

栽培イネにおける花成時期の多様性をもたらす
分子機構の解析

高橋 靖幸

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21年 1月26日提出

目次

I 序論

II 材料と方法

III 結果

- III-1 イネコアコレクションの花成時期の調査
- III-2 花成時期の多様性と花成関連遺伝子の発現量との関係
- III-3 *Hd3a* 翻訳領域における塩基多型の解析
- III-4 *Hd3a* 上流因子における塩基多型の解析
 - III-4-1 *Ehd1* 翻訳領域のシーケンス解析
 - III-4-2 *Hd1* 翻訳領域のシーケンス解析
- III-5 *Hd1* とは独立した花成時期多様化への影響
 - III-5-1 *Hd3a* プロモーター領域のシーケンス解析
 - III-5-2 *Ehd1* 発現量の影響
 - III-5-3 *Ehd1* プロモーター領域のシーケンス解析
 - III-5-4 *OsMADS51* 翻訳領域のシーケンス解析
- III-6 コアコレクション各品種の光中断の応答性
- III-7 花成時期および *Hd3a* 発現量の多様化における線形モデル解析

IV 考察

- IV-1 栽培イネにおける花成時期の多様性をもたらす分子機構
 - IV-1-1 栽培イネにおける花成時期の多様性
 - IV-1-2 *Hd1* アリルの多様性
 - IV-1-3 *Ehd1* 遺伝子発現量の多様性
 - IV-1-4 *Hd3a* プロモーター領域におけるシス配列の同定
 - IV-1-5 光中断応答からみられる感光性の違い
 - IV-1-6 線形モデル解析の考察
- IV-2 新規な花成誘導機構
- IV-3 シロイヌナズナとの比較

V 謝辞

VI 参考文献

I 序論

花成は植物にとって種の存続をかけた非常に重要な現象である。花成とは栄養生長期から生殖生長期への生長相の転換のことを指し、茎頂分裂組織 (shoot apical meristem; SAM) において花芽の形成が開始される。イネの発芽から出穂までの器官は発芽から幼穂分化までの栄養生長期と幼穂分化から出穂までの生殖生長期に分けられるが、生殖生長相の長さは品種によってほとんど変わらないため、出穂期の変化は主に栄養生長期の長さによって決定される (松尾ら, 1990)。本来熱帯性の植物であるイネの受粉は温度や湿度などの周囲の環境要因の影響を非常に受けやすいため、最適な時期に花成を行う事が繁殖の成否に直接関わる非常に重要な要因である。

イネをはじめとした植物は、自らを取り巻く周囲環境の変化を敏感に感じ取る事で季節の変化を察知している。このうち花成誘導に大きく影響する外的環境要因として温度や日長などが挙げられる。秋に発芽し春に開花するコムギやキャベツなど多くの植物においては、冬の低温を経験する事が花成誘導において必須である。この現象は春化 (Vernalization) と呼ばれる。一方、夏から秋にかけて開花するイネは花成誘導の際に日長の影響を大きく受ける。日長は一年を通して規則的に移り変わる光情報であり、植物は自身の持つ概日時計に制御された内在性リズムと外からの明暗シグナルとの相互作用によって日の長さの変化を感じ取っている (井澤, 2001)。植物の花成時期が日長の周期的な変化に対して決定されている事は、1920 年に Garner と Allard のよってタバコやダイズを用いた実験により報告された。そして、このような日長の変化に伴って生物が示す反応は光周性 (Photoperiodism) と名付けられた。この光周性反応の違いにより植物は長日植物、短日植物そして中性植物の 3 種類に大きく分類することができる。連続した日の長さがある一定以上であると花芽形成するのが長日植物であるのに対して、短日植物での花芽形成は連続した暗期があり一定以上であることが必要である。この明暗周期の限界時間は植物種によって異なる (滝本, 1998)。

イネは一般的に短日植物に分類される。イネの光周性花成誘導における分子機構はジャポニカ型品種の日本晴とインディカ型品種の Kasalath の雑種後代を利用した出穂期遺伝子座の QTL (Quantitative Trait Loci) 解析および変異体解析等を用いた研究によって一連の経路に関わる主要な遺伝子が同定された (Yano *et al.*, 2001)。短日条件下における花成誘導では *OsGI*、*Heading date 1 (Hd1)*、*Heading date 3a (Hd3a)* がそれぞれ光受容体からの光シグナル

と内在性の概日リズムの相互作用により制御されている (図 1)。一方で、長日植物であるアブラナ科の一年生草本植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においても *GIGANTIA (GI)*、*CONSTANS (CO)*、*FLOWERING LOCUS T (FT)* といったイネとオーソログの関係にある同様の遺伝子セットを用いて花成を誘導している (Fowler *et al.*, 1999; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Kardalisky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Hayama *et al.*, 2004)。

OsGI はフィトクロム発色団の生合成酵素の一つヘムオキシゲナーゼをコードした *SE5* 遺伝子の欠損変異体の解析から同定された遺伝子でありシロイヌナズナ *GI* とアミノ酸レベルで約 67%の相同性を示す (Hayama *et al.*, 2002)。*OsGI/GI* は概日時計的な発現周期を示し、下流の *Hd1/CO* の発現を正に制御する。*gi* 変異体は長日条件下で非常に遅咲きの表現型を示す (Suarez-Lopez *et al.*, 2001)。また *OsGI* の過剰発現個体および RNAi 発現抑制個体でも花成時期への影響が非常に大きいことから *OsGI/GI* の機能はイネとシロイヌナズナで高く保存されている事が考えられる (Hayama *et al.*, 2003)。*OsGI/GI* のコードするタンパク質は膜貫通領域を持ちその局在は核内であることが示されているが、生化学的機能は未知であり *CO* の発現制御における詳細な分子機構は未だ不明である。

Hd1 は前述した QTL 解析によって同定された遺伝子座からマップベースドクローニングによって単離された遺伝子であり、シロイヌナズナ *CO* とアミノ酸レベルで約 43%の相同性を示す (Yano *et al.*, 2000)。*Hd1/CO* は B-box type zinc finger ドメインと CCT (*CO*, *CO-like*, *TOC1*) ドメインを持つ転写因子様タンパク質をコードしている。*Hd1* は *GI* をはじめとした概日時計の制御を受けて短日、長日の両条件下において常に一定のリズムをもって発現している。また *Hd1* は *Hd3a* の発現を短日条件下では促進、長日条件下では抑制する因子であることが報告されていることから、フィトクロムを介した光シグナルにより転写後の制御を受けていると考えられている (Izawa *et al.*, 2002)。一方、*CO* は *GI* をはじめ F-box タンパク質 FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1)や CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)など複数の因子の拮抗作用によりその転写制御がされている事が明らかにされている (Imaizumi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006)。CCT ドメインは核局在シグナルを持っており *CO* タンパク質の核局在に重要な役割を果たしている (Robson *et al.*, 2001)。*CO* タンパク質の安定化はフィトクロムやクリプトクロームなどの光受容体による制御がなされており、最近では光受容体からのシグナルを受けた CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)が E3 ligase として機能し暗期でプロテアソーム依存的に *CO* タンパク質の分解

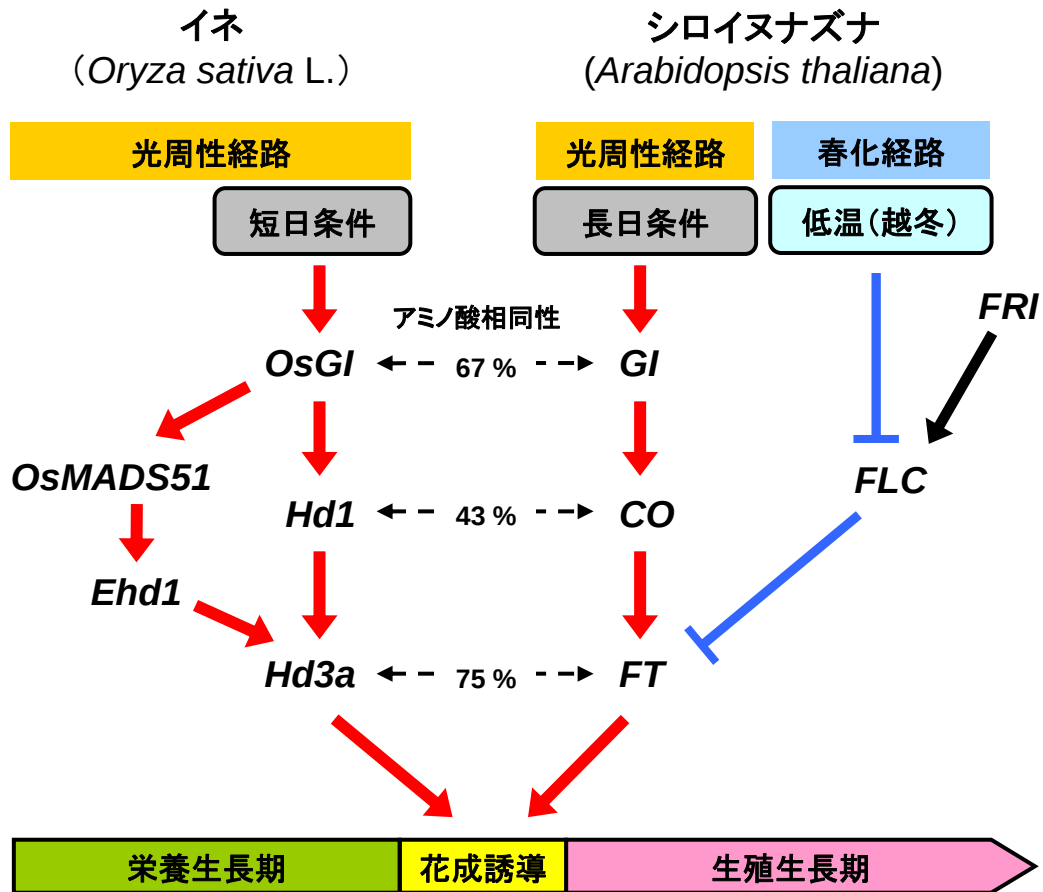


図1 イネとシロイヌナズナにおける花成誘導経路の分子機構の比較

光周性花成経路では、イネとシロイヌナズナは共通した遺伝子セットを用いて花成誘導が行われている。これに加えてイネ特異的な経路として*OsMADS51-Ehd1*を介した機構も存在する。また、シロイヌナズナでは*FLC*を中心とした、春化経路などが報告されている。

を行っている事が報告されている (Valverde *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2008)。また CO タンパク質は酵母における *HEME ACTIVATOR PROTEIN (HAP)* のオーソログと CCT ドメインを介して CO/AtHAP3/AtHAP5 の 3 量体を形成する事で下流の *FT* の発現を促進する事が示唆されている (Wenkel *et al.*, 2006)。*Hd1/CO* は相同なタンパク質をコードしているにも関わらず、下流の *Hd3a/FT* の発現制御機構における日長応答の違いを決定する原因である事が示されている (Hayama *et al.*, 2003)。これは、*Hd1/CO* におけるタンパク質レベルでの制御機構の違いにより、両者の日長応答の違いがもたらされていると考えられる。

日長応答に関しては、植物の感光性を評価するのに非常に有用な手法として光中断が知られている。光中断とは、連続した暗期を短時間の光照射で中断する事で短日植物の花成が遅延する現象である。光中断のシグナルは主に光受容体 *phyB* を介し、*Hd3a* の発現抑制を行う事で花成遅延を誘導していることが示された (Ishikawa *et al.*, 2005)。この反応は *OsGI* や *Hd1* 発現パターンに影響しないことから、*Hd1* 転写後の制御が行われているであろうと考えられる (図 2)。

Hd3a は *Hd1* と同様に QTL 解析からマップベースクローニングによって同定された遺伝子であり、シロイヌナズナ *FT* とアミノ酸レベルで 75% と非常に高い相同性を示す (Kojima *et al.*, 2002)。*Hd3a/FT* は PEPB (phosphatidylethanolamine binding protein) と類似したタンパク質をコードしており、過剰発現体はいずれも非常に早咲きの表現型を示す。さらに *Hd3a/FT* タンパク質は移動性の花成促進因子すなわちフロリゲンの実体であることを強く示唆する報告が近年されている (図 3; Corbesier *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007)。シロイヌナズナの *FT* 過剰発現体を用いた接ぎ木実験により花成が誘導されることや、カボチャの師管液から *Hd3a/FT* ホモログタンパク質が検出されたことにより、*Hd3a/FT* タンパク質は葉の維管束師部で発現、翻訳され茎頂分裂組織まで師管内を通り移動することが示された (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007)。FT においては茎頂分裂組織で bZIP 転写因子 FD と相互作用することで、花芽形成遺伝子の *APETALA 1 (AP1)*、*CAULIFLOWER (CAL)* そして *FRUITFUL (FUL)* の発現を誘導し花芽形成を開始する (Abe *et al.*, 2005)。一方 *Hd3a* においては、その相互作用因子については未だ知見が乏しいが、茎頂分裂組織において *Hd3a* タンパク質が存在しうる事が GFP タンパク質を融合させた形質転換体を用いた実験から示されており、シロイヌナズナと共通した機構があると考えられる (Tamaki *et al.*, 2007)。またイネゲノム中には *FT* とアミノ酸レベル

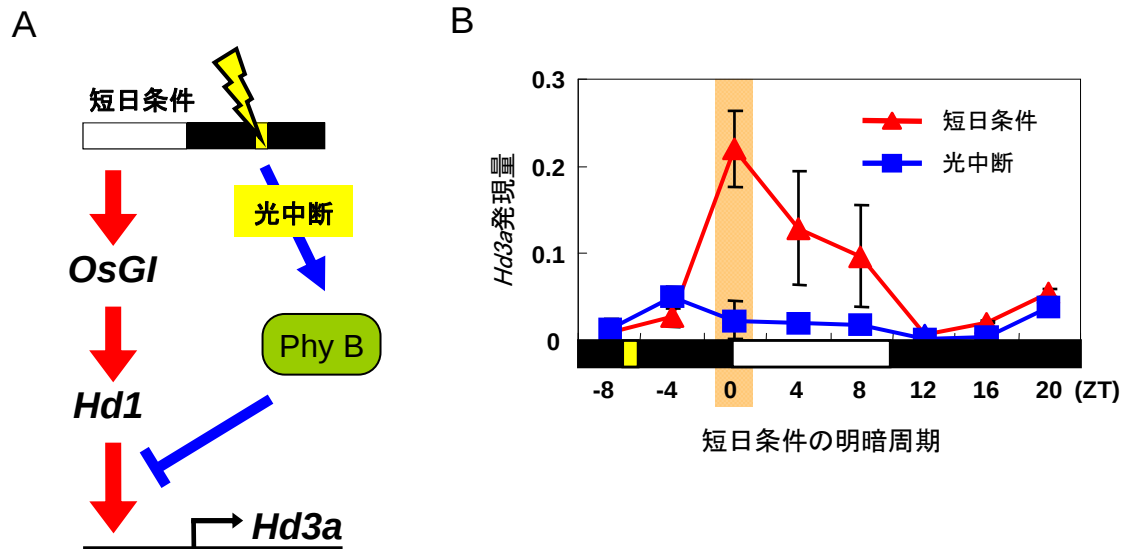


図2 イネにおける光中断反応の分子機構

- A 光中断による*Hd3a*発現抑制の分子機構。光中断のシグナルは光受容体Phy Bを介して、*Hd1*転写後のステージに影響し*Hd3a*の発現抑制を行っていると考えられている。
- B 短日条件下と光中断処理における*Hd3a*の発現パターン。グラフは播種後35日目における日本晴を用いた結果。光中断による発現抑制率はオレンジで示した時間 (ZT 0)で解析を行った。

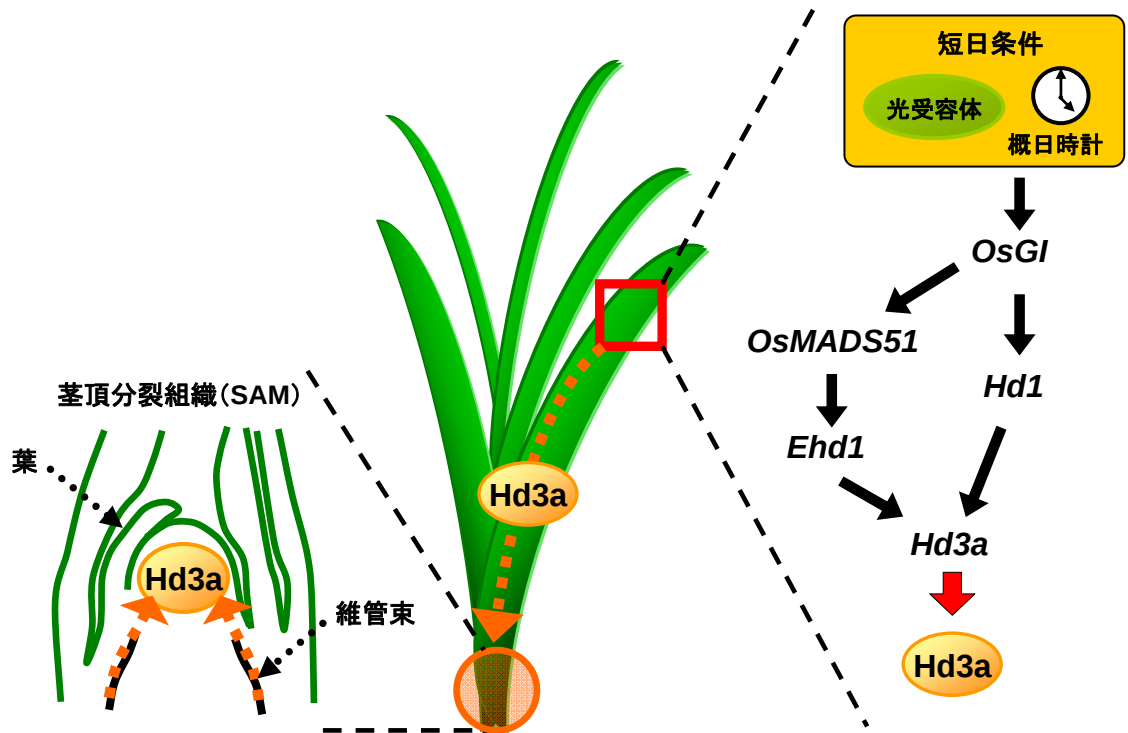


図3 短日条件下における光周性花成誘導経路のモデル

日長の変化は植物の葉において光受容体と概日時計との情報の統合によって感知され、花成関連遺伝子の発現を誘導する。葉の維管束組織において発現した*Hd3a*はタンパク質に翻訳され、維管束師部組織を通り茎頂分裂組織へと移動する。茎頂分裂組織において*Hd3a*タンパク質が花芽形成遺伝子の発現を誘導することで、栄養生長期から生殖生長期への生長相の転換すなわち花成が誘導される。

