

光発芽種子におけるアブシジン酸の機能に関する研究

(Studies on function of abscisic acid in photoblastic seed)

澤田 義昭

平成 17 年度入学

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

生物機能開発学連合講座

略号表

AAO	アブシジンアルデヒド酸化酵素
ABA	アブシジン酸
ABA 8ox	ABA 8'-水酸化酵素
CPS	<i>ent</i> -コパリル 2 リン酸合成酵素
CCD	カロテノイド酸化開裂酵素
d ₆ -ABA	(±)-2- <i>cis</i> , 4- <i>trans</i> - d ₆ -ABA
DPA	ジヒドロファゼイン酸
FR	遠赤色光
GA	ジベレリン
GA2ox	GA 2-酸化酵素
GA3ox	GA 3-酸化酵素
GA20ox	GA 20-酸化酵素
GGDP	ゲラニルゲラニル 2 リン酸
KAO	<i>ent</i> -カウレン酸酸化酵素
KO	<i>ent</i> -カウレン酸化酵素
KS	<i>ent</i> -カウレン合成酵素
LC-MS/MS	液相クロマトグラフィー/タンデム質量分析計
NCED	9- <i>cis</i> -エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ
NSY	ネオキサントニン合成酵素
PA	ファゼイン酸
Pfr	FR 吸収型フィトクロム
Pr	R 吸収型フィトクロム
QRT-PCR	リアルタイム定量 RT-PCR
R	赤色光
SDR	キサントキシン脱水素酵素
ZEP	ゼアキサントニンエポキシダーゼ

目次

序論	1
第1章	
光発芽レタス種子のアブシジン酸代謝酵素遺伝子の機能解析	9
第2章	
レタス種子におけるアブシジン酸代謝酵素遺伝子の発現の光とジベレリンによる制御	20
第3章	
レタス種子におけるアブシジン酸の内生量およびアブシジン酸代謝酵素遺伝子の発現の部位別の解析	36
第4章	
アブシジン酸処理がレタス種子のジベレリン代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響	42
第5章	
総括	53
引用文献	58
謝辞	

序論

光は植物において形態形成や光合成のエネルギー源として重要な環境因子の一つである。いくつかの高等植物の種子では、発芽において吸水だけでなく光を要求するものがあり、このような種子は光発芽種子と呼ばれる。光発芽種子は、吸水後、暗黒下では発芽しないが、短時間の赤色光 (R; およそ 540~690 nm) により発芽が誘導され、その直後の遠赤色光 (FR; 695~780 nm) は R の効果を打ち消し、発芽が抑制される。この2種の光の効果は可逆的で、最後に処理した光の波長により発芽するかしらないかが決まる。このような光可逆的な発芽は光発芽と呼ばれ、この現象はレタス (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) 種子を用いた実験から発見されている (Borthwick et al., 1952)。種子が光発芽性を示す植物種には、レタスのほかにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.)、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) などが知られており、これらの種子は穀類などのような光発芽性を示さない他の植物種の種子と比べて非常に小さく貯蔵物質が少ないという特徴がある。発芽を誘導する R は光合成を行なううえで重要な波長域の光であり、一方、FR は他の植物葉の透過光の主成分であり、FR の多い環境は生育に不利な環境であるため、このような光発芽は貯蔵物質の少ない植物における重要な生存戦略の一つと考えられている。このレタス種子の光発芽という現象の発見を引き金にして、カブ (*Brassica rapa* L.) の黄化子葉とトウモロコシ (*Zea mays* L.) の黄化芽生えから R と FR の受容体タンパク質であるフィトクロムが発見された (Butler et al., 1959)。フィトクロムはフィトクロモビリンという発色団とアポタンパク質 (120 kDa) からなる色素タンパク質であり、細胞中ではダイマーを形成すると考えられている。その発色団の一部の構造の光吸収による可逆的シス-トランス異性化を介して (Hanzawa et al., 2001)、FR 吸収型のフィトクロム (Pfr) と R 吸収型 (Pr) とは可逆的に転換することが知られており、このことが前述のような光可逆的制御の起点となる。R 処理により活性化された Pfr 型フィトクロムは、核内に移行し転写因子として関

連の遺伝子の発現を制御すると考えられている (Martinez-Garcia et al., 2000)。

レタス種子の光発芽の機構を明らかにするために、半世紀以上にわたって、生化学的、形態学的、生理学的、分子生物学的などの側面から膨大な研究が行われてきている。その中の一例として、Rにより発芽を誘導した場合、貯蔵タンパク質の分解により (Takeba and Matsubara, 1977)、胚軸において growth potential (発芽を 50%抑制するマンニトール濃度で評価) が増加すること (Takeba and Matsubara, 1979) さらに、その増加は、グルタミンとグルタミン酸内生量が胚軸で蓄積すること (Takeba, 1980a ; Takeba, 1980b) に起因し、それを介した細胞伸長により胚軸が果皮を破って発芽するというモデルが示されている。さらに、顕微鏡上でスリットを用いた部位別光照射実験により、発芽を誘導する R は吸水レタス種子の胚軸で受光されることも示唆されている (Inoue and Nagashima, 1991)。これらを含めた膨大な研究の中でも、光発芽における植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) やジベレリン (GA) の関与は、発芽制御機構において特に重要な知見であり、レタス種子では 1960 年代から研究されてきている。GA は種子発芽、茎部伸長、葉の伸展、花成など高等植物の生活環を通して重要な生理現象を制御するジテルペン型植物ホルモンであり (Hedden and Thomas, 2006)、ABA は気孔の開鎖誘導を含めた乾燥耐性、種子成熟、種子休眠などに関与するセスキテルペン型植物ホルモンである (Leung and Marion-Poll, 2006)。レタス種子においては、活性型 GA (GA_3 あるいは GA_1 : 図 0-1) を処理すると暗黒下でも発芽が誘導される (Kahn and Goss, 1957 ; Ikuma and Thimann, 1960 ; Toyomasu et al., 1993)、GA 処理は R 処理を代替することが示されている。さらにレタス種子では、 GA_1 の前駆体である GA_{20} と GA_{19} の内生量は光処理によりほとんど影響を受けなかったが、 GA_1 内生量はフィトクロムにより正に制御される可能性が示されている (Toyomasu et al., 1993)。一方、ABA (図 0-1) は、それを処理することにより R 処理や GA 処理によって誘導される発芽が抑制されることが示されており (Kahn, 1968; Sankhla and Sankhla, 1968)、さらに、R 処理や GA 処理によって発芽を誘導したときに ABA 内生量は著しく減少することも報告されている (Toyomasu et al.,

1994)。これらの結果は、発芽制御には2つの植物ホルモンの内生量調節が重要であることを示しており、それは両ホルモンの生合成と不活性化、即ち代謝に関与する酵素遺伝子の制御を介して行われると考えられた。

GAはゲラニルゲラニル2リン酸(GGDP)より生合成されるが、活性型GAの生合成酵素としては、生合成初期の段階に関与する色素体内のジテルペン環化酵素である*ent*-コパリル2リン酸合成酵素(CPS)と*ent*-カウレン合成酵素(KS)、生合成中期の段階に関与する小胞体膜結合型シトクロムP450酸化酵素である*ent*-カウレン酸化酵素(KO)と*ent*-カウレン酸化酵素(KAO)、生合成後期の段階に関与する可溶性2-オキソグルタル酸依存性酸化酵素であるGA20-酸化酵素(GA20ox)とGA3-酸化酵素(GA3ox)が知られており(図0-2)、GA3oxにより3位の炭素が水酸化されることで、最終的に活性型GAが生成すると考えられている(Hedden and Thomas, 2006)。GA不活性化については、配糖体化やP450酸化酵素によるエポキシ化など複数の経路が知られているが、その中でも2位の炭素の水酸化が生理現象制御のためには重要と考えられており、その段階を触媒するのが2-オキソグルタル酸依存性酸化酵素に属するGA2-酸化酵素(GA2ox)である(図0-2)(Hedden and Thomas, 2006)。一方、ABAは高等植物では炭素数40個のカロテノイドから生合成されると考えられており、その生合成酵素としては、色素体内のゼアキサントキシンエポキシゲナーゼ(ZEP)、ネオキサントキシン合成酵素(NSY)、9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ(NCED)、さらに細胞質中のキサントキシン脱水素酵素(SDR)、アブシジンアルデヒド酸化酵素(AAO)が知られており(図0-3)、特に、カロテノイド基質を酸化的に開裂するNCEDがABA内生量調節の律速酵素と考えられている(Leung and Marion-Poll, 2006)。ABAの不活性化は、水酸化による経路と配糖体化による経路が知られているが、P450酸化酵素による8'位の炭素の水酸化が主要と考えられておりその段階を触媒するのがABA8'-水酸化酵素(ABA8ox)である(図0-3)(Leung and Marion-Poll, 2006)。8'位が水酸化されたABAは、非酵素的にファゼイン酸(PA)に異性化された後、ジヒドロファゼイン酸(DPA)または

epi-DPA に還元される (Leung and Marion-Poll, 2006)。このような GA や ABA 代謝酵素をコードする cDNAs はモデル植物であるシロイヌナズナやイネを含めたいくつかの植物種からクローニングされている (Hedden and Thomas, 2006 ; Leung and Marion-Poll, 2006)。

レタス種子では、GA 生合成後期段階に関与する *GA20ox* 遺伝子 (*LsGA20ox1* と *LsGA20ox2*) と *GA3ox* 遺伝子 (*LsGA3ox1* と *LsGA3ox2*)、さらに GA 不活性化に関与する *GA2ox* 遺伝子 (*LsGA2ox1* と *LsGA2ox2*) の発現解析により、フィトクロムにより *LsGA3ox1* の発現量が正に、*LsGA2ox2* の発現量が負に制御されることが GA_1 内生量増加に関与すると考えられている (Toyomasu et al., 1998 ; Nakaminami et al., 2003)。ところが、本研究を着手した時点では、レタス種子における ABA 代謝酵素遺伝子の発現調節については報告が無かった。シロイヌナズナの ABA 欠損突然変異体の種子は、GA 生合成阻害剤存在下 ($10^{-5}M$ ウニコナゾール P) でも 50 %程度発芽し (Nambara et al., 1992)、また、トウモロコシの ABA 欠損変異体 *vp14* は穂発芽することなども知られており (Schwartz et al., 1997)、ABA 内生量減少は発芽誘導において重要な生理的プロセスであると考えられている。このように、ABA は GA とともに発芽制御において重要な役割を演じていると考えられるので、光発芽レタス種子においてもその内生量調節のメカニズムや機能を解明することは重要な知見を与えるものと期待された。そこで本博士論文研究では、光発芽制御における ABA の機能を追究するために ABA 代謝酵素である *NCED* と *ABA8ox* に着目し、以下の実験を行った。まず、第 1 章では、レタス種子からクローニングされていた *NCED* と *ABA8ox* ホモログ (澤田, 2003 ; 青木, 2006) について、それらの翻訳産物の機能を実証した。第 2 章では、ABA 内生量の調節機構を調べるために、異なる光条件下で培養したレタス種子における ABA とその代謝物の内生量を定量し、さらにそのときの *LsNCED* と *LsABA8ox* の発現解析を通して、ABA 代謝酵素遺伝子発現のフィトクロムによる制御の可能性を検討した。また、吸水レタス種子における ABA 内生量は GA_1 処理で発芽を誘導したときにも減少すること (Toyomasu et al., 1994) から、上記遺伝子の発現の GA_1 による制御についても追究した。第 3 章では、レタス種子

での ABA 内生量減少部位を検討するために、子葉部と胚軸部に分けた試料を用いて ABA 内生量の定量と *LsNCED* と *LsABA8ox* の発現解析を行い、GA 蓄積部位および受光部位 (Inoue and Nagashima, 1991) と比較した。第 4 章では、ABA 処理によって R 処理により誘導される発芽が抑制されることも知られている (Kahn, 1968; Sankhla and Sankhla, 1968) ので、ABA による GA 内生量への影響を調べるために、ABA 処理した種子をもちいて GA 代謝酵素遺伝子の発現解析を行った。最後に第 5 章では、本研究結果について、レタス種子と同じく光発芽種子として知られるシロイヌナズナ種子での知見との比較も含めて総合考察した。

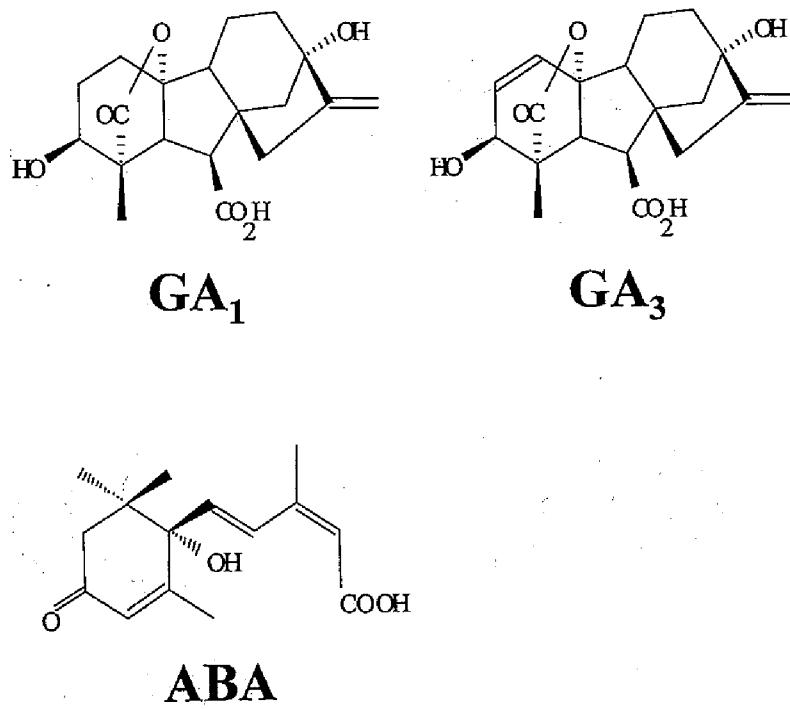


図0-1 活性型GAとABAの構造式

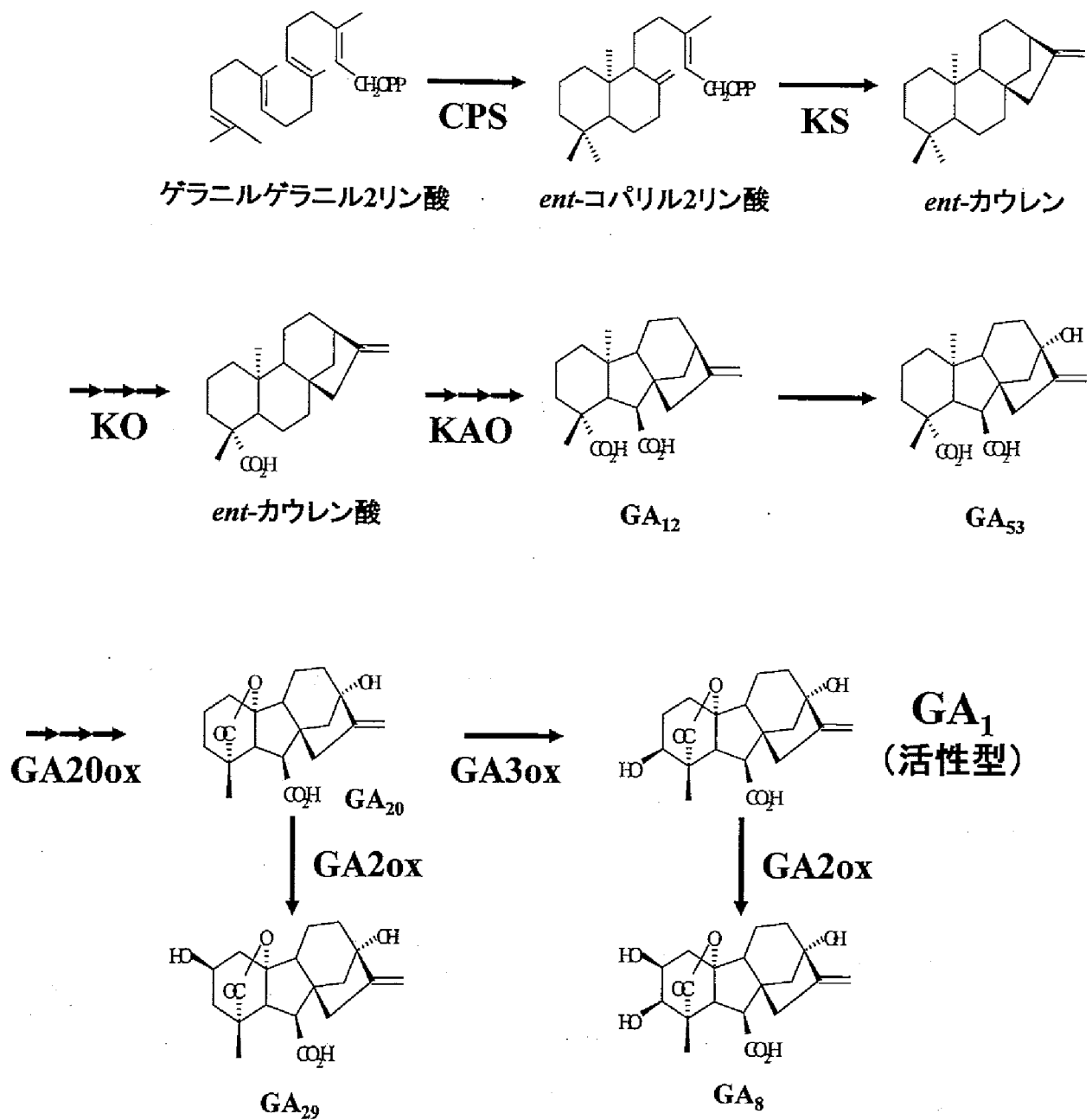


図0-2 高等植物における主要なGA₁代謝経路と代謝酵素

酵素の略称は、CPS、*ent*-コパリル2リン酸合成酵素；KS、*ent*-カウレン合成酵素；KO、*ent*-カウレン酸化酵素；KAO、*ent*-カウレン酸酸化酵素；GA20ox、GA 20-酸化酵素；GA3ox、GA 3-酸化酵素；GA2ox、GA 2-酸化酵素である。

