

フィトクロム発色団合成酵素遺伝子 *Se13*
(*OsHY2*)の機能欠損がイネの生長に及ぼす効果

2015

吉竹 良洋

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 不感光性突然変異体 X61 を用いたイネの感光性獲得機構の解析	
2.1 緒言	14
2.2 材料および方法	
2.2.1 植物材料	19
2.2.2 3'RACE PCR 法による全長 cDNA の特定	21
2.2.3 ベクターコンストラクション	23
2.2.4 形質転換イネの作出	23
2.2.5 形質転換体の到穂日数評価	24
2.2.6 フィトクロムの分光学的解析	24
2.2.7 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現の定量的解析	25
2.2.8 出穂期関連遺伝子の判別マーカーの作製と多重変異系統の作出	29
2.2.9 単変異および多重変異系統の上位性解析	30
2.3 結果	
2.3.1 X61 の原因遺伝子 <i>sel3</i> の機能検証	31
2.3.2 X61 の早生化および感光性獲得の分子機構	37
2.4 考察	45

第 3 章	フィトクロム発色団フィトクロモロビン合成酵素がイネの生育に及ぼす効果	
3.1	緒言	50
3.2	材料および方法	
3.2.1	植物材料	55
3.2.2	細胞内局在性解析	55
3.2.3	クロロフィルおよびテトラピロール中間体の測定	56
3.3	結果	
3.3.1	イネ PΦB 合成酵素の細胞内局在性	58
3.3.2	PΦB 合成酵素がイネの生育に及ぼす効果	60
3.3.3	クロロフィルおよびテトラピロール中間体の定量	62
3.4	考察	64
第 4 章	不感光性遺伝子 <i>sel3</i> を用いた中性植物化育種に関する研究	
4.1	緒言	69
4.2	材料および方法	
4.2.1	植物材料	72
4.2.2	農業形質の評価	72
4.3	結果および考察	73
第 5 章	総合考察	79

摘要	82
引用文献	86
謝辞	101

【第 1 章】

序 論

生物は、季節変化に応じて自らの生活環を劇的に変化させる。植物の開花、鳥の渡り、蝶の大移動、魚類の産卵行動、冬眠などがその代表例である。したがって、季節変化の少ない赤道直下・低緯度地域以外に生息する生物にとって、季節の変化を捉えることは、生存(繁殖)戦略上極めて重要な意味をもっている。生物は、このような季節変化を“日の長さ”や“温度”の変化によって感知することが知られており、多くの生物種でその計時機構の解明に向けた研究が進められている。植物では、シロイヌナズナにおいて花成に関する計測機構が精力的に解析されてきており、興味深い 2 つの理論が構築されるに至っている。ひとつは、植物および昆虫の研究(Pittendrigh et al., 1964)をもとに Sawa et al. (2007) が発展させた外的・内的符号モデルである。外的符号とは、内生の周期的なシグナルと外界のシグナルが、ある日長条件下において一致することであり、この場合に花成誘導もしくは抑制シグナルが発現する。一方、内的符号とは、内生の複数の周期的なシグナルが合致することであり、この場合に花成誘導もしくは抑制シグナルが発現する。花成変異体を用いた順遺伝学的手法により単離された *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Kobayashi et al., 1999; Kardailsky et al., 1999) は花成ホルモンの分子実体であり (Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007; Taoka et al., 2011)、その発現を担う Zn フィンガー型の転写因子 *CONSTANS (CO)* のプロモーター領域上で外的・内的符号が確認される。C4 型の Zn フィンガー(Dof, DNA-binding with one finger)ドメインを有する *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* は、*CO* プロモーターに結合し、日中の *CO* の転写を抑制する。一方、光(青色光)依存的に活性化される光受容体 *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1)* は、長日条件下において、概日時計関連遺伝子である *GIGANTEA (GI)* お

よび *CDF1* と *CO* プロモーター領域上に複合体を形成する。その結果、*FKF1* の E3 リガーゼ作用によって *CDF1* タンパク質が分解され、*CO* の転写が誘導される。短日条件下においては、*FKF1* の発現ピークが既に暗期に入っていること、また *GI* の発現(位相)がシフトして *FKF1* の発現とタイミングがずれることから、*FKF1* と光の外的な符号と、時計関連遺伝子の *GI* と *FKF1* の発現時期の内的な符号の一致が季節認識に重要であることが示されている(Sawa et al., 2007, 図 1)。

もうひとつは、ゲート理論である(Pittendrigh et al., 1976)。これは、昆虫や動物の羽化や孵化などの個体発生(Gating Phenomenon)が概日的にある一定の時刻に起こることに着想を得た概念であり、転じてショウジョウバエやヒトの概日時計の光同調機構^{*1}に関して、同概念に基づいた研究が進みつつある。条件的短日植物であるイネにおいては、イネフロリゲン遺伝子 *Hd3a* (*Heading-date 3a*)および *RFT1* (*Rice Flowering locus T*)を抑制する日長反応性(感光性)の鍵遺伝子 *Ghd7* (*Grain-number, plant height and heading-date 7*)の発現が長日条件特異的に上昇すること(Xue et al., 2008)から、*Ghd7* の発現にはゲートの開閉が関与していると考えられている。日長の認識には、早朝に開いた *Ghd7* のゲートに赤色光が入力されることが重要である(Itoh et al., 2010, 図 2)。しかしながら、*Ghd7* のゲートがなぜ早朝に開くのであろうか。イネの日長認識機構に関する基本的な疑問はこの点に集約されると考えられる。その詳細については未だ明らかとなっていないが、*Ghd7* の発現は概日時計の制御下にあることが示唆されている(Xue et al., 2008)ことから、*Ghd7* のゲート開閉のメカニズムの解明には、動物の概日時計に関する研究の進展にみられるように、時計遺伝子の光同調性を介した位相の制御(内的符号)の解明が鍵を握ると考えられる。いずれにしても、日長認識は、多

様な光受容体と時計遺伝子、花成遺伝子がおりなす巧妙かつ複雑な反応系である。

一方、温度受容機構に関しては、シロイヌナズナで研究が進められており、春化経路(一定期間の低温が花成を誘導する)がエピジェネティックに制御されていることが知られている。加えて、フロリゲン遺伝子 *FT* が高温条件下において活性化されたフィトクロム相互作用因子 *PIF4* とヒストンバリエーションの 1 つ *H2A.Z* とによって拮抗的に制御されていること、および花成に関与する *FLM* (*Flowering locus M*) が温度依存的な選択的スプラッシング機構により制御されていることが報告されている(Kumer and Wigge 2009; Kumer et al., 2012; Pose et al., 2013)。今後、日長認識だけではなく、一般的かつ広範な植物の温度受容機構を解明することによって、生物の季節認識メカニズムの理解が飛躍的に発展することが期待される。

イネにおける花成の分子機構は、ジャポニカ品種日本晴とインディカ品種カサラスなど自然変異を有する品種間の雑種後代を利用した QTL (Quantitative Trait Locus) 解析と各種変異原処理(X 線、 γ 線、EMS、重イオンビーム)によって誘発された出穂期突然変異体を用いた解析を中心として進められてきた(Yano et al., 2001)。その結果、上流のシグナルを統合し、イネフロリゲン *Hd3a* および *RFT1* を独立的に正に制御する 2 つの主要な転写因子 *Ehd1* (*Early heading date 1*; Doi et al., 2004) と *Hd1* (*Heading date 1*; Yano et al., 2000) が同定された。*Ehd1* は、台湾品種台中 65 号とアフリカイネ *Oryza glaberrima* の交雑後代の QTL 解析と、その後のマップベースクローニング法により単離された。*Ehd1* は、B 型レスポンスレギュレーターと DNA 結合 GARP (*Golden 2, Arabidopsis RESPONSE*

REGULATOR

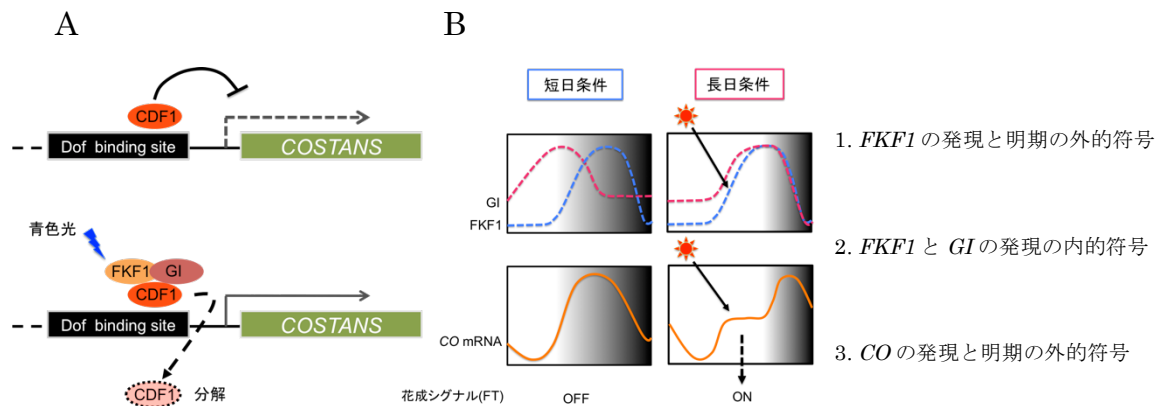


図 1 シロイヌナズナにおける日長認識の分子モデル (澤・Steve Kay, 2008 一部改変)

A. *CO* 遺伝子プロモーター領域における発現分子モデル

CDF は *CONSTANS(CO)* のプロモーター領域に結合し、その発現を負に制御する。しかし昼方、青色光により活性化された FKF1 は GI と青色光依存的に複合体を形成し、CDF を分解する。その結果 *CO* 発現抑制が解除され発現する(脱抑制)。

B. *GI* および *FKF1* による外的内的符号の分子モデル

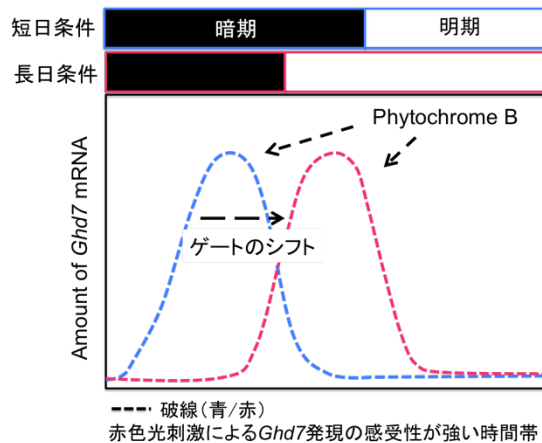


図 2 イネにおける感光性遺伝子 *Ghd7* のゲーティングモデル (Itoh et al., 2008)

赤色光刺激を受けた場合 *Ghd7* の発現は誘導されることが知られているが、長日および短日条件において照射された場合に最も誘導される時間帯が異なる(ゲートのシフト)。長日条件においてはゲートのタイミングと明期のタイミングが一致するため *Ghd7* は誘導されるが、短日条件においてはゲートのタイミングが暗期であるため誘導されない。このため短日条件では花成が遅延しないと考えられる。しかし、なぜゲートのタイミングにずれが生じるのかは未解明である。

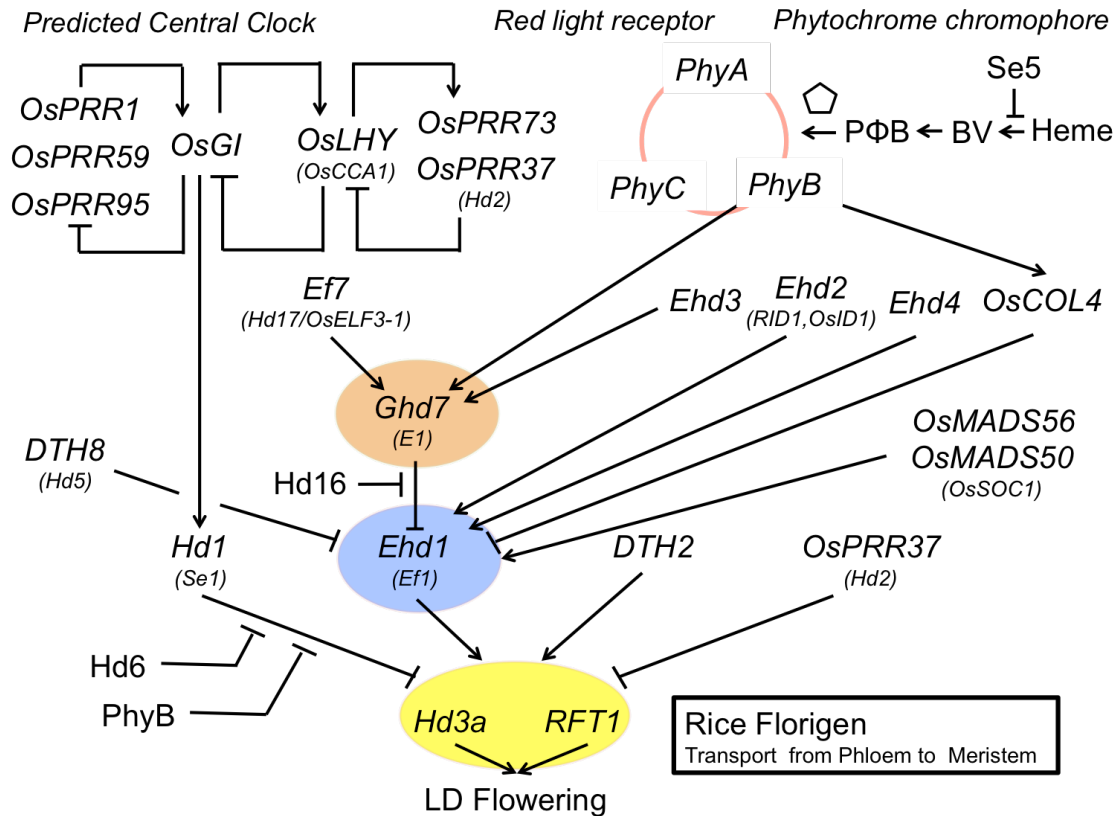


図 3 長日条件下におけるイネ花成ネットワークモデル

イネフロリゲン *Hd3a*, *RFT1* を正に制御する因子は *Ehd1* および *DTH2* であり、反対に *Hd1*, *OsPRR37/Hd2* は負に制御する。また *OsPRR37/Hd2* は時計の構成因子として機能する。*Ehd1* は多くのシグナルを統合しており、*Ehd2/RID1/OsID1*, *Ehd3*, *Ehd4*, *OsCOL4*, *DTH2*, *OsMADS50*, *OsMADS56*, *Ghd7* などの遺伝子により正負に制御される。このうち *Ghd7* は感光性の鍵遺伝子として知られており、時計遺伝子のほか赤色光受容体 *Phys* によっても制御されることが知られている他、*Hd16* によりリン酸化修飾を受けることにより *Ehd1* の抑制効果を強化する。またもう 1 つの感光性遺伝子 *Hd1* は時計遺伝子 *OsGI* に正に制御され、*PhyB* および *Hd6* (*Hd1* とは間接的) の翻訳後修飾を受ける。*Se5* は、*Heme* から *BV* への代謝過程を制御しており、発色団 *PΦB* の合成を通じて全フィトクロム分子種(*PhyA-C*)の活性化に関与する。時計遺伝子は、*OsPRR1*, *OsPRR59*, *OsPRR95*, *OsGI*, *OsLHY/OsCCA1*, *OsPRR37/Hd2*, *OsPRR73* が主な構成遺伝子であり上記のようなフィードバックループを構成すると考えられているが、遺伝学的な証明は不十分である。

and *Chlamydomonas* regulatory protein of P-starvation acclimatization response) ドメイン有するタンパク質をコードするイネ科植物特有の遺伝子である。*Ehd1* を制御する因子は、上述した *Ghd7* の他に、*DTH8* (*for days to heading on chromosome 8*) (Wei et al., 2010)/*Hd5* (Fujino et al., 2013)、*Ehd3* (*Early heading date 3*) (Matubara et al., 2011)、*Ehd4* (*Early heading date 4*) (Gao et al., 2013)、*OsCOL4* (*OsCONSTANS like 4*) (Lee et al., 2010)、*Hd16* (*Heading date 16*) (Hori et al., 2013)、*Hd6* (*Heading date 6*) (Ogiso et al., 2010)、*Ef7* (*Early flowering 7*) (Yuan et al., 2009, Saito et al., 2012)/*Hd17* (Matsubara et al., 2012)/*OsELF3-1* (Yang et al., 2013)、*OsMADS50* (*Oryza sativa MADS 50*) (Lee et al., 2010)/*OsSOC1*, *OsMADS51* (*Oryza sativa MADS 51*) (Kim et al., 2007)、*OsMADS56* (*Oryza sativa MADS 56*) (Ryu et al., 2009)、*Se14* (*photoperiod sensitivity 14*) (Yokoo et al., 2014)、*Se15* (*photoperiod sensitivity 15*) (Xu et al., unpublished)、*Se5* (*photoperiod sensitivity 5*) (Izawa et al., 2010)、*PhyA, B, C* (*Phytochrome A, B, C*) (Takano et al., 2005, 2009)などが報告されている。特に、*Ehd2* (*Early heading date 2*)/*RID1*/*OsID1*)は、DNA 結合 C2H2 型 Zn フィンガーを有する転写因子をコードしており、その変異体が長日条件下において、1 年以上出穂しないことから、イネ花成の“マスタースイッチ”であると考えられている (Matsubara et al., 2008, Wu et al., 2008, Park et al., 2008)。一方、*Hd1* は、ジャポニカ品種日本晴とインディカ品種カサラスの雑種後代の QTL 解析および銀坊主背景の γ 線照射由来突然変異系統 HS66 および HS110 の原因遺伝子の解析によって単離された (Yano et al., 2000)。*Hd1* は、他のタンパク質と相互作用する CCT (CO, CO-like, TOC1) ドメインと DNA 結合 C2H2 型 Zn フィンガーを有するタンパク質をコードし、シロイヌナズナ *CO* のオルソログとしてアミノ酸レベルで高

い相同性(43%)を示す。また、他の花成遺伝子とは異なり、幼苗期から概日性の発現リズムを示し、短日条件下において花成を促進的に、長日条件下においては抑制的に働く。Ishikawa et al. (2009)は、赤色光受容体フィトクロム B の変異体 (phyB) の背景をもつ *Hd1* 恒常発現組換え体 (*Hdlox/phyB*) とコントロール (*Hdlox/WT*) 間の花成の早晚性の比較から、フィトクロム B が長日条件下で *Hd1* タンパク質を花成抑制的に制御していることを見出した。このことは、フィトクロムを介した *Hd1* の翻訳後調節機構が花成を決定づける要因であることを示している。*Hd1* を正に制御する因子として、時計遺伝子 *OsGI* (*Os-GIGANTEA*) が報告され (Hayama et al., 2003)、これ以外にも近年、*Hd1*, *Ehd1* とは独立に花成経路を担う遺伝子として *DTH2* (*for days to heading on chromosome 2*) (Wu et al., 2013) や *OsPRR37* (*Os-Pseudo response regulator 37*) (Koo et al., 2013)/ *Hd2* が単離されている。したがって、イネは、いくつかの花成経路から自らの成長(発達ステージ)に合わせて適切な経路を選択しているものと考えられる(図 3)。

高等植物の時計遺伝子に関する研究は、シロイヌナズナにおいて最も進んでおり、洗練された時計遺伝子ネットワークモデルの構築が進んでいる。イネにおいてもホモログ探索とその発現の概日的な解析により多数の時計遺伝子 (*OsPRR1*, *OsPRR59*, *OsPRR95*, *OsGI*, *OsLHY*/ *OsCCA1*, *OsPRR37*/ *Hd2*, *OsPRR73*) の存在が示されている (Murakami et al., 2003, 2007)。シロイヌナズナの分子時計は、相互に組合わされた 3 つの転写・翻訳の正・負のフィードバックループにより構成されている。その中心的なループは、pseudo response regulator をコードする *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) (Strayer et al., 2000) と 2 つの部分的に重複した *Myb* 様転写因子 *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) (Schaffer et al.,

1998)および *CCAI* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) (Wang and Tobin, 1998)により構成され、明け方に、*LHY* と *CCAI* が *TOC1* のプロモーターにそれぞれ結合することによって *TOC1* の発現を抑制し、夕方には蓄積された *TOC1* が *LHY* と *CCAI* の発現を誘導する(Alabadi et al., 2001)。2 つめのループは、pseudo response regulator をコードする 2 つの *TOC1* 様遺伝子 *PRR7* (*PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7*)と *PRR9* および *LHY/CCAI* により構成され、明け方に蓄積した *LHY* と *CCAI* が冗長的に機能してこれらを抑制する *PRR7* と *PRR9* の発現を誘導する(Locke et al., 2006; Zeilinger et al., 2006)。3 つめのループは、核タンパク質 *GI* (*GIAGANTEA*)と *TOC1* により構成され、*LHY/CCAI* および *TOC1* に負に制御される *GI*が、夕方、*TOC1* の発現を誘導する(Fowler et al., 1999; Makino et al., 2002)。イネでは、Nagano et al. (2012)が、圃場条件において経時的にサンプリングした植物体のマイクロアレイ解析から、時計遺伝子のフィードバック制御機構の保存性を示している。このように分子遺伝学的な研究に基づいて、イネの花成経路は時計遺伝子および花成遺伝子の両面からその理解が深まってきている(図 3)。

イネにおける花成研究は、基礎科学に留まらず、地域適応性育種や季節適応性育種に重要な指針を提供する。明治 2 年(1869)に札幌と道南の一部において始まった北海道の水稲栽培は、昭和 4 年(1929)には道東と道北の一部を除き北海道全域でその商業栽培が可能となった。雲南・アッサムあるいは長江中・下流域に起源する栽培イネ(佐藤 2003; Londo, et al., 2006; Huang et al., 2013) が、なぜ高緯度に位置する北海道で商業栽培(分布)が可能になったのか、これには極弱感光性品種の開発が大きく貢献した。元来、条件的短日植物であるイネは、日長が

限界日長の 13.5h を超えると出穂を遅延させる。このため、栽培適期(晩春～夏)の日長が常に限界日長(>13.5h)を超えて推移する高緯度地域(およそ 40°NL 以北)においては、中緯度地域向き品種を栽培しても出穂に至らない(もしくは出穂が、著しく遅延して種子が稔らない)。このため北海道での水稻栽培は、極弱感光性品種(遺伝子)の開発が必須であった。後の解析により、北海道水稻の感光性の喪失にはそれぞれ独立的に *Ghd7* 座に生じた 2 つ変異、すなわち 1 塩基の欠失(=*Ghd7-0a*) とレトロトランスポゾンの挿入(=*Ghd7-0b*)に起因することが明らかとなり、“赤毛”を含む品種のハプロタイプ解析により感光性遺伝子 *Ghd7* の欠損がイネの北進に寄与したことが立証されている(浅野 2009)。一方、栽培期間中の日長が常に短日下にある台湾においては、減収させないために出穂までの栄養生长期間を十分に確保する必要があり、多くのジャポニカ型台湾品種は、*Ehd1* (=*Efl*)座に基本栄養生長相を長くする劣性の遺伝子 *ehd1* (=*efl*)をもつ。これらのことは、地域ごとにそれぞれの稲作に適した出穂期遺伝子が利用されてきたこと、すなわち出穂期の改変が各地域の稲作に生産性の向上と安定とをもたらしたことを示している。ところが、近年、花成遺伝子の機能解析が進むとともにこれまでに育種上利用されてきた複数の感光性遺伝子(*Ghd7*, *Hd1*, *DTH2*, *DTH8*)が、枝梗数や稔実率などの収量形質に何らかの効果を及ぼすことが指摘されるようになってきた(Xue et al., 2008; Wei et al., 2010; Zhang et al., 2012; Wu et al., 2013; 広瀬 2013)。地理的拡大に寄与した *Ghd7* は、*in situ* hybridization 法により相転換後の二次枝梗原基においてその発現が強く観察されることから、二次枝梗の発達に関与する可能性が大きく、現在その実証研究が進められている(Yan et al., 2013)。さらに、シロイヌナズナにおいて花成の鍵遺伝子 *FT* および

