

図・本館

突然変異体を用いたイネの根系形成機構に  
関する研究

2002年3月

名古屋大学大学院 生命農学研究科  
農学専攻 博士課程後期課程  
作物科学講座

犬飼義明

名古屋大学図書



11378105

# 目次

要旨	1
緒論	5
第1章 種子根および節根の発生を制御する遺伝子の機能	
1. 緒言	14
2. 材料と方法	16
3. 結果	19
4. 考察	24
5. 図表	28
第2章 種子根の伸長成長を制御する遺伝子の機能	
1. 緒言	42
2. 材料と方法	44
3. 結果	46
4. 考察	49
5. 図表	52
第3章 環境刺激誘導性短根型変異体の変異形質の発現機作	
1. 緒言	61
2. 材料と方法	63
3. 結果	67
4. 考察	70
5. 図表	73
総合考察	82
謝辞	93
引用文献	94
報文目録	103

## 要旨

根系形成の遺伝的制御機構に関する知見は、他の器官に比べると圧倒的に少ない上に断片的である。さらには、これらの基礎的な知見をもとにした根系機能の遺伝的改良といった応用面を考えた場合、特に主要作物を対象にした研究が必要不可欠であるが、これまでにはそのような研究の蓄積は極めて限られている。植物の形態形成やその遺伝的制御を研究するための手法はいくつかあるが、その中でも突然変異体による解析は極めて有効な手段の一つである。本研究は、イネにおける根の発育に関する突然変異体についての発育形態学的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査し、根系形成に関わる制御機構を遺伝学的側面から明らかにしようとしたものである。

初めに、イネ (*Oryza sativa* L., 品種 Blue Rose) に  $\gamma$  線処理を行った  $M_2$  世代の幼植物 (約 7,500 個体), および台中 65 号の *MNU* (*N-methyl-N-nitrosourea*) 受精卵処理後代の  $M_3$  世代における幼植物 (約 10,500 個体) を供試し、根の発育に関わる突然変異体の選抜を試みた。その結果、台中 65 号の *MNU* 受精卵処理後代から 2 系統 (odm202, HK8215), および Blue Rose の  $\gamma$  線処理後代から 6 系統 (BRX65, BRX117, BRX180, BRX334, BRX430, BRX448) 得られた。これらは種子根、冠根の発生に関わる変異体、および種子根の伸長に関わる変異体であった。これらの  $M_3$ , あるいは  $M_4$  世代のヘテロ型個体における表現型の分離について  $\chi^2$  検定を行った結果、正常型 : 変異体型が 3 : 1 に適合する分離を示したため、これらの変異体はいずれも単因子劣性遺伝子変異に起因することが判明した。

次に、新たに得られた変異体 8 系統と、これまでにその作出が報告されている台中 65 号の *MNU* 受精卵処理後代から得られた単因子劣性遺伝子変異に起因する *radicleless* (*ral*) 変異体 3 系統 (odm40, odm115, odm123) を用いて交雑実験を行い、それらの変異形質を支配する遺伝子の対立性を検討した。その結果、種子根の

発生に関わる遺伝子座が2座 (*RADICLELESS1* (*RAL1*), *RAL2*), 冠根の発生に関わる遺伝子座が2座 (*CROWN ROOTLESS1* (*CRL1*), *CRL2*), および種子根の伸長に関わる遺伝子座が3座 (*REDUCED ROOT LENGTH1* (*RRL1*), *RRL2*, *RRL3*) 存在することが判明した。

そこで、まず根系形成の出発点にあたる根の発生過程の制御機構を解析することを目的に、*RAL1*, *RAL2*, *CRL1*, および *CRL2* に座乗する遺伝子の突然変異に起因する変異体を用いて、形態的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査した。

イネの種子胚中には、一本の幼芽と幼根が分化する。これに対して、今回新たに得られた *rll1-2* の種子胚中には、幼芽は存在するが、幼根の分化は認められず、胚発生突然変異体として既に作出されている *rall-1*, *ral2-1*, および *ral2-2* 変異体と類似した特徴を示した。また、これらの *ral* 変異体4系統ではいずれも胚のサイズが原品種に比べ縮小化する傾向がみられ、幼芽の分化位置はより基部側へ移行していた。一方、これらの変異体は冠根形成が可能であった。加えて、*rall-1 ral2-1* 二重変異体では、胚のサイズが各交雑親の変異体に比べさらに小さく、また幼芽も欠損していた。これらの結果から、*RAL1*, および *RAL2* はいずれも幼根そのものの発生分化を制御するのではなく、胚の領域形成に直接あるいは間接的に関わる遺伝子座であると考えた。

*crl1* 変異体では、冠根数が減少すること以外は形態的特徴が原品種とほぼ同様であったが、*crl2* 変異体では地上部の矮化、葉や穂の奇形化、および種子根の長さや直径の増加など、冠根の発生以外にも多くの形態的異常が認められた。*crl1* 変異体の茎葉部には冠根原基の形成が認められなかったため、冠根数の減少は原基の発生自体が抑制されることに起因することが明らかとなった。これに対して *crl2* 変異体では、原品種に比べると数は少ないものの、冠根原基の形成が認められた。しかし、ほとんどの冠根原基は茎葉部外へ伸長することはなく、原基形成後、その成長

を停止していた。したがって、本変異体における冠根数の減少は冠根原基の発生日体を抑制する作用と、形成された原基の成長を抑制する作用の2つの原因によるものと推定された。これらの結果から、*CRL1* は冠根原基の発生前に特異的に作用するが、*CRL2* はイネの様々な発育過程に関わる遺伝子座であると判断した。

*rall-2 crr1* 変異体の幼苗では、冠根および種子根のいずれの発生前も認められず、両交雑親である変異体の形質が付加的に現れていた。また、その後も継続的に冠根発生前数について調査したところ、*rall-2 crr1* 二重変異体では、原品種に比べその数は著しく少なかったが、*crr1* 変異体とほぼ同数の冠根を形成した。これらの結果から、特に *RAL1* は冠根形成には全く関与せず、幼根の発生前に特異的に関わる遺伝子座であることが判明した。

次に、根の伸長過程における遺伝支配の実態について、*RRL1*、*RRL2*、および *CRL2* に座乗する遺伝子の突然変異に起因する変異体を用いて解析した。*rll1* 変異体、および *rll2-1* 変異体の15日齢の幼苗における種子根長は、原品種のそれぞれ36%、および45%であり、*crl2* 変異体では114%であった。種子根の組織を観察した結果、短根化する変異体のうち、*rll1* 変異体は原品種に比べ細胞の伸長のみが抑制されており、*rll2-1* 変異体では細胞伸長が抑制され、かつ根端分裂域のサイズが減少する傾向が見られた。また、一細胞層において単位時間あたりに増加した総細胞数（セルフラックス）は、*rll1* では原品種と同程度であったが、*rll2-1* では有意に減少していた。一方、長根化する特徴を有する *crl2* 変異体は分裂域のサイズ、セルフラックス、および成熟域における細胞長のいずれも原品種に比べ増加していた。

*rll1 crr2* 二重変異体の成熟域における細胞長は、*rll1* 変異体、および *crr2* 変異体の細胞長の間を示し、また *rll2-1 crr2* 二重変異体の細胞長、根端分裂域のサイズ、およびセルフラックスは、いずれも *rll2-1* 変異体、および *crr2* 変異体の各値の間に位置していた。以上の結果から、*RRL1*、および *RRL2* は根軸方向への細胞の伸長、あるいは増殖過程において促進的に作用し、逆に *CRL2* はこれらの過程に対

して抑制的に作用する機能を持つ遺伝子座であり、それらに座乗する遺伝子が互いに競合的に作用することによって根の伸長量が決定されることが示唆された。

これらの根の伸長に関わる変異体の中に、短根性の発現が生育環境に依存する変異体 (*rrl3* 変異体) が 1 系統存在した。そこで、*rrl3* 変異体を用いてこの変異形質の発現に関わる環境要因を調査した結果、この変異体は機械的刺激に対し最も鋭敏な応答性を示して短根化する変異体であることを明らかにした。また、本変異体における種子根の組織学的特性から、正常な根が機械的ストレスにさらされた場合には細胞の伸長抑制と細胞増殖の低下が同時に起こるのに対し、本変異体の根では、根端分裂域における根軸方向への細胞増殖率が特異的に低下することによって短根化が誘起されることを明らかにした。これまでは、機械的ストレス下での細胞の伸長抑制と細胞増殖の低下といった 2 つの異なる機構を厳密に区別して解析することは非常に困難であった。しかし、本変異体では細胞伸長過程に異常が認められなかったため、本変異体は機械ストレス下での細胞の増殖、および伸長の変化に関わる機構を区別して解析する上で、極めて有用な研究素材であると考えた。

このように、本研究は根系形成機構を根の発育に関わる突然変異体を用いて遺伝学的側面から解析し、(1) 種子根、および冠根の形成に関わる遺伝子座をそれぞれ 2 座ずつ同定し、前者は幼根が分化する胚の領域形成過程に対して直接あるいは間接的に制御する遺伝子座であり、また後者は冠根原基の発生、および形成後の成長過程に関わる遺伝子座であること、(2) 種子根の伸長に対して抑制的、および促進的な機能をもつ遺伝子座が存在し、その伸長量はそれらに座乗する遺伝子が互いに競合的に作用することによって決定されること、および (3) 機械的ストレス下において、根端分裂域の根軸方向への細胞増殖過程を特異的に制御する遺伝子座が存在することを認めた。

## 緒論

植物の形態形成やその遺伝的制御を研究するための手法はいくつかあるが、その中でも突然変異体の利用による解析は極めて有効な手段の一つである。本研究は、イネにおける根の発育に関する突然変異体についての発育形態学的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査し、根系形成に関わる制御機構を遺伝学的側面から明らかにしようとしたものである。

根系を構成する異なる種類の根の、数、長さ、太さなどで表される発達程度と、それらの土壌空間中における配置によって規定される根系構造は、根系全体の機能発現において決定的な役割を果たしている (Lynch 1995, Yamauchi et al. 1996)。したがって、この根系構造の形成過程がどのような遺伝支配を受けているのかを解明することは極めて重要な課題であるが、その実態についてはなにもつかめない状態が続いていた。しかしこの 10 年ほどの間に、特にシロイヌナズナを中心に根の発育過程に関わる突然変異体の作出、および選抜が精力的に行われ、シロイヌナズナの根がどのような機能を持つ遺伝子によって形作られているのかが徐々に明らかになってきた。

植物のライフサイクルで、もっとも早く形成されるのは胚発生中に分化する幼根である。シロイヌナズナの胚では、頂端-基部の軸に沿って茎頂分裂組織、2 枚の子葉、胚軸、幼根、根端分裂組織が並ぶ (Jurgen et al. 1991)。このパターンの形成は、軸の極性の確立、および軸に沿った各器官や組織の分化の 2 つのプロセスから成り立つと考えられる。Jurgen らは、頂端-基部の軸に沿ったパターン形成過程がどのような遺伝的制御を受けているかを探るため、芽生えにおいて特定の器官が欠損する変異体を徹底して選抜した (Jurgen et al. 1991, Mayer et al. 1991)。その結果、4 種の突然変異体が得られ、このうち *monopteros (mp)* は胚軸と根をそれぞれ欠損していると解釈された (Mayer et al. 1991)。*mp* 変異体の初期胚を調べたところ、apical, central, および basal の 3 つの領域のうち、本変異体では central と basal 領域で細胞分裂パターンに異常が見られたため、*MP* 遺伝子はこれらの領域を発生

の初期段階で確立するのに重要であると判断された (Mayer et al. 1991). しかし, Scheres et al. (1994), および Willemsen et al. (1998) は, 組織切片の詳細な観察とクローン解析により細胞系譜の追跡を試み, 作成した心臓型胚の原基分布図と apical, central, および basal の 3 領域に対応させたところ, 1 つの器官や組織を構成する細胞が, 必ずしも同じ領域に由来しないことが判明したため, 胚の個々の器官や組織の分化に細胞系譜はあまり重要でないと考察した. このことは, *fass* (*fs*) 変異体の特徴からも裏付けされる. *fs* 変異体は, 正常型に見られるような細胞分裂の規則性を全く失い, 極端に変形した芽生えを形成するが, この芽生えでは茎頂分裂組織, 子葉, 胚軸, 幼根が相対的に正常な位置に見られ, 放射軸に沿った各組織も正しい位置に分化していた (Torres-Ruiz and Jurgens 1994). このようなことから, 胚の細胞の運命は, 細胞系譜よりも細胞の相対的な位置に大きく依存すると現在では考えられている. したがって, *MP* 遺伝子が必ずしも central と basal 領域の確立に働くとは断定できないことになる. その後, この *MP* 遺伝子については, より詳細な解析が行われた結果, *mp* の芽生えから不定根を誘導して完全な植物体まで成長させたところ, どの器官においても維管束細胞の伸長が不十分で, しばしば分断されており, 配列も乱れていた (Przemeck et al. 1996). 維管束の形成には, 細胞の長軸方向に沿ったオーキシンの流れが重要であるが (Sachs 1991), 実際に *mp* 変異体の花茎ではオーキシンの極性移動量が減少していた (Przemeck et al. 1996).

また, *mp* 変異体と同様に胚軸と根を欠損する *bodenlos* (*bdl*) 変異体が単離されたが, *mp bdl* 二重変異体はほとんど胚軸のみとなった (Hamann et al. 1999). 以上のことから, *MP* 遺伝子は胚の特定領域の確立, およびその後の幼根の分化に直接的な役割を果たしているのではなく, オーキシンと関連した維管束細胞の軸化に関わっていると考えられる.

頂端-基部軸に沿った細胞運命の決定には, *HBT* 遺伝子も関与している (Willemsen et al. 1998). *hbt* 変異体では, 球状胚の段階で hypophyseal cell が正常に分裂せず, 最終的に静止中心と根冠の根の先端部の構造が異常になる. また, 本変異体では胚発生の後半に始原細胞の分裂が始まらない, lateral root cap が形成されないなど, 多くの異常が認められた.



さらに野生株の幼根では、皮層始原細胞の娘細胞が並層分裂して皮相と内皮を作っているが、*hbt* 変異体では、皮層始原細胞に相当する位置の細胞も既に分化し、並層分裂して皮層と内皮に別れていた。Willemsen et al. (1998) は、このような多面に渡る *hbt* 変異体の異常性に関わる遺伝子の本質的な機能について、近年提案された新しい静止中心の機能の面から考察している。

van den Berg et al. (1995) は、根端の様々な細胞をレーザーを用いて破壊する実験を行い、例えば皮層始原細胞を壊すと、その空隙を埋めた内鞘の始原細胞が他の皮層細胞と同じように分裂して、皮層と内皮を形成することを見いだした。さらに、皮層始原細胞を壊した場合、その始原細胞は皮層と内皮を形成したが、皮層の始原細胞に接している 3 つの皮層の娘細胞を同時に壊した場合には、始原細胞は並層分裂による皮層と内皮を形成しなくなった。以上のことから彼らは、始原細胞の細胞分裂の様式は、細胞が置かれている位置に基づき、その位置へ同じ細胞層のより成熟した基部側の細胞から始原細胞に求頂的に情報が伝達されることによって決定されると判断した。このように、細胞の分裂様式に関わる位置の情報が各細胞ごとに求頂的に始原細胞まで伝達されているとすると、すべての始原細胞に接している静止中心は、位置情報の流れが収束する場所であると考えられる。そこで彼らは、4 つの静止中心の細胞のうちのいずれか一つをレーザーで壊してその影響を調べた (van den Berg et al. 1997)。その結果、直接それに接していた各始原細胞は、本来娘細胞が示す形に分化してしまい、新たに娘細胞を作ることを止めてしまったため、彼らは静止中心が分化を促進する上位方向からの位置情報に対抗して働き、始原細胞を未分化の状態に保っていると提案した。このような静止中心の機能から判断すると、*HBT* 遺伝子は、胚発生の初期段階に観察された hypophyseal cell の異常分裂に基づく、静止中心と根冠部分の決定に関わるものであり、その他に見られる形態異常は静止中心が形成されないための二次的な結果と解釈される (Willemsen et al. 1998)。

このような頂端-基部パターンに関わる変異体の他に、放射パターンに関わる変異体として、*scarecrow (scr)*、*short root (shr)*、および *wooden leg (wol)* 変異体が得られている。

野生株は、表皮細胞と中心柱の間に皮層と内皮の 2 層を形成するが、*scr* と *shr* 変異体ではそれらの間に 1 層しか存在せず、いずれの変異体も皮層始原細胞の娘細胞に並層分裂が起きないために細胞層が欠損していた (Scheres et al. 1995)。*shr* 変異体では、通常、内皮で形成されるカスパリー線を持つ細胞が消失しているため内皮が欠損していると考えられるが、*shr* 変異体の表皮細胞と中心柱の間における 1 層の細胞層はカスパリー線を持ち、また皮層組織に特異的なモノクローナル抗体の発現が認められるため、この細胞層は両者の性質を有していると想定される。また、根の細胞層の数が増加する *fs* 変異体と交雑した結果、*scr fs* 二重変異体ではそれぞれの性質を示す細胞層が形成されたが、*shr fs* 二重変異体ではカスパリー線を持つ細胞層は形成されなかった。したがって、*SCR* 遺伝子は皮層始原細胞の娘細胞における並層分裂にのみ関わり、*SHR* 遺伝子は並層分裂と内皮そのものの分化に関わるものと考えられる。一方、*wol* 変異体では、中心柱の細胞数が減り、かつ師部も欠損していたが、*wol fs* 二重変異体では細胞数が増えて師部も認められた (Scheres et al. 1995)。したがって、*WOL* 遺伝子は、師部の分化ではなく、中心柱内の細胞分裂に特異的に関わっていると考えられる。

これらとは異なり、幼根の分裂組織は正常に分化するが、発根後すぐに伸長を停止する変異体として *root meristemless1 (rml1)* および *rml2* が得られている (Cheng et al. 1995)。伸長を停止した根には分裂組織が維持されておらず、また伸長前の幼根の表皮細胞数と伸長停止後の表皮細胞数は全く同じであったため、本変異体の幼根の伸長は、細胞の伸長のみ起因したものと想定された。これに関して、ソラマメやワタを用いた実験から、吸水後、幼根基部側部位で細胞伸長が始まり、その結果幼根がある程度伸長することが引き金となって、根端分裂組織が再活性化することが明らかにされている (Obroucheva et al. 1995)。したがって、*RML1* および *RML2* は細胞伸長後の分裂活性の再開に関わる遺伝子である可能性が高い (Cheng et al. 1995)。この *rml* 変異体のような根端分裂組織の維持に欠陥を示し、結果として短根化する変異体はこの他にも得られているが (Baskin et al. 1992)、逆に分裂組織が巨大化し、根が長根化する変異体は得られていない。一方、地上部では、

茎頂分裂組織が巨大化し、草丈が増加する *clavata1 (clv1)*, および *clv3* 変異体が得られている (Clark et al. 1993, 1995). これらの変異体の分裂組織では有糸分裂指数が野生型よりも遅いことが判明しており, *CLV* 遺伝子は分裂組織の負の制御因子ではなく, 未分化細胞の発生運命の決定を促す役割を持つものと考えられている (Laufs et al. 1998). 茎頂, および根端分裂組織の恒常性に関わる機構を比較する上でも, *CLV* のような機能を持つ遺伝子が根端分裂組織でも作用しているのかどうか興味深い.

細胞の根軸方向への伸長過程に関わる変異体として *stunted plant1 (stpl)* が, また放射方向に関わる変異体として, *sabre* および *cobra* が得られている (Benfey et al. 1993, Baskin et al. 1995, Hauser et al. 1995). 極大まかには, 根冠を除く根端は始原細胞群とこれに続く分裂域, および伸長域とに区別されるが, 分裂域と伸長域とは交互に重なっているため, 厳密な意味ではその境界は存在しない (Dolan and Roberts 1995). これに関して *stpl* 変異体では, 分裂能力を持つ細胞の根軸方向への伸長は野生型と変わらないが, 分裂能力を失った細胞の伸長は阻害されていた (Baskin et al. 1995). この結果は, 分裂能力を持つ細胞と持たない細胞間で細胞伸長の制御機構が遺伝的に異なることを示し, *STP1* は後者の伸長過程のみに作用すると考えられる. *cobra* および *sabre* 変異体では, いずれも主根の直径が肥大していたが, 肥大する組織の種類については変異体間に違いが認められ, *sabre* では皮層のみ, また *cobra* では表皮のみがそれぞれ放射方向へ伸長していた (Benfey et al. 1993, Hauser et al. 1995). また, *sabre cobra* 二重変異体では皮層と表皮のいずれの組織も肥大したため, 異なる組織を形成する細胞の伸長方向は, 別々の遺伝的支配下にあると考えられる.

また, これまでに根毛の形成に関する突然変異体も数多く作出されている. シロイヌナズナの場合, 表皮細胞が根毛を形成するか否かは, すぐ内側の細胞層である皮層との位置関係によって決定され, 2つの皮層と接する表皮細胞が根毛を形成する細胞であり, 1つの皮層としか接しない表皮細胞は根毛を持たない細胞である (Dolan et al. 1994, Galway et al. 1994). *root hair defective 6 (rhd6)* は根毛の誘導が抑制される変異体であるが, この変異

体へエチレンの前駆物質である ACC を処理することにより根毛形成が認められたため、根毛の誘導はエチレンによって制御されていると考えられる (Masucci and Schiefelbein 1994). このことは、ACC を処理した野生株の根でも、通常根毛が形成されない表皮細胞から根毛が誘導されることから裏付けられる (Tanimoto et al. 1995). 一方、*caprice (cpc)* 変異体では根毛の発生数が野生株の 1/4 程度に減少するが、エチレン処理によっても根毛数が増加しないため、CPC は根毛形成開始の制御機構そのものに関わることが示唆された (Wada et al. 1997). したがって、同じ根毛数の減少を示すが、*RHD6* と *CPC* は機能的に異なると考えられる.

これらとは逆に、ほとんど全ての表皮細胞から根毛が形成され、その数が著しく増加する変異体として、*constitutive triple response 1 (ctr1)*, *transparent testa glabra (ttg)*, および *glabrous 2 (gl2)* が得られている. このうち *ctr1* では、暗条件下で野生株を育てる際にエチレンを作用させた場合に観察される、上胚軸の伸長成長阻害、放射方向への肥大成長の促進、水平方向への屈曲成長といったいわゆるトリプルレスポンスがエチレンの処理なしに誘導される (Kieber et al. 1993). しかし、エチレン合成阻害剤の aminoethoxyvinylglycine (AVG) やエチレン結合阻害剤の銀イオンなどにより *ctr1* からは根毛形成が誘導されなかったため、*ctr1* はエチレンがなくても情報伝達経路が恒常的に活性化されている変異であると解釈されている. Wada et al. (1997) は、根毛数の増加する変異体である *ttg* および *gl2* と、減少する変異体である *cpc* の間で交雑実験を行い、それぞれの二重変異体の表現型を調査した. その結果、*cpc gl2* 二重変異体は *gl2* の表現型を示し、*cpc ttg* 二重変異体はその中間の表現型を示した. また、*GL2* 遺伝子は既に単離されており、この発現を GUS レポーター遺伝子の発現により *ttg* 変異体で調査した結果、本変異体では GUS 遺伝子の発現量が減少する傾向が認められた (Hung et al. 1998). これらの結果より、*CPC* は *TTG* と相互作用して、下流の *GL2* の発現を制御していることが示唆されている.

さらに、根は様々な環境刺激によって成長パターンを変化させるため、環境刺激に対する応答反応機構を解析する系としても注目されてきた. これまでに多くの環境応答機構に

関わる変異体が得られているが (Benfey and Schiefelbein 1994, Okada et al. 1996, Sakai et al. 2000), なかでも重力応答機構に関する研究の蓄積が著しい. コロドニー・ウェント説によれば, 感受された重力刺激が傾いた根, およびシュートにおいて器官の上下両側におけるオーキシンの不等分布を引き起こし, その不等分布にしたがって, 偏差成長が引き起こされる. このオーキシンの不等分布形成にオーキシン輸送系が重要なことが, オーキシン極性輸送阻害剤を用いた数多くの生理実験から示唆されてきた (Lomax et al. 1995). 合成オーキシンである 1-NAA や 2, 4-D は, 天然オーキシンである IAA と同様のオーキシン活性を示すが, これら 2 つの細胞内外への輸送機構は大きく異なり, 1-NAA は拡散により, また 2, 4-D はキャリアーにより細胞内に取り込まれることが知られている (Delbarre et al. 1996). 根の重力屈性異常を示すシロイヌナズナの *aux1* 変異体の各合成オーキシンに対する反応性が詳細に調査された結果 (Yamamoto and Yamamoto 1998), *aux1* 変異体の根は 2, 4-D に対して耐性を示すが, 1-NAA に対しては野生型と同様の感受性を示し, また低濃度の 1-NAA を培地に添加することにより重力屈性が回復した. 1-NAA と 2, 4-D の取り込まれ方の違いを考慮すると, *AUX1* 遺伝子は取り込みキャリアーに関わると考えられ, さらに *AUX1* 遺伝子の単離, およびタンパク質の機能解析が進められたところ, 上記の考えを支持する結果が得られている (Utsuno et al. 1998).

以上のように, シロイヌナズナの突然変異体を用いて根形成機構の遺伝制御の実態が徐々に解明されている. その他の植物では, トマトにおいて 30 年以上も前から根の発育に関わる突然変異体が数多く単離されていた. Zobel (1975) は, このうち側根を形成できない *diageotropica* (*dgt*) 変異体と不定根を形成できない *rosette* (*ro*) 変異体に注目し, これらの二重変異体の表現型を調査した. その結果, *dgt ron* 二重変異体からは側根や不定根は形成されないが, 胚軸の基部から非常に多くの根 (*basal root*) の発生が観察されたため, 形態学的, 発生学的に異なる側根, 不定根, および *basal root* は遺伝学的にも異なる結論している. また, タバコにおいても不定根形成が誘導されない *rac* 変異体を得られており, この変異体を用いてその形成機構に関して解析されている. タバコの野生株から

採取した茎へオーキシンを処理した場合、基部側から不定根の発生が認められるが、*rac* 変異体では細胞分裂は誘導されるがその後の分裂組織の形成が抑制されるため、*RAC* 遺伝子は細胞分裂を組織化する上で必須の遺伝子であると考えられる (Lund et al. 1996). *rac* 変異体では野生型の不定根形成過程において発現する3つの遺伝子 (*HRGPnt3*, *iaa4/5*, および *gh3*) の内、*iaa4/5* および *gh3* の発現は見られたが、*HRGPnt3* の発現は認められなかった (Lund et al. 1997). これらの3つの遺伝子はいずれも野生型へのオーキシン処理によって発現が誘導されることから、彼らは *RAC* 遺伝子は分裂組織の形成を誘導するオーキシンのシグナル伝達経路、あるいはオーキシンに対する感受性の増加を制御しているものと考察している.

