

博 士 論 文

イネの分げつおよび根の成長を制御する
D10、*D14* 遺伝子およびストリゴラクトンに関する研究

2015 年

有 手 友 嗣

目次

緒論.....	1
第1章 イネ分げつわい性変異体の表現型解析および分子遺伝学的解析.....	10
1-1 序論.....	10
1-2 材料と実験方法.....	12
1-3 結果.....	22
1-4 考察.....	52
第2章 ストリゴラクトンによる腋芽の伸長抑制と <i>DI4</i> 遺伝子の機能解析...	59
2-1 序論.....	59
2-2 材料と実験方法.....	66
2-3 結果.....	68
2-4 考察.....	74
第3章 ストリゴラクトンがイネの根の成長に与える影響	
3-1 序論.....	78
3-2 材料と実験方法.....	81
3-3 結果.....	83
3-4 考察.....	92
結論.....	95
謝辞.....	101
参考文献.....	102
論文目録.....	114

緒論

地球上には多くの生物種が存在しており、その多くは未だに発見、分類されていないものと想像されるが、現在確認されているものだけでもおおよそ 120 万種が記載されている。(Mora et al. 2011)。そのうちの約三分の二は昆虫を中心とする動物であり、種子植物とシダ植物を中心とする維管束植物は約 25 万種存在している。

種とは何かについては、「ある程度同一の形質が、世代を超えて継承されている集団」という概念はあるものの、全ての生物に一義的に当てはめることのできる定義は今のところない。近年ではDNA配列の相同性に基づく分子遺伝学的分類が主流となりつつあるが、高等植物に限って言えば、最も直感的に分かりやすい種の違いはそれぞれの種が持つ独自の形態ではないだろうか。山野や植物園などに行き、木々や草花を観察すれば、全体から細部にいたるまで、多様な形態が存在していることに驚かされる。また、生物分類学の父と呼ばれるカール・リンネは、植物を花の雄蕊と雌蕊の形により分類した。この分類法は現在では使用されていないが、形態の違いが植物種の大きな違いであるとの認識は、過去も現在も変わっていないだろう。

形態形成、つまり生物の体がどのように形作られるかという視点で見ると、植物は動物と大きく異なっている。その大きな違いの1つは、動物は基本的に、主要な器官のほとんどを胚発生時に形成し終え、その後は各器官が肥大成長して個体が成長するのに対し、植物は胚発生時に基本的な体制を作り終えた後も、器官を新たに形成し続け、茎や葉の数や形を変えながら成長する点である。青々とした葉を展開し続けていた植物がある条件下で突然色鮮やかな花を咲かせるといった劇的な形態変化は、植物の特徴的な性質であると言っても過言ではない。この動物と植物における形態形成の違いは、環境に対する適応戦略が動物と植物で異なっているためというのが通説である。つまり、動物は自律的に行動することができるため、自らの生存に不適な環境にさらされた場合に、望ましい環境を求めて移動することができるのに対し、植物は自らの意志で移動することができないため、周囲の環境に適した形態へと自らを変化させることが重要であり、そのためには臨機応変に形態形成を行う

必要があるという考えである。

植物の臨機応変な形態形成において中心的役割を担っているのは、「頂端分裂組織 (Apical Meristem)」である(図 1)。頂端分裂組織は、葉と茎で形成されるシュート系の頂端部である「茎頂」、ならびに根系の頂端部である「根端」に存在しており、未分化な幹細胞の維持および幹細胞から各器官への分化が行われている組織である。シュート系の頂端分裂組織である「茎頂分裂組織 (Shoot Apical Meristem)」では、その中心部において幹細胞が細胞分裂を繰り返しており、幹細胞から新たな幹細胞が複製されると同時に、葉や茎の基となる始原細胞が形成される。形成された始原細胞は複製された幹細胞に押し出される形で茎頂分裂組織の周縁部に移動しながら、分裂と伸長を繰り返し、葉や茎などの各器官へと分化・成長していく。一般的に、茎頂分裂組織は数十個の細胞から成る非常に小さい組織であるため、茎頂分裂組織および分化した数枚の若い葉を合わせて「頂芽 (apical bud)」と呼んでいる。根系の頂端分裂組織である「根端分裂組織 (Root Apical Meristem)」においても、形成される器官に違いはあれども、茎頂分裂組織と同様に幹細胞の維持と分化が行われており、分裂組織とそこから分化した根冠などをまとめて「根端 (root tip)」と呼んでいる。茎頂分裂組織、根端分裂組織のどちらにおいても、分裂組織の中心部で増殖した細胞が周縁部へと供給され、細胞が積み重なることでシュート系と根系は分裂組織の存在する頂端側へと伸長する。このように頂端－基部という 1 本の主軸に沿って、シュート系と根系がそれぞれ頂端側へ一方向に伸長していくことも植物の形態形成の特徴である。

胚発生時に形成される分裂組織は、先ほど述べた茎頂分裂組織と根端分裂組織の2つのみであるが、植物体が成長するにつれ、この2つの分裂組織以外にも新たに分裂組織が形成されるようになる。シュート系においては、茎頂分裂組織が茎、葉といった器官を形成して1つのシュート系を構築するとともに、葉の腋に「腋生分裂組織 (Axillary meristem)」と呼ばれる二次的な分裂組織が形成される。この腋生分裂組織は茎頂分裂組織と同様に茎や葉を形成しながら伸長して、二次的なシュート系である「側枝」を形成する。側枝に形成された葉の腋には、さらに三次的な腋生分裂組織が形成され、

それらが伸長するとまた側枝になる。このように茎頂分裂組織によって形成された腋生分裂組織が伸長して側枝になり、側枝がさらに腋生分裂組織を形成するという一連の現象を繰り返すことで、植物の多くに見ることができる高次元の繰り返し構造、いわゆるフラクタル構造が構築される。

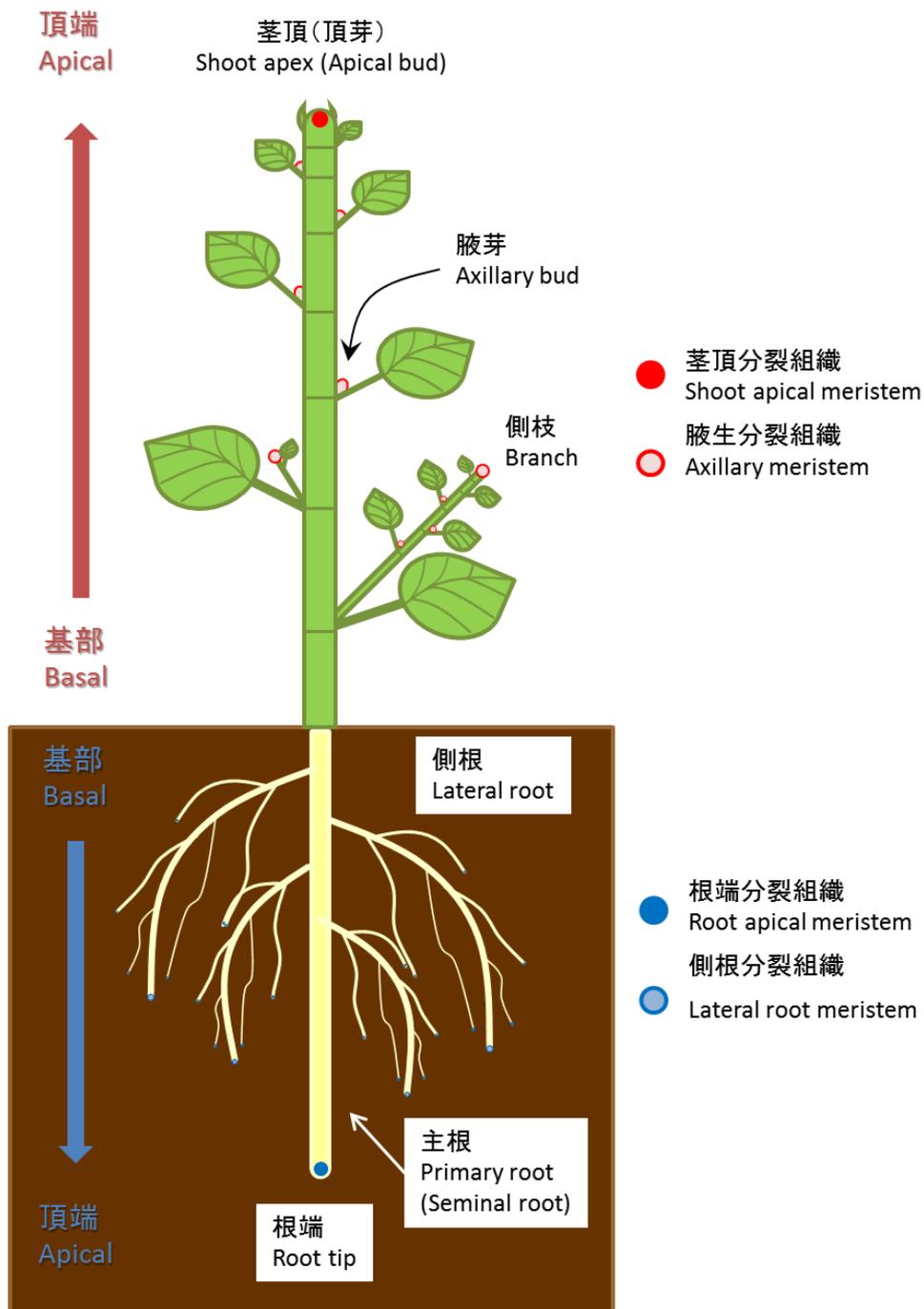
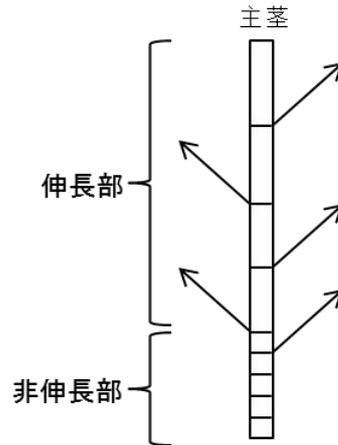


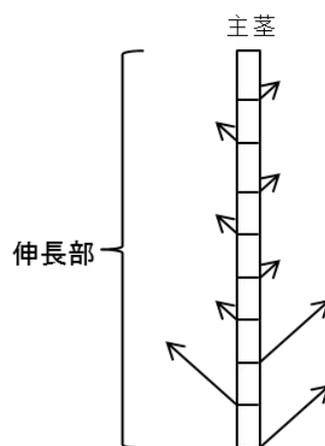
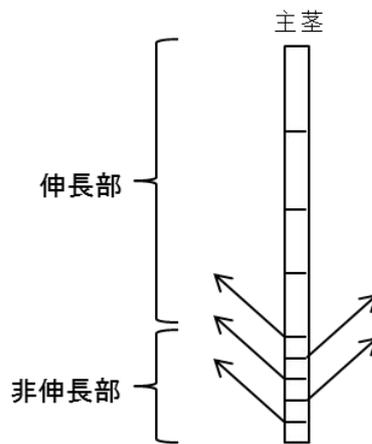
図 1 植物の基本的形態

しかし、葉の腋に形成された全ての腋生分裂組織が、必ず成長して側枝になるわけではない。(もし、形成された全ての腋性分裂組織が伸長すれば、植物体の成長とともに側枝は指数関数的に増加し、植物体は茎と葉が密生したいわゆる「てんぐ巢症状」のような形態になるはずである。)実際には、ほとんどの腋生分裂組織は数枚の葉を分化させた「腋芽」と呼ばれる状態になった後、成長を停止して「休眠(dormancy)」と呼ばれる状態になる。休眠した腋芽は環境条件が変化した時や植物体が傷つくなどした時に再び成長を開始することが知られている。このように、腋生分裂組織の形成ならびに腋芽の成長／休眠が高度に制御されることで、側枝のパターンは無秩序になることなく、植物体全体で調和の取れた形態を保っている(Beveridge et al. 2003)。

側枝のパターンは植物種によって大きく異なっており、このパターンの形成には、成長する腋芽の数が大きく影響している。休眠する腋芽が多ければ、一輪菊のように主軸がはっきりとした形態となり、成長する腋芽が多ければ、小菊のように多数の枝を展開する形態となる。また、成長する腋芽の数だけではなく、腋芽が成長するタイミングや植物体における位置も、側枝のパターンを決定する上で重要な意味を持っている。植物形態学で頻繁に利用されているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、イネ(*Oryza sativa*)、エンドウマメ(*Pisum sativum* L.)の3種を例に見てみると、シロイヌナズナは栄養成長期にほとんど茎が伸長しない偽ロゼット型と呼ばれる草型であり、栄養成長期には腋芽はほとんど成長することがない。しかし、生殖成長期に入ると茎が伸長し始め、伸長した茎の各節と非伸長部の上位数節の腋芽が成長し、側枝となる(図 2)。対してイネは、シロイヌナズナと同じ偽ロゼット型の草型であるが、側枝は基本的に、栄養成長期に非伸長部の下位～中位節から発生し、非伸長部の上位節や伸長部の節からはほとんど発生することがない(図 2)。最後にエンドウマメは、シロイヌナズナ、イネと違って茎の各節間が伸長する直立型の草型であるが、側枝はイネと同様に、下位～中位の数節から発生し、上位節ではほとんどの腋芽は伸長しない(図 2)。



Aguilar-Martinez et al. 2007, The Plant Cell, Vol. 19より改変して抜粋



Morris et al. 2001, Plant Physiol. Vol.125 より改変して抜粋

図 2 シロイヌナズナ、イネ、エンドウの側枝パターン

主茎中の線は各節、矢印は各節から伸長した側枝を示す。

作物であるイネにおいては、側枝のパターンは形態学的な意味だけではなく、農学的にも重要な意味を持っている。単子葉植物であるイネは各節に一枚ずつ葉を形成し、それぞれの葉の腋に1つの腋芽を形成する。他の植物種と同様に、形成された腋芽が成長すると側枝になるが、イネを含む単子葉類の作物種では、側枝のことを特に「分げつ」と呼んでいる。分げつにはそれぞれに穂が形成されるため、分げつ数はイネの収量構成要素の1つである「単位面積あたりの穂数」に強く影響を与える。そのため、分げつ数は、イネの栽培において成長を判断する重要な指標になっている。栽培学的には苗を植えて活着した後、分げつが発生する期間を分げつ期と呼び、分げつが一番多くなった時期を最高分げつ期と呼ぶ。最高分げつ期を過ぎた後に発生した分げつは、穂をつけない無効分げつになり、枯死することが多い(星川 1975)。従って、最高分げつ期までに十分かつ最適な分げつ数を確保することが、イネの栽培技術上での重要なポイントだと言われている。

分げつ数は栽植密度、施肥量、水深、気温など様々な要因によって影響を受けるため、分げつ数を制御している遺伝的背景の探索には量的形質座位(QTL; Quantitative Trait Locus)解析が主に用いられてきた(Wu et al. 1999, 小林ら 2002, Yamagishi et al. 2004)。また、QTL解析とは異なるアプローチとして分子遺伝学的な研究も進められており、イネの分げつ数を制御している遺伝子の一つとして *FINE CULM1* (*FC1*) 遺伝子が発見されている(Takeda et al. 2003, Goto et al. 2005)。*fc1* 変異体は腋芽の成長抑制が弱くなり、分げつ数が増加した表現型を示すため、腋芽の成長を抑制する働きをしていると考えられている(Takeda et al. 2003, Goto et al. 2005)。*FC1* 遺伝子は TCP ドメインを持つ転写因子をコードしており、トウモロコシの *TEOSINTE BRANCHED 1* (*TBI*) 遺伝子のオーソログである(Doebley et al. 1997, Takeda et al. 2003)。*TBI* 遺伝子はトウモロコシの栽培化に寄与した QTL の解析から、分げつを減少させるものとして単離された遺伝子である(Doebley and Stec 1991, Doebley et al. 1997)。*TBI* 遺伝子および *FC1* 遺伝子は腋芽で発現しており、発現量が増加すると、腋芽の成長が抑制される(Hubbard et al. 2002, Takeda et al. 2003)。

この他に腋芽の成長/休眠の制御において古くから研究されているのが、

「頂芽優勢 (apical dominance)」と呼ばれる現象である (図 3)。頂芽優勢とは、頂芽が存在しているときは頂芽の成長が優先され、腋芽の成長が抑制されるという現象であり、多くの高等植物に存在することが知られている (Cline, 1991, 1996)。物理的な損傷により頂芽が失われると、頂芽より下に存在する腋芽が成長を開始することから、腋芽の成長を抑制するシグナルが頂芽から出ていると古くから考えられていた。

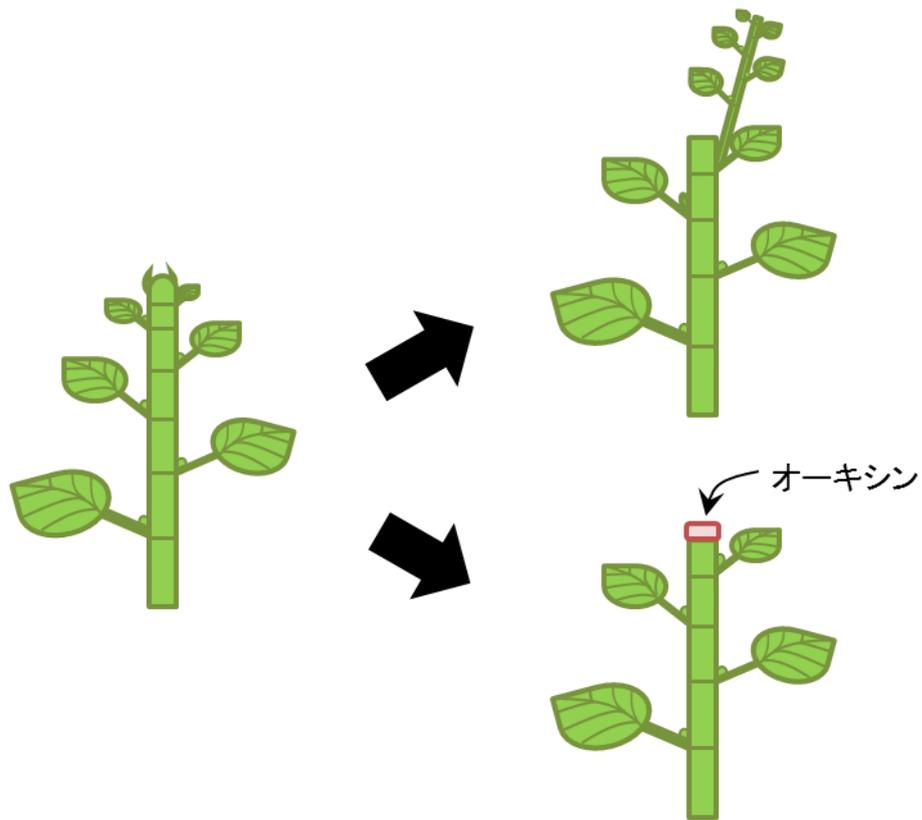
そのシグナルの1つとして考えられているのが植物ホルモンのオーキシンである。Thimann と Skoog (1933) はソラマメを用いて、切除した頂芽の代わりにオーキシンを塗布すると、腋芽の成長が抑制される作用があることを明らかにした。またオーキシンの輸送阻害剤を頂芽の直下に塗布することで、腋芽が成長を開始することから、頂芽から求基的に輸送されるオーキシンが腋芽の成長を抑制していると考えられた (for reviews see Shimizu-Sato and Mori 2001, Leyser 2003)。

