

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02174

研究課題名(和文)細胞壁ダイナミクスが誘起するイネ根系形態の可塑的反応機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms on phenotypic plasticity of rice root system architecture induced by cell wall dynamics

研究代表者

犬飼 義明(Inukai, Yoshiaki)

名古屋大学・農学国際教育研究センター・教授

研究者番号：20377790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：側根原基サイズは根系形態を決定する主要な要因であり、乾燥ストレス下での水吸収能を規定することから、側根原基サイズの制御機構解明は不良環境下での安定的なイネ生産にとって極めて重要である。そこで、側根原基サイズが増加する種々の変異体を用い、その特徴解析や原因遺伝子の同定・機能解析を行った結果、細胞壁の伸展性やオーキシンの局在性の変動が側根原基サイズの制御に関わることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、世界的な干ばつが頻発する中、根系改良による耐乾性育種が注目されている。本研究の成果から、イネの根系形態を可塑的に変化させる能力を強化し、乾燥ストレス耐性に優れた品種を作出する上での有用な手がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：Since the lateral root primordium size is a major factor that determines the root system morphology and regulates the water absorption capacity under drought stress, it is extremely important for stable rice production under a poor environment to elucidate the control mechanism of the lateral root primordium size. Here, we tried to characterize some rice mutants that produce big size of lateral root primordia and isolate and analyze each mutant's causative gene. As a result, it was clarified that changes in cell wall extensibility and auxin localization are involved in the control of lateral primordium size.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 突然変異体 側根形成 オーキシン 細胞壁 分子機構

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な干ばつが頻発する中、根系改良による耐乾性育種が注目されている (Ahmadi *et al.* 2014)。これまでに申請者らは、様々な水稻品種・系統を対象に耐乾性程度を評価し、ストレス下において側根が可塑的に発達する品種・系統群が高い耐乾性を示すことを明らかにした (Suralta *et al.* 2018)。イネの側根には直径の大きな L 型側根と小さな S 型側根が存在し、前者のみが長く伸長でき、かつさらに高次の側根を発生させる能力を持つため、ストレス下において側根の発達を高めるには L 型側根化 (側根原基サイズの増加) を促す必要がある。しかしながら、このような側根原基サイズの可塑性をもたらす分子機構はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

側根形成の制御機構はモデル植物であるシロイヌナズナを中心に解析が進められてきた。このシロイヌナズナには原基サイズが異なる側根は存在しないが、主要穀物であるトウモロコシやコムギを含むイネ科作物には存在するため、イネを用いることにより主要イネ科作物の独自の形態応答機構の解析がはじめて可能となる。しかし、主軸根 (親根) 上のどの位置からどのタイプの側根が形成されるかの規則性はなく、これまではそのメカニズムの詳細な解析が困難であった。これを克服すべく、申請者らは水耕法にて栽培したイネ実生の種子根を根端近傍で切断することで、側根形態の可塑的反応過程を簡便に捉えられる実験系 (根端切除法) を確立してきた (Kawai *et al.* 2017)。

加えて遺伝学的な解析を可能にするため、申請者らは側根原基サイズが増加する突然変異体の作出を継続的に試み、計 5 系統の変異体を選抜するとともに、それぞれの原因候補遺伝子を同定した。その結果、これらの多くは細胞壁の伸展性や生合成に関わることが示唆される遺伝子であったため、これにより側根原基サイズの制御が細胞壁の特性により決定される可能性が示唆された。本研究では、これらの独自の材料や上述の根端切除法を駆使し、細胞壁特性とイネの側根原基サイズの関連性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

L 型側根数が有意に増加する 5 つのイネ突然変異体とそれらの原品種を供試した。はじめに、各候補遺伝子をそれぞれの突然変異体に導入し、変異質の相補性を検定することで原因遺伝子を決定した。次に、これら原因遺伝子の発現性を定量 PCR や *in situ hybridization* 法、プロモーター-GFP 等により解析した。これまでに、植物ホルモンが根の発生に重要な役割を示すことが知られている。そこで、これら変異体におけるオーキシン応答性や内生含量を測定するとともに、オーキシン誘導性遺伝子群の発現解析、ならびにオーキシン信号伝達の進行を可視化できる *DR5::NLS-3xVenus* を導入した形質転換体を作成し、その挙動を観察した。