一方、これらの双子葉植物以外では、根の発育に関わる突然変異体がほとんど得られておらず、その遺伝支配の実態についてはほとんど明らかになっていない. これまでの研究において、根系形態における遺伝的変異が30種以上の植物で認められている (O'Toole and Bland 1987). また、ホルモンによる根の発育の制御機構も種間で異なり、例えばブドウやトマト、オウトウでは不定根形成は内生的に IAA 濃度が上昇することにより誘導されるが (Maldiney et al. 1986, Label et al. 1989, Gasper et al. 1990), エンドウではそのようなオーキシン濃度の上昇なしに不定根形成が誘導される (Bollmark et al. 1988, Nordström と Eliasson 1991). したがって、ある植物のみから得られた情報を全ての植物にあてはめていくだけではもちろん不十分であり、そのため特に根系形質に注目した品種育成を目指す上では、目的とする作物を用いて解析する必要性が高い.

そこで本研究の第1章では、主要作物の一つであり、しかもわが国において他の作物と比較して種々の根系形質についての研究の蓄積が多いイネを材料にして、まず根の発育に関わる突然変異体の作出、選抜を行った. その結果、根の発生、伸長、および環境応答に関わる変異体を得た. そこでつづいて、根系形成の出発点にあたる根の発生過程の制御機構を解析することを目的に、新たに得られた根の発生に関わる突然変異体と胚発生突然変異体として既に作出されている種子胚中に幼根の分

化が認められない *radicleless* 変異体 (Kitano et al. 1993) を用いて形態的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査した。これまで短根化する変異体は数多く得られているが、長根化する変異体は得られておらず、そのためどのような遺伝子座が根の伸長を制限しているのか、またそのような遺伝子座は根の伸長を促進させる遺伝子座とどのような相互作用性を示すのかという問題が残されたままである。これに関して、第 1 章で得られた突然変異体の中には、根の長さの増加、および減少を示す変異体がそれぞれ存在していた。これらの変異体はこのような問題を解析する上で、極めて有用な研究素材であると考えられる。そこで第 2 章では、長根、および短根化する変異体を用い、まずこれらの変異体の幼苗期にみられる形態、および組織学的特徴を調べ、次に F<sub>3</sub> 世代で分離した二重変異体型個体の特徴を解析することにより、それらの遺伝子間の相互作用性について検討した。根系構造は、根系全体の機能発現において決定的に重要な役割を果たしているが、この構造は、第 1 章、および第 2 章で解析した根の発生数や伸長量といった要素によって規定される。さらに、圃場条件下において重要となるのが、外部環境に対する根の応答反応である。そこで第 3 章では、第 1 章で得られた短根性の発現が成育環境に依存する変異体を用いて、本変異体の短根性を誘起する環境要因、および短根化した根の組織学的特徴を調査し、さらに短根性の発現機作について生理学的側面から検討した。

以上のように、本研究では、根に関する突然変異体についての発育形態学的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査し、根系形成に関わる制御機構を遺伝学的側面から明らかにすることを試みた。

## 第1章 種子根および冠根の発生を制御する遺伝子座の機能

### 緒言

一般に、多くの双子葉植物では、主根とそこから発生した側根が根系を構成するのに対して、単子葉植物の根系は、その個体発生において順次発生してくる多くの冠根によって特徴付けられる、いわゆるひげ根状の根系を形成する (Kepper 1992)。例えば、圃場で栽培されるイネの根系は、しばしば数百本もの、また時には千本以上もの冠根を発生することが知られている (Kawata et al. 1978, Kawashima 1988)。しかしながら、イネでは冠根の発生に関わる突然変異体が得られておらず、そのためその発生過程がどのような遺伝子によって制御されているのかについては全く知見が得られていない。

イネの根系は、種子根、冠根、およびそれらから発生する側根などの種類の異なる根によって構成されている。これまでの研究において、これらの根の間の形態、解剖、および発生学的な類似性や相違性が明らかにされているが (Waisel and Estel 1991, Yamauchi et al. 1996)、根系機能の改善を育種目標に掲げる場合には、これらに加え遺伝学的側面での共通性や相違性について明らかにすることが必要不可欠である。しかし、イネではこれまでに種子胚中に幼根の分化が認められない *radicleless* 変異体が3系統 (odm 40, odm 115 odm 123) 得られているが (Kitano et al. 1993)、本変異遺伝子が幼根以外の根の発生にどのような影響を及ぼすのかについては詳細には検討されていない。また、他の種類の根ではこのような発生に関わる突然変異体は得られていないため、種類の異なる根の発育過程が、どのような共通の、あるいは異なる遺伝制御下にあるのかに関しては解析が進んでいない。

そこで本章では、まずイネを材料に水耕法あるいはグロースポーチ法によって、根の発育に関する突然変異体の作出、および選抜を試みた結果、幾つかの形態的特徴が異なる突然変異体を得た。その中に、種子根の発生に関わる変異体1系統 (HK8215)、および冠根の発生に関わる変異体2系統 (odm 202, BRX334) が存在した。次に、これらの



3 系統と *radicleless* 変異体 3 系統, およびそれらの原品種を材料として用いて, まず発芽後の成育過程に見られる形態的特徴について調査した. また, これらの変異体間で異なる 6 組合せの交雑実験を行い, 各変異体の変異形質を支配する遺伝子の遺伝関係, および遺伝子間の相互作用性を調べることにより, 各変異遺伝子座の機能について比較・検討した. 加えて, 多くの植物において冠根の発生はオーキシンにより強く促進されることが知られているため(Blakesley et al. 1991), 冠根の発生に関わる odm 202, および BRX334 変異体については, 冠根形成に対するオーキシン処理の影響についても調査した.

## 材料と方法

### 1. 根の突然変異体の作出, 選抜および遺伝様式

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種 Blue Rose に  $\gamma$  線処理を行った  $M_2$  世代の幼植物 (約 7,500 個体), および台中 65 号の MNU (*N-methyl-N-nitrosourea*) 受精卵処理後代の  $M_3$  世代における幼植物 (約 10,500 個体) を変異体の選抜に供試した.

供試した種子は, ペンレート-T 200 倍溶液に 28℃ 暗黒条件恒温器内で 24 時間浸漬した後に, さらに水道水中に同条件下で 24 時間浸漬し, 催芽させた. Blue Rose の  $\gamma$  線処理  $M_2$  世代については,  $M_1$  個体別系統毎に  $M_2$  種子 15 粒程度を, 温室内で 2 週間, 通気水耕栽培した後, 種子根・冠根の発生数, 長さ, 直径と側根の発達程度に注目して選抜した. 台中 65 号の MNU 受精卵処理後代については,  $M_2$  個体別系統毎に  $M_3$  種子 15 粒程度を縦 6 cm × 横 15 cm のシードパック・グロースポーチ (Mega International of Minneapolis 社製) に播種し, 人工気象室 (12 時間日長, 気温 30℃) 内において 2 週間育成した後, 上記と同様に選抜を行った.

両選抜集団とも原品種との差が顕著に観察され変異体である可能性が認められた系統について, ホモ型あるいはヘテロ型個体の自殖後代種子を得た後, 2 週齢の幼植物をそれぞれの原品種とともに選抜時と同様の方法で育成し, 変異形態の発現の再現性を確認した. また, 得られた各変異体において, 変異遺伝子をヘテロ型に持つ個体を展開し, 自殖次世代のヘテロ型個体における変異体の出現頻度について  $\chi^2$  検定を行い, 遺伝様式を解析した.

### 2. 突然変異体の形態的特徴の解析

新たに得られた突然変異体 3 系統 (HK8215, odm 202, BRX334), 台中 65 号の MNU 受精卵処理後代から得られた単因子劣性遺伝子変異に起因する *radicleless* (*ral*) 変異体 3 系統 (odm40, odm115, odm123) (Kitano et al. 1993), およびそれらの原品種を供試材

料に用いた。

これらの種子を各 4 粒ずつ上記と同様の方法で殺菌，および催芽させた後，人工気象室（12 時間日長，気温 30℃）内において栄養源を含まない 0.8% の寒天培地で育成させ，播種 2 週間後に草丈，葉齢，種子根長，種子根直径，冠根数，および側根数を測定した。また，その後の発育過程に見られる特徴を調査するために，播種 2 週間後においてさらに育成を継続することが可能であった変異体とそれらの原品種を土壌を充填したワグナーポット（1/5000a）に移植し，ガラス室内で育成した。

次に，HK8215 と *radicleless* 変異体における種子胚の形態的特徴を比較するために，各変異体とその原品種台中 65 号の種子を 24 時間浸漬した後に，樹脂包埋法により種子胚の縦断切片を作成した。一方，odm 202，BRX334，およびそれらの原品種である台中 65 号および Blue Rose については，パラフィン包埋法により茎葉部における横断連続切片を作成し，冠根の発生，分化過程における形態的特徴について比較した。

### 3. 冠根欠損型変異体における冠根形成に対するオーキシンの影響

odm 202，BRX334，およびそれらの原品種の催芽種子を， $\alpha$ -naphthaleacetic acid ( $\alpha$ -NAA) をそれぞれ  $10^{-6}$ ， $10^{-7}$ ，および  $10^{-8}$  M 含む 0.8% の寒天培地に播種した。人工気象室（12 時間日長，気温 30℃）内において 2 週間育成した後に，それらの冠根数を測定した。

### 4. 種子根欠損型，*radicleless*，および冠根欠損型変異体間の遺伝解析

HK8215，odm 202，BRX334，および *ral* 変異体 3 系統 (odm 40，odm 115，odm 123) との間で 6 つの異なる組合せで交雑実験を行った。odm 115，123 および BRX 334 は，変異遺伝子についてホモ型個体を得られなかったため，ヘテロ株を交雑母体として  $F_1$  種子を得た。それらの  $F_1$ ， $F_2$ ，および  $F_3$  世代を用いて以下のような方法で遺伝分析を行った。

HK8215 および *ral* 変異体の交雑組合せでは、それらの F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, あるいは F<sub>3</sub> 世代の種子を個別に脱粉した後試験管に入れ、28℃暗黒条件恒温器内でベンレート-T 200 倍溶液中に約 24 時間浸漬させた。その後、これらの吸水種子をシャーレに移し、解剖顕微鏡下で種子を解剖用メスで縦断し、正常胚と変異体胚に区別して胚の表現型分離について調査した。

odm 202 と BRX334 間、および HK8215 と odm 202 間の交雑組合せでは、F<sub>2</sub> あるいは F<sub>3</sub> 世代の種子をベンレート-T 200 倍溶液に 24 時間浸漬した後、人工気象室（12 時間日長、気温 30℃）内で栄養源を含まない 0.8%の寒天培地で育成させ、播種 10 日後に表現型を調査した。また、これらの変異体と各交雑後代で分離した二重変異体、およびそれらの原品種を同様の条件下で 18 日間育成し、それぞれの個体について播種後 48 時間毎に冠根数を測定した。

## 結果

### 1. 突然変異体の同定および遺伝様式

原品種との差が顕著に観察された系統について自殖次世代における表現形質の再現性を確認した結果、最終的に根の発育に関する突然変異体が台中 65 号の MNU 受精卵処理後代から 2 系統 (odm202, HK8215), および Blue Rose の  $\gamma$  線処理後代から 6 系統 (BRX65, BRX117, BRX180, BRX334, BRX430, BRX448) 得られた。これらの変異体を表現型の特徴から、種子根欠損型変異体、冠根欠損型変異体、短根型変異体、および環境刺激誘導性短根型変異体に分類した。これらの  $M_3$ , あるいは  $M_4$  世代のヘテロ型個体における表現型の分離について  $\chi^2$  検定を行った結果、正常型 : 変異体型が 3 : 1 に適合する分離比を示したため、これらの変異体はいずれも単因子劣性遺伝子変異に起因することが判明した (第 1-1 表)。

### 2. 種子根の発生に関わる突然変異体の形態的特徴の解析

第 1-1 図に示すように、HK8215 では種子根の発生が認められず、odm40, odm115, および odm123 と同様の特徴を示した。一方、いずれの変異体も冠根形成は可能であり、特に odm40 と HK8215 は原品種との間にその数において有意差が認められなかった (第 1-2 表)。地上部の成育を原品種と比較すると、odm115 と odm123 では極めて劣り、発芽後 10 日前後で既にその成育が停止したが、odm40 と HK8215 では草丈は有意に小さかったが成育は継続可能であり、また葉齢には原品種との間に有意差は認められなかった (第 1-2 表)。これらの 2 系統は出穂し、自殖稔実種子を得ることも可能であったが、種子は奇形化する傾向が認められた (第 1-3 図)。このような傾向は、いずれの系統においても自殖あるいは交雑後代から分離する全ての個体で見られたことから、種子の奇形化はこれらの変異遺伝子の多面発現によるものと考えられた。

イネの種子胚中には、通常、一本の幼芽と幼根が分化する。これに対して、今回新た

に得られたHK8215の種子胚中には、幼芽は存在するが、幼根の分化は認められず、*ral*変異体3系統と類似した特徴を示した(第1-3図)。一方、幼芽に関しては、odm 40およびHK8215ではほぼ正常に分化していたが、odm 115およびodm 123では、分化した幼芽の原基が顕著に縮小化する傾向が見られ、系統間に形態的差異が認められた。これらの4つの変異体では、原品種に比べいずれも胚のサイズが小さく、胚の領域分化が若干未発達な状態を示し、また幼芽は胚の基部側で分化する傾向が認められた(第1-3図)。

### 3. 冠根の発生に関わる突然変異体の形態的特徴の解析

第1-4図、および第1-2表に示したように、odm 202とBRX334では原品種に比べ著しく冠根の発生が抑制された。これらの変異体の幼苗期に見られる特徴を比較すると、odm 202では冠根の発生に見られる異常以外は形態的特徴が正常型とほぼ同様であるのに対して、BRX334では他の調査形質においても異常性が認められ、地上部が矮性化する一方、種子根は長根化、肥大化し、また側根密度は低下した。これらの変異個体を湛水・多肥条件下で育成したところ、いずれの個体も地上部は奇形を伴った極矮性を示し、中には幼穂形成が可能な個体も若干存在したが、小穂の分化程度は極めて劣り稔実種子は得られなかった(第1-5図)。これに対してodm 202は、湛水・多肥条件下においてはその後の成育も正常であり、原品種とほぼ同時期に出穂し、自殖稔実種子を得ることも可能であった(第1-2図)。

両変異体とそれらの原品種の茎葉部における横断切片図を第1-6図、および第1-7図に示した。各原品種における2.5葉期の茎葉部では、辺周部維管束環に接する部位から数本の冠根の発生が認められたが、odm 202では冠根、およびその原基の形成が全く見られなかったため(第1-6図)、本変異体における冠根発生の抑制は、原基の発生自体が抑制されることに起因していることが明らかとなった。これに対して、BRX334の2.5葉期における茎葉部では、原品種に比べると数は少ないものの、鞘葉節および第1節に

においてもすでに冠根原基の形成が見られた（第 1-7 図）。しかしほとんどの冠根原基は鞘葉の基部を破って茎葉部外へ伸長することではなく、冠根原基形成帯に形成された状態で発育を停止していた。したがって、本変異体における冠根発生の抑制は、odm 202 と同様に冠根原基の発生自体を抑制する作用と、形成された冠根原基の成長を抑制する作用の 2 つの原因によるものと判断した。

これらの変異体と各原品種における冠根形成に対する  $\alpha$ -NAA の影響を調査した結果、odm 202 と台中 65 号、および Blue Rose の冠根数は、 $10^{-6}$  M の  $\alpha$ -NAA 処理により無処理区に比べ有意に増加した（第 1-3 表）。一方、BRX334 では  $\alpha$ -NAA の処理濃度に関わらず、冠根数の増加は認められなかった。

#### 4. 各突然変位遺伝子間の対立性の検定

ホモ型間の交雑が可能であった HK8215 と odm 40 の組合せの  $F_1$  世代では、正常個体は 1 個体も出現せず全て種子根欠損型を示した（第 1-4 表）。その他の組合せでは、 $F_2$  世代における表現型の分離を調査した結果、odm 123 と odm 115 との組合せでは、正常型：変異胚型が同一遺伝子座の遺伝子変異を想定した 3：1 の分離比に、また odm 40 と odm 115、および odm 40 と odm 123 の両組合せでは、正常型：変異胚型が異なる遺伝子座における遺伝子変異を想定した 9：7 の分離比にそれぞれ適合した（第 1-4 表）。以上の結果より、odm 40 の変異遺伝子は odm 123 および odm 115 の変異遺伝子とは非対立関係に、HK8215 の変異遺伝子とは対立関係にあり、また odm 115 の変異遺伝子は odm 123 の変異遺伝子とは対立関係にあることが明らかになった。odm 40 と HK8215 の変異遺伝子の遺伝子座を *RADICLELESS1* (*RAL1*)、また odm 115 と odm 123 のそれを *RAL2* とし、それぞれの対立遺伝子を *rall-1* (odm 40), *rall-2* (HK8215), *ral2-1* (odm 115), および *ral2-2* (odm 123) と命名した。

両変異体間の  $F_2$  世代では、正常型：冠根欠損型が異なる遺伝子座における遺伝子変異

を想定した 9 : 7 の分離比にそれぞれ適合し、これらの変異遺伝子は非対立関係にあることが判明した (第 1-4 表). odm 202 の変異遺伝子の遺伝子座を *CROWN ROOTLESS1* (*CRL1*), また BRX334 のそれを *CRL2* とそれぞれ命名した.

#### 5. 二重変異体個体の同定, および特徴の解析

*rall-1* と *ral2-1* 変異体, および *rall-2* と *crl1* 変異体間の交雑  $F_2$  世代では, 正常型, および各交雑親と同様の特徴を示す変異体型の他に, 前者の交雑組合せでは種子胚中に幼根, および幼芽の両器官の分化が認められない個体が (第 1-3F 図), また後者では種子根および冠根のいずれの発生も認められない個体がそれぞれ分離した (第 1-8D 図). 次に, 各交雑組合せの  $F_2$  世代で分離したいずれかの交雑親型個体を展開した自殖次世代において表現型の分離を調査した結果, いずれの組合せにおいても交雑親型と上記の交雑親とは異なる変異型個体が 3 : 1 の割合で分離したため, 後者を二重変異体個体と判定した (第 1-5 表).

*crl1* と *crl2* 変異体間の交雑  $F_2$  世代では, 調査時点で二重変異体と *crl2* 変異体型の区別が不明瞭な個体が存在した. そこで, 本交雑組合せの  $F_2$  世代で分離した *crl1* 変異体型個体を展開した自殖次世代における表現型の分離を調査した結果, *crl1* 変異体型個体と *crl2* 変異体型に類似した形態的特徴を示す個体が, 3 : 1 の割合で分離したため, 後者を二重変異体個体と判定した (第 1-5 表).

これらの変異体, および二重変異体と各原品種における冠根発生数の推移について調査した結果を第 1-9 図に示した. *rall-2* 変異体の冠根数は, 原品種台中 65 号に比べ播種後 6 日目までは少なかったが, 播種後 8 日目までにはほぼ同数の冠根が発生し, その後は原品種と同様に推移した. また, *rall-2* *crl1* 二重変異体の冠根数は *crl1* 変異体と同様に推移していた. 一方, *crl1*, および *crl2* 変異体はいずれも原品種である台中 65 号, および Blue Rose に比べ, 著しく冠根の発生数が少なかったが, *crl1* *crl2* 二重変異体ではそれ



らの変異体よりさらにその発生が抑制され、播種後 18 日目までには全ての調査個体において冠根の発生は確認されなかった。

## 考察

イネの種子胚中には、一本の幼芽と幼根が分化する。これに対して、今回新たに得られたHK8215の種子胚中には、幼芽は存在するが、幼根の分化は認められず、胚発生突然変異体として既に作出されている種子根欠損型変異体3系統と類似した特徴を示した。このような胚発生の段階で幼根を欠如する突然変異体はシロイヌナズナにおいてもいくつか見いだされている (Berleth and Jurgens 1993)。このうち *monopteros* 変異体は、完成胚段階で幼根原基だけでなく、それが分化する胚の領域全体が欠如するという特徴を有した。この *monopteros* 変異体は変異胚の培養から得たカルスから不定根を正常に形成するため、根の発生分化に直接関与する遺伝子変異には起因していないものと考えられており、一種のパターン形成(頂端-基部パターン)突然変異体と推定された (Mayer et al. 1993)。しかしながら、その後この *MP* 遺伝子についてより詳細な解析が行われた結果、*mp* の芽生えから不定根を誘導して完全な植物体まで成長させたところ、どの器官においても維管束細胞の伸長が不十分で、しばしば分断されており、配列も乱れていた (Przemeck et al. 1996)。維管束の形成には、細胞の長軸方向に沿ったオーキシンの流れが重要であるが (Sachs 1991)、実際に *mp* 変異体の花茎ではオーキシンの極性移動量が減少していた (Przemeck et al. 1996)。また、*mp* 変異体と同様に胚軸と根を欠損する *bodenlos (bdl)* 変異体が単離されたが、*mp bdl* 二重変異体はほとんど胚軸のみとなった (Hamann et al. 1999)。以上のことから、*MP* 遺伝子は胚の特定領域の確立、およびその後の幼根の分化に直接的な役割を果たしているのではなく、オーキシンと関連した維管束細胞の軸化に関わっていると考えられる。これに関して、今回調査した *ral* 変異体4系統全てにおいて、胚のサイズは原品種に比べ縮小化する傾向がみられ、また冠根の形成も可能であった。加えて、*ral1-2 ral2-2* 二重変異体では、胚のサイズの縮小化が各交雑親の変異体に比べさらに顕著に認められ、またこの種子胚中には幼芽の形成も見られなかった。これらの結果から、*RAL1*、および *RAL2* はいずれも幼根そのものの発生分化や胚の基部側領域形成を特異的に制御するのではなく、胚

の領域全体の形成に直接あるいは間接的に関わる遺伝子座であると判断した。

一方、胚発生中に形成される幼根とは異なり、冠根原基はその後の成長過程で茎葉節において内生的に分化する (Kaufman 1952, Kawata et al. 1972)。今回調査した *cr1* 変異体 2 系統のうち、*cr11* 変異体では冠根原基の発生自体が抑制され、一方、*cr12* 変異体では、冠根原基の発生自体と原基形成後の成長の両者が抑制されていた。また、*cr11* 変異体の幼苗では、他の調査形質において原品種との間に有意差は認められず、その後も原品種と同様に成育可能であったが、*cr2* 変異体では冠根数の減少以外にも他の多くの面で原品種との間に形態的差異が認められた。したがって、*CRL1* は冠根の発生のみの特異的に作用するが、*CRL2* は植物の様々な発育過程を制御する遺伝子座であると考えられる。また、*cr11 cr12* 二重変異体では両 *cr1* 変異体よりさらに冠根の発生が抑制されていたため、冠根形成過程において *CRL1*、および *CRL2* は異なる経路で作用することが示唆された。さらに、 $\alpha$ -NAA の処理により *cr11* 変異体における冠根形成機能の欠陥は緩和されたが、*cr12* 変異体はそのような傾向を示さなかったため、*CRL1*、および *CRL2* は機能的にも異なると推測した。

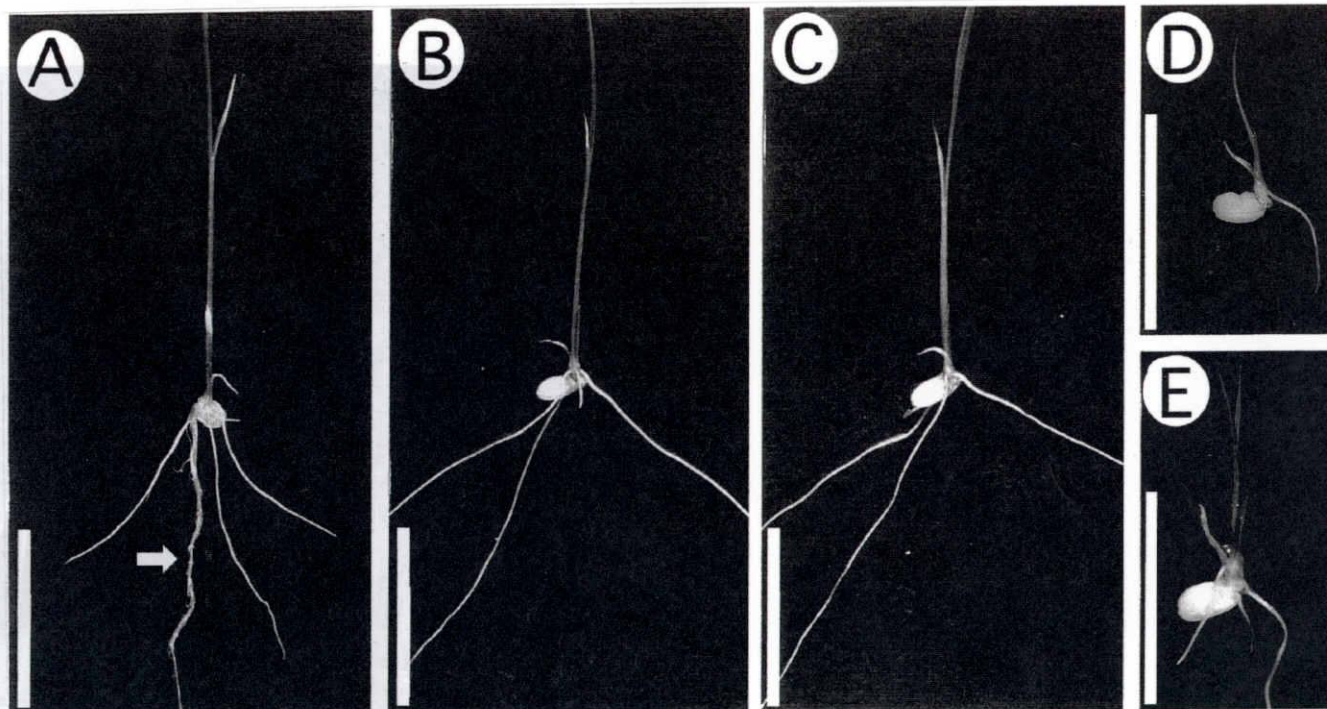
これらの *cr1* 変異体は、これまでに報告されている不定根形成に関わる突然変異体とその特徴が異なっていた。シロイヌナズナの *alf4-1* 変異体は、側根および冠根のいずれの形成も認められなかったが (Celenza et al. 1995)、*cr1* 変異体では側根の形成は可能であった。また、タバコの *rac* 変異体では、外部からのオーキシン処理により細胞分裂は誘導されたが、その後組織だった分裂へと進行せず、結果として正常な不定根原基の形成は認められなかった (Lund et al. 1996)。これに対して、*cr11* 変異体ではオーキシン処理により冠根自体を形成し、また *cr2* 変異体は外部からのオーキシン処理なしで冠根原基を形成することが可能であった。トウモロコシの *rtcs* 変異体は、*cr11* 変異体と同様に冠根原基の発生自体が抑制されていたが、*cr11* 変異体の幼苗では、原品種に比べ明らかに数は少ないものの、冠根の形成が認められているのに対して、*rtcs* 変異体では播種後 50 日を過ぎても冠根の発生は全く認められず、また外部からのオーキシン処理によっても冠根形成は誘導されなかった (Hetz et al. 1996)。この

