

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
Туре	theses (doctoral)
File Information	Machiko_Fukuda.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

## 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

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 LsFT の単離と高温抽苔における発現解析	沂
3 - 1		
0 1	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・	65
3-2	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・ リーフレタス高温抽苔における	65
3-2	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 75
3-2	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 75
3-2 第四章	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 75
3-2 第四章 4-1	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 75 83
3-2 第四章 4-1 4-2	レタス花成経路統合遺伝子 LsFT の単離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 75 83

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	• •	95
-------	-------------------------	-----	----

### 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 ・ 107

総合考察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	116
摘要	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	122
引用文献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	128

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,サラダの主役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



## 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「〇〇(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.

3

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  $GA_{12}$ アルデヒドまでの生合成、(3)  $GA_{12}$  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二リン酸合成酵素(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  $GA_{12}$ 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  $GA_{12}$ 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; 20DD) が関与する。20DD 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. GA<sub>12</sub>は,続く代謝経路により活性型ジベレリンである GA<sub>4</sub>へと変換される. また, GA<sub>12</sub>は13位の水酸化酵素により GA<sub>53</sub>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. 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-オキソグルタ 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<sub>1</sub> 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 20DD 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

6

条件下の植物体に GA3 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GA3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(Loliun tenulentum)においては,外生の GA5 と GA6 は花 茎伸長なしに花芽分化のみを誘導し、GA1、GA3、GA4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,GA1に比べてGA4でそ の伸長効果が大きい(Xu et al., 1997). Polianthes theorosa においては、ジベレリ ンの花芽分化への効果はGA<sub>1</sub>が最も大きく,GA<sub>3</sub>,GA<sub>4</sub>と続く(Chang et al., 2001). ストックでは、GA4が開花と花茎伸長するのに対しGA1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)はホ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GA20ox が触媒する反応のうちGA53から GA19 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、GA19 から GA20 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 FLOWEIRNG 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SOC1 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

8



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(一)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に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が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 が可能となってきていることから、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2ODD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う一つの着眼点は、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

12

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,ナプラ,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℃(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℃(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 (LeicaMicrosystems, 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.



0, 栄養成長期

1, 膨大期

2, 頂花房形成期

3, 側花房形成期

### 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	Î
パトリオット	結球性	エンパイア	栽培品種	
晚抽性育成系統	結球性	近縁野生種	育成系統	<b>、</b> 晚抽性

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

(LeicaMicrosystems) 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

'リーフレタス	播種 移植 5/16 6/15 ▼ 育苗 ▼	(22) 7/7 ▽	(28) 7/13 ▽	(34) 7/19 ▽	(40) (44 7/25 7/2 ∇ ∇	4) 29		
グリーン' 'テキサス	▼ 育苗 ▼	(22) 7/7 ▽	(28) 7/13 ▽	(35) 7/20 ▽	(42) 7/27 ▽			
グリーン'	▼ 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GAIであると考えられる. 20DD 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, 20DD 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-オキソ 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<sub>1</sub> 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℃(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.以下 25/15℃区を低温区,35/25℃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砕した.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 濃度とクオリティーを測定した.

(2) qRT-PCR

First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)を用いて,1  $\mu$ 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.GAoxidase 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),  $0.5 \mu$  M フォワードプライマ -,  $0.5 \mu$  M リバースプライマー, 鋳型 DNA 1  $\mu$  L を含む 10  $\mu$  L 反応液中にお いて,94℃で 10 分を 1 サイクルの後,94℃で 10 秒,55℃で 30 秒,72℃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6cm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1cmであった