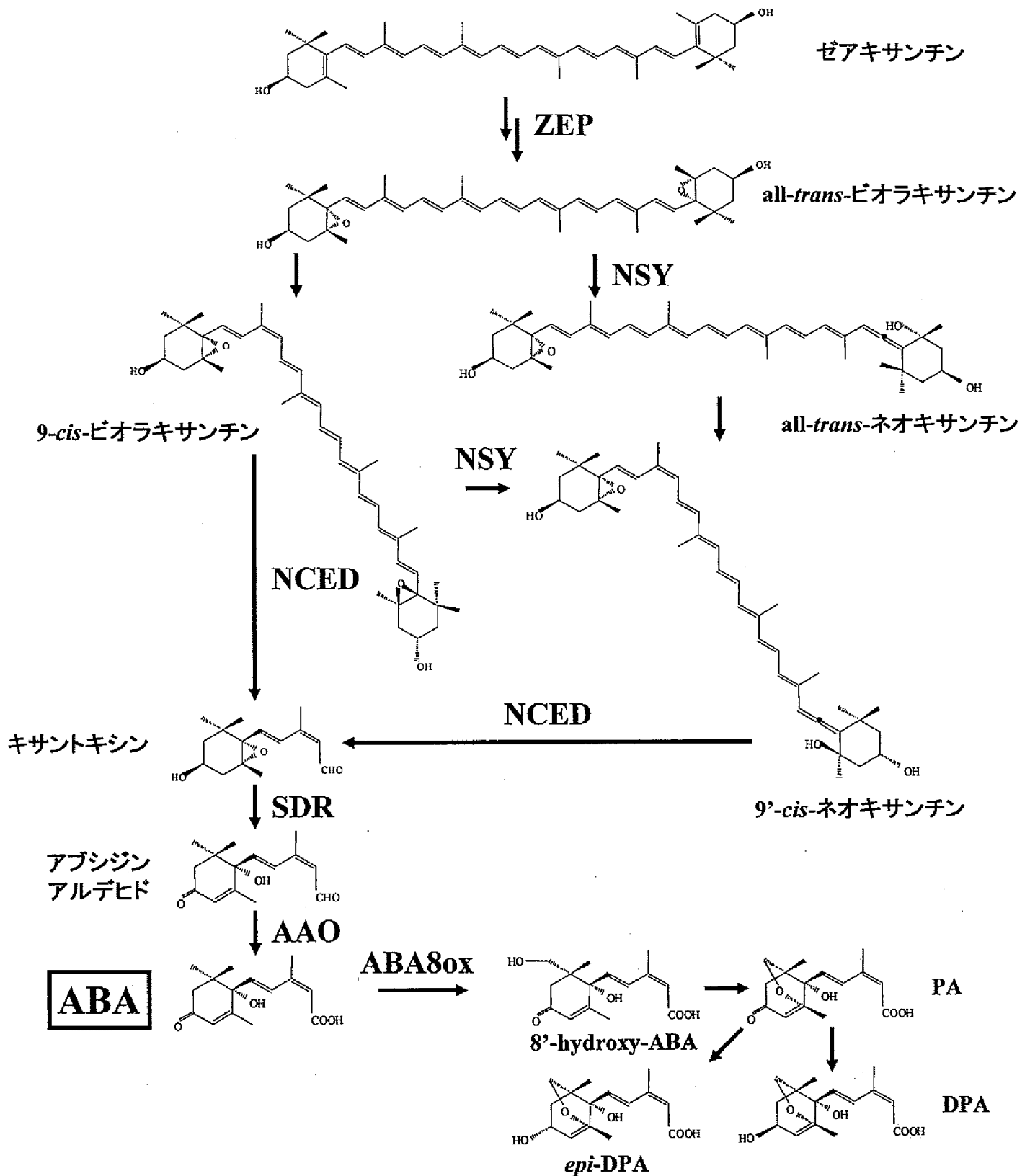


図0-3 高等植物における主要なABA代謝経路と代謝酵素

酵素の略称は、ZEP、ゼアキサンチンエポキシダーゼ；NSY、ネオキサンチン合成酵素；NCED、9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ；SDR、キサントキシン脱水素酵素；AAO、アブシジンアルデヒド酸化酵素；ABA8ox、ABA 8'-水酸化酵素である。

第1章

光発芽レタス種子のアブシジン酸代謝酵素遺伝子の機能解析

緒言

レタスからは、ABA 生合成酵素遺伝子である *NCED* と ABA 不活性化酵素遺伝子である *ABA8ox* のホモログがそれぞれ4種ずつ cDNA クローニングされ(澤田, 2003; 青木, 2006)、*LsNCEDI~4* と *LsABA8ox1~4* と名付けられていた。しかしながら、これらのホモログは、他植物のそれぞれの当該酵素と一次構造の相同性が高いものの(図 1-1)、それぞれの翻訳産物の触媒能は調べられていなかった。そこで、これらの遺伝子が目的酵素をコードしているかを実証することを本章の目的とした。*NCED* については、当該遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナにおける ABA 蓄積量を指標に機能を検討した。*ABA8ox* については、植物由来の NADPH 還元酵素と共発現させた酵母より調製したマイクロソーム画分中の組換えタンパク質を用いて ABA を基質とした変換実験を行った。

結果と考察

NCED は、カロテノイド酸化開裂酵素 (CCD) ファミリーに属するが、レタスからは ABA 生合成に関与する *NCED* と相同性が高い cDNA が4種 (*LsNCEDI~4*)、それ以外の機能未知な *CCD* ホモログが2種 (*LsCCD1*, 2) クローニングされていた(澤田, 2003)。このうち、4種の *LsNCED* が ABA 生合成に関与し、2種の *LsCCD* は関与していないことを実証するために、それぞれの遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナの *AtNCED3* 欠損突然変異体である T5004 (Iuchi et al., 2001) における内生 ABA 蓄積量を調べた。組換え体は、各遺伝子の完全長 cDNA を Gateway システムを利用し、カリフラワーモザイクウイルス 35S promoter 下で強制発現させる pGWB2 vector に組み込み、アグロバクテリウムを介して T5004 に導入することで調製した。得られたそれぞれの T₃ 種子3ラインずつについて、白色光下で24時間吸水

させたものを試料として、内部標準を用いた LC-MS/MS 法により ABA 内生量を定量した。定量結果は図 1-2 に示した。*LsNCED1~4* をそれぞれ過剰発現させた 3 ラインでは T5004 に比べ、有意に ABA 内生量が多く蓄積していた。一方、*LsCCD1* あるいは *LsCCD2* を過剰発現させた 3 ラインでは、ともに ABA 内生量が T5004 と同程度であり、有意な差はみられなかった。これらの結果から、4 種の *LsNCED* は ABA 生合成に関与する NCED をコードすること、*LsCCD1, 2* は ABA 生合成に関与しないことが示唆された。

ABA8ox は ER 膜上で機能する P450 酸化酵素ファミリーの一種であるため、シロイヌナズナ由来の NADPH 還元酵素遺伝子が組み込まれている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, WAT11 株) (Pompon et al., 1996) を宿主として各目的遺伝子より組換え酵素を発現させ、その酵母よりマイクロソーム画分を調製した。P450 酸化酵素活性発現には、ER 膜上で NADPH 還元酵素と会合させる必要があるため、上記酵母を宿主とした。このマイクロソーム画分を用いて、ABA を基質として変換実験を行い、生成物は液相クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) により同定した。ABA8ox は ABA の 8'位の水酸化を触媒し、それによって生成する 8'-hydroxy-ABA は非酵素的に PA に異性化することが示されている (Gillard et al., 1976 ; Krochko et al., 1998) ので、ここでは PA を最終産物として検出した。LC-MS/MS 分析の結果を表 1-1 に示す。4 種すべてのクローンについて、PA 標品の保持時間とマススペクトルが一致した産物が検出され、このことから *LsABA8ox1~4* は全て ABA8ox をコードしていることが示された。

材料と方法

(1) *LsNCED*、*LsCCD* 過剰発現体の調製

完全長 cDNA を得るために、レタス種子より調製した cDNA を鋳型として、表 1-2 に示したプライマーを用いて RT-PCR を以下のように行なった。反応液容量は 25 μ l、酵素は Expand plus (1.25 units ; ロッシュダイアグノティクス) を用いた。94 $^{\circ}$ C、2 分間の熱変性後、

94 °C、30 秒間の熱変性、50 °C、30 秒間のアニーリング、72 °C、3 分間の伸長反応を 40 サイクル行い、72 °C、7 分間の伸長反応を行い、反応を終了した。PCR 産物は、クローニングベクターである pGEM T Easy vector (プロメガ) を用いてサブクローニング後、プライマー配列に付加した制限酵素 (完全長 cDNA の 5'側に *KpnI*、3'側に *XhoI*) を利用してインサートを切り出し、Gateway エントリーベクターである pENTR1A (インビトロジェン) に組み込んだ。さらに、目的 cDNA は、35S プロモーター下で目的遺伝子を強制発現させるDESTINY ベクター、pGWB2 (島根大学、中川准教授より供与) に LR クロナーゼ (インビトロジェン) を用いて組み替えた。得られたプラスミドは以下のようにエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) に導入した。エレクトロポレーション (GENE PULSER 2 ; バイオラッド) は、1 mm のキューベットを使用して、プラスミド 50 ng をコンピテントセルに混ぜて、2.5 KV、250 Ω、25 μF の条件で行った。そこに LB 培地 (1 % トリプトン、0.5 % 酵母エキス、1 % NaCl) を加えて、30°C で 1 時間振とう培養した。その後、LB/カナマイシン、ハイグロマイシン (25 μg/ml) 寒天培地にまき、30 °C で 2 日間培養した。

アグロバクテリウムの感染は以下のように、花序浸し法 (Clough and Bent, 1998) により行った。形質転換したアグロバクテリウム培養液をディッピング培地 (1/2 MS、5 % スクロース、0.03 % Silwet L-77) に懸濁し、突然変異体 T5004 (Iuchi et al., 2001) の花序を浸して感染させた。チャックの付いたビニール袋に入れ、植物を順化させ、22 °C 連続白色光下で生育させて T₁ 種子を得た。T₁ 種子をカナマイシン、ハイグロマイシン (25 μg/ml) とクロラムフェニコール (100 μg/ml) を含んだ 1/2 MS 寒天培地にまいて組換え体を選抜し、それをポットに移植して 22 °C 連続白色光下で生育させ、T₂ 種子を取得した。同様の方法により次世代の T₃ 種子を得た。

(2) 吸水 T₃ 種子の内生 ABA 定量分析

ろ紙 (No. 3 ; ワットマン) を三重に敷き 2 ml の蒸留水を加えた組織培養用ディッシュ (60 mm 径 ; 岩城硝子) に、10 mg の組換え T₃ 種子あるいは T5004 種子をまき、22° C 連続白光下で 24 時間培養した後、サンプリングした。ABA の抽出は、Saika et al., (2007) の方法をもとに以下のように行った。凍結試料は、ジルコニアビーズ (YTZ ボール、2 mm 径 ; ニッカトー) を入れた 1 ml の 80 %メタノール水溶液 (v/v) 中で、ティッシュライザー (キアゲン) により破碎した。4° C で 16 時間静置することにより抽出した。内部標準として、(±)-2-*cis*, 4-*trans*- d₆-ABA (d₆-ABA ; Icon Services) を 0.2 ng 加えた後、遠心分離 (15,000 g、10 分、25 °C) により上清を回収した。上清を減圧遠心により濃縮乾固した後、1 ml の 99 %イソプロパノール:1 %酢酸 (v/v) を加え、超音波とボルテックスにより懸濁した。懸濁液を遠心 (2,000 g、5 分、25 °C) して上清を回収し、上清は減圧遠心により濃縮乾固した。沈殿を 50 µl のメタノールに懸濁した後、450 µl の 1 %酢酸水溶液 (v/v) を加え、サンプル内の油分を除去するために 1 ml のヘキサンを用いて溶媒分画を行い、中間層と水層を回収した。水画分を、減圧遠心により濃縮乾固した後、沈殿を 100 µl の 99 %メタノール:1 %酢酸 (v/v) に溶かし、さらに 900 µl の 1 %酢酸水溶液 (v/v) を加えた。1 ml のアセトニトリル、1 ml のメタノール、1 ml の 1 %酢酸水溶液 (v/v) によりコンディショニングした Oasis HLB 1-mL solid-phase extraction cartridges (ウォータース) に抽出溶液を通し、1 ml の 1 %酢酸水溶液 (v/v) による洗浄を 3 回行った後、1 ml の 50 %アセトニトリル:49 % 蒸留水:1 % 酢酸 (v/v) により ABA 画分を溶出した。この画分を減圧遠心により濃縮乾固した後、沈殿を蒸留水に溶解して、LC-MS/MS 分析に供した。

(3) *LsABA8ox* 組換えタンパク質の発現とマイクロソーム画分の調製

レタス種子より調製したcDNAを鋳型として、各遺伝子のコード領域を表1-3に示したプライマーを用いて前述と同じ方法でRT-PCRを行った。pGEM T Easy vectorを用いてサブクローニングした後、プライマー配列に付加した制限酵素サイト (コード領域cDNAの5'側に*Bgl*II、

3'側に*KpnI*、ただし*LSABA8ox3*のみ3'側に*EcoRI*を利用して切り出し、酵母用発現ベクターpYeD60 (Pompon *et al.*, 1996) に組み込んだ。精製したプラスミドを*Saccharomyces cerevisiae* WAT11株 (Pompon *et al.*, 1996) に導入した。組換え酵母をSGI 培地 (20 g/l グルコース、1 g/l bactocasamino acids、40 mg/l トリプトファン) にて24時間から36時間培養後、培養液の一部をSLI培地 (20 g/l ガラクトース、1 g/l bactocasamino acids、40 mg/l トリプトファン) に移植し、ガラクトース (終濃度2%) 添加で組換えタンパク質の発現を誘導した。12時間後、集菌した菌体を0.1 Mリン酸カリウムバッファー (pH 7.6) に再懸濁し、フレンチプレス (20000 psi, FRENCH PRESSURE CELL PRESS; Thermo IEC) で破碎し、超遠心分離 (100,000 g、4°C、1時間) により得られたマイクロソーム画分を0.1 Mリン酸カリウムバッファー (pH 7.6) に懸濁した。

(4) 変換実験

マイクロソーム画分を用いた ABA の変換実験は、Kushiro *et al.* (2004) と同様の方法で以下のように行った。上記マイクロソーム画分懸濁液 100 μ l を用いて、以下の組成の反応液を調製した：38 μ M (+) -S-ABA、0.5 mM NADPH、0.5% (w/v) Triton X-100、1 mM (\pm) -ジチオトレイトール。22°C で16時間反応させた後、1 N HCl により pH 2 に調整し反応を停止した。酢酸エチル抽出を行った後、酢酸エチル層を減圧遠心により濃縮乾固した後、沈殿を蒸留水に溶解して LC-MS/MS 分析に供した。

(5) LC-MS/MS 分析

ABA と PA の検出は、LC (ACQUITY UPLC system; ウォータース) -MS/MS (Q-Tof premier; マイクロマス) を使用した。LC 部の条件は、使用カラムに ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m; ウォータース) を用い、移動相 (流速は 0.2 ml/分) に2種の溶媒を用いたグラジエント法を使用した。溶液 A は蒸留水、溶液 B は 0.05% 酢酸 (v/v) ア

セトニトリルとし、25分かけて (A 97 % ; B 3 %) から (A 80 % ; B 20 %) へ、30分かけて (A 80 % ; B 20 %) から (A 2 % ; B 98 %) にした。この条件での保持時間は、PA が 14.9 分、ABA と d₆-ABA が 23.0 分であった。MS/MS 部の条件は、以下に示した: Capillary (kV) = 2.6, Source temperature (°C) = 80, Desolvation temperature (°C) = 400, Cone gas flow (l/hour) = 0, Desolvation gas flow (l/hour) = 500, Collision energy = 8.0 (ABA、d₆-ABA) 、12.0 (PA) 、MS/MS transition (m/z) : 263/153 (ABA) 、269/159 (d₆-ABA) 、279/139 (PA) 。ABA 内生量の定量は、m/z 153 (ABA) 、m/z 159 (d₆-ABA) 、m/z 139 (PA) の強度を用いて、解析ソフト MassLynx v. 4.1 (マイクロマス) により行った。定量分析は、T5004 種子で 6 反復、各過剰発現体ラインで 3 反復行い、分散分析は Tukey's HSD 法により行った。

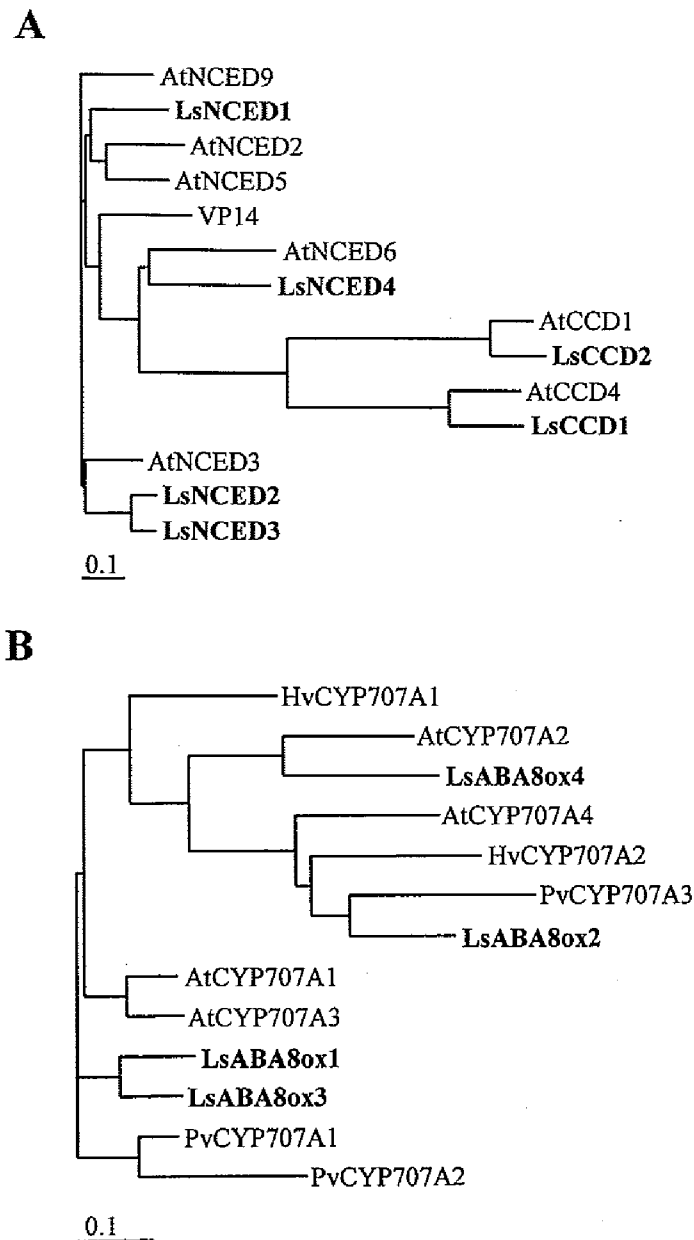


図1-1 NCEDとABA8oxの推定アミノ酸配列に基づいた系統樹

A. レタスNCEDと他の植物種のNCEDとを比較した系統樹、系統樹の作製はClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)を用いた。アクセス番号は、AtCCD1, NM116217; AtNCED2, NM117945; AtNCED3, NM112304; AtCCD4, NM118036; AtNCED5, NM102749; AtNCED6, NM113327; AtNCED9, NM106486 (*Arabidopsis thaliana*), VP14, U95953 (*Zea mays*), LsCCD1, AB120111; LsCCD2, AB120112; LsNCED1, AB120107; LsNCED2, AB120108; LsNCED3, AB120109; LsNCED4, AB120110 (*Lactuca sativa*)である。

