

博士論文
2016 年度

京野菜であるミズナとミブナの
形態の多様性の遺伝的背景の解析と来歴の調査

京都産業大学大学院
工学研究科 生物工学専攻

学籍番号；1355043
氏名；川勝 弥一

目次

要旨	4
略語一覧.....	6
総合序論.....	8
第 1 章 ミズナとミブナの葉の形態の多様性の解析	14
1-1. 序論.....	15
1-2. 方法.....	18
1-2-1. 植物の栽培法および葉の形態の定量	18
1-2-2. RNA-seq によるミズナおよびミブナ間の SNPs の特定と CAPS マーカーの作成..	18
1-2-3. RAD-seq によるミズナおよびミブナ間の SNPs の検出.....	19
1-2-4. 連鎖地図の作成と QTL 解析.....	19
1-2-5. RNA-seq による遺伝子発現量の解析.....	19
1-2-6. 各候補遺伝子の PCR 解析およびマーカーの作成.....	20
1-2-7. qRT-PCR による遺伝子発現量の解析	20
1-2-8. 植物ホルモンの網羅的定量分析	21
1-3. 結果.....	26
1-3-1. 葉の形態の観察と形質の定量評価	26
1-3-2. 分子マーカーの開発と連鎖地図の作成	30
1-3-3. QTL 解析による葉形変異に寄与する遺伝子座の特定	30
1-3-4. RNA-seq によるミズナとミブナの遺伝子発現量の網羅的解析	31
1-3-5. 鋸歯に寄与する 7 番染色体の QTL 内における葉形制御候補遺伝子の解析	40
1-3-6. ロープの大きさに寄与する 10 番染色体の QTL 内における葉形制御候補遺伝子の解 析.....	40
1-3-7. 他のミズナとミブナの品種における遺伝子型の解析.....	41
1-3-8. 6 番および 9 番染色体に見られた QTL の解析	50
1-3-9. ミズナにおけるロープの形成とジベレリンとの関連.....	50
1-4. 考察.....	54
1-4-1. ミズナとミブナの葉の形態における QTL 解析.....	54
1-4-2. 次世代シーケンス技術を用いた遺伝子発現パターンおよび各候補遺伝子の解析	54
1-4-3. ジベレリンと葉のロープの形成の関連	55
1-5. 参考文献.....	56
第 2 章 ミズナとミブナのトライコーム形成の解析	62
2-1. 序論.....	63

2-2. 方法.....	65
2-2-1. 植物の栽培法.....	65
2-2-2. トライコームの計測法と連鎖地図の作成.....	65
2-2-3. トライコーム形成の候補遺伝子のマーカー作成.....	65
2-2-4. ミズナおよびミブナにおける <i>BrGL1</i> の qRT-PCR 解析.....	65
2-2-5. <i>BrGL1</i> の分子系統解析.....	65
2-2-6. <i>BrGL1</i> の転写領域下流に対する分子マーカーの作成.....	66
2-3. 結果.....	68
2-3-1. 連鎖地図の作成とミズナとミブナのトライコーム数の違い.....	68
2-3-2. トライコームの本数における QTL 解析と原因遺伝子の特定.....	68
2-3-3. トライコーム形成に寄与する 3 番染色体に見られる QTL.....	69
2-3-4. ミズナおよびミブナの <i>BrGL1</i> の発現量と配列の比較.....	75
2-3-5. 他の <i>B. rapa</i> の品種における <i>BrGL1</i> の遺伝子型とトライコーム数との関連.....	75
2-4. 考察.....	83
2-4-1. ミズナおよびミブナにおけるトライコーム数の QTL 解析.....	83
2-4-2. ミズナおよびミブナにおける <i>BrGL1</i> 転写領域の下流配列の比較および 6 番染色体上の <i>BrGL1</i> の配列.....	83
2-4-3. ミブナにおける <i>BrGL1</i> の対立遺伝子の多様性とトライコーム数との関連.....	83
2-4-4. <i>BrGL1</i> の遺伝的多様性とミブナの来歴について.....	84
2-5. 参考文献.....	85
第 3 章 文献によるミズナとミブナの来歴調査.....	88
3-1. 序論.....	89
3-2. 結果と考察.....	90
3-2-1. ミズナの来歴.....	90
3-2-2. ミズナの葉の形態の記載と壬生地方における栽培について.....	90
3-2-3. ミブナという呼称の成立について.....	90
3-2-4. 丸い葉のミブナの成立.....	94
3-2-5. カブ類との交雑によるミズナの葉形変異.....	95
3-3. 参考文献.....	102
第 4 章 ミブナの葉形の成立とカブ類の関係.....	103
4-1. 序論.....	104
4-2. 方法.....	106
4-2-1. 植物の栽培法.....	106
4-2-2. カブ類の遺伝子型の解析.....	106
4-3. 結果.....	107

4-3-1. 各 <i>B. rapa</i> の品種の葉形.....	107
4-3-2. <i>B. rapa</i> の遺伝子型の解析.....	107
4-3-3. ミズナとカブ類の交雑.....	107
4-4. 考察.....	114
4-5. 参考文献.....	116
総合討論.....	117
謝辞.....	120

要旨

植物の葉は植物の形態を特徴づけている器官であり、特に野菜類は人為的選択等によって近縁であっても葉の形態が大きく異なる事がある。京野菜であるミズナとミブナ (*Brassica rapa* L. subsp. *nipposinica* L. H. Bailey) は近縁でありながら葉形が大きく異なることが知られており、ミズナは特徴的な鋸歯を持つ葉を有している一方で、ミブナは単純なへら型の葉を有している。これだけ形態が異なるものの、ミブナはミズナの栽培過程で生じたと考えられており、同一種内の異なる品種という関係であり交配が可能である。本研究では、このミズナとミブナの形態の多様性について、遺伝的背景の解明を試みた。また、ミズナとミブナは日本で古くから栽培されている伝統野菜であり、古い農学書や本草書などにも記録が多く残されている。そこで、江戸時代から明治時代までに書かれた文献を中心に、ミズナとミブナの来歴や葉形変異の推移について網羅的に調査し、ミズナとミブナの形態の多様性について文化的な側面からも明らかにすることを目指した。

第1章では、ミズナとミブナの葉形変異の遺伝的背景について報告する。ミズナとミブナを交配すると、そのF₁世代の葉は中間形質を示した。このF₁世代を自家受粉させて得たF₂世代の葉形は、複雑なものから単純なものまで、様々な形態を示した。これは、ミズナとミブナの葉形の多様性は複数の遺伝子座が寄与している量的形質であることを示しており、quantitative traits loci (QTL) 解析によって原因遺伝子が特定できると考えられた。本研究では、QTL解析に必要な連鎖地図の作成のためにRNA-seqを行い、ミズナおよびミブナ間でのSNPsを検出してCAPSマーカーを作成した。また、次世代シーケンス技術であるrestriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) も行い、より詳細な連鎖地図の作成を行った。葉の形態の定量法としては、葉の形態の複雑さ、葉の先端の鋸歯の高さ、ローブの深さ、という3つの指標を用いた。F₂世代の葉の形態をこの3つの指標で定量化し、作成したマーカーでジェノタイプピングすることでQTL解析を行った。解析の結果、葉の形態の複雑さにおいては6、7、9、10番染色体に、先端の鋸歯の高さについては6、7、9番染色体に、ローブの深さについては10番染色体にQTLが見られた。さらに、葉の形態の複雑さに見られる3つのQTLは、先端の鋸歯に寄与する2つのQTLおよび、ローブの深さに見られる1つのQTLと一致した。このことから、葉の形態の複雑さは、鋸歯の高さとローブの深さという2つの要素で説明できることが分かり、鋸歯の高さを決定する遺伝子座を3箇所、ローブの深さを決定する遺伝子座を1箇所特定することができた。QTLに座乗する遺伝子についてはRNA-seqにより発現量を測定し、候補遺伝子を推定した。葉形への寄与率が特に高かった7番および10番染色体の候補遺伝子については、ミズナおよびミブナ間での配列の比較を行った。

第2章では、ミズナおよびミブナ間に見られるトライコーム数の差異に関わる原因遺伝子の単離について報告する。ミズナとミブナの葉を観察した結果、ミブナの葉の表面には多数のトライコームが見られる一方、ミズナにはほとんど見られないことが分かった。これらの違いについてもQTL解析を行った結果、9番染色体に寄与率が非常に大きいQTLが見つかった。このQTLについて解析を行った結果、*GLABRA1 (GL1)* の相同遺伝子が、ミズナとミブナのトライコーム数の違いに関する原因遺伝子として特定できた。

第3章では、ミズナとミブナの来歴と葉形変異の推移について、江戸時代から明治時代にかけての文献を中心に行った調査の結果について報告する。農学書や本草書などの文献におけるミズナ及びミブナの葉形、あるいは形態に関する記述を網羅的に調査した結果、丸い葉のミブナが誕生したのは1800年代中頃と推察できた。さらに、丸い葉のミブナが誕生した原因は、ミズナとカブ類とが交雑したことがきっかけであったと推察された。

これを受けて第4章では、カブ類の遺伝的解析を行った。主に近畿圏で栽培されているカブ類を対象にして、第1章で同定された葉形の決定に関わるQTL付近のマーカーを用いてジェノタイピングを行った結果、特に6番染色体のQTL付近において、カブ類はミブナ型の遺伝子型を有している場合が多いことが分かった。これは、カブ類がミブナの誕生に関わっていた可能性を示唆している。

本研究では、遺伝的解析をもとにミズナとミブナにおける形態の多様性の遺伝的背景を明らかにすることができた。また、農学書や本草書などの記録からミズナとミブナの来歴を明らかにし、葉の形態が変化した年代を特定した。栽培植物の育種に伴う形質変化について、遺伝的背景と歴史的な背景を合わせて明らかにした例は珍しく、本研究により得られた知見は、生命科学のみならず人文科学的にも意義が大きいと考えられる。

略語一覽

AFLP	amplified fragment length polymorphism
AS	<i>ASYMMETRIC LEAVES</i>
<i>Aux/IAA</i>	<i>Auxin/indole-3-acetic acid</i>
<i>B. carinata</i>	<i>Brassica carinata</i>
<i>B. juncea</i>	<i>Brassica juncea</i>
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
<i>B. nigra</i>	<i>Brassica nigra</i>
<i>B. oleracea</i>	<i>Brassica oleracea</i>
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i>
bHLH	basic helix loop helix
BLAST	basic local alignment search tool
<i>BLH</i>	<i>Bel1-like homeodomain</i>
bp	base pair
<i>BP</i>	<i>BREVIPEDICELLUS</i>
CIM	composite interval mapping
<i>CIN</i>	<i>CINCINNATA</i>
<i>CPC</i>	<i>CAPRICE</i>
cpm	Counts per million
CTAB	cetyl trimethyl ammonium bromide
<i>CUC</i>	<i>CUP SHAPED COTYLEDON</i>
<i>CYC</i>	<i>CYCLOLOIDEA</i>
DI	Dissection Index
DNA	deoxyribonucleic acid
e	entire
<i>EGL</i>	<i>ENHANCER OF GLABRA</i>
<i>EPFL</i>	<i>EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE</i>
<i>ER</i>	<i>ERECTA</i>
<i>ETC</i>	<i>ENHANCER OF TRY AND CPC</i>
<i>FIL</i>	<i>FILAMENTOUS FLOWER</i>
<i>FLC</i>	<i>Flowering Locus C</i>
GA	Gibberellin
<i>GA20ox3</i>	<i>gibberellin 20-oxidase 3</i>
<i>GL</i>	<i>GLABRA</i>
HD-ZIP III	Class III Homeodomain Leucine Zipper

<i>KAN</i>	<i>KANADI</i>
<i>KNAT</i>	<i>Kn1-like in Arabidopsis thaliana</i>
<i>KNOX</i>	<i>KNOTTED1-like</i>
LG	linkage group
LOD	Logarithm of odds
<i>MAW</i>	<i>MAEWEST</i>
Mb	mega base
miR	micro RNA
<i>PCF</i>	<i>PROLIFERATING CELL FACTORS</i>
PCR	polymerase chain reaction
<i>PHB</i>	<i>PHABULOSA</i>
<i>PHV</i>	<i>PHAVOLUTA</i>
<i>PIN</i>	<i>PINFORMED</i>
QTL	quantitative traits loci
RAD-seq	restriction site-associated DNA sequencing
RAPD	random amplified polymorphic DNA
<i>RCO</i>	<i>REDUCED COMPLEXITY</i>
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
SAM	shoot apical meristem
<i>SAW</i>	<i>Sawtooth</i>
SSR	simple sequence repeat
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
<i>TBL</i>	<i>TRICHOME BIREFRINGENCE-like</i>
<i>TBR</i>	<i>TRICHOME BIREFRINGENC</i>
<i>TCL</i>	<i>TRICHOMELESS</i>
<i>TRY</i>	<i>TRIPTYCHON</i>
<i>TTG1</i>	<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA</i>
<i>WOX</i>	<i>WUSCHEL related homeobox</i>
<i>YAB</i>	<i>YABBY</i>
<i>ZFP</i>	<i>Zinc finger protein</i>

総合序論

生物の形態の多様性がどのように生じたのかを明らかにすることは、生物学の命題の一つである。生物の一つの分類群である植物では、葉の形がその植物の形態をもっとも特徴づけていると言える。植物の葉は葉身、葉柄、葉脈などの部分を持ち、それらの大きさや配置パターンによって様々な形態を示す。その中でも最も基本的な構成要素である葉身は、先端、脚部、葉縁などが様々な形態を示し、多様な形態が生じている。葉は植物の光合成器官であるため、その形態や配列の仕方は、日照条件、平均気温、降雨量などの環境条件によって様々な進化・多様化してきたと考えられる。環境適応の他にも、育種のために有用な形質を残すため、あるいは観葉植物として利用するためなど、人為的に選択されることでも多様化が生じたと考えられる。

人為選択による形態の多様化が顕著なものとして、野菜類が挙げられる。野菜類などの栽培植物は、育種などの過程で人為的に選択されることで、品種間・変種間などの比較的近縁なもの間でも大きな形態の差異が見られることが多い。野菜類の葉の形態の多様性を解析することは、自然に見られる葉の形態の多様性を解析するモデルケースとして利用できる他、育種の歴史を明らかにするという点でも重要である。

本研究では、葉の形態の多様性を解析するためのモデルケースとして、京都の伝統野菜であるミズナとミブナ (*Brassica rapa* L. subsp. *nipposinica* L. H. Bailey) に注目した (Artemyeva et al., 2011)。ミズナは特徴的な鋸歯のある葉縁を有している一方で、ミブナは単純な丸い葉を有している (Fig. 1)。これらの葉の形態は全く異なるが、互いに同一種内の異なる品種の関係で交配が可能である。現在でもミズナとミブナの両方を指して「ミズナ」と称されることがあり、区別が必要な際には「丸葉水菜」という呼称も使用される (菊池, 2006)。これは、ミズナとミブナが互いに近い関係にあることを反映していると考えられる。ミズナとミブナの葉の形態の多様性における遺伝的背景が明らかになれば、ミズナの葉の鋸歯のような特徴的な形の形態形成メカニズムが明らかになると期待できる。

ミズナおよびミブナが属する *Brassica* 属 (アブラナ属) は、世界中で栽培されている野菜類の中で重要な属のひとつあり、多くの研究がなされている。二倍体の *Brassica* 属には *Brassica rapa* (*B. rapa*; n=10)、*Brassica nigra* (*B. nigra*; クロガラシ; n=8)、*Brassica oleracea* (*B. oleracea*; キャベツ; n=9) の3つが知られており、これらはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から分岐する際に6倍体化したことが知られている (Lysak et al., 2005; Town et al., 2006)。また、複二倍体の *Brassica* 属として *Brassica juncea* (*B. juncea*; カラシナ; n=18)、*Brassica napus* (*B. napus*; セイヨウアブラナ; n=19)、*Brassica carinata* (*B. carinata*; アビシニアガラシ; n=17) が知られており、それぞれ *B. rapa* と *B. nigra*、*B. rapa* と *B. oleracea*、*B. nigra* と *B. oleracea* が交配することによって誕生したことが知られている (U, 1935)。ミズナおよびミブナが属する *B. rapa* は特に東アジアにおいてもっとも重要な野菜のひとつで、作物として様々な利用されている。例えば葉菜類として利用されるハクサイやチンゲンサイ、根菜類として利用されるカブ類、食用油として利用されるオイルシードなどはすべて *B. rapa* に含まれ、このような多様性は育種によって人為的に生じたと考えられる。こういった作物としての有用性から、*B. rapa* は多くの研究者が注目しており、既に *B. rapa* ssp. *pekinensis* (ハクサイ) のゲノム配列が明らかにされている (Wang et al., 2011)。また、分子マーカーも多数開発されており、amplified fragment length polymorphism (AFLP)、random amplified

polymorphic DNA (RAPD)、 simple sequence repeat (SSR) マーカーなどを用いた解析や quantitative traits loci (QTL) 解析が多数行われている (Suwabe et al., 2002; Lowe et al., 2004; Suwabe et al., 2004; Tsuro et al., 2005; Suwabe et al., 2006; Choi et al., 2007; Ling et al., 2007; Kim et al., 2009)。QTL とは量的形質座位のことで、ヒトの身長やイネの収量など、数や量で計測される形質に寄与する遺伝子座位のことをいう。*B. rapa* に関する QTL 解析の先行研究では、3 つの異なる集団を用いた QTL 解析の結果から、花芽形成、種子の大きさ、葉の形、根の太さ等に関する QTL が 29 個特定され、花芽形成については *Flowering Locus C (FLC)* のホモログが原因遺伝子として推定されている (Lou et al., 2007)。他にも、種皮の色とトライコーム形成に寄与する遺伝子として、*TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)* のホモログが単離されている (Zhang et al., 2009)。このように *B. rapa* については、QTL 解析などによる形質関連遺伝子座の同定や原因遺伝子の特定に関する研究が多く発表されており、技術的にはミズナやミブナについても同様の手法を適用することが可能である。よって *B. rapa* のゲノム情報などの研究基盤を利用し、QTL 解析を行うことによって、ミズナとミブナの育種による葉の形態変化の遺伝的背景を明らかにできると考えた。

本研究ではミズナとミブナの遺伝的解析の他、来歴 (原産地や伝来の過程) の調査も行った。ミズナやミブナは、漬け菜 (葉を漬物にして食べる野菜) として日本で古くから栽培されてきたが、来歴については原産地も含めてほとんど明らかとなっていない。ミズナの来歴については不明な点が多いが、種皮型に関する研究から、ミズナは日本独特のものであるという説がある (青葉, 1964, 1981, 2013)。*B. rapa* には A 型と B 型という 2 つの種皮型があり、種子を水没させた際にゼリーの層が見られる種子を A 型、見られない種子を B 型という。ミズナとミブナの種皮型は A 型である一方で、中国原産のカブ類や漬け菜類は B 型種皮を有している。このことから、A 型種皮は日本で独自に誕生した形質であると考えられている (青葉, 1964, 1981, 2013)。また、東日本で栽培されているカブ類も、中国のカブ類同様 B 型種皮を有しているものが多い (青葉, 1964, 1981, 2013)。日本のカブ類はもとも中国またはヨーロッパより渡来してきたことが分かっており、西日本で育てられている A 型種皮を持つカブは、ミズナ (もしくはその原種) との交雑により生じたと考えられている (青葉, 1964, 1981, 2013)。また、分子系統解析からも、ミズナとミブナは近縁であるが、他の *B. rapa* とはやや離れたところに分類されることが示されている (Takuno, et al., 2006)。これらの来歴に関する研究の結果から、ミズナとミブナは日本独特の野菜であると考えられる。

一方で、ミズナ及びミブナは伝統野菜であることから、農耕や出版の技術が発達した江戸時代ごろから、比較的多くの記録が残されている。1787 年に刊行された『拾遺都名所図会』にはミブナの栽培の様子が描かれており、京都の壬生地方の名産であることからミブナ (壬生菜) と呼ばれるという記述がある。ここには壬生地方におけるミブナの栽培について描かれているが、ここで描かれているミブナの画はミズナのような切れ込みのある葉が描かれている (Fig. 2)。このことから、当時のミブナの葉の形態は現在のミズナに近かったと考えられ、現在のミブナのような丸葉がいつ成立したもののかわかりかにされていなかった。そこで本研究では、ミズナからミブナが分化したといわれている江戸時代から明治時代の農業書や本草書の記録を調査することで、ミズナとミブナの育種の歴史を明らかにすることを試みた。本研究によってミズナとミブナの葉の形態の多様性について、遺伝的解析と

文献調査の結果の双方を統合してミズナとミブナの育種の歴史を明らかにすることができれば、植物科学の観点からのみならず、文化的にも大きな意義があると考えられる。

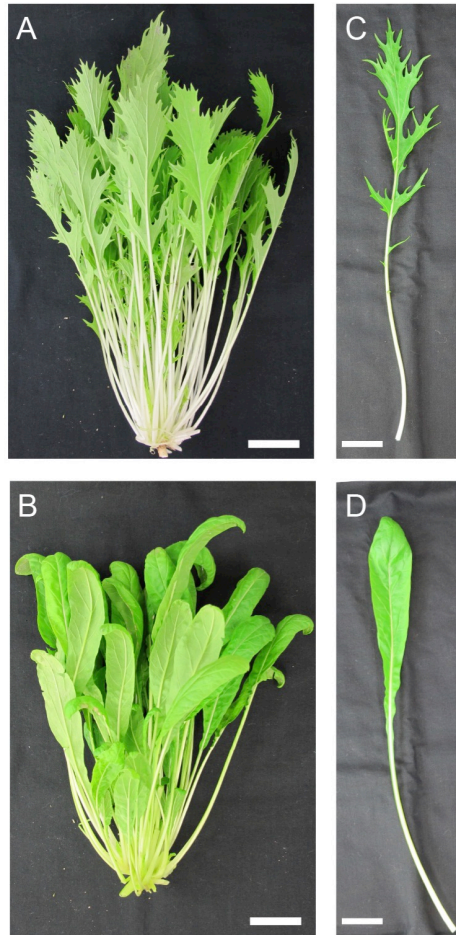


Figure 1 ミズナとミブナの形態

4ヶ月育てたミズナ（京みぞれ）（A）とミブナ（京錦）（B）の植物体と、典型的な葉の例（ミズナ；C、ミブナ；D）。スケールバー；5 cm（A, B）、3 cm（C, D）。



Figure 2 拾遺都名所図会 卷之一 「壬生肆社」 1787年 (早稲田大学古典籍総合データベース)

第 1 章

ミズナとミブナの葉の形態の多様性の解析

1-1. 序論

植物の葉は、多分化能を持つ細胞群である茎頂分裂組織 (shoot apical meristem; SAM) から分化する器官であり、開始 (initiation)、形態形成 (morphogenesis)、分化 (differentiation) の3つの段階によって形成される (Dengler and Tsukaya, 2001)。葉の形成に関するメカニズムについては、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究から様々な報告がある。まず、葉が分化する茎頂分裂組織においては、植物で初めて単離された Class I ホメオボックスタンパク質である *KNOTTED1-like* (*KNOX*) が発現している (Chuck et al., 1996)。*KNOX* は茎頂分裂組織を維持する機能があり、MYB ドメインタンパク質である *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) によって発現が抑制されることで、茎頂のみに発現が制限されている (Tsiantis et al., 1999; Byrne et al., 2000)。*AS1* の補因子としては *AS2* が知られており、これらはヘテロダイマーを形成することで機能する (Ori et al., 2000; Xu et al., 2003)。Class I *KNOX* は強発現または異所的な発現をすることによって葉の形態が複雑化することが知られており (Chuck et al., 1996)、シロイヌナズナでは *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)、*BREVIPEDICELLUS* (*BP*)、*Kn1-like in Arabidopsis thaliana 2* (*KNAT2*)、*KNAT6* という4つの Class I *KNOX* が報告されている (Hay and Tsiantis, 2010)。*KNOX* は TALE ホメオドメインを有しており、同じく TALE ドメインを有している *Bel1-like homeodomain* (*BLH*) と直接結合する。*BLH* は MEINOX ドメインを介して *KNOX* と直接結合して核内に局在させる機能を持ち、シロイヌナズナの *BLH* である *SAWTOOTH 1, 2* (*SAW1, 2*) が両方欠損すると葉の形態が複雑化することが知られている (Smith et al., 2002; Kumar et al., 2007)。

茎頂から葉が分化する際には、茎頂のある領域にオーキシンが限局し、そこから葉が分化する。このオーキシンの局在は、*PINFORMED1* (*PIN1*) という膜輸送タンパク質によって生じる (Hay et al., 2006)。*PIN* はオーキシン輸送体で、細胞群の特定の一面だけに発現してオーキシンを排出することで、組織内でオーキシンが一方方向に輸送される。続いて起こる葉の形態形成においても、オーキシン関連遺伝子が寄与することが知られている。例えば、葉の形態形成には葉の縁における伸長が重要な要素であり、ここでも *PIN* タンパク質とオーキシンが機能することが知られている。*PIN1* は葉の縁に沿って発現することでオーキシンの局在が生じ、その収束地点で鋸歯の形成が起こる (Hay et al., 2006)。他にも *Auxin/indole-3-acetic acid* (*Aux/IAA*) family である *IAA9* は、オーキシンシグナルの抑制因子として働くと考えられており、トマトの *entire* (*e*) 変異体では *IAA9* の欠損により葉の形態が単純化する (Wang et al., 2005)。

葉の形態形成には、オーキシン以外の植物ホルモンも寄与している。トマトを用いた研究から、ジベレリンは葉の成熟速度を早め、葉の形態をより単純な形にすることが知られている (Hay et al., 2002)。また、半水生植物である *Rorippa aquatica* では、形成する葉の形態が温度によって変化することが知られており、25°C で育てた場合では単純な葉を形成する一方で、20°C では複雑な葉を形成する。しかし、ジベレリンを添加して育てると、20°C で生育させても単純な葉を形成することが知られている (Nakayama et al., 2014)。

このように、葉の形態形成に寄与する遺伝子や因子は多く報告されているが、自然に見られる形態

の多様性に関して遺伝的背景を解明した例は少ない。形態形成に関する研究はシロイヌナズナなどのモデル植物を用いた研究に集中しており、多様な植物を対象にした研究は、あまり行われていないことが原因である。自然に見られる植物の形態の多様性の研究としては、トマトの葉の研究がある。トマト属である *Solanum cheesmaniae* は、近縁種である *S. galapagense* と比較して単純な葉を有している。この多様性は、*PETROSELINUM/TOMATO KNOX-LIKE HOMEODOMAIN PROTEIN 1 (PTS/TK1)* という遺伝子に起因している。*S. galapagense* では *PTS/TK1* の上流配列が一塩基欠失しており、これによって発現量が増加している。*PTS/TK1* は *KNOX* と競合して *BLH* と結合し、*BLH* の発現を増幅させることによって葉の形態を複雑化すると考えられている (Kimura et al., 2008)。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は単純な葉を有しているが、近縁種である *Cardamine hirsuta* は複葉を有している。この形態の多様性には *REDUCED COMPLEXITY (RCO)* ホメオドメインタンパク質という、小葉の間における葉の伸長を抑制する機能を有する因子が寄与していることが知られている。この *RCO* は *LATE MERISTEM IDENTITY 1 (LMI1)* のホモログであることが知られており、アブラナ科の祖先がシロイヌナズナから分岐して二倍体化した後にシロイヌナズナからは失われたと考えられている (Mad et al., 2014)。さらに、ワタ (*Gossypium hirsutum*) の葉には Okra leaf と呼ばれる葉身が細い品種が知られている。Fine mapping による解析の結果、Okra leaf の原因遺伝子は、上述した *LMI1* のホモログである可能性が高いことが示されている (Zhu et al., 2016)。

ミズナおよびミズナが含まれる *B. rapa* についても、品種における形態の多様性の解析が行われている。QTL 解析の結果から、ハクサイのような結球した形態をつくるには、*TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF (TCP)* が寄与していることが明らかになった (Yu et al., 2013; Liang et al., 2016)。*TCP* family には *CINCINNATA (CIN)*、*PROLIFERATING CELL FACTORS (PCF)*、*CYCLOLOIDEA (CYC)* という 3 つのグループが知られており、*CIN* family はマイクロ RNA である miR319 によって発現調節されていることが知られている (Martín-Trillo and Cubas, 2010)。*CIN* は葉の形態形成に寄与していることが知られており、キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) の *cin* や、シロイヌナズナの *jaw-D* は、それぞれ *CIN* 遺伝子の欠損と、miR319 の過剰発現によって、葉の形態形成に異常が生じることが知られている (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003)。また、*TCP14, 15* の二重変異体は、シロイヌナズナにおいて葉の形態に寄与することが知られている (Kieffer et al., 2011)。*TCP* は細胞分裂を促進させる機能があり、強く発現することによって葉の縁の形態やひだの形成に寄与すると考えられている。

B. rapa の葉の形態に寄与する QTL 解析についても先行研究があり、葉身の深い切り込みによって形成されるローブの形成には 10 番染色体の QTL が寄与するという報告がある (Li et al., 2009; Kubo et al., 2010)。Li らの 2009 年の研究では、この原因遺伝子として、*gibberellin 20-oxidase 3 (GA20ox3)* のホモログがローブの形成に寄与していると報告している (Li et al., 2009)。*GA20ox3* は植物ホルモンであるジベレリンの合成に関与する遺伝子で (Hedden and Phillips, 2000)、花芽において *GA20ox1,2* によるフィードバック調節を受けることなどが知られている (Plackett et al., 2012)。ジベレリンは葉の形態を単純化するため、ジベレリン合成の関連遺伝子は葉の形態の多様性

におけるローブの形成に重要な機能を有している可能性がある。一方で別の研究では、同じローブに寄与する 10 番染色体の QTL の原因遺伝子として、前述した *LM11* のホモログを挙げている (Ni et al., 2014)。*LM11* は茎頂を維持する機能を有し、花芽形成にも寄与することが知られている (Saddic et al., 2006)。

本章では、QTL 解析によりミズナとミブナの葉の形態の違いを決定している染色体領域を検出した。ミズナとミブナを交配して得られた F_2 世代について葉の形態を定量し、QTL 解析を行った。得られた QTL に座乗する遺伝子については発現量を解析し、ミズナおよびミブナ間で発現量が異なる遺伝子を特定した。この中で先行研究より葉の形態形成に関わることが知られている遺伝子のホモログを検索し、候補遺伝子とした。各候補遺伝子についてはミズナ及びミブナの間で配列の比較を行い、QTL 解析に用いたものとは異なるミズナおよびミブナの品種についても遺伝子型の解析を行うことで、ミズナとミブナの葉形変異の原因遺伝子の特定を目指した。

1-2. 方法

1-2-1. 植物の栽培法および葉の形態の定量

ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) の種子は、タキイ種苗株式会社から購入したものを利用した。培養土には、くみあいニッピ園芸培養土 1 号 (日本肥料株式会社) を使用し、京都産業大学の温室 (23°C) で育てた。また、その他のミズナおよびミブナの品種についても、種苗会社から購入したものをを用いた (Table 1)。

花芽形成を誘導するために、3 週間育てた後に春化处理 (40 日、4°C) を行った。ミブナの雌しべにミズナの花粉を受粉させて F₁ 世代をつくり、F₁ 世代を自家受粉させることで F₂ 世代を得た。本研究で用いた F₂ 世代は、母方がミブナ、父方がミズナである F₁ 世代からつくった。

F₂ 世代の植物は、2013 年 6 月 22 日に 55 個体の、6 月 24 日に 44 個体の F₂ 世代の種子を播種した。ゲノム DNA は本葉から抽出した。さらに RAD-seq 解析のために、82 個体の F₂ 分離集団を用いた。2014 年の 6 月 30 日に 27 個体、7 月 7 日に 34 個体、7 月 17 日に 21 個体、それぞれ播種した。ゲノム DNA は cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法を用いて抽出した (Chen et al., 2014)。

播種 4 週間後の植物の本葉について、葉の形態の定量を行った。Dissection Index (DI; 葉の周りの長さ/葉の面積) は、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて算出した。葉の先端の鋸歯については、葉の先端の鋸歯の幅を、鋸歯の高さで割ることによって定量した。ローブについては、切れ込みの深さを 4 段階に分類 (切れ込みが浅ければ 1、深ければ 4 とした) することで形質の定量を行った。全ての定量は、各個体につき 3 枚の葉に対して行い、平均値を算出した。

ジベレリン溶液として、1 mg/ml のジベレリン (協和発酵バイオ) 溶液を 2% 含んだ、0.01% silwet (バイオメディカルサイエンス) 溶液を調製した。ジベレリン溶液は、子葉が形成された植物の茎頂に、毎日 1 回ずつ添加した。コントロールには、0.01% silwet 溶液を用いた。

1-2-2. RNA-seq によるミズナおよびミブナ間の SNPs の特定と CAPS マーカーの作成

RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、ミズナとミブナの茎頂と 2 mm 以下の葉原基から抽出した。抽出過程のカラム上で、DNaseI 処理も行った。RNA ライブラリは mRNA-Seq Sample Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて作成した。シークエンスは Illumina Genome Analyzer IIx で行い、36 bp のリードを読んだ。マッピングは BWA software (ver.0.6.2, Default parameters) で行った。リファレンスは PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Br>) から、Brapa_197_cds.fasta をダウンロードして利用した。SNPs は SAMtools (ver.0.1.18, Default parameters; Mapping quality \geq 30; Depth \geq 10) を用いて検出した。検出した SNPs からは、CAPS designer (http://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl) を用いて CAPS マーカーを設計した。マーカーのサイズが 100–920 bp となるようにプライマーを設計した。作成し

たマーカーを (Table 2) に示す。CAPS マーカーを用いたジェノタイピングでは PCR は全量 10 μ l で行い、0.25 units Taq DNA ポリメラーゼ、テンプレート DNA (< 1 μ g)、0.5 mM dNTP (Takara Bio)、10 mM のプライマーセットで反応を行った。反応液は 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) を用いて、95°C で 1 分処理後、35 サイクルの 95°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 30 秒の処理を行い、最後に 72°C で 4 分処理した。PCR 完了後、各マーカーを制限酵素で処理し、2%アガロースゲルで電気泳動することで遺伝子型を解析した。

1-2-3. RAD-seq によるミズナおよびミブナ間の SNPs の検出

RAD-seq の主なプロトコルは、先行研究を参照した (Kawamura et al., 2016)。解析は 2014 年に植えた F₂ 世代 82 株と、ミズナとミブナ 3 個体ずつに対して行った。BglI と EcoRI をゲノム DNA 切断のための制限酵素として用い、各アダプター (BglI, EcoRI) を DNA フラグメントに結合させた。アダプターとプライマーの配列は (Table 3) に示す。シーケンシングは HiSeq 2500 (Illumina) と TruSeq v3 chemistry を用いて行い、Trimmomatic ver.0.32 を前処理に用いた (Bolger et al., 2014)。Stacks による解析はデフォルト値 (ref_map.pl) を用いて行い (Catchen et al., 2013)、リファレンスデータは PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/>) からダウンロードした (Brapa_197_cds.fasta)。

1-2-4. 連鎖地図の作成と QTL 解析

連鎖地図の作成は Antmap (Iwata and Ninomiya, 2006) を用いた。また、QTL 解析は、WinQTL cartographer ver. 2.5 (Wang et al., 2007) を用いて、composite interval mapping (CIM) 法で解析した。検定は 1000 回行い、 $p = 0.05$ を閾値とした。

1-2-5. RNA-seq による遺伝子発現量の解析

購入したミズナおよびミブナの種子を、播種後 3 週間育て、莖頂と 3 mm 以下の葉原基、4 mm-10 mm の葉原基、10-20 mm の葉原基、20-50 mm の葉原基をそれぞれ 50-100 mg 回収し、液体窒素で凍らせた。凍結サンプルから RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、トータル RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて TruSeq stranded mRNA (illumina) で RNA-seq ライブラリを作成し、NextSeq 500 (Illumina) を用いて 76 サイクル、シングルエンドで配列決定を行った。得られたリードは、PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Br>) からダウンロードした Brapa_197_cds.fasta をリファレンスとして用いて、bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) でマッピングした。それぞれの遺伝子にマップされたリードの数を、HTSeq で抽出してカウントデータを得た (Anders et al. 2015)。その後、EdeR で発現変動遺伝子を同定した (Robinson et al. 2008)。

1-2-6. 各候補遺伝子の PCR 解析およびマーカーの作成

各遺伝子の配列解析に用いたプライマーを (Table 4) に示す。PCR は BIOTAQ™ DNA Polymerase (BIO LINE) を用い、試薬の最適条件で PCR を行った。PCR 産物は電気泳動の後に LaboPass™ Products (COSMO Genetech) を用いて精製し、ベクターである pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) に導入した。生成したプラスミドはコンピテントセル (DH5α) に導入してサブクローニングを行った。プラスミドの精製には FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いた。

候補遺伝子として特定できた *BrBLH3* と *BrTCP21* については、CAPS マーカーを作成した。*BrBLH3* には (forward: 5'-GTGAGAGTAACAAGAAGACC-3'; reverse: 5'-CATCAGCCATTGTAAAGAGC-3')、*BrTCP21* には (forward: 5'-TGTAGTCACGCTCCAAATGG-3'; reverse: 5'-AAGGGTCATTAGGTGACAAT-3') という特異的プライマーを作成し、PCR を行った。PCR 産物に対して、*BrBLH3* は *HaeIII* (Takara)、*BrTCP21* は *BspEI* (NEB) という制限酵素でそれぞれ処理することで、遺伝子型の解析を行った。PCR および制限酵素処理の条件は、連鎖地図作成時の CAPS マーカーの際と同じ条件で行った。*BrTCP15* については、(forward: 5'-GAAGCACAAGTCATCATTC-3'; reverse: 5'-AACTCGATCAGAACTCGTGG-3') という特異的プライマーを用いて、電気泳動による鎖長の比較によって解析を行った。PCR は、反応液の条件などは CAPS マーカーの作成と同じ条件を用いたが、サイクル数は 30 サイクルで行った。*BrPIN3* と *BrLM11* についてはそれぞれ (forward: 5'-GGCTAGGGTTTATTCGCTATTC-3'; reverse: 5'-GTATCCCTCAAATACTAATGC-3')、(forward: 5'-ACTCATTGATGCTCATGCC-3'; reverse: 5'-AATACGTTCTATGGGCCCG-3') という特異的プライマーを用いて PCR を行い、シーケンシングによる配列解析を行うことで遺伝子型を特定した。PCR の条件は、CAPS マーカーと同じ条件で行ったが、アニーリング時間は 30 秒間行った。

