

イネの栽培化プロセスの分子遺伝学的研究

—脱粒性に関するケース—

小西 左江子

2006

目次

序論	----- 4
材料と方法	-----11
1. 植物材料	-----11
2. 脱粒性の測定	-----11
3. 形態観察	-----16
3-1. 組織学的観察	
3-2. 電子顕微鏡観察	
4. 脱粒性遺伝子の単離	-----16
4-1. 高精度連鎖解析	
4-2. 相補性試験	
5. 発現解析	-----20
5-1. ノーザン解析	
5-2. 定量的 RT-PCR	
5-3. <i>in situ</i> 解析	
6. アソシエーション解析	-----22
6-1. ハプロタイプ解析	
6-2. 脱粒性の測定	
7. 栽培化過程の推定	-----24
結果	-----26
1. 脱粒性程度の比較	-----26
2. 離層形成部位の比較	-----28
2-1. 組織学的観察	
2-2. 電子顕微鏡観察	

3.	脱粒性遺伝子 <i>qSH1</i> の単離	-----30
3-1.	高精度連鎖解析	
3-2.	相補性試験	
4.	脱粒性遺伝子 <i>qSH1</i> の構造	-----40
5.	発現解析	-----44
5-1.	ノーザン解析	
5-2.	定量的 RT-PCR	
5-3.	<i>in situ</i> 解析	
6.	アソシエーション解析	-----46
6-1.	コアコレクション全体におけるアソシエーション解析	
6-2.	温帯ジャポニカ全体におけるアソシエーション解析	
7.	栽培化過程の推定	-----54
	考察	-----58
1.	イネ脱粒性遺伝子 <i>qSH1</i> の単離	-----58
2.	イネとシロイヌナズナの離層形成についての比較	-----61
3.	脱粒性の喪失の原因となった SNP の役割	-----68
4.	栽培化過程の推定	-----71
5.	栽培化に関与した DNA 変異	-----74
6.	育種への利用	-----76
	引用文献	-----79
	論文目録	-----88
	謝辞	-----89

序論

主要穀物の栽培化は約 1 万年前に起こったと考えられる(Tanksley and McCouch, 1997; Salamini *et al.*, 2002; Khush, 1997; Doebley, 2004)。栽培化の過程では、種子数の増加、収量性の向上、植物体の形態の変化、粒数の変化、開花期の栽培地への適応、種子の色、脱粒性の喪失といった農業上重要な形質についての選抜が古代のヒトによって、比較的短期間に行われたと考えられている。

トウモロコシ(*Zea mays* L.)においては、テオシンテ(*Zea mays* ssp. *parviglumis*)という、トウモロコシというよりは、イネを彷彿させる形態の野生種から現在のトウモロコシへの栽培化が起こったことが、ゲノムワイドな SSR マーカーによる DNA 解析(Matsuoka *et al.*, 2002)や考古学的な解析(Sluyter and Dominguez, 2006)によって明らかとなっており、約 5000 年から 9000 年前にメキシコ近郊で 1 回だけ起こったと考えられている。このとき、古代人によって選抜されたトウモロコシの栽培化に関与した形質としては、分げつ(側穂)や穂などの形態に関わる形質が知られており、分げつについては、*teosinte branch 1 (tb1)* が、最初の栽培化 QTL として同定され、遺伝子の構造も明らかになっている(Doebley *et al.*, 1997)。また、雌穂の形態に関与し、穀粒を覆っていた外皮 (cupule) の退化に関与する遺伝子 *teosinte glume architecture 1 (tga 1)* が最近になって単離され、報告された(Wang *et al.*, 2005)。トウモロコシの栽培化では、*tb1* 遺伝子の変化により分げつがなくなり、*tga1* 遺伝子の変化により、穀粒が雌穂の表面に露出し、

我々が今日、食料として容易に利用が可能な形態へと大きく変化したと考えられる。

我々、日本人が主食としているイネの栽培化は、河姆渡（かぼと）遺跡や草鞋山遺跡などの考古学的な遺跡から、古代の水田跡が発掘され、その遺跡の年代推定から、中国の長江の下流域に、約 7000 年前には、水田文化が生まれていたと考えられている。(Tanksley and McCouch, 1997; Salamini *et al.*, 2002; Khush, 1997; Doebley, 2004)。また、中国の長江中流域で約 1 万年前の遺跡から発掘されたイネの籾が、短粒、幅広であったことから、この頃、既に栽培化されたイネが育てられていたであろうと推測されている（平成 17 年 1 月 24 日毎日新聞、朝日新聞 記事）。つまり、日本で主に育てられているイネ品種ジャポニカ亜種 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) に関しては、約 1 万年前に、中国の長江中流域で、栽培化された可能性が高い。

従来 of 形態学的観察や、生化学的性質による分類からも、同様な結果が得られてはいるが、栽培イネ(*Oryza sativa*)は、レトロトランスポゾンの pSINE を用いた系統樹解析 (Cheng *et al.*, 2003)や SSR マーカーを用いた系統樹解析 (Garris *et al.*, 2005)により、大きくインディカ(*Indica*)、熱帯ジャポニカ(*Tropical japonica*)、温帯ジャポニカ(*Temperate japonica*) に大別することができる。また、中立と考えられる 3 個の遺伝子の DNA 配列を、多くの栽培イネや野生イネを材料に比較し、その栽培域から考察した、分子系統地理学的な解析より、インディカ、熱帯ジャポニカ、温帯ジャポニカは、多様な野生イネの中から、それぞれ地理的に離れた少なくとも 3 箇所ですべて独立に栽培化が起こったと推定されている (Londo *et al.*, 2006)。この論文では、インディカ亜種・アウス亜種・ジャポニカ亜種の

3つの栽培化イネが生まれたことが提唱されており、従来、信じられていたインディカは祖先野生種であるニバラ(*O. nivara*)から分化し、ジャポニカは祖先種であるルフィポゴン(*O. rufipogon*)より熱帯ジャポニカと温帯ジャポニカに分化したとの説とは多少異なっている。野生イネの自生地が当時と大きく異なっていることも知られており、現在の栽培域からの推定には限界があるが、DNAの多型、つまり、ハプロタイプによる分類を進めた点で、この論文は興味深い。これまでの説では、熱帯ジャポニカは東南アジア周辺で分化した後、一部は、南方から日本へ伝わり、日本陸稲となり、温帯ジャポニカは中国長江流域で栽培化された後、朝鮮半島や日本に伝わった（日本水稲）と考えられている。遺跡の年代からは、中国の長江周辺の遺跡が古く、その意味で、長江流域でのジャポニカ亜種の栽培化の可能性が高いと考えられる。Londoらの発見は、長江中流域にイネが伝わるまでに、インドシナ半島で、すでに、栽培化が始まっていたことを示唆する結果なのかもしれない。我々が住む日本には、考古学的な知見から、水稲は約3000年前に伝わったと考えられている。縄文時代に熱帯ジャポニカがすでに日本に伝わり、陸稲的な栽培が始まっていたとする説もあるが、検証はこれからである。

インディカについての、栽培化の詳細は不明である。その意味では、Londoらの論文での、インドシナ半島での、インディカ亜種とアウス亜種の2回の栽培化が起こったという説が、それなりに強い根拠を持つ、初めての論文といえる。文献上の記録では、約1000年前に、現在のベトナムから、インディカが中国に伝播したことがわかっている（佐藤2003）。実は、日本においても、唐干といった品種は、大唐米と呼ばれ、インディカの系統で、江戸時代・明治時代に、

主に、九州地方で、盛んに栽培されていたとの記録がある（佐藤 2003）。

野生イネから栽培イネへの栽培化においては、トウモロコシに見られる大きな形態的な変化は見出しにくいですが、イネにおいて、栽培化による人為的な選抜を受けたと推定される変異としては、出穂期、草型、草丈(Sasaki *et al.*, 2002)、種子サイズ、のげ喪失、根系、粒色、でんぷん組成(Isshiki *et al.*, 1998)、脱粒性の喪失(Li *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2006) などがあげられ、大きな形態変化を伴うというよりは、野生イネがもつ形質を徐々に人が栽培するのに適した形へと変化されてきたと考えられ、収量性や品質の向上や栽培のしやすい形質について栽培化が行われたと考えられている。その中で、非常に明確に区別できる形質が、脱粒性の変化である。

野生イネは強い脱粒性を持つ。種子の成熟と共に、自然脱粒する。つまり、種子登熟後の穂を見ると、まるで、ススキのように見える。この性質は、種子拡散という目的には重要で、自然界での子孫存続においては大切な形質であると考えられるが、作物としてみると、大きく収量が減少することから、脱粒性は、栽培化の過程で最初に選抜の対象となった形質の1つと考えられている。また、栽培されるイネの脱粒性の程度に応じてさまざまな脱穀システムが開発されてきたことから、今日でも農業上重要な形質の1つである。イネの脱粒性に関する研究は、形態に関する観察も多少記述があるが、多くは、突然変異体や品種間差の遺伝学的な解析であり、第11染色体上に *sh1*(Nagao and Takahashi, 1962)、第1染色体上に *sh2* (大場ら 1990)、第4染色体上に *Sh3* (Eiguchi and Sano, 1990)、第3染色体上に *sh4* (Fukuta *et al.*, 1998)などの遺伝子座が報告されている。また、国内外の410品種を用いた脱粒性の多様性に関する研究が行われ、現存

する品種に、非常に大きな脱粒性程度の幅があることが報告されている（福田 1994）。一般に、インディカが脱粒しやすく、ジャポニカが脱粒しにくい傾向がある。さらに、ジャポニカ栽培品種の日本晴とインディカ栽培品種のカサラスの F2 集団を用いた QTL 解析により、第 1, 2, 5, 11, 12 染色体上に脱粒性 QTL が検出され、第 1 染色体長腕上に検出された QTL が最も作用力が大きなことが報告されている（福田 1994）。また、この十年、イネの主流となった QTL 遺伝解析では、野生イネと栽培イネを用いた QTL 解析により、第 1 染色体上に *qSHT-1*, 第 4 染色体上に *qSHT-4*, 第 8 染色体上に *qSHT-8*, 第 9 染色体上に *qSHT-9*, 第 11 染色体上に *qSHT-11* の 5 つの脱粒性 QTL が検出されている (Cai and Morishima, 2002)。他の組み合わせによる QTL 解析により、第 1 染色体と第 4 染色体に脱粒性 QTL が検出されている (二村ら 2003)。また、野生イネのグルメパチュラ (*O. glumaepatula*) とジャポニカの台中 65 号との QTL 解析により、第 4 染色体に脱粒性 QTL が検出されている (Sobrizal *et al.*, 1999)。

ここに挙げたように、脱粒性に関する遺伝子あるいは QTL の報告は多数あるが、つい最近まで遺伝子の同定にはいたっていなかった。これは、ゲノム解析や形質転換系開発に主に用いられた日本イネ品種のほとんどが脱粒性を失っているものが多いことから、脱粒性に関する突然変異体を得たり、分子生物学的な解析が困難であったりしたからと考えられる。

さて、イネの脱粒性には、糊の基部の離層形成が関与していることが示唆されている (Oba and Kikuchi, 1989)。この離層を形成し、それが崩壊する現象は、植物の生活環の中で、非常によく観察される現象で、主に、子孫を効率的に残すためと理解できることが多い。シロイヌナズナでは、さやの中央にある valve

と replum の間の valve margin で離層が形成されることによりさやが開裂し、種子が飛散し、子孫を効率的に残すことができる(Dinny and Yanofsky, 2005)。シロイヌナズナのさやの離層形成に関与する遺伝子は、この5年間で多数単離され、遺伝的ネットワークが詳細に解析されている(Liljegren *et al.*, 2000; Rajani and Sundaresan, 2001; Roeder *et al.*, 2003; Ferrandiz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004)。まず、離層形成に必須な遺伝子として、*SHATTERPROOF (SHP1)*、*SHATTERPROOF 2 (SHP2)* が単離され、これらは離層形成部位で転写発現していることがわかっている。そして、その発現を離層形成部位に特定するために、valve と呼ばれるさや本体の部分では *FRUITFULL (FUL)* が、鞘の中心部では *REPLUMLESS (RPL)* が発現し、お互いに拮抗する形で作用し、その境界に *SHP1*、*SHP2* が発現することによって離層が形成される。(本研究で単離したイネ脱粒性遺伝子 *qSH1* は、*RPL* のイネオーソログ (進化上同一起源遺伝子) である。) イネとシロイヌナズナでは、離層が形成される場所は、イネでは糊の基部、シロイヌナズナは雌しべから派生した器官であるさやの中央にある valve margin といったように異なるが、繁殖戦略として種子を飛散させるといった同じ役割をもつ。そこで、イネにおける脱粒性の分子機構の解明は、イネとシロイヌナズナの離層形成の比較という意味で、分子生物学的にも、非常に興味深いと考えられる。

本研究では、イネの栽培化に関連した脱粒性遺伝子に着目し、自然変異を利用したアプローチにより脱粒性に関与する遺伝子を単離することで、その分子機構を明らかにしたいと考え、研究を遂行した。また、その過程で、イネの栽培化において、重要な役割を果たした DNA 変化を同定し、どういった変異を人

が選んだのかについての解析を行った。また、その特殊なアレルをこれからの育種に利用できるのではないかと考えている。

そこで、日本晴とカサラスの F2 集団を用いた QTL 解析により第 1 染色体長腕上に検出され寄与率 68.6% といった最も作用力の大きな QTL (福田 1994) をターゲットとし、この遺伝子座を *QTL of seed shattering on chromosome 1 (qSH1)* と名付けて、マップベースクローニング法により遺伝子の単離を行った。その結果、*qSH1* 遺伝子が離層形成に必須で、イネの栽培化において、重要な役割を果たしたと考えられるその遺伝子上の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) を同定することができた。この結果から、古代人は離層形成部位での転写のみを抑える遺伝子の発現制御シス配列の変化を積極的に利用したということが明らかとなった。また、栽培化とは、約 1 万年といった比較的短い期間に急速に起こった植物の進化現象の 1 つとして解釈することができるので (宮田 1994)、イネの多様性を効率的に含んでいると考えられるコアコレクションを用いて、単離した栽培化関連遺伝子である脱粒性遺伝子 *qSH1* 周辺のハプロタイプ解析を行った。これにより、DNA の変異の痕跡から今回同定した脱粒性の喪失の原因となる SNP がイネの栽培化においてどのような役割を果たしたのかについて推測を行った。

材料と方法

1. 植物材料

遺伝子単離の材料としては、親品種であるジャポニカ品種の日本晴と、インディカ品種のカサラス（図 1）および、それらの雑種後代を用いた。すなわち、日本晴とカサラスの F1 に日本晴を戻し交雑し、マーカー選抜により、*qSH1* 領域周辺が分離し、それ以外の脱粒性 QTL 領域（図 2）が日本晴に固定した分離集団（図 3B,C）を用いて高精度連鎖解析を行った。

また、形態観察には、日本晴およびカサラスとそれらの F1 に日本晴を戻し交雑し、マーカー選抜により、*qSH1* 領域のみがカサラス型に固定し、それ以外の日本晴/カサラス間で検出された脱粒性 QTL 領域が日本晴に固定した準同質遺伝子系統である NIL(*qSH1*)を用いた（図 1、図 3A）。

2. 脱粒性の測定

脱粒性の測定には、穀粒脱粒性試験装置 (Ichikawa *et al.*,1990) を用いて測定を行った（図 4）。この装置では、小穂が枝梗から離れるときの抗張強度(gf)を測定し、脱粒性程度を数値化できる。出穂後、約 35 日から 40 日後の主桿の穂を収穫し、20 穎花について脱粒性を測定した。各穎花の平均値を各系統の脱粒性の値とした。



ジャポニカ品種
日本晴

インディカ品種
カサラス

図1 遺伝子単離に用いた親品種のイネの穂

左は、ジャポニカ品種の日本晴、右はインディカ品種のカサラスの登熟後のイネの穂を示す。日本晴は、登熟後に穂を握っても脱粒しないが、カサラスは穂を軽く握っただけで図のように脱粒する。

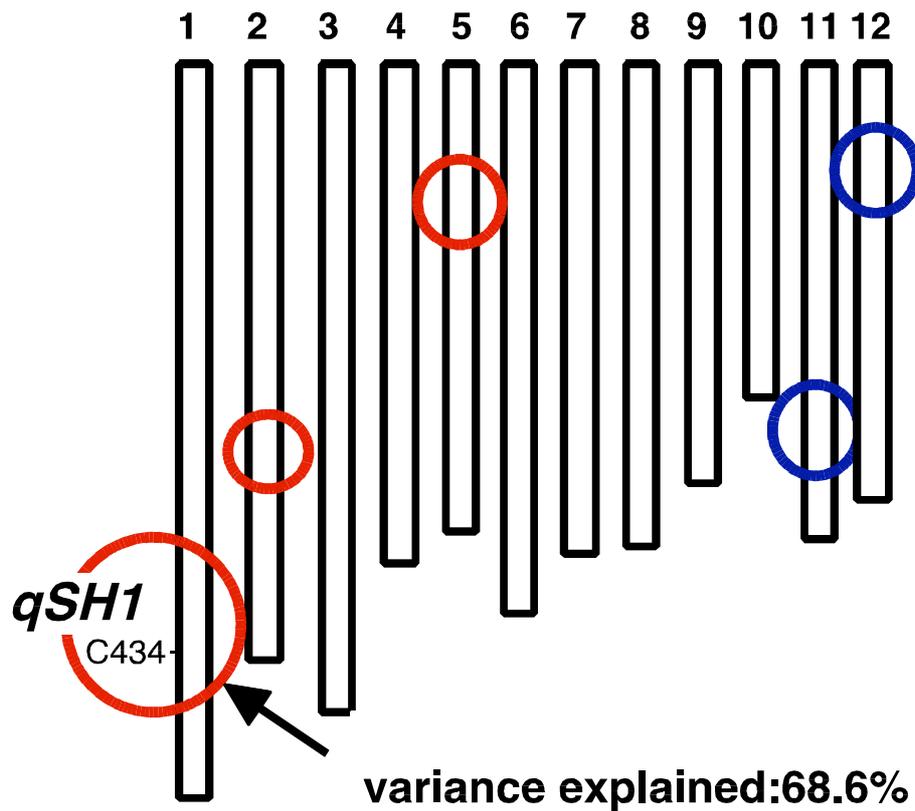


図2 日本晴とカサラスのF2を用いたQTL解析で
検出された脱粒性QTL
(福田 (1994) を改変)

日本晴とカサラスのF2集団86個体を用いたQTL解析の結果、○で示した第1、2、5、11、12染色体の5カ所に脱粒性QTLが検出された。赤丸はカサラス断片を持つと脱粒する方向に働くことを、青丸はカサラス断片を持つと脱粒しにくい方向に働くことを意味する。第1染色体長腕上に検出されたQTLが、検出された中で最も作用力が大きかったので(寄与率：68.6%)、これを*qSH1*と名付け遺伝子単離を行った。C434は、*qSH1*近傍に位置するRFLPマーカを示す。

