HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ダイズの感光性の制御機構と遺伝的多様性に関する分子遺伝学的研究
Author(s)	徐, 美兰
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11100号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11100
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64928
Type	doctoral thesis
File Information	Xu_Meilan.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ダイズの感光性の制御機構と遺伝的多様性に関する
分子遺伝学的研究

平成25年度 博士論文

北海道大学 大学院 農学院

生物資源科学専攻　博士課程

徐 美兰 (XU MEILAN)

目次

第 1 章　緒論 1
第２章　非感光性獲得機構の多様化と開花後の光周性反応 10
1 材料および方法 11
1-1 供試材料 11
1-2 開花前ならびに開花後の感光性の評価 11
1-3 DNA マーカーを用いた遺伝子型の推定 11
1-4 シーケンス分析 12
1-5 新たに観察された機能欠損遺伝子を判別する DNA マーカーの開発 12
1-6 開花誘導後の光周性反応と有限伸育性遺伝子 *DT1*（*TFL1b*）の発現解析- 13
2 結果および考察 14
2-1 開花に対する非感光性の評価 14
2-2 DNA マーカーを用いた遺伝子型の分類 15
2-3 優性遺伝子のシーケンス解析 16
2-4 *E3* および *E4* が関与する開花後の光周反応 17
2-5 *E3* および *E4* の制御による開花後の主茎の生長と莢の発育 18
第３章　ハロソイおよびトヨムスメの感光性と遺伝子発現の概日リズムから見た分子機構の特徴 29
1 材料および方法 29
1-1 供試材料 29
1-2 日長処理実験と発現解析 29
2 結果および考察 30
2-1 ハロソイとトヨムスメの光周性反応 30
2-2 ハロソイとトヨムスメにおける開花関連遺伝子発現プロフィル 31
第 4 章　VIGS を用いた *E1L* 遺伝子の機能解析 38
1 材料および方法 39
1-1 供試材料 39
1-2 E1L-ALSV ベクターの構築 39
1-3 ウイルス接種とウイルス感染の検定 39
1-4 低分子 RNA の抽出と siRNA の検出 40
1-5 qRT-PCR 法による遺伝子の発現解析 41
2 結果および考察 42
2-1 E1L-ALSV ベクターのトヨムスメへの感染と開花に及ぼす効果 42
2-2 E1L-ALSV ベクターを用いた *E1L* のサイレンシング 43
2-3 トヨムスメの開花を促進するメカニズムの解析 43
第 5 章　光中断による開花抑制に関与する分子機構の解析 54
1 材料および方法 55
2 結果および考察 56
2-1 日長変換実験における *E1* および *E1L* の日長応答の解析 56
2-2 光中断がダイズの開花に及ぼす効果 57
2-3 開花遺伝子の発現に及ぼす光中断の効果 58

第 6 章　総合考察 68
1 非感光性獲得機構の多様化と開花後の光周性反応 68
2 *E1L* がダイズの開花に及ぼす影響 70
3 光中断による開花抑制に関与する分子遺伝学的機構 72
4 ダイズにおける光中断の分子的基盤のモデル 75
摘　要 79
Summary 82
引用文献 86
付表 1 本研究で用いた試薬の組成 102
謝辞 104

第1章　緒論

花成とは、分裂組織が葉の原基を形成する栄養相から花芽の原基を形成する生殖相へと変換することである (田澤 2009)。植物にとって、花成の時期は、日の長さ（日長）や温度など外的環境要因によって規定され、種の存続に大きな影響を与える。その中でも、日長は、花成の調節に重要な役割を果たしている。1920年、アメリカの育種学者—Garner と Allard—は、タバコやダイズを用いた実験により、日長の季節変化が、花成の時期を決定することを明らかにし、日長の季節変化に対する花成の反応を光周性反応と呼んだ。日長に対する反応性から、植物種は、昼が短いときに花芽が形成されるイネ、シソ、ダイズ等の短日植物、昼の長さがある一定以上のときに花芽が形成されるシロイヌナズナ、ホウレンソウ、コムギ等の長日植物、花芽形成が日長の長さに影響されないトマトやキュウリ等の中性植物に分類される。

地球の自転による明と暗の周期的な変化に同調するように、植物は、葉の上下運動、気孔の開閉や光合成等に24時間の周期的な変化を引き起こす (石川ら 2006)。これらの周期的変化は、体内の概日時計に制御される概日リズムとよばれ、明暗サイクルが恒常的な暗条件に移行した後にも維持される (Thomas and Vince-Prue 1997)。Bünning (1936) は、光周期による花成の調節は、概日リズムと光シグナルの相互作用による日長測定によってもたらされるというモデルを提唱した。彼は、暗期に与えた光が花芽形成に及ぼす作用には、促進作用と抑制作用があり、それらの作用が生じる相を親明相および親暗相と命名した。概日リズムは、この2つの相がほぼ12時間周期で交代し、短日植物の場合、光照射が親明相で与えられると開花を促進し、親暗相で与えられると開花を抑制する。このように内生リズムの特定の位相に光が照射されることにより日長を測定しているとする考えが外的符合モデルと呼ばれている (田澤 2009)。

光周性反応と内生リズムに関する Bünning (1936) の仮説は、Hamner の研究グループが行った二つの実験結果によって支持されている。その一つは、ダイズの感光性品種を8時間の明期の後に様々な時間の暗期を与え、そのサイクルを7回繰り返した後に形成された花芽数を比較する実験である。形成された花芽数は、一つのサイクルを構成する明期と暗期の長さの和と連動し、各サイクルでの明期が最初の明期の時刻と24時間の周期で同期す

る時 (明期と暗期の和が24時間の倍数の48時間または72時間の時) に最も多く、同期しない時 (36時間および60時間の時) に花芽形成が抑制された (Hamner and Takimoto 1964)。もう一つの実験では、同じ8時間の明期の後に64時間の暗期を与え、暗期中の様々な時間帯に4時間の光中断を与え、これを一サイクルとして７回繰り返し、その後に形成された花芽数を比較した。花芽の数は、光中断がほぼ24時間の周期で最初の明期の時刻と一致するときに最も多く、明期開始12時間後またはその24時間の倍数時 (36時間後と60時間後) に明期が与えられたときに花芽形成が抑制された (Coulter and Hamner 1964)。これらの結果は、光照射が花芽生成に異なる効果を与える二つの相 (親明相と親暗相) がほぼ12時間の間隔で交互に進行すると考えた Bünning (1936) の仮説に符合する。

ダイズにおける非感光性の獲得機構に関する従来の研究成果

ダイズは、世界各地で栽培される適応性の高い作物の一つである。ダイズは、感光性が強い短日植物として知られているが、日長に対する反応は品種によって異なる。このため、個々の品種の栽培適地を緯度の観点からみると、１つの品種が、高い生産力を安定的にもたらしうる緯度の範囲は限定され、幅広い緯度の下で高い収量を得るには、各地の日長変化に適した、様々な開花・登熟習性を持つ品種が必要になる。特に、高緯度地域で栽培される品種にとり、感光性が低下または欠落した非感光性が重要な特性になる。ダイズの開花および登熟の制御には、これまで9つの主働遺伝子 (*E1* から *E8* および *J*) ならびに様々な量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus; QTL) の関与が報告されてきた (Watanabe et al. 2012)。これらのうち、*E1*、*E3*、*E4* および *E7* 座の変異が非感光性の創出に関与する (Buzzell 1971; Kilen and Hartwig 1971; Buzzell and Voldeng 1980; Saindon et al. 1989a, 1989b; Cober et al. 1996a, 1996b, 2001; Cober and Voldeng 2001a, 2001b; Cober et al. 2010)。

E3 座は、赤色光 (R) の豊富な蛍光灯を用いて自然日長を 20 時間に延長した人工長日（FLD; Fluorescent Long Day）においても開花が抑制されない FLD 不感受性の遺伝解析から同定された (Buzzell 1971; Kilen and Hartwig 1971)。この特性は、劣性遺伝子 *e3* によって支配されている。一方、自然日長を遠赤色光 (FR) の豊富な白熱灯で 20 時間に延長した人工長日（ILD; Incandescent Long Day）下でも開花が抑制されない ILD 不感受性には *e3* に

加えて *E4* 座の劣性遺伝子 (*e4*) が必要である (Buzzell and Voldeng 1980; Saindon et al. 1989a)。

これらの遺伝子座に加えて、*E1* および *E7* も、特に *e3*/*e4* の遺伝的背景の下で ILD に対する感受性の制御に関与している (Cober et al. 1996b, 2001; Cober and Voldeng 2001a, 2001b)。*E1* はダイズの開花において最も大きな影響を与える (Bernard 1971; McBlain et al. 1987; Upadhyay et al. 1994)。Cober et al. (1996b) は、早生の無限伸育品種ハロソイの *E1*、*E3* および *E4* 座に関する準同質遺伝子系統 (NIL) を用いて、赤色 : 遠赤色光比 (R:FR 比) の異なる長日条件に対する開花の反応を比較した。その結果、R:FR 比の高い長日下では、ハロソイの *e1*、*e3* および *e4* に関する NIL (H-*e1/e3/e4*) と *E1*、*e3* および *e4* に関する NIL (H-*E1/e3/e4*) はともに開花が抑制されず同じ時期に開花したが、R:FR の比率が 0.9 の長日下では後者でのみ開花が抑制された。すなわち *E1* は、*e3*/*e4* 背景下において、R:FR 比の低い長日下で開花を抑制する (Cober et al. 1996b; Thakare et al. 2010)。一方、*E7* 座の劣性ホモ遺伝子 *e7* は、*e1*/*e3*/*e4* 型が有する R:FR 比の低い長日に対する反応性をさらに弱める効果を持つ (Cober and Voldeng 2001a; Cober et al. 2001)。しかし、これら 4 遺伝子座の劣性ホモ型においてさえ、感光性を完全に欠落させることはできない (Cober and Voldeng 2001b)。近年、この *e1*/*e3*/*e4*/*e7* 系統の開花を促進する新たな遺伝子座 *E8* が同定されている (Cober et al. 2010)。

Cober et al. (1996b, 2001) は、R:FR 比の異なる光源に対する開花の反応から、その受容体としてフィトクーロム A (PHYA) の関与を示唆した。PHYA タンパク質は遠赤色光のセンサー (光受容体) として、直接あるいは他の光受容体との相互作用を通して、種子発芽、脱黄化および屈光性反応等さまざまな発育過程に関わり、また、避陰反応、光周性植物の概日リズムのリセットや開花にも関与している (Casal et al. 1997)。また、PHYA は高フォトン照射 (High photon irradiance) の赤色光の光受容体としても機能していることが明らかにされている (Franklin et al. 2007; Franklin and Whitelam 2007)。

Liu et al. (2008) は、*E4* 座の異なる対立遺伝子に関する感光性および非感光性の NIL の *PHYA* の二つのホモログ (*GmPHYA1* および *GmPHYA2*) の塩基配列解析から、*e4* 対立遺伝子を持つ非感光性系統の *GmPHYA2* の第 1 エキソンに *SORE-1* と名づけた *Ty1/copia* 様レトロトランスポゾンが挿入されており、その結果生じた中途終止コドンによって不完

全な PHYA タンパク質が産生されていることを明らかにした。さらに、遺伝子マッピング分析から *GmPHYA2* が *E4* と共分離すること、*e4* を有するハロソイの NIL では、連続の FR 光条件で不完全な脱黄化反応を示すことなどから、Liu et al. (2008) は、*E4* が、GmPHYA2 タンパク質をコードし、その劣性 *e4* は機能欠損であると結論した。シロイヌナズナ (Neff and Chory. 1998)、イネ (Takano et al. 2001, 2005) およびエンドウ (Weller et al. 1997, 2001) では、*phyA* の機能欠損変異体は脱黄化反応を完全に失うことから、*e4* 系統に見られた不完全な脱黄化反応は、*GmPHYA2* の同祖遺伝子であり、異なる連鎖群 (O 連鎖群：Gm10) に存在する *GmPHYA1* の冗長的な作用と考えられた (Liu et al. 2008)。しかし、遺伝解析に使用しうる自然突然変異体が発見されていないため *GmPHYA1* の機能は明らかにされていない。さらに、ポジショナルクローニングから、*E3* が GmPHYA3 タンパク質をコードしていることが明らかにされた (Watanabe et al. 2009)。

E1 は、ポジショナルクローニングにより、DNA 結合に関わる B3 ドメインを持つ転写因子として同定された (Xia et al. 2012)。*E1* の発現は、短日条件で抑制され、長日条件で誘導されるが、PHYA 欠損型の *e3*/*e4* 型では長日での発現誘導は生じない。さらに、*E1* を過剰発現させたダイズの形質転換個体では、シロイヌナズナの *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) のオーソログである *FT2a* および *FT5a* の発現が強く抑制され、その結果開花が著しく遅延した (Xia et al. 2012)。これらの結果から、*E1* は、*E3* および *E4* によって調節される光周性の制御下にあり、*FT2a* および *FT5a* の発現の抑制因子と考えられている (Xia et al. 2012)。ダイズゲノムには、*E1* と94%のアミノ酸相同性を示す二つのパラログ—*E1* 様遺伝子 (Glyma04g24640およびGlyma18g22670) —が存在する (Xia et al. 2012)。*E1* の作用性から、*E1* との相同性が高いこれら二つのパラログも開花に対して何らかの効果を有すると予想されるが、詳細な解析はされていない。

モデル植物における感光性の機構と外的符号モデル

光周性花成経路が詳しく研究されているモデル植物—シロイヌナズナとイネ—における主要な開花関連遺伝子のネットワークについてこれまでの知見を整理する。

[シロイヌナズナ]

長日植物であるシロシヌナズナでは、光周期経路、春化経路、ジベレリン経路、自律経路などの4つの経路が開花を制御している。これらのうち、光周性の遺伝子ネットワークには、*GIGANTEA* (*GI*)、*CONSTANS* (*CO*) および *FT* が重要な働きをもつ (Fowler et al. 1999; Kardailsky et al. 1999; Kobayashi et al. 1999; Park et al. 1999; Suarez-Lopez et al. 2001; Yanovsky and Kay 2002)。光シグナルは光受容体によって概日時計へ伝えられ、下流の *GI*、*CO*、*FT* が順次に活性化されて花成を促進する (Simpson and Dean 2002; Yanovsky and Kay 2003; Hayama and Coupland 2003)。*GI* は核シグナルをもつ1,173個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その mRNA 量は24時間周期の概日リズムをもち、日長に関わりなく発現のピークは明期後半 (夕方) にある (Fowler et al. 1999; Park et al. 1999)。*CO* は2つのジンクフィンガー構造を含む、375個のアミノ酸からなるタンパク質をコードし、*FT* のプロモーターに結合する転写因子である (Tiwari et al. 2010)。*CO* の mRNA 量も概日リズムをもち、その発現量は、短日および長日条件ともに日中で低く、明期始め (夜明け) と明期後半からに暗期に上昇する (Putterill et al. 1995; Suarez-Lopez et al. 2001)。フロリゲンである FT は、短い175個のアミノ酸からなる (Kardailsky et al. 1999)。GI は、時計制御下にある FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) と複合体を形成する。この複合体は *CO* プロモーターに結合する CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) と複合体を形成して、FKF1によって仲介されるタンパク質分解活性により CDF1 が分解され、*CO* の転写が始まる (Imaizumi et al. 2003, 2005; Sawa et al. 2007)。葉の葉脈の師部細胞で合成された FT タンパク質は師管を通って茎頂に移動し、転写因子である FLOWERING LOCUS D (FD) と複合体を形成して、花芽分裂組織決定遺伝子である *APETALA1* (*AP1*) のプロモーターに結合しその転写を促進して花成を誘導する (Abe et al. 2005; Wigge et al. 2005)。

シロイヌナズナにおける光周性反応の外的符合モデルは以下のように説明されている (Imaizumi 2010; Valverde 2011)。前述のように、明期の下では、*CO* プロモーター上に結合している CDF1 が、青色光を吸収して活性化された FKF1 と GI の複合体と結合することにより分解され、その結果、*CO* の発現が上昇する。さらに *CDF1* の発現自体が、*TIMING OF CAB EXPRESSION1* (*TOC1*) と *PSUDO RESPONSE REGULATOR 5* (*PRR5*) の制御下にあり、明期後半に *CDF1* の発現が抑制されることも *CO* の発現上昇に寄与している。この

ように、明期が長い条件下では十分な CO が合成されるが、短い明期では十分な CO は合成されない。さらに、暗期では、合成された CO が CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) により分解されるが、明期後半に光 (青色光) が当たるとクリプトクロームが活性化され COP1 が核外に移行し、CO は COP1 依存の分解を逃れて核に蓄積される。その結果、明期後半の時間帯に *FT* の発現が上昇する。したがって、シロイヌナズナの開花の光周性は、明期における *CO* の発現と暗期における CO タンパク質分解の収支によってもたらされる。

[**イネ**]

長日植物であるシロイヌナズナに対して、イネは典型的な短日植物である。イネでは、QTL 解析によって同定された出穂性に関与する *Hd1* と *Hd3a* がそれぞれシロイヌナズナの *CO* および *FT* のオーソログであることが明らかにされた (Yamamoto et al. 1998; Yano et al. 2000; Kojima et al. 2002)。また、シロイヌナズナの *GI* と67%のアミノ酸相同性をもつオーソログ *OsGI* が同定されている (Hayama et al. 2002)。これら3遺伝子は、シロイヌナズナと同様の発現ネットワークを構成するが、*Hd1* の作用は *CO* とは異なり、短日で開花を促進するが長日では開花を抑制する (Yamamoto et al. 1998; Izawa et al. 2002; Shimamoto and Yokoi 2005)。異なる日長条件下での *Hd1* の相反する作用は、Hd1 とフィトクロームの相互作用として捉えられた (Izawa et al. 2002)。すなわち、明期に増えたフィトクロームの活性型 (Pfr) が Hd1 と相互作用し、Hd1 の *Hd3a* 転写促進作用を抑える。一方、暗期では Pfr が Pr 型に変換されるが、明期が長い長日条件では Pfr のレベルが十分に低下せずに Hd1 と相互作用する結果、*Hd3a* の転写が促進されないのに対して、暗期の長い短日条件では Pfr のレベルが十分に低下して、Hd1 は Pfr との相互作用から解放され *Hd3a* の転写を促進すると考えられた (Izawa et al. 2002)。また、イネの光周性開花経路には *Hd1-Hd3a* 経路の他に、概日時計によって発現が制御される *Ehd1* (*Early heading date 1*) を経由する経路がある。*Ehd1* は、Bタイプのレスポンスレギュレーターをコードし、*Hd3a* の発現を誘導する (Doi et al. 2004)。*Ehd1* の発現には *CO* 様遺伝子である *Ghd7* (*Grain number, plant height and heading date 7*) が関与し、*Ehd1* の発現は長日下で *Ghd7* によって抑制される (Xue et al. 2008)。

Ishikawa et al. (2005) は、*phyA*、*phyB* および *phyC* 変異体を用いてイネにおける光中断実験を行ない、光中断の開花および *Hd3a* の発現に及ぼす効果を解析した。その結果、*phyA* および *phyC* 変異体では、野生型と同様に光中断による開花遅延が観察され、*Hd3a* も同様に発現が抑制された。一方、*phyB* 変異体では、光中断による開花遅延は観察されず、*Hd3a* も光中断処理後も野生型と比較して高く維持されていた。これらの実験から、イネの場合、光中断のシグナルは主に PHYB を介して *FT* オーソログである *Hd3a* の発現を抑制することにより、花成遅延が誘導されることが明らかとなった （Ishilkawa et al. 2005）。このような *Hd3a* の光中断に対する反応には、*Ehd1* および *Ghd7* が関与することが Itoh et al. (2010) によって示されている。両遺伝子の発現は、*OsGI* によって規定される内生リズムの各々独自の光誘導相に、外部から与えられた青色または赤色の光照射が符合するか否かによって制御される。すなわち、短日下では、*Ghd7* の光誘導相は暗期の中期に、一方 *Ehd1* の光誘導相は明期の初めにあるため、暗期から明期に移行した朝方には、*Ghd7* の発現が誘導されずに *Ehd1* の発現が上昇し、その結果 *Hd3a* の発現が誘導される。一方、長日下では、光誘導相が両遺伝子ともに明期の初めにあるため、朝方に *Ghd7* の発現が誘導され、Ghd7 が翌朝の *Ehd1* の発現を抑制することによって *Hd3a* の発現が抑えられる。短日下での光中断による開花抑制は、赤色光の照射と光誘導の符号によって *Ghd7* の発現が誘導され、翌朝の *Edh1* の発現を抑制することによって *Hd3a* の発現が抑えられる結果として理解される (Itoh et al. 2010)。イネにおける光周期反応は、*OsGI* によって規定される独自の内生リズムを持った光誘導相と青色光または赤色光のシグナルとの符号に依存した *Ehd1* および *Ghd7* の発現制御によって規定されている (Itoh et al. 2010)。

ダイズにおける開花遺伝子オーソログ

ダイズにおいても、シロイヌナズナやイネで見いだされた光周期経路の開花遺伝子のオーソログが見出され、それらの機能が解析されている (Kong et al. 2010; Thakare et al. 2010, 2011; Sun et al. 2011; Watanabe et al. 2011)。*E2* は、ポジショナルクローニングによって、シロイヌナズナの *GIGANTEA* のオーソログであることが明らかにされ、*FT2a* の発現が優性ホモ型 *E2*/*E2* に比べて劣性ホモ型 *e2*/*e2* で上昇する (Watanabe et al. 2011)。Kong et al.

(2010) は、ダイズゲノムから10個の *FT* オーソログを見出し、ハロソイおよびその *e3*/*e4* に関する NIL を用いて、短日と長日条件下でそれらの発現を比較し、短日で発現が誘導される二つのオーソログ—*FT2a* および *FT5a*—を見出した。これらの遺伝子を、CaMV 35S プロモーターを用いてシロイヌナズナのコロンビア (Col-0) で過剰発現させたところ、開花が促進され、両遺伝子が期待される FT の機能をもつことが確認された (Kong et al. 2010)。一方、Yamagishi and Yoshikawa (2011) は、リンゴ小球形潜在ウイルス (Apple latent spherical virus; ALSV) ベクターを用いてシロイヌナズナの *FT* を開花非誘導的な条件下でダイズで過剰発現させたところ、伸育性に関わりなくダイズ品種の開花が誘導されたことを報告している。これらの結果は、シロイヌナズナやイネのように、*FT* がダイズの開花誘導にも重要な役割を果たすことを示している。また、*FT2a* および *FT5a* の発現量は、正常な PHYA をもつハロソイでは長日下で抑制されるが、PHYA が欠損している *e3*/*e4* 型では発現は抑制されず、その発現は *E3* および *E4* に制御されていることが示されている (Kong et al. 2010)。

開花後の光周性反応

ダイズの光周性反応は、開花誘導だけではなく、開花後の主茎や分枝の生長ならびに種子の登熟などの生殖生長にもみられる。長日は、感光性品種の葉の老化や種子の登熟を遅らせる (Han et al. 2006; Kantolic and Slafer 2007; Jiang et al. 2010)。ダイズの *E* 遺伝子は、開花だけでなく登熟の時期も制御する (Bernard 1971; McBlain et al. 1987; Saindon et al. 1989a)。また、種子登熟を制御する QTL がさまざまな連鎖群で見出されている (Lee et al. 1996; Watanabe et al. 2004; Zhang et al. 2004; Cheng et al. 2011; Komatsu et al. 2012) 。しかし、開花後の光周性反応に関する QTL の報告はほとんどない。Cheng et al. (2011) は、長日条件下で開花後の登熟期間を制御する二つの QTL を見出した。これらは、マップ情報から *E3* および *E8* (Cober et al. 2010) に相当すると思われ、同時に開花の制御にも関与していた (Cheng et al. 2011)。

本研究の目的

本研究では、ダイズの開花制御に関する遺伝学的、分子生物学的研究を行った。まず、第2章では、様々な地域に由来する非感光型ダイズ品種・系統について、DNA マーカーを用いて感光性遺伝子座 (*E1*~*E4*) の遺伝子型を推定し、長日条件下における開花後の登熟や主茎の生長様式に基づいて、開花後の光周性反応の多様性とその分子機構について検討した。第3章では早生品種であるハロソイとトヨムスメならびにハロソイの非感光型 NIL を用いて、開花遺伝子の発現様式を比較し、感光性分子機構の多様性を明らかにした。第4章では、*E1* と94%のアミノ酸相同性を示す二つの *E1* 様遺伝子—*E1L-C1* および *E1L-G*—の開花に及ぼす機能を、ALSV を用いた Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) により検討した。第5章では、*E1* の発現機構に焦点を当てて、ダイズの開花に及ぼす光中断の機構について検討した。第6章では、これらの研究成果を基に、ダイズにおける感光性の機構について考察した。

第２章　非感光性獲得機構の多様化と開花後の光周性反応

高緯度地域で栽培されるダイズ品種の多くは、感光性が低下または欠落している。この非感光性には、主に *E1*、*E3* および *E4* 座の機能欠損遺伝子が関与する 2 つの遺伝的制御機構によって支配されている (Abe et el. 2003; Liu and Abe 2010)。その一つは、古くから指摘されてきた *E3* および *E4* 座の二重劣性ホモ型 (*e3*/*e4*) である (Buzzell 1971; Buzzell and Voldeng 1980; Saidon et al. 1989a; Cober et al. 1996a; Abe et el. 2003)。*E3* および *E4* はフィトクローム A (PHYA) アポタンパク質 (GmPHYA3 および GmPHYA2) を支配しており (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009)、PHYA の機能欠損が非感光性を導く。もう一つは、北海道の在来種「坂本早生」の非感光性を特徴づける遺伝的制御機構である。同じく北海道の在来種「三春大豆」 (*e3*/*e4* 型) との交雑後代の解析から、「坂本早生」は *e3*/*E4* を持ち、*e1* かまたは *E1* 座と連鎖する新規の非感光性遺伝子を有することが示唆されてきた (Abe et el. 2003; Liu and Abe 2010)。その後、Xia et al. (2012) によって、*E1* の原因遺伝子が特定され、その塩基配列解析から「坂本早生」が機能欠損遺伝子 (*e1-fs*) を持つことが明らかにされた。したがって、「坂本早生」の非感光性には、*E1* 座の機能欠損遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。

また、ダイズの光周性反応は、開花誘導だけではなく、開花後の主茎や分枝の生長ならびに種子の登熟などにもみられる。長日は、感光性品種の葉の老化や種子の登熟を遅らせる (Han et al. 2006; Kantolic and Slafer 2007; Jiang et al. 2010)。ダイズの *E* 遺伝子は、開花だけでなく登熟の時期も制御する (Bernard 1971; McBlain et al. 1987; Saindon et al. 1989a)。また、種子登熟を制御する QTL がさまざまな連鎖群で見出されている (Lee et al. 1996; Watanabe et al. 2004; Zhang et al. 2004; Cheng et al. 2011; Komatsu et al. 2012) 。しかし、開花後の光周性反応に関する QTL の報告はほとんどない。Cheng et al. (2011) は、長日条件下で開花後の登熟期間を制御する二つの QTL を見出した。これらは、マップ情報から *E3* および *E8* (Cober et al. 2010) に相当すると思われ、また、開花の制御にも関与していた (Cheng et al. 2011)。

本章では、高緯度に位置する様々な地域から導入された非感光性品種・系統について、4 つの感光性遺伝子座 (*E1*、*E2*、*E3* および *E4*) の遺伝子型を DNA マーカーを用いて推

定し、非感光性をもたらす遺伝子型の多様性と開花前および開花後の光周性反応との関係を解析した。

1 材料および方法

1-1 供試材料

供試系統は、高緯度地域から導入された 53 の非感光性系統である (表 2-1)。これらは、日本北部からの 9 系統 (北海道から 6 系統、東北地方から 3 系統)、中国東北部からの 29 系統、極東ロシアからの 8 系統、ウクライナからの 4 系統、ポーランドからの 3 系統を含む。これらに加えて、感光性遺伝子型が同定されている品種ハロソイ (*e1-as/e2/E3/E4*)、ハロソイの *e3*、*e4* ならびに伸育性遺伝子座 (*Dt1*) の劣性遺伝子 (*dt1*) に関する準同質遺伝子系統 (NIL; H-*e3*、H-*e4*、H-*e3e4* および H-*dt1*) を用いた。

1-2 開花前ならびに開花後の感光性の評価

上記材料を、温室内でペーパーポットに播種し、約10日間育苗した後、北海道大学フィールド科学研究センター生産圃場に設置した白熱灯で補光して20時間日長とした長日圃場 (人為長日区) と、補光を与えない隣接する自然日長圃場 (自然日長区) で栽培した。各系統4個体を栽培し、個体毎に最初の花が観察された日 (R1 期; Fehr et al. 1971) と植物全体が登熟した日 (R8 期) ならびに登熟期の主茎節数を調査した。実験は2011年と2012年に行った。

1-3 DNA マーカーを用いた遺伝子型の推定

4 つの *E* 遺伝子 (*E1*、*E2*、*E3*、および *E4*) ならびに伸育性遺伝子 *Dt1* の遺伝子型を、対立遺伝子を特異的に判別する DNA マーカーを用いて推定した。用いた DNA マーカーは、*E1* については Xia et al. (2012) を、*E2* については Watanabe et al. (2011) を、*E3* については Harada et al. (2011) を、*E4* については Liu et al. (2008) および Tsubokura et al. (2013) を参照にした。一方、*Dt1* 座には 4 個の有限伸育性に関わる対立遺伝子が存在するが (Tian et al. 2010)、そのうち *dt1-bb* (Liu et al. 2010) の解析した *dt1* に相当するについては Liu et al. (2010) の作出した DNA マーカーを、残りの遺伝子のうち、稀な *dt1-ta* を除く *dt1-ab* お

よび *dt1-tb* については、Tian et al. (2010) が報告している塩基多型を基に DNA マーカーを作出した。

Doyle and Doyle (1990) の方法に従い、全ゲノム DNA を本葉から抽出した。PCR 溶液は、30 ng/μl に調整した DNA 溶液を 1 μl、10 pM のフォワードおよびリバースプライマーをそれぞれ 0.5 μl、ExTaq ポリメラーゼ (TaKaRa) を 0.2 μl、10×ExTaq 緩衝液を 2 μl、dNTP 2 μl を含み、滅菌水を加えて 20 μl とした。PCR 反応は、94℃で 5 分間処理した後、熱変性を 94℃で 30 秒、アニーリングを 50℃から 60℃ (プライマーによって異なる : 表 2-2 を参照) で 30 秒、伸長反応を 72℃で 30 秒から 90 秒行い、これを 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した後、サイクル終了後に 72℃で 5 分間処理した。PCR 産物は、直接または制限酵素で処理した後に、1%から 3%のアガロースゲルで電気泳動し、UV ライト下で視覚化した。用いた DNA マーカーの種類、プライマー配列、制限酵素、電気泳動後の断片サイズを表 2-2 に示した。

1-4 シーケンス分析

DNA マーカー解析の結果、優性対立遺伝子を持つと判定された系統については、それらの塩基配列を解析した。*E1* ではコード領域を含む 525 bp の領域を、*E3* では 4 つのエキソンに対応した 571 bp から 2350 bp の領域を、*E4* ではイントロンを含む全コード領域をカバーする 2384 bp と 3506 bp の 2 つの領域を、KOD FX (TOYOBO) ポリメラーゼを用いて増幅した。増幅した断片は ExoSAP-IT enzyme kit (GE Life Sciences Japan) を用いて精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Japan) を用いてシークエンス反応を行った。シークエンスは 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

1-5 新たに観察された機能欠損遺伝子を判別する DNA マーカーの開発

シークエンス解析によって見出された機能欠損遺伝子について、突然変異サイト周辺の配列から CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) または dCAPS (derived CAPS) マーカーを開発した (表 2-2)。マーカー特異的なプライマーを用いてターゲット領域を増幅した後、適切な制限酵素で消化し、電気泳動で分離して UV ライト下で視覚化した。