関連遺伝子 *ELF3* が、気孔開閉の鍵酵素 $H^+ATPase$ を活性化する青色光受容体 フォトリノピン(*Phot1*, *Phot2*)の制御に関与することが報告され(Kinoshita et al., 2011)、イネにおいても、*FT* および *ELF3* のオルソログである *Hd3a* および *Ef7* の変異体(それぞれ *GP2* および *HS276*)が気孔の開閉異常に起因すると考えられる光合成効率の低下を示すことが報告されている(岩橋ら 2012)。このように、個々の遺伝子の詳細な機能について迫ろうとする分子遺伝学研究の発展は、これまでの出穂期育種の再評価と視点を変えた新たな花成研究の理解に基づいた分子育種の必要性を示している。

本研究では、分子遺伝学研究に基づいた新たなイネ不感光性品種育成の分子基盤を整備することを目的として、大規模かつハイスループットな遺伝子発現解析システムを構築するとともに、感光性を完全に喪失した系統である X61 を用いて、感光性獲得(イネ花成ネットワーク)の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、基本栄養生長相(BVP)と感光相(PSP)において時計遺伝子の周期的な振動(Oscillation and amplitude)に対する赤色光の関与がステージ(相)ごとに異なることを明らかにし、このことが感光性獲得メカニズムに大きく関わっていることを見出した(第 2 章)。また、X61 の原因遺伝子 *se13* およびその野生型対立遺伝子 *Se13* の生理学的な機能を明らかにし(第 3 章)、これの解析結果を基にして X61 を利用した新たなイネ中性植物化育種モデルを構築し、このモデルの妥当性を北海道(札幌)および京都における実地試験によって考察した(第 4 章)。

*1 ショウジョウバエの光同調機構

ショウジョウバエの体内時計の位相は主観的昼においては光による影響を受けない(ゲート閉)。しかし、主観的夜には光に呼応して暗期の前半において後退し、後半では前進させることにより同調することが知られる(ゲート開)。時計遺伝子 *Period (Per)* は、主観的夜に光が当たると分解される。一方、光を受けると発現が誘導される。従って前半部に光があたれば、*Per* の上昇部をもう一度繰り返すことになり位相が後退し、後半ではタンパクの減少が先行したことになり、位相は前進する(岡村均, 深田吉孝 2004)。

【第 2 章】

不感光性突然変異体 X61 を用いたイネの感光性
獲得機構の解析

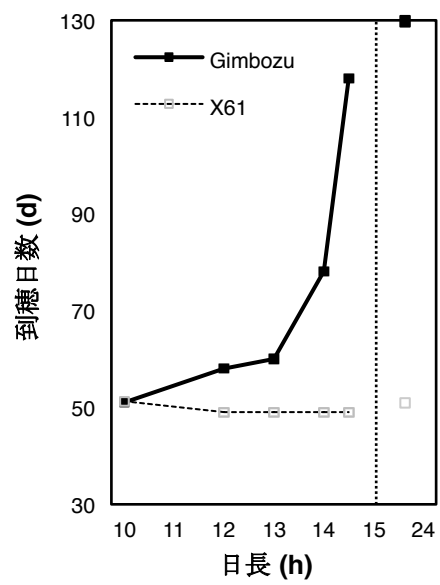
2.1 緒言

当研究室の山懸と谷坂が、品種銀坊主の γ 線種子照射によって誘発した極早生突然変異系統 X61 は、感光性をほぼ完全に喪失しており、長日条件下では銀坊主より 30 日早く出穂する(図 4A, B)。Saito et al. (2011) は、X61 の早生化は単一の劣性遺伝子 *se13* によって支配されていること、および、X61 と日本晴/カサラスの CSSLs (Chromosome segment substitution lines, イネゲノムリソースセンター/RGRC)との交雑後代の精細なマップベースクローニングおよびシーケンス解析により、X61 ではフィトクロム発色団フィトクロモビルン(PΦB)合成酵素をコードする遺伝子 *OsHY2* の第一エキソンに 1 塩基の挿入が存在することを見出し、X61 (*se13*)の極早生性は PΦB 合成酵素のナンセンス変異に起因するものと推定した(図 5A, B)。PΦB 合成酵素遺伝子は、タバコ的一种 *Nicotiana plumbaginifolia* (Pew2) (Kraepiele et al., 1994)、エンドウ(*PCD2*) (Weller et al., 1997)、トマト(*AU*) (Terry and Kendrick, 1996)、シロイヌナズナ(*HY2*) (Kohchi et al., 2001)、トウモロコシ(*Elm1*) (Sawers et al., 2002, 2004)、など多くの植物種で検出・同定されている。また、生化学的な解析から、PΦB はグルタミン酸を初発物質として(Elich and Lagarias, 1987)、ヘム(Heme b)からビルベルジン(Biliverdin IX α , BV)を介して代謝され(Weller et al., 1996; Terry et al., 1995; 図 6)、赤色光受容体フィトクロムのシステイン残基と共有結合し、赤/遠赤色光(赤色光 $\lambda=660\text{nm}$, 遠赤色光 $\lambda=735\text{nm}$)によってその構造を可逆的に変化させ、フィトクロムの赤色光の認識に重要な役割を果たすことが知られている。このため、PΦB の生合成は全フィトクロム分子種の活性化に重要であると考えられる。イネフィトクロムはゲノム中に 3 分子種 (PhyA,B,C) 存在し(Takano et al., 2008)、それぞれイネの花成を協調的に



図 4A

写真 左 銀坊主 (WT) 右 X61 (*se13*).
矢頭は出穂した穂先を示す。



B

異なる日長における銀坊主と X61
の到穂日数 (日長反応性試験)

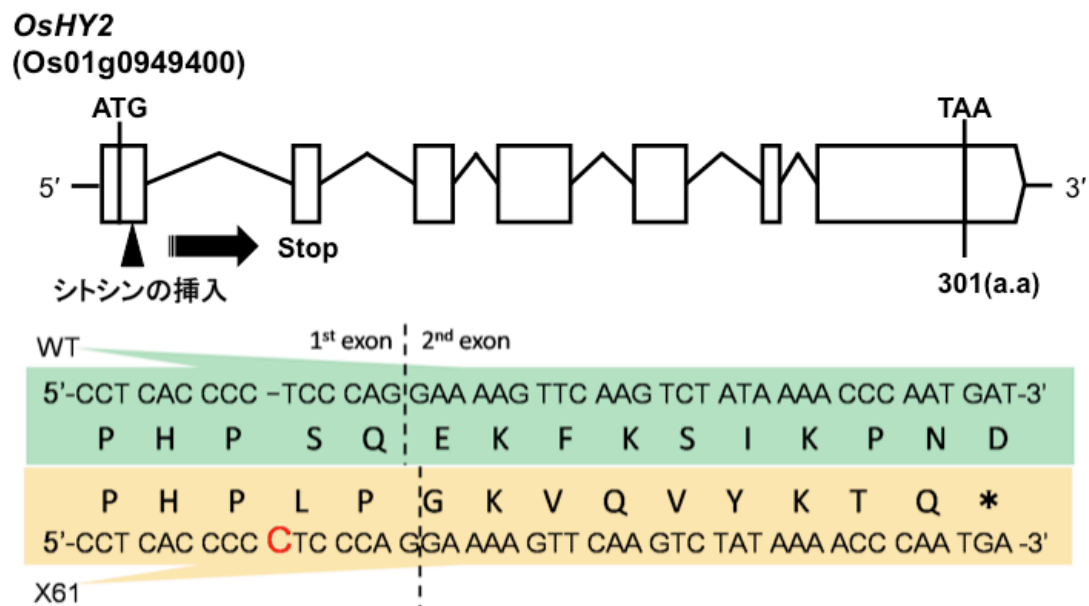
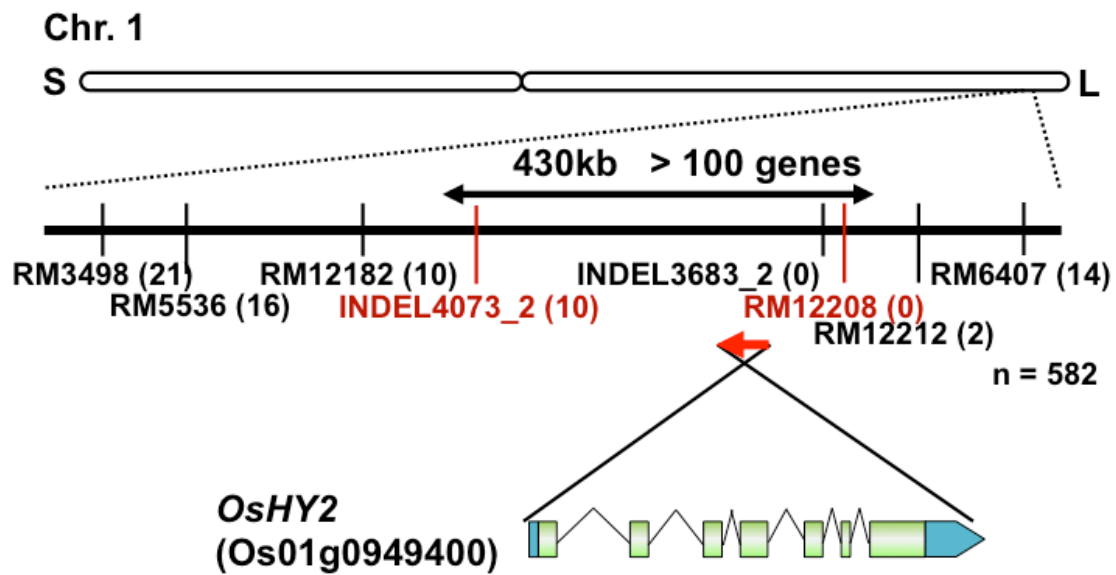


図 5 マップベースクローニングおよびトイネフィットクロム発色団合成酵素 *OsHY2* 座のゲノムシーケンス

日本晴カサラス CSSLs と X61 の交雑 F2 集団より原因遺伝子 *se13* の候補領域を INDEL4073_2 および RM12208 の 430kb に絞り、*OsHY2* 座の第一エキソンに X61 ではシトシンの挿入が起きたことに起因したナンセンス変異を確認した (Saito et al., 2011)。

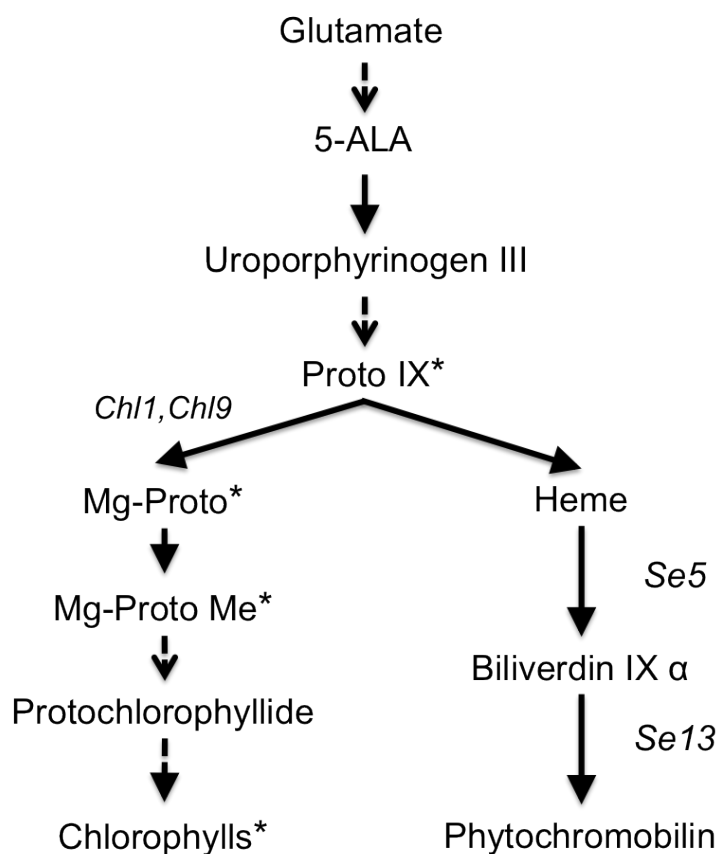


図 6 発色団フィトクロモビルンおよびクロロフィル生合成経路
 フィトクロモビルン(PΦB)は、Heme から BV を経て合成される。Heme から BV の過程はイネにおいて Se5 (heme oxygenase) が触媒することが知られている。一方 Heme の上流にある Protoporphyrin IX(ProtoIX)はクロロフィルの前駆体にもなっておりイネにおいては Chl1 および Chl9 (Mg-chelatase) の作用により Mg^{2+} が配位するとクロロフィル合成系へと流れる。

制御している(Takano et al., 2005; Osugi et al., 2011)。また、発色団合成経路において PΦB の上流に位置し、Heme から BV へと代謝する heme oxygenase の変異体(*se5*)は、X61 同様に、感光性を喪失する(Izawa et al., 2000)ことから、PΦB 合成酵素は X61 (*se13*)の感光性喪失・早生化の有力な原因遺伝子であると考えられる。本章では、まず、X61 の原因遺伝子の検証を目的として、X61 におけるフィトクロムの赤色光応答に関する分光学的解析と組換え系を利用した相補性試験および RNAi (RNA interference) 法を用いた PΦB 合成酵素の発現抑制システムの解析を実施した。

X61 は、強感光性品種銀坊主より誘発された 1 遺伝子劣性突然変異であるが、当研究室においてこれまでに誘発された出穂期突然変異系統の中で最も早生化しており、感光性をほぼ完全に喪失している。このため、X61 の突然変異遺伝子 *se13* はイネの花成に非常に大きな影響を及ぼす因子と考えられる。上述のように、分子遺伝学的研究の発展とともに、イネの花成経路は非常に複雑なものであることが明らかとなり(図 3)、このため、*se13* あるいはその野生型遺伝子 *Se13* の花成経路における役割は、他の遺伝子の発現を網羅的に解析したうえで考察する必要がある。

そこで本章では、まず、X61 の早生化と感光性の喪失が *se13* によるものであること、および、*Se13* 座が PΦB をコードする遺伝子座であることを検証した。ついで、X61 と原品種銀坊主間で既知の遺伝子の発現プロファイルを、基本栄養生長相(BVP)および感光相(PSP)で比較することにより、イネの発育過程における感光性の獲得のメカニズムについて考察した。

2.2 材料および方法

2.2.1 植物材料

植物材料として、X61、銀坊主、SE5、農林 8 号、EG2、HS110、SE5SE13、DMG4、DMG5 および TMG1 の 2 品種、10 系統を供試した。SE5 は原品種農林 8 号からガンマ線照射によって誘発された極早生突然変異系統であり、変異遺伝子 *se5* をもつ。また、農林 8 号は銀坊主と同じ出穂期遺伝子型をもつ品種である。EG2 は銀坊主と品種愛国との交雑後代に得られた系統である。HS110 は、X61 と同様に銀坊主からガンマ線照射によって獲得された早生突然変異系統であり、突然変異遺伝子 *hd1* をもつ。SE5SE13 は、X61 と SE5 との交雑により作出された *se5* および *se13* の二重突然変異系統である。DMG1、DMG4、DMG5 および TMG1 はそれぞれ銀坊主の遺伝的背景に *se13/hd1*、*se13/ghd7*、*hd1/ghd7* および *se13/hd1/ghd7* 導入した系統である。これら品種・系統の出穂期遺伝子型を表 1 に示す。

表 1 本研究で用いた系統・品種名とその遺伝子型

系統・品種名	遺伝子型
X61(<i>se13</i>)	<i>Ghd7/Hd1/Se5/se13</i>
銀坊主	<i>Ghd7/Hd1/Se5/Se13</i>
農林8号	<i>Ghd7/Hd1/Se5/Se13</i>
SE5(<i>se5</i>)	<i>Ghd7/Hd1/se5/Se13</i>
EG2 (<i>ghd7/e1</i>)	<i>ghd7/Hd1/Se5/Se13</i>
HS110 (<i>hd1/se1</i>)	<i>Ghd7/hd1/Se5/Se13</i>
SE5SE13 (<i>se5se13</i>)	<i>Ghd7/Hd1/se5/se13</i>
DMG1 (<i>se13hd1</i>)	<i>Ghd7/hd1/Se5/se13</i>
DMG4 (<i>se13ghd7</i>)	<i>ghd7/Hd1/Se5/se13</i>
DMG5 (<i>hd1ghd7</i>)	<i>ghd7/hd1/Se5/Se13</i>
TMG1 (<i>se13hd1ghd7</i>)	<i>ghd7/hd1/Se5/se13</i>

2.2.2 3'RACE PCR 法による全長 cDNA の特定

Se13 の転写単位を特定するため、RACE (rapid amplification of cDNA ends)を行った。長日条件下で栽培した銀坊主の播種後 25 日の葉身より Trizol® (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した後、DNaseI (Takara-Bio)処理を行った。ついで、3'-Full RACE Core Set (Takara-Bio)を用いて 1st PCR および 2nd PCR を行い、得られた増幅産物を pGEM-T vector easy (Promega)に TA クローニングし、ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)を用いて増幅産物の塩基配列を決定した。PCR 反応に供試したプライマーを表 2 に示す。

表 2 遺伝子型判別用プライマーシーケンス

Gene	Name	Sequence
<i>hd1/se1</i>	se1_U7	gctgcatctttaggc
	se1_L7	ctccagcaggtgtcagg
<i>ef1-h/ehd1</i>	Ef1-h_FforMAS	gcctcattttctttgtgatgtatgtacc
	EHD-G1_L1-YQB	cggtaggaaagaacgcatc
<i>e1/ghd7</i>	Lhd4-U8-hamada	cgtttcagcaatagcattatgg
	Lhd4-insert-U	gacgcacaaatggagcacgaac
	Lhd4-L6	tcagcgagatcgatgacttg
<i>se5</i>	Se5dcapsFw	aagccgttcgtggaggagatgagggc
	Se5dcapsRv	ggcgcggtcgcagatggtttcgagag

2.2.3 ベクターコンストラクション

Se13 過剰発現体を作出するために、RACE 法により決定した全塩基配列が含まれるようにプライマーを設計し、ハイフィデリティー型の DNA ポリメラーゼ酵素 KOD-Plus (Toyobo)を用いて、*Se13* の全長 cDNA を増幅した。また、同じプライマーを用いて、銀坊主ゲノムがもつ *Se13* 配列の増幅を行った。それらの増幅産物を pBluescript SK(+)を用いてサブクローニングし、塩基配列を確認した後、過剰発現ベクター pMLH7133 (Mitsuhara et al., 1996)を用いてクローニングした。得られたベクターコンストラクトをアグロバクテリウム EHA101 株に形質転換した。

Se13 発現抑制体を作出するために、RACE によって得られた 6 つの選択的スプラッシング産物に共通する配列(図 8)を標的とする塩基配列を PCR 増幅し、サブクローニングベクター pENTR (Invitrogen)に導入した。増幅配列を Gateway 技術 (Invitrogen)の LR 反応を介して RNAi サイレンシングベクター pANDA (Miki et al., 2004)にクローニングし、アグロバクテリウム LBA4404 株に形質転換した。ベクター構築に供試したプライマーを表 2 に示す。

2.2.4 形質転換イネの作出

Se13 発現抑制体(*Se13*-RNAi 系統)の作出は、品種日本晴の種子より誘導した胚盤カルスを用いて、Hiei et al. (1994)のアグロバクテリウム法によって行った。*Se13* 過剰発現体の作出は、コシヒカリの形質転換法を基にしたアグロバクテリウム法を改変して行った。

2.2.5 形質転換体の到穂日数の評価

作製した形質転換体の T2 種子を 0.5%ベンレート T 水和剤 20 (Sumitomo Chemical)溶液を用いて消毒し、粒状培土(IBIKO Corporation Agri and Bio division)とバーミキュライト(NITTAI)を 2:1 の割合で混合した培養土に播種した。発芽した幼苗からゲノム DNA を抽出し、PCR によって HPTII (ハイグロマイシン抵抗性)遺伝子が増幅された個体を形質転換体として選抜した。過度な生長を抑制するため、幼苗をプラスチックカップ(D-345JT, Asahikasei Packs)に移植し、セラ不動(PhytoCulture)にて、短日条件(10 時間明期/14 時間暗期)および長日条件(14.5 時間明期/9.5 時間暗期)下で出穂まで育成した。

2.2.6 フィトクロムの分光学的解析

約 1600 個体の銀坊主および X61 を 1C 濃度の木村氏 B 水耕液(pH5.5) (Baba and Takahashi, 1956)にて暗所栽培し、白色の鞘葉約 5g をサンプリングした。1cm 程度に切り分け、予め氷冷した乳鉢に生体重あたり 0.8 当量(ml/g)の冷抽出液 A (100 mM Tris-HCl (pH8.3), 5 mM EDTA, 28 μ M 2-メルカプトエタノール, 2 mM PMSF)を加え、乳鉢にてよく破碎した。破碎液をロート上で 2 重ガーゼによってろ過し、超遠心(20,000 rpm, 5 min, Himac CP 85 β , Hitachi Koki) した。回収した上清を秤量後、0.01%になるように 10%ポリエチレンイミンを静かに加え、15 分間、4°C、暗所にて攪拌した。その後、超遠心(30,000 rpm, 15 min)し、上清を回収した。上清に 100 g/l になるように予め乳鉢で破碎した硫酸アンモニウム(硫安)をミクロスパーテルで攪拌しながら静かに加え、30 分間、4°C、暗所にて攪拌した。超遠心(30,000 rpm, 15 min)を行い、ろ液に最終 250 g/l になるようにさらに硫

安を加え攪拌した後、30 分間、4°C、暗所で静置した。再度、超遠心(30,000 rpm, 15 min)し、上清を取り除いた後、沈殿物に触れないように注意しながら遠心チューブを逆さまにして立て、キムワイプにて硫酸溶液を完全に取り除いた。沈殿物を 1 ml の測定液 B (10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.8), 1 mM EDTA, 28 μ M 2-メルカプトエタノール)に再可溶し、微量遠心機(15,000 rpm, 10 min, 15°C)で遠心した後、上清を測定試料として用いた。測定は、吸収差スペクトル分析により行った。まず、遠赤色光(FR)を照射してスペクトルを測定し、次に赤色光(R)の照射後のスペクトルを取得した。この操作を 3 回繰り返し、吸収差スペクトルの平均を求めた。照射光源として蛍光分光光度計 RF-5300PC (Shimadzu)、検出器として分光光度計 U3310 (Hitachi Technologies)を用い、スリット幅 20 nm のキュベットにて測定した。なお抽出、測定作業はすべて緑色安全光下(緑 2 青 1 フィルター, Nakagawa Chemical)で行った。