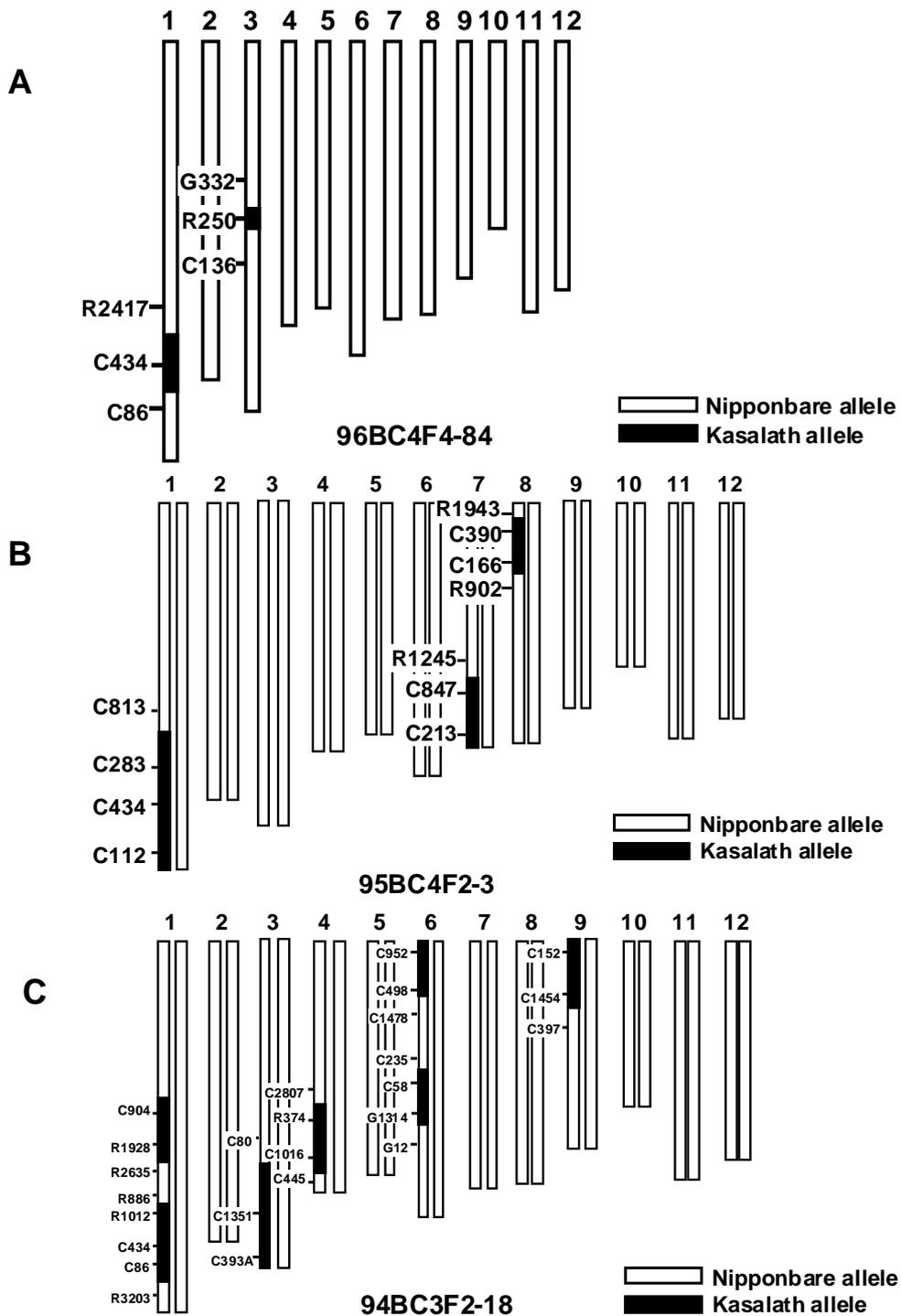


図3 脱粒性遺伝子 $qSH1$ の単離に用いた材料のグラフィカルジェノタイプ

A: $qSH1$ の準同質遺伝子系統(NIL)のグラフィカルジェノタイプ

B,C: $qSH1$ の高精度連鎖解析に用いた材料のグラフィカルジェノタイプ

白枠は日本晴アリルを、黒枠はカサラスアリルを示す。記号は、RFLPマーカーの位置を示す。

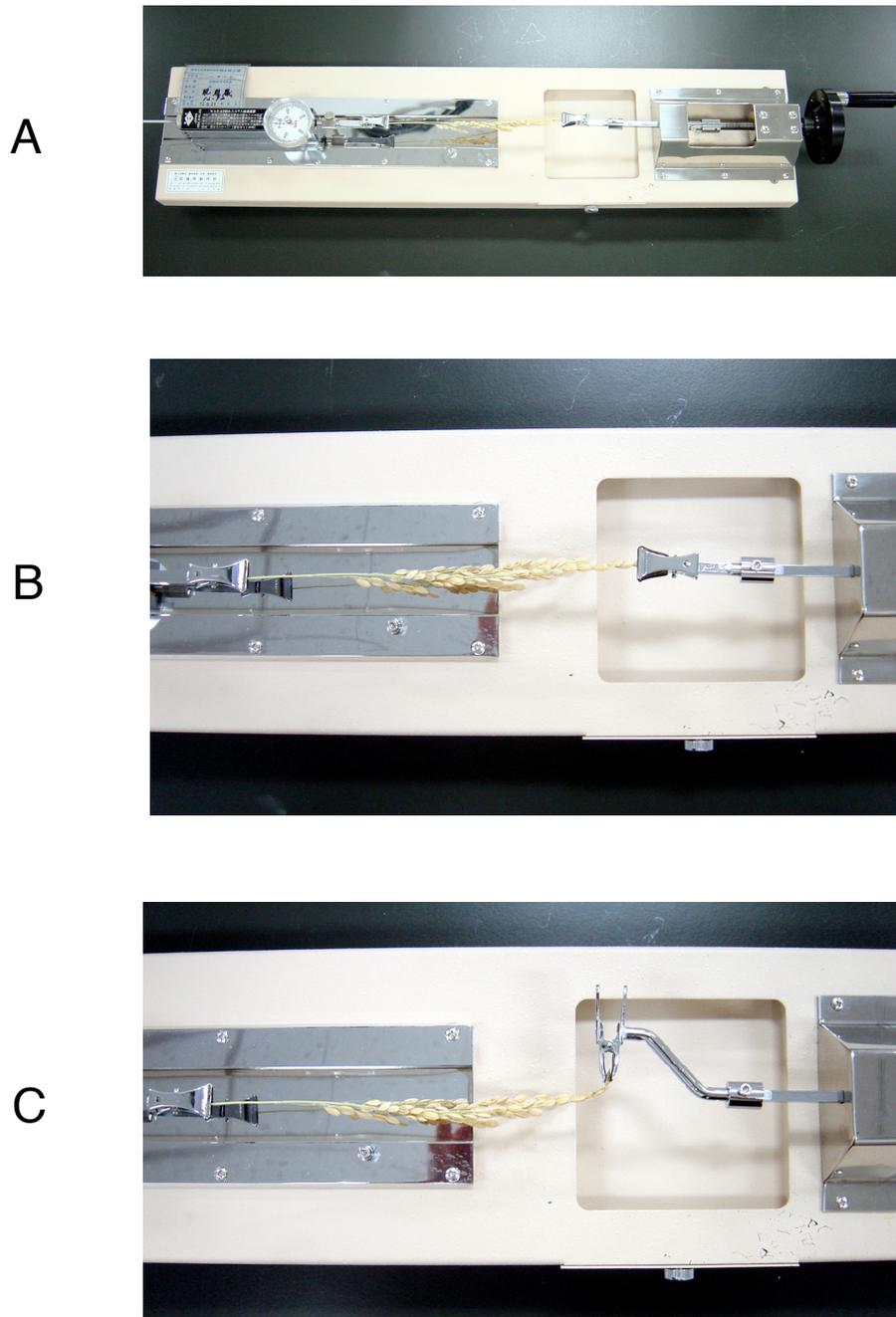


図4 穀粒脱粒性試験装置

脱粒性を定量化するために、穀粒脱粒性試験装置 (Ichikawa *et al.*, 1990) を用いた。穂軸と籾をクリップで挟み、回転棒を回転させると少しずつ引っ張られ、籾が小枝梗から離れるまでに加えた力の強度の測定ができる(A)。クリップ部の変換により、水平に引っ張って脱粒性を測定する引っ張り強度(B)と籾を横から挟んで力を加えたときの脱粒性を測定する曲がり強度(C)が測定できる。

3. 形態観察

3-1. 組織学的観察

の基の層位の縦断の組織観察は、出と直後の穎花を FAA (50%エタノール：ホルムアルデヒド：酢酸=18：1：1) で1週間固定した後、パラフィンを行い、ミクロトームをいて8 μ mの切を作成して行った(村上2004)。

3-2. 電子顕微鏡観察

出と40後の穎花を水洗、乾燥後、金定着を行い、JEOL JSM-6301F 電子顕微鏡で穎花と小枝梗の接続の観察を行った。

4. 脱性遺伝子の単

4-1. 高精度連鎖解析

マッピングにより *qSH1* 遺伝子の候補ゲノム域を絞り込むために、*qSH1* 域のみがし、それ以外の脱性 QTL 域が晴に固定した集団 (図 3B,C) より 10,388 個体を供試し、*qSH1* 近の組換え個体を遺伝子をはさみ込む DNA マーカーをいて選した (1)。さらにられた組換え個体についてはその自殖後代より組換え固定系を選した。選した固定系について *qSH1* 近の DNA マーカーの遺伝子型を調査するとともに脱性のを調査した。遺伝子型と脱性の関係から、候補ゲノム域を限定した。*qSH1* が座乗する

表1 ラフマッピングに使用したマーカーおよび*qSH1*近傍マーカー

No.	マーカー名	プライマー名	5'	塩基配列	3'	マーカーの種類	制限酵素
1	C283	CK0283U	5'	TCT GCT AAC ACT GAC ACC GT	3'	STSマーカー	
		CK0283L	5'	AAT CTG CTT TCC TCG TCT CG	3'		
2	C434	CK0434U	5'	CAC GCT TAT TGA ACA TTG AT	3'	STSマーカー	
		CK0434L	5'	GGG ATA AAT GAT GCC AGA TG	3'		
3	R3265	RA3265U4	5'	TGT TCA CGG ATG AAT GAG	3'	STSマーカー	
		RA3265L4	5'	TGA CCA ATC GGC GAT AGA TA	3'		
4	RA3279	RA3279U	5'	ACC TTG AAT GTG TGC TTA TGT A	3'	CAPSマーカー	MboI
		RA3279L	5'	GAA TCT CGT CAG CAA GTA GC	3'		
5	S10925	SS0925U	5'	TGC CTC TGT TAT GGC GA	3'	CAPSマーカー	EcoRI
		SS0925L	5'	TAC AAC AAG TAG TTA CAA ATC ACA	3'		
6	cnt21-2UL	cnt21-2U	5'	GAC ACT TGT GAT GTG CAT GC	3'	CAPSマーカー	HindIII
		cnt21-2L	5'	CAT GCA GGC ATG GCT TCC AA	3'		
7	qSH1/SNP CAPS	P5H10-106.5K-U	5'	CAA TAC ATG CAT GGA TGC GT	3'	CAPSマーカー	BspHI
		P5H10-107.2K-L	5'	TCC ATA TGT GTG TAG GAC CC	3'		

晴の塩基情報 (P0005H10, Acc No. AP004127)を いて、挿入・欠失を
した In/del マーカーおよび1塩基多型を した SNP マーカーを作成し、
候補領域のさらなる絞り込みを行った (2、 3)。

4-2. 相性試験

マッピングにより絞り込んだ候補ゲノム領域および12kb離れた位置に存在する
予測 ORF 領域を含む30kbのゲノム領域を、この領域をカバーする機型
であるカサラスのBACクローン (clone No. B200B7) (Baba *et al.*, 2000)および形
質転換のベクターpPZP2H-lac (Fuse *et al.*, 2001)を いて、10kbのゲノムラ
イブラリーを作成し、上記領域をカバーするクローンの選 行ってコンティ
グを作成した。これらの選 されたクローンを いて、機欠損型の 晴に
形質転換を行った。次に、予測 ORF 領域とマッピングにより 定した *qSH1* の
原因となる SNP 領域の を含む長いクローンを するため、TACベクター(Liu *et*
al., 1999)を いて30kbのゲノムライブラリーを作成し、 的とするクローン
の選 を行った。選 されたクローンを機欠損型の 晴に し、相性
を調べた。TACベクターの形質転換効率は、常に低く、通常ゲノム断片をイ
ネに する際に いている pPZP2H-lac ベクターを したときと 較して
2%の効しかなかった。また、TACベクターを いた場合、 定の DNA
断片が大きいせい、一 けちてしまう現象がよく見られ、選 できた形
質転換体中、ゲノム DNA 断片を完全に形質転換できたのは、25%であった (24
系 中6系)。

表2 qSH1近傍多型検出用プライマー

No.	プライマー名	5'	塩基配列	3'	検出多型
1	105.8k-U	5'	AAT GGG AGG GAG GGA GTA TA	3'	qSH1-D
2	106.7k-L	5'	CCA ACC ATA ATA GGC TCA CG	3'	
3	106.5k-U	5'	CAA TAC ATG CAT GGA TGC GT	3'	qSH1-E, qSH1-F, qSH1/SNP
4	107.2k-L	5'	TCC ATA TGT GTG TAG GAC CC	3'	
5	107.0k-U	5'	TAG GAC CGT GGA TAC TTC AA	3'	qSH1-H, qSH1-I, qSH1-J
6	107.8k-L	5'	GCA CAT CTC TAC AAT GAG GG	3'	

表3 qSH1近傍多型情報

No.	マーカー名	位置 (P0005H10)	種類	日本晴	カサラス
1	qSH1-D	105.8kb-106.3kb	Indel	518bp deletion	
2	qSH1-E	107037bp	SNP	C	T
3	qSH1-F	107074-75bp	SSR	--	TT
4	qSH1-SNP	107413bp	SNP	T	G
5	qSH1-H	107686bp	SNP	A	G
6	qSH1-I	107692-94	SSR	AGG	---
7	qSH1-J	107943bp	SNP	T	C

5. 現解析

5-1. ノーザン解析

晴と NIL(*qSHI*)のイネより、および の 育ステージ In 7 から In9 (Itoh *et al.*, 2005) までの を 身と 鞘をできるだけ取り除いてサンプリングを行った。フェノール により Total RNA を抽出し、oligotex-dT30 (super) カラム (ニッポンジーン) を いて poly (A) mRNA を精製し、これを 2 μ g いてフィルター (positively charged, ベーリンガーマンハイム) を作成した。*qSHI* の cDNA クローン AK060936 よりホメオボックスを含む 域を PCR により増 し (4)、pGEM-T vector (Promega) にクローニングし、Multi primer DNA labeling system (アマシャム) を いて P³²-dCTP でラベリングして、プローブとして い、65°C で一 ハイブリダイゼーションを行った。2 \times SSC/ 0.1%SDS、55°C、30 で2 回振とうしながら洗浄を行った。さらに、2 \times SSC/ 0.1%SDS、55°C、1 時間ゆ っくりと振とうしながら洗浄を行った後、X線フィルムに 光後、現像した。

5-2. 定 RT-PCR

qSHI の cDNA クローンである AK060936 の塩基 を して、Primer Express1.5 (ABI) を いて、プローブの設計を行った (5)。 晴と NIL(*qSHI*) のイネより、 の 育ステージ In 6 および In7 (Ito *et al.*, 2005) の を 身と 鞘をできるだけ取り除いたサンプルを いて、フェノール により Total RNA を抽出した。これを いて Super Script II Reverse Transcriptase (BRL) で 1st strand cDNA を合成し、1 μ l をテンプレートとして qPCR Mastermix および *qSHI* の

表4 ノーザンプローブ用プライマー

No.	プライマー名	5'	塩基配列	3'
1	RBEL-EE3-U2	5'	GTT TAG CCC GTC CTT CAC AG	3'
2	RBEL-EE3-L2	5'	ATG ACG TCG TTG ATC ACG AC	3'

表5 定量的RT-PCR用プライマー

No.	プライマー名	5'	塩基配列	3'
1	qSH1KTaqMan-F	5'	CCT ACC GAT GGT GAT AAG CAA AT	3'
2	qSH1KTaqMan-R	5'	CCC TTG CGT TGA TAA ACC AGT T	3'
3	qSH1KTaqManCycPrimer1	5'	AAA ACA AAC AGG CTT GAC ACG CAA CCA G	3'

Taq man プローブを用いて ABI7900 により定量的 RT-PCR を行った。

5-3. *in situ* 解析

qSH1 の cDNA クローンである AK060936 を用いてホメオボックスを含む 870bp を PCR により増幅し (6)、pGEM-T vector (Promega) にクローニングし、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて DIG ラベルアンチセンスプローブの合成を行った。また、イネの組織をサンプリングし、FAA 固定した後、パラフィン包埋を行った。マイクロトームを用いて、8 μ m の切片を作成した。Kyojima *et al.* (1998) の方法に準じてハイブリダイゼーションおよび検出を行った。確認のため、ジブプロプローブでゲノムサザン解析を行うと一帯のバンドのみハイブリすることから、異様に *qSH1* 遺伝子を検出できるプローブであると考えられる。

6. アソシエーション解析

6-1. ハプロタイプ解析

イネの種間で多型を見つけるために、40kb の *qSH1* 域について 生イネのルフィポゴン 5 系統とジャポニカの 3 種 (戦捷、神、赤) を用いて 12 カ所を 1kb ずつシーケンスを行い、塩基置換を調べた。その結果、3 つの域で多型が見つかった。また、*qSH1* の ORF にアミノ酸置換を伴う塩基置換が存在したので、この域も含めた 4 つの域について 118 系統のイネのコレクション (Kojima *et al.*, 2005) を用いてシーケンスを行って塩基置換を調べた (7)。その結果、イネコレクションに属する多型が 13 個見つかった

表6 *in situ*プローブ合成用プライマー

No.	プライマー名	5'	塩基配列	3'
1	AK060936-1U	5'	ATG ATT CTG AAC CAG CTG CG	3'
2	AK060936-3L	5'	CAG CAA GTG ACC ACC AAT CT	3'

ので、この多型のパターンによりハプロタイプの 定、解析に いた。

6-2. 脱 性の測定

出 後 35 から 40 のイネのコアコレクション 118 種の主 を収穫し、20 穎花()について穀 脱 性試験装置を いて脱 性を測定し、その 均値を各 種の脱 性 とした。

7. 栽 化過 の推測

遺 子の 化を考えるに、進化上 一起源をもつ遺 子は、共通祖先を持つと仮定できる。(ただし、栽 化が起こったときに一個のハプロタイプであったかどうかは ではないが。)

そこで、 定した現存する *qSH1* の 13 個のハプロタイプから、共通祖先のハプロタイプを推定するために、できるだけ少ない塩基置換と組換えを仮定しながら、ステップバイステップで、仮想 に過去に遡り、ハプロタイプの数減らしていき、共通祖先のハプロタイプを推定し、*qSH1* がどのように DNA 化を受けながら、栽 化を経たかの過 の推測を行った。そして、その中で、今回 定した SNP の位置・時期に関して、考察した。

表7 qSH1ハプロタイプ解析用プライマー

No.	プライマー名	5'	塩基配列	3'	検出多型
1	con24-13U	5'	CAA TGG AAA AGC CGC TGA TG	3'	SNP1,SNP2,AT repeat 1, T repeat1, AT repeat2
	con24-13L	5'	CGT TGC ATG AAT TGT AGC AC	3'	
2	RBEL-E1-U	5'	ATC ATG CAG CAA GTG ACC AC	3'	SNP3,SNP4
	RBEL-E1-L2	5'	TCA CAA CCT AGA GAT GAG GC	3'	
3	106.5k-U	5'	CAA TAC ATG CAT GGA TGC GT	3'	qSH1/SNP
	107.2k-L	5'	TCC ATA TGT GTG TAG GAC CC	3'	
4	108.9k-U	5'	ACA GGG TGA TCC CAA CAG TT	3'	SNP5,SNP6,SNP7,A repeat, T repeat2
	109.8k-L	5'	TAA CCG GTG ATG GTT GTG CA	3'	

結果

1. 脱 性程度の 較

一般的に、インディカ 種は強い脱 性を持ち、ジャポニカ 種は脱 しにくい。インディカ 種のカサラスは、登熟すると脱 しやすくなり、 を手で軽く触っただけで、脱 する (図 1)。一 、ジャポニカ 種の 晴は、登熟しても脱 しにくく、 を手で握っても脱 しない。この脱 性程度を定 的に測定するために、 研究では、 晴、カサラス、NIL(*qSH1*) (第 1 染色体長上の脱 性 QTL である *qSH1* 域のみがカサラスに固定し、それ以外の 晴とカサラスの F2 で検出された QTL 域を 晴に固定した準同質遺伝子系統、図 3A)の脱 性程度を穀 脱 性試験装置 (Ichikawa *et al.* 1990, 図 4) をいて測定した (図 5)。この測定においては、脱 しにくい 種は、 脱 性程度は高い値を示し、脱 しやすい 種は、低い値を示す。測定の結果、 晴の数値が最も高く、NIL(*qSH1*)が最も低い値を示した。また、カサラスよりもNIL(*qSH1*)の が低い値を示したことから、NIL(*qSH1*)の が脱 しやすことがわかり、わずかな脱 性の違いも検出できることが かった。また、 晴とカサラスの F2 を いた QTL 解析の結果から、カサラスは第 11、12 染色体に脱 しにくい 向に働く QTL をもっていることが 告されている (図 2)。また、NIL(*qSH1*)は、 晴とカサラスの F2 を いた QTL 解析で検出された 5 つの脱 性 QTL のうち、第 1 染色体長 上の *qSH1* 域のみがカサラスに置換されている (図 2、図 3A)。NIL(*qSH1*)とカサラスの脱 性 QTL と脱 性の測定結果

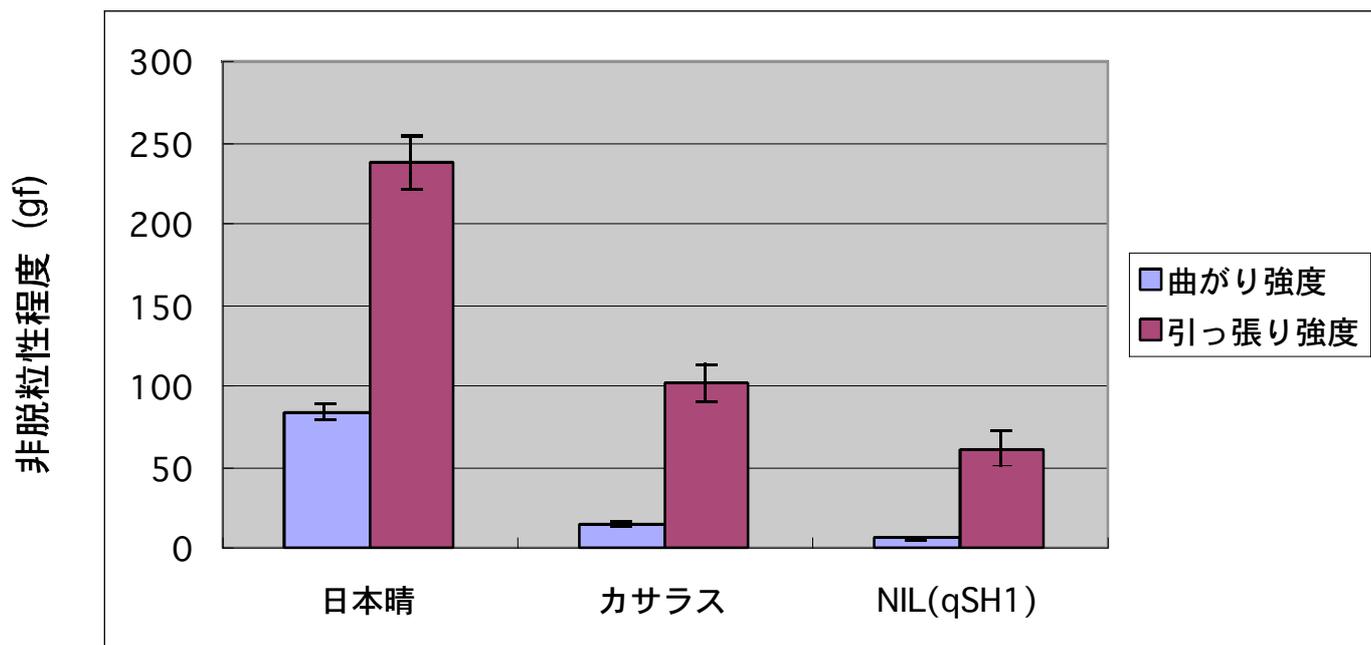


図5 脱粒性程度の比較

マッピングに用いた親品種である日本晴とカサラス、NIL(*qSH1*)の脱粒性程度を穀粒脱粒性試験装置（図4）を用いて測定した。非脱粒性程度は、脱粒しやすいほど低い値を示す。

