



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イネ科植物におけるシーケンス情報からみた自然変異と作物育種への利用
Author(s)	長野, 宏則
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7150号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7150
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85785
Type	doctoral thesis
File Information	NAGANO_Hironori.pdf



イネ科植物におけるシーケンス情報からみた
自然変異と作物育種への利用

**(Natural variations from sequence information in the family Poaceae,
and their utilization for crop breeding)**

北海道大学大学院環境科学院

長 野 宏 則

学位論文

イネ科植物におけるシークエンス情報からみた 自然変異と作物育種への利用

**(Natural variations from sequence information in the family Poaceae,
and their utilization for crop breeding)**

長 野 宏 則

NAGANO Hironori

2021

目次

第1章	序論	1
第2章	イネ半矮性遺伝子 <i>Sd1</i>	10
第3章	ススキ開花遺伝子 <i>MsiHd1</i>	36
第4章	イネゲノムの遺伝子間領域	56
第5章	総合考察	73
要旨		80
Summary.....		85
引用文献		90
謝辞.....		116

第1章 序論

地質学データの1つに、「空気の化石」とも言うべき南極などの氷床コア分析がある。氷床中に閉じ込められた大気組成を知ることのできる氷床コアの分析データは、過去数十万年間の長期にわたる気候変動を解明し、氷期と間氷期が約10万年間隔で繰り返されてきた事実を明らかにしている。この周期的な気温変動の原因には、ミランコビッチサイクルと呼ばれる、地球の公転楕円軌道、地軸の傾き、および自転軸の向きの三要素によって生ずる、2万年から10万年周期の日射量変動が密接に関わっている。およそ38億年前に生命が誕生して以来、地球は人類の経済活動とは関わりなく寒冷期と温暖期を繰り返してきた。しかしながら、18世紀後半の産業革命以降、化石燃料の消費により過去数十万年間になかったほどの気温上昇が起きていることが氷床コアの分析から分かってきた。このような状況の中、2021年度のノーベル物理学賞は、初めて気象や気候の研究分野を対象に贈られた。二酸化炭素濃度(CO₂)の上昇が地球温暖化に影響するという気候モデルを世界に先駆けて発表した功績から、米国プリンストン大学の真鍋淑郎氏が、ドイツとイタリアの二名の研究者とともに受賞した。大気中のCO₂が増えると地表温度が上がることを1960年代にコンピューターによる計算結果で示すことを考案し、地球温暖化という複雑な気象現象を科学的にシミュレーション予測できるようになった。2021年8月に行われた気候変

動に関する政府間パネル（IPCC）は第 6 次評価報告書の中で、「人類の影響が大気、海洋および陸域を温暖化させてきたことには疑う余地はない。大気、海洋、雪氷圏および生物圏において、広範囲かつ急速な変化が現れている」ことが述べられ（<https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>）、地球温暖化の要因が人類の活動にあることは明白だと断言した。これまでの IPCC の表現は、「可能性が非常に高い(第 4 次 2007 年)」、「可能性が極めて高い(第 5 次 2013 年)」と変遷しており、今回は最も強い表現となる、「疑う余地がない (2021 年)」と発言するに至った。19 世紀末以降、地球全体の平均気温は 0.3 から 0.6℃、海面は 10 から 25 cm 上昇しており、このまま何も対策をせず温室効果ガスを排出し続けると、2100 年の平均気温は産業革命前に比べ約 2℃上昇すると予測されている。

今から約 2 万 1000 年前の最終氷期（寒冷期）から次の間氷期（温暖期）に移行する約 1 万年間において平均気温は 4～7℃上昇しているが、20 世紀後半の気温上昇速度はその約 10 倍も速くなっている。温暖化と寒冷化は地球史の中で幾度も繰り返されてきたことだが、現在私達が直面している温暖化は、過去のものとは区別して考えなければならない状況となってきている。温暖化対策には大きく 2 つの方針があり、1 つは「緩和」でもう 1 つは「適応」である。緩和は、温室効果ガスを減らして地球温暖化を抑制することであり、省エネルギー政策や植林などのことを指す。一方、適応は、温暖化がある程度進んだとしても被害を

最小限に留めるために備える対策を言う。日本政府は 2018 年 12 月 1 日から「気候変動適応法」という新しい法律を施行した。この法律により、我が国における適応策の法的位置づけが明確化され、国、地方公共団体、事業者、国民が連携・協力して適応策を推進するための法的仕組みが整備された。農業などの産業から国民生活、防災など、その対象分野は幅広く、各自治体は指針に基づきながら地域の適応計画の整備を行い、企業または個人においても適応に努めるよう求められている。例として、自治体における地域の特産物の品種改良が挙げられる。異常気象による連日の猛暑や寒波、風水害などは多くの農作物にダメージを与え、今後は高温に適した品種、干ばつに強い品種などを開発することが必要になる。近年は年平均気温が高温の年に、イネを食害するニカメイガ (*Chilo suppressalis* Walker) の発蛾最盛期の予測が困難となっており、その都度、防除適期の変更を余儀なくされている。ニカメイガは北海道から沖縄まで日本全土に分布し (Hachiya 1981; Nozato 1982)、和名のニカメイガ (二化螟蛾) は日本の多くの地域で 2 化、すなわち年に 2 世代発生することから名付けられている。しかしながら、2060 年代には日本の多くの地域で 3 化、更には 4 化するシミュレーション予測がなされており (Yamamura 2001)、ニカメイガの他、農作物に影響を及ぼす害虫のツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps* Uhler) やヒメトビウンカ (*Lodelphax striatellus* Fallen) なども含め注視していく必要がある。

る。昆虫類の生態系の変化は、これまで予想しなかった病虫害が作物に広がる恐れも考えられるため、今後、耐虫性や耐病性を備えた品種の開発も地球温暖化に対する適応対策の1つとして必要不可欠である。

国連の発表によると、急激に伸び続ける世界人口は2021年の時点で約78億人と推計されており、2050年には97億人に達するとの見方を示した。人口のピークは2100年頃の110億人と考えられており、今世紀中の増加傾向に収まる気配はない。人類はその誕生から20万年の歴史のほとんどを飢餓と戦ってきたが、石器や土器の道具を生み出し、農耕・牧畜による定住生活を経て人口を徐々に拡大させてきた。そして18世紀半ばまで数億人だった人口は18世紀の後半に急激に伸び始めた。それは水力・風力など自然エネルギーに代わり、化石燃料を利用し始めた産業革命の時期に重なる。20世紀半ばに25億人を超えた時は、穀物の品種改良や化学肥料の大量投入などの農業革命を起こして人口爆発による飢餓問題に対処できた。これは後に「緑の革命」と呼ばれ(Davies 2003)、1940年代から1960年代にかけて、高収量品種の育成と導入、化学肥料、灌漑設備、農業機械の技術革新などにより急激な食糧増産を達成した農業革命の1つである。この一連の戦略を主導した米国の農学者ノーマン・ボーローグは1970年にノーベル平和賞を授与された。緑の革命の代表的な品種改良に、メキシコで取り組まれたコムギ(*Triticum aestivum* (L.) Thell.)の品種‘Sonora64’などの

例がある。このコムギ品種の育成には日本の半矮性コムギ在来種‘達磨’が大きく貢献した。‘達磨’は半矮性遺伝子 *Rht-B1b* と *Rht-D1b* を保持し、ジベレリンのシグナル伝達を阻害することで半矮性形質をもたらす (Peng et al. 1999)。

この遺伝子を持たない通常のコムギの場合、大量の窒素肥料の投入は草丈が伸び過ぎて倒伏するのに対し、半矮性品種は肥料を効率よく増収へとつなげる。岩手県の稲塚権次郎は在来種の‘達磨’とアメリカコムギの‘Glassy Fultz’、更にトルココムギの‘Turkeyred’との交配を経て、1935年に‘農林10号’を生み出した (Noda 1986) 。

‘農林10号’は戦後、海を渡り、ボーローグによるコムギ高収量新品種群育成の母本として使用された。この新品種群の栽培導入によってメキシコは、1944年から1964年のおよそ20年間で、コムギの生産量が約6倍に増え、コムギの輸入国から輸出国への転換を果たした (Fujimaki 2000) 。

この成功により、半矮性品種と大量の化学肥料を組み合わせる増産をもたらすアイデアは、直ぐにアジア地域におけるイネ (*Oryza sativa* L.) の品種改良にも導入された。インディカ (*O. sativa* L. ssp. *indica*) 品種‘低脚烏尖’に由来する半矮性遺伝子 *sd1* のアリルはイネ第1染色体に座乗する (Maeda et al. 1997; Murai et al. 2003) 。

このアリルは多肥栽培に適した高収量インディカ品種を育成するために積極的に用いられ、‘IR8’、‘IR36’および‘IR72’のような東南アジアのほとんど全ての品種が持っている (De Datta et al. 1968; Peng et al.

1999)。 *Sd1* はジベレリン生合成経路の後期段階を触媒する GA20 オキシダーゼ (*OsGA20ox-2*) をコードする。‘低脚烏尖’ の場合、 *sd1* 遺伝子のエキソン 1 とエキソン 2 を含む領域に 383 bp の欠失があり、酵素機能を失っている (Ashikari et al. 2002; Monna et al. 2002; Spielmeier et al. 2002)。 イネのジャポニカ系統 (*O. sativa ssp. japonica*) においては、主なものに ‘十石’ (Kikuchi et al. 1985)、 ‘Calrose76’ (Mackill and Rutger 1979)、 ‘レイメイ’ (Futsuhara 1968) があり、それぞれエキソン 1、 2、 3 上の一塩基非同義置換により半矮性形質を生じる。これらの半矮性アレルは、日本の東北地方 (Toriyama et al. 1967; Yamazaki et al. 1987) や九州 (Okada et al. 1967)、 およびカルフォルニア (Rutger 1983; McKenzie et al. 1994) において優秀な短稈ジャポニカ品種を育成するために利用された。イネの緑の革命後も様々な国から半矮性系統がリリースされたにも関わらず、いずれの系統も現在まで、農業上有用な半矮性系統は第 1 染色体長腕上の *Sd1* 座に生じたアレルに集約されている。その理由の 1 つには、稈長、節間長の短縮の手段、草型改良および穂数増加効果などの有利な特徴を *sd1* 変異体が有することが指摘されている (Koshio et al. 2000)。また、Murai ら (2004) はジャポニカ品種 ‘台中 65 号’ の遺伝的背景を用いて、‘低脚烏尖’ の *sd1* アレルが耐倒伏性を増強する効果に関わる主要な 2 つの要因が、第 4 節間から穂首までの長さの減少と、第 4 節間強度の増加であることを報告してい

る。*sd1* の機能欠失による生育上の影響範囲が第 4 節間に限定されていることが、生産性へのデメリットを最小限に留めているのかもしれない。一方で、これまで人類の食料生産に利用されてこなかった空気中の大量の窒素が、20 世紀初めのアンモニアの人工合成の成功以降、様々な環境問題を引き起こしている。農地に散布された窒素肥料由来の硝酸態窒素が地下水や河川へ大量に流出することによる水質の富栄養化が進んでいる。そして、飢餓問題は時代が下った現代においてもアジアやアフリカの地域で依然として続いており、解決されたとは言えない。すなわち「第二の緑の革命」が求められており、しかもその農業革命は炭素排出がゼロの持続可能な革命でなければならない。化学肥料とともに低農薬を実現するための病虫害抵抗性品種の開発が待たれる。また、高温や低温に対する気温への対応や、干ばつや洪水への対策も不可欠である。このような自然災害に対応するために、今後私達はこれまでにない自然変異を模索し、それらを同定・利用することが求められる。

本研究では上記背景のもとに、イネ科作物の遺伝子および遺伝子間領域に存在する自然変異を明らかにすることを目的に、品種改良の基本材料であるゲノム DNA の 3 領域について調査を行った。まず第 2 章において、イネの緑の革命に貢献した遺伝子 *Sd1* について、イネ栽培種 *O. sativa*、および野生祖先種 *O. rufipogon* を加えた幅広い材料を用い、その変異を調査した。また、準同質遺伝

子系統を作出し、インディカ系統、温帯ジャポニカ系統 (*O. sativa* ssp. *temperate japonica*)、および熱帯ジャポニカ系統 (*O. sativa* ssp. *tropical japonica*) がそれぞれ持つ *Sd1* アリルについて、その表現型効果を調査した。*Sd1* 遺伝子の各アリルが表現型に与える影響について考察する。第 3 章においては、先行するイネ科の近縁種であるイネやソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) の開花遺伝子制御機構を参考に、ススキ (*Miscanthus sinensis* Andersson) の開花遺伝子 *MsiHd1* の単離を計画した。ススキ属は現在、冷涼な温帯地域におけるバイオエネルギー作物の主要な選択肢となっている。また、開花は地域や季節への適応に影響を与える重要な形質であり、バイオマス改善のための、育種的に重要な標的形質でもある。ススキは日本において古来より、茅葺屋根や家畜の飼料として利用するために里山の共有地に育てられていたものの、その栽培管理は粗放的であった。そのため食用栽培種の特徴である遺伝的ボトルネック効果の影響が比較的少ない植物材料であると考えられる。東アジアに自生するススキ系統を対象とした広範な材料から開花遺伝子 *MsiHd1* が持つ地理的な遺伝的多型を明らかにした。この多型解析は、ススキ属の開花遺伝子の特徴づけた最初の報告となる。第 4 章においては、イネの遺伝子間領域を対象に調査を行った。約 30 億塩基対からなるヒトゲノムでは、タンパク質をコードするエクソン領域は 2%程度と言われ、多くの真核生物ゲノムにおいても遺伝子間領域は、かつてはジャンク

DNA と呼ばれ、意味を持たない領域と考えられていた。しかしながら、シーケンス解析技術の向上により比較ゲノム学が進むと、遠縁の種間においても遺伝子間領域が保存されている事例が報告されてきた。そこで、イネ *Waxy* (*Wx*, モチ) 遺伝子領域近傍の約 200 kb 領域を対象に、遺伝子間領域に存在する自然変異について調査した。以上の研究結果を踏まえ、最後の第 5 章では、野生集団に関して、それらが保有する多様な自然変異を探索・同定し、有効な育種素材として利用することの可能性を考察した。シーケンス解析することにより、有用なアレル等のシーケンス情報を育種事業に利用することの重要性を総合考察で指摘した。

第2章 イネ半矮性遺伝子 *Sd1*

第1節 緒言

農業改革でよく知られている出来事の1つに、コムギとイネにおける「緑の革命」がある (Peng et al. 1999; Hedden 2003)。穀類の生産力向上を目指した緑の革命において、トウモロコシ (*Zea mays* L.) やコムギ、そしてイネの品種改良が行われた。コムギやイネの高収量品種群 (High-yielding varieties, HYVs) では、植物体の構造を変化させた短稈形態により、大量の窒素施肥条件下における耐倒伏性と高い種子生産をもたらした (Harlan 1992; Khush 1999)。これらの形質の主たる原因遺伝子は、ジベレリン (GA) 生合成経路の調節に関与していた (Peng et al. 1999; Hedden 2003)。イネの場合、インディカ品種の‘低脚烏尖’ (Dee-geo-woo-gen (DGWG)) で検出された劣性の半矮性遺伝子 (*Semi-dwarf1* (*Sd1*) または *OsGA20ox2*) が HYVs の ‘IR8’ に使用された。HYVs はその後、異なる国から独立にリリースされたにも関わらず、高収量をもたらす主働遺伝子は同じ座の異なるアリルであることが明らかとなり、種子生産における *Sd1* 座の重要な役割が示唆された (Kikuchi and Futsuhara 1997; Monna et al. 2002; Spielmeyer et al. 2002; Sasaki et al. 2002; Ashikari et al. 2002) 。‘低脚烏尖’ に由来する半矮性アリルは、イネ第1染色体長腕の *sd1* 座に座乗し (Aquino and Jennings 1966; Suh and Heu 1978; Ogi et al. 1993; Murai and Yamamoto 2001;

Murai et al. 2003)、以下の2つの要因により耐倒伏性を高める。1つは稈長の、特に下部節間の減少であり、もう1つは第4節間自体の剛性を高めることにある (Murai et al. 2004)。この半矮性アリルは、肥料の大量投入に適応した高収量インディカ品種を開発するために集中的に利用され、東南アジアにおけるほとんど全てのHYVsが保持している (De Datta et al. 1968; Peng et al. 1999)。

‘低脚烏尖’の*sd1*の場合、エキソン1とエキソン2の領域に383 bpの欠失が存在し、ジベレリン合成酵素の機能を失っている (Ashikari et al. 2002; Monna et al. 2002; Spielmeier et al. 2002; Fig. 2-1)。現在、*Sd1*座には、‘低脚烏尖’の欠失型アリルを含めて4つの半矮性自然変異アリルが知られている。ジャポニカ品種の‘十石’は一塩基置換による漏出型変異アリルであり、中国のインディカ在来品種‘Aijiao-Nante’と‘Zhaiyeqing 8’は、2 bpの欠失と一塩基置換変異をそれぞれ持つ (Asano et al. 2007)。しかしながら、*sd1*の表現型効果は他の相互作用遺伝子との組み合わせに影響を受けるため、アリルの地理的分布や表現型効果に関する知識はイネでは限定されていた (Aquino and Jennings 1966)。また、*sd1*による半矮性形質は、熱帯での慣行栽培においては弱有害形質であり、そのような有害なアリルが在来種においてどのように維持されてきたのか疑問が残る (Jennings and Aquino 1968)。以上のような*Sd1*座の状況から、半矮性アリルの来歴および表現型効果を明らかにすることを目的として、イネの「緑の

革命」に貢献した *Sd1* 座の調査を計画した。

第2節 材料および方法

(1) 地理的分布調査に用いた植物材料

世界に分布する *Oryza* 属の 10 種、256 系統を供試し、*Sd1* 座におけるアリの地理的分布について調査を行った。材料には、140 系統の栽培イネ *O. sativa* と 58 系統の野生祖先種 *O. rufipogon* を含んだ。*O. rufipogon* は多年生と一年生に、また *O. sativa* はインディカとジャポニカのタイプに分類される (Oka 1988; Morishima et al. 1992)。塩基配列解析では更に、8 つの種 (*O. glaberrima*、*O. barthii*、*O. longistaminata*、*O. glumaepatula*、*O. meridionalis*、*O. officinalis*、*O. eichingeri*、および *O. meyeriana*) を含む 58 系統を加えた。以上の材料は国立遺伝学研究所 (三島市)、および国際稲研究所 (International Rice Research Institute (IRRI), Los Banos) より入手した。

(2) アリの同定

インディカ在来種である ‘低脚烏尖’ (DGWG) の *sd1* 座で報告されている DGWG 型欠失アリルは、ジャポニカ品種の ‘日本晴’ の配列 (<http://rgp.dna.affrc>).

go.jp) に基づき設計された特異的な L1 プライマー (5'-CTCGTCTTCTCCCC
TGTTACAA-3') および R2 プライマー (5'-GTGTCGCCGATGTTGATGAC-3')
を用いた。256 系統について Polymerase chain reaction (PCR) を行い、電気
泳動後、増幅産物の移動度により遺伝子型を判定した (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。

(3)DNA の塩基配列決定

5' 隣接領域から第 2 エキソン (1,874 bp) までの DNA フラグメントについ
て、66 系統の塩基配列を決定した (Fig. 2-1, Fig. 2-3)。Big Dye Terminator
Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) と ABI 377 オートシーケンサー
(Applied Biosystem, Inc., Foster City, CA) をシーケンス反応に使用した。
DNA 配列は DDBJ (DNA Data Bank of Japan: [https://www.ddbj.nig.ac.jp/
index.html](https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html)) のアクセッション番号 AB213460 から AB213479 に登録した。

(4)系統樹解析

遺伝子系統樹の構築のため、Kimura (1980) の 2 パラメーター法を用いた NJ
法 (Saitou and Nei 1987) を用いた (Fig. 2-3)。生殖的に隔離された分類群
(*O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, および *O. meridionalis*) の塩基配列をアウ

トグループとして使用した。公開データベース上の‘日本晴’ (AF254556) 、
‘Milyang23’ (AF465256) 、‘IR64’ (AY115558) および *O. rufipogon* (AY115559)
の *Sd1* 配列を系統樹構築の際に追加した。

(5) *Sd1* 遺伝子近傍の多型

DGWG 型アリル近傍における染色体領域の DNA 多型を調査するため、3 つ
の分子マーカー (KS3、RM8278、RM1387) 領域を用いた。KS3 は P0005H10
(Rice Genome Research Project; <http://rgp.dna.affrc.go.jp/>) に基づき設計し、
RM8278 と RM1387 はコーネル大学 (<http://www.gramine.org/>) のマイクロサ
テライトマーカーに基づき設計した。KS3 用のプライマー配列は 5'-TTCGGCC
AGCCGCACAATATTT-3'、および 5'-CGATGGTGATAAGCAAATGCTAGC
AAA-3' を用いた。KS3、RM8278、RM1387 の遺伝地図上の位置は、それぞれ
108 センチモルガン (cM) 、108 cM、121 cM である。‘A58’ x W107 の組換え
自殖系統の調査結果に基づき、*sd1* の座乗位置は第 1 染色体上の 114 cM に
位置づけられる。

(6)交雑実験

表現型効果を調査した F₅ 個体群は、‘A58’ (ジャポニカイネ) x W1944 (多年生野生イネ) の交雑から単粒系統法により得た。札幌 (北緯 43° 03′) にて栽培し、両親の遺伝子型による表現型効果を比較するため、成熟後に主稈の長さを測定した (Fig. 2-4) 。アリの判定は 本節 (2) 項に記載した同様の手法により決定した。

(7)‘IR36’遺伝的背景による *sd1* 準同質遺伝子系統の育成

‘IR36’ の *sd1* 座を置換し、2 つのインディカ品種と 3 つのジャポニカ品種 (温帯ジャポニカ 2 系統および熱帯ジャポニカ 1 系統) に由来する *Sd1* 座を持つ 5 つの準同質遺伝子系統を育成した (Fig. 2-5) 。1980 年代に東南アジアで最も広い栽培面積を持っていた DGWG 型アリの保持する ‘IR36’ (Peng et al. 1999) を反復親として用いた。*Sd1* のドナーとして 3 品種のジャポニカと 2 品種のインディカを使用した。‘コシヒカリ’ は日本の代表品種で、食味は良いが耐倒伏性は低い。‘神力’ は日本の在来種の 1 つである。‘Silewah’ は、インドネシアのスマトラ島の熱帯ジャポニカ在来種であり、穂ばらみ期において強い耐冷性を示す (Satake and Toriyama 1979) 。一方、‘Karalath’ はインドの古い品種の 1 つで、日本の農業生物資源研究所のジーンバンクより入手した。‘IR5867’ は、IRRI

のインディカ育成系統である。‘IR36’を遺伝的背景に持つ5つの準同質遺伝子系統に、36-Koshi、36-Shin、36-Sile、36-Kara、および36-5867とそれぞれ名付けた (Fig. 2-5, Table 2-1)。戻し交雑数はそれぞれ、17、16、15、17、および17回にわたり行った。36-Koshiの場合、‘IR36’ x ‘コシヒカリ’のF₁ (*Sd1/sd1*) に ‘IR36’ (*sd1/sd1*) を戻し交雑した。B₁F₁世代において、長稈の *Sd1/sd1* 個体を ‘IR36’ と交配し、B₁₇F₁ まで連続戻し交雑を繰り返した。B₁₇F₁ 植物の種子と他の4つの準同質遺伝子系統の B_nF₁ 植物の種子は、南国市 (北緯 33° 55′) から札幌市 (北緯 43° 03′) へ送り、戻し交雑を継続した。

