

機関番号：21401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380012

研究課題名（和文）浸透圧ストレス条件下における側根形成に関する遺伝子発現および作物生理学的解析

研究課題名（英文）A study to clarify the mechanism of lateral root formation under the osmotic stress condition by the crop physiological and molecular biological analysis.

研究代表者

小川 敦史（OGAWA ATSUSHI）

秋田県立大学 生物資源科学部 助教

研究者番号：30315600

研究成果の概要（和文）：本研究では、1）作物根系の大部分を占める側根原基ならびにその周辺組織における、浸透圧ストレス条件下での発現遺伝子ならびに代謝物質の変動の網羅的解析、2）冠根および側根数が著しく減少するイネ突然変異体の特徴の解明と、その原因遺伝子の単離および機能解析、3）糖代謝関連酵素の根系形成への関与の解明、4）オーキシンやサイトカイニンの働きを制御する腫瘍誘発遺伝子群の一つである 6b 遺伝子を導入した植物体での根系形成やホルモンの分配の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed (1) the global gene and metabolite profiling of at the primordia and surrounding tissue of maize lateral root under osmotic stress conditions, (2) the characteristic of mutant in rice which reduced the emergence of the lateral roots and the crown roots, the isolation of the causal gene, and the analysis of that gene function, (3) the function of the metabolic enzymes of sugar for the root system formation, and (4) the root system formation and the distribution of the plant hormones in the transgenic plant for one of the tumor-inducing gene, 6b gene, that regulated the function of auxin and cytokinin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：作物生理学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：浸透圧ストレス 側根形成 オーキシン 糖代謝 マイクロアレイ メタボローム 突然変異体

1. 研究開始当初の背景

作物の根系は、乾燥ストレスや塩ストレスである浸透圧ストレスに対してその形態が大きく変化する。根系形態は、ある程度の弱いストレス条件下においては、根長を伸ばし根圏を拡大することで、養水分の吸収を維持している。この根圏の拡大には、種子や茎か

ら直接発生している主軸根ではなく、主軸根から発生している側根の伸長が大きく寄与している。特に養水分吸収が阻害されることにより植物の生育障害が起きる浸透圧ストレス条件下では、いかに側根の生長を維持し、養水分の吸収を維持することで地上部への養水分の供給を維持できるかが、生育・生存

のための重要な鍵となる。作物根系が環境変化に対してその形を変えていく性質を「可塑性」と呼ぶ。側根の発生や伸長を中心とした作物根系での可塑性の発現は、作物の浸透圧ストレス下での生育を考える上で非常に重要な形質である。ストレスがないときの側根形成過程の解明が重要であることは言うまでもなく、さらに浸透圧ストレス下での側根形成過程について明らかにすることは、耐浸透圧ストレス育種を行う上で非常に意義ある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『浸透圧ストレス下での側根形成過程について、遺伝子発現、植物ホルモン分配、糖の分配と代謝、形態形成という一連の流れを明らかにする』ことである。本研究では、浸透圧ストレス下での側根形成について、分子生物学的、植物生理学的、作物学的手法を用い、遺伝子発現から植物ホルモンや糖の分配・酵素活性の局在性などの生理学的現象をとおして、形態学的発現まで明らかにする。

3. 研究の方法

(1)

①植物体の育成

材料にはトウモロコシ実生の種子根を用いた。催芽処理後水耕液へ移植しそのまま4日間栽培した処理区（コントロール区）と、3日目に水ポテンシャルが -0.21 MPaになるように水耕液中にポリエチレングリコール 6,000 を溶解してさらに1日間栽培した処理区（浸透圧ストレス区; PEG10%）を用意した。

②DNA マイクロアレイ解析

・組織サンプル:水耕液へ移植して4日後、両処理区とも種子根軸上の根端から約 1.5 - 3.5cm の部位（約 2 cm, 側根原基形成部位）をサンプリングした。

・側根原基サンプル:水耕液へ移植して4日後、同様に種子根軸上の根端から約 2-3cm の部位（約 1 cm, 側根原基形成部位）を包埋剤内で凍結させた後クライオスタットで凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションシステム(ASLMD, Leica)を用い、顕微鏡下で切片から側根原基のみを切り出した。

