

イネ根系形成遺伝子の機能解析と その下流因子の探索

名古屋大学大学院 生命農学研究科

生物機構・機能科学専攻

資源生物機能学講座

植物遺伝育種学研究分野

木富 悠花

2012年3月

目次

略語	3
要旨	5
第1章 緒論	
緒論	8
図表	13
第2章 冠根および側根の initiation を制御する <i>CRL4</i> 遺伝子の単離と機能解析	
緒言	18
材料および方法	21
結果	34
考察	39
図表	43
第3章 側根の initiation を制御する <i>OsIAA13</i> 遺伝子の機能解析およびその下流因子の探索	
緒言	57
材料および方法	60
結果	65
考察	70
図表	74

第4章 冠根の initiation を制御する *CRL5* 遺伝子の単離と機能解析

緒言	85
材料および方法	88
結果	96
考察	104
図表	109

第5章 *CRL5* 遺伝子下流で機能する冠根の initiation 制御因子群の探索

緒言	128
材料および方法	131
結果	142
考察	148
図表	154

第6章 総合考察

総合考察	170
図表	175

引用文献	178
------	-----

謝辞	197
----	-----

略語

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
BAC	bacterial artificial chromosome
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	bovine serum albumin
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CTP	cytidine triphosphate
CHX	cycloheximide
dCAPS	derived cleaved amplified polymorphic sequence
DEX	dexamethasone
DMF	dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethanol
GDP	guanosine diphosphate
GFP	green fluorescent protein
GR	glucocorticoid receptor

GTP	guanosine triphosphate
GUS	β -glucuronidase
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MeOH	methanol
MNU	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAA	<i>N</i> -1-naphthaleneacetic acid
tRNA	transfer ribonucleic acid
NBT	nitro-blue tetrazolium
NPA	1- <i>N</i> -naphthylphthalamic acid
OX	over-expresser
PAC	P1 artificial chromosome
PCR	polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait loci
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
STS	sequence tagged site
UTP	uridine triphosphate
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
WT	wild-type

要旨

今後の食糧問題を解決していく上では、作物のさらなる増産が必須である。炭素以外のすべての養水分は根から吸収されるため、これまでに多収化やストレス回避による安定生産に向けた根系形態改良の重要性が指摘されてきた。しかし、地上部諸形態の著しい遺伝的改良の成功例に比べ、根系形態の改良はめざましい成果が得られていない。この要因に、根系形成機構の遺伝支配の情報が他の器官に比べ圧倒的に少ないことがあげられる。本研究はモデル植物であると同時に主要作物そのものであるイネに着目し、根系形成の分子機構を明らかにするとともに、根系形態の人為的制御を可能にする有用遺伝子の同定を目指したものである。

イネの根系は、大まかには基部茎葉節から発生する不定根（冠根）と、それらから発生する側根により構成される。これらの根の機能は大きく異なるため、根系形態の改良は両者を区別して進める必要がある。そこで本研究では、これらの両者の遺伝支配の共通性および相違性を把握するため、両者あるいはいずれかの根の数が著しく減少する 3 つの変異体の特徴を精査するとともに、これらの原因遺伝子の単離と機能解析を行った。その結果、Arf-GEF をコードする *CRL4* 遺伝子はオーキシン極性輸送を制御し、根の形成領域における適切なオーキシンの集積と濃度勾配を確立することで冠根および側根原基両者の形成を促すことが明らかとなった。また、Aux/IAA ファミリーに属する *OsIAA13* 遺伝子は、オーキシンシグナル伝達を制御することにより側根形成を特異的に制御することが判明した。*CRL4* 遺伝子と相同性の高い遺伝子はイネゲノム中に 1 個しか存在しないのに対し、*OsIAA13* 遺伝子に関しては 30 個存在している。したがって、後者の Aux/IAA ファミリーに属する個々の遺伝子はそれぞれ機能分化が進んでいることが想定され、冠根と側根を区別して根系形態を改良するには非常に有用であると考えられた。

一方、冠根形成を特異的に制御する *CRL5* 遺伝子は AP2/ERF 型転写因子をコードする新

たな根の制御因子であることが明らかとなった。上述のように、根の発生はオーキシンにより正に制御される一方、サイトカイニンには負の制御を受け、両ホルモンは根の発生に対して拮抗的に作用することが知られていたが、この拮抗作用の分子機構は未解明の部分が多く残されていた。これに関して本研究により、1) *CRL5* 遺伝子はオーキシンシグナル伝達を制御する *ARF* の標的遺伝子であることが、ゲルシフトアッセイ等により示唆された、2) *CRL5* 過剰発現体では野生型に比べサイトカイニンの根形成阻害作用の影響を受けにくい、3) 実際にサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する *OsRR1* 遺伝子等の発現量が過剰発現体では増加し、逆に *crl5* 変異体では減少していた、4) *crl5* 変異体において *OsRR1* 遺伝子を *CRL5* プロモーター制御下で発現させた形質転換体 (*ProCRL5:OsRR1/crl5*) では、有意な冠根数の増加が観察された、および 5) サイトカイニンの不活性化に関与する *cytokinin-O-glucosyltransferase* をコードする遺伝子の上流配列と *CRL5* タンパク質が *in vitro* で直接相互作用することが明らかとなった。以上より、オーキシンにより誘導を受けた *CRL5* 遺伝子はサイトカイニンシグナル伝達を負に制御することを通して冠根の発生を促進すると考えられ、本遺伝子は両ホルモン間の拮抗作用の制御に関して中心的な役割を担うものと推定された。加えて、この *CRL5* 遺伝子の過剰発現個体では顕著に冠根数が増加することが判明し、根系形態の人為的改良を目指す上での *CRL5* 遺伝子やその下流因子であるサイトカイニン関連遺伝子群の有用性が強く示唆された。

第 1 章

緒論

緒論

植物の根は養水分の吸収や植物体の支持など、植物の生育に必須な役割を担う重要な器官である。しかし地上部とは異なり根は地中からサンプリングして初めて解析が可能となると同時に、その解析や生育環境の設定にも膨大な労力と時間を必要とするため、根系形質に関わる遺伝情報は地上部諸形質に比べて圧倒的に少なく断片的であった。そのような中、近年では双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナを材料に根の発生のメカニズムが少しずつ明らかになってきた (Fukaki *et al.*, 2007; Overvoorde *et al.*, 2010)。シロイヌナズナは、主根とそこから発生した側根による主根型根系を形成する。根の発生はオーキシンにより正に、またサイトカイニンにより負に制御されることが古くから報告されてきた。実際に、シロイヌナズナにオーキシンを外生投与すると側根数が増加し (Schiefelbein, 2003)、オーキシン生合成に関与する *YUCCA* 遺伝子の過剰発現によっても側根数が増加する (Zhao *et al.*, 2001)。一方、シロイヌナズナにおいてサイトカイニンを外生投与すると側根の発生が阻害され (Laplaze *et al.*, 2007)、サイトカイニンの分解に関与する遺伝子を過剰発現させた形質転換体では側根の発生が増加することが報告されている (Werner *et al.*, 2001)。

シロイヌナズナに続き、2004年12月にはイネの全ゲノム配列が解読され、単子葉類のモデル植物として精力的に研究が進められている。イネの根には種子根、冠根 (不定根) および側根の区別がある (図 1-1)。胚発生の過程で幼根 (種子根) が形成され、種子根に引き続いて基部茎葉節から冠根が形成される。イネは地上部の基部茎葉節から順次発生する数多くの冠根が特徴的なひげ根型根系を形成し (図 1-2A)、1株当たりの冠根数は通常 500 ~ 1000 本にも達する (Klepper, 1992)。冠根は茎葉の発育に伴い、下位節から順次上位節へ次々と発生する (図 1-2B)。野生型のイネにおいて、冠根原基は維管束を取り囲むように一周する辺周部維管束環の外側に接する柔細胞から発生し、小維管束と葉から入ってきた大維管束との間に形成される (図 1-2C, 2D)。そして種子根や冠根からは、無数の細かい根である側根

が形成される。

シロイヌナズナの側根形成とイネの冠根および側根形成には共通する点が数多く存在しており、その遺伝制御機構においても類似性が指摘されてきた (Fukaki *et al.*, 2007)。シロイヌナズナの場合と同様に、イネにおいてもオーキシン処理によって側根と冠根の発生数が増加し (Inukai *et al.*, 2005)、また *OsYUCCA1* 過剰発現体では冠根および側根の発生が著しく増加する (Yamamoto *et al.*, 2007)。イネにサイトカイニン进行处理することで、冠根数および側根数は著しく減少する (Kitomi *et al.*, 2011a)。これまでに、イネの根系形成の分子機構を明らかにするために根の発生異常を示す変異体が作出・選抜され、その原因遺伝子の単離と機能解析が行われてきた。その中でも冠根数が著しく減少する突然変異体 *crown rootless1* (*cr1*) の原因遺伝子を単離したところ、*CRL1/ADVENTITIOUS ROOTLESS1 (ARL1)* 遺伝子は *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* ドメインタンパク質をコードすることが明らかになった (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)。シロイヌナズナの *LOB* 遺伝子は新しい器官が作られる部位で特異的に働く遺伝子であるため、植物特有であることが報告されている (Iwakawa *et al.*, 2002; Shuai *et al.*, 2002)。イネにおいて冠根は発芽後に分化する器官であり、この結果に一致する。シロイヌナズナにおいても、*AS2/LOB* ドメインタンパク質をコードする遺伝子が側根形成に関与していることが報告された (Okushima *et al.*, 2007)。

ところで、イネは世界三大穀物の一つであり、世界人口の約半数の主食ないし常食となっている (久馬, 2002)。これまでのイネの多収化を目指した品種改良は、草丈を低くし倒れにくくすることで成功を収めてきた。しかしさらなる多収を目指す上では、この草丈の低さが律則要因となり登熟歩合の低下が生じることが判明し、現在は長稈で大きな葉身を有しバイオマス生産を増加させることで多収化が進められている (Peng and Khush, 2003)。一方、単純に地上部のみを大きくすれば多収が実現するというわけではなく、水が十分にあり水田においてさえ従来の品種では晴れた日の日中に根からの吸水が蒸散に追いつかず、水ストレスが生じることにより光合成速度が低下する。意外なことに水の流れの抵抗値は

葉や莖に比べ根で最も高く、またその値は根の老化により著しく上昇する (Miyamoto *et al.*, 2001)。したがってさらなる多収化を目指す上では、従来品種より若く健全な根の発生量を増やすことが不可欠である。実際に近年育成された多収性品種は従来品種に比べ地上部に対する根の割合が高く、それに応じて吸水力が高くなるために日中の光合成速度を高く維持することができる結果、乾物生産量が多くなると報告されている (Soejima *et al.*, 1995; 蔣ら, 1998)。このことから、収量を上げるためには地上部を大きくするとともに冠根および側根も多くすることが必要であると考えられる (図 1-3)。それに関して、*crl1* 変異体では地上部形質に異常は認められず、野生型と同様に生育・結実することができたため、*CRL1/ARL1* 遺伝子は根特異的に機能する育種上非常に有用な遺伝子であると考えられた (Inukai *et al.*, 2005)。しかし、*CRL1/ARL1* 遺伝子の過剰発現体では根の発生数の増加が認められなかった (Inukai *et al.*, 2005)。また、*OsYUCCAI* 遺伝子の過剰発現により冠根および側根の発生は著しく増加するが、オーキシンは植物にとって必須の植物ホルモンであり根以外の様々な器官形成に大きな影響を与えるため (Yamamoto *et al.*, 2007)、オーキシン生合成に関与する *OsYUCCAI* 遺伝子を直接育種に利用することも困難である。したがって、冠根および側根の発生量を増加させるという育種方針の下では、これを可能にする有用遺伝子の探索が必要不可欠である。

一方、灌漑施設が整っておらず水ストレスが問題となっている栽培環境下では、根を発達させすぎるとかえって収量を減少させてしまう恐れがある。稲作が盛んに行われているアジアの水田の約半分は雨水のみに水分供給を依存する天水田であり、天水田においては旱魃と洪水が交互に繰り返されている。このような水ストレス条件下におけるイネの収量は、灌漑水田での収量の約半分程度に減少してしまう (Hoshikawa and Kobayashi, 2003)。Niones *et al.* (2012) は土壌の水分含量が変動する栽培条件下における、イネの地上部乾物重と地下部乾物重および総根長の関係を詳細に解析し報告している。地下部乾物重を増加させる QTL を持つ系統と側根数を増加させる QTL を持つ系統とを比較した結果、地下部乾物重を増加させる QTL を持つ系統は側根数を増加させる QTL を持つ系統に比べて地上部乾物

重が減少した。この両系統間では地下部乾物重には有意な差が認められたものの、総根長に有意な差は認められなかったため、地下部乾物重の増加に寄与しているのは冠根であると考えられる。これより、冠根を増加させるよりも側根を増加させるほうが、土壌の水分含量が変動する栽培条件下においてはより多くの収量を得られることが判明した。さらに、両方の QTL を持つ系統と側根数を増加させる QTL のみを持つ系統を比較してみると、側根数を増加させる QTL のみを持つ系統の地下部乾物重および総根長は両方の QTL を持つ系統の 60% 程度であるにも関わらず、両者の間で地上部乾物重に有意な差は認められなかった。したがって、土壌水分変動ストレス環境下において安定的な生産を得るためには根系をただ発達させるのではなく、冠根を少なくして地下部への同化産物配分を抑え、その分、水分吸収の大部分を担う側根を増加させたような根系が理想的であると考えられる (図 1-3; Niones *et al.*, 2012)。そのため、側根数のみを増加させたような根系形態が理想とされる育種方針の下では、冠根形成と側根形成それぞれに特異的な制御機構について明らかにすることが求められる。

イネは冠根が特徴的なひげ根型根系を形成し、また生育初期に形成された種子根や冠根は比較的早く老化する傾向にある (森田, 2000)。これは主根とそこから発生した側根が主根型根系を形成し、発育に伴う不定根形成が限られているシロイヌナズナとは異なる特徴である。加えてイネは水生植物であり、陸生植物であるシロイヌナズナとは生育環境の違いも存在する。双子葉植物のモデルであるシロイヌナズナと単子葉植物のモデルであるイネではこのような形態的・生理的特徴以外に遺伝制御機構においても異なる点が多く存在すると予想される。したがってシロイヌナズナで蓄積されてきた情報の全てをそのままイネに当てはめることは不可能であり、イネの改良のためにはイネ独自の情報を蓄積する必要があると考えられる。また、シロイヌナズナは遺伝子の機能重複が多く、側根形成においても AS2/LOB ドメインタンパク質をコードする 2 つの遺伝子が揃って機能しなくなることによって初めて異常表現型が現れる (Okushima *et al.*, 2007)。ところがイネでは同じく *CRL1/ARL1* 遺伝子のみが機能を欠損するだけで冠根形成が抑制されるため (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*,

2005)、根系形成機構の解析を進める上でもイネは非常に有用な研究素材であると考えられる。

そこで本研究では、それぞれ特徴や機能の異なるイネの冠根と側根の両者あるいはいずれかの根の数が著しく減少した 3 つの変異体を材料として用い、冠根形成と側根形成の遺伝制御機構の共通性および相違性を明らかにすることを試みた (図 1-4)。まず第 2 章では冠根と側根で共通の制御機構を明らかにするため、冠根数および側根数が減少する *cr14* 変異体の原因遺伝子の単離とその機能解析を行った (Kitomi *et al.*, 2008a)。次に第 3 章では側根特異的な制御機構を明らかにするため、側根数のみが減少する T1-34-6 変異体の原因遺伝子の単離とその機能解析を行った。また側根形成に関与するとされる遺伝子群より、側根形成にのみ特化した遺伝子の同定も試みた (Kitomi *et al.*, submitted)。第 4 章では冠根特異的な制御機構を明らかにするため、冠根数のみが減少する *cr15* 変異体の原因遺伝子の単離とその機能解析を行った (Kitomi *et al.*, 2011a)。さらに第 5 章では *CRL5* 遺伝子を介した植物ホルモンの相互作用機構の解析に加え、その過剰発現により根の増加を可能にすることが判明した *CRL5* 遺伝子の標的因子群の同定を試みた (Kitomi *et al.*, 2011a, in preparation)。以上の結果を踏まえ、第 6 章において本研究より明らかになったイネの根系形成を制御する分子機構と、これら根の発生を制御する遺伝子の育種利用性について考察した。

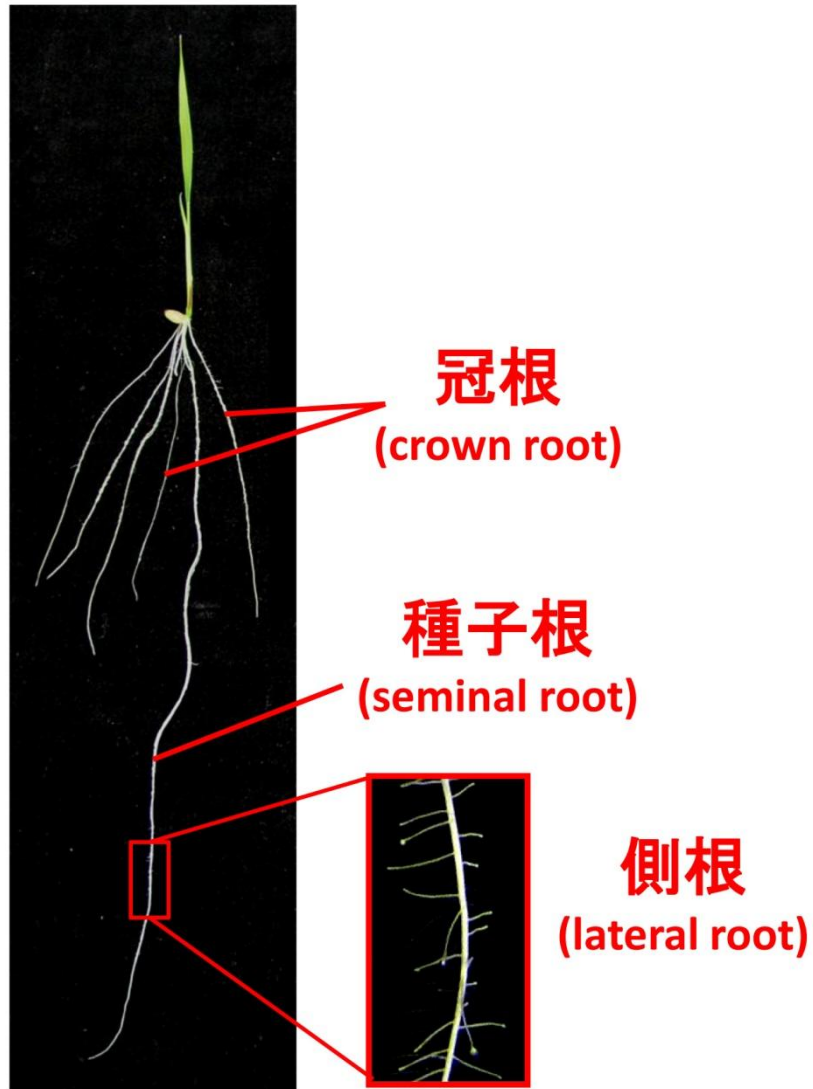


図 1-1. イネの根系

冠根：胚発生後に基部茎葉節から発生する根（ひげ根）。

種子根：胚発生時に形成される根。

側根：冠根や種子根から発生する根。

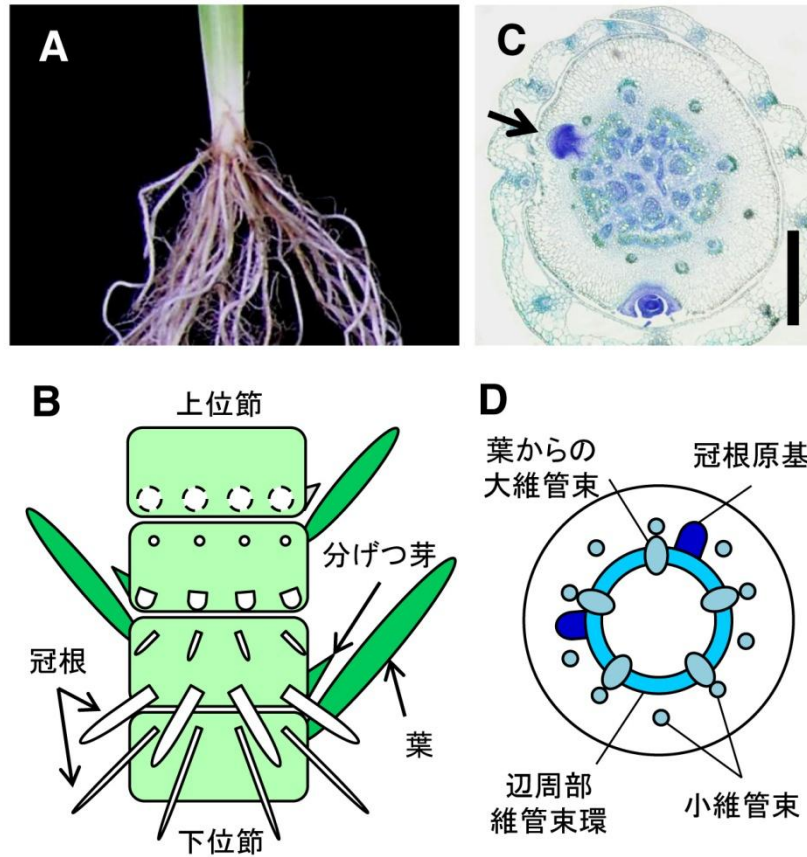


図 1-2. イネに特徴的な冠根の発生様式

A: 1 か月齢の野生型における冠根の様子。

B: イネの基部茎葉節の模式図。節は葉に覆われているため、外側からは見えない。

C: 基部茎葉節の冠根原基形成部位における横断切片。矢印は冠根原基を示す。

(Bar = 500 μ m)

D: 基部茎葉節の冠根原基形成部位における横断切片の模式図。

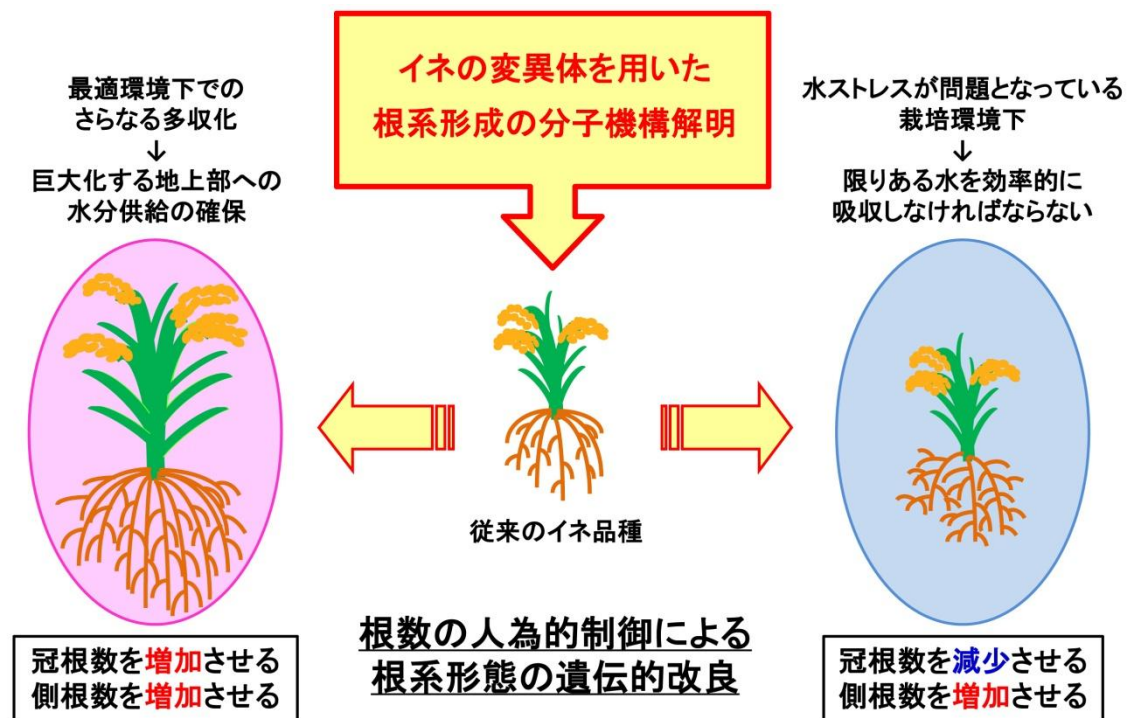


図 1-3. 本研究で目指すイネ根系の育種目標

最適環境下においてさらなる多収を目指すためには、地上部を大きくするとともに、冠根および側根も増加させることが必要であると考えられる。

一方、灌漑施設が整っておらず水ストレスが問題となっている栽培環境下では、水分吸収の大部分を担う側根を増加させて冠根数は減少させることで、安定的な生産が可能になると考えられる。

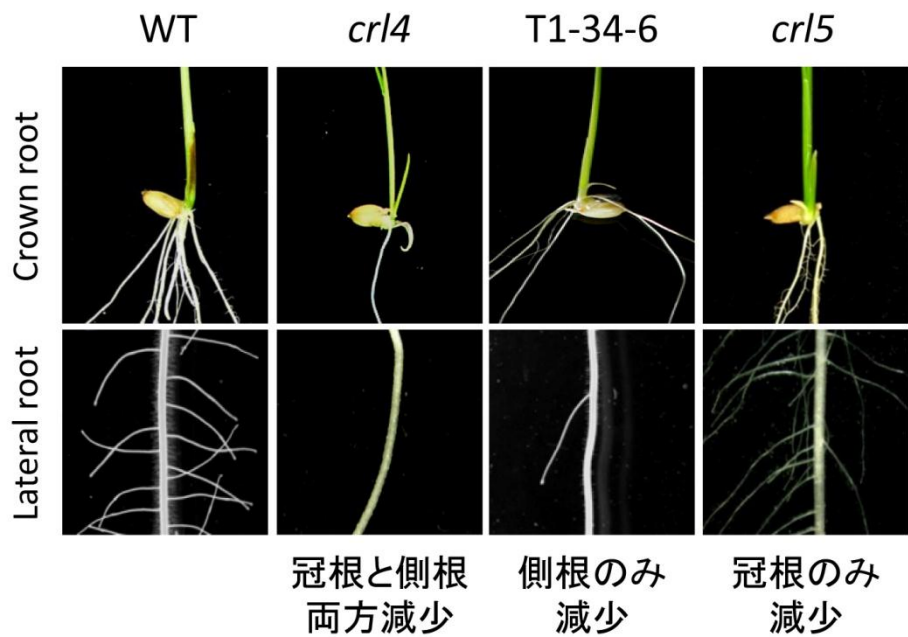


図 1-4. 根の数が著しく減少する突然変異体

crl4 変異体は冠根数および側根数の両方が著しく減少する。

T1-34-6 変異体は側根数のみが著しく減少し、冠根数は減少しない。

crl5 変異体は冠根数のみが著しく減少し、側根数は減少しない。

第 2 章

冠根および側根の **initiation** を 制御する *CRL4* 遺伝子の 単離と機能解析

緒言

植物ホルモンであるオーキシンは植物体内で多種多様な役割を担っており、サイトカニンと並んで植物の生存に必須な化学物質である。根の発生はオーキシンによって制御されていることが古くから知られており、実際にオーキシンを外生投与することでイネにおいても側根や冠根の発生数が増加することが報告されている (Schiefelbein, 2003)。高等植物の主要な内生オーキシンは indole-3-acetic acid (IAA) であり、その IAA の生合成には 4 つの tryptophan (Trp) 依存経路 (indole-3-acetamide (IAM) 経路、indole-3-acetaldoxime (IAQx) 経路、tryptamine (TAM) 経路、indole-3-pyruvic acid (IPA) 経路) と 1 つの Trp 非依存経路が推定されている (Sugawara *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 1991)。しかし、オーキシンは植物の生存に必須であるために欠損変異体を得るのが困難であること、植物にごく微量に存在する IAA 生合成中間物質は化学的に不安定なために分析することが難しかったことが原因となり、IAA 生合成経路の全容は現在においても不確定な点が多く存在している。その中で、TAM 経路の律側因子であり、TAM から *N*-hydroxytryptamine (NHT) への転換を触媒する酵素である flavin monooxygenase をコードしていると考えられていた *YUCCA* 遺伝子については、変異体を用いた詳細な解析が行われてきた (Cheng *et al.*, 2006; Tobeña-Santamaria *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2001)。ところが近年、*YUCCA* は IPA 経路において IPA から IAA への転換を触媒する酵素であることが証明された (Mashiguchi *et al.*, 2011)。イネにおいては、*OsYUCCA1* 遺伝子の過剰発現により冠根および側根の発生が著しく増加することが報告されている (Yamamoto *et al.*, 2007)。また、シロイヌナズナにおいて Trp から IAOx への転換を触媒する酵素として、cytochrome P450 monooxygenase である CYP79B2 と CYP79B3 も報告されている (Zhao *et al.*, 2002)。この CYP79B の関与する IAQx 経路はアブラナ科植物固有の IAA 生合成経路であることが示されている (Sugawara *et al.*, 2009)。

IAA は茎頂分裂組織や若い葉などで合成され、植物体の主に基部側へと輸送されていく

(Ljung *et al.*, 2001)。オーキシンは方向性をもって能動的に輸送されることが知られており、その極性は AUXIN RESISTANT1 (AUX1)/LIKE AUX1 (LAX) タンパク質によるオーキシンの取り込み段階ではなく、細胞内において主に細胞膜に局在する PIN-FORMED (PIN) タンパク質および MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)/P-GLYCOPROTEIN (PGP) タンパク質による排出段階において制御されている (Bennett *et al.*, 1996; Gälweiler *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1991; Santelia *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2008; Titapiwatanakun *et al.*, 2009)。その結果として形成されるオーキシンの濃度勾配は重力など環境に対する応答や胚発生および器官発生などに欠かせない要因であり、根の発生および成長にもこのオーキシン濃度勾配が重要であることがシロイヌナズナを用いた研究により報告されている (Blilou *et al.*, 2005; Friml *et al.*, 2003; Grieneisen *et al.*, 2007)。実際に、シロイヌナズナにおいてオーキシン極性輸送阻害剤を処理した植物体や PIN タンパク質をコードする遺伝子に変異が生じた突然変異体では、側根の発生が抑制されることが報告されている (Mravec *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 1998)。イネにおいてオーキシン極性輸送機能の異常を持つ突然変異体は報告されていないが、オーキシン輸送阻害剤処理により側根および冠根の発生が抑制されるため、イネの根の形成においてもオーキシン極性輸送が重要な役割を果たしていることが示唆されていた (Morita and Kyojuka, 2007)。

本章で取り上げる *cr14* 変異体は、イネ品種・日本晴の培養変異に由来する単因子劣性の突然変異体である。この *cr14* 変異体は、冠根数および側根数が著しく減少するという表現型を示す。また *cr14* 変異体は重力屈性の異常も示したため、本変異体はオーキシン関連の突然変異体であると考えられた。*cr14* 変異体の原因遺伝子 *CRL4* はエンドソームと細胞膜との間の小胞輸送に関わる GTP 結合性タンパク質の 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、オーキシン極性輸送の制御に関わっていると考えられた。実際に *cr14* 変異体においてはオーキシン極性輸送能が低下し、組織レベルでのオーキシン局在パターンが乱れていた。これらの結果より、*CRL4* 遺伝子を介したオーキシン極性輸送による正常なオーキシンの集積と濃度勾配の維持が、冠根およ

び側根の **initiation** には必須であることが明らかとなった。

材料および方法

植物体の育成

crl4 変異体は栄養生長期から生殖生長期へと生育段階を移行させることができないため、*crl4* 遺伝子座がホモ型となっている種子を得るために *crl4* 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、野生型には *crl4* 遺伝子座の遺伝子型が野生型ホモ型とヘテロ型が 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 *crl4* 変異体とインド型品種 Kasalath との交雑 F₂ 集団は、*crl4* 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。

種子はベンレート T-400 倍液に 24 時間浸漬させて種子を消毒した後、水道水に替えて 48 時間浸漬し催芽させた。これらの種子を実験に応じて恒温室 (28.0°C, 連続光) で水道水を満たした水耕槽、あるいはグロースチャンバー (29.5°C, 連続光) で栄養源を含まない寒天培地 (0.6% agar) にて生育させた。水耕で育てる場合、播種 3 日目からエアーポンプによりエアレーションを行った。

パラフィン包埋試料作製

観察対象とする器官をカミソリで切断し、すぐに 20 ml 容スクリー管に入れた FAA 固定液 (formaldehyde : acetic acid : 50% EtOH = 1 : 1 : 18) に浸した。次にバキュームポンプを用いて脱気し、FAA を組織内に完全に浸透させた状態で 4°C にて保存した。翌日サンプルを脱水させるため、FAA とサンプルの入ったボトルを振盪させながら中の溶液を 1 時間ごとに 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 95% EtOH の順に入れ替え、100% EtOH に 2 回入れ替えた後に新しい 100% EtOH を入れて 4°C にて一晩置いた。翌日新しい 100% EtOH に入れ替えて振盪させながら 1 時間置き、次に EtOH : Histo-Clear = 3 : 1, EtOH : Histo-Clear = 1 : 1, EtOH : Histo-Clear = 1 : 3 の順に液を 1 時間ごとに入れ替えた。100% Histo-Clear を 1 時

間ごとに3回入れ替えた後、スクリー管に2/3量の新しいHisto-Clearを入れ、Paraplast (Oxford Labware) を液面が容器一杯になるまで入れて一晩振盪させながら放置した。60°Cのオーブンに移してParaplastを完全に溶かした後に液を半分捨て、再びParaplastを液面が容器一杯になるまで入れて60°Cのオーブン内で6時間放置した。これを2回繰り返した後、液を全て捨ててサンプルが十分浸かる量の60°Cで溶解した100% Paraplastを注ぎ入れ、60°Cのオーブンで一晩放置した。さらに12時間ごとに6回、新しい100% Paraplastに交換した。

溶解したParaplastをアルミシャーレ(テラオカ)に、同様にParaplastを溶解させた試料を熱したピンセットでアルミシャーレに移した。これを室温で一晩放置し、十分固化させた。マイクローム装着用の木片にサンプルを貼り付けて周囲の余分なパラフィンをトリミングし、回転式マイクローム(RM2135, Leica)で厚さ8 µmに切削した。得られたパラフィンはMilliQ水を滴下したAPSコート付きスライドグラス(MATSUNAMI)上に載せ、40°Cのホットプレート上でパラフィンを伸展させた後にスライドグラスを傾斜させて水を除去し、ホットプレート上で一晩放置して乾燥させてスライドグラスに固定させた。

トルイジンブルー組織染色

スライドグラス上のサンプルからパラフィンを除去するためにスライドグラスをラックに入れ、100% Histo-Clearに2回、Histo-Clear : EtOH = 1 : 1に1回それぞれ10分ずつ浸した後、EtOHシリーズ(100%, 90%, 70%, 50%, 30%)に30秒ずつ浸した。サンプルが載ったスライドグラスをトルイジンブルー溶液に1分間浸して染色した後、流水で約20分間洗浄した。その後EtOHシリーズ(30%, 50%, 70%, 90%, 100% ×2回)に一定時間脱水し、EtOH : Xylene = 1 : 1, Xyleneにそれぞれ3分浸してキシレンに置換した。

ドラフト内でXyleneが乾かないうちに手早くEUKITTに封入し、一晩放置して十分に乾かした後、光学顕微鏡(BX60, OLYMPUS)で観察した。

重力屈性テスト

種子を消毒・催芽させた後、栄養源を含まない寒天培地 (1.3% agar) に播種し、人工気象室内にて7日間生育させた。野生型を数本と全ての *crl4* 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。

外生オーキシシン処理

種子を消毒・催芽させた後、試験管に入れた 2,4-D 濃度を 0 M、0.001 μ M および 0.1 μ M の3段階にふった栄養源を含まない寒天培地 (0.8% agar) に播種し、グロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) で生育させた。播種から6日間種子根の根端をマークし、14日後に冠根数および側根数を測定した。側根数は基部から 5 cm の範囲に存在するものを実体顕微鏡 (M3516 NSW-60L, Carton) を用いてカウントした。

マップベースクローニング法による遺伝子単離

(1) TPS 法による DNA 抽出

crl4 遺伝子座がヘテロ型の親とインド型品種 Kasalath とを交雑して得た F₂ 種子を 1-1 と同様に消毒・催芽させた後、恒温室内で水道水を満たした水耕層にて生育させた。播種後14日目に冠根を形成しない表現型を示す *crl4* ホモ型をサンプリングし、地上部を 2 ml サンプルチューブに入れて TPS buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M KCl, 10 mM EDTA) を 200 μ l 加え、MULTI-BEADS SHOCKER (YASUI KIKAI) を用いてサンプルを破砕した (1600 rpm, 20 秒, 室温)。70°C で 35 分間インキュベートした後、1500 rpm で 10 分間遠心した。破砕物を取らないようにして上清を 1.5 ml チューブに移し、200 μ l の isopropanol を加えてピペティングした。1500 rpm で 10 分間遠心した後、ペレットを 70% EtOH で洗浄し 3 分間減圧乾燥させて 100 μ l の 1/10 TE に溶解させた。

(2) 分子マーカーの設定

まず *CRL4* 遺伝子の染色体上での大まかな座乗位置を特定するため、イネゲノム解析研究によって既に公開されている RFLP マーカーを元に作製された STS マーカーと CAPS マーカーを用いて *CRL4* 遺伝子との連鎖解析を行った。次にこれらの分子マーカーによって狭められた領域である第 3 染色体長腕側に新規 CAPS マーカーを作製するため、Rice Genome Research Program の日本晴の各 PAC/BAC クローンシーケンスデータ (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/irgsp-status.cgi>) より第 3 染色体上の目的位置の塩基配列を取得し、この塩基配列に対応する Kasalath の塩基配列を同データベース内の Kasalath BAC-end BLAST (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>) より取得した。そして得られた日本晴と Kasalath の配列を比較し、配列が異なる箇所を認識する制限酵素が存在する部分を含む断片が増幅されるようにプライマーの設計を行った。

作製した CAPS マーカーが正確に機能することを確認するために日本晴と *cri4* 変異体から TPS 法によって抽出した全 DNA を鋳型 DNA として PCR を行い、各 CAPS マーカー用の制限酵素で処理を行ってから 2% agarose gel (Agarose LO₃, TAKARA) で電気泳動し、日本晴と Kasalath 間でバンドサイズの違いが予想通り認められたものを遺伝子型の検定に用いた。使用した分子マーカーのプライマー配列は別紙のリストを参照。

(3) PCR 反応

TPS 法で得られた DNA 溶解液を鋳型 DNA として PCR 反応を行った。PCR 反応は 10 μ l 系 (1 μ l 鋳型 DNA, 1 \times Ex Taq buffer, 0.25 mM dNTP mix, 1 μ M Upper primer, 1 μ M Lower primer, 2 μ l 50% glycerol, 0.25 U Ex Taq DNA polymerase (TAKARA)) で行った。反応は GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用い、95°C 1 分の変性後に 95°C 30 秒・55°C 30 秒・72°C 30 秒の 3 ステップを 35 サイクル行って 72°C 7 分の伸長反応の後 10°C で保存した。

(4) 制限酵素処理

PCR 反応液 10 μ l に 2 μ l 10 \times buffer, 0.1 μ l 制限酵素, 8 μ l MilliQ 水を加えて total 20 μ l とし、37°C で約 3 時間インキュベートした。

(5) 電気泳動およびバンド観察

制限酵素処理液に 2 μ l 10 \times loading buffer を加え、agarose gel (30 μ g/l EtBr, 1 \times TAE buffer, 2% Agarose LO₃) で電気泳動を 200 V で 30 分間行った。バッファーには 1 \times TAE buffer を用いた。結果は FAS-III (TOYOBO) で記録した。

(6) ゲル除去による DNA 抽出

電気泳動を行った後、結果を Transilluminator (DR-45M2, Clare Chemical Research) でバンドを投影し、目的のサイズの DNA 断片をカミソリで切り出した。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用い、切り出したゲル片から DNA を抽出した。

(7) シーケンス反応

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver 3.1 (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応 (1 μ l DNA 断片, 4 μ l 1/4 Big Dye Terminator, 0.5 μ l primer (3.2 pmol/ μ l), 4 μ l 滅菌水) を行った。反応は GeneAmp PCR System 9700 を用い、96°C 10 秒・50°C 5 秒・60°C 4 分の 3 ステップを 25 サイクル行った後 4°C で保存した。反応後の溶液を 1.5 ml チューブに移し、等量の isopropanol を加えてピペッティングした。15000 rpm で 10 分間遠心した後上清を捨て、沈殿を -20°C 保存の 70% EtOH で洗浄し再度 15000 rpm で 3 分間遠心した。上清を捨てて沈殿を 5 分間風乾させ、15 μ l Hi-Di formamid (Applied Biosystems) に溶解した。ボルテックスミキサーで攪拌後 PCR 用 96 穴プレートに移して 95°C で 2 分間インキュベートし、すばやく氷上に置いて急冷した後シーケンサー (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。

コンストラクトの作製

相補性検定用コンストラクトは、*CRL4* 遺伝子の転写開始点より上流 4359 bp と終止コドンより 1314 bp を含む約 9.2 kbp のゲノム DNA 断片を 3 段階に分けて、まず pBluescript II SK (-) (Stratagene, Agilent) にクローニングした。3 分割したうちの中央部の配列は BAC clone OsJNBa0056E06 より *XhoI* および *SmaI* で切りだし、残りは野生型のゲノム DNA を鋳型にして PCR により増幅 (2 µl template cDNA, 1× Prime STAR buffer (TAKARA), 0.2 mM dNTP mix, 0.2 µM Upper primer, 0.2 µM Lower primer, 5% DMSO, 0.75 U Prime STAR HS DNA polymerase (TAKARA)) して作製した。このプラスミドから目的の配列を *KpnI* および *NotI* で切り出して末端を平滑化し、pCAMBIA 1300 vector (Cambia) に再度クローニングすることで作成した。コンストラクトの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

ProDR5:GUS コンストラクトは、Scarpella *et al.* (2003) と同じものを使用した。

形質転換の作製

イネの形質転換は Hiei *et al.* (1994) および Ozawa (2009) の方法に従って行った。ただし、遺伝子導入の材料となるカルスは次のように準備した。種子の籾を取り除いて MilliQ 水で 3 回洗浄後、70%エタノールで 1 分滅菌した。次に種子を MilliQ 水で 3 回以上すすぎ、3 倍希釈した次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン) に入れて 20 分間振盪しながら滅菌した。そしてクリーンベンチ内でアンチホルミンを捨てて滅菌水で 5 回以上洗浄し、滅菌した種子を N6D 固形培地に植えてグロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) でカルスを誘導した。約 2 週間後にカルスの一部を採取して TPS 法により DNA を抽出し、*crl4* の遺伝子型を確認できる dCAPS マーカーを用いた PCR 反応で genotyping を行い、*crl4* 遺伝座が野生型ホモ型あるいは *crl4* 変異体ホモ型となっているカルスを選抜した。使用した dCAPS マーカーの配列は別紙のリストを参照。

作成したコンストラクトをエレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 に導入し、カルスと共存培養させ遺伝子を導入した。形質転換個体は 50 mg/L

hygromycin を含む MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上で選抜した。

系統樹の作製

CRL4 タンパクの全アミノ酸配列を用いてイネのアノテーションデータベースに対して BLAST 検索を行い、CRL4 のホモログ遺伝子 *CRL4-like* の全アミノ酸配列を入手した。またシロイヌナズナの *GNOM* およびそのホモログである *GNOM-like1*、および *GNOM-like2*、ヒトの *GBF1* の全アミノ酸配列も併せて入手し、合計 4 つの全アミノ酸配列を用いて ClustalW により系統樹を作製した。

オーキシン極性輸送能の測定

ラジオアイソトープでラベルした 40 μM 3-[5(n)- ^3H] Indolylacetic acid (^3H -IAA, Amersham) をドライアップしてエタノールを飛ばし、 ^3H -IAA 1 μl あたり 40 g の Vaseline (Wako) に混ぜて 1 μM (740 Bq/ μl) に調整したペーストを以下の実験に用いた。

(1) オーキシン輸送能測定

まず、1 μM ^3H -IAA を含むペーストを爪楊枝で 1.5 ml チューブの底に塗り付けた。地上部の輸送能測定には、10 ~ 12 日齢の植物の基部 3 mm より上方 1.5 cm の葉鞘を、頂部側を下にして切り口がペーストに当たるように 1.5 ml チューブ入れた。種子根における輸送能測定には、種子根の根端 1.5 cm を根端あるいは基部側を下にしてペーストに当たるように 1.5 ml チューブ入れた。28°C で 4 時間インキュベートした後、上になっている側から 3 mm をサンプリングし、クリアゾル 5 ml を加えた 7 ml 容のバイアルに 1 個体分ずつ入れた。室温にて一晩インキュベートした後、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) オーキシン蓄積量測定