(8) 稈長形質の測定

反復親 ‘IR36’、ドナー親5系統、および5つの B_nF₂ 集団を、2006年4月25日に播種し、札幌市および南国市の温室で栽培した。24日経過した2つの苗を円筒形ポット (内径 15.0 cm) に移植した。緩行性コーティング肥料の ECOLONG180 (Chisso Asahi Fertilizer) を基肥として与えた。5つの B_nF₂ 集団のそれぞれ12から40の苗よりゲノムDNAを抽出し、*Sd1/Sd1* の遺伝子型を持つ実生を選抜した。成熟時において、3~9個体の最大稈長を測定した (Table 2-1)。同様に、5つのドナー親と ‘IR36’ についても、5~9個体の最大稈長を測定した。植物体を短日処理するため、6月20日から出穂日までの期間

は、午後 5 時 30 分から翌日午前 7 時まで短日処理装置内で暗所処理した。

(9)DNA マーカー分析

準同質遺伝子系統における染色体置換領域を決定するために、Simple sequence repeat (SSR) マーカー (Akagi 2000; Garris et al. 2005) および Single nucleotide polymorphism (SNP) マーカー (Feltus et al. 2004) を用いて DNA マーカーの多型を調査した。RM5501、RM8085、RM5781、RM8278、RM472、RM431、および RM1387 の 7 つの SSR マーカーと、M1、M6、M7、M8、および M9 の 5 つ SNP マーカーを用いた (Fig. 2-5)。塩基配列情報は Gramene (www.gramene.org/markers/) および Rice Genome Research Program (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/publicdata/caps/index.html>) より得た。SNP マーカーの *qSH1* (=KS3) は Onishi et al. (2007) が開発したものを用いた。SNP マーカーは、PCR 増幅産物の塩基配列をオートシーケンサー ABI3130 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) を使用して遺伝子型を同定した。

(10)準同質遺伝子系統における *Sd1* アリルの塩基配列登録

‘IR36’、‘コシヒカリ’、‘神力’、‘Silewah’、‘Karalath’、‘IR5867’ における

Sd1 塩基配列をそれぞれ、アクセッション番号 AB538264 から AB538269 として DDBJ に登録した。

第3節 結果

(1) DGWG 型アリの地理的分布

Sd1 座での DGWG 型アリの地理的分布について、栽培イネ 2 種（15 カ国に由来する *O. sativa* および *O. glaberrima*）、および野生イネ 8 種（17 カ国に由来）を含む合計 256 系統を調査した。*Sd1* 遺伝子領域の PCR 増幅と電気泳動により、遺伝子型を判定した（Fig. 2-2）。DGWG 型アリを持つことが既に明らかな HYVs の 3 系統の他に、*O. sativa* の 1 系統および *O. rufipogon* の 2 系統が、DGWG 型アリを保持していた。新たに見つかった DGWG 型キャリアである 3 系統は、インディカ在来種の ‘Liu-t'ou-tu’、野生祖先種 *O. rufipogon* の W1944、および W1718 であった。これら 3 系統は全て中国由来であることから、DGWG 型アリの分布が地理的に限定していることを示唆した。

(2) *Sd1* の遺伝子系統樹の構築

第 1 エキソン、第 2 エキソンおよび 5' 隣接領域（アラインメント長 1,824 bp）の塩基配列を決定し、DGWG 型キャリアを含む 66 系統の塩基配列を比較した。

O. sativa と *O. rufipogon* の 62 の配列には、明確な 20 のハプロタイプが含まれていた。NJ 遺伝子系統樹は、20 のハプロタイプを A1 と A2 からなる 2 つの異なるグループに分割した（Fig. 2-3）。このことは *O. sativa*-*O. rufipogon* 集団に、2 系統の *Sd1* 遺伝子が存在することを示した。*O. sativa* の配列は全て、A1 グループにおいてのみ検出された。

Sd1 遺伝子近傍の多型を調査するため、第 1 染色体上の *Sd1* 遺伝子から 6~7 cM 離れた位置にある 3 つの DNA マーカー（KS3、RM8278、および RM1387）が、DGWG キャリアである ‘IR36’、‘Liu-t'ou-tu’、W1718、および W1944 において調査された。この DNA マーカー領域を調査することにより、DGWG 型欠失アリルを含む染色体断片の起源が、‘IR8’ などの HYVs のような近代品種から最近起きた浸透交雑の可能性の有無を検証できる。調査の結果、W1944 のみが、3 つの DNA マーカー領域の全てにおいて、他のキャリアとは異なる野生系統特異的な DNA 多型を示した。

このような弱有害遺伝子は野生祖先種において、どのように保存されてきたのだろうか？ *Sd1* アリルの表現型の影響を、‘A58’（*Sd1*/*Sd1* 優性ホモ接合型、

ジャポニカ在来種) と W1944 (*sd1/sd1* 劣性ホモ接合型、DGWG 型キャリアの野生系統) との間の F₅ 交雑集団において調査した。W1944 は、多年生で長稈を示す (Fig. 2-4)。交雑実験の結果は、稈長における連続した超越分離を示し、W1944 の DGWG 型アリの効果が他の相互作用遺伝子との組み合わせにおいて機能することを意味した。相互作用遺伝子の存在は、‘A58’ との連続戻し交雑による W1944 の後代が、はっきりとした矮性表現型のみを生み出す事実によっても支持される (結果省略)。それゆえ自然界において、DGWG 型アリを持つ変異個体は半矮性を発現することなく、野生イネの遺伝的背景において、隠れた変異アリルとして維持されてきたのかもしれない。

(3) 準同質遺伝子系統を用いた稈長調査

Table 2-1 に、札幌市と南国市における反復親 ‘IR36’、5 つの準同質遺伝子系統、および各ドナー親の稈長を示す。‘Silewah’ は、5 つのドナー親の間で際立って高い稈長を示した。インディカ 2 系統は、温帯ジャポニカ 2 系統よりも長稈だった。5 つの準同質遺伝子系統は、札幌市と南国市のそれぞれにおいて 20.6 ~ 41.7 cm および 30.5 ~ 58.5 cm、‘IR36’ よりも長稈を示した。5 つの準同質遺伝子系統の稈長は、36-Koshi $\leq$ 36-Shin $\approx$ 36-Sile < 36-Kara < 36-5867 と順位づけされた。札幌市の稈長は南国市より 16.9 ~ 50.1 cm 低く、11 のデータの

2 セットは、互いに高い相関関係があった ($r=0.911$ 、0.01 水準で有意)。

(4) 準同質遺伝子系統における *Sd1* の置換領域

5 つの準同質遺伝子系統における *Sd1* の染色体置換領域を決定するために、*Sd1* 近傍の DNA マーカーを調査した (Fig. 2-5)。36-Koshi の置換領域は、*qSH-1* と *M-sd1-d* の間に存在し、この領域は ‘日本晴’ ゲノムの 38.191 Mb から 40.112 Mb の間に相当する。36-Shin は、長腕末端側の M7 マーカーまで *Sd1* 置換領域を持つものの、短腕末端側は RM5501 を越えており、決定できなかった。36-Kara は、RM472 と *M-sd1-d* との間の最も短い領域で置換していた。36-Sile は M1 と M9 マーカーとの間、36-5867 は RM472 と M6 の間に *Sd1* 置換領域が存在した。以上の結果、5 つの準同質遺伝子系統の全てが置換領域に *Sd1* を含んでおり、準同質遺伝子系統の *Sd1* 領域は全て長稈のドナー親に由来することを示した。

(5) インディカとジャポニカ亜種間における *Sd1* 座の塩基配列の差異

Fig. 2-6 および Table 2-2 に、‘IR36’ とドナー親 5 系統における *Sd1* 座のコード領域において非同義置換を引き起こすアミノ酸と塩基置換の位置を示す。‘日

本晴’の *Sd1* 塩基配列をリファレンス配列とした場合、エキソン 1 の 299 bp (アミノ酸番号 100) とエキソン 3 の 1,019 bp (アミノ酸番号 340) において、インディカとジャポニカ間に塩基多型が存在した (Fig. 2-6)。温帯および熱帯ジャポニカ 3 品種の ‘コシヒカリ’、‘神力’、‘Silewah’ は、‘日本晴’ と同一の配列を持つのに対し、インディカ 2 品種の ‘IR5867’ と ‘Karalath’ はエキソン 1 とエキソン 3 において、A (グルタミン酸) から G (グリシン)、A (グルタミン) から G (アルギニン) への非同義置換がそれぞれ認められた (Fig. 2-6, Table 2-2)。

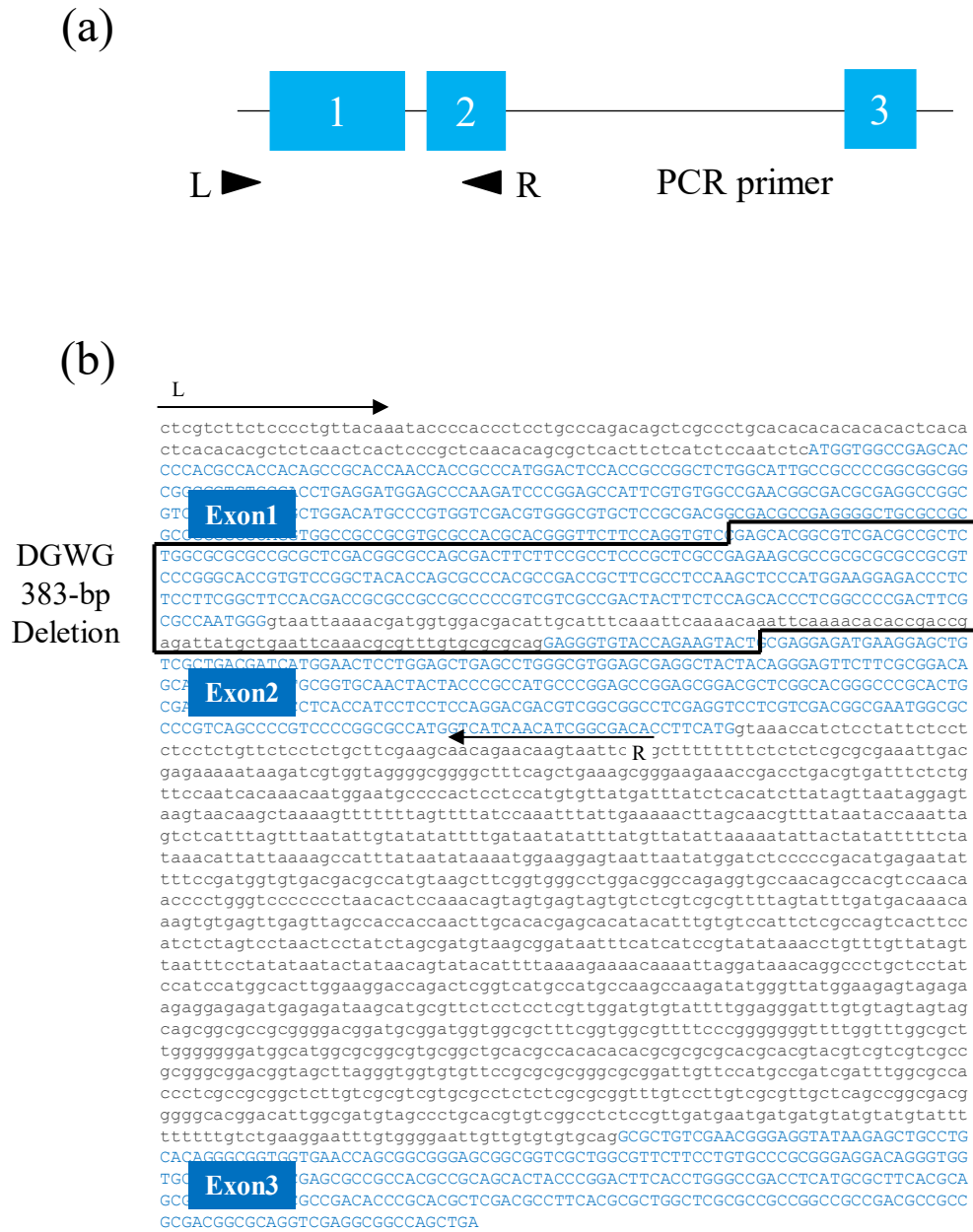


Fig. 2-1

The gene structure and nucleotide sequence of *Sd1* (*OsGA20-oxidase2*) of *Oryza sativa* ssp. *japonica* ‘Nipponbare’. *Sd1* gene encodes a gibberellin synthase.

(a) Three blue boxes and a horizontal line show exons and non-coding region, respectively. Arrowheads indicate a pair of Polymerase Chain Reaction (PCR) primers. (b) Blue letters represent the positions of three exons, and gray letters represent the 5' upstream region and two introns. The area surrounded by bold line indicates 383-bp deletion of *sd1* in *Oryza sativa* ssp. *indica* ‘Dee-geo-woo-gen’. A pair of horizontal lines with arrowheads indicate a pair of PCR primers used in this experiment.

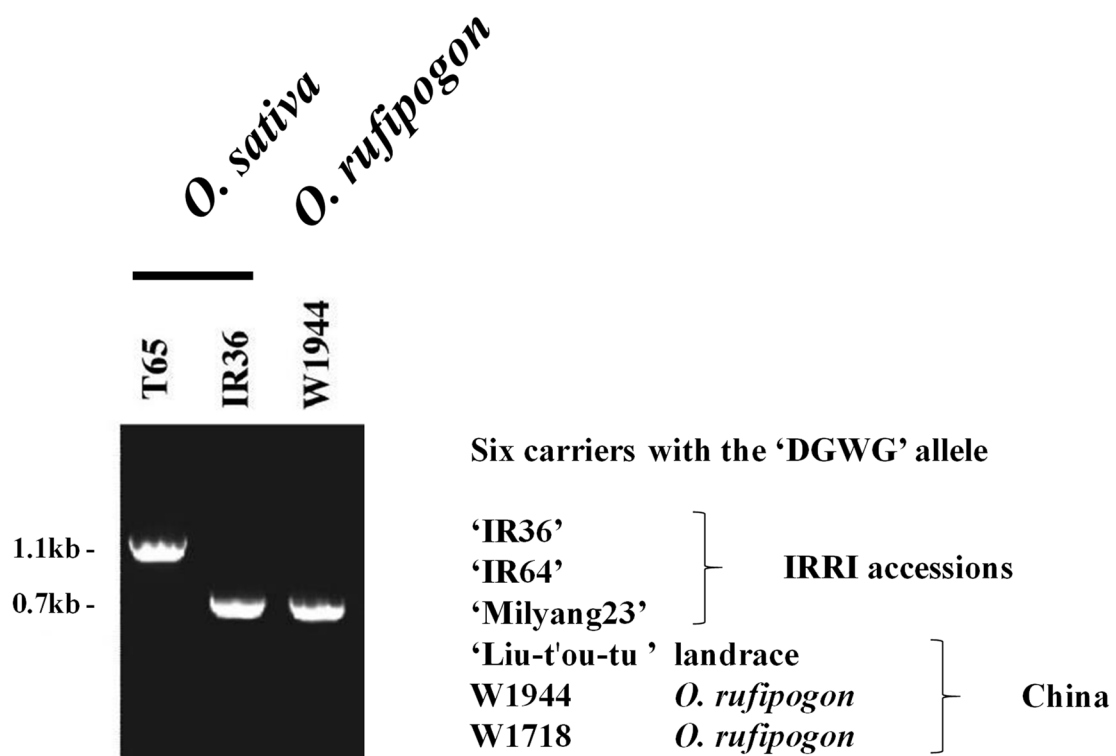


Fig. 2-2

Detection of DGWG carriers from 256 accessions of *Oryza* species. Six carriers with DGWG allele were detected by the electrophoresis. 'IR36', 'IR64' and 'Mileang23' are International Rice Research Institute (IRRI) accessions that were known to have DGWG alleles. 'Liu-t'ou-tu', W1944 and W1718 are novel DGWG carriers in this study. 'Liu-t'ou-tu' is a landrace from China. W1944 and W1718 are wild progenitor, *Oryza rufipogon* from China.

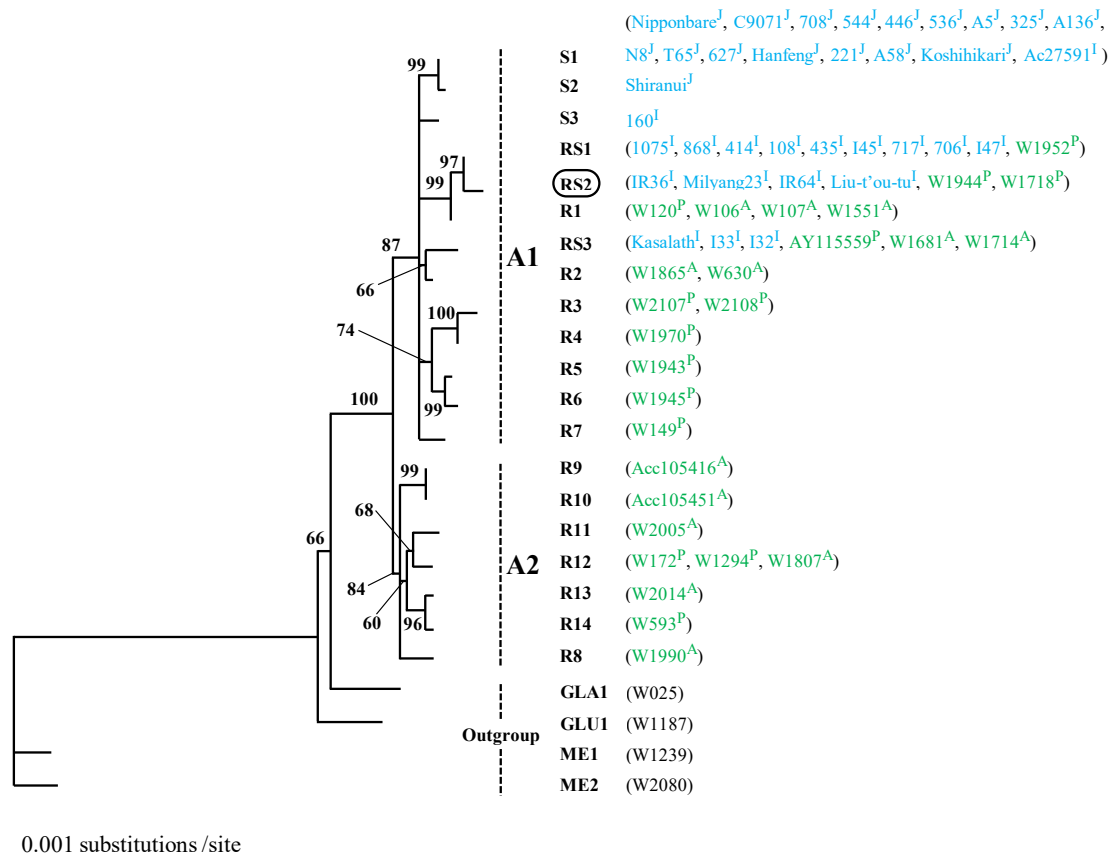


Fig. 2-3

Neighbor-joining (NJ) reconstruction of the genealogical relationships among 24 *SdI* haplotypes in 66 strains of wild (*Oryza rufipogon*, green letters) and cultivated rice (*Oryza sativa*, blue letters). GLA1 of *O. glaberrima*, GLU1 of *O. glumaepatula*, ME1 and ME2 of *O. meridionalis* were used as outgroups. I and J show *indica* and *japonica* types of *O. sativa*, respectively. P and A show perennial and annual forms of *O. rufipogon*, respectively. *SdI* gene phylogenetic tree had two major groups (A1 and A2). Six carriers with DGWG type allele belonged to haplotype RS2.

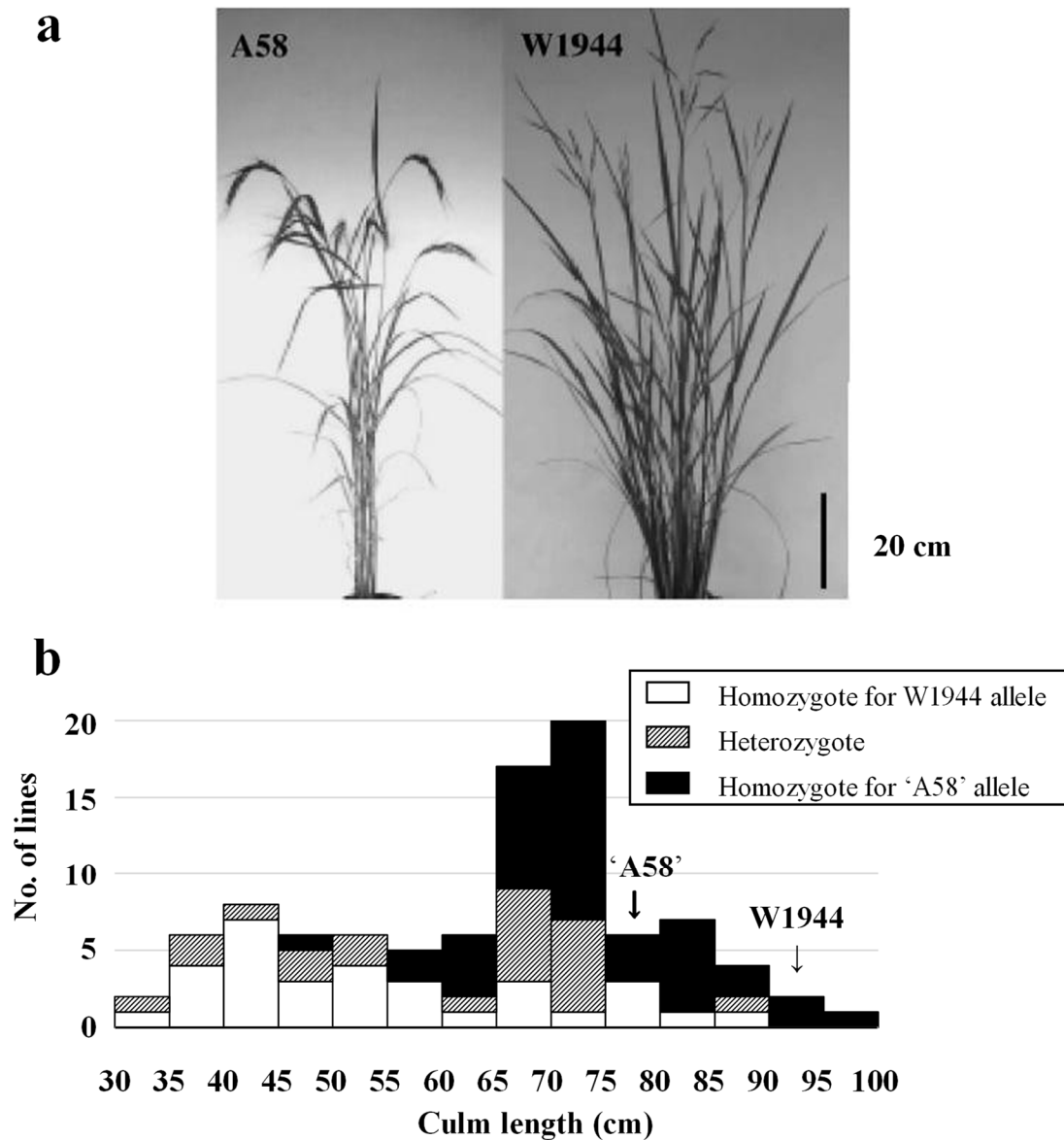


Fig. 2-4

Frequency distribution of culm length observed in the 96 F₅ lines of 'A58' (*Sd1/Sd1*) x W1944 (*sd1/sd1*). The allelic state at the *Sd1* locus was determined by the method described in Fig. 2-2. Two vertical arrows in the graph represent the average of culm length in 'A58' and W1944, respectively. Bar is 20 cm.