から、カサラスは他の脱 性 QTL の影響で NIL(*qSH1*)より 脱 性程度が高い (脱 しにくい) と推定される。

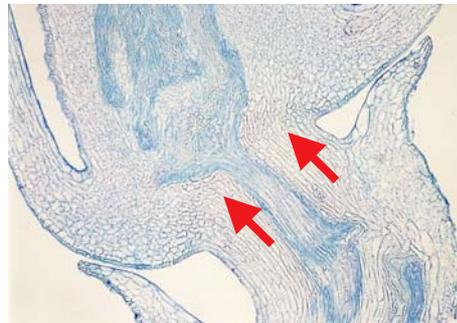
2. 層形成 位の 較

2-1. 組織学的観察

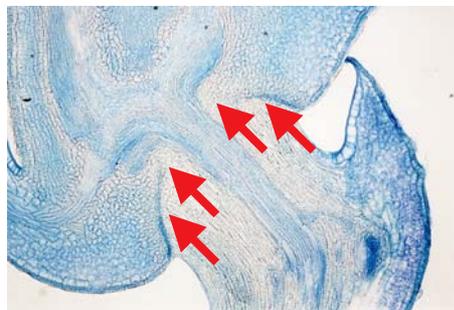
脱 性は、 の基 に形成される 層と関係があることが示唆されている。(Oba and Kikuchi, 1989) そこで、イネの の基 の縦軸切 を作成し、 晴とカサラス、NIL(*qSH1*)の 層形成 位の 較を行った(図 6)。その結果、 晴では、まったく 層が形成されないが、NIL(*qSH1*)では、 の基 に な 層が形成されることが観察された(図 6 印)。また、カサラスでは、 と枝梗の接続の 側では、 層は形成されないが、外側では 層が形成されるといった 層を示した。このことは、カサラスが、他の QTL 域に脱 しにくくなるアレルをもっていること(図 2)や穀 脱 性試験装置で測定した結果(図 5)と一致する。以上の結果から、*qSH1* 域をカサラス型にするだけで、完全な 層が形成されたことから、*qSH1* 遺伝子は 層形成に 須な遺伝子であることが かった。つまり、栽 化の過程で、*qSH1* 遺伝子に 異が ることで、 晴では 層が形成されなくなり、脱 しなくなったと推測される。このことから、他の 層形成に な遺伝子は、 晴では機 していることが示唆された。



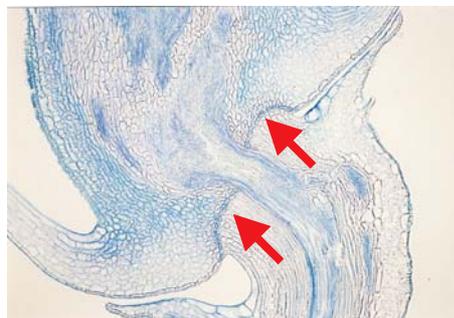
イネの籾



日本晴



カサラス



NIL(*qSH1*)

図6 離層形成程度の比較-1

左の写真は、イネの籾を示す。白枠で囲んだ籾の基部で離層が形成される。この部分を用いて縦軸方向の切片を作成し、日本晴とカサラス、NIL(*qSH1*)で、穎花と小枝梗の接続部の離層形成程度（矢印）を比較した。

2-2. 電子顕微鏡観察

脱 性程度の異なる 種における脱 後の と小枝梗の接続 の形態を 較 するために、電子顕 鏡を いて、 晴とカサラスと NIL(*qSHI*)の登熟後の と小枝梗との接続 を観察した (図 7)。 晴は、登熟後でも脱 しにくいので、 を小枝梗から 的に引っ張って脱 し、その接続 を観察した。観察の結果、 晴では、接続 は細 間で 層が形成されないために、細 が 断されている 子が観察された。また、カサラスでは、中心 (維管束側) の接続 においては、細 が 断されている 子が観察されたことから、中心 では 層は形成されていないと推測される。一 、外側では接続 は 較 的なめらかであった。このことから、カサラスの外側では、 層が形成されていることが推測される。以上の観察結果から、カサラスは、 層を形成すると考えられる。NIL(*qSHI*)では、どの を観察しても接続 は細 が 断されずなめらかであったことから、完全な 層が形成されていて、脱 時には 層が形成されている細 で 脱したと考えられる。以上の結果は、脱 性程度の測定結果 (図 5) や切 を作成して 層を観察した結果 (図 6) と相関が見られた。

3. 脱 性遺伝子 *qSHI* の単

3-1. 高精度 鎖解析

脱 性の測定や形態観察により、親 種での脱 性程度や 層形成の差異が 検出できた。これらの結果より *qSHI* 域のみを含む NIL(*qSHI*)では、最も脱

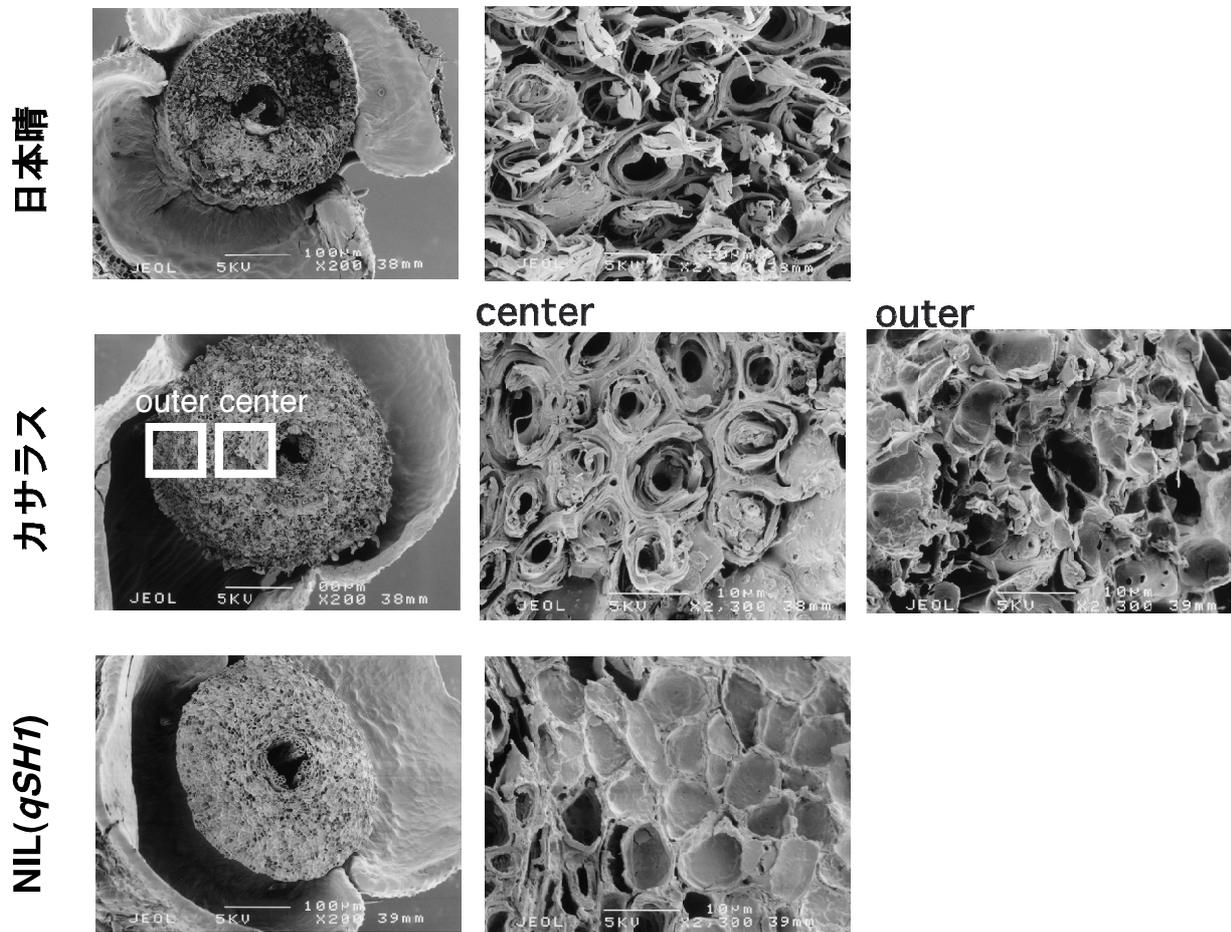


図7 離層形成程度の比較-2

イネは、糊と小枝梗の接続部で脱粒するので、電子顕微鏡観察により脱粒性の異なる品種を用いて接続部の構造を比較した。写真は、上から日本晴、カサラス、NIL(*qSH1*)のそれぞれ小枝梗と糊との接続面（小枝梗側）を示す。右側の写真は、接続面の拡大写真を示す。日本晴では、接続面は細胞壁が分断されている様子が観察された。このことから、日本晴では離層は形成されていないと推測される。カサラスでは、中心部の接続面では、細胞壁が分断された様子が、また外側の接続面では、比較的なめらかな様子が観察された。このことから、カサラスでは、外側と中心部での離層形成程度が異なることが示唆され、中心部では離層が形成されず、外側では離層が形成されるといった部分離層を形成することが示唆される。NIL(*qSH1*)では、どの部分を観察しても、接続面はなめらかであった。このことから、NIL(*qSH1*)では、完全な離層が形成されていることが示唆される。

しやすく、完全層が形成されたことから、この第1染色体長上に存在する最も寄与の高い QTL である *qSH1* を標的としてマップベースクローニングにより遺伝子の単離を行った。選抜には、*qSH1* 領域のみが分離し、それ以外の脱粒性 QTL 領域が日晴に固定した分組集団 (図 3B,C) を用いて、10,388 個体の組換え個体の選抜を行った (図 8)。ラフマッピングには、RFLP マーカー (Harushima *et al.*, 1998) を PCR ベースの CAPS マーカーに変換した、S10925 および R3279 (図 8、表 1) を用いて組換え個体の選抜を行った。その後、イネゲノムプロジェクトの成果である日晴のゲノム情報 (IRGSP, 2005) を用いて *qSH1* 遺伝子周囲のカサラスのゲノム断片をシーケンスし、日晴との多型領域をマーカー化することにより、候補領域の絞り込みを行った (表 2、表 3)。候補領域の絞り込みの結果、最終的には、*qSH1* 遺伝子近位に 4 個体の組換え個体を選抜することができた。さらに、これら 4 個体の後代より、組換え固定系統を選抜し、脱粒性程度と遺伝子型を調べ、さらに絞り込みを行った結果、*qSH1* の脱粒性の喪失の原因となる領域をマーカー *qSH1-F* とマーカー *qSH1-H* の間の 612bp に絞り込むことができた (図 8)。この間の日晴とカサラスの塩基配列を調べて比較を行った結果 (図 8、図 9)、1 個の SNP しか存在しなかったことから、脱粒性の喪失の原因となる変異を遺伝子の機能に関わる 1 塩基多型 (Functional Nucleotide Polymorphism, FNP) として同定することができた。

3-2. 相性試験

高精度連鎖解析により、脱粒性の喪失の原因となる SNP を同定できた (図 8、図 9) ので、次に遺伝子予測プログラム Rice GAAS (URL: <http://Rice GAAS>).

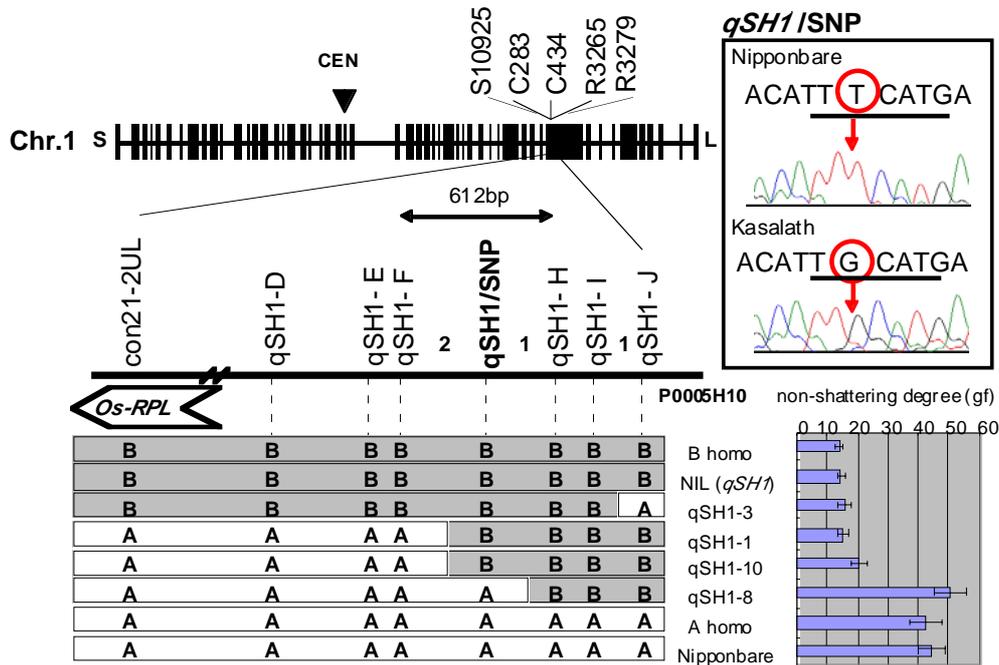


図8 脱粒性遺伝子*qSH1*の高精度連鎖解析とSNPの同定

図の上にはラフマッピングで*qSH1*の組換え個体の選抜に用いたCAPSマーカー (S10925, R3279)および*qSH1* 近傍に存在するRFLPマーカーの位置を示す。下の図は、*qSH1*の分離個体 (10,388個体) を用いた高精度連鎖解析により選抜された組換え個体の後代の組換え固定系統の遺伝子型および非脱粒性程度を示す。遺伝子型のAは日本晴型、遺伝子型のBはカサラス型を示す。高精度連鎖解析により、候補領域をマーカーqSH1-FとqSH1-Hとの間の612bpに絞り込んだ。この領域の日本晴とカサラスの塩基配列の比較により、脱粒性の喪失の原因となる領域を1個のSNPに特定できた。右上に、SNP領域の日本晴とカサラスの塩基配列を示す。赤丸は、SNPを示す。下線は、シスエレメントであるRYリピートの位置を示す。

		10	20	30	40	50		
qSH1/SNPN612	1	TTTTTTTTCT	TTTCTCTGC	TCGACTCGAC	CATGGCTTTA	CTACATGTGA	50	
qSH1/SNPK612	1	TTTTTTTTCT	TTTCTCTGC	TCGACTCGAC	CATGGCTTTA	CTACATGTGA	50	
		60	70	80	90	100		
qSH1/SNPN612	51	TAGGCTTTTT	AGTTCGTGCA	TGTAGCAGCG	GTAGCACACT	AGCATGACAT	100	
qSH1/SNPK612	51	TAGGCTTTTT	AGTTCGTGCA	TGTAGCAGCG	GTAGCACACT	AGCATGACAT	100	
		110	120	130	140	150		
qSH1/SNPN612	101	GTCTGGATAA	CCACCGGTGC	GGAGTGGCCC	ACCGGGTTAG	GCCGCCGGCC	150	
qSH1/SNPK612	101	GTCTGGATAA	CCACCGGTGC	GGAGTGGCCC	ACCGGGTTAG	GCCGCCGGCC	150	
		160	170	180	190	200		
qSH1/SNPN612	151	GGCATGGGGC	GTACATGCAT	GCATGGCTTT	TCTCGGGAAT	TATAATCGTG	200	
qSH1/SNPK612	151	GGCATGGGGC	GTACATGCAT	GCATGGCTTT	TCTCGGGAAT	TATAATCGTG	200	
		210	220	230	240	250		
qSH1/SNPN612	201	TGATGGTCCG	CTGATCGGAT	GGATCGGGCC	GTGCGCGCGT	GAGCCTATTA	250	
qSH1/SNPK612	201	TGATGGTCCG	CTGATCGGAT	GGATCGGGCC	GTGCGCGCGT	GAGCCTATTA	250	
		260	270	280	290	300		
qSH1/SNPN612	251	TGGTTGGATT	GGGACGATGC	GTA	TACTACTAC	TACGTACACT	ACGTACGGGT	300
qSH1/SNPK612	251	TGGTTGGATT	GGGACGATGC	GTA	TACTACTAC	TACGTACACT	ACGTACGGGT	300
		310	320	330	340	350		
qSH1/SNPN612	301	AGGGTTCGGC	GATGATGGTA	TTGATGTATA	CTGGACATT	<u>T</u> CATGATACAC	350	
qSH1/SNPK612	301	AGGGTTCGGC	GATGATGGTA	TTGATGTATA	CTGGACATT	G CATGATACAC	350	
		360	370	380	390	400		
qSH1/SNPN612	351	GTACCACCAA	ATGCTAAGGA	TCTTTGGACG	AGATGGCTAG	TGTTTGGTGC	400	
qSH1/SNPK612	351	GTACCACCAA	ATGCTAAGGA	TCTTTGGACG	AGATGGCTAG	TGTTTGGTGC	400	
		410	420	430	440	450		
qSH1/SNPN612	401	AAAGATCTAG	TGACTGATCC	GGCCGGTATT	TAGGACCGTG	GATACTTCAA	450	
qSH1/SNPK612	401	AAAGATCTAG	TGACTGATCC	GGCCGGTATT	TAGGACCGTG	GATACTTCAA	450	
		460	470	480	490	500		
qSH1/SNPN612	451	AGCCGCCAAG	TAACAGGAGG	GGCGCCTATC	CGTGACAGGA	GCTGTCTCCA	500	
qSH1/SNPK612	451	AGCCGCCAAG	TAACAGGAGG	GGCGCCTATC	CGTGACAGGA	GCTGTCTCCA	500	
		510	520	530	540	550		
qSH1/SNPN612	501	CATTTTCGATT	GATTATTGCA	TGGCGAAGGC	GTGATCAGCA	GGGATTGACA	550	
qSH1/SNPK612	501	CATTTTCGATT	GATTATTGCA	TGGCGAAGGC	GTGATCAGCA	GGGATTGACA	550	
		560	570	580	590	600		
qSH1/SNPN612	551	GGATGCGAGT	AGCGCGTGCT	GTGCCAGGAA	AGGTTACACA	AGTTCCCCGC	600	
qSH1/SNPK612	551	GGATGCGAGT	AGCGCGTGCT	GTGCCAGGAA	AGGTTACACA	AGTTCCCCGC	600	
		610	620	630	640	650		
qSH1/SNPN612	601	ACAAAAAAAA	AA.....	650	
qSH1/SNPK612	601	ACAAAAAAAA	AA.....	650	

図9 脱粒性遺伝子*qSH1*の原因SNP周辺の日本晴とカサラスの塩基配列の比較

qSH1/SNPN612 および *qSH1/SNPK612* は、それぞれ日本晴とカサラスの *qSH1* の原因となる SNP 周辺の 612bp の塩基配列を示す。赤文字は、この領域内の日本晴とカサラス間の SNP を示す。ここで示した領域の日本晴の配列は制限酵素 BspHI 部位を持つので（下線）、プライマー 106.5k-U と 107.2k-L で *qSH1/SNP* 領域を増幅して制限酵素処理すれば、CAPS マーカーとして利用できる。

dna.affrc. go.jp/) を いて、周 の遺伝子 測を行った。その結果、特定した SNP 周 域には ORF が 測されず、SNP から 12kb 離れた 域にシロイヌナズナの *REPLUMLESS* (*RPL*) (Roeder *et al.*, 2003) に相同性の高い ORF (*Os-RPL*) (locus ID Os01g0848400, Rice Annotation Program DataBase) が 測された。*RPL* は、*BEL1* タイプのホメオボックス遺伝子 (Reiser *et al.*, 1995) をコードし、シロイヌナズナのさやの valve での 層形成に必要な遺伝子であることが知られている。そこで特定した SNP 域と *Os-RPL* 域を含む 30 kb 域を機能型のアリルをもつと考えられるカサラスゲノム断 (10kb) を いてサブクローンコンティグを作成し、機能欠損型のアリルをもつと考えられる日 晴に導入して相 性試験を行った (図 10)。その結果、10kb のゲノム断 のシリーズでは、sub51 クローンを導入した形質転換体では、24 系統中 5 系統が脱 性を回復し、部分的な相 を示したが、それ以外の断 を導入した形質転換体では、脱 性を相 することができなかった。つまり、この結果は SNP 域だけでも ORF 域だけでも相 には不十分であることを示唆している。しかしながら、シロイヌナズナにおけるオーソログの *RPL* の 層形成の関 や部分相 から、*Os-RPL* が *qSH1* 遺伝子の 体であると考えられた。そこで、次に *qSH1* の原因となる SNP 域と *RPL* 遺伝子に相同性の高い 域 (*Os-RPL* 域) の を含む 26kb の長いコンストラクトを機能型のアリルをもつと考えられるカサラスゲノム断 および長いゲノム断 を導入できる TAC ベクターシステム (Liu *et al.*, 1999) を いて作成し、機能欠損型のアリルをもつと考えられる日 晴に導入し、相 性試験を行った (図 10)。その結果、解析した 6 系統中すべての系統で脱 性の相 が示されたことから、完全な相 には長い