2.2.7 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現の定量的解析

ベンレート T 水和剤 20 にて種子消毒を行った後、銀坊主は 30°C、3 日間、X61 は 30°C、6 日間の催芽処理を行った。粒状培土とバーミキュライトを 2:1 の割合で混合した培養土を詰めたプラスチックカップ(D-345JT, Asahi-Kasei Packs)に 50 粒程度を播種し、適宜、間引きを行いながら温室にて 14 日間栽培した。その後、サンプリングまで植物用チャンバー(LPH-240SP, Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan)にて長日条件下 (30°C, 14.5 時間明期/25°C, 9.5 時間暗期、湿度 70%、400 ppm CO₂)で育成した。播種後 20、22、25 および 28 日の 3 個体の最新展開葉を 1 サンプルとして、3 時間間隔で 24 時間継時的にサンプリング

した。全 RNA は植物体を 2 ml チューブ入れ、マルチビーズショッカー(PAT, Yasui-Kikai, Osaka, Japan)で破砕した(1,200 rpm, 15 sec)後、TriPure (Roche)を用いたフェノール法により抽出した。RNA サンプルは、DNaseI (Takara-Bio)処理し、使用まで-80°C にて保存した。全 RNA 1.5 μ g に逆転写酵素およびランダムプライマー(Transcriptor Universal cDNA Master, Roche)を加え、サーマルサイクラーを用いて cDNA を合成した(予冷(4°C, 30 sec)、アニーリング(25°C, 5 min)、逆転写反応(55°C, 10 min)、変性失活(85°C, 5 min)の順に行った)。さらに Taqman preamp master mix kit (Life Technologies)を用いて、解析対象遺伝子 48 種を予め増幅した(熱変性(95°C, 10 min)の後、熱変性(95°C, 15 sec)とアニーリング・伸長(60°C, 4 min)を 18 サイクル行い、4°C で保存)。予備増幅産物を TE buffer (Teknova)を用いて 5 倍希釈し、1 サンプル当たり 10 nl の cDNA 溶液と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、表 3 に示すプローブおよび遺伝子特異的プライマーを混合した 48 gene assays reagent を IFC Controller MX (Fluidigm)を用いて 48 $\times$ 48 gene expression chip (48.48 Fluidigm Dynamic Arrays, Fluidigm)にロードした。qPCR は Biomark HD system (Fluidigm)を用いて行った(熱変性 (95°C, 10 min)の後、熱変性(95°C, 15 sec)、アニーリング(70°C, 5 sec)、伸長(60°C, 1 min)を 40 サイクル)。Taqman プローブを用いた qPCR は、PCR 効率(ϵ)を一定にすることが一般に困難である。この欠点を補うため、各遺伝子間で異なる PCR 効率を解析結果に反映させた改良型 delta-delta CT 法(Pfaffl, 2001)を採用し、イネユビキチン (*RUBQ2*)を内部標準として解析した。PCR 効率は 2 倍希釈系列 5 点の CT 値から算出し、許容される決定係数 > 0.97 , $0.9 < \text{傾き} < 1.1$ のものを採用した(Schmittgen and Livak, 2008)。得られた PCR 効率(ϵ)を図 7 に、プライマーおよび Taqman プロー

ブを表 3 に示した。

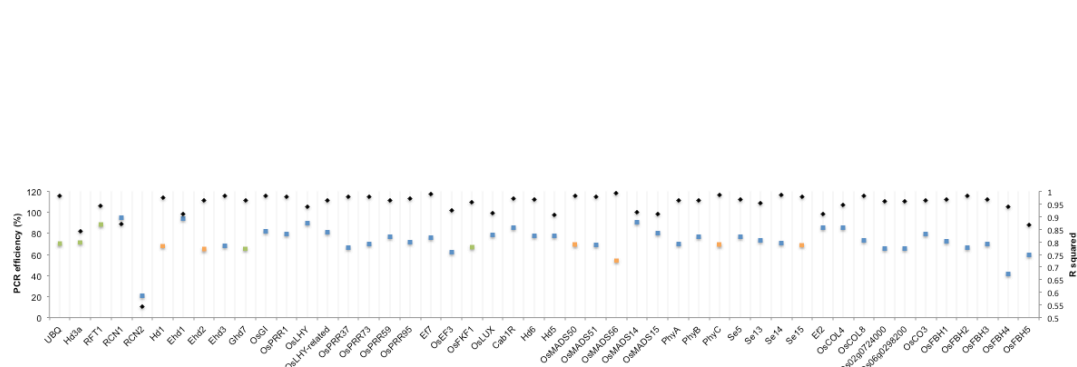


図 7 解析遺伝子に用いたプライマー・プローブの PCR 効率 (ϵ)と R^2 値
 R^2 値は実験的反復間における誤差であること(黒), 橙は ABI 社、青は Roche 社、緑は人
 工合成(日本遺伝子研究所社製)のプローブであることを示す。

表 3 本解析で用いたプライマーおよび Taqman プローブセット

No.	Gene	RAP-ID	Forward primer	Reverse primer	Probe	Annealing T _m (°C)
1	<i>Hd3a</i>	Os06g0157700	GCTAACGATGATCCCGAT	CCTGCAATGTATAGCATGC	CTGCTGCATGCTCACTATCATCATCC	70
2	<i>RFT1</i>	Os06g0157500	CGTCCATGGTGACCCAACA	CCGGGTCTACCATCACGAGT	CGGTGGCAATGACATGAGGACGTTT	70
3	<i>Ghd7</i>	Os07g0261200	CCAGCGCCACCATCATG	GGCCTCCCTCTCCACCA	CCAAACACGGTGGTTGGCGCA	70
4	<i>Hd1</i>	Os06g0275000	-	-	Os03553657.m1 (Life technology co.,Ltd)	70
5	<i>Hd5</i>	Os08g0174500	GTCAGGGAACAAGCGTACT	GATGCCCTCGAACTCCATC	#149 (Roche diagnostics japan)	70
6	<i>Hd6</i>	Os03g0762000	TCAACTTGTCAAGATCGCAA	GGCTCCCAACAAGAGCTTC	#73 (Roche diagnostics japan)	70
7	<i>Ehd1</i>	Os10g0463400	TGAAGTGCAGCTACAAGGTACA	GGTCAACTATTTGTGGATTGTCC	#98 (Roche diagnostics japan)	70
8	<i>Ehd2</i>	Os10g0419200	-	-	Os03639299.m1 (Life technology co.,Ltd)	70
9	<i>Ehd3</i>	Os08g0105000	CAACCTGCACTATTTGACG	GGCCAACCTTGCTCAAACTTC	#120 (Roche diagnostics japan)	70
10	<i>OsCOL4</i>	Os02g0610500	TTCTACCCCGAACACTCCAT	CCTCTCCTTCCCTTGCT	#77 (Roche diagnostics japan)	70
11	<i>DTH2</i>	Os02g0724000	CTTCTTCAGGAGATGGGATGA	TCATTGAACATATCTTTGTCTGTGAC	#29 (Roche diagnostics japan)	70
12	<i>OsCO3</i>	Os09g0240200	ACGACGCTCCAAATTTCA	TGCTCTTGATGACCTCAAGT	#9 (Roche diagnostics japan)	70
13	<i>Se5</i>	Os06g0603000	CCAAGCTTTTATCTGCCATTTT	TCCAGCTCCTCTTGTTCAGA	#19 (Roche diagnostics japan)	70
14	<i>Se13</i>	Os01g0949400	TGCTGTACCACAAGTTGCTCA	TGGGTTTATAGACTTGAACCTTTCC	#25 (Roche diagnostics japan)	70
15	<i>OsMADS50</i>	Os03g0122600	-	-	Os03540888.m1 (Life technology co.,Ltd)	70
16	<i>OsMADS51</i>	Os01g0922800	CAAGCTCTACGAGTACTCTCCTC	TGTAATCTCCTCTCGTTCAAGTCTC	#36 (Roche diagnostics japan)	70
17	<i>OsMADS56</i>	Os10g0536100	-	-	Os03523219.m1 (Life technology co.,Ltd)	70
18	<i>OsMADS14</i>	Os03g0752800	TGAGCGCTACTCCTATGCGAG	GCCTTCAGTTTCTTATATTCGTG	#122 (Roche diagnostics japan)	70
19	<i>OsMADS15</i>	Os07g0108900	TGAGTCCATTTCCGAGCTG	TCTTCTGCCTCTCCACCACT	#63 (Roche diagnostics japan)	70
20	<i>E7</i>	Os06g0142600	GGAAAGCAAGACGTGCTATTATG	ACCAACTTATGACAGCTCAAAAAC	#56 (Roche diagnostics japan)	70
21	<i>OsEF3</i>	Os01g0566100	GCGCTCTACGAGCAGTTCA	GCTCAAAAAGAGGATGTCA	#21 (Roche diagnostics japan)	70
22	<i>OsGL</i>	Os01g0182600	CACTAGGTGGCTATGTATCATCGT	TGGCATCAATAGTGGCTTCA	#11 (Roche diagnostics japan)	70
23	<i>OsPRR1</i>	Os02g0618200	GAGCTGCTGAACCTCTGGAC	TTCTCCGACAAACCAAGCAT	#149 (Roche diagnostics japan)	70
24	<i>OsLHY</i>	Os08g0157600	TCATGCTCAAAAAGTTCTCACCC	GTGGTGGAGGTATGTCGATGT	#80 (Roche diagnostics japan)	70
25	<i>OsLHY-related</i>	Os08g0157600	GACGCATCCAAGAGCACATA	TTGTCCCGAGATGATTTCTTTG	#92 (Roche diagnostics japan)	70
26	<i>OsPRR37</i>	Os07g0695100	TGCAAGAGATGGCAGTGATAA	GGAGACATAGCCTGTGGACTG	#59 (Roche diagnostics japan)	70
27	<i>OsPRR73</i>	Os03g0284100	GTGTTGGACACAACGCTAGG	TGTTGTGGGCTGTCAATCTC	#59 (Roche diagnostics japan)	70
28	<i>OsPRR59</i>	Os11g0157600	TCACTATGCCACGCTCTC	AGAATCTGGGACGACATCATT	#108 (Roche diagnostics japan)	70
29	<i>OsPRR95</i>	Os09g0532400	AACATGGAATGCAAGTGAACAA	CCATTGGCTGCTTATATTCCA	#75 (Roche diagnostics japan)	70
30	<i>OsLUX/OsPCL1</i>	Os01g0971800	AACGGGAACCAACAACAG	CCACCTCCACGAACCTCTT	#28 (Roche diagnostics japan)	70
31	<i>OsFKF1</i>	Os11g0547000	GTTGGCAAGAGCGGCTCT	GGGCTGTCTTCAACAGCTG	CGGCTACGCTCCTGTGATGCCTACACT	70
32	<i>PhyA</i>	Os03g0719800	TGGGGAACCACTTCTATCTCAT	CCTCGTACATTTGTGACAGCA	#37 (Roche diagnostics japan)	70
33	<i>PhyB</i>	Os03g0309200	TGGAGATGACTGATCTAAAGGATG	CACCTTTCTCAAGCACCACAAAG	#34 (Roche diagnostics japan)	70
34	<i>PhyC</i>	Os03g0752100	-	-	Os03589027.m1 (Life technology co.,Ltd)	70
35	<i>OsCOL8</i>	Os10g0560400	CGAAGGTGATGCGGTACAA	ACCGGATCTGCTTCTGATATC	#35 (Roche diagnostics japan)	70
36	<i>Os06g0298200</i>	Os06g0298200	GGAAATACCTTCTGGAACTCTGA	TGCATTGCTGGTCACTGG	#117 (Roche diagnostics japan)	70
37	<i>RUBQ2</i>	Os03g0234200	GAGCCTCTGTTCTGTCAGTA	ACTCGATGGTCCATTAAACC	TTGTGGTGTGATGTCTACTTGTGTC	70

2.2.8 出穂期関連遺伝子の判別マーカーの作製と多重変異系統(DMG,TMG)

の作出

銀坊主、X61 および SE5 の相互交雑により、DMG1 (*Ghd7/hd1/Se5/se13*)、DMG2 (*Ghd7/hd1/Se5/se13*)、DMG4 (*ghd7/Hd1/Se5/se13*)、DMG5 (*Ghd7/hd1Se5.Se13*)、TMG1 (*ghd7/hd1/Se5/se13*)、および SE5SE13 (*Ghd7/Hd1/se5/se13*)を作出した。なお、SE5SE13 は、幼苗での枯死や種子不稔、発芽不良などを示すため、*se13* ヘテロ接合型個体の分離次代から獲得、維持した。この際、*se13* の判別マーカーとして、SNPs 判定に用いられる dCAPS マーカーを利用した。表 2 に示すプライマーを用いてステップダウン PCR 反応(熱変性(94°C, 2 min)の後、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(65°C (1 サイクル毎に 1°C 降下), 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 11 サイクル、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(55°C, 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 24 サイクル、伸長(72°C, 5 min))を行い、PCR 産物を *Bse*LI (New England Biolabs)で処理した。変異型アレル(*se13*)は 120 bp と 30 bp のバンドとして検出される。12%アクリルアミドゲルで電気泳動し(250 V, 120 min)、*se13* アレルの有無を判定した。*hd1/se1* および *ehd1/efl-h* の判別マーカーとして、indel マーカーを用いた。表 2 に示すプライマーを用いて PCR 反応(熱変性(94°C, 2 min)の後、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(55°C, 30 sec)、伸長(72°C, 1 min)を 40 サイクル、伸長(72°C, 5 min))を行った。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動した際、*hd1/se1* では、野生型アレル(トランスポゾン *mPing* の挿入なし(-))は 458 bp, 変異型アレル(*mPing* 挿入有り(+))は 888 bp を、*ehd1/efl-h* では、野生型アレル(*mPing*(-))は 149 bp, 変異型アレル(*mPing*(+))は 579 bp のバンドとして検出される。*ghd7/el* の判別マーカーは、*hd1/se1* および *ehd1/efl-h* と同じく、indel マーカーを利用し

た。表 2 に示すプライマーを用いてステップダウン PCR (熱変性(94°C, 2 min)の後、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(65°C (1 サイクル毎に 1°C 降下), 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 16 サイクル、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(52°C, 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 24 サイクル、伸長(72°C, 5 min))を行った。1%アガロースゲルにおいて、野生型アレルは 450 bp, 変異型アレルは 350 bp のバンドとして検出される。*se5* の判別は、dCAPS マーカーを利用した。表 2 に示すプライマーを用いてステップダウン PCR (熱変性(94°C, 2 min)の後、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(65°C (1 サイクル毎に 1°C 降下), 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 11 サイクル、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(52°C, 30 sec)、伸長(72°C, 30 sec)を 24 サイクル、伸長(72°C, 5 min))を行い、PCR 産物を *Sac* I (Takara-Bio) で処理した。変異型アレルは、12%アクリルアミドゲルにおいて 160 bp と 30 bp のバンドとして検出される。

2.2.9 単変異および多重変異系統の上位性解析

2012 年および 2013 年に京都大学北部構内実験圃場(N35°01' E135°46')にて、上記で作製した多重変異系統を自然日長条件(ND)下で栽培し、これらの到穂日数を調査した。2012 年は 4 月 24 日、2013 年は 4 月 23 日に播種した。播種日から各系統の出穂日までの日長時間は、イネの限界日長とされる 13.5 時間を上回っていたことから、栽培期間中の日長はすべて長日条件下で推移したと考えられる。

2.3 結果

2.3.1 X61 の原因遺伝子 *se13* の機能検証

Se13 の完全長 cDNA を同定するために、銀坊主における *Se13* 転写産物の 3'-RACE PCR を行った。6 つのコロニーからプラスミドを精製し、シーケンス解析を行ったところ、それぞれ異なる構造の転写産物が得られた(図 8)。このことから、*Se13* 座から選択的スプライシングによって異なる複数の転写産物が合成されることが明らかとなった。これら転写産物のうち、“ α ”は、全長 906 bp であって、7 つのイントロンと 8 つのエキソンから成っており、~34 kDa のタンパク質をコードすると推定された。このタンパク質はこれまでに報告されているシロイヌナズナ P Φ B 合成酵素 HY2 とアミノ酸レベルで 49% の相同性を示した。一方、“ β - ζ ”はフレームシフトするもの、または 5' 側に新たにできた開始コドンから翻訳されるものなど、不完全なタンパク質をコードする転写産物であることが明らかとなった。

Se13 転写産物“ α ”を 35S プロモーターに融合し(35S::*Se13*)、突然変異系統 X61 に導入した。コントロールとして β -glucuronidase (GUS) を 35S プロモーターに連結したコンストラクト(35S::*GUS*)も X61 に導入した。その結果、短日条件下ではどの系統においても到穂日数に変化は観察されなかったが、長日条件下では 35S::*GUS* を導入した系統(以下、X61^{V_{cc}})が X61 と同程度の到穂日数を示すことが認められた。一方、35S::*Se13* を導入した系統 (以下、X61^{Comp})は銀坊主とほぼ同程度の到穂日数を示し、感光性の喪失に起因する表現型は機能型 P Φ B 合成酵素遺伝子(*Se13*)を導入することにより回復することが明らかとなった(図 9)。

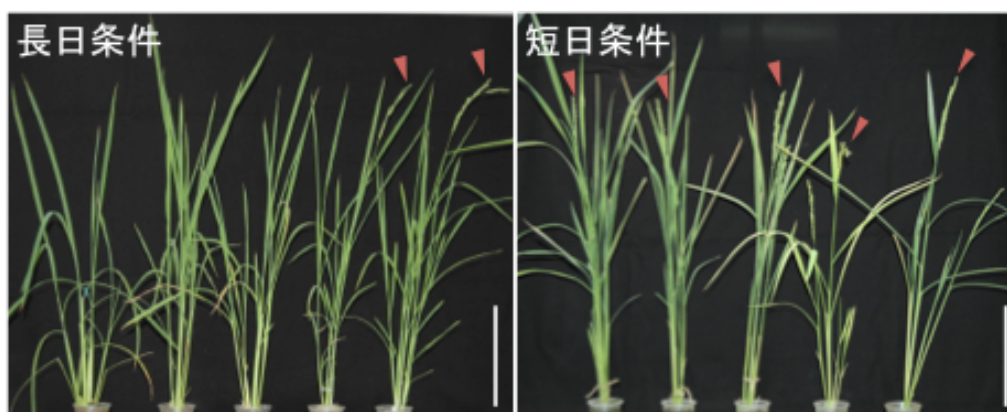
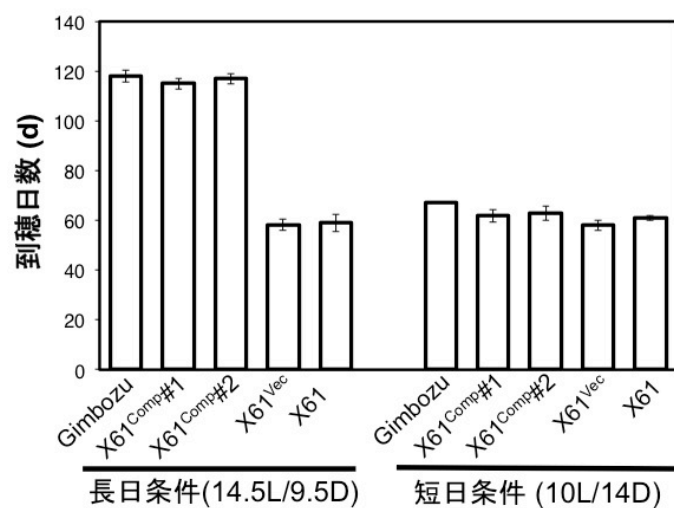


図 9 長日条件および短日条件における相補性試験の結果

X61^{Comp.} (X61 に機能型 PΦB 合成酵素遺伝子を導入した系統), X61^{Vec.} (X61 に *GUS* 遺伝子を導入した系統)を銀坊主、X61 とともに長日条件、短日条件において栽培した。左から順に Gimbozu, X61^{Comp.#1}, X61^{Comp.#2}, X61^{Vec.}, X61。その結果、長日条件下において X61^{Comp.}は銀坊主とほぼ同程度の到穂日数を示し、感光性を完全に回復した。

3' RACE によって得られた 6 つの *Se13* 転写産物に共通する配列を発現抑制の標的配列としたコンストラクトを日本晴に形質転換し、15 の *Se13* 発現抑制系統 (以下、*se13*-RNAi) を獲得した。 *Se13* 遺伝子の発現抑制効率を解析したところ、 *se13*-RNAi における *Se13* の発現量は、コントロール(日本晴)と比較して、約 7.4% ~75.8% と多様であった(図 10)。この中で、 *Se13* の発現が強く抑制された 2 系統(#1 および#3)は、過度な葉色の低下や 3 葉期における生長停止を示し、しばらくして致死した(図 19, 第 3 章)。一方、他の系統は長日条件下においても、日本晴と同等の到穂日数を示し、葉色の低下も観察されなかった。このため、以降の解析には *se13*-RNAi 系統 #1 および#3 を供試した(第 3 章を参照)。

標準条件(×1)である生体重 5g の植物体より抽出したサンプルを試験してフィトクロムの吸光を調べたところ、銀坊主では、フィトクロムの最大吸光スペクトルである $\lambda=660$ nm (赤色光)、 $\lambda=735$ nm (遠赤色光)付近において最大の吸光が観察された。一方、X61 は、銀坊主(WT) と比較して、ほとんど赤/遠赤色光に対して応答性を示さないことが明らかとなった(図 11 左図)。しかし、わずかに 660 nm 付近において吸光が観察されたことから、標準条件の 10 倍(×10)にあたる 50g の植物体よりフィトクロム A (PhyA) を抽出し、再度、詳細な赤/遠赤色光応答性について検討した。その結果、X61 は、 $\lambda=660$ nm(赤色光)、 $\lambda=735$ nm(遠赤色光)付近において極大の吸収が観察された(図 11 右図)。