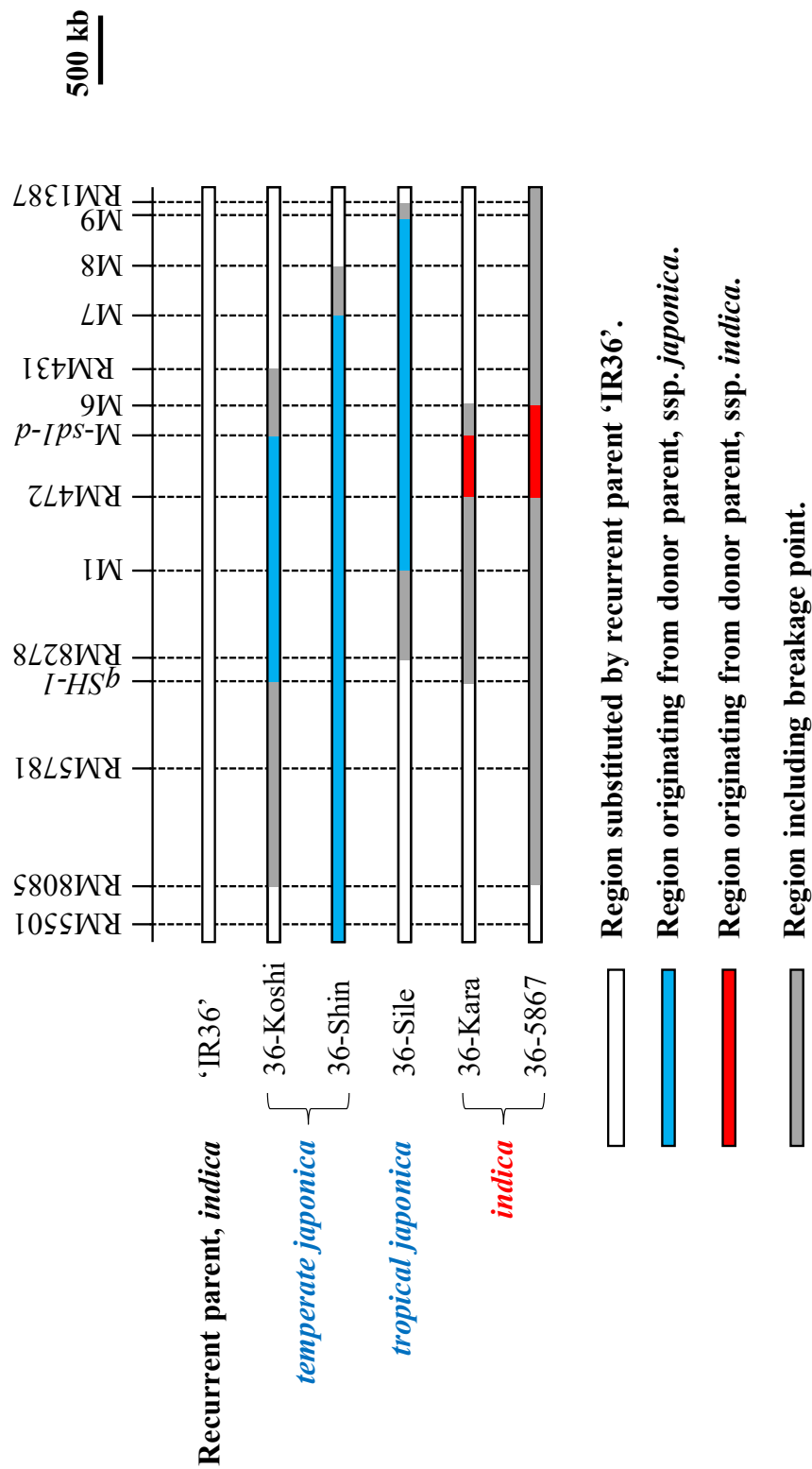


Fig. 2-5
Substituted region originating from each of *Oryza sativa* *ssp. japonica* and *ssp. indica* donor parents for *Sd1* in the five tall isogenic lines of 'IR36'.

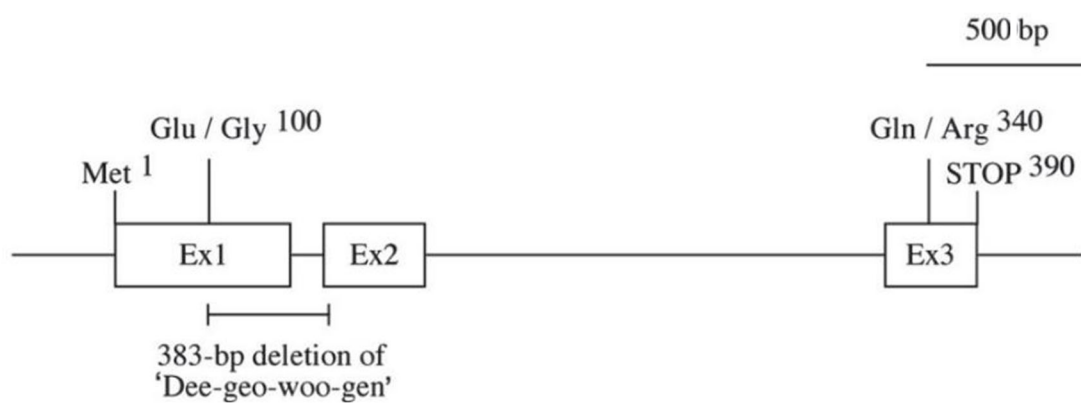


Fig. 2-6

Structure of *Sd1* gene, and two putative amino-acid sites polymorphic between *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *indica*. Met: methionine (translational start). Glu/Gly: glutamic acid in ssp. *japonica*/glycine in ssp. *indica*. Gln/Arg: glutamine in ssp. *japonica*/arginine in ssp. *indica*. Numeral off to the upper right of each amino acid: the number of amino acids from the translational start.

Table 2-1. Culm length of 'IR36', its five isogenic lines and their respective donor parents at Nankoku, Kochi (Kochi Univ.) in 2007 and at Sapporo, Hokkaido (Univ. of Hokkaido) in 2006.

Location	Isogenic lines/varieties										
	'IR36'	36-Koshi	36-Shin	36-Sile	36-Kara	36-5867	'Koshihikari'	'Shinriki'	'Silewah'	'Karakath'	'IR5867'
Nankoku	67.6 ^h	98.1 ^e	106.3 ^d	107.8 ^d	118.3 ^c	126.1 ^b	92.8 ^f	87.1 ^g	169.6 ^a	130.7 ^b	120.3 ^c
Sapporo	44.3 ^g	64.9 ^f	65.2 ^f	68.6 ^{ef}	76.2 ^{cd}	86.0 ^b	74.0 ^{cde}	70.2 ^{def}	149.8 ^a	80.6 ^{bc}	86.7 ^b

Values followed by the same letter within each row are not significantly different at the 5% level, in accordance with Tukey-Kramer's method (Sokal and Rohlf 1995).

Nankoku: 20 plants were measured for each of the isogenic lines and varieties.

Sapporo: the number of measured plants were 9, 3, 9, 6, 8, 6, 5, 6, 6 and 6, respectively, for 'IR36' to 'IR5867', from left to right.

Table2-2. Polymorphic sites in the coding region of *Sd1* in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *indica* .

Polymorphisms and their positions of nucleotide (those of amino acid)				
Variety/line	Subspecies	Exon 1		Exon 3
		299 (100)		1019 (340)
‘Nipponbare’	<i>japonica</i>	A	(glutamic acid)	A (glutamine)
‘Koshihikari’	<i>japonica</i>	A	(glutamic acid)	A (glutamine)
‘Shiriki’	<i>japonica</i>	A	(glutamic acid)	A (glutamine)
‘Silewah’	<i>japonica</i>	A	(glutamic acid)	A (glutamine)
‘Karalath’	<i>indica</i>	G	(glycine)	G (arginine)
‘IR5867’	<i>indica</i>	G	(glycine)	G (arginine)
‘IR36’	<i>indica</i>	-	(-)	G (arginine)

-: being included into the deletion of 383 bp

第4節 考察

(1) DGWG 型半矮性遺伝子 *sd1*

食糧増産を目的とした 1960 年代のイネの「緑の革命」において、台湾の半矮性在来品種である ‘低脚烏尖’ (DGWG) と、インドネシアの高収量品種 ‘Peta’ との交雑後代から最初の HYVs として ‘IR8’ がリリースされた。DGWG 型のキャリアが同一の *Sd1* 配列を保持していたという観察結果 (Fig. 2-2, Fig. 2-3) は、それぞれが共通の起源であることを示唆している。DGWG 型アリの起源に関しては、栽培化の過程で生じたか、あるいは野生祖先種の稀な変異体として古くから存在していたのか疑問が残る。あるアリの固定には、周辺領域の DNA 変異が排除されることから (Wang et al. 1999; Innan and Kim 2004) 、*Sd1* 座から数 cM の距離にある 3 つの DNA マーカー (KS3, RM8278, RM1387) の塩基配列比較を行った。その結果、W1718 は浸透交雑の可能性を否定できなかったが、W1944 は 3 箇所全てにおいて栽培種とは異なる、野生種特異的な塩基配列であることを明らかにできた。DGWG 型アリを含む W1944 の染色体領域は、近代品種である HYVs から W1944 への浸透交雑ではなく、野生祖先種集団に、古くから存在していた変異であった可能性を示唆した。一般的に、半矮性形質は自然界では、日照条件などの面で、競争力に乏しく不利な弱有害形質であると考えられている。しかしながら、栽培イネ系統 ‘A58’ (*Sd1/Sd1*) と

W1944 (*sd1/sd1*) との F₅ 交雑集団 96 個体の解析から、DGWG 型アリルをホモ接合で有する個体であっても、長稈を示す分離個体が観察された (Fig. 2-4) 。量的形質遺伝子座 (Quantitative Trait Locus、QTL) の組み合わせ次第で DGWG 型アリルが隠れた変異として野生イネ集団内に長く受け継がれ、近代農法に適した半矮性に貢献する変異アリルの 1 つとして利用されてきた状況が示唆された。このことは、W1944 を含む *O. rufipogon* が、*Sd1* 遺伝子と同じ第 1 染色体に座乗する脱粒性の量的形質遺伝子座の *qSH1* (Konishi et al. 2006) を持つことと一致する (Xiong et al. 1999; Cai and Morishima 2002) 。

高密度な植栽と肥料が施されることにより、高い生産性が得られる管理圃場下では、個体間における競争を増加させる。競争力と種子生産との間の負の関係は、自然界の様々な植物種のトレードオフとしてしばしば観察される (Grime 1974) 。イネの場合、草丈の増加は相互遮蔽と葉面積指数の減少を導き、種子生産の低下を引き起こす。反対に、短稈植物は相互遮蔽を最小限に抑え、単位面積あたりの高収量能力を生み出す (Tanaka et al. 1966) 。この複雑な関係は、矮性表現型の選択的価値が、隣接する植物や生息地によって異なることを意味する。「緑の革命」以前は、半矮性植物で構成される個体群が、長稈の植物で構成される個体群と比較して、穀物収量に関して高い潜在能力を持つとは予想されてこなかった。農家は半矮性品種の単位面積あたりの収量が高いことを経験的

に認識していたため、イネが相互競争力の低い集約管理されたモノカルチャー下において、高収量をもたらす短稈植物が農家の間で無意識的に選ばれてきたのだろう (Jennings 1966; Jennings and Aquino 1968)。本章による結果は、農家が農業に従事する中で高収量を得るために、DGWG 型アリルとその相互作用遺伝子を選択してきたこと、およびその同一変異は異なる在来種に維持されてきたことを確認した。近縁野生種における遺伝子の多様性は事実上、イネの緑の革命に不可欠なものであった。変化し続ける世界において、将来遭遇する未知の農業需要に対応するため、自然変異はより必須な存在であると考えられる (Ruttan 1999; Tilman et al. 2002)。

(2) インディカ-ジャポニカ亜種間における *Sd1* 遺伝子

一般にイネの稈長は温帯ジャポニカ品種よりもインディカの在来品種の方が長稈で、熱帯ジャポニカとインディカの在来品種は形質において重複した分布を持っている (Matsuo 1952)。この亜種間における稈長形質に与える *Sd1* の効果を調査することを目的に、準同質遺伝子系統の作出を計画した。本章において、北海道札幌市と高知県南国市の 2 箇所の試験地において、反復親に 'IR36' (インディカ品種) を用いた連続戻し交雑により、インディカおよびジャポニカ由来の *Sd1* 座をそれぞれ有する 5 つの準同質遺伝子系統と親系統の稈長形質を比

較した (Fig. 2-5, Table 2-1)。観察の結果、いずれもインディカ由来の *Sd1* 座を有する系統が、ジャポニカ由来の *Sd1* 座の系統よりも長稈を示した。熱帯ジャポニカの ‘Silewah’ は、2つの試験地において際立って高い稈長を示した (Table 2-1)。準同質遺伝子系統の 36-Sile は、ドナー親の稈長が最も高いにも関わらず、ジャポニカのドナーグループに属することは注目に値する。

Sd1 座の塩基配列を比較したところ、エキソン 1 とエキソン 3 にそれぞれ 1箇所の非同義置換が認められた (Fig. 2-6, Table 2-2)。5つの準同質遺伝子系統は、それぞれのドナー親に由来する *Sd1* の染色体断片を含んでいた (Fig. 2-5)。それゆえ、エキソン 1 の 299 bp での多型、およびエキソン 3 での 1,019 bp での多型 (Fig. 2-6, Table 2-2) が、主にジャポニカドナーの準同質遺伝子系統とインディカドナー系統間との稈長における差異を引き起こしたと推測できる。これはジャポニカ由来の *Sd1* 座に生じた弱い漏出型変異であると考えられ、それぞれを *SD1-in* (t) および *SD1-ja* (t) と名付けて両者を区別した。

Tanaka et al. (1964) の研究によれば、東南アジアと台湾に由来する 6つのインディカ品種の稈長が 141~213 cm であったのに対し、日本由来の 6つのジャポニカ品種の稈長は 81~103 cm と、相対的に低い稈長を示した。*SD1-ja* (t) のキャリアである ‘Silewah’ は、*SD1-in* (t) キャリアの ‘Karalath’ よりも稈長が、札幌市で 69.2 cm、南国市で 38.9 cm 高く (Table 2-1)、このことは、*sd1* 座以

外の QTL が稈長形質に影響を与えているのかもしれない。イネの稈長に関わるいくつかの QTL が、イネ染色体上に検出されている (Xiao et al. 1996; Lu et al. 1997; Yamamoto et al. 2001) 。 Ishimaru et al. (2004) は、第 1 染色体上の稈長に関係する QTL の 1 つがイネのショ糖リン酸合成酵素に関する遺伝子と同一であると報告しており、このような QTL がインディカおよび熱帯・温帯ジャポニカ間における *O. sativa* 亜種間の表現型差異を引き起こすのかもしれない。

第3章 ススキ開花遺伝子 *MsiHd1*

第1節 緒言

ススキ属 (Genus *Miscanthus*) は、東アジアおよびオセアニアに自生する地下茎を有する多年生 C₄ 植物である (Hodkinson et al. 2002)。ススキ属は現在、冷涼な温帯地域におけるバイオエネルギー作物の主要な選択肢の 1 つである。ススキ属は分類上、トウモロコシ、ソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、およびサトウキビ (*Saccharum officinarum* L.) とともに Andropogoneae 族に属している (Hodkinson et al. 2002)。*Miscanthus* 種のうち、ススキ (*Miscanthus sinensis* Andersson.)、オギ (*M. sacchariflorus* (Maxim.) Franch.)、および両種の雑種であるジャイアントミスカンサス (*Miscanthus* x *giganteus* Greef & Deuter ex Hodkinson & Renvoize (Mxg)) が、バイオエネルギー作物の候補として注目されてきた。ススキは東アジアと東南アジアに自生しており、通常は 2 倍体である (Lafferty and Lelly 1994; Sacks et al. 2013)。オギもまた東アジア原産であり、2 倍体および 4 倍体の生態型を含む。中国由来のほとんどのオギは 2 倍体であるが、日本由来のオギは 4 倍体である。ススキ属を用いた現在までの商業的なバイオマス生産は、ススキとオギの間に生じた稔性を持たない種間雑種である Mxg が、1930 年代に Aksel Olsen によって日本の横浜からデンマークに持ち込まれ、その単一クローン栽培に限定されている (Greef and Deuter

1993; Linde-Laursen 1993)。

開花は、地域および季節への適応を左右する重要な形質である。また、バイオマス量を増加する栄養成長期間の延長のための、育種上、重要な標的形質でもある。日本の高緯度および高標高地におけるススキは、低緯度や低標高地のものよりも早く開花し、最も早いススキは最も遅いものと比較して 2 か月早く開花する (Adati 1958; Anzoua et al. 2015)。開花時期を調節するための遺伝メカニズムは、多くの植物で特徴づけられている。*CONSTANS (CO)* と *Heading Date 1 (Hd1)* は、それぞれシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) とイネの開花経路における中心的な調節因子である (Valverde 2011)。*CO* と *Hd1* は、共通の祖先遺伝子から分岐したオーソログであり、CCT (*CONSTANS*, *CO*-like、および *TOC1*) モチーフと 2 つの B-box 型 zinc-finger ドメインを含む核タンパク質をコードしている。CCT モチーフには核移行シグナルが含まれる (Robson et al. 2001)、B-box はタンパク質間相互作用に関与していると考えられている (Khanna et al. 2009)。*CO* はシロイヌナズナにおいて、長日条件下でのみ開花を促進するが、イネの *Hd1* は長日条件下では開花を抑制する一方で、短日条件下では開花を促進するという、日長反応に対して二面性を示す (Yano et al. 2000; Shrestha et al. 2014)。イネにおいて単離された開花調節遺伝子は、他にも *Ehd1* (*Early heading date 1*)、*Ghd7* (*Grain number, plant height and*

heading date7)、*OsPRR37*(*Pseudo-response regulator 37*、または *Hd2*) などがあり、特に *Ehd1*(または *Hd14*) は進化上、イネ科に特異的な開花促進遺伝子であり、*Hd1* 非存在下でも機能する (Doi 2004)。*Ghd7*(または *Hd4*) はイネの主要な開花抑制遺伝子で、長日条件下における開花を抑制する (Xue 2008)。緯度的クラインを示す地理的分布が観察され、北海道など高緯度地域の系統の多くは劣性ホモ型の *ghd7* を保持することにより、早生の表現型を示す (Shrestha et al. 2014; Fujino et al. 2019)。開花抑制遺伝子の 1 つである *OsPRR37* においても、北方の早生品種の地理的分布と *OsPRR37* の自然変異との相関が指摘されている (Koo et al. 2013)。PRR タンパク質は概日時計に関わる植物に普遍的な遺伝子ファミリーの 1 つであり、同様の日長反応変異体がオムギとコムギにも存在する (Turner et al. 2005; Beales et al. 2007)。ススキの近縁種であるソルガムでは、2 つの開花活性化因子である *SbCO* と *SbEhd1* が光周性開花において機能する (Yang et al. 2014)。*SbPRR37* と *SbGhd7* は、それぞれ *SbCO* と *SbEhd1* の活性を抑制し、長日条件下において開花を遅延させる (Murphy et al. 2011, 2014; Yang et al. 2014)。

本章の DNA 解析は、東アジアに自生する広範なススキ系統を対象に行われた。ススキの近縁種であるイネやソルガムの開花遺伝子制御機構を参考にして、各地域におけるススキの開花調節遺伝子の地理的な自然変異を明らかにするこ

とを目的に、ススキ *Hd1* のホモログの単離を行った。

第2節 材料および方法

(1) 植物材料

日本列島各地から収集された自生する *M. sinensis* 24 系統、中国大陸からの *M. sinensis* 14 系統、朝鮮半島からの *M. sinensis* 3 系統、日本の *M. sinensis* ssp. *condensatus* 1 系統、日本の *M. floridulus* 1 系統、日本の 2 倍体 *M. sacchariflorus* ‘Robustus’ 1 系統、および 4 倍体 *M. sacchariflorus* 1 系統を含む、合計 44 のススキ属を遺伝子解析に用いた。

(2) DNA/RNA の抽出および cDNA 合成

DNeasy plant DNA extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan) のプロトコールに基づき、200mg の成葉からススキ 28 系統のゲノム DNA を抽出した。残りの 16 系統のゲノム DNA は、イリノイ大学から提供された。トータル RNA (JM0079-2 および JM0125-1) は、TRIzol 試薬 (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を使用した。1 μ g のトータル RNA を鋳型とし、TaKaRa AMV kit (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を使用して、オリゴ dT で始まる cDNA を 50°C

で 30 分間合成した。転写産物のスプライシングサイトおよび末端サイトを決定するために、合成した cDNA とフォワードプライマー (5'-GATCAGGAGAAG ACATATACACCC-3') を用いて PCR 反応を行った。

(3) DNA の増幅と塩基配列の決定

ススキの近縁種で、かつ十分なアノテーション情報を含むソルガムゲノムの第 10 染色体上における約 2 kb の *CO/Hd1* ホモログ領域に基づき、クローニング用のススキプライマーを設計した (Fig. 3-1)。5' および 3' 非翻訳領域において、TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (TaKaRa) を使用してススキの DNA フラグメントを得た。最終的に、5' 隣接領域から 3' 隣接領域を含む DNA フラグメント (2~2.5 kb) を、特異的なプライマー (F14: 5'- GATCAGGAGAAG ACATATACACCC-3' および R17: 5'- GATCACTGACCACTCATGGTATAAC-3') と Taq polymerase (TaKaRa) を使用して増幅した。PCR 条件は 96°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 3 分間 (30 サイクル) で行った。バッファーと Mg^{2+} の濃度は、メーカーのマニュアルに従った。コード領域を含む PCR 産物を、pGEM vector (Promega KK., Tokyo, Japan) にクローニングした後、各系統において得られた 7 から 25 個のプラスミドクローンの塩基配列を決定した。アラインメント化には ATGC software (GENETYX Co., Tokyo, Japan) を用いた。得ら

れた DNA 配列は DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) に、アクセス番号 AB973600 から AB973675、および LC010137 から LC010211 として登録した。

(4) 系統樹の構築

系統樹の構築に、GENETYX software, version 10.1.4 (GENETYX Co, Tokyo, Japan) を使用した。Neighbor-Joining (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987) は、Kimura (1980) の 2 パラメーター法を用いて実行した。系統樹構築の際のアウトグループとしてソルガムゲノム (Yang et al. 2014) を使用した (Fig. 3-4, Fig. 3-5)。

第 3 節 結果

(1) *MsiHd1* ホモログの単離

M. sinensis の *CO/Hd1* ホモログを単離するために、日本列島に由来する 23 系統、韓国由来の 3 系統、および中国由来の 14 系統に対して PCR 増幅を行った。特異的な 2~2.5 kb の PCR 産物を全ての系統から得た。RT (Reverse transcription) -PCR の結果に基づき、PCR フラグメント内において 2 つのエキ

ソンと 1 つのイントロンからなる *M. sinensis CO/Hd1* 配列を同定し、*MsiHd1* と名付けた (Fig. 3-1)。*MsiHd1* は、タンパク質間相互作用の原因となる可能性のある 2 つの保存された B-box zinc finger ドメイン (Ben-Naim et al. 2006; Wenkel et al. 2006) および核局在化シグナルに関与する CCT ドメイン (Robson et al. 2001) を持つ、400 のアミノ酸をコードしていた (Fig. 3-2)。*MsiHd1* のスプライシングサイトはソルガムとイネのものに一致し、PolyA 付加サイトは終止コドンの 159 bp 下流に存在した (Fig. 3-1)。

