総説

エピジェネティクスが制御する植物の形質

藤本 龍^{1,2)}・石川 亮³⁾¹⁾ 国立遺伝学研究所育種遺伝研究部門, 三島市, 〒411-8540²⁾ CSIRO Plant Industry, GPO Box 1600, Canberra ACT 2601, Australia³⁾ 神戸大学農学研究科資源生命科学科応用植物学コース植物育種学研究室, 神戸市, 〒657-8501

Plant traits regulated by epigenetic mechanisms

Ryo Fujimoto^{1,2)} and Ryo Ishikawa³⁾¹⁾ National Institute of Genetics, Mishima 411-8540, Japan²⁾ CSIRO Plant Industry, GPO Box 1600, Canberra ACT 2601, Australia³⁾ Laboratory of Plant Breeding, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

キーワード

エピジェネティクス, DNA メチル化, ヒストン修飾, トランスポゾン, ストレス, 生殖隔離, ジーンサイレンシング

はじめに

遺伝子の発現情報の伝達は塩基配列に依存するジェネティックな遺伝と塩基配列によらず、遺伝子の修飾状態の変化に依存するエピジェネティックな遺伝が存在する。植物のエピジェネティクス研究は、モデル植物であるシロイヌナズナで進んでおり、特に突然変異体を用いた解析がこの分野の進展に大きく貢献している。動物のエピジェネティックな制御に関連する遺伝子の突然変異体は、致死に到ることが多いが、植物の突然変異体では致死に到らず、遺伝学的な解析が可能であることが理由として挙げられる。また、エピジェネティックな遺伝子の発現制御は、遺伝子機能・環境応答・生殖制御などとの関連性が示唆されていることから育種において重要な研究課題である。本総説では、育種学的観点からエピジェネティックな制御機構の重要性について、トランスポゾン・生殖・環境応答の項目に分けて概説し、またエピジェネティックな現象による重要農業形質の例について最近の話題を交えて紹介する。

1. エピジェネティックな制御機構～DNAメチル化とヒストン修飾～

エピジェネティックな転写制御では、DNA のメチル化とヒストンコード仮説 (Strahl and Allis 2000, Jenuwein and Allis 2001) に始まるヒストンテイルの修飾 (メチル化, アセチル化, リン酸化等) が関与している。DNA メチル

化は、メチル基が DNA 合成後にシトシン環の 5 位に付加される。一般的に DNA のメチル化は転写抑制化、脱メチル化は転写活性化に働く。一方、ヒストン H3 の 4 番目のリジン (H3K4) と H3K36 のメチル化は転写活性化の指標、H3K9, H3K27, H3K20 は転写抑制化の指標として知られている (図 1; Fuchs *et al.* 2006, Pfluger and Wagner 2007)。さらに、リジン残基に対して付加されたメチル基の数によって、転写の活性、不活性化が変わることも知られている。ヒストンのアセチル化においても、アセチル化は転写活性化に、脱アセチル化は転写の抑制化に働くことが一般的に知られている (図 1; Fuchs *et al.* 2006, Pfluger and Wagner 2007)。また近年、ゲノムレベルでこれらエピジェネティックな制御を理解しようとする解析も多数行われている。

1-1. DNA メチル化と脱メチル化

シロイヌナズナから明らかにされた DNA のメチル化は 2 つの反応によって行われる。1 つは、維持型のメチル化反応で、MET1 (Methyltransferase 1) と CMT3 (Chromomethylase 3) が働き、それぞれ主に CG 配列のメチル化、CNG 配列のメチル化を担っていることが示されている (Lindroth *et al.* 2001, Bartee *et al.* 2001, Kankel *et al.* 2003, Saze *et al.* 2003)。もう 1 つの反応は、*de novo* のメチル化で、これは DRM (domains rearranged methyltransferase) が担っている (Cao *et al.* 2000, 2002)。さらに、24 塩基の低分子 RNA (siRNA; short interfering RNA) がガイドになり、相補的な配列がメチル化される DNA メチル化機構 (RdDM; RNA-directed DNA methylation) が近年注目されており、siRNA の生成に関わる遺伝子と標的配列の *de novo* DNA のメチル化に関わる遺伝子が次々と明らかにされている (Matzke *et al.* 2009)。一方、DNA の脱メチル化に関わる

編集委員: 安井 秀

2010 年 3 月 26 日受理 2010 年 10 月 27 日受理

Correspondence: r-ishika@port.kobe-u.ac.jp

ryo.fujimoto@csiro.au

図 1. ヒストンの N 末端におけるリジン残基の修飾と転写との関係

(A) ヒストンテイルのリジン残基における修飾箇所。ヒストンは H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ 2 コピー (8 量体) と 147 bp の DNA から構成される。特に、H3 と H4 の N 末端に位置するリジン残基は種々の修飾 (メチル化・アセチル化等) を受け、そのヒストン近傍に位置する遺伝子の転写の活性化・抑制化との関連性が知られている。(B) シロイヌナズナにおけるヒストン修飾と近傍遺伝子の転写の関係

遺伝子としては、DNA グリコシラーゼとリアーゼの 2 つの機能を有する DME (DEMETER; Choi *et al.* 2002) (後述) と ROS1 (Repressor of Transcriptional gene silencing; Gong *et al.* 2002) が同定されている。脱メチル化の機構は、グリコシラーゼ活性が、メチルシトシンを除去し、リアーゼ活性が DNA にニックを入れ、DNA 修復の際に、メチル化されていないシトシンに変わること、DNA の脱メチル化が起こると考えられている (Agius *et al.* 2006)。

1.2. ヒストン修飾

ヒストンの可逆的な修飾が、後述する春化反応や環境ストレス応答等のエピジェネティックな転写制御に関わることが示されている。シロイヌナズナのヒストンアセチル基転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素の変異体では、植物の生育や発達段階において、多面的な異常を示すことから、ヒストンのアセチル化による遺伝子の発現制御が、植物の正常な発達に重要であると考えられている (Vlachonasios *et al.* 2003, Bertrand *et al.* 2003, Tian and Chen 2001, Tian *et al.* 2003)。ヒストンの脱アセチル化酵素は、PD3/HSA (reduced potassium dependency protein 3/histone deacetylase 1 protein) クラス, SIR2 (silent information regulator protein 2) クラスと植物に特異的な HD2 (histone deacetylase 2) クラスの 3 つに分類されている (Pandey *et al.* 2002)。