B. レタスABA8oxと他の植物種のABA8oxとを比較した系統樹、アクセス番号は、AtCYP707A1, NM118643; AtCYP707A2, NM128466; AtCYP707A3, NM180805; AtCYP707A4, NM112814 (*Arabidopsis thaliana*), HvCYP707A1, DQ145932; HvCYP707A2, DQ145933 (*Hordeum vulgare*), PvCYP707A1, DQ352541; PvCYP707A2, DQ352542; PvCYP707A3, DQ352543 (*Phaseolus vulgaris*), LsABA8ox1, AB235917; LsABA8ox2, AB235918; LsABA8ox3, AB235919; LsABA8ox4, AB235920 (*Lactuca sativa*)である。

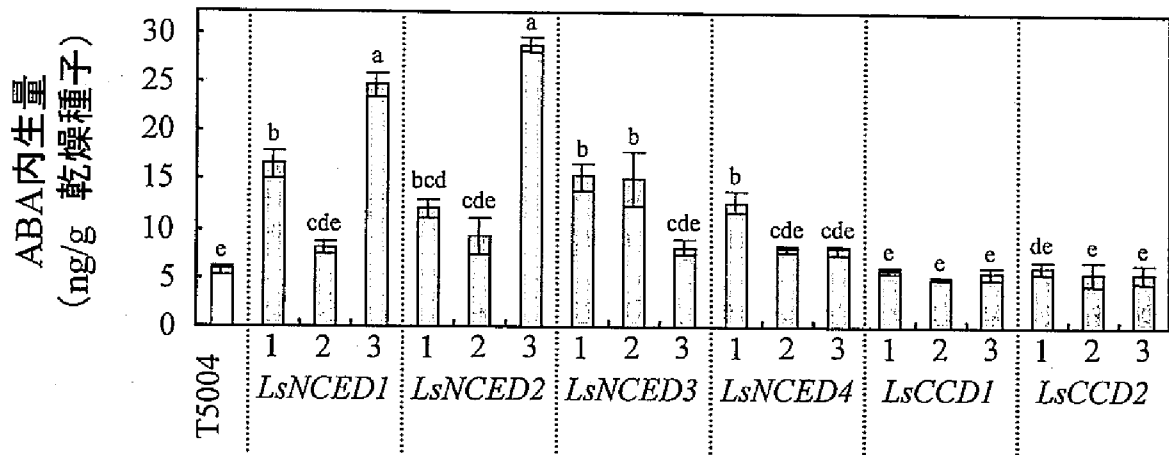


図1-2 吸水させたT5004と組換え体種子(T₃)のABA内生量分析

白色光下、吸水開始後24時間の種子を用いて、LC-MS/MSによりABA内生量を定量した。縦軸はABA内生量を、横軸はそれぞれの組換え体のラインを示している。T5004については、独立した6反復、組換え体の各ラインについては独立した3反復でABAを定量し、平均値と標準誤差を示した。分散分析はTukey's HSD法を用いた(P<0.05)。

表 1-1 組換え LsABA8ox を含む酵母マイクロソーム画分を用いた変換実験の産物の LC-MS/MS 分析結果

クローン名	同定した代謝物	LC の保	
		持 時 間 (分)	特徴的なイオンピークとその相対比 (最大のものを 100%とした)
LsABA8ox1	ファゼイン酸	14.6	279 (M ⁺ , 12), 235 (6), 205 (46), 187 (20), 168 (29), 139 (100)
LsABA8ox2	ファゼイン酸	14.6	279 (M ⁺ , 12), 235 (6), 205 (46), 187 (20), 168 (29), 139 (100)
LsABA8ox3	ファゼイン酸	14.6	279 (M ⁺ , 12), 235 (6), 205 (46), 187 (20), 168 (29), 139 (100)
LsABA8ox4	ファゼイン酸	14.6	279 (M ⁺ , 12), 235 (6), 205 (46), 187 (20), 168 (29), 139 (100)
	ファゼイン酸 (標品)	14.6	279 (M ⁺ , 12), 235 (6), 205 (46), 187 (20), 168 (29), 139 (100)

表 1-2 *LsNCED* と *LsCCD* の完全長 cDNA 増幅に用いたプライマー

下線と二重下線はそれぞれ *Kpn*I と *Xho*I サイトを示している。

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>LsNCED1</i>	<u>GGTACCACCTCCAGCCCTTCA</u> TCCT	<u>CTCGAGGAAAAGCACATTCATGTTTCTTCA</u>
<i>LsNCED2</i>	<u>GGTACCCGACATTA</u> AAATAGCTTCAATCAC	<u>CTCGAGAGATGAAATTTACATAGTTATATA</u>
<i>LsNCED3</i>	<u>GGTACCTCCACCAACTTTCAA</u> ATTGCTTAC	<u>CTCGAGACTTAATACAACATAAAGTATATT</u>
<i>LsNCED4</i>	<u>GGTACCCACCATTAAAGCTATCACGT</u>	<u>CTCGAGATTGAATTAAGCTTAATTAGCCAA</u>
<i>LsCCD1</i>	<u>GGTACCCAGACCACACAATGGATTCTC</u>	<u>CTCGAGACTTAAAACTGATGTTTCACTTAT</u>
<i>LsCCD2</i>	<u>GGTACCCACAGATGGGCACCATGGAG</u>	<u>CTCGAGAATTGATAACACCATTGTATTAAT</u>

表 1-3 *LsABA8ox* の完全長 cDNA 増幅に用いたプライマー

下線は制限酵素サイトを示している。

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>LsABA8ox1</i>	<u>AGATCT</u> ATGGAATTCATTACCATTACCATGT	<u>GGTACCTCACTT</u> GAGAGAGAGTTTAATGGGT
<i>LsABA8ox2</i>	<u>AGATCT</u> ATGGAGGAGAGAGAAGGAATAATCA	<u>GGTACCCTAAGTATCATAACAAGCACCACAT</u>
<i>LsABA8ox3</i>	<u>AGATCT</u> ATGGAACTCATTACCTTCGTCTTCT	<u>GAATTCTCAICTT</u> IACAGTTGTTTCTTGGGA
<i>LsABA8ox4</i>	<u>AGATCT</u> ATGCTTCCTTCACCCACCTCAATCG	<u>GGTACCCTAGATGTTGTTGATGGCATGGACT</u>

第2章

レタス種子におけるアブシジン酸代謝酵素遺伝子の発現の光とジベレリンによる制御

緒言

レタス種子の発芽は赤色光処理や GA 処理により誘導されるが、両処理の発芽誘導効果は ABA 処理によって抑制されることが知られている (Kahn, 1968; Sankhla and Sankhla, 1968)。レタス種子においては、R/FR 処理種子を対照区、R 処理種子を発芽条件として経時的に ABA 内生量が定量され、R 処理種子で ABA 内生量が劇的に減少することが示されている (Toyomasu et al., 1994)。本章では、ABA 内生量の調節機構を調べるために、FR 処理種子を対照区、FR/R 処理、FR/R/FR 処理種子を用いて、ABA 代謝酵素遺伝子である *LsNCED1~4* と *LsABA8ox1~4* の転写物の蓄積をリアルタイム定量 RT-PCR (QRT-PCR) により正確に定量した。あわせて同光条件で調製した種子を用いて、ABA 内生量を再度定量し、さらにその代謝物の内生量も定量した。なお、ABA の減少機構は種子内での代謝調節によってだけでなく種子外への排出による可能性も考えられたため、培地中におけるそれら化合物の量も定量した。また、レタス種子では、外生 GA₁ 処理により発芽を誘導したときにも、ABA 内生量が減少することが報告されている (Toyomasu et al., 1994)。そこで、上記遺伝子の発現に対する GA₁ 処理の影響を調べた。さらに、FR/R 処理後に GA₁ 内生量が増加することから、それら遺伝子発現のフィトクロムによる制御が GA を介するか、あるいは介さないかを検討するために、阻害剤により GA 生合成を抑制した種子を用いた発現解析も行った。

結果と考察

レタス種子におけるアブシジン酸およびその代謝物の内生量に対する光の影響

本実験においては、3種の光処理を施した：FR 処理、発芽を誘導する FR/R 処理、フィト

クロム制御による可逆性を確認するための FR/R/FR 処理。通常、完熟種子中では Pr 型フィトクロムが残存していることがあり、レタス種子でも暗黒下で吸水・培養した場合、数%発芽することがある。そこで、対照区としては暗発芽を完全に抑制する FR 処理種子を用いた。各光処理は 5 分間のパルス照射で行い、光処理後暗黒下で培養した (図 2-1)。FR 処理種子と FR/R/FR 処理種子では処理後 24 時間まで発芽しなかった (図 2-2 ; FR と FR/R/FR 参照) が、FR/R 処理種子は処理後 12 時間で発芽がみられはじめ、24 時間後では約 80 %の発芽率となった (図 2-2 ; FR/R 参照)。本実験系により光処理後 9 時間まで 3 時間毎に種子を採取した (図 2-1)。なお、発芽は FR/R 処理後 10 時間以降ではじまるので、試料の採取は発芽前で行ったことになる。また、種子を採取した後の液体培地も定量用試料とした。

それらの試料について、内部標準を用いた LC-MS/MS 法により ABA とその代謝物として PA、DPA、*epi*-DPA の定量分析を行った。その結果、*epi*-DPA のみ試料からは検出できなかった (内部標準は検出できた) ので、それ以外の物質の定量結果を図 2-3 に示した。種子における ABA 内生量は FR 処理後に若干減少したが、FR/R 処理後では著しく減少し、R 処理による ABA 内生量の著しい減少は過去の報告 (Toyomasu et al., 1994) と一致した。ABA の代謝物である PA と DPA 内生量は、ABA 内生量に比べて著しく少なく、DPA 内生量に対する光処理の影響はほとんどみられなかったが、PA 内生量は FR/R 処理後 3~9 時間にかけて、FR 処理後と比較して 2 倍程度有意に増加した。FR/R/FR 処理種子では FR 処理種子と同程度の ABA と PA 内生量であり、FR/R 処理の効果は引き続き FR 処理により完全に打ち消された。これらの結果は、フィトクロムによって ABA 内生量は負に、PA 内生量は正に制御されることを示唆した。また、培地中における ABA、PA、DPA 量については、種子中の量と比べて少なく、それらに対する光処理の影響はほとんどみられなかった。これらの結果とレタス種子の果皮には ABA が 20 ng/500 mg 程度と比較的多く含まれること (Inoue, 1990) を考えあわせると、培地中の 3 種の物質は、果皮からの物理的な拡散により浸出したものであることが示唆され、FR/R 処理後の ABA 内生量の減少は培地への積極的な分泌によつ

てではなく、種子内での代謝によると考えられた。さらに種子中および培地中の PA と DPA の量が種子中の ABA の減少量よりも著しく少ないことから、PA、DPA は種子中に蓄積せず、速やかに代謝されることが示唆された。

レタス種子における *LsNCED* と *LsABA8ox* の発現の光による制御

前述と同じ条件で調製した試料 (図 2-1) を用いて、この ABA 内生量調節のメカニズムを調べるために、ABA 生合成酵素遺伝子と不活性化酵素遺伝子の発現制御に着目し、*LsNCED* と *LsABA8ox* の転写物量を QRT-PCR により定量した。FR 処理と FR/R 処理での結果を図 2-4-B~E (FR、FR/R 参照) に示す。なお、本培養条件でも GA 生合成酵素遺伝子である *LsGA3ox1* の発現量が FR/R 処理により増加すること (Toyomasu et al., 1998) の再現は確認された (図 2-4-A)。

LsNCED1~4 の発現は光処理直前 (吸水開始後 3 時間) の吸水種子 (0 h) において検出することができたが、その中でも *LsNCED2* と *LsNCED4* が主に発現しており (図 2-4-B、C)、*LsNCED1* と *LsNCED3* の発現量は *LsNCED2* と *LsNCED4* と比較すると 100 分の 1 程度と著しく低く (データ不掲載)、それらの発現は ABA 内生量にほとんど影響を与えないと考えられた。*LsNCED2* の発現は、FR 処理後 3 時間でわずかに増加し、光処理後 9 時間まで同程度の発現量が維持されたが、FR/R 処理後は光処理後 3 時間で急激に減少し、処理後 9 時間まで緩やかに減少した (図 2-4-B ; FR と FR/R 参照)。*LsNCED4* の発現は、FR 処理後 3 時間で減少し、処理後 9 時間まで同程度の発現量が維持されたが、FR/R 処理でも処理後 3 時間までに発現量が減少し、その減少量は FR 処理後よりも著しかった (図 2-4-C ; FR と FR/R 参照)。なお、FR 処理後の *LsNCED2* の発現量のわずかな増加と *LsNCED4* の発現量の減少は、FR 処理をしていない暗黒下培養種子においても FR 処理種子と同様の発現パターンを示したので (データ不掲載)、この両遺伝子の FR 処理後の発現の変動は、FR 処理による影響ではなく吸水種子中で時間に伴う発現量の変化と考えられた。*LsABA8ox* は 4 種とも吸水

種子 (0 h) において発現を検出することができたが、その中でも *LsABA8ox1* と *LsABA8ox4* が主要に発現していた (図 2-4-D, E)。この 2 種の遺伝子と比べて *LsABA8ox2* の発現量は 100 分の 1 程度、*LsABA8ox3* は 10 分の 1 程度と低かった (データ不掲載) ので、*NCED* の場合と同様に、発現量が比較的多い *LsABA8ox1* と *LsABA8ox4* に着目した。*LsABA8ox1* の発現量は各光処理後 3 時間でわずかに減少し、そのまま維持されたが、その発現に対する光処理の影響はほとんどみられなかった (図 2-4-D; FR と FR/R 参照)。一方、*LsABA8ox4* の発現量は、FR 処理後はほとんどかわらなかったが、それと比べると、FR/R 処理では処理後 3 時間で一過的に有意に増加し、ピークをなした (図 2-4-E; FR と FR/R 参照)。光処理の影響がみられた処理後 3 時間において、FR/R/FR 処理後の *LsNCED2*、*LsNCED4* と *LsABA8ox4* の発現量は、FR 処理とほとんど同じレベルだったので (図 2-5)、3 種の遺伝子の発現に対する R 処理の効果は、直後の FR 処理により完全に打ち消されることが明らかとなった。以上の結果は、フィトクロムによって *LsNCED2* と *LsNCED4* の発現は負に、*LsABA8ox4* の発現は正に制御されることを示唆しており、このことから、これら 3 種の遺伝子の発現制御が R 処理後の ABA 内生量減少に深く関与すると考えられた。

レタス種子における *LsNCED* と *LsABA8ox* の発現のジベレリンによる制御

前述のように、レタス種子において R 処理により発芽を誘導した場合、ABA 内生量は著しく減少し、この ABA 内生量減少には *LsNCED2*、*LsNCED4*、*LsABA8ox4* の発現制御が関与する可能性が示された。一方、 GA_1 処理した場合にも ABA 内生量は著しく減少すること (Toyomasu et al., 1994) が報告されているので、ここでは、 GA_1 処理により発芽を誘導した際の *LsNCED* と *LsABA8ox* の転写物量を QRT-PCR により定量し、R 処理の場合と比較することにした。 GA_1 処理は光処理直前から開始し、FR 処理および FR/R 処理と比較するために、直後に FR 処理も行った (FR+ GA 処理)。FR+ GA 処理種子は処理後 18 時間では約 25% の発芽がみられ、24 時間後では約 60% の発芽率を示し (図 2-2; FR+ GA 参照)、FR/R