(2) アリルの同定と遺伝子系統樹解析

2 倍体であるススキゲノムの各系統から 2~5 種類の *MsiHd1* アリルを同定できた。遺伝子系統樹の構築から、座の 1 つは独立したクレードを形成する偽遺伝子座であると考えられ、*MsiHd1b* と名付けた (Fig. 3-1, Fig. 3-4, Fig. 3-5)。興味深いことに、もう一方のクレードに属する *MsiHd1a* は、日本由来のほぼ全ての系統 (22/23) が少なくとも 1 つ以上の機能欠失型アリルを持つのに対し、中国大陸由来の系統は全て (17/17) が機能的なアリルしか持っていなかった (Fig. 3-3, Fig. 3-4, Fig. 3-5)。中国大陸と日本列島の 2 つの地域間におけるススキ集団において、機能的な *MsiHd1* のコピー数の著しい差異が明らかとなった。

(3) MITE トランスポゾンおよび復帰型アリの同定

特徴的な末端構造 (Terminal inverted repeat (TIR) : 末端逆方向反復配列、Target site duplications (TSD) : 標的部重複) を持つ新しいタイプの 5 つの Miniature inverted transposable element (MITE) が *MsiHd1* アリにおいて同定され、MsiMITE1-MsiMITE5 と名付けた (Fig. 3-6, Fig. 3-7, Fig. 3-8) 。 MsiMITE1 と MsiMITE5 は *MsiHd1a* に存在し、その他の 3 つの MITE は *MsiHd1b* に存在した (Fig. 3-6) 。 MITE は遺伝子近傍に優先的に位置することが知られている (Bureau and Wessler 1994a; Feschotte et al. 2002) 。 日本由来の系統でのみ検出された MsiMITE1 は、挿入により終止コドンを形成し、*MsiHd1a* の機能欠失を引き起こしていた (Fig. 3-6, Fig. 3-7) 。 一方、中国大陸由来の多くの系統は、MsiMITE1 の再転移に由来すると考えられる復帰型アリを持ち (Fig. 3-3)、MsiMITE1 配列の位置に代わって 6 bp のフットプリントを残していた (Fig. 3-7) 。 MsiMITE2 および MsiMITE3 は、*MsiHd1b* の 5' 非翻訳領域においてタンデムに挿入していた (Fig. 3-6) 。 MsiMITE3、MsiMITE4、および MsiMITE5 は、JM0125-1、JM0058-1、および PMS007 でのみ、それぞれ検出された (Fig. 3-6) 。

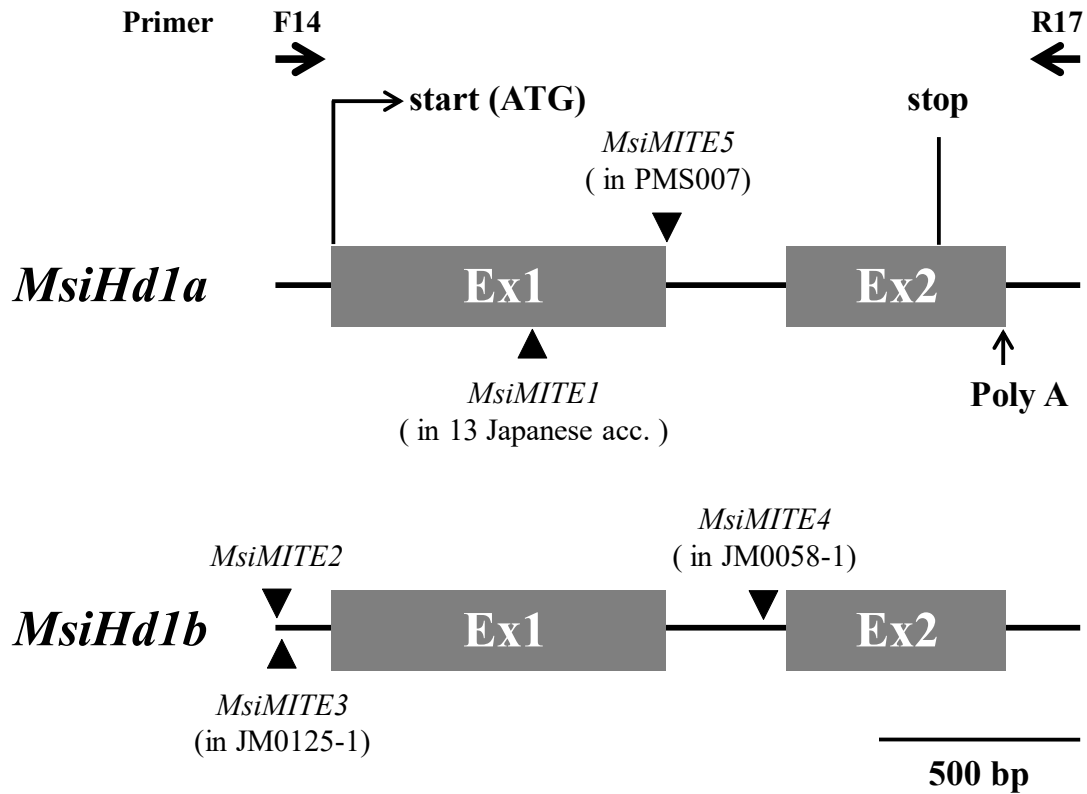


Fig. 3-1

The gene structure of *Miscanthus* CO/Hdl homologues, *MsiHd1*. Two types of homologues, *MsiHd1a* and *MsiHd1b*, were detected. *MsiHd1b* is a putative pseudogene, given that its sequences are discriminated unambiguously from *MsiHd1a* by a common MsiMITE2 insertion and additional indels with deleterious mutations, including one crucial, 1-bp insertion that causes a premature stop codon. The positions of the start and stop codon and polyA addition site are shown. All PCR products from the genus *Miscanthus* in this study were amplified by a pair of primers, F14 and R17, depicted as arrowheads above the figure.

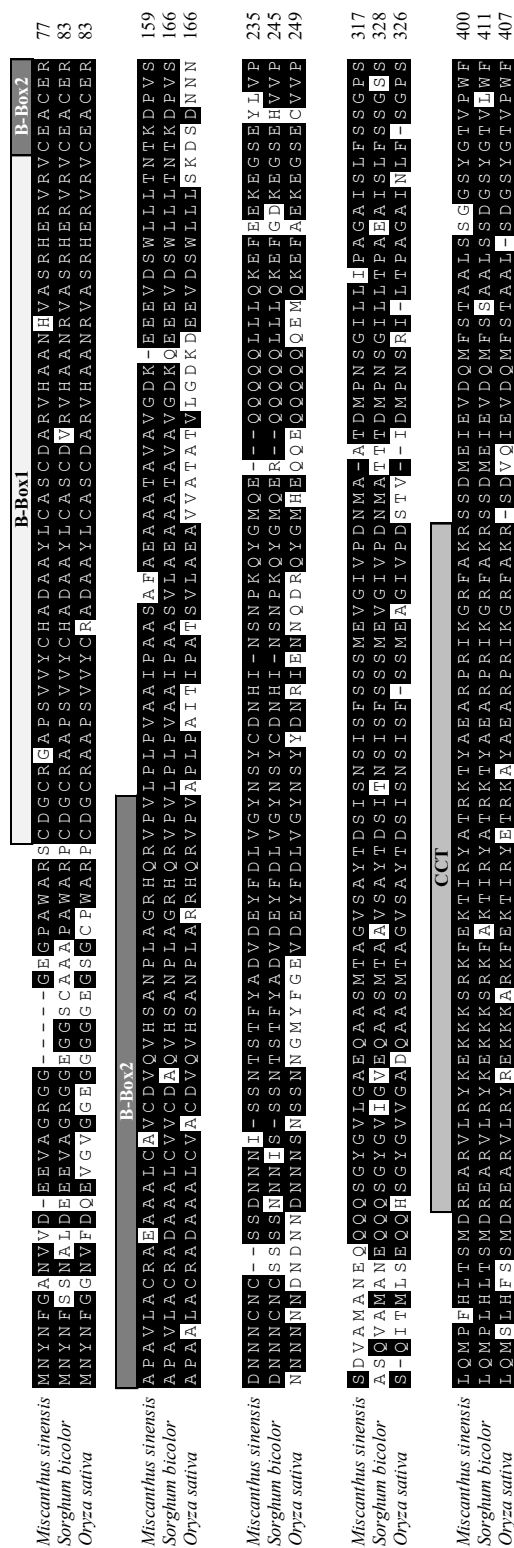


Fig. 3-2

Alignment of the *CO/Hdl* homologs from *Miscanthus sinensis* (a functional allele from JM0079-2), *Sorghum bicolor* and *Oryza sativa*. Amino acid sequences are available on NCBI as accession numbers AB973600, XP_002436860 and BAB17628, respectively. Highlights in black and dashes represent conserved amino acids among all three homologs and gaps in the alignment, respectively. The conserved B-Box and CCT domains, indicated with boxes above alignment were reported by Yang et al. (2014). Amino acid numbers are shown on right.

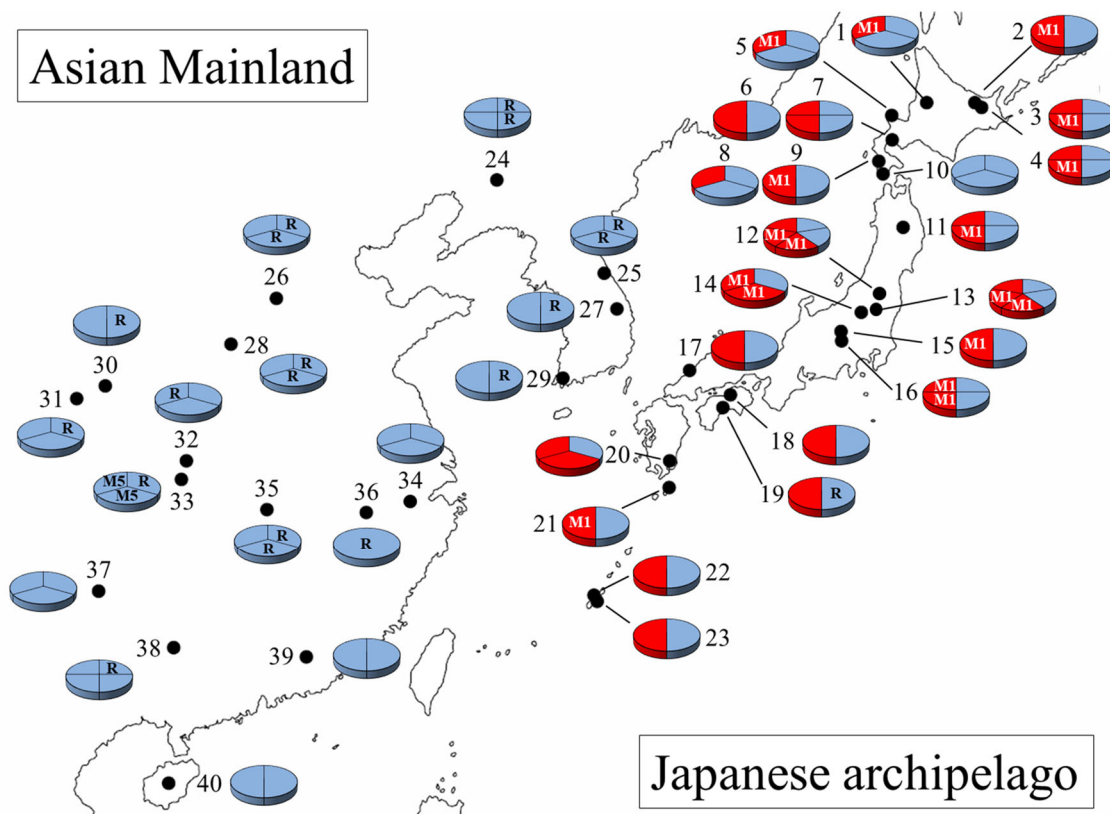


Fig. 3-3

Geographic distribution of *Hd1a* alleles in *M. sinensis* accessions from East Asia. Information regarding *MsiHd1b* was omitted for simplification. The site numbers on the map correspond to map numbers in Table 1 in Nagano et al. (2015). Pie charts with one to five pieces represent the number of detected alleles in *MsiHd1a*. Blue indicates functional alleles and red indicates non-functional alleles. R, revertant allele from MsiMITE1; M1, MsiMITE1; and M5, MsiMITE5.

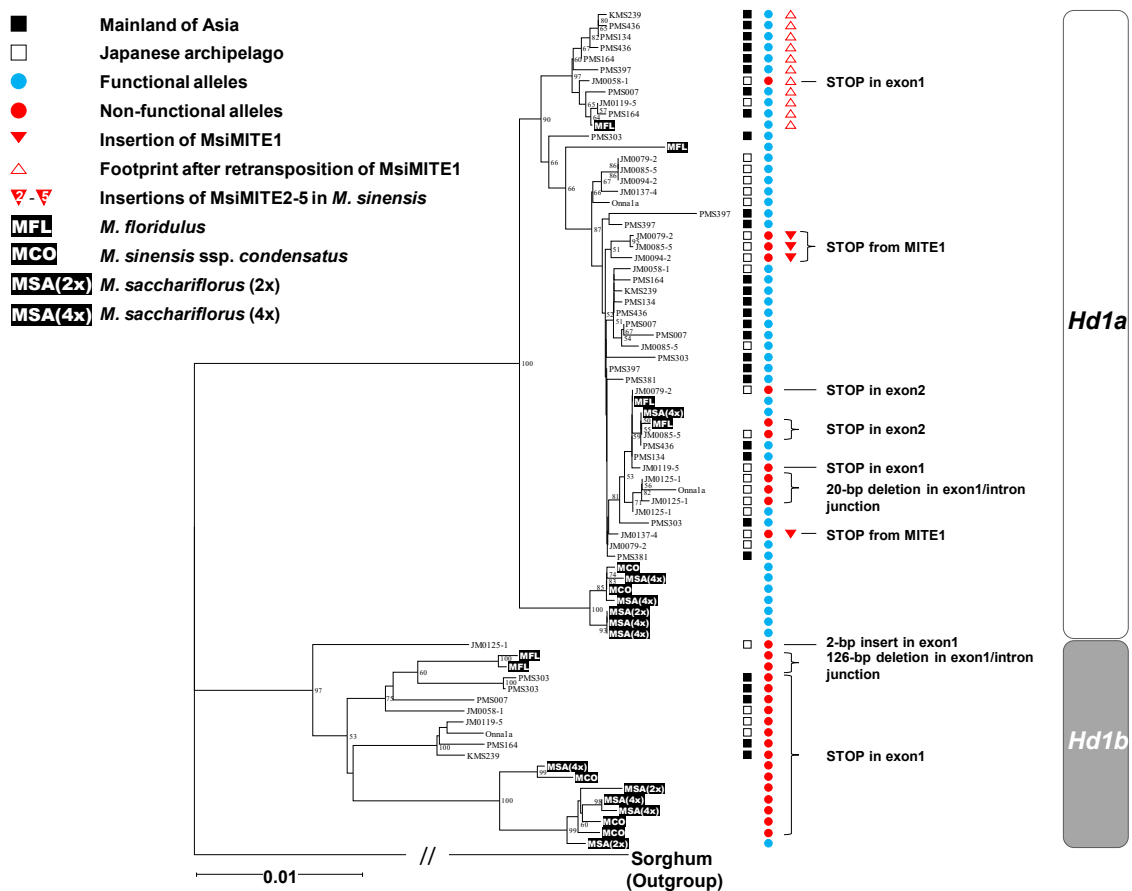


Fig. 3-4

Neighbor-Joining (NJ) tree showing the relationships among 54 *CO/Hd1* alleles of 16 accessions of *Miscanthus sinensis*, six *CO/Hd1* alleles from one of *M. floridulus*, five *CO/Hd1* alleles from one of *M. sinensis* spp. *condensatus*, three *CO/Hd1* alleles from one of *M. sacchariflorus* (2x), and eight *CO/Hd1* alleles from one of *M. sacchariflorus* (4x). To facilitate viewing this figure on a single page, only about half of the accessions analysed are shown here (Fig. 3-5 in next page is complete tree in this study or see Supplementary Fig. S2 at JXB online for the complete tree (Nagano et al. 2015)). Sixteen accessions of *M. sinensis* that represent a range of MITE insertions and latitudes of origin were included in this figure. *Sorghum bicolor* was used as an out-group. The phylogenetic tree was split largely into two clades, which were classified as two loci, *Hd1a* and *Hd1b*. All detected alleles of *Hd1b* in *M. sinensis* were non-functional. Major mutations that caused loss-of-function are shown to the right of the red circles, which represent non-functional alleles. The double slash on the out-group branch indicates shortening of the branch length by approximately half. Bootstrap values for nodes supported in >50% of 1000 bootstrap replicates are shown. The unnumbered squares, circles, and triangles represent the geographic origin of accessions, putative gene function, and the existence of MsiMITE1, respectively. The numbered triangles show MsiMITE2 to MsiMITE5.

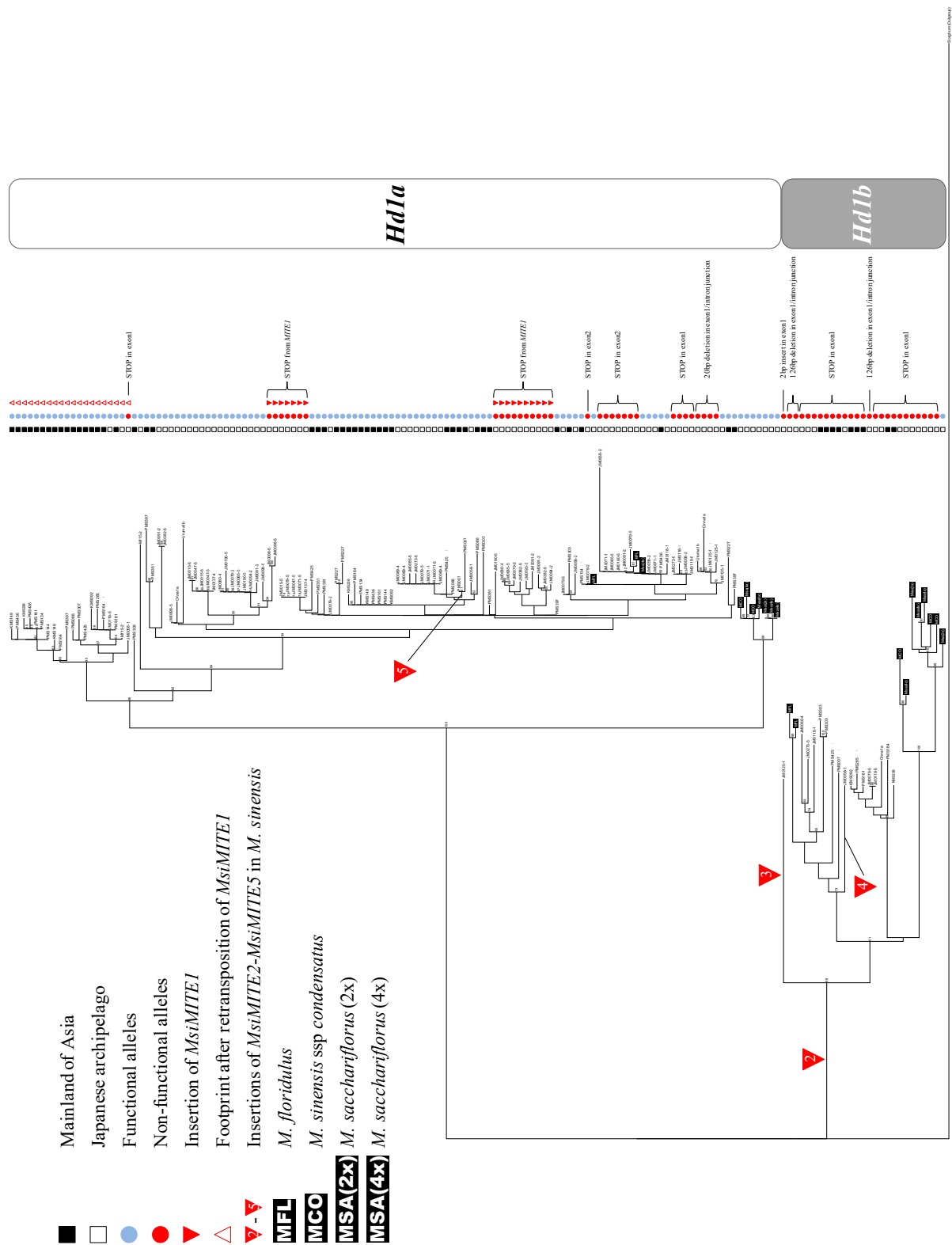


Fig.3-5 Complete phylogenetic tree constructed using neighbor-joining (NJ) method. 131 *CO/Hdl1* alleles of 40 *Miscanthus sinensis*, 6 of *M. floridulus*, 5 of *M. sinensis* ssp. *condensatus*, 3 of *Miscanthus sacchariflorus* (2x) and 8 of *M. sacchariflorus* (4x) were analyzed.

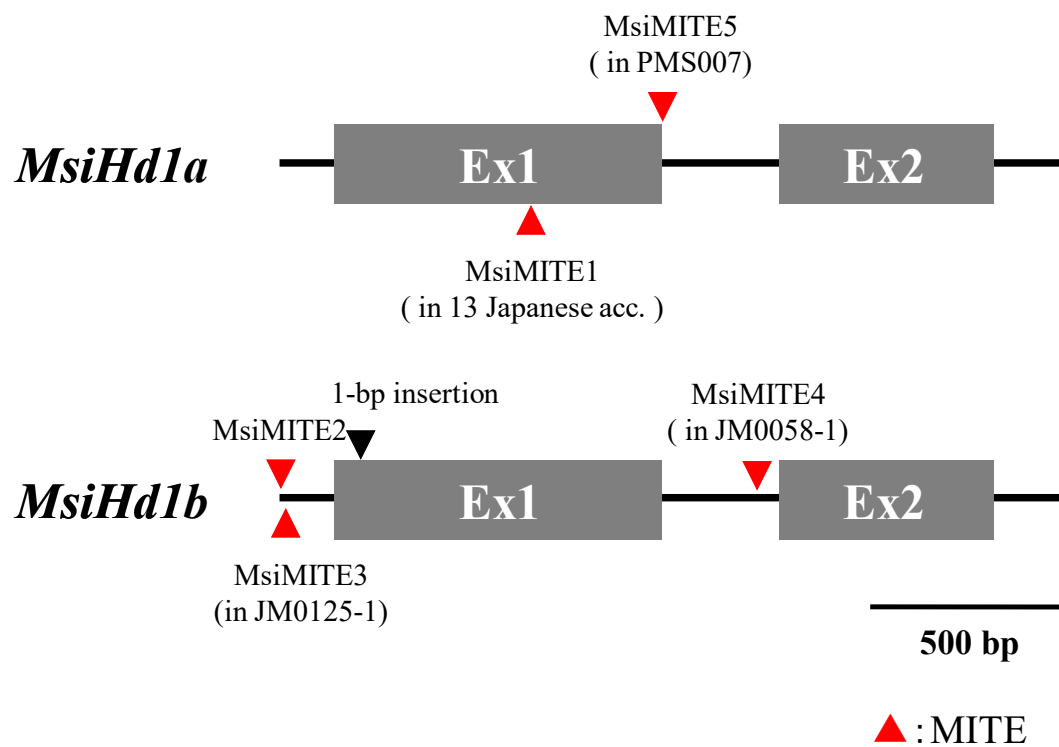


Fig. 3-6

Insertional sites of five miniature inverted transposable elements (MITEs) (MsiMITE1–5) are indicated by filled red triangles. *Miscanthus* accessions in which MITE sequences were detected are indicated in parentheses below the names of the MITEs.

