HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホウレンソウの花芽形成・抽だいに関する研究
Author(s)	安部, 英里香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11814号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11814
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60924
Type	doctoral thesis
File Information	Erika_Abe.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ホウレンソウの花芽形成・抽だいに関する研究

北海道大学　大学院農学院

生物資源科学専攻　博士課程

安部　英里香

謝辞

本研究を遂行するにあたり，貴重なる御助言と，ご校閲を賜わりました大阪府立大学准教授　山口　夕博士に対し深く感謝申し上げます。また，博士前期課程において研究指導を賜わりました北海道大学大学院名誉教授　幸田　泰則博士に深く感謝申し上げます。

論文の作成にあたり、御助言とご校閲の労を賜った同大学大学院教授　増田　清博士ならびに近藤　則夫博士に厚くお礼申し上げます。

博士後期課程において、本研究ならびに本論文作成において数々のご指導を賜った本大学大学院准教授　藤野　介延博士に心より感謝申し上げます。

日夜共に研究活動に励み、数々のご協力を頂いた同講座の大学院生及び学生諸氏には感謝の意を表します。

最後に、著者の研究室生活を支えてくれた友人、家族、周りのすべての人に感謝致します。

本論文は、北海道大学大学院農学院生物資源科学専攻博士課程修了のために課せられた作物生理学を専門分野とする研究課題を論文として表したものです。

目次

略語表

第 1 章　諸言　1

第 2 章　研究史　4

2. 1　ホウレンソウの抽だいに関する研究

2. 2　作物の抽だいに関する研究

2. 3　高等植物の花芽形成に関する研究

2. 4　FT ホモログに関する研究

2. 5　花芽形成の光周期経路に関する研究

第 3 章　ホウレンソウ抽だい抑制物質単離の試み　10

3. 1　実験材料及び方法

3. 2　実験結果

3. 3　考察

第 4 章　花芽形成に関する遺伝子の単離　33

4. 1　実験材料及び方法

4. 2　実験結果

4. 3　考察

第 5 章　花芽形成関連遺伝子のホウレンソウホモログの発現様式解析　65

5. 1　実験材料及び方法

5. 2　実験結果

5. 3　考察

第 6 章　総合考察　83

適　　要　88

引用文献　91

略語表

SAM	茎頂分裂組織（shoot apical meristem）
FW	生重（fresh weight）
GA	ジベレリン（gibberellin）
JAMe	ジャスモン酸メチル（methyl jasmonate）
MeOH	メタノール（methanol）
EtOH	エタノール（ethanol）
EA	酢酸エチル（ethyl acetate）
HPLC	高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography）
MS 培地	Murashige & Skoog 培地
Tween20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
FD-MS	Field Desorption-Mass spectrometry
EI-MS	Electron Ionization-Mass spectrometry
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
NaCl	塩化ナトリウム (sodium chloride)
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
FT	FLOWERING LOCUS T
CO	CONSTANS
CDS	Coding Sequence
ZT	Zeitgeber Time

第 1 章　緒言

植物の一生は，発芽に始まり，栄養生長期を経て生殖成長へと移行し，種子形成を行うという生活環をとる。植物の生態型は，生殖成長への移行時期の違いから，一年生，冬一年生および多年生に分けられる。冬一年生植物では，一般的に 1 年目は栄養生長を行い，茎の節間が伸長せず詰まった，草丈の低い状態（ロゼット型）をとる。そして，冬の低温を経験し，2 年目の春の長日条件下で生殖生長に転じ，急激な茎の伸長（抽だい）を起こし開花に至る。冬一年生の生態型を持つ作物には，ダイコンを始めとするアブラナ科の植物や，タマネギ，ニンジン，テンサイ，ホウレンソウなどがある。冬一年生の作物を春に播種した場合，春先の低温や街灯などの夜間照明による過度の長日条件下にさらされることにより，ロゼット型が打破され，抽だいを開始することがある（不時抽だい)。冬一年生の作物の多くは，ロゼット型の時期の茎葉や根を利用することが多く，抽だいが生じると味や食感の劣化により農産物としての商品価値を失う。冬一年生作物の不時抽だいは農業上大きな問題になることから，栄養成長から生殖生長へ切り換わる制御機構の解明が求められている。

植物にとって，栄養成長から生殖成長への切り換え，つまり花を咲かせることは子孫を残すために，重要な機構である。そのため，日長や気温の変化などの環境要因と，植物ホルモン，概日リズムといった内生要因のバランスによって厳密に制御されている (テイツとザイガー, 2004)。植物の花芽形成・抽だいに関してはシロイヌナズナを始めとしたモデル植物における遺伝学的な研究が盛んに行われ，多くのことが解明され始めた (Zeevaart, 2008; Song et al., 2013)。しかし，植物の花芽形成は植物種によって独特の特徴を持っており，モデル植物において提唱されていることが当てはまらない場合もあるため (Ballerini and Kramer, 2011)，それぞれの植物における花芽形成・抽だいの研究を行うことが必

要とされている。

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. / 英名 : Spinach) は中央アジア原産のヒユ（アカザ）科の冬一年生植物である。栽培地は北部温帯地方に広く分布し，熱帯から寒冷地まで世界的に栽培されている葉菜である (藤枝, 1993)。日本人にとっても馴染み深く，日本の生産量は世界第 3 位である。ホウレンソウの品種は大きく東洋種と西洋種の 2 つに分けられる。原産地から中国へ伝わった東洋種が日本の在来種となった。一方で，ヨーロッパに伝わったものが西洋種である。一般に東洋種は葉が薄くて切れ込みが深く，株元が赤色であるのに対し，西洋種は葉が厚く切れ込みのない丸葉であり，株元の赤色が薄い。東洋種は暑さに弱く，日長が長くなると容易に抽だいする易抽性であるため，栽培期が秋から冬に限定される。西洋種は抽だいに長時間の日長を必要とする晩抽性である。食味や形態等の嗜好性から，日本人には東洋種の方が好まれる傾向にある。そこで現在は東洋種の食味の良さと西洋種の栽培のしやすさを兼ね備えた一代交雑品種が実用品種の多くを占めている (香川, 1974)。

ホウレンソウは長日植物であり，長日条件で抽だいが促進される。東洋系品種では 12 ~ 13 時間以上，西洋系品種では 14 ~ 16 時間日長下で，花芽分化・抽だいが促進される (香川, 1974)。そのため，春夏の長日期の栽培では，西洋系品種でさえも収穫サイズに達する前に抽だいが起きてしまうことがある。ホウレンソウは生育適温が 15 ~ 20℃と低く，高温下での生育は不安定である。北海道では冷涼な気候を生かして春に播種し夏に収穫する，夏どりホウレンソウの生産が盛んであるが，この作型では抽だいが頻繁にみられる。ホウレンソウの需要は通年であることから，春から夏に栽培する作型において，抽だいは収量を左右する問題となっている。

栽培地域によって抽だい性の異なる品種が定着したということは，日長や気

温による影響が大きいことを示している。しかし，品種間での日長感受性の違いによる抽だい性の違いや，抽だいを引き起こす主要因についてはまだ明らかになっていない。また，抽だいと花芽形成はほぼ同時に起こるが，関連性について明らかになっていない。本研究室ではアブラナ科の冬一年生植物ダイコンの抽だいを制御している，抽だい阻害物質 (Anti-Bolting Compound , ABC) を単離した (Yoshida et al., 2010)。アカザ科のホウレンソウの抽だい制御機構は不明であるが，ホウレンソウにも抽だいを制御している物質が存在している可能性がある。また，ホウレンソウの花芽形成に関しては分子生物学的研究の報告が少なく, ゲノム情報もその一部が 2014 年に公開されたばかりである (Dohm et al., 2014)。

そこで，ホウレンソウの花芽形成・抽だい制御機構解明に向けて，抽だいを抑制している物質の存在を明らかにすることと共に，花芽形成の分子生物学的研究を行うこととした。

第２章　研究史

2. 1　ホウレンソウの抽だいに関する研究

ホウレンソウ（*Spinacia oleracea* L.）はヒユ（アカザ）科の冬一年生植物で，冬の低温経験後，春の長日条件下で花芽形成・抽だいが引き起こされる。抽だいは，ある一定期間以上の低温とその後の長日条件によって促進されることから，温度と日長が主な環境要因であるとされている(Song et al., 2013)。ホウレンソウは街灯などの夜間照明による過度の長日条件下におかれることで抽だいが起きる (高尾　保之, 1998)。同じ冬一年生植物でもダイコン（*Raphanus sativus* L.）やテンサイ（*Beta vulgaris*）は，一定期間の低温経験がなければ，長日条件下で栽培しても抽だいしにくい。ホウレンソウは低温よりも日長による制御が強いとされ，日長制御についての報告が多い (高尾, 1998, 2006)。 ホウレンソウの抽だい性の異なる品種を使い，夜間照明による影響を調べると，品種に関係なく，花芽形成・抽だいまでの日数は夜間照明の照度を高くするほど短くなることが報告されている (高尾, 1998)。晩抽性品種では，花芽形成・抽だい開始に必要な夜間照明の照度が易抽性品種と比較して高くなった (高尾, 2006)。

抽だいの内生要因としては，細胞伸長を促進する植物ホルモンの一つ，ジベレリンが重要な役割を果たしていると考えられている (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009)。ホウレンソウの抽だいにおいても，内生ジベレリン量の関連性が報告されている (Zeevaart, 1971; Metzger and Zeevaart, 1982; Zeevaart and Gage, 1993)。内生ジベレリン量は，短日条件下から長日条件下へ移すと，茎頂部で増加した (Zeevaart and Gage, 1993)。ジベレリンは，茎頂部において，茎伸長時に起こる細胞伸長だけではなく，細胞分裂も促進する (テイツとザイガー, 2004)。さらに, ジベレリン合成経路の第一段階である *ent*-カウレンの合成も日長により制御され, 長日条件で増加することが報告されている (Zeevaart and Gage, 1993)。

また，長日条件下で育成したホウレンソウに，ジベレン合成阻害物質を与えると，茎伸長が抑制される (Zeevaart, 1971)。それに対し，活性型ジベレリン GA_1 を短日条件下で育成したホウレンソウに与えると，茎伸長が促進される (Zeevaart et al., 1993)。ジベレリンやその前駆体の量的変動だけではなく，ジベレリン合成に関する遺伝子も単離され，その発現様式と日長に関する研究も行われた (Wu et al., 1996; Lee and Zeevaart, 2002, 2005, 2007)。活性型ジベレリンの生合成酵素 GA 20-oxidase をコードする *GA20ox1* 遺伝子の発現量は, 短日条件下よりも長日条件下で育成した時の方が高い (Wu et al., 1996)。短日から長日条件下へと日長変化させると，茎頂や葉柄で著しく増加した。茎頂において GA20ox1 は，タンパク質レベルでも蓄積が確認されている (Lee and Zeevaart, 2007)。一方で, 活性型ジベレリンの不活性化酵素 GA 2-oxidase をコードする *GA2ox1* 遺伝子は短日条件下から長日条件下へ移行すると，茎頂において発現量が減少した (Lee and Zeevaart, 2005)。

2. 2　作物の抽だいに関する研究

ホウレンソウ以外の作物でも，抽だいとジベレリンとの関係が研究されている (Mutasa-Gottgens et al., 2009, 2010)。ダイコンでは，活性型ジベレリン量は，抽だいを誘導するための低温処理前後において茎ではほとんど変わらなかった (Nakayama et al., 1995)。 しかし，低温処理後に長日条件下に移行させると，劇的に上昇した。ジベレリン量は低温処理よりも長日により誘導されたことから，低温処理は，ダイコン茎のジベレリンへの感受性に影響を与えると考えられた。

抽だいを抑制する因子についての研究では，ジベレリン生合成阻害剤が抽だいを抑えるという報告がある (Zeevaart, 1971)。植物ホルモンのジャスモン酸がテンサイの抽だいを阻害するという報告があるが，テンサイ植物中にはそれを

十分に説明できるほどの内生ジャスモン酸量は存在していなかった (Koda et al. 2001)。ダイコンにおいては，短期間で抽だい阻害活性を検出する生物検定法を確立し，ダイコン地上部の抽出物に抽だい阻害物質が存在していることが明らかとなった (Yoshida et al., 2010)。

2. 3　高等植物の花芽形成に関する研究

抽だいと同様に花芽形成は温度と日長の環境条件によって正負に制御されている。接ぎ木実験の結果より，葉で作られた後，篩管を通じて茎頂へ運ばれ，茎頂で花芽形成を誘導する物質＜花芽形成促進因子フロリゲン＞の存在が提唱された。その後，何十年もの間フロリゲンの同定を試みる研究がなされてきた (Zeevaart, 2008)。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の分子遺伝学的研究より，花芽形成を促進する遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) が単離され (Kobayashi et al., 1999)，イネの *FT* ホモログ *Heading date3a* (*Hd3a*) の研究より，花成誘導条件である短日条件下の葉で *Hd3a* mRNA 量が増加し，翻訳産物が維管束篩部を通って茎頂分裂組織 (shoot apical meristem, SAM) に運ばれ，花芽形成を促進することが報告された (Tamaki et al., 2007)。この報告を始めとして，FT タンパク質が輸送されることを支持する報告が相次ぎ，*FT* ホモログの翻訳産物こそがフロリゲンの正体であることが明らかにされた (Zeevaart, 2008)。

花芽形成は，光周期経路，低温経験による春化依存経路，ジベレリン依存経路，そして齢などによる自律的経路の主な 4 つの経路が複雑に絡み合い正負の制御を行っている。そして，これら経路は統合的にに FT を制御する (Song et al., 2013)。正負の制御因子によって，厳密に発現が制御された *FT* は，葉の維管束篩部で発現し，翻訳産物が SAM へと運ばれる (Zeevaart, 2008)。SAM において，FT は 14−3−3 タンパク質を介して (辻，2013)，bZIP 型転写因子である

FLOWERING LOCUS D (FD) と複合体を形成する。この複合体が花芽分裂決定遺伝子 *APETALA1* のプロモーター領域に直接結合し，転写を活性化することで花芽形成が起きる (Abe et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005)。

2. 4　FT ホモログに関する研究

FT タンパク質は，動物で最初に発見されたホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質（PEBP）と類似した構造を持つ。PEBP ファミリーは多くの生物に普遍的に存在し (平岡ら, 2008)，リン脂質の一種であるホスファチジルエタノールアミンと結合する。分子量 20,000 の小さな球状タンパク質で，ホスファチジルエタノールアミンのリン酸基の部分が結合するアニオン結合ポケット領域とよばれる小さなくぼみをもつ。植物においての PEBP ファミリーは，FT グループ，CEN/TFL グループ，MFT グループの 3 つに大きく分けられる (Ballerini and Kramer, 2011)。シロイヌナズナでは FT タンパク質が花芽形成を誘導するのに対し，CEN/TFL グループに属する TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) は花芽形成を抑制する (Kobayashi et al., 1999)。多くの植物において，FT タンパク質及びその花芽形成制御機能は保存されている。しかし，同じ FT グループタンパク質でも新たな機能を持つ報告がある (Ballerini and Kramer, 2011)。テンサイ（*Beta vulgaris*）には FT ホモログが 2 つ存在し，それらの配列は非常に高い相同性を示すが，拮抗的な機能を持つ (Pin et al., 2010)。BvFT2 は花芽形成促進因子として働き，BvFT1 は抑制因子として働く。木本植物のポプラ（*Populus trichocarpa*）にも 2 つの FT ホモログが存在し，PtFT1 は一定期間の低温により誘導され，花成誘導因子として働く。一方で，PtFT2 は日長に強く制御され，栄養成長期の芽の休眠調節に関わる。トマト（*Solanum lycopersicum*）の FT ホモログ，*SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* 遺伝子は花成だけではなく，葉の形態を含めた一般的な

形態形成制御遺伝子として機能し, *SFT* 遺伝子の発現量が果実収量にも重要であることが報告されている (Ballerini and Kramer, 2011)。さらに，花芽形成促進とは異なる機能を持つ FT には, 転写活性に重要な領域で置換が生じている (辻ら, 2013)。

2. 5　花芽形成の光周期経路に関する研究

光周期経路には概日時計によって制御されている *CONSTANS* (*CO*) 遺伝子が存在する。*CO* は日長に応答し，*FT* 遺伝子の制御を行い，花芽形成を誘導する。長日植物のシロイヌナズナでは，日長が長くなると発現量が増え，*FT* 遺伝子の転写活性を直接正に制御し，花芽形成を促進することができる。短日植物のイネでは， *CO* ホモログ，*Heading date 1* (*Hd1*) 遺伝子は，日長による発現様式に違いはなく，制御経路の上流に位置する *OsGIGANTEA* からシグナルを受け，長日条件下では *Hd3a* 遺伝子の発現を抑制する方向に働き, 短日条件下では誘導する方向に働くことで花芽形成を制御している (Song et al., 2013)。 CO に似たタンパク質は植物のゲノム上に複数存在し，CONSTANS-like (COL) ファミリーを形成している。COL ファミリーは植物に特有の B-Box ジンクフィンガー型転写因子であり，N 末端領域に 1 つもしくは 2 つの B−Box ドメインを持ち，C 末端領域に CCT ドメインを持つ (Ballerini and Kramer, 2011)。ジンクフィンガータンパク質とは亜鉛イオンを配位することで特定の構造をとり，DNA や RNA，タンパク質と相互作用を示すタンパク質のことである。B-Box ドメインはジンクフィンガードメインの 1 種であり，タンパク質相互作用に関連しているとされている (Gangappa and Botto, 2014)。シロイヌナズナでは，CO は coiled-coil を含むタンパク質 CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1)と相互作用し，*FT* の転写を調節する。CCT ドメインは *FT* のプロモーター領域の結合部位となって

おり，転写活性化に重要なドメインとなっている。CO が FT を制御する機構はポプラでも報告があり，多くの植物で存在する可能性がある。しかし，中性植物のトマトにおいて CO ホモログは見つかっておらず，アサガオ（*Ipomoea nil*）やエンドウ（*Pisum sativum* L.）においてもその機構は保存されていない (Ballerini and Kramer, 2011)。

シロイヌナズナでは，光周期経路とジベレリン依存経路が相互作用を示すことも知られている (Song et al., 2013)。ジベレリン合成経路において，活性型 GA を生合成する酵素 GA 20-oxidase と GA 3-oxidase をコードする *GA20ox* と *GA3ox*, 活性型 GA を不活化する酵素 GA 2-oxidase をコードする *GA2ox* が存在し，これらの遺伝子発現が活性型ジベレリン量の調節を行っている。MYB 型転写因子 ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1) は *GA20ox* の発現を正に制御する。さらに AS1 は CO タンパク質と複合体を形成し，*FT* プロモーターに結合して *FT* の発現を制御する。AS1 は活性型 GA 量の増加と，*FT* 転写活性能を持つ CO タンパク質を増加させることで，花芽形成を促進している。TEMPRANILLO 1 (TEM1) と TEMPRANILLO 2 (TEM2) は *FT* の発現を直接抑制する。TEM タンパク質は光シグナルと概日時計によって, CO タンパク質とのバランスを保っている。CO/TEM のバランスが CO に傾くと, *FT* 転写が促進され, 花芽形成が誘導される。 TEM1 と TEM2 は *GA20ox1*, *GA3ox1* と *GA3ox2* の遺伝子発現も抑制し，*GA3ox1* ならびに *GA3ox2* に関してはプロモーター領域に直接結合する。つまり，AS1 と TEM は葉の篩部での活性型ジベレリンを制御することで，*FT* の発現制御を行っているだけではなく，光周期経路の CO とも深く関係している (Song et al., 2013)。

第 3 章 ホウレンソウ抽だい抑制物質単離の試み

植物の生長機構が正負に制御されているように，抽だいも正負の因子によって制御されていると思われる。ホウレンソウの抽だいを正に制御する物質としてジベレリンが挙げられるが，負の制御因子として，抽だいを抑制する低分子化合物が存在する可能性を考えた。ホウレンソウ幼植物体を用いた抽だい抑制活性検定法を考案し，この方法を用い，晩抽性品種のホウレンソウ地上部のエタノール抽出物から，抽だい抑制物質の純化を試みた。

3.1　実験材料及び方法

3. 1. 1　ホウレンソウの圃場栽培

晩抽性品種アクティオン（サカタのタネ）を抽出材料に供した。抽だいが起こらない短日条件下の 8 月中旬から北海道大学北方生物圏フィールド科学センター農場に播種し，適宜，間引きを行いながら慣行法に従って栽培した。ロゼット型を保った植物体 4 kg を 9 月下旬に収穫し，最終濃度が約 80%になるようにエタノールに浸漬し，室温，暗所にて 2 週間静置後，抽出を行った。

3. 1. 2　ホウレンソウの無菌培養法及び抽だい抑制活性検出法

（1）ホウレンソウの無菌培養法

本実験における無菌培養では，基本培地として MS 培地を用いた(Murashige と Skoog, 1962)（表 1)。無菌培養及び生物検定には Fe を除く無機塩類の濃度を

半量とした 1/2 MS 培地を使用した。培地に対し，0.6%の植物用寒天（和光純薬工業）を加え，完全に溶解し，コニカルフラスコ等に分注した後，オートクレーブ(121℃，7 分間) で滅菌した。

ホウレンソウ易抽性品種リード（サカタのタネ）の種子を 1 時間~1 時間半水に浸漬し十分に吸水させ，硬い果皮を柔らかくした。その後手で果皮を剝き，乾燥させた。果皮を除去した種子を 70% エタノールに 1 分間漬けた後，Tween20 を数滴添加した 10% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 20 分間表面殺菌を行った。その際，5 分間超音波処理をし，殺菌溶液をしみ渡らせた。その後クリーンベンチ内で滅菌水にて十分に洗浄し，滅菌した濾紙上で水分を切り，1/2 MS 培地 50 ml の入った 300 ml 容カルチャーボトルに 20~25 粒ずつ播種した。25℃，16 時間日長の条件で 1 週間発芽させ，幼植物体を得た。