ヒストンのメチル化に関わる遺伝子は、SET ドメイン

を持つ 4 つのクラスに分けられ、E (z) (enhancer of zeste) クラス, SU (VAR3-9) (Suppressor of variegation 3-9) クラス, TRX (trithorax) クラス, ASH1 (absent, small or homeotic 1) クラスとして扱われている (Ng *et al.* 2007)。シロイヌナズナでは、SU (VAR3-9) クラスの幾つかの遺伝子がヒストンのメチル化活性を持つことが示された (Jackson *et al.* 2002, 2004, Ebbs and Bender 2006)。E (z) クラスは、ポリコム群 (Polycomb Group, PcG) タンパク質, PRC2 様の複合体の構成要素の 1 つで、H3K27 のメチル化に関わっていると考えられている。トリソラックス群 (trithorax Group, trxG) タンパク質は転写活性化状態の維持に働き、ポリコム群タンパク質と拮抗的に働くことが知られている (Alvarez-Venegas and Avramova 2001, Alvarez-Venegas *et al.* 2003)。シロイヌナズナでは、TRX タンパク質群の ATX1 (*Arabidopsis* trithorax 1) がヒストンのメチル化に関わる可能性が示された (Pien *et al.* 2008)。近年、哺乳類のヒストンの脱メチル化酵素 LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) のホモログや、jmi (Jumonji) ドメインを持つタンパク質がシロイヌナズナにおいて同定され、ヒストンの脱メチル化による転写制御に関わることが報告された (He *et al.* 2003, Noh *et al.* 2004, Jiang *et al.* 2007, Liu *et al.* 2007, Saze *et al.* 2008, Yu *et al.* 2008)。これらの報告から、植物においても、ヒストンのメチル化が可逆的である可能性が議論されている。

2. サイレンシングとエピジェネティクス

植物ゲノムには、多くのトランスポゾンが存在し、高等植物のゲノムの主要構成要素であることが、近年のゲノム情報の蓄積から明らかになってきた。トランスポゾンの転移は、生存に必須な遺伝子の機能喪失をもたらす危険性があり、宿主である植物はトランスポゾンの転移を制御する必要がある。一方で、トランスポゾンの転移は新たな遺伝子機能や発現制御の創出にかかわることが数多く示されている。さらに、転移活性のあるトランスポゾンを利用した遺伝子タギングによる遺伝子の機能解析も行われている。

2.1. トランスポゾンのサイレンシング

B. McClintock がトウモロコシにおいて動く遺伝子 (Mobile genetic element) を発見したのを先駆けに、トランスポゾンの研究が活発に行われている。応用面においても、DNA 型トランスポゾンである, Ac (Activator), Spm (Suppressor-Mutator), Mu (Mutator) を用いた遺伝子タギングがなされている (Candela and Hake 2008)。トウモロコシの自律型の MuDR は, *mudrA* と *mudrB* の 2 つの転写産物をコードし, *mudrA* はトランスポゼース, *mudrB* は integration に必要な因子である (Lisch *et al.* 2002)。また、活性化した MuDR を優性的にサイレンシングする遺伝子座, MuK (Mu killer) 遺伝子座が見つかった (Slotkin

et al. 2003, 2005). *Muk* は、部分的に欠失した *MuDR* が重複かつ逆位することで生じたもので、ヘアピン構造を形成し siRNA を生成する構造をとる. このことから、自然発生したトランスポゾンの変異によって、siRNA を生成することで、DNA のメチル化・トランスポゾンのサイレンシングが引き起こされた可能性が示唆されている (Slotkin *et al.* 2005). また、RdDM に必要な RNA 依存的 RNA ポリメラーゼをコードする *MOP1* (*mediator of paramutation 1*) の変異体において、*MuDR* の活性化が見られることから、*MuDR* のサイレンシングが RdDM によって制御されている可能性が示唆されている (Woodhouse *et al.* 2006a, 2006b).

イネでは、培養細胞で転移が見られるレトロトランスポゾン *Tos17* が知られており、イネの遺伝子機能解析に用いられている (Hirochika 2001). 培養による *Tos17* の転移誘導には、エピジェネティックな制御が関わると思われるが、DNA のメチル化と転移には相関が見られず、培養細胞による *Tos17* の転移は DNA のメチル化による制御とは独立であることが推測された (Cheng *et al.* 2006). H3K9 のヒストンメチル基転移酵素 *SDG714* (for SET domain group protein 714) の RNAi ノックダウン変異体では、*Tos17* の H3K9 のメチル化の低下、DNA のメチル化の低下が見られ、*Tos17* が転移したことから、H3K9 のメチル化、それに付随する DNA のメチル化が、*Tos17* のサイレンシングに関与する可能性が示唆された (Ding *et al.* 2007).

この他にも、シロイヌナズナの DNA 低メチル化変異体でトランスポゾンの転移が (Miura *et al.* 2001, Singer *et al.* 2001, Tsukahara *et al.* 2009), 同じアブラナ科の *Brassica rapa* の RNAi 形質転換体を用いた DNA 低メチル化植物体でも、トランスポゾンの転写の活性化が見られている (Fujimoto *et al.* 2008a). これらの研究から、植物ゲノムに存在するトランスポゾンの中には、エピジェネティックな制御によって、その転移能力が抑制されているものが存在することが明らかになった.

2-2. トランスポゾンが近傍遺伝子の発現に与える影響

トランスポゾンの挿入が近傍遺伝子の発現に影響を与えることが知られている. イネに多コピー存在する非自律性のレトロトランスポゾン *Dasheng* の各組織における DNA のメチル化の違いが近傍遺伝子の組織特異的発現と関連しているものが見つかった. このことから、*Dasheng* の LTR (long terminal repeat) の DNA メチル化が近傍の遺伝子の発現に影響を与える可能性が示唆された (Kashkush and Khasdan 2007). また、イネ品種・銀坊主においてコピー数の爆発的増加がみられる *mPing* が、遺伝子のプロモーター領域に挿入された際、*mPing* に存在するストレス応答配列によって、近傍遺伝子の発現を制御している例が報告されている (Naito *et al.* 2009). シロイヌナズナのインプリント遺伝子 *FWA* (*FLOWERING*

WAGENINGEN) は、プロモーター領域に存在する *SINE* 配列が DNA のメチル化の標的になっていることが強く示唆され、トランスポゾンの抑制機構から *FWA* のサイレンシング機構が獲得された可能性が示唆された (Fujimoto *et al.* 2008b). B. McClintock によって、トランスポゾンの挿入が近傍の遺伝子の発現の活性化や抑制に影響を与える「Controlling element」が提唱され、これらの研究により分子生物学的にその機構の一部が明らかにされた.

