

イネの開花時期を制御する遺伝子ネットワークの解析

早間 良輔
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座
(島本 功 教授)

平成 14 年 2 月 1 日提出

博士論文要旨

高等植物の多くは一年の間で規則的に変移する日長を識別し、開花反応を行う時期を厳密に決定する。日長に対する反応様式には複数のタイプがあり、長日条件下において花成を促進する植物や、逆に短日条件下において花成を促進する植物が存在する。日長による開花時期の決定機構はこれまで生理学的、分子生物学的研究が盛んに行われてきており、この機構には特定の光受容体と約 24 時間の内生リズムを発生させる概日時計が関与することが長日、短日植物の間で知られてきた。近年、シロイヌナズナを用いた分子生物学的解析により、長日植物における花成の日長反応の分子機構に関する知見は飛躍的に増えたが、一方で短日植物においては、関連遺伝子の単離例の少なさから、開花時期決定機構の分子機構に関する知見は比較的乏しかった。そこで本研究では、短日植物に属するイネから関連遺伝子の単離、解析を行い、イネの開花時期を制御する分子機構を研究した。

フィトクロム発色団の生合成欠損変異株であるイネ *se5* 変異株は、花成の日長応答性を示さず野生型株に比べ早く開花する。まず、この変異株において野生型株と異なる発現様式を示す遺伝子群の単離を行った。*se5* 変異株における花成の表現型は長日条件下で顕著に現れることから、長日条件下で育成した *se5* 変異株と野生型株から経時的に RNA を収集し、これらの RNA を蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて解析した。約 8,400 の独立な遺伝子を検証した結果、*se5* 変異株において mRNA の発現様式の変化した遺伝子が 27 見いだされた。うち 12 の遺伝子の mRNA の発現には野生型株において日周性の変動が見られ、これらの発現は概日時計により制御されると考えられた。これらの中から mRNA レベルが日長により変化する遺伝子を探索すると、5 つの遺伝子では mRNA 量が短日条件下において上昇しており、何らかの日長反応に関与することが示唆された。これら 5 つの全長 cDNA の塩基配列を決定した結果、NAC-ドメイン様転写調節因子あるいは花成制御の 1 因子である糖の代謝を調節するアルドラーゼ遺伝子などが同定された。

一方、発現に日周性の変動が見られた遺伝子の中に、*GIGANTEA* (*GI*) のイネ相同遺伝子が見いだされた。*GI* は長日植物シロイヌナズナにおいて長日条件下での開花促進に機能する遺伝子である。近年になって、イネの開花時期決定に関与する遺伝子の単離がいくつか報告されたが、それらもシロイヌナズナの開花時期決定に関与する遺伝子の相同遺伝子であったことから、開花時期決定の分子機構はイネとシロイヌナズナとの間で一部保存されていると考えられる。本研究ではさらに、*GI* のイネ相同遺伝子の機能解析を行い、イネの開花時期を制御する遺伝的経路の同定を行うと同時に、この遺伝的経路をシロイヌナズナで働く遺伝的経路との間で比較した。

まず、*GI* のイネ相同遺伝子 (*OsGI*) の発現用度を調べたところ、*OsGI* mRNA の発現は明期の終わりにピークを迎える形での概日リズムを示し、*GI* のそれと同様のパターンを示した。この結果は、双方の *GI* mRNA の調節機構が保存されていることを示唆す

る。さらに、*OsGI* を過剰発現する形質転換イネを作成し、開花時期を調べた結果、*OsGI* 過剰発現株は開花が遅くなると同時にその日長反応が減少し、*OsGI* は長日条件下での花成の抑制に機能すると考えられた。以上の結果から、双方の植物種間に存在する日長応答性の違いは *GI* の下流の分子機構により引き起こされると考えられた。*GI* は *CONSTANS* (*CO*) の発現を活性化し、さらに *CO* は *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現を誘導する。そこで、*Hdl* (*CO* のイネ相同遺伝子) および *Hd3a* (*FT* のイネ相同遺伝子) の *OsGI* 過剰発現株における発現様式を調べたところ、*Hdl* の発現は *OsGI* 過剰発現株において上昇しており、*GI* による *CO* の発現調節と同一の関係を示した。このことから、*GI* (*OsGI*) による *CO* (*Hdl*) の発現制御機構も双方の植物種間において保存されていると考えられた。しかしながら、*Hd3a* の発現は *OsGI* 過剰発現株において減少しており、*GI* による *FT* の発現調節とは逆の関係を示した。以上の結果より、イネとシロイヌナズナのあいだの日長感受性の違いを決定する分子基盤は、*CO* (*Hdl*) による *FT* (*Hd3a*) の発現調節機構にあると考えられた。

以上の結果を総合すると、イネとシロイヌナズナとの間の日長感受性の違いは、それを制御する遺伝的経路が遺伝子レベルで全く異なるというよりはむしろ、シロイヌナズナとの間で保存された遺伝的経路のうち途中の遺伝子の発現制御機構が逆転しているという比較的単純な違いで決定されているように思える。このような発現制御機構の逆転を引き起こす分子機構の解明が今後の課題として考えられる。

目次

序論	----- 1
第 1 章 イネの光周性反応に関与する候補遺伝子の同定	
材料と方法	
1. 植物材料および育成	----- 8
2. Fluorescent differential display 法による遺伝子単離	----- 9
3. 全長 cDNA の単離	----- 16
4. 発現解析	----- 16
結果	
1. mRNA の発現様式が <i>se5</i> 変異株において変化した遺伝子の単離	----- 16
2. 日周性の発現様式を示す遺伝子の同定	----- 20
3. 発現量が日長により変化する遺伝子の同定	----- 26
4. 日長応答性遺伝子の <i>se5</i> 変異株における発現様式	----- 28
5. <i>OsGI</i> の <i>se5</i> 変異株での発現様式	----- 28
考察	
1. <i>SE5</i> 制御下の日周反応	----- 30
2. 発現量が日長に応答して変化する遺伝子	----- 31
3. 日長応答性遺伝子の発現様式	----- 31
4. <i>OsGI</i> の <i>se5</i> 変異株での発現変化	----- 32
5. 同定遺伝子の花成反応における役割	----- 32
第 2 章 <i>OsGI</i> の機能解析	
材料と方法	
1. 植物材料および育成	----- 35
2. 方法	----- 35
結果	
1. <i>OsGI</i> のアミノ酸配列の特徴	----- 38
2. <i>OsGI</i> のゲノム中におけるコピー数	----- 38

3. <i>OsGI</i> の発現様式	----- 38
4. <i>OsGI</i> の機能解析	----- 41
 考察	
1. <i>OsGI</i> の同定	----- 51
2. <i>OsGI</i> の発現様式	----- 51
3. イネの光周性を制御する遺伝的経路	----- 52
4. <i>Se1</i> および <i>Hd3a</i> の <i>OsGI</i> による発現制御	----- 54
 謝辞	
----- 58	
 引用文献	
----- 59	

序論

一年を通じた季節の変化のなかで、多くの生物は自らの行動様式や生活環を劇的に変化させる。ある種の哺乳類や鳥類は春にかけて生殖活動を活発に行い、またある種の昆虫は秋にかけて蛹を形成し休眠状態に入る (Follett et al., 1998)。これらの生物は、季節の変動に伴う環境の大規模な変化に対処するために、一年の間の時間の流れを積極的に認識する機構を獲得してきたのであろう。これらの生物が時間の流れを認識するための手がかりとする主要な環境要因は日長である。規則的に推移する日長を時間認識の手がかりに用いることは、規則性の乏しい温度を時間認識の手がかりにすることと比べ有利であったに違いない。

生物が日長に応答してその生命活動を変化させる反応は光周性反応と呼ばれている。光周性反応の存在が初めて明らかになったのは高等植物の花成反応に関する研究からである。GarnerとAllard (1920) はビロキシ品種のダイズを春から秋の間の様々な時期に播種し、その後の開花時期を調べることで、このダイズが自分の生理的年齢ではなく季節ごとに変化する環境因子に応答して花芽形成を起こすことをまず明らかにした。さらに GarnerとAllard (1923) は、タバコのメリーランドマンモス品種を7月はじめから毎夕暗所に移し、日長を短縮させた場所で育成させ、その開花時期を調べることで、この植物が日長を識別することを明らかにした。

シソやその他の植物を用いた実験から、日長の識別には厳密な内在機構の関与が示唆されている。例えば、日長の 15 分の変化は、それまで全く花成反応を示さなかったシソの群を一斉に花成誘導へと導くことが示されている (滝本, 1998)。光周性反応の生理学的研究は、光周性反応には一日の間の光エネルギーの総量が重要であるのではなく、明暗サイクル中の明あるいは暗のタイミングが重要であるとしている (Thomas and Vince-Prue, 1997)。このことに関して、光周性反応に関する生理学的解析は、日長の識別機構に約 24 時間の内因性のリズムを発生させる概日時計と特定の光受容体との間の相互作用が関与することを示唆している。それは少なくとも次のような実験結果からである。ビロキシ品種のダイズを明暗周期の後に、64 時間の暗期を与えて、その間の様々な時間に光を照射すると、時間依存的に花成が抑制されたりされなかったりすることが観察され、それは約 24 時間ごとに繰り返される。このことは、概日時計により規定された時刻に光があるかないかで花成の有無が決定されることを示唆している (Thomas and Vince-Prue, 1997)。

花成の光周性反応を示す植物種は多数知られているが、日長に対する花成反応の様式は植物種において異なる。例えば、ヒヨス、ハウレンソウあるいはシロイヌナズナなどの開花は長日条件下において促進され、短日条件下では遅延する。その

一方で、アサガオ、シソ、あるいはイネなど開花は長日条件下において逆に遅延し、短日条件下において花成を促進する。前者は長日植物、後者は短日植物と呼ばれている。また、これらの他に、一定期間の長日 (短日) に続いて短日 (長日) が与えられた場合に開花を促進する長短日植物 (短長日植物) や、日長が一定範囲内にある場合に開花が促進される中間植物などが知られている。これらの植物の間では日長の識別機構にどのような差異があるのであろうか。光周性反応に関する生理学的解析は、短日植物の日長の識別に暗期の長さが重要であることを示唆している。すなわち、暗期の長さが一定以上あれば、同時に与えられた明期の長さに関係なく花成反応が起こる現象が複数の短日植物において示されている (Thomas and Vince-Prue, 1997)。一方複数の長日植物においても暗期の長さが重要であることが知られてはいるが、長日植物の多くは花成の促進に長い明期を必要とすることが示されている (Thomas and Vince-Prue, 1997)。

高等植物における花成の光周性反応を包括的に理解するためには、日長反応性において異なる様々な植物種を対象にした研究が必要である。花成の光周性反応における近年の分子生物学的研究は日長反応性の異なる複数の植物種を対象に行われているが、得られた知見の多くは主に長日植物に属するシロイヌナズナを用いた研究によるものである (Simpson et al., 1999; Reeves and Coupland, 2000)。シロイヌナズナを用いた研究において同定された遺伝子あるいは遺伝子座は 20 以上あり、これらは光周性反応の制御機構における役割から 3 つのグループに分けることができる。一つは概日リズムの制御、あるいはリズム情報の伝達に関与する遺伝子群であり、これらの機能欠損は光周性反応の変化と同時に、多くの遺伝子の発現の概日リズムあるいは特定遺伝子の発現の日周変動に変化を引き起こす。二番目は光受容体あるいは光シグナリングに関与する遺伝子群であり、これらの機能欠損は同時に光形態形成の変化あるいは光応答性遺伝子の発現変化などを引き起こす。三番目としては花成誘導を直接的に誘導する遺伝子であり、これらの遺伝子は花成促進条件である長日条件下において発現レベルが上昇する。

概日リズムの制御因子として光周性反応の制御に関与する遺伝子としては、*LONG ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*)、*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*)、*GIGANTEA* (*GI*)、*TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*)、*EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*)、*ZEITLUPE* (*ZTL*)、*FKF1* (flavin-binding, kelch repeat, F-box の略称)、*LPK2* (*LOV kelch protein2* の略称) が挙げられる。*LHY* および *CCA1* は共に Myb 様転写調節因子をコードしており、共通の遺伝子ファミリーに属する (Schaffer et al., 1998; Wang and Tobin, 1998; Green et al., 1999)。これらの過剰発現は花成の遅延を引き起こす (Schaffer et al., 1998; Wang and Tobin, 1998)。*CK2* は *CCA1* と結合する

タンパク質として同定された遺伝子であり、カゼインキナーゼ 2 の β サブユニットをコードする (Sugano et al., 1998)。CK2 は CCA1 および LHY タンパク質のリン酸化活性を有することが示されている (Sugano et al., 1998; Sugano et al., 1999)。また、CK2 の過剰発現は花成早化を引き起こす (Sugano et al., 1999)。GI は機能未知の核タンパク質をコードしており、GI の機能欠損は花成の遅延を引き起こす (Park et al., 1999; Fowler et al., 1999; Huq et al., 2000)。TOC1 は二成分制御系におけるレスポンスレギュレーター様タンパク質をコードしており、この機能欠損は Landsberg erecta 背景の短日条件下では花成の早化を引き起こす (Millar et al., 1995; Somers et al., 1998)。ELF3 遺伝子は機能未知の核タンパク質をコードし、この機能欠損は開花の早化を引き起こす (Zagotta et al., 1992; Hicks et al., 1996; Liu et al., 2001; Hicks et al., 2001)。ZTL、FKF1、LPK2 はともに PAS ドメイン、F ボックス、kelch リピートを含むタンパク質をコードしており、ユビキチン/プロテアソーム経路においてタンパク質分解制御に関わると考えられている (Somers et al., 2000; Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001)。FKF1 の機能欠損は花成の遅延を引き起こすが、LPK2 の過剰発現も花成の遅延を引き起こす (Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001)。この遺伝子ファミリーの機能欠損時と機能獲得時における表現型がどちらも花成遅延であることの理由は明らかではない。また *ztl* 変異は共優性変異であると考えられており、この変異株は花成遅延を示す (Somers et al., 2000)。

概日リズム制御遺伝子で構成される花成経路はほとんど分かっていない。これらの突然変異株あるいは過剰発現株同士の掛け合わせによる遺伝学的解析は進んでいないのが現状である。また、特定変異の遺伝子発現に対する影響を調べた例はいくつかあるが、ひとつの変異が他の発現に変化をもたらすと同時に、その逆も見られる。例えば、CCA1 および LHY の過剰発現は GI の発現に変化をもたらすが、同時に *gi* 変異もこれらの遺伝子の発現に影響する (Fowler et al., 1999)。同様のことが TOC1 と CCA1、あるいは TOC1 と LHY との間の発現制御において報告されている (Alabadi et al., 2001)。ところで、概日リズムの発生機構は 24 時間周期への同調のための環境情報入力系、リズムを発生させる中心振動系、そして情報出力系により構成され、特に中心振動系は特定遺伝子間の発現のネガティブ・フィードバックにより構成されていると考えられている (Dunlap, 1999)。このフィードバック成分をコードする遺伝子群は発現を相互に調節し合い、この成分遺伝子的一方の変異は他方の発現に影響を与えると考えられる。これに関連して、TOC1 と CCA1、および TOC1 と LHY は、中心振動系のフィードバックループを形成しているという仮説が提唱されている (Alabadi et al., 2001)。また、フィードバックループ成分および情報出力系成分をコードする遺伝子は発現に概日リズムを示すが、環境情報入力系成分をコー

ドする遺伝子の多くも発現に概日リズムを示す (McWatters et al., 2000; Covington et al., 2001; Park et al., 1999)。このことは、概日リズム形成に関わる遺伝子の多くは活性を相互に調節し合うことを示唆する。

情報出力系に関わる因子として花成の光周性に関与する遺伝子としては、*CONSTANS* (*CO*) が挙げられる。*CO* は zinc-finger ドメインを持つことなどから、転写調節因子として機能すると考えられている。*CO* の機能欠損は花成の遅延を引き起こし、過剰発現は花成の顕著な早化を引き起こす (Putterill et al., 1995)。また、*CO* mRNA の発現は概日リズムを示すが、*CO* の過剰発現は *CAB* 遺伝子の発現の概日リズムに有意な影響を与えないことから、*CO* はリズム情報を花成反応へと導く遺伝子であるとされている (Ledger et al., 2001; Suarez-Lopez et al., 2001)。これまでに *gi*、*lhy*、*elf3* 変異株において *CO* の発現レベルの変化が示されており、またこの発現変化はこれらの変異株における花成の表現型と良く一致する (Suarez-Lopez et al., 2001)。

花成を直接的に制御する遺伝子としては、*FLOWERING LOCUS T* (*FT*) および *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*) が挙げられる。*FT* はホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) 様の配列を有するタンパク質をコードする (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。*FT* の発現は花成促進条件である長日条件下において上昇し、この機能欠損は花成遅延を引き起こす (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。*SOC1* は *CO* の過剰発現による花成早化の表現型を抑制する変異の一つとして見いだされた遺伝子であり、MADS-box タンパク質ファミリーの一員として単離された *AGL20* と同一遺伝子であることが知られている (Onouchi et al., 2000)。また *SOC1* は *CO* の過剰発現により発現が上昇する遺伝子群としても見いだされている (Samach et al., 2000)。*SOC1* の発現は長日条件下において上昇し、この機能欠損は花成の遅延を引き起こす (Samach et al., 2000; Lee et al., 2000)。

光受容体因子として光周性反応を制御する遺伝子としては、*PHYTOCHROME A* (*PHYA*)、*PHYTOCHROME B* (*PHYB*)、*PHYTOCHROME D* (*PHYD*)、*PHYTOCHROME E* (*PHYE*)、および *CRYPTOCHROME 2* (*CRY2*) が挙げられる。しかしながら、これらの遺伝子の花成に対する役割は一樣ではない (Lin et al., 2000)。*PHYA*、*PHYB*、*PHYD*、*PHYE* 遺伝子は赤色光および遠赤色光受容体であるフィトクロムファミリーに属する。このなかで、*PHYA* の機能欠損は花成の遅延を引き起こすことから、*PHYA* は花成の促進に機能する (Johnson et al., 1994)。一方、*PHYB*、*PHYD*、*PHYE* の機能欠損はいずれも花成の早化を引き起こすことから、これらのフィトクロム分子は花成の遅延に機能する (Goto et al., 1991; Bagnall et al., 1995; Aukerman et al., 1997; Devlin et al., 1998; Devlin et al., 1999)。*CRY2* はUV-B / 青色光受

容体ファミリーに属する。この機能欠損は開花の遅延を引き起こすことから、*CRY2* は花成の促進に機能する (Guo et al., 1998)。また、*phyB* および *cry2* 変異株を用いた遺伝学的解析から、*CRY2* は *PHYB* シグナリングを抑制することで花成の促進に機能するとされている (Guo et al., 1998; Mockler et al., 1999)。このことに関連して、*CRY2* と *PHYB* タンパク質は核内において結合することが示されている (Mas et al., 2000)。

光シグナリング因子として花成の光周性反応の制御に関わる遺伝子あるいは遺伝子座としては、*PYTOCHROME-SIGNALING EARLY FLOWERING 1-3* (*PEF1-3*)、および *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1* (*COP1*) が挙げられる。*PEF1* は *PHYA* および *PHYB* に共通のシグナリングに、*PEF2* および *PEF3* は *PHYB* シグナリングに関与し、これらの変異株では共に花成の早化を引き起こす (Ahmad and Cashmore, 1996)。これらの遺伝子は同定には至っていない。*COP1* は RING フィンガー、コイルドコイル領域、ならびに WD40 リピートを含むタンパク質をコードしており、この遺伝子の機能欠損は花成の早化を引き起こすとされている (McNellis et al., 1994)。*COP1* は光形態形成の抑制因子としての役割がよく知られており、光形態形成の促進因子である b-zip 型転写因子 HY5 の暗所での分解に関与する (Osterlund et al., 2000)。

花成の光周性反応に関する生理学的解析は、日長の識別に概日時計シグナルと光受容体シグナルとの相互作用が重要であることを示唆している。このことに関して、シロイヌナズナでは次のようなことが明らかになっている。*FT* の発現レベルは長日条件下で上昇し、この制御には *CO* が関与することが明らかになっている (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。また、*FT* の *CO* による発現誘導には新規な転写翻訳系を必要としないことから、この制御には直接的な発現機構が関与する。また、*CO* の一日のあいだの発現レベルは長日条件下と短日条件下との間で有意な変化を示さない。そこで、*FT* の長日条件下での発現誘導は *CO* タンパク質と光受容体シグナルとの相互作用により制御されているという仮説が提唱されている (Suarez-Lopez et al., 2001)。