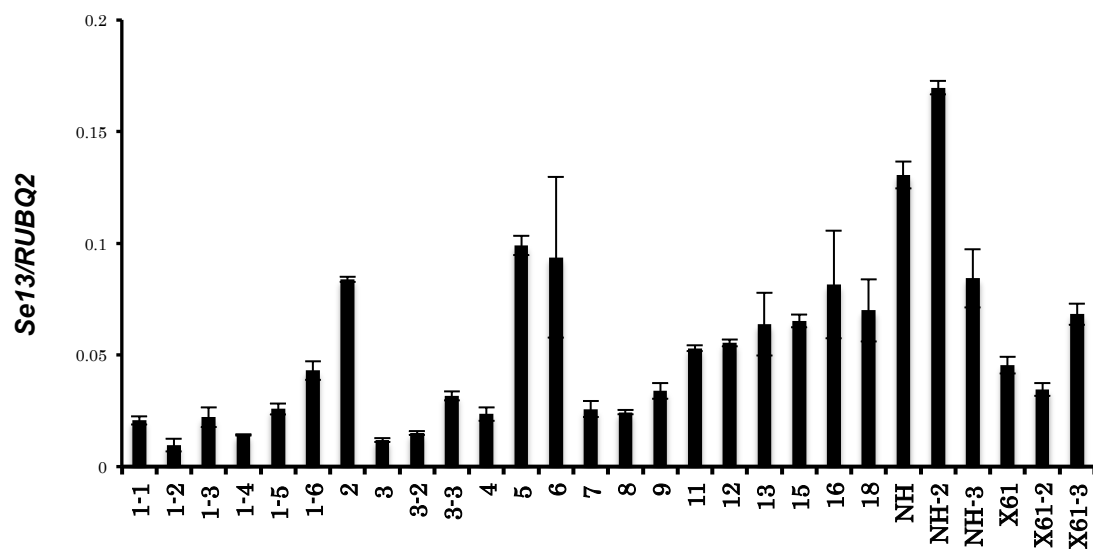


図 10 Se13-RNAi 系統の *Se13* 遺伝子の発現量

#1-1～18 までは Se13-RNAi 系統名、NH は日本晴を示す。

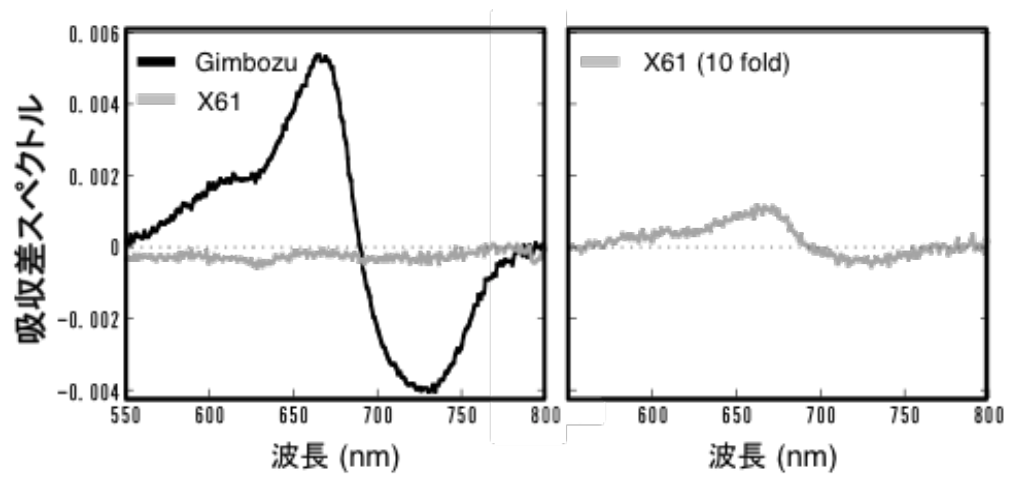


図 11 X61 および銀坊主の PhyA 光スペクトラム解析

黒は 銀坊主 (WT)を示し、灰色は X61 を示す。右図は 左の 10 倍量の植物体より抽出した。主に PhyA の光スペクトラムを示す。

2.3.2 X61 の早生化および感光性獲得の分子機構

BVPにある播種後 18 および 22 日(18 および 22DAS)における X61 のイネフロリゲン遺伝子 *RFT1* の発現量は、その発現ピークとされる夜明け直後(ZT0-3)に銀坊主のそれと比べて有意に高いことが明らかとなった。しかしながら、もう 1 つのフロリゲン遺伝子 *Hd3a* の発現は、X61 と銀坊主間で差が認められなかった。このことから、X61 の早生化は *RFT1* の発現上昇に起因することが明らかとなった。そこで、*RFT1* の上流遺伝子についてその発現を調査した。その結果、X61 では、銀坊主と比べて *Hd1* の発現に変化が確認されず、*Ehd1* および *Ehd2/RID1/OsID1* (以後、*Ehd2*)の発現のみが上昇していたことから、*Ehd1* の上流遺伝子である *Ehd2* の発現の上昇が早生化の原因であると考えられた(図 12)。一方、PSPにある播種後 25 および 28 日(25 および 28DAS)では、18 および 22DAS におけると同様に、X61 において *RFT1* の上昇が観察された。そこで、*Ehd1* および *Ehd2* の発現について調査したところ、X61 において *Ehd1* の発現は上昇していたが、*Ehd2* の発現に変化はなかった。次いで、他の出穂期関連遺伝子についても解析したところ、X61 において、感光性遺伝子 *Hd1* の発現リズムが完全に喪失するとともに、*Ghd7* の夕方(ZT12)の発現が低下していることが明らかとなった。これまでに、*Hd1* および *Ghd7* は時計遺伝子により制御されるとする報告がある(Hayama et al., 2003; Xue et al., 2008)ことから、時計遺伝子の概日リズムについて解析したところ、X61 において、*CCA1* の発現に顕著な変化は観察されなかったが、*OsPRR* シリーズ(*OsPRR1*, *OsPRR37*, *OsPRR59*, *OsPRR73*, *OsPRR95*) および *OsGI* の明期中の発現(振幅, amplitude)が低下していることが明らかとなった(図 13)。このことから、PSPにおける時計遺伝子の適切な振幅に赤色光の入

力が必須であると考えられた。そこで、BVP (18 および 22 DAS)における時計遺伝子の概日リズムについても同様に解析した。その結果、興味深いことに、18 および 22 DAS では、銀坊主および X61 いずれにおいても時計遺伝子は適切に振幅を繰り返しており、位相の前進や後退もないことが明らかとなった(図 13)。このことは、BVP および PSP 間で赤色光が時計遺伝子の振幅に及ぼす効果が異なることを示唆しており、このことが、X61 における感光性喪失の原因であると考えられた。

PSP において、*Se13* は感光性遺伝子 *Hdl* および *Ghd7* の発現を制御することが示されたため、それぞれの変異体 HS110 (*hdl*)、EG2 (*ghd7*)、それらを組み合わせた 2 重変異体(DMG1; *se13/hdl*, DMG4; *se13/ghd7*, DMG5; *hdl/ghd7*)および 3 重変異体(TMG1; *se13/hdl/ghd7*)を作出し、長日条件下での到穂日数を比較した。その結果、*se13* を有する 2 重変異体の DMG1 (*se13/hdl*)および DMG4 (*se13/ghd7*) は、X61 (*se13*)と同程度の到穂日数を示した。この結果は、発現解析の結果と矛盾がなく、*Se13* は *Hdl* および *Ghd7* と遺伝的な相互作用することが示唆された。また、DMG5 (*hdl/ghd7*) はそれぞれの単独の変異体(*hdl*, *ghd7*)よりも早生化したことから、これまでの報告と同様、*Hdl* と *Ghd7* の感光性経路は互いに独立的であることが示唆された。一方、DMG5 (*hdlghd7*)が TMG1 (*se13hdlghd7*)よりも晩生であった。このことは、*Hdl* および *Ghd7* 経路とは異なる未知の感光性経路の存在を示している(図 15)。また、SE5SE13 (*se5/se13*)は *se13* と同程度の到穂日数を示した(図 16)。

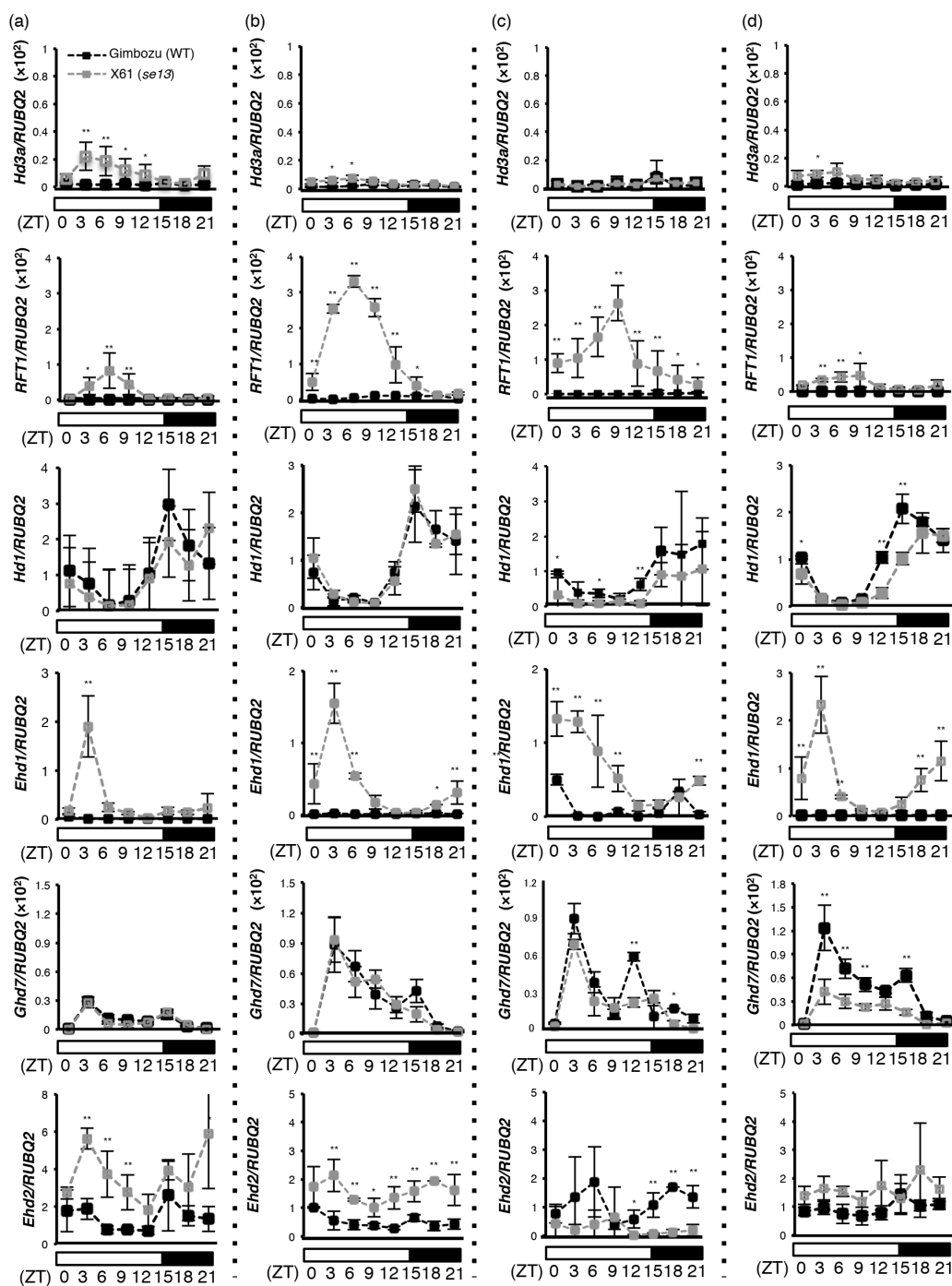


図 12 主な出穂期遺伝子の発現

a)18DAS b)22DAS c)25DAS d)28DAS の発現データ

**0.05 < P < 0.01; *P < 0.01. (two-tailed Student's t-test)

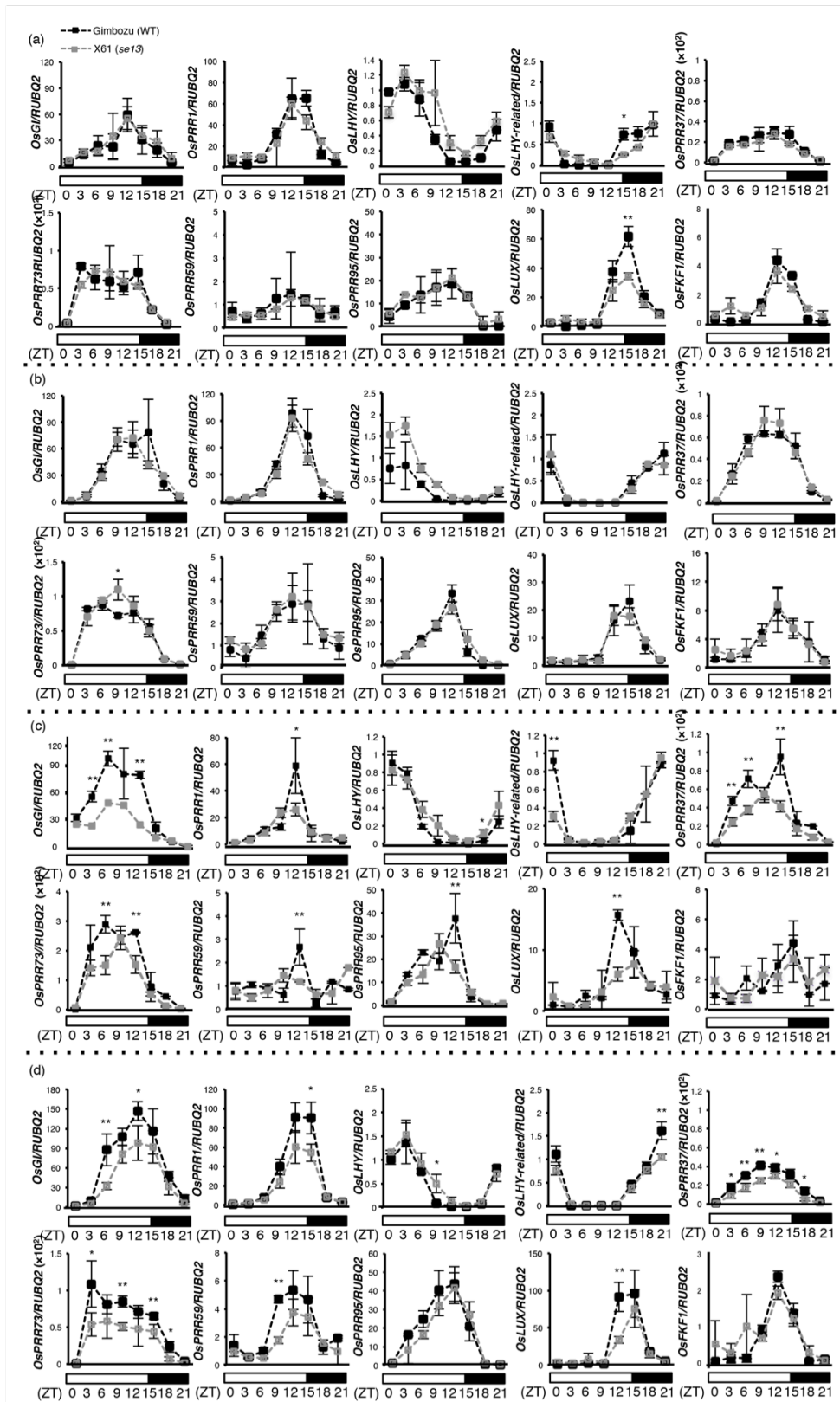
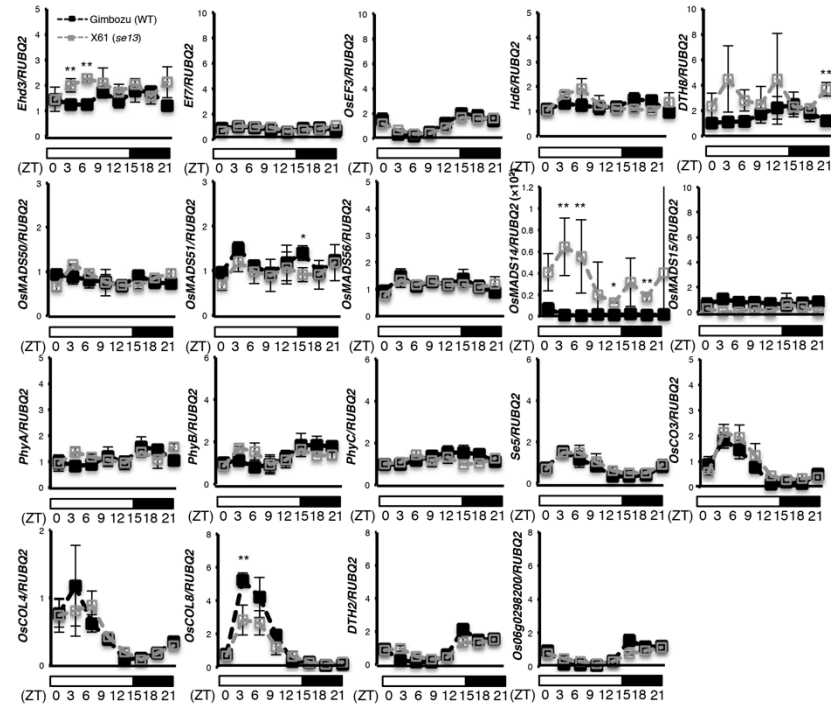


図 13 主な時計遺伝子の発現

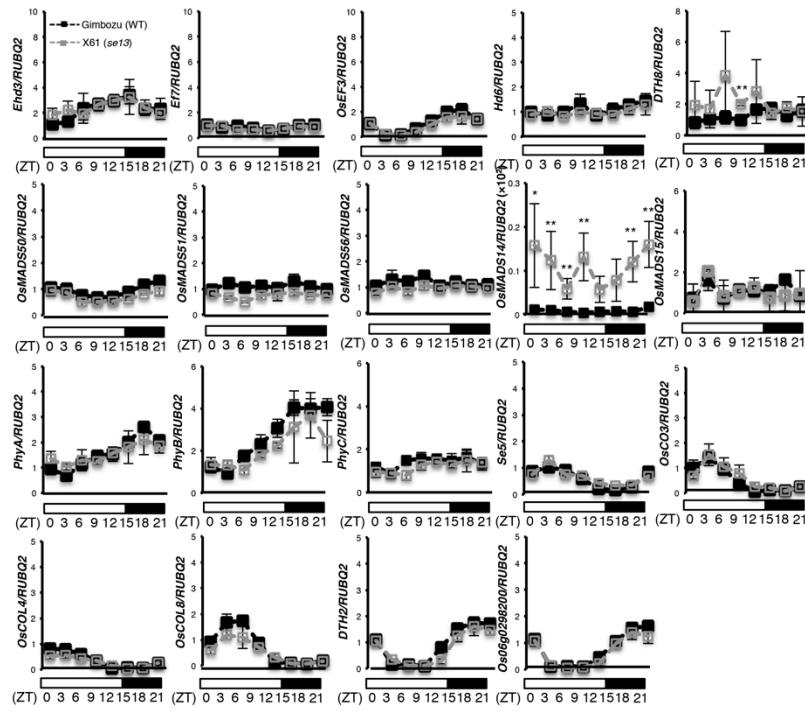
a)18DAS b)22DAS c)25DAS d)28DAS の発現データ

**0.05 < P < 0.01; *P < 0.01. (two-tailed Student's t-test)

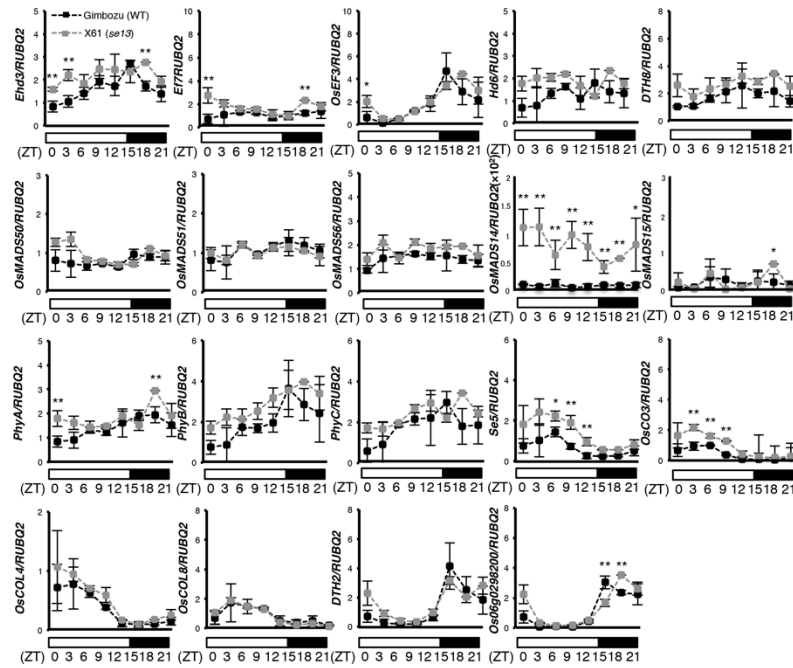
a)



b)



c)



d)

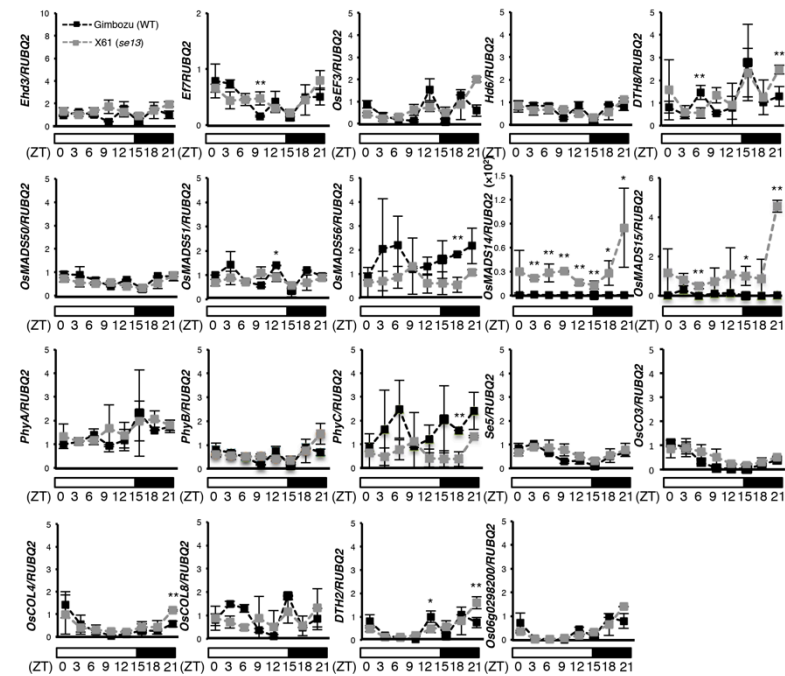


図 14 その他の出穂期遺伝子および時計関連遺伝子群の発現

a)18DAS b)22DAS c)25DAS d)28DAS の発現データ

**0.05 < P < 0.01; *P < 0.01. (two-tailed Student's t-test)

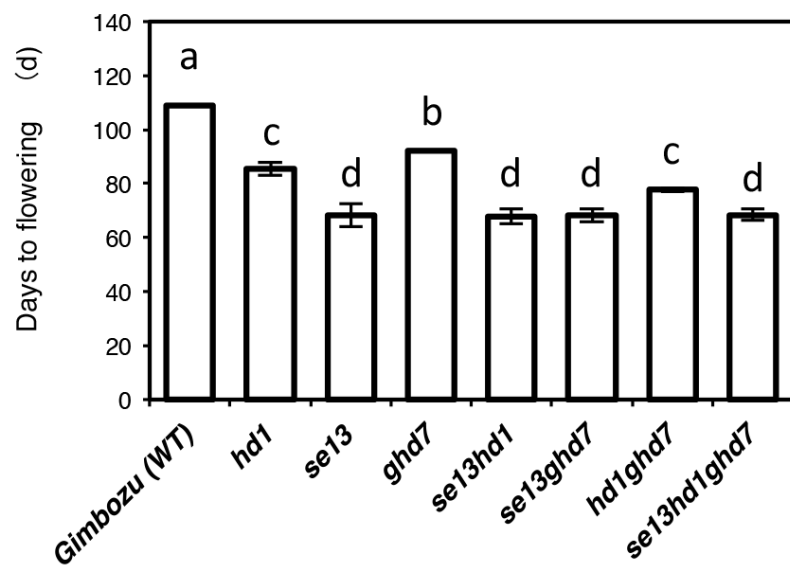


図 15 出穂期遺伝子の上位性解析

長日条件下における各系統の到穂日数 縦軸は到穂日数 横軸は各変異系統名を示す。

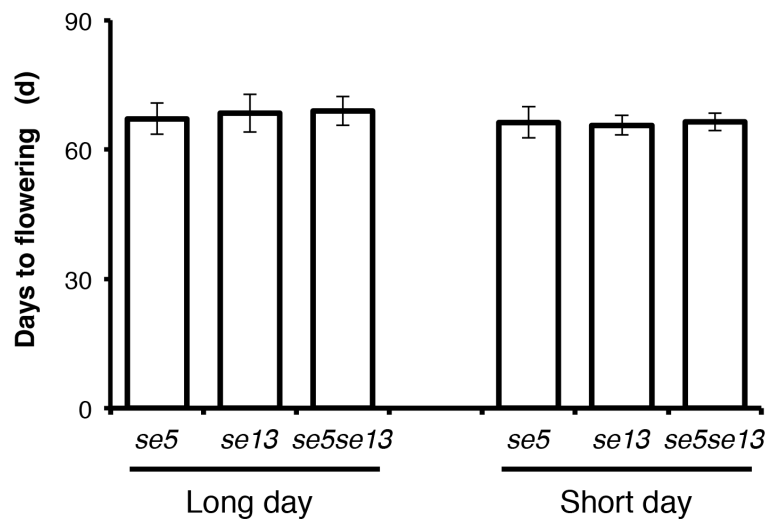


図 16 SE5、SE13、SE5SE13 の上位性解析

短日条件(10h light/14h dark)および長日条件下(9.5h light/13.5h dark)における到穂日数。縦軸は到穂日数 横軸は各変異系統名を示す。

