

第6章 ネギの生育・花成におけるジベレリンの機能解明

ジベレリンは植物ホルモンの一つであり、高等植物の生活環を通して、茎部の伸長、種子発芽の誘導、花芽形成など重要な生理現象を制御している（神谷、1994；豊増、2004）。ジベレリンは、イネ馬鹿苗病の病原菌（*Gibberella fujikuroi*）が生産する毒素として単離、構造決定された物質であり、現在、136種の同族体が天然型ジベレリンとして登録されている（Plant-hormones、2007）。高等植物におけるジベレリン生合成経路には、ジベレリン骨格に水酸基が導入される時期の違う2つの主要な経路、早期13位水酸化経路と早期非水酸化経路が存在する（神谷、1994；豊増、2004）。前者では、GA₁₂の13位に水酸基が導入されてGA₅₃となり、20位、3位が順次酸化されて活性型ジベレリンGA₁となる。後者では、GA₁₂の13位に水酸基が導入されない以外は早期13位水酸化経路と同様に生合成が進行し、活性型ジベレリンGA₄が生成する。また、GA₁と同程度の生物活性を示すGA₃は、高等植物での検出例は少ないが、トウモロコシにおいてGA₂₀からGA₅を経て生合成されることが報告されている（Fujiokaら、1990）。

栄養成長から生殖成長への移行は、植物の発育における重要な段階である。一般に、花成に伴う茎伸長には、ジベレリンが関与することが定説となっている（Chouard、1960；Pharis・King、1985）。また、モデル植物のシロイヌナズナをはじめとする幾つかの低温要求性の植物では、低温による花成誘起がジベレリンによって代替できることが報告されている（Mouradovら、2002；Pharis・King、1985；Wittwer・Bukovac、1957）。その一方で、ジベレリンを投与しても花成の誘導ができない事例、ジベレリン生合成阻害剤によって抽苔が抑制されても花成が抑制されない事例もある（Zeevaart、1983）。このように、ジベレリンの花成誘起への関与は、植物種によって異なるものと推察される。

ネギにおいては、分けつ発生にジベレリン投与が及ぼす影響を調査した事例（村井ら、1981；山崎ら、2006、2007）があるものの、花成および抽苔についての報告はない。また、*Allium*属における内生ジベレリンは、タマネギ（Nojiriら、1993）、ワケギ（Yamazakiら、2002）において報告されているが、ネギにおいては未調査である。

本章では、ネギの生育、花成におけるジベレリンの機能解明の第一歩として、ネギの内生ジベレリンの同定および定量、ジベレリン関連の候補遺伝子のクローニングおよび発現解析を行った。

第1節 初夏どり栽培におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が抽苔に及ぼす影響

ネギの生育、花成におけるジベレリンの役割を明らかにするために、初夏どり栽培におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤の処理が生育、抽苔率、抽苔発生の時期に及ぼす影響について検討を行った。

材料および方法

実験は鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場（鳥取県境港市中海干拓地）の砂畑圃場（砂丘未熟土）において行った。2001年10月10日に‘長悦’を264穴チェーンポットに1穴当たり2粒と3粒を交互に播種、11月28日に条間1mで深さ15cmの植え溝を切り、簡易移植機「ひっぱりくん」（日本甜菜製糖）で移植した後、12月18日から翌年3月28日まで有滴ポリエチレンフィルム（厚さ0.03mm、積水化学）でトンネル被覆（トンネル幅50cm、地面から25cmの高さに2m間隔で両サイドに直径8cmの換気穴をあけた）した。総施肥量はN：P₂O₅：K₂O＝20.5：28.5：20.3kg・10a⁻¹とした。処理は、ジベレリン（協和発酵、商品名：ジベレリン液剤）5ppmおよび25ppm、ウニコナゾールP（アグロス、商品名：スミセブンP）0.5ppmおよび1ppmを2月18日および27日の計2回、1m²当たり1L灌注処理した。無処理区は同量の水のみとした。実験規模は各区4m²、反復なしとした。3月28日に各区10株について、草丈、葉身長、葉鞘長、葉鞘径、葉数および地上部の新鮮重を測定した。4月17日から6月6日まで1週間おきに、各区3m²について葉鞘から花茎が15cm以上伸長した個体を抽苔株として計数した。

結果および考察

ジベレリン（GA区）およびウニコナゾールP（UZP区）がネギの生育に及ぼす影響を表6-1-1に示した。草丈は、無処理区に対してGA区およびUZP区で短かった。葉鞘長は、無処理区の17.5cmに対して、UZP区で約12cmと短く、GA区で約16cmとやや短くなった。地上部の新鮮重は、無処理区の41.3gに対して、GA区およびUZP区ともに約30gと生育が抑制された。処理が抽苔率に及ぼす影響を表6-1-2に示した。抽苔率は、無処理区の5%に対して、GA区で30%以上、UZP区で60%以上であった。抽苔発生を1週間おきに調査した結果、抽苔発生はGA区で早くなり、UZP区で遅くなる傾向が認められた（図6-1-1）。

前述したように、花芽誘起、その後の花芽発達および

表 6-1-1 初夏どり栽培におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が
生育に及ぼす影響^z (2002)

実験区	草丈	葉身長	葉鞘長	葉鞘径	葉数	新鮮重	
処理剤 濃度	(cm)	(cm)	(cm)	(mm)	(枚)	(g)	
無処理	—	64.7 a ^y	47.2 a	17.5 a	13.9 ab	3.7 b	41.3 a
GA ₃	5 ppm	54.6 b	39.0 b	16.0 b	13.5 b	4.1 a	33.9 b
	25 ppm	51.5 b	36.5 b	16.1 b	14.9 a	4.1 a	30.2 b
UZP	0.5 ppm	53.4 b	41.2 b	12.2 c	13.4 b	2.5 c	29.4 b
	1.0 ppm	53.7 b	41.9 b	11.9 c	14.8 a	2.7 c	28.4 b

^z 処理は、2月18日、27日に行い、3月28日に調査した

^y 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較法 (Tukey 法) において5%水準で有意差があることを表す

表 6-1-2 初夏どり栽培におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が
抽苔率に及ぼす影響 (2002)

実験区	調査株数	抽苔株数	抽苔率 (%)	
処理剤 濃度				
無処理	—	139	7	5.0
GA ₃	5 ppm	142	43	30.3 ** ^z
	25 ppm	165	59	35.8 **
UZP	0.5 ppm	140	97	69.3 **
	1.0 ppm	118	72	61.0 **

^z **は無処理区に対して1%レベルで有意差があることを表す

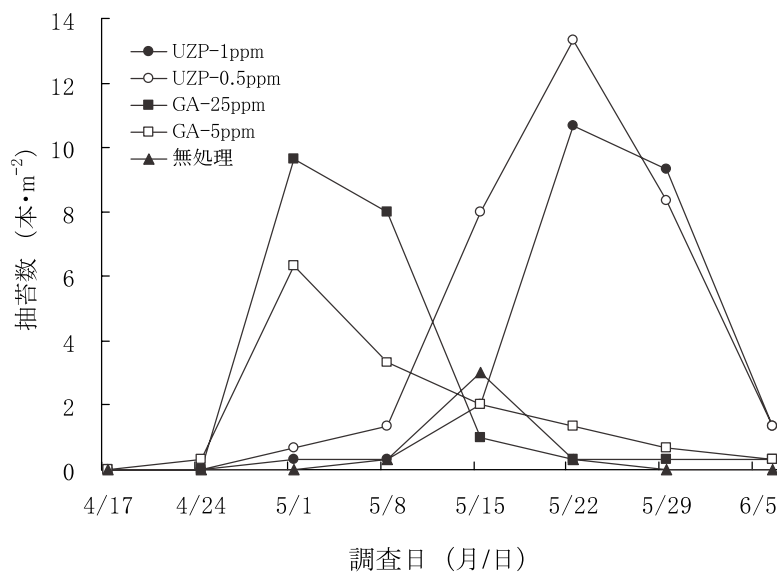


図 6-1-1 初夏どり栽培におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が
抽苔発生の推移に及ぼす影響 (2002)

花茎伸長（抽苔）におけるジベレリンの役割は、植物の種類によって異なる（Evans, 1971; Pharis・King, 1985）。本実験の抽苔率が無処理区に対して、GA区とUZP区の両方で高まったことは、これまでの知見では説明が難しい実験結果であるが、花芽誘起に対するジベレリンの関与の可能性を示唆する結果であると考えられる。一方、抽苔（花茎伸長）に関して、GA区で発生が早まったのに対し、UZP区では発生が遅くなった。この結果から、ネギにおける花茎伸長にはジベレリンが機能していると推察される。

本実験では、ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤の処理によってネギの形態への影響も認められた。一般に、植物にジベレリンを処理すると、茎葉の伸長が認められる（神谷, 1994）が、本実験のGA区では草丈がやや短くなる傾向が認められた。その様子は、葉身が細くなり、全体的に生育が抑制された状態であり、UZP区とは明らかに異なる形態であった（図6-5-3参照）。

以上のように、ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤は、ネギの抽苔率、抽苔発生の時期、草姿に影響を及ぼした。この結果、ネギの生育、花成にジベレリンが何らかの重要な役割を果たしていると考えられることから、以降の実験においてネギのジベレリンの同定、ジベレリン関連の候補遺伝子のクローニングを行った。

第2節 ネギの内生ジベレリン

前節においてネギの花芽分化、花茎伸長（抽苔）にジベレリンが何らかの関与をしている可能性が示唆された。また、村井ら（1981）、山崎ら（2006, 2007）は、ネギにおいて、外生ジベレリンによって分けつ数が増加し、ジベレリン生合成阻害剤によって分けつ数が減少することを報告している。これらのことから、ネギの花成、分けつにはジベレリンが重要な役割を果たしていると考えられるが、これまでにネギの内生ジベレリンについての報告はない。

本節では、ネギの内生ジベレリンについて、第1項で内生ジベレリンの検索・同定、第2項で内生ジベレリン含量の品種間差、第3項で葉鞘・葉身の伸長を制御する活性型ジベレリンについて検討を行った。

第1項 内生ジベレリンの検索・同定

本項では、抽苔および分けつの特性が異なる‘長悦’および‘晩中太’（‘坊主不知’）を供試し（表6-2-1）、両品種の地上部（葉鞘・葉身）における内生ジベレリンの検索・同定を行った。

材料および方法

(1) 植物材料

‘長悦’および‘晩中太’（鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場維持系統）を供試し、鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場の砂畑圃場で栽培した。‘長悦’は2002年10月3日に264穴チェーンポットに1穴当たり2粒と3粒を交互に播種、11月28日に条間1mで深さ15cmの植え溝を切り、簡易移植機「ひっぱりくん」（日本甜菜製糖）で移植した後、12月18日から翌年3月28日までポリエチレンフィルム（厚さ0.03mm、積水化学）でトンネル被覆（トンネル幅50cm、地面から25cmの高さに2m間隔で両サイドに直径8cmの換気穴をあけた）した。‘晩中太’は、2002年9月19日に移植した。肥培管理等は現地慣行とした。両品種とも2003年3月28日にサンプリングし、-20℃で凍結保存した。

(2) ジベレリンの抽出および精製

地上部（凍結試料200g）を約5倍量の80%メタノールを加え破砕し、室温で30分静置した後、減圧濾過し、濾液を減圧濃縮した。濃縮液をヘキササンと分配し、水層を回収した。溶媒分配による精製操作は繰り返し3回とした。水層のpH3以下にした後、酢酸エチルと分配し、酢酸エチル層を回収した。酢酸エチル層をリン酸緩衝液（0.5M K_2HPO_4 : 0.25M KH_2PO_3 = 100 : 3）と分配し、水層を回収した。これにPVPP（Polyvinylpolypyrrolidone）10gを混和し、減圧濾過した。濾液をpH3以下に調整した後、酢酸エチルと分配し、酢酸エチル層を回収した。これに無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、減圧乾固した。試料を80%メタノールで溶解してC18カラム（VARIAN）に通し、80%メタノールでジベレリンを溶出し減圧乾固した。試料をメタノールで溶解してDEAカラム（VARIAN）で粗精製した。

(3) ODS-HPLC

粗精製した試料をさらにHPLCによって精製した。カラムはODS-4253-D（内径15mm、長さ250mm、センシユー科学）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、流速は $2\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ とし、溶出プログラムは、当初2分間を1%酢酸含有の30%メタノール、その後28分を1%酢酸含有の30%メタノールから100%メタノールとの直線勾配、その後、20分を100%メタノールとした。注入の4分後から1分毎に32画分を得た。

(4) イネ生物検定

矮性イネ‘短銀坊主’を用いた改良点滴法（Nishijima・Katsura, 1989）による生物検定を行った。種籾を1%次亜塩素酸ナトリウムで30分、1時間殺菌後、ウニコナゾールP（アグロス、商品名：スミセブンP液剤、）の

表 6-2-1 本実験で供試した品種の特性

供試品種	種・品種群	抽苔性	分けつ性	繁殖
‘長 悦’	千住黒柄	晩	極少有	種 子
‘晩中太’	坊主不知	難	有	株分け
‘吉 晴’	晩ネギ	晩	有	種 子

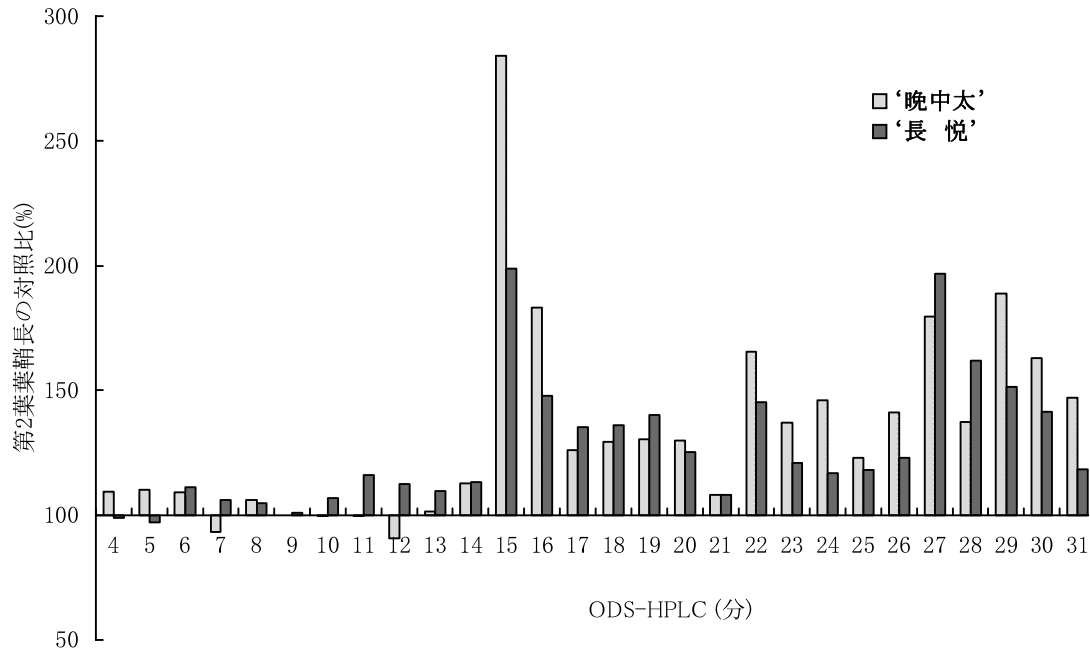


図 6-2-1 ネギ地上部(葉鞘・葉身)から抽出した画分のジベレリン様活性

イネ‘短銀坊主’に 50%アセトンのみを点滴した区を対照とした

対照区に対し, GA_3 点滴で $50\text{pg}\cdot\text{個体}^{-1}=143\%$, $100\text{pg}\cdot\text{個体}^{-1}=$

170.6% , $300\text{pg}\cdot\text{個体}^{-1}=199.5\%$, $1000\text{pg}\cdot\text{個体}^{-1}=275.9\%$ の活性が認め