オーキシンによる頂芽優勢の制御が発見された当初は、頂芽で生産されたオーキシンが、茎を移動して腋芽に直接入り、腋芽のオーキシン濃度を上昇させることで腋芽の成長を抑制すると考えられていた。しかしながら、頂芽からのオーキシンは直接腋芽に入ることはないことが明らかにされ (Morris, 1977)、オーキシンを直接腋芽に塗布しても成長が阻害されることはないことも明らかになった。さらに、頂芽を切除することによって腋芽の IAA 量は顕著に増加することが明らかになったことから (Gocal et al. 1991)、オーキシンは腋芽に直接入って成長を抑制するのではなく、何らかの二次因子を介して腋芽の成長を抑制していると考えられるようになった。

オーキシンの下流で腋芽の成長を制御する因子の1つとして考えられているのが、同じく植物ホルモンの一種であるサイトカイニンである (for review see Cline 1991)。サイトカイニンを休眠している腋芽に直接与えると、頂芽が存在しているにも関わらず腋芽は成長する。また人為的にサイトカイニンの生合成量を増加させた形質転換体は、頂芽優勢が低下し、腋芽が増加した表現型を示す (Medford et al. 1989, Hewlett et al. 1994)。さらに、頂芽を除くことによってサイトカイニン合成が促進され (Nordstrom et al. 2004)、オーキシンを塗布することによってサイトカイニンの合成が抑制されることが報告さ

れており(Tanaka et al. 2006)、近年ではサイトカイニンの生合成を抑制することが頂芽優勢におけるオーキシンの役割の1つと考えられるようになった。

(a)



(b)

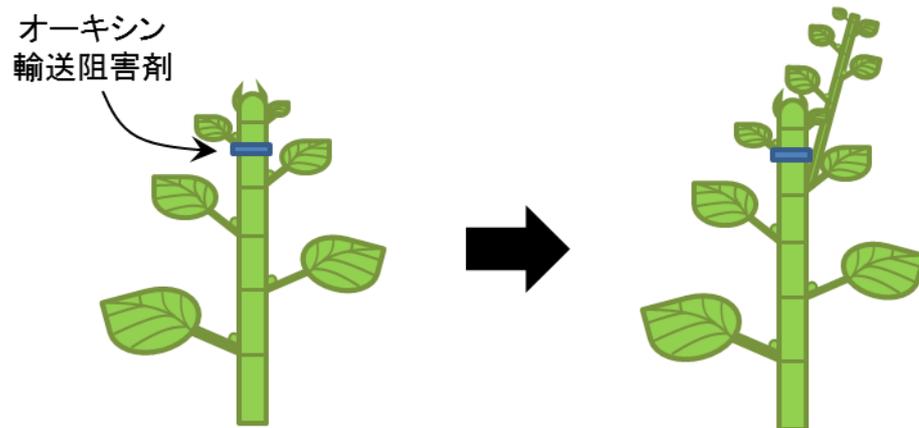


図 3 頂芽優勢とオーキシンの働き

(a) 頂芽を取り除くと、切断面に近い腋芽が伸長する。切断面にオーキシシンを塗布すると、腋芽の伸長は阻害される。

(b) 茎にオーキシシン輸送阻害剤を塗布すると、その下の腋芽が伸長する。

さらに近年、シロイヌナズナ、エンドウ、ペチュニア、イネを用いた分子遺伝学的な研究により、オーキシンやサイトカイニンとは異なる新たな因子の存在が明らかにされてきた。シロイヌナズナの *more axillary branching (max)*、エンドウの *ramosus (rms)*、ペチュニアの *decreased apical dominance (dad)* は側枝の増加とわい性を示す変異体である (Beveridge et al. 1996, Napoli 1996, Sternberg et al. 2002)。これらの変異体に野生型の地下部を接木すると、地上部の表現型が回復することから、地下部から地上部へ移動して腋芽の成長を抑制する新たなホルモン様物質が存在することが明らかになった (Napoli 1996, Beveridge et al. 1997, Foo et al. 2001, Turnbull et al. 2002)。

シロイヌナズナにおいて、この新規ホルモン様物質が腋芽の成長を抑制するためには少なくとも *MAX1*、*MAX2*、*MAX3*、*MAX4* の 4 遺伝子が必要であることが明らかになった (Stirnberg et al. 2002, Turnbull et al. 2002)。また、エンドウにおいては *RMS1*、*RMS2*、*RMS3*、*RMS4*、*RMS5* の 5 遺伝子が新規ホルモン様物質の経路で働いていることが明らかになった (Morris et al. 2001)。さらに、シロイヌナズナを用いた接木の組み合わせ実験から *MAX1*、*MAX3*、*MAX4* は新規ホルモン様物質の生合成に関わっていると考えられ、F-box Leucine-Rich Repeat タンパク質をコードする *MAX2* は受容もしくは伝達に関わっていると考えられた (Stirnberg et al. 2002, Turnbull et al. 2002, Booker et al. 2005)。*MAX3* と *MAX4* はカロテノイド酸化開裂酵素 (CCD; Carotenoid Cleavage Dioxygenase) である CCD7 および CCD8 をコードしており、新規ホルモン様物質はカロテノイドから合成される可能性が強く示唆された (Sorefan et al. 2003, Booker et al. 2004, Schwartz et al. 2004)。カロテノイド蓄積型大腸菌株に CCD7 を発現させると、トランス型 β カロテンが代謝され、さらにその代謝産物が CCD8 により分解されて、13 アポ β カロテンが生成されることが明らかになっているため (Schwartz et al. 2004)、*MAX4* (CCD8) は *MAX3* (CCD7) の下流で新規ホルモン様物質の生成に関与していると考えられている。

エンドウの *RMS1* 遺伝子とペチュニアの *DAD1* 遺伝子は *MAX4* のオーソログであることが明らかになっており (Sorefan et al. 2003, Snowden et al.

2005)、さらに *RMS4* が *MAX2* の、*RMS5* が *MAX3* のそれぞれオーソログであることが明らかになった (Johnson et al. 2006)。これらの結果は新規ホルモン様物質による腋芽の成長抑制がシロイヌナズナ、エンドウ、ペチュニアといった高等植物種間で保存されていることを示している。

そこで、イネの分げつ制御においても、シロイヌナズナ、エンドウ、ペチュニアと同様に新規ホルモン様物質による腋芽の成長抑制が関与していると考え、イネの分げつ制御機構を分子遺伝学的に明らかにするために、*max*、*rms*、*dad* 変異体と同様にわい性と側枝の増加という2つの表現型を示す変異体について解析を始めた。イネの総合データベースである Oryzabase (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>) には突然変異体に関するデータベースがあり、その中にはわい性と分げつ数の増加の両方の表現型を示す「分げつわい性変異体 (Tillering Dwarf)」が登録されている (Kinoshita and Takahashi 1991)。これまでに、分げつわい性変異体のうち、顕著に分げつ数が増加する5つの劣勢変異体 *dwarf3* (*d3*; 分げつわい稲)、*dwarf10* (*d10*; 奇形晩神力)、*dwarf14* (*d14*; 上川分わい)、*dwarf17* (*d17*; 多分げつ型)、*dwarf27* (*d27*; 分げつ稲) について解析し、これらの変異体では腋芽の形成は正常で、腋芽の休眠が弱くなることで分げつが増加していることを明らかにしている (Ishikawa et al. 2005)。さらに *d3* の原因遺伝子を単離し、*D3* が F-box LRR タンパク質をコードしており、*MAX2/RMS4* のオーソログであることを明らかにしている (Ishikawa et al. 2005)。しかし、残る *d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体は原因遺伝子が解明されていなかった。そこで著者はイネの分げつ制御機構を分子遺伝学的に解明することを目的として、*d3*、*d10*、*d14* 変異体を中心に表現型の解析と分子遺伝学的な解析を行った。第1章においては、表現型の解析および *d10*、*d14* の原因遺伝子の単離と発現解析、ならびに、イネにおける頂芽優勢と *D3*、*D10*、*D14* 遺伝子の関連について述べる。その後、著者を含む研究グループは新規ホルモン様物質が「ストリゴラクトン」であることを明らかにしたため (Umehara et al. 2007)、第2章ではストリゴラクトン経路における *D14* 遺伝子の機能解析を中心に述べる。最後に第3章ではストリゴラクトンの新たな機能としてイネの根の成長に及ぼす影響について解析した結果を述べる。

第 1 章

イネ分げつわい性変異体の表現型解析および分子遺伝学的解析

1-1 序論

イネは人類にとって重要な作物であり、その分げつ性は収量に強く影響することが知られていたため、イネの分げつについては古くから作物学的な研究が進められてきた。また、近年では遺伝学的な研究も進められ、分げつ数に影響する QTL の解析が進められている他 (Wu et al. 1999, 小林ら 2002, Yamagishi et al. 2004)、分げつ数を制御する遺伝子 *fine culm 1 (fc1)* も単離されていたものの (Takeda et al. 2003)、イネの分げつ制御における分子遺伝学的メカニズムはほとんど明らかになっていなかった。イネの総合データベースである Oryzabase (online: <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>) には突然変異体に関するデータベースがあり、その中には稈長が短くなる「わい性」と、分げつ数の増加 (多分げつ性) の両方の表現型を示す「分げつわい性変異体 (Tillering Dwarf)」が登録されている (Kinoshita and Takahashi 1991)。分げつわい性変異体のうち、顕著に分げつ数が増加する 5 つの劣勢変異体 *dwarf3 (d3; 分げつわい稲)*、*dwarf10 (d10; 奇形晩神力)*、*dwarf14 (d14; 上川分わい)*、*dwarf17 (d17; 多分げつ型)*、*dwarf27 (d27; 分げつ稲)* について解析した結果、これらの変異体 (以降、まとめて *d* 変異体と呼ぶ) では腋芽の形成は正常であり、通常は休眠する腋芽が伸長した結果として分げつが増加していることを既に報告している (Ishikawa et al. 2005)。さらに *d3* の原因遺伝子を単離し、*D3* が F-box LRR タンパク質をコードしており、シロイヌナズナ、エンドウマメにおいて腋芽の休眠制御に関与していることが明らかになっていた *MAX2/RMS4* のオーソログであることを報告している (Ishikawa et al. 2005)。

これらの結果から、*d* 変異体の原因遺伝子である *D3*、*D10*、*D14*、*D17*、*D27* は腋芽の休眠制御に関与していることが示唆されていたが、

それぞれの遺伝子がどのように腋芽の休眠制御に関与しているのかは不明であった。また、残る *d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体の原因遺伝子は解明されていなかった。そこで、*d10*、*d14* 変異体の原因遺伝子を単離し、分子遺伝学的解析を用いて *D3*、*D10*、*D14* の機能を解明することを試みた。さらに、頂芽優勢と *D3*、*D10*、*D14* の関係について解明することを目指し、イネの頂芽優勢についても解析を行った。

1-2 材料と実験方法

1-2-1 植物体材料

本研究ではイネの野生型として *Oryza sativa* cv. Shiokari (シオカリ) と *Oryza sativa* cv. Taichung65 (台中 65 号) を用いた。*dwarf 3-1* (*d3-1*)、*dwarf 10-1* (*d10-1*)、*dwarf 14-1* (*d14-1*)、*dwarf 17-1* (*d17-1*)、*dwarf 27-1* (*d27-1*) は、シオカリを遺伝的背景とする *Id* 系統 (Kinoshita and Takahashi 1991) を用いた。*Id* 系統は高牟禮逸朗博士 (北海道大学) より提供していただいた。*dwarf 10-2* (*d10-2*) はイネゲノムリソースセンターより得た *Oryza sativa* cv. Nipponbare (日本晴) の組織培養由来の集団から得た。*fine culm 1* 変異体として台中 65 号を遺伝的背景とする *fc1-1* (Takeda et al. 2003) と *Oryza sativa* cv. Nourin 8 (農林 8 号) を遺伝的背景とする *fc1-2* を用いた。*fc1-1* は上口智治博士 (名古屋大学) より提供していただいた。*fc1-2* は根本圭介博士 (東京大学) より提供していただいた。

D10 遺伝子ならびに *D14* 遺伝子のマップベースドクローニングには *d10-1* ならびに *d14-1* と *Oryza sativa* cv. Kasalath (カサラス) の交配第 2 世代の中から、*d10-1* および *d14-1* の表現型を示す個体を選抜して解析に用いた。*d10-1* ならびに *d14-1* とカサラスの交配は前川雅彦博士 (岡山大学) に行っていた。表現型の解析に用いた植物は佐々木 (1999) に従って、夏季の温室で育成した。その他の解析に用いた植物体は温室または人工気象室 (25 °C、16 時間明条件、8 時間暗条件) で育成した。

1-2-2 イネの形質転換

イネの形質転換は寺田（2005）に従い、イネ種子から誘導したカルスに、形質転換用ベクターを導入したアグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*, EHA104 株）を感染させ、目的の形質転換体を得た。

1-2-3 ベクターの作成

1-2-3-1 *FC1 promoter::GUS* ベクター

GATEWAY Cloning (Invitrogen, 中川 2005) を利用して作成した。5' -CACCACGACGGATCCTAGTTGGAG-3' および 5' -CTTTACTGATGGGACTCCTT-3' のプライマーセットを用いて、日本晴のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、約 3.1 kbp の DNA を *FC1 promoter* 配列として得た。得られた *FC1 promoter* 配列を pENTR/D-TOPO Cloning Kit (Invitrogen 製) を利用して pENTR ベクターに導入し、エントリーベクターを得た。ディスティネーションベクターには中川強博士(島根大学)より提供していただいた pGWB3 (no promoter, GUS) を用いた。制限酵素 XhoI (Takara 製) で切断したエントリーベクターと、ディスティネーションベクターで LR 反応を行い、*FC1 promoter::GUS* ベクターを得た。LR 反応には LR clonase (Invitrogen 製) を用いた。

1-2-3-2 *d10-1* 相補用ベクター

イネの BAC クローン OSJNBa0014k08 を *SpeI* (Takara 製) によって切断し、0.5% アガロースゲルで電気泳動して DNA 断片を分離した。アガロースゲルから *OsCCD8* とその上流および下流配列を含む約 6.7 kbp の DNA 断片を回収して、*SpeI* で切断して脱リン酸化した pPZP ベクター (Hajdukiewicz et al. 1994) にライゲーションした。ライゲーションには T4 DNA Ligase (Takara) を用い、脱リン酸化には Alkaline Phosphatase (Takara 製) を用いた。最終的に得られたバ

イナリーベクターを *d10-1* 相補用ベクターとして用いた。

1-2-3-3 *d14-1* 相補用ベクター

イネの BAC クローン OSJNBa0009J13 を *Bam*HI および *Xba*I (Takara 製) によって切断し、0.5% アガロースゲルで電気泳動して DNA 断片を分離した。アガロースゲルから D14 候補遺伝子とその上流および下流配列を含む約 4.9 kbp の DNA 断片を回収して、*Bam*HI および *Xba*I で切断した pPZP ベクター (Hajdukiewicz et al. 1994) にライゲーションした。ライゲーション、脱リン酸化は前述の方法で行った。最終的に得られたバイナリーベクターを *d14-1* 相補用ベクターとして用いた。

1-2-3-4 *D10 promoter::GUS* ベクター

5' -CACCAGCACACATGCAAGAACGTC-3' および 5' -CTGCAGCATAGC-GGGAGAC-3' のプライマーセットを用いて、日本晴のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、約 3.0 kbp の DNA を D10 promoter 配列として得た。得られた D10 promoter 配列を用いて、FC1 promoter::GUS と同様の方法で、D10 promoter::GUS ベクターを作成した。

1-2-3-5 *D14 promoter::GUS* ベクター

5' -GGATCCCCTTGTCTAAGACC-3' および 5' -CACACCAGCGCGG-CGGATTG-3' のプライマーセットを用いて、BAC クローン OSJNBa0009J13 を鋳型として PCR を行い、約 2.7 kbp の DNA を D14 promoter 配列として得た。得られた D14 promoter 配列を用いて、FC1 promoter::GUS、D10 promoter::GUS と同様の方法で、D14 promoter::GUS ベクターを作成した。

1-2-3-6 *35S::D10 : GFP*

GATEWAY Cloning (Invitrogen, 中川 2005) を利用して作成した。播種後 13 日の *d3-1* 変異体の地上基部より採取、合成した cDNA をテ

ンプレートにして、*D10* 遺伝子の翻訳領域を PCR(95 °C・30 秒 : 60 °C・30 秒 : 72 °C・2 分、30 サイクル) で増幅した。5' -CACCATGTCTCCCGCTATGCTGC-3'、5' -CTTGCTGTTCTTTTCCTGG-3' をプライマー配列として使用した。増幅した産物を pENTR/D-TOPO Cloning Kit (Invitrogen 製) を利用して pENTR ベクターに導入し、エントリークローンを作成した。ディステイナーションベクターには中川強博士(島根大学)より提供していただいた pGWB5 (35S promoter, CsGFP) を用いた。制限酵素 XhoI (Takara 製) で切断したディステイナーションベクターと作成したエントリークローンをを用いて LR 反応を行い、*35S::D10 : GFP* ベクターを得た。LR 反応には LR clonase (Invitrogen 製) を用いた。

1-2-4 GUS 染色

FC1 promoter::GUS 形質転換体の地上基部、*D10 promoter::GUS* 形質転換体の地上基部および根、*D14 promoter::GUS* 形質転換体の地上基部、に GUS 染色溶液を 24 時間浸透させて GUS 活性のある細胞を染色した。染色した組織は 70%エタノール溶液に 2 日間浸漬して透明化した後、実体顕微鏡で観察した。GUS 染色溶液の作成は槻木ら (2005) に従った。