1-6 開花誘導後の光周性反応と有限伸育性遺伝子 *DT1*（*TFL1b*）の発現解析

ハロソイおよび H-*e3*、H-*e4*、H-*e3/e4*、H-*dt1* を用いて、シロイヌナズナ *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) のオーソログである *Dt1* (*TFL1b*) の茎頂における発現の経時的変化を解析した。子葉展開後12日間、短日 (12時間日長) で栽培して花芽を誘導させた後、光源の異なる長日 (20時間日長) 条件―一つは *E3* の効果を調べるための蛍光灯と白熱灯を組み合わせて R:FR 比を1.2とした長日 (実験1)、もう一つは *E4* の効果を調べるため、実験1の光源を16時間照射した後、白熱灯だけを用いて4時間照射した長日 (実験2) ―で栽培し、開花日、開花後の主茎節数と莢の生長を調査した。実験は25℃の人工気象室で行った。また、短日処理終了時 (12日目)、長日に移してから7日、14日および21日目に、各系統4個体から、光点灯後4時間目に茎頂部をバルクで採取し、RNA 抽出した後 cDNA を合成し、発現解析を行った。

採取した組織は、液体窒素で凍結させながら粉末状に粉砕した。RNA の抽出には、RNeasy plant mini kit (QIAGEN) または付表1に示す RNA 抽出緩衝液を用い、前者の場合には付属の説明書に準じて、RNA 抽出緩衝液を使用した場合には、下に示した方法を用いて RNA を抽出した。

粉砕物に600 µlの RNA 抽出バッファー (付表1) を加えてさらに粉砕し、1.5 ml チューブに移し、30 µl メルカプトエタノールとフェノール:クロロホルム:イソアルミルアルコール (PCI 25:24:1) を600 µl 加えて充分に混合した。15,000 rpm で10分遠心分離 (4℃) し、上清液を新しい1.5 ml チューブに移し、等量の PCI 25:24:1を加え混合した後 15,000 rpm で5分遠心分離 (4℃) した。上清液を新しい1.5 ml チューブに移し、等量のクロロホルム:イソアルミルアルコール (24:1) を加え混合した後、15,000 rpm で5分遠心分離 (4℃) した。上清液を新しい1.5 ml チューブに移し、上清液の1/3量の8 M 塩化リチウムを加え、転倒混合させた後、氷の中に挿して4℃で一晩静置した。その後、15,000 rpm で10分遠心分離 (4℃) し、上清を除去した。70%エタノールにてリンスした後、上清をマイクロピペットで吸い取り、沈殿物を100 µl の滅菌水に溶解した。

RNA サンプルからゲノム DNA を除去するために、Recombinant DNase 1 (RNase free) (TAKARA BIO.) を用いて DNA 消化を行った。RNA 溶液を NANODROP 2000c

Spectrometer (Thermo SCIENTIFIC) を用いて OD を測定し、20~30 μg の RNA に、滅菌水を270 μl まで加えた。付属の10×DNase Buffer 30 μl、DNase 1 (RNase free) 2 μl を添加し、混合した後、37℃で30分間処理した。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 を21 μl の滅菌水に溶解した。OD を測定し、RNA の濃度を約200 ng/μl に調節した。1%のアガロースゲル電気泳動で RNA 分解およびゲノム DNA の残存状態を確認した。また逆転写反応の際にはネガテイブコントロールとして酵素を入れないものを用意し、DNA が混在していないことを確認した。

cDNA は、200 ng/μl に調整した RNA 溶液4 μl (800 ng) に、4 μl の dNTP 溶液 (2.5 mM)、1 μl の oligo(dT)$_{20}$(50 uM) および4 μl の滅菌水を加えて65℃で5分間保温し、その後氷中で5分間急冷して RNA の高次構造を解いた後、4 μlの5×First-Strand Buffer、2 μlの0.1M DTT および1 μlの M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加え、42℃で60分間、99℃で1分間反応させて合成した。合成された cDNA は、10倍希釈して発現解析のテンプレートとして用いた。

qRT-PCR は CFX96 Real Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いて行った。PCR 反応液は、5 μl の cDNA 溶液、10 μl のSYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ(TakaRa)、2.5 μl の Forward Primer (2.4 μM) と2.5 μl の Reverse Primer (2.4 μM) からなり、95℃で3分間処理した後、95℃で10秒間の熱変性、58℃で20秒間のアニーリング、72℃で20秒間プレートリードし、78℃で2秒、その後またプレートリードし、これを1サイクルとして40サイクル反応させ、最後に融解曲線解析を行った。発現量のコントロールには *β-tubulin*(Glyma08g01740) を用いた。遺伝子発現解析に用いたプライマー情報を表2-4に示す。

2 結果および考察

2-1 開花に対する非感光性の評価

感光性は、人為長日区と自然日長区における開花日の差を基に評価した。ハロソイは感光性を有し、2011年と2012年の二か年において、自然日長区では播種後平均57日で開花したが、人為長日区では補光終了時 (播種後62日または65日) までに花芽は形成されなかった。H-*e3* や H-*e4* も、人為長日区では補光終了までに花芽は形成されなかった。自然日長区で

は、H-*e3* は播種後46日で、H-*e4* は53日間で開花した。一方、H-*e3/e4* では、長日による開花遅延の効果は観察されず、どちらの区においても播種後40日で開花した。実験に供試した53系統では、人為長日による開花遅延が5日以内であり、全ての系統を非感光性とみなした。

2-2 DNA マーカーを用いた遺伝子型の分類

E1 から *E4* の4つの遺伝子の責任遺伝子が同定されている (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009; Watanabe et al. 2011; Xia et al. 2012)。これまでに開発された DNA マーカー (Liu et al. 2008; Xia et al. 2012; Watanabe et al. 2011; Harada et al. 2011; Tsubokura et al. 2013) を用いて、53の非感光性系統の遺伝子型を推定した。

E1 座には4つの対立遺伝子が報告されている (Xia et al. 2012)。これらは、2つの機能欠損遺伝子 (*e1-nl*と*e1-fs*)、1つの機能低下遺伝子 *e1* (本研究では Xia et al. (2012) に従い *e1-as* と示す)、そして優性の *E1* である。*e1-nl* は *E1* を含む130Kb領域が欠失する突然変異体、*e1-fs* は1塩基欠失によるフレームシフト突然変異体である。*e1-as* は核への移行シグナル部位に一塩基置換によるアミノ酸置換が生じ、正常な核移行が阻害された機能低下型の変異体である (Xia et al. 2012)。調査した53系統中、8系統が *E1* を、33系統が *e1-as* を、11系統および1系統がそれぞれ機能欠損遺伝子 *e1-nl* および *e1-fs* を有していた。

シロイヌナズナ *GIGANTEA* (*GI*) のオーソログである *E2* 遺伝子座には野生型の *E2* と単塩基置換により中途終止コドンが生じた機能欠損遺伝子 *e2* が存在する (Watanabe et al. 2011)。調査した53系統全てが *e2* を有していた。

E3 座には、野生型 (*E3*) と一つの機能欠損遺伝子 (*e3*)、*E4* 座には野生型 (*E4*) と5つの機能欠損遺伝子 (*e4-SORE-1*、*e4-kam*、*e4-oto*、*e4-tsu*および*e4-kes*) が見出されている (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009; Tsubokura et al. 2013)。*E3* 座では、調査した53系統中、20系統が *E3* を、33系統が *e3* を、また *E4* 座では、15系統が *E4* を、38系統が *e4* (*e4-SORE1*：20系統、*e4-kam*：2系統、*e4-oto*：1系統、*e4-kes*：15系統) を有していた。非感光型である両座の二重劣性ホモ型は22系統にみられ、ともに優性遺伝子を持つ系統が4系統、*E3* あるいは *E4* の片方を有する系統が27系統存在した。

2-3 優性遺伝子のシーケンス解析

DNA マーカーの解析から、野生型と推定された遺伝子についてシーケンス解析を行い、既知の野生型遺伝子の塩基配列と比較した。その結果、*E1* ならびに *E4* には新たな突然変異は見出されなかった。一方、*E3* には、機能欠損を引き起こす二つの突然変異が見出された。一つは、第3エキソンで翻訳開始点のアデニンから数えて3,139番目の塩基シトシン (C) がチミン (T) に置換し、終止コドンが生じたナンセンス突然変異体であり、もう一つは、第1エキソンの1,275番目の塩基に一つの T が挿入されたフレームシフト突然変異体である。いずれも不完全なタンパク質をコードしていると推察された (図2-1A および B)。これら二つの機能欠損遺伝子を *e3-ns* (nonsense mutation) および *e3-fs* (frameshift) と名付けた。また、従来 *e3* として取り扱われてきた対立遺伝子については、第4エキソン以降の欠失による機能欠損遺伝子であったことから *e3-tr* (truncated) と呼ぶ。

次に、*e3-ns* および *e3-fs* を判別できる DNA マーカーを開発した (表2-2)。*e3-fs* の場合、T の挿入が、野生型を含む他の対立遺伝子の *Ale*I 制限サイトに生じていたことから、変異箇所を含む758 bp (*e3-fs* 型ではTの挿入により759 bp) の断片を PCR で増幅した後、*Ale*I で消化して他の対立遺伝子と区別した。*E3*、*e3-ns* および *e3-tr* では、増幅断片は552塩基対と206塩基対の断片に消化されたが、*e3-fs* を有する「Darta」では消化されなかった (図2-1C左)。*e3-ns* の場合、その増幅断片に *Mfe*I 制限サイトが生じるようプライマーにミスマッチ塩基を挿入した。163塩基対のPCR産物は、*e3-ns* を有する「Nawiko」においてのみ *Mfe*I によって140塩基対と23塩基対に消化された (図2-1C右)。

E3 座の遺伝子型を再評価することにより、最終的に53の非感光性系統を15種類の遺伝子組み合わせに分類することができた。さらに、機能欠損遺伝子を遺伝子座毎にまとめることにより53系統を6種類の遺伝子型グループ (*e1*/*e3*/*e4*、*e1*/*E3*/*e4*、*e1*/*e3*/*E4*、*e1-as*/*e3*/*e4*、*e1-as*/*e3*/*E4* および *E1*/*e3*/*e4*) に分類することができた。この分類において、異なる機能欠損対立遺伝子を一括して *e1*、*e3* および *e4* と表した。53の非感光性系統の中で、*E3* および *E4* 座の二重劣性ホモ型が36系統 (70%) と最も高頻度で観察された。残りの17系統は、*E3* あるいは *E4* のいずれか片方を有していた。これらのうち、「坂本早生」のように *E1* 座の機能欠損遺伝子を持つ系統が10系統見出された。一方、*e1-as*/*e3*/*E4* の遺伝子型をもつ系統が7系統存在した。この遺伝子型は、ハロソイの *e3* に関する準同質遺伝子系統 (H-*e3*)

と同じ遺伝子型である。しかし、H-*e3* は FR 光の豊富な長日条件に対して感光性を示す (Cober et al. 1996b; Liu and Abe 2010)。したがって、*e1-as*/*e3*/*E4* の非感光性には、*E1*、*E3* および *E4* 座とは異なる新規の非感光性遺伝子が関与すると考えられる。

2-4 *E3*および*E4*が関与する開花後の光周反応

供試した53系統は、自然日長区と人為長日区の開花日の差異が5日以内と小さく、開花誘導に関して非感光性とみなされた。しかし、開花後の主茎の生長や登熟期など、開花後の栄養生長や生殖生長は遺伝子型間で異なった反応を示した (図2-2および2-3)。

長日により登熟が5日以上遅延した系統が36系統存在した。最初の花が観察された日 (R1) から登熟 (R8) までに要した期間を生殖生長期間とすると、人為長日による生殖生長期間への影響が、ほとんど観察されなかった系統から最大で29日増加した系統まで変異した (図2-2)。*e3/e4* 型の系統では生殖生長期間の延長程度は最大12日であり、平均すると4.2日であった。一方、*E3* あるいは *E4* をもつ17系統のうち14系統では、人為長日による生殖生長期間の延長は12日以上あり、平均で19.1日であった。遺伝子型間で比較すると、人為長日による生殖生長期間の延長は、*e1l*/*e3*/*E4* で14.3日、*e1-nl*/*E3*/*e4* で21.8日、*e1-as*/*e3*/*E4* で 23.7日であった (図2-4)。したがって、*E3* および *E4* は、開花誘導だけではなく、開花後の生殖生長期間にも影響を与えた。

人為長日は、開花後の主茎の生長にも影響を与えた (図2-3)。ダイズの主茎の生長を規定する伸育性には少なくとも2つの遺伝子—*Dt1* および *Dt2*—が関与しており、その中でも *Dt1* の効果が大きい (Bernard 1972)。*Dt1* はシロイヌナズナの *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) のオーソログ (*TFL1b*) である (Tian et al. 2010; Liu et al. 2010)。*Dt1* 座にはこれまで、単一のアミノ酸置換によって生じた4つの劣性遺伝子 (*dt1-ab*、*dt1-bb*、*dt1-tb*および*dt1-ta*) が見出されている (Tian et al. 2010)。2つの遺伝子 (*dt1-ab* および *dt1-tb*) について、塩基配列情報から DNA マーカーを作出し、これらとLiu et al. (2010) が開発した DNA マーカー（*dt1-bb*）を利用して53系統の *Dt1* 遺伝子型を推定した。その結果、41系統が *Dt1* を、12系統が *dt1-bb* あるいは *dt1-tb* を有していた (表2-1)。

有限伸育型では、一般に開花後に主茎の生長が止まるが、無限伸育型では茎頂分裂組織の栄養生長が終るまで茎の生長が持続する (Liu et al. 2010)。*dt1-bb* あるいは *dt1-tb* をも

つ12の有限型系統は、自然日長区と人為長日区で同程度の主茎節数を示した (図2-3)。一方、41の無限型系統は、自然日長区に比べて人為長日区でより多くの節を形成したが、その程度は遺伝子型間で異なった (図2-3)。*e3/e4* 型では、*E1* 座の遺伝子型に関わりなく人為長日による主茎節数の増加は最大で2.4節であり、平均で0.7節と、両日長区ともに開花後主茎の生長が止まった (図2-3および2-4)。一方、*E4* をもつ系統では、人為長日区で主茎節数が増加したが、その程度は *E1* 座の遺伝子型 (*e1* あるいは *e1-as*) に依存し、*e1* をもつ系統 (*e1/e3/E4*) では増加数は平均1.5節と、両日長区で類似したが、*e1-as* をもつ系統 (*e1-as*/*e3*/*E4*) では人為長日による主茎節数の増加は、最も少ない系統でも3.4節であり、平均で5.7節であった (図2-4)。

2-5 *E3* および *E4* の制御による開花後の主茎の生長と莢の発育

実験圃場で観察された開花後の光周性反応の遺伝子型間差異を検証するために、異なる光源を用いた二つの長日条件におけるハロソイ (*e1*/*e2*/*E3*/*E4*) およびその *e3*、*e4*、*e3/e4* および *dt1* に関するNIL (H-*e3*、H-*e4*、H-*e3/e4*、H-*dt1*) を用いて、開花後の栄養ならびに生殖生長に関わる長日の影響を解析した。

ハロソイは、子葉展開後12日間の短日処理により開花が誘導され、その後長日下においても開花が持続する (Kong et al. 2010)。両実験ともに、ハロソイおよび NIL の開花は子葉展開後23-25日 (長日条件に変換してから11-13日後 : 図2-5C および D の網かけ部分) に始まり、ハロソイや H-*e4* では実験期間中開花が継続した。開花後30日目までに形成された主茎節数を比較すると、有限型の H-*dt1* では6-8節で主茎の生長が止まり、無限型は H-*dt1* に比べてより多くの節を形成したが、節数は遺伝子型により異なった (図2-5A)。ハロソイと H-*e4* では、H-*dt1* に比べて両実験ともに平均で約6節以上節数が増加した。これら2系統に比べると、H-*e3/e4* および H-*e3* では主茎の生長が早く停止した。特に、FR光の豊富な長日 (実験2) では、H-*e3/e4* の主茎の生長が H-*e3* より早く停止し、H-*e3/e4* の主茎節数は H-*dt1* とほぼ同じであった。

開花後の莢の発育様式は、主茎の生長で観察された結果とは異なった (図2-5B)。開花後30日目には、両実験とも H-*e3* および H-*e3/e4* で3.0 cm 以上の大きさの莢を4-5個形成したが、ハロソイや H-*e4* では莢の発育はほとんど観察されなかった。また、H-*dt1* の場

合、実験1では莢の発育は観察されなかったが、実験2では3.0 cm 以上の莢を平均で2個形成した。

茎頂における *Dt1* の発現は、有限型では開花誘導に伴い急速に消失するが、無限伸育型では開花後しばらく維持される (Liu et al. 2010)。短日処理 12 日目の *Dt1* の発現量は、両実験ともに *E3* および *E4* 座の遺伝子型に関わりなく非常に低かった (2-5C および D)。また、H-*dt1* では長日に転換した後でも発現の上昇は見られなかった。一方、無限伸育であるハロソイと感光性遺伝子の NIL では、H-*e3/e4* を除き、両実験ともに長日に転換した 7 日目 (LD7) には *Dt1* の発現量が増加したが、その後の推移は実験間ならびに遺伝子型間で異なった。R 光の豊富な光源による長日 (実験 1) では、ハロソイおよび H-*e4* の *Dt1* 発現は転換後 21 日まで比較的高いレベルで維持されたが、H-*e3* の発現は長日転換後 14 日目には急速に低下した (図 2-5C)。一方、FR 光の豊富な光源による長日 (実験 2) では、ハロソイ、H-*e3* および H-*e4* の *Dt1* 発現は長日転換後 14 日まで維持され、その後急速に減少した (図 2-5D)。H-*e3/e4* の *Dt1* の発現量は、H-*dt1* 同様に、全ての生長段階で低かった。これらの結果から、*Dt1* の発現には *E3* および *E4* が関与することが明らかとなった。

これらの結果から、ダイズの開花に関する非感光性には、*E1*、*E3* および *E4* 座に関する少なくとも 3 組の遺伝子型が関与すること、これらの遺伝子型は開花後の光周性反応には異なった反応を示すことが明らかとなった。さらに、ダイズの光周性反応には、開花前および開花後のいずれの生育段階においても PHYA が関与していることが明らかとなった。第 6 章の総合考察では、これらの遺伝子型と光周性反応に関する開花遺伝子ならびに伸育性遺伝子のネットワークのモデルを提案する。

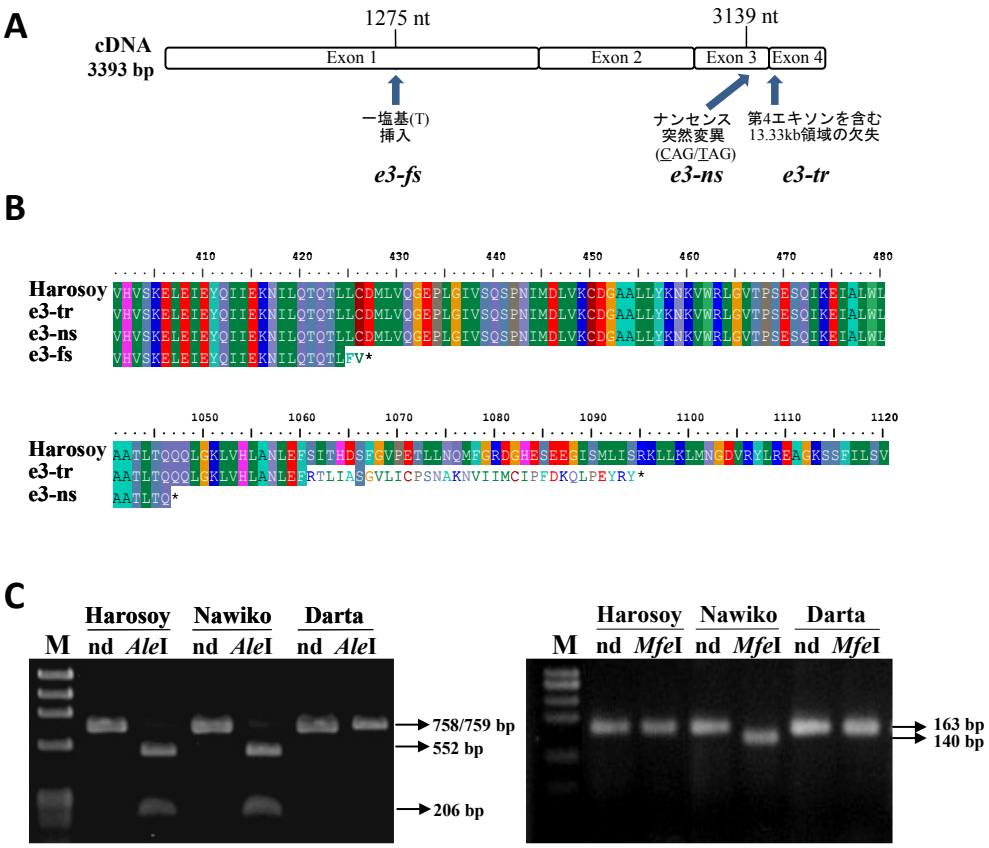

図 2-1. *E3* 座で見出された新たな機能欠損遺伝子とそれらを識別する DNA マーカー

A）新規の機能欠損遺伝子（*e3-fs* および *e3-ns*）と第 4 エキソンが欠失した既知の劣性遺伝子 *e3*（*e3-tr*）の突然変異の位置とタイプ。B）ハロソイと 3 種類の劣性遺伝子の予測アミノ酸配列の比較。星印は停止コドンを示す。C）*E3* 座の新たな機能欠損遺伝子—*e3-fs*（左）および *e3-ns*（右）—を識別する DNA マーカー。供試材料は、ハロソイ（Harosoy）（*E3*）、Nawiko（*e3-ns*）および Darta（*e3-fs*）である。M は φX174/*Hae*III の分子量マーカーを泳動したもの。

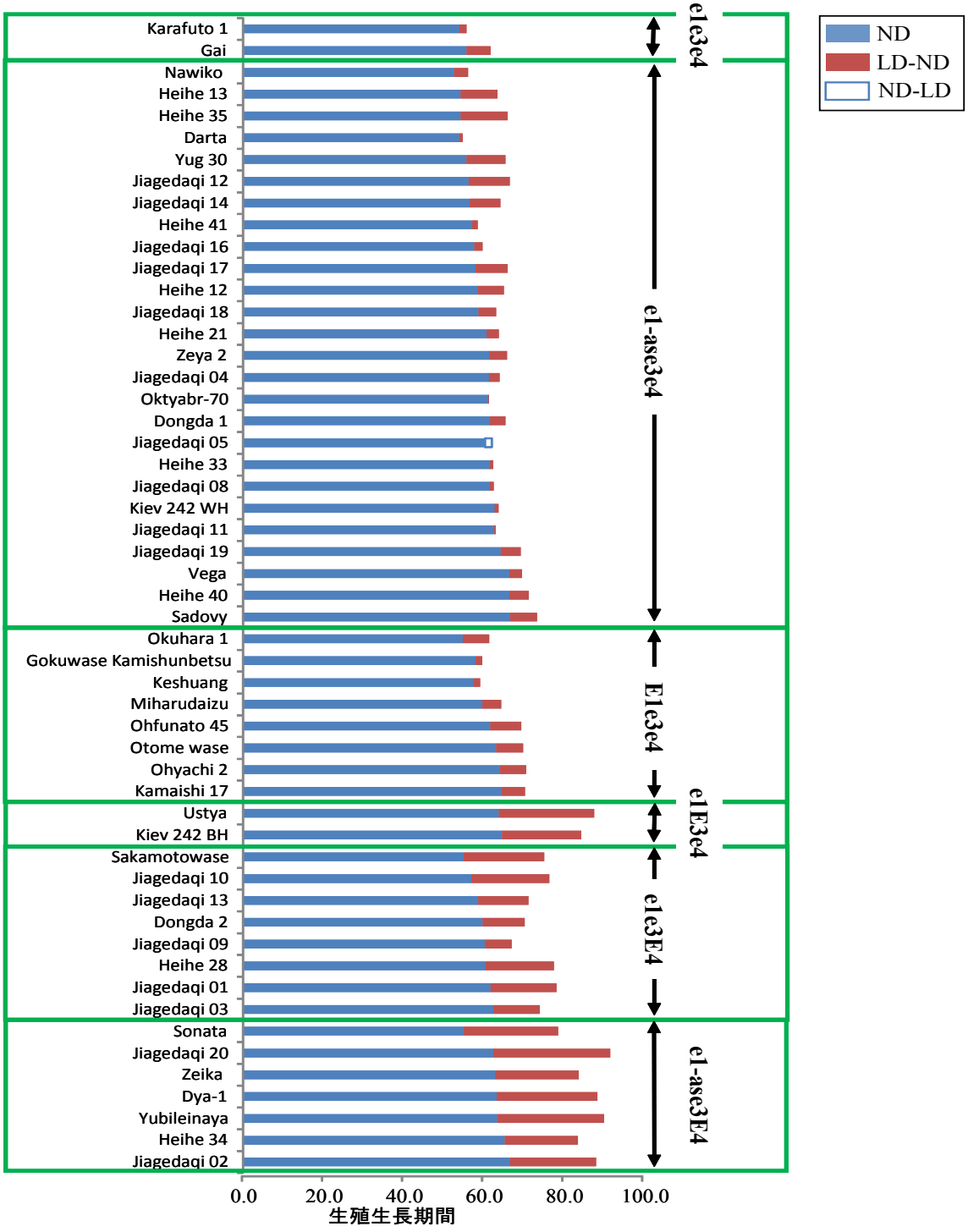

図 2-2. 非感光性ダイズ系統の自然日長区と人為長日区における生殖生長期間

図中の青のバーは自然日長での生殖生長期間（最初の花が咲いてから登熟までに要した日数）を、赤のバーと白抜きのバーは、長日により増加した期間と減少した期間を示す。非感光性ダイズ系統は、*E1*、*E3* および *E4* 座の遺伝子型に基づいて分類した。*e1*、*e3* および *e4* は各々対応する遺伝子座の機能欠損対立遺伝子を表す。

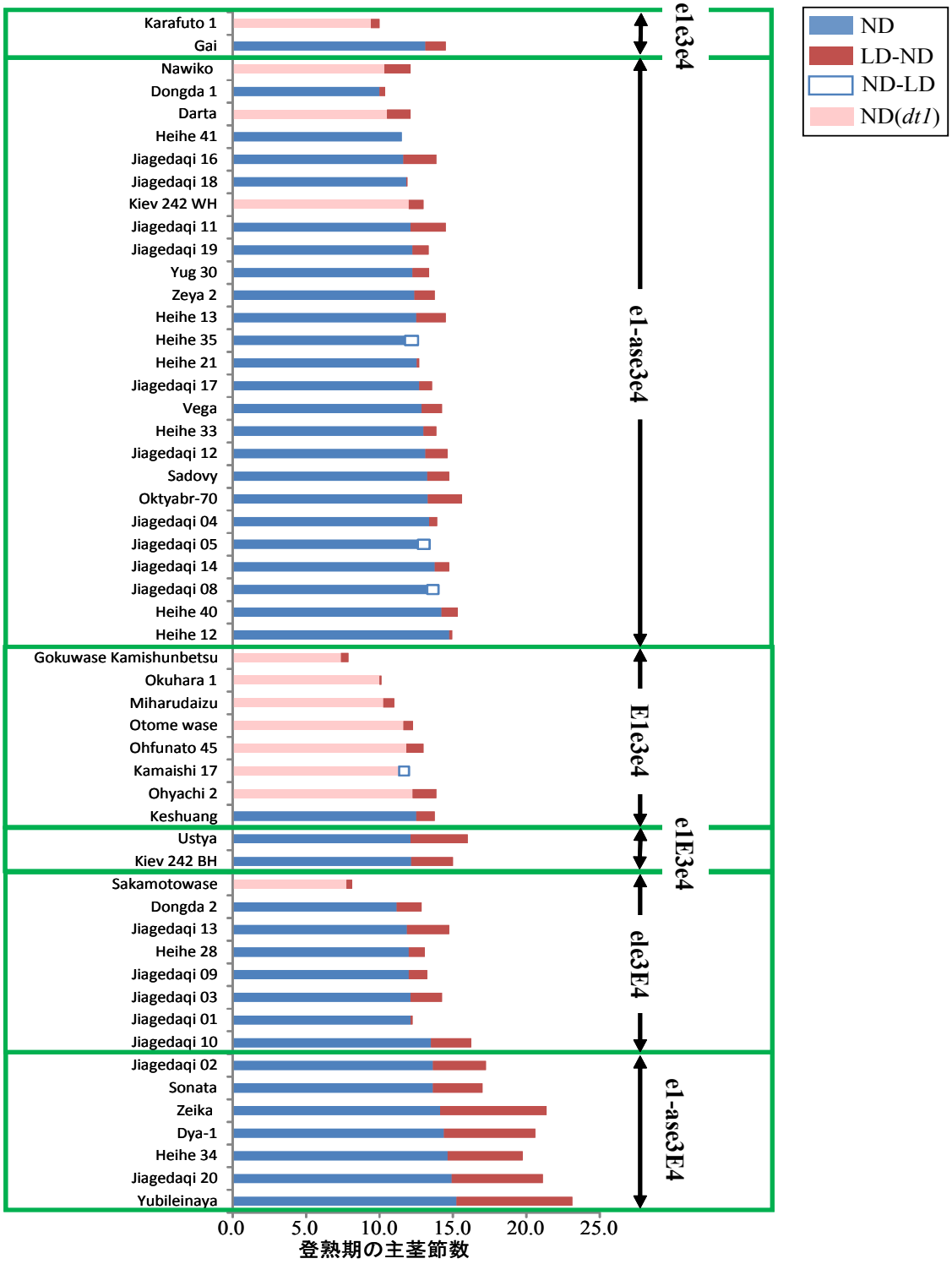

図 2-3. 非感光性ダイズ系統の自然日長区と人為長日区における登熟期の主茎節数

図中の青のバーは自然日長での登熟期の主茎節数を、赤のバーと白抜きのバーは、長日により増加した節数と減少した節数を示す。ピンクのバーは有限伸育型系統を示す。非感光性ダイズ系統は、*E1*、*E3* および *E4* 座の遺伝子型に基づいて分類した。*e1*、*e3* および *e4* は各々対応する遺伝子座の機能欠損対立遺伝子を表す。

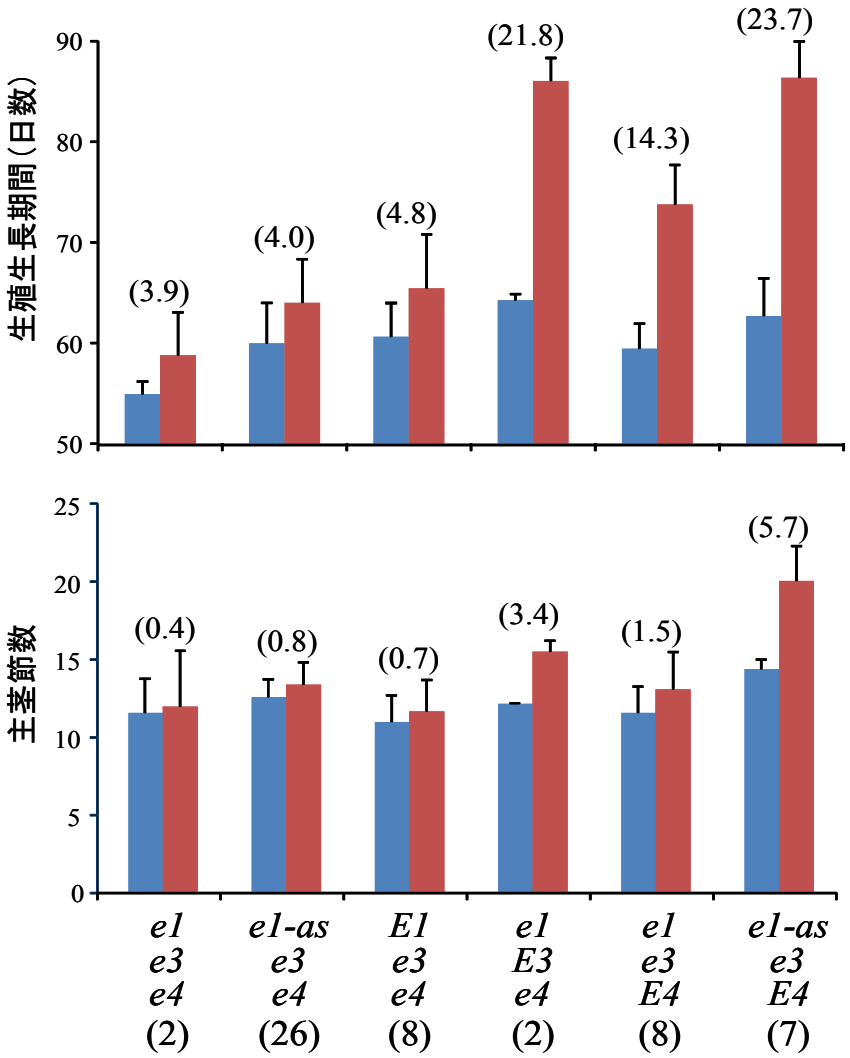

図 2-4. 非感光性ダイズ系統の異なった開花後の光周性反応

異なった遺伝子型組み合わせを持つ系統の自然日長区（青のバー）ならびに人為長日区(赤のバー）における生殖生長期間と主茎節数の平均値（±標準偏差）を示す。*e1*、*e3* および *e4* は各々対応する遺伝子座の機能欠損対立遺伝子を表す。