2-3. パラミューテーション

パラミューテーションはメンデル遺伝に反する遺伝パターン of の 1 つで、トウモロコシで最初に発見された (Brink 1958). 2 つの対立遺伝子の相互作用により、片方の対立遺伝子に遺伝性の変化が生じる. トウモロコシでは、アントシアニン生合成経路に関わる 3 つの対立遺伝子座 [*r1* (*red1*), *b1* (*booster 1*), *pl1* (*purple plant 1*)] でパラミューテーションの研究が進んでいる (図 2). この現象は、パラミューテーションが引き起こされる対立遺伝子座 (paramutable allele) の *R-r*, *B-I*, *Pl-Rh* と、パラミューテーションを引き起こす対立遺伝子座 (paramutagenic allele) の *R-st*, *B'*, *Pl'* の相互作用により起こり、パラミューテーションによって対立遺伝子の発現に変化 (サイレンシング) が生じたもの (paramutated allele) は、*R-r'*, *B-I'*, *Pl-Rh'* と示される. さらに、*R-r'*, *B'*, *Pl'* は *R-r*, *B-I*, *Pl-Rh* に再びパラミューテーションを引き起こし、これを Secondary パラミューテーションという (Chandler *et al.* 2000). パラミューテーションの状態を解除する変異体 *rmr1* (*required to maintain repression 1*), *rmr2*, *rmr6*, *rmr7*, *mop1* (前述), *mop2* が報告されており、これらの原因遺伝子が明らかにされている. *RMR1* はクロマチンリモデリング因子である Snf2 タンパク質をコードし、*RMR2* は PolIV 複合体のサブユニットを、*RMR7/MOP2* は、PolIV と PolV 複合体の共通のサブユニットをコードしていた (Dorweiler *et al.* 2000, Hollick and Chandler 2001, Hollick *et al.* 2005, Alleman *et al.* 2006, Hale *et al.* 2007, Erhard *et al.* 2009, Stonaker *et al.* 2009, Sidorenko *et al.* 2009). これらの結果から、パラミューテーションは、small RNA やクロマチン状態の変化によって制御されている可能性が示唆されている (Chandler 2007).

3. 生殖とエピジェネティクス

生殖・受精に由来した細胞内には、父親と母親由来のゲノムが存在する. 多くの遺伝子はこれら両親のゲノムから同等に転写されて生命機能を担うと考えられているが、特定の遺伝子はこの法則に従わず、エピジェネティックな制御によって片方のゲノムからのみ発現することが知られている. また、時系列的に生じる生殖過程でのイベントでは、そのタイミングに合わせた遺伝子発現制御

エピアレル	アレルの特徴
B' paramutagenic	発現抑制されており、抑制状態を転移することが可能
$B-I$ paramutable	paramutagenic alleleと接合すると発現抑制を受ける
$B-I'$ paramutated	接合後にparamutagenic alleleの作用で発現抑制を受けた

図2. トウモロコシの *b1* 遺伝子座におけるパラミューテーション B' と $B-I$ の F_1 個体では、 $B-I$ 由来の *b1* 遺伝子の発現抑制が見られる。これは、 B' と $B-I$ の相互作用により、 $B-I$ 由来の *b1* 遺伝子がパラミューテーション ($B-I \rightarrow B-I'$) によって発現が抑制されたためである。このパラミューテーションは、*b1* 遺伝子の発現を制御している *b1* 遺伝子座の 100 kb 上流に位置する 853 bp のリピート (☆印) のアレル間相互作用 (トランス) によると考えられている。 F_2 世代の $B-I$ ホモ個体においても、*b1* 遺伝子の発現が見られない。これは、 $B-I'$ の状態が後代でも維持されていることによる。また、 F_1 個体に $B-I$ を戻し交雑した次世代全ての個体でも *b1* 遺伝子の発現が見られない。このことは、パラミューテーションが引き起こされた $B-I'$ が $B-I$ に対してパラミューテーションを引き起こすことを示しており、Secondary パラミューテーションと呼ばれている。

が必要となる。アレル、組織、時期特異的な遺伝子発現制御にエピジェネティックな制御が関わっている例が多数報告されている (Shiba and Takayama 2007)。近年、これらエピジェネティックな修飾の違いが、動植物の生殖過程において、非常に重要な役割を果たしていることが議論されている。

3-1. ゲノムインプリンティング

受精に依存せず種子形成が生じるアポミクシス様のシロイヌナズナ変異体では、変異が母親側から遺伝した場合においてのみ致死性の表現型を示す (Huh et al. 2007)。これらの原因遺伝子 (*MEA*; *MEDEA*, *FIS2*; *Fertilization independent seed 2*) は受精前の中央細胞において母親アレル特異的に発現が誘導されるインプリント遺伝子であることが明らかになった (Huh et al. 2007)。これらインプリント遺伝子のプロモーターなどの制御領域では、父親と母親のアレル間で DNA メチル化やヒストンメチル化 (H3K27) レベルの違いが報告されている。このアレルに依存した発現制御では、受精前に母親アレルのメチル化シトシンが *DME* の働きによって除去され、母親側の遺伝子発現が誘導される (Choi et al. 2002, Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006a, Kinoshita et al. 2004)。さらに、*MEA* 自身の発現は、*MEA* を含むポリコームタンパク複合体によってインプリントを受けていることが報告されている (図3; Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006b, Baroux et al. 2006)。一方、父親側アレルから発現するインプリント遺伝子として *PHE1* (*PHERES1*) が報告されている (Köhler et al. 2003)。 *PHE1* は *MEA* によってヒストン修飾レベルでインプリンティングが制御されており (Köhler et al. 2005)、また 3'UTR 領域に位置するシスエレメントの DNA メチル化が発現を正に制御している (図3; Makarevich et al. 2008)。