1-2-5 マップベースドクローニング

d10-1 ならびに *d14-1* 変異体とカサラスの交配第 2 世代より得られた変異体の葉から簡易抽出法 (川崎 1997) によってゲノム DNA を採取し、Simple Sequence Repeat (SSR) マーカー (McCouch et al. 2002) および derived CAPS (dCAPS) マーカーの PCR に用いた。dCAPS マーカーは Shen et al. (2004) および決定した塩基配列 (後述) をもとに作成した。*D14* 遺伝子のマップベースドクローニングに用いた IM4 は後述の方法で塩基配列を決定し、一塩基置換を検出した。SSR および dCAPS マーカーの PCR は ExTaq (Takara) を用いて、95 °C・30 秒 : 55 °C・30 秒 : 72 °C・1 分の条件で 30 サイクル行った。増

幅産物および制限酵素処理した産物を4%のアガロース (Solana 製) で電気泳動し、エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) で染色して多型を確認した。

1-2-5-1 *D10* 遺伝子のマップベースクローニング用プライマー

RM243 SSR F: 5' -GATCTGCAGACTGCAGTTGC-3'
R: 5' -AGCTGCAACGATGTTGTCC-3'

RM5638 SSR F: 5' -GGCTTCCTCATCGCCATC-3'
R: 5' -CTGAGCAGCATTCCAGTCTG-3'

RM237 SSR F: 5' -CAAATCCCGACTGCTGTCC-3'
R: 5' -TGGGAAGAGAGCACTACAGC-3'

RM8097 SSR F: 5' -TACATACACGTTTCATGTGCC-3'
R: 5' -CGAGCGTAGGAAGACTACC-3'

M1152 SSR F: 5' -TGGGTGAGTTTTCTGAAGCA-3'
R: 5' -AGGCCTAGCCTTCACCCTAA-3'

M1182 SSR F: 5' -GCTTTAATACGCAAGGCAGAA-3'
R: 5' -GTCCAGATCGACCACTTCGT-3'

IM1 SSR F: 5' -CCAAAATAAATTTTACCAAATTTTGAC-3'
R: 5' -AAGAAAAAGAACCCAACCTTCTGG-3'

RM1095 SSR F: 5' -CAGGTGCTGCCTCGAGAAC-3'
R: 5' -AATCGTGTGACAGCCTGATG-3'

IM2 SSR F: 5' -GTCGTTCTCTCGGGACAGG-3'
R: 5' -AGGCTACTCACCGTGTGACC-3'

IM3 SSR F: 5' -CCTGCCTAGTGGACCGAGT-3'
R: 5' -CCATCTCTGCTCCCTCTCAG-3'

RM3411 SSR F: 5' -CGTCCTCCAGATGGTCCAC-3'
R: 5' -ATGGGACTCCCGTACTCCTC-3'

1-2-5-2 *D14* 遺伝子のマップベースクローニング用プライマー

RM4108 SSR F: 5' -GTCCCTCGCTTTATATCTAG-3'

R: 5' -CAACTCTGCTAAACGAATTA-3'
 M3014 SSR F: 5' -AATCCGGTTGAGGTTGACAC-3'
 R: 5' -ATTTTCAGTTCGGCGAGAGG-3'
 M3020 SSR F: 5' -GAATGCACTTAGGGTCAAAAG-3'
 R: 5' -AACTTGGCGTGGCACATATT-3'
 RM232 SSR F: 5' -CCGGTATCCTTCGATATTGC-3'
 R: 5' -CCGACTTTTCCTCCTGACG-3'
 M3069 SSR F: 5' -AGGGACGAATGGAGTATTACG-3'
 R: 5' -AAGAATTGCCGGTCTCAATG-3'
 RM16 SSR F: 5' -CGCTAGGGCAGCATCTAAA-3'
 R: 5' -AACACAGCAGGTACGCGC-3'
 RM55 SSR F: 5' -CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG-3'
 R: 5' -TCCCGGTTATTTTAAGGCG-3'
 M3026 SSR F: 5' -TGAGTTAAACCCCTGAAAACAG-3'
 R: 5' -CCCATTTGATTGTTCTCGAAAG-3'
 M3029 SSR F: 5' -AGAGCGAAACCCTAGGCAAC-3'
 R: 5' -CAATCCTAGCTATAACCTGGACA-3'
 IM1 SSR F: 5' -GATGTCGCGAAACAAAATCC-3'
 R: 5' -CGTCCGTAGCTAAAAGACTG-3'
 IM2 dCAPS (ScaI) F: 5' -CCCAATATTTTCAGTTAGTGGTGA-3'
 R: 5' -GCTAGGAGAATTGGGGGTTT-3'
 IM3 dCAPS (PmaCI) F: 5' -CAGCCGACTAAAATCTTTCTT-3'
 R: 5' -CTGCTGCTCGGGCTACTG-3'
 IM4 一 塩基置換 F: 5' -TTCAAACCTCGACGTGTGGAC-3'
 R: 5' -CGTTCGGTCTTTTTGGTCTC-3'
 IM5 dCAPS (SphI) F: 5' -TCGCTAGCTACTTTTCTGATGCGGATGCATG-3'
 R: 5' -TGTGTTTTGTCCGATTGACC-3'
 IM6 dCAPS (SspI) F: 5' -CCCACATTTTCAAATTCAAGGCGTGTAATA-3'
 R: 5' -GTCAACCCAATGAGGCAAAT-3'

1-2-6 DNA塩基配列の決定

CTAB法(番 1997)によって採取したゲノムDNAをテンプレートにして、PCRダイレクトシーケンスをおこなった。*D10*および*D14*配列のPCR産物をテンプレートにして、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems製)を用いたシーケンスPCR(96℃・10秒:50℃・5秒:60℃・4分、25サイクル)を行った。その後、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems製)を用いて塩基配列を決定し、Genetyx-win ver.5 (Software Development Corporation製)を用いて配列の比較を行った。

1-2-7 RT-PCR

播種後14日(第4葉抽出中)の植物体から成熟葉身、根、根端、第2節の腋芽、茎頂を採取した。第1節の腋芽は第3葉抽出中の個体より採取した。穂ばらみ期の野生型より穂を採取した。*d*変異体と*fc1*の基部は播種後14日の個体から、冠根を含まないように採取した。採取したサンプルを凍結粉碎し、total RNAを抽出した。total RNAの抽出にはRneasy Plant minikit (QIAGEN製)またはAgilent Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies製)を用いた。混入したゲノムDNAの分解にはDNaseI Amplification Grade (Invitrogen製)を用いた。First-strand cDNAの合成にはSuperScriptII RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen製)を用いた。合成したFirst-strand cDNAをテンプレートにしてPCRを行った。PCRは95℃・30秒:57℃・30秒:72℃・45秒の設定で行った。使用したプライマー配列を以下に記した。

以下

<i>FC1</i>	F: 5' - GCCGGATGCAAGAAATC -3'
	R: 5' - TCAGGAGTAGTGCCGCGAA -3'
Actin	F: 5' - CAATCGTGAGAAGATGACCC -3'
	R: 5' - GTCCATCAGGAAGCTCGTAGC -3'

OSH1 F: 5' - CAGAGCTACCTGAGATTGATGC -3'
R: 5' - TCGATCTAGGTCATGGTAG -3'
D10 F: 5' - GGTAGCAACGAGAGGCAGTT -3'
R: 5' - TCGACCTTGGTGAGCGTGTT -3'
D10like F: 5' - CACGTCATGTGCAAGTCC -3'
R: 5' - TTGATGCTGCACATGTCC -3'
D14 F: 5' - GTGCTGTCGCATGGCTTC -3'
R: 5' - GCAGGTCGTCGACGTAGG -3'
D3 F: 5' - TTCGGCCTACTCTCAAGGAA -3'
R: 5' - CACAGCTTCACTGAGGTCCA -3'
HTD1 F: 5' - GGCAACAGGATCAAGCTC -3'
R: 5' - AGACGTCGACCTTCACCA -3'
OsIAA20 F: 5' - CACGCTCCACCTTATGTTCC -3'
R: 5' - ACAGCGAGGTGACTCTACGG-3'

以上

1-2-8 *D10:GFP*、*D14:GFP* の細胞内局在の観察

上記の方法で作成した *35S::D10:GFP*、*35S::D14:GFP*、*35S::GFP:D14* ベクターおよび *35S::S9:DsRed2* ベクターを、パーティクルガンを用いてタマネギの表皮細胞に導入した。導入した細胞を一晩培養して、細胞内の蛍光を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus 製) で観察した。*35S::S9:DsRed2* ベクターは東京大学の堤伸浩博士より分与していただいた。

1-2-9 Decapitation 処理 (除穂処理)

出穂直後に穂首を止葉の葉鞘ごと切断して、Decapitation 処理とした。穂の先端の花が開花した時を出穂とみなした。穂首を切断した後、切断面に 1% (1 g/100ml) の IAA を含むラノリンを 50 μ l 塗り、オーキシン処理とした。IAA を含むラノリンは試験期間中、毎日交換した。Decapitation 処理およびオーキシン処理を行った 7

日後に上位 5 節の腋芽の長さを測定し、出穂時の腋芽の長さとの差を伸長した長さとした。出穂時の腋芽の長さは、Decapitation 処理およびオーキシン処理を行った個体とは別に、複数個体を無作為に選び、出穂時の上位 5 節の腋芽の長さを測定した。野生型を用いた実験では各処理を 9 サンプルずつ行い、最大および二番目に大きい 2 サンプルならびに最小および二番目に小さい 2 サンプルを除いた、中央 5 サンプルの平均を解析に用いた。d10 変異体を用いた実験では各処理を 14 個体ずつ行い、野生型と同様に最大および二番目に大きい 2 サンプルならびに最小および二番目に小さい 2 サンプルを除いた、中央 10 サンプルの平均を解析に用いた。

1-2-10 オーキシン処理

人工気象室内で育成した播種後 13 日の植物体を、100ml の IAA 水溶液 (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) に 3 時間浸した。Mock 処理として、少量のエタノールを溶かした 100ml の水に植物体を浸した。

1-2-11 Real-time PCR

Real-time PCR 試薬には *Power SYBR Green PCR Master Mix*(QIAGEN) を用い、PCR および解析には 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。PCR は Initial step を 95 $^{\circ}$ C \cdot 15 分、denaturation を 95 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒、annealing を 56 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、extension を 72 $^{\circ}$ C \cdot 35 秒、76 $^{\circ}$ C \cdot 35 秒、80 $^{\circ}$ C \cdot 35 秒の設定で 50 サイクル行った。内部標準遺伝子として *Ubiquitin* を用いた。*OsIAA20* は 80 $^{\circ}$ C、*Ubiquitin* は 76 $^{\circ}$ C で蛍光強度の測定を行った。プライマーには、*OsIAA20* は F: 5' - TGGGCAACAAGAGGAGGAAG -3' および R: 5' - CGTATGAGCCGAGGATGGA-3'、*Ubiquitin* は F: 5' - AACCACTGAGGCCCAAGA -3' および R: 5' - ACGATTGATTTAACCACTCCATGA -3' を使用した。

1-3 結果

1-3-1 *d* 変異体と *fc1* 変異体の表現型の比較

dwarf 3-1 (*d3-1*)、*dwarf 10-1* (*d10-1*)、*dwarf 14-1* (*d14-1*)、*dwarf 17-1* (*d17-1*)、*dwarf 27-1* (*d27-1*) の 5 つの変異体（以下 *d* 変異体と表記する）は分げつ数が著しく増加すると同時に、稈長が著しく短くなる「分げつわい性変異体 (tillering dwarf mutant)」である (Ishikawa et al. 2005、図 4a)。*d* 変異体では腋芽の形成は正常であるが、通常は休眠する腋芽が伸長することにより分げつが増加すると考えられている (Ishikawa et al. 2005)。

まず、*d* 変異体において分げつ数がどのように増加するのかを把握するために、*d* 変異体の総分げつ数を、播種から出穂まで経時的に調査した。なお、分げつ数の計測は、慣行に則り、葉の腋から分げつが出現したときを分げつの発生とした。

野生型のイネは通常、第 5 葉が展開する頃に第 2 葉脇から分げつが発生し、その後、本葉が一枚展開するごとに、第 3、4 葉の順に分げつが発生する（同伸葉同伸分げつ理論）。総分げつ数は幼穂形成期のころに最大となり（最高分げつ期）、その後は分げつがほとんど発生しなくなる（星川，イネの成長）。しかし、野生型（しおかり）において分げつがほとんど発生しなくなった播種後 40 日以降においても、*d* 変異体は分げつを発生し続け、野生型と *d* 変異体の分げつ数の差は出穂期にあたる播種後 59 日で最大になった (*d3-1*, 137; *d10-1*, 189; *d14-1*, 151; *d17-1*, 166; *d27-1*, 146; しおかり, 28; 図 4b)。特に *d* 変異体では、野生型ではほとんど発生しない 3 次分げつ、4 次分げつが多く発生しており (data not shown)、播種後 40 日までは、形成された腋芽が全て伸長したと仮定した場合とほぼ同じ数の分げつが発生していた。

イネにおいては、*d* 変異体以外に分げつ数が増加する変異体として *fine culm 1* (*fc1*) 変異体が知られている (Takeda et al. 2003, Goto et al. 2005)。そこで、*d* 変異体と *fc1-1* 変異体の表現型を比較した。*fc1-1* も野生型（台中 65 号）に対してより多くの分げつを

発生した。しかしながら、*fc1-1* の分けつ数は最大でも野生型の 2 倍程度であり、*d* 変異体よりも分けつ数の増加は穏やかであった (*fc1-1*, 100; 台中 65 号, 46; 図 4b)。

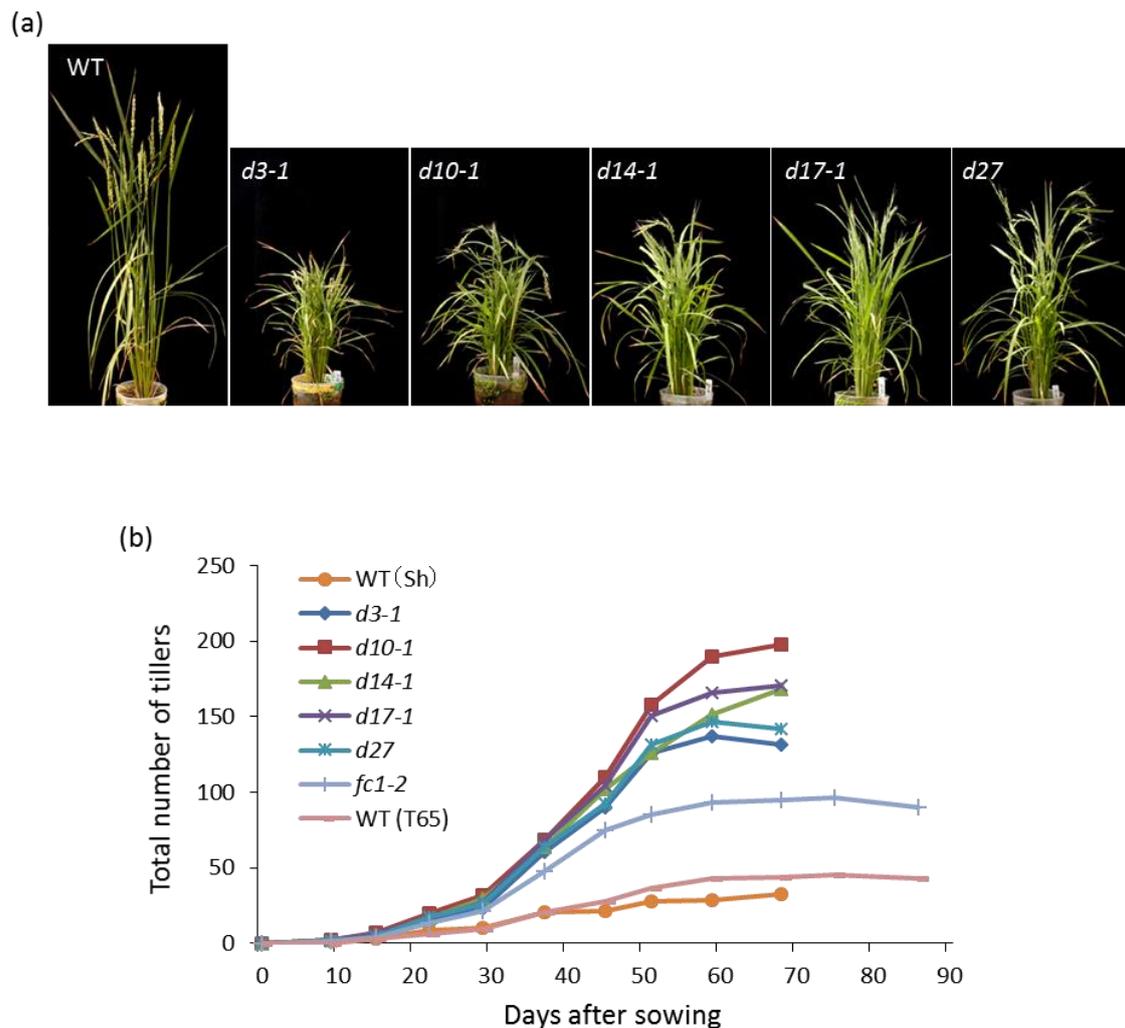


図 4 *d* 変異体 (*d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27-1*) の表現型

(a) 播種後 10 週目の *d* 変異体。左から WT (シオカリ), *d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27-1*。

(b) *d* 変異体の総分けつ数の経時的变化。総分けつ数を播種後 70 日まで、7 日ごとに計測した。

次に第 1 節の腋芽について観察した。一般に、野生型のイネでは第 2 節より上位の節の腋芽が伸長して分けつになるが、第 1 節の腋芽が伸長することはほとんどない(星川, イネの成長)。しかし、*d* 変異体および *fc1* 変異体では第 1 節の腋芽が高い確率で伸長し、分けつが発生していた { *d3-1*, 98% (65/66 個体) ; *d10-1*, 85% (59/69 個体) ; *fc1-1*, 85% (70/82 個体) ; シオカリ, 0% (0/70 個体) ; 台中 65 号, 0% (0/87 個体) ; 図 5, Ishikawa et al. 2005}。