組織サンプルからは RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), 側根原基サンプルからは RNAqueous-Micro (Ambion) を用いて total RNA を抽出し, Agilent Technologies 社の maize 44k oligo microarray を用い 1 色蛍光法によりそれぞれマイクロアレイ試験を行った。この結果をもとに、浸透圧ストレス区と対照区での発現変動遺伝子を比較することにより、トウモロコシ側根原基および周辺組織におけるストレス条件下での発現遺伝

子の比較を行った。

③メタボローム解析

コントロール区の他に、水ポテンシャルが -0.21 MPa と -0.42 MPa になるようにポリエチレングリコール 6,000 を水耕液中に溶解した処理区（浸透圧ストレス区; PEG 10%, 20%）の計3処理区を用意した。サンプリングは DNA マイクロアレイ解析の組織サンプルと同様の方法でおこない、Agilent CE-TOFMS system でトウモロコシ側根原基形成部位での処理区間の代謝物質の変動を網羅的に解析した。

(2)

①植物体の育成

cr14 変異体は生殖成長へとステージを移行させることができないため、*cr14* 遺伝子座がホモ型となっている種子を得るために *cr14* 遺伝子座がヘテロ型となっている個体を自殖させる方法を用いた。そのため、WT には *cr14* 遺伝子座の遺伝子型が WT ホモ型と *WT/cr14* のヘテロ型になっているものが 1:2 の割合で混在している。同様に高精度連座解析に用いる *cr14* 変異体とインド型品種 Kasalath との交雑 F2 集団は、*cr14* 遺伝子座がヘテロ型となっている個体に Kasalath を交配させることで作製した。

②CRL4 遺伝子の単離

CRL4 遺伝子の単離はマップベースクローニング法を用いた。マップベースクローニング法とは目的遺伝子を染色体上にマップすることから始め、序々に染色体上での位置を狭めていき、最終的に目的遺伝子をクローニングする方法である。通常の遺伝学的手法である表現形質の遺伝解析に分子生物学的手法を加えることによって精密な遺伝地図を作り上げていくことができる。

③オーキシン極性輸送量の測定

ラジオアイソトープでラベルした [3H]-IAA を用いてオーキシンの輸送量を測定した。実験に使用した [3H]-IAA は、エタノールで 40 μ M に調整された状態の 3-[5(n)-3H] Indolylacetic acid (Amarsham, USA) をドライアップしてエタノールを飛ばし、その後 3-[5(n)-3H] Indolylacetic acid 1 μ l あたり 40 μ l の 10mM MES buffer (pH5.7) に溶解して 1 μ M (740Bq/ μ l) に調整したものをを用いた。

(3)

供試材料としてトウモロコシを用い、3日間催芽処理し、1/2 濃度のホグランド水耕液 (pH 6.0) 中で水耕栽培を行い、播種後 3, 4, 5 日目にサンプリングを行った。種子根根端から 1cm 間隔で切断し、各部位におけるスクロース、グルコース、フルクトース含有量を測定した。また根端から 0-1 cm 部位（細胞分裂および伸長部位）、3-4 cm 部位（側根発

生予定部位), 6-7 cm (側根発生中の部位) 9-10 cm 部位および 12-13 cm 部位 (既に側根が発生した部位) におけるスクロースの代謝に関与する Invertases (Cell-wall-bound invertase, Neutral invertase, Soluble acid invertase) および Sucrose synthase の活性を測定した. さらに Nitro blue tetrazolium (NBT) を用いた手法および抗 Invertase 抗体を用いた手法により, 根系における Invertase および Sucrose synthase の局在性を検出した.