# 表 2-1. qRT-PCR に使用したプライマーセット

遣伝子		而2万川
LsGA20ox1	Forward	5'- TGAGTTCACTCAGAAGCATTAC -3'
	Reverse	5'- CTAGTTGACATTGATGGATGTG -3'
LsGA20ox2	Forward	5'- GAACTAGTGGACGAAAAGAAC -3'
	Reverse	5'- TCTGCTGAATCCAGTTGGTG -3'
LsGA20ox3	Forward	5'- TGACTCCCTTGCAGTGTGCA -3'
	Reverse	5'- GAGCTTCATTTATCAACCTCTG -3'
LsGA3ox1	Forward	5'- CGGTTGGGTGACAGTCCC -3'
	Reverse	5'- GATAAGCGACTGACAAGCGG -3'
LsGA3ox2	Forward	5'- CGTTTGTGTGCACCTATCACT -3'
	Reverse	5'- GAAATAATTAGATCCATAAACCTG -3'
LsGA3ox3	Forward	5'- TCATGGGTTCTTGTGTTGATG -3'
	Reverse	5'- AAGAGTTTGTGGGCAAGTAGT -3'
LsGA2ox1	Forward	5'- GAAGTTGGATGTCTGTTCCTG -3'
	Reverse	5'- ACCCTATGCTTTACACTCTTG -3'
LsGA2ox2	Forward	5'- TCAACATGAGACAGTACGAG -3'
	Reverse	5'- GATACTCGATCCATCCAACG -3'
Actin	forward	5'- AGGGCAGTGTTTCCTAGTATTGTTG -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℃,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,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 の分子種の特定

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LsGA20oox 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℃,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℃,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).



移植後週数(週)

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℃, 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. 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℃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2cm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,*LsGA20x1*,*LsGA30x1*, *LsGA20x1* 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 よびホ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 Tntl 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 LsGA2ox1 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 GA1, GA4, GA19, GA20 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7cm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 200g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回繰り返し、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、へ 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 30g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1ml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2mlの80%メタノールで溶出した.計3回行い,総量7mlとした.エ バポレーターを用い溶出液を乾固し、約1ml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2ml 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,センシュー科学,日本)を用い,カ ラム温度は 40℃とした.移動相は 1%酢酸を含む 30%メタノール溶液,液速は 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℃で24時間静置した.水洗いした後  $20 \mu$  g/ml ウニコナゾール P 溶液に浸漬 し、暗黒下 30℃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℃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℃で2日間生育させ、HPLC で得られた各分画を  $200 \mu 1 の 50% 7 セトンに溶解し、植物体 1 個体当たり 1 \mu 1 を子葉鞘と第 1 葉$ の間に点滴した.<math>30℃、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  $20 \mu 1 m \lambda$ ,  $80 \degree \degree \degree 30 \Im$ 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1ml・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℃で保ち,その後32℃・min-1で220℃ まで,続いて8℃・min-1で270℃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.凍結後粉砕し,凍結乾燥機により乾燥させた.0.05-0.2g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 Ing の [17, 17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] -GA<sub>1</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub> (Olchemim Ltd., Chech 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回繰り返し、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、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 GA<sub>1</sub>, GA<sub>20</sub>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、GA<sub>53</sub>、GA<sub>44</sub>、GA<sub>19</sub>は低温区で内生量が
多い傾向がみられた.GA<sub>19</sub>からGA2oxによって合成されるGA<sub>29</sub>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).

42

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 <sub>20</sub>	22-23	418(100), 403(18), 375(57), 359(14), 301(14)
	GA19	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 <sub>20</sub>	22-23	418(100), 403(18), 375(52), 359(16), 301(14)
	$GA_{19}$	24-25	434(100), 402(29), 375(43), 345(23)

表 2-2. GC/MS によるレタスのジベレリン同定

\*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<sub>29</sub>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<sub>29</sub>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<sub>20</sub>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<sub>20</sub>から合成される GA<sub>1</sub>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<sub>1</sub>が不活化した型である GA<sub>8</sub> 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<sub>20</sub>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<sub>1</sub>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<sub>8</sub>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<sub>20</sub>,GA<sub>1</sub>,GA<sub>8</sub>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<sub>1</sub>および GA<sub>8</sub>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 GA1, GA4, GA19, GA20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 GA4 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、GA1, 3epi-GA1, GA17, GA19, GA20, GA77 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 GA1, GA19, GA20 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

44



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).