で高い相同性を示す *FT-like* 遺伝子が *Hd3a* を含み 13 個存在している (Chardon and Damerval, 2005)。このうち *Rice Flowering Locus T1 (RFT 1)* は *Hd3a* と最も高い相同性を示す因子であり、*Hd3a* とはリダンダントに花成を誘導している事が示唆されている (Komiya *et al.*, 2008)。

もう一方、イネにおいては *Hd3a* 発現を *Hd1* とは独立して正に制御する因子として *Early heading date 1 (Ehd1)* が報告されている (Doi *et al.*, 2004)。*Ehd1* は台湾品種の台中 65 号とアフリカ稲 *Oryza glaberrima* の交配後代を用いた QTL 解析により同定され、マップベースドクローニングによって単離された。*Ehd1* は B-Type response regulator をコードしており、Receiver ドメインと GARP (*Golden2*, *Arabidopsis RESPONSE REGULATOR [ARR]*, and *Chlamydomonas* regulatory protein of P-starvation acclimatization response [*Psr1*]) DNA 結合ドメインを持つ。さらに *Ehd1* は短日条件下で *OsMADS51* によって発現が正に制御されている。*OsMADS51* は T-DNA 挿入変異集団における短日条件下で遅咲きの表現型を示す系統から単離、同定された Type I MADS-box 遺伝子である (Kim *et al.*, 2007)。また *OsMADS51* は *OsGI* による転写制御を受けている。非常に興味深い点として、*OsMADS51* および *Ehd1* はどちらもシロイヌナズナにおけるオーソログが存在しない (Doi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007)。この事からシロイヌナズナとイネはその花成制御について多くの共通した機構を持つが、*OsMADS51-Ehd1* を介した経路はイネに特異的な経路であると考えられる。

このように、これまでの分子遺伝学的な解析から、イネの短日条件下における花成誘導の分子機構における多くの知見が得られてきた。イネにおける花成誘導機構の知見はモデル植物として植物の生殖戦略や環境適応の理解に役立つのみでなく、農業的な観点からも育種形態の発展や収量増加などにおいて非常に重要な形質である。イネは、世界の 3 分の 1 以上の人々の主食とされる重要な穀物である。現在主に世界で栽培されているイネは *Oryza sativa* という種に分類され、約 8000 から 10000 年前の栽培化および農業育種の過程を経て、現在の栽培イネとして進化してきた (Khush, 1997; Doebley *et al.*, 2006)。その起源は遺跡から発掘された籾殻や稲作の痕跡から中国の長江下流域であると考えられている (佐藤, 2003)。これまでの、長年にわたる栽培化過程においてイネは様々な遺伝的な変化を伴い祖先野生種にはないような形態的形質、生理的形質を獲得した。そして、人為的な選択により農業育種にとって有用な様々な形質が選抜されてきた。例えば代表的な栽培化形質としては、収穫時における種子の脱粒性の低下、植物体の倒伏を防ぐための草丈の矮化そして食味に関する米の品質などが挙げられる (Konishi *et al.*,

2006; Khush *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2006)。

栽培化に関与した形質としては花成時期も例外ではない。特に、花成時期の多様化は稲作地域の拡大や育種技術の発展に貢献した重要な形質の一つであると考えられている (Izawa, 2007)。イネは本来熱帯性の植物であり、栽培イネ (*Oryza sativa*) の *Oryza rufipogon* と呼ばれる祖先野生種から栽培化されたと考えられている。また *Oryza rufipogon* には一年生と多年生のタイプが存在し、一年生タイプは *Oryza nivara* と呼ばれ別種として見なされる場合もある。さらに *Oryza sativa* にはジャポニカとインディカの二種類の亜種に大別されるが、これらはそれぞれ多年生タイプと一年生タイプの *Oryza rufipogon* から別々に進化したと考えられている (Cheng *et al.*, 2003)。この *Oryza rufipogon* の主な生育分布は北緯 25 度あたりよりも南のインドシナ半島や東南アジアなど温暖な地域となっている。イネの花芽は低温による影響を非常に受けやすく、花粉形成過程における低温は花粉稔性の著しい低下の原因となることから、栽培イネの耕作地域を高緯度へと拡大するためには、周囲の環境が温暖時期の間に花芽形成を行わせることにより受粉を成功させる必要がある。しかし、高緯度地域における温暖な季節は日の長い長日条件であり、短日植物であるイネが花成誘導を行うには不利な日長条件であることから、耕作地域の拡大のためにはイネの日長に対する応答を変化させる必要があった。現在北海道や東北で栽培されているイネは日長に対する反応（感光性）が鈍化していることにより、日長に依存せず決まった時期に花成が誘導される。それぞれのイネ品種はこのように日長反応を変化させる事で花成時期を多様化させ高緯度地域への栽培を可能にしたと考えられる。それではいったい花成時期の多様化には、どのような遺伝的変化が伴ったのであろうか？イネの光周性花成誘導経路に関わる遺伝子の多くは日本晴とカサラスとの QTL 解析によって同定されたことから、それぞれの因子が潜在的に花成時期の多様性に影響している可能性が大いにあった。しかし、個々の品種における花成時期の違いをもたらす原因は明らかになってきたが、イネ品種集団全体として注目した際に、どのような遺伝的構造の変化が生じているかについては知見が乏しい。

シロイヌナズナにおいては花成時期の多様性の分子機構についていくつかの研究報告が成されている。シロイヌナズナは幅広い緯度範囲に生育しており、それぞれの生育環境に非常に良く適応していると考えられる。花成時期の多様性をもたらすひとつの要因に、ある一定期間の低温を処理する事で花成が誘導される春化が挙げられる (図 1)。特に *FLOWERING LOCUS C (FLC)*、*MADS-box* タンパク質をコードした花成抑制因子はこの経路におい

て中心的な役割を担っており、下流の *FT* の発現を越冬前の時期に抑制する事で花成誘導を阻害する働きをしている (Michaels *et al.*, 1999)。そして一定期間以上の低温を経験すると (越冬)、*FLC* 発現が低下し花成が誘導される。シロイヌナズナの系統集団を用いた解析から *FLC* はその塩基配列から *FLC^A* と *FLC^B* のグループに分けられ、それぞれ低緯度地域での花成促進、高緯度地域での花成抑制に影響している (Caicedo *et al.*, 2004)。また *FLC* はエピジェネティックな変異が自然変異に寄与していることが明らかになっている (Shindo *et al.*, 2006)。さらに、*FLC* 発現を正に制御する因子である *FRIGIDA* (*FRI*) は挿入や欠失など非常にアレル間での塩基多型に富んでおり、natural variation のターゲットになっている事も良く知られている (Johanson *et al.*, 2000; Shindo *et al.*, 2005;)。また、これらの因子がシロイヌナズナのエコタイプにおける花成応答の多様化およびそれぞれの地理的分布に大きく関与している事が示唆されている (Stinchcombe *et al.*, 2004; Toomajian *et al.*, 2006)。これに対して、熱帯性の植物であるイネは春化に対して感受性を持たない上に *FLC* のオースログがゲノム中に存在しない (Tadege *et al.*, 2003)。したがって日長に依存した花成誘導すなわち光周性花成誘導経路が主であるイネは、シロイヌナズナとは異なった分子機構によって花成時期の多様性を生み出していると考えられる (Izawa *et al.*, 2003; Alonso-Blanco *et al.*, 2005)。イネの花成時期の多様化における分子レベルの知見は、イネの栽培化における光周性花成誘導経路の分子的な変遷の理解のみでなく、未知の分子機構の発見や花成時期のコントロールにつながる有用な因子の探索にも非常に役立つと期待される。

本研究では、栽培イネ集団の内包する遺伝的多様性を効率よく調査する為にアジアを中心とした様々な地域由来の 64 品種のイネを用いた。そして、遺伝子発現解析およびシーケンス解析により、イネ品種における多様な花成時期をもたらす分子レベルでの原因の同定を試みた。さらに同定された候補因子の花成時期多様化への寄与について統計的アプローチにより解析を試みた。

II 材料と方法

(1) 実験材料

- イネコアコレクション (Kojima *et al.*, 2004; 表 1)
- 台中 65 号
- *Tos17* 挿入 *Hd1* 遺伝子破壊株 (Hirochika *et al.*, 2001)

(2) 方法

a、植物の育成および花成時期の評価

種子の休眠打破として 60 度のチャンバーにおいて 3 時間乾燥させた。後に 1%希釈したベンレート溶液(デュポン)に約 24 時間浸し種子滅菌を行い、水道水で洗浄する。シャーレで発芽させた種子は、シードリングケース(15cm×6cm、深さ 9cm) を用いて、4 - 8 個体になるよう播種を行った。土はくみあい宇部粒状培土 2 号(宇部興産)にバーミキュライト(ニッタイ株式会社)を 4:1 の割合で混合したものを用いた。

生育は人工気象器(NC-350S: 日本医化器械製作所)内で短日条件(10 時間明期: 30℃、14 時間暗期: 25℃、湿度 70%)において行った。照明は白色蛍光灯(400 - 700 nm、100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)を用いた。

光中断処理は、短日条件下で生育させた際の播種後 35 日目暗期中央(暗期開始後 7 時間目)に 30 分間の光照射を行った。この処理における光量は明期で使用しているのと同様のものを用いた。サンプリングは直後の明期開始時に行った。

花成時期(出穂期)は播種後第 1 穎花が止葉の葉耳から出現した日までの日数として評価した。

b、植物体からの RNA 抽出

短日条件下で生育させた播種後 35 日目の植物体から葉身を 5-10cm ほど採取し、2ml チューブに回収した後速やかに液体窒素を用いて凍結した。採取したサンプルはマルチビーズショッカー(MB301[S]型; 安井器械)を用いて粉末状になるまで破碎した。RNA の抽出は RNeasy Plant Midi Kit (QIAGEN) または TRIzol (Invitrogen)を用い付属の説明書に準じて作業を行った。

RNA サンプルからゲノム DNA を除去するために、DNase I Amplification Grade (Invitrogen)を用いて DNA 消化を行った。反応は 16.8 μl の RNA 溶液に対して、付属の 10×buffer 2 μl 、DNase I 1 μl 、RNase 阻害剤(PRI (ブ

表1 イネコアコレクション

CC No.	名前	原産地	亜種
1	NIPPONBARE	日本	Japonica
2	KASALATH	インド	Indica
3	BEI KHE	カンボジア	Indica
4	JENA 035	ネパール	Indica
5	NABA	インド	Indica
6	PULUIK ARANG	インドネシア	Indica
7	DAVAO 1	フィリピン	Indica
9	RYOU SUISAN KOUMAI	中華人民共和国	Indica
10	SHUUSOUSHU	中華人民共和国	Indica
11	JINGUOYIN	中華人民共和国	Indica
13	ASU	ブータン	Indica
14	IR 58	フィリピン	Indica
15	CO 13	インド	Indica
16	VARY FUTSI	マダガスカル	Indica
17	KEIBOBA	中華人民共和国	Indica
18	QINGYU(SEIYU)	台湾	Indica
19	DENG PAO ZHAI	中華人民共和国	Indica
20	TADUKAN	フィリピン	Indica
21	SHWE NANG GYI	ミャンマー	Indica
22	CALOTOC	フィリピン	Indica
23	LEBED	フィリピン	Indica
24	PINULUPOT 1	フィリピン	Indica
25	MUHA	インド	Indica
26	JHONA 2	インド	Indica
27	NEPAL 8	ネパール	Indica
28	JARJAN	ブータン	Indica
29	KALO DHAN	ネパール	Indica
30	ANJANA DHAN	ネパール	Indica
31	SHONI	バングラデシュ	Indica
32	TUPA 121-3	バングラデシュ	Indica
33	SURJAMUKHI	インド	Indica
34	ARC 7291	インド	Indica
35	ARC 5955	インド	Indica
36	RATUL	インド	Indica
37	ARC 7047	インド	Indica
38	ARC 11094	インド	Indica
39	BADARI DHAN	ネパール	Indica
40	NEPAL 555	インド	Indica
41	KALUHEENATI	スリランカ	Indica
42	LOCAL BASMATI	インド	Indica
43	DIANYU 1	中華人民共和国	Japonica
44	BASILANON	フィリピン	Indica
45	MA SHO	ミャンマー	Japonica
46	KHAO NOK	ラオス	Japonica
47	JAGUARY	ブラジル	Japonica
48	KHAU MAC KHO	ベトナム	Japonica
49	PADI PERAK	インドネシア	Japonica
50	REXMONT	アメリカ	Japonica
51	URASAN 1	日本	Japonica
52	KHAU TAN CHIEM	ベトナム	Japonica
53	TIMA	ブータン	Japonica
55	TUPA 729	バングラデシュ	Japonica
57	MILYANG 23	大韓民国	Indica
58	NEANG MENH	カンボジア	Indica
59	NEANG PHTONG	カンボジア	Indica
60	HAKPHAYNHAY	ラオス	Indica
61	RADIN GOI SESAT	マレーシア	Indica
62	KEMASIN	マレーシア	Indica
63	BLEIYO	タイ	Indica
64	PADI KUNING	インドネシア	Indica
65	RAMBHOG	インドネシア	Indica
66	BINGALA	ミャンマー	Indica
67	PHULBA	インド	Japonica
68	KHAO NAM JEN	ラオス	Japonica

CC No.: イネコアコレクション管理番号

タ肝臓由来) ; Takara) 0.5 μ l を混合し、37 度で 20 分間行った。酵素反応後は、フェノール/クロロホルム精製によって残存酵素を除去し、回収された RNA は最終的に 30 μ l の DEPC 処理水で溶解した。

サンプリングの時間は解析対象とするそれぞれの遺伝子発現量が最も高くなる時に行った。時間は zeitgeber time; ZT (明期開始時を ZT 0 として表す) で表している。それぞれのサンプリング時間で解析した遺伝子は以下のようになる、ZT 0 (*Hd3a*、*RFT*) ; ZT 8 (*OsGI*、*OsMADS51*) ; ZT 16 (*Hd1*) ; ZT 20 (*Ehd1*)。

c、逆転写反応

精製した RNA サンプルを 1 μ g 用い、逆転写反応による cDNA 合成を行った。反応には SuperScript II H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を使用した。反応組成と時間は以下に示す条件で行った。

反応組成

RNA	1 μ g
5 $\times$ buffer	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
20pmol dT21 (プライマー)	1 μ l
10mM dNTP	1 μ l
SuperScript II RT	0.2 μ l
+ DEPC 処理水	合計 20 μ l

反応時間

30°C	10 分
42°C	50 分
95°C	5 分

d、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

● 検量線の作成

リアルタイム PCR による各遺伝子の発現量の正確な定量および比較の為、それぞれの遺伝子断片を連結させたプラスミドを作成した。遺伝子断片はイネ葉身由来の cDNA を鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara) を用いた PCR によって増幅し、Zero Blunt TOPO kit (Invitrogen) によって pCR Blunt TOPO ベクター (Invitrogen) へクローニングした。このベクターから

1 fg から 10pg/ μ l までの 5 段階希釈系列の溶液を作成し、リアルタイム PCR の検量線作成用のテンプレートとした。

- リアルタイム PCR

合成した cDNA をテンプレートとし、二本鎖 DNA を認識する蛍光色素である SYBR Green I を用いて増幅産物の定量を行った。PCR 反応には *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 7000 シーケンスディテクションシステム (Applied Biosystems) によって行った。反応組成と時間は以下に示す条件で行った (表 2)。

反応組成

cDNA (テンプレート)	1 μ l
2× <i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 μ l
プライマー F	0.5 μ l
R	0.5 μ l
滅菌水	8 μ l
合計	20 μ l