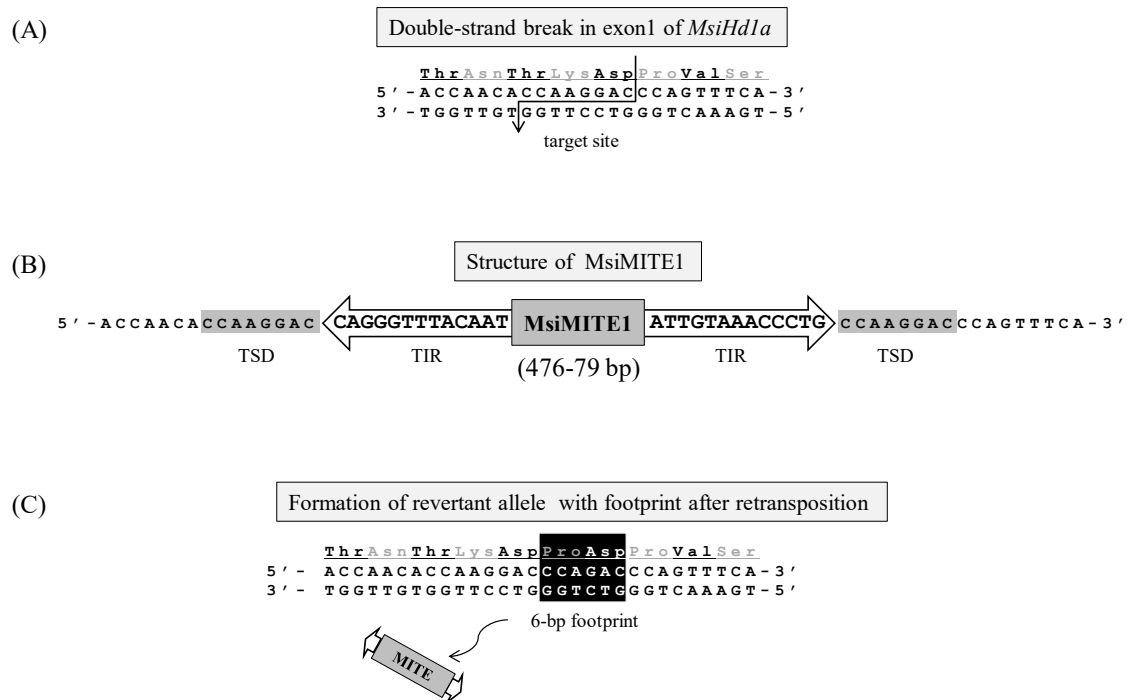


Fig. 3-7

The structure of MsiMITE1 and a schematic diagram of its insertion and retransposition. (A) A target site before insertion of MsiMITE1. (B) Miniature inverted transposable element (MITE)-like sequences are recognized by terminal inverted repeats (TIRs) and target site duplications (TSDs). (C) Revertant alleles contain a 6-bp footprint which encodes two additional amino acids (proline and aspartic acid) at the insertion-retransposition site of MsiMITE1.

		TIR (bp)	TSD (bp)	Size (bp)	Superfamily	Detected other Species (nucleotide identities(%))
5' - ATA	GGCGTGATTG	11	3	350-385	PIF/Harbinger	Sorghum (80%)
	MsiMITE2					
CAATCAGCCC						
ATA - 3'						
5' - CCCATACT	TAGGGATGAACGGATCGGATA	23	8	276	hAT	Sorghum (90%) Sugarcane (89%)
	MsiMITE3					
TATCCGTACCGTTTTCATCCATA						
CCCATACT - 3'						
5' - TCG	GGCGCGTTTAGTT	14	3	274	PIF/Harbinger	Sugarcane (78%)
	MsiMITE4					
AACTAAACAAGGCC						
TCG - 3'						
5' - ATTACTAC	CAAGGTTTTCATTATCGG	18	8	351	hAT	Sugarcane (87%) Switchgrass (83%)
	MsiMITE5					
CCGATAAAAAAACCTTG						
ATTACTAC - 3'						

Fig. 3-8

The structure of MsiMITE2 to MsiMITE5. The open arrows indicate terminal inverted repeats (TIRs) and the black highlighted letters represent target site duplications (TSDs). Based on the length of TIRs and TSDs, MsiMITE elements were classified to two superfamilies, *PIF/Harbinger* and *hAT*. Other species in which MITEs similar to MsiMITE2, MsiMITE3, MsiMITE4 and MsiMITE5 were detected by BLASTN search, and the corresponding nucleotide identities are shown.

第4節 考察

本章では、*MsiHd1* がススキゲノムにおいて複数座を持つことを明らかにした (Fig. 3-1, Fig. 3-4, Fig. 3-5)。複数座の存在は、*CO/Hd1* 座を単一座で持つソルガム、トウモロコシ、およびイネとは対照的に、ススキ属では普遍的な特徴であると考えられた。ソルガムゲノムと比較した *Miscanthus* 属における最近生じたゲノム重複の報告 (Kim et al. 2012; Ma et al. 2012; Swaminathan et al. 2012) は、*CO/Hd1* 座のコピー数の差異を一部説明することができる。彼らによる *M. sinensis* の大規模なゲノム解析は、*M. sinensis* ($x = 19$) が $x = 10$ の祖先種からの分岐後に染色体が倍加した 4 倍体種であることを明らかにした。*M. sinensis* に同定された複数の *MsiHd1* 座は、全ゲノム重複 (*MsiHd1a* および *MsiHd1b*) と、不等交差による局所的な遺伝子重複 (*MsiHd1a* のタンデムコピー化) によって引き起こされた可能性が考えられる。遺伝子重複は新しい機能を獲得するための進化的プロセスの 1 つでありうるが (Ohno 1970)、重複した遺伝子の一方は変異や遺伝的浮動による不活性化を受ける可能性がある (Hughes 1994; Force et al. 1999)。倍数化による複数の *MsiHd1* 座間における遺伝子機能の冗長性が、*MsiHd1b* への偽遺伝子化を可能にしたのかもしれない。

機能的な *MsiHd1a* アリルの数に関してアジア大陸の集団と日本の集団との間における顕著な分化は、最終氷期極大期後に中国南東部の退避地 (レフュジア)

から日本列島への移動が、アジア大陸における北進より先に起こったという Clark et al. (2014) の見解と一致する。Clark et al. (2014) はまた、初期の日本の *M. sinensis* 祖先集団が、1 つの明確なグループとしてヤングドリラス期を生き残り、そのグループはおそらくは短い生育期間に対する適応において強い自然選択に遭い、一方、アジア大陸の *M. sinensis* 集団は低緯度環境にかなり最近まで、長い生育期間を持つ地域にとどまっていたと推定した。しかしながら、本章における *MsiHd1* の系統樹は、日本列島とアジア大陸を隔てる明確なクレードを特定しなかった (Fig. 3-4, Fig. 3-5)。アジア大陸と日本に由来する *M. sinensis* 集団は本研究から、機能的な *MsiHd1* アリルの数は異なっていたが、類似した緯度から収集された両集団の遺伝子型は、共通の圃場で育てられた時には類似した成長期間を経て出穂した (結果省略)。このことは、両集団が同じ表現型の結果をもたらしながらも、異なる遺伝子型に基づく遺伝メカニズムを持つ可能性を示唆している。シロイヌナズナでは、開花を誘導するフロリゲンタンパク質 FT の上流 6 kb 内にある CAATT モチーフに ABC タンパク質複合体が結合し、そこへ CO タンパク質が作用してクロマチン構造を引き寄せ、*FT* 遺伝子発現を活性化させるというモデルが提唱されている (Laloum et al. 2013; Cao et al. 2014)。転写因子の ABC タンパク質複合体の 1 つに対応するイネのオーソログは *Ghd8* (*Hd5*) 遺伝子であり、Guo et al. (2021) はススキゲノムの第 13

および第7染色体上に、それぞれ *MsiGhd8A* と *MsiGhd8B* を同定した。両遺伝子の地理的分布調査と発現解析を行ったところ、いくつかの系統において *MsiGhd8B* の発現量が開花時期に影響を与える可能性が示された。ススキバイオマスの収量と品質を開花制御の観点から改善するには、他の開花調節遺伝子を含め、さらなる調査が必要であると考えられる。

M. sinensis の *CO/Hd1* ホモログに同定された5つの新規 MITE 様転移因子 (MsiMITE1-5) の他に、MsiMITE1 の再転移が推察される6bpのフットプリントを持った復帰型アレルが見出された (Fig. 3-7)。検出した5つの MsiMITE はサトウキビ、ソルガム、スイッチグラスのゲノムにおいて、類似配列の存在が明らかとなった (Fig. 3-8)。TIR と TSD が観察され、これらの MITE が他のイネ科植物種間においても共有されていることを示唆した。1990年代の初め以来、イネとトウモロコシの *Waxy (Wx)* 遺伝子近傍において、それぞれ MITE が報告された時 (Umeda et al. 1991; Bureau and Wessler 1992)、ヒトを含む動物や植物においても多くの MITE ファミリーが同定されてきた (Feschotte et al. 2002)。MITE は現在、6つのスーパーファミリー (*Tc1/mariner*、*PIF/Harbinger*、*hAT*、*Mutator*、*CACTA*、および *Micron*) に整理、分類されている (Lu et al. 2012; Han et al. 2013)。これらの定義において、MsiMITE1、MsiMITE3、および MsiMITE5 は *hAT* スーパーファミリー (8bp の TSD、>5bp の TIR)

に属し、MsiMITE2 および MsiMITE4 は *PIF/Harbinger* スーパーファミリー (3 bp の TSD、>4 bp の TIR) に属すると考えられた (Fig. 3-8)。

第4章 イネゲノムの遺伝子間領域

第1節 緒言

Thomas (1971) によって提唱された C 値のパラドックス、すなわち、異なる種の遺伝子の数は基本的に同じであるのに、ゲノムサイズが大きく異なることに関連して、様々なイネ科ゲノムの構造と機能が解析されてきた。遺伝地図レベルとメガベースにわたる物理地図レベルとの比較研究では、遺伝子の内容や順序といったゲノム構成要素が、イネ科ゲノム間において予想以上に保存されていることが明らかとなった (Gale and Devos 1998)。しかしながら、*Shrunken2* (*Sh2*: スクロース合成酵素) と *Anthocyanin1* (*A1*: アントシアニン生合成酵素) 遺伝子における遺伝子間領域の塩基配列は、トウモロコシ、ソルガム、イネの間で著しく異なり (Chen and Bennetzen 1996; Chen et al. 1998)、2 つの遺伝子間の物理的距離は、トウモロコシ、ソルガム、イネのそれぞれ約 140 kb、20 kb、20 kb であると報告された (Chen et al. 1997)。これらの研究は、近縁種間の種分化のプロセスや自然変異の様相を理解する上で、遺伝子領域よりも遺伝子間領域の方が適していることを示唆している。

1990 年代の細菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome (BAC)) ライブラリーシステムの登場により、物理的距離を持った地図と、個々の遺伝子間にお

ける分子生物学的な解析が大幅に容易になった (Shizuya et al. 1992; Zhang et al. 1996; Nakamura et al. 1997)。遺伝距離は生物ごとに異なり、高密度連鎖地図を作成するにしても、分子マーカーの数には限度があるため (Kurata et al. 1994)、1 センチモルガン (cM) のゲノム構造は十分に解明されてこなかった (Bennetzen 1997)。100 kb を越える DNA 断片のクローニングを可能にした BAC ライブラリーの利用は、新規遺伝子の単離のみならず、それまで困難であった数 cM にわたるゲノム構造解析を可能にした。連続した BAC クローンのコンティグを丁寧なステップで構築した物理地図による解析は、現在の次世代シーケンス解析へとつながるリシーケンス時代の基礎を築いてきた。一方で、シーケンスデータは遺伝子内部や隣接領域の変異を特定するのに役立ちながらも、ゲノム断片の繰り返し頻度などの定量的データが必要な場合には十分ではない。実際、真核生物ゲノムの主要な構成要素である多くの反復配列は、特にマイナーな生物種の場合には、DNA データベース上にまだ反映されていない可能性がある。シーケンシング技術の代わりに、サザンハイブリダイゼーション法は依然としてゲノムを構成するセグメントの反復性を解析するための合理的な手段であると考えられる (Springer et al. 1994)。

Waxy (*Wx*) 座は、古くからイネやトウモロコシで遺伝的に解析がよく進んでいる。通常、多数の植物材料を育成して遺伝解析に使用することは困難であるが、

花粉であればヨード反応を用いて、顕微鏡下で大量の染色花粉のウルチ性（青色に呈色）とモチ性（赤紫色）によって容易に区別できる。モチ性の変異個体同士を交雑し、F₁ 個体におけるウルチ性への復帰花粉個体の出現割合から遺伝的組換え価を求めたイネの微細構造遺伝地図が作られてきた（Li et al. 1968）。*Wx* 座は花粉胚乳および花粉におけるアミロース合成に関与する顆粒結合性デンプン合成酵素をコードしている（Sano 1984; Hirano and Sano 1991）。この遺伝子の発現は種子のアミロース含有量に影響を与える。これまでに、様々な *Wx* アリルが興味を引く遺伝学の研究対象として利用されてきた（Sano 1984; Okagaki and Wessler 1988; Makenzie and Rutger 1983; Cai et al. 1998; Hirano et al. 1998; Isshiki et al. 1998）。本章において、ジャポニカイネの BAC クローンを使用して、*Wx* 座近傍約 200 kb の物理地図を構築し、遺伝子間領域に存在する自然変異について調査した。200 kb のゲノム領域をカバーする、60 のセグメント（平均サイズ 5.7 kb）をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーション解析を行った。高コピーシグナルを検出するハイブリダイゼーションパターンは反復性配列に起因することが予想されたため、各反復性領域の構造的特徴をイネゲノムデータベースとの比較から明らかにした。

第2節 材料および方法

(1) BAC ライブラリーのスクリーニング

Nakamura et al. (1997) の記載の通り、*O. sativa* のジャポニカ品種 ‘シモキタ’ のプロトプラストに由来する 21,504 クローンからなる BAC ライブラリーをスクリーニングに使用した。BAC クローンを並べた高密度マトリックスレプリカの 7 枚のフィルターに対し、*Wx* 遺伝子配列を含む DNA プローブ (Hirano and Sano 1991) をハイブリダイズし、8 個の陽性クローンを得た (Fig. 4-1)。サザンハイブリダイゼーションには、ECL (Electro chemiluminescence) 遺伝子検出システム (GE Healthcare Pharma, Tokyo) を使用した。

(2) BAC クローンのサブクローニング

8 個の陽性クローンのうち、200 kb をカバーできる 2 つの代表的な BAC クローン DNA (125-G1 および 120-H10, Fig. 4-1) を *Sau3AI* で部分消化し、10～23 kb の画分を 0.6% アガロースゲルより精製した。分画した DNA を λ DASH ファージベクター (Stratagene, California) の *Bam*HI 消化物とライゲーションした。パッケージングは、GE Healthcare Pharma 社の方法に従った。ファージクローンの精製は、Sambrook et al. (1989) による方法に従い、200 個のファージを

ピックアップした。連続したオーバーラップファージクローン集団（コンティグ）を制限酵素地図構築に用いた（Fig. 4-2）。

(3) ゲノミックサザンハイブリダイゼーション

7種のイネからなる14系統（Table 4-1）をゲノミックサザンハイブリダイゼーションに使用した。トータルDNAは、Hirano et al. (1989) の記載の通り単離した。*Hind*III で消化した各DNAを0.8%アガロースゲルで電気泳動した。アガロースゲル内のDNAをナイロンメンブレン（Biodyne B, Pall, New York）へ転写し、ECL 遺伝子検出システムを使用して、サブクローンフラグメントをプローブとしてハイブリダイズした。メンブレンは0.5M NaCl、42°Cで20分間、標準的なECL条件で2回洗浄を行った。

(4) 反復領域の検出と同定

第6染色体短腕に座乗する *Wx* 座近傍の約200 kbの配列が、2つのイネゲノミッククローン（アクセッション番号 AP000559 および AP002542）より得られた。200 kbの配列を500 bpから成る390のセグメントに分割し、各セグメントをBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) サーチ (version 2.0,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) のクエリとして検索し、合計で 75 箇所の反復領域を検出した (Table 4-2)。イネゲノム上で高い類似性を共有する反復性領域間でアラインメントを作成し、それらの比較から反復因子の範囲を特定した。

第3節 結果

(1) 制限酵素物理地図の構築とサザンハイブリダイゼーション解析

21,504 個のクローンを含むイネ BAC ライブラリーより、*Wx* 遺伝子をプローブに用いて、8 個の陽性クローンをスクリーニングした (Fig. 4-1)。BAC クローンは更に、26 の λ フェージベクターへのサブクローン化後、それらのインサート配列を解析することにより、長さ 260 kb にわたる *Hind*III 制限酵素地図を構築した (Fig. 4-2)。ジャポニカ品種 ‘シモキタ’ のゲノム DNA に対し、260 kb 領域に由来する 60 のフラグメント (平均 5.7 kb) をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーション解析を行った。得られたハイブリダイゼーションパターンから、明瞭なシングルコピーバンド (クラス 1)、不鮮明な背景を持つシングルコピーバンド (クラス 2)、マルチコピーバンド (クラス 3)、および高コピー性バンドのみ (クラス 4) の、4 つのクラスに分類した (Fig. 4-2, Fig. 4-3)。

これらのパターンの差異は、60 の各フラグメントにおける反復性配列の有無を反映すると考えられた。続いて、7つの *Oryza* 属種に由来する 14 系統 (Table 4-1) の DNA に対して、同じくサザンハイブリダイゼーション解析を行った。品種 ‘シモキタ’ に対してクラス 4 に分類された各サイトでは、14 系統間においても類似した高コピー性のハイブリダイゼーションパターンが観察されたことから、反復配列の反復頻度と種類に、AA ゲノム種間における変化はあまり存在しないことを示唆した。一方、クラス 3 サイト (Fig. 4-2) では、14 系統間において著しく異なるコピー数の差異を検出した (Fig. 4-4) 。 *O. sativa*、*O. rufipogon* に属するアジア由来のイネ系統は、多数のハイブリダイゼーションシグナルを検出したのに対し、*O. glaberrima*、*O. barthii*、*O. glumaepatula*、*O. meridionalis*、および *O. longistaminata* に由来する系統では低コピーのシグナルを検出した。

(2) 200 kb のイネゲノムデータベースを用いた反復性配列の探索

2001 年の時点におけるイネゲノムデータベースから、これまで調査してきたイネ *Wx* 座周辺 260 kb の領域のうち、約 200 kb の塩基配列が入手可能であった。200 kb の領域を 500 bp に分割したセグメントをイネゲノムデータベース配列に対する BLAST 検索のクエリとした。Table 4-2 にまとめたように、200 kb

のゲノム領域から 75 の反復性配列を検出できた。75 のうち、41 は既知の転移性因子またはマイクロサテライト配列であり、残りの 34 は未同定の反復因子だった。反復因子の末端配列に Terminal inverted repeat (TIR) を持つ短い配列および 2 bp または 3 bp の Target site duplications (TSDs) を有する既知の Miniature inverted repeat transposable elements (MITE) 配列が見出された (Bureau and Wessler 1992; Bureau and Wessler 1994a; Bureau and Wessler 1994b; Bureau et al. 1996; Tarchini et al. 2000) 。興味深いことに、クラス 3 に分類した、*Wx* の約 50 kb 上流の領域 (Fig. 4-2) に、パラレトロウイルスである イネツングロ病ウイルス (Rice tungro bacilliform virus (RTBV)) に類似性を示す領域が存在した。イネツングロ病は熱帯アジアに発生するウイルス病で (Hibino 1994; Saito et al. 2019) 、このウイルスゲノムに相同性を持つ配列がイネゲノムに複数存在することがサザンハイブリダイゼーションの結果から明らかとなった (Fig. 4-4) 。

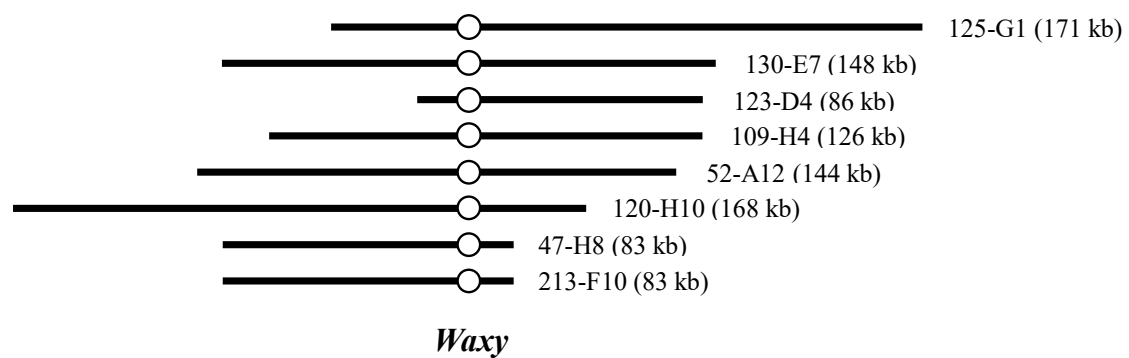


Fig. 4-1

Relative locations of the Bacterial Artificial Chromosome (BAC) clones that were isolated by probing the *Waxy* gene. Among eight clones obtained, 47-H8 and 213-F10 were identical. The numbers in parentheses indicate the size of each clone.

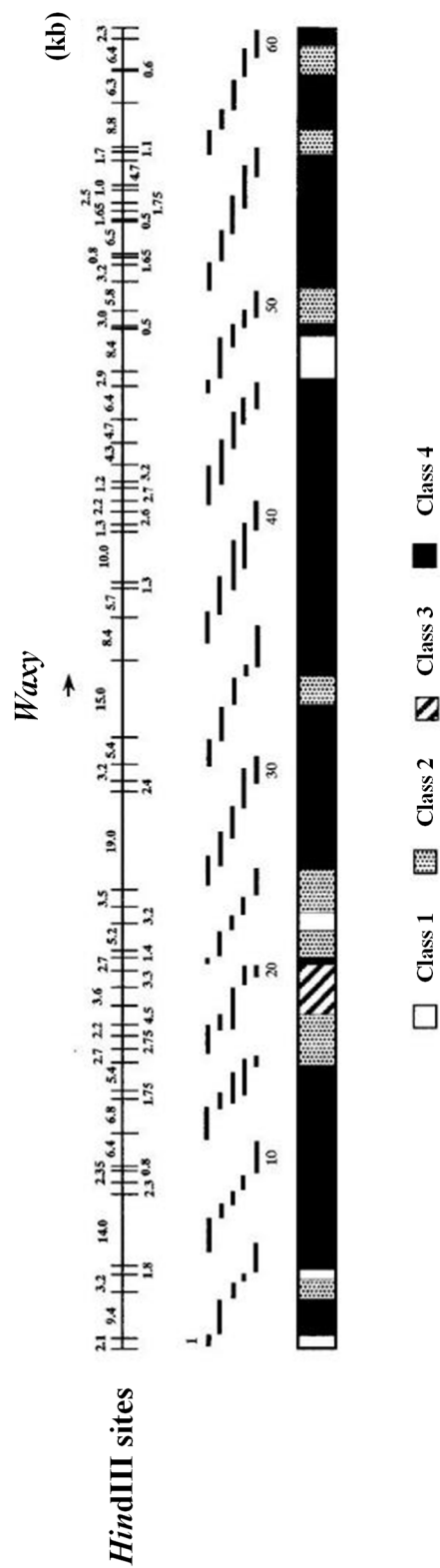


Fig. 4-2

Physical map constructed based on *Hind*III restriction sites, 60 overlapping fragments covering the 260-kb contig, and classification of their DNA fragments. The *Waxy* locus is present in the center of the map, and the arrow shows an orientation of the 5' to the 3' of the *Waxy* gene. Numbers above the map indicate sizes of the *Hind*III fragments which are demarcated by vertical lines. Sixty overlapping segments (black lines with numbers) covering the 260-kb contig were used for the probes. The numbers of these segments indicate an order from the left side of the contig. The resultant hybridization patterns were classified as Class 1-4 displayed in the wide box with the four patterns below the map.