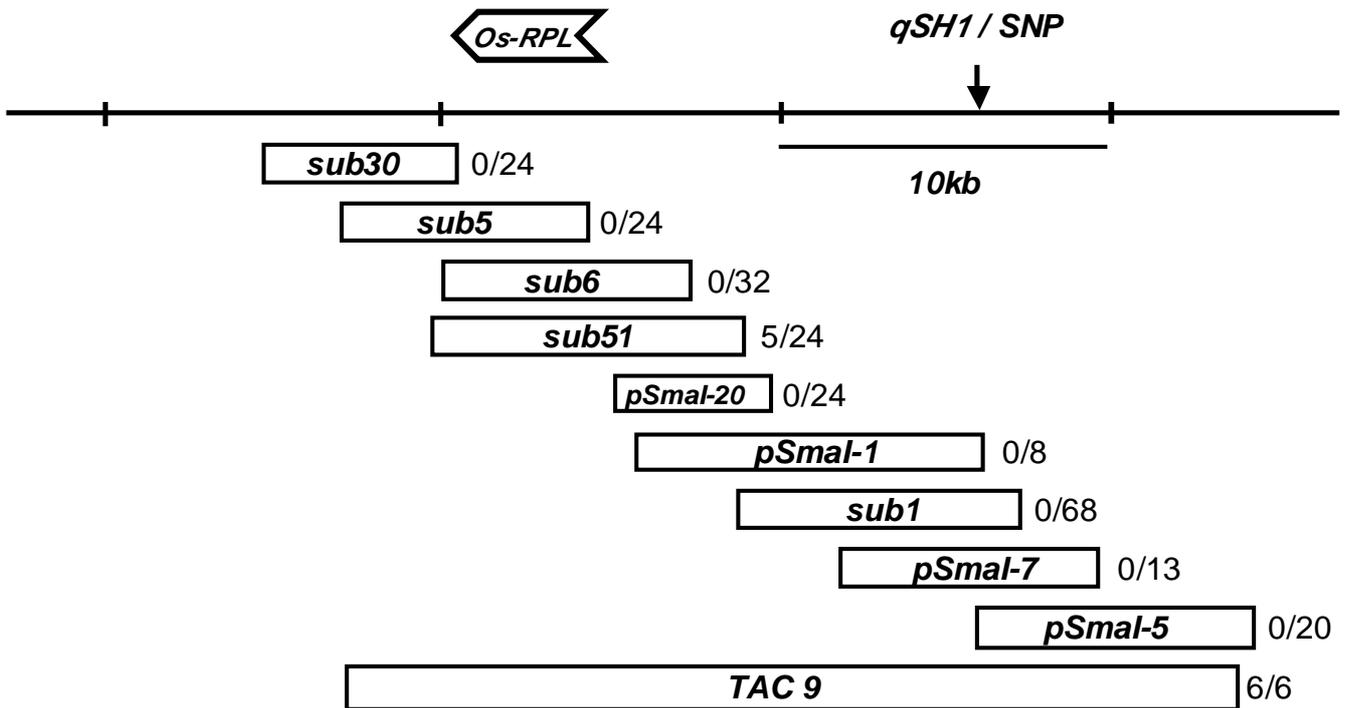


図10 相補性試験（全体）

高精度連鎖解析により特定できた脱粒性の喪失の原因となるSNP (*qSH1/SNP*) およびシロイヌナズナのさやの離層形成に必須な*RPL*遺伝子に相同性の高い領域 (*Os-RPL*) を機能型のカサラスゲノム断片を用いて約10kbのコンストラクトを作成し、領域をカバーするコンティグを作成した。また、*qSH1/SNP*および*Os-RPL*領域の両方を含む約26kbの長いコンストラクト(*TAC9*)を作成した。図の上には、*qSH1/SNP*周辺の物理地図を、また下には作成したコンストラクトの位置を示した。各コンストラクトの右の数字は、相補した個体/解析個体を示す。

断片が必要であり、SNP 域と Os-RPL 域の 方が必要であることが分かった。SNP 域と Os-RPL 域の 方を含む長い断片を用いた詳細な相補性試験の結果を図 11 に示した。相補した TAC9 クローンを導入した形質転換体の 6 系統 (図 10) より 2 系統と導入断片の確認により導入予定の一部の 域が抜け ちた 2 系統の結果を図 11 に示した。導入断片の確認を行った結果 (図 11B)、TAC9-1 および TAC9-201 クローンを導入した形質転換体では、SNP 域および Os-RPL 域の 方を含んでいることが確認できた。一方、TAC9-203 および TAC9-204 クローンを導入した形質転換体では Os-RPL 域が抜け ちていることがわかった。これらの系統の脱 性程度を測定した結果 (図 11A)、SNP 域および Os-RPL 域の 方を含んでいる TAC9-1 および TAC9-201 クローンを導入した形質転換体では、ポジティブコントロールの NIL(*qSH1*)と同程度およびそれ以上の脱 性を示すことから脱 性が相補されたことが分かった。一方、Os-RPL 域が抜け ちている TAC9-203 および TAC9-204 クローンを導入した形質転換体では、ネガティブコントロールのベクターのみを導入した形質転換体と同程度の脱 性を示したことから、脱 性が相補されなかったことが分かった。以上の結果から脱 性の相補には、SNP 域と Os-RPL 域の 方が必要であることが明らかとなった。次に、脱 性が相補した TAC9-1 および TAC9-201 クローンを導入した形質転換体の後代での分 子を調べた (図 12)。その結果、TAC9-1 および TAC9-201 クローンを導入した形質転換体のどちらの系統でも脱 性が分 離し、導入断片の有無と脱 性に相関が見られた。このことから、形質転換を用いた相補性試験により、脱 性の相補性が確認できた。今回 *qSH1*/SNP 域と Os-RPL 域の 方を含む 26kb の断片を導入す

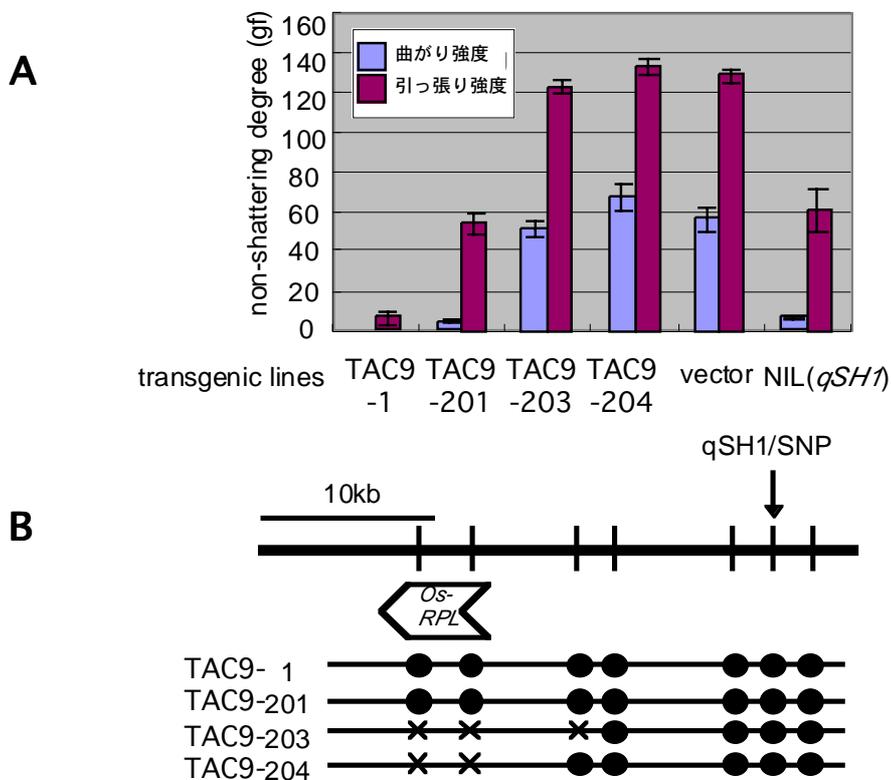


図11 相補性試験（長い断片を用いた結果（T0世代））

A: 形質転換体の非脱粒性程度、 B: 形質転換体の導入断片の確認

qSH1 /SNPと*RPL*に相同性の高い領域（*Os-RPL*領域）の両方を含む長い断片を用いた相補性試験（T0世代）の結果を示す。相補したTAC9クローンを導入した形質転換体6系統のうちの2系統（TAC9-1, TAC9-201）および導入断片の確認により*Os-RPL*領域が抜け落ちた2系統（TAC9-203, TAC9-204）の結果を示す。ネガティブコントロールとしてvectorのみ導入した形質転換体を、ポジティブコントロールとしてNIL(*qSH1*)を用いた。

るため、長い断片を形質転換できる TAC ベクターシステムを用いたが、大腸菌やアグロでの形質転換効、またカルスへのアグロの感染効ともに非常に効が低かった。また、植物体内で導入した断片の一部が高頻度で抜けちることもあった。

4. 脱性遺伝子 *qSH1* の構造

脱性遺伝子 *qSH1* は 2451bp で 612 アミノ酸をコードし、4つのエキソンからなり、*BEL1* タイプのホメオボックス遺伝子(Reiser *et al.*, 1995 ; Ito *et al.*, 2002) をコードし、シロイヌナズナのさやの層形成に必須な *RPL* に高い相同性があることが分かった(図 13)。イネとシロイヌナズナの *BEL1* タイプの遺伝子を相同性検索より選び出し、図 14 に示したホメオドメイン域の 63 アミノ酸のアライメントを用いて系統樹を作成した(図 15)。その結果、*qSH1* は *RPL* と同じ分岐に属することから、*qSH1* は *RPL* のオーソログであることが分かった。また、シロイヌナズナの *RPL* は層形成以外にも植物の伸張などにも関与していることから、多機能遺伝子であることが明らかになっており、*PRL* の他に *BELLRINGER (BLR)* や *PENNYWISE (PNY)* といった別の名前が異なるグループによって付けられている (Roeder *et al.*, 2003 ; Smith and Hake, 2003 ; Smith *et al.*, 2004 ; Byrne *et al.*, 2003)。また、*RPL* と冗長な機能をもつ *POUNDFOOLISH (PNF)* が同じ分岐に存在し(図 15)、その二重変異体は極端な性を引き起こす(Smith and Hake, 2003)。また、イネでもゲノム上に同じ系統樹上の分岐に機能未知の遺伝子が1つ存在するので、この遺伝子がイネの *qSH1* と冗長な機能をもつ可能性

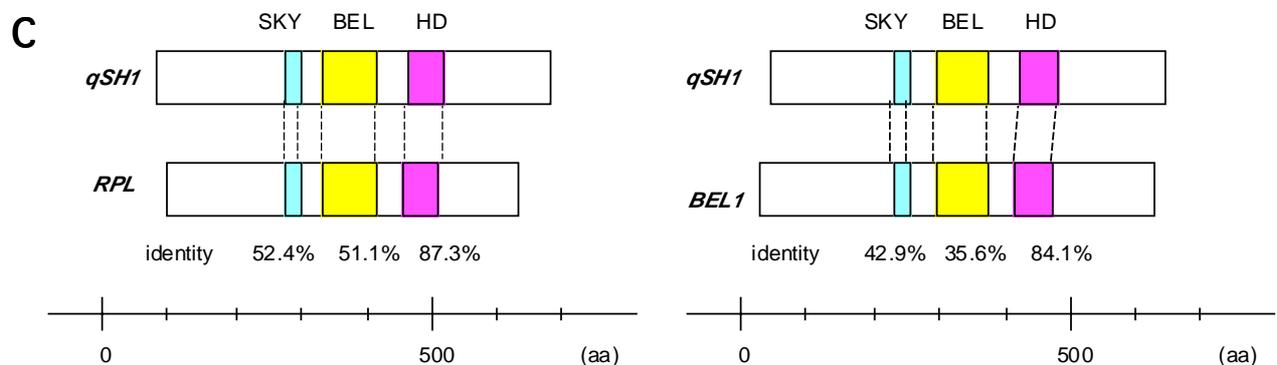
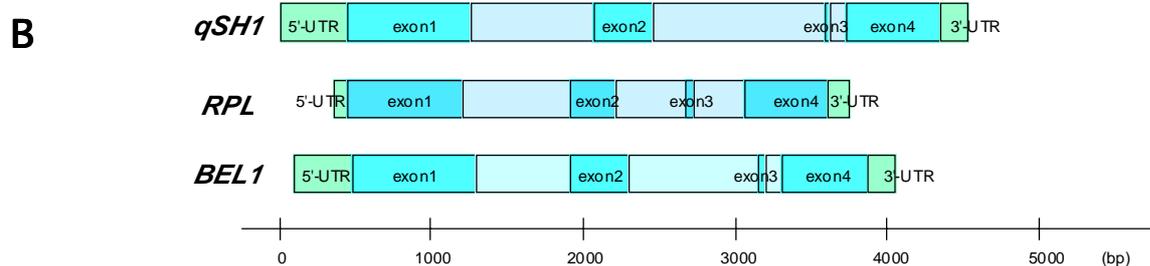
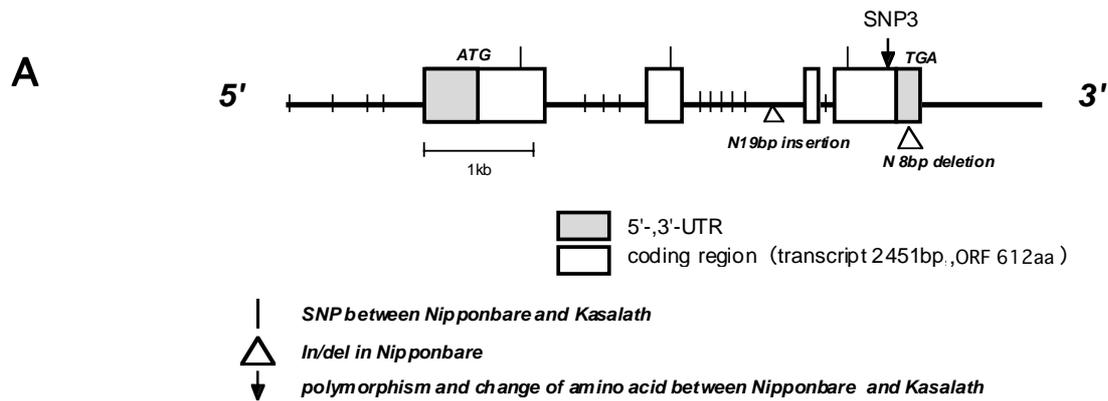


図13 脱粒性遺伝子*qSH1*の構造

A: *qSH1* 遺伝子の構造。グレー枠は、5'、3' UTR、白枠はエキソンを示す。4つのエキソンからなり、コード領域は2451bpで、612アミノ酸からなる遺伝子である。縦の棒は、日本晴とカサラスのSNP部位を示す。△は日本晴側の挿入または欠失を示す。↓はSNPによりアミノ酸が置換した位置を示す。

B: *qSH1* 遺伝子とシロイヌナズナの*RPL*, *BEL1* 遺伝子との構造の比較
qSH1, *RPL*, *BEL1* ともに4つのエキソンからなる。エキソンのサイズは3つの遺伝子で非常に似ている。

C: *qSH1* 遺伝子とシロイヌナズナの*RPL*, *BEL1* 遺伝子とのドメイン構造の比較
qSH1, *RPL*, *BEL1* は、*BEL1* タイプのホメオボックス遺伝子で、SKY, BEL, HDドメインを持つ。HD領域は、高い相同性を示す。

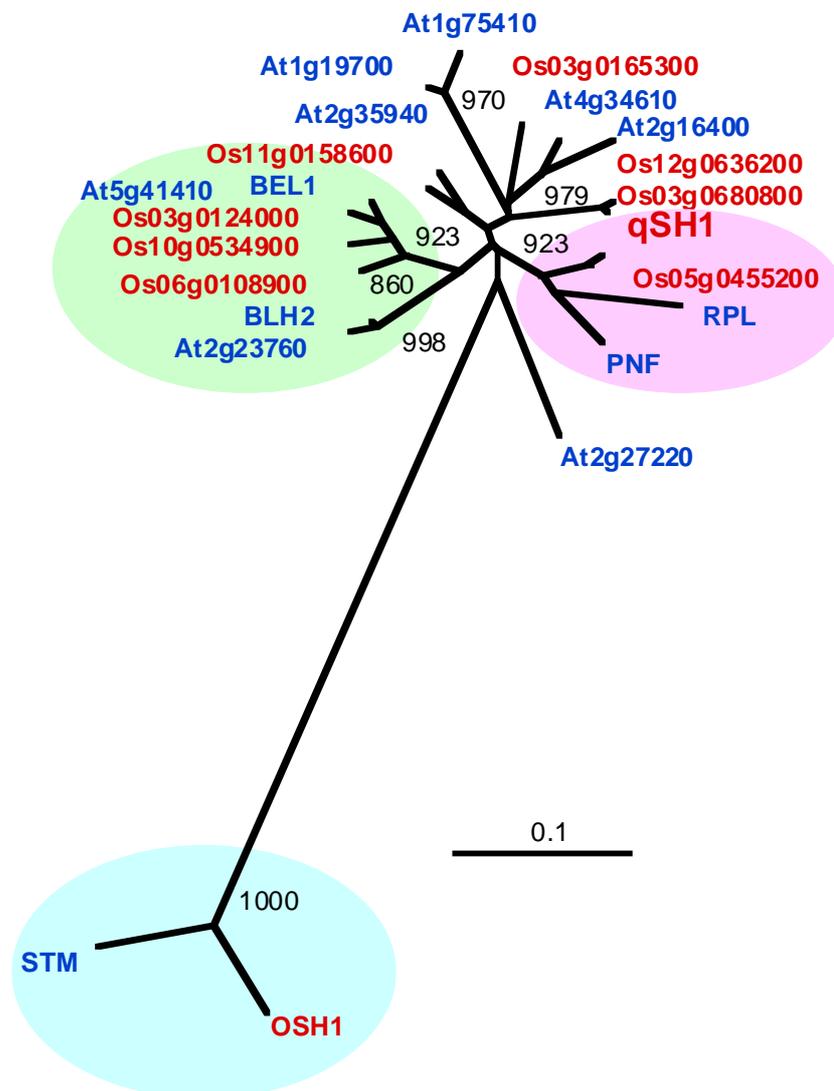


図15 イネとシロイヌナズナのBEL1タイプのホメオボックスをもつ遺伝子を用いた系統樹

イネとシロイヌナズナのBEL1タイプのホメオボックス遺伝子を相同性検索により選び出し、ホメオドメインの63アミノ酸のアライメント（図14）を用いて、近隣結合法による系統樹を作成した。赤文字はイネ、青文字はシロイヌナズナを示す。OSH1 とSTM はアウトグループとして用いた。

がある。

5. 現解析

5-1. ノーザン解析

晴と NIL(*qSHI*)の のステージ In7, In8, In9 および の mRNA を いて *qSHI* の 現を調べた (図 16A)。その結果、 晴と NIL(*qSHI*)のどちらでもではほとんど 現していないことが かった。また、 のステージが In7 から In9 へと進むにつれて、 晴でも NIL(*qSHI*)でも 現 が低下することが かった。また、 晴と NIL(*qSHI*)の 現 には 確な差は見られなかった。このことは、*qSHI* の 現が、 層でのみ 化し、トータルとしての 現 が大きく化しないからではないかと推測される。

5-2. 定 的 RT-PCR

ノーザン解析の結果、*qSHI* は のステージ In7 で高い 現が見られたので、次にこの周 のステージの を いて、 晴と NIL(*qSHI*)での 現 を定 的 RT-PCR により調べた (図 16B, C)。その結果、ユビキチンで相対値を出したときには、ステージ In6 では 晴と NIL(*qSHI*)の 現 にほとんど差は見られなかったが、ステージ In7 では少し 現 の差が見られ、NIL(*qSHI*)の 現 が若干高い値を示した (図 16B)。そこで、穎花当たりの *qSHI* の 現 を 較 してみた (図 16C)。その結果、ステージ In6 では、 現 の差が少し見られ、NIL(*qSHI*)の 現 が若干高い値を示した。また、ステージ In7 では、 現 の