1-2-7. qRT-PCR による遺伝子発現量の解析

京都産業大学の温室 (23°C) で3週間育てたミズナおよびミブナの5-10 mm の葉原基を液体窒素で凍結させ、RNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。1 μg の RNA から、Transcriptor Universal cDNA Master solution (Roche, Basel, Switzerland) を用いて逆転写反応を行い、一本鎖 cDNA を合成した。

qRT-qPCR は、Universal SYBR Select Master Mix (Life Technologies) と 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、50°C で2分・95°C で2分処理した後、95°C で15秒、60°C で1分を40サイクル行い、95°C で15秒、60°C で1分、95°C で15秒、60°C で15秒処理することで解析した。

BrGA20ox3 の発現量の解析には (forward: 5'-AGACCAAGTCGCTGGTCTTC-3'; reverse: 5'-CCATGAATGTGTCGCCTATG-3') という特異的プライマーを用いた。コントロールとして用いたアクチンの発現量は、以下のプライマーを用いて定量した (forward:

5'-ATCAGGAAGGACTTGTACGGTAAC-3';

reverse:

5'-GCTGAGGGAAGCAAGAATGGAACC-3') (Li et al., 2009)。

1-2-8. 植物ホルモンの網羅的定量分析

ホルモン分析に用いた植物は、QTL 解析と同様の条件で生育させた、播種後 4 週間後のミズナとミブナを用いた。4-10 mm、10-20 mm、20-50 mm の葉原基をそれぞれ 30-100 mg 回収し、液体窒素で凍らせた。サンプルの破碎・抽出・精製・分析定量は、理化学研究所 植物科学研究センター (神奈川) で行った。質量分析には、AB SCIEX Triple TOF 5600 (SCIEX) を用いた (Kojima et al., 2009)。

Table 1 ミズナ・ミブナの品種と購入先

	vegetable name	購入先	所在地	
ミズナ	広茎京菜	サカタのタネ	神奈川県 横浜市	
	京かなで	タキイ種苗株式会社	京都府 京都市	
	京しぐれ	タキイ種苗株式会社	京都府 京都市	
	サラダでたべる京水菜	タキイ種苗株式会社	京都府 京都市	
	千筋キョウナ	サカタのタネ	神奈川県 横浜市	
	水天	サカタのタネ	神奈川県 横浜市	
	早生千筋京水菜	野口のタネ	埼玉県 飯能市	
	中生千筋京水菜	野口のタネ	埼玉県 飯能市	
	晩生千筋京水菜	野口のタネ	埼玉県 飯能市	
	サラダ京水菜	野口のタネ	埼玉県 飯能市	
	ミブナ	京風味	タカヤマシード	京都府 京都市
		早生京壬生菜	野口のタネ	埼玉県 飯能市
		丸葉ミブナ	アタリヤ農園	千葉県 香取市
薬食同源 みぶな		タカヤマシード	京都府 京都市	
早生壬生菜		丸種株式会社	京都府 京都市	
丸葉ミブナ(無印)		浜名農園	静岡県 浜名市	
丸葉ミブナ(中生種)		太田種苗	滋賀県 近江八幡市	
丸葉ミブナ(晩生種)		太田種苗	滋賀県 近江八幡市	
ベビーリーフ 中生ミブナ		中原採種場	福岡県 福岡市	
サラダ壬生菜(京なじみ)		丸種株式会社	京都府 京都市	

Table 2 CAPSマーカー

Marker IDs	Chr	Reference	Mibuna_snp	Mizuna_snp	Candidate Enzymes	B fragment	Z fragment	Forward Primer	Reverse Primer
Bra011820M	1	A		G	SalI	150	50, 100	GGATGGGAGCGGAATGGGC	GTCCCGAGCTCTAGCCG
Bra011343M	1	A		G	MspI	50,100	150	CTTGTGTTGGGTTTTT	CCAACCAACAGAACACAGC
Bra011081M	1	T	C		BglII	150	50, 100	GAGCTGGAATGATGGATTGC	GTGGATGTATGATCCGATTC
Bra013353M	1	A		G	XhoI	50, 100	150	GGAAGAGGAGGAAAGAAAAG	GCTTGCTGAATCAGATGAGC
Bra013601M	1	C	G		RsaI	50, 100	150	CTTACGTCACGCCAATCGAC	CAGGCGGAGCCCCACAG
Bra013675M	1	C	G		XhoI	50, 100	150	GTAAGAAATTTGAGGATGAG	CTCTAGTCAGCGGCTCAGTG
Bra013737M	1	T		G	BclI	50, 100	150	GGAGAAGAGAACAGAGAAAAC	GAAGTACCAACAGATCCAG
Bra013836M	1	T		C	BglII	160	50, 110	GTTGCTGGGAGGTGGAACCC	GCCTTCTCACCCAGCTGTGG
Bra013836M	1	C		T	RsaI	50, 100	150	GCTCATACGCAGTCTTGAGG	GAACATCTCGATGTGAAGAG
Bra013863M	1	C	T		MspI	150	50,100	CGCTGCTCAGGCGTGAACCC	GAGTGGCAGCAGCGGATTTG
Bra013873M	1	G	A		HindIII	150	100, 50	GAGTGTGTTTGGTTGGATG	CCAACAATGCAGTCTCTGC
Bra026484M	1	A	C		StyI(EcoT14 I)	40, 100	140	ATGGCTGAACAGACTGAGAA	CAATGGCGTCAGAGGATGC
Bra029974M	1	G		T	BclI	150	50, 100	GGAAGTCGTCGATCTGGCG	GAAACTCGAAGCCATCTTCG
Bra028325M	1	G		T	MspI	50,100	150	GAGAGGGAGGATTTTTATTTC	CGGACTCTTTATGCTTTTTG
Bra023825M	1	C	T		XhoI	150	50, 100	CTCAGATTCGGCTCGGTTG	GCTCTCCAGAATCACCACAC
Bra021288M	1	T	A		EcoRV	50, 100	150	GGCGATTGCGCATTTGAACC	CCATAGAAAAGAACGCCACAG
Bra021136M	1	A	G		EcoRV	50, 100	150	CCACCAGTGGGACGCTTAGG	GGTTTCTCACCTTCTCTTTC
Bra021462M	1	T	G		HinI	150	50,100	GATCCCCAGCGACTGAAGAAG	GTAGCGTTGGTAGAATTTGCG
Bra021325M	1	T	G		PvuII	50,90	140	CTATCACAAAATTATGCC	CAGTCTCGTAGTAGAGCTTC
Bra034103M	1	T		A	RsaI	50, 100	150	CTGGTTACGGAAAGCCGTTTC	GATTATACGAAGAGGCGCC
Bra034077M	1	T	A		HinI	50,100	150	CTACCAAGCAATGAGTGG	CAGCAATCTTTTACCCTTC
Bra028526M	2	T	G		BclI	50, 100	150	GGTGCCAACTGCGACAATGC	GGGCCAGGCTGATGTTTCTC
Bra023416M	2	G	C		MspI	150	50,100	CTTCAGCGACCACCACCGTC	GACATCTGAGTATTCATGCC
Bra023575M	2	C		G	NcoI	50, 100	150	GATGATGGAGCGGAGAGAG	CCCACCAGAAAATCCTTAG
Bra020134M	2	G		A	RsaI	150	50, 100	CCATGTTCTAGTAGAAGCTC	CGGTTTCTCTGCAAGCTC
Bra020268M	2	C	A		EcoRV	40, 100	140	GAAGACGGTGACGGGAAGAG	GCCTTGTGGATCTGAATCTC
Bra008025M	2	C	A		MspI	100	50,50	CTGCGAAGCCTTCTCGTC	GTAGAAAAGGAACATCCTTAG
Bra033149M	2	C	T		BsoBI	150	50,100	CAACTGGTGGTATGCTATG	CTTTGTTTGTAGCTTCTTC
Bra026586M	2	A		G	MspI	150	50,100	GAACTGAGAACTAGTCC	GAGGAATGAAGAAATCTCGG
Bra032954M	2	C		G	RsaI	150	50, 100	GAAAGCGCATGCTCAATG	CACACAAATGGTGGCCATC
Bra020615M	2	T	G		PstI	60, 100	160	GATGGCTCAAGGATTTAGC	GTCCCTCCTCCTCTTGTTC
Bra029275M	2	T	G		HindIII	150	50,100	CGGAGAGTAGTATTCAGGG	CAAAAGTGGTCCGCTGAATC
Bra005881M	3	G		C	NcoI	150	50, 100	GTGTGAAGGTGGGACTTG	CCTTCATGAACCGTCTAAC
Bra006101M	3	C		A	RsaI	50, 100	150	CGCCTCCATGGATGTTGGTC	CAGTCTCTCTCTCGGCTC
Bra006124M	3	G		A	EcoRI	150	50, 100	GGATTTAGTTATAGCTGCTC	GGATGCACCTGAGGATCAAC
Bra006273M	3	A	C		RsaI	150	50, 100	CCCAATCCCACCTCCCGG	CTCTCATACATACGTTCTTC
Bra006629M	3	A		G	HindIII	150	50, 100	GGGAAAAAGGGAGAACTGC	CTTCCACTCTCAAAGAGTG
Bra006674M	3	C		G	EcoRV	60, 100	160	GGATAAAGAGACAGAAGTCC	CTCAGCCACTCTCACCGCTC
Bra023091M	3	A		G	BsoBI	150	50,100	CCAAGTACGTGGTGAATAG	GGTCATCTTCATAGTGTCC
Bra000011M	3	C	T		XhoI	150	100, 50	CAGTGGCCCTCCTCCAAGGG	ATAGGACCGAAACAGAGCG
Bra000454M	3	T	G		SacI	150	50, 100	AGCCGTAGCAGAGATGTTG	CACAATCGACCTTTGCAATC
Bra000595M	3	G	A		EcoRI	60, 100	150	GATTTCTACAGAACTACTAC	CCATAGTCGCCAAATAGAG
Bra000632M	3	C	T		HindIII	50, 100	150	CGGAGAATCCCGGAGAAAAG	CAATGCCACAACACTAAGG
Bra000965M	3	T		C	HindIII	50, 100	150	CGTTTTGAAAGATGTTCTG	CTTGACAGTGACGGAAGACG
Bra001661M	3	T		C	HindIII			GTCACATGTCGGTTACGCC	CCATAGTCCGTTCTCGTTC
Bra013225M	3	G	C		PvuII	50,100	150	GAGTTTTGGTCTCCTTGCC	GTTAATCTTCTCGATAGTG
Bra013156M	3	G	C		MspI	50,100	150	CGACGCTGGCCAACGGGATC	GAAAATCCTTAAACCCGTAC
Bra013146M	3	G		A	StyI(EcoT14 I)	150	100, 50	GGGCGGAGTCAGTCTGCTG	CAGTCTTAAACGATATGTTTC
Bra013014M	3	A	T		HindIII	150	100, 50	GAGGGAGACGGAGCTGATCG	GACTCGTTGCTTCTAAACCG
Bra012760M	3	A	C		EcoRV	150	50, 100	CGAAGTTGGACGCAGTGG	GTTTGGTAGCATAGATACCC
Bra014601M	4	C	T		BsoBI	150	50,100	GTATGGTCAGAAGTGGATTC	CCGTTCTCTCACCACCTCC
Bra025448M	4	C		T	BclI	150	50, 100	GCTGGGGGAAAGTGTATTC	CTGAAGTCTCTCAGAGCCG
Bra032172M	4	A	T		XbaI	50, 100	150	TTCTTGCAAGTTATGCGAG	CGGGGATAAAGGAGGTCTC
Bra034297M	4	A		T	NheI	300	200, 100	CCAAAGTCTGACACTTCAGC	TTTCCCGCATCTTATATTGC
Bra034308M	4	T	G		HindIII	300	200, 100	CTAAGGCCTCCGAGAGGCTG	TCCTCAGCTCTGCTCCACC
Bra021795M	4	A		G	BamHI	50, 100	150	GGAGCTGTTAAAGACATCCG	CATAGAAGCCAACACAGTG
Bra021865M	4	A		C	PvuII	50,100	150	GCAAAACTCTCAGAACATGC	GCTCGCCTCCATCAGAGCC
Bra017222M	4	T	G		PvuII	150	50,100	GAGGAGCCTTAGCGGAGCC	GTGTTGATGAAGAAAACCTC
Bra017165M	4	A		G	HinI	150	50,100	CTTGTTTCAGACAGCAGTC	CTTGACAGGATTTGCCCTG
Bra004444M	5	T	A		RsaI	50, 100	150	GGAAGATAGAGAGTGTCTAT	CTAATCTCAAGCTTCTCAAC
Bra004534M	5	C	A		BamHI	150	100, 50	GCTTCGTGCTGCTTCTTCTC	CATCTTACCCTTCATCAATC
Bra004562M	5	C		T	RsaI	50, 100	150	CTGACTCTGGTGTACATCTG	GCCTTGAGGGAAGCAATGGG
Bra005087M	5	G		T	HindIII	150	50, 100	CTCTTGAACCTGGTCTTATC	GAGGAGTCATTATAATAGCC
Bra005199M	5	T		G	RsaI	150	50, 100	CATGGAGCTGTCGGAGGAG	GAGAATAACCTCCCAAC
Bra005306M	5	T	C		BsoBI	50,100	150	CTTATCCACCGAGAAAACCTG	GCTCTGAGAAAAGAACCTTG
Bra032216M	5	C	T		StyI(EcoT14 I)	220	60, 160	CTAGACGAGCAATTTACAC	CACAGCCATACCAAATAGAG

Bra034408M	5	A	T		XhoI	200, 100	300	CAGCTGCTCATGCCAACCGC	ACACGGACCTAATCCCGATC
Bra029788M	5	C	T		SmaI	150	50, 100	GATTGGGAATAGCGTTGATG	CAACACCTTAGCACATCCGC
Bra029732M	5	G		C	BamHI	150	100, 50	TCAGAGAGTGTGAGCTGATG	TCAGCGTTTCTTTGGAATC
Bra029732M	5	G		T	RsaI	10, 40, 100	10, 110	GATCGGGACCCGTACCGAGG	CACTCGACGGAGAGAGCACC
Bra029714M	5	C	G		RsaI	50, 100	150	CTGATATGGGTGACAAGACG	CCTGTGCGAGTGTCCACG
Bra019727M	6	T		C	RsaI	150	50, 100	GAAGTTTGTATGACCATG	CCTAAGCTCCGAGTACAAG
Bra026158M	6	A	C		StyI(EcoT14 I)	100, 50	150	ATCAAAAGGAGATAGAAGAG	TCCACCTCCAGGTATCTTTC
Bra026064M	6	T		C	EcoRV	50, 100	150	GTGAGACCGTGAATGTAGTG	CCAGATGCTCTAACCTCTCC
Bra017971M	6	C		T	HindIII	150	50, 100	CGAGCTGAATCTGAGGATG	GTACACAGAGTCTCTGACG
Bra017976M	6	G		C	RsaI	50, 100	150	GAGATGATGGCGATATCGAG	CGCTCATCGTGGACACCACG
Bra009922M	6	T		C	EcoRV	50, 100	150	GCCGGATGGGAGCGGTGAAG	CTTACAATCCCTTCCAACG
Bra009978M	6	T	G		BclI	140	50, 90	CAAAGATTGAAGTATATGAC	CTTCTTCTCTTTAACACCG
Bra037484M	6	C		G	PvuII	100	50,50	GCTGAGGGTGGGTGAAGGG	GACCACCTCTTTGTTTTCTC
Bra025140M	6	A		G	StyI(EcoT14 I)	100, 50	150	AGATTGGTGAATCTGAGGATG	AGATCAAAGTAACTCTGAC
Bra025060M	6	T		C	NheI	100, 50	150	AGAGTCTCTTTGCTTCATGG	CTTACCAATTCGATCTTG
Bra033657M	6	C		T	StyI(EcoT14 I)	100, 200	300	ACAACGAGGCTGCGCTCAAG	ATGGTCCAGGGTTTGGTGGG
Bra033596M	6	T		G	RsaI	150	50, 100	CTCGGGCTCGGCTTTGAAG	CTCGAGAGTCTCAAGGAACG
Bra036427M	7	A	G		BglII	50, 100	150	CACCTATCTACCTTCAGAAC	CAGGGTCGATGAAGAAGTTC
Bra015135M	7	T		C	BsoBI	150	50,100	GTATGATGGATCTGGGAAG	GCATCAAGCATCTTGGATGG
Bra015013M	7	C	A		PstI	150	50, 100	GATGATGAGGATCTCTTGG	GCAAGTAATCTCTCAAGAAC
Bra012022M	7	C		T	BclI	50, 100	150	GTCTCTTGTACGACTGTCC	GCTTCGAATCCGATTTAAC
Bra003345M	7	C	G		MspI	150	50,100	GGGCTCTCGCTCATTGAGG	GGGAGAATATTTCTCATAG
Bra003358M	7	C	T		BsoBI	150	50,100	GCTTGGTAATTCGTCGAAC	CGTAAATCTGACGGAAAC
Bra003393M	7	G	C		SmaI	50, 100	150	CGCAGCCCGGAGAGTTCG	CGAGTAGAGTGACTCTGTG
Bra003691M	7	C	T		StyI(EcoT14 I)	150	50, 100	CAATGGAGATCGTGAACAG	GTGTCGTCTCCATCACCATC
Bra004158M	7	A	C		BsoBI	150	50,100	GTTAAGAGGAGCAAGGCTGC	GTGAGTCTGCCTGTTAGAG
Bra004168M	7	A	G		RsaI	130	30, 100	GACTGAGAGGCTCTAATG	GACGACGGCTTTGAGTAGG
Bra004365M	7	A		G	BamHI	50, 100	150	GGAAGAGGAGATGATGATG	CCCTTCTCTTCTGGTTTC
Bra004369M	7	C		G	BamHI	150	50, 100	CATCTCCGTGTCCTGGG	GCAAGGACGAGCTTAGTTC
Bra016224M	7	C	A		NheI	50, 100	150	GGTCGTTTTGCCCGGAGC	CCAACACTCGCGACCTCTC
Bra016160M	7	G	A		EcoRV	50, 100	150	GCTCGTTTACGCCAGAGAAG	GACCCTTCTCTCTCGCCG
Bra015908M	7	C		G	PvuII	150	50,100	GTAGCTGTGGAACGGGAAC	GAGAGTCTGCGTGGACGGG
Bra015878M	7	C	T		HinfI	150	50,100	CTGACCATAGATCGCCTTG	CGCTTGGAGAATTGTGTGC
Bra030919M	8	C		T	XhoI	50,100	150	ATTCGCGCCGAGGCTCTCG	GAGACGGCGGTTTACGAGC
Bra010375M	8	T	C		HinfI	50,100	150	GAGTCGCTGGAGAGCAAG	CTACGCTTGGCCAACTTTGG
Bra010459M	8	G	A		BclI	150	50, 100	GGTACAGCCCGAGTCTGAC	CAACTTGGCCATCTCAGGG
Bra016472M	8	G		C	BsoBI	150	50,100	CAGTCCCTCTCCAAAGGG	CATCTTGTGATTTTCATAG
Bra016476M	8	C		T	RsaI	50, 90	140	CCATCCTTACGGATCCTC	CGATGAGTAAGGCTGTTGCG
Bra036325M	9	A		C	BclI	150	50, 100	GCTTCAACACGGCGGAGAGG	GCTTGTCTCAGCAGCGTC
Bra036619M	9	T		G	HindIII	50,100	129	CAGAAGTGAGCAGTCTTGG	CAGAAGTGAGCAGTCTTGG
Bra036325M	9	G		C	RsaI	50, 100	150	GGAACGTGATACTACCGTCG	CTCTCGCCAAGTCCGAGAG
Bra037200M	9	T		G	BamHI	220, 80	300	GGCAGAATCTTGTGCTGATG	TCACCACTCTCATCCCGTC
Bra027078M	9	A	T		PvuII	150	50,100	CTCCAAGCGGTTAAGAAGG	GTGTCGTAAGGAGACTTCC
Bra027966M	9	A	G		BclI	50, 100	150	CCAGCTCCAGAAGCTAATGC	GTGCTCGAGGCCCCCAATG
Bra029564M	9	G		A	BamHI	100, 50	150	GATGTTATATTTGATTTGGC	GCAAACCTAAGAGACGAGG
Bra028015M	9	A	G		StyI(EcoT14 I)	150	100, 50	TCTCCGATGACGAGGATCC	AGAAGTGAAGTGAATGCGG
Bra028006M	9	G	A		BsoBI	150	50,100	CAGCGGAATATTACTTTTAC	CAGCGTTTTACGCGCTTTCG
Bra023294M	9	G	C		NheI	150	50, 100	CTCTTCGTAGAGCTTATGGG	CGGAGTCTTCTGCACCAAC
Bra032349M	9	A	C		StyI(EcoT14 I)	100, 200	300	AACGAGCGTGGAGTCTCTC	GAGTCATCGATCACAGGTC
Bra032344M	9	C		G	SmaI	150	50, 100	CCACTTCTCTCCCATGC	CGCCGAGGATCATGATTTTC
Bra006976M	9	G	A		XbaI	170	50, 120	GGAATAACAATTTGGGGATG	CAACAACATGAACGAATATG
Bra031205M	9	G	A		RsaI	50, 100	150	CGAAGAGTTCAGTCTTAGGG	CGAAAGCGTGTGCTGTTG
Bra026921M	9	A	C		PstI	50, 100	150	GGAGATGAAAGCGAAGAAG	GCTCGTAGGCTGTATCAGC
Bra026972M	9	T		A	PvuII	50,100	150	GAAAAGGGTCAACGGTTTGC	CTGTATTGTTGGCTAGCTCG
Bra015397M	10	A		C	StyI(EcoT14 I)	150	50, 100	GGATAGGGAAGCAACCTATC	CTCAGGACACCAGCATCTTC
Bra033255M	10	G		C	SacI	100, 200	300	AGGAACGGGAGTGGAGCG	ACGAGATTCTTGTGCCGTAC
Bra033249M	10	A	G		RsaI	150	50, 100	GTGCTGTGGCCATGAACTG	GTTTACTGTCCATCTCTCAG
Bra002425M	10	G		A	PvuII	150	50,100	GAAGAAGAAGAGGAGACCCC	CTTCTCTCTGTGTTCTGAG
Bra002277M	10	T		A	PvuII	50,100	150	CACITGAGGAGTGGGAAAAG	GTCCGTGACACTCTGCTCC
Bra002173M	10	G	A		HindIII	150	50, 100	CGTAGGGATAAGAAGCTTG	CTACGTTTTCCGAGGTCAC
Bra002101M	10	T		A	HindIII	50, 100	150	GAAGAAGAAGCGGCTGTGAC	GATAAAGTGGGACTTTCTC
Bra001970M	10	G	A		XhoI	150	50, 100	GACTTTCGTTGTCAAGGAGG	TCATCTACAAGCTCGTTCTC
Bra008676M	10	A		T	HinfI	50,100	150	CACCGCCGCCACTACTTTTC	CTAGGGCTGATGGTGGCTAG
Bra008861M	10	A		G	RsaI	150	50, 100	CGACGTTTAGCCGCTGGGG	GGTGTACAGGAATACTACC
Bra009004M	10	T		A	XbaI	150	50, 100	GTTGGAGTTTGTGTCAAG	CAGTTGAACCGTACGAAGT
Bra041018M	11	G		A	SacI	250, 150	500	TGTTATGAGGATATCTGCG	CATGAAGTGGTACTTCTGT

Table 3 RAD-seqプライマー

primer name	
TruSeq_EcoRI_adaptor1	/5Phos/A*A*TTGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTC*A*C
TruSeq_EcoRI_adaptor2	G*T*CAAGTTTCACAGCTCTTCCGATC*T*C
TruSeq_BglII_adaptor1	A*A*TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT*C*C
TruSeq_BglII_adaptor2	G*A*TCGGAAGAGCTGTGCAGA*C*T
TruSeq_Univ_primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGA
TruSeq_IP001_xxxxxx	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGT

“ * ” = phosphorothioate bond

XXXXXX = 6mer index sequence

Table 4 配列解析に用いたプライマー

target genes	primer name	Forword	primer name	Reverse
<i>BrBLH3</i>	BLH3_F	GCATGCAACCTCTGTACCAA	BLH3_R	GCTACATTGGCCTTGAAAC
<i>BrTCP15</i>	TCP15_F	ATGGATCCTGATCCAGATCA	TCP15_R	GCACAAGTCATCATTCCCTAG
<i>BrTCP15</i> downstream	TCP15_prom_F	GAAGCACAAGTCATCATTCC	TCP15_prom_R	CGAGTCATGACCGATCACTG
<i>BrPIN3</i>	PIN3_F	ATGGCACGACCTCTATACGG	PIN3_R	CGCTGGTTTACTACATTCTA
<i>BrPIN3</i> promoter	PIN3_prom_R	GTTCCCTAAATCTTATGCC	PIN3_prom_R	GACCGTATAGAGGTCGTGCC
<i>BrGA20ox3</i>	GA20ox3_F	CGGATCTTTTCATTTCCAC	GA20ox3_R	CATAAGGGTTAAGACAAGAG
<i>BrGA20ox3</i> promoter	GA20ox3_prom_F	GCTAATACCAATCGGCATTG	GA20ox3_prom_R	CGATGCAAATCTCCTGAATC
<i>BrTCP21</i>	TCP21_F	ATGTGCAACGACGACGGGAC	TCP21_R	TGAGTTATCCTCCTCCTCCC
<i>BrTCP21</i> promoter	TCP21_prom_F	CACTGTTACTTGTACTGGC	TCP21_prom_R	TTCACGGCGTTAAGAGTTCC
<i>BrLMI1_1</i>	LMI1_F1	CAAGAACTGAGAGAAAATGG	LMI1_R1	CAAACGTGAGATCAATTTGG
<i>BrLMI1_2</i>	LMI1_F2	GTATCCCTTTTGGCTTACGGC	LMI1_R2	TCATCTCAGAAAGAGTAACG
<i>BrLMI1_3</i>	LMI1_F3	CTTGGGGGTATATATGTTACC	LMI1_R3	GTCGGTGTGCATGAATTTCC
<i>BrLMI1_4</i>	LMI1_F4	GATTCGCTTATACTATTTGC	LMI1_R4	ATCGTATAGCTGCTCAAGCTGCTT
<i>BrLMI1_5</i>	LMI1_F5	CGCGGTTTGGTTCCAGAA	LMI1_R5	GGGGTCTCTCTGATAGAATC
<i>BrLMI1_6</i>	LMI1_F6	TGTACCATTTACCATATTGC	LMI1_R6	GATAAGCACAAGCTATTACGG
<i>BrLMI1</i> downstream	LMI1_F7	AAGAAACAGATCTCCGGTGG	LMI1_R7	TAGCGCCAAAAGATAGTACC

1-3. 結果

1-3-1. 葉の形態の観察と形質の定量評価

ミズナとミブナは互いに同一種内の異なる品種の関係であるが、ミズナは特徴的な鋸歯を有する葉を持つ一方で、ミブナは単純なへら型の葉を有している (Fig. 3 A-D)。また、茎頂を実体顕微鏡で観察したところ、葉身約 5 cm 前後の葉ではミズナの葉に深い切れ込みによって形成されているローブが見られるが、葉身約 5 mm の葉ではローブの構造は明確には確認できなかった (Fig. 3 E-H)。さらに、約 500 μm の葉身を比較すると、ミブナの葉には特に何も見られないが、ミズナの葉にはすでに鋸歯が形成されていることが分かった (Fig. 3 I, J)。このことは、比較的初期の葉原基の段階で、葉の形態の多様化が生じていることを示している。

これらの葉形変異の原因遺伝子の特定を目指し、ミズナとミブナを交配させた結果、 F_1 世代の葉は、中間形質を示した (Fig. 4)。さらに、 F_1 世代を自殖させて F_2 世代をつくった結果、葉の形態は複雑なものから単純なものまで、様々な形態を示した (Fig. 5)。このことは、ミズナとミブナの葉形変異には複数の遺伝子座が寄与していることを示している。

ミズナの葉では、特徴的な鋸歯が見られると共に、深く切れ込んだローブの構造が見られることが分かる (Fig. 3A)。ミズナの複雑な形態は、このような複数の要因が組み合わさった結果生じている可能性が考えられる。そこでミズナとミブナの葉形変異の原因遺伝子を特定するため、 F_2 世代の葉の形態について、Dissection Index (DI)、葉の先端の鋸歯、ローブの深さ、という 3 つの指標で定量を行い、その表現型の分布からそれぞれの要素の遺伝的関連を推定した。DI は葉の周の長さを面積の平方根で割った値で、形態の複雑さを示す指標となる。ローブの深さについては、(Fig. 5) の 10 枚の葉を 4 段階に分類すると、① ローブが見えづらい；(Fig. 5 C, I)、② ローブが浅い；(Fig. 5 E, F, G)、③ ローブが見られる；(Fig. 5 A, B, J)、④ ローブが深い；(Fig. 5 D, H)、となる。2013 年と 2014 年に播種した F_2 世代について、各形質のスコアの分布をプロットした (Fig. 6)。どちらの結果も、DI や先端の鋸歯については正規分布に近い形の分布を示した (Fig. 6 A, B)。この結果は、これらの形質には複数の遺伝子が寄与していることを示している。一方で、ローブの深さについては値が小さい個体群が最も多く、正規分布に近いとは言えない分布を示した (Fig. 6 C)。この結果は、単一または少数の遺伝子がローブの深さに寄与していることを示している。

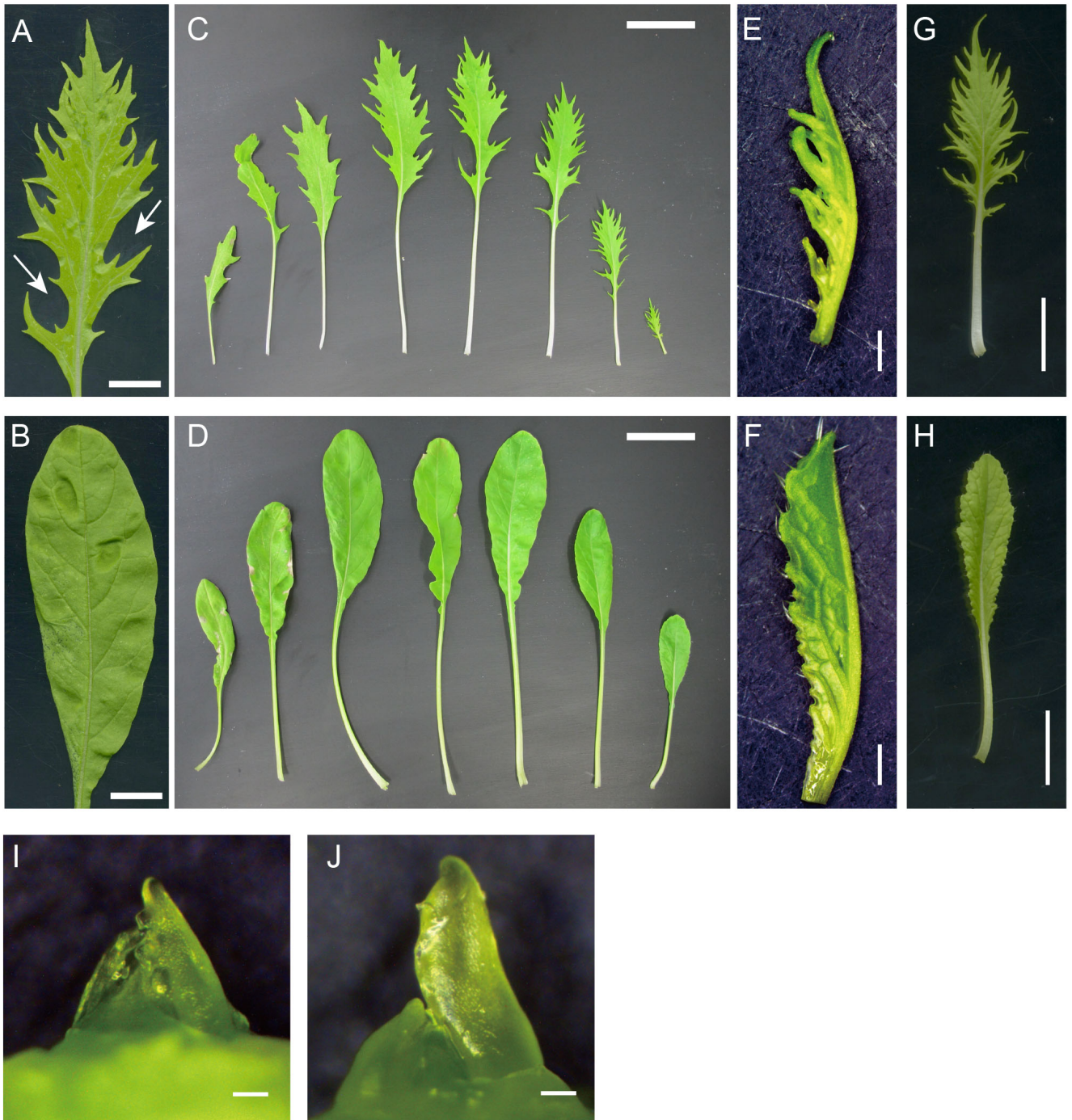


Figure 3 ミズナとミブナの葉の形態

ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) の葉の形態。ミズナ (A) は特徴的な鋸歯の他、深い切れ込み (白矢印) によって形成されたローブが見られる。一方でミブナ (B) は、単純な丸い形をしている。(C, D) は、それぞれミズナとミブナの葉を、若い順に右から並べたものを示す。(E, F) は、それぞれミズナとミブナの葉身約 5 mm の葉原基で、(G, H) は葉身約 5 cm のミズナとミブナをそれぞれ示す。(I, J) はそれぞれ、ミズナとミブナの約 500 μ m の葉原基で、この時期にはすでにミズナの葉に鋸歯が形成されている。スケールバー ; 1 cm (A, B)、5 cm (C, D)、1 mm (E, F)、1 cm (G, H)、(I, J) 100 μ m。



Figure 4 ミズナおよびミブナの F₁ 世代の葉形

4週間育てた、ミズナとミブナを交配させた F₁ 世代の葉形。(A), (B) はそれぞれ、ミズナおよびミブナを母親に持つ F₁ 世代の本葉を示す。スケールバー ; 3 cm。

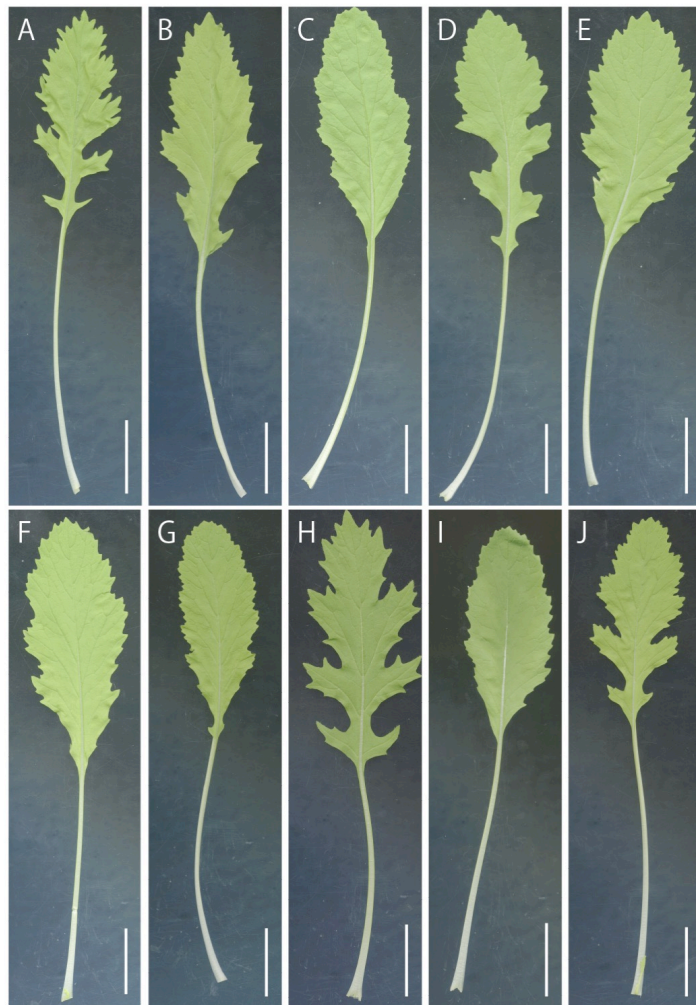


Figure 5 ミズナとミブナを交配させた F₂ 世代の葉形

播種後 4週間育てた。F₂ 世代の葉の形を 10 例示す。葉の形態は、複雑なものから単純なものまで、様々な形態を示している。スケールバー ; 3 cm

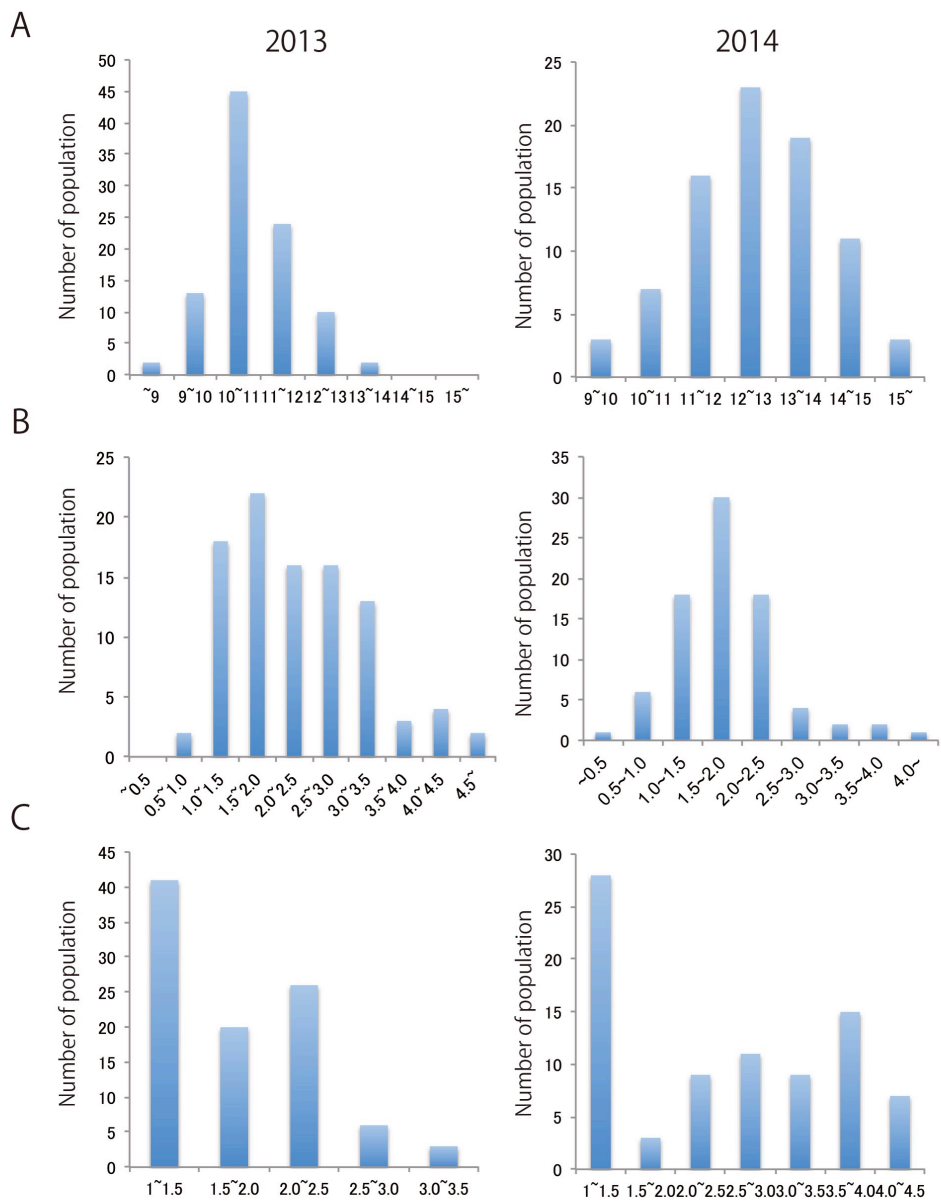


Figure 6 F₂ 世代の表現型の定量

2013年(左)と2014年(右)に播種したF₂世代の、表現型の分布を示した。(A) Dissection Index、(B) 葉の先端の鋸歯の高さ、(C) ロープの大きさの定量結果を示しており、縦軸が個体数、横軸が各表現型のスコアを示す。横軸のスコアのインターバルは、以上~未満で示してある。