ように *crl* 変異体は他の不定根形成に関する変異体と異なる特徴を持つため、これらの変異体を用いて解析を進めることにより、不定根形成を制御する個々の遺伝子座の役割について新たな知見が得られるものと期待される。

さらに Hetz et al (1996) は、*rtcs* 変異体へのオーキシン処理により、中茎根の形成が認められたと報告している。同様に、これまでに幼根あるいは不定根のいずれか一方の形成能力を欠く突然変異体が数多く報告されている (Berleth and Jurgens 1993, Celenza et al. 1995, Hong et al. 1995, Lund et al. 1996)。したがって、異なる種類の根の発生過程はその遺伝支配に関しても異なると考えられる (van den Berg 1998)。さらに本研究では、*RAL1*、および *CRL1* に座乗する変異遺伝子間の相互作用性についても検討した結果、*rall-2 crl1* 二重変異体では両交雑親の変異形質が付加的に現れており、また本二重変異体は *crl1* 変異体とほぼ同数の冠根を形成したため、特に *RAL1* は冠根形成には全く関与せず、種子根の発生に特異的に関わる遺伝子座であることが判明し、上記の考えが個々の変異体の表現型からのみでなく、異なる種類の根の発生を制御する遺伝子間の相互作用性を考慮した上でも正しいことを明らかにした。

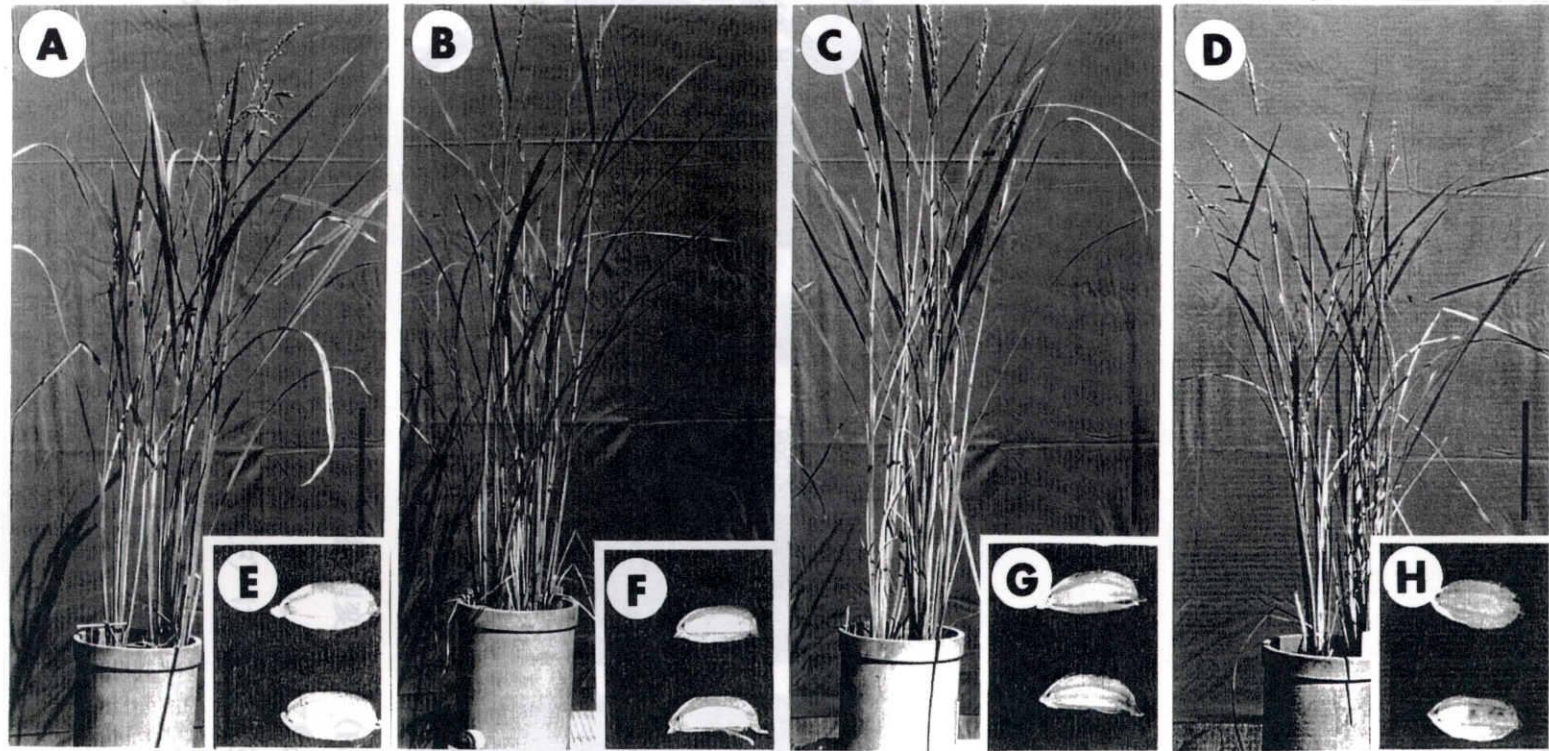
一方、根の分裂組織におけるパターン形成やその後の成長過程では、一つの種類の根で特異的に異常を示す突然変異体は得られておらず、その全てが種子根や冠根、側根といったいずれの根においても形態的異常を示していた (Scheres et al. 1995, Willemsen et al. 1998)。したがって、異なる種類の根でのこれらの過程は、発生の初期段階とは異なり、共通の遺伝子によって制御されていると考えられる (van den Berg 1998)。これに関して、*crl2* 変異体は、冠根数の減少だけでなく、種子根軸上の側根密度も低下していた。本章では、*crl2* 変異体における側根の発生抑制の原因については組織学的観点から解析していないが、本変異体における冠根数減少は、冠根原基の発生自体、および形成された冠根原基の成長を抑制する作用の 2 つの原因によるものであったため、側根密度の減少がいずれの原因によるものなのか興味深い。

これまでの研究において、種類の異なる根の間の形態、解剖、および発生学的な類似性や相違性が明らかにされているが (Waisel and Estel 1991, Yamauchi et al. 1996), 遺伝学的側面からの研究は限られている。これに関して、本章で用いた *RAL1*, および *CRL1* はそれぞれ種子根, および冠根の発生に特異的に作用し, 一方, *CRL2* は冠根や側根といった種類の異なる根の発育に関して共通に制御する遺伝子座であると考えられる。したがって, これらに座乗する遺伝子の変異に由来する突然変異体を用いて, さらに詳細に解析することによって, 異なる種類の根の遺伝的制御機構の共通性, および相違性について新たな知見が得られるものと期待される。一方, *crl1* 変異体は, 冠根数の減少以外, 地上部も含めた形態的特徴が原品種とほぼ同様であった。このような特徴を持つ変異体は, 根系の大きさと地上部の成育の関連性について解析する上でも, 極めて有用な研究素材となりうるであろう。

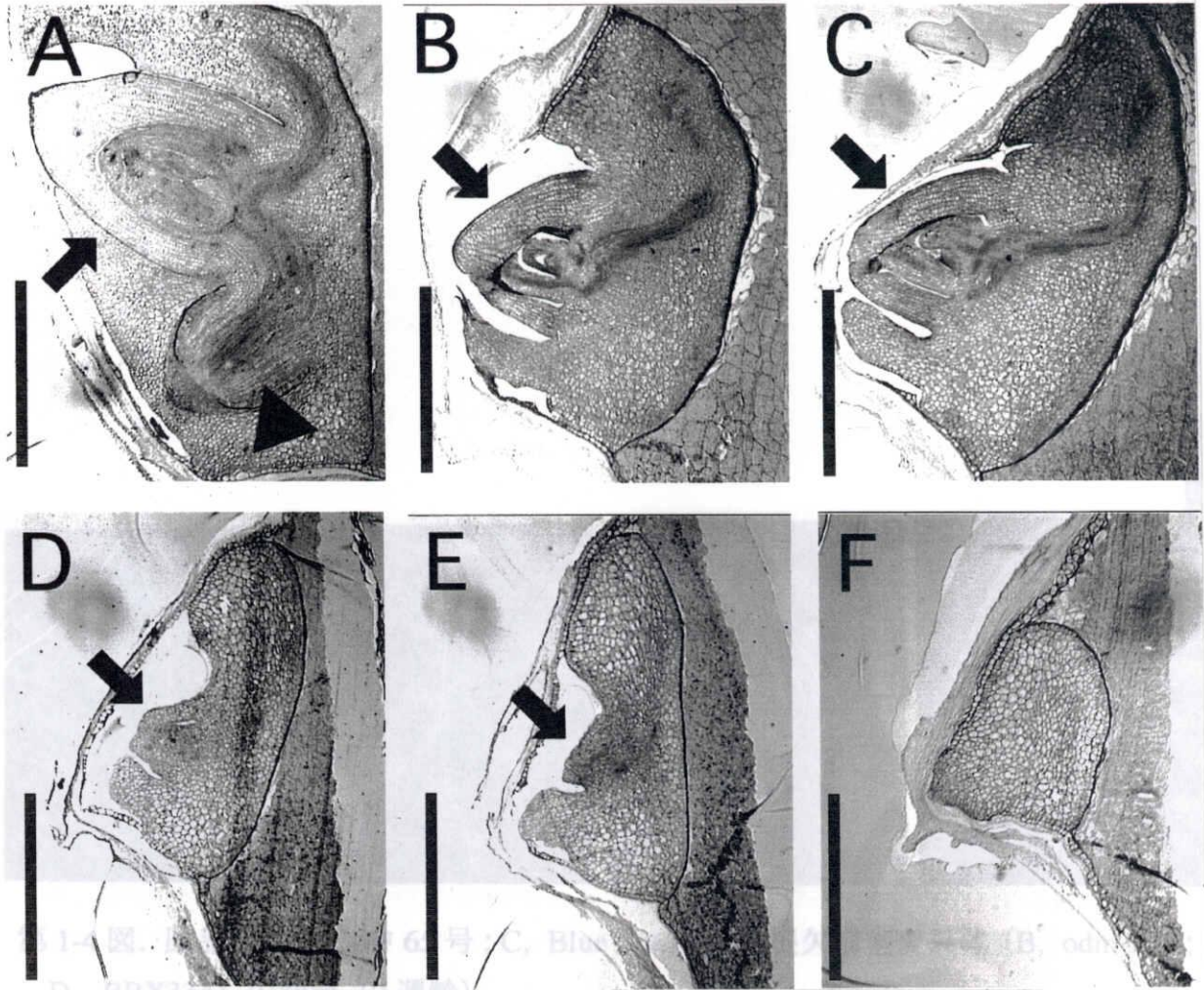


第 1-1 図. 原品種 (A, 台中 65 号), 種子根欠損型変異体 (B, HK8215), および *radicleless* 変異体 (C, odm 40 ; D, odm 115 ; E, odm 123) の幼苗 (10 日齢).

図中のスケールの長さは 2 cm.

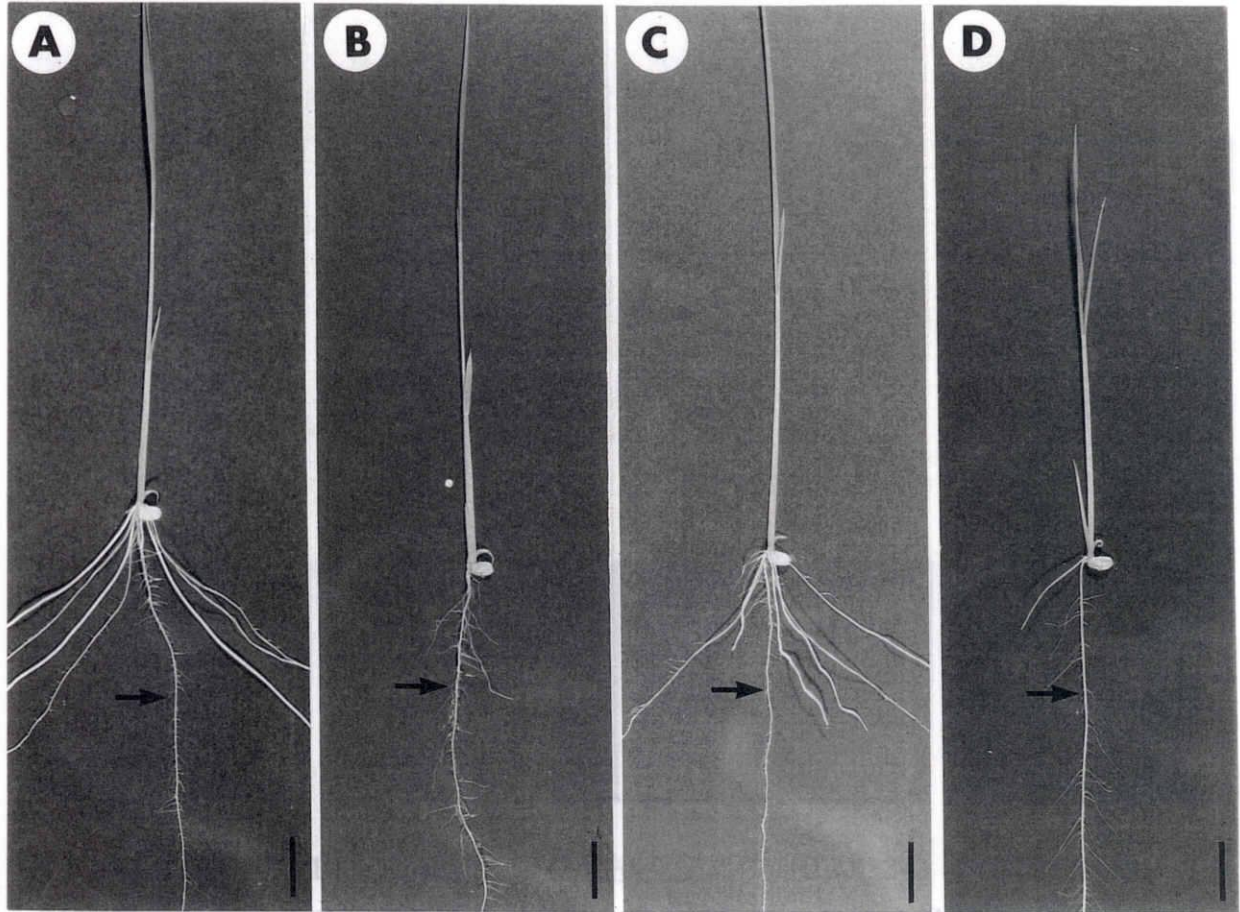


第 1-2 図. 原品種 (台中 65 号) と種子根欠損型変異体 (HK8215), *radicleless* 変異体 (odm 40), および冠根欠損型変異体 (odm 202) の成育後期に見られた植物体, および自殖稔実種子の形態的特徴. A, E; 原品種; B, F; HK8215; C, G; odm 40; D, H; odm 202.  
 図中のスケールの長さは 15 cm.

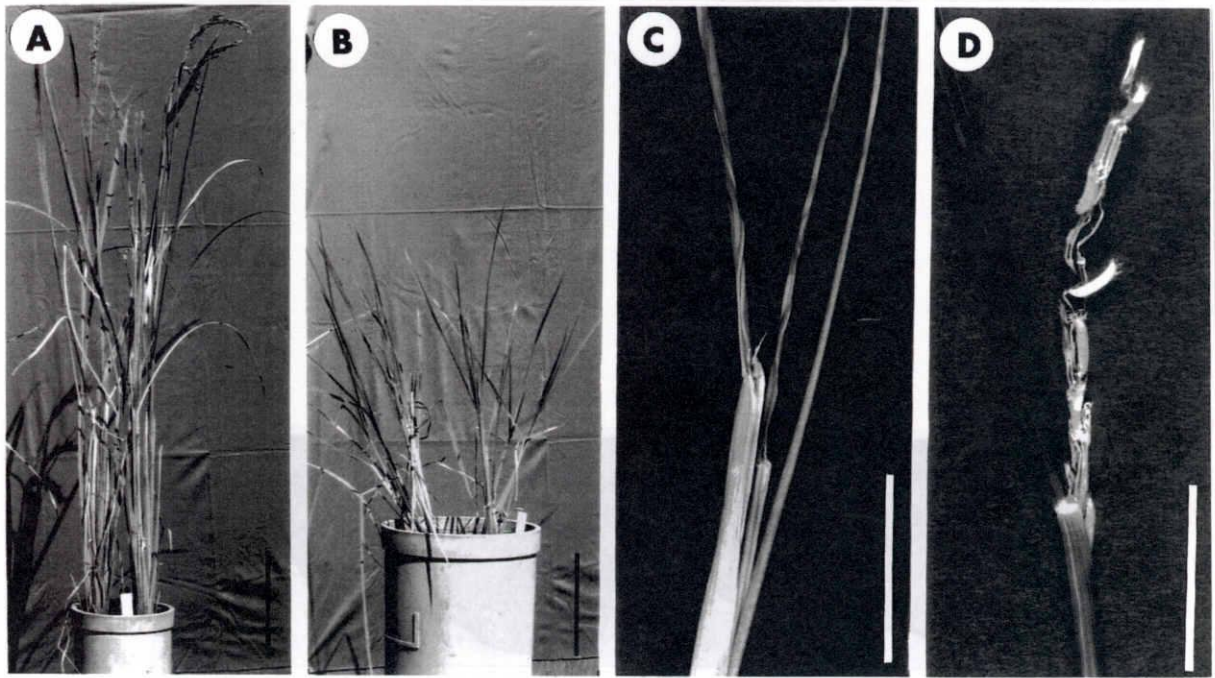


第 1-3 図. 原品種 (A, 台中 65 号), 種子根欠損型変異体 (B, HK8215), *radicleless* 変異体 (C, odm 40 ; D, odm 115 ; E, odm 123), および odm 40 と odm 115 との交雑  $F_2$  世代で見られた器官未分化型個体 (F) における胚の縦断面. 矢印は幼芽, 矢尻は幼根を示す. 図中のスケールの長さは 500  $\mu\text{m}$ .





第1-4図. 原品種 (A, 台中 65 号 ; C, Blue Rose) と冠根欠損型変異体 (B, odm 202 ; D, BRX334) の幼苗 (2 週齢). 写真は 2 cm. 図中のスケールの長さは 2 cm.



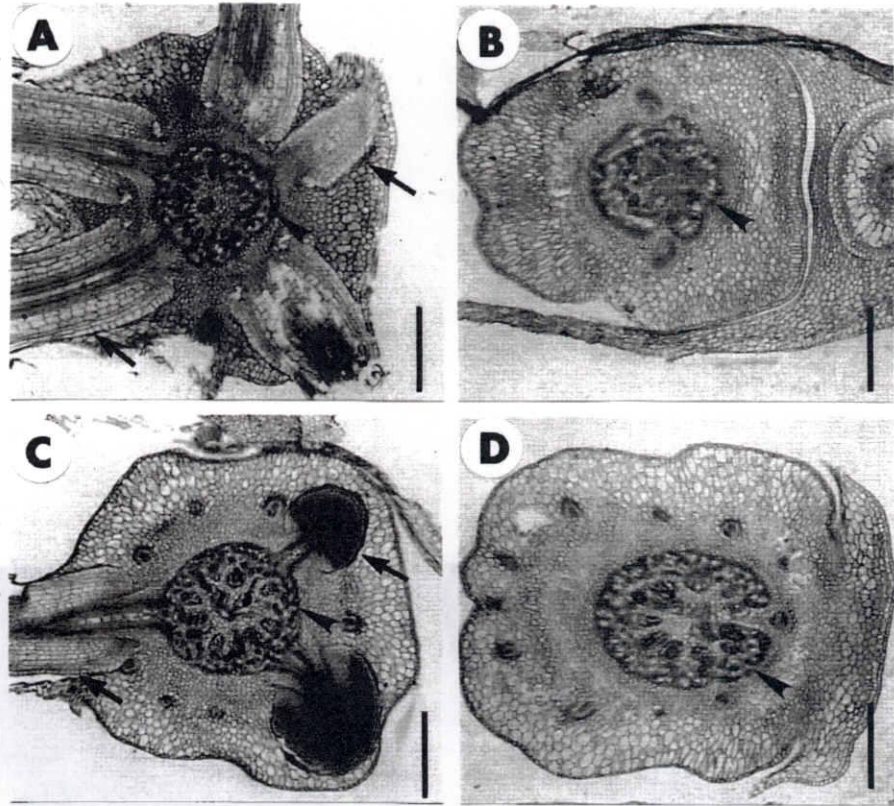
第 1-5 図. 原品種 (Blue Rose) と冠根欠損型変異体 (BRX334) の形態的特徴.

A, 原品種の成育後期における植物体 ; B, BRX334 の成育後期における植物体.

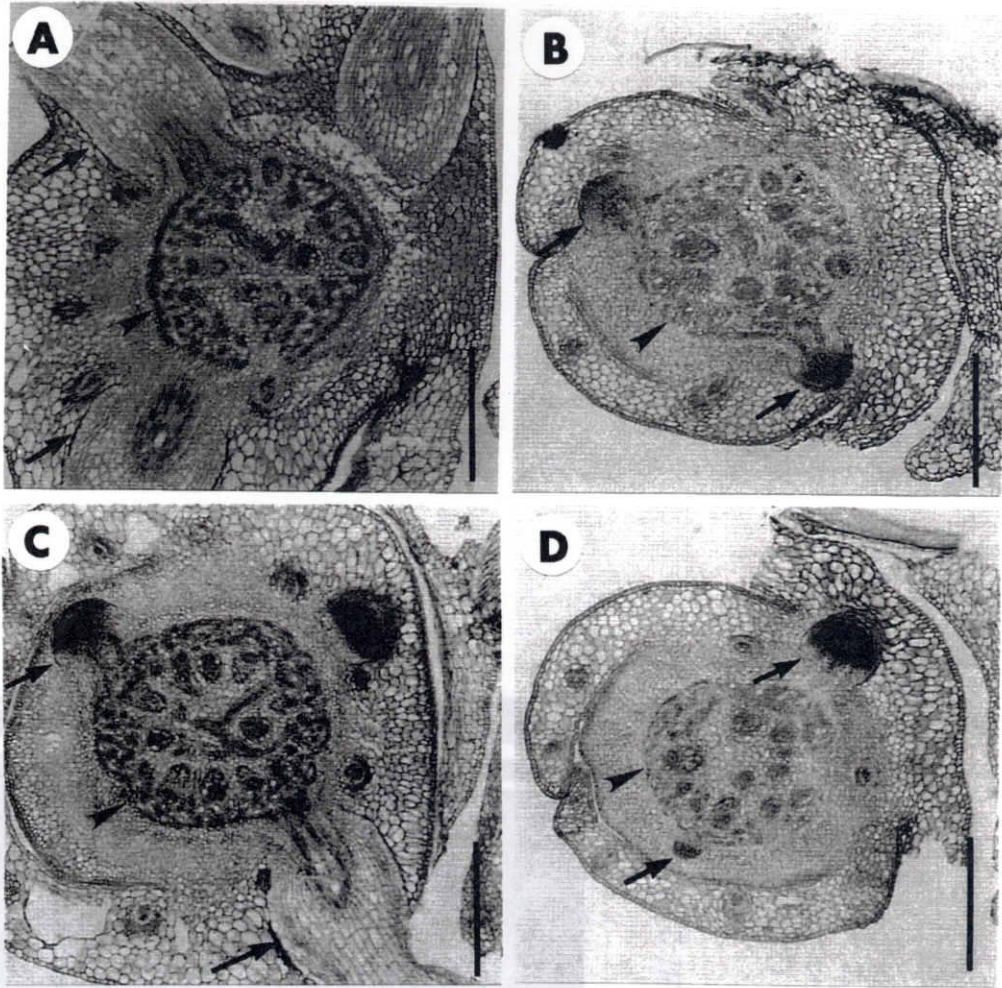
図中のスケールの長さは 15 cm. C, BRX334 の葉の拡大図 ; D, BRX334 の幼穂

の拡大図. 図中のスケールの長さは 2 cm. 図中の矢印は辺周部維管束環を示す. 図中のスケールの長さは 300  $\mu$ m.

スケールの長さは 300  $\mu$ m.

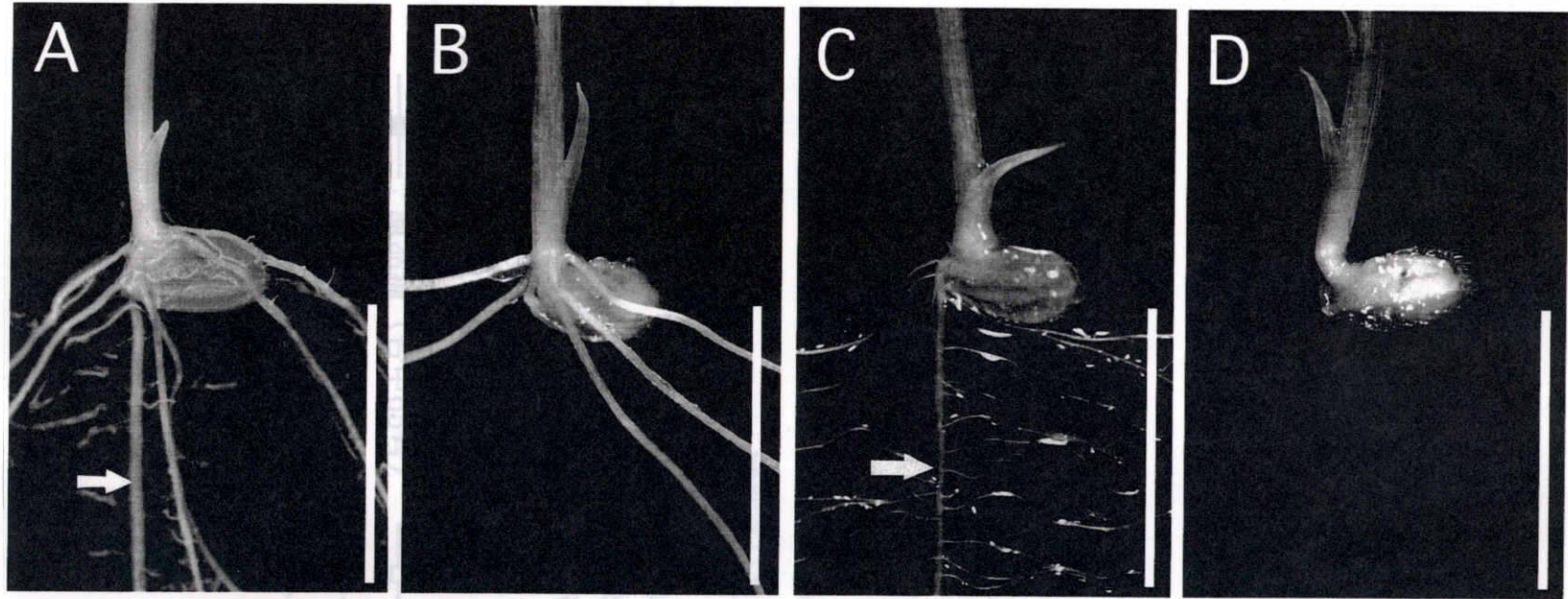


第 1-6 図. 原品種 (台中 65 号, A と C) と冠根欠損型変異体 (crl1 変異体, B と D) の 2.5 葉期における茎葉部の横断面. 変異 A および B, 鞘葉節下段; C および D, 第 1 節下段. 矢印は A および C における冠根および冠根原基, 矢尻は B および D における辺周部維管束環を示す. 図中のスケールの長さは 300  $\mu\text{m}$ .