2.4 考察

これまでの日長反応性に関する分子遺伝学的研究によって、多様なフィトクロム分子が協調的に花成制御の一翼を担っていることがシロイヌナズナ(Sharrock and Quail, 1989; Clack et al., 1994)、ダイズ(Watanabe et al., 2009)、トウモロコシ(Christensen and Quail; 1989)、ソルガム(Childs et al., 1997)など多くの植物種で報告されている。イネにおいては、*Se5* がフィトクロム発色団の生合成経路に関与する Heme Oxygenase をコードすることが知られており(Izawa et al., 2000)、*se5* 変異体を用いた研究から日長反応性(感光性)に関する知見がまとめられている。本研究は、X61 の相補性試験およびフィトクロムの赤色光応答に関する分光学的解析から、X61 の原因遺伝子 *Se13* が PΦB 合成酵素をコードすることを明らかにした。生化学(酵素学)的解析から発色団の生合成経路は既に明らかにされており、*Se13* は *Se5* の下流に位置するものと考えられた。*se5* と *se13* の 2 重変異体 (SE5SE13)を用いたエピスタシス解析において、SE5SE13 (*se5/se13*)が X61 (*Se5/se13*)と同程度の到穂日数を示したことから、*Se13* は *Se5* の下流に位置することが確認された。Andres et al. (2009)は、網羅的な遺伝子発現解析から変異を特定する手法の Volcano plot analysis を用いて、新たに *se5* 変異体 *s73* を単離するとともに、その早生化メカニズムを解析した。その結果、長日条件下の *s73* において *Ehd1* の発現上昇と *OsGI* の発現低下、また、それに伴う *Hd1* の発現量の低下を認め、このことが *s73* の早生化の原因であると結論した。本研究でも、25 DAS の X61 で、*s73* の場合と同様に、*Ehd1* の発現上昇と *OsGI* の発現低下、また、それに伴う *Hd1* の発現量の低下が観察され、感光性の鍵遺伝子である *Ghd7* の発現も低下していた。これまでの研究から、*Hd1* と *Ghd7* は時計遺伝子に強く制御

されていることが知られている(Itoh et al., 2008)。時計遺伝子の詳細な発現解析から、25 および 28 DAS の X61 で、明期中の *OsPRR* シリーズ(*OsPRR1*, *OsPRR37/Hd2*, *OsPRR59*, *OsPRR73*, *OsPRR95*)の振幅が低下することが明らかとなった。*Ghd7* の上流遺伝子として、シロイヌナズナ時計関連遺伝子 *ELF3* のホモログである *Ef7* に加えて、*Ehd3* が知られているが、これら遺伝子の発現は X61 と銀坊主間で差異は認められなかった(図 14)。一方、エピスタシス解析により、*Ghd7* との関連性が示唆されている *OsPRR37/Hd2* (Fujino and Sekiguchi, 2005; Shibaya et al., 2011)の発現量が低下することが認められた。さらに、時計中央振動子 *PRR7* のホモログであるオオムギ *Ppd-H1* (*Photoperiod-H1*, Turner et al., 2005)、コムギ *Ppd-D1a* (Beales et al., 2007)、ソルガム *SbPRR37* (Murphy et al., 2011)の変異体は感光性を喪失していることが報告されている。以上の知見から、X61 における *Ghd7* の発現量の低下は時計遺伝子 *OsPRR37/Hd2* の発現量の低下に起因するものと考えられた。しかしながら、*OsPRR37* は *Ghd7* の発現を制御しないとする反証結果もあり(Lin et al., 2003; Koo et al., 2013)、今後は、*OsPRR37* を過剰発現する組換え体 X61 を作製するなど、感光性の作用と時計遺伝子との関連性についてさらに検討する必要がある。

近年、シロイヌナズナの概日時計研究において、示唆的な 2 つの研究報告がなされた。ひとつは、フィトクロム null 変異体(*phyABCDE*)に *CCA1 pro::LUC* のコンストラクトを導入した形質転換体を用いて、その時計遺伝子の発現(発光)を解析し、時計遺伝子の適切な振動(発振)には赤色光が必須であるという報告である(Hu et al., 2013)。もうひとつは、免疫学的手法の 1 つである chromatin immuno-precipitation (ChIP) 法により、*ELF3*、*ELF4*、および *LUX* (*LUX*

ARRUMAJIRO)は複合体(Evening Components, EC)を形成し、これが時計遺伝子 *PRR7*(*Pseudo response regulator 7*)のプロモーター領域に結合することを明らかにした報告である(Dixon et al., 2011; Helfer et al., 2011; Chow et al., 2012)。また、ELF3 とフィトクロムの分子的关系性の解析から、*PRR7* が赤色光シグナルを時計遺伝子へ入力する因子と考える報告もある(Kolmos et al., 2011)。このように、分子生物学的手法の発展に伴い、時計遺伝子の適切な発振には赤色光が重要であることが明らかになりつつある。しかし、イネにおいてはこれまでに、赤色光が時計遺伝子の振動に必要であるという報告はなかった。本研究の結果、X61 において時計遺伝子の振動(amplitude)が低下したことから、イネにおいても赤色光は重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、BVP にある 18 および 22 DAS の X61 において、時計遺伝子が適切に振動を繰り返していたことから、時計遺伝子の適切な振動には赤色光依存、非依存的な発育ステージが存在することが示唆される。銀坊主および X61 において、22 DAS は BVP であり、25 DAS は PSP である。以上のことから、BVP では時計遺伝子は赤色光非依存的に適切な振動を繰り返しているために、*Hdl* および *Ghd7* に影響を与えないと考えられた。一方、PSP では赤色光依存的に時計遺伝子の適切な振動が繰り返されるため、*Hdl* および *Ghd7* の制御を介して感光性が獲得されるのではないかと考えられた(図 17)。

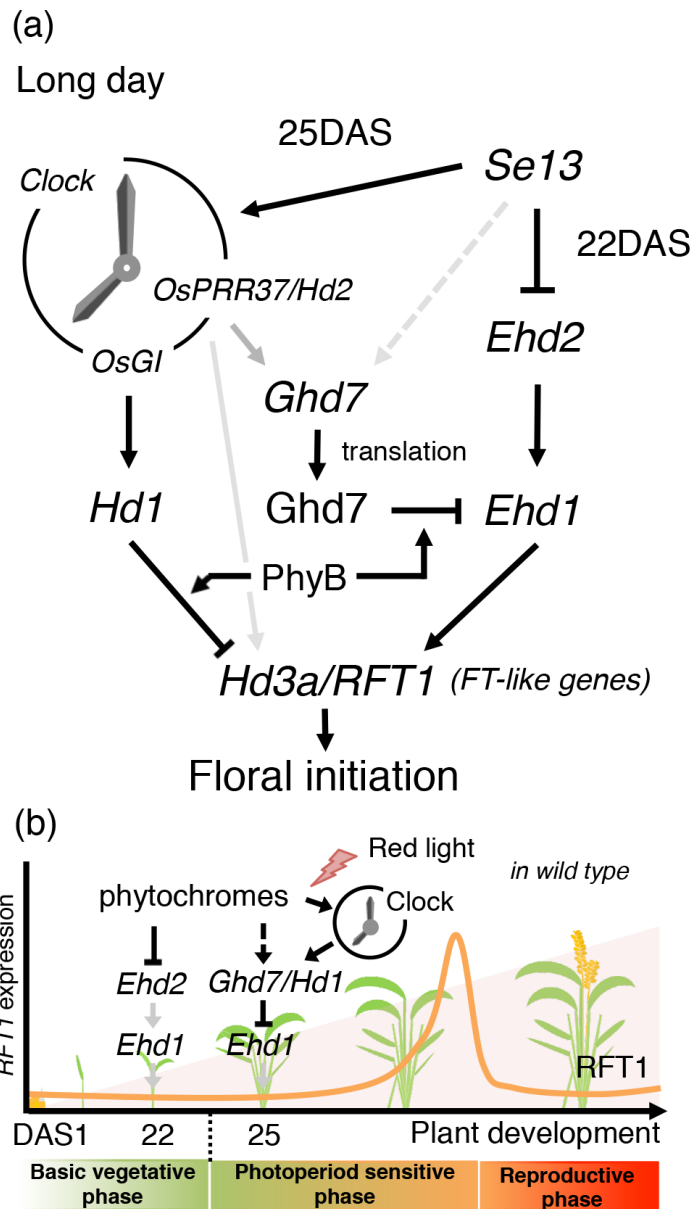


図 17 本研究で考えられたイネ出穂の遺伝子ネットワークモデル
a, b) フロリゲン遺伝子 *RFT1* は出穂約 30 日前に一過的に発現する (Komiya et al., 2008)。長日条件下において *Se13* は *Ehd2* の発現を抑制し、イネの出穂を抑制する(18, 22DAS)。一方、25, 28DAS においては、時計遺伝子の発現を適切に調節することにより、*Ghd7* および *Hd1* の発現を正に制御し、出穂を抑制する。22 および 25DAS はそれぞれ、BVP および PSP の相転換期に位置する。

【第3章】

フィトクロム発色団フィトクロモロビン合成
酵素がイネの生育に及ぼす効果

3.1 緒言

テトラピロールは、4個のピロール環が環状(ポルフィリン)もしくは直鎖状に結合した物質であり、植物においてはクロロフィル、ビリン、ヘム、シロヘムの4つのグループに大別される。その分子代謝は葉緑体で行われ、グルタミルtRNA^{Glu}から第一律速段階であるアミノレブリン酸(5-ALA)へと代謝される(C5経路)。C5経路は生合成系全体の律速段階であることが知られている。次に、2分子の5-ALAが縮合して1つのピロール環が形成され、これらが4つ連なることでテトラピロールが形成される。さらに環状化しポルフィリン環が形成された後、環全体の共鳴系が完成し、Proto IX(プロトポルフィリン)が生成される。ビリン合成の基質であるヘム(ヘムb、プロトヘム)は、Ferrochelatase (FC)により Proto IX にFe²⁺が配位することで合成される。また、赤色光受容に必須なフィトクロム発色団フィトクロモビリン(PΦB)やフィコビリソームのビリン色素は、Heme oxygenase (HO)によるヘムの酸化的開裂により合成が開始される。一方、クロロフィル合成系へは、Mg-chelataseによりProto IXにMg²⁺が配位することによって進行し、Mg-Proto IX(Me)などを経て、最後に長鎖アルコール(フィトール)の修飾を受けて完成する。クロロフィル合成系の最終産物であるクロロフィル(a)は、葉緑体に局在し光合成の初期反応($12\text{H}_2\text{O} + 12\text{NADP}^+ \rightarrow 6\text{O}_2 + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+$ etc.)に関与する。一方、ヘムは核に輸送されアポタンパクの種類、構造、結合方式により電子伝達反応、酸化還元反応、活性酸素消去といった様々な生体反応に利用されることが広く示されている。また、ヘムやクロロフィル中間体Mg-Proto IX (Me) は葉緑体の機能状態を核に伝えるシグナル分子として機能していること(レトログレードシグナル)が示唆されている。緑藻*Chlamydomonas reinhardtii* に

において、Mg-Proto IXおよびヘムはHSP70A (*Heat shock protein 70A*)やLHC (*Light harvesting complex*) 構成体の核遺伝子の転写制御に関わることが相次いで報告されている(Meinecke et al., 2010)。始原植物とされる紅藻*Cyanidioschyzon merolae*においては、Mg-Proto IX(Me)が葉緑体由来のシグナルとして核DNAの複製を誘導し、細胞周期を調節することが動植物を通じて初めて報告されており、高等植物種においてもそのシグナルの保存性が確認されるとともに(Kobayashi et al., 2009)、受容体についても詳細な解析がなされている(Kobayashi et al., 2011)。一方、光を吸収し電子を放出するポルフィリン化合物(i.e. Proto IX)の強い光増感酸化作用は活性酸素種の発生に関与し、プログラム細胞死(光過敏反応死)を誘導する。このように、テトラピロール物質は多様な分子的機能(性質)を有するため、その合成系は厳密に管理されなければならない。

シロイヌナズナにおいて、分子遺伝学的にレトログレードシグナル異常をきたしたと考えられる*genome uncoupled (gun)* 変異体が複数単離されており(Susek et al., 1993)、これらを用いてテトラピロール経路における分子代謝の解明とシグナル分子の探索が行われた。その結果、それぞれGUN1はPentatricopeptide repeat protein (PPR)、GUN2^{*1}はHeme oxygenase、GUN3^{*1}はPΦB synthase、GUN4はMg-chelatase (porphyrin complexes bind the ChlH)、そしてGUN5はMg-chelatase H subunit (ChlH)をコードしていることが明らかになった。GUN1を除き全てのGUN(2-5)はテトラピロール代謝に関与していることが示された(Mochizuki et al., 2001, Larkin et al., 2003, Koussevitzky et al., 2007, Woodson and Chory 2008)が、*gun*の表現型を説明しうるレトログレードシグナルの分子実体の特定には至らなかった(Moulin et al., 2008; Mochizuki et al., 2008)。一方、テトラピロールの代謝ネッ

トワークに関する理解は大きく進んでいる。そのネットワークは、明期と暗期において大きく異なる。暗期においては、細胞質から核に移行したCOP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)がHY5 (LONG HYPOCOTYL 5)を分解するとともに、PIF1、3、4、5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs 1, 3, 4, 5)の蓄積を誘導する。また、ジベレリンがDELLAの分解を介してPIF3、4を活性化させる。すなわち、クロロフィル合成を正に制御するHY5の分解と、負に制御するPIFの活性化を介して光誘導性クロロフィル合成遺伝子(*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*、*CHL27*、*PORC*、*CAO*)の発現を抑制する。またCOP1の作用により蓄積したEIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3)はPchl_{ide}還元酵素^{*2} *PORA*と*PORB*のプロモーター領域に結合し、それらの発現を誘導する。しかし、PORの(赤色)光依存的な代謝過程によりプロトクロロフィリド(Pchl_{ide})が蓄積し、Pchl_{ide}と結合したPORは*FLU* (*FLUORESCENT IN BLUE LIGHT*)および*CHL27*と複合体を形成した後、GluTRと結合することでALA合成を阻害する。さらに、発色団とクロロフィル合成経路の分岐点において色素体内のATPおよびMg²⁺イオン濃度が低下し、MgChの不活化とFeChの活性化が起こる。また、暗期における色素体内の還元作用の低下に起因してチオレドキシン(TRX)のCHLIサブユニットへの還元作用の低下が起こり、MgCh活性が低下する。これによりヘム合成の流れが加速し、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害が起こる。明期においては、フィトクロム(PHY)と青色光受容体クリプトクロム(CRY)がCOP1の機能を阻害することで、HY5の蓄積が起こる。また、PHYは、PIFを分解するとともに*GLK*の遺伝子発現を誘導する。その結果、HY5とGLKの活性化とPIFの分解による脱抑制により、光誘導性クロロフィル合成遺伝子の発現が上昇する。また、COP1の不活性化と

エチレンシグナルの低下によってEIN3が分解され、*PORA*と*PORB*の発現は減少する。一方で、光依存的にPORが活性化し、Pchl_{ide}の還元が行われると、GluTRはFLU複合体から解離し活性化される。ヘム/クロロフィル合成の分岐点では、ATPやMg²⁺イオン濃度の上昇、TRXによるCHLIの還元、GUN4によるCHLHへの基質供給により、MgCh活性が上昇する。FeCh活性がATP濃度の上昇に伴い低下すると同時に、ヘム合成の低下を招きGluTRのフィードバック阻害は解除される。その結果、ALA合成の活性化とともにクロロフィル合成経路への流れが増加し、クロロフィル合成が促される。このように、ヘム-フィトクロモビルン(発色団)合成経路を含む全テトラピロール代謝がクロロフィル合成に関与していることが分かる。実際に、ヘムから続く発色団代謝に関与する酵素の機能変異体(*hyl/gun2*, *hy2/gun3*)ではクロロフィル含量が低下する。

PΦB合成酵素HY2 (GUN3)は、その酵素学的解析から還元型フェレドキシン(Fd-red)依存性の酵素タンパク質(Ferredoxin dependent bilin reductases (FDBRs))であることが示されている(Kohchi et al., 2001)。ホモロジーモデルを用いた構造学的解析により、HY2はBV結合性ポケットを有し、最も親和性の高いAtFd2 (At1g60950)と静電氣的相互作用を中心として結合していることが示されている(Chiu et al., 2010)。また特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析により、HY2は葉緑体のストロマに局在するものと考えられる(Tsurui et al., 2001)。これらのことから、PΦBは、葉緑体の光化学系Iにおいて光エネルギーにより活性化されたAtFd2が電子供与体としてHY2と結合し、BVを還元することで合成されと考えられる。イネにおいては、光合成効率または収量性の向上の観点からクロロフィル合成に関する変異体が多数収集されており、中国のグループを中心とし

てMgCh (*Chl1*, Zhang et al., 2006; *Chl9*, Wu et al., 2007) など次々単離されている。しかし、テロラピロールの分子代謝に関する構成的な理解は未だ乏しい。第2章に示すように、*Se5*および*Se13*は発色団合成に関与しており、これらの変異体では葉色の低下が観察される(Xu et al., 2012)。しかし、RNAi法によるPΦB合成酵素(*Se13*)の発現抑制系統は、過度な葉色の低下や3葉期における生長停止に起因した致死性の表現型を示す。そこで、本章では、*se13*のイネの生育に及ぼす効果について検証するとともにPΦB合成酵素の分子進化学的な見地より検討を加えた。

*1 Heme oxygenaseをコードする*GUN2*およびPΦB synthaseをコードする*GUN3*は、それぞれ*Long Hypocotyl 1 (HY1)*および*HY2*の新規アレル。

*2 “Protochlorophyllide”を“Chlorophyllide”に還元する作用を有するPOR還元酵素 Protochlorophyllide oxidoreductase。

3.2 材料および方法

3.2.1 植物材料

植物材料として、銀坊主、X61、日本晴、*Se13*-RNAi(#1)、*Se13*-RNAi(#3)を供試した。

3.2.2 細胞内局在性解析

*in silico*解析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)によって予測された*Se13*の葉緑体局在シグナル(Transit Peptide)配列を緑色蛍光タンパク質GFPに融合したコンストラクトを作製し、細胞内局在性解析用ベクターpTH2 (Niwa et al., 1999)に導入した。プラスミドを導入した大腸菌株DH5 α を3 mlのLB液体培地にて37°C、一晩、培養した後、培養液を200 mlのLB液体培地に添加し、さらに37°C、一晩、培養した。遠心操作 (5,000 G, 30 min, 4°C)により集菌した後、QIAGEN Plasmid Purifications Kit Maxi (QIAGEN GmbH)を用いてプラスミドを抽出し、使用時まで-20°Cで保存した。局在性解析は簡便性の観点からタマネギ表皮細胞およびイネプロトプラストにて解析した。タマネギの表皮細胞においては、パーティクル・ボンバーメント法(PDS-1000/He™, Bio-Rad)により金粒子にコーティングしたプラスミドを表皮細胞に導入し、30°C、暗所で一晩静置した後、蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000, OLYMPUS Corp.)下でGFPの局在性を解析した。なお、圧力調整用のラプチャーディスクは900 psi、金粒子は1.0 μ mのものを使用した。イネプロトプラストの単離は、銀坊主種子を粒状培土(IBIKO Corporation Agri and Bio division)とバーミキュライト(NITTAI)を2:1の割合で混合した培養土に播いた後、植物体を徒長させることを目的として低光量型の植物育成用チャンバー (CLE-303, TOMY-SEIKO)にて10-14日間栽培した。地際部と葉身部を除去した後、

市販のカミソリを用いて葉鞘を0.5-1 mm幅に切断した。減圧処理を30分間行った後、酵素液(1.5% セルラーゼ、0.75% マセロザイム、0.6 M マンニトール、10 mM MES、1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% BSA)中で30°C、4時間、40 rpmで振とう培養した。酵素液を取り除き、W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 2 mM MES (pH 5.7)) を加え、30°C、1時間、40 rpmで振盪培養した。32 μm のナイロンメッシュで濾過し、遠心操作(125 $\times$ g, 10 min)を行った。上清を減圧器によりすばやく除去し、MaMg (0.6 Mマンニトール, 15 mM MgCl_2 , 4 mM MES (pH 5.7))を加えよく混和した後、パスツールピペットを用いて20%ショ糖液を試験管下から境界層を作るように穏やかに加え、ショ糖密度勾配遠心法(125 $\times$ g, 10 min)によりプロトプラストおよび残渣を画分した。集めたプロトプラストにW5を加え、血球計算盤を用いて、 2×10^6 cell/mlになるように調整をした後、PEG法(Bart et al., 2006)により作製したプラスミドを接種した。再度遠心操作(125 $\times$ g, 10min)を行い、PEGを取り除きKMC(117 mM KCl, 82 mM MgCl_2 , 85 mM CaCl_2)を加え、30°C、一晩、暗所で静置した後、蛍光顕微鏡(FLUOVIEW FV1000, OLYMPUS)下でGFPの局在性を解析した。