長日植物における花成の光周性反応の分子生物学的研究はシロイヌナズナ以外の植物においてもなされている。エンドウでは、*PHYA* の機能欠損が花成遅延を、*PHYB* の機能欠損が花成早化を引き起こすことが知られている (Weller et al., 1997; Weller et al., 2001)。またオオムギでは、*PHYB* タンパク質の光安定性が失われた突然変異株において花成の早化が報告されている (Hanumappa et al., 1999)。

短日植物の光周性反応の制御機構に関する知見は、シロイヌナズナを主体とした長日植物での研究と比べると少ない。しかしながら、この知見は近年の分子生物

学的解析により飛躍的に増加する傾向にあり、これは主にイネを用いた研究成果によるものである。イネは世界的な主要穀物のひとつと数えられ、その開花時期が栽培範囲や栽培時期を決定する上で大きな影響を及ぼすことから、イネの花成研究は育種学的な立場も含めてこれまで積極的な研究が行われている。

Hd1、*Hd2*、*Hd3a*、*Hd3b*、*Hd5* および *Hd6* 遺伝子座はカサラス品種と日本晴品種を用いた QTL 解析から同定され、これらの準同質遺伝子系統を用いた遺伝解析が進められている (Yano et al., 1997; Yamamoto et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Yano et al., 2001)。他に、*Se1*、*Se3*～*Se7*、*E1*～*E3* が光周性に関連する遺伝子座として同定されている (Chandraratna, 1955; Yokoo and Okuno, 1993; 川瀬, 村田, 1958; 川瀬ら, 1959)。このうち *Hd1*、*Hd3a*、*Hd6*、*Se1*、*SE5* は遺伝子がすでに単離されている (Izawa et al., 2000; Yano et al., 2000; Yano et al., 2001; Takahashi et al., 2001)。これらの遺伝子はシロイヌナズナの光周性反応を制御する遺伝子とアミノ酸レベルで類似したタンパク質をコードしていたことから、花成の光周性反応の制御機構はイネとシロイヌナズナとの間で一部共通している可能性が示唆されている (Yano et al., 2001)。

Hd1 は *CO* とアミノ酸配列のレベルで類似したタンパク質をコードする。また、*Hd1* は品種間の花成の違いを決定する因子のひとつ *Se1* と同一遺伝子座であることが示されている。さらに、*Se1* の機能欠損は長日条件下での花成の早化を引き起こすと共に、短日条件下での花成の遅延を引き起こすとの報告がされている。このことから、*Se1* は長日条件下での花成の抑制、および短日条件下での花成の促進の両方に機能するとの考察がされている (Yano et al., 2000)。一方、当研究室の杉山および中野はそれぞれ独立に *se1* 変異株の異なるアリの開花時期を調べ、*se1* 変異株の短日条件下での開花遅延を認めることが出来なかった (杉山, 2000; 中野, 2001)。このことから、*se1* 変異の短日条件下での花成遅延の表現型の有無は生育条件に依存すると考えられる。*Hd3a* は *FT* とアミノ酸レベルで類似したタンパク質をコードする。この遺伝子の過剰発現は花成の早化を引き起こすことが示されている。また、*Hd3a* の発現は短日条件下において上昇することが明らかになっている (Yano et al., 2001)。*Hd6* はカゼインキナーゼ 2 の α サブユニットをコードする。順同質遺伝子系統の解析から、この機能欠損は花成の早化をもたらすことが示されている (Takahashi et al., 2001)。*SE5* (*Se5*) は植物体が淡緑色を呈す変異株の原因遺伝子として同定され、フィトクロムの発色団の生合成酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼをコードする。*se5* 変異株では長日条件下と短日条件下のいずれでも花成が早化することに加えて、連続明期においても同様の花成早化を示すことから、*se5* 変異株では光周性反応が完全に欠損しているとされている (Izawa et al., 2000)。また、ソルガムの光周性欠損突

然変異株の原因遺伝子として単離された遺伝子は *PHYB* であったことから、短日植物の光周性反応の制御にフィトクロムの重要性が示唆されている (Childs et al., 1997)。

長日植物での光周性機構に関する知見はシロイヌナズナにおいて豊富に蓄積されている。イネは短日植物の中でも分子生物学的知見が豊富に蓄積されつつあるが、イネでの機構解明にはさらなる遺伝子単離が必要であると考えられる。そこで本研究では、イネにおける花成の光周性反応の制御機構を解明する一環として、関連遺伝子の同定およびその機能解析を行った。第1章では、イネの光周性反応に関与する候補遺伝子を同定し、発現様式およびコードするタンパク質の特徴からこれらの光周性反応における役割を論じた。第2章では、同定遺伝子の機能解析を行うことでイネの光周性反応に対する同定遺伝子の役割を検証し、イネの光周性反応を制御する遺伝的経路について論じた。

第1章 イネの光周性反応に関与する候補遺伝子の同定

シロイヌナズナにおける光周性反応の分子生物学的解析から、光周性の制御には mRNA レベルでの発現調節機構が重要であることが示唆されている。生理学的研究から光周性制御に対する重要性が示唆されてきた概日リズムは、多数の関連遺伝子の mRNA レベルでの発現様式に認められる特徴であり、また関連遺伝子のなかでも *CCA1*、*LHY*、*LPK2*、および *CO* mRNA の過剰発現はシロイヌナズナの光周性反応を顕著に減少させることが知られている (Putterill et al., 1995; Schaffer et al., 1998; Wang and Tobin, 1998; Schultz et al., 2001)。さらに、シロイヌナズナの花成が長日条件下で促進されることと関連して、mRNA レベルが長日条件下において上昇する遺伝子が複数同定されており、なかでも *FT* mRNA の過剰発現はシロイヌナズナの光周性反応を減少させることが知られている (Kobayashi et al., 1999)。このことは、花成の光周性反応に関与する遺伝子を、mRNA の発現様式を指標に同定する手法が有用であることを示している。Samach らは *CO* の発現誘導時に mRNA レベルでの発現が変化する遺伝子を探索し、シロイヌナズナの光周性制御に関与する遺伝子を複数同定している (Samach et al., 2000)。そこで本研究では、mRNA の発現様式を指標にした、イネの光周性反応に関与する候補遺伝子の探索、および同定を行った。

材料と方法

1. 植物材料および育成

1-1. 材料

イネ (*Oryza sativa* L.)

- ・ 農林 8 号。日長感受性を保持する日本稲品種。光周性関連遺伝子座として *Se-1ⁿ*、*E₁*、*E₂*、および *e₃* を持つ。
- ・ *se5* 突然変異株。イネ品種農林 8 号に対する γ 線照射により得られた日長感受性欠損変異株 (Yokoo and Okuno, 1993)

1-2. イネの育成

イネの発芽処理は、30 % 次亜塩素酸を用いて滅菌した種子を MS 固体培地上に播種することで行った。人工気象室で発芽させた幼苗を培地上で一週間から 10 日間生育させ、その後培土に移し生育させた。人工気象室の日長条件は長日条件を 14 時間日長、短日条件を 10 時間日長とした。温度条件は、明期の間を 30 °C、暗期の間を

25℃とした。

2. Fluorescent differential display 法による遺伝子単離

Kuno らの方法を一部改変した (Kuno et al., 2000)。

2-1. RNA の抽出

GTC-CsCl 法を用いた。イネの葉身を液体窒素で満たした乳鉢で十分に破碎し、12 ml GT 溶液 (4 M Guanidine Thiocyanate, 25 mM 酢酸ナトリウム, 117 mM メルカプトエタノール) に移し 5.7 M CsCl 溶液 (5.7 M CsCl, 25 mM 酢酸ナトリウム) を用いて濃度勾配を作成し、32,000 rpm、20℃、22 時間超遠心機 (BECKMAN 社) で遠心し RNA 沈殿を回収した。

2-2. cDNA 合成

2.5 μ g 相当の RNA を含んだ水溶液に DEPC 水を加えて 6.5 μ l にし、これを 4 サンプル用意した。これらに以下に示す 25 μ M オリゴ dT プライマーをそれぞれ 1 種類ずつ 2 μ l 加えた。その後これらをサーマルサイクラーを用いて 70℃ で 10 分間熱処理し、その後すばやく氷冷した。

・ 逆転写用オリゴdTプライマー (宝酒造)

DD1 primer; 5'-GT₁₅VA-3'

DD2 primer; 5'-GT₁₅VT-3'

DD3 primer; 5'-GT₁₅VC-3'

DD4 primer; 5'-GT₁₅VG-3' V:T以外の塩基の混合

次に、それぞれの溶液に次の試薬を加え、以下の条件下で逆転写反応を行った。この反応にはサーマルサイクラーを用いた。

5×First strand buffer (BRL 社)	4 μ l
2.5 mM mixed dNTPs (宝酒造)	4 μ l
0.1 M DTT (BRL 社)	2 μ l
RNase inhibitor (宝酒造, 130 U/ μ l)	0.5 μ l
Super Script II Reverse Transcriptase (BRL 社, 200 U/ μ l)	1 μ l

反応条件

25 °C、10 min

42 °C、50 min

90 °C、 5 min

それぞれの溶液に滅菌水を加え全量を 100 μ l とし、以下の PCR 反応に用いた。

2-3. PCR 反応

4 種類の異なる cDNA プールをテンプレートに、以下に示す任意配列プライマー 80 種類を用いて PCR を行った。以下に PCR 反応液の組成および反応条件を示す。

PCR反応組成 (10 μ l)

cDNA	1 μ l
10×PCR buffer (宝酒造)	1 μ l
2.5 mM mixed dNTP (宝酒造)	0.2 μ l
25 μ M 蛍光アンカーオリゴ dT プライマー	0.1 μ l
2 μ M 任意配列プライマー	2.5 μ l
Ex-Taq polymerase (宝酒造)	0.1 μ l
滅菌水	5.1 μ l

PCR反応条件

94 °C (3min)、40 °C (5min)、72 °C (5min)×1

95 °C (15sec)、40 °C (2min)、72 °C (1min)×25

72 °C (10min)

PCR 反応に用いる蛍光アンカーオリゴ dT プライマー (以下に示した) の配列は cDNA 合成に用いた 4 種類のプライマーと同一であり、PCR の際には cDNA 合成に使用したのと同じ配列プライマーを用いた。

・ 蛍光アンカーオリゴ dT プライマー (宝酒造)； 5' 末端がローダミン標識されたオリゴ dT プライマー

DD1 primer; 5'-Rhodamine-GT₁₅VA-3'

DD2 primer; 5'-Rhodamine-GT₁₅VT-3'

DD3 primer; 5'-Rhodamine-GT₁₅VC-3'

DD4 primer; 5'-Rhodamine-GT₁₅VG-3' V:T以外の塩基の混合

・ 10 mer の任意配列プライマー (Operon 社) ; 80 種類

AP1 5'-AGCCAGCGAA-3'
AP2 5'-GACCGCTTGT-3'
AP3 5'-AGGTGACCGT-3'
AP4 5'-GGTACTCCAC-3'
AP5 5'-GTTGCGATCC-3'
AP6 5'-GCAATCGATG-3'
AP7 5'-CCGAAGGAAT-3'
AP8 5'-GGATTGTGCG-3'
AP9 5'-CGTGGCAATA-3'
AP10 5'-TAGCAAGTGC-3'
AP11 5'-CAGACCGTTC-3'
AP12 5'-TGCTGACCTG-3'
AP13 5'-AGTTAGGCAC-3'
AP14 5'-AATGGGCTGA-3'
AP15 5'-AGGGCCTGTT-3'
AP16 5'-CGTCAGTGAC-3'
AP17 5'-GCAAGGAGTC-3'
AP18 5'-CTGAGCTAGG-3'
AP19 5'-GGCTAATGCC-3'
AP20 5'-GTGATCGGAC-3'

OPA1 5'-CAGGCCCTCC-3'
OPA2 5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA3 5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA4 5'-AATCGGGCTG-3'
OPA5 5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA6 5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA7 5'-GAAACGGGTG-3'
OPA8 5'-GTGACGTAGG-3'
OPA9 5'-GGGTAACGCC-3'
OPA10 5'-GTGATCGCAG-3'
OPA11 5'-CAATCGCCGT-3'
OPA12 5'-TCGGCGATAG-3'
OPA13 5'-CAGCACCCAC-3'
OPA14 5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA15 5'-TTCCGAACCC-3'
OPA16 5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA17 5'-GACCGCTTGT-3'
OPA18 5'-AGGTGACCGT-3'
OPA19 5'-CAAACGTCGG-3'
OPA20 5'-GTTGCGATCC-3'

OPB1 5'-GTTTCGCTCC-3'
OPB2 5'-TGATCCCCTGG-3'
OPB3 5'-CATCCCCCTG-3'
OPB4 5'-GGACTGGAGT-3'
OPB5 5'-TGCGCCCTTC-3'
OPB6 5'-TGCTCTGCCC-3'
OPB7 5'-GGTGACGCAG-3'
OPB8 5'-GTCCACACGG-3'
OPB9 5'-TGGGGGACTC-3'
OPB10 5'-CTGCTGGGAC-3'
OPB11 5'-GTAGACCCGT-3'

OPC1 5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC2 5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC3 5'-GGGGGTCTTT-3'
OPC4 5'-CCGCATCTAC-3'
OPC5 5'-GATGACCGCC-3'
OPC6 5'-GAACGGACTC-3'
OPC7 5'-GTCCCGACGA-3'
OPC8 5'-TGGACCGGTG-3'
OPC9 5'-CTCACCGTCC-3'
OPC10 5'-TGTCTGGGTG-3'
OPC11 5'-AAAGCTGCGG-3'

OPB12 5'-CCTTGACGCA-3'	OPC12 5'-TGTCATCCCC-3'
OPB13 5'-TTCCCCCGCT-3'	OPC13 5'-AAGCCTCGTC-3'
OPB14 5'-TCCGCTCTGG-3'	OPC14 5'-TGCGTGCTTG-3'
OPB15 5'-GGAGGGTGTT-3'	OPC15 5'-GACGGATCAG-3'
OPB16 5'-TTTGCCCCGGA-3'	OPC16 5'-CACACTCCAG-3'
OPB17 5'-AGGGAACGAG-3'	OPC17 5'-TTCCCCCCCAG-3'
OPB18 5'-CCACAGCAGT-3'	OPC18 5'-TGAGTGGGTG-3'
OPB19 5'-ACCCCCGAAG-3'	OPC19 5'-GTTGCCAGCC-3'
OPB20 5'-GGACCCTTAC-3'	OPC20 5'-ACTTCGCCAC-3'

PCR 反応後、10 μ l のローディングバッファー (95% ホルムアミド、20 mM EDTA) を反応液に加え、電気泳動に用いた。

2-4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびバンドの検出

定法に従って組み立てたゲル板に、以下の要領で作成したポリアクリルアミド溶液を流し込み、ゲルを作成した。

4 % ポリアクリルアミドゲル組成

・ 生化学用尿素 (和光純薬)	21 g
・ 10×TBE	5 ml
・ 40 % アクリルアミド/ビス溶液, 19:1 (5 % C) (Bio-Rad 社)	5 ml
滅菌水を用いて 50 ml としたのち、ゲル板に流し込む直前に	
・ 10 % APS	240 μ l
・ TEMED	24 μ l

を加えた。

これを Dual Adjustable Nucleic Acid Sequencer (C.B.S Scientific 社) にセットし 5 分間の pre-run を行った。85 $^{\circ}$ C、3 min の熱変成を行った PCR 産物 3 μ l を電気泳動に用いた。ゲル板 1 枚当たり 1500 V、20 mA、約 3 時間を泳動条件とした。その後 FM-BIOII (宝酒造) を用いてバンドを検出した。

2-5. PCR 断片のサブクローニング

目的バンドのゲル上での位置を確認した後、この部分をゲルごと回収し、30 μ l TE

の入ったエッペンドルフチューブに移した。凍結融解を 3 回繰り返し行うことで、PCR 断片を TE に溶出させた。ここでの PCR 断片量は非常に少ないので、この上清 1 μ l をテンプレートとして、FDD に用いたのと同じプライマーを使って再度 PCR 反応を行い、多量の PCR 産物を得た。これを DNA ligation kit ver.2 (宝酒造) を用いて p-GEM-T ベクター (Promega 社) へ挿入、大腸菌に形質転換し、複数の大腸菌コロニーからプラスミドを抽出した。

2-6. 目的の PCR 断片が挿入されたプラスミドの選抜

回収されたゲルには、目的とする PCR 断片の他に隣接した無関係な PCR 断片が混在すると考えられる。そこで、得られた複数のプラスミドの中から目的とする PCR 断片が挿入されたプラスミドを選抜するために、プラスミドに挿入された PCR 断片をプローブに用いた、FDD の際の RT-PCR 産物に対するサザン解析を行った。

2-6-1. プローブ作成

プローブは、PCR 断片が挿入されたプラスミドを鋳型に T7 および SP6 プライマーを用いて PCR 反応を行い、インサートを増幅することで得た。

2-6-2. メンブレン作成

RT-PCR 産物を再度電気泳動し、バンド検出を行った後、目的バンドを含むゲル領域上にメンブレン (Hybond N+; Amersham 社) を未処理のままのせ、さらにその上に同じ大きさの濾紙 (3MM; Wattman 社) を 3 枚重ねて乗せ、サランラップを被せた状態で 3 時間から一昼夜おいた。その後 UV クロスリンカーを用いて PCR 産物をメンブレン上に固定した。

2-6-3. サザン解析

ECL direct nucleic acid labeling and detection kit (Amersham 社) を用いた。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーション、メンブレンの洗浄およびシグナルの検出方法は添付の説明書に従ったが、メンブレンの洗浄温度は 60 $^{\circ}$ C で行った。FDD の際のバンドパターンと同一のシグナルパターンが得られるプローブを同定し、そのプラスミドを目的のものとした。

2-7. 同一遺伝子から増幅された重複バンドの同定

10 mer 任意配列プライマーは、FDD に用いる PCR 反応条件では鋳型に対して非特異的に結合する。その結果、特定遺伝子から増幅された PCR 断片が別の任意配列プラ

イマー使用時においても増幅されることがあると考えられる。このような重複バンドをサブクロニングの対象から除外するために、同一遺伝子由来と考えられるバンドをゲル上で同定した。

サブクロニングしたバンドと同様の発現様式を示すバンドを展開する RT-PCR 産物を全て再度電気泳動し、その後 2-2-5-6 と同様の方法により DNA をメンブレンに固定し、サブクロニングした PCR 産物をプローブにサザン解析を行うことで重複バンドを同定した。

2-8. 擬陽性クローンの除去

同定クローンの *se5* 変異株での発現変化を RNase protection 法 (RPA III kit; Ambion 社) を用いて確認し、再現性の得られない擬陽性クローンはこの時点で除去した。

2-8-1. アンチセンスプローブ合成のためのテンプレートの作成

対象遺伝子の DNA 断片が挿入されたベクターに関して、そのインサートの方向性を確認した後、SP6、T3、あるいは T7 のいずれかの RNA ポリメラーゼを使用するかを決定した。さらに、適切な長さのアンチセンスプローブが合成されるように、適当な制限酵素でベクターを線状化し、これをテンプレートとした。それぞれの解析遺伝子において用いた制限酵素、および RNA ポリメラーゼを Fig. 1 に示す。

2-8-2. アンチセンスプローブの作成

T3、T7 もしくは SP6 RNA ポリメラーゼ (Promega 社) を用いて *in vitro* 転写反応を行うことによりアンチセンス RNA プローブを得た。なお、高比活性プローブを作成した場合の反応組成を () に示す。

in vitro 転写反応組成 (10 μ l)

5 $\times$ First strand buffer (BRL 社)	2 μ l
100 mM DTT (BRL 社)	1 μ l
ATP, GTP, and CTP (2.5 mM each)	2 μ l
100 μ M UTP	1 (0) μ l
linearized template DNA (500 μ g/ μ l)	1 μ l
[α - ³² P] UTP	1 (3) μ l
Ribonuclease Inhibitor (宝酒造 130 u/ μ l)	0.5 μ l
T3, T7 or SP6 RNA Polymerase (Promega 社)	0.5 μ l
滅菌水	1 (0) μ l