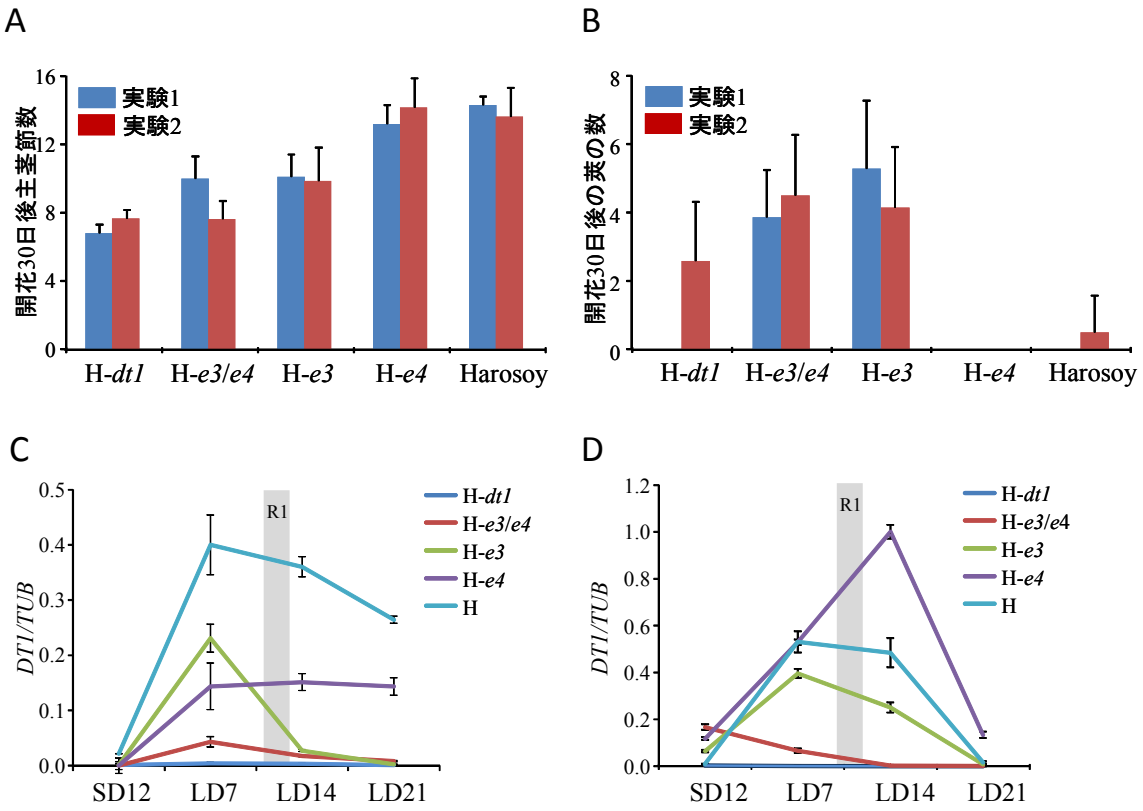

図 2-5. ハロソイ (Harosoy) およびハロソイの *e3*、*e4*、*e3/e4* および *dt1* に関する NIL (H-*e3*、H-*e4*、H-*e3/e4*、H-*dt1*) の開花後の光周性反応

開花後の光周性反応を、開花後 30 日目の A) 主茎節数の平均値 (±標準偏差) ならびに B) 3cm 以上の大きさに発育した莢の数の平均値 (±標準偏差) で評価した。植物体を、子葉展開後 12 日間、12 時間の短日下で栽培した後、R:FR 比が 1.2 の光源を用いて 20 時間日長にした長日 (実験 1：青のバー) と同じ光源で 16 時間照射した後白熱灯で 4 時間照射した長日 (実験 2：赤のバー) で栽培した。C と D) 茎頂部における *DT1* 遺伝子の発現量を、実験 1 (C) と実験 2 (D) で調査した。発現量は、*β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。図中 R1 は開花日を示す。

表 2-1. 高緯度に位置する様々な地域から導入された 53 の非感光性ダイズにおける 4 つの感光性遺伝子および伸育性遺伝子の遺伝子型

系統	導入地域	遺伝子型				
		E1	*E2*	*E3*	*E4*	*Dt1*
Harosoy-e3e4		*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Harosoy-e3		*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Harosoy-e4		*e1-as*	*e2*	***E3***	*e4-SORE1*	***Dt1***
Harosoy		*e1-as*	*e2*	***E3***	***E4***	***Dt1***
Gokuwase Kamishunbetsu	Hokkaido/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-bb*
Kamaishi 17	Tohoku/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-kam*	*dt1-bb*
Keshuang	North-east China	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	***Dt1***
Miharudaizu	Hokkaido/JPN	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-bb*
Ohfunato 45	Tohoku/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-kam*	*dt1-bb*
Ohyachi 2	Hokkaido/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-bb*
Okuhara 1	Hokkaido/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-bb*
Otome wase	Tohoku/Japan	***E1***	*e2*	*e3-tr*	*e4-oto*	*dt1-bb*
Darta	Poland	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-SORE1*	*dt1-tb*
Dongda 1	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 12	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Heihe 13	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 21	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Heihe 33	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 35	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 40	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 41	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Jiagedaqi 04	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 05	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 08	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 11	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 12	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 14	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Jiagedaqi 16	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	***Dt1***
Jiagedaqi 17	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Jiagedaqi 18	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Jiagedaqi 19	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	***Dt1***
Kiev 242 WH	Ukraine	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-tb*
Nawiko	Poland	*e1-as*	*e2*	*e3-ns*	*e4-SORE1*	*dt1-tb*
Oktyabr-70	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Sadovy	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Vega	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	***Dt1***
Yug 30	Ukraine	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Zeya 2	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	***Dt1***
Heihe 34	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 02	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 20	North-east China	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Dya-1	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	***E4***	***Dt1***
Sonata	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	***E4***	***Dt1***
Yubileinaya	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	***E4***	***Dt1***
Zeika	Far-east Russia	*e1-as*	*e2*	*e3-fs*	***E4***	***Dt1***
Gai	Poland	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	***Dt1***
Karafuto 1	Hokkaido/Japan	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE1*	*dt1-bb*
Dongda 2	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Heihe 28	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 01	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 03	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 09	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 10	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Jiagedaqi 13	North-east China	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	***Dt1***
Sakamotowase	Hokkaido/Japan	*e1-fs*	*e2*	*e3-tr*	***E4***	*dt1-bb*
Kiev 242 BH	Ukraine	*e1-nl*	*e2*	***E3***	*e4-SORE1*	***Dt1***
Ustya	Ukraine	*e1-nl*	*e2*	***E3***	*e4-SORE1*	***Dt1***

表 2-2. ４つの感光性遺伝子 *E1*、*E2*、*E3*、*E4* および伸育性遺伝子 *Dt1* の遺伝子型を推定する DNA マーカー

遺伝子座	対立遺伝子		プライマー配列 (5' - 3')	アニーリング温度（℃）	マーカータイプ	制限酵素	増幅された断片および消化された断片のサイズ (bp)		参照
E1	*e1-fs* /*e1-nl*	F	CACTCAAATTAAGCCCTTTCA	60	CAPS	*Hinf* I	*E1*/*e1-as*	186 + 36	Xia et al.
		R	TTCATCTCCTCTTCATTTTTGTTG				*e1-fs*	136 + 46 + 36	2012
							e1-nl	増幅なし	**+本研究**
	e1-as	F	TCAGATGAAAGGGAGCAGTGTCAAAAGAAGT	50	dCAPS	*Taq* I	*E1*/*e1-fs* /*e1-nl*	444/443	Xia et al.
		R	TCCGATCTCATCACCTTTCC				*e1-as*	413+31	2012
E2	*e2*	F	AAGCCTATGCCAGCTAGGTATTT	58	dCAPS	*Dra* I	*E2*	110	Watanabe et al.
		R	GAAGCCCATCAGAGGCATGTCTTATT				*e2*	27+83	2011
E3	*e3-tr*	F	TGGAGGGTATTGGATGATGC	58	FLP		*E3-Misuzudaizu*	1,339	Harada et al.
		R1	CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG				*E3-Harosoy*	558	2011
		R2	CGGTCAAGAGCCAACATGAG				*e3-tr*	275	
		R3	GTCCTATACAATTCTTTACGACG						
	e3-fs	F	GGGATAGTTCTGATGCTGTTCAA	60	CAPS	*Ale* I	*E3*	552 + 206	**本研究**
		R	CCTTGTATCGATAGCATATGTGCT				*e3-fs*	759	
	e3-ns	F	GTTGAAGAGAAGATCACAACA	53	dCAPS	*Mfe* I	*E3*	163	**本研究**
		R	GATGAACTAATTTCCCTAACTGCA				*e3-ns*	140 + 23	
E4	*e4-oto*	F	CCCAGACACTCTTGTGTGAT	55	CAPS	*Sac* I	*E4*	535	Tsubokura et al.
		R	CCATACTCTCGGTATCTTTG				*e4-oto*	439 + 96	2013
	e4-tsu	F	CACCCTAGGAGTTGTGTTGTT	55	dCAPS	*Eco* RV	*E4*	355	Tsubokura et al.
		R	GCGGTTCTGTACAATTGCCTGATA				*e4-tsu*	332 + 23	2013
	e4-kam	F	CTTAATAAAGCCATGACTGGTTTG	55	CAPS	*Afl* II	*E4*	494	Tsubokura et al.
		R	CTTGAGTTTCAATGAGGTTTCAAC				*e4-Kam*	286 + 208	2013
	e4-kes	F	CTTAATAAAGCCATGACTGGTTTG	55	CAPS	*Bsp* HI	*E4*	494	Tsubokura et al.
		R	CTTGAGTTTCAATGAGGTTTCAAC				*e4-Kes*	399 + 95	2013
	e4-SORE-1	F	AGACGTAGTGCTAGGGCTAT	55	FLP		*E4*	1,229	Liu et al .
		R1	GCATCTCGCATCACCAGATCA				*e4-SORE-1*	837	2008
		R2	GCTCATCCCTTCGAATTCAG						
Dt1	*dt1-ab*	F	CACACCCACCCCACATATAT	56	CAPS	*Hind* III	*Dt1*	808	**本研究**
		R	GGCAAAACCAGCAGCTACTT				*dt1-ab*	593 + 215	
	dt1-tb	F	CACACCCACCCCACATATAT	56	CAPS	*Acc* I	*Dt1*	646 + 92 + 70	**本研究**
		R	GGCAAAACCAGCAGCTACTT				*dt1-tb*	738 + 70	
	dt1-bb	F	GGCTGCTGTCTACTTCAATGTCTAG	52	dCAPS	*Xba* I	*Dt1*	155+21	Liu et al.
		R	GCCACATGTGAAGATCAACTTCCA				*dt1-bb*	176	2010

CAPS; cleaved amplified polymorphic sequence, FLP; fragment length polymorphism

表 2-3. 53 の早生非感光性ダイズ系統の感光性遺伝子型

感光性遺伝子型[1)]	4つ感光性遺伝子座で対立遺伝子の組合せ				系統の数
	E1	*E2*	*E3*	*E4*	
e1 /e3 /e4	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE-1*	2
e1-as /e3 /e4	*e1-as*	*e2*	*e3-ns*	*e4-SORE-1*	1
	e1-as	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE-1*	8
	e1-as	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	4
	e1-as	*e2*	*e3-fs*	*e4-SORE-1*	3
	e1-as	*e2*	*e3-fs*	*e4-kes*	10
E1 /e3 /e4	*E1*	*e2*	*e3-tr*	*e4-SORE-1*	4
	E1	*e2*	*e3-tr*	*e4-oto*	1
	E1	*e2*	*e3-tr*	*e4-kes*	1
	E1	*e2*	*e3-tr*	*e4-kam*	2
e1 /E3 /e4	*e1-nl*	*e2*	*E3*	*e4-SORE-1*	2
e1 /e3 /E4	*e1-nl*	*e2*	*e3-tr*	*E4*	7
	e1-fs	*e2*	*e3-tr*	*E4*	1
e1-as /e3 /E4	*e1-as*	*e2*	*e3-tr*	*E4*	3
	e1-as	*e2*	*e3-fs*	*E4*	4

1) 小文字 (*e1*、*e3* および *e4*) は各々対応する遺伝子座の機能欠損対立遺伝子を表す。

表 2-4. 本研究で用いた qRT-PCR 用プライマー

ターゲット遺伝子		プライマー配列 (5' - 3')
TUB	F	GAGAAGAGTATCCGGATAGG
	R	GAGCTTGAGTGTTCGGAAAC
TFL1b	F	AGGCACAACAGATGCCACAT
	R	GGCAAAACCAGCAGCTACTT
FT2a	F	GGATTGCCAGTTGCTGCTGT
	R	GAGTGTGGGAGATTGCCAAT
FT5a	F	GCCTTACTCCAGCTTATACT
	R	GGCATGCTCTAGCATTGCAA
E1	F	CACTCAAATTAAGCCCTTTCA
	R	TTCATCTCCTCTTCATTTTTGTTG
E1L-C1	F	CACTCAAAGCCCGATCATCA
	R	AAGAATCTTCTCCTTGATGTCT
E1L-G	F	GTGTAAACACTCAAAGTCCTT
	R	CTCCTCTTCATTTTTGTTGCTGC
E1L(C1+G)	F	GTGGAACCAAGATTTCGTGAGA
	R	CTGGCATAGCTCGTTTAAGGA
COL1a	F	CAGATGTTCTCGACAACACT
	R	CGAGATATGATTGACTTGAC
COL1b	F	CATCAAAACACCACTCTGAC
	R	GCGTCAGCCTTGCAGAGGAA
GIa	F	GTTGCAACCCCACTACAGCCT
	R	GAGGCAGAGCCAAAGCCTATG
GIb	F	GTTGCAACCCCGCTACAACCA
	R	TCGAGGCAGAGCCAATGCCA
GIc	F	CACGAAGATCTCATTCTCGCAGCT
	R	CAACCCAAATCCAGCCAAAACCG
FUL-04g	F	AAGAGAGACTCACGGTCAT
	R	AATAGAAGGACGTAGCACCC
FUL-05g	F	CTAATGAAGAAACTCCAACCTCA
	R	GGTATAGTCACCGTCAAATGCCT
FUL-06g	F	CCCACAACAACACTAGCTCTCA
	R	AGTAGTAGCACCCTTCAATT
FUL-08g	F	GAGACATTCCAAGGAAGAGCATT
	R	GAGCAGTTATTAAGCTCGATCG
FUL-17g	F	GTAATGAAGAAACTCCAACGTCGA
	R	GCAGTCAGAAACGTCACACA
FUL-18g	F	CAATGCAAGGAGGAACACCA
	R	GAGCAGTTATTAAGCTCGGCAT

第３章　ハロソイおよびトヨムスメの感光性と遺伝子発現の概日リズムから見た分子機構の特徴

前章では、様々な地域に由来する非感光性ダイズ品種・系統について感光性遺伝子座 (*E1~E4*) の遺伝子型を推定し、開花に関する非感光性の遺伝的多様性や、登熟や主茎の生長など開花後の栄養および生殖生長の光周性反応の多様性を明らかにした。一方で、感光性品種の中にも、様々な開花遺伝子の発現様式の異なる品種が見いだされ、ダイズにおける感光性分子機構の多様さが示唆されている。本章では、早生品種であるハロソイとトヨムスメならびにハロソイの非感光性 NIL を用いて開花遺伝子の発現様式を比較して、開花遺伝子の発現に及ぼす PHYA の作用と、ハロソイとトヨムスメの開花制御機構の違いを特徴づける。特に、開花誘導に関わる *FT* のみならず、その下流で機能する *FRUITFUL* (*FUL*) のダイズオーソログについても発現解析を行った。*FUL* の発現は、*SUPRESSOR OF CONSTANS1* (*SOC1*) によって制御されるが、*SOC1* は *FT* と *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) のタンパク質複合体によって正に誘導されるほか、温度や齢、GA など光周期経路とは異なる経路の遺伝的制御下にある (Wang et al. 2009; Yamaguchi et al. 2009; Wellmer and Riechmann 2010; Jung et al. 2012)。特に、コムギやトウモロコシではそのホモログである *AP1*/*FUL* 様遺伝子が開花誘導に直接関与している (Danyluk et al. 2003; Trevaskis et al. 2003; Yan et al. 2003; Danilevskaya et al. 2008; Fornara et al. 2004)。本章では、*FT* に加えて *FUL* の発現解析から、ハロソイとトヨムスメの開花制御に関わる分子機構の特徴を明らかにする。

1 材料および方法

1-1 供試材料

実験には、ハロソイ、ハロソイの *e3* および *e4* に関するNIL (H-e*3*/*e4*) およびトヨムスメを供試した。ハロソイとトヨムスメは *E3* および *E4* 座に優性遺伝子を有する。また、トヨムスメは *E1* 領域が欠失した *e1-nl*/*e1-nl* 型である。

1-2 日長処理実験と発現解析

上記3品種系統を、第2章で示した耕種法に従い2011年および2012年に人為長日圃場と隣接する自然日長圃場で栽培して開花日を調査した。また、日長反応性の特徴を明らかにするために、ハロソイとトヨムスメを25℃に設定した人工気象室で、明期を12時間、14時間、16時間ならびに18時間とした異なる日長条件で栽培して開花日を調査した。人工気象室の光源は、蛍光灯を主光源、白熱灯を補光源として、赤色光：遠赤色光の比 (R:FR比) は1.2である。短日 (明期12時間) で栽培されたハロソイとトヨムスメ、ならびに長日 (明期18時間) で栽培されたハロソイ、トヨムスメおよび H-*e3/e4* について開花遺伝子発現の概日リズムを解析した。発現解析には、子葉展開後20日齢個体の茎頂から数えて第二本葉の小葉を用いた。サンプリングは光点灯から3時間毎に9回 (24時間) 行い、サンプリングごとに4個体の小葉をバルクして RNA 抽出に用いた。さらに、*E1* および *E1L* の発現の経時的変化を詳細に特徴づけるために、長日で栽培されたハロソイおよびトヨムスメについて、光点灯から5時間までの時間帯と、明期から暗期へ移行する５時間の時間帯 (光点灯後15時から20時) に、子葉展開後20日齢の4個体から１時間毎に小葉をバルクしてサンプリグした。RNA の抽出、cDNA 合成ならびに qRT-PCR 解析は第2章の方法に従った。発現量のコントロールには *β-tubulin*(Glyma08g01740) を用い、遺伝子発現解析に用いたプライマー情報を表2-4に示す。

2 結果および考察

2-1 ハロソイとトヨムスメの光周性反応

ハロソイとトヨムスメは、ともに *E3* および *E4* 座に優性遺伝子を有するが、*E1* 座の遺伝子型で異なり、ハロソイは機能低下型の対立遺伝子 *e1-as* を、トヨムスメは遺伝子を欠失した *e1-nl* を有する。両品種は、R:FR 比が1.2の人工気象室の下では、16時間日長までは日長の変化に対して同様の反応を示した。子葉展開後の開花まで日数は、ハロソイでは、12時間日長で平均22日、14時間日長で平均23日、16時間日長で平均30日であり、トヨムスメでは、12時間日長で平均24日、14時間日長で平均26日、16時間日長で平均33日であった。18時間日長ではトヨムスメで平均40日と、ハロソイ (55日) に比べて開花が早かった。一方、R:FR 比が0.7の白熱灯で補光した人為長日圃場では、ハロソイでは補光終了時期 (8月上旬) まで花芽を形成しなかったが、トヨムスメでは7月下旬 (7/24-7/26) に開花した。定植から

の開花まで日数は、2011年で平均53日、2012年で平均51日であり、これらは、隣接した自然日長区の平均開花日 (2011年で52日、2012年で48日) とほぼ同じであった。したがって、トヨムスメでは、R:FR 比の比較的高い条件下ではハロソイと同様に日長の長さに応じて開花が遅延するが、R:FR 比の低い長日下では開花が抑制されなかった。*E1* は、*E3* および *E4* 座の二重劣性ホモ型 (*e3/e4*) の下では、R 光の豊富な長日に対しては光周性を示さないが、FR 光の豊富な長日に対しては光周性反応を示す (Cober et al. 1996b) 。本実験の結果からも、FR 光に対する光周性反応は主に *E1* が関与することが示唆された。

2-2 ハロソイとトヨムスメにおける開花関連遺伝子発現プロフィル

遺伝子発現の概日リズムを短日 (12時間日長) と長日 (18時間日長) で解析した。解析した遺伝子は、*E1* とそのパラログである *E1L* (Glyma04g24640およびGlyma18g22670) および *FT* の2個のオーソログ (*FT2a* および *FT5a*) に加えて、Watanabe et al. (2012) がシロイヌナズナの開花遺伝子のアミノ酸配列を基にダイズゲノムシークエンスデーターベースから抽出した *CONSTANS* (*CO*) の2個のオーソログ (*GmCOL1a*; Glyma18g51320 および *GmCOL1b*; Glyma08g28370)、*GIGANTIA* (*GI*) の3個のオーソログ (*GmGIa* [*E2*]; Glyma10g36600、*GmGIb*; Glyma20g30980、*GmG1c*; Glyma09g07240) ならびに *FRUITFUL* (*FUL*) の6個のオーソログ (*FUL-04g*; Glyma04g31847、*FUL-05g*; Glyma05g07380、*FUL-06g*; Glyma06g22650、*FUL-08g*; Glyma08g27680、*FUL-17g*; Glyma17g08890、*FUL-18g*; Glyma18g50910) (Watanabe et al. 2012) である。本研究では、*E1* の2つのパラログを、その所属連鎖群に基づいて *E1L-C1* および *E1L-G* と呼ぶ。

E1 および *E1L* の発現様式 (図3-1A) ：ハロソイにおける *E1* の発現は短日では観察されず、長日では点灯後3時間目と明期から暗期への移行時 (18時間目) にピークを示した。この特徴的な発現様式は Xia et al. (2012) の観察結果とも一致する。また、PHYA 欠損型の H-*e3/e4* では、長日下においても *E1* の発現は誘導されなかった。ハロソイとトヨムスメの *E1L-C1* と *E1L-G* の発現様式は、ハロソイの *E1* と酷似し、短日では発現が誘導されず、長日では点灯後3時間目と明暗移行時に発現ピークを示した。また、*E1L-C1* と *E1L-G* の発現量は *β-tubulin* に対する相対値を参考にした場合、ハロソイに比べてトヨムスメで高

かった。

E1 および *E1L* の発現様式をさらに特徴づけるために、長日下における発現様式を光点灯から5時間までの時間帯と、明期から暗期へ移行する5時間の時間帯について1時間毎に解析した (図3-1B)。トヨムスメでは、先の実験結果と同じ時間に発現ピークが現れた。一方、ハロソイでは、*E1* および *E1L* ともに、両ピークともに一時間早い光点灯後2時間目と17時間目に発現ピークが現れた。特に第一の発現ピークの場合、ピーク時から一時間ずれることにより発現のレベルは大きく低下した。したがって、*E1* および *E1L* の発現解析を行う場合、解析時間について十分注意を払う必要がある。

FT の発現様式 (図3-2) : *FT2a* は、ハロソイおよびトヨムスメともに長日では発現が認められなかった。一方、短日では、両品種ともに発現が誘導されたが、トヨムスメの発現はハロソイに比べて非常に低く、その最大発現量はハロソイの約1/10に過ぎなかった。ハロソイの長日下における *FT* の発現抑制には *e1-as* が関与していると考えられるが (Xia et al. 2012)、トヨムスメの場合、*E1* が欠失しているにもかかわらず、*FT2a* の発現が短日でも低く抑えられおり、*E1* 以外の要因がトヨムスメにおける *FT2a* 発現に関与していると思われる。一方、*FT5a* については、発現の概日リズムがハロソイとトヨムスメで異なった。短日では、ハロソイの場合、Kong et al. (2010) が報告したように、光点灯後3時間目に発現のピークが生じたが、トヨムスメの場合は、暗期の終わり (光点灯後21時間目) に発現のピークが現れた。一方、長日では、ハロソイでは発現が認められず、トヨムスメでは、光点灯後6時間目に小さな発現のピークが観察された。H-*e3/e4* の場合、長日における *FT2a* および *FT5a* の発現量は、短日におけるハロソイの発現量と大差なく、長日によるハロソイの *FT* の発現抑制に関与する光受容体は主に *E3* および *E4* の支配下にある PHYA であることが強く示唆された。

CO の発現様式 (図3-2) : *COL1a* と *COL1b* の間で発現の概日リズムが異なった。*COL1a* の発現は、他の植物種で観察されるように、両品種ともに暗期で増加し明期で減少したが、その発現量はハロソイに比べてトヨムスメで非常に高かった。また、両品種ともに日長処理間に明確な差異は認められなかった。H-*e3/e4* の場合、概日リズムがハロソイとやや異な

り、光点灯3時間目に発現ピークが生じたが、発現レベルそのものはハロソイと異ならなかった。*COL1b* の発現は、両品種ともに長日では抑制され、短日では暗期の終わりに増加したが、その程度はハロソイに比べてトヨムスメで高かった (図3-2) 。また、H-*e3/e4* の *COL1b* の発現は、ハロソイ同様に長日でも抑制されていた。

GI の発現様式 (図3-2) ：いずれのパラログともに、短日では光点灯後9時あるいは12時、長日では光点灯後12時あるいは15時と、明期の終わりに発現のピークが生じ、他の植物種で観察される *GI* に典型的な概日リズムを示した。また、いずれの日長においてもトヨムスメの発現量がハロソイや H-*e3/e4* の発現量より高く、また、短日に比べて長日で発現量が低下した。

FUL の発現様式 (図3-3) ：*FUL-18g* を除く全てのパラログにおいて、短日および長日条件ともに明期の終わりに発現ピークが現われた。特に、トヨムスメの場合、短日では、暗期にも発現のピークが観察された。一方、*FUL-18g* では、朝方に発現のピークが生じた。発現量を短日と長日で比較すると、トヨムスメでは、*FUL-04g*、*FUL-06g*、*FUL-08g* および *FUL-18g* の発現が短日で上昇したが、*FUL-05g* と *FUL-17g* の発現量は日長に影響されなかった。一方、ハロソイでは、全てのパラログの発現が短日で誘導された。PHYA 欠損型である H-*e3/e4* では、いずれのパラログにおいても発現が認められ、発現ピークが明期から暗期への移行期 (点灯後18時) であった点を除き、発現量そのものは短日でのハロソイの発現量と変わらなかった。したがって、*FUL* の発現にも PHYA が関与していた。しかし、トヨムスメにおいては *FUL-05g* と *FUL-17g* の発現量が日長処理間で異ならなかった。トヨムスメも、ハロソイ同様に正常な *E3* および *E4* を持つことから、トヨムスメでは他の要因がこれらのパラログの光周性反応を抑制していると思われる。

これらの結果を要約すると、ハロソイとトヨムスメは、R 光に対する光周性反応は互いに類似しているにもかかわらず、開花に関わる様々な遺伝子の発現様式が異なり、開花制御に関わる分子機構が両者の間で異なることが明らかとなった。両者の交雑後代では、開花の早晩性について超越分離が観察されており (竹島ら未発表データ)、制御機構の違い

を反映した結果と理解される。発現様式の解析から、両者の開花に関する分子機構を以下のように特徴づけることができる。

ハロソイ：従来の研究 (Kong et al. 2010; Xia et al. 2012) において明らかにされてきたように、ハロソイでは、短日では *E1* の発現が抑制され、その結果 *FT2a* と *FT5a* の発現が上昇し開花が誘導されるが、長日では *E1* の発現がPHYAの下で誘導され、*FT2a* と *FT5a* の発現を抑制する。したがって、ハロソイの開花の光周性反応は PHYA-E1-FT の経路に強く依存しているといえる。

トヨムスメ：*FT2a* の発現が短日においても非常に低く、*FT2a* は開花誘導に十分な役割を果たさないか、あるいは、たとえあったとしても、非常に小さな役割しか果たしていないと思われる。一方で *COL1a* が高発現しており、イネ (Shimamoto and Yokoi 2005; Yamamoto et al. 1998; Izawa et al. 2002; Lee et al. 2010) で報告されているよう、ダイズにおいても *COL* が *FT* の発現抑制に関与している可能性がある。今後、*COL1a* の発現を制御する要因の解析、ならびに *COL1a* の *FT2a* 発現に及ぼす効果の解析が必要である。しかし、圃場条件の自然日長下ではトヨムスメとハロソイの開花日はほぼ同じであり、トヨムスメの開花誘導には、*FT* とは独立した要因が関与していると考えざるを得ない。その要因としては、本章で解析した *FUL* 遺伝子が候補に挙げられよう。今後、*FUL* の機能解析が必要である。

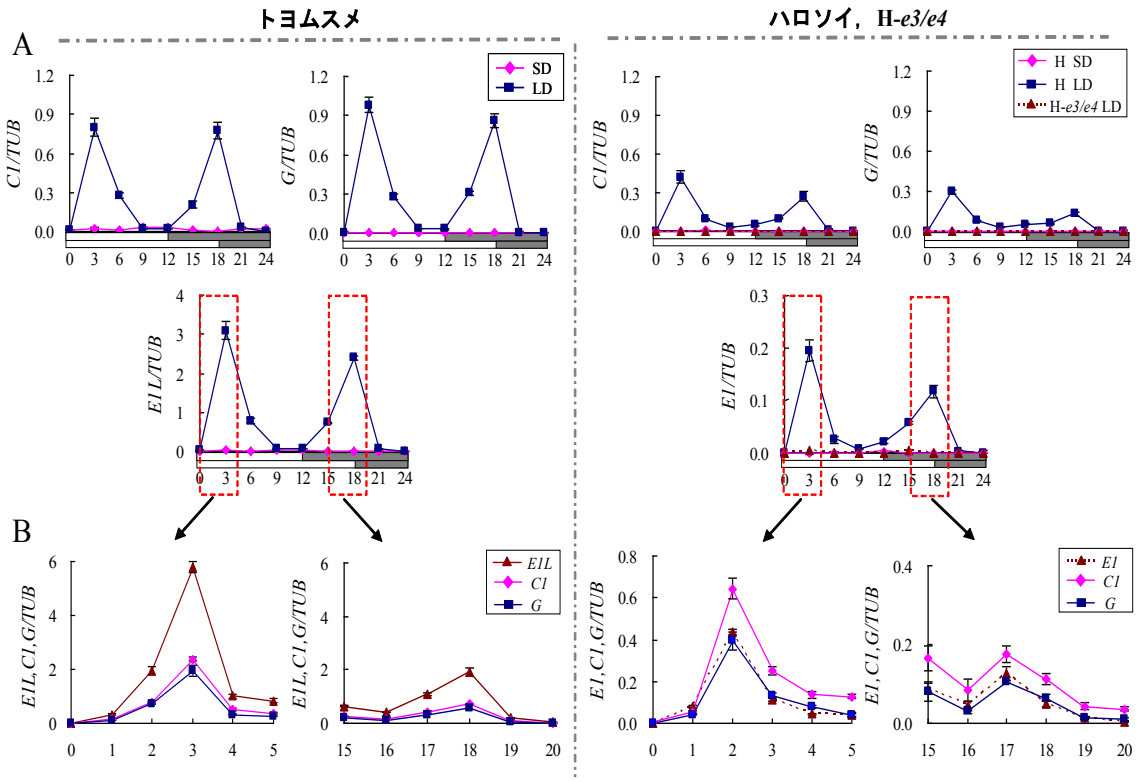

図 3-1. ハロソイ (H) とトヨムスメにおける *E1* および *E1L* 遺伝子の発現の概日リズム。両品種の短日および長日と H-*e3/e4* の長日における発現様式を qRT-PCR 法により解析した。