反応時間

50°C	2 分	} 45 サイクル
95°C	10 分	
95°C	15 秒	
60°C	1 分	

- 遺伝子発現解析

遺伝子発現データは ABI PRISM 7000 SDS Software version 1.1 (Applied Biosystems) によって収集した。データの解析には Microsoft Excel 2003 を使用した。全ての遺伝子発現量は内部標準である *UBIQUITIN* 遺伝子の発現量に対する割合として標準化した。

e、シーケンス解析

塩基多型の解析はダイレクトシーケンス法で行った。解析の対象とする領域はそれぞれのイネ品種のゲノム DNA をテンプレートとした PCR によって増幅した。PCR には TaKaRa LA Taq または PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara) を用いた。PCR 断片は MinElute (QIAGEN) を用いて精製し、残存し

表2 本研究で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' - 3')
Primers for real-time PCR	
<i>Ubq</i> -F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
<i>Ubq</i> -R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA
<i>OsGl</i> -F	ATCGTTCTGCAGGCCGAGA
<i>OsGl</i> -R	TCACCAATGCTTCTGGGCTAT
<i>OsMADS51</i> -F	GAAATCAAAGAAGATGTTGGCAAA
<i>OsMADS51</i> -R	CTTCCTCCTGCCCCCTAGAG
<i>Hd1</i> -F	TCAGCAACAGCATATCTTTCTCATCA
<i>Hd1</i> -R	TCTGGAATTTGGCATATCTATCACC
<i>Ehd1</i> -F	GCGCTTTTGATTTCTGC
<i>Ehd1</i> -R	ATATGTGCTGCCAAATGTTGCT
<i>Hd3a</i> -F	GCTCACTATCATCATCCAGCATG
<i>Hd3a</i> -R	CCTTGCTCAGCTATTTAATTGCATAA
<i>RFT1</i> -F	TGACCTAGATTCAAAGTCTAATCCTT
<i>RFT1</i> -R	TGCCGGCCATGTCAAATTAATAAC
Primers for cloning full length <i>Hd1</i> coding region	
<i>Hd1</i> FLpENTR-F	CACCATGAATTATAATTTTGGTGGCAACGTG
<i>Hd1</i> FLpENTR-R	TCAGAACCATGGAACAGTACCATAGCT
Primers for cloning <i>Hd3a</i> promoter region	
<i>pHd3a</i> -Spe1F	ACTAGTCATTAATTGCCTTACCTCAAC
<i>pHd3a</i> -BamH1R	CGGGATCCCGATCTTGCAAAAAACCTG

たプライマーや dNTP 等を除去した。

精製された PCR 断片 1 μ l をテンプレートとして使用しシーケンス PCR を行った。反応には Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた。シーケンス PCR 産物の精製には Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter)を用いた。精製したシーケンス PCR 産物は 20 μ l の HiDi ホルムアミドで溶解し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてデータの収集を行った。収集された配列データは GENETYX program ver.7 (GENETYX)を用いて解析を行った。

f、ホタルルシフェラーゼによるレポーターアッセイ

- コンストラクトの作成

CaMV 35S::Hd1 ; コアコレクション各品種由来の cDNA を用いて、それぞれの Hd1 アリルの翻訳領域を PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara)を用いた PCR によって増幅した (表 2)。増幅断片は Directional TOPO Cloning kit (Invitrogen)を用いて、pENTR/D-TOPO vector へサブクローニングした。最後に、Hd1 翻訳領域断片を LR recombination reaction (Invitrogen)によって CaMV 35S promoter :: gateway cassette / pUC12 plasmid へ挿入した。それぞれの Hd1 アリルの単離は以下の品種を用いた。Type 1 (cv. BEI KHE)、Type 2 (cv. TADUKAN)、Type 3 (cv. SHUUSOUSHU)、Type 4 (cv. BLEIYO)、Type 5 (cv. RAMBHOG)、Type 6 (cv. NIPPONBARE)、Type 7 (cv. IR 58)、Type 8 (cv. BADARI DHAN)、Type 9 (cv. TIMA)、Type 10 (cv. PHULBA)、Type 11 (cv. URASAN 1)、Type 12 (cv. MA SHO)、Type 13 (cv. KASALATH)、Type 14 (cv. PULUIK ARANG)、Type 15 (cv. JENA 035)、Type 16 (cv. NABA)、Type 17 (cv. TUPA 121-3)。

Hd3a promoter::pLUC (Photinus pyralis) ; NIPPONBARE 品種から抽出したゲノムを鋳型とし、Hd3a プロモーター領域(5'非翻訳領域を含む上流 1963 bp 領域)を PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara)を用いた PCR によって増幅した (表 2)。増幅断片は Ligation-Convenience Kit (NIPPON GENE)を用いて pLUC (Photinus pyralis)が挿入された pUC12 plasmid へクローニングした。

- PEG 法によるイネプロトプラストの形質転換 (Chen *et al.*, 2006)

継代 3 日目のイネ培養細胞 (Oc 細胞) からセルラーゼ処理によって得られたプロトプラストを 2×10^6 個/ml に調整する。2ml のエッペンチューブ内で 100 μ l プロトプラスト溶液にレポーターコンストラクトとして 1 μ g の Hd3a promoter::pLUC、エフェクターコンストラクトとして 5 μ g の CaMV

35S::Hd1 を加える。良く混合した後に 110 μ l の PEG 溶液を加え、緩やかに混合し室温で 20 分間静置する。W5 溶液で PEG を洗浄し、1ml の W5 溶液を加え、遮光し 30°C でインキュベートする。12 時間後にサンプリングとしてアスピレーターを用いて W5 溶液を除去し、5 倍希釈した Reporter Lysis Buffer (Promega) を 25 μ l 加え、ボルテックスにより攪拌し、-80°C で凍結させ細胞を破壊した。

- レポーターアッセイ

Luciferase Assay Systems (E4030; Promega) を用い、付属の説明書に準じて作業を行った。-80°C で凍結していたサンプルを室温で融解させ、96 ウェルプレート (655074 ; greiner bio-one) に 10 μ l ずつ分注した。測定は 50 μ l の Luciferase Assay Reagent を分注し、2 秒静置したのち 10 秒間の発光量をカウントした。試薬の分注および発光量の測定には Mithras LB940 (BERTHOLD) を使用した。それぞれのサンプルの発光量はサンプルのタンパク量 1 μ g あたりの量として標準化し、ベクターコントロール 35S::Bar における発光量との割合として評価した。タンパク量は Bradford 法によって測定した。

g、統計解析

統計解析は Microsoft Excel 2003 および Excel アドインソフト Statcel 2 (OMS 出版) を用いて行った。花成時期とそれぞれの花成関連遺伝子の発現量との相関関係はピアソンの相関係数検定によって評価した。また、Functional、Non-functional それぞれの Hd1 アリルにおける花成時期および Hd3a 発現量などの独立した 2 群の統計的な差は F 検定によって 2 群の分散が等しい事を確認したうえでスチューデントの t 検定 (両側検定) によって検定した。 $p < 0.01$ を統計的に有意であると判断した。それぞれの花成関連遺伝子で同定されたアリルおよびプロモーター領域のハプロタイプの花成時期および遺伝子発現量への影響は一元配置分散分析法もしくはクラスカル・ワーリス検定を用いて評価した。検定の結果水準間に差があると認められた場合、Sceffe's F test を用いて多重比較検定を行った。 $p < 0.01$ を統計的に有意であると判断した。

h、線形モデル解析

それぞれの要因の寄与率の結果は、線形モデル解析によって解析した (Lynch *et al.*, 1998; Grafen *et al.*, 2007)。

3つの要因における寄与率

モデル式：

花成時期 = Hd1 機能 (の効果、以下同様)

$$\begin{aligned} &+ \text{Hd3a プロモータータイプ} \\ &+ \text{Ehd1 発現量} \\ &+ \text{Hd1 機能} \times \text{Hd3a プロモータータイプ} \\ &+ \text{Hd3a プロモータータイプ} \times \text{Ehd1 発現量} \\ &+ \text{Ehd1 発現量} \times \text{Hd1 機能} \end{aligned}$$

回帰式：

$$y = \alpha + \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 + \beta_3 Z_3 + \beta_4 Z_1 Z_2 + \beta_5 Z_1 Z_3 + \beta_6 Z_2 Z_3$$

- y: 花成時期の期待値
α: 全ての花成時期の平均
Z₁: Hd1 機能 (Functional, Non-functional)
Z₂: Hd3a プロモータータイプ (Type A, Type B)
Z₃: Ehd1 発現量 (実測値)
f: 花成時期の実測値

回帰係数 ($\beta_1 \sim \beta_6$) を最小二乗法によって求めた：

$\sum_x (f_x - y_x)^2$ 、すなわち期待値と実測値の差の平方和、を最小にする係数
ただし X は個体を表す

$$r^2 = 1 - \{(\text{Ve} / \text{Genetic 以外の自由度}) / (\text{Vf} / \text{トータルの自由度})\}$$

$$\text{Vf} = \text{Vy} + \text{Ve}$$

- r^2 : 寄与率
Vf: 花成時期の実測値の分散
Vy: 花成時期の期待値の分散 (Genetic な分散、= 遺伝分散)
Ve: その他 (環境要因や他の遺伝要因、エラー) の分散
トータルの自由度: $n-1$
Genetic 以外の自由度: $n-p-1$ (このモデルで $p=6$)

それぞれの要因におけるおおよその寄与率

回帰式を $y = \alpha + \beta Z$ とおいて、それぞれの因子の単独での寄与率を同様の解析を行った。それぞれの寄与率については $r^2_{Hd1\ func.}$: $r^2_{Hd3a\ pro.}$: $r^2_{Ehd1\ exp.}$ の比率で分配した。

Hd3a 発現量の多様性に対する寄与率については、 y を *Hd3a* 発現量の期待値、 α を全ての *Hd3a* 発現量の平均そして f を *Hd3a* 発現量の実測値として上記と同様の解析を行った。また、注目したこれら 3 つの領域には連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium: LD) がほとんど無いことを確認している。解析は R software を用いて行った。

Ⅲ 結果

Ⅲ-1 イネコアコレクションの花成時期の調査

本研究では、実験材料としてイネコアコレクションを用いた。イネコアコレクションとは、64 品種から構成される栽培イネのコレクションであり、栽培イネ集団における代表的な遺伝形質の約 90%以上がカバーされている特徴をもつ (Kojima *et al.*, 2005)。そこでまず、コアコレクションに含まれる 64 品種全てを短日条件に設定した人工気象器内で生育させた。この際、花成時期（出穂期）は播種後第 1 穎花が止葉の葉耳から出現した日までの日数として評価した。この結果、最も早く出穂した品種はタイ由来の BLEIYO であり播種後約 45 日目であった。これに対して、最も出穂の遅かった品種はインドネシア由来の PADI KUNING で播種後約 156 日目であった。また他の品種においてもそれぞれの花成時期に目立った偏りは無く、品種間で幅広い花成時期の多様性が見られた (図 4)。

Ⅲ-2 花成時期の多様性と花成関連遺伝子の発現量との関係

それぞれのイネ品種で見られた幅広い花成時期をもたらす分子機構を明らかにするために、まず短日条件下での花成誘導経路に關与する既知の花成関連遺伝子について発現量の多様性の解析を試みた。解析は、*OsGI*、*OsMADS51*、*Hd1*、*Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1* の 6 つの遺伝子について注目して行った。それぞれの遺伝子の発現量は概日リズムを示すため、サンプリングはそれぞれの遺伝子発現がピークとなる時間で行った。この結果、*OsGI*、*OsMADS51*、*Hd1* については品種間での遺伝子発現量はほぼ一定であった (図 5A-C)。これに対して、*Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1* では品種間で非常に幅広い発現量を示す結果が得られた (図 5D-F)。そこで、これら 6 つの遺伝子発現量と花成時期との関係について散布図の作成およびピアソンの相関係数検定を用いて解析を行った。この結果、*OsGI*、*OsMADS51*、*Hd1*、*RFT1* においては遺伝子発現量と花成時期との相関関係はほとんど見られなかったが、*Ehd1* および *Hd3a* においては有意な相関関係が見出された (表 3)。この関係は特に *Hd3a* において顕著であった (ピアソンの相関係数 $r = -0.681$ 、 $p < 0.01$)。この結果から、*Hd3a* の発現量がイネの花成時期の決定に重要である事が示

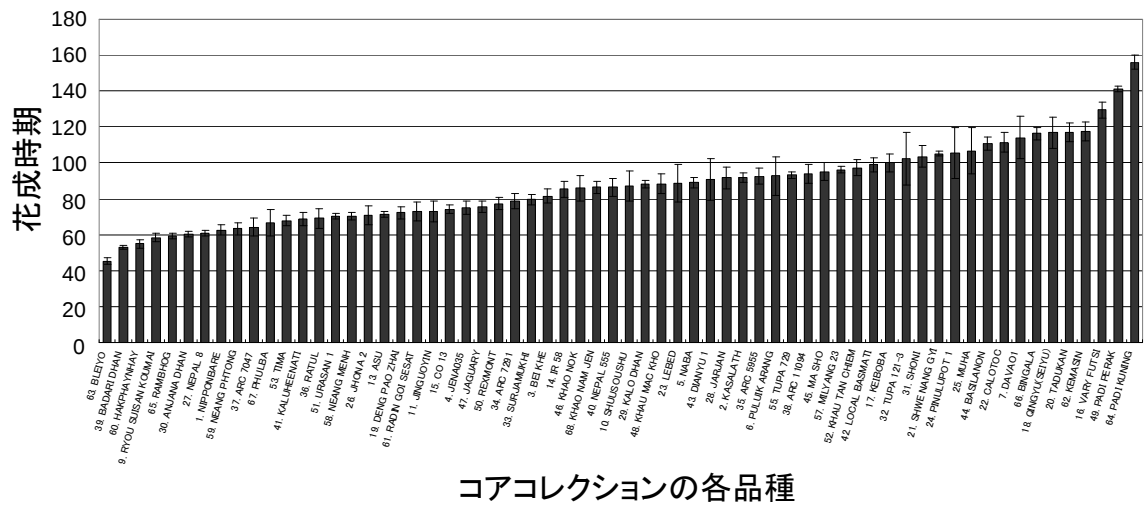


図4 イネコアコレクションにおける花成時期の多様性

短日条件下におけるコアコレクション各品種の花成時期を示している。花成時期は播種した日から第1穎花が止葉の葉耳から出現した日までの日数として評価した。それぞれ4から8個体の平均を示している。y誤差範囲は標準偏差を示す。

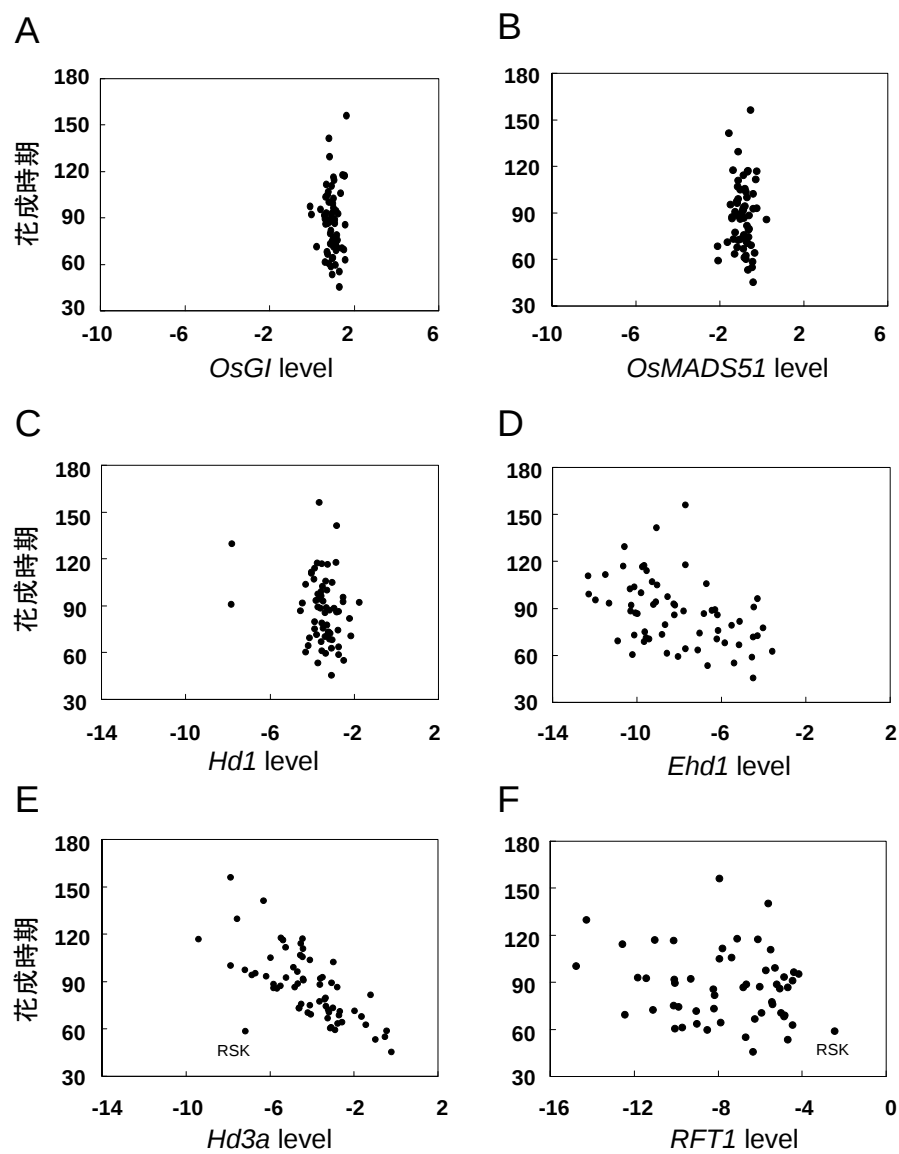


図5 花成関連遺伝子の発現量と花成時期の関係

それぞれの遺伝子の発現解析は、短日条件（10時間明期、14時間暗期）で生育させた播種35日目の植物体において最上位展開葉のサンプリングを行いリアルタイムPCRを用いて行った。発現量は自然対数で表している。RSK, RYOU SUISAN KOUMAI品種