られた

20ppm水溶液に浸し、30 ・暗黒条件下に 1 日静置した。ウニコナゾールP 水溶液から取り出してよく洗浄した後、蒸留水に浸漬し30 ・暗黒条件下に 2 日間置き催芽させた。0.8%寒天を入れた管瓶（内径 28mm × 深さ58mm）に 6 個体を植え付けた後、30 ・連続照明下で 2 日間生育させた。HPLCで得られた各画分を200 μ の50%アセトンに溶解し、1 μ ずつ葉鞘と第 1 葉の間に点滴した。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。

(5) 試料の誘導体化

ジベレリン様活性が認められた画分を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。メチル化した試料を減圧乾固し、MSTFA (*N*-Methyl-*N*-TMS-trifluoroacetamide) を20 μ 加え、80 で30分間トリメチルシリル化(TMS化)を行った。

(6) ガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS)

誘導体化した試料をGC/MS (GC : 6890N、Agilent Technology、MS : JMS-700、JEOL) にて分析した。カラムはDB-1キャピラリーカラム（内径 0.25mm、長さ 15 m、膜厚 0.25 μm 、Agilent Technology）キャリアガスには高純度ヘリウムガスを流速 1 $\text{Ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で用いた。カラムの温度制御は、以下の昇温プログラムとした。注入後の 2 分間は130 で保ち、その後、32 $\cdot\text{min}^{-1}$ で 220 まで、続いて 8 $\cdot\text{min}^{-1}$ 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)。また、試料と同時に微量の直鎖炭化水素を注入し、Kovatの保持時間指数 (KRI) を求めた (Kovat, 1958)。

表 6-2-2 GC/MS によるネギ地上部のジベレリンの同定

Cultivars	Identified GAs	t _R on ODS- HPLC (min)	KRI ^z	Principal ions and relative abundance ^b (% base peak)
‘長悦’	GA ₃	15	2692	504(M ⁺ , 100), 475(7.6), 387(6.0), 370(10.7), 208(19.4)
	GA ₁	16	2670	506(M ⁺ , 100), 491(16.6), 448(11.2), 376(14.2), 207(5.2)
	GA ₂₀	22-23	2494	418(M ⁺ , 100), 404(10.5), 375(23.1), 359(12.0), 301(9.3)
	GA ₃₄	25-26	2667	506(M ⁺ , 100), 459(4.6), 431(4.7), 416(3.8), 372(7.3)
	GA ₄	27	2515	418(M ⁺ , 40.6), 386(33.1), 328(26.3), 284(100), 225(58.6)
	GA ₉	30	2327	330(M ⁺ , 6.0), 298(100), 286(18.4), 270(53.7), 243(30.7)
‘晩中太’	GA ₃	15	2692	504(M ⁺ , 100), 475(5.5), 387(8.0), 370(9.0), 208(28.6)
	GA ₁	16	2672	506(M ⁺ , 100), 491(12.2), 448(11.5), 376(7.1), 207(12.2)
	GA ₂₀	22-23	2495	418(M ⁺ , 100), 404(5.8), 375(26.5), 359(10.3), 301(2.7)
	GA ₃₄	25-26	2669	506(M ⁺ , 100), 459(2.8), 431(1.9), 416(2.3), 372(5.8)
	GA ₄	27	2515	418(M ⁺ , 36.6), 386(16.0), 328(27.2), 284(100), 225(59.6)
	GA ₉	30	2327	330(M ⁺ , 11.2), 298(100), 286(26.5), 270(84.4), 243(34.1)

^z 標品 GA の KRI; GA₃=2692, GA₁=2668, GA₂₀=2491, GA₃₄=2665, GA₄=2510, GA₉=2326

結 果

矮性イネ‘短銀坊主’を用いた生物検定の結果(図 6-2-1) ネギの地上部(葉鞘・葉身)にはジベレリン様活性を示す複数の成分が含まれており、‘長悦’と‘晩中太’では、第2葉鞘の伸長に若干の差は認められたが、ジベレリン様活性の認められる画分はよく一致していた。標品ジベレリンのマスペクトルおよびKRIとの比較によって、‘長悦’および‘晩中太’ともに6種類のジベレリン、GA₁、GA₃、GA₄、GA₉、GA₂₀、GA₃₄が同定された(表6-2-2)。一方、28および29画分にもジベレリン様活性が認められたが、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。

以上の結果、ネギの地上部では、活性型ジベレリンとして13位が水酸化されたGA₁およびGA₃、13位が水酸化されていないGA₄が同定された。

第2項 抽苔および分けつ特性の異なる品種における内生ジベレリン含量

抽苔および分けつ特性の異なる3品種を用い(表 6-2-1) 前項において同定されたジベレリン含量を調査した。

材料および方法

(1) 植物材料

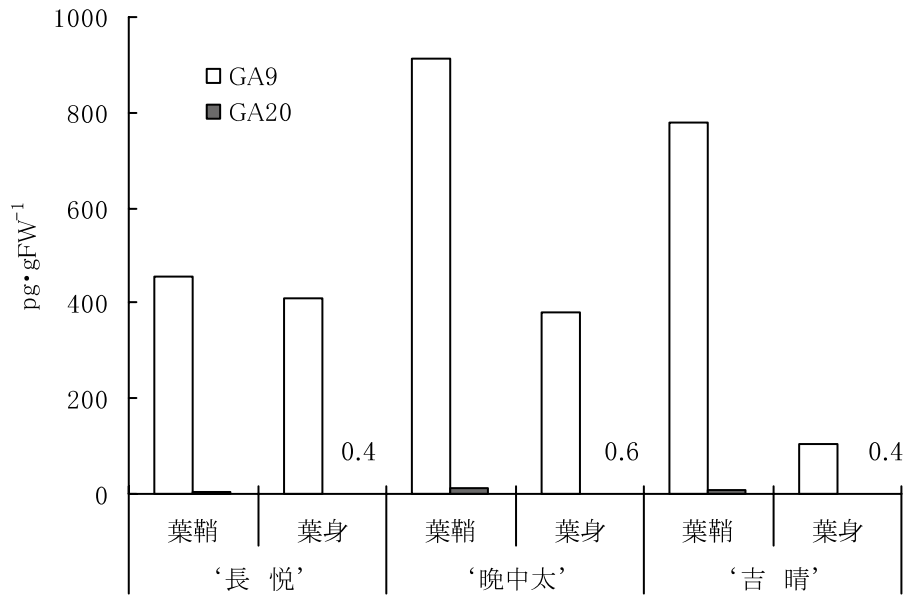
‘長悦’、‘晩中太’および‘吉晴’(晩ネギ、武蔵野種

苗)を供試した。材料は、何れもプランター(10L)に‘長悦’は2003年4月3日(24株/プランター)‘晩中太’は8月11日(4株/プランター)‘吉晴’は9月11日(5株/プランター)に移植し、10月上旬まで雨よけハウス内で栽培した(鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場)。施肥は、それぞれの移植時期にあわせ行い、共通として9月15日および10月3日に各プランターに化成肥料20g(12-12-12)を施用した。その後、10月1日に野菜・茶業研究所(三重県津市)のガラス室に移動し、10月15日に人工気象室に搬入した。人工気象室の設定は12時間日長(PPFD = 158.0 ± 13.4 μmol · m⁻² · s⁻¹)、昼25 / 夜15 条件とし、30日後に地上部を葉鞘と葉身に分けサンプリングし、-20℃で凍結保存した。なお、‘晩中太’および‘吉晴’は、10月3日時点で1株当たり3本から5本に分げつしていた。

(2) ジベレリンの抽出、精製および定量

ジベレリンの抽出は第1項に示した方法に従い行った。約100gの凍結試料からメタノール抽出後、内部標準として、各50ngの[17, 17-²H₂]GA₁、[17, 17-²H₂]GA₃、[17, 17-²H₂]GA₄、[17, 17-²H₂]GA₉、[17, 17-²H₂]GA₂₀を添加し、ODS-HPLC画分、試料のメチル化、TMS化を行った後、GC/MSでマスペクトルの確認を行った。その後、ガスクロマトグラフィー/選択的イオンモニタリング(Selected Ion Monitoring)(GC/SIM)分析を行った。目的のフラグメントイオン(m/z)として、GA₁/[17, 17-²H₂]GA₁はm/z506と508、

前駆体ジベレリン



活性型ジベレリン

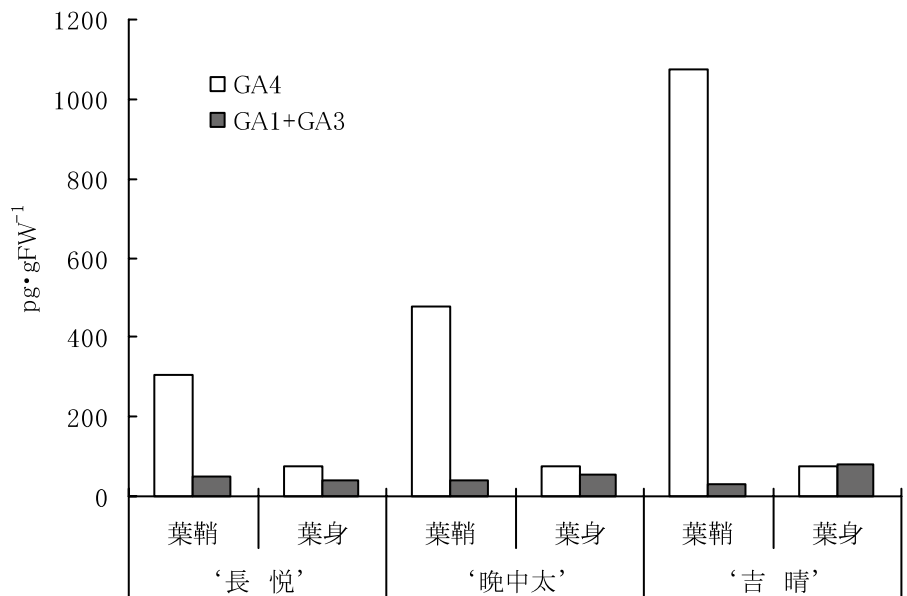


図 6-2-2 ネギの葉鞘および葉身におけるジベレリン含量の品種間差

GA₃/ [17, 17-²H₂] GA₃はm/z504と506、GA₄/ [17, 17-²H₂] GA₄はm/z418と420、386と388、GA₉/ [17, 17-²H₂] GA₉はm/z298と300、270と272、GA₂₀/ [17, 17-²H₂] GA₂₀は418と420をモニターし、GA₁、GA₃、GA₄、GA₉、GA₂₀それぞれ506/508、504/506、418/420、298/300、418/420のクロマトグラムの面積比で検量線を作成してジベレリン含量を算出した。

結 果

供試した品種の葉鞘と葉身におけるジベレリン含量を図6-2-2に示した。葉鞘におけるジベレリン含量についてみると、各品種とも前駆体ジベレリンではGA₂₀に比べGA₉の含量が高く、活性型ジベレリンではGA₁ + GA₃に比べGA₄が高含量であった。GA₄は、各品種とも葉身に比べて葉鞘において高含量であった。GA₉濃度についてみると、‘長悦’は葉鞘と葉身で同等であったが、‘晚中太’および‘吉晴’では葉身に比べて葉鞘で高かった。葉鞘におけるジベレリン含量には品種間差が認められ、前駆体GA₉、活性型GA₄ともに‘長悦’に比べて、‘晚中太’および‘吉晴’で高い傾向であった。

第3項 葉鞘・葉身の伸長を制御する活性型ジベレリン

ネギ地上部(葉鞘・葉身)では、活性型ジベレリンとして13位が水酸化されたGA₁およびGA₃、13位が水酸化されていないGA₄が同定された。この結果からネギにおいては、ジベレリン生合成系として、早期13位水酸化経路と早期非水酸化経路の両方が存在すると考えられる。本項では、種子繁殖の‘長悦’および‘吉晴’の芽生えを用いて、GA₃とGA₄処理が草丈の伸長に及ぼす影響について調査した。

材料および方法

‘長悦’および‘吉晴’を供試した。市販の培養土(ナブラ養土タイプS、ヤンマー)を用い、288穴セルトレイに1穴当たり3粒播種した。播種後は、人工気象室内で12時間日長(PPFD = 158.0 ± 13.4 μmol · m⁻² · s⁻¹)、昼20 / 夜15 で生育させた。播種10日後に、GA₃およびGA₄を1ポット当たり5 μg (0.5%メタノール溶液)注入処理した。対照区は0.5%メタノール溶液のみとした。各実験区とも12ポットとした。処理14日後に草丈を調査した。

結 果

‘長悦’および‘吉晴’の芽生えにおけるGA₃とGA₄を処理した結果を図6-2-3に示した。‘長悦’では、GA₃

に比べGA₄において高い伸長反応がみられた。一方、‘吉晴’ではGA₃およびGA₄ともに伸長反応が認められなかった。

考 察

ネギにおいて13位が水酸化されたジベレリンとしてGA₁、GA₃、GA₂₀が、13位が水酸化されていないジベレリンとしてGA₄、GA₉、GA₃₄が同定された。同定された6種類のジベレリンの存在により、他のネギ属植物であるタマネギ(Nojiriら、1993) ワケギ(Yamazakiら、2002)と同様に、ネギの地上部では、ジベレリン生合成経路のうち、早期13位水酸化経路と早期非水酸化経路の2つ(神谷、1994; 豊増、2004)が機能していることが推定された。また、同じユリ科のスカシユリ(Takayamaら、1994) チューリップ(Rebersら、1994b、1995)においても早期13位水酸化経路および早期非水酸化経路の存在が報告されており、ユリ科では両経路が機能していることが推察される。

高等植物においてGA₃の検出例は少ないが、本実験においてはGA₃が同定され、GA₃の生合成経路が存在する可能性が考えられた。GA₃の生合成について、トウモロコシ(Fujiokaら、1990)ではGA₂₀からGA₅を経て生合成されることが、酸果オウトウ(Nakayamaら、1996)ではGA₉₅を経て合成されることが報告されている。本実験においてもGA₃の前駆体として報告されているGA₅およびGA₉₅を検索したが、見いだせなかった。

一方、ワケギにおいてもGA₃が同定されている(Yamazakiら、2002)が、タマネギではGA₃が同定されていない。田代ら(田代、1984; Tashiroら、1995)により、ワケギはネギを母親にシャロット(*Allium cepa* L. Aggregatum group)を花粉親に持つ1代雑種であることが明らかにされている。これらのことから、ワケギにおけるGA₃の生合成経路はネギの遺伝子に由来している可能性が示唆される。

ジベレリンの茎伸長活性は、イネ(Crozierら、1970) エンドウ(Pooleら、1995)において、13位水酸化ジベレリンが高いことが報告されている。一方、アブラナ科植物のシロイヌナズナ(Zeevaart・Talon、1992) キャベツ(Hamanoら、2002) ストック(Hisamatsuら、1998) ウリ科植物のキュウリ(Crozierら、1970)では、13位非水酸化ジベレリンの茎伸長活性が高いことが報告されている。ユリ科植物において、カノコユリ(Ohkawa、1979) スカシユリ(Takayamaら、1994) チューリップ(Rebersら、1994a)では、13位非水酸化ジベレリンの茎伸長活性が高いことが報告されている。ネギの葉鞘部において、前駆体ジベレリンはGA₂₀に比べGA₉の含量