処理に比べて発芽は遅れた。発現解析は、同様に処理後 9 時間まで 3 時間毎に採取した試料を用いて行なった。前述の発現量が著しく低かった *LsNCED1*、*LsNCED3*、*LsABA8ox2*、*LsABA8ox3* の発現については、GA₁ 処理後も同様に低発現量だった (データ不掲載)。一方、*LsNCED2*、*LsABA8ox1*、*LsABA8ox4* の発現量は、FR 処理と FR+GA 処理とではほとんど同じレベルであったが、*LsNCED4* の発現は FR 処理と比較して FR+GA 処理後に著しく発現量が減少した (図 2-4-B~E ; FR と FR+GA 参照)。しかも、この FR+GA 処理後の *LsNCED4* の発現量の減少は FR/R 処理後と比較して遅れており、発芽率の増加の遅れ (図 2-2) と良い相関を示した。以上の結果、GA₁ 処理による ABA 内生量の減少には、*LsNCED4* の発現量の減少が関与している可能性が示された。さらにこのことから、*LsNCED4* の発現は FR/R 処理により増加する内生 GA₁ (Toyomasu et al., 1993) によって制御されるという可能性も考えられた。しかしながら、*LsNCED4* の発現のフィトクロムによる制御には、増加した内生 GA₁ のシグナルを介する経路だけではなく、それを介さない経路も含まれるのかどうかについては、前述の実験結果だけでは判別できなかった。そこで、フィトクロムによる GA を介さない制御を検討するために、阻害剤により GA 生合成を抑制した種子を用いて、*LsNCED4* の発現解析を行った。GA 生合成阻害剤の中で、トリアゾール系であるユニコナゾール P は、GA 生合成酵素の P450 である KO 活性を阻害する (Izumi et al., 1985) が、一方では同じ P450 ファミリーに属する ABA の不活性化酵素の ABA8ox 活性も阻害することが報告されており (Saito et al., 2006)、ABA 内生量にも影響を与える可能性が高いと考えた。そこで本研究では、P450 とは異なる酵素ファミリーであるジテルペン環化酵素 CPS の阻害剤の一つ AMO-1618 を用いた (Kawaide et al., 1997)。FR/R 処理した種子では、処理後 12 時間において 80% 程度の発芽がみられたが、同光条件下でも 50 mM AMO-1618 存在下では発芽は 5% 程度にまで抑制された (図 2-6A)。このように、AMO-1618 処理により R で誘導される発芽はほとんど抑えられ、処理種子内の GA₁ 内生量の具体的なデータは無いものの、本処理種子では少なくとも発芽誘導しないレベルまで GA₁ の内生量を抑制したと考えて、それを発

現解析に用いた。*LsNCED4* の発現量は、FR 処理後では処理直前 (0 h) とほぼ同程度の発現量が維持されたが、それと比べて FR/R 処理後は、AMO-1618 存在下でも非存在下でもほぼ同等に著しく減少した (図 2-6-B)。この結果は、*LsNCED4* の発現は GA_1 内生量が増加しない場合でも R 処理により減少することを示唆した。以上、本研究により、*LsNCED4* の発現は、GA を介さないフィトクロムによる負の制御の可能性も含まれるものの、GA によって負に制御される可能性が示され、このことが GA 処理後の ABA 内生量減少に深く関与すると考えられた。

材料と方法

(1) 植物材料と光源

レタス種子は、1993 年アメリカ Ferry Morse 産の種子より厳選したウィルスフリーの種子を South Pacific Seed Company (New South Wales, Australia) で栽培し、1996 年に採取した種子をさらに同社にて栽培し、2005 年に採取した種子を用いた。種子は実験に用いるまでシリカゲルと同包し 4 °C で保管した。R (7 Wm^{-2}) は、赤 LED 基板 (MIL-R18 ; サンヨーバイオメディカル) を用いて作り、FR (5.5 Wm^{-2}) は、近赤外線 LED 基板 (MIL-IF18 ; サンヨーバイオメディカル) を用いて作った光を、さらにメタアクリル板 (デラグラス A-900 ; 旭化成) を通して得た。レタス種子 500 mg を 2 ml の 1 mM MES バッファー (pH 6.1) を入れたプラスチックシャーレ (60 mm 径 ; 岩城硝子) に入れ暗黒下で培養し、吸水開始後 3 時間で採取したものを光処理直前種子 (0 h) とした。さらに、吸水開始後 3 時間で培地を新しい MES バッファー 1.5 ml に置換し、FR を 5 分間照射したものを FR 処理とし、FR に続いて R を 5 分間照射したものを FR/R 処理とし、また、それに続いて再び FR を 5 分間照射したものを FR/R/FR 処理とした。各光処理後、暗黒下に戻し、3 時間毎に種子と培地を別々に採取し、液体窒素により凍結した。暗黒下培養種子は、培地交換を吸水開始後 3 時間で行い、光処理を行わず再び暗黒下で培養した。 GA_1 処理は、吸水開始後 3 時間で培地交

換する時に、1 mM GA₁を含む培地と交換することにより行ない、その直後に、FR処理を施した (FR+GA)。AMO-1618を用いた実験では、レタス種子 50 mg を用いて前述と同様の条件で培養し、光処理はFRとFR/Rの2種を行った。AMO-1618処理は、吸水開始のときに50 mM AMO-1618を含んだ培地に完熟種子を蒔くことで行い、吸水開始後3時間でFR/R処理を行った (FR/R+AMO)。光処理後、暗黒下に戻し、2時間毎に光処理後6時間まで種子を採取し、液体窒素により凍結した。ABAとその代謝物の定量には、独立して3反復分、QRT-PCRには独立して2反復分を調製して用いた。

(2) アブシジン酸とその代謝物の抽出

(1) で調製した種子試料 (500 mg) からのABAとその代謝物の抽出は、第1章 (2) と同様の方法で行った。内部標準として、50 ng の d₆-ABA、2.5 ng の d₃-PA、d₃-DPA (National Research Council of Canada、Dr. Suzanne R. Abrams より供与) と d₃-*epi*-DPA (京都大学、平井伸博教授より供与) を試料を破砕して4°Cに16時間静置した抽出物に加えた後、遠心分離 (2000 g、20分、25°C) により上清を回収した。上清の5分の1量を用いて、第1章 (2) と同様に以降の操作を行った。培地からのABAとその代謝物の抽出は、1 N HClによりpH 2に調整した後、1 mlの酢酸エチルによる抽出を3回行なった。酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、減圧遠心により濃縮乾固した。沈殿を蒸留水に溶解し、LC-MS/MS分析に供した。

(3) LC-MS/MS分析

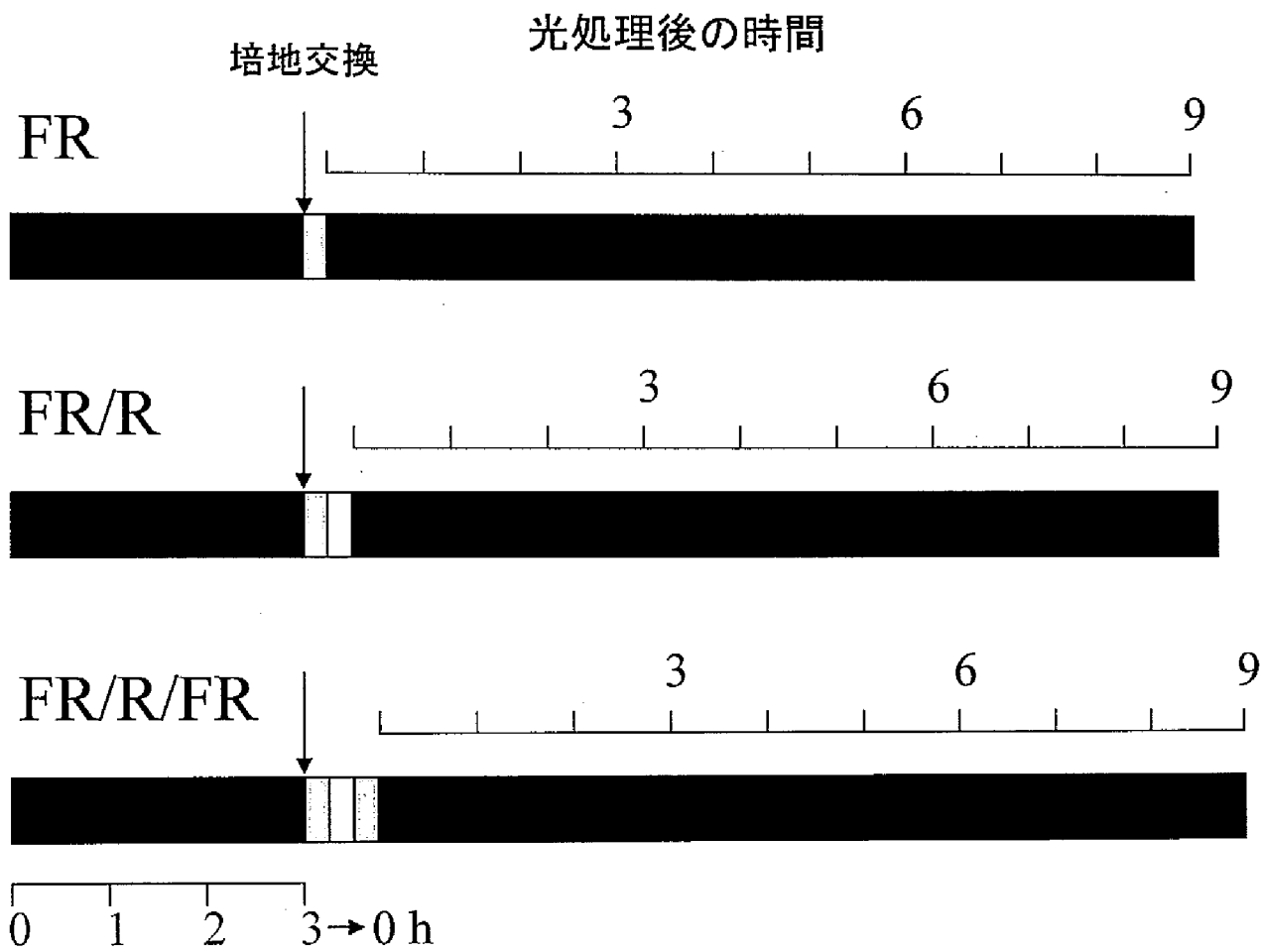
ABAとその代謝物の定量分析は、第1章 (5) と同様の条件で行なった。保持時間は、DPAとd₃-DPAが8.5分、*epi*-DPAとd₃-*epi*-DPAが14.2分、PAとd₃-PAが14.9分、ABAとd₆-ABAが23.0分であった。MS/MS部の条件は、Collision energy = 8.0 (ABAとd₆-ABA)、12.0 (PAとd₃-PA)、18.0 (DPAとd₃-DPA)、14.0 (*epi*-DPAとd₃-*epi*-DPA)、MS/MS transition

(*m/z*) : 263/153 (ABA) 、 269/159 (*d*₆-ABA) 、 279/139 (PA) 、 282/142 (*d*₃-PA) 、 281/171 (DPA) 、 284/174 (*d*₃-DPA) 、 281/171 (*epi*-DPA) 、 284/174 (*d*₃-*epi*-DPA) であった。ABA とその代謝物の定量は、*m/z* 153 (ABA) 、 *m/z* 159 (*d*₆-ABA) 、 *m/z* 139 (PA) 、 *m/z* 142 (*d*₃-PA) 、 *m/z* 171 (DPA) 、 *m/z* 174 (*d*₃-DPA) 、 *m/z* 171 (*epi*-DPA) 、 *m/z* 174 (*d*₃-*epi*-DPA) を用いて行なった。

(4) QRT-PCR 分析

(1) で調製した試料からの全 RNA の抽出は、図 2-4 の実験の場合は熱ホウ酸塩法 (Wan and Wilkins, 1994) により行い、図 2-5 と図 2-6 の実験の場合は RNAqueous column (Ambion) と Plant RNA Isolation Aid (Ambion) により添付説明書に従って行った。1 本鎖 cDNA の合成は、1 μ g の全 RNA を鋳型にして QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン) を用いて添付説明書に従って行った。逆転写反応液に等量の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA) を加え、各遺伝子の発現量に応じて TE バッファーで適度に希釈して QRT-PCR の鋳型とした。リアルタイム QRT-PCR は SYBR Green I (キアゲンまたはタカラバイオ) を用いて行った。キアゲンの SYBR Green I を用いた場合は、1 サンプルあたり SYBR Green Pre Mix 12.5 μ l、30 μ mol フォワードとリバースプライマーの混液 0.5 μ l、超純水 7 μ l、鋳型 cDNA 5 μ l を混ぜて反応液は調製し、sequence detector system (model 7000 ; アプライドバイオシステム) により増幅・検出した。タカラバイオの SYBR Green I を用いた場合は、1 サンプルあたり SYBR Green Pre Mix 12.5 μ l、10 μ mol フォワードとリバースプライマーの混液 0.5 μ l、超純水 10 μ l、鋳型 cDNA 2 μ l を混ぜて反応液は調製し、Thermal Cycler Dice Real Time System (TP800 ; タカラバイオ) により増幅・検出した。QRT-PCR に用いたプライマーの塩基配列は表 2-1 に示した。定量には、QRT-PCR 増幅領域を含む約 600 bp の cDNA 断片を pGEM T Easy vector (プロメガ) に組込んだコントロールプラスミドを作製し、1 fM \times 10⁻⁴~10⁻⁸ の 5 段階に希釈したプラスミドの増幅曲線から算出した検量線を用いた (プラスミド溶液は、

キアゲンの場合 5 μ l、タカラバイオの場合 2 μ l)。各遺伝子の発現量は、ハウスキーピングコントロールとした 18S rRNA 量あたりに標準化し、*LsNCED4* の 0 h の発現量を 1 とした相対値で示した。



吸水開始後の時間

図2-1 光処理種子試料の調製

レタス種子を暗黒下で3時間培養し(0 h)、培地交換後、3種の光処理(5分間のRあるいはFRパルス照射)を行った。再び暗黒下で培養し、すべての操作は、安全光下で行った。図中、黒が暗黒下、灰色がFR、白色がRを示す。

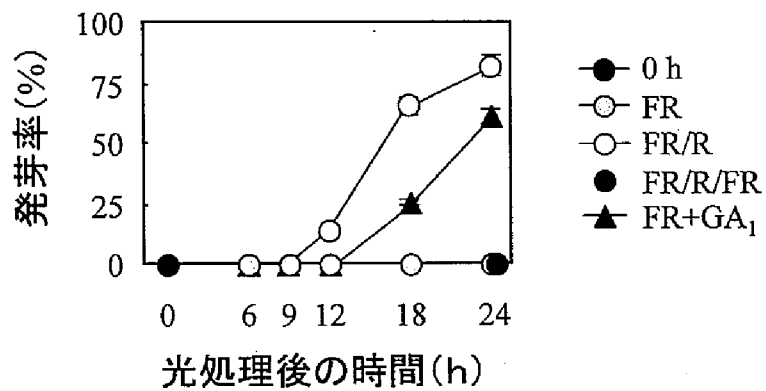


図2-2 異なる条件におけるレタス種子の発芽率の経時変化

0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示す。3種の光処理は図2-1を参照。GA₁処理(1 mM)は光処理直前の培地交換時に行った。縦軸は幼根の発根で評価した発芽率、横軸は光処理後の時間を示した。発芽率は、独立した3反復の実験での平均値を標準誤差とともに示した。

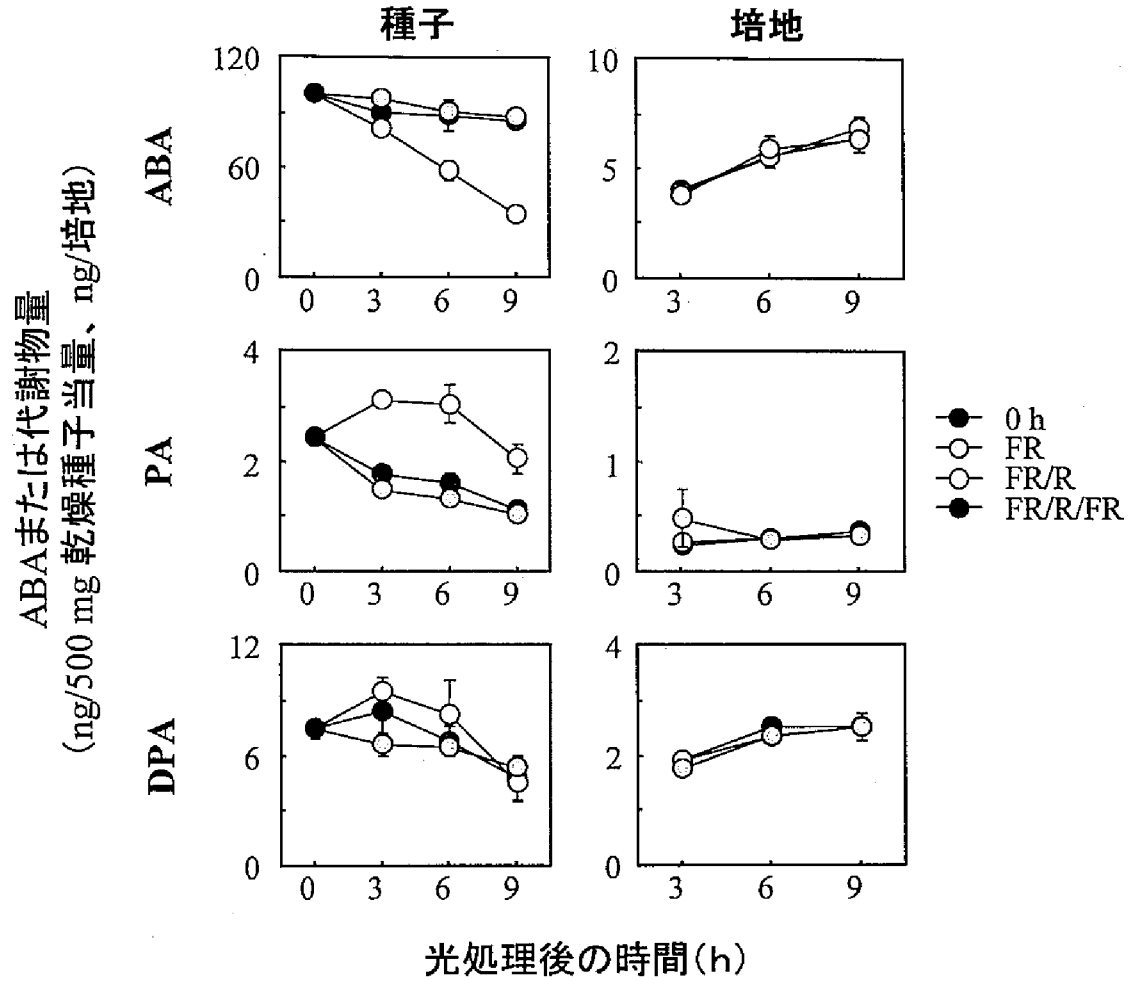


図2-3 ABA、PAとDPA量の種子内と培地における経時変化

定量分析はLC-MS/MSにより行った。0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示す。3種の光処理は図2-1を参照。縦軸は各物質の量、横軸は光処理後の時間を示した。分析は、独立して2反復行い、平均値を標準誤差とともに示した。