（2）抽だい抑制活性の生物検定法

播種から 1 週間後，生育段階が同程度の幼植物体を選択し，根と子葉上部を切除した。根の切除は，培地に添加した物質の取り込みを促進するために行った。また，ホウレンソウの生長に伴いコニカルフラスコ内で植物体の子葉同士がぶつかり合うことを防ぐため子葉上部を切除した。得られた植物体を 4 個ずつ 1/2 MS 培地 20 ml の入った 100 ml 容コニカルフラスコに垂直に立てて移植した。 ホウレンソウの抽出物からの抽だい抑制物質純化の各分離段階において，それぞれの分画に含まれる抽だい抑制活性分画を生物検定法で検出し，活性物質の分離を進めた。各分離段階での抽出物は 100 ml 容コニカルフラスコに直接添加し，湯煎にて溶媒を揮発させた後，20 ml ずつ培地を分注し，オートクレーブを行った。生物検定の有効性を確認するために，ジャスモン酸メチル

	mg/L
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2・2H_2O$	440
$MgSO_4・7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4・4H_2O$	22.3
$ZnSO_4・7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4・2H_2O$	0.25
$CuSO_4・5H_2O$	0.025
$CoCl_2・6H_2O$	0.025
$FeSO_4・7H_2O$	27.85
NA_2-EDTA	37.25
Inositol	100
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxin-HCl	0.5
Sucrose	30000

1 M NaOH で pH 5.8 に調整

表 3. 1　Murashige and Skoog (MS) 培地の組成

を使用した。メタノールに溶解したジャスモン酸メチルを最終濃度 3×10^{-5} M になるように濾紙片に塗布し自然乾燥させ，これをコニカルフラスコにいれ，その後培地を分注した。培養は，25℃，16 時間日長で行った。2 週間後に観察を行い，子葉節から上の節間数と茎伸長を測定し，節間長平均値を算出した。この値を抽だい抑制活性の指標とした（図 3.1）。

3. 1. 3　溶媒分画法

3. 1. 1 より得られたホウレンソウエタノール抽出液はロータリーエバポレーター（ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N SERIES, EYLA）を用いて減圧濃縮した。これを分液ロートを用いて等量の酢酸エチルにて 3 回，順次，分配抽出した。それぞれの分画は濃縮した後に，酢酸エチル分画は酢酸エチルに，水分画は純水に溶かし，-30℃で冷凍保存した。

3. 1. 4　シリカゲルカラムクロマトグラフィー

3. 1. 3 で得られた酢酸エチル分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりさらに分離した。酢酸エチル分画はロータリーエバポレーターで溶媒を完全に除去した後に，トルエンに再溶し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。シリカゲル（Wakogel C-300 カラムクロマトグラフ用, 和光純薬工業）は，試料の乾重の 20 倍量使用し，初期溶媒であるトルエンを加えて膨潤させ，カラム管に充填した。担体を初期溶媒で洗浄した後，試料を投入し，カラム容量の 5 倍量の溶出溶媒で段階溶出を行った。溶出溶媒は，流した順に，トルエン，酢酸エチル 10%（酢酸エチル /トルエン，v/v），酢酸エチル 40%（酢酸エチル /トルエン，v/v），酢酸エチル 80%（酢酸エチル /トルエン，v/v），メタノールを用いた。それぞれの分画を回収し，ロータリーエバポレーターで減圧濃

縮し溶媒を除去した後，少量の酢酸エチルまたはメタノールに溶解して-30℃で冷凍保存した。

3. 1. 5　固相抽出

3. 1. 4 で得られた活性画分をさらに Sep - Pak C_{18} vac 35cc （Waters）にて分離した。Sep - Pak C_{18} vac 35cc は予めカラム容量の 2 倍量のメタノール, 純水, 70% メタノールの順に洗浄した。ロータリーエバポレーターにて減圧濃縮し，溶媒を除去した試料に 70% メタノールを加えた。超音波処理を行い充分に溶解させた後にカートリッジカラムに供し，カラム容量の 2 倍量の溶出溶媒にて段階溶出した。溶出溶媒は流した順に 70% メタノール，90% メタノール，メタノールを用いた。得られた各分画はロータリーエバポレーターで濃縮乾固し，少量のメタノールに溶解して-30℃で冷凍保存した。

3. 1. 6　高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分取・精製

3. 1. 5 で得られた活性分画をセミ分取用カラム（Prep Nova-Pak HRC_{18} 25 ×100 mm, Waters）を用いて HPLC に供し，記録計に示される 210 nm の吸光ピークを指標に分取した。展開溶媒は 95 % メタノール / 水 （0.1 % 酢酸），流速は 4.0 ml/min の分離条件で行った。得られた各分画はロータリーエバポレーターにて濃縮乾固し，少量のメタノールに溶解して-30℃で冷凍保存した。

セミ分取用カラムにより得られた活性画分を更に分析用カラム（Radial Pak Cartridge Nova-Pak C_{18}, 4.6 × 250 mm, Waters）を用いて HPLC に供し，不純物を除去した。展開溶媒は 85% アセトニトリル / 水 （0.1% 酢酸），流速は 1.0 ml/min の条件で行った。その後，フラッシュエバポレーター（CONSENTRATOR TC-8, TAITEC）にて濃縮乾固し，少量のメタノールに溶解して-30℃で冷凍保存した。

3. 1. 7　質量分析による分子量の測定

3. 1. 6 で得られた活性画分を質量分析に供し, 抽だい抑制物質の同定を試みた。質量分析（MS ： Mass Spectrometry）のイオン化法は電解脱離法（FD：Field Desorption）と電子イオン化法（EI : Electron Ionization）の 2 つの方法を行った。なお，実際の質量分析は北海道大学農学部 GC−MS&NMR 室に依頼した。質量分析の結果から，Mass Bank（http://www.massbank.jp/index.html）及び，Lipidomics pathway（http://www.lipidmaps.org）によりライブラリーサーチを行った。

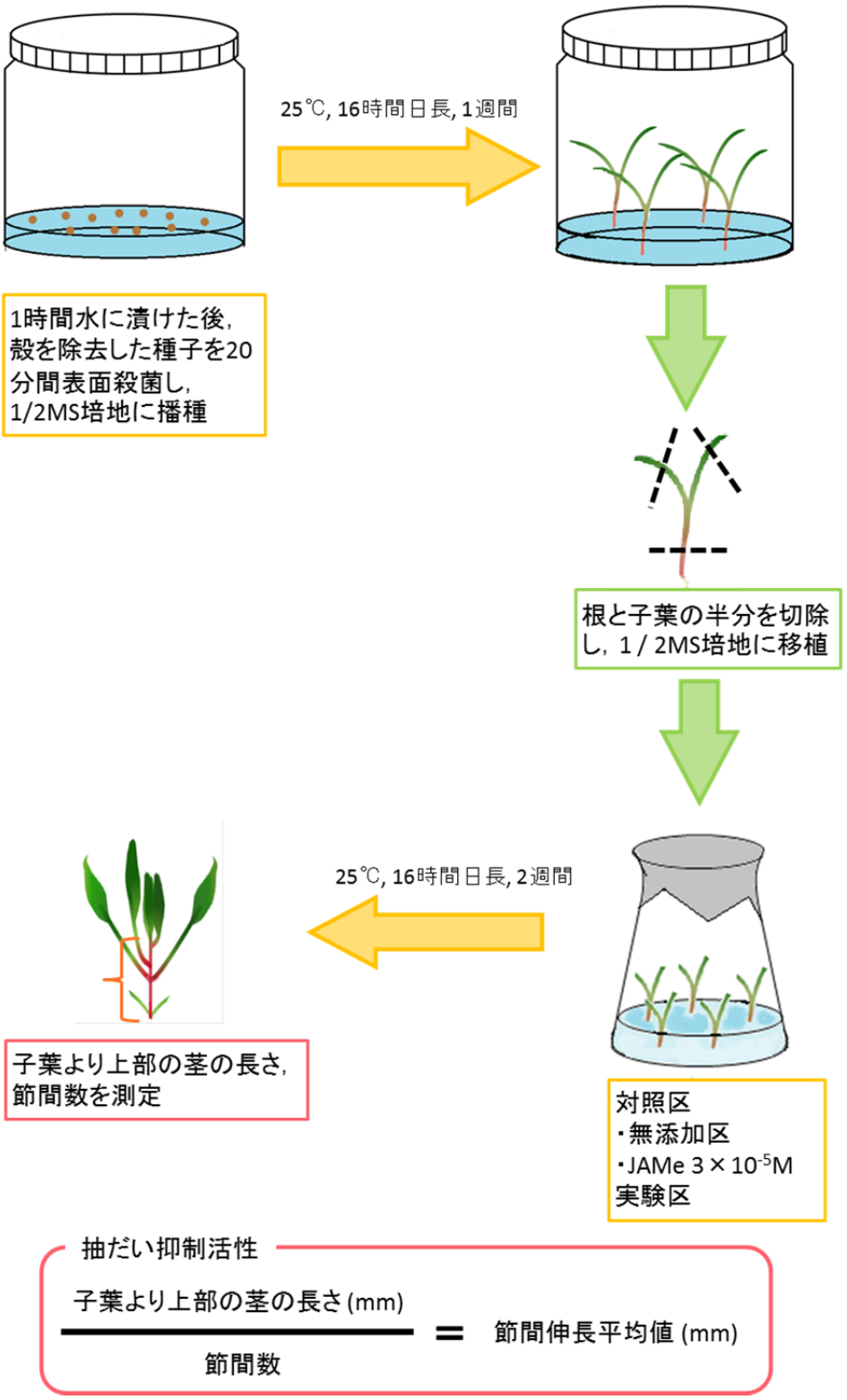


図 3. 1　ホウレンソウの抽だい抑制活性検出法

3. 2　実験結果

溶媒分画で得られた分画をそれぞれ 20 g F.W. / 20 ml の濃度で培地に添加して，検定を行ったところ，酢酸エチル分画に強い抽だい抑制活性が確認できた（図 3. 2, 3. 3）。図の写真に示すように，水分画では茎の伸長阻害は見られたが，植物体は褐変し生育が阻害された。したがって，この茎の伸長阻害は単なる生長阻害によるものと思われた。次に酢酸エチル分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し，30 g F.W. / 20 ml の濃度で検定を行ったところ，トルエン溶出分画，10％ 酢酸エチル / トルエン溶出分画，80％ 酢酸エチル / トルエン溶出分画およびメタノール溶出分画に抑制活性が見られた（図 3. 4, 3. 5）。これらの画分を Sep – Pak C_{18} vac 35cc に供し，80 g F.W. / 20 ml の濃度で 培地に添加して検定を行ったところ，80% 酢酸エチル / トルエン分画のメタノール溶出分画に強い抑制活性が確認できたため（図 3. 6，3. 7），高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にてさらに分取を行った。HPLC の 210 nm の吸光ピークにより分取した分画を 80 g F.W. / 20 ml の濃度で培地に添加して検定を行ったところ，Fr. c の活性が最も高い結果となった（図 3. 8 ~ 3. 10）。Fr. c を更に分析用カラムにて精製したところ，単一ピークであったため，質量分析に供した。質量分析のイオン化法は，FD 法及び EI 法を用いた。FD – MS の結果から，m/z = 797.6 に分子イオンピークが確認でき，この物質の分子量は 796 であることが分かった（図 3. 11）。この分子量と，EI-MS によるフラグメンテーション様式を用いて脂質のライブラリーサーチを行ったところ，Monogalactosyldiacylglycerol（MGDG），16-hexadecanoic acid が候補化合物として挙げられた。

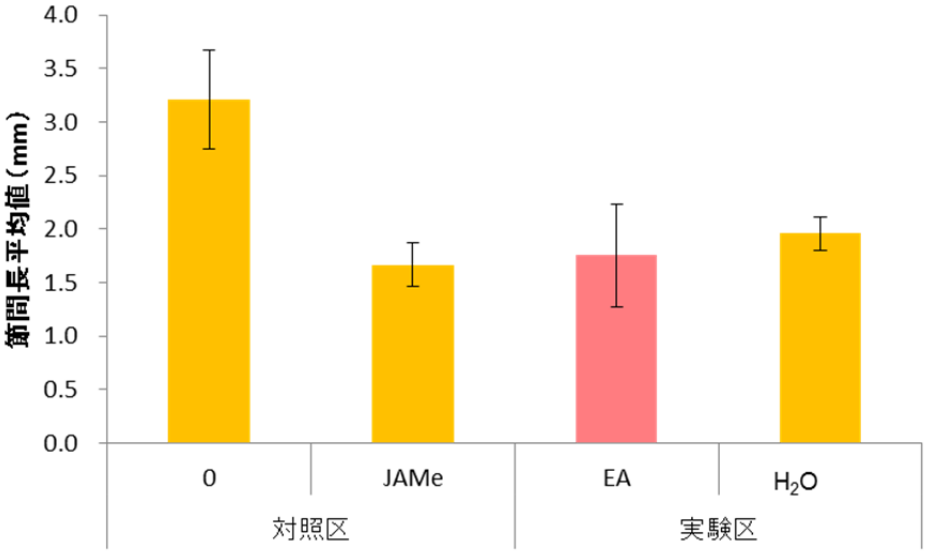


図 3. 2　ホウレンソウ地上部のエタノール抽出物から得られた溶媒分画がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 20 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加した。25℃，16 時間日長で 2 週間培養し，ホウレンソウ幼植物体の節間長平均値を算出した。対照区の JAMe には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。(エラーバーは標準偏差，供試数は 8)

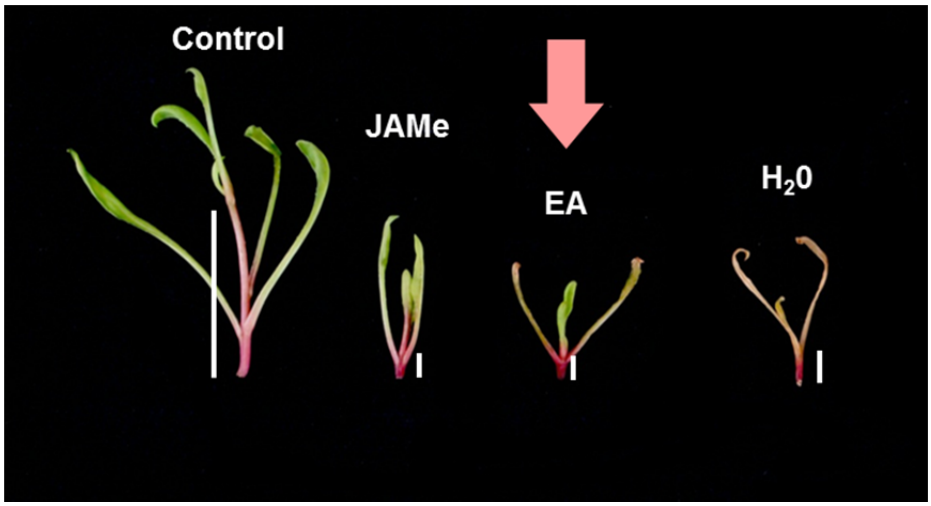


図 3. 3　ホウレンソウ地上部のエタノール抽出物から得られた
溶媒分画がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 20 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加し，25℃，16 時間日長で 2 週間培養した。 JAMe 区には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。植物体は比較しやすいように子葉付根で切断した。白棒は茎の伸長を，赤矢印は活性画分を示す。

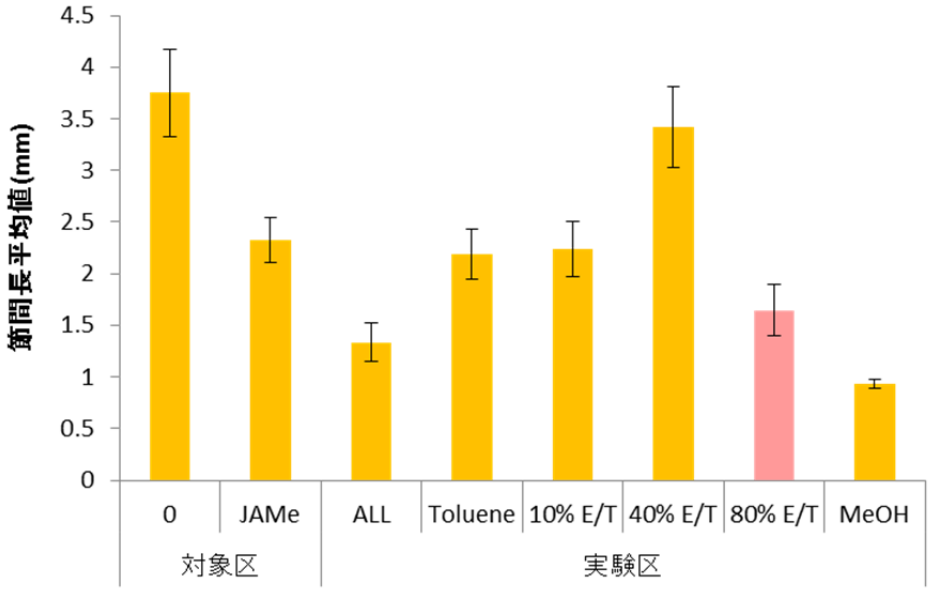


図 3. 4　シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 30 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加した。25℃，16 時間日長で 2 週間培養し，ホウレンソウ幼植物体の節間長平均値を算出した。対照区の JAMe には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。(E/T は, 酢酸エチル／トルエン, ALL は分離前の画分，エラーバーは標準偏差，供試数は 8 ）

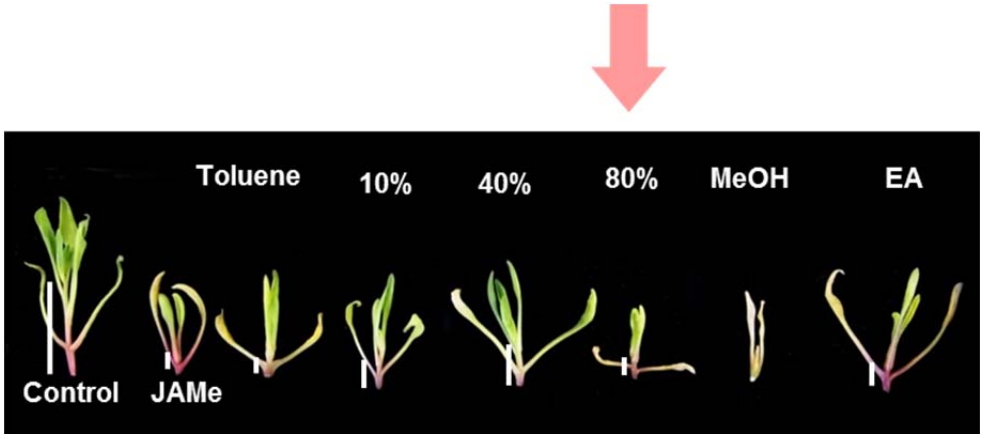


図 3. 5　シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 30 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加し，25℃，16 時間日長で 2 週間培養した。 JAMe 区には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。植物体は比較しやすいように子葉付根で切断した。白棒は茎の伸長を，赤矢印は活性画分を示す。

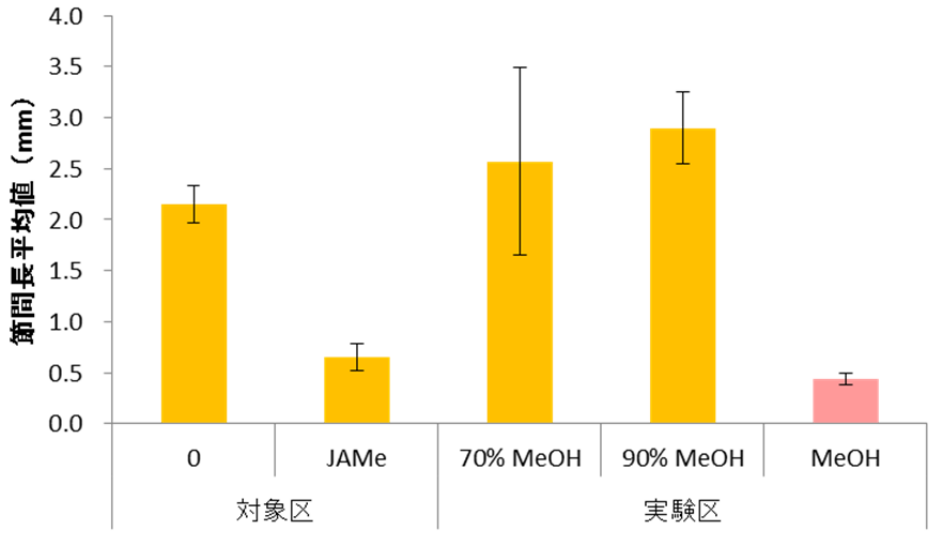


図 3. 6　固相抽出で分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 50 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加した。25℃，16 時間日長で 2 週間培養し，ホウレンソウ幼植物体の節間長平均値を算出した。対照区の JAMe には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。(エラーバーは標準偏差, 供試数は 8)

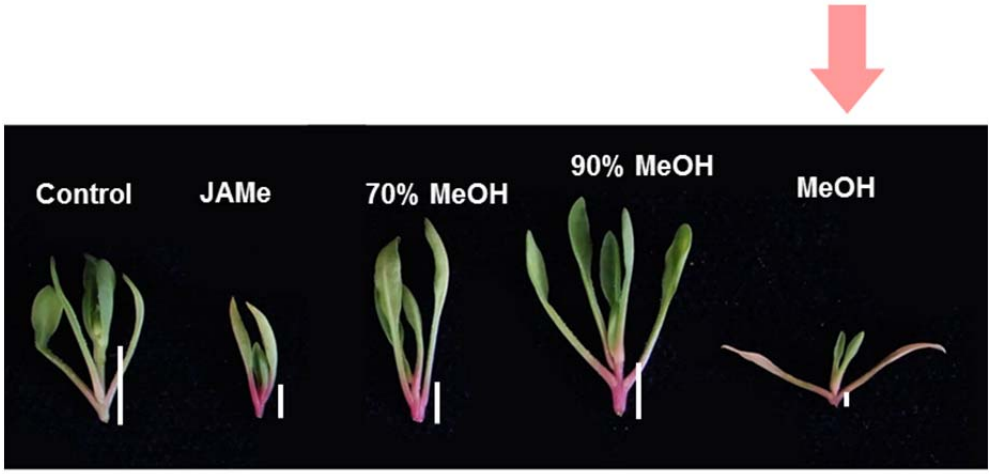


図 3. 7　固相抽出で分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 50 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加した。25℃，16 時間日長で 2 週間培養し，ホウレンソウ幼植物体の様子を撮影した。 JAMe 区には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。植物体は比較しやすいように子葉付根で切断した。白棒は茎の伸長を，赤矢印は活性画分を示す。