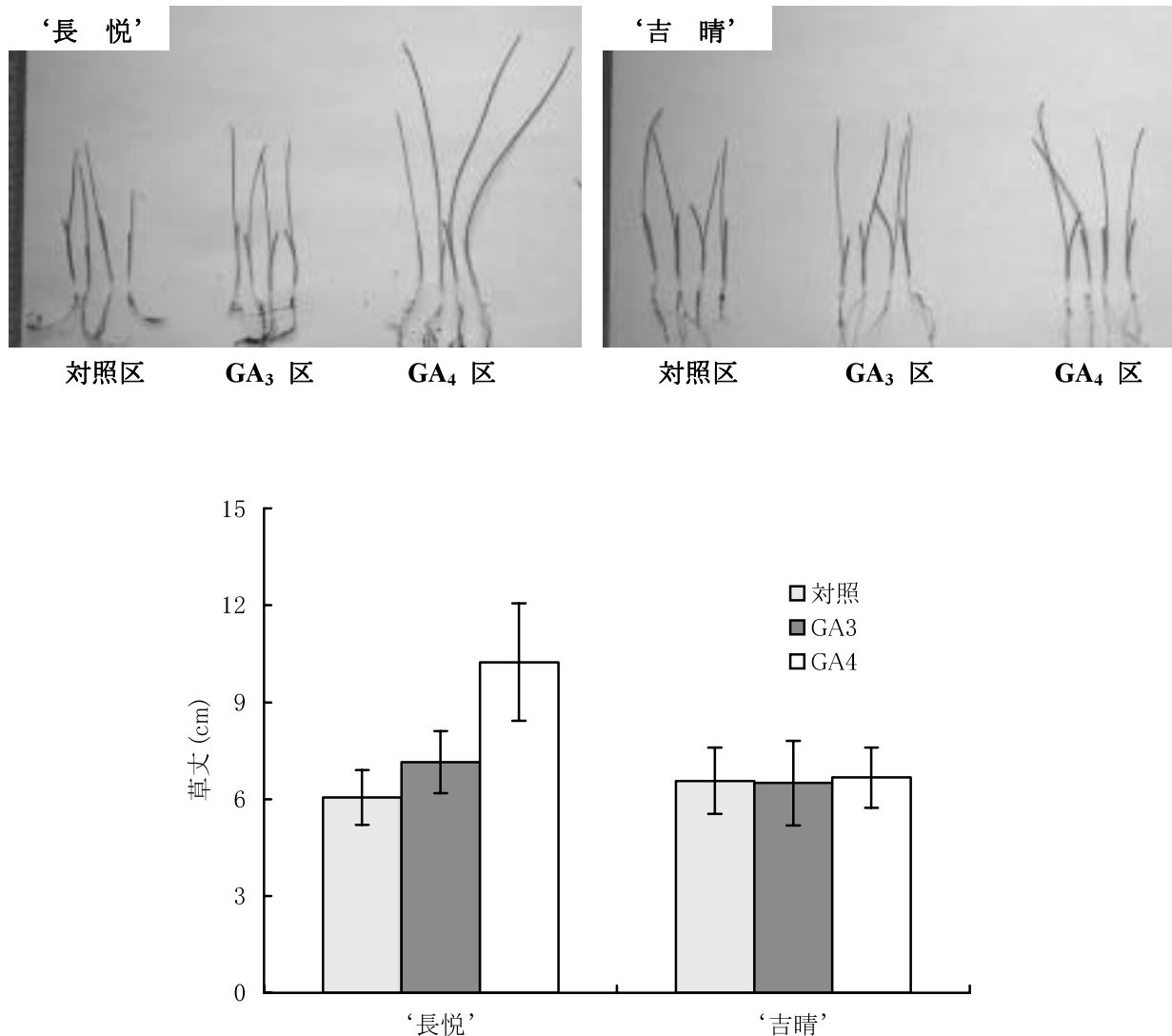


図 6-2-3 活性型ジベレリンが‘長悦’および‘吉晴’の芽生えの草丈に及ぼす影響
 処理 14 日後の草丈に及ぼす影響を調査した
 図中のバーは標準偏差(n=15)を表す

が高く、活性型ジベレリンではGA₁およびGA₃に比べてGA₄の含量が高かった(図 6-2-2)。さらに、‘長悦’の芽生えを用いた実験において、GA₃に比べGA₄は高い伸長反応が認められた(図6-2-3)。これらの結果から、ネギ地上部の伸長には、主に早期非水酸化経路のGA₄が機能している可能性が示唆される。また、タマネギ(Nojiriら、1993)、ワケギ(Yamazakiら、2002)、スカシユリ(Takayamaら、1994)においても同様に地上部の活性型ジベレリンはGA₄含量が高いことが報告されており、これらはユリ科に共通であることが推察される。

第3節 ネギのジベレリン関連の候補遺伝子のクローニング

植物におけるジベレリン反応を考える場合、ジベレリ

ンの含量とジベレリンに対する反応性が重要であり、その研究は「ジベレリン生合成」と「ジベレリンシグナル伝達」の2つに大別できる(芦苾・松岡、2004; Olszewskiら、2002; 豊増、2004)。

ジベレリンの生合成経路は、それぞれ触媒する酵素の諸性質により大きく以下の3段階に分けられる(豊増、2004)。geranylgeranyl diphosphate (GGDP) から *ent*-kaureneまでの段階(色素体内、環化酵素)、*ent*-kaureneからGA₁₂までの段階(小胞体、シトクロムP450系1原子酸素添加酵素)、GA₁₂以降の段階(細胞質、2-オキシグルタル酸依存性2原子酸素添加酵素)。高等植物においてGA₁₂以降のジベレリン生合成は、早期13位水酸化経路と早期非水酸化経路の2つが存在し、それぞれの経路における活性型ジベレリンはGA₁とGA₄である。どちらの経路が主要であるかは、植物種によって

異なり、また同じ植物種においても時期や器官の違いによって主要経路が異なることもある(豊増、2004)。第6章の第2節において、ネギでは両経路が存在することを明らかにした。GA₁₂以降のジベレリン生合成には、3つの重要な酵素が関与し、それぞれの酵素によって植物体における活性型ジベレリンの含量が調節されている。それぞれの酵素は、GA₁₂/GA₅₃からGA₉/GA₂₀までの3段階を触媒するGA₂₀位酸化酵素、GA₉/GA₂₀からGA₄/GA₁を触媒するGA₃酸化酵素、GA₄/GA₁からGA₃₄/GA₈を触媒するGA₂酸化酵素である(Olszewskiら、2002; 豊増、2004)。これらの酵素をコードする遺伝子は、モデル植物のシロイヌナズナおよびイネを中心にクローニングされ、現在では多くの植物種においてクローニングが行われている(豊増、2004)。

一方、ジベレリンのシグナル伝達については、Ueguchi・Tanakaら(2005)によりジベレリン受容体(GID1)がイネからクローニングされたことにより、シグナル伝達機構の全体像が明らかとなった。イネにおけるジベレリンのシグナル伝達機構は以下のように考えられている(松岡、2005)。細胞外から輸送された、または、細胞内で合成されたジベレリンは、核においてGID1と結合する。ジベレリンを結合したGID1は、それまで核内でジベレリンシグナルを抑制していたDELLAタンパク質(Hussain・Peng、2003; Ikedaら、2001)であるSLR1(Itohら、2002)と相互作用が可能となる。さらに、GID1と相互作用したSLR1は、F-boxタンパク質であるGID2(Sasakiら、2003)に認識されることとなり、結果としてSCF複合体にリクルートされユビキチン化、分解に導かれ(Moonら、2004)、ジベレリンのスイッチが入ると考えられている。

本節では、ネギにおけるジベレリン生合成としてGA₂₀位酸化酵素、GA₃酸化酵素およびGA₂酸化酵素をコード

する候補遺伝子、ジベレリンシグナル伝達の抑制因子として働くDELLAタンパク質をコードする候補遺伝子のクローニングを行った。

材料および方法

鳥取大学農学部内のガラス室で栽培した‘長悦’の地上部をサンプリングし、-80℃で凍結保存した。

(1) 全RNAの抽出

全RNA抽出は、Wan・Wilkins(1994)の方法を改変して行った。試料1gを液体窒素中で粉碎し、RNA抽出溶液2Mℓ(100mM LiCl、1%SDS、100mM Tris-NaOH、10mM EDTAとphenol(0.1% hydroxyl-quinoline含有と1:1の割合で混合)を加え、室温で5分間振とうした後、クロロホルム1Mℓを加え、室温で30分間振とうした。25℃、20000g、30分間遠心し上澄みを捨てた。クロロホルム1Mℓを加え室温で15分間振とうした後、25℃、12000g、15分間遠心、上澄みを回収した後、10M LiClを1.6Mℓ加え、4℃で16時間以上静置した。4℃、12000g、30分間遠心し上澄みを捨て、2M LiClを1ml加え沈殿を溶解しマイクロチューブに回収した。4℃、15000rpm、10分間遠心し上澄みを捨て、80%エタノールで沈殿を洗浄した。全RNAはDEPC処理水に溶解し-20℃で保存した。

(2) cDNAのPCRクローニング

First Strand cDNA Synthesis Kit(TOYOBO)を用い、全RNA 2μgから1本鎖cDNAを合成した。これを鋳型として既報のジベレリン関連遺伝子の保存領域から構築したプライマーを用いてRT-PCRを行った(表6-3-1)。PCR反応は常法とした。得られたPCR産物は、アガロースゲル(SEAKEM GTG、FMO)電気泳動をした後、Sephaglas™ BandPrep Kit(Pharmacia)を用いて精製した。

表 6-3-1 ジベレリン関連の候補遺伝子のクローニングに用いたプライマーの塩基配列

遺伝子名		プライマー塩基配列 ^z
GA20 酸化酵素	sence	5'-TNCNTGGAARGARACNCTNYC-3'
	antisence	5'-AKHRCCATRAANGTRTCRCC-3'
GA3 酸化酵素	sence	5'-ATGTGGYMGARGGNTTYAC-3'
	antisence	5'-GTRTGNGCNGCNAGNCCCAT-3'
GA2 酸化酵素	sence	5'-ATGGGTGTTCTTGCTAATCAACC-3'
	antisence	5'-CAACCCAACCAATATCTCCATTAG-3'
GAI ホモログ	sence	5'-ATGGCIGAIGTIGCICAIAARYTIGARCA-3'
	antisence	5'-GCIGTRAARTGIGCRAAYTTNARRTAIGGRCA-3'

^z N:A/T/G/C, H:A/C/T, K:G/T, R:A/G, Y:C/T, I:inosine

精製したDNA断片は、pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を用いたTAクローニングした。プラスミドの抽出および精製は、FlexiPrep Kit (Pharmacia) を用いて行った。DNAの塩基配列は、Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems)、ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により決定し、DNASIS pro software (Hitachi Software Engineering) およびBLASTにより解析した。全鎖長cDNAのクローニングは、GeneRacer kit (Invitrogen) によるRLM-RACE法により行った。

結果および考察

保存領域を基に構築したプライマーを用いたPCRにより得られた部分断片の塩基配列を決定し、BLAST検索を行った。このうち、既報のジベレリン関連遺伝子と相同性が認められたものについて、RACE法により全鎖長cDNAのクローニングを行い、以下に示すネギにおけるジベレリン関連の候補遺伝子が得られた(表6-3-2、図6-3-1から図6-3-4)。

(1) ジベレリン生合成遺伝子

GA20酸化酵素

クローニングしたcDNAは、他植物種のGA20酸化酵素遺伝子と高い相同性が認められたことから*AFGA20ox1*と命名した(図6-3-1)。*AFGA20ox1*は、全長1405bp、359aaをコードすると推定された。他植物種とのアミノ酸の相同性は、シロイヌナズナのAt20ox1 (Phillipsら、1995) と55%、エンドウのPsGA20ox1 (Martinら、1996) と52%、イネのOsGA20ox1 (Toyomasuら、1997) と50%、オオムギのHv20ox1 (Spielmeyerら、2004) と55%であった。

GA3酸化酵素

クローニングしたcDNAは、他植物種のGA3酸化酵素遺伝子と高い相同性が認められたことから*AFGA3ox1*と命名した(図6-3-2)。*AFGA3ox1*は、全長1214bp、365aa

をコードすると推定された。他植物種とのアミノ酸の相同性は、シロイヌナズナのGA4 (Chiangら、1995、1997) と52%、エンドウのLE (Lesterら、1997; Martinら、1997) と45%、イネのOsGA3ox1 (Itohら、2001) と43%、オオムギのHv3ox1 (Spielmeyerら、2004) と43%であった。

GA2酸化酵素

クローニングしたcDNAは、他植物種のGA2酸化酵素遺伝子と高い相同性が認められたことから*AFGA2ox1*と命名した(図6-3-3)。*AFGA2ox1*は、全長1163bp、381aaをコードすると推定された。他植物種とのアミノ酸の相同性は、シロイヌナズナのAtGA2ox1 (Thomasら、1999) と49%、エンドウのPsGA2ox1 (Lesterら、1999) と52%、イネのOsGA2ox3 (Sakamotoら、未発表) と52%、オオムギのHv2ox4 (Spielmeyerら、2004) と52%であった。

以上の結果、GA12以降のジベレリン生合成に関わり、活性型ジベレリン含量に影響を及ぼす酵素の候補遺伝子*AFGA20ox1*、*AFGA3ox1*、*AFGA2ox1*のクローニングに成功した。一方、多くの植物種において、GA20酸化酵素 (Kanekoら、2003; Spielmeyerら、2004)、GA3酸化酵素 (Itohら、2001; Spielmeyerら、2004; Yamaguchiら、1998)、GA2酸化酵素 (Lesterら、1999; Spielmeyerら、2004; Thomasら、1999) は多重遺伝子族であることが知られている。本実験においては各酵素の候補遺伝子とも1タイプずつのクローニングであり、別のタイプも存在する可能性も考えられ、今後、組織や時期別のサンプルにおいてクローニングを検討する必要がある。

(2) ジベレリンのシグナル伝達に関するGAIホモログ遺伝子 (DELLAタンパク質)

縮重プライマーを用いたPCRの結果、DELLAタンパク質遺伝子と高い相同性を示す2つのクローンが得られた。さらに、RACE法による全鎖長cDNAのクローニ

表 6-3-2 本実験においてクローニングしたネギのジベレリン関連の候補遺伝子

クローン名	コードするタンパク質	cDNA (bp)	アミノ酸 (aa)	vs <i>Arabi</i> (%) ²
<i>AFGA20ox1</i>	GA20 酸化酵素	1405	359	55
<i>AFGA3ox1</i>	GA3 酸化酵素	1214	365	50
<i>AFGA2ox1</i>	GA2 酸化酵素	1163	381	48
<i>AFGAI1</i>	DELLA タンパク質	1899	568	49
<i>AFGAI2</i>	DELLA タンパク質	1953	579	50

