグリーン’において移植後 47 日に発現のピークが観察された (図 4-11)。

考察

1. 花芽形成決定遺伝子 *LsLFYL*, *LsAPIL*

茎頂において花芽が形成される時期に発現して作用していると考えられている *LFY* および *API* については、シロイヌナズナで研究が進んでおり、いくつかの植物種においては相同性遺伝子が単離され解析されている (Benlloch et al., 2007)。シロイヌナズナにおいては、*LFY* 遺伝子は花芽発達の初期段階で発現し茎頂が花芽となる運命付けを行い、また以降の花芽形成に関する遺伝子の活性化にも関与している (Parcy et al., 1998)。*API* は長日条件下で花芽原基において検出され (Wigge et al., 2005)、*API* の活性化は *LFY*、もしくは *FT* と *FD* による作用が媒介していると考えられている (Parcy et al., 1998; Ruiz-García et al., 1997)。Li ら (2009) は、キクにおける *LFY* と *API* の相同性遺伝子を解析し、花成誘導条件下においてこれらの遺伝子発現が増加することを報告している。本実験で

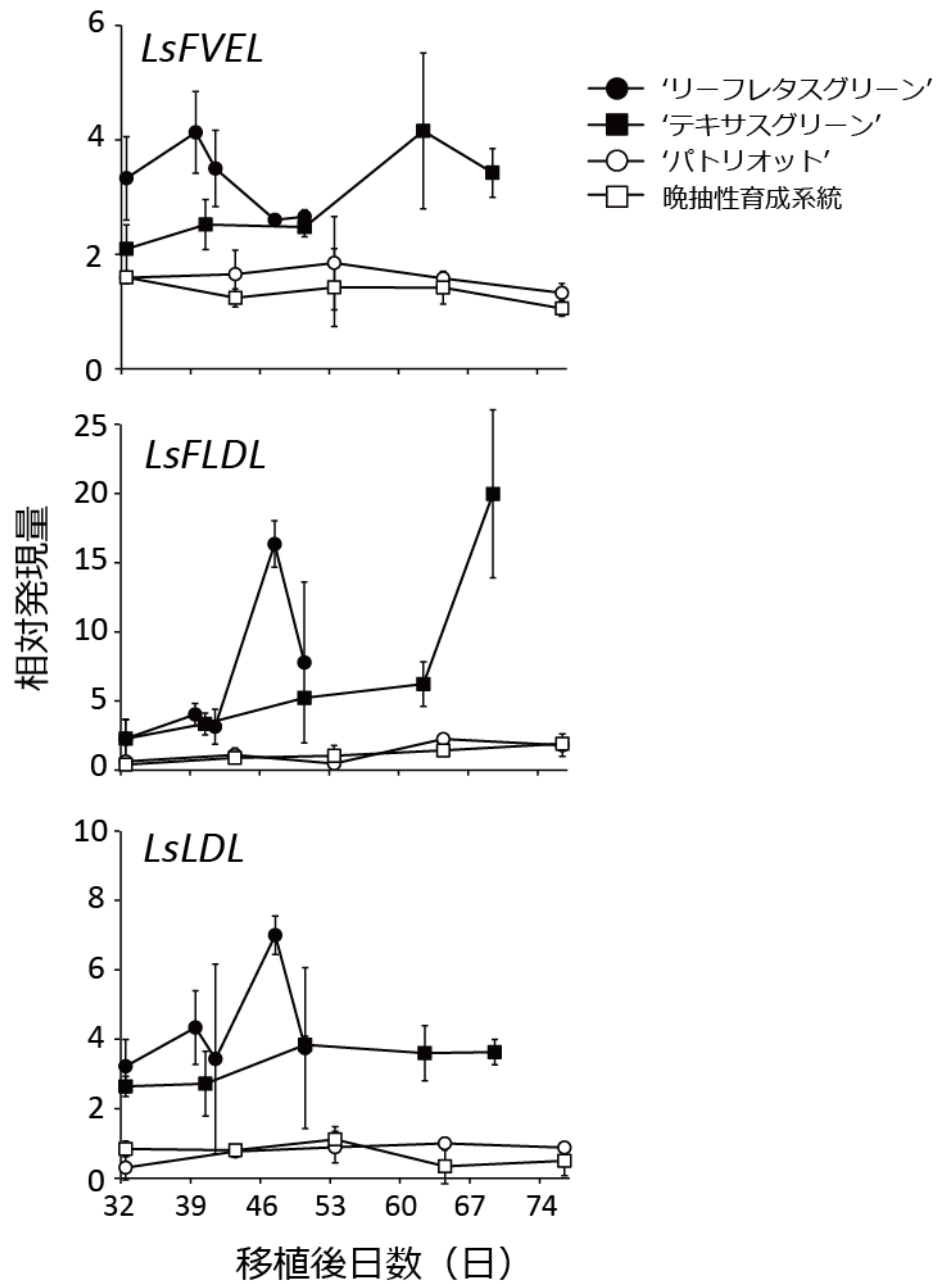


図 4-11. 圃場で栽培したレタス最大葉における自律的経路関連遺伝子の発現動態

圃場で生育させたレタスを経時的にサンプリングし、最大葉における *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL* の発現量を qRT-PCR により解析した。図中縦棒線は Biological replicate を示す (n=3)。

は、圃場で生育しているレタス茎頂における *LsLFYL*, *LsAPIL* の発現レベルが、花芽発達段階とよく一致することを示した (図 4-9)。これは、エンドウマメ (Berbel et al., 2001), ポプラ (Rottmann et al., 2000), リンゴ (Wada et al., 2002) 等でも報告されているように、*LFY* および *API* のレタス相同性遺伝子がレタスの花芽形成に関与していることを示唆した。

2. 花成経路統合遺伝子 *LsFT*

人工気象装置内は高度に制御された環境であることから、実施される実験においては様々な処理を行うことができること、反復実験が容易であること、などの利点を持つ。一方、自然環境は予測が困難な、変動する数々の要因によって構成されている。これまで多く制御環境下で行われ明らかにされてきた遺伝学研究を自然条件に展開していこうとする動きもあり (Izawa, 2015), 自然条件および制御環境の両方を用いて検証することの意義が示されている

(Champigny et al., 2013; Guevara et al., 2012; Plessis et al., 2015)。前章により、*LsFT* が、高温条件に設定された制御環境下における花成に関与していることが示されたが、本章では、圃場条件で栽培されたレタスにおける遺伝子発現を解析した。抽苔が発生しうる作型により露地圃場で栽培した ‘リーフレタスグリーン’ および ‘テキサスグリーン’ では花成および抽苔が観察され、花成時期と協調して *LsFT* の発現レベルの上昇がみられた (図 4-10) ことから、*LsFT* の花成時の高発現は、環境の変動が大きい圃場条件下で生育している植物体においても観察されることが示された。またこの遺伝子が圃場条件下での花成に関連していることが示唆された。

3. 自律的経路に関与する遺伝子 *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL*

花成の制御機構については、シロイヌナズナ以外の植物種においてもその構

成因子が明らかにされつつあるが、自律的経路上の個々の遺伝子については情報が少ない。しかしながら、植物ゲノム上にはいくつかの自律的経路上の遺伝子の相同配列が存在することが Hecht ら(2005)によって示されている。Hu ら(2014)は、*FLD* のダイズ相同性遺伝子、*GmFLD* を単離しシロイヌナズナを用いた形質転換実験を行い、*GmFLD* 発現体は野生型よりも開花が早く、遅咲き形質であるシロイヌナズナ *fld* 変異体を補完できることを示した。コショウランの *FVE* 相同性遺伝子は栄養成長から生殖成長に移行する間に発現量が増加することが示されている(Sun et al., 2012)。また、シロイヌナズナ *ld* 変異体は遅咲き形質を示すことから、*LD* 遺伝子が花成誘導に何らかの役割を持つことが推察される(Lee et al., 1994; Rédei, 1962)。シロイヌナズナにおける自律的経路遺伝子の主な作用は、春化反応によってエピジェネティックにサイレンシングされる *FLC* 遺伝子の作用を抑制することで花成を誘導することである。現代に入って利用されているレタス品種は春化によらず花成誘導が起こるが、レタス近縁野生種には二年生、多年生の種もある(Lebeda et al., 2006)。本実験結果は、春化応答の形質を持たないと考えられる現代レタス品種における自律的経路遺伝子の存在を示した、新たな知見である。本実験では、*LsFVEL* は *LsFT* と同様に、花芽形成決定遺伝子の発現増加に先立って発現量が増加しており、*LsFLDL* は花芽形成決定遺伝子の発現増加と同時期に発現のピークが観察された。また *LsLDL* については1品種で明確な発現ピークがみられなかったが、確認されなかった品種・系統に比べて試験期間全体の発現量が多い傾向がみられた(図4-11)。本実験で観察されたこれらの遺伝子の発現動態は、少なくとも本実験で用いた栽培条件において、自律的経路遺伝子のレタス相同性遺伝子が花成プロセスにおいて何らかの働きをしていることを示唆している。

4-2-2 制御環境下におけるレタス花成関連遺伝子の発現解析

材料および方法

1. 植物材料

前述の方法 (1-1) で育苗したレタス品種 ‘テキサスグリーン’ および晩抽性育成系統を、混合培土を充填した 7 cm の不織布ポットに移植し、35/25°C (昼/夜温) および 25/15°C (昼/夜温) に設定したグロースチャンバーに移して栽培した。以下 25/15°C 区を低温区、35/25°C 区を高温区とした。日長は 14 時間とした。

2. qRT-PCR

遺伝子発現解析に用いるサンプルとして、各調査ポイントにおける最大葉を採取し液体窒素で凍結後粉砕した。約 100 mg を秤量し、前述の方法 (2-1) により鋳型を作成した。PCR 反応および発現解析は前述 (4-1) と同様の機器および方法により行った。