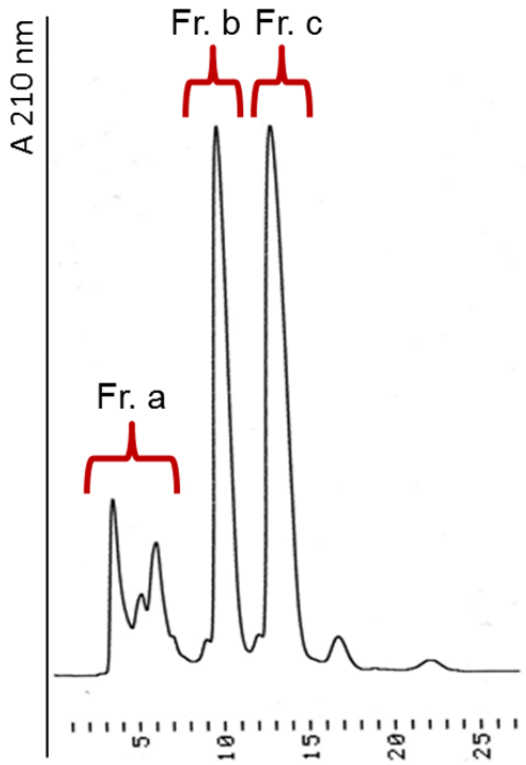


図 3. 8　ホウレンソウ抽出物の HPLC クロマトグラム

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物の固相抽出により抽だい抑制活性がみられた分画を HPLC に供し, 210 nm の吸光ピークを指標に,分取した。

溶媒 : 95 % メタノール, 0.1% 酢酸

流速 : 4.0　ml/min

カラム: Prep Nova-Pak HRC_{18} 25 ×100 mm, Waters

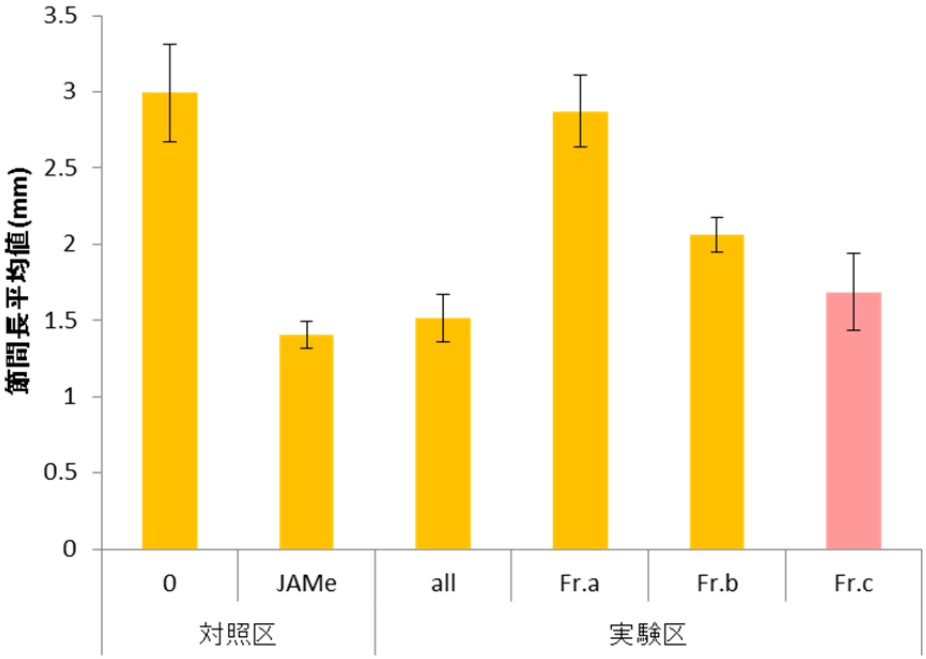


図 3. 9　HPLC で分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 80 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加した。25℃，16 時間日長で 2 週間培養し，ホウレンソウ幼植物体の節間長平均値を算出した。対照区の JAMe には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。（エラーバーは標準偏差，供試数は 8 ）

図 3. 10　HPLC で分画したホウレンソウ抽出物がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物を 80 g F.W. / 20 ml の濃度になるよう生物検定用培地へ添加し，25℃，16 時間日長で 2 週間培養した。 JAMe 区には 3×10^{-5} M　JAMe を添加した。植物体は比較しやすいように子葉付根で切断した。白棒は茎の伸長を，赤矢印は活性画分を示す。

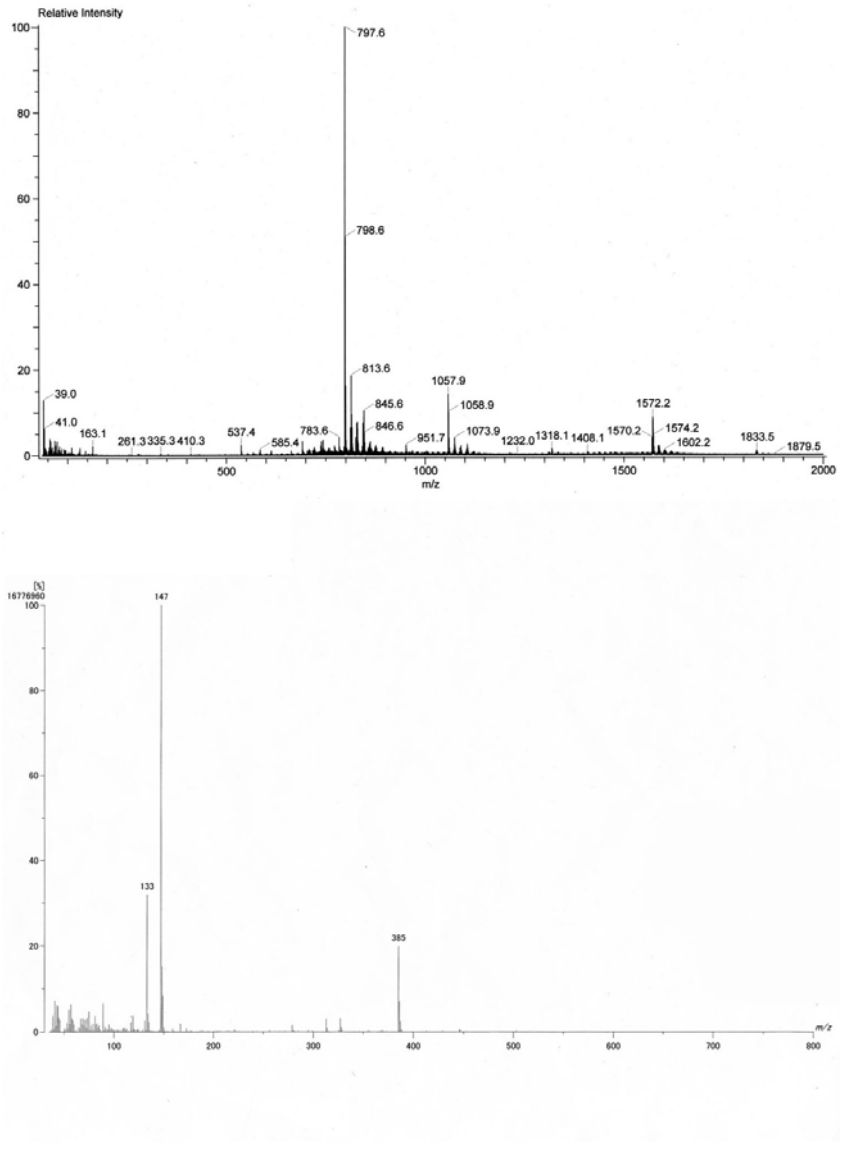


図 3. 11　HPLC で分画したホウレンソウ抽出物 Fr. c の FD-MS,，EI-MS スペクトラム

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物の HPLC 分画のうち，抽だい抑制活性がみられた Fr. c を質量分析（MS : Mass Spectrometry）に供した。イオン化法は電解脱離法（FD：Field Desorption）（上図）と電子イオン化法（EI : Electron Ionization）（下図）の方法を行った。

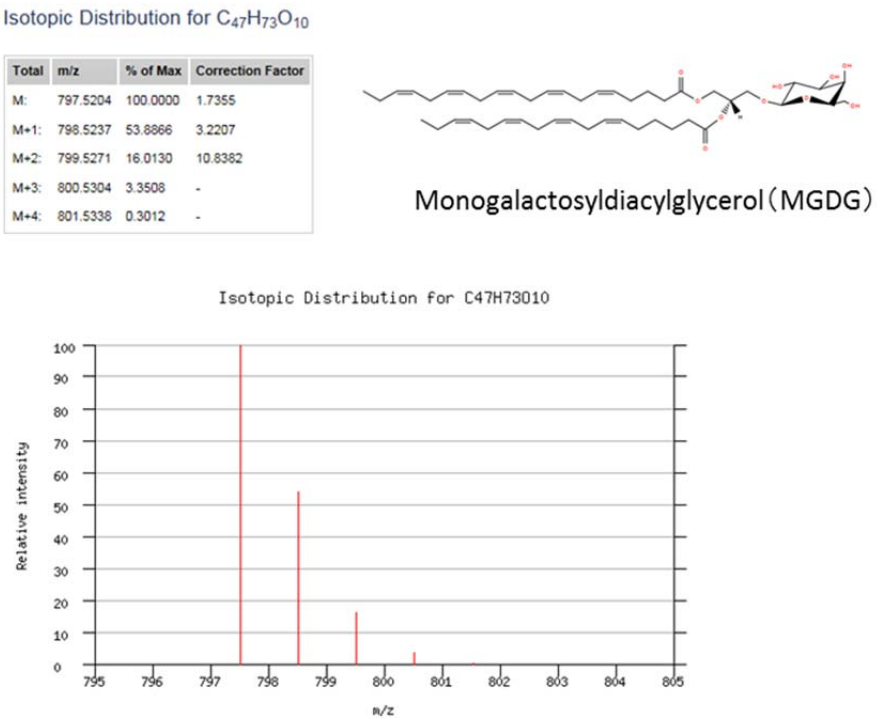


図 3. 12　HPLC で分画したホウレンソウ抽出物 Fr. c の
FD-MS スペクトラムのライブラリーサーチ

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物の HPLC 分画のうち，抽だい抑制活性がみられた Fr.c の FD-MS の結果に基づき，Lipidomics pathway（http://www.lipidmaps.org）によりライブラリーサーチを行った。

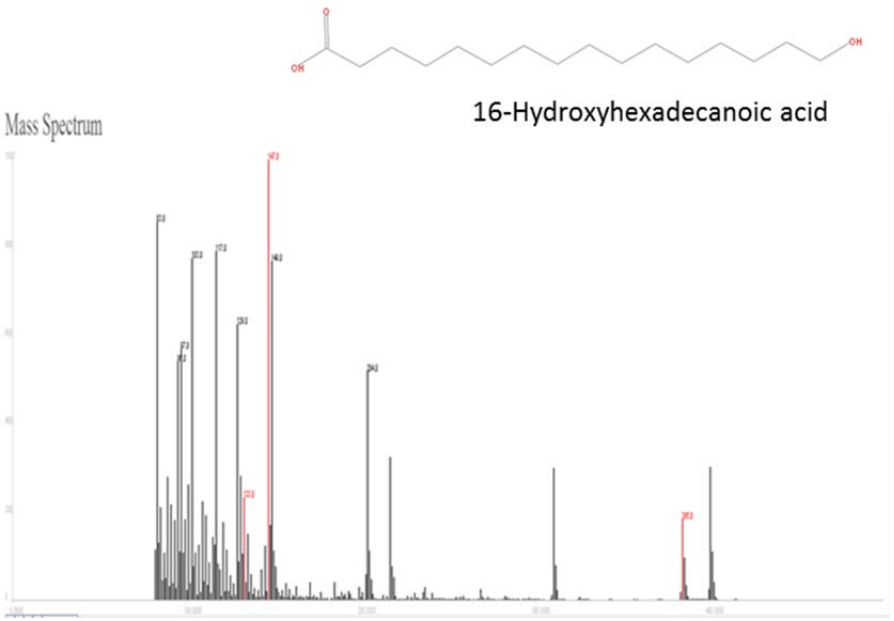


図 3. 13　HPLC で分画したホウレンソウ抽出物 Fr. c の
EI-MS スペクトラムのライブラリーサーチ結果

圃場にて短日条件下で約 1 ヶ月半栽培したホウレンソウから得られたエタノール抽出物の HPLC 分画のうち，抽だい抑制活性がみられた Fr.c の EI-MS の結果に基づき，Mass Bank（http://www.massbank.jp/index.html）によりライブラリーサーチを行った。

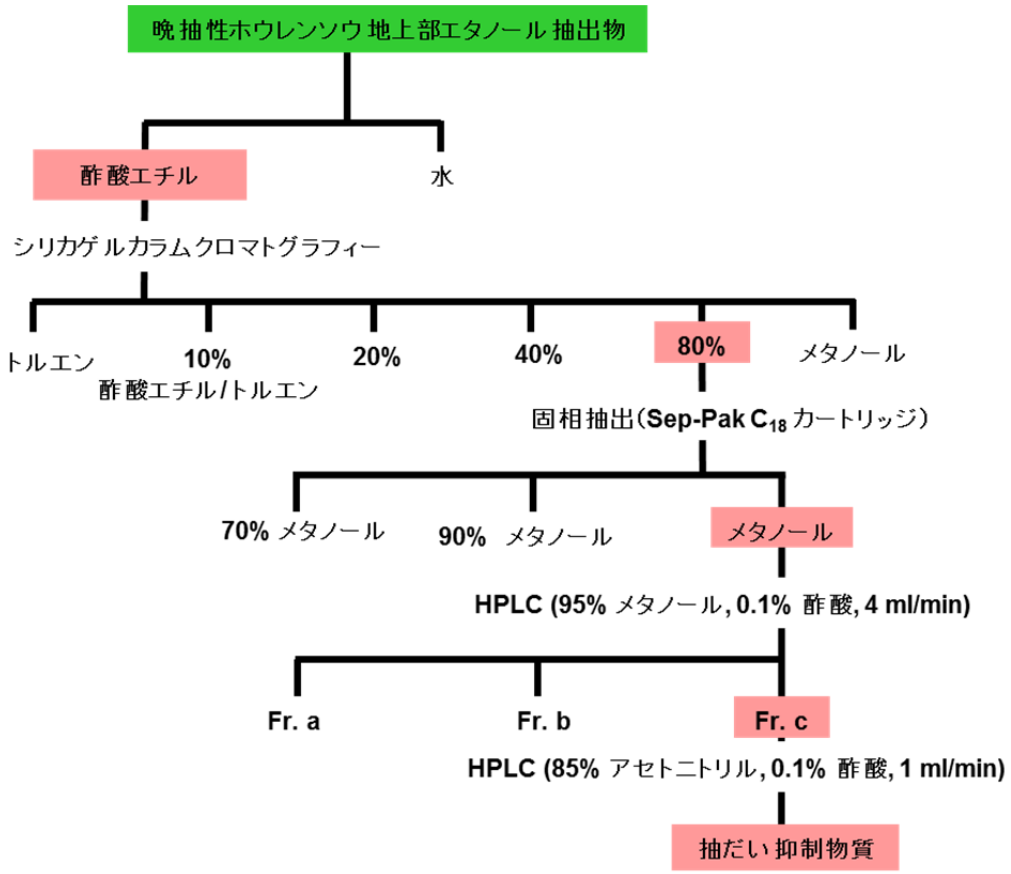


図 3. 14　ホウレンソウ抽だい抑制物質の精製過程

3. 3　考察

植物の生長機構は，正負のバランスによって制御されている。ホウレンソウの抽だいには正の制御因子である活性型ジベレリンによって抽だいは促進される (Zeevaart, 1971; Zeevaart et al., 1993)。ホウレンソウ地上部のエタノール抽出物には強い抽だい抑制活性が認められ，ホウレンソウの抽だいにおける負の制御因子の存在が示唆された。このエタノール抽出物から得られた溶媒分画の水分画には強い生長阻害が認められたが，ホウレンソウに含まれるシュウ酸などの水溶性の生長阻害物質が抽出されたためと考えられる。酢酸エチル可溶性分画も，精製途中のシリカゲルカラムクロマトグラフィー分画や固相抽出分画では，植物体の大きさが小さく，一見，生長阻害のように考えられた。しかし，HPLC の活性画分において，葉の枚数や形態に変化はなく，茎伸長のみが抑制されたため，この分画には抽だい抑制物質が存在することが明らかになった。前段階の分画には生長を抑制する夾雑物が含まれていたと考えられる。この HPLC 活性画分の FD-MS 結果から，グリセロールにガラクトースがついた Monogalactosyldiacylglycerol（MGDG）が，EI-MS の結果からは，16-hexadecanoic acid が候補化合物として挙げられた。以前報告されたダイコンの抽だい阻害物質も，α-(7Z, 10Z, 13Z)-hexadecatrienoic acid（16：3 脂肪酸モノグリセリド）であり (Yoshida et al., 2010)，抽だい抑制活性を示すジャスモン酸も脂肪酸の一種である。このことは，脂質が抽だい抑制に関連している可能性を示唆している。ジャスモン酸やジャスモン酸メチル，ダイコンの抽だい阻害物質はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて異なる画分に存在することが報告されており，本研究で単離した抽だい抑制物質はホウレンソウ特有である可能性が高いと考えられる。

ホウレンソウの抽だい抑制物質の候補化合物である MGDG は，葉緑体の膜脂質を構成する物質であり，植物細胞の全膜脂質中でも最も主要な脂質である。主に光合成反応に重要な役割を果たしていると考えられ，リン欠乏条件下ではリン脂質を補っているという報告もある (小林と太田, 2009)。シロイヌナズナの MGDG の合成酵素 MGD1 ノックアウト変異体は発芽後，緑化出来ず致死してしまう (Kobayashi et al., 2007)。MGDG の植物の形態形成との関わりは不明だが，ホウレンソウの抽だい抑制物質が MGDG であれば更なる生理的な機能の解明に繋がる。

第 4 章 花芽形成に関する遺伝子の単離

花芽形成の制御は，GA 依存経路，光周期依存経路，自律的経路，春化依存経路の 4 つの経路が複雑に絡みあって制御されていると考えられている (Song et al., 2013)。ホウレンソウの花芽形成・抽だいは低温よりも日長による影響が強いため，光周期経路による制御が強いと考えた。遺伝子レベルでの花芽形成の制御機構を調べるために, 光周期経路の代表的な遺伝子である *CONSTANS* (*CO*) と，花芽形成経路統合遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現解析を行うことが必要である。しかし，ホウレンソウの *CO* 及び *FT* 遺伝子の報告はまだなく，これら遺伝子の単離を試みた。

4. 1　実験材料および方法

4. 1. 1　ホウレンソウの育成

易抽性品種リード（サカタのタネ）を長日条件である 5 月中旬から北海道大学北方生物圏フィールド科学センター農場に播種し，適宜，間引きを行いながら慣行法に従って育成した。花芽だけが形成された段階の植物体と花芽が形成され，茎伸長も起きた（抽だいした）植物体を実験に用いることにした。実験に用いた試料は収穫後すぐに葉と根を切除し，茎部分を液体窒素で凍結させ，-80℃で保存した。また，人工気象機（EYELA FLI-301N）において短日条件下（9 時間日長）で日本ホウレンソウ（サカタのタネ）を栽培し，花芽形成が起きていない段階である，本葉が 4 枚程度発達した植物体も試料として用いた。その

場合は植物体の地上部を液体窒素で凍結させ，-80℃で保存した。

4. 1. 2　RNA 抽出，精製

-80℃にて凍結保存したホウレンソウを TRIzol Reagent（Invitrogen）を使用して抽出した。まず，試料をそれぞれ乳鉢と乳棒ですり潰した。その後，約 0.1 g の粉砕した植物組織に 1.5 ml TRIzol Reagent を加え，室温で 5 分間静置した後，12,000×g，4℃で 10 分間遠心分離し，上清を新しいチューブに回収した。回収した上清に 250 µl のクロロホルムを加え，15 秒間攪拌し，3 分間室温で静置した後，10,000×g，4℃で 15 分間遠心分離をした。分離した水層を新しいチューブに回収し，イソプロパノールと 0.8 M クエン酸ナトリウム / 1.2 M NaCl をそれぞれ水層の半量ずつ加え, 穏やかに混和した。10 分間室温で静置した後, 10,000×g, 4℃で 10 分間遠心分離し，上清を除去した。70% エタノールを 200 µl 加え，よく攪拌して沈殿を洗った。10,000×g，4℃で 5 分間遠心分離し，上清を除去後，沈殿を乾燥した。滅菌水（ナカライテスク）50 µl に沈殿を再度溶解し，- 30℃で保存した。

4. 1. 3　DNase 処理

得られた RNA は分光光度計 UV-1800（島津製作所）を使用し，260 nm の吸光値から下記の式により算出した。

$$\text{RNA 濃度 (ng / µl)} = \text{Abs (260 nm)} \times 40$$

RNA は, DNA Free（Ambion）を使用し, DNase 処理を行った。RNA 5 µg に 10×buffer l µl，DNase I 0.5 µl を加え，最終量 10 µl となるよう滅菌水（ナカライテスク）を加えた。37℃で 30 分間静置した後, 2 µl の DNase inactivation reagent を加えた。2 分間室温に静置し，室温で 2 分間遠心分離を行い，上清を新しいチューブに回

収し-30℃に保存した。DNase 処理後の RNA はアガロースゲル電気泳動にて分解していないことを確認した。

4. 1. 4　アガロースゲル電気泳動

アガロース S（ニッポンジーン）を 0.5×TAE バッファー（表 4. 1）に溶解し，型に入れ，固めたものを電気泳動のゲルとして使用した。泳動には 0.5×TAE バッファーを用いた。試料には蛍光試薬として RNA 確認時は SYBR Gold，DNA の時は SYBR Green（Invitrogen）を 1/4000 量添加し，1/10 量の Loading dye（50% グリセロール，0.5% Orange G）を加えてから泳動を行った。分子量マーカー（ニッポンジーン）は泳動する量に関わらず，0.5 μl を SYBR Green，Loading dye とともに泳動した。電気泳動にはミュービット（アドバンス）を使用し，safe imager™ （Invitrogen）で電気泳動のバンドを確認した。

表 4. 1　×0.5 TAE バッファー組成

	mM（mmol / l）
Tris	20
酢酸	20
EDTA	0.5

4. 1. 5　逆転写反応による cDNA 合成

実験目的に応じて，逆転写反応をそれぞれ行った。

（1）内部配列取得のための逆転写反応

ReverTra Ace -α- （TOYOBO）を使用し，プロトコールに従い反応を行った。

反応液は 5× RT バッファー 1 µl, dNTP Mixture（各 10 mM）0.5 µl, RNase Inhibitor（10U/µl）0.25 µl, 50 µM の Oligo (dT) 20 0.05 µl, ReverTra Ace® 0.25 µl, 0.5 µg/µl に調整した RNA 1 µl, Nuclease-Free 水 2.5 µl を加えて最終量 5 µl にした。なお, 3'-RACE（rapid amplification of cDNA ends）用にはアダプター配列付 oligo (dT) 10 mM を使用した。反応は，30℃ 10 分間，42℃ 30 分間，70℃ 5 分間，4℃ 数分間の条件で行った。反応後の試料は 20 µl の TE バッファー（表 4. 2）を加え, -30℃で保存した。