加えて、上述の根端切除法を駆使し、レーザーマイクロダイセクションによって単離した野生型の S 型・L 型側根原基間でのトランスクリプトーム解析を行い、両者間の発現変動遺伝子群の同定を試み、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1) *wavy root elongation growth 1 (weg1)* 変異体の解析結果

weg1 変異体は、主軸根が湾曲して伸長するとともに、側根メリステムサイズが著しく増加する特徴を有する。興味深いことに、これらの側根は湾曲した部位の凸側に形成される傾向を示した。そこで、湾曲部位における個々の細胞の伸長パターンを野生型と *weg1* 変異体間で比較した結果、本変異体では本部位の細胞長が内側と外側で大きく異なっており、その結果として湾曲して根が伸長することが判明した。マップベースクローニングの結果、本変異体の原因遺伝子は第 9 染色体に座乗し、更なる座乗候補領域の制限化と相補性検定により、最終的に細胞壁の伸展性に関わると推定される hydroxyproline-rich glycoprotein をコードすることが明らかとなった。また、本遺伝子は根の伸長帯で発現しており、そのため本遺伝子の機能欠損により細胞伸長の左右対称性が乱れ、主軸根が湾曲すると考えられた。

次に、湾曲伸長と側根原基サイズ制御の関係性を調べるため、根の発生制御に深く関わることが知られているオーキシンの局在性を、オーキシン応答プロモーターである *DR5* を用いて解析した。その結果、主軸根の湾曲部位の凸側では高濃度のオーキシンが局在し、その結果として直径の大きな側根メリステムが形成されることが示唆された。

(2) *outstanding rooting 1 (our1)* 変異体の解析結果

野生型に比べ、*our1* 変異体幼苗の根系形質は種子根長・冠根長ともに長い一方で、総側根密度が減少した。また、*our1* 変異体では L 型側根数が増加し、S 型側根数の減少が確認された。これら長根化や総側根密度の減少はオーキシンシグナル伝達が阻害される *Osiaa13* 変異体と共通して見られる特徴であり、本変異体におけるオーキシンの関与が示唆された。

そこで、本変異体の重力屈性を調べた結果、野生型に比べ重力応答能が低下する傾向が見られ

た。また、オーキシン誘導性遺伝子の *OsIAA20* や *ARL1/CRL1* の発現量が *our1* 変異体で低下し、オーキシンにより発現が抑制され、細胞壁の伸展性を制御する *OsEXPA18* の発現量が増加していた。一方、オーキシン含量には両者間に有意な差は見られなかった。本変異体の原因遺伝子の単離を試みた結果、bZIP ファミリーに属する遺伝子の機能欠損に起因することが判明した。以上のことから、本変異体では bZIP 型転写因子の変異によるオーキシン信号伝達の抑制や細胞壁の伸展性の向上を通して根系発育が促されると考えられた。

(3) T3-7-1 変異体の解析結果

T3-7-1 変異体は、コントロール条件下で野生型よりも少ない側根を形成した一方、根端切除にตอบสนองしてより多くの L 型側根を形成した。マップベースクローニングによって、*WUSCHEL-related homeobox (WOX)* ファミリー遺伝子である *QHB/OsWOX5* を本変異体の原因遺伝子として同定した。また、レーザーマイクロダイセクションによって単離した野生型の S 型・L 型側根原基間でのトランスクリプトーム解析により、2 種類の側根原基間における発現変動遺伝子として 531 遺伝子を同定した。その中で、*WOX11/12* クレードに属する *OsWOX10*, *OsWOX11*, および *OsWOX6* は L 型側根原基において S 型に比べて高く発現上昇していた。*QHB/OsWOX5* プロモーターを用いて、コントロール条件下の側根原基において *OsWOX10* を過剰発現させたところ、*OsWOX10* 発現量依存的に側根直径が増加した。また、CRISPR/Cas9 システムより作出した *Oswox10* 変異体では、土壌乾燥条件下で生じた L 型側根の直径が野生型よりも低下した。加えて、Yeast one-hybrid 法によって *QHB/OsWOX5* は抑制型の転写因子であり、*qhb/Oswox5* 変異体ではその抑制能が失われていることが示された。さらに、*qhb/Oswox5* 変異体では根端切除後の *OsWOX10* 発現量が野生型よりも高く、ゲルシフトアッセイによって *QHB/OsWOX5* リコンビナントタンパク質は *OsWOX10* 上流配列に結合することが示された。以上より、*QHB/OsWOX5* は側根直径を正に制御する *OsWOX10* の発現を抑制することで、根端切除処理にตอบสนองした L 型側根形成を負に制御することが明らかとなった。