(4)

土壤細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) は植物に感染して根頭癌腫病を引き起こす. 6b 遺伝子は腫瘍誘発遺伝子群の一つであり, 植物ホルモンのオーキシンやサイトカイニンの働きをモジュレートする. AKE10 株から得られた AK-6b 遺伝子をタバコに導入すると種々の形態変化が引き起こされるが, 本実験では根系の形成と植物ホルモン動態との関連を調べた. デキサメタゾン (Dex) 投与によって活性化されるプロモーター下流に AK-6b 遺伝子をクローニングし, タバコに導入し形質転換体から T1 世代種子を採取した. 得られた種子を 10 μM Dex 存在下で培養した. また茎に近いところの根切片を作成した. オーキシンのレポーター遺伝子として DR5:GUS コンストラクトを導入して GUS アッセイを行い さらに根の切片を作成し, サイトカイニンに対する抗体 (anti-zeatin riboside) によって染色した.

4. 研究成果

(1) 対照区と浸透圧ストレス区と比較においてストレス区で発現上昇・減少がみられた遺伝子を抽出し, これら発現変動遺伝子リストに対する Gene Ontology (GO) 解析の結果をまとめた. キーワードを用いた遺伝子セット全体の発現変動について統計検定を行った結果から, 浸透圧ストレス下でのトウモロコシ側根原基およびその周辺組織で起きている現象を以下に考察する (図 1).

側根原基の周辺組織ではほぼすべてのキーワード遺伝子セットが有意に発現上昇していたことから, 浸透圧ストレスに対応するべく地上部と連携して物質の輸送や糖の転流・代謝活性を上昇させ浸透圧維持を優先的に行っていると推測される. かつ細胞の維持や分裂活性の維持継続も行ってた. そして側根原基そのものでは物質の輸送や糖などの代謝を止め, ストレスに応答しつつ細胞の維持や分裂活性の維持継続を優先的に行っていた.

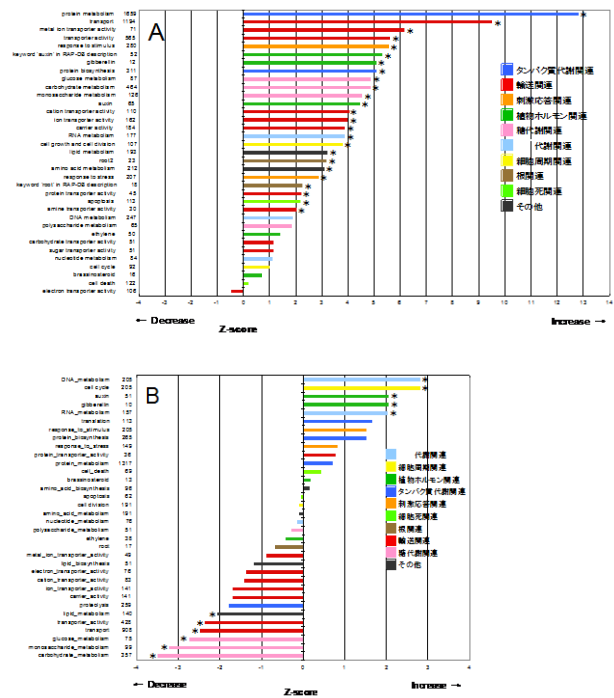


図 1. トウモロコシ側根原基およびその周辺組織における対照区とストレス処理区間の各遺伝子セット全体の発現変動の有意性

A: 側根原基形成部位 B: 側根原基
アステリスク (*) のついたキーワードで分類した遺伝子セットは有意 (p<0.05) に発現変動していることを示す

一方メタボローム解析では, コントロール区に比ベストレス処理区で有意に上昇している代謝物質が多く見られ, 生体内で重要な抗酸化機能を有するグルタチオンや細胞分裂や増殖の制御に関わるポリアミンのスペルミン等, DNA マイクロアレイの結果を反映すると思われる結果が得られた (表 1).