表 4. 2　TE バッファー組成

	mM（mmol/l）
Tris-HCl	1
EDTA	0.1

（2）完全長 cDNA の作製

ExactSTART™ Eukaryotic mRNA 5' - & 3' – RACE Kit（Epiciente）を使用し，プロトコールに従って反応を行った。まず始めに，RNA 5 µg をアルカリホスファターゼ処理した。反応液（表 4. 3）を 37℃，15 分間保温した後に，0.5 µl のグリコーゲンを加え，50 µl のフェノール：クロロホルム = 1 : 1 の混合液を加え，よく攪拌した。1 分間遠心分離を行い，水層を回収した。次に，50 µl の Nuclease-Free 水でフェノール：クロロホルム層を洗い，水層を回収した。100 µl のクロロホルムを水層に加え，よく攪拌し，1 分間遠心分離を行い，RNA を含んでいる水層を回収した。回収した水層に 10 µl の 3 M 酢酸ナトリウムと 50 µl のイソプロパノールを加え，よく攪拌した。氷上で 20 分間静置し，4℃ で 15

分間遠心分離を行い，上清を除いた。80% エタノール（4℃）で沈殿を洗った。15 分間遠心分離を行い，上清を除き，沈殿を乾燥させた。乾燥後，Nuclease-Free 水 3.75 µl に沈殿を溶解した。この実験での遠心分離はすべて室温，10,000×g で行った。

表 4. 3　アルカリホスファターゼ処理

反応液	
Apex Reaction バッファー	5 µl
Apex Heat – Labile Alkaline Phosphatase	2.5 µl
トータル RNA（5 µg 分）	20 µl
Nuclease-Free 水	22.5 µl
最終量	50 µl

アルカリホスファターゼ処理した RNA を Tobacco Acid Pyrophosphatase 処理した。反応液（表 4. 4）を 37℃，30 分間保温し，室温に静置した。

表 4. 4　Tobacco Acid Pyrophosphatase 処理

反応液	
TAP バッファー	0.5 µl
TAP	0.5 µl
RiboGuard RNase Inhibitor	0.25 µl
RNA 試料	3.75 µl
最終量	5 µl

Tobacco Acid Pyrophosphatase 処理した RNA 試料を使用し，5’ – RACE Acceptor Oligo ライゲーションを行った。反応液（表 4. 5）を 37℃，30 分間保温した。

表 4. 5　5’ – RACE Acceptor Oligo ライゲーション反応液

RNA Ligase バッファー	1 µl
TAP STOP バッファー	0.5 µl
T4 RNA Ligase	0.5 µl
2 mM ATP Solution	0.5 µl
5’ – RACE Acceptor Oligo	0.5 µl
RNA 試料	5 µl
Nuclease - Free 水	2 µl
最終量	10 µl

5’ – RACE Acceptor Oligo ライゲーション後, First – Strand cDNA Synthesis を行った。反応液（表 4. 6）を 37℃ 60 分間，85℃ 10 分間処理し，55℃で反応停止した。反応液は，RNase Solution 0.5 µl を加え，55℃，5 分間保温した。

表 4. 6　First – Strand cDNA Synthesis

反応液	
MMLV RT バッファー	1 µl
MMLV Reverse Transcriptase	0.5 µl
dNTP Premix	1 µl
cDNA 合成プライマー	0.5 µl
RNA 試料	10 µl
Nuclease-Free 水	7 µl
最終量	20 µl

次に，Second – Strand cDNA Synthesis 及び PCR Amplification を行った。反応液（表 4. 7）は，95℃ 30 秒間の後に，95℃ 20 秒間，62℃ 30 秒間，72℃ 3 分間のサイクルを 35 回行い、4℃ 数分で反応を停止させた。

表 4. 7　Second – Strand cDNA Synthesis and PCR Amplification

反応液	
FailSafe PCR Premix E	15 µl
Prime STAR DNA Polymerase	0.5 µl
PCR プライマー 1（表）	2.5 µl
PCR プライマー 2（表）	2.5 µl
first – strand cDNA	20 µl
Nuclease-Free 水	9.5 µl
最終量	50 µl

4. 1. 6　RT-PCR 反応

（1）内部配列取得のための PCR 条件

Biotaq^{TM} HS DNA Polymerase（Bioline）のプロトコールに従い RT-PCR を行った。反応液（表 4. 8）は，95℃ 10 分間の後に，96℃ 20 秒間，55℃もしくは 60℃ 20 秒間，72℃ 1 分間を目的に応じたサイクルで行い、12℃ 数分で反応を停止させた。必要に応じて，PCR 産物を鋳型とする nested PCR も行った。

表 4. 8　RT-PCR 反応液組成

反応液	
×10 バッファー	1 µl
Biotaq^{TM} HS DNA Polymerase	0.04 µl
dNTP mix	0.8 µl
プライマー（2 µM）	2 µl (各 1 µl)
鋳型 DNA	0.5 µl
Nuclease-Free 水	5.7 µl
最終量	10 µl

（2）全長 cDNA 取得のための PCR 条件

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase（タカラバイオ）のプロトコールに従い RT-PCR を行った。反応液（表 4. 9）は，98℃ 10 秒間，60℃ 15 秒間，68℃ 1 分間のサイクルを 30 回行い、12℃ 数分で反応を停止させた。

表 4. 9　RT-PCR 反応液組成

反応液	
×5 バッファー	2 μl
PrimeSTARR GXL DNA Polymerase	0.2 μl
dNTP mix	0.8 μl
プライマー（2 μM）	2 μl (各 1 μl)
鋳型 DNA	0.5 μl
Nuclease-Free 水	4.7 μl
最終量	10 μl

4. 1. 7　PCR 産物へのリン酸基付加

PrimeSTAR GXL Polymerase を用いた場合，PCR 産物が平滑末端であるため，クローニングを行う際にリン酸基を付加させる必要がある。PCR 産物の反応液に対して 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）と 2~2.5 倍量の 99%エタノールを加えて撹拌した後，10,000 ×g で 15 分間遠心分離し，上清をピペットで取り除き，70%エタノールを 100 μl 加え，10,000×g，15 分間遠心分離し，上清を取り除いて乾燥させた。その後，T4 Polynucleotide kinase（TOYOBO）を用い，リン酸基の付加を行った。乾燥させた試料に Denaturation バッファーを 15.5 μl 加え，ウォーターバスで 90℃，2 分間ボイル後，氷上で 5 分間急冷した。その後 Blunt end バッファー 2 μl，10 mM ATP 2 μl，T4 Polynucleotide kinase 0.5 μl を加え，37℃で 30 分間保温した。この反応液を電気泳動し，4. 1. 8 に示す方法で精製した。Biotaq HS polymerase を用いた場合は，そのまま電気泳動し，4. 1. 8 に示す方法で精製を行った。

4. 1. 8　アガロースゲルからの DNA 断片抽出

QIAEX II Gel Extraction kit （QIAGEN）を使用し，プロトコールに従って PCR 産物の精製を行った。電気泳動で確認した目的のサイズの DNA 断片ゲルからメスで切り抜き，1.5 ml チューブに回収した。QX I バッファーを 100 mg のゲルに対し 300 µl 加え，よく攪拌した。QX II を 4 µl 加え，よく攪拌し，50℃，10 分間保温した。その際，2 分おきに撹拌した。30 秒間遠心分離し，上清を除き，200 µl の QX I バッファーで沈殿を洗った。30 秒間遠心分離し，上清を除き，200 µl の PE バッファーを加え，沈殿を洗った。30 秒間遠心分離し，上清を取り除き，沈殿を乾燥させた。10 µl の純水に沈殿を溶かし，室温で 5 分間静置した。その後，30 秒間遠心分離を行い，上清を新しいチューブに回収し，-30℃で保存した。遠心分離はすべて室温，13,000×g で行った。

4. 1. 9　増幅 DNA 断片のクローニング

設計したプライマーにより増幅した内部配列のクローニングを行った。TA クローニングを行う場合は pGEM-TEasy ベクター（promega）に PCR 産物をライゲーションした。平滑末端クローニングを行う場合は，*Eco*R V（Roche）にて切断し，Thermosensitive Alkaline Phosphatase（TSAP，Promega）により脱リン酸化処理を行った pBlueScriptⅡ SK (-) ベクター（Agilent Technologies）を用いて行った。ライゲーション反応はどちらのベクターの場合も，×2 Rapid DNA ライゲーション　バッファー 0.5 µl, T4 DNA リガーゼ 0.25 µl, 精製した PCR 産物 1 µl, ベクター 0.5 µl，純水 2.75 µl を加え，最終量 5 µl にしたものを反応液とした。平滑末端のベクターを用いる場合は，リン酸基の付加を行った PCR 産物をライゲーションした。反応液を室温に 3 時間静置した後，大腸菌コンピテントセル（XL10）にライゲーションした反応液を 2.5 µl 加え，20 分間氷上で静置した。

次に 42℃で 1 分間ヒートショックを行い，氷上で急冷した。SOC 液体培地（表 4. 10）を 200 μl 加え，アンピシリンを 50 mg/l 添加した LB 寒天培地（表 4. 11）で 37℃，一晩培養した。出てきたコロニーは，コロニーPCR により選抜した（表 4. 12）。ベクターの塩基配列に合わせたプライマーを設計し，アガロースゲル電気泳動で増幅断片の大きさの違いから目的遺伝子のベクターへの挿入を判断した。目的遺伝子を持っていた大腸菌はアンピシリン 100 mg/l となるよう添加した 1.5 ml の LB 液体培地にて 37℃，一晩振とう培養した。LB 培地（表 4. 11）は水に溶かし，オートクレーブ（TOMY）した培地を液体培地として使用し，寒天培地として使用する際は 1.2%の細菌用寒天（和光純薬工業）を加えてオートクレーブ後，シャーレに分注し，使用した。

表 4. 10　SOC 培地組成

Toryptone	2%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
$MgSO_4$	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
グルコース	20 mM
yast extract	0.5%

表 4. 11　LB 培地組成

	% (w/v)
Toryptone	1
NaCl	1
yast extract	1

表 4. 12 コロニーPCR 反応液

×10 バッファー	1 μl
Biotaq^{TM} HS DNA Polymerase	0.04 μl
dNTP mix	0.8 μl
プライマー（2 μM）	2 μl (各 1 μl)
Nuclease-Free 水	6.7 μl
最終量	10 μl

反応は 95℃ 10 分間の後に，96℃ 20 秒間，60℃ 20 秒間，72℃ 1 分間を 30 サイクル行い，12℃ 数分で反応を停止させた。

4. 1. 10　プラスミド抽出

培養液を 1.5 ml のチューブに回収した。1 分間遠心分離を行い, 上清を除いた。SET バッファー（表 4. 13）を 50 μl 加え，沈殿をボルテックスでよく溶かした後に，Litic Mix.（表 4. 14）を 100 μl 加え，転倒混和した。次に 3 M 酢酸ナトリ

ウム（pH 5.2）溶液を 200 µl 加え，転倒混和した後，7 分間遠心分離を行い，上清を新しいチューブへ移した。イソプロパノール（室温）を 230 µl 添加し，ボルテックスで撹拌後，室温，1 分間静置した。7 分間遠心分離後，上清をデカンテーションで除き，沈殿に 10 ng/µl に調整した RNase を 50 µl 加え，ボルテックス後，37℃，30 分間保温した。その後，PEG/NaCl（20% PEG6000 （v/w）/ 2.5 M NaCl）を 40 µl 加え，氷上で 30 分間静置した。10 分間遠心分離して上清を除き，400 µl の 80% エタノール（4℃）で沈殿を洗い，遠心分離を 3 分間行い，上清を除き，沈殿を乾燥させた。乾燥後，Nuclease-Free 水 50 µl に沈殿を溶解した。得られたプラスミドは-30℃で保存した。遠心分離は全て 4℃，14,000×g で行った（TOMY）。

表 4.13　SET バッファー組成

Tris (pH 8.0)	50 mM
EDTA	50 mM
スクロース	2.0%
RNase	50 µg/ml

表 4. 14　Litic Mix.組成

NaOH	200 mM
SDS	1.0%

4. 1. 11　制限酵素処理による挿入遺伝子の確認

プラスミド DNA 4 µl，×10 バッファー 1 µl，制限酵素 0.25 µl，純水 4.75 µl を加え，最終量 10 µl を反応液とした。37℃，1 時間保温し，電気泳動を行い，必要な DNA 鎖長が切り出されているかを確認した。

4. 1. 12　DNA 配列の決定

シーケンス反応は Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて行った。Big dye 5×バッファー 0.875 µl， Big dye ver1.1 0.5 µl，2 µM の各種プライマー 0.4 µl，プラスミド DNA もしくは PCR 産物 0.6 µl，純水 2.175 µl を加え，5 µl の反応液とした。反応は 96℃ 3 分間の後に，96℃ 10 秒間，50℃ 5 秒間，60℃ 1 分間を 45 サイクル行い、4℃ 数分で反応を停止させた。

シーケンス反応終了後，反応液に 35 µl の 80% エタノール（室温）を加え，攪拌した後，15 分間室温に静置した。3,500 rpm，室温で 10 分間遠心分離後，上清を除いた。100 µl のエタノール（室温）を加え，デカンテーション後，ピペットにて上清を完全に除き，乾燥させた。キャピラリーシーケンサー用 Formamide（Applied Biosystems）を乾燥させた試料に 15 µl 加えた。95℃，2 分間で変性させ，氷上にて 5 分間急冷させた後，シーケンス用プレートに全量移した。シーケンスは北海道大学農学部共通機器のキャピラリーシーケンサー（3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems）を用いて行った。

4. 1. 13　プライマーの設計

ホウレンソウにおける花芽形成関連遺伝子のホモログを単離するために，プライマーの設計を行った。すでに報告のある同じアカザ科のテンサイ（*Beta*

vulgaris）やシロザ（*Chenopodium rubrum*）の配列を参考に設計した。内部配列取得後は，その配列を元にプライマー設計ソフト Primer 3（http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/）を用いて各遺伝子に特異的なプライマーを設計した（表 4. 15）。

4. 1. 14　ホウレンソウホモログの相同性比較

単離したホウレンソウホモログを他の植物の FT 及び CO と比較するために，BioEdit（https://www.bioedit.com/）内の ClustalW プログラムを使い，Multiple alignment を行った。FT は PEBP ドメイン， COL は CCT ドメインの系統樹解析を行った。系統樹解析は Philip program 内の SEQBOOT， PROTPARS 及び CONSENSE プログラム（PHYLIP 3.68; http://evolution. genetics.washington.edu/phylip.html）を使い，系統樹の描画は TreeView（http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html）を使用した。比較する他の植物の FT 及び CO のアミノ酸配列は，GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）から取得した。

4. 1. 15　タンパク質の立体構造の比較

FT タンパク質に関しては立体構造の比較も行った。swiss-model（http://swissmodel.expasy.org）に登録されているシロイヌナズナ FT タンパク質の立体構造 (Ahn et al., 2006) を元に予測されるホウレンソウ FT ホモログの立体構造を調べた。立体構造の描画は swiss-model viewer version 4.1（http://spdbv.vital-it.ch）を用いて行った。

表 4. 15 プライマー 一覧

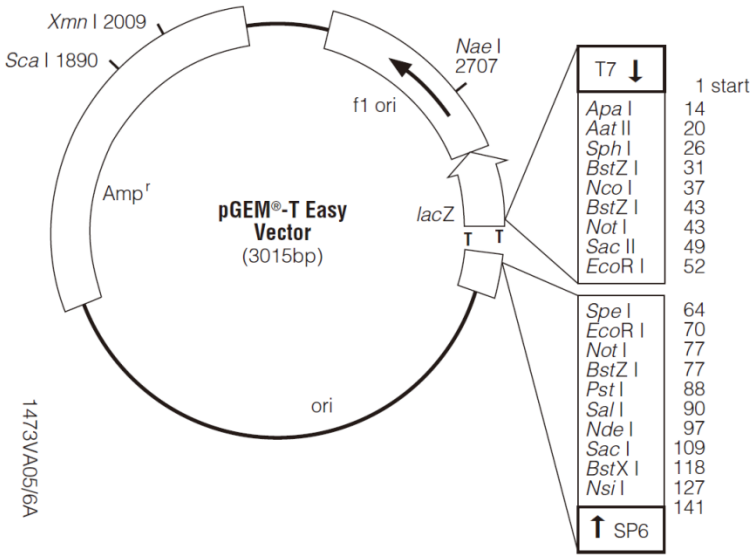
プライマー名	配列（5’ → 3’）	目的
SoFT-1[*1]	AGGYGATGACCTTAGGACTT	内部配列取得
SoFT-2[*1]	CCTCCCTTTGRCAATTGAARTA	内部配列取得
SoFT1-1	TAACTAGAGACTTTGCTGAACT	3’-RACE
SoFT1-2	AGAGTTCAGCAAAGTCTCTAGT	5’-RACE
SoFT1-3	TCATAGCAAACCACCTCTTGA	5’-RACE
SoFT2-1	CAGTTGGAATTCATCGTTTCA	3’-RACE
SoFT2-2	TCCAACTGARGGTCTTGGGT	5’-RACE
SoFT2-3[*1]	TAGACYGAAGCAACGGGTAAA	5’-RACE
SoCO-1[*1]	TGACACRTGCCGTKCAGCACC	内部配列取得
SoCO-2	TGTGCTACCTGTGATGCTGA	内部配列取得
SoCO-3[*1]	TCMACATCTGTTCTYTTWGCRAA	内部配列取得
SoCO-4	TGAAGGGGATGAGGATGAAG	3’-RACE
SoCO-5	CTTCATCCTCATCCCCTTCA	5’-RACE
SoCO-6	ACTGAATTCCTGCTGCTGGT	5’-RACE
SoFT1full-F	GCAACTTCTTAGTAATCCTACAATACC	完全長 cDNA
SoFT1full-R	AAAGAGAATCACTAGTTTTATTCAAGC	完全長 cDNA
SoFT2full-F	AAATTATTTTCTTAACCCATTCCCTA	完全長 cDNA
SoFT2full-R	CGGTTTCTTAGACGGTAGAGTGA	完全長 cDNA
SoCOLfull-F	GAGAGAGAGATGATGAAGAAGGAA	完全長 cDNA
SoCOLfull-R	ACCGCACACTCAACTCCATT	完全長 cDNA

PCR primer1[*2]	TCATACACATACGATTTAGGTGACACTATAG AGCGGCCGCCTGCAGGAAA	5‘-RACE
PCR primer2[*2]	TAGACTTAGAAATTAATACGACTCTATAGGCG CGCCACCG	3’-RACE
アダプター配列付き oligo(dT)	AATTCGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT	3’-RACE
OG25FOW1[*3]	GTCACGACGTTGTAAAACGAC	シーケンス
OG25REV1[*3]	CAGGAAACAGCTATGACCATG	シーケンス

＊1 degenerate プライマー

＊2 キット付属のプライマー

＊3 ベクターのプライマー



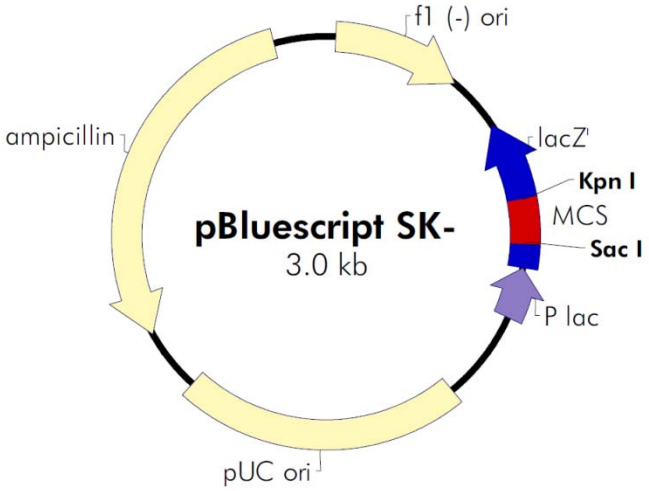


図 4. 1　クローニングベクターのマップ

上図：pGEM-T Easy（promega）

下図：pBluescript SK(-)（Agilent Technology）

4. 2 結果

4. 2. 1　COL ホモログの単離

ホウレンソウから CO ホモログの単離を行うために同じヒユ（アカザ）科植物であるテンサイの *CONSTASN-like 1* (*BvCOL1*) の配列を参考に(Chia et al., 2008), 保存性の高い領域にプライマー（SoCO1~SoCO3）を設計した（表 4. 15)。このプライマーを用いて RT-PCR 及びシーケンスを行ったところ, 花芽が形成された易抽性品種リードの試料から約 500 塩基の DNA 断片を増幅することができた。この DNA 断片の塩基配列を決定し，*CO* ホモログであることを確認した。そこで，増幅された DNA 断片の内部にプライマー（SoCO4~SoCO6）を設計し（表 4. 15)，5'-RACE 及び 3'-RACE を行い，全長配列を取得した。単離したホモログを *SoCOL1* と名付けた。*SoCOL1* の完全長 cDNA は 1155 塩基であり，遺伝子配列から推定される SoCOL1 タンパク質は 360 アミノ酸残基で, 分子量は 40127.71 であった（図 4.2)。

COL ファミリーは N 末端領域に 1 つもしくは 2 つのジンクフィンガーB−Box ドメインを持ち，C 末端領域に CCT ドメインを持つことが知られている (Griffiths et al., 2003)。さらに，B−Box ドメインの構成から大きく 3 つのグループに分けることができ (Ballerini and Kramer, 2011; Valverde, 2011)，タイプ I は 2 つの B-Box ドメイン，タイプ II は 1 つの B−Box ドメイン，タイプ III は完全な B-Box 1 つと，不完全な B-Box を持つ構成になっている。単離したホウレンソウホモログ SoCOL1 の推定されるアミノ酸配列は N 末端領域に 2 つの B-Box ドメイン，C 末端領域に 1 つの CCT ドメインが存在した。SoCOL1 とテンサイ，シロザ，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の CO，COL との相同性比較を行ったところ, BvCOL1 と 89% (Chia et al., 2008), CrCOL1, CrCOL2 とは 92%, 84% (Drabešová et al., 2014)，AtCO，AtCOL1 及び AtCOL2 とはそれぞれ 54%，55%,

60% (Griffiths et al., 2003)のアミノ酸配列の相同性を示した（図 4. 3）。COL ファミリーの CCT ドメインを用いて系統樹解析を行ったところ，B-Box の構成と一致して，AtCO や BvCOL1 と同じ分岐群に属していることが示された（図 4. 4）。