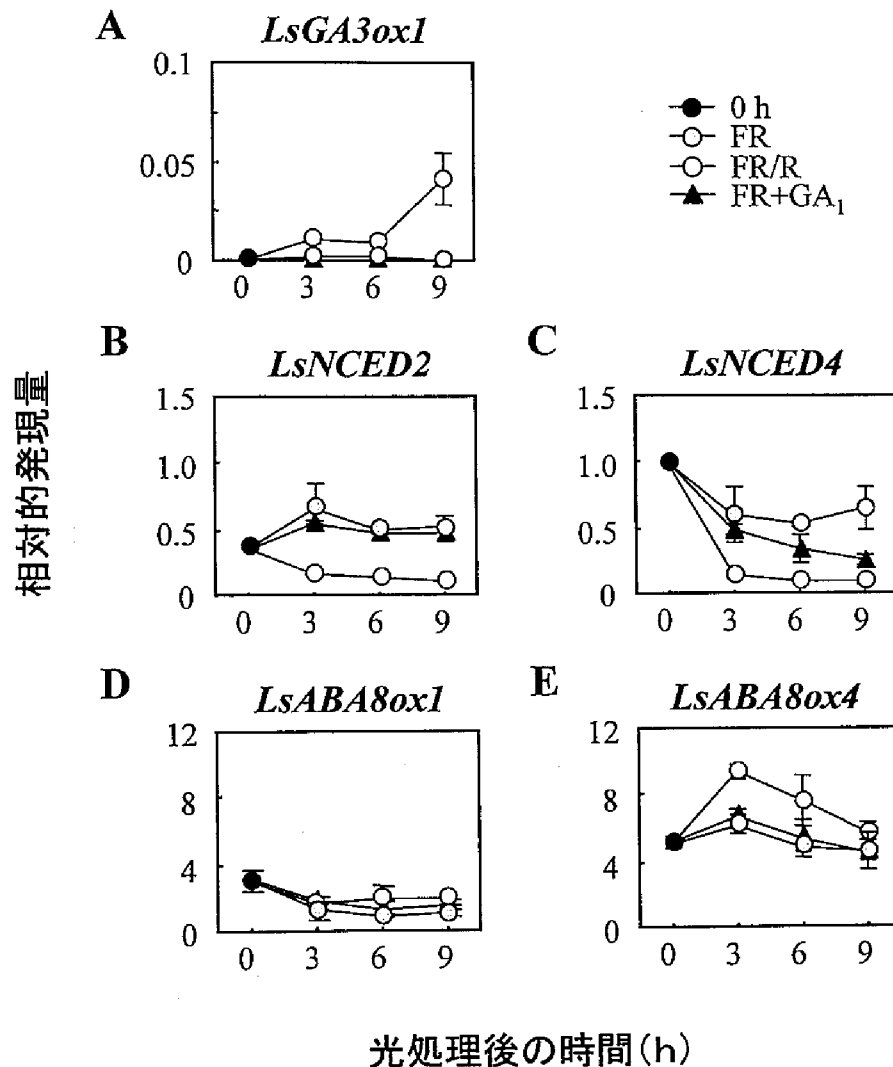


図2-4 異なる条件で培養したレタス種子の*LsNCED2*, 4と*LsABA8ox1*, 4の発現量の経時変化

各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。3種の光処理は図2-1を参照。GA₁処理(1 mM)は光処理直前の培地交換時に行った。各遺伝子の発現量は18S rRNA量により標準化した後、*LsNCED4*の0 hの発現量を1として相対的に示した。縦軸は相対的な発現量、横軸は光処理後の時間を示した。独立した2反復の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

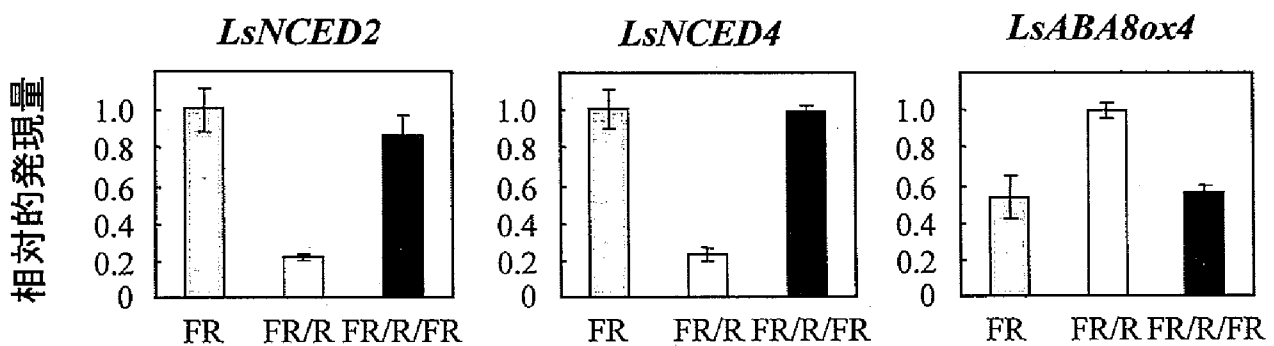


図2-5 異なる3種の光条件で培養したレタス種子における*LsNCED2*, 4と*LsABA8ox4*の発現量

各光処理後3時間の種子を用いた。各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。3種の光処理は図2-1を参照。各遺伝子の発現は18S rRNA量により標準化した後、それぞれの遺伝子について発現量が最大になった試料を1として相対的に示した。独立した2反復の実験の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

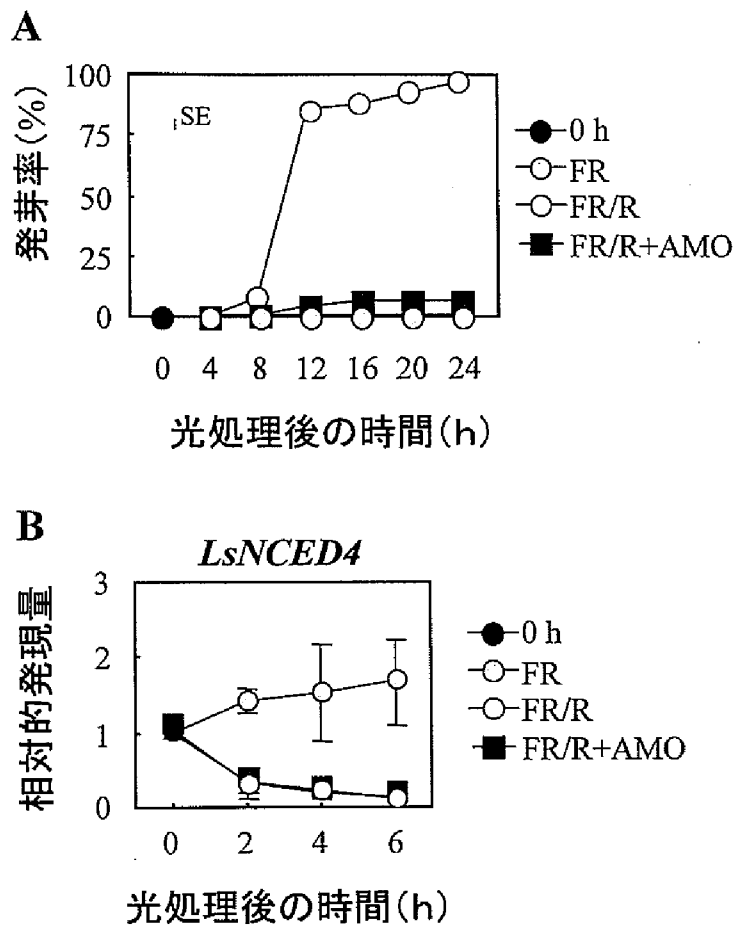


図2-6 GA生合成阻害剤存在下でのレタス種子の発芽率と*LsNCED4*の発現

A. 異なる条件におけるレタス種子の発芽率、0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。2種の光処理は図2-1を参照。AMO-1618処理(50 mM)は吸水開始から行った。縦軸は幼根の発根で評価した発芽率、横軸は光処理後の時間を示した。発芽率は、独立した3反復の実験での平均値を標準誤差とともに示した。

B. GA生合成阻害剤存在下での*LsNCED4*の発現量の経時変化、*LsNCED4*の発現量はQRT-PCRにより定量した。条件はAと同様。18S rRNA量により標準化した後、0 hの発現量を1として相対的に示した。縦軸は相対的な発現量、横軸は光処理後の時間を示した。独立した2反復の実験の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

表 2-1 本章の QRT-PCR に用いたプライマー

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>18S rRNA</i>	GGAGCGATTTGTCTGGTTA	ATCTAAGGGCATCACAGACC
<i>LsNCED1</i>	AAACCCTACAATCCGACTATTTCG	GGCCGCAGCTCTTTGTAAG
<i>LsNCED2</i>	CTTCAGTTTCCTAAACAGTCTGTTGGTA	TGCTTTCAATCCATCTTCAACG
<i>LsNCED3</i>	CAGTCGTCGGAGAAATFCCA	GCCTTTGTGTCTCCGTATGG
<i>LsNCED4</i>	GGACACGGCTCATGGAATC	GCGAGATCACCGTCACGTT
<i>LsABA8ox1</i>	GCTCGTGACCAAATCTCATCTC	TCAATGTGGGAAACCATGTG
<i>LsABA8ox2</i>	TTGGGTTGTCCAAGTATCATGTTAG	CAAGCTTCGGAGATTATCAAGTGAT
<i>LsABA8ox3</i>	CCTGCTAGCAAAGAGAGAATGC	CCCATCCTCGGAGTGATTG
<i>LsABA8ox4</i>	GTGATGATATCGAGTCCTAAAGTAGCA	TTGAGATGCGAATGGTATGG
<i>LsGA3ox1</i>	TGTTTGCAC TTCCTATCCAACAG	TACGAGCATGTTTCGTATGGAGAT

第3章

レタス種子におけるアブシジン酸の内生量およびアブシジン酸代謝酵素遺伝子の発現の部位別の解析

緒言

前章の結果から、レタス種子における ABA 内生量は、フィトクロムにより制御され、ABA 代謝酵素遺伝子である *LsNCED2*、*LsNCED4*、*LsABA8ox4* の発現制御を通して減少する可能性が示された。吸水レタス種子では、受光部位が胚軸にあることが示されており (Inoue and Nagashima, 1991)、また発芽時には、胚軸で growth potential が増加すること (Takeba, 1980c ; 1980d) など、発芽に重要な生化学的現象が胚軸で起きることが示されている。そこで、発芽過程における ABA 内生量減少部位を追究するために、レタス種子を子葉側と胚軸側の 2 つの部位にわけ、それぞれの部位に含まれる ABA 内生量を定量し、かつ、光による ABA 内生量調節に関与すると考えられた *LsNCED2*、*LsNCED4*、*LsABA8ox4* について QRT-PCR により転写物量を測定した。また、2 章において内生 GA によっても負に制御される可能性が示された *LsNCED4* の発現部位と GA₁ 増加部位とを比較するために、*LsGA3ox1* (Toyomasu et al., 1998) と不活性化酵素遺伝子 *LsGA2ox2* (Nakaminami et al., 2003) についても同様の試料を用いて転写物量を定量した。

結果と考察

本実験では、FR と FR/R 処理したレタス種子を用いて、図 3-1A に示した模式図のように種子を切断し、それぞれの部位を子葉側、胚軸側とした：子葉側には子葉、果皮、種皮、内胚乳が含まれ、胚軸側には、胚軸原基、根原基、茎頂分裂組織、子葉の一部、果皮、種皮、内胚乳が含まれていた。両部位における ABA 内生量は、内部標準を用いた LC-MS/MS 法により定量した (図 3-1B)。吸水開始後 3 時間である光処理直前の種子 (0 h) の ABA 内

生量は、子葉側に比べ胚軸側で約 2 倍多かった。FR 処理後、子葉側における ABA 内生量はほとんど変わらなかったが、胚軸側では緩やかに減少した。一方、FR/R 処理後は、両部位で ABA 内生量は減少し、処理後 9 時間では、FR 処理と比較して FR/R 処理では、種子 1 粒あたり胚軸側では 36 pg、子葉側では 25 pg 減少した。このように、R 処理による ABA 内生量の減少量は子葉側と比較して胚軸側で約 1.4 倍多かった。この結果は、ABA 内生量減少は両部位で見られるが、特に胚軸側における ABA の減少量が多いことを示した。

この両部位における ABA 内生量減少のメカニズムを追究するために、光による ABA 内生量調節に関与すると考えられた 3 種の ABA 代謝酵素遺伝子 (*LsNCED2*、*LsNCED4*、*LsABA8ox4*) の発現局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討したが、有意なシグナルを検出することはできなかった (データ不掲載)。そこで、その 3 種の遺伝子について、前述のように凍結後、2 つの部位に切った種子を材料として、QRT-PCR による発現解析を行った (図 3-2-A)。*LsNCED2* は、0 h においては子葉側と比較して胚軸側に著しく多く発現しており、FR 処理では処理後 9 時間まで 0 h と同程度の発現がみられたが、FR/R 処理では処理後 3 時間以降で著しく発現量が減少した。*LsNCED4* の発現は、0 h では、両部位で同程度の発現がみられた。子葉側におけるこの遺伝子の発現量は、FR、FR/R 処理ともに同程度減少したため、培養中の時間経過に伴う発現量の減少と考えられた。一方、胚軸側での *LsNCED4* の発現量は、FR 処理では処理後 9 時間まで 0 h とほとんど同じレベルに維持されたが、FR/R 処理では処理後 3 時間から著しく減少した。種子全体を用いた発現解析から、*LsNCED4* の発現量は FR 処理後も減少していたが (図 2-4)、これは子葉側の発現量の減少に起因すると考えられた。このことにより、種子全体での発現解析において FR 処理種子と比較して FR/R 処理種子で減少した分 (図 2-4) は、胚軸側における FR/R 処理後の減少に相当すると考えられた。一方、*LsABA8ox4* の発現量は、0 h では両部位で同程度であり、FR 処理では処理後 9 時間までは 0 h とほとんど変わらなかったが、FR/R 処理後では処理後 3 時間以降で両部位において増加した。これらの結果から、FR/R 処理による子葉側での ABA

の減少には *LsABA8ox4* の発現量の増加が関与し、さらに、それよりも顕著な胚軸側における ABA 内生量の減少には *LsNCED2* と *LsNCED4* の発現量の減少と *LsABA8ox4* の発現量の増加が関与しており、特に胚軸側において顕著に発現していた *LsNCED2* と *LsNCED4* の制御が重要であると考えられた。ところで、2章において *LsNCED4* の発現は内生 GA により負に制御される可能性が示されていたので、次に、FR/R 処理後に *LsNCED4* の発現量が減少する部位と GA₁が増加する部位とを比較するために、GA 代謝酵素遺伝子である *LsGA3ox1* と *LsGA2ox2* についても同じ試料を用いて発現解析を行った。その結果を図 3-2-B に示す。なお、レタス種子内の GA₁ 内生量は ABA 内生量と比較して 100 分の 1 程度と極微量で、両部位における内生 GA₁ 定量は容易ではなかったため、R 処理後の GA₁ 内生量の増加に深く関与すると考えられているこの 2 遺伝子の両部位における発現を調べ、間接的ではあるが GA₁ 内生量増加部位を推定した。*LsGA3ox1* について、0 h において両部位における発現は非常に低かった。子葉側では FR、FR/R 処理ともに処理後 9 時間まで発現量は低かったが、胚軸側においては、FR 処理では処理後 9 時間まで発現量は若干増加したものの、それと比較して FR/R 処理では処理後 3 時間から著しく発現量が増加した。一方、*LsGA2ox2* では、0 h において子葉側と比べて胚軸側に主に発現しており、子葉側では、FR、FR/R 処理後も発現量が低く維持されたが、胚軸側では、FR 処理と比較して FR/R 処理では処理後 3 時間から発現量が減少する傾向がみられ、さらに処理後 9 時間では有意に減少した。以上のように、胚軸側において両遺伝子は顕著に発現し、さらに発現制御されていたことから、FR/R 処理後に胚軸側で GA₁ 内生量が増加するという可能性が示唆された。この結果は、*LsNCED4* の発現が内生 GA₁ により負に制御されるという可能性を支持するものであった。レタス種子では発芽誘導に関与する赤色光の受光部位が調べられており、それは種子胚軸の中でも将来芽生えの胚軸に分化する胚軸原基の付近であることが示されている (Inoue and Nagashima, 1991)。本章において、それぞれの代謝酵素遺伝子の発現制御を通して胚軸側で ABA 内生量は減少し、それとは逆に GA₁ 内生量は増加する可能性が示唆されたことから、

胚軸側の ABA 内生量減少部位と GA₁ 内生量増加部位は受光部位に近いと予想され、このような胚軸側における ABA と GA の内生量調節は発芽誘導において重要なイベントであると考えられた。今後は、これらの局在部位について組織レベルでより詳細に検証する必要がある。

材料と方法

(1) 植物材料の調製

レタス種子 (500 mg) を用いて第 2 章 (1) と同条件で調製した凍結試料について、ドライアイス上で剃刀を用いて、図 3-1A に示したように切断した。ABA 内生量の定量には独立した 3 反復の試料の中からそれぞれ 20 粒を、QRT-PCR には 2 反復の試料の中からそれぞれ 50 mg 分を用いて切断した。

(2) アブシジン酸の定量分析

(1) で調製した種子試料を用いて、第 2 章と同様に、d₆-ABA (1 ng) を内部標準として LC-MS/MS 法により ABA 定量分析を行った。

(3) QRT-PCR 分析

(1) で調製した種子試料を用い、QRT-PCR は第 2 章と同様の方法で行なった。QRT-PCR に用いたプライマーは表 2-1 に示したものと、*LsGA2ox2* については、フォワードプライマー 5'-TGGAGGTCCACCATTGATG-3' と リバースプライマー 5'-CCTATTATCAGTCAACCTGGTCTTG TAG-3'を用いた。