1-3-2. 分子マーカーの開発と連鎖地図の作成

ミズナおよびミブナ間における QTL 解析に必要な連鎖地図を作成するためには、分子マーカーが必要となる。本研究ではミズナとミブナのジェノタイピングを行うための CAPS マーカーを作成するために、RNA-seq を行い、転写領域に存在する SNPs を同定した。その結果、4286 の SNPs が見つかり、そのうち 480 個が CAPS マーカーとして利用可能と予測された。実際にマーカーとして利用可能かどうかを実験によって確認したところ、131 個のマーカーを作成することに成功した。2013 年に播種した F₂ 世代をこのマーカーでジェノタイピングして連鎖解析を行い、103 のマーカーからなる連鎖地図を作成した。合計鎖長は 1392.0 cM で、マーカー間隔の平均は 13.5 cM であった。連鎖地図上にマップされたマーカーの位置を示す (Fig. 7)。

しかしながら、この時点ではマーカー数が十分とは言えず、マーカー数を増やすために RAD-seq 解析を行った。2014 年に播種した F₂ 世代 82 株について RAD-seq を行った結果、40,926 から 2,962,220 のリードが得られた (平均 = 590,412.73)。また、両親系統から得られたリード数は、母方が 940,873、父方が 577,755 であった。これらの中から検出できた RAD-tag はそれぞれ 33,641 と 44,648 で、マーカーとして利用できたものが 10,296 であった。このうち、2,644 が F₂ 世代から見つかり、最終的に 158 のマーカーから成る連鎖地図が作成できた。染色体番号は、BLAST 解析より明らかにした。合計鎖長は 5,441.5 cM で、間隔の平均は 34.4 cM であった (Fig. 8)。

1-3-3. QTL 解析による葉形変異に寄与する遺伝子座の特定

上記の CAPS マーカーによる連鎖地図を用いて、DI に関する QTL 解析を行った結果、6 番染色体の Bra038607M-Bra025140M、7 番染色体の Bra003691M-Bra004365M、10 番染色体の Bra008861M-Bra009004M の 3 箇所に、閾値以上の LOD スコアを示す QTL が見られた。同様に、葉の先端の鋸歯については 6 番染色体の Bra026064M-Bra009922M、7 番染色体の Bra004369M-Bra016160M、9 番染色体の Bra023294M-Bra031205 の 3 箇所に、ローブの大きさについては 10 番染色体の Bra008861M-Bra009004M の一箇所に QTL が見つかった (Fig. 9, Table 5)。

また、RAD-seq の結果を用いた QTL 解析も行った結果、葉の先端の鋸歯について 6 番染色体と 7 番染色体に QTL が見られ、それぞれ 17138-18237、14298-13693 間に LOD スコアが閾値以上の QTL が存在した (Fig. 10, Table 5)。なお、RAD-seq を用いた解析からは、その他の定量法 (DI またはローブの大きさ) では、閾値以上の LOD スコアが検出できなかった。

それぞれの QTL の物理的位置 (Mb) を特定したところ、DI で特定できた 6、7、10 番染色体の QTL の位置は、葉の先端の鋸歯で見られた 2 つの QTL の位置と、ローブの大きさで見られた 10 番染色体のピークの位置とほぼ一致することがわかった (Fig. 11, Table 5)。さらに、RAD-seq で得られた QTL の位置も調べた結果、6、7 番染色体に見られる QTL の位置は、2013 年の先端の鋸歯における QTL とほぼ同じ位置であることが分かった (Fig. 11, Table 5)。2013 年の QTL 解析の結果から得られた、各 QTL に存在する遺伝子数は、葉の先端の鋸歯に寄与する 6、7、9 番染色体の QTL については、それぞれ 1475、155、1818 個、ローブの大きさに寄与する 10 番染色体の QTL には 1086

の遺伝子が存在すると考えられた (Table 6)。

1-3-4. RNA-seq によるミズナとミブナの遺伝子発現量の網羅的解析

QTL に座乗する葉形変異遺伝子は、ミズナおよびミブナで発現量が異なると予想できた。よってミズナおよびミブナにおける様々な葉の発生段階において RNA-seq を行い、遺伝子の発現パターンを網羅的に比較解析することで、葉形変異の原因遺伝子を明らかにすることを試みた。ミズナとミブナの 3 mm 以下の葉原基を含む茎頂、4-10 mm、10-20 mm、20-50 mm の葉原基について RNA-seq を行い、ミズナおよびミブナ間で発現量に差が見られる遺伝子を検出した (False Discovery Rate < 0.05)。その結果、先端の鋸歯に寄与している 6、7、9 番染色体の QTL からはそれぞれ、599 個、59 個、692 個の遺伝子に発現量の差が見られた (Table 6)。また、ローブの大きさに寄与する 10 番染色体の QTL からは、312 個の遺伝子に発現量の差が見られた (Table 6)。この中から、先行研究の結果に基づいて葉の形態形成に寄与すると考えられた遺伝子を抽出した。結果、鋸歯に寄与する 6 番染色体の QTL 内からは *TCP7*、*IAA28*、*WUSCHEL related homeobox 14 (WOX14)*、*ASYMMETRIC LEAVES 2-like 9 (ASL9)* の 4 個、7 番染色体の QTL 内からは *BLH3*、*TCP15*、*PIN3* の 3 個、9 番染色体の QTL 内からは *KANADI 2 (KAN2)*、*BLH4* の 2 個、10 番染色体の QTL 内からは *GA20ox3*、*TCP21*、*LM11* の 3 個の遺伝子のホモログが、それぞれ見つかった (Table 7)。*KAN* や *WOX* は、それぞれ葉の表裏形成や葉の伸長に重要な因子であることが知られている (Eshed et al., 2001; Garcia et al., 2006; Nardmann et al., 2004; Yamaguchi et al., 2012)。

本研究では、DI に寄与する QTL のうち、寄与率が高かった 7 番と 10 番染色体の QTL に注目した。これらの QTL は先端の鋸歯およびローブの大きさにおいて、非常に高い寄与率を示した (Table 5)。ミズナとミブナにおけるこれらの遺伝子の発現パターンを示したものが (Fig. 12) である。比較してみると、*BrLM11* は茎頂で発現量に差が見られたが、葉原基では差が見られなかった。逆に *BrTCP15*、*BrTCP21*、*BrBLH3* は、茎頂における発現量の差は小さいが、葉原基における発現量の差が大きかった。*BrPIN3*、*BrGA20ox3* は、発現パターンに大きな差は見られなかったが、どの発生段階においてもミズナでの発現量が大きかった。

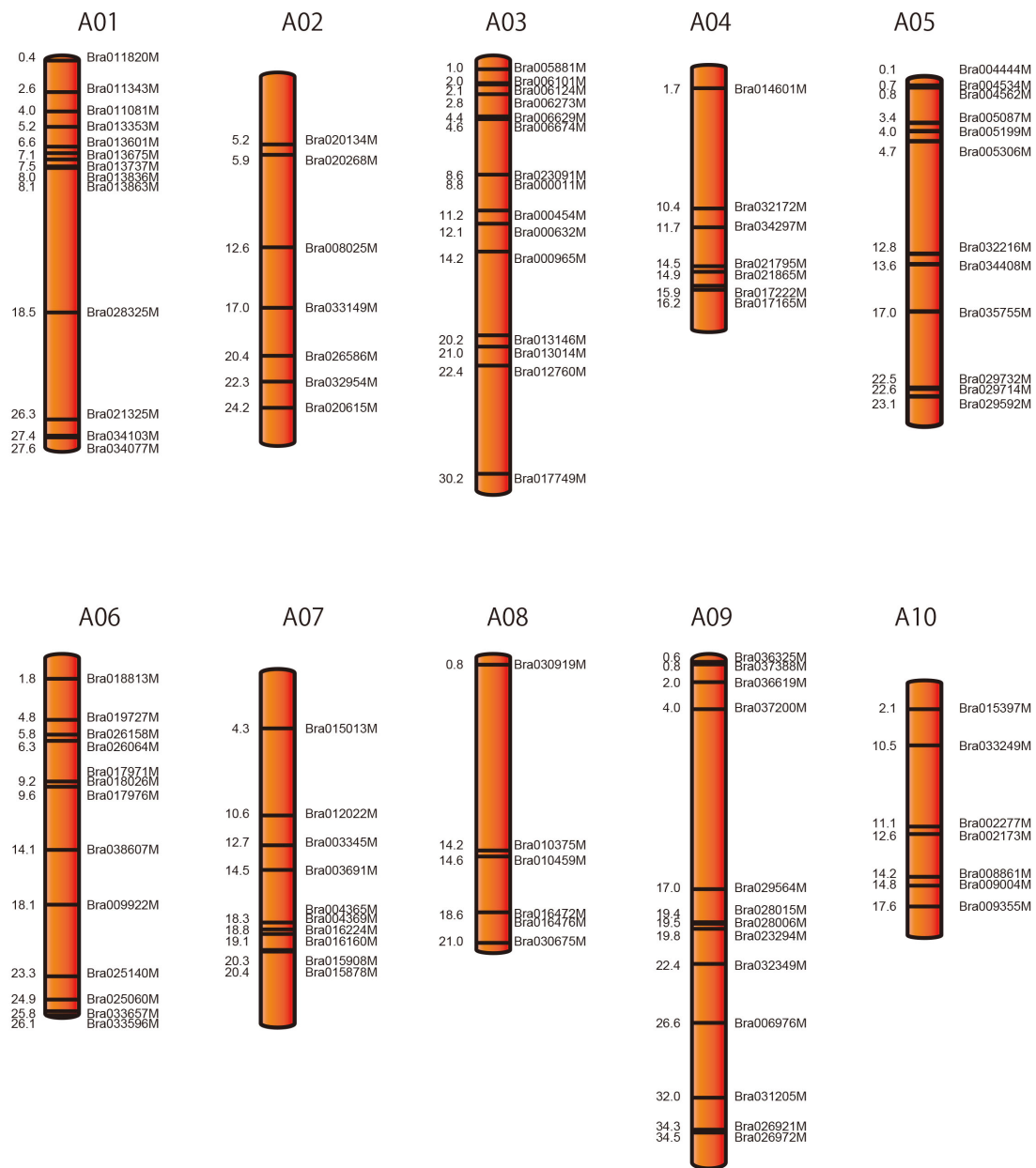


Figure 7 CAPS マーカーの染色体上の位置

地図の上の番号が染色体番号、地図の右にマーカー名、左にマーカーの位置 (Mb) が記されている。各連鎖地図における染色体番号は、PLANT GDB

(<http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Br>) を参照した。

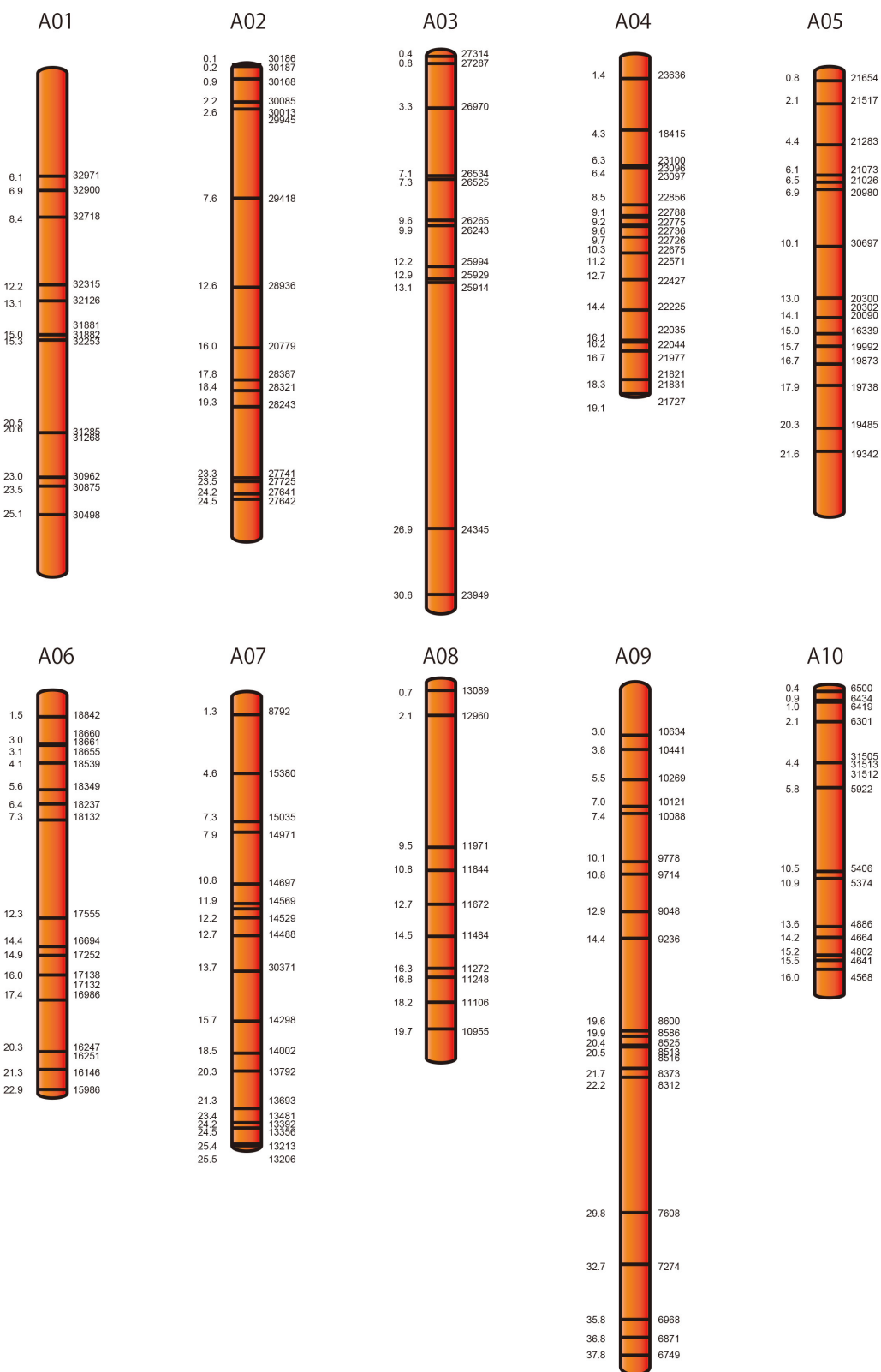


Figure 8 RAD-seq の結果より作成したマーカーの位置

地図の上の番号が染色体番号、地図の右にマーカー名、左にマーカーの位置 (Mb) が記されている。各連鎖地図における染色体番号は、PIANT GDB

(<http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Br>) を参照した。

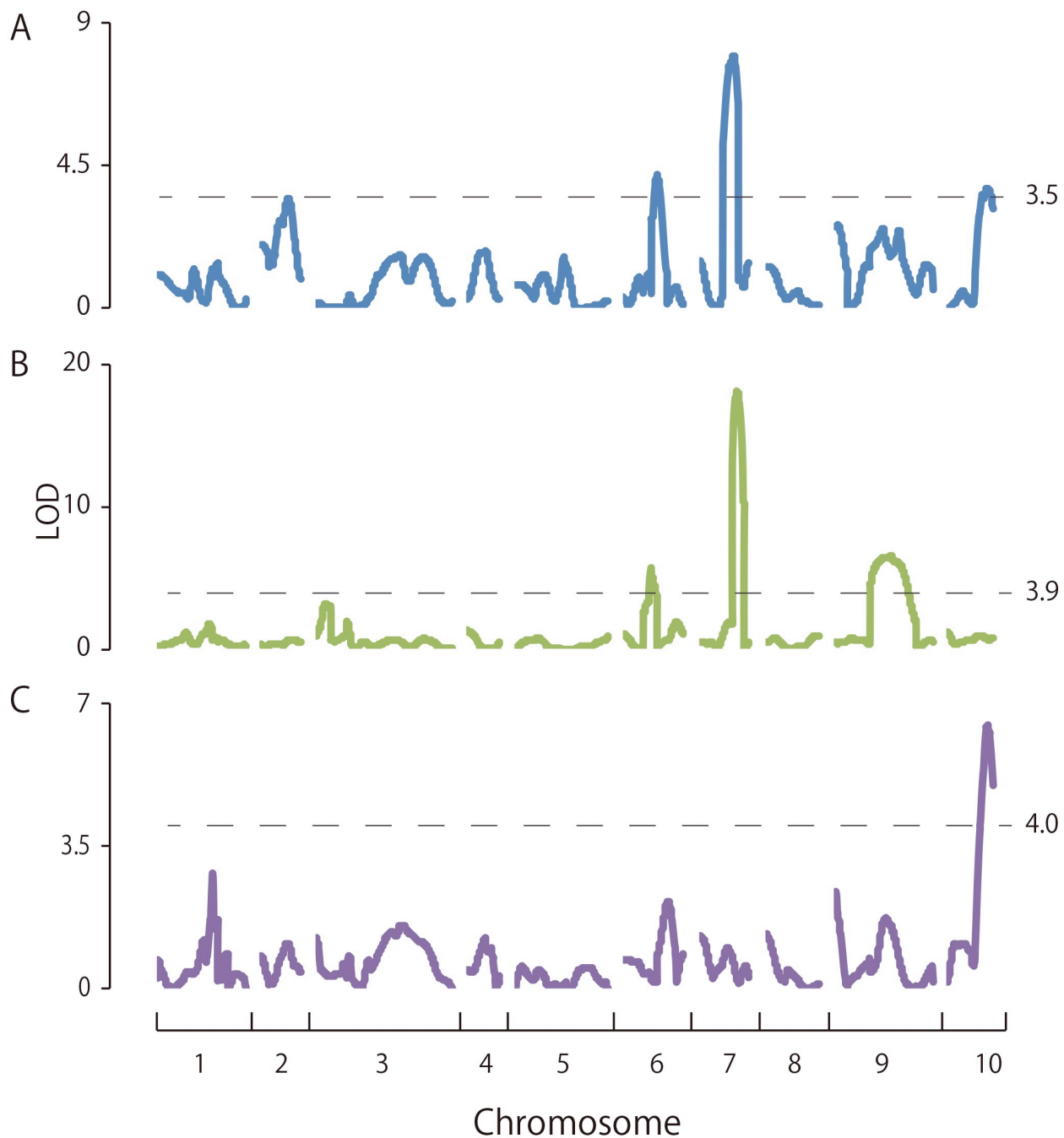


Figure 9 CAPS マーカーによる連鎖地図を用いた、葉形に関する QTL 解析

(A) が DI、(B) が先端の鋸歯、(C) がローブの大きさにおける QTL 解析の結果を示す。縦軸が LOD スコア、横軸が各染色体の番号と位置を示す。破線は閾値 ($p = 0.05$) を示し、この値以上の LOD スコアが見られる位置が、形質に寄与している。(A) は、6、7、10 番染色体に、(B) は 6、7、9 番染色体に、(C) は 10 番染色体に、それぞれ閾値以上の LOD スコアが見られた。

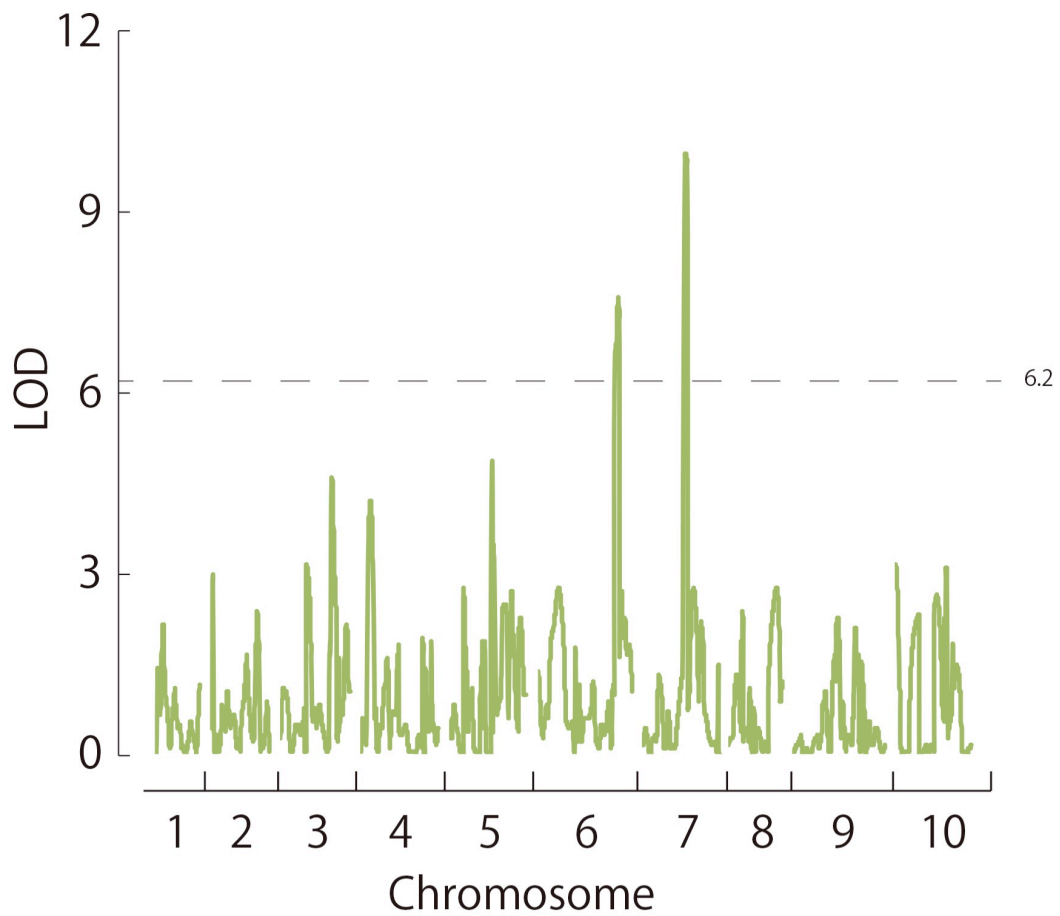


Figure 10 RAD-seq を用いた、葉の先端の鋸歯に関する QTL 解析

RAD-seq を用いた、先端の鋸歯における QTL 解析の結果を示す。縦軸が LOD スコア、横軸が各染色体の番号と位置を示す。破線は閾値 ($p=0.05$) を示し、この値以上の LOD スコアが見られる位置が、形質に寄与している。6 番染色体と 7 番染色体上に、閾値以上の LOD スコアが見られた。

Table 5 QTL解析の結果とQTLの物理的位置

Genotyping	Year	Phenotype	Sample number	LG	Interval	Location (Mb)	LOD score	Additive effect	Dominance effect	R ² (%)					
CAPS markers	2013	DI	96	A06	Bra038607M-Bra025140M	14.1-23.3	4.3	-0.41	-0.42	12.4					
				A07	Bra003691M-Bra004365M	14.5-18.3	8.0	-0.64	-0.29	27.9					
				A10	Bra008861M-Bra009004M	14.2-14.8	3.8	-0.50	-0.03	14.0					
				Ser	A06	Bra026064M-Bra009922M	6.3-18.1	5.7	0.40	-0.13	8.7				
					A07	Bra004369M-Bra016160M	18.3-19.1	18.1	0.73	-0.26	37.9				
					A09	Bra023294M-Bra031205M	19.8-32.0	6.4	0.38	-0.20	13.2				
				Lobe	A10	Bra008861M-Bra009004M	14.2-14.8	6.5	-0.45	-0.13	29.4				
					RAD-seq	2014	Ser	82	A06	18237-17138	6.4-16.0	7.6	0.46	-0.41	24.71
									A07	14298-13693	15.7-21.3	10.0	0.57	-0.23	40.3

Above the LOD threshold

Scored at the LOD peak

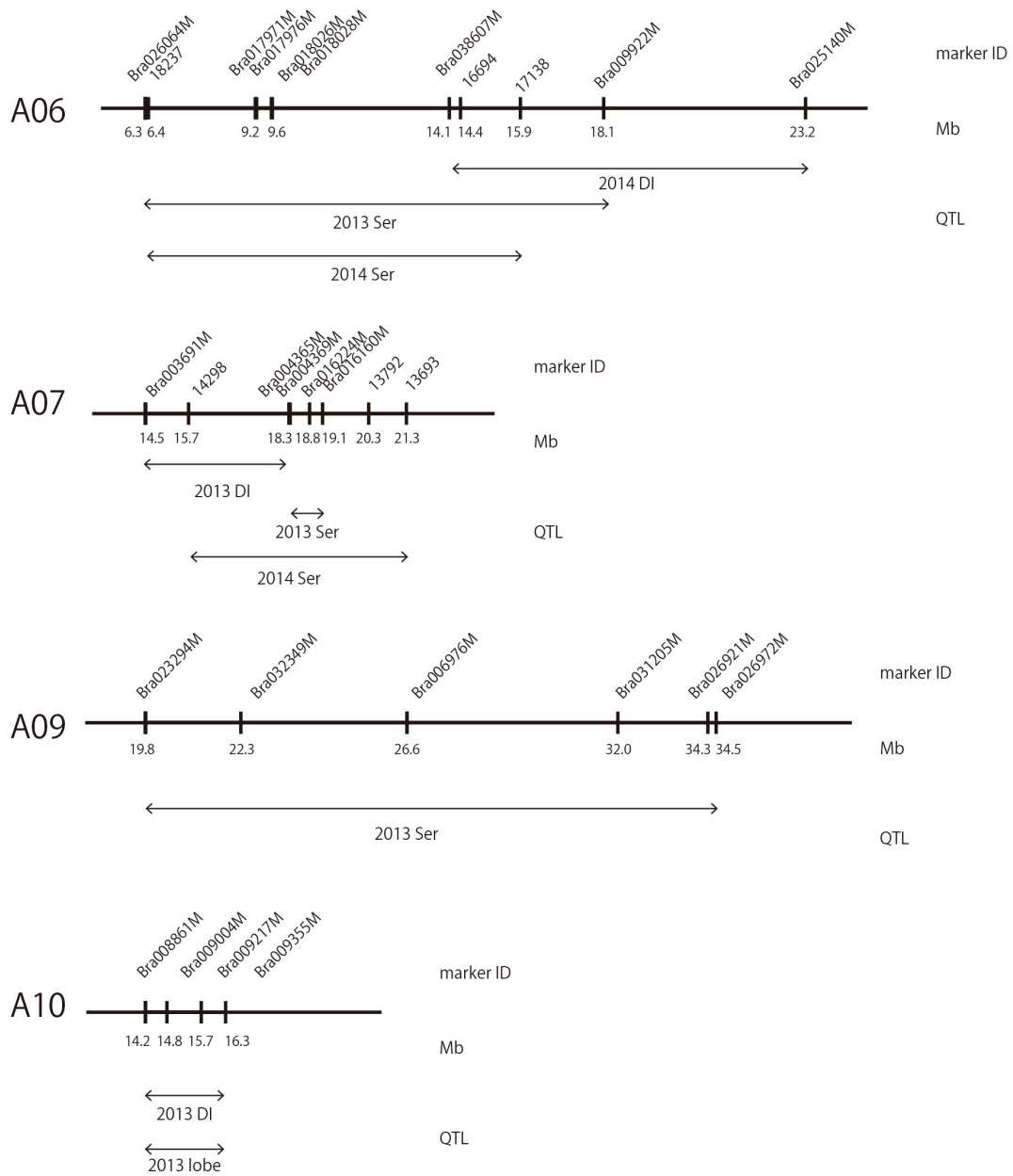


Figure 11 葉形変異に寄与する各 QTL の物理的位置

地図の上にはマーカーの番号、下には得られた QTL と物理的位置 (Mb) が示されている。左端には、各染色体の番号が記されている。両矢印の下には、形質の名前と特定した年度が記されている。DI: Dissection Index、Ser: 葉の先端の鋸歯の高さ、lobe: ローブの深さ、をそれぞれ示している。

Table 6 各QTLに存在した遺伝子数と、発現パターンに差が見られた遺伝子の数

QTL	QTLに存在する遺伝子数	発現量に差があった遺伝子数
A06	1475	599
A07	155	59
A09	1818	692
A10	1086	312

Table 7 各QTLの原因遺伝子と考えられる候補遺伝子

QTL	gene	Mizuna vs Mibuna FDR
A06	<i>BrTCP7</i>	7.0E-03
	<i>BrIAA28</i>	4.0E-05
	<i>BrWOX14</i>	3.3E-24
	<i>BrASL9</i>	1.6E-04
A07	<i>BrBLH3</i>	1.7E-11
	<i>BrTCP15</i>	6.4E-30
	<i>BrPIN3</i>	4.3E-07
A09	<i>BrKAN2</i>	7.1E-05
	<i>BrBLH4</i>	8.4E-05
A10	<i>BrGA20ox3</i>	4.4E-06
	<i>BrTCP21</i>	1.1E-03
	<i>BrLMI1</i>	5.8E-05

FDR; False Discovery Rate

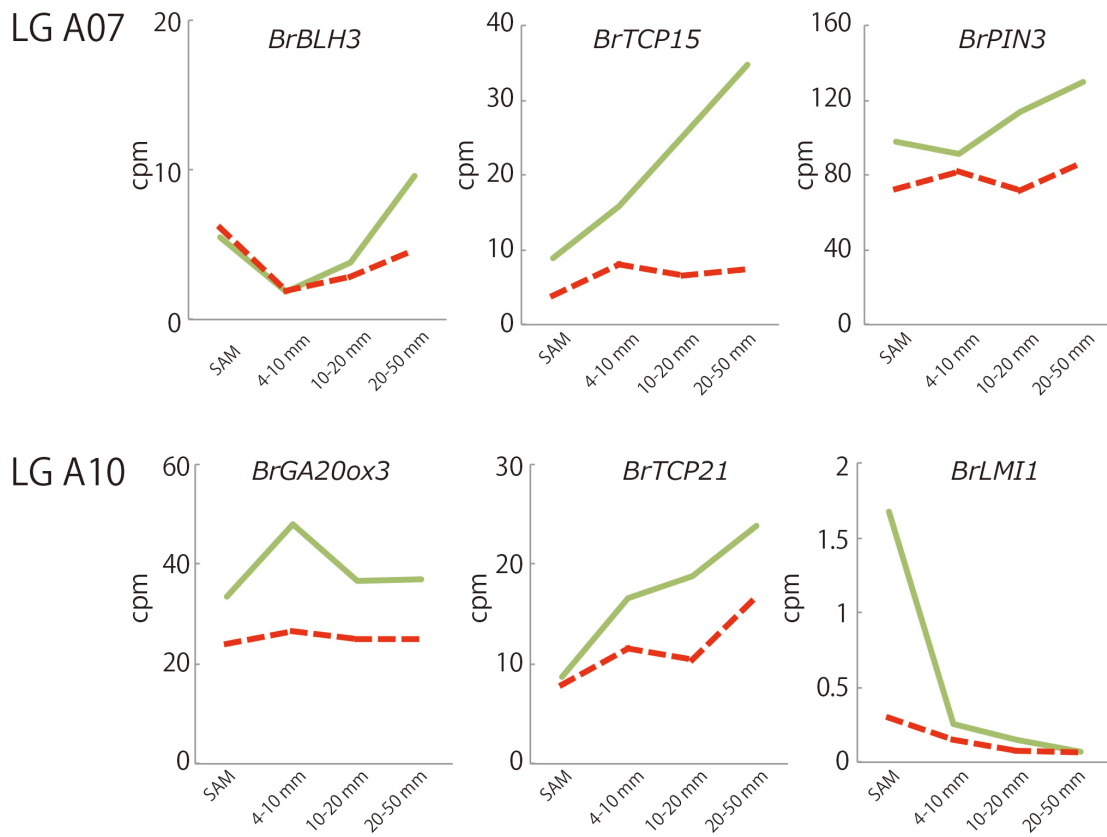


Figure 12 7 番および 10 に番染色体に見られた、葉形変異に寄与する候補遺伝子の発現パターン

RNA-seq の結果、ミズナおよびミブナで発現量に有意差があった葉形変異の候補遺伝子について、各遺伝子の発現パターンを示す。上段が 7 番、下段が 10 番染色体に見られた候補遺伝子を示す。実線 (緑) がミズナ、破線 (赤) がミブナにおける各遺伝子の発現量を示しており、縦軸が発現量 (cpm)、横軸が発生段階を示す。

1-3-5. 鋸歯に寄与する 7 番染色体の QTL 内における葉形制御候補遺伝子の解析

葉の先端の鋸歯の形態に最も大きく寄与する 7 番染色体の QTL に存在する遺伝子について、まずは *BrBLH3* の解析を行った。ミズナとミブナの *BrBLH3* の配列を比較したところ、複数の SNPs が見られ、特に第一・第三エキソンに多数の変異が見られた (Fig. 13 A, B)。この塩基置換によって、POX ドメイン内にアミノ酸置換が生じていた (Fig. 13 C)。

次に、*BrTCP15* について配列の解析を行った。ミズナおよびミブナ間で *BrTCP15* の配列を比較したところ、ミズナおよびミブナ間でエキソンに複数の SNPs が見られ、加えて下流の配列にはミブナの方が 100 塩基以上長い配列を有していることがわかった (Fig 14 A, B)。さらに、転写領域に見られる塩基置換によって、アミノ酸置換も生じることがわかった (Fig 14 C)。

最後に、7 番染色体の QTL の候補遺伝子として *BrPIN3* の解析を行った結果、第 3 イントロンと転写領域の 597 塩基上流において、ミズナに一塩基の欠失が見られることが分かった (Fig. 15)。以上の結果より、7 番染色体の QTL の原因遺伝子と考えられる 3 つの候補遺伝子全てにおいて、ミズナとミブナの間で配列に違いが見られることが分かった。

1-3-6. ロープの大きさに寄与する 10 番染色体の QTL 内における葉形制御候補遺伝子の解析

ロープの大きさに寄与する 10 番染色体の QTL の候補遺伝子として、*BrGA20ox3* の解析を行った。*GA20ox3* はジベレリンの合成に寄与する遺伝子で、葉で発現することによって形が単葉化することが知られている (Hay et al., 2006; Hasson et al., 2010)。また、*B. rapa* の葉のロープの形成は 10 番染色体上の *BrGA20ox3* が寄与しているという報告があり、プロモーター領域に見られる、スタートコドンから数えて 94、579、585、642 塩基上流に見られる SNPs が、*BrGA20ox3* の発現量の差をもたらすと考察されている (Li et al., 2009)。しかし、ミズナおよびミブナ間で *BrGA20ox3* のプロモーター配列を比較してみた結果、配列の違いは見られなかった (Fig. 16)。なお、遺伝子領域にもミズナおよびミブナ間で配列の違いは見られなかった。

次に、*BrTCP21* について、配列の比較を行った。ミズナおよびミブナ間で配列を比較した結果、転写領域に変異は見られなかったが、スタートコドンから数えて約 550 塩基上流において、ミブナに 6 塩基の欠損が見られた (Fig. 17)。

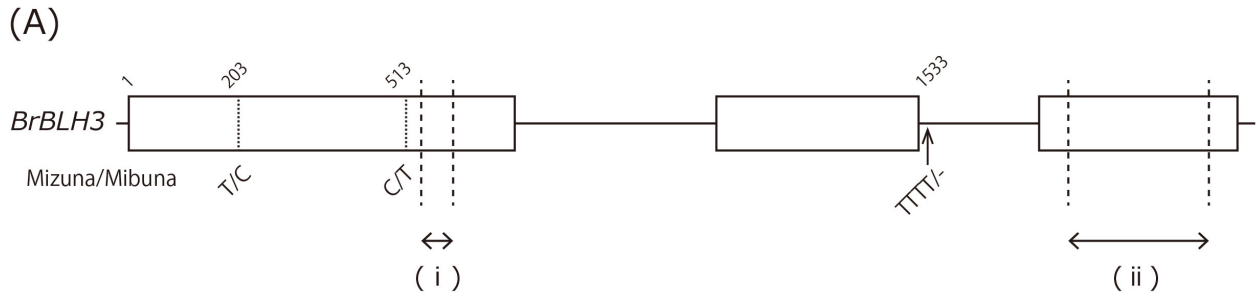
最後に、A10 の QTL のもう一つの候補遺伝子として *BrLMI1* の解析を行った。まず、*BrLMI1* の転写領域を含む配列で PCR を行った結果、ミブナからは増幅が確認できなかった (Fig. 18, A)。さらに転写領域から下流について配列を比較した結果、約 600 塩基下流において、ミズナおよびミブナ間に SNPs が見られ、また 14 塩基の欠失が見られた (Fig. 18 B, C)。ミズナおよびミブナにおける *BrLMI1* の転写領域付近における増幅効率の違いに関して詳細に解析するために、複数のプライマーを設計して PCR を行った。解析の結果、スタートコドンから数えて 923-1145 塩基の領域 (特異的プライマー ; LMI1_F5-R5 で増幅できる領域) において、ミズナでは増幅が確認できるが、ミブナからは出来ないことが分かった (Fig. 19B)。これは、*BrLMI1* のエキソン 2 とイントロン 2 を含んだ領域において、ミブナにはこの領域にトランスポゾンなどの配列が挿入されている可能性を示している。