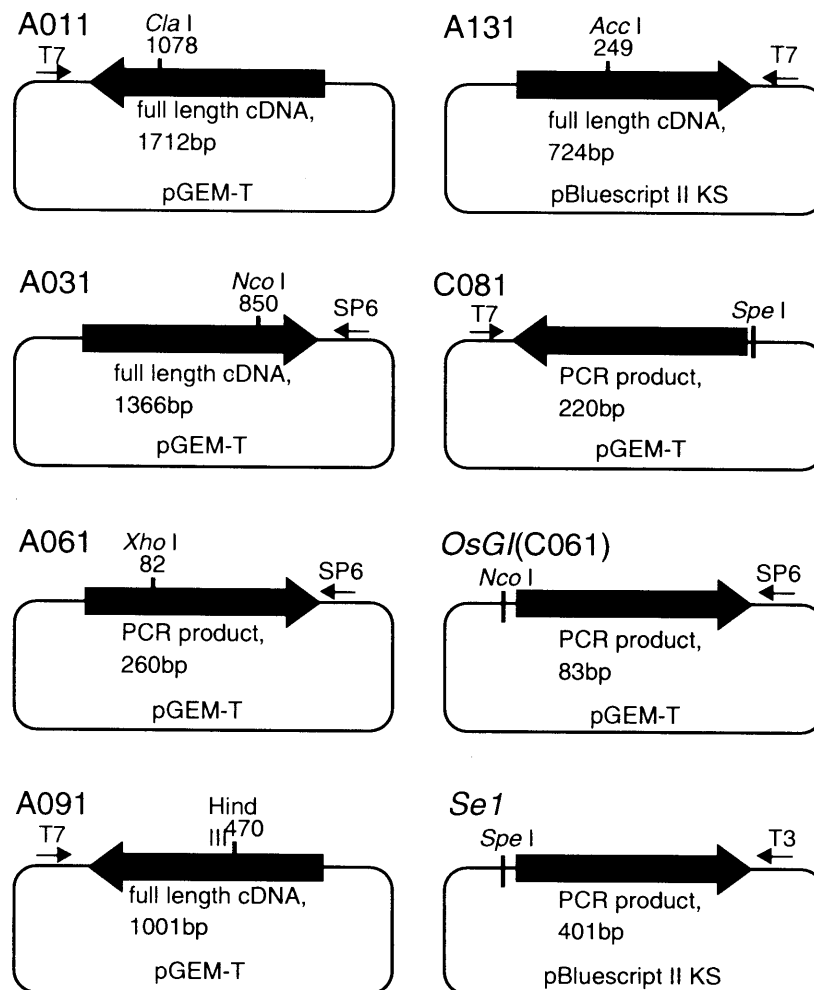


Fig. 1. RNA プローブの作成に用いたテンプレート

プラスミド線状化のための制限酵素および逆転写反応に使用したポリメラーゼ (T7、T3、SP6) を示した。A011、A031、A091、A131 はそれぞれ全長 cDNA の挿入されたプラスミドを、A061、C061、C081 はそれぞれ FDD の際の PCR 産物が挿入されたプラスミドを、*Se1* は cDNA プールから増幅した PCR 産物の挿入されたプラスミドをテンプレート作成に使用した。

37 °C、2 時間の逆転写反応の後 DNase I (Pharmacia 社) 1 μ l を反応液に加え、37 °C、15 分間反応させることでテンプレートを除いた。10 μ l のローディング・ダイを加え、これを 94 °C、3 分間熱変成させたのち急冷し、4 % ポリアクリルアミドゲルを用いて 280 V、40 mA、30 分間の電気泳動を行った。このゲルを X 線フィルムに 30 秒間感光させることによりプローブのシグナルを得て、この部分をゲルごと回収した。さらに、キットに添付の gel elution buffer 50 μ l にこのゲルを入れ、これを 37 °C で 3 時間インキュベートすることで、プローブをゲルから溶出させた。

2-8-3. Protection 反応

全てキットに添付の説明書に従った。また、RNase は添付の RNase T を使用した。

3. 全長 cDNA の単離

Marathon kit (Clontech 社) あるいは 5' full race core kit (Gibco BRL 社) を用いて行った。方法は添付の説明書の準じた。シーケンスは定法に従った。

4. 発現解析

RNase protection 法を用いた。2-8 に記載した方法により行った。コントロールとして ubiquitin (*ubq*) 遺伝子 (Accession No. D12629; Nishi et al., 1993) を用いた。

結果

1. mRNA の発現様式が *se5* 変異株において変化した遺伝子の単離

SE5 遺伝子はフィトクロムのクロモフォア生合成に関与する酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼをコードし、この機能欠損は活性フィトクロム量の顕著な低下および赤色光/遠赤色光下での光形態形成反応の欠損を引き起こす (Izawa et al., 2000)。また、*se5* 変異株における花成の表現型は極めて顕著であり、長日条件下での花成遅延が全く認められず光周性反応が完全に欠損する。このことから、光周性関連遺伝子の発現様式が *se5* 変異株において顕著に変化していることが予想される。そこで、まず mRNA レベルでの発現様式が *se5* 変異株において変化する遺伝子の同定を行った。解析方法として fluorescent differential display 法を用いた。

花成の光周性反応に対するフィトクロムの関与は複数の短日植物種を用いた生理学的解析から示唆されている。これらの植物では、暗期の長さが一定以上あれば同時に与えた明期の長さに無関係に花成が引き起こされることから、光周性に必要

な条件は暗期の長さであり、暗期の間での花成誘導機構の活性化が示唆される。ところで暗期の始めに照射した遠赤色光 (FR) パルスは、残存する活性型フィトクロム (Pfr) を不活性型 (Pr) に変換し、Pfr 量の急速な減少を引き起こすと考えられている (Thomas and Vince-Prue, 1997)。またこの光処理はイネやアサガオなどの長日条件下での花成を早化させることが示されており (Takimoto and Hamner, 1965; Ikeda, 1985)、暗期中に花成制御活性を持つフィトクロムが存在することを示唆する。また、光化学的活性フィトクロム量を顕著に減少させる *se5* 変異は、暗期中での活性フィトクロム量をも顕著に減少させていると考えられる。このことは、暗期において花成調節を行う機構が *se5* 変異株において変化していることを示唆する。以上のことから、暗期に発現し、なおかつ *se5* 変異株と野生型株との間で異なる発現様式を示す遺伝子を単離することで、光周性関連遺伝子を同定することが可能であると考えた。そこで、解析には野生型株と *se5* 変異株から夜間に 2 時間おき (5 回) に収集した葉身由来 RNA を用いた。また *se5* 変異株の表現型は長日条件下において顕著に現れることから (Izawa et al., 2000)、これらの RNA は長日条件下において育成した植物体から抽出した。植物体は播種後 28 日目のを使用した。このとき、用いた少数の *se5* 変異株における茎頂に花芽原基が認められた (早間, data not shown)。また、解析法として fluorescent differential display 法を用いた (Kuno et al., 2000)。

4種類の oligo-dT primer と 80 種類の arbitrary primer との組み合わせによる PCR を行い、約 32,000 バンドについてアクリルアミドゲル上でパターンを比較した。Fig. 2 は電気泳動の結果の一例を示しており、*se5* 変異株において野生型株と異なったバンドパターンを示すものを矢印で示している。その後このようなパターンを示すバンドをゲルから切り出し、PCR 産物をクローニングした。ところで、約 32,000 のバンドの中には同一遺伝子由来のバンドが重複して存在する可能性が考えられる。これらの PCR 産物をサブクローニングの対象から除外するために、サブクローニングされた PCR 産物をプローブに用いた RT-PCR 産物に対するサザン解析を行った。さらに、この解析により得られた独立な配列を持つクローンについて、発現変化の再現性を RNase protection assay を用いて確認した。その結果、*se5* 変異株において発現が上昇しているクローンを 10、逆に低下しているクローンを 17 単離した (Table 1)。

同一配列を持つ PCR 断片を同定するためのサザン解析によると、独立な 27 遺伝子の元となったバンドは、電気泳動により展開された約 32,000 バンドのうち合計で 99 本を占めた (Table 1)。これは、ひとつの遺伝子に由来するバンドが 32,000 バンドのうち平均 3.8 本重複して存在することを示している。この結果をもとに differential display によって吟味することができた独立な遺伝子の総数を予測する

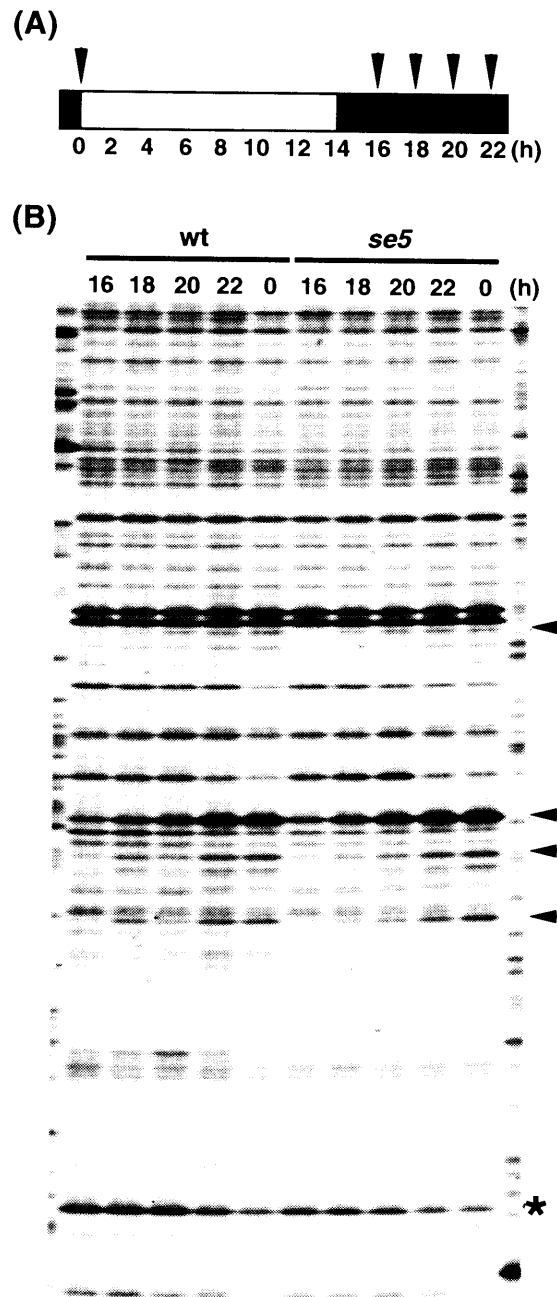


Fig. 2. *se5* 変異株において発現の変化する遺伝子のディファレンシャル・ディスプレイによる同定

(A) 植物体から葉身をサンプリングした時刻。矢印で示す。(B) PCR 産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動の一例。矢印は規則的なシグナル変動の認められるバンドを示す。星印は、上記の特徴に加え *se5* 変異株においてシグナル強度の変化しているバンドを示す。

Table 1 FDD によるスクリーニング結果

	Total		Genes showing diurnal expression	
	No. of Bands	No. of non-redundant clones	No. of Bands	No. of non-redundant clones
Up-regulated in <i>se5</i>	32	10	31	9
Down-regulated in <i>se5</i>	67	17	18	3
Unchanged	~32,000		~3,200 ^a	

^aシグナル強度に規則的な変動を示したバンドを示す (Fig. 2 参照)

と、その数は約 8,400 であると見積もることが出来る。一方、約 32,000 バンドの内 99 本が *se5* 変異株においてパターンの変化を示していたことから、本条件下において発現している遺伝子なかで、約 0.3% の遺伝子の mRNA の発現が *SE5* によって制御されていると見積もることができる。

2. 日周性の発現様式を示す遺伝子の同定

光周性反応は日周性の生理反応の一つに定義されることから、光周性制御に関与する遺伝子は日周性の発現様式を示すと考えられる。実際、シロイヌナズナでの一連の研究において単離された光周性関連遺伝子の大多数が mRNA の発現に日周変動を示す。そこで、同定遺伝子における発現の日周変動を調べた。2 時間おきに採取した葉身から RNA を抽出し、RNase protection assay 法により解析した。その結果、27 遺伝子のうち 12 の遺伝子には日周性の発現変動が見られた。(Fig. 3)。これらの遺伝子群は、明期開始時刻に発現のピークを迎えるもの、あるいはちょうど明期の中間に当たる時刻にピークを持つもの、さらに明期終了時刻にピークを持つものなど、様々な日周パターンを示した (Fig. 3)。

日周性の発現様式を示す遺伝子はシロイヌナズナにおいて非常に多数知られている。DNA チップを用いた解析では、対象としたシロイヌナズナの 8,000 遺伝子のうちの約 480 に概日リズムの発現様式を示すことが明らかになっている (Harmer et al., 2000)。日周性の発現様式を示すイネの遺伝子数を推測するために、differential display において、ゲル上でシグナル強度に規則的な変動が見られるバンドを数えた。その結果、約 3200 のバンドにシグナルの規則的な変動が認められた (Table 1)。このことは、イネの葉において発現する遺伝子のなかで、約 10% が日周性の発現様式を示すことを示唆している。ところで、ここで得られた 12 の遺伝子の元となるバンドの数は、サザン解析の結果、49 バンド存在する明らかになったことから (Table 1)、日周性の発現パターンを示す遺伝子の中で、約 1.5% (49/3200) という限定された遺伝子の発現が *SE5* により制御されることを示唆している。

これらの遺伝子のタンパク質の生化学的機能および生物学的役割を調べるため、GenBank データベースを用いて相同性検索を行った。その結果、A061、A151、C061、C081、J011 はイネの既知の遺伝子と塩基配列レベルではほぼ完全に一致した。A011、A021、A031、A091、A131、G011 は Gen Bank 上に有意な相同性が認められる配列が存在しなかったことから、5' および 3' レース法を用いて全塩基配列を決定し、再度相同性検索を行った。また、A071 はアミノ酸レベルで有意な相同性の認められる遺伝子がデータベース上に存在したので、完全長 cDNA の単離を省略した。Table 2 は BLASTX アルゴリズムを用いたアミノ酸配列レベルでの相同性検索の結果

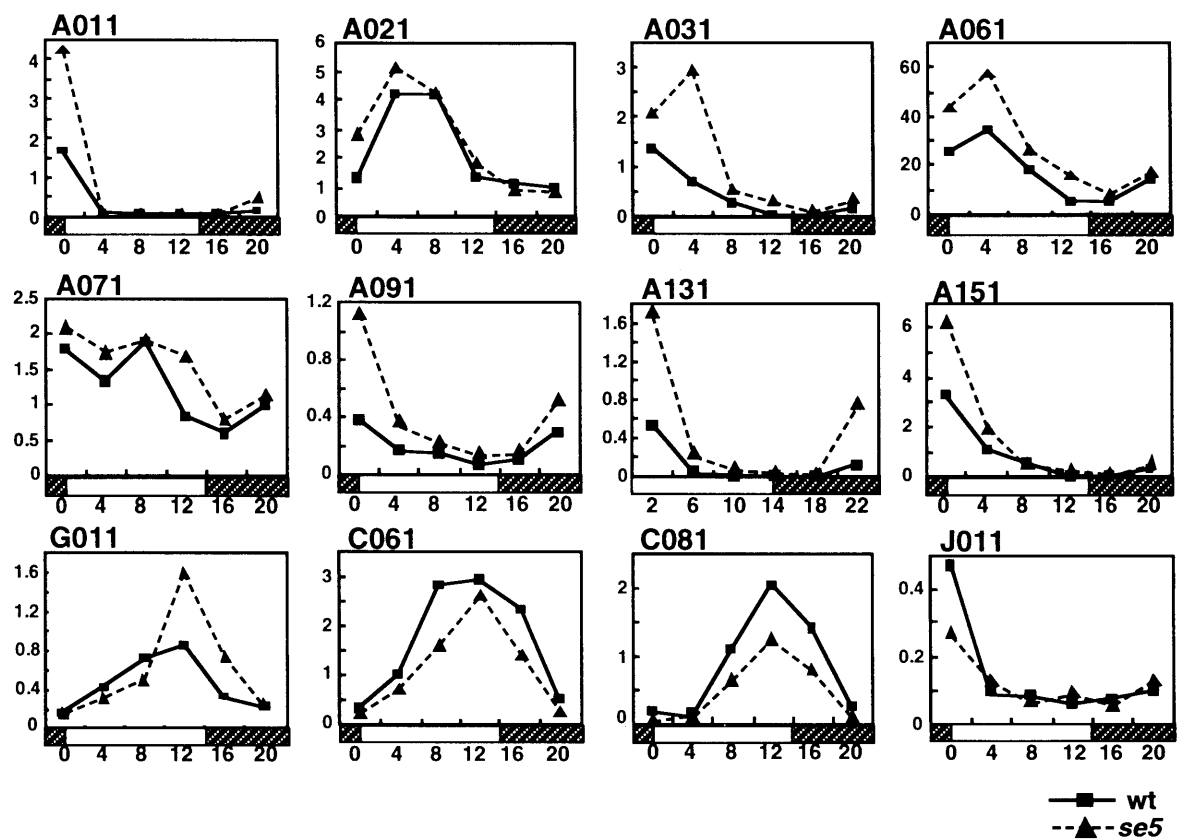


Fig. 3. 発現が日周変動を示す同定遺伝子

長日条件下において 28 日間育成した植物体の葉身由来 RNA を用いた。シグナルの検出には RNase protection 法を用いた。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。

を示している。その結果、NAC- ドメインタンパク質など転写調節因子として機能する遺伝子 (A021およびA031)、特定の代謝経路上において機能する酵素 (A061、A151、およびJ011)、タンパク質の糖修飾に関与する酵素 (A071)、あるいはプロテアーゼ阻害剤 (A131) が検索されたほかに、シロイヌナズナ光周性を制御する遺伝子 *GI* とアミノ酸レベルで類似した配列を持つ遺伝子が検索された。以下に有意な相同性が認められた既知の遺伝子について述べる。

A021

A021 の推定アミノ酸配列は、B-box タイプの Zn-finger を二つ持つシロイヌナズナのタンパク質と最も高い相同性を示した。このタンパク質はシロイヌナズナのゲノム解読プロジェクトにおいて存在が推定されたもので、その生物学的役割は未知である。B-box タイプの Zn-finger ドメインは、哺乳類における癌遺伝子あるいは転写調節因子の間で保存された領域として最初に報告され、システイン残基を多く含むことが特徴として知られている (Borden, 1998)。この Zn-finger ドメインの生化学的機能は余りよく分かっていないが、タンパク質間相互作用への関与が示唆されるとの報告がある (Cao et al., 1997)。高等植物では、シロイヌナズナの光周性関連遺伝子 *CO*、あるいは *CO* ファミリーに属する *COL1* および *COL2* がこのタイプの Zn-finger を二つ持つ (Ledger et al., 2001)。ただし、A021 の *CO* ファミリーとの類似領域は Zn-finger モチーフ領域に限られ、タンパク質間相互作用に関与すると考えられている CCT モチーフなど *CO* ファミリー間の共通領域は存在しない (Strayer et al., 2000。Kurup et al., 2000)。また、シロイヌナズナの光形態形成に対する負の調節因子のひとつとして *COP1* 遺伝子が知られているが、*COP1* と結合する因子として最近単離が報告された *STO* もこのタイプの Zn-finger を持つ (Lippuner et al., 1996)。ただし、*COP1* との結合に関与する領域は *STO* の C 末端部位に存在し (Holm et al., 2001)、A021 配列内にこれと類似した領域は見られない。

A031

A031 は、NAC ドメインを持つイネのタンパク質と最も高い相同性が認められた。このタンパク質はイネゲノム解読プロジェクトにおいて存在が推定されたもので、その生物学的役割は未知である。NAC ドメインは、茎頂分裂組織の形成に関与するペチュニア遺伝子 *NAM* およびシロイヌナズナ遺伝子 *CUC2* との間で保存された領域として最初に報告された (Souer et al., 1996; Aida et al., 1997; Aida et al., 1999)。NAC ドメインタンパク質は植物界において大きな遺伝子ファミリーを形成していることが知られている。その生物学的役割は遺伝子により異なり、*NAM* および *CUC2* の他に、花器官細胞の伸長に関与するとされるシロイヌナズナの遺伝子

NAP、オーキシンを介した側根形成に関与するシロイヌナズナの遺伝子 *NAC1*、さらにカブクリンクルウイルス (TCV) のコートタンパク質と結合することで TCV に対する抵抗性に寄与することが示唆されているシロイヌナズナ *TIP* 遺伝子などがこれまでに知られている (Sablowski and Meyerowitz, 1998; Xie et al., 2000; Ren et al., 2000)。またこれらの他に、老化に伴い mRNA の蓄積が誘導されるトマトの遺伝子 *SENU5*、ムギ矮化ジェミニウイルス (WDV) の RepA タンパク質と結合するタンパク質として単離されたパンコムギ遺伝子 *GRAB1* および *GRAB2*、維管束系を通して茎頂へと輸送される mRNA 種に見いだされた *CmNACP* などが知られている (John, et al., 1997; Xie et al., 1999; Ruiz-Medrano et al., 1999)。

A061

A061はイネの葉緑体局在性アルドラーゼをコードすることが示された (Tsutsumi et al., 1994)。葉緑体局在性アルドラーゼはカルビン回路での CO₂ 固定に関与する酵素として知られており、この代謝経路においてグリセルアルデヒド -3- リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸とのアルドール縮合を触媒する。また、葉緑体局在性アルドラーゼ活性をアンチセンス RNA を用いて減少させたポテトの形質転換体では、光合成能の減少とともにデンプン生合成量およびスクロース生合成量の減少が認められている (Haake et al., 1998)。