3.2.3 クロロフィルおよびテトラピロール中間体の測定

クロロフィル含量の測定は、Porraらの方法(Porra et al., 1989)に従った。3 mlのDMF (N,N-dimethyl formamide)に約0.2 gになるように切断した葉身を浸漬し、4°C、一晩、暗所で静置した。溶出したクロロフィルを含むDMF液は紫外可視分光光度計(Bio-spec 1600, Shimadzu)で646.8 nmおよび663.8 nmにおける吸光度を測定し、クロロフィルa, bの含量を算出した。テトラピロール中間体については、

Protoporphyrin IX (ProtoIX)、Mg-Protoporphyrin IX (Mg-Proto)、Mg-Protoporphyrin IX monomethyl ester (Mg-Proto Me)の量をMochizuki et al. (2008)の方法に従って測定した。植物材料(50-100 mg)を秤量し、液体窒素で凍結させた後、マルチビーズショッカー(PAT, Yasui-kikai, Osaka, Japan)により破砕した。破砕したサンプルに0.1 mlの-20°Cに予め冷やしたアセトンを加え、遠心操作(10,000×g, 10 min, 4°C)を行った。上清を回収し、さらに残渣に0.1 ml の アセトンを加え遠心操作(10,000×g, 10 min, 4°C)を行った。上清を混合し、秤量した後、蛍光HPLC解析に供した。色素体の分離には逆相C18カラム (150×2.1 mm; 4-μm particle diameter Nova-Pak®) を使い、HPLCはLC-VP (Shimadzu)を、蛍光検出器はRF-10AXL (Shimadzu)を使用した。移動相はそれぞれSolvent A (Methanol: Acetonitrile: 0.25 M aqueous pyridine(pH5.0)=50:25:25(v:v:v)) Solvent B (Methanol:Acetonitrile:Aceton=20:60:20(v:v:v))を用い、タイムプログラム(Time: 0 min, Solvent B: 0%; 12 min, 45%; 17 min, 98%; 22.5 min, 98%; 0 min, 0%)、流速1.2 ml/min、Proto IXの検出には励起波長を400 nm, 蛍光波長を635 nmに、Mg-ProtoおよびMg-ProtoMeの検出には励起波長を417 nm, 蛍光波長を600 nmにより行い、波長の切替えはMg-Protoの溶出時間に基づいて25.25 minに行った。検量線は、それぞれの標品(ProtoIX, Mg-Proto, Mg-ProtoMe)をDMSOに溶解後、アセトンにより2倍希釈系列を5点作成した。ProtoIXおよびMg-ProtoはFrontier Scientificより購入し、Mg-ProtoMeは京都大学植物生理学分科・望月伸悦博士よりご提供頂いた。

3.3 結果

3.3.1 イネ PΦB 合成酵素の細胞内局在性

相補性試験において PΦB 合成酵素としての活性を有することが示された *Se13* 選択的スプライシング産物“α”の cDNA(終止コドンの除いたもの)および *in silico* 解析により予測された N 末端側 33 アミノ酸の Transit Peptide (TP)をコードする配列を緑色蛍光蛋白質 GFP に融合したコンストラクトを作製し、コントロール(35S::*GFP*)とともに、その局在性をタマネギ表皮細胞およびイネプロトプラストに導入した(図 18)。その結果、タマネギ表皮細胞において、TP のみを融合した場合には葉緑体の自家蛍光シグナルが観察される箇所と GFP 蛍光シグナルが観察される箇所とが一致した。このことから、*Se13* タンパク質の TP は葉緑体移行シグナルとして機能することが示された。しかし、同じく葉緑体への移行が期待された全長 cDNA を GFP に融合した場合には、コントロールと同様に、核および細胞質においてその蛍光シグナルが観察された。このことは、タマネギ表皮細胞では葉緑体が未発達(エチオプラスト)であることや、異なる宿主を用いたためであることが考えられた。このため、葉緑体が発達しているイネ鞘葉由来のプロトプラストにおいて同様の実験を行った。しかし、タマネギ表皮細胞を用いた場合と同様に、GFP の蛍光シグナルは核および細胞質で検出された(図 18)。

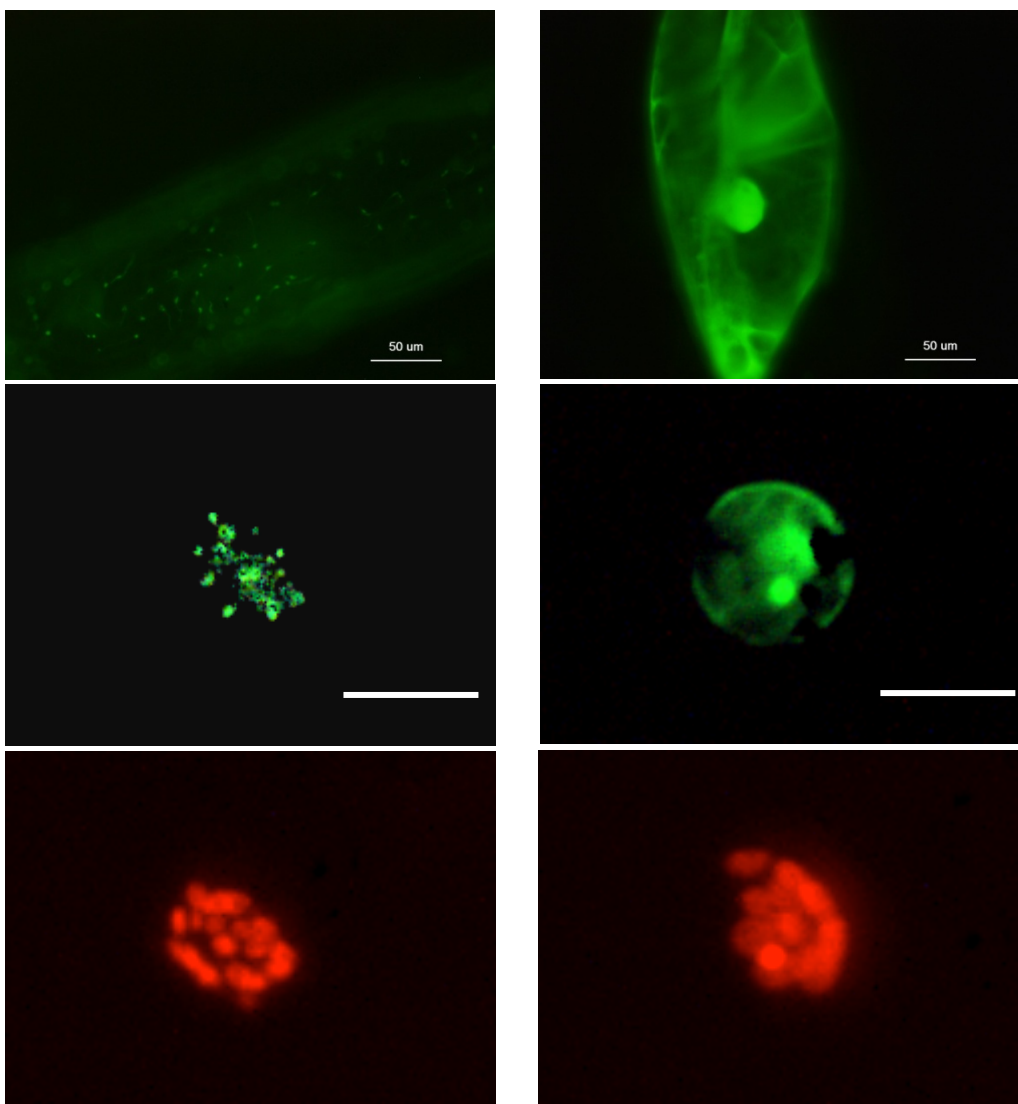


図 18 Se13-GFP 融合タンパク質の細胞内局在性

図右は *Se13*-TP, 左は *Se13* 全長を融合したものを示す。上段はタマネギ表皮細胞を示し、中・下段はイネプロトプラストにおけるそれぞれの局在性を示す。緑は、GFP 蛍光を 赤は、葉緑体の自家蛍光をそれぞれ示す。

3.3.2 PΦB 合成酵素がイネの生育に及ぼす効果

葉鞘の長さに基づいて、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)の光応答性について解析した。明条件下において、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)の葉鞘長の長さは、それぞれ 0.96 ± 0.09 cm および 0.91 ± 0.12 cm であり、原品種日本晴(0.44 ± 0.05 cm)と比較して有意に伸長していることが明らかとなった(図 19)。一方、X61 は 0.93 ± 0.10 cm であり、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)と日本晴の中間型であった。また、第 3 葉においても同様の傾向が認められた。暗条件下において、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)の葉鞘長は、日本晴と同程度であった。一方、根長に関しては、明条件および暗条件いずれにおいても *se13*-RNAi 系統(#1, #3)と銀坊主の間に有意な差はなかった。

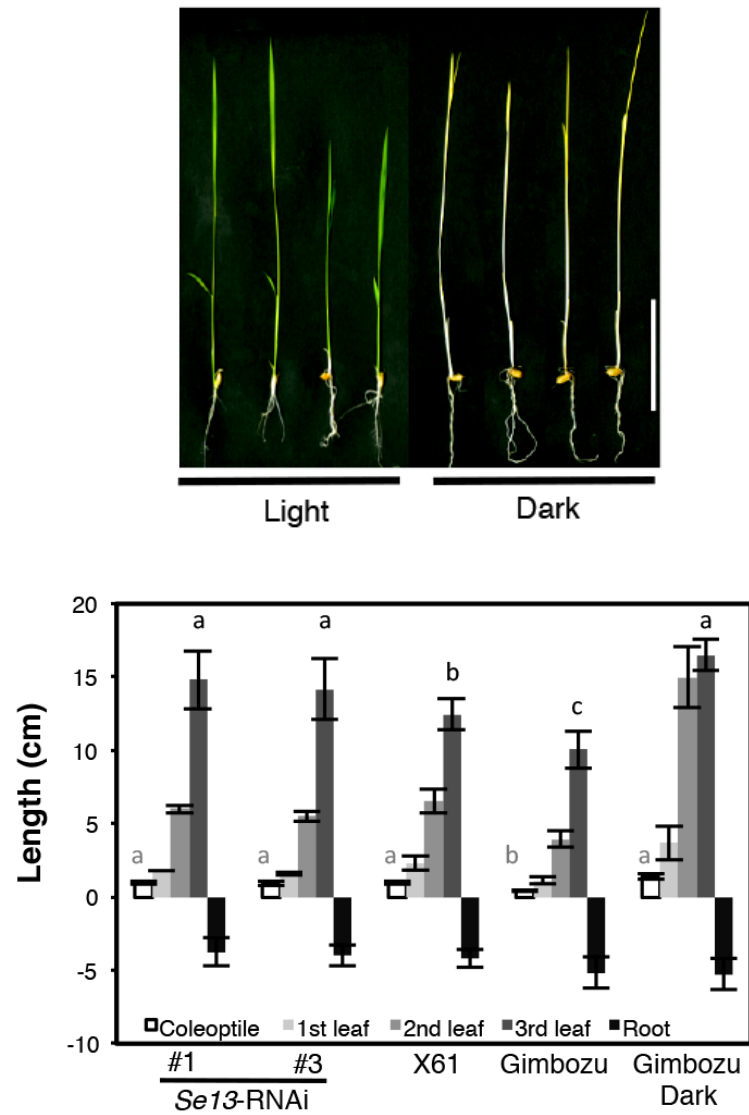


図 19 *Se13*-RNAi 系統および X61, 銀坊主の植物体(上図), 子葉鞘長(下図)

上図 植物体は左から *Se13*-RNAi #1, #3, X61, 銀坊主を示す。スケール 5cm。下図は子葉鞘長, 第 1 葉長, 第 2 葉長, 第 3 葉長, 根長をそれぞれ示す。

3.3.3 クロロフィルおよびテトラピロール中間体の定量

se13-RNAi 系統(#1, #3)は過度な葉色の低下を示したことから、クロロフィル含量を DMF 吸光度(Porra)法により解析した。その結果、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)では、クロロフィル a, b の含量が大きく減少していることが明らかとなった。一方、X61 におけるクロロフィル含量の減少は軽微であった。次いで、クロロフィル合成の中間体であり、多様な生体反応に関与し致死の表現型を説明しうると考えられたテトラピロール化合物 3 種(ProtoIX, Mg-ProtoIX, Mg-ProtoIX Me)の含量を蛍光-HPLC (High performance liquid chromatography)法により測定した。Mg-ProtoIX および Mg-ProtoIX Me の含量は、*se13*-RNAi 系統、X61 および日本晴の間に大きな差はなかった。ProtoIX は、*se13*-RNAi 系統および X61 において、多量に蓄積されていた(図 20)。

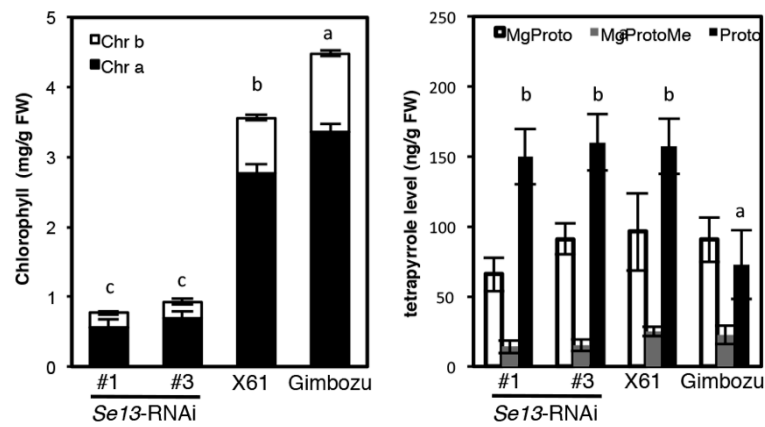


図 20 *Se13*-RNAi 系統および X61, 銀坊主のクロロフィル a および b 含量(左図)とテトラピロール物質含量(右図)

縦軸はクロロフィルまたはテトラピロール物質含量を示し、横軸は各系統名を示す。

3.4 考察

Kochi et al., (2001)は、シロイヌナズナ HY2 の TP に緑色蛍光蛋白質 GFP を融合したタンパク質を用いて、タマネギの表皮細胞における HY2 の発現を調べ、葉緑体において GFP 蛍光シグナルが局在することを見出した。また、Tsurui et al. (2001)は、特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析から、HY2 は葉緑体のストロマに局在すると指摘した。PΦB 合成酵素は、フェレドキシン依存性の酵素タンパク質である。したがって、HY2 の局在が葉緑体であるとする、これら 2 つの研究結果はきわめて妥当であると考えられる。光学顕微鏡下において葉緑体の発達が確認できるイネ鞘葉由来のプロトプラストを用いた本研究における局在性試験において、Se13 タンパク質の推定 TP を融合した GFP は葉緑体においてその局在性を観察できたが、Se13 の全長 cDNA を融合した GFP は葉緑体では局在しなかった。前章において、Se13 の完全長 cDNA が X61 の表現型を完全に相補したことから、GFP に融合した cDNA 配列も機能型の Se13 タンパク質を発現していると考えられる。シロイヌナズナにおいて、HY2 の完全長 cDNA を導入した GFP も葉緑体に局在しないこと(Kohchi et al., 2001)から、GFP を融合したことで Se13 タンパク質の輸送機序に何らかの異常が生じた可能性が考えられる。

近年、プロテオーム解析技術の発展に伴い、葉緑体に局在するタンパク質の存在が次々に明らかとなっているが、しばしばゲノムシーケンスに基づいた *in silico* 解析の結果と異なることが指摘されている。このため、タンパク質の葉緑体局在シグナルは、単に N 末端側の水酸基に富んだ疎水性アミノ酸だけではないのではないかという指摘がある。実際に、潜在的な移行シグナルの存在に関

する報告やゴルジ体を介した TP 非依存性の輸送経路の存在が確認されている (Kitajima et al., 2009)。葉緑体の局在が示される HY1 (Muramoto et al., 1999)の *in silico* 解析との比較において、局在性を示すシグナルスコアの高さから HY1 は TP 依存的な葉緑体局在性タンパク質であるが、HY2 および *Se13* がもつ TP は偽性(TP 非依存性)の可能性が考えられる。以上のことから、今後の可視化タンパク質を用いた局在性試験には、供試するアミノ酸配列の選択と局在性を示すシグナルの検出にはより慎重な判断が求められると考えられる。

第 2 章において、*Se13* は発色団の生合成を通じてイネの花成を負に制御することが示された。しかし、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)は、X61 より脆弱な表現型を示し、致死となった。タバコの発色団合成遺伝子 *Pew1* (Heme oxygenase)および *Pew2* (PΦB synthase)の 2 重変異体 *pew1pew2* は幼苗期の生育停止に起因した致死の表現型を呈する(Krapiel et al., 1994)。これは *se13*-RNAi 系統(#1, #3)に非常に近似した表現型であることから、PΦB 合成は植物の生育に必須であることが示唆される。Chory et al. (1989)は、シロイヌナズナ *hy1* 変異体が *hy2* 変異体より脆弱な表現型を示すことをパラドックスと称している。興味深いことに、その重要性にも関わらず多くの植物種(2 倍体)において、Heme oxygenase (HY1)は複数コピー存在する(シロイヌナズナにおいては酵素活性を有する遺伝子として少なくとも 2 コピー存在する)のに対して、PΦB 合成酵素(HY2)はゲノム中に 1 コピーしか存在しない (Terry et al., 1997; Kohchi et al., 2001; SALAD-DB, <http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>)。高等植物において、フィトクロムを介したシグナル伝達系は健全な生育に必須であること(Strasser et al., 2010)から、植物は進化の過程において複数の Heme oxygenase 遺伝子をもつことで赤色光シグナル伝達

系に対する頑強性を獲得したと考えられる。一方、構造学的解析によりフェレドキシン(Fd-red)が PΦB 合成反応の中心的な役割を果たすこと、および site-directed mutagenesis 法によると PΦB 合成酵素は分子的頑強性を示すことが指摘されている(Chiu et al., 2010)。これらのことは、PΦB 合成酵素は、複数の機能性のスプライシング産物を産生することで、その冗長性を確保してきたことを示唆している。したがって、*sel3*-RNAi 系統(#1, #3)は、*Se13* の全ての選択的スプライシング産物を RNAi の標的としたため、致死的な表現型を示したのではないかと考えられる。しかし、トウモロコシ PΦB 合成酵素遺伝子 *Elm1* の選択的スプライシング産物は、保存された完全長 cDNA に由来するタンパク質以外には酵素活性がないことが示されている(Sawers et al., 2004)。したがって、*sel3*-RNAi 系統(#1, #3)の致死の原因は、今後、さらなる研究が必要である。

sel3-RNAi 系統(#1, #3)では、明条件下においても葉鞘の伸長が観察され、その程度は暗条件下において育成した日本晴と同程度であった。また、*sel3*-RNAi 系統(#1, #3)において、クロロフィル含量が著しく低下していた。植物の細胞伸長は、シロイヌナズナではジベレリン(GA)と赤色光の拮抗作用によることが示されている。明条件下では、赤色光によって活性化した PHY が、細胞伸長関連遺伝子を正に制御する bHLH 型転写因子 *PIF3* および *PIF4* を分解することで細胞伸長が抑制される。一方、暗条件下では、GA と結合した GID1 (GA 受容体) が DELLA を分解することで *PIF3* および *PIF4* を開放し、細胞伸長関連遺伝子の発現を誘導することによって細胞伸長が促進される(Feng et al., 2008; Lucas et al., 2008)。イネにおいては、細胞伸長の抑制は主に PHYB の作用によることが示される(Takano et al., 2005)。また、クロロフィル合成の後期段階で

Protochlorophyllide を Chlorophyllide に還元する POR (PORA および PORB)の代謝過程は赤色光依存的な反応である(Barnes et al., 1996; Sperling et al., 1997)。X61 の *se13* は漏出型のアレル(第 2 章)であることを踏まえると、*se13*-RNAi 系統(#1, #3)の致死の表現型は活性化型 PHY (Pfr)含量の低下に起因すると考えられる。しかしながら、クロロフィル合成系において、その中間体を含め多くの代謝物が機能性を有することから、クロロフィル含量の低下が *se13*-RNAi 系統(#1, #3)の致死の直接原因か否かについては今後の研究が必要である。

【第 4 章】

不感光性遺伝子 *se13* を用いた中性植物化育種に関する研究

4.1 緒言

イネは北緯 55°から南緯 35°の広域にわたって栽培される重要作物である。湿潤温暖な低緯度地方に起源したイネが高緯度地方で栽培可能になったのは、出穂期の改変による適応性育種の賜物である。イネ開花前発育相は、発芽後しばらくの間(10~80 日)の日長に反応しない期間(基本栄養生長相)とこれにつづく花芽分化までの日長に反応する期間(感光相)、および花芽分化から出穂開花までの期間(後感光相)に分けられる(Vergara and Chang 1985, Nishida et al., 2001)。これまでの出穂期改変育種では、主として感光相の長さを決定する感光性(PS)程度および基本栄養生長相(BVP)の長さを改変することによって目的とする出穂開花期をもつ品種を開発してきた。このため、南北に広がる日本には、BVP と PS に関する 3 つの生態型、すなわち、PS 強・BVP 短の関東以西品種群、PS やや弱・BVP やや長の東北・北陸品種群、PS 弱・BVP 短の北海道品種、が存在する。2004 年にイネゲノムが国際コンソーシアムにより解読されて以降、出穂期遺伝子の単離と機能解析が進むとともに、新規有用出穂遺伝子が相次いで報告されるようになり、従来なかった出穂特性をもつ品種の作出が可能になってきている。当研究室においても原因遺伝子の単離手法の 1 つであるマップベースクローニング法に基づいて多くの出穂期遺伝子が単離されており(Saito et al., 2009; Saito et al., 2011; Yuan et al., 2009; Yokoo et al., 2014)、MAS (Marker-assisted selection)によって様々な出穂特性をもつ系統の作出に成功している(横尾 2014)。本研究で解析した X61 は品種銀坊主から γ 線種子照射によって誘発獲得された極早生突然変異系統であり、第 2 章および第 3 章で、その原因遺伝子 *se13* は P Φ B 合成酵素遺伝子の機能欠損性の漏出型突然変異遺伝子であり、感光性をほぼ完全に消滅

させることを明らかにした。本章では、*se13* と各種基本栄養生長性遺伝子を組合せることによって種々の BVP をもつ日長非依存的なイネ(中性植物化イネ)の開発をモデル化し(図 21)、このモデルの妥当性を北海道(札幌)および京都における実地試験によって考察した。