結果

1. 制御環境下での植物の生育状況

花成関連遺伝子の発現解析に用いたレタスの生育状況を図 4-12 に示す。‘テキサスグリーン’ の茎長は、高温区においてポット移植後 24 日には約 15 cm となり、36 日に約 30 cm、48 日に約 55 cm となった。一方低温区では移植後 24 日で約 5 cm、36 日で約 10 cm、48 日で約 25 cm、60 日で約 25 cm であった。晩抽性育成系統の茎長は、高温区においてはポット移植後 24 日で約 5 cm であり、36 日で約 8 cm、48 日で約 12 cm、60 日で約 20 cm となった。低温区では、移植後 24 日で約 4 cm であったがその後も短いまま推移し、移植後 60

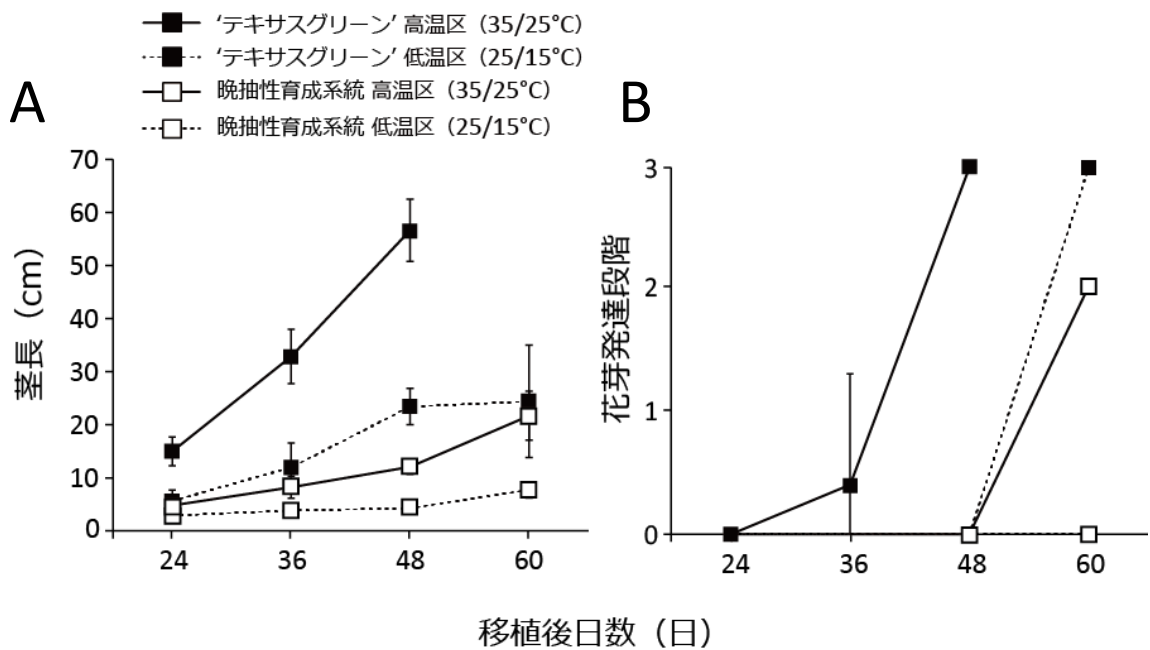


図 4-12. 制御環境下で栽培したレタスの生育状況

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 茎長 (A) および花芽発達段階 (B) を調査した. 縦棒線は標準偏差を示す (n=5).

日でも 10 cm 未満となった (図 4-12A)．‘テキサスグリーン’では、高温区の移植後 36 日において一部に花芽分化が認められたことからスコアは 0.3 となり、移植後 48 日には目視により花芽が確認された．低温区の移植後 48 日までには花芽分化は認められずスコアは 0 であり、移植後 60 日にはすべての個体の茎頂で側花房形成が認められスコアは 3 となった．また晩抽性育成系統では、高温区の移植後 60 日においては全ての個体で頂花房形成が認められたためスコアは 2 となった．低温区では栽培期間中の花芽分化は確認されなかった (図 4-12B)．図 4-13 に、両品種・系統の茎伸長の様子を示した．

2. 花成関連遺伝子の発現量の変化

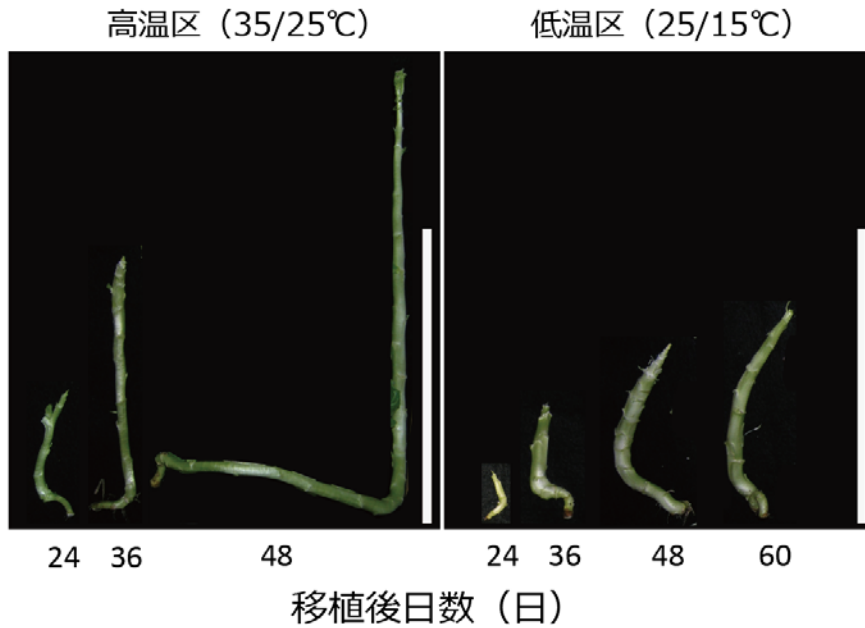
2-1 花成経路統合遺伝子 *LsFT*

最大葉をサンプリングし *LsFT* の発現解析を行ったところ、‘テキサスグリーン’における高温区の移植後 48 日のおよび低温区の移植後 60 日で *LsFT* の急激な発現上昇が観察された．一方、晩抽性育成系統における *LsFT* の発現量は高温区の移植後 36 日において若干の上昇があったものの高温区、低温区ともに栽培期間を通して低い値で推移した (図 4-14)．

2-2 自律的経路に関与する遺伝子 *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL*

‘テキサスグリーン’における *LsFVEL* の発現レベルを高温区と低温区で比較すると、移植後 24 日および 36 日で高温区の発現レベルが高かった．低温区における発現レベルは徐々に増加し、移植後 60 日では 24 日の 2 倍程度であった．晩抽性育成系統においては、*LsFVEL* は高温区と低温区で有意な差はみられなかった．‘テキサスグリーン’における *LsFLDL* の発現量は、高温区では移植後 36 日および 48 日において発現レベルが高くなった．低温区では移植後 36 日で増加し、48 日に減少するが 60 日で再度高くなった．晩抽性育成系統にお

‘テキサスグリーン’



晩抽性育成系統

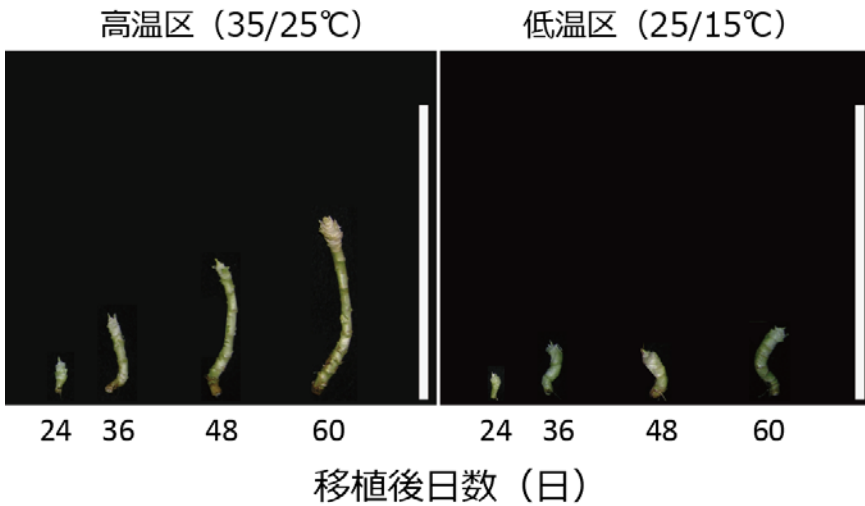


図 4-13. 制御環境下で栽培したレタスの茎伸長の様子

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15℃および 35/25℃で生育させた.
スケールバー : 30 cm.