種間交雑や倍数体間交雑においてしばしば見られる胚乳発生異常は、古くから研究されており、過去に育種家たちは経験に基づいて、これらの発生異常を回避し、種間雑種を得て育種に利用することに成功してきた。Endosperm Balance Number 仮説、極核活性化説が独立して提唱され、種間交雑における胚乳発生異常の法則が調べられた (Johnston and Hanneman 1982, Nishiyama and Yabuno 1978)。これらに共通する分子機構について、インプリンティングやポリコーム複合体が関わっている可能性が議論されており (Kinoshita 2007, Ishikawa and Kinoshita 2009, Köhler et al. 2010)、実際にシロイヌナズナ近縁種を用いた解析から、雑種胚乳における *MEA* や *PHE* などのインプリント遺伝子の発現異常が報告されている (Josefsson et al. 2006, Walia et al. 2009, Erilova et al. 2009)。イネやトウモロコシにおいても、胚乳においてインプリンティングが生じることが報告されていることから (Luo et al. 2009, Gutiérrez-Marcos et al. 2006)、種間交雑における胚乳発生異常に一般性があるかどうか今後の課題で

図3. シロイヌナズナにおけるゲノムインプリンティングの制御機構

FIS2, *FWA*, *MEA* などのインプリント遺伝子の近傍に位置する DNA のメチル化は、受精前に中央細胞で発現している DME の働きによって除去され（脱メチル化）、これらのインプリント遺伝子の発現が誘導される。一方、花粉側（雄性配偶体）では、脱メチル化が起きず、インプリント遺伝子は発現が抑制されたままである。受精後核内では、これらメチル化の有無によって、アレル特異的な発現が生じる。また、ポリコムタンパク質をコードする *MEA* は母親側から発現した *MEA* タンパクがポリコム複合体を構成し、父親側の *MEA* アレルの発現をヒストンレベルで抑制している。*PHE1* も同様に *MEA* タンパクを含むポリコムによってインプリンティングが制御されている。さらに、*PHE1* の発現に 3' 側に位置する DNA メチル化が重要であることも近年報告されている。

ある。また、インプリンティングが単為発生抑制に関与しているという報告もなされており (Nowack *et al.* 2007)、インプリンティング制御機構の利用・改変による生殖隔離打破や胚乳発生制御が将来可能になることが期待される。

3-2. アブラナ科の自家不和合性

アブラナ科植物の自家不和合性は、1つの複合座、*S* 複合座において制御されており、*S* 複合座に座乗する花粉側の因子 *SP11* (*S* locus protein 11) と柱頭側の因子 *SRK* (*S* receptor kinase) の *S* 特異的な相互作用により決定される (Watanabe *et al.* 2003, Fujimoto and Nishio 2007, 藤本・西尾 2008)。アブラナ科野菜では自家不和合性の自殖を拒絶する性質を利用して、一代雑種育種法により、キャベツ、ブロッコリー、カブ、ハクサイ、ダイコン等で商業的な採種が行われている。

アブラナ科植物の自家不和合性は孢子体型自家不和合性であることから、花粉の表現型は親の遺伝子型に由来する。ヘテロ個体の中には、片方のアレルが、もう片方のアレルの表現型を抑制する優劣性が見られる。花粉側

の優劣性においては、劣性側のアレルが、時期・組織特異的な *de novo* の DNA メチル化によって劣性側の転写が抑制される可能性が示された (Shiba *et al.* 2006)。また、この劣性の発現抑制において、優性側の *SP11* の発現が必ずしも必要でないことが示されている (Fujimoto *et al.* 2006, Okamoto *et al.* 2007)。どのような機構で、片方のアレルにのみ DNA のメチル化がなされるかは明らかにされていないが、*de novo* のメチル化が生じていることから、siRNA を介しているとの推測がなされており (Shiba and Takayama 2007)、今後の研究が期待される。

4. 環境応答とエピジェネティクス

植物は動物のように移動できないことから、ある環境ストレス化にさらされた際に、環境ストレスに応じた対策をとる必要性が高い。植物は、様々な遺伝子の発現を環境ストレスに応じて変化させることで耐性を獲得しており、ストレスに応じた遺伝子発現制御にエピジェネティックな制御が関連していることが報告されている (Chinnusamy *et al.* 2009)。当然ながら、農作物の収量は、環境によって変動するため、環境ストレス応答は、農学において重要な研究課題である。また、植物の生殖器官は成長の進んだ体細胞から分化することから、環境の変化に応じて得られたエピジェネティックなストレス耐性が次世代に伝達し、適応能を高めている可能性についても報告されており (Molinier *et al.* 2006)、環境ストレスとエピジェネティック制御の今後の研究が期待される。

4-1. 春化反応 (Vernalization)

植物が春に花を咲かせるためには、冬に一定期間の低温にさらされる春化 (Vernalization) が必要である。春化にヒストン修飾が関わっていることが、シロイヌナズナの研究で明らかにされている。開花を抑制する *FLC* (*Flowering locus C*) 遺伝子は、一定期間の低温により発現が抑制される (Dennis and Peacock 2007)。この時、転写の活性型の指標である、H3K4 のメチル化や H3 のアセチル化が低下し、転写に抑制の指標である H3K9 や H3K27 のメチル化が上昇することが示され (Bastow *et al.* 2004, Sung and Amasino 2004)、このヒストン修飾に関わる遺伝子が単離されている。その中には、発現が春化によって変化するもの (Sung and Amasino 2004) や、恒常的に発現している遺伝子がある (Gendall *et al.* 2001, Levy *et al.* 2002)。一度、春化処理を受けると、*FLC* の発現は抑制状態のまま維持され、この抑制状態の維持に、*LHP1* (*Like heterochromatin protein 1*) が関与することも示されている (Sung *et al.* 2006, Mylne *et al.* 2006)。またごく最近、低温に応じた初期の *FLC* の発現制御にアンチセンス鎖 non-coding RNA が関わっていることが示され、RNA 代謝とヒストン修飾制御の関連が議論されている (Swiezewski *et al.* 2009)。