表3 ピアソンの相関係数検定による花成関連遺伝子の発現量の関係

	花成日数	<i>RFT</i>	<i>Hd3a</i>	<i>Ehd1</i>	<i>Hd1</i>	<i>OsMADS51</i>
<i>OsGI</i>	0.021	-0.035	0.035	0.220	-0.001	0.340 *
<i>OsMADS51</i>	-0.006	-0.251	-0.050	0.076	0.015	
<i>Hd1</i>	-0.224	0.175	0.189	0.147		
<i>Ehd1</i>	-0.425 **	0.235	0.462 **			
<i>Hd3a</i>	-0.681 **	0.128				
<i>RFT1</i>	-0.197					

** $P < 0.001$, * $P < 0.01$

された。さらに、イネ品種における花成時期の多様化の原因は *Hd3a* の発現量を制御する因子に存在する多様性によってもたらされている事が示唆された。

III-3 *Hd3a* 翻訳領域における塩基多型の解析

Hd3a の発現量が花成時期の多様性と強い相関関係を示した。これに対して *Hd3a* タンパク質の活性は品種間で変化があるかをシーケンス解析によって調査した。*Hd3a* は 4 つのエキソンによって構成されており、翻訳領域の全長は 540 bp となる。シーケンス解析の結果、全部で 6 つの *Hd3a* アリルが同定された (図 6)。この領域で見つかった 6 ヶ所の塩基置換のうちアミノ酸の変化を伴う非同義塩基置換は 3 ヶ所であった。シロイヌナズナの *Hd3a* オーソログである *FT* における知見から、*FT* タンパク質の活性に重要とされる幾つかのアミノ酸およびドメインが報告されている (Ahn *et al.*, 2006)。しかし、*Hd3a* においてこれらに相当するアミノ酸領域には変化は見られなかった。また、既知の *ft* 変異体における機能低下の原因となる変異箇所においても変化は見出されなかった。以上の結果から、*Hd3a* はイネ品種間で高度に保存されている事が示唆された。

III-4 *Hd3a* 上流因子における塩基多型の解析

III-4-1 *Ehd1* 翻訳領域のシーケンス解析

Ehd1 の翻訳領域は 5 つのエキソンで構成されており、その全長は 1026bp となる。*Ehd1* の翻訳領域におけるシーケンスを行ったところ、全部で 16 ヶ所の塩基置換が見つかり、7 つの *Ehd1* アリルが同定された (図 7)。アミノ酸の変化を伴う非同義塩基置換は 10 ヶ所であった。Receiver ドメインにおいては一ヶ所 43 番目のバリンがイソロイシンに変化していたが (V43I)、リン酸化リレー機能に重要とされるアミノ酸 (D₁、D₂、K) に関してはアミノ酸の変化は見られなかった。また GARP ドメインでは 219 番目グリシンからアルギニンへの変異 (G219R) が見られた。*Ehd1* における G219R の変異は Doi らによってタンパク質機能の低下の原因となる事が既に報告されており、GARP ドメインの持つ DNA 結合活性が著しく低下することが Gel mobility shift 解析によって示されている (Doi *et al.*, 2004)。しかし、G219R 変

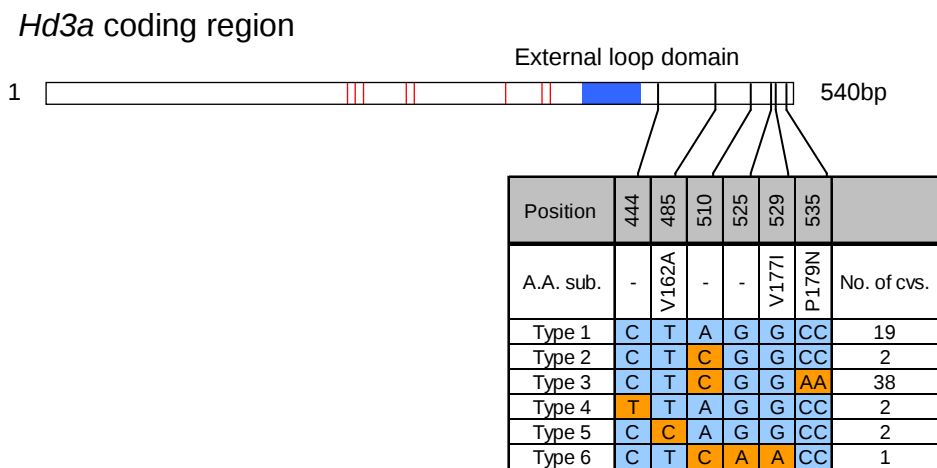


図6 *Hd3a*翻訳領域における塩基多型

*Hd3a*翻訳領域で見出された塩基多型の位置を示している。*Hd3a*タンパク質機能に重要とされる アミノ酸は赤線で、External loop domainは青ボックスで示してある。

Ehd1 coding region

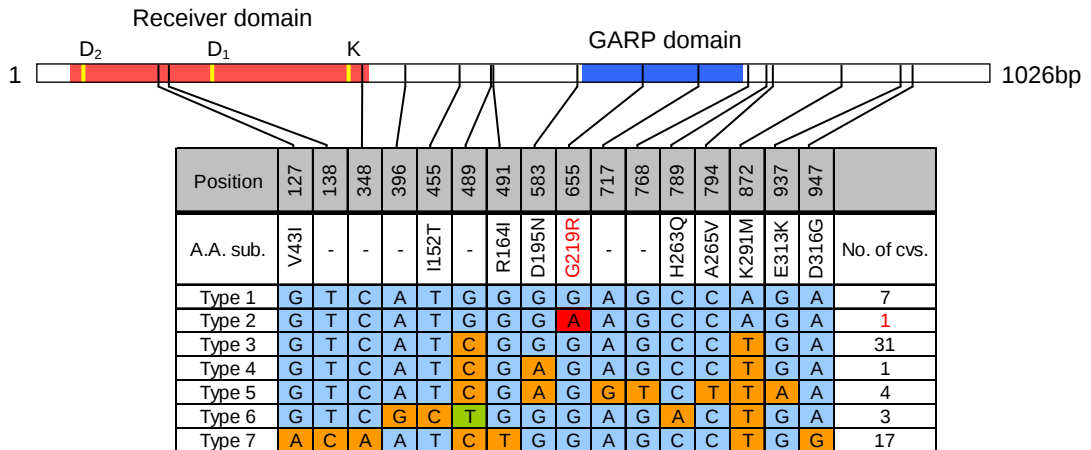


図7 Ehd1翻訳領域における塩基多型

Ehd1翻訳領域で見出された塩基多型の位置を示している。Receiver domainおよびGARP domainはそれぞれ赤と青のボックスで示してある。リン酸化リレー機能に重要とされるアミノ酸 (D₁、D₂、K) は黄色で示した。GARPドメインにおけるG219Rの変異はタンパク質機能の低下の原因となる事が報告されている。

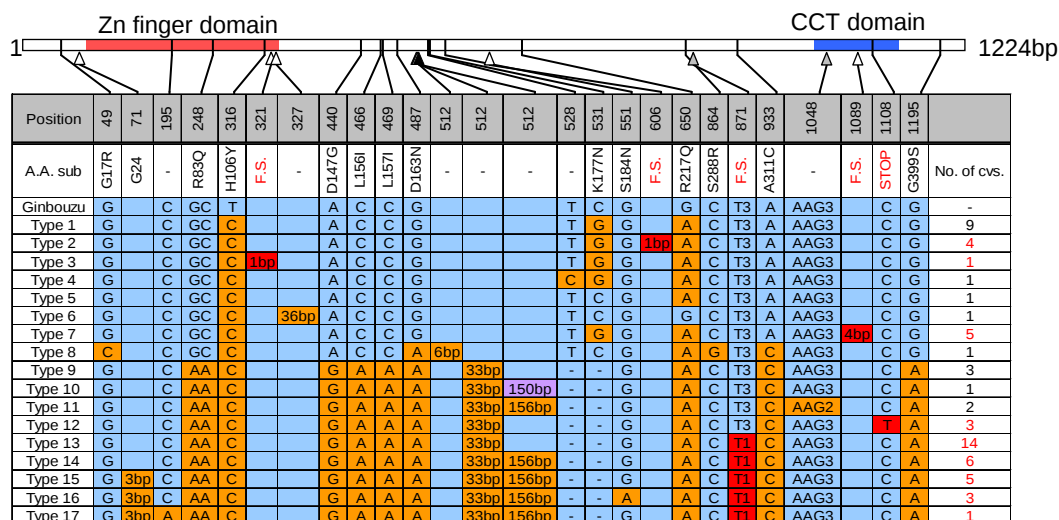
異を持つ品種はコアコレクション内で中国由来の DIANYU 1 の 1 品種のみであった。したがって G219R 変異によって *Hd3a* 発現量の多様性を説明する事は出来ないと考えられる。そこで、それぞれの *Ehd1* アリルによる影響を調べるために、分散分析 (ANOVA) を用いた統計解析を行った。しかし、*Hd3a* 発現量および花成時期のどちらにおいても有意な関連は見出されなかった。以上の結果から、*Ehd1* は栽培イネ集団内で高度に保存されていると考えられる。

III-4-2 *Hd1* 翻訳領域のシーケンス解析

Hd1 の翻訳領域は 2 つのエキソンから構成されており、その全長は 1224bp となる。*Hd1* の翻訳領域についてシーケンス解析を行ったところ、全部で 17 つのアリルを同定することができた (図 8A)。このうち Type1 と 4 および Type15 と 17 の *Hd1* アリルはそれぞれ同様のアミノ酸配列を示すため、タンパク質としては 15 種類が同定された。非常に興味深いことに、これらのアリルの中には、*Hd1* の CCT ドメインに大きく影響を与えると思われる塩基の変化を示すものが複数見出された。このような変異としては、矢野らがインド由来の *Kasalath* において見出した 2bp の欠失が既に報告されている。この欠失で生じたフレームシフトにより、C 末端側の CCT ドメインが完全に失われている。今回の解析において見出されたアリルの内、*Kasalath* の有する *Hd1* アリルは Type13 に分類されている。また、Type14 から 17 においても同様の 2bp の欠失を持っている。そして本研究結果から、この既に報告されているアリルに加え、さらに 4 種類のアリルが見出された。Type2、3、7 の *Hd1* アリルはそれぞれ 1bp または 4bp の欠失によりフレームシフトが生じ、この結果 CCT ドメインを完全にまたは一部を失っている (図 8B)。また、Type12 のアリルについては CCT ドメインの途中に生じたチミンからシトシンへの塩基置換がナンセンス変異の原因となっていた。CCT ドメインは *Hd1* の核局在およびタンパク質相互作用に重要な役割を果たしていることが報告されている。またシロイヌナズナの *Hd1* オーソログである *CONSTANS* を用いた実験からも、CCT ドメインの欠失がタンパク質機能に非常に重要であることが示されている (Robson *et al.*, 2001)。以上のことから、CCT ドメインが失われたこれらの *Hd1* は機能が著しく低下、もしくは欠損していると考えられる。

そこで、これらのアリルのコードする *Hd1* タンパク質が実際に機能を保持もしくは欠損をしているか否かを調べるために、イネプロトプラストを用いたレポータージーンアッセイを試みた。短日条件下の植物体内での *Hd1* は

A *Hd1* coding region



B

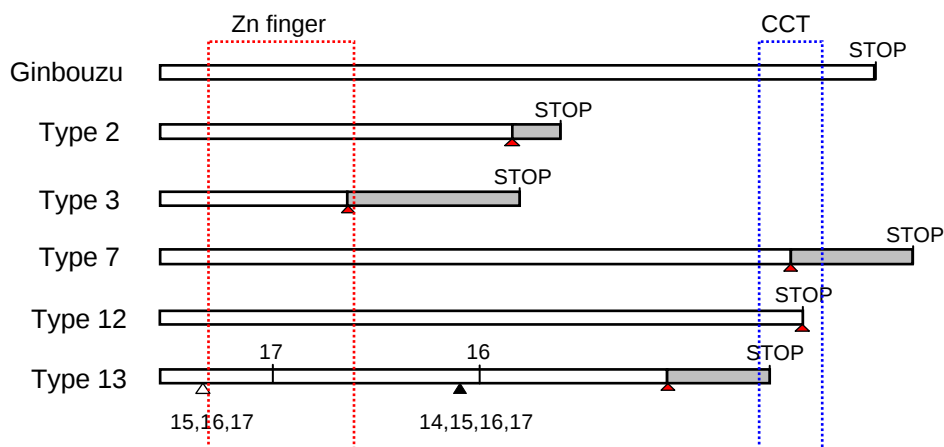


図8 *Hd1*翻訳領域における塩基多型

- A *Hd1*翻訳領域で見出された塩基多型の位置を示している。欠失は白矢頭、挿入は黒矢頭そしてリピート箇所は灰矢頭で示す。Zn-finger domainおよびCCT domainはそれぞれ赤と青のボックスで示してある。*Hd1*タンパク質機能低下に影響を与える原因となる塩基多型は表中に赤で示した。
- B CCTドメインを欠失したnon-functional *Hd1*アレルの構造。原因となった塩基変化の位置は赤矢頭で示す。灰色の領域はフレームシフトによるアミノ酸配列の変化した領域を示している。白と黒の矢頭はそれぞれ各アレルの欠失と挿入の位置を示している。

Hd3a プロモーターを正に制御するが、それとは逆にイネプロトプラスト内においては過剰発現させた機能的な *Hd1* は *Hd3a* プロモーター活性を抑制することが報告されている (Hayama *et al.*, 2003)。そこで本解析においては、各アリのコードする *Hd1* タンパク質の機能をルシフェラーゼの発光活性の抑制によって評価した。ベクターコントロールとして *Hd1* アリの代わりにはビアラフォス耐性遺伝子 (*Bar*) を挿入したプラスミドを用いた。この結果、CCT ドメインが保存させている *Hd1* アリにおいてはルシフェラーゼの活性抑制が見られた。またこれに対して、CCT ドメインが失われていた *Hd1* アリにおいては低い抑制活性が見られ、生細胞内で機能の著しい低下もしくは欠損を確認することができた (図 9)。しかし、同じタイプの欠損を持つアリ間でも発光活性にばらつきが見られることから、本解析ではアリ間の微妙な活性の違いを評価することは難しいと思われる。そこでこれらの *Hd1* アリを一括して今後 Functional、Non-functional アリと分類した。さらに Non-functional *Hd1* アリを持つ品種は Functional *Hd1* アリを持つ品種よりも低い *Hd3a* 発現量および遅咲きの表現型を示す傾向にあった (図 10A)。またそれぞれのアリグループにおける平均では花成時期および *Hd3a* 発現量の両方において有意な差が確認された (図 10B)。以上の結果より、イネ品種間での花成時期の多様性をもたらす主な原因の一つが、*Hd1* 翻訳領域においてタンパク質機能に大きく影響を与える高頻度の塩基変化である事が示唆された。

III-5 *Hd1* とは独立した花成時期多様化への影響

これまでの結果より、*Hd1* における塩基多型がイネの花成時期の多様化に大きく影響していることを示した。しかし、依然として Functional、Non-functional アリと分類したそれぞれのグループ内においても品種間で花成時期および *Hd3a* 発現量にばらつきが見られる。そこで、この原因として考えられるいくつかの可能性について解析を試みた。

III-5-1 *Hd3a* プロモーター領域のシーケンス解析

まず、*Hd3a* 発現量の多様性をもたらす要因としてプロモーター領域に注目した。解析は 5'-UTR 領域を含む翻訳開始地点から上流 2121 bp 領域を対象として行った。この領域は本研究室におけるこれまでの報告から、内在性の *Hd3a* 発現パターンを模倣できることが確認されている。この領域におけ