A) 12 時間日長の短日 (SD) と 18 時間日長の長日 (LD) における *E1* および *E1L* 遺伝子の発現様式を、遺伝子毎の発現量 (*E1L-C1* および *E1L-G*) ならびに両者を込にした発現量 (*E1L*) で示した。B) 長日における *E1* および *E1L* 遺伝子の発現様式を、明期開始からの 5 時間と明期から暗期 へ移行する 5 時間 (光点灯後 15 時から 20 時まで) について一時間毎に解析した。発現量は *β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*C1* および *G* は, それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。*E1L* は *E1L-C1*＋*E1L-G* を示す。

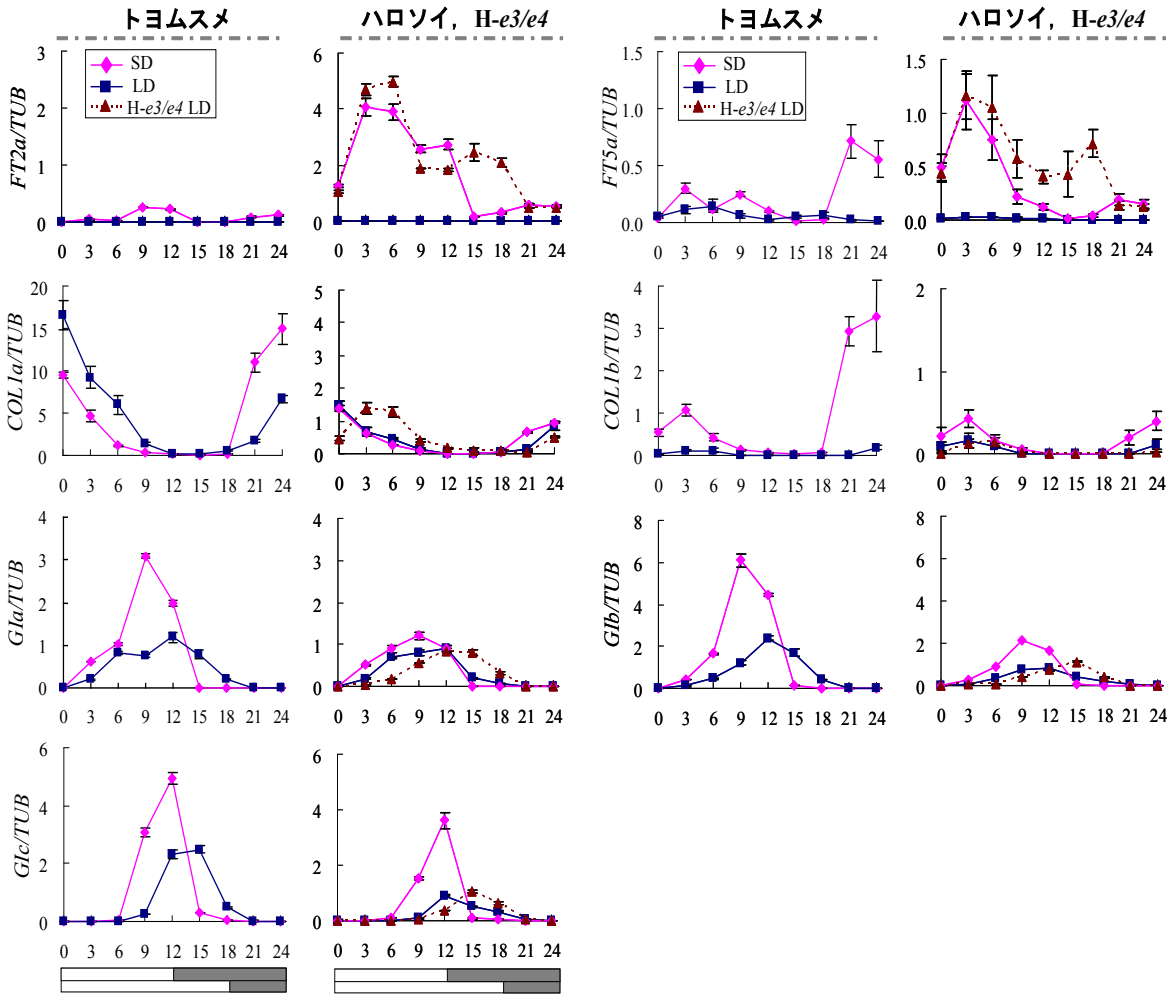

図 3-2. ハロソイ (H) とトヨムスメにおける開花遺伝子の発現の概日リズム。両品種の短日および長日と H-*e3/e4* の長日における発現様式を qRT-PCR 法により解析した。

解析した遺伝子は、アラビドプシスの *FT*、*GI* ならびに *CO* に関するダイズオーソログ—*FT2a*、*FT5a*、*COL1a*、*COL1b*、*GIa* (*E2*)、*GIb*、*GIc* —である。各遺伝子の発現量を *β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。

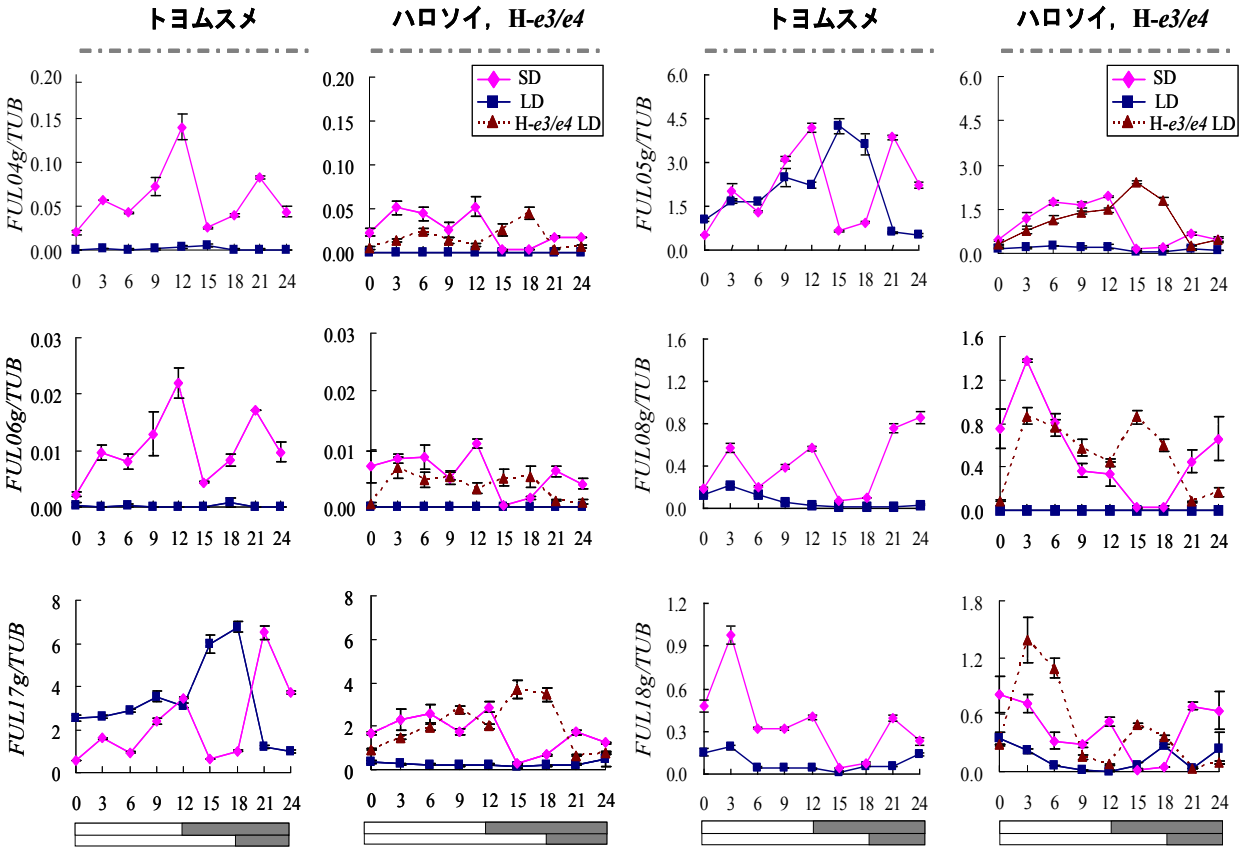

図 3-3. ハロソイ (H) とトヨムスメにおける *FUL* 遺伝子オーソログの発現の概日リズム。両品種の短日 (SD) および長日 (LD) と H-*e3/e4* の長日における発現様式を qRT-PCR 法により解析した。

発現量は *β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。

第 4 章　VIGS を用いた *E1L* 遺伝子の機能解析

E1 は、これまでに報告されてきた感光性遺伝子 (*E1*～*E8*) の中でも開花に最も大きな影響を持ち (Watanabe et al. 2012) 、長日下でダイズの *FT* オーソログである *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制する (Xia et al. 2012)。ダイズゲノムには、*E1* と94%のアミノ酸相同性を示す2つのパラログ *E1L-C1* (Glyma04g24640) および *E1L-G* (Glyma18g22670) が存在する。*E1* の作用性から、*E1* との相同性が高いこれらパラログも開花に対して何らかの効果を有すると予想されるが、その効果については未だ解析されていない。Xia et al. (2012) は、各種の遺伝子予測プログラム (GenScan、GeneMark、FGENESH および RiceGAAS) を用いて、*E1* およびこれらパラログのアミノ酸 (AA) 配列長を174および173アミノ酸と推定したが、ダイズゲノムデータベース—Phytozome Glyma 1.1—では、それらとは異なる長さのアミノ酸配列が予測されている (図4-1) 。データベースでは、これらのパラログの開始コドンが、Xia et al. (2012) が予測した開始コドンより57塩基上流に予測され、その結果、19アミノ酸だけ長い192アミノ酸のタンパク質が予測されている。本研究では、*E1* の推定アミノ酸配列についてはXia et al. (2012) を、一方 *E1L* のアミノ酸配列は Glyma 1.1 に従って解析を進める。両 *E1L* と *E1* とのアミノ酸の相同性は91%であったが、*E1L* 間の相同性は96%であり、*E1L-C1* および *E1L-G* は *E1* に比べて互いに類似性が高い。

本章では、*E1L* の機能を解析するために、*E1* が欠失した北海道品種「トヨムスメ」を用い、リンゴ小球形潜在ウイルスをベクターとした Virus-induced Gene Silencing (VIGS) により *E1L* の発現を人為的にノックダウンさせたトヨムスメ個体を作出して、*E1L* の開花ならびに開花関連遺伝子の発現に及ぼす作用を解析した。ALSV は、近年マメ科を含む幅広い植物種で効果的なベクターとして VIGS 実験等に利用されている (Igarashi et al. 2009)。さらに、ダイズでは、ALSV が種子を経て後代に伝達される (Yamagishi and Yoshikawa 2009)。本研究ではこの種子伝染性の特性を利用して、ALSV 感染次代の材料を用いることにより、ウイルス感染そのものが植物個体の生育に及ぼす効果を排除して *E1L* の VIGS が開花に及ぼす効果を解析した。

1 材料および方法

1-1 供試材料

実験に用いたトヨムスメは、*E1*～*E4* 座に関して *e1-nl/e2/E3/E4* の遺伝子型をもつ。*E3* および *E4* 座に優性遺伝子を有することから、トヨムスメは感光性を示すと予想される。

1-2 E1L-ALSV ベクターの構築

E1L-C1 のコード領域 (579塩基対) の翻訳開始点のアデニンから220塩基から426塩基にわたる207塩基対を VIGS に用いた。ハロソイのゲノム DNA からクローニング用の制限サイトを付与したプライマー対 (5'-TACATCTCGAGCCTTGGAAGATCAAGAAGACG-3' および5'-TACATGGATCCAGACCATCGCTTTAGAACGAG-3') を用いた PCR により目的領域を増幅した。増幅断片を制限酵素で消化した後、目的断片を ALSV RNA2 の感染性 cDNA クローンである pEALSP2L5R5 の外来遺伝子導入サイトに挿入した (図4-2)。このクローンを ALSV RNA1 の感染性 cDNA クローンである pEALSR1 とともに増殖宿主のキノアに接種してウイルス化し、E1L-ALSV を得た。なお、E1L-ALSV ベクターの構築とダイズへの感染は岩手大学の吉川信幸博士ならびに山岸紀子博士の協力を得た。

1-3 ウイルス接種とウイルス感染の検定

VIGS 実験は、日長を明期18時間 (25℃) 、暗期6時間 (20℃) に設定した人工気象室で行った。発根直後の子葉に *E1L* を含まない wt-ALSV と *E1L* を含む E1L-ALSV を接種した。ダイズの場合、感染初期の退緑斑の有無により感染を確認することができるが、ウイルスからインサート部分 (*E1L-C1*配列) が脱落する可能性があるため、RT-PCR によりインサートの有無を確認した。感染個体の初生葉から全 RNA を抽出し、oligodT(20) で逆転写を行い、プライマー対 (5'-CCCAAATCTGCTAGAAGGTC-3' および 5'-GCAAGGTGGTCGTGA-3') を用いて RT-PCR を行った。E1L-ALSV の感染個体から登熟種子を収穫した。VIGS 実験には、E1L-ALSV 感染個体より得られた種子を用いた。親個体別に7粒から10粒を播種し、幼苗の初生葉から RNA を抽出して、上述の方法に従い E1L-ALSV の有無を確認した。E1L-ALSV を有した個体を感染個体、欠落していた個体を非感染個体として開花ならびに遺伝子発現の解析に供した。

1-4 低分子 RNA の抽出と siRNA の検出

低分子 RNA の抽出は、子葉展開後22日齢個体の光点灯後2時間目の若い本葉を用いた。採取した葉は解析まで-80℃で保存した。低分子 RNA の抽出および siRNA の検出は Goto et al. (2003) の方法を一部分改変して行った。約0.8 g のサンプル葉を液体窒素の下で粉砕し、10倍量の LMW RNA 抽出緩衝液 (付表1：1 ml あたり16 µl の1 M DTT を含む) を加えて磨砕した。サンプル量の10倍のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) 溶液を含む15 ml チューブに磨砕液を移し、ボルテックスで激しく撹拌した後、8,000 rpm で10分遠心分離 (4℃) した。得られた水層を新たな15 ml チューブに移して、再度、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて同条件で遠心分離し、得られた水層を1/3量の8 M 塩化リチウム溶液を含む15 ml チューブに加えて氷中で一晩静置した。一晩静置したサンプル溶液を9,500 rpm で15分遠心分離 (4℃) し、その上清を1.5 ml チューブに移し、1/10量の3 M 酢酸ナトリウムおよび2.5倍量のエタノールを加えて転倒混和して-20℃にて１時間静置した。14,000 rpm で20分遠心分離 (4℃) して上清を除去し、70%エタノールでリンスした後、沈殿を乾燥させた。乾燥した沈殿物を200 µl の滅菌水に完全に溶解し、等量の20% PEG 溶液 (付表1) を加えてボルテックスで撹拌した後、氷上で１時間静置した。12,000 rpm で10分間遠心分離(4℃)して上清を1.5 ml チューブに移し、1/10量の3 M 酢酸ナトリウムおよび2.5倍量のエタノールを加えて転倒混和した後、-20℃にて１時間静置した。14,000 rpm で15分遠心分離 (4℃) して上清を除去した後、70%エタノールにてリンスした。上清をマイクロピペットで吸い取り、沈殿物を30 µl のホルムアミドに溶解し、低分子 RNA のサンプルとした。得られた溶液1 µl を NANODROP 2000c Spectrometer (Thermo SCIENTIFIC) を用いて OD を測定し、低分子 RNA の濃度を求めた。

30 µg の低分子 RNA を、65℃にて5分間静置した後氷上で5分間静置し、3分の1量の4×サンプルバッファー (付表1) を加えて電気泳動した。電気泳動は50 V で5分間行った後、200Vにて4時間行った。泳動後、20×SSC 溶液 (付表1) を用いて、低分子 RNA をHybond-N^+ナイロンメンブレンフィルター (GEヘルスケア) に16時間転写した。転写した低分子 RNA を UV クロスリンカーを用いて150 mJ/cm^2 のエネルギー線量でメンブレンに固定した。

siRNA の検出用プローブは、トヨムスメの cDNA を鋳型として *E1L-C1* 領域 (642 bp) を増幅し、さらにそれを鋳型として、プライマー対

（5'-CCTTGGAAGATCAAGAAGAC-3' と5'-AGACCATCGCTTTAGAACGA-3') を用いた PCR により ALSV に挿入した207塩基対の領域を増幅した。アガロースゲルから増幅断片を切り出し精製した後、pGEM-T-easy ベクター (Promega) にライゲーションさせ、大腸菌 (JM109) へ形質転換した。コロニー PCR により選抜したシングルコロニーを100 mg/l のアンピシリンを添加した3 mlの LB 液体培地で14時間振盪培養 (170 rpm、37℃) し、Wizard(R) *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドを抽出した。シークエンス解析により、抽出したプラスミドの配列を確認した。制限酵素 *SpeI* (TaKaRa) を用いて、プラスミドを直線化し、センス鎖の RNA を得た。その後、DIG RNA Labeling Kit (Roche) で siRNA 検出プローブを作成した。

メンブレンは、40℃で1時間ハイブリダイゼーションバッファー (付表1) 15 ml に入れてプレハイブリダイゼーションを行い、5分間煮沸した後に氷中で急冷した4.5 µg のプローブ (50 µl の滅菌水) を1 ml のハイブリダイゼーションバッファーを加えて、プレハイブリダイゼーションバッファーに混合し、40℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。終了後、メンブレンを洗浄し、ブロッキング溶液 (付表1) で1時間 (室温) 振盪し、1 µl の抗 Dig 抗体を含む新たなブロッキング溶液 (0.3% Tween20 を含む) で30分間 (室温) メンブレンと反応させた。マレイン酸バッファー (付表1) ならびに AP バッファー (付表1) で洗浄した後、12 µl の CDP star (Roche) を含む12 ml の AP バッファーをメンブレンに滴下し、ハイブリバックに密閉して X 線フィルム Hyperfilm™MP (Amersham) に20時間露光させた。その後、レンドールおよびレンフィックス (ともにFUJIFILM) を用いて現像ならびに定着処理を行った。

1-5 qRT-PCR 法による遺伝子の発現解析

E1L-ALSV に感染した 3 個体の種子から発芽定着した E1L-ALSV 伝達個体 (以下、E1L-ALSV 感染個体と呼ぶ) および非伝達個体 (前者の対照) について、子葉展開後 16 日、22 日および 28 日齢に、若い本葉を光点灯後 2 時間目と 4 時間目にバルクでサンプリングし、発現解析に供試した。採取した葉は解析まで-80℃で保存した。予備試験の結果、生育の進んだ葉では E1L-ALSV 感染個体と非感染個体の間に *E1L* 発現量の差が認められなかったことから、本研究では展開したばかりの若い葉を解析に用いた。RNA の抽出、cDNA

合成ならびに qRT-PCR 解析は第 2 章の方法に従った。発現量のコントロールには *β-tubulin*(Glyma08g01740) を用い、遺伝子発現解析に用いたプライマー情報を表 2-4 に示す。

2 結果および考察

2-1 E1L-ALSV ベクターのトヨムスメへの感染と開花に及ぼす効果

E1L の機能を明らかにするために、本研究では *E1* を欠失しているトヨムスメを用い、ALSV を利用した *E1L* の VIGS を試みた。*E1L-C1* と *E1L-G* は、アミノ酸配列の相同性が高く、そのため個々の遺伝子を特異的にノックダウンするのは困難と考え、本研究では両者の間で相同性の高い領域 (図4-3) に着目して両遺伝子を同時にノックダウンすることにより *E1L* の機能を総合的に評価しようと試みた。VIGS に用いた領域 (塩基番号 220~426番) には、両遺伝子間に１塩基の差異が存在したが (図4-3) 、後述するように、ALSV ベクターに *E1L-C1* 由来の配列を挿入したにもかかわらず、*E1L-G* の発現も同様に低下しており、作出した E1L-ALSV は両遺伝子を同時にノックダウンする上で効果的であった。

発芽したトヨムスメの子葉に ALSV を接種し、接種個体 (wt-ALSV 2個体と E1L-ALSV 5個体) ならびに非感染個体 (3個体) を18時間日長 (明期25℃/暗期20℃) で栽培した。RT-PCR によるウイルス感染検定を行ったところ、いずれも期待されるサイズの増幅断片が得られ、E1L-ALSV 感染個体において *E1L* 断片の脱落は観察されなかった (図4-4) 。E1L-ALSV 感染個体は出芽後40日~44日から開花が始まったが、非感染個体および wt-ALSV 感染個体では、同じ時期には花芽は観察されず、開花は出芽後49日~51日に始まった (図4-4)。

ALSV の種子伝染性 (Yamagishi and Yoshikawa 2009) を利用して、本研究では、E1L-ALSV 感染個体の中から開花が比較的に早かった3個体 (#1、#3、#5) を選び、それらの個体で収穫された種子を用いて、開花に及ぼす *E1L* の VIGS の効果を解析した。3個体から得られた種子をそれぞれ７粒または10粒発芽させ、初生葉から RNA を抽出して RT-PCR により E1L-ALSV の存在を確認した。その結果、各親個体に由来する3ないし4個体で E1L-ALSV の伝達が認められた (図4-5A)。これら E1L-ALSV が伝達された E1L-ALSV 感染個体と伝達されなかった非感染個体について、開花日 (子葉展開後から最

初の花が咲くまでに要した日数) および最初の花が咲いた時の主茎節数を調査し、また登熟に至る生育の様子を観察した。

E1L-ALSV 感染個体の開花日は、由来した親に関わりなく平均で29日から33日であった。一方、非感染個体の開花日は、親個体に関わりなく平均44日から46日であり、E1L-ALSV 感染個体では、非感染個体に比べて開花が12日から15日早まった (図4-6 A および C)。開花時期の節数も E1L-ALSV 感染個体では平均8から9節であったのに対し、非感染個体の節数は平均13から14節であった (図4-6 B)。播種後100日目、E1L-ALSV 感染個体は、すでに落葉し、莢および茎ともに褐変したが、非感染個体では葉や茎は緑色を呈し、莢も未熟であった (図4-6D) 。したがって、*E1L* は、*E1* 同様にダイズの開花早晩性を制御することが明らかになった。

2-2 E1L-ALSV ベクターを用いた *E1L* のサイレンシング

E1L-ALSV の感染により *E1L* の VIGS が実際に生じているか否かを確認するために、VIGS の過程で生じる siRNA の発生を解析した。E1L-ALSV 感染個体および非感染個体からそれぞれ10個体について、また wt-ALSV 感染個体からは5個体について、子葉展開後20齢の個体から若い葉をバルク採取し、低分子 RNA を抽出してノーザンブロット解析を行った。その結果、E1L-ALSV 感染個体においてのみ siRNA 分子に相当する領域に強いシグナルが検出された。一方、非感染個体および wt-ALSV 感染個体ではシグナルは検出できなかった (図4-5B)。

E1L が VIGS によってどの程度ノックダウンされたかを確認するために、E1L-ALSV 感染個体と非感染個体から、子葉展開後16日、22日および28日目に若い本葉を光点灯後2時間目または4時間目にバルク採取し、*E1L* の発現量を解析した。qRT-PCR の結果、いずれの生育ステージにおいても、*E1L-C1* および *E1L-G*、ならびに両者を込にした *E1L* の発現は、非感染個体に比べて E1L-ALSV 感染個体で低下し、両者の差異は統計的に有意であった (図4-7 A、B、C)。

2-3 トヨムスメの開花を促進するメカニズムの解析

ALSV の利用により、*E1L* の VIGS が有効に機能していることが明らかとなった。特に、

開花日に及ぼす効果が顕著であったことから、*E1L* も、*E1* 同様にダイズの開花について抑制的に作用していると考えられる。そこで、*E1L* も、*E1* 同様に *FT2a* および *FT5a* の発現を制御しているか否かを明らかにするために、E1L-ALSV 感染および非感染個体の *FT2a* および *FT5a* の発現量を比較した。16日齢と22日齢の光点灯後2時間目の *FT2a* の発現量は、非感染個体に比べて E1L-ALSV 感染個体で1.5倍ならびに2.5倍ほど増加した (図4-7D)。しかし、22日齢と28日齢の光点灯後4時間目の *FT2a* 発現量は、逆に E1L-ALSV 感染個体に比べて非感染個体で高かった。一方、*FT5a* の発現は、E1L-ALSV 感染個体ではほとんど認められなかったが、非感染個体では22日齢と28日齢の光点灯4時間目に発現が認められた (図4-7 E)。これらの結果を要約すると、*FT2a* の発現には VIGS による一定した傾向が認められず、また、前章で示した様に、発現そのものが著しく低く、さらに *FT5a* の発現は E1L-ALSV 感染個体に比べて非感染個体で高かった。したがって、*E1L* の発現は、必ずしも *FT2a* や *FT5a* の発現とは密接に対応しておらず、*E1L* の開花を抑制する効果は、*FT* とは異なる別の遺伝子の制御によってもたらされている可能性がある。

最近、イネ、トウモロコシやコムギでは、MAD ボックス遺伝子である *AP1/FUL* ホモログが開花の制御に関与していることが報告されている (Danyluk et al. 2003; Trevaskis et al. 2003; Yan et al. 2003; Fornara et al. 2004; Danilevskaya et al. 2008; Komiya et al. 2009)。MADS ボックスタンパク質とは DNA 結合と蛋白質間相互作用に関与する MADS ボックスと呼ばれるドメインを持つ転写調節因子であり (Schwarz-Sommer et al. 1990; Shore et al. 1995) 、多くの MADS ボックスタンパク質が花の形態形成に関わっている (Ng and Yanofsky 2001; Riechmann and Meyerowitz 1997; Theißen 2001)。ダイズゲノムには6コピーの *FUL* オーソログが存在する (Watanabe et al. 2012) 。そこで、これら *FUL* の発現様式を E1L-ALSV 感染個体ならびに非感染個体で比較した。解析した *FUL* は、*FUL-04g* (Glyma04g31847)、*FUL-05g* (Glyma05g07380)、*FUL-06g* (Glyma06g22650)、*FUL-08g* (Glyma08g27680)、*FUL-17g* (Glyma17g08890) および *FUL-18g* (Glyma18g50910) である。発現解析の結果 (図4-8)、*FUL-18g* を除く全ての *FUL* で、非感染個体に比べて E1L-ALSV 感染個体で発現量が有意に増加した。*FUL-18g* では、E1L-ALSV 感染と非感染個体間に発現量の明確な差異は認められなかった。*FUL-04g* および *FUL-06g* の発現量は他に比べて低かったが、*E1L* のノックダウンによる開花促進効果は、*FUL* の発現誘導を介して生じた可能性がある。

第3章で示したように、トヨムスメにおいて、6遺伝子のうち *FUL-04g*、*FUL-06g*、*FUL-08g* および *FUL-18g* の発現が長日では著しく低く、短日によって誘導された。*E1L* の VIGS 実験では、*FUL-18g* の発現に効果が認められなかったことから、*FUL-04g*、*FUL-06g* および *FUL-08g* が *E1L* の制御下にあると考えられる。

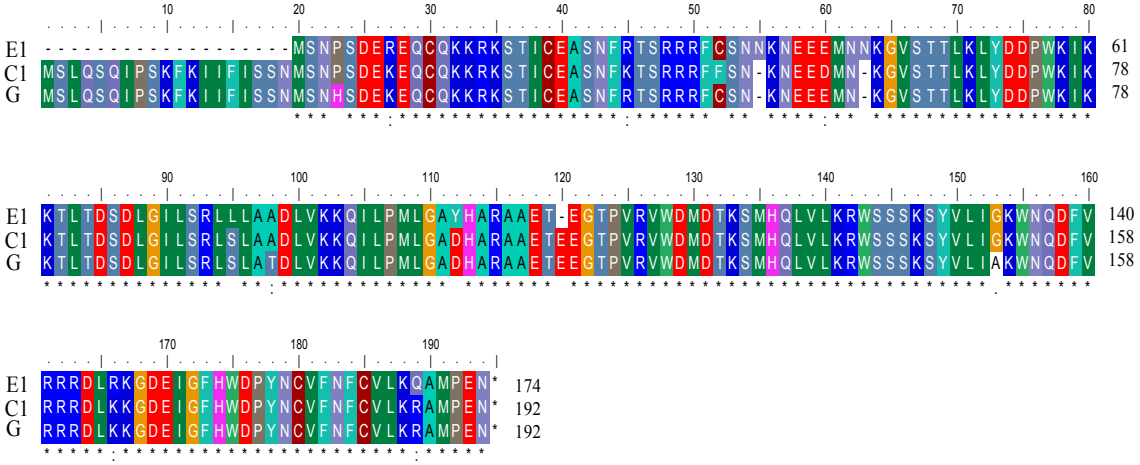

図 4-1. *E1* 遺伝子 (AB552962.1) および二つの *E1L* 遺伝子、*E1L-C1* (Glyma04g24640.1) と *E1L-G* (Glyma18g22670.2) の推定アミノ酸配列

C1 および G は、それぞれ E1L-C1 および E1L-G を示す。*E1* のアミノ酸配列は Xia et al. (2012) を、*E1L* のアミノ酸配列は Phytozome Glyma1.1 を参照した。

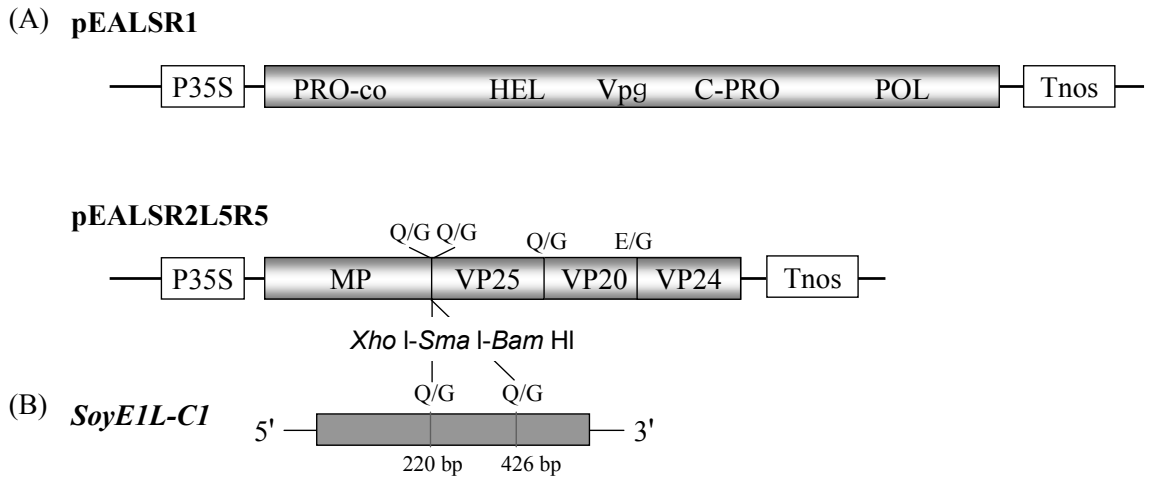

図 4-2. A) リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) ベクターの構造。
B) *E1L-C1* 遺伝子のコーディング領域。*E1L-C1* 遺伝子のコーディング領域を灰色の四角で表記し、その一部の領域（220 bp-426 bp）を pEALSR2L5R5 に挿入した。P35S: CaMV 35S プロモーター; Tnos: ノパリンシンターゼ ターミネーター; PRO-co: プロテアーゼ 補助因子; HEL: NTP-結合ヘリカーゼ; C-PRO: システインプロテアーゼ; POL: RNA ポリメラーゼ; MP: 42 K 移行蛋白質; Vp25、Vp20 および Vp24: 外被蛋白質; Q/G および E/G: プロテアーゼ切断部位。