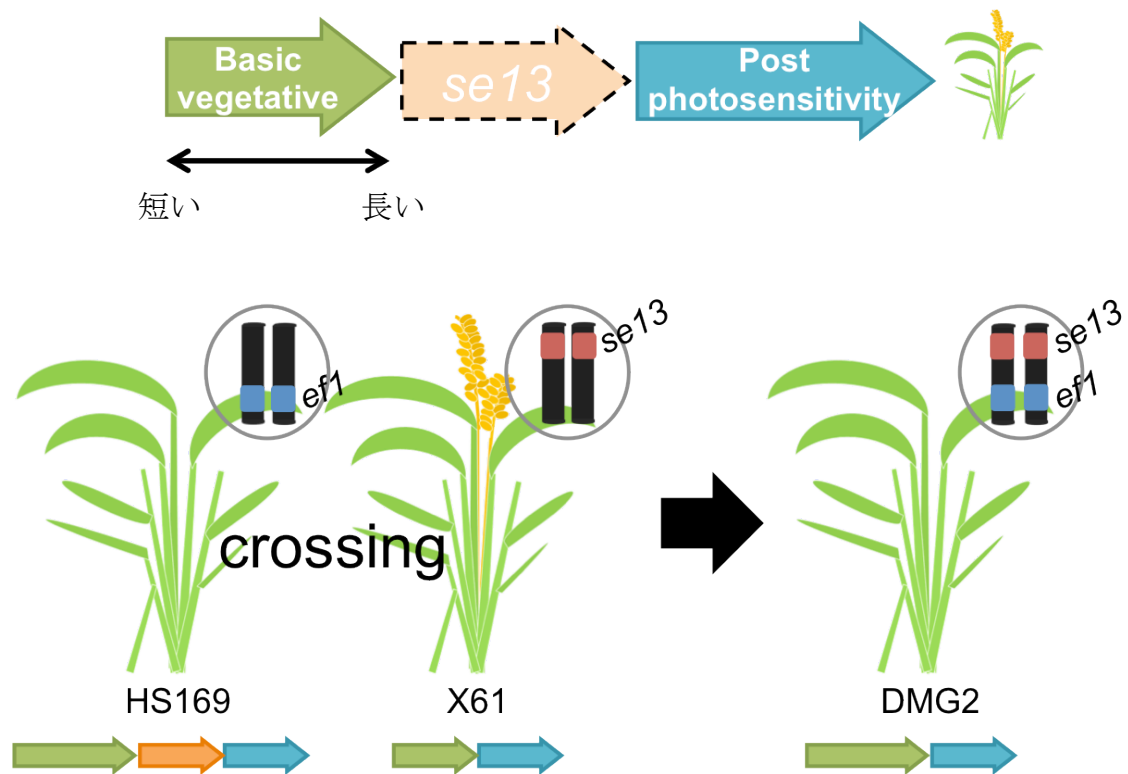


図 21 不感光性系統 X61 を用いて構築したイネ中性植物化育種モデル

イネの出穂期は開花前生育相において発芽直後からしばらくの間(10~80日)の日長に反応しない基本栄養生長相、これにつづく日長に反応する感光相、および花芽分化から出穂までの期間の後感光相により決定されるが、不感光性系統 X61 を利用することにより日長の長さに非依存的に基本栄養生長相の長短(早晚)によりイネの出穂期を制御する育種モデルを構築した。その実証実験として HS169 は銀坊主(WT)に比較して基本栄養生長相の長さが増大した銀坊主由来の突然変異系統であり X61 と交配することにより感光性を喪失し、基本栄養生長性が増大する特徴を有する DMG2 (Double Mutant Gimbozu 2)の作製とその評価を行った。

4.2 材料および方法

4.2.1 植物材料

植物材料として、銀坊主(HEG4)、X61 (*sel3*)、HS110 (*hd1/sel*)、HS169 (*ehd1/efl*)、DMG2 (*sel3/efl*)、品種きらら 397 (kirara397)を供試した。

4.2.2 農業形質の評価

2012 および 2013 年に京都大学北部構内実験圃場にて 1 系統あたり 8×12 株で移植後、3×3 個体で坪狩りし、各種農業形質(一次枝梗数、二次枝梗数、総粒数、一次/二次枝梗数、出穂時分けつ数、時系列出葉数、穂軸長、千粒重)を調査した。

4.3 結果および考察

イネの中性植物化育種を検討するために、X61 の各種農業形質について解析した(図 22)。その結果、銀坊主と比較して、X61 では一次枝梗数および二次枝梗数の減少によって 1 穂当たりの粒数が大幅に低下した(図 21B-E)。このことは、X61 では穂首までの枝梗長が有意に短くなって(図 22G)、穂首までの長さが短くなり、これによって一次・二次枝梗数が減少したためであると考えられた。穂首長に関する分子遺伝学的知見は乏しいが、枝梗の発達は SAM (shoot apical meristem) の大きさと相関関係のあることが示唆されている(Huang et al., 2009)。X61 と銀坊主間には葉の展開速度に差がなかったこと(図 22I)から、X61 の早生化は、葉間期の短縮が原因ではなく、SAM が十分に発達する前に発現・輸送された RFT1 (フロリゲン)が花芽分化、さらには穂の発達(生殖生長)を促したことがその原因であると考えられた。他方、千粒重が X61 で上回ったのは、粒数の減少に対する補償効果であると考えられた(図 21F)。このように、X61 を京都において栽培すると、早生化の副次効果による収量の低下が避けられず、*se13* を利用する場合には BVP を長くする必要があることが確認された。

次に、図 21 で示すように日長に依存せず、基本栄養生長相の長さのみでイネの早晩性を決定する育種モデルを構築し、実証するため、X61 の出穂期遺伝子型に基本栄養生長相を著しく長くする *efl* (*ehd1*)遺伝子を組み込んだ DMG2 (*se13/efl*)を MAS により作出した。京都での圃場栽培実験の結果、DMG2 は自然日長下で、出穂が X61 よりも約 35 日遅延し、出穂までの栄養成長期間が長くなることが明らかとなった(図 23A)。また、これにより 1 穂当たり粒数が銀坊主並みに増加することが明らかとなった(図 23A,B)。DMG2 および銀坊主間で日長ご

との到穂日数を比較したところ、銀坊主は、日長が長くなるに従って、出穂が遅延したが、DMG2 は出穂が遅延せず、いずれの日長下でも 100 日前後の到穂日数を示した。すなわち、*se13* の利用により日長非依存的に出穂を制御することに成功した(図 23C)。

DMG2 系統(その他比較対象を含む)を北海道・札幌市(北緯 43°、高緯度であるため栽培期間中の日長が長い)で試験栽培したところ、銀坊主は京都で栽培した時と比較して 30 日程度出穂遅延したが、DMG2 は到穂日数が京都での栽培時と同程度となり、日長非依存的に出穂することが明らかとなった(図 24A)。しかし、北海道の代表品種の 1 つであるきらら 397 と比較すると、DMG2 の到穂日数はほぼ同じであったが、収量形質に関しては きらら 397 が有意に高いことが明らかとなった(図 24B,C,D)。一方、HS110 (*se1*)は出穂期が DMG2、きらら 397 より 20 日程、遅延したが(図 23A)、収量性はきらら 397 とほぼ同程度となり(図 24B,C,D)、逆に籾数(/m²)や 1 穂籾数はきらら 397 を上回った。したがって、出穂期をより HS110 側(晩生)に近づけた方が、収量性が上がると考えられるが、DMG2 と HS110 は遺伝的背景が若干異なっており、この点についてはさらなる研究が必要である。いずれにしても、本研究の結果は、*se13* を利用した日長非依存的出穂期改変の可能性を示すものであり、今後は、異なる基本栄養生長性遺伝子を導入した系統およびこれに多収性遺伝子を導入した系統を作出して、その可能性について検証する必要があると考える。

A



左; 銀坊主 右; X61

B



左; 銀坊主 右; X61

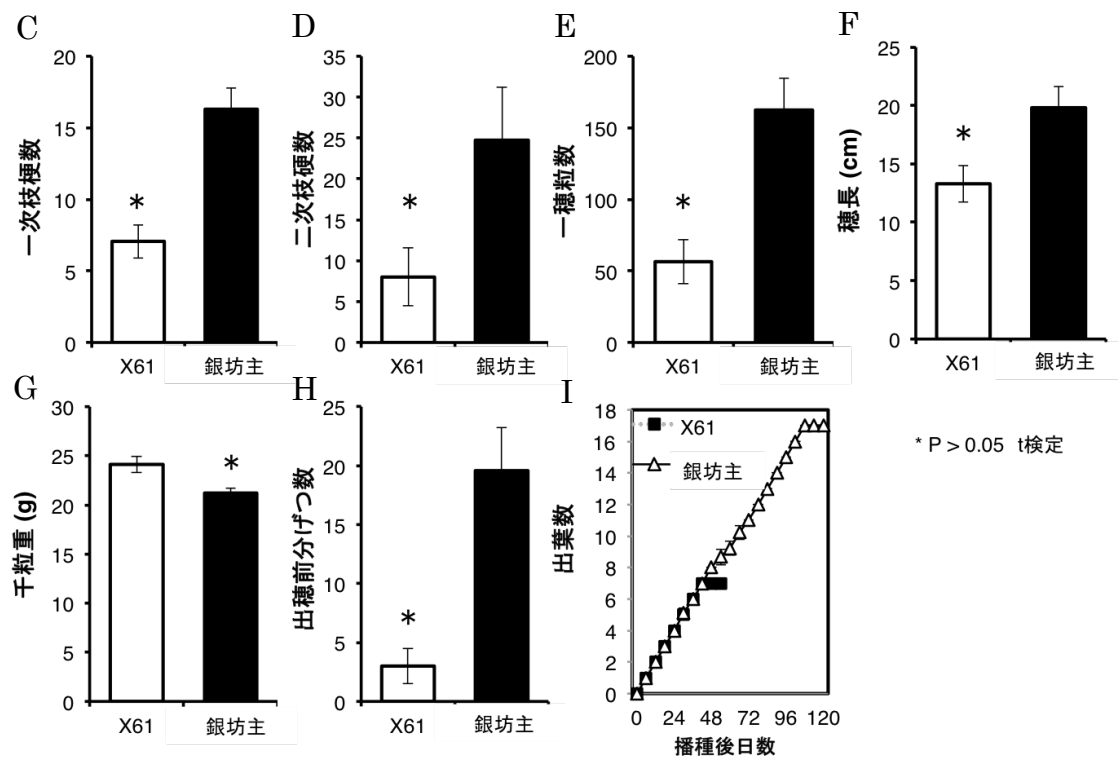


図 22 A)穂形態 B)着粒した種粳 C)一次枝梗数 D)二次枝梗数 E)総粒数 F)千粒重 G)穂軸長 H)出穂時分げつ数 I)時系列出葉数

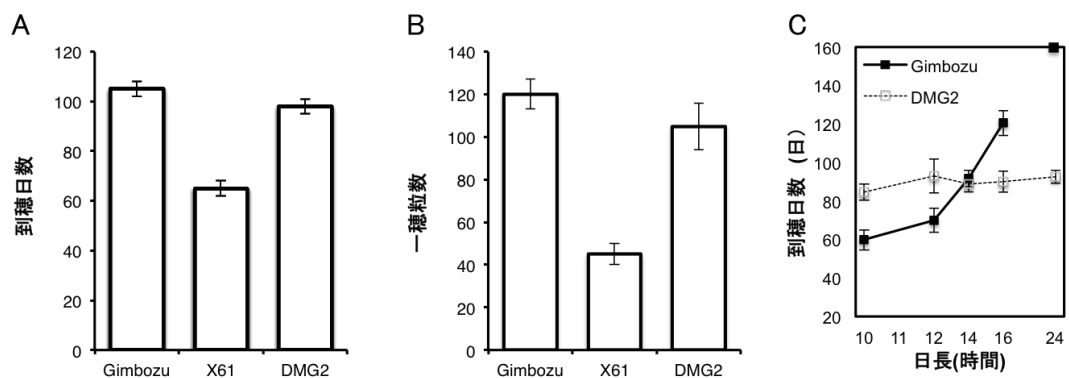


図 23 栽培地京都における各系統の A) 到穂日数 B) 一穂粒数 C) DMG2 の日長応答性

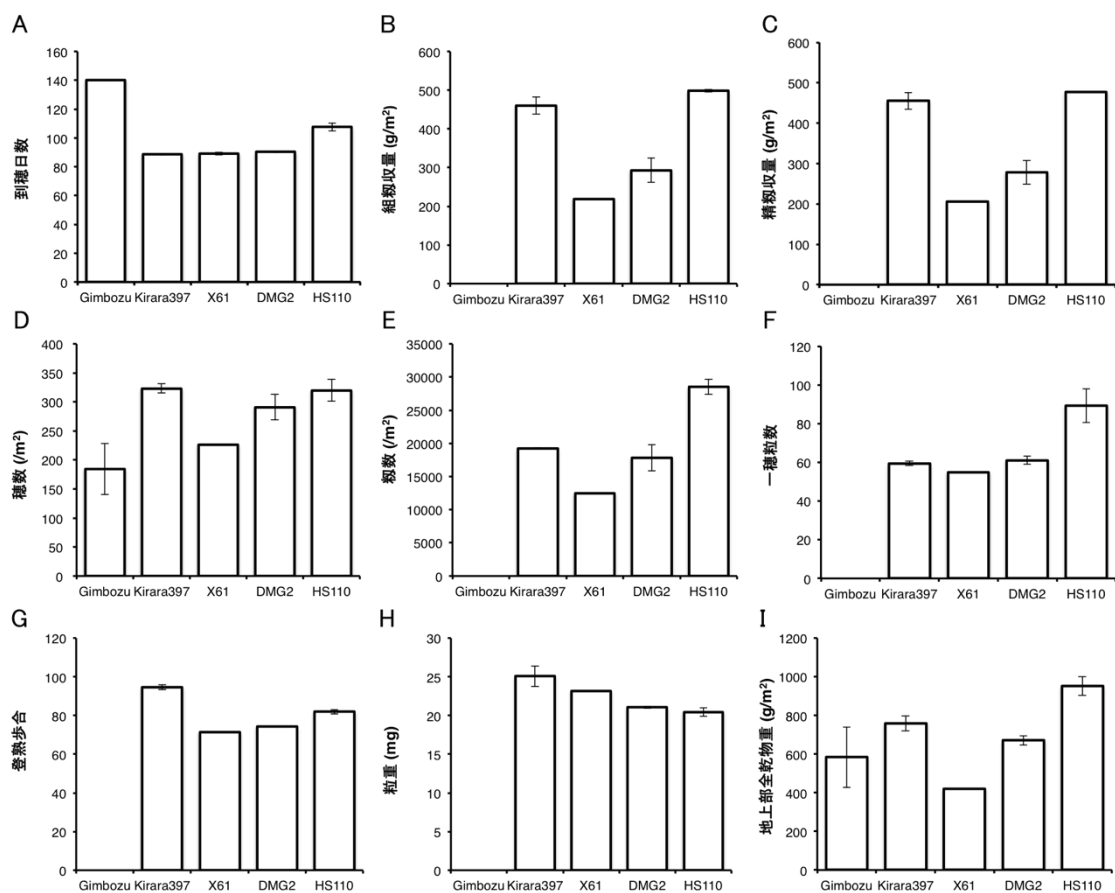


図 24 栽培地北海道・札幌における各系統の A)到穂日数 B)粗粳収量(g/m²) C)精粳収量(g/m²) D)穂数(/m²) E)粒数(/m²) F)一穂粒数 G)登熟歩合 H)粒重(mg) I)地上部全乾物重(g/m²)
(銀坊主は出穂したが全て不稔のため、種子形質に関しては、データなし。)

【第 5 章】

総合考察

本研究の意義は、遺伝子ネットワークの解析を技術基盤として育種利用へとつなげることの具体的妥当性を探ったことにあると考えている。【第1章】緒言にも述べたように、分子遺伝学研究の発展に伴う出穂期に関する遺伝子単離とGWAS (Genome-wide association study)から、出穂期遺伝子の多様な組合せが地域適応性の拡大に貢献してきたことが明らかにされた。このことは、これまでのイネの出穂期改変育種において、基本栄養生長相とこれにつづく感光相の長さ(感光性の強度によって決まる)を支配する遺伝子が結果的にうまく組み合わせられ、様々な変異が創成されてきたことを物語っているが、表現型に選抜基礎をおく従来型の出穂期改変育種には限界があり、新たな視点からの育種、すなわち分子育種の実践が求められている。しかし、動物を含め、日長に応答しない基本栄養生長相(動物では、不感光相^{*1})の分子機構や感光性の獲得機構に関する知見はこれまでに例がなく、出穂期改変育種の分子育種を行うためには、日長に応答しない基本栄養生長相の分子機構や感光性の獲得機構を明らかにする必要がある。本研究では、【第2章】図17モデルに示したように、基本栄養生長相においては、時計遺伝子の振幅(amplitude)に必須の赤色光のシグナルが入力されないこと、しかし、感光相では、時計遺伝子の振幅に赤色光が入力されることを明らかにした。これらは、ラットの胎児の時計遺伝子の振幅が母体のラットが受けた日照情報よりも食事スケジュール(栄養)に大きく依存すること(Ohta et al., 2008)、すなわち、動植物の未成熟な発達段階(幼若期)では、時計遺伝子の振幅が光依存しないことと類似の生存戦略上の現象であると考えられる。本研究では、時計遺伝子への赤色光入力を司る因子が相転換の鍵因子と考えられたものの、その分子理解には及ばなかった。これは今後の大きな研究課題であるが、

基本栄養生長相における赤色光応答性に関しては、野生株および *PhyABC* 変異体を用いたより継続的かつ詳細な研究が必要であると考えている。

【第4章】で *se13* を用いた日長に依存しない育種モデル(図 21)の構築において、イネの出穂期を日長非依存的に制御することに成功した。【第2章】で示したように、時計遺伝子に制御される感光性遺伝子のなかには、収量性を低下させるものがあり(Xue et al., 2008; Wei et al., 2010; Zhang et al., 2012; Wu et al., 2013; 広瀬 2013)、また、【第3章】で RNAi により *Se13* 遺伝子を完全に抑制させると植物体が致死することが明らかにされた。したがって、X61 がもつ漏出型アレルの *se13* を利用して感光性を完全に喪失させ、基本栄養生長相の長さを変えることによってイネの早晩性を決定する技術は育種上有効であると考えられた。

基本栄養生長相および感光相を有する作物にはダイズ、レンズ豆、ソルガム、トウモロコシなど複数含まれており、中性植物化育種の知見を含めた本成果が、種々の作物における地域適応性の拡大に向けた育種技術のガイドラインとなることを期待したい。

*1 不感光相

ウズラ、ハムスター、ウマといった動物は季節繁殖性の動物であり、長日条件下において、生殖腺が発達し繁殖行動をとる。しかし、孵化(ウズラの場合)直後からある一定期間、日長に応答した生殖腺発達のない、日長に応答しない相が存在する(Ikegami et al., 2013)。

【摘要】

生物にとって、季節の変化を捉えることは、生存 (繁殖) 戦略上きわめて重要な意味をもつ。多くの生物は、このような季節変化を“日の長さ (日長)”の変化によって感知することが知られており、その計時機構の解明を目指した研究が多くの生物種で進められている。イネにおいては、発芽直後からしばらくの間 (10~80 日) の日長に反応しない基本栄養生長相と、これに続く、日長に反応する感光相が存在する。しかし、イネを含め、生物が発育の過程でいかにして感光性を獲得するのかその詳細な分子機構は不明である。本研究では、イネ品種銀坊主の γ 線種子照射後代に得られた出穂期突然変異系統 X61 の極早生および不感光性に関する原因遺伝子 *se13* が、フィトクロム発色団フィトクロモビルン(P Φ B)合成酵素遺伝子の機能喪失型アレルであるかどうかを検証するとともに、基本栄養生長相および感光相における銀坊主と X61 間の遺伝子発現プロファイルの比較から、感光性の発育ステージ依存的獲得機構について検討した。また、*Se13* 座の農業形質に及ぼす効果を解析し、その機能欠損型アレルを利用したイネの中性植物化育種の可能性について考察した。得られた結果の概要は以下のとおりである。

1. X61 の感光性喪失の分子機構

これまでの研究から、X61 の感光性の喪失は、第 1 染色体上の新規感光性遺伝子 *Se13* (*OsHY2*: Os01g0949400) の第 1 エキソン上に生じたシトシンの挿入によるものであると推定されている (Saito et al., 2009)。本研究では、まず、RACE 法より *Se13* の転写産物の全長配列を決定したのち、X61 の遺伝的背景において機能

型 *Se13* 転写産物を恒常的に発現する組換えイネ(X61^{comp})を作出した。X61^{comp} の到穂日数が、野生型の銀坊主と同程度であったことから、X61 の感光性喪失の原因遺伝子は *Se13* の劣性アレル *se13* であることが確認された。*Se13* は、シロイヌナズナの PΦB 合成酵素遺伝子 *HY2* と高い相同性を示し、また、PΦB はフィトクロムと結合することによりフィトクロムに赤色/遠赤色光受容能を付与する。光スペクトル解析の結果、X61 は赤色/遠赤色光受容能が著しく低下していることが認められ、X61 の感光性の喪失は、*Se13* がコードする PΦB 合成酵素の機能欠損による赤色/遠赤色光受容能の低下に起因することが明らかになった。

2. *Se13* の分子生物学的解析

光スペクトル解析において、X61 は赤色/遠赤色光にわずかに応答したことから、*se13* は漏出型アレル(leaky allele)であると考えられた。そこで、*Se13* の機能を詳細に解析するため、RNA 干渉法によって *Se13* の発現を抑制した日本晴(*Se13*-RNAi)を作出した。*Se13*-RNAi は、X61 と異なり、幼苗期に薄黄色を呈し致死となった。幼苗期致死の原因を明らかにするため、PΦB の生合成経路で活性酸素種等の産生に関与する ProtoIX および Mg-ProtoIX(Me)を定量したところ、Mg-ProtoIX(Me)含量は *Se13*-RNAi と日本晴間に有意差はなかったが、ProtoIX は *Se13*-RNAi において有意に多く蓄積されていた。しかし、ProtoIX は X61 においても同程度に蓄積していたことから、ProtoIX の蓄積では *Se13*-RNAi の幼苗期致死を説明することはできなかった。クロロフィルの合成は、赤色光によって促進される。そこで、クロロフィル a, b 含量を測定したところ、*Se13*-RNAi においてクロロフィル a, b いずれの含量も有意に低下していた。また、異なる光条件

下での形態観察から、*Se13*-RNAi は赤色光受容能が低下していることが明らかになった。以上のことから、*Se13* 発現抑制による赤色光受容能の低下が、クロロフィル含量の低下による幼苗期致死を引き起こしたと考えられた。

3. *Se13* が出穂関連遺伝子の発現におよぼす効果

Se13 の下流で機能する遺伝子を同定するために、基本栄養生長相(18 および 22 DAS (Days after sowing)) および感光相(25 および 28 DAS) における X61 および銀坊主の出穂期関連遺伝子の発現を定量的 PCR によって解析した。その結果、主要な感光性遺伝子 *Hdl* および *Ghd7* の発現に関して、18 および 22 DAS では銀坊主と X61 間に有意な差はなかったが、25 および 28 DAS では X61 において顕著な低下がみられ、また、一部の時計遺伝子(*OsGI* および *OsPRR* 遺伝子群)に関しても、25 および 28 DAS で X61 において顕著な低下がみられた。これらのことから、*Se13* は感光相における時計遺伝子の振幅の維持に働いており、その機能喪失に伴う時計遺伝子の振幅低下が X61 における *Hdl* と *Ghd7* の発現低下を引き起こしたと考えられた。

4. *se13* を利用した中性植物化育種の検証

これまでの早晩性育種では、基本栄養生長相の長さあるいは感光性の強度を改変することによって、目的とする表現型を獲得してきた。本研究では、感光性をほぼ完全に喪失した X61 の遺伝的背景に基本栄養成長相を著しく長くする *efl* (= *ehd1*) 遺伝子を導入した系統 DMG2 (*se13/efl*) を作出し、これを X61 および銀坊主とともに京都で栽培し、イネの中性植物化育種に *se13* が利用可能かどうか

を検討した。その結果、X61 (*se13/Efl*)は、銀坊主と比較して、到穂日数が約 35 日短くなり(約 60 DAS)、1 次および 2 次枝梗数が減少し、穂長が短くなったが、DMG2 (*se13/efl*)は、到穂日数が約 100 日となり銀坊主と比較して 1 穂あたり粒数がほぼ同程度となった。さらに、DMG2 を北海道で栽培し、各種農業形質を調査したところ、DMG2 の到穂日数は京都で栽培した場合と同程度であり、収量性も北海道における作付面積首位品種の「きらら 397」並みであった。これらのことから、*se13* は長い基本栄養成長相が保証される遺伝的背景下では、収量等の農業形質に負の効果を与えないことが明らかになった。

本研究では、不感光性突然変異系統 X61 を用いて、イネの発育過程における感光性獲得の分子機構の解明を試みるとともに、不感光性遺伝子 *se13* の育種的利用について解析を行った。その結果、基本栄養生長相において、フィトクロム(赤色光)非依存的に振幅している時計遺伝子の発現が、感光相ではフィトクロムに依存するようになることを見出し、この「依存—非依存」が基本栄養成長相から感光相への相の転換に関わっていることが明らかになった。このことは、相転換に関与する鍵因子の発見に重要な示唆を与えるものであろう。本研究の結果、*se13* は、基本栄養成長相を長くする遺伝子と共存する場合には、収量を含む農業形質に負の影響を与えないことが明らかにされた。したがって、*se13* はイネの中性植物化育種における新たな遺伝子資源として利用可能であると考えられた。

【引用文献】

Alabadí, D. *et al.* (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880–883.