4. 2. 2　FT ホモログの単離

ホウレンソウから FT ホモログの単離を行うために同じヒユ（アカザ）科植物であるテンサイの *BvFT1*，*BvFT2* (Pin et al., 2010)，シロザの *CrFT1*，*CrFT2* (Chab et al., 2008) の配列を参考に，保存性の高い領域にプライマー（SoFT-1，SoFT-2）を設計した（表 4. 15）。このプライマーを用いて RT-PCR 及びシーケンスを行ったところ，花芽が形成され，茎伸長のしていない易抽性品種リードの茎断片試料から約 500 塩基の DNA 断片を増幅することができた。この DNA 断片の塩基配列を決定し，*FT* ホモログであることを確認した。そこで，増幅された DNA 断片の内部にプライマー（SoFT1-1~SoFT1-3）を設計し（表 4. 15），5’-RACE 及び 3’-RACE を行い，全長配列を取得し，*SoFT1* とした。*SoFT1* の完全長 cDNA は 871 塩基であり，遺伝子配列から推定される SoFT1 タンパク質は 180 アミノ酸残基で，分子量は 20155.94 であった（図 4. 5）。

さらに人工気象機にて短日条件下で育成した日本ホウレンソウの植物体地上部試料について，SoFT-1，SoFT-2 を用いて RT-PCR を行ったところ，約 500 塩基の DNA 断片を得ることができた。この配列を調べたところ，*SoFT1* とは異なる配列をしていたため，特異的なプライマー（SoFT2-1~SoFT2-3）を設計し（表 4. 14），5’-RACE 及び 3’-RACE を行い，全長配列を取得し，*SoFT2* とした。*SoFT2* の完全長 cDNA は 719 塩基であり，遺伝子配列から推定される SoFT2 タンパク質は 175 アミノ酸残基で，分子量 19969.57 であった（図 4. 6）。

SoFT1 と *SoFT2* は，異なる品種から単離されたため，品種による違いも考え

られた。日本ホウレンソウから *SoFT1* の cDNA を増幅して，塩基配列を確認した結果，リードの *SoFT1* と完全に同一配列であった。よって，ホウレンソウから *FT* ホモログを 2 つ単離することができた。

推定されるアミノ酸配列から，SoFT1 と SoFT2 間の配列相同性は 80%と高い相同性を示した。さらに，テンサイ，シロザ，シロイヌナズナの FT と比較すると，SoFT1 は BvFT1，BvFT2 (Pin et al., 2010)と 74%，83%，CrFT1，CrFT2 (Chab et al., 2008)とは 83%，66%，AtFT (Kobayashi et al., 1999)とは 74%という相同性を示した。SoFT2 は BvFT1，BvFT2 と 79%，89%，CrFT1，CrFT2 とは 87%，60%，AtFT とは 74%という相同性を示した（図 4. 7)。 FT が属する PEBP 遺伝子は FT-like，CEN/TFL-like 及び MFT-like の 3 つの分岐群に分けられる (Ballerini and Kramer, 2011)。PEBP ドメインの系統樹解析の結果，ホウレンソウから単離された FT ホモログはどちらも FT 分岐群に属することが示された（図 4. 8)。

SoFT1 と SoFT2 は，テンサイにおいて花芽形成誘導に必要なアミノ酸の 134 番目のチロシン，137 番目のグリシン，138 番目のトリプトファンが保存されていた。しかし，シロイヌナズナにおいて FT の機能的に重要なアミノ酸残基は SoFT2 ではすべて保存されていたが，SoFT1 ではそのうち 140 番目のグルタミンがプロリンに置換されていた（図 4.7, 4. 9)。

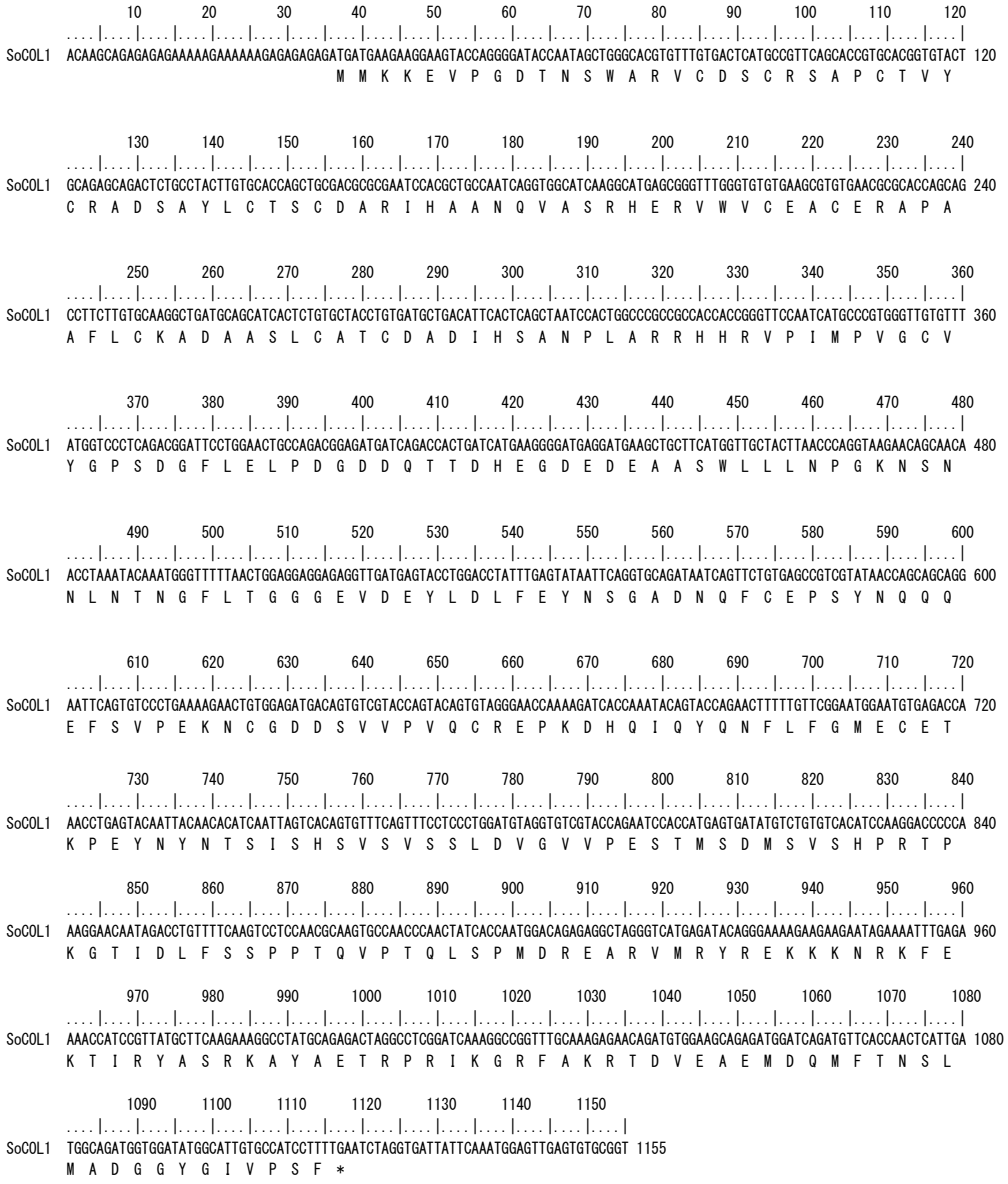


図 4.2　ホウレンソウから単離した *COL1* 遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ酸配列

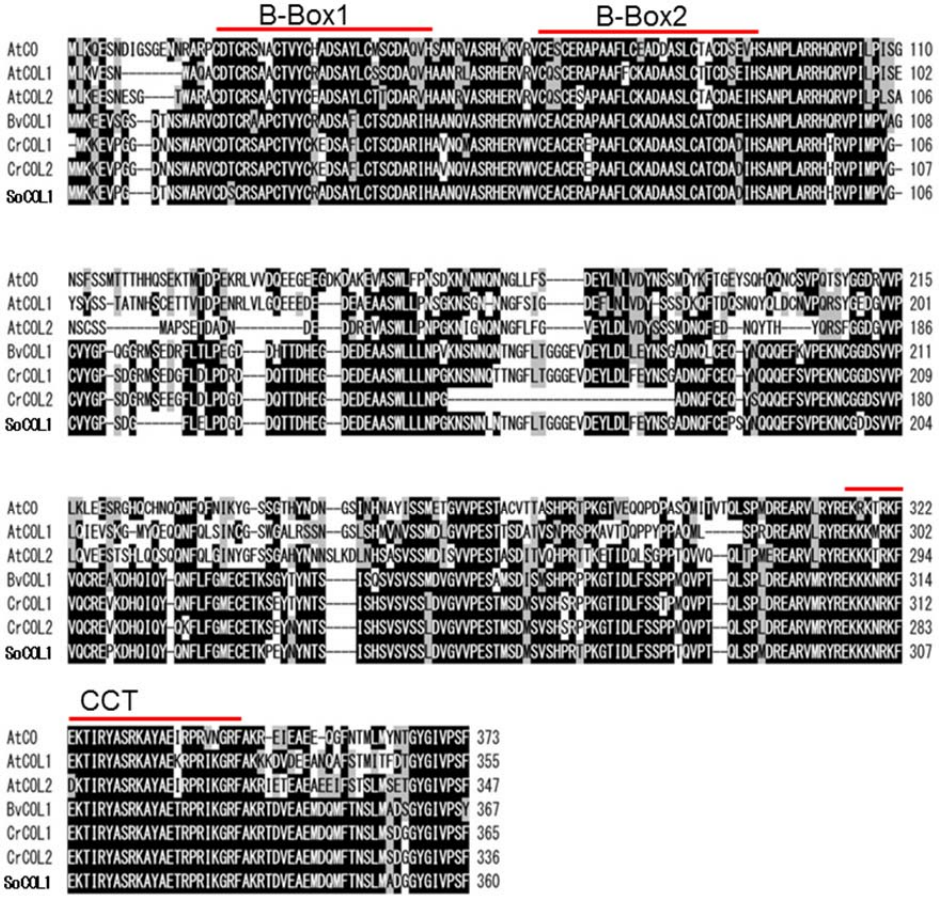


図 4. 3 ホウレンソウ *COL1* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と，他植物の CO 及び COL のアミノ酸配列との相同性比較

SoCOL1 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と，GenBank に登録されている CO, COL のアミノ酸配列を ClustalW (BioEdit program，https://www.bioedit.com/)を用いて相同性を比較した。黒色は一致したアミノ酸，灰色は類似したアミノ酸を示す。赤い棒で示す領域は CONSTANS に重要な B-Box 及び CCT ドメインの位置を示す。

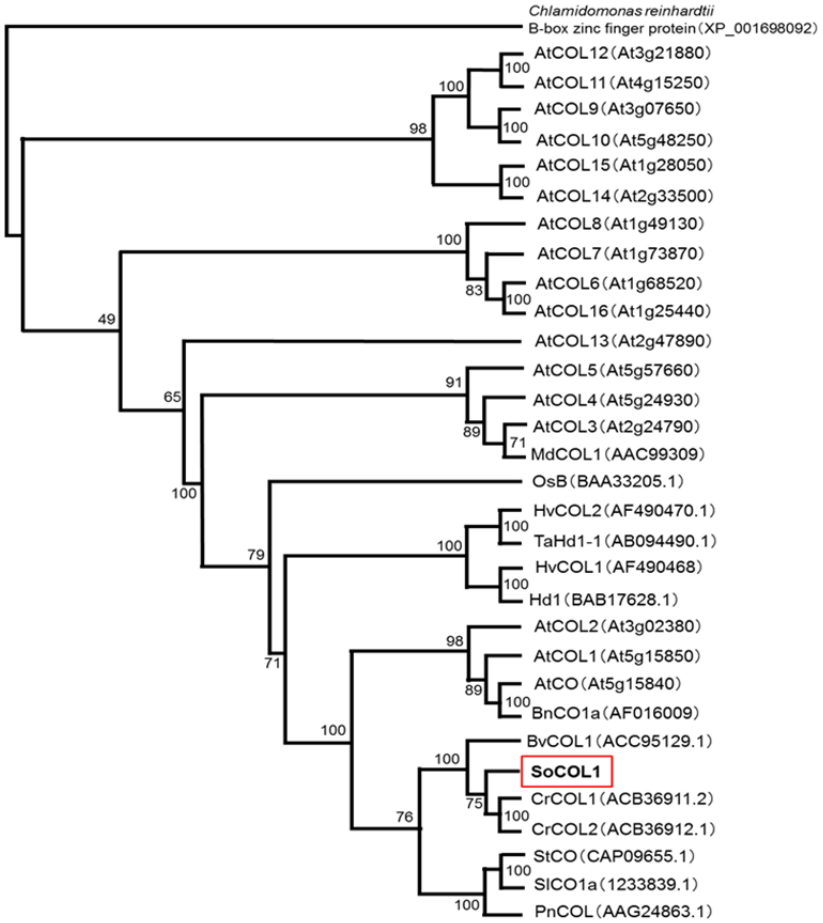


図 4. 4 ホウレンソウ *COL1* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と，他植物の CO 及び COL のアミノ酸配列との系統解析

SoCOL1 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と，GenBank に登録されている COL ファミリーのアミノ酸配列の CCT ドメインを Philip program 内の SEQBOOT，PROTPARS，CONSENSE プログラム (PHYLIP 3.68; http://evolution. genetics.washington.edu/phylip.html)を用いて系統樹解析を行った。系統樹の描画は TreeView (http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html)を用いた。クラミドモナスの B-box zinc finger タンパク質をアウトグループとした。系統樹内の数字はブートストラップ値であり，() 内はアクセッションナンバー。

```
          10        20        30        40        50        60        70        80        90        100       110       120
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  GTGCAACTTCTTAGTAATCCTACAATACCTAAAGTCAAAAAATAATGCCTAGGATAGCATCAACAAGTGCGCCAAGAGATCCATTAGAAATAGGTAGAGTTATCGGAGATGTTTTGGATC 120
                                          M  P  R  I  A  S  T  S  A  P  R  D  P  L  E  I  G  R  V  I  G  D  V  L  D

          130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  CCTTCAATAGGTCTGTGACTCTTAGAATCAGCTATAACAATAGAGTGGTTACTACTGGAGGAGAATTTAGGCCATCTGAAGTTGTTAGCCAACCTAGAGTCGAGATTGGAGGTGATGACC 240
       P  F  N  R  S  V  T  L  R  I  S  Y  N  N  R  V  V  T  T  G  G  E  F  R  P  S  E  V  V  S  Q  P  R  V  E  I  G  G  D  D

          250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  TTAGAACTTTCTACACCTTGGTAATGGTGGATCCCGATGCTCCTAGCCCAAGTAACCCGCACCTGAGGGAGTACTTGCACTGGCTGGTGACTGATATTCCTGGGACCACTGGTGCATCCT 360
       L  R  T  F  Y  T  L  V  M  V  D  P  D  A  P  S  P  S  N  P  H  L  R  E  Y  L  H  W  L  V  T  D  I  P  G  T  T  G  A  S

          370       380       390       400       410       420       430       440       450       460       470       480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  TTGGTCAAGAGGTGGTTTGCTATGAAAGTCCACGACCACCAATGGGGATACACCGATTTGTATTTGTGTTGTTTCAACAATTAGGAAGGCAAACTGTTTATCCACCAGGATGGCGTCCAA 480
       F  G  Q  E  V  V  C  Y  E  S  P  R  P  P  M  G  I  H  R  F  V  F  V  L  F  Q  Q  L  G  R  Q  T  V  Y  P  P  G  W  R  P

          490       500       510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  ACTTCATAACTAGAGACTTTGCTGAACTTTATAATCTTGGACTACCAGTTGCTGCTGTCTATTTCAATTGTCAAAGGGAAGGAGGTTGTGGTGGAAGGAGGTTGTAATTTCGATCTCCAT 600
       N  F  I  T  R  D  F  A  E  L  Y  N  L  G  L  P  V  A  A  V  Y  F  N  C  Q  R  E  G  G  C  G  G  R  R  L  *

          610       620       630       640       650       660       670       680       690       700       710       720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  CTTATGTTTCTCTGGCAGCTCCTTAATTTCGCACTTAATTAAGATATTCATAATTTTAGTACACCTTTTAACGCTCTACTCATATAAAAATATTATATGTATACTTAGTATTTTATAGCT 720

          730       740       750       760       770       780       790       800       810       820       830       840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SoFT1  CTACCTAAATATATTTGCCTTTTTTGTATCATGTGACTCGTAGTACCGACTCACAAAATACAAAATGATCAAAGTTGTAGTAAGAAACTTAAGCGATTATATGCATTGTACTAATTCATG 840


          850       860       870
....|....|....|....|....|....|.
SoFT1  GGCTTGAATAAAACTAGGGATTTTCTTTTGT 871
```

図 4.5 ホウレンソウから単離した *FT1* 遺伝子の塩基配列と
推定されるアミノ酸配列

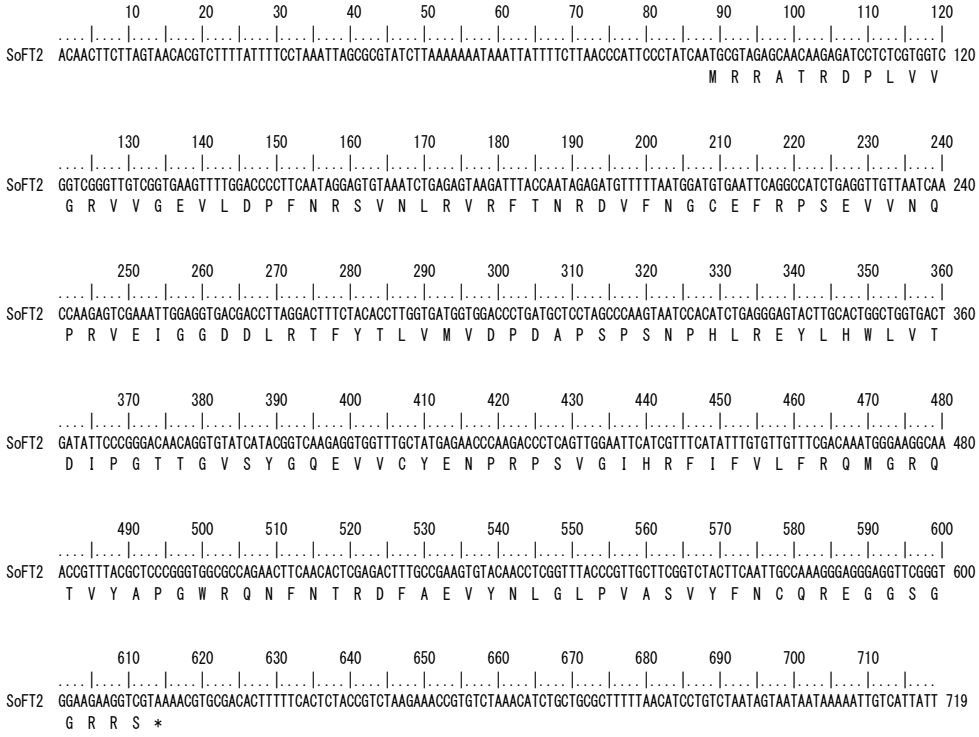


図 4.6　ホウレンソウから単離した *FT2* 遺伝子の塩基配列と
推定されるアミノ酸配列

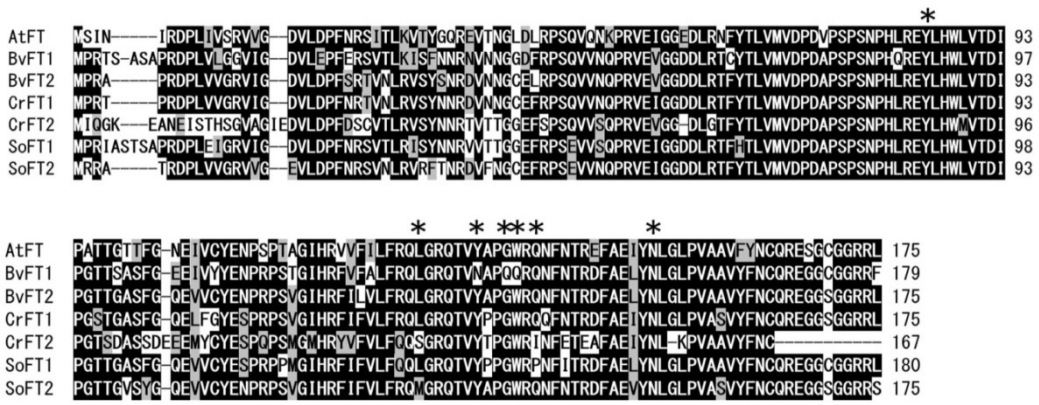


図 4.7　ホウレンソウ *FT* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と，他植物の FT アミノ酸配列との相同性比較

SoFT1,SoFT2 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と，GenBank に登録されている FT のアミノ酸配列について ClustalW　(BioEdit program , https://www.bioedit.com/) を用いて相同性を比較した。黒色は一致したアミノ酸，灰色は類似したアミノ酸，アスタリスクは FT 機能活性に重要なアミノ酸を示す。

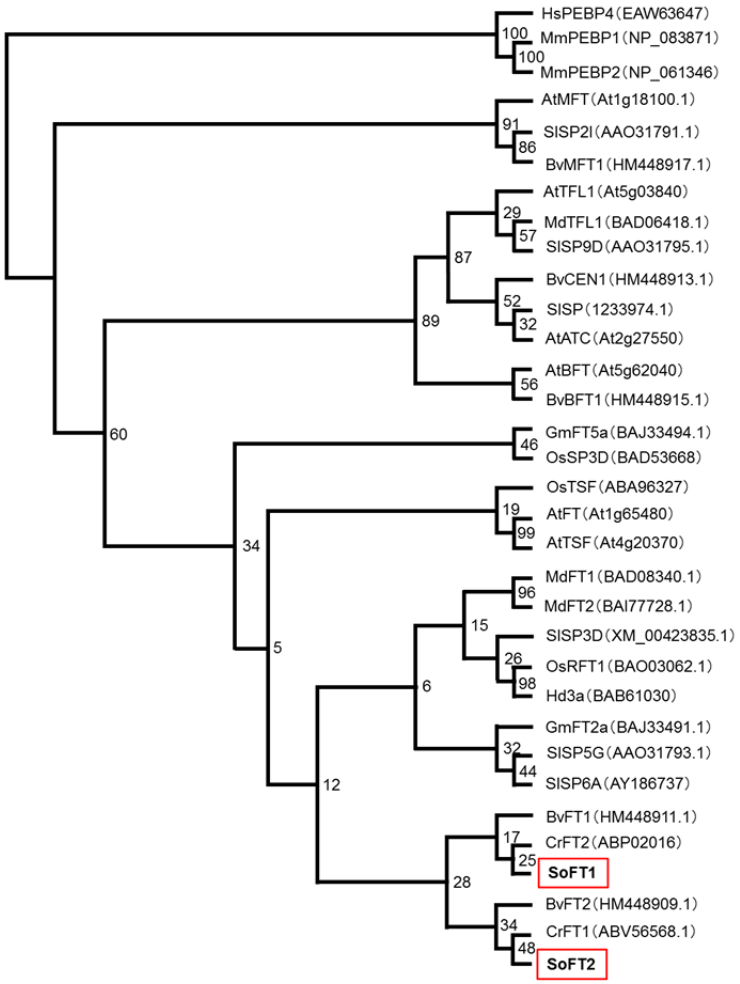


図 4. 8　ホウレンソウ *FT* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と, 他植物の PEBP ファミリーのアミノ酸配列との系統解析