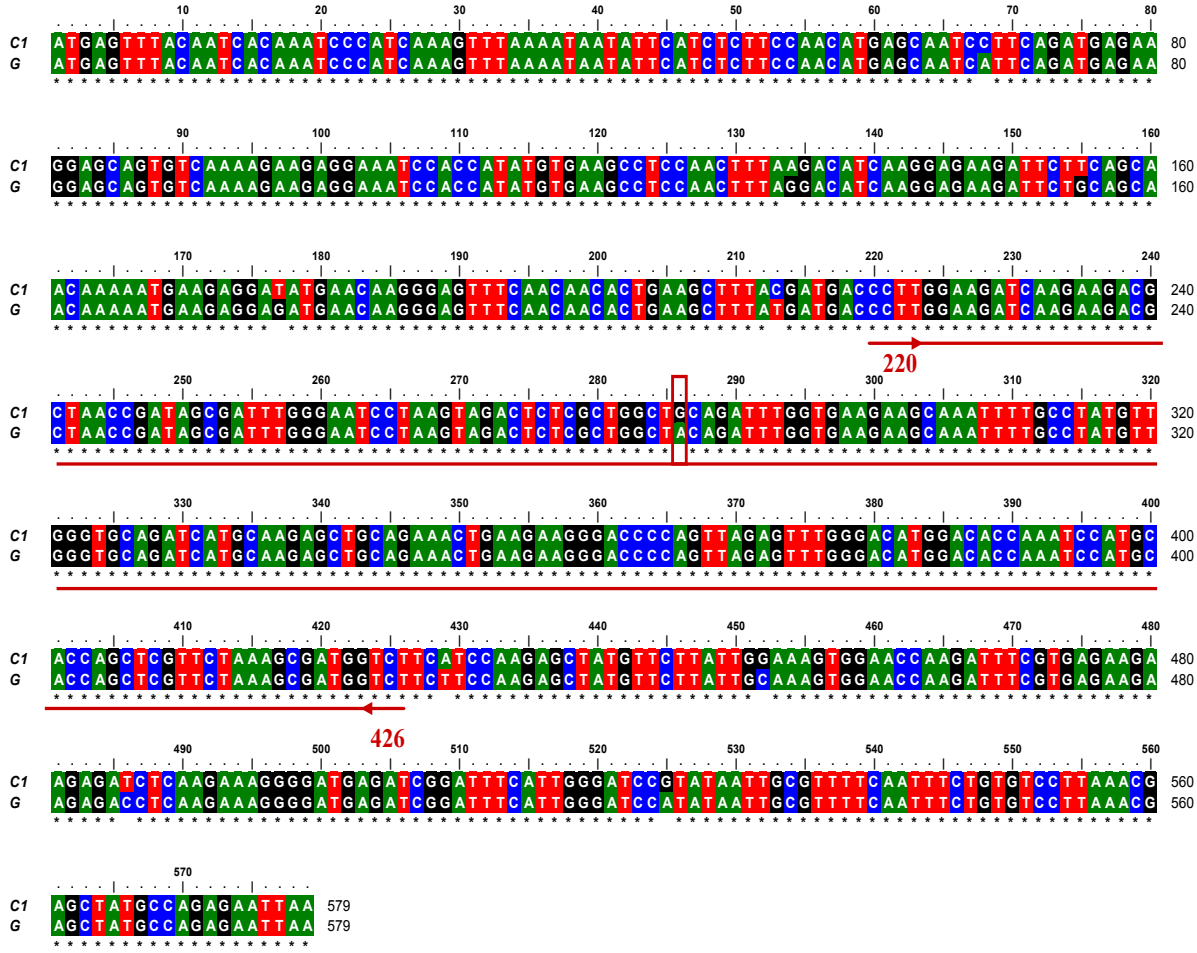

図 4-3. *E1L* 遺伝子のコーディング領域の塩基配列と VIGS に利用した領域

二つの *E1L* 遺伝子の間で相同性の高い領域 (塩基番号 220~426 番; 赤線部) を VIGS ならびに siRNA を検出するノーザンブロット解析用プローブに用いた。赤ワクは領域内に見出された塩基多型。*C1* および *G* は、それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

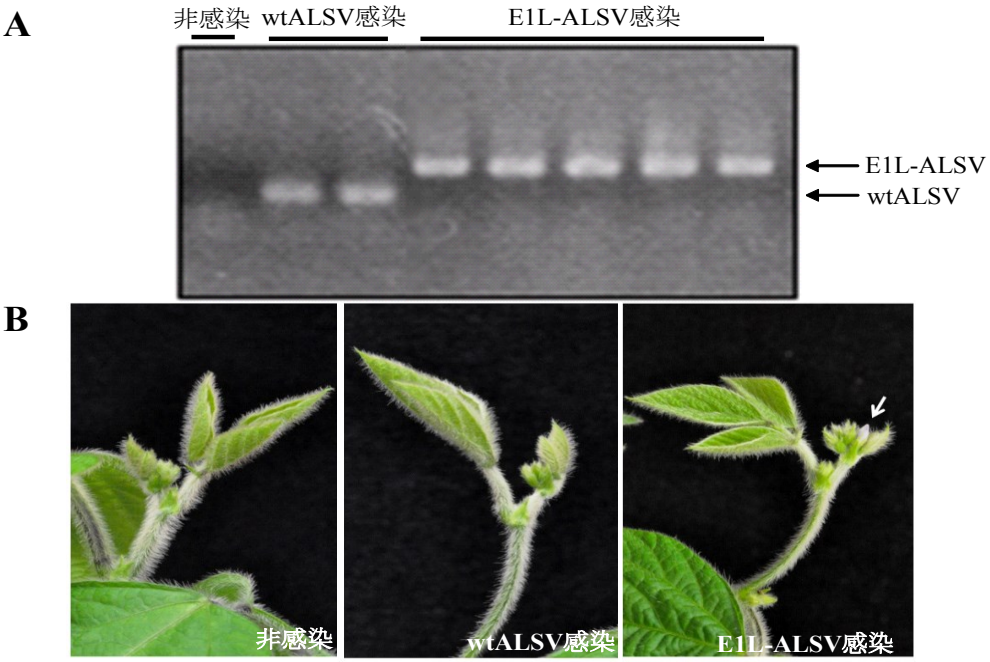

図 4-4. E1L-ALSV のトヨムスメへの感染と開花の促進効果

A) RT-PCR による E1L-ALSV 感染の検定。 B) 同じ日数育成した状態で、E1L-ALSV が感染したトヨムスメ個体 (右図) だけで開花が見られた。

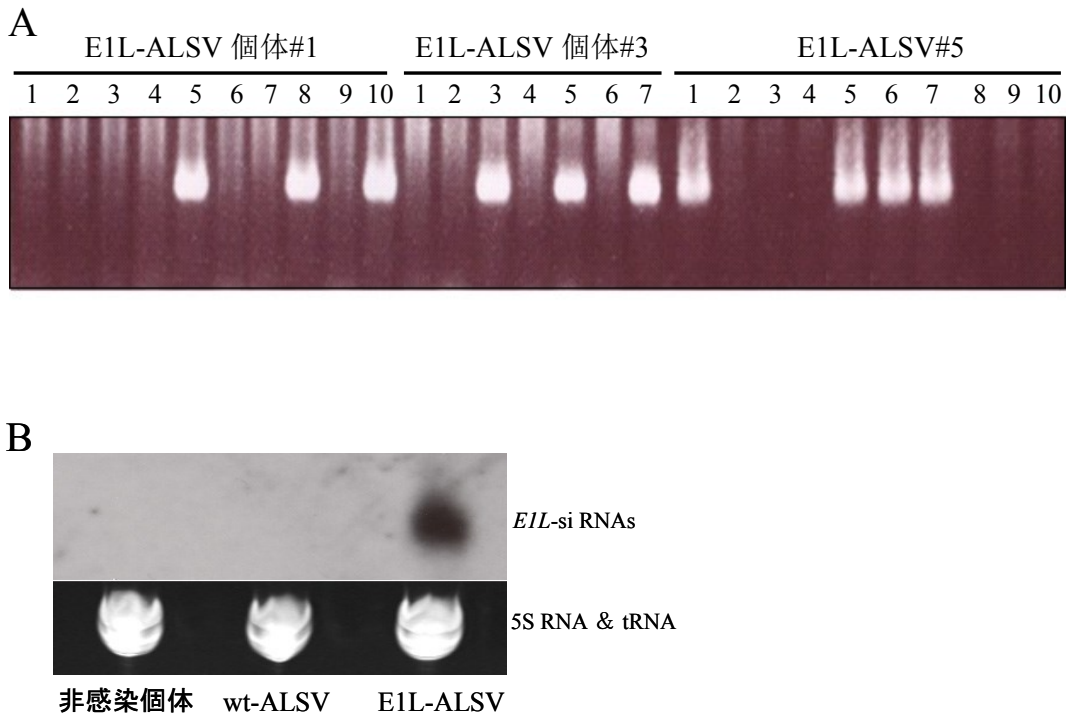

図 4-5. E1L-ALSV が感染したトヨムスメ個体の後代におけるウイルスの伝達と *E1L*-siRNA の発生

A) RT-PCR によるウイルス感染個体の検定。B) ノーザンブロット解析による *E1L*-siRNA の検出。5S RNA & tRNA のバンドは等量の低分子 RNA が泳動されていることを示す。*E1L* は *E1L-C1*＋*E1L-G* を示す。

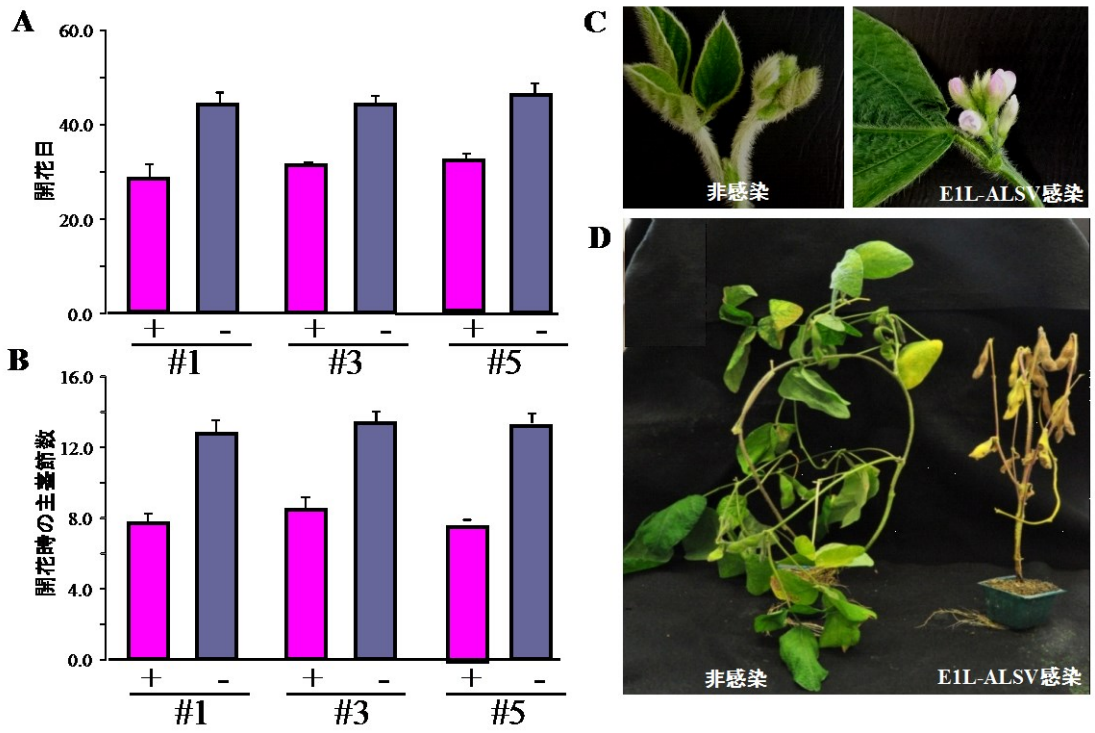

図 4-6. *E1L* 遺伝子の VIGS がトヨムスメの開花および登熟に及ぼす効果

E1L-ALSV が感染した 3 個体の後代で観察された E1L-ALSV 保有個体と非保有個体の開花日の平均値 (±標準偏差) (A)、開花時の主茎節数の平均値 (±標準偏差) (B) ならびにそれらの頂芽 (C) および成熟期の形態 (D) 。図中＋は E1L-ALSV 保有個体、－は E1L-ALSV 非保有個体を示す。

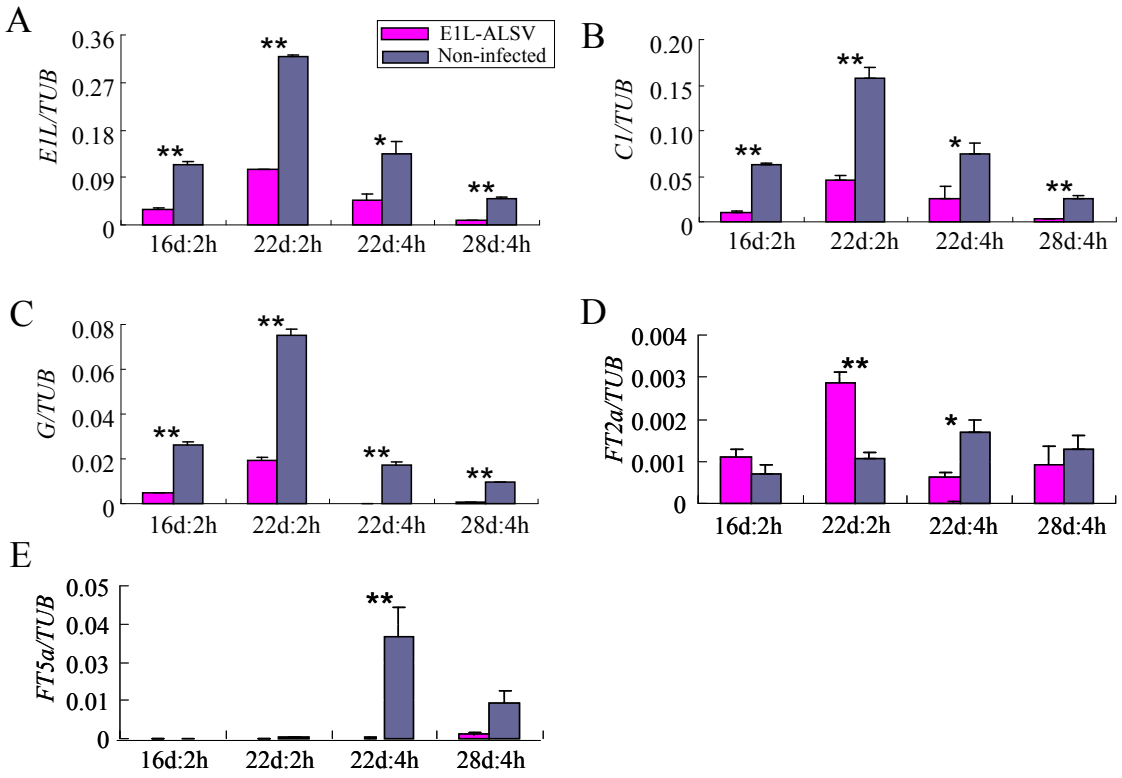

図 4-7. VIGS による *E1L* 遺伝子のノックダウンと *FT* 遺伝子の発現に及ぼす効果

VIGS の効果を、出芽後 16 日、22 日ならびに 28 日の光点灯後 2 時間または 4 時間目に調査した。A) は *E1L* 遺伝子 (*E1L-C1* ＋ *E1L-G*) の発現量を、B) は *E1L-C1* の発現量を、C) は *E1L-G* の発現量を示す。D) および E) は *FT* の発現量を示す。発現量は *β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*、**は各々5%および 1%水準で E1L-ALSV 感染個体と非感染個体の間に統計的に有意差があることを示す。*E1L* は *E1L-C1*＋*E1L-G* を示す。*C1* および *G* は, それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

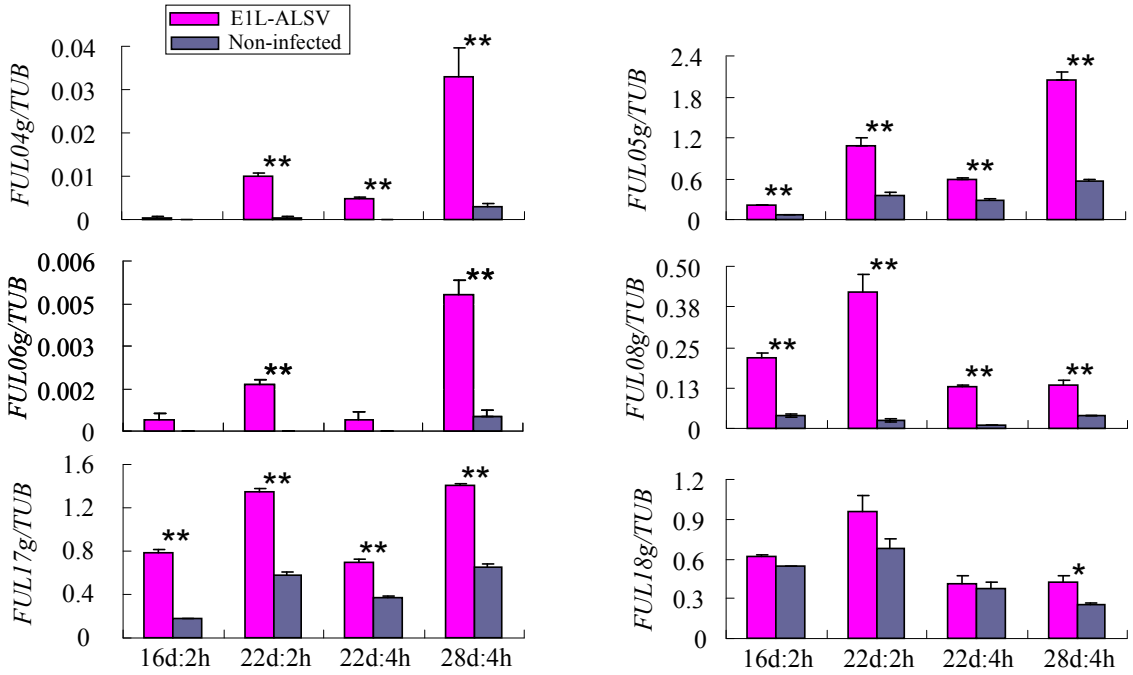

図 4-8. *E1L* 遺伝子のノックダウンがダイズの 6 個の *FUL* オーソログの発現に及ぼす効果

qRT-PCR 法により 6 個の *FUL* オーソログの発現量を、*β-tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*、**は各々5%および 1%水準で E1L-ALSV 感染個体と非感染個体の間に統計的に有意差があることを示す。

第 5 章　光中断による開花抑制に関与する分子機構の解析

Bünning (1979) は、ダイズの感光性品種を用い、8時間の明期と様々な時間に30分の光パルスを与えた64時間の暗期からなるサイクルを7回繰り返し、光中断が花芽形成に及ぼす効果を観察した。暗期中に与えられた光パルスは、与えられた時間により、花芽形成に促進的または抑制的に作用し、促進と抑制がほぼ12時間の間隔で繰り返された。この観察結果は、明期から暗期への切り替えが、光に対する感受性の振動を誘発し、光周性が概日時計によって支配されているとした彼の内生リズムに関する仮説 (1936) と良く符合した。光周性反応と内生リズムに関する Bünning (1936) の仮説は、Hamner (1964) の研究グループによっても支持され、外的要因である日の長さが、光が開花に促進的に作用する親明相と抑制的に作用する親暗相がほぼ12時間間隔で繰り返される概日リズムとどのように符合するかによって、開花の光周期反応が決定されるとする外的符合モデルとして理解されている。

長日植物のシロイヌナズナでは、緒論で示した様に、光周期反応の外的符合モデルを、*CO* の発現と CO タンパク質の安定性に及ぼす光環境 (日周期) の影響の結果として捉えられている (Imaizumi 2010; Valverde 2011)。一方、短日植物のイネの場合、暗期に与えた光中断の時間によって *FT* オーソログである *Hd3a* の発現が大きく影響され、暗期の中期に光中断が与えられた時に抑制効果が最も強く、またその抑制効果には PHYB が関与していることが明らかにされている (Ishikawa et al. 2005)。さらに、*Hd3a* の促進因子である *Ehd1* とその抑制因子である *Gdh7* が、それぞれ *OsGI* によって規定される内生リズムの中で独自の光誘導相をもち、これらの位相に青色または赤色の光照射が符合するときに開花が誘導または抑制され、イネの限界日長や光中断などの光周期反応が巧妙に制御されている (Itoh et al. 2010)。

ダイズの場合、*E* 遺伝子の多くが開花に対して抑制的に働くが、それらのうち *E1* はダイズの *FT* オーソログの発現を抑制する転写因子と考えられる (Xia et al. 2012)。第3章で明らかにしたように、*E1* およびそのホモログである *E1L* の発現様式は、長日下では明期開始直後と、明期から暗期への変換期直前に発現のピークを持つ特徴的な発現様式を示す。さらに第4章で示したように、*E1L* は、*E1* とは異なり、*FT* ではなくその下流で機能する *FRUITFUL* の発現誘導に関連していた。そこで本章では、*E1* および *E1L* およびダイズの

主要な *FT* オーソログである *FT2a* および *FT5a*、ならびに *FUL* のオーソログの発現に着目して、ダイズにおける開花に及ぼす光中断の分子的機構を明らかにしようと試みた。

1 材料および方法

日長変換実験

実験にはハロソイを用いた。ハロソイを、人工気象室 (25℃) 内で、子葉展開後19日間長日条件 (明期18時間／暗期6時間) で栽培し、20日目の光点灯後12時間目に消灯して長日を短日 (12時間日長) に変換した。3日後 (子葉展開後23日目) 、変換した暗期を再び明期に戻し、18時間日長の長日とした。日長変換の前後に、光点灯後15時から20時および0時 (光点灯時) から5時にかけて一時間毎の遺伝子発現の推移を解析した。解析には、茎頂から数えて二番目の十分に展開した本葉を用いた。本葉の小葉一枚を4個体から採取し、解析まで-80℃で保存した。RNA の抽出、cDNA 合成ならびに qRT-PCR 解析は第2章の方法に従った。

光中断実験

ハロソイ、ハロソイの *E1* ならびに *e3* および *e4* に関するNIL (H-*E1* および H-*e3/e4*) とトヨムスメを実験に用いた。これらの系統は、H-*e3/e4* を除き、*E3* および *E4* 座に優性遺伝子を有する。また、トヨムスメは *E1* 領域が欠失した *e1-nl*/*e1-nl* 型である。非感光性である H-*e3/e4* を光中断実験のコントロールとして用いた。

光中断処理は、明期を8時間とし、暗期の異なる時期帯に2時間の光照射を与えて行った。光中断を与えた時間は、消灯後2時間、4時間、7時間、10時間および12時間後である。それらの処理を、明期—暗期—2時間の光中断—暗期の各相の時間の長さに基づき、8-2-2-12、8-4-2-10、8-7-2-7、8-10-2-4および8-12-2-2と表記する。実験は人工気象室 (25℃) 内で行い、各系統4個体をポットで栽培した。

発現解析には、日長変換実験と同様に、茎頂から数えて二番目の十分に展開した本葉を用いた。サンプリングは、明期では1時間毎に8回、また光中断期では、中断後1時間目と2時間目の2回行った。RNA の抽出、cDNA 合成ならびに qRT-PCR 解析は第2章の方法に

従った。

2 結果および考察

2-1 日長変換実験における *E1* および *E1L* の日長応答の解析

第3章で示したように、*E1* および *E1L* は、18時間日長の下では、光点灯後に第一のピークと消灯前に第二のピークをもつ遺伝子発現を示す。第二のピークは、16時間日長 (Xia et al. 2012) においても観察されるが、14時間日長では観察されない (渡辺啓史 私信) 。本章では、両遺伝子の発現がどのように光に応答するかを明らかにするために、日長条件を変換したときの両遺伝子の発現様式を解析した。また、*E1* の制御下にある *FT* の発現様式もあわせて解析した。実験結果を図5-1および図5-2に示す。

***E1* および *E1L* の発現** : 両遺伝子ともに、子葉展開後20日目に光点灯後12時から18時に至る6時間の明期が暗期に変わることにより、それまで観察されていた第二の発現ピーク (LD19) が誘導されず、遺伝子発現はいずれの時間ともに観察されなかった (LD19SD1) 。さらに、変換前に観察された第一の発現ピーク (LD19) も、変換直後 (LD19SD1) には光の照射下であるにもかかわらず誘導されなかった。一方、2日間の短日を経て、3日目の光点灯後12時から18時の暗期を明期へと変換した場合 (LD19SD3LD1) 、発現レベルは低かったものの、暗期下で抑制されていた第二の発現ピーク (LD19SD1およびLD19SD3) が再度誘導された (LD19SD3LD1) 。さらに、長日への変換後の明期の始まりには、処理開始前のレベル (LD19) と同じレベルの第一の発現ピークが誘起され、その2日後 (LD19SD3LD3) では、18時間日長下で観察される概日リズム (第3章 図3-1) と同じ発現を示した。これらの結果から、*E1* および *E1L* の発現は、光に対して強く敏感であり、光は、両遺伝子の発現に関して、発現そのものと発現の誘導という二つの役割をもつと考えられる。

***FT* の発現** : *FT2a* および *FT5a* の発現は、長日 (LD19) では抑制されていたが、明期が暗期に変更され *E1* および *E1L* の発現が抑制されると (LD19SD1)、同時間帯には発現誘導されなかったものの、翌明期には低いながら発現が上昇した。発現誘導は変換後3日目 (LD19SD3) にも観察されたが、発現のレベルは明期より暗期の後半で高かった。暗期が明

期へ変換されることにより、変換後に観察された両遺伝子の発現情報が抑制された (LD19SD3LD1) 。翌明期では、*FT5a* の発現は誘導されず、また *FT2a* の発現も2時間目に増加したがすぐに減少した。変換後2日目 (LD19SD3LD3) には、両遺伝子の発現は、処理前 (LD19) の長日条件と同様に発現が完全に抑制された。

2-2 光中断がダイズの開花に及ぼす効果

異なる時間帯に与えた光中断の開花に及ぼす効果を、*E3* および *E4* 座に優性遺伝子を持つハロソイ、トヨムスメ、H-*E1* ならびに劣性遺伝子をもつ H-*e3/e4* を用いて解析した。各系統の各処理区における開花日を図 5-3 に示す。光中断を与えなかった 8 時間明期の短日条件では、平均開花日は子葉展開後 22 日から 24 日であり、系統間に差異は認められなかった。

光中断の明確な効果が、暗期の中期 (消灯後7時間目) に光中断を与えた8-7-2-7処理で観察された。ハロソイおよびトヨムスメでは、ともに8-7-2-7処理では対照に比べて約9日開花が遅延した。さらに、H-*E1* では、開花抑制の程度が前二系統に比べて強く、8-7-2-7処理では、子葉展開後60日においても花芽の形成は認められなかった。その他の処理では、ハロソイや H-*E1* では、8-4-2-10処理においてもそれぞれ対照に比べて3日および8日開花が遅延したが、トヨムスメでは開花遅延は観察されなかった。対照的に、*E3* と *E4* 座が二重劣性型である H-*e3/e4* では、いずれの処理区ともに開花日は対照 (8-16) とほぼ同じであり、光中断の効果は認められなかった。

Borthwick (1952) は、光中断に対する反応には赤色光と遠赤色光の受容体であるフィトクローム (PHY) が関与することを明らかにした。また、イネでは、*phyA*、*phyB* および *phyC* の突然変異体を用いた光中断実験から、*phyA* 変異体と *phyC* 変異体では野生型と同様に光中断による開花遅延がみられたが、*phyB* 変異体においては光中断による開花遅延はみられず、PHYB が光中断に関与することが示されている (Ishikawa et al. 2005)。本研究の結果から、ダイズにおいては、光中断に対する反応には少なくともフィトクローム A (PHYA) アポタンパク質である GmPHYA3 と GmPHYA2 を支配する *E3* および *E4* が関与すると考えられる。

顕著な光中断効果が認められた H-*E1* の場合、他の時間 (8-2-2-12、8-10-2-4ならびに

8-12-2-2処理) に施した光中断は大きな開花遅延を引き起こさなかった。したがって、開花遅延には光中断を与える時間が重要であり、暗期の中期に与えた光中断が最も効果が強かった。この結果は、同じ短日植物であるイネで観察された結果 (Ishikawa et al. 2005) と一致する。また、H-*E1* に比べると、*E1* の機能低下遺伝子 (*e1-as*) を有するハロソイでは、光中断による開花遅延の効果は小さかった。これらの結果から、光中断の効果には *E1* 座が関与することを示す。しかし、*E1* が欠失したトヨムスメにおいても、ハロソイと同様の光中断反応を示しており、*E1* 座以外の要因も光中断に関与していると考えられる。

2-3 開花遺伝子の発現に及ぼす光中断の効果

光中断による開花遅延の原因を明らかにするため、8-7-2-7 処理における *E1* および *E1L* ならびに *FT2a* および *FT5a* の発現の推移を qRT-PCR によって調べた (図 5-4)。開花抑制が認められたハロソイ、H-*E1* およびトヨムスメでは、*E1* および *E1L* の発現が誘導されたが、概日リズム実験 (第 3 章) や先の日長変換実験で示したような光点灯後の発現上昇 (第一のピーク) は観察されず、点灯後 7−8 時間目に発現が上昇し、光中断時の点灯 1 時間目と 2 時間目に発現がさらに増加した。また、*E1L* の発現は、概日リズムの解析結果と同様に、ハロソイならびに H-*E1* に比べてトヨムスメで高かった。一方、光中断効果が観察されなかった H-*e3/e4* では両遺伝子の発現誘導は認められなかった。

8-7-2-7 処理における *FT2a* および *FT5a* の発現様式は系統間で異なった。光中断の効果が観察されなかった H-*e3/e4* では、両遺伝子ともに発現が上昇し、点灯後 2 時間目と光中断後 2 時間目にピークが存在した。対照的に、H-*E1* では、*FT2a* および *FT5a* ともに発現は認められなかった。*FT2a* と *FT5a* の発現様式はハロソイとトヨムスメで異なった。*FT2a* の発現は、トヨムスメでは H-*E1* 同様に強く抑制されたが、ハロソイでは明期後半にやや上昇した。*FT5a* の発現は、ハロソイに比べてトヨムスメで高く、明期では H-*e3/e4* に比べてやや低かったものの、光中断期では H-*e3/e4* と同じ程度の発現を示した。一方、ハロソイにおいても、明期の終わり (光点灯 8 時間目) と光中断期に *FT5a* の発現が上昇した。これらの結果から、8-7-2-7 処理で観察された光中断の効果の系統間の差異は、*FT2a* や *FT5a* の発現量の差として理解することができよう。第 3 章では、トヨムスメが FR 光の豊富な人為長日に反応しなかったことから、FR 光に対する反応には *E1* が関与するこ