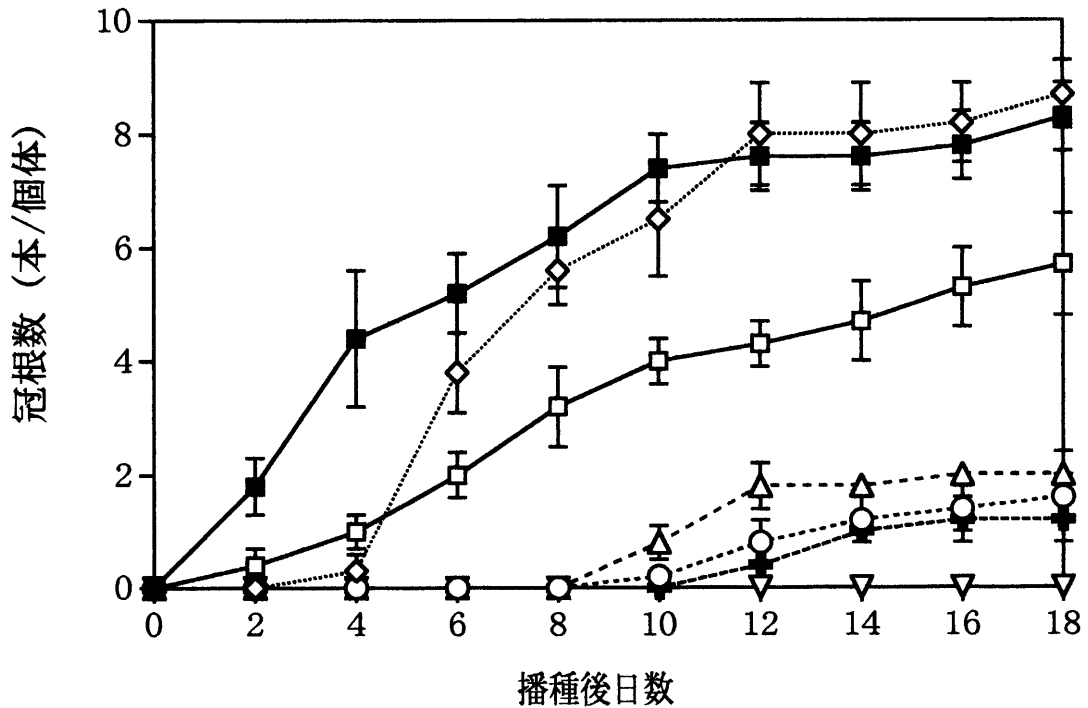
第 1-7 図. 原品種 (Blue Rose, A と C) と冠根欠損型変異体 (*crl2* 変異体, B と D) の 2.5 葉期における茎葉部の横断面.

A および B, 鞘葉節上段; C および D, 第 1 節下段. 矢印は冠根 および冠根原基, 矢尻は辺周部維管束環を示す. 図中のスケールの長さは 300  $\mu\text{m}$ .



第 1-8 図. 種子根欠損型変異体 (*rall-2* 変異体) と冠根欠損型変異体 (*crl1* 変異体) との交雑  $F_2$  世代に見られた 4 種の表現型.

A, 正常型; B, *rall-2* 変異体型; C, *crl1* 変異体型; D, *rall-2 crl1* 二重変異体型. 矢印は種子根を示す. 図中のスケールの長さは 1 cm.



第1-9図. 原品種 (台中65号, BlueRose), 種子根欠損型変異体 (*ral1-2*変異体), 冠根欠損型変異体 (*crl1*, *crl2*変異体), および各変異体間の交雑後代において分離した二重変異体型個体における冠根数の推移. 誤差線は4反復の標準誤差を示す.

- 原品種 (台中65号)
- 原品種 (Blue Rose)
- ◇— *ral1-2* 変異体
- *crl1* 変異体
- △— *crl2* 変異体
- ▽— *crl1crl2* 変異体
- ◆— *ral1-2 crl1* 変異体

第1-1表. 各変異遺伝子をヘテロ型に持つ個体を展開した自殖次世代のヘテロ型個体における表現型分離.

型	系統	表現型		$\chi^2$ (3:1)	P.
		正常個体	変異個体		
種子根欠損型	HK8215	118	32	1.08	0.25-0.50
冠根欠損型	odm 202	134	38	0.78	0.25-0.50
	BRX334	2E-270	40	0.45	0.50-0.75
短根型	BRX65	177	67	0.79	0.25-0.50
	BRX117	133	38	0.70	0.25-0.50
	BRX430	145	49	0.01	0.90-0.95
	BRX448	113	32	0.66	0.25-0.50
環境刺激誘導性 短根型	BRX180	177	67	0.19	0.50-0.75

第1-2表. 原品種 (台中65号, Blue Rose) と種子根欠損型変異体 (HK8215), *radicleless* 変異体 (odm 40, odm 115, dm 123), および冠根欠損型変異体 (odm 202, BRX334) の諸形質 (2週齢) の比較.

対象形質	台中65号	HK8215	odm 40	odm 115	odm 123	odm 202	Blue Rose	BRX334
草丈 (cm)	13.3	7.4**	7.6**	0.5**	1.6**	14.1 <sup>ns</sup>	14.1	9.2**
葉齡	3.1	3.2 <sup>ns</sup>	3.2 <sup>ns</sup>	0.6**	1.4**	3.1 <sup>ns</sup>	2.9	2.5 <sup>ns</sup>
種子根長 (cm)	18.4	-	-	-	-	19.1 <sup>ns</sup>	17.2	21.2**
種子根直径 (mm) <sup>1)</sup>	368.4	-	-	-	-	356.4 <sup>ns</sup>	364.2	599.1**
冠根数	7.3	7.0 <sup>ns</sup>	7.3 <sup>ns</sup>	0.5**	3.5**	0.5**	5.3	0.8**
側根密度 (cm <sup>-1</sup> ) <sup>2)</sup>	9.1	-	-	-	-	8.0 <sup>ns</sup>	11.1	6.3**

<sup>1)</sup> 根端から10 mm基部側の部位で測定.

<sup>2)</sup> 種子根上に形成された1次側根数/種子根長.

\*\* : 原品種との間で1%レベルで有意差有り. ns : 有意差なし.



第1-3表. 異なる濃度の $\alpha$ -NAAを含む寒天培地で育成した原品種（台中65号, Blue Rose）および冠根欠損型変異体（odm 202, BRX334）の冠根数（2週齢）の比較.

$\alpha$ -NAA 濃度 (M)	冠根数			
	台中65号	odm 202	Blue Rose	BRX334
0	7.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.5
10 <sup>-8</sup>	7.5 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	0.8 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	5.5 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>
10 <sup>-7</sup>	8.0 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	6.3 $\pm$ 0.5*	1.0 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>
10 <sup>-6</sup>	11.5 $\pm$ 0.3**	3.5 $\pm$ 0.3**	7.5 $\pm$ 0.3**	0.8 $\pm$ 0.5 <sup>ns</sup>

平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4) .

\* : 原品種との間で5%レベルで有意差有り, \*\* : 1%レベルで有意差有り, ns : 有意差なし.

第1-4表. 種子根欠損型 (HK8215) と *radicleless* 変異体 (odm 40, odm 115, odm 123) 間, および冠根欠損型変異体 (odm 202, BRX334) 間の交雑F<sub>1</sub>, およびF<sub>2</sub>世代における表現型分離.

組合せ (♀×♂)	F <sub>1</sub> 表現型		期待値	$\chi^2$	P.
	正常型	変異胚型			
HK8215×odm 40	0	15	-	-	-
組合せ (♀×♂)	F <sub>2</sub> 表現型		期待値	$\chi^2$	P.
	正常型	変異胚型			
odm 123 <sup>1)</sup> × odm 115 <sup>1)</sup>	675	210	3 : 1	0.8	0.25-0.50
odm 40 × odm 115 <sup>1)</sup>	368	287	9 : 7	0	0.95-0.975
odm 40 × odm 123 <sup>1)</sup>	174	109	9 : 7	3.2	0.05-0.10
odm 202 × BRX334 <sup>1)</sup>	正常型	冠根欠損型	9 : 7	3.7	0.05-0.10
	151	91			

<sup>1)</sup> 変異遺伝子についてホモ型個体を得られなかったため, ヘテロ株を交雑母体としてF<sub>1</sub>種子を得た.

第1-5表. *radicleless* 変異体 (*ral1-1*, *ral1-2*, *ral2-1* 変異体), および冠根欠損型変異体 (*crl1*, *crl2* 変異体) 間のF<sub>3</sub>世代における表現型分離.

組合せ	F <sub>2</sub> 表現型	二重変異体型	$\chi^2$ (3 : 1)	P.
<i>ral1-1</i> × <i>ral2-1</i>	207 <sup>1)</sup>	49	1.15	0.25-0.50
<i>crl1</i> × <i>ral1-2</i>	164 <sup>2)</sup>	40	3.16	0.05-0.10
<i>crl1</i> × <i>crl2</i>	193 <sup>2)</sup>	56	0.84	0.25-0.50

<sup>1)</sup> *ral1-1* × *ral2-1* では, F<sub>2</sub>世代で出現した*ral1-1* 変異体型個体に由来する自殖F<sub>3</sub>世代における表現型の分離を調査したため, F<sub>2</sub>表現型として*ral1-1* 変異体型個体を数えた.

<sup>2)</sup> *crl1* × *ral1-2* および*crl1* × *crl2* では, F<sub>2</sub>世代で出現した*crl1* 変異体型個体にそれぞれ由来する自殖F<sub>3</sub>世代における表現型の分離を調査したため, F<sub>2</sub>表現型として*crl1* 変異体型個体を数えた.

## 第2章 種子根の伸長を制御する遺伝子座の機能

### 緒言

根系を構成する異なる種類の根の、数、長さ、太さなどで表される発達程度と、それらの土壌空間中における配置によって規定される根系構造は、根系全体の機能発現において決定的な役割を果たしている (Lynch 1995, Yamauchi et al. 1996). この構造を規定する要素の内、根の長さは最も重要なものの一つであり、そのため土壌資源獲得に関わる要素としてしばしば測定されている (Evance and Barber 1964, Taylor 1982, Teo et al. 1995, Kashiwagi et al. 2000). さらに、根系構造とそのダイナミクスは、種々のストレスにさらされた作物にとって極めて重要であり (Yamauchi et al. 1996, Azhiri-Sigari et al. 2000, Kamoshita et al. 2000), 例えば、土壌深層への根の到達は多くの植物において乾燥ストレス耐性と密接な関係にあることが知られている (Sullivan and Ross 1979, Narayan 1991, Fukai 1995, Nemoto et al. 1998, Oyanagi 1998).

近年、この伸長の遺伝制御の実体を明らかにするため、発芽後の幼根における根端での細胞分裂の再開 (Cheng et al. 1995, Vernoux et al. 2000), 根端分裂組織の維持 (Benfey et al. 1993), 細胞伸長の方向や程度 (Baskin et al. 1992, Benfey et al. 1993, Hauser et al. 1995, Baskin et al. 1995, Takahashi et al. 1995) に関わる突然変異体が、シロイヌナズナを中心に数多く同定されている。加えて、根端分裂組織や成熟域における細胞長が原品種に比べ著しく減少する突然変異体がイネにおいても得られている (Kitano and Futsuhara 1989, Liang and Ichii 1996, Ichii and Ishikawa 1997).

しかし、これら全ての変異は根長の減少を引き起こすため、これらの変異体を用いた解析からは、伸長を促進する機能を持つ遺伝子座を同定できるのみであり、逆にどのような遺伝子座が根の伸長を制限しているか、またそのような遺伝子座は根の伸長を促進させる遺伝子座とどのような相互作用性を示すのかという問題が残されたままである。これに関して、前章で解析した *crl2* 変異体は、冠根数が著しく減少するのに加え、種子

根長が有意に増加するという性質を伴っていた。加えて、前章で示した突然変異体の作出・選抜時には、根の長さの減少を示す変異体が存在しており、これらの長根化、あるいは短根化する変異体はこのような問題を解析する上で、極めて有用な研究素材であると考えられる。

そこで本章では、まずこれらの変異体の幼苗期にみられる形態、および組織学的特徴を調べ、次に  $F_3$  世代で分離した二重変異体型個体の特徴を解析することにより、それらの遺伝子間の相互作用性について検討した。

## 材料と方法

### 1. 根の伸長に関わる突然変異体の遺伝解析

新たに得られた4つの短根型変異体 (BRX65, BRX117, BRX430, および BRX448) と *crl2* 変異体を材料に用いた。これらの変異体間, および *crl2* 変異体との間で交雑実験を行った。 *crl2* 変異体は, 変異遺伝子についてホモ型個体を得られなかったため, ヘテロ株を交雑母体として  $F_1$  種子を得た。  $F_1$ ,  $F_2$ , および  $F_3$  種子をベンレート-T 200 倍溶液に 24 時間浸漬した後に, さらに水道水中に 24 時間浸漬し, 催芽させた。これらの種子を人工気象室 (12 時間日長, 気温 30°C) 内で栄養源を含まない 0.8%の寒天培地で育成させ, 播種後 15 日目に表現型を調査した。

### 2. 突然変異体の特徴

上記の変異体 5 系統とその原品種 Blue Rose の種子を各 4 粒ずつ上記と同様の方法で殺菌, および催芽させた後, 人工気象室 (12 時間日長, 気温 30°C) 内において栄養源を含まない 0.8%の寒天培地で育成させ, 播種 15 日後に草丈, 葉齢, 種子根長, 種子根直径, 冠根数, および側根数を測定した。また, それぞれの対立性遺伝子のグループから BRX65, BRX117, および *crl2* 変異体を選択し, それらについては上記と同様の育成条件下で 3 週間育成し, 24 時間毎に種子根長を測定した。

次に, これらの変異体の短根化, および長根化の原因について明らかにするために, 樹脂包埋法により 9 日齢の幼苗の種子根根端部位の縦断切片を作成し, 表皮から第 3 列目の皮層細胞長を光学顕微鏡下で計測した。

さらに, これらの変異体間の交雑  $F_3$  世代で分離した各二重変異体型個体を上記と同様の方法で 15 日間育成し, 草丈, および種子根長を測定した。また, 皮層細胞長についても上記と同様に測定した。

### 3. セルフラックスの計算

BRX65, BRX117, *cri2* 変異体, およびこれらの変異体間の交雑 F<sub>3</sub> 世代で分離した各二重変異体型個体と原品種 Blue Rose について, 以下のようにセルフラックスを測定した. セルフラックスは, 単位時間あたりに一層の細胞層で増加した総細胞数として定義される (Silk *et al.* 1989, Thomson and Atwell 1989, Fraser *et al.* 1990). 細胞の増殖率が時間に関わらず一定であると仮定すると, セルフラックスは細胞層のどの部位においても一定の値を取るようになる. そこで, ここではセルフラックスを伸長域から成熟域へ移行した総細胞数として捉え, 以下の式により計算して求めた (Silk *et al.* 1989).

$$\text{セルフラックス} = \text{根の伸長率} / \text{成熟域における細胞長}$$

## 結果

### 1. 変異遺伝子間の対立性検定

BRX117, BRX430, および BRX448 間の  $F_1$  世代では, いずれの交雑組み合わせからも正常個体は 1 個体も出現せず, 全て短根型を示し, 逆にこれらの変異体と BRX65 間の  $F_1$  世代は, 全て正常個体であった (第 2-1 表). したがって, BRX117, BRX430, および BRX448 の各変異遺伝子是对立関係にあり, またこれらの変異遺伝子と BRX65 の変異遺伝子は非対立関係にあることが判明した. BRX65 の変異遺伝子の遺伝子座を *REDUCED ROOT LENGTH1 (RRL1)*, また BRX117, BRX430, および BRX448 のそれを *RRL2* とし, 各対立遺伝子を *rrl2-1* (BRX117), *rrl2-2* (BRX430), および *rrl2-3* (BRX448) と命名した.

### 2. 形態的特徴の解析

*rrl* 変異体では, 原品種に比べ著しく種子根の伸長が抑制されていたが, その傾向は *rrl1* 変異体で特に大きかった (第 2-1 図, 第 2-2 表). また, 種子根直径は *rrl2-1*, *rrl2-2*, および *rrl2-3* 変異体で有意に小さく, これらでは側根密度も低かった (第 2-2 表). これに対して, 側根密度, 草丈および葉齢は *rrl1* 変異体のみで有意に低かった (第 2-2 表). このように, 各変異遺伝子対立関係にある *rrl2-1*, *rrl2-2*, および *rrl2-3* 変異体では, 形態的特徴が非常に類似していたため, 以後の実験では *rrl2-1* 変異体を用いて *RRL2* 遺伝子座の機能を解析した. 一方, *rrl2* 変異体の種子根長は, 原品種に比べ有意に大きかった (第 2-1 図, 第 2-2 表).

次に, 播種後 21 日間にわたり, 種子根長の推移を調査した結果, *rrl1* 変異体の種子根長は, 成育期間を通じて常に原品種より小さく, 播種 12 日後前後で既にその伸長が停止した (第 2-2 図). 一方, *rrl2-1* 変異体の種子根は, 原品種に比べ播種後 6 日目から伸長率が低下したが, 播種 5 日後までは原品種とほぼ同様に伸長可能であった (第 2-2 図).



これとは対照的に、*crl2* 変異体の種子根は、原品種に比べ播種後 3 日目までは短かったが、その 5 日後にはその傾向は逆になり、その後は常に *crl2* 変異体の種子根長が原品種に比べ大きく推移していた (第 2-2 図)。

### 3. 種子根の組織学的観察

*rrl1*, *rrl2-1* および *crl2* 変異体とその原品種では、いずれも播種後 3 日目から 6 日目までは種子根長が直線的に増加し、またこの期間はこれらの変異体、および原品種における根の伸長特性が反映されていたため (第 2-2 図)、種子根の伸長率を播種 3 日後、および 6 日後の種子根長の差により求め、セルフラックスを計算した。

原品種に比べ、*rrl1* 変異体の成熟域における皮層細胞長は小さく、また根端での細胞伸長が始まる部位は、より基部側へ移行していた (第 2-3B, 4A 図, 第 2-3 表)。一方、セルフラックスには、両者の間に有意差は認められなかった (第 2-3 表)。これらの結果から、本変異体における短根性は、根軸方向への細胞伸長の開始が遅延することと、細胞伸長の程度が減少するためであることが判明した。同様に、*rrl2-1* 変異体における成熟域での皮層細胞長は、原品種に比べ有意に小さかったが、その抑制率は *rrl1* 変異体より小さかった (第 2-4A 図, 第 2-3 表)。また、*rrl2-1* 変異体では、原品種に比べ、より成長点側の細胞で既に根軸方向への細胞伸長が開始し、根端分裂組織のサイズが減少する傾向が認められた (第 2-3C, D, 4A 図)。また本変異体では、原品種に比べセルフラックスも有意に低かった (第 2-3 表)。したがって、*rrl2-1* 変異体の短根性は、軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の低下の 2 つの原因によるものと判断した。

*crl2* 変異体の根端分裂組織のサイズ、セルフラックス、および成熟域における皮層細胞長は、いずれも原品種に比べ明らかに大きかった (第 2-3E, F, 4A 図, 第 2-3 表)。これらの結果から、本変異体の長根化は、軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の増加の両者により誘起されることを認めた。

#### 4. 二重変異体の特徴の解析

*rrl1* と *rrl2-1* および *crl2* 変異体間の各交雑  $F_2$  世代では、正常型、および各交雑親と同様の特徴を示す変異体型の他に、これらとは形態的特徴が異なる個体が分離した (第 2-1E, F, G 図). 次に、各交雑組合せの  $F_2$  世代で分離したいずれかの交雑親型個体を展開した自殖次世代において表現型の分離を調査した結果、いずれの組合せにおいても交雑親型と交雑親とは異なる変異型個体が 3 : 1 の割合で分離したため、後者を二重変異体個体と判定した (第 2-4 表).

これらの各二重変異型個体は、以下のようにそれぞれの交雑親である変異体の形態的特徴においていくつかの類似点、および相違点が観察された. これらの二重変異体における種子根長は、いずれも播種後 3 日目から 6 日目までは直線的に増加したため (第 2-2 図), 種子根の伸長率を播種後 3 日目, および 6 日目の種子根長の差により求め、セルフフラックスを計算した.

*rrl1 rrl2-1* 変異体: 種子根長は、両交雑親に比べさらに小さかった (第 2-1E, 5B 図). また、成熟域における皮層細胞長は両交雑親の細胞長の間中に位置していた (第 2-3G, 4B 図, 第 2-3 表). 一方、根端分裂組織のサイズやセルフフラックスは *rrl2-1* 変異体のそれらと同程度であり (第 2-4B, 第 2-3 表), 草丈は *rrl1* 変異体と同様であった (第 2-5A 図).

*rrl1crl2* 変異体: 種子根長, および成熟域における皮層細胞長は、両交雑親のそれらの値の間中に位置していた (第 2-1F, 3H, 4C, 5B 図). 草丈は両交雑親に比べ小さかった (第 2-5A 図). 一方、セルフフラックスは *crl2* 変異体と同様の値を示した (第 2-3 表).

*rrl2-1 crl2* 変異体: 種子根長, 根端分裂組織のサイズ, セルフフラックス, および成熟域における皮層細胞長は、いずれも両交雑親のそれらの値の間中に位置していた (第 2-1G, 3I, 4D, 5B 図, 第 2-3 表). 一方、草丈は *crl2* 変異体と同様であった (第 2-5A 図).

## 考察

これまでの研究において、いくつかの短根性を示す変異体がイネにおいて得られているが (Kitano and Futsuhara 1989, Liang and Ichii 1996, Ichii and Ishikawa 1997), 長根化する変異体は得られておらず, そのためどのような遺伝子座が根の伸長を制限しているか, またそのような遺伝子座は根の伸長を促進させる遺伝子座とどのような相互作用性を示すのかという問題が残されたままであった. 本章では, 長根化, および短根化する両タイプの変異体, およびそれらの二重変異体の特徴を調査することにより, 根の伸長に関わる遺伝子座の機能, およびそれらの相互作用性について解析した.

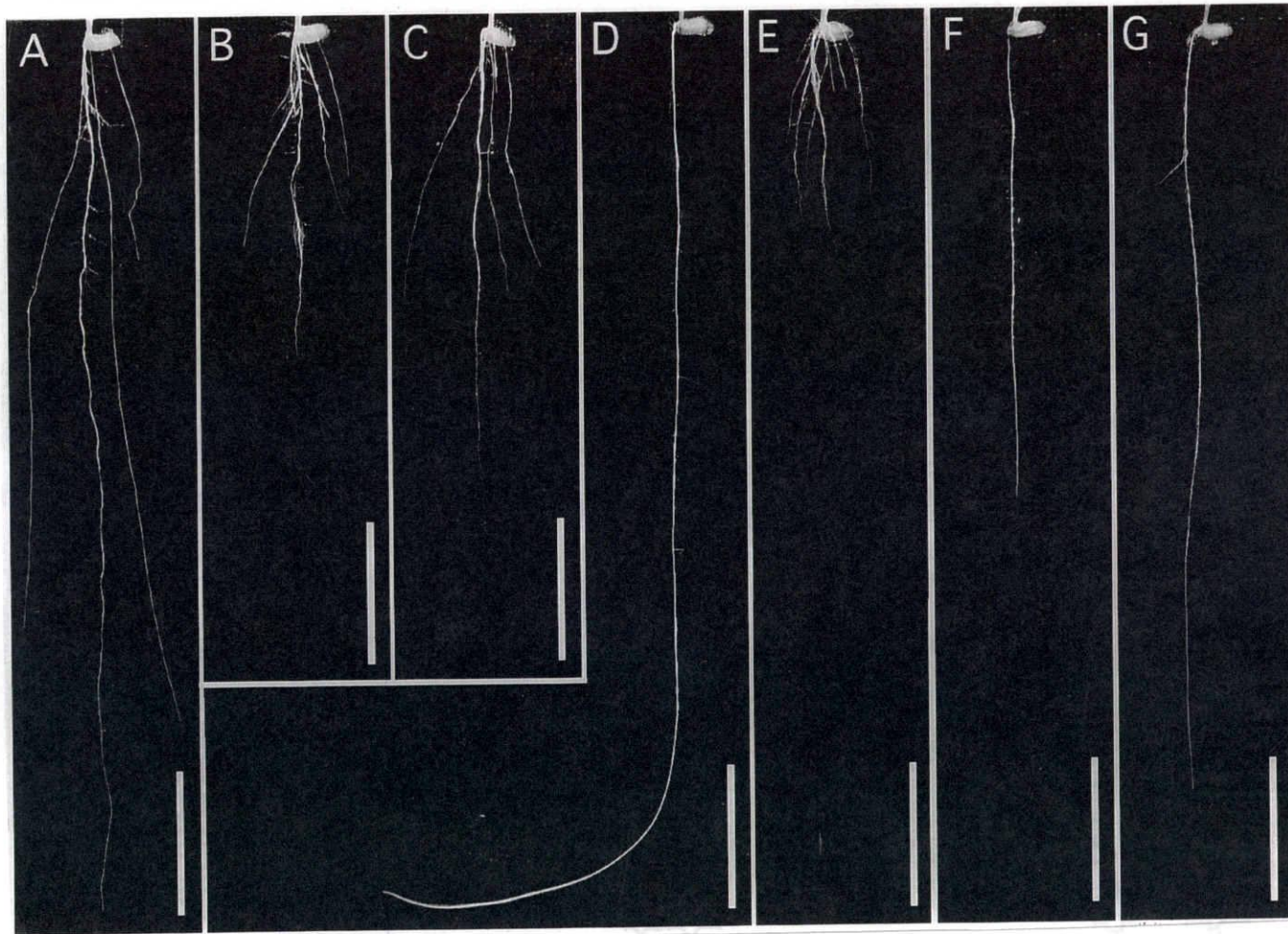
*rrl1* 変異体における短根性は, 根軸方向への細胞伸長の開始が遅延することと, 細胞伸長の程度が減少するためであったため, *RRL1* は細胞伸長の開始, およびその伸長程度の両者に関わる遺伝子座であると考えられた. 一方, *rrl2-1* 変異体の短根性は, 軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の低下の 2 つの原因によるものであったため, *RRL2-1* は軸方向への細胞増殖率, および伸長過程に対して促進的に作用する遺伝子座であると推定された. 軸方向への細胞増殖率は, 分裂細胞の数と細胞分裂速度の 2 つの要素によって規定される (Beemster and Baskin 1998). これまでに, イネでは根端分裂組織のサイズ, および成熟域における細胞長が減少し短根化する変異体が 2 系統 (*rt*, および *srt-1*) 得られているが, これらの両変異体は, 発芽後すぐに各原品種よりも明らかに低い種子根伸長率を示した (Kitano and Futsuhara 1989, Ichii and Ishikawa 1997). 一方, これらとは異なり, *rrl2-1* 変異体の種子根は, 播種後 5 日目までは原品種とほぼ同様に伸長可能であった. もし, 本変異体の軸方向への細胞増殖率の低下が, 分裂域に存在する細胞が伸長への移行を促進され, その結果として分裂能力をもつ細胞数が減少したためであると仮定すると, 軸方向への細胞増殖率の低下が誘起されたとしても, 発芽直後の種子根伸長率の維持は可能となる. したがって, 少なくとも *RRL2* の機能の一つは, 分裂域に存在する細胞の伸長への移行の抑制に関わるものではないかと考えられる.