SoFT1,SoFT2 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と, GenBank に登録されている PEBP ファミリーの PEBP ドメインを Philip program 内の SEQBOOT，PROTPARS，CONSENSE プログラム (PHYLIP 3.68; http://evolution.　genetics.washington.edu/phylip.html)を用いて系統樹解析を行った。系統樹の描画は TreeView program (http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html)を用いた。ヒト及びマウスの PEBP タンパク質をアウトグループとした。系統樹内の数字はブートストラップ値，() 内はアクセッションナンバー。

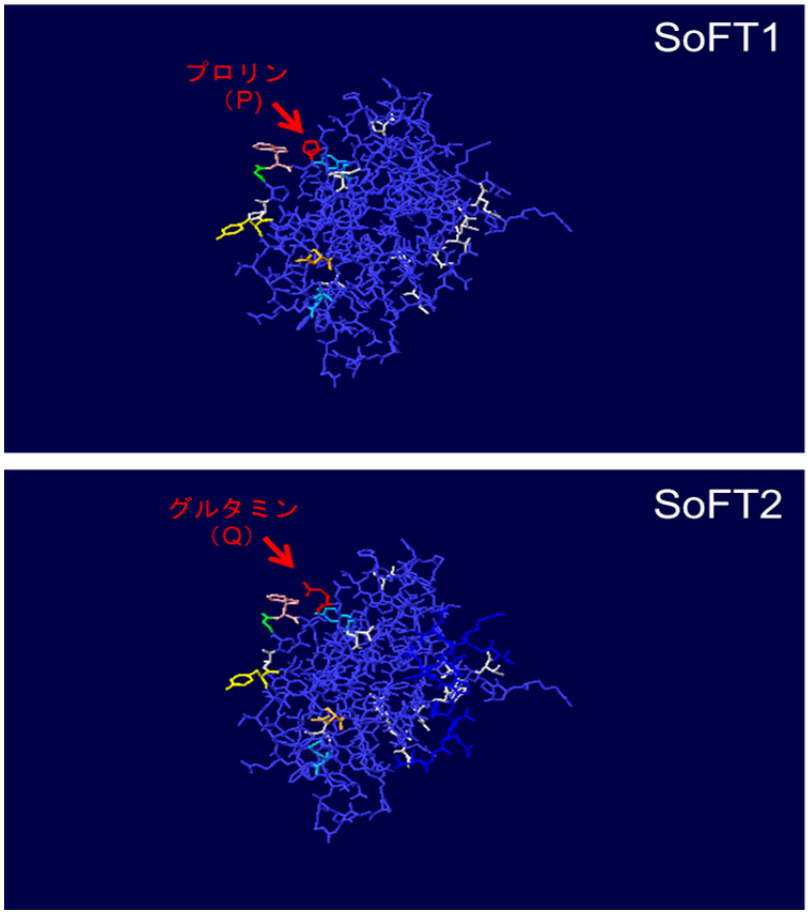


図 4. 9　ホウレンソウ *FT* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列の
予測立体構造

swiss-model(http://swissmodel.expasy.org)に登録されているシロイヌナズナ FT タンパク質の立体構造(Ahn et al., 2006)を元に、ホウレンソウ FT ホモログの予測立体構造比較を行った。立体構造の描画は swiss-model viewer version 4.1（http://spdbv.vital-it.ch）を用い，白色のアミノ酸残基は FT 間で異なるアミノ酸残基を示し、赤色は FT 機能活性に重要なアミノ酸のうち、SoFT1 で置換されていたアミノ酸、その他の色は FT 機能活性に重要なアミノ酸残基を示す。

4. 3 考察

ホウレンソウの分子生物学的な花芽形成制御機構を研究するために，新たにホウレンソウから光周期経路の *CONSTANS* (*CO*) 遺伝子と, 花成経路統合遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子の単離を試みた。

シロイヌナズナの AtCO は日長を認識し，長日条件下で *FT* の転写を活性化させる (Suárez-López et al., 2001; Tiwari et al., 2010)。AtCO が属する COL ファミリーは植物に特有のジンクフィンガー型転写因子である。ジンクフィンガータンパク質とは亜鉛イオンを配位することで特定の構造をとり，DNA や RNA，タンパク質と相互作用を示すタンパク質のことである。B-Box ドメインはジンクフィンガータンパク質のサブグループの一つで，タンパク質相互作用に関連しているとされている。B−Box ドメインを含むタンパク質は生物に普遍的に存在し，動物ではよく研究が行われているが，植物では詳細な研究が始まったばかりである。植物の B−Box ドメインを含むタンパク質は，coiled-coil ドメインを含むタンパク質と相互作用することが知られている。AtCO は，coiled-coil を含むタンパク質 CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) と相互作用を示し，*FT* の転写を調節することが知られている (Gangappa and Botto, 2014)。COL ファミリーは，N 末端領域に 1 つもしくは 2 つの B−Box ドメインを持ち，C 末端領域に CCT ドメインを持つ。CCT ドメインは *FT* のプロモーター領域の結合部位となっており，転写活性化に重要なドメインとなっている。シロイヌナズナには 17 個の COL ファミリーが存在し，B−Box ドメインの構成から大きく 3 つのグループに分けることができる (Griffiths et al., 2003)。タイプ I は 2 つの B-Box ドメイン，タイプ II は 1 つの B−Box ドメイン，タイプ III は完全な B-Box 1 つと，不完全な B-Box を持つ構成になっている。タイプ I は日周への応答や光シグナルに関連し，タイプ II ならびにタイプ III も日周応答に関連しているとされ

ている。SoCOL1 は N 末端領域に 2 つの B−Box ドメインを持ち，C 末端領域に CCT ドメインを持っていた。B-Box ドメインの構成と一致して，CCT ドメインの系統樹解析でも, SoCOL1 は, AtCO や BvCOL1 と同じ分岐群に属していた（図 4. 5）。BvCOL1 や CrCOL1, CrCOL2 とは高い相同性を示したが, AtCO や AtCOL1, AtCOL2 とはあまり高い相同性を示さなかった。しかし，SoCOL1 の B-Box ドメインは，Box1，Box2 それぞれのシロイヌナズナのコンセンサス配列を保存しており（B-Box1:C-X2-C-X7-8-C-X2-D-X-A-X-L-C-X2-C-D-X3-H, B-Box2:C-X2-C-X3-P-X4-C-X2-D-X3-L-C-X2-C-D-X3-H）(Gangappa and Botto, 2014)，亜鉛イオンを配位するために必要なシステイン及びヒスチジンは保存されていた。さらに，COP1 との相互作用に重要な配列である，V-P モチーフも持っていたことから（図 4. 4），SoCOL1 は日周応答に関連して，花成制御に関連している可能性が考えられる。

FT タンパク質は，動物で最初に見つかったホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質（PEBP： phosphatidylethanolamine binding protein）と似た構造をを持つ(平岡ら, 2008)。植物における PEBP ファミリーは系統樹解析で, FT-like, CEN/TFL-like 及び MFT-like の 3 つのグループに分けることができる (Ballerini and Kramer, 2011)。多くの植物で FT-like は花成促進の機能を持ち，CEN/TFL-like は花成抑制機能を持つことが知られている。シロイヌナズナでは，FT と TFL はどちらも 4 つのエキソンを持ち，エキソン 4 を入れ換えると，互いの機能が入れ替わる (Ahn et al., 2006)。エキソン 4，特に 109 番目のグルタミン酸（E），138 番目のトリプトファン（W），140 番目のグルタミン（Q），152 番目のアスパラギン（N）はリガンド結合領域の構造に影響を及ぼし，花成促進／抑制機能を持つために重要であることが報告されている (Ho and Weigel, 2014)。テンサイには, FT ホモログが 2 つ存在する (Pin et al., 2010)。BvFT2 は花成を促進し，AtFT の

花成促進機能に重要なアミノ酸を全て保存している，FT オーソログである。BvFT1 は系統樹解析で FT-like 分岐群に属するものの，花成を抑制する働きを持っている。BvFT1 は FT に重要なアミノ酸をほとんど保存しているが，138 番目のトリプトファン（W）はグルタミン（Q）に置換されている。さらに，アミノ酸の 134 番目のチロシン（Y）がアスパラギン（N）に，137 番目のグリシン（G）はグルタミン（Q）に置換されている。この領域を BvFT1 と BvFT2 で入れ替えると, FT と TFL の時と同様に花成促進／抑制機能が入れ替わる (Pin et al., 2010)。SoFT1 と SoFT2 は，134 番目のチロシン，137 番目のグリシン，138 番目のトリプトファンは保存されていた。SoFT2 では，109 番目のグルタミン酸，140 番目のグルタミン，152 番目のアスパラギンも保存されていたが，SoFT1 では 140 番目のグルタミンのみプロリン（P）に置換されていた（図 4. 7)。140 番目のグルタミンはリガンド結合ポケットの近くに位置し，タンパク質間相互作用に重要である (Hanzawa et al., 2005; Ho and Weigel, 2014)。シロイヌナズナにおいて，FT は 14-3-3 タンパク質と相互作用し, 14-3-3 タンパク質を介して FD と複合体を形成する。この複合体が花芽分裂決定遺伝子である *APETALA1* の転写を活性化させる (Abe et al., 2005)。140 番目のグルタミンをアスパラギン酸やリジンに置換してもタンパク質との相互作用に影響を及ぼさないことが報告されている (Ho and Weigel, 2014)。しかし，プロリンは環状側鎖を持ち，タンパク質の立体構造を変化させるため，タンパク質相互作用能に影響を与える可能性も考えられる。また，シロザの FT ホモログ CrFT2 は SoFT1 と同様に 140 番目のグリシンがイソロイシン（I）に置換されていた（図 4. 7)。CrFT2 はその遺伝子発現様式から FT の機能を持たない可能性が指摘されており (Chab et al., 2008; Drabešová et al., 2014)，SoFT1 においても同様に花芽形成促進機能を持たない可能性も考えられる。

第 5 章 花芽形成関連遺伝子のホウレンソウホモログの発現様式解析

ホウレンソウから単離した COL ホモログならびに FT ホモログは，花芽形成促進機能を持つために重要なアミノ酸配列を保存していた。しかし，実際にホウレンソウで機能を持っているかは不明である。そこで *COL*，*FT* のホウレンソウホモログが日長に応答し，花芽形成と連動しているかを検討するために，遺伝子発現様式の解析を行った。

5. 1　実験材料および方法

5. 1. 1　ホウレンソウの育成

3. 1. 1 と同様に, ホウレンソウ種子（品種　日本ホウレンソウ, サカタのタネ）の果皮を手で除去した後，水で湿らせたろ紙を置いたシャーレに播種し，発芽するまで 4℃暗所で静置した。発芽後，園芸用培養土（ポットエース）とバーミキュライトを 1 : 1 に混合した培養土に移植した。育成は全て人工気象機（EYELA FLI-2000T, FLI-301N）を使用した。長日条件（16 時間日長），短日条件（9 時間日長），いずれの場合も 22℃で行った。日長条件間で生育速度が異なるため，本葉の発達具合を指標とし，生育段階を規定した。遺伝子発現量の日周変動の解析には，長日条件下，短日条件下，いずれも本葉が 3 ~ 4 枚に発達した段階の植物体地上部を試料とし，4 時間おきに採取した。器官別の遺伝子発現様式の解析には長日条件下で育成した植物体を使用した。実体顕微鏡（C-PSC, Nikon）を用いて，子葉，本葉，茎頂に分けて採取した。採取は全て明期開始から 9 時間後

に行った。遺伝子発現量の日長変化への応答実験では短日条件下で 1 か月間育成し，花芽形成の起きていない，本葉が 5～6 枚程度発達した植物体を長日条件下へと移した後，2 日おきに本葉を試料として採取した。花芽形成の有無は光学顕微鏡下（ECLIPSE E600，Nikon）で観察した。採取は全て明期開始から 9 時間後に行った。全ての試料は採取後すぐに液体窒素で凍結させ, -80℃で保存した。

5. 1. 2　光学顕微鏡による花芽形成時期の観察

光学顕微鏡用試料を作製し，ホウレンソウの花芽形成過程を観察した。採取したホウレンソウの茎頂部を，FAA 固定液（表 5. 1）に浸漬し，1～24 時間固定した。その後，エタノールと n-ブタノールを用いて順次，脱水した（表 5. 2)。パラフィン（PARAPLAST PLUS Tissue Embedding Medium, McCormik Scientific）で置換後（表 5. 3)，パラフィンケーキを作製した。パラフィンケーキから茎頂部を含むブロックを作製し，ミクロトームにより 8 μm の連続縦断切片を作製した。連続切片はスライドグラス（スーパーフロスト ホワイト APS，松浪硝子）上の純水に浮かべて十分に伸展させた後，過剰な水を取り除き一晩乾燥させた。伸展及び乾燥は伸展台を 37～40℃に設定して行った。その後，パラフィンを除去し（表 5. 4)，0.5%　(w/v) サフラニンと 0.5% (w/v) ファストグリーン FCF を用いて染色した（表 5. 5)。標本用封入剤（マウントクイック，大道産業株式会社）を用いて切片を封入し，プレパラートを作製した。観察は光学顕微鏡（ECLIPSE E600，Nikon）を用いて行った。

表 5. 1　FAA 固定液

	%（v/v）
ホルムアルデヒド	10
酢酸	5
エタノール	50
水	35

表 5. 2　植物組織の脱水過程

	純水 (%)	エタノール (%)	n-ブタノール (%)	時間（時間）
1	30	50	20	12～24
2	15	50	35	12
3*	0	45	55	12
4	0	25	75	12
5	0	0	100	12
6	0	0	100	24～48

*0.5% エオシン添加

脱水過程は全て室温で行った。

表 5. 3　脱水した植物組織のパラフィン置換過程

	パラフィン (%)	n-ブタノール (%)	時間（時間）
1	35	65	12 ~ 24
2	100	0	24 ~ 48

パラフィン置換はオーブンを 63℃に設定して行った。

表 5. 4　パラフィン連続縦断切片のパラフィン除去

	純水 (%)	エタノール (%)	レモゾール (%)	時間（分）
1	0	0	100	15
2	0	0	100	10
3	0	50	50	10
4	0	100	0	10
5	5	95	0	10
6	25	75	0	10
7	50	50	0	10

パラフィン除去の操作は全て室温で行った。

表 5. 5 植物組織連続縦断切片の染色
（サフラニン，ファストグリーンの二重染色）

		時間
1	0.5% サフラニン溶液（50% エタノール）	3 ~ 24 時間
2	純水（弁色）	数秒〜数分
3	50% エタノール	数秒〜数分
4	70% エタノール	数秒〜数分
5	90% エタノール	数秒〜数分
6	99% エタノール	数秒〜数分
7	0.5% ファストグリーン溶液	1 ~ 3 分
	（クローブオイル：エタノール：キシレン＝2：1：1）	
8	クローブオイル：エタノール：キシレン＝2：1：1（弁色）	数分
9	キシレン	10 分
10	キシレン	15 分

染色の操作は全て室温で行った。

5. 1. 3　cDNA の合成

RNA 抽出及び濃度算出は 4. 1. 2, 4. 1. 3 と同様に行った。DNase 処理及び，逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover kit（TOYOBO）を使用し，プロトコールに従って反応を行った。トータル RNA 0.5 μg に 4×DN Master Mix（gDNA Remover 添加済み）2 μl，Nuclease-free 水を加え，最終量 8 μl となるようにした。37℃で 5 分間保温後，2 μl の 5×RT Master Mix II を加えて逆転写反応は 37℃ 15 分，50℃ 5 分，98℃ 5 分，12℃ 5 分の条件で行った。反応後の試料は 40 μl の TE バッファー（表 4. 2）を加えて-30℃で保存した。

5. 1. 4　プライマーの設計

第 4 章で単離した完全長 cDNA の塩基配列を元にプライマー設計ソフト Primer 3（http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/）を用いて約 300 塩基の DNA 断片が増幅される各遺伝子に特異的なプライマーを設計した（表 5. 6）。ホウレンソウの *Actin* 遺伝子（*SoActin*）ならびに *Tubulin* 遺伝子（*SoαTUB*）を内部標準遺伝子とするために GenBank 及び(Kawade et al., 2008)をもとにプライマーを設計した。

5. 1. 5　リアルタイム PCR

各遺伝子の発現様式を調べるために，リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR の反応は THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（TOYOBO）を使用し，プロトコールに従って行った。10 μl の THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix，2 μl の cDNA，2 μl の 2 μM 各種プライマー（表 5. 6），4 μl の純水を混合し，最終量 20 μl とした。この反応液をリアルタイム PCR 用リアクションプレートに分注し，CFX Connect™ Real-Time System（Bio-Rad）を用いて，反応は 95℃ 30 秒間の後に, 95℃ 10 秒間と 62℃ 30 秒間を 45 サイクル行った。内部標準遺伝子として，

SoActin と *SoαTUB* を用いた。

表 5. 6　リアルタイム PCR 用プライマー

プライマー名	配列（5’ → 3’）
SoFT1-a	GGCCATCTGAAGTTGTTAGC
SoFT1-b	AGACAGCAGCAACTGGTAGT
SoFT2-a	AGGCCATCTGAGGTTGTTAAT
SoFT2-b	AGTCTCGAGTGTTGAAGTTCT
SoCO-a	TGAAGGGGATGAGGATGAAG
SoCO-b	TCACATTCCATTCCGAACAA
SoActin F	GGTGATGGTGTTAGTCACAC
SoActin R	AATGATGGCTGGAAGAGAAC
SoαTUB-a	TGTTGTTCCCAAGGATGTGA
SoαTUB-b	GGCCCTCTTGGCATACATAA

5. 2　結果

5. 2. 1　*SoCOL1* の遺伝子発現様式

CO ならびに *COL* ホモログの遺伝子発現量は日周変動を示すことが知られている (Valverde, 2011)。*SoCOL1* の遺伝子発現量が日周変動を示すのかを調べた。長日条件下，短日条件下共に，葉が 3–4 枚に発達した段階の植物体地上部を用いた。光学顕微鏡による茎頂観察では，長日条件下では花芽形成が起きており，短日条件では花芽形成が起きていないことを確認した（図 5. 1）。*SoCOL1* は日長条件に関係なく，暗期が始まると発現量が増加し始め，暗期終了時（zeitgeber time [ZT]=0）に最大値となる発現様式を示した。また，長日条件と短日条件，つまり花芽形成誘導条件と抑制条件の間で，発現量の差はなかった（図 5. 2）。

5. 2. 2　*SoFT* 遺伝子の発現様式

（1）遺伝子発現量の日周変動

様々な植物から同定された *FT* ホモログも遺伝子発現量が日周変動を示すことが知られていることから (Song et al., 2013)，*SoFT1* ならびに *SoFT2* 遺伝子の発現量が日周変動するかどうかを調べた。試料は 5. 2. 1 と同じ試料を使用した。S*oFT1* と *SoFT2* は短日条件ではほとんど発現がみられず，長日条件で常に高く発現していた（図 5. 3）。*SoFT1* は長日条件において日周変動を示し，明期の終わり（ZT=16）に最大となった。一方で，*SoFT2* は概日リズムを示さなかった。

（2）器官別の発現様式

一般的に *FT* 遺伝子は葉で発現し，翻訳産物の FT タンパク質が茎頂分裂組織（shoot apical meristem, SAM）に移動して花芽形成を誘導することが知られている (Zeevaart, 2008)。本研究で単離したホウレンソウホモログの発現器官を調べ

るために，長日条件下で育成した植物体の子葉，本葉，茎頂における遺伝子発現量をリアルタイム PCR により定量した。このとき，各器官は本葉の発達枚数をもとに設定した 3 つの生育段階から採取し，各生育段階における花芽形成の有無は光学顕微鏡により確認した（図 5. 4)。

ステージ I：花芽形成が起きておらず，本葉 1～2 枚目が 5 mm 程度

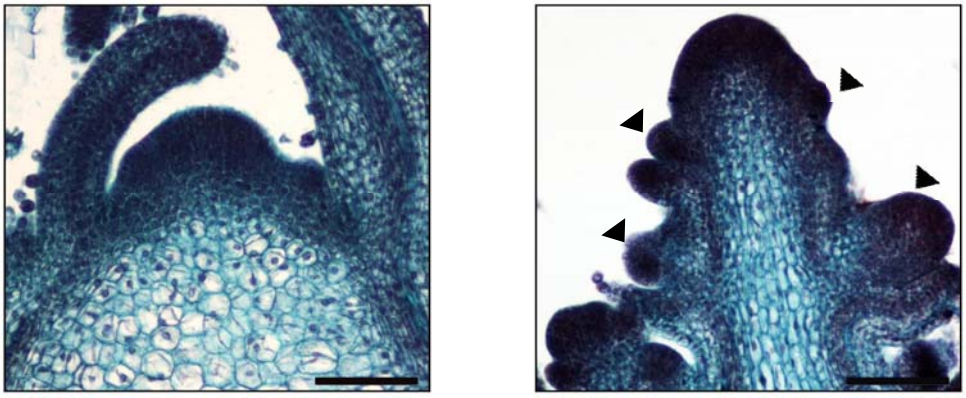
ステージ II：花芽形成が起きているものと起きていないものが混在しており，本葉 3～4 枚目が 5 mm 程度

ステージ III：全個体に花芽形成が確認でき，本葉 5～6 枚目が 5 mm 程度

SoFT2 の発現量は全てのステージにおいて子葉で高く，茎頂部では低い発現様式となった。また，生育段階が進むにつれて，本葉での発現が増加した（図 5. 5)。*SoFT1* に関してはほとんどの部位，生育段階で発現量が低すぎるために，特異的な発現量を検出することができなかった。