とを示したが、光中断実験で用いた人工気象室の光源が R 光の豊富な蛍光灯であったことから、*E1* は R 光に対しても反応することが分かった。

ハロソイ、H-*E1* およびトヨムスメは、光中断を与える時間によって開花に及ぼす光中断の効果が異なった (図5-3) 。光中断を与える時間が開花遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするために、H-*E1* について、8-4-2-10処理 (開花が8日間遅延) 、8-7-2-7処理 (未開花) および8-10-2-4処理 (中断効果は認められない) における遺伝子発現様式を解析した (図5-5) 。8-10-2-4処理では光中断による *E1* および *E1L* の発現は誘導されず、8-4-2-10処理でも、光中断時の2時間目に発現量がやや上昇したが、明期では8-10-2-4処理同様に発現が低かった。一方、*FT2a* および *FT5a* の発現は、8-4-2-10処理および8-10-2-4処理ともに上昇した。*FT2a* では、両処理ともに明期に入って発現が同等に誘導されたが、8-10-2-4処理では8-4-2-10処理に比べて明期の終わりまで発現が高く維持された。*FT5a* では、発現の誘導様式が処理間で異なり、8-10-2-4処理では明期の終りと光中断時に、8-4-2-10処理では明期の始まりに高い発現を示した。

一方、*E1* が欠失したトヨムスメについては、8-4-2-10処理と8-7-2-7処理 (開花が8日間遅延) における *E1L*、*FT2a* および *FT5a*、*FUL* の発現様式を比較した (図5-6および図5-7)。8-4-2-10処理では、8-7-2-7処理で観察された *E1L* の発現上昇が観察されず、8-7-2-7処理に比べて *FT2a* や *FT5a* の発現が上昇した。しかし、VIGS 実験の結果から *E1L* は *FT2a* や *FT5a* の発現には関与していないと考えられることから、それらの発現誘導には他の因子が関与していると予想される。一方、*FUL* に対する光中断の効果は、*FUL5g* と *FUL17g* を除く4遺伝子で認められた。いずれも、暗期中期に2時間の光中断を与えた8-7-2-7処理で、遺伝子発現が低く抑制され、光中断の効果が観察されなかった8-4-2-10処理で発現が上昇した。これらの結果は、第3章で示した長日および短日下における遺伝子発現の概日リズムの解析結果とも一致した。

これらの結果を要約すると、*E1* 座が *E1* あるいは *e1-as* の場合、PHYA が正常であると、特に暗期中期の光中断により *E1* の発現が誘導され、*FT2a* および *FT5a* の発現が抑制されて開花が遅延することがわかった。一方、*E1* が欠落したトヨムスメの場合、同じく暗期中期の光中断により *E1L* の発現が誘導された。しかし、第4章の VIGS 実験の結果から示唆される様に、*E1L* は *FT2a* や *FT5a* の発現に明確な影響を与えていない。したが

って、*FT2a* や *FT5a* の発現を抑制する *E1L* 以外の開花抑制遺伝子が存在することが思われる。またトヨムスメの場合、光中断で *E1L* の発現が上昇した一方で、*FUL* の発現が低下した。VIGS 実験から示唆されたように、*E1L* のノックダウンによって *FUL* の発現が増加したことから、光中断より誘導された *E1L* が *FUL* またはそれに影響を与える他の遺伝子の発現を抑制して、その結果開花を遅延させた可能性があろう。さらに、劣性の *e3/e4* 型では光中断の効果が観察されなかったことから、フィトクローム A が光中断に関わっていることが明らかになった。

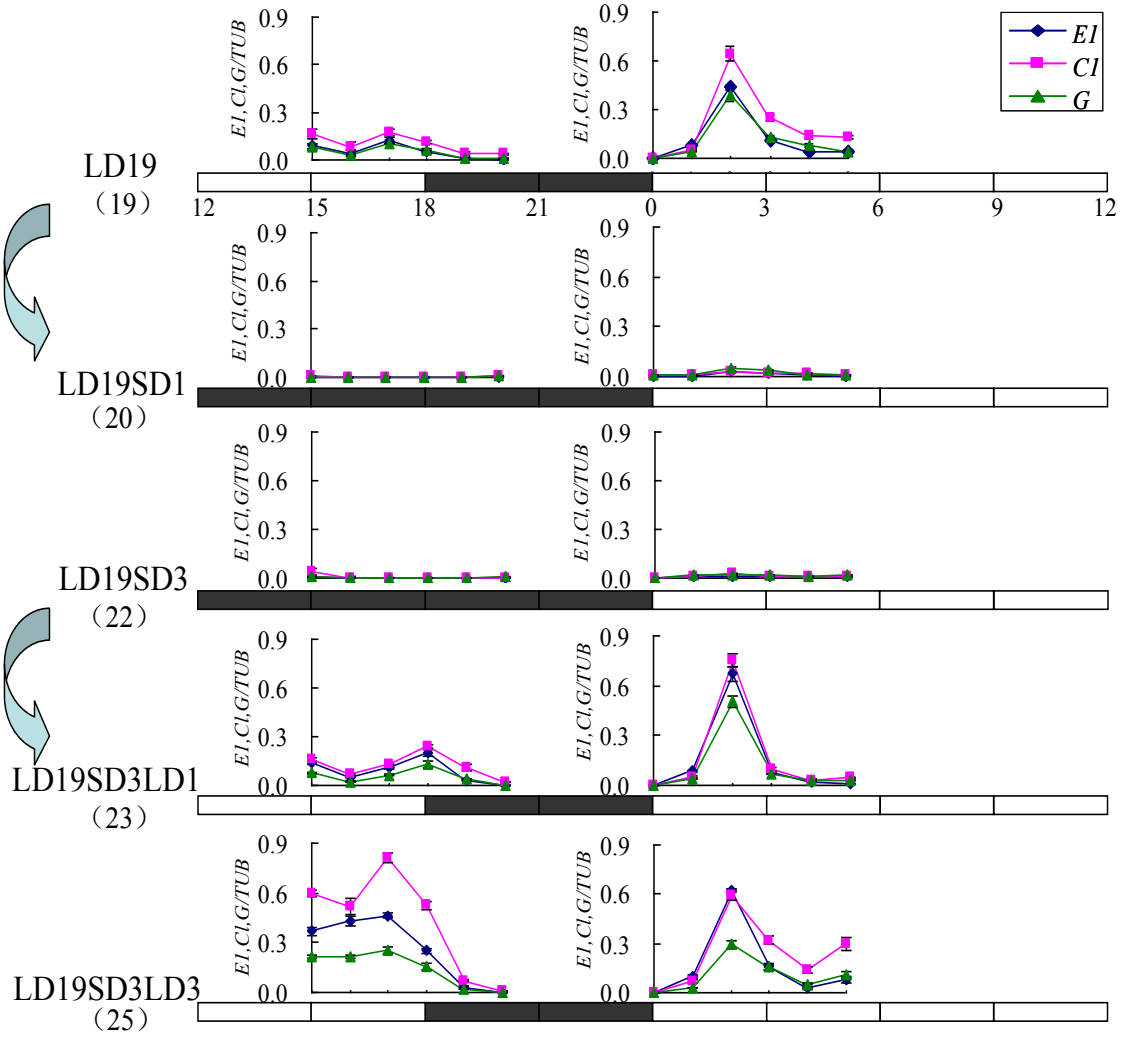

図 5-1. 日長変換実験における *E1* および *E1L* 遺伝子発現の光応答

ハロソイ (H) を 19 日間長日条件で栽培し、20 日目の光点灯後 12 時間目に光を消灯して 12 時間日長とした。3 日後 (子葉展開後 23 日目)、変換した暗期を再び明期に戻した。明期の光点灯開始から 5 時間ならびに 15 時から 20 時にかけて 一時間毎に遺伝子発現量を調査した。発現量は *β-Tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*C1* および *G* は、それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

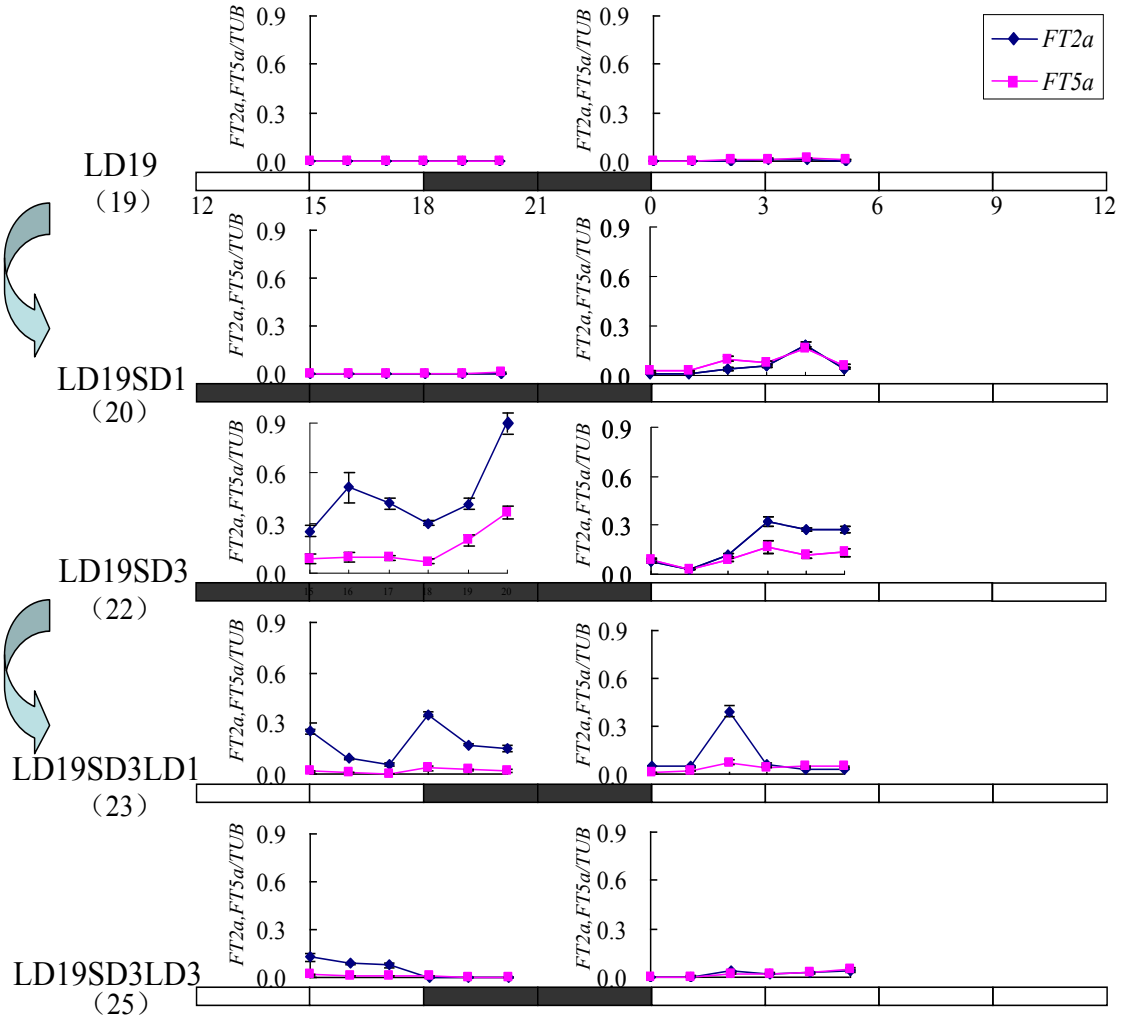

図 5-2. 日長変換実験における *FT2a* および *FT5a* 遺伝子発現の光応答

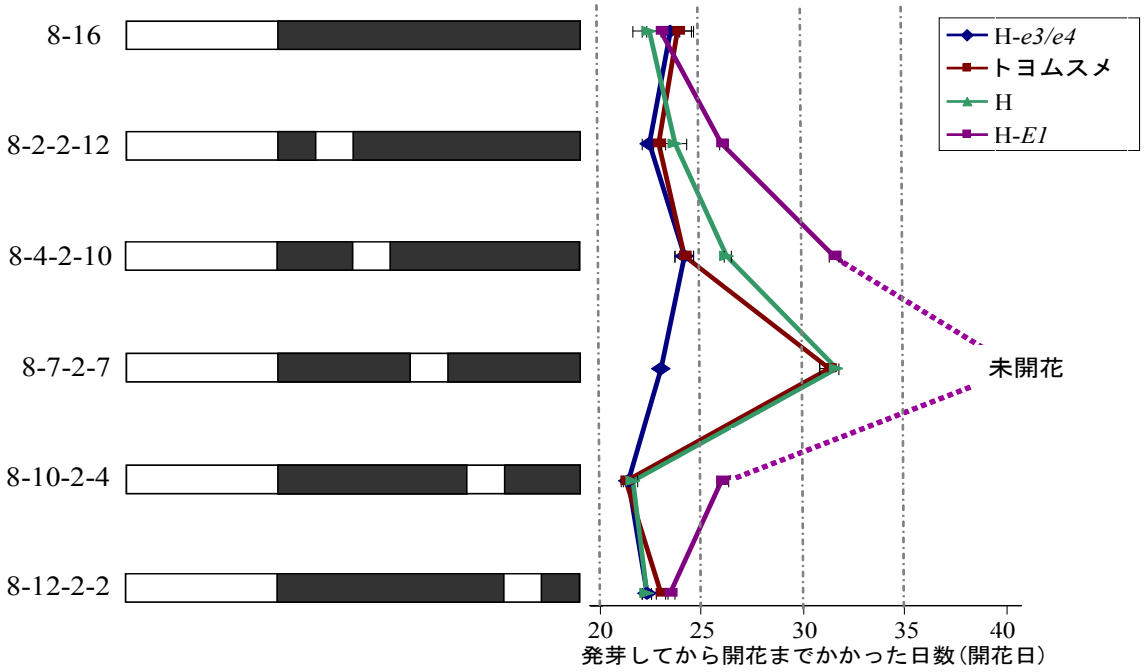

図 5-3. 光中断が開花に及ぼす効果

暗期（16 時間）の様々な時間帯に 2 時間光中断した。各系統の開花日は 8 個体の平均値（±標準誤差）である。

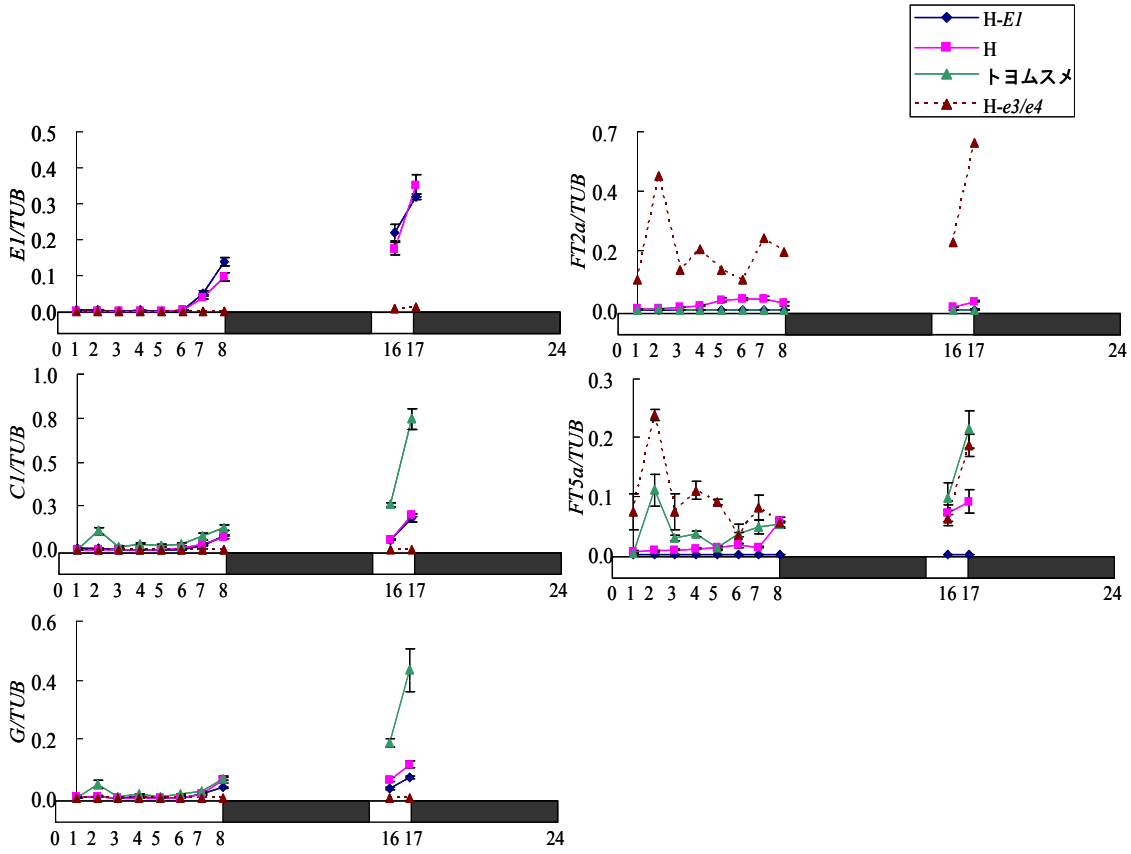

図 5-4. 光中断 8-7-2-7 処理における *E1*/*E1L* 遺伝子ならびに *FT2a* および *FT5a* 遺伝子の発現の推移

各遺伝子の発現量は *β-Tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*C1* および *G* は、それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

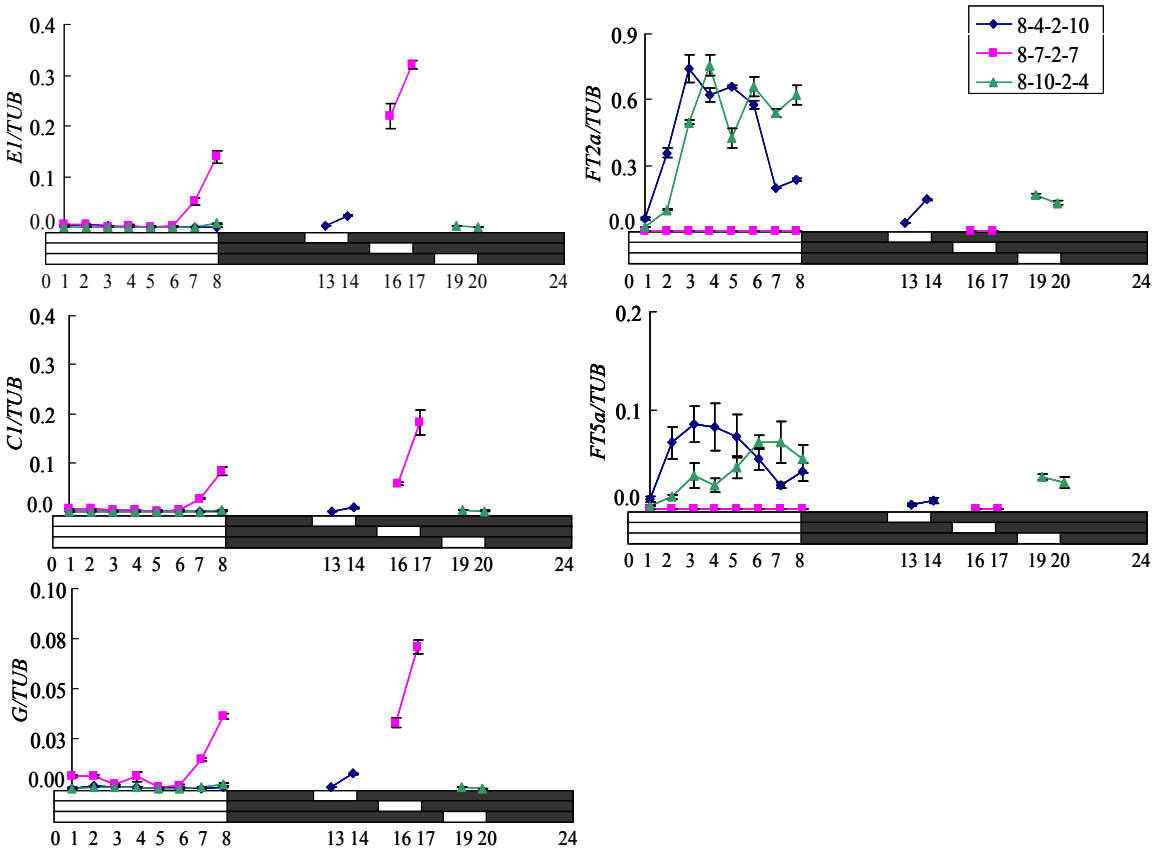

図 5-5. H-*E1* における異なる光中断処理が遺伝子発現に及ぼす効果

各遺伝子の発現量は *β-Tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*C1* および *G* は、それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

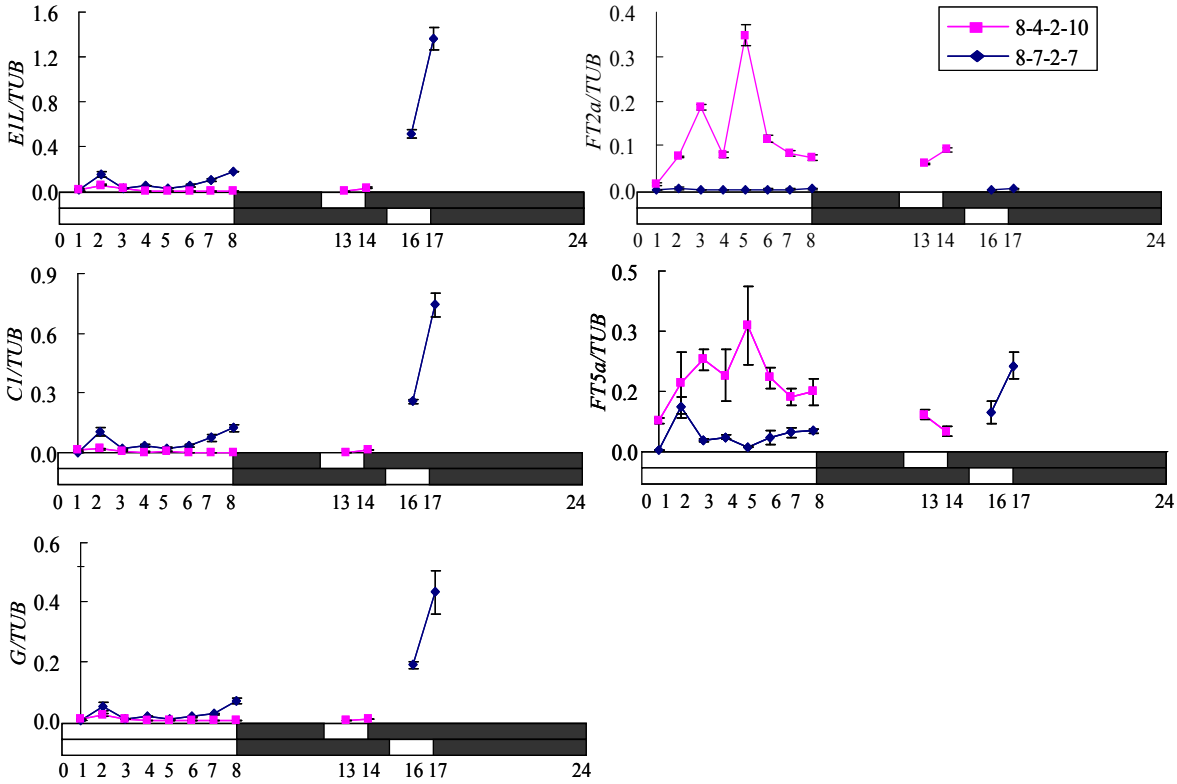

図 5-6. トヨムスメにおける異なる光中断処理が遺伝子発現に及ぼす効果

トヨムスメを光中断 8-7-2-7 および 8-4-2-10 処理した時の *E1L* および *FT* 遺伝子の発現の推移。各遺伝子の発現量は *β-Tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。*E1L* は *E1L-C1*＋*E1L-G* を示す。*C1* および *G* は、それぞれ *E1L-C1* および *E1L-G* を示す。

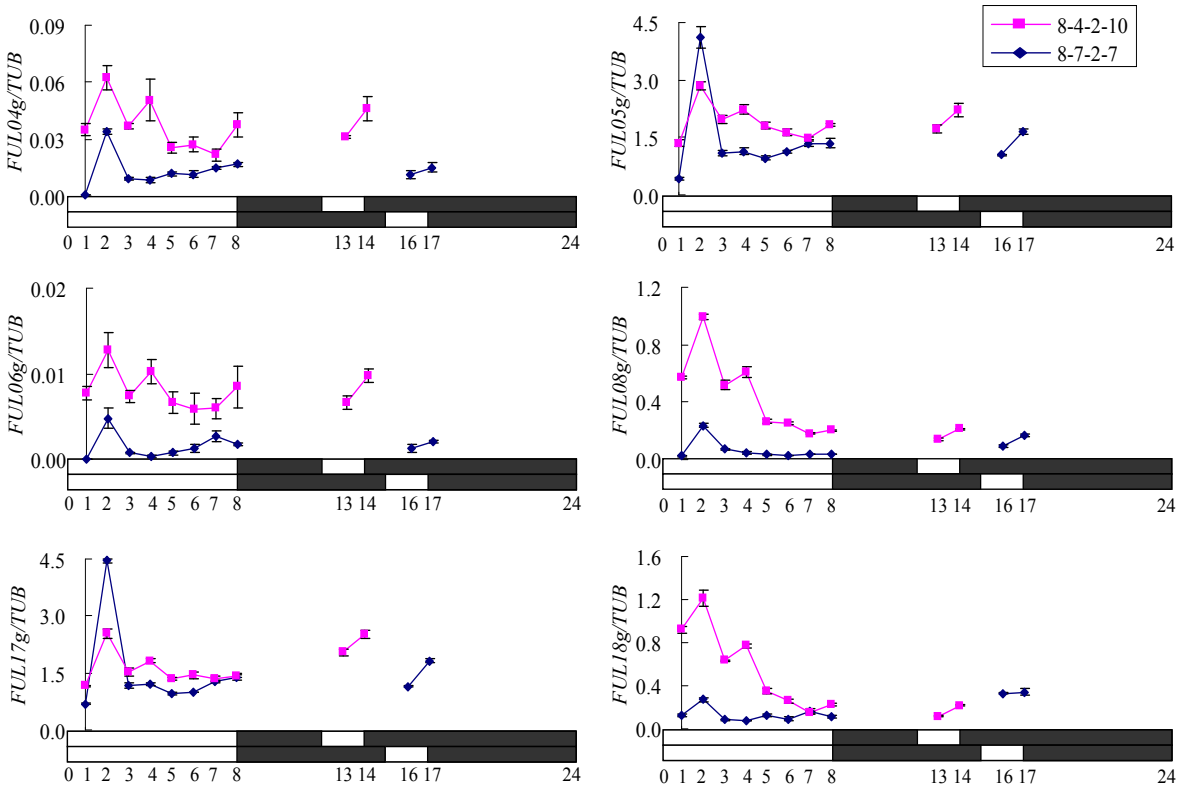

図 5-7. 異なる光中断処理における遺伝子発現の推移

トヨムスメを光中断 8-7-2-7 および 8-4-2-10 処理した時の *FUL* 遺伝子の発現の推移。各遺伝子の発現量は *β-Tubulin* (*TUB*) の mRNA 量に対する相対値で示した。各サンプルの発現量は全て 3 反復の平均値 (±標準誤差) である。

第 6 章　総合考察

1 非感光性獲得機構の多様化と開花後の光周性反応

ダイズは、短日下で開花が誘導される短日植物である。このようなダイズが、無霜期間が短く、生育盛期の日長が長日で推移する高緯度地域で種子を生産するには、長日下でも開花可能な感光性が低下または欠落した非感光性が必要となる。本研究では、非感光性をもたらす分子遺伝学的機構の多様性を明らかにするために、高緯度に位置する様々な地域から導入された非感光性品種・系統の*E*遺伝子座 (*E1*、*E2*、*E3*、および *E4*) の遺伝子型を、DNA マーカーを用いて推定した。供試品種・系統の中には、*E3* 座に新たな機能欠損遺伝子を有する系統が存在した。これらを含めて遺伝子型を分類したところ、これらの品種・系統は、全体で15の遺伝子型に分類され、さらに対立遺伝子の機能に基づいて3つの遺伝子型グループ (*e3/e4* 型、*e1*/E3/*e4* または *e1*/*e3*/*E4* 型、*e1-as*/*e3*/*E4* 型) に大別することができた。これらのうち、36品種・系統（全体の70%）が PHYA 機能欠損型である *e3/e4* 型に分類され、PHYA の機能欠損が、ダイズにおいて非感光性をもたらす最も優占的な遺伝子型であった。第二の型は、*E3* または *E4* のいずれか片方を持ち *E1* 座が機能欠損型である *e1*/*E3*/*e4* または *e1*/*e3*/*E4* 型であり、11品種・系統がこの型に含まれた。第三の型は、*e1-as*/*e3*/*E4* の遺伝子型であり、これはハロソイの *e3* に関する準同質遺伝子系統 (H-*e3*) と同じ遺伝子型であった。しかし、H-*e3* は FR 光の豊富な長日条件に対して感光性を示すことから (Cober et al. 1996b; Liu and Abe 2010)、この型の非感光性系統は、*E1*、*E3* および *E4* 座とは異なる遺伝子座に新規の非感光性遺伝子を有すると考えられる。したがって、ダイズの高緯度地方への適応に不可欠な非感光性は、これらの遺伝子座ならびに新規の遺伝子座での独自にかつ繰り返し生じた突然変異体の組み合わせの結果として獲得されてきたことが明らかになった。

多様な研究材料を用いた本研究のもう一つの興味深い知見は、*E3* および *E4* 座が、登熟期間や主茎の生長など、開花後の栄養生長や生殖生長に及ぼす光周性反応にも関与していることである。 ダイズの *E* 遺伝子は、開花だけでなく登熟の時期も制御することが知られてきた (Bernard 1971; McBlain et al. 1987; Saindon et al. 1989a)。Han et al. (2006) は、暗期に与えた赤色光は感光性品種の開花後の栄養生長を促進するが、その後の遠赤色光の

照射により抑制され、開花後の生育にもフィトクロームが関与する光周性反応が存在することを明らかにした。本研究は、開花後の光周性反応が、4遺伝子座に基づく遺伝子型グループによって異なることを明らかにした。*e3/e4* 型系統では、*E1* 座の遺伝子型に関わりなく、人為長日による登熟の遅延効果が低く、主茎の生長も対照とする自然日長と同様に停止した。したがって、ダイズにおける開花後の光周性反応にも PHYA が関与していることがわかる。一方、*E3* あるいは *E4* のいずれかをもつ系統 (*e1*/*E3*/*e4* または *e1*/*e3*/*E4* 型、ならびに *e1-as*/*e3*/*E4* 型) では、人為長日による登熟の遅延や主茎の生長の維持など、光周性反応を示した。これらの結果は、さらにハロソイおよびその *e3*、*e4*、*e3/e4* および *dt1* に関する NIL を用いた環境制御実験においても確認された。

これら異なる遺伝子型グループの長日条件下におけるダイズの開花および開花後の光周性反応は、3つの *E* 遺伝子座の対立遺伝子と伸育性遺伝子 (*Dt1*) ならびに2つの花成遺伝子 (*FT2a*／*FT5a*) のネットワーク (図6-1) として理解することができる。すなわち、*E3* または *E4* のいずれかを持ち *E1* または *e1-as* を有する感光性系統の場合 (図6-1A)、長日下では、PHYA によって誘導された *E1* または *e1-as* が *FT2a* と *FT5a* の発現を抑制し開花は誘導されない。これらの系統が一定期間の短日に曝されると、開花が誘導され、日長が長日に変換された後でも開花が維持される。しかし、PHYA のコントロール下で作用する未知の因子 (Y) によって生殖生長の進行が抑制され、PHYA によって誘導された *E1* が *Dt1* (*TFL1b)* の発現を維持することによって主茎の無限伸育性が維持される。*e3/e4* 型の非感光性系統では、*E1* の発現が誘導されないため、*FT* の発現が増加し、長日変換後においても開花が誘導され生殖生長が進み、種子が登熟して茎頂分裂組織 (SAM) の栄養生長も止まる (図6-1B)。*E3* または *E4* 座のいずれかに正常な *PHYA* をもつ非感光性系統の場合、*E1* 座の機能欠損遺伝子を有する *e1/e3/E4* または *e1/E3/e4* グループでは、*E1* の機能欠損により主茎の生長は停止するが、要因 Y により登熟は遅延し（図6-1C）、一方、*E1* 座の機能低下遺伝子を有する *e1-as/e3/E4* グループでは、SAM の栄養生長性が維持され、要因 Y により登熟も遅延する（図6-1D）。

これらのモデルは、ダイズの開花後の生長に関する2つの問いを提起する。1つは、*E1* がどのように開花後の主茎の生長に影響を与えるのか、という問いである。*E1* は、早晩性を介した収量や様々な農業特性への影響に加えて、低温耐性などの特性 (Takahashi and Abe.