² 各クローンは図 6-3-1 から図 6-3-4 における *Arabidopsis* とのアミノ酸の相同性を表す

		10	20	30	40	50
AFGA20ox1	1	Y-----	---EKNNGS	V-----	I DSTL LNQVYR	IPKDF--VWP
Arabidopsis	1	YAVSFVITSP	EE-EDKPKL	LGNIQTP	I NPSM NLQAN	IPNDF--IWP
Pea	1	YAI ECI TSSR	KLMTDKSDKN	ENEESK	LVF DRSF LKNQ L	LPKRFFTIWP
Rice	1	Y-----	-MVVDEQE-	-----	VVF DRAVLSGDT	IPSQF--IWP
Barley	1	YVQP-----	-----	-----	VVF DRAVLSGRTD	IPSQF--IWP
		60	70	80	90	100
AFGA20ox1	51	CHEP N-KIG	E-LN--APLV	DIKGFLEGDE	RSTNVASELV	KTACLNHGFF
Arabidopsis	51	DDEKPSINVL	E-LD--VPLI	D LQ N L	SSTLDASRLT	SEACKKHGFF
Pea	51	DDEKP-CMNV	PELD--VPLI	D-KNFLSGDP	FRAVRSKTI	SEACEKHGFF
Rice	51	REESPSVAV	EELEFTVLI	D----VSRG	RERSSVVRD	GEACERHGFF
Barley	51	EGESPTPDAT	EEIH--VPLI	D LGM SGDP	RARAEVTRLV	GEACERHGFF
		110	120	130	140	150
AFGA20ox1	101	QVFNHGID--	QDI VSDA LVS	MDFFH L S D	H K L K R K R K D S	SM--W3VAGG
Arabidopsis	101	LVVNHGID--	EEL SDAHEV	TSRFFDPLS	EKQAVLAKSG	ES--V3VASS
Pea	101	LVVNHGIDTF	TK L E R H S Y	M N D F E V P L S	Q K Q R D R K T S	E F--D G V A S S
Rice	101	LVVNHGID--	R L L E R H R C	M D A F F T L P L S	E K F T D R R S G	A R G R T A V A S S
Barley	101	QVVNHGID--	R D L L D A H R C	V D A F F T L P L	E K Q R A L R P S	E S--D G V A S S
		160	170	180	190	200
AFGA20ox1	151	HTDRFASKLP	WKETLSFPHS	NSSDK--TTP	VVNFSTSLG	EEF---EDMS
Arabidopsis	151	FTGRFSTKLP	WKETLSFRFC	DMSR--SKS	VQDVFCDA LG	HGF---QPF
Pea	151	FTGRFSTLP	WKETLSFPHS	DEFTKPHSI	VQDVLNLTG	ED--F--DQF
Rice	151	FTGRFASKLP	WKETLSFRV	SAGDEEGEEG	VBEVLRKLG	AEHGFTARR LG
Barley	151	FTGRFASKLP	WKETLSFRSC	--PSD--PAL	VQDVIVATLG	EDH---ARR LG
		210	220	230	240	250
AFGA20ox1	201	IVYQKVC EAM	NE SLSIMD L	L A I S L G V N	--R L H Y R E F F	-KDCSSIMRL
Arabidopsis	201	KWVQVC EAM	SS S L S I M E L	L G L S L G V K	--R D Y F R E F F	-EENDSIMRL
Pea	201	EVYQVC EAM	SK S L S I M E L	L G L S L G V G	--K E C F R D F F	T E E N S I M R L
Rice	201	EVYRVC E M	S R L S L E I M E V	L G E S L G I V G D	R R H Y F R A F F	-Q R N D S I M R L
Barley	201	EVYRVC E M	S R L S L E I M E V	L G E S L G V G	--R R H Y R F F F	-E E N D S I M R L
		260	270	280	290	300
AFGA20ox1	251	NVYPPCQ--E	P D L T L G T G P H	C D P T S L T V L I	Q D V N G L E V F	V D N R W S I R P
Arabidopsis	251	NVYPPCQ--K	P D L T L G T G P H	C D P T S L T I L H	Q D H V N G L O V F	V E N D A R S I R P
Pea	251	NVYPPCQ--K	P D L T L G T G P H	C D P T S L T I L H	Q D V G G L O V F	V D N E J S I R P
Rice	251	NVYPPCQ--R	P L D T L G T G P H	C D P T S L T I L H	Q D H V G G L E V I	A E G R W R A I R P
Barley	251	NVYPPCQ--R	P L E T L G T G P H	C D P T S L T I L H	Q D V G G L O V H	T D S R W R S I R P
		310	320	330	340	350
AFGA20ox1	301	V--RGA L W N	I G D T F M A L S N	--SRYK SCLH	RAVWNKDER	KSLAYFVCPA
Arabidopsis	301	N--PKAFWVN	I G D T F M A L S N	--D R Y K S C L H	RAVWNSKSER	KSLAFFLCPK
Pea	301	NFFTNAFWVN	I G D T F M A L S N	--SRYK SCLH	RAVWNKTTA	KSLAFFLCPK
Rice	301	R--PGA L WVN	V G D T F M A L S N	F T A R V S S C L H	RAVWNSTAPR	R S L A F F L C P E
Barley	301	R--RDAFWVN	I G D T F M A L S N	--SRYK SCLH	RAVWNSRVP	KSLAFFLCP E
		360	370	380	390	400
AFGA20ox1	351	EDRI VAPPKD	LVS KY--EPR	KVPDFTWREL	L V F--	TQNHV RADMKTLQSF
Arabidopsis	351	KDRVWTPPRE	L D S I--TSP	RVPDFTWREL	L E F--	TQKHV RADMTLQAF
Pea	351	GDKVWTPPRE	L V N D L F T P R	I V P D F T W P M L	L E F--	TQKHV RADMTLQAF
Rice	351	MDTVWAPPE	L V D D--HHP	VVPDFTWRAL	L D F T	TQNHV RADMTQAF
Barley	351	MDKVVWTPPT	L V D A R--NPR	RVPDFTWRB L	L D F--	TQKHV RADMKTLQVF
		410				
AFGA20ox1	401	ANIL-----	-STHPA.			
Arabidopsis	401	SDWL-----	--TKP.			
Pea	401	TKWIQKQK N	-----			
Rice	401	SDWL NHHRHL	QPTI VS.			
Barley	401	SSLVVDDP-	-ASART.			

図 6-3-1 GA20 酸化酵素遺伝子と推定される AFGA20ox1 における他植物とのアミノ酸配列の比較
 Arabidopsis AtGA20ox1 (Phillips et al., 1995, accession number X83379), pea PsGA20ox1 (Martin et al., 1996, accession number X91658), rice OsGA20ox1 (Toyomasu et al., 1997, accession number U50333), barley Hv20ox1 (Spielmeyer et al., 2004, accession number AY551428)

		10	20	30	40	50
AFGA3ox1	1	1PSISMEPI	HFPDPIHHPK	HFDGSAHEV	PDSHTNPTIQ	-----PFP
Arabidopsis	1	1PAMLDVFA	GPIILPASH	IPDFNSRE	PDSYKNTPKD	DLFSAAPS
Pea	1	1PSLEAYR	AIPVHVKH	-PDFNSQEL	PEBYNATHLD	DHLLDBNFI
Rice	1	1PTPSHL	KVP-----L	CFDFAAARV	PETHAWPGLD	DHPVDDGGG
Barley	1	1PSTPPSQLN	KDP-----NR	YFDGSAAREV	PDTHAWDGDH	ELPVDGGV
		60	70	80	90	100
AFGA3ox1	51	PNGPNEIPV	IDLSSPDVIS	LIGACEEAG	VFQVISHGVD	LNLHNLSSQ
Arabidopsis	51	PPATGENIP	IDLDHPDPTN	QIGACRTAG	AFQISNHGVP	LSLDDIEF
Pea	51	MKESTTTVPV	IDLNDPRAEK	LIGACKTAG	VYDVMNHGTP	LSLEEDIQH
Rice	51	--GEDAVPV	VDMGAGDAA	RVARAEQWG	AFLEVGHGVP	RALESVEER
Barley	51	--AGDDAVPV	VDMRDPRAE	RVARAEQWG	AFLEEGHGVP	TELLARVER
		110	120	130	140	150
AFGA3ox1	101	ARALFSLPTQ	QKLKABRSPN	SISGVGLAPI	SSFSKLMWS	EGFTISGSPL
Arabidopsis	101	TGSLFGLPVQ	RKLKBARET	SVSGYGVARI	ASFFNKQMS	EGFTITSSPL
Pea	101	GQTFSLPSE	QKAKATASPD	SVSGYGVARI	SSFFPKLMWY	EGFTIVSSPL
Rice	101	VARYFSLPAS	EKMRARAPG	EPCVYGGPPI	SSFFSKLMWS	EGFTVSPSS
Barley	101	IAGMFLPTP	EKMRARADG	DLVYVGPPLI	ASVYBKQMS	EGVTLTPAN
		160	170	180	190	200
AFGA3ox1	151	DHAFELWP	--DDVNFCE	VI EEVVKEMK	RYAEALMDLM	LBSGLTEET
Arabidopsis	151	NDFAKLWP	--DHHNMD	IV EEEYEEHK	KLABKMLMFA	NBLGVSEED
Pea	151	DHAFELWP	--DDYTRFCD	IVVQVDETAK	KLASTLMDLM	LBSGLITRED
Rice	151	RSEELRWPK	SDDVYLFCD	VMEEFHKEMR	SLADELRF	RALGLTGE
Barley	151	HAEFRKWP	AGDVAHESG	VMEEFLKEMR	SLANALMEF	VALGLTRED
		210	220	230	240	250
AFGA3ox1	201	IKIABPMNE	--QDISSVQL	NSVPAQPNPD	RAI GLAAHTD	SLLTILVNS
Arabidopsis	201	IKIABLSSD	--NWDARLQL	NIVYVCPPEP	RAMGLAAHTD	STLTLVNS
Pea	201	IKIABSKAQF	--KADARLQL	NSVPAQPNPD	RAMGLAAHTD	STFLTILNS
Rice	201	VAGVEAERRI	GERMTATVHL	NIVYVCPPEP	RALGLAHTD	SSEFTVLS
Barley	201	IAGVEAEHNL	TESMTETMHL	NIVYVCPDPT	RALGLKHTD	SSEFTVLS
		260	270	280	290	300
AFGA3ox1	251	NTSGLOWLP	NKESSPTQIV	TVPPVPGALV	VNVGDLPHIL	SNGRFHSVYH
Arabidopsis	251	NTSGLOWFRD	DLG-----IV	TVPPVPGSLV	VNVGDLPHIL	SNGRFKSWLH
Pea	251	DTSGLOWNRE	GSQ-----IV	TVPPVQGGV	VNVGDLPHIL	SNGLYPSWLH
Rice	251	LVPGLQLFAR	--GP--DRWV	RVPVWGAIV	VNVGDLPHIL	TNGRFHSVYH
Barley	251	QVPSLILFAR	--GPVDRWV	EVPVWPGALV	VNVGDLPHIL	TNGRFHSVYH
		310	320	330	340	350
AFGA3ox1	301	RAVWNRTEHA	VSVAVLCGPP	ADVKVSPIVK	PVGPRA----	YRPITWREVLG
Arabidopsis	301	RAVWNRTRAA	LSVAFLGPP	SDIKTSVAK	LVSPESEPLV	QSWTKVEYLK
Pea	301	RVLWNRTRDR	FVVAVLCGPP	SNVEICPHAK	LIGPTKPPV	RSWTKNEVLG
Rice	301	RAVWNRDRDR	VSGLVLCGPP	PDREVAPLPE	AVPAGSPPAY	RAVTWPEVYR
Barley	301	RAVWNRERER	ISVAVLCGPP	ADVKVAPLKE	VWGGSKPAY	RAITWSEVIV
		360	370	380	390	
AFGA3ox1	351	IKARLFDKAL	ASVLIIEE--	-----DHN	DNSTCLLSCV	
Arabidopsis	351	TKATHFNKAL	SIIA-----	-----N	FREE	
Pea	351	TKAKIIFNKAL	SSVRLCTPIN	G-----FDVN	DSNKNSVQVG	
Rice	351	VRKKAFATGG	SALKMVSTDA	AAA--ADEAD	DVAARADVHA	
Barley	351	VRKEAFANHG	ADLEFGKGR	ALDMLSISSD	EDDGAETHRD	

図 6-3-2 GA3 酸化酵素遺伝子と推定される AFGA3ox1 における他植物とのアミノ酸配列の比較
 Arabidopsis GA4 (Chiang et al., 1995,1997, accession number At1g15550), pea LE (Lester et al., 1997;
 Martin et al., 1997, accession number AF001219), rice OsGA3ox2 (Itoh et al., 2001, accession number
 AB056519), barley Hv3ox1 (Spielmeyer et al., 2004, accession number AY551430)

		10	20	30	40	50	
AFGA2ox1	1	MGVLANQH-M	EQI --- WKPQK	SLPVVPI --- IP --- LDLSI --- PNRES	H --- IVKACEE --- FG		
Arabidopsis	1	YRWL --- SKPVAI	-----	PKSGFS --- IPV --- LDI --- SDPESKH	A --- IVKACED --- FG		
Pea	1	K-----PIS	EQVTVWRNNM	PI --- TFSS --- IP --- WDL --- SKPDAKT	L --- IVKACED --- FG		
Rice	1	YVWLAGPPAV	DHI --- PL --- FP --- PD	PGDVFSGV --- PV	VDL --- SSPGAAR	AV --- WDFCERV --- S	
Barley	1	YVWLAKPAA	EQI --- AL --- MTPE	PAES --- FSGV --- PA	VDL --- SSPGAAR	DV --- WDFCERF --- G	
		60	70	80	90	100	
AFGA2ox1	51	FFKVI --- NHGVS	KV --- MI --- TKLEKE	ARK --- FFSLPQF	EKEK --- SEC --- ---	YGNKRI --- GS	
Arabidopsis	51	FFKVINHGVS	AE --- V --- SY --- LEHE	TVD --- FFSLPKS	EK --- IQVA --- GVP	FGVGN --- SKI --- GA	
Pea	51	FFKVINHGIP	LD --- AI --- SD --- LESE	AFK --- FFSLPQT	EKEK --- APANP	FGVGNKRI --- GL	
Rice	51	FFKV --- NHGVA	TD --- TI --- DK --- EESE	AVR --- FFSD --- TDP	D --- K --- DR --- SGPAYP	FGVGS --- KRI --- GF	
Barley	51	FFBV --- NHGVP	AV --- WDR --- LEAE	AVR --- FFAST --- DA	EK --- DR --- SGPADP	FGVGS --- KRI --- GR	
		110	120	130	140	150	
AFGA2ox1	101	NGDI --- SNVEYL	L --- FE --- K --- NKP --- --	--FL --- K --- EPSAR	--L --- F --- LSALNE	V --- IT --- AMKS --- _SD	
Arabidopsis	101	NGDV --- SNVEYL	L --- INA --- N --- DSGS	GP --- F --- PSLLK --- S	PGT --- F --- ANALEE	V --- IT --- SVRK --- MTF	
Pea	101	NGDI --- SNVEYL	LL --- IT --- ND --- EHNF	SL --- ---	Y --- G --- -ED	IDK --- F --- ABL --- _KD	V --- K --- CAM --- RNM --- AC
Rice	101	NGDMG --- WEYL	LL --- AL --- DD --- AS --- LA	DA --- ---	CT --- VP --- S	CAV --- F --- ALNE	V --- IT --- SV --- RK --- VAV
Barley	101	NGDMG --- WEYL	LL --- A --- DR --- DT --- --	--S --- K --- ASPP	SSAL --- F --- EA --- IN --- YA	V --- Y --- SAM --- AS --- LA	
		160	170	180	190	200	
AFGA2ox1	151	E --- L --- V --- MA --- K --- SL	N --- I --- E --- -K --- EALKE	I --- GMN --- E --- SD --- _M	FR --- VNHVPP --- FP	LL --- QEL --- --K --- -S	
Arabidopsis	151	DVLEK --- ITD --- SL	G --- I --- K --- PRNT --- _SK	L --- VSD --- ONT --- DSI	L --- R --- NHVPPCP	L --- SNKKTNG --- SK	
Pea	151	E --- I --- _D --- MAEGL	K --- I --- DP --- K --- NV --- FSK	L --- V --- Y --- KQSDCL	FR --- VNHVPP --- DP	---	
Rice	151	RV --- TE --- AV --- SEGL	G --- I --- AQAD --- LSA	L --- VT --- AE --- SD --- QV	FR --- VNHVPP --- CP	---	
Barley	151	TVLE --- AV --- REGL	G --- V --- SP --- AD --- ALD	M --- VT --- BE --- SD --- QV	FR --- VNHVPP --- CP	LL --- QEL --- _PPN --- -S	
		210	220	230	240	250	
AFGA2ox1	201	S --- _T --- GFGEHTD	P --- QL --- IS --- ILRSN	D --- SN --- S --- Y --- DI --- AL --- K	D --- GS --- W --- _L --- PI --- PPD	E --- DS --- FF --- V --- NV --- GD	
Arabidopsis	201	N --- V --- I --- GFGEHTD	P --- QI --- IS --- ILRSN	N --- TS --- GL --- QI --- I --- _N	D --- GS --- W --- I --- SV --- PPD	H --- S --- FF --- V --- Y --- VG --- D	
Pea	201	N --- L --- I --- GFGEHTD	P --- QI --- IS --- ILRSN	N --- TS --- GL --- QI --- I --- _R	D --- GS --- W --- I --- SV --- PPD	H --- S --- FF --- V --- Y --- VG --- D	
Rice	201	S --- V --- TGFGEHTD	P --- Q --- L --- V --- S --- IL --- RSN	G --- T --- SG --- L --- QI --- AL --- R	D --- G --- S --- W --- V --- SV --- PPD	A --- D --- S --- FF --- V --- NV --- GD	
Barley	201	S --- V --- TGFGEHTD	P --- Q --- L --- V --- S --- IL --- RSN	G --- T --- S --- L --- Q --- I --- AL --- R	D --- G --- S --- W --- V --- SV --- PPN	R --- D --- A --- FF --- V --- NV --- GD	
		260	270	280	290	300	
AFGA2ox1	251	M --- _Q --- VLTNGR --- L	K --- SV --- K --- HR --- W --- TT	-S --- V --- K --- SRVSMI	F --- F --- S --- PP --- PN --- DL	I --- SA --- _P --- OLL --- NT	
Arabidopsis	251	S --- LQV --- ITNGRF	K --- SV --- A --- HR --- V --- AA	N --- CK --- K --- SRVSMI	V --- F --- AG --- PP --- LD --- R	I --- AP --- L --- Q --- LD --- N	
Pea	251	S --- LQV --- ITNGRF	K --- SV --- A --- HR --- V --- AA	N --- G --- I --- DP --- A --- _SMI	V --- F --- S --- PP --- L --- SEK	I --- AP --- L --- P --- S --- _M --- -K	
Rice	251	S --- LQVLTNGRF	K --- SV --- K --- HRVVA	N --- S --- _K --- SRV --- S --- I	V --- F --- S --- PP --- LA --- QR	I --- AP --- L --- P --- OLL --- GE	
Barley	251	S --- LQVLTNGR --- L	R --- SV --- A --- HRV --- VAG	N --- GL --- K --- SRVSMI	V --- F --- AG --- PP --- LA --- QR	I --- AP --- L --- Q --- LL --- AG	
		310	320	330	340	350	
AFGA2ox1	301	EEKEKCM --- VI --- E	FT --- W --- AE --- VK --- RTA	F --- K --- SALADNRL	A --- _L --- FE --- I --- -----	-----K --- P --- ..	
Arabidopsis	301	E --- DE --- --R --- LY --- EE	FT --- W --- AE --- VK --- NST	V --- N --- SALADNRL	Q --- Q --- FE --- -----R	K --- T --- I --- K --- NLLN --- ..	
Pea	301	G --- KE --- --S --- LY --- KE	FT --- W --- AE --- VK --- SST	V --- SALADNRL	G --- N --- VE --- -----R	I --- A --- AT --- -----..	
Rice	301	G --- ED --- --S --- LY --- KE	FT --- W --- AE --- VK --- KAA	V --- K --- SALADNRL	A --- Q --- FE --- -----K	-----K --- -----..	
Barley	301	TQSLP --- _LY --- RD	FT --- W --- AE --- VK --- KAA	V --- SALADNRL	A --- P --- FE --- TPLVAM	PH --- A --- AHRS --- ..	

