

平成21年5月29日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780002
 研究課題名（和文） イネの冠根形成を支配する遺伝子の単離と機能解析
 研究課題名（英文） Isolation and functional analysis of *CRL* genes involved in crown root formation in rice
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

冠根の発生に関わる遺伝的・生理的メカニズムを解析するために、冠根数が著しく減少するイネ *crown rootless (crl)* 突然変異体を用い、その特徴解析および原因遺伝子の単離と機能解析を試みた。その結果、イネの冠根形成は植物ホルモンの1つであるオーキシンの輸送、およびシグナル伝達系で機能する遺伝子によって誘導されることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	270,000	3,970,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ、突然変異、根、発生・分化、遺伝子、オーキシン

1. 研究開始当初の背景

根系形成の遺伝的制御機構に関する知見は、地上部諸器官に比べ圧倒的に少ない上に断片的である。さらには、これらの基礎的な知見をもとにした根系機能の遺伝的改良といった応用面を考えた場合、特に主要作物を対象にした研究が必要不可欠であるが、これまでの根系形成機構の解析に関しては、その多くが双子葉植物のモデル植物であるシロ

イヌナズナを対象とした研究に限られている。これに関して我々は、これまでに *CRL1* 遺伝子を単離することに成功し、その機能を解析した結果、本遺伝子は *IAA*、および *ARF* タンパク質によるオーキシンシグナル伝達系の下流に位置する転写因子をコードし、最終的に冠根の発生を促すことを明らかにしたが、このオーキシンのシグナル伝達系から根形成へと導く間の機構はシロイヌナズナ

ではミッシングリンクとして残されていた課題であった。したがってイネを用いることで、シロイヌナズナの解析からは判明しがたい新たな情報が得られるものと期待された。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの根系が主根とそれから生じる側根によって形成されるのに対して、イネやコムギなどの主要作物を含むイネ科作物の根系は、地上部茎葉節より順次発生する不定根(冠根)によって特徴づけられ、特にイネでは一株あたり数百本以上に達すると報告されている。これまでに我々は、冠根の発生数が著しく低下する *CROWN ROOTLESS1 (CRL1)* 変異体を作成・選抜し、その原因遺伝子の単離、および機能解析を行ってきた。さらに今回、この *CRL1* 遺伝子とは異なる遺伝子座の変異に起因し、同じく冠根数が著しく減少する突然変異体を得ることに成功した。そこで本研究では、これら *cr1* 変異体を材料に用い、形態的・生理的特徴を精査するとともに、それらの原因遺伝子の単離、および発現解析等を行うことにより、イネ科作物の根系を形成する上で主要な役割を果たす冠根形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *CRL* 遺伝子の単離

各 *cr1* 変異体の原因遺伝子を明らかにするため、各変異体とインド稲カサラスとの交雑 F_2 集団を用いてマップベースクローニングを行った。マップベースクローニング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。これにより得られた原因候補遺伝子は、相補性検定によって野生型の表現型への復帰を確かめた。

(2) オーキシン関連形質の比較

冠根形成は植物ホルモンのオーキシン処理により著しく影響を受け、前述の *CRL1* 遺

伝子もオーキシンのシグナル伝達に関わることが判明している。そこで、以下のようにオーキシンシグナルとの関連の指標となっている根の重力屈性反応、ならびにオーキシン極性輸送能を野生型と *cr1* 変異体間で比較した。

① 重力屈性テスト

種子を消毒・催芽させた後、栄養源を含まない 1.3%濃度の寒天培地に播種し、人工気象室内にて7日間生育させた。野生型のを数本と全ての *cr14* 変異体を残して間引いた後 90° 回転させ、1日後に根の屈曲角度を測定した。

② オーキシン極性輸送量の測定

1 μ M [3 H]-IAA 1.7 μ l を染み込ませた 2mm 四方の濾紙をエッペンドルフチューブの底に敷いた。10~12 日齢の野生型と *cr14* 変異体の基部 3mm より上方 1.5cm の葉鞘を切り出し、頂部側を下にして切り口が濾紙に当たるように入れて 28°C で 4 時間インキュベートした。次に、上になっている基部側から 3mm をサンプリングし、クリアゾル II 5ml を加えた 7ml 容のバイアルに 1 個体分ずつ入れ、液体シンチレーションカウンター (LIQUID SCINTILLATION COUNTER LSC-5100, Alaka) で放射活性を測定した。