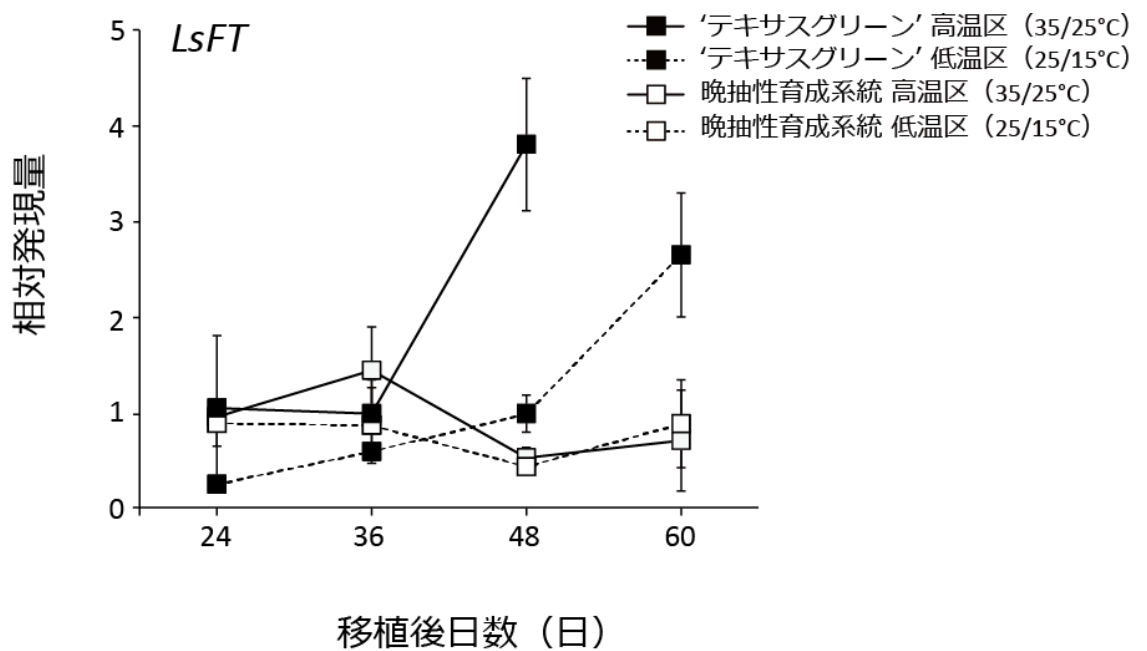


図 4-14. 制御環境下で栽培したレタス最大葉における *LsFT* 発現動態

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 最大葉における *LsFT* の発現量を qRT-PCR により解析した. 図中縦棒線は Biological replicate を示す (n=3).

いては高温区の移植後 24 日で反復内変動が大きく、低温区の移植後 24 日で発現レベルが低かったが、その後はどちらの区もほぼ一定の発現レベルで推移した。 *LsLDL* については、‘テキサスグリーン’および晩抽性育成系統ともに低温区で発現量が多い傾向がみられたが反復内変動が大きく、いずれの品種・系統および処理区においても明確な発現量のピークはみられなかった (図 4-15)。

考察

第三章において、*LsFT* はレタスのモデル的品種 ‘リーフレタスグリーン’ の花成の進行に伴い最大葉で発現量が増加することが明らかとなり、第 4 章-2-1 では、圃場で栽培され抽苔が観察されたレタス品種においても、花成進行に対応したこの遺伝子の発現増加が認められた。本実験では再び制御環境下で生育させた結球性レタス品種・系統の *LsFT* の発現動態を調査した。結球性レタスの中では比較的早抽性である ‘テキサスグリーン’ は、高温区で抽苔が早く、低温区においても移植後 60 日で花芽分化が認められ、花成の表現型と遺伝子発現はよく一致していた (図 4-12A, B および図 4-14)。一方、晩抽性育成系統では、高温区にの移植後 60 日において茎頂の花芽分化が認められたが、*LsFT* 発現レベルに明確なピークは見られなかった (図 4-12B および図 4-14)。花成にともなった *LsFT* の発現増加がみられなかった理由としては、晩抽性育成系統がレタス近縁野生種との交雑を経た交雑後代であり非常に抽苔が遅い形質を有することから、他のレタス品種とは異なる遺伝背景を持つことが考えられる。晩抽性育成系統の *LsFT* 遺伝子のコード領域の塩基配列は ‘リーフレタスグリーン’ と相異はないことを確認しているが、晩抽性育成系統ではなんらかのメカニズムにより *LsFT* の発現レベルが低く、そのことが育成系統の花成の遅速に関与している可能性が考えられる。また、*FT* は植物の花成誘導において中心的な役割を果たしていると考えられる一方、同族遺伝子のうち花成に抑制

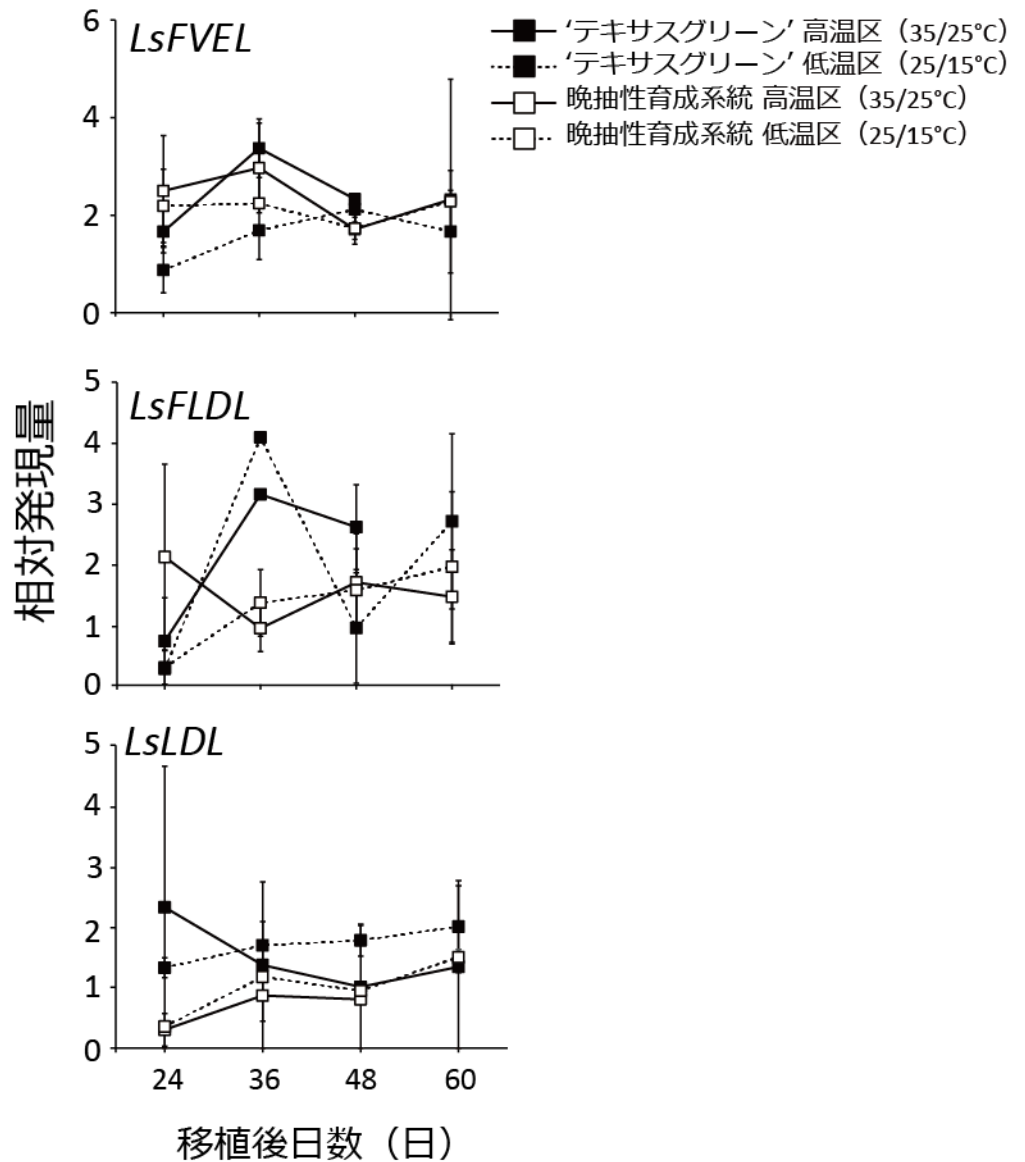


図 4-15. 制御環境下で栽培したレタス最大葉における自律的経路関連遺伝子の発現動態

25/15°C, 14 時間日長に設定したチャンバー内で 3 週間育苗した苗をポットに移植し, 25/15°C および 35/25°C で生育させ, 最大葉における *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL* の発現量を qRT-PCR により解析した. 図中縦棒線は Biological replicate を示す (n=3).

的に作用する因子が *FT* と拮抗して作用している可能性(Hanano and Goto, 2011) や, *FT* からは独立している花成制御経路(Hisamatsu and King, 2008)の例なども報告されており, 晩抽性育成系統の花成制御においては, 花成制御の表現に *LsFT* 以外の因子が適している可能性も考えられる. 緒言においても述べたとおり, 晩抽性はレタス品種育成において重要な形質である一方, 原因遺伝子の同定やマーカー開発は達成されていない. 本実験で得られた結果を基に, *LsFT* 遺伝子の発現様式の差異がレタス花成の早晩性とどのように関連しているのかをさらに詳細に解析することは, これらの技術開発の基盤知見となると考えられる.

自律的経路に関与する遺伝子 *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL* は, 圃場で栽培され抽苔が観察されたレタス品種において, *LsFT* と同様に花成進行に関連して発現の変動がみられること示した (図 4-11). 制御環境下の栽培においては, 両品種・系統で花芽分化が確認されたが, 遺伝子の発現動態は, 圃場実験で観察された花成進行に対する発現動態とは異なっていた. 自律的経路遺伝子は長日, 短日どちらの条件でも花成が遅延する変異体から単離・同定された遺伝子であり, 温度反応に対してはこれまでほとんど報告がない. 本実験では, *LsFVEL* が‘テキサスグリーン’高温区で低温区に比べて発現量が増加しており, *LsFVEL* は温度応答性があり, 特に高温条件においては花成進行にともなった発現増加を示すことが考えられた. *LsFLDL* については, 両品種・系統で花成進行にともなった発現増加がみられなかったが, ‘テキサスグリーン’の両温度区で晩抽性育成系統の両温度区より発現量が多く, 花成早晩性の異なる品種・系統間で発現制御の品種間差があることが推察された. *LsLDL* については, 圃場実験では早抽性品種で発現量が多かったが, 制御環境下では有意な差とはならなかった. 品種・系統の処理区間で比較すると低温区で発現量が多い傾向がみられたことから, 制御環境下では低温条件でより発現が誘導されると