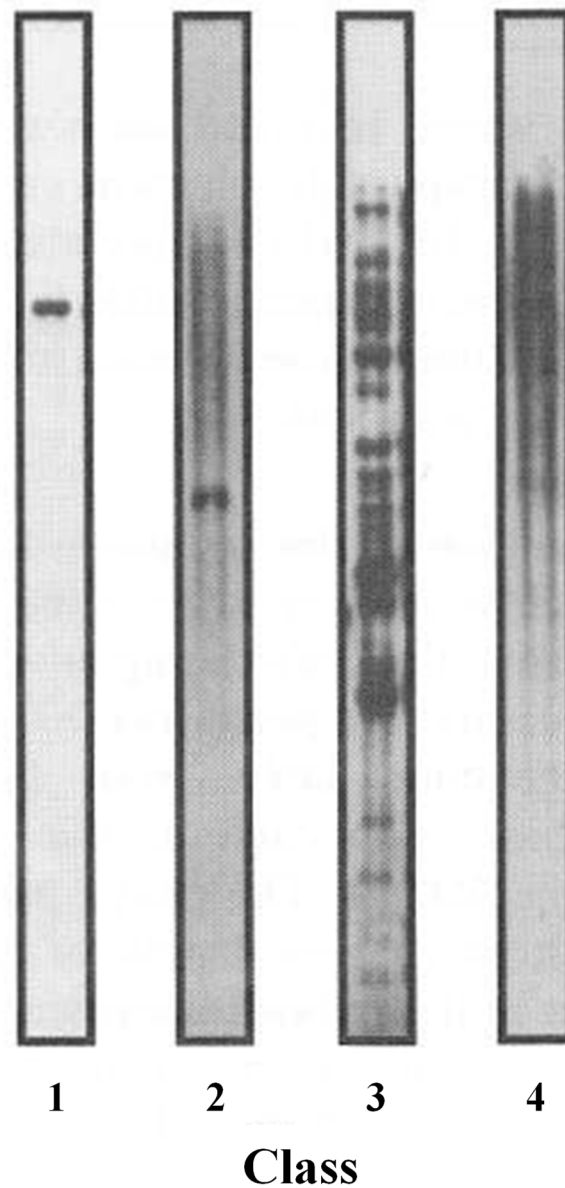


Fig. 4-3

Classification of the DNA segments using Southern blotting patterns for the 260-kb contig around the *Waxy* locus. The panels exhibit the typical hybridization patterns for the four classes: lane 1 shows the class 1 pattern, giving a single fragment of a few discrete fragments without a smeared background; lane 2 shows class 2, which shows a single fragment or a few discrete fragments with a background smeared pattern; lane 3 shows class 3, giving multi-discrete fragments without background; lane 4 shows class 4, giving a strongly smeared pattern.

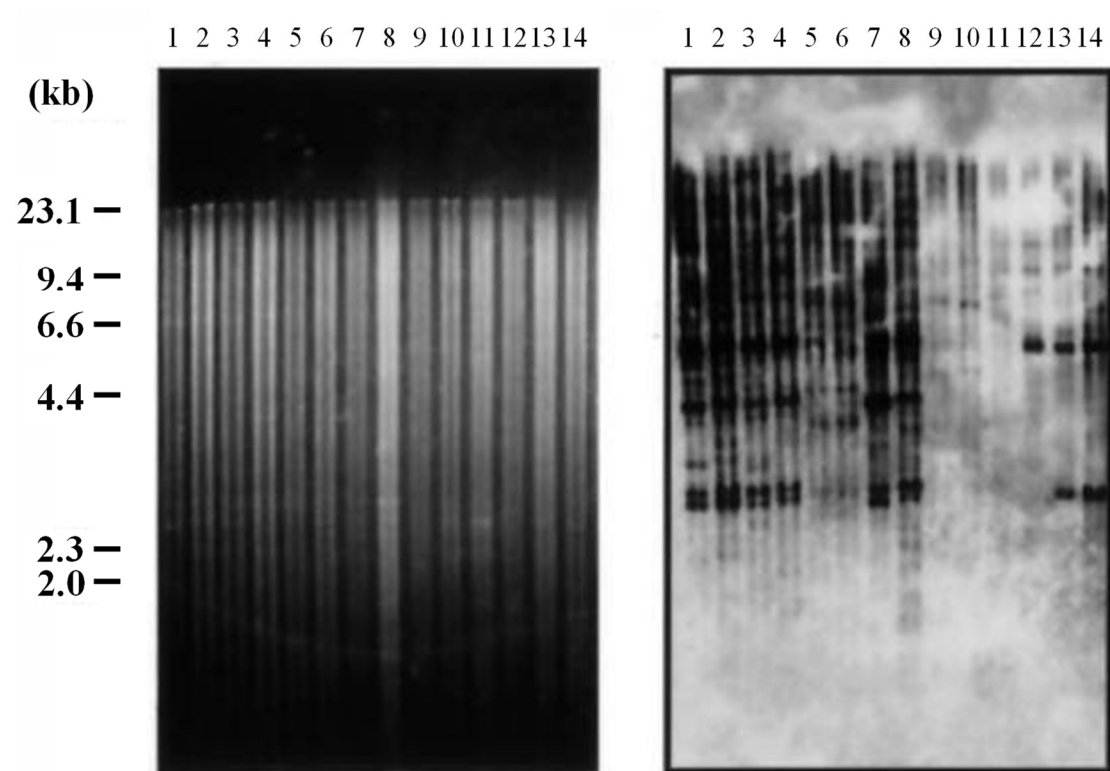


Fig. 4-4

Representative patterns resulted from genomic hybridizations in the 14 lines (Table 4-1). Class 3 probes (fragment no. 20 in Fig. 4-2) gave a multi-discrete fragment without a background.

Table 4-1. The samples of *Oryza* species with the AA genome used in the present study.

Sample no.	Species ^a	Cultivar or accession	Remarks
1	<i>O. sativa</i>	'Shimokita'	ssp. <i>temperate japonica</i> type from Japan
2	<i>O. sativa</i>	'T65wx'	Near-isogenic line of Taichung 65 with <i>waxy</i> from 'Kinoshitamochi' (BC ₁₂)
3	<i>O. sativa</i>	'221'	ssp. <i>tropical japonica</i> type from Indonesia
4	<i>O. sativa</i>	'PTB10'	ssp. <i>indica</i> type from India
5	<i>O. rufipogon</i>	W107	Annual type from India
6	<i>O. rufipogon</i>	W120	Perennial type from India
7	<i>O. rufipogon</i>	W1717	Perennial type from China (through International Rice Research Institute (IRRI))
8	<i>O. rufipogon</i>	W1718	Perennial type from China (through International Rice Research Institute (IRRI))
9	<i>O. glaberrima</i>	W025	From Guinea
10	<i>O. barthii</i>	W1592	From Cameroun
11	<i>O. glumaepatula</i>	W1185	From Suriname
12	<i>O. meridionalis</i>	W1625	From Australia
13	<i>O. longistaminata</i>	W1034	From Nigeria
14	<i>O. longistaminata</i>	W1572	From Nigeria

^a *Note*: The nomenclature for identifying *Oryza* species was made according to Sano (1990) and Morishima et al. (1992), although their nomenclature is confusing in the literature. Based on their sexual affinities, *O. glumaepatula* and *O. meridionalis* are regarded as distinct species and *O. nivara* as an annual type of *O. rufipogon*. All the materials are preserved at the National Institute of Genetics, Mishima, and Plant Breeding Laboratory, Hokkaido University, Sapporo.

Table 4-2. A list of repetitive sequences found in the 200-kb region around the *Waxy* locus and the classification as to transposable elements (TEs).

Class	Family	Subfamily	RS no. (Position) ^a	Reference
I	<i>p-SINE</i>	<i>p-SINE I</i>	41 (B: 90136-90259), 42 (B: 93272-93396), 64 (B: 124352-124461)	Umeda et al. (1991)
II	<i>CACTA-like</i>	<i>CACTA-like</i>	48 (B: 99148-100167)	Tarchini et al. (2000)
	<i>Tourist</i>	<i>Castaway</i>	63 (B: 123684-123948)	Bureau et al. (1996)
		<i>Ditto/Type F</i>	16 (A: 84793-85042), 27 (A: 121759-122008)	Bureau et al. (1996)
		<i>Gaijin</i>	56 (B: 112132-112282)	Bureau et al. (1996)
		<i>Type C</i>	12 (A: 80473-80735), 34 (B: 72197-72530), 37 (B: 78729-79073)	Tarchini et al. (2000)
			52 (B: 106052-106315), 57 (B: 112314-112654), 74 (B: 155068-155319)	
		<i>Type E</i>	59 (B: 117784-117985)	Tarchini et al. (2000)
		<i>Tabito I</i>	1 (A: 44224-14419), 21A: 46779-47024), 68A: 131694-131892)	Nagano et al. (2002)
		<i>Tabito II</i>	3 (A: 45815-48961), 7 (A: 68719-68871), 9 (A: 74458-74609)	Nagano et al. (2002)
		<i>Tabito III</i>	5 (A: 62279-62406)	Nagano et al. (2002)
		<i>Tabito IV</i>	10 (A: 75414-75763)	Nagano et al. (2002)
		<i>Tabito V</i>	30 (A: 133780-134025)	Nagano et al. (2002)
		<i>Tabito VI</i>	58 (B: 115872-116008)	Nagano et al. (2002)
	<i>Tnr1/Stowaway</i>	<i>Tnr1</i>	25 (A: 120553-120778), 35 (B: 73010-73256), 43 (B: 94109-94346)	Umeda et al. (1991)
		<i>Stowaway-Os4</i>	44 (B: 95126-95334)	Bureau et al. (1994a)
		<i>Stowaway-Os6</i>	70 (B: 137134-137200)	Bureau et al. (1994a)
		<i>Type A</i>	20 (A: 98815-99051), 69 (A: 136718-136965)	Tarchini et al. (2000)
		<i>Type B</i>	14 (A: 83018-83258), 21 (A: 109869-110107), 45 (B: 95600-95843)	Tarchini et al. (2000)
			61 (B: 122424-122661), 65 (B: 124952-125186), 66 (B: 127346-127569)	
		<i>Kiseru I</i>	17 (A: 90206-90432)	Nagano et al. (2002)
		<i>Kiseru II</i>	29 (A: 123860-124122)	Nagano et al. (2002)
		<i>Kiseru III</i>	88 (B: 81992-82218)	Nagano et al. (2002)
		<i>Kiseru IV</i>	47 (B: 98292-98457)	Nagano et al. (2002)
	<i>Mu-like</i>	<i>Mermite</i>	54 (B: 110574-110978)	Tarchini et al. (2000)
		<i>Onaga I</i>	19 (A: 96437-96575), 39 (B: 85285-86938), 40 (B: 86993-88410)	Nagano et al. (2002)
			50 (B: 103062-103426)	
		<i>Onaga II</i>	53 (B: 107036-107754)	Nagano et al. (2002)
	<i>Akan</i>	<i>Akan</i>	18 (A: 91324-91919)	Nagano et al. (2002)
	<i>Mashu</i>	<i>Mashu</i>	26 (A: 120622-121088), 75 (B: 155536-156804)	Nagano et al. (2002)
	<i>Saroma</i>	<i>Saroma</i>	33 (A: 137816-138389)	Nagano et al. (2002)
	<i>Shikotsu</i>	<i>Shikotsu</i>	55 (B: 111333-111487), 67 (B: 128728-128985)	Nagano et al. (2002)
	<i>Toya</i>	<i>Toya</i>	62 (B: 128362-128471)	Nagano et al. (2002)
Unknown	<i>Basho</i>	<i>Basho</i>	41 (A: 57083-58173), 46 (B: 96817-98291), 49 (B: 100171-100705)	Turcotte et al. (2001)
			60 (B: 120882-121251)	
	<i>Explorer</i>	<i>Explorer</i>	28 (A: 123621-123805)	Bureau et al. (1996)
	<i>Wanderer</i>	<i>Wanderer</i>	8 (A: 69603-69824)	Bureau et al. (1996)
	<i>Type Unique</i>	<i>Type Unique</i>	32 (A: 186026-186128), 36 (B: 75964-76185)	Tarchini et al. (2000)
	<i>Moiwa</i>	<i>Moiwa</i>	73 (B: 151334-154187)	Nagano et al. (2002)
	<i>Rishiri</i>	<i>Rishiri</i>	71 (B: 139698-139937)	Nagano et al. (2002)
	<i>Shari</i>	<i>Shari</i>	51 (B: 103834-104257)	Nagano et al. (2002)
	<i>Taisetsu</i>	<i>Taisetsu</i>	31 (A: 135339-135595)	Nagano et al. (2002)
	<i>Teine</i>	<i>Teine</i>	6 (A: 65425-65665)	Nagano et al. (2002)
	<i>Tengu</i>	<i>Tengu</i>	15 (A: 84494-84563)	Nagano et al. (2002)
	<i>Youtei</i>	<i>Youtei</i>	72 (B: 153655-153790)	Nagano et al. (2002)
	RTBV-like	RTBV-like	23 (A: 112058-119385)	Nagano et al. (2002)
	Microsatellite	MRG6379	11 (A: 79154-79181)	AY024054
		MRG0415	13 (A: 81499-81522)	AY018090
		(AT) n	22 (A: 111644-111987)	Nagano et al. (2002)
		(AT or AC) x 124	24 (A: 119462-119713)	Nagano et al. (2002)

^a: RS (repetitive sequence) no. is indicated below each red box in Fig. 1 in Nagano et al. (2002).

Numbers in parentheses show the nucleotide position in accession no registered in AP000559 (A) or AP002542 (B).

第4節 考察

Deshpande and Ranjekar (1980) は Cot 解析 (Flavell et al. 1977) により、反復配列がイネゲノムの含有量の 50% を占めると推定した。Tarchini et al. (2000) は、イネ第 11 染色体における *Adh1-Adh2* 遺伝子間領域 340 kb の転移因子の割合を 28.5% と算出し、Turcotte et al (2001) はイネゲノムの 910 kb の調査から、転移因子の割合を 19.9% と報告した。本章ではイネゲノムの遺伝子間領域を調査する目的で、*Wx* 座近傍の 200 kb について解析を行い、全体の 15% に相当する反復領域を見出した。散在する反復 DNA は、真核生物のゲノム骨格における基本的なフレームの本質的な構成要素である (Britten and Kohne 1968)。多くの場合、反復配列は転移因子 (Transposable elements) であり、通常 2 つのクラスに分類される。クラス I は、RNA 中間体によって複製的に転移するレトロエレメントであり、クラス II は非複製型のエレメントで、DNA はカットアンドペースト様式で転移する (Charlesworth et al. 1995; McDonald 1999)。反復配列は、植物ゲノムの主要な構成要素であることが知られており、トウモロコシでは、*Adh1* (*Alcohol dehydrogenase 1*) 座周辺の 280 kb の DNA 領域が、コピー数とゲノム構成に関して特徴づけられた (Springer et al. 1994)。トウモロコシゲノム DNA の 280 kb のうちの最大で 197 kb の領域が反復性のセグメントだった。この比率は、トウモロコシゲノムの 60~80% が反復配列を含むという

Flavell et al. (1974) や Bennett and Smith (1976) など、その他の古い推定値とも一致していた。トウモロコシゲノムでは、レトロトランスポゾンのような転移因子が遺伝子間領域に介在していた (Bennetzen et al. 1994; San Miguel et al. 1996, 1998)。本章において、*Wx* 座近傍の 200 kb 領域から 75 の反復因子を同定し (Table 4-2)、その内の 41 は既に報告のある転移性反復配列であった。調査した領域内には LTR (Long terminal repeat) を持つような 5 kb を越える長い反復因子は存在せず、多様で豊富な短いクラス II の転移因子が遺伝子間領域に存在しており、以上のような反復配列の特徴は、イネの全ゲノム調査の見解とも一致する (Turcotte et al. 2001)。同様に、コンパクトなシロイヌナズナのゲノムにもクラス I の転移因子が比較的少なく、クラス II の転移因子が豊富に含まれる傾向が報告されている (Le et al. 2000)。

Rice tungro bacilliform virus (RTBV) ゲノムに相同性を持つ配列が 200 kb 領域内に見出され、イネゲノム内に複数の相同配列の存在が明らかとなった。植物のパラレトロウイルスの DNA は、宿主染色体に高頻度で組み込まれる事例が報告されている (Jakowitsch et al. 1999; Harper et al. 1999; Ndowora et al. 1999)。イネツングロ病は熱帯アジアに発生するウイルス病で、媒介昆虫のヨコバイの吸汁により、RTBV と RTSV (Rice tungro spherical virus) との共感染により引き起こされる (Hibino 1994; Saito et al. 2019)。このクラス 3 の領域をプローブ

に用いた *Oryza* 属 14 系統に対するサザンハイブリダイゼーション解析は、アジア地域に分布する系統において、RTBV 様配列が高いコピー数のシグナルを検出するのに対し、アフリカやその他の地域由来の系統では低コピー数であることを明らかにした (Fig. 4-4)。興味深いことに、アジアのイネと、アフリカなどその他の地域のイネとでは、ツングロ病に対する感受性が異なることが知られている (Kobayashi and Ikeda 1992)。アジアのイネはツングロ病に感染するものの、枯死するまでには至らないのに対し、アフリカのイネは 4 週間で全身に壊死が起こる。イネの 12 本の染色体にはウイルスゲノムの断片が多数、存在することが確認されており (Liu et al. 2012)、ゲノムに散らばったウイルス様配列を再構成すると RTBV の 8 kb のゲノム配列に類似した、7.5 kb の内在性 RTBV 様配列、eRTBV 配列として再現することができた (Kunii et al. 2004)。この内在配列は、穀類で最初に同定された内在性パラレトロウイルスとして報告された。RTBV に対する病害抵抗性の程度と、ウイルス様配列断片のコピー数との関連が検証されるきっかけとなり、現在も研究が進められている (Liu et al. 2012; Chen et al. 2014)。

第5章 総合考察

インドネシア在来の熱帯ジャポニカ ‘Silewah’ は、耐冷性 QTL を有することから、北海道イネの耐冷性強化のための育種母本系統として利用されている (Mori et al. 2011) 。この在来品種 ‘Silewah’ を収集したかつての田園地域は都市化が進行し、現在では近隣地区においてでさえもこの品種は使われなくなっている (Ebana 2018) 。似たような状況は日本国内にも起きている。1956 年に品種登録された ‘コシヒカリ’ は 1979 年から現在まで 2 位以下を大きく引き離す作付面積第 1 位を誇るブランド米となっている。Nagamine et al. (2000) によれば、在来品種栽培について日本国内の農家を対象に調査を行ったところ、残存する在来品種は過去 10 年間で半減していた。現在、工業化と都市化の進行、森林の伐採などにより、世界の作物の遺伝資源は激減している。この状況は特に、戦後の緑の革命を期に、加速度的に進行した。歴史上のどんな人物よりも多くの命を救ったとして、米国の農学者ノーマン・ボーローグにノーベル平和賞が 1970 年に授与されたが、その一方で、緑の革命では多くの問題点も指摘されている。従来行われてきた伝統的な農法と在来種を使用していた時には必要のなかった灌漑施設、肥料、農薬、農業機械が、農民に要求された。このような高額な初期投資のできない貧農家は革命の恩恵にあずかれず、上・中層農家との貧富の格差を広げることとなった。また、‘IR8’ など HYVs の導入はモノカルチャー化を押

し進め、病気が蔓延した時に、かつては別の性質の品種が生き残り、全滅を回避できたはずの保証が今では失われた。このように、大規模かつ広範囲な農地造成により生み出された耕地に単一の優良品種を導入することは、これまでバランスが保たれていた大小の動植物や土壌微生物などの生態系に大きな変化をもたらす。結果として、数年の後に、導入した高収量や抵抗性の品種が、これまでは問題にならなかったはずの土壌細菌や昆虫類によって脅かされる事態へと発展する。今後は長期的な観点に立って、産業の振興や地域に貢献する多様な遺伝資源の保存を進めていく必要がある。

イネは湛水耐性を持つ植物であるが、通常の栽培イネは長時間にわたる水没条件下では生存できない。バングラデシュ、ミャンマー、タイなどの東南アジアのモンスーン地域では雨季により、毎年数メートルの深さに達する洪水が発生する。この地域に適応した浮イネという野生および栽培種のイネは、急激な増水環境に対しても、節間を急速に伸長させ、上位葉と穂を水面上に保ち酸素を摂取してこの特殊な環境を生き延びる (Kende et al. 1998; Hattori et al. 2011; Mittal et al. 2022)。やがて水が引いた後も正常に生育し、その後の登熟と収穫を果たすことができる。この浮イネ性という節間伸長の促進に働くのは *Snorkel1 (SK1)* および *Snorkel2 (SK2)* という、通常の栽培イネは持たない2つの遺伝子が関与する (Hattori et al. 2009)。そしてもう1つ重要なことは、ゲノムワイド解析によ

って明らかとなった、浮イネ性を持つ系統に共通した多型を持つ *Sd1* アリルの存在がある。*SK1*、*SK2*、そして浮イネ特異的な *Sd1* アリルとの組み合わせにより、増水時の急速な節間伸長の促進において、相乗的な伸長効果を生み出すことが明らかにされている (Kuroha et al. 2018)。*Sd1* 遺伝子は本研究の第 2 章でも扱ったが、*Sd1* は栽培イネの機能欠失型アリルにおいて半矮性形質を示すのに対し、浮イネでは逆に節間伸長形質の重要遺伝子として東南アジア地域で利用されていることは大変興味深い。この浮イネ特異的なアリルの起源を野生イネ (*O. rufipogon*) を含めた系統で調査した結果、南アジアや東南アジアの野生イネにおいてこのハプロタイプを持つ系統が見出され、この地域の野生イネ集団を含めた系統が広く保持する *Sd1* アリルであることが明らかにされた (Kuroha et al. 2018)。このような東南アジアのモンスーン地域における長期の雨による「深水洪水」に *Snorkel* 遺伝子が重要であるのに対し、一方で、短期間の豪雨による「冠水洪水」と呼ばれる比較的水深の浅い水没には、イネ第 9 染色体上に座乗する *Submerge1* (*Sub1*) が重要な役割を果たす (Xu et al. 2006)。*Sub1* QTL の実体は 3 つの遺伝子のクラスターで構成されており、*Sub1B* および *Sub1C* の 2 つのタンデム遺伝子は‘日本晴’をはじめとした通常のイネにも保存されているが、*Sub1A* は冠水耐性のある系統にのみ存在する。IRRI ではこの *Sub1A* 遺伝子を導入して冠水耐性を獲得した「Scuba rice」を開発し、メコン

デルタ地域の稲作への洪水被害改善に役立てている。ただし近年、この地域では内陸部への海水侵入も問題視されており、今後は冠水耐性に加えて塩害耐性を持ったイネの開発も必要となっている。Kitomi et al. (2020) はインドネシアのイネ品種 ‘Gemdjah Beton’ が保持する第 7 染色体上の地表根遺伝子 *qSOR1* を ‘ササニシキ’ へ導入し、通常は土壌中に伸長する根が土壌表面を伸長するように改変したところ、塩害による収量減少が ‘ササニシキ’ に比べ、約 15% 改善した。この *qSOR1* 遺伝子はインドネシアの一部の品種群のみが保持している。*qSOR1* 遺伝子のホモログはイネ以外の作物にも存在することから、根系改良によるトウモロコシやダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) など畑作物の耐湿性改善にも有効であると期待されている。