図 6-3-3 GA2 酸化酵素遺伝子と推定される AFGA2ox1 における他植物とのアミノ酸配列の比較
 Arabidopsis AtGA2ox1 (Thomas et al., 1999, accession number AJ132435), pea PsGA2ox1 (Lester et al.,
 1999, accession number AF100955), rice OsGA2ox3 (Sakamoto et al., unpublished, accession number
 AB092485), barley Hv2ox4 (Spielmeyer et al., 2004, accession number AY551432)

		10	20	30	40	50
AFGA11	1	MKREHAE	SSSGP	PPPLKN	SKK	MI EEE DAG
AFGA12	1	MKREHE	SSS R	PPT	NKK	MI EEE DAG
GAI	1	MKRD	HHHQ		DK	TM MN EED DNG
RGA	1	MKRD	HQFQ	RLSNHGT	SSS	SSSISKDK
OsGAI	1	MKRE	VD	AG S	SSSS	SAD MGS
SLN1	1	MKRE	VD	AG S	SSSS	SAD MGS
		60	70	80	90	100
AFGA11	51	LGKVR	NTDM	ADV	AQKLE	QLDMV
AFGA12	51	LGKVL	ASDM	ADV	AQKLE	QLDMV
GAI	51	LGKVR	SS	E1	ADV	FTAQKLE
RGA	51	LGKVR	SS	E1	ADV	FTAQKLE
OsGAI	51	LGKVR	SS	DM	ADV	FTAQKLE
SLN1	51	LGKVR	SS	DM	ADV	FTAQKLE
		110	120	130	140	150
AFGA11	101	HYNPS	DLST	LN	LESML	SELNA
AFGA12	101	HYNPS	DLST	LN	LESML	SELNA
GAI	101	HYNP	AE	LT	LN	LESML
RGA	101	HYNP	SE	LSW	LDN	MLSELN
OsGAI	101	HYNPS	DLSSW	LN	LESML	SELNA
SLN1	101	HYNP	DLSSW	LN	LESML	SELNA
		160	170	180	190	200
AFGA11	151	SSSN	VNP	FDQF	RTN	
AFGA12	151	DFQY	YBN	NE	SSMI	ASSD
GAI	151	DLK	VI	FTPGD	AI	LNQFA
RGA	151	EL	PAR	AD	SSS	STVAL
OsGAI	151	EL	PAR	AD	SSS	STVAL
SLN1	151	EL	PAR	AD	SSS	STVAL
		210	220	230	240	250
AFGA11	201	PDRK	KRPT		ASS	SSS
AFGA12	201	SSSS	SSSS	SSSV	QPT	PRS
GAI	201				GW	ET
RGA	201	PDS	MVT	STST	STQ	IGG
OsGAI	201	SSSS	SSSS	SSSLG	GGAS	RSV
SLN1	201	SSSS	SSSS	SSSLG	GGAS	RSV
		260	270	280	290	300
AFGA11	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
AFGA12	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
GAI	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
RGA	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
OsGAI	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
SLN1	251	IRLV	H	L	AC	AEAV
		310	320	330	340	350
AFGA11	301	LARR	I	Y	R	L
AFGA12	301	LARR	I	Y	R	L
GAI	301	LARR	I	Y	R	L
RGA	301	LARR	I	Y	R	L
OsGAI	301	LARR	I	Y	R	L
SLN1	301	LARR	I	Y	R	L

図 6-3-4 DELLA 遺伝子と推定される AFGA11 および AFGA12 における他植物とのアミノ酸配列の比較 (前) Arabidopsis GAI (Peng et al., 1997, accession number Y15193), RGA (Silverstone et al., 1998, accession number AY054160), rice OsGAI (SLR1) (Ogawa et al., 2000 ; Ikeda et al, 2001, accession number AB030956), barley SLN1 (Chandler et al., 2002, accession number AF460219)

図中の下線は、それぞれ DELLA ドメインおよび TVHYNP ドメインを表す

		360	370	380	390	400
AFGA11	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
AFGA12	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
GAI	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
RGA	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
OsGAI	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
SLN1	351	FEGCKRVHVI	DFGMKQGM	QWPALLQALA	LRPGGPPSFR	LTGIGPPQPD
		410	420	430	440	450
AFGA11	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
AFGA12	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
GAI	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
RGA	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
OsGAI	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
SLN1	401	NTDALQQVGL	KLAQFAETIR	VDFEVRGFV	ANSLADLEP	FMLELAPSEI
		460	470	480	490	500
AFGA11	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
AFGA12	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
GAI	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
RGA	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
OsGAI	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
SLN1	451	NELVEEVRVAV	NSVFLHKLK	AKHGAIEKVL	RTIIRAVKPKI	VTWVE--QEA
		510	520	530	540	550
AFGA11	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
AFGA12	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
GAI	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
RGA	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
OsGAI	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
SLN1	501	NHNSVIFLDR	FTESLHYVST	LFDSLEGGCV	SD-----	GGED
		560	570	580	590	600
AFGA11	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
AFGA12	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
GAI	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
RGA	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
OsGAI	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
SLN1	551	QVMSEVYVLR	QICNVVACEG	AER--TERHE	TLGQWRNRLG	RAGFEPVHLG
		610	620	630	640	650
AFGA11	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
AFGA12	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
GAI	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
RGA	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
OsGAI	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
SLN1	601	SNAFKQASML	LALFAGGQGY	RVEEENGLM	LGWH--TRPL	IATSAWVAA
AFGA11	651	V--.				
AFGA12	651	DV--.				
GAI	651	N--.				
RGA	651	RY--.				
OsGAI	651	R--.				
SLN1	651	P--.				

図6-3-4 DELLA遺伝子と推定されるAFGA11およびAFGA12における他植物とのアミノ酸配列の比較 (後)
 Arabidopsis GAI (Peng et al., 1997, accession number Y15193), RGA (Silverstone et al., 1998, accession number AY054160), rice OsGAI (SLR1) (Ogawa et al., 2000 ; Ikeda et al, 2001, accession number AB030956), barley SLN1 (Chandler et al., 2002, accession number AF460219)

ングを行い、*AFGAI1*および*AFGAI2*と命名した(図6-3-4)。*AFGAI1*は、全長1899bp、568aaをコードすると推定され、シロイヌナズナのGAI(Pengら、1997)と56%、RGA(Silverstoneら、1998)と55%、イネのOsGAI(SLR1)(Ogawaら、2000; Ikedaら、2001)と61%、オオムギのSLN1(Chandlerら、2002)と61%の相同性がアミノ酸レベルで認められた。*AFGAI2*は、全長1953bp、579aaをコードすると推定され、シロイヌナズナのGAIと56%、RGAと56%、イネのOsGAIと62%、オオムギのSLN1と61%の相同性がアミノ酸レベルで認められた。*AFGAI1*と*AFGAI2*とは、お互いに72%の相同性が認められた。

DELLAタンパク質は、GRASファミリーと呼ばれる植物特有の転写因子群(Bolle、2004; Pyshら、1999)に属し、N末端領域にDELLAドメインとTVHYNPドメインを有し、この領域が欠失などの変異を起こすと、ジベレリンに対する応答が喪失し植物体が矮化することが明らかとなっている(Boss・Thomas、2002; Ikedaら、2001; Pengら、1999)。*AFGAI1*および*AFGAI2*は、DELLAドメインおよびTVHYNPドメインが高く保存されていた(図6-3-4)。

以上の結果、ネギにおいてジベレリンのシグナル伝達の抑制因子として働くDELLAタンパク質をコードする候補遺伝子、*AFGAI1*および*AFGAI2*のクローニングに成功した。

第4節 ネギ単一異種染色体添加系統を用いたシャロットにおけるジベレリン関連の候補遺伝子の座乗染色体の決定

Spielmeierら(2004)は、コムギの単一異種染色体添加系統を用い、オオムギにおけるジベレリン生合成関連遺伝子の座乗染色体の決定を行っている。Shigyoら(1996)は、ネギゲノムを2つとシャロットゲノムを1つ持つ異質三倍体にネギを戻し交雑して、ネギ単一異種染色体添加系統を作出している。現在、本系統を用いて遺伝子分析が行われており(執行、2002)、タマネギでは連鎖地図と染色体の対応関係の解明などが行われている(Martinら、2005; Van Heusden、2000)。本節では、前節でクローニングしたネギのジベレリン関連の候補遺伝子について、分球タマネギであるシャロットにおける座乗染色体の決定を行った。

材料および方法

Shigyoら(1996)が作出したシャロットの染色体を一本ずつ持つネギ単一異種染色体添加系統(2n=17、FF

+1AからFF+8A)を供試した。ネギ、シャロット、添加系統のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、得られた増幅断片を制限酵素で消化した後、2%アガロースゲル電気泳動を行った。ネギのジベレリン関連の候補遺伝子としてクローニングした*AFGA20ox1*、*AFGA3ox1*、*AFGA2ox1*、*AFGAI1*、*AFGAI2* 遺伝子のシャロットにおける座乗染色体を決定した。各遺伝子におけるプライマー塩基配列および制限酵素は表6-4-1に示したとおりである。なお、実験に用いたゲノムDNAは山口大学農学部執行正義博士より譲渡を受けた。

結果および考察

前節においてクローニングしたジベレリン関連の候補遺伝子について、シャロットの染色体を一本ずつ持つネギ単一異種染色体添加系統を用い、シャロットの座乗染色体の決定を行った。いずれの遺伝子においてもネギとシャロットのPCR産物の断片長に違いは認められなかったことから、PCR-RFLP法によりシャロットの座乗染色体の決定を行った(表6-4-2、図6-4-1)。その結果、ジベレリン生合成の候補遺伝子として、*AFGA20ox1*は4A、*AFGA3ox1*は7A、*AFGA2ox1*は4Aに、ジベレリンシグナル伝達関連の候補遺伝子として、*AFGAI1*は3A、*AFGAI2*は4Aに座乗していた。本実験はシャロットにおける座乗染色体の決定であり、ネギの座乗染色体の決定には、松原ら(2005)が作出したような単一染色体欠失系統を用いる必要がある。塚崎ら(2005、2006)は、タマネギDNAマーカーのネギでの利用を試み、それぞれの連鎖群上のマーカーの配列と、既報のネギおよびタマネギの染色体番号との間に矛盾がないこと、ネギとタマネギのゲノム構造は高く保存されていることを報告している。このことから、本研究でクローニングしたジベレリン関連の候補遺伝子について、ネギにおいてもシャロットと同じ染色体番号に座乗している可能性が高いと考えられる。タマネギでは連鎖地図および染色体地図の作成が精力的に行われてきており(Martinら、2005; Van Heusden、2000)、今後、ジベレリン関連の候補遺伝子の地図への位置対応も重要な仕事となるであろう。

ジベレリン関連の候補遺伝子が座乗した染色体の添加によって、形態への影響がどのように現れるのか興味もたれる。ジベレリンの機能として、植物の茎部の伸長制御がある(神谷、1994)。イネおよびコムギにおける「緑の革命」に関与した遺伝子は、イネではGA20位酸化酵素遺伝子の変異による機能喪失(Ashikariら、2002; Sasakiら、2002)であり、コムギではDELLAタンパク質遺伝子の変異による機能喪失(Pengら、1999)であることが明らかにされている。Shigyoら(1997)は、ネ

表 6-4-1 ジベレリン関連の候補遺伝子の座乗染色体の決定に用いたプライマーおよび制限酵素

遺伝子名		プライマーの塩基配列	制限酵素
<i>AFGA20ox1</i>	sence	5'-GTGATGCATTGTACTGCATGG-3'	<i>Hinf</i> I
	antisence	5'-GACCACCACCGGTTATCTAC-3'	
<i>AFGA3ox1</i>	sence	5'-ATGCCTTCCATTTCAATGGAACAA-3'	<i>Rsa</i> I
	antisence	5'-CTTCCCATTTCATTGGATGC-3'	
<i>AFGA2ox1</i>	sence	5'-CACTTCCTTATGTCCCTAACATA-3'	<i>Hae</i> III
	antisence	5'-CCTGAAGGTGCAATGTATAGTC-3'	
<i>AFGAI1</i>	sence	5'-AGAGGAACCCGACGCCGGCG-3'	<i>Hae</i> III
	antisence	5'-CTTAATCCACATAGAAAAGATAC-3'	
<i>AFGAI2</i>	sence	5'-GGAAGAAACAGACGATGGAG-3'	<i>Alu</i> I
	antisence	5'-CACCAAACAACCTCATACTGACAT-3'	

表 6-4-2 ネギ単一染色体添加系統を用いたシャロットにおけるジベレリン関連の候補遺伝子の座乗染色体、並びにネギ単一染色体添加系統の形態特徴

遺 伝 子 名		シャロット	
GA 生合成	GA シグナル伝達	座乗染色体	ネギ単一染色体添加系統の形態特徴 ²
<i>AFGA2ox1</i>	<i>AFGAI1</i>	3A	草丈が短い、花茎が短い、葉の展開が遅い、 仏炎包(花球)が小さい
<i>AFGA20ox1</i>	<i>AFGAI2</i>	4A	草丈が長い、花茎が長い、葉身が濃緑、 分けつが少ない、葉の展開が遅い、 小花が大きい、尖った仏炎包(花球)
<i>AFGA3ox1</i>		7A	葉の展開が早い、秋から冬にかけて腋芽の伸長