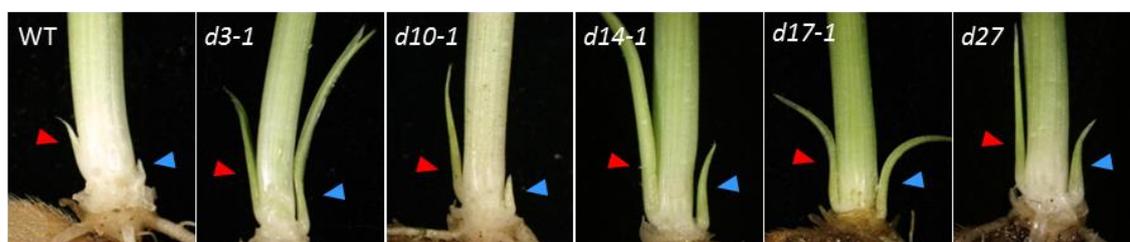


図 5 播種後 2 週間(葉齢 3.5)の第 1 節および第 2 節の腋芽。

左から WT(シオカリ), *d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27* . 青矢頭は第 1 節腋芽, 赤矢頭は第 2 節腋芽を示す。

最後に、稈長について調査した。出穂後の稈長は *d3-1* が極端に短く野生型の半分未満であり、*d10-1*、*d14-1*、*d17-1*、*d27-1* も野生型の約 70% しかなかった (*d3-1*, 35 cm; *d10-1*, 55 cm; *d14-1*, 59 cm; *d17-1*, 62 cm; *d27-1*, 66 cm; WT, 88 cm, 図 6)。 *fc1-1* の稈長は台中 65 号の 80% 以上あった (*fc1-1*, 107 cm; 台中 65 号, 131cm; 図 3)。さらに節間伸長比について比較したところ、*d* 変異体では第 1~5 節間の全てが短くなっていたのに対し、*fc1-1* では第 1 節間と第 5 節間のみが短くなっていた (図 6)。

これらの結果より *d* 変異体と *fc1-1* 変異体はどちらも腋芽の伸長抑制が弱くなることによる分けつ数の増加と、稈長の減少という共通した表現型を示すが、*d* 変異体と *fc1-1* 変異体の表現型は全く同一ではないと考えられた。

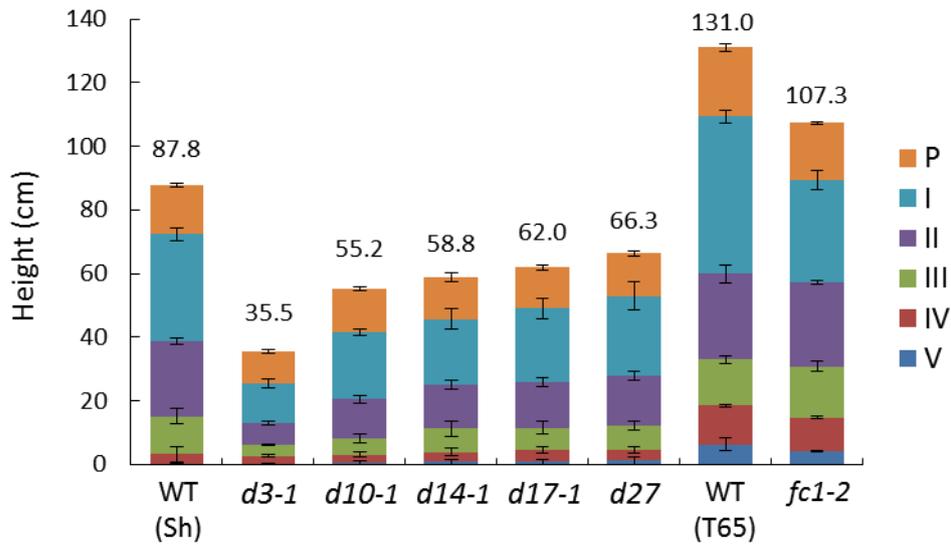


図 6 *d* 変異体 (*d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27-1*) の稈長

P, 穂; I, 第 I 節間; II, 第 II 節間; III, 第 III 節間; IV, 第 IV 節間; V, 第 V 節間. 各棒の上にある数字は各節間長の合計、エラーバーは標準偏差を示す.

1-3-2 *d* 変異体における *FCI* 遺伝子の発現

転写因子をコードする *FCI* 遺伝子は腋芽で発現しており、腋芽において *FCI* 遺伝子の発現が失われると、腋芽が伸長することが報告されている (図 7a, Takeda et al. 2003)。 *FCI promoter::GUS* 形質転換体を組織化学的に染色すると、第 1 節の腋芽で強い GUS 染色が見られた (図 7b)。さらに *FCI* 遺伝子の発現特異性を RT-PCR によって調査した結果、*FCI* 遺伝子は腋芽特異的に発現しており、特に第 1 節の腋芽で強く発現していた (図 7c)。以上のことから、野生型において第 1 節の腋芽の伸長が抑制されているのは、*FCI* 遺伝子が強く発現しているためと考えられた。この結果をふまえ、野生型と異なり第 1 節の腋芽が伸長する *d* 変異体では、第 1 節腋芽における *FCI* 遺伝子の発現が失われていると仮説を立て、*d* 変異体の第 1 節腋芽と第 2 節腋芽における *FCI* 遺伝子の発現を RT-PCR によって比較した。その結果、*d* 変異体においても腋芽における *FCI* 遺伝子の発現は完

全に失われてはならず、第 2 節腋芽よりも第 1 節腋芽で強く発現するという *FC1* 遺伝子の発現パターンも失われていなかった。しかしながら、*d3-1*, *d14-1*, *d17-1* においては *FC1* 遺伝子の発現は、野生型よりもやや弱くなっていた (図 7d)。

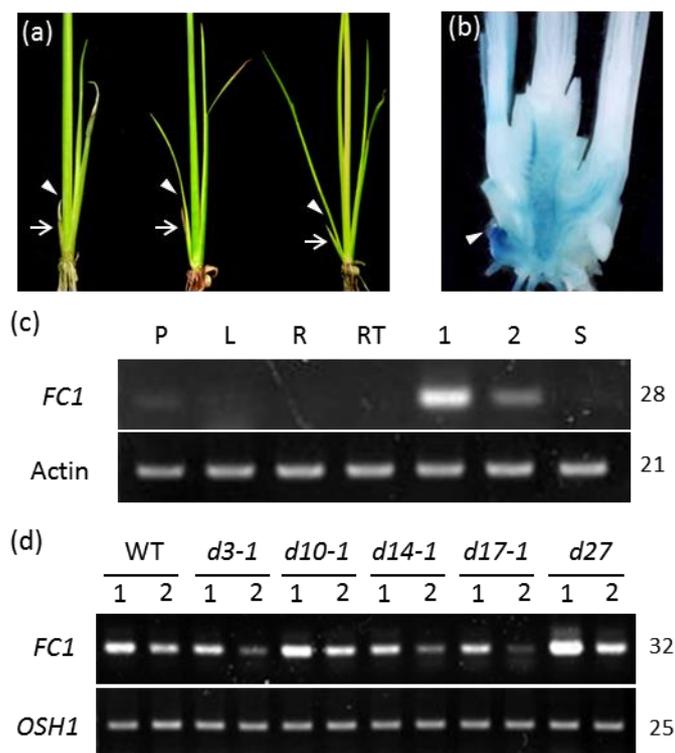


図 7 *d* 変異体における *FC1* 遺伝子の発現

- (a) 第 5 葉抽出中の *d10-1* 変異体と *fc1-1* 変異体の基部。左から WT, *d10-1*, *fc1-1* の順に示した。矢印は第 1 葉、矢頭は第 1 節腋芽を示す。
- (b) p*FC1*::GUS 形質転換体。観察に際して葉は取り除いた。矢頭は第 1 節腋芽を示す。
- (c) *FC1* 遺伝子の器官別 RT-PCR。P; 穂, L; 葉身, R; 根, RT; 根端, 1; 第 1 節腋芽, 2; 第 2 節腋芽, S; 茎頂。第 1 節腋芽は第 3 葉抽出中の個体から、第 2 節腋芽は第 4 葉抽出中の個体から採取した。写真の右に PCR サイクル数を表記した。*Actin* 遺伝子をコントロールとして用いた。
- (d) *d* 変異体における *FC1* 遺伝子の発現。1; 第 1 節腋芽, 2; 第 2 節腋芽。メリステム由来の cDNA 量を揃えるため、コントロールとしてメリステム特異的に発現する *OSH1* 遺伝子を用いた。

1-3-3 *D10* 遺伝子の単離

マップベースドクローニングにより *D10* 遺伝子の単離を行った。*d10-1* 変異体とカサラスを交配した交配第 2 世代 (F₂) 集団の中から、第 1 節の分けつが発生したものを *d10* 変異体として使用した。ラフマッピングによって *D10* 遺伝子座を第 1 染色体長腕の RM237 と RM8097 の間の約 14 cM に定めた (図 8a)。さらに 154 個体の F₂ 世代を用いて *D10* 遺伝子座を含む領域を約 450bp に限定した (図 8b)。この約 450bp の領域にはシロイヌナズナの *MAX4*、エンドウの *RMS1*、ペチュニアの *DAD1* のホモログである *OsCCD8* (Os01g0746400) が存在していた。

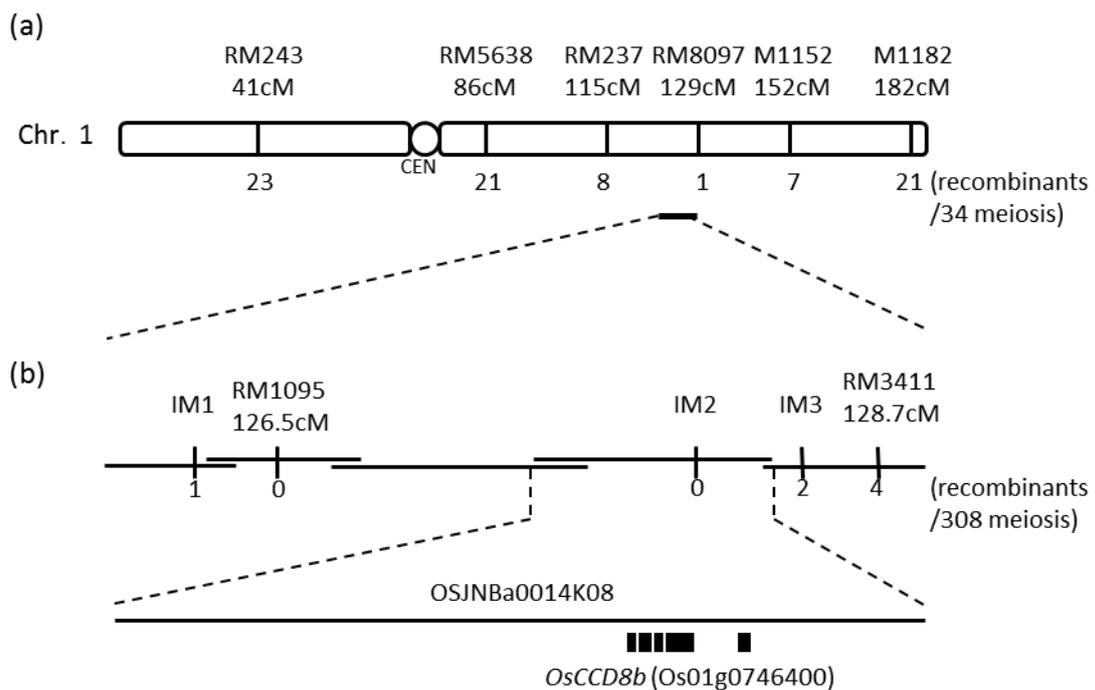


図 8 *D10* のマップベースドクローニング

(a) イネの第 1 染色体とラフマッピングの結果。

(b) ファインマッピングの結果。黒四角形は *OsCCD8b*/*Os01g0746400* のエクソン領域を示す。

max4/rms1/dad1 変異体と *d10* 変異体は分枝の増加とわい性という共通した表現型を示すため、*D10* が *OsCCD8* (Os01g0746400) である可能性が考えられた。そこで 2 つの *d10* アリル (*d10-1*, *d10-2*) について *OsCCD8* の翻訳領域のシーケンスを決定した。*d10-1* では *OsCCD8* タンパク質の 112 番目のロイシンがプロリンに変わる一塩基置換が起きていた (図 9a, b)。この 112 番目のロイシンは *OsCCD8* が属するカロテノイド酸化開裂酵素 (Carotenoid Cleavage Deoxygenase; CCD) スーパーファミリーで保存されているアミノ酸残基である (図 9b, for review see Auldrige et al. 2006)。*d10-2* では第 5 エキソン中に終始コドンを生じさせる一塩基置換が起きていた (図 9a)。

さらに *D10* 遺伝子が *OsCCD8* であることをより確実にする為、*d10-1* 変異体に *OsCCD8* の翻訳領域および上流 3190bp と下流 410bp の配列を含む 6.7kbp のゲノム断片を導入した。ゲノム断片が導入された形質転換体は野生型と同等にまで分けつ数が減少し、稈長も回復した (図 9c)。以上の結果から *D10* 遺伝子は *OsCCD8* (Os01g0746400) であると結論した。

CCD8 はカロテノイド酸化開裂酵素のスーパーファミリーに属する酵素である (for review see Auldrige et al. 2006)。イネには CCD8 をコードする遺伝子が 2 つ存在し (Os01g0566500、Os01g0746400)、それぞれ *OsCCD8a*、*OsCCD8b* と名づけられている (図 10, Snowden et al. 2005)。今回明らかにした *D10* は *OsCCD8b* (Os01g0746400) であった。そのため、*OsCCD8a* (Os01g0566500) を *D10 like* と名づけた。*D10/OsCCD8b* は 570 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、*MAX4/AtCCD8* と 65% の相同性を持っていた。

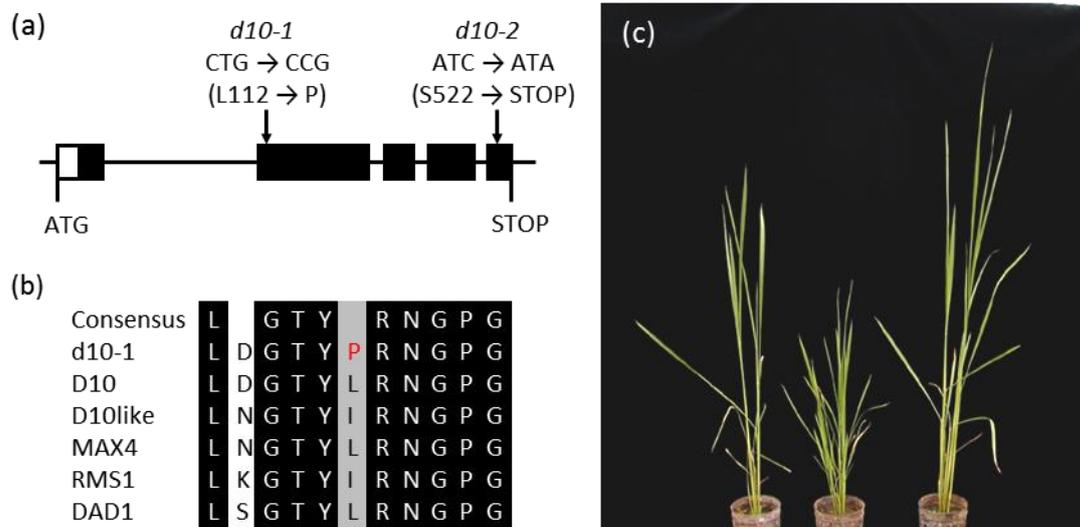


図 9 *D10* 遺伝子と *d10* 変異体における変異箇所

- (a) *OsCCD8b* 遺伝子 (Os01g0746400) のエクソン/イントロン構造と *d10-1*, *d10-2* アリル. 実線はゲノムを, 四角形は翻訳領域を示す. カロテノイド酸化開裂酵素で保存されている領域を黒で示した.
- (b) *d10-1* アリルにおけるアミノ酸の変異位置とその近傍のアラインメント. 赤字で *d10-1* アリルにおける変異を示した. 白文字黒背景はカロテノイド酸化開裂酵素 (CCD) で保存されているアミノ酸残基を示す.
- (c) *d10-1* 変異体の相補実験. *OsCCD8b* 遺伝子 (Os01g0746400) を含むゲノム DNA 断片を導入した形質転換体を作成し, その個体から得られた分離世代の種子を 5 週間育成した. 左から野生型 (シオカリ), ゲノム断片が導入されていない分離個体 (*d10-1*), ゲノム断片が導入されている分離個体.