種子を消毒・催芽し、栄養分を含まない寒天培地 (0.8% agar) にて 5 日間生育させ、これらの地上部を基部から 1 cm を残して切除し、1 μ M [3 H]-IAA を含むペーストを切り口に塗った。28°C で 4 時間インキュベートした後、基部側から 3 mm および種子根全体をサンプリングし、クリアゾル 5 ml を加えた 7 ml 容のバイアルに 1 個体分ずつ入れた。室温にて一晩インキュベートした後、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定した。

半定量的 RT-PCR

(1) RNA 抽出

種子を消毒・催芽し水耕にて 2 週間生育させ、冠根形成部位を含む基部から 1.5 cm の茎葉部をサンプリングし、RNA を抽出した。RNA 抽出には TRIzol を用いた。0.1 g の植物体を液体窒素で凍結させ、乳棒と乳鉢を用いてよくすりつぶし、1.5 ml チューブに入れた 1 ml の TRIzol Reagent (Promega) に加えて室温で 5 分インキュベートした。そこに 200 μ l の chloroform を加えてよく混合し、さらに室温で 2 ~ 3 分インキュベートした。その後 4°C \cdot 15000rpm で 10 分間遠心して上清を採取し、500 μ l の isopropanol を加えて混合した後、室温で 10 分インキュベートした。その後 4°C \cdot 15000 rpm で 10 分間遠心して沈殿を回収し、70% EtOH でリンスした。洗浄後、沈殿を軽く乾燥させて滅菌 100 μ l に溶解し、分光光度計 (Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop) で RNA 濃度を測定した。

(2) cDNA 合成

cDNA 合成には Omniscript RT Kit (QIAGEN) を用いて行った。2 μ g の total RNA を含む溶液と RNase-free water とを合わせて 13 μ l に調整し 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で 2 分間インキュベートした。そこに 10 \times Buffer RT 2 μ l, dNTP mix 2 μ l, RNase inhibitor (HPR I) 1 μ l, Oligo-dT primer 1 μ l, Omniscript Reverse Transcriptase 1 μ l を加えて total 20 μ l とし、37°C で 60 分間インキュベートした。その後、酵素を失活させるために 93°C で 5 分

間インキュベートした。

(3) PCR 反応

植物組織サンプルから得られたRNAより合成されたcDNAを鋳型にして、10 μ l系 (1 μ l 鋳型 DNA, 1 \times Ex Taq buffer, 0.25 mM dNTP mix, 1 μ M Upper primer, 1 μ M Lower primer, 0.25 U Ex Taq DNA polymerase) でPCR反応を行った。cDNA濃度は*ACTIN1* (*ACT1*) のバンドの発光強度をもとに、滅菌水で調整した。反応はGeneAmp PCR system 9700を用い、95 $^{\circ}$ C 5分の変性後に95 $^{\circ}$ C 30秒・55 $^{\circ}$ C 40秒・72 $^{\circ}$ C 30秒の3ステップを*CRL4*は30サイクル、*CRL4-like*は35サイクル、*ACT1*は25サイクル行って72 $^{\circ}$ C 7分の伸長反応の後10 $^{\circ}$ Cで保存した。PCR反応液を2% agarose gelで電気泳動し、バンドパターンを解析した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

in situ hybridization

(1) プローブの作製

野生型の茎葉部から得られたRNAより合成されたcDNAを鋳型にして、30 μ l系のPCRでDNAを増幅 (2 μ l template cDNA, 1 \times Ex Taq buffer, 0.25 mM dNTP mix, 1 μ M M13 Forward Primer, 1 μ M M13 Reverse Primer, 5% DMSO, 0.5 U Ex Taq DNA polymerase) した。次に0.7% agarose gel (30 μ g/L EtBr, 1 \times TAE buffer, 0.7% LO₃)で電気泳動後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いてDNAを回収した。このDNA 1 μ gに滅菌水を加えて11.5 μ lにしたものを60 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートした後、NTP lab. Mix (250 nM Digoxigenin-11-UTP (Roche), 150 nM UTP, 400 nM ATP, 400 nM CTP, 400 nM GTP, 38 mM Tris (pH 7.5)) を2 μ l, RNase inhibitor (HPR I, TAKARA) 0.5 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, 5 \times T7 transcription buffer (Stratagene, Agilent) 4 μ l, T7 RNA Polymerase (Stratagene, Agilent) 1 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。次に0.5 M EDTA (pH 8.0)を1 μ l, 4 M LiCl 2.5 μ l, 100% EtOH 65 μ lを加えてよくタッピングし、-80 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした後、15000 rpm・4 $^{\circ}$ Cで10分遠心分離した。上澄

みを捨てて沈殿に70% EtOHを200 μ l加えて洗浄し、沈殿を乾燥させた後100 μ lの滅菌水に溶かし、RNase inhibitor (HPR I) を0.5 μ l加えて-20°Cで保存した。プローブの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

(2) Hybridization

HybridizationはKouchi and Hata (1993) の方法をもとに以下の順で行った。①パラフィン切片を作成し、スライドグラス上のサンプルからパラフィンを除去するためにスライドグラスをラックに入れ、100% Histoclearに10分ずつ2回、次にHistoclear : EtOH = 1 : 1の溶液に5分浸した。②100% EtOHに5分ずつ2回浸した後、1時間減圧乾燥した。③100% EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOHにそれぞれ2分浸した後、滅菌水に5分ずつ2回浸した。④スライドグラスをproteinase K溶液 (5 μ g/ml proteinase K (Wako) in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA) に37°Cで30分インキュベートした。⑤滅菌水に5分ずつ2回浸した後、後固定液 (4% paraformaldehyde in 0.8 mM NaOH, 10 mM Na-P Buffer) に10分浸した。⑥スライドグラスを滅菌水に5分ずつ2回浸した後、トリエタノール溶液 (0.5% acetic anhydride, 100 mM triethanolamine) に10分浸した。⑦2 \times SSPE (20 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA · 2Na) に5分ずつ2回浸した後、30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOHにそれぞれ2分浸した。⑧スライドグラスを100% EtOHに5分ずつ2回浸した後、1時間減圧乾燥した。⑨スライドグラス1枚あたり200 μ l hybridization mix (50% deionized formamide, 0.1% dextran sulfate (Millipore), 1 \times TE, 300 mM NaCl, 1 \times Denhardt's, 60 mM DTT, 0.5 μ g/ μ l poly A, 5 μ g/ μ l tRNA, 0.2 μ l RNA probe) をのせて、密閉容器内にて55°Cで16時間インキュベートした。⑩55°C に温めた4 \times SSC (600 mM NaCl, 60 mM citric acid) でスライドグラス上のプローブを落とし、さらに4 \times SSCに7分ずつ55°Cで2回浸した。⑪RNase溶液 (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mg RNaseA) に37°Cで30分インキュベートした。⑫RNase Buffer Buffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA) に5分ずつ3回浸してスライドグラスを洗った。⑬Buffer 1 (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) に5分ずつ室温で2回浸

した後、スライドガラス1枚あたり500 μ lのブロッキング溶液 (0.5% Blocking Reagent in Buffer 1) をのせて、室温で30分インキュベートした。⑭Buffer 1でブロッキング溶液を洗い流した後、スライドガラス1枚あたり500 μ l Anti-Dig-AP (1 : 500 in 0.1% BSA, 0.2% Tween20 in Buffer 1) をのせて室温で60分インキュベートした。⑮スライドガラスをBuffer 1で10分ずつ振盪させながら3回スライドガラスを洗い、さらにBuffer 3 (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) に5分浸した。⑯スライドガラス1枚あたり800 μ lの発色液 (NBT (75 mg/ml in 70% DMF) : BCIP (50 mg/ml in DMF) : Buffer 3 = 9 : 7 : 2000) をのせ、密閉容器内に室温で3時間から一晩インキュベートした。⑰スライドガラスをTE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に5分浸し、蒸留水に2分、30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOH にそれぞれ1分浸した。次に100% EtOHに2分ずつ2回浸し、EtOH : xylene = 1 : 1, 100% xylene に2分浸した。⑱ドラフト内でxyleneが乾かないうちに手早くEUKITTに封入し、一晩放置して十分に乾かした後、光学顕微鏡 (BX60, OLYMPUS) で観察した。

***ProDR5:GUS* 形質転換体の観察**

作製した *ProDR5:GUS* 形質転換体を GUS 染色液 (1 mM X-Gluc, 50 mM Na-P buffer (pH 7.0), 7% MeOH, 0.1% TritonX-100) に浸漬後、バキュームポンプを用いて脱気し GUS 染色液を組織内に完全に浸透させ、37°C の暗黒条件下で 16 時間インキュベートした。反応は植物体を EtOH に浸漬させることで停止させ、同時に植物体から葉緑素を抜いて脱色した。

GUS 発現部位をそのままあるいは 5% agar に包埋後してビブラトーム (VT1200S, Leica) で 100 μ m に切削し、実体顕微鏡 (SZX16, Olympus) で観察した。

Primer list

・ 遺伝子単離

Primer name	Sequence
E50828_U	5'-GGGGTACCTGTGCTAATCTC-3'
E50828_L	5'-TCACACAAGATCCTGGAATG-3'

C63279_U	5'-TCAAGTCCATCCAGATCACC-3'
C63279_L	5'-TGAGACAACAGGTTTTACCG-3'

C53358_U	5'-GGAGGAATGAATGAATGAAG-3'
C53358_L	5'-GCAGTATTCATACATAGGAG-3'

R440 (<i>Hinf</i> I)_U	5'-CTCACCACCATCACCTCCTC-3'
R440 (<i>Hinf</i> I)_L	5'-CCAGCTACAAAAGAACCAGC-3'

B02·E17_F- <i>Afa</i> I_U	5'-TGTGAGCAGTAGGTTTGTGG-3'
B02·E17_F- <i>Afa</i> I_L	5'-GACTTTCCAAACCCTGCATG-3'

M23_F- <i>Afa</i> I_U	5'-GTAGCAACGCGCATGATATC-3'
M23_F- <i>Afa</i> I_L	5'-CACTATGAACACTTCGCCGA-3'

K17·M23_R- <i>Xsp</i> I_U	5'-ATACTACCCAGAGCTACGCT-3'
K17·M23_R- <i>Xsp</i> I_L	5'-CCGGCAACTCATCATCA-3'

N01_R- <i>Hha</i> I_U	5'-GGTGCAATAGAAGGAGTTGC-3'
N01_R- <i>Hha</i> I_L	5'-GACGGTTCTCTAGGAAGTCA-3'

H05_F- <i>Hinf</i> I_U	5'-TGGATGCATATGAGACTGCC-3'
H05_F- <i>Hinf</i> I_L	5'-GGATTGGCAGACCATATGCT-3'

M19_R- <i>Alu</i> I_U	5'-AACTGACCTTGTCTAGACC-3'
M19_R- <i>Alu</i> I_L	5'-GGCTGGAGAGTGCCTGCTAA-3'

C944 (<i>Xba</i> I)_U	5'-GCCAGGGAACCTTCATCTC-3'
C944 (<i>Xba</i> I)_L	5'-AACTTGGGTATCTTTATGCAG-3'

C1401 (<i>Eco</i> RI)_U	5'-TAACAACCGACCACAAATAC-3'
C1401 (<i>Eco</i> RI)_L	5'-GGAGAAGGACAAGGGGAAGA-3'

・相補性検定コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>CRL4 XbaI-XbaI_U</i>	5'-ATGCGCTATGTTAGAGGCAC-3'
<i>CRL4 XbaI-XbaI_L</i>	5'-ACGAATCTGGACAGAAGCCT-3'
<i>CRL4 EcoRI-EcoRI_U</i>	5'-GCTGAAAGGGTCCATAAAAAGTC-3'
<i>CRL4 EcoRI-EcoRI_L</i>	5'-GGAACAATCCATGCTCAAGG-3'

・遺伝子型決定

Primer name	Sequence
<i>crl4 check-R_U</i>	5'-GGTGGATCTTCAATTCGTAAGC-3'
<i>crl4 check-R_L-HinfI</i>	5'-GATAAGTGGGCTCATGGTC-3'

・半定量的 RT-PCR

Primer name	Sequence
<i>CRL4-RT_U</i>	5'-CTGTGGAGCTTGATGAATACAC-3'
<i>CRL4-RT_L</i>	5'-CAAGCTTCTCAGGCAACAAATG-3'
<i>CRL4-like-RT_U</i>	5'-AGACCATGCAGGAGGTTATCCG-3'
<i>CRL4-like-RT_L</i>	5'-ACAACACCAAATCCACCTCCCA-3'
<i>ACT1-RT_U</i>	5'-GACTACATACTCCATCATG-3'
<i>ACT1-RT_L</i>	5'-AGCATTTCCTGTGCACAATGG-3'

・ *in situ* hybridization プローブ作製

Primer name	Sequence
<i>CRL4-in situ_U</i>	5'-GCTGAAAGGGTCCATAAAAAGTC-3'
<i>CRL4-in situ_L</i>	5'-CAAGCTTCTCAGGCAACAAATG-3'

結果

crl4 変異体の表現型解析

2 週齢の野生型 (日本晴) は数本の冠根を発生させているのに対し、同じ 2 週齢の *crl4* 変異体においては冠根が観察されなかった (図 2-1)。そこで冠根形成部位である基部茎葉節の横断切片を作成し観察したところ、野生型においては維管束の周囲を一周するように存在する辺周部維管束環の外側に接する柔細胞において冠根原基が形成されていた (図 2-2A)。それに対して *crl4* 変異体では、冠根原基が形成されていなかった (図 2-2B)。冠根数の減少に加え、*crl4* 変異体では種子根から発生する側根数も有意に減少していた (図 2-2C, 2D)。*crl4* 変異体の種子根長は野生型に比べて有意に短い (表 2-1)、発根のタイミングは野生型とほぼ同時であった (data not shown)。また、*crl4* 変異体は野生型に比べて早い時期に分げつを形成し、その伸長角度は野生型に比べて大きかった (data not shown)。野生型は通常、3~4 カ月ほどで生殖生長期へと生育相を転換させる (図 2-3A)。一方、*crl4* 変異体の大部分は幼苗期に枯死するが、一部の個体は 4 カ月以上生育することができた (図 2-3B)。しかし、その個体は栄養生長期から生殖生長期へと生育相を転換することはできなかった (図 2-3B)。

冠根数および側根数の減少はイネのオーキシン関連突然変異体で観察される異常表現型である (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)。また、イネおよびシロイヌナズナにおいて、重力屈性の異常も典型的なオーキシン関連異常として報告されている (Fukaki *et al.*, 2002; Inukai *et al.*, 2005; Leyzer *et al.*, 1996; Nagpal *et al.*, 2000; Tian and Reed, 1999; Yang *et al.*, 2004)。そこで *crl4* 変異体の重力屈性を調べたところ、野生型では重力方向が変化するとそれに敏感に応答したのに対し、*crl4* 変異体では重力方向の変化に対する応答が鈍くなっていた (図 2-4A)。重力方向を 90° 転換させて 24 時間後の根の伸長角度 (図 2-4B) を測定したところ、野生型ではすべての個体が 50° 以上の屈性を示したのに対し、*crl4* 変異体ではすべての個体において 50° 以下であった (図 2-4C)。また、外生オーキシンを投与しても *crl4* 変異体の冠

根数、側根数および種子根長を野生型並みに回復させることはできなかった (表 2-1)。

CRL4 遺伝子の単離

CRL4 遺伝子を単離するため、*crl4* 変異体のヘテロ個体に Kasalath を交雑して得た F₂ 集団を用いた高精度連鎖解析を行った。その結果、*CRL4* 遺伝子座は第 3 染色体の 101.9 cM 付近に存在することが明らかになった。野生型と *crl4* 変異体とで塩基配列を比較したところ、*crl4* 変異体において BAC クローン OSJNBa0056E06 (AC135792) 上に座乗する Os03g0666100 (LOC_Os03g46330) の配列内に 1 塩基置換が生じており、その結果 120 番目のロイシンがストップとなったナンセンス変異が認められた (図 2-5A)。この遺伝子は 1 つのエキソンからなる 3528bp の ORF を持つ遺伝子であり、プロモーターおよび遺伝子全長配列を含んだ約 9.2 kbp のゲノム DNA 断片 (図 2-5B) を *crl4* 変異体に導入したところ、*crl4* 変異体の異常表現型を相補した (図 2-5C)。

CRL4 遺伝子は Arf-GEF をコードしており、中央部 5'末端側には Arf-GEF に特徴的な Sec7 domain が存在していた (図 2-5A)。シロイヌナズナにおいて最も *CRL4* 遺伝子と相同性の高い遺伝子は *GNOM/EMBRYO DEFECTIVE30 (EMB30)* であった。Arf-GEF はエンドソームと細胞膜との間の小胞輸送に関わる GTP 結合性タンパク質の Arf を活性化させる因子であり、オーキシン排出キャリアーである PIN1 のリサイクルを制御している (Geldner *et al.*, 2003a; Stainmann *et al.*, 1999)。そのため、*gnom* 変異体では Arf-GEF 依存的な PIN1 のリサイクルが異常になるためにオーキシン極性輸送に異常が生じ、胚の頂部-基部軸に沿ったパターン形成が阻害されることが報告されている (Geldner *et al.*, 2003a; Stainmann *et al.*, 1999)。BLAST 検索の結果、イネゲノム中には *CRL4* 遺伝子のホモログ遺伝子 (*CRL4-like*) が 1 つ、第 2 染色体上に存在していることが判明した (Os02g0326600, LOC_Os02g22090)。CRL4 と *CRL4-like* および GNOM は Sec7 domain においてそれぞれ 83%、90% のアミノ酸相同性を有していた (図 2-6A)。また、Sec7 domain のアミノ酸配列を基にヒトの Arf-GEF である GBF1 をアウトグループとして、イネの *CRL4*, *CRL4-like* およびシロイヌナズナの GNOM,

GNOM-like1 (GNL1), GNL2 の分子系統樹を作成した (図 2-6B)。その結果、CRL4 はイネの CRL4-like とよりも、シロイヌナズナの GNOM とより相同性が高いことがわかった (Fig. 3B)。

crl4 変異体ではオーキシン極性輸送能が低下していた

CRL4 遺伝子は、PIN1 タンパク質の局在を制御することによりオーキシン極性輸送に関与するシロイヌナズナの GNOM/EMB30 と相同性の高いタンパク質をコードしていた。また、イネにオーキシン極性輸送阻害剤である NPA を処理すると冠根形成が著しく抑制され、この NPA を処理した野生型の幼苗の表現型は *crl4* 変異体と非常に類似している (Liu *et al.*, 2005; Morita and Kyozuka, 2007)。したがって、*crl4* 変異体における冠根数減少などの異常表現型は、オーキシン極性輸送の異常に起因しているのではないかと考えられた。オーキシンの極性輸送は維管束形成にも関与しており、オーキシンの方向性を持った流れ乱れることにより維管束形成に異常が生じることが知られている (Berlenth and Mattoson, 2000; Geldner *et al.*, 2003b; Koizumi *et al.*, 2000; Sieburth *et al.*, 2006)。*gnom* 変異体の weak allele において、2 枚の子葉が融合し、太くなった維管束が過度に相互連絡するという葉脈パターン異常が報告されている (Koizumi *et al.*, 2000; Sieburth *et al.*, 2006)。そこで野生型および *crl4* 変異体の第 2 葉の葉身中央部の横断切片を作成し観察したところ、大維管束および小維管束のいずれにおいても野生型と *crl4* 変異体で維管束の形態に明らかな差異は見られなかった (図 2-7A, 7B)。また *crl4* 変異体については 4 ヶ月齢の葉身についても横断切片を作製し観察を行ったが、これも野生型との間に明らかな差異は認められなかった (data not shown)。しかし *crl4* 変異体では葉身の幅が減少しており、維管束の数がそれに応じて減少する傾向が認められた (図 2-7A, 7B)。一方、野生型および *crl4* 変異体の種子根横断切片を観察したところ、野生型では細胞壁の厚い後生木部道管が比較的散在しているのに対し、*crl4* 変異体では後生木部道管と考えられる細胞の数が増加しており、それが放射状に並んでいた (図 2-7C, 2D)。

そこで実際に、野生型および *crl4* 変異体におけるオーキシン極性輸送能をラジオアイソ

トープラベルした IAA (^3H -IAA) を用いて測定した。その結果、*crl4* 変異体の地上部におけるオーキシン極性輸送能は野生型の 17%に低下していた (図 2-8A)。また、種子根における求頂的 (基部から根端) および求基的 (根端から基部) 輸送能は、それぞれ野生型の 41%、48%に低下していた (図 2-8A)。加えて、*crl4* 変異体の基部茎葉節および種子根へのオーキシン蓄積量を野生型と比較したところ、それぞれ野生型の 53%、13%に減少していた (図 2-8B)。

CRL4 遺伝子の発現解析およびオーキシン局在解析

半定量的 RT-PCR により *CRL4* 遺伝子の器官別発現解析を行ったところ、*CRL4* 遺伝子は供試したすべての器官 (節、葉身、葉鞘、根) で発現しており、特に葉身と根において比較的高く発現していた (図 2-9)。*CRL4-like* 遺伝子も供試したすべての器官で発現しており、その発現強度のパターンも *CRL4* 遺伝子とほぼ同様であった (図 2-9)。それに加え、*CRL4* 遺伝子の基部茎葉節における発現パターンを *in situ hybridization* 法により解析した。その結果、冠根原基の中心柱および辺周部維管束環の外側に接する柔細胞でシグナルが観察された (図 2-10)。

また、野生型および *crl4* 変異体における *DR5* プロモーターの発現パターンを、*GUS* レポーターを用いて解析した。*DR5* はオーキシシンシグナル応答性の人工プロモーター配列であり、*ProDR5:GUS* は植物体内でのオーキシン局在を可視化するためのマーカー遺伝子として頻繁に用いられている (Sabatini *et al.*, 1999; Scarpella *et al.*, 2003)。野生型において、葉身の先端および中央部、葉鞘、基部茎葉節において *GUS* 染色が観察された (図 2-11A)。一方、*crl4* 変異体では葉身先端部と基部茎葉節において微かに *GUS* 染色が観察された (図 2-11B)。基部茎葉節における *GUS* 染色を詳細に解析するために、基部茎葉節の横断切片を作成して観察した。その結果、野生型では維管束と辺周部維管束環に接する柔細胞において *GUS* 染色が観察され (図 2-11C)、*CRL4* 遺伝子の発現部位と一致していた (図 2-12)。一方、*crl4* 変異体では維管束における *GUS* 染色はほとんど確認されず、*GUS* 染色は柔細胞全体に薄く広

がっていた (図 2-11D)。

考察

本研究の第 2 章では、著しく冠根数および側根数が減少する *crl4* 変異体の原因遺伝子 *CRL4* の単離とその機能解析を行った。

CRL4 遺伝子は Arf-GEF をコードする

変異体とインド型品種カサラスとの交雑自殖次世代 F₂ を用いた高精度連鎖解析により、*CRL4* 遺伝子は Arf-GEF をコードしていることが判明した。同じ遺伝子座に異なる変異を持つ *osgnom1* 変異体においても、*crl4* 変異体と同様の異常表現型が報告されている (Liu *et al.*, 2009)。Arf-GEF は、エンドソームと細胞膜との間の小胞輸送に関わる GTP 結合性タンパク質の Arf を活性化させる因子である (Steinmann *et al.*, 1999)。Arf は小さな GTP 結合性タンパク質であり、分子スイッチとして細胞膜とエンドソームとの間の小胞輸送を制御している。Arf の活性型である Arf-GTP と不活性型である Arf-GDP の交換反応が小胞輸送に必要であり、この小胞輸送によってオーキシンの排出キャリアーである PIN1 タンパク質が連続的にリサイクルされていることがシロイヌナズナを用いた研究により明らかにされている (Geldner *et al.*, 2001)。オーキシンの方向性を持った輸送は植物の発生・分化に必須であり、その極性は PIN タンパク質の細胞内局在パターンによって決められている (Geldner *et al.*, 2003a; Jacobs and Gilbert, 1983; Mayer *et al.*, 1993; Shevell *et al.*, 1994)。したがって、シロイヌナズナの *gnom* 変異体では Arf-GEF 依存的な PIN1 リサイクルが行われなくなるためにオーキシン極性輸送に異常が生じ、植物の発生において最も重要なプロセスの 1 つである胚の頂部-基部軸に沿ったパターン形成が阻害される (Steinmann *et al.*, 1999)。シロイヌナズナ *gnom* 変異体の strong allele では胚における軸に沿った細胞の配列や幼根の欠失、子葉と胚軸の融合あるいは欠損といった表現型が現れる (Mayer *et al.*, 1993; Meinke, 1985; Shevell *et al.*, 1994)。一方、weak allele では側根の減少に加え、側脈が欠損し細脈が密集した融合子葉と

脈端数の増加により複雑化した維管束を持つロゼッタ葉が観察されている (Geldner *et al.*, 2003b; Koizumi *et al.*, 2000; Sieburth *et al.*, 2006)。

crl4 変異体では Arf-GEF に特徴的な Sec7 domain より前でナンセンス変異が生じていたため (図 2-5A)、CRL4 タンパク質の機能はほとんど失われていると考えられ、*crl4* 変異体は null allele であると推測される。ところが、*crl4* 変異体では冠根数および側根数の減少や重力屈性異常などのオーキシン関連異常が観察されたものの、胚発生異常や頂部-基部軸の欠損といった、*gnom* 変異体の strong allele で観察される表現型は観察されなかった (図 2-1, 2, 4)。また *crl4* 変異体には葉維管束が葉身の幅に応じて減少する傾向や種子根の道管数が増加する傾向が見られたものの、*gnom* 変異体の weak allele に見られるような明らかな葉の脈パターン異常は幼苗期および成熟期のどちらにおいても認められなかった (図 2-7A, 7B)。シロイヌナズナには2つの *GNOM/EMB30* のホモログ遺伝子 *GNL1* および *GNL2* がシロイヌナズナゲノム内に存在している。しかし、*GNOM/EMB30* とより相同性の高い *GNL1* のオーキシン極性輸送への寄与は低いことが報告されている (Richter *et al.*, 2007; Teh and Moore, 2007)。したがって、*gnom* 変異体における強い表現型異常は、植物の発生に必須な機能を有しているにも関わらずシロイヌナズナにおいては遺伝子機能の冗長性が低いことが原因であると推測される。イネにおいては *CRL4* のホモログ遺伝子 *CRL4-like* がイネゲノム内に1つ存在している。器官別発現解析より *CRL4-like* 遺伝子は、*CRL4* 遺伝子と同様に調査した全ての器官において発現が認められた (図 2-9)。これより、イネにおいて *CRL4* 遺伝子と *CRL4-like* 遺伝子が重複して機能し、*crl4* 変異体において *CRL4-like* 遺伝子が *CRL4* 遺伝子の機能を補完するために異常が軽減されているのではないかと推測された。*CRL4* 遺伝子と *CRL4-like* 遺伝子の機能重複について詳細に検討するにあたっては、*crl4* 変異体背景で *CRL4-like* 遺伝子を RNAi によって機能を抑制した形質転換体を作製し、その形態的特徴を解析する必要があるだろう。

crl4 変異体はオーキシン極性輸送に異常を示す

シロイヌナズナにおいて *GNOM/EMB30* は、PIN1 タンパク質の局在制御を通じてオーキシン極性輸送に重要な役割を果たしており (Geldner *et al.*, 2003a; Steinmann *et al.*, 1999)、*gnom* 変異体の weak allele では側根形成の異常が報告されている (Geldner *et al.*, 2003b)。側根形成は、オーキシンの基部から根端への求頂的輸送および根端から基部への求基的輸送によって制御されていることが知られている (Geldner *et al.*, 2003a; De Smet *et al.*, 2007)。側根数が減少する *crl4* 変異体においてはやはり、種子根でのオーキシンの求頂的および求基的輸送が野生型に比べて有意に低下していた (図 2-8A)。シロイヌナズナにおいて *GNOM/EMB30* は、根においては求頂的輸送を主に担う PIN1 タンパク質の局在を制御していると報告されているが、*gnom* 変異体の weak allele では求基的なオーキシン輸送の異常も報告されている (Geldner *et al.*, 2003a; Geldner *et al.*, 2003b; Steinmann *et al.*, 1999)。したがって、*CRL4* 遺伝子がコードする Arf-GEF は求頂的オーキシン極性輸送および求基的オーキシン極性輸送の両方を介し、側根形成を制御していると考えられる。

crl4 変異体では野生型に比べて基部茎葉節における [³H]-IAA の蓄積量が 53% に低下し (図 2-8B)、また野生型では葉身の先端および中央部、葉鞘、基部茎葉節で強く観察された *ProDR5:GUS* の発現も、*crl4* 変異体では葉身の先端と基部茎葉節で弱く発現するに留まった (図 2-11A, 11B)。葉身の先端はオーキシンが生合成される場所の 1 つであることから、葉身の中央部および葉鞘での GUS 染色の消失は、*crl4* 変異体におけるオーキシン極性輸送の異常によって引き起こされたと考えられる。基部茎葉節において *ProDR5:GUS* の発現は、野生型で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観察された (図 2-11C)。この GUS 染色パターンは *in situ hybridization* による *CRL4* 遺伝子の発現パターンと一致していた (図 2-10C, 12)。ところが *crl4* 変異体では維管束における GUS 染色が認められず、GUS 染色は柔細胞全体に薄く広がっていた (図 2-11D)。オーキシン極性輸送阻害によりオーキシンの濃度勾配が失われ、オーキシンが均一に分布するようになると、シロイヌナズナでは側根の initiation が阻害されることが報告されている (De Smet *et al.*, 2007)。したがって、*CRL4*

遺伝子は基部茎葉節におけるオーキシンの適切な集積と濃度勾配の確立を通じ、冠根の *initiation* を制御していると考えられた (図 2-13)。また興味深いことに、*osgnom1* 変異体の基部茎葉節ではシロイヌナズナのどの *PIN* 遺伝子とも対の関係とならない *OsPIN5* 遺伝子および *OsPIN9* 遺伝子の発現上昇が報告されている (Liu *et al.*, 2009)。これはシロイヌナズナでは通常作られない冠根の形成にイネ特有の *PIN* 遺伝子である *OsPIN5b* および *OsPIN9* が関与していることを示唆するものであり、このような違いがイネとシロイヌナズナの根系形態の違いを生む一因となったのかもしれないと推測される。

表 2-1. 外生オーキシシン (2,4-D) 投与時の冠根数、側根数および種子根長の比較

		2,4-D濃度		
		0 M	0.001 μ M	0.1 μ M
冠根数	WT	9.36 \pm 0.49	8.58 \pm 0.56	10.15 \pm 0.45
	<i>crl4</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
側根数	WT	25.73 \pm 1.34	25.33 \pm 1.36	26.46 \pm 1.53
	<i>crl4</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
種子根長	WT	14.05 \pm 0.45	13.83 \pm 0.45	11.72 \pm 0.44
	<i>crl4</i>	4.3 \pm 0.11	3.16 \pm 0.32	3.49 \pm 0.22

冠根数と側根数は播種 2 週間後、種子根長は播種 6 日後に測定した。

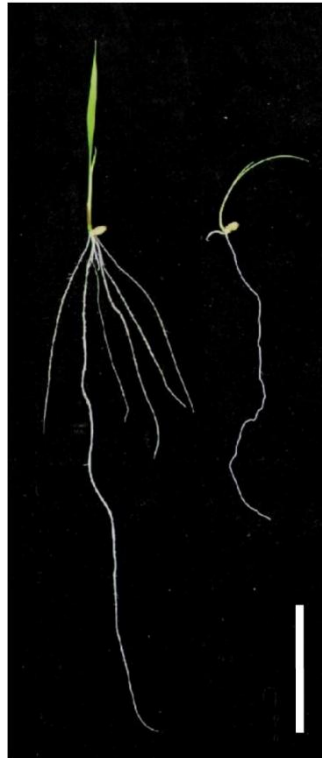


図 2-1.2 週齡の野生型 (右) と *crl4* 変異体 (左)

(Bar = 5 cm)

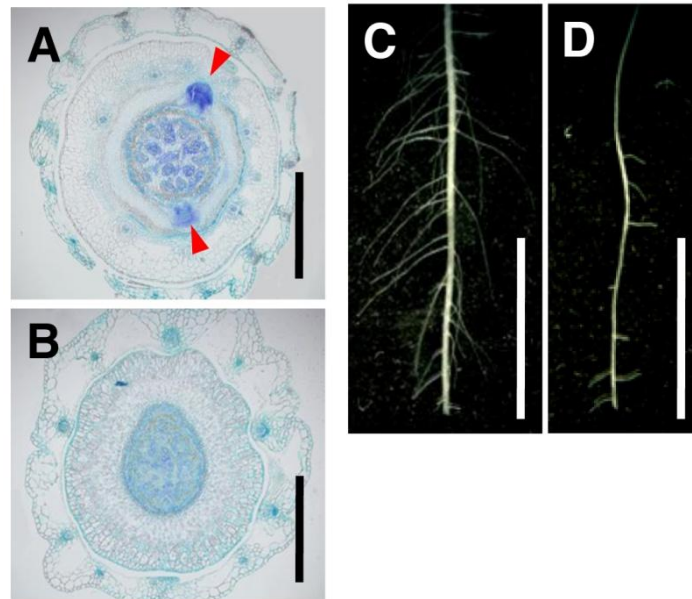


図 2-2. *crl4* 変異体における冠根および側根の形成異常

A: 7 日齢の野生型における基部茎葉節の横断切片。矢頭は冠根原基を示す。
(Bar = 500 μ m)

B: 7 日齢の *crl4* 変異体における基部茎葉節の横断切片。(Bar = 500 μ m)

C: 7 日齢の野生型の種子根から発生した側根。(Bar = 1 cm)

D: 7 日齢の *crl4* 変異体の種子根から発生した側根。(Bar = 1 cm)

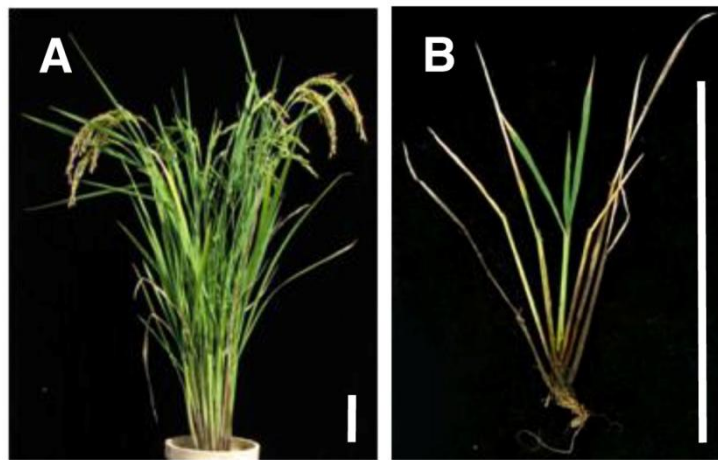


図 2-3.4 カ月齢の野生型 (A) と *crl4* 変異体 (B)

(Bar = 10 cm)

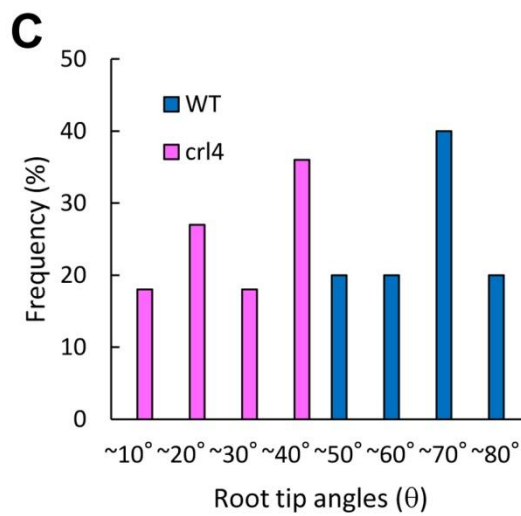
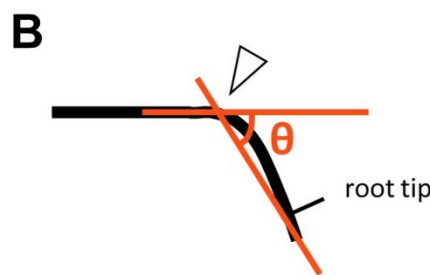
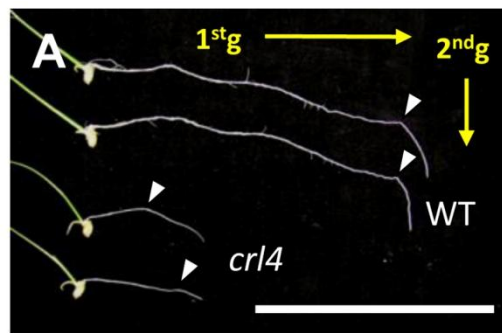


図 2-4. *crl4* 変異体における根の重力屈性異常

A: 1st g の方向に 1 週間育てた後、2nd g の方向に 90°回転させた野生型と *crl4* 変異体。(Bar = 10 cm)

B: 測定した屈曲角度 (θ)。矢頭は 90°回転させたときの根端の位置を示す。

C: 野生型と *crl4* 変異体の種子根における屈曲角度。

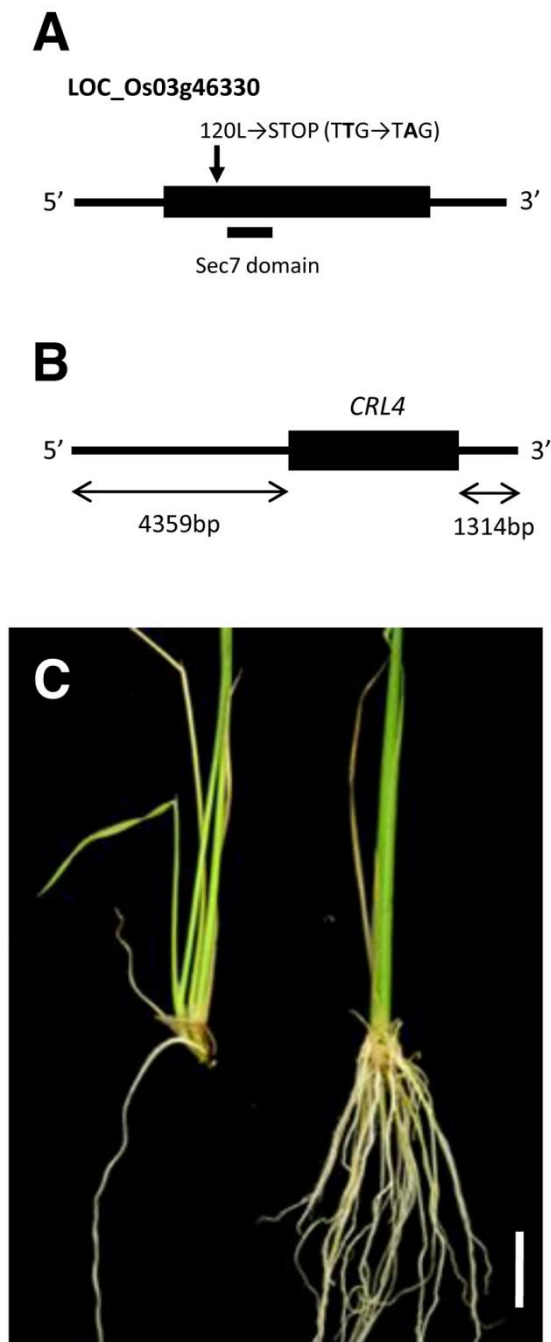


図 2-5. *CRL4* 遺伝子の単離

A: *CRL4* 遺伝子の構造と変異箇所。黒四角は exon、横線は特徴的な機能ドメイン、矢印は *crl4* 変異体における変異箇所を示す。

B: 相補性検定に用いた *CRL4* 遺伝子全長配列を含むゲノム断片の模式図。

C: 空ベクター (pCAMBIA) を導入した *crl4* 変異体 (control, 左) と *CRL4* 遺伝子全長配列を含むゲノム断片を導入した *crl4* 変異体 (右)。

A

```

CRL4      1 GAD-HNRDPMKGLFQGGTHLPEKLDQSVACFFRYTAGLDKLVGDFLGNHDFCVQ 59
CRL4-like 1 GVF-HNRDPMKGFYLGAAHLPEKLDPSVALFFRYTPGLDNLGDTLGNHDFEFSIL 59
GNOM      1 GAD-HNRDPMKGLFQGGTHLPEKLDQSVACFFRYTAGLDKLVGDFLGNHDFCVQ 59
GNL1      1 GAD-HNRDPMKGLYQGVHLPEKLDKSVACFFRYTCGLDKNVMGDFLGNHDQFCIQ 59
GNL2      1 AAN-HNRDEKGLLEYLKYNYVSDPLPMALASFFRYTPGLDKMTGDTLGDPELHLS 59
GBF1      1 TGTEGNQPKKGIQFLQKGLTIPMNTVEAQLWLENPRLDKMTIEFVSDRKNIDL- 59

CRL4      60 VHEFAQTDFQEMNDTALRLFLETFRLGESQKIDRVLEAFSDRYEQSPQAFANK-D 118
CRL4-like 60 VHEFAKTFDFKEMNDAAALRLFLETFRLGESQKIDRVLEAFSERYEQSPQMFVNR-D 118
GNOM      60 VNEFAGTFDFQYMNLDALRLFLETFRLGESQKIDRVLEAFSERYMQSPPEILANK-D 118
GNL1      60 VHEFAKTFDFQNNLDALRLFVGTFRLGSAQKIDRVLEAFSERYEQSPHILIDK-D 118
GNL2      60 VRSFTHTEFTGMNDTALRTFLESFRLGESQKIDRVLEAFSERYDQSSDIFASKD 119
GBF1      60 -ESESITFSQGLRDEALRLYLEAFRLGAPVINDLLEAFTEEMMNCNGSPFANS-D 117

CRL4      119 TALVLAYSIFLNTDQHNQVKKK---TEEDFIKNRNINSGDLPREMSSELYHSICR 175
CRL4-like 119 AALVLSYSIFLNTDQHNIRVKKK---TEEDFIKNRNINSGDLPREFSELYYSICR 175
GNOM      119 AALVLSYSIFLNTDQHNQVKKK---TEEDFIRNRNINSGDLPREFSELFHSICN 175
GNL1      119 AAFVLAYSIFLNTDQHNQVKKR---TEEDFIRNRNINSGDLPREFSEIYHSIRH 175
GNL2      120 TVHILQYSLFLNTDQHNQVRRK---TEEDFIRNRNINAGNDLPKEYSELFQSHAT 176
GBF1      118 ACFSLAVALFLNTDQHNHRKQNAPILEEFKRLKGVVGGKDFEQDILEDMYHAKN 177

CRL4      176 NEI 178
CRL4-like 176 NEI 178
GNOM      176 NEI 178
GNL1      176 SEI 178
GNL2      177 NAF 179
GBF1      178 EEI 180

```

B

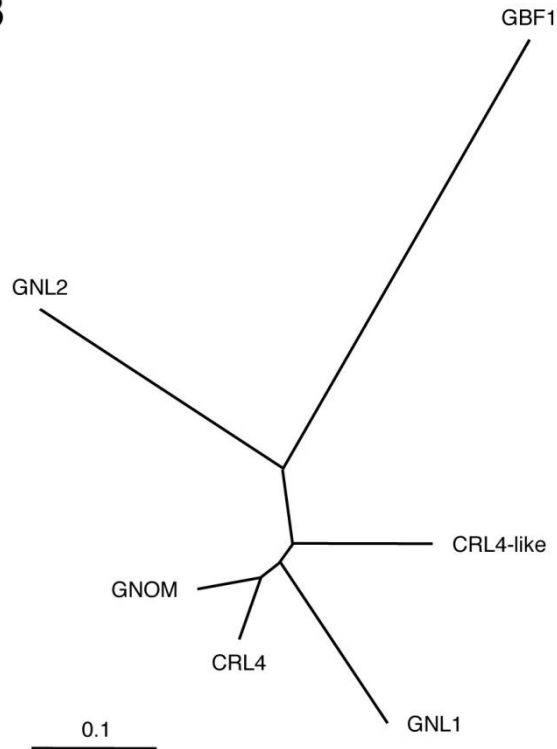


図 2-6. CRL4 のアミノ酸アライメントと分子系統樹

A: イネの CRL4, CRL4-like およびシロイヌナズナの GNOM, GNL1, GNL2 の Sec7 domain におけるアミノ酸配列の比較。

B: Sec7 domain のアミノ酸配列を元に作成した、Arf-GEF の分子系統樹。ヒトの Arf-GEF である GBF1 をアウトグループとして用いた。