この仮定は *rrl1 rrl2-1* 二重変異体の特徴からも支持される。*rrl1* 変異体の成熟域における細胞長は、*rrl2-1* 変異体より小さいため、*rrl1 rrl2-1* 二重変異体の細胞長は *rrl1* 変異体と同様か、あるいは両交雑親よりもさらに減少することが想定される。しかし、実際の *rrl1 rrl2-1* 二重変異体の細胞長は両交雑親の中間の値を示した。根端分裂域における細胞分裂速度と細胞伸長の開始の2つの過程は、互いに独立に制御されているため (Ivanov 1981), *RRL2* が細胞分裂速度のみに関わる遺伝子座であるとする、この結果の説明は極めて困難である。上述したように、*RRL1* は細胞伸長の開始、およびその伸長程度の両者に関わる遺伝子座であると考えられるため、*RRL2* は分裂域に存在する細胞の伸長への移行に関わると仮定すれば、本変異体が両交雑親の細胞長の中間の値をとったことは、細胞伸長への移行に対して両変異遺伝子が逆向きの作用を示した結果であると解釈される。

一方、*crl2* 変異体の長根化は、軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の増加の両者により誘起された。本変異体の種子根長は、播種後 5 日目以降は原品種に比べ大きく推移していたが、播種後 3 日目までは逆に小さかった。したがって、*RRL2* と対照的に、*CRL2* は分裂域に存在する細胞の伸長への移行の促進に関わる遺伝子座であると想定される。*crl2* 変異体の根端分裂組織のサイズは、原品種に比べ明らかに増加した。このような変異体はこれまでに報告されていないが、茎頂分裂組織のサイズが増加する変異体として、シロイヌナズナの *clavata1* (*clv1*)、および *clv3* 変異体が同定されている (Clark et al. 1993, 1995)。これらの変異体と茎頂分裂組織の維持に欠陥を示すシロイヌナズナの *shoot apical meristemless1* (*stm-1*)、および *stm-2* 変異体 (Barton and Poething 1993, Clark et al. 1996) との二重変異体では、茎頂分裂組織の維持が可能であったため、*STM* と *CLV* は分裂組織の活性に競合的に作用し、その恒常性はこれらの遺伝子座における作用力のバランスの上に成り立っていると考えられている (Clark et al. 1996)。これに関して、*rrl2-1 crl2* 二重変異体の根端分裂組織のサイズ、およびセルフラックスは両交雑親である変異体の中間に位置し、より正常個体の値に近づいていた。これらの結果から、*RRL2*、および *CRL2* は根端分裂組織の恒常性に対してお互いに

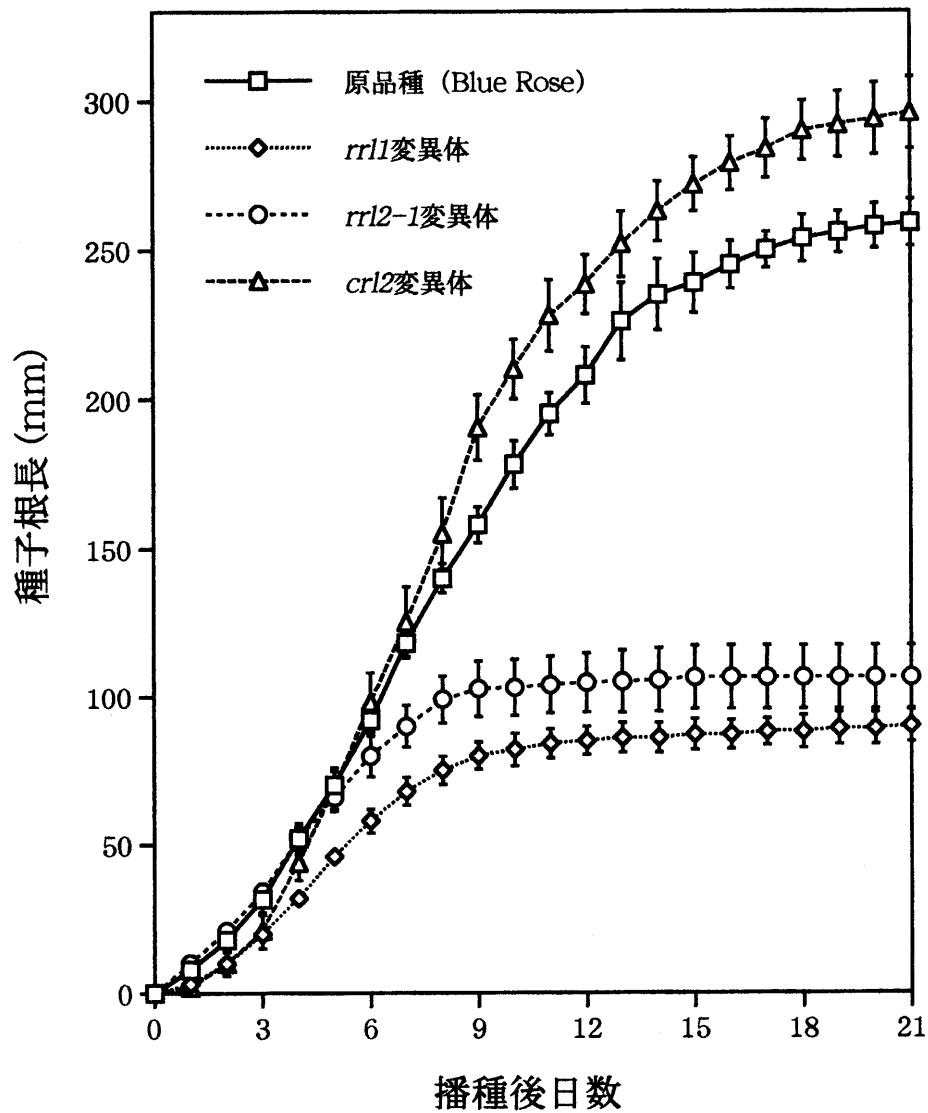
競合的に作用する可能性が高く、また茎頂、および根端分裂組織では、その維持に関して同様の機構が存在することが示唆された。

これまで、根の伸長過程の遺伝的制御機構に関しては、特に伸長を抑制する遺伝子座についての知見が得られていなかったが、本章では根端分裂組織の維持や細胞伸長程度に関して競合的に作用する遺伝子座が存在することを明らかにした。根系形質に着目した品種育成を目指す上では、個々の根の発育の制御機構を遺伝学的側面から明らかにする必要がある。本章で用いた突然変異体、およびそれらの二重変異体についてさらに詳細に表現型の特徴やホルモンに対する反応性等を解析することによって、根の伸長過程を制御する個々の遺伝子座機能に迫ることができると期待される。



第2-1 図. 原品種 (A, Blue Rose), 短根型変異体 (B, *rrl1* 変異体 ; C, *rrl2-1* 変異体), 冠根欠損型変異体 (D, *crl2* 変異体), および各変異体間の交雑  $F_3$  世代で見られた二重変異体 (E, *rrl1 rrl2-1* 変異体 ; F, *rrl1 crl2* 変異体 ; G, *rrl2-1 crl2* 変異体) における 15 日齢の幼苗.

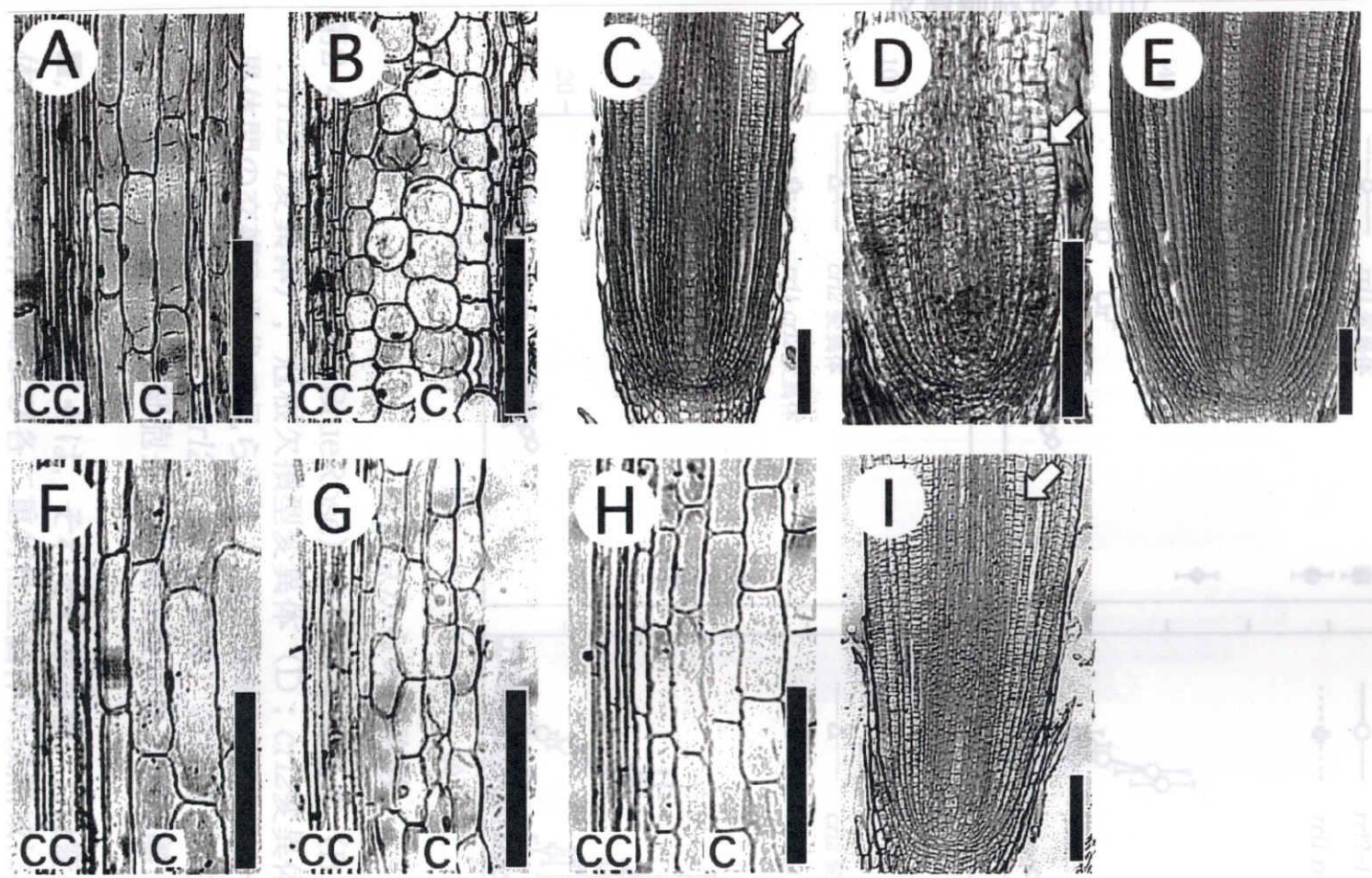
図中のスケールの長さは 4 cm.



第2-2図. 原品種 (BlueRose) , 短根型変異体 (*rrl1*変異体, *rrl2-1*変異体) , 冠根欠損型変異体 (*crl2*変異体) の種子根長の推移.

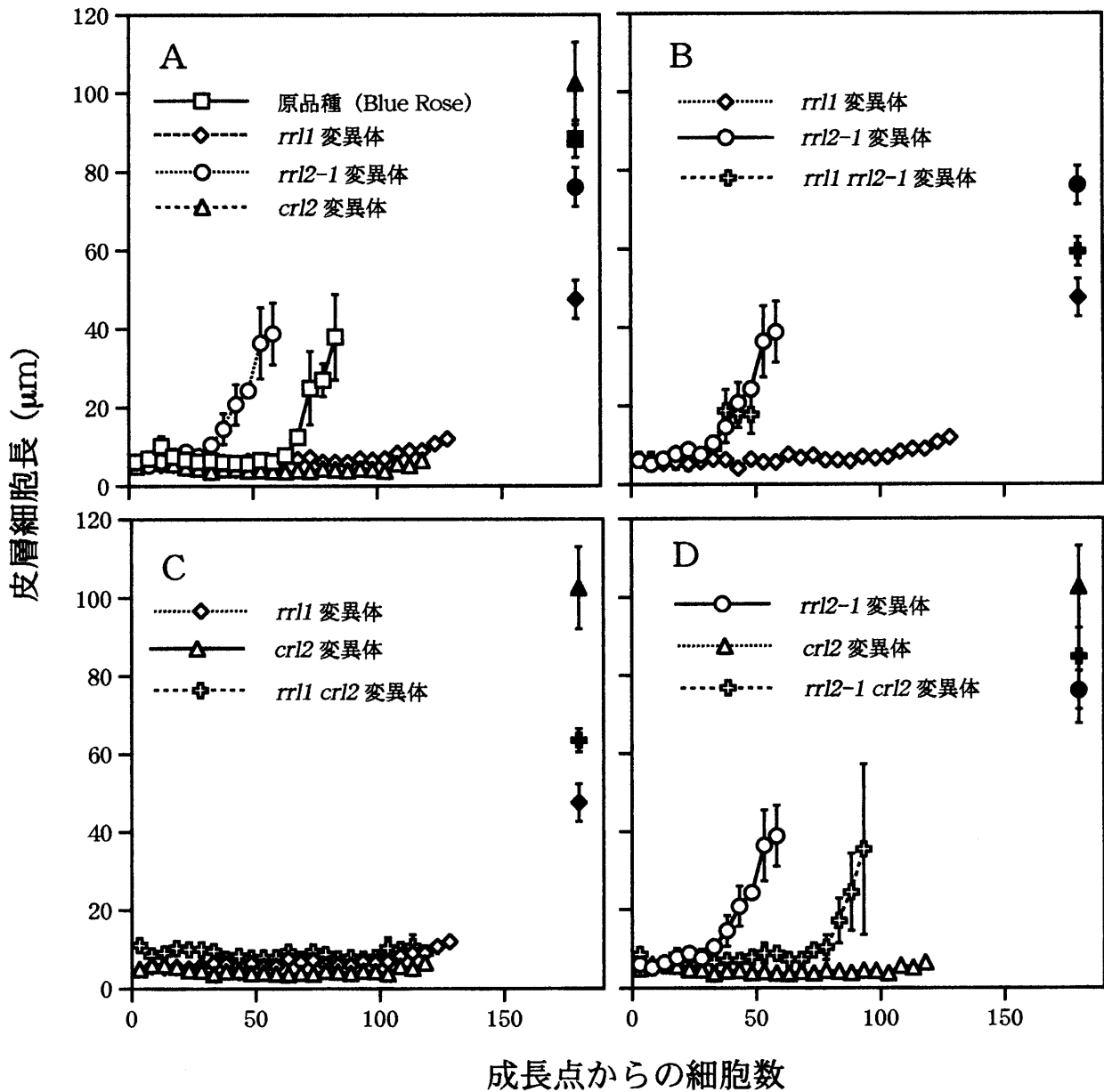
誤差線は6反復の標準誤差を示す.

長を示す。副根類は4反復の標準偏差を示す。



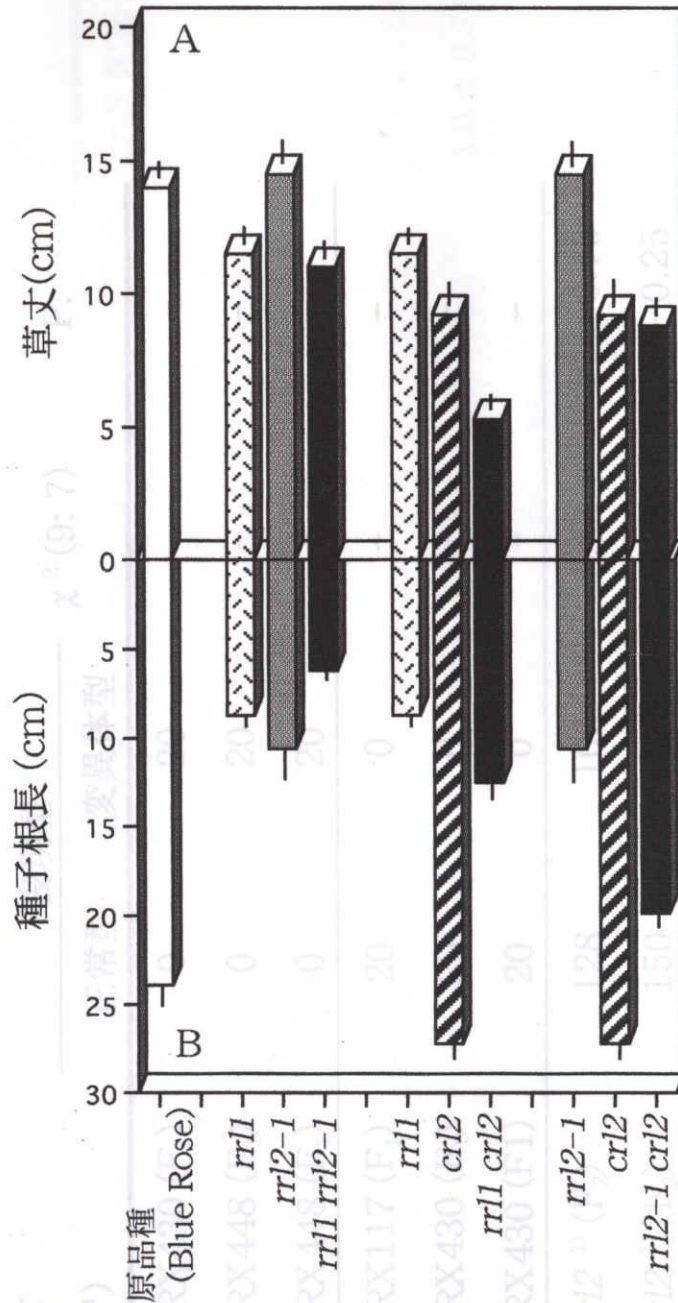
第2-3 図. 原品種 (A および C, Blue Rose), 短根型変異体 (B, *rrl1* 変異体 ; D, *rrl2-1* 変異体), 冠根欠損型変異体 (E および F, *crl2* 変異体), および各変異体間の交雑  $F_3$  世代で見られた二重変異体 (G, *rrl1 rrl2-1* 変異体 ; H, *rrl1 crl2* 変異体 ; I, *rrl2-1 crl2* 変異体) の種子根における縦断面。  
A, B, F, G および H : 原品種および各変異体の根端成長点から約 8 mm 基部よりの成熟域。C, D, E および I : 原品種および各変異体の根端部位。矢印は既に軸方向への伸長を開始した細胞を示す。図中のスケールの長さは 100  $\mu\text{m}$ 。





第2-4図. 原品種 (A: BlueRose), 短根型変異体 (B: *rrl1*変異体, C: *rrl2-1*変異体), 冠根欠損型変異体 (D: *crl2*変異体), および各変異体間の交雑F<sub>3</sub>世代で見られた二重変異体 (E: *rrl1rrl2-1*変異体, F: *rrl1crl2*変異体, G: *rrl2-1crl2*変異体) の幼苗 (9日齢) における表皮から3層目の皮層細胞長の根端成長点からの距離 (細胞数) に伴う推移.

■, ◆, ●, ▲および+は, それぞれ原品種, *rrl1*変異体, *rrl2-1*変異体, *crl2*変異体, および各二重劣性型個体の成熟域における皮層細胞長を示す. 誤差線は4反復の標準誤差を示す.



第2-5図. 原品種 (BlueRose), 短根型変異体 (*rrl1*変異体, *rrl2-1*変異体), 冠根欠損型変異体 (*crl2*変異体), および各変異体間の交雑F<sub>3</sub>世代で見られた二重変異体 (*rrl1rrl2-1*変異体, *rrl1crl2*変異体, *rrl2-1crl2*変異体) の幼苗 (15日齢) における草丈 (A) および種子根長 (B). 誤差線は4反復の標準誤差を示す.

第2-1表. 短根型変異体 (BRX65, BRX117, BRX430, BRX448) および冠根欠損型変異体 (BRX334) 間の交雑F<sub>1</sub>, あるいはF<sub>2</sub>世代における表現型分離.

組合せ (♀ × ♂)	表現型		$\chi^2$ (9: 7)	P.
	正常型	変異体型		
BRX117 × BRX430 (F <sub>1</sub> )	0	20	-	-
BRX117 × BRX448 (F <sub>1</sub> )	0	20	-	-
BRX430 × BRX448 (F <sub>1</sub> )	0	20	-	-
BRX65 × BRX117 (F <sub>1</sub> )	20	0	-	-
BRX65 × BRX430 (F <sub>1</sub> )	20	0	-	-
BRX65 × BRX430 (F <sub>1</sub> )	20	0	-	-
BRX65 × <i>crl2</i> <sup>1)</sup> (F <sub>2</sub> )	128	106	0.23	0.50-0.75
BRX117 × <i>crl2</i> <sup>1)</sup> (F <sub>2</sub> )	150	98	1.81	0.10-0.25
BRX430 × <i>crl2</i> <sup>1)</sup> (F <sub>2</sub> )	145	95	1.69	0.10-0.25
BRX448 × <i>crl2</i> <sup>1)</sup> (F <sub>2</sub> )	132	110	0.29	0.50-0.75

<sup>1)</sup>: 変異遺伝子についてホモ型個体を得られなかったため, ヘテロ株を交雑母体としてF<sub>1</sub>種子を得た.

第2-2表. 原品種 (Blue Rose) と短根型変異体 (*rrl1*, *rrl2-1*, *rrl2-2*, *rrl2-3*変異体) および冠根欠損型変異体 (*crl2* 変異体) の諸形質 (15日齢) の比較.

対象形質	Blue Rose	<i>rrl1</i> 変異体	<i>rrl2-1</i> 変異体	<i>rrl2-2</i> 変異体	<i>rrl2-3</i> 変異体	<i>crl2</i> 変異体
草丈 (cm)	14.0 ± 0.4	11.5 ± 0.2**	14.5 ± 0.6 <sup>ns</sup>	13.9 ± 0.6 <sup>ns</sup>	13.2 ± 0.8 <sup>ns</sup>	9.2 ± 1.0**
葉齡	3.0 ± 0.2	3.5 ± 0.2**	3.2 ± 0.3 <sup>ns</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>ns</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>ns</sup>	2.5 ± 0.4*
種子根長 (cm)	23.9 ± 1.0	8.7 ± 0.5**	10.6 ± 1.1**	10.7 ± 0.9**	11.1 ± 0.9**	27.2 ± 0.9**
種子根直径 (mm) <sup>1)</sup>	358.8 ± 10.2	373.3 ± 12.1 <sup>ns</sup>	243.5 ± 12.1**	236.8 ± 14.5**	240.4 ± 10.3**	603.2 ± 16.0**
冠根数	5.8 ± 0.6	6.0 ± 0.3 <sup>ns</sup>	6.3 ± 0.5 <sup>ns</sup>	6.5 ± 0.4 <sup>ns</sup>	6.5 ± 0.4 <sup>ns</sup>	1.0 ± 0.5**
側根密度 (cm <sup>-1</sup> ) <sup>2)</sup>	11.2 ± 0.5	6.3 ± 0.2**	14.9 ± 0.8**	15.1 ± 1.2**	15.6 ± 0.8**	7.1 ± 0.4**

平均値 ± 標準誤差 (n = 6) .

<sup>1)</sup> 根端から10 mm基部側の部位で測定.

<sup>2)</sup> 種子根上に形成された1次側根数 / 種子根長.

\*\* : 原品種との間で1%レベルで有意差有り. ns : 有意差なし.

第2-3表. 原品種 (Blue Rose) , 短根型変異体 (*rrl1* , *rrl2-1* , *rrl2-2* , *rrl2-3* 変異体) , 冠根欠損型変異体 (*crl2* 変異体) , および各変異体間の交雑F<sub>3</sub>世代で見られた二重変異体における種子根伸長率, 成熟域における皮層細胞長, および伸長域と成熟域の境界で計算したセルフラックス.

	種子根伸長率 (mm h <sup>-1</sup> )	成熟域における細胞長 (mm)	セルフラックス <sup>1)</sup> (no. cells h <sup>-1</sup> )
Blue Rose	0.84	88.3	9.51
<i>rrl1</i> 変異体	0.46**	47.5**	9.68 <sup>ns</sup>
<i>rrl2-1</i> 変異体	0.60**	76.1**	7.88**
<i>crl2</i> 変異体	1.12**	102.5*	10.93**
<i>rrl1 rrl2-1</i> 変異体	0.45	59.2	7.62
<i>rrl1 crl2</i> 変異体	0.70	63.5	10.99
<i>rrl2-1 crl2</i> 変異体	0.78	84.6	9.21

平均値±標準誤差 (n = 4) .

\* : 原品種との間で5%レベルで有意差有り, \*\* : 1%レベルで有意差有り, ns : 有意差なし.

<sup>1)</sup> : 種子根伸長率/成熟域における細胞長

第2-4表. 短根型変異体 (*rrl1* , *rrl2-1* 変異体) および冠根欠損型変異体 (*crl2* 変異体) 間のF<sub>3</sub>世代における表現型分離.

組合せ (♀×♂)	F <sub>3</sub> 表現型		$\chi^2$ (3: 1)	P.
	F <sub>2</sub> 表現型	二重変異体		
<i>rrl1</i> × <i>rrl2-1</i>	83 <sup>1)</sup>	36	1.75	0.10-0.25
<i>rrl1</i> × <i>crl2</i>	109 <sup>1)</sup>	24	3.43	0.05-0.10
<i>rrl2-1</i> × <i>crl2</i>	65 <sup>2)</sup>	21	0.02	0.99<

<sup>1)</sup> *rrl1* × *rrl2-1* および *rrl1* × *crl2* では, F<sub>2</sub>世代で出現した *rrl1* 変異体型個体にそれぞれ由来する自殖F<sub>3</sub>世代における表現型の分離を調査したため, F<sub>2</sub>表現型として *rrl1* 変異体型個体を数えた.