考えられた。花成の制御因子の発現には、温度、日長や光強度、温度の日変化等の様々な環境要因が影響していると考えられる。露地圃場のような環境条件とチャンバーのような制御環境下ではこれらの要素が異なっており、各栽培条件下で観察される花成において、その誘導時の遺伝子発現様式は異なることが示唆された。植物が持つ複数の花成制御経路は、様々な環境要因を感知してその条件に合った成長の最適解を導き出すために植物がもつメカニズムであるので、本実験で用いた圃場条件、制御環境条件それぞれの環境要因との相互作用の結果、花成に関連する遺伝子群の発現様式の変動が観察されたものと推察される。

総合考察

本研究は、冷涼を好むレタスの周年安定生産を目指したときに問題となる、抽苔、花成について、栽培管理技術や品種育成技術に資することを目的として生理的メカニズムの解明を試みたものである。

第一章では、レタスの抽苔研究を行うにあたり花芽分化の過程を明確にする必要があることから、レタスのモデル的品種‘リーフレタスグリーン’を用いて茎頂の発達段階を明らかにした。また、本研究において供試した品種・系統について、圃場における栽培での花芽発達過程を調査した。この結果、本研究で供試した品種・系統においては、少なくとも花芽分化前までの茎頂の大きさに大きく違いがないことが示された。

第二章では、花芽分化、花茎伸長への関与が示唆されている植物ホルモン、ジベレリンについてレタスの抽苔における機能解明を目的とし、ジベレリン代謝酵素遺伝子の発現解析、供試品種の内生ジベレリンの同定、精密定量を行った。レタスにおけるジベレリン代謝では、特に代謝経路下流の酵素群が、他の植物同様に複数の遺伝子により遺伝子族を形成していることが明らかになっており、本研究では各酵素遺伝子について特異的に検出できるプライマーセットを設計し qRT-PCR により発現解析を行い、レタスの高温抽苔時にジベレリン代謝を律速する代謝酵素遺伝子の分子種を明らかにしようとした。この結果、レタスの茎では各パラログのうち *LsGA20ox1*, *LsGA3ox1*, *LsGA2ox1* が主に発現しており、高温抽苔においては茎の上部において、*LsGA3ox1* の発現レベルが特異的に増加することが明らかとなった。また、レタスの内生ジベレリンとして、本研究供試品種においても GA_{19} , GA_{20} , GA_1 を同定し、茎の上部では GA_1 が、下部では GA_{20} の内生量が増加することを明らかにした。生合成促進の制御方法としては、生合成の促進もしくは不活化の抑制が考えられる。

‘リーフレタスグリーン’では、抽苔条件下で不活化酵素遺伝子の発現量が低下したが、それが生合成の促進の作用に働く場合の物質変化、すなわち活性型ジベレリンの直前の前駆体である GA_{20} の増加、 GA_{20} の不活化型である GA_{29} の減少、 GA_1 の不活化型である GA_8 の減少等は観察されず、 GA_8 の物質量は GA_1 と同様の変動を示していた。以上のことから高温条件により誘導されるレタス抽苔においては、生合成酵素遺伝子である *LsGA3ox1* が積極的に作用した結果内生 GA_1 が増加することによって茎伸長が促進されていることが示唆された。古くからジベレリン生理研究の材料として供試されてきたレタスであるが、実生以上の大きさの植物体でその遺伝子発現、内生量動態をみた例はなく、Fukuda ら(2009)により論文として報告できたことは、レタス抽苔研究において意義のあるものであったと思われる。さらに、抽苔特性の異なる品種間で遺伝子発現量および内生量を分析したところ、晩抽性品種では遺伝子発現および内生量の増加量が早抽性品種に比べて少なく、抽苔の進行程度と、生合成制御による内生ジベレリン量になんらかの関連があることが推察された。結球性の晩抽性品種‘パトリオット’においては、*LsGA2ox1* の経時的増加が観察された。これに関連する物質変化はみられなかったため、この不活化酵素遺伝子の増加にどのような作用があったのかは明らかとはならなかった。しかしながら、抽苔性に関与する量的形質遺伝子座として $GA2ox$ がマップされる報告もあり(Guitton et al., 2016; Li et al., 2013; Personal communication), ‘パトリオット’の *LsGA2ox1* の発現動態がその晩抽性形質と関連している可能性が考えられる。

レタスの高温抽苔時の茎伸長は、*LsGA3ox1* がキー遺伝子となっていることが明らかになったため、 $GA3ox$ の作用阻害剤である植物成長調節剤「ビビフルフロアブル」および「プリモマックス」を高温抽苔条件下にあるレタスに処理したところ、連続処理およびスポット処理で茎伸長が抑制された。高濃度の連

続処理では、茎伸長抑制効果が大きいものの矮化程度も大きくなり、また品種によって最適濃度が異なる可能性が示された。実用的な農業利用を考えると異なる条件検討が必要であり、薬剤の効果が茎伸長抑制に特異的である必要があると思われるが、薬剤処理の結果は、本章で明らかにした生合成の分子メカニズムをもとに考えられる作用を再現したといえる。

第三章では、レタスにおいて抽苔を誘起する要因である花成に着目し、レタスの花成経路統合遺伝子の単離と解析を試みた。縮重プライマーの利用と RACE 法により、528 bp の *FT* 相同性遺伝子を同定し、*LsFT* と命名した。近年の全ゲノム重複に関する研究により、進化の過程で全ゲノムが重複した結果機能的に関連のある複数の遺伝子がゲノム上に存在していると考えられている。*FT* についても植物種により複数の分子種が存在することが報告されている (Igasaki et al., 2008; Kotoda et al., 2010; Oda et al., 2012)。本実験では、単離過程で Degenerate PCR, TAILPCR, RACE 法を行ったが、検出された塩基配列は一種類であった。類似配列が得られなかったこと、サザンハイブリダイゼーションの結果はシングルバンドの検出であったことから、*LsFT* はシングルコピーであると推論された。本遺伝子の機能解析のため、過剰発現させたシロイヌナズナの形質を調べたところ、形質転換体は野生型と比較して有意に花成が早まったことから、*LsFT* は *FT* と同様の作用を持つと推定された。レタスにおける発現解析により、*LsFT* は植物体内では最大葉で発現量が多く、明期開始直後と明期終前に発現量が増加する変動パターンを示すことが示された。また本遺伝子の発現量は、茎頂の花芽発達段階とよく一致した。これらの結果から、*LsFT* はレタス花成の誘導作用を持つと結論した。これまでにレタスにおける花成関連遺伝子の報告はなく、本章の実験結果を論文として公表した (Fukuda et al., 2011) ことは、レタス花成メカニズム解明へむけて意義あるものと考えられた。

第四章では、レタス花成機構解明の一環として、花成制御経路で作用してい

と思われる花成関連遺伝子のレタス相同性遺伝子の単離を行い、前章の *LsFT* とあわせて品種間差および栽培環境の違いによる遺伝子発現変動を解析した。花芽形成決定遺伝子のレタス相同性遺伝子、*LsAPIL* および *LsLFYL* を単離し、圃場栽培において抽苔が観察されたレタス品種の茎頂での発現を解析したところ、両遺伝子とも花芽形成期の茎頂において発現量が急激に上昇したことから、レタスの花芽形成においても花芽形成決定遺伝子が働いており、これにより茎頂が形態的に変化すると考えられた。また、*LsFT* の発現量を解析したところ、圃場で抽苔が観察された品種においては上述の花芽形成決定遺伝子の発現増加に先立って、葉における *LsFT* 発現量が増加することが明らかとなった。花成進行と関連した *LsFT* の発現増加が制御環境下だけでなく圃場条件下における花成においても検出されたことで、この遺伝子が異なる条件下での花成においても広く花成誘導に関与している可能性が示された。自律的経路上で作用していると考えられる *LsFVEL* は、*LsFT* と同様に、圃場栽培において抽苔が観察されたレタス品種において花芽形成決定遺伝子の発現増加に先立った発現増加がみられた。*LsFLDL* は、花芽形成決定遺伝子の発現増加と同じタイミングで発現が増加した。また、*LsLDL* は1品種で花芽形成決定遺伝子の発現増加と同じタイミングで発現が増加し、明確なピークがみられなかった1品種においても、抽苔がおこらなかった晩抽性品種・系統に比べて全体的に発現レベルが高い傾向を示した。これらの結果は、レタスにおける自律的経路の存在と、これに関連する遺伝子群がレタス花成に何らかの作用を持つ可能性を示した新規の報告(Fukuda et al., 2017)であり、当該遺伝子群のさらなる詳細解析によって、圃場条件下におけるレタス花成誘導および花成早晚性の品種間差の解明につながる知見の集積が期待できる。

本章ではまた、ここまでに単離した花成関連遺伝子の発現量を再度、制御環境下で抽苔を確認した品種・系統で解析した。早抽性結球性レタス品種では、

高温条件で抽苔が早く、低温区において花芽分化が認められ、花成の表現型と *LsFT* の発現動態はよく一致していたが、晩抽性育成系統では、早抽性結球性レタスから遅れて高温条件で花芽分化が認められたものの、*LsFT* の発現量に明確なピークはみられなかった。晩抽性育成系統はレタス近縁野生種との交雑後代であり、強度の晩抽性を有する。他のレタス品種とは異なる遺伝背景を持つ可能性が考えられるこの育成系統では、何らかのメカニズムにより *LsFT* の発現レベルが低く、それが強度の晩抽性形質に関与している可能性が考えられた。*LsFT* の発現様式の差異とレタス花成の早晩性との関連を詳細に解析することは、晩抽性の原因遺伝子の同定や晩抽性マーカー開発の基盤知見として貢献することが期待できる。圃場での栽培により抽苔が観察されたレタスにおいては、自律的経路上の遺伝子群が花成と協調して発現量が増加したが、制御環境下での栽培により花芽分化が確認されたレタスにおいては、当該遺伝子群の発現パターンが圃場実験と異なっていた。花成と自律的経路遺伝子の温度応答性の関係をみた例はこれまでにないが、*LsFVEL* と *LsLDL* については温度処理間で発現量が異なる傾向がみられたことから、両遺伝子が温度応答性を有することが示唆された。*LsFVEL* は早抽性結球性品種の高温区で花成と協調して発現量が増加し、*LsLDL* は早抽性結球性品種の両温度区で晩抽性育成系統の両温度区よりも発現量が多かったことから、制御環境下の花成ではこれらの遺伝子発現量が花成と協調することが考えられた。花成の制御因子の発現には、温度、日長や光強度、温度の日変化等の様々な環境要因が影響していると考えられ、露地圃場のような環境条件とチャンバーのような制御環境下ではこれらの要素が異なっており、各栽培条件下で観察される花成において、その誘導時の遺伝子発現様式は異なることが示唆された。高度に制御されている実験室条件と、様々な要因が変動する自然条件下では植物の表現型および様々な形質の分子的制御が異なる場合があることが報告されている(Malmberg et al., 2005;