(3) *CRL* 遺伝子の発現解析

各 *CRL* 遺伝子の機能する場を特定するため、それらの器官別遺伝子発現を判定量的 RT-PCR 法によって解析した。加えて、それら遺伝子のプロモーター-GUS、および *in situ* ハイブリダイゼーション法によって組織、細胞レベルでの発現を解析した。

4. 研究成果

(1) *CRL4* 遺伝子はオーキシンの極性輸送を介して冠根形成を制御する

冠根の発生に関わる遺伝的・生理的メカニズムを解析するために、冠根数が著しく減少する突然変異体 *cr14* を用い、その特徴解析および原因遺伝子の単離と機能解析を試みた。冠根の発生はオーキシンにより制御されることが明らかになっている。そこで同じくオーキシンによる支配を受ける側根数および根の重力屈性について、野生型(日本晴)と

cr14 変異体との間で比較した。その結果、*cr14* 変異体では野生型に比べて明らかに側根数が減少し、かつ根の重力屈性も異常であった。

次に *CRL4* 遺伝子を単離するために、材料として *cr14* 変異体にインド型品種 *Kasalath* を交雑して得た F_2 雑種集団を用いて高精度連鎖解析を行った。その結果、*CRL4* 遺伝子は第 3 染色体上の 101.9cM に位置する BAC クローン AC135792 上に座乗することが判明した。この BAC クローン上に存在する ORF について *cr14* 変異体と日本晴間で塩基配列を比較したところ、シロイヌナズナにおいてパターン形成に関わるとされている *GNOM/EMB30* に相同性の高い配列内にナンセンス変異が認められた。*GNOM/EMB30* はエンドソームと細胞膜との間の小胞輸送に関わる GTP 結合性タンパク質である ADP ribosylation factor (ARF) を活性化させる ARF guanine exchange factor (ARF-GEF) をコードしており、オーキシン排出キャリアーである PIN1 サイクルを制御していると考えられている。我々は野生型にオーキシン輸送阻害剤である NPA を処理すると冠根の発生が減少することを確認した。加えて *cr14* 変異体と野生型間で地上部から地下部へのオーキシン輸送量を比較した結果、*cr14* 変異体では野生型の 20% 以下に低下していた。以上の結果より、*CRL4* 遺伝子はオーキシンの極性輸送を介して冠根形成を制御することが判明した。

オーキシン極性輸送機能の異常を持つ突然変異体はイネではほとんど報告されておらず、今後本変異体の特徴をより詳細に解析することでイネにおけるオーキシン輸送に依存した形態形成機構が明らかになるものと期待される。

(2) *CRL5* 遺伝子は冠根原基形成の位置および数を決定する

今回オーキシンによる冠根形成に関わる新たな経路を探索することを目的とし、*cr15* 変異体の特徴を解析するとともに、その原因遺伝子の単離および発現解析を行った。はじめに、冠根原基形成部位である茎葉節の横断切片を作製し観察した結果、*cr15* 変異体の冠根数が減少する原因は冠根原基ができ

てからその発達に異常が起こるからではなく、原基の形成自体が抑制されるためであることが解った。したがって、*CRL1* 遺伝子と同様に *CRL5* 遺伝子も冠根形成の initiation の段階で機能することが判明した。

また、*cr11 cr15* 二重変異体の表現型の解析したところ、二重変異体ではそれぞれの単独変異体と比較して冠根を形成する能力がさらに抑制されていた。この二重変異体のさらなる冠根数の減少は、冠根の誘導に必要な両方の経路が機能できなくなったためであると考えられる。したがって、*CRL5* 遺伝子は *CRL1* 遺伝子の経路とは異なる経路で機能すると推測された。

そこで、*cr15* 変異体の原因遺伝子の単離を試みた結果、第 7 染色体上に位置する *AINTEGUMENTA(ANT)* と相同性の高い予測遺伝子内にナンセンス変異が認められた。*ANT* は植物で転写因子として知られる分子がもつ AP2 ドメインを二つ持つファミリーに属していることが明らかとなっている。一方、*cr15* 変異体で認められたナンセンス変異の位置は、この二つの AP2 ドメインをコードする領域より上流に位置するため、本遺伝子は明らかにその機能を欠損していると考えられた。