表 1 トウモロコシ種子根(側根原基形成部位)における浸透圧処理による代謝物の変動

Compound name	Comparative Analysis		Ratio *
	PEG 10% vs Control	PEG 20% vs Control	
Glutathione (GSH)	9.1	20	2.3
γ-Glu-Cys	5.9	8.9	1.5
Cyclohexylamine	4.4	2.7	0.6
Spermine	3.9	1.9	3.9
4-Amino-3-hydroxybutyric acid	3.7	6.0	1.6
Spermidine	3.4	4.3	1.3
O-Acetylcamline	3.0	4.4	1.5
trans-Aconitic acid	2.9	2.4	0.8
Glycero-phosphocholine	2.4	1.6	6.9
Camline	1.9	2.4	1.2
N-Acetyl spermidine	1.9	3.8	2.0
Histidinol	1.7	2.4	1.4
Lactic acid	1.5	6.9	4.7
5-Oxo-2-tetrahydrofuran-carboxylic acid	1.5	2.7	1.8

*換者を分母として算出

(2) マップベースクローニング法により cr14 変異体の原因遺伝子の単離を試みたところ, CRL4/OsGNOM はシロイヌナズナの GNOM/EMBRYO DEFECTIVE30 (EMB30) に相同性の高い遺伝子であることが判明した. CRL4/OsGNOM の発現部位を調べるために半定量的 RT-PCR による発現解析を行ったところ, CRL4/OsGNOM は植物体のあらゆる器官において発現していることが明らかになった.

そこで cr14 変異体の地上部および地下部におけるオーキシン輸送能をトレーサー実

験により測定し、野生型の輸送能と比較した。その結果 *crl4* 変異体のオーキシン輸送能は野生型の輸送能に比べ、地上部の求基的輸送能（茎頂から基部への輸送）は 10%、根の求頂的輸送能（基部から根端への輸送）は 41% にそれぞれ低下していた（図 2A, B）。加えて冠根原基の形成部位である基部茎葉節のオーキシン蓄積量を同様に測定したところ、*crl4* 変異体では野生型に比べてオーキシン蓄積量が 53% にまで低下していることが判明した（図 2C）。そのため本変異体の冠根数の減少は、地上部からのオーキシン輸送量の低下に起因すると考えられた。ところが *crl4* 変異体の冠根数減少は外生オーキシン投与により回復しないことから、本変異体での冠根数減少は基部茎葉節におけるオーキシンの不足のみが原因ではないと考えられた。そこで基部茎葉節でのオーキシンの局在を可視化するため、DR5:GUS を *crl4* 変異体と野生型に導入した形質転換体を作成した。野生型の基部茎葉節における DR5:GUS の染色は、維管束と辺周部維管束環に接する柔細胞で観察された（図 3）。この発現パターンは *in situ hybridization* により解析した *CRL4/OsGNOM* の発現パターンと非常によく一致していた（図 3）。一方、*crl4* 変異体においては維管束での GUS 染色はほとんど観察されず、かすかな GUS 染色が柔細胞全体に広がり、野生型で見られた明らかな局在性は観察されなかった（図 3）。これらの結果から、*CRL4/OsGNOM* はイネにおいてシロイヌナズナの *GNOM/EMB30* と同様に PIN1 のリサイクルを介したオーキシン極性輸送に関与し、冠根および側根形成領域での適切なオーキシン量の分配と initiation 領域での局所的なオーキシン蓄積を確立することで冠根原基の initiation を促すことが示唆された。

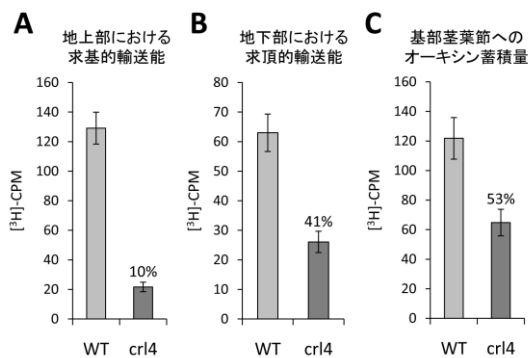


図2 *crl4* 変異体におけるオーキシン輸送能
 A: 地上部における茎頂→基部へのオーキシン輸送能.
 B: 根における基部→根端へのオーキシン輸送能.
 C: 基部茎葉節におけるオーキシン蓄積量.
 それぞれグラフの上の数値は、野生型と比べた時の *crl4* 変異体の測定値の割合を示す。