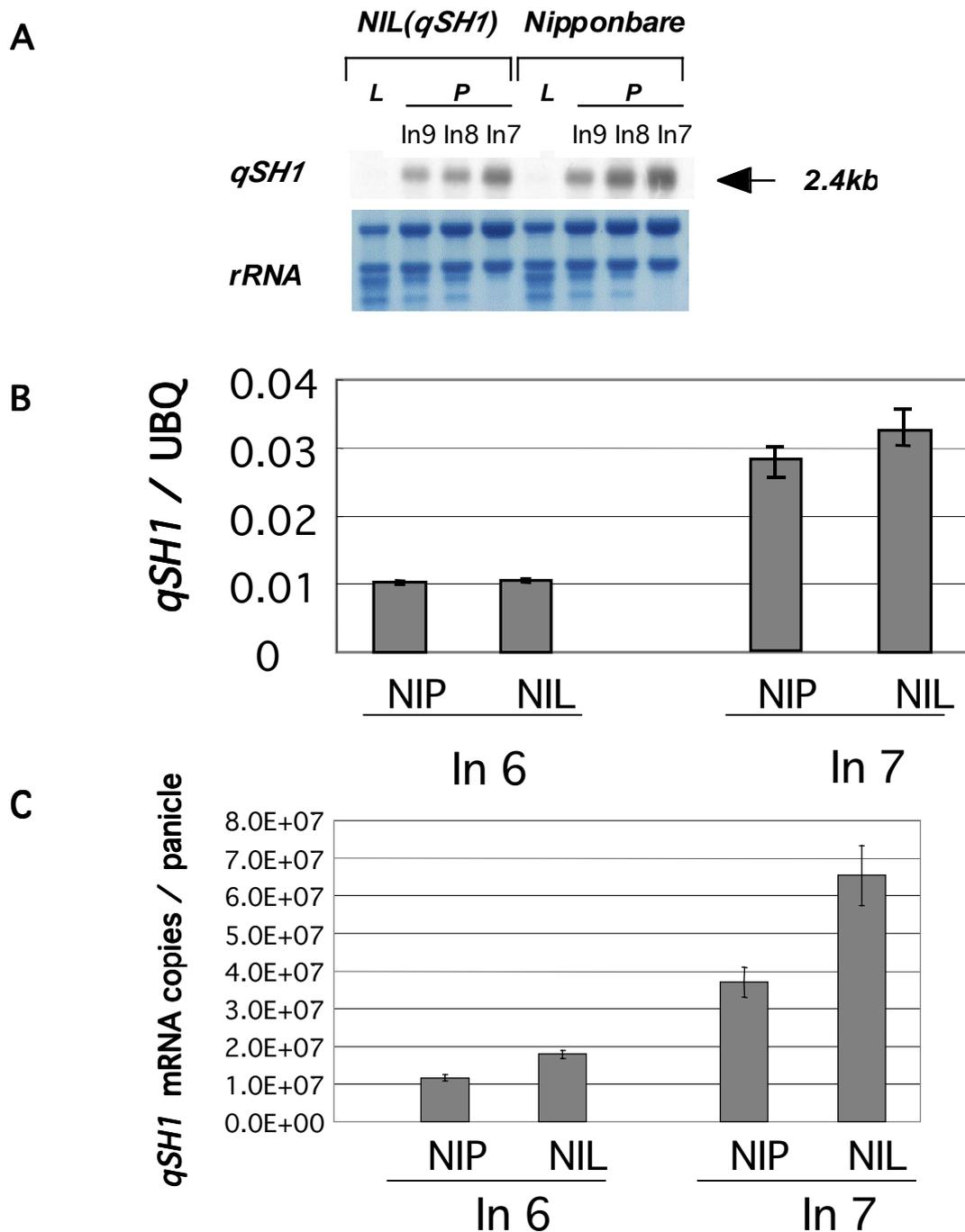


図16 発現解析

A: ノーザン解析 *qSH1* の組織特異的な発現を調べるために、日本晴とNIL(*qSH1*)の mRNAを用いてノーザン解析を行った。Lは葉、Pは幼穂、In7, In8, In9は幼穂の発育ステージを示す (Ito et al. 2005)。In7は花器官分化期、In8は幼穂が伸張するステージ、In9は、出穂期を示す。

B,C: 定量的RT-PCR In6, In7は、幼穂の発育ステージで、In6は穎器官分化期、In7は花器官分化期を示す。B: ユビキチンを用いた*qSH1* の発現の相対値を示す。C: 穂当たりの*qSH1* の発現量を比較した。

差がはっきりと見られ、NIL(*qSH1*)の 現 が 1.5 高い値を示した。このように、小花単位で 現を見ればNIL(*qSH1*)での 現上昇を確 することができた。

5-3. *in situ* 解析

次に、組織 異的な 現パターンを調べるために、*qSH1* プローブを いて、
晴とNIL(*qSH1*)の で *in situ* ハイブリダイゼーションを行った (図 17)。
in situ 解析の結果、イネの 形成のステージ In1(Itoh *et al.*, 2005)では枝梗の
化が始まる前のステージであるが、 晴、NIL(*qSH1*)ともに先端 組織で
現していることが かった。また、ステージ In7 は、花器官が 化するステージ
で穎花の基 にまだ 層形成がはっきり見られないステージである。このステ
ージ In7 では、 晴では 現は見られないが、NIL(*qSH1*)では将 層が形成
されるであろう 位で 現が見られた。また、 では、 晴でも NIL(*qSH1*)
でもどちらも 現が見られた。また、ステージ In8 は、 が急速に伸張するステ
ージであるが、 晴では *qSH1* の 現は見られないが、NIL(*qSH1*)では 層形
成 位全体で *qSH1* の 現が見られた。以上の結果から、*qSH1* 遺伝子の 体は、
RPL のオーソログ、*Os-RPL* であり、今回マッピングにより 定した *qSH1* の FNP
によって、 層 異的な 現をしていることが かった (図 17、図 18)。

6. アソシエーション解析

6-1. コアコレクション全体におけるアソシエーション解析

脱 性は栽 化の対象となった形質の1つなので、今回 定した脱 性の原因

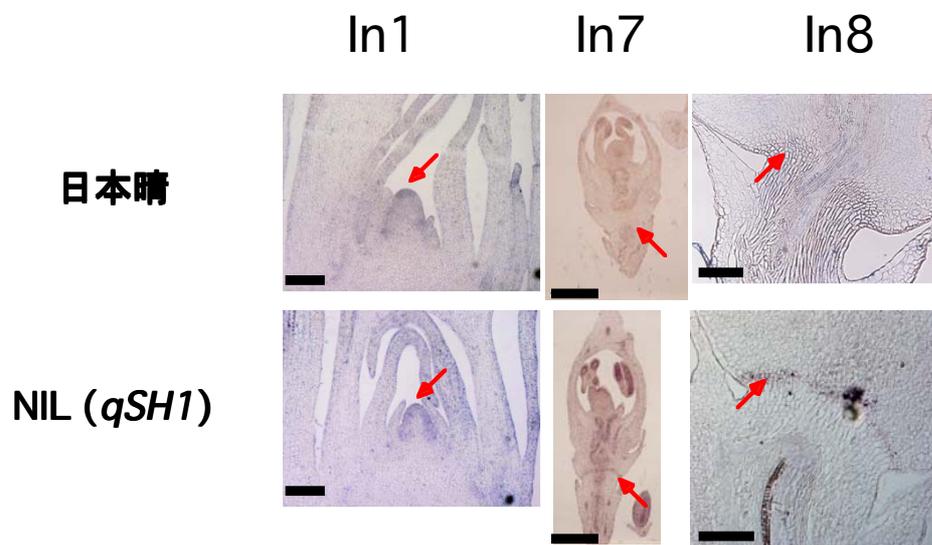


図17 *in situ* 発現解析

qSH1 の発現部位を調べるために、日本晴とNIL(*qSH1*) の幼穂を用いて、*in situ* 発現解析を行った。

In1, In7, In8は、イネの幼穂の発育ステージ(Ito *et al.*, 2005)を示し、

In1は、枝梗の分裂組織が確立するステージ、In7は、花器官の分化が始まるステージ、

In8は、穂の急速な伸張が起こるステージを示す。

スケールバー：In1は100μm, In7は200μm, In8は100μmを示す。

幼穂の 発育ステージ	日本晴	NIL (<i>qSH1</i>)
In1	花芽の先端分裂組織	花芽の先端分裂組織
In7	葯	葯 離層形成部位
In8	葯、維管束	葯、維管束 離層形成部位

図18 *qSH1*発現部位の比較 (*in situ*の結果のまとめ)

*in situ*の結果、幼穂の発育ステージIn1では、日本晴とNIL(*qSH1*)の発現部位に差は見られないが、ステージIn7とIn8では、日本晴とNIL(*qSH1*)で*qSH1*の発現に差が見られた。

SNP がイネの栽培化においてどの程度重要な役割を果たしたのかを推定するために、アソシエーション解析を行った。アソシエーション解析というのは、遺伝的に関係の深い系統で特定のDNAの多型が目的の現型の程度と相関を示すかどうかを調べる解析手である。うまく相関を示すDNA多型を見つけることができれば、その周りに原因となる異を交することなくマップ(位置の特定)することができる。今回の場合、すでに脱性の喪失の原因であると定されているSNPをいたアソシエーション解析なので、このSNPがイネの栽培化で示した影響を調べることが目的となる。

研究では、国立遺伝学研究所と() 業生資源研究所より譲っていただいた生イネ5系統および栽培種のコレクション113系統の計118系統をいて*qSH1*周のハプロタイプと脱性程度を調べ、アソシエーション解析を行った(図19)。これらの系統の多くは、() 業生資源研究所で行われたDNA多型のゲノムワイドな解析により選ばれた系統で、イネのもつDNAの多性のほとんどをカバーすると考えられるコアコレクションを含んでいる(Kojima *et al.*, 2005)。イネは、ゲノムワイドなレトロトランスポゾンを含いた解析(Cheng *et al.*, 2003)やSSRマーカーを含いた(Garris *et al.*, 2005)や系統地学的な解析(Londo *et al.*, 2006)などにより、大きく生イネ、インディカ、帯ジャポニカ、温帯ジャポニカに大される。*qSH1*の原因SNPのハプロタイプは、機型がG、機欠損型がTを示す。生イネのルフィポゴンでは、*qSH1*の原因SNPのパターンは、すべて機型を示し、脱性程度は常に脱しやすいことから、ルフィポゴンでは*qSH1*は機していることがかった。インディカでは、*qSH1*の原因SNPのパターンは、すべて機型を示し、脱性程度は若干

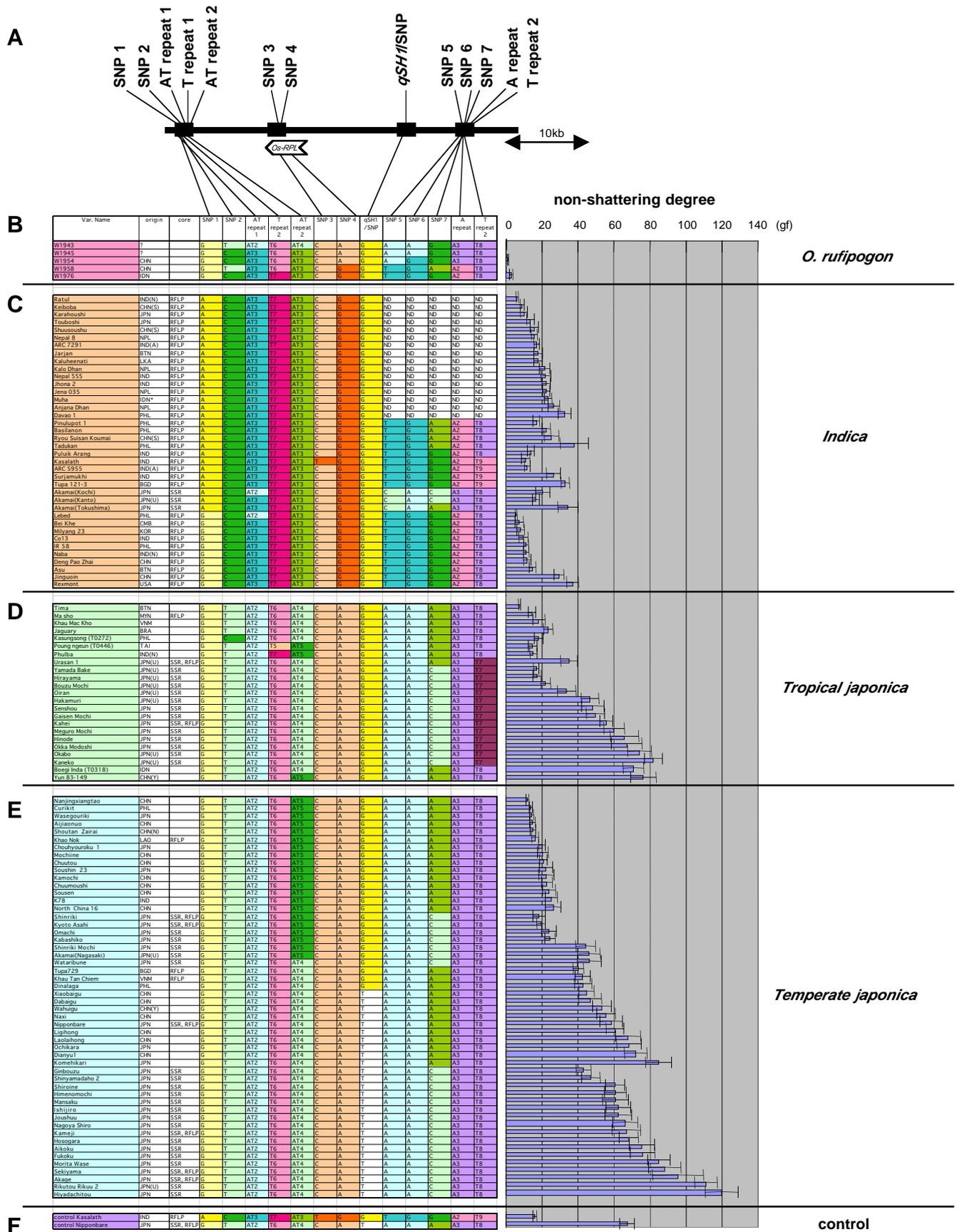


図19 脱粒性遺伝子*qSH1*のアソシエーション解析 (コアコレクション全体)

qSH1 周辺の13個の多型および118系統のイネのコレクションを用いて、ハプロタイプのパターン（左）と非脱粒性程度（右）を調べた。ハプロタイプのパターン（左）の表には、左から品種名、原産地、コアコレクションかどうか（コアコレクションの場合、分類に用いたマーカーのタイプ）、解析に用いた多型とその塩基配列を示した。各多型部位の塩基配列は、多型を含む領域をPCRで増幅し、シーケンスにより調べた。PCRで不増幅のため解析できなかったものは、ND と示した。

- A: 解析に用いた*qSH1* 周辺の多型の物理地図
- B: 野生イネ5系統の結果（ハプロタイプは5パターン）
- C: インディカ38品種の結果（ハプロタイプは22品種（NDの系統を除いた数）中9パターン）
- D: 熱帯ジャポニカ23系統の結果（ハプロタイプは7パターン）
- E: 温帯ジャポニカ52系統の結果（ハプロタイプは6パターン）
- F: コントロール

アソシエーション解析の結果、*qSH1* /SNP（右から6番目）は、温帯ジャポニカ(E)では機能型の塩基「G」（黄色）と機能欠損型の塩基「T」（白色）が存在し、そのパターンと脱粒性に相関が見られたことから、温帯ジャポニカの脱粒性の喪失に関与していると示唆される。

の程度の差はあるが、全体的に脱 しやすいことが分かった。このことから、インディカでは *qSH1* は機能していることが分かり、インディカ内の脱 性程度の差には、別の遺伝子の関与が示唆される。

熱帯ジャポニカでは、*qSH1* の原因 SNP のパターンはすべて機能型を示したが、脱 性程度が落ちやすいものから落ちにくいものまで存在したことから、熱帯ジャポニカの脱 性の喪失には別の遺伝子が関与していることが示唆される。

一方、温帯ジャポニカでは、*qSH1* の原因 SNP のパターンは機能型と機能欠損型が存在した。また、脱 性程度は落ちやすいものと落ちにくいものが存在し、*qSH1* の原因 SNP のパターンが機能型だと脱 しやすい機能欠損型だと脱 にくいといったハプロタイプと脱 性との相関がはっきりと見られた。以上の結果から、今回同定した脱 性遺伝子 *qSH1* の SNP は温帯ジャポニカの脱 性の喪失に関与していることが示唆された。

6-2. 温帯ジャポニカにおけるアソシエーション解析

今回同定した脱 性遺伝子 *qSH1* の SNP が温帯ジャポニカの脱 性の喪失に関与していることがイネコレクションを用いたアソシエーション解析により示唆された。考古学的な解析から、イネ（水稲）の栽培化は、中国の長江中流域で生じ、その時期は約 7000 年から 1 万年前とされている。また、日本にイネ（水稲）が伝わったのは、約 3000 年前とされている (Khush, 1997; Sato *et al.*, 1991)。そこで、次に、*qSH1* の原因の変異はいつ、どこで生じたのかを調べるために、温帯ジャポニカの原因が中国であることから、中国の温帯ジャポニカの在来品種を用いてアソシエーション解析を行った (図 20)。その結果、中国の在来品種

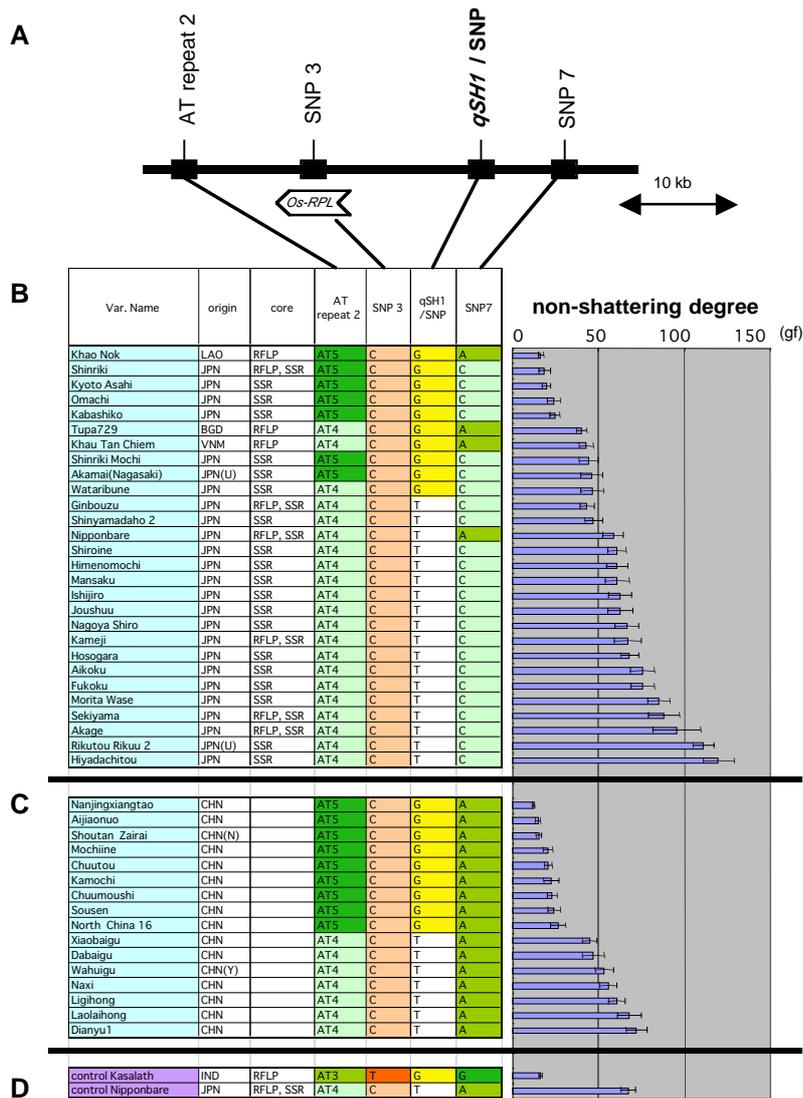


図20 脱粒性遺伝子qSH1のアソシエーション解析 (温帯ジャポニカ)

イネのコレクション118品種を用いたアソシエーション解析の結果、qSH1のSNPは温帯ジャポニカの脱粒性の喪失に関与していることが示唆された。このことから、次に、温帯ジャポニカ（中国原産以外）を用いたアソシエーション解析を行い、SNPの変異が起こった時期の推定を行った。

- A: 解析に用いたqSH1の多型と物理地図。
- B: 温帯ジャポニカ（中国原産以外）を用いた結果。
- C: 温帯ジャポニカ（中国原産）を用いた結果。
- D: コントロール

図の左側にはハプロタイプを、右側には脱粒性程度を示す。qSH1/SNPは、塩基「G」が機能型（黄色）、塩基「T」が機能欠損型（白色）を示す。温帯ジャポニカでは、中国原産（C）でも中国原産以外（B）でもqSH1/SNPが機能型を示すと脱粒しやすく、機能欠損型を示すと脱粒しにくくなるという相関が見られた。

でも *qSH1* の SNP のパターンに機能型と機能欠損型が存在し、脱粒性程度と相関があることが分かった。

以上の結果と考古学的な知見から、今回同定した脱粒性の喪失の原因となる *qSH1* の SNP は、約 3000 年前から 1 万年前に中国で生じた変異であり、これを栽培化の過程で古代人が利用したと考えられる。

7. 栽培化過程の推測

穀物の栽培化は、約 1 万年前に始まり比較的短い期間で急速に進んだ進化現象の一つであり、自然変異と組換えによって起こった出来事である。現在のイネ栽培種は、基本的に自殖植物なので、新しく生じた塩基多型は、自殖後代で容易に固定し、自然交配が比較的少ないと考えられる。

このことから、栽培に有利な変異をもつ栽培化過程のイネ系統が古代の人によって一旦選抜を受けると、それが自殖栽培により種子が増殖され、急速に栽培地域が広がっていったと推定される。もし、そうだとすると、イネの栽培化過程で生じた DNA の変化の歴史、つまり、栽培化の歴史を現存するイネ系統の DNA 多型の多様性を調べ、ステップバイステップで共通祖先を推定することで再現できるのではないかと考えた。そこで、まず、イネの品種間で多型を見つけるために、約 40kb の *qSH1* 領域について、野生イネのルフィポゴン 5 系統とジャポニカの古い在来品種 3 品種（戦捷、神力、赤毛）を用いて、12 カ所を約 1kb ずつシーケンスを行い、塩基配列を調べた。その中で、3 つの領域で多型が見つかった。また、*qSH1* の ORF 内には 4 つ塩基置換があり、その中で第 4 エ