コムギ・オオムギ等の穀物も、開花にはシロイヌナズナ同様に春化処理を必要とする。オオムギにおいて、春化処理により誘導される開花促進遺伝子 *VRN1* (*Vernalization 1*) がヒストン修飾により制御されていることが示された (Oliver *et al.* 2009)。シロイヌナズナ以外の春化を必要とする植物においても、このようなヒストン修飾の変化によって春化反応を制御する遺伝子の発現が制御されていると考えられる。

4-2. 環境ストレス応答とヒストン修飾

トウモロコシでは、UV-B に対する抵抗性とヒストンのアセチル化の関連性が報告されている。UV-B 耐性系統と非耐性系統を用いたプロテオーム解析から、耐性系統において、UV-B 照射によりヒストン H3 と H4 の N 末端に高アセチル化が起こることが明らかとなった。さらに、クロマチンリモデリングに関わる因子の RNAi ノックダウン系統では、UV-B 照射によるアセチル化の増加が見られず、耐性機構が正常に機能しなくなる。このことから、UV-B 照射の耐性に関与する遺伝子群の発現上昇には、ヒストンのアセチル化を介した転写活性化が重要である可能性が議論されている (Casati *et al.* 2008)。

イネにおいて、*ADH1* (*Alcohol dehydrogenase 1*) と *PDC1* (*Pyruvate decarboxylase 1*) の発現は冠水時に転写が誘導され、好気条件に戻すと発現量が減少する。この条件下で、転写の活性化との関連が示唆されている H3K4me2 と H3K4me3 についてクロマチン免疫沈降法を用いて調べたところ、発現に応じたヒストンメチル化が生じていることが明らかになった。このことから、冠水時は、H3K4me2 から H3K4me3 へ、冠水解除によって H3K4me3 から H3K4me2 へのダイナミックな変換が起こっていることが推察された。またアセチル化は転写活性化の誘導よりはむしろ維持に関与していると推測されている (Tsuiji *et al.* 2006)。このように、環境ストレス応答遺伝子の発現にヒストン修飾が関わっている例が報告されているが、その制御機構については未だ明らかとなっておらず、今後の研究の進展が期待される。

5. エピジェネティクスが支配する植物の形質

5-1. エピジェネティック変異と形質変化

トマトの果実の成熟に異常が見られる自然発生変異体として *cnr* (*colorless nonripening*) が知られており、この成熟遅延形質は流過程において有益な農業形質である。*cnr* の原因遺伝子は SBP-box を持つ *LeSPL-CNR* であり、野生型と変異型で塩基配列に違いはないが、開始コドンの上流に *cnr* 変異体特異的な DNA の高メチル化が見られる。その結果、発現は抑制されトマトの成熟遅延形質の原因であることが確認された (Manning *et al.* 2006)。このような自然発生的なエピジェネティック変異の例として、イネ矮性遺伝子 (*D1*) のプロモーター領域における

DNA メチル化とヒストン修飾が *D1* 遺伝子の転写抑制を引き起こす *Epi-d1* アレル (Miura *et al.* 2009) などが報告されている。また、倍数化に伴って同祖遺伝子の 1 つに DNA メチル化が生じ、その発現が抑制される例がコムギで報告されている (Shitsukawa *et al.* 2007)。

葡萄の果皮が黄緑色と赤色に分けられることは広く知られている。赤色品種「ルビーオキヤマ」は黄緑色品種「イタリア」の枝変わり品種として作出された。アントシアニン合成系を制御する *myb* 転写因子の発現について調べたところ、*VvmybA1* は赤色を有する品種においてのみ転写が確認され、転写の見られない品種では、プロモーター配列にレトロトランスポゾンが挿入されていた。この変異は黒海東岸でブドウの栽培化が始まったとされる紀元前 6000–5000 年前から、選択的に育種に用いられてきたと考えられる (Kobayashi *et al.* 2004)。このようなトランスポゾンによる農業形質の制御は、トマトの果実長を支配する *SUN* 遺伝子 (Xiao *et al.* 2008) や、メロンの性決定機構 (Martin *et al.* 2009) にも関与していることが報告されている。

5-2. RNA サイレンシングと形質変化

イネの主要な種子貯蔵蛋白質であるグルテリンの含量が低下した突然変異系統 LGC1 (Low glutelin content 1; Iida *et al.* 1993) は、腎臓病患者向けの医療用低蛋白質米品種として利用されている。グルテリン蛋白質は逆方向に互いに並んだ非常によく似た遺伝子にコードされており、変異体ではそれら遺伝子間の 3.5kb が欠失し、転写終結点が失われるために連続して転写が起きる。この転写物は両端に相補配列を持ち、RNA 干渉による転写後ジーンサイレンシング (PTGS: post transcriptional gene silencing) が起き、グルテリン遺伝子の発現低下が生じていることが実験的に確認された (Kusaba *et al.* 2003)。

大豆の種皮着色は商品価値を左右する重要な農業形質である。栽培種の大豆の多くは黄色種皮を持ち、この形質が発現するには優性遺伝子 *I* が必要であり、劣性遺伝子 (*i*, *I*¹, *I*²) では黒色種皮が発現する。黄色種皮はアントシアニン合成を制御する *CHS* (Chalcone synthase) 遺伝子が転写後にサイレンシングを受ける PTGS であることが明らかにされた (Senda *et al.* 2004, Tuteja *et al.* 2004)。*CHS* 遺伝子が inverted repeat の構造を持つことにより、siRNA が作られることが明らかになり (Kasai *et al.* 2007)、また種皮組織特異的に siRNA が生じ、二次的な RNA 依存的 RNA polymerase の働きにより効率的にターゲットである *CHS* の発現が種皮特異的に抑制されることが明らかになった (Tuteja *et al.* 2009, Kurauchi *et al.* 2009)。さらに、種皮着色における温度感受性機構は、低温による *CHS* の siRNA 量の変化に起因することが報告されている (Kasai *et al.* 2009)。