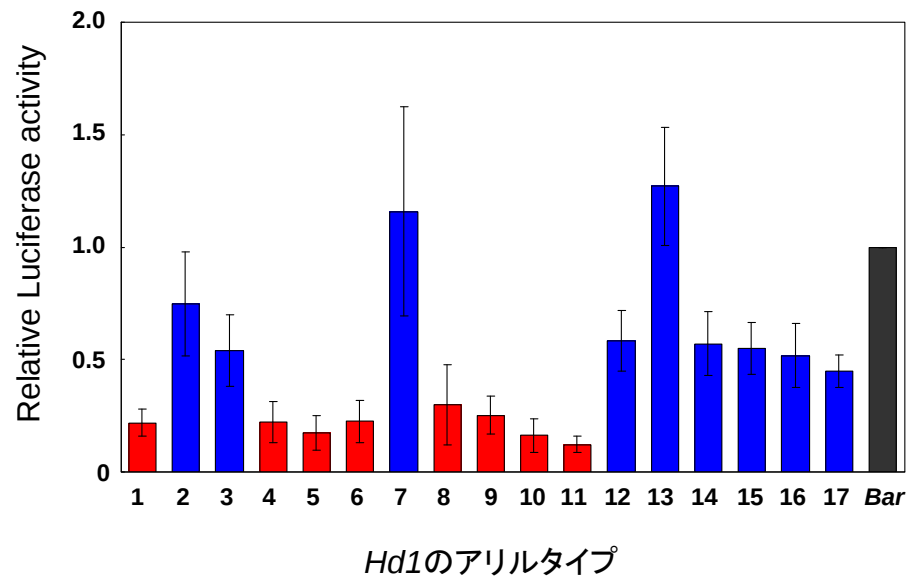


図9 レポータージーンアッセイを用いたHd1アリルの機能評価

Functional Hd1アリルは赤で、Non-functional Hd1アリルは青で表している。それぞれの発光量はサンプルのタンパク量 1 ugあたりの量として標準化し、ベクターコントロール35S::Bar (ビアラフォス耐性遺伝子)における発光量との割合として評価した。y誤差範囲は標準偏差を示す。n = 12-16。

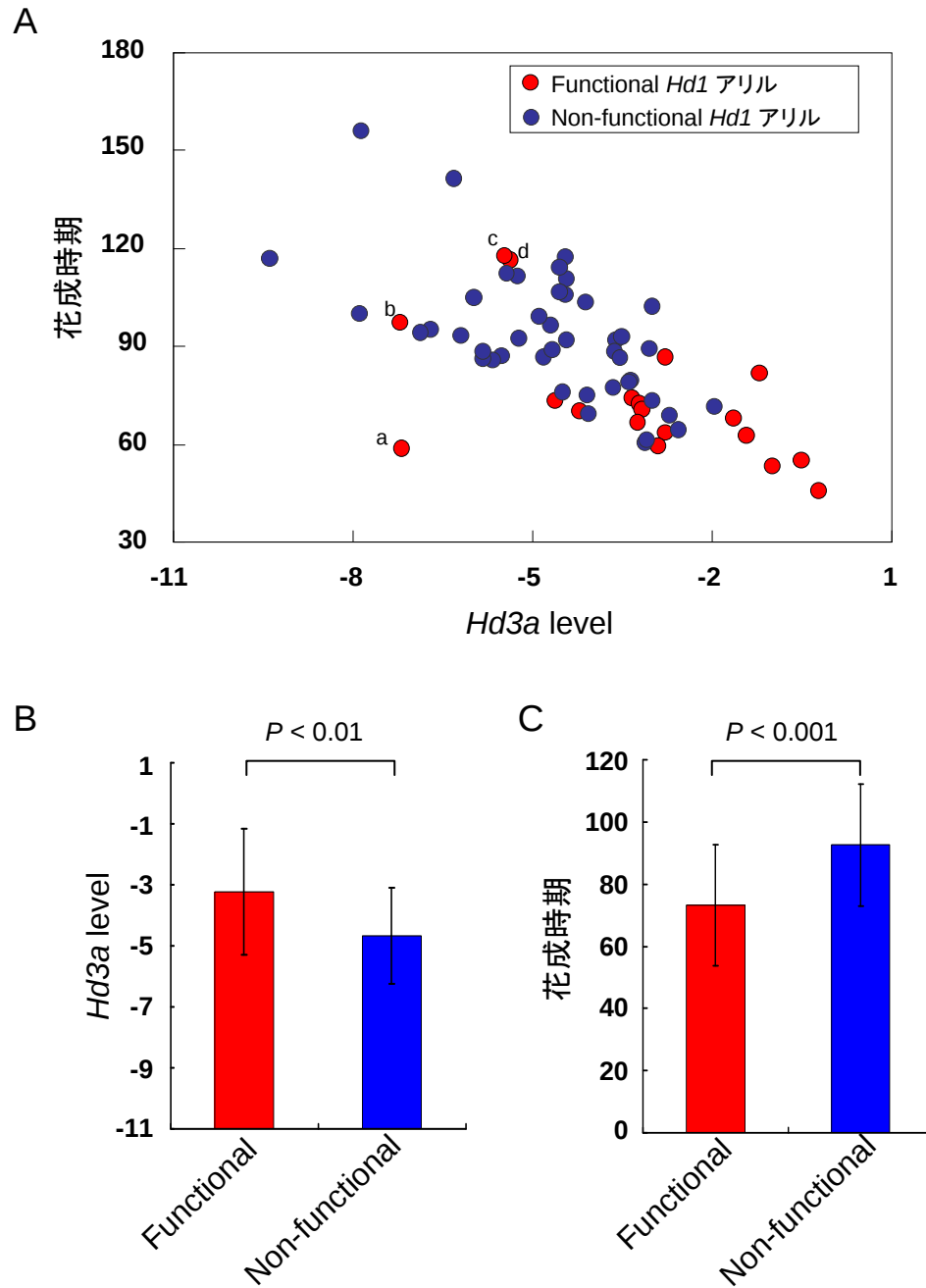


図10 *Hd1*機能における花成時期および*Hd3a*発現量への影響

- A *Hd3a*発現量と花成時期の相関グラフにおける、各*Hd1*アリの分布。Non-functional *Hd1*アリを持つ品種は低い*Hd3a*発現量及び遅咲きの表現型を示す傾向が見られた。a, RYOU SUISAN KOUMAI品種; b, KHAU TAN CHIEM品種; c, KEMASIN品種; d, BINGARA品種
- B Functional *Hd1*アリとNon-functional *Hd1*アリにおける*Hd3a*発現量の比較。
- C Functional *Hd1*アリとNon-functional *Hd1*アリにおける花成時期の比較。y誤差範囲は標準偏差を示す。

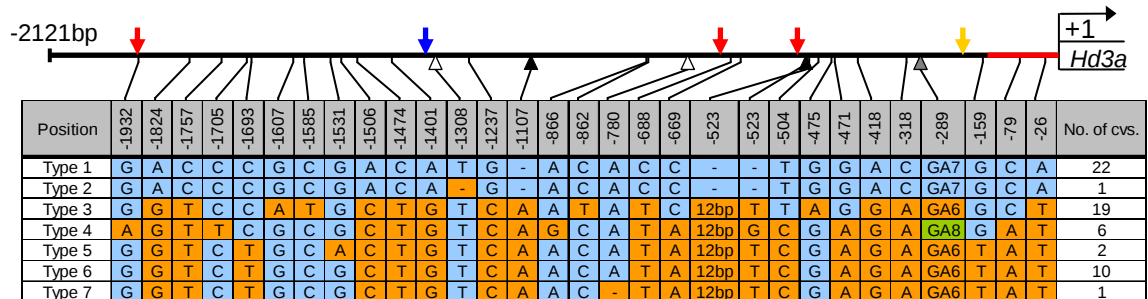
るシーケンス解析の結果、7つのハプロタイプが同定された (図 11A)。*Hd3a* プロモーター領域に関しては、*Hd3a* 発現制御に重要とされるシス配列が現時点では同定されていない。そこでいくつかのアプローチから *Hd3a* プロモーターのハプロタイプと花成時期および *Hd3a* 発現量の多様性の関連を調査した。

まず、*Hd3a* の上流因子 *Hd1* と *Ehd1* から予測される2種類のシス配列に注目した。まず *Hd1* についてはシロイヌナズナにおけるオーソログである CONSTANS が HAP (HEME ACTIVATOR PROTEIN) と複合体を形成する可能性が報告されている (Wenkel *et al.*, 2006)。この HAP 複合体は DNA 上の CCAAT 配列への結合能を有している。このことから *Hd1* においても *Hd3a* プロモーター上の CCAAT-box をターゲットにしている可能性が考えられる。もう一方、*Ehd1* の持つ GARP ドメインは DNA 結合活性を有しており、このドメインは ARR1-binding element を標的にしていることが報告されている (Sakai *et al.*, 2000)。このことから、*Ehd1* は *Hd3a* プロモーター上の ARR1-binding element に結合し、*Hd3a* 発現制御を行っている可能性が考えられる。そこで、この2種類のシス配列について PLACE (plant cis-acting regulatory DNA elements) データベースを用いて検索を行った (Higo *et al.*, 1999)。この結果、*Hd3a* プロモーター上に CCAAT-box は1箇所と ARR1-binding element は3箇所見つかった (図 11A)。この内、塩基置換が見られたのは上流-1932 bp における ARR1-binding element のみであった。さらに、この塩基置換は Type4 *Hd3a* プロモーター(6品種)のみでしか見られなかったことから、花成時期および *Hd3a* 発現量の多様化を説明するには不十分であると考えられる。

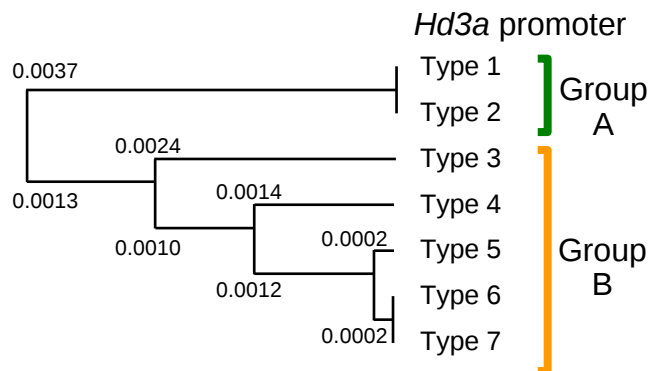
次に、それぞれのハプロタイプ間で花成時期および *Hd3a* 発現量に関連が見出せるかを調べるために、多重比較検定を行った。それぞれのハプロタイプを持つ品種にはばらつきがあるため、検定にはデータ数や分散、分布に制限の無い Scheffe's F test を用いた。しかし、それぞれのハプロタイプ間で花成時期および *Hd3a* 発現量のどちらにおいても有意な差は検出されなかった。

最後に、*Hd3a* プロモーター上で見られる塩基多型がハプロタイプ間で均一ではなく偏りがあることに注目し、それぞれの配列を比較した系統樹を作成した。この結果、Type 1、2 と Type 3-7 の2つのクレードに分類されることが見出された (図 11B)。そこで、これらを Group A、B と分類しそれぞれの花成時期および *Hd3a* 発現量について比較したところ、*Hd3a* 発現量について有意な差が見られた ($p < 0.05$) (図 11C)。もう一方、それぞれの塩基多型に注目し、*Hd3a* 発現量とのアソシエーション解析をおこなった。-1531 bp、

A *Hd3a* promoter region



B



C

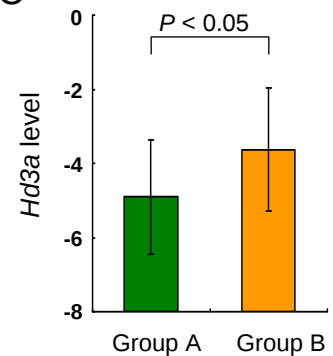


図11 *Hd3a*プロモーター領域におけるシーケンス解析

- A *Hd3a*プロモーター領域における塩基多型の位置を示している。5'-非翻訳領域は赤線で示してある。欠失は白矢頭、挿入は黒矢頭そしてリピート箇所は灰矢頭を示す。ARR1-binding elementは赤、CCAAT-boxは青、TATA-boxは黄色の矢印でそれぞれ表している。
- B *Hd3a*プロモーターハプロタイプの系統樹。系統樹はGENETYX program ver.7 を用いてUPGMA法で作成された。数字は遺伝距離を示す。
- C Group A、Bで分類された品種グループにおける*Hd3a*発現量の平均の比較。発現量は自然対数で表している。y誤差範囲は標準偏差を示す。

-1308 bp、-780 bp で Group A、B と分類した結果とは顕著に異なった *Hd3a* 発現量の差が見られたが、これはデータ数が極度に偏っている事が原因であると考えられ、この塩基置換が原因である可能性は低いと考えられる (図 12)。

以上の結果から、今回は直接的な原因を見出すことは出来なかったが、潜在的に *Hd3a* プロモーターにおける塩基多型がイネ品種間での *Hd3a* 発現量の多様性をもたらしている原因のひとつである可能性が示唆された。

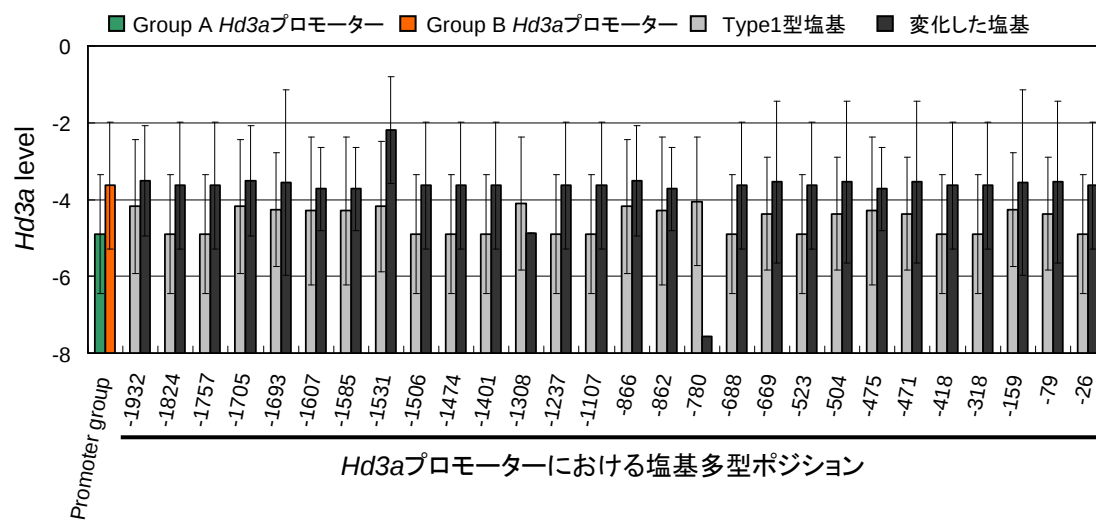
III-5-2 *Ehd1* 発現量の影響

OsMADS51-Ehd1 は *Hd1* とは独立して短日条件下で *Hd3a* の発現を制御する経路である。*Ehd1* に関しては本研究におけるこれまでの結果から、アミノ酸配列は品種間で高度に保存されていたが、遺伝子発現量に関しては品種間で幅広い発現量を示し、*Hd3a* 発現量との間に緩やかであるが有意な相関関係が見出されていた ($r = 0.462$, $p < 0.01$) (図 5D; 表 3)。そこでこの相関関係に注目し、それぞれ Functional、Non-functional *Hd1* アリルを持つ品種のグループで分けて解析を行った。この結果、*Ehd1* 発現量と *Hd3a* 発現量における相関関係は Functional *Hd1* アリルを持つ品種グループでは $r = 0.489$ ($p < 0.05$)、Non-functional *Hd1* アリルを持つ品種グループでは $r = 0.314$ ($p < 0.05$) であった。以上の結果より、それぞれのグループ間で相関係数 (r) の値に差はあったが、有意な相関関係が見出された。このことから、それぞれの品種間でみられた幅広い *Ehd1* 発現量は *Hd1* とは独立して *Hd3a* 発現量の多様化に影響していると考えられる。

III-5-3 *Ehd1* プロモーター領域のシーケンス解析

Ehd1 の発現量の多様化をもたらしている原因を明らかにするために、*Ehd1* プロモーター領域に注目しシーケンス解析を試みた。解析は 5'-UTR 領域を含む翻訳開始地点から上流 2067 bp 領域を対象として行った。この結果、9 つのハプロタイプが同定された (図 13A)。*Ehd1* プロモーター領域についても、*Ehd1* の発現制御に重要とされるシス配列が現時点では同定されていない。そこで、*Ehd1* 発現量と花成時期との相関グラフにおける各 *Ehd1* プロモーターハプロタイプの分布を調べた。この結果、それぞれのアリルにおける顕著な偏りは見出されなかった (図 13B)。そこで次に、それぞれのハプロタイプと *Ehd1* 発現量の関連を調べるために、多重比較検定を行った。Scheffe's

A



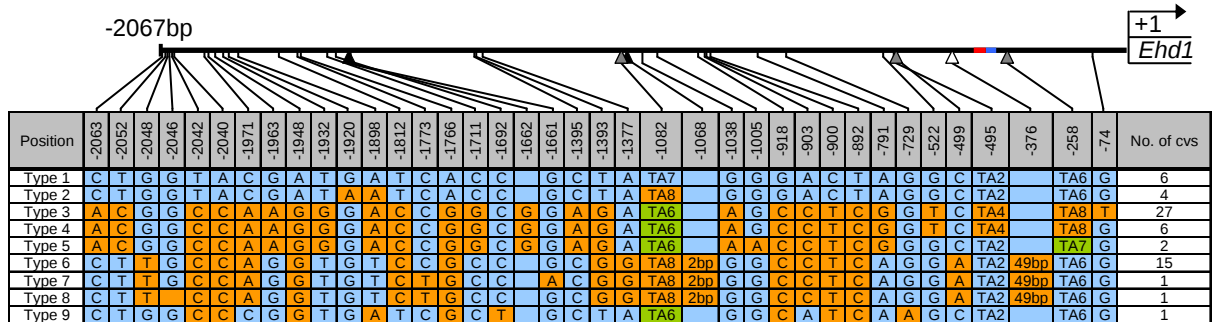
B

Position	-1932	-1824	-1757	-1705	-1693	-1607	-1585	-1531	-1506	-1474	-1401	-1308	-1237	-1107	-866	-862	-780	-688	-669	-523	-504	-475	-471	-418	-318	-159	-79	-26
Type 1型塩基	55	23	23	55	48	42	42	59	23	23	23	60	23	23	55	42	60	23	42	23	42	42	42	23	23	48	42	23
変化した塩基	6	38	38	6	13	19	19	2	38	38	38	1	38	38	6	19	1	38	19	38	19	19	19	38	38	13	19	38