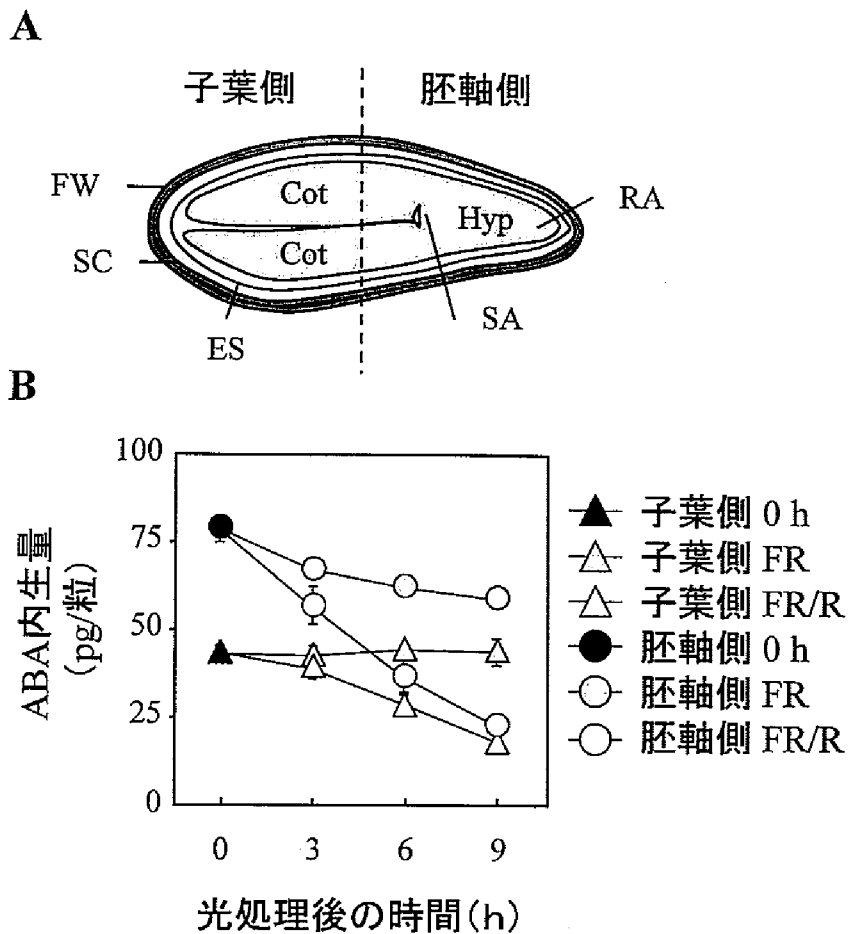


図3-1 レタス種子における胚軸側と子葉側での内生ABA量

A. 採取後凍結した種子試料を2つの部位に切断した。子葉側には、子葉(Cot)、果皮(FW)、種皮(SC)、胚乳(ES)；胚軸側には、胚軸原基(Hyp)、根端原基(RA)、茎頂(SA)、子葉の一部、FW、SC、ESが含まれた。

B. LC-MS/MSによる子葉側と胚軸側の内生ABA定量実験、0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。2種の光処理は図2-1を参照。縦軸はABA量、横軸は光処理後の時間を示した。分析は、独立した3反復の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

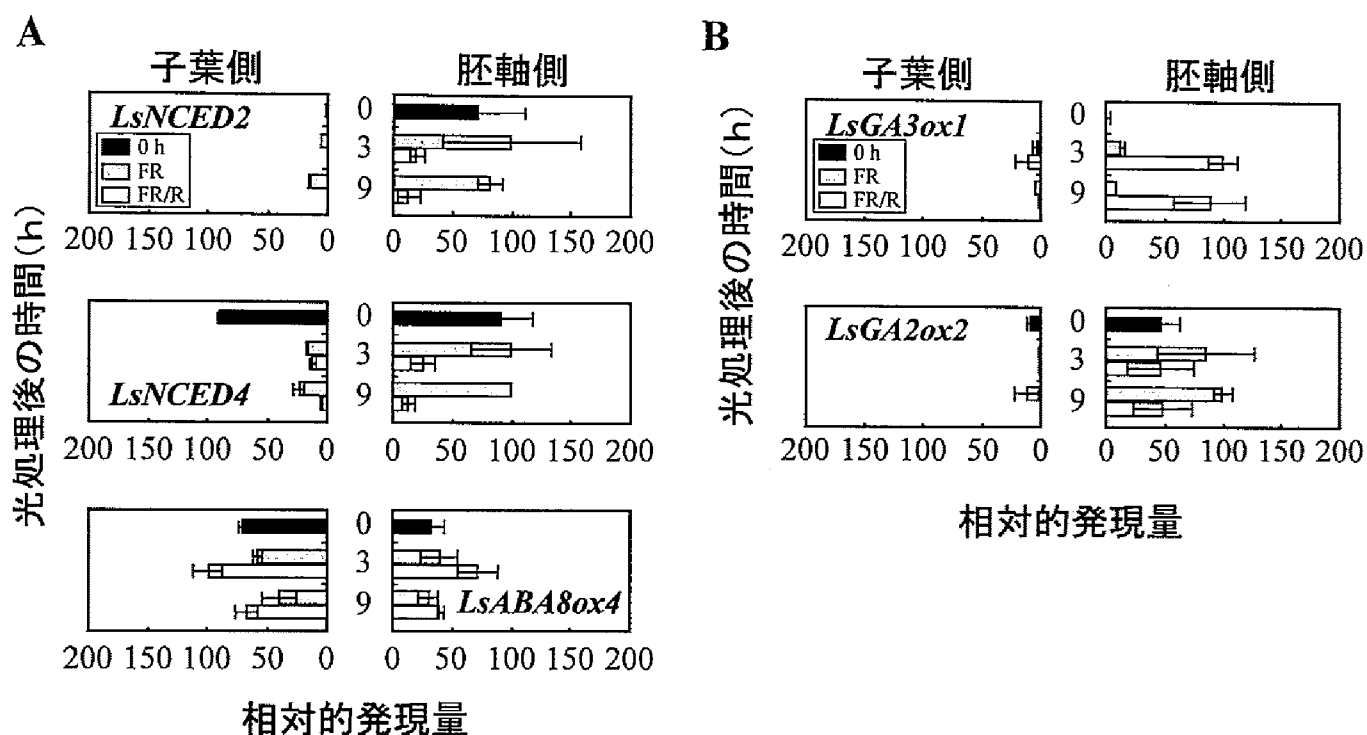


図3-2 レタス種子における胚軸側と子葉側でのABAとGA代謝酵素遺伝子の発現

A. *LsNCED2*, *LsNCED4*, *LsABA8ox4*の子葉側と胚軸側における発現量、各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。2種の光処理は図2-1を参照。各遺伝子の発現は18S rRNA量により標準化した後、それぞれの遺伝子において発現量が最大になった試料を100として相対的に示した。縦軸は光処理後の時間、横軸は相対的な発現量を示した。独立した2反復の実験の平均値を標準誤差とともに示した。

B. *LsGA3ox1*と*LsGA2ox2*の子葉側と胚軸側における発現量、解析条件はAと同様。

第4章

アブシジン酸処理がレタス種子のジベレリン代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

緒言

レタス種子においては、GA 処理により発芽を誘導したときに、*LsNCED4* の発現量の減少を通して ABA 内生量が減少した (第2章)。一方、レタス種子に ABA 処理を行うと、R 処理により誘導される発芽は抑制されることが示されている (Kahn, 1968; Sankhla and Sankhla, 1968)。これらのことから、レタス種子では GA は ABA 内生量調節を負に制御し、それとは逆に ABA は GA 内生量を負に制御すること、即ち、ABA と GA が相互に作用してそれぞれの内生量が制御されるという可能性が考えられた。そこで、本章ではレタス種子における ABA による GA 内生量への影響を調べるために、ABA 処理した種子の全体あるいは種子を子葉部と胚軸部に切断した試料をもちいて、GA 代謝酵素遺伝子の発現解析を QRT-PCR により行った。

結果と考察

レタス種子では、GA 生合成後期に関与する酵素遺伝子 *LsGA20ox1*、*LsGA20ox2*、*LsGA3ox1*、*LsGA3ox2* の発現解析がノーザンブロット法により (Toyomasu et al., 1998)、また GA 不活性化酵素遺伝子 *LsGA2ox1* と *LsGA2ox2* の発現解析が半定量 RT-PCR により行われており (Nakaminami et al., 2003)、フィトクロムによって *LsGA3ox1* の発現は正に、*LsGA20ox2* と *LsGA2ox2* の発現は負に制御され、さらに *LsGA20ox1* と *LsGA2ox1* の発現は光処理の影響をほとんど受けないということが示されていた。このことから、レタス種子における R 処理後の GA₁ 内生量の増加 (Toyomasu et al., 1993) には、主に *LsGA3ox1* の発現量増加と *LsGA2ox2* の発現量減少が関与すると考えられている。本章では、これら 6 種の遺伝子に、GA 生合成

初期に関与する *LsCPS*、*LsKS* と生合成中期に関与する *LsKO1*、*LsKO2*、*LsKAO* (澤田ら、論文作成中) を加えた合計 11 種の GA 代謝酵素遺伝子の発現に対する ABA 処理の影響を調べた。光処理は 2 章と同じ 3 種 (FR、FR/R、FR/R/FR) を行い、さらに ABA 処理は、FR/R 処理直前に 0.1 mM ABA を含む培地に入れ替えることで行った (FR/R+ABA)。FR 処理と FR/R/FR 処理では処理後 24 時間まで発芽はみられなかったが、FR/R 処理では、処理後 8 時間で約 10% の発芽がみられ、12 時間後には約 80% の発芽率を示した (図 4-1)。また、FR/R+ABA 処理種子については、処理後 24 時間まで発芽はみられず、本実験系においても FR/R 処理による発芽誘導効果は ABA 処理により完全に抑制された。このような条件下で、発現解析は、FR/R 処理による発芽がまだ誘導されない光処理後 6 時間まで 2 時間毎に採取した種子の全体、あるいは処理後 2 時間と 6 時間の種子を第 3 章と同様に子葉部と胚軸部に切断した試料を用いて QRT-PCR により行った。

まず、種子全体の場合の光処理の影響について述べる (図 4-2-A~K; FR と FR/R、図 4-3)。GA 生合成初期と中期の生合成酵素遺伝子の中で、*LsCPS*、*LsKS*、*LsKO1*、*LsKO2* の発現量は、FR、FR/R 処理ともに処理後 6 時間まで光処理直前の種子 (0 h) とほぼ同等であり (図 4-3-A、B、C、D)、光処理による影響はほとんど見られなかった。一方、*LsKAO* の発現は、FR 処理では 0 h とほとんど変わらなかったが、FR/R 処理では光処理後 6 時間まで緩やかではあったが有意に増加した (図 4-2-E)。さらに、処理後 4 時間では FR/R/FR 処理の発現量は FR 処理と同等で (図 4-3-A)、R の効果は続く FR により打ち消され、*LsKAO* の発現は、若干ではあるがフィトクロムにより正に制御されると考えられた。GA 生合成後期に関与する遺伝子の中で、*LsGA20ox1* の発現は光処理の影響を有意には受けず (図 4-2-F)、*LsGA20ox2* と *LsGA3ox1* の発現は、それぞれフィトクロムにより負と正に制御されていることが示され (図 4-2-G、H、図 4-3-B、C)、これらの 3 種の発現パターンは、過去の知見 (Toyomasu et al., 1998) と同様だった。以前のノーザンブロット分析では検出できなかった (Toyomasu et al., 1998) *LsGA3ox2* の発現量は、*LsGA3ox1* と同様、フィトクロムにより正に制御されることが

示された (図 4-2-I、図 4-3-D)。次に、これら生合成酵素遺伝子の子葉側と胚軸側での発現を調べた結果を図 4-4-A~J に示す。*LsKS*、*LsKO2*、*LsGA20ox2* の 3 種の遺伝子の発現は、FR と FR/R 処理ともに両部位で同程度発現していた (図 4-4-B、D、F) が、*LsCPS*、*LsKO1*、*LsGA20ox1* の発現は、子葉側と比較して胚軸側で若干多く発現している傾向にあった (図 4-4-A、C、F)。*LsGA20ox1* については、胚軸側では両光条件でほぼ同程度の発現量であったが、子葉側では FR 処理と比較して FR/R 処理では有意に発現量が高く (図 4-4-F)、種子全体を用いた発現解析の場合に、有意差はなかったものの、FR 処理と比較して FR/R 処理での発現量のごくわずかに高い傾向がみられた (図 4-2-F) のは、この子葉側での差によると考えられた。3 章で示した *LsGA3ox1* と同様に *LsKAO* と *LsGA3ox2* も胚軸側で主に発現しており、それらの胚軸側における発現量は、FR 処理と比較して FR/R 処理で有意に高く (図 4-4-E、H、I)、種子全体の場合と同様のパターンとなった。GA 不活性化段階については、今回解析した遺伝子の中で最も発現量が多かった *LsGA2ox1* の発現は、光処理による影響はほとんど見られず (図 4-2-J)、*LsGA2ox2* の発現量は、FR/R 処理では FR 処理と比較して処理後 6 時間まで有意に低いレベルとなり (図 4-2-K ; FR と FR/R 参照)、この R の効果は続く FR により打ち消され (図 4-3-E)、このような両遺伝子の発現パターンは過去の知見 (Nakaminami et al., 2003) と同様であった。*LsGA2ox1* の発現量は、子葉側と胚軸側で同程度であった (図 4-3-J) が、3 章で示したように、胚軸側で主に発現している *LsGA2ox2* の発現量は、FR 処理と比べて FR/R 処理で低くなり (図 4-3-K)、種子全体の解析結果と同様の傾向を示した。以上の結果から、胚軸側に主に発現する *LsKAO*、*LsGA3ox1*、*LsGA3ox2*、*LsGA2ox2* の発現がフィトクロムにより制御されることを通して GA₁ 内生量が胚軸側で主に増加するということが示唆された。その中でも特に、今回解析した遺伝子の中で最も発現量が少なかった 2 種の *LsGA3ox* 遺伝子の発現は、ともに胚軸側でフィトクロムにより最も劇的に制御され、このことが GA₁ 内生量増加に深く関与すると考えられた。

このときの FR/R 処理種子における GA 代謝酵素遺伝子の発現に対する ABA 処理の影響

を調べた結果を図 4-2-A~K (FR/R+ABA も参照) に示す。光処理によりほとんど影響を受けなかった *LsCPS*、*LsKS*、*LsKO1*、*LsKO2*、*LsGA2ox1* の発現量は、FR/R+ABA 処理と FR/R 処理とで同程度であり、それらの発現に対する ABA 処理の影響はほとんどみられなかった (図 4-2-A~D、J)。*LsKAO* と *LsGA2ox2* については、前述のようにそれらの発現は光処理による影響は受けたが、FR/R+ABA 処理と FR/R 処理で同程度の発現量を示し、それらの発現に対して ABA 処理の影響はほとんどみられなかった(図 4-2-E、G)。*LsGA3ox1* の発現量は、FR/R 処理と比べ FR/R+ABA 処理では、FR 処理ほどではないが、処理後 6 時間以降で有意に低くなっており (図 4-2-H)、FR/R 処理による発現量の増加が一部抑制されたと考えられた。ところが、*LsGA3ox2* の発現は、FR/R+ABA 処理と FR/R 処理とではほぼ同程度の発現量を示し、この発現に対する ABA 処理の影響は有意にはみられなかった (図 4-2-I)。一方、*LsGA2ox2* の発現量は FR/R 処理と比較して FR/R+ABA 処理では、FR 処理ほどではないが、処理後 6 時間でわずかながら有意に高くなり、FR/R 処理後の発現量の減少が一部抑制されたと考えられた(図 4-2-K)。そこで、ABA 処理の影響を受けた *LsGA3ox1* と *LsGA2ox2*、さらに *LsGA3ox2* については、胚軸側と子葉側での発現を調べた (図 4-5)。その結果、胚軸側における *LsGA3ox2* の発現量は、FR/R 処理と FR/R+ABA 処理とで同程度であり、胚軸側での *LsGA3ox1* の発現量は、FR/R 処理と比較して FR/R+ABA 処理では若干ながら有意に低いレベルとなり、それとは逆に胚軸側での *LsGA2ox2* の発現量は FR/R 処理と比較して FR/R+ABA 処理では有意に高いレベルとなった。このように、これら 3 種の遺伝子の胚軸側での発現パターンは種子全体の場合と同様の結果となった。以上の結果から、ABA 処理によるレタス種子の発芽抑制は、FR/R 処理後の胚軸側での *LsGA3ox1* の発現量の増加と *LsGA2ox2* の発現量の減少が一部キャンセルされたことにより、内生 GA₁ の量が発芽に十分なレベルまで増加しないことによるという可能性が示された。このことと発芽過程において内生 ABA 量が減少すること (第 2 章) とを考えあわせると、吸水種子では多量に存在する内生 ABA により *LsGA3ox1* の発現が負に、*LsGA2ox2* の発現が正に制御され、その結果と

して GA₁ 内生量は負に制御されているが、FR/R 処理後に ABA 内生量が減少すると両遺伝子の発現に対する ABA による制御が解除されて GA₁ 内生量が増加するというメカニズムが一部存在する可能性が示唆された。さらに、第 2 章では、FR/R 処理後に内生量が増加した GA₁ の作用により ABA 生合成酵素遺伝子 *LsNCED4* の発現が抑制され、ABA 内生量が減少するというメカニズムが一部存在する可能性も示されており、これらのことは、吸水レタス種子において、ABA と GA の内生量は光により制御される中で、それぞれ拮抗的に互いの内生量を調節しあう機構も含まれている可能性を示唆した。

材料と方法

(1) 植物材料と光源

R (6.5 W/m²) は、20 W 蛍光灯 (プラントルクス ; 東芝) 4 本の光を光散乱用プラスチックフィルター (アクリルライト KS-001E ; 三菱レーヨン)、赤色フィルター (アクリルライト S-102 ; 三菱レーヨン) の順に通して作った。FR (5.0 W/m²) は、20 W 遠赤外線ランプ (東芝) 6 本の光を光散乱用プラスチックフィルター (アクリルライト KS-001E)、メタアクリル板 (デラグラス A-900 ; 旭化成) の順に通して作った。種子は第 2 章 (1) と同じものを用い、試料の調製は、レタス種子 50 mg を用いて、第 2 章 (1) と同様の方法で行った。また、ABA 処理は、吸水開始後 3 時間での培地交換時に 0.1 mM ABA を含んだ培地に交換することで行った。