RNA サイレンシング機構を利用した研究も盛んに行われるようになってきている。相補配列が転写され、人為的に

PTGS を起こすベクターの開発 (Miki and Shimamoto 2004) や、ウイルス由来の遺伝子サイレンシングを用いた実験系 (VIGS: virus-induced gene silencing) が研究されている (Otagaki *et al.* 2006, Nagamatsu *et al.* 2007)。

おわりに

このように概説したエピジェネティックな制御機構は、遺伝子そのものの機能を失わせる一方的な変異だけではなく、可逆的かつ自空間的な微調整、組織的な特異性など細かな制御を可能にすると考えられる。1980 年代より、分子マーカー、遺伝地図の確立により育種学的な研究が飛躍的に向上し、農業上重要な形質を支配する遺伝子の同定が急速に進んでいる。しかしながら、これらの遺伝子を育種的に活用するためにはその調節、制御機構の解析・利用が必要であることは言うまでもない。植物におけるエピジェネティクス研究は、シロイヌナズナを材料にしたものが圧倒的に貢献しているが、イネをはじめとする穀物や、野菜類におけるアブラナ科のように実際の作物において、これらエピジェネティックな制御機構の改編が近い将来に育種分野で役立つことが期待される。エピジェネティックな変異は後代に遺伝すると考えられているが、一方で環境等の変化によって、ジェネティックな変異とは異なり可逆的な側面もある。エピジェネティック変異の報告例は未だ少なく、個々のエピジェネティックな変異がどれほど安定的に後代に遺伝するかが、品種育成においては重要な課題となるだろう。

謝 辞

本原稿の作成において、貴重な助言を頂きました角谷徹仁先生、木下哲先生、島本功先生、西尾剛先生に深く感謝いたします。

引用文献

- Agius, F., A. Kapoor and J. K. Zhu (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11796–11801.
- Alleman, M., L. Sidorenko, K. McGinnis, V. Seshadri, J.E. Dorweiler, J. White, K. Sikkink and V.L. Chandler (2006) *Nature* 442: 295–298.
- Alvarez-Venegas, R. and Z. Avramova (2001) *Gene* 271: 215–221.
- Alvarez-Venegas, R., S. Pien, M. Sadler, X. Witmer, U. Grossniklaus and Z. Avramova (2003) *Curr. Biol.* 13: 627–637.
- Baroux, C., V. Gagliardini, D.R. Page and U. Grossniklaus (2006) *Genes & Dev.* 20: 1081–1086.
- Bartee, L., F. Malagnac and J. Bender (2001) *Genes & Dev.* 15: 1753–1758.
- Bastow, R., J.S. Mylne, C. Lister, Z. Lippman, R.A. Martienssen and C. Dean (2004) *Nature* 427: 164–167.
- Bertrand, C., C. Bergounioux, S. Domenichini, M. Delarue and D.X. Zhou (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 28246–28251.
- Brink, R.A. (1958) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 23: 379–391.
- Candela, H. and S. Hake (2008) *Nat. Rev. Genet.* 9: 192–203.
- Cao, X., N.M. Springer, M.G. Muszynski, R.L. Phillips, S. Kaeppler and S.E. Jacobsen (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4979–4984.
- Cao, X. and S.E. Jacobsen (2002) *Curr. Biol.* 12: 1138–1144.
- Casati, P., M. Campi, F. Chu, N. Suzuki, D. Maltby, S. Guan, A.L. Burlingame and V. Walbot (2008) *Plant Cell* 20: 827–842.
- Chandler, V.L., W.B. Eggleston and J.E. Dorweiler (2000) *Plant Mol. Biol.* 43: 121–145.
- Chandler, V.L. (2007) *Cell* 128: 641–645.
- Cheng, C., M. Daigen and H. Hirochika (2006) *Mol. Genet. Genomics* 276: 378–390.
- Chinnusamy, V. and J.K. Zhu (2009) *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 133–139.
- Choi, Y., M. Gehring, L. Johnson, M. Hannon, J.J. Harada, R.B. Goldberg, S.E. Jacobsen and R.L. Fischer (2002) *Cell* 110: 33–42.
- Dennis E.S. and W.J. Peacock (2007) *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 520–527.
- Ding, Y., X. Wang, L. Su, J. Zhai, S. Cao, D. Zhang, C. Liu, Y. Bi, Q. Qian, Z. Cheng, C. Chu and X. Cao (2007) *Plant Cell* 19: 9–22.
- Dorweiler, J.E., C.C. Carey, K.M. Kubo, J.B. Hollick, J.L. Kermicle and V.L. Chandler (2000) *Plant Cell* 12: 2101–2118.
- Ebbs, M.L. and J. Bender (2006) *Plant Cell* 18: 1166–1176.
- Erhard, K. F. Jr., J.L. Stonaker, S.E. Parkinson, J.P. Lim, C.J. Hale and J.B. Hollick (2009) *Science* 323: 1201–1205.
- Erilova, A., L. Brownfield, V. Exner, M. Rosa, D. Twell, S.O. Mittelsten, L. Hennig and C. Köhler (2009) *PLoS Genet.* 5: e1000663.
- Fuchs, J., D. Demidov, A. Houben and I. Schubert (2006) *Trends Plant Sci.* 11: 199–208.
- Fujimoto, R., T. Sugimura, E. Fukai and T. Nishio (2006) *Plant Mol. Biol.* 61: 577–587.
- Fujimoto, R. and T. Nishio (2007) *Adv. Bot. Res.* 45: 139–154.
- Fujimoto, R., T. Sasaki, H. Inoue and T. Nishio (2008a) *Plant Mol. Biol.* 66: 463–473.
- Fujimoto, R., Y. Kinoshita, A. Kawabe, T. Kinoshita, K. Takashima, M. Nordborg, M.E. Nasrallah, K.K. Shimizu, H. Kudoh and T. Kakutani (2008b) *PLoS. Genet.* 4: e1000048.
- Gehring, M., J.H. Huh, T.F. Hsieh, J. Penterman, Y. Choi, J.J. Harada, R.B. Goldberg and R.L. Fischer (2006) *Cell* 124: 495–506.
- Gendall, A.R., Y.Y. Levy, A. Wilson and C. Dean (2001) *Cell* 107: 525–535.
- Gong, Z., T. Morales-Ruiz, R.R. Ariza, T. Roldán-Arjona, L. David and J.K. Zhu (2002) *Cell* 111: 803–814.
- Gutiérrez-Marcos J.F., L.M. Costa, M. Dal Prà, S. Scholten, E. Kranz, P. Perez and H.G. Dickinson (2006) *Nat. Genet.* 38: 876–878.
- Hale, C.J., J.L. Stonaker, S.M. Gross and J.B. Hollick (2007) *PLoS Biol.* 5: e275.
- He, Y., S.D. Michaels and R.M. Amasino (2003) *Science* 302: 1751–1754.
- Hirochika, H. (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 118–122.
- Hollick, J.B. and V.L. Chandler (2001) *Genetics* 157: 369–378.
- Hollick, J.B., J.L. Kermicle and S.E. Parkinson (2005) *Genetics* 171: 725–740.
- Huh, J.H., M.J. Bauer, T.F. Hsieh and R. Fischer (2007) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 480–485.
- Iida, S., E. Amano and T. Nishio (1993) *Theor. Appl. Genet.* 87: 374–378.