(4) T3-2, T12-3, T12-36 変異体の解析結果

コントロール条件下で野生型よりも多くの L 型側根を形成する T12-3, T3-2, および T12-36 変異体を選抜し、マップベースクローニングによってこれら変異体の原因遺伝子としてダイナミン関連タンパク質をコードする *OsDRP1C* および *OsDRP2B* を同定した。ダイナミンタンパク質は、細胞壁主成分であるセルロースの合成やオーキシン輸送タンパク質の細胞内局在を制御することが報告されている。そこで、オーキシン応答プロモーターである *DR5* を用いて側根原基におけるオーキシンシグナルの分布を解析した。その結果、野生型および *drp* 変異体において、L 型側根原基では特にその基部においてオーキシンの蓄積が認められた。

また、オーキシン極性輸送阻害剤 (NPA) および小胞輸送阻害剤 (BFA) は外生オーキシンによる側根直径増加の作用を高め、このとき側根原基基部でのオーキシン蓄積が観察された。さらに、側根直径を正に制御する *OsWOX10* はオーキシン応答性であり、*drp* 変異体においてその発現が高いことが判明した。また、グルココルチコイド処理によって機能獲得型のオーキシンシグナル抑制因子である *mIAA3* が誘導される *mIAA3-GR* システムを用いたオーキシンシグナル伝達の誘導的抑制により、野生型背景における根端切除後の側根直径増加が抑制される傾向が見られた。さらにゲルシフトアッセイにより、側根原基で発現する促進型の ARF タンパク質である *OsARF19* が *OsWOX10* 上流配列に結合することが示された。以上より、側根原基、特にその基部におけるオーキシンシグナルの上昇は、*OsWOX10* の発現上昇を引き起こし、L 型側根を誘導すると考えられた。