(2) QRT-PCR 分析

全 RNA の抽出、1 本鎖 cDNA 合成、QRT-PCR は第 2 章 (4) と同様に行なった。使用したプライマーは、18S rRNA、*LsGA3ox1*、*LsGA2ox2* については前述のもの (2 章、3 章) を用い、それ以外の遺伝子については表 4-1 に示す。

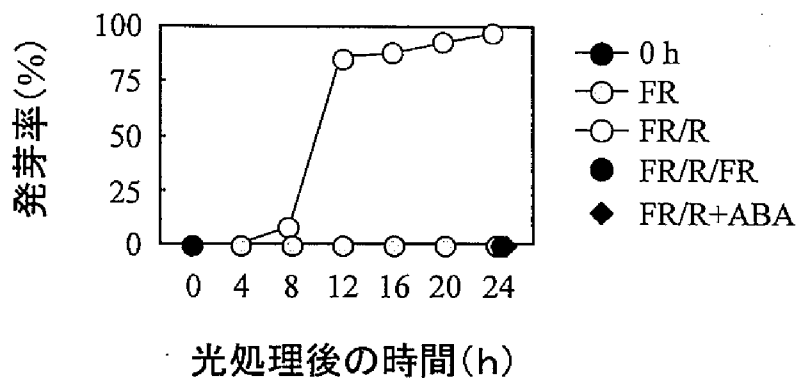


図4-1 異なる条件におけるレタス種子の発芽率の経時変化

0 hは暗所吸水開始後開始後3時間(光処理直前)を示している。3種の光処理は図2-1を参照。ABA処理(0.1 mM)は光処理直前の培地交換時に行った。縦軸は幼根の発根で評価した発芽率、横軸は光処理後の時間を示した。発芽率は、独立した3反復の実験での平均値を標準誤差とともに示した。

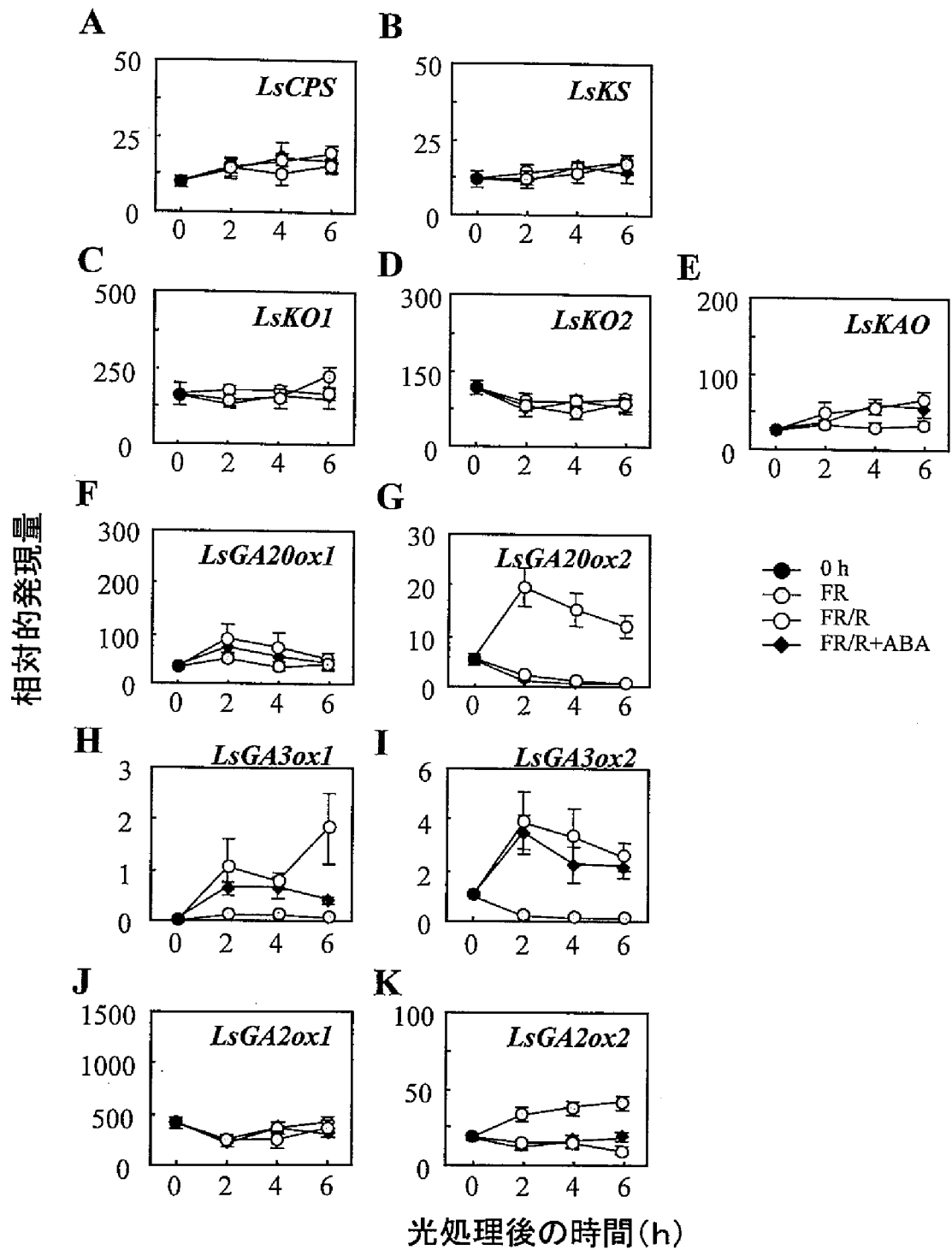


図4-2 異なる条件で培養したレタス種子におけるGA代謝酵素遺伝子の発現量の経時変化

各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。3種の光処理は図2-1を参照。ABA処理(0.1 mM)は光処理直前の培地交換時に行った。各遺伝子の発現量は18S rRNA量により標準化した後、*LsGA3ox2*の0 hの発現量を1として相対的に示した。縦軸は相対的な発現量、横軸は光処理後の時間を示した。独立した3反復の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

相対的発現量

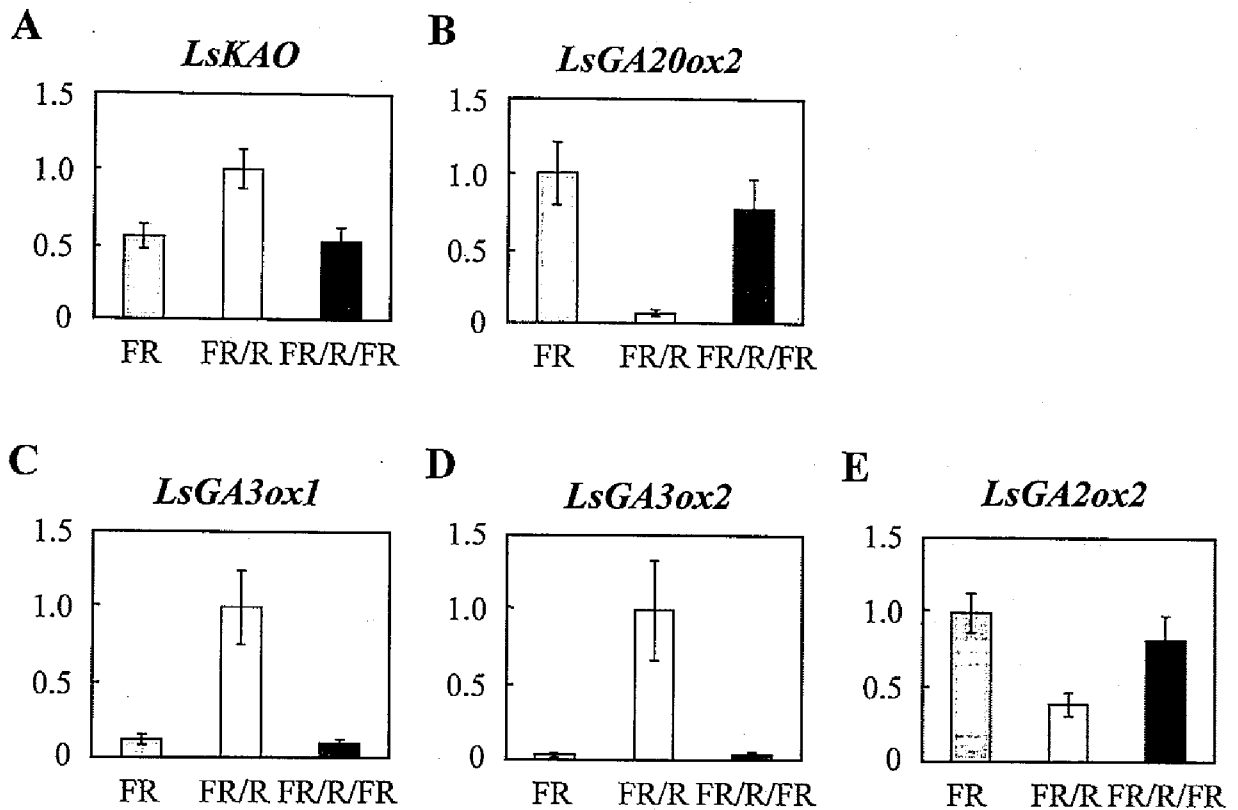


図4-3 異なる3種の光条件で培養したレタス種子におけるGA代謝酵素遺伝子の発現量

各光処理後4時間の種子を用いた。各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。3種の光処理は図2-1を参照。各遺伝子の発現は18S rRNA量により標準化した後、それぞれの遺伝子について発現量が最大になった試料を1として相対的に示した。独立した2反復の実験の定量値の平均値を標準誤差とともに示した。

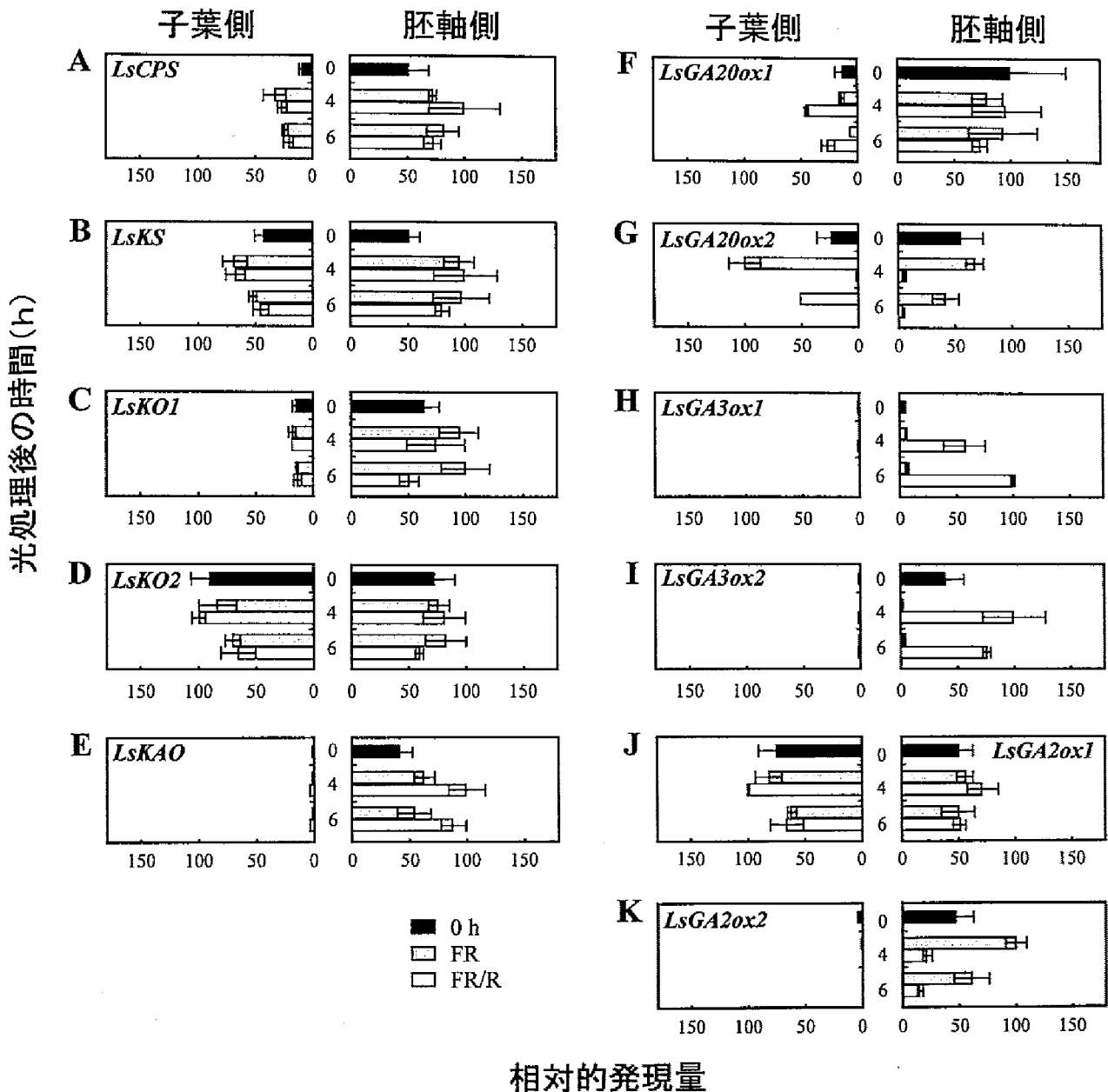


図4-4 異なる光条件で培養したレタス種子における胚軸側と子葉側でのGA代謝酵素遺伝子の発現

各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。0 hは暗所吸水開始後3時間(光処理直前)を示している。2種の光処理は図2-1を参照。各遺伝子の発現は18S rRNA量により標準化した後、それぞれの遺伝子において発現量が最大になった試料を100として相対的に示した。縦軸は光処理後の時間、横軸は相対的な発現量を示した。独立した2反復の実験の平均値を標準誤差とともに示した。

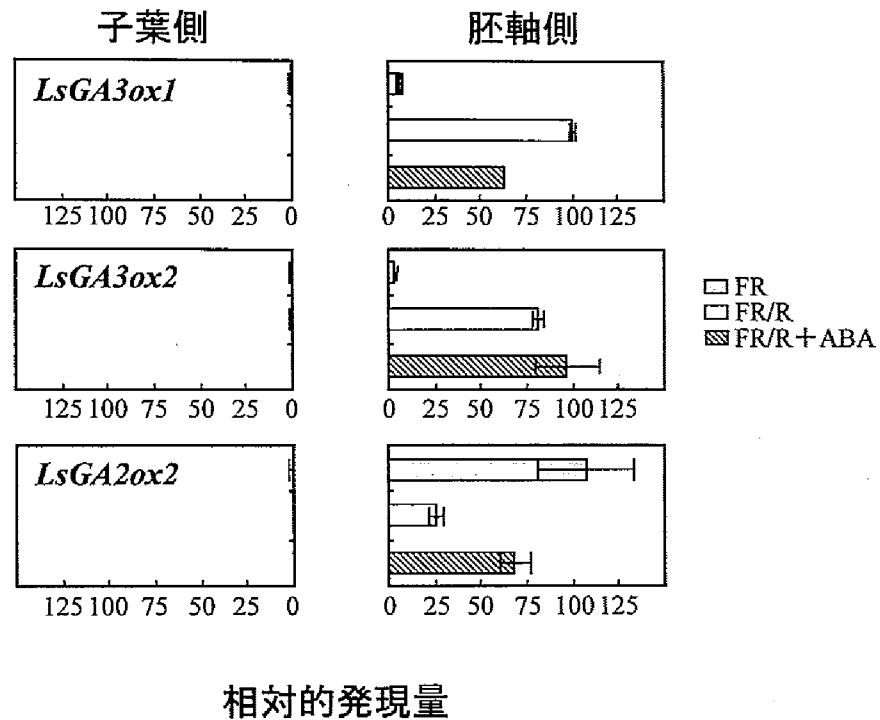


図4-5 ABA処理したレタス種子における子葉側と胚軸側でのGA代謝酵素遺伝子の発現

光処理後6時間の種子を用いた。各遺伝子の発現量はQRT-PCRにより定量した。2種の光処理は図2-1を参照。ABA処理(0.1 mM)は光処理直前の培地交換時に行った。各遺伝子の発現は18S rRNA量により標準化した後、それぞれの遺伝子において発現量が最大になった試料を100として相対的に示した。横軸は相対的な発現量を示した。独立した2反復の実験の平均値を標準誤差とともに示した。

表 4-1 本章の QRT-PCR に用いたプライマー

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>LsCPS</i>	ATGACGTCGTGGAGGATGAG	CCCAAGCTGTGTCATAAGCTGATAC
<i>LsKS</i>	ACTGTCATGACCCCTTGATGTGA	CCATCATCAAGCTGATTATCCAGTA
<i>LsKO1</i>	GGCTATGGTGACCAGATTCGA	TGAGCAGCTGGTCCTAGGATACTA
<i>LsKO2</i>	AGGATGTTGAAAGCATATACGTGAAG	GGGACCCACTTGAGATAIGGA
<i>LsKAO</i>	GAAACATGTGGTCTTTCCTCAGA	TCGGGAACAGTCACGATGA
<i>LsGA20ox1</i>	GACCTAGAGGTTCCCTTGATAGACTTG	AGTCCATGTATGTTTGAGCATCAGA
<i>LsGA20ox2</i>	GAACTTGCAGTTCCTTAGTTGACCTA	AGGTCCATGTACCTATGAGCATCTAC
<i>LsGA3ox2</i>	GCACTTGTGGTAAATATAGGTGACTTG	GGTGGGCCATAGAGATAAGCTACA
<i>LsGA2ox1</i>	ACCACCATTGAGCGAGAAGATAG	TATCCGCCAATCTTGATTTAAATGC

第5章

総括

レタス種子は、それを用いた実験により光発芽という現象が発見され (Borthwick et al., 1952)、さらにこの光可逆的な発芽制御がフィトクロム発見の端緒となったばかりではなく (Butler et al., 1959)、それ以来、その光発芽に関しては、植物ホルモンである ABA や GA の関与も含めて、様々な分野において多くの研究が行われてきた。本博士論文研究は、このように伝統的なレタス種子を材料として、光発芽制御における ABA の機能について追究したものである。