Mishra et al., 2012; Weinig et al., 2002). 本実験結果は、このような Laboratory/field gap の一例であり、基礎研究成果を実用的技術開発に応用、発展させていくためには、制御環境条件下および圃場条件下で得られる情報による、植物の生理メカニズムの統合的理解が必要であることを示したといえる。

以上、本研究によってレタスの高温抽苔時におけるジベレリン動態の分子的メカニズムと、抽苔と花成に関わる遺伝子の働きの一端が明らかとなった。レタスにおいて初めて花成経路統合遺伝子を単離、同定し、自律的花成経路上の遺伝子群の関与を推定した。今後本研究で得られた知見が発展し、将来のレタスの安定生産技術開発に寄与することを期待したい。

摘要

本研究では、レタスの安定生産につながる栽培管理技術や効率的な品種開発に貢献するため、レタスの栽培で問題となる、抽苔の生理機構を解明することを目的に、抽苔時の植物ホルモン、ジベレリンの動態解析を行った。また、抽苔を誘起する要因である花成に関連する遺伝子群を同定し、抽苔と花成に関与する遺伝子の発現および遺伝子機能の解析を行った。

第一章

1. レタスにおける花芽分化の過程を明確にするために、レタスのモデル的品種‘リーフレタスグリーン’を用いて茎頂の花芽発達段階を定義した。
2. 本研究で供試した、抽苔特性が異なる品種、系統について圃場における栽培での花芽発達過程を調査し、茎頂の大きさには大きな品種間差がないことを明らかにした。

第二章

1. ジベレリン代謝を制御していると考えられる二原子酸素添加酵素群の酵素遺伝子のうち、レタス茎で主要に発現している分子種は、*LsGA20ox* では *LsGA20ox1*、*LsGA3ox* では *LsGA3ox1*、*LsGA2ox* では *LsGA2ox1* であることを明らかにした。これは、早抽性であるリーフレタス‘リーフレタスグリーン’と晩抽性である結球性レタス‘パトリオット’の両品種で同じ傾向であった。
2. 高温条件に移植することによって茎伸長が促進されているレタス茎の上部2 cmで、*LsGA3ox1* の発現量が劇的に増加した。増加の程度は‘リーフレタスグ

リーン’で多く，‘パトリオット’で少なかった．また‘リーフレタスグリーン’の *LsGA2ox1* は高温条件下で経時的に減少したが，‘パトリオット’の *LsGA2ox1* は経時的に増加した．これらの結果から抽苔特性の異なる品種間でジベレリン代謝に対する遺伝子レベルの応答性が異なる可能性が示された．

3. GC-MS を用いた解析により，本研究で供試したレタス品種において内生ジベレリンとして GA_{19} ， GA_{20} ， GA_1 が同定され，本研究で供試したレタス品種においては早期 13 位水酸化経路が主要な経路であると考えられた．

4. 高温条件に移植することによって茎伸長が促進されているレタス茎において，低温区において GA_{53} ， GA_{44} の内生量が多い傾向がみられた．‘リーフレタスグリーン’の GA_{19} 内生量は，高温区よりも低温区で多い傾向がみられたが，‘パトリオット’の GA_{19} 内生量は高温区で多い傾向がみられた．高温により引き起こされる反応段階の制御が抽苔特性の異なる 2 品種間で異なる可能性を示した．

5. ‘リーフレタスグリーン’において，高温区の茎上部 2 cm の GA_1 量は有意に増加した．‘パトリオット’高温区では増加程度はわずかであった．両品種の GA_8 の内生量は， GA_1 と同様の増減の動態を示した．これにより，高温条件下でのレタス茎伸長においては GA_1 内生量が増加し，この増加は茎頂の直下に位置する，急激に伸長している部位で起こっていることが明らかとなった．また‘パトリオット’では温度処理間での活性型 GA_1 量の差は‘リーフレタスグリーン’ほど明確ではなかった．前後の物質の内生量から，‘パトリオット’高温区においても代謝経路のフローは増加しているものと推察されたが，高温によるジベレリン内生量の増加程度は，早抽性品種ほど著しく晩抽性品種ほど

小さい可能性を示した。

6. 以上酵素遺伝子発現および内生量定量の結果から、高温により抽苔誘導がおこっているレタスの茎では、伸長の著しい茎頂直下の茎上部において *LsGA3ox1* の発現レベルの増加することによって内生の活性型ジベレリン GA_1 が増加し、茎伸長が促進されていると考えられた。

7. 抽苔誘導時の茎では *LsGA3ox1* の発現量が増加することが明らかになったため、*GA3ox* の作用阻害剤を高温条件下で栽培しているレタスに処理した。‘リーフレタスグリーン’においては、処理濃度に依存して茎伸長が抑制された。‘パトリオット’においては、低濃度処理では茎伸長が促進された。本剤は一般に低濃度では *GA2ox* を阻害し活性型ジベレリンを蓄積させることで伸長反応を促進することがある。伸長促進と抑制の境界の濃度は、品種間で異なると考えられた。両品種ともに、高濃度になるほど植物体全体の矮化が著しく、実用的な利用には形態変化への影響を加味した、より詳細な条件検討が必要であると考えられた。

8. 高温条件下で栽培している‘リーフレタスグリーン’への、*GA3ox* の作用阻害剤「ビビフルフロアブル」, 「プリモマックス」高濃度溶液のスポット処理は、薬剤の種類、濃度、処理タイミングによらず、無処理に比べて茎伸長を抑制した。しかしながら、同じ作用機作を持つ剤の同濃度処理でも効果の程度が異なったことから、本処理方法においても、形態変化を期待した使用には十分に注意が必要であると考えられた。

第三章

1. 多くの植物種で花成誘導因子“フロリゲン”の有力な候補と考えられている *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子のレタス相同性遺伝子, *LsFT* を単離した.
2. *LsFT* のエクソン配列長は既報の他の植物種のものと同様であり, 全長 cDNA はキクの *FT* と高い相同性を示した. 単離過程での塩基配列解析, サザンブロット解析により, *LsFT* はシングルコピーであると考えられた.
3. *LsFT* の過剰発現シロイヌナズナは, 野生型に比べて花成が早まる表現型を示したことから, *LsFT* は花成制御において *FT* 様の作用を持っていると考えられた.
4. 葉位別のサンプリング, 発現解析により, *LsFT* の発現は最大葉で最も多いことが明らかになった.
5. *LsFT* の発現は一日のうちで変動を示し, 明期開始直後および明期終了直前に増加するという動態を示した. 経時的な発現量変化は花芽発達段階とよく一致し, 花芽発達に伴い発現量が劇的に増加した.

第四章

1. 茎頂を花芽へと運命付ける, 花芽形成決定遺伝子 *APETALA1* (*API*), *LEAFY* (*LFY*) のレタス相同性遺伝子, *LsAPIL*, *LsLFYL* を単離した. 花成制御経路のひとつである自律的花成経路で作用していると考えられる遺伝子 *FVE*, *FLOWERING LOCUS D* (*FLD*), *LUMININDEPENDENS* (*LD*) のレタス相同性遺伝子, *LsFVEL*, *LsFLDL*, *LsLDL* を単離した.

2. 抽苔特性が異なるレタス品種・系統を露地圃場で栽培したところ、リーフレタスである‘リーフレタスグリーン’と、比較的早抽性である結球性レタス、‘テキサスグリーン’で抽苔が観察された。このとき茎頂における *LsAPIL*, *LsLFYL* の発現量は、実体顕微鏡下での観察による花芽発達段階が2以上になった時点で急激に増加した。これにより、レタス花芽形成においても花芽形成決定遺伝子が作用して茎頂が形態的に変化していることが示唆された。

3. 圃場での栽培において抽苔が確認された‘リーフレタスグリーン’および‘テキサスグリーン’では、花芽形成決定遺伝子の発現ピークに先立って *LsFT* の発現レベルの上昇がみられた。これにより、制御環境下での花成に加えて、環境要因の変動の大きい圃場条件下での花成においても *LsFT* が重要な役割を持っていることが明らかとなった。

4. 圃場での栽培において抽苔が確認された‘リーフレタスグリーン’および‘テキサスグリーン’において、*LsFVEL* は、*LsFT* と同様に花芽形成決定遺伝子の発現ピークに先立って発現レベルの上昇がみられた。*LsFLDL* は花芽形成決定遺伝子の発現増加と同じタイミングで発現が増加した。*LsLDL* は、‘テキサスグリーン’では明確なピークがみられなかったものの、‘リーフレタスグリーン’では花芽形成決定遺伝子の発現増加と同じタイミングで発現が増加した。いずれの遺伝子においても、花芽分化が確認されなかった晩抽性品種・系統では発現量は低いまま推移した。これにより、レタス花成における自律的経路の存在と、自律的経路遺伝子のレタス相同性遺伝子がレタス花成に何らかの関連を持つ可能性が明らかになった。

5. 結球性レタスのなかで比較的早抽性である‘テキサスグリーン’と、レタス近縁野生種との交雑後代である、強度の晩抽性を有する晩抽性育成系統を制御環境下で栽培したところ、両品種・系統で花芽分化が認められた。‘テキサスグリーン’の *LsFT* 発現動態は花成の表現型とよく一致していたが、晩抽性育成系統では *LsFT* の発現量に明確なピークはみられなかった。他のレタス品種とは異なる遺伝背景を持つと思われる育成系統において *LsFT* の発現レベルが低いことは、本系統が持つ強度の晩抽性形質に関与している可能性がある。