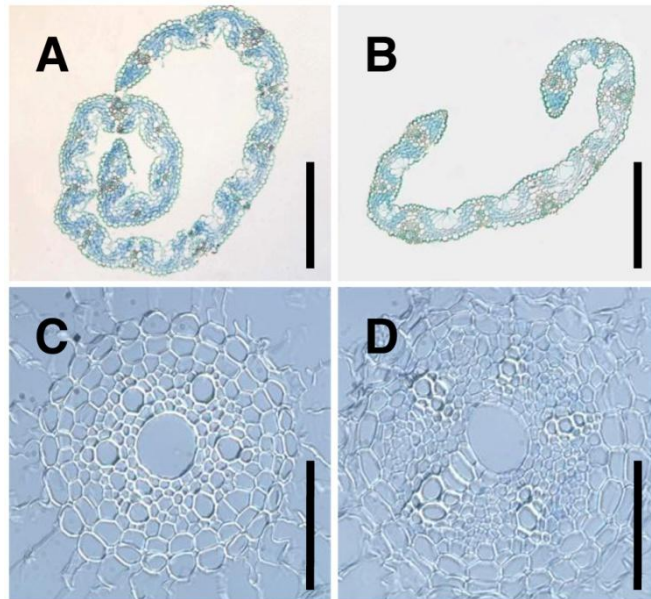


図 2-7. *crl4* 変異体における維管束構造の異常

A: 野生型における第2葉の横断切片。(Bar = 200 μm)

B: *crl4* 変異体における第2葉の横断切片。(Bar = 200 μm)

C: 野生型における種子根の横断切片。(Bar = 50 μm)

D: *crl4* 変異体における種子根の横断切片。(Bar = 50 μm)

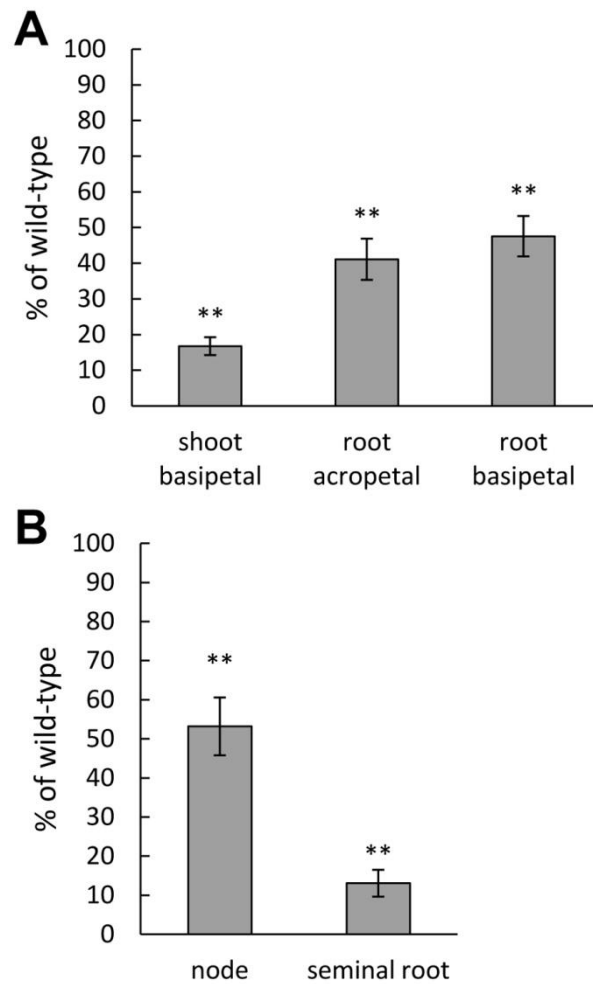


図 2-8. *crl4* 変異体と野生型とのオーキシン極性輸送能の比較

A: *crl4* 変異体における地上部の求基的輸送能、種子根の求頂的輸送能および種子根の求基的輸送能。**は野生型との間に 5% レベルで有意差があることを示す。

B: *crl4* 変異体における基部茎葉節および種子根へのオーキシン蓄積量。

**は野生型との間に 5% レベルで有意差があることを示す。

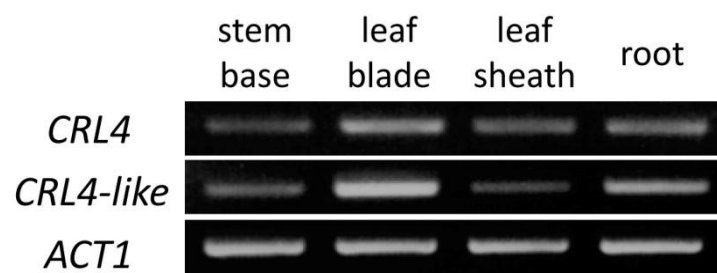


図 2-9. 半定量的 RT-PCR による *CRL4* 遺伝子の発現解析

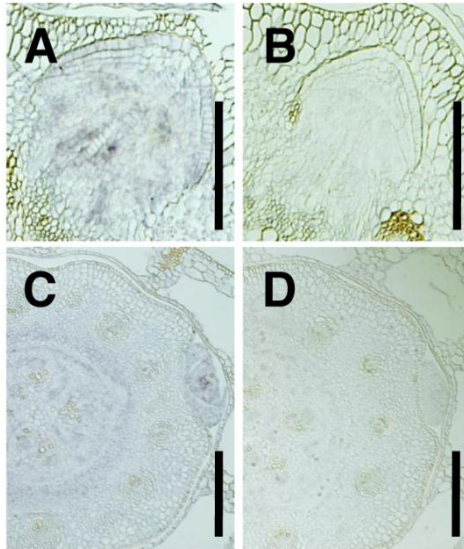


図 2-10. *in situ hybridization* による *CRL4* 遺伝子の発現パターンの解析

A: 7 日齢の野生型の冠根原基における *CRL4* 遺伝子の発現。(Bar = 100 μm)

B: *CRL4* sense probe によるコントロール。(Bar = 100 μm)

C: 7 日齢の野生型の冠根の initiation 部位における *CRL4* 遺伝子の発現。

(Bar = 200 μm)

D: *CRL4* sense probe によるコントロール。(Bar = 200 μm)

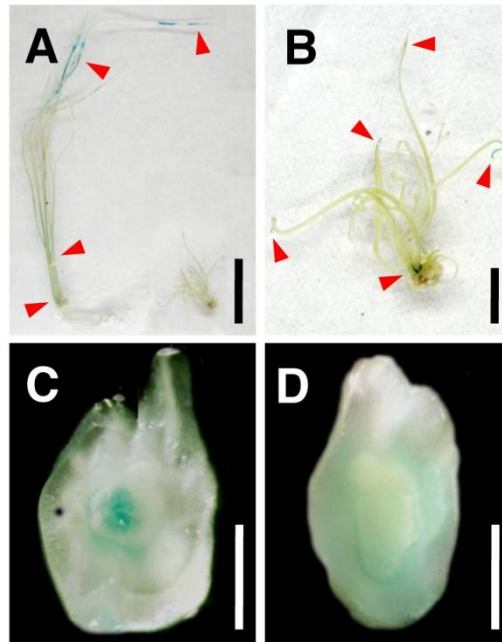


図 2-11. 野生型と *crl4* 変異体におけるオーキシン局在パターンの比較

A: *ProDR5:GUS* を導入した野生型 (左) と *crl4* 変異体 (右)。

矢頭は GUS 染色が観察された箇所を示す。(Bar = 5 cm)

B: *ProDR5:GUS* を導入した *crl4* 変異体 (A を拡大)。(Bar = 1 cm)

C: *ProDR5:GUS* を導入した野生型における基部茎葉節の横断切片。(Bar = 1 mm)

D: *ProDR5:GUS* を導入した *crl4* 変異体における基部茎葉節の横断切片。

(Bar = 1 mm)

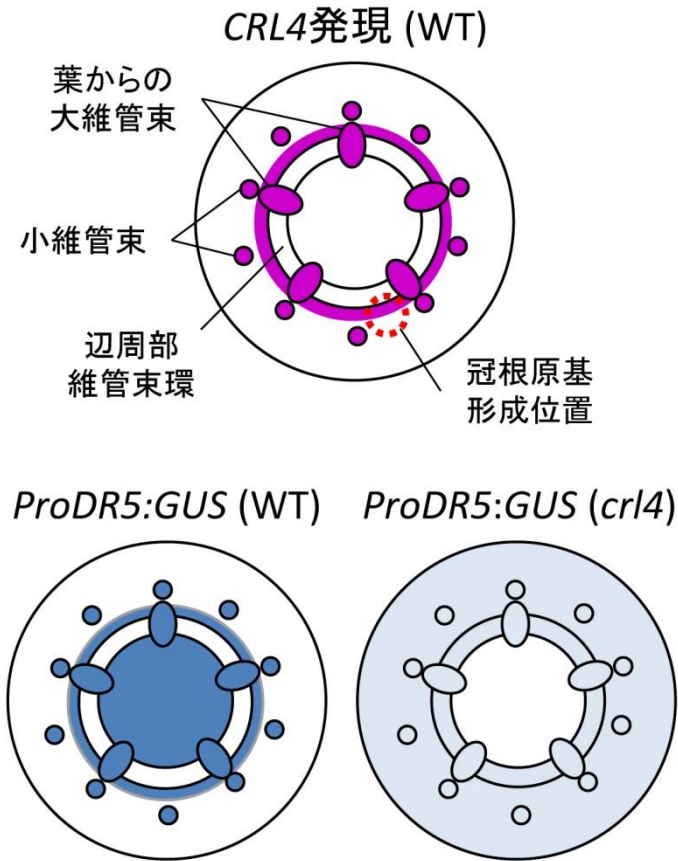


図 2-12. 冠根の initiation 部位における *CRL4* 遺伝子と *ProDR5:GUS* の発現パターンの比較 (模式図)

CRL4 遺伝子は冠根の initiation 部位において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。また、野生型における *ProDR5:GUS* の発現は中心柱、維管束および辺周部維管束環の外側に接する柔細胞で観察された。冠根原基は辺周部維管束環の外側に接する柔細胞から発生し、この部位において *CRL4* 遺伝子の発現と *ProDR5:GUS* の発現は重なっていることが判明した。

冠根の initiation が阻害される *crl4* 変異体においては、このような局在パターンは認められず、GUS 染色は柔細胞全体に薄く広がっていた。

第3章

側根の **initiation** を制御する *OsIAA13* 遺伝子の機能解析および その下流因子の探索

緒言

イネの根系は主に基部茎葉節から発生する冠根と、冠根から発生する側根により構成される。両者は発生の方が異なるだけでなく、その内部構造にも違いがあり、側根では放射軸方向の細胞層数が冠根に比べて著しく減少し層構造がより単純化している (Rebouillat *et al.*, 2009)。しかしそれ以上に、両者はその機能が大きく異なる。イネは生育する環境に応じて、その根系形態を劇的に変化させることが知られているが、この根系形態の変化に大きく寄与しているのは側根であることが報告されている (Luquet *et al.*, 2005; Suralta *et al.*, 2008)。したがって、根系形態の改良は側根と冠根を区別して進める必要がある。

オーキシンのシグナル伝達は、AUXIN (Aux)/INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) タンパク質と AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) タンパク質の相互作用によって制御されている (Liscum and Reed, 2002)。オーキシ存在しないときは Aux/IAA と ARF はヘテロダイマーを形成し、ARF の転写活性が抑制されてオーキシシグナルは伝達されない。オーキシン受容体である TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)/AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB) にオーキシンが受容されると Aux/IAA タンパク質は E3 ubiquitin ligase である SCF^{TIR1/AFBs} 複合体と相互作用してユビキチン化され、その後 26S proteasome により速やかに分解される (Gray *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2007)。Aux/IAA タンパク質が分解されると ARF の転写活性が回復してオーキシシグナルが下流へと伝達され、最終的に根の発生などのオーキシン応答反応が誘導される。速やかな Aux/IAA タンパク質の分解には Aux/IAA の domain II 領域内の 5 つのアミノ酸 (GWPPV) を含む 13 アミノ酸が重要であり、この高度に保存された配列にアミノ酸置換が生じると Aux/IAA タンパク質は安定化し ARF の転写活性を恒常的に抑制する (Ramos *et al.*, 2001)。実際に、Aux/IAA タンパク質が安定化し分解されにくくなった機能獲得型突然変異体である *auxin resistant5 (axr5)/iaa1* 変異体、*short hypocotyl2 (shy2)/iaa3* 変異体、*bodenlos (bdl)/iaa12* 変異体、*solitary root (slr)/iaa14* 変異体、

crane/iaa18 変異体、*massugu2 (msg2)/iaa19* 変異体、*iaa28-1* 変異体では側根数が減少することが報告されている (Fukaki *et al.*, 2002; Hamann *et al.*, 2002; Rogg *et al.*, 2001; Tatematsu *et al.*, 2004; Tian and Reed, 1999; Uehara *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004)。

イネにおいては *Aux/IAA* 遺伝子の突然変異体が報告されていなかったが、イネにおける *Aux/IAA* 遺伝子の1つである *OsiIAA1* 遺伝子 (*OsiIAA13* in Jain *et al.*, 2006a) の発現がオーキシンによって誘導されることが示され、イネにおいても *Aux/IAA* および *ARF* によるオーキシンシグナル伝達経路の存在が示唆された (Thakur *et al.*, 2001, 2005)。イネにおける *Aux/IAA* および *ARF* によるオーキシンシグナルの機能を明らかにするため、*Aux/IAA* タンパク質の安定化に関わる domain II にアミノ酸変異を導入した安定型 *OsiIAA3* (*OsiIAA31* in Jain *et al.*, 2006a) を dexamethasone (DEX) 誘導系により過剰発現させた形質転換体 (*OsiIAA3P58L-GR* in Inukai *et al.*, 2005) を用いた解析がなされた (Nakamura *et al.*, 2006)。この形質転換体においては DEX 処理時に著しい冠根および側根の減少が観察されており、イネにおいても *Aux/IAA* および *ARF* によるオーキシンシグナル伝達が根の形成に重要な役割を果たしていることが判明した (Nakamura *et al.*, 2006)。

これまでイネの冠根形成と側根形成は、共通の制御しか報告がなされていなかった (Inukai *et al.*, 2005)。しかし両者の間には明らかな形態的・機能的差異が存在するため、その形成機構においても異なる制御が存在すると考えられる。また、原因遺伝子は単離されていないが、側根数が減少するイネ *Lateral rootless1 (Lrt1)* 変異体では冠根数の減少が観察されていないことから (Chhun *et al.*, 2003; Hao and Ichii, 1999)、イネの側根形成と冠根形成には独立した制御機構があることが示唆される。そこで本章では、側根数が著しく減少するが冠根数は減少しない T1-34-6 変異体の原因遺伝子の単離とその機能解析を行った。T1-34-6 変異体は、イネ品種・台中 65 号の MNU 受精卵処理後代より得られた不完全優性の突然変異体である。この T1-34-6 変異体は重力屈性の異常も示したため、本変異体も *crl4* 変異体と同様にオーキシン関連の突然変異体であると考えられた。T1-34-6 変異体の原因遺伝子は、オーキシンシグナル伝達の鍵となる *Aux/IAA* タンパク質の1つである *OsiIAA13* を

コードしていることが判明した。*Osiaa13* 変異体においては側根の **initiation** 部位におけるオーキシニンシグナルが消失していたことから、*OsIAA13* 遺伝子は側根形成に必須であるオーキシニンシグナル伝達を制御していると考えられた。さらに本章では公開トランスクリプトームデータを基に、側根の **initiation** 特異的に機能する *OsIAA13* 依存的なオーキシニンシグナル伝達経路において機能する遺伝子の同定も試みた。

材料および方法

植物体の育成

第2章 材料および方法を参照。

フォイルゲン染色

種子を消毒・催芽させた後、水耕にて5日間生育させた植物の根端から4 cmをサンプリングしてFAA固定液に浸した。その後脱イオン水で3分ずつ2回洗浄し、6 N HClに10分浸した。再度脱イオン水で3分ずつ2回洗浄し、シッフ試薬 (SIGMA) を入れたシャーレにサンプルを入れて30分から1時間インキュベートした。サンプルをシッフ試薬に浸漬したまま、実体顕微鏡で赤紫色に染まった側根原基数をカウントした。

重力屈性テスト

角型シャーレに入れた栄養源を含まない寒天培地 (1% agar) の上に、水耕にて7日間生育させた植物をのせて根端部分にマジックで印を付けた。アルミホイルで地下部を遮光し、90°回転させた状態でグロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) で1日生育させた後、根の屈曲角度を測定した。

マップベースクローニング法による遺伝子単離

第2章 材料および方法を参照。

使用した分子マーカのプライマー配列は別紙のリストを参照。

コンストラクトの作製

相補性検定用コンストラクト (*ProCRL5:CRL5*) は、*Osi13* 変異体のゲノム DNA を鋳型

に *OsIAA13* 遺伝子の転写開始点より上流 3943 bp と終止コドンより 1273 bp を含む約 7.9 kbp のゲノム DNA 断片を 2 本に分けて PCR 増幅し (2 μ l template cDNA, 1 \times Prime STAR buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 μ M Upper primer, 0.2 μ M Lower primer, 5% DMSO, 0.75 U Prime STAR HS DNA polymerase)、In-fusion HD cloning kit (Clontech) を用いて pCAMBIA 1300 vector にクローニングすることで作成した。コンストラクトの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

ProDR5:GUS コンストラクトは、Scarpella *et al.* (2003) と同じものを使用した。

形質転換の作製

第 2 章 材料および方法を参照。

ProDR5:GUS 形質転換体の観察

第 2 章 材料および方法を参照。

半定量的 RT-PCR

第 2 章 材料および方法を参照。95°C 5 分の変性後に 95°C 30 秒・55°C 40 秒・72°C 30 秒の 3 ステップを、Os07g0539400, Os05g0209600, Os12g0577700, Os01g0263000, Os03g0399800, Os04g0423800, Os07g0104100, Os07g0638500, Os08g0280200 は 30 サイクル、Os05g0324600, Os06g0697000, Os04g0677100, Os03g0347700, Os05g0219900, Os10g0155100, *CRL1*, *CRL5* は 35 サイクル、Os05g0466100, Os07g0669500, Os04g0415800, Os04g0445100 は 40 サイクル、Os03g0659700, Os09g0531600 は 45 サイクル、*ACT1* は 25 サイクル行って 72°C 7 分の伸長反応の後 10°C で保存した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

Primer list

・ 遺伝子単離

Primer name	Sequence
E50828_U	5'-GGGGTACCTGTGCTAATCTC-3'
E50828_L	5'-TCACACAAGATCCTGGAATG-3'
C63279_U	5'-TCAAGTCCATCCAGATCACC-3'
C63279_L	5'-TGAGACAACAGGTTTTACCG-3'
C53358_U	5'-GGAGGAATGAATGAATGAAG-3'
C53358_L	5'-GCAGTATTCATACATAGGAG-3'
RM16_U	5'-GTGCGCCAGGAGTAGTTGTCTCC-3'
RM16_L	5'-GACGTGTACACATAGCCAAATCATCC-3'
RM15414_U	5'-TCCATCATATGCTCTGCTCTCTGC-3'
RM15414_L	5'-CCTCCCTTCCTCCAGATCACC-3'
RM168_U	5'-TGTCGTCGAGGATTTGGAGATCG-3'
RM168_L	5'-GAATCAATCCACGGCACAGTCC-3'
C944 (<i>Xba</i> I)_U	5'-GCCAGGGAACCTTCATCTC-3'
C944 (<i>Xba</i> I)_L	5'-AACTGGGTATCTTTATGCAG-3'
RM6358_U	5'-CCCGACACAACCAACACATAACC-3'
RM6358_L	5'-GCTCGAATCTCATACCAAACATGC-3'
RM15827_U	5'-GAGCAGCAAGCGAGAGAGAAAGG-3'
RM15827_L	5'-GACGTGTCTCCCTGTGCCTACC-3'
RM3199_U	5'-CTGCGCTTCCCTGCTTGTACC-3'
RM3199_L	5'-ATGCATGATCCTACCAGCAAAGG-3'
RM5172_U	5'-CAAGTTTGGGTCAGACATACAAGG-3'
RM5172_L	5'-TTGGTGCTCTTGTAGTTTGTGC-3'
C1401 (<i>Eco</i> RV)_U	5'-TAACAACCGACCACAAATAC-3'
C1401 (<i>Eco</i> RV)_L	5'-GGAGAAGGACAAGGGGAAGA-3'
RM520_U	5'-ACGATAACGCCGACATCACTGG-3'
RM520_L	5'-GCTAAGCATCCACGGTTTCTCTCC-3'
R2628 (<i>Afa</i> I)_U	5'-TCAAATAGGAGTTAGCAGAAC-3'
R2628 (<i>Afa</i> I)_L	5'-CCAGGAGAGGAGAGGTAAGT-3'
C1329 (<i>Eco</i> T22I)_U	5'-TGCTGCCCTCATTATCTGCT-3'
C1329 (<i>Eco</i> T22I)_L	5'-GGAGGTCGGAGTAAAGGAAA-3'

・相補性検定コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>OsIAA13_promoter1_U-XbaI</i> (pCAM)	5'-GTACCCGGGATCCTGTTAAGC TAGGTAGGCTAGT-3'
<i>OsIAA13_promoter2_L</i>	5'-TGGTCTCCTCGAAGCCCCTCT-3'
<i>OsIAA13_ORF1_U</i>	5'-GGCTTCGAGGAGACCATTGA-3'
<i>OsIAA13_ORF2_L XbaI</i> (pCAM)	5'-GCAGGTCGACTCTAGTCCATCTA CATTCCGGCTGT-3'

・半定量的 RT-PCR

Primer name	Sequence
Os03g0659700_U	5'-GCCAGCAATGTCAGCAAGCT-3'
Os03g0659700_L	5'-GTCCACCACCATGTCCAGCT-3'
Os05g0324600_U	5'-TCTACAAGCTGAGGGACATG-3'
Os05g0324600_L	5'-CTCCATCAGTGGCATCTGCT-3'
Os05g0466100_U	5'-CGTCTGCTCCAGCTTGCCAA-3'
Os05g0466100_L	5'-CTGTAACGGCCCACCTTCTG-3'
Os07g0669500_U	5'-ATTGGCTCGTACGGTCACCA-3'
Os07g0669500_L	5'-GAAGCTGAATGGAGAGTAGG-3'
Os09g0531600_U	5'-AGGCCAAGAAGGACTGCACC-3'
Os09g0531600_L	5'-CCACCGTCACCATCTGCTGA-3'
Os06g0697000_U	5'-AGATCGACATGCAGCTCAAG-3'
Os06g0697000_L	5'-GCATGTTCGTCACCATGAAT-3'
Os07g0539400_U	5'-CAATGGGACATGCGACTTTG-3'
Os07g0539400_L	5'-AGTTTCCAATCTCTGGTGCC-3'
Os04g0415800_U	5'-CCGGACAAGATGGCGCTGAA-3'
Os04g0415800_L	5'-TCATGGCAGAGTGTAATCTC-3'
Os05g0209600_U	5'-AGCAAGATCATCCGTGGCCT-3'
Os05g0209600_L	5'-CTTCAGCCCGTATTTTCAGCC-3'
Os04g0677100_U	5'-CGACACGTGCTACGACCTGA-3'
Os04g0677100_L	5'-CGACGTATCCGTTGGCTGAG-3'
Os12g0577700_U	5'-GAGACGTTCCGGGGCATGAT-3'
Os12g0577700_L	5'-GCCGACATTGACCCTCCTTC-3'
Os01g0263000_U	5'-ACAGTCTCTTGTGCTGACAC-3'
Os01g0263000_L	5'-CATTCCAATGGTGTGGCTTC-3'

Os03g0347700_U	5'-TTAAGACCAACCCTCACCAG-3'
Os03g0347700_L	5'-CCCACGCCGTAGCAGAACTT-3'
Os03g0399800_U	5'-TGGCGGAGTTCACGTTTCGAC-3'
Os03g0399800_L	5'-ATGCACGGGTTGACGTAGAC-3'
Os04g0423800_U	5'-GTTCCCGCAGTTCTATCAGC-3'
Os04g0423800_L	5'-GATCTCGTCGATCACCTCGT-3'
Os04g0445100_U	5'-AGGAGACGACGGAGCAGAAG-3'
Os04g0445100_L	5'-CTTCTTGCCACCGTCGTCAC-3'
Os05g0219900_U	5'-CTGGACCAGCTCAAGTCGGA-3'
Os05g0219900_L	5'-ATAGATCTTGAGCTCCAGGC-3'
Os07g0104100_U	5'-TTCACCCAGCTCTCCAGAT-3'
Os07g0104100_L	5'-TTGGCCACCAGCCGGTAGTA-3'
Os07g0638500_U	5'-TAATTCTGCTTGGCCTCAGC-3'
Os07g0638500_L	5'-GGTCGTTGAACACCACCATC-3'
Os08g0280200_U	5'-TGGGAGGAGTCACAGAAAAC-3'
Os08g0280200_L	5'-CATTAGGTCAGGCAAGGGCA-3'
Os10g0155100_U	5'-AAGTACGCGGCGTACTTCGT-3'
Os10g0155100_L	5'-TCTGCAGGAAGTTGGTGCCG-3'
<i>CRL1</i> -RT_U	5'-AGCAACGTGTCCAAGCTGCT-3'
<i>CRL1</i> -RT_L	5'-GTCCTGGTGGTGTATCCCTT-3'
<i>CRL5</i> -RT_U	5'-CCATCGACACGTTTCGGTCAGAG-3'
<i>CRL5</i> -RT_L	5'-GAGGTCCTTGTTGCCGGAGACT-3'
<i>ACT1</i> -RT_U	5'-GACTACATACAACTCCATCATG-3'
<i>ACT1</i> -RT_L	5'-AGCATTTCCTGTGCACAATGG-3'

結果

T1-34-6 変異体の表現型解析

T1-34-6 変異体は野生型に比べ、種子根および冠根から発生する側根の数が著しく減少していた (図 3-1, 2A, 2B, 表 3-1)。T1-34-6 変異体を野生型と交雑して得た F₂ 集団において野生型と側根数の減少した個体が 1 : 3 の割合で分離したため、T1-34-6 変異体は機能獲得型突然変異体であることが判明した。さらに詳細に表現型を調べたところ、全 F₂ 個体の約半分の個体が野生型と変異体の中間の表現型を示したため (野生型 : 中間型 : 変異型 = 1 : 2 : 1)、T1-34-6 変異体は不完全優性の突然変異体であることが明らかになった (表 3-1)。12 日齢の幼苗における種子根の基部から 5 cm で発生している側根数の他に種子根長、3 か月齢の植物における草丈、稈長、穂長、分げつ数、穂数の各種表現型においても全 F₂ 個体の約半分の個体が野生型と変異体の中間の表現型が認められた (表 3-1)。T1-34-6 変異体における側根数減少の原因を調べるため、フォイルゲン染色により種子根上の側根原基の形成数を調べた。その結果、変異体では側根原基の形成数自体が減少していた (表 3-1)。側根数の減少に加え、T1-34-6 変異体では野生型に比べて根毛数の減少も観察されたが (図 3-2C, 2D)、冠根数に変化は認められなかった (図 3-1, 表 3-1)。

側根数の減少は、イネとシロイヌナズナにおいて典型的なオーキシン関連異常表現型である (Fukaki *et al.*, 2002; Inukai *et al.*, 2005; Kitomi *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Rogg *et al.*, 2001; Tatematsu *et al.*, 2004; Tian and Reed, 1999; Uehara *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004)。それに加えて重力屈性の異常もイネとシロイヌナズナで典型的なオーキシン関連異常表現型として報告されている (Fukaki *et al.*, 2002; Inukai *et al.*, 2005; Kitomi *et al.*, 2008a, 2011a; Leyzer *et al.*, 1996; Nagpal *et al.*, 2000; Tian and Reed, 1999; Yang *et al.*, 2004)。そこで T1-34-6 変異体の重力屈性を調べたところ、野生型では重力方向が変化するとそれに敏感に応答したのに対し、T1-34-6 変異体では重力方向の変化に対する応答が異常になっていた。

重力方向を 90° 転換させて 24 時間後の根の伸長角度を測定したところ、野生型の根ではすべての個体が 60° ~ 90° に屈性したのに対し、中間型では 20° ~ 50° 程度しか屈曲しなかった (図 3-3)。変異型では -80° ~ 130° に渡って屈曲し、重力方向と屈曲方向が一致しない個体も認められた (図 3-3)。さらに T1-34-6 変異体におけるオーキシン応答について解析するため、*ProDR5:GUS* の発現パターンを野生型と変異体とで比較した。野生型において GUS 染色は根冠、冠根の中心柱、側根の initiation 部位に局在していた (図 3-4A, 4C)。T1-34-6 変異体においては根冠でごく薄い GUS 染色が観察されたが、側根の initiation 部位では GUS 染色は認められなかった (図 3-4B, 4D)。

イネのオーキシン関連異常突然変異体では冠根数の減少も観察される (Inukai *et al.*, 2005; Kitomi *et al.*, 2008, 2011a; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009)。そのため、*ProDR5:GUS* の発現パターンを冠根の initiation が起こっている部位でも観察した。野生型において GUS 染色は維管束に局在していた (図 3-4E)。T1-34-6 変異体においても維管束において野生型と同じ GUS の局在パターンが観察された (図 3-4F)。

T1-34-6 変異体の原因遺伝子の単離

T1-34-6 変異体の原因遺伝子を単離するため、ホモ型の T1-34-6 変異体に Kasalath を交雑して得た F₂ 集団を用いた高精度連鎖解析を行った。その結果、T1-34-6 変異体の原因遺伝子は第 3 染色体の 137.9 cM 付近に存在することが明らかになった (図 3-5A)。分子マーカー RM5172 と C1401 に挟まれたこの領域には *OsIAA13* (Os03g0742900) が存在していることがデータベースより明らかになった。*OsIAA13* 遺伝子はイネの Aux/IAA タンパク質をコードしており、シロイヌナズナと同様に ARF の転写因子としての機能を抑制することでオーキシンシグナル伝達を阻害するという重要な役割を担っていると考えられている (Thakur *et al.*, 2001, 2005)。データベース RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>; Sato *et al.*, 2010) の root gene expression profile covering various developmental stages and tissue-types (RXP_4001, Takehisa *et al.*, 2012) で *OsIAA13* 遺伝子の根での発現パターンを参照したところ、*OsIAA13*

遺伝子は根冠および伸長帯・初期の成熟帯の最内層（内皮、内鞘、中心柱）で最も強く発現していることが判明した（図 3-7）。側根の *initiation* は伸長帯/初期の成熟帯の内皮/内鞘細胞で起こると考えられている（Takehisa *et al.*, 2012）。Aux/IAA と ARF によるオーキシシグナル伝達が側根の *initiation* の中心的な役割を果たしていることは古くから知られており、この *OsIAA13* 遺伝子がイネの側根形成に関与しているのではないかと示唆された。そこで野生型と T1-34-6 変異体とで *OsIAA13* 遺伝子の塩基配列を比較したところ、変異体においてグリシンからアラニンへの 1 塩基置換が生じ、その結果 89 番目のグリシンがアラニンとなったミスセンス変異が認められた（図 3-4B）。このミスセンス変異は Aux/IAA タンパク質の安定性に関与する domain II の高度に保存された 5 つのアミノ酸（GWPPV）配列内で生じていた（図 3-5B）。*OsIAA13* はイネにおいては *OsIAA11* および *OsIAA30* と、シロイヌナズナにおいては *AXR2/IAA7*、*SLR/IAA14*、*IAA16*、*AXR3/IAA17* と相同性が高い（Jain *et al.*, 2006a）。機能獲得型突然変異体である *Osiaa11* 変異体は、側根の *initiation* の異常により側根数は減少するものの冠根数に異常はないという T1-34-6 変異体と同様の異常表現型を示すことが報告されている（Zhu *et al.*, 2012）。また、シロイヌナズナの *SLR/IAA14* の機能獲得型変異体および *NPH4/ARF7* と *ARF19* の機能欠損型の二重変異体においても側根数の減少が報告されている（Fukaki *et al.*, 2002; Okushima *et al.*, 2005, Wilmoth *et al.*, 2005）。*OsIAA13* 遺伝子のプロモーターおよび変異体と同じミスセンス変異を有する遺伝子全長配列を含んだ約 7.9 kbp のゲノム DNA 断片（*ProOsIAA13:Osiaa13*）を野生型に導入したところ、T1-34-6 変異体と同様に側根数の減少や典型的なオーキシン関連異常表現型を示した（図 3-6）。したがって、T1-34-6 変異体で生じた異常は *OsIAA13* 遺伝子の domain II における 1 アミノ酸変異に起因すると結論付け、T1-34-6 変異体を今後は *Osiaa13* 変異体と呼ぶこととした。

OsIAA13 依存的な側根形成経路で側根の *initiation* に関与する遺伝子の探索

近年、シロイヌナズナの根における時空間的な遺伝子発現を高精度に解析した root map が作成された（Brady *et al.*, 2007）。この root map では組織特異的あるいは細胞特異的なプロ

モーターに GFP を連結した形質転換体系統の根をセルラーゼ処理し、GFP 蛍光を指標に cell sorter で目的の細胞を選抜して RNA を抽出することで、細胞特異的および発達段階特異的なトランスクリプトームデータを得ている (Birnbaum *et al.*, 2003; Brady *et al.*, 2007)。イネにおいては、Takehisa *et al.* (2012) により laser microdissection 法を用いた包括的な網羅的遺伝子発現解析が行われた。この解析では、根 (冠根) を頂部-基部軸方向に 8 つの発達段階 (R0, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7) に、放射軸方向に 3 つの組織 (EpiExo, Cortex, EndStele) に分けることで、詳細な発達段階特異的および組織特異的なトランスクリプトームが明らかにされている (Takehisa *et al.*, 2012)。このトランスクリプトームデータを利用し、Takehisa *et al.* (2012) では側根形成に機能していると考えられる 232 遺伝子が報告されている。この 232 遺伝子は側根の initiation が起こる伸長帯/初期の成熟帯の内皮/内鞘細胞 (R2R3-EndStele) において発現が上昇している (R2R3-EpiExo, R2R3-Cortex, R7-EndStele と比較して 5 倍以上) 遺伝子であり、さらにこの 232 遺伝子の中から根冠 (R0) および分裂帯 (R1) の両方で発現が上昇していない 71 遺伝子 (Cluster I) を側根の initiation に特異的に機能する重要な遺伝子として位置づけている (Takehisa *et al.*, 2012)。

Cluster I に含まれる 71 遺伝子のうち、Functional Category が Unknown あるいは Others であったもの以外の 21 遺伝子に注目し、これら遺伝子を OsIAA13 依存的な側根形成経路下流で機能しているものとそうでないものに区別するため、半定量的 RT-PCR により野生型と *Osiaa13* 変異体との間でこれら遺伝子の側根形成部位における発現量を比較した。その結果、Os07g0669500, Os06g0697000, Os07g0539400, Os12g0577700 の 4 つの遺伝子の発現が、野生型と比較して *Osiaa13* 変異体で低下していることが判明した (図 3-8)。この 4 遺伝子のうち Os07g0669500 は、シロイヌナズナにおいて側根原基の初期段階における細胞分裂パターンの制御に関与すると報告されている PUCHI と相同性の高い AP2/ERF 型転写因子をコードしていた (Hirota *et al.*, 2007)。Os06g0697000 と Os07g0539400 はそれぞれ xyloglucan endotransglycosylase/hydrase (XTH) あるいは glycoside hydrolase をコードしており、細胞壁修飾に関連した機能を持つと考えられる。XTH は細胞壁マトリックス多糖であるキシログル

カン分子のつなぎ変え反応または切断反応を触媒し、細胞壁の構築や再編過程で中心的な役割を担う酵素タンパク質である (Fry *et al.*, 1992; Nishitani and Tominaga, 1992)。イネの細胞壁はキシログルカン含量が低いにも関わらず *OsXTH* 遺伝子はキシログルカン含量の多い細胞壁を持つシロイヌナズナの *XTH* 遺伝子数 (33 個) と同程度の 29 個存在し、イネにおいてもキシログルカン代謝の重要性が示唆されている (Yokoyama *et al.*, 2004)。また、Os12g0577700 は細胞周期の進行を促進する cyclin-dependent protein kinase と相同性の高い protein kinase domain containing protein をコードしていた (Stals *et al.*, 2000)。Osiaa13 変異体背景で発現量が低下していたこれら 4 つの側根の initiation に関与する遺伝子は、OsIAA13 依存的な側根形成経路の下流で機能している可能性が高いと考えられた。

考察

本研究の第2章では、側根数が著しく減少するが冠根数は減少しない T1-34-6 (*Osiiaa13*) 変異体の原因遺伝子 *OsIAA13* の単離とその機能解析、およびその下流因子の探索を試みた。

OsIAA13 遺伝子による側根形成特異的な遺伝制御

T1-34-6 (*Osiiaa13*) 変異体とインド型品種カサラスとの交雑自殖次世代 F₂ を用いた高精度連鎖解析により、T1-34-6 (*Osiiaa13*) 変異体の原因遺伝子はイネの Aux/IAA タンパク質をコードする *OsIAA13* 遺伝子であることが判明した (図 3-5B)。*Osiiaa13* 変異体では側根数が著しく減少するが、冠根数に変化は認められない (図 3-1, 2A, 2B, 表 3-1)。また、*Osiiaa13* 変異体では野生型で観察される側根の initiation 部位での *ProDR5:GUS* の染色が消失していたのに対し、冠根の initiation 部位での染色パターンは野生型と同じであった (図 3-4E, 4F)。したがって、*OsIAA13* は冠根の initiation には関与せず、側根の initiation にのみ特化した機能を持っていると考えられた。今までに Aux/IAA 依存的なオーキシシンシグナル伝達経路で機能する根系形成遺伝子として *CRL1/ARL1* 遺伝子が報告されており、*crl1* 変異体では冠根数の減少に加えて側根数の減少も報告されている (Inukai *et al.*, 2005)。そこで、*Osiiaa13* 変異体における *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現レベルを野生型における発現レベルと比較してみたところ、両者の間に発現量の変化は認められなかった (図 3-9)。これより、*CRL1/ARL1* 遺伝子の発現は *OsIAA13* 遺伝子によって制御されていないことが判明し、*OsIAA13* 遺伝子の関与する側根形成経路と冠根と側根の両方の initiation を制御する *CRL1/ARL1* 遺伝子による側根形成経路は別経路であると示唆された。また、後述の冠根の initiation 特異的に機能する *CRL5* 遺伝子の発現レベルも *CRL1/ARL1* 遺伝子と同様、野生型と *Osiiaa13* 変異体との間で変化は認められなかった (図 3-10)。

Aux/IAA は遺伝子ファミリーを形成しており、イネでは 31 遺伝子、シロイヌナズナでは

29 遺伝子がそれぞれのゲノム中に存在している (Jain *et al.*, 2006a; Liscum and Reed, 2002)。Aux/IAA と相互作用する ARF もまた遺伝子ファミリーを形成しており、イネでは 25 遺伝子、シロイヌナズナでは 23 遺伝子が報告されている (Liscum and Reed, 2002; Wang *et al.*, 2007)。シロイヌナズナにおいて ARF はそれぞれに異なった役割を果たしており、胚発生には MONOPTEROS (MP)/ARF5、屈性には ARF2, NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4 (NPH4)/ARF7, ARF19、花の発達には ETTIN (ETT)/ARF3、根と胚軸の形成には ARF2, NPH4/ARF7, ARF8, ARF19 がそれぞれ関与していることが報告されている (Hardtke and Berleth, 1998; Harper *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Okushima *et al.*, 2005; Sessions *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2004)。これらの ARF は特定の Aux/IAA と対をなして機能しており、胚発生において MP/ARF5 は BDL/IAA12 と、胚軸伸長と側根発達において NPH4/ARF7 は MSG2/IAA19 と、側根形成において NPH4/ARF7 および ARF19 は SLR/IAA14 と *in vivo* で相互作用することが示されている (Fukaki *et al.*, 2005; Hamann *et al.*, 2002; Tatsumi *et al.*, 2004)。このように、Aux/IAA および ARF によるオーキシンシグナル伝達は植物のあらゆる器官形成やイベントに関与しているが、それぞれに異なる Aux/IAA と ARF が機能していることが示唆されている。したがって、*OsIAA13* 遺伝子の側根の initiation 特異的な制御は、Aux/IAA が遺伝子ファミリーを形成し、それぞれが機能分化しているからであると考えられる。イネにおいても *OsIAA23* 遺伝子は根端分裂組織の維持に関与し (Jun *et al.*, 2011)、*OsIAA13* 遺伝子と最も相同性の高い *OsIAA11* 遺伝子は *OsIAA13* 遺伝子と同様に側根の initiation 特異的に機能することが報告されている (Zhu *et al.*, 2012)。また、トウモロコシの *Rum1/ZmIAA10* 遺伝子はさらに機能特異性が高く、胚発生時に形成される主根と種子根から発生する側根の initiation にのみ機能し、胚発生後に形成される不定根から発生する側根の initiation には機能しないことが示されている (von Behrens *et al.*, 2011; Woll *et al.*, 2005)。

OsIAA13 依存的な経路で機能する側根の initiation に関与する遺伝子

近年イネにおいて、laser microdissection 法を用いた包括的な網羅的遺伝子発現解析が行わ

れ、側根の *initiation* が起こる伸長帯/初期の成熟帯の内皮/内鞘細胞において発現が上昇している 232 遺伝子が側根形成に機能する遺伝子として見出されており、その中から根冠および分裂帯の両方で発現が上昇していない 71 遺伝子 (Cluster I) が側根の *initiation* に特異的に機能する遺伝子として位置づけられている (Takehisa *et al.*, 2012)。本章ではこのトランスクリプトームデータを利用し、Cluster I に含まれる 71 遺伝子のうち、Functional Category が Unknown あるいは Others であったもの以外の 21 遺伝子から OsIAA13 依存的な側根形成経路下流で機能している遺伝子の同定を試みた。半定量的 RT-PCR により野生型と *Osiaa13* 変異体との間でこれら遺伝子の側根形成部位における発現量を比較したところ、Os07g0669500, Os06g0697000, Os07g0539400, Os12g0577700 の 4 つの遺伝子の発現が、野生型と比較して *Osiaa13* 変異体で低下していることが判明した (図 3-8)。これら 4 遺伝子は側根の *initiation* 特異的な OsIAA13 依存的なオーキシンスIGNAL伝達経路下流で機能していると示唆される。一方で、*Osiaa13* 変異体において発現量が低下していなかった遺伝子群は、OsIAA13 とは異なる OsIAA あるいは別の因子によってその発現を制御され、最終的に側根の *initiation* に関与していると考えられる。

Osiaa13 変異体において発現が低下していた 4 遺伝子のうちの 1 つである Os07g0669500 は、シロイヌナズナにおいて側根原基の初期段階における細胞分裂パターンの制御に関与すると報告されている PUCHI と相同性の高い AP2/ERF 型転写因子をコードしていた。PUCHI 遺伝子は側根の *initiation* が起こっていると考えられる内鞘細胞および形成初期段階の側根原基での発現が観察されており、また ARF によってその発現を直接誘導されることが示唆されている (Hirota *et al.*, 2007)。したがって、Os07g0669500 のコードする AP2/ERF 型転写因子も側根の *initiation* に関与している可能性が高いと考えられる。

また Os06g0697000 は、細胞壁マトリックス多糖であるキシログルカン分子のつなぎ変え反応または切断反応を触媒する酵素である XTH をコードしていた (Fry *et al.*, 1992; Nishitani and Tominaga, 1992)。29 個存在する OsXTH のうち、本遺伝子は OsXTH10 をコードしている (Yokoyama *et al.*, 2004)。OsXTH10 遺伝子は、根特異的に発現する 4 つの AtXTH 遺伝子

(*AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19*, *AtXTH20*) と相同性が高いことが判明している (Yokoyama *et al.*, 2004; Vissenberg *et al.*, 2005)。これらのうち、*AtXTH20* 遺伝子は側根原基の initiation が起こる内鞘細胞を含む最内層および発達中の側根原基で発現し、側根が伸長する頃にはその発現が消失する (Vissenberg *et al.*, 2005)。また、*AtXTH19* 遺伝子はオーキシンによってその発現が誘導されることが示されている (Vissenberg *et al.*, 2005)。RiceXPro より Os06g0697000 の根端における発現部位を調べたところ、Os06g0697000 は側根の initiation が起こる伸長帯/初期の成熟帯の内皮/内鞘細胞で強く発現していた。したがって、Os06g0696400 がコードする OsXTH10 も OsIAA13 依存的なオーキシシンシグナル伝達経路下流において側根の initiation に関与している可能性が高いと推測される。glycoside hydrolase をコードする Os07g0539400 も同様に、側根の initiation が起こる伸長帯/初期の成熟帯の内皮/内鞘細胞で強く発現していた。これより Os07g0539400 も細胞内細胞壁マトリックス多糖の加水分解制御を介し、側根の initiation に関与していると予想される。