- Ishikawa, R. and T. Kinoshita (2009) *Mol. Plant* 2: 589–599.
- Jackson, J.P., A.M. Lindroth, X. Cao and S.E. Jacobsen (2002) *Nature* 416: 556–560.
- Jackson, J.P., L. Johnson, Z. Jasencakova, X. Zhang, L. PerezBurgos, P.B. Singh, X. Cheng, I. Schubert, T. Jenuwein and S.E. Jacobsen (2004) *Chromosoma* 112: 308–315.
- Jenuwein, T. and C.D. Allis (2001) *Science* 293:1074–1080.
- Jiang, D., W. Yang, Y. He and R.M. Amasino (2007) *Plant Cell* 19: 2975–2987.
- Johnston, S.A. and R.E. Jr. Hanneman (1982) *Science* 217: 446–448.
- Josefsson, C., B. Dilkes and L. Comai (2006) *Curr. Biol.* 16: 1322–1328.
- Jullien, P.E., T. Kinoshita, N. Ohad and F. Berger (2006a) *Plant Cell* 18: 1360–1372.
- Jullien, P.E., A. Katz, M. Oliva, N. Ohad and F. Berger (2006b) *Curr. Biol.* 16: 486–492.
- Kankel, M.W., D.E. Ramsey, T.L. Stokes, S.K. Flowers, J.R. Haag, J.A. Jeddelloh, N.C. Riddle, M.L. Verbsky and E.J. Richards (2003) *Genetics* 163: 1109–1122.
- Kasai, A., K. Kasai, S. Yumoto and M. Senda (2007) *Plant Mol. Biol.* 64: 467–479.
- Kasai, A., S. Ohnishi, H. Yamazaki, H. Funatsuki, T. Kurauchi, T. Matsumoto, S. Yumoto and M. Senda (2009) *Plant Cell Physiol.* 50: 1090–1098.
- Kashkush, K. and V. Khasdan (2007) *Genetics* 177: 1975–1985.
- Kinoshita, T., A. Miura, Y. Choi, Y. Kinoshita, X. Cao, S.E. Jacobsen, R.L. Fischer and T. Kakutani (2004) *Science* 303: 521–523.
- Kinoshita, T. (2007) *Genes Genet. Syst.* 82: 177–186.
- Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto and H. Hirochika (2004) *Science* 304: 982.
- Köhler, C., L. Hennig, C. Spillane, S. Pien, W. Gruissem and U. Grossniklaus (2003) *Genes & Dev.* 17: 1540–1553.
- Köhler, C., D.R. Page, V. Gagliardini and U. Grossniklaus (2005) *Nat. Genet.* 37: 28–30.
- Köhler, C., S.O. Mittelsten and A. Erilova (2010) *Trends Genet.* 26: 142–148.
- Kurauchi, T., T. Matsumoto, A. Taneda, T. Sano and M. Senda (2009) *Breed. Sci.* 59: 419–426.
- Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura and T. Nishio (2003) *Plant Cell* 15: 1455–1467.
- Levy, Y.Y., S. Mesnage, J.S. Mylne, A.R. Gendall and C. Dean (2002) *Science* 297: 243–246.
- Lindroth, A.M., X. Cao, J.P. Jackson, D. Zilberman, C.M. McCallum, S. Henikoff and S.E. Jacobsen (2001) *Science* 292: 2077–2080.
- Lisch, D., C.C. Carey, J.E. Dorweiler and V.L. Chandler (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6130–6135.
- Liu, F., V. Quesada, P. Crevillén, I. Bäurle, S. Swiezewski and C. Dean (2007) *Mol. Cell* 28: 398–407.
- Luo M., D. Platten, A. Chaudhury, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2009) *Mol. Plant* 2: 711–723.
- Makarevich, G., C.B. Villar, A. Erilova and C. Köhler (2008) *J. Cell Sci.* 121: 906–912.
- Manning, K., M. Tör, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson, G.J. King, J.J. Giovannoni and G.B. Seymour (2006) *Nat. Genet.* 38: 948–952.
- Martin, A., C. Troadec, A. Boualem, M. Rajab, R. Fernandez, H. Morin, M. Pitrat, C. Dogimont and A. Bendahmane (2009) *Nature* 461: 1135–1138.
- Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel and A.J. Matzke (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 367–376.
- Miki, D. and K. Shimamoto (2004) *Plant Cell Physiol.* 45: 490–495.
- Miura, A., S. Yonebayashi, K. Watanabe, T. Toyama, H. Shimada and T. Kakutani (2001) *Nature* 411: 212–214.
- Miura, K., M. Agetsuma, H. Kitano, A. Yoshimura, M. Matsuoka, S.E. Jacobsen and M. Ashikari (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 11218–11223.
- Molinier, J., G. Ries, C. Zipfel and B. Hohn (2006) *Nature* 442: 1046–1049.
- Mylne, J.S., L. Barrett, F. Tessoro, S. Mesnage, L. Johnson, Y.V. Bernatavichute, S.E. Jacobsen, P. Fransz and C. Dean (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5012–5017.
- Nagamatsu, A., C. Masuta, M. Senda, H. Matsuura, A. Kasai, J.S. Hong, K. Kitamura, J. Abe and A. Kanazawa (2007) *Plant Biotechnol. J.* 5: 778–790.
- Naito, K., F. Zhang, T. Tsukiyama, H. Saito, C.N. Hancock, A.O. Richardson, Y. Okumoto, T. Tanisaka and S.R. Wessler (2009) *Nature* 461: 1130–1134.
- Ng, D.W., T. Wang, M.B. Chandrasekharan, R. Aramayo, S. Kertbundit and T.C. Hall (2007) *Biochim. Biophys. Acta.* 1769: 316–329.
- Nishiyama, I. and T. Yabuno (1978) *Cytologia* 43: 453–466.
- Noh, B., S.H. Lee, H.J. Kim, G. Yi, E.A. Shin, M. Lee, K.J. Jung, M.R. Doyle, R.M. Amasino and Y.S. Noh (2004) *Plant Cell* 16: 2601–2613.
- Nowack, M.K., R. Shirzadi, N. Dissmeyer, A. Dolf, E. Endl, P.E. Grini and A. Schnittger (2007) *Nature* 447: 312–315.
- Okamoto, S., M. Odashima, R. Fujimoto, Y. Sato, H. Kitashiba and T. Nishio (2007) *Plant J.* 50: 391–400.
- Oliver, S.N., E.J. Finnegan, E.S. Dennis, W.J. Peacock and B. Trevaskis (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8386–8391.
- Otagaki, S., M. Arai, A. Takahashi, K. Goto, J.S. Hong, C. Masuta and A. Kanazawa (2006) *Plant Biotechnology* 23: 259–265.
- Pandey, R., A. Müller, C.A. Napoli, D.A. Selinger, C.S. Pikaard, E.J. Richards, J. Bender, D.W. Mount and R.A. Jorgensen (2002) *Nucleic. Acids. Res.* 30: 5036–5055.
- Pfluger, J. and D. Wagner (2007) *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 645–652.
- Pien, S., D. Fleury, J. S. Mylne, P. Crevillén, D. Inzé, Z. Avramova, C. Dean and U. Grossniklaus (2008) *Plant Cell* 20: 580–588.
- Saze, H., S.O. Mittelsten and J. Paszkowski (2003) *Nat. Genet.* 34: 65–69.
- Saze, H., A. Shiraishi, A. Miura and T. Kakutani (2008) *Science* 319: 462–465.
- Senda, M., C. Masuta, S. Ohnishi, K. Goto, A. Kasai, T. Sano, J.S. Hong and S. MacFarlane (2004) *Plant Cell* 16: 807–818.
- Shiba, H., T. Kakizaki, M. Iwano, Y. Tarutani, M. Watanabe, A. Isogai and S. Takayama (2006) *Nat. Genet.* 38: 297–299.
- Shiba, H. and S. Takayama (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2632–2646.
- Shitsukawa, N., C. Tahira, K. Kassai, C. Hirabayashi, T. Shimizu, S. Takumi, K. Mochida, K. Kawaura, Y. Ogiwara and K. Murai (2007) *Plant Cell* 19: 1723–1737.
- Sidorenko, L., J.E. Dorweiler, A.M. Cigan, M. Arteaga-Vazquez, M. Vyas, J. Kermicle, D. Jurcin, J. Brzeski, Y. Cai and V.L. Chandler (2009) *PLoS Genet.* 5: e1000725.
- Singer, T., C. Yordan and R.A. Martienssen (2001) *Genes & Dev.* 15: 591–602.
- Slotkin, R.K., M. Freeling and D. Lisch (2003) *Genetics* 165: 781–797.