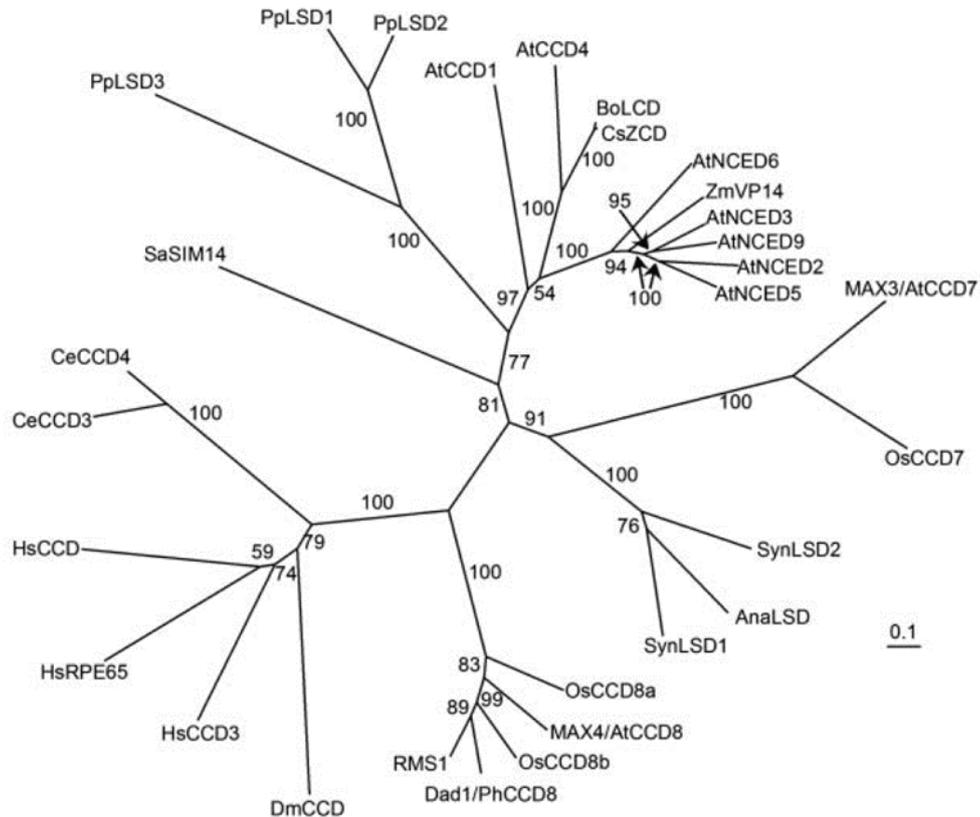


図 10 植物の CCD ファミリーの無根系統樹 (Snowden et al. 2005)

1-3-4 *D14* 遺伝子の単離

マップベースクローニングにより *D14* 遺伝子の単離を行った。*d14-1* 変異体とカサラスの交配から得られた F2 集団の中から、第 1 節の分げつが発生したものを *d14-1* 変異体として使用した。17 個体を用いたラフマッピングの結果、*D14* 遺伝子座を第 3 染色体長腕の約 30 cM の領域に定めた (図 11a)。さらに 65 個体を用いて詳細なマッピングを行った結果、*D14* 遺伝子座を含む領域を BAC クローン OSJNBa0009J13 内の約 36 kbp に狭めた (図 11b)。この約 36 kbp の領域には「Rice Genome Automated Annotation System (Rice GAAS; <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/>)」によって 8 つの遺伝子が予測されていた。

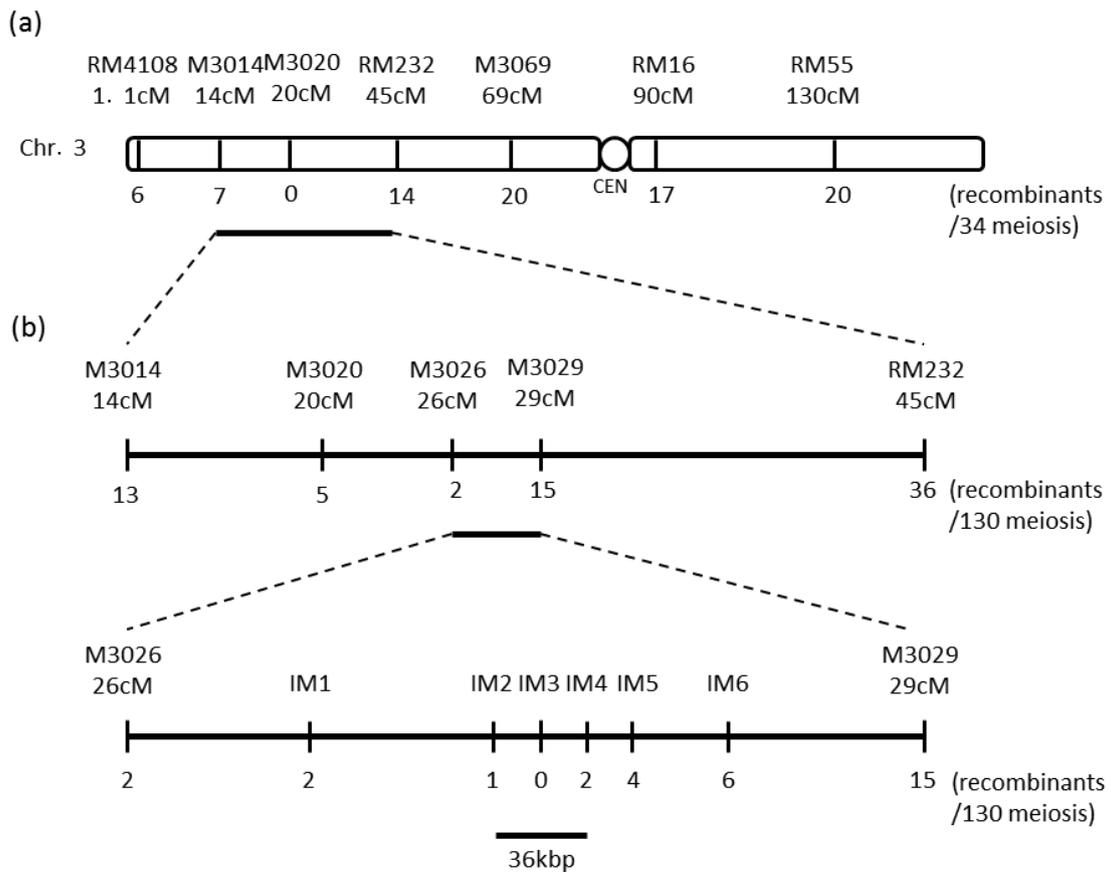


図 11 *D14* 遺伝子のマップベースクローニング

(a) イネの第 3 染色体とラフマッピングの結果。

(b) ファインマッピングの結果。一番下の直線は *D14* 遺伝子が存在すると考えられた 36 kbp の DNA 領域を示す。

この 8 つの予測遺伝子についてゲノム DNA シークエンスを *d14-1* 変異体と野生型で決定し、比較した。*d14-1* 変異体では Os03g0203200 のローカスに 603 bp の DNA 配列が挿入されていた。この DNA 配列をクエリ配列として National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (online: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で検索したところ、トランスポゾン (nDart1) の配列と完全に一致した。このトランスポゾンが挿入されていた予測遺伝子 (Os03g0203200) の全長 cDNA 配列 (AK070827) を Knowledge Oryza

Molecular Encyclopedia (online: <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) より得た。その結果、この遺伝子は 2 つのエクソンから構成されており、318 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると考えられた。*d14-1* 変異体ではイントロン領域にトランスポゾンが挿入されていた(図 12a)。また *d14-1* 変異体における AK070827 の発現量を RT-PCR により調べたところ、*d3-1*、*d10-1*、*d17-1*、*d27-1* 変異体および *fc1-1* 変異体では AK070827 の発現は WT と変わらないにも関わらず、*d14-1* 変異体では AK070827 の正常な mRNA が合成できていなかった(図 12b)。また、*d14-1* に Os03g0203200 を含むゲノム DNA を導入すると、表現型が回復した(図 12c)。以上の結果より、Os03g0203200/AK070827 が *D14* 遺伝子であると結論した。

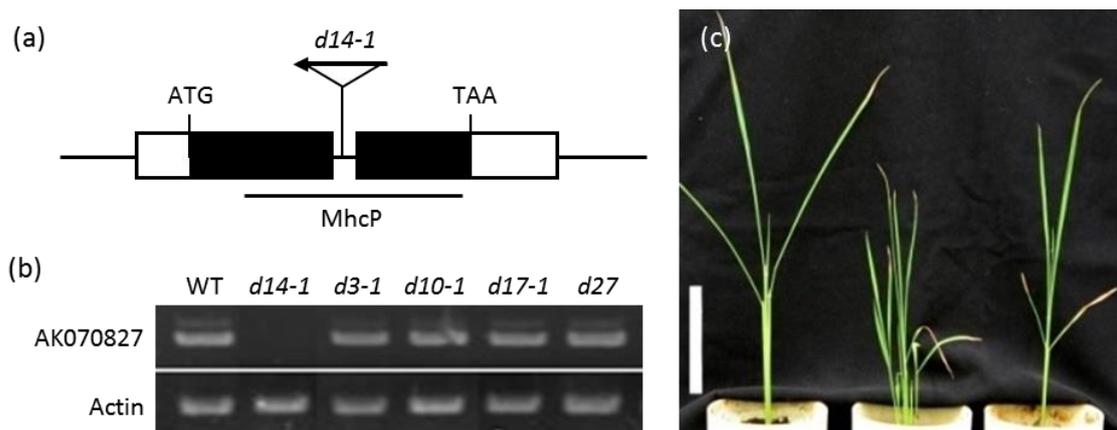


図 12 *D14* 遺伝子

- (a) *D14* 遺伝子候補 (Os03g0203200/AK070827) のエクソン/イントロン構造。矢印は nDart1 を示す。
- (b) *D14* 候補遺伝子 (Os03g0203200/AK070827) の *d* 変異体における発現解析。RT-PCR に用いた DNA は、茎頂から採取したトータル RNA から逆転写して作成した cDNA を使用した。
- (c) *d14-1* 変異体の相補実験。*d14-1* 変異体に Os03g0203200/AK070827 のゲノム DNA を導入した。左: WT, 中央: *d14-1*, 右: ゲノム DNA 断片を導入した個体。スケールバーは 10 cm を示す。

1-3-5 D14 タンパク質の分子機能

NCBI の Conserved Domain Database (<http://130.14.29.110/Structure/cdd/cdd.shtml>) によると *D14* は MhpC と呼ばれるドメインを持っていた。MhpC はアルファ/ベータ型加水分解酵素 (alpha/beta hydrolase super family) で保存されている配列である。*D14* の MhpC ドメインと相同性の高い配列を持つ遺伝子を「NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)」によって検索し、系統樹を描いた (図 13)。イネゲノム中には *D14* のホモログ (Os03g0437470) が 1 つあると考えられた。シロイヌナズナには *D14* ホモログとして At3g03990 と At4g37470 の 2 つが存在し、At3g03990 が *D14* と、At4g37470 が Os03g0437470 とオーソログな関係にあった。アルファ/ベータ型加水分解酵素が活性を持つには 96 番目のセリン、196 番目のフェニルアラニン、247 番目のヒスチジンの 3 連構造が必要であることがわかっており、この 3 連構造は *D14* の MhpC ドメインでも保存されていた (data not shown, For review see. Nardini and Dijkstra 1999, Kaneko et al. 2005)。

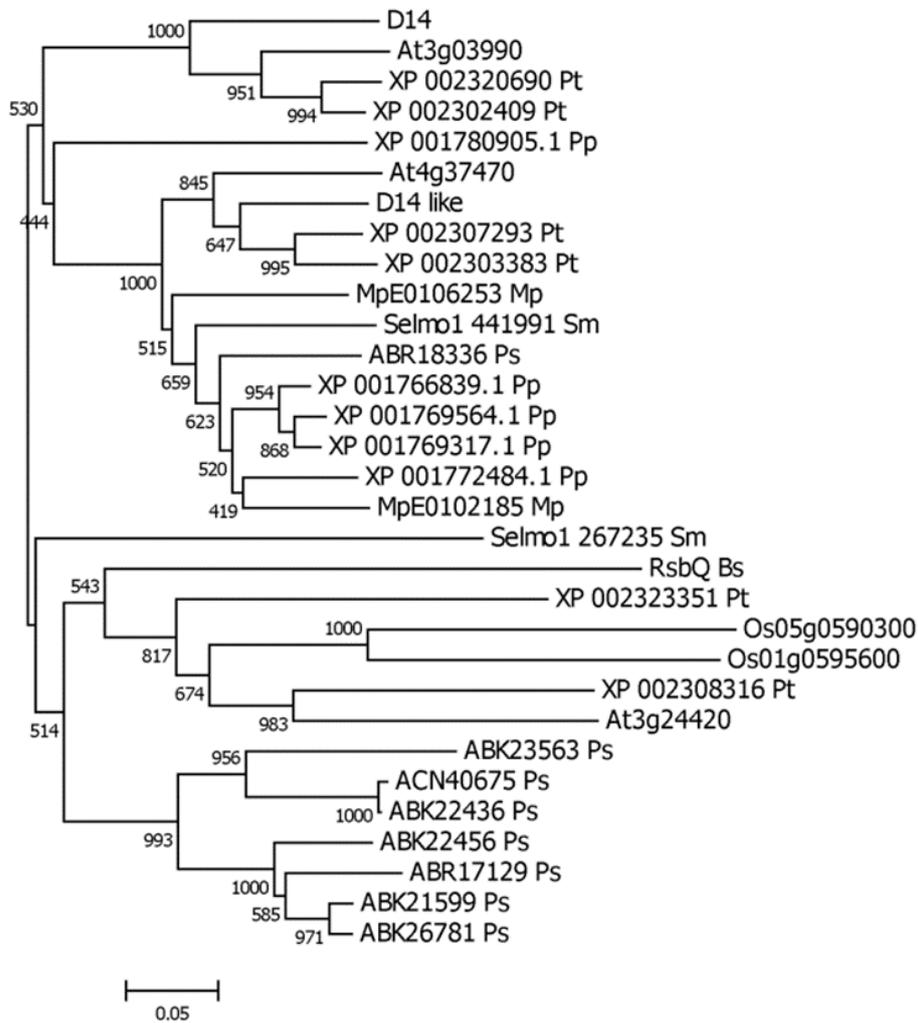


図 13 D14 ホモログの分子系統学的解析

Expressed sequence tag (EST) 配列から予想された、植物の D14 ホモログのアミノ酸配列と *Bacillus subtilis* の RsbQ タンパク質のアミノ酸配列を用いて、無根系統樹を作成した。EST 配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) および Selaginella Genomics (<http://xsellaginella.genomics.purdue.edu/>) から収集した。無根系統樹は ClustalX (2.09) を用いて、Neighbor-joining 法で作成した (<http://www.clustal.org/>)。ブートストラップ値 (1000 反復) を各分岐点に示した。At, *Arabidopsis thaliana*; Bs, *Bacillus subtilis*; Mp, *Marchantia polymorpha*; Os, *Oryza sativa*; Pp, *Physcomitrella patens*; Ps, *Picea sitchensis*; Pt, *Populus trichocarpa*; Sm, *Selaginella moellendorffii*.

1-3-6 *D10*、*D14* 遺伝子の発現パターン

D10、*D14* 遺伝子が発現している器官の特異性について調査した。穂、葉、根、根端、第 1 節腋芽、第 2 節腋芽、茎頂における *D10*、*D10 like*、*D3*、*HTD1* および *D14* 遺伝子の発現を、RT-PCR によって調査した (図 14)。*D10* は全ての器官で発現が低かったが、腋芽と茎頂での発現が穂、葉身、根に比べて高かった。*D10 like* は穂で強く発現しており、それ以外の器官ではあまり発現していなかった。*D3*、*HTD1* はどちらも調べた全ての器官で発現していた (Ishikawa et al. 2005, Zou et al. 2006, 図 14)。*D14* は *D3* と同じく全ての器官で発現しており、成熟葉身で一番強く発現していた。また第 1 節の腋芽でも強く発現していた。しかし根端での発現は非常に低かった (図 14)。

D10、*D14* 遺伝子の発現をより詳細に解析するため、*D10 promoter GUS* (*pD10::GUS*) を導入した植物体 9 個体および *D14 promoter GUS* (*pD14::GUS*) を導入した植物体 3 個体を作成し、GUS の発現パターンを解析した。図 15 に示すように、*pD10::GUS* による染色は、根の維管束、地上部の節および節間、ならびに花序で検出された。また、葉でも強い染色が見られた (data not shown)。根の維管束では比較的強い染色が観察されたが、根端は染色されず、RT-PCR の結果 (図 14) と同様の結果になった。根と茎の横断切片を観察したところ、根では中心柱の柔組織、茎では木部柔細胞で GUS の染色が観察された。一方、*pD14::GUS* による染色は *pD10::GUS* と比較して、全体的に薄く、観察した形質転換体 3 個体は染色強度にばらつきがあったが、維管束が染色されるという染色パターンは共通していた (図 16)。葉と茎の横断切片を観察したところ、いずれの組織においても木部柔細胞で GUS の染色が観察された (図 16)。

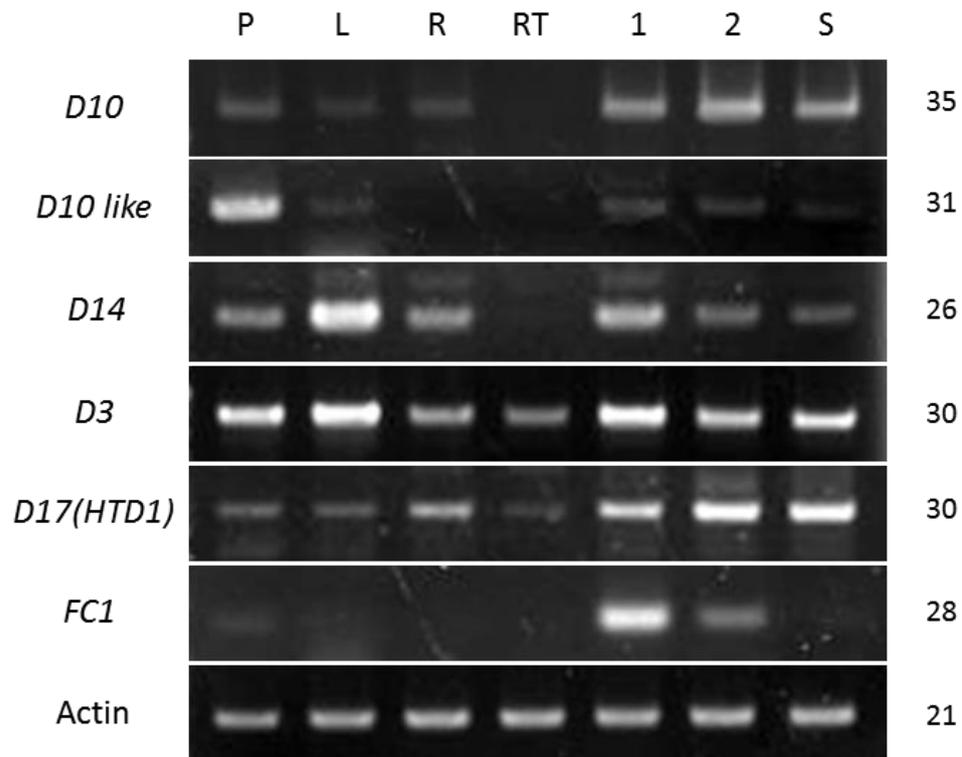


図 14 *D10* および *D14* 遺伝子の発現特異性の解析

D10, *D10 like*, *D3*, *HTD1*, *FC1* 遺伝子の器官別 RT-PCR の結果。P, 穂； L, 成熟葉身； R, 根； RT, 根端； 1, 第 1 節腋芽； 2, 第 2 節腋芽； S, 茎頂。第 1 節腋芽は第 3 葉抽出中の個体から，第 2 節腋芽は第 4 葉抽出中の個体から採取した。コントロールとして *Actin* を用いた。各遺伝子配列の増幅に用いた PCR サイクル数を写真の右に示した。

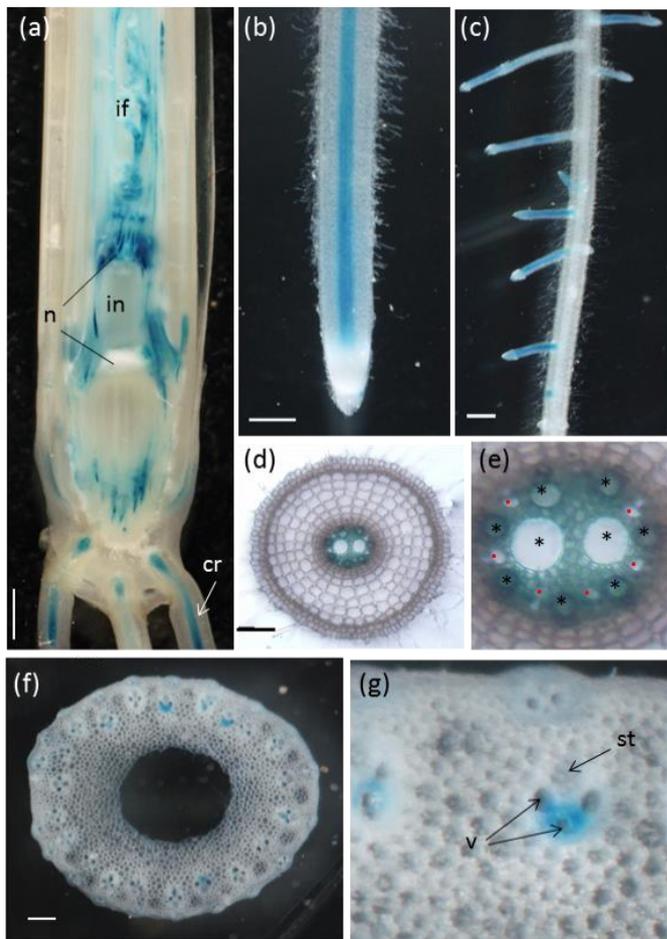


図 15 *D10 promoter::GUS* の解析

(a) 出穂期の基部の縦断切片, (b) 根, (c) 側根, (d, e) 根の横断切片, (f, g) 伸長した茎の横断切片, (e)と(g)はそれぞれ(d)と(f)の維管束部を拡大したもの. (e)における赤い点は篩部を, 黒い星は木部を示す. cr, 冠根; if, 幼穂; in, 節間; n, 節; st, 篩部; v, 木部. スケールバー: 1 mm (a), 300 μ m (b, c, f), 100 μ m (d).