図12 Hd3aプロモーター領域における塩基多型ごとの解析

- A 各ポジションにおける塩基多型について品種をグループ化し、それぞれのHd3a発現量の平均を比較した。発現量は自然対数で表している。y誤差範囲は標準偏差を示す。
- B 塩基多型についてグループ化された品種数。

A *Ehd1* promoter region



B

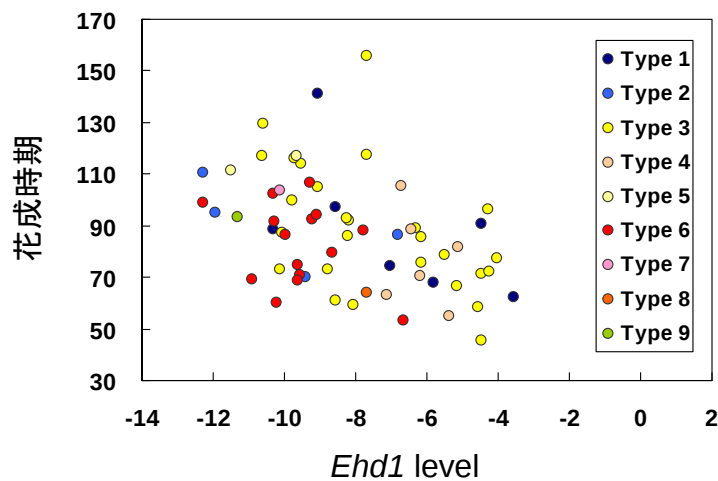


図13 *Ehd1*プロモーター領域における塩基多型

- A *Ehd1*プロモーター領域で見出された塩基多型の位置を示している。欠失は白矢頭、挿入は黒矢頭そしてリピート箇所は灰矢頭で示す。赤線と青線で示してある領域はTAおよびGAリピートを示すが、リピート回数の決定が困難であったため解析対象から除いた。
- B *Ehd1*発現量と花成時期の相関グラフにおける、それぞれの*Ehd1*プロモーターハプロタイプを有する品種の分布。

F test を用いて検定を行った結果、*Ehd1* プロモーターのハプロタイプ間では *Ehd1* の発現量に有意な関連を見出すことが出来なかった。この結果より、*Ehd1* プロモーター領域における塩基多型による *Ehd1* 発現量の多様化の影響は少ないと考えられる。

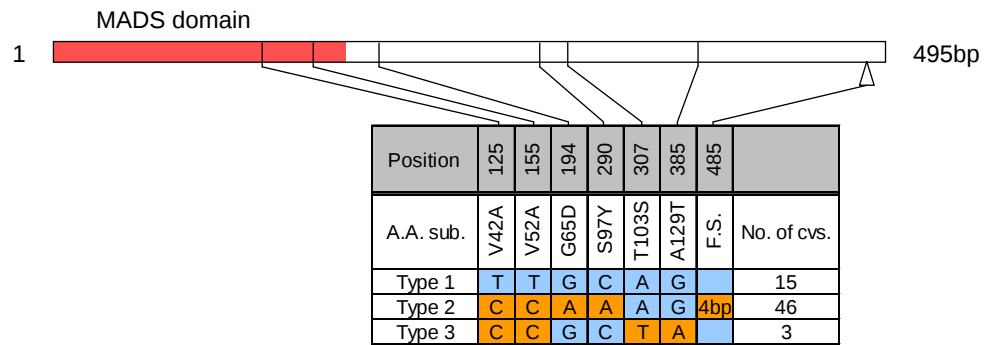
III-5-4 *OsMADS51* 翻訳領域のシーケンス解析

Ehd1 の発現量の多様化をもたらしているもう一方の原因の候補として *OsMADS51* の翻訳領域に注目した。*OsMADS51* は短日条件下で *Ehd1* 発現を正に制御する事が報告されている。これまでの結果から、*OsMADS51* の発現量は品種間で顕著な変化は見られなかった。したがって、*OsMADS51* タンパク質の品種間での活性の違いが *Ehd1* 発現量の多様化をもたらしている事が推測される。そこで、シーケンス解析により *OsMADS51* 翻訳領域における塩基多型を調査した。*OsMADS51* は SRF-like MADS ドメインを有する Type I MADS-box 遺伝子であり、翻訳領域の全長は 495 bp である。この領域における解析の結果、3つのアリルが同定された (図 14A)。またこの領域における塩基の変化は全てアミノ酸の変化を伴うものであった。特に Type 2、3 *OsMADS51* アリルでは、MADS ドメイン内では 125bp、155bp の位置でバリンからアラニンへのアミノ酸置換が生じていた。さらに、Type 2 *OsMADS51* アリルでは 3'末端側の 485 bp において 4 塩基欠失によるフレームシフトが生じていた。このように、それぞれのアリルにおいてタンパク質活性に影響を与える可能性のある塩基多型が見出された。そこで、*Ehd1* 発現量と花成時期との相関グラフにおける各 *OsMADS51* アリルの分布を調べた。この結果、それぞれのアリルにおける顕著な偏りは見出されなかった (図 14B)。さらに、Scheffe's F test を用いてこれらの *OsMADS51* アリルにおける *Ehd1* 発現量の影響を検定した。しかし、この結果においてもアリル間での有意な差は見られなかった。以上の結果から、*Ehd1* 発現量の多様化について *OsMADS51* 翻訳領域における塩基多型の影響は少ないと考えられる。

III-6 コアコレクション各品種の光中断の応答性

光中断は連続した暗期を光照射により中断することで、開花が遅延する現象として知られている。イネにおける光中断の分子的メカニズムは、光中断による光シグナルは光受容体 phyB を介し *Hd3a* の発現抑制を行う。またこ

A *OsMADS51* coding region



B

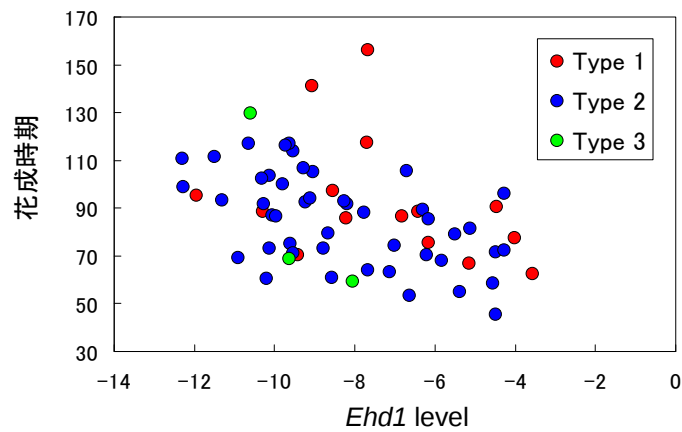


図14 *OsMADS51*翻訳領域における塩基多型

- A *OsMADS51*翻訳領域で見出された塩基多型の位置を示している。欠失位置は白矢頭で示す。赤のボックスはMADSドメインを表している。
- B *Ehd1*発現量と花成時期の相関グラフにおける、それぞれの*OsMADS51*アレルを有する品種の分布。

の *Hd3a* 発現抑制は *Hd1* の転写後の制御を受けていると考えられている。そこで、イネ品種間での光中断による *phyB* を介した *Hd3a* 発現抑制応答の変化を調査するためにイネコアコレクション全ての品種に対して光中断処理を行った。光中断反応は短日条件下における *Hd3a* 発現量と光中断処理後の *Hd3a* 発現量を比較し、その発現抑制率によって評価した。この結果、光中断による *Hd3a* の発現抑制はほぼ全ての品種において観察された (図 15)。またその大半が 50%以上の発現抑制率を示していた。このことから、光中断反応はイネ品種で普遍的な応答であることが示唆され、*phyB* を介した *Hd3a* 発現制御機構は品種間で高く保存されていることが考えられる。

III-7 花成時期および *Hd3a* 発現量の多様化における線形モデル解析

これまでの解析の結果から *Hd1* 翻訳領域、*Hd3a* プロモーター領域そして *Ehd1* 発現量といった要因の品種間における多様性が花成時期の多様性をもたらす原因として示唆された。そこで、これらの3つの要因が花成時期の多様化にどれほど寄与しているのかを算出する事を試みた。本解析は総合研究大学院大学・葉山高等研究センターの印南秀樹博士および手島康介博士との共同研究によって行った。それぞれの要因の寄与率は、以下のモデル式から線形モデル解析によって算出を試みた。

$$\begin{aligned}
 \text{花成時期} &= \text{Hd1 機能 (の効果、以下同様)} \\
 &+ \text{Hd3a プロモータータイプ} \\
 &+ \text{Ehd1 発現量} \\
 &+ \text{Hd1 機能} \times \text{Hd3a プロモータータイプ} \\
 &+ \text{Hd3a プロモータータイプ} \times \text{Ehd1 発現量} \\
 &+ \text{Ehd1 発現量} \times \text{Hd1 機能}
 \end{aligned}$$

解析の結果、*Hd1* アリルの多型、*Hd3a* プロモータータイプの多型そして *Ehd1* 発現量によってイネ品種の示す花成時期の多様性の 26.6%が説明できる事が示された。残りは、データ採取における実験的、生物学的なばらつきやエラー、またその他の説明できない遺伝的、環境的な要因等が含まれている。これらの要因における寄与の内訳は、それぞれ 44.8 %、16.7 % そして 38.5 %であると算出された。このことから花成時期の多様化において *Hd1* における塩基多型が大きく影響している事が示された。またこれに対して、*Hd3a*

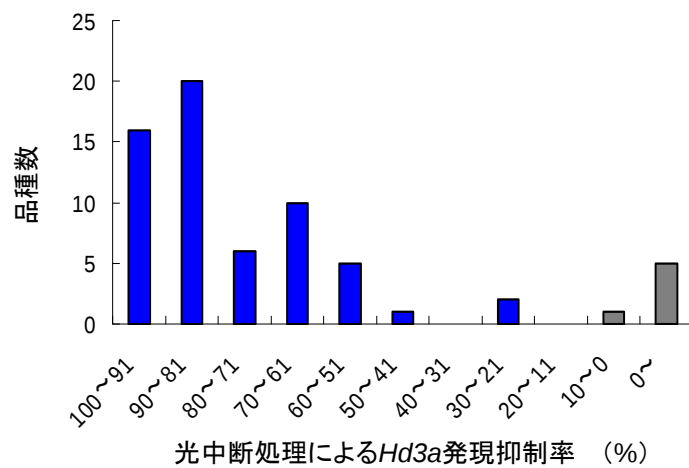


図15 コアコレクションにおける光中断反応

コアコレクションにおける発現抑制率のまとめ。結果はヒストグラムで表してある。発現抑制が確認された品種を青、確認されなかった品種を灰で表した。

発現量の多様性に対する寄与率として同様の解析を行った結果、*Hd3a* 発現量の多様性の 44.8 %がこれら 3 つの要因によって説明できる事が示された。さらにこれらの要因の寄与率の内訳はそれぞれ 24.7 %、48.3 %そして 27.0 %であった。この事から *Hd3a* 発現量の多様化においては *Hd3a* プロモーターにおける塩基多型が最も大きく影響している事が示された。以上の結果から、*Hd3a* プロモーターは *Hd3a* 発現量の多様化に対する直接のターゲットになっているのに対して、*Hd1* および *Ehd1* は *Hd3a* に加え、他の要因を介し花成時期の多様化に影響していることが考えられる。以上の解析から、花成時期および *Hd3a* 発現量の多様性をもたらすそれぞれの要因の貢献の度合いを示すことが出来た。

IV 考察

IV-1 栽培イネにおける花成時期の多様性をもたらす分子機構

IV-1-1 栽培イネにおける花成時期の多様性

イネの栽培化の過程において、耕作地域の拡大に大きく貢献した形質の一つが日長に応答した花成時期の多様化であると考えられている。実際に本研究で用いたコアコレクションに含まれる 64 品種においても、一定の日長条件下で生育させたにも関わらず非常に幅広い花成時期を示した (図 4)。この 64 品種のイネのほとんど、それぞれの地域の生育環境に適した在来種である。この事からも、近代育種が行われる前からイネを栽培するにあたり日長に応答した花成誘導反応の多様化が重要な役割をしていた事が裏付けられる。

IV-1-2 *Hd1* アリルの多様性

本研究における結果から、栽培イネの花成時期の多様性をもたらす主要因の一つが、*Hd1* の翻訳領域におけるタンパク質活性に影響を与える塩基多型である事が示された。非常に興味深い点としては、この領域においてタンパク質活性に影響を与える塩基多型が独立して複数同定された事が挙げられる。これまでに *Hd1* における変異はインド由来の *Kasalath* で同定された 2bp 欠失によるフレームシフト変異および台湾由来の *Taichung 65* (台中 65 号) で見出されたレトロエレメント様断片 (1901 bp) の挿入による機能低下などが報告されていた (Yano *et al.*, 2000; Doi *et al.*, 2004)。そしてこれに加え本研究の解析から新たに 4 つの変異が同定された (図 8)。一方これに対して、*OsMADS51*、*Ehd1*、*Hd3a* に関しては少なくとも調査した 64 品種においてはタンパク質の活性は高度に保存されている事が示された。このように、花成関連遺伝子でも特に *Hd1* において高頻度にタンパク質活性に影響を与える塩基多型が集中している事から、*Hd1* がイネ品種における花成時期の多様化のターゲットになっていたのではと考えられる。

今回の解析により *Hd1* で見出された高頻度の塩基多型はイネの栽培化の過程でどのような変遷を辿ったのであろうか？特に、この高頻度な塩基多型が栽培化の過程で蓄積したものであるのか、それとも既に存在していた多様な *Hd1* アリルを有した野生イネがそれぞれ独立して選抜され栽培イネとして固定したのかという疑問が挙げられる。栽培イネ (*O. sativa*) には 2 つの亜種インディカとジャポニカが存在する。これまでの報告から、これらは *O.*

nivara と *O. rufipogon* の 2 つの起源種から別々に進化してきたことが強く示唆されている (Cheng *et al.*, 2003)。また、それぞれの *Hd1* アリルの内訳もインディカ型とジャポニカ型品種で強い偏りがある事から、栽培化以前の時点で既にこの遺伝子座における多型は存在していたのではないかと推測される。今後は幾つかの野生イネおよび近縁種を解析することでこの問題に迫れるかもしれない。もう一方で、Functional、Non-functional *Hd1* アリルで分類した際の、地理的分布を調べた結果、顕著な勾配は見られなかった (図 16)。この理由として、環境的要因に加えて人為的な伝播の影響などが大きいと考えられる。また考えられる他の問題点として、コアコレクションそれぞれの品種における由来に関する情報が国でしかないこと、またそれぞれの品種の詳細な系譜が不明である事が挙げられる。今後は本研究で得られたシーケンス情報を元に、詳細な由来および系譜の明らかになっている品種に注目して解析を行う事で、イネの栽培化における耕作地域の北上化に関する分子的な知見として有用な情報を得られる事が期待される。

IV-1-3 *Ehd1* 遺伝子発現量の多様性

花成時期の多様性をもたらす要因として、*Ehd1* 発現量が深い関係があることが示された。そこで *Ehd1* 発現量の多様性をもたらす原因として、*Ehd1* プロモーター領域および上流因子である *OsMADS51* 翻訳領域のシーケンス解析を行った。しかし、多様な *Ehd1* 発現量との間に有意な関係は見出されなかった。これに関しては、今回の解析の対象以外の要因の存在が考えられる。考えられる要因の一つとして、*RID1/Ehd2/OsID1* が挙げられる。*RID1/Ehd2/OsID1* はトウモロコシ *ID1* のイネにおけるオーソログで *Ehd1* の発現量を制御する因子として最近報告された (Wu *et al.*, 2008; Matsubara *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008)。*RID1/Ehd2/OsID1* は短日条件下で *Ehd1* 発現を正に制御することが報告されており、*Ehd1* 発現量の多様性をもたらす要因として有力な候補である。また、トウモロコシ *ID1* は転写因子として機能し、DNA 上の TTTTGTCG/C 配列に特異的に結合することが報告されている (Kozaki *et al.*, 2004)。これに関しては、*Ehd1* プロモーター領域においてこの配列の存在を調べたが、トウモロコシで報告されている配列はいずれも見出すことは出来なかった。トウモロコシとイネでは花成誘導経路での *ID1* の機能する分子機構が異なっていることが考えられる。

また *Ehd1* は短日条件下のみなく長日条件下（非短日条件）での花成誘導においても重要な役割を果たしている。この際、*Ehd1* を制御する因子として *OsMADS50* および負の制御因子として *Ghd7* が報告されていることから

(Lee *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2008)、発現量の多様化にはこのような因子の影響を受けている可能性も考えられる。