<sup>2)</sup> *rrl2-1* × *crl2* では, F<sub>2</sub>世代で出現した *rrl2-1* 変異体型個体に由来する自殖F<sub>3</sub>世代における表現型の分離を調査したため, F<sub>2</sub>表現型として *rrl2-1* 変異体型個体を数えた.

### 第3章 環境刺激誘導性短根型変異体の変異形質の発現機作

#### 緒言

圃場条件下で栽培される作物は、その成長を大きく左右する様々なストレスにさらされており、そのストレスの多くが土壌中に存在している。一方、植物根はこれらのストレスに対して非常に敏感であり、それを回避するために成長パターンを変化させる能力を有している。したがって、このストレスの回避機構をさらに高めるためにも、環境刺激に対する植物の形態反応機構を解明することは極めて重要である。

前章までにおいて、根の発生、あるいは伸長成長に関わる突然変異体を用いて、それらの発育過程を制御する遺伝子の機能について解析してきた。これらの変異体の選抜時において、短根性の発現が成育環境に依存する突然変異体が1系統得られた。本変異体の種子根は、水耕栽培する際に通気を行わず、水を静止させた状態で育成すると原品種と同様に伸長するが、エアーストーンを通して水耕液中に気泡を放出して育成すると、極端に短くなる特異な性質を示した。したがって、本変異体は外部環境に対する根の応答機構を解析する上で極めて有用な研究素材であると判断した。このような BRX180 の性質から、水耕液中の高い溶存酸素濃度、あるいは気泡による根への機械的刺激のどちらか、あるいは両方が本変異体の短根性を誘起する環境要因である可能性が高いと考えられた。そこで本章では、まずこれらの環境要因に対する本変異体の根の伸長反応を精査し、本変異体の短根性を誘起する環境要因を特定しようとした。また同時に、短くなった根の組織学的特性を調査することにより、短根化の原因について検討した。

一般的に、機械的ストレスにさらされた根は太く短くなるが、このような形態的变化はホルモンの制御下にあると考えられている (Goss and Russell 1980, Atwell 1993, Bengouh et al. 1997)。このような形態的变化の誘導時には内生エチレン量の増加が認められるため、機械的ストレス下での形態的变化はエチレンによって媒介されることが示唆されている (Goeschl et al. 1966, Kays et al. 1974, Sarquis et al. 1991)。一方、

これまでにオーキシンやアブシジン酸 (ABA) の関与についても研究されており, Lachno et al. (1982), および Moss et al. (1988) は, 機械的ストレス下で育成したトウモロコシ根において天然オーキシンであるインドール-3-酢酸 (IAA) の内生量は 3.5 倍に増加したが, ABA の内生量は変化しなかったと報告している. これに対して, Tardieu et al. (1992), および Mulholland et al. (1996) は, 機械的ストレスによりトウモロコシやオオムギ根において内生 ABA 量が増加したことを認めた. そこで本章では, BRX180 の短根性の発現過程においてエチレン, IAA および ABA が関与していると仮定し, これら 3 種のホルモン, およびそれらの合成, あるいは作用阻害剤に対する反応性を原品種と比較し, 短根性が発現する機作についても検討した.



## 材料と方法

第 1 章で得られた環境刺激誘導性短根型変異体 (BRX 180), およびその原品種である Blue Rose を供試材料に用いて, 以下の実験を行った.

### 1. 形態的特徴の解析とセルフラックスの計算

これらの種子を各 4 粒ずつベンレート-T 200 倍溶液に 28℃暗黒条件恒温器内で 24 時間浸漬した後, さらに水道水中に同条件下で 24 時間浸漬し, 催芽させた. その後, 人工気象室 (12 時間日長, 気温 30℃) 内において通気水耕栽培し, 播種後 1 週間目に草丈, 葉齢, 種子根長, 種子根直径, および種子根軸上における側根数と側根長を測定した. また, 同条件下で育成した 2 日齢の幼植物における種子根根端部の縦断切片を樹脂包埋法により作成し, 表皮から第 3 層目の皮層細胞長を光学顕微鏡下で計測した. さらに, 第 2 章の方法と同様に, 以下の式によりセルフラックスを求めた.

$$\text{セルフラックス} = \text{根の伸長率} / \text{成熟域における細胞長}$$

### 2. *rrl1*, *rrl2-1* 遺伝子との対立性の検定

前章において解析した結果, 短根型変異体は 2 つの異なる遺伝子座 (*RRL1*, *RRL2*) の変異に起因する突然変異体に分類された. そこで, BRX180 の変異遺伝子と *RRL1*, および *RRL2* に座乗する変異遺伝子との対立性を検定するため, BRX180 と *rrl1*, および *rrl2-1* 変異体との間で交雑実験を行い, それぞれの F<sub>1</sub> 世代における表現型分離について調査した.

### 3. 短根性を誘起する環境要因の解明

本変異体とその原品種である Blue Rose の種子を上記と同様の条件で催芽させた後, それぞれの種子を 4 粒ずつ以下の 5 種類の処理区の水耕槽へ播種し, 水耕栽培によって

1 週間育成した。この時、水耕液への通気は行わなかった。栽培は人工気象室内（12 時間日長，気温 30℃）で行った。播種後 24 時間毎に種子根長および水耕液の溶存酸素濃度を測定した。溶存酸素濃度の測定には，DO メータ（堀場製作所製）を使用した。

#### 1) 水耕液中の溶存酸素濃度の制御

まず，通常，非通気水耕栽培条件下では，根の呼吸により水耕液の溶存酸素濃度は徐々に低下するため，本処理区においては，水耕液量の異なる大型（25 l），中型（6 l）および小型水耕槽（1 l）において，通気せずに同数の植物体を育成することにより，水耕液中の溶存酸素濃度を異なる 3 段階のレベルに設定することを試みた。この方法により，大型水耕槽で育成した場合には，気泡による機械的刺激を与えず，通気水耕栽培条件下と同程度の溶存酸素濃度を維持することが可能となったため，この区を高溶存酸素濃度処理区とした。一方，中型水耕槽，および小型水耕槽の水耕液中では，成育期間中の平均溶存酸素濃度が大型水耕槽のそれに比べそれぞれ  $0.93 \mu\text{l/l}$  および約  $1.66 \mu\text{l/l}$  低下する傾向が見られたため，前者を中溶存酸素濃度処理区，後者を低溶存酸素濃度処理区とした。第 3-1A 図にこれらの 3 処理区における実験期間中の水中溶存酸素濃度の推移を示した。

#### 2) 機械的刺激処理

本処理では，気泡により根へ機械的刺激を与える代わりに，水耕液全体を振とうすることによって機械的刺激を与えた。さらに，あらかじめ植物体 8 個体を成育させておき，水耕液の溶存酸素濃度が一定の低い値に落ちついてから原品種と本変異体の催芽種子を播種し，播種時から常に振とうさせた状態において育成することにより，機械的刺激処理時における水耕液中の溶存酸素濃度の種子根伸長性への影響も評価した。この方法により，本処理区における水耕液の溶存酸素は，振とう処理区に比べ平均  $1.19 \mu\text{l/l}$  程度

低下し、また実験期間中常に一定の低い値を示した（第 3-1B 図）。いずれの処理区も水耕液への通気は行わなかった。

### 3) 処理区の設定

以上の水耕液中の溶存酸素濃度処理と振とう処理を組み合わせ、次の 5 処理区を設定した。

(1) 高溶存酸素濃度処理区：脱イオン水を 25 ℓ 入れた大型水耕槽（25×40×30 cm）において育成した。

(2) 中溶存酸素濃度処理区：脱イオン水を 6 ℓ 入れた中型水耕槽（25×20×15 cm）において育成した。

(3) 低溶存酸素濃度処理区：脱イオン水を 1 ℓ 入れた小型水耕槽（6×14×25 cm）において育成した。

(4) 振とう処理区：脱イオン水を 1 ℓ 入れた小型水耕槽（6×14×25 cm）を振とう機上に設置し、播種時から常に振とうさせた状態において育成した。

(5) 振とう＋低溶存酸素濃度処理区：あらかじめ脱イオン水を 1 ℓ 入れた小型水耕槽（6×14×25 cm）において植物体 8 個体を育成させておき、水耕液の溶存酸素濃度が一定の低い値に落ちついてから供試個体を播種し、播種時から常に振とうさせた状態において育成した。

各処理区から 4 個体ずつ測定に供した。

### 4. エチレン、IAA および ABA とそれらの阻害剤投与に対する反応性

BRX180 とその原品種である Blue Rose の種子を、ベンレート-T 200 倍溶液に 28℃ 暗黒条件恒温器内で 24 時間浸漬した後、さらに水道水中に同条件下で 24 時間浸漬して催芽させた。これらの催芽種子を 0.8% の寒天上に播種し、人工気象室（12 時間日長、

気温 30℃) 内において 2 日間育成後, 種子根長を測定した. これらの幼苗を以下のようにエチレンオーキシシン (インドール-3-酢酸 (IAA)), アブシジン酸 (ABA), およびこれらの阻害剤を添加した水耕液中に移植し, 48 時間後に種子根長を再び測定した.

(1) 非振とう処理区へのホルモン投与: エチレンは密閉容器内の空気中に  $10^{-1}$ , 1,  $10^2$ ,  $10^3 \mu\text{l}/\text{l}$  になるように注入し, また IAA と ABA は水耕液中に  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M になるように添加し, その中で水耕栽培を行った. 振とう処理は行わなかった.

(2) 振とう処理区へのホルモン投与: 上記と同様の手法で各ホルモンを投与し, 水耕液を振とうしつつ育成した.

(3) 振とう処理区へのホルモン阻害剤投与: エチレン作用阻害剤である  $\text{AgNO}_3$  は  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  および  $10^{-7}$  M, オーキシシン作用阻害剤である  $\alpha$ -(*p*-chlorophenoxy) isobutyric acid (PCIB) )は  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  および  $10^{-3}$  M, および ABA 合成阻害剤である norflurazon (NF) は  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , および  $10^{-4}$  M になるように水耕液中に添加し, 水耕液を振とうしつつ育成した.

## 結果

### 1. 形態的特徴の解析

BRX180 とその原品種 Blue Rose を非通気水耕栽培条件下において育成した場合、本変異体の種子根は原品種と同様に伸長したが、通気水耕栽培条件下では、原品種に比べ本変異体の種子根の伸長は著しく抑制された（第 3-2B 図，第 3-1 表）。また、原品種に比べ側根長は小さく、また側根密度は高かったが、種子根直径，草丈，および葉齢には本変異体と原品種との間に有意差は認められなかった（第 3-1 表）。

### 2. *rrl1*, *rrl2-1* 遺伝子との対立性の検定

BRX180 と *rrl1*, および *rrl2-1* 変異体間の  $F_1$  世代では、いずれの交雑組み合わせからも短根型固体は 1 個体も出現せず、全て正常型固体であった（第 3-2 表）。したがって、BRX180 の変異遺伝子と *rrl1*, および *rrl2-1* とは非対立関係にあることが判明し、BRX180 の変異遺伝子の遺伝子座を *REDUCED ROOT LENGTH3* (*RRL3*) と命名した。

### 3. 短根性を誘起する環境要因の解明

#### 1) 水耕液中の溶存酸素濃度の制御

第 3-3A, B および C 図にこれらの溶存酸素濃度の異なる 3 処理区において、本変異体とその原品種を 1 週間成育させた時の種子根長の推移を示した。これらの処理区では、本変異体の種子根長は原品種と同様に増加し、短根性の発現は見られなかった。

#### 2) 機械的刺激処理

振とう処理区では、気泡により根へ機械的刺激を与える代わりに、振とうによって機械的刺激を与えるために小型水耕槽を振とう機上に設置し、播種時から常に振とうさせ

た状態において植物体を育成した。その結果、本処理区では、水耕液の溶存酸素濃度が高溶存酸素濃度処理区よりも若干低い値を示したが、振とう処理により明らかに本変異体において種子根長が短くなる傾向が見られ、播種後 7 日目における本変異体の種子根長は、原品種の 1/3 以下であった（第 3-3D 図）。以上の結果から、本変異体の短根性を誘起する環境要因は、気泡や振とうによる根への機械的刺激であることが明らかになった。

さらに、振とう＋低溶存酸素濃度処理区では、短根性が発現する条件（すなわち機械的刺激が与えられる条件）下における、水耕液中の溶存酸素濃度の種子根伸長性への影響を評価した。その結果、本変異体の種子根長は原品種に比べ短くなったが、その抑制程度は振とう処理区ほど顕著ではなく、播種後 7 日目で変異体の種子根長は原品種の約 2/3 であった（第 3-3E 図）。このことは、本変異体の短根性を発現する機構に水耕液中の溶存酸素濃度も関与していることを示唆している。

#### 4. 種子根の組織学的観察

通気水耕栽培条件下において育成した結果、播種 48 時間後において既に、短根突然変異体 BRX 180 とその原品種である Blue Rose との間に種子根長における顕著な差異が認められた（BRX 180 : 28.3 mm, Blue Rose : 54.0 mm）。この播種 48 時間後の幼植物の種子根端の組織を観察した結果、成熟域における放射方向、および根軸方向の皮層細胞長は、いずれも原品種と本変異体との間に差異は認められなかった（第 3-4C, D 図, 第 3-3 表）。一方、本変異体の分裂域は、原品種に比べ明らかに短くなり、そのため伸長域がより成長点側に移行し（第 3-4A, B, 5 図）、またセルフラックスも原品種に比べ有意に小さかった（第 3-3 表）。このことから、本変異体の短根性の発現は、細胞の伸長が抑制されたためではなく、根軸方向の細胞増殖率の低下に起因することが明らかとなった。

## 5. エチレン, IAA および ABA とそれらの阻害剤投与に対する反応性

非振とう栽培条件下では, BRX180 と Blue Rose はエチレン, IAA, および ABA 濃度が高まるにつれて種子根の伸長抑制程度も増加し, これらのホルモン投与に対して同様の反応性を示した (第 3-6A, B, C 図). したがって, 本変異体の短根性は, これらのホルモンに対する感受性が原品種に比べ高まっているためではないと考えられた. 同様に, 振とう栽培条件下においても, Blue Rose の種子根伸長量はこれらのホルモン濃度が高まるにつれてより減少した (第 3-6D, E, F 図). 一方, 本変異体では, 振とう処理のみにより既に著しく種子根伸長量が低下していたが, ABA 投与下では, その濃度の上昇と共に種子根伸長量がさらに低下する傾向が認められた (第 3-6F 図). このような反応性とは異なり, エチレン, および IAA 投与下における本変異体の種子根伸長量は, Blue Rose の伸長量が各ホルモンの無投与時での本変異体の伸長量を下回る濃度になって初めて低下する傾向を示した (第 3-6D, E 図). この原因として, エチレンや IAA の内生量が既に本変異体において高まっており, それによって既に短根化しているため, あるいは *RRL3* が制御する過程は, エチレンや IAA が関わる過程と共通であるため, さらに外部からこれらのホルモンを投与しても比較的低濃度では影響を受けないことが想定された. しかし, 本変異体の短根性は, これらのホルモン阻害剤投与下においても回復されなかったため (第 3-6G, H, I 図), 本変異体の短根性は ABA のみでなく, エチレンや IAA の内生量の増加にも起因しないと考えられた.

## 考察

本章において、環境刺激誘導性短根型変異体 (*rrl3* 変異体) の短根性を誘起する環境要因、および短くなった根の組織学的特性を調査した結果、本変異体は振とうなどの機械的刺激に特異的に反応し、根軸方向の細胞増殖率が低下することによって短根性を示すことが明らかとなった。また、その伸長の抑制程度は水耕液中の溶存酸素の影響を受け、それが低い場合には抑制程度が小さいことも確認した。

一般的に、機械的ストレスにさらされた根は太く短くなるが (Atwell 1993, Bengouh et al. 1997)、この形態的变化は細胞の伸長方向が根軸方向から放射方向へと移行することと、細胞増殖率が低下することに起因している (Croser et al. 1999)。これに関して、本変異体では、一細胞層での細胞増殖率を示すセルフラックスは原品種である Blue Rose に比べ有意に減少したが、種子根直径、および成熟域における根軸方向や放射方向の皮層細胞長には、両者の間に有意差は認められなかった。したがって、*RRL3* は機械的ストレスに対する応答機構において根軸方向の細胞増殖率にのみ特異的に作用する遺伝子座であると考えられる。

加えて、本変異体では、原品種に比べ側根長は減少し、一方、側根密度は増加していた。これに関して Goss (1977) は、種子根のみに機械的ストレスを与えられるようサイズを設定したガラスビーズ中にオオムギの根を伸長させた場合では、非ストレス下で育成した場合に比べ側根長、および側根発生密度はともに増加したと報告している。このようないわゆる補償成長の観点から見ると、本変異体において観察された側根密度の増加は、*RRL3* の直接的な作用ではなく、種子根の伸長抑制による間接的な作用の結果であると考えられる。しかし、本変異体における側根長の減少は、このような補償成長の概念では説明がつかないため、*RRL3* は種子根のみでなく、側根に関しても同様に作用する遺伝子座であると判断した。

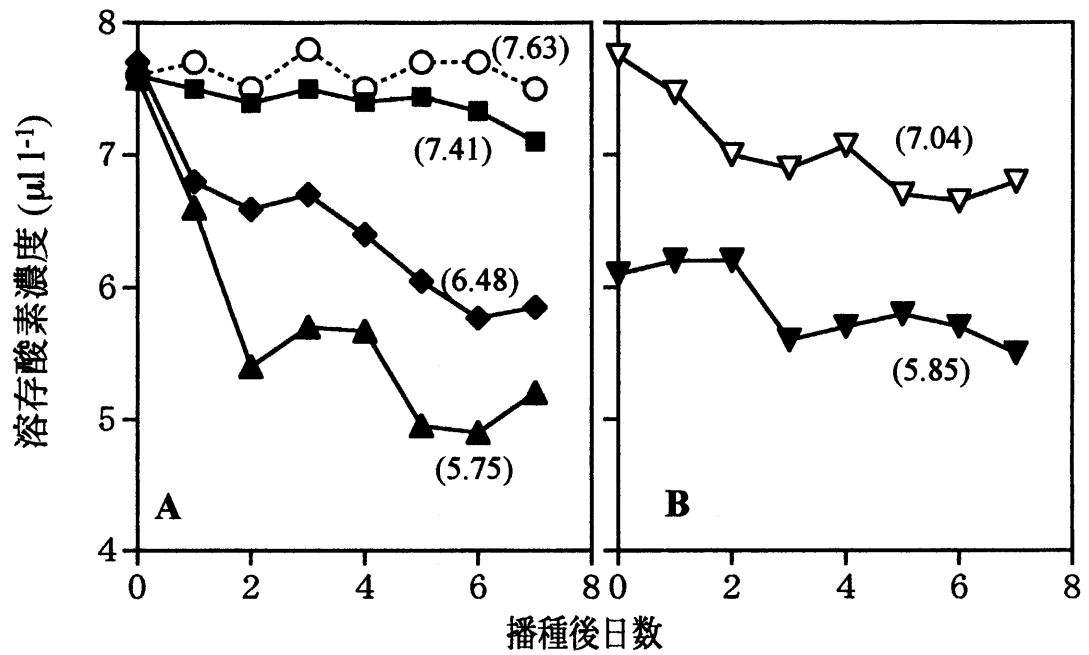
エチレン、IAA および ABA に対する感受性は、本変異体と原品種間に差異はなく、ま



た本変異体の種子根伸長の抑制程度は、これらのホルモンの阻害剤によって緩和されなかった。したがって、本変異体の種子根長の減少は、これらのホルモンに対する感受性やそれらの内生量の増加に起因しないと考えられる。本章では、これまでに機械的ストレス下で育成した根で増加することが報告されているこれら 3 種のホルモンについて検討を行ったが、緒論でも述べたように、ABA に関しては機械的ストレス下で増加しないとする報告も多い (Lachno et al. 1982, Moss et al. 1988)。また、IAA についても増加を認めた報告は一例のみである (Lachno et al. 1982)。機械的ストレス下における形態的变化の誘導時には内生エチレン量の増加が多くの植物根において認められ、さらに外部からのエチレンおよびエチレン前駆物質の処理により同様の形態的变化が誘起されるため、多くの研究者によって機械的ストレス下での形態的变化はエチレンによって媒介されることが支持されている (Goeschl et al. 1966, Kays et al. 1974, Wilkins et al. 1976, Sarquis et al. 1991)。しかし、根長の減少や直径の増加といった形態的变化は、細胞の伸長方向の変化のみによっても誘導されるため、エチレンが実際に細胞の増殖過程に作用するかどうかについては議論の余地が残されている。

Xu et al. (1995) は、接触や風雨といった機械的刺激により主根や側根といった様々な部位で発現が誘導される *TCH4* 遺伝子をシロイヌナズナから単離したが、彼らはこの *TCH4* 遺伝子の発現がブラシノステロイドによって誘導されることを見いだしている。一方、本章では *rrl3* 変異体の種子根伸長の抑制程度は、水耕液中の溶存酸素濃度が高い場合に大きいことを明らかにした。これに関して、土壤中において酸素が欠乏する場合には、根端でのサイトカイニンの合成が阻害され (Reid and Bradford 1984)、また根端分裂組織の細胞増殖率は高サイトカイニン濃度下で抑制されることが知られている (Feldman 1979)。したがって、今後はこれまでに機械的ストレスとの関係が充分検討されていないこれらのホルモンについても、*rrl3* 変異体の短根性の発現機作との関連性を検討する必要がある。

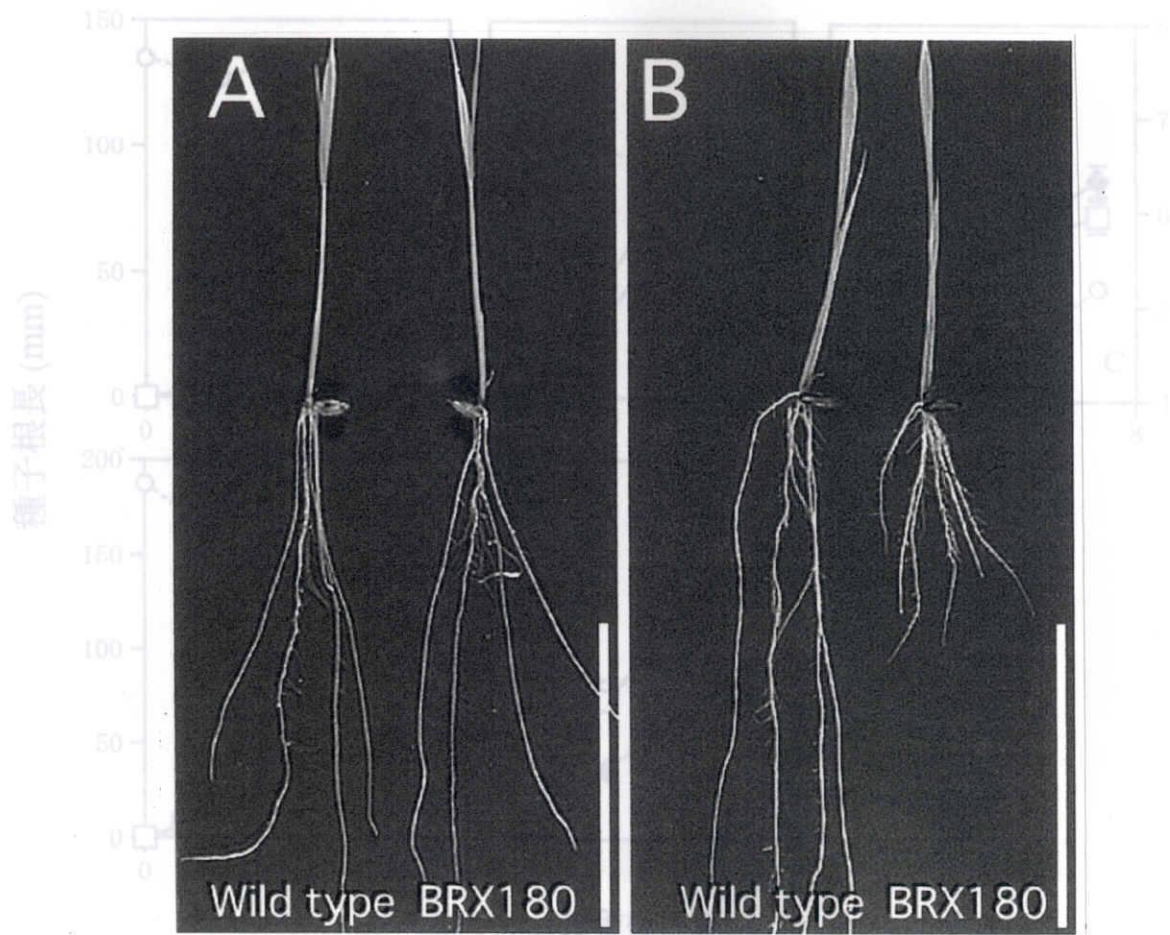
以上のように、本章では環境刺激誘導性短根型変異体を用いて解析した結果、(a) 本変異体の短根性は振とうなどの機械的刺激によって誘導され、その伸長の抑制程度は水耕液中の溶存酸素の影響を受けること、(b) 本変異体は根軸方向の細胞増殖率が低下することによって短根化し、細胞伸長過程は正常であること、(c) 本変異体の種子根伸長の抑制は、エチレンや IAA、および ABA の感受性や内生量の増加によって誘導されないことを明らかにした。これまで、環境刺激、例えば重力 (Okada and Shimura 1992, Hobbie and Estelle 1995, Fukai et al. 1997)、光や接触 (Okada and Shimura 1990, 1992) に対する根の細胞伸長過程に異常を示す突然変異体は数多く得られているが、細胞増殖過程に欠陥を示す変異体は得られていない。さらに、これまでは機械的ストレス下での細胞の伸長抑制と細胞増殖の低下といった 2 つの異なる機構を、厳密に区別して解析することは非常に困難であった。しかし、本変異体では細胞伸長過程に異常が認められなかったため、本変異体は、機械ストレス下での細胞の増殖に関わる機構について特異的に解析できるという点で、極めて有用な研究素材である。



第3-1図. 水耕液中の溶存酸素濃度の推移.