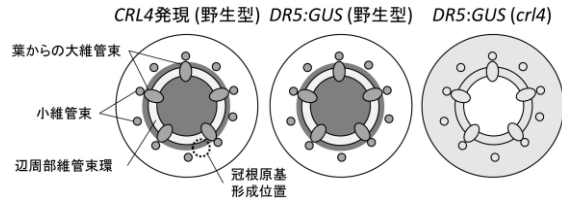


図3 基部茎葉節における *CRL4* 発現, *DR5:GUS* 発現色の濃淡はそれぞれの発現強度と対応している。*CRL4* および野生型での *DR5:GUS* 発現は維管束および辺周部維管束環の外側に接する柔細胞で発現していた。一方 *crl4* 変異体においては維管束での *GUS* 染色はほとんど観察されず、かすかな *GUS* 染色が柔細胞全体に広がっていた。

(3) 種子根軸上の各部位における各糖の含有量は、グルコースが最も高く、続いてスクロース、フルクトースの順であった。含有量は根端 1 cm 部分において他の部位に比べスクロースでは 3~5 倍、グルコースでは 3~12 倍、フルクトースでは 3~10 倍高い値を示した。地上部から転流によって運ばれてくるスクロースを最初に代謝する Cell-wall-bound invertase, Neutral invertase, Soluble acid invertase および Sucrose synthase の活性も、根端から 0-1cm 部分において他の部位よりそれぞれ、2 倍、5 倍、10 倍、2.5 倍高い値を示した（図 4）。3 種類の Invertases の中でも、Soluble acid invertase が他の 2 種類よりも 10 倍高い活性を示した。播種後日数の経過にともない、Neutral invertase 以外の酵素の活性は各部位で低下した。このとき糖の含有量も低下しており、これらの結果は生長に伴う代謝量の変化を示しているものであると考えられた。*in situ* で酵素活性部位の局在性を観察したところ、NBT を用いて染色法では、Invertase および Sucrose synthase の活性が種子根および側根の根端部分の細胞伸長部位に当たるところで検出された。抗 Invertase 抗体を用いた手法では、種子根根端の細胞伸長部位、側根発生部位では側根原基周辺の皮層および表皮で Invertase の局在性が検出された。側根原基では Invertase の局在性は検出されなかった。これらの結果より地上部から転流によって運ばれるスクロースは根系形成時に細胞分裂帯および伸長帯が存在する種子根および側根根端部分に分配され、Invertase や Sucrose synthase によりグルコース、フルクトース、UDP-グルコースが生成されることが示された。これらの物質はセルロースやエネルギーとなる物質に代謝され細胞形成などに関与したり、浸透圧調節に関わる溶質として細胞伸長に関与したりするなどして、根系形成に大きく寄与していることが示唆された。

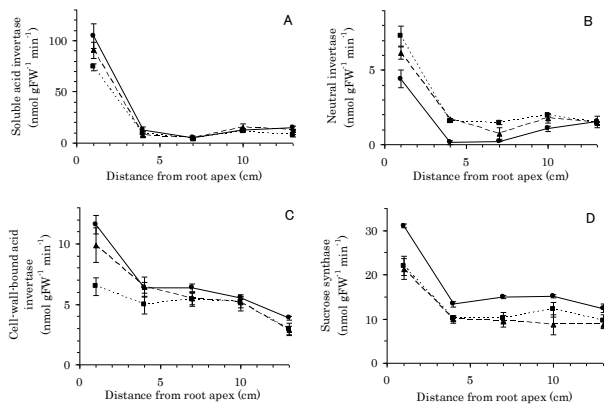


図4 播種後3日目(●), 4日目(▲)5日目(■)において, 根端から0-1 cm 部位(細胞分裂および伸長部位), 3-4 cm 部位(側根発生予定部位), 6-7 cm (側根発生中の部位) 9-10 cm 部位および12-13 cm 部位(既に側根が発生した部位)における, (A) soluble acid invertase, (B) neutral invertase, (C) cell-wall-bound invertase, (D) sucrose synthase 活性の変化。

(4)