6. 制御環境下において花芽分化が確認された‘テキサスグリーン’および晩抽性育成系統では、自律的経路上の遺伝子群の発現パターンは圃場実験と異なっていた。花成の制御因子の発現には、温度、日長や光強度、温度の日変化等の様々な環境要因が影響していると考えられる。露地圃場のような環境条件とチャンバーのような制御環境下ではこれらの要素が異なっており、各栽培条件下で観察される花成において、その誘導時の遺伝子発現様式は異なることが示唆された。

引用文献

- Amasino, R., 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* 61, 1001–1013. doi:TPJ4148 [pii] 10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x
- Atherton, J. G., Craigon, J., Basher, E. A., 1990. Flowering and bolting in carrot. I. Juvenility, cardinal temperatures and thermal times for vernalization. *J. Hortic. Sci.* 65, 423–429. doi:10.1080/00221589.1990.11516075
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J. A., Ruiz-García, L., Martínez-Zapater, J. M., 2004. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet.* 36, 162–166. doi:10.1038/ng1295
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: A comparative view. *Ann. Bot.* doi:10.1093/aob/mcm146
- Berbel, A., Navarro, C., Fernández, C., Cañas, L. A., Madueño, F., Beltrán, J. P., 2001. Analysis of *PEAM4*, the pea *API* functional homologue, supports a model for *API*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant J.* 25, 441–451. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.00974.x
- Blanc, G., Wolfe, K. H., 2004. Widespread Paleopolyploidy in Model Plant Species Inferred from Age Distributions of Duplicate Genes. *The Plant Cell* 16, 1667–1678. doi:10.1105/tpc.021345
- Blázquez, M. A., 1998. Gibberellins Promote Flowering of Arabidopsis by Activating the *LEAFY* Promoter. *The Plant Cell* 10, 791–800. doi:10.1105/tpc.10.5.791
- Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I., Weigel, D., 1997. *LEAFY* expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* 124, 3835–3844.

- Chailakhyan, M. K. Krikorian, A. D., 1975. Forty Years of Research on the Hormonal Basis of Plant Development: Some Personal Reflections. *Botanical Review* 41, 1-29.
- Champigny, M. J., Sung, W. W., Catana, V., Salwan, R., Summers, P. S., Dudley, S. A., Provard, N. J., Cameron, R. K., Golding, G. B., Weretilnyk, E. A., 2013. RNA-Seq effectively monitors gene expression in *Eutrema salsugineum* plants growing in an extreme natural habitat and in controlled growth cabinet conditions. *BMC Genomics* 14, 578. doi:10.1186/1471-2164-14-578
- Chang, S. T., Chen, W. S., Koshioka, M., Mander, L. N., Huang, K. L., Du, B. S., 2001. Gibberellins in relation to flowering in *Polianthes tuberosa*. *Physiol. Plant.* 112, 429–432. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1120317.x
- Clough, S. J., Bent, A. F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Coles, J. P., Phillips, A. L., Croker, S. J., Garcia-Lepe, R., Lewis, M. J., Hedden, P., 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J.* 17, 547–556. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00410.x
- Corbesier, L., Coupland, G., 2006. The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* 57, 3395–3403. doi:10.1093/jxb/erl095
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T., Hedden, P., Fromm, H., Aloni, R., 2012. Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *The Plant Cell* 24, 66–79. doi:10.1105/tpc.111.093096

- Esumi, T., Hagihara, C., Kitamura, Y., Yamane, H., Tao, R., 2009. Identification of an FT ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). J. Hortic. Sci. Biotechnol. 84, 149–154. doi:10.1080/14620316.2009.11512496
- Evans, M. R., Wilkins, H. F., Hackett, W. P., 1992. Gibberellins and temperature influence long-day floral initiation in poinsettia. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117, 966–971.
- Fleet, C. M., 2003. Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* Confers Increased *ent*-Kaurene Production But No Increase in Bioactive Gibberellins. Plant Physiol. 132, 830–839. doi:10.1104/pp.103.021725
- Frankland, B., Wareing, P. F., 1960. Effect of Gibberellic Acid on Hypocotyl Growth of Lettuce Seedlings. Nature 185, 255–256. doi:10.1038/185255a0
- Fujiwara, S., Oda, A., Yoshida, R., Niinuma, K., Miyata, K., Tomozoe, Y., Tajima, T., Nakagawa, M., Hayashi, K., Coupland, G., Mizoguchi, T., 2008. Circadian Clock Proteins LHY and CCA1 Regulate SVP Protein Accumulation to Control Flowering in *Arabidopsis*. The Plant Cell 20, 2960–2971. doi:10.1105/tpc.108.061531
- Fukuda, M., Matsuo, S., Kikuchi, K., Kawazu, Y., Fujiyama, R., Honda, I., 2011. Isolation and functional characterization of the *FLOWERING LOCUS T* homolog, the *LsFT* gene, in lettuce. J. Plant Physiol. 168, 1602–1607. doi:10.1016/j.jplph.2011.02.004
- Fukuda, M., Matsuo, S., Kikuchi, K., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., Honda, I., 2009. The endogenous level of GA₁ is upregulated by high temperature during stem elongation in lettuce through *LsGA3ox1* expression. J. Plant Physiol. 166, 2077–2084. doi:10.1016/j.jplph.2009.06.003

- Fukuda, M., Yanai, Y., Nakano, Y., Sasaki, H., Uragami, A., Okada, K., 2017. Isolation and Gene Expression Analysis of Flowering-related Genes in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Hort. J. doi:10.2503/hortj.OKD-036
- Gaskin, P., MacMillan, J., 1991. GC-MS of the Gibberellins and Related Compounds: Methodology and a Library of Spectra. Cantock's Enterprises.
- Gregory, F. G., Hussey, G. G., 1953. PHOTOPERIODIC RESPONSES OF ARABIDOPSIS THALIANA. Proc. Linn. Soc. London 164, 137–139. doi:10.1111/j.1095-8312.1953.tb00676.x
- Griggs, D. L., Hedden, P., Temple-Smith, K. E., Rademacher, W., 1991. Inhibition of gibberellin 2Beta-hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. Phytochemistry 30, 2513–2517. doi:10.1016/0031-9422(91)85091-D
- Guevara, D. R., Champigny, M. J., Tattersall, A., Dedrick, J., Wong, C.E., Li, Y., Labbe, A., Ping, C. L., Wang, Y., Nuin, P., Golding, G. B., McCarry, B. E., Summers, P. S., Moffatt, B. A, Weretilnyk, E. A, 2012. Transcriptomic and metabolomic analysis of Yukon *Thellungiella* plants grown in cabinets and their natural habitat show phenotypic plasticity. BMC Plant Biol. 12, 175. doi:10.1186/1471-2229-12-175
- Guitton, B., Kelner, J. J., Celton, J. M., Sabau, X., Renou, J. P., Chagné, D., Costes, E., 2016. Analysis of transcripts differentially expressed between fruited and deflowered “Gala” adult trees: a contribution to biennial bearing understanding in apple. BMC Plant Biol. 16, 55. doi:10.1186/s12870-016-0739-y
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C., Lin, C., 1998. Regulation of Flowering Time by *Arabidopsis* Photoreceptors. Science 279, 1360–1363. doi:10.1242/dev.02340
- Gyllenstrand, N., Clapham, D., Kallman, T., Lagercrantz, U., 2007. A Norway Spruce *FLOWERING LOCUS T* Homolog Is Implicated in Control of Growth Rhythm in Conifers. Plant Physiol. 144, 248–257. doi:10.1104/pp.107.095802

- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E., Whitelam, G. C., 2003. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT*. *Plant J.* 33, 875–885. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01674.x
- Hanano, S., Goto, K., 2011. *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell* 23, 3172–84. doi:10.1105/tpc.111.088641
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., Coupland, G., 2007. A Circadian Rhythm Set by Dusk Determines the Expression of *FT* Homologs and the Short-Day Photoperiodic Flowering Response in *Pharbitis*. *The Plant Cell* 19, 2988–3000. doi:10.1105/tpc.107.052480
- He, Y., 2003. Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302, 1751–1754. doi:10.1126/science.1091109
- Heath, O. V. S., Hollies, M. A., 1965. Studies in the Physiology of the Onion Plant. *J. Exp. Bot.* 16, 128–144. doi:10.1007/BF03051081
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M. E., Ellis, N., Beltrán, J. P., Rameau, C., Weller, J. L., 2005. Conservation of *Arabidopsis* Flowering Genes in Model Legumes. *Plant Physiol.* 137, 1420–1434. doi:10.1104/pp.104.057018
- Hedden, P., Sponsel, V., 2015. A Century of Gibberellin Research. *J. Plant Growth Regul.* 34, 740–760. doi:10.1007/s00344-015-9546-1
- Hedden, P., Thomas, S. G., 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444, 11–25. doi:10.1042/BJ20120245
- Henderson, I. R., Liu, F., Drea, S., Simpson, G. G., Dean, C., 2005. An allelic series reveals essential roles for *FY* in plant development in addition to flowering-time control. *Development* 132, 3597–3607. doi:10.1242/dev.01924