1-3-7. 他のミズナとミブナの品種における遺伝子型の解析

ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) の解析から見つかった候補遺伝子が、ミズナとミブナの葉の形態の多様性の原因遺伝子であるかどうかを解析するため、他のミズナおよびミブナの品種について、遺伝子型の解析を行った。各候補遺伝子の配列の解析より、ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) の間で多型が見られなかった *BrGA20ox3* 以外の候補遺伝子についてマーカーを作成し、ミズナおよびミブナそれぞれ 10 種類の品種について遺伝子型を解析した。解析に用いたミズナおよびミブナの葉形を (Fig. 20) に示す。

7 番染色体の鋸歯に寄与する QTL における候補遺伝子である *BrBLH3* については、POX ドメインの領域の変異 (Fig. 13) について遺伝子型の解析を行った。解析を行った結果、早生京壬生菜など一部のミブナの品種は、ミズナ (京みぞれ) 型ホモの遺伝子型を示した (Table 8)。この結果は、ミブナ (京錦) に見られた *BrBLH3* の変異はすべてのミブナの品種で見られるわけではなく、必ずしも丸い葉の形成に必要な対立遺伝子ではない可能性を示している。もう一つの 7 番染色体の候補遺伝子である *BrTCP15* については、下流の配列の長さを利用してマーカーを作成した (Fig. 14)。解析の結果、ミブナ (京錦) 型のホモの遺伝子型を有するミブナの品種は見られなかった (Table 8)。加えて丸葉ミブナや京なじみなど、ミズナ (京みぞれ) 型のホモを有するミブナも多かった。最後の 7 番染色体の候補遺伝子である *BrPIN3* については、上流の配列に見られた一塩基欠失について解析を行った (Fig. 15)。解析の結果、ミズナの品種である京かなではミブナ型ホモの遺伝子型を有しており、ミブナの品種においてもミズナ型ホモの遺伝子型を有するものが複数見つかった (Table 8)。

次に、10 番染色体のローブの大きさに寄与する QTL における候補遺伝子である *BrTCP21* について遺伝子型の解析を行った。上流に見られた配列の違いから分子マーカーを作成し (Fig. 17)、解析を行った。解析の結果、ミズナおよびミブナにかかわらず、ほとんどの品種がミブナ型ホモの遺伝子型を示し、ミズナの対立遺伝子を有するものはわずかに 4 つであった (Table 8)。最後に、*BrLMI1* について解析を行った。下流に見られた配列の違いからマーカーを作成し (Fig. 18)、解析を行った結果、すべてのミズナの品種はミズナ型ホモの遺伝子型を示した。また、ミブナの品種はすべて、ミブナの対立遺伝子を少なくとも一つは有していた。この結果は、ミブナ (京錦) で見られた *BrLMI1* の多型は、ミブナに特有の配列である可能性があり、加えてミブナの *BrLMI1* はミズナの *BrLMI1* に対して優性である可能性を示している。



(B)

(i)

```

Mizuna_BHLH3 541 ACAACAATGACAAGGGTCAAGACTTTACTAATGGGCTAATAATAACACACAGAGAACG 600
Mibuna_BHLH3 541 ACAACAATGACAAGGGTCAAGACTTTACTAACGGGTCAACTGATAACAACCTCAGAAAACG 600
*****
Mizuna_BHLH3 601 AGAAATTCCAAGAGGAGTTATCTCCTCAAGAAGTCAAGAAGTTCAGAGCAAGAAGAACA 660
Mibuna_BHLH3 601 AGAACTGCATGAGGAGTTATCTCCTCAAGAAGTCAAGAAGTTCAGAGCAAGAAGAACA 660
**** *

```

(ii)

```

Mizuna_BHLH3 1740 GTGATGCATCAGAGTTACTTCTAACTCTAATCAAGACAAGAACAAATGCAGGAAACAT 1799
Mibuna_BHLH3 1737 GAGATGCATCAGAGTTACTTCTAACTCTAACCAGACAAGAACAAATGCAGGAAACAT 1796
*****
Mizuna_BHLH3 1800 CTCAGCTCAACACGAAGACTTTTTCTTCTCAACAACATCATCAAGGAAACAACAACA 1859
Mibuna_BHLH3 1797 CCCAGCTTAACACGAAGACTCTTATCTTCTCAACAACATCATCAAGGAAACAACAACA 1856
*****
Mizuna_BHLH3 1860 ACAACATTGCATATACATCTGCTGTTGAAGAAAACCTTGTCTTCACAGATCGAAAACGAG 1919
Mibuna_BHLH3 1857 ACAACATTGCATATACATCTGCTGTTGAAGAAAACCTGCTTCGAGATCGAAAACGAG 1916
*****

```

(C)

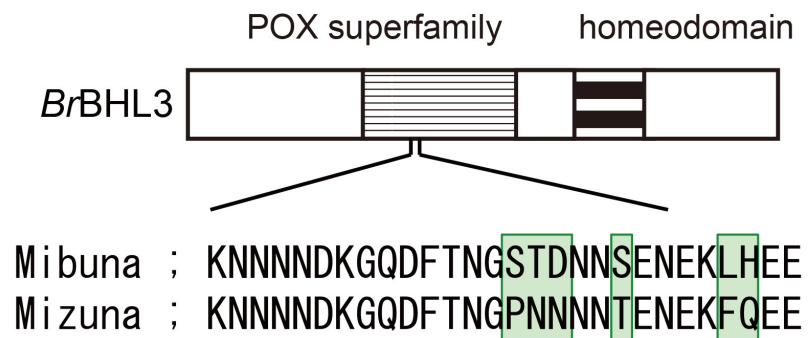
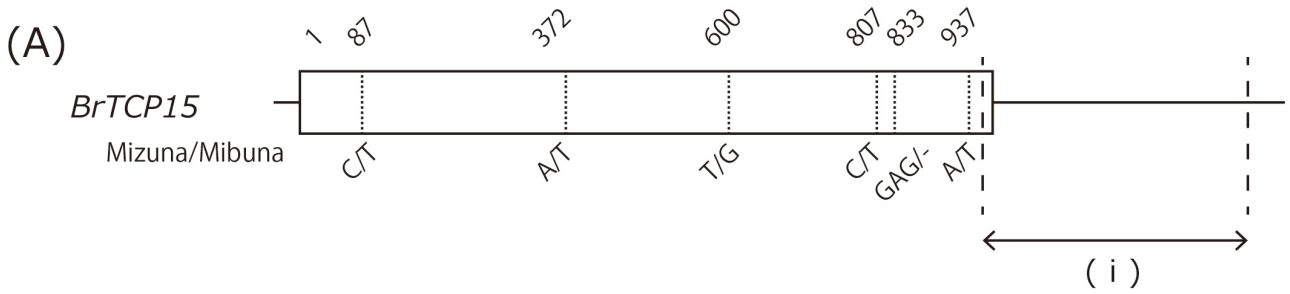


Figure 13 ミズナとミブナの *BrBLH3* の比較

BrBLH3 の塩基配列の模式図を (A) に示す。白枠がエキソン、横線がイントロンを示す。図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号で、下にミズナおよびミブナで見られた塩基置換を示す。”-”は欠失を示す。特に配列に顕著な違いが見られたのが点線で挟まれた (i), (ii) の領域で、(B) にそれらの領域におけるミズナとミブナの塩基配列を示す。*BrBLH3* のアミノ酸配列を模式的に示したものが (C) で、緑で示された部分にアミノ酸置換が見られる。



(B)

MizunaTCP15	1	CATTCCTAGGCCAA-----	14
MibunaTCP15	1	CATTCCTAGGCCAAAAAACACACAAACAATATATCTGTGAGATTATGAAGATAAGGA	60

MizunaTCP15	14	-----	14
MibunaTCP15	61	CATATAATATTAGGATAACGATATATCGTATTTGTATTTATCTATAAGCTAAACTCCTTA	120
MizunaTCP15	14	-----AA-AACCACACACAA	28
MibunaTCP15	121	GGAATAGGATCTATTCTTGTATATATACTCGTCATTGTACATCAATAAAGAACACACTT	180
		** ** *	
MizunaTCP15	29	-ACAAT-ATATCTGTGAGATTTATTTATTTTTTATGTCCTTTCGTTTGTTGATTGTT	86
MibunaTCP15	181	TACATTCATAT-TA-GAGATTTATTTATTTTT-ATGTCCTTTCGTTTGTTGATTGTT	237
		*** * **** * *****	
MizunaTCP15	87	TTTAAACAAGCGTGTTTTGTTCATTGC-TT---TTTTTCATATGGAGTATTTTTT-	141
MibunaTCP15	238	TTTAAACAAGCGTGTTTTGTTCATTGCCTTTTCATATGGAGTATTTTTTTT	297
		***** ** *****	
MizunaTCP15	142	CTTTATAAECTTCCACGAGTTCTGATCGAGTTTCATTATCTTCTGATTAATGTATTAAG	201
MibunaTCP15	298	CTTTATAAECTTCCACGAGTTCTGATCGAGTTTCATTATCTTCTGAATATTGTATCAAG	357
		***** ** *****	

(C)

Mibuna_TCP15	241	GAGGGGGVHLMNFPAPFALFSGQPLASGYGGGGGGG-EHNHYGVL SALNAAYRPVQETA	299
Mizuna_TCP15	241	GAGGGGGVHLMNFPAPFALFSGQPLASGYGGGGGGG-EHNHYGVL SALNAAYRPVQETA	300

Mibuna_TCP15	300	NQQNHGDHHHNHQEDGSTSHHS	321
Mizuna_TCP15	301	NQQNHGDHHHNQEDGSTSHHS	322

Figure 14 ミズナおよびミブナの *BrTCP15* の配列

BrTCP15 の塩基配列の模式図を (A) に示す。白枠がエキソン、横線がイントロンを示す。図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号で、下にミズナおよびミブナで見られた塩基置換を示す。"-" は欠損を示す。特に配列に顕著な違いが見られたのが点線で挟まれた (i) の領域で、(B) にその領域におけるミズナとミブナの配列を示す。ミズナとミブナの *BrTCP15* のアミノ酸配列を (C) に示す。赤枠の部分は、ミズナ・ミブナ間に見られたアミノ酸置換を示す。

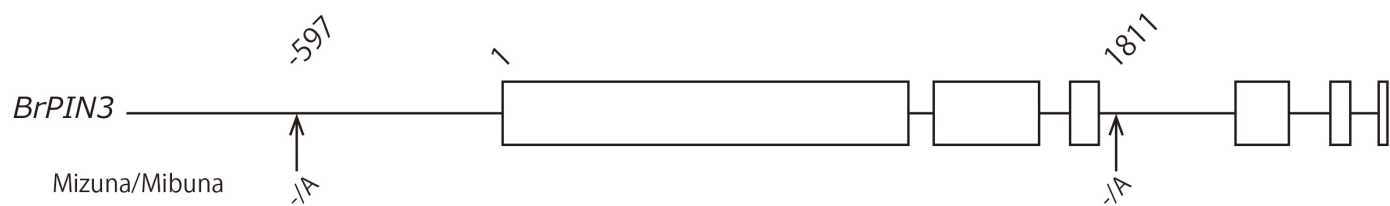
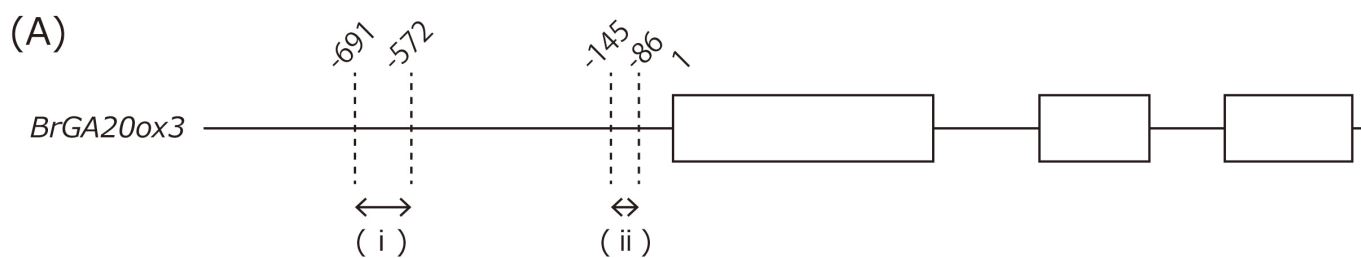


Figure 15 ミズナおよびミブナの *BrPIN3* の配列

BrPIN3 の塩基配列の模式図を示す。白枠がエクソン、横線がイントロンを示す。図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号で、下にミズナおよびミブナで見られた塩基置換を示す。”-”は欠損を示す。



(B)

(i)

Mizuna_GA20ox3	-691	CATGACATGTTGAGATTTGCGGTAGCATCACTCATTAAACCC	TTC	CAACATCATGAACA	-692
Mibuna_GA20ox3	-691	CATGACATGTTGAGATTTGCGGTAGCATCACTCATTAAACCC	TTC	CAACATCATGAACA	-692

Mizuna_GA20ox3	-631	TTGAATTGCTCAATATCATTGTGAAAAAGGCTGCCATGG	AGG	GTACATAAATGCC	-572
Mibuna_GA20ox3	-631	TTGAATTGCTCAATATCATTGTGAAAAAGGCTGCCATGG	AGG	GTACATAAATGCC	-572

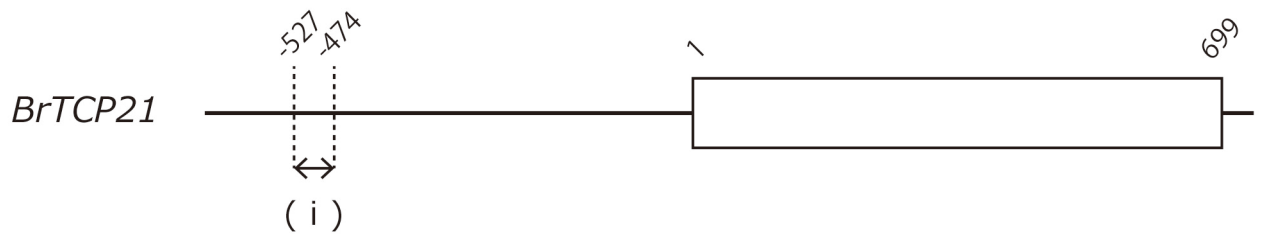
(ii)

Mizuna_GA20ox3	-145	CTCACCCCTATAAATAGCACTCCTTTCTCCAGTTACATGACCACTATAT	TTTTATAT	-86
Mibuna_GA20ox3	-145	CTCACCCCTATAAATAGCACTCCTTTCTCCAGTTACATGACCACTATAT	TTTTATAT	-86

Figure 16 *BrGA20ox3* のプロモーター領域の配列

BrGA20ox3 の塩基配列の模式図を (A) に示す。白枠がエクソン、横線がイントロンを示す。図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号を示す。先行研究より SNPs が見られると予想された領域が破線で挟まれた (i)、(ii) で示された領域で、その領域におけるミズナおよびミブナの塩基配列を (B) に示す。上赤枠で囲った塩基は、先行研究より SNPs が見られると予想された塩基で、その上の数字はスタートコドンから数えた各 SNPs の位置を示す。

(A)



(B)

Mizuna_TCP21_prom	541	CTCCTCCAGCTACAGGTGGACACGACTACTTTTCTTTTGTAGTCACGCTCCAAATGGAAT	482
Mibuna_TCP21_prom	527	CTCCTCCAG-----GTGGACACGACTACTTTTCTTTTGTAGTCACGCTCCAAATGGAAT	474
		*****	*****

Figure 17 ミズナおよびミブナの *BrTCP21* のプロモーター配列の比較

BrTCP21 の塩基配列の模式図を (A) に示す。白枠がエクソン、横線がイントロンを示す。ミズナとミブナの配列において、特に違いが見られた領域が点線で挟まれた (i) の領域で、下にそれぞれの塩基配列を示す。

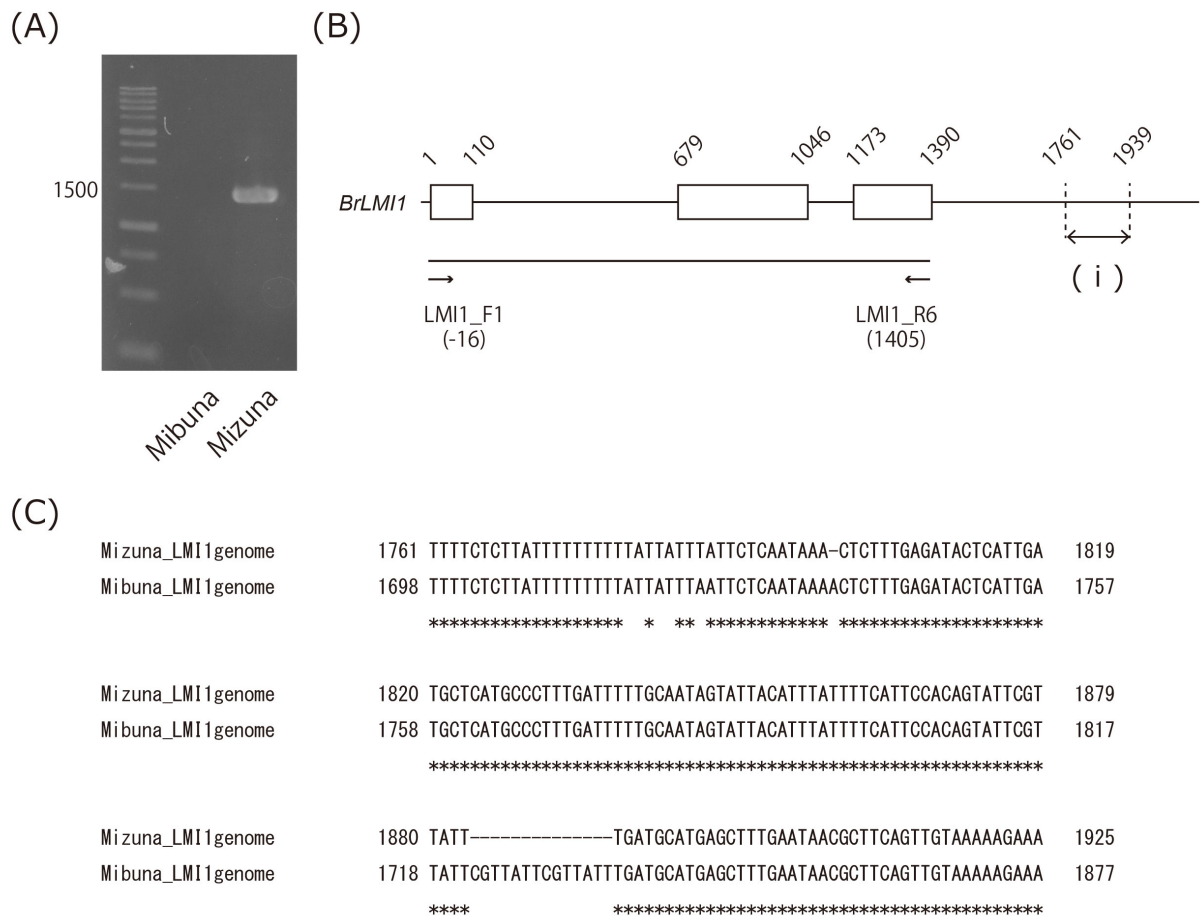
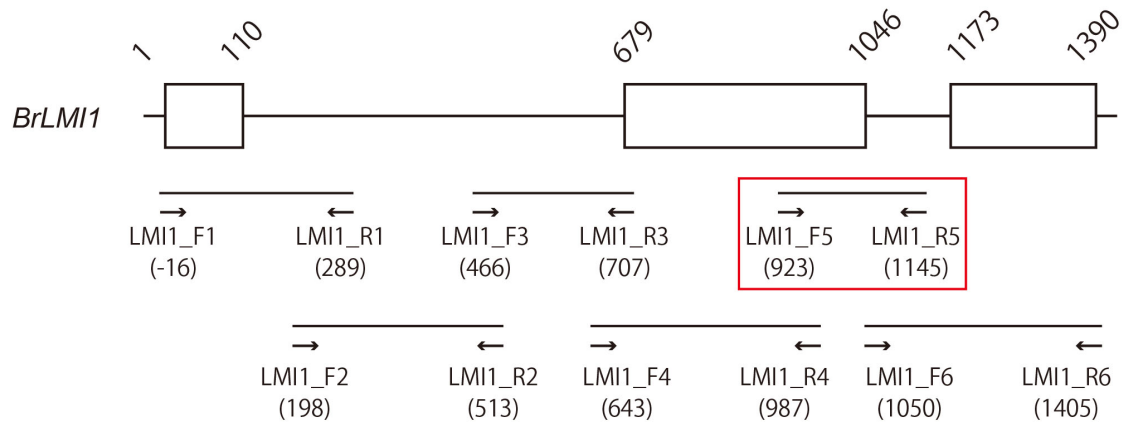


Figure 18 ミズナおよびミブナの *BrLMI1* の配列の比較

(A) ミズナとミブナの PCR の結果。第一レーンがマーカークのレーンで、左の数字が鎖長を示す。(B) *BrLMI1* の構造を模式的に示しており、白がエキソン、線がイントロンを示す。下に示した矢印で挟まれた領域が、(A) の実験の際に *BrLMI1* の増幅に用いたプライマーの位置を示し、括弧内の数字はプライマーの開始位置を示す。図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号を示している。模式図中で示した (i) におけるミズナとミブナの配列を (C) に示す。

(A)



(B)

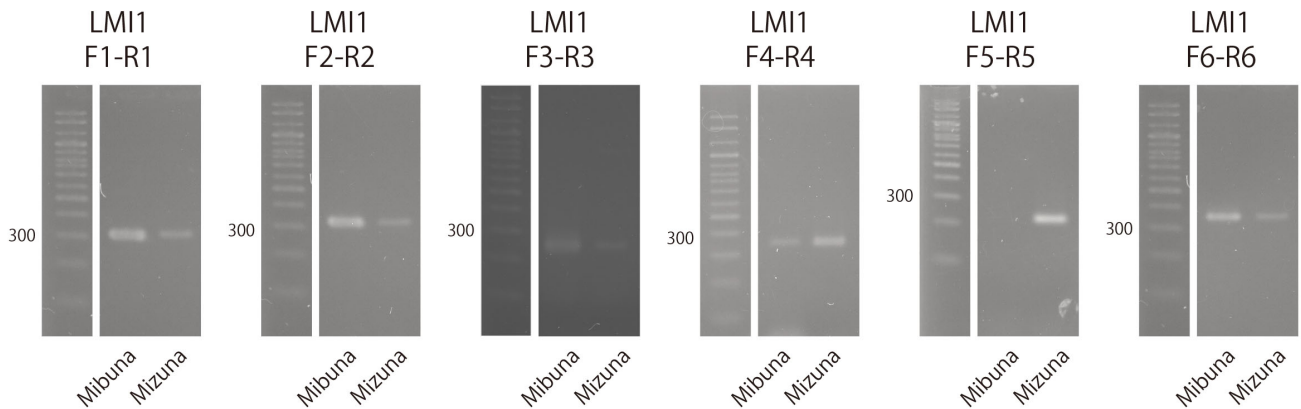


Figure 19 ミズナおよびミブナにおける *BrLMI1* の増幅

BrLMI1 の塩基配列の模式図を (A) 示す。白枠がエクソン、横線がイントロンを示しており、図上の数字がスタートコドンから数えた塩基の番号を示す。*BrLMI1* の増幅に用いた各プライマーの位置が模式図の下に記されており、プライマー名の下に記されている括弧内の数字は各プライマーのスタートコドンから数えた位置を示す。下の写真は各プライマーペアを用いたミズナとミブナの PCR の結果を示している。赤枠で囲まれたプライマーペア (LMI1_F5-R5) を用いた PCR では、ミブナにおける増幅が確認できなかった。マーカールーンの横の数字は、マーカの鎖長 (bp) を示す。

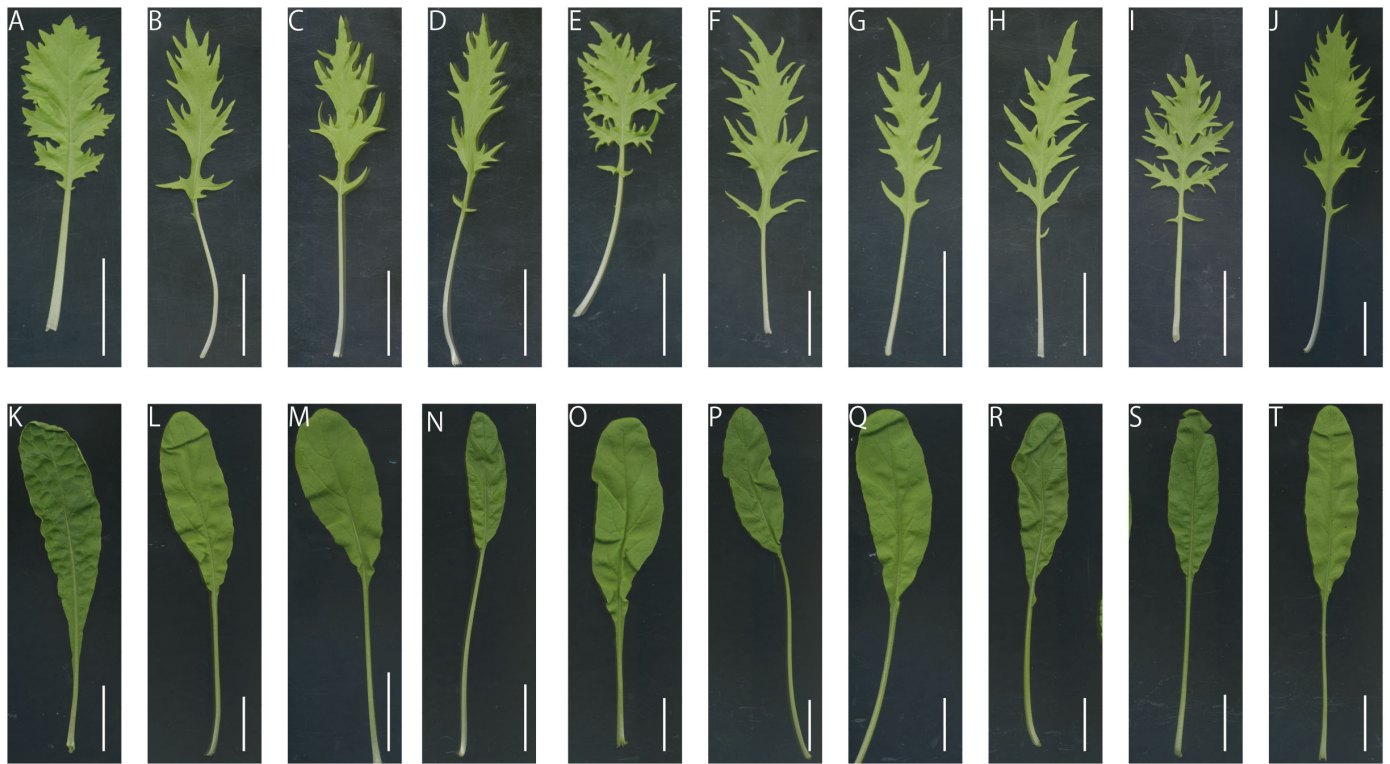


Figure 20 ミズナとミブナの他の品種の葉形

4 週間育てたミズナとミブナの葉の形態を示す。A, 広茎京菜、B, 京かなで、C, 京しぐれ、D, サラダでたべる京水菜、E, 千筋キョウナ、F, 水天、G, 早生千筋京水菜、H, 中生千筋京水菜、I, 晩生千筋京水菜、J, サラダ京水菜、K, 早生京壬生菜、L, 京風味、M, 丸葉ミブナ、N, 薬食同源 みぶな、O, 早生壬生菜、P, 丸葉ミブナ (無印)、Q, 丸葉ミブナ (中生種)、R, 丸葉ミブナ (晩生種)、S, ベビーリーフ 中生ミブナ、T, サラダ壬生菜 (京なじみ)。スケールバー ; 3 cm ミズナおよびミブナ

Table 8 ミズナ・ミブナの各品種における遺伝子型の解析

vegetable name	A07			A10	
	<i>BrBLH3</i>	<i>BrTCP15</i>	<i>BrPIN3</i>	<i>BrTCP21</i>	<i>BrLMII</i>
ミズナ					
広茎京菜	BZ hetero	Z	BZ hetero	B	Z
京かなで	Z	Z	B	B	Z
京しぐれ	BZ hetero	Z	Z	BZ hetero	Z
サラダでたべる京水菜	Z	Z	Z	BZ hetero	Z
千筋キョウナ	BZ hetero	Z	Z	B	Z
水天	Z	Z	BZ hetero	B	Z
早生千筋京水菜	Z	Z	Z	B	Z
中生千筋京水菜	BZ hetero	BZ hetero	Z	B	Z
晩生千筋京水菜	BZ hetero	BZ hetero	Z	BZ hetero	Z
サラダ京水菜	Z	Z	Z	B	Z
ミブナ					
京風味	BZ hetero	BZ hetero	BZ hetero	B	B
早生京壬生菜	B	BZ hetero	Z	B	BZ hetero
丸葉ミブナ	Z	Z	BZ hetero	B	BZ hetero
薬食同源 みぶな	BZ hetero	Z	BZ hetero	B	BZ hetero
早生壬生菜	B	BZ hetero	Z	B	B
丸葉ミブナ (無印)	Z	Z	Z	B	BZ hetero
丸葉ミブナ (中生種)	B	Z	BZ hetero	B	BZ hetero
丸葉ミブナ (晩生種)	Z	BZ hetero	BZ hetero	B	BZ hetero
ベビーリーフ (中生ミブナ)	Z	BZ hetero	Z	B	B
サラダ壬生菜 (京なじみ)	B	Z	Z	BZ hetero	BZ hetero

B: ミブナ型ホモ、Z: ミズナ型ホモ、BZ hetero: ミズナ・ミブナ型のヘテロ

1-3-8. 6番および9番染色体に見られたQTLの解析

6番染色体からは *TCP7*, *IAA28*, *WUSCHEL related homeobox 14 (WOX14)*, *ASYMMETRIC LEAVES 2-like 9 (ASL9)* の4つの遺伝子のホモログが、9番染色体からは *KANADI 2 (KAN2)*, *BLH4* の2つの遺伝子のホモログが、RNA-seqの結果より発現量に差が見られ、かつ葉形変異に寄与することが知られている遺伝子として発見できた (Table 7)。RNA-seqの解析による、発現パターンを (Fig. 21) に示す。これらのQTLについては、これらの遺伝子の中に原因遺伝子が存在する可能性がある。

1-3-9. ミズナにおけるローブの形成とジベレリンとの関連

ジベレリンは葉の形態を単純化させることがこれまでの研究により明らかになっている (Nakayama et al., 2014)。そこで、ミズナとミブナの葉における単位重量あたりのジベレリンの量を様々な葉の発生段階において行った。その結果、ジベレリンの前駆体であるGA24、GA2、GA20、GA9が検出でき、これらすべてについて20-50 mmの葉原基における含有量が、ミブナの方が多い傾向が見られた (Fig. 22)。特に葉身が5-20 mmの葉に含まれる単位重量あたりのGA24の量は、ミブナの方が有意に高かった ($p = 0.008$)。さらに、実際にミズナの茎頂にジベレリンを与えて育てたミズナは、無処理の個体に比べて葉の切れ込みが小さくなり、葉のローブが見られなくなることが分かった (Fig. 23)。このことは植物体内のジベレリンの量が葉形決定に関わっていることを示唆している。

ここで、ローブの形成に寄与すると考えられたミズナとミブナの *BrGA20ox3* について、発現量をqRT-PCRで調べてみた結果、茎頂や葉身20-50 mmの葉では差が見られなかった。一方で葉身が5-20 mmの葉では、ミブナの方がミズナと比べて有意に発現量が高いことが分かった (Fig. 24)。この時期は、ミズナおよびミブナの葉においてGA24の量に最も差が出た時期と一致している (Fig. 22 A)。一方で、RNA-seqによる解析の結果では *BrGA20ox3* の発現はミズナの方が高く、qRT-PCRの結果と逆であった (Fig. 12)。また、先行研究で見られた *BrGA20ox3* の発現量の増加は、*BrGA20ox3* プロモーター領域の塩基置換によることが示唆されているが (Li et al., 2009)、ミズナとミブナ間においてはそのような配列の違いは見られなかった (Fig. 16)。以上の結果より、ミズナおよびミブナ間で見られるジベレリン量の差には、*BrGA20ox3* が寄与しているという遺伝的根拠は、今回の解析では得られなかった。ミズナおよびミブナにおけるジベレリン量の違いには他に原因遺伝子が存在しており、*BrGA20ox3* はその下流において制御されることによって発現量が変動していると考えられる。

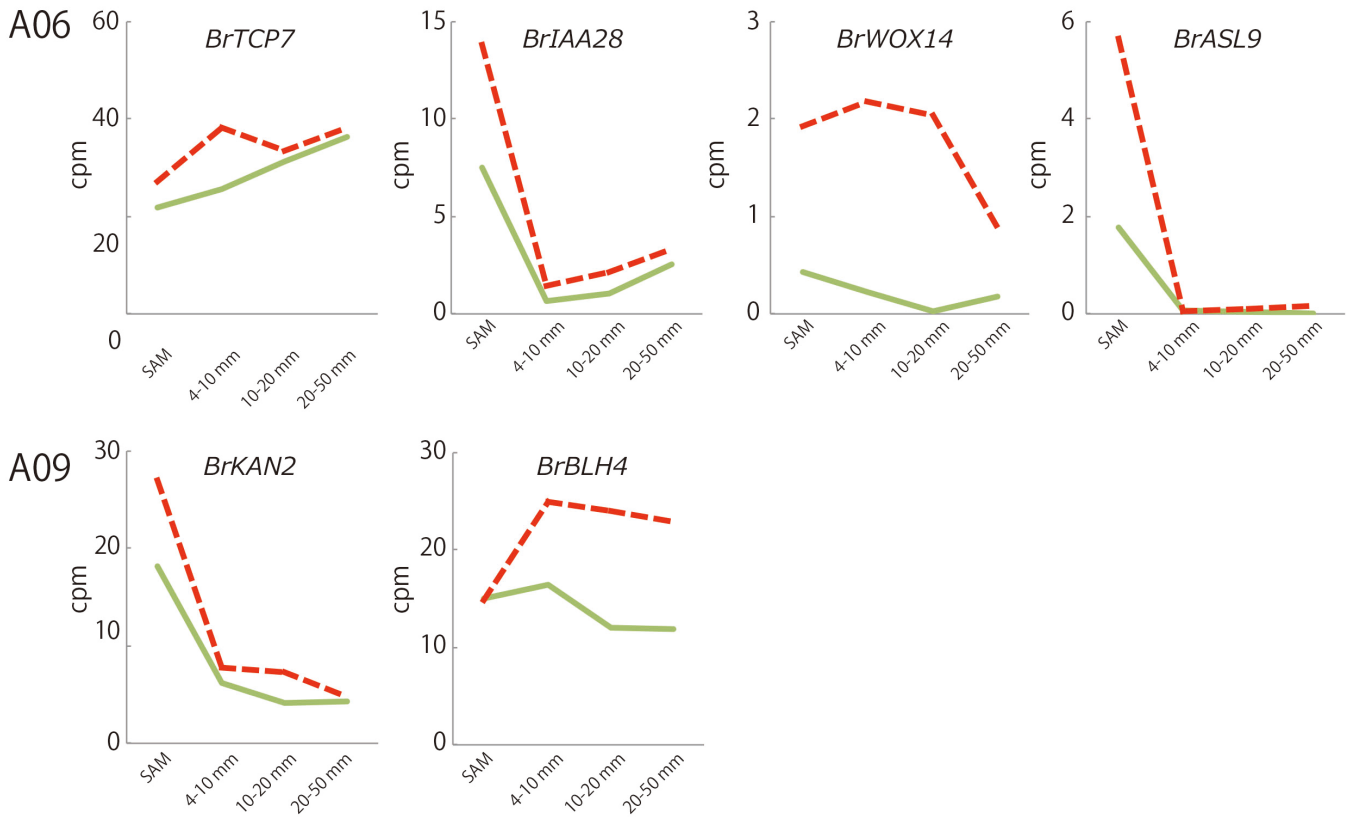


Figure 21 6番および9番染色体に見られた、葉形変異に寄与する候補遺伝子の発現パターン

RNA-seqの結果、ミズナおよびミブナで発現量に有意差があった葉形変異の候補遺伝子について、各遺伝子の発現パターンを示す。上段が6番、下段が9番染色体に見られた候補遺伝子を示す。実線（緑）がミズナ、破線（赤）がミブナにおける各遺伝子の発現量を示しており、縦軸が発現量（cpm）、横軸が発生段階を示す。

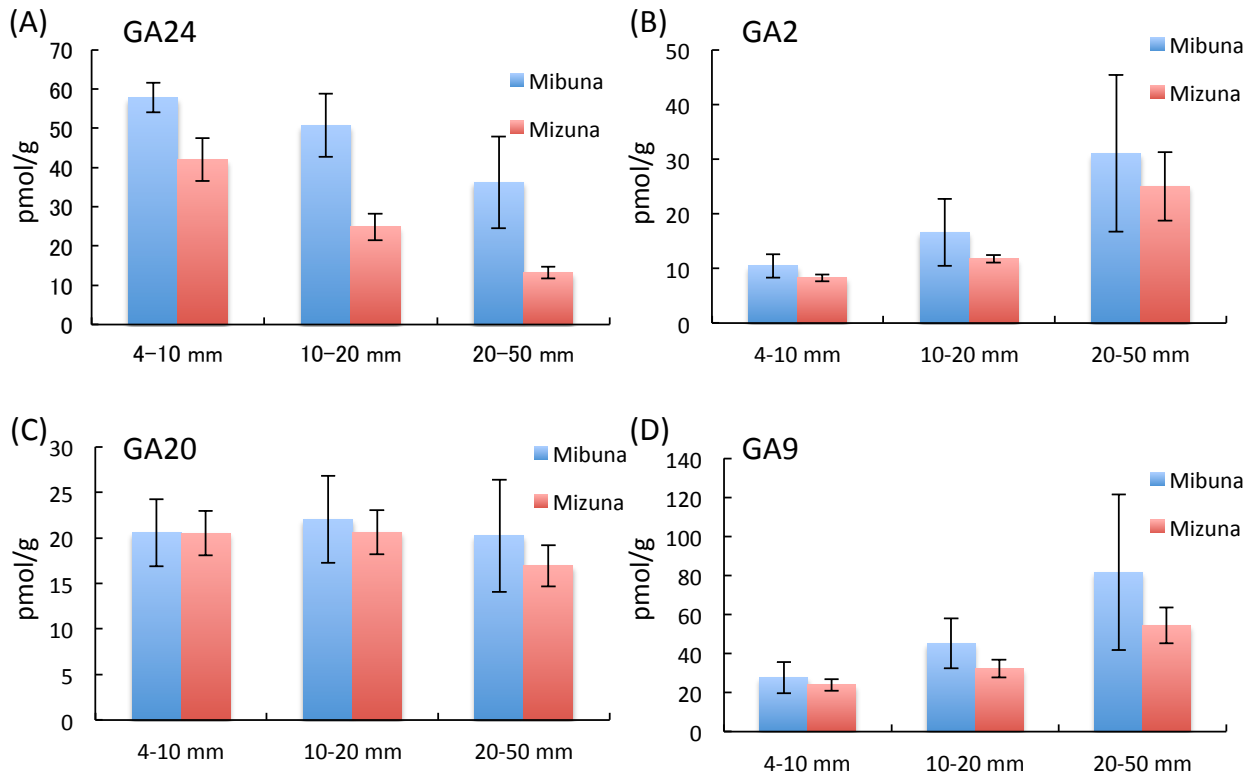


Figure 22 ミズナおよびミブナの葉の各発生段階における単位重量あたりのGA量

(A)、(B)、(C)、(D) はそれぞれ、GA24、GA2、GA20、GA9のグラフで、青がミブナ、赤がミズナの量を示す。横軸が定量した葉原基の大きさを示す。エラーバーはウェルチの t 検定で算出した ($p < 0.05$; $n=3$)。