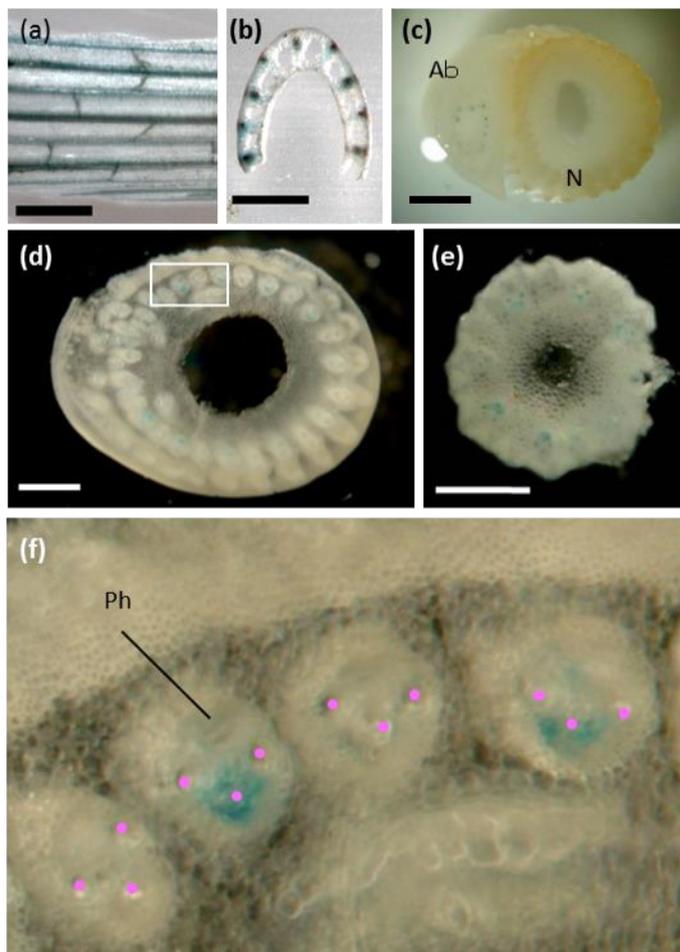


図 16 *D14 promoter::GUS* の解析

(a) 葉鞘, (b) 葉鞘の横断切片, (c, d) 節部および腋芽の横断切片, (e) 穂首の横断切片, (f)は(d)の四角く囲った部分の拡大図. Ab, 腋芽; N, 節; Ph, 師部. スケールバー: 100 μ m (a), 500 μ m (b, e), 1 mm (c, d).

1-3-7 細胞内局在

シロイヌナズナの MAX4 タンパク質は葉緑体に局在することが報告されている (Auldrige et al. 2006)。D10 タンパク質も iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) によって葉緑体に局在することが予想された。D10 と GFP の融合タンパク質をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで誘導する形質転換ベクターを作成し、パーティクルガン法でタマネギ表皮細胞に導入した。葉緑体のマーカーとして *35S::S9:DsRed2* を同時に導入した (Arimura et al. 1999)。D10:GFP は細胞質内に点在していた (図 17)。D10:GFP と S9:DsRed2 の発光が重なっていたことから D10 タンパク質は葉緑体に局在すると考えられた。

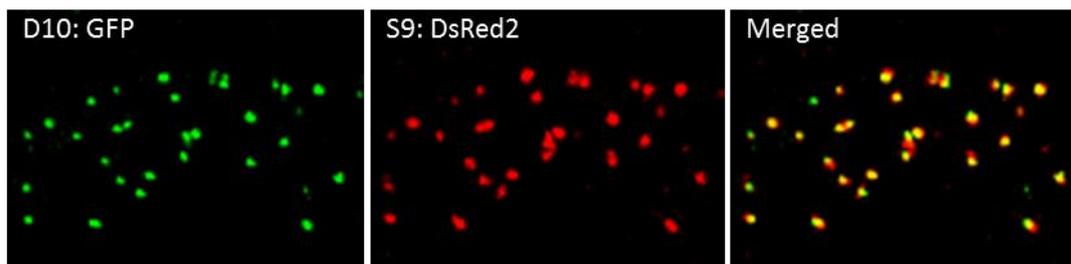


図 17 D10 タンパク質の細胞内局在

CaMV35S: *D10::GFP* と CaMV35S: *S9::DsRed2* を共発現させたタマネギ表皮細胞。葉緑体のマーカーとして *S9:DsRed2* を発現させた (Arimura et al. 1999)。D10::GFP (左), S9::DsRed2 (中), D10::GFP と S9::DsRed2 の画像を合わせたもの (右)。スケールバーは 20 μ m。

1-3-8 *d* 変異体における *D10*、*D14* 遺伝子の発現

RMS1 遺伝子の発現は *rms1*、*rms3*、*rms4*、*rms5* 変異体で著しく上昇しており、エンドウではフィードバックによって *RMS1* 遺伝子の発現が制御されていると考えられている (Foo et al. 2005)。一方、シロイヌナズナの *max* 変異体においては *MAX4* の発現に変化は見られない (Bainbridge et al. 2005)。そこで、*d* 変異体と *fc1* 変異体に

おける *D10*、*D10 like*、*D3*、*HTD1* 遺伝子および *D14* 遺伝子の発現を RT-PCR によって調査した。*D10* 遺伝子の発現は *d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体の全てにおいて著しく上昇していた (図 18)。しかしながら *fc1* 変異体では *D10* 遺伝子の発現上昇は見られなかった。*D10 like*、*D3*、*HTD1* および *D14* 遺伝子の発現は *d* 変異体、*fc1* 変異体ともに大きな変化はなかった (図 18)。

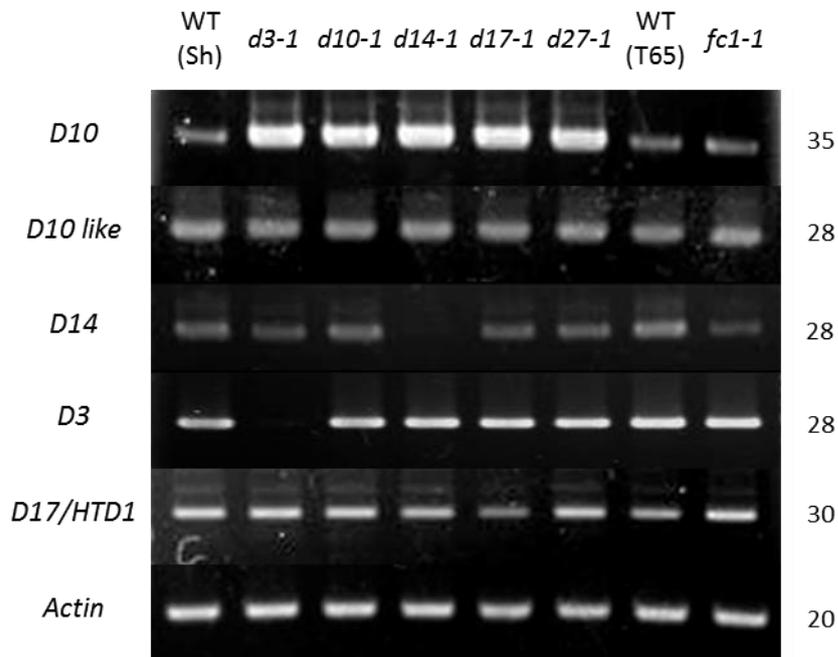


図 18 *d* 変異体と *fc1* 変異体における *D3*、*D10*、*D14* 遺伝子の発現

播種後 13 日の *d* 変異体と *fc1-1* 変異体における *D10*、*D10 like*、*D14*、*D3*、*HTD1* 遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した。*Actin* 遺伝子をコントロールとして用いた。*d* 変異体では *D10* 遺伝子の発現が顕著に上昇していた。しかし *fc1-1* 変異体では *D10* 遺伝子の発現上昇は見られなかった。*d3-1* 変異体および *d14-1* 変異体では正常な *D3* mRNA および *D14* mRNA が合成できていないと考えられたため (Ishikawa et al. 2005, 図 17), PCR による増幅が確認できなかった。Sh, シオカリ (*d3-1*、*d10-1*、*d14-1*、*d17-1*、*d27-1* の野生型); T65, 台中 65 号 (*fc1-1* の野生型)。

1-3-9 オーキシンによる発現誘導

エンドウでは茎頂から供給されたオーキシンによって *RMS1* 遺伝子の発現が誘導されることが報告されている (Foo et al. 2005, Sorefan et al. 2003)。しかしシロイヌナズナではオーキシンによって *MAX4* 遺伝子が誘導されることはない (Bainbridge et al. 2005)。オーキシンによって *D10*、*D14* 遺伝子の発現が誘導されるかを RT-PCR によって調査した。播種後 13 日の植物体をオーキシン溶液に 3 時間浸した後、茎頂から cDNA を合成した。オーキシンを与えることによって *D10* 遺伝子の発現が顕著に上昇した。しかし *D10 like*、*D3*、*D14*、*FC1* 遺伝子はオーキシンによる発現の変化は見られなかった (図 18a)。*HTD1* 遺伝子はオーキシンによって発現が誘導されることが報告されている (Zou et al. 2006)。しかしながら今回の実験ではオーキシンによる *HTD1* 遺伝子の発現上昇はみられなかった (図 19a)。

D10 遺伝子の発現上昇がオーキシンによる直接的なものか、それともタンパク質の翻訳を介したもののかなのかを検証するため、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドをオーキシン処理と併用した。50 μ M の IAA で処理することによって *D10* 遺伝子の発現は上昇したが、シクロヘキシミドを同時に与えると *D10* 遺伝子の発現は上昇しなかった (図 19b)。したがって、オーキシンによる *D10* 遺伝子の発現上昇は、新しくタンパク質を翻訳することによって起きる間接的なものであると考えられた。

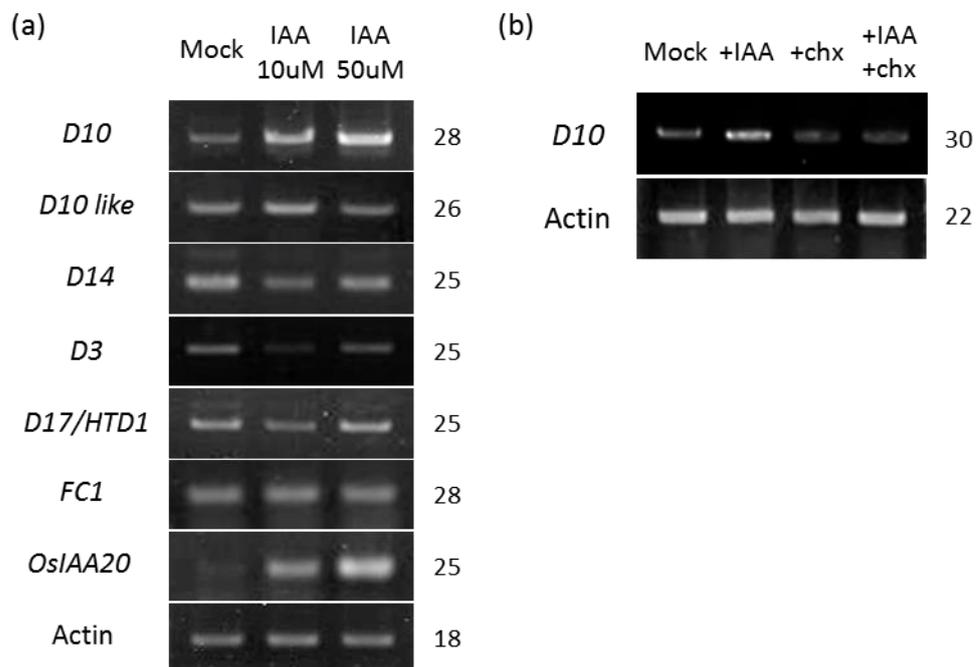


図 19 オーキシシンによる *D* 遺伝子の発現誘導

(a) 10 μ M および 50 μ M のオーキシシン (IAA) を、播種後 13 日目の野生型の個体に与えて、*D10*、*D10 like*、*D14*、*D3*、*HTD1*、*FC1* 遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した。オーキシシン誘導のコントロールとして *OsIAA20* 遺伝子を用いた。電気泳動結果の右に各遺伝子の PCR サイクル数を示した。

(b) 翻訳阻害剤シクロヘキシミドによる *D10* の発現誘導の阻害。オーキシシンとシクロヘキシミドを併用して *D10* 遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した。+IAA: 50 μ M IAA のみ、+chx: 1 μ M シクロヘキシミドのみ、+IAA +chx: 50 μ M IAA と 1 μ M シクロヘキシミドを併用。Actin 遺伝子をコントロールとして用いた。

1-3-10 イネにおける頂芽優勢

シロイヌナズナやマメ科植物における頂芽優勢については数多くの研究が行われているが(Cline et al. 1996)、単子葉植物であるイネの頂芽優勢についてはほとんど研究がなされていない。そこで、まずイネにおける頂芽優勢についての基礎的な知見を得るため、頂芽による腋芽の伸長抑制とオーキシンの効果について解析した。栄養成長期のイネは節間がほとんど伸長せず、頂芽が露出しないため、出穂後に穂を切除することで頂芽を除いた(Decapitation 処理)と見なし、腋芽の成長にどんな影響が出るか観察した。

まず出穂時における各節の腋芽を観察した。下位節の腋芽は出穂時には既に伸長して、分けつになっていた。また最上位の節(止葉節)には腋芽が稀にしか形成されていなかった。最上位を除いた上位4節(上から2、3、4、5節目)の腋芽はほとんどの個体で伸長していなかった(data not shown)。以上の理由から、この上位4節の腋芽を解析に用いた。しかし、9個体の腋芽を観察したところ、上から2節目の腋芽が出穂時に既に伸長している個体が2個体存在していた。したがって、出穂時に既に伸長している腋芽を解析から除くために、9個体中2個体は出穂時に腋芽が伸長しているものとみなして、両端を2サンプルずつ控除した刈込み平均(中央の5サンプルの平均)を用いて解析を行った。無処理においては出穂7日後でも腋芽はほとんど伸長していなかった。しかしながら穂を切除することによって2節目の腋芽が顕著に伸長し、7日後にはおおよそ100mm伸長していた(図20c)。2節目以外の腋芽は穂を切除してもほとんど伸長しなかった。したがって、穂は腋芽の成長を抑制していると考えられ、イネにおいても頂芽優勢が存在することが示唆された。また穂を切除した後、切断面にオーキシンを与えると、無処理と同程度にまで腋芽の伸長が抑制された(図20)。この結果より、オーキシンは穂と同様に腋芽の成長を抑制する効果を持っており、イネにおいてもオーキシンを介した頂芽優勢が存在していると考えられた。

以上の結果より、イネにおいては、穂を切除する処理をDecapitation処理と見なし、頂芽優勢の試験を行うことは妥当であると考え、以後の解析を行った。

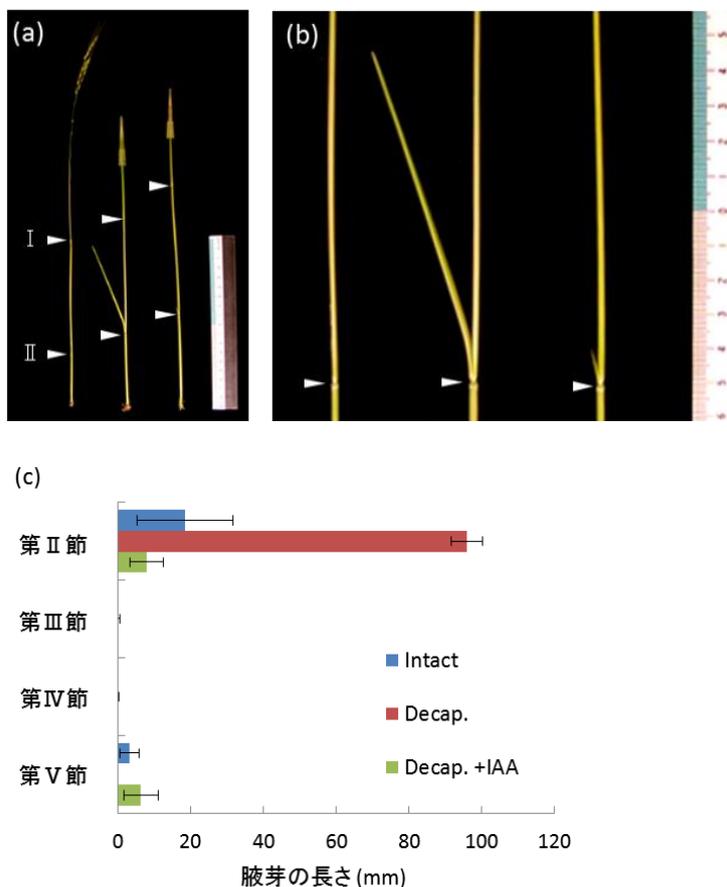


図 20 イネにおける Decapitation 処理とオーキシンの効果

- (a) Decapitation 処理による腋芽の生長. 出穂直後に穂首を切断して, $50 \mu\text{l}$ のラノリン (Decapitation 処理) もしくは 1% IAA を含むラノリン (Decapitation+IAA 処理) を塗った. ラノリンは毎日交換した. 左から無処理, Decapitation 処理, Decapitation+IAA 処理を示した. 白い矢頭で節 (第 I 節、第 II 節) の位置を示した.
- (b) 第 II 節 (上から 2 番目の節) の腋芽. 左から無処理, Decapitation 処理, Decapitation+IAA 処理を示した. 白い矢頭で節の位置を示した.
- (c) 出穂直後に Decapitation 処理を行い, 出穂 7 日後における第 II 節、第 III 節の腋芽の長さを計測した. 計測した 9 サンプルから上位および下位の 2 サンプルずつを除外し, 中央の 5 サンプルの平均 \pm 標準誤差を示した. 第 I 節 (止葉節) の腋芽は形成されていないことが多く, 解析には用いなかった. Intact: 無処理, Decap., Decapitation 処理; Decap.+IAA, Decapitation+IAA 処理.