1999; Githiri et al. 2007) にも関与するが、開花および成熟以外の形態形成に与える役割については明らかにされていない。第2章で示したように、主茎の生長は、*Dt1* である *TFL1b* の発現と密接に関連している。シロイヌナズナでは、*TFL1* の発現は花分裂組織遺伝子である *APETALA1* と *LEAFY* によって抑制されている (Liljegren et al. 1999; Ratcliffe et al. 1999)。これらの遺伝子は、葉で合成された FT が茎頂部に移行し、FLOWERING LOCUS D (FD) と結合して発現が誘導される (Abe et al. 2005; Wigge et al. 2005; Huang et al. 2005; Sablowski 2007)。したがって、*E1* や *e1-as* 対立遺伝子は、PHYA の制御下で *FT2a* と *FT5a* の発現を抑制し、その結果 *DT1* の発現を維持することによって主茎の SAM の栄養生長性を継続させている可能性がある。この場合、*E1* 座の対立遺伝子の主茎生長に及ぼす異なる影響は、それらの直接的な影響ではなく、むしろ *FT* 発現の抑制による間接的な影響として理解されよう。

もう1つの問いは、ダイズにおいて、開花自身が種子形成の直接の引き金になるか、という問いである。PHYA によって仲介する光周性反応によって、開花とは関わりなく、種子登熟が直接、または未知の因子を介して間接的に制御されることが本研究の結果から示された。PHYA の機能欠損型だけが長日条件で開花後の種子登熟の顕著な遅延が観察されなかった (図6-1)。したがって、今後は、開花後の種子の発育を影響する因子 (例えば ネットワークモデルの Y) の探究が必要であろう。

2 *E1L* がダイズの開花に及ぼす影響

ダイズゲノムには、*E1* と94%のアミノ酸相同性を示す2つのパラログ *E1L-C1* および *E1L-G* が存在する (Xia et al. 2012)。長日下では、PHYA によって発現が誘導された *E1* または *e1-as* が *FT2a* と *FT5a* の発現を抑制するため開花は誘導されない (Xia et al. 2012)。*E1* の作用性とその相同性から、*E1L-C1* および *E1L-G* も開花に対して抑制的な効果を有すると予想される。本研究では、*E1* が欠失した「トヨムスメ」を用い、*E1* の影響が存在しない状況下で、VIGS により *E1L* の発現を人為的にノックダウンさせて、その開花ならびに開花関連遺伝子の発現に及ぼす効果を解析した。その結果、*E1L* の VIGS によりトヨムスメの開花が12日から15日早くなり、*E1L* は、*E1* 同様にダイズの開花早晩性を制御することが示された。しかし、*FT2a* および *FT5a* の発現は *E1L* の発現とは密接に対応して

おらず (図4-7D および E)、*E1L* の開花を抑制する効果は、*E1* 同様に、*FT* の発現制御を介して行われることを示す積極的な証拠は得られなかった。なお、*E1L-G* を35Sプロモーターを用いてダイズ品種カリユタカで過剰発現させた T1 個体では、*FT2a* や *FT5a* の発現が強く抑制されており (未発表データ)、*E1L* の作用性についてはさらに解析を進める必要がある。

最近、イネ、トウモロコシやコムギでは、MAD ボックス遺伝子である *APETALA1 / FRUITFUL* (*AP1/FUL*) ホモログが開花の制御に関与していることが報告されている (Danyluk et al. 2003; Trenaskis et al. 2003; Yan et al. 2003; Fornara et al. 2004; Danilevskaya et al. 2008; Komiya et al. 2009)。*FUL* の発現は、*SUPRESSOR OF CONSTANS1* (*SOC1*) によって制御されるが、*SOC1* は *FT* と *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) のタンパク質複合体によって正に誘導されるほか、温度や齢、GA などの光周性とは異なる経路の遺伝的制御下にある (Wang et al. 2009; Yamaguchi et al. 2009; Wellmer and Riechmann 2010; Jung et al. 2012)。そこで、開花誘導に関わる *FT* の下流で機能する *FUL* のダイズオーソログについて発現解析を行った。6つの *FUL* オーソログの中で、*FUL-18g* を除く全ての *FUL* で、*E1L* のVIGS個体で発現量が有意に増加した (図4-8)。したがって、*E1L* のノックダウンによる開花促進効果は、*FUL* の発現誘導を介して生じた可能性がある。特に、これら遺伝子のトヨムスメにおける短日と長日での発現パターンをみると (図3-3)、6遺伝子のうち *FUL-04g*、*FUL-06g*、*FUL-08g* および *FUL-18g* の発現が長日では著しく低く、短日によって誘導された。これらのうち、*E1L* の VIGS 個体で発現量が増加した*FUL-04g*、*FUL-06g* および *FUL-08g* が *E1L* の制御下にあると考えられる。

シロイヌナズナで、*FUL* は葉の形態、果実発育、開花に関わっていることが知られている(Gu et al. 1998; Ferrandiz et al. 2000; Melzer et al. 2008)。*FUL* は、花序分裂組織 (inflorescence meristem) と茎生葉 (cauline leaves) で高発現し (Mandel and Yanofsky 1995; Gu et al. 1998; Ferrandiz et al. 2000; Schmid et al. 2005)、機能欠損の *ful-1* 対立遺伝子は開花を遅延させ、茎生葉のサイズを増加させる (Gu et al. 1998; Ferrandiz et al. 2000)。また、コムギの春化反応に関与する *VRN1* は *AP1/FUL* 様遺伝子であり (Yan et al. 2003)、*VRN1* の機能欠損変異体は、栄養生長を継続して生殖生長へ移行しない (Shitsukawa et al. 2007)。非春化処理個体では *VRN1* の転写は低く、春化後その発現が葉身で上昇する (Murai et al. 2003;

Danyluk et al. 2003)。このような春化処理に応じた発現パターンの変化はオオムギの *VRN1* でも報告されている (Trevaskis et al. 2003; Sasani et al. 2009)。さらに、Kinjo et al. (2012) は、春化要求性のない春播きコムギ品種 Chinese Spring を用い、*VRN1* (*WFUL1*) に加えて、同じく *AP1/FUL* 様遺伝子である *WFUL2* および *WFUL3* の機能を解析し、*VRN1* の葉身での発現が開花に関連していること、SAM ではこれらすべての遺伝子発現が上昇すること、*WFUL2* をシロイヌナズナに過剰発現させたところ開花が促進されたこと、などから *FUL* がコムギの開花に関与していると報告している。

このように、*FUL* は植物において様々な役割を果たしている。ダイズにおいては、*FUL* のオーソログ機能についてはまだ明らかにされていない。本研究の結果から、*E1L* がダイズの開花を制御することが明らかになった。また、ダイズの *FUL* のオーソログは、*E1L* の制御下にあり、開花に関わっていると考えられるが、その詳しい制御メカニズムについては明らかではなく、今後の研究が必要である。また、他の植物のようにダイズにおいても、*FUL* オーソログが開花だけではなく、他の特徴にも影響を与える可能性があり、今後、ダイズの *FUL* オーソログについて、詳しく研究する必要がある。

3 光中断による開花抑制に関与する分子遺伝学的機構

短日植物では、連続した長い暗期を短時間の光照射によって中断すると花芽形成が抑制される。そのため、短日植物は長夜植物としても捉えられる。本研究では、ダイズにおける光中断の分子遺伝学的機構を明らかにするために、16時間暗期の様々な時間帯に2時間の光照射を与えた光中断が開花および開花関連遺伝子の発現に及ぼす効果を解析した。実験に供試したハロソイ、H-*E1* およびトヨムスメでは、16時間暗期の中期に光中断を与えた時に開花が大きく抑制された。一方、PHYA 機能欠損型である H-*e3/e4* では光中断の効果は認められず、光中断に対する反応には PHYA が関与することが示された。古くから、光中断に対する反応には フィトクロームが関与することが知られており (Borthwick 1952)、イネにおいては PHYB が光中断に関与している (Ishikawa et al. 2005, 2009)。第3章の発現解析の結果から、PHYA 機能欠損型の長日における *FT2a* および *FT5a* の発現量は、短日におけるハロソイの発現量とほぼ同じであり、ダイズにおいて *FT* の発現に影響を与える主な光受容体が PHYA であることが示された。さらに、第3章ではトヨムスメの ILD に対す

る反応から、*E1* が FR 光の豊富な長日に対して応答する因子であることを示したが、第5章の光中断実験から R 波長の豊富な光に対しても応答することが明らかになった。さらに、トヨムスメもハロソイと同様に R 光の豊富な光源を用いた光中断によって開花遅延したことから、*E1L* は R 光の豊富な光に反応すると考えられる。

第3章で示したように、*E1* および *E1L* の長日における発現は、光点灯後2時間ないし3時間目と明期から暗期への移行期に二つのピークを持つ日周期反応を示す (図3-1) 。第5章での日長変換実験では、18時間明期の後半6時間を暗期に変えることにより、それまでに観察されていた第二の発現ピークが消失し、さらに暗期後の明期の始めに観察される第一の発現ピークも誘起されなかった (図5-1)。したがって、*E1* および *E1L* の発現は光に対して敏感であり、光は、両遺伝子の発現そのものと発現誘導という二つの役割をもつと考えられた。光中断も *E1* および *E1L* の発現に影響を与え、光中断を16時間暗期の中期に与えた時にのみそれらの発現が誘導された。すなわち、*E1* および *E1L* の発現は、一日の特定の時間帯の光照射によって誘導され、それ以外の時間帯に与えられた光照射はこれらの遺伝子の発現をもたらすことはなかった。そこで、*E1* および *E1L* の発現を誘導する上で重要な時間帯を E1/E1L 光誘導期とよぶことにする。この光誘導期に与えられた光照射によって *E1* ならびに *E1L* の発現が誘導され、その結果 *FT2a* や *FT5a* の発現が抑制されて、開花が抑制される。H-*E1* の場合、光誘導期にあたる16時間暗期の中期以外の光照射 (8-4-2-10や8-2-2-12処理) では、*E1* ならびに *E1L* の発現誘導は低く、*FT2a* や *FT5a* の発現が抑制されなかった。しかし、8-4-2-10処理では8時間日長の対照区に比べて開花が8日遅延していた。このような *FT* の発現抑制を伴わない開花遅延の原因については今後検討する必要がある。

光中断の効果をハロソイと H-*E1* で比べると、*E1* の機能低下遺伝子 (*e1-as*) を有するハロソイで、光中断による開花遅延の効果が H-*E1* に比べて小さかった (図5-3)。したがって、ダイズの場合、PHYA に加えて、*E1* 座も光中断による開花抑制に関与している。本研究の結果から、ダイズにおいては、暗期の適切な時期 (E1/E1L 光誘導期) に与えられた光照射が PHYA を介して *E1* の発現を誘導し、*FT2a* や *FT5a* の発現を抑制することによって開花が遅延することが初めて明らかとなった。本研究では、これらの経路を PHYA-E1-FT 経路と呼ぶ。

一方、トヨムスメにおいても光中断による開花遅延が生じた。トヨムスメの場合、*E1* が欠失していることから、光中断による開花遅延はハロソイとは異なる開花経路を通してもたらされたと思われる (図5-3 および 5-4)。第3章で指摘したように、トヨムスメの *FT2a* の発現は短日においても非常に低く、*FT2a* はトヨムスメの開花誘導に十分な役割を果たしていないか、あるいは、たとえあったとしても非常に小さな役割しか果たしていない。一方、第4章の VIGS 実験から明らかにされたように、*E1* のホモログである *E1L* は、*FT2a* や *FT5a* の発現には大きな影響を与えず、一方で *FUL* (特に、*FUL-04g*、*FUL-06g* および *FUL-08g*) の発現を抑制した。したがって、トヨムスメの光中断による開花遅延は、*E1L* の発現誘導による *FUL* の発現抑制を介して引き起こされた可能性がある。本研究では、この系を PHYA-E1L-FUL 経路と呼ぶ。

なお、*FT2a* の発現が抑制されていたトヨムスメでは、*COL1a* が高発現していた。したがって、イネ (Shimamoto and Yokoi 2005; Yamamoto et al. 1998; Izawa et al. 2002; Lee et al. 2010) で報告されているように、ダイズにおいても *COL* が *FT* の発現抑制に関与している可能性がある。開花関連遺伝子のネットワークにおける *CO* の役割を明らかにすることがダイズにおける感光性の解明に必要である。

本研究結果から、光中断による開花遅延には光中断を与える時間が重要であり、暗期の中期に与えた光中断が最も効果が強かった。これは、同じ短日植物であるベンケンソウ (田澤 2009) やイネ (Ishikawa et al. 2005) で観察された結果と一致する。イネでは、暗期の光中断によって *FT* のオーソログである *Hd3a* の発現が抑制されるが、その効果は暗期の中期に光中断を与えた時に最も強く、その他の時間帯に与えた光中断に比べて開花が最も遅延した (Ishikawa et al. 2005)。短日植物であるアサガオにおいても、光中断による開花抑制が報告され (Liu et al. 2001; Hayama et al. 2007)、光中断は *FT* のオーソログである *PnFT1* および *PnFT2* の発現を抑制し、開花抑制をもたらしている (Hayama et al. 2007)。本研究においても、ハロソイや H-*E1* での光中断の効果には、*FT2a* や *FT5a* の発現抑制が関与すると考えられた。しかし、トヨムスメで見られたように、ダイズの場合、PHYA-E1-FT 経路に加えて、それとは異なる PHYA-E1L-FUL 経路を通した開花制御が存在すると予想され、複数の経路を介して感光性が決定されている可能性がある。今後、PHYA-E1L-FUL 経路について、*FUL* の開花に及ぼす役割や *E1L* の *FUL* の制御機構など

を検討する必要があろう。

光中断実験ならびに日長変換実験から、*E1* および *E1L* の発現は、一日の特定の時間帯 (E1/E1L 光誘導期) に光を感受することが不可欠であり、暗期に与えた光照射が光誘導期からずれると *E1* ならびに *E1L* の発現が誘導されなかった。このような暗期の特定時間帯における光照射の重要性は、光周性反応に内生リズムが関与し、内生リズムが開花に促進的に作用する親明相と阻害的に作用する親暗相に区分され、どの相に外部から光が与えられるかによって開花が決定されるとした Bünning (1936) の考え（その後、Pittendrigh and Minis (1964) によって外的符号モデルと呼ばれた）によく一致する。特に日長変換実験ならびに光中断実験の結果から、*E1* ならびに *E1L* の発現は、光誘導期に光を受容することが不可欠である。この時期は、Bünning (1936) が定義した親暗相の中でも親暗度の最も高い時間に相当すると考えられる。さらに、光中断処理の *E1* および *E1L* の発現は、長日で見られたような暗期後の明期初めの第一のピークが認められず、光中断期にピークが存在した。Bünning (1936) は、光周性リズムが明期の開始でスタートすると考えた (田澤 2009)。仮に、*E1* や *E1L* の発現に必要な光感受時期が12時間周期で繰り返されると仮定すると、本実験の場合、暗期から光中断による光点灯時に内生リズムがリセットされるときに12時間周期で光照射を受けることになる。光中断期における発現ピークの生起は、Bünning (1936) が想定した光による内生リズムのスタートが、8時間明期の開始時ではなく光中断時を起点にしたと捉えることができる。

4 ダイズにおける光中断の分子的基盤のモデル

本研究から観察された結果に基づいて、ダイズにおける感光性の開花遺伝子ネットワーク、を提案する (図6-2)。*E1* 機能欠損型のトヨムスメの光中断の実験の結果から、光中断の効果が認められなかった8-4-2-10処理では、*E1L* の発現が誘導されず *FT2a* や *FT5a* の発現が上昇した。しかし、VIGS 実験の結果から、*E1L* は *FT2a* や *FT5a* の発現には必ずしも明確な効果をもたないことが示唆された。したがって、*FT2a* や *FT5a* の発現誘導には他の抑制因子 (W) が関与していると予想される。すなわち、PHYA が正常であり、*E1* 座が *E1* あるいは *e1-as* の場合 (図6-2B)、暗期中期の光中断により、*E1* 座の遺伝子、*E1L* ならびに未知の *W* 遺伝子の発現が誘導される。*E1* および *W* は *FT2a* および *FT5a* の発現を

抑制し、また、*E1L* が *FUL* の発現を直接または未知の遺伝子を介して抑制する。PHYA が正常であるが *E1* 機能欠損型のトヨムスメの場合 (図6-2C)、暗期中期の光中断により *E1L* および *W* の発現が誘導され、*W* が *FT2a* および *FT5a* の発現を、一方 *E1L* が *FUL* を抑制して開花を遅延させる。今後、未知の因子である *W* を明らかにするとともに、*FUL* の開花に及ぼす役割、*FUL* の発現に及ぼす *E1L* の機能について明らかにする必要がある。

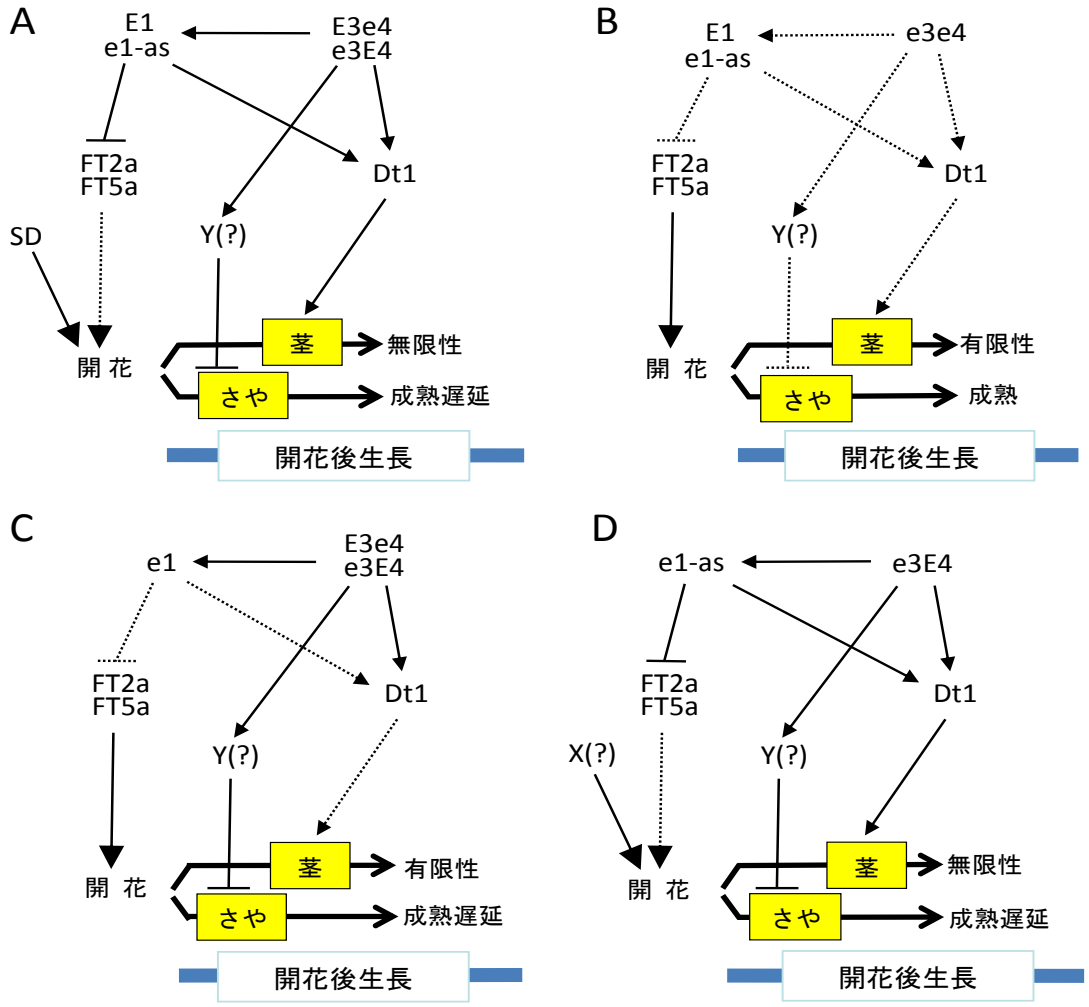

図6-1. 長日条件下におけるダイズの開花および開花後の光周性反応を説明する3つの *E* 遺伝子座の対立遺伝子と伸育性遺伝子 (*Dt1*) および花成遺伝子 (*FT2a*／*FT5a*) のネットワーク

A) *E3* または *E4* のいずれかを持ち *E1* または *e1-as* の感光性系統の場合、長日下では、PHYA によって発現が誘導された *E1* が *FT2a* と *FT5a* の発現を抑制するため開花は誘導されない。これらの系統が一定期間の短日に曝されると、開花が誘導され、日長が長日に転換された後でも開花が維持される。しかし、PHYA のコントロール下で作用する未知の因子 (Y) によって生殖生長が抑制され、PHYA ならびに *E1* の作用で発現が維持される *Dt1* (*TFL1b*) によって主茎の無限伸育性が維持される。B) *e3*/*e4* 型の非感光性系統では、PHYA の機能欠損により、長日条件下においても開花が誘導され、その後の生殖生長も進み、日長に左右されることなく種子が登熟し、SAM の栄養生長も止まる。C) *E1* 機能欠損型ならびに D) *e1-as*/*e3*/*E4* 型の非感光性系統では、長日下においても *E1* 遺伝子の機能欠損または未知の因子 (X) によって開花が誘導されるが、感光型 (A) 同様に、*E3* または *E4* の制御下で生殖生長が抑制される。一方、SAM の栄養生長性は、*E1* 機能欠損型に比べて *e1-as*/*e3*/*E4* 型で維持され、登熟に至るまでにより多くの節を形成する。*e1*、*e3* および *e4* は各々対応する遺伝子座の機能欠損対立遺伝子を表す。実線は誘導を、点線は抑制を示す。

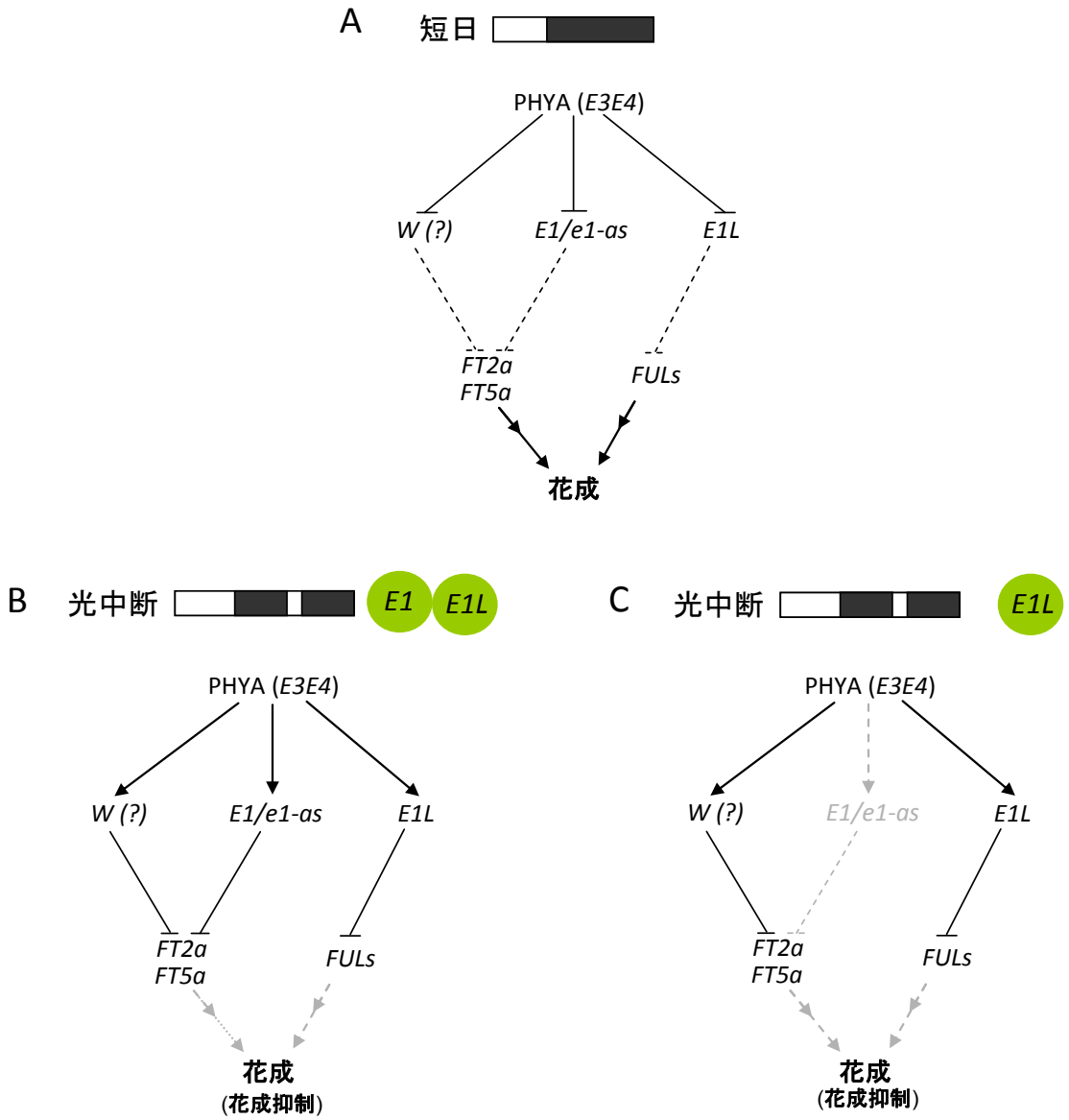

図 6-2. ダイズにおける光中断のシグナル伝達経路のモデル

A) 短日下で予想される開花経路。短日下では、開花抑制因子 (*W*、*E1/e1-as*、*E1L*) の発現が抑制され、*FT2a*、*FT5a* および *FUL* 遺伝子の発現誘導によって開花が促進する。B) PHYA が正常であり、*E1* 座が *E1* あるいは *e1-as* の場合、暗期中期の光中断により、*E1* 座の遺伝子、*E1L* ならびに未知の *W* 遺伝子の発現が誘導され、*E1* および *W* は *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制し、また *E1L* が *FUL* の発現を直接または間接的に抑制する。C) PHYA が正常であるが *E1* 機能欠損型のトヨムスメの場合、暗期中期の光中断により *E1L* および *W* の発現が誘導され、*W* が *FT2a* および *FT5a* の発現を、一方、*E1L* が *FUL* を抑制して開花を遅延させる。

摘　要

花成の時期は、植物種のローカルな、またグローバルな環境に対する適応を規定する重要な要素である。花成に影響を与える要因の中でも、日の長さ（日長）は、温度とともに花成を調節する主な環境要因である。ダイズは、一般に短日植物として捉えられるが、幅広い緯度の下で栽培される適応性の高い作物である。この広域適応性は、地域毎に適した開花特性をもたらす多様な遺伝的機構が支えている。特に、高緯度に適応した品種の多くは、感光性が低下または欠落している。本研究では、ダイズにおける感光性の分子遺伝学的機構の解明を目指して、開花前および開花後の光周期反応を制御する遺伝的機構の多様性、ならびに、ダイズの主要な感光性遺伝子 *E1* とそのホモログの感光性の制御機構における機能について検討を加えた。得られた結果を基に、ダイズにおける光中断の現象を説明する新たなモデルと、また、開花前ならびに開花後の光周期反応を説明する主要な開花遺伝子のネットワークを提案した。以下に、本研究で得られた結果を要約する。

第2章では、高緯度に位置する様々な地域から導入された非感光性品種・系統について、DNAマーカーを用いて感光性遺伝子座 (*E1*、*E2*、*E3* および *E4*) の遺伝子型を推定し、感光性遺伝子型と開花前および開花後の光周期反応との関係を解析した。塩基配列解析の結果、*E3* 座には新たな機能欠損遺伝子が見いだされ、供試系統は15の多遺伝子座遺伝子型に分類された。すなわち、ダイズにおいて、非感光性は、おもに *E1*、*E3* および *E4* 座の多様な対立遺伝子の組み合わせの結果として、独自にそして繰り返し選抜されてきた。これらの遺伝子型は、さらに対立遺伝子の機能に基づいて3つの遺伝子型グループ (*e3/e4* 型、*e1*/*E3*/*e4* または *e1*/*e3*/*E4* 型、*e1-as*/*e3*/*E4* 型) に大別することができた。その中でも、PHYA機能欠損型である *e3/e4* 型の頻度が最も高く、PHYA の機能欠損がダイズの非感光性をもたらす主要な遺伝子型であった。これに加えて、ダイズのフロリゲン遺伝子 (*FT2a* と *FT5a*) の抑制因子と考えられている *E1* の機能欠損と、これらの遺伝子とは異なる新規の非感光性遺伝子の関与が示唆された。光周期反応は、開花のみならず開花後の栄養および生殖生長にも影響を与えており、この反応にも *E3* および *E4* 遺伝子座が支配するPHYAが関与していた。さらに、同定された3つ遺伝子型グループは、開花後の主茎の生長や登熟

期など、開花後の栄養生長や生殖生長については異なった反応を示した。

第3章では、早生品種であるハロソイとトヨムスメならびにハロソイの非感光型 NIL を用いて短日と長日における開花遺伝子の発現解析を行い、発現様式の差異から、多様な感光性機構を特徴づけた。トヨムスメは *E1* が欠失した *e1-nl* 型である。ハロソイ (*e1-as* 型) では、短日で *E1* の発現が抑制され、*FT2a* と *FT5a* の発現が上昇して開花が誘導されるが、長日では PHYA の制御下で *E1* の発現が誘導され、*FT2a* と *FT5a* の発現を抑制する。一方、トヨムスメでは、*FT2a* の発現が短日においても非常に低く、一方で、*FT* の抑制因子の候補としての *COL1a* 遺伝子がハロソイに比べて強発現していた。*FT* の下流で機能する *FUL* のダイズオーソログについて発現解析を行った結果、トヨムスメでは、*FUL-05g* と *FUL-17g* の発現量が日長処理間で異ならなかった。これらの結果から、ハロソイの開花の光周性反応には PHYA-E1-FT 経路が開花誘導に関与するが、トヨムスメでは、*E1* が欠如しており、また *FT2a* の発現が強く抑制されていたことから、他の要因が開花誘導に関与していると考えられた。その候補として *FUL* 様遺伝子が挙げられた。

第4章では、*E1* と94%のアミノ酸相同性を示す2つのパラログ (*E1L-C1* および *E1L-G*) について、それらの機能を、リンゴ小球形潜在ウイルスを用いた PTGS により解析した。実験材料には、*E1* の効果を除くために、*E1* が欠失したトヨムスメを用いた。*E1L* のVIGS によりトヨムスメの開花が12日から15日早くなり、*E1L* の発現も有意に低下した。したがって、*E1L* も、*E1* 同様にダイズの開花早晩性を制御することが明らかとなった。*E1L* の発現低下に伴い、*FT2a* および *FT5a* の発現の上昇は認められず、一方で、*FUL* オーソログの多くの発現が有意に増加した、したがって、*E1L* は、*FUL* 様遺伝子の発現に影響を与えることによって開花を制御していると考えられた。

第5章では、ダイズの光中断に対する反応を、特徴的な発現様式を示す *E1* に着目して検討した。第3章の発現解析から、*E1* および *E1L* は、18時間の日長下では光点灯初期と消灯前に二つの発現ピークを持つ。しかし、この18時間明期の後半6時間を暗期に変えると第二の発現ピークが生起せず、さらに暗期後の明期への変換後における第一の発現ピーク

も誘起されなかった。一方、延長した6時間の暗期を明期に戻すと、第二の発現ピークが生起し、暗期後の第一の発現ピークも現れた。さらに、16時間暗期の光中断実験では、暗期中期に与えた光中断だけが *E1* および *E1L* の発現を誘起し、その結果 *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制し、供試系統の開花を遅延させたが、他の時間帯に与えた光中断の *E1* および *E1L* に及ぼす効果は認められなかった。このような光中断の効果は PHYA 機能欠損型である H-*e3/e4* では認められず、光中断に対する反応には PHYA が関与していた。ダイズにおいては、暗期の適切な時期 (E1/E1L 光誘導期) に与えられた光照射が PHYA を介して *E1* の発現を誘導し、*FT2a* や *FT5a* の発現を抑制することによって開花が遅延することが初めて明らかとなった。一方、*E1* が欠失しているトヨムスメにおいても光中断による開花遅延が認められた。この場合、*E1L* の発現誘導により *FUL* が発現抑制されているものと考えられ、第3章および第4章の結果を踏まえ、ダイズの感光性における *E1L* の役割、ならびに *FUL*様遺伝子の開花誘導への関与が示唆された。さらに、光中断実験ならびに日長変換実験から、*E1* および *E1L* の発現は、一日の特定の時間帯 (E1/E1L 光誘導期) に光を感受することが不可欠であり、暗期に与えた光照射が光誘導期からずれると *E1* ならびに *E1L* の発現が誘導されなかった。このような暗期の特定時間帯における光照射の重要性は、光周性反応に内生リズムが関与し、内生リズムが開花に促進的に作用する親明相と阻害的に作用する親暗相に区分され、どの相に外部から光が与えられるかによって開花が決定されるとした Bünning (1936) の考え (外的符号説) によく一致した。

第6章では、これらの実験結果から得られた知見を基に、ダイズにおける開花前ならびに開花後の光周期反応を説明する遺伝子ネットワークと、その多様性を考察した。さらに、古くから指摘されてきたダイズの感光性、特に光中断に対する反応性の分子機構について、*E1* 遺伝子の発現機作から新たなモデルを提案した。このようなダイズの感光性の遺伝的多様性と分子遺伝学的機構の理解は、ダイズの適応性や収量性を改良する育種に貢献する。

Summary

The time of flowering is an important factor for plants to adapt to local and global environments. Among the factors which effect flowering, day length has a central role on the control of flowering. Soybean is a short-day (SD) plants, but it exhibits a high adaptability over a wide range of latitudinal environments. This wide adaptability is provided by diverse genetic mechanisms for flowering; various genotypes have been selected for under different latitudinal environments. In particular, absent or weakened sensitivity to photoperiod is necessary for soybean to flower under long daylengths of summer in high-latitude environments. In this study, I tried to elucidate the diversity on molecular-genetic mechanisms of photoperiod sensitivity, and functions of major flowering loci (*E1*, *E2*, *E3* and *E4*) in pre- and post-flowering photoperiod sensitivity in soybean. First, I studied diverse molecular-genetic mechanisms underlying the control of photoperiod sensitivity by means of DNA marker and sequencing analyses, and expression analyses, and determined different post-flowering photoperiod responses among pre-flowering photoperiod-insensitive genotypes at the four flowering loci and a growth habit locus *Dt1*. I also studied the function of *E1,*which has the largest effect on flowering time in soybean, and its two paralogs in controlling photoperiod sensitivity. Based on the results obtained in this study, I proposed a new model to explain the mechanism of night break effect, and a gene regulatory network on pre-flowering and post-flowering photoperiod responses in soybean. The results obtained in this study are summarized as below.