移植後週数(週)

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, GA20ox 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、ホ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、GA20ox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2cm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 GA<sub>1</sub>の増加はみられなかったが、前駆物質である GA<sub>20</sub>、および GA<sub>1</sub>が 不活化された型のGAs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苦する際の 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 れまでに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,水稲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,GA3ox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GA3ox 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℃(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.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℃(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、GA<sub>3</sub>(ジベレリン協和粉剤、協和発酵バイオ、日本)およびGA<sub>4</sub>(Olchemim,Ltd.)含有量が1µg/mlとなるように溶液を調整し、これを100 ml/m<sup>2</sup>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、茎長を調査した.

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  $\mu$  g/ml, 100 $\mu$  g/ml, 1000 $\mu$  g/ml となるように溶液を調 整し, これを 100 ml/m<sup>2</sup> 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/m<sup>2</sup>、移植後 1週および2週は100 ml/m<sup>2</sup>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、GA<sub>3</sub>処理区では約15 cm となった. 一方、GA<sub>4</sub>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、GA<sub>3</sub>処理区で約11 cm であった (図2-9). GA<sub>4</sub>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5cm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50cm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1000µg/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 μ g/ml 処理区, 100 μ g/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 µ g/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2cm 未満となった.鉛直方向直径は移植後1週で約17cm 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6cm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、10µg/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 μ g/ml 処理区, 1000 μ g/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).





В

А



 $GA_3 \boxtimes$ 

図 2-10. ジベレリン (GA<sub>3</sub>) 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,薬剤処理を行い, '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 塩のレタス茎伸長に対する効果

25/15℃, 14 時間日長に設定したチャンバー内で3週間育苗した苗 を、25/15℃および35/25℃で生育させた.35/25℃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/m 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、 $10 \mu$  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.  $100 \mu$  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  $10 \mu$  g/ml 処理区と同様であった.  $1000 \mu$ 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、 $1000 \mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  g/ml 処理およ び 2000  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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).

56





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/m<sup>2</sup>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 2-14. 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/m<sup>2</sup>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/m<sup>2</sup>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.

59

#### 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 であるかどうかが決まっていると考えられている.コチョウノマイ

(*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 GA<sub>3</sub> と GA<sub>4</sub> で比較した場合,GA<sub>4</sub> 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 の数値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 µg/ml 処理区では、コントロールおよび 10 µg/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 μg/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 µg/ml から 1000 µg/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 µ 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 μ g/ml で茎伸長が促進さ れ, 100 μ 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.

62

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 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、GA4 は検出されなかったため、高温による LsGA3ox1 の発 現増加はGAI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、GA1 と GA20 の両方を基質とし、それぞれ GA8 と GA29 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、GA1からGA8への変換の減少を引き起こす場合と、GA20からGA29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<sub>1</sub>が増加すると予想される。本実験では、GA<sub>20</sub>の内生量は高 温区で若干多い傾向がみられたが、GA8の増減の動態がGA1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 と考察する.また、'パトリオット'においても、移植後1週のGA1量に有意 差がないものの, LsGA3ox1 の発現量および GA1 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、GA1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<sub>1</sub> は茎の上部で増加し、前駆体である GA<sub>20</sub> 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℃(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.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砕した.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,クオリティーをチェックした.

(2) cDNA 合成と PCR クローニング

(1) により得られた1  $\mu$ 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℃で 30 秒の加熱後、98℃で 10 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分 30 秒のサ イクルを 35 回行った後、72℃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 Purifucation 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 sequensing 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'-CTTCGGTTTAACCCCACTATTAAAGG-3'
LsFT transformation	forward	5'-AT <u>TCTAGA</u> ATGATGCCTAGGGAGAGGA-3'
	reverse	5'- <u>GAGCTC</u> TTATCTTCTTCGCCCACCAAAC-3'
Tubulin qRT-PCR	forward	5'-GGCAAAATGAGCACGAAAGAG-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 XbaI, SacI 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 $\mu$ g のゲノム DNA を *Eco*RV および *BgI*II 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ティング (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 XbaI および SacI 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 XbaI および SacI 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℃, 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 T<sub>2</sub>種子を用い、22℃,長日条件および 22℃,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 mrifolium 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ティ ングの結果, BGIII 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 µg) を BglII, EcoRV 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.