キソンに存在する1塩基置換(図13A, SNP3)は、アミノ酸置換を伴う変異であったので、この領域も合わせた4つの領域について118系統のイネのコアコレクション(Kojima Y. *et al.*, 2005)を用いてシーケンスを行った(図19、表7)。その結果、4つの領域で、利用可能な13個の多型(SNPが8個(*qSH1*/SNPも含む)、SSRが5個(図19 A))が見つかったので、この*qSH1*周辺の13個の多型を用いて、*qSH1*のハプロタイプパターンを調べた(図19, 21A)。野生イネのルフィポゴンでは、解析に5系統用いたが、系統間では*qSH1*のハプロタイプは5パターンとすべて異なるパターンを示した。インディカでは、解析に38品種用いたが、16の品種で1領域(5個の多型を含む)についてPCRでの増幅が見られなかった。これらの品種を除いた22品種では、*qSH1*のハプロタイプは9パターン存在した。熱帯ジャポニカでは、解析に23品種用いたが、*qSH1*のハプロタイプは7パターン存在した。温帯ジャポニカでは、解析に52品種用いたが、*qSH1*のハプロタイプは6パターン存在した。イネの各グループ間での多様性を比較してみると、野生イネのルフィポゴン間では、100%(5パターン/5系統)、インディカ間では40.9%(9パターン/22品種)、熱帯ジャポニカ間では30.4%(7パターン/23品種)、温帯ジャポニカ間では11.5%(6パターン/52品種)であった(図21A)。野生イネのルフィポゴンは、今回解析には5系統しか用いていないが、5系統中5パターンと*qSH1*領域について非常に多様性があることが分かった。一方、ジャポニカでは多様性が減っていることが分かった。この結果は、栽培化が進む段階で、DNAレベルの多様性が減っている、つまり過去にこの領域が選抜を受けたことを示唆している。

そこで、*qSH1*のハプロタイプを用いて、イネの栽培化過程の推測を行った

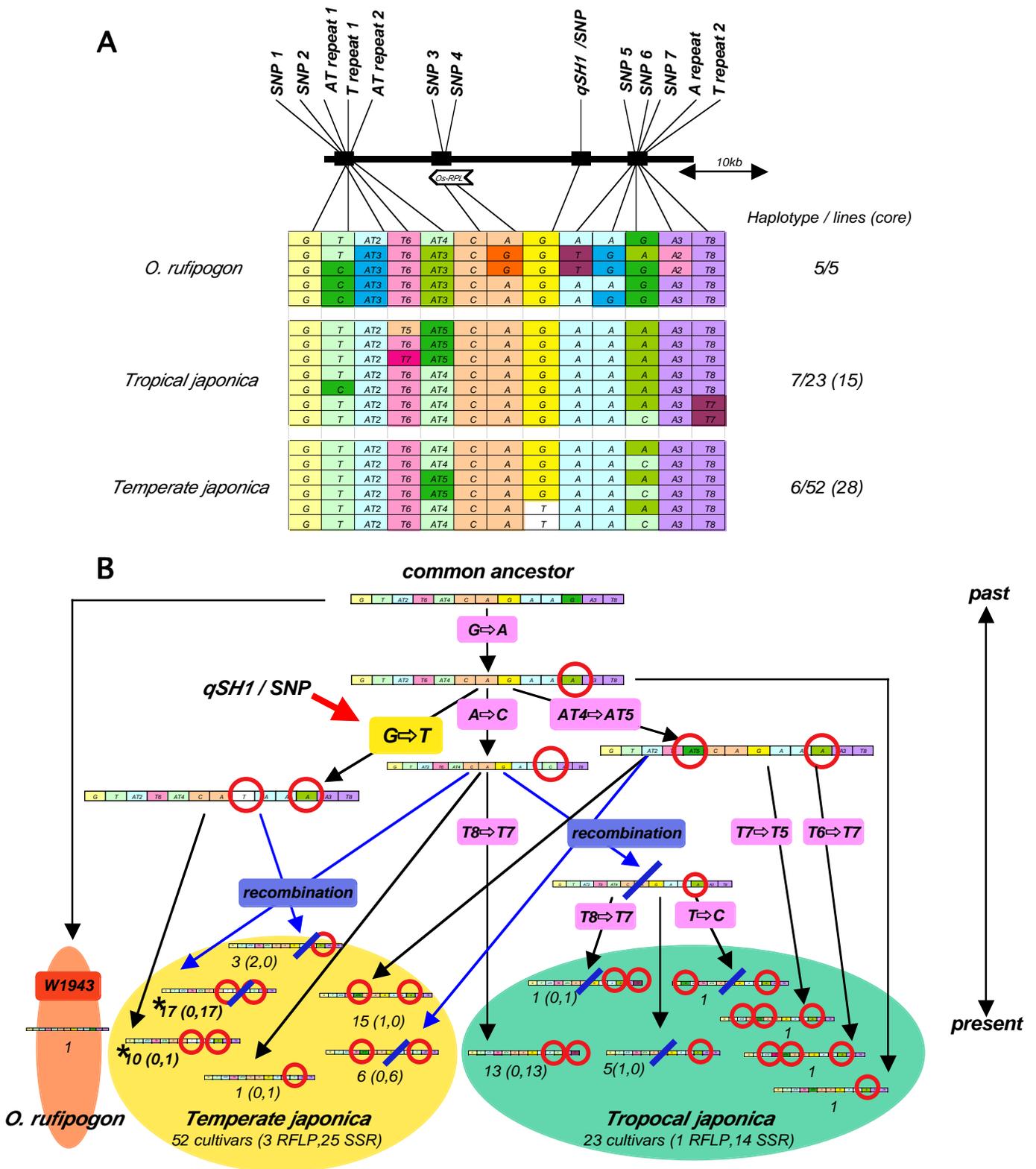


図21 脱粒性遺伝子 $qSH1$ のハプロタイプによるイネ栽培化過程の推測

A: $qSH1$ のハプロタイプの物理地図と各イネグループでのハプロタイプのパターンを示す。
 B: $qSH1$ のハプロタイプを用いたイネの栽培化過程の推測。図の上から下に向けて過去から現在を示す。できるだけ少ない塩基置換と組換えにより、栽培化仮定の推測を行った。赤丸 (○) は塩基置換を、青斜線 (／) は組換えを示す。

(図 21B)。その結果、ジャポニカの 75 品種を 9 個の塩基置換と 2 回の組換えにより現在の 13 のハプロタイプパターンから 1 個の共通祖先のパターンへと過去にさかのぼる形で推定することができた。これにより、*qSH1* 領域が栽培化過程でどのように DNA 変化を起こしていったのかを推測することができた(図 21B)。この結果から、*qSH1* の脱粒性の喪失の原因となる SNP の変異は、栽培化過程の初期の頃に生じた変異であると推測される。この *qSH1* の SNP に変異をもつハプロタイプは、13 パターン中 2 パターンしか存在しないが、75 品種中 27 品種存在する (図 21B)。このことは、脱粒しない温帯ジャポニカ品種をヒトが積極的に選抜を行ったことにより周辺の多様性が減ったと考えられる。

考察

1. イネ脱粒性遺伝子 *qSH1* の単離

野生種は繁殖戦略として強い種子脱粒性を持つが、栽培種は、人が収穫するまで脱粒しない。このことから、脱粒性の喪失過程は、栽培化と密接に関係した農業形質の1つであると考えられる。

本研究では、栽培品種のインディカ品種のカサラスとジャポニカ品種の日本晴の後代を用いて、68.6%の寄与率を示す第1染色体上に存在する主要な脱粒性のQTL 遺伝子 *qSH1* を単離した。*qSH1* 領域の分離個体（約1万個体）を用いた高精度連鎖解析により、脱粒性の喪失の原因領域を612bpに絞り込み、品種間の塩基配列の比較により1個のSNPとして同定することができた。また、NIL(*qSH1*)を用いた形態観察により、*qSH1* 遺伝子は、種子が植物から離れるときに必要となる籾の基部での離層形成に必要であることが明らかとなった。

さらに、発現解析や相補性試験より、このORFから12kb上流に存在するSNPが、離層特異的な*qSH1* mRNAの転写調節に必要なシスエレメント内の変異であることが明らかとなった。また、イネのコアコレクションを用いた*qSH1*のアソシエーション解析により*qSH1*のSNPが、ジャポニカ品種の脱粒性の喪失に関与していたことを明らかにした。ちょうど同時期に、Liらによって、独立なイネの脱粒性QTL 遺伝子 *sh4* が単離された(Li *et al.*, 2006)。Liらは、野生イネのニバラと栽培インディカ品種の後代を用いて第4染色体上に検出された脱粒性QTL 遺伝子である *sh4* を単離した。また、マッピングによって脱粒性の原因と

なる領域を 1700bp に絞り込み、原因となる変位を 7 つに絞り込んだ。彼らは、さらにアソシエーション解析により変位領域のうち 1 アミノ酸置換を生じる塩基置換により脱粒性の喪失が起こったことを証明している。日本晴とカサラスの QTL 解析では *sh4* 遺伝子座に脱粒性の QTL は同定されなかった。いくつかの解析結果より、ジャポニカとインディカは独立に栽培化されたと考えられるので、*sh4* 遺伝子座は、野生イネの段階で機能を欠損したアリルが存在する可能性がある。そういったアリルが野生イネに現存するかどうかも含め、今後の解析を待つ必要がある。結局、本研究では、期せずして、*sh4* の脱粒性への影響を排除した材料を用いて *qSH1* の効果を解析したことになる。また、野生イネと日本晴を用いた QTL 解析では、第 1, 4 染色体上に脱粒性 QTL が検出されることなどから、この野生イネでは、*qSH1* も *sh4* も機能型であることが示唆される（二村ら 2003、Cai and Morishima, 2002）。

ジャポニカ品種の日本晴にインディカ品種の機能型の *qSH1* 領域を置換した系統である NIL(*qSH1*)は完全離層をもつことから（図 6）、*qSH1* は離層の形成に非常に重要な役割を持っていると考えられる。一方、*sh4* の栽培品種の機能欠損アリルは、まだ、ある程度の脱粒性を保持しているからか、離層形成への作用は非常に弱く、穀物を収穫するまでは植物にとどまっていることから、野生イネより、脱粒しにくいものの、脱穀により容易に脱粒する程度である。

sh4 のみの効果を解析するためには、機能型の *qSH1* の遺伝的背景を除いた材料を用いることが必要であると考えられるが、野生イネの *sh4* が変異した場合、部分離層が形成されることから、不完全ではあるが、離層形成に影響があると考えられる。しかしながら、*sh4* が欠損していると考えられる日本晴背景の

NIL(*qSH1*)が完全な離層を形成することから、*sh4* と *qSH1* の機能の相互作用に関しては、今後の解析をまつ必要がある。

今回の脱粒性遺伝子 *qSH1* の同定はマッピングにより行ったが、同様の手法を用いて、トマトでは、糖含量に関与する QTL 遺伝子である *Brix9-2-5* が同定されている。このケースでは、マッピングで候補領域を 484bp にまで絞り込んでいく(Fridman *et al.*, 2000)。その中にアミノ酸置換部位が 3 カ所、4bp のインサクション、18bp のダイレクトリピート、7bp のリピートと複数の多型が存在したが、その後のイントログレッションラインを用いたさらなる絞り込みにより原因となる変異の同定が行われた (Fridman *et al.*, 2004)。また、イネのもう 1 つの脱粒性遺伝子 *sh4* の単離では、遺伝子領域を 1.7kb に絞り込み、原因となる変異を 7 つにまで絞り込んだ (Li *et al.*, 2006)。マッピングでは原因となる変異の同定にはいたっていないが、アソシエーション解析と組み合わせることで、原因を 1 個の変異に特定できた。

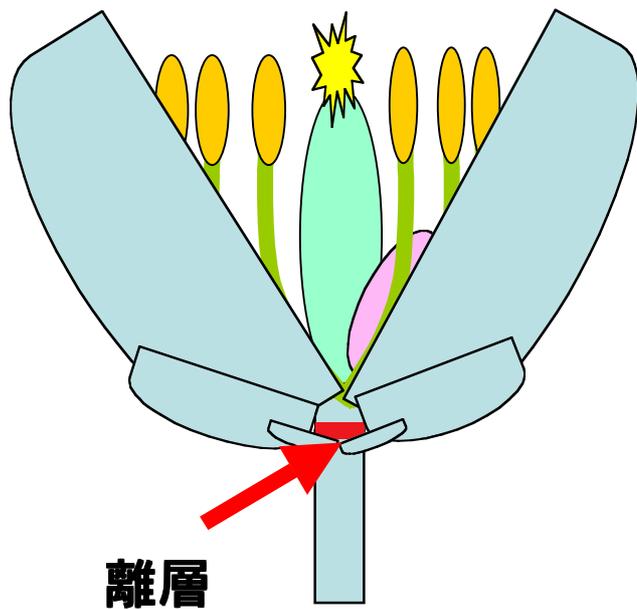
これまで、品種間差を用いたマッピングでは、遠縁種間の組み合わせを用いているケースが多く、絞り込んだ候補領域内にも複数の多型が存在し、原因となる変異を同定することは困難であった。しかし、今回の脱粒性遺伝子 *qSH1* のマッピングでは、約 1 万個体といった大規模集団からの組換え個体の選抜により、候補領域の絞り込みを行った結果、612bp に絞り込むことができ、原因となる多型を 1 個の SNP に特定することができた (図 8、図 9)。また、*Brix9-2-5* や *sh4* のケースにあるようにイントログレッションラインを用いた解析やアソシエーション解析と組み合わせることにより、マッピングにより同定した SNP が栽培化において果たした役割について確定することができるようになった。

これまでに、作物の栽培化関連遺伝子としては、トウモロコシの分げつに
関与する *tb1* (Doebley *et al.*, 1997)やトマトの果実のサイズに関与する *fw2.2* (Frary
et al., 2000) の二例の遺伝子単離が報告されるにとどまっていたが、この1年の
間にトウモロコシの種皮の離脱に関与する *tg1* (Wang *et al.*, 2005)やコムギの穂
の形態や草丈、脱穀性や脱粒性に関与する *Q* 遺伝子(Simons *et al.*, 2006)、そして
イネの2つの脱粒性遺伝子 *sh4* (Li *et al.*, 2006) と本研究の *qSH1* (Konishi *et al.*,
2006)の単離が報告された。単子葉作物での遺伝子単離が急速に進んだのは、イ
ネのゲノム情報が解読されたことが非常に大きい(IRGSP, 2005)と考えられる。

2. イネとシロイヌナズナの離層形成についての比較

イネでは、花の基部に離層が形成されるが、シロイヌナズナでは、雌しべが、
受粉後に分化してできる器官であるさやに、縦方向に離層が形成される(図22)。
今回単離したイネの脱粒性遺伝子 *qSH1* とシロイヌナズナの離層形成に必要な
遺伝子である *RPL* が系統樹上の同じ分岐に存在する(図15) こと等からこれら
はオーソログの関係にあると考えられるので、イネとシロイヌナズナでは、離
層を作るために必要とされる遺伝子機能は保存されていると考えられる。また、
どちらの遺伝子も、繁殖戦略として種子を飛散させるために必要な組織を形成
するといった役割をもつが、機能する場所が解剖学的に異なっているにもかかわらず、
離層形成という機能に関与する遺伝子が同じ起源をもつといったこの
現象は興味深い。この違いをもたらすひとつの考え方としては、キーとなる *qSH1*
と *RPL* の発現制御機構、つまり、プロモーター上の変化が一番に考えられる。

イネの花



シロイヌナズナの花

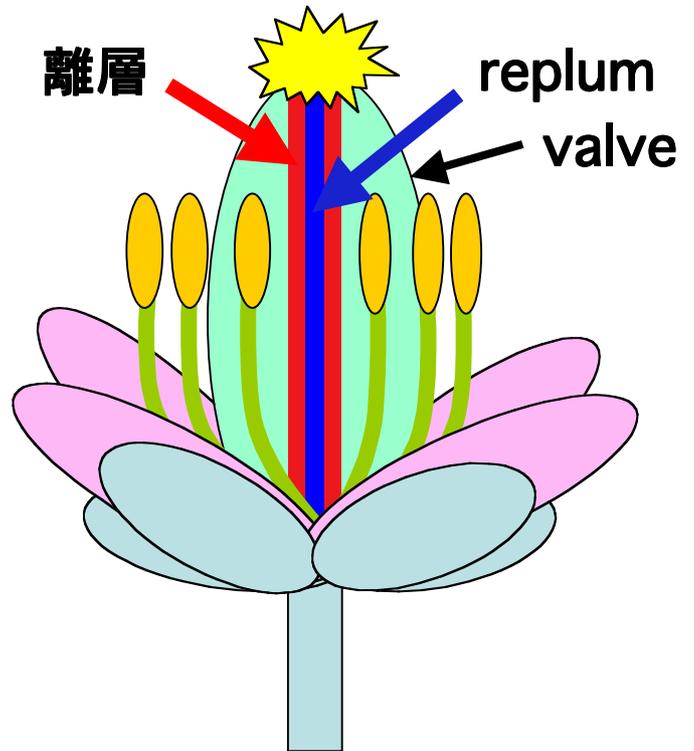


図22 離層形成部位の比較

イネとシロイヌナズナの花を模式的に示した。

イネの花は外側から副護穎、護穎、外穎、内穎が形成され（みず色）、その内側に退化した花弁であるりんぴ（ピンク）、6本の雄ずい（黄緑色+橙色）と1つの雌ずい（緑色+黄色）が形成される。シロイヌナズナの花は、外側から、4枚のがく（みず色）、4枚の花弁（ピンク）、6本の雄ずい（黄緑色+橙色）と2つのcarpelが融合した雌ずい（緑色+黄色）が形成される。

離層が形成される部位を赤色で示した。イネでは、もみの基部の護穎と小枝梗の間に離層が形成されるのに対して、シロイヌナズナでは、雌ずいから派生した器官であるさやのreplum（青色）とvalve（緑色）の間で離層が形成される。

脱 性の喪失の原因となる *qSH1* の SNP 域は、RY リピート (Baumlein *et al.*, 1992) と呼ばれる 6-8bp の既知のシス配 が存在し、*qSH1* が機能型のカサラスでは正常型を、*qSH1* が機能欠損型の日本晴では変異型を示す (図 8)。RY リピートは、シロイヌナズナの *ABI3* タイプの B3 ドメインが下流の遺伝子を転写調節する際に認識するシス配 として知られている。シスエレメントを検索できる web site である PLACE (URL: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>)を用いて、イネの脱 性遺伝子 *qSH1* とシロイヌナズナの *RPL* 遺伝子周辺の RY リピートの分布を調べた (図 23)。*qSH1* の SNP 周辺では、非常に多くの RY リピートが存在することが分かる。一方、シロイヌナズナの *RPL* 周辺では、それほど RY リピートは分布していない。この分布頻度の違いが、*qSH1* の発現調節に関与し、イネとシロイヌナズナでのオーソログ関係にある遺伝子の発現場所が異なる原因の1つとなっている可能性が考えられる。また、シロイヌナズナでは、*ABI3* タイプの B3 ドメインをもつものがゲノム中に3つ存在する。(Giraudat *et al.*, 1992; Luerssen *et al.*, 1998 ; Kagaya *et al.*, 2005)。一方、イネでは、相同性検索の結果、ゲノム中に4つ存在することから、これらの遺伝子が、*qSH1* の上流で働く可能性が示唆される。ここで述べたように、イネとシロイヌナズナの離層形成部位の違いは、離層形成に必須な転写因子の発現制御の違いに起因する可能性がある。

シロイヌナズナでは、*qSH1* のオーソログである *RPL* の他に、さやの離層形成に関与する複数の遺伝子が報告されている(Dinneny *et al.*, 2005) (図 24)。*BEL1* タイプの ホメオボックス遺伝子である *RPL* と MADS ボックス遺伝子の *FUL* (Ferrandiz *et al.*, 2000)がさやでの 域形成のために 抗的に働き(Dinneny *et al.*,