² Shigyo ら(1997)による

ギ単一染色体添加系統の形態的な特徴を報告しており、GA2酸化酵素およびDELLAタンパク質が座乗した3A添加個体では「草丈が短い」、「花茎が短い」「葉の展開が遅い」、GA20酸化酵素およびDELLAタンパク質が座乗した4A添加個体では「草丈が長い」、「花茎が長い」、GA3酸化酵素が座乗した7A添加個体では「葉の展開が早い」、以上のような形態的な特徴が見られる(表6-4-2)。他の遺伝子の影響があるなかで、このようにジベレリン関連の候補遺伝子の座乗した染色体の添加された系統において、草丈などジベレリン関連形質に差が見られることは興味深い。

第5節 ジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析

本節では、第3節でクローニングしたジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析を行った。

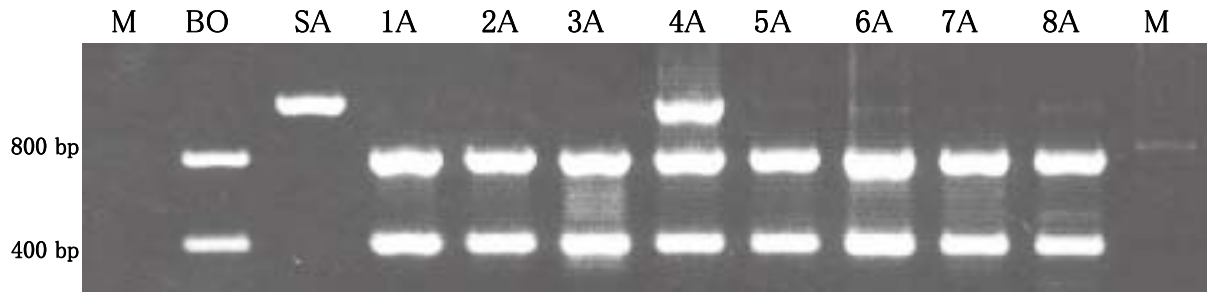
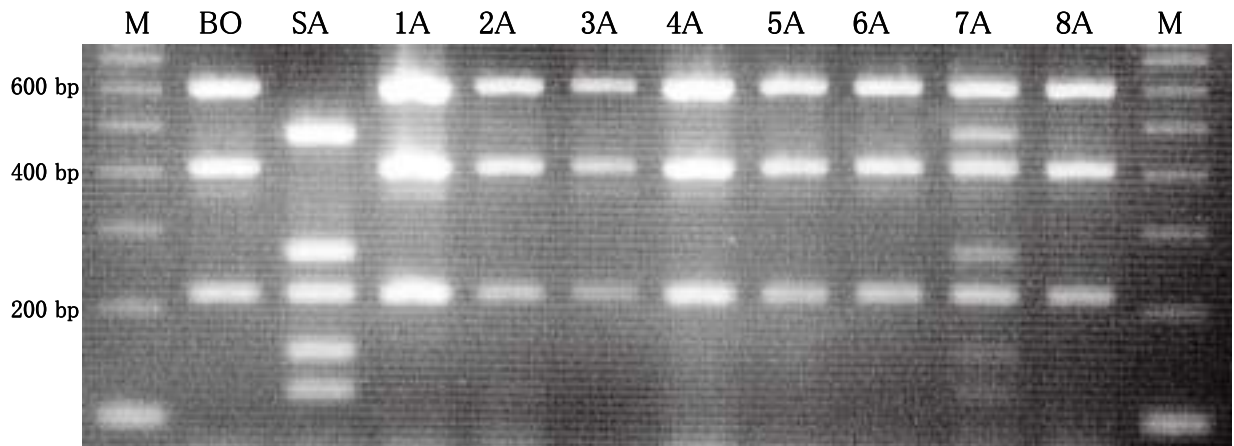
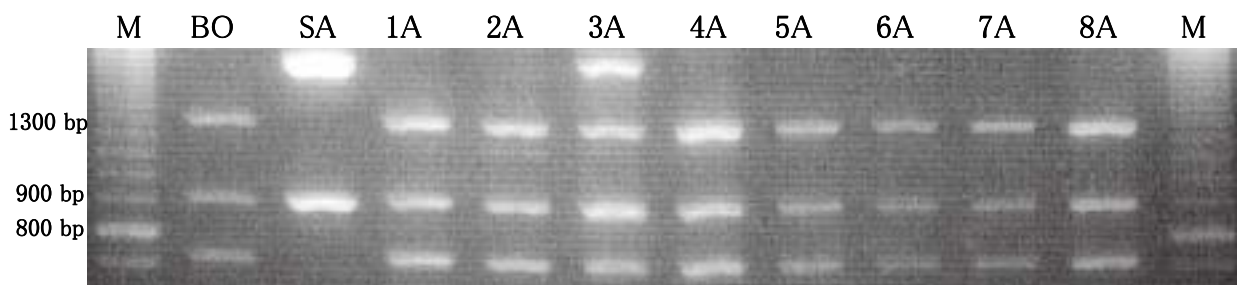
第1項 抽苔および分けつ特性の異なる品種における発現解析

第2節において実験に用いた3品種(表6-2-1)を供試し、花芽分化の非誘導条件下で生育させた後、ジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析を行った。

材料および方法

(1) 植物材料

‘長悦’、‘晩中太’および‘吉晴’を供試し、材料はいずれもプランター(10L)で栽培した。‘長悦’および‘吉晴’は、2005年5月15日に200穴セルトレイに播種し、7月10日に‘長悦’は15株/プランター、‘吉晴’は5株/プランター、‘晩中太’は9月15日5株/プランターで植え付けをした。これらは10月20日まで鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場の雨よけハウス内で栽培し、その後、鳥取大学農学部のガラス温室(20℃)において栽

(A) *AFGA20ox1*(B) *AFGA3ox1*(C) *AFGA2ox1*

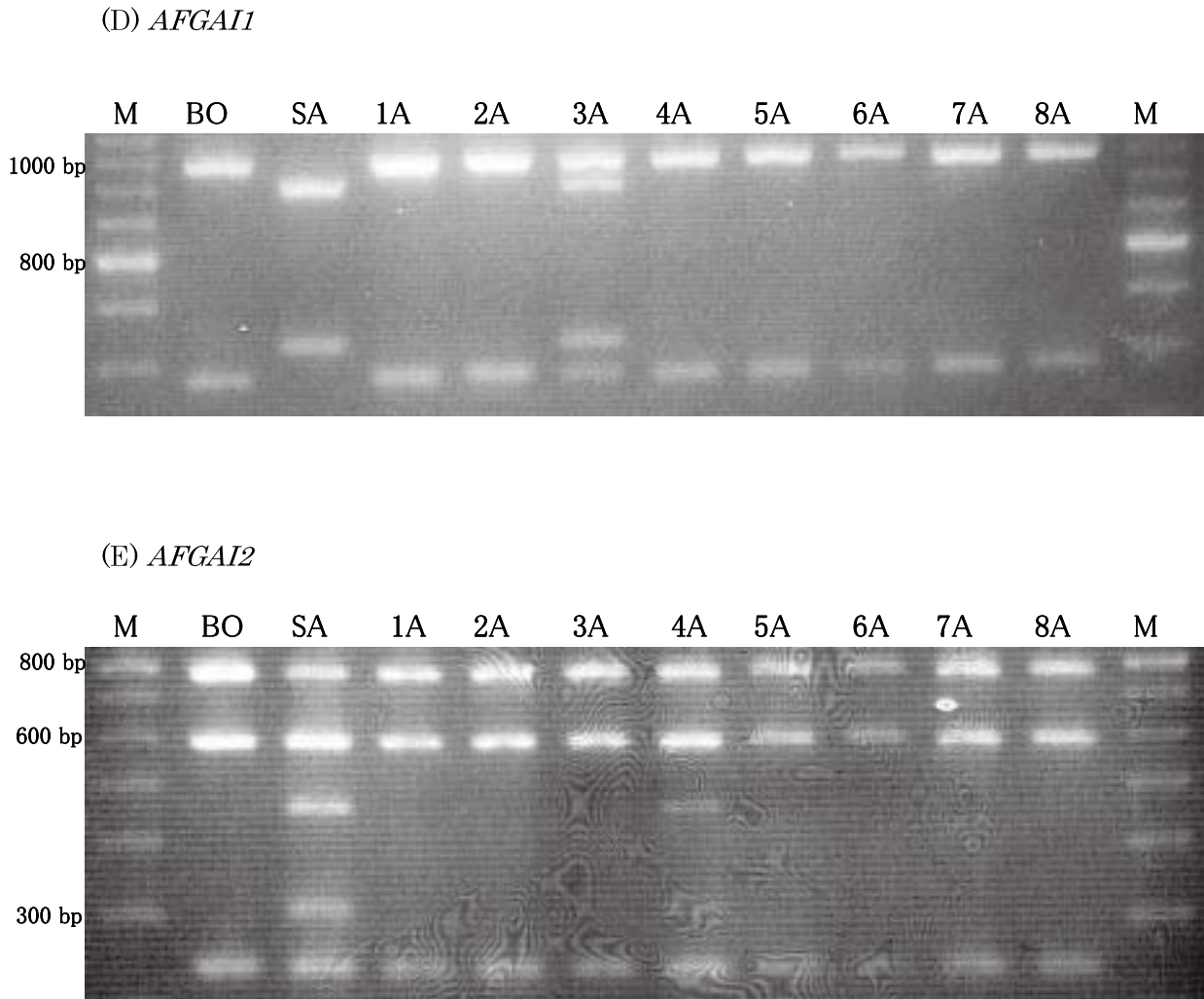


図 6-4-1 ネギ単一染色体添加系統を用いたシャロットにおける
ジベレリン関連の候補遺伝子の座乗染色体の決定
BO はネギ, SA はシャロット, M はマーカーを表す
1A から 8A は添加されたシャロットの染色体番号を表す

培した。サンプリングは、各品種とも葉鞘、葉身および根の3つに分け、液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。

(2) ノーザン解析およびRT-PCR解析

全RNAの抽出は第3節に示した方法に従った。各サンプルの全RNA $10\mu\text{g}$ を1.2%アガロース(ホルムアミド含有)電気泳動を行った後、ナイロンメンブレン(Amersham)に吸引プロット装置(Amersham)を用いて転写した後、UV照射してRNAをナイロンメンブレンに固定した。

ネギのジベレリン関連の候補遺伝子としてクローニングした *AFGA20ox1*、*AFGA3ox1*、*AFGA2ox1*、*AFGAI1*、*AFGAI2*をそれぞれプローブとした。*AFGAI1*および*AFGAI2*は、両者の3'末端領域の約300bpをPCR(プライマーは、sense: 5'-GCGTTC/TAAGCAGCGCAGTATG-3', antisense: ベクターの配列(Reversal primer)で増幅した断片を用いた。プローブは、Megaprime Prime labeling System(Amersham)

を用いてランダムプライマー法により ^{32}P ラベルした。 65°C で4時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、 65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、ナイロンメンブレンを 65°C 、 $2\times\text{SSC}$ (0.1% SDS)で15分間の洗浄を2回繰り返した。次いで 65°C 、 $0.2\times\text{SSC}$ (0.1% SDS)で15分間の洗浄を2回繰り返した。発現解析はイメージングアナライザー(FLA-5000、FUJIFILM)によって行った。

AFGA20ox1、*AFGA2ox1*は発現量が低く、ノーザン解析では検出できなかったことから、RT-PCRによる解析を行った。First Strand cDNA Synthesis Kit(TOYOBO)を用い、各サンプルの全RNA $1\mu\text{g}$ から1本鎖cDNAを合成した。これを鋳型としてPCRを行った。反応は、 94°C 、5分間の熱変性、続いて熱変性 94°C 、1分間、アニーリング1分間、伸長 72°C 、2分間を30サイクル、あるいは40サイクル行い、最後に 72°C 、10分間の伸長反応を行った。プライマーは表6-5-1に示した。

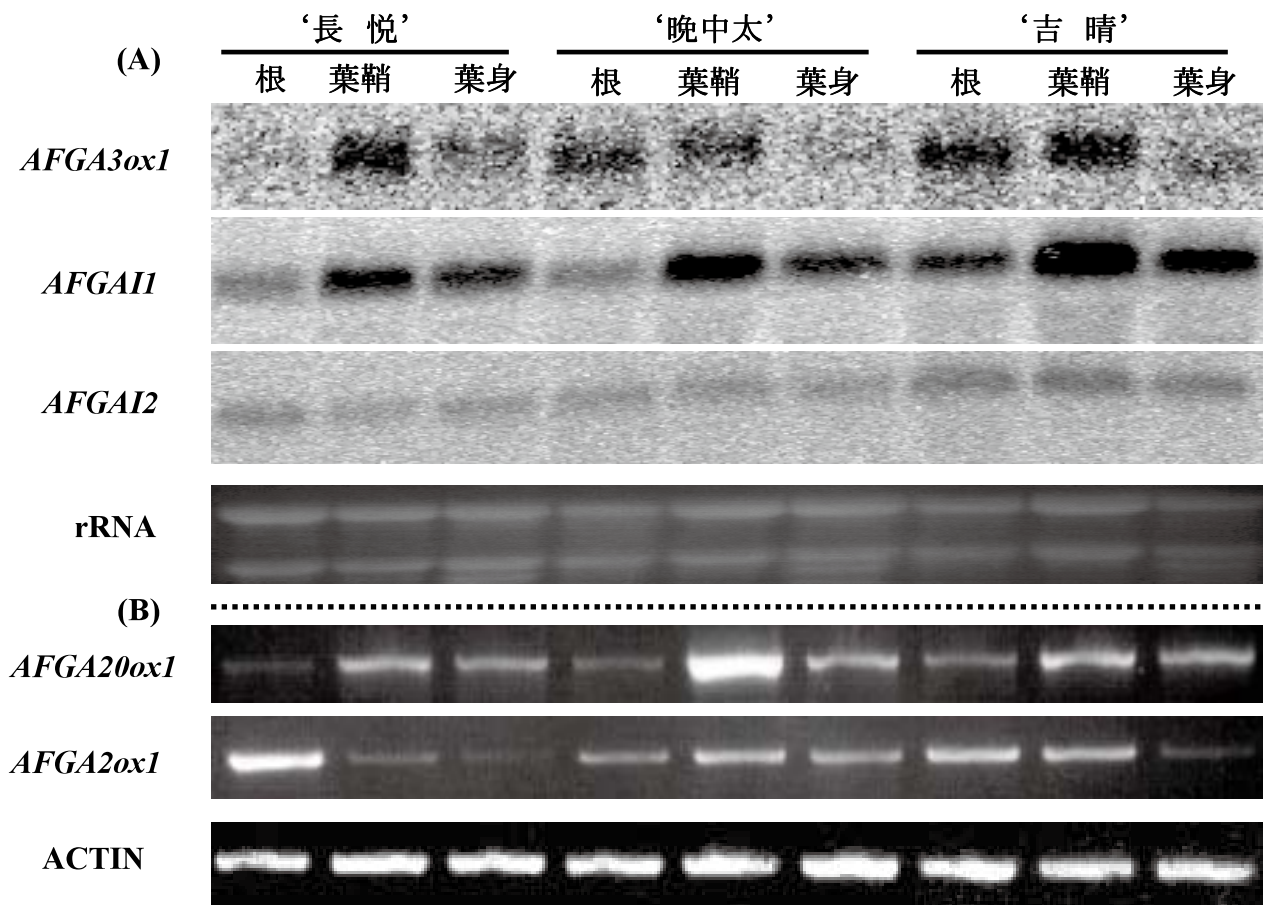


図 6-5-1 品種の組織別におけるジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析

(A) ^{32}P ラベルしたプローブによるノーザン解析

(B) RT-PCRによる発現解析

表 6-5-1 RT-PCR 発現解析に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子名		プライマー塩基配列 ^a
<i>AFGA20ox1</i>	sence	5'-GTGATGCATTGTACTGCATGG-3'
	antisence	5'-GACCACCACCGGTTATCTAC-3'
<i>AFGA2ox1</i>	sence	5'-CACTTCCTTATGTCCCTAACATA-3'
	antisence	5'-CCTGAAGGTGCAATGTATAGTC-3'
Actin	sence	5'-GGAATGGTCAAGGCTGGATTTGC-3'
	antisence	5'-ACGGCCTGGATAGCAACATACAT-3'