In chapter 2, using allele-specific DNA markers, I estimated the genotypes at maturity and growth habit loci (*E1* to *E4,* and *Dt1*) in 53 photoperiod-insensitive accessions that were introduced from various geographic regions located at high latitudes. I found two novel dysfunctional alleles at the *E3* locus. Finally, I allocated the 53 accessions into 15 multi-locus genotypes. The photoperiod insensitivity in soybean may therefore have been generated repeatedly by combining independently-generated alleles at the *E1*, *E3*, and *E4* loci. Further, these genotypes were classified into three genotypic groups, based on functions of alleles at respective loci. Among them, the

double-recessive genotype at two *phytochrome A* (*phyA*) loci, *E3* and *E4*, was the most predominant, suggesting that the dysfunction of PHYA was a major mechanism which has brought the photoperiod insensitivity in soybean. The remaining two groups included the dysfunction of *E1*, a repressor for two soybean orthologs of *Arabidopsis FLOWERING LOCUS T* (*FT2a* and *FT5a*), and a control by a novel gene(s) that was different from the above three loci. Photoperiod further influenced not only pre-flowering growth, but also post-flowering vegetative and reproductive growths, such as reproductive period and stem growth after flowering, both of which were under the control of two *phyA* genes, *E3* and *E4*. The function of the two *phyA* genes on post-flowering growths was further confirmed by experiments under controlled environments with near-isogenic lines (NILs) for the *E3* and *E4* loci.

In chapter 3, I studied expression patterns for soybean orthologs of *Arabidopsis* flowering genes for early-flowering cultivars 'Toyomusume' and 'Harorosy', and a photoperiod-insensitive Harosoy NIL. 'Toyomusume' and 'Harosoy' possess dominant wild-type alleles at the *E3* and *E4* loci, but are different in the genotype at the *E1* locus; the former is homozygous for a dysfunctional allele *e1-nl* whereas the latter is homozygous for a hypomorphic allele *e1-as*. Both cultivars exhibited the photoperiod-sensitivity under an R-light-enriched LD condition, whereas under an FR-light-enriched LD condition, 'Toyomusume' did not show a flowering delay relative to the natural daylength condition with a daylength of 16.5 hours including a civil-twilight, suggesting that the *E1* gene was a main regulator in the photoperiod response to the FR-light-enriched LD condition. Both cultivars further differed in the expression pattern for *FT2a* and *FT5a*. In 'Harosoy', the two genes were up-regulated by SD, and inhibited by LD under the control of PHYA. In contrast, 'Toyomusume' produced a very low expression of *FT2a* under both SD and LD conditions, whereas some of the soybean orthologs for *Arabidopsis FRUITFUL* (*FUL*) and *CONSTANS* (*CO*) genes were highly up-regulated in 'Toyomusume' than in 'Harosoy'. The results obtained suggest that the two cultivars have different molecular mechanisms in controlling flowering; in 'Harosoy' flowering may be mainly controlled by a PHYA-E1-FT pathway, whereas in 'Toyomusume', in which the *E1* gene was deleted and the *FT2a* expression was strongly suppressed, other factors are most likely

involved in floral induction. The *FUL-like* genes were considered as more probable candidate genes to induce flowering in 'Toyomusume'.

In chapter 4, I applied a virus-induced gene silencing (VIGS) method with *Apple latent spherical virus* (ALSV) to a functional analysis for two *E1L* genes (*E1L-C1* and *E1L-G*). In order to evaluate their effects on flowering independently of the *E1* gene, 'Toyomusume' was used as an experimental material because it lacked the functional *E1* gene. The VIGS method successfully down-regulated the expression of two *E1L* genes, and promoted the flowering of 'Toyomusume' by 12 to 15 days compared with the flowering in untreated control plants. Similarly to *E1*, the *E1L* genes thus controlled time of flowering in soybean. However, differently from *E1*, up-regulations of the *FT2a* and *FT5a* expression were not observed, although transcript levels of most of the six *FUL-like* genes tested increased. Therefore, the *E1L* genes may be involved in the control of flowering through the regulation of *FUL-like* genes.

In chapter 5, I examined the response to night break of soybean by focusing on a characteristic expression pattern of *E1* and *E1L* genes, which was revealed by the expression analysis in chapter 3. A diurnal expression of *E1* and *E1L* genes showed two expression peaks, one after dawn and the other at evening, under the LD condition. When the daytime of the last 6 hours of 18-hour light was substituted by darkness, however, the second peak and further even the first peak after the dawn of the next day did not appear. The two peaks of expression reappeared after converting the darkness to the daytime three days later. The night break experiments further indicated that, when given at the middle of the 16-h night, a two-hour light illumination induced the expression of *E1* and *E1L* genes to suppress the expression of *FT2a* and *FT5a* and delay flowering. This effect of night break on the *E1* and *E1L* expressions was observed neither when the light illumination was given at the other times nor under the dysfunction of PHYA. Therefore, the light illumination given at an appropriate time during night induced the expression of *E1* and *E1L* genes under the regulation of PHYA, which consequently suppressed the expression of *FT2a* and *FT5a* to delay flowering. The flowering delay by night break was also observed in 'Toyomusume', which lacked the *E1* gene

itself; in this case, the expression of *FT2a* and *FUL-like* genes was suppressed. As indicated in chapter 4, the *E1L* genes may be involved in the photoperiod responses of soybean possibly through the regulation of *FUL-like* genes. The flowering delay observed in 'Toyomusume' may thus be partly attributable to the down-regulation of *FUL-like* genes that was caused by the induction of *E1L* gene expression. In addition, the night break and daylength-conversion experiments suggest that light at a specific time is indispensable to induce expression of *E1* and *E1L* genes. The results obtained in this study is thus in good agreement with the idea of Bünning (1936), known as the external coincidence model. The light-induced *E1*/*E1L* gene expressions may be a major cause of night break response in soybean.

In chapter 6, based on the findings obtained in this study, I summarized as a gene network on pre-flowering and post-flowering photoperiod responses in soybean and discussed their diverse mechanisms. In addition, I proposed a new molecular model to account for night-break responses of soybean. Understanding of the molecular genetic mechanisms and genetic diversity of the photoperiod sensitivity may undoubtedly contribute to the breeding for improvement of yield and adaptability in soybean.

引用文献

Abe J, Xu DH, Miyano A, Komatsu K, Kanazawa A, Shimamoto Y: **Photoperiod-insensitive Japanese soybean landraces differ at two maturity loci**. *Crop Sci* 2003, 43:1300–1304.

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

Bernard RL: **Two genes for time of flowering in soybeans**. *Crop Sci* 1971, 11:242-244.

Bernard RL: **Two genes affecting stem termination in soybean**. *Crop Sci* 1972, 12:235-239.

Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW: **The reaction controlling floral innitiation**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952, 38:929-934.

Bünning E: **Die endonome Tagesperiodik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion**. *Ber Deut Bot Ges* 1936, 54:590-607. *

Bünning E: **Circadian rhythms, light, and photoperiodism: a reevaluation**. *Bot Mag Tokyo* 1979, 92:89-103.

Buzzell RI: **Inheritance of a soybean flowering response to fluorescent-daylength conditions**. *Can J Genet Cytol* 1971, 13:703–707.

Buzzell RI, Voldeng HD: **Inheritance of insensitivity to long day length**. *Soybean Genet Newsl* 1980, 7:26–29.

Casal JJ, Sanchez RA, Yanovsky MJ: **The function of phytochrome A**. *Plant, Cell and Environ* 1997, 20:813-819.

Cheng L, Wang Y, Zhang C, Wu C, Xu J, Zhu H, Leng J, Bai Y, Guan R, Hou W, Zhang L, Han T: **Genetic analysis and QTL detection of reproductive period and post-flowering photoperiod responses in soybean**. *Theor Appl Genet* 2011, 123:421-429.

Cober ER, Tanner JW, Voldeng HD: **Genetic control of photoperiod response in early-maturing near-isogenic soybean lines**. *Crop Sci* 1996a, 36:601–605.

Cober ER, Tanner JW, Voldeng HD: **Soybean photoperiod-sensitivity loci respond differentially to light quality**. *Crop Sci* 1996b, 36:606–610.

Cober ER, Stewart DW, Voldeng HD: **Photoperiod and temperature responses in early-maturing, near-isogenic soybean lines**. *Crop Sci* 2001, 41:721–727.

Cober ER, Voldeng HD: **A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1* and *T***. *Crop Sci* 2001a, 41:698–701.

Cober ER, Voldeng HD: **Low R:FR light quality delays flowering of *E7E7* soybean lines**. *Crop Sci* 2001b, 41:1823–1826.

Cober ER, Molnar SJ, Charette M, Voldeng HD: **A new locus for early maturity in soybean**. *Crop Sci* 2010, 50:524-527.

Coulter MW, Hamner KC: **Photoperiodic Flowering Response of Biloxi Soybean in 72-Hour Cycles**. *Plant Physiol* 1964, 39:848-856.

Danilevskaya ON, Meng X, Selinger DA, Deschamps S, Hermon P, Vansant G, Gupta R, Ananiev EV, Muszynski MG: **Involvement of the MADS-box gene ZMM4 in floral induction and inflorescence development in maize**. *Plant Physiol* 2008, 147:2054–2069.

Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F: **TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals**. *Plant Physiol* 2003, 132:1849–1860.

Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A: ***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* 2004, 18:926-936.

Doyle JJ, Doyle JL: **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus* 1990, 12:13–15.

Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS: **Stage of development description for soybeans, Glycine max (L.) Merrill**. *Crop Sci* 1971, 11:929–931.

Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF: **Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER**. *Development* 2000, 127:725–734.

Fornara F, Parenicova L, Falasca G, Pelucchi N, Masiero S, Ciannamea S, Lopez-Dee Z, Altamura MM, Colombo L, Kater MM: **Functional characterization of OsMADS18, a member of the AP1/SQUA subfamily of MADS box genes**. *Plant Physiol* 2004, 135:2207–2219.

Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J: **GIGANTEA: a circadian clockcontrolled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains**.

EMBO J 1999, 18:4679–4688.

Franklin KA, Allen T, Whitelam GC: **Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor**. *Plant J* 2007, 50:108–117.

Franklin KA, Whitelam GC: **Phytochrome A function in red light sensing**. *Plant Signal Behav* 2007, 2:383-385.

Githiri SM, Yang D, Khan NA, Xu D, Komatsuda T, Takahashi R: **QTL analysis of low temperature induced browning in soybean seed coats**. *J Hered* 2007, 98:360-366.

Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, Martienssen R: **The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development**. *Development* 1998, 125:1509–1517.

Hamner KC, Takimoto A: **Circadian rhythms and plant photoperiodism**. *Am Nat* 1964, 98: 295-322. *

Han T, Wu C, Tong Z, Mentreddy RS, Tan K, Gai J: **Postflowering photoperiod regulates vegetative growth and reproductive development of soybean**. *Env Exp Bot* 2006, 55:120-129.

Harada K, Watanabe S, Xia Z, Tsubokura Y, Yamanaka N, Anai T: **Positional cloning of the responsible genes for maturity Loci *E1*, *E2* and *E3* in soybean.** In Soybean - Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement, 2011.ISBN:978-953-307-721-5.

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

Hayama R, Coupland G: **Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering**. *Curr Opin Plant Biol* 2003, 6:13-19.

Hayama R, Agashe B, Luley E, King R, Coupland G: **A circadian rhythm set by dusk determines the expression of FT homologs and the short-day photoperiodic flowering response in Pharbitis**. *Plant Cell* 2007, 19:2988-3000.

Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O: **The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering**. *Science* 2005, 309:1694-1696.

Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, Takahashi Y, Sugawara E, Tamura A, Yaegashi H, Yamagishi N, Takahashi T, Isogai M, Takahashi H, Yoshikawa N: **Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes.** *Virology* 2009, 386:407–416.

Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA: **FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis**. *Nature* 2003, 426:302-306.

Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA: **FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis**. *Science* 2005, 309:293-297.

Imaizumi T: **Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location**. *Curr Opin Plant Biol* 2010, 13:83-89.

Ishikawa R, Tamaki S, Yokoi S, Inagaki N, Shinomura T, Takano M, Shimamoto K: **Suppression of the Floral Activator Hd3a Is the Principal Cause of the Night Break Effect in Rice**. *Plant Cell* 2005, 17:3326-3336.

石川 亮、横井修司、島本 功。**光中断実験から光周性による開花の分子機構に迫る**。蛋白質 核酸 酵素 2006、51:933-942。

Ishikawa R, Shinomura T, Takano M, Shimamoto K: **Phytochrome dependent quantitative control of Hd3a transcription is the basis of the night break effect in rice flowering**. *Genes Genet Syst* 2009, 84:179-184.

Itoh H, Nonoue Y, Yano M, Izawa T: **A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice**. *Nat Genet* 2010, 42:635-638.

Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K: **Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice**. *Genes Dev* 2002, 16:2006-2020.

Jiang Y, Wu C, Zhang L, Hu P, Hou W, Han T: **Long-day effects on the terminal inflorescence development of a photoperiod-sensitive soybean [Glycine max (L.) Merr.] variety**. *Plant Sci* 2010, 180:504-510.

Jung JH, Ju Y, Seo PJ, Lee JH, Park CM: **The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis**. *Plant J* 2012, 69:577-588.

Kantolic AG, Slafer GA: **Development and seed number in indeterminate soybean as affected by timing and duration of exposure to long photoperiods after flowering**. *Ann Bot* 2007, 99: 925-933.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D: **Activation tagging of the floral inducer FT**. *Science* 1999, 286:1962-1965.

Kilen TG and Hartwig EE: **Inheritance of a light-quality sensitive character in soybeans**. *Crop Sci* 1971, 11:559–561.

Kinjo H, Shitsukawa N, Takumi S, Murai K: **Diversification of three APETALA1/FRUITFULL-like genes in wheat**. *Mol Genet Genomics* 2012, 287:283-294.

Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T: **A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals**. *Science* 1999, 286:1960-1962.

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

Komatsu K, Hwang TY, Takahashi M, Sayama T, Funatsuki H, Oki N, Ishimoto M: **Identification of QTL controlling post-flowering period in soybean**. *Breed Sci* 2012, 61:646-652.

Komiya R, Yokoi S, Shimamoto K: **A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice**. *Development* 2009, 136:3443–3450.

Kong F, Liu B, Xia Z, Sato S, Kim BM, Watanabe S, Yamada T, Tabata S, Kanazawa A, Harada K, Abe J: **Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean**. *Plant Physiol* 2010, 154:1220-1231.

Lee SH, Bailey MA, Mian MAR, Shipe ER, Ashley DA, Parrot PW, Hussey RS, Boerma HR: **Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging, and maturity in a soybean population segregating for growth habit**. *Theor Appl Genet* 1996, 92:516-523.

LeeYS, Jeong DH, Lee DY, Yi J, Ryu CH, Kim SL, Jeong HJ, Choi SC, Jin P, Yang J, Cho LH, Choi

H, An G: ***OsCOL4*** **is a constitutive flowering repressor upstream of** ***Ehd1*** **and downstream of** ***OsphyB***. *Plant Journal* 2010, 63:18-30.

Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS, Yanofsky MF: **Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate**. *Plant Cell* 1999, 11:1007-1018.

Liu B, Abe J: **QTL Mapping for photoperiod-insensitivity of a Japanese soybean landrace Sakamotowase**. *J Hered* 2010, 101:251–256.

Liu B, Kanazawa A, Matsumura H, Takahashi R, Harada K, Abe J: **Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of phytochrome A gene**. *Genetics* 2008, 180:996–1007.

Liu B, Watanabe S, Uchiyama T, Kong F, Kanazawa A, Xia Z, Nagamatsu A, Arai M, Yamada T, Kitamura K, Masuta C, Harada K, Abe J: **The soybean stem growth habit gene** ***Dt1*** **is an ortholog of Arabidopsis** ***TERMINAL FLOWER 1***. *Plant Physiol* 2010, 153:198–210.

Liu J, Yu J, McIntosh L, Kende H, Zeevaart JA: **Isolation of a CONSTANS ortholog from Pharbitis nil and its role in flowering**. *Plant Physiol* 2001, 125:1821-1830.

Mandel MA, Yanofsky MF: **The Arabidopsis AGL8 MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by APETALA1**. *Plant Cell* 1995, 7:1763–1771.

McBlain BA, Hesketh JD, Bernard RL: **Genetic effect on reproductive phenology in soybean isolines differing in maturity genes**. *Can J Plant Sci* 1987, 67:105-116.

Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beeckman T: **Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana**. *Nat Genet* 2008, 40:1489–1492.

Murai K, Miyamae M, Kato H, Takumi S, Ogihara Y: **WAP1, a wheat APETALA1 homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth**. *Plant Cell Physiol* 2003, 44:1255–1265.

Neff MM, Chory J: **Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development**. *Plant Physiol* 1998, 118: 27–35.

Ng M, Yanofsky MF: **Function and evolution of the plant MADS-box gene family**. *Nat Rev Genet* 2001, 2:186–195.

Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG: **Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis GIGANTEA gene**. *Science* 1999, 285:1579-1582.

Pittendrigh CS, Minis DH: **The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks.** *Amer Natur* 1964, 98:261-294.*

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

Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES: **Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis**. *Development* 1999, 126:1109-1120.

Riechmann JL, Meyerowitz EM: **MADS domain proteins in plant development**. *Biol Chem* 1997, 378:1079–1101.

Sablowski R: **Flowering and determinacy in Arabidopsis**. *J Exp Bot* 2007, 58:899-907.

Saindon G, Beversdorf WD, Voldeng HD: **Adjusting of the soybean phenology using the *E4* loci**. *Crop Sci* 1989a, 29:1361-1365.

Saindon G, Voldeng HD, Beversdorf WD, Buzzel RIl: **Genetic control of long daylength response in soybean**. *Crop Sci* 1989b, 29:1436-1439.

Sasani S, Hemming MN, Oliver S, Greenup A, Tavakkol-Afshari R, Mahfoozi S, Poustini K, Sharifi HR, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B: **The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (Hordeum vulgare)**. *J Exp Bot* 2009, 60:2169–2178.

Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T: **FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis**. *Science* 2007, 318:261-265.

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU: **A gene expression map of Arabidopsis thaliana development**. *Nat Genet* 2005, 37:501–506.

Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H: **Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in Antirrhinum majus**. *Science* 1990, 250:931-936.

Shimamoto and Yokoi: In "**Light Sensing in plants**", ed. by Wada M. Shimazaki K. Iino M. Springer and Bot. Soc. Japan, 2005, p.339-346.

Shitsukawa N, Ikari C, Shimada S, Kitagawa S, Sakamoto K, Saito H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T, Takumi S, Nasuda S, Murai K: **The einkorn wheat (Triticum monococcum) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the VRN1 gene**. *Genes Genet Syst* 2007, 82:167–170.

Shore P and Sharrocks AD: **The MADS-box family of transcription factors**. *Eur J Biochem* 1995, 229:1-13.

Simpson GG, Dean C: **Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?** *Science* 2002, 296: 285-289.

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

Sun H, Jia Z, Cao D, Jiang B, Wu C, Hou W, Liu Y, Fei Z, Zhao D, Han T: **GmFT2a, a soybean homolog of FLOWERING LOCUS T, is involved in flowering transition and maintenance**. *PloS One* 2011, 6:e29238.

Takahashi R, Abe J: **Soybean maturity genes associated with seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures**. *Crop Sci* 1999, 39:1657-1662.

Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M: **Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants**. *Plant Cell* 2001, 13:521–534.

Takano M, Inagaki N, Xie X, Yuzurihara N, Hihara F, Ishizuka T, Yano M, Nishimura M, Miyao A, Hirochika H, Shinomura T: **Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C**

in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* 2005, 17:3311–3325.

田澤 仁：**マメから生まれた生物時計**。学会出版センター 2009。

Thakare D, Kumudini S, Dinkins RD: **Expression of flowering-time genes in soybean E1 near-isogenic lines under short and long day conditions**. *Planta* 2010, 231:951-963.

Thakare D, Kumudini S, Dinkins RD: **The alleles at the E1 locus impact the expression pattern of two soybean FT-like genes shown to induce flowering in Arabidopsis**. *Planta* 2011, 234:933-943.

Theißen G: **Development of floral organ identity: stories from the MADS house**. *Curr Opin Plant Biol* 2001, 4:75–85.

Thomas B, Vince-Prue D: **Photoperiodism in plants**. *Academi Press, San Diego*1997.

Tian Z, Wang X, Lee R, Li Y, Specht JE, Nelson RL, McClean PE, Qiu L, Ma J: **Artificial selection for determinate growth habit in soybean**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:8563–8568.

Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C, Belachew A, Repetti PP, Reuber TL, Ratcliffe OJ: **The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element**. *New phytol* 2010, 187:57-66.

Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES: **MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:13099–13104.

Tsubokura Y, Matsumura H, Xu M, Nakashima H, Liu B, Anai T, Kong F, Yuan X, Kanamori H,

Katayose Y, Takahash R, Harada K, Abe J: **Genetic variation in soybean at the maturity locus *E4* is involved in adaptation to long days at high latitudes**. *Agronomy* 2013, 3:117-134.

Upadhyay AP, Ellis RH, Summerfield RJ, Roberts EH, Qi A: **Characterization of photothermal flowering responses in maturity isolines of soybean (Glycine (L.) Merrill) cv. Clark**. *Ann Bot* 1994, 74:87–96.

Valverde F: **CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering**. *J Exp Bot* 2011, 62:2453-2463.

Wang JW, Czech B, Weigel D: **miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana**. *Cell* 2009, 138:738-749.

Watanabe S, Harada K, Abe J: **Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean**. *Breed Sci* 2012, 61:531-543.

Watanabe S, Hideshima R, Xia Z, Tsubokura Y, Sato S, Nakamoto Y, Yamanaka N, Takahashi R, Ishimoto M, Anai T, Tabata S, Harada K: **Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3***. *Genetics* 2009, 182:1251–1262.

Watanabe S, Tajuddin T, Yamanaka N, Hayashi M, Harada K: **Analysis of QTLs for reproductive development and seed quality traits in soybean using recombinant inbred lines**. *Breed Sci* 2004, 54:399-407.

Watanabe S, Xia Z, Hideshima R, Tsubokura Y, Sato S, Harada K: **A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering**. *Genetics* 2011, 188:395-407.

Weller JL, Murfet IC, Reid JB: **Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in day-length detection**. *Plant Physiol* 1997, 114:1225–1236.

Weller JL, Beauchamp N, Kerckhoffs LH, Platten JD, Reid JB: **Interaction of phytochromes A and B in the control of de-etiolation and flowering in pea**. *Plant J* 2001, 26:283–294.

Wellmer F, Riechmann JL: **Gene networks controlling the initiation of flower development**. *Trends Genet* 2010, 26:519-527.

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D: **Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis**. *Science* 2005, 309:1056-1059.

Xia Z, Watanabe S, Yamada T, Tsubokura Y, Nakashima H, Zhai H, Anai T, Sato S, Yamazaki T, Lü S, Wu H, Tabata S, Harada K: **Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109:E2155-2164.

Xue W, Xing Y, Weng X, Zhao Y, Tang W, Wang L, Zhou H, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q: **Natural variation in *Gdh7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice**. *Nature Genetics* 2008:761-767.

Yamagishi N and Yoshikawa N: **Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors**. *Plant Mol Biol* 2009, 71:15-24.

Yamagishi N, Yoshikawa N: **Expression of FLOWERING LOCUS T from Arabidopsis thaliana induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit**.

Planta 2011, 233:561–568.

Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D: **The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1**. *Dev Cell* 2009, 17:268-278.

Yamamoto T, Kuboki Y, Lin SY, Sasaki T, Yano M: **Fine mapping of quantitative trait loci, Hd-1, Hd-2 and Hd-3, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors**. *Theor Appl Genet* 1998, 97:37–44.

Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J: **Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:6263–6268.

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T: **Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis floweringtime gene CONSTANS**. *Plant Cell* 2000, 12:2473-2484.

Yanovsky MJ, Kay SA: **Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis.** *Nature* 2002, 419:308-312.

Yanovsky MJ, Kay SA: **Living by the calendar: how plants know when to flower**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:265–275.

Zhang WK, Wang YJ, Luo GZ, Zhang JS, He CY, Wu XL, Gai JY, Chen SY: **QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (Glycine max L. Merr.) genetic map and their association with EST markers**. *Theor Appl Genet* 2004, 108:1131-1139.

*：田澤 (2009) から引用した。

付表 1 本研究で用いた試薬の組成

★ RNA 抽出バッファー

10 mM Tris-HCI (pH7.5)、1 mM EDTA (pH8.0)、100 mM NaCI、1% SDS

上記溶液を調製後、0.45 μm のフィルターにてろ過滅菌した。

★ LMW RNA 抽出バッファー

100 mM Tris-HCl (pH8.8)、20 mM EDTA (pH8.0)、200 mM NaCl、4% N-lauryl sarcosine

上記溶液を調製後、0.45 μm のフィルターで 50 ml チューブにろ過滅菌した。

★ 20% PEG 溶液

2 M NaCl、20% polyethylene glycol (PEG8,000)

上記溶液を調製後、ろ過滅菌した。

★ アクリルアミド溶液

14.3% acrylamide、0.75% N-N′-methylenebisacrylamide、44.5 mM Tris、

44.5 mM boric acid、1 mM EDTA (pH8.0)、7 M urea

★ 4×サンプルバッファー

178 mM Tris base、178 mM boric acid、4 mM EDTA (pH8.0)、0.1% BPB、40 % sucrose

上記溶液を調製後、0.45 μm フィルターにてろ過滅菌した。

★ 10×TBE

Tris 890 mM、ホウ酸 890 mM、20 mM EDTA(pH8.0)

上記試薬を調製後、オートクレーブ滅菌した。

★ 20×SSC

3 M NaCl、0.3 M クエン酸三ナトリウム

上記溶液を調製後、オートクレーブ滅菌した。

★ マレイン酸バッファー

100 mM maleic acid、150 mM NaCl

NaOH で pH7.5 に調製した後、オートクレーブ滅菌した。

★ 10% Blocking Reagent

終濃度 10%になるように Blocking Reagent (Roche)をマレイン酸バッファーに溶解した後、オートクレーブ滅菌した。

★ 1 M Pi バッファー

1 M Na_2HPO_4

H_3PO_4 で pH7.0 に調製した後、オートクレーブ滅菌した。

★ ハイブリダイゼーションバッファー

50% formamide、7% SDS、1% N-lauryl sarcosine、2% Blocking Reagent、50 mM Pi-buffer、5×SSC

★ 洗浄溶液

2×SSC、0.1% SDS

★ ブロッキング溶液

マレイン酸バッファーに 10%Blocking Reagent を終濃度 1%になるように添加した。

★ AP バッファー

100 mM Tris、100 mM NaCl、10 mM $MgCl_2$

HCl で pH9.5 に調製した後、オートクレーブ滅菌した。

謝辞

本研究を進行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻及び校閲を賜りました主査の北海道大学大学院農学研究院の阿部純教授、副査の北海道大学大学院農学研究院の山田哲也講師、金澤章准教授、貴島祐治教授に心より感謝いたします。阿部純教授には指導教官として博士課程から3年間に渡り、研究全般において始終温かくご指導と適切なご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。山田哲也講師、金澤章准教授には研究全般で適切なご助言とご指導を頂き大変お世話になりました。心より感謝申しあげます。また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました貴島祐治教授に深謝致します。

岩手大学農学部の吉川信幸教授ならびに山岸紀子博士には ALSV を用いた VIGS についてご指導を賜りました。佐賀大学農学部の穴井豊昭准教授、渡邊哲史講師には本研究の進行に適宜ご指導を賜りました。中国科学院東北地理与農業生態研究所の劉宝輝博士、孔凡江博士、夏正俊博士、袁暁輝博士からもご指導賜りました。心より感謝いたします。

植物遺伝資源学 研究員の佐藤雅子さん、研究補助員の橘井康子さん、西辻邦子さん、植物遺伝資源学の竹島亮馬君、ザオチェンさん、原細胞工学の河西めぐみさんには実験に多くの協力を頂きました。北海道大学大学院農学研究院の王秀峰准教授、植物遺伝資源学事務員の奥山久三江さん、植物遺伝資源学の学生、研究補助員、細胞工学と植物病原学の皆様、友人の皆様方には研究の遂行と大学院生活の面でいろいろお世話になりました。この場を借りて感謝申しあげます。最後に、精神的支援と激励で温かく支えてくれた家族に心から感謝します。

平成25年6月20日

徐美兰