< 引用文献 >

- ①Ahmadi et al. 2014. The roots of future rice harvests. *Rice* 7: 29.
- ②Kawai et al. 2017. Compensatory growth of lateral roots responding to excision of seminal root tip in rice. *Plant Root* 11: 48-57.
- ③Suralta et al. 2018. Root plasticity for maintenance of productivity under abiotic stressed soil environments in rice: Progress and prospects. *Field Crops Research* 220: 57-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawai, T., Akahoshi, R., Shelley, I. J., Kojima, T., Sato, M., Tsuji, H. and Inukai, Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Auxin distribution in lateral root primordium development affects its size and lateral root diameter in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 834378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.834378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Lucob-Agustin, N., Kawai, T., Takahashi-Nosaka, M., Kano-Nakata, M., Wainaina, C. M., Hasegawa, T., Inari-Ikeda, M., Sato, M., Tsuji, H., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 169
2. 論文標題 WEG1, which encodes a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, is essential for parental root elongation controlling lateral root formation in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 214-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ppl.13063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hasegawa, T., Lucob-Agustin, N., Yasufuku, K., Kojima, T., Nishiuchi, S., Ogawa, A., Takahashi-Nosaka, M., Kano-Nakata, M., Inari-Ikeda, M., Sato, M., Tsuji, H., Wainaina, C. M., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 306
2. 論文標題 Mutation of OUR1/OsbZIP1, which encodes a member of the basic leucine zipper transcription factor family, promotes root development in rice through repressing auxin signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2021.110861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lucob-Agustin, N., Sugiura, D., Kano-Nakata, M., Hasegawa, T., Suralta, R. R. Niones, J. M., Inari-Ikeda, M., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 301
2. 論文標題 The promoted lateral root 1 (plr1) mutation is involved in reduced basal shoot starch accumulation and increased root sugars for enhanced lateral root growth in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2020.110667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lucob-Agustin, N., Kawai, T., Kano-Nakata, M., Suralta, R. R., Niones, J. M., Hasegawa, T., Inari-Ikeda, M., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 Morpho-physiological and molecular mechanisms of phenotypic root plasticity for rice adaptation to water stress conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 20-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.20106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawai, T., Shibata, K., Akahoshi, R., Nishiuchi, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Kojima, T., Nosaka-Takahashi, M., Sato, Y., Toyoda, A., Lucob-Agustin, N., Kano-Nakata, M., Suralta, R. R., Niones, J. M., Chen, Y., Siddique, K. H. M., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 119
2. 論文標題 WUSCHEL-related homeobox family genes in rice control lateral root primordium size	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 e2101846119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101846119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 長谷川友美、河合翼、赤星良輔、Lucob-Agustin, N.、安福航希、兒島孝明、西内俊策、小川敦史、仲田 (狩野) 麻奈、佐藤萌子、辻寛之、山内章、犬飼義明
2. 発表標題 イネのオーキシン関連変異体を用いた根系形成機構の解析
3. 学会等名 第53回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河合翼、赤星良輔、兒島孝明、高橋 (野坂) 実鈴、佐藤豊、高橋宏和、中園幹生、佐藤萌子、辻 寛之、山内 章、犬飼 義明
2. 発表標題 イネにおけるオーキシン局在に应答した側根原基サイズの制御機構
3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawai, T., Nosaka-Takahashi, M., Sato, Y., Chen, Y., Siddique, K. H. M., Takahashi, H., Nakazono, M., Yamauchi, A., Inukai, Y.
2. 発表標題 Development and genetic analysis of compensatory growth of lateral roots in rice
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河合翼, 高橋(野坂)美鈴, 高橋宏和, 佐藤豊, 中園幹生, 山内章, 犬飼義明
2. 発表標題 イネにおける異形側根の発生制御機構の解析
3. 学会等名 第50回根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合翼, 高橋(野坂)美鈴, 高橋宏和, 佐藤豊, 中園幹生, 山内章, 犬飼義明
2. 発表標題 根端切除法を用いたイネ異形側根原基におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第27回育種学会中部地区談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合翼, Noawin B. Lucob, 犬飼義明
2. 発表標題 イネ側根メリステムサイズのフレキシブルな制御機構
3. 学会等名 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の夢」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N Lucob-Agustin, T Kawai, M Takahashi-Nosaka, M Kano-Nakata, C Mbathi Wainaina, T Hasegawa, M Inari-Ikeda, M Sato, H Tsuji, A Yamauchi and Y Inukai
2. 発表標題 Parental root bending induces L-type lateral root formation via auxin accumulation at the outer side of bent region in rice
3. 学会等名 第50回根研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川友美, ルコブ ノナウイン, 安福航希, 兒島孝明, 西内俊策, 高橋(野坂)美鈴, 井成(池田)真由子, 佐藤萌子, 辻 寛之, 犬飼義明
2. 発表標題 イネ our1 変異体はオーキシン信号伝達の抑制を通して根系発育を促す
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合翼, 赤星良輔, 高橋(野坂)美鈴, 高橋宏和, 佐藤豊, 中園 幹生, 山内 章, 犬飼 義明
2. 発表標題 イネにおける可塑的な側根メリス テムサイズ制御機構の解析
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤星 良輔, 河合 翼, 井成 (池 田) 真由子, 佐藤 萌子, 辻 寛之, 高橋 (野坂) 美鈴, 高橋 宏和, 佐藤 豊, 中園 幹生, 山内 章, 犬飼義明
2. 発表標題 イネにおけるオーキシン局在に応 答した側根原基形成機構
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河合翼、兒島孝明、山内章、犬飼義明
2. 発表標題 イネ異形側根のメリステム形成におけるQHB/OsWOX5遺伝子の役割
3. 学会等名 第48回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nonawin B. Lucob, Misuzu Takahashi-Nosaka, Akira Yamauchi and Yoshiaki Inukai
2. 発表標題 Functional Analysis of a Mutation Promoting Lateral Root Development via Carbohydrate Regulation in Rice.
3. 学会等名 10th Symposium of the International Society of Root Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa Kawai, Misuzu Nosaka-Takahashi, Akira Yamauchi and Yoshiaki Inukai
2. 発表標題 Developmental analysis on compensatory growth of lateral roots responding to excision of seminal root tip in rice
3. 学会等名 10th Symposium of the International Society of Root Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川友美、柴田晃秀、高橋(野坂)美鈴、西内俊策、鮫島啓彰、菊田真由美、榎原大悟、山内章、犬飼義明
2. 発表標題 異なる水条件下における our1 変異体の根の成長特性
3. 学会等名 第49回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N Lucob-Agustin, M Nakata-Kano, D Sugiura, M Takahashi-Nosaka, A Yamauchi and Y Inukai
2. 発表標題 Starch biosynthesis and sugar transport are involved in lateral root development of rice
3. 学会等名 第49回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬飼義明
2. 発表標題 イネにおける根の発生分化と形態形成の遺伝的制御に関する研究
3. 学会等名 第26回育種学会中部地区談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	兒島 孝明 (Kojima Takaaki) (40509080)	名古屋大学・生命農学研究科・講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	西オーストラリア大学			
バングラデシュ	バングラデシュ農業大学			
フィリピン	フィリピン稲研究所			