A071 (部分配列)

A071 の PCR 断片 (414bp) を BLASTX アルゴリズムを用いて検索を行った結果、5' 末端の 131 bp 領域においてシロイヌナズナ O-GlcNAc トランスフェラーゼ (推定) の C 末端部位と有意な相同性が認められた。GlcNAc とは糖の一種 N-アセチルグルコサミンの略称であり、O-GlcNAc トランスフェラーゼは O-GlcNAc のタンパク質に対する転移を触媒する。タンパク質の O-GlcNAc トランスフェラーゼを介した糖修飾機構は、シグナル伝達機構のひとつである可能性が近年考えられている (Wells et al., 2001)。例えば、O-GlcNAc の標的タンパク質への転移は、細胞周期の移行、T 細胞の活性化、グルコースの代謝と共に進行することが知られている (Hart, 1997)。また、O-GlcNAc による修飾が増した標的タンパク質はプロテアソームによる分解から免れることや、別のタンパク質との相互作用が阻害されることなどが知られている (Han and Kudlow, 1997; Roos et al., 1997)。なお、高等植物では、ジベレリンのシグナリングに関与するシロイヌナズナ *SPY* 遺伝子が O-GlcNAc トランスフェラーゼをコードすることが知られている (Jacobsen et al., 1996)。

A131

A131 はイネプロテアーゼインヒビターと最も高い相同性が認められた。このプロテアーゼインヒビターは γ -チオニンと非常に高い相同性を有していた。 γ -チオニ

ンは、抗真菌性のポリペプチドとして知られている α -および β -チオニンと類似した構造を持つポリペプチドであり (Florack and Stiekema, 1994; Epple et al., 1997)、 γ -チオニンに関しては in vitro 翻訳系において翻訳の阻害活性を持つこと、また昆虫の α -アミラーゼ活性を阻害することなどの報告がある (Mendez et al., 1990; Ary et al., 1989)。

A151

A151はイネのピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼをコードすることが明らかになった。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は、糖代謝系においてピルビン酸からアセチル Co-A を生ずる反応を触媒するが、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼはこの複合体成分のピルビン酸デヒドロゲナーゼをリン酸化することにより複合体の不活性化に機能するとされている。また、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ活性をアンチセンス RNA の発現により減少させた形質転換シロイヌナズナでは開花が早くなるとの報告がある (Zou et al., 1999)。

C061

C061 はシロイヌナズナの光周性反応を制御する遺伝子 *GI* とアミノ酸レベルで類似した配列を持つタンパク質をコードすることが明らかになった (Park et al., 1999; Fowler et al., 1999)。gi 変異はいくつかの遺伝子の発現リズムの周期を変化させることから、この遺伝子は概日時計の制御を担う因子のひとつとして光周性反応を制御すると考えられている (Park et al., 1999)。一方、*GI* は連続赤色光下での光形態形成反応が減少した突然変異株の原因遺伝子でもあったことから、PhyB のシグナリングにも関与することが示されている (Huq et al., 2000)。

C081

C081 は発現に概日リズムを示すイネ *lir1* 遺伝子であることが明らかになった。*lir1* は機能未知のタンパク質をコードし、またその生物学的役割は不明である (Reimann and Dudler, 1993)。

J011

J011 はミオイノシトール -1- リン酸シンターゼをコードすることが明らかになった (Yoshida et al., 1999)。この酵素は、グルコース -6- リン酸からミオイノシトール -1- リン酸が生合成される反応を触媒する。ミオイノシトール -1- リン酸およびこの物質から生合成されるミオイノシトールは様々な物質の生合成経路における出発点であり (Bohnert et al., 1995)、ミオイノシトール -1- リン酸からはシグナル伝達系において重要な役割を果たすホスファチジルイノシトールや細胞膜におけるリン脂質などが生合成され、ミオイノシトールからは炭水化物の貯蔵形態のひとつであるラフィノースや、細胞壁成分のひとつであるガムなどが生合成される (Bohnert et al.,

Table 2 日周発現遺伝子がコードするタンパク質

Gene name	Best Homology: accession No.
Up-regulated in <i>se5</i>	
A011	<i>Arabidopsis</i> unknown protein: AAF24535
A021	<i>Arabidopsis</i> putative B-box zinc-finger protein: CAB38816
A031	Rice putative NAC-domain protein: CAB55403
A061	Rice fructose-bisphosphate aldorase (AldP): Q40677
A071	<i>Arabidopsis</i> putative O-GlcNAc transferase: AAC25927
A091	----a
A131	Rice proteinase inhibitor: AAB17095
A151	Rice putative pyruvate dehydrogenase kinase: AAG46146
G011	----a
Down-regulated in <i>se5</i>	
C061	<i>GIGANTEA</i> homolog of rice: CAB56058
C081	Rice <i>lir1</i> gene: S33632
J011	Rice <i>myo</i> -inositol phosphate synthase (RINO1): AB012107

^a有意な相同性なし

1995)。

3. 発現量が日長により変化する遺伝子の同定

シロイヌナズナの光周性関連遺伝子である *FT* および *SOC1* は、花成の促進される長日条件において mRNA レベルが増大する (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Lee et al., 2000)。se5 変異株は花成の光周性反応を示さないことから、このような遺伝子の発現様式が変化していると予想される。そこで、日周性の発現様式を示した 12 の遺伝子の中から、mRNA 量が日長により変化する遺伝子を探索した。RNA は長日および短日条件下において育成した野生型株の葉身由来のものを使用した。また、葉身は一日の間に 2 時間おきに収集し、一日間の発現量を長日および短日の間で比較できるようにした。植物体は播種後 47 日後のものを使用した。この時期では、短日条件下で育成した少数の野生型株の茎頂に花芽原基が観察される (早間, data not shown)。RNase protection assay により発現解析を行った結果、発現量が日長に応答する遺伝子が 5 つ同定された (A011、A031、A061、A091、A131) (Fig. 4A, B)。これらの遺伝子は全て花成の促進される短日条件下において mRNA レベルが増加していた (Fig. 4A, B)。このことは、これらが短日条件下での花成促進に機能することを示唆する。またこの発現の日長応答性は、これらの発現レベルが se5 変異株において上昇することと矛盾しない。

日周性の発現様式を詳細に観察した結果、これらの遺伝子は暗期の間に発現が上昇し始め、明期の始めあるいは中間に当たる時間に発現極大を迎えていた (Fig. 4A)。また、暗期中での発現上昇は暗期の早く始まる短日条件下において早い時間に見られた。これらの遺伝子の発現極大は、A061、A131 では長日条件下において明期開始からそれぞれ 4 時間、2 時間後にあり、短日条件下での発現極大よりも後ろの時間に移動していた (Fig. 4A)。その一方で、A011、A031 および A091 は、いずれの日長条件下においても明期の始まり発現極大を迎えた (Fig. 4A)。ところで、概日時計の明暗周期に対する同調化反応に関する研究から、概日時計制御下にある遺伝子の発現様式には、その日周パターン全体が日長の長化に伴って後方に移動する特徴があると考えられている (Millar and Kay, 1996)。A061 および A131 の発現様式は、短日条件下で発現が上昇することを除くと、概日リズム様の発現様式とよく一致する。一方、A011、A031、および A091 は長日と短日の両方の条件下において同一の時間に極大を迎えることから、これは概日リズムの発現様式とは一部異なると考えられる。

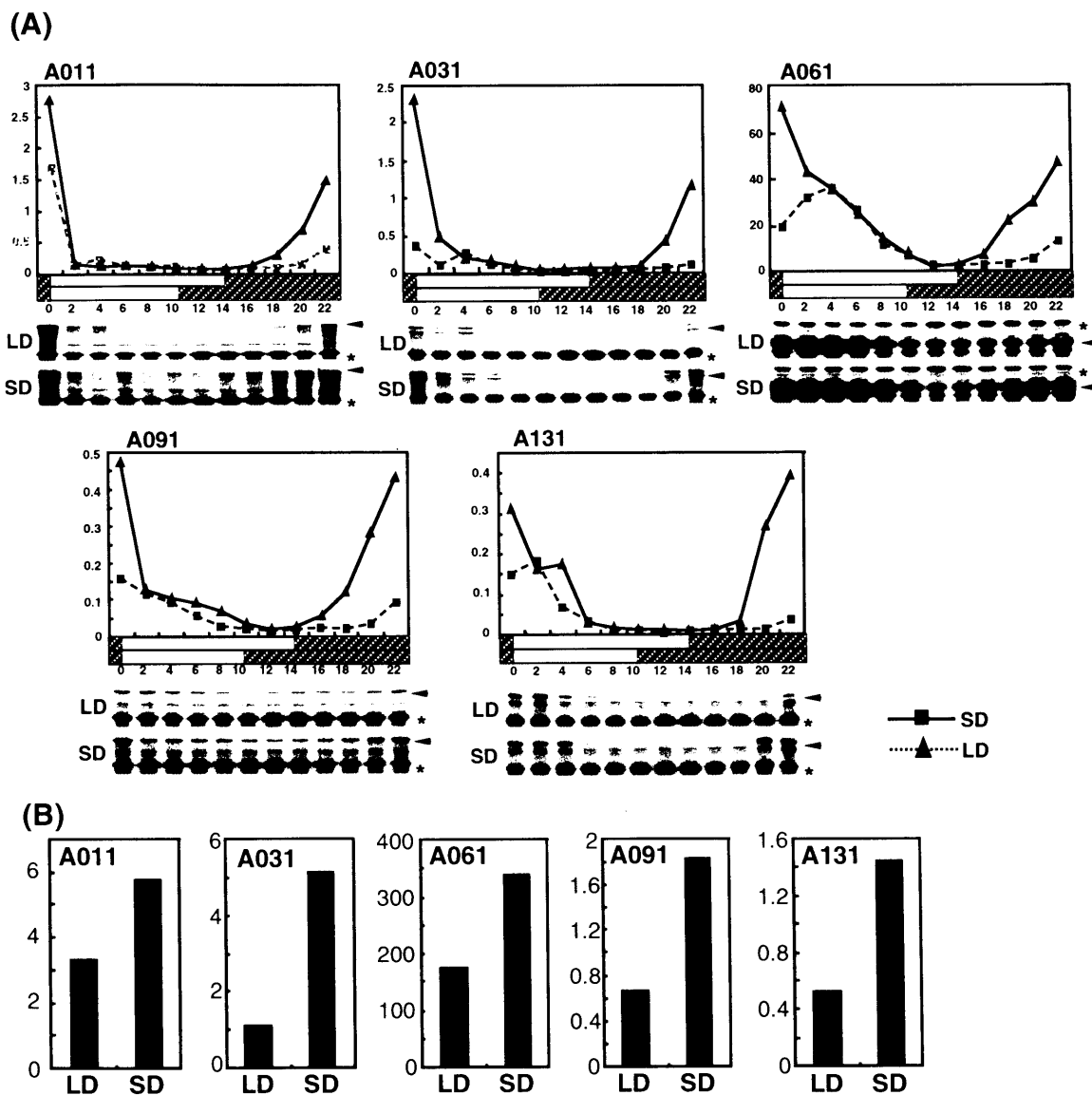


Fig. 4. 発現レベルが日長により変化する同定遺伝子

(A) 日周性の発現用式の長日条件下および短日条件下での比較。47 日間育成した野生型株の葉身由来 RNA を用いた。シグナルの検出には RNase protection 法を用いた。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。矢印は同定遺伝子シグナルを、星印は *ubq* シグナルを示す。(B) mRNA 総量の長日条件下および短日条件下での比較。

4. 日長応答性遺伝子の *se5* 変異株における発現様式

A011、A031、および A091 の発現レベルが明期の始まりと共に減少することは、これらの発現が光により抑制されていることを示している。そうであれば、これら遺伝子の発現低下のパターンはフィトクロムの機能が大幅に失われた *se5* 変異株において変化している可能性が考えられる。このことを検証するために、A031 の *se5* 変異株での発現様式を調べた。植物体は播種して 28 日後のものを使用した。この時期では、長日条件下で育成した少数の *se5* 変異株の茎頂に花芽原基が観察される (早間, data not shown)。一日の間で 2 時間おきに単離した RNA を用いて解析を行ったところ、短日条件下では、A031 の *se5* 変異株での発現様式に野生型との大きな変化は見られなかった (Fig. 5A)。一方、長日条件下では A031 の *se5* 変異株での発現様式に野生型との有意な変化が見られた。すなわち *se5* 変異株では、A031 の発現極大が野生型株と比べ明期の側に約 4 時間移動しており、その部分の発現が野生型株と比べ上昇していることが示された (Fig. 5A)。このことは、A031 の光による発現抑制に *SE5* が関与することを示している。さらに、A031 の一日の間での総発現量を長日条件と短日条件との間で比較すると、野生型株で見られた短日条件下での発現上昇が *se5* 変異株では失われており、*se5* 変異株ではむしろ長日条件下においてわずかに増加していることが明らかになった (Fig. 5B)。 *se5* 変異株の開花は短日条件下よりも長日条件下でわずかに早くなることから、この発現様式は *se5* 変異株での花成反応とよく一致している。以上の結果は、A031 の発現レベルの日長応答性には光による発現抑制が重要であること、さらにこの光による発現抑制には *SE5* が関与することを示している。加えて、この制御へのフィトクロムの関与が示唆される。

5. *OsGI* の *se5* 変異株での発現様式

GI とアミノ酸レベルで類似した遺伝子 (C061) の発現が *se5* 変異株において変化していたことは、この遺伝子の発現変化が *se5* 変異株における光周性欠損の原因であることを連想させる。そこで、この *GI* 類似遺伝子 (*OsGI*) の *se5* 変異株での発現様式を野生型株と比較した。その結果、*se5* 変異株の花成早化の表現型が顕著に現れる長日条件下では、*OsGI* の *se5* 変異株での発現レベルはその極大を迎える前後の時間において野生型株と比べわずかな減少を示した (Fig. 3)。一方、*OsGI* の *se5* 変異株における極大レベルに野生型株との有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。このことは、*se5* 変異株は光周性を完全に失い長日条件下での花成が顕著に早化するにも関わらず、*OsGI* の *se5* 変異株での長日条件下における発現変化はさほど顕著ではないことを示している。

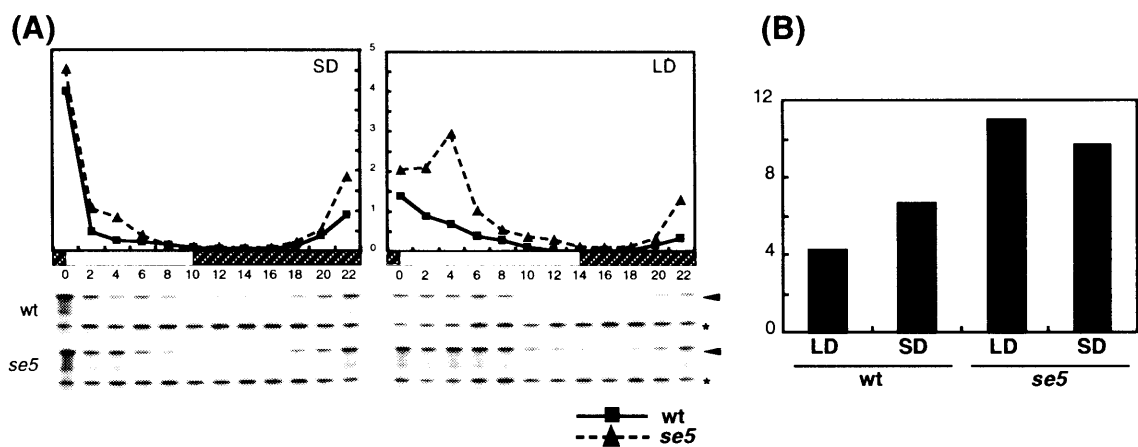


Fig. 5. A031 の発現の *se5* 変異株における日長応答性

(A) 日周性の発現用式の長日条件下および短日条件下での比較。28 日間育成した野生型株の葉身由来 RNA を用いた。シグナルの検出には RNase protection 法を用いた。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。矢印は A031 シグナルを、星印は *ubq* シグナルを示す。(B) mRNA 総量の長日条件下および短日条件下での比較。

考察

1. *SE5* 制御下の日周反応

発現に日周性の変動を示す遺伝子はこれまでに非常に多数知られている。DNA チップを用いた解析では、対象としたシロイヌナズナの 8,000 遺伝子の約 6% (480 遺伝子) が発現に概日リズムを示すことが明らかになっている (Harmer et al., 2000)。この中には、概日リズム制御に関わる遺伝子の他に、光合成反応など光応答性の生理反応に関わる遺伝子群や、炭酸、窒素、硫酸同化、および様々な代謝経路を構成する遺伝子群が含まれる (Harmer et al., 2000)。またこの中には光周性反応の制御に関わる遺伝子も複数見いだされている。本研究では、約 10% のバンドがシグナル強度の規則的な変動を示しており、葉において発現している遺伝子の約 1 割は日周性の発現様式を示すものと推測された。一方、*se5* 変異株において発現が変化する遺伝子はこの中のさらに 1.5% に限られることから、*se5* 変異は日周性の発現様式を示す遺伝子の中でも、特定の遺伝子集団の発現を変化させる。すなわち *SE5* は、数多く存在する日周性の生理反応の中でも、特定の反応を制御していると考えられる。

CAB など光合成関連遺伝子の発現の光誘導にはフィトクロムが関与することが古くから知られている。一方、*se5* 変異株において発現の変化した遺伝子には、光合成に関連する遺伝子は含まれていなかった。このことから、光合成関連遺伝子の *se5* 変異株における発現様式は、本実験条件では、野生型株と比べ大きくは変化していないことが示唆される。これと類似した実験結果がシロイヌナズナにおいて報告されている。すなわち、活性フィトクロムがほとんど検出されない *hy1* 変異株のアリルでは、*CAB* や *CHS* などの光応答性遺伝子の明暗周期での発現様式に変化が見られないことが知られている (Chory et al., 1989)。この原因として、上記の光応答性遺伝子の明暗周期での正常な発現には、活性フィトクロム (Pfr) が必要ではない、あるいはごく少量あるだけで十分である可能性が考えられる。明暗サイクルには白色光が用いられることから、他の光受容体も上記遺伝子の正常な発現に関わるのであろう。

では、*se5* 変異株において変化した日周反応とはいったい何であろうか。発現が日周変動を示した遺伝子の中には、アルドラーゼ、O-GlcNAc トランスフェラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ・キナーゼ、ミオイノシトール1-リン酸シンターゼなどが見いだされる。これらのことから、*se5* 変異株では炭酸同化、糖代謝経路やイノシトール1-リン酸を起点とする特定の生合成経路、また O-GlcNAc 転移を介した特定タンパク質の活性調節機構が変化していると考えられる。ところで、この中にアルドラーゼが含まれることは興味深い。アンチセンス RNA を用いてアルドラーゼ活性

を減少させたポテトの形質転換体では、光合成能の減少に伴ってデンプンおよびスクロースの生合成量が減少することが知られている (Haake et al., 1998)。また、デンプン代謝異常を示すシロイヌナズナの突然変異株では花成に異常が見られることや、スクロースの外的投与がシロイヌナズナの花成を変化させることなどから (Casper et al., 1985; Casper et al., 1991; Bernier et al., 1993)、アルドラーゼ遺伝子の *se5* 変異株での発現変化は、*se5* 変異株での花成変化に一部関与する可能性が示唆される。

一方、日周性の発現様式を示す 12 の遺伝子の中には、発現パターンあるいはアミノ酸配列から光周性に関連すると考えられる遺伝子が 6 つ見いだされた。A011、A031、A061、A091、A131 は日長に依存して発現レベルが変化し、C061 は *GI* とアミノ酸レベルで類似した配列を有していた。

2. 発現量が日長に応答して変化する遺伝子

短日条件下において mRNA レベルの上昇していた 5 つの同定遺伝子は、イネの短日条件下での花成促進に関与することが示唆される。一方、これらの遺伝子がコードするタンパク質はこれまでに同定されてきた光周性関連遺伝子には見いだされないことから、これらは発現が日長に応答して変化する新奇な遺伝子であることが示される。また、高等植物の光周性反応は花成反応以外にもいくつか知られていることから、これら遺伝子の花成反応とは異なる光周性反応への関与も示唆される。花成反応以外の光周性反応としては、光合成産物の貯蔵器官への分配、塊茎などといった貯蔵器官の発達、休眠芽の形成、種子の発芽などが知られている (Thomas and Vince-Prue 1997)。