IV-1-4 *Hd3a* プロモーター領域におけるシス配列の同定

Hd3a プロモーターのハプロタイプを A、B と分類して解析した結果から、*Hd3a* 発現量の多様性をもたらす要因が *Hd3a* プロモーター領域にある事が示唆された (図 11)。これに関しては、詳細なシス配列に関する知見が不足しているため、現時点ではその原因となる塩基多型を同定する事は出来なかった。さらに、個々の塩基多型に注目して解析を行ったが、ハプロタイプを A、B と分類して解析した結果とほぼ同様の結果が得られた。原因同定のための簡便な手法としてイネプロトプラストを用いたトランジェント解析が挙げられるが、上流因子 Hd1 をエフェクターとして用いた場合では表現型が発現抑制となるためプロモーター活性の評価が難しいと考えられる。今後は形質転換体の作出など、他のプロモーター活性評価系を構築する必要がある。

もう一方で、*Hd3a* 発現量の多様性をもたらす要因として、*Hd3a* プロモーター領域で見出された多型と強く連鎖した他の領域に原因がある可能性も否定できない。NIPPONBARE 品種と KASALATH 品種を用いた *Hd3a* 遺伝子座における準同質遺伝子系統の解析から、プロモーター領域下流の領域に *Hd3a* 発現量および花成時期の制御をする原因があることも示唆されている (Kojima *et al.*, 2002)。本研究の結果から翻訳領域は品種間で高く保存されていた事から、イントロン領域を中心にした今後の解析により新たな知見が得られる可能性が期待される。

IV-1-5 光中断応答からみられる感光性の違い

本研究結果から、光中断反応はイネ品種で普遍的な応答であることが示唆され、phyB を介した *Hd3a* 発現制御機構は品種間で高く保存されていることが示唆された。そこでさらに、Functional、Non-functional *Hd1* アリルを有する品種で分類し光中断反応の表現型を調査した。この結果、Functional *Hd1* アリルを有するグループは Non-functional *Hd1* アリルを有するグループと比べ、光中断処理によって減少する *Hd3a* 発現量の幅が大きい事が見出された (図 17)。この結果より、*Hd3a* 発現量の大幅な減少を示す Functional *Hd1* アリルグループは光中断処理による花成遅延の影響を受け易いのに対して、比較的少ない *Hd3a* 発現量の減少を示す Non-functional *Hd1* アリルグループは逆

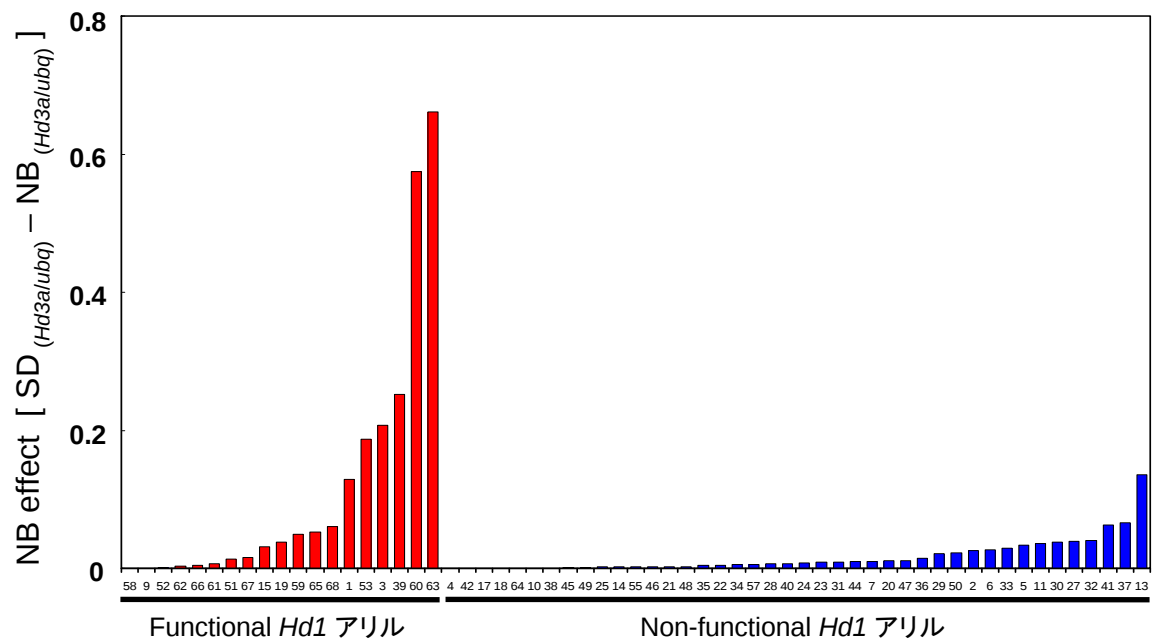


図17 *Hd1*アリル機能別での光中断応答の違い

y軸は短日条件下における*Hd3a*発現量と光中断処理後の*Hd3a*発現量の差を表している。

に光中断処理による影響を受けにくいことが示された。これは、2つのアリルグループ間での感光性に対する花成誘導反応の違いを表していると考えられる。

IV-1-6 線形モデル解析の考察

解析から花成時期および *Hd3a* 発現量の多様性をもたらすそれぞれの要因の貢献の度合いを示すことが出来た。遺伝子発現解析の結果から、花成時期と *Hd3a* 発現量の多様性の間には相関関係があることが示されていたが、線形モデル解析の結果ではそれぞれの因子の寄与率の値に違いが見られた。この原因として、*Hd3a* プロモーター領域の多型の影響は *Hd3a* 発現が直接的なターゲットであるのに対して、*Hd1* アリルと *Ehd1* 発現量は *Hd3a* 発現量のみでなく他の要因も介して花成誘導に影響しているのではないかと推測される。*RFT1* は *Hd1* および *Ehd1* の影響を受け、*Hd3a* とはリダンダントに花成を誘導する事から (Doi *et al.*, 2004; Komiya *et al.*, 2008)、ここで挙げた他の要因の候補として有力であると考えられる。今回の解析からは、*RFT1* の花成時期多様化への影響は見出されなかったが (図 5F)、今後この要因に注目して解析を進める事は興味深いと思う。

もう一方で、未だ説明のつかない影響が多く残っている。この影響には、土壌や温度などの生育環境条件による影響やデータ採取における実験的、生物学的なばらつきやエラー等も含まれている。現時点で考えられる要因の一つとして、それぞれの *Hd1* アリルの微妙な活性の違いによる影響が挙げられる。本研究ではそれぞれの *Hd1* アリルをその機能活性から大きく Functional、Non-functional と大別して解析を行った。しかし、それぞれのアリルのコードするタンパク質の構造は様々であり (図 8)、これらの活性にはさらに微妙な差があると考えられる。ルシフェラーゼ発光を利用したレポータージーンアッセイを用いてそれぞれのアリルの *Hd1* タンパク質活性の評価も試みたが、同じタイプの欠損を持つアリル間でも発光活性にばらつきが見られ、アリル間の微妙な活性の違いを評価することは出来なかった。また、Type13-17の *Hd1* アリルは同じタイプの変異を持つが(871bpにおける2塩基欠失)、Type 13とType 14-17の間ではルシフェラーゼ発光に大きな差があった (図 9)。この原因の一つとしては、Type14-17で見られる52アミノ酸の挿入が影響しているのではないかと推測される (図 8)。しかし、このアミノ酸挿入の影響はプロトプラストを用いた過剰発現実験で特異的に見られるものなのか、実際の植物体内でも同様の影響を及ぼすのかは現在のところ不明である。

実際に Type13-17 の *Hd1* アリルを持つそれぞれの品種間でも *Hd3a* 発現量には幅広いばらつきが見られている (図 18)。それぞれの *Hd1* タンパク質の活性の違いを正確に評価するためには、現時点では *hd1* 変異体に *native Hd1* プロモーターを用いてそれぞれのアリルを導入した形質転換体もしくは、準同質遺伝子系統を作成する必要があると考えられる。

IV-2 新規な花成誘導機構

本研究で解析した品種には、これまで報告されている既知の制御機構に当てはまらない品種が幾つか見出されている。これらの品種に注目して詳細に解析することで、新規の花成誘導因子の同定の可能性が期待される。その手掛かりの一つに中国由来の品種である Ryou Suisan Koumai (RSK) が挙げられる。この品種は *Hd3a* 発現量と花成時期の相関関係から大きく外れた表現型を示している (図 5)。興味深いことに、RSK は著しく低い *Hd3a* 発現量を示しながら約 58.5 日と極めて早咲きの表現型を示す。この品種に関しては、これまでに *RFT* の遺伝子発現量が著しく高発現していることを我々は見出している (図 19)。もしかしたら、いくつかの品種においては、*Hd3a* に依存しない花成促進経路を用いている可能性があるかもしれない。今後この原因を追究することは、新規花成促進経路の発見につながる可能性もあり興味深い。

もう一方で *Hd1* 活性と花成時期の間に相関が見られない品種として KHAU TAN CHEM、KEMASIN そして BINGARA が挙げられる (図 10)。これらの品種は Functional *Hd1* アリルを有しているにも関わらず、非常に低い *Hd3a* 発現量を示している。そこで、それぞれの *Ehd1* 及び *Hd1* の遺伝子発現量に注目したが、どちらにおいても特別な異常値は示しておらず、相関から外れている理由を説明できるものではなかった。これらの品種に関しては、*Hd1* タンパク質が *Hd3a* の遺伝子発現を制御する機構のどこかに原因があると予測できるが、現時点ではこの機構は未知である。今後これらの品種を手掛かりとして、その機構を明らかにする事は非常に興味深いと考えている。

IV-3 シロイヌナズナとの比較

本研究ではイネの光周性花成誘導経路における花成時期の多様性をもた

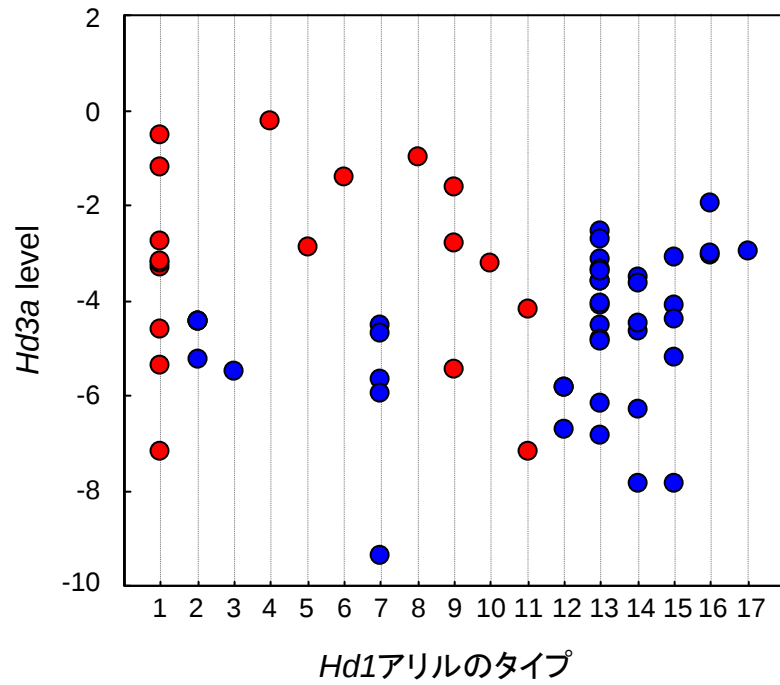


図18 各Hd1アレルを持つ品種におけるHd3a発現量の分布
Functional Hd1アレルを持つ品種は赤、Non-functional Hd1アレルを持つ品種は青で示した。Hd3a発現量は自然対数で示してある。

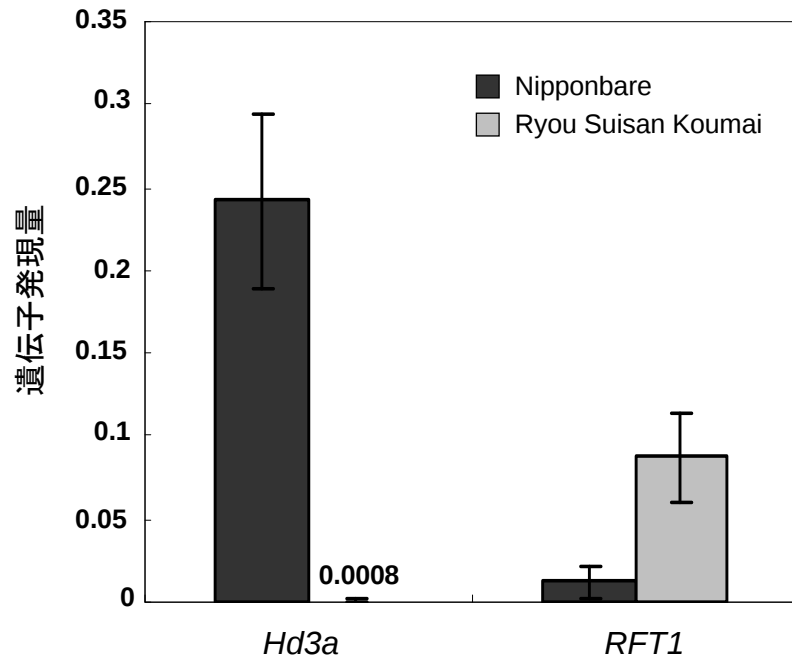


図19 Ryou Suisan Koumaiにおける*Hd3a* および*RFT1*発現量

それぞれの遺伝子の発現解析は、短日条件（10時間明期、14時間暗期）で生育させた播種35日目の植物体において最上位展開葉のサンプリングを行いリアルタイムPCRを用いて行った。y誤差範囲は標準偏差を示す。

らず分子機構について解析した。この結果は、先行するシロイヌナズナで得られていた知見とは大きく異なるものであった。イネにおいては *Hd3a* 発現量と花成時期との間に強い相関関係を見出した ($r = -0.681$; 図 5E、表 3)。またこの相関関係は、より遅い生長ステージにおいてもほぼ同様の結果が得られている (図 20)。一方でシロイヌナズナでは *FT* においては発現量と花成時期との相関は著しく低い値 ($r = -0.079$) を示すことが報告されている (Lempe *et al.*, 2005)。これに対して、シロイヌナズナでは春化経路で中心的な役割を果たす *FLC* の発現量との間には強い相関関係 ($r = 0.783$) を示す (Lempe *et al.*, 2005)。また、*Hd1* においてもイネではタンパク質機能に影響を与える塩基多型が高頻度に見出されたのに対し、シロイヌナズナ *CO* は系統間で非常に高く保存されている事が示唆されている (Purugganan 私信)。これらの結果は、イネとシロイヌナズナでは花成制御の多様性機構が大きく異なっている事を示していると考えられる。以上のことから、植物の生育地域の拡大および生育環境への適応において、それぞれの植物種では花成時期の多様化をもたらす際に異なった因子がターゲットとなった可能性が示された。

一方で、同じイネ科の植物であるコムギやオオムギにおいても *Hd1* オーソログが報告されている (Griffiths *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2003)。しかし、これら *TaHd1*、*HvHd1* については花成誘導における機能は未だほとんど解析されておらず、花成時期の多様化および栽培化に対する影響については知見が乏しい。栽培イネを用いて得られた知見は今後これらの穀物の花成時期の研究に役立つと期待される。

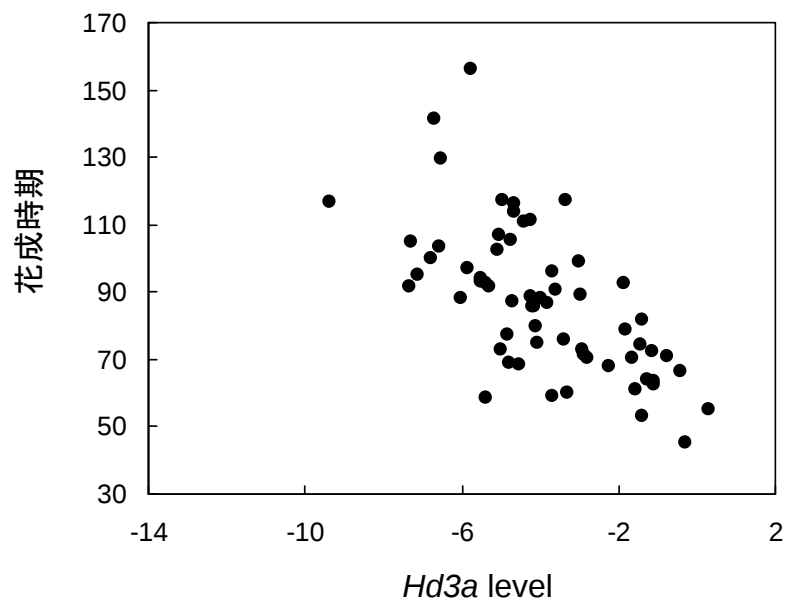


図20 播種後60日目における*Hd3a*発現量と花成時期の関係

それぞれの遺伝子の発現解析は、短日条件（10時間明期、14時間暗期）で生育させた播種60日目の植物体において最上位展開葉のサンプリングを行いリアルタイムPCRを用いて行った。発現量は自然対数で表している。