（3）日長変化にともなう発現量の変化

SoFT1 と *SoFT2* の遺伝子発現量が長日条件下で，花芽形成が起きる際に増加したこと，短日条件で低く，長日条件で高かったことから，遺伝子の発現が日長の変化に反応している可能性が考えられた。そこで短日条件下で葉が 5–6 枚程度発達した段階の植物体を長日条件下に移し，2 日おきに本葉を採取した。6 日目には全個体で花芽が形成されることを，光学顕微鏡観察により明らかにした（図 5. 6)。*SoFT1* の発現量は長日条件に移した 2 日後に 2 倍になり，その後 6 日目まで発現量は徐々に増加し続けた。*SoFT2* の発現量は長日条件に移した 2 日後に 20 倍に増加し，その後発現量は減少していき，6 日目には長日条件下への移行時と比較して 10 倍量程度の発現量になった（図 5. 7)。



短日条件　　**長日条件**

図 5. 1　各日長条件下で育成したホウレンソウ茎頂部の縦断切片

短日条件（9 時間日長，左図），長日条件（16 時間日長，右図）で本葉が 3～4 枚程度に発達するまで栽培したホウレンソウ茎頂部の縦断切片を作成し，光学顕微鏡（ECLIPSE E600, Nikon）にて花芽形成の有無を観察した。黒棒は 100 μm，矢頭は花芽を示す。

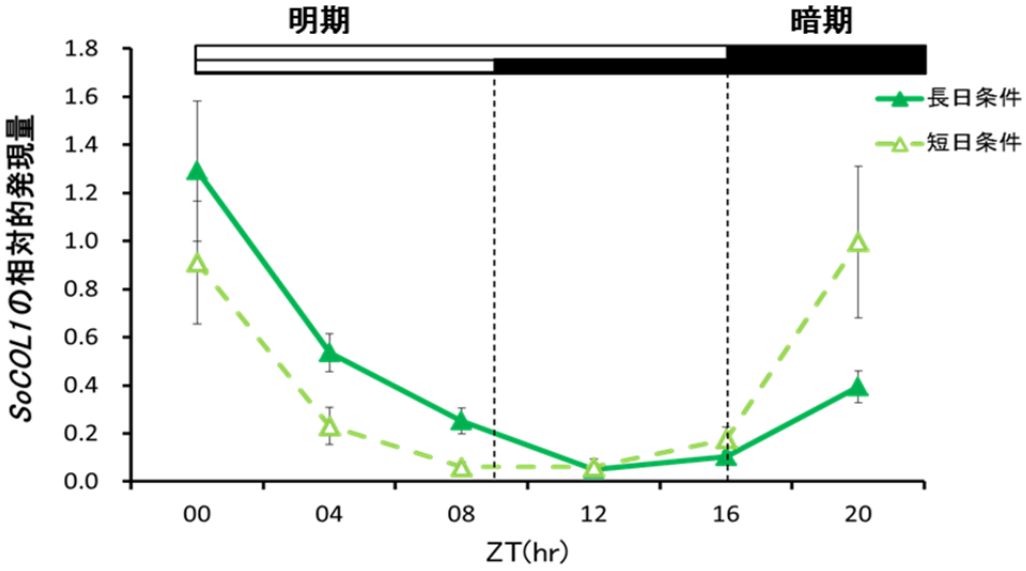


図 5. 2　*SoCOL1* 遺伝子発現量の日周変動

長日条件（16 時間日長），短日条件（9 時間日長）で本葉が 3～4 枚程度発達するまで栽培したホウレンソウを 4 時間おきに採取し，リアルタイム PCR を用いて *SoCOL1* 遺伝子の発現様式を解析した。遺伝子発現量は *SoActin* 及び *SoαTUB* に対する相対値を示す。値は 4 回の独立した実験の平均値，エラーバーは標準偏差を示す。ZT＝Zeitgeber Time, ZT=0 は明期開始時。

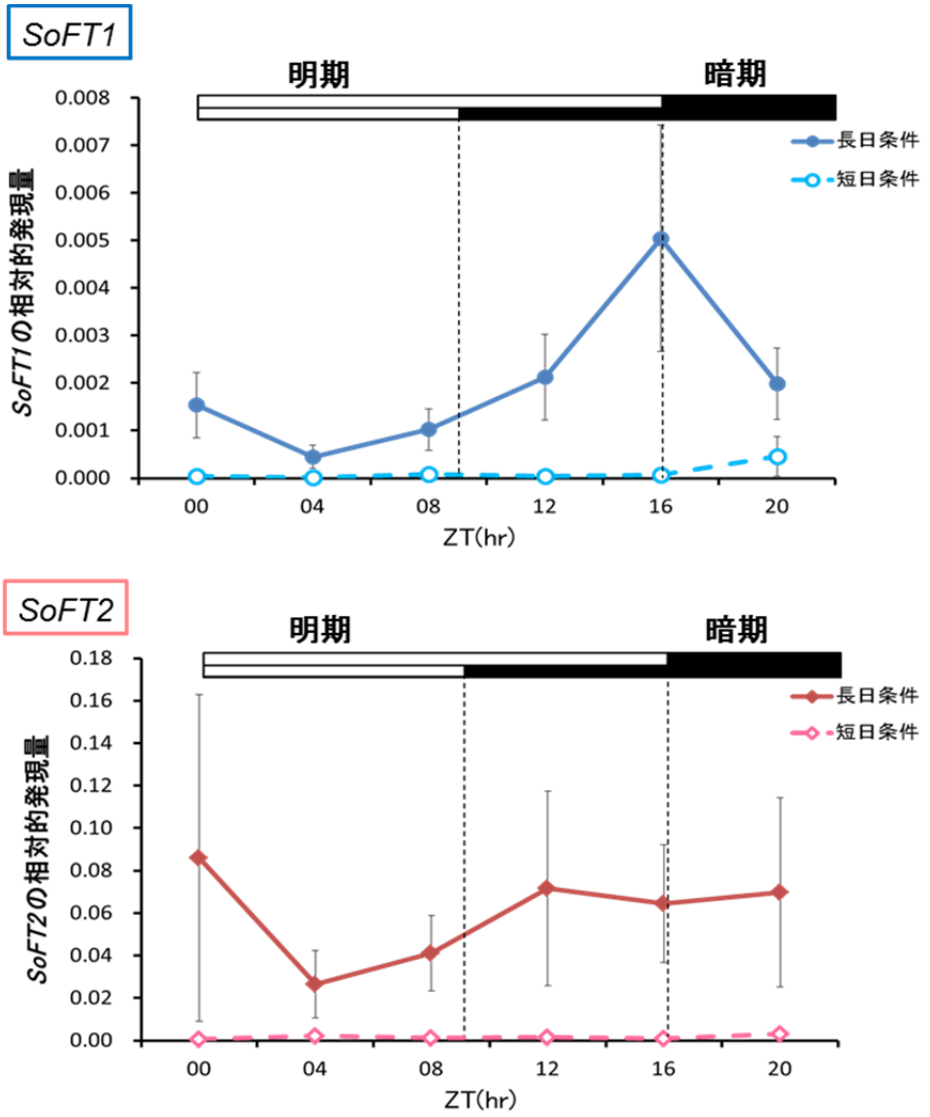


図 5. 3　*SoFT1* と *SoFT2* 遺伝子発現量の日周変動

長日条件（16 時間日長），短日条件（9 時間日長）で本葉が 3～4 枚程度発達するまで栽培したホウレンソウを 4 時間おきに採取し，リアルタイム PCR を用いて *SoFT1* ならびに *SoFT2* 遺伝子の発現様式を解析した。遺伝子発現量は *SoActin* 及び *SoαTUB* に対する相対値を示す。値は 4 回の独立した実験の平均値，エラーバーは標準偏差を示す。ZT＝Zeitgeber Time, ZT=0 は明期開始時。

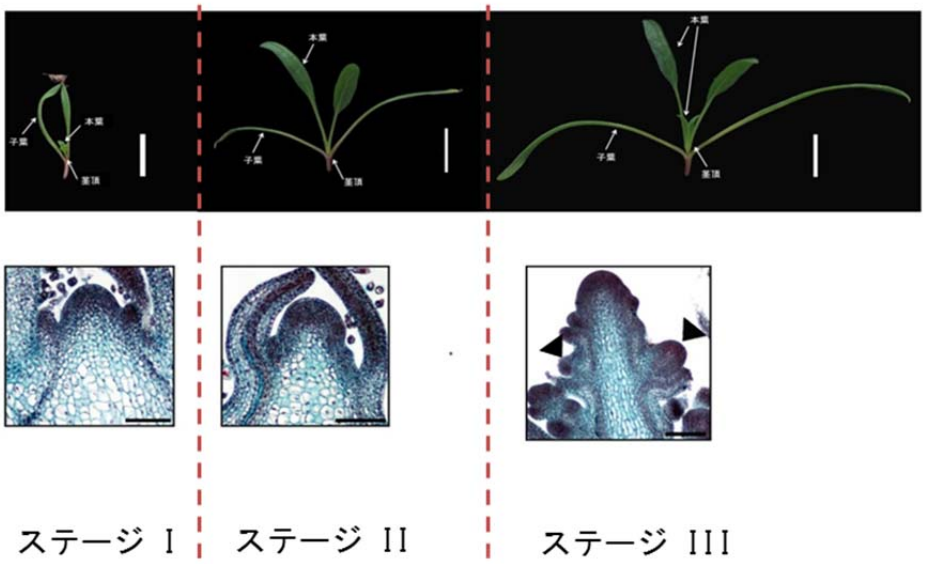


図 5. 4　ホウレンソウの生育段階と花芽形成過程

長日条件（16 時間日長）で栽培したホウレンソウを生育段階過程により 3 つの段階に設定した。

ステージ I　　：花芽形成が起きておらず，本葉 1~2 枚目が 5　mm 程度

ステージ II　：花芽形成が起きているものと起きていないものが混在しており，本葉 3~4 枚目が 5 mm 程度

ステージ III　：全個体に花芽形成が確認でき，本葉 5~6 枚目が 5 mm 程度

各生育段階の茎頂部の縦断切片を作成し，光学顕微鏡（ECLIPSE E600, Nikon）にて花芽形成過程を観察した。上図は植物体外観，下図は茎頂部の縦断切片。白棒は 1 cm，黒棒は 100 µm，矢頭は花芽をそれぞれ示す。

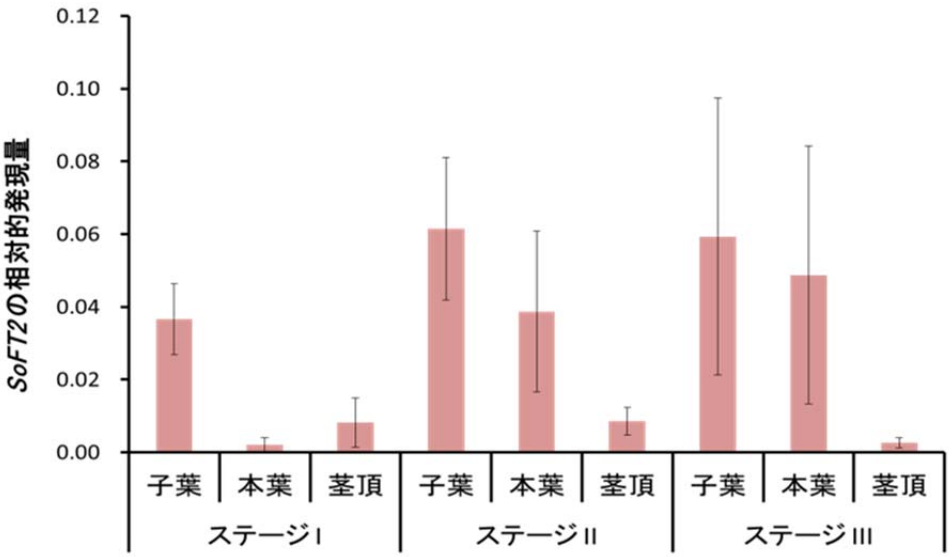


図 5. 5 *SoFT2* 遺伝子の各生育段階ごとの器官別発現様式

長日条件（16 時間日長）で栽培したホウレンソウを生育段階過程により 3 つの段階に設定し，器官別の *SoFT2* 遺伝子発現量をリアルタイム PCR により調べた。遺伝子発現量は *SoActin* 及び *SoαTUB* に対する相対値を示す。値は 4 回の独立した実験の平均値，エラーバーは標準偏差を示す。

ステージ I　　：花芽形成が起きておらず，本葉 1～2 枚目が 5 mm 程度

ステージ II　：花芽形成が起きているものと起きていないものが混在しており，本葉 3～4 枚目が 5 mm 程度

ステージ III　：全個体に花芽形成が確認でき，本葉 5～6 枚目が 5 mm 程度

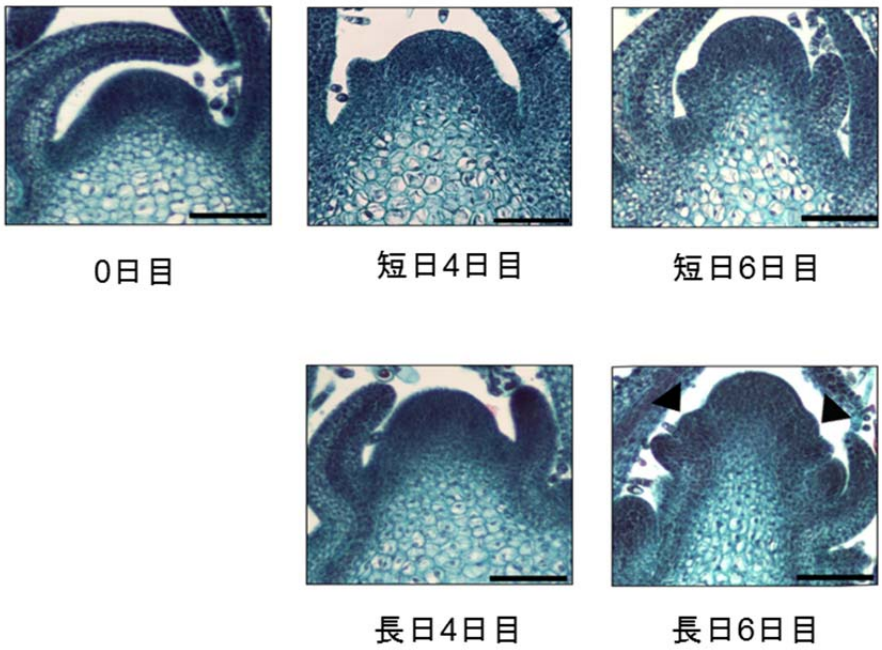


図 5. 6　短日条件下から長日条件下へ移行した時の花芽形成過程

短日条件下（9 時間日長）で本葉が 5～6 枚程度に発達するまで栽培したホウレンソウを長日条件下（16 時間日長）へ移し，移した日を 0 日目とし，2 日おきに 6 日目までサンプリングを行った。長日条件下では，6 日目に全ての個体で花芽形成が確認できた。茎頂部の縦断切片を作成し，光学顕微鏡（ECLIPSE E600, Nikon）にて花芽形成過程を観察した。黒棒は 100 μm，矢頭は花芽を示す。

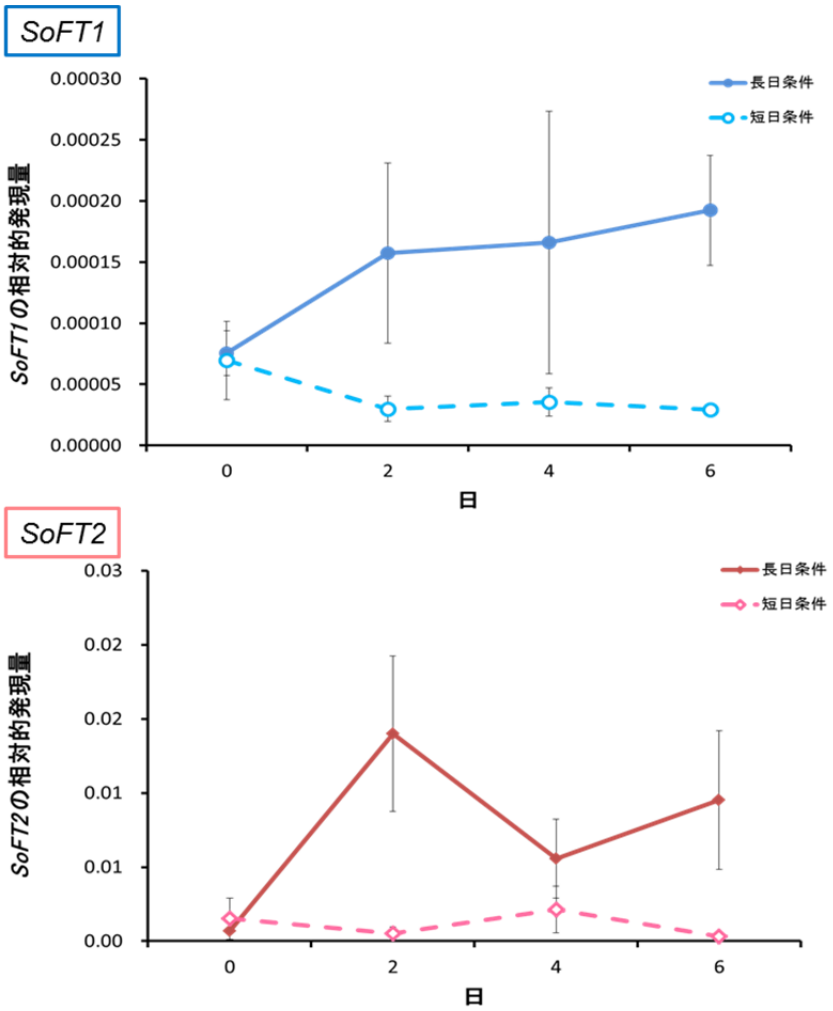


図 5. 7　短日条件下から長日条件下へ移行した時の *SoFT1* と *SoFT2* 遺伝子発現量の変動

短日条件下（9 時間日長）で本葉が 5 ~ 6 枚程度に発達するまで栽培したホウレンソウを長日条件下（16 時間日長）へ移し，移した日を 0 日目とし，2 日おきに 6 日目までサンプリングを行った。長日条件下では，6 日目に全ての個体で花芽形成が確認できた。リアルタイム PCR を用いて *SoFT1* と *SoFT2* 遺伝子の発現様式を解析した。遺伝子発現量は *SoActin* 及び *SoαTUB* に対する相対値を示す。値は 4 回の独立した実験の平均値，エラーバーは標準偏差を示す。

5. 3　考察

本研究で単離した花芽形成関連遺伝子のホウレンソウホモログについて，その機能を確認するために，リアルタイム PCR による遺伝子発現様式の解析を行った。

シロイヌナズナにおいて，*AtCO* は明期に誘導され，*FT* 遺伝子の転写を活性化させる (Song et al., 2013)。*AtCO* の mRNA 量は概日時計によって制御され日周変動を示し，明期終了時に最大値となる (Suárez-López et al., 2001)。日長が長くなると，*AtCO* の mRNA 量は高く維持される。AtCO の翻訳産物は光条件下で安定するため，長日条件下では *FT* 転写活性化に必要な量の AtCO タンパク質が蓄積する。*SoCOL1* の遺伝子発現量は日長に関係なく日周変動を示し，暗期の終わりに最大となり，明期が開始されると，著しく減少した（図 5. 2)。この遺伝子発現様式は，*AtCO* とは逆の動きであり，*BvCOL1*，*AtCOL1*，*AtCOL2* の遺伝子発現様式と似ていた (Ledger et al., 2001; Chia et al., 2008)。*AtCOL1* ならびに *AtCOL2* はシロイヌナズナにおいて日周変動を示すが，花芽形成には影響を及ぼさないことが報告されている (Ledger et al., 2001)。一方で，花成遅延の表現型を示すシロイヌナズナ *co-2* 変異体に *BvCOL1* を過剰発現させると花成遅延を回復させることが報告されている (Chia et al., 2008)。これは BvCOL1 が花成促進能力を有している可能性を示しており，発現様式が似ている SoCOL1 に関してもその可能性がある。

FT 遺伝子は, 葉で発現し, その翻訳産物が葉の篩部を通って茎頂に運ばれる。その後，茎頂にて FD と複合体を形成し，*AP1* 遺伝子の転写活性化を行うことで花芽形成を誘導する (Abe et al., 2005)。シロイヌナズナやテンサイの *FT* 遺伝子の発現は日周変動を示すが, *SoFT2* はいずれの日長条件においても概日リズムは示さなかった（図 5. 3)。しかし，子葉と本葉で発現し，茎頂部ではほとんど発

現が検出されなかったこと（図 5. 5），短日条件下に比べ長日条件下，つまり花芽形成後に常に高く発現していたこと（図 5. 3），短日条件下から長日条件下へ移して 2 日目には発現量が急激に増加したことから（図 5. 7），SoFT2 は FT オーソログである可能性が高い。*SoFT1* の遺伝子発現は *SoFT2* に比べると，日長を変化させた時に，花芽形成に伴う増加率は低く（図 5. 7），発現部位の特定も出来なかった。しかし，*SoFT1* は茎断片，*SoFT2* は植物体地上部より単離されたことから（4. 2. 2），*SoFT1* は花芽形成後の茎断片で発現していると考えられる。シロイヌナズナの FT ホモログ，*TWIN SISTER OF FT* (*TSF*) (Yamaguchi et al., 2005) は花芽形成誘導機能を持つが, その発現部位は胚軸である。ダイズ（*Glycine max*）の FT ホモログ，GmFT2a および GmFT5a はいずれも花芽形成を誘導する。しかし，短日条件下から長日条件下へと日長変化をさせた時に，*GmFT2a* は急激に発現量が減少するが, *GmFT5a* はゆるやかに発現量が減少する (Kong et al., 2010)。このように同じ FT ホモログでも応答性が違うことが知られている。シロザの *CrFT2* は，日周変動を示さず，野生型のシロイヌナズナならびに花成遅延変異体 *ft-2* に過剰発現させても花芽形成を誘導せず, 花芽形成制御機構には関連しないと考えられたが，オープンリーディングフレームが保存されていること，遺伝子発現量が高いことから何らかの機能があるとされている (Drabešová et al., 2014)。ホウレンソウの *SoFT1* は長日条件に移すと発現量が増加し，概日リズムを示したことから（図 5. 3, 5. 7），光シグナル伝達において何らかの役割を果たしていると考えられる。