3. 日長応答性遺伝子の発現様式

生理学的解析あるいは分子生物学的解析から、日長識別には概日時計シグナルと光受容体シグナルとの相互作用が重要であると考えられているが、この分子機構は明らかではない。近年になって、シロイヌナズナなどから花成の光周性に関与する遺伝子が多数同定され、この中には *FT* や *SOC1* 遺伝子など発現レベルが日長により変化する遺伝子群が見いだされる。日長識別の分子機構の解明には、このような遺伝子の日長依存的発現の発現機構を知ることが重要である。一方、同定された 5 つの遺伝子の発現レベルは日長に依存して変化することから、これらの発現制御機構を知るとは、日長識別の分子機構を知る手掛かりとなりうる。中でも、発現の日長応答性が *se5* 変異株において失われる A031 は、日長の識別機構を考える上で特に興味深い。

A031 の発現の日長応答性には光による発現抑制が関与し、さらにこの光抑制にはフィトクロムが関与することが示唆される。では、A031 の光抑制を受けていない場合の発現様式はどのようなものであろうか。A031 の *se5* 変異株での発現様式を見ると、長日条件下での発現極大は短日条件下と比べ後の時間に移動しており、これは時計制御下にある遺伝子の明暗周期での発現様式と一致する。このことから、A031 の日長依存的発現の原因は、概日時計により発生した日周発現にフィトクロムによる発現抑制が加わり、その結果、長日条件下での発現レベルが減少したことによると示唆される。また短日条件下において、A031 の *se5* 変異株での発現様式が野生型株と比べ大きな変化を示さなかったのは、A031 の野生型株での発現極大がちょうど明期開始時刻と重なったためであると考えられる。

一方、A061、A131 の発現レベルは概日リズム様の日周変動を維持したまま短日条件下で上昇する。時計制御下にある遺伝子の発現レベルを長日条件と短日条件との間で比較した場合、一日の間での発現レベルは大きくは変化しないのが一般的であることから、この制御機構は不明である。

4. *OsGI* の *se5* 変異株での発現変化

光周性反応が失われた *se5* 変異株において *OsGI* の発現が変化していたことは、この遺伝子の発現変化が *se5* 変異株における光周性欠損の原因であることを連想させる。しかしながら、*se5* 変異株は長日条件下において顕著な花成早化の表現型を示すにも関わらず、*OsGI* の *se5* 変異株での発現様式に野生型株との顕著な変化は認められなかった。このことから、この発現変化は *se5* 変異株の長日条件下での花成早化の原因ではない可能性が示唆される。今後、この仮説を検証するための遺伝学的解析が必要であろう。

5. 同定遺伝子の花成反応における役割

短日植物イネの光周性反応における分子生物学的知見は最近になって増えつつある。光周性反応の失われた突然変異株から *SE5* が、開花時期の品種間差を決定する遺伝子として *Hd1* (*Se1*)、*Hd3*、*Hd6* および *SE5* が遺伝学的手法により単離され、その開花時期決定に対する役割が解析されている。本研究では、mRNA レベルでの発現制御の光周性制御における重要性に着目し、発現が光周性反応の制御特性と一致する遺伝子を探索した。まず、*se5* 変異株において発現様式が変化した遺伝子の単離を行い、合計 27 の独立な遺伝子を同定した。(Fig. 6)。さらに、この中から日周性の発現様式を示す遺伝子を探索することで、12 遺伝子を見いだした。すなわちこれらは、*SE5* 制御下の日周反応に関与する遺伝子であり、光周性反応への関与が期待

される。ところで、これらの発現は概日時計により制御されると予想されるが、*se5* 変異は白色光下では *CAB* の概日リズムに影響を与えないことが知られており、*se5* 変異はこの条件では概日時計の制御に大きな影響を与えていないと考えられている (杉山, 2000)。従って、日周変動を示す 12 の同定遺伝子の *se5* 変異株における発現変化は、概日時計を介さない経路の活性変化に起因すると考えられる (Fig. 6)。これら 12 の遺伝子は *se5* 変異株において発現レベルの上昇していた遺伝子群と、逆に発現レベルの減少していた遺伝子群とに分けられる。*se5* 変異株は開花の早くなる表現型を示すことから、前者の遺伝子群は開花の促進に機能すると期待され、一方後者の遺伝子群は開花の抑制に機能すると期待される。前者の遺伝子群には、花成促進条件である短日条件下において発現レベルが上昇する遺伝子が 5 つ見いだされた (Fig. 6)。一方、シロイヌナズナの光周性を制御する *GI* の類似遺伝子である *OsGI* は、後者の遺伝子群に見いだされた (Fig. 6)。これら 6 遺伝子はイネの光周性への関与が示唆される。

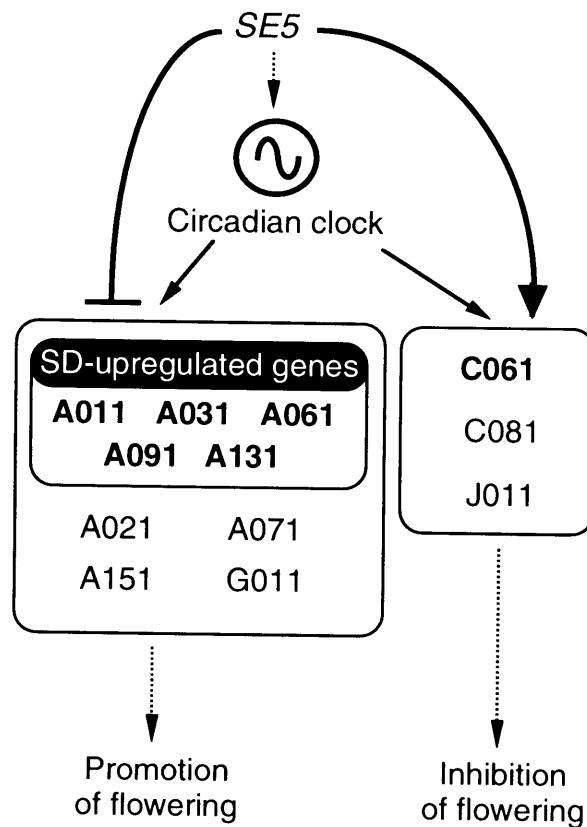


Fig. 6. イネの花成反応に対する同定遺伝子の役割の推定

se5 変異株において発現様式が変化した遺伝子に、発現に日周性のパターンを示す遺伝子が 12 見いだされた。これらの同定遺伝子の中から、mRNA レベルの増大を示す遺伝子を 9 つ、逆に減少を示す遺伝子を 3 つ同定した。*se5* 変異株は花成の早化を引き起こすことから、前者は花成促進に機能することが期待される。このグループの中には、発現レベルの短日条件下において上昇する遺伝子が 5 つ見いだされた (A011、A031、A061、A091、A131)。一方、後者は花成抑制に機能することが期待され、*OsGI* が見いだされた (C061)。また、同定遺伝子の *se5* 変異株での日周パターンの変化は、概日時計の制御が *se5* 変異株において変化したためではないと考えられる。

第2章 *OsGI* の機能解析

短日植物における光周性反応の分子生物学的知見は近年になって飛躍的に増加する傾向にあるが、これは主にイネを用いた研究成果によるものである。これまでに *SE5*、*Hd1* (*Se1*)、*Hd3a*、*Hd6* が遺伝学的解析から同定され、これらのイネにおける光周性反応への役割が解析されている (Yano et al., 2000; Izawa et al., 2000; Yano et al., 2001; Takahashi et al., 2001)。興味深いことに、これらの遺伝子はそれぞれシロイヌナズナの光周性関連遺伝子 *HY1*、*CO*、*FT*、*CK2* とアミノ酸配列レベルで類似したタンパク質をコードしており (Yano et al., 2000; Izawa et al., 2000; Yano et al., 2001; Takahashi et al., 2001)、イネの光周性を制御する遺伝的機構がシロイヌナズナと一部類似している可能性を示唆している。また *OsGI* が本研究において見いだされたこともこの可能性を支持する。一方、イネとシロイヌナズナは日長に対して逆の花成反応を示すことも事実であり、光周性を制御する双方の遺伝的経路は必ず何らかの形で異なるはずである。本研究では、*OsGI* の機能解析を行うことでイネの光周性反応を制御する遺伝的経路の同定を試みた。それと同時に、イネとシロイヌナズナの光周性経路における相違点を探索した。

材料と方法

1. 植物材料

農林8号 (N-8) および *OsGI* 過剰発現株 (*OsGI-ox* 株)。*OsGI-ox* 株は、農林8号に Fig. 7 のコンストラクトをアグロバクテリウム感染法により導入することで得た。(Hiei et al., 1994)。

2. 方法

2-1. 開花時期の測定

種子を長日 (14 時間日長) あるいは短日条件 (10 時間日長) に設定した人工気象室において発芽させ、そのまま出穂まで生育させた。発芽処理および植物体の育成は第1章に記載した方法で行った。出穂日数は播種から出穂までの日数とした。

2-2. 発現解析

2-2-1. RT-PCR

cDNA 合成には Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL 社) を用いた。方法は添付の説明書に従った。逆転写用プライマーは random 9-mer (宝酒造) を使用した。得られた反応液に滅菌水を加え 100 μ l とし、以下の PCR 反応を行った。

プライマー配列

OsGI (209 bp)

5'-TGGAGAAAGGTTGTGGATGC-3'

5'-GATAGACGGCACTTCAGCAGAT-3'

Se1 (401 bp);

5'-GTTTGCAGAGAAGGAAGGGAGCGAGTG-3'

5'-CAAGAAAGGCGTATGCAGAGGCACGACC-3'

Hd3a (257bp);

5'-TCAGGGTTTTTTTGCAAGATCGATGG-3'

5'-GGTAGACCCAGATGCACCAAGCCCA-3'

ubiquitin (ubq) (209bp);

5'-GACAAGGAGGGAATCCCG-3'

5'-GCATAGCATTTGCGGCA-3'

PCR 反応組成 (10 μ l)

cDNA	6 μ l
10 $\times$ PCR buffer (宝酒造)	1 μ l
2.5 mM mixed dNTP (宝酒造)	1 μ l
10 μ M specific primer 1	0.5 μ l
10 μ M specific primer 2	0.5 μ l
Ex-Taq polymerase (宝酒造)	0.1 μ l
滅菌水	1 μ l

PCR 反応条件

96 $^{\circ}$ C (1 min)

94 $^{\circ}$ C (30 sec)、64 $^{\circ}$ C (30 sec)、72 $^{\circ}$ C (30 sec) $\times$ サイクル数

Fig. 13 における PCR では、*OsGI*、*Se1*、*Hd3a*、*ubq* の増幅にそれぞれ 24、28、28、24 のサイクル数を適用した。Fig. 14, 15 においては、*Hd3a*、*ubq* にそれぞれ 19、17 のサイクル数を適用した。シグナルの検出にはエチジウムブロマイド染色 (Fig. 13)

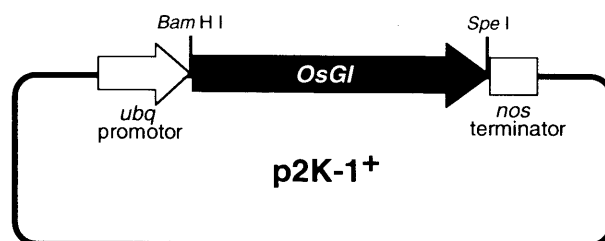


Fig. 7. *OsGI* 過剰発現用コンストラクト
 導入した *OsGI* 配列には 5'-UTR および 3'-UTR としてそれぞれ 240 bp および 274 bp を含む。

あるいはサザン解析 (Fig. 14, 15) を用いた。

2-2-2. RNase protection assay

第1章に記載した方法を用いた。Fig. 1 にRNA プローブ作成に使用したテンプレートプラスミドを記載する。

結果

1. *OsGI* のアミノ酸配列の特徴

GI のイネ類似遺伝子 (*OsGI*) cDNA の全塩基配列から、*OsGI* は 1160 アミノ酸から成るタンパク質をコードすると予測された (Fig. 8)。*OsGI* の全アミノ酸配列を *GI* と比較した結果、*GI* とは約 67% の相同性が認められ、またアミノ酸配列全体にわたって高い相同性が見られた。*GI* タンパク質には 11 箇所の膜貫通領域の存在がコンピュータ解析によって予測されていたが (Fowler et al., 1999)、その後の解析から *GI* は核内に局在化することが示され、核タンパク質として機能すると考えられている (Huq et al., 2000)。*GI* タンパクの核局在に必要な領域はすでに同定されており、その内部には塩基性アミノ酸に富んだ核移行シグナル様配列が認められている (Huq et al., 2000)。この領域を比較すると、*OsGI* にも同様の断片領域が保存されていることが明らかになった (Fig. 8)。このことは、*OsGI* が *GI* と同様核タンパク質として機能することを示唆する。

2. *OsGI* のゲノム中におけるコピー数

OsGI のイネゲノム中におけるコピー数を調べるために、*OsGI* 全長 cDNA をプローブにサザン解析を行った。その結果、得られたバンド数およびシグナル強度に洗浄条件による変化が見られなかった (Fig. 9)。このことから、これらのバンドは全て *OsGI* そのものに由来すると考えられた。またデータベース検索の結果、イネゲノム配列および EST に *OsGI* と似て非なる配列は存在しなかった。これらのことは、*OsGI* がイネゲノム中に 1 コピー存在することを示唆する。また、*GI* はシロイヌナズナのゲノム中に 1 コピー存在することから、*OsGI* は *GI* の相同遺伝子であることが示唆される。

3. *OsGI* の発現様式

イネは花成反応においてシロイヌナズナとは逆の日長応答性を示すことから、双方の光周性経路には異なる調節段階があるはずである。さらにこの段階は双方の

rice GI	M--SASNEKWIDGLQFSSSLFWPPPQDSQQKQAI LAYVEYFGQPTADSEQFPEDIAQLIQSCYPSKEKRLVDEVL	73
Arabidopsis GI	MASSSSSERWIDGLQFSSSLWPPPRDPQHKDQV VAYVEYFGQPTSE--QFPDDIAELVRHQYPSTEKRLDDVL	73
rice GI	ATFVLHHPEHGHAVVHPILSRIIDGTLSDYDRNGFFPMSFISLFSHTSEKEYSEQWALACGEILRLVTHYNRPYFK	148
Arabidopsis GI	AMFVLHHPEHGHAVILPIISCLIDGSLVYSKEAHPFASFISLVCPSSENDYSEQWALACGEILRLVTHYNRPYFK	148
rice GI	VDHQHSEAECSSTSDQASSCESMEKRANGSPRNEPDRKPLRPLSPWITDILLAAPLGIRSDYFRWCGGVMGKYAA	223
Arabidopsis GI	TEQQNGDTERNCLSKATTSGSPTSEPKAGSP-TQHERKPLRPLSPWISDILLAAPLGIRSDYFRWCSGVMGKYAA	222
rice GI	GGELKPPTTAYSRGSGKHPQLMPSTPRWAVANGAGVILSVCDDEEVARYETANLTAAAVPALLPPPTTSLDEHLV	298
Arabidopsis GI	G-ELKPPTIA-SRGSGKHPQLMPSTPRWAVANGAGVILSVCDDEEVARYETATLTAVAVPALLPPPTTSLDEHLV	295
rice GI	AGLPPEPYARLFHRYIAIATPSATQRLFLGLEAPPSPWAPDALDAAVQLVELLRAAEDYDSGMRLPKNWMHLHF	373
Arabidopsis GI	AGLPALEPYARLFHRYIAIATPSATQRLLLGLEAPPSPWAPDALDAAVQLVELLRAAEDYASGVRLPRNWMHLHF	370
rice GI	LRAIGTAMSMRAGIAADTSAALLFRILSQPTLLFPPLRHAEGVELHHEPLGGYVSSYKRQLEVPASEATIDATAQ	448
Arabidopsis GI	LRAIGIAMSMRAGVAADAAAALLFRILSQPALLFPPLSQVEGVEIQHAPIGGYSSNYRKQIEVPAAEATIEATAQ	445
rice GI	GIASMLCAHGPVWEVRICTIWEAAYGLPLSSSAVDLPEIIVVAAPLQPTLSWSLYLPLLKVFYELPRGSPSEAC	523
Arabidopsis GI	GIASMLCAHGPVEVRICTIWEAAYGLIPLNSSAVDLPEIIVATPLQPPILSWNLYIPLLKVLEYLPRGSPSEAC	520
rice GI	LMRIFVATVEAILRRTFPSETS-EQSRKPR-----SQSKNLAVAEALRTMIHSLFVESCASMDLASRLLFVVLT	591
Arabidopsis GI	LMKIFVATVETILSRTPPESSRELTRKARSSFTTRSATKNLAMELRAHVHALFLESCAGVELASRLLFVVLT	595
rice GI	CVSHQALPGGSKRPTGSDNHSSEEVNTDSRLTNG-----RNRCKKRQGPVATFDSYVLAAVCALSCSELQFPFIS	661
Arabidopsis GI	CVSHEAQSSGSKRPRSEYASTTENIEANQPVSNQNTANRKSERNVKGQGPVAAFDSYVLAAVCALACEVQLYPMIS	670
rice GI	KNGNHSNLKDSIKIVI PGKTTGISNELHNSISSAILHTRRILGILEALFSLKPSSVGTWSYSSNEIVAAAMVAA	736
Arabidopsis GI	GGGNFSNSAVAGTITKPVKINGSSKEYGAGIDSAISHTRRILAILEALFSLKPSSVGTWFSYSSSEIVAAAMVAA	745
rice GI	HVSELFRRSRPCLNALSALKQCKWDAEISTRASSLYHLIDLHGKTIVTSIVNKAEPLEAHLTLTPVKKDEPPIEEK	811
Arabidopsis GI	HISELFRRSKALTHALSGLMRCKWKEIHKRASSLYNLIDVHKSIVASIVDKAEPLEAYLKNTPVQKDSVTCNLW	820
rice GI	NINSSDGGALEKKDASRSHRNKGFARPLKCAEDVILNGDVASTSGKAIASLQVEASDLANFLTMDRNGG-YRGS	885
Arabidopsis GI	KQENTCASTTCFDTAVTSASRTEM-NPRGNHXYARHSDEGSRPSEKGIKDFLLDASDLANFLTADRLAGFYCGT	894
rice GI	QTLRSVLSEKQELCFSVVSLWQKLIASPEMQMSAESTSAHQGWKRVVDALCDIVSASPTKASAAIVLQAEKDL	960
Arabidopsis GI	QKLLRSVLAEKPELSFSVVSLWHLKLIAPETIQAESTSAQQGWQVVDALCNVVSATPAKAAAIVLQAEKDL	969
rice GI	QPWIARDDEQGGKMWVNQRIVKLIAELMRNHDSPEALVILASASDLLLRATDGMVLDGEACTLPQLELLEVTAR	1035
Arabidopsis GI	QPWIAKDDEEGQKMWKINQRIVKVLVELMRNHDRPESLVLASASDLLLRATDGMVLDGEACTLPQLELLEATAR	1044
rice GI	AVHLIVEWGDGSGVSVADGLSNLLKCRLLSTIRCLSHPSAHVRALSMSVLRDILNSG--QINSSKLIQGEHRNGIQ	1108
Arabidopsis GI	AIQPVLAWGSPGLAVVDGLSNLLKCRLLPATIRCLSHPSAHVRALSTSVLRDIMNQSSIPIKVTPKLPPTTEKNGMN	1119
rice GI	SPTYQCLAASIINWQADVERCIEWEAHSRRATGLTLAFLTAALKELGC--PLTC	1160
Arabidopsis GI	SPSYRFFNAASIDWKADIQNCNLWEAHSLLSTMTPTQFLDTAARELGCTISLSQ	1173

Fig.8. OsGI のアミノ酸配列の GI との比較

灰色の囲いは OsGI と GI との間での相同あるいは類似アミノ酸を示す。下線は GI の核移行に必要な領域を示す。太字は核移行シグナル様の塩基性アミノ酸配列を示す。