1-3-11 *d10* 変異体における頂芽優勢

d 変異体の頂芽優勢について解析するため、*d10* 変異体を用いて Decapitation 処理とオーキシン処理を行い、腋芽の伸長を観察した。まず出穂時における各節の腋芽を観察した。上から 2 節目の腋芽は、野生型と同様に、ほとんどの個体で伸長していなかったが(図 21)、それ以外の節の腋芽は出穂時に既に伸長していた(data not shown)。最上位の節の腋芽は稀にしか形成されていなかった。以上の理由により、上から 1、4、5 節目は解析から除外し、2 節目と 3 節目の腋芽を用いて解析を行った。*d10* 変異体においては 14 個体ずつ調査し、両端の 2 サンプルずつを控除した刈込み平均(中央の 10 サンプルの平均)を解析に用いた(図 22)。無処理の野生型は腋芽がほとんど伸長しなかったが、*d10* 変異体においては無処理でも 2 節目の腋芽が 60mm ほど伸長していた。出穂時に既に伸長していた第 3 節の腋芽も約 60mm 伸長していた。穂を切除することによって 2 節目の腋芽は無処理よりも更に伸長し、100mm 程度伸長していた。出穂時に既に伸長していた 3 節目の腋芽は伸長が促進されることはなかった。したがって、*d10* 変異体では頂芽優勢が弱くなっているものの、完全に頂芽優勢が機能しなくなっているわけではないと考えられた。穂を切除した後、切断面にオーキシンを与えることによって 2 節目の腋芽の伸長は抑制された(図 21、図 22)。しかし、野生型にオーキシン処理を行った場合は 10mm 程度しか伸長しなかったのに対し、*d10* 変異体ではオーキシンを与えても 30mm ほど伸長していた(図 22)。3 節目の腋芽はオーキシン処理を行ってもほとんど伸長が抑制されなかった(図 22)。したがって *d10* 変異体においてもオーキシンによって腋芽の伸長が抑制されるが、完全に抑制されるわけではないと考えられた。

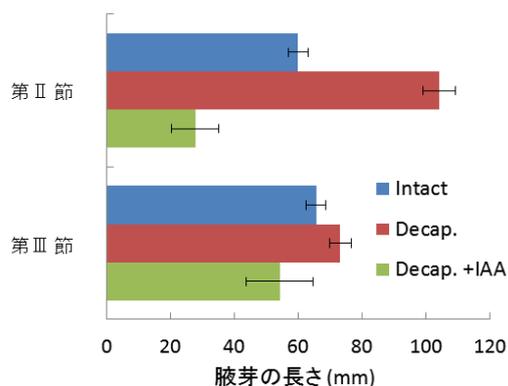


図 21 *d10-1* 変異体における Decapitation 処理とオーキシンの効果

出穂直後に Decapitation 処理または Decapitation+IAA 処理を行い、出穂 7 日後における第 II 節、第 III 節の腋芽の長さを計測した。計測した 14 サンプルから上位および下位の 2 サンプルずつを除外し、中央の 10 サンプルの平均 ± 標準誤差を示した。第 I 節（止葉節）は解析に用いなかった。

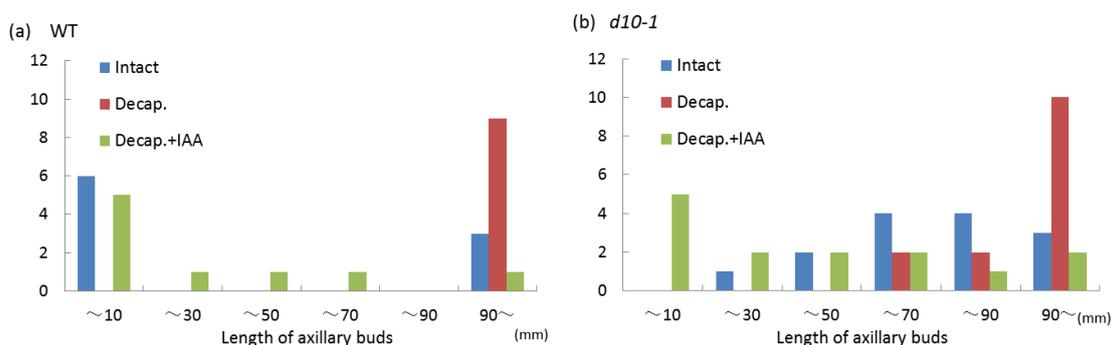


図 22 腋芽の長さの度数分布

出穂直後に Decapitation 処理または Decapitation+IAA 処理を行い、出穂 7 日後における第 II 節の腋芽の長さを計測した。野生型の結果 (a), *d10-1* 変異体の結果 (b). Intact, 無処理; Decap., Decapitation 処理; Decap.+IAA, Decapitation+IAA 処理。腋芽の長さを 6 つの階級に分けて、各階級のサンプル数を示した。WT は 9 サンプルずつ、*d10-1* 変異体は 14 サンプルずつ計測を行った。WT における各処理の中央値は Intact: 9 mm, Decap.: 98 mm, Decap.+IAA: 8 mm. *d10-1* 変異体における各処理の中央値は Intact: 67 mm, Decap.: 115 mm, Decap.+IAA: 31 mm.

1-3-12 *d* 変異体におけるオーキシン濃度

d10 変異体における頂芽優勢の低下が、内生オーキシンの低下、もしくは内生サイトカイニンの増加による可能性が考えられたため、*d* 変異体と *fc1* 変異体のオーキシンとサイトカイニンの内生量を定量した。第4葉抽出中の植物体から伸長前の腋芽を含むように茎頂部分を採取し、インドール酢酸 (IAA) ならびに活性型サイトカイニンであるトランスゼアチンとイソペンテニルアデニンを定量した。IAA 量は *d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体の全てにおいて有意に上昇していたが、*fc1* 変異体では IAA 量の増加はわずかであった (図 23)。一方、トランスゼアチンとイソペンテニルアデニンは *d* 変異体および *fc1* において大きな変化はなかった (data not shown)。

以上の結果から、*d10* を含む *d* 変異体における頂芽優勢の低下は、内生オーキシンの内生量の減少または内生サイトカイニンの増加によるものではないと示唆された。

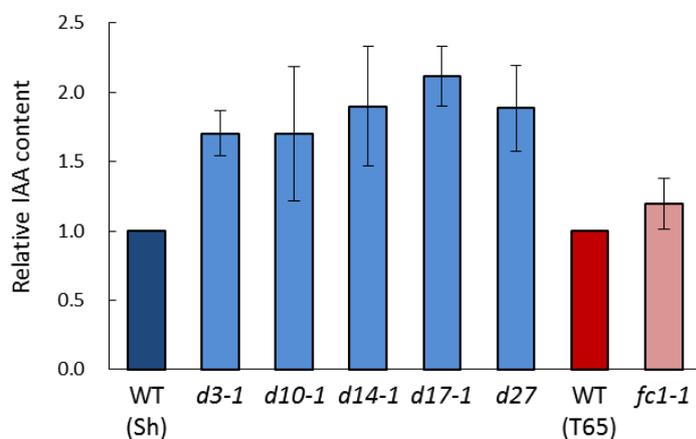


図 23 *d* 変異体と *fc1-1* 変異体の内生オーキシン量

播種後 13 日の *d* 変異体と *fc1-1* 変異体の地上基部における内生オーキシン (IAA) を定量した。 *d3-1*、*d10-1*、*d14-1*、*d17-1*、*d27* はシオカリ (Sh) におけるオーキシン量を 1 とした相対値を示した。 *fc1* は台中 65 号 (T65) のオーキシン量を 1 とした相対値を示した。内生オーキシン量の定量は独立して 2 回行い、その平均値 ± 標準誤差を示した。

1-3-13 *d*変異体のオーキシンに対する応答性

シロイヌナズナにおいて AUX/IAA と ARF を介したオーキシンスIGNAL伝達が異常になった *axr1* 変異体は腋芽の休眠が弱く、側枝が増加する表現型を示す (Lincoln et al. 1990, Leyser et al. 1993)。このことは腋芽の休眠制御に AUX/IAA と ARF を介したオーキシンスIGNAL伝達が関与していることを示唆している。*d* 変異体と *fc1* 変異体において AUX/IAA と ARF を介したオーキシンのSIGNAL伝達が正常か検証した。*d* 変異体と *fc1* 変異体に外生的にオーキシンを与え、AUX/IAA と ARF を介してオーキシン依存的に誘導される遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で調べた (図 24)。マーカー遺伝子としてオーキシン早期応答遺伝子 *OsIAA20* (Os06g0166500) を用いた (Jain et al. 2006)。野生型ではオーキシン濃度依存的に *OsIAA20* の mRNA が蓄積していた。*d* 変異体においても野生型とほぼ同等の *OsIAA20* の発現誘導が見られた。一方、*fc1* 変異体は野生型 (台中 65 号) に比べて *OsIAA20* の mRNA が 3 倍以上に蓄積していた。*OsIAA20* 以外のオーキシン誘導遺伝子として *OsPINOID* の発現も解析した結果、*fc1* では野生型よりも強く誘導されていた (森田修士論文 2006、data not shown)。以上の結果より、*d* 変異体において AUX/IAA と ARF を介したオーキシンのSIGNAL伝達は正常に機能しており、*d* 変異体における頂芽優勢の低下はオーキシンに対する感受性が低下しているからではないと考えられた。むしろ、*d* 変異体では、内生オーキシン量が増加しているにも関わらず、頂芽優勢が低下していたことから、*D* 遺伝子は頂芽優勢において、オーキシンの下流で機能している可能性が示唆された。

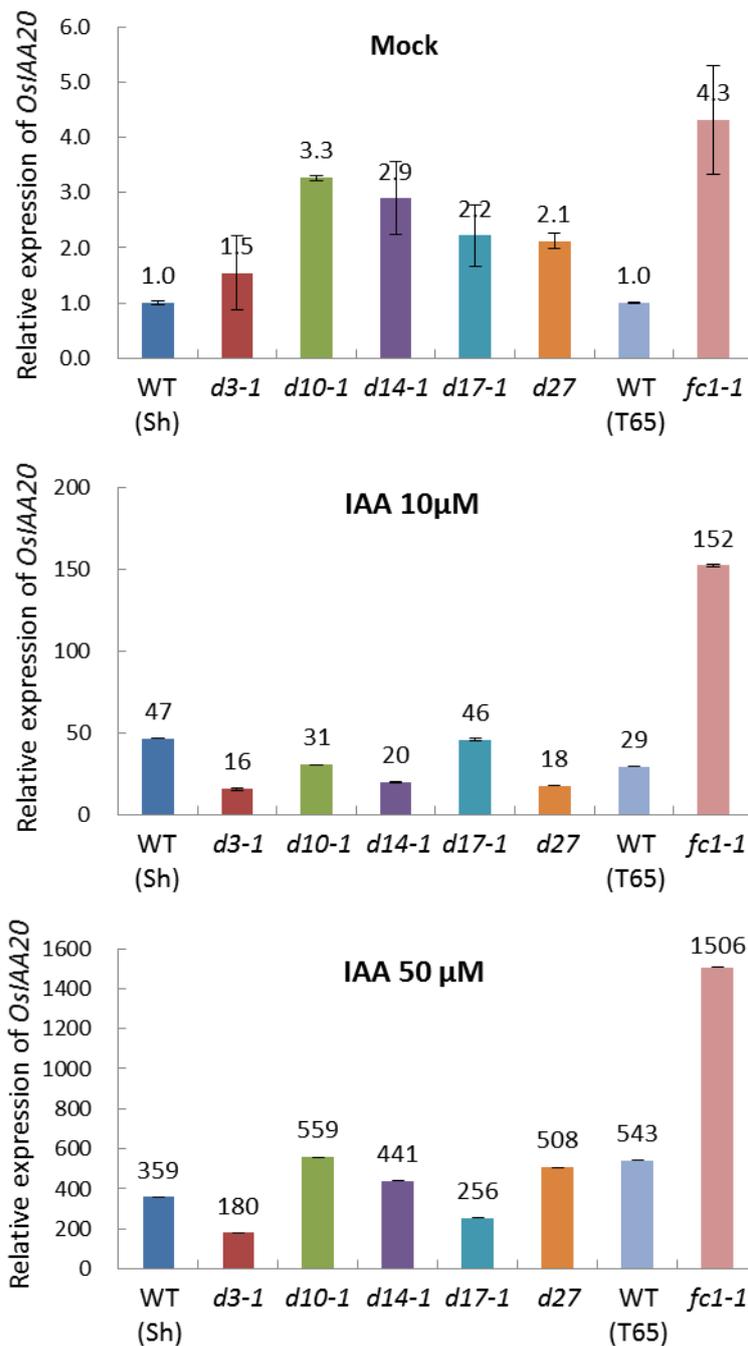


図 24 *d* 変異体と *fc1-1* 変異体のオーキシンに対する応答性

d 変異体および *fc1-1* 変異体におけるオーキシン早期誘導遺伝子 (*OsIAA20*) の発現を Real-time PCR によって解析した。 *d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27* は WT (シオカリ, Sh) の Mock における発現量を 1 として *OsIAA20* 遺伝子の相対的発現量を示した。 *fc1-1* は WT (台中 65 号, T65) の Mock における発現量を 1 として相対値を示した。標準誤差をバーで示した。

1-3-14 Decapitaion 処理による *D3*、*D10*、*D14* 遺伝子の発現変動

頂芽優勢における *D3*、*D10*、*D14* 遺伝子の機能をさらに検討するために、Decapitaion 処理ならびにオーキシン処理を行った時の *D3*、*D10*、*D14* 遺伝子の発現量を分析した。既に、*D10* 遺伝子の発現は Decapitation 処理により抑制され、*D3*、*D14* 遺伝子の発現は、Decapitation 処理後の時間が長くなるほど発現量が増加することが明らかにされている（大島修士論文 2008）。同様の実験を行ったところ、Decapitation 処理を行ってから 1 時間後には *D10* 遺伝子の発現が抑制されること、*D3*、*D14* 遺伝子の発現は Decapitation 処理を行うことにより上昇し、Decapitation 処理から時間が経つほど発現量が増加することが確認できた（図 25）。また、Decapitation 処理後に切断面にオーキシンを塗布すると、*D10* 遺伝子の発現は維持されたが、*D3*、*D14* 遺伝子の発現は、Decapitation 処理の場合と同様に、無処理の時よりも上昇した（図 25）。以上の結果をまとめると、*D10* 遺伝子の発現は Decapitation 処理により抑制され、オーキシン処理により維持されることから、*D10* 遺伝子は穂（頂芽）由来のオーキシンにより発現が制御されていることが示唆された。しかし、*D3*、*D14* 遺伝子の発現は Decapitation 処理により上昇するが、オーキシン処理を行っても Decapitation 処理の効果が打ち消されることはなかったため、*D3*、*D14* 遺伝子はオーキシンとは別の、Decapitation を伝達するシグナルによって発現が制御されている可能性が示唆された。

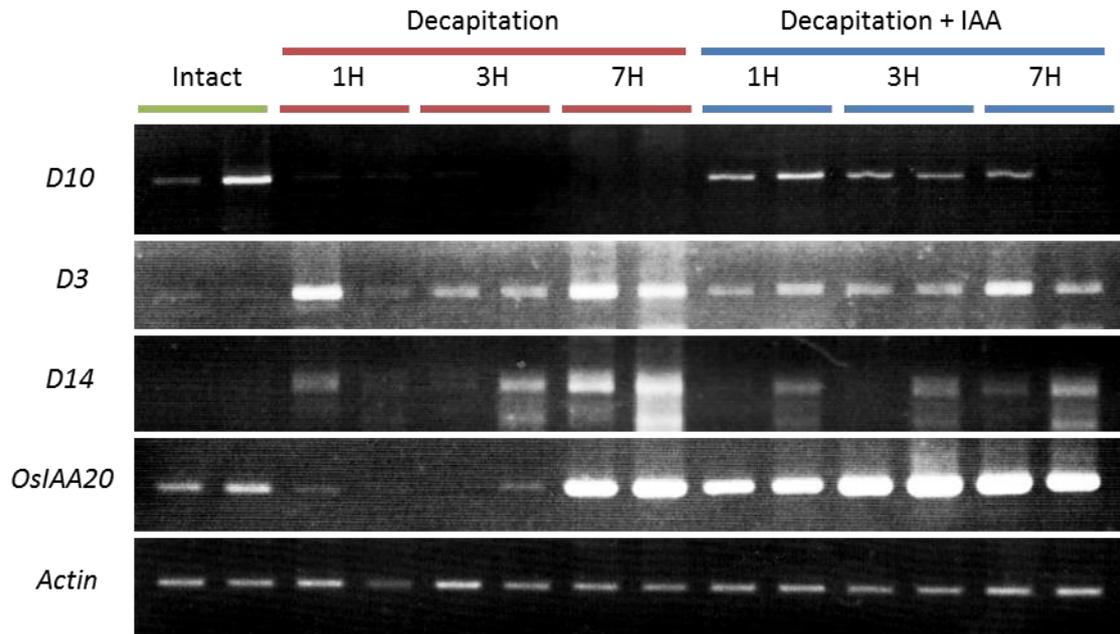


図 25 Decapitation 処理による *D* 遺伝子の発現変化

出穂直後に第 II 節から 5 cm 上の節間で茎を切断し、切断面にラノリン (Decapitation 処理) または 1% IAA を含むラノリン (Decapitation+IAA 処理) を塗布した。2 個体について独立に処理を行った。コントロールとして *Actin* を用いた。