Os12g0577700 は細胞周期の進行に関与し、G2/M 期特異的に発現する Cdc2 と相同性の高い cyclin-dependent kinase をコードしていた (Stals *et al.*, 2000)。Cdc2 のうち B-type cyclin-dependent kinase である CDKB2;1 はシロイヌナズナにおいて正常な細胞周期の進行に加えて分裂組織形成にも重要であることが報告されており、またイネにおいては側根原基において特徴的なパッチ状の発現が観察されている (Andersen *et al.*, 2000; Umeda *et al.*, 1999)。これらの報告から、Os12g0577700 がコードする cyclin-dependent kinase は、細胞周期進行を調節することで側根の initiation を促進していると示唆される。

これら 4 遺伝子の翻訳開始点から 1.5 kbp 上流の配列内にはそれぞれ、TGTCTC motif が存在していた。これらの TGTCTC motif は AuxRE として機能している可能性が高く、もしそうであれば、これら 4 つの遺伝子は OsARF によってその発現を直接制御されていると示唆される。

表 3-1. T1-34-6 変異体の表現型

Parameter	Age	wild-type	Heterozygous mutant	Homozygous mutant
Number of lateral roots (5cm from base)	12-day-old	92.6 ± 5.42	29.6 ± 2.03**	11.1 ± 1.50***†
Number of LRP (4cm from root tip)	12-day-old	24.2 ± 1.64	-	0.9 ± 0.22**
Length of a seminal root (mm)	12-day-old	139.7 ± 4.65	-	223.0 ± 14.18**
Number of crown roots	12-day-old	9.0 ± 0.30	-	9.1 ± 0.54
Plant height (cm)	3-month-old	137.4 ± 1.46	121.1 ± 1.99**	107.4 ± 4.19***†
Column length (cm)	3-month-old	88.2 ± 1.13	78.2 ± 2.17**	68.3 ± 4.39***†
Ear length (cm)	3-month-old	24.2 ± 0.55	20.8 ± 0.67**	18.4 ± 1.42**
Tiller number	3-month-old	10.3 ± 0.57	9.1 ± 0.86	6.6 ± 1.17*
Ear number	3-month-old	5.3 ± 0.35	3.9 ± 0.41*	2.4 ± 0.24**

各遺伝子型別の諸形質を測定した。*あるいは**は野生型との間で 5%あるいは 1%レベルで有意差があることを示し、†あるいは**†はヘテロ型との間で 5%あるいは 1%レベルで有意差があることを示す。

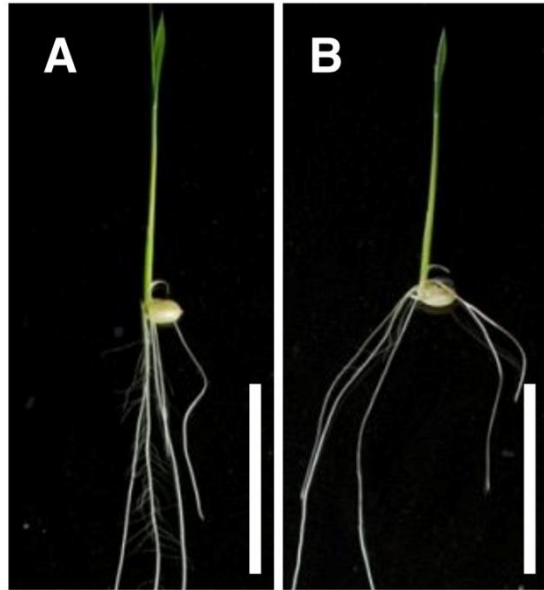


図 3-1. 2 週齢の野生型 (A) と T1-34-6 変異体 (B)

(Bar = 5 cm)

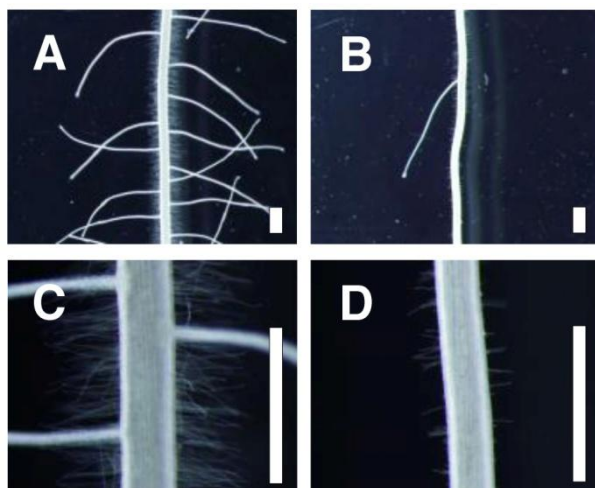


図 3-2. T1-34-6 変異体における側根および根毛の形成異常

A: 2 週齢の野生型における種子根から発生した側根。(Bar = 1 mm)

B: 2 週齢の T1-34-6 変異体における種子根から発生した側根。(Bar = 1 mm)

C: 2 週齢の野生型における種子根から発生した根毛。(Bar = 1 mm)

D: 2 週齢の T1-34-6 変異体における種子根から発生した根毛。(Bar = 1 mm)

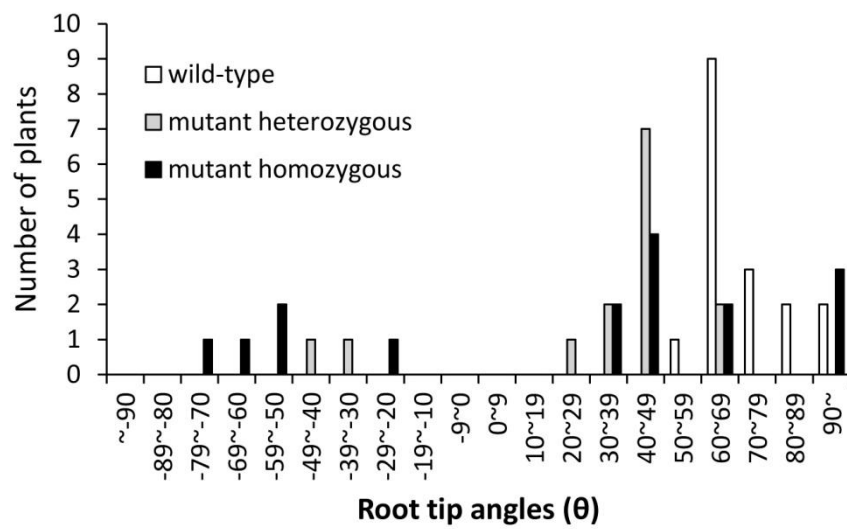


図 3-3. T1-34-6 変異体における根の重力屈性異常

1週間生育させた各遺伝子型の幼苗を90°回転させて1日後の種子根の屈曲角度を測定した。

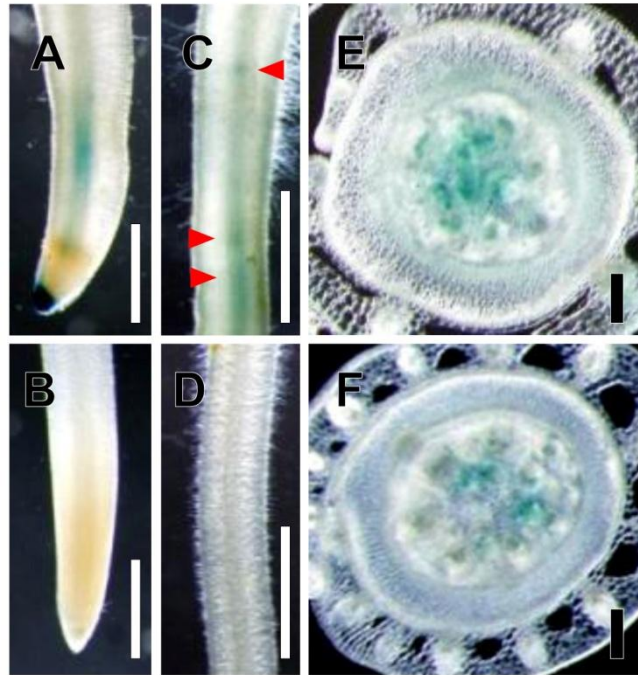


図 3-4. 野生型と T1-34-6 変異体における *ProDR5:GUS* の染色パターンの比較

A: *ProDR5:GUS* を導入した野生型における冠根の根端。(Bar = 200 μm)

B: *ProDR5:GUS* を導入した T1-34-6 変異体における冠根の根端。(Bar = 200 μm)

C: *ProDR5:GUS* を導入した野生型における側根の initiation 部位。

矢頭は側根原基形成の誘導が起こっている箇所を示す。(Bar = 200 μm)

D: *ProDR5:GUS* を導入した T1-34-6 変異体における側根の initiation 部位。(Bar = 200 μm)

E: *ProDR5:GUS* を導入した野生型における基部茎葉節の横断切片。(Bar = 200 μm)

F: *ProDR5:GUS* を導入した T1-34-6 変異体における基部茎葉節の横断切片。(Bar = 200 μm)

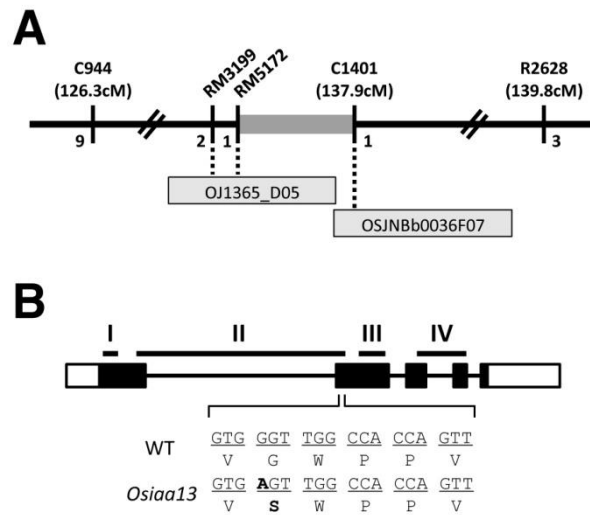


図 3-5. T1-34-6 変異体の原因遺伝子の単離

A: マップベースクローニングによる高精度連鎖解析地図。縦線は分子マーカーの位置、下の数字は各分子マーカーの位置における組み換え個体数を示す。

B: *OsIAA13* 遺伝子の構造と変異箇所。黒四角は exon、横線は特徴的な機能ドメインを示す。

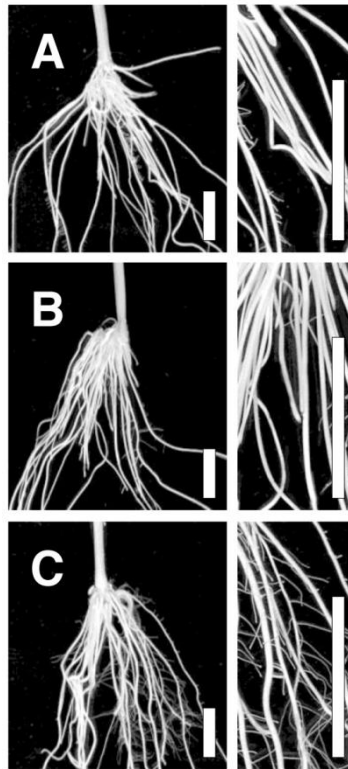


図 3-6. T1-34-6 変異体の相補性検定

A: 変異型 *OsIAA13* 遺伝子全長配列を含む DNA 断片 (*ProOsIAA13:Osiaa13*) を導入した野生型 (左) とその拡大 (右)。 (Bar = 1 cm)

B: 空ベクター (pCAMBIA) を導入した T1-34-6 変異体 (左) とその拡大 (右)。 (Bar = 1 cm)

C: 空ベクター (pCAMBIA) を導入した野生型 (左) とその拡大 (右)。 (Bar = 1 cm)

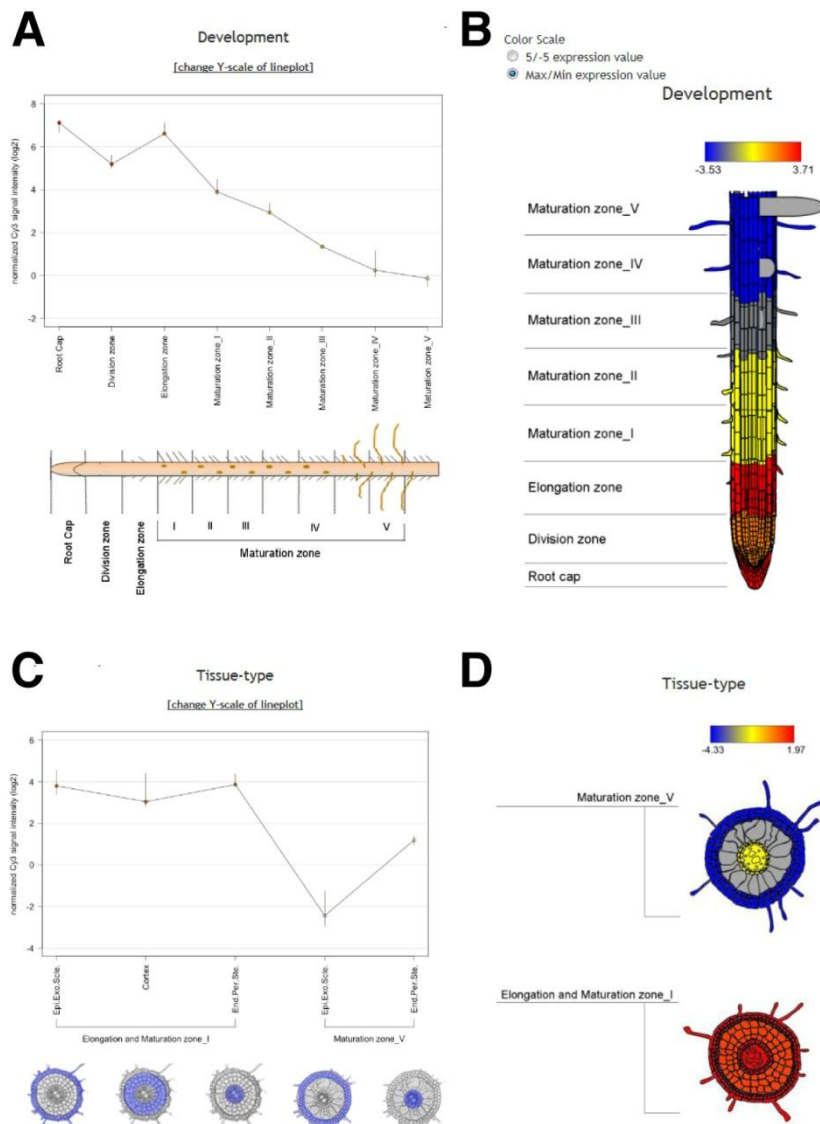


図 3-7. *OsIAA13* 遺伝子の発現パターン (RiceXPro: <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>より引用)

A: 根端部における *OsIAA13* 遺伝子の成長段階別の発現 (Normalized signal intensity line graph)。

B: 根端部における *OsIAA13* 遺伝子の成長段階別の発現 (Relative expression value pictograph)。

C: 根端部における *OsIAA13* 遺伝子の組織特異的な発現 (Normalized signal intensity line graph)。

D: 根端部における *OsIAA13* 遺伝子の組織特異的な発現 (Relative expression value pictograph)。

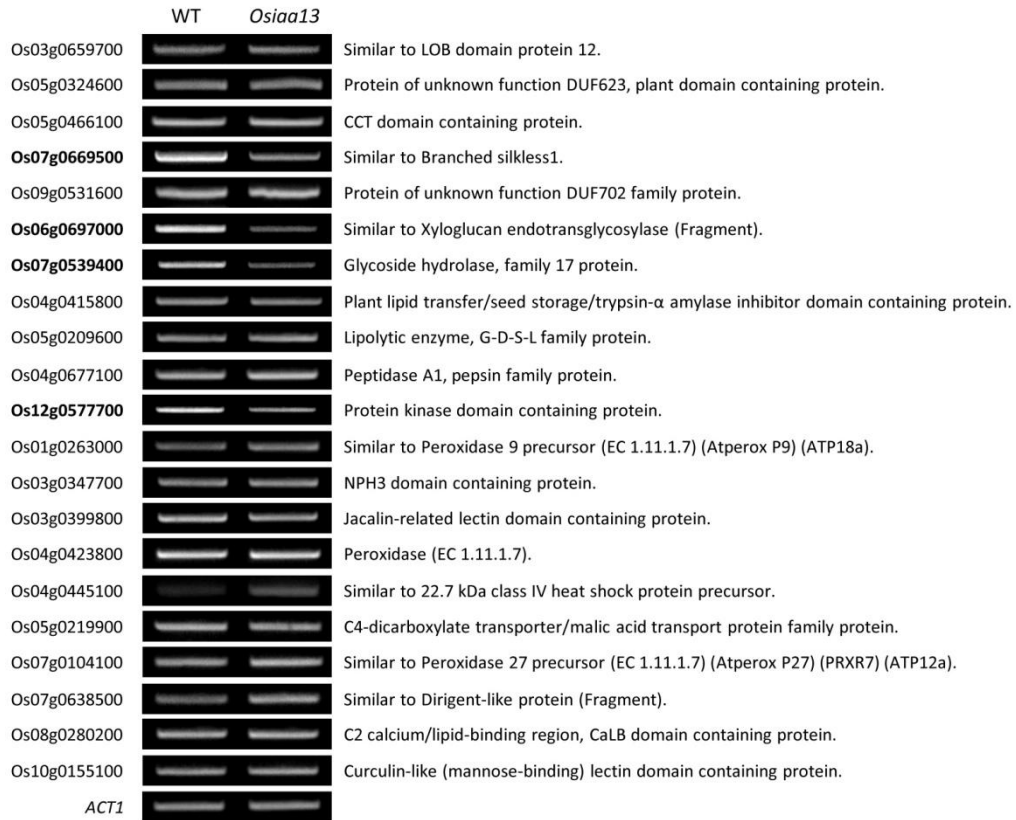


図 3-8. *Osiaa13* 変異体における側根の initiation に関与する遺伝子群の発現解析

調べた 21 遺伝子中、太字で示した 4 遺伝子 (Os07g0669500, Os06g0697000, Os07g0539400, Os12g0577700) の発現が、*Osiaa13* 変異体において低下していた。

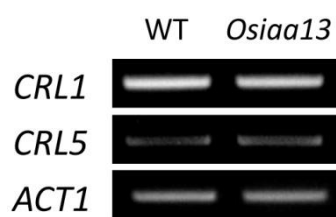


図 3-9. *Osiaa13* 変異体における *CRL1* 遺伝子および *CRL5* 遺伝子の発現解析

第4章

冠根の **initiation** を制御する *CRL5* 遺伝子の単離と機能解析

緒言

イネの根において水分吸収において主に機能していると考えられているのは側根であり、水分ストレス耐性が強いイネ品種において乾燥ストレス後に再灌水を行うと側根数が劇的に増加することが報告されている (Bañoc *et al.*, 2000; Kano-Nakata *et al.*, 2011)。冠根は側根形成の場としての役割を果たしており、前述のようなストレス条件下においては冠根数の増加も同時に観察されている (Bañoc *et al.*, 2000)。この新たな冠根発生に伴う側根形成の場の増加は効果的な総根長の増加をもたらし、結果として地上部乾物重の増加に大きく貢献していると考えられる。また植物体の支持という点においては、冠根が主にその機能を果たしている。冠根数が著しく減少する *crl1* 変異体はポット栽培では野生型とほぼ同様に生育し収量も同程度であったものの、水田において 1 株個体数の少ない慣行法により栽培すると著しい冠根数の減少に起因する登熟後の倒伏により収量が低下してしまう (西川ら, 2009)。このように冠根はイネの生育および生産性にとって非常に重要な要素であり、冠根形成のメカニズムを解明することは根系形態改良へ向けた品種育成にとって必須であるといえる。

前述の通り、根の形成に重要な役割を果たすオーキシニンシグナルの伝達は Aux/IAA と ARF の相互作用によって制御されており (Liscum and Reed, 2002)、Aux/IAA タンパク質の機能獲得型突然変異体では側根数が減少する (Fukaki *et al.*, 2002; Hamann *et al.*, 2002; Rogg *et al.*, 2001; Tatematsu *et al.*, 2004; Tian and Reed, 1999; Uehara *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004)。それに加え、Aux/IAA タンパク質と相互作用する ARF タンパク質に変異が生じた *arf7 arf19* 二重変異体においても著しい側根数の減少が報告されている (Okushima *et al.*, 2005; Wilmoth *et al.*, 2005)。しかし長い間、オーキシニンシグナル伝達と根の発生との間を結び付けるメカニズムに関しては、研究が進んでいるシロイヌナズナにおいてさえもミッシングリンクとして残されていた。

オーキシシンシグナル伝達と根の発生との間を結び付ける因子として初めて報告されたのは、AS2/LOB ドメインタンパク質をコードする *CRL1/ARL1* 遺伝子である。イネの冠根数が著しく減少する *crl1* 変異体の解析から、*CRL1/ARL1* 遺伝子は Aux/IAA と ARF によるオーキシシンシグナル伝達経路の下流に位置する転写因子として機能し、最終的に根の発生を促進することが明らかになった (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)。この *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現は ARF タンパク質によって直接制御されていることが判明したため、*CRL1/ARL1* 遺伝子がオーキシシンシグナル伝達と根の発生との間を結び付ける因子であることが明らかとなった (Inukai *et al.*, 2005)。シロイヌナズナの側根形成においても *CRL1/ARL1* 遺伝子と最も相同性の高い *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16 (LBD16)/ASYMMETRIC LEAVES2 LIKE18 (ASL18)* 遺伝子および *LBD29/ASL16* 遺伝子が、*NPH4/ARF7* および *ARF19* 依存的なオーキシシンシグナル伝達経路の下流で側根形成を正に制御する因子として見出された (Okushima *et al.*, 2007)。また、トウモロコシにおいても AS2/LOB ドメインタンパク質をコードする *ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS (RTCS)* 遺伝子が冠根形成に関与していることが報告された (Taramino *et al.*, 2007)。

イネは不定根がメインのひげ根型根系を形成し、一方シロイヌナズナは主根とそこから分枝する側根による主根型根系を形成する。しかし、シロイヌナズナとは根系形態の異なるイネより見出された *CRL1/ARL1* 遺伝子は上述の通り、イネとシロイヌナズナの間で共通の根系形成制御遺伝子であった。したがって *CRL1/ARL1* 遺伝子では、イネとシロイヌナズナの根系形態の違いを説明することはできない。また、*CRL1/ARL1* 遺伝子も *LBD16/ASL18* 遺伝子および *LBD29/ASL16* 遺伝子も側根形成に関与する。そのため、シロイヌナズナでは通常作られない冠根の形成に特化した遺伝子を見出すことができれば、イネとシロイヌナズナの根系形態の違いを説明する遺伝制御機構を明らかにできるのではないかと考えられた。そこで本章では、冠根数が著しく減少するが側根数は減少しない *crl5* 変異体の原因遺伝子の単離とその機能解析を行った。*crl5* 変異体はイネ品種・金南風の MNU 受精卵処理後代より得られた単因子劣性の突然変異体である。*crl5* 変異体の原因遺伝子を単離したところ、

CRL5 遺伝子は APETALA2 (AP2)/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (ERF) 型転写因子をコードしていた。この *CRL5* 遺伝子と最も相同性の高い遺伝子は、通常冠根（不定根）を作らないシロイヌナズナでは根の発生への関与が報告されていない遺伝子であった。*CRL5* 遺伝子は Aux/IAA および ARF によるオーキシンスIGNAL伝達経路において機能することが判明した。また、本遺伝子の関与する冠根形成経路は今までに報告されていた冠根形成経路とは異なる経路であることが明らかとなった。

材料および方法

植物体の育成

第2章 材料および方法を参照。

パラフィン包埋試料作製

第2章 材料および方法を参照。

トルイジンブルー組織染色

第2章 材料および方法を参照。

重力屈性テスト

第2章 材料および方法を参照。

外生オーキシンの投与

種子を消毒・催芽させた後、2,4-D濃度を 0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM にふった水に播種してグロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) で生育させ、12 日後に冠根数を測定した。遺伝子発現変化の解析は、水耕にて7日間生育させた野生型のイネを 10 μM IAA を含む水に挿し、グロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) で0時間, 1時間, 3時間, 6時間, 12時間, 24時間処理した。一定時間処理した植物の冠根形成部位を含む基部から 5 mm の茎葉節をサンプリングして直ちに液体窒素で凍結させ、RNA 抽出サンプルとした。

マップベースクローニング法による遺伝子単離

第2章 材料および方法を参照。

使用した分子マーカーのプライマー配列は別紙のリストを参照。

コンストラクトの作製

相補性検定用コンストラクト (*ProCRL5:CRL5*) は、*CRL5* 遺伝子の転写開始点より上流 3674 bp と終止コドンより 1061 bp を含む約 10.2 kbp のゲノム DNA 断片を PAC clone OJN0474G09 より *EcoRI* で切り出し、pCAMBIA 1300 vector にクローニングすることで作成した。

CRL5-like RNAi コンストラクト (*ProACT:CRL5-like1* RNAi, *ProACT:CRL5-like2* RNAi) は、野生型の茎葉部から得られた RNA より合成された cDNA を鋳型にして PCR により増幅 (2 µl template cDNA, 1× Prime STAR buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 µM Upper primer, 0.2 µM Lower primer, 5% DMSO, 0.75 U Prime STAR HS DNA polymerase) するとともに両端に制限酵素配列をリンカー付加し、*Bam*HI および *Eco*RI あるいは *Kpn*I および *Hind*III によってまず pBluescript II SK (+) 上に逆向き反復配列を作成した。このプラスミドから目的の配列を *Bam*HI で切りだして末端を平滑化し、*pACT::nos/Hm3* binary vector に再度クローニングすることで作成した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

ProCRL5:GFP コンストラクトは、ゲノム DNA あるいは pGWB5 vector を鋳型に *CRL5* 遺伝子の転写開始点より上流 2088 bp と *sGFP-nos* 配列を PCR により増幅し、*Xba*I あるいは *Hind*III によって pCAMBIA 1300 vector にクローニングすることで作成した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

CRL5 過剰発現用コンストラクト (*ProACT:CRL5*) は、cDNA を鋳型にして PCR により増幅したものをまず pBluescript II SK (+) にクローニングし、このプラスミドから目的の配列を *Xba*I および *Sma*I で切り出して *pACT::nos/Hm3* binary vector に再度クローニングすることで作成した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

OsIAA3P58L-GR コンストラクトは、Inukai *et al.* (2005) および Nakamura *et al.* (2006) と同じものを使用した。

形質転換の作製

第2章 材料および方法を参照。

系統樹の作製

第2章 材料および方法を参照。

半定量的 RT-PCR

第2章 材料および方法を参照。95°C 5分の変性後に 95°C 30秒・55°C 40秒・72°C 30秒の3ステップを *CRL1* は45サイクル、*CRL5* は30サイクル、*OsIAA4* は30サイクル、*ACT1* は25サイクル行って 72°C 7分の伸長反応の後 10°C で保存した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

ProCRL5:GFP 形質転換体の観察

作製した *ProCRL5:GFP* 形質転換体をそのまま、あるいは 5% agar に包埋後してビブラトームで 100 μm に切削し、GFPHQ フィルター付き実体顕微鏡 (SZX16, Olympus) で観察した。

in situ hybridization

第2章材料および方法を参照。

プローブの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

薬剤処理

DEX は DMSO に 100 mM 濃度になるように溶解し、100 μM になるように MS 培地に加えて植物を生育させた。2,4-D を処理するときは、100 μM DEX および 1 μM 2,4-D を含む水に植物を挿し、3時間後に基部から 5 mm の茎葉節をサンプリングして直ちに液体窒素で凍結させ、RNA 抽出サンプルとした。

CHX は EtOH に 100 mM 濃度になるように溶解し、50 μ M になるように水に加えた。2,4-D を処理するときは、まず 50 μ M CHX に水耕にて 7 日間生育させた植物を挿して前処理した後、終濃度が 1 μ M になるように 2,4-D を添加し、3 時間後に基部から 5 mm の茎葉節をサンプリングして直ちに液体窒素で凍結させ、RNA 抽出サンプルとした。

ゲルシフトアッセイ

(1) OsARF1 リコンビナントタンパク質の作製

OsARF1 リコンビナントタンパク質発現ベクター (*OsARF1* cDNA-pET32a) は Inukai *et al.* (2005) と同じものを使用し、*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換して 37°C・180 rpm で O.D. 600 値が 0.6 になるまで培養し、100 mM IPTG 存在下において 16°C・180 rpm で 16 時間タンパク質を発現させた。超音波破碎後に TALON Metal Affinity Resin (Clontech) で His-tag 精製し、PD10 column (GE Healthcare) で脱塩した後に陰イオンクロマトグラフィー (MonoQ, GE Healthcare) でさらに精製した。

(2) プローブの作製

CRL5 遺伝子上流配列 (130 bp ~ 200 bp) を PCR にて増幅し、pCRII vector (Invitrogen) にクローニングした。このコンストラクトを鋳型に M13 primers で増幅した PCR 産物を *Eco*RI 処理し、Klenow fragment (TAKARA) を用いて [α -³²P]dATP でラジオアイソトープラベルした。これを NICK column (GE Healthcare) で精製したものをプローブとして使用した。プローブの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

(3) 結合反応

結合反応は Sakamoto *et al.* (2001) に従って行った。プローブと OsARF1 リコンビナントタンパク質を、ローテーターを用いて 4°C で 30 分間結合 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10mM DTT, 10% glycerol, 0.05% NP-40 (Sigma), 50 ng/ μ l poly(dI-dC) (Sigma), 1 μ g/ μ l

BSA, 1 mM EDTA, 4 μ l probe, 6 μ l protein) させた後、4% アクリルアミドゲル (0.25 \times TBE) に 4 $^{\circ}$ C \cdot 160 V で 2 時間電気泳動した。frag. 3 でのコンペティターアッセイには 32 P ラベルしていない frag. 3 あるいは frag. 3m を用いた。コンペティターを加える場合は、必要量のコンペティターを入れて減圧乾燥させたチューブにプローブ以外の結合反応液とタンパク質を加え、ローテーターを用いて 4 $^{\circ}$ C で 30 分間コンペティターとタンパク質を結合させた後、プローブを加えてさらにローテーターを用いて 4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。

泳動後のアクリルアミドゲルを濾紙に張り付けて 80 $^{\circ}$ C で 2 時間減圧乾燥させ、Imaging Plate (富士フィルム) に一定時間感光させた後、IR BAS-2000 (富士フィルム) で検出した。

Primer list

・ 遺伝子単離

Primer name	Sequence
S14082S (<i>Mbo</i> I)_U	5'-GGGCGGGTGAAGGTGATGAA-3'
S14082S (<i>Mbo</i> I)_L	5'-AGTTGAACATAGATGCCACG-3'
C261 (<i>Eco</i> RI)_U	5'-TTCTCTTCTCTTGTGCGGC-3'
C261 (<i>Eco</i> RI)_L	5'-AGGCACACAACCAAAGAAGC-3'
C2523S (<i>Afa</i> I)_U	5'-CAGGGAGGGAGAGGAAGGAC-3'
C2523S (<i>Afa</i> I)_L	5'-TGACAGATAACTCCAGGTAA-3'
S11633 (<i>Xho</i> I)_U	5'-GAAGGAAAAAGGAGCAACAA-3'
S11633 (<i>Xho</i> I)_L	5'-AGATGCTGCGAAGGGATGGT-3'
E12196_U	5'-CTTCAGTAGTCCGATCGCC-3'
E12196_L	5'-ACCAGGGGCAACACACCAGC-3'
B05-E12 (<i>Afa</i> I)_U	5'-CTGGTCAATACTGCTAAGGG-3'
B05-E12 (<i>Afa</i> I)_L	5'-AAGGTGGCACAATGTGCAAC-3'
M23-E06 (<i>Alu</i> I)_U	5'-CAATGCATCTAGGAATTCCC-3'
M23-E06 (<i>Alu</i> I)_L	5'-TCCATTGCCATCTGACCTTG-3'
M23-150 (Seq)_U	5'-GAGACTTCATGAAGGCGCGA-3'
M23-150 (Seq)_L	5'-ACCAAGGGCCATGACTTAGG-3'
G09 (Seq)_U	5'-CCATCCCGAGTTCGGTAATCCC-3'
G09 (Seq)_L	5'-AACGAGCACACGGGAAGCGACA-3'
D05 (Seq)_U	5'-ACCTCCAACGTCATTCATCGGA-3'
D05 (Seq)_L	5'-GAAACTCGATTAACCTCGAAGA-3'
26S (Seq)_U	5'-GAGTTCTGTACCATGAACCCAT-3'
26S (Seq)_L	5'-ACAGGGTCCACAGCAACAAGTA-3'
O14 (<i>Hae</i> III)_U	5'-CCGCCAAGTGTAATTCAGTGG-3'
O14 (<i>Hae</i> III)_L	5'-GCTCATTGTCATTGGTGGCAGT-3'
D07 (<i>Hap</i> I)_U	5'-TTGTACACAGTCCCAGCTCC-3'
D07 (<i>Hap</i> I)_L	5'-ATGGTGGACTCTCCAATAGC-3'

・ RNAi コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>CRL5-like1</i> RNAi_5'UTR_U + <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCATGTACTCGCCAATG-3'
<i>CRL5-like1</i> RNAi_5'UTR_L + <i>Eco</i> RI	5'-GAATTCCTGGTGACGCCTCTG-3'
<i>CRL5-like1</i> RNAi_5'UTR_U + <i>B</i> + <i>Kpn</i> Iaa	5'-AAGGTACCGGATCCATGTACTCG-3'
<i>CRL5-like1</i> RNAi_5'UTR_L + <i>E</i> + <i>Hind</i> IIIaa	5'-TTAAGCTTGAATTCCTGGTGACG-3'
<i>CRL5-like2</i> RNAi_5'UTR_U + <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCTTCTGCTCAGCTCAC-3'
<i>CRL5-like2</i> RNAi_5'UTR_L + <i>Eco</i> RI	5'-GAATTCCTGGTGACGCCCTA-3'
<i>CRL5-like2</i> RNAi_5'UTR_U + <i>B</i> + <i>Kpn</i> Iaa	5'-AAGGTACCGGATCCTTCTGCTCA-3'
<i>CRL5-like2</i> RNAi_5'UTR_L + <i>E</i> + <i>Hind</i> IIIaa	5'-TTAAGCTTGAATTCCTGGTGACG-3'

・ 半定量的 RT-PCR

Primer name	Sequence
<i>CRL1</i> -RT_U	5'-AGCAACGTGTCCAAGCTGCT-3'
<i>CRL1</i> -RT_L	5'-GTCCTGGTGGTGTATCCCTT-3'
<i>CRL5</i> -RT_U	5'-CCATCGACACGTTTCGGTCAGAG-3'
<i>CRL5</i> -RT_L	5'-GAGGTCCTTGTTGCCGGAGACT-3'
<i>OsIAA4</i> -RT_U	5'-GGCATTCCCGGTGCCCATGA-3'
<i>OsIAA4</i> -RT_L	5'-GTCCATCGCCTATGGTGCGAC-3'
<i>ACT1</i> -RT_U	5'-GACTACATACAACTCCATCATG-3'
<i>ACT1</i> -RT_L	5'-AGCATTTCCTGTGCACAATGG-3'

• *ProCRL5:GFP* コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>ProCRL5_U+XbaI</i>	5'-TCTAGAGATCATACTGTAGCCTG-3'
<i>ProCRL5_L+XbaI</i>	5'-TCTAGACGTGCAAACAAACTGAG-3'
<i>GFP with nos_U+HindIII</i>	5'-AAGTGGTTCGATCTAGAGGATCC-3'
<i>GFP with nos_L+HindIII</i>	5'-AAGCTTGCTAATTCCCGATCTAG-3'

• *in situ* hybridization プローブ作製

Primer name	Sequence
<i>CRL5-in situ_U</i>	5'-ACGACGTGGCGGCGATCAAG-3'
<i>CRL5-in situ_L</i>	5'-TTAGGCGTCGGTCCAGGCGG-3'

• 過剰発現コンストラクト (*ProACT:CRL5*) 作製

Primer name	Sequence
<i>CRL5 OX1_U+XbaI</i>	5'-AATCTAGAACCGCCATTGACACTG-3'
<i>CRL5 OX1+HinfI_L</i>	5'-CTCCTCCTGCGTGCTGAAAG-3'
<i>CRL5 OX2+HinfI_U</i>	5'-ATCATCAGCACGGACGGTGG-3'
<i>CRL5 OX2_L+BamHI</i>	5'-TTGGATCCGCCTAGCTCTAGCTAT-3'

• ゲルシフトアッセイプローブ作製

Primer name	Sequence
frag.1_U	5'-GTACACCAATACTACTAGC-3'
frag.1_L	5'-TCTCTCTCTATCTTCTCTCTGTCTGTCTGTC-3'
frag.2_U	5'-GCCAAGCTCAAACCTCAAACCTCACC-3'
frag.2_L	5'-AATGGCGGTGGGCTGCGACAGATCGA-3'
frag.3_U	5'-AGCCACCGCCATTGACACTGACACG-3'
frag.3_L	5'-TGGTGCACGTGGTGGTGTTCGTCCAT-3'
frag.3m_U	5'-AGCCACCGCCATTGATACTGATACG-3'
frag.3m_L	5'-TGGTGCACGTGGTGGTGTTCGTCCAT-3'

結果

cr15 変異体の表現型解析

2 週齢の野生型 (金南風) は数本の冠根を発生させているのに対し、同じ 2 週齢の *cr15* 変異体においては冠根数が有意に減少していた (図 4-1, 2E)。そこで冠根の initiation 部位である基部茎葉節の横断切片を作成し観察したところ、野生型においては維管束の周囲を一周するように存在する辺周部維管束環の外側に接する柔細胞において冠根原基が形成されていた (図 4-2A, 2C)。それに対して *cr15* 変異体では、冠根原基の数が減少していた (図 4-2B, 2D)。形成された冠根原基に異常は観察されなかったため、*cr15* 変異体では冠根原基の initiation に異常が生じていると考えられた。一方、*cr15* 変異体において種子根から発生する側根数は野生型と差はなかった (図 4-2F)。冠根数および側根数の減少はイネのオーキシン関連突然変異体で観察される異常表現型であるが (Inukai *et al.*, 2005; Kitomi *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2005)、*cr15* 変異体の場合は冠根のみに異常が生じていることが判明した。また、*cr15* 変異体の種子根長は、野生型に比べて少し短くなっていた (図 4-2G)。

生殖生長期においては、野生型に比べて *cr15* 変異体の草丈は少し低く、また葉身幅は少し狭くなっていた (図 4-3A)。*cr15* 変異体は開花・結実することができるが、野生型に比べて開花時期が少し遅れ、穎花の大きさは少し小さくなり、稔性は 40% ~ 70% 程度に低下した (図 4-3B)。通常、野生型のイネの花には 6 本の雄蕊、1 本の雌蕊、2 本の鱗皮が穎花の中に形成される (図 4-3C)。*cr15* 変異体では上述のような花の異常が観察されるが、穎花の内部組織の数や形態に異常は観察されなかった (図 4-3C, 4D)。

イネおよびシロイヌナズナにおいて典型的なオーキシンが関与する形態変化として、重力屈性が挙げられる (Fukaki *et al.*, 2002; Inukai *et al.*, 2005; Kitomi *et al.*, 2008a; Leyzer *et al.*, 1996; Nagpal *et al.*, 2000; Tian and Reed, 1999; Yang *et al.*, 2004)。そこで *cr15* 変異体の重力屈性を調べたところ、野生型では重力方向が変化するとそれに敏感に応答したのに対し、*cr15* 変

異体では重力方向の変化に対する応答が鈍くなっていた。重力方向を 90° 転換させて 24 時間後の根の伸長角度 (図 4-4A) を測定したところ、野生型では屈曲角度は平均して 51.1 ± 2.6° であったが、*crl5* 変異体では 55° 以上屈曲せず屈曲角度の平均値は 31.1 ± 2.9° に留まった (図 4-4B)。また、外生オーキシンを投与しても *crl5* 変異体の冠根数を野生型並みに回復させることはできなかった (図 4-5)。

CRL5 遺伝子の単離

CRL5 遺伝子を単離するため、*crl5* 変異体に Kasalath を交雑して得た F₂ 集団を用いた高精度連鎖解析を行った。その結果、*CRL5* 遺伝子座は第 7 染色体の 5.2 cM 付近に存在することが明らかになった (図 4-6A)。野生型と *crl5* 変異体とで塩基配列を比較したところ、*crl5* 変異体において PAC クローン P0474G09 (AP005309) 上に座乗する Os07g0124700 (LOC_Os07g03250) の配列内に 1 塩基置換が生じており、その結果 192 番目のトリプトファンがストップとなったナンセンス変異が認められた (図 4-6B)。この遺伝子は 8 つのエキソンからなる 5419bp の ORF を持つ遺伝子であり、プロモーターおよび遺伝子全長配列を含んだ約 10.2 kbp のゲノム DNA 断片を *crl5* 変異体に導入したところ、*crl5* 変異体の異常表現型を相補した (図 4-6C)。

CRL5 遺伝子は AP2 domain を 2 つ持つタイプの AP2/ERF 型転写因子をコードしており、シロイヌナズナにおいて葉や花などの側生器官の形成に関与する *AINTEGUMENTA* (*ANT*) と相同性の高い遺伝子であることが判明した (Elliott *et al.*, 1996; Mizukami and Fischer, 2000)。*ANT* は 7 つの *ANT-like* (*AIL*)/*PLETHORA* (*PLT*) と、2 つの AP2 domain とそれら間の保存された領域から成る DNA 結合領域において高い配列相同性を持ち (Nole-Wilson *et al.*, 2005)、4 つの *AIL/PLT* 遺伝子 (*PLT1*, *PLT2*, *AIL6/PLT3*, *AtBABY BOOM* (*AtBBM*)) は根の発育に冗長的に機能していることが報告されている (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007)。ところがシロイヌナズナの *ant* 変異体においては根の異常は報告されていない (Elliott *et al.*, 1996)。BLAST 検索の結果、イネゲノム中には *CRL5* 遺伝子のホモログ遺伝子 (*CRL5-like*) が 2 つ、

どちらも第 3 染色体上に存在していることが判明した (*CRL5-like1*: Os03g0770700, LOC_Os03g56056; *CRL5-like2*: Os03g0232200, LOC_Os03g12950)。CRL5 と *CRL5-like1* および *CRL5-like2* は DNA 結合領域においてそれぞれ 57%、49% のアミノ酸相同性を有していた (図 4-7A)。また、DNA 結合領域のアミノ酸配列を基にシロイヌナズナの AP2 をアウトグループとして、イネの CRL5 と 2 つの *CRL5-like* およびシロイヌナズナの ANT と 7 つの AIL/PLT の分子系統樹を作成した。その結果、これらは 2 つのクレードに分けられ、イネの CRL5 と 2 つの *CRL5-like* はシロイヌナズナの ANT および AIL1 と同じクレードに属し、根の形成に関与する報告のある 4 つの AIL/PLT とは異なるクレードに分けられることが判明した (図 4-7B)。

CRL5 遺伝子とそのホモログ遺伝子の根系形成における寄与

crl5 変異体の変異は 2 つの AP2 domain より前でアミノ酸合成が停止するナンセンス変異であるが、*crl5* 変異体において完全に冠根の initiation が抑制されることはなく、変異の強さから予想される表現型よりも比較的弱い表現型を示す。イネゲノム中には 2 つの *CRL5* のホモログ遺伝子である *CRL5-like1* 遺伝子および *CRL5-like2* 遺伝子が存在しているため (図 4-7)、これらの遺伝子は *CRL5* 遺伝子と冗長的に冠根の initiation に関与している可能性が高いと考えられた。また側根の initiation においても *CRL5* 遺伝子と冗長的に機能しているか、あるいは *CRL5-like* 遺伝子が側根の initiation に関与し *CRL5* 遺伝子は冠根の initiation のみに関与するというように機能分化している可能性が考えられた。そこで RNAi 法を用いて *CRL5-like1* 遺伝子および *CRL5-like2* 遺伝子のノックダウン個体を作成し、その表現型を観察した。野生型背景でそれぞれの遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/WT, *CRL5-like2* RNAi/WT) では、野生型に比べて冠根数は減少していたが側根の減少は認められなかった (図 4-8A, 8B, 8C)。さらに、*crl5* 変異体背景でそれぞれの遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/*crl5*, *CRL5-like2* RNAi/*crl5*) では、*CRL5-like1* RNAi/WT および *CRL5-like2* RNAi/WT よりもシビアな表現型を示した (図 4-8D, 8E, 8F, 8G, 8H)。*CRL5-like1* RNAi/*crl5* は