## A 長日条件







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℃長日条件下(A)および22℃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様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出し,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℃(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.以下35/25℃区 を高温区,25/15℃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で 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、



図 3-5. LsFT 発現解析に用いたレタスの生育状況

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, 25/15℃および 35/25℃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℃, 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℃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、茎の維管束を通って茎頂 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



# 移植後日数(日)

# 図 3-7. 最大葉における LsFT の発現変動

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,25/15℃および35/25℃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 濃度とクオリティーを測定した. (2) cDNA 合成と PCR クローニング

(1) により得られた 0.5  $\mu$ 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℃で 30 秒の加熱後, 98℃で 10 秒, 55℃で 30 秒, 72℃で 1 分 30 秒のサイクルを 35 回行った後, 72℃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 sequensing 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

84

	表 4-1. 遺伝子群の単離	, gRT-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'-GTGTTCTGCTCYTGTATGGCCTTTCC-3'
LsAP1L fragment (nested)	Forward	5'-GATTAACAGRCARGTWACTTTCTCRAAG-3'
<i>LsAP1L</i> 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'
<i>LsLFYL</i> qRT-PCR	Forward	5'-GCGAAAGAGAGGGTGAAAA -3'
	Reverse	5'-CGAAGCAACCTCATCAAGACA -3'
LsFVEL fragment	Forward	5'-GTBCCCRTTCTSTAHGACTGGC -3'
	Reverse	5'-CCCARATRTTCAARMVACCATC -3'
LsFVEL fragment (nested)	Reverse	5'-TRTTCAARMVACCATCYTCWGC -3'
LSFVEL RACE	Sense	5'-CGTTTGTTTGATCGTCGAAACCTTAC -3'
	Antisense	5'-ATCAGATCAGGACGCGACTCTGTG -3'
LsFVEL full-length cDNA	Forward	5'-AGAAAAACATAGGGCAGAGAGAGG -3'
	Reverse	5'-TAAATCATAATTGATGTATGATAATGAATC -3'
<i>LsFVEL</i> 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'-CGCATYTTTGCTTTYTGDATATCATC -3'
<i>LsLDL</i> qRT-PCR	Forward	5'-AGGAGTGGAGTGTGTGTTATGGA -3'
	Reverse	5'-CTTTGGGATTTGCTGGGATTTC -3'
LsFLDL fragment	Forward	5'-AYCARGAYGAYCCRTATGAYATGGG -3'
	Reverse	5'-YADYCTCWTBTCATCRCCHCCTC -3'
LsFLDL fragment (nested)	Reverse	5'-TGHTGRTTRAARTGWGAYTSDAGYTG -3'
<i>LsFLDL</i> qRT-PCR	Forward	5'-AACCTCAAATGCCCGAAGAA -3'
<i>LsFT</i> qRT-PCR	Forward	5'-CGATATACCAGCGACCACGGGAGCA-3'
	Reverse	5'-TGACGCCATCCAGGGGCATACACA-3'
<i>Tubulin</i> qRT-PCR	Forward	5'-GGCAAAATGAGCACGAAAGAG-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 may* 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 *LsAP1L* (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. *LsAP1L*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 *AP1*, ブラックコットンウッド AP1-like protein gene,シロイヌナズナ *AP1* 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



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*, BtAP1: 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*.



# 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*.



図 4-3. レタスにおける FVE 様遺伝子



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.

LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD	1 MAISNANHQIAIVPSNITTSIEGILESQKEILSKOICELGNIVSROCKLIGVNPLSQB 1 —MDARK——EDIEIGSSVESLMEILDSQKVERSQIDQEQUVAQCKLIGVNPLAQB 1 —MDAINEDESVEIGSSESSQKEIVSQKELFHSQIDQEQUITVIQCKLIGVNPLAQB 1 —MDINNEGESEEIGSSVESEQKEIDSQHELFHSQIDDEQUITVQCKLIGVNPLAQB 1 ——MDINNEGESEEIGSSVESEQKEIDSQHELFHSQIDDEQUITVQCKLIG	
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VVLD	1	
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	121 QRSRVREFIRLSREKZTQSSEQVQIQDE ESSSNVDTLNHEVPLNSVGPSSVDA 116 QKIRVRKQVRLSREKVVMSNIHALQDDGVEDNNATNHVEVPLNSVGPSSVDA 119 QRSRVRESVOLSREKVVSSNSGDEPHDC-QINSDEMREDNE PVLNSAGQSNDE 119 QRSRVRKAQLSREKZLKSNSGADSIDM-QINEDFWRDINE PLNSAGQSNDE 107 QRNRVRKVVRLSREKZINNAHKGSQDGVFITSDAMFVDDVPLNSVABNEVPNTVS- 119 QRSRVRKVVRLSREKZINNAHKGSQDGVFITSDAMFVDDVPLNSVABNEVPNTVS- 119 QRSRVRKVVRLSREKZINSQADSIDVGVEITSDAMFVDDVPLNSVABNEVPNTVS- 119 QRSRVRKVVRLSREKZINSQADSIDVGVEITSDAMFVDDVPLNSVABNEVPNTVS-	ЭЕ - Р
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	174 -PSCSTQDEVLPDTDDSDKYF IANIFSIMRKEETFSGQVKIMEWILQIQSESVIE 176 TVALIPEDTIEPDTS 172 -ASCSTQEVALPDLDDSDKYFVENIFSIIRKEETFSGQVKIMEWILQIQDASVI WFL 172 -ASCSTQEVALPDLDDSDKQFVENIFGIXQKEETFGGREKIMEWILTIQNESVIIWFL 172 -ASCFTQQTALEDLDEDRQFVENIFGIXQKEETFGGREKIMEWILTIGNESVIIWFL 166 NEAPINADDVLEGLDELDREFAFKIFDIIRKEETFSGQVKIMEWILQTGTP2VINWFL 173 VPSCSTQALALHELDDSDEVFIENIFTIMRKEETFSGQVEIMEWILQNONSSVIIWFL	N K L C K K
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	233 GGVMILASWLSQAAIEEQTSVLEVILEVLCHLPLHKALEAHMSAILQSVNKLRFYRVSI 236 GGVTILITTNLSQAASEEQTSVLLIIKVLCHLPLHKASEENMSAILQSVNGLRFYRTSI 231 GGMNLATWLSBAAAEEQTSVLLIIKVLCHLPLHKATEMHISAILQSVNKLRFYRTSI 231 GGMNLATWLSBAAAEEQTSVLLIIKVLCHLPLHKATEAHISAILQSVNKLRFYRTSI 226 GGVMILITWLSQAAAEEQTSVLLIIKVLCHLPLHKATEAHISAILQSVNKLRFYRTSI 233 GGVMILATWLSQAAAEEQTSVLLIVILKVLCHLPLHKATEAHISAILGSVNKLRFYRTSI 233 GGVMILATWLSQAAAEEQTSVLLIVILKVLCHLPLHKATEAHISAILHSVNCLRFYRTSI	
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	293 SNRAKSLLSIWSKMFARSQAMRKPNANISQVDAQNETILKQSIGEIMENESIHSRIENE 296 SNRAKGLLSIWSKMFARSQAMRKPNANISQTISQSLILKQSIAEIMGDSSN 291 SNRAKVLLSIWSKIFARNQVIKKPNOVKISITCH FMMISQSIGOFMCSESWHSNIIV 291 SNRAKVLLSIWSKIFIRNQAIKKPNOVKISITCH FMMISQSIGOFMCSESWHSNIIV 286 SNRAKVLLSIWSKMFARSQAIKKPNOIKSSTDA-QIMILKQSIDEIMCNESKQSDIGN 293 SNRAKVLLSIWSKMFARSQAIKKPNOIKSSTDA-QIMILKQSIDEIMCNESKQSDIGN 293 SNRAKVLLSIWSKMTARICFIKTSNSAKTSSDA-QIMILKQSIGEIMCDESWKSDINI	A Ja
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VVLD	353 AUSTLEN-SENSROGSIKLISSESDDSNUMILIKGVSSSHGRERRKVQLVEQPG 350 DIISLSNGKSENVERIESSGERKLILISADDSTKKHMLGSNESYNKERRKVQLVEQPG 351 DIIALSSEGENFRK4GSEGEKLLEFSIDDSNK4SSLGVSSSGERRKVQLVEQPG 349 DVIALSNEFSDERKIES-OSVKLIEFSIDDSNK4SSLGVSSSGERRKVQLVEQPG 345 GVIALSSESSENTRKIESSGALKLEFSIDDLSFKHILGASSSHRERRKVQLVEQPG 353 QALAPFODNSETVRKIEFIGALKLEFSIDTINKSIRGVSSSCIRERRKVQLVEQPG	医紧张子 紧紧
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	408 ACCREPOVILLETAQCELISADDIQKAKWRAQEVASKYGESYVCSHPHVKIDVERV 410 AACKSPOTVEICTSGRSREMSADDIQKAKWRALYMOSKNSKKDPLPSALGISKIVHEE 411 SVSRSQVERAGEVSGGREMSVDDIQKAKWRALEMOSKYGKSSSK-ESK-DIKILSIN 407 -VSRSPOTALIGEVTOSREMSIDDIQKAKWRALEMOSKYKKISSIKENG-DIKINSIS 405 TAGRSPOTALIGEVTOSREMSIDDIQKAKWRALEMONKIGKIGSSSKEMSTGANGCIN- 413 TAGRILOFCRAVEVSEGREMSADDIQKAKWRAQEMOSKYGKIGSSSKEMSHDANSICESS	7- 90
LsLDL AtLD GmLD MtLD PtLD VvLD	465      IMSATSSESSESKAHVHPKVEEHATSSS         470       LALHSAKDSPPIQNNEAK@EDEFVGSTVQPVNGFSTIQPVNGPSAVQPVNGPLAVQPVN         469       F	SIM NG