第 6 章　総合考察

植物にとって，生殖生長への移行は子孫を残すために重要な機構であり，内生要因と外部要因の相互作用により厳密に制御されている。そして生殖生長への移行時には茎頂分裂組織において細胞が分化し, 大きな形態変化を伴う (テイツとザイガー, 2004)。ホウレンソウにおける生殖生長は, 最初に花芽が形成され, その後，茎伸長（抽だい）が起きる。抽だいは，品質の低下と外観をそこねるため，農業上大きな問題である。そこで私は，ホウレンソウの抽だい制御機構を解明すべく研究を行った。植物の生長制御機構は促進因子と抑制因子とのバランスの間で決定している。これは花芽形成・抽だいにおいても当てはまると考えられる。本研究ではホウレンソウの花芽形成・抽だいを制御している内生因子を特定することを目的とし，抽だい抑制活性を持つ物質と，花芽形成に関連している遺伝子の単離を試みた。

ホウレンソウの抽だいには活性型ジベレリンが正の制御因子，抽だいを促進する因子として作用する報告があることから (Zeevaart, 1971; Zeevaart et al., 1993; Wu et al., 1996; Lee and Zeevaart, 2002, 2007)，負の制御因子，抽だい抑制因子の単離を試みた。ロゼット型のホウレンソウ地上部のエタノール抽出物から, 本研究で開発した検定法を用い，抽だい抑制活性を検出した。エタノール抽出物の水分画は分離初期に生物検定で強い生長阻害を示した（図 3. 2, 3. 3）。この分画には水溶性の強酸性物質が含まれていた。これらはホウレンソウに含まれている多量のシュウ酸やシュウ酸の誘導体である可能性が高いと考えられる。有機溶媒可溶性画分の HPLC 精製画分に抽だい抑制活性を示すものがあり（図 3. 9, 3. 10），ホウレンソウのエタノール抽出物で認められた抽だい抑制活性が, 単なる夾雑成分による生長阻害ではなく，ホウレンソウ内に抽だい抑制物質が存在することが明らかとなった。HPLC の活性画分を質量分析にて構造解析に供

したところ，分子量 796 であった（図 3. 11）。精製段階での過程がすべて低極性であったことから，脂質ライブラリーサーチを行ったところ，分子量から Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)，フラグメンテーションパターンから 16-hexadecanoic acid が候補化合物として挙げられた（図 3. 12, 3. 13）。MGDG は葉緑体の膜脂質であり, 光合成に深く関連しているとされているが (小林と太田, 2009)，花芽形成や抽だいへの関与の報告はない。しかし，ダイコンの抽だい阻害物質 α-(7Z, 10Z, 13Z)-hexadecatrienoic acid（16：3 脂肪酸モノグリセリド）(Yoshida et al., 2010) や，抽だい抑制活性を示すジャスモン酸も脂肪酸の一種であることから，ホウレンソウから単離した抽だい抑制物質が脂質関連物質である可能性を支持している。本研究で単離した抽だい抑制物質は，ジャスモン酸やジャスモン酸メチル，ダイコンの抽だい阻害物質とは精製段階において異なる分画にくることから，ホウレンソウ特有の物質ある可能性が高く，植物種により抽だいを抑制する物質が異なる可能性がある。

一般的に花芽形成と抽だいはほぼ同時に起こることから 1 つの現象であると考えられている。しかし，同じアカザ科のテンサイとホウレンソウにおいても両現象が生じるタイミングは異なる。ホウレンソウは花芽形成が先に起こり，花茎伸長，抽だいが生じる。一方で，テンサイは抽だい中に花芽を形成せず，抽だい完了後に花芽形成が始まる。したがって，両現象は密接に関連しているものの，それぞれ異なったメカニズムで制御されている可能性もある。

テンサイの抽だい制御は抽だい B 遺伝子座に存在する *BOLTING TIME CONTROL1* (*BvBTC1*) によって決まっている (Pin et al., 2012)。一年生のテンサイ（*B. vulgaris* ssp. *maritima*）では *BvBTC1* が *BvFT1* の発現を抑制し，*BvFT2* の発現を促進する。その結果，低温期間なしに長日条件下で抽だいする。一方，二年生のテンサイ（*B. vulgaris* ssp.*vulgaris*）において，長日条件下では劣勢対立

遺伝子 *Bvbtc1* の発現量が低く，*BvFT2* を促進することが出来ず，その結果，抽だいが起きない。*Bvbvc1* は低温期間中に発現量が徐々に上昇し，*BvFT1* の発現を抑制し，*BvFT2* の発現を促進する。その結果，抽だいが起きる。*BvBTC1* による *BvFT1* ならびに *BvFT2* の制御が花芽形成だけでなく，抽だいも制御していると考えられている。

ホウレンソウにおいてもテンサイのように花芽形成関連遺伝子が抽だい性に関与する可能性もある。ホウレンソウの花芽分化には日長は関係なく，ある程度の大きさになると花芽分化し，その後の抽だいに日長が影響するとされてきた (山川, 2003)。しかし，光学顕微鏡による観察を行った結果，長日条件下にて播種から 2 週間程度育成し，本葉が 3～4 枚発達した段階から花芽形成が確認できたが，短日条件下にて育成した場合は 1 か月程度の本葉 5～6 枚発達した段階でも花芽形成は確認出来なかった（図 5. 1, 5. 4, 5. 6）。花芽形成が確認できた個体は茎伸長が始まっていたこと，花芽形成の発達と共に *FT* ホモログが増加したことから，花芽形成関連遺伝子の増加が，後の茎伸長に影響を及ぼしている可能性も考えられる。本研究で単離した抽だい抑制物質によって茎伸長が抑制されたが，このときの花芽形成の有無は確認出来ていない。ダイコンの場合は，抽だい阻害物質を与えると花芽形成は起きるが茎伸長は起きないと報告されている (Yoshida et al., 2010)。

花芽形成は，光周期経路，春化依存経路，ジベレリン依存経路，自律的経路の主な 4 つの経路が複雑に絡み合い正負の制御を行っている。そして，これらの経路は統合的に FLOWERING LOCUS T (FT) を制御する (Song et al., 2013)。花芽形成は正負の制御因子によって制御されているが，植物ごとに花芽形成誘導に重要な制御経路が異なる。ホウレンソウは低温よりも日長に強く依存することが報告されているため (山川, 2003)，日長制御経路に重点をおいて研究を行

った。光周期依存経路の代表的な遺伝子 *CONSTANS* (*CO*) と *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子のホウレンソウホモログの単離を試みた結果，1 つの *CO-like* 遺伝子（*SoCOL1*）と 2 つの *FT* 遺伝子（*SoFT1*，*SoFT2*）を単離した。公開された西洋ホウレンソウのゲノム情報 (Dohm et al., 2014)で，単離した 3 つの遺伝子について BLAST 検索を行ったところ，完全一致するものが見つかった。完全長 cDNA に関しては，抽だい性の異なる西洋種，東洋種では全く同じ配列であることが示された。SoCOL1 の推定アミノ酸配列は，2 つの B−Box と 1 つの CCT ドメインを持ち，シロイヌナズナの AtCO やテンサイの BvCOL1 と同じ分岐群に属した（図 4. 3）。 *AtCO* は *FT* 転写活性化のために，光条件下で誘導される (Song et al., 2013)。*SoCOL1* の発現様式は，*AtCO* とは反対に，どちらの日長条件においても暗期に誘導される日周変動を示した（図 5. 2）。この発現様式は，*AtCOL1*，*AtCOL2*，*BvCOL1* と似ていた (Ledger et al., 2001) 。AtCOL1 ならびに AtCOL2 は花芽形成には関連しないとされているが，シロイヌナズナの花成遅延変異体に *BvCOL1* を過剰発現させると, 表現型を回復させる (Chia et al., 2008)。そのため BvCOL1 には花芽形成誘導機能があると考えられ，SoCOL1 にも保存されている可能性がある。

ホウレンソウから単離された SoFT1 と SoFT2 はアミノ酸配列の高い相同性を示し，他の植物の FT と同分岐群に属した（図 4. 6）。SoFT1 は FT 分岐群の中でも花成抑制機能を持つ BvFT1 (Pin et al., 2010)と非常に近い。BvFT1 も SoFT1 も FT の花芽形成誘導機能に重要なアミノ酸が置換されていたが，置換されていたアミノ酸の位置や数は異なった。SoFT1 の置換されていたアミノ酸はシロザの CrFT2 と同じ位置であり, CrFT2 は花芽形成誘導機能を持たないと報告されている (Chab et al., 2008; Drabešová et al., 2014)。*SoFT1* は遺伝子の発現様式から，花芽形成への関連性は低いと考えられたが，日周変動を示し，日長変化に応答し

たため，光シグナル伝達の何らかの役割を果たしていると考えられる。このことは他の植物の報告と同様に, FT ホモログの花芽形成誘導以外の機能を示した。

SoFT2 は FT の花芽形成誘導機能に必要なアミノ酸を全て保存していたが，SoFT1 はその内一つのアミノ酸が置換されていた（図 4. 7)。*SoFT2* 遺伝子は他植物の *FT* ホモログと同様に子葉と本葉で発現し，短日条件下から長日条件下へ移行させると，花芽形成に先立って発現量が劇的に増加した（図 5. 6, 5. 7)。タンパク質の相同性と遺伝子発現様式から，他の *FT* ホモログのように日周変動は示さないものの，SoFT2 が FT オーソログであり，ホウレンソウの花芽形成に関連している可能性が示唆された。

SoFT1 と SoFT2 のタンパク質の保存性と遺伝子発現様式の解析から，シロイヌナズナやテンサイと同様に，FT の花芽形成誘導機構がホウレンソウにおいても保存されている可能性が示された。FT タンパク質はシロイヌナズナにおいて，14-3-3 タンパク質と相互作用し，14-3-3 タンパク質を介して FD と複合体を形成する (辻ら, 2013)。この複合体が花芽分裂決定遺伝子である *APETALA1* の転写を活性化させ，花芽形成が起きる。この 14-3-3 タンパク質と相互作用を示すために必要なアミノ酸が，SoFT2 にはすべて保存されていた (Ho and Weigel, 2014)。ホウレンソウにおいて，FD タンパク質や 14−3−3 タンパク質の報告はまだ無いが，同様の機構で *AP1* の転写活性化が行われていることが示唆される。

ホウレンソウは、環境ストレス下での生殖生長を回避するために，抑制と促進のバランスを保ちながらロゼット型を維持している。今回単離された抽だい抑制物質の品種間や日長条件間における量的，質的な変動だけでなく，外生的に与えた場合の形態変化，花芽形成関連遺伝子の発現様式を調べることで，花芽形成と抽だいの関連性への理解を深め，ホウレンソウにおける花芽形成・抽だいの制御機構を明らかにできると考えられる。

摘 要

本研究はホウレンソウに存在する抽だい制御因子を探索することを目的に抽だい抑制物質の単離と，花芽形成関連遺伝子の単離およびその遺伝子発現様式を解析した。

1. *in vitro* で育成したホウレンソウ易抽性品種の幼植物体を用いた抽だい抑制活性検定法を開発し，晩抽性品種から抽だい制御物質の探索を行った。
2. ホウレンソウ晩抽性品種アクティオン地上部のエタノール抽出物が強い抽だい抑制活性を示した。このエタノール抽出物の酢酸エチル可溶性分画は抽だい抑制活性を示し，水分画は生長阻害活性が確認された。
3. 各種クロマトグラフィー, HPLC を用いて酢酸エチル可溶性分画から抽だい抑制物質の単離・精製ならびに質量分析を行った。その結果，分子量 796 の抽だい抑制物質の単離に成功した。
4. 単離した抽だい抑制物質のライブラリーサーチの結果，Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) が候補化合物としてあげられた。MGDG は葉緑体の膜脂質構成成分である。
5. 花芽形成制御経路のうち光周期経路の代表的な遺伝子である *CONSTANS* (*CO*)，花芽形成経路統合遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の単離を RT-PCR 及び RACE 法を用いて行った。
6. リードの茎断片から，*SoCOL1* 遺伝子と *SoFT1* 遺伝子，日本ホウレンソウの地上部から *SoFT2* 遺伝子をそれぞれ単離した。2 つの *FT* 遺伝子（*SoFT1, SoFT2*）は異なる品種から単離されたが，日本ホウレンソウにも *SoFT1* の CDS は確認され，品種による違いはなかった。さらに，研究途中で公開された西洋ホウレンソウ「ビロフレイ」と比較しても CDS は完全に一

致していた。

7. 推定されるアミノ酸配列から，SoCOL1 は CO タンパク質の特徴とされる B−Box や CCT ドメインを持っていた。系統樹解析の結果，SoCOL1 はシロイヌナズナの AtCO や，テンサイの BvCOL1 と同分岐群に属した。

8. *SoCOL1* の遺伝子発現量は日周変動を示し，花芽形成が起きている長日条件下（16 時間日長），花芽形成が起きていない短日条件下（9 時間日長），いずれの場合も暗期が始まると発現量が増加し，暗期終了時に最大値となった。日長条件間においての発現量の差はなかった。

9. *SoCOL1* の日周変動は，テンサイの BvCOL1 と似た様式を示し，系統樹解析の結果と一致した。SoCOL1 は BvCOL1 のオーソログである可能性が考えられた。

10. SoFT1 ならびに SoFT2 は推定されるアミノ酸配列から，80%の相同性を示した。系統樹解析からシロイヌナズナの AtFT やテンサイの BvFT1, BvFT2 と同分岐群に属した。

11. SoFT1 では FT ホモログが花芽形成誘導の機能を持つために重要なアミノ酸残基のうち，AtFT の 140 番目のグルタミンがプロリンに置換されていた。一方で，SoFT2 では重要なアミノ酸残基が全て保存されていた。

12. *SoFT1* の遺伝子発現量は，花芽形成が起きている長日条件下にて，花芽形成が起きていない短日条件下よりも常に高かった。また，日周変動を示し，明期終了時（ZT=16）に最大となった。*SoFT1* は短日条件下から長日条件下へと移行させると発現量が 2 倍に増加し，日長変化に応答していることが分かった。

13. *SoFT2* の発現量は，いずれの日長条件でも日周変動を示さなかった。しかし，長日条件下にて，花芽形成が起きていない短日条件下よりも常に高

く，短日条件下から長日条件下へと移行させると発現量が 20 倍に増加した。器官別の発現様式では，子葉と本葉で高く発現し，花芽の発達とともに発現量が増加した。

14. *SoFT1* の発現様式と重要な領域のアミノ酸残基が置換されていたことから，SoFT1 は花芽形成ではなく，光シグナル伝達において何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

15. *SoFT2* の発現様式とアミノ酸配列との相同性から，SoFT2 は FT オーソログであり，花芽形成誘導機能を持つ可能性が考えられた。

引用文献

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science **309,** 1052-1056.

Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., and Weigel, D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. Embo j **25,** 605-614.

Ballerini, E.S., and Kramer, E.M. (2011). In the Light of Evolution: A Reevaluation of Conservation in the CO-FT Regulon and Its Role in Photoperiodic Regulation of Flowering Time. Front Plant Sci **2,** 81.

Chab, D., Kolar, J., Olson, M.S., and Storchova, H. (2008). Two flowering locus T (FT) homologs in Chenopodium rubrum differ in expression patterns. Planta **228,** 929-940.

Chia, T.Y., Müller, A., Jung, C., and Mutasa-Göttgens, E.S. (2008). Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus. J Exp Bot **59,** 2735-2748.

Dohm, J.C., Minoche, A.E., Holtgrawe, D., Capella-Gutierrez, S., Zakrzewski, F.,

Tafer, H., Rupp, O., Sorensen, T.R., Stracke, R., Reinhardt, R., Goesmann, A., Kraft, T., Schulz, B., Stadler, P.F., Schmidt, T., Gabaldon, T., Lehrach, H., Weisshaar, B., and Himmelbauer, H. (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (Beta vulgaris). Nature **505,** 546-549.

Drabešová, J., Cháb, D., Kolař, J., Haškovcová, K., and Štorchová, H. (2014). A dark-light transition triggers expression of the floral promoter CrFTL1 and downregulates CONSTANS-like genes in a short-day plant Chenopodium rubrum. J Exp Bot **65,** 2137-2146.

藤枝　國光. (1993). 野菜の起源と分化.

Gangappa, S.N., and Botto, J.F. (2014). The BBX family of plant transcription factors. Trends Plant Sci **19,** 460-470.

Griffiths, S., Dunford, R.P., Coupland, G., and Laurie, D.A. (2003). The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice, and Arabidopsis. Plant Physiol **131,** 1855-1867.

Hanzawa, Y., Money, T., and Bradley, D. (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. Proc Natl Acad Sci U S A **102,** 7748-7753.

平岡　和久, 大門　靖史, 荒木　崇. (2008). 種子植物における汎用的な長距離シグナルであるFT蛋白質. Plant Morphology **19,** 11.

Ho, W.W., and Weigel, D. (2014). Structural features determining flower-promoting activity of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T. Plant Cell **26,** 552-564.

香川　彰. (1974). 農業技術体系　第7巻　ホウレンソウ,　3-8

Kawade, K., Ishizaki, T., and Masuda, K. (2008). Differential expression of ribosome-inactivating protein genes during somatic embryogenesis in spinach (Spinacia oleracea). Physiol Plant **134,** 270-281.

Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **104,** 17216-17221.

小林　康一,　太田　哲之. (2009). 高等植物におけるガラクト脂質の合成と生体膜構築. Plant　Morphology **21,** 11.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science **286,** 1960-1962.

Koda, Y., Ohkawa-Takahachi, K., and Kikuta, Y. (2001). Stimulation of Root Thickening and Inhibition of bolting by Jasmonic Acid in Beet Plants. *Plant. Prod. Sci.* **4,** 5.

Kong, F., Liu, B., Xia, Z., Sato, S., Kim, B.M., Watanabe, S., Yamada, T., Tabata, S., Kanazawa, A., Harada, K., and Abe, J. (2010). Two coordinately regulated homologs of FLOWERING LOCUS T are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean. Plant Physiol **154,** 1220-1231.

Ledger, S., Strayer, C., Ashton, F., Kay, S.A., and Putterill, J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. Plant J **26,** 15-22.

Lee, D.J., and Zeevaart, J.A. (2002). Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. Plant Physiol **130,** 2085-2094.

Lee, D.J., and Zeevaart, J.A. (2005). Molecular cloning of GA 2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in Nicotiana sylvestris. Plant Physiol **138,** 243-254.

Lee, D.J., and Zeevaart, J.A. (2007). Regulation of gibberellin 20-oxidase1 expression in spinach by photoperiod. Planta **226,** 35-44.

Metzger, J.D., and Zeevaart, J.A. (1982). Photoperiodic control of gibberellin metabolism in spinach. Plant Physiol **69,** 287-291.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum **15,** 5.

Mutasa-Gottgens, E., and Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. J Exp Bot **60,** 1979-1989.

Mutasa-Gottgens, E., Qi, A., Mathews, A., Thomas, S., Phillips, A., and Hedden, P. (2009). Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement. Transgenic Res **18,** 301-308.

Mutasa-Gottgens, E.S., Qi, A., Zhang, W., Schulze-Buxloh, G., Jennings, A., Hohmann, U., Muller, A.E., and Hedden, P. (2010). Bolting and flowering control in sugar beet: relationships and effects of gibberellin, the bolting gene B and vernalization. AoB Plants **2010,** plq012.

Nakayama, M., Yamane, H., Nojiri, H., Yokota, T., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Nishijima, T., Koshioka, M., Katsura, N., and Nonaka, M. (1995). Qualitative and Quantitative Analysis of Endogenous Gibberellins in *Raphanus sativus* L. during Cold Treatment and the Subsequent Growth. Biosci. Biotech. Biochem. **59,** 4.

Pin, P.A., Benlloch, R., Bonnet, D., Wremerth-Weich, E., Kraft, T., Gielen, J.J., and Nilsson, O. (2010). An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. Science **330,** 1397-1400.

Pin, P.A., Zhang, W., Vogt, S.H., Dally, N., Buttner, B., Schulze-Buxloh, G., Jelly, N.S., Chia, T.Y., Mutasa-Gottgens, E.S., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Weisshaar, B., Kraus, J., Gielen, J.J., Lommel, M., Weyens, G., Wahl, B., Schechert, A., Nilsson, O., Jung, C., Kraft, T., and Muller, A.E. (2012). The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. Curr Biol **22,** 1095-1101.

Song, Y.H., Ito, S., and Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. Trends Plant Sci **18,** 575-583.

Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. Nature **410,** 1116-1120.

高尾　保之. (1998). ホウレンソウの生育および抽だいに及ぼす夜間照明の影響と品種の限界照度. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **67,** 7.

高尾　保之. (2006). 夜間照明の光質並びに消灯時刻がホウレンソウの抽だいに及ぼす影響. 東京農総研研報 **1,** 5.

Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., and Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. Science **316,** 1033-1036.

Tiwari, S.B., Shen, Y., Chang, H.C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S.F., McPartland, M., Hymus, G.J., Adam, L., Marion, C., Belachew, A., Repetti, P.P., Reuber, T.L., and Ratcliffe, O.J. (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. New Phytol **187,** 57-66.

テイツ, L.,ザイガー, E. (2004). 植物生理学 第3版

辻 寛之, 田岡 健一郎, and 島本 功. (2013). 花成ホルモン"フロリゲン"の構造と機能. 領域融合レビュー **2**.

Valverde, F. (2011). CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. J Exp Bot **62,** 2453-2463.

Wu, K., Li, L., Gage, D.A., and 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.

山川 邦夫. (2003). 野菜の生態と作型―起源からみた生態特性と作型分化―, pp. 272.

Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., and Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. Plant Cell Physiol **46,** 1175-1189.

Yoshida, Y., Takada, N., and Koda, Y. (2010). Isolation and identification of an anti-bolting compound, hexadecatrienoic acid monoglyceride, responsible for inhibition of bolting and maintenance of the leaf rosette in radish plants. Plant Cell Physiol **51,** 1341-1349.

Zeevaart, J.A. (1971). Effects of photoperiod on growth rate and endogenous gibberellins in the long-day rosette plant spinach. Plant Physiol **47,** 821-827.

Zeevaart, J.A. (2008). Leaf-produced floral signals. Curr Opin Plant Biol **11,** 541-547.

Zeevaart, J.A., and Gage, D.A. (1993). ent-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants Spinacia oleracea L. and Agrostemma githago L. Plant Physiol **101,** 25-29.

Zeevaart, J.A., Gage, D.A., and Talon, M. (1993). Gibberellin A1 is required for stem elongation in spinach. Proc Natl Acad Sci U S A **90,** 7401-7405.