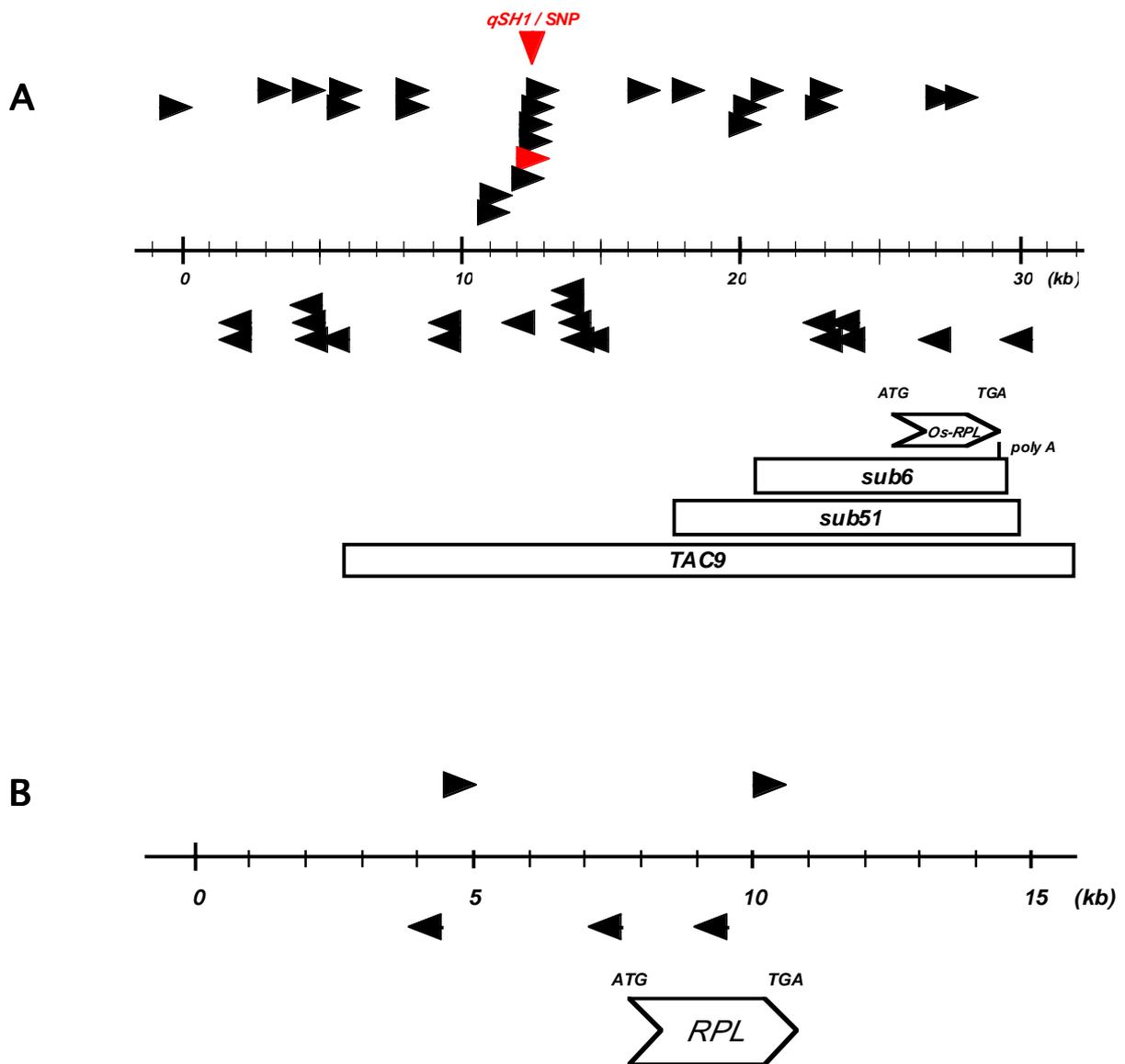
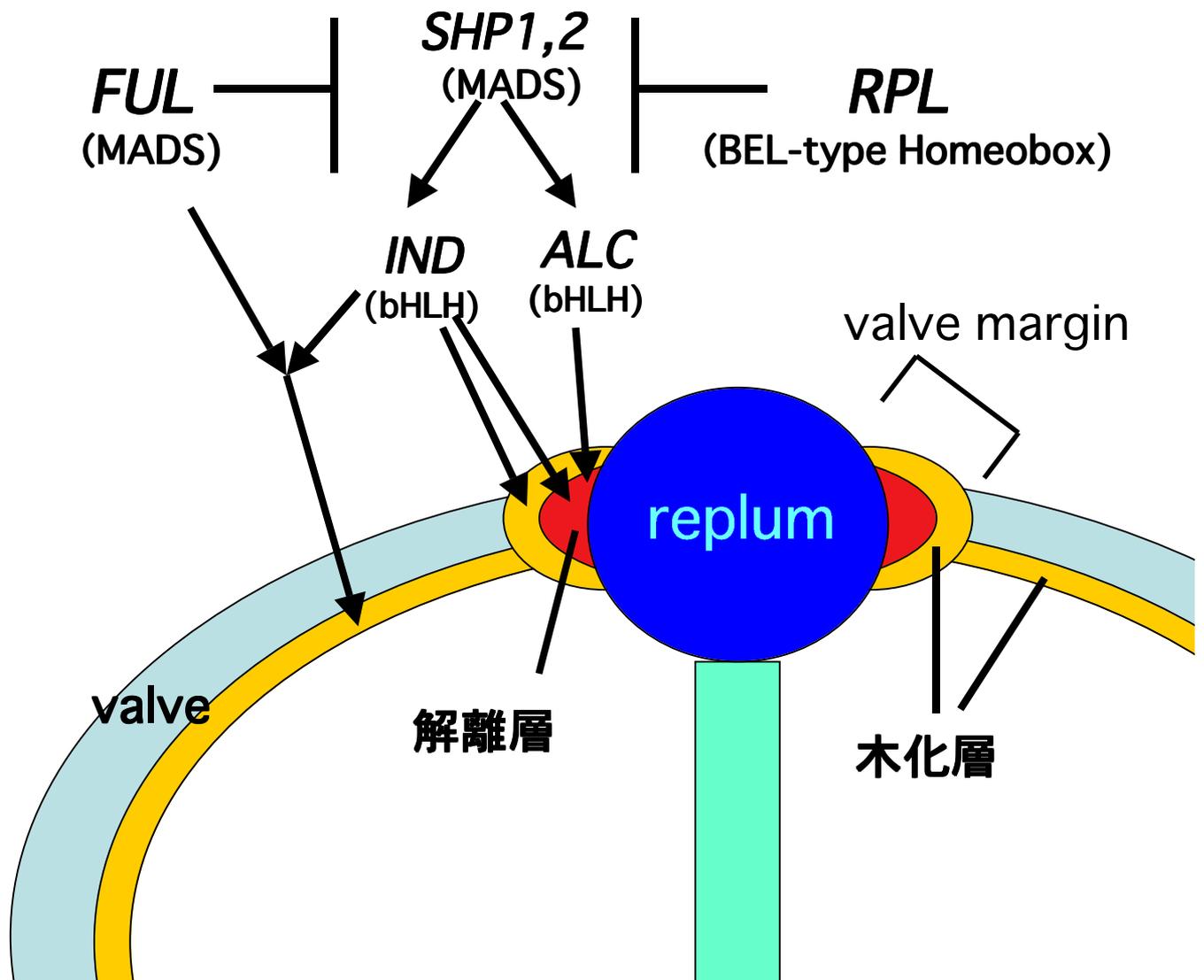


図23 シスエレメントであるRYリピートの分布

A: イネの *qSH1/SNP* 周辺のRYリピート (CATGCA) の分布
相補性試験で用いたコンストラクトの物理地図も示した。

B: シロイヌナズナの *RPL* 周辺のRYリピートの分布

▶ は、RYリピートの存在領域を示し、矢頭で方向性を示した。
RYリピートは、6bp完全に一致したものを示した。



Dinneny and Yanofsky (2005)より改変

図24 シロイヌナズナの離層形成の分子機構

シロイヌナズナのさやの横軸断面の模式図と離層形成に関与する遺伝子の働きを示す。イネ脱粒性遺伝子*qSH1*のシロイヌナズナのオーソログである*RPL*は、さやで*FUL*と拮抗的に働いて領域を決定し、下流にある*SHP1*, *SHP2*, *ALC*, *IND*がvalve marginとvalveの内側の木化層と解離層で働くことによって、さやの開裂を制御している。

2005)、下の遺伝子である MADS ボックス遺伝子の *SHP1*, *SHP2* (Liljegren *et al.*, 2000)や bHLH タイプの転写因子である *IND* (Liljegren *et al.*, 2004)や *ALC* (Rajani and Sundaresan, 2001)を制御して、さやの valve margin や valve での解層や木化層を形成し、さやの層形成を制御している。ここで、*RPL* 遺伝子の発現が層形成部位と同じではないことは特筆すべきである。*qSH1* は今回の解析では、層形成部位もしくはその近傍での発現が確認できた。イネにおいて、*SHP1*, *SHP2* のような層そのもので発現し、層形成に必須な遺伝子は同定できていないので、今後の解析が重くなると思われる。

シロイヌナズナの *SHP1*, *SHP2* は、AG クレードの MADS ボックスに属する。系統樹解析の結果、*SHP* は、単子と双子が共通祖先から分化した後に双子から分化したと考えられる。(Kramer *et al.*, 2004)。シロイヌナズナの AG クレードの4つの MADS ボックス遺伝子のすべては、雌ずい域で発現しており、(Pinyopich *et al.*, 2003) 花の基部での発現は報告がない。また、イネでは、2つの AG のオーソログが進化的にも AG と機能が保存されている (Yamaguchi *et al.*, 2006)。以上のことから、イネでは、*SHP* については、機能的にオーソログに対応するものが存在しないと考えられる (図 25)。このことは、*qSH1* の制御を受ける下の層形成遺伝子は、イネとシロイヌナズナで異なる可能性がある。

事実、*sh4* はシロイヌナズナにおいて明確なオーソログが同定できていない。今回、イネ脱性遺伝子 *qSH1* とシロイヌナズナの *RPL* といったオーソログ関係にある転写因子が層形成に関する重要な因子として同定できたことで、今後、比較生物学的なアプローチで植物がいかに多性を獲得したかに関する知見を層形成を1つのモデルとした研究の進展が期待される。

	イネ	シロイヌナズナ
離層形成の場所	もみの基部	さやのvalve margin
関与する遺伝子	<i>qSH-1</i> (BEL1-type Homeobox)	<i>RPL</i> (BEL1-type Homeobox)
	対応するものなし	<i>SHP1</i> <i>SHP2</i> (MADS) (MADS)

図25 イネとシロイヌナズナの離層形成の比較

イネとシロイヌナズナでは、離層が形成される場所が解剖学的に異なるが、イネ脱粒性遺伝子*qSH1*とシロイヌナズナの*RPL*といったオーソログ関係にある遺伝子が離層形成に関与している。一方、シロイヌナズナの*SHP1*, *SHP2*のイネオーソログは対応するものが存在しない。このことから、イネとシロイヌナズナでは離層形成に関与する周辺の遺伝子やその働きが異なることによって多様性が生じていると考えられる。

3. 脱 性の喪失の原因となった SNP の役割

相補性試験の結果 (図 10、11)、特定した SNP 域と、Os-RPL 域の一方を持つ TAC9 クローンを導入した形質転換体では脱 性を相補でき、Os-RPL 域を十分に含む sub51 クローンを導入した形質転換体では脱 性を部分的に相補でき、SNP 域のみを含む sub1 クローンを導入した形質転換体では脱 性を相補できなかったことから、今回同定した *qSH1* の SNP は、遺伝子の転写制御域に存在し、SNP と Os-RPL 域が脱 性遺伝子 *qSH1* 域であり、層形成に働くと考えられる (図 26)。これまで、植物では、ORF と転写制御域が別れて存在するケースはあまり報告されていなかった。最近になって、今回のケースのように遺伝子本体と制御域が別れているケースが報告されており、シロイヌナズナの *FT* 遺伝子では、約 10kb (Takada and Goto, 2003)、トウモロコシの *tb1* では、上の約 58-69kb (Clark *et al.*, 2006) が転写調節に関与していることが示唆されている。また、プロモーター域の変異がイネの耐病性に影響を与えているケースも報告されている (Chu *et al.*, 2006)。

今回、同定した脱 性遺伝子 *qSH1* の原因となる変異は、ORF から約 12kb 離れた調節域に生じた 1 塩基置換であり、この変異によって、形態的には籾の基部での層形成にのみ影響を与えることが明らかとなった。

栽培化遺伝子であるトウモロコシの *tb1* は、分げつ制御だけでなくや穂・小花の形態制御といった多面的な (pleiotropic) 機能をもっている (Doebley *et al.*, 1995; Doebley, 2004)。また、*tb1* の栽培化に関与した DNA 変化は ORF の変化ではなく、ORF から約 58-69kb 上の域にあることが報告されている (Clark *et al.*, 2004;

相補性試験の結果

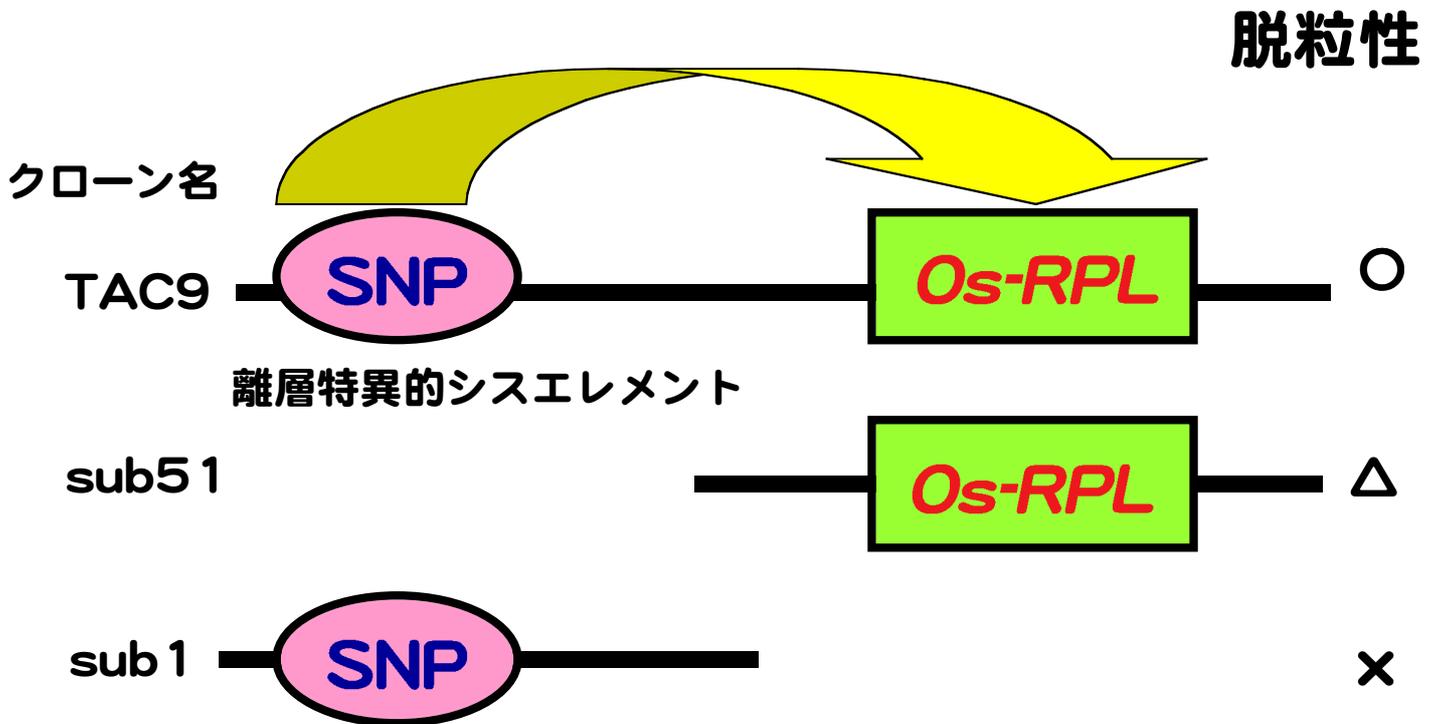


図26 モデル（脱粒性の喪失の原因となったSNPの役割）

相補性試験の結果より、今回同定した脱粒性の原因となるSNP領域と*Os-RPL*領域の両方を含むTAC9では脱粒性を相補でき、*Os-RPL*領域のみを十分に含むsub51では脱粒性を部分的に相補でき、SNP領域のみを含むsub1では、脱粒性を相補できなかったことから、原因となるSNP領域と*Os-RPL*領域が*qSH1* 遺伝子領域であり、SNPは転写調節領域に存在し、離層形成に働くと考えられる。

Clark *et al.*, 2006)。今回、同定した脱粒性遺伝子 *qSH1* は、ORF 内にアミノ酸置換を生じる変異が1つ存在する (図 13A) が、アソシエーション解析の結果、この変異は脱粒性には影響を与えないことが示唆され、ORF から約 12kb 離れた領域に存在する *qSH1* の SNP がマッピングと *in situ* 発現解析の結果から脱粒性の差に影響を与えていることが明らかとなっている (図 19、図 20)。*qSH1* のシロイヌナズナのオーソログである *RPL* はさやの離層形成に関与しているが、それ以外にもメリステムの維持や節間伸張といった多面的な機能を持つ (Smith and Hake, 2003 ; Roeder *et al.*, 2003 ; Byrne *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2004) ことから、*qSH1* も多面的な機能を持つことが示唆される。また、*in situ* 発現解析の結果、*qSH1* はイネの籾の基部の離層以外でも花芽分裂組織でも発現が見られる (図 17、図 18) ことなども、上記の考えを支持する。とすると、古代人は、*qSH1* の変異の中で、多面的な機能変化をおこす変異ではなく、離層形成のみに影響が出る制御シス配列をその変異を知らずに選抜した可能性がある。このように、栽培化遺伝子において実際に栽培化に利用されたアリルは特殊なアリルであり、遺伝子本体が多面的な機能を持つケースでは、機能完全欠損アリルになると、植物体に栽培化で利用された表現型以外の変化も生じる可能性が高く、そういった個体は栽培化の過程で選抜されずに淘汰されたのではないかと考えられる。本研究では、自然変異を利用して遺伝子単離を行ったことによって、栽培化で利用された遺伝子の発現調節領域に生じたわずかな変異を同定することができたのかもしれない。

4. 栽培化過程の推定

イネを含む主要穀物の栽培化が始まったのは約 1 万年前と考えられている。今回脱粒性遺伝子として単離した *qSH1* 遺伝子の変異は、イネのアソシエーション解析および考古学的な知見から、約 3000 年から 1 万年前に温帯ジャポニカで生じた変異であることが推測された。イネの栽培化過程で、古代人が *qSH1* に生じた脱粒性の喪失の原因となる変異をもつ個体（もしくは、小集団）を選抜し、その集団サイズを増やしていったと考えられる。例えば、図 21 に示すように、ジャポニカのなかで、脱粒しないハプロタイプは 2 パターンしか存在しないが、そのパターンをもつ在来品種は多数存在する。このことは、栽培が始まっていたと考えられる中間的な栽培種の集団の中の 1 個体に起こった変異が次の世代に伝わり、難脱粒性の固定した個体もしくは集団を、古代人がより収量性の高い個体・集団として、強い選抜をかけたことを示している。

また、現存するジャポニカの近縁野生イネ(W1943)(Cheng *et al.*, 2003)のハプロタイプが推定した共通祖先と同じハプロタイプを示すことから、*qSH1* 遺伝子領域に関しては、W1943 が一番ジャポニカに近い野生イネであることを示唆している。このことは、pSINE と呼ばれるレトロトランスポゾンのゲノム上の挿入パターンから、W1943 がジャポニカに近い野生イネの小グループのメンバーであることを示した仕事(Cheng *et al.*, 2003)と非常によくあっている。ほとんどの真核生物において、中立な DNA 変異は、1 塩基部位、1 年あたり、10 のマイナス 9 乗のオーダーの頻度で受けることがわかっており、高等植物もこれに準じていると考えられている（宮田 1994）。遺伝子は、通常 5-10kb のサイズを持つ

ことから、栽培化にかかった約1万年の間に、1個の遺伝子がDNA変化を受ける頻度はそれほど高くない。したがって、1万年という時間は、遺伝子の変化を指標にする限り、その変化をかなり正確に推定できる可能性がある。今回、ハプロタイプ解析によって、*qSH1* 遺伝子の栽培イネのハプロタイプの共通祖先にまで比較的簡単に推定できたことはこのことを如実に示している。

今回調べた野生イネのハプロタイプを詳細に見ると、ジャポニカに近いハプロタイプとインディカに近いハプロタイプに大別でき、両方が途中で組換えを起こすことでできたと考ええると説明しやすいハプロタイプも存在する。このことは、栽培種に比べて、野生イネは、非常に頻繁に自然交配を繰り返して、多様な遺伝子型を持っていることがわかる。また、そういった交配を繰り返していた野生イネの集団から現在の栽培イネがボトルネックを受けながら、栽培化された様子が想像される。このことは、ジャポニカとインディカが20万年前という栽培化からずっと以前の野生イネの段階で、はっきり種分化していたというレトロトランスポゾンの挙動 (Vitte et al., 2004)からの推定を合わせて考えると、多様であった野生イネは交配を繰り返しながらも、地理的な分布ごとに独特なハプロタイプをもつ集団として分化し、そういった集団のなかから、約1万年前に、長江の流域ではジャポニカが、そして、インド・タイ・ミャンマーの周辺ではインディカが独立に栽培化されてきたと考えることができる。このとき、それぞれが、強いボトルネックをうけることで、栽培種のDNAの多様性が非常に減少したと推定できる。前述した3つの遺伝子のハプロタイプ解析によれば、野生種中に見つかるハプロタイプは栽培種 (*O.sativa*) と野生種 (*O.rufipogon*) を合わせた全体のハプロタイプの種類の約8割強に相当し、それに

比べて栽培種に見つかるハプロタイプは、約 2 割になるそうである。つまり、野生イネがもつ多様性のごく一部から栽培イネが生まれたことが示唆され、我々の *qSH1* の結果と非常に整合性が取れた結果になっている。解析した野生イネの *qSH1* 遺伝子領域のハプロタイプの多様性は、地理的に離れて分化していた野生イネも、ある頻度で遠縁のものとの交配を繰り返す機会があったことを示唆しているが、その詳細は不明である。

一方、最近単離されたもう一つの脱粒性遺伝子 *sh4* は、インディカ品種でもジャポニカ品種でも同じ変異を持っている (Li *et al.*, 2006)。ジャポニカ、インディカの起源に関してはこれまでいろいろな説が提唱されているが、最近の論文によると、系統地理学的な解析により、インディカとジャポニカは、少なくとも独立な 3 回以上の栽培化によって生じたことが報告されている (Londo *et al.*, 2006)。このことは、*sh4* の変異は、約 1 万年前にイネの栽培化が起こった後に生じたのではなく、古代人が栽培化を始める前からすでに野生種内で生じていた変異で、しかも、野生種が自然界で生存するには支障のなかった自然変異を古代の人が見つけてイネの栽培化に利用したと考えることができる。同じアレルが、ジャポニカとインディカのそれぞれ独立に起こったと考えられる 2 回の栽培化の両方で利用されたという仮説は、無数に存在するであろう変異の中で、栽培化に寄与できる変異がそれほど多くないことを示唆していて興味深い。*sh4* 欠損型である多くのインディカが、まだかなり脱粒しやすいことに見られるように、*sh4* 変異による脱粒性の変化は比較的弱いもので、自然脱粒する表現型から手で握ると簡単に脱粒してしまう程度の表現型の変異でしかない。逆に言えば、この程度の変異であったからこそ、*sh4* の難脱粒性アレルが自然界でも存在