結果および考察

ノーザン解析およびRT-PCRによる発現解析の結果を図6-5-1に示した。*AFGA3ox1*、*AFGAI1*および*AFGAI2*はノーザン解析で検出できたが、*AFGA20ox1*および*AFGA2ox1*は発現量が低く、RT-PCRによる発現解析を行った。

*AFGA3ox1*は、いずれの品種も葉身に比べ葉鞘で高い発現が見られた。また、根において‘晩中太’および‘吉晴’は高い発現が見られたが、‘長悦’では低かった。*AFGA20ox1*も葉身に比べ葉鞘で高い発現が見られ、根においても*AFGA3ox1*と同様に‘長悦’に比べ‘晩中太’および‘吉晴’でやや高い発現であった。

*AFGAI1*および*AFGAI2*は、いずれの品種の根、葉鞘、葉身においても恒常的に発現しており、いずれの組織においても*AFGAI2*に比べ*AFGAI1*の発現が高かった。*AFGAI1*の発現は葉鞘でやや高い傾向であった。これらことから、ネギの栄養成長期におけるジベレリンシグナル伝達には、*AFGAI1*が強く影響している可能性が考えられる。

第2項 栄養成長期におけるジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤処理の影響

ジベレリン生合成遺伝子の発現は、活性型ジベレリンによりフィードバック制御されることが数多く報告されている (Itohら、2001; Lesterら、1999; Phillipsら、1995; Rossら、1999; Thomasら、1999; Yamaguchiら、1998)。本項では、栄養成長期における‘長悦’において、ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤の処理を行い、生育への影響、並びに*AFGA3ox1*、*AFGAI1*、*AFGAI2*遺伝子の発現解析を行った。

材料および方法

2005年6月22日に‘長悦’を200穴セルトレイに1穴当たり3粒播種し、8月20日にプランター(10L)に15

株ずつ植え付け、鳥取大学農学部のガラス室内で生育させた。施肥は緩効性肥料(12-12-12)を、植え付け時にプランター当たり5g、10月1日に10g施用した。処理は、GA₃(協和発酵、ジベレリン液剤)を20ppm、ウニコナゾールP(アグロス、スミセブンP)を1ppmそれぞれ500M²/プランター、10月1日、8日および15日の計3回行った。生育調査は、1週間おきに草丈、葉身長、葉鞘長および葉数を測定した。実験は各区とも3反復(プランター)とした。処理開始後、0週、1週、2週および4週に葉鞘部をサンプリングし、第1項に示した方法によって、*AFGA3ox1*、*AFGAI1*、*AFGAI2*遺伝子のノーザン解析を行った。

結果および考察

GA₃(GA区)およびウニコナゾールP(UZP区)処理後のネギの生育推移を図6-5-2に、処理9週後の様子を図6-5-3に示した。UZP区では、処理直後から著しい草丈の抑制が認められ、葉鞘および葉身ともに伸長が抑えられた。一方、GA区は葉身長がやや抑制され、対照区に比べ草丈がやや短くなった。また、GA区およびUZP区ともに花芽分化の誘起は認められなかった(データ省略)。

ノーザン解析の結果を図6-5-4に示した。UZP区における*AFGA3ox1*の発現は、対照区に比べて1週後に発現が増加し、2週および4週後も高い発現が認められた。GA区では1週後に発現量が低下したが、その後、2週後および4週後には対照区に比べて発現量が増加した。*AFGAI1*、*AFGAI2*の発現は、GA区およびUZP区ともに明確な傾向は認められなかった。

GA₃酸化酵素遺伝子は、活性型ジベレリンの投与によってフィードバック制御を受けることがイネ(Itohら、2001)、シロイヌナズナ(Yamaguchiら、1998)、エンドウ(Rossら、1999)において知られている。本実験でも対照区に対して、処理1週後ではGA区で発現量が低下し、UZP区では発現量が増加した。このことから、ネ

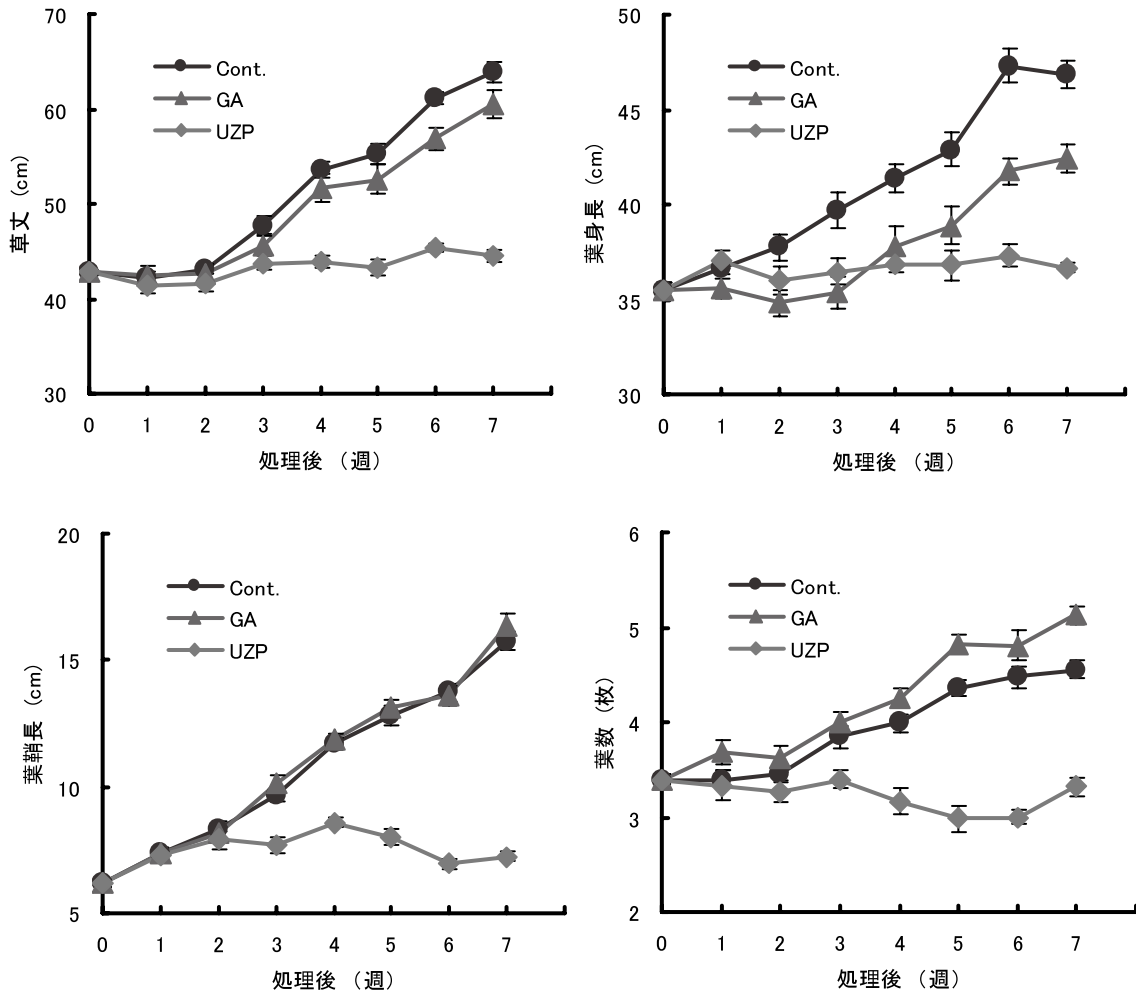


図 6-5-2 ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が生育に及ぼす影響

品種は‘長悦’を供試した

処理はジベレリン:GA₃液剤の20 ppm, ジベレリン生合成阻害剤:ウニコナゾールP液剤の1 ppmを, 0, 1, 2週の計3回行った

図中のバーは標準誤差(n=10)を表す

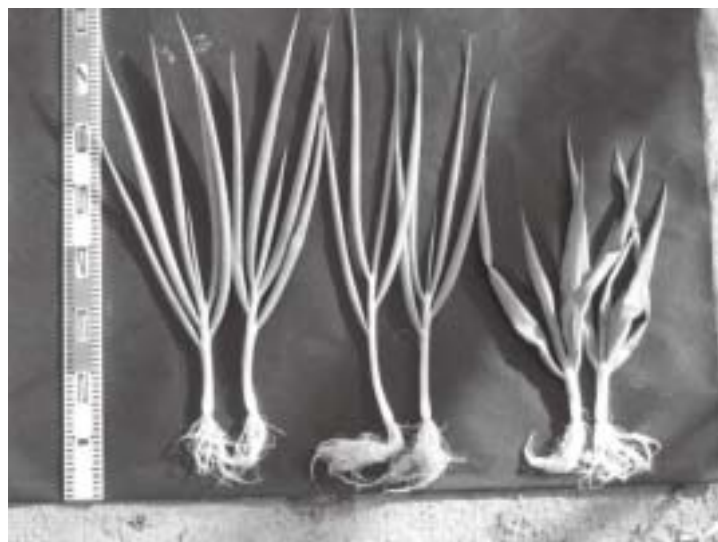
ギにおいてもジベレリン投与に対して*AFGA3ox1*はフィードバック制御を受けることが明らかとなった。しかし、GA区では1週後および2週後にもGA₃を処理しているにもかかわらず、発現量が増加したことは興味深い。これまでに、ジベレリン処理後にGA₃酸化酵素遺伝子の発現量が増加する報告はなく、本実験の結果を説明するのは難しいが、2週後および4週後でGA区の*AFGA3ox1*の発現が高まったことと草丈がやや短くなることとの関連がある可能性も考えられる。

以上、本実験によりのジベレリン投与時に*AFGA3ox1*の発現量が変化することが明らかになったが、不明な点が多く残され、GA₄処理での発現解析も含め再度検討する必要がある。

第3項 花芽の発達と花茎伸長との関係、並びにジベレリン関連遺伝子の発現

これまでに花芽分化後の花茎伸長には、ジベレリンが関係しているという報告は、ホウレンソウ (Dong・Zeevaart, 2002; Zeevaartら, 1993)、ダイコン (Nishijimaら, 1998a)、キャベツ (Hamanoら, 2002)、シロイヌナズナ (Xuら, 1997) など幾つかの植物において報告されている。ネギにおいても第1節において、花茎伸長はGA₃処理が早まり、ウニコナゾールP処理で遅くなる結果が得られている。

本項では、‘長悦’を用い、花芽の発達と花茎伸長との関係を明らかにし、花茎を経時的にサンプリングし花



対照区

GA 区

UZP 区

図 6-5-3 ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が生育に及ぼす影響
写真は処理 9 週後

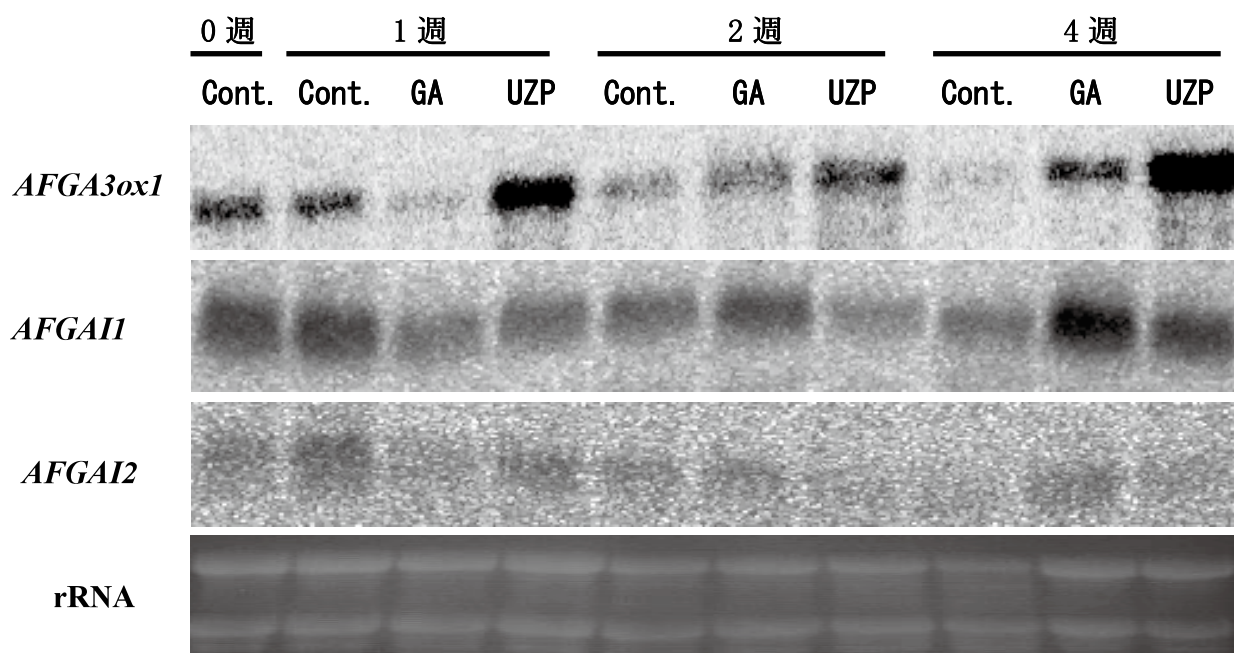


図 6-5-4 ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤が *AFGA3ox1*, *AFGAI1*, *AFGAI2* 遺伝子の発現に及ぼす影響 (ノーザン解析)

表 6-5-2 ネギの花芽発達ステージの分類

スコア	花芽の発達ステージ ²
0	未分化
I	肥厚期から総包形成期
II	小花形成期
III	花被, 雄ずい形成期
IV	葯形成, 雄ずい形成期
V	花粉, 胚珠形成期
VI	花粉粒形成, 柱頭初生期
VII	開花

² 江口ら(1958a,b), Yamasakiら(2000b)の報告をもとに分類した

球と茎部におけるジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析を行った。

材料および方法

実験材料は、鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場の砂畑(砂丘未熟土)において栽培した。2004年6月20日に‘長悦’を200穴セルトレイに1穴当たり3粒播種し、8月27日に条間1mで深さ15cmの植え溝を切り、ポット間隔15cmで移植し、翌年の5月まで栽培した。総施肥量はN:P₂O₅:K₂O = 18.0:18.0:18.0kg・10a⁻¹とした。実験規模は30m²、反復なしとした。12月15日から約1か月ごとに、花芽の発達ステージ(表6-5-2)および花茎長の調査を行った。

また、3月から5月にかけて花茎長別に1:0cmから3cm、2:3cmから5cm、3:5cmから15cm、4:15cmから40cm、5:50cm以上の5段階に分けて、花球と茎部に分けてサンプリングし、第1項に示した方法によって、*AFGA3ox1*、*AFGAI1*、*AFGAI2* 遺伝子のノーザン解析を行った。

結果および考察

ネギの花芽発達のステージを未分化から開花までを8段階に分類して(表6-5-2)‘長悦’の花茎伸長の時期に経時的にサンプリングし、花茎長と花芽発達ステージとの関係を調査した(図6-5-5A)。その結果、ネギでは小花形成期から開花に至るまで花茎伸長が続き、花茎伸長に伴い花芽も発達する関係が認められた。また、花被、雄ずい形成期以降に急激な花茎伸長が開始することが明らかとなった。