Figure 23 ジベレリンを与えて育てたミズナの葉形

ジベレリンを与えて4週間育てたミズナの葉(右)と、Control(左)の葉形を示す。白矢印はローブを示す。スケールバー; 3 cm

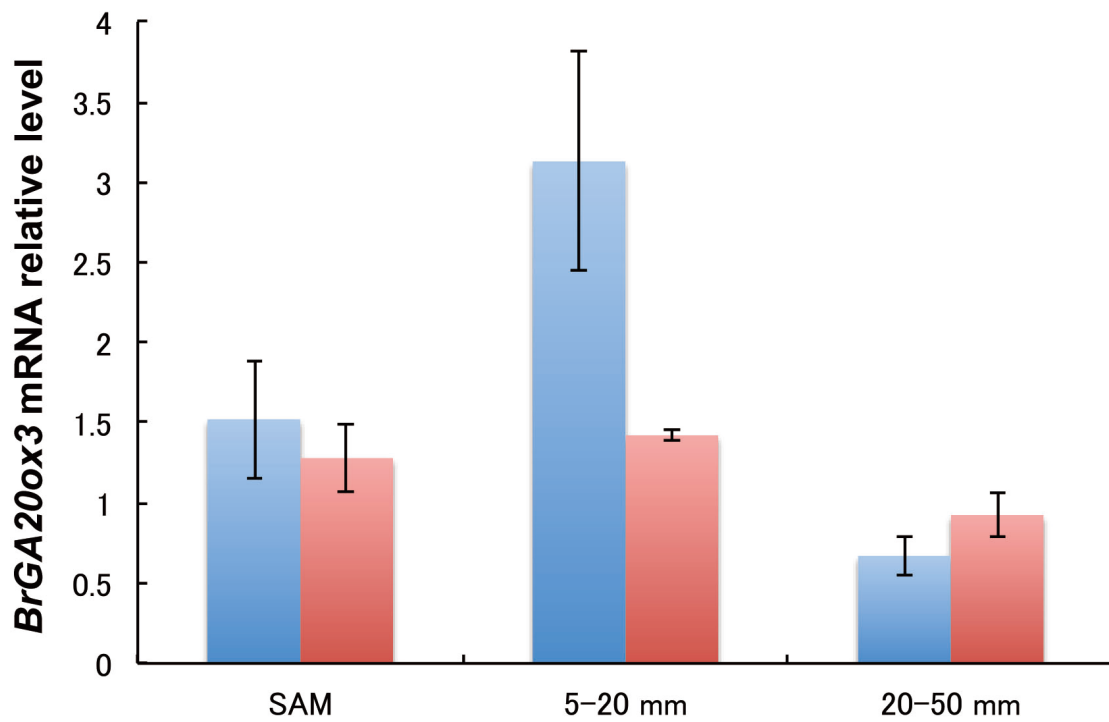


Figure 24 ミズナとミブナの、*BrGA20ox3* の発現量の比較

ミブナ(青)とミズナ (赤) の *BrGA20ox3* の発現量を示す。縦軸が発現量、横軸が各組織を示す。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

1-4. 考察

1-4-1. ミズナとミブナの葉の形態における QTL 解析

本研究では、葉の形態の多様性の原因遺伝子を明らかにするために、京野菜であるミズナおよびミブナの葉形変異の原因遺伝子の特定を目指し、QTL 解析を行った。最初に、QTL 解析に必要な連鎖地図の作成を行ったところ、CAPS マーカーを用いたものと RAD-seq を用いたものの、2 つの連鎖地図が作成できた (Fig. 7, 8)。CAPS マーカーの連鎖地図と比較して、RAD-seq の結果から作製した連鎖地図の合計鎖長が長かったことは、 F_2 世代のリード数のばらつきが大きかったこと、stacks に用いられたリードの使用率が低かった (41.1%) ことが原因と考えられる。

これらの連鎖地図を用いて QTL 解析を行った結果、ミズナとミブナの葉形変異に寄与する遺伝子座が複数見つかった。具体的には、葉の形態の複雑さに寄与する遺伝子座が 4 つ、先端の鋸歯の高さに関わる遺伝子座が 3 つ、ローブの大きさに関わる遺伝子座が 1 つ、それぞれ見つかった (Fig. 9, Table 5)。これらの遺伝子座を比較してみると、葉の先端の鋸歯の高さとローブの大きさで見られる QTL の位置は、DI に見られる QTL の位置とほぼ一致していることが分かる (Fig. 11)。このことは、葉の形態に寄与する主な QTL は 6、7、9、10 番染色体上に 4 つ存在すること、更に葉の形態の複雑さは鋸歯の高さとローブの大きさという 2 つの要素で、おおよそ説明できることを示している。DI には、7 番染色体上の QTL が最も寄与率が高く、次いで 10 番染色体上に寄与率の高い QTL が見られた (Fig. 9, Table 5)。これらの QTL が、葉の形態の多様性に最も寄与していると考えられる。DI の QTL の位置と先端の鋸歯の高さの QTL の位置が完全には一致していないことは、DI による定量では葉柄の長さが反映されることが原因と考えられ、今後の解析では葉柄を解析から除外することが解析の精度を高める上で重要であるかもしれない。RAD-seq の結果で得られた、葉の先端の鋸歯の高さに寄与する 6 番および 7 番染色体の QTL も、CAPS マーカーで得られた QTL の位置と一致した (Fig. 10, Table 5)。このことから、鋸歯の形成には特に 6 番および 7 番染色体に重要な遺伝子が存在すると考えられる。

1-4-2. 次世代シーケンス技術を用いた遺伝子発現パターンおよび各候補遺伝子の解析

葉形変異に寄与している遺伝子は、ミズナおよびミブナ間で発現量が異なる可能性が高い。よって RNA-seq を用いて発生過程における遺伝子発現量の比較を行い、ミズナとミブナの葉形変異の原因遺伝子の特定を試みた。特定できた 12 の候補遺伝子 (Table 7) について詳しく解析した結果、発生段階において様々な発現パターンを示していることが分かった (Fig. 12, 21)。このような発現パターンの変動が、葉の形態形成に重要である可能性がある。

形質への寄与率が高かった 7 番および 10 番染色体の QTL で見つかった 6 つの候補遺伝子について、ミズナとミブナで配列の比較を行った。その結果、*BrBLH3*、*BrTCP15*、*BrPIN3*、*BrTCP21*、*BrLM11* の 5 つの遺伝子について、転写領域およびその付近に多型が見つかった (Fig. 13-19)。これらの変異がミズナおよびミブナの間に見られる葉の形態の多様性の原因であるかを調べるため、他のミズナおよびミブナの品種について遺伝子型の解析を行った。その結果、今回解析した候補遺伝子の中では、

葉のローブ形成に寄与する QTL に座乗する *BrLM11* が、原因遺伝子である可能性が高いことが分かった (Table 8)。残念ながら今回の解析では、先端の鋸歯に寄与する 7 番染色体上の QTL に座乗する遺伝子については原因遺伝子の特定には至らなかった。今回解析した候補遺伝子について、より上流における領域や、あるいはエンハンサー領域を解析することで、原因遺伝子が特定できる可能性がある。あるいは、今回解析した候補遺伝子の他に原因遺伝子が存在するのかもしれない。

1-4-3. ジベレリンと葉のローブの形成の関連

ミズナとミブナの葉原基におけるジベレリン量を定量した結果、ミブナの方がジベレリン量が多く、特に葉身が 20 mm 前後の葉における GA24 の差が顕著であることが分かった (Fig. 22)。また、ジベレリン溶液をミズナの茎頂に添加して生育させると葉のローブの形成が抑制されることが分かった (Fig. 23)。葉原基の観察の結果から、発生初期の葉原基ではミズナの葉のローブの構造が不鮮明な一方で、50 mm 以下の葉でははっきりとローブが確認できる (Fig. 3E, G)。このことから、ローブの構造は葉身が 30 mm 前後の発生段階で発現する遺伝子が重要な機能を有している可能性があり、GA24 の量に差が出る時期はこの時期に一致する。これらの結果から、ジベレリン合成関連遺伝子が葉のローブ形成に寄与していると考え、*BrGA20ox3* という遺伝子の解析を行った。*BrGA20ox3* はジベレリン合成に寄与する遺伝子で、ローブに寄与する 10 番染色体の QTL に座乗していた (Table 7)。ミズナとミブナの葉における *BrGA20ox3* の発現量を qRT-PCR で調べた結果、ミブナの方が発現量が高く、特に葉身が 2 cm 前後の葉における発現量が顕著であった (Fig. 24)。この *BrGA20ox3* の発現量の差が、ミズナとミブナの GA24 の量と関係しており、葉のローブ形成に寄与している可能性が考えられた。一方で、先行研究で *BrGA20ox3* の発現量の差の原因とされるプロモーター領域の配列の違いは、ミズナおよびミブナ間では見られなかった (Fig. 16)。以上の結果も踏まえると、*BrGA20ox3* がミズナおよびミブナの形態の多様性に寄与しているという直接的な根拠は、今回の解析では得られなかった。しかし、ジベレリンがローブの形成に寄与していることは間違いなく、他のジベレリン関連遺伝子について解析を行うことで、ミズナとミブナの葉形変異の原因遺伝子が明らかになるかもしれない。

1-5. 参考文献

- Artemyeva, A.M., Budahn, H., Klocke, E. and Chesnokov, Y.V., 2011. Use of CACTA mobile genetic elements for revision of phylogenetic relationships in *Brassica rapa* L. species. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 1, 577-586.
- Anders S, Theodor PP, Huber W. HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015, 31(2):166-9.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-20.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.A., 2000. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408, 967-71.
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. and Cresko, W.A., 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol* 22, 3124-40.
- Chen, A.L., Liu, C.Y., Chen, C.H., Wang, J.F., Liao, Y.C., Chang, C.H., Tsai, M.H., Hwu, K.K. and Chen, K.Y., 2014. Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *PLoS One* 9, e96417.
- Choi, S., Teakle, G., Plaha, P., Kim, J., Allender, C., Beynon, E., Piao, Z., Soengas, P., Han, T., King, G., Barker, G., Hand, P., Lydiate, D., Batley, J., Edwards, D., Koo, D., Bang, J., Park, B. and Lim, Y., 2007. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theor Appl Genet* 115, 777 - 792.
- Chuck, G., Lincoln, C. and Hake, S., 1996. *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1277-89.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F. and Bowman, J.L., 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III *HD-ZIP* and *KANADI* genes. *Curr Biol* 13, 1768-74.
- Eshed, Y., Baum, S.F., Perea, J.V. and Bowman, J.L., 2001. Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr Biol* 11, 1251-60.
- Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E. and Martienssen, R.A., 2006. Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the trans-acting siRNA pathway. *Curr Biol* 16, 933-8.
- Hasson, A., Blein, T. and Laufs, P., 2010. Leaving the meristem behind: the genetic and molecular control of leaf patterning and morphogenesis. *C R Biol* 333, 350-60.
- Hay, A., Barkoulas, M. and Tsiantis, M., 2006. *ASYMMETRIC LEAVES1* and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development* 133, 3955-61.

- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S. and Tsiantis, M., 2002. The gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* 12, 1557-65.
- Hay, A. and Tsiantis, M., 2010. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137, 3153-65.
- Hedden, P. and Phillips, A.L., 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5, 523-30.
- Iwata, H. and Ninomiya, S., 2006. AntMap: Constructing Genetic Linkage Maps Using an Ant Colony Optimization Algorithm. *Breeding Science* 56, 371-377.
- Kawamura, K., Kawanabe, T., Shimizu, M., Nagano, A.J., Saeki, N., Okazaki, K., Kaji, M., Dennis, E.S., Osabe, K. and Fujimoto, R., 2016. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis. *Plant Gene* 5, 1-7.
- Kieffer, M., Master, V., Waites, R. and Davies, B., 2011. *TCP14* and *TCP15* affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. *Plant J* 68, 147-58.
- Kim, H., Choi, S., Bae, J., Hong, C., Lee, S., Hossain, M., Van Nguyen, D., Jin, M., Park, B.-S., Bang, J.-W., Bancroft, I. and Lim, Y., 2009. Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles the ten individual chromosomes of *Brassica rapa*. *BMC Genomics* 10, 432.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F.Y. and Sinha, N., 2008. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel *KNOX* gene. *Curr Biol* 18, 672-7.
- Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. and Sakakibara, H., 2009. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* 50, 1201-14.
- Kubo, N., Saito, M., Tsukazaki, H., Kondo, T., Matsumoto, S. and Hirai, M., 2010. Detection of quantitative trait loci controlling morphological traits in *Brassica rapa* L. *Breeding Science* 60, 164-171.
- Kumar, R., Kushalappa, K., Godt, D., Pidkowich, M.S., Pastorelli, S., Hepworth, S.R. and Haughn, G.W., 2007. The *Arabidopsis* BEL1-LIKE HOMEODOMAIN proteins *SAW1* and *SAW2* act redundantly to regulate *KNOX* expression spatially in leaf margins. *Plant Cell* 19, 2719-35.
- Li, F., Kitashiba, H., Inaba, K. and Nishio, T., 2009. A *Brassica rapa* Linkage Map of EST-based SNP Markers for Identification of Candidate Genes Controlling Flowering Time and Leaf Morphological Traits. *DNA Research* 16, 311-323.
- Liang, J., Liu, B., Wu, J., Cheng, F. and Wang, X., 2016. Genetic Variation and Divergence of

- Genes Involved in Leaf Adaxial-Abaxial Polarity Establishment in *Brassica rapa*. *Front Plant Sci* 7, 94.
- Ling, A.E., Kaur, J., Burgess, B., Hand, M., Hopkins, C.J., Li, X.I., Love, C.G., Vardy, M., Walkiewicz, M., Spangenberg, G., Edwards, D. and Batley, J., 2007. Characterization of simple sequence repeat markers derived in silico from *Brassica rapa* bacterial artificial chromosome sequences and their application in *Brassica napus*. *Molecular Ecology Notes* 7, 273-277.
- Lou, P., Zhao, J., Kim, J.S., Shen, S., Del Carpio, DP., Song, X., Jin, M., Vreugdenhil, D., Wang, X., Koornneef, M. and Bonnema, G., 2007. Quantitative trait loci for flowering time and morphological traits in multiple populations of *Brassica rapa*. *J Exp Bot* 58, 4005-16.
- Lowe, A.J., Moule, C., Trick, M. and Edwards, K.J., 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1103-1112.
- Lysak, M.A., Koch, M.A., Pecinka, A. and Schubert, I., 2005. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res* 15, 516-25.
- Martín-Trillo, M. and Cubas, P., 2010. *TCP* genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* 15, 31-39.
- Nagaharu, U., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* 7, 389-452.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N. and Kimura, S., 2014. Regulation of the *KNOX-GA* gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress. *Plant Cell* 26, 4733-48.
- Nancy G. Dengler and Hirokazu Tsukaya, 2001. Leaf Morphogenesis in Dicotyledons: Current Issues. *International Journal of Plant Sciences* 162, 459-464.
- Nardmann, J., Ji, J., Werr, W. and Scanlon, M.J., 2004. The maize duplicate genes narrow sheath1 and narrow sheath2 encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development* 131, 2827-39.
- Nath, U., Crawford, B.C., Carpenter, R. and Coen, E., 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299, 1404-7.
- Ni, X., Sun, Z., Zhang, H., He, H., Ji, Z. and Xia, H., 2014. Genetic engineering combined with random mutagenesis to enhance G418 production in *Micromonospora echinospora*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 1383-90.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L. and Hake, S., 2000. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* 127, 5523-32.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D., 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-63.

- Plackett, A.R., Powers, S.J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., Phillips, A.L., Wilson, Z.A., Thomas, S.G. and Hedden, P., 2012. Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis gibberellin 20-oxidases* demonstrates that *GA20ox1*, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* 24, 941-60.
- Robinson, MD, and Smyth, GK (2008). Small sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9, 321-332.
- Saddic, L.A., Huvermann, B., Bezhani, S., Su, Y., Winter, C.M., Kwon, C.S., Collum, R.P. and Wagner, D., 2006. The LEAFY target *LM11* is a meristem identity regulator and acts together with LEAFY to regulate expression of CAULIFLOWER. *Development* 133, 1673-82.
- Smith, H.M., Boschke, I. and Hake, S., 2002. Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9579-84.
- Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Kage, T. and Hirai, M., 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1092-1098.
- Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Ohyama, A., Hirai, M. and Fukuoka, H., 2004. Characteristics of Microsatellites in *Brassica rapa* Genome and their Potential Utilization for Comparative Genomics in Cruciferae. *Breeding Science* 54, 85-90.
- Suwabe, K., Tsukazaki, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Kondo, M., Fujimura, M., Nunome, T., Fukuoka, H., Hirai, M. and Matsumoto, S., 2006. Simple Sequence Repeat-Based Comparative Genomics Between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The Genetic Origin of Clubroot Resistance. *Genetics* 173, 309-319.
- Takuno, S., Kawahara, T. and Ohnishi, O., 2006. Phylogenetic relationships among cultivated types of *Brassica rapa* L. em. Metzg. as revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 279-285.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, DP. and Zamore, P.D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17, 49-63.
- Town, C.D., Cheung, F., Maiti, R., Crabtree, J., Haas, B.J., Wortman, J.R., Hine, E.E., Althoff, R., Arbogast, T.S., Tallon, L.J., Vigouroux, M., Trick, M. and Bancroft, I., 2006. Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell* 18, 1348-59.
- Tsiantis, M., Schneeberger, R., Golz, JF., Freeling, M. and Langdale, J.A., 1999. The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* 284, 154-6.
- Tsuro, M., Suwabe, K., Kubo, N., Matsumoto, S. and Hirai, M., 2005. Construction of a

- Molecular Linkage Map of Radish (*Raphanus sativus* L.), Based on AFLP and *Brassica*-SSR Markers. *Breeding Science* 55, 107-111.
- Vlad, D., Kierzkowski, D., Rast, M.I., Vuolo, F., Dello Iorio, R., Galinha, C., Gan, X., Hajheidari, M., Hay, A., Smith, R.S., Huijser, P., Bailey, C.D. and Tsiantis, M., 2014. Leaf Shape Evolution Through Duplication, Regulatory Diversification, and Loss of a Homeobox Gene. *Science* 343, 780-783.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., Chaabouni, S., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M., 2005. The tomato *Aux/IAA* transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17, 2676-92.
- Wang, S., Basten, C. and Zeng, Z., 2007. Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J.-H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J.C., Paterson, A.H., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A.G., Park, B.-S., Weisshaar, B., Liu, B., Li, B., Liu, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G.J., Bonnema, G., Tang, H., Wang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hirakawa, H., Abe, H., Guo, H., Wang, H., Jin, H., Parkin, I.A.P., Batley, J., Kim, J.-S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J.A., Li, J., Yu, J., Meng, J., Wang, J., Min, J., Poulain, J., Wang, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M.G., Zhao, M., Jin, M., Ramchiary, N., Drou, N., Berkman, P.J., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, S., Huang, S., Sato, S., Sun, S., Kwon, S.-J., Choi, S.-R., Lee, T.-H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., et al., 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* 43, 1035-1039.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y. and Huang, H., 2003. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130, 4097-1107.
- Yamaguchi, T., Nukazuka, A. and Tsukaya, H., 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant Cell Physiol* 53, 1180-94.
- Yu, X., Wang, H., Zhong, W., Bai, J., Liu, P. and He, Y., 2013. QTL mapping of leafy heads by genome resequencing in the RIL population of *Brassica rapa*. *PLoS One* 8, e76059.
- Zhang, J., Lu, Y., Yuan, Y., Zhang, X., Geng, J., Chen, Y., Cloutier, S., McVetty, P.B. and Li, G., 2009. Map-based cloning and characterization of a gene controlling hairiness and seed coat color traits in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* 69, 553-63.

Zhu, Q.H., Zhang, J., Liu, D., Stiller, W., Liu, D., Zhang, Z., Llewellyn, D. and Wilson, I., 2016.
Integrated mapping and characterization of the gene underlying the okra leaf trait in
Gossypium hirsutum L. J Exp Bot 67, 763-74.

高嶋四郎、『京の伝統野菜と旬野菜』、トンボ出版、2003年、55～61ページ

青葉高、『日本の野菜文化史辞典』、八坂書房、2013年、163～176ページ

青葉高、『本邦そ菜在来品種の地理的分布と分類に関する研究 (第4報)ツケナ在来品種の分類と地理的
分布について』、園芸学会雑誌、1964年、65～72ページ

青葉高、『野菜在来品種の系譜』、法政大学出版局、1981年、199～216ページ

高嶋四郎、『京の伝統野菜と旬野菜』、トンボ出版、2003年、55～61ページ

青葉高、『日本の野菜文化史辞典』、八坂書房、2013年、163～176ページ

青葉高、『本邦そ菜在来品種の地理的分布と分類に関する研究 (第4報)ツケナ在来品種の分類と地理的
分布について』、園芸学会雑誌、1964年、65～72ページ

青葉高、『野菜在来品種の系譜』、法政大学出版局、1981年、199～216ページ

第2章

ミズナとミブナのトライコーム形成の解析

2-1. 序論

ミズナとミブナの葉の形態に着目して遺伝的な解析を進める過程において、ミブナ（京錦）の葉には葉の表面に多数のトライコームが見られる一方で、ミズナ（京みぞれ）の方には殆ど見られないことを見出した。トライコームとは、植物の葉、茎、花芽組織などの表皮細胞から形成される伸びた毛状の組織で、ほぼすべての陸上植物に存在する。トライコームは解析の容易さから、細胞の運命決定、細胞周期の調節、形態形成などの優れたモデルとして研究されてきた。トライコームの形態は、植物種によって単細胞や多細胞、枝分かれのあるものと無いものなど、様々な形態がある。また、トライコームの機能としては、温度調節、水分調節、防虫性、UV 耐性、耐凍害性、腺としての機能などが知られている (Traw and Bergelson, 2003; Wagner et al., 2004; Suo et al., 2013; Yang and Ye, 2013)。工業的には、ワタのトライコームが綿として利用されているほか、葉菜類におけるトライコームは食感にも影響するため、育種の面においても重要な組織である。そのため、ミズナとミブナに見られるトライコーム数の違いに注目することで、ミズナとミブナの形態の多様性とその遺伝的背景について新たな知見が得られる他、育種への応用も期待できると考えた。

トライコームについては、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究から、様々な知見が得られている。シロイヌナズナでは、トライコームは単細胞で、3つの枝分かれ構造を有している。また、トライコームの形成は、細胞運命の決定、細胞の特異化、形態形成の3段階から成っており (Hülkamp et al., 1994) それぞれの段階は異なる因子によって制御されている。トライコーム形成に重要な因子には、最初に単離されたものとして *GLABRA1 (GL1)* が知られている (Oppenheimer et al., 1991)。*GL1* は R2R3-type MYB family に属する転写因子で、欠損するとトライコーム形成が阻害される因子として単離された。また、*GL1* と同じ機能を有する因子として *WEREWOLF (WER)* や *MYB23* が知られている (Walker et al., 1999; Kang et al., 2009)。他にも、basic helix loop helix (bHLH) を有する *GL3* と *ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)*、WD40 repeat factor である *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* などが、トライコーム誘導因子として知られている (Yang and Ye, 2013)。*GL1* と *TTG1* は、それぞれ *GL3* と *EGL3* と結合し、MYB/bHLH/WD リピート複合体を形成する。この複合体は表皮細胞に作用し、homeodomain-leucine zipper を有する *GL2* と、WRKY transcription factor を有する *TTG2* を発現させ、トライコームを分化させる (Rerie et al., 1994; Ishida et al., 2007a)。また、ジベレリンやサイトカイニンといった植物ホルモンも表皮細胞の分化に寄与しており、*GL1* の転写を促進する因子である *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS (GIS)* や *Zinc finger protein 9 (ZFP9)* が、植物ホルモンに応答することによって花芽におけるトライコーム形成に寄与していることが報告されている (Gan et al., 2007)。トライコームの抑制因子としては *CAPRICE (CPC)*、*TRIPTYCHON (TRY)*、*ENHANCER OF TRY AND CPC 1 (ETC1)*、*ETC2*、*ETC3*、*TRICHOMELESS1 (TCL1)* が知られており、どれも R3 MYB に属している (Kirik et al., 2004; Wang et al., 2007b)。これらの抑制因子は発現した細胞から隣の細胞に移動して、*GL1* と競合して不活性な複合体を形成することで、トライコーム形成を抑制する。

また、トライコームの二次壁の形成に重要な因子についても報告されている。シロイヌナズナのト

ライコーンは強い複屈折性を有しており、光を当てると偏光が見られる。しかし、*TRICHOME BIREFRINGENCE (TBR)* に欠損があると、ライコーンの二次壁におけるセルロース含有量が減少し、結晶性が損なわれることで偏光が見られなくなる他、ライコーンの形態にも異常が生じることが知られている (Potikha and Delmer, 1995)。また、*TBR* のホモログである *TRICHOME BIREFRINGENCE-like 1, 2 (TBL1, 2)* もまた、ライコーンの複屈折性や数に影響することが報告されている (Bischoff et al., 2010)。

B. rapa のライコーンはシロイヌナズナと異なり、分岐構造を有していないことが知られている。また、*B. rapa* におけるライコーンの形成については先行研究があり、6番染色体上の *BrGL1* が機能しているという報告がある (Li et al., 2009; Kubo et al., 2010)。6番染色体の *BrGL1* には4つの対立遺伝子が存在しており、機能を有する野生型である A-allele と比較して、B-allele、C-allele、D-allele はそれぞれ、エキソン3の5塩基欠失によるフレームシフト、1塩基置換によるアミノ酸置換、2塩基欠失によるフレームシフトによって機能が欠損し、ライコーンが形成されなくなることが知られている (Li et al., 2011)。また、*B. rapa* の別の品種を用いた報告では、9番染色体に最も大きくライコーン形成に寄与する QTL が存在する他、7番および4番染色体上にもライコーン形成に寄与する QTL が存在するという報告もある (Song et al., 1995)。これらの研究は、ライコーン形成に寄与する遺伝子は、同じ *B. rapa* であっても品種によって様々であることを示している。

そこで本章では、ミズナとミブナのライコーン形成に寄与する遺伝子の単離を試みた。ミズナとミブナを交配することで得た F_2 世代について葉におけるライコーン数を計量し、QTL 解析を行った。得られた QTL に座乗していたライコーン形成関連遺伝子について配列の解析を行い、形質との連鎖性を解析した。他のミブナの品種についても遺伝子型とライコーン数との関連を解析することで、ミブナにおけるライコーン形成の原因遺伝子の特定を目指した。

2-2. 方法

2-2-1. 植物の栽培法

ミズナ (京みぞれ)、ミブナ (京錦) および F_2 集団については、第 1 章と同一のものを用いた。表現型の定量を行った株は、播種後 4 週間育ててから定量を行った。また、他の *B. rapa* の品種については、第 1 章で用いたものの他 (Table 1)、新たに購入したものを用いた (Table 9)。

2-2-2. トライコームの計測法と連鎖地図の作成

解析に用いたミズナおよびミブナの F_2 世代は、第 1 章の解析で用いた集団と同じものを用いた。トライコームの数は、各個体の本葉について、葉の先端から 1 cm 以内に生えているトライコームの本数を計測した。

CAPS マーカーは第 1 章で作成したものと同一のものを用いたが、R software の geno.Table を用いて不適切なマーカーを除いた後に、Antmap で連鎖地図の作成を行った。RAD-seq の結果については、第 1 章と同一のものを用いた。QTL 解析は WinQTL cartographer ver. 2.5 (Wang et al., 2007a), を用いて composite interval mapping (CIM) 法で解析した。検定 (permutation test) は 1000 回行い、LOD スコアの閾値は $p = 0.05$ とした。

2-2-3. トライコーム形成の候補遺伝子のマーカー作成

各遺伝子について、(Table 10) に示すプライマーを設計し、CAPS マーカーと同じ条件で PCR を行った。*BrTBR*、*BrETC1*、*BrGL3b* についてはそれぞれの制限酵素で処理することで、遺伝子型の解析を行った。*BrGL1* については、シーケンスによる配列の比較で遺伝子型を解析した。

2-2-4. ミズナおよびミブナにおける *BrGL1* の qRT-PCR 解析

京都産業大学の温室 (23°C) で 3 週間育てたミズナおよびミブナの 5–10 mm の葉原基を液体窒素で凍結させ、RNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。qRT-qPCR は、*BrGL1* については (forward: 5'-GGAACACCCATCTCAGTAAG-3'; reverse: 5'-TATTTCCCACTACAACGTTTC-3') というプライマーを用いた。その他、対照とするアクチンのプライマーの条件などは、第 1 章と同じ方法を用いた。

2-2-5. *BrGL1* の分子系統解析

系統解析は MEGA6 (Tamura et al., 2013; Kumar et al., 2016) を用いて、(<http://www.megasoftware.net/>) neighbor-joining 法で行った。系統樹の作成は GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で検索できた *AtMYB* の塩基配列を用いて行った。ブートストラップ値は 1000 回の検証を行って算出した。

2-2-6. *BrGL1* の転写領域下流に対する分子マーカーの作成

9 番染色体上の *BrGL1* の下流の配列の解析は (forward: 5'-GTCACATTACCTTGATATGG-3'; reverse: 5'-ACTGGACTATCAGTTTGCTC-3') というプライマーを用いて、電気泳動による鎖長の比較によって行った。また、6 番染色体上の *BrGL1* のエキソン 3 の配列は、 (forward: 5'-TCTCTCCCAAATCCAGATGG-3'; reverse: 5'-CTAGAGGCAGTAGCCAGTAT-3') というプライマーを用いて PCR 産物をシーケンスすることで、遺伝子型を特定した。PCR の条件は、第 1 章の CAPS マーカーと同じ条件を用いた。

Table 9 *B. rapa*の品種と購入先

分類	品種名	購入先	所在地
<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>hakabura</i>	野沢菜	つる新種苗	長野県 松本市
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>perviridis</i>	小松菜	トーホク株式会社	栃木県 宇都宮市
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	チンゲン菜	トーホク株式会社	栃木県 宇都宮市
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	はくさい	トーホク株式会社	栃木県 宇都宮市
<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>rapa</i>	すぐき菜	つる新種苗	長野県 松本市
	聖護院	つる新種苗	長野県 松本市
	天王寺	つる新種苗	長野県 松本市
	うぐいす菜	つる新種苗	長野県 松本市
	な花(寒咲花菜)	トーホク株式会社	栃木県 宇都宮市
	かぶ	トーホク株式会社	栃木県 宇都宮市
	あやめ雪	サカタのタネ	神奈川県 横浜市
	紫姫	有限会社 フタバ種苗卸部	沖縄県 南城市
	日野菜蕪	タキイ種苗株式会社	京都府 京都市
	津田蕪	タキイ種苗株式会社	京都府 京都市
	万木かぶ	クラギ株式会社	三重県 松阪市

Table 10 候補となる遺伝子のマーカー

Assay type	Marker IDs	Target gene	Forward primer	Reverse primers	position of SNPs	SNPs	
						Mibuna	Mizuna
SNPs	Bra039065M	<i>BrGL1</i>	GACCTATCCCGATCGTATAC	GTAAGAGATATTTTCATAGCC	upstream 776 bp	C	T
Markers of candidate genes related to trichome development.							
Assay type	Marker IDs	Target gene	Forward primer	Reverse primers	Candidate Enzymes	Expected size (bp)	
						Mibuna	Mizuna
CAPS	Bra037385M	<i>BrTBR</i>	TCGTTCCCAAGCTTTACCC	GATTGGTGTAGAGAGGACCC	<i>BclI</i>	163	128, 47
	Bra037388M	<i>BrETC1</i>	CAGAAGTGAGCAGTCTTGAG	CACGTTGAATTTGTAGAAG	<i>BclI</i>	96, 54	150
	Bra027653M	<i>BrGL3b</i>	ACATTGTTCCCTGAAGCTCC	TGGTTCCTTGCTCATACACGC	<i>BslI</i>	150	100, 150

2-3. 結果

2-3-1. 連鎖地図の作成とミズナとミブナのトライコーム数の違い

CAPS マーカーを用いた解析より、84 マーカーによる連鎖地図が作成できた。地図の全長は 927.2 cM で、マーカー間の平均距離は 11.2 cM であった。マーカーの位置を示す (Fig. 25)。

ミズナとミブナの葉を比較すると、ミズナにはほとんどトライコームが見られないが、ミブナには葉の表面に多数のトライコームが生えていることが分かった (Fig. 26 A-D)。本研究ではトライコームの数を定量するため、葉の先端から 1 cm の領域に生えているトライコームの数を数え、形質の定量を行った。その差を比較したところ、ミブナのトライコーム数 (中央値 = 17.3) はミズナ (中央値 = 0.7) よりも有意に多いことが分かった (Fig. 26 E)。

2-3-2. トライコームの本数における QTL 解析と原因遺伝子の特定

トライコームの数について、2 種類の連鎖地図を用いて QTL 解析を行った結果、2013 年は 9 番染色体上のマーカー Bra036325M-Bra037200M 間に、2014 年は 9 番染色体上のマーカー 10088-10441 間に閾値以上の LOD スコアが見られた。これらの QTL の位置を *B. rapa* のゲノムデータから調べてみた結果、ほぼ同じ位置を示していることが分かった (Fig. 27, Table 11)。2013 年も 2014 年も同じ QTL が形質に寄与していたことから、この形質は環境に左右されないことが示唆された。

B. rapa のゲノム情報からこの位置に存在する遺伝子を探索したところ、*ETC1*、*GL1*、*TBL26*、*TBL4* 遺伝子の相同遺伝子が存在することが分かった (Fig. 27)。これらはトライコーム形成に寄与することが知られている。2014 年に特定できた QTL 付近からは *GL3* というトライコーム関連の相同遺伝子も 2 つ見つかった (Payne et al., 2000; Morohashi et al., 2007)。しかしながら、これらの遺伝子は 2013 年に特定できた QTL である Bra036325M-Bra037200M の外側に位置していた。

ミズナとミブナの *BrETC1*、*BrTBL26*、*BrGL1*、*BrGL3b* について、それぞれマーカーを作成し (Table 10)、形質との連鎖を比較した。各マーカーの遺伝子型におけるトライコーム数の分布を調べた結果、他の遺伝子と比較して *BrGL1* が最も形質との連鎖性が高かった (Fig. 28, Table 12)。具体的には、トライコーム数が最も少ない集団 (0-5 本) の個体数は、2013 年、2014 年共に *BrGL1* がミズナ型ホモである個体が最も多かった (Table 12)。このことから、*BrGL1* がトライコーム数の差異に関する原因遺伝子と考えられた。

なお、Bra036619M-10634 における LOD スコアも閾値より高く、その領域内に *TBR* のホモログである *BrTBL4* が存在していた。*TBL4* は *TBR* のホモログで、*TBR* はトライコームの数にも寄与することが報告されている (Potikha and Delmer, 1995; Bischoff et al., 2010)。しかし、*TBR* とトライコームの本数との関連はシロイヌナズナでもよく知られておらず、加えてミズナおよびミブナ間で転写領域および上流 1400 bp 付近まで配列を比較したが、*BrTBL4* の配列に変異は見られなかった (Fig. 29)。これらの理由から、*BrTBL4* はトライコーム形成に寄与していないと考えられた。

2-3-3. トライコーム形成に寄与する3番染色体に見られるQTL

2013年のQTL解析の結果からは、LODスコアが閾値(=3.3)を超える領域が3番染色体上のBra006674M-Bra006629Mからも見つかった(Table 11)。この領域からはトライコーム形成の関連遺伝子として、*TRIPTYCHON (TRY)*、*TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2)*、*ENHANCER OF TRY AND CPC 3 (ETC3)*、*Zinc finger protein 8 (ZFP8)* のホモログが見つかった (Johnson et al., 2002; Schellmann et al., 2002; Schiefelbein, 2003; Gan et al., 2007; Ishida et al., 2007b; Wester et al., 2009)。しかしながら、このQTLの形質への寄与率は10.3%でしかなく、9番染色体上のQTLの寄与率(78.0%)と比較して大きく下回る。さらに2014年のQTL解析の結果からは3番染色体上のQTLは見られないことから、3番染色体のQTLは、ミズナとミブナのトライコーム形成にはそれほど大きな影響はないものと考えられる。