CRL5 遺伝子の器官別の発現を半定量的 RT-PCR により解析したところ、冠根の形成部位である茎葉部に加え、葉鞘部位でも発現することが明らかとなった。*cr15* 変異体は葉が細くなることや、稔性が低下するといった異常が認められているため、これらの結果から *CRL5* 遺伝子は根のみでなく、葉や花器官など地上部の形態形成も制御しているものと考えられた。

また、*CRL1* 遺伝子と *CRL5* 遺伝子の相互作用を明らかにするために、*cr15* 変異体における *CRL1* 遺伝子の発現や *cr11* 変異体における *CRL5* 遺伝子の発現を野生型と比較した。その結果、各変異体における各遺伝子の発現が野生型と比べて変化しなかった。この結果からもこれらの遺伝子は冠根形成において異なる経路で機能している可能性が高いとする著者らの考えは支持される。

一方、オーキシンテストの結果から *cr15* 変異体はオーキシンに関連した突然変異体で

あることが示唆された。さらに、オーキシン処理による発現解析を行ったところ、*CRL5* 遺伝子はオーキシンによって発現が誘導されることがわかり、*CRL5* 遺伝子はオーキシンシグナル伝達系の下流に位置していることが明らかとなった。

次に、*in situ* hybridization により冠根形成部位である基部茎葉節における *CRL5* 遺伝子の発現パターンを調べたところ、*CRL5* 遺伝子は発生中の冠根原基および伸長中の冠根原基における維管束で強い発現が、また冠根形成予定部位では維管束および辺周部維管束環に接する柔細胞で局所的な発現が見られた。発生中の冠根原基における *CRL5* 遺伝子の発現は *CRL1* 遺伝子の発現パターンと類似していたが、冠根形成予定領域においては辺周部維管束環に接する柔細胞を一周するように発現する *CRL1* 遺伝子とは異なるパターンを示した。これまでの報告では *CRL1* 過剰発現個体では冠根数の増加は認められていないが、本研究において *CRL5* 過剰発現個体で冠根数の増加が認められた。これより *CRL5* 遺伝子は冠根原基形成能を有する細胞群に作用して冠根原基形成の位置および数を決定する遺伝子であり、*CRL1* 遺伝子とは異なる作用を有すると考えられた。

以上より *CRL5* 遺伝子は冠根数を人為的に制御する上で重要な遺伝子であると考えられ、今後の育種利用への応用が期待された。

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2件)

①Y. Kitomi, H. Kitano and Y. Inukai 2008. Mapping of the *CROWN ROOTLESS3* gene, *CRL3*, in rice. Rice Genet. Newslett. 24: 31-33. <査読有り>

②Y. Kitomi, A. Ogawa, H. Kitano and Y. Inukai 2008. *CRL4* regulates crown root formation through auxin transport in rice. Plant Root 2: 19-28. <査読有り>

[学会発表] (計6件)

①木富悠花ら. 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

②木富悠花ら. イネ冠根形成を制御する遺伝子とその分子機構の解析. 第29回根研究集会. 2008年11月7日. 千葉科学大学

③Kitomi Y. et al. Molecular Mechanism of Crown Root Formation in Rice. 5th International Symposium on Adventitious Root Formation. June, 16-20, 2008. Alcalá de Henares, Madrid, Spain

④木富悠花ら. イネ *crown rootless* 変異体を用いた冠根形成機構の解析. 第49回日本植物生理学会年会. 2008年3月22日. 札幌コンベンションセンター

⑤伊藤寛子ら. イネの根の発生・分化を支配する *CRL5* 遺伝子の単離. 日本育種学会中部地区談話会第14回講演会. 2007年12月1日. 信州大学

⑥木富悠花ら. イネの根の発生・分化に関する *CRL4* 遺伝子の機能解析. 第111回日本育種学会講演会. 2007年3月31日. 茨城大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 義明 (INUKAI YOSHIKI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号: 20377790