- Hiraoka, T., 1967a. Ecological studies on the salad crops. I Effects of temperature, photoperiod and gibberellin spray on bolting, budding and flowering time of head lettuce (*Lactuca sativa* L. cultivar. Wayahead, Edogawa strain). Engei Gakkai zasshi 36, 70–78. doi:10.2503/jjshs.36.70
- Hiraoka, T., 1967b. Ecological studies on salad crops. II Effect of photoperiods on flower bud differentiation, bolting and heading in lettuce, with special reference to the difference of photoperiodic sensibility between varieties on various growing stages. Engei Gakkai zasshi 36, 411–420. doi:10.2503/jjshs.36.411
- Hisamatsu, T., 1999. Promotion of Flowering in Stock [*Matthiola incana* (L.) R. Br.] by Prohexadione-calcium in Plastic-calcium in Plastic-film Greenhouse Conditions. J. Japanese Soc. Hortic. Sci. 68, 540–545. doi:10.2503/jjshs.68.540
- Hisamatsu, T., King, R. W., 2008. The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and gibberellin. J. Exp. Bot. 59, 3821–3829. doi:10.1093/jxb/ern232
- Hisamatsu, T., Koshioka, M., Kubota, S., Fujime, Y., King, R. W., Mander, L. N., 2000. The role of gibberellin biosynthesis in the control of growth and flowering in *Matthiola incana*. Physiol. Plant. 109, 97–105. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.100114.x
- Hou, C. J., Yang, C. H., 2009. Functional Analysis of *FT* and *TFL1* Orthologs from Orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) that Regulate the Vegetative to Reproductive Transition. Plant Cell Physiol. 50, 1544–1557. doi:pcp099 [pii] 10.1093/pcp/pcp099
- Hsu, C. Y., 2006. Poplar *FT2* Shortens the Juvenile Phase and Promotes Seasonal Flowering. The Plant Cell 18, 1846–1861. doi:10.1105/tpc.106.041038

- Hsu, C. Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., Drnevich, J., Vandervelde, L., Ellis, J. D., Rice, B. M., Wickett, N., Gunter, L. E., Tuskan, G. A., Brunner, A. M., Page, G. P., Barakat, A., Carlson, J. E., DePamphilis, C. W., Luthe, D. S., Yuceer, C., 2011. *FLOWERING LOCUS T* duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10756–61. doi:10.1073/pnas.1104713108
- Hu, Q., Jin, Y., Shi, H., Yang, W., 2014. *GmFLD*, a soybean homolog of the autonomous pathway gene *FLOWERING LOCUS D*, promotes flowering in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 14, 263. doi:10.1186/s12870-014-0263-x
- Huang, S., Raman, A. S., Ream, J. E., Fujiwara, H., Cerny, R. E., Brown, S. M., 1998. Overexpression of 20-Oxidase Confers a Gibberellin-Overproduction Phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 773–781. doi:10.1104/pp.118.3.773
- Igasaki, T., Watanabe, Y., Nishiguchi, M., Kotoda, N., 2008. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* Family in Lombardy Poplar. *Plant Cell Physiol.* 49, 291–300. doi:10.1093/pcp/pcn010
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sentoku, N., Kitano, H., Matsuoka, M., Kobayashi, M., 2001. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 beta -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8909–8914. doi:10.1073/pnas.141239398
- Iwama, S., MotaiI, M., 1954. Ecological studies of vegetables in the regions of different altitudes. 7. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 22, 203–216. doi:10.2503/jjshs.22.203
- Iwami, N., 1958. Ecological studies of lettuce (I) Development of the floral organ. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 35–38. doi:10.2503/jjshs.28.35
- Izawa, T., 2015. Deciphering and prediction of plant dynamics under field conditions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 87–92. doi:10.1016/j.pbi.2015.02.003

- Kardailsky, I., 1999. Activation Tagging of the Floral Inducer *FT*. *Science* 286, 1962–1965. doi:10.1126/science.286.5446.1962
- Kim, H. J., Hyun, Y., Park, J. Y., Park, M. J., Park, M. K., Kim, M. D., Kim, H. J., Lee, M.H., Moon, J., Lee, I., Kim, J., 2004. A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 36, 167–171. doi:10.1038/ng1298
- King, R. W., Moritz, T., Evans, L. T., Martin, J., Andersen, C. H., Blundell, C., Kardailsky, I., Chandler, P. M., 2006. Regulation of Flowering in the Long-Day Grass *Lolium temulentum* by Gibberellins and the *FLOWERING LOCUS T* Gene. *Plant Physiol.* 141, 498–507. doi:10.1104/pp.106.076760
- Kobayashi, Y., 1999. A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* 286, 1960–1962. doi:10.1126/science.286.5446.1960
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J., Soppe, W., 1998. Genetic Control of Flowering Time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 345–370. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.345
- Koornneef, M., van der Veen, J. H., 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor. Appl. Genet.* 58, 257–263. doi:10.1007/BF00265176
- Kotoda, N., Hayashi, H., Suzuki, M., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Kidou, S. i., Igasaki, T., Nishiguchi, M., Yano, K., Shimizu, T., Takahashi, S., Iwanami, H., Moriya, S., Abe, K., 2010. Molecular Characterization of *FLOWERING LOCUS T*-Like Genes of Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiol.* 51, 561–575. doi:10.1093/pcp/pcq021
- Lebeda, A., Ryder, E. J., Grube, R., Dole_alová, I., K_ístková, E., 2006. Lettuce (*Asteraceae*; *Lactuca* spp.), in: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and

- Crop Improvement, Genetic Resources Chromosome Engineering & Crop Improvement. CRC Press, pp. 377–472. doi:10.1201/9781420009569.ch9
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M., Lee, I., 2000. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 14, 2366–2376. doi:10.1101/gad.813600
- Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N., Michaels, S. D., Weaver, L. M., John, M. C., Feldmann, K. A., Amasino, R. M., 1994. Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: A Gene Involved in the Control of Flowering Time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6, 75–83. doi:10.1105/tpc.6.1.75
- Li, L., Niki, T., Nishijima, T., Douzono, M., Koshioka, M., Hisamatsu, T., 2009. Roles of CmFL, CmAFL1, and CmSOCl in the transition from vegetative to reproductive growth in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 447–453.
- Li, X., Ramchiary, N., Dhandapani, V., Choi, S. R., Hur, Y., Nou, I. S., Yoon, M. K., Lim, Y. P., 2013. Quantitative trait loci mapping in *Brassica rapa* revealed the structural and functional conservation of genetic loci governing morphological and yield component traits in the A, B, and C subgenomes of *Brassica* species. *DNA Res.* 20, 1–16. doi:10.1093/dnares/dss029
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J. P., Eshed, Y., 2006. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6398–6403. doi:0601620103 [pii] 10.1073/pnas.0601620103

- Lockard, R. G., Grunwald, C., 1970. Grafting and Gibberellin Effects on the Growth of Tall and Dwarf Peas. *Plant Physiol.* 45, 160–162.
- MacMillan, J., 2001. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20, 387–442. doi:10.1007/s003440010038
- Malmberg, R. L., Held, S., Waits, A., Mauricio, R., 2005. Epistasis for fitness-related quantitative traits in *Arabidopsis thaliana* grown in the field and in the greenhouse. *Genetics* 171, 2013–2027. doi:10.1534/genetics.105.046078
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M. F., 1992. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360, 273–277. doi:10.1038/360273a0
- Mazier, M., Botton, E., Flamain, F., Bouchet, J. P. P., Courtial, B., Chupeau, M. C. C., Chupeau, Y., Maisonneuve, B., Lucas, H., 2007. Successful Gene Tagging in Lettuce Using the *Tnt1* Retrotransposon from Tobacco. *Plant Physiol.* 144, 18–31. doi:10.1104/pp.106.090365
- Michniewicz, M., Lang, A., 1962. Effect of nine different gibberellins on stem elongation and flower formation in cold-requiring and photoperiodic plants grown under non-inductive conditions. *Planta* 58, 549–563. doi:10.1007/BF01928367
- Mikel, M. A., 2007. Genealogy of Contemporary North American Lettuce. *HortScience* 42, 489–493.
- Mishra, Y., Johansson Jänkänpää, H., Kiss, A. Z., Funk, C., Schröder, W. P., Jansson, S., 2012. *Arabidopsis* plants grown in the field and climate chambers significantly differ in leaf morphology and photosystem components. *BMC Plant Biol.* 12, 6. doi:10.1186/1471-2229-12-6
- Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., Sun, T.P., 2006. Distinct and overlapping roles of two

- gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J.* 45, 804–818.
doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02642.x
- Moon, Y. H., Chen, L., Pan, R. L., Chang, H. S., Zhu, T., Maffeo, D. M., Sung, Z. R.,
2003. *EMF* Genes Maintain Vegetative Development by Repressing the Flower
Program in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15, 681–693. doi:10.1105/tpc.007831
- Nakaminami, K., Sawada, Y., Suzuki, M., Kenmoku, H., Kawaide, H., Mitsuhashi, W.,
Sassa, T., Inoue, Y., Kamiya, Y., Toyomasu, T., 2003. Deactivation of Gibberellin
by 2-Oxidation during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Biosci.*
Biotechnol. Biochem. 67, 1551–1558.
- Nakayama, I., Kamiya, Y., Kobayashi, M., Abe, H., Sakurai, A., 1990a. Effects of a
Plant-Growth Regulator, Prohexadione, on the Biosynthesis of Gibberellins in
Cell-Free Systems Derived from Immature Seeds. *Plant Cell Physiol.* 31, 1183–
1190.
- Nakayama, I., Miyazawa, T., Kobayashi, M., Kamiya, Y., Abe, H., Sakurai, A., 1990b.
Effects of a New Plant Growth Regulator Prohexadione Calcium (BX-112) on
Shoot Elongation Caused by Exogenously Applied Gibberellins in Rice (*Oryza*
sativa L.) Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31, 195–200.
- Niki, T., Nishijima, T., Nakayama, M., Hisamatsu, T., Oyama-Okubo, N., Yamazaki, H.,
Hedden, P., Lange, T., Mander, L.N., Koshioka, M., 2001. Production of Dwarf
Lettuce by Overexpressing a Pumpkin Gibberellin 20-Oxidase Gene. *Plant Physiol.*
126, 965–972. doi:10.1104/pp.126.3.965
- Nishijima, T., Katsura, N., 1989. A Modified Micro-Drop Bioassay Using Dwarf Rice
for Detection of Femtomol Quantities of Gibberellins. *Plant Cell Physiol.* 30, 623–
627.

- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., Araki, T., 2008. Long-distance, Graft-Transmissible Action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T Protein to Promote Flowering. *Plant Cell Physiol.* 49, 1645–58. doi:10.1093/pcp/pcn154
- Oda, A., Narumi, T., Li, T., Kando, T., Higuchi, Y., Sumitomo, K., Fukai, S., Hisamatsu, T., 2012. *CsFTL3*, a chrysanthemum *FLOWERING LOCUS T-like* gene, is a key regulator of photoperiodic flowering in chrysanthemums. *J. Exp. Bot.* 63, 1461–1477. doi:10.1093/jxb/err387
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I., Weigel, D., 1998. A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395, 561–566. doi:10.1038/26903
- Plackett, A. R. G., Powers, S. J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., Phillips, A.L., Wilson, Z. a., Thomas, S. G., Hedden, P., 2012. Analysis of the Developmental Roles of the *Arabidopsis* Gibberellin 20-Oxidases Demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the Dominant Paralogs. *The Plant Cell* 24, 941–60. doi:10.1105/tpc.111.095109
- Plessis, A., Hafemeister, C., Wilkins, O., Gonzaga, Z. J., Meyer, R. S., Pires, I., Müller, C., Septiningsih, E. M., Bonneau, R., Purugganan, M., 2015. Multiple abiotic stimuli are integrated in the regulation of rice gene expression under field conditions. *Elife* 4, 1–27. doi:10.7554/eLife.08411
- Proebsting, W. M., Hedden, P., Lewis, M. J., Croker, S. J., Proebsting, L. N., 1992. Gibberellin Concentration and Transport in Genetic Lines of Pea : Effects of Grafting. *Plant Physiol.* 100, 1354–1360. doi:10.1104/pp.100.3.1354
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G., 1995. The *CONSTANS* Gene of *Arabidopsis* Promotes Flowering and Encodes a Protein Showing Similarities to

Zinc Finger Transcription Factors. *Cell* 80, 847–857. doi:10.1016/0092-8674(95)90288-0

Rappaport, L., Wittwer, S. H., 1956. Night Temperature and Photoperiod Effects on Flowering of Leaf Lettuce. *Am. Soc. Hortic. Sci.* 68, 279–282.

Rebers, M., Kaneta, T., Kawaide, H., Yamaguchi, S., Yang, Y.-Y., Imai, R., Sekimoto, H., Kamiya, Y., 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant J.* 17, 241–250. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00366.x

Rédei, G. P., 1962. SUPERVITAL MUTANTS OF ARABIDOPSIS. *Genetics* 47, 443–60.

Rogers, S. O., Bendich, A. J., 1989. Extraction of DNA from plant tissues, in: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., Verma, D. P. S. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 73–83. doi:10.1007/978-94-009-0951-9_6

Rottmann, W. H., Meilan, R., Sheppard, L. A., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Cheng, S., Jouanin, L., Pilate, G., Strauss, S. H., 2000. Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J.* 22, 235–245. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00734.x

Ruiz-García, L., Madueno, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., Martínez-Zapater, J.M., 1997. Different Roles of Flowering-Time Genes in the Activation of Floral Initiation Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 9, 1921–1934. doi:10.1105/tpc.9.11.1921

Ryder, E. J., 1999. *Lettuce, Endive, and Chicory*, CABI Publishing Series. CABI Pub.

- Samach, A., 2000. Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613–1616.
doi:10.1126/science.288.5471.1613
- Sawada, Y., Katsumata, T., Kitamura, J., Kawaide, H., Nakajima, M., Asami, T., Nakaminami, K., Kurahashi, T., Mitsuhashi, W., Inoue, Y., Toyomasu, T., 2008. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. *J. Exp. Bot.* 59, 3383–3393. doi:10.1093/jxb/ern192
- Schwartz, C., Balasubramanian, S., Warthmann, N., Michael, T. P., Lempe, J., Sureshkumar, S., Kobayashi, Y., Maloof, J. N., Borevitz, J. O., Chory, J., Weigel, D., 2009. *Cis*-regulatory Changes at *FLOWERING LOCUS T* Mediate Natural Variation in Flowering Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 183, 723–732.
doi:10.1534/genetics.109.104984
- Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J. P., Bowman, J. L., Eshed, Y., Lifschitz, E., 2009. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8392–8397. doi:10.1073/pnas.0810810106
- Simpson, G. G., Dean, C., 2002. *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time. *Science*. 296, 285–289. doi:10.1126/science.296.5566.285
- Sun, X., Qin, Q., Zhang, J., Zhang, C., Zhou, M., Paek, K. Y., Cui, Y., 2012. Isolation and characterization of the *FVE* gene of a *Doritaenopsis* hybrid involved in the regulation of flowering. *Plant Growth Regul.* 68, 77–86. doi:10.1007/s10725-012-9695-1
- Takada, S., 2003. TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* Homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, Counteracts the Activation of *FLOWERING*

- LOCUS T* by CONSTANS in the Vascular Tissues of Leaves to Regulate Flowering Time. *The Plant Cell* 15, 2856–2865. doi:10.1105/tpc.016345
- Talon, M., Zeevaart, J. A., Gage, D. A., 1991. Identification of Gibberellins in Spinach and Effects of Light and Darkness on their Levels. *Plant Physiol.* 97, 1521–6. doi:10.1104/pp.97.4.1521
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., Shimamoto, K., 2007. Hd3a Protein Is a Mobile Flowering Signal in Rice. *Science* 316, 1033–1036. doi:10.1126/science.1141753
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tanaka-Ueguchib, M., Itoh, H., Oyama, N., Koshioka, M., Matsuoka, M., 1998. Over-expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase. *Plant J.* 15, 391–400. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00217.x
- Thompson, H. C., Knott, J. K., 1933. The Effect of Temperature and Photoperiod on the Growth of Lettuce. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 30, 507–509.
- Toyomasu, T., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Inoue, Y., Kamiya, Y., 1998. Phytochrome Regulates Gibberellin Biosynthesis during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiol.* 118, 1517–1523. doi:10.1104/pp.118.4.1517
- Toyomasu, T., Tsuji, H., Yamane, H., Nakayama, M., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Inoue, Y., 1993. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *J. Plant Growth Regul.* 12, 85–90. doi:10.1007/BF00193238

- Toyomasu, T., Yamane, H., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Inoue, Y., 1992. Control by light of hypocotyl elongation and levels of endogenous gibberellins in seedlings of *Lactuca sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 33, 695–701.
- Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M. V, Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K., Malnoy, M., Flachowsky, H., 2010. Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232, 1309–1324. doi:10.1007/s00425-010-1254-2
- Turck, F., Fornara, F., Coupland, G., 2008. Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 573–594. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755
- Valverde, F., 2004. Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science* 303, 1003–1006. doi:10.1126/science.1091761
- Van de Peer, Y., Fawcett, J. A., Proost, S., Sterck, L., Vandepoele, K., 2009. The flowering world: a tale of duplications. *Trends Plant Sci.* 14, 680–688. doi:10.1016/j.tplants.2009.09.001
- Vidal, A. M., Ben-Cheikh, W., Talón, M., García-Martínez, J. L., 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 217, 442–448. doi:10.1007/s00425-003-0999-2
- Wada, M., Cao, Q., Kotoda, N., Soejima, J., Masuda, T., 2002. Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Mol. Biol.* 49, 567–577. doi:10.1023/A:1015544207121
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M., 1992. *LEAFY* Controls Floral Meristem Identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843–859. doi:10.1016/0092-8674(92)90295-N

- Weinig, C., Ungerer, M. C., Dorn, L. A., Kane, N. C., Toyonaga, Y., Halldorsdottir, S. S., Mackay, T. F. C., Purugganan, M. D., Schmitt, J., 2002. Novel Loci Control Variation in Reproductive Timing in *Arabidopsis thaliana* in Natural Environments. *Genetics* 162, 1875–1884.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D., 2005. Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in *Arabidopsis*. *Science* 309, 1056–9. doi:10.1126/science.1114358
- Wittwer, S. H., Bukovac, M. J., Sell, H. M., Weller, L. E., 1957. SOME EFFECTS OF GIBBERELLIN ON FLOWERING AND FRUIT SETTING. *Plant Physiol.* 32, 39–41.
- Wittwer, S. H., Bukovac, M. J., 1957. Gibberellin Effects on Temperature and Photoperiodic Requirements for Flowering of Some Plants. *Science* 126, 30–31. doi:10.1126/science.126.3262.30
- Wu, K., Li, L., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., 1996. Molecular Cloning and Photoperiod-Regulated Expression of Gibberellin 20-Oxidase from the Long-Day Plant Spinach. *Plant Physiol.* 110, 547–554. doi:10.1104/pp.110.2.547
- Xu, Y. L., Gage, D. A., Zeevaart, J. A., 1997. Gibberellins and Stem Growth in *Arabidopsis thaliana*. Effects of Photoperiod on Expression of the *GA4* and *GA5* loci. *Plant Physiol.* 114, 1471–1476. doi:10.1104/pp.114.4.1471
- Yamaguchi, S., 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 225–251. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804
- Yamaguchi, S., Smith, M. W., Brown, R. G., Kamiya, Y., Sun, T., 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* 10, 2115–2126. doi:10.2307/3870788

Zeevaart, J. A., 2006. Florigen Coming of Age after 70 Years. *The Plant Cell* 18, 1783–1789. doi:18/8/1783 [pii] 10.1105/tpc.106.043513

Zeevaart, J. A., 1971. Effects of photoperiod on growth rate and endogenous gibberellins in the long-day rosette plant spinach. *Plant Physiol.* 47, 821–7. doi:10.1104/pp.47.6.821

中山包, 1962. チシャの抽苔におよぼすジベレリン噴霧処理の影響. *農業及園芸* 57, 877–878.

農林水産省, 2015. 農林水産統計情報.