表4 花成関連遺伝子のシーケンス解析の結果

Gene	Accession no.	Length (bp)	SNP		Indel sites	F. S. sites	Nonsense mutation	No. of alleles
			Synonymous	Nonsynonymous				
<i>Hd3a</i>	AB052944	540	3	4	0	0	0	6
<i>Ehd1</i>	AB092506	1026	6	10	0	0	0	7
<i>OsMADS51</i>	AB003327	495	0	6	1	1	0	3
<i>Hd1</i>	AB041840	1224	1	13	8	4	1	18

表5 コアコレクションにおける花成関連遺伝子の各アレルのまとめ

CC No.	名前	原産地	亜種	花成日数	OsMADS51 cds	Ehd1 Pro.	Ehd1 cds	Hd1 cds	Hd3a pro.	Hd3a cds
1	NIPPONBARE	日本	Japonica	62.5 ± 2.9	1	1	1	6	1	1
2	KASALATH	インド	Indica	91.8 ± 2.8	2	3	3	13	3	3
3	BEI KHE	カンボジア	Indica	81.6 ± 4.1	2	4	3	1	5	2
4	JENA 035	ネパール	Indica	75.0 ± 3.8	2	6	7	15	4	3
5	NABA	インド	Indica	89.1 ± 2.9	2	3	3	16	3	3
6	PULUIK ARANG	インドネシア	Indica	92.8 ± 10.7	2	3	3	14	6	3
7	DAVAO 1	フィリピン	Indica	114.0 ± 11.7	2	3	3	7	N.D.	3
9	RYOU SUISAN KOU MAI	中華人民共和国	Indica	58.5 ± 2.4	2	3	3	1	1	6
10	SHUUSOUSHU	中華人民共和国	Indica	87.1 ± 8.6	2	3	3	3	1	1
11	JINGUOYIN	中華人民共和国	Indica	73.1 ± 5.7	2	3	3	16	3	3
13	ASU	ブータン	Indica	71.4 ± 1.8	2	3	3	16	6	3
14	IR 58	フィリピン	Indica	85.5 ± 4.4	2	3	3	7	1	1
15	CO 13	インド	Indica	74.3 ± 2.4	2	1	1	1	3	3
16	VARY FUTSI	マダガスカル	Indica	129.5 ± 4.5	3	3	3	N.D.	7	3
17	KEIBOBA	中華人民共和国	Indica	100.0 ± 5.2	2	3	3	15	N.D.	3
18	QINGYU(SEIYU)	台湾	Indica	116.8 ± 8.7	2	3	3	7	N.D.	3
19	DENG PAO ZHAI	中華人民共和国	Indica	72.3 ± 3.4	2	3	3	1	3	3
20	TADUKAN	フィリピン	Indica	117.1 ± 5.3	2	5	6	2	6	3
21	SHWE NANG GYI	ミャンマー	Indica	105.0 ± 1.3	2	3	3	7	1	4
22	CALOTOC	フィリピン	Indica	111.5 ± 5.6	2	5	6	2	1	1
23	LEBED	フィリピン	Indica	88.6 ± 10.4	1	4	3	14	1	1
24	PINULUPOT 1	フィリピン	Indica	105.5 ± 14.3	2	4	6	2	1	1
25	MUHA	インド	Indica	106.7 ± 12.8	2	6	7	13	3	3
26	JHONA 2	インド	Indica	71.0 ± 5.3	2	6	7	N.D.	3	3
27	NEPAL 8	ネパール	Indica	61.0 ± 1.7	2	3	3	15	3	3

cds: 翻訳領域、Pro.: プロモーター領域、N.D.: 未決定

CC No.	名前	原産地	亜種	花成日数	OsMADS51 cds	Ehd1 Pro.	Ehd1 cds	Hd1 cds	Hd3a pro.	Hd3a cds
28	JARJAN	ブータン	Indica	91.7 ± 6.1	2	6	7	15	4	3
29	KALO DHAN	ネパール	Indica	88.1 ± 2.0	2	6	7	13	3	3
30	ANJANA DHAN	ネパール	Indica	60.3 ± 1.5	2	6	7	13	3	3
31	SHONI	バングラデシュ	Indica	103.5 ± 6.0	2	7	7	13	3	3
32	TUPA 121-3	バングラデシュ	Indica	102.3 ± 14.6	2	6	7	17	3	3
33	SURJAMUKHI	インド	Indica	79.6 ± 2.9	2	6	7	13	3	3
34	ARC 7291	インド	Indica	78.9 ± 4.2	2	3	3	13	3	3
35	ARC 5955	インド	Indica	92.5 ± 4.4	2	6	7	15	3	3
36	RATUL	インド	Indica	69.1 ± 5.5	2	6	7	13	4	3
37	ARC 7047	インド	Indica	64.1 ± 5.0	2	8	7	13	3	3
38	ARC 11094	インド	Indica	94.2 ± 5.3	2	6	7	13	3	3
39	BADARI DHAN	ネパール	Indica	53.1 ± 1.1	2	6	7	8	4	3
40	NEPAL 555	インド	Indica	86.5 ± 5.0	2	6	7	13	4	3
41	KALUHEENATI	スリランカ	Indica	68.6 ± 3.6	3	6	7	13	4	3
42	LOCAL BASMATI	インド	Indica	99.0 ± 3.9	2	6	7	13	2	1
43	DIANYU 1	中華人民共和国	Japonica	90.7 ± 11.5	1	1	2	N.D.	1	1
44	BASILANON	フィリピン	Indica	110.7 ± 3.8	2	2	5	2	1	1
45	MA SHO	ミャンマー	Japonica	95.1 ± 5.0	1	2	5	12	1	1
46	KHAO NOK	ラオス	Japonica	85.9 ± 6.9	1	3	3	12	1	1
47	JAGUARY	ブラジル	Japonica	75.6 ± 3.3	1	3	5	14	1	1
48	KHAU MAC KHO	ベトナム	Japonica	88.4 ± 5.7	1	1	1	12	1	1
49	PADI PERAK	インドネシア	Japonica	141.3 ± 1.7	1	1	1	14	1	1
50	REXMON	アメリカ	Japonica	77.4 ± 3.4	1	3	3	14	3	3
51	URASAN 1	日本	Japonica	70.3 ± 1.5	1	2	5	11	1	1
52	KHAU TAN CHIEM	ベトナム	Japonica	97.3 ± 4.5	1	N.D.	1	11	1	1
53	TIMA	ブータン	Japonica	67.8 ± 2.9	2	1	1	9	1	5
55	TUPA 729	バングラデシュ	Japonica	93.2 ± 1.8	2	9	4	13	1	5
57	MILYANG 23	大韓民国	Indica	96.1 ± 1.9	2	3	3	7	1	4

cds: 翻訳領域、Pro.: プロモーター領域、N.D.: 未決定

CC No.	名前	原産地	亜種	花成日数	OsMADS51 cds	Ehd1 Pro.	Ehd1 cds	Hd1 cds	Hd3a pro.	Hd3a cds
58	NEANG MENH	カンボジア	Indica	70.4 ± 2.1	2	4	3	1	5	2
59	NEANG PHTONG	カンボジア	Indica	63.4 ± 3.5	2	4	3	1	6	3
60	HAKPHAYNHAY	ラオス	Indica	55.0 ± 2.4	2	4	3	1	6	3
61	RADIN GOI SESAT	マレーシア	Indica	73.0 ± 5.4	2	3	3	1	6	3
62	KEMASIN	マレーシア	Indica	117.5 ± 5.3	1	3	3	9	6	3
63	BLEIYO	タイ	Indica	45.4 ± 1.9	2	3	3	4	6	3
64	PADI KUNING	インドネシア	Indica	156.0 ± 3.8	1	3	3	14	6	1
65	RAMBHOG	インドネシア	Indica	59.3 ± 1.6	3	3	3	5	6	3
66	BINGALA	ミャンマー	Indica	116.3 ± 3.5	2	3	3	1	3	3
67	PHULBA	インド	Japonica	66.6 ± 7.2	1	3	3	10	1	1
68	KHAO NAM JEN	ラオス	Japonica	86.4 ± 3.4	1	2	1	9	1	1

cds: 翻訳領域、Pro.: プロモーター領域、N.D.: 未決定

V 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学バイオサイエンス研究科 島本 功教授に深く感謝いたします。

当講座の川崎 努准教授、一色 正之准教授（現 横浜市立大学木原生物学研究所）、Wong Hann Lin 助教、辻 寛之助教、河野 洋治博士には多くの貴重な御助言および励ましの言葉を賜りました事を深く感謝いたします。特に、研究および実験の進め方について一から御指導いただいた横井 修司准教授（現 岩手大学農学部）に心から御礼申し上げます。

イネコアコレクションの分譲および基本情報を提供していただいた独立行政法人農業生物資源研究所の江花 薫子博士に深く感謝いたします。共同研究として線形モデル解析を行っていただいた総合研究大学院大学葉山高等研究センターの印南 秀樹准教授および手島 康介博士に深く感謝いたします。

アドバイザーとして多くの有益な御助言および御指導を賜りました本学の形質発現植物学講座の田坂 昌生教授、植物遺伝子機能学講座の橋本 隆教授、細胞間情報学講座の高山 誠司教授に深く感謝いたします。

植物分子遺伝学講座の先輩、後輩そして同期の皆さんには研究面のみでなく大学生活における精神的な支えとして非常にお世話になりました事に深く感謝いたします。そして多くの喜びや苦しみを共に分かち合ってくれた友人たちに心から感謝いたします。

最後に、これまでの学生生活を全面的に援助し、遠方から常に暖かく見守って応援していただいた家族に心から深く感謝いたします。ありがとうございました。

VI 参考文献

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

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

Alonso-Blanco, C., Mendez-Vigo, B., and Koornneef, M. (2005). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* **49**, 717-732.

Caicedo, A.L., Stinchcombe, J.R., Olsen, K.M., Schmitt, J., and Purugganan, M.D. (2004). Epistatic interaction between Arabidopsis FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15670-15675.

Chardon, F., and Damerval, C. (2005). Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. *J Mol Evol* **61**, 579-590.

Chen, S., Tao, L., Zeng, L., Vega-Sanchez, M.E., Umemura, K., and Wang, G.-L. (2006). A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology* **7**, 417-427.

Chen, M., and Ni, M. (2006). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates CONSTANS expression and photoperiodic flowering. *Plant J* **46**, 823-833.

Cheng, C., Motohashi, R., Tsuchimoto, S., Fukuta, Y., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (2003). Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the

interspersed pattern of SINEs. *Mol Biol Evol* **20**, 67-75.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.

Doebley, J.F., Gaut, B.S., and Smith, B.D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell* **127**, 1309-1321.

Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Shimatani, Z., Yano, M., and Yoshimura, A. (2004). Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes Dev* **18**, 926-936.

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.

Grafen, A., Hails, R., 野間口謙太郎 (訳), 野間口眞太郎 (訳) (2007). 一般線形モデルによる生物科学のための現代統計学—あなたの実験をどのように解析するか—. 共立出版

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

Hayama, R., and Coupland, G. (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **135**, 677-684.

Hayama, R., Izawa, T., and Shimamoto, K. (2002). Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* **43**, 494-504.

- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., and Shimamoto, K. (2003).** Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**, 719-722.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999).** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**, 297-300.
- Hirochika, H. (2001).** Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 118-122.
- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., and Kay, S.A. (2005).** FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science* **309**, 293-297.
- Ishikawa, R., Tamaki, S., Yokoi, S., Inagaki, N., Shinomura, T., Takano, M., and Shimamoto, K. (2005).** Suppression of the Floral Activator Hd3a Is the Principal Cause of the Night Break Effect in Rice. *Plant Cell* **17**, 3326-3336.
- Izawa, T. (2007).** Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. *J Exp Bot* **58**, 3091-3097.
- Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M., and Shimamoto, K. (2002).** Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev* **16**, 2006-2020.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F., and Coupland, G. (2008).** Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *Embo J* **27**, 1277-1288.
- Jaeger, K.E., and Wigge, P.A. (2007).** FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**, 1050-1054.

Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., and Dean, C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**, 344-347.

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.

Khush, G.S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol* **35**, 25-34.

Khush, G.S. (1999). Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* **42**, 646-655.

Kim, W.Y., Hicks, K.A., and Somers, D.E. (2005). Independent Roles for EARLY FLOWERING 3 and ZEITLUPE in the Control of Circadian Timing, Hypocotyl Length, and Flowering Time. *Plant Physiol* **139**, 1557-1569.

Kim, S.L., Lee, S., Kim, H.J., Nam, H.G., and An, G. (2007). OsMADS51 is a short-day flowering promoter that functions upstream of Ehd1, OsMADS14, and Hd3a. *Plant Physiol* **145**, 1484-1494.

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.

Kojima, Y., Ebana, K., Fukuoka, S., Nagamine, T., and Kawase, M. (2005). Development of an RFLP-based Rice Diversity Research Set of Germplasm. *Breed. Sci.* **55**, 431-440.

Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., and Yano, M. (2002). Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**, 1096-1105.

- Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S., and Shimamoto, K. (2008).** Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development* **135**, 767-774.
- Konishi, S., Izawa, T., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., and Yano, M. (2006).** An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* **312**, 1392-1396.
- Kozaki, A., Hake, S., and Colasanti, J. (2004).** The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. *Nucleic Acids Res* **32**, 1710-1720.
- Lee, S., Kim, J., Han, J.J., Han, M.J., and An, G. (2004).** Functional analyses of the flowering time gene OsMADS50, the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20) ortholog in rice. *Plant J* **38**, 754-764.
- Lempe, J., Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Singh, A., Schmid, M., and Weigel, D. (2005).** Diversity of flowering responses in wild *Arabidopsis thaliana* strains. *PLoS Genet* **1**, 109-118.
- Lin, M.K., Belanger, H., Lee, Y.J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., Lough, T.J., and Lucas, W.J. (2007).** FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* **19**, 1488-1506.
- Liu, L.J., Zhang, Y.C., Li, Q.H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.L., Wang, L., and Yang, H.Q. (2008).** COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 292-306.
- Lynch, M., Walsh, B. (1998).** *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., and Schmid, M. (2007).** Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **17**, 1055-1060.

Matsubara, K., Yamanouchi, U., Wang, Z.X., Minobe, Y., Izawa, T., and Yano, M. (2008). Ehd2, a rice ortholog of the maize INDETERMINATE1 gene, promotes flowering by up-regulating Ehd1. *Plant Physiol* **148**, 1425-1435.

Michaels, S.D., and Amasino, R.M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-956.

Nemoto, Y., Kisaka, M., Fuse, T., Yano, M., and Ogihara, Y. (2003). Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *Plant J* **36**, 82-93.

Olsen, K.M., Caicedo, A.L., Polato, N., McClung, A., McCouch, S., and Purugganan, M.D. (2006). Selection under domestication: evidence for a sweep in the rice waxy genomic region. *Genetics* **173**, 975-983.

Park, S.J., Kim, S.L., Lee, S., Je, B.I., Piao, H.L., Park, S.H., Kim, C.M., Ryu, C.H., Xuan, Y.H., Colasanti, J., An, G., and Han, C.D. (2008). Rice Indeterminate 1 (OsId1) is necessary for the expression of Ehd1 (Early heading date 1) regardless of photoperiod. *Plant J* **56**, 1018-1029.

Robson, F., Costa, M.M., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pineiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., and Coupland, G. (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J* **28**, 619-631.

Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* **24**, 703-711.

Shindo, C., Aranzana, M.J., Lister, C., Baxter, C., Nicholls, C., Nordborg, M., and Dean, C. (2005). Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. *Plant Physiol* **138**, 1163-1173.

- Shindo, C., Lister, C., Crevillen, P., Nordborg, M., and Dean, C. (2006).** Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. *Genes Dev* **20**, 3079-3083.
- Stinchcombe, J.R., Weinig, C., Ungerer, M., Olsen, K.M., Mays, C., Halldorsdottir, S.S., Purugganan, M.D., and Schmitt, J. (2004).** A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene FRIGIDA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4712-4717.
- 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.
- Tadege, M., Sheldon, C.C., Helliwell, C.A., Upadhyaya, N.M., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2003).** Reciprocal control of flowering time by OsSOC1 in transgenic *Arabidopsis* and by FLC in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 336-369.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., and Shimamoto, K. (2007).** Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**, 1033-1036.
- Toomajian, C., Hu, T.T., Aranzana, M.J., Lister, C., Tang, C., Zheng, H., Zhao, K., Calabrese, P., Dean, C., and Nordborg, M. (2006).** A nonparametric test reveals selection for rapid flowering in the *Arabidopsis* genome. *PLoS Biol* **4**, e137.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., and Coupland, G. (2004).** Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierc, J., Samach, A., and Coupland, G. (2006).** *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2971-2984.

Wu, C., You, C., Li, C., Long, T., Chen, G., Byrne, M.E., and Zhang, Q. (2008). RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12915-12920.

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.

Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., Zhou, H., Yu, S., Xu, C., Li, X., and Zhang, Q. (2008). Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet* **40**, 761-767.

井澤毅 (2001). 光シグナルによる花成誘導. 細胞工学別冊 植物細胞工学 16 植物の光センシング 124-133.

佐藤洋一郎 (2003). 交流の大河 5000 年 イネが語る日本と中国. 農文協 p.8

滝本敦 (1998). 花を咲かせるものは何か. 中公新書

松尾考嶺, 清水正治, 角田重三郎, 村田吉男, 熊澤喜久雄, 逢原雄三, 星川清親, 石原邦, 山口彦之, 菊池文雄 (1990). 稲学大成 遺伝編. 農村漁村文化協会