Α

図 4-4. レタスにおける LD 様遺伝子



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.

В

LSELDL	T	
OsFLD	1	DLNPHQIYRAGAPALPPPPATMSDQPPPYTPLPLLSSFPPNPY DQTPDPASTPTLVLPN
HvFLD	1	ASDQQPPSTLLPL-ASLPPNPNENPTPSPVPALHISA
AtFLD	1	MVS
P+FLD	1	
V-FT D	-	
VVELD	T	MSHIFPSAKSKRLNKSKPL-SCPIKKINGIIILNVWHAKLD
GmFLD	1	LQF-SSPQ-NPNENPNHNVFLDPTS
LSFLDL	1	
OsFLD	61	PAFENKRKETEFRR
HvFLD	37	LPSSKRKTTEFRR
At FLD	4	FSAR-KKRER SORSMSSUNSLEVENVGLIPGNSNEVSSSASSGRENVEVVN
DATED	-	
PUPLD	1	
VvFLD	41	GEASRW MERRER PRSAATFTPSQNQVFQIPHTSNGTINGN-NYLAGASSSTSFSKLSIE
GmFLD	28	DSIGRSQRNPASFRLPPLT
		-
LsFLDL	1	ND
OsFLD	90	SPSAQPPPRASAADDIIVINREPTAEPVTALTAGFPADSLIDEEIEAGVVSDVGGIEQVN
HVFT.D	57	S PA PH PPV PPSA ADDT TWTNE PPTAF AVTAL TAGEPA DST. TOFFTFAGWVSDVGG TFOVN
A FT D	57	
ACFLD	5/	GSNQIVKSIEGIGDITTIINKDATIIAADALIAGEPADSLIMETIFGWPIWGGTEQW
PtFLD	1	
VvFLD	100	NPTSSTAAVEDISDEIIVINKEATSEALIALSAGFPADSLTEEEIDAGVLSIIGGIEQVN
GmFT.D	68	TLPTAANPSPSASDET TETNKEPKTEAL TATTAGEPADST.TEEET DAAVLPVIGGTEOVN
0.002.22		
LSFLDI.	3	YTVVRNHTTSRØBANVHAØTSKGETKETVSNE ENHLTHSAYDETTENGYTMEGVS PURKE
Oart	150	VIT TOWNT T DODD TONISAT A KE SOA TT TER WORK TAN AW COLUSING TANDAY
OBILD	120	TILLIRNEL DI SWEDTENSWEAKD SHATLIFFE ODELLNAATSELV SEGETINE GVAPATKE
HvFLD	117	VILLENEL LT RORD TENSO AKE PEASLIEPHOEHULTSAYNELVSHGEVNEGVAPAIKE
AtFLD	117	YILIRNHIISKWRENISSWVTKEMFINSIPKHOSSLLDSAYNYLVTHGYINFGIAQAIKD
Pt.FT.D	1	BORNELSE SAYNERS AND A STREET AND A SAYNY AND A
V-FT D	1.60	VII TONUTTA VADENUS STAR ZENET COURSECUTE I DEAVNERUE UCVINESULA IVE
VVELD	100	TILLIKNET LAGWEENVOOW VAAENFIGOVEORULLIJUUSATINELVIEGIVINEGVADALKE
GmFLD	128	YTLIRNHI IAKWRENVSNWVSKKTELDYIHPHYHSLLUSAYNYIVSHEYINFEVASSIKE
LsFLDL	63	QMPDESTEGS-VIVIGAGLAGLAAARQLIAFGEKVIVLEGRNRFGGRVYTQKMGQCQ-NG
OsFLD	210	RIPKEETRHNIVIVVGAGLAGLAAAROLVAFGFKVVVLEGRKRCGGRVYTKKMEGCG
HVFT.D	177	R TPKEETRENDVTVVGAGLAGLAAARET TVSGEKVTVLEGRKROGGRVYTKKMEGOG
A PT D	177	