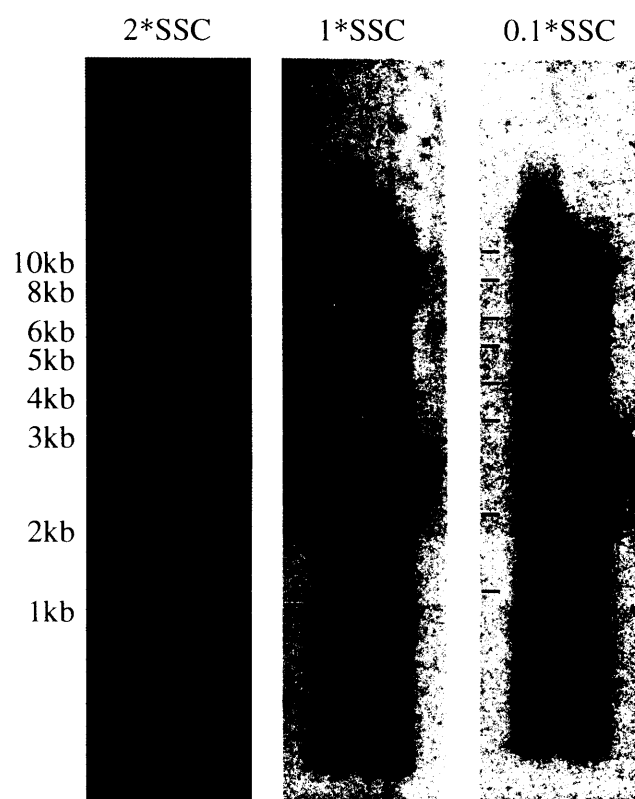


Fig. 9. *OsGI* イネゲノム中でのコピー数確認のためのサザン解析
Bam H I (左レーン) および *Sac* I (右レーン) により消化したイネゲノムに対し、*OsGI* 全長 cDNA をプローブにサザン解析を行った。メンブレンの洗浄は 65 °C で行った。メンブレンの洗浄に用いた SSC 濃度を上に示した。

GI の発現調節機構なのかもしれない。この可能性を確かめるために、*OsGI* の発現解析を行った。ところで、*GI* mRNA の発現は概日時計により制御されていることが明らかになっている (Park et al., 1999)。そこでまず、*OsGI* の発現における概日リズムの有無を調べた。連続明期あるいは連続暗期の間で 4 時間おきに 2 日間にわたって採取した葉身由来 RNA を用いて発現解析を行った結果、*OsGI* mRNA レベルは連続明期および連続暗期において約 24 時間周期で上下し、典型的な概日リズムのパターンを示した (Fig. 10)。このことから、*OsGI* の発現制御には *GI* 同様概日時計の関与が示された。このリズムパターンを詳細に観察すると、*OsGI* は主観的明期の終わりに発現極大を迎える形の概日リズムを示すことが分かった (Fig. 10)。この特徴は *GI* において観察されている特徴と同一であり (Park et al., 1999)、*OsGI* の発現は *GI* と同様のパターンの概日リズムを示すことが明らかになった。

光周性反応は明暗周期において調節される生理反応に定義されることから、*OsGI* の明暗周期での発現様式を調査する必要がある。そこで、*OsGI* の発現の一日の間での発現様式を調べた。一日の間に 2 時間おきに採取した葉身由来 RNA を用いて解析を行った結果、*OsGI* の発現は明期の終わりに発現極大を迎える形の日周パターンを示した (Fig. 11)。この日周パターンは *GI* のそれと同様であり (Fowler et al., 1999)、*OsGI* の明暗周期での発現は *GI* と同様の日周パターンを示すことが明らかになった。さらに、この発現様式を長日条件と短日条件との間で比較すると、長日条件下における発現極大は短日条件下よりも後ろの時刻に移行し (Fig. 11)、*GI* と同一の特徴を示した。 (Fowler et al., 1999)。以上の結果は、*OsGI* の発現様式が *GI* のそれと類似していることを示しており、イネとシロイヌナズナの日長応答性の違いが双方の *GI* の発現制御機構に起因するものではないことを示唆している。

4. *OsGI* の機能解析

4-1. *OsGI-ox* 株の開花時期

OsGI の花成に対する役割を調べるために、*OsGI* をユビキチンプロモーターにより恒常的に発現する形質転換体を作成した (Fig. 11)。その結果、独立な形質転換体を 5 系統得た。次いで、これらのうち 3 系統の後代 (分離世代) を長日条件及び短日条件下で育成し、開花に要する日数を測定した。このとき、使用した 3 系統の個体はサザン解析により導入遺伝子座の遺伝子型を確認した (data not shown)。

解析に用いた *OsGI* 過剰発現株 (*OsGI-ox* 株) の 3 系統すべてにおいて、導入遺伝子をヘテロあるいはホモに持つ集団は、野生型株あるいは導入遺伝子を持たない集団と比べ花成の遅延を示した (Fig. 12)。さらに、これら集団の開花時期には長日と短

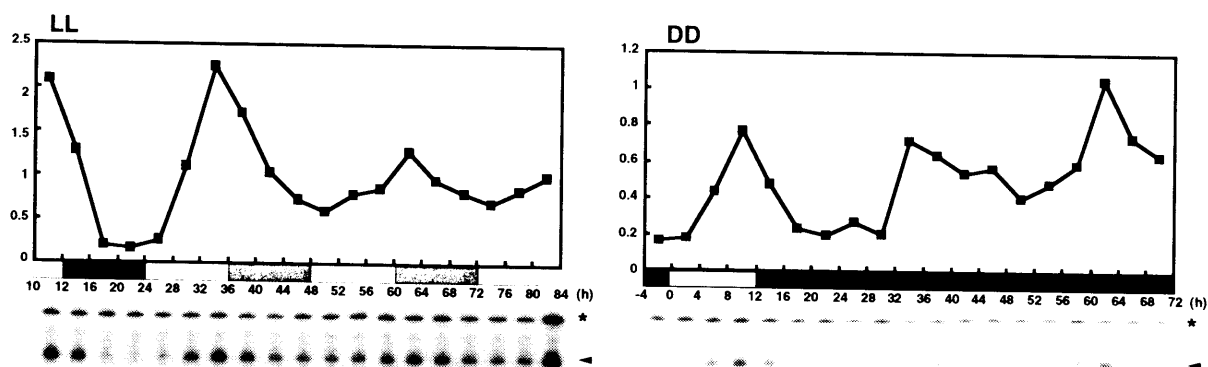


Fig. 10. *OsGI* mRNA 発現の概日リズム

明暗サイクル (12 時間明、12 時間暗) に 5 日間同調させた野生型株を連続明期 (LL; 36 時以降) あるいは連続暗期 (DD; 24 時以降) に移した。葉身は 4 時間おきにサンプリングし、ここから抽出した RNA を解析に用いた。シグナルの検出には RNase protection 法を用いた。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。矢印は *OsGI* シグナルを、星印は *ubq* シグナルを示す。

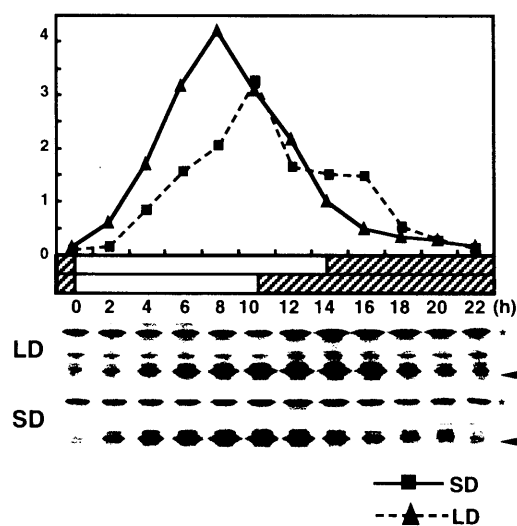


Fig. 11. *OsGI* mRNA 発現の日周パターン

47 日間育成した野生型株の葉身由来 RNA を用いた。シグナルの検出には RNase protection 法を用いた。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。矢印は *OsGI* シグナルを、星印は *ubq* シグナルを示す。

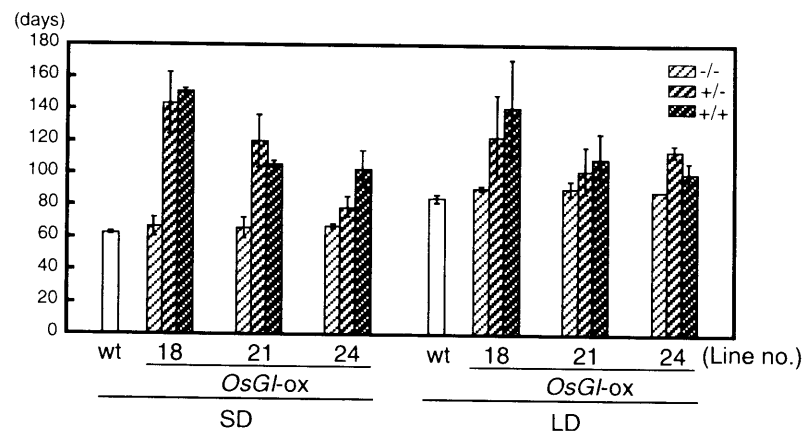


Fig. 12. *OsGI-ox* 株の開花時期

OsGI-ox 株の 3 系統 (T1 世代) を長日条件および短日条件下において育成し、出穂日を調べた。それぞれの個体における導入遺伝子の遺伝子型はサザン解析により同定した。+/+、+/-、-/- は導入遺伝子の遺伝子型を示す。

日条件下との間での有意な違いが見られず、花成の光周性反応がほとんど失われていた (Fig. 12)。以上の結果は、*OsGI* が長日条件下において花成の抑制に働くことを示している。さらに、*GI* は花成の促進に機能する遺伝子であることから (Fowler et al., 1999)、*OsGI* は花成において *GI* とは逆の働きをすることが示される。

4-2. イネ光周性関連遺伝子の *OsGI-ox* 株での発現様式

これまでの結果は、シロイヌナズナとイネとの間の光周性反応の違いを決定する分子機構が双方の *GI* の下流にあることを示唆している。*GI* と *OsGI* は互いに類似した発現様式を示し、また *GI* は長日条件下において花成の促進に働く一方、*OsGI* は同様の日長条件下において花成の抑制に機能すると考えられるからである。シロイヌナズナの光周性経路において、*GI* は *CO* の発現を正に制御し (Suarez-Lopez et al., 2001)、さらに *CO* は *FT* の発現を誘導する (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Suarez-Lopez et al., 2001)。一方イネにおいては、*CO* および *FT* の相同遺伝子としてそれぞれ *Hd1* および *Hd3a* が知られており、これらはイネの光周性反応の制御に参与する。(Yano et al., 2000; Yano et al., 2001)。そこで、*GI* を介したシロイヌナズナでの遺伝的経路がイネにおいてどの程度保存されているかを調べるために、*Hd1* および *Hd3a* の *OsGI-ox* 株での発現様式を調べた。

Fig. 13A は *OsGI*、*Se1* および *Hd3a* の形質転換体後代すなわち分離集団での発現レベルを RT-PCR を用いて調べた結果を示している。この結果をもとに *Se1* と *OsGI* の発現レベルの間に相関関係が認められるかを調べると、*OsGI* の機能する長日条件下では、*OsGI* を高発現する個体において *Se1* の発現レベルが上昇する傾向が認められ、*Se1* と *OsGI* の発現レベルの間には正の相関関係が見られた (Fig. 13B)。ところで、*Se1* の発現には日周性の変動が認められる (Fig. 14A, E, F)。そこで、*OsGI-ox* 株の一系統 (Line 18) を用いて *Se1* の *OsGI-ox* 株での発現レベルを一日を通して調べたところ、*Se1* mRNA レベルの *OsGI-ox* 株での上昇は、野生型株での発現の低い時間帯において主に観察された (Fig. 14A, E)。以上の結果は、*OsGI* が *Se1* の発現を正に制御することを示しており、同時に、*Se1* の *OsGI* による発現調節が *CO* の *GI* による発現調節と同一の関係をとることを示している。

ところで、*OsGI-ox* 株での *Se1* mRNA レベルの上昇は短日条件下においても認められた (Fig. 13C, 14D, F)。すなわち、*OsGI* の過剰発現は短日条件下での *Se1* の発現に長日条件下と同等の影響を及ぼしたと考えられた。

一方、*Hd3a* と *OsGI* の発現レベルの間の相関関係を調べたところ、長日条件下では、*Hd3a* の発現レベルは *OsGI* を高発現する個体において減少しており、*Hd3a* と *OsGI* の発現レベルの間には負の相関関係が認められた (Fig. 13D)。また、*Hd3a* の発

現にも日周変動が認められることから (Fig. 14B, G, H)、*Hd3a* の *OsGI-ox* 株での発現レベルを一日を通して調べた。その結果、*Hd3a* の *OsGI-ox* 株での発現レベルは野生型株と比べ減少していた (Fig. 14B, G)。以上の結果は、*OsGI* が *Hd3a* の発現レベルの抑制に機能することを示しており、それと同時に、*Hd3a* の *OsGI* による発現調節は *FT* の *GI* による発現調節とは逆の関係をとることを示している。

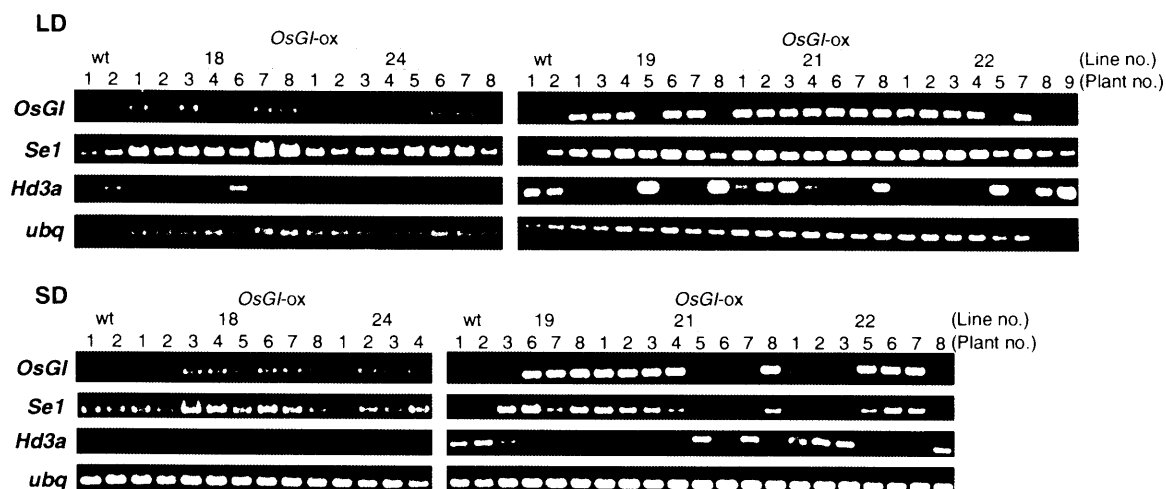
また、*OsGI-ox* 株での *Hd3a* mRNAレベルの低下は短日条件下においても観察され (Fig. 13B, 14B, H)、*OsGI* の過剰発現が短日条件下での *Hd3a* の発現に長日条件下と同等の影響を及ぼしたと考えられた。

栄養成長から生殖成長へと移行するタイミングを知ることは花成反応の研究にとって重要であるが、茎長分裂組織の位相転換が播種後どのタイミングで起こるかは今のところ明らかではない。しかしながら、花成促進条件である短日条件下では、播種してから 45 日から 50 日間ほど育てた野生型株の茎長において花芽の原基がしばしば観察される (早間, data not shown)。一方、花芽原基は播種後 30 日目ほどの比較的若い野生型株には全く見られないことから (早間, data not shown)、茎長分裂組織の生殖成長期への転換期は、短日条件下では 30 日目から 50 日目の間に起こると考えられる。*Se1* および *Hd3a* レベルの日周パターンの解析に用いた RNA は 30 日目の比較的若い植物体であり、この生育段階における *OsGI-ox* 株での *Se1* および *Hd3a* の発現変化は、*OsGI-ox* 株での花成変化の直接的な原因ではない可能性がある。そこで、播種後 47 日目の植物体を用いて同様の発現解析を行った。

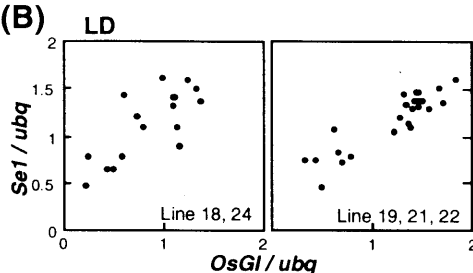
その結果、*OsGI*、*Se1*、および *Hd3a* の *OsGI-ox* 株での発現変化は播種後 30 日目の植物体と比べ異なっていた。まず、*OsGI* の *OsGI-ox* 株での発現は野生型株での発現極大よりも下のレベルで推移していた (Fig. 15A, C, D)。同様の結果は花成が遅延する別の系統 (Line 21) においても認められ、またこの系統での *OsGI* の発現低下は Line 18 と比べ顕著であった (Fig. 16A, B, C)。次いで *Se1* の発現レベルを解析すると、*OsGI* の発現と同様の特徴が *Se1* の発現様式においても認められた (Fig. 15A, E, F, Fig. 16A, D, E)。このことは、*OsGI* が *Se1* の発現を正に制御するという考えと一致する。すなわち、*Se1* の *OsGI-ox* 株での特定の時間帯における発現低下は、*OsGI* の *OsGI-ox* 株での特定の時間帯における発現低下に起因すると考えると、この結果を説明することができる。一方、*Hd3a* の *OsGI-ox* 株での発現レベルは、播種後 30 日目の過剰発現株での発現低下の度合いと比べさらに減少の度合いを増しており、同時に *Hd3a* の発現レベルの日長変化は完全に失われていた (Fig. 15B, G, H)。このことは、*OsGI-ox* 株の花成の表現型とよく一致する。

また、*OsGI* の *OsGI-ox* 株での発現が野生型株での発現極大よりも下のレベルで推移していたにも関わらず、*Hd3a* の発現レベルに顕著な減少が見られたことは、

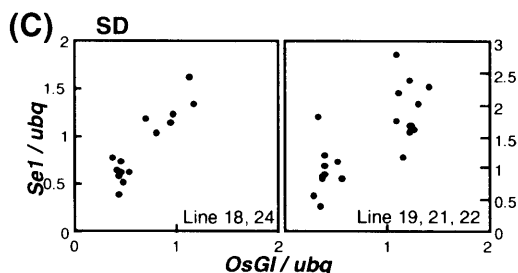
(A)



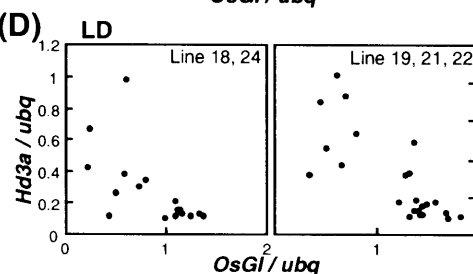
(B)



(C)



(D)



(E)

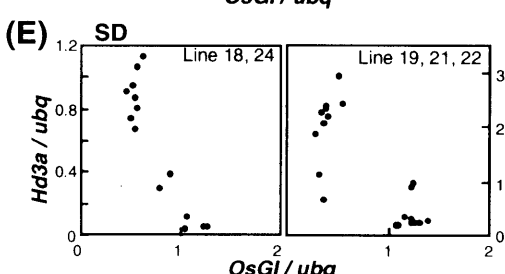


Fig. 13. *Se1* および *Hd3a* の *OsGI*-ox 株における発現様式

52日間育成した *OsGI*-ox 株 5 系統 (T1 世代) の葉身由来 RNA を RT-PCR に用いた。葉身は長日、短日条件とも明期開始から 3 時間後にサンプリングし、ここから抽出した RNA を解析に用いた。(A) ゲル電気泳動の結果。(B) および (C) *Se1* の発現レベルと *OsGI* の発現レベルとの相関関係。(D) および (E) *Hd3a* の発現レベルと *OsGI* の発現レベルとの相関関係。