栽培化が始まったとされる 1 万年前以降、何千年もの間、作物の改良は人類の知識と、時には偶然得られた経験によって、意識的・無意識的に野生植物から栽培植物への改良が時間をかけて進んできた。1900 年のメンデルの法則の再発見を経て、現在私達は科学的知見に基づいて計画的に作物の改良を加速化させている。遺伝子組換え作物やゲノム編集などの新技術の現れた現在においても品種改良の基本は交雑育種であり、交雑して得られた分離集団は形質の幅を広げ、育種家はその中から遺伝子の組み合わせの良いものを見極め、選抜し、品種として固定する。この過程には、選抜する技術、高度な栽培技術の発展が不可欠

であるが、最も重要なことは、幅広い遺伝資源材料が自然界に存在することである。収量性や様々な抵抗性に関わる遺伝子にせよ、農業有用遺伝子はそれ 1 つで解決できる事例は少なく、複数の遺伝子が組み合わされて初めて効果が発揮できる。例えばジャポニカ米の低アミロース米の発現に Wx^b 遺伝子は必須であるが (Hirano et al. 1998; Isshiki et al. 1998)、インディカ系統が保持する Wx^a を Wx^b へ遺伝子置換しても期待通りにアミロース含量を低下させることはできなかった (Mikami et al. 2000)。このことは、第 2 章で見た 'A58' x W1944 (*O. rufipogon*) の分離集団の結果と同様で、相互作用する他の遺伝子の存在によって導入遺伝子単独では形質を自由に変更できないことを意味している。実際、これ 1 つであらゆる問題を解決できるような改良遺伝子の報告はまだ少なく (Zhou et al. 2019)、私達は様々な遺伝的背景を想定した準備をしておく必要がある。これまで行われてきた品種改良の多くは、平均的なその地域環境を前提として行われてきている。しかし近年、想定外の天災が連日報道されている。現在の農業は、限られた少数の品種に依存し過ぎており、今後環境が大きく変化する中でどのような育種目標を持って品種を作るのが重要である。育種とは、遺伝子の最適な組み合わせを探すことと表現することもできる。地球温暖化に伴い、今後は地方の在来品種や近縁野生種などの遺伝資源保護の問題を含め、人と農

地が持続的に存続するために、地球環境全体のバランスを考慮した育種モデルを構築していくことが必要である。

本研究では、イネ科植物の自然変異に焦点を当て、育種上重要な収量性に関わる稈長や開花形質の遺伝子領域、ならびに遺伝子間領域において調査を進めてきた。イネ *Sd1* を対象とした遺伝解析は、作出した準同質遺伝子系統の調査が、高知大学によって現在も継続中であり、*sd1* 変異アリルを用いたイネ育種分野への応用が期待される (Rana et al. 2021)。ススキ開花遺伝子では、HD1 タンパク質と共に複合体を形成する GHD8 の研究が、ススキ *Ghd8* (*MsiGhd8*) の RNA 発現データの解析から、Guo et al. (2021) によって報告されている。また、ススキドラフトシーケンスの塩基配列情報が 2017 年に公開されたことにより、*MsiHd1* や *MsiGhd8* を含む主要な開花遺伝子が、ススキの 19 本の染色体上にマップすることが可能となった (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Msinensis_v7_1)。本研究で明らかにした *MsiHd1a* および *MsiHd1b* のようなススキ属が示す複数座の特徴が、他の多くのススキ開花遺伝子においても同様であった。このススキゲノムのドラフトシーケンス情報を用いて、ススキ *MsiHd1* 内に見出された 5 種類の MITE 配列 (MsiMITE1-MsiMITE5) が、ススキゲノムにおいて実際に多数反復していることも確認できた。イネ 200 kb ゲノム領域から見出された RTBV 様配列の最新の知見では、イネゲノム内に見出

されたウイルス様配列が、現存するツングロ病ウイルスの RTBV ではなく、その祖先ウイルスに起源が求められることや、内在化のイベントが複数起源であったことなどが、イネの種分化や栽培化との観点から現在、議論されている (Chen et al. 2014)。200 kb の領域から見つかった主要な反復因子である MITE 配列の 1 つは、イネの 12 本に多数反復して散在する特徴を活かし、イネ QTL を検出する分子マーカーとして実際に利用された (Onishi et al. 2007)。以上のように、本研究からイネとその近縁野生種、ならびにススキが保有する多様な自然変異を明らかにでき、それら自然変異を含んでいる種、品種、系統は未だ有効な育種素材として活用できる可能性を再認識できた。今後も植物集団の自然変異が持つシーケンス情報を活用し、新たな多収性や環境ストレス耐性等の新形質を備えた品種開発への貢献が期待できるものとする。

要旨

イネ科植物は、イネ (*Oryza sativa*) に代表されるような食糧として、また、近年ではススキ属植物 (*Miscanthus* spp.) のようなバイオマス資源作物としても有益な植物である。今後予想される地球上の人口増加、ならびに地球温暖化による気象変動の対応には、イネ科植物の果たす役割は大きく、そのための優良品種の開発が必要不可欠である。本研究では、イネとその近縁野生種ならびにススキにおいて、主要な農業形質に関連する遺伝子等についてシーケンス解析を行い、ゲノムの自然変異を調査した。その結果、植物集団中には自然変異が豊富に保存されていることを明らかにでき、今後の新品種開発において、集団にみられる自然変異を利用することの重要性を示唆した。

食糧増産を目的とした 1960 年代のイネの「緑の革命」において、半矮性遺伝子 *Semi-dwarf1* (*Sd1*) の変異アレルを用いた短稈の高収量品種群が開発された。高窒素施肥下における短稈形態は、耐倒伏性と高い種子生産性をもたらす。*Sd1* 遺伝子はジベレリン生合成酵素の 1 つである GA20 酸化酵素 (*OsGA20ox-2*) をコードする。*Sd1* には、インディカ品種の ‘低脚烏尖’ (DGWG) 由来の機能欠失型自然変異アレルが存在する。このアレルの由来を調査するため、野生イネ 8 系統および栽培イネ 2 系統の計 256 系統において、系統樹解析を行った。その結果、DGWG アレルは栽培イネだけでなく、野生イネ (*O. rufipogon*) の系統

W1944 からも検出された。*Sd1* 座から数 cM の距離にある塩基配列を比較したところ、DGWG アリルを含む染色体領域が、高収量品種群から W1944 へ最近浸透交雑したのではなく、野生祖先種に由来する可能性が示された。一般的に自然界では、半矮性形質は日照条件などの面で、競争力に乏しく不利な弱有害形質であると考えられている。しかしながら、栽培イネ系統 ‘A58’ (*Sd1/Sd1*) と W1944 (*sd1/sd1*) との F₅ 交雑集団 96 個体の解析から、DGWG アリルをホモ接合で有する個体であっても、長稈を示す分離個体が観察された。量的形質遺伝子座 (QTL) の組み合わせ次第で DGWG アリルが隠れた変異として野生イネ集団内に長く受け継がれ、近代農法に適した半矮性に貢献する変異アリルの 1 つとして利用されてきた状況が示唆された。

栽培イネ *O. sativa* にはインディカとジャポニカの亜種が存在し、インディカ系統がジャポニカ系統よりも平均して長稈であるという一般的な傾向がイネ研究者の間で認識されていた。そこで、反復親に ‘IR36’ (インディカ品種) を用いた連続戻し交雑により、インディカおよびジャポニカ由来の *Sd1* 座をそれぞれ有する 5 つの準同質遺伝子系統を作出し、稈長形質を調査した。札幌市および高知県南国市における 2 つの試験地での観察の結果、いずれもインディカ由来の *Sd1* 座を有する系統が、ジャポニカ由来の *Sd1* 座の系統よりも長稈を示した。*Sd1* 座の塩基配列を比較したところ、エキソン 1 とエキソン 3 にそれぞれ 1 箇

所の非同義置換が認められた。これはジャポニカ由来の *Sd1* 座に生じた弱い漏出型変異であると考えられ、それぞれを *SD1-in*(t) および *SD1-ja*(t) と名付けて両者を区別した。

ススキ属 (*Miscanthus*spp.) は、東アジア原産の多年生 C₄ 植物であり、冷涼地域における有望なバイオマス資源作物である。開花は、地域や季節への適応を左右する重要な形質であり、バイオマス生産量を改善するための育種上、重要な標的形質でもある。開花調節に中心的な役割を果たす *CONSTANS/Heading date1*(*Hd1*) 遺伝子のホモログを、2 倍体植物であるススキ (*M. sinensis*) ゲノムからクローン化し、*MsiHd1* と名付けた。更に、日本列島由来のススキ 23 系統と、中国大陸由来の 17 系統を用い、合計で 131 のホモログをクローニングし、塩基配列を決定した。2 倍体であるススキゲノムの各系統からは、2~5 種類の *MsiHd1* アリルを同定できた。1 つの系統が 5 種類のアリルを保持するためには、3 つの遺伝子座が必要となることから、ススキゲノムには、少なくとも 3 つの *MsiHd1* 座が存在することを示唆した。遺伝子系統樹の構築から、座の 1 つは独立したクレードを形成する偽遺伝子座であると考えられ、*MsiHd1b* と名付けた。残りのクレードに属する *MsiHd1a* は興味深いことに、日本由来のほぼ全ての系統 (22/23) が少なくとも 1 つ以上の機能欠失型アリルを持つのに対し、中国大陸由来の系統は全て (17/17) が機能的なアリルしか持っていなかった。

これらの結果により、ススキ *MsiHd1* 座は中国大陆と日本列島由来の系統間では、開花調節機能への依存度が大きく異なる可能性が示唆された。

イネ *Waxy* 座は、胚乳と花粉のアミロース合成に関わる顆粒結合型デンプン合成酵素をコードする。*Wx* 座近傍 200 kb の物理地図構築が計画され、構築の過程で行われたサザンハイブリダイゼーション解析と BLAST 解析は、この領域に存在する 75 個もの反復配列を明らかにした。反復性転移因子の一種である Miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) がこの領域の主要な反復配列 (45/75) であり、末端配列構造の特徴から、5 つの新規 MITE を同定した。また、野生イネ 5 系統、栽培イネ 2 系統を用いたサザンハイブリダイゼーション解析は、*Wx* 座上流 50 kb に存在する Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV) 様配列がアジア種ゲノムにおいて反復性を示すのに対し、アフリカやアメリカ大陸由来の種では低コピー数であることを明らかにした。MITE 配列は、ススキ *MsiHd1* 遺伝子内にも 5 種類の MsiMITE1~MsiMITE5 として同定された。5 種の MITE はデータベース検索により、ソルガム、サトウキビ、スイッチグラスのゲノムにも 78~90% の高い相同性を持つ配列が存在した。以上の結果は、MITE がイネ科ゲノムにおいて広く分布することを示唆している。

本研究において、シークエンス解析の結果から、イネ科植物が保有する豊富な遺伝的多型、変異アレルの来歴および地理的分布、そして反復性配列の存在を明

らかにすることができた。多様な自然変異を保有している野生集団や系統等は、未だ有効な育種素材として利用できる可能性を再認識できた。自然変異が持つシーケンス情報の活用は、さらなる多収性や気象変動に対応した環境ストレス耐性等の新形質を備えた品種開発に貢献できると期待される。

Summary

Poaceae or Gramineae is a large and nearly ubiquitous family of monocotyledonous flowering plants known as grasses. It includes cereal grasses such as rice (*Oryza sativa*) which provides staple food, and perennial biomass grasses such as *Miscanthus* spp. for feedstock of bioenergy, which are important for human. Grasses would continue to contribute a major role toward the expected future growing population on the earth and happening climate change due to global warming. For that purpose, the development of elite varieties is a key issue as future investment. In this study, sequencing analyses of genes for major agricultural traits were performed in rice and its wild relatives as well as *Miscanthus* spp. and natural variations in the genomes were investigated. Sequence information from the present study revealed that natural DNA variations are abundantly conserved in the plant populations, suggesting the importance of utilizing the natural variations for the development of novel varieties in the future.

The "Green Revolution" of rice was initiated in the 1960s to increase food production in order to alleviate hunger and poverty by introducing short-culm and high-yielding varieties developed using mutant allele of the semi-dwarf gene, *Semi-dwarf1* (*Sd1*). The short culm rice plants provide lodging resistance and high seed yielding under high level of nitrogen fertilization. The *Sd1* encodes *GA20 oxidase* (*OsGA20ox-2*), one of the

gibberellin biosynthetic enzymes. *Sd1* alleles include one of the defective alleles from the indica type variety ‘dee-geo-woo-gen (DGWG)’. In order to investigate the origin of this allele, phylogenetic analysis was performed on 256 accessions belonging to eight wild and two cultivated rice species. As a result, DGWG-type allele was detected not only in cultivar but also in wild progenitor (*O. rufipogon*, W1944). A comparison of nucleotide sequences in the vicinity of *Sd1* showed that the DGWG allele-containing chromosomal region suggested the origin from wild ancestors rather than recently introgression from high-yielding varieties into W1944. Generally, in natural condition, semi-dwarf trait is considered to be poor competitive and deleterious by insufficient sunshine due to shade. The phenotypic analysis of 96 F₅ lines of ‘A58’ (*Sd1* / *Sd1*) and W1944 (*sd1* / *sd1*) showed that segregations with high culm length were observed even if genotypes were homozygous for DGWG allele. This experiment suggested that depending on the combination of quantitative trait locus (QTL), DGWG allele has long been kept in the wild rice progenitors as a hidden variation and has been utilized as one of the mutant alleles that contributed to semi-dwarfness adapted for modern cultivation system under high level of nitrogen fertilizer.

O. sativa includes subspecies of indica and japonica, and general tendency has been recognized that the indica type varieties were higher in culm length than the japonica type

varieties. Five near-isogenic lines (NILs) with *Sd1* locus derived from both indica and japonica varieties were developed using 'IR36' (indica variety) as the recurrent parent, and the culm length trait was investigated among five NILs. Field observation at two sites, Sapporo (Hokkaido University) and Nankoku (Kochi University) showed that the NILs with *Sd1* locus derived from indica were longer in culms than the lines with japonica *Sd1*.

1. Comparison of the nucleotide sequences in the coding region of *Sd1*, one non-synonymous substitution was found in each of exon 1 and exon 3 in japonica type. A weak leaky mutant allele occurring in the *Sd1* locus derived from japonica was identified and *SD1-in* (t) and *SD1-ja* (t) were designated to distinguish between indica and japonica *Sd1*s.

The genus *Miscanthus* is a perennial C₄ grass native to eastern Asia and is a promising candidate bioenergy crop in cool temperate areas. Flowering time is a crucial factor governing regional and seasonal adaptation and is also an important target trait for extending the vegetative phase to improve biomass potential. Homologues of *CONSTANS* / *Heading date1* (*Hd1*) gene, which plays a central role in flowering regulation, were cloned from *Miscanthus sinensis* and named *MsiHd1*. Furthermore, using 23 accessions of *M. sinensis* from Japan and 17 accessions from mainland China, a total of 131 homologues were cloned and their nucleotide sequences were determined. Two to five *MsiHd1* alleles in each accession were identified, suggesting that *MsiHd1* consists of at

least three loci in the *Miscanthus* genome. The phylogenetic tree indicated that one of the multiple *MsiHd1* loci is a pseudogene locus without any functional alleles, the pseudogene locus was named *MsiHd1b*. Interestingly, in most Japanese accessions 50% or more of the *MsiHd1a* alleles were non-functional, whereas accessions from the East Asian mainland harbored only functional alleles. These differences in *MsiHd1a* show that the dependency on functional *MsiHd1a* alleles is different between accessions from the East Asian mainland and Japan.

The Rice *Waxy* (*Wx*) locus encodes a granule-bound starch synthase involved in the synthesis of amylose in endosperm and pollen. A 200-kb physical map construction in the vicinity of the *Wx* was planned, and southern blot and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis in the process of the map construction revealed 75 repetitive sequences existing in this region. Miniature inverted repeat transposable elements (MITEs), one of repetitive transposable element, are the major repeat sequences (45/75) in this region, and five novel MITEs were identified due to the typical character with terminal structures. In addition, southern blot analysis using five wild relatives and two cultivars showed that the Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV) -like sequence at 50 kb upstream of the *Wx* locus showed highly repetitive in the Asian species genome, whereas African and American species had low copies. MITE sequence was also identified in *MsiHd1* gene of

the *Miscanthus* genome as MsiMITE1-MsiMITE5. These had sequences showed high similarity of 78 to 90% in the genomes of sorghum, sugar cane, and switchgrass, suggesting that MITE is widely distributed in the grasses genome.

The information on genomic sequencing of grasses in the present studies revealed the abundance of DNA polymorphisms possessed in grasses species, the origin and geographical distribution of mutant alleles, and exist of the repetitive sequences among intergenic regions. Various natural variations supplied by wild grasses populations could still be used as effective genetic and breeding resources. Utilization of natural DNA sequence variations from sequence information would be expected to contribute to the development of varieties with novel traits such as higher yield with sustainability and resilience to environmental impact of climate change.

引用文献

- Adati S. (1958) Studies on genus *Miscanthus* with special reference to the Japanese species for breeding purpose as fodder crops. Bulletin of the Faculty of Agronomy, Mie University 17: 1– 112. (in Japanese)
- Akagi H. (2000) DNA fingerprinting and variety identification in Japonica rice. Breed. Res. 2: 89– 96. (in Japanese)
- Anzoua G.K., Suzuki K., Fujita S., Toma Y. and Yamada T. (2015) Evaluation of morphological traits, winter survival, and biomass potential in wild Japanese *Miscanthus sinensis* Anderss. populations in northern Japan. Grassl. Sci. 61: 83– 91.
- Aquino R.C. and Jennings P.R. (1966) Inheritance and significance of dwarfism in an indica rice variety. Crop Sci. 6: 551– 554.
- Ashikari M., Sasaki A., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Datta S., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G.S., Kitano H. and Matsuoka M. (2002) Mutation in a gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase*, contributed to the rice ‘Green Revolution’. Breed. Sci. 52: 143– 150.
- Asano K., Yamasaki M., Takuno S., Miura K., Katagiri S., Ito T., Doi K., Wu J., Ebana K., Matsumoto T., Innan H., Kitano H., Ashikari M. and Matsuoka M. (2007)

- Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 11034– 11039.
- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W. and Laurie D.A. (2007) A *Pseudo-Response Regulator* is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 115: 721– 733.
- Ben-Naim O., Eshed R., Parnis A., Teper-Bamnolker P., Shalit A., Coupland G., Samach A. and Lifschitz E. (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between *CONSTANS*-like proteins and DNA. Plant J. 46: 462– 476.
- Bennett M.D. and Smith, J.B. (1976) Nuclear DNA amounts in Angiosperms. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 274: 227– 274.
- Bennetzen J.L., Schrick K., Springer P.S., Brown, W.E. and San Miguel, P. (1994) Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of modified, highly repetitive DNA. Genome 37: 565– 576.
- Bennetzen J.L. (1997) The structure and evolution of angiosperm nuclear genomes. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 103– 108.
- Britten R.J. and Kohne D.E. (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher

- organisms. *Science* 161: 529– 540.
- Bureau T.E. and Wessler S.R. (1992) *Tourist*: a large family of small inverted-repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell* 4: 1283– 1294.
- Bureau T.E. and Wessler S.R. (1994a) *Stowaway*: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell* 6: 907– 916.
- Bureau T.E. and Wessler S.R. (1994b) Mobile inverted-repeat elements of the *Tourist* family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1411– 1145.
- Bureau T.E., Ronald P.C. and Wessler S.R. (1996) A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8524– 8529.
- Cai X.L., Wang Z.Y., Xing Y.Y., Zhang J.L. and Hong M.M. (1998) Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J.* 14: 459– 465.
- Cai H. W. and Morishima H. (2002) QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1217– 1228.

- Cao S., Kumimoto R.W., Gnesutta N., Calogero A.M., Mantovani R. and Holt B.F. 3rd (2014) A distal *CCAAT*/NUCLEAR FACTOR Y complex promotes chromatin looping at the *FLOWERING LOCUS T* promoter and regulates the timing of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 1009– 1017.
- Charlesworth D. and Charlesworth B. (1995) Transposable elements in inbreeding and outbreeding populations. *Genetics* 140: 415– 417.
- Chen M. and Bennetzen J.L. (1996) Sequence composition and organization in the *sh2/al*-homologous region of rice. *Plant Mol. Biol.* 32: 999– 1001.
- Chen M., San Miguel P. Oliveira A.C., Woo S.S., Zhang H., Wing R.A. and Bennetzen J.L. (1997) Micocollinearity in the *sh2*-homologous regions of the maize, rice and sorghum genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8268– 8272.
- Chen M., San Miguel P. and Bennetzen J.L. (1998) Sequence organization and conservation in *sh2/al*-homologous regions of sorghum and rice. *Genetics* 148: 435– 443.
- Chen S., Liu R., Koyanagi K.O. and Kishima Y. (2014) Rice genomes recorded ancient pararetrovirus activities: Virus genealogy and multiple origins of endogenization during rice speciation. *Virology* 471-473: 141– 152.

- Clark L.V., Brummer J.E., Głowacka K., Hall M.C., Heo K., Peng J., Yamada T., Yoo J.H., Yu C.Y., Zhao H., Long S.P. and Sacks E.J. (2014) A footprint of past climate change on the population structure of *Miscanthus sinensis*. *Ann. Bot.* 114: 97– 107.
- Davies W.P. (2003) An historical perspective from the Green Revolution to the gene revolution. *Nutr. Rev.* 61: S124– 134.
- De Datta S.K., Tauro A.C. and Balaoing S.N. (1968) Effect of plant type and nitrogen level on the growth characteristics and grain yield of indica rice in the tropics. *Agron. J.* 60: 643– 647.
- Deshpande V.G. and Ranjekar P.K. (1980) DNA in three graminea species with low DNA content. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361: 1223– 1233.
- Doi K., Izawa T., Fuse T., Yamanouchi U., Kubo T., Shimatani Z., Yano M. and Yoshimura A. (2004) *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev.* 18:926– 936.
- Ebana K. (2018) Conservation and utilization of rice genetic resources. *Agriculture and horticulture* 93: 488– 490. (in Japanese)
- Feltus F.A., Wan J., Schulze S.R., Estill J.C., Jiang N. and Paterson A.H. (2004) An SNP

resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Res.* 14: 1812– 1819.

Feschotte C., Zhang X. and Wessler S.R. (2002) Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and their relationship with established DNA transposons. In: Craig N., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A., eds. *Mobile DNA II*. Washington DC, American Society of Microbiology Press: 1147– 1158.

Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B. and Smith D.B. (1974) Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence in plants. *Biochem. Genet.* 12: 257– 269.

Flavell R.B., Rimpau J. and Smith D.B. (1977) Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma (Berl.)* 63: 205– 222.

Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y-L. and Postlethwait J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531– 1545.