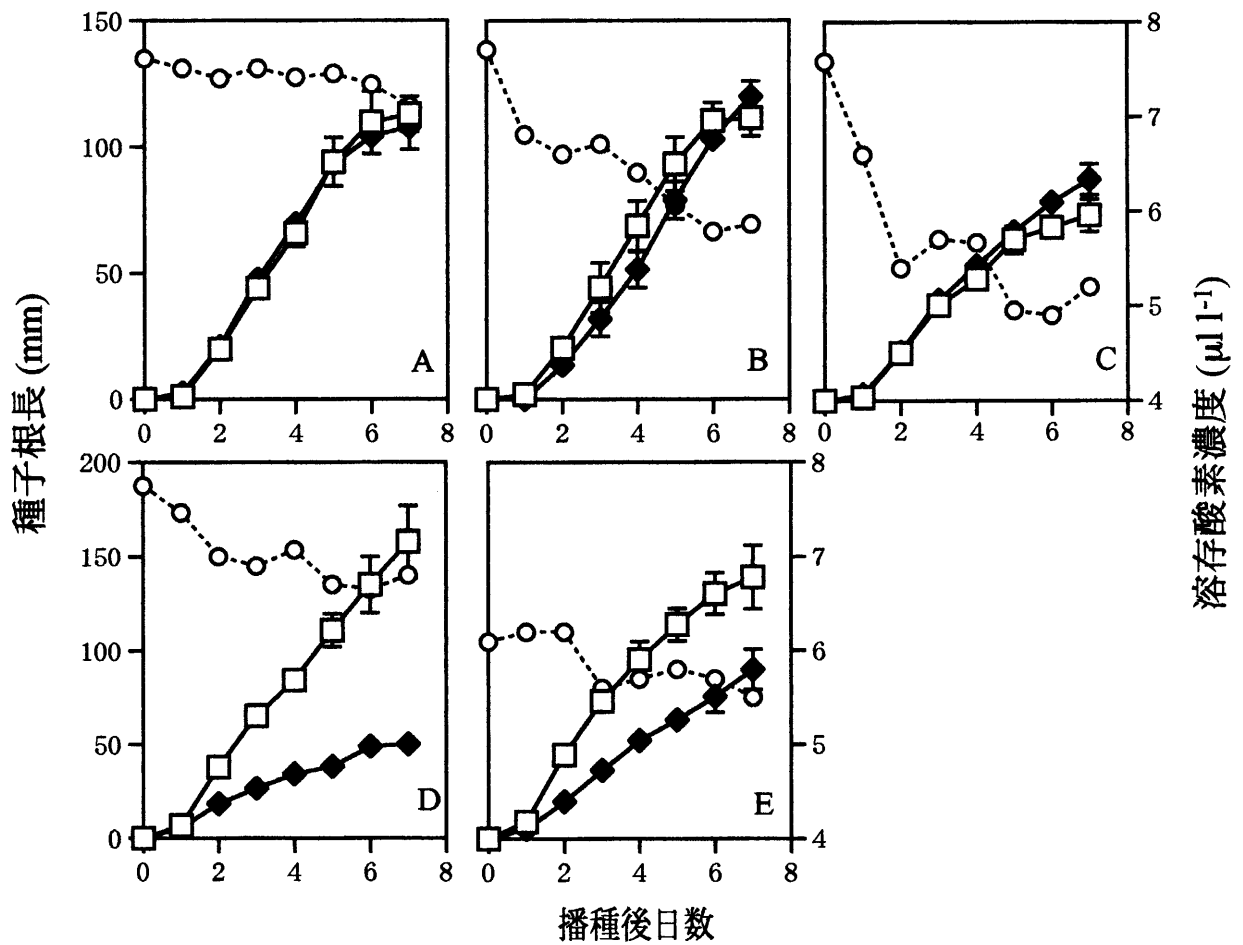
○, 通気; ■, 高溶存酸素濃度処理区; ◆, 中溶存酸素濃度処理区;  
 ▲, 低溶存酸素濃度処理区; ▽, 振とう処理区; ▼, 振とう+低溶存  
 酸素濃度処理区.

括弧内の数値は成育期間の平均溶存酸素濃度を示す.



第3-2 図. 原品種 (Blue Rose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (BRX180) の10日齢の幼苗. A, 非通気水耕栽培条件下で育成; B, 通気水耕栽培条件下で育成. 図中のスケールの長さは5 cm.

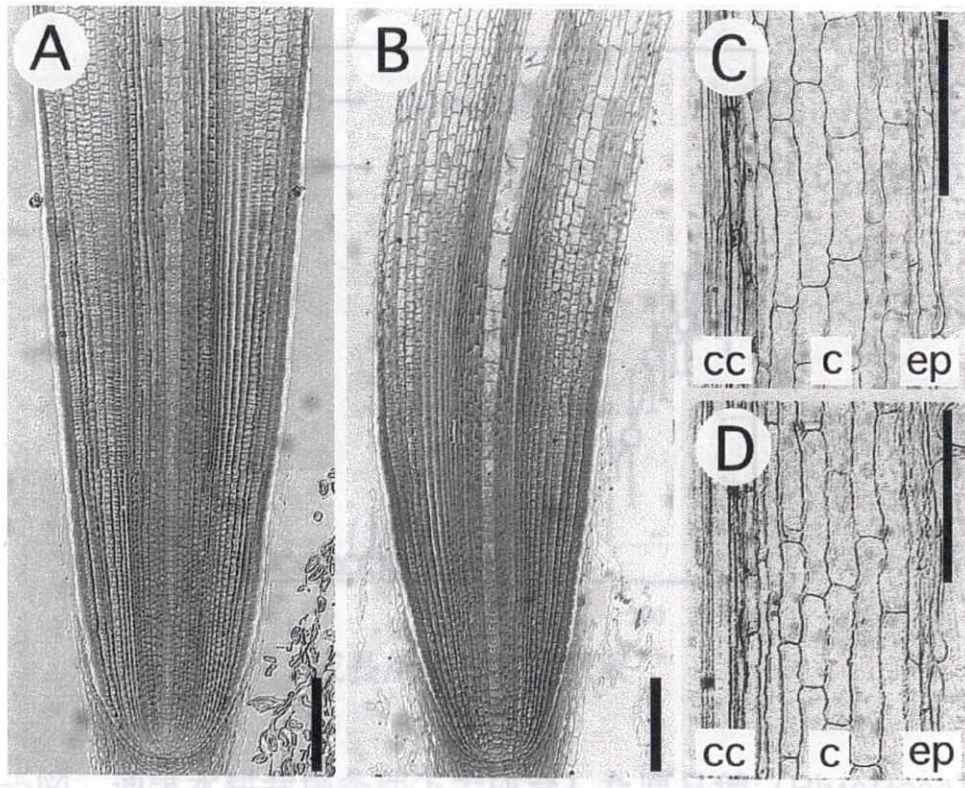
—□— Blue Rose      —●— BRX180      - - - ○ - - - 保存機系測定



第3-3図. 高 (A), 中 (B), 低溶存酸素濃度処理区 (C) と振とう (D), および振とう+低溶存酸素濃度処理区 (E) における原品種 (BlueRose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (BRX180) の種子根長の推移.

誤差線は4反復の標準誤差を示す.

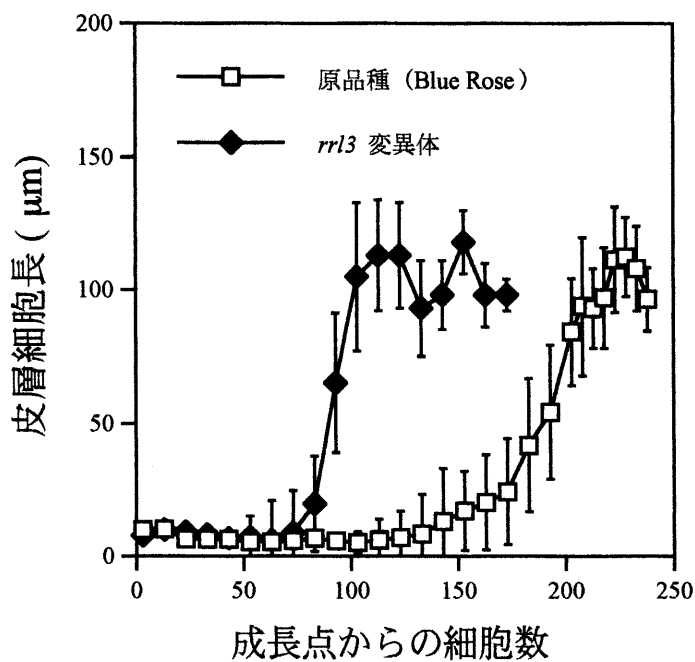
—□— Blue Rose      —◆— BRX 180      ----○---- 溶存酸素濃度



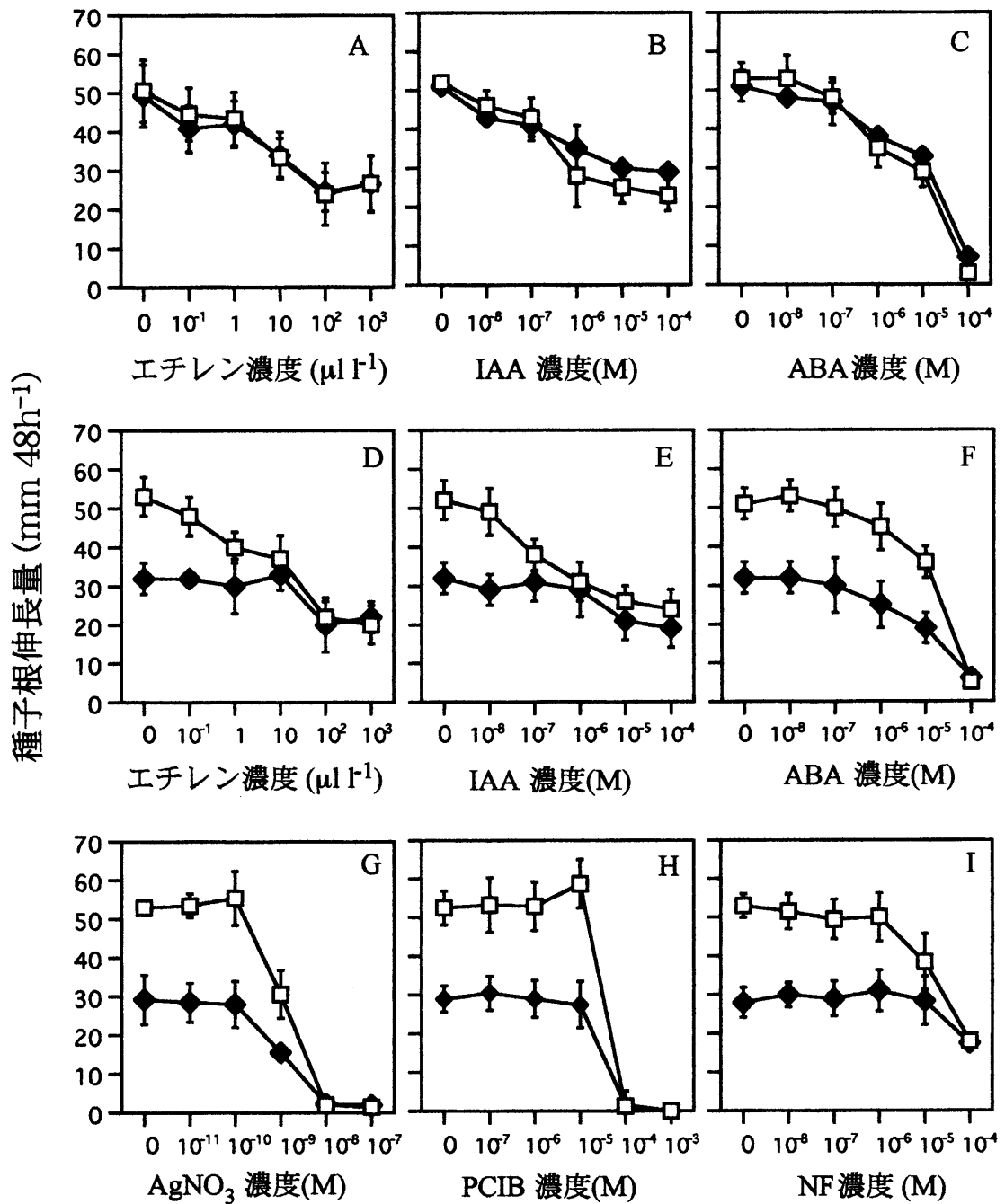
第 3-4 図. 原品種 (Blue Rose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (*rrl3* 変異体) の種子根における縦断面.

A, 原品種の根端部位; B, *rrl3* 変異体の根端部位; C; 原品種の根端成長点から約 8 mm 基部よりの成熟域; D, *rrl3* 変異体の根端成長点から約 8 mm 基部よりの成熟域. cc, 中心柱; c, 皮層; ep, 表皮.

図中のスケールの長さは 100  $\mu\text{m}$ .



第3-5図. 通気水耕栽培条件下で育成した原品種 (BlueRose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (*rrl3*変異体) における表皮から3層目の皮層細胞長の根端成長点からの距離 (細胞数) に伴う推移.  
誤差線は4反復の標準誤差を示す.



第3-6図. 原品種 (BlueRose)と環境刺激誘導性短根型変異体 (*rrl3*変異体)のエチレン, IAA, ABA, およびそれらの阻害剤処理区における種子根伸長量.

A-C: 水耕槽を振とうせずに栽培. D-I: 水耕液を振とうしつつ栽培. 誤差線は4反復の標準誤差を示す.

—□— 原品種 (Blue Rose)      —◆— *rrl3* 変異体



第3-1表. 原品種 (Blue Rose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (BRX180) の諸形質 (1週齢) の比較.

対象形質	Blue Rose	BRX180
草丈 (mm)	57.3 ± 1.3	60.3 ± 1.3 <sup>ns</sup>
葉齡	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 <sup>ns</sup>
種子根長 (mm)	153.0 ± 3.8	49.0 ± 1.1**
平均側根長 (mm) <sup>1)</sup>	7.8 ± 0.6	2.1 ± 0.3**
側根密度 (cm <sup>-1</sup> ) <sup>2)</sup>	13.1 ± 0.7	20.3 ± 0.9**
種子根直径 (μm) <sup>3)</sup>	418.4 ± 6.5	398.0 ± 6.3 <sup>ns</sup>

平均値 ± 標準誤差 (n = 4).

<sup>1)</sup> 種子根の基部から20mmまでの根軸上から発生した1次側根の合計の長さ  
 / 同部位から発生した1次側根数.

<sup>2)</sup> 種子根上に形成された1次側根数 / 種子根長.

<sup>3)</sup> 根端から10 mm基部側の部位で測定.

\*\* : 原品種との間で1%レベルで有意差有り, ns : 有意差なし.

注) 短根性が発現する生育環境である通気水耕栽培条件下で育成.

第3-2表. 環境刺激誘導性短根型変異体 (BRX180) と短根型変異体 (*rrl1*, *rrl2-1* 変異体) の交雑F<sub>1</sub>における表現型の特徴.

組合せ (♀ × ♂)	F <sub>1</sub> 個体数	
	正常型	短根型
BRX180 × <i>rrl1</i>	18	0
BRX180 × <i>rrl2-1</i>	20	0

第3-3表. 原品種 (Blue Rose) と環境刺激誘導性短根型変異体 (*rrl3* 変異体) の成熟域における皮層細胞の根軸および放射方向の長さ, および伸長域と成熟域の境界で計算したセルフラックス.

	根軸方向の細胞長 (mm cell <sup>-1</sup> )	放射方向の細胞長 (mm cell <sup>-1</sup> )	セルフラックス (no. cells h <sup>-1</sup> )
Blue Rose	105.1 ± 7.8	23.8 ± 4.6	9.14 ± 0.28
<i>rrl3</i> 変異体	104.0 ± 10.1 <sup>ns</sup>	21.3 ± 4.3 <sup>ns</sup>	3.20 ± 0.25**

平均値 ± 標準誤差 (n = 4).

\*\* : 原品種との間で1%レベルで有意差有り, ns : 有意差なし.

注) 短根性が発現する生育環境である通気水耕栽培条件下で育成.

## 総合考察

根系形成の遺伝的制御機構に関する知見は、他の器官に比べると圧倒的に少ない上に断片的である。さらには、これらの基礎的な知見をもとにした根系機能の遺伝的改良といった応用面を考えた場合、特に主要作物を対象にした研究が必要不可欠であるが、これまでにはそのような研究の蓄積は極めて限られている。植物の形態形成やその遺伝的制御を研究するための手法はいくつかあるが、その中でも突然変異体の利用による解析は極めて有効な手段の一つである。本研究は、イネにおける根の発育に関する突然変異体についての発育形態学的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査し、根系形成に関わる制御機構を遺伝学的側面から明らかにしようとしたものである。

第 1 章において、イネを材料に根の発育形態に注目して突然変異体の作出・選抜を試みた結果、8 系統の変異体を得、表現型の特徴から種子根欠損型変異体、冠根欠損型変異体、短根型変異体、および環境刺激誘導性短根型変異体に分類した。また、これらの変異体はいずれも単因子劣性遺伝子変異に起因することが判明した。イネではこれまでに短根性を示す変異体 (Kitano and Futuhara 1989, 梁と一井 1996, Ichii and Ishikawa 1997, Noda et al. 2000) や種子胚中に幼根の分化が認められない *radicleless* 変異体 (Kitano et al. 1993) が単離されているが、本研究では、それらと類似する特徴を示す変異体に加えて、これまでに報告例のない冠根欠損型、および環境刺激誘導性短根型変異体を計 3 系統得た。

次に、新たに得られた変異体 8 系統と、これまでに同定されている台中 65 号の MNU 受精卵処理後代から得られた単因子劣性遺伝子変異に起因する *radicleless* (*ral*) 変異体 3 系統 (*odm40*, *odm115*, *odm123*) を用いて交雑実験を行い、それらの変異形質を支配する遺伝子の対立性を検討した。その結果、種子根の発生に関わる遺伝子座が 2 座 (*RADICLELESS1* (*RAL1*), *RAL2*)、冠根の発生に関わる

遺伝子座が 2 座 (*CROWN ROOTLESS1 (CRL1)*, *CRL2*), および種子根の伸長に関わる遺伝子座が 3 座 (*REDUCED ROOT LENGTH1 (RRL1)*, *RRL2*, *RRL3*) 存在することが判明した。

そこでつづいて、根系形成の出発点にあたる根の発生過程の制御機構を解析することを目的に、*RAL1*, *RAL2*, *CRL1*, および *CRL2* に座乗する遺伝子の突然変異に起因する変異体を用いて、形態的特徴や、変異形質を支配する遺伝子間の相互作用性について調査した。

イネの種子胚中には、一本の幼芽と幼根が分化する。これに対して、今回新たに得られたHK8215の種子胚中には、幼芽は存在するが、幼根の分化は認められず、胚発生突然変異体として既に作出されている種子根欠損型変異体 3 系統と類似した特徴を示した。このような胚発生の段階で幼根を欠如する突然変異体はシロイヌナズナにおいてもいくつか見い出されている (Berleth and Jurgens 1993)。このうち *monopteros* 変異体は、完成胚段階で幼根原基だけでなく、それが分化する胚の領域全体が欠如するという特徴を有した。この *monopteros* 変異体は変異胚の培養から得たカルスから不定根を正常に形成するため、根の発生分化に直接関与する遺伝子変異には起因していないものと考えられており、一種のパターン形成 (頂端-基部パターン) 突然変異体と推定された (Mayer et al. 1993)。しかしながら、その後この *MP* 遺伝子についてより詳細な解析が行われた結果、*mp* の芽生えから不定根を誘導して完全な植物体まで成長させたところ、どの器官においても維管束細胞の伸長が不十分で、しばしば分断されており、配列も乱れていた (Przemeck et al. 1996)。維管束の形成には、細胞の長軸方向に沿ったオーキシンの流れが重要であるが (Sachs 1991)、実際に *mp* 変異体の花茎ではオーキシンの極性移動量が減少していた (Przemeck et al. 1996)。また、*mp* 変異体と同様に胚軸と根を欠損する *bodenlos (bdl)* 変異体が単離されたが、*mp bdl* 二重変異体はほとんど胚軸のみとなった (Hamann et al. 1999)。以上のことから、*MP* 遺伝子は胚の特定領域の確立、およびその後の幼根の分化に直接的な役割を果たしているのではなく、オーキシンと関連した

維管束細胞の軸化に関わっていると考えられる。これに関して、今回調査した *ral* 変異体 4 系統全てにおいて、胚のサイズは原品種に比べ縮小化する傾向がみられ、また冠根の形成も可能であった。加えて、*ral1-2 ral2-2* 二重変異体では、胚のサイズの縮小化が各交雑親の変異体に比べさらに顕著に認められ、またこの種子胚中には幼芽の形成も見られなかった。これらの結果から、*RAL1*、および *RAL2* はいずれも幼根そのものの発生分化や胚の基部側領域形成を特異的に制御するのではなく、胚の領域全体の形成に直接あるいは間接的に関わる遺伝子座であると判断した。

一方、胚発生中に形成される幼根とは異なり、冠根原基はその後の成長過程で茎葉節において内生的に分化する (Kaufman 1952, Kawata et al. 1972)。今回調査した *crl* 変異体 2 系統のうち、*crl1* 変異体では冠根原基の発生自体が抑制され、一方、*crl2* 変異体では、冠根原基の発生自体と原基形成後の成長の両者が抑制されていた。また、*crl1* 変異体の幼苗では、他の調査形質において原品種との間に有意差は認められず、その後も原品種と同様に成育可能であったが、*cr2* 変異体では冠根数の減少以外にも他の多くの面で原品種との間に形態的差異が認められた。したがって、*CRL1* は冠根の発生のみの特異的に作用するが、*CRL2* は植物の様々な発育過程を制御する遺伝子座であると考えられる。また、*crl1* *crl2* 二重変異体では、両 *crl* 変異体よりさらに冠根の発生が抑制されていたため、冠根形成過程において *CRL1*、および *CRL2* は異なる経路で作用することが示唆された。さらに、 $\alpha$ -NAA の処理により *crl1* 変異体における冠根形成機能の欠陥は緩和されたが、*crl2* 変異体はそのような傾向を示さなかったため、*CRL1*、および *CRL2* は機能的にも異なる と推測した。

これまでの研究において、いくつかの短根性を示す変異体がイネにおいて得られているが (Kitano and Futsuhara 1989, Liang and Ichii 1996, Ichii and Ishikawa 1997)、長根化する変異体は得られておらず、そのためどのような遺伝子座が根の伸長を制限しているか、またそのような遺伝子座は根の伸長を促進させる遺伝子座とどのような相互作用性を示すのかという問題が残されたままであった。これに関して、第 1 章で解析

した *crl2* 変異体は、冠根数が著しく減少するのに加え、種子根長が有意に増加するという性質を伴っていた。加えて、第 1 章で示した突然変異体の作出・選抜時には、根の長さの減少を示す変異体が存在しており、これらの長根化、あるいは短根化する変異体はこのような問題を解析する上で、極めて有用な研究素材であると考えられる。そこで第 2 章では、*RRL1*, *RRL2*, および *CRL2* に座乗する遺伝子の突然変異に起因する変異体を用い、まずこれらの変異体の幼苗期にみられる形態、および組織学的特徴を調べ、次に  $F_3$  世代で分離した二重変異体型個体の特徴を解析することにより、それらの遺伝子間の相互作用性について検討した。

*rrl1* 変異体における短根性は、根軸方向への細胞伸長の開始が遅延することと、細胞伸長の程度が減少するためであったため、*RRL1* は細胞伸長の開始、およびその伸長程度の両者に関わる遺伝子座であると考えられた。一方、*rrl2-1* 変異体の短根性は、軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の低下の 2 つの原因によるものであったため、*RRL2-1* はこれらの過程に対して促進的に作用する遺伝子座であると推定された。軸方向への細胞増殖率は、分裂細胞の数と細胞分裂速度の 2 つの要素によって規定される (Beemster and Baskin 1998)。これまでに、イネでは根端分裂組織のサイズ、および成熟域における細胞長が減少し短根化する変異体が 2 系統 (*rt*, および *srt-1*) 得られているが、これらの両変異体は、発芽後すぐに各原品種よりも明らかに低い種子根伸長率を示した (Kitano and Futsuhara 1989, Ichii and Ishikawa 1997)。一方、これらとは異なり、*rrl2-1* 変異体の種子根は、播種後 5 日目までは原品種とほぼ同様に伸長可能であった。もし、本変異体の軸方向への細胞増殖率の低下が、分裂域に存在する細胞が伸長への移行を促進され、その結果として分裂能力をもつ細胞数が減少したためであると仮定すると、軸方向への細胞増殖率の低下が誘起されたとしても、発芽直後の種子根伸長率の維持は可能となる。したがって、少なくとも *RRL2* の機能の一つは、分裂域に存在する細胞の伸長への移行の抑制に関わるものではないかと考えられる。

この仮定は *rrl1 rrl2-1* 二重変異体の特徴からも支持される。*rrl1* 変異体の成熟域に

における細胞長は、*rrl2-1* 変異体より小さいため、*rrl1 rrl2-1* 二重変異体の細胞長は *rrl1* 変異体と同様か、あるいは両交雑親よりもさらに減少することが想定される。しかし、実際の *rrl1 rrl2-1* 二重変異体の細胞長は両交雑親の中間の値を示した。根端分裂域における細胞分裂速度と細胞伸長の開始の 2 つの過程は、互いに独立に制御されているため (Ivanov 1981)、*RRL2* が細胞分裂速度のみに関わる遺伝子座であるとする、この結果の説明は極めて困難である。上述したように、*RRL1* は細胞伸長の開始、およびその伸長程度の両者に関わる遺伝子座であると考えられるため、*RRL2* は分裂域に存在する細胞の伸長への移行に関わると仮定すれば、本変異体が両交雑親の細胞長の中間の値をとったことは、細胞伸長への移行に対して両変異遺伝子が逆向きの作用を示した結果であると解釈される。

一方、*crl2* 変異体の長根化は、軸方向への細胞増殖率と細胞伸長の増加の両者により誘起された。本変異体の種子根長は、播種後 5 日目以降は原品種に比べ大きく推移していたが、播種後 3 日目までは逆に小さかった。したがって、*RRL2* と対照的に、*CRL2* は分裂域に存在する細胞の伸長への移行の促進に関わる遺伝子座であると想定される。*crl2* 変異体の根端分裂組織のサイズは、原品種に比べ明らかに増加した。このような変異体はこれまでに報告されていないが、茎頂分裂組織のサイズが増加する変異体として、シロイヌナズナの *clavata1 (clv1)*、および *clv3* 変異体が同定されている (Clark et al. 1993, 1995)。これらの変異体と茎頂分裂組織の維持に欠陥を示すシロイヌナズナの *shoot apical meristemless1 (stm-1)*、および *stm-2* 変異体 (Barton and Poething 1993, Clark et al. 1996) との二重変異体では、茎頂分裂組織の維持が可能であったため、*STM* と *CLV* は分裂組織の活性に競合的に作用し、その恒常性はこれらの遺伝子座における作用力のバランスの上に成り立っていると考えられている (Clark et al. 1996)。これに関して、*rrl2-1* *crl2* 二重変異体の根端分裂組織のサイズ、およびセルフラックスは両交雑親である変異体の中間に位置し、より正常個体の値に近づいていた。これらの結果から、*RRL2*、および *CRL2* は根端分裂組織の恒常性に対してお互いに競合的に作用する可能性が高く、また茎