本博士論文研究では、まず、レタスの *NCED* と *ABA8ox* 遺伝子を同定し (1章)、それらの発現解析等により、レタス種子ではフィトクロムによって *LsNCED2* と *LsNCED4* の発現が負に、*LsABA8ox4* の発現が正に制御されることを通して ABA 内生量が負に制御されるという可能性を示した (2章)。その中でも、*LsNCED4* の発現のフィトクロムによる制御には GA を介した経路と介さない経路があることも示唆した (2章)。さらに、レタス種子内の ABA 内生量は、胚軸側で子葉側よりも多く減少しており、それには胚軸側における *LsNCED2* と *LsNCED4* の発現量の減少と *LsABA8ox4* の発現量の増加が関与する可能性が示された (3章)。一方、ABA により、胚軸側における GA 生合成酵素遺伝子 *LsGA3ox1* の発現が負に、GA 不活性化酵素遺伝子 *LsGA2ox2* の発現が正に制御され、その結果として GA 内生量を負に制御するという機構が部分的に存在する可能性も示唆された (4章)。以上のように、レタス種子においては、GA ばかりでなく ABA 内生量も代謝酵素遺伝子の発現を通して光により制御されていることが明らかになり、さらに、そこには、それぞれ拮抗的に互いの内生量を調節しあう機構も含まれているという可能性が示唆された (図 5-1)。

ところで、シロイヌナズナは、代表的なモデル双子葉植物であり、1990 年代から主に遺伝学的解析手法を用いて、植物の生活環を通して生長、発達を制御する様々な遺伝子の機

能が解明されてきた。しかも、レタスと同様に、その種子も光発芽性を示すことから、突然変異体や遺伝子組換え体を用いた解析により、これまでにフィトクロム分子種ファミリーや ABA と GA 代謝酵素遺伝子の特徴付け等が行われ、光発芽制御機構において重要な知見を提供してきている (Shinomura et al., 1996 ; Yamaguchi et al., 1998, 2001 ; Ogawa et al., 2003 ; Okamoto et al., 2006 ; Seo et al., 2006 ; Oh et al., 2007 ; Yamauchi et al., 2007)。

レタス種子と同様に、シロイヌナズナ種子においても ABA 代謝酵素遺伝子である *NCED* と *ABA8ox* の発現はフィトクロムにより制御され、それを通して ABA 内生量は減少することが最近報告されており (Seo et al., 2006)、このような事象は光発芽種子に普遍的だと考えられた。ところが、レタス種子ではフィトクロムによる *LsNCED4* の発現制御には GA を介する経路と介さない経路があり、*LsNCED2* と *LsABA8ox4* の発現は GA を介さない経路で制御される可能性が示されたが、シロイヌナズナ種子の場合では、フィトクロムにより制御される *AtNCED6*、*AtNCED9* と *AtCYP707A2* (シロイヌナズナの *ABA8ox*) の発現は、*LsNCED4* と同様に GA を介する経路と介さない経路、両方で制御されると考えられている (Seo et al., 2006 ; Oh et al., 2007)。これにより、光発芽種子における ABA 代謝酵素遺伝子の詳細な発現制御機構は植物種によって異なると考えられた。また、レタス種子では、フィトクロムによる *LsGA3ox1* の正の制御と *LsGA2ox2* の負の制御は ABA により負の影響を受け、*LsGA3ox2* の正の制御は影響を受けなかったが、シロイヌナズナ種子においては、*GA2ox* に関する知見はないものの、主に発現している 2 種の *GA3ox* の発現は ABA により負の影響を受けた (Seo et al., 2006)。このように、光発芽種子において ABA が GA 代謝酵素遺伝子に与える影響の詳細は種によって異なったが、ABA が GA 内生量に負の影響を与えることは普遍的な事象と考えられた。

ABA 生合成酵素遺伝子の種子内での組織レベルの発現については、シロイヌナズナでは *NCED* に関する報告はないものの、プロモーター:レポーター遺伝子アッセイにより *AtSDR* と *AtAAO3* の発現は根原基付近で検出されており (Seo et al., 2006)、レタス種子の胚軸側で

主に見られた *LsNCED2*, 4 の発現と良い相関はみられた。ところが、ABA 不活性化酵素遺伝子 *AtCYP707A2* の発現は *in situ* ハイブリダイゼーションにより胚軸原基の皮層と胚乳部分で検出され (Okamoto et al., 2006)、レタスの *LsABA8ox4* の発現は胚軸側だけではなく、子葉側でも同程度発現がみられたこととは異なり、ABA 不活性化酵素遺伝子の種子内の組織レベルでの発現制御は植物種によって異なると考えられた。このように遺伝学的手法を適用できるばかりではなく、ABA 代謝酵素遺伝子発現レベルが比較的高かったシロイヌナズナにおいては、遺伝子発現の詳細な組織レベルでの情報はあるものの、ABA そのものの局在に関する知見はなく、本博士論文ではレタス種子における ABA 減少部位に関して情報を示した。その情報は、種子を二分しただけでおおまかなものではあったが、ABA 内生量のフィトクロムによる負の制御について組織レベルで示した最初の報告となった。レタス種子では、R 処理による ABA 内生量減少量は、子葉側での減少は *LsABA8ox4* の発現量増加が関与し、胚軸側の方が子葉側よりも多いのは、胚軸側では *LsABA8ox4* の発現量増加に加えて、*LsNCED2*, 4 の発現量が減少しており、そのことが主に関与すると考えられ、ABA 内生量減少と代謝酵素遺伝子の発現パターンは良い相関を示した。シロイヌナズナ種子の子葉では ABA 代謝酵素遺伝子の発現制御はみられないが、Laser Microdissection 法 (Nakazano et al., 2003) 等による詳細な試料調製や高感度 ABA 分析法を通して ABA の局在に関する情報が近い将来得られると、両種子の詳細な比較ができると期待できる。一方、ABA と互いに拮抗的に作用する GA については、その内生レベルの低さから、両種子とも組織レベルで分析されていないが、その代謝酵素遺伝子の組織レベルでの発現については両種子間で良い相関がみられた。レタス種子では *LsGA3ox1*, 2 と *LsGA2ox2* の発現とその制御が胚軸側でみられることが示されたが、シロイヌナズナ種子では、*in situ* ハイブリダイゼーションやプロモーター:レポーター遺伝子アッセイにより *AtGA3ox1*, 2 と *AtGA2ox2* の発現が胚軸原基の皮層でみられることが示されている (Yamaguchi et al., 2001 ; Yamauchi et al., 2007)。このように両種子において、胚軸側で ABA や GA の内生量が調節されることが発芽制御において

特に重要であることと考えられ、この事象は光発芽種子だけではなく、他の種子においても普遍的であると予想された。さらに、レタス種子の胚軸では、発芽誘導のための赤色光受光部位 (Inoue and Nagashima, 1991) がみられるだけではなく、グルタミン、グルタミン酸の増加による growth potential 増大やその起因となるグルタミン合成酵素活性の増加 (Takeba, 1983 ; 1984)、など生化学的事象もみられ、上の可能性を支持するといえる。このようなレタス種子における組織レベルでの一連の知見が古くから得られていたのは、レタス種子の長さが 5 mm 程度で、シロイヌナズナなどの光発芽性を示す他の植物種の種子と比べ大きく、さらに種子内の胚の形状も他の種子のような湾曲したものではなく、まっすぐなものである (図 3-1-A) という特徴によるものである。本博士論文では、このようなレタス種子の特徴を活かしてシロイヌナズナでも得られていなかった ABA の組織レベルでの分布に関する知見を初めて提供したことになる。

以上、本博士論文研究では、レタス種子における ABA の内生量の光による制御機構あるいは制御部位、さらには ABA と GA との相互作用について、その一部を明らかにした。本研究により得られた成果は、光発芽機構の解明研究に重要な知見を与えただけでなく、複雑な種子発芽機構解明研究の基盤となることが期待される。

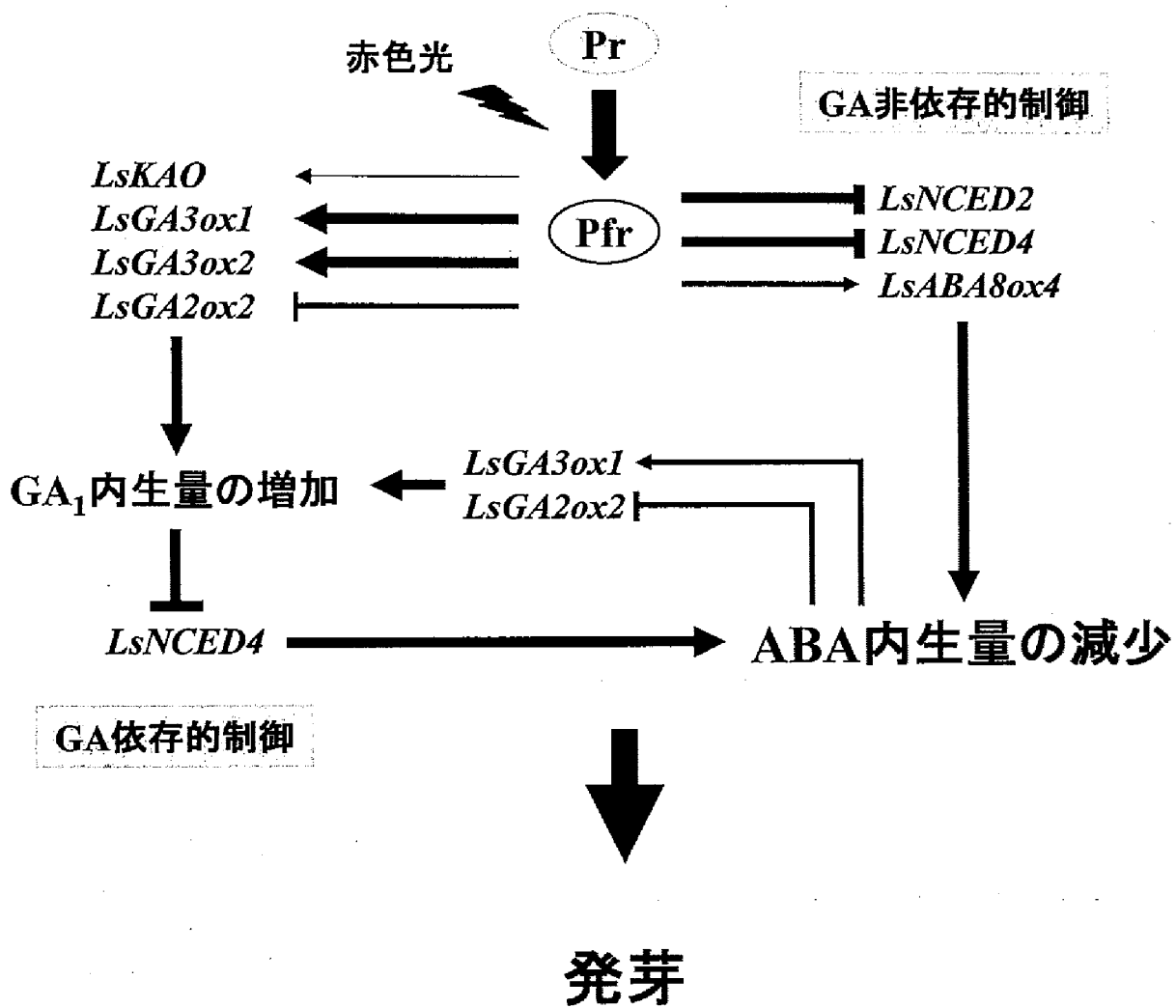


図5-1 レタス種子における光によるあるいはGAとの相互作用によるABA内生量制御

引用文献

Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* 38: 662-666

Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 1703-1708

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip, a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743

Hanzawa H, Inomata K, Kinoshita H, Kakiuchi T, Jayasundera KP, Sawamoto D, Ohta A, Uchida K, Furuya M (2001) In vitro assembly of phytochrome B apoprotein with synthetic analogs of the phytochrome chromophore. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3612-3617

Hedden P, Thomas SG (2006) PLANT HORMONE SIGNALING *Annual Plant Reviews* 24, Blackwell publishing, UK

Ikuma H, Thimann KV (1960) Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. *Plant Physiol* 35: 557-566

Inoue Y (1990) Role of gibberellins in phytochrome-mediated lettuce seed germination. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J (eds) *Gibberellins*. Springer-Verlag, New York, pp 289-295

Inoue Y, Nagashima H (1991) Photoperceptive site in phytochrome-mediated lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) seed germination. J Plant Physiol 137: 669-673

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant J 27: 325-333

Izumi, K., Kamiya, Y, Sakurai, A., Oshio, H. and Takahashi, N. (1985) Studies of sites of action of a new plant growth retardant (*E*)-1-(4-chlorophenyl)-4, 4-dimethyl-2-(1, 2, 4-triazol-1-yl)-penten-3-ol (S-3307) and comparative effects of its stereoisomers in a cell free system of *Cucurbitis maxima*. Plant Cell Physiol. 29: 821-827

Kahn A (1968) Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. Science 125: 645-646

Kahn A, Goss JA (1957) Effect of gibberellin on germination of lettuce seed. Science 125: 645-646

Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y (1997) Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. J Biol Chem 272: 21706-21712

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T,

Kamiya Y, Nambara E (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encode ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23: 1647-1656

Leng J, Marion-Poll A (2006) PLANT HORMONE SIGNALING Annual Plant Reviews 24, Blackwell publishing, UK

Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859-863

Nakaminami K, Sawada Y, Suzuki M, Kenmoku H, Kawaide H, Mitsuhashi W, Sassa T, Inoue Y, Kamiya Y, Toyomasu T (2003) Deactivation of gibberellin by 2-oxidation during germination of photoblastic lettuce seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1551-1558

Nakazano M, Qiu F, Borsuk AL, Schnable SP (2003) Laser-Capture Microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of Maize. *Plant Cell* 15: 583-596

Nambara E, Naito S, McCourt P (1992) A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *Plant J* 2: 435-441

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15:1591-1604

Oh E, Ymaguchi S, Hu J, Jikumaru Y, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun Tp, Kamiya Y, Choi G (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 19: 1192-1208

Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E (2006) *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 97-107

Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol* 272: 51-64

Saika H, Okamoto M, Miyoshi K, Kushiro T, Shinoda S, Jikumaru Y, Fujimoto M, Arikawa T, Takahashi H, Ando M, Arimura S, Miyano A, Hirochika H, Kamiya Y, Tsutsumi N, Nambara E, Nakazono M (2007) Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant Cell Physiol* 48: 287-98

Saito S, Okamoto M, Shinoda S, Kushiro T, Koshiba T, Kamiya Y, Hirai N, Todoroki Y, Sakata K, Nambara E, Mizutani M (2006) A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1731-1739

Sankhla N, Sankhla D (1968) Reversal of (\pm)-abscisic acid II-induced inhibition of lettuce seed germination. *Physiol Plant* 21: 190-195

Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaert JAD, McCarty DR (1997). Specific oxidative cleavage of

carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874

Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun Tp, Koshiha T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* 48: 354-366

Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 8129-8133

Takeba G (1980a) Changes revealed by a tracer technique in the amino acid metabolism of thermodormant and non-dormant New York lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 21: 1627-1638

Takeba G (1980b) Accumulation of free amino acids in the tips of non-thermodormant embryonic axes accounts for the increase in the growth potential of New York lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 21: 1639-1644

Takeba G (1980c) Effects of temperature, red light and hormones on the accumulation of free amino acids in osmotically growth-inhibited embryonic axes of New York lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 21: 1645-1649

Takeba G (1980d) Phytochrome-mediated accumulation of free amino acids in embryonic axes of New York lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 21: 1651-1656

Takeba G (1983) Phytochrome-mediated increase in glutamine synthetase activity in photosensitive New York lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 24: 1477-1483

Takeba G (1984) Effect of gibberellic acid on glutamine synthetase activity in two varieties of lettuce seeds, New York 515 and Grand Rapids . *Plant Cell Physiol* 25: 239-247

Takeba G, Matsubara S (1977) Rapid disappearance of small fat bodies during the early stage of imbibition of lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 18: 1067-1075

Takeba G, Matsubara S (1979) Measurement of growth potential of the embryo in New York lettuce seed under various combinations of temperature, red light and hormones. *Plant Cell Physiol* 20: 51-61

Toyomasu T, Tsuji H, Yamane H, Nakayama M, Yamaguchi I, Murohushi N, Takahashi N, Inoue Y (1993) Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *J Plant Growth Regul* 12: 85-90

Toyomasu T, Yamane H, Murofushi N, Inoue Y (1994) Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 35: 127-129

Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998) Phytochrome regulation gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* 118:

1517-1523

Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, Kamiya Y, Sun Tp (1998) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 10: 2115-2126

Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun Tp (2001) Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 28: 443-453

Yamauchi Y, Takeda-Kamiya N, Hanada A, Ogawa M, Kuwahara A, Seo M, Kamiya Y, Yamaguchi S (2007) Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol* 48: 555-561

Wan CY, Wilkins TA (1994) A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem* 223: 7-12

澤田 義昭 (2003) 山形大学 学士論文

青木 美紀 (2004) 山形大学大学院 修士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご協力をいただきました。ここに、厚く御礼申し上げます。すばらしい研究の場を与えていただきました山形大学農学部生物資源利用科学講座分子細胞生化学研究室の三橋渉教授、直接ご指導いただきました豊増知伸准教授に深く感謝致します。実験全般に渡りご指導していただきました理化学研究所・植物科学研究センター生殖制御研究チームの南原英司氏、立松圭氏に深く感謝します。理化学研究所における実験では軸丸裕介氏、花田篤志氏、篠田祥子氏、原田幸代氏、関本雅代氏には大変お世話になりました。また、貴重なレタス種子試料を提供していただきました東京理科大学の井上康則教授、 d_3 -PA と d_3 -DPA を御供与いただきました National Research Council of Canada の Dr. Suzanne R. Abrams、 d_3 -*epi*-DPA を御供与いただきました京都大学平井伸博教授、実験に用いたベクターを御供与いただきました島根大学中川強助教授に深く御礼申し上げます。研究に御協力いただきました同研究室の中南健太郎氏、青木美紀氏、藤田翔平氏をはじめとした研究室の皆様にも深く感謝します。最後にこれまでの大学生活を全面的に支援してくれた両親と兄弟に深く感謝し、御礼申し上げます。

澤田義昭