T1 世代種子を 10 μM Dex 存在下で培養したところ, ひげ根系に近い形態を示した(図 5 A, B)。一方ベクターのみを導入したタバコでは主根系であった。根は肥大化し, 細胞数も増加していることがわかった(図 5 C, D)。ベクターのみのタバコでは側根の発生部位と思われる所に GUS 活性が見られたが(図 2B) AK-6b-タバコでは GUS 活性が検出できなかった。サイトカイニンに対する抗体 (anti-zeatin riboside) によってサイトカイニンの局在性を検出したところ, ベクターのみのタバコに比べ AK-6b-タバコでは維管束部位で濃い染色が見られ, サイトカイニンレベルが局所的に上昇していることがわかった(図 3)。根ではオーキシンのレベルが減少し, 相対的にサイトカイニンレベルが上昇してひげ根状になったのではないかと考えられる。AK-6b 遺伝子は植物体のオーキシニン/サイトカイニンの局在を改変し, 蓄積レベルのバランスを変えて形態変化を引き起こしているのだらうと思われる。一方, カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターに AK-6b をクローニングシネに導入したが形態変化は見られなかった。

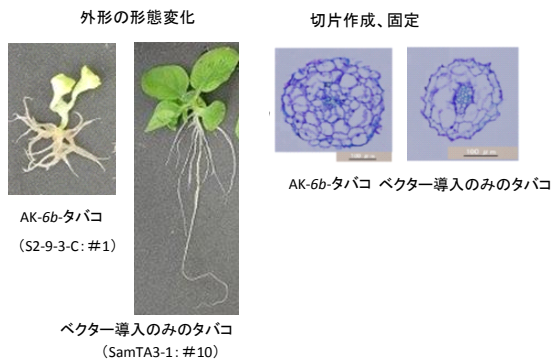


図5 根の外形および組織形態: 10 μM Dex を含む MS 培地で播種した後 21 日後の外形写真(A, B)および組織固定後の根端から 6~7mm の切片をトルイジンブルーで染色したもの(C, D)。

サイトカイニン染色

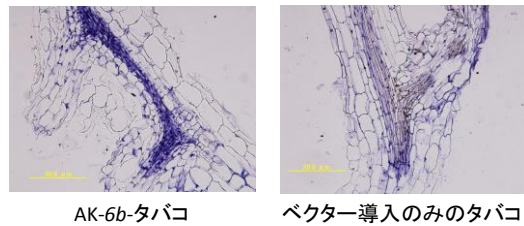


図3 サイトカイニンの検出: 10 μM Dex を含む MS 培地で播種した後 21 日後に 4%パラホルムアルデヒドで根を固定し, 切片を作成した。ゼアチンリボシドに対するものクローニン抗体(Agdia 社)を用いて反応させた。次にアルカリリンフォスファターゼをカップルさせてある 2 時抗体と反応させ, ウェスタンブローで発色させた。AK-6b-タバコの維管束周辺がよく染まっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Yuka Kitomi, Hiroko Ito, Tokunori Hobo, Koichiro Aya, Hidemi Kitano, Yoshiaki Inukai The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRR1*, a type-A response regulator of cytokinin signaling The Plant Journal 査読有り 2011 accepted
- ② 小川敦史 根系形成に関わる細胞学的, 生理学的要因についての組織科学的・免疫細胞学的手法をもちいた解析法 日本作物学会紀事 査読有り 79 (2010) 373-376.
- ③ Y. Yamamoto, Y. Inukai, H. Kitano, T. Sazuka and M. Matsuoka Characterization and mapping of the *CROWN ROOTLESS2* gene, *CRL2*, in rice. Rice Genetics Newsletter 査読有り 25 (2010) 25-26.
- ④ Encarna Velázquez, José Luis Palomo, Raúl Rivas, Hilario Guerra, Alvaro Peix, Martha E. Trujillo, Pablo García-Benavides, Pedro F. Mateos, Hiroetsu Wabiko and Eustoquio Martínez-Molina Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. Systematic and Applied Microbiology 査読あり 33 (2010) 247-251.
- ⑤ Atsushi Ogawa, Nanako Taguchi and Kazumitsu Miyoshi Variations in endopolyploidy level during the short period in the roots and leaves of maize (*Zea mays*) seedlings at the early growing stage. Plant Biotechnology

Reports 査読有り 4 (2010) 117-123.