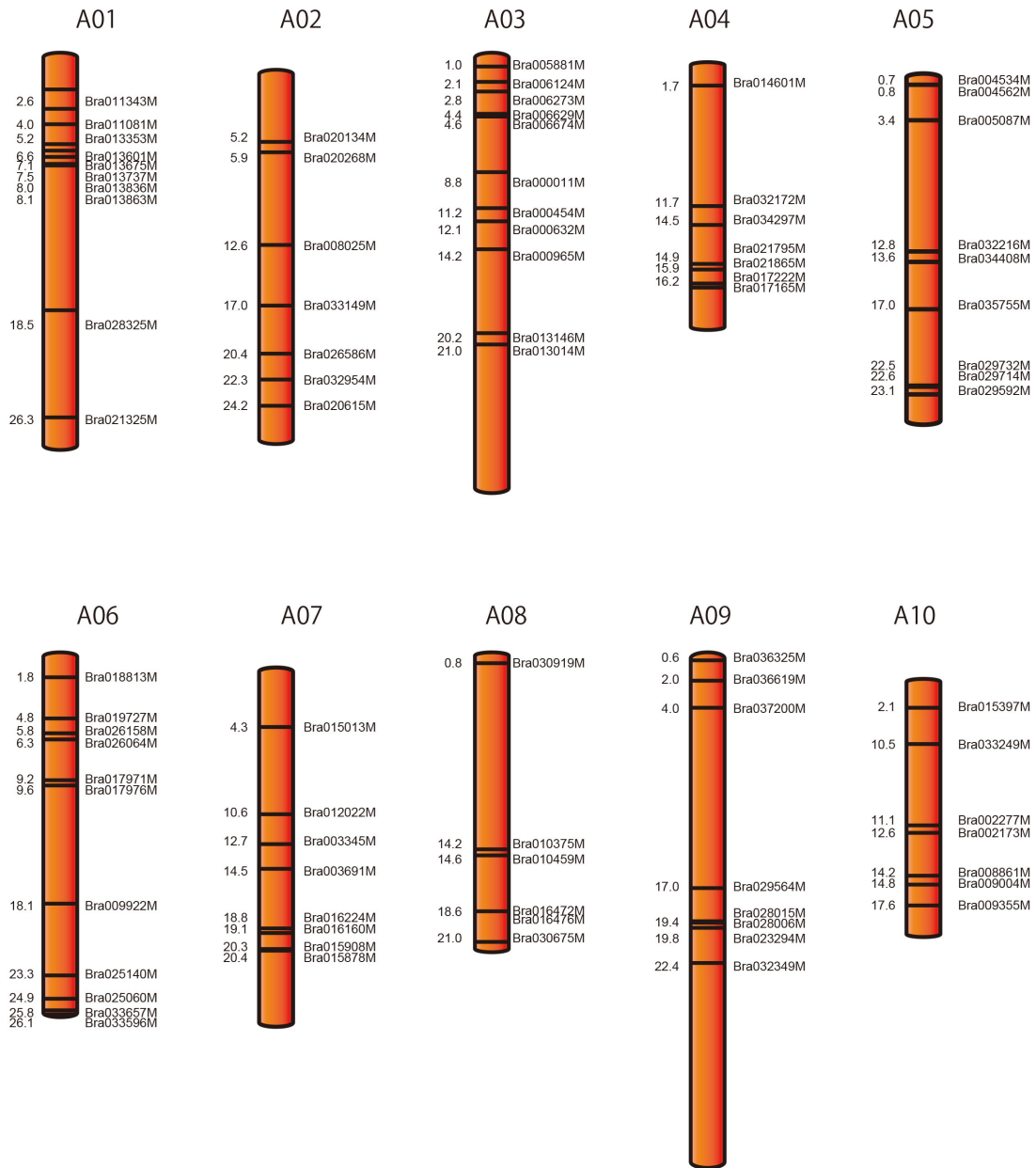


Figure 25 QTL 解析に用いた CAPS マーカーの位置

トライコームにおける QTL 解析に用いた連鎖地図。地図の上の番号が染色体番号、地図の右にマーカー名、左にマーカーの位置 (Mb) が記されている。染色体番号は、PLANT GDB

(<http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Br>) を参照した。

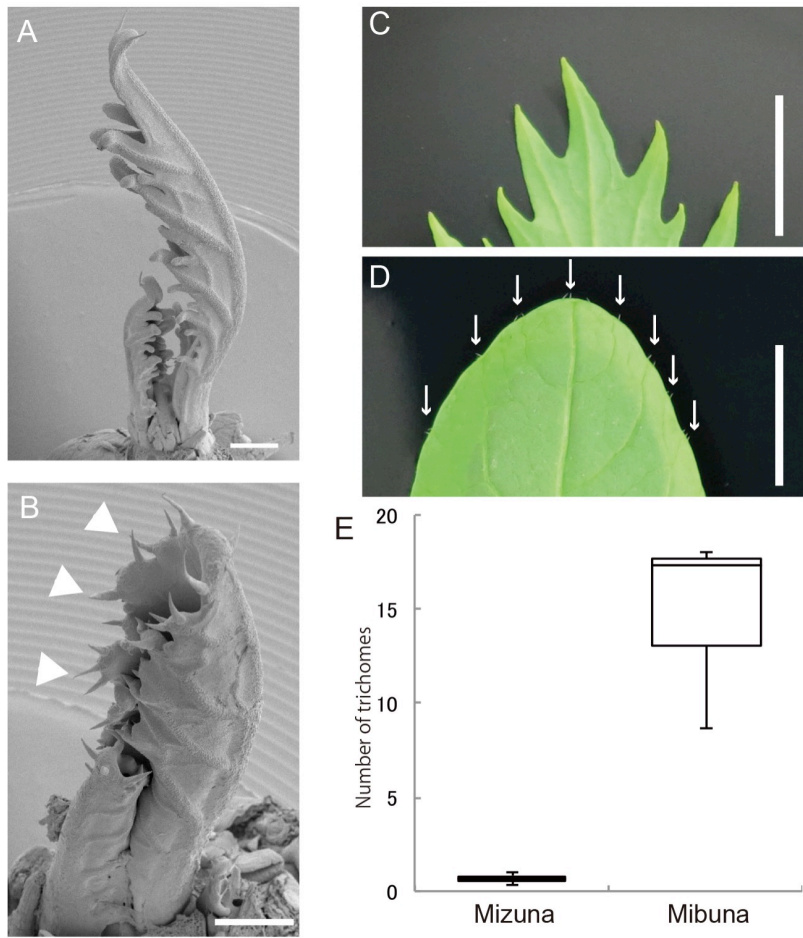


Figure 26 ミズナとミブナの葉原基とトライコームの数

ミズナ (A) とミブナ (B) の葉原基の様子。ミズナの葉には特に何も見られない一方で、ミブナの葉の縁には多数のトライコーム (白三角) が見られる。成長した葉においても、ミズナ (C) の葉の縁には何も見られない一方で、ミブナ (D) には多数のトライコームが見られる (白矢印)。ミズナとミブナのトライコームの数を、ボックスプロットで示したものを (E) に示す。スケールバー; (A, B) 0.5 mm、(C, D) 2 mm。

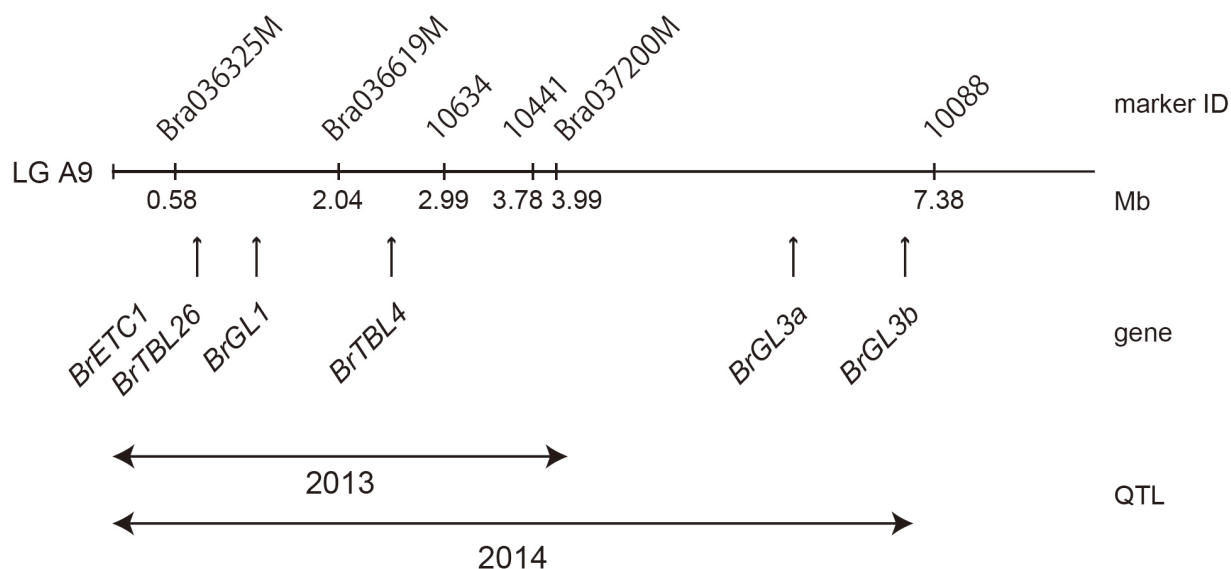


Figure 27 分子マーカーと、QTL の物理的位置

地図の上にはマーカー名が、下にはそれぞれの物理的距離 (Mb) が記されている。物理的位置は PlantGDB (<http://www.plantgdb.org>) を参照した。下には、候補遺伝子の位置と、2013年と2014年に特定できたQTLの位置を示す。

Table 11 トライコームに関するQTL解析

Genotyping	Year	Sample number	LG	Interval	Physical location (Mb)	LOD score	Additive effect	Dominance effect
CAPS markers	2013	96	A9	Bra036325M-Bra037200M	0.58-3.99	27.7	15.78	1.24
			A3	Bra006273M-Bra006629M	2.78-4.35	5.8	-3.66	4.31
RAD-seq	2014	82	A9	10088-10441	2.99-7.38	14.4	9.45	2.57
Above the LOD threshold						Scored at the LOD peak		

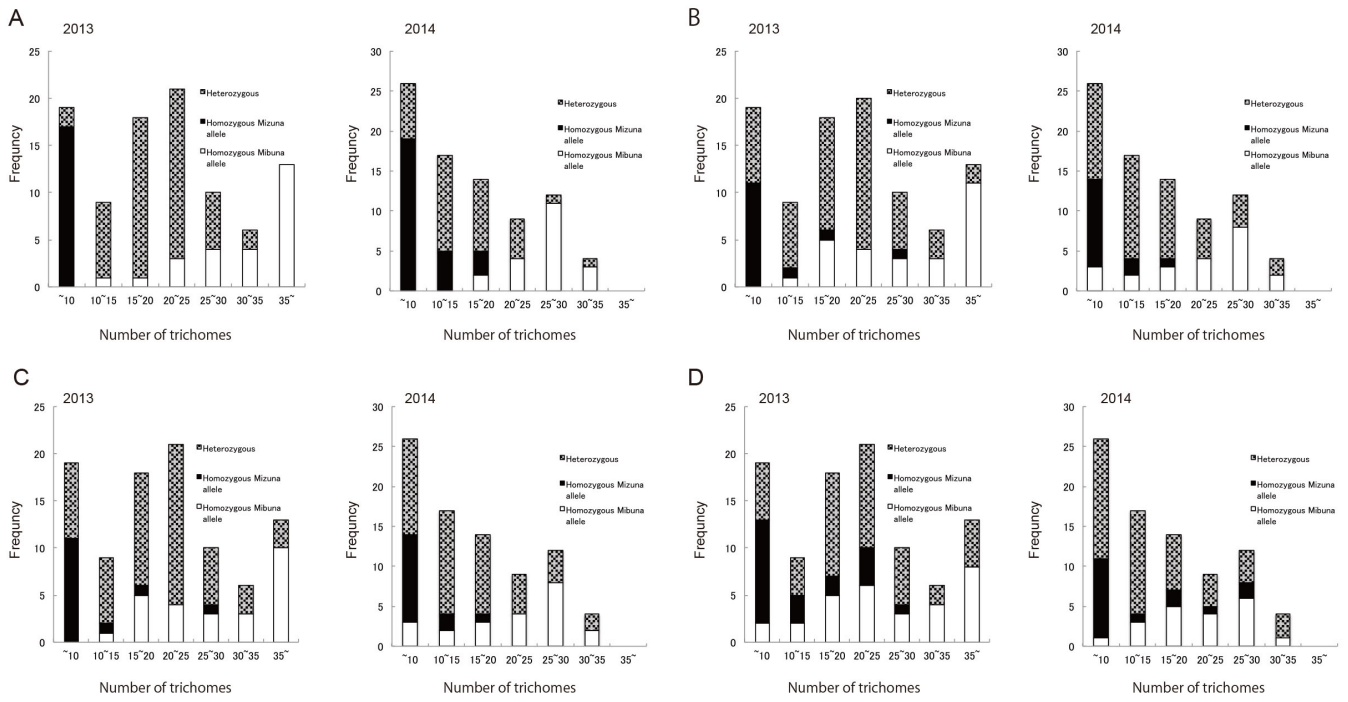


Figure 28 トライコーム数に寄与する候補遺伝子と、形質との連鎖

F₂世代について、*BrGL1* (A)、*BrETC1* (B)、*BrTBL4* (C)、*BrGL3b* (D) のマーカーを用いて、形質との連鎖を調べた。各グラフは、左が2013年、右が2014年の結果を示す。縦軸が個体数、横軸がトライコームの数を示している。グラフ中の黒は遺伝子型がミズナ型ホモ、白がミブナ型ホモ、灰がヘテロ型を示す。

Table 12 F₂集団のトライコーム数と遺伝子型の関連

		trichome number							
		~10	10~15	15~20	20~25	25~30	30~35	35~	
2013	<i>BrGL1</i>	Mibuna homo	0	1	1	3	4	4	13
		Heterozygous	2	8	17	18	6	2	0
		Mizuna homo	17	0	0	0	0	0	0
	<i>BrETC1</i>	Mibuna homo	0	1	5	4	3	3	11
		Heterozygous	8	7	12	16	6	3	2
		Mizuna homo	11	1	1	0	1	0	0
	<i>BrTBR</i>	Mibuna homo	0	1	5	4	3	3	10
		Heterozygous	8	7	12	17	6	3	3
		Mizuna homo	11	1	1	0	1	0	0
<i>BrGL3b</i>	Mibuna homo	2	2	5	6	3	4	8	
	Heterozygous	6	4	11	11	6	2	5	
	Mizuna homo	11	3	2	4	1	0	0	
2014	<i>BrGL1</i>	Mibuna homo	0	0	2	4	11	3	0
		Heterozygous	7	12	9	5	1	1	0
		Mizuna homo	19	5	3	0	0	0	0
	<i>BrETC1</i>	Mibuna homo	3	2	3	4	8	2	0
		Heterozygous	12	13	10	5	4	2	0
		Mizuna homo	11	2	1	0	0	0	0
	<i>BrTBR</i>	Mibuna homo	3	2	3	4	8	2	0
		Heterozygous	12	13	10	5	4	2	0
		Mizuna homo	11	2	1	0	0	0	0
<i>BrGL3b</i>	Mibuna homo	1	3	5	4	6	1	0	
	Heterozygous	15	13	7	4	4	3	0	
	Mizuna homo	10	1	2	1	2	0	0	

2-3-4. ミズナおよびミブナの *BrGL1* の発現量と配列の比較

ミズナおよびミブナから単離できた *BrGL1* の配列と、シロイヌナズナの *GL1* の配列も合わせて遺伝子系統樹を作成した結果、*BrGL1* の配列はシロイヌナズナの *MYB* よりも *GL1* と近縁である事がわかった (Fig. 30 A)。また、アミノ酸配列を比較すると、*MYB* ドメインが保存されていることが分かった (Fig. 30 B)。これらの結果から、*BrGL1* はシロイヌナズナの *GL1* と同じ機能を有すると考えられた。ミズナとミブナの葉原基における *BrGL1* について、qRT-PCR による発現量の比較を行った結果、ミブナの方がミズナと比べて発現量が有意に高いことが分かった (Fig. 31)。この発現量の違いが、ミズナとミブナのトライコーム数の違いに寄与していると考えられる。

なお、先行研究では、*B. rapa* のトライコーム形成には、6 番染色体の *BrGL1* が重要であることが報告されている (Li et al., 2009; Kubo et al., 2010)。これまでに 6 番染色体の *BrGL1* には 4 つの対立遺伝子 (A, B, C, D-allele) が存在することが知られており、そのひとつである B-allele はエキソン 3 に 5 塩基の欠失があることで、フレームシフトによって機能が欠損している (Li et al., 2011)。ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) の 6 番染色体上の *BrGL1* の配列を決定した結果、これらの *BrGL1* はどちらも、機能を持たない B-allele であることが分かった (Fig. 32)。このことから、ミズナ (京みぞれ) とミブナ (京錦) においては、6 番染色体の *BrGL1* の機能については解析する必要はないことが分かった。

次にミズナとミブナの 9 番染色体上の *BrGL1* を単離し、配列を決定したところ、スタートコドンから数えて 722 番目のイントロンに一塩基多型 (SNPs) が見られたのみであり、エキソン領域に変異は見られなかった (Fig. 33 A)。先行研究より、シロイヌナズナの *GL1* は、転写領域の下流の領域が発現に寄与していることが知られているため (Larkin et al., 1993)。ミズナとミブナの *BrGL1* の下流の配列を調べた。その結果、多数の SNPs や挿入/欠損が見られ、特にスタートコドンから数えて約 2200 bp 下流において、ミブナの配列 (Mibuna *GL1*-allele) はミズナの配列 (Mizuna *GL1*-allele) よりも、約 200 bp 長いことが明らかになった (Fig. 33 B)。先行研究の結果を踏まえ、これらの配列の違いが、*BrGL1* の発現量の違いに寄与していると考えられた。

2-3-5. 他の *B. rapa* の品種における *BrGL1* の遺伝子型とトライコーム数との関連

9 番染色体上の *BrGL1* の下流の配列からマーカーを作成し、その他の *B. rapa* の品種についても遺伝子型を解析した結果、ミブナ以外の *B. rapa* で、Mibuna *GL1*-allele を有するものは見つからなかった (Table 13)。このことから、この配列はミブナに特有の配列である可能性がある。興味深いことに、ハクサイ、ナバナ、カブなど (トーホク株式会社より購入) は、ミブナ (京錦) でもミズナ (京みぞれ) でもない *BrGL1* の下流配列を示した (Table 13)。な花、カブ、紫姫はミズナよりも少し短いバンド (Shorter band) を示し (Fig. 34)、ハクサイとあやめ雪は 200 bp 付近に重複した複数のバンド (Duplicated bands) が見られた (Fig. 34)。

一方で、今回 QTL 解析に用いなかったミブナの品種について、それぞれ複数個体について 9 番染色体上の *BrGL1* の下流の配列を解析した結果、ミブナ (京錦) と同じ *BrGL1* の下流配列を有するミブナの品種が複数見つかった。これらの遺伝子型とトライコームの数との関連を調べた結果、9 番染色

体上の *BrGL1* の下流の配列とトライコーン数には関連が見られなかった (Fig. 35 A)。そこで、これらの各個体について 6 番染色体上の *BrGL1* の遺伝子型についても解析を行った結果、6 番染色体上の *BrGL1* が機能を失っている B-allele を有している場合には、ミブナ (京錦) の *BrGL1* の下流配列を持つとトライコーンの本数が増えることが分かった (Fig. 35 B)。一方で、6 番染色体上の *BrGL1* が機能を有する A-allele や A, B のヘテロであった場合、ミブナ (京錦) の *BrGL1* の下流配列とトライコーンの数との相関は見られなかった (Fig. 35 C, D)。

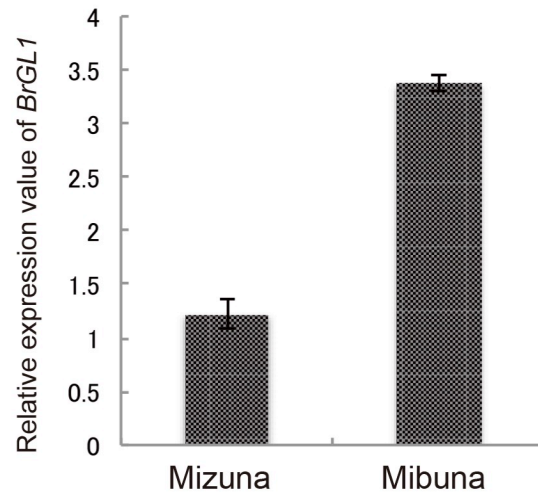


Figure 31 ミズナとミブナの *BrGL1* の発現量

ミズナとミブナの葉原基における *BrGL1* の発現量。標準偏差をウェルチの *t* 検定で算出した結果、 $p < 0.05$ であった ($n=3$)。

<i>BrGL1</i> A-allele	301	GGAAGGACAGATAACCAAGTCAAGAATCACTGGAACACTCATCTCAGCAAAAAAATCGTC	360
<i>BrGL1</i> B-allele	301	GGAAGGACAGATAACCAAGTCAAGAATCAC-----CACTCATCTCAGCAAAAAAATCGTC	355
Mizuna <i>GL1</i> (Chr6)	301	GGAAGGACAGATAACCAAGTCAAGAATCAC-----CACTCATCTCAGCAAAAAAATCGTC	355
Mibuna <i>GL1</i> (Chr6)	301	GGAAGGACAGATAACCAAGTCAAGAATCAC-----CACTCATCTCAGCAAAAAAATCGTC	355
		*****	*****

Figure 32 6 番染色体上の *BrGL1* の配列

ミズナとミブナの6番染色体上の *BrGL1* の配列を比較した結果、どちらも B-allele と同じ5塩基の欠損が見られた。

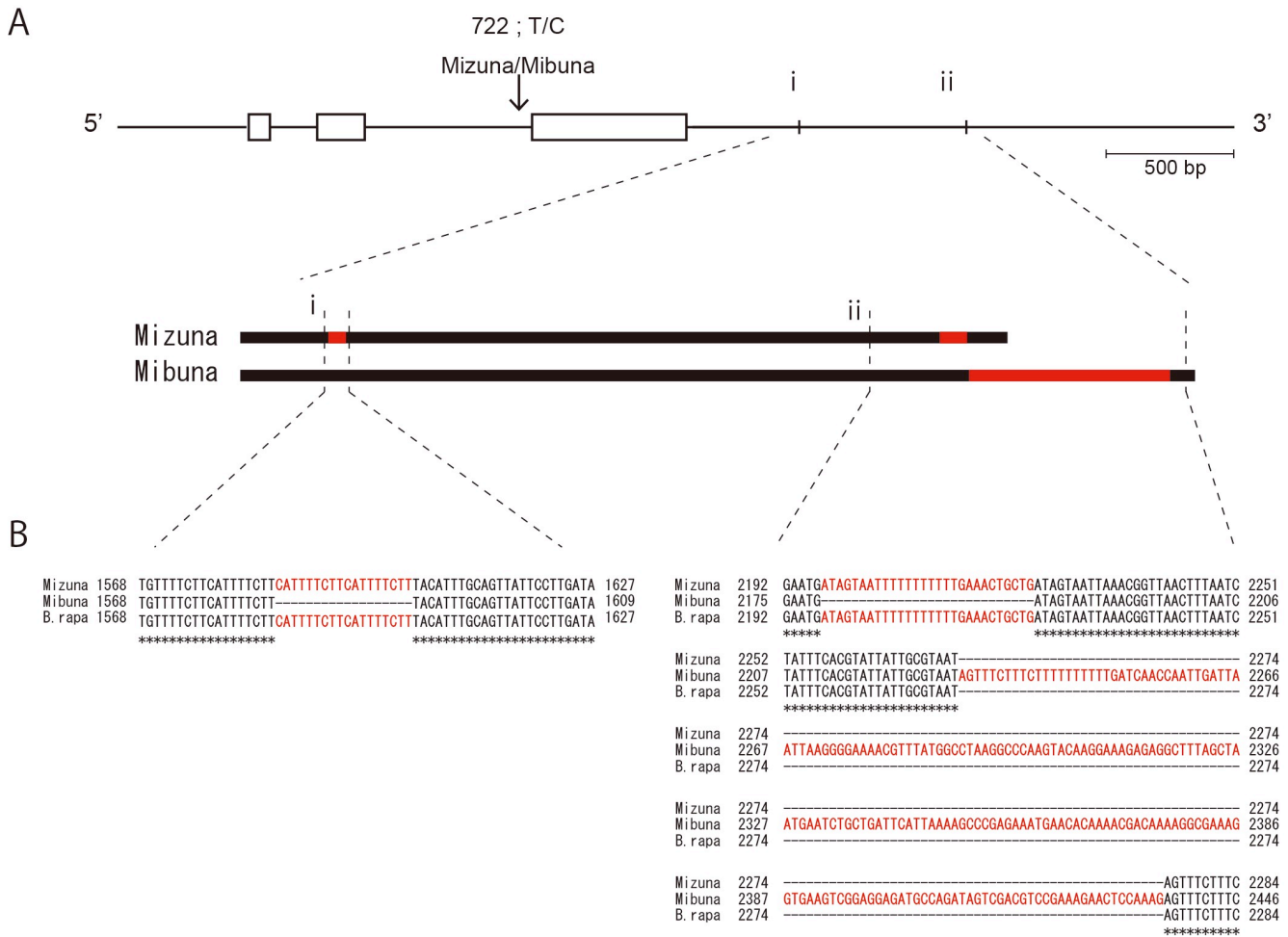


Figure 33 ミズナおよびミブナの 9 番染色体上の *BrGL1* の模式図と、下流の配列の比較

(A) 白い四角で示されているのが *BrGL1* のエキソン、黒線は非転写領域を示している。i, ii で示した転写領域の下流の配列を、*B. rapa* の配列と合わせてアライメントしたものが (B) で、ミズナおよびミブナ間で挿入欠損が見られた。塩基番号は、*BrGL1* のスタートコドンから数えている。

Table 13 *B. rapa*の各品種におけるLG A09上のBrGL1の遺伝子型

分類	品種名	GL1 allele (chr 9)
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>nipposinica</i> (Mizuna)	広茎京菜	Mizuna GL1 allele
	京かなで	Mizuna GL1 allele
	京しぐれ	Mizuna GL1 allele
	サラダでたべる京水菜	Mizuna GL1 allele
	千筋キョウナ	Mizuna GL1 allele
	水天	Mizuna GL1 allele
	早生千筋京水菜	Mizuna GL1 allele
	中生千筋京水菜	Mizuna GL1 allele
	晩生千筋京水菜	Mizuna GL1 allele
	サラダ京水菜	Mizuna GL1 allele
	<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>hakabura</i>	野沢菜
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>perviridis</i>	小松菜	Mizuna GL1 allele
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	チンゲン菜	Mizuna GL1 allele
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	はくさい	Duplicated bands*
<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>rapa</i>	すぐき菜	Mizuna GL1 allele
	聖護院	Mizuna GL1 allele
	天王寺	Mizuna GL1 allele
	うぐいす菜	Mizuna GL1 allele
	な花(寒咲花菜)	Shorter band**
	かぶ	Shorter band**
	あやめ雪	Duplicated bands*
	紫姫	Shorter band**
	日野菜蕪	Mizuna GL1 allele
	津田蕪	Mizuna GL1 allele
	万木かぶ	Mizuna GL1 allele

* Duplicated bands were detected.

** Shorter band was detected.

これらの遺伝子型は (Fig. 34) に示されている。

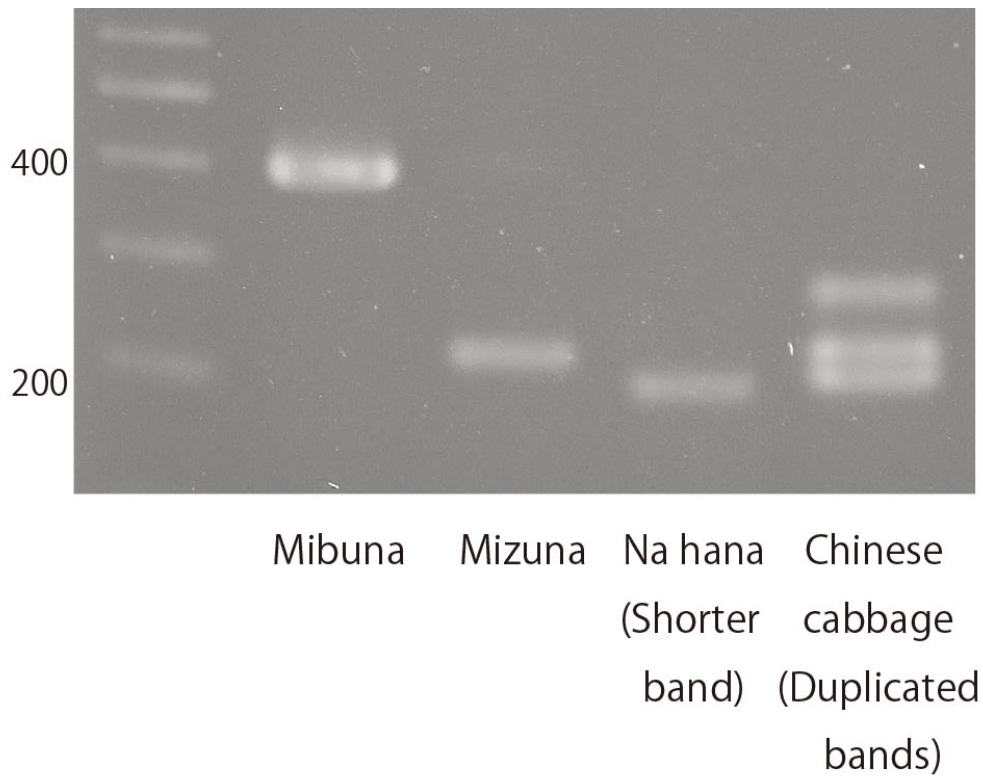


Figure 34 *B. rapa* の 9 番染色体上の *BrGL1* の遺伝子型

9 番染色体上の *BrGL1* の下流の配列を PCR で増幅させた結果、ミズナでは 400 bp 付近に (第 2 レーン)、ミズナでは 200 bp 付近 (第 3 レーン) でバンドが見られる。ナバナ、カブ、紫姫ではミズナよりも短いバンドが見られ (第 4 レーン: ナバナ)、ハクサイとあやめ雪では 200 bp 付近に重複したバンドが見られた (第 5 レーン: ハクサイ)。第一レーンはマーカーで、左の数字はマーカーバンドの長さ (bp) を示している。

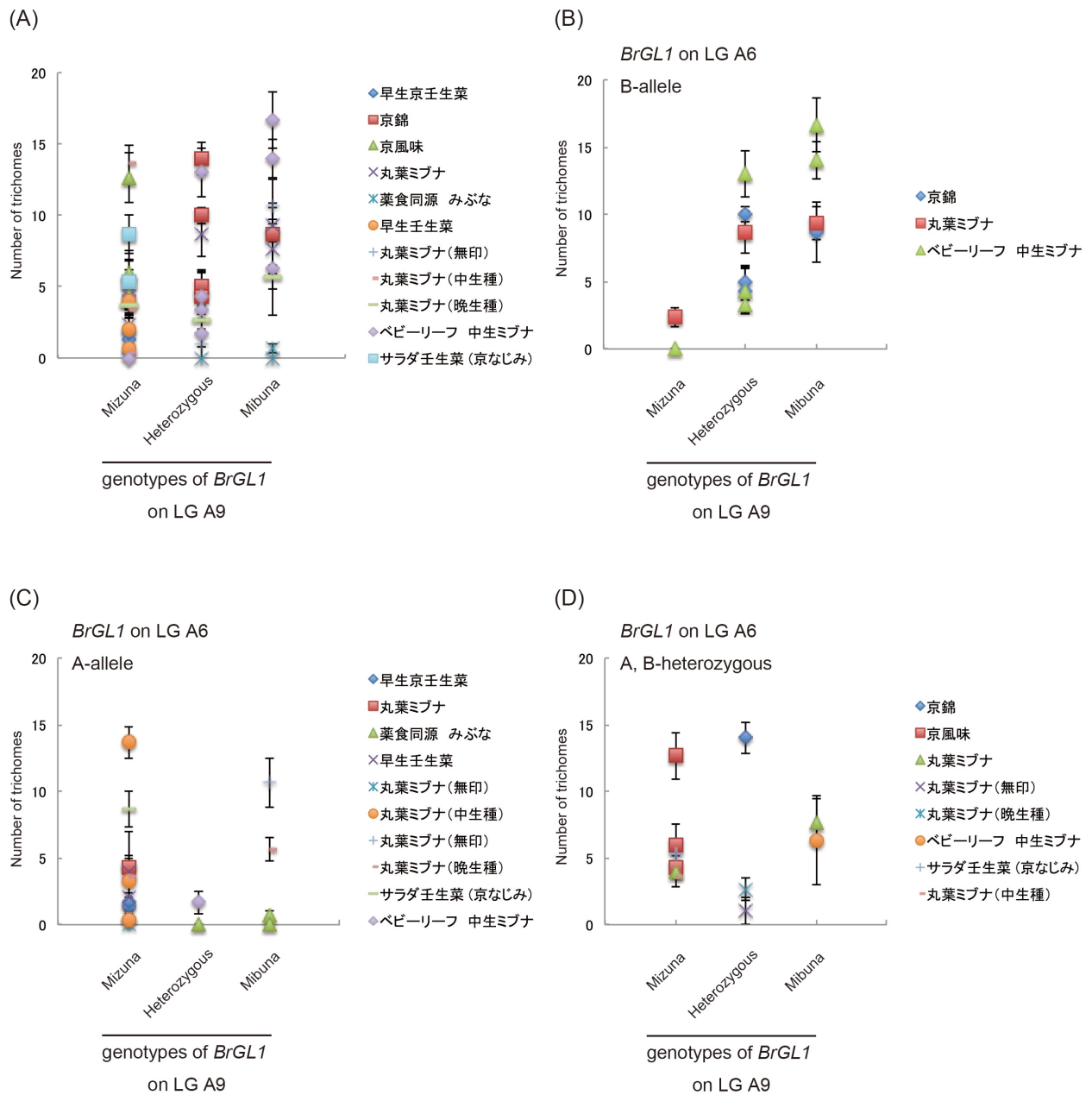


Figure 35 *BrGL1* の遺伝子型と、トライコームの数との関連

縦軸がトライコームの数、横軸が9番染色体上の *BrGL1* の遺伝子型を示す。各ミブナの品種について、9番染色体上の *BrGL1* とトライコームの数をプロットした結果、遺伝子型とトライコーム数に関連は見られなかった (A)。これらの品種のうち、6番染色体上の *BrGL1* が B-allele だったもののみについて解析した結果、Mibuna *GL1*-allele を有する方がトライコーム数が増加する傾向が見られた (B)。一方で6番染色体上の *BrGL1* が A-allele (C)、または A,B のヘテロだった場合 (D)、9番染色体上の *BrGL1* の遺伝子型とトライコーム数との相関は見られなかった。

2-4. 考察

2-4-1. ミズナおよびミブナにおけるトライコーン数の QTL 解析

QTL 解析を用いて、ミズナとミブナのトライコーン数の違いにおける原因遺伝子の単離を行った。F₂世代についてトライコーン数を測定したところ、2013 年も 2014 年も、正規分布のような分布を示さなかった (Fig. 28)。このことは、単一または少数の遺伝子座が形質に寄与していることを示している。2013 年と 2014 年に行った QTL 解析の結果、どちらの年からも 9 番染色体に寄与率の大きなトライコーン形成に関連する QTL が得られ (Fig. 27, Table 11)、この QTL からは *GL1* というシロイヌナズナにおいてトライコーン形成に重要な転写因子のホモログが見つかった。ミズナおよびミブナにおける *BrGL1* の発現量を確認するために qRT-PCR による発現量の比較を行った結果、ミブナのほうが発現量が有意に高いことがわかった (Fig. 31)。形質転換等により確認する必要があるが、この *BrGL1* の発現量の違いが、ミズナとミブナのトライコーン数の違いの原因である可能性がある。

2-4-2. ミズナおよびミブナにおける *BrGL1* 転写領域の下流配列の比較および 6 番染色体上の *BrGL1* の配列

シロイヌナズナにおいては、*GL1* の発現制御は転写領域よりも下流の配列が重要であることが知られている (Larkin et al., 1993)。そこで、ミズナとミブナの *BrGL1* の下流の配列を比較した結果、ミズナおよびミブナ間で配列が大きく異なり、特にスタートコドンから数えて 2200 bp ほど下流において、ミブナには約 200 bp の長い挿入配列が見られることが分かった (Fig. 33)。この領域は、前述した *GL1* の発現制御に重要と考えられる領域であり、この配列の違いが、ミズナとミブナの *BrGL1* の発現量の違いの原因であると示唆される。

B. rapa のトライコーン形成については先行研究があり、QTL 解析の結果などから、6 番染色体上の *BrGL1* が重要な役割を持つことが報告されている (Li et al., 2009; Kubo et al., 2010)。しかし、本研究の QTL 解析では 6 番染色体上にトライコーンに寄与する QTL は検出されなかった。加えて、確認のためにミズナとミブナの 6 番染色体上の *BrGL1* の配列を調べたところ、どちらも転写配列の塩基の欠失により、機能を失った遺伝子を有していることが分かった (Fig. 32) (Li et al., 2011)。ミズナでのトライコーンの減少は 6 番染色体の *BrGL1* の機能欠損、および 9 番染色体の *BrGL1* の発現量が低いことが同時に起こることによって生じていると考えられる。このことは *B. rapa* のトライコーン形成にはこれまでに報告のあった 6 番染色体の他にも、新たに 9 番染色体の *BrGL1* も機能することがあることを示しており、トライコーン形成における重要な因子であることが明らかになった。

2-4-3. ミブナにおける *BrGL1* の対立遺伝子の多様性とトライコーン数との関連

ミブナの他の各品種について、それぞれ複数個体について 9 番染色体上の *BrGL1* の下流配列を解析した結果、品種内でも遺伝子型にばらつきが見られ、Mibuna *GL1*-allele を有するものの他、Mizuna *GL1*-allele を有するものもいくつか見つかった (Fig. 35)。この遺伝子型とトライコーン数との関連を調べた結果、6 番染色体上の *BrGL1* が機能を失っている B-allele ホモである場合は、

Mibuna *GL1*-allele を持つとトライコームの本数が増えることが分かった (Fig. 35 B)。このことは、9 番染色体上の *BrGL1* は、6 番染色体上の *BrGL1* が機能を果たさない場合、その機能を補償することを示している。一方で、6 番染色体上の *BrGL1* が機能を有する A-allele だった場合、Mibuna *GL1*-allele とトライコームの数との相関は見られなかった (Fig. 35 C, D)。このことは、6 番染色体上の *BrGL1* が機能している場合は9 番染色体上の *BrGL1* はトライコームの数に影響していないことを示している。詳細な原因遺伝子の解析などが必要であるが、このような場合には3 番染色体上の QTL などが形質に寄与する可能性が考えられる (Table 11)。

2-4-4. *BrGL1* の遺伝的多様性とミブナの来歴について

先行研究より、ミズナとミブナは、日本に持ち込まれてから独自に進化したと考えられている (Takuno et al., 2006)。9 番染色体上の *BrGL1* の下流の配列を比較した結果、ミブナよりもミズナのほうが、ハクサイ (*B. rapa*) と近い配列を有していることが分かった (Fig. 33 B)。このことは、ミズナが *B. rapa* から分岐した後にミブナが誕生した可能性を示している。本研究で調べた限りでは、ミブナ以外の *B. rapa* で、9 番染色体における *BrGL1* が Mibuna *GL1*-allele を有するものは見つからなかった (Table 13)。このことは、この配列はミブナのみで見られる配列であり、ミブナが分岐した後に獲得された対立遺伝子である可能性を示している。今後、9 番染色体上の *BrGL1* の遺伝子型を解析することで、ミブナの来歴が明らかになるかもしれない。興味深いことに、ハクサイ、ナバナ、カブなどの9 番染色体上の *BrGL1* は、Mibuna *GL1*-allele でも Mizuna *GL1*-allele でもない対立遺伝子を示した (Fig. 34, Table 13)。*B. rapa* の *BrGL1* には、まだ未発見の対立遺伝子が存在する可能性があり、トライコームの数と *BrGL1* の遺伝子型を解析することで、新規の発現制御機構が明らかになるだけでなく、ミズナおよびミブナに限らず、広く *B. rapa* の多様性について知見が得られる可能性がある。

2-5. 参考文献

- Bischoff, V., Nita, S., Neumetzler, L., Schindelasch, D., Urbain, A., Eshed, R., Persson, S., Delmer, D. and Scheible, W.R., 2010. *TRICHOME BIREFRINGENCE* and its homolog AT5G01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 153, 590-602.
- Gan, Y., Liu, C., Yu, H. and Broun, P., 2007. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors *GIS*, *ZFP8* and *GIS2* in the regulation of epidermal cell fate. *Development* 134, 2073-81.
- Hülkamp, M., Miséra, S. and Jürgens, G., 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76, 555-566.
- Ishida, T., Hattori, S., Sano, R., Inoue, K., Shirano, Y., Hayashi, H., Shibata, D., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K. and Wada, T., 2007a. *Arabidopsis* *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of *GLABRA2* transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell* 19, 2531-43.
- Johnson, C.S., Kolevski, B. and Smyth, D.R., 2002. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a Trichome and Seed Coat Development Gene of *Arabidopsis*, Encodes a WRKY Transcription Factor. *The Plant Cell Online* 14, 1359-1375.
- Kang, Y.H., Kirik, V., Hülkamp, M., Nam, K.H., Hagely, K., Lee, M.M. and Schiefelbein, J., 2009. The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Cell* 21, 1080-94.
- Kirik, V., Simon, M., Hülkamp, M. and Schiefelbein, J., 2004. The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* 268, 506-513.
- Kubo, N., Saito, M., Tsukazaki, H., Kondo, T., Matsumoto, S. and Hirai, M., 2010. Detection of quantitative trait loci controlling morphological traits in *Brassica rapa* L. *Breeding Science* 60, 164-171.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S. and Marks, M.D., 1993. *Arabidopsis* *GLABROUS1* Gene Requires Downstream Sequences for Function. *The Plant Cell* 5, 1739-1748.
- Li, F., Kitashiba, H., Inaba, K. and Nishio, T., 2009. A *Brassica rapa* Linkage Map of EST-based SNP Markers for Identification of Candidate Genes Controlling Flowering Time and Leaf Morphological Traits. *DNA Research* 16, 311-323.
- Li, F., Kitashiba, H. and Nishio, T., 2011. Association of sequence variation in *Brassica*

- GLABRA1* orthologs with leaf hairiness. *Molecular Breeding* 28, 577-584.
- Morohashi, K., Zhao, M., Yang, M., Read, B., Lloyd, A., Lamb, R. and Grotewold, E., 2007. Participation of the *Arabidopsis* bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant Physiol* 145, 736-46.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J. and Marks, M.D., 1991. A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* 67, 483-493.
- Payne, C.T., Zhang, F. and Lloyd, A.M., 2000. GL3 Encodes a bHLH Protein That Regulates Trichome Development in *Arabidopsis* Through Interaction With *GL1* and *TTG1*. *Genetics* 156, 1349-1362.
- Potikha, T. and Delmer, D.P., 1995. A mutant of *Arabidopsis thaliana* displaying altered patterns of cellulose deposition. *The Plant Journal* 7, 453-460.
- Rerie, W.G., Feldmann, K.A. and Marks, M.D., 1994. The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 8, 1388-99.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jürgens, G. and Hülskamp, M., 2002. *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*.
- Schiefelbein, J., 2003. Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 74-78.
- Song, K., Slocum, M.K. and Osborn, T.C., 1995. Molecular marker analysis of genes controlling morphological variation in *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Theor Appl Genet* 90, 1-10.
- Suo, B., Seifert, S. and Kirik, V., 2013. *Arabidopsis* GLASSY HAIR genes promote trichome papillae development. *Journal of Experimental Botany*.
- Takuno, S., Kawahara, T. and Ohnishi, O., 2006. Phylogenetic relationships among cultivated types of *Brassica rapa* L. em. Metzg. as revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 279-285.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Traw, M.B. and Bergelson, J., 2003. Interactive Effects of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Gibberellin on Induction of Trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 1367-1375.
- Wagner, G.J., Wang, E. and Shepherd, R.W., 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany* 93, 3-11.

- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. and Gray, J.C., 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11, 1337-50.
- Wang, S., Basten, C. and Zeng, Z., 2007a. Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, S., Kwak, S.H., Zeng, Q., Ellis, B.E., Chen, X.Y., Schiefelbein, J. and Chen, J.G., 2007b. *TRICHOMELESS1* regulates trichome patterning by suppressing *GLABRA1* in *Arabidopsis*. *Development* 134, 3873-82.
- Wester, K., Digjuni, S., Geier, F., Timmer, J., Fleck, C. and Hulskamp, M., 2009. Functional diversity of R3 single-repeat genes in trichome development. *Development* 136, 1487-96.
- Yang, C. and Ye, Z., 2013. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 1937-1948.

第3章

文献によるミズナとミブナの来歴調査

3-1.序論

ミズナとミブナが古くから日本で栽培されてきたものであることは間違いないが、その詳しい来歴については分かっていない。ミズナとミブナは、広くは漬け菜として分類される(青葉, 1981)。漬け菜については明確な定義があるわけではないが、主に漬物や煮物に利用されるアブラナ属の葉菜類の中でも、ハクサイのような結球性を示さないものを指すことが多い。漬け菜は古くから多くの種類が栽培されており、古い文献では「菘」と記載されている。「菘」の読み方はナ、スウ、アオナ、タカナ、ウキナなど様々であり、アオナとはカブ類を指していたこともあることから、「菘」とはカブ類なども含めた多くの種類の野菜類の総称であったと考えられている(高崎, 2003)。また、延喜年間(901年~923年)に編纂された日本に現存する最古の薬物辞典(本草書)である『本草和名』(深江輔仁)には、「菘」の一種として「百葉」という植物について記載されている。ミズナが数多くの葉をつけ、現在でも「千筋水菜」などの呼称が残っていることから、この百葉がミズナの前種であった可能性がある。

ミブナについての記録は、1787年に刊行された『拾遺都名所図会』に、壬生地方におけるミブナの栽培について描かれている。しかしここに描かれているミブナの葉は、ミズナのような切れ込みのある葉が描かれており(Fig. 2)、現在の丸い葉のミブナがいつ頃成立したものであるかについては不明であった。このように、江戸時代は農耕や出版の技術が発達した時代であったため、多くの農学書が出版されており、ミズナやミブナに関する記録もこの時期から多数残されている。そこでこれらの文献が刊行された年代と記載内容を調査すれば、鋸歯を有する葉を持つミズナから、丸い葉のミブナが誕生した年代や、葉の形態の推移の過程を明らかにできると考えた。ミズナとミブナの形態の多様化についての文献調査の結果と、前章までで述べたミズナとミブナの遺伝的な背景の結果を合わせて考察することで、ミズナとミブナに見られる葉形変異の歴史を文化的な側面からも明らかにできると考えた。

本章では、ミズナとミブナおよびそれらに関連する野菜類について、特に葉の形態の推移に注目して、1700年代から1900年代前半に刊行された地誌や農学書などを中心に文献の調査を行った。文献の年代と、その記載内容や画に残された葉の形態を参照することで、ミズナとミブナの葉の形態の多様化が生じた年代とその原因の推定を行った。

3-2. 結果と考察

3-2-1. ミズナの来歴

ミズナの葉の形態について調査する前に、まずはミズナの来歴に関する記録について調査した。ミズナの来歴については『本草図譜』（岩崎灌園、1828）に記載がある。これによると、ミズナは中国の農書である『農政全書』に記載されている「水蕪菁」に該当し、カブなどと同様に中国から入ってきたとされている。しかし「水蕪菁」がどのような野菜かは不明であり、さらに中国ではミズナに該当するような野菜は栽培されておらず、ミズナが中国から移入したという直接的な証拠は見られない。総合序論でも述べたように、種皮型の解析から、ミズナは日本独特のものである可能性が高く（青葉、1964, 1981, 2013）、少なくとも古くから日本で栽培されていたものであると考えられる。また、土御門泰重の日記である『泰重卿記』には、寛永七年（1630年）正月に「水入菜」を御所に送ったと記録されており、この水入菜とはミズナのことである。さらに1645年に松江重頼より刊行された俳諧論書の『毛吹草』には、山城の九条の名物として「水菜」が挙げられており、これがミズナという言葉自体の最も古い記載である。ミズナについてはその他にも多くの文献に記載されており、葉が柔らかくて美味であることから、当時から幅広く利用されていた野菜であることが窺える。

3-2-2. ミズナの葉の形態の記載と壬生地方における栽培について

次に、過去の文献に記載されたミズナの葉の形態について詳しく調査した。これまで調べた限りで最も古いミズナの画は、加賀の土屋又三郎によって1707年に刊行された『耕稼春秋』に見られ、明らかに切れ込みのある葉が描かれている（Fig. 36 A）。また、後藤光生の『隨観写真』（1757）（Fig. 36 B）、1804年に刊行された『成形図説』（Fig. 36 C）、岩崎灌園により1828年に刊行された『本草図譜』（Fig. 36 D）にもミズナの画が描かれており、これらの全てで切れ込みのある葉が描かれている。このように、ミズナに関しては比較的多くの記録が残されており、古くから切れ込みのある葉を有していたことは間違いないと思われる。

ミズナはミズナが誕生したとされる壬生地方における栽培が盛んであったようで、農学者である村松標左衛門の所有していた『本草綱目啓蒙』（1805）には、菘の項目に「水菜 京 壬生ノ名産」という赤字による書き込みがある。『本草綱目啓蒙』は、中国の最も充実した本草書として知られている『本草綱目』について、本草学者である小野蘭山（1729～1810）が口授した内容を整理したものである。小野蘭山は日本のリンネと称されるほどの江戸時代における大学者であり、村松標左衛門は小野蘭山の門下生の一人であった。上述の赤字による書き込みは村松標左衛門本人によるものと思われる。

3-2-3. ミズナという呼称の成立について

次に、ミズナの葉に関する記述を詳しく調べた。ミズナに関する最も古い記述は、1787年に刊行された『拾遺都名所図会』で見つかった。『拾遺都名所図会』は江戸時代の地誌であり、京都の壬生地方におけるミズナの栽培について記述されている。ここには「水菜は京の名産」「一説に水菜にあらず

壬生菜なりとぞ」と記載されており、ここでも壬生地方においてミズナの栽培が盛んであったことが窺える。しかし、『拾遺都名所図会』に描かれている野菜の葉は、ミズナのような切れ込みのある葉が描かれていることが分かる (Fig. 2)。ここに描かれている野菜は、画面右上で栽培されている未収穫のもの、あるいは画面右下にある収穫後のものを見てみるとカブのようなものが描かれており、現在のミズナおよびミブナとは形態が異なる点も多い。しかし葉の形態に関して言えば、1787年の段階では現在のようなミブナは誕生しておらず、当時のミブナはミズナのような、切れ込みのある葉を有していたと考えられる。

この『拾遺都名所図会』に描かれたミブナは、現在のミブナとは形状が大きく異なることから、ミブナではなくミズナであるとする見解も多い (林, 1975, 1963; 宗政・西野, 1997; 高崎, 2003, 2004)。しかし、やはりミブナに相当する漬け菜であったとも考えられる。文献調査の結果より、ミズナは壬生の名産であるという意味で、「壬生水菜」やそれに近い表現で記されている例が多いことに筆者らは注目した。例えば京都の座敷唄である『はっはくどき』(成立年代不明)には京都の名物として「東寺かしら芋に壬生水菜」と唄われている。他にも、野村立英 (1751~1828) の『しきのくさぐさ』(成立年代不詳)では、ミズナは「壬生の菜」とされている。さらに、1778年に刊行された京都の名産について紹介された文献である『水の富貴寄』(橘井栄助)にも「壬生水菜」という記述が見られ、ここに添えられている簡単な画には明らかに切れ込みのある葉が描かれている (Fig. 37)。これらの記載は、壬生で栽培されていた漬け菜 (壬生水菜) はミズナとして認識されており、その葉は切れ込みを有していたことを示している。先ほど示した、非常に写実性の高いミズナの画が描かれている『成形図説』(1804年)でもミブナに関する記載は見られなかったことも考えると、1800年代前後ではミブナという名称は完全には定着しておらず、名称的にも形態的にも、ミズナとミブナが区別されていなかったことを裏付けている。当時は壬生地方の名産で質の良いミズナを「壬生水菜」「壬生の菜」と呼んでおり、最終的にそれが転じてミブナという呼称が生まれたと推察できた。

A



B



C



D



Figure 36 (A) 耕稼春秋 1707年 (日本農書全集4巻)、(B) 随観写真 1757年 (東京国立博物館情報アーカイブ)、(C) 成形図説 1804年 (国立国会図書館デジタルコレクション)、(D) 本草図譜 1828年 (国立国会図書館デジタルコレクション)

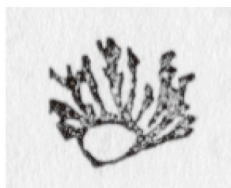


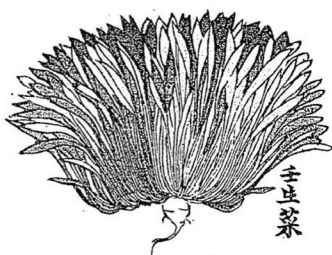
Figure 37 水の富貴寄 1778年 (新選京都叢書第八卷)



京菜

場種育田三京東

早蒔は九月中旬より十月下旬迄、蒔き後苗を間引き三度人糞を施し十一月十二日採收し瀧きて浸し物とし又鹽蔵すべし。晚蒔は十月下旬より十月下旬は蒔き明年三月頃採るべし。



三豆菜

場種育田三京東

九月中旬より十月下旬まで蒔き後苗を間引き三度人糞を施し十一月十二日採收し瀧きて浸し物とし或は鹽蔵してよし。東京三田育種場

Figure 38 穀菜弁覧 1889年 (国立国会図書館デジタルコレクション)

3-2-4. 丸い葉のミブナの成立

次に、ミブナの葉が現在のように丸くなった過程に注目して文献を調査した。今回調査した限りでは、最も古い丸い葉のミブナについて描かれていたものは、1889年に刊行された『穀菜弁覧』（竹中卓郎）であった。ここには切れ込みのある葉を有するミズナと、丸い葉のミブナの両方が描かれている（Fig. 38）。この記録から、1889年には間違いなく丸葉のミブナが成立していたことになる。さらにより古い記録では、1878年の『植物図教授法』（柴田勝良）にあるミズナの絵は切葉を有しているが（Fig. 39）、ミズナの説明で「水菜ハ其葉歯牙形ヲナス又縁の平ナルモノアリ」（下線は筆者による）と記載されている。この「縁の平ナルモノ」とは現在におけるミブナのことであると推察でき、丸葉のミブナが誕生していた可能性を示している。また、1873年に伊藤圭介により刊行された『日本産物誌』には、ミズナについて「壬生村ニテ作者ヲ壬生菜ト云 上品ナリ 葉ニ缺刻ナシ」（下線は筆者による）との記述がある。これが、今回の調査で発見できた最も古い丸い葉のミブナに関する記録であり、「壬生菜の葉に欠刻（切れ込み）が無い」ことが明確に記述されていることから、1873年には丸い葉のミブナが成立していたと考えられる。なお、最も古い丸い葉のミブナの写真については、1915年に刊行された『明治園芸誌 京都の維新後の変遷』（勤修寺経雄）で見られ、「中堂寺水菜」として丸い葉を有するミブナの写真が掲載されている（Fig. 40）。中堂寺は壬生寺の隣にある寺で、中堂寺近辺で成立した早生品種のミブナが当時、中堂寺早生もしくは中堂寺水菜と呼ばれていた（京都府農会、1909）。また、1909年の『京都府園芸要鑑』（京都府農会）には、真正壬生菜の説明に「葉柄織細織維少なくして柔軟なり丸葉にして色は淡緑に白菜に近し」（下線は筆者による）とあり、ミブナが丸葉であることが明確に記述されている。

丸い葉のミブナが成立した1873年以前の記録で、1856年に刊行された『草木図説』に、ミズナに関する興味深い記述が見つかった。『草木図説』には非常に写実性の高いミズナが描かれていて、特徴的な葉形が正確に描かれている（Fig. 41）。そこには、「葉 油菜葉ニ似テ瘦小 缺刻深シテ尖鋭不齊 一根數百葉ヲ簇生シ」と記述されており、ミズナの葉の切れ込みについて詳細に記述されている。さらにミブナについても触れられていて、「又 葉缺刻少シテ柄白フシテ柔ニ 味厚キモノヲ 壬生ノ名産トス故ニ 京ニテ 壬生菜 ノ称アリテ 之ヲ貴フ 又 上条ノ如クシテ葉尖圓キモノヲ マル葉 ト云フ」（下線は筆者による）という記載が見られ、ミブナの葉の欠刻が少なかったことや、葉の先端が丸いことから丸葉と呼ばれていたことが記されており、当時ミブナの葉とミズナの葉とが明らかに形態が異なるものとして認識されていることが分かる。注目すべき点はミブナの葉の欠刻が「少シテ」と記述されていることで、葉の欠刻は現在のミブナのように「無かった」のではなく、少しは見られたことが窺える。つまり『草木図説』が刊行された1856年の時点では、ミブナの葉は、ミズナと比較して明らかに単純化しているが、現在のような完全な丸い葉への移行期であったと考えられる。

さらに、1800年代中頃はミブナの葉の形態の移行期であったことを示唆する書物に、『植物図説雑纂』（伊藤圭介）がある（近世歴史資料研究会、2012）。ここでは、ミズナについては漬け菜の一種としてまとめられ、数多くの写生図や印葉図（植物の葉や花に墨を塗って紙に転写する拓本）が記録されている（Fig. 42）。ミズナについては「水菜の一種」として変種と思われる植物の葉についても多く記

録されており、たとえば「キヤウナ 変葉ノ種 缺刻少ナキモノ」として、現在の広茎京菜のような葉を有する植物の印葉図が残されている (Fig. 43)。この記録もまた、『植物図説雑纂』が編集されていた当時、ミズナの中に丸葉に近いようなものがあったことがわかる。『植物図説雑纂』は 275 冊にもなる資料であり、幕末から明治の初期の長期間に渡ってまとめられたので、ミズナに関する記述がいつ頃のものかを推定することは難しいが、伊藤圭介が植物学者として活躍しはじめた 1827 年以降のものであることは間違いない。

興味深いことに、『植物図説雑纂』にはミブナについての記述がほとんどみられない。唯一見られたミブナに関する記述は、ミズナの写生図の説明で、「壬生ノ名産ナリ 故二壬生菜トモ云ウ (トモは合略仮名)」というものであった。ミズナのことを「壬生菜ともいう」と述べられていることから、明らかに両者が同一視されていたことがわかる。一方で、先ほど紹介した伊藤圭介が 1873 年に出版した『日本産物誌』ではミブナが丸葉であることがはっきりと述べられている。このことから、『植物図説雑纂』におけるミズナに関する記載は、遅くとも 1870 年以前に編集されたと考えられ、資料の大半は 1800 年代の中頃にまとめられたものと考えられる。

このように、1800 年代中頃に編集された資料では、飯沼慾齋の『草木図説』ではミブナの葉に欠刻が少なかったこと、伊藤圭介の『日本産物誌』では欠刻がないと記されていることがわかった。以上、これまでに調査した文献の記載から考えられることを整理すると、1700 年代の終わりにミブナという呼称が確立し、その後 1860 年くらいにかけて葉の形が丸葉に近くなり、1873 年には丸葉が成立していたと考えられる。当時の本は木版印刷であり、本の執筆から出版までに相当の時間がかかったであろうことをも考えれば、1860 年代の終わり頃には丸葉のミブナが成立していたと考えられる。今回調査した文献の中で、ミズナやミブナの形態に関する記述があったものについて、記載内容と年代を (Table 14) にまとめた。

3-2-5. カブ類との交雑によるミズナの葉形変異

これまでの調査結果から、1700 年代中頃のミブナは切れ込みのある葉を有しており、丸い葉のミブナが成立したのは 1800 年代の中頃であると考えられた。これは、わずか 100 年ほどの期間において、ミブナに劇的な葉形変異が起こったことを示している。また、第 1 章の結果より、この葉形変異には 4 箇所もの遺伝子座の変異が関連していることが分かっている (Fig. 9, Table 5)。これほどの変異がわずか 100 年ほどの期間に、自然に生じたとは考えにくい。よっておそらく、ミブナの丸葉は他の *B. rapa* の植物と交雑することによって誕生したのではないかと考えられた。*B. rapa* は他殖性であり、他の *B. rapa* と容易に交雑する。そして、現在のところ仮説でしかないが、*B. rapa* の中でもカブ類との交雑によって誕生したと考えられた。京都には聖護院蕪という京都原産のカブがある他、壬生地方のすぐ側にある神泉苑町では、大阪原産のカブである天王寺蕪からうぐいす菜という漬け菜を育種したと伝えられている (上田, 2003)。このように、京都ではカブの育種が盛んに行われていたと考えられ、壬生地方でも栽培は盛んであったと想像される。交雑により得られた個体は雑種であり、他の品種から遺伝子が持ち込まれることで形質が変化することが多い。

前述した『京都府園芸要鑑』には、壬生地方におけるミブナの栽培の様子や栽培方法について詳細に記されていることから、明治時代において壬生近辺はミブナやミズナが盛んに栽培されていたことが窺える。残念ながら、ミブナが誕生したと考えられる1800年代において、壬生地方でどのような作物が栽培されていたかについては記録が見つからなかった。しかし、『都紀行』によると1864年3月19日(旧暦)に壬生寺で演じられている壬生狂言を見物していて、「桶取・ほうろくわりなどの狂言を見物して門外へ出るに、京菜の花盛りてあたかも毛氈の美なるを敷ことくなり」(下線は筆者による)と記したあと、「菜の花の桶へ散りこむ踊りかな」(下線は筆者による)と詠んでいる。このことから、当時、壬生寺の近辺で京菜や菜の花が育てられていたことがわかる。「菜の花」とは春に黄色い十字花を咲かせるアブラナ属植物の総称であり、カブ類もアブラナ科に分類される。また、窪田修佐の『京都繁昌記』(1896)に壬生狂言の解説があり、「四条千本の壬生寺は古刹なり。春色駘蕩として、菜花金を吐き、雲雀空に吟じて、胡蝶花に舞ふ。」(下線は筆者による)という記述がある。この記述から、壬生でアブラナ属植物の栽培が盛んであったと推察できる。

先ほども述べたように、多種類のアブラナ属植物を狭い面積で栽培すると、比較的容易に他の品種と他殖してしまう。ミズナを栽培する際、当時の農業のように農家が自家採種する場合、交雑による種子が多く含まれることになる。そのような種子を播種すると、栽培しているはずの野菜とは見た目や性質が違ったものが育つことが多い。交雑による農作物の変化は農家にとっては古くから問題であったようで、廣川獬の『長崎見聞録』(1818)には、長崎の名物の唐菜(唐人菜、長崎白菜の原種)の栽培に関する解説の中で“京都にて作られるミズナを、他所にうつしても、同じものは育たない”という内容の記述がある。また、田村吉茂の『農業自得』(1841)には、作物の性質の変化について詳しく解説されていて、水菜(京菜)についても“種子を関東に持ち帰っても、3、4年で別の野菜に変わってしまう”といった内容が記されている。これらの文献に書かれているようなミズナの性質の変化は、交雑が原因によるものと考えられる。また、『砂畠菜伝記』(著者未詳、1831)には、唐菜の採種用の株を育てるときの注意として、ミズナ、からし、ダイコンなどを近辺に植えないこと、さらにミズナについても、カブ類を近くで栽培しないことを注意点として挙げている。これは、ミズナなどは近くに植えられた植物の影響を受けて性質が変わること、つまり交雑することが経験的に理解されていたことを示している。これらの文献の記載からも、当時の農業生産においては交雑による性質の変化が頻繁に生じていたことがわかる。

ミズナなどの漬け菜の栽培においてはカブとの交雑がよく生じていたと思われる。宮崎安貞の『農業全書』(1697)では、菘の説明において、「根大きなあり。小きあり」とあり、漬け菜とカブとの交雑によって、様々な形態が生じていたと推察される。また、今回の文献調査では、多くの文献において漬け菜とカブ類とが同じ類として分類されていた。これは、経験的にミズナとカブ類が近縁であることが理解されていたことを示している。一般にアブラナ属の植物の葉は葉縁に鋸歯が見られるものが多いが、近畿地方で古くから育てられてきた近江カブ、聖護院カブ、天王寺カブ、うぐいす菜などの葉はミブナのような丸い葉を有している。これらのことから、丸い葉を持つカブ類とミズナと交雑することで、現在の丸い葉のミブナが誕生したきっかけとなったと推察した。前述した『拾遺都名所図会』のミブナには、カブのようなものが描かれていることもまた、この仮説を裏付けているも

のと考えられる (Fig. 2)。さらに、先に述べた伊藤圭介の『植物図説雑纂』には、「水菜の一種」としてカブのような植物が記録されている。葉の形に注目してみると、この「水菜の一種」は、同じ『植物図説雑纂』に記録されているミズナと比較して、葉の形が比較的単純に描かれており (Fig. 44)、交雑による葉の形態変化が生じていたことを示唆している。この植物と現在のミズナとの関連については不明であるが、「ミズナが誕生したきっかけは、ミズナと丸い葉を有するカブ類との交雑」という仮説を支持するものであると思われる。

今回の文献調査の結果より、ミズナは当時、壬生地方で栽培されたミズナのことを指していたこと、切れ込みのある葉を持つミズナと丸い葉のミズナは 1860 年代の終わり頃に成立したことが示された。ミズナおよびミズナの遺伝的解析により分岐の年代を推定し、この年代に合致するようであれば、生物学のみならず、文化的にも興味深い結果になると考えられる。さらに、丸い葉のミズナの誕生は、カブ類が交雑することによって生じたことが可能性として示された。よって今後は、丸い葉を有するカブ類についても遺伝的解析を行うことで、ミズナとミズナの葉の形態の多様化について、明らかにできる可能性がある。

江戸時代は人口の増大に対応するために、農業技術が劇的に発達した時代であった。さらに、印刷技術の発展もあって、その技術を伝えるための農学書などが全国で出版されていた。また、小野蘭山や飯沼慾斎といった研究者によって日本の草本学が進められ、さらにシーボルト (ドイツの博物学者) に師事した伊藤圭介らによって日本の植物学の基礎が築かれた時代でもある。本研究ではミズナとミズナの来歴に注目して文献調査を行ったが、これらに限らず日本の文献について詳細に調査を行うことで、野菜類を中心とした日本の食文化や育種の歴史などが明らかにできると考えられる。

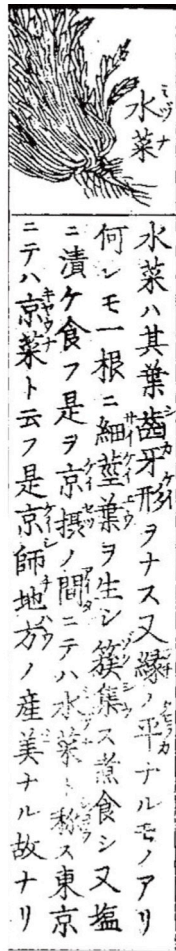


Figure 39 植物図教授法 1878年 (国立国会図書館近代デジタルライブラリー)



Figure 40 明治園芸誌 京都の維新後の変遷 1915年

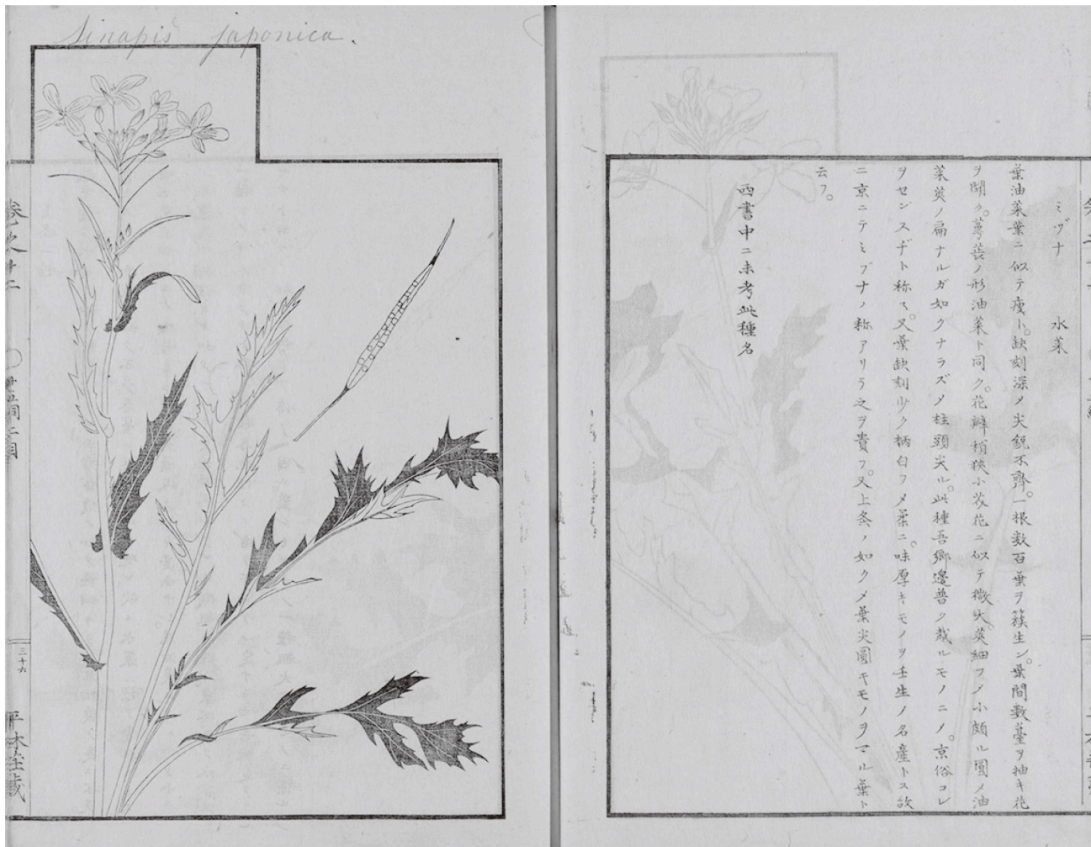


Figure 41 草木図説 1856年 (国立国会図書館デジタルコレクション)

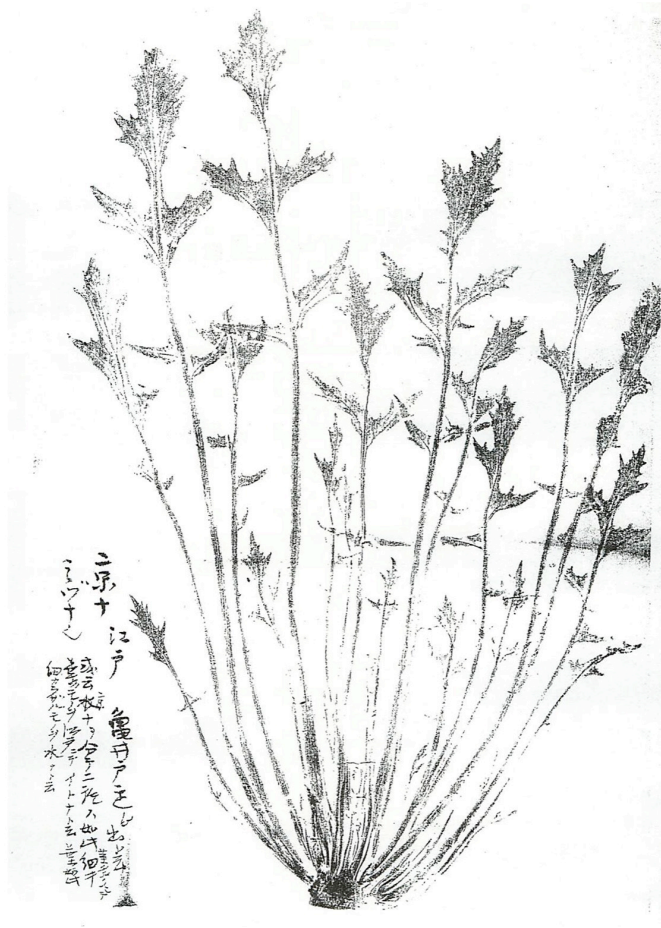


Figure 42 植物図説雑纂 「京ナ (ミヅナ)」 年代不明 (近世植物・動物・鉱物図譜集成)



Figure 43 植物図説雑纂 「キヤウナ 変葉ノ種 缺刻少キモノ」 年代不明 (近世植物・動物・鉱物図譜集成)



Figure 44 植物図説雑纂 年代不明 (近世植物・動物・鉱物図譜集成)

Table 14 ミズナとミブナの文献調査

出版年	著作名	著者	内容
1630	秦重卿記	土御門秦重	「水入菜」の記載
1645	毛吹草	松江重頼	「水菜」の記載 [最古]
1707	耕稼春秋	土屋又三郎	水菜(切り葉)の絵 [最古]
1757	随観写真	後藤光生	水菜(切り葉)の絵
1778	水の富貴寄	橘井栄助	“壬生水菜”の絵(切り葉)
1787	拾遺都名所図会	秋里籬島・ 竹原春朝齋	ミブナの栽培の絵(切り葉) [最古]
1795	蔬菜図巻	呉春	水菜(切り葉)の絵
1804	成形図説	島津重豪	水菜(切り葉)の絵
1828	草本図譜	岩崎灌園	水菜(切り葉)の絵
1850頃	植物図説雑纂	伊藤圭介	水菜について「欠刻の少ないもの」「変葉の種」について記載
1856	草本図説	飯沼慾齋	「壬生菜の葉に欠刻が少ない」の記載
1873	日本産物誌	伊藤圭介	「壬生菜の葉に欠刻なし」の記載
1878	植物図教授法	柴田勝良	水菜に「縁の平らなもの」がある
1889	穀菜弁覧	竹中卓郎	水菜(切葉)と壬生菜(丸葉)の絵 [最古]
1909	京都府園芸要鑑	京都府農会	「真性壬生菜は丸葉」の記載
1915	明治園芸誌	勤修寺経雄	壬生菜(丸葉)の写真 [最古]

3-3. 参考文献

- Takuno, S., Kawahara, T. and Ohnishi, O., 2006. Phylogenetic relationships among cultivated types of *Brassica rapa* L. em. Metzg. as revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 279-285.
- 菊池昌治、『現代にいきづく京の伝統野菜』、誠文堂新光社、2006年、19～33ページ
- 京都府農会、『京都府園芸要鑑』、1909年、343～351ページ
- 近世歴史資料研究会、『近世植物・動物・鉱物図譜集成
- 高嶋四郎、『京の伝統野菜と旬野菜』、トンボ出版、2003年、55～61ページ
- 高嶋四郎、『京野菜』、淡交社、1982年、120～133ページ
- 宗政五十緒・西野由紀、『京都名所図会謎解き案内』、小学館、1997年、76～81ページ
- 上田耕司、『京野菜を楽しむ』、淡交社、2003、26～27ページ
- 青葉高、『日本の野菜文化史辞典』、八坂書房、2013年、163～176ページ
- 青葉高、『本邦そ菜在来品種の地理的分布と分類に関する研究 (第4報) ツケナ在来品種の分類と地理的分布について』、園芸学会雑誌、1964年、65～72ページ
- 青葉高、『野菜在来品種の系譜』、法政大学出版局、1981年、199～216ページ
- 林義雄、『京の野菜記』、ナカニシヤ出版、1975年、86～91ページ
- 林義雄、『京都市近郊特産蔬菜作の変遷過程』、農業経済研究報告第5号、1963年、340～363ページ

第 4 章

ミブナの葉形の成立とカブ類の関係

4-1. 序論

第3章の来歴調査の結果、ミズナの鋸歯のある葉からミブナの丸葉への葉形変化には、カブ類の交雑が関係しているのではないかと考えられた。よって第4章では丸い葉を有するカブ類について遺伝的解析を行うことで、ミズナにカブ類が交雑することによってミブナが誕生したという仮説の検証、および交雑したカブ類の品種の解明を目指した。江戸時代を中心とした文献調査の結果からミズナとミブナの分岐の原因について仮説を設定し、その仮説を遺伝的に裏付けることができれば文化的な意義も大きいと考えられ、京都を代表する伝統野菜であるミズナとミブナの育種の歴史の一端が明らかにできると期待される。

カブはミズナおよびミブナと同じ *B. rapa* の一種で、世界中で栽培されている。分類は大きくアフガニスタン原産のアジア型と、地中海付近原産のヨーロッパ型に分けられ、西日本ではアジア型が、東日本ではヨーロッパ型が多い。これらは、種皮型の解析などで分類できる (青葉, 1964, 1981, 2013)。

ミブナが誕生した地域である京都府のカブ類には、日本最大の蕪である聖護院蕪が知られている。聖護院蕪は京都の聖護院村が原産と言われ、言い伝えによると聖護院の百姓である伊勢屋利八が現在の滋賀県から持ち帰った蕪類が起源とされている。すぐき菜もまた、京都特産の蕪類として知られており、1600年頃から栽培され始めたと言われている。もともとは原始的なカブとされており、原種はすでに絶滅しており、聖護院蕪との交雑で現在のすぐき菜が誕生したとされている (青葉, 1981)。

京都以外の西日本におけるカブについては、滋賀県で古くからカブ類が栽培されていたことが知られている。万木蕪は高島郡安曇川町西万木地方の特産で、400年以上の歴史がある。万木蕪の起源については、現在の愛知県から取り寄せられたものであるとか、逆に愛知県の方に移されたという言い伝えもある (青葉, 1981)。また、滋賀県蒲生郡日野町を中心に栽培されているカブ類に日野菜蕪が知られ、これは現在では三重県で盛んに栽培されている。『日野町誌』によると、日野菜蕪はこの地域に野生していたカブ類を品種改良したものが起源とされている (青葉, 1981)。また、大阪には大阪市天王寺付近で栽培されてきた天王寺蕪がある。天王寺蕪は日本最古の蕪類で、関西に限らず全国で栽培され、各地に本種から誕生したというカブ類が残されている。壬生地方の隣にある神泉苑町では、うぐいす菜という漬け菜が誕生したと伝えられていることを第3章にて述べたが、これは天王寺蕪の早生種として育種されたとされている。さらに、少し離れた中国地方でも、島根県松江市付近で栽培されている津田蕪などが知られている。津田蕪は、江戸時代初期に近江 (現在の滋賀県) から持ち帰ったものが起源とされている (青葉, 1981)。