Andrés, F., Galbraith, D., Talón, M. and Domingo, C., (2009) Analysis of PHOTOPERIOD SENSITIVITY5 sheds light on the role of phytochromes in photoperiodic flowering in rice. *Plant physiology*, **151**(2), 681–690.

浅野翔 (2011) 修士論文「イネ感光性遺伝子 *E1* 座が日本稲の伝播および北進に果たした役割」.

Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J. and Laurie, D., (2007) A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **115**(5), 721–733.

Childs, K., Miller, F., Cordonnier-Pratt, M., Pratt, L., Morgan, P. and Mullet, J., (1997) The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, encodes a phytochrome B. *Plant physiology*, **113**(2), 611–619.

Chiu, F.-Y., Chen, Y.-R. and Tu, S.-L., (2010) Electrostatic interaction of phytochromobilin synthase and ferredoxin for biosynthesis of phytochrome chromophore. *The Journal of biological chemistry*, **285**(7), 5056–5065.

Chow, B., Helfer, A., Nusinow, D. and Kay, S., (2012) ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant signaling & behavior*, **7**(2), 170–173.

Chory, J., Peto, C., 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. *The Plant cell*, **1**(9), 867–880.

Christensen, A. and Quail, P., (1989) Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. *Gene*, **85**(2), 381–390.

Clack, T., Mathews, S. and Sharrock, R., (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant molecular biology*, **25**(3), 413–427.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., *et al.*, (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, **316**(5827), 1030–1033.

Dixon, L., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M., Pokhilko, A. and Millar, A., (2011) Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in *Arabidopsis*. *Current biology : CB*, **21**(2), 120–125.

Doi, K. *et al.* Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. (2004) *Genes Dev.* **18**, 926–936.

Elich, T. and Lagarias, J., (1987) Phytochrome Chromophore Biosynthesis : Both 5-Aminolevulinic Acid and Biliverdin Overcome Inhibition by Gabaculine in Etiolated *Avena sativa* L. Seedlings. *Plant physiology*, **84**(2), 304–310.

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., *et al.*, (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, **451**(7177), 475–479.

Fowler, S. *et al.* (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.

Fujino, K., Sekiguchi, H., Kiguchi, T. (2005) Identification of an active transposon in intact rice plants. *Mol. Genet. Genomics* **273**, 150–157.

Fujino, K., Yamanouchi, U. and Yano, M., (2013) Roles of the Hd5 gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **126**(3), 611–618.

Gao, H., Zheng, X.-M., Fei, G., *et al.*, (2013) Ehd4 encodes a novel and *Oryza*-genus-specific regulator of photoperiodic flowering in rice. *PLoS genetics*, **9**(2), e1003281.

Hayama, R. *et al.* (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**, 719–722.

Helfer, A., Nusinow, D., Chow, B., Gehrke, A., Bulyk, M. and Kay, S., (2011) LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Current biology : CB*, **21**(2), 126–133.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T., (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **6**(2), 271–282.

広瀬郁夫 (2013) 修士論文「イネ出穂期遺伝子が収量構成要素に及ぼす効果」

Hori, K., Ogiso-Tanaka, E., Matsubara, K., Yamanouchi, U., Ebana, K. and Yano, M., (2013) Hd16, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **76**(1), 36–46.

Hu, W. *et al.* (2013) Unanticipated regulatory roles for *Arabidopsis* phytochromes revealed by null mutant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **110**, 1542–1547.

Huang, X., Kurata, N., Wei, X., *et al.*, (2012) A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, **490**(7421), 497–501.

Huang, X., Qian, Q., Liu, Z., *et al.*, (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nature genetics*, **41**(4), 494–497.

Ikegami, K. and Yoshimura, T., (2013) Seasonal time measurement during reproduction. *The Journal of reproduction and development*, **59**(4), 327–333.

Ishikawa, R., Aoki, M., Kurotani, K.-I., Yokoi, S., Shinomura, T., Takano, M. and Shimamoto, K., (2011) Phytochrome B regulates Heading date 1 (Hd1)-mediated expression of rice florigen Hd3a and critical day length in rice. *Molecular genetics and genomics : MGG*, **285**(6), 461–470.

岩橋優 田中佑 伊藤真 吉竹良洋 齊藤大樹・奥本裕・本間香貴 (2013) Homologous genes of FT and ELF3 in rice (*Oryza sativa* L.) affect stomatal opening and photosynthetic rate. 日本作物學會紀事 82, 380-381

Izawa, T. *et al.* (2000) Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J.* **22**, 391–399.

Izawa, T., (2007) Daylength measurements by rice plants in photoperiodic short-day flowering. *International review of cytology*, **256**, 191–222.

Kardailsky, I., Shukla, V., Ahn, J., Dagenais, N., Christensen, S., Nguyen, J., Chory, J., Harrison, M. and Weigel, D., (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science (New York, N.Y.)*, **286**(5446), 1962–1965.

Kinoshita, T., Ono, N., Hayashi, Y., *et al.*, (2011) FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Current biology : CB*, **21**(14), 1232–1238.

Kitajima, A., Asatsuma, S., Okada, H., *et al.*, (2009) The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids. *The Plant cell*, **21**(9), 2844–2858.

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 (New York, N.Y.)*, **286**(5446), 1960–1962.

Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Tanaka, K., (2009) Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(3), 803–807.

Kobayashi, Y., Imamura, S., Hanaoka, M. and Tanaka, K., (2011) A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication. *Nature cell biology*, **13**(4), 483–487.

Kolmos, E., Herrero, E., Bujdoso, N., Millar, A., Tóth, R., Gyula, P., Nagy, F. and Davis, S., (2011) A reduced-function allele reveals that EARLY FLOWERING3 repressive action on the circadian clock is modulated by phytochrome signals in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, **23**(9), 3230–3246.

Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S. and Shimamoto, K., (2008) Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development (Cambridge, England)*, **135**(4), 767–774.

Kim, S. *et al.* (2007) OsMADS51 is a short-day flowering promoter that functions upstream of Ehd1, OsMADS14, and Hd3a. *Plant Physiol.* **145**, 1484–1494.

Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A. and Lagarias, J., (2001) The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *The Plant cell*, **13**(2), 425–436.

Koo, B.-H., Yoo, S.-C., Park, J.-W., *et al.*, (2013) Natural variation in OsPRR37 regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Molecular plant*, **6**(6), 1877–1888.

- Koornneef, M., Rolff, E., Spruit, C. (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **100**, 147-160.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. and Chory, J., (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, **316**(5825), 715–719.
- Kraepiel, Y., Jullien, M., Cordonnier-Pratt, M. and Pratt, L., (1994) Identification of two loci involved in phytochrome expression in *Nicotiana plumbaginifolia* and lethality of the corresponding double mutant. *Molecular & general genetics : MGG*, **242**(5), 559–565.
- Kumar, S. and Wigge, P., (2010) H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, **140**(1), 136–147.
- Kumar, S., Lucyshyn, D., Jaeger, K., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N. and Wigge, P., (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, **484**(7393), 242–245.
- Larkin, R., Alonso, J., Ecker, J. and Chory, J., (2003) GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science (New York, N.Y.)*, **299**(5608), 902–906.
- Lee, Y.-S. *et al.* (2010) OsCOL4 is a constitutive flowering repressor upstream of Ehd1 and downstream of OsphyB. *Plant J.* **63**, 18–30.
- Lee, S. *et al.* (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.
- Lin, H., Liang, Z., Sasaki, T., Yano, M. (2003) Fine mapping and characterization of quantitative trait loci Hd4 and Hd5 controlling heading date in rice. *Breeding Science* **53**, 51-59.

- Londo, J., Chiang, Y.-C., Hung, K.-H., Chiang, T.-Y. and Schaal, B., (2006) Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(25), 9578–9583.
- Locke, J. *et al.* (2006) Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 59.
- Lucas, M. de, Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., *et al.*, (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**(7177), 480–484.
- Makino, S. *et al.* (2002) The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* **43**, 58–69.
- Matsubara, K. *et al.* (2011) Ehd3, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *Plant J.* **66**, 603–612.
- Matsubara, K., Ogiso-Tanaka, E., Hori, K., Ebana, K., Ando, T. and Yano, M., (2012) Natural variation in Hd17, a homolog of Arabidopsis ELF3 that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant & cell physiology*, **53**(4), 709–716.
- Matsubara, K. *et al.* (2008) Ehd2, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating Ehd1. *Plant Physiol.* **148**, 1425–1435.
- Meinecke, L., Alawady, A., Schroda, M., Willows, R., Kobayashi, M., Niyogi, K., Grimm, B. and Beck, C., (2010) Chlorophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that accumulate magnesium protoporphyrin IX. *Plant molecular biology*, **72**(6), 643–658.
- Miki, D. and Shimamoto, K., (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant & cell physiology*, **45**(4), 490–495.

Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., *et al.*, (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant & cell physiology*, **37**(1), 49–59.

Mochizuki, N., Brusslan, J., Larkin, R., Nagatani, A. and Chory, J., (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(4), 2053–2058.

Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. and Nagatani, A., (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(39), 15184–15189.

Moulin, M., McCormac, A., Terry, M. and Smith, A., (2008) Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(39), 15178–15183.

Murakami, M., Ashikari, M., Miura, K., Yamashino, T. and Mizuno, T., (2003) The evolutionarily conserved OsPRR quintet: rice pseudo-response regulators implicated in circadian rhythm. *Plant & cell physiology*, **44**(11), 1229–1236.

Murakami, M., Tago, Y., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007) Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **48**, 110–121.

Murphy, R., Klein, R., Morishige, D., Brady, J., Rooney, W., Miller, F., Dugas, D., Klein, P. and Mullet, J., (2011) Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(39), 16469–16474.

Nagano, A. *et al.* (2012) Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Cell* **151**, 1358–1369.

Nishida, H. *et al.* (2001) Analysis of tester lines for rice (*Oryza sativa* L.) heading-time genes using reciprocal photoperiodic transfer treatments. *Annals of Botany* **88**, 527–536.

Niwa, Y., (2003) A Synthetic Green Fluorescent Protein Gene for Plant Biotechnology. *Plant Biotechnology*, **20**(1), 1–11.

Ogiso, E. *et al.* (2010) The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. *Plant Physiol.* **152**, 808–820.

Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., *et al.*, (2008) Maternal feeding controls fetal biological clock. *PloS one*, **3**(7), e2601.

岡村均, 深田吉孝 (2004) 時計遺伝子の分子生物学. シュプリンガー・フェアラーク東京.

Osugi, A., Itoh, H., Ikeda-Kawakatsu, K., Takano, M. and Izawa, T., (2011) Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant physiology*, **157**(3), 1128–1137.

Park, S. *et al.* (2008) Rice Indeterminate 1 (OsId1) is necessary for the expression of Ehd1 (Early heading date 1) regardless of photoperiod. *Plant J.* **56**, 1018–1029.

Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45–e45.

Pittendrigh, C., (1964) The Entrainment of Circadian Oscillations by Skeleton Photoperiods. *Science (New York, N.Y.)*, **144**(3618), 565.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J. Comp. Physiol.* **106**, 333–355.

Porra, R., Thompson, W., Kriedemann, P. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**, 384–394.

Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G., Immink, R. and Schmid, M., (2013) Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, **503**(7476), 414–417.

Ryu, C.-H. *et al.* (2009) OsMADS50 and OsMADS56 function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. *Plant Cell Environ.* **32**, 1412–1427.

Saito, H., Okumoto, Y., Yoshitake, Y., Inoue, H., Yuan, Q., Teraishi, M., Tsukiyama, T., Nishida, H. and Tanisaka, T., (2011) Complete loss of photoperiodic response in the rice mutant line X61 is caused by deficiency of phytochrome chromophore biosynthesis gene. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **122**(1), 109–118.

Saito, H., Ogiso-Tanaka, E., Okumoto, Y., *et al.*, (2012) Ef7 encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene Ghd7 under both short- and long-day conditions. *Plant & cell physiology*, **53**(4), 717–728.

Saito, H., Yuan, Q., Okumoto, Y., Doi, K., Yoshimura, A., Inoue, H., Teraishi, M., Tsukiyama, T. and Tanisaka, T., (2009) Multiple alleles at Early flowering 1 locus making variation in the basic vegetative growth period in rice (*Oryza sativa* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **119**(2), 315–323.

佐藤洋一郎 (2003) 「イネの文明-人類はいつ稲を手にしたか」 PHP 新書.

Sawa, M., Nusinow, D., Kay, S. and Imaizumi, T., (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, **318**(5848), 261–265.

澤真理子, Steave A. Kay (2008) 「概日時計をもとに季節を計る分子メカニズム光周性花成における新たな符合の重要性」 蛋白質・核酸・酵素.

Sawers, R., Linley, P., Farmer, P., Hanley, N., Costich, D., Terry, M. and Brutnell, T., (2002) Elongated mesocotyl1, a phytochrome-deficient mutant of maize. *Plant physiology*, **130**(1), 155–163.

Sawers, R., Linley, P., Gutierrez-Marcos, J., Delli-Bovi, T., Farmer, P., Kohchi, T., Terry, M. and Brutnell, T., (2004) The Elm1 (ZmHy2) gene of maize encodes a phytochromobilin synthase. *Plant physiology*, **136**(1), 2771–2781.

Schaffer, R. *et al.* (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219–1229.

Schmittgen, T. and Livak, K., (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, **3**(6), 1101–1108.

Sharrock, R. and Quail, P., (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes & development*, **3**(11), 1745–1757.

Shibaya, T. *et al.* (2011) Genetic interactions involved in the inhibition of heading by heading date QTL, Hd2 in rice under long-day conditions. *Theor. Appl. Genet.* **123**, 1133–1143.

Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M., Casal, J. and Cerdán, P., (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(10), 4776–4781.

Strayer, C. *et al.* (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768–771.

Susek, R., Ausubel, F. and Chory, J., (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, **74**(5), 787–799.

Tamaki, S. *et al.* (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**, 1033–1036.

Takano, M. *et al.* (2005) Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* **17**, 3311–3325.

Takano, M. *et al.* (2009) Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 14705–14710.

Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., *et al.*, (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, **476**(7360), 332–335.

Terry, M. and Kendrick, R., (1996) The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *The Journal of biological chemistry*, **271**(35), 21681–21686.

TERRY, M.J., (1997) Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 740–745.

Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R. and Laurie, D., (2005) The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science (New York, N.Y.)*, **310**(5750), 1031–1034.

Vergara, B. S., Chang, T. T. (1985) *The flowering response of the rice plant to photoperiod: A review of the literature.* (The International Rice Research Institute, Los Banos).

Wang, Z., Tobin, E. (1998) Constitutive expression of the circadian clock associated 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207–1217.

Watanabe, S., Hideshima, R., Xia, Z., *et al.*, (2009) Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus E3. *Genetics*, **182**(4), 1251–1262.

Wei, X., Xu, J., Guo, H., *et al.*, (2010) DTH8 suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant physiology*, **153**(4), 1747–1758.

Weller, J.L., Terry, M.J., Reid, J.B. and Kendrick, R.E., (1997) The phytochrome-deficient *pcd2* mutant of pea is unable to convert biliverdin IX α to 3(Z)-phytochromobilin. *The Plant Journal*, **11**, 1177–1186.

Weller, J., Terry, M., Rameau, C., Reid, J. and Kendrick, R., (1996) The Phytochrome-Deficient *pcd1* Mutant of Pea Is Unable to Convert Heme to Biliverdin IX[α]. *The Plant cell*, **8**(1), 55–67.

Woodson, J. and Chory, J., (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature reviews. Genetics*, **9**(5), 383–395.

Wu, C. *et al.* (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.

Wu, W., Zheng, X.-M., Lu, G., *et al.*, (2013) Association of functional nucleotide polymorphisms at DTH2 with the northward expansion of rice cultivation in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(8), 2775–2780.

Wu, Z., Zhang, X., He, B., *et al.*, (2007) A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant physiology*, **145**(1), 29–40.

- Xu, S., Wang, L., Zhang, B., *et al.*, (2012) RNAi knockdown of rice SE5 gene is sensitive to the herbicide methyl viologen by the down-regulation of antioxidant defense. *Plant molecular biology*, **80**(2), 219–235.
- Xue, W. *et al.* (2008) Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature Genet.* **40**, 761–767.
- Yang, Y. *et al.* (2013) OsELF3 is involved in circadian clock regulation for promoting flowering under long-day conditions in rice. *Mol. Plant* **6**, 202–215.
- Yan, W., Liu, Haiyang, Zhou, X., *et al.*, (2013) Natural variation in Ghd7.1 plays an important role in grain yield and adaptation in rice. *Cell research*, **23**(7), 969–971.
- Yano, M., Kojima, S., Takahashi, Y., Lin, H. and Sasaki, T., (2001) Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant physiology*, **127**(4), 1425–1429.
- Yano, M. *et al.* (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.
- Yokoo, T., Saito, H., Yoshitake, Y., Xu, Q., Asami, T., Tsukiyama, T., Teraishi, M., Okumoto, Y. and Tanisaka, T., (2014) Se14, encoding a JmjC domain-containing protein, plays key roles in long-day suppression of rice flowering through the demethylation of H3K4me3 of RFT1. *PloS one*, **9**(4), e96064.
- 横尾敬行 (2014) 博士論文「イネ新規感光性遺伝子 *Se14* の機能解析と育種への応用」
- Yoshitake, Y., Yokoo, T., Saito, H., *et al.*, (2015) The effects of phytochrome-mediated light signals on the developmental acquisition of photoperiod sensitivity in rice. *Scientific reports*, **5**, 7709.

- Yuan, Q., Saito, H., Okumoto, Y., Inoue, H., Nishida, H., Tsukiyama, T., Teraishi, M. and Tanisaka, T., (2009) Identification of a novel gene *ef7* conferring an extremely long basic vegetative growth phase in rice. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **119**(4), 675–684.
- Zeilinger, M. *et al.* (2006) A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Molecular Syst. Biol.* **2**, 58.
- Zhang, H., Li, J., Yoo, J.-H., Yoo, S.-C., Cho, S.-H., Koh, H.-J., Seo, H. and Paek, N.-C., (2006) Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant molecular biology*, **62**(3), 325–337.
- Zhang, Z.-H., Wang, K., Guo, L., Zhu, Y.-J., Fan, Y.-Y., Cheng, S.-H. and Zhuang, J.-Y., (2012) Pleiotropism of the photoperiod-insensitive allele of Hd1 on heading date, plant height and yield traits in rice. *PloS one*, **7**(12), e52538.

【謝辞】

農業生物資源研究所遺伝子組換え研究センター・高野誠博士、植物生産生理機能研究ユニット・宮尾光恵博士には、イネフィトクロム抗体を提供戴いた。また、同ユニット・井澤毅博士には、*se5* 変異体を提供して戴き、光原一朗博士にはイネ用過剰発現ベクターpMLH7133 を提供して戴いた。奈良先端科学技術大学院大学植物分子遺伝学研究室・故・島本功博士、三木大介博士にはイネ遺伝子発現抑制用ベクターpANDA を提供して頂いた。静岡県立大学植物機能開発研究室・丹羽康夫博士には植物一過発現用 GFP ベクターpTH2 を提供して戴いた。京都大学理学研究科植物生理学分科・望月伸悦博士には、Mg-ProtoIXMe の精製標品を提供して戴いた。京都大学理学研究科分子発生学分科・阿形清和博士、柴田典人博士には qPCR 機器 BIOMARKHD1 を提供して戴いた。京都大学農学研究科植物生産管理学研究室・北島宣博士、中崎鉄也博士には研究設備を提供戴いた。京都大学農学研究科化学生態学研究室・森直樹博士、網干貴子博士には LC-MS を、生物調整化学研究室・宮川恒博士、中川好秋博士、宮下正弘博士には蛍光 HPLC を提供して戴いた。農業生物資源研究所ゲノム機能改変研究ユニット・土岐精一博士、雑賀啓明博士、ならびに植物生産生理機能研究ユニット、現・遺伝資源センター・小木曾映里博士にはイネの遺伝子組換え技術につ

いてご助言を戴いた。農業食品産業技術総合研究機構作物研究所水稻育種研究分野・黒木慎博士には、北海道での出穂期育種モデルについて作出系統の栽培と、その評価を頂いた。京都大学農学研究科植物病理学研究室・三瀬和之博士には、イネプロトプラスト単離の新たな実験系開発について貴重なご指導戴き、また、同生命科学研究科全能性統御機構学分野・佐藤文彦博士には、プロトプラスト形質転換法についてのご助言とパーティクルガン PDS-1000/He™のご提供を戴いた。大阪府立大学理学研究科生体光制御研究室・徳富哲博士、直原一徳博士、桂ひとみ博士には光スペクトラム解析について、貴重なご指導と実験設備の提供を戴いた。京都大学生命科学研究科遺伝子特性分野・河内孝之博士、千代田将大博士には研究の立案・遂行から、研究設備、各種プロトコルのご提供を戴いた。また、京都大学大学院農学研究科育種学研究室・谷坂隆俊名誉教授、奥本裕教授、寺石政義講師、築山拓司助教、同植物生産管理学研究室・齋藤大樹助教には、研究遂行にご助言を戴いた。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また育種学研究室学生、ならびに、遺伝子発現解析に尽力してくれた横尾敬行君(博士)、泉はるかさん、菊沢恭子さんには厚く御礼申し上げたい。