再分化率が著しく低く、再分化したほとんどの個体では地上部が著しく矮化し、冠根の発生は認められなかった (図 4-8G)。また、根が発生したとしても植物体からの冠根は発生せず、極まれにカルスから発生するのみであり、その不定根は発根培地上でさらに増加することはなく、既に発生していた不定根からは側根が発生していた (図 4-8E)。再分化した *CRL5-like1 RNAi/crl5* は約 1 カ月程度で枯死した。*CRL5-like2 RNAi/crl5* では再分化率の低下は認められなかったものの地上部が矮化し、根の発生が認められない個体が多く観察された (図 4-8H)。植物体から発生する冠根は 1 ~ 2 本程度であり、その冠根からは側根が発生していた (図 4-8F)。*CRL5-like2 RNAi/crl5* のうち、発根しなかった個体は約 2 カ月程度で枯死した。これらノックダウン個体の表現型より、*CRL5* 遺伝子とそのホモログ遺伝子は側根の発生には関与せず、冠根の発生にのみ特化して機能すると示唆された。また冠根の initiation において、これらの遺伝子は冗長的に機能していることが明らかになった。

CRL5 遺伝子の発現解析

半定量的 RT-PCR により *CRL5* 遺伝子の器官別発現解析を行ったところ、*CRL5* 遺伝子は冠根原基の initiation 部位である節において発現していることがわかった (図 4-9)。*CRL5* 遺伝子の発現レベルは特に形成初期の花序において高く、花序から穎花へと発育が進んでいくに従ってその発現レベルは低下していった (図 4-9)。

次に、野生型に GFP を *CRL5* プロモーター制御下で発現させた形質転換イネ (*ProCRL5:GFP*) を作成し、組織レベルでの発現解析を行った。形質転換体において GFP 蛍光は冠根の分裂帯 (図 4-10A)、側根の基部および根端部 (図 4-10B)、発育中の側根原基 (図 4-10C)、基部茎葉節 (図 4-10D) で観察された。GFP 蛍光が観察された冠根の横断切片を作成し観察したところ、GFP 蛍光は中心柱で発現していることがわかった (図 4-10E)。冠根原基の initiation と *CRL5* 発現との関係を詳細に調べるため、基部茎葉節の横断切片を作成し GFP 蛍光を観察した。冠根原基は下位節から上位節に向かって順次発生していくため、基部茎葉節を茎頂分裂組織から冠根が出現してくる部位までの横断切片を作成することで、

冠根の発育ステージを連続的に追って観察することが可能である (図 4-11A)。基部茎葉節において GFP 蛍光は葉の維管束 (図 4-11C_α, 11C_β, 11C_γ)、若い葉原基 (図 4-11C_α)、節の維管束 (図 4-11C_γ, 11C_δ)、冠根の中心柱 (図 4-11C_γ) で観察された。冠根原基は節の大維管束と小維管束との間の、辺周部維管束環の外側に接する柔細胞から発生する (図 4-11B; Kaufman, 1959)。この部位において GFP 蛍光は冠根原基の initiation が起こると予想される柔細胞で発現していた (図 4-11C_β, 12C)。この部位における *CRL5* 遺伝子の mRNA 発現を *in situ* hybridization 法を用いて調べた。その結果、*CRL5* 遺伝子の mRNA は *ProCRL5:GFP* における GFP 蛍光シグナルと同様に、辺周部維管束環の外側に接する柔細胞で環状に発現していた (図 4-12)。

***CRL5* 遺伝子と *Aux/IAA* および *ARF* によるオーキシンスイグナル伝達との関係性**

これまでに、野生型 (台中 65 号) に比べて著しく冠根数が減少する突然変異体として *crli* 変異体が報告されている (図 4-13B, 13D; Inukai *et al.*, 2005)。*CRL1/ARL1* 遺伝子は、冠根の initiation の正の制御因子である AS2/LOB ドメインタンパク質をコードしており、冠根形成に関わるオーキシンスイグナル伝達経路において、その発現は *ARF* タンパク質によって直接制御されている (Inukai *et al.*, 2005)。*crli* 変異体は *crli* 変異体とよく似た形態的特徴を有していたため (図 4-13A, 13B, 13C, 13D)、*CRL5* 遺伝子もオーキシンスイグナル伝達経路で機能する遺伝子ではないかと推測された。そこで外生オーキシンに対する *CRL5* 遺伝子の発現変化を半定量的 RT-PCR により解析した。その結果、*CRL5* 遺伝子の発現は IAA 処理後約 1 時間で上昇し、約 3 時間後にピークに達し、その後は徐々に低下していった (図 4-13E)。この発現パターンは *CRL1/ARL1* 遺伝子と同様であり、したがって *CRL5* 遺伝子も冠根の initiation に関わるオーキシンスイグナル伝達経路で機能していると考えられた。*CRL5* 遺伝子と *CRL1/ARL1* 遺伝子との関係を調べるため、まず *crli* 変異体における *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現および *crli* 変異体における *CRL5* 遺伝子の発現をそれぞれ半定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、野生型と変異体との間でこれらの遺伝子の発現レベルに差は見られな

かった (図 4-14A)。次に、*cr11 cr15* 二重変異体を作成し、その表現型をそれぞれの単独変異体と比較した。それぞれの単独変異体は生育後期になると野生型に比べて著しく少ないながらも冠根を発生させることができるが (図 4-13B, 13D, 14D)、*cr11 cr15* 二重変異体は生育後期になっても全く冠根を発生させることができなかつた (図 4-14B, 14D)。この二重変異体の相加的な表現型より、*CRL5* 遺伝子は *CRL1/ARL1* 遺伝子とは異なる経路で機能していることが示唆された。示唆された両遺伝子の関係性を確認するため、さらに *cr11* 変異体背景で *CRL5* 遺伝子を過剰発現させた形質転換体 (*ProACT:CRL5/cr11*) を作成し、その表現型を観察した。その結果、*ProACT:CRL5/cr11* はベクターコントロールと同様に冠根を発生させることができず、*CRL5* 遺伝子の過剰発現によって *cr11* 変異体の冠根数減少を回復させることはできなかつた (図 4-14C, 14D)。したがってこれらの結果より、*CRL5* 遺伝子と *CRL1/ARL1* 遺伝子は冠根の initiation に関してそれぞれ異なった遺伝経路で機能していると考えられた。

オーキシシンシグナルは ARF タンパク質が転写活性化因子あるいは転写抑制因子として下流の遺伝子発現を制御することで伝達されるが、平常状態において ARF は Aux/IAA タンパク質と二量体を形成しており、ARF によるオーキシシン依存的な転写は Aux/IAA の分解により制御されている (Gray *et al.*, 2001)。そこで、OsIAA3 (OsIAA31 in Jain *et al.*, 2006a) の安定性に関わる domain II の保存されたプロリンをロイシンに置換し、DEX 誘導系により恒常的に安定型 OsIAA3 タンパク質を発現させた形質転換体 (*OsIAA3P58L-GR* in Inukai *et al.*, 2005) において *CRL5* 遺伝子の発現を解析した。この形質転換体は DEX 未処理の時にはオーキシシン関連異常表現型は観察されないが、DEX を処理すると以前の報告と同様に重力屈性異常および側根形成異常に加え、冠根数の減少が観察された (Inukai *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006)。DEX 未処理時の形質転換体においては *CRL5* 遺伝子の発現はオーキシシンによって誘導されたが、DEX 処理時の形質転換体において *CRL5* 遺伝子の発現はオーキシシンによって誘導されなかつた (図 4-15A)。この *CRL5* 遺伝子の発現の挙動はオーキシシン早期応答遺伝子である *OsIAA4* 遺伝子 (*OsIAA1* in Jain *et al.*, 2006a) と同じであった (図 4-15A; Inukai *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006)。これらの結果は Aux/IAA タンパク質の分解が *CRL5* 遺伝子のオ

ーキシシク依存的な発現誘導に重要であることを示しており、同時に *CRL5* 遺伝子は *CRL1/ARL1* 遺伝子と同様に Aux/IAA および ARF によるオーキシシクシグナル伝達経路で機能していることを示唆している。

また、*CRL5* 遺伝子のオーキシシク依存的な発現誘導におけるタンパク質合成阻害剤である CHX の影響を解析した。もし ARF タンパク質が直接 *CRL5* 遺伝子の発現を誘導していない場合、すなわち *CRL5* 遺伝子の発現誘導に二次的なタンパク質合成が必要であるならば、CHX 処理時のオーキシシクによる *CRL5* 遺伝子の発現誘導は抑制されると予想される。解析の結果、CHX 処理時のオーキシシクによる *CRL5* 遺伝子の発現誘導は抑制されなかった (図 4-15B)。*CRL1/ARL1* 遺伝子も同様な発現の挙動することが報告されている (Inukai *et al.*, 2005)。この結果から、オーキシシクによる *CRL5* 遺伝子の発現誘導に新規のタンパク質合成は必要でないと強く示唆された。

ARF タンパク質により直接発現を誘導されるオーキシシク早期応答遺伝子は、そのプロモーター領域に TGTCTC motif を含むオーキシシク応答性シス配列 (AuxRE) が見出されている (Hagen and Guilfoyle, 2002)。ARF に直接発現を誘導されることが報告されている *CRL1/ARL1* 遺伝子は、プロモーター領域に 2 つ存在する TGTCTC motif のうちの 1 つに OsARF1 (Waller *et al.*, 2002; OsARF23 in Wang *et al.*, 2007) が結合することが示され、この TGTCTC motif は *CRL1/ARL1* 遺伝子発現のシス配列として機能することが報告されている (Inukai *et al.*, 2005)。AuxRE の配列のうち、TGTC motif が ARF との結合に大きく寄与していることも判明している (Ulmasov *et al.*, 1997)。*CRL5* 遺伝子のプロモーター配列内には 3 つの TGTC motif (RE1, RE2, RE3) が見出された。RE1 は TGTC motif の相補的な配列が 3 回タンデムに並んだもの (GACAGACAGACA)、RE2 は TGTCTC motif 内で 1 塩基置換が生じた配列 (TGTCGC)、RE3 は TGTC motif の相補的な配列が 2 回タンデムに並んだ間に 2 塩基が挿入された配列 (GACACTGACA) である (図 4-15C)。これらの配列とイネの ARF タンパク質が相互作用するかどうかを、ゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、OsARF1 リコンビナントタンパク質と RE3 を含む fragment 3 に結合が認められ、RE1 あるいは RE2 を含む fragment 1

あるいは fragment 2 では結合が認められなかった (図 4-15D)。また、ラジオアイソトープラベルしていない fragment 3 をコンペティターとして加えると、コンペティター投入量の増加に従って OsARF1 と fragment 3 との結合が阻害された (図 4-15D)。さらに、RE3 の 2 つの TGTC motif に変異を加えた fragment 3m (GATACTGATA) では OsARF1 との結合は認められなかった (図 4-15D)。以上の結果から、*CRL5* 遺伝子は Aux/IAA と ARF によるオーキシシンシグナル伝達経路の下流で機能し、その発現はプロモーター領域内の RE3 に ARF タンパク質が結合することにより直接制御されている可能性が高いと示唆された。

CRL5 過剰発現体の作成とその表現型解析

CRL5 遺伝子の機能をさらに解析するために、*CRL5* 過剰発現体 (*ProACT:CRL5/WT*) を作成した (図 4-16A)。形質転換当代の *CRL5* 過剰発現体のほとんどで地上部に異常は認められなかったが (図 4-16B, 16C, 16D, 16E)、一部の個体で重力屈性の異常 (図 4-16D, 16F) や巻葉 (図 4-16G)、矮化 (図 4-16H) といった異常表現型が観察された。正常な地上部を持つ形質転換体はその後正常に生育し、稔実に至った (data not shown)。この *CRL5* 過剰発現体においては、冠根数および側根数の増加が認められた (図 4-16B, 16C, 16D)。

考察

第3章では、冠根数が著しく減少するが側根数は減少しない *cr15* 変異体の原因遺伝子 *CRL5* の単離とその機能解析を行った。

CRL5 遺伝子は AP2/ERF 型転写因子をコードする

変異体とインド型品種カサラスとの交雑自殖次世代 F₂ を用いた高精度連鎖解析により、*CRL5* 遺伝子は AP2 domain を 2 つ持つタイプの AP2/ERF 型転写因子をコードしていることが判明した (図 4-6B)。シロイヌナズナにおいて *CRL5* 遺伝子と最も相同性が高い遺伝子は *ANT* であった (Elliott *et al.*, 1996; Mizukami and Fischer, 2000)。*ANT* は側生器官の成長制御因子であり、シロイヌナズナの *ant* 変異体では野生型に比べて有意に花のサイズが小さく、反対に *ANT* 過剰発現体では花のサイズが大きくなる (Elliott *et al.*, 1996; Klucher *et al.*, 1996; Krizek, 1999; Mizukami and Fischer, 2000)。また、*ANT*, *AIL5*, *AIL6/PLT3* および *AIL7* 遺伝子は花メリステムと発育中の花においてそれぞれ異なるが部分的に重複した発現パターンを示し (Nole-Wilson *et al.*, 2005)、少なくとも *ANT* 遺伝子と *AIL6/PLT3* 遺伝子は花の成長とパターン形成に冗長的に機能していると報告されている (Krizek, 2009)。イネにおいて *CRL5* 遺伝子は若い葉原基、花序および根端メリステムで強く発現しており (図 4-9, 10A, 10B, 10C, 11C_α)、また *cr15* 変異体において葉、花および根は正常に発達するものの野生型に比べてそのサイズは小さくなっていた (図 4-1, 2G, 3)。ところが一方で、*CRL5* 過剰発現体では植物体や器官のサイズに変化はなかった (data not shown)。これより、*CRL5* 遺伝子はシロイヌナズナの *ANT* 遺伝子と同様に器官のサイズ制御に関与していると考えられるが、*ANT* 遺伝子のように主導的に機能はしていないと示唆される。加えて、*cr15* 変異体背景でそれぞれの遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/*cr15*, *CRL5-like2* RNAi/*cr15*) では地上部形態にも強い矮化などの異常表現型が観察され (図 4-8D, 8E, 8F, 8G, 8H)、特に *CRL5-like1*

RNAi/*cr15* では *CRL5-like2* RNAi/*cr15* よりもシビアな矮化および再分化率の著しい低下が認められた。したがって *CRL5* 遺伝子は器官サイズの制御だけでなく、そのホモログ遺伝子と冗長的に地上部形態形成全般に関与していると示唆され、特に *CRL5-like1* 遺伝子との冗長性が高いと考えられた。

ANT 遺伝子と相同性の高い7つの *AIL/PLT* 遺伝子のうち、*PLT1*, *PLT2*, *AIL6/PLT3*, *AtBBM* 遺伝子は根の発育に冗長的に機能していることが報告されており (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007)、特に *PLT1* 遺伝子および *PLT2* 遺伝子は過剰発現により本来根を形成しない器官からの発根を誘導することができるため、根の形成におけるマスタースイッチとして位置づけられている (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007)。イネにおいてシロイヌナズナの *PLT* 遺伝子に最も相同性の高い2つの遺伝子 (*OsPLTs*) はシロイヌナズナの *PLT1* 遺伝子および *PLT2* 遺伝子と同様の発現パターンを示すことから、*OsPLT* 遺伝子も根の形成に関与していると推測された (図 4-17; Kitomi *et al.*, 2011b)。しかし、*CRL5* 遺伝子と最も相同性の高い *ANT* 遺伝子は葉や花の形成に関与することは報告されているものの、*ant* 変異体では根の形態異常は観察されていない (Elliott *et al.*, 1996)。イネの *CRL5* と2つの *CRL5-like* およびシロイヌナズナの *ANT* と7つの *AIL/PLT* の分子系統樹を作成したところ、やはりイネの *CRL5* と2つの *CRL5-like* はシロイヌナズナの *ANT* および *AIL1* と同じクレードに属したが、根の形成に関与する報告のある *AIL/PLT* とは異なるクレードに分けられた (図 4-7B)。また、RNAi による *CRL5-like1* 遺伝子および *CRL5-like2* 遺伝子の機能類推から、*CRL5* 遺伝子とその2つのホモログ遺伝子は冠根の *initiation* 特異的に機能することが示唆された (図 4-8)。したがって、イネは冠根を形成するためにシロイヌナズナにおいては根の形成に関与しない遺伝子と相同性の高い *CRL5* 遺伝子に、シロイヌナズナでは通常作られない冠根 (不定根) 形成特異的な制御機能を付与したと考えられ、このような違いがイネとシロイヌナズナの根系形態の違いを生む一因となったのかもしれないと推測される。

CRL5 遺伝子はどの植物種でも見出されていなかった新たな根系形成遺伝子である

イネの冠根形成とシロイヌナズナの側根形成には共通する点が多く存在する。これまでにイネの冠根形成には、*CRL1/ARL1* 遺伝子が重要な機能を担っていることが報告されている (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)。*CRL1/ARL1* 遺伝子は Aux/IAA および ARF によるオーキシニンシグナル伝達経路において機能し、ARF タンパク質によってその発現を直接制御される遺伝子である (Inukai *et al.*, 2005)。*cr15* 変異体は *cr11* 変異体とよく似た形態的特徴を有しており (図 4-13A, 13B, 13C, 13D)、また *CRL5* 遺伝子のオーキシンによる発現誘導パターンも *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現誘導パターンと類似していた (図 4-13E)。したがって、*CRL5* 遺伝子も冠根形成に関与するオーキシニンシグナル伝達経路で機能しているのではないかと推測された。ところが *cr11* 変異体では冠根数の減少に加えて側根数の減少も観察されるため (Inukai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)、*CRL1/ARL1* 遺伝子は冠根の initiation 特異的に機能する遺伝子ではない。シロイヌナズナにおいても *CRL1/ARL1* と相同性の高い *LBD16/ASL18* 遺伝子および *LBD29/ASL16* 遺伝子も ARF7 タンパク質および ARF19 タンパク質によって発現を直接制御され、オーキシンによる側根形成を促進することが報告されている (Okushima *et al.*, 2007)。すなわち *CRL1/ARL1* 遺伝子は *CRL5* 遺伝子とは異なり、根系形態の異なるイネとシロイヌナズナの間で共通の根系形成制御遺伝子であるといえる。

したがってこれら 2 つの遺伝子の関係性を考えると *CRL5* 遺伝子は *CRL1/ARL1* 遺伝子とは別経路上で機能すると考えられたため、まず *cr11* 変異体における *CRL5* 遺伝子の発現および *cr15* 変異体における *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現を調べたところ、野生型におけるそれぞれの遺伝子の発現量と比較して変化がなかった (図 4-14A)。また *cr11 cr15* 二重変異体における相加的な表現型 (図 4-14B, 14D) および *ProACT:CRL5/cr11* 個体において *cr11* 変異体の冠根数減少を回復させることができなかったことから (図 4-14C, 14D)、*CRL5* 遺伝子と *CRL1/ARL1* 遺伝子は別経路上で機能していると考えられた。*CRL1/ARL1* 遺伝子は上述のとおり、Aux/IAA と ARF によるオーキシニンシグナル伝達経路において、ARF タンパク質のダイレクトターゲットとして位置づけられている。安定型 Aux/IAA タンパク質存在下におい

て *CRL5* 遺伝子の発現誘導が阻害されることから、*CRL5* 遺伝子も Aux/IAA および ARF によるオーキシシンシグナル伝達経路で機能していることが示唆された (図 4-15A)。加えて、*CRL5* 遺伝子の発現誘導には二次的なタンパク質合成が不要であり (図 4-15B)、*CRL5* 遺伝子上流配列内の AuxRE のうちの 1 つが OsARF1 リコンビナントタンパク質と直接相互作用することから (図 4-15D)、*CRL5* 遺伝子は ARF タンパク質にその発現を直接制御されている遺伝子であることが強く示唆された。

シロイヌナズナにおいて ARF タンパク質にその発現を直接制御され、根の initiation に関与する遺伝子は *CRL1/ARL1* 遺伝子と相同性の高い *LBD/ASL* 遺伝子しか報告されていない。また、トウモロコシにおいて冠根の initiation に関与することが報告されている *RTCS* 遺伝子も、*CRL1/ARL1* 遺伝子と相同性の高い遺伝子である (Taramino *et al.*, 2007)。したがって、*CRL5* 遺伝子はどの植物種でも見出されていなかった新たな根系形成制御遺伝子であることが明らかとなった。それと同時に、この *CRL5* 遺伝子に関与する根系形成経路は、既知の根系形成経路とは別のものであることも併せて判明した (図 4-18)。

CRL5 過剰発現体では冠根数および側根数が増加する

cr15 変異体では側根数が減少しないこと (図 4-2F) および *cr15* 変異体背景でホモログ遺伝子の機能を抑制した形質転換体においても側根数の減少が認められなかったことから (図 4-8)、*CRL5* 遺伝子は根の initiation に関しては冠根にのみ特化した遺伝子であると示唆された。一方で、*CRL5* 遺伝子は発達中の側根原基において発現が認められた (図 4-10C)。シロイヌナズナにおいて ARGOS (auxin-regulated gene involved in organ size) の細胞増殖および器官成長の制御は、ANT を介して行われていると報告されている (Hu *et al.*, 2003)。また、*CRL5* 遺伝子は伸長中の冠根および側根の根端分裂組織でも発現しており、この部位は根端分裂組織のサイズ制御に関わる遺伝子の相互作用が報告されている箇所である (Dello Ioio *et al.*, 2008)。したがって、この側根原基での *CRL5* 遺伝子の発現は、側根の initiation ではなく initiation の後の発育に *CRL5* 遺伝子に関与している可能性を示唆していると考えられる。

CRL5 過剰発現体では冠根数の増加に加えて側根数の増加が認められた (図 4-16B, 16C, 16D)。*CRL5* 過剰発現体における側根数の増加は、過剰発現によって側根の *initiation* 部位での *CRL5* 遺伝子の発現量が、ある一定以上の閾値を越えたことで引き起こされているのではないかと考えられた。シロイヌナズナの *ANT* 過剰発現体においてはカルスからの不定根発生が観察されているが側根原基数は増加しない、つまり *ANT* 遺伝子は未分化細胞からの発根は誘導できるが未分化細胞自体の数を増やして発根させることができないと示唆されている (Mizukami and Fischer, 2000)。先にも述べたが、*CRL5* 過剰発現体では反対に、シロイヌナズナに加えてタバコでも観察されている *ANT* 過剰発現での器官サイズの増大が認められない (Mizukami and Fischer, 2000)。相同性の高い両遺伝子は、形態の異なる種をまたぐことでその機能を変化させたことがここからも推測される。

CRL5 過剰発現個体では冠根数および側根数の増加に加え、一部の個体において葉身の巻きや重力屈性異常といった地上部形態の異常も観察された (図 4-16)。葉身は *CRL5* 遺伝子の発現レベルが低い器官であり (図 4-9)、そのため *ACTIN* プロモーターで植物体全体にほぼ均一に *CRL5* 遺伝子を発現させると普段発現量が少ない器官で特に異常が現れると考えられる。重力屈性異常に関しても同様で、重力屈性に何らかの形で関与する *CRL5* 遺伝子が植物体全体でほぼ均一に発現したために、*CRL5* 過剰発現個体において重力に対する反応が異常になったと考えられる。したがって冠根形成部位および側根形成部位特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下で *CRL5* 遺伝子を発現させれば、地上部形態に異常が現れることなく冠根数および側根数だけが増加したイネを作出することができると予想される。また、*CRL5* 遺伝子下流で機能している遺伝子の中には冠根の *initiation* に特異的な遺伝子があると予想され、その遺伝子も根の発生量改変による品種育成を試みる上で非常に有用であると考えられる。



図 4-1.3 週齡の野生型 (左) と *crt5* 変異体 (右)

(Bar = 5 cm)

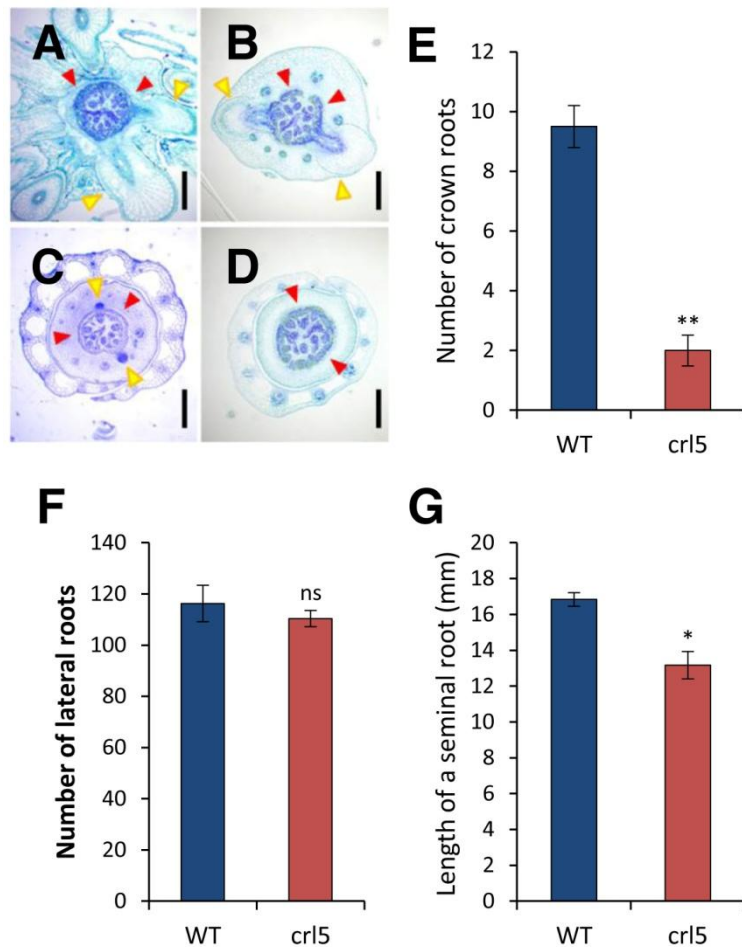


図 4-2. *crl5* 変異体における冠根および側根の形成異常

A: 7 日齢の野生型における鞘葉節の横断切片。(Bar = 200 μ m)

B: 7 日齢の *crl5* 変異体における鞘葉節の横断切片。(Bar = 200 μ m)

C: 7 日齢の野生型における第 1 節の横断切片。(Bar = 200 μ m)

D: 7 日齢の *crl5* 変異体における第 1 節の横断切片。(Bar = 200 μ m)

赤矢頭は辺周部維管束環、黄矢頭は冠根原基を示す。

E: 2 週齢の *crl5* 変異体における冠根数。**は野生型との間に 1% レベルで有意差があることを示す。

F: 2 週齢の *crl5* 変異体における側根数。ns は野生型との間に有意差がないことを示す。

G: 2 週齢の *crl5* 変異体における種子根長。*は野生型との間に 5% レベルで有意差があることを示す。

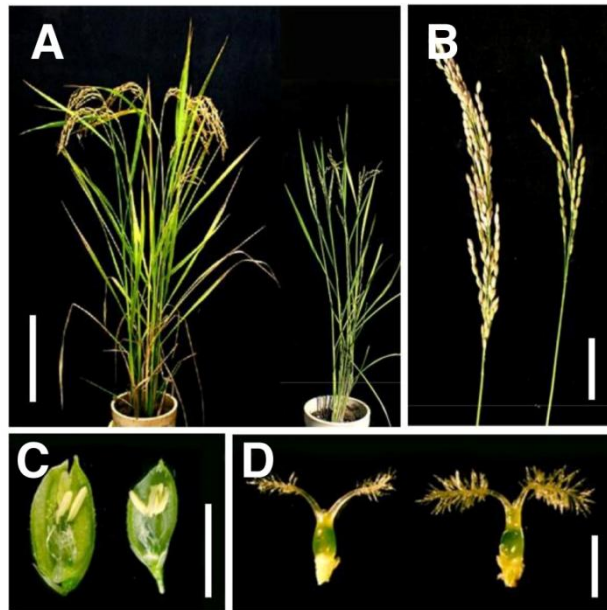


図 4-3. 生殖生長期における *crl5* 変異体の異常

A: 4 ヶ月齢の野生型 (左) と *crl5* 変異体 (右)。 (Bar = 10 cm)

B: 野生型 (左) と *crl5* 変異体 (右) の穂。 (Bar = 5 cm)

C: 野生型 (左) と *crl5* 変異体 (右) の花。 (Bar = 5 mm)

D: 野生型 (左) と *crl5* 変異体 (右) の雌蕊。 (Bar = 1 mm)

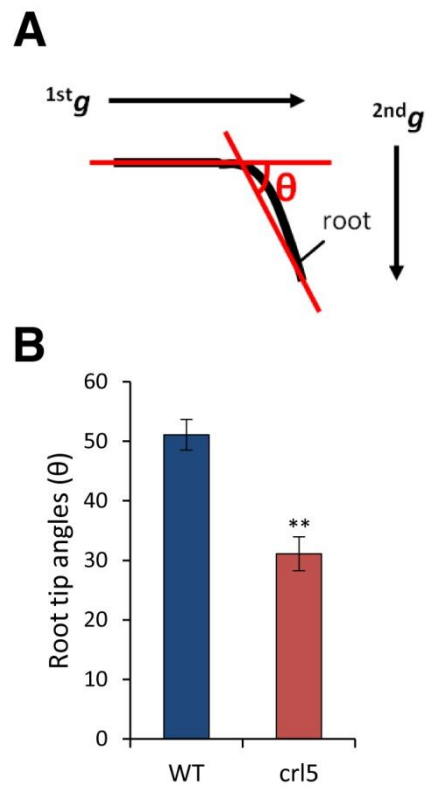


図 4-4. *crl5* 変異体における根の重力屈性異常

A: 1st g の方向に 1 週間育てた後、2nd g の方向に 90°回転させたときの屈曲角度 (θ)。

B: 野生型と *crl5* 変異体の種子根における屈曲角度。

**は野生型との間に 1% レベルで有意差があることを示す。

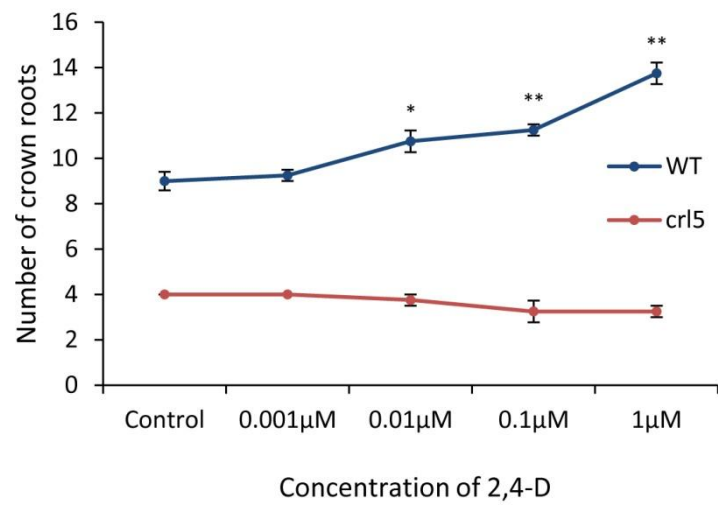


図 4-5. 外生オーキシシン (2,4-D) 投与時の冠根数の比較

*および**は野生型との間に 5%あるいは 1%レベルで有意差があることを示す。

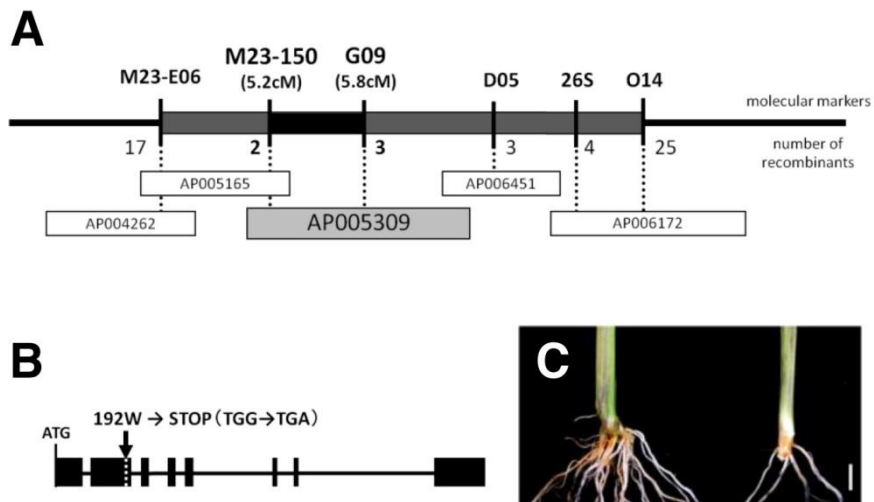


図 4-6. *crl5* 変異体の原因遺伝子の単離

A: マップベースクローニングによる高精度連鎖解析地図。

縦線は分子マーカーの位置、下の数字は各分子マーカーの位置における組み換え個体数を示す。

B: *CRL5* 遺伝子の構造と変異箇所。黒四角は exon、

矢印は *crl5* 変異体における変異箇所を示す。

C: *CRL4* 遺伝子全長配列を含むゲノム断片を導入した *crl5* 変異体 (左) と空ベクターを導入した *crl5* 変異体 (control, 右)。(Bar = 1 cm)

A

```

CRL5      251 AVAAADGGRKRGAGGGGKQPVHHRKSIDTFGQRTSOYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGR 320
CRL5-like1 269 YMAMDAVSKKRGADRAQQKQPV-HRKSIDTFGQRTSOYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGR 337
CRL5-like2 256 DGGEQRVGGKR-GTGGGKQKQPV-HRKSIDTFGQRTSOYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGR 323
ANT       247 TMAAAKKKRGQEDVVVGGKQIV-HRKSIDTFGQRTSOYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGHSRKGR 315
PLT1     147 PSETTGDNASG--GALAVVETATPRRALDTFGQRTSIYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCRREGQSRKGR 213
PLT2     153 PAETSADNSSSTNTSGAIVEATPRRTLPTFGQRTSIYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCRREGQSRKGR 222

CRL5      321 QVYLGGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFELELYQELPEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 390
CRL5-like1 338 Q--GGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFELELYQELPEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 404
CRL5-like2 324 QVYLGGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFELELYQELPEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 393
ANT       316 QVYLGGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFAENYQKELPEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 385
PLT1     214 QVYLGGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFRITNYEKVEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 283
PLT2     223 QVYLGGYDREKAARNDLAALKYWGQSTHINFRITNYEKVEEMQWTRQEVVAHLRRSSGFSRGAS 292

CRL5      391 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 460
CRL5-like1 405 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 474
CRL5-like2 394 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 463
ANT       386 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 455
PLT1     284 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 353
PLT2     293 YRGVTRRHQHRWQARIGRVSGNKDLYLGTFTQEEAAEAYDPAIKFRGDAVTFNFDIRYDVOKIMSS 362

```

B

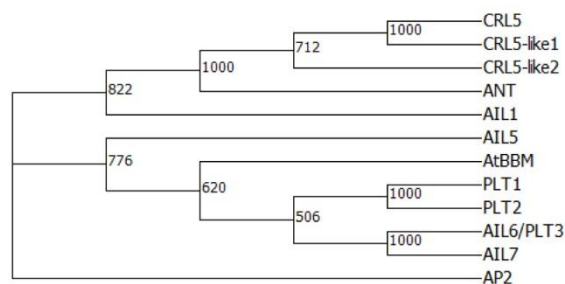


図 4-7. CRL5 のアミノ酸アライメントと分子系統樹

A: イネの CRL5, CRL4-like1, CRL5-like2 およびシロイヌナズナの ANT, PLT1, PLT2 の、2つの AP2 domain とそれら間の保存された領域におけるアミノ酸配列の比較。

B: 2つの AP2 domain とそれら間の保存された領域におけるアミノ酸配列を元に作成した AP2/ERF の分子系統樹。AP2 domain を1つもつシロイヌナズナの AP2 をアウトグループとして用いた。



図 4-8. *CRL5-like1* 遺伝子および *CRL5-like2* 遺伝子のノックダウン個体の表現型

A: 空ベクター (*pAct::nos/Hm3*) を導入した野生型。(Bar = 1 cm)

B: 野生型背景で *CRL5-like1* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/WT)。(Bar = 1 cm)

C: 野生型背景で *CRL5-like2* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like2* RNAi/WT)。(Bar = 1 cm)

D: 空ベクター (*pAct::nos/Hm3*) を導入した *crl5* 変異体。(Bar = 1 cm)

E: *crl5* 変異体背景で *CRL5-like1* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/*crl5*) の表現型が弱いもの。(Bar = 1 cm)

F: *crl5* 変異体背景で *CRL5-like2* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like2* RNAi/*crl5*) の表現型が弱いもの。(Bar = 1 cm)

G: *crl5* 変異体背景で *CRL5-like1* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like1* RNAi/*crl5*) の表現型が強いもの。(Bar = 1 cm)

H: *crl5* 変異体背景で *CRL5-like2* 遺伝子をノックダウンした個体 (*CRL5-like2* RNAi/*crl5*) の表現型が強いもの。(Bar = 1 cm)

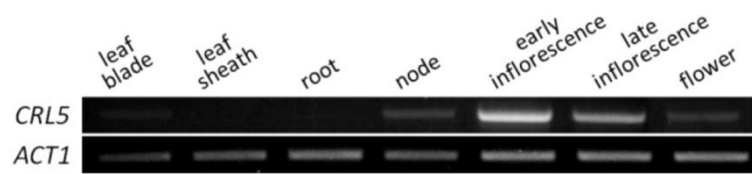


図 4.9. 半定量的 RT-PCR による *CRL5* 遺伝子の発現解析

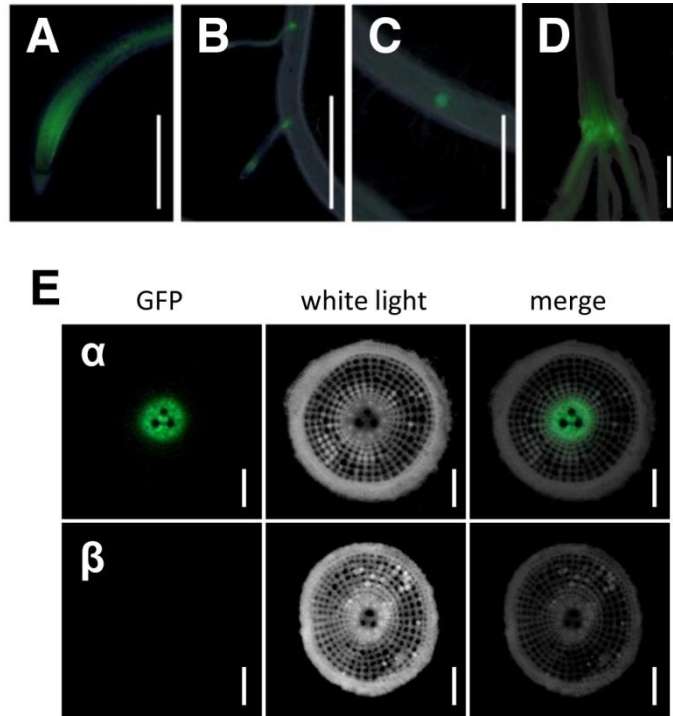


図 4-10. *ProCRL5:GFP* による *CRL5* 遺伝子の発現パターンの解析

A: 冠根の根端における *CRL5* 遺伝子の発現。(Bar = 5 mm)

B: 冠根から発生した側根における *CRL5* 遺伝子の発現。(Bar = 5 mm)

C: 発達中の側根原基における *CRL5* 遺伝子の発現。(Bar = 5 mm)

D: 基部茎葉節における *CRL5* 遺伝子の発現。(Bar = 5 mm)

E: *ProCRL5:GFP* を導入した冠根の横断切片 (α) と空ベクター (pCAMBIA) を導入した冠根の横断切片 (control, β)。 (Bar = 100 μ m)

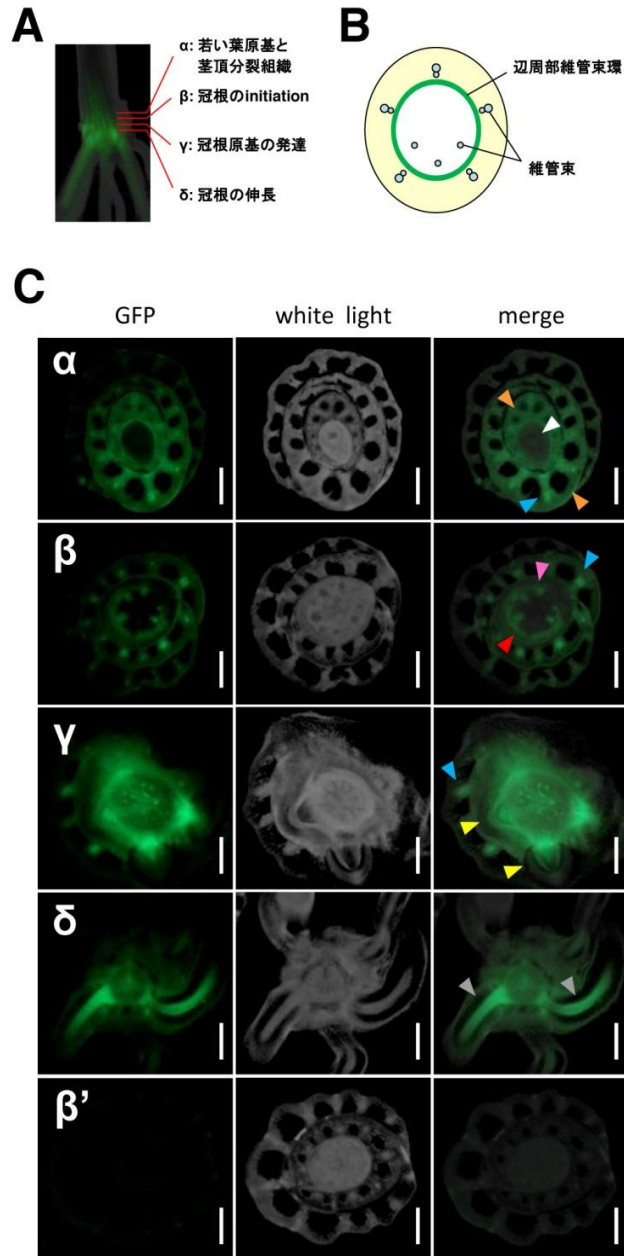


図 4-11. *ProCRL5:GFP* による冠根の initiation 部位における *CRL5* 遺伝子の発現

パターンの解析

A: 冠根原基の発達段階と、基部茎葉節における位置関係。α から δ は C での α から δ と対応している。

B: 冠根の initiation 部位 (A_β, C_β) の模式図。

C: 冠根原基の発達段階別の *CRL5* 遺伝子の発現。β' はコントロール (pCambia を導入) における β の部位の横断切片。白矢頭は茎頂分裂組織、オレンジ矢頭は若い葉原基、青矢頭は葉の維管束、ピンク矢頭は節の維管束、赤矢頭は辺周部維管束環、黄矢頭は冠根原基、グレー矢頭は冠根の維管束を示す。(Bar = 200 μm)

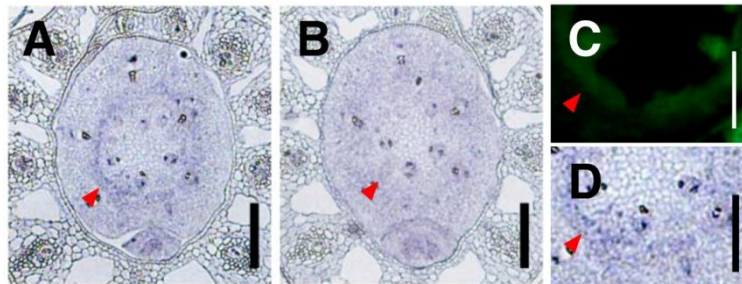


図 4-12. *in situ hybridization* による *CRL5* 遺伝子の発現パターンの解析

A: 7 日齢の野生型の冠根の initiation 部位における *CRL5* 遺伝子の発現。

(Bar = 200 μ m)

B: *CRL5* sense probe によるコントロール。(Bar = 200 μ m)

C: 冠根の initiation 部位における *ProCRL5:GFP* の発現 (図 4-11C $_{\beta}$ を拡大)。

(Bar = 200 μ m)

D: *in situ hybridization* による *CRL5* シグナル (A を拡大)。(Bar = 200 μ m)