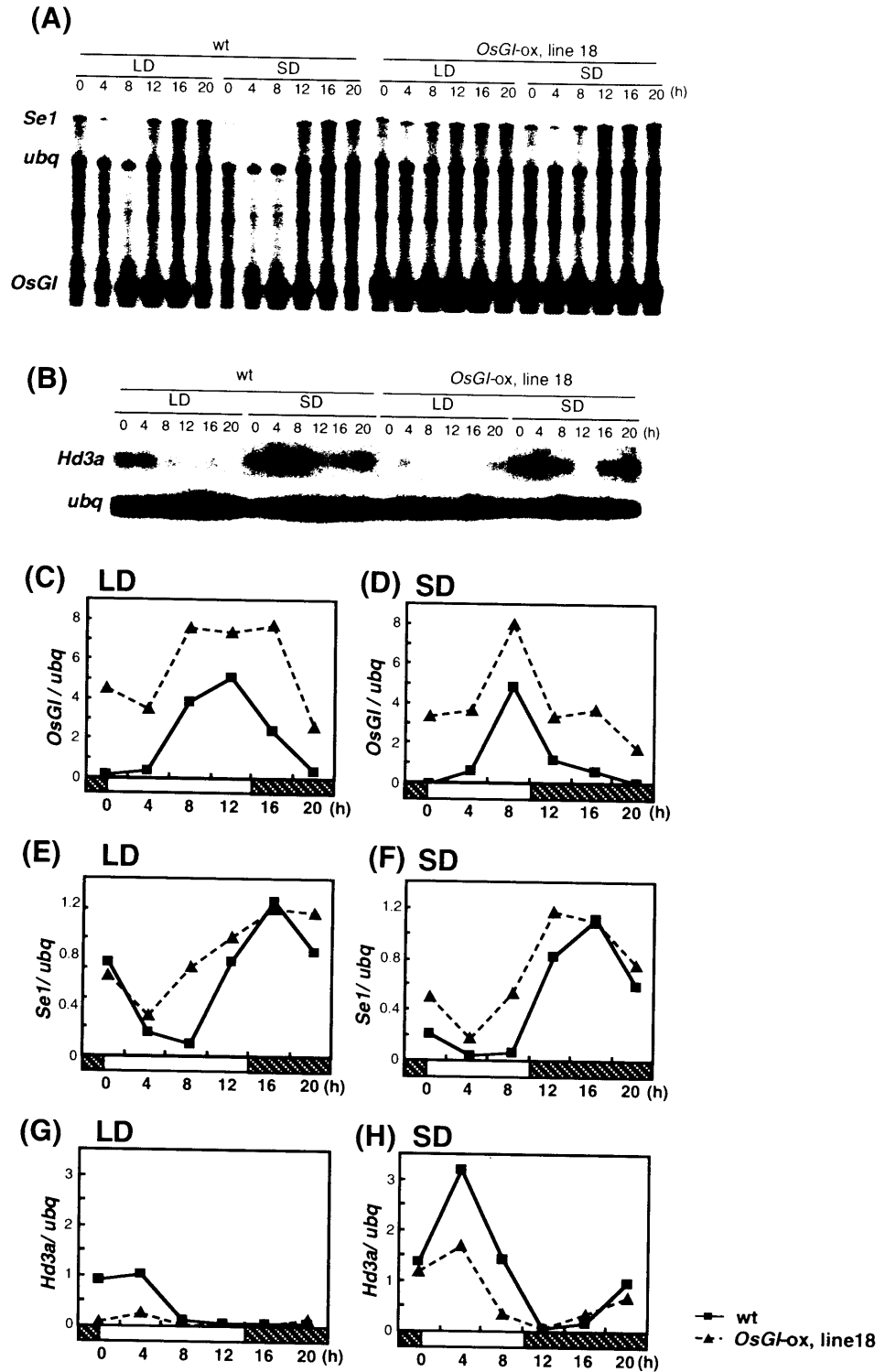


Fig. 14. *Se1* および *Hd3a* の発現の *OsGI-ox* 株における日周変動のパターン (30日目の植物体)

OsGI-ox 株 (Line 18) の葉身由来 RNA を発現解析に用いた。(A) RNase protection 法による *OsGI* および *Se1* シグナルの検出。(B) RT-PCR による *Hd3a* シグナルの検出。(C) および (D) *OsGI* の発現様式。(E) および (F) *Se1* の発現様式。(G) および (H) *Hd3a* の発現様式。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。

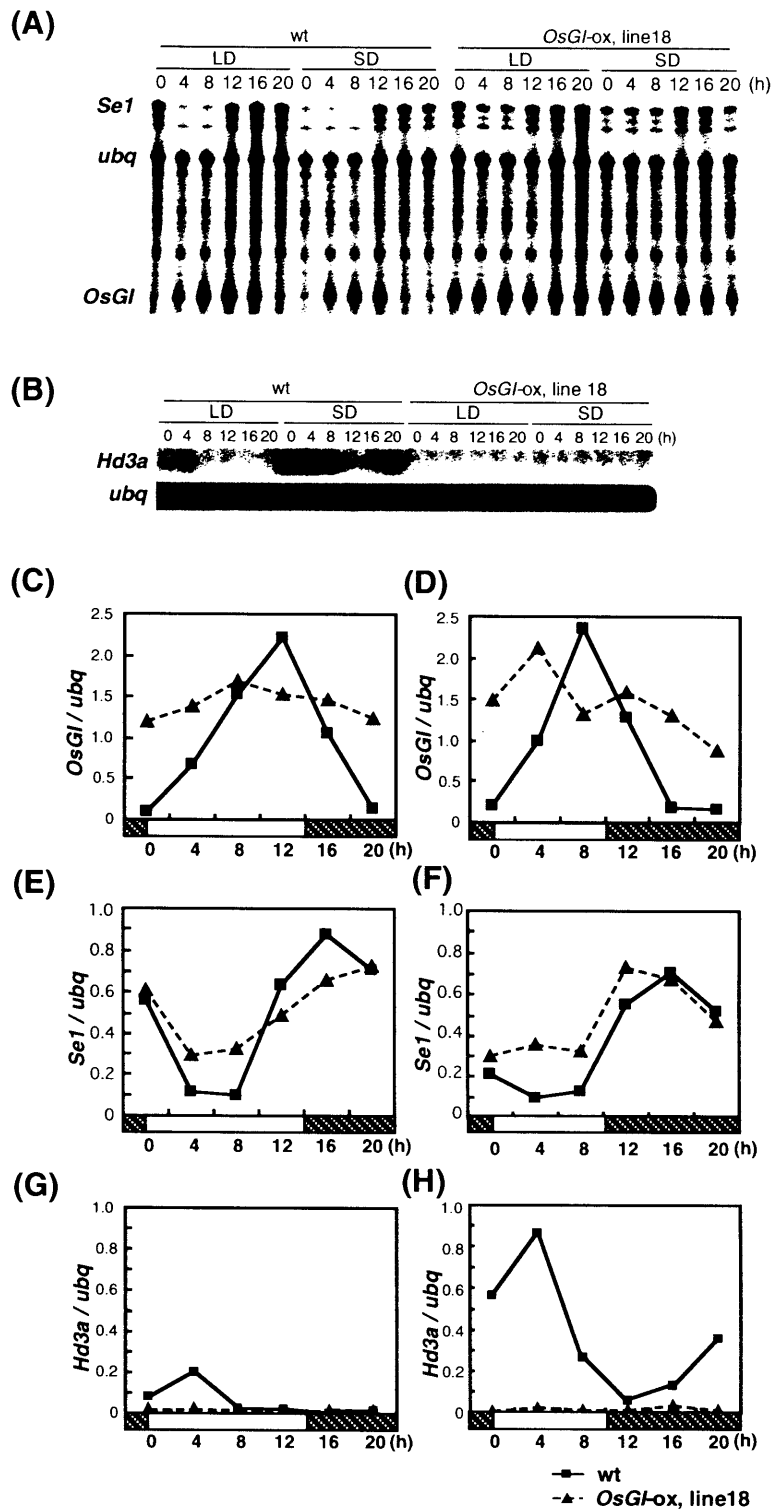


Fig. 15. *Se1* および *Hd3a* の発現の *OsGI-ox* 株における日周変動のパターン (47 日目の植物体)

OsGI-ox 株 (Line 18) の葉身由来 RNA を発現解析に用いた。(A) RNase protection 法による *OsGI* および *Se1* シグナルの検出。使用した *OsGI* プロンプの比活性は Fig. 12 と比べ低いことを付記しておく。(B) RT-PCR による *Hd3a* シグナルの検出。(C) および (D) *OsGI* の発現様式。(E) および (F) *Se1* の発現様式。(G) および (H) *Hd3a* の発現様式。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。

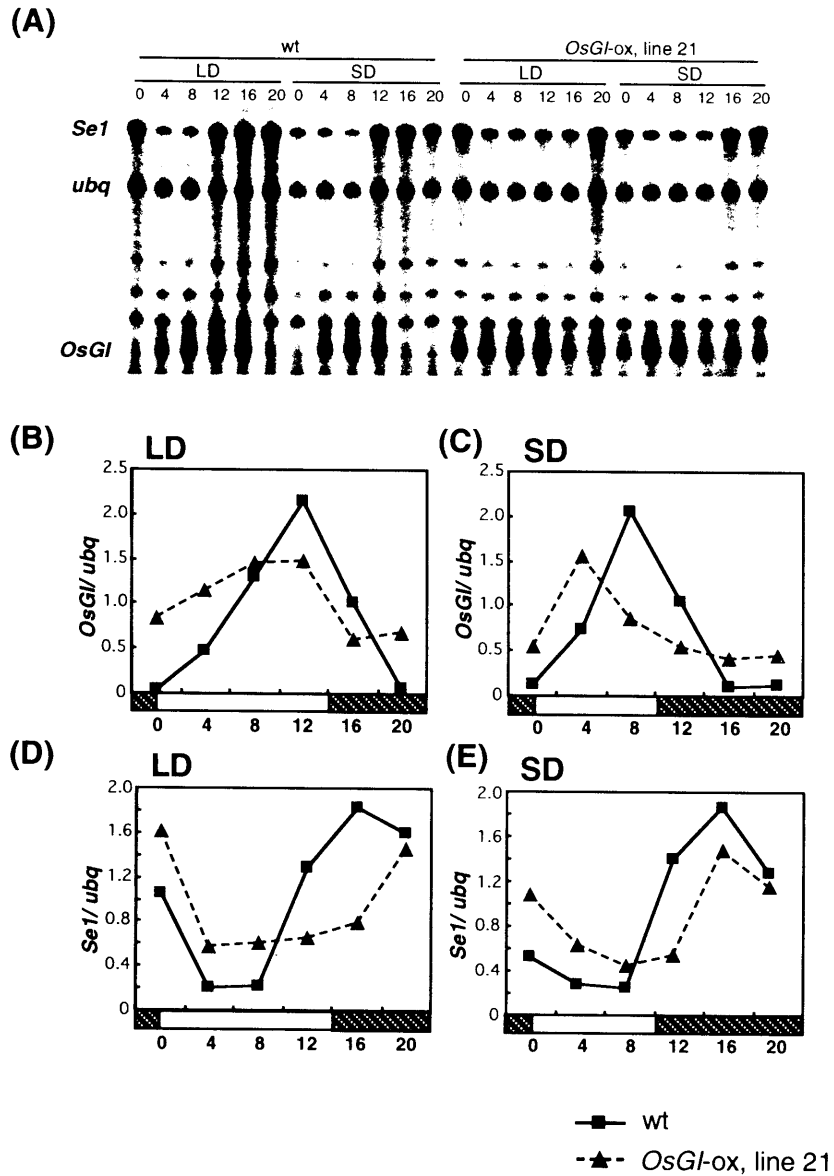


Fig. 16. *Se1* および *Hd3a* の発現の *OsGI*-ox 株における日周変動のパターン (47日目の植物体)

OsGI-ox 株 (Line 21) の葉身由来 RNA を RT-PCR に用いた。(A) RNase protection 法による *OsGI* および *Se1* シグナルの検出。使用した *OsGI* プロブの比活性は Fig. 12 と比べ低いことを付記しておく。(B) および (C) *OsGI* の発現様式。(D) および (E) *Se1* の発現様式。横軸は時刻を、縦軸は同定遺伝子のシグナル強度を *ubq* シグナルを用いて標準化した値を示す。

Hd3a の発現低下が *OsGI* による発現制御だけでは説明できないことを示している。

考察

1. *OsGI* の同定

GI および *OsGI* はそれぞれ 1173 a.a. および 1160 a.a. の比較的大きなタンパクをコードし、これらはアミノ酸領域全体において高い相同性が認められることから、*OsGI* タンパク質と *GI* タンパク質間の構造維持がこれらの生化学的機能に重要であると考えられる。また *GI* には塩基性アミノ酸に富んだ核移行シグナル様配列が見いだされ、さらに *GI*-GFP 融合タンパクは核に局在することが示されている (Huq et al., 2000)。核移行シグナル様の配列は *OsGI* においても見いだされることから、*OsGI* も核タンパクとして機能することが予測される。また、*OsGI* のアミノ酸配列には *GI* と同様膜貫通領域が見いだされるが (Park et al., 1999)、このことが何を意味しているかは現在のところ *GI* も含め不明である。*GI*-GFP 融合タンパク質に由来するシグナルはもっぱら核の内部に見られ、核膜において強いシグナルが見られるわけではないことが知られている (Huq et al., 2000)。

OsGI タンパク質の生化学的役割を予測できる特徴配列は、現在のところ核移行シグナルと膜貫通領域のほかに見いだすことはできない。一方 *GI* においては、*gi* アリルの変異箇所から、その機能発現に C- 末端 200 アミノ酸領域の重要性が予測されている (Park et al., 1999)。Putterill のグループは最近 *GI* の C- 末領域を bait に yeast two-hybrid 法を行い、この領域に結合するタンパクを複数同定している (Putterill et al., 2000)。また、Coupland のグループは最近 *GI* の C- 末部位に変異を入れた変異型 *gi* をシロイヌナズナに導入することで、この変異型 *GI* がシロイヌナズナにおいて dominant-negative に機能することを明らかにしている (Coupland, pers. commun.)。これらのことは、*GI* タンパク質の機能において C- 末部位が重要性であることを強く示唆する。この領域は *OsGI* にも保存されていることから、*OsGI* の C- 末領域がタンパク質としての機能に重要であることが示唆される。

2. *OsGI* の発現様式

OsGI の発現に概日リズム見られることは、*OsGI* の発現が概日時計により制御されていることを示している。概日時計の自律振動体成分をコードする遺伝子はこれまでに昆虫、齧歯類、藻類および菌類から同定され、これら生物種における概日時計の分子的基盤が明らかにされつつある (Dunlap, 1999)。しかしながら高等植物では、概日リズムの制御に関連する遺伝子が多数同定されているものの、概日時計の

実体である自律振動体の構成成分はシロイヌナズナも含め明らかにされておらず、今後の解析が待たれる。ただし、*CCA1* (および *LHY*) と *TOC1* は互いの発現調節において負のフィードバックループを形成していることが近年示唆され、これらの遺伝子は自律振動体の構成成分をコードする可能性が示唆されている (Alabadi et al., 2001)。

OsGI の発現リズムは *GI* と類似したパターンを示すことから、双方の *GI* の発現制御機構はイネとシロイヌナズナとの間で保存されていることが示唆される。シロイヌナズナでは、*lhy* 変異あるいは *CCA1* の過剰発現が *GI* の発現を変化させることから、これらの遺伝子は *GI* の発現を間接的あるいは直接的に制御すると考えられている (Fowler et al., 1999)。ところで、*GI* の発現は明期終了時刻に極大を迎える形の概日リズムを示す。この形の概日リズムを示す遺伝子は、近年のマイクロアレイを用いた解析からシロイヌナズナにおいて 60 以上同定されており、またこれら遺伝子のプロモーター上には "aaaatatct" という共通配列がしばしば見いだされる (Harmer et al., 2000)。この共通配列に導入した変異はレポーター遺伝子のリズム振幅を大幅に減少させることから、この共通配列は明期終了時に極大をとるパターンの日周発現に重要であることが示唆されている (Harmer et al., 2000; Alabadi et al., 2001)。さらに、この共通配列には *CCA1* および *LHY* が結合することが最近示されている (Alabadi et al., 2001)。興味深いことに、この共通配列は *GI* プロモーター上においても見いだされる。このことから、*GI* の発現は、*LHY* および *CCA1* により直接制御されている可能性が考えられている (Alabadi et al., 2001)。*OsGI* のプロモーター上にこの共通配列が存在するか否かは興味深い点であるが、現在のところ *OsGI* のコーディング領域の上流において転写開始点を見いだすに至っていないため、*OsGI* のプロモーター上における共通配列の有無は明かではない。しかしながら、*OsGI* の発現様式が *GI* と酷似していたことは、*OsGI* の発現調節においても、*LHY* のイネ相同遺伝子による直接的な機構の関与が連想される。このことに関連して、Oikawa らは *LHY* とアミノ酸レベルで類似したイネ遺伝子 (*OsLHY*) の発現解析を行い、*OsLHY* の発現が *LHY* と類似した形の日周変動を示すことを報告している (及川, 1999)。

OsGI の発現には、発現の極大を示す時間が長日条件下で後にずれるという日長応答性が認められる。この日長応答性は時計制御下の遺伝子における発現様式によく見られる特徴であるが、この日長応答性が花成の光周性反応にとって重要な意味を持つかどうかは明らかではない。

3. イネの光周性を制御する遺伝的経路

シロイヌナズナの光周性経路において、*GI*、*CO*、*FT* は共に長日条件下での花

成の促進に機能し、これらの発現は *GI*、*CO*、*FT* の順に活性化される (Fowler et al., 1999; Putterill et al., 1995; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Suarez-Lopez et al., 2001)。本研究において、*OsGI* の過剰発現株は花成遅延を引き起こすと同時に光周性反応を減少させたことから、*OsGI* は長日条件下での花成の遅延に機能すると考えられる。従って、*OsGI* の花成に対する役割は *Se1* の花成に対する役割と一致する。一方、*Hd3a* は短日条件下での花成の促進に機能することから、*Hd3a* の花成に対する役割は *OsGI* あるいは *Se1* とは逆である。すなわち、*OsGI* および *Se1* は、*GI* および *CO* と同様、主に長日条件下において機能する遺伝子である一方、*Hd3a* は短日条件下において機能する遺伝子であり、*FT* とは逆の日長条件下で活性化されると考えられる。

発現解析の結果、*OsGI* の過剰発現株において *Se1* の発現が上昇していたことは、*OsGI* が *Se1* の発現を正に制御することを示している (Fig. 17)。この特徴は *CO* の *GI* による発現制御と一致し、*GI* から *CO* に至る光周性経路がイネにも保存されていることが示唆される (Fig. 17)。また、*OsGI* の発現様式が *GI* と、*Se1* の発現様式が *CO* とそれぞれ類似していることも、この経路がシロイヌナズナとイネの間で保存されていることを支持する (Fig. 14, 15, 16; Fowler et al., 1999; Park et al., 1999; Suarez-Lopez et al., 2001)。一方、*Hd3a* の発現レベルは *OsGI-ox* 株において減少しており、*Hd3a* の *OsGI* による発現制御は、*FT* の *GI* による発現制御とは逆の関係を示す。このことは、*OsGI* と *Hd3a* が同一の光周性経路上に位置しながら、*Hd3a* の発現調節機構はシロイヌナズナとは全く逆であることを示している。このことに関連して、*Hd3a* の発現の日周パターンは *FT* とちょうど逆位相の関係をとる。すなわち、*FT* の発現が極小を迎える時間において、*Hd3a* の発現は極大となる (Fig. 14, 15; Suarez-Lopez et al., 2001)。

以上のことは、イネとシロイヌナズナの間に存在する日長感受性の違いを決定する分子的基盤が、*FT* (*Hd3a*) の *CO* (*Se1*) による発現制御機構にある可能性を示唆する (Fig. 17)。すなわち、シロイヌナズナでは、*CO* が長日条件下において *FT* の発現を誘導するのに対して、イネでは *Se1* が長日条件下において *Hd3a* の発現を抑制することで、これらの植物種の間の日長感受性の違いが発生すると考えられる。このことに関して、Izawa は最近 *Hd3a* の発現レベルが長日条件下で育成した *se1* 変異株において上昇することを明らかにした (Izawa, pers. commun.)。このことは、上記の仮説を強く支持するものである。

以上のことから、シロイヌナズナとイネの光周性反応の違いは、それを制御する遺伝的経路が構成遺伝子レベルで全く異なるというよりはむしろ、イネとシロイヌナズナとの間で保存された遺伝的経路のうち一部の遺伝子発現制御が逆転してい

るという比較的単純な違いで決定されることが示唆される。この発現制御の逆転を引き起こす原因を解明することが今後の大きな研究課題の一つといえよう。これにより生物の多様性を生み出す分子的变化の一例の解明が期待されるからである。

シロイヌナズナあるいはイネにおいて同定された花成経路は植物界においてどの程度保存されているのであろうか。*GI*、*CO* および *FT* の類似遺伝子はこれまでに複数の植物種において確認されている。*GI* の類似遺伝子はオオムギにも存在することがデータベース上において確認される。*CO* の類似遺伝子はアブラナ、クロガラシや、アサガオにおいてクローニングされている (Lagercrantz et al., 1996; Robert et al., 1998; Lagercrantz et al., 2000; Liu et al., 2001)。興味深いことに、アサガオの *CO* 類似遺伝子 *PnCO* の発現は *CO* と類似した形の日周変動を示し、さらに *PnCO* のシロイヌナズナでの過剰発現は *co* 変異株の花成遅延の表現型を回復させることが明らかになっている (Liu et al., 2001)。また、*FT* の類似遺伝子はオレンジにおいて確認されている (Kobayashi et al., 1999)。