カブの食用部位は主に胚軸からなり、葉の形態についてはあまり注目されないが、切れ込みのあるものから丸いものまで様々な形態がある。そして、上述の聖護院蕪や万木蕪など近畿圏で古くから栽培されていたカブの原種は丸い葉を有するものが多い。第3章で詳しく述べたように、『拾遺都名所図会』に描かれた野菜にカブのようなものが描かれていることから、ミブナがカブとの交雑種であることを強く示唆している (Fig. 2)。そこで第4章では、主に関西で栽培されている丸い葉を有するカブ類について遺伝子型を解析することで、丸い葉のミブナが誕生した遺伝的背景について明らかにす

ることを試みた。第 1 章で明らかになったミズナとミブナの葉形に寄与する QTL 付近のマーカーを用いてカブ類の遺伝子型を解析し、各カブ類における遺伝子頻度を調べた。また、実際にミズナにカブ類を交雑させ、 F_1 世代の葉の形態を調べることで、丸い葉のミブナが誕生した育種の歴史の解明を目指した。

4-2. 方法

4-2-1. 植物の栽培法

実験に用いたカブ類については第1章同様、種苗会社より購入したものを用いた (Table 1, 7)。飛鳥あかね蕪はナント育種株式会社 (奈良県 橿原市) から購入した。また、カブ類の抽苔についても第1章に記載したものと同様の条件で、3週間育てた後に春化处理 (40日、4°C) を行うことで花芽形成させた。ミズナの柱頭にカブ類の花粉を受粉させることで、F₁世代を得た。F₁世代の種子は、播種後、京都産業大学の温室で4週間、くみあいニッピ園芸培養土で生育させたのち、本葉を採取した。

4-2-2. カブ類の遺伝子型の解析

各カブの品種は9-13個体について遺伝子型を解析した。PCRの条件など、カブ類の遺伝子型の解析については、第1章で用いたCAPSマーカーの作成法と同じ方法を用いた。マーカーとして用いたプライマーと制限酵素については (Table 15) にまとめた。

また、*BrLM11* の解析には、第1章で用いた特異的プライマー (LM11_F5: 5'-CGCGGTTTGGTTCCAGAA-3'; LM11_R6: 5'-GATAAGCACAAGCTATTACGG-3') を用いた。PCRにはBIOTAQ™ DNA Polymerase (BIO LINE) を用いた。PCRは95°Cで1分処理後、30サイクルの95°Cで30秒、60°Cで30秒、72°Cで30秒の処理を行い、最後に72°Cで4分処理した。PCR産物は電気泳動を行い、バンドが確認できるか否かで遺伝子型の解析を行った。

Table 15 カブの遺伝子型の解析に用いたCAPSマーカーのプライマーと制限酵素

marker ID	chromosome	restriction enzyme	Mibuna-allele	Mizuna-allele	Foward primer	Reverce primer
Bra017976M	6	<i>RsaI</i>	50, 100	150	GAGATGATGGCGATATCGAG	CGCTCATCGTGGACACCACG
Bra038607M		<i>HaeIII</i>	50, 100	150	AGCCGGAAGAAGACTTGGAG	CTGGTGAAGAAAGATGAAGC
Bra009922M		<i>EcoRV</i>	50, 100	150	GCCGGATGGGAGCGTGAAG	CTTACAATCCCCTTCCAACG
Bra003691M	7	<i>StyI (EcoT14 I)</i>	150	50, 100	CAATGGAGATCGTGAACAG	GTGTCGTCTCCATCACCATC
Bra004365M		<i>BamHI</i>	50, 100	150	GGAAGAGGAAGATGATGATG	CCCTTTCCTCTCTGGTTTC
Bra015845M		<i>HaeIII</i>	150	50, 100	GTGAGAGTAACAAGAAGACC	CATCAGCCATTGTTAAGAGC
Bra023294M	9	<i>NheI</i>	150	50, 100	CTCTTCGTAGAGCTTATGGG	CGGAGTCTTCTGCACCAAAC
Bra006976M		<i>XbaI</i>	170	50, 120	GGAATAACAATTTGGGGATG	CAACAACATGAACGAATATG
Bra031205M		<i>RsaI</i>	50, 100	150	CGAAGAGTTCAGTCTTAGGG	CGAAAGCGTGTTGCTGTTG
Bra009004M	10	<i>XbaI</i>	150	50, 100	GTTGGAGTTTGTGTGCAAG	CAGTTGAACCGTACGAACTG
Bra009338M		<i>BspEI</i>	50, 100	150	ATGTCGAACGACGACGGGAC	TGAGTTATCCTCCTCCTCCC
Bra009355M		<i>StyI (EcoT14 I)</i>	150	50, 100	GGTTTTCGTTGGGAAAGTGG	CAAATCCCGCATCCTTGATG

4-3. 結果

4-3-1. 各 *B. rapa* の品種の葉形

本研究で用いたカブ類の葉を (Fig. 45) に示す。葉の形態は、どれも比較的単純な形状であるが、ミブナのように完全に丸い形を有しているものは少なく、唯一うぐいす菜が完全に丸い形に近かった。他の *B. rapa* は葉縁が波打った葉を有しているが、ミズナのような鋭い鋸歯は有していなかった。

4-3-2. *B. rapa* の遺伝子型の解析

第1章で明らかにできた、ミズナとミブナの葉形変異に寄与する QTL 付近のマーカーを用いて遺伝子型を解析した。各マーカーの物理的位置を Fig. 46 に、各カブ類 9-14 個体について遺伝子型を解析した結果を Fig. 47 に示す。6 番染色体上の Bra038607M に注目すると、このマーカーの遺伝子型はすべての個体においてミブナ型のホモを示していることが分かる (Table 16)。このことから、このマーカー付近に 6 番染色体の QTL に存在する原因遺伝子が座乗している可能性がある。また、聖護院蕪の 6 番染色体やあやめ雪の 10 番染色体の遺伝子型は、全てミブナ型のホモであった。これらのカブ類は、各 QTL におけるミズナとミブナの葉形変異遺伝子のうち、ミブナ型の遺伝子を有している可能性が高い。今回解析した中で、最もミブナ型の遺伝子を多く有していたのが京都が原産である聖護院蕪で、次いであやめ雪、紫姫であった (Table 17)。よってこれらのカブ類の祖先や原種が、ミズナとミブナの分岐に関わっていた可能性がある。

第1章の結果より、ミズナとミブナの葉形に最も寄与する QTL は 7 番染色体の QTL であった (Fig. 9, Table 5)。7 番染色体における遺伝子型の解析結果では、3 つのマーカー全てでミブナ型の対立遺伝子を有していたのは津田蕪のみであり、他では聖護院蕪や紫姫ではミブナの遺伝子頻度が比較的高かった (Table 16)。さらに、ローブの形成に寄与すると考えられた *BrLM11* の遺伝子型について、カブ類における遺伝子型の解析を行った。ミブナでは増幅が見られないプライマーセットを用いてカブ類の PCR を行った結果、すべてのカブ類において増幅が確認できた (Fig. 48)。これらのカブ類は、ミブナ型の *BrLM11* をヘテロで有している可能性はあるが、最低でもミズナの *BrLM11* を 1 つは有していることが分かった。この結果は、ローブの形成については、ミズナとミブナの葉の形態の多様性の原因遺伝子が、カブ由来ではない可能性を示している。

4-3-3. ミズナとカブ類の交雑

ミズナとカブ類とを交雑させて F_1 世代をつくった結果、葉の形態はミズナと比較すると単純な形となった (Fig. 49)。葉の形態に注目すると、親であるカブ類の葉と比較すると鋸歯が鋭く、すべての葉においてローブが見られることが分かる。これらの葉形は、伊藤圭介が刊行した『植物図説雑纂』にある「水菜の一種」 (Fig. 44) の葉形と近く、「水菜の一種」がカブ類との交雑種である可能性を示唆している。

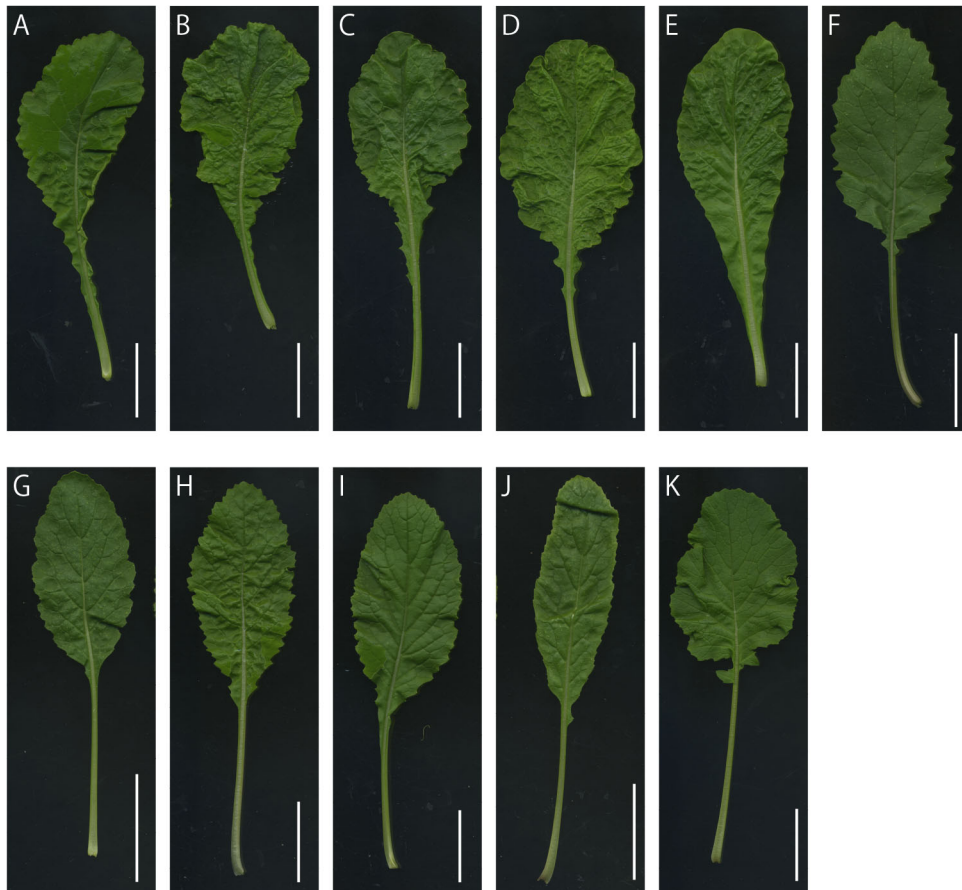


Figure 45 カブ類の葉の形態

播種後4週間育てたカブ類の葉を示す。(A) すぐき菜、(B) 聖護院蕪、(C) 天王寺蕪、(D) 野沢菜、(E) うぐいす菜、(F) あやめ雪、(G) 紫姫、(H) 日野菜蕪、(I) 津田蕪、(J) 万木蕪、(K) 飛鳥あかね蕪、の本葉を示す。スケールバー；3 cm。

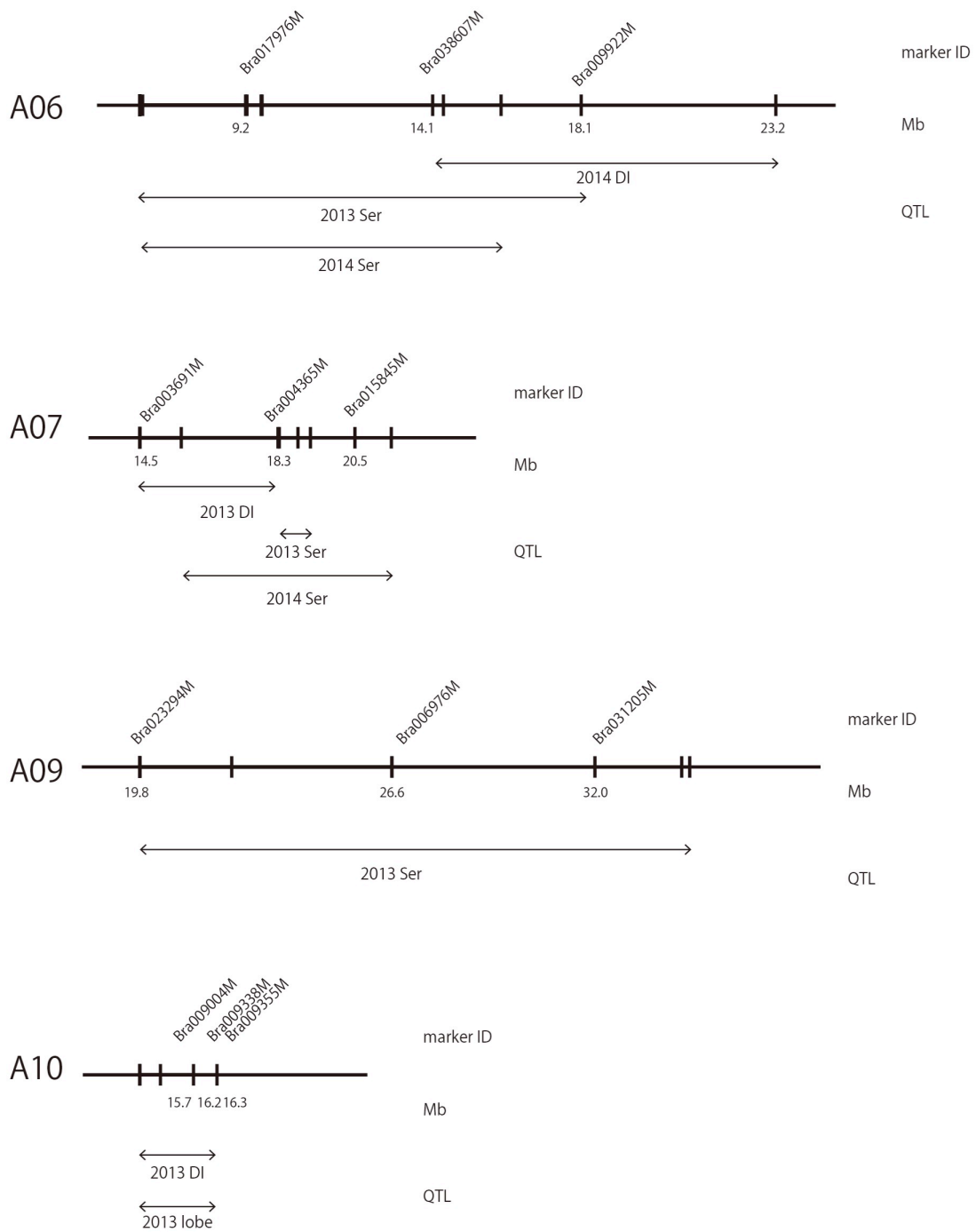


Figure 46 カブの遺伝子型の解析に用いた分子マーカーの物理的位置

それぞれの QTL の周辺の模式図を示す。左端に、各染色体の番号が記されている。地図の上には、解析に用いたマーカーの ID、下には得られた QTL と物理的位置 (Mb) が示されている。両矢印の下には、形質の名前と特定した年度が記されている。DI: Dissection Index、Ser: 葉の先端の鋸歯、lobe: ローブの深さ、をそれぞれ示している。

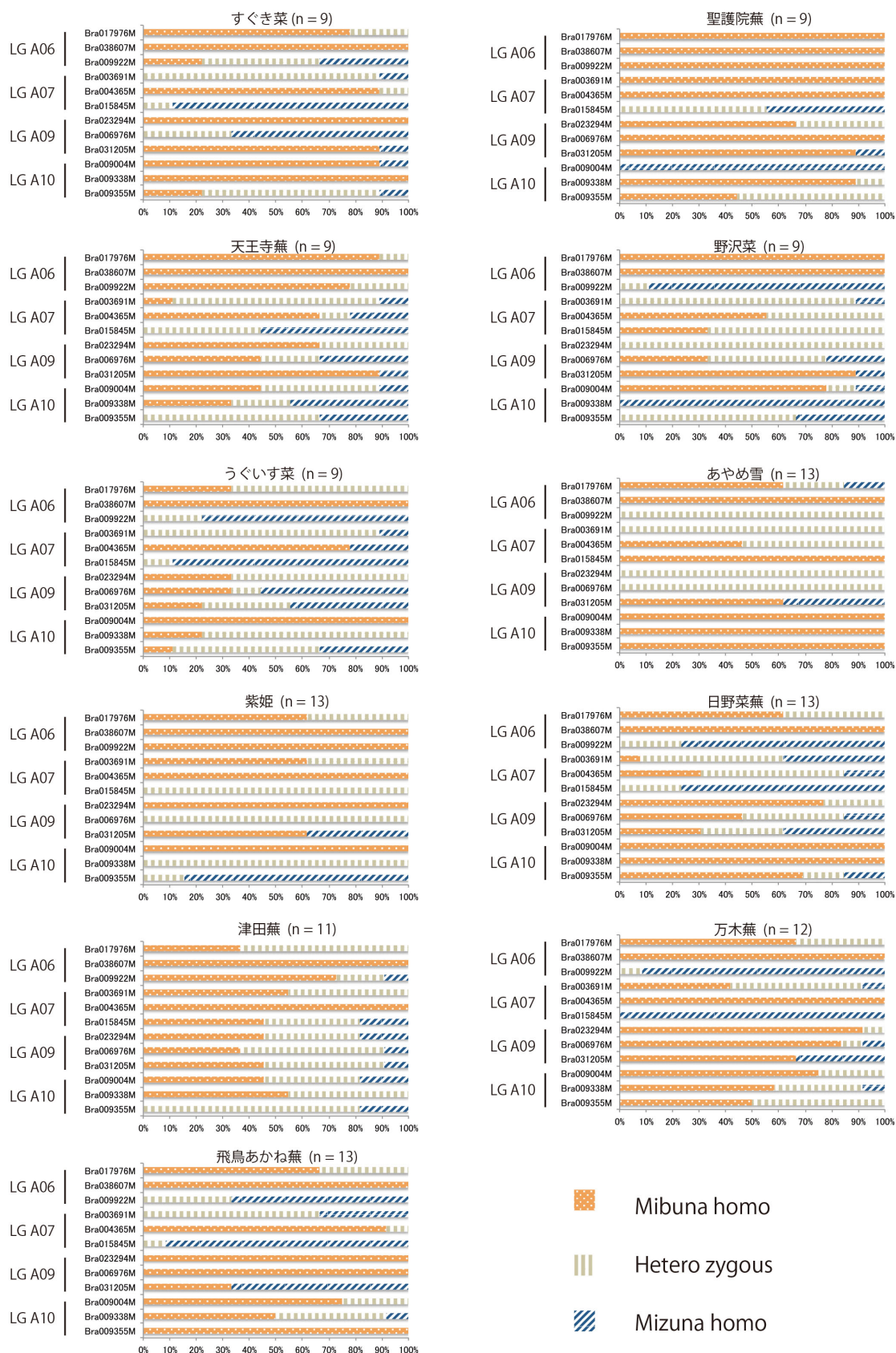


Figure 47 カブ類における遺伝子型の解析

第1章で検出した各QTL付近のマーカーを用いた、カブ類の解析の結果を示す。品種名の横の数字は、解析に用いた各カブ類の個体数 (n) を示す。マーカー名と座乗する染色体の番号が左列に記されている。ドット柄 (オレンジ) がミブナ型ホモ、斜線 (青) がミズナ型ホモ、縦縞 (白) がヘテロ型の遺伝子型を示す。

Table 16 各品種における遺伝子型の割合

Chromosome	marker ID	子<名菜			聖護院蕪			天王寺蕪			野沢菜			子<いっ菜			あやめ蕪		
		Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)
6	Bra017976M	77.8	22.2	0.0	100.0	0.0	0.0	88.9	11.1	0.0	100.0	0.0	0.0	33.3	66.7	0.0	61.5	23.1	15.4
	Bra038607M	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	Bra009922M	22.2	44.4	33.3	100.0	0.0	0.0	77.8	22.2	0.0	0.0	11.1	88.9	0.0	22.2	77.8	0.0	100.0	0.0
	7 Bra003691M	0.0	88.9	11.1	100.0	0.0	0.0	11.1	77.8	11.1	0.0	88.9	11.1	0.0	88.9	11.1	0.0	100.0	0.0
	Bra004365M	88.9	11.1	0.0	100.0	0.0	0.0	66.7	11.1	22.2	56.6	44.4	0.0	77.8	0.0	22.2	46.2	53.8	0.0
	Bra015845M	0.0	11.1	88.9	0.0	0.0	44.4	0.0	44.4	55.6	33.3	66.7	0.0	0.0	11.1	88.9	0.0	100.0	0.0
	9 Bra023294M	100.0	0.0	0.0	66.7	33.3	0.0	66.7	33.3	0.0	100.0	0.0	33.3	66.7	11.1	88.9	0.0	100.0	0.0
	Bra006976M	0.0	33.3	66.7	100.0	0.0	0.0	44.4	22.2	33.3	33.3	44.4	22.2	33.3	33.3	11.1	56.6	0.0	100.0
	Bra031205M	88.9	0.0	11.1	88.9	0.0	11.1	88.9	0.0	11.1	88.9	0.0	11.1	100.0	0.0	33.3	61.5	0.0	38.5
	10 Bra009004M	88.9	0.0	11.1	0.0	0.0	100.0	44.4	44.4	0.0	44.4	77.8	11.1	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
Bra009338M	100.0	0.0	0.0	88.9	11.1	0.0	33.3	22.2	44.4	0.0	0.0	100.0	0.0	22.2	77.8	0.0	100.0	0.0	
Bra009355M	22.2	66.7	11.1	44.4	55.6	0.0	0.0	66.7	33.3	0.0	66.7	33.3	11.1	55.6	33.3	100.0	0.0	0.0	
total		57.4	12.8	8.9	74.1	6.9	6.1	51.9	16.3	8.5	40.7	20.4	10.4	36.1	21.0	12.2	54.6	20.9	2.3
Chromosome	marker ID	紫梗			白野菜蕪			津田蕪			万木蕪			飛鷹あかね蕪					
	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	Mibuna (%)	hetero (%)	Mizuna (%)	
	6 Bra017976M	61.5	38.5	0.0	61.5	38.5	0.0	36.4	63.6	0.0	66.7	33.3	0.0	66.7	33.3	0.0	66.7	33.3	0.0
	Bra038607M	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	Bra009922M	100.0	0.0	0.0	0.0	23.1	76.9	72.7	18.2	9.1	8.3	91.7	0.0	33.3	66.7	0.0	33.3	66.7	0.0
	7 Bra003691M	61.5	38.5	0.0	7.7	53.8	38.5	54.5	45.5	0.0	41.7	50.0	8.3	66.7	33.3	0.0	66.7	33.3	0.0
	Bra004365M	100.0	0.0	0.0	30.8	53.8	15.4	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	91.7	8.3	0.0	91.7	8.3	0.0
	Bra015845M	0.0	100.0	0.0	0.0	23.1	76.9	45.5	36.4	18.2	0.0	8.3	100.0	0.0	0.0	8.3	91.7	0.0	0.0
	9 Bra023294M	100.0	0.0	0.0	76.9	23.1	0.0	45.5	36.4	18.2	91.7	8.3	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	Bra006976M	0.0	100.0	0.0	46.2	38.5	15.4	36.4	54.5	9.1	83.3	8.3	33.3	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
Bra031205M	61.5	38.5	0.0	30.8	30.8	38.5	45.5	45.5	9.1	66.7	0.0	33.3	33.3	0.0	66.7	33.3	0.0	66.7	
10 Bra009004M	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	45.5	36.4	18.2	75.0	25.0	0.0	75.0	25.0	0.0	75.0	25.0	0.0	
Bra009338M	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	54.5	45.5	0.0	58.3	33.3	8.3	50.0	41.7	8.3	50.0	41.7	8.3	
Bra009355M	0.0	15.4	84.6	69.2	15.4	15.4	0.0	81.8	18.2	50.0	50.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	
total	57.1	17.2	4.9	51.9	14.1	10.3	53.0	20.2	4.0	61.1	10.1	9.4	59.7	10.2	10.0	54.6	20.9	2.3	

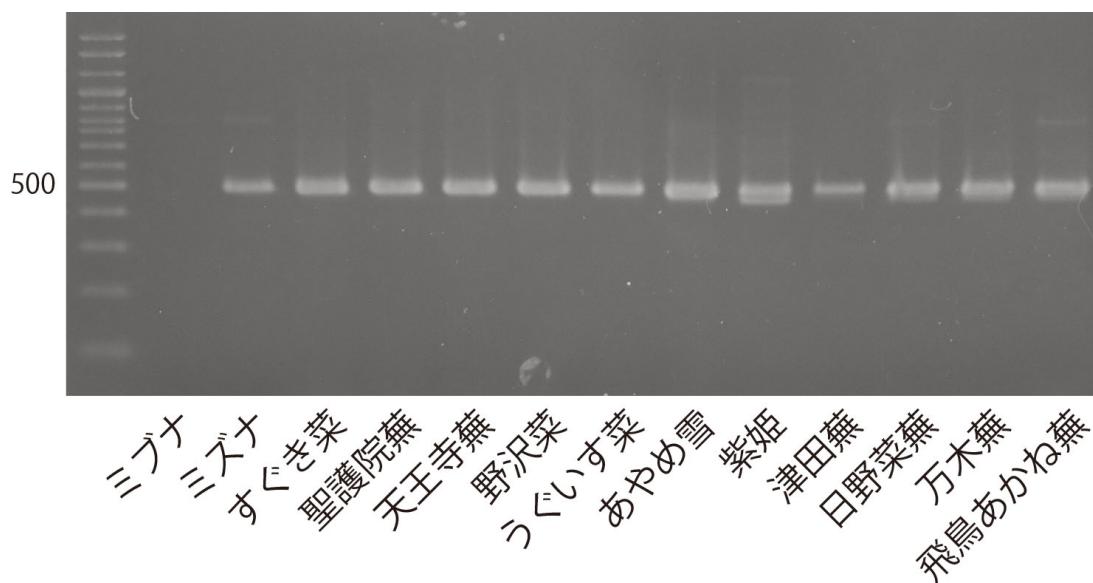


Figure 48 *BrLMI1* の遺伝子型の解析

BrLMI1 の特異的プライマーを用いた PCR の泳動の結果を示す。各レーンの下に、解析を行った野菜類の名称を示す。一番左のレーンがマーカーのレーンを示しており、左にマーカーの鎖長を示す。



Figure 49 ミズナとカブとの交雑

ミズナとカブとを交雑させた F₁世代の、播種後 4 週間後の葉を示す。それぞれ、(A) すぐき菜、(B) 天王寺蕪、(C) 野沢菜、(D) うぐいす菜、(E) あやめ雪、(F) 紫姫、(G) 日野菜蕪、(H) 津田蕪、(I) 万木蕪、とミズナと交雑させた個体の本葉を示す。スケールバー ; 3 cm。

4.4. 考察

第3章におけるミズナとミブナの来歴調査の結果から、ミブナはミズナとカブとが交雑したことで誕生した可能性が高いと考えられた。この仮説を検証するために、カブ類の複数個体について遺伝子型の解析を行い、ミズナとミブナの対立遺伝子における遺伝子頻度を調べた。

第1章で詳細に解析した7番染色体のQTLについては、Bra004365Mがすべての*B. rapa*において一つ以上のミブナ型ホモの遺伝子型を有していた (Fig. 47, Table 16)。このことから、7番染色体のQTLは、カブ由来の遺伝子がミズナとミブナの葉形の多様性の原因遺伝子である可能性がある。もう一つ詳細に解析した10番染色体のQTLについては、あやめ雪や日野菜蕪が比較的多くのミブナ型の遺伝子を有していた一方で、全体的にミブナ型の遺伝子はあまり多く見つからなかった (Fig. 47, Table 16)。加えて、ローブ形成の原因遺伝子である可能性が高い*BrLM11*については、ミブナ型ホモの遺伝子型を有するカブ類は見つからなかった (Fig. 48)。ミブナの*BrLM11*をヘテロで有するカブ類が存在する可能性は残るが、10番染色体の葉形変異の原因遺伝子はカブ類に由来するものではなく、ミブナが独自に獲得した遺伝子型である可能性がある。

他のQTLについては、6番染色体上のマーカーであるBra038607Mによる遺伝子型の解析の結果は、すべてのカブ類においてミブナの対立遺伝子を示した (Fig. 47, Table 16)。6番染色体における解析では、他のマーカーにおいても比較的多くのミブナ型の対立遺伝子が見られたことから、6番染色体におけるミズナとミブナの葉形変異遺伝子はカブ類から由来するものである可能性が高いと考えられ、特にBra038607M付近における遺伝子を解析することで、ミズナとミブナの葉形変異の原因遺伝子を特定できると考えられる。9番染色体上のQTLについては、Bra031205Mがすべての*B. rapa*において一つ以上のミブナ型ホモの遺伝子型を有していた (Fig. 47, Table 16)。よって9番染色体上におけるQTLもカブ由来の遺伝子が原因遺伝子である可能性があり、Bra031205M付近の遺伝子を解析することで、葉形変異の原因遺伝子を特定できる可能性がある。

今回の解析では、紫カブについても複数の品種を解析した。『植物図説雑纂』に描かれている「水菜の一種」の記述に注目してみると、「子ズミイロノトコロ紫」と書かれている (Fig. 44)。「子ズミイロ」とは「子墨色」または「濃墨色」のことであると推察され、画中の葉の付け根の部分に当たる、着色された部分が紫色であることが示されている。つまり、この「水菜の一種」は紫色を有しており、紫カブの交雑によって生じた可能性が高い。本研究で解析した紫カブは、あやめ雪、紫姫、日野菜蕪、津田蕪、万木蕪、飛鳥あかね蕪の6種類である。この中ではあやめ雪が最も多くのミブナの対立遺伝子を有しており (Table 16)、さらにすべての個体において10番染色体の遺伝子型がミブナ型のホモであった (Fig. 47)。また、紫姫、津田蕪、飛鳥あかね蕪は、それぞれ6、7、9番染色体における遺伝子型が、ミブナ型のホモの遺伝子型を比較的多く有していた (Fig. 47)。これらのカブ類もしくはその原種が、ミズナとミブナの葉形変異に関わっている可能性がある。

ミズナとカブ類を交雑したF₁世代の葉は、ミズナと比較して明らかに単純化された葉形を示した (Fig. 49)。このF₁世代を継代するか、あるいは再度カブなどの丸葉の*B. rapa*を交雑することで、より単純化した葉が誕生すると考えられる。

今回解析したカブ類の中でも、特にミブナ型の遺伝子を多く有していたのが聖護院蕪であった (Fig. 47, Table 16)。聖護院蕪は京都原産の野菜であり、当時の壬生地方でも近縁種が栽培されていた可能性が高い。次いでミブナ型の遺伝子を多く有していたのは、あやめ雪と紫姫であった (Fig. 47, Table 16)。これらのカブ類について品種改良の過程を解析すれば、ミブナの誕生に寄与したカブ類について、新たな知見が得られるかもしれない。次に多かった津田蕪は島根県の蕪であり、京都からは地理的にやや離れているが、もともとは京都の隣の滋賀県から伝わったとされている。よって津田蕪の原種が京都でも多く栽培されていたか、あるいは津田蕪が島根県に伝わる過程で京都にも伝わっていたのかもしれない。津田蕪だけでなく、ミブナ型の遺伝子型を持つカブについて、原種や来歴、京都での栽培の歴史などを調査することで、ミブナが誕生したより詳細な背景を明らかにできると期待できる。

4-5.参考文献

青葉高、『日本の野菜文化史辞典』、八坂書房、2013年、163～176ページ

青葉高、『本邦そ菜在来品種の地理的分布と分類に関する研究(第4報) ツケナ在来品種の分類と地理的分布について』、園芸学会雑誌、1964年、65～72ページ

青葉高、『野菜在来品種の系譜』、法政大学出版局、1981年、199～216ページ

総合討論

葉をはじめとした生物の形態の多様性がどのように生じたのかを解析することは生物学の命題であり、その分子的な背景を明らかにすることは生態学的・進化的にも意義がある。加えて作物の場合は、その栽培化の過程をも明らかにできれば、文化的意義も大きい。本研究では、京都の伝統野菜であるミズナとミブナに注目し、その形態の多様性における遺伝的背景と来歴に関する研究を行った。

*B. rapa*の葉の形態については先行研究で、葉のローブに関する QTL 解析が行われている。しかし、葉の鋸歯に関する研究は見当たらない。ミズナとミブナを交配して得られた F_2 世代の葉の形態の複雑さは正規分布に近い分布を示したことから (Fig. 6)、葉の形態形成には複数の遺伝子が寄与していると考えられた。実際にミズナおよびミブナにおける葉の形態に関する QTL 解析の結果、葉形変異には 4 つの QTL が寄与していることが分かり、これらの QTL に葉形変異の原因遺伝子が座乗していると考えられる。特に 7 番染色体に存在する QTL が形質への寄与率が高く、*BrBLH3*、*BrTCP15*、*BrPIN3* といった候補遺伝子が見つかった。また、ローブの形成に寄与する 10 番染色体の QTL からは *BrGA20ox3*、*BrTCP21*、*BrLMI1* といった候補遺伝子が見つかり、*BrLMI1* が原因遺伝子である可能性が最も高いという結論に至った。今後は先端の鋸歯の形成に寄与する原因遺伝子の特定を目指すことで、葉の形態に関する新たな知見が得られる可能性がある。

ミズナ及びミブナのトライコーム形成に寄与する遺伝子としては、9 番染色体上の *BrGL1* が特定できた。*B. rapa*のトライコーム形成には、これまでに 6 番染色体上の *BrGL1* が重要な働きを持つとされてきたが、本研究では 9 番染色体の *BrGL1* も重要な機能を有することが示された。今回特定できた 9 番染色体の Mibuna *GL1*-allele はミブナの中でも限られた品種のみが有する対立遺伝子である可能性が示され、解析を発展させることで、トライコームの形成と多様性に関する新たな知見につながる期待できる。

江戸時代の文献からミズナとミブナの育種の歴史について調査した結果、1860 年ごろに壬生地方におけるミズナの栽培過程において丸葉のミブナが誕生し、間引きなどの人為的選択によって、丸葉のミブナが誕生したという仮説が強く示唆された。このような国内の文献からの来歴の調査は、古くからの情報が保存されている伝統野菜でないと難しい。京野菜は、日本の文化の中心であった京都で長年育種されてきた伝統野菜で、国内で最も農学書などに記録が多い野菜のひとつと考えられる。その中でもミズナとミブナは葉の形態が全く異なることから、当時の記録からも形態の多様化の過程が比較的容易に読み取れた。丸葉のものが選択された理由は不明だが、単に形が珍しかったから選択されたのかもしれないし、品質が良いものを選択していたら、たまたま丸葉のものが選択された可能性も考えられる。このように、野菜類の形態の多様化を調査することは、植物科学のみならず歴史的・文化的にも当時の農業の様子を知るという意味で意義が大きいと考えられる。

文献調査の結果より、ミズナとミブナの多様化の原因としてカブ類の交雑が考えられた。実際にカブ類の遺伝子型を解析した結果、ミズナおよびミブナの葉の形態における QTL 付近の対立遺伝子はミブナの遺伝子型を有するものが多く、とくに聖護院蕪、あやめ雪、紫姫、津田蕪などがミブナ型の遺伝子を多く有していた。これらのカブ類の祖先に当たるものがミズナと交雑することによって、丸い葉のミブナが誕生したきっかけになったと考えられる。

京都には、京野菜をはじめとした、様々な野菜類が栽培そして育種されてきた。これは京都が海から遠く、海産物が手に入りにくいことから野菜類の重要性が高かったこと、気候が温和で台風の影響なども受けにくく、農業に適している土地だったこと、寺社が多いことから野菜を利用する精進料理が発達していたことなどが理由として挙げられる。また、何より京都はかつての都であり、人口が多かったことからその需要を補うための野菜生産が盛んであったことは明白である。この際、より品質の高い、あるいは珍しい野菜を栽培・販売したいと考える農家も多かったと考えられる。ミズナは壬生の名産で、品質や味が良いことから盛んに栽培されていたと考えられるため、ミズナは当時におけるブランド野菜として誕生したのではないかと推察される。

ミズナおよびミズナを含めた野菜類は、モデル植物ではないことが多いため、品種間に見られる形態の多様性を解析することが難しい。しかし近年、次世代シーケンス技術が利用しやすくなったことから、非モデル生物であっても遺伝的背景を解析することが比較的容易になってきている。本研究でも、RAD-seq や RNA-seq といった次世代シーケンス技術を用いることで、形態の多様性に関する知見が得られた。将来的には、野菜類をはじめとした非モデル生物における遺伝的な解析が行われることで、今までは解明されてこなかった形態の多様性の背景の解明や、育種への応用につながると期待できる。

本研究ではミズナとミズナの葉形変異について QTL を明らかにし、複数の候補遺伝子を発見できた。これらの遺伝子についてプロモーター領域の解析や、形質転換による遺伝子導入などを行うことで、原因遺伝子が特定できると考えられる。また、ミズナからミズナが誕生した原因としてカブ類の交雑が考えられ、遺伝的解析によってその仮説が一部裏付けられた。今後はミズナが誕生した江戸時代に京都で栽培されていたカブ類の調査や、その遺伝子型の解析を行うことで、実際にミズナの誕生に寄与したカブの品種を明らかにできると期待できる。一連の研究を通してミズナおよびミズナの葉の形態の多様化の原因が明らかにできれば、伝統野菜の育種の歴史の一端を明らかにできるという点で、生物学的のみならず文化的にも意義が大きいと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始多大なご指導及び御鞭撻を賜りました、京都産業大学 総合生命科学部 教授 木村 成介 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、貴重なご指導及び御鞭撻を頂きました、京都府立大学 久保 中央 博士、実験面で多大なご協力をいただいた上ノ山 華織 様、坂本 智昭 様、温室の管理をしていただいた山岸 博 先生、寺地 徹 先生、および両研究室の方々に、厚く感謝の意を表します。

さらに本研究において、RNA-seq 解析にご協力いただきました 明治大学 矢野 健太郎 博士 および 五十嵐 香理 様、RAD-seq 解析にご協力いただきました 京都大学 工藤 洋 博士、龍谷大学 永野 惇 博士および 基礎生物学研究所 八杉 公基 博士、走査型電子顕微鏡による観察にご協力頂きました 東京学芸大学 Ferjani Ali 博士、ホルモン解析にご協力を頂きました 理化学研究所 榊原 均 博士に、この場を借りて御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始親身なるご指導を頂きましたカリフォルニア大学デービス校 中山 北斗 博士および 京都産業大学 岡本 (愿山) 郁 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、様々なご考慮、ご協力して下さいました京都産業大学 総合生命科学部木村研究室の皆様、心より御礼申し上げます。