矢頭は辺周部維管束環を示す。

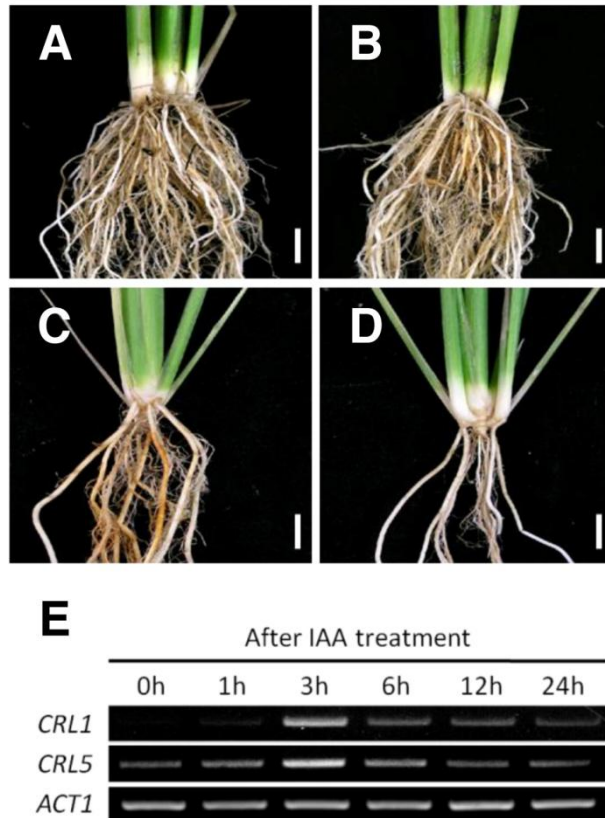


図 4-13. 1 ヶ月齢の野生型、*cr15* 変異体および *cr11* 変異体

A: 1 ヶ月齢の金南風 (*cr15* 変異体の野生型)。 (Bar = 1 cm)

B: 1 ヶ月齢の T65 (*cr11* 変異体の野生型)。 (Bar = 1 cm)

C: 1 ヶ月齢の *cr15* 変異体。 (Bar = 1 cm)

D: 1 ヶ月齢の *cr11* 変異体。 (Bar = 1 cm)

E: 外生オーキシシンによる *CRL1* 遺伝子および *CRL5* 遺伝子の発現誘導パターン。

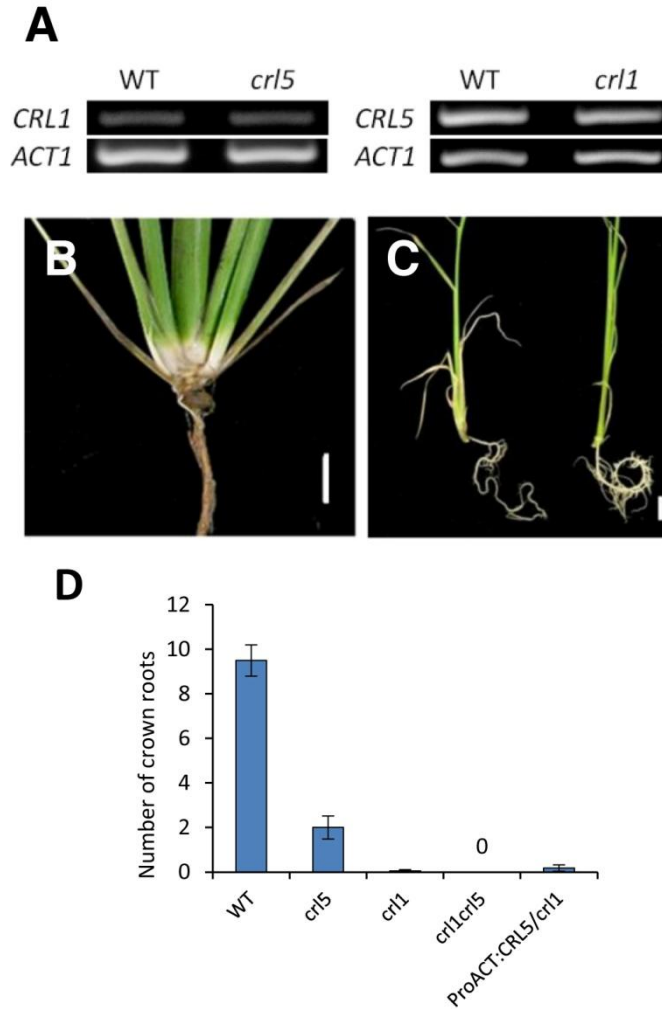


図 4-14. *CRL5* 遺伝子と *CRL1* 遺伝子の冠根の initiation における関係性

A: *crl5* 変異体における *CRL1* 遺伝子の発現 (左) および *crl1* 変異体における *CRL5* 遺伝子の発現量の比較 (右)。

B: 1 ヶ月齢の *crl1 crl5* 二重変異体。(Bar = 1 cm)

C: 空ベクター (*pAct::nos/Hm3*) を導入した *crl1* 変異体 (左) と *crl1* 変異体背景で *CRL5* 遺伝子を過剰発現させた個体 (*ProACT:CRL5/crl1*, 右)。(Bar = 1cm)

D: 野生型、*crl5* 単独変異体、*crl1* 単独変異体、*crl1 crl5* 二重変異体、*ProACT:CRL5/crl1* の冠根数の比較。

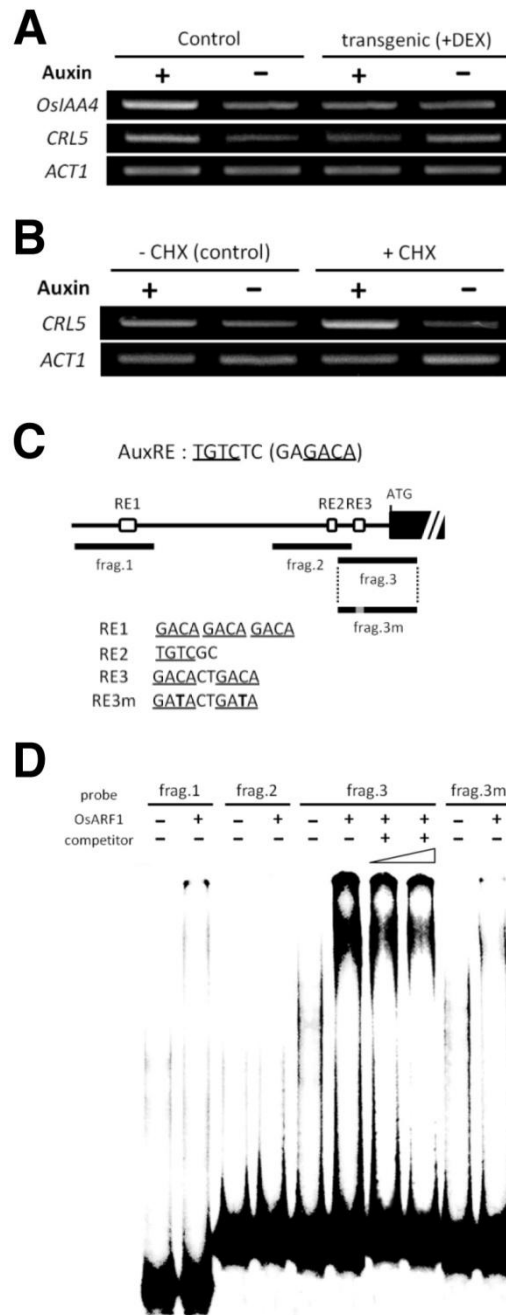


図 4-15. オーキシシンによる *CRL5* 遺伝子の発現制御

A: *OsIAA3P58L-GR* における安定型 *OsIAA3* タンパク質誘導時のオーキシシンによる *CRL5* 遺伝子の発現誘導パターンの変化。

B: CHX 存在下におけるオーキシシンによる *CRL5* 遺伝子の発現誘導パターンの変化。

C: *CRL5* 遺伝子上流配列に存在する 3 つの TGTC motif の位置とその配列。白四角は TGTC motif、横線はゲルシフトアッセイに用いたプローブ配列を示す。frag. 3m は frag. 3 に含まれる RE3 に変異を導入したもの。

D: OsARF1 リコンビナントタンパク質と 32 P-labeled probe を用いたゲルシフトアッセイ。

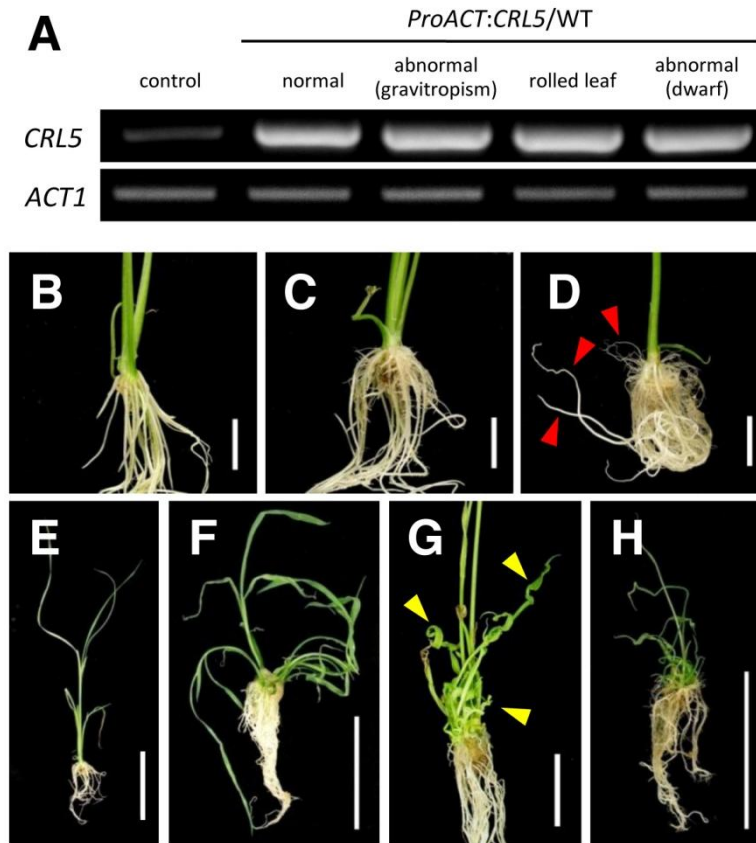


図 4-16. *CRL5* 過剰発現体で観察される異常表現型

A: *ProACT:CRL5/WT* における *CRL5* 遺伝子の発現量の比較。

B: 空ベクター (*pAct::nos/Hm3*) を導入した野生型 (control)。(Bar = 1 cm)

C: *ProACT:CRL5* を導入した野生型 (*ProACT:CRL5/WT*)。(Bar = 1 cm)

D: 根の重力応答が異常になった *ProACT:CRL5/WT*。

赤矢頭は重力応答が異常になった根を示す。(Bar = 1 cm)

E: 地上部形質に異常のない *ProACT:CRL5/WT*。(Bar = 5 cm)

F: 葉の重力応答が異常になった *ProACT:CRL5/WT*。(Bar = 5 cm)

G: 葉身が巻いた *ProACT:CRL5/WT*。黄矢頭は巻葉を示す。(Bar = 5 cm)

H: 矮化した *ProACT:CRL5/WT*。(Bar = 5 cm)

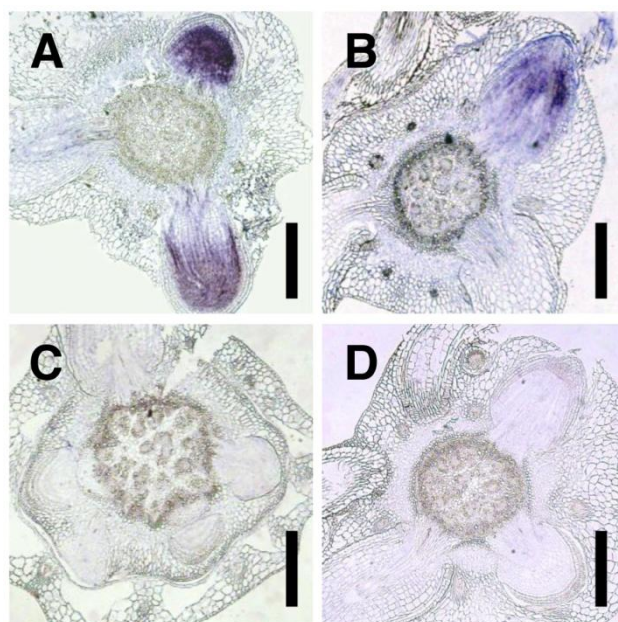


図 4-17. *in situ hybridization* による *OsPLT* 遺伝子の発現パターンの解析

A: Os04g0653600 (LOC_Os04g55970) の発現。(Bar = 200 μ m)

B: Os06g0657500 (LOC_Os06g44750) の発現。(Bar = 200 μ m)

C: Os04g0653600 sense probe によるコントロール。(Bar = 200 μ m)

D: Os06g0657500 sense probe によるコントロール。(Bar = 200 μ m)

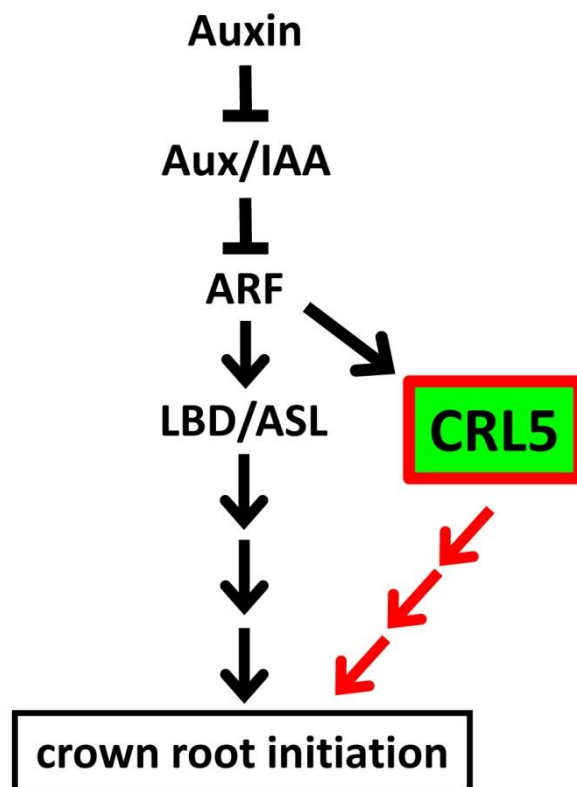


図 4-18. *CRL5* 遺伝子による冠根の initiation の制御

CRL5 遺伝子は Aux/IAA および ARF によるオーキシシンシグナル伝達経路で機能し、その発現を直接 ARF に制御されると示唆された。*CRL5* 遺伝子はどの植物種でも見出されていなかった新たな根系形成遺伝子であるとともに、この *CRL5* 遺伝子の関与する根系形成経路は既知の根系形成経路とは異なるものであることが明らかとなった。

第 5 章

CRL5 遺伝子下流で機能する 冠根の **initiation** 制御因子群の探索

緒言

根の発生には AS2/LOB ドメインタンパク質をコードする遺伝子群が重要であることは、様々な植物種において報告されてきた (Inukai *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2007; Taramino *et al.*, 2007)。それに加えて *crl1* 変異体では地上部形質に異常は認められず、野生型と同様に生育・結実することができたため、*CRL1/ARL1* 遺伝子は根特異的に機能する育種上非常に有用な遺伝子であると考えられた (Inukai *et al.*, 2005)。しかし、*CRL1* 過剰発現体では根の発生数の増加が認められなかったため (Inukai *et al.*, 2005)、冠根および側根の発生量を増加させる育種に利用可能な有用遺伝子の発見が切望されていた。これに関して本研究の第 4 章では、*CRL5* 遺伝子が過剰発現によって根の発生量を増加させる能力を持つことが明らかとなった (図 4-16A, 16B)。したがって *CRL5* 遺伝子は、根の発生量を増やす育種において非常に有用な遺伝子であるといえる。ところが *CRL5* 過剰発現体では冠根数および側根数の増加に加え、一部の個体で葉身の巻きや重力屈性異常といった地上部形態の異常も観察された (図 4-16C, 16E, 16F, 16G; Kitomi *et al.*, 2011a)。したがって、単純に *CRL5* 遺伝子の発現量に依存するだけでは実用的な品種の育成を実現することはできないと考えられた。

サイトカイニンとオーキシンと並び、植物の成長に必須な植物ホルモンとして古くから知られており、根の形態形成にも深く関与している。サイトカイニンとオーキシンとは反対に根の発生抑制する働きを持っており、シロイヌナズナにおいてサイトカイニンを外生投与すると側根の発生が阻害され (Laplaze *et al.*, 2007)、サイトカイニンの分解に関与する cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) をコードする遺伝子を過剰発現させた形質転換体では側根の発生が増加することが報告されている (Werner *et al.*, 2001)。サイトカイニンの生体内での恒常性は生合成と代謝のバランスによって成り立っている。サイトカイニンの生合成反応は adenosine phosphate-isopentenyltransferase (IPT)、cytochrome P450 monooxygenase である CYP735A1 および CYP735A2、LONELY GUY (LOG) などの酵素により触媒されている

(Kakimoto, 2001; Kurakawa *et al.*, 2007; Takei *et al.*, 2001, 2004)。一方、サイトカイニンの代謝は不可逆的な脱水素反応による分解、配糖化による可逆的あるいは不可逆的な不活性化などが知られている (Hou *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 1999a, 1999b, 2001; Schmülling *et al.*, 2003)。サイトカイニン分解酵素をコードする *CKX* 遺伝子はサイトカイニンによって誘導され、サイトカイニン量を調節するための負のフィードバック制御に関与していると考えられている (Werner *et al.*, 2001)。シロイヌナズナに7つ存在する *CKX* 遺伝子についてはそれぞれの遺伝子発現部位の組織特異性および遺伝子産物特有の分布パターンが報告されており (Werner *et al.*, 2003)、様々な組織ごとでのサイトカイニン量の調節機構が植物の発育に必須となっていることが示唆される。また、グルコースあるいはキシロースがサイトカイニンの側鎖の水酸基に結合した配糖体は、貯蔵型サイトカイニンとして機能しているのではないかと考えられている。配糖体には *O*-glucoside 型と *N*-glucoside 型の2種類があり、*O*-glucoside 型のみが β -glucosidase により脱グルコシル化され活性型サイトカイニンに戻ることができる (Brzobohatý *et al.*, 1993)。

サイトカイニンが細胞で受容されると、サイトカイニンシグナルが伝達される。シロイヌナズナにおいてサイトカイニンは3つの *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE (AHK)* 遺伝子によってコードされるサイトカイニン受容体に結合する (Hwang and Sheen, 2001; Inoue *et al.*, 2001)。これらの受容体はリン酸基の転移反応 (His-Asp リン酸リレー) を介して核へとサイトカイニンシグナルを伝達させ、最終的に2種類の *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR)* による転写調節を制御する。核内へと移行したリン酸基は type-B ARR に転移し、リン酸化された type-B ARR は転写活性化因子として機能して type-A ARR 遺伝子などの下流遺伝子の転写を活性化する (Mason *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2001; To *et al.*, 2004)。type-A ARR は type-B ARR と類似した receiver domain を持ち下流遺伝子の上流配列に結合できるが、type-B ARR に備わっている output domain を欠損しているために下流遺伝子の転写を促進することができず、結果として type-B ARR と競合しサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する (To *et al.*, 2004)。

サイトカイニンとは根の形態形成において、オーキシンとは拮抗的に働いていることが古くから知られている。根の発育という点において注目した研究からは、シロイヌナズナの根端分裂組織でサイトカイニン早期応答性遺伝子の *ARR1* (type-B *ARR*) がオーキシニンシグナル伝達を負に制御する *SHY2/IAA3* 遺伝子を活性化し、*PIN1* 遺伝子の発現を抑制することで根端細胞の分化を促進していることが報告された (Dello Ioio *et al.*, 2008)。これより根端における細胞分裂と細胞伸長とのバランス、つまり根端メリステムにおける未分化細胞と分化細胞の境界の制御はオーキシンとサイトカイニンの相互作用によって維持されていることが示唆された。イネにおいても、オーキシンおよびサイトカイニンによって発現が促進される *WUSCHEL*-related homeobox 遺伝子の *WOX11* がサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する *OsRR2* 遺伝子の発現を直接的に抑制することで冠根発育を促進していることが報告されている (Zhao *et al.*, 2009)。またサイトカイニンは、根の *initiation* にも関与しているということが近年明らかになってきた。シロイヌナズナの側根発生において外生サイトカイニンはオーキシン誘導性の *PIN* 遺伝子の発現を抑制し、オーキシン濃度勾配を攪乱することで側根原基の *initiation* を阻害する (Laplaze *et al.*, 2007)。胚発生時には原根層におけるオーキシニンシグナルがサイトカイニンシグナル伝達の負の制御因子である *ARR7* 遺伝子および *ARR15* 遺伝子の発現を正に制御することが、根端幹細胞の確立には必須であることが示された (Müller and Sheen, 2008)。

本章では、*CRL5* 遺伝子の機能解析および *crl5* 変異体を用いた網羅的発現解析により、根の発生数を増加させる能力を持つ *CRL5* 遺伝子の下流で機能する遺伝子の同定を試みた。これらの解析から、*CRL5* 遺伝子の下流には冠根形成を抑制するサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する機構が存在していることが判明し、*CRL5* 遺伝子は冠根形成時におけるオーキシニンシグナルとサイトカイニンシグナルの相互作用を仲介する役割を持つと考えられた。また、サイトカイニンを不活性化する機構の存在も示唆され、*CRL5* 遺伝子の下流では徹底的なサイトカイニン作用の抑制により新たな冠根形成が促進されていると示唆された。

材料および方法

植物体の育成

第2章 材料および方法を参照。

オーキシシン処理

第4章 材料および方法を参照。

半定量的 RT-PCR による発現解析

第2章 材料および方法を参照。95°C 5分の変性後に 95°C 30秒・55°C 40秒・72°C 30秒の3ステップを *OsRR* はすべて 35 サイクル、*CRL5* は 30 サイクル、*Os02g0755900* は 32 サイクル、*WOX11* は 30 サイクル、*ACT1* は 25 サイクル行って 72°C 7分の伸長反応の後 10°C で保存した。使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

サイトカイニン処理

種子を消毒・催芽させた後、CPPU 濃度を 0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM にふった水あるいは Kinetin 濃度を 1 μM , 5 μM , 10 μM にふった水に播種してグロースチャンバー内 (29.5°C, 連続光) で生育させ、12 日後に冠根数を測定した。

コンストラクトの作製

ProCRL5:OsRR1 コンストラクトは、ゲノム DNA あるいは cDNA を鋳型に *CRL5* 遺伝子の転写開始点より上流 2088 bp と *OsRR1* mRNA 配列を PCR により増幅し (2 μl template cDNA, 1 \times Prime STAR buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 μM Upper primer, 0.2 μM Lower primer, 5% DMSO, 0.75 U Prime STAR HS DNA polymerase)、*XbaI* および *SmaI* あるいは *HindIII* によって

pCAMBIA 1300 vector にクローニングすることで作成した。コンストラクトの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

形質転換の作製

第 2 章 材料および方法を参照。

パラフィン包埋試料作製

第 2 章 材料および方法を参照。

in situ hybridization

第 2 章材料および方法を参照。

使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

トルイジンブルー組織染色

第 2 章 材料および方法を参照。

マイクロアレイ解析

播種後 36 時間のイネの胚盤を含む地上部全体から TRIzol Reagent を用いて total RNA を抽出し、RNeasy Plant Mini Kit で精製した。この RNA 8.5 µg を用いて GeneChip Rice Genome Array (AFFYMETRIX) でマイクロアレイ解析を行った。実験方法はすべて GeneChip 付属のマニュアル (One-Cycle cDNA Synthesis) に従った。hybridization 後は GeneChip Operating Software 1.2 を用いて Prime のプロトコルは PRIME_450、Wash&Stain のプロトコルは FS450_0001 を採用した。なお、2 回の生物学的反復を行った。

Comparison Analysis の Baseline は野生型 (金南風) とし、候補となる遺伝子は Detection call が P (Present) かつ Change call が D (Decrease) で Signal Log Ratio が -0.8 以下 (約 < 2-fold

down) のものを抽出した。

DNA beads display system

(1) CRL5 リコンビナントタンパク質の作製

CRL5 タンパク質の2つの AP2 domain とその間の保存された領域から成る DNA 結合領域部分を含む領域を PCR にて増幅するとともに両端に *EcoRI* 認識配列を付加し、*EcoRI* によって pET32-a(+) vector (Novagen) にクローニングして作製した。このコンストラクトを *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換して 37°C・180 rpm で O.D. 600 値が 0.6 になるまで培養し、100 mM IPTG 存在下において 30°C・180 rpm で 16 時間タンパク質を発現させた。リコンビナントタンパク質発現用コンストラクトの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

DNA beads display system に用いる場合は、KCl buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT) に懸濁して超音波破碎し、4°C・15000 rpm で 10 分遠心した後の上清を結合反応に使用した。ゲルシフトアッセイに用いる場合は、KCl-EDTA buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1mM DTT) に懸濁して超音波破碎後、上清を TALON Metal Affinity Resin で His-tag 精製し、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo) を用いて 4°C で一晚透析 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 10% glycerol) して精製した。

(2) ゲルシフト用プローブの作製

まず Nole-Wilson and Krizek (2000) により同定された、ANT タンパク質の DNA 結合領域部分との相互作用が認められた DNA 配列群より選抜した配列にリンカー配列を連結させたもの (70 mer 以下に設定) を鋳型とした。control DNA 配列 template と BS19_Rv primer を 95°C で解離させた後、Klenow fragment を用いて 37°C で 1 時間インキュベート (50 nM control DNA 配列 template, 1 μM BS19_Rv primer, 0.25 mM dNTPs, 1× Klenow fragment buffer, 6 U

Klenow fragment) して 2 本鎖 DNA を合成した。合成した 2 本鎖 DNA を鋳型に BS19_Fw primer および BS19_Rv primer にて PCR 増幅したものを pCRII vector にクローニングした。

このコンストラクトを鋳型に Cy3 修飾した Rv primer を用いて 50 μ l 系 (1 μ M BS19_Fw primer, 1 μ M BS19_Rv-Cy3 primer, 0.25 mM dNTPs, 1 \times Ex Taq buffer, 2.5 U Ex Taq DNA polymerase, 2 μ l 1/400 希釈 plasmid) で PCR 増幅したものを QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、これをプローブとして使用した。プローブの作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

(3) ゲルシフトアッセイ

結合反応および電気泳動は Nole-Wilson and Krizek (2000) に従って行った。約 100 ng/ μ l 濃度のプローブ 1 μ l と 0.2 μ M あるいは 2 μ M に調整した精製 CRL5 リコンビナントタンパク質 9 μ l を遮光してローテーターを用いて 25 $^{\circ}$ C で 4 時間結合させた後、5% アクリルアミドゲル (1 \times TBE) に遮光して 4 $^{\circ}$ C \cdot 100 V で 90 分電気泳動した。

泳動後のアクリルアミドゲルをラップに挟み、Typhoon 9400 (Amersham Biosciences) を用いて Cy3 シグナルを検出した。

(4) microbeads-DNA 複合体の作製

CRL5 遺伝子上流配列を 30 μ l 系 (1 μ M Upper primer, 1 μ M Lower primer, 0.2 mM dNTPs, 1 \times KOD FX buffer, 0.6 U FOD FX, 2 μ l 1/400 希釈 plasmid) で PCR にて増幅し、Target Clone -Plus- (TOYOBO) を用いて pTA2 vector (TOYOBO) にクローニングした。このコンストラクトを鋳型に dual-biotin 修飾した Fw primer と Cy5 修飾した Rv primer を用いて 50 μ l 系 (1 μ M BS19_Fw T8-dual biotin primer, 1 μ M BS19_Rv-Cy5 primer, 0.25 mM dNTPs, 1 \times buffer, 2.5 U DNA polymerase, 2 μ l 1/400 希釈 plasmid) で PCR 増幅し、100 μ l 分の PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製したものを microbeads との複合体形成に用いた。500 bp 以上の配列の増幅には Prime STAR HS DNA polymerase、500 bp 未満の配列の増幅には Ex Taq DNA

polymerase を用いた。DNA 配列の作製に使用したプライマーの配列は別紙のリストを参照。

Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) 1 μ l (6×10^5 beads) を 1 \times B&W buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) で洗浄後、DNA 500 ng を混合した 1 \times B&W buffer 50 μ l に懸濁し、ローテーターを用いて 25 $^{\circ}$ C で 30 分間結合させた。

(5) 結合反応

KCl buffer で洗浄した DNA-microbeads 複合体を超音波破碎上清 10 μ l に懸濁し、ローテーターを用いて 25 $^{\circ}$ C で 1 時間結合させた。氷冷した KCl buffer 100 μ l で洗浄した後、氷冷した KCl buffer で 1/100 希釈した Penta-His Alexa Fluor 488 Conjugate (QIAGEN) 20 μ l で懸濁し、さらにローテーターを用いて 25 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。

上清を取り除き、氷冷した KCl buffer 500 μ l に懸濁した DNA-microbeads 複合体を JSAN セルソーター (Bay bioscience) にソーティングした。DNA-microbeads 複合体の数をカウントすると同時に、検出チャンネル FL1 の Alexa Fluor 488 蛍光強度を DNA-タンパク質結合量、FL5 の Cy5 蛍光強度を microbeads-DNA 結合量として検出した。取得したデータは FlowJo (TOMY Digital Biology) を用いて解析した。

Primer list

• 半定量的 RT-PCR

Primer name	Sequence
<i>OsRR1</i> -RT_U	5'-AGGATCAGCAGATGCATGAATG-3'
<i>OsRR1</i> -RT_L	5'-GAGACGCTGTAGTCCTTGCTT-3'
<i>OsRR2</i> -RT_U	5'-ACGATCTTCTCAAAGCCATCAAG-3'
<i>OsRR2</i> -RT_L	5'-TGAGAGGCTTAAGGATGAAATCCT-3'
<i>OsRR3</i> -RT_U	5'-AGGGTTCGATCTCCTCAAGAG-3'
<i>OsRR3</i> -RT_L	5'-GAATTCTCCGACGACATTAGC-3'
<i>OsRR4</i> -RT_U	5'-CTGCATGCCTGGCATGACAG-3'
<i>OsRR4</i> -RT_L	5'-GCAGCTGCAATCACTGATGA-3'
<i>OsRR5</i> -RT_U	5'-ACCGAATGTGAGCATGATTATCA-3'
<i>OsRR5</i> -RT_L	5'-CCTTGACCTTCTTCAGGAGTTCATA-3'
<i>OsRR6</i> -RT_U	5'-GTCCCAACGTCAACATGATC-3'
<i>OsRR6</i> -RT_L	5'-CACGTTCTCCGACGACATGAT-3'
<i>OsRR7</i> -RT_U	5'-TGCTCAAGAAGATCAAGGAATCG-3'
<i>OsRR7</i> -RT_L	5'-GGCACGTTCTCTGACGACATTAT-3'
<i>OsRR8</i> -RT_U	5'-TAGAAAGTGTCATGCAAGCA-3'
<i>OsRR8</i> -RT_L	5'-GAAAATGTTATTCTCATAGAGC-3'
<i>OsRR9</i> -RT_U	5'-GTTGTGATCATGTCATCGGA-3'
<i>OsRR9</i> -RT_L	5'-AAGCAGTATCCGTTAACGGA-3'
<i>OsRR10</i> -RT_U	5'-CTGCATGCCTGGCATGACAG-3'
<i>OsRR10</i> -RT_L	5'-CAAATGACCAGTCAGATGCT-3'
<i>OsRR11</i> -RT_U	5'-AGAGGGCCCTGGAAGTCTGCTA-3'
<i>OsRR11</i> -RT_L	5'-CTCCGAAACAAACAATGCGT-3'
<i>OsRR12</i> -RT_U	5'-TAGAAAGTGTCATGCAAGCA-3'
<i>OsRR12</i> -RT_L	5'-ATTGTTTCTTCATCTTGCCA-3'
<i>OsRR13</i> -RT_U	5'-TAGAAAGTGTCATGCAAGCA-3'
<i>OsRR13</i> -RT_L	5'-ATTCTTTCTTCATCTTGCCA-3'
<i>CRL5</i> -RT_U	5'-CCATCGACACGTTTCGGTCAGAG-3'
<i>CRL5</i> -RT_L	5'-GAGGTCCTTGTTGCCGGAGACT-3'
Os02g0755900-RT_U	5'-GACGTCGTCATGGGTTTCTC-3'
Os02g0755900-RT_L	5'-CCTTGATCCTCATGTTCTC-3'
<i>WOX11</i> -RT_U	5'-CCAGATGGGCGAGAGCTACT-3'
<i>WOX11</i> -RT_L	5'-CGTTGCCATCGATCAATCAA-3'

<i>ACT1</i> -RT_U	5'-GACTACATACAACTCCATCATG-3'
<i>ACT1</i> -RT_L	5'-AGCATTTCCTGTGCACAATGG-3'

• *in situ* hybridization プローブ作製

Primer name	Sequence
<i>OsRR1-in situ</i> _U	5'-AACTGCTCGCCGGCGAACAC-3'
<i>OsRR1-in situ</i> _L	5'-GCTCTCTGAATGTACATCG-3'

• *ProCRL5:OsRR1* コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>pCRL5_U-Xba</i> Iaa	5'-AATCTAGAGATCATACTTGTAGCCTG-3'
<i>pCRL5_U-Sma</i> Iaa	5'-TTCCCGGGCGTGCAAACAAACTGAG-3'
<i>cOsRR1_U</i>	5'-ATGGAAGGAGGAAGGGGGGT-3'
<i>cOsRR1_L+Hind</i> IIIaa	5'-TTAAGCTTTCAAGCACACCACAGG-3'

• *CRL5* リコンビナントタンパク質発現用コンストラクト作製

Primer name	Sequence
<i>CRL5-BD_U+Eco</i> RIaa	5'-AAGAATTCGACGGTGGCCGCAAG-3'
<i>CRL5-BD_L+Eco</i> RIaa	5'-TTGAATTCGTCCTTGGAGGTGGT-3'

• control DNA 配列 template

Primer name	Sequence
BS19-nega_80bp	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAGGTGAAGTGAGAGTAGTAA AAGGATGGGTTCAGAAGGACGGAAGCGATGACTCCGAGAAT-3'
BS11	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCCCAGGCACGCATCCCAAGT GAATTCGAAGCGATGACTCCGAGAAT-3'
BS15	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCTTGGTGCACATATCCCGATGC TTACAGAAGCGATGACTCCGAGAAT-3'
BS3	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAGAATTCACGGTTCCCGAGGG CTTTGGAAGCGATGACTCCGAGAAT-3'
BS4	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCGAGAGCACAGTTCCCCAGGT GAATTGAAGCGATGACTCCGAGAAT-3'

- control DNA 配列コンストラクト作製

Primer name	Sequence
BS19_Fw-1	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGC-3'
BS19_Rv	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTC-3'

- ゲルシフト用プローブ作製

Primer name	Sequence
BS19_Rv-Cy3	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTC-3'

- microbeads-DNA 複合体作製

Primer name	Sequence
BS19_Fw T8-dual biotin	5'-TTTTTTTTGGTTCGATACTTCAGATAGC-3'
BS19_Rv-Cy5	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTC-3'

- CRL5* 下流候補遺伝子上流配列 (2 kbp) コンストラクト作製

Primer name	Sequence
1st (LOC_Os04g11120)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCGAAGTGA CTCTCACCTGTGA-3'
1st (LOC_Os04g11120)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGAAGAGC CATAGTGACAGAA-3'
2nd (Os02g0258800)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCTCCTCTT GTCAAACACACC-3'
2nd (Os02g0258800)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGGCCAATG TGGCTTTCTTGC-3'
3rd (Os06g0696400)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCATGCATC CCTCCAACCCTT-3'
3rd (Os06g0696400)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTATCCGA CGGGCAAATGCC-3'
4th (Os02g0755900)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCTAGCCAC TTGCATCCCTTC-3'
4th (Os02g0755900)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTGATATG GGCGCTGGACAA-3'

5th (Os01g0691300)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCAGGTTCT ACGACGACCTCG-3'
5th (Os01g0691300)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTGAGATTG CGAGTGTGTTA-3'
6th (Os03g0315400)_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCTCTCCTGG TTGGAATAGTCG-3'
6th (Os03g0315400)_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGACTTGGA AAGAAAGGACCA-3'

• *CRL5* 下流候補遺伝子上流配列 (600 bp) コンストラクト作製

Primer name	Sequence
2nd-1_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCACCTTTCA GACATGTGGGCT-3'
2nd-1_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCACGTGAGA GGGAAATCAGGG-3'
2nd-2_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCCCTGATT TCCCTCTCACGT-3'
2nd-2_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGCAACGTT TGACCACTCGTC-3'
2nd-3_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCGACGAGTG GTCAAACGTTGC-3'
2nd-3_L (2nd (Os02g0258800)_L)	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGGCCAATGT GGCTTTCTTGC-3'
3rd-1_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAAGGCAGA CTATGGGTAGAG-3'
3rd-1_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCCTGGATATA GACCTAACCCG-3'
3rd-2_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCGGGTTAGG TCTATATCCAG-3'
3rd-2_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTTTCGCCTG GTTTGCCCAT-3'
3rd-3_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCATGGGGCAA ACCAGGCGAAC-3'
3rd-3_L (3rd (Os06g0696400)_L)	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTATCCGAC GGGCAAATGCC-3'

4th-1_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCGTACAACAT GTAAGCCATCG-3'
4th-1_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGGTTGCAGA TCTGTACATCT-3'
4th-2_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAGATGTACA GATCTGCAACC-3'
4th-2_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGCATTCATGC TGCAGCCCTG-3'
4th-3_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCAGGGCTGC AGCATGAATGC-3'
4th-3_L (4th (Os02g0755900)_L)	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTGATATGG GCGCTGGACAA-3'

• *CRL5* 下流候補遺伝子上流配列 (400 bp) コンストラクト作製

Primer name	Sequence
2nd_2-A_U (2nd-2_U)	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCCCCTGAT TTCCCTCTCACGT-3'
2nd_2-A_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCTATTATGG GACGGAGGGAGT-3'
2nd_2-B_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCTTATGCA AGAGCGCTCAATC-3'
2nd_2-B_L (2nd-2_L)	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGCAACGTT TGACCACTCGTC-3'
3rd_3-A_U (3rd-3_U)	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCATGGGGC AAACCAGGCGAAC-3'
3rd_3-A_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCTGGACGC ACGCTGGATCCAG-3'
3rd_3-B_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAGCAAAA GCGCCACAAAAGC-3'
3rd_3-B_L (3rd (Os06g0696400)_L)	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGTATCCGA CGGGCAAATGCC-3'
4th_2-A_U (4th-2_U)	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCAGATGTA CAGATCTGCAACC-3'
4th_2-A_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCGAGCATC CGCAATGGTAAAG-3'

4th_2-B_U	5'-GGTTCGATACTTCAGATAGCGGCACCC ATAATGGTTATCT-3'
4th_2-B_L	5'-ATTCTCGGAGTCATCGCTTCACATCAGC GCATGCGCCGAT-3'

結果

CRL5 過剰発現体のカルスはサイトカイニン感受性が低下する

イネにおいて形質転換体を作成するにあたり、カルスから地上部を再分化させる必要がある。再分化培地には 1 μM の NAA (オーキシン) と 10 μM の kinetin (サイトカイニン) が含まれている (Hiei *et al.*, 1994)。このホルモン条件下では根の発生はサイトカイニンの作用によって阻害され、地上部が再分化する (図 5-1A)。ところが CRL5 過剰発現体のカルスからは多数の不定根が発生し、その不定根からは側根も発生した (図 5-1B)。したがって、CRL5 過剰発現体ではサイトカイニン感受性が低下していると考えられた。そこで、野生型と CRL5 過剰発現体のカルスを様々な kinetin 濃度の培地に移植し、その形態変化を解析した。野生型のカルスは低濃度の kinetin (1 μM) を含む培地上では根の再分化のみが誘導され、高濃度の kinetin (10 μM , 50 μM , 100 μM) を含む培地上では地上部の再分化のみが誘導された (図 5-2)。一方、CRL5 過剰発現体のカルスは低濃度の kinetin を含む培地上では野生型と同様に根の再分化のみが誘導されたが、野生型では地上部しか再分化しない高濃度の kinetin を含む培地においても CRL5 過剰発現体のカルスは地上部に加えて根の再分化も誘導された (図 5-2)。

さらに、幼苗への影響を調べるため、1-(2-chloro-4-pyridryl)-3-phenylurea (forchlorfenuron, CPPU) を幼苗に処理し、冠根数の変化を調べた。CPPU はレタスにおいて、オーキシンによって誘導された側根形成を阻害することが報告されている人工のサイトカイニン様物質である (Zhang and Hasenstein, 1999)。CPPU は活性型サイトカイニンを不可逆的に不活性化させるサイトカイニン酸化酵素を阻害することで、植物組織中で活性型サイトカイニンを集積させる機能を持つと考えられている (Bilyeu *et al.*, 2001; Laloue and Fox, 1989)。そのため、CPPU を処理した植物体では内生サイトカイニンレベルの上昇による影響が観察されると期待された。野生型において CPPU を処理した植物体では冠根および側根の形成が阻害さ

れ、その表現型は CPPU 未処理時の *crl5* 変異体と非常によく似ていた (図 5-3A, 3B, 3C, 3D, 3E)。冠根数は CPPU 濃度依存的に減少し、0.01 μM でコントロールに比べ有意に冠根数が減少した (図 5-3F)。一方、*CRL5* 過剰発現体においても CPPU 濃度依存的な冠根数の減少が観察されたが、野生型に比べてその減少は緩やかであった (図 5-3F)。0.1 μM 以上の CPPU 濃度では野生型と *CRL5* 過剰発現体との間で冠根数に有意な差が認められた (図 5-3F)。同様の傾向は kinetin を処理した場合にも認められた (図 5-3G)。これらの結果より、*CRL5* 遺伝子にはサイトカイニンによる根の発生抑制作用を打ち消すような機能があるのではないかと示唆された。

CRL5 遺伝子によるサイトカイニンシグナル伝達の抑制機構

シロイヌナズナにおいてサイトカイニンはまず、細胞膜上に存在する 3 つのサイトカイニン受容体である AHK に結合する (Hwang and Sheen, 2001; Inoue *et al.*, 2001; To and Kieber, 2008)。サイトカイニンと結合した受容体は二成分制御系 (His-Asp リン酸リレー) を活性化し核へと伝達され、type-A と type-B の 2 種類の ARR が活性化される (Mason *et al.*, 2005; To *et al.*, 2004)。type-B ARR はサイトカイニンシグナル伝達を正に制御する因子であるのに対し (Sakai *et al.*, 2001; To and Kieber, 2008)、反対に type-A ARR はサイトカイニンシグナルを負に制御する因子として機能していることが報告されている (To *et al.*, 2004; To and Kieber, 2008)。*CRL5* 過剰発現体の冠根形成に関して CPPU 感受性が低下していたことから、type-A ARR に注目して解析を進めた。イネには 13 個の type-A RR (*OsRR*) が存在しており、これらはシロイヌナズナの type-A ARR と同様にサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する機能を持っていると考えられている (Ito and Kurata, 2006; Jain *et al.*, 2006b)。これら全ての *OsRR* 遺伝子に関して野生型、*crl5* 変異体、*CRL5* 過剰発現体における発現レベルを半定量的 RT-PCR によって解析し比較した。サイトカイニンシグナルは冠根形成を抑制するため、もし *CRL5* 遺伝子の下流で冠根形成に関与している *OsRR* 遺伝子があるとするれば、その *OsRR* 遺伝子の発現レベルは野生型での発現レベルと比較して *CRL5* 過剰発現体では上昇、*crl5* 変

異体では低下していると想定される。結果、13個の *OsRR* 遺伝子のうち、*OsRR1* および *OsRR2* 遺伝子の発現が野生型と比較して *CRL5* 過剰発現体で上昇し、反対に *cr15* 変異体で低下していた (図 5-4)。

そこで、その傾向がより顕著であった *OsRR1* 遺伝子の発現を冠根の initiation 部位において *in situ hybridization* 法により解析した。野生型において *OsRR1* 遺伝子は基部茎葉節全体で弱く発現が認められ、その中でも特に辺周部維管束環に接する柔細胞で環状に発現していた (図 5-5)。この *OsRR1* 遺伝子の発現パターンは *CRL5* 遺伝子の発現パターンと同様であり (図 4-11C_β, 4-12)、これら 2つの遺伝子の発現部位は冠根の initiation 部位において一致していることが判明した。さらに、*cr15* 変異体背景において *CRL5* プロモーター制御下で *OsRR1* 遺伝子を過剰発現させた形質転換体 (*ProCRL5:OsRR1/cr15*) を作成し、その表現型を解析した。結果、*ProCRL5:OsRR1/cr15* は基部茎葉節において *OsRR1* 遺伝子が過剰発現していることが確認され、これらの形質転換体では相補ライン (*ProCRL5:CRL5/cr15*) に比較すると少ないものの、ベクターコントロールの *cr15* 変異体 (empty vector/*cr15*) に比べて有意に冠根数が増加していた (図 5-6A, 6B)。したがってこれらの結果より、*OsRR1* 遺伝子は *CRL5* 遺伝子の下流において冠根形成に関与すると考えられた (図 5-6C)。