Fujimaki (2000) The Green Revolution and Beyond. *Jpn. J. Trop. Agri.* 44: 206– 212. (in Japanese)

Fujino K., Yamanouchi U., Nonoue Y., Obara M. and Yano M. (2019) Switching genetic effects of the flowering time gene *Hd1* under LD conditions by *Ghd7* and *OsPRR37*

- in rice. *Breed. Sci.* 69: 127– 132.
- Futsuhara Y. (1968) Breeding of a new rice variety Reimei by gamma-ray irradiation. *Gamma Field Symp.* 7: 87– 109.
- Gale M.D. and Devos K.M. (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Science* 288: 656– 658.
- Garris A.J., Tai T.H., Coburn J., Kresovich S. and McCouch S. (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169: 1631– 1638.
- Greif J.M. and Deuter M. (1993) Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* Greif et Deu. *Angewandte Botanik* 67: 87– 90.
- Grime J.P. (1974) Vegetation classification by reference to strategies. *Nature* 250: 26– 31.
- Guo Z., Xu M., Nagano H., Clark L.V., Sacks E.J. and Yamada T. (2021) Characterization of the *Ghd8* Flowering Time Gene in a Mini-Core Collection of *Miscanthus sinensis*. *Gene* 12: 288.
- Hachiya K. (1981) Notes on host plants of the genus *Chilo* (Lepidoptera, Pyralidae) in Hokkaido. *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations.* 45: 47– 52. (in Japanese with English summary)

- Han Y., Qin S. and Wessler S.R. (2013) Comparison of class 2 transposable elements at superfamily resolution reveals conserved and distinct features in cereal grass genomes. *BMC Genomics* 14: 71.
- Hattori Y., Nagai K., Furukawa S., Song X.-J., Kawano R., Sakakibara H., Wu J., Matsumoto T., Yoshimura A., Kitano H., Matsuoka M., Mori H. and Ashikari M. (2009) The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026– 1030.
- Hattori Y., Nagai K. and Ashikari M. (2011) Rice growth adapting to deepwater. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14: 100– 105.
- Harlan J.R. (1992) *Crops and Man*. 2nd Ed. American Society of Agronomy, Inc., Madison.
- Harper G., Osuji J.O., Heslop-Harrison J.S. and Hull R. (1999) Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255: 207– 213.
- Hedden P. (2003) The genes of the green revolution. *Trend Genet.* 19: 5– 9.
- Hibino H. (1994) Tungro virus agents of rice and their transmission by vector leafhoppers. *Virus* 44: 49– 53.

Hirano H.Y., Komeda, Y. and Iino, T. (1989) Cloning and structural analysis of the snap-back DNA of *Pharbitis nil*. *Plant Mol. Biol.* 12: 235– 244.

Hirano H.Y. and Sano Y. (1991) Molecular characterization of the *waxy* locus of rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Physiol.* 32: 989– 997.

Hirano H. Y., Eiguchi M., Sano Y. (1998) A single base change altered the regulation of the *Waxy* gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. *Mol. Biol. Evol.* 15: 978– 987.

Hodkinson T.R., Chase M.W. and Renvoize S.A. (2002) Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Ann. Bot.* 89: 627– 636.

Hughes A.L. (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 256: 119– 124.

Innan H. and Kim Y. (2004) Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10667– 10672.

Ishimaru K., Ono K. and Kashiwagi T. (2004) Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta* 218: 388– 395.

Isshiki M., Morino K., Nakajima M., Okagaki R.J., Wessler S.R., Izawa T. and

- Shimamoto K. (1998) A naturally occurring functional allele of the rice *wary* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.* 15: 133– 138.
- Jakowitsch J., Mette M.F., van Der Winden J., Matzke M.A. and Matzke A.J. (1999) Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13241– 13246.
- Jennings P.R. (1966) The evolution of plant type in *Oryza sativa*. *Econ. Bot.* 20: 396– 402.
- Jennings P.R. and Aquino R.C. (1968) Studies on competition in rice. 3. The mechanism of competition among phenotypes. *Evolution* 22: 529– 542.
- Kende H., van der Knaap E. and Cho H.T. (1998) Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* 118: 1105– 1110.
- Khanna R., Kronmiller B., Maszle D.R., Coupland G., Holm M., Mizuno T. and Wu S.-H. (2009) The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *Plant Cell* 21: 3416– 3420.
- Khush G.S. (1999) Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* 42: 646– 655.
- Kikuchi, F. and Futsuhara Y. (1997) Inheritance of morphological characters. 2. Inheritance of semidwarf. In: *Science of the Rice Plant*. Vol. 3: 309– 317. (eds.: Matsuo T., Shimizu S., Tsunoda S., Murata Y., Kumazawa K., Futsuhara Y., Hoshikawa K., Yamaguchi H. and Kikuchi F.) Tokyo Food and Agricultural Policy Research Center, Tokyo.

- Kikuchi F., Itakura N., Ikehashi H., Yokoo M., Nakane A. and Maruyama K. (1985)
Genetic analysis of semidwarfism in high yielding rice varieties in Japan. Bull. Nat.
Inst. Agr. Sc., Ser. D 36: 125– 145. (in Japanese with English summary)
- Kim C., Zhang D., Auckland S.A., Rainville L.K., Jakob K., Kronmiller B., Sacks E.J.,
Deuter M. and Paterson A.H. (2012) SSR-based genetic maps of *Miscanthus sinensis*
and *M. sacchariflorus*, and their comparison to sorghum. Theor. Appl. Genet. 124:
1325– 1338.
- Kimura M. (1980) Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions
through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111– 120.
- Kitomi Y., Hanzawa E., Kuya N., Inoue H., Hara N., Kawai S., Kanno N., Endo M.,
Sugimoto K., Yamazaki T., Sakamoto S., Sentoku N., Wu J., Kanno H., Mitsuda N.,
Toriyama K., Sato T. and Uga Y. (2020) Root angle modifications by the *DRO1*
homolog improve rice yields in saline paddy fields. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 17:
21242– 21250.
- Kobayashi N. and Ikeda R. (1992) Necrosis caused by rice tungro viruses in *Oryza*
glaberrima and *O. barthii*. Jpn. J. Breed. 42: 885– 890.
- Konishi S., Izawa T., Lin S.Y., Ebana K., Fukuta Y., Sasaki T. and Yano M. (2006) An

- SNP Caused Loss of Seed Shattering During Rice Domestication. *Science* 312: 1392– 1396.
- Koo B.H., Yoo S.C., Park J.W., Kwon C.T., Lee B.D., An G., Zhang Z., Li J., Li Z. and Paek N.C. (2013) Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Mol. Plant* 6: 1877– 1888.
- Koshio K., Inaishi Y., Hayamichi Y., Fujimaki H., Kikuchi F. and Toyohara H. (2000) Character expression of isogenic lines with semidwarfing genes of different origins in rice (*Oryza sativa* L.). *Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku.* 45: 201– 209.
- Kunii M., Kanda M., Nagano H., Uyeda I., Kishima Y. and Sano Y. (2004) Reconstruction of putative DNA virus from endogenous rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution. *BMC Genomics* 5: 8.
- Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K., Harushima Y., Sue N., Wu J., Antonio B.A., Shomura A., Shimizu T., Lin S.Y., Inoue T., Fukuda A., Shimano T., Kuboki Y., Toyama T., Miyamoto Y., Kiriwara T., Hayasaka K., Miyao A., Monna L., Zhong H.S., Tamura Y., Wang Z.-X., Mochizuki T., Umehara Y., Yano M., Sasaki T. and Minobe Y. (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat. Genet.* 8: 365– 372.

- Kuroha T., Nagai K., Gamuyao R., Wang D.R., Furuta T., Nakamori M., Kitaoka T., Adachi K., Minami A., Mori Y., Mashiguchi K., Seto Y., Yamaguchi S., Kojima M., Sakakibara H., Wu J., Ebana K., Mitsuda N., Ohme T.M., Yanagisawa S., Yamasaki M., Yokoyama R., Nishitani K., Mochizuki T., Tamiya G., McCouch S.R. and Ashikari M. (2018) Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science* 361: 181– 186.
- Lafferty J. and Lelly T. (1994) Cytogenetic studies of different *Miscanthus* species with potential for agricultural use. *Plant Breed.* 113: 246– 249.
- Laloum T., Mita S.D., Gamas P., Baudin M. and Niebel A. (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci.* 18: 594– 595.
- Le Q.H., Wright S., Yu Z. and Bureau T. (2000) Transposon diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7376– 7381.
- Li. H.W., Wu H.P., Wu L. and Chu. M.Y. (1968) Further studies of the interlocus recombination of the glutinous gene of rice. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 9: 22– 26.
- Linde-Laursen I.B. (1993) Cytogenetic analysis of *Miscanthus* ‘Giganteus’, an interspecific hybrid. *Hereditas* 119: 297– 300.
- Liu R., Koyanagi K.O., Chen S. and Kishima Y. (2012) Evolutionary force of AT-rich

repeats to trap genomic and episomal DNAs in the rice genome: lessons from endogenous pararetrovirus. *Plant J.* 72: 817– 828.

Lu C., Shen L., He P., Chen Y., Zhu L., Tan Z. and Xu Y. (1997) Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 94: 145– 150.

Lu C., Chen J., Zhang Y., Hu Q., Su W. and Kuang H. (2012) Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) have been accumulated through amplification bursts and play important roles in gene expression and species diversity in *Oryza sativa*. *Mol. Bio. Evol.* 29: 1005– 1017.

Ma X.F., Jensen E., Alexandrov N., Troukhan M., Zhang L., Thomas-Jones S., Farrar K., Clifton-Brown J., Donnison I., Swaller T. and Flavell R. (2012) High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS ONE* 7: 33821.

Mackill D.J. and Rutger J.N. (1979) The inheritance of induced-mutant semidwarfing genes in rice. *J. Hered.* 70: 335– 341.

Maeda H., Ishii T., Mori H., Kuroda J., Horimoto M., Takamure I., Kinoshita T. and Kamijima O. (1997) High density molecular map of semidwarfing gene, *sd-1*, in rice

(*Oryza sativa* L.). Breed. Sci. 47: 317– 320.

Makenzie K.S. and Rutger J.N. (1983) Genetic analysis of amylose content, alkali spreading score and grain dimensions in rice. Crop Sci. 23: 306– 313.

Matsuo T. (1952) Geographical studies on the cultivated rice. Bull. Natl Inst. Agric. Sci. Ser. D. 3: 1– 111. (in Japanese)

McDonald J.F. (1999) Evolution and consequences of transposable elements. Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 855– 864.

McKenzie, K.S., Johnson C.W., Tseng S.T., Oster J.J. and Brandon D.M. (1994) Breeding improved rice cultivars for temperate regions: a case study. Aust. J. Exp. Agric. 34: 897– 905.

Mikami I., Dung L.V., Hirano H.Y. and Sano Y. (2000) Effects of the two most common *Wx* alleles on different genetic backgrounds in rice. Plant Breed. 119: 505– 508.

Mittal L., Tayyeba S. and Sinha A.K. (2022) Finding a breather for *Oryza sativa*: Understanding hormone signalling pathways involved in rice plants to submergence stress. Plant Cell Environ. 45: 279– 295.

Monna L., Kitazawa N., Yoshino R., Suzuki J., Masuda H., Maehara Y., Tanji M., Sato M., Nasu S. and Minobe Y. (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene,

- sd-1*: Rice “Green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. DNA Res. 9: 11– 17.
- Mori M., Onishi K., Tokizono Y., Shinada H., Yoshimura T., Numao Y., Miura H., Sato T. (2011) Detection of a novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a *tropical japonica* rice variety Silewah. Breed. Sci. 61: 61– 68.
- Morishima H., Sano Y. and Oka H.I. (1992) Evolutionary studies in cultivated rice and its wild relatives. Oxford Surveys Evol. Biol. 8: 135– 184.
- Murai M., Maruyama K. and Kikuchi F. (2003) Gene symbol registration No. 155. Gene symbol: *sd1-r*, *sd1-d*. Rice Genet. Newslett. 20: 5.
- Murai M., Komazaki T. and Sato S. (2004) Effects of *sd1* and *Ur1* (*Undulate rachis -1*) on lodging resistance and its related traits in rice. Breed. Sci. 54: 333– 340.
- Murai M. and Yamamoto H. (2001) Allelic relationships and height effects of rice dwarfing genes from cvv. Dee-geo-woo-gen, Calrose 76 and Reimei determined in a constant genetic background. SABRO J. Breed. Genet. 33: 21– 30.
- Murphy R.L., Klein R.R., Morishige D.T., Brady J.A., Rooney W.L., Miller F.R., Dugas D.V., Klein P.E. and Mullet J.E. (2011) Coincident light and clock regulation of *pseudoresponse regulator protein 37* (*PRR37*) controls photoperiodic flowering in

- sorghum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 16469– 16474.
- Murphy R.L., Morishige D.T., Brady J.A., Rooney W.L., Yang S., Klein P.E. and Mullet J.E. (2014) *Ghd7* (*Ma6*) Represses Sorghum Flowering in Long Days: *Ghd7* Alleles Enhance Biomass Accumulation and Grain Production. Plant Genome 7: 1– 10.
- Nagamine T., Nakayama H., Ebana K., Akiba M. and Oomizu T. (2000) Monitoring of on farm conservation of crop landraces in Fukushima prefecture. Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources in 2000. 17: 1– 16. (in Japanese)
- Nagano H., Kunii M., Azuma T., Kishima Y. and Sano Y. (2002) Characterization of the repetitive sequences in a 200-kb region around the rice *waxy* locus: diversity of transposable elements and presence of veiled repetitive sequences. Genes Genet. Syst. 77: 69– 79.
- Nagano H., Clark L.V., Zhao H., Peng J., Yoo J.H., Heo K., Yu C.Y., Anzoua K.G.; Matsuo T., Sacks E.J. and Yamada Y. (2015) Contrasting allelic distribution of *CO/Hdl* homologues in *Miscanthus sinensis* from the East Asian mainland and the Japanese archipelago. J. Exp. Bot. 66: 4227– 4237.
- Nakamura S., Asakawa S., Ohmido N., Fukui K., Shimizu, N. and Kawasaki S. (1997)

Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta²* using a highly representative rice BAC library. Mol. Gen. Genet. 254: 611– 620.

Noda K. (1986) “Daruma” and “Akakomugi”. SEIKEN ZIHO 34: 1-14.

Nozato K. (1982) Effect of Group Size on Larval Survival of *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera: Pyralidae). Japanese journal of applied entomology and zoology 26: 63– 67. (in Japanese with English summary)

Ndowora T., Dahal G., LaFleur D., Harper G., Hull R., Olszewski N.E. and Lockhart B. (1999) Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. Virology 255: 214– 220.

Ogi Y., Kato H., Maruyama K., Saito A. and Kikuchi F. (1993) Identification of RFLP markers closely linked to the semidwarfing gene at the *sd-1* locus in rice. Jpn. J. Breed. 43: 267– 275.

Ohno S. (1970) Evolution by gene duplication. New York: Springer-Verlag.

Oka H.I. (1988) Origin of Cultivated Rice. JSSP, Tokyo / Elsevier, Amsterdam.

Okada M., Yamakawa Y., Fujii K., Nishiyama H., Motomura H., Kai S. and Imai T. (1967)

On the new varieties of paddy rice “Hoyoku, Kokumasari and Shiranui”. Bull.

- Kyushu Agr. Exp. Sta. 12: 187– 224. (in Japanese with English summary)
- Okagaki R.J. and Wessler S.R. (1988) Comparison of non-mutant and mutant *waxy* genes in rice and maize. *Genetics* 120:1137– 1143.
- Onishi K., Horiuchi Y., Ishigoh-Oka N., Takagi K., Ichikawa N., Maruoka M. and Sano Y. (2007) A QTL cluster for plant architecture and its ecological significance in Asian wild rice. *Breed. Sci.* 57: 7– 16.
- Peng J.R., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D. and Harberd N.P. (1999) Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256– 261.
- Rana B.B., Kamimukai M., Bhattarai M., Rana L., Matsumoto A., Nagano H., Oue H. and Murai M. (2021) Effects of tall alleles *SD1-in* and *SD1-ja* to the dwarfing allele *sd1-d* originating from ‘Dee-geo-woo-gen’ on yield and related traits on the genetic background of *indica* IR36 in rice. *Breed. Sci.* 71: 334– 343.
- Robson F., Costa M.M., Hepworth S.R., Vizir I., Piñeiro M., Reeves P.H., Putterill J. and Coupland G. (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and

- transgenic plants. *Plant J.* 28: 619– 631.
- Rutger J.N. (1983) Applications of induced and spontaneous mutation in rice breeding and genetics. *Adv. Agron.* 36: 383– 413.
- Ruttan V.W. (1999) The transition to agricultural sustainability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5960– 5967.
- Sacks E.J., Juvik J.A., Lin Q., Stewart J.R. and Yamada T. (2013) The gene pool of *Miscanthus* species and its improvement. In: Paterson AH, ed. *Genomics of the Saccharinae*. New York: Springer, 73– 101.
- Saito N., Encabo J. R., Chen S., Jonson G., Kishima Y. and Choi I-R. (2019) Innate Vulnerability of *Oryza glaberrima* to *Rice tungro bacilliform virus*. *JARQ* 53: 1– 6.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406– 425.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- San Miguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P.S., Edwards K.J., Lee M., Avramova Z. and Bennetzen J.L. (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765– 768.

San Miguel P., Gaut B.S., Tikhonov A., Nakajima Y. and Bennetzen J.L. (1998)

The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat. Genet.* 20: 43– 45.

Sano Y. (1984) Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm.

Theor. Appl. Genet. 68: 467– 473.

Sano Y. (1990) The genic nature of gamete eliminator in rice. *Genetics* 125: 183– 191.

Sasaki A., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Swapan D.,

Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G.S., Kitano H. and Matsuoka M.

(2002) A mutant of gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701– 702.

Satake T. and Toriyama K. (1979) Two extremely cool-tolerant varieties. *IRRN* 4: 9– 10.

Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y. and Simon M. (1992)

Cloning and stable maintenance of 300-kilo-base-pair fragments of human DNA in

Escherichia coli using as F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:

8794– 8797.

Shrestha R., Gómez-Ariza J., Brambilla V. and Fornara F. (2014) Molecular control of

seasonal flowering in rice, *arabidopsis* and temperate cereals. *Ann. Bot.* 114: 1445– 1458.

Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1995) *Biometry*, 3rd ed. – Freeman W.H.

Spielmeyer W., Ellis M.H. and Chandler P.M. (2002) *Semidwarf(sd-1)*, “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9043– 9048.

Springer P.S., Edwards K.J. and Bennetzen, J.L. (1994) DNA class organization on maize *Adhl* yeast artificial chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 863– 867.

Suh S.H. and Heu M.H. (1978) The segregation mode of plant height in the cross of rice varieties. VI. Linkage analysis of the semi-dwarfness of the rice variety “Tongil”. Korean J. Breed. 10: 1– 6.

Swaminathan K., Chae W.B., Mitros T., Varala K., Xie L., Barling A., Glowacka K., Hall M., Jezowski S., Ming R., Hudson M., Juvik J.A., Rokhsar D.S. and Moose S.P. (2012) A framework genetic map for *Miscanthus sinensis* from RNAseq-based markers shows recent tetraploidy. BMC Genomics 13: 142.

Tanaka A., Navasero S.A., Garcia C.V., Parao F.T., Ramírez E. (1964) Growth habit of the plant in the tropics and its effect on nitrogen response. Tech. Bull. I. R. R. I. 3: 1– 80.

Tanaka A., Kawano K. and Yamaguchi J. (1966) Photosynthesis, respiration and plant type of the tropical rice plant. Internat. Rice Res. Inst. Tech. Bull. 7: 1– 46.

Tarchini R., Biddle P., Wineland R., Tingey S. and Rafalski A. (2000) The complete

- sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted collinearity with maize chromosome 4. *Plant Cell* 12: 381– 391.
- Thomas C.A. (1971) The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 5: 237– 256.
- Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R. and Polasky S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671– 677.
- Toriyama K., Tsunoda K., Futsuhara Y., Wada J., Fujimura K. and Nakahori T. (1967) On the new rice variety “Reimei”. *Bull. Aomori Agric. Exp. Stn.* 12: 6– 17. (in Japanese with English summary)
- Turcotte K., Srinivasan S. and Bureau T. (2001) Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant J.* 25: 169– 179.
- Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R.P. and Laurie D.A. (2005) The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031– 1034.
- Umeda M., Ohtsubo H. and Ohtsubo E. (1991) Diversification of the rice *Waxy* gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn J. Gene.* 66: 569– 586.
- Valverde F. (2011) *CONSTANS* and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *J. Exp. Bot.* 62: 2453– 2463.

Wang R.L., Stec A., Hey J., Lukens L. and Doebley J. (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398: 236– 239.

Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierc J., Samach A. and Coupland G. (2006) *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 2971– 2984.

Xiao J., Li J., Yuan L. and Tanksley S.D. (1996) Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92: 230– 244.

Xiong L.Z., Liu K.D., Dai X.K., Xu C.G. and Zhang Q. (1999) Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F₂ population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. *Theor. Appl. Genet.* 98: 243– 251.

Xu K., Xu X., Fukao T., Canlas P., Maghirang-Rodriguez R., Heuer S., Ismail A.M., Bailey-Serres J., Ronald P.C. and Mackill D.J. (2006) *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705– 708.

Xue W., Xing Y., Weng X., Zhao Y., Tang W., Wang L., Zhou H., Yu S., Xu C., Li X. and

- Zhang Q. (2008) Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat. Genet.* 40: 761– 767.
- Yamamoto T., Taguchi-Shiobara F., Ukai Y., Sasaki T. and Yano M. (2001) Mapping quantitative trait loci for days-to-heading, and culm, panicle and internode lengths in a BC₁F₃ population using an elite rice variety, Koshihikari, as the recurrent parent. *Breed. Sci.* 51: 63– 71.
- Yamamura K. (2001) Increase in paddy rice pests due to global warming. *Chikyu Kankyo* 6: 251– 257. (in Japanese)
- Yamazaki K., Tanabu K., Takadate M., Mikami T., Arima K., Kawamura Y., Tatsuta H., Namioka M., Kanazawa T., Ono K. and Mimoto H. (1987) A new rice cultivar “Mutsuhomare”. *Bull. Aomori Agric. Exp. Stn.* 30: 1– 17. (in Japanese with English summary)
- Yang S., Weers B.D., Morishige D.T. and Mullet J.E. (2014) *CONSTANS* is a photoperiod regulated activator of flowering in sorghum. *BMC Plant Biol.* 14: 148.
- Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fuse T., Baba T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y. and Sasaki T. (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the

arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. Plant Cell 12: 2473– 2484.

Zhang H.B., Choi S., Woo S.S., Li Z. and Wing R.A. (1996) Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of permanent recombinant inbred mapping population. Mol. Breed. 2: 11– 24.

Zhou J., Xin X., He Y., Chen H., Li Q., Tang X., Zhong Z., Deng K., Zheng X., Akher S. A., Cai G., Qi Y. and Zhang Y. (2019) Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. Plant Cell Rep 38: 475– 485.

謝辞

本論文は、筆者が国立大学法人北海道大学大学院農学研究院ならびに同大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場在任中に行った研究成果をまとめたものである。北海道大学大学院国際食資源学院 山田敏彦教授には本論文の執筆の機会を与えて戴き、また、その遂行にあたって終始、懇切なるご指導を戴いた。ここに深謝の意を表します。同大学大学院農学研究院 貴島祐治教授、ならびに同大学低温科学研究所 田中亮一教授、同大学北方生物圏フィールド科学センター 星野洋一郎教授には、多大なるご校閲の労をとっていただいた。ここに心より感謝の意を表します。同大学 佐野芳雄名誉教授ならびに高知大学 村井正之名誉教授には、原著論文執筆に際して懇切なるご助言をいただいた。謹んで感謝申し上げます。明治大学農学部 内藤忠雄名誉教授ならびに新潟食料農業大学 荒木肇教授には長きにわたり、温かい励ましのお言葉をいただいた。心よりお礼申し上げます。遺伝子研究の面白さ、研究の楽しさを教えていただいた北海道大学 三上哲夫名誉教授ならびに同大学大学院農学研究院 久保友彦教授に篤くお礼申し上げます。最後に、本研究の調査および執筆のための時間を使わせていただいた同大学生物生産研究農場 角田貴敬植物生産技術室長ならびにフィールドの魅力を教えていただいた同大学農場技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。