できたと考えられる。自然界においては、脱粒するという形質は効率的に子孫を残すためには非常に重要であったと考えられるからである。

5. 栽培化に関与した DNA 変異

イネの栽培化の歴史は、約 1 万年と比較的最近になって行われたことであるが、選抜の対象となる変異が、栽培化が始まった以降に起こった DNA 変異だけだとすると、栽培化に寄与したと考えられる変異の多様性がかなり低くなってしまふ。真核生物では、遺伝子サイズ(約 10kb)の DNA のどこかに中立な変異の入る頻度は、10 万年に 1 回程度の頻度である (宮田 1994)。人為選抜にかかった集団サイズにもよるが、任意の変異体を得るほどの大きさの集団から栽培種が生まれたとは考えにくい。しかし、実際に、形質を極端に大きく変化させる多数の変異が育種に利用されていることを考えると、*sh4* の例にもあるように、栽培化が行われるずっと昔から野生に自生している植物に自然に起こった変異すべてが栽培化の選抜の対象となりえたと考えられる。こういった古いアリルを利用することで、多様な形質の急激な栽培化を可能にし、極端な変化も可能にしたと考えられる。つまり、栽培化とは、野生種集団に既に存在していたアリルを古代人が人為選抜したケース、つまり *sh4* のケースと、選抜を既に受けた中間栽培種中に起きた新しい突然変異を利用したケース、つまり *qSH1* のケースとの大きく二つに分けて考えることができる。

トウモロコシのように他殖性が強く大きな変化を伴う栽培化では、メキシコ南部で約 5000 年から 9000 年前に 1 回の栽培化によって野生種であるテオシンテ

から中間栽培種である在来品種への栽培化が起り、在来品種は 20 世紀に入ってから、育種家による作物の育種や改良によって、インブレッドラインへと人為選抜が行われた (Yamasaki *et al.*, 2005)。このトウモロコシの栽培化には、特に、もうひとつの大きな遺伝効果、すなわち、選抜を受ける集団に多様性を与える原因として、突然変異に基づく特定のアリルによる効果だけではなく、既存の遺伝子変異の組み合わせによる効果が重要な働きを果たした可能性を考える必要があるのではと考えている。古代人による選抜過程に、突然変異の組み合わせが重要な役割を果たしたという科学的な証拠はまだ得られていないが、例えば、日本列島は、南北に細長く、北海道と九州とでは日長や温度はかなり異なっているにもかかわらず、イネの栽培域は非常に広範であるのは、出穂期関連遺伝子のアリルの組み合わせによっていることが、最近の研究結果で明らかとなってきており (竹内、矢野 2006)、今後の研究の進捗が楽しみな領域である。この変異の組み合わせ効果に関しては、自殖が主な繁殖形態であるイネの栽培化においては、なかなか利用されてこなかったと考えられる。このことは、他殖性のテオシンテとトウモロコシが形態的に大きな変化を受けたことと、野生イネと栽培イネの形態的な差が小さいイネとでは好対照である。近年、イネにおいて、DNA マーカーを用いた新しい育種の試みがスタートしており、これまで利用されなかった遠縁の種を染色体置換系統を利用することで、遺伝子の組み合わせを育種に導入しようとの試みは、今後非常に楽しみである。トウモロコシのようなイネが生まれる可能性もあるかもしれない。

6. 育種への利用

今回、温帯ジャポニカの脱粒性の喪失の原因となる遺伝子の SNP を明らかにすることができたが、最後に、この知見を利用した育種への利用について考察してみたい。イネコレクションを用いたアソシエーション解析の結果、インディカ品種では、脱粒性遺伝子 *qSH1* の SNP は、機能型を示し、脱粒しやすい品種が多く存在した。*qSH1* の SNP の機能欠損型はジャポニカにしか存在していないが、インディカではこれまで、*sh4* 以来、非脱粒化の育種・栽培化は行われてこなかったようである。しかしながら、数千年前からジャポニカにはすでに難脱粒性の *qSH1* があったはずである。これが利用されなかったのは、機械化される前の脱穀の方法では、極端な難脱粒性は必要とされなかったことがひとつの原因であろう。しかしながら、もっと、大きな理由は、自殖が主な繁殖方法であるイネでは、自然交雑の頻度が低く、生態系から言っても、インディカとジャポニカの交配があまり起きなかったこと、また、仮に起こったとしても、後代で不良形質の分離が激しく、日印交雑による育種が困難であったことが考えられる。

また、近代育種に目を向けてみると、インディカの育種では、フィリピンのイネ国際研究所 (IRRI) で行われた育種は、緑の革命と呼ばれ、有名な IR8 に始まる IR シリーズといったインディカの一連の品種群が育成されており、現在でも、東南アジアの各国の主要品種や母本となっている。IR8 とは、低脚烏尖 (Dee-geo-woo-gen) を片親にもち、半矮性遺伝子 *semi dwarf1 (sd1)* (Sasaki *et al.*, 2002) を利用することで、従来品種に比べ高収量をもたらした。また、IR8 は

ミラクルライスと呼ばれ、イネにおいて緑の革命をもたらした品種である (Khush, 2001)。実は、近代育種においても、日本晴が持つ *qSH1* がインディカの品種改良に利用されなかった背景には、この低脚烏尖の *sd1* アリルの存在が大きく関与したのではと推測される。脱粒性遺伝子 *qSH1* も半矮性遺伝子 *sd1* も、同じ第1染色体長腕上の近傍に座乗する。今回、脱粒性遺伝子 *qSH1* が単離されたことで、この遺伝子間の物理距離は約 1.9Mb の距離にあることが分かった (図 27)。このことから、これらの2つの遺伝子は強く連鎖しており、インディカ品種の低脚烏尖の *sd1* アリルを選抜した時点で、日印交雑の後代であっても、温帯ジャポニカの脱粒しない *qSH1* アリルは導入されなかった可能性が非常に高くなる。今回、脱粒性遺伝子が同定されたことによって、遺伝子情報を利用したゲノム育種を行うことにより、脱粒しにくいインディカ品種を作成することも可能になる。

イネ、コムギ、トウモロコシといった主要穀物は、人類の消費するカロリーの50%以上を供給している (Doebly, 2006)。今後、人口増加に伴って、穀物の深刻な不足がはっきりと予測される中、中国やインドといった大規模な水田地域で栽培されるインディカ品種の機械化栽培が主流となれば、*qSH1* を利用したインディカ品種の非脱粒化への利用は有効であり、このことによるインディカの収量性の上昇は、世界での穀物生産に非常に大きな貢献ができると考えられる。

A



sd1 (A.Sasaki *et al.* 2002)

wild *sd1* (IR8)

B

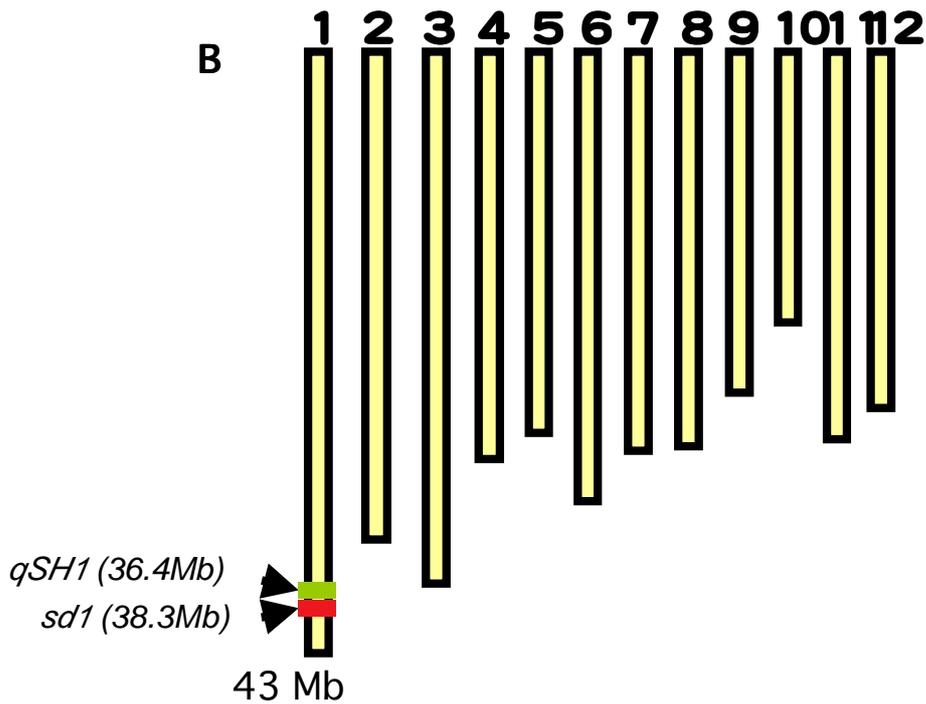


図27 脱粒性遺伝子 $qSH1$ と半矮性遺伝子 $sd1$ との関係

A: 右は半矮性遺伝子 $sd1$ の突然変異型のIRRIで育成されたインディカ品種のIR8、左は野生型のイネを示す。

B: 脱粒性遺伝子 $qSH1$ と半矮性遺伝子 $sd1$ との物理距離（約1.9Mb）を示す。第1染色体の物理距離は約43Mbである。

引用文献

Baba, T., Katagiri, S., Tanoue, H., Tanaka R., Chiden, Y., Saji, S., Hamada, M., Nakashima, M., Okamoto, M., Hayashi, M., Yoshiki, S., Karasawa, W., Honda, M., Ichikawa, Y., Arita, K., Ikeno, M., Ohta, T., Umehara, Y., Matsumoto, T., Jong, P. J. and Sasaki, T. Construction and characterization of rice genomic libraries : PAC library of *Japonica* variety, Nipponbare and BAC library of *Indica* variety , Kasalath. (2000). Bulletin of the NIAR **14**, 41

Baumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inze, D., and Wobus, U. (1992). Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. Plant J **2**, 233-239.

Byrne, M.E., Groover, A.T., Fontana, J.R., and Martienssen, R.A. (2003). Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene *BELLRINGER*. Development **130**, 3941-3950.

Cai, W., and Morishima, H. (2002). QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. Theor Appl Genet **104**, 1217-1228.

Cheng, C., Motohashi, R., Tsuchimoto, S., Fukuta, Y., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (2003). Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINEs. Mol Biol Evol **20**, 67-75.

Chu, Z., Yuan, M., Yao, J., Ge, X., Yuan, B., Xu, C., Li, X., Fu, B., Li, Z., Bennetzen, J.L., Zhang, Q., and Wang, S. (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev **20**, 1250-1255.

Clark, R.M., Linton, E., Messing, J., and Doebley, J.F. (2004). Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 700-707.

Clark, R.M., Wagler, T.N., Quijada, P., and Doebley, J. (2006). A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. *Nat Genet* **38**, 594-597.

Dinneny, J.R., and Yanofsky, M.F. (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *Bioessays* **27**, 42-49.

Dinneny, J.R., Weigel, D., and Yanofsky, M.F. (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687-4696.

Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annu Rev Genet* **38**, 37-59.

Doebley, J. (2006). Plant science. Unfallen grains: how ancient farmers turned weeds into crops. *Science* **312**, 1318-1319.

Doebley, J., Stec, A., and Gustus, C. (1995). *teosinte branched1* and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**, 333-346.

Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485-488.

Eiguchi, M., and Sano, Y. (1990). A gene complex responsible for seed shattering and panicle spreading found in common wild rices. *Rice Genet. News* **7**, 105-107.

Ferrandiz, C., Liljegren, S.J., and Yanofsky, M.F. (2000). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**, 436-438.

- Frary, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., and Tanksley, S.D.** (2000). fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85-88.
- Fridman, E., Pleban, T., and Zamir, D.** (2000). A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4718-4723.
- Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y.S., Fernie, A.R., and Zamir, D.** (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**, 1786-1789.
- Fukuta, Y., and Yagi, T.** (1998). Mapping of a shattering resistance gene in a mutant line SR-5 induced from an indica rice variety, Nan-jing11. *Breed Sci* **48**, 345-348.
- Fuse, T., Sasaki, T., and Yano, M.** (2001). Ti-plasmid vectors useful for analysis of rice genes. *Plant Biotech* **18**, 219
- 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.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H.M.** (1992). Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T., Kuboki, Y., Yamamoto, T., Lin, S.Y., Antonio, B.A., Parco, A., Kajiya, H., Huang, N., Yamamoto, K., Nagamura, Y., Kurata, N., Khush, G.S., and Sasaki, T.** (1998). A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* **148**, 479-494.
- Ichikawa, T., Sugiyama, T., Takahashi, H., Miyahara, S.** (1990). Equipment for quantitative measurement of shattering habit of paddy. *JARQ* **24**, 37-42.

IRGSP (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.

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 waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J* **15**, 133-138.

Ito, M., Sato, Y., and Matsuoka, M. (2002). Involvement of homeobox genes in early body plan of monocot. *Int Rev Cytol* **218**, 1-35.

Itoh, J., Nonomura, K., Ikeda, K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamagishi, H., Kitano, H., and Nagato, Y. (2005). Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol* **46**, 23-47.

Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005). *LEAFY COTYLEDON1* controls seed storage protein genes through its regulation of *FUSCA3* and *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*. *Plant Cell Physiol* **46**, 399-406.

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

Khush, G.S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* **2**, 815-822.

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

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.

- Kramer, E.M., Jaramillo, M.A., and Di Stilio, V.S.** (2004). Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics* **166**, 1011-1023.
- Kyozuka, J., Konishi, S., Nemoto, K., Izawa, T., and Shimamoto, K.** (1998). Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1979-1982.
- Li, C., Zhou, A., and Sang, T.** (2006). Rice domestication by reducing shattering. *Science* **311**, 1936-1939.
- Liljgren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., and Yanofsky, M.F.** (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-770.
- Liljgren, S.J., Roeder, A.H., Kempin, S.A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., and Yanofsky, M.F.** (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* **116**, 843-853.
- Liu, Y.G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., and Shibata, D.** (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6535-6540.
- Londo, J.P., Chiang, Y.C., Hung, K.H., Chiang, T.Y., and Schaal, B.A.** (2006). From the Cover: Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9578-9583.
- Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P., and Misera, S.** (1998). *FUSCA3* encodes a protein with a conserved *VP1/AB13*-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**, 755-764.

- MacNeish, R. S., Cuunar, S. G., Zhao, A., Libby, J.** (1998) Second Ann. Rep. Sino-American Jianxi Origin of Rice Project (SAJOR), 80
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, G.J., Buckler, E., and Doebley, J.** (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6080-6084.
- Nagao, S., and Takahashi, M.** (1963). Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice. *Journ Facul Agr, Hokkaido Univ* **53**, 72-130.
- Oba, S., Kikuchi, F.** (1989). Formation of abscission layer controlled by a shattering gene linked with semidwarfing gene *sh-1* in rice. *Rice Genet. News* **6**, 132-134.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F.** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**, 85-88.
- Rajani, S., and Sundaresan, V.** (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol* **11**, 1914-1922.
- Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G.W., and Fischer, R.L.** (1995). The *BELLI* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell* **83**, 735-742.
- Roeder, A.H., Ferrandiz, C., and Yanofsky, M.F.** (2003). The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Curr Biol* **13**, 1630-1635.
- Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., and Martin, W.** (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet* **3**, 429-441.

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). Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**, 701-702.

Sato, Y. I., Tang, X., Yang, L. U., Tang, L. U. (1991) Wild-rice seeds found in an oldest rice remain. *Rice Genet. News* **8**, 76.

Simons, K.J., Fellers, J.P., Trick, H.N., Zhang, Z., Tai, Y.S., Gill, B.S., and Faris, J.D. (2006). Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q*. *Genetics* **172**, 547-555.

Sluyter, A., and Dominguez, G. (2006). Early maize (*Zea mays* L.) cultivation in Mexico: dating sedimentary pollen records and its implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1147-1151.

Smith, H.M., and Hake, S. (2003). The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* **15**, 1717-1727.

Smith, H.M., Campbell, B.C., and Hake, S. (2004). Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH*. *Curr Biol* **14**, 812-817.

Sobrizal, K., Ikeda, K., Sanchez, P. L., and Yoshimura, A. (1999). RFLP mapping of a seed shattering gene on chromosome 4 in rice. *Rice Genet. News* **16**, 74-75.

Takada, S., and Goto, K. (2003). *TERMINAL FLOWER2*, an *Arabidopsis* homolog of *HETEROCHROMATIN PROTEIN1*, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by *CONSTANS* in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**, 2856-2865.

Tanksley, S.D., and McCouch, S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* **277**, 1063-1066.

Wang, H., Nussbaum-Wagler, T., Li, B., Zhao, Q., Vigouroux, Y., Faller, M., Bomblies, K., Lukens, L., and Doebley, J.F. (2005). The origin of the naked grains of maize. *Nature* **436**, 714-719.

Yamaguchi, T., Lee, D.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., and Hirano, H.Y. (2006). Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *Plant Cell* **18**, 15-28.

Yamasaki, M., Tenailon, M.I., Bi, I.V., Schroeder, S.G., Sanchez-Villeda, H., Doebley, J.F., Gaut, B.S., and McMullen, M.D. (2005). A large-scale screen for artificial selection in maize identifies candidate agronomic loci for domestication and crop improvement. *Plant Cell* **17**, 2859-2872.

佐藤 洋一郎 (2003)

イネが語る日本と中国 (交流の大河 5000 年) 図説 中国文化百華
(社) 農山漁村文化協会

竹内 善信、矢野 昌弘 (2006)

出穂期を調整する —コシヒカリの出穂性同質遺伝子系統の育成— 農業と園芸 81 巻 110-113

二村 直人、石川 亮、上島 脩志、石井 尊生 (2003)

野生イネ *Oryza rufipogon* 由来の脱粒性遺伝子のマッピング
育種学研究 5 (別 2) P100

福田 善通 (1994)

イネの脱粒性に関する遺伝育種学的分析、岡山大学農学部学位論文

宮田 隆 (1994)

分子進化学への招待 DNA に秘められた生物の歴史
講談社 ブルーバックス

村上 高 (2004)

形質転換イネの植物中における GUS レポーター遺伝子発現の組織科学的解析法
(独) 農業生物資源研究所

論文目録

Konishi S., Izawa T., Lin S.Y., Ebana K., Fukuta Y., Sasaki T., Yano M. (2006)
An SNP Caused Loss of Seed Shattering During Rice Domestication.
Science **312**, 1392-1396.

**Ma J.F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M.,
Murata Y., Yano M. (2006)**
A silicon transporter in rice.
Nature **440**, 688-691.

Ma J.F., Mitani N., Nagao S., Konishi S., Tamai K., Iwashita T., Yano M. (2004)
Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon
transporter gene in rice.
Plant Physiol. **136**, 3284-3289.

Kyozuka J., Konishi S., Nemoto K., Izawa T., Shimamoto K. (1998)
Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle
branch initiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 1979-1982.

謝辞

本論文作成および本研究を遂行するにあたり、直接ご指導を賜り、常に前向きな討論や研究に対する姿勢など多岐にわたりご鞭撻いただきました独立行政法人農業生物資源研究所 光環境応答研究ユニット井澤 毅博士に心よりお礼申し上げます。本論文作成および本研究を遂行するにあたり、全般にわたってご指導を賜り、適切なお助言、ご指導を賜りました独立行政法人 農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センター長 矢野 昌裕博士に心からお礼申し上げます。本論文作成にあたって、ご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 島本 功教授に心より感謝いたします。本研究を進めるにあたり、快く脱粒性の QTL 解析結果を使用させていただきました独立行政法人 国際農林水産業研究センター 福田 善通博士に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、脱粒性のマッピングのための分離集団ならびに準同質遺伝子系統等の材料を快く提供してくださいました農林水産先端技術研究所（現：ホンダリサーチインスティテュートジャパン）の林 少揚博士に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、イネコアコレクションを快く分譲してくださり、情報を提供してくださった独立行政法人農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センター江花 薫子博士に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご丁寧に *in situ* 発現解析のご指導をしていただきました、東京大学 栽培学研究室 経塚 淳子助教授、倉川 尚氏、独立行政法人農業生物資源研究所 田切 明美氏に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、形質転換用のコンストラクト作成について、的確なお助言をいただきました、独

立行政法人農業生物資源研究所植物ゲノム研究ユニット片寄 裕一博士、農林水産先端技術研究所 山根 弘子氏に感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご丁寧電子顕微鏡の操作方法についてご指導をしてくださりました独立行政法人農業生物資源研究所 井上 尚博士ならびに土原 和子博士(現:金沢工業大学)に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、多大な便宜を図っていただきました独立行政法人農業生物資源研究所理事 佐々木 卓治博士、植物ゲノム研究ユニット長 松本 隆博士、農林水産先端技術研究所研究第3部長 江口 恭三博士に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、イネゲノム塩基配列情報を提供してくださりました、独立行政法人農業生物資源研究所ゲノムリソースセンター長 長村吉晃博士、農林水産先端技術研究所 宋 健瑜博士に感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、イネの脱粒性測定でご協力をいただきました独立行政法人農業生物資源研究所 松崎 礼子氏に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、イネの形質転換でご協力をいただきました独立行政法人農業生物資源研究所 朱 紅加 氏、青田 房子氏に心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、激励および助言をいただきました農林水産先端技術研究所のみなさま、独立行政法人農業生物資源研究所 光環境応答研究ユニット井澤研究室のみなさま、および QTL ゲノム育種研究センターのみなさまに心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり、多大なご理解と激励および支援をしていただきました私の家族である杉田 勝弘、小西 清、小西 幸子、小西 加純、中野 未夏に心より感謝いたします。