冠根形成に関与する *CRL5* 下流因子のさらなる探索

CRL5 過剰発現体を用いた *CRL5* 遺伝子の機能解析から、オーキシンとサイトカイニンの相互作用による冠根形成機構が明らかになった。しかし、*ProCRL5:OsRR1/cr15* の冠根数は empty vector/*cr15* に比べて有意に増加したが、*ProCRL5:CRL5/cr15* の冠根数に比べると有意に少なく、その相補は部分的であった (図 5-6A, 6B)。したがって、*OsRR1* 遺伝子が関与する経路以外にも、*CRL5* 遺伝子の下流には冠根の発生に重要な経路があると考えられた。そこで、網羅的遺伝子発現解析により野生型に比べて *cr15* 変異体の基部茎葉節において発現が 1/2 以下に低下している遺伝子を探索し、さらにその中から、*cr11* 変異体の基部茎葉節では発現が低下していないものを選抜することで *CRL5* 遺伝子の下流で冠根数の増加に関与す

る因子の探索を試みた。*CRL1/ARL1* 遺伝子は過剰発現させても冠根数を増加させることができなため、*CRL1/ARL1* 遺伝子下流で機能するものの冠根数増加には関与しないと考えられる遺伝子を除くことで、より確実に *CRL5* 遺伝子の下流で冠根数増加に関与する遺伝子を見出すことができると考えた。

冠根原基の *initiation* 時における遺伝子挙動に特化して解析するためには、冠根形成部位を原基の *initiation* が進行するまさにそのタイミングでサンプリングする必要がある。イネの冠根形成部位である基部茎葉節は葉原基の分化に伴い順次形成されていくが、栄養生長期の間はほとんど伸長しない。茎頂分裂組織で止葉原基が分化し終わり生殖生長期へ移行する頃、上から 5 つ目の節の基部に分裂組織が形成され、その上部域において著しい節間伸長が起こる。しかしそれ以下の節では節間伸長が起こらず、上部 5 節を伸長茎部と呼ぶのに対し、上位 6 節以降は不伸長茎部と呼ばれる。そして、生殖生長期にはほぼ冠根原基の形成は終了している。したがって冠根原基形成時の基部茎葉節は様々な生育ステージの原基が密集している状態となっており、*initiation* が起こっている部分だけをサンプリングするのは非常に困難である。冠根原基はまず、最も下位にある鞘葉節で形成される (Rebouillat *et al.*, 2009)。そこで播種後 36 時間の野生型の鞘葉節のパラフィン横断切片を作成して観察したところ、2~3 個の冠根原基の *initiation* が起こり原基形成のための分裂が始まった段階であることが判明した (図 5-7A)。鞘葉節は最初に冠根原基が発生する節であるため、この段階よりもステージの進んだ冠根原基は存在しない。よってこの播種後 36 時間をサンプリングのタイミングとした。なお、同じ段階の *crl1* 変異体では全く冠根原基が形成されていなかった (図 5-7B)。*crl5* 変異体も基本的には冠根原基は形成されておらず、形成されていたとしても野生型より少なく 1 個だけであった (図 5-7C, 7D)。抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、野生型と比べて *crl5* 変異体で発現が 1/2 以下に低下していた 66 遺伝子から *crl1* 変異体においても発現が 1/2 以下に低下していた 24 遺伝子を除いた 42 遺伝子を、冠根数増加に関与する *CRL5* 下流候補遺伝子として見出した (図 5-7E, 表 5-1)。

CRL5 直下候補遺伝子の選抜

次に、これら 42 個の候補遺伝子上流配列と CRL5 タンパク質との相互作用を DNA beads display system 法を用いて解析することにより、CRL5 タンパク質に発現を直接制御されている遺伝子の選抜を試みた。DNA beads display system 法とは、microbeads に DNA 配列を付加し、microbeads-DNA 複合体とタグを付加した CRL5 タンパク質とを反応させ、そこにタグ認識蛍光抗体を処理し、fluorescence-activated cell sorter (FACS, 細胞自動解析-分離装置) で microbeads-DNA 複合体の数とその蛍光強度を検出することにより DNA-タンパク質相互作用を解析する手法である (Kojima *et al.*, 2010)。つまり、蛍光強度の強い microbeads-DNA 複合体が得られる上流配列を持つ遺伝子が CRL5 直下で機能する遺伝子であると考えられ、加えて本手法を用いることで DNA-タンパク質間の結合強度を定量化することが可能となる。解析には、CRL5 タンパク質の 2 つの AP2 domain とその間の保存された領域から成る DNA 結合領域部分とその C 末端に His-tag を付加したものを大腸菌内で発現させたリコンビナントタンパク質を用いた。CRL5 リコンビナントタンパク質との相互作用を指標となるコントロール DNA 配列は、Nole-Wilson and Krizek (2000) により同定された、ANT タンパク質の DNA 結合領域部分との相互作用が認められた DNA 配列群より選抜した配列にリンカー配列を連結させたものを用いた。実際にこれらの配列と CRL5 リコンビナントタンパク質との *in vitro* における相互作用を確認し、相互作用が認められなかった配列 (BS19) を negative control、強い相互作用を示した配列 (BS4) を positive control とした (図 5-8A)。これらを FACS 解析に供試すると、positive control では no template および negative control に比べてピークがより蛍光強度の高い右側にシフトし、有意な蛍光強度ピークの差を確認することができた (図 5-8B, 8C)。

本手法を用いて、42 個の CRL5 下流候補遺伝子上流 2 kbp の DNA 配列と CRL5 リコンビナントタンパク質との相互作用を解析した結果、3 つの候補遺伝子において positive control と同様な蛍光強度ピークのシフトが認められた (図 5-9)。さらに、これら 3 つの CRL5 直下候補遺伝子上流配列と CRL5 リコンビナントタンパク質との結合領域を、それぞれ約

400 bp に狭めることができた (図 5-10)。3 つの *CRL5* 直下候補遺伝子はそれぞれ、expressed protein をコードする Os02g0258800、xyloglucan endotransglucosylase/hydrase (XTH) をコードする Os06g0696400、cytokinin-*O*-glucosyltransferase をコードする Os02g0755900 であった (図 5-10)。XTH は細胞壁マトリックス多糖であるキシログルカン分子のつなぎ変え反応または切断反応を触媒し、細胞壁の構築や再編過程で中心的な役割を担う酵素タンパク質である (Nishitani and Tominaga, 1992)。イネの細胞壁はキシログルカン含量が低いにも関わらず *OsXTH* 遺伝子はキシログルカン含量の多い細胞壁を持つシロイヌナズナの *XTH* 遺伝子数 (33 個) と同程度の 29 個存在し、イネにおいてもキシログルカン代謝の重要性が示唆されている (Yokoyama *et al.*, 2004)。cytokinin-*O*-glucosyltransferase は配糖化により活性型サイトカイニンを可逆的に不活性化させる酵素タンパク質である (Martin *et al.*, 1999a)。zeatin *O*-glucosyltransferase をコードする *ZOG1* 遺伝子をトウモロコシで過剰発現させた形質転換体では、側根数の増加が観察されている (Pineda Rodo *et al.*, 2008)。そこで Os02g0755900 の外生オーキシンに対する発現変化を調べた。*CRL5* 遺伝子はオーキシンによって発現が誘導されるため (図 4-13E)、Os02g0755900 が *CRL5* の標的であるとすれば Os02g0755900 も *CRL5* 遺伝子と同様の発現パターンを示すと推測された。その結果、Os02g0755900 はオーキシンによって発現が誘導され、しかも *CRL5* 遺伝子よりも少し遅れて発現誘導がかかることが判明した (図 4-13E)。

考察

第5章では、第4章においてその過剰発現により根の増加をもたらすことが判明した *CRL5* 遺伝子の下流因子の探索を試みた。

冠根形成におけるオーキシニンシグナルとサイトカイニンシグナルの相互作用

シロイヌナズナにおいて、サイトカイニンは *PIN* 遺伝子の発現抑制を介してオーキシニンによって誘導される細胞運命の再決定を阻害することにより、側根の *initiation* を抑制している (Laplaze *et al.*, 2007)。また、胚発生時の幼根形成においては、オーキシニンシグナルがサイトカイニンシグナル伝達の負の制御因子である *ARR7* 遺伝子および *ARR15* 遺伝子の発現を誘導している (Müller and Sheen, 2008)。このとき、*ARF* が *ARR7* 遺伝子および *ARR15* 遺伝子の上流配列内の TGTC motif に結合することにより、初期胚の原根層において根端幹細胞確立のためサイトカイニンシグナルを負に制御することが報告されている (Müller and Sheen, 2008)。

イネにおいてサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する 13 個の *OsRR* 遺伝子のうち (Ito and Kurata, 2006; Jain *et al.*, 2006b)、その中でも *CRL5* 過剰発現体において発現が上昇し、かつ *crl5* 変異体で発現が低下していたものは *OsRR1* および *OsRR2* の2つであった (図5-4)。イネとシロイヌナズナおよびトウモロコシの type-A RR で分子系統樹を作成するとこれら2つの *OsRR* は *ZmRR7* と共に、シロイヌナズナの *ARR* が含まれないクレードに属することが報告されている (Ito and Kurata, 2006)。このうち、*OsRR2* 遺伝子はイネの冠根発育に関与していることが報告されている (Zhao *et al.*, 2009)。したがって、このクレードに属する *OsRR1* 遺伝子および *OsRR2* 遺伝子は、シロイヌナズナでは通常作られない冠根 (不定根) 形成に特に重要な役割を果たしているのではないかと推測される。その *OsRR1* 遺伝子の冠根の *initiation* 部位における発現と *CRL5* 遺伝子の発現は重なっており (図4-11C_β, 4-12, 5-5)、

また *CRL5* プロモーター制御下で *OsRR1* 遺伝子を発現させることで *cr15* 変異体の冠根数減少を相補することができた (図 5-6A, 6B)。したがって、オーキシンスIGNALによりその発現が誘導される *CRL5* 遺伝子の下流でサイトカイニンシグナリングを負に制御する *OsRR1* 遺伝子が機能していることが明らかになり、*CRL5* 遺伝子が冠根形成時におけるオーキシンスIGNALとサイトカイニンシグナルの相互作用を仲介する役割を持つことが判明した (図 5-6C)。

これまで植物の器官形成におけるオーキシンスとサイトカイニンとの相互作用については、上述のように様々な報告がなされてきた。しかし、*CRL5* 遺伝子と同等な役割を持つ因子、つまり ARF と type-A RR との相互作用を仲介する因子は報告されていない。実際に、シロイヌナズナにおける側根の initiation 時には、サイトカイニンは *PIN* 遺伝子の発現抑制を介したオーキシンス濃度勾配の攪乱によって、オーキシンスにより誘導される細胞運命の再決定を阻害する (Laplaze *et al.*, 2007)。またトウモロコシにおける葉の initiation 時には、トウモロコシの type-A RR である *ABERRANT PHYLLLOTAXY1 (ABPH1)* 遺伝子 (*ZmRR3* in Ito and Kurata, 2006) の発現がサイトカイニンによって誘導され、*ABPH1* 遺伝子を介した *ZmPIN1a* 遺伝子の発現制御が示されている (Giulini *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009)。これらの報告はサイトカイニンによる *PIN* 遺伝子の発現制御、すなわちオーキシンス極性輸送制御を介したサイトカイニンとオーキシンスの相互作用の例である。一方、シロイヌナズナの茎頂分裂組織において、MP/ARF5 による *ARR7* 遺伝子および *ARR15* 遺伝子の直接的な発現抑制が、*WUSCHEL (WUS)* と *CLAVATA3 (CLV3)* による幹細胞維持機構に関与していることが報告されている (Zhao *et al.*, 2010)。また胚発生時の幼根形成においても、AuxRE を介してオーキシンスIGNALが *ARR7* 遺伝子および *ARR15* 遺伝子の発現を直接誘導し、初期胚の原根層における根端幹細胞の確立に関与している (Müller and Sheen, 2008)。これらの報告は ARF タンパク質が直接 type-A RR 遺伝子の発現を制御することによる、オーキシンスとサイトカイニンの相互作用の例である。本研究においては、*CRL5* 遺伝子が冠根形成時におけるオーキシンスIGNALとサイトカイニンシグナルの相互作用を仲介することが新たに判明した (図

5-6C)。CRL5 遺伝子はシロイヌナズナでは通常作られない冠根 (不定根) 形成特異的な制御機能を持つこと、また他の植物種でも見出されていなかった新たな根系形成制御遺伝子であることから、このような新たなオーキシンとサイトカイニンの相互作用が見出されたものと推測される。

冠根原基の発育段階特異的なサイトカイニンシグナルの役割

イネの根の形態形成においては、その発達段階が明瞭に分類されている (Coudert *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009)。大まかには、根の形態形成の最も初期段階の原基誘導段階である initiation、原基を構成する細胞が活発に分裂・増殖して原基の秩序だった構造を作っていく段階である development、内部組織から分化した原基が外側の組織を突き破って出現し伸長していく段階である growth の 3 段階に分けられ、それぞれの発育段階によって異なる遺伝子発現が報告されている (Itoh *et al.*, 2005)。

イネにおいて近年、WOX11 遺伝子が冠根形成を正に制御していることが報告された (Zhao *et al.*, 2009)。WOX11 遺伝子はオーキシンおよびサイトカイニンによってその発現が促進され、またサイトカイニンシグナル伝達を負に制御する OsRR2 遺伝子の発現を直接的に抑制し、その結果として冠根原基の発達時における細胞増殖を制御していることが示されている (Zhao *et al.*, 2009)。これは、冠根原基の initiation 時において CRL5 遺伝子が OsRR1 遺伝子の発現を促進することと相反する遺伝制御である。これら 2 つの遺伝子の冠根形成時における発現パターンを比較してみたところ、WOX11 遺伝子の発現は冠根原基の発育後期で主に観察され (Zhao *et al.*, 2009)、initiation の段階で既に発現が認められる CRL5 遺伝子とは異なる発現パターンを示すことがわかった (図 4-11C_β, 4-12)。加えて、crl5 変異体および CRL5 過剰発現体の基部茎葉節における WOX11 遺伝子の発現レベルを野生型における発現レベルと比較してみたところ、crl5 変異体および CRL5 過剰発現体における WOX11 遺伝子の発現は野生型と比べて変化がなく、したがって WOX11 遺伝子の発現は CRL5 遺伝子によって制御されていないことが判明した (図 5-12)。これらの結果より、CRL5 遺伝子と

WOX11 遺伝子は *OsRR* 遺伝子の発現を制御することで冠根形成を促進する点は共通であるが、*CRL5* 遺伝子は冠根原基の *initiation* 時に機能するが *WOX11* 遺伝子は冠根原基の *development* 時に機能するという点、および *CRL5* 遺伝子はサイトカイニンシグナルを抑制するが *WOX11* 遺伝子はサイトカイニンシグナルを促進するという点が異なることが明らかになった。それと同時に、冠根の *initiation* にはサイトカイニンシグナルを負に制御することが、一方で冠根の *development* にはサイトカイニンシグナルを正に制御することが重要であることも併せて判明した。

CRL5 直下候補遺伝子の冠根形成への関与

本章では、*CRL5* 遺伝子の機能解析を通じた *CRL5* 遺伝子下流因子の探索の他に、マイクロアレイおよび DNA beads display system を用いた *CRL5* 直下候補遺伝子の探索を試みた。その結果、マイクロアレイ解析から 42 個の *CRL5* 下流候補遺伝子を選抜し、その中から DNA beads display system 解析により 3 個の *CRL5* 直下候補遺伝子を見出した (図 5-9)。さらに、これら 3 個の *CRL5* 直下候補遺伝子上流配列と *CRL5* リコンビナントタンパク質との結合領域を、それぞれ約 400 bp に狭めることができた (図 5-10)。約 400 bp の結合領域内には Nole-Wilson and Krizek (2000) によって同定された ANT タンパク質の結合コンセンサス配列とよく似た配列は見出せなかった。また、Nole-Wilson and Krizek (2000) ではゲルシフトアッセイによって調べられた ANT タンパク質と DNA 配列群の一部との相互作用強度が 3 段階 (>90%, 40-60%, <10%) で示されているが、この値は *CRL5* リコンビナントタンパク質と DNA 配列群との相互作用強度とは一致しなかった (図 5-13)。これらの結果から、*CRL5* の結合コンセンサス配列は ANT の結合コンセンサス配列とはあまり似ていないと考えられた。ここからも、イネの *CRL5* とシロイヌナズナの *ANT* との間の差異が示唆される。

3 個の *CRL5* 直下候補遺伝子のうちの 1 つである Os06g0696400 は、細胞壁マトリックス多糖であるキシログルカン分子のつなぎ変え反応または切断反応を触媒する酵素である XTH をコードしていた (Fry *et al.*, 1992; Nishitani and Tominaga, 1992)。29 個存在する OsXTH

のうち、この Os06g0696400 は OsXTH11/OsXTR2 をコードしていた (Yokoyama *et al.*, 2004; Uozu *et al.*, 2000)。OsXTH11 遺伝子は、根特異的に発現する 4 つの AtXTH 遺伝子 (AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19, AtXTH20) と相同性が高いことが判明している (Yokoyama *et al.*, 2004; Vissenberg *et al.*, 2005)。これらのうち、AtXTH19 はオーキシンによってその発現が誘導されることが示されている (Vissenberg *et al.*, 2005)。また、OsXTH11 遺伝子と最も相同性の高い OsXTH10 遺伝子は側根の initiation に関与する遺伝子群 (cluster I in Takehisa *et al.*, 2012) に含まれ、かつ OsIAA13 依存的な側根形成経路で機能している可能性が示唆されており (Kitomi *et al.*, submitted; Takehisa *et al.*, 2012)、これらの XTH 遺伝子群は根の形成に関与すると考えられる。したがって、Os06g0696400 がコードする OsXTH11 もオーキシンによって発現が誘導される CRL5 遺伝子の下流で冠根の initiation に関与している可能性が高いと推測される。

また、CRL5 直下候補遺伝子の Os02g0755900 は、配糖化によりサイトカイニンを可逆的に不活性化させる酵素である cytokinin-*O*-glucosyltransferase をコードしていた (Martin *et al.*, 1999a)。上述のようにサイトカイニンは側根形成を阻害するため、側根原基が形成される内鞘細胞においてはサイトカイニンシグナル強度の低下が認められ、また側根原基においてはサイトカイニン分解酵素をコードする CKX 遺伝子が発現していることが報告されている (Mähönen *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2003)。これらの結果より、原基形成には活性型サイトカイニンが減少することが重要であると示唆され、実際にシロイヌナズナにおいて AtCKX1 を側根形成部位である内鞘細胞で異所的に発現させると側根数が増加する (Laplaze *et al.*, 2007)。ところが、zeatin *O*-glucosyltransferase をコードする ZOG1 遺伝子をトウモロコシで過剰発現させた形質転換体においてサイトカイニン欠乏時と同様の表現型が現れることが報告されているもの (Pineda Rodo *et al.*, 2008)、cytokinin-*O*-glucosyltransferase はその変異体が見つからないため、その機能については不明な点が多く存在している。Os02g0755900 はオーキシン処理によってその発現が誘導され、しかも CRL5 遺伝子の発現誘導よりも少し遅れて発現誘導がかかることが判明した (図 5-11)。今後は、本遺伝子産物の配糖化活性の有無、冠根形成部位における発現パターンおよび *cr15* 変異体背景での相補性検定を行い、

実際に *CRL5* 遺伝子の下流でサイトカイニンの不活性化が誘導され、それが冠根形成に関与しているのかどうかについて検証する必要がある。仮に *Os02g0755900* がコードする cytokinin-*O*-glucosyltransferase が *CRL5* 遺伝子の直下で機能しているとすれば、*CRL5* 遺伝子の下流では *OsRR1* 遺伝子によるサイトカイニンシグナル伝達の打ち消しだけでなく、活性型サイトカイニン自体を不活性化させる、つまり徹底的にサイトカイニン作用を抑制することで新たな冠根形成を促進していると想定される (図 5-14)。

表 5-1. *crl5* 変異体において野生型と比較して発現量が 1/2 以下に低下していた遺伝子

Locus ID	FC in <i>crl5</i>	Annotation
Os02g0707100	-12.1	Probable monodehydroascorbate reductase, cytoplasmic isoform 2 (MDAR 2)
Os11g0644700	-3.2	Disease resistance response protein
Os11g0189600	-3.2	Cycloartenol synthase (2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase)
Os07g0489300	-2.7	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2 (Zeatin O-glucosyltransferase 2)
Os03g0192700	-2.6	Inositol-3-phosphate synthase (MI-1-P synthase) (IPS)
Os05g0163300	-2.5	Fasciclin-like arabinogalactan protein 7 precursor
Os04g0348600	-2.5	Response regulator receiver domain
Os01g0155800	-2.5	glycine-rich cell wall structural protein precursor, putative, expressed
Os02g0677300	-2.5	Dehydration responsive element binding protein 1D (DREB1D protein)
Os08g0508000	-2.5	Cytochrome P450 76C1
Os03g0808500	-2.4	nonspecific lipid-transfer protein 4 precursor, putative, expressed
CB656443	-2.4	cysteine proteinase
Os05g0189300	-2.4	Acid phosphatase 1 precursor (Apase-1(1))
Os11g0535525	-2.3	10 kDa prolamin precursor
Os04g0127300	-2.3	Cucumisin precursor (Allergen Cuc m 1)
9632.m00987	-2.3	hypothetical protein
Os11g0535525	-2.2	10 kD prolamin
Os06g0254700	-2.1	caleosin-related family protein similar to Ca+2-binding EF hand protein
Os04g0573000	-2.1	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
Os02g025880	-2.1	expressed protein
BI306108	-2.1	skin secretory protein xP2 precursor, putative, expressed
Os09g0323500	-2.0	Ser/Thr-rich protein T10 in DGCR region
Os01g0297200	-2.0	Probable mitochondrial chaperone BCS1 (BCS1-like protein)
Os03g0619100	-2.0	Dof zinc finger protein MNB1A
Os04g0553500	-2.0	Pectinesterase-2 precursor (Pectin methylesterase) (PE)
Os06g0696400	-1.9	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 precursor (At-XTH22)
Os03g0234900	-1.9	Peroxidase 53 precursor (Atperox P53) (ATPA2)
Os02g0755900	-1.9	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2 (Zeatin O-glucosyltransferase 2)
Os10g0150600	-1.8	proline-rich protein GPP1
Os12g0123500	-1.8	Nucleoside-triphosphatase (NTPase) (Apyrase)
Os01g0691300	-1.8	Nonspecific lipid-transfer protein 2 (LTP 2)
Os12g0115700	-1.8	Chalcone--flavonone isomerase (Chalcone isomerase)
Os03g0315400	-1.8	Transcription factor MYB21 (Myb-related protein 21) (AtMYB21) (AtMyb3)
Os11g0530600	-1.8	chalcone synthase
Os06g0696400	-1.7	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 precursor (At-XTH22)
AU165037	-1.7	
CF336021	-1.7	
Os05g0563000	-1.7	NAC-domain containing protein 2 (ANAC002)
Os01g0914300	-1.7	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein, expressed
Os10g0345800	-1.7	hypothetical protein
Os01g0940000	-1.7	Cytokinin dehydrogenase 1 precursor (Cytokinin oxidase 1) (CKO 1) (AtCKX1)
Os09g0491820	-1.7	Dihydroflavonol-4-reductase (DFR) (TRANSPARENT TESTA 3 protein)

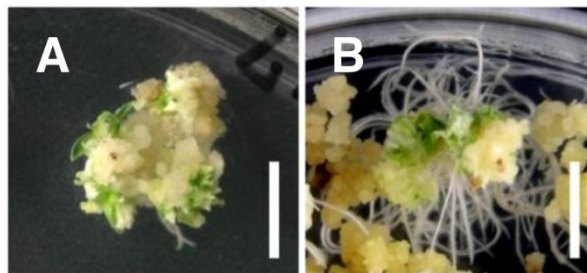


図 5-1. 再分化培地上における *CRL5* 過剰発現体

A: 空ベクター (*pAct::nos/Hm3*) を導入したカルス。(Bar = 5 mm)

B: *ProACT::CRL5* を導入したカルス。(Bar = 5 mm)

再分化培地には 1 μ M NAA および 10 μ M kinetin が含まれている。

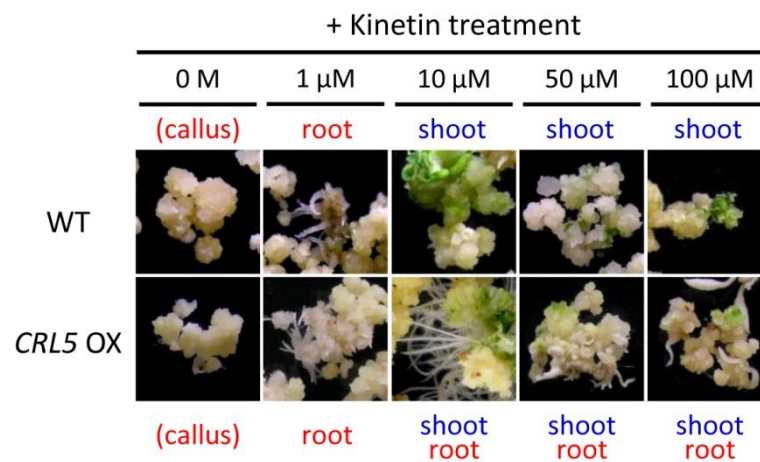


図 5-2. 異なるサイトカイニン濃度下での *CRL5* 過剰発現カルスの再分化の様子

全ての培地には器官誘導のため、1 μ M NAA が含まれている。

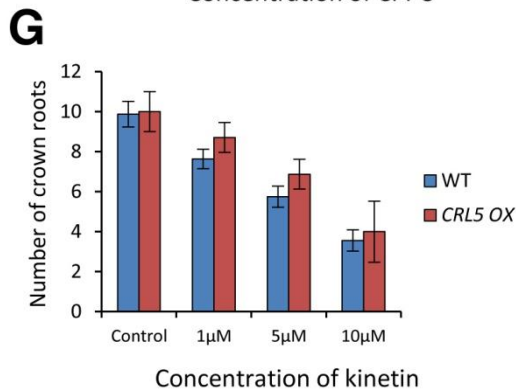
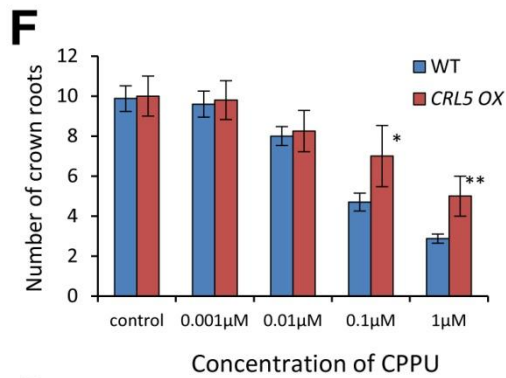
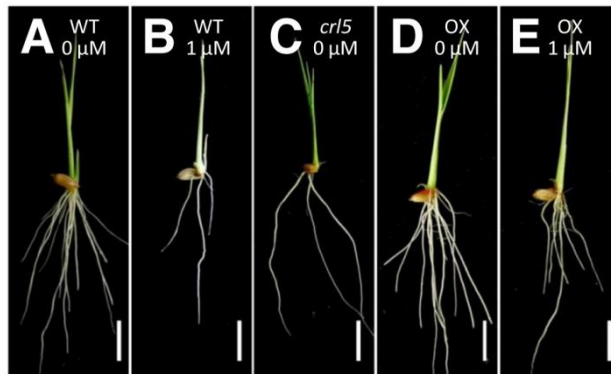


図 5-3. CPPU 処理あるいは kinetin 処理による冠根数の変化

A: CPPU 未処理の野生型。(Bar = 1 cm)

B: 1 μM CPPU 処理時の野生型。(Bar = 1 cm)

C: CPPU 未処理の *cr15* 変異体。(Bar = 1 cm)

D: CPPU 未処理の *CRL5* 過剰発現体。(Bar = 1 cm)

E: 1 μM CPPU 処理時の *CRL5* 過剰発現。(Bar = 1 cm)

F: CPPU 処理による冠根数の変化。*および**は同じ濃度の CPPU 処理時の野生型における冠根数と比較して 5%あるいは 1%レベルで有意差があることを示す。

G: kinetin 処理による冠根数の変化。

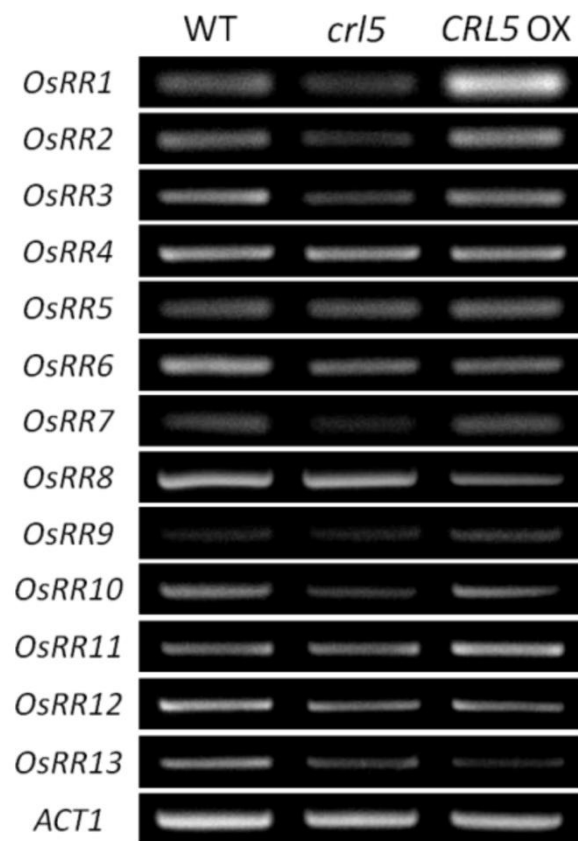


図 5-4.半定量的 RT-PCR による *OsRR* 遺伝子群の発現量の比較

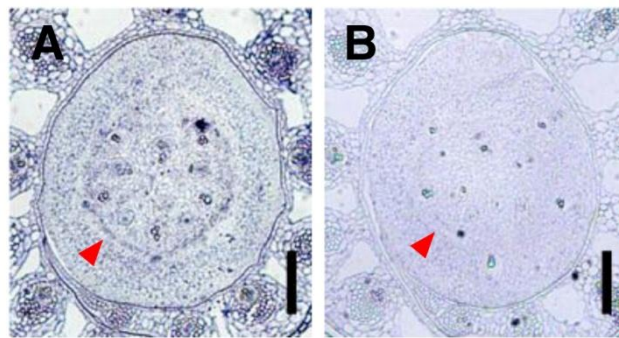


図 5-5. *in situ hybridization* による *OsRR1* 遺伝子の発現パターンの解析

A: 7 日齢の野生型の冠根の initiation 部位における *OsRR1* 遺伝子の発現。

(Bar = 200 μm)

B: *OsRR1* sense probe によるコントロール。(Bar = 200 μm)

赤矢頭は辺周部維管束環を示す。

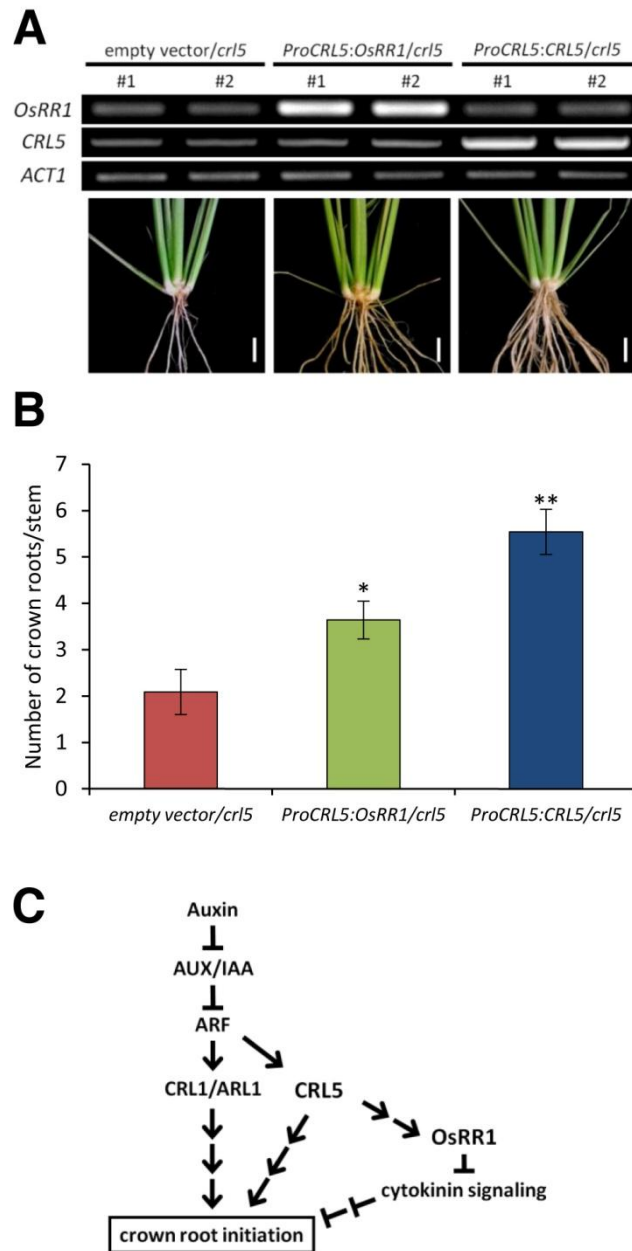


図 5-6. *OsRR1* 遺伝子による *cr15* 変異体の相補

A: 空ベクター (pCAMBIA) を導入した *cr15* 変異体 (empty vector/*cr15*, 左)、*ProCRL5:OsRR1* を導入した *cr15* 変異体 (*ProCRL5:OsRR1/cr15*, 中央)、*CRL5* 遺伝子全長配列を含む DNA 断片を導入した *cr15* 変異体 (*ProCRL5:CRL5/cr15*, 右) における *OsRR1* 遺伝子および *CRL5* 遺伝子の発現量と、2 ヶ月齢の形質転換体。(Bar = 1 cm)

B: empty vector/*cr15*、*ProCRL5:OsRR1/cr15*、*ProCRL5:CRL5/cr15* における分けつあたりの冠根数の比較。*および**は empty vector/*cr15* との間に 5%あるいは 1%の有意差があることを示す。

C: *CRL5* 遺伝子によるサイトカイニンシグナル伝達の抑制と冠根の initiation。

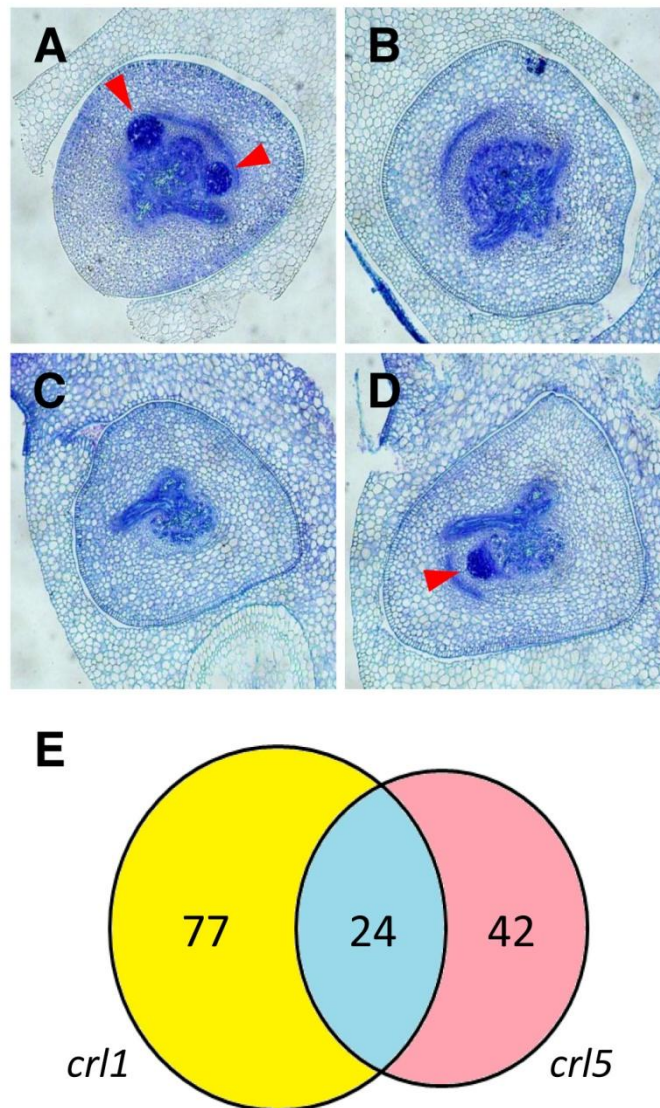


図 5-7. マイクロアレイ解析に用いた植物体の横断切片および *crl* 変異体において発現量が $1/2$ 以下に低下していた遺伝子

- A:** 播種後 36 時間の野生型における鞘葉節の横断切片 赤矢頭は冠根原基を示す。
- B:** 播種後 36 時間の *crl1* 変異体における鞘葉節の横断切片。
- C:** 播種後 36 時間の *crl5* 変異体における鞘葉節の横断切片。(冠根原基がないもの)。
- D:** 播種後 36 時間の *crl5* 変異体における鞘葉節の横断切片 (冠根原基が 1 つあるもの)。赤矢頭は冠根原基を示す。
- E:** 変異体において野生型と比較して発現量が $1/2$ 以下に低下していた遺伝子。

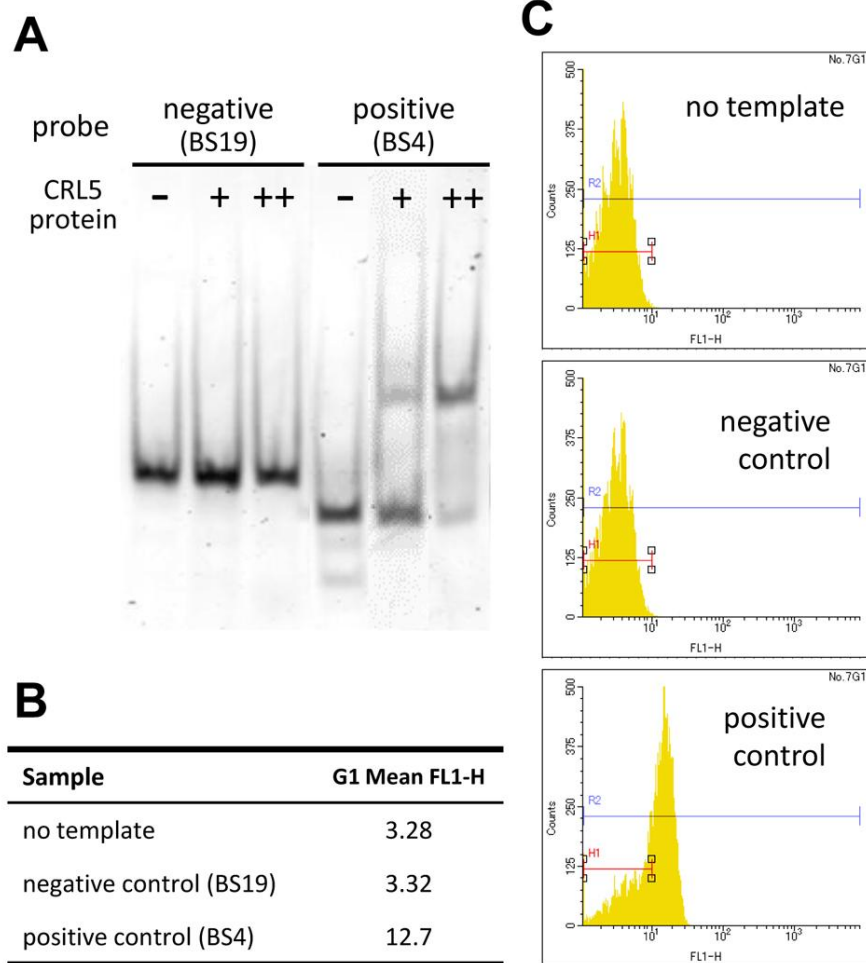
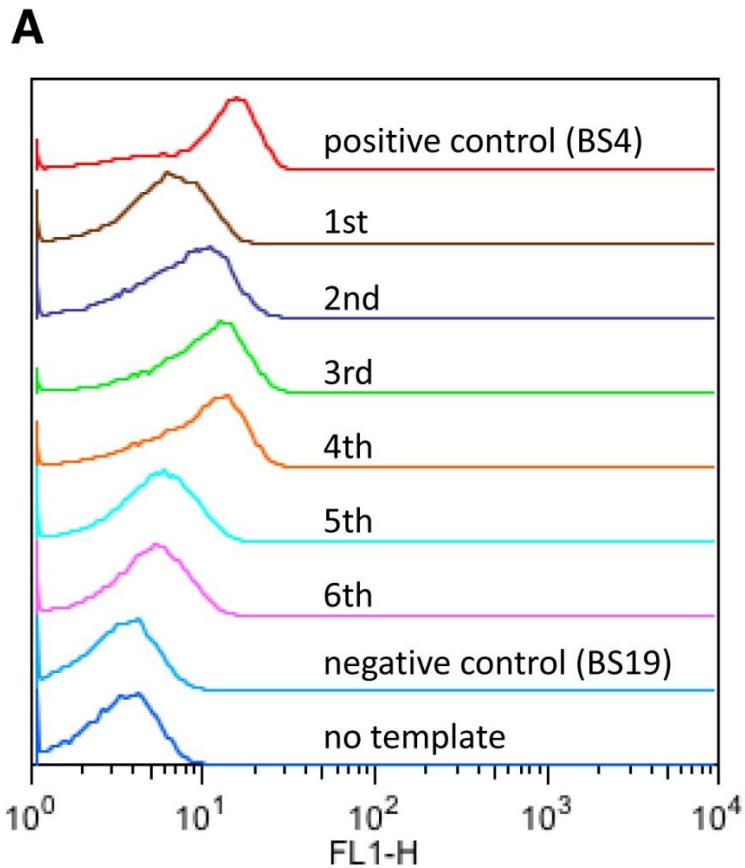


図 5-8. CRL5 リコンビナントタンパク質と DNA 配列との相互作用

A: CRL5 リコンビナントタンパク質と相互作用が認められなかった DNA 配列 (BS19) と、強い相互作用が認められた DNA 配列 (BS4) を用いたゲルシフトアッセイ。タンパク質投入量はそれぞれ、0 mol (-), 0.02 nmol (+), 0.2 nmol (++)。

B: CRL5 リコンビナントタンパク質と相互作用が認められなかった DNA 配列 (BS19) と、強い相互作用が認められた DNA 配列 (BS4) を用いた、DNA beads display system より得られた Alexa Fluor 488 の蛍光強度。

C: 各処理区における DNA beads display system の結果。縦軸が DNA-microbeads 複合体の数、横軸が Alexa Fluor 488 の蛍光強度を示す。



B

Sample	G2 Mean FL1-H
positive control (BS4)	12.6
1st	6.5
2nd	8.33
3rd	10.7
4th	10
5th	5.5
6th	5.04
negative control (BS19)	3.26
no template	3.26

図 5-9. *CRL5* 下流候補遺伝子上流 2 kbp と *CRL5* リコンビナントタンパク質との結合

A: DNA beads display system による、*CRL5* リコンビナントタンパク質と *CRL5* 下流候補遺伝子上流 2 kbp の結合量 (Alexa Fluor 488 の蛍光強度) の比較。

B: 6つの *CRL5* 下流候補遺伝子上流 2 kbp を用いた DNA beads display system より得られた Alexa Fluor 488 の蛍光強度。