- Slotkin, R.K., M. Freeling and D. Lisch (2005) *Nat. Genet.* 37: 641–644.
- Stonaker, J.L., J.P. Lim, K.F. Jr. Erhard and J.B. Hollick (2009) *PLoS Genet.* 5: e1000706
- Strahl, B.D. and C. D. Allis (2000) *Nature* 403: 41–45.
- Sung, S. and R.M. Amasino (2004) *Nature* 427: 159–164.
- Sung, S., Y. He, T.W. Eshoo, Y. Tamada, L. Johnson, K. Nakahigashi, K. Goto, S.E. Jacobsen and R.M. Amasino (2006) *Nat. Genet.* 38: 706–710.
- Swiezewski, S., F. Liu, A. Magusin and C. Dean (2009) *Nature* 462: 799–802.
- Tian, L. and Z.J. Chen (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 200–205.
- Tian, L., J. Wang, M.P. Fong, M. Chen, H. Cao, S.B. Gelvin and Z.J. Chen (2003) *Genetics* 165: 399–409.
- Tsuji, H., H. Saika, N. Tsutsumi, A. Hirai and M. Nakazono (2006) *Plant Cell Physiol.* 47: 995–1003.
- Tsukahara, S., A. Kobayashi, A. Kawabe, O. Mathieu, A. Miura and T. Kakutani (2009) *Nature* 461: 423–426.
- Tuteja, J.H., S.J. Clough, W.C. Chan and L.O. Vodkin (2004) *Plant Cell* 16: 819–835.
- Tuteja, J.H., G. Zabala, K. Varala, M. Hudson and L.O. Vodkin (2009) *Plant Cell* 21: 3063–3077.
- Vlachonasios, K.E., M.F. Thomashow and S.J. Triezenberg (2003) *Plant Cell* 15: 626–638.
- Walia, H., C. Josefsson, B. Dilkes, R. Kirkbride, J. Harada and L. Comai (2009) *Curr. Biol.* 19: 1128–1132.
- Watanabe, M., S. Takayama, A. Isogai and K. Hinata (2003) *Breed. Sci.* 53: 199–208.
- Woodhouse, M.R., M. Freeling and D. Lisch (2006a) *Genetics* 172: 579–592.
- Woodhouse, M.R., M. Freeling and D. Lisch (2006b) *PLoS Biol.* 4: e339.
- Xiao, H., N. Jiang, E. Schaffner, E.J. Stockinger and E. van der Knaap (2008) *Science* 319: 1527–1530.
- Yu, X., L. Li, L. Li, M. Guo, J. Chory and Y. Yin (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 7618–7623.
- 藤本 龍・西尾 剛 (2008) *育種学研究* 10: 1–9.