ACTLD	1//	AFFAQ30N33-VII VCAGL3GIAAARQJIKFGFAVI VLEGKARFGGRVII KAVEA AK
PtFLD	38	QFPQEDTKSN-VIVVGAGLAGISAARQLMRIGFKVTVLEGRKRAGGRVYTKRMEGGAGNR
VvFLD	220	KIPTEPSKON-VVVIGAGLAGIAAARQLMRFGYKVTVLEGRKRAGGRVYTKKMEGGNR
Gm FT.D	188	RVPAFASRPA-VTVVGAGLAGLAAAROLERFGFKVTVLFGRKRAGGRVYTKKMEGGNR
Onit 22	100	
LSFLDI.	121	NYAVVDLGGSV TGTHANPTGVLAROTSTPLHKVRDKCPLYDPBGKEVGKPTDSKVPFTP
OAFT D	267	D STACDU COSULTOTECNIDI CIUAZOL CE DUBUT DDZCDI VDDDCS IZADDZU DZZAZOTE
USILD	20/	Notice and the second s
HVFLD	234	RSAAADLGGSVLTGTSGNPLGIVAKQLGLPMHKIRDKCPLYRPDGSPVDPEVDKEVEGTY
AtFLD	233	VGAAADLGGSVLTGTLGNPLGIIARQLGSSLYKVRDKCPLYRVDGKFVDPDVDIKVEVAF
PtFLD	97	VSASVDLGGSVLTGTLGNPLGILAROLGYSMHKVRDKCPLYSVDGKPVDLDMDMKVETAF
VVFT.D	277	T-AAADLGGSVLTGTHGNPLGTVAROLGVHLHKVRDKCPLYSVDGKPVDPDMDLKVFADF
CWEED	245	
GMPLD	245	NOAAADLGGSVLIGILGNPILGIVARQLGELLHKVRDKCPLYOVNGNPVDPLNDWKVLSAP
T - 177 197	1.04	
LSELDL	191	KKINNAVYLLIK, QUNJCHINICHINICHINICHINICHINICHINICHINICHI
OsFLD	327	NKLLDKSSLLRASMGDVAMDVSLGAALETIROTDGDLSTDQDMNLFNWHLANLEYANAGL
HvFLD	294	NKFLDNASHMREKMGDVAMDISLGAALET <mark>LROSDGGISSEEDINLFNWHIANLEYANAGL</mark>
At FLD	293	NOLLDKA SKLROIMGDVSMDVSLGAALETEROMSONDMATERMCLENWHLANLE VAN AGT
D+ FT D	1 = 7	NDLIDKASPLOCIMCDUSWOUSLCAALETEDOWEDAUNUZEDINE ENDUGANTEVANACT
FUFLD	13/	NET TEN OF TRANSPORTED TO A TEN OF TE
VVFLD	336	NRLLLDKASKLRQLMGBVSVDVSLGAALETTERQVCGDAVNAEDIINLENWHLANLEYANAGL
GmFLD	305	NRLLDKASRLRQLMGEVSVDVSLGAALETFSQVYRDAVSDEEMNLFNWHLANLEYANAGL
LsFLDI.		
OSFT-D	387	I.SKI.SLAFWDODDPYDMGGDHCFI.PGGNGRI.VOALAFNVPTWYFRTVHTTPYCCDCVOV
Unitip	254	
HALTD	354	SSRISEARWDQDDEYDAGGDACELEGGAGKLVQALAENVELVYERTAHTTRYGGDGVQVV
AtFLD	353	VSKLSLAFWDQDDPYDMGGDHCFLPGGNGRLVQALAENVPILYEKTVQTIRYGSNGVKVT
PtFLD	217	LSKLSLAFWDQDDPYDMGGDHCFLPGGNGRLVQALAENVPILYEKTVHTWRYGSDGVBVI
VVFLD	396	LSKLSLAFWDODDPYDMGGDHCFLPGGNGRLVOWISENVPILYEKTVHTIRYGSDGVOVI
GmFT-D	365	LSNLSLAEWDODDPYDMGGDHCELPGGNGKLVOALSENVPTLYEKTVHMTRYSCDGVOVT
the second s	~~~~	