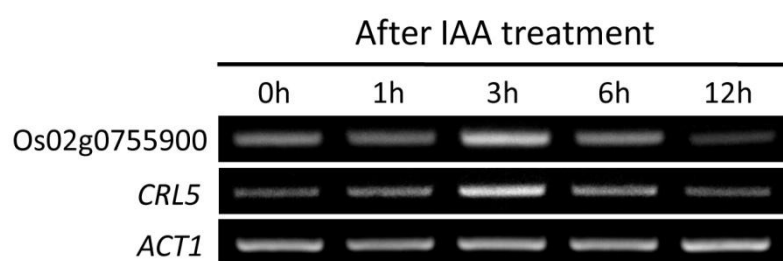


図 5-11. Os02g0755900 の外生オーキシンによる発現誘導

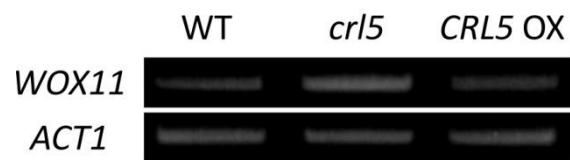


図 5-12.半定量的 RT-PCR による *WOX11* 遺伝子の発現量の比較

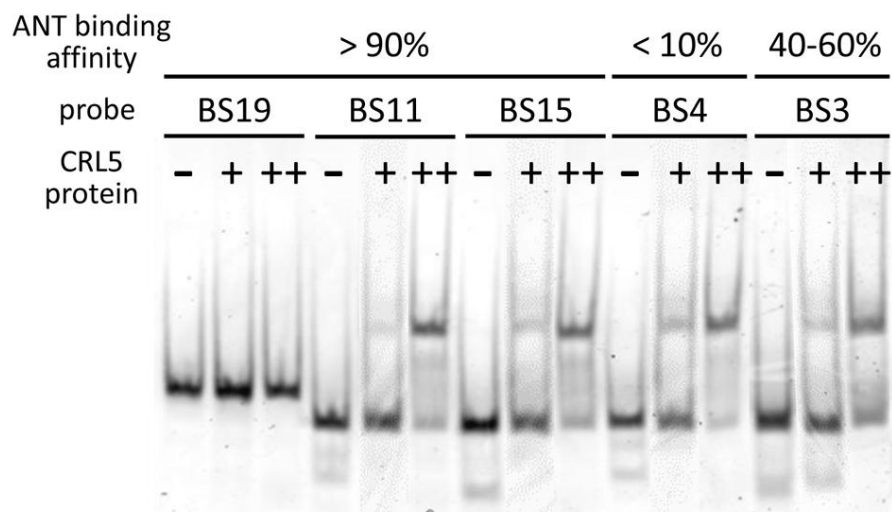


図 5-13. control DNA 配列と ANT リコンビナントタンパク質および CRL5 リコンビナントタンパク質との相互作用強度の違い

タンパク質投入量はそれぞれ、0 mol (-), 0.02 nmol (+), 0.2 nmol (++)。

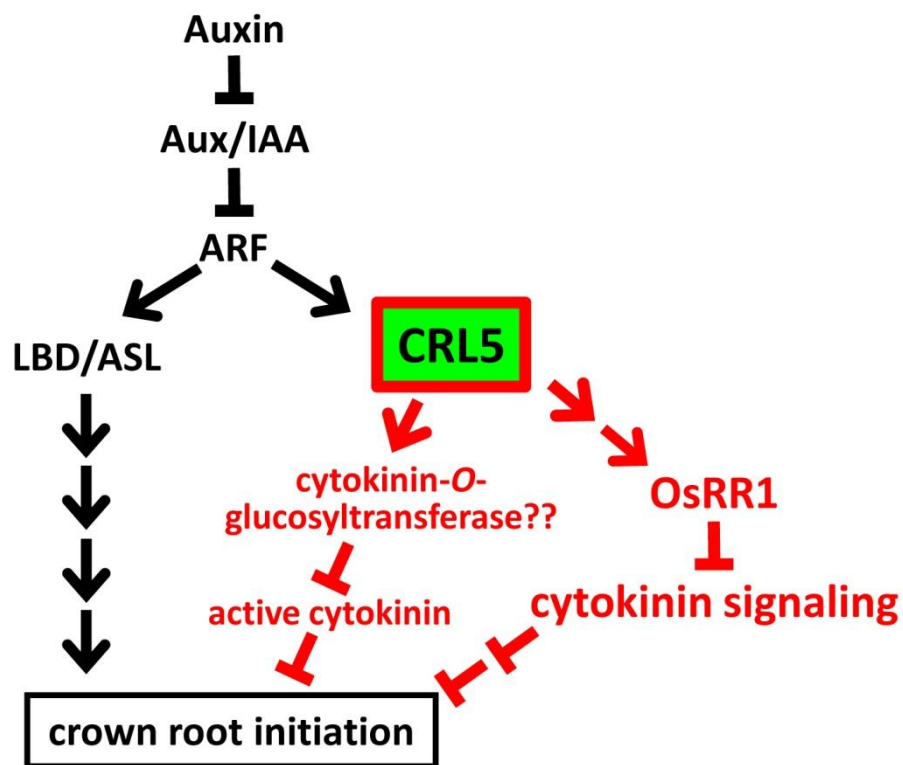


図 5-14. *CRL5* 遺伝子の徹底的なサイトカイニン作用の抑制による冠根の **initiation** 促進機構

オーキシンによって発現を誘導される *CRL5* 遺伝子の下流では、*OsRR1* 遺伝子によるサイトカイニンシグナル伝達の抑制に加え、配糖化によるサイトカイニンの不活性化が行われていると想定された。

第6章

総合考察

総合考察

本研究では、それぞれ特徴が異なったイネの根の発生に関する突然変異体を用い、イネにおける根系形成を制御する分子機構のさらなる解明を試みた。その結果、冠根の *initiation* と側根の *initiation* の両方を制御する遺伝子として *CRL4*、側根の *initiation* を特異的に制御する遺伝子として *OsIAA13*、冠根の *initiation* を特異的に制御する遺伝子として *CRL5* を見出した。*CRL4* 遺伝子がオーキシンを冠根および側根形成領域へ局所的に輸送することにより、*initiation* 領域でのオーキシンスIGNAL伝達が進行する。これにより側根の *initiation* 部位において *OsIAA13* 遺伝子および *CRL1/ARL1* 遺伝子の発現が上昇し、また冠根の *initiation* 部位においては *CRL1/ARL1* 遺伝子および *CRL5* 遺伝子の発現が上昇する。その結果、最終的に側根あるいは冠根原基形成の誘導が起こる。その際、*CRL5* 遺伝子は冠根原基の誘導を負に制御するサイトカイニンSIGNAL伝達の進行を抑制していると考えられる (図 6-1)。今まで形態の異なるイネの冠根と側根の発生に関しては、これら両方を共通に制御する *CRL1/ARL1* 遺伝子しか報告されていなかったが、本研究により冠根と側根の形成には *CRL1/ARL1* 遺伝子による制御以外にも側根・冠根共通の制御機構が存在し、またそれぞれに特異的な制御機構も存在することが明らかとなった。特に *CRL5* 遺伝子は今までどの植物種においても報告されていなかった根系形成制御因子であり、この *CRL5* 遺伝子による根系形成経路は既知のものとは別の新たな根系形成経路であることが判明した。さらに *CRL5* 遺伝子による冠根の *initiation* はオーキシンスIGNALとサイトカイニンSIGNALの相互作用によって制御されており、その相互作用を *CRL5* 遺伝子が仲介することを本研究において新たに見出した。イネはシロイヌナズナでは通常作られない冠根を作り出すため、シロイヌナズナでは根の形成に関与しない遺伝子である *CRL5* 遺伝子に根を形成する上で重要な機能を付与し、これがイネとシロイヌナズナの根系形態の違いを生む一因となったのではないかと推測される。

灌漑施設が整っておらず水ストレスが問題となっている栽培環境下では根を発達させず

ざるとかえって収量を減少させてしまう恐れがある。したがってこの場合は根系をただ発達させるのではなく、冠根を少なくして地下部への同化産物配分を抑え、その分、水分吸収の大部分を担う側根を増加させたような根系が理想的であると考えられる。ところが、これまでにイネの冠根形成と側根形成をそれぞれ特異的に支配している遺伝子は報告されていなかったため、冠根数を減少させることと側根数を増加させることを両立することは困難であると考えられていた。これに関して本研究では、*OsIAA13* 遺伝子が側根の initiation を特異的に、*CRL5* 遺伝子が冠根の initiation を特異的に制御することを明らかにした。*Osiaa13* 変異体では地上部形質に目立った異常が認められないため、*OsIAA13* 遺伝子は育種上非常に有用な遺伝子であるといえる。イネの側根数のみを増加させるためには、側根形成特異的な *OsIAA13* 依存的なオーキシニンシグナル伝達を側根形成部位において強めることが必要であると考えられる。したがってこの場合は、分解されやすい *OsIAA13* タンパク質をコードする *OsIAA13* 遺伝子を過剰発現させるのではなく、平常状態でもオーキシニンシグナルが伝達されるように *OsIAA13* タンパク質が有する ARF の転写活性抑制機能を欠損させることが有効な手段であるだろう。今後、*OsIAA13* 機能欠損型突然変異体を同定することができれば、その糸口が見いだせる可能性があると推測される。また、本研究においては *OsIAA13* 遺伝子下流で機能する側根の initiation に関与する遺伝子の探索も行い、その候補遺伝子を複数見出した。これらの候補遺伝子のうち、側根の initiation にのみ特化した遺伝子を利用することでも側根のみを増加させたイネの作出が可能となると期待できる。一方、*cr15* 変異体は *Osiaa13* 変異体とは異なり稔性低下などの地上部形質に異常が観察されるため、*cr15* 変異体そのものを冠根を減少させる育種に利用することは困難である (図 4-3)。*CRL5* 遺伝子下流で機能している遺伝子の中には地上部形態形成関連遺伝子と冠根の initiation 特異的な遺伝子があると考えられるため、その中でも冠根の initiation に機能が特化した遺伝子を探索し、その遺伝子の突然変異体を利用することがこの問題を打開するために有効な手段であると考えられる。それに関して本研究では *CRL5* 遺伝子下流因子の探索を行い、その候補遺伝子を複数見出すことができた。今後これらの候補遺伝子の変異体を探索し、そ

の変異体が地上部形質に異常を示すことなく、冠根数のみが減少しているかどうかを確認する必要があるだろう。

一方、現在の多収化を目標としたイネ品種の育成においては、地上部を大きくしバイオマス生産を増加させるような改良が進められており、その巨大化する地上部へ十分な水分を供給するためには冠根および側根を増加させることが必要であると考えられる。これまで根の発生には、AS2/LOB ドメインタンパク質をコードする遺伝子群が重要であることが様々な植物種で報告されていた (Inukai *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2007; Taramino *et al.*, 2007)。しかし、これらの遺伝子群の過剰発現体では根の発生数の増加が認められず、育種に利用可能な有用遺伝子の発見が切望されていた。これに関して、*CRL1/ARL1* 遺伝子と同様に冠根形成および側根形成の両方を制御する *CRL4* 遺伝子は解析の結果、オーキシン極性輸送に関与する Arf-GEF をコードすることが判明した。ところがオーキシン極性輸送はあらゆるオーキシン反応の基盤となるため、*CRL4* 遺伝子を育種に利用することは困難であると予想された。一方、*CRL5* 過剰発現体では冠根数および側根数が増加することが判明したため (Fig. S4)、根の発生量を増やす上で *CRL5* 遺伝子は非常に有用であることが明らかとなった。ところが *CRL5* 過剰発現個体では冠根数および側根数の増加に加え、一部の個体で葉身の巻きや重力屈性異常といった地上部形態の異常も観察された。*CRL5* 遺伝子はシロイヌナズナで最も相同性の高い *ANT* 遺伝子と同様に地上部組織の発育にも関与していると考えられるため、*CRL5* 遺伝子をそのまま過剰発現させるだけでは実用的な品種とはならない。それを打開する策としてまず、*CRL5* 遺伝子を冠根および側根の initiation 部位でのみ過剰発現させることが挙げられる。冠根形成部位および側根形成部位特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下で *CRL5* 遺伝子を発現させれば、地上部形態に異常が現れることなく冠根数および側根数だけが増加したイネを作出することができると予想される。また、*CRL5* 遺伝子下流で冠根の initiation に機能が特化した遺伝子を探索し、その遺伝子を利用することも有効な手段であると考えられる。それに関して本研究では *CRL5* 遺伝子下流因子の探索を行い、その候補遺伝子を複数見出すことができた。今後これらの候補遺伝子の過剰発現

体を作成してその表現型を観察することで、これらの候補遺伝子が冠根の *initiation* 特異的に機能する遺伝子かどうかを判断することが必要であるだろう。

以上のように、イネにおいて根の形成に関与する遺伝子の突然変異体を用いた研究によって、イネの根系形成を制御する分子機構が徐々に明らかになってきた。本研究で材料とした3つの突然変異体は全て根の *initiation* が阻害されるタイプの変異体であるが、*initiation* は起こるもののその後の原基の発育維持ができないために根の数が減少する変異体についても解析が進められている。*cr13* 変異体および *cr17* 変異体では原基の発育に異常が認められ、*cr13* 変異体では発育途中ですでに細胞が液胞化し、*cr17* 変異体は発育途中で細胞分裂が阻害されることが原因で冠根原基の発育を維持できなくなる (図 6-2; Kitomi *et al.*, 2008b; 木富と犬飼, 2011)。これに対して、*cr12* 変異体および *cr16* 変異体では原基形成過程には異常は認められないが、その後の原基の伸長が阻害される (図 6-2; Inukai *et al.*, 2001; 木富と犬飼, 2011; Yamamoto *et al.*, 2010)。これらの解析から得られる知見によって原基の *initiation* から *development*、さらに *growth* に至るまで、根の形成制御機構の総合的な理解が深まるものと期待される。

ところで研究を進めていく中で、冠根の *initiation* が阻害される *cr1* 変異体では冠根や側根の発生に異常が生じるにも関わらず、幼根 (種子根) は正常に発生することがわかった。根は大きく、胚発生中に形成される *embryonic root* と胚発生後に形成される *post-embryonic root* に分類される。イネにおいて *embryonic root* は幼根、冠根と側根が *post-embryonic root* であり、このうち特に幼根はイネの初期成長期に養水分吸収を一定に引き受ける重要な器官である。イネの幼根が欠失する突然変異体も同定されており、*radicleless1 (ral1)* および *ral2* 変異体が報告されている (Hong *et al.*, 1995; Scarpella *et al.*, 2003)。*cr15* 変異体では野生型に比べて冠根数が著しく減少するが、幼根は正常に形成される (図 6-3A, 2B)。冠根数および側根数が減少する *cr11* 変異体においても、幼根は正常に形成される (Inukai *et al.*, 2005)。一方、*ral1* 変異体では幼根が形成されないが冠根数は減少しない (図 6-3C; Hong *et al.*, 1995; Scarpella *et al.*, 2003)。したがって、イネにおいて *embryonic root* の発生と *post-embryonic root*

の発生は独立に制御されていると考えられる。それを支持するさらなる証拠として *rall crl1* および *rall crl5* 二重変異体は幼根と冠根の両方を欠失するという相加的な表現型を示す (図 6-3D; Inukai *et al.*, 1998; Kitomi *et al.*, 2011b)。このようにイネの幼根にも特異的な発生制御機構が存在することが明らかとなった。今後、幼根の発生機構も明らかにすることができれば、冠根および側根と併せてイネの根の包括的な発生機構の解明を実現できると考えられる。このようなイネの根系形成に関わるより多くの遺伝情報を掴むことは分子機構の解明にも貢献するだけでなく、そこから得られる新たな知見は根系形態改良へ向けた品種育成へ有用な情報として提供できると期待できる。

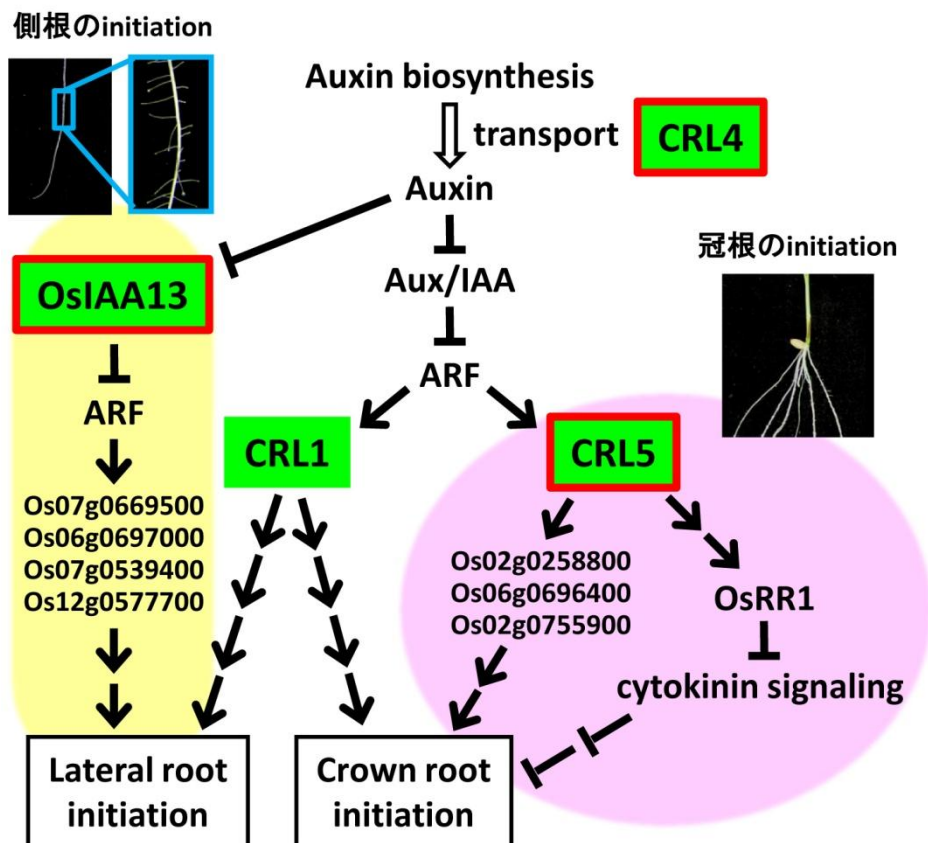


図 6-1. オーキシシンシグナル伝達および *CRL* 遺伝子群によるイネの根系形成機構

CRL4 遺伝子がオーキシシンを冠根および側根形成領域へ局所的に輸送することにより、initiation 領域でのオーキシシンシグナル伝達が進行する。これにより側根の initiation 部位において *OsIAA13* 遺伝子および *CRL1* 遺伝子の発現が上昇し、また冠根の initiation 部位においては *CRL1* 遺伝子および *CRL5* 遺伝子の発現が上昇する。その結果、最終的に側根あるいは冠根原基形成の誘導が起こる。その際、*CRL5* 遺伝子は冠根原基の誘導を負に制御するサイトカイニンシグナル伝達の進行を抑制していると考えられる。

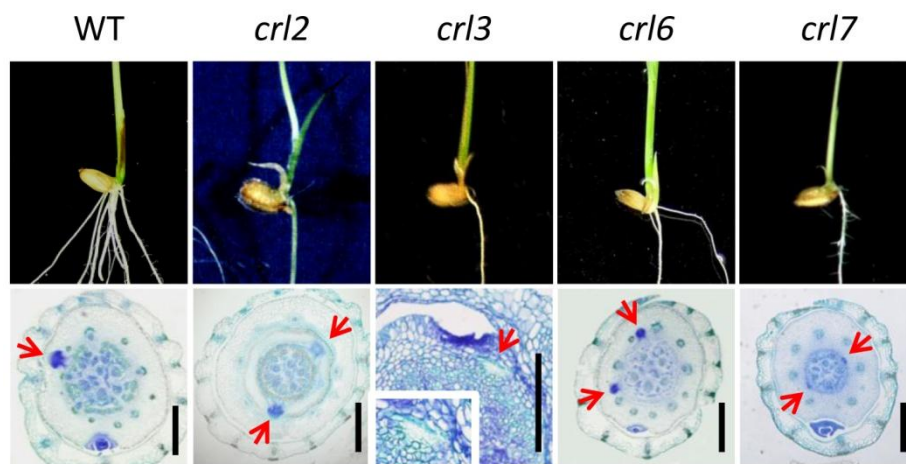


図 6-2. 根の **initiation** は起こるものの、その後の原基の発育維持ができないために根の数が減少する突然変異体

crl3 変異体および *crl7* 変異体では原基の発育に異常が認められ、*crl3* 変異体では発育途中ですでに細胞が液胞化し、*crl7* 変異体は発育途中で細胞分裂が阻害されることが原因で冠根原基の発育を維持できなくなる。*crl2* 変異体および *crl6* 変異体では原基形成過程には異常は認められないが、その後の原基の伸長が阻害される。矢印は冠根原基を示す。



図 6-3. イネの幼根と冠根の発生に関わる突然変異体

A: 7 日齢の野生型。(Bar = 1 cm)

B: 7 日齢の *crl5* 変異体。(Bar = 1 cm)

C: 7 日齢の *rall* 変異体。(Bar = 1 cm)

D: 7 日齢の *rall crl5* 二重変異体。(Bar = 1 cm)

アスタリスクは冠根、矢頭は幼根 (種子根) を示す。

引用文献

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R. and Scheres, B.** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120.
- Andersen, S.U., Buechel, S., Zhao, Z., Ljung, K., Novák, O., Busch, W., Schuster, C. and Lohmann, J.U.** (2008) Requirement of B2-type *cyclin-dependent kinases* for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 88-100.
- Bañoc, D.M., Yamauchi, A., Kamoshita, A., Wade, L.J. and Pardales, J.R. Jr.** (2000) Dry matter production and root system development of rice cultivars under fluctuating soil moisture. *Plant Prod. Sci.* **3**: 197-207.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B. and Feldmann, K.A.** (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950.
- Berleth, T. and Mattsson, J.** (2000) Vascular development: tracing signals along veins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 406-411.
- Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D. and Morris, R.O.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**: 378-386.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. and Benfey, P.N.** (2003) A Gene Expression Map of the *Arabidopsis* Root. *Science* **302**: 1956-1960.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and Scheres, B.** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth

and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.

Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U. and Benfey, P.N. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**: 801-806.

Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell J. and Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**: 1051-1054.

Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y. (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**: 1790-1799.

Chhun, T., Taketa, S., Tsurumi, S. and Ichii, M. (2003) The effects of auxin on lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul.* **39**: 161-170.

Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N.G. and Gantet, P. (2010) Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends Plant Sci.* **15**: 219-226.

Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S. (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**: 1380-1384.

De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N.F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M.J. and Beeckman, T. (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**: 681-690.

Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P. and Smyth, D.R. (1996) *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**: 155-168.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and

- Jürgens, G.** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S. and Matthews, K.J.** (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* **282**: 821–828.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. and Tasaka, M.** (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**: 153-168.
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A. and Tasaka, M.** (2005) Tissue-specific expression of stabilized *SOLITARY-ROOT/IAA14* alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **44**: 382-394.
- Fukaki, H., Okushima, Y. and Tasaka, M.** (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **256**:111-137.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. and Scheres, B.** (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**: 1053-1057.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y., Jürgens, G. and Palme, K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**: 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jürgens, G.** (2003a) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**: 219-230.
- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torrest-Ruiz, R.A., Mayer, U. and Jürgens,**

- G.** (2003b) Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* **131**: 389-400.
- Giulini, A., Wang, J. and Jackson, D.** (2004) Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue *ABPHYLL1*. *Nature* **430**: 1031-1034.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001) Auxin regulates the SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Marée, A.F., Hogeweg, P. and Scheres, B.** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008-1013.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* **49**: 373-385.
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. and Jürgens, G.** (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* **16**: 1610-1615.
- Hao, Z. and Ichii, M.** (1999). A mutant RM109 of rice (*Oryza sativa* L.) exhibiting altered lateral root initiation and gravitropism. *Japanese J. Crop Sci.* **68**: 245-252.
- Hardtke, C.S. and Berleth, T.** (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**: 1405-1411.
- Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K. and Liscum, E.** (2000) The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* **12**: 757-770.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T.** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**: 271-282.

- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M. and Tasaka, M.** (2007) The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2156-2168.
- Hong, S.K., Aoki, T., Kitano, H., Satoh, H. and Nagato, Y.** (1995) Phenotypic diversity of 188 rice embryo mutants. *Dev. Genet.* **16**: 298-310.
- Hoshikawa, K. and Kobayashi, S.** (2003) Study on structure and function of an earthen bund irrigation system in Northeast Thailand. *Paddy Water Environ.* **1**: 165-171.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S. and Bowles, D.J.** (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**: 47822-4732.
- Hu, Y., Xie, Q. and Chua, N.H.** (2003) The *Arabidopsis* Auxin-Inducible Gene *ARGOS* Controls Lateral Organ Size. *Plant Cell* **15**: 1951-1961.
- Hwang, I. and Sheen, J.** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**: 383-389.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. and Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**: 1060-1063.
- Inukai, Y., Yamauchi, A., Satoh, H., Nagato, Y. and Kitano, H.** (1998) Genetic analysis of induced rice developmental mutants showing radicleless and rootless. *Rice Gen. Newslett.* **15**: 88-90.
- Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A.** (2001) Characterization of rice mutants deficient in formation of crown roots. *Breed. Sci.* **51**: 123-129.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H. and Matsuoka, M.** (2005) *Crown Rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin Signaling. *Plant Cell* **17**: 1387-1396.

- Ito, Y. and Kurata, N.** (2006) Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene* **382**: 57-65.
- Itoh, J., Nonomura, K., Ikeda, K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamaguchi, H., Kitano, H. and Nagato, Y.** (2005) Rice Plant Development: from Zygote to Spikelet. *Plant Cell Physiol.* **46**: 23-47.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C. and Machida, Y.** (2002) The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol.* **43**: 467-478.
- Jacobs, M. and Gilbert, S.F.** (1983) Basal localization of the presumptive auxin carrier in pea stem cells. *Science* **220**: 1297-1300.
- Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J.K., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P.** (2006a) Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics* **6**: 47-59.
- Jain, M., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P.** (2006b) Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol.* **6**: 1.
- Jun, N., Gaohang, W., Zhenxing, Z., Huanhuan, Z., Yunrong, W. and Ping, W.** (2011) OsIAA23-mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in rice. *Plant J.* **68**: 433-442.
- Kakimoto T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**: 677-685.
- Kano-Nakata, M., Inukai, Y., Wade, L.J., Siopongco, J.D.L.C. and Yamauchi, A.** (2011) Root development, water uptake, and shoot dry matter production under water deficit conditions in

- two CSSLs of rice: functional roles of root plasticity. *Plant Prod. Sci.* **14**: 307-317.
- Kaufman, P.B.** (1959) Development of the shoot of *Oryza sativa* L. Part III. Early stages in histogenesis of the stem and ontogeny of the adventitious root. *Phytomorph* **9**: 382-404.
- Kitomi, Y., Ogawa, A., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2008a) *CRL4* regulates crown root formation through auxin transport in rice. *Plant Root* **2**: 19-28.
- Kitomi, Y., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2008b) Mapping of the *CROWN ROOTLESS3* gene, *CRL3*, in rice. *Rice Gen. Newslett.* **24**: 31-33.
- Kitomi, Y., Ito, H., Hobo, T., Aya, K., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2011a) The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRRI*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J.* **67**: 472-484.
- Kitomi, Y., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2011b) Molecular mechanism of crown root initiation and the different mechanisms between crown root and radicle in rice. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1270-1278.
- 木富 悠花, 犬飼 義明 (2011) イネ冠根形成の誘導過程を制御する分子機構. 根の研究 **20**: 61-71.
- Kitomi, Y., Inahashi, H. and Inukai, Y.** OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. Submitted.
- Kitomi, Y., Wang, P., Kojima, T. and Inukai, Y.** Investigation of the direct targets of CRL5 through DNA beads display system in rice. In preparation.
- Klepper, B.** (1992) Development and growth of crop root systems. In: Hatfield JL, Stewart BA, (Eds.) Limitations to plant root growth. Springer-Verlag, Berlin, pp. 265-286.
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. and Fischer, R.L.** (1996) The *AINTEGUMENTA* gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **8**: 137-153.

- Koizumi, K., Sugiyama, M. and Fukuda, H.** (2000) A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development* **127**: 3197-3204.
- Kojima, T., Hashimoto, Y., Kato, M., Kobayashi, T., Nakano, H.** (2010) High-throughput screening of DNA binding sites for transcription factor AmyR from *Aspergillus nidulans* using DNA beads display system. *J. Biosci. Bioeng.* **109**: 519-525.
- Kouchi, H. and Hata, S.** (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 106–119.
- Krizek, B.A.** (1999) Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Dev. Genet.* **25**: 224-236.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. and Kyojuka, J.** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652-655.
- 久馬 一剛 (2002) 食糧生産と環境 pp.5 化学同人
- Laloue, M. and Fox, J.E.** (1989) Cytokinin oxidase from wheat: partial purification and general properties. *Plant Physiol.* **90**: 899-906.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. and Bennett, M.** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**: 3889-3900.
- Lee, B.H., Johnston, R., Yang, Y., Gallavotti, A., Kojima, M., Travençolo, B.A., Costa Lda, F., Sakakibara, H. and Jackson, D.** (2009) Studies of *aberrant phyllotaxy1* mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. *Plant Physiol.* **150**: 205-216.

- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S. and Estelle, M.** (1996) Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J.* **10**: 403-413.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M. and Ecker, J.R.** (2004) Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **7**: 193-204.
- Liscum, E., and Reed, J.W.** (2002) Genetics of AUX/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **49**: 387-400.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H. and Wu, P.** (2005) ARL1, a LOB domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J.* **43**: 47-56.
- Liu, S., Wang, J., Wang, L., Wang, X., Xue, Y., Wu, P. and Shou, H.** (2009) Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family. *Cell Res.* **19**: 1110-1119.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P. and Sandberg, G.** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465-474.
- Luquet, D. Zhang, B.G., Dingkuhn, M., Dexet, A. and Clément-Vidal, A.** (2005) "Phenotypic Plasticity of Rice Seedlings: Case of Phosphorus Deficiency". *Plant Prod. Sci.* **8**: 145-151.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y. and Kakimoto, T.** (2006) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **16**: 1116-1122.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.** (1999a) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 284-289.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.** (1999b) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **120**: 553-558.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E. and Mok, D.W.** (2001) A maize cytokinin gene encoding

- an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 5922-5926.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y. and Kasahara, H.** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**: 18512-18527.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Schaller, G.E.** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3007-3018.
- Mayer, U., Buttner, G. and Jürgens, G.** (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies in the role of the *gnom* gene. *Development* **117**: 149-162.
- Meinke, D.W.** (1985) Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theor. Appl. Genet.* **69**: 543-552.
- Miyamoto, N., Steudle, E., Hirasawa, T. and Lafitte, R.** (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. *J. Exp. Bot.* **52**: 1835-1846.
- Mizukami, Y. and Fischer, R.L.** (2000) Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 942-947.
- 森田 茂紀 (2000) 根の発育学 pp.129-134 東京大学出版会
- Morita, Y. and Kyojuka, J.** (2007) Characterization of *OsPID*, the rice ortholog of *PINOID*, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant Cell Physiol.* **48**: 540-549.
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrásek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.I., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zazimalová, E., Geisler, M. and Friml, J.** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**:1136-1140.
- Müller, B. and Sheen, J.** (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification

- during early embryogenesis. *Nature* **453**: 1094-1097.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 472-497.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M. and Reed, J.W.** (2000) AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* **123**: 563-573.
- Nakamura, A., Umemura, I., Gomi, K., Hasegawa, Y., Kitano, H., Sazuka, T. and Matsuoka, M.** (2006) Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein. *Plant J.* **46**: 297-306.
- Niones, J.M., Inukai, Y., Suralta, R.R. and Yamauchi, A.** (2012) QTL for lateral root plasticity under transient soil moisture fluctuation stress in rice. Submitted.
- 西川 浩人・尾崎 祐朗・北野 英己・犬飼 義明 (2009) イネ冠根欠損型突然変異体を用いた地上部-地下部成長関係の解析. 根の研究 **18**: 113-116.
- Nishitani, K. and Tominaga, R.** (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* **267**: 21058-21064.
- Nole-Wilson, S. and Krizek, B.A.** (2000) DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4076-4082.
- Nole-Wilson, S., Tranby, T.L. and Krizek, B.A.** (2005) *AINTEGUMENTA-like (AIL)* genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Mol. Biol.* **57**: 613-628.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J. and Shimura, Y.** (1991) Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**: 677-684.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. and Theologis,**

- A.** (2005) Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* **17**: 444-463.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. and Tasaka, M.** (2007) *ARF7* and *ARF19* regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 118-130.
- Overvoorde, P., Fukaki, H. and Beeckman, T.** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a001537.
- Ozawa, K.** (2009) Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* **176**: 522-527.
- Peng, S. and Khush, G.S.** (2003) Four decades of breeding for varietal improvement of irrigated lowland rice in the International Rice Research Institute. *Plant Prod. Sci.* **6**: 157-164.
- Pineda Rodo, A., Brugière, N., Vankova, R., Malbeck, J., Olson, J.M., Haines, S.C., Martin, R.C., Habben, J.E., Mok, D.W. and Mok, M.C.** (2008) Over-expression of a zeatin *O*-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *J. Exp. Bot.* **59**: 2673-2686.
- Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O. and Callis, J.** (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* **13**: 2349-2360.
- Rebouillat, J., Dievart, A., Verdeil, J.L., Escoute, J., Giese, G., Breitler, J.C., Gantet, P., Espeout, S., Guiderdoni, E. and Périn, C.** (2009) Molecular genetics of rice root development. *Rice* **2**: 15-34.
- Reed, R.C., Brady, S.R. and Muday, G.K.** (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 1369-1378.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y.D., Rios, G., Koncz, C.,**

- Robinson, D.G. and Jürgens, G.** (2007) Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* **448**: 488-492.
- Rogg, L.E., Lasswell, J. and Martel, B.** (2001) A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* **13**: 465-480.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. and Scheres, B.** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* **99**: 463-472.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Oka, A.** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**: 1519-1521.
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S. and Matsuoka, M.** (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* **15**: 581-590.
- Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Düchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E. and Geisler, M.** (2005) MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* **579**: 5399-5406.
- Sato, Y., Antonio, B.A., Namiki, N., Takehisa, H., Minami, H., Kamatsuki, K., Sugimoto, K., Shimizu, Y., Hirochika, H. and Nagamura, Y.** (2010) RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in *japonica* rice grown under natural field conditions. *Nucleic Acids Res.* **39**: D1141-1148.
- Scarpella, E., Rueb, S. and Meijer, A.H.** (2003) The *RADICLELESS1* gene is required for vascular pattern formation in rice. *Development* **130**: 645-658.
- Schiefelbein, J.W.** (2003) Cell-fate specification in the epidermis: A common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 74-78
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E. and Bartrinay Manns, I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other

species. *J. Plant Res.* 116: 241-252.

Sessions, A., Nemhauser, J.L., McColl, A., Roe, J.L., Feldmann, K.A. and Zambryski, P.C.

(1997) *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481-491.

Shevell, D.E., Leu, W.M., Gilimor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A. and Chua, N.H. (1994)

EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* **77**: 1051-1062.

蔭 才忠・平沢 正・石原 邦 (1988) 水稻多収性品種の生理生態的特徴について —アケノホシと日本晴の比較—。日作紀 **57**: 139-145.

Shuai, B., Reynaga-Peña, C.G. and Springer, P.S. (2002) The lateral organ boundaries gene

defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* **129**: 747-761.

Sieburth L.E., Muday G.K., King E.J., Benton G., Kim S., Metcalf K.E., Meyers L., Seamen E.

and Van Norman J.M. (2006) *SCARFACE* Encodes ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1396-1411.

Soejima, H., Sugiyama, T. and Ishihara, K. (1995) Changes in the chlorophyll contents of leaves

and in levels of cytokinins in root exudates during ripening of rice cultivars Nipponbare and Akenohoshi. *Plant Cell Physiol.* **36**: 1105-1114.

Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Galweiler, L.,

Palme, K. and Jürgens, G. (1999) Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**: 316-318.

Stals, H., Casteels, P., Van Montagu, M. and Inzé, D. (2000) Regulation of cyclin-dependent

kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **43**: 583-593.

Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y.,

Kamiya, Y. and Kasahara, H. (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 5430-5435.

- Suralta, R.R., Inukai, Y., and Yamauchi, A.** (2008) Utilizing chromosome segment substitution lines (CSSLs) for evaluation of root responses to transient moisture stresses in rice. *Plant Prod. Sci.* **11**: 457-465.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beekman, T., Laplaze, L. and Bennett, M.J.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* **10**: 946-954.
- Takehisa, H., Sato, Y., Igarashi, M., Abiko, T., Antonio, B.A., Kamatsuki, K., Minami, H., Namiki, N., Inukai, Y., Nakazono, M. and Nagamura, Y.** (2012) Genome-wide transcriptome dissection of the rice root system: implications for developmental and physiological functions. *Plant J.* **69**: 126-140.
- Takei, K., Sakakibara, H. and Sugiyama, T.** (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 26405-26410.
- Takei, K., Yamaya, T. and Sakakibara, H.** (2004) *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**: 41866-41872.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640-645.
- Taramino, G., Sauer, M., Stauffer, J.L. Jr., Multani, D., Niu, X., Sakai, H. and Hochholdinger, F.** (2007) The maize (*Zea mays* L.) *RTCS* gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *Plant J.* **50**:

649-659.

- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M., Harper, R.M., Liscum, E. and Yamamoto, K.** (2004) *Massugu2* encodes AUX/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 379-393.
- Teh, O. and Moore, I.** (2007) An ARF-GEF acting at the golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* **448**: 493-496.
- Thakur, J.K., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P.** (2001) *OsiIAA1*, an *Aux/IAA* cDNA from rice, and changes in its expression as influenced by auxin and light. *DNA Res.* **8**: 193-203.
- Thakur, J.K., Jain, M., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P.** (2005) Exogenous auxin enhances the degradation of a light down-regulated and nuclear-localized *OsiIAA1*, an *Aux/IAA* protein from rice, via proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* **1730**: 196-205.
- Tian, Q. and Reed, J.W.** (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* **126**: 711-721.
- Tian, C.E., Muto, H., Higuchi, K., Matamura, T., Tatematsu, K., Koshiba, T. and Yamamoto, K.T.** (2004) Disruption and overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J.* **40**: 333-343.
- Titapiwatanakun, B., Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Yang, H., Mravec, J., Sauer, M., Cheng, Y., Adamec, J., Nagashima, A., Geisler, M., Sakai, T., Friml, J., Peer, W.A. and Murphy, A.S.** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57**: 27-44.
- To, J.P. and Kieber, J.J.** (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.* **13**: 85-92.

- To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Kieber, J.J.** (2004) Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**: 658-671.
- Tobeña-Santamaria, R., Bliet, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J.N., Souer, E. and Koes, R.** (2002) FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes Dev.* **16**: 753-763.
- Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M. and Fukaki, H.** (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1025-1038.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J.** (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**: 1865-1868.
- Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J. and Uchimiya, H.** (1999) Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.* **119**: 31-40.
- Uozu, S., Tanaka-Ueguchi, M., Kitano, H., Hattori, K. and Matsuoka, M.** (2000) Characterization of *XET*-related genes of rice. *Plant Physiol.* **122**: 853-859.
- Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J.P. and Nishitani, K.** (2005) Differential expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* genes in *Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol.* **46**: 192-200.
- von Behrens, I., Komatsu, M., Zhang, Y., Berendzen, K.W., Niu, X., Sakai, H., Taramino, G. and Hochholdinger, F.** (2011) *Rootless with undetectable meristem 1* encodes a monocot-specific AUX/IAA protein that controls embryonic seminal and post-embryonic lateral root initiation in maize. *Plant J.* **66**: 341-353.
- Waller, F., Furuya, M. and Nick, P.** (2002) *OsARF1*, an auxin response factor from rice, is

- auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. *Plant Mol Biol.* **50**: 415-425.
- Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. and Tao, Y.** (2007) Genome-wide analysis of the *auxin response factors* (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **394**: 13-24.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. and Schmülling, T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. and Schmülling, T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**: 2532-2550.
- Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Reed, J.W.** (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* **43**: 118-130.
- Woll, K., Borsuk, L.A., Stransky, H., Nettleton, D., Schnable, P.S. and Hochholdinger, F.** (2005) Isolation, characterization, and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant *rum1*. *Plant Physiol.* **139**: 1255-1267.
- Wright, A.D., Sampson, M.B., Neuffer, M.G., Michalczuk, L., Slovin, J.P. and Cohen, J.D.** (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* **254**: 998-1000.
- Yamamoto, Y., Kamiya, N., Morinaka, Y., Matsuoka, M. and Sazuka, T.** (2007) Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice. *Plant Physiol.* **143**: 1362-1371.
- Yamamoto, Y., Inukai, Y., Kitano, H., Sazuka, T., Matsuoka, M.** (2010) Characterization and mapping of the *CROWN ROOTLESS2* gene, *CRL2*, in rice. *Rice Gen. Newslett.* **25**: 25-26.
- Yang, X., Lee, S., So, J.H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L. and Estelle, M.** (2004) The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of

SCF^{TIR1}. *Plant J.* **40**: 772-782.

Yokoyama, R., Rose, J.K. and Nishitani, K. (2004) A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol.* **134**: 1088-1099.

Zhang, N. and Hasenstein, K.H. (1999) Initiation and elongation of lateral roots in *Lactuca sativa*. *Int. J. Plant Sci.* **160**; 511-519.

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D. and Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**: 306-309.

Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J. and Celenza, J.L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* **16**: 3100-3112.

Zhao, Y., Hu, Y., Dai, M., Huang, L. and Zhou, D.X. (2009) The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell* **21**: 736-748.

Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. and Lohmann, J.U. (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**: 1089-1092.

Zhu, Z.X., Liu, Y., Liu, S.J., Mao, C.Z., Wu, Y.R. and Wu, P. (2012) A Gain-of-Function Mutation in *OsIAA11* Affects Lateral Root Development in Rice. *Mol. Plant* **5**: 154-161.

謝辞

本研究を遂行するにあたり非常に熱心なご指導およびご助言をいただきました、名古屋大学大学院生命農学研究科・植物遺伝育種学研究分野の犬飼義明 助教に心より深く感謝申し上げます。また研究を進めていく上で適切なご助言をいただきました、名古屋大学大学院生命農学研究科・植物遺伝育種学研究分野の中園幹生 教授ならびに佐藤豊 准教授に深く感謝いたします。

貴重な実験材料である *crl4* 変異体および *crl5* 変異体は名古屋大学生物機能開発利用研究センター・有用農業形質保存研究分野の北野英己 教授に、*Osiaa13* 変異体は National Bioresource Project of Rice より分譲していただきました。名古屋大学生物機能開発利用研究センター・植物分子育種研究分野の佐塚隆志 准教授、福井県立大学の三浦孝太郎 講師には、様々な実験に関して適切なご助言をいただきました。秋田県立大学の小川敦史 准教授には、組織免疫学実験に関してご尽力いただきました。名古屋大学大学院生命農学研究科・分子生物工学研究分野の兒島孝明 助教には、DNA beads display system および蛍光検出ゲルシフトアッセイなどの実験に関するご指導およびご助言をいただきました。名古屋大学高等研究院の安益公一郎 特任助教、名古屋大学生物機能開発利用研究センター・有用農協形質保存研究分野の保浦徳昇 博士には、ラジオアイソトープ検出ゲルシフトアッセイ実験についてご指導とご助言をいただきました。University of Leed の Tory Chhun 博士には、オーキシン極性輸送関連の実験のご指導をいただきました。農業生物資源研究所の佐藤豊 博士ならびに竹久妃奈子 博士には、イネの根におけるトランスクリプトームデータの提供および実験に関するご助言をいただきました。ここに感謝の意を表すとともに、皆さまに厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生活および学生生活を送る中で長い間お世話になりました、名古屋大学大学院生命農学研究科・植物遺伝育種学研究分野関係者の皆さまに心より感謝申し上げます。

報文目録

1) **Kitomi, Y., Ogawa, A., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2008)

CRL4 regulates crown root formation through auxin transport in rice.

Plant Root 2: 19-28.

2) **Kitomi, Y., Ito, H., Hobo, T., Aya, K., Kitano, H. and Inukai, Y.** (2011)

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.

Plant J. **67**: 472-484.

3) **Kitomi, Y., Inahashi, H., Takehisa, H., Sato, Y. and Inukai, Y.** (submitted)

OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice.

4) **Kitomi, Y., Wang, P., Kojima, T., Kitano, H. and Inukai, Y.** (in preparation)

Investigation of the direct targets of *CRL5* through DNA beads display system in rice.

参考文献目録

1) **Kitomi Y., Kitano H. and Inukai Y.** (2008)

Mapping of the *CROWN ROOTLESS3* gene, *CRL3*, in rice.

Rice Gen. Newslett. **24**: 31-33.

2) **Kitomi Y., Kitano H. and Inukai Y.** (2011)

Molecular mechanism of crown root initiation and the different mechanisms between crown root and radicle in rice.

Plant Signal. Behav. **6**: 1276-1278.

3) 木富悠花, 犬飼義明 (2011)

イネ冠根形成の誘導過程を制御する分子機構.

根の研究 **20**: 61-71.