- ⑥川島長治, 松本大, 小川敦史 水稻における気孔開度と個体群生長速度, 純同化率, 葉面積指数および乾物生産との関係について—秋田県大潟村における水管理に着目して— 日本作物学会紀事 査読有り 78 (2009) 324-334.
- ⑦Roel R. Suralta, Yoshiaki Inukai and Akira Yamauchi Dry matter production in relation to root plastic development, oxygen transport, and water uptake of rice under transient soil moisture stresses Plant and Soil 査読有り 332 (2010) 87-104.
- ⑧Atsushi Ogawa, Fumihiko Ando, Kyoko Toyofuku and Choji Kawashima The sucrose metabolism for the root development in the seminal root of maize seedlings. Plant Production Science 査読有り 12 (2009)9-16

[学会発表] (計 36 件)

- ①豊福恭子 浸透圧ストレス条件下でのトウモロコシ側根原基および周辺組織における遺伝子発現および代謝物質の網羅的解析 第 231 回日本作物学会年会, 2011 年 3 月, 東京農業大学
- ②豊福恭子 浸透圧ストレス条件下でのトウモロコシ側根原基および周辺組織における網羅的遺伝子発現プロファイリング 第 33 回根研究集会, 平成 22 年 11 月, 兵庫県立大学
- ③犬飼 義明 オーキシン誘導性イネ *CRL5* はサイトカイニン信号伝達を負に制御し冠根形成を促す 第33回根研究集会 2010. 11. 12 兵庫県立大学 (兵庫県)
- ④Yoshiaki Inukai *CRL5* promotes crown root formation through repressing cytokinin signaling in Rice China-Japan Joint Workshop on Rice Morphogenesis 2010. 10. 9 Xijiao Hotel, Beijing, China
- ⑤ 豊福恭子 浸透圧ストレス条件下でのトウモロコシ側根原基における発現変動遺伝子の網羅的解析 —レーザーマイクロダイセクション法とマイクロアレイ法を用いて— 第230回日本作物学会年会, 2010年9月, 北海道大学
- ⑥ 犬飼義明 耐旱性向上を目指したイネ根系形成機構の解析 第48回ガンマーワールドシンポジウム 2009. 7. 15 水戸三の丸ホテル
- ⑦沢田泰樹 植物腫瘍遺伝子 *6b* の発現によるタバコ根の形態変化 第 31 回 根研究集会 2009 年 11 月 29 日 秋田県立大学
- ⑧松波麻耶 異なる土壤水分に対するイネ品種の物質生産の遺伝的変異 第230回日本作物学会講演会 北海道大学 2010年9月

4日-5日

- ⑨木富悠花 イネ冠根形成を制御する *CROWN ROOTLESS5 (CRL5)* 遺伝子の解析とその下流因子の探索. 第 50 回日本植物生理学会年会. 2009 年 3 月 22 日. 名古屋大学
- ⑩ 小川 敦史 浸透圧ストレス条件下でのアスコルビン酸代謝関連物質の投与がトウモロコシ幼植物体における O_2^- の蓄積およびその代謝に与える影響 第 226 回日本作物学会 2008.9.24-25
- ⑪ Kitomi Y. Mechanism of Crown Root Formation in Rice. 5th International Symposium on Adventitious Root Formation. June, 16-20, 2008. Alcala de Henares, Madrid, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 敦史 (OGAWA ATSUSHI)
秋田県立大学 生物資源科学部 助教
研究者番号: 30315600

(2) 研究分担者

我彦 広悦 (WABIKO HIROETSU)
秋田県立大学 生物資源科学部 教授
研究者番号: 10191842

(3) 連携研究者

犬飼 義明 (INUKAI YOSHIAKI)
名古屋大学 生命農学研究科 助教
研究者番号: 20377790