# 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 AP1, 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 µMフォワードプライマー,0.4µMリバースプライマ ー,鋳型 DNA 1µL を含む 10µL 反応液中において,94℃で10分を1サイク ルの後,94℃で10秒,55℃で30秒,72℃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℃であり、平年値(1981年から2010年 までの観測平均値)(21.3℃)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



月/日

# 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, LsAP1L

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.



移植後日数(日)

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).

102

## 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, LsAP1L

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 AP1 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). AP1 は長日条件下で花芽原基において 検出され(Wigge et al., 2005), AP1 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 AP1 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、LsAP1L*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*AP1* 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. コチョウラン 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.

106

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℃(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.以下 25/15℃区を低温区,35/25℃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℃, 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, 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 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 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



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℃, 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, 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

112



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℃, 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,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

114

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. 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 *LsGA20x1、LsGA30x1、LsGA20x1* が主要に発現しており、高温抽苔においては茎の上部において、*LsGA30x1* 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 GA19、GA20、GA1を同定し、茎の上部では GA1が、下部では GA20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量変化、すなわち活性 型ジベレリンの直前の前駆体である GA20 の増加,GA20 の不活化型である GA29 の減少,GA1の不活化型であるGA8の減少等は観察されず,GA8の物質量は GAI 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 が主動的に作用した 結果内生GA」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量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更 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

る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, LsAP1L 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。<br />
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晩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,

119

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、LsFLDL 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. 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

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
 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.

 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

 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<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>1</sub> 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<sub>53</sub>, GA<sub>44</sub>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<sub>19</sub>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<sub>19</sub>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<sub>1</sub> 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<sub>8</sub>の内生量は,GA<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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<sub>1</sub> 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 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GA1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

124

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類似しており,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

 
 主項を花芽へと運命付ける,花芽形成決定遺伝子 APETALA1 (AP1), LEAFY (LFY) のレタス相同性遺伝子,LsAP1L,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, FLOWERINGLOCUS 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 *LsAP1L, 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.

- 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., Feríndiz, C., Cañas, L. A., Madueño, F., Beltrán, J. P., 2001.
  Analysis of *PEAM4*, the pea *AP1* functional homologue, supports a model for *AP1*-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, Provart, 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 Agrobacteriummediated 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. Leafinduced 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 GA<sub>1</sub> 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, CmAFLl, 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 ofGrafting. 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. Overexpression 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. Overexpression 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.