頂、および根端分裂組織では、その維持に関して同様の機構が存在することが示唆された。

根系構造は、根系全体の機能発現において決定的に重要な役割を果たしているが、この構造は、第 1 章、および第 2 章で解析した根の発生数や伸長量といった要素によって規定される。さらに、圃場条件下において重要となるのが、外部環境に於ける根の応答反応であり、植物根はそれ自身が有する可塑性と環境条件に応じて著しくその構造を変化させる。そこで第 3 章では、まず短根性の発現が成育環境に依存する *rrl3* 変異体の短根性を誘起する環境要因、および短くなった根の組織学的特性を調査した。その結果、本変異体は振とうなどの機械的刺激に特異的に反応し、根軸方向の細胞増殖率が低下することによって短根性を示すことが明らかとなった。また、その伸長の抑制程度は水耕液中の溶存酸素濃度の影響を受け、それが低い場合には抑制程度が小さいことも確認した。

一般的に、機械的ストレスにさらされた根は太く短くなるが (Atwell 1993, Bengouh et al. 1997)、この形態的变化は細胞の伸長方向が根軸方向から放射方向へと移行することと、細胞増殖率が低下することに起因している (Croser et al. 1999)。本変異体では、一細胞層での細胞増殖率を示すセルフラックスは原品種である Blue Rose に比べ有意に減少したが、種子根直径、および成熟域における根軸方向や放射方向の皮層細胞長には、両者の間に有意差は認められなかった。したがって、*RRL3* は機械的ストレスに対する応答機構において根軸方向の細胞増殖率にのみ特異的に作用する遺伝子座であると考えられる。

加えて、本変異体では、原品種に比べ側根長は減少し、一方、側根密度は増加していた。これに関して Goss (1977) は、種子根のみに機械的ストレスを与えられるようサイズを設定したガラスビーズ中にオオムギの根を伸長させた場合では、非ストレス下で育成した場合に比べ側根長、および側根発生密度はともに増加したと報告している。このようないわゆる補償成長の観点から見ると、本変異体において観察された側根密度の増加は、*RRL3* の直接的な作用ではなく、種子根の伸長抑制による間接的な作

用の結果であると考えられる。しかし、本変異体における側根長の減少は、このような補償成長の概念では説明がつかないため、*RRL3* は種子根のみでなく、側根に関しても同様に作用する遺伝子座であると判断した。

エチレン、IAA および ABA に対する感受性は、本変異体と原品種間に差異はなく、また本変異体の種子根伸長の抑制程度は、これらのホルモンの阻害剤によって緩和されなかった。したがって、本変異体の種子根長の減少は、これらのホルモンに対する感受性やそれらの内生量の増加に起因しないと考えられる。本章では、これまでに機械的ストレス下で育成した根で増加することが報告されているこれら 3 種のホルモンについて検討を行った。ABA に関しては機械的ストレス下で増加しないとする報告があり (Lachno et al. 1982, Moss et al. 1988)、また、IAA についてもその増加を認めた報告は一例のみである (Lachno et al. 1982)。機械的ストレス下における形態的変化の誘導時には、内生エチレン量が増加することが多くの植物根において認められており、さらに外部からのエチレンおよびエチレン前駆物質の処理により同様の形態的変化が誘起されるため、多くの研究者によって機械的ストレス下での形態的変化はエチレンによって引き起こされるされることが支持されている (Goeschl et al. 1966, Kays et al. 1974, Wilkins et al. 1976, Sarquis et al. 1991)。しかし、根長の減少や直径の増加といった形態的変化は、細胞の伸長方向の変化のみによっても誘導されるため、エチレンが実際に細胞の増殖過程に作用するかどうかについては議論の余地が残されている。

Xu et al. (1995) は、接触や風雨といった機械的刺激により主根や側根といった様々な部位で発現が誘導される *TCH4* 遺伝子をシロイヌナズナから単離し、この *TCH4* 遺伝子の発現がブラシノステロイドによって誘導されることを見いだしている。一方、本章では *rrl3* 変異体の種子根伸長の抑制程度は、水耕液中の溶存酸素濃度が高い場合に大きいことを明らかにした。これに関して、土壌中において酸素が欠乏する場合には、根端でのサイトカイニンの合成が阻害され (Reid and Bradford 1984)、また根

端分裂組織の細胞増殖率は高サイトカニン濃度下で抑制されることが知られている (Feldman 1979)。したがって、今後はこれまでに機械的ストレスとの関係がほとんど検討されていないこれらのホルモンについても、*rrl3* 変異体の短根性の発現機作との関連性を検討する必要がある。

このように、本研究は根系形成機構を根の発育に関わる突然変異体を用いて遺伝学的側面から解析し、(1) 種子根、および冠根の形成に関わる遺伝子座をそれぞれ 2 座ずつ同定し、前者は幼根が分化する胚の領域形成過程に対して直接あるいは間接的に制御する遺伝子座であり、また後者は冠根原基の発生、および形成後の成長過程に関わる遺伝子座であること、(2) 種子根の伸長に対して抑制的、および促進的な機能をもつ遺伝子座が存在し、その伸長量はそれらに座乗する遺伝子が互いに競合的に作用することによって決定されること、および (3) 機械的ストレス下において、根端分裂域の細胞増殖過程を特異的に制御する遺伝子座が存在することを認めた。

最後に、これらの変異体の今後の研究における有効利用性について考察する。*crl* 変異体は、これまでに報告されている不定根形成に関わる突然変異体とその特徴が異なっていた。シロイヌナズナの *alf4-1* 変異体は、側根および冠根のいずれの形成も認められなかったが (Celenza et al. 1995)、*crl* 変異体では側根の形成は可能であった。また、タバコの *rac* 変異体では、外部からのオーキシン処理により細胞分裂は誘導されたが、その後組織だった分裂へと進行せず、結果として正常な不定根原基の形成は認められなかった (Lund et al. 1996)。これに対して、*crl1* 変異体ではオーキシン処理により冠根自体を形成し、また *cr2* 変異体は外部からのオーキシン処理なしで冠根原基を形成することが可能であった。トウモロコシの *rtcs* 変異体は、*crl1* 変異体と同様に冠根原基の発生自体が抑制されていたが、*crl1* 変異体の幼苗では、原品種に比べ明らかに数は少ないものの、冠根の形成が認められているのに対して、*rtcs* 変異体では播種後 50 日を過ぎても冠根の発生は全く認められず、また外部からのオーキシン処理によっても冠根形成は誘導されな

った (Hetz et al. 1996). このように *crl* 変異体は他の不定根形成に関する変異体と異なる特徴を持つため、これらの変異体を用いて解析を進めることにより、不定根形成を制御する個々の遺伝子座の役割について新たな知見が得られるものと期待される。

さらに Hetz et al (1996) は、*rtcs* 変異体へのオーキシン処理により、中茎根の形成が認められたと報告している。同様に、これまでに幼根あるいは不定根のいずれか一方の形成能力を欠く突然変異体が数多く報告されている (Berleth and Jurgens 1993, Celenza et al. 1995, Hong et al. 1995, Lund et al. 1996). したがって、異なる種類の根の発生過程はその遺伝支配に関しても異なると考えられる (van den Berg 1998). さらに本研究では、*RAL1*, および *CRL1* に座乗する変異遺伝子間の相互作用性についても検討した結果、*rall-2 crl1* 二重変異体では両交雑親の変異形質が付加的に現れており、また本二重変異体は *crl1* 変異体とほぼ同数の冠根を形成したため、特に *RAL1* は冠根形成には全く関与せず、種子根の発生に特異的に関わる遺伝子座であることが判明し、上記の考えが個々の変異体の表現型からのみでなく、異なる種類の根の発生を制御する遺伝子間の相互作用性を考慮した上でも正しいことを明らかにした。

一方、根の分裂組織におけるパターン形成やその後の成長過程では、一つの種類の根で特異的に異常を示す突然変異体は得られておらず、その全てが種子根や冠根、側根といったいずれの根においても形態的異常を示していた (Scheres et al. 1995, Willemsen et al. 1998). したがって、異なる種類の根でのこれらの過程は、発生の初期段階とは異なり、共通の遺伝子によって制御されていると考えられる (van den Berg 1998). これに関して、*crl2* 変異体は、冠根数の減少だけでなく、種子根軸上の側根密度も低下していた。本章では、*crl2* 変異体における側根の発生抑制の原因については組織学的観点から解析していないが、本変異体における冠根数減少は、冠根原基の発生自体、および形成された冠根原基の成長を抑制する作用の 2 つの原因によるものであったため、側根密度の減少がいずれの原因によるものなのか興味深い。

これまでの研究において、種類の異なる根の間の形態、解剖、および発生学的な類

似性や相違性が明らかにされているが (Waisel and Estel 1991, Yamauchi et al. 1996), 遺伝学的側面からの研究は限られている。これに関して, 本章で用いた *RAL1*, および *CRL1* はそれぞれ種子根, および冠根の発生に特異的に作用し, 一方, *CRL2* は冠根や側根といった種類の異なる根の発育に関して共通に制御する遺伝子座であると考えられる。したがって, これらに座乗する遺伝子の変異に由来する突然変異体を用いて, さらに詳細に解析することによって, 異なる種類の根の遺伝的制御機構の共通性, および相違性について新たな知見が得られるものと期待される。一方, *crl1* 変異体は, 冠根数の減少以外, 地上部も含めた形態的特徴が原品種とほぼ同様であった。このような特徴を持つ変異体は, 根系の大きさと地上部の成育の関連性について解析する上でも, 極めて有用な研究素材となりうるであろう。

一方, 上述したように, 根の伸長過程の遺伝的制御機構に関しては, 特に伸長を抑制する遺伝子座についての知見が得られていなかったが, 本章では根端分裂組織の維持や細胞伸長程度に関して競合的に作用する遺伝子座が存在することを明らかにした。根系形質に着目した品種育成を目指す上では, 個々の根の発育の制御機構を遺伝学的側面から明らかにする必要がある。上述した茎長分裂組織の維持に関わる *clv* 変異体ではより詳細な観察が行われており, 本変異体の分裂組織では有糸分裂指数が野生型よりも遅いことが判明している。この結果から, *CLV* 遺伝子は分裂組織の負の制御因子ではなく, 未分化細胞の発生運命の決定を促す役割を持つものと考えられている (Laufs et al. 1998)。さらに, *CLV* 遺伝子は既にクローニングされており, それがコードするタンパク質の機能解析から, これらの遺伝子は茎頂分裂組織におけるシグナル伝達系において細胞外シグナルの受容体として機能していると考えられている (Clark et al. 1997)。したがって, 今後, 本章で用いた突然変異体についてさらに詳細な解析やそれらのクローニングを進めていくことによって, 根の伸長過程を制御する個々の遺伝子座の機能の実態に迫ることができると期待される。

これまで, 環境刺激, 例えば重力 (Okada and Shimura 1992, Hobbie and Estelle

1995, Fukai et al. 1997), および光や接触 (Okada and Shimura 1990, 1992) に対する根の細胞伸長過程に異常を示す突然変異体は数多く得られているが, 細胞増殖過程に欠陥を示す環境応答に関わる変異体は得られていない. これに関して, *rrl3* 変異体は振とうなどの機械的刺激に特異的に反応し, 根軸方向の細胞増殖率が低下することによって短根性を示した. これまでは, 機械的ストレス下での細胞の伸長抑制と細胞増殖の低下といった 2 つの異なる機構を厳密に区別して解析することは非常に困難であった. しかし, 本変異体では細胞伸長過程に異常が認められなかったため, 本変異体は機械ストレス下での細胞の増殖, および伸長の変化に関わる機構を区別して解析する上で, 極めて有用な研究素材であると考えられる.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、常に温かく私を励ましながら、終始絶大なご援助と的確なご指導を承りました名古屋大学大学院生命農学研究科循環資源学研究分野の山内 章教授に深く感謝の意を表します。また、研究途上において懇切なご助言とご指導を承りました、本学作物科学研究分野の巽 二郎教授、飯嶋盛雄助教授ならびに矢野勝也教官に対し、心から感謝いたします。そして、本研究の実験材料である odm 40 をはじめとするいくつかの変異系統を供試して下さっただけでなく、終始適切なるご指導をいただいた本学植物遺伝育種学研究分野の北野英己助教授に心から感謝の意を表します。また、本学循環資源学研究分野、ならびに作物科学研究分野の学生の皆さまには本研究を進める上で、数々のご援助、ご協力をいただいただけでなく、本論文を仕上げる段階で大変お世話になりました。心から感謝いたします。

最後に、これまで私を温かく見守ってくれた両親をはじめ、私の家族に対しても深く感謝いたします。

## 引用文献

- Atwell, B. J. 1993. Response of roots to mechanical impedance. *Environ. Exp. Bot.* 33: 27-40.
- Azhiri-Sigari, T., Yamauchi, A., Kamoshita, A. and Wade, L. J. 2000. Genotypic variation in response of rainfed lowland rice to drought and rewatering. II. Root growth. *Plant Prod. Sci.* 3: 180-188.
- Barton, M. K. and Poething, R. S. 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild-type and *shoot meristemless* mutant. *Development* 119: 823-831.
- Baskin, T. I., Cork, A., Williamson, R. E. and Gorst, J. R. 1995. *STUNTED PLANT 1*, a gene required for expansion in elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiol.* 107: 233-243.
- Baskin, T. I., Betzner, A. S., Hoggart, R., Cork, A. and Williamson, R. E. 1992. Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 427-437.
- Beemster, G. T. S. and Baskin, T. I. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 1515-1526.
- Benfey, P. N. and Shiefelbein, J. W. 1994. Getting to the root of plant development: The genetics of *Arabidopsis* root formation. *Trends Genet.* 10: 84-88.
- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K. J., Schiefelbein, W., Hauser, M.-T. and Aeschbacher, R. A. 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57-70.
- Bengough, A. G., Croser, C. and Pritchard, J. 1997. A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. *Plant Soil* 189: 155-164.
- Berleth, T. and Jürgenes, G. 1993. The role of *monopteros* gene in organizing the basal body region of



- the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118: 575-587.
- Blakesley, D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root initiation. In "Biology of adventitious root formation". Davis, T. D. and B. E. Hassing (eds), Plenum Press, New York, pp. 143-154.
- Blakesley, D., Weston, G. D. and Hall, J. F. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. I. Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regul.* 10: 341-353.
- Celenza, J. L., Grisafi, P. L. and Fink, G. R. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9: 2131-2142.
- Cheng, J.-C., Sleeley, K. A. and Sung, Z. R. 1995. *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol.* 107: 365-376.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. 1993. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119: 397-418.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. 1995. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121: 2057-2067.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. and Meyerowitz, E. M. 1996. The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 1567-1575.
- Croser, C., Bengough, A. G. and Pritchard, J. 1999. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (*Pisum sativum*). I. Rates of cell flux, mitosis, and strain during recovery. *Physiol. Plant.* 107: 277-286.
- Dolan, L. and Roberts, K. 1995. Plant development: pulled up by the roots. *Current Opinion Genet. Dev.* 5: 432-438.
- Evans, S. D. and Barber, S. A. 1964. The effect of rubidium-86 diffusion on the uptake of rubidium-86

- by corn. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 28: 56-57.
- Feldman, L. J. 1979. Cytokinin biosynthesis in roots of corn. *Planta* 145: 315-321.
- Fraser, T. E., Silk, W. K. and Rost, T. L. 1990. Effects of low water potential on cortical cell length in growing regions of maize roots. *Plant Physiol.* 93: 648-651.
- Fukai, S. and Cooper, M. 1995. Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice. *Field Crop Res.* 40: 67-86.
- Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. 1997. The *RHG* gene is involved in root and hypocotyl gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 38: 804-810.
- Goeschl, J. D., Rappaport, L. and Pratt, H. K. 1966. Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. *Plant Physiol.* 41: 877-884.
- Goss, M. J. 1977. Effects of mechanical impedance on root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 28: 96-111.
- Goss, M. J. and Russell, R. S. 1980. Effects of mechanical impedance on root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). III. Observations on the mechanism of response. *J. Exp. Bot.* 31: 577-588.
- Hartung, W., Zhang, J. and Davies, W. J. 1994. Does abscisic acid play a stress physiological role in maize plants growing in heavily compacted soil? *J. Exp. Bot.* 45: 221-226.
- Hauser, M.-T., Morikami, A. and Benfey, P. N. 1995. Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* 121: 1237-1252.
- Hetz, W., Hochholdinger, F., Schwall, M. and Feix, G. 1996. Isolation and characterization of *rtcs*, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J.* 10: 845-857.
- Hobbie, L. and Estelle, M. 1995. The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* 7: 211-220.
- 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.
- Ichii, M. and Ishikawa, M. 1997. Genetic analysis of newly induced short-root mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 47: 121-125.
- Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A. 2001. Characterization of rice mutants deficient in the formation of crown roots. *Breed. Sci.* 51: 123-129.
- Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A. 2001. *RRL1*, *RRL2* and *CRL2* loci regulating root elongation in rice. *Breed. Sci.* 51: 231-239.
- Ivanov, V. B. 1981. Cellular basis of root growth. *Sov. Sci. Rev. D2*: 365-392.
- Kamoshita, A., Wade, L. J. and Yamauchi, A. 2000. Genotypic variation in response of rainfed lowland rice to drought and rewatering. III. Water extraction during the drought period. *Plant Prod. Sci.* 3: 189-196.
- Kamoshita, A., Wade, L. J., Siopongco, J., Zhang, J., Ali, M. L., Pathan, M. S., Sarkarung, S. and Nguyen, H. T. 1999. Analysis of two rice populations for constitutive root system morphology and preliminary QTL analysis. In "Genetic improvement of rice for water-limited environment" Ito, O., J. O'Toole and B. Hardy (eds.), International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. p. 227-238.
- Kashiwagi, J., Iwama, K. and Hasegawa, T. 2000. Stability of phenotypic variation of root length over environmental conditions in the seedling generation of potato. *Jpn. J. Crop Sci.* 69: 332-336 (in Japanese with English summary).
- Kaufman, P. B. 1959. Development of the shoot of *Oryza sativa* L. III. Early stages in histogenesis of the stem and ontogeny of the adventitious root. *Phytomorph.* 9: 382-404.
- Kawashima, C. 1988. Root system formation in rice plant. III. Quantitative studies. *Jpn. J. Crop Sci.* 57: 26-36 (in Japanese with English summary).
- Kawata, S., Harada, J. and Yamazaki, K. 1972. On the crown root primordium formation in the stem

- of rice plants. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 41: 296-309 (in Japanese with English summary).
- Kawata, S., Harada, J. and Yamazaki, K. 1978. On the number and the diameter of crown root primordia in rice plants. Jpn. J. Crop Sci. 47: 644-654 (in Japanese with English summary).
- Kays, S. J., Nicklow, C. W. and Simons, D. H. 1974. Ethylene in relation to the response of roots to physical impedance. Plant Soil 40: 565-571.
- King, P. J. 1988. Plant hormone mutants. Trends Genet. 4: 157-162.
- Kitano, H. and Futsuhara, Y. 1989. Inheritance and gene expression of a root-growth inhibiting mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Proc. of the 6th Intl. Congr. of SABRAO: 349-352.
- Klepper, B. 1992. Development and growth of crop root systems. In "Limitations to plant root growth". Hatfield, J. L. and B. A. Stewart (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 265-286.
- Kono, Y., Yamauchi, A., Kawamura, N., Tatsumi, J., Yoneyama, T. and Inagaki, N. 1987. Interspecific differences of the capacities of waterlogging and drought tolerances among summer cereals. Jpn. J. Crop Sci. 56: 115-129.
- Lachno, D. R., Harrison-Murray, R. S. and Audus, L. J. 1982. The effects of mechanical impedance to growth on the levels of ABA and IAA in root tips of *Zea mays* L. J. Exp. Bot. 33: 943-951.
- Liang, Z.-W. and Ichii, M. 1996. Morphological Characterization of the seedlings of short-root mutant LM10 selected from rice (*Oryza sativa* L., cv. IR8). Jpn. J. Crop. Sci. 65: 473-478.
- Lund, S. T., Smith, A. G. and Hackett, W. P. 1996. Cuttings of a tobacco mutant, *rac*, undergo cell divisions but do not initiate adventitious roots in response to exogenous auxin. Physiol. Plant. 97: 372-380.
- Lynch, J. 1995. Root architecture and plant productivity. Plant Physiol. 109: 7-13.
- Maurel, C., Leblanc, N., Barbier-Brygoo, H., Perrot-Rechenmann, C., Bouvier-Durand, M. and Guern, J. 1994. Alterations of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplasts. Plant Physiol. 105: 1209-1215.

- Moss, G. I., Hall, K. C. and Jackson, M. B. 1988. Ethylene and the responses of roots of maize (*Zea mays* L.) to physical impedance. *New Phytol.* 105: 303-311.
- Mulholland, B. J., Taylor, I. B., Black, C. R. and Roberts, J. A. 1996. Effects of soil compaction on barley (*Hordeum vulgare* L.) growth. II. Are increased xylem sap ABA concentrations involved in maintaining leaf expansion in compacted soils? *J. Exp. Bot.* 47: 551-556.
- Narayan, D. 1991. Root growth and productivity of wheat cultivars under different soil moisture conditions. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.* 17: 19-26.
- Nemoto, H., Suga, R., Ishihara, M. and Okutsu, Y. 1998. Deep rooted rice varieties detected through the observation of root characteristics using the trench method. *Breed. Sci.* 48: 321-324.
- Noda, T., Tanaka, S., Hutsuhara, Y. and Ikeda, R. 2000. Character expression and mode of inheritance of a root-growth inhibiting mutant gene, *rt2* in rice. *Sci. Rep. Fac. Agr. Meijo Univ.* 36: 47-55 (in Japanese with English summary).
- Okada, K. and Shimura, Y. 1990. Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274-276.
- Okada, K. and Shimura, Y. 1992. Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways. *Cell.* 70: 369-372.
- Oyanagi, A. 1998. A new approach to crop root system with quantitative analysis of the root depth. *Jpn. J. Crop Sci.* 67: 3-10 (in Japanese).
- O'Toole, J. C. and Bland, W. L. 1987. Genetic variation in crop plant root systems. *Advan. Agron.* 41: 91-145.
- Peterson, W. R. and Barber, S. A. 1981. Soybean root morphology and K-uptake. *Agron. J.* 73: 316-319.
- Pilet, P.-E. and Ney, D. 1981. Differential growth of georeacting maize roots. *Planta* 151: 146-150.
- Reid, D. M. and Bradford, K. J. 1984. Effects of flooding on hormone relations. In T. T. Kozlowski

- ed., Flooding and plant growth. Academic Press, Orlando. 195-219.
- Romano, C. P., Hein, M. B. and Klee, H. J. 1991. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.* 5: 438-446.
- Sarquis, J. I., Jordan, W. R. and Morgan, P. W. 1991. Ethylene evolution from maize (*Zea mays* L.) seedling roots and shoots in response to mechanical impedance. *Plant Physiol.* 96: 1171-1177.
- Shen, W. H., Petit, A., Guern, J. and Tempé, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 3417-3421.
- Silk, W. K., Lord, E. M. and Eckard, K. J. 1989. Growth patterns inferred from anatomical records. *Plant Physiol.* 90: 708-713.
- Sullivan, C. Y. and Ross, W. M. 1979. Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. *In* "Stress physiology in crop plants" Mussell H. and R. C. Staples (eds.), Wiley, New York. p. 263-282.
- Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N. and Chua, N.-H. 1995. The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes Dev.* 9: 97-107.
- Tardieu, F. Zhang, J. and Davies, W. J. 1992. What information is conveyed by an ABA signal from maize roots in drying field soil? *Plant Cell Environ.* 15: 185-191.
- Taylor, H. M. 1982. Modifying root systems of cotton and soybean to increase water absorption. *In* "Adaptation of plants to water and high temperature stress" Turner, N. C. and P. J. Kramer (eds.), Wiley, New York. p. 75-84.
- Teo, Y. H., Beyrouthy, C. A., Norman, R. J. and Gbur, E. E. 1995. Nutrient uptake relationship to root characteristics of rice. *Plant Soil* 171: 297-302.
- Thomson, C. J. and Atwell, B. J. 1989. Analysis of growth components of roots of wheat seedlings

- exposed to low O<sub>2</sub> concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 29: 387-393.
- Trewavas, A. J. 1991. How do plant growth substances work? II. *Plant Cell Environ.* 14: 1-12.
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inze, D., May, M. J. and Sung, Z. R. 2000. The *ROOT MERISTEMLESS1 / CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97-109.
- Waisel, Y. and Eshel, A. 1991. Multifform behavior of various constituents of one root system. In "Plant roots. The hidden half". Waisel, Y., A.Eshel and U. Kafkafi (eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 39-52.
- Wilkins, S. M., Wilkins, H. and Wain, R. L. 1976. Chemical treatment of soil alleviates effects of soil compaction on pea seedling growth. *Nature* 259: 392-394.
- Wilson, A. J., Robards, A. W. and Goss, M. 1977. Effects of mechanical impedende on root growth in barley, *Hordeum vulgare* L. II. Effects on cell development in seminal roots. *J. Exp. Bot.* 28: 1216-1227.
- Wu, W., Prugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C. and Braam, J. 1995. *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* 7: 1555-1567.
- Yamauchi, A., Pardales, J. R. Jr. and Kono, Y. 1996 Root system structure and its relation to stress tolerance. In O. Ito, C. Johansen, J. J. Adu-Gyamfi, K. Katayama, J. V. D. K. Kumar Rao and T. J. Rego eds., Dynamics of roots and nitrogen in cropping systems of the semi-arid tropics. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba. 211-233.
- Zheng, H. G., Babu, R. C., Pathan, M. S., Ali, L., Huang, N., Courtosis, B., Nguyen, H. T. 2000. Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: comparison of

genetic backgrounds. *Genome* 43: 53-61.

Zobel, R. W. 1991. Genetic control of root system. In "Plant roots. The hidden half". Waisel, Y.,

A.Eshel and U. Kafafi (eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 27-38.

van den Berg, C., Weisbeek, P. and Scheres, B. 1998. Cell fate and cell differentiation status in

*Arabidopsis* root. *Planta* 205: 483-491.



## 報文目録

- 1) Inukai, Y., Yamauchi, A., Satoh, H., Nagato, Y. and Kitano, H.  
Genetic analysis of induced rice developmental mutants showing radicleless and crown rootless. *Rice Genetics Newsletter* 15: 88-90. (1998)
- 2) Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A.  
Characterization of rice mutants deficient in the formation of crown roots. *Breeding Science* 51: 123-129. (2001)
- 3) Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A.  
*RRL1*, *RRL2* and *CRL2* loci regulating root elongation in rice. *Breeding Science* 51: 231-239. (2001)
- 4) Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A.  
Mechanical stimulus-sensitive mutation, *rrl3*, affects the cell production process in the root meristematic zone in rice. *Plant Production Science* (submitted)
- 5) Inukai, Y., Miwa, M., Nagato, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A.  
The role of *RAL1*, *RAL2*, *CRL1* and *CRL2* loci involved in radicle and crown root formation in rice. (in preparation)