4. *Se1* および *Hd3a* の *OsGI* による発現制御

Se1 の *OsGI* による発現制御機構の解明は今後の研究課題の一つとして考えられる。例えば、*Se1* mRNA の日周変動の制御に *OsGI* mRNA の日周変動が必要か否かという点は現在明かではない。このことについては、*OsGI* の恒常的発現が *Se1* の発現リズムを欠失させるかを今後検証する必要がある。Putterill のグループは最近、*GI* を *gi* 変異株において恒常的に発現させた場合、*CO* mRNA の振幅性には大きな変化が認められないと報告しており、*CO* mRNA の日周変動の制御に *GI* mRNA の日周変動が必ずしも必要でないことを示唆している (Putterill, pers. commun.)。本研究では *Se1* の *OsGI-ox* 株での日周変動を観察し、この振幅性はある程度残存していることが示されたが、このとき *OsGI* にもある程度の振幅性が残存していた (Fig. 14)。*OsGI* の野生型株での発現レベルが *OsGI* の *OsGI-ox* 株での恒常的発現を阻害しており、このことが上述の疑問に答えることを困難にしている。ところで、*OsGI* の *OsGI-ox* 株での発現は野生型株と比べ一日の間の全ての時間帯で上昇していたにもかかわらず、*Se1* の *OsGI-ox* 株における発現の上昇は、元来発現の低い明期の間にのみ認められ、発現極大レベルに野生型株との大きな差異は認められない。このことは、*Se1* の *OsGI* による発現誘導をある程度制限する機構が存在することを示唆している。また、上述の点とは別に、*OsGI* による *Se1* の発現誘導には更なる転写翻訳系のステップが介在しているのか、あるいは新規な転写翻訳系を介さない直接的な制御機構が関与するのかという点も、今後明らかにすべき課題であろうと考えられる。

47 日目の *OsGI-ox* 株では、*OsGI* の発現レベルが野生型株と比べ時間帯によって

は低下するにも関わらず、*Hd3a* の発現レベルは顕著に減少する傾向が観察される (Fig. 15, 16)。この結果は、*Hd3a* の *OsGI* による発現抑制に特定時間に発現している *OsGI* が重要であることを示唆する。また、*Hd3a* の発現を抑制する機能を持つことが最近明らかになった *Se1* の発現も、*OsGI* と連動する形で時間帯によっては野生型株と比べ低レベルを示す (Fig. 15, 16)。興味深いことに、*Se1* の *OsGI-ox* 株での発現の上昇は明期の間に限られていることから、*Hd3a* の *Se1* による発現抑制に、明期において発現する *Se1* が重要であることが示唆される。このことは、光と概日時計による一つの日長識別機構モデルを連想させる。すなわち、概日時計の出力系 (この場合 *Se1*) が光により活性化され、この活性レベルは日長変化 (光のある時間の長さの変化) により大きく変化するというモデルである (Fig. 18)。これと同様のモデルは光周性反応における生理学的研究あるいはシロイヌナズナを用いた分子生物学的研究においても提示されている (Harmer et al., 2000; Suarez-Lopez et al., 2001)。また、*Se1* はその変異株の花成の表現型から主に長日条件下で機能すると考えられるが、*Se1* mRNA の発現には日周変動が見られるのみで日長依存的な量的変化は見られない。Fig. 18 に示したモデルは、*Se1* の長日条件下での機能発現モデルを示しているともいえよう。すなわち、*Se1* タンパク質の光による活性化が長日条件下での機能発現に重要であるのかもしれない。

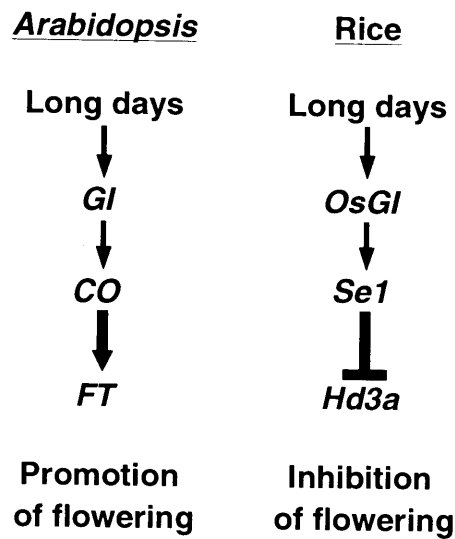


Fig. 17. イネとシロイヌナズナの花成経路のモデル

花成の光周性反応を制御する双方の遺伝的経路において、*CO* (*Se1*) の *Gl* (*OsGl*) による発現制御機構は保存されていることが示唆される。*Gl* と *CO*、および *OsGl* と *Se1* はともに長日条件下において活性化され、前者の二つは花成の促進に機能する一方、後者の二つは花成の抑制に機能する。このとき、前者は長日条件下で *FT* の発現を誘導するのに対し、後者は *Hd3a* の発現を抑制する。イネとシロイヌナズナの日長感受性の違いを決定する分子的基盤は *CO* (*Se1*) による *FT* (*Hd3a*) の発現制御機構にあることが示唆される。

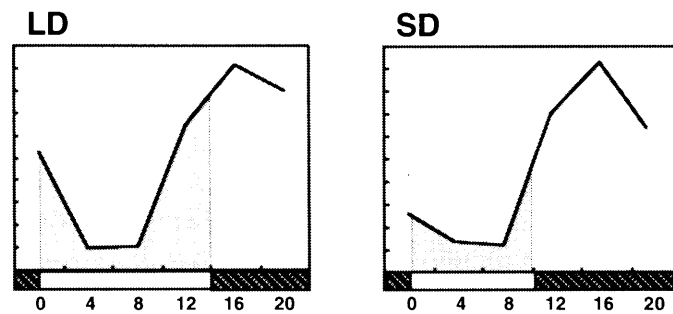


Fig. 18. 光と概日時計による日長識別機構のモデル

概日時計の出力系は明暗周期において日周性の発現様式を示す (黒線)。光シグナルはこれと相互作用し、活性化する (灰色の部分)。日長変化、すなわち光の当たる時間帯の長さの変化は、この活性化量を変化させる。また、概日時計の出力系の日周変動は、わずかな日長変化から活性化量の大きな変化を発生させる。

謝辞

まず、本研究を遂行するに当たり、数々の御指導、御鞭撻を賜りました指導教官の島本 功教授に謹んで感謝申し上げます。また、研究に対する数々の御助言、励ましの御言葉を賜りました経塚淳子助教授、一色正之博士、並びに講座の方々に深く感謝申し上げます。また、FDD 法を行うに当たり、適切な御指導を賜りました日立製作所基礎研究所の古谷雅樹博士をはじめ、内田憲孝博士、久野範人博士、並びに村松高道博士に深く感謝申し上げます。また、*Se1* および *Hd3a* の塩基配列情報を快く提供していただいた農業生物資源研究所の矢野昌裕博士に深く感謝申し上げます。また、形質転換体を作製していただいた当研究室の延原美香さんに深く感謝申し上げます。最後に、本研究を進めるに当たり、直接御指導を賜りました井澤毅博士に心から感謝申し上げます。

引用文献

- Ahmad M., and Cashmore A.R. (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J.* 10, 1103-1110.
- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., and Tasaka M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9, 841-857.
- Aida M., Ishida T., and Tasaka M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 8, 1563-1570.
- Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Mas P., and Kay S.A. (2001). Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293, 880-883.
- Ary M.B., Richardson M., and Shewry P.R. (1989). Purification and characterization of an insect alpha-amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi*). *Biochem. Biophys. Acta.* 999, 260-266.
- Aukerman M.J., Hirschfeld M., Wester L., Weaver M., Clack T., Amasino R.M., and Sharrock R.A. (1997). A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* 9, 1317-1326.
- Bagnall D.J., King R.W., Whitelam G.C., Boylan M.T., Wagner D., and Quail P.H. (1995). Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 108, 1495-1503.
- Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., and Lejeune P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5, 1147-1155.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., and Jensen R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Borden K.L. (1998). RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol.* 76, 351-358.
- Cao T., Borden K.L., Freemont P.S., and Etkin L.D. (1997). Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. *J. Cell. Sci.* 110, 1563-1571.
- Casper T., Huber S.C., and Somerville C. (1985). Alteration in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* 79, 11-17.
- Casper T., Lin T.-P., Kakefuda G., Benbow L., Preiss J., and Somerville C. (1991). Mutation

- of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol.* 95, 1181-1188.
- Chandraratna M.F. (1955). Genetics of photoperiod sensitivity in rice. *J. Genet.* 53, 215-223.
- Childs K.L., Miller F.R., Cordonnier-Pratt M.M., Pratt L.H., Morgan P.W., and Mullet J.E. (1997). The sorghum photoperiod sensitivity gene, *Ma3*, encodes a phytochrome B. *Plant Physiol.* 113, 611-619.
- Chory J., Peto C.A., Ashbaugh M., Saganich R., Pratt L., and Ausubel F. (1989). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* 1, 867-880.
- Covington M.F., Panda S., Liu X.L., Strayer C.A., Wagner D.R., and Kay S.A. (2001). ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1305-1315.
- Deng X.W., Matsui M., Wei N., Wagner D., Chu A.M., Feldmann K.A., and Quail P.H. (1992). *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* 71, 791-801.
- Devlin P.F., Patel S.R., and Whitelam G.C. (1998). Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1479-1487.
- Devlin P.F., Robson P.R., Patel S.R., Goosey L., Sharrock R.A., and Whitelam G.C. (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* 119, 909-915.
- Devlin P.F., and Kay S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499-2510.
- Dunlap J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Epple P., Apel K., and Bohlmann H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.
- Florack D.E., and Stiekema W.J. (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol. Biol.* 26, 25-37.
- Follett, B.K., King, V.M. and Meddle, S.L. (1998). Biological rhythms and photoperiodism in plants, Lumsden P.J., and Millar A.J. eds. (Oxford: BIOS scientific), pp 231-242.
- Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G., and Putterill J. (1999). *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18, 4679-4688.
- Garner W.W., and Allard H.A. (1920). Effect of relative length of day and night and other factors of the environments on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18, 553-606.

- Goto N., Kumagai T., and Koornneef M. (1991). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol. Plant.* 83, 209-215.
- Green R.M., and Tobin E.M. (1999). Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4176-4179.
- Guo H., Yang H., Mockler T.C., and Lin C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.
- Haake V., Zrenner R., Sonnewald U., and Stitt M. (1998). A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14, 147-157.
- Hamner K.C. (1940). Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. *Bot. Gaz.* 101, 658-687.
- Han I., and Kudlow J.E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2550-2558.
- Hanumappa M., Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.M., and Deitzer G.F. (1999). A photoperiod-insensitive barley line contains a light-labile phytochrome B. *Plant Physiol.* 119, 1033-1040.
- Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., and Kay S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110-2113.
- Hart G.W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 315-335.
- Hicks K.A., Millar A.J., Carre I.A., Somers D.E., Straume M., Meeks-Wagner D.R., and Kay S.A. (1996). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* *early-flowering 3* mutant. *Science* 274, 790-792.
- Hicks K.A., Albertson T.M., and Wagner D.R. (2001). *EARLY FLOWERING3* encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1281-1292.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282.
- Holm M., Hardtke C.S., Gaudet R., and Deng X.W. (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J.* 20, 118-127.
- Huq E., Tepperman J.M., and Quail P.H. (2000). GIGANTEA is a nuclear protein involved in

- phytochrome signaling in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9789-9794.
- Ikeda K. (1985). Photoperiodic flower induction in rice plants as influenced by light intensity and quality. JARQ 18, 164-170.
- Izawa T., Oikawa T., Tokutomi S., Okuno K., and Shimamoto K. (2000). Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). Plant J. 22, 391-399.
- Jacobsen S.E., Binkowski K.A., and Olszewski N.E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9292-9296.
- John I., Hackett R., Cooper W., Drake R., Farrell A., and Grierson D. (1997). Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. Plant Mol. Biol. 33, 641-651.
- Johnson E., Bradley M., Harberd N.P., and Whitelam G.C. (1994). Photoresponses of light grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 105, 141-149.
- Kardailsky I., Shukla V.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J., Harrison M.J., and Weigel D. (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. Science 286, 1962-1965.
- Kobayashi Y., Kaya H., Goto K., Iwabuchi M., and Araki T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science 286, 1960-1962.
- Kuno N., Muramatsu T., Hamazato F., and Furuya M. (2000). Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of *Arabidopsis* using a fluorescent differential display technique. Plant Physiol. 122, 15-24.
- Kurup S., Jones H.D., and Holdsworth M.J. (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. Plant J. 21, 143-155.
- Lagercrantz U., Putterill J., Coupland G., and Lydiat D. (1996). Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. Plant J. 9, 13-20.
- Lagercrantz U., and Axelsson T. (2000). Rapid evolution of the family of *CONSTANS LIKE* genes in plants. Mol. Biol. Evol. 17, 1499-1507.
- Ledger S., Strayer C., Ashton F., Kay S.A., and Putterill J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS-LIKE* genes. Plant J. 26, 15-22.
- Lee H., Suh S.S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.G., Lee J.S., Kwon Y.M., and Lee I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. Genes Dev. 14, 2366-2376.
- Lin C. (2000). Photoreceptors and regulation of flowering time. Plant Physiol. 123, 39-50.

- Lippuner V., Cyert M.S., and Gasser C.S. (1996). Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 12859-12866.
- Liu J., Yu J., McIntosh L., Kende H., and Zeevaart J.A. (2001). Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol.* 125, 1821-1830.
- Liu X.L., Covington M.F., Fankhauser C., Chory J., and Wagner D.R. (2001). *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis *PHYB* signal transduction pathway. *Plant Cell* 13, 1293-1304.
- Mas P., Devlin P.F., Panda S., and Kay S.A. (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408, 207-211.
- McNellis T.W., von Arnim A.G., Araki T., Komeda Y., Misera S., and Deng X.W. (1994). Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* 6, 487-500.
- McWatters H.G., Bastow R.M., Hall A., and Millar A.J. (2000). The *ELF3 zeitnehmer* regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408, 716-720.
- Mendez E., Moreno A., Colilla F., Pelaez F., Limas G.G., Mendez R., Soriano F., Salinas M., and de Haro C. (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194, 533-539.
- Millar A.J., Carre I.A., Strayer C.A., Chua N.H., and Kay S.A. (1995). Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267, 1161-1163.
- Millar A.J., and Kay S.A. (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling *CAB* gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15491-15496.
- Nishi R., Hashimoto H., Kidou S., Uchimiya H., Kato A. (1993). Isolation and characterization of a rice cDNA which encodes a ubiquitin protein and a 52 amino acid extension protein. *Plant Mol. Biol.* 22, 159-161.
- Nelson D.C., Lasswell J., Rogg L.E., Cohen M.A., and Bartel B. (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101, 331-340.
- Mockler T.C., Guo H., Yang H., Duong H., and Lin C. (1999). Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126, 2073-2082.
- Onouchi H., Igeno M.I., Perilleux C., Graves K., and Coupland G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* 12, 885-900.

Osterlund M.T., Hardtke C.S., Wei N., and Deng X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405, 462-466.

Park D.H., Somers D.E., Kim Y.S., Choy Y.H., Lim H.K., Soh M.S., Kim H.J., Kay S.A., and Nam H.G. (1999). Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* *GIGANTEA* gene. *Science* 285, 1579-1582.

Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., and Coupland G. (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847-857.

Putterill J., Folwer S., Milich R., Moyle R., Pullen C., Snowden K., Richardson K., and Morris B. (2000). Knowing when the time is right: The *GIGANTEA* gene and photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis*. *FNL* 30, 17-24.

Reeves P.H., and Coupland G. (2000). Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 37-42.

Reimann C., and Dudler R. (1993). Circadian rhythmicity in the expression of a novel light-regulated rice gene. *Plant Mol. Biol.* 22, 165-170.

Ren T., Qu F., and Morris T.J. (2000). *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12, 1917-1926.

Robert L.S., Robson F., Sharpe A., Lydiate D., and Coupland G. (1998). Conserved structure and function of the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS* in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 37, 763-772.

Roos M.D., Su K., Baker J.R., and Kudlow J.E. (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6472-6480.

Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., and Lucas W.J. (1999). Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126, 4405-4419.

Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M.F., and Coupland G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616.

Sablowski R.W., and Meyerowitz E.M. (1998). A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92, 93-103.

Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carre I.A., and Coupland G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219-1229.

Schultz T.F., Kiyosue T., Yanovsky M., Wada M., and Kay S.A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2659-2670.

Simpson G.G., Gendall A.R., and Dean C. (1999). When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 99, 519-550.

Somers D.E., Webb A.A., Pearson M., and Kay S.A. (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125, 485-494.

Somers D.E., Devlin P.F., and Kay S.A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282, 1488-1490.

Somers D.E., Schultz T.F., Milnamow M., and Kay S.A. (2000). *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101, 319-329.

Souer E., van Houwelingen A., Kloos D., Mol J., and Koes R. (1996). The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85, 159-170.

Strayer C., Oyama T., Schultz T.F., Raman R., Somers D.E., Mas P., Panda S., Kreps J.A., and Kay S.A. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289, 768-771.

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

Sugano S., Andronis C., Green R.M., Wang Z.Y., and Tobin E.M. (1998). Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11020-11025.

Sugano S., Andronis C., Ong M.S., Green R.M., and Tobin E.M. (1999). The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12362-12366.

Takahashi Y., Shomura A., Sasaki T., and Yano M. (2001). *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the α subunit of protein kinase CK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7922-7927.

Takimoto A., and Hamner K.C. (1965). Effect of far-red light and its interaction with red light in the photoperiodic response of *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* 40, 859-864.

Thomas B., and Vince-Prue D. (1997). *Photoperiodism in Plants*. (London: Academic Press).

Tsutsumi K., Kagaya Y., Hidaka S., Suzuki J., Tokairin Y., Hirai T., Hu D.L., Ishikawa K., and Ejiri S. (1994). Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene* 141, 215-220.

- Wang Z.Y., and Tobin E.M. (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93, 1207-1217.
- Weller J.L., Murfet I.C., and Reid J.B. (1997). Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in day-length detection. *Plant Physiol.* 114, 1225-1236.
- Weller J.L., Beauchamp N., Kerckhoffs L.H., Platten J.D., and Reid J.B. (2001). Interaction of phytochromes A and B in the control of de-etiolation and flowering in pea. *Plant J.* 26, 283-294.
- Wells L., Vosseller K., and Hart G.W. (2001). Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291, 1276-1278.
- Xie Q., Sanz-Burgos A.P., Guo H., Garcia J.A., and Gutierrez C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol. Biol.* 39, 647-656.
- Xie Q., Frugis G., Colgan D., and Chua N.H. (2000). Arabidopsis *NAC1* transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14, 3024-3036.
- Yamamoto T., Kuboki Y., Lin S.Y., Sasaki T., and Yano M. (1998). Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor. Appl. Genet.* 97, 37-44.
- Yamamoto T., Lin H.X., Sasaki T., and Yano M. (2000). Identification of heading date quantitative trait locus *Hd6* and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced backcross progeny. *Genetics* 154, 885-891.
- Yano M., Harushima Y., Nagamura Y., Kurata N., Minobe Y., and Sasaki T. (1997). Identification of quantitative trait loci controlling heading data in rice using a high-density linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1025-1032.
- Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fuse T., Baba T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y., and Sasaki T. (2000). *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12, 2473-2484.
- Yano M., Kojima S., Takahashi Y., Lin H., and Sasaki T. (2001). Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol.* 127, 1425-1429.
- Yokoo M., and Okuno K. (1993). Genetic analysis of earliness mutations induced in the rice cultivar Norin 8. *Jpn J. Breed* 43, 1-11.
- Yoshida K.T., Wada T., Koyama H., Mizobuchi-Fukuoka R., and Naito S. (1999). Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of *Myo-inositol-1-phosphate synthase*

and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol.* 119, 65-72.

Zagotta M.T., Shannon S., Jacobs C., and Meeks-Wagner D.R. (1992). Early-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 411-418.

Zou J., Qi Q., Katavic V., Marillia E.F., and Taylor D.C. (1999). Effects of antisense repression of an *Arabidopsis thaliana* pyruvate dehydrogenase kinase cDNA on plant development. *Plant Mol. Biol.* 41, 837-849.

及川鉄男 (1999). 日長非感受性突然変異株se5の解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.

滝本敦 (1998). 花を咲かせるものは何か. 中公新書

川瀬 恒男, 村田 信夫 (1958). 遺伝子の形質発現と環境との関係に関する研究 1, 水稻E1およびE2遺伝子の日長に対する反応. 育雑 8, 95-99

川瀬 恒男, 村田 信夫, 山根 国男 (1959). 遺伝子の形質発現と環境との関係に関する研究 2, 水稻E3、E4およびE5遺伝子の日長に対する反応. 育雑 9, 227-236

杉山展子 (2000). イネの光周性反応における概日時計の役割. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.

中野弥生 (2001) イネの光周性変異体の解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.