花茎を長さ別に5段階に分けてサンプリングし(図6-5-5B)花球と茎部のノーザン解析を行った(図6-5-5C)。その結果、茎部における*AFGA3ox1*の発現は、

2の段階(3-5cm)で高まり、その後、茎部伸長に伴い減少した。一方、花球における*AFGA3ox1*の発現は、4の段階(15-40cm)で高まった。また、*AFGAI1*および*AFGAI2*は、*AFGA3ox1*と同様な発現パターンが認められ、花球および茎部ともに*AFGAI2*に比べ*AFGAI1*の発現が高かった。なお、*AFGA20ox1*および*AFGA2ox1*は発現量が低く、ノーザン解析では検出できなかった(データ省略)。

ホウレンソウでは、花茎伸長時に内生の活性型ジベレリンが高まり(Zeevaartら、1993)。この増加には、GA20酸化酵素遺伝子の発現が関わっていることが明らかにされている(Dong・Zeevaart、2002)。本実験では、*AFGA20ox1*の発現はノーザン解析で検出できなかったが、*AFGA3ox1*の発現は、茎伸長が急激に高まる花被、雄ずい形成期に高まったことから、花茎伸長にはジベレリンが密接に関わっていると推察される。また、*AFGA3ox1*と*AFGAI1*および*AFGAI2*との発現パターンが類似していたことは興味深い。ダイコン(Nakayamaら、1995)、グンバイナズナ(Hazebroekら、1993; Metzgerら、1990)においては、低温遭遇中あるいは遭遇後に劇的にジベレリンの代謝が変化することが報告されている。さらに、Okaら(2001)は、トルコギキョウおよびシロイヌナズナにおいて春化後にジベレリン感受性が高まることを報告している。本実験における茎部における*AFGA3ox1*と*AFGAI1*および*AFGAI2*の発現が高まった結果は、花芽分化後のジベレリンの代謝と感受性の変化により急激な茎伸長が起こることを示唆している。

花球において*AFGA3ox1*、*AFGAI1*および*AFGAI2*の発現の高まった4の段階(15-40cm)は、小花の発達における花粉、胚珠形成期(スコア:)にあると推定される。Kobayashiら(1990)はイネの未熟な葯において

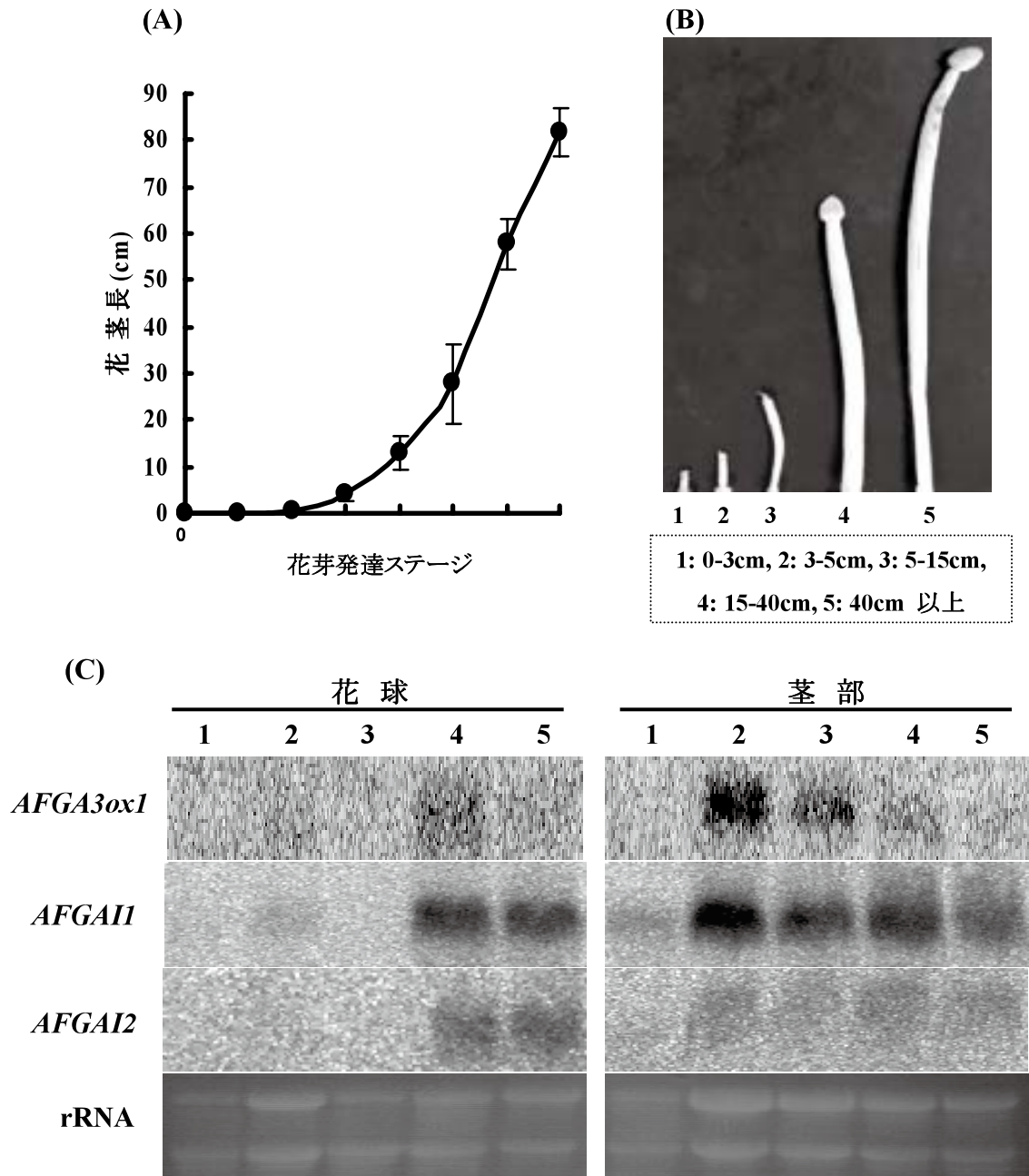


図 6-5-5 花芽発達における *AFGA3ox1*, *AFGA11*, *AFGA12* 遺伝子の発現解析

品種は‘長悦’を用いた

(A) 花芽発達ステージと花茎長との関係

(B) 花茎長別にサンプリングした

1: 0-3cm, 2: 3-5cm, 3: 5-15cm, 4: 15-40cm, 5: 40cm 以上

(C) 花球および茎部におけるノーザン解析

ジベレリンが蓄積していること報告しており、花粉形成においてGA3酸化酵素遺伝子が発現していることがItohら(2001)により明らかにされている。これらのことからネギにおいても葯の発達、花粉形成にジベレリンが関与している可能性が示唆される。

第6節 総合考察

(1) ネギの内生ジベレリンについて

本実験では、13位水酸化ジベレリンとしてGA₁、GA₃、GA₂₀が、13位非水酸化ジベレリンとしてGA₄、GA₉、GA₃₄が同定され、ネギにおいては早期13位水酸化経路と早期非水酸化経路の2つが機能していることが明らかとなった(図6-6-1)。また、GA₁₂以降のジベレリンの生合成に関わる候補遺伝子として、GA20酸化酵素(*AFGA20ox1*)、GA3酸化酵素(*AFGA3ox1*)、GA2酸化酵素(*AFGA2ox1*)をそれぞれクローニングした(図6-6-1)。ネギの葉鞘部において、前駆体ジベレリンではGA₂₀に比べてGA₉の含量が高く、活性型ジベレリンではGA₁+GA₃に比べGA₄の含量が高かったことから、地上部の伸長には早期非水酸化経路のGA₄が主に機能していると推察される。

ネギの地上部におけるGA₄含量は、葉身に比べて葉鞘で高く、*AFGA3ox1*の発現も同様に葉身に比べて葉鞘で高かった。一方、葉鞘のGA₄含量は品種間差が認められ、‘長悦’に比べ‘晚中太’および‘吉晴’で高かった。*AFGA3ox1*の発現は、葉鞘において品種間で差は見られなかったものの、根において違いが認められ、‘長悦’に比べ‘晚中太’および‘吉晴’では高い発現が認められた。本実験では根におけるジベレリン含量を測定していないが、*AFGA3ox1*の発現解析の結果から根で生成されたGA₄が葉鞘に移動しているために、‘晚中太’および‘吉晴’でGA₄含量が高まった可能性も考えられる。‘晚中太’と‘吉晴’との共通の特性は、分けつ性を有することである。ネギに外生ジベレリンを処理することで、分けつの発生が増加することが、村井ら(1981)、山崎ら(2006、2007)によって報告され、ネギの分けつの発生にジベレリンが関与している可能性が示唆されている。本実験の分けつ性を有する‘晚中太’と‘吉晴’でGA₄含量が高かったことは、分けつの発生機構にジベレリンが関与している可能性を示唆しており、今後、詳細な検討が必要であろう。

‘長悦’および‘吉晴’の芽生えを用いたジベレリンの投与実験において、両品種では伸長反応が異なった。この結果から、ネギにおいてジベレリンの反応性に品種間差があることが示唆される。ジベレリンと植物の生理

現象との関連について考える場合、活性型ジベレリン含量のみでなく、反応性についても考える必要がある。ジベレリンシグナル伝達に関する研究は、分子生物学の分野で近年急速に進み、モデル植物であるイネ、シロイヌナズナにおいてシグナル伝達のしくみが明らかにされつつある(芦刈・松岡、2004;池田ら、2003;Pengら、1998;Ueguchi-Tanakaら、2005)。コムギ*Rht1*、トウモロコシ*D8*、シロイヌナズナ*gai*は、ジベレリンの投与により成長を回復しない半矮性の突然変異体であり、DELLAタンパク質に欠陥を有するため、非感受性を示すと考えられている(Ikedaら、2001;Pengら、1998)。これらの突然変異体は、野生型に比べ20倍から100倍に活性型ジベレリン含量が高まっている(Appleford・Lenton、1991;Fujiokaら、1988)。これらの報告から、‘吉晴’はジベレリンに対する反応性が低いために、内生GA₄含量が高まっている可能性も推察される。しかし、上述の非感受性の変異体が矮性であるに対して、‘吉晴’の草型は矮性を示さないことから、‘吉晴’が非感受性変異体である可能性は低いと考えられる。ネギのジベレリンに対する感受性の違いについては、今後の検討が必要であろう。

(2) ネギの花成におけるジベレリンの影響

一般に、花成に伴う茎伸長には、ジベレリンが関与することが定説となっている(Chouard、1960;Pharis・King、1985)。また、低温要求性の長日植物の中には、花成非誘導条件下でジベレリンの投与により生殖生長への移行が起こるものが多くある(Pharisら、1985;Zeevaart、1983)。低温による花成誘導から花芽分化に至る過程において、ジベレリンを必要とする過程は花成誘起の段階である可能性が、カリフラワー(Wurrら、1981)、ストック(Hisamatsuら、1998)、ダイコン(Nishijimaら、1998a)で示唆されている。その一方で、ジベレリンを投与しても花成の誘起ができない事例、ジベレリン生合成阻害剤によって抽苔が抑制されても花成が抑制されない事例もある(Zeevaart、1983)。ネギは低温要求性を示すが短日植物である(八鍬・興水、1969)ことから、上述の長日植物の場合とは、花成に対するジベレリンの関与が異なることが予想される。以下、ネギの花成、抽苔におけるジベレリンの役割を3つに分けて考察する。

1) 花成非誘導条件下におけるジベレリンの花芽分化への影響

花成非誘導条件下、つまり、栄養生長期にGA3およびウニコナゾールPの処理を行っても、花芽分化が誘起さ

れなかった（第5節の第2項）。このことから、シロイヌナズナの花成モデル（Mouradovら、2002）で提唱されているようなジベレリン経路（Gibberellin Pathway）は、ネギにおいて存在しない可能性が示唆される。

2) 花成誘導条件下におけるジベレリンの花芽分化への関与

花成誘導条件下の初夏どり栽培（トンネル被覆条件下）におけるGA₃およびウニコナゾールPの処理により、両者とも抽苔率が高まったことから（第1節）、花成誘導条件下においては花芽分化の誘起への何らかの関与が疑われる。しかし、ジベレリンおよびジベレリン阻害剤、相反するものを処理したにも関わらず、両者で抽苔率が高まったことから、花成誘導条件下におけるジベレリンの花芽分化への関与は不明である。本研究では、両者の処理で抽苔率が高まった理由を説明できる十分な知見を得ることができなかったことから再度検討が必要である。

3) 花芽分化後の花茎伸長におけるジベレリンの関与

第1節において、GA₃区では抽苔が早まり、ウニコナ

ゾールP区では抽苔が遅くなったことから、花茎の伸長にはジベレリンが機能していると考えられる。このことは、第5節の第3項で行ったジベレリン関連の候補遺伝子の発現解析からも支持される。また、花芽発達の後期にあたる花粉・胚珠形成にGA₃酸化酵素遺伝子およびDELLAタンパク質遺伝子の発現が高まっていたことから、花芽発達の後期にもジベレリンが関与している可能性が示唆される。

以上のように、花茎伸長にはジベレリンが関与していることを明らかにしたが、花成誘導条件下におけるジベレリンの花芽分化への関与は明らかにできなかった。初夏どり栽培においてジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤ともに抽苔率が高まったことから、ダイコンで実験されているようなジベレリン阻害剤による抽苔制御（Nishijimaら、1998b）は、ネギにおいて実用化できないと考えられる。また、花芽分化後の花茎伸長の抑制をジベレリン生合成阻害剤処理によって、花茎が葉鞘の外部に現れることを数日間ほど遅らすことができる可能性もあるが、ジベレリン阻害剤処理によるネギの形態への影響が大きいことから実用的ではないと考えられる。

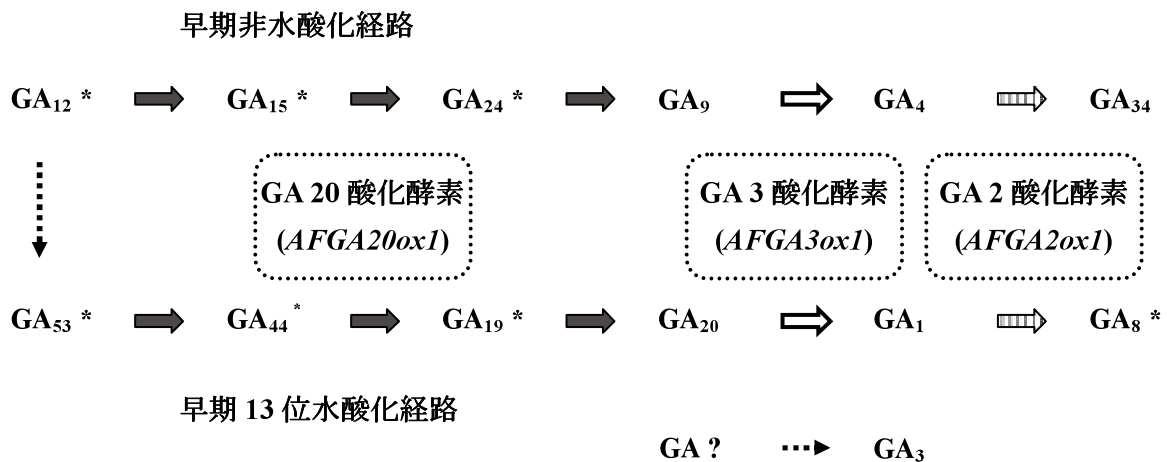


図 6-6-1 ネギにおける推定ジベレリン生合成経路

図中の* は本実験において同定されなかった推定ジベレリンを表す

図中の黒矢印:GA 20 位酸化酵素, 白矢印:GA 3 酸化酵素,

縞矢印:GA 2 酸化酵素, それぞれの生成に関与することを表す