1-4 考察

1-4-1 イネにおいても新規ホルモン様物質により腋芽の成長が抑制されている。

D10 遺伝子をマップベースクローニングによって単離した結果、*D10* 遺伝子はカロテノイド酸化開裂酵素群に属する *OsCCD8* をコードしていることが明らかになった。*OsCCD8* はシロイヌナズナの *MAX4* (Sorefan et al. 2003)、エンドウの *RMS1* (Foo et al. 2005)、ペチュニアの *DAD1* (Snowden et al., 2005) のオーソログである。当研究室では既に *D3* 遺伝子が F-box LRR タンパク質をコードしており、シロイヌナズナの *MAX2* 遺伝子のオーソログであることを明らかにしている (Ishikawa et al. 2005)。また *d* 変異体と非常に良く似た表現型を示す *htd1* 変異体の原因遺伝子である *HTD1* が *OsCCD7* をコードしており、*MAX3* のオーソログであることも明らかになっている (Zou et al. 2005, 2006)。さらに、*d17* 変異体は *HTD1* 遺伝子の塩基配列に突然変異が生じていること、さらに正常な *HTD1* 遺伝子を *d17* 変異体に導入すると表現型が回復することが明らかにされており、*D17* 遺伝子は *OsCCD7* をコードしている *HTD1* 遺伝子と同一であることが既に分かっている (Umehara et al. 2008)。

これらの結果はイネにおいても、シロイヌナズナ、エンドウ、ペチュニアと同じ新規ホルモン様物質による腋芽の成長抑制機構が保存されており、*D10*、*D3*、*HTD1/D17* 遺伝子がこの新規ホルモン様物質の生合成または受容に関与していることを強く示唆している。

シロイヌナズナとエンドウでは *CCD8* はゲノム中に1つずつしか存在しないが、イネゲノムには *CCD8* をコードする遺伝子が *Os01g0566500* と *Os01g0746400* の2つ存在し、それぞれ *OsCCD8a*、*OsCCD8b* と名づけられている (Snowden et al. 2005)。本研究では *D10* 遺伝子が *OsCCD8b/Os01g0746400* であることを明らかにし、一方の *OsCCD8a/Os01g0566500* を *D10 like* と命名した。*D10 like* はシロイヌナズナの *MAX4* 遺伝子と高い相同性 (Identities = 60%, Similarity = 76%) を示すため、*MAX4* と同様の酵素活性をもつことが

予想された。しかしながら、*D10 like*は主に穂で発現しており、*HTD1*や *D10* 遺伝子の発現パターンとは全く異なっていた (図 14)。*D10 like* 遺伝子が新規抑制因子の生合成に関与するのか、それともまったく別の機能を持つのかについては、変異体の表現型を含めた今後の研究が期待される。

1-4-2 *D10* 遺伝子の発現はフィードバックにより制御されている

*d*変異体と *fc1*変異体における *D10* 遺伝子の発現を解析した結果、*d*変異体では *D10* 遺伝子の発現が上昇していた (図 18)。この結果は *D10* 遺伝子の発現が負のフィードバックによって制御されていることを示唆しており、*d* 変異体ではこのフィードバックによる抑制が弱くなっている、もしくはフィードバックによる誘導が強くなっているために *D10* 遺伝子の発現が上昇していると考えられた。また、*fc1*変異体では *D10* 遺伝子の発現上昇が見られなかったことから (図 18)、このフィードバックは腋芽の伸長／休眠状態に依存するものではなく、新規ホルモン様物質のシグナル伝達に依存していると考えられた。一方、*D3*、*HTD1* 遺伝子の発現は *d*変異体および *fc1*変異体で大きく変化しておらず (図 18)、フィードバックによって大きく変化する *D10* 遺伝子の発現が、新規ホルモン様物質の生合成において律速段階になっている可能性が示唆された (図 26)。

エンドウの *rms* 変異体では *RMS1* 遺伝子の発現が上昇しており、*RMS1* 遺伝子の発現もフィードバックによる制御を受けていると考えられている (Foo et al. 2005)。*D10* 遺伝子と *RMS1* 遺伝子に対するフィードバック制御は転写レベルで行われているため、プロモーター依存的な現象であると予想される。今後、フィードバック制御に必要なシス配列を明らかにすることで、フィードバックがどのようなメカニズムで発生し、イネの分けつ性においてどのような意味があるのかを理解する重要な情報が得られると期待される。

また F-box LRR タンパク質をコードする *D3* 遺伝子は新規ホルモン様物質の受容または伝達に関与していると考えられ、*d3* 変異体

では新規ホルモン様物質の生合成は正常であると予想される。さらに、*d3* 変異体では *D10* 遺伝子の発現が上昇していることから、*d3* 変異体においては新規ホルモン様物質が蓄積していると予想される。*d3* 変異体を用いることで、新規ホルモン様物質の正体が明らかにされることが期待される。

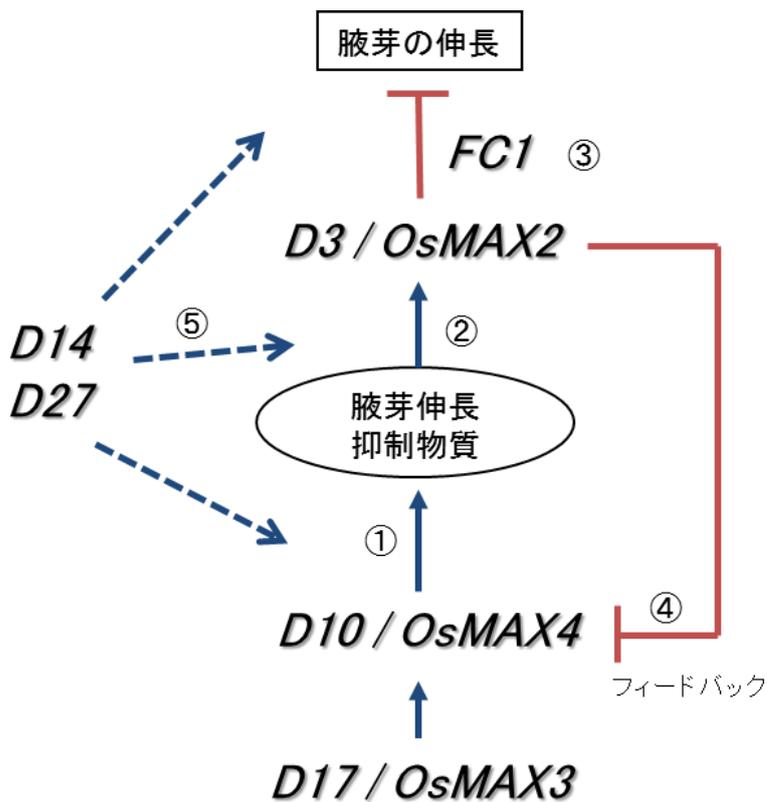


図 26 *D* 遺伝子の予想される機能

① *D10 / OsMAX4*, *D17 / OsMAX3* 遺伝子は腋芽伸長抑制物質の生合成に関与している。② *D3 / OsMAX2* 遺伝子は腋芽伸長抑制物質の受容またはシグナル伝達に関与している。③ *D* 遺伝子による腋芽の伸長制御には *FC1* 遺伝子が(一部)関与している (Minakuchi *et al.* 2010)。④ *D10 / OsMAX4* 遺伝子の発現はフィードバックにより制御される。⑤ *D14*, *D27* 遺伝子は *D3 / OsMAX2*, *D10 / OsMAX4*, *D17 / OsMAX3* 遺伝子と同じ経路で腋芽の伸長抑制に関与する。

1-4-3 *D14*、*D27* 遺伝子は新規抑制因子の経路で働く

d3、*d10*、*d17* 変異体だけでなく、*d14*、*d27* 変異体においても *D10* 遺伝子の発現上昇が見られたことから (図 18)、*D14*、*D27* 遺伝子は *D3*、*D10*、*D17* 遺伝子と同じく新規ホルモン様物質による腋芽成長制御機構において機能していることが示唆された。本研究により *D14* 遺伝子はマップベースドクローニングの結果、加水分解酵素 (alpha/beta hydrolase) と予測されるタンパク質をコードしていることが明らかになった (図 12)。*D14* タンパク質は加水分解酵素スーパーファミリーに共通して存在する MhpC ドメインを持っており、酵素活性に必要な 3 連構造も保存されている (data not shown)。したがって、*D14* タンパク質も加水分解酵素活性を持つと予想され、新規抑制因子の生合成に関与している可能性がある。しかし、*D14* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を BLAST によって検索した結果、*Bacillus subtilis* の *RsbQ* と高い相同性 (Identities = 38%、Similarity = 53%) があることがわかった。*RsbQ* は微生物において、ストレス応答を制御する σ^B 転写因子を活性化する働きを持っており、その機能には加水分解酵素活性に重要な 96 番目のセリンと 246 番目のヒスチジンを必要とする (Brody et al. 2001)。またジベレリンの細胞内受容体であることが明らかになった GIBERELIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) は、加水分解酵素の 1 種であるエステラーゼ、リパーゼで共通して保存されている配列を持つ (Ueguchi-Tanaka et al. 2005)。したがって、*D14* タンパク質が新規抑制因子の受容、伝達に関与している可能性も現段階では否定できない。イネゲノム中に存在するホモログ (Os03g0437600) が *D14* 遺伝子と同じ機能を持つのかを含めて、今後の解析が期待される。またシロイヌナズナには *D14* 遺伝子のホモログが 2 つあり、At3g03990 が *D14* に最も近い関係にある (図 13)。At3g03990 がシロイヌナズナにおいて腋芽の抑制に働いているか今後の解析が期待される。

シロイヌナズナにおいては新規抑制因子に関与している遺伝子と

して、シトクローム P450 をコードする *MAX1* 遺伝子が知られている (Booker et al. 2005)。また、接木の組み合わせ実験から *MAX1* 遺伝子は *MAX3*、*MAX4* 遺伝子の下流で新規抑制因子の生合成に関与していると考えられている (Stirnberg et al. 2002)。イネゲノム中には *MAX1* 遺伝子のホモログが 3 つ存在するが (Nelson et al. 2003)、これら *OsMAX1* 遺伝子を機能欠失したイネの突然変異体の解析は行われておらず、今後の解析が期待される。

1-4-4 イネの頂芽優勢における *D* 遺伝子の機能

栄養成長期のイネは頂芽が露出しないため、頂芽を取り除いて腋芽の伸長を観察することは困難である。そこで本研究では穂を頂芽とみなして、穂を除くと腋芽の伸長が促進されること、オーキシンが腋芽の伸長を抑制することを明らかにし、イネにおいてもオーキシンを介する頂芽優勢が存在すると考えた。頂芽優勢の意義が、成長に必要な要素を 1 つの器官に集中することと考えれば、穂と頂芽は同等の存在であると考えられる。しかしながら、栄養生長期に形成された腋芽は盛んに伸長するのに対し、生殖生長期転換後に形成された腋芽は強く抑制されており、栄養成長期と生殖成長期で腋芽の伸長制御機構が変化している可能性は否定できない。

d10 変異体では穂が存在しているにも関わらず腋芽が伸長しており、頂芽優勢が失われていると考えられた。しかし、穂を取り除くことによって腋芽は更に伸長したため、頂芽優勢が完全に失われたわけではなく、部分的に失われていると考えられた。また *d10* 変異体ではオーキシンによって腋芽の伸長が完全には抑制されないため、オーキシンによる腋芽の伸長抑制が部分的に失われていると考えられた。また *d10* 変異体ではオーキシンの生合成は低下しておらず、オーキシンに対する感受性も低下していない (図 23、24)。以上の結果より、*d10* 変異体ではオーキシンによる頂芽優勢が部分的に失われているが、オーキシンの量、受容が低下しているわけではなく、オーキシンが受容された後の段階で異常が起きていると考えられた。

したがって、原因遺伝子である *D10* 遺伝子はオーキシンの下流で腋芽の伸長抑制に関わっていると予想される。*D10* 遺伝子の発現が Decapitation 処理により低下し、さらにオーキシン処理によって維持されることはこのことを支持しており、*D10* 遺伝子によって合成される新規ホルモン様物質が、オーキシンの二次因子として腋芽の伸長を抑制している可能性が示唆された。ただし、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを併用することによって、*D10* 遺伝子の発現が誘導されなくなったことから、オーキシンによる *D10* 遺伝子の発現誘導はなんらかのタンパク質の翻訳を必要とする間接的なものであると考えられた。また *d10* 変異体においてもオーキシンは腋芽の伸長を抑制するため、新規抑制因子を介さずにオーキシンが腋芽の伸長を抑制する経路も存在すると考えられた。オーキシンによるサイトカイニン合成の抑制はその 1 つであると予想される (Nordstrom et al. 2004, Tanaka et al. 2006)。

人為的に活性型オーキシンの内生量を増やした形質転換体は頂芽優勢が強くなり、分枝が減少することが知られている (Romano et al. 1993)。一方、*d* 変異体は内生オーキシン量が増加しているにも関わらず (図 23)、腋芽の抑制が弱くなり、分げつが増加した (図 4)。この結果も *D3*、*D10*、*D14*、*D17*、*D27* 遺伝子がオーキシンの下流で腋芽の抑制に関与している可能性を示唆している。内生オーキシン量の増加は *fc1* 変異体では見られないため、*d* 変異体における内生オーキシンの増加は腋芽が伸長したことによって起きたわけではなく、*D3*、*D10*、*D14*、*D17*、*D27* 遺伝子に依存するものと考えられた。したがって、新規ホルモン様物質は腋芽の成長を抑制する他に、オーキシンの生合成を抑制していることが示唆された。オーキシンが *D10* 遺伝子の発現を誘導し、新規ホルモン様物質がオーキシンの生合成を抑制することで、互いにフィードバックを形成し、オーキシンと新規ホルモン様物質のバランスが保たれることで、腋芽の伸長と休眠が制御されている可能性が示唆される (図 27)。

エンドウの *rms1* 変異体は頂芽優勢が低下しており、オーキシンを

与えても腋芽の伸長が抑制されない。またオーキシンによって *RMS1* 遺伝子の発現が誘導されるため、エンドウにおいては、オーキシンは *RMS1* 遺伝子の発現を制御することで腋芽の伸長を抑制していると考えられている (Beveridge et al. 2000, Foo et al. 2005)。一方、シロイヌナズナの *max4* 変異体にオーキシンを与えると腋芽の伸長が部分的に抑制されるが、*MAX4* 遺伝子の発現はオーキシンによって誘導されない (Sorefan et al. 2003, Bainbridge et al. 2005)。本研究により *d10* 変異体にオーキシンを与えると腋芽の伸長は部分的に抑制され、*D10* 遺伝子の発現がオーキシンによって誘導されることが明らかになった。この結果はエンドウともシロイヌナズナとも完全に一致する結果ではなく、オーキシンと新規抑制因子の相互作用が種によって異なっていることを示唆している。この制御の多様性がシロイヌナズナ、エンドウ、イネの種特異的な分枝のパターンを決定する要因になっているのかもしれない。

第 2 章

ストリゴラクトンによる腋芽の伸長抑制と *D14* 遺伝子の機能解析

2-1 序論

エンドウの *ramosus* (*rms*) 変異体、ペチュニアの *decreased apical dominance* (*dad*) 変異体、シロイヌナズナの *more axillary growth* (*max*) 変異体、そしてイネの *dwarf* (*d*) 変異体の解析を通じて、カロテノイドから生成されると予想される新規ホルモン様物質が腋芽の伸長を抑制していること、新規ホルモン様物質の生合成およびシグナル伝達に関与していると考えられる相同遺伝子が高等植物に広く存在することが次々と明らかにされたが(表 1)、新規ホルモン様物質の正体、ならびにその生合成およびシグナル伝達の詳細については不明であった。

表 1 *D* 遺伝子のホモログ

Protein	Rice	Arabidopsis	Pea	Petunia
F-box LRR	<i>D3</i>	<i>MAX2</i>	<i>RMS4</i>	
CCD8	<i>D10</i>	<i>MAX4</i>	<i>RMS1</i>	<i>DAD1</i>
Putative Hydrolase	<i>D14/D88/HTD2</i>			<i>DAD2</i>
CCD 7	<i>D17/HTD1</i>	<i>MAX3</i>	<i>RMS5</i>	<i>DAD3</i>
Iron containing protein	<i>D27</i>			
Others		<i>MAX1</i>	<i>RMS2</i> <i>RMS3</i>	

D3, Ishikawa et al. (2005); *D88*, Gao et al. (2009); *HTD2*, Liu et al. (2009); *D27*, Lin et al. (2009); *MAX1* and *MAX2*, Stirnberg et al. (2002); *MAX3*, Booker et al. (2004); *MAX4*, Sorefan et al. (2005); *RMS1*, Sorefan et al. (2005); *RMS2* and *RMS3*, Morris et al (2001); *RMS4* and *RMS5*, Johnson et al. (2006); *DAD1*, Showden et al. (2005); *DAD2*, Hamiaux et al. (2012); *DAD3*, Drummond et al. (2009)

そこで、理化学研究所の山口博士の協力の下、新規ホルモン様物質の正体を明らかにするため、新規ホルモン様物質を多量に蓄積していると予想される *d3-1* 変異体のメタノール抽出物を、カラムクロマトグラフィーを用いて分画した後、新規ホルモン様物質を欠失していると予想される *d10-1* 変異体に供与することによって表現型が回復するか検討した。野生型のイネでは、通常は伸長しない第1節の腋芽が、*d10-1* 変異体では高い確率で伸長することを利用して、分画物の供与から表現型の確認までを約2週間で検定する方法を開発し、複数回検討を重ねたが、新規ホルモン様物質の正体を明らかにするまでには至らなかった。

その後、2008年に理化学研究所の梅原らの研究グループおよびフランスの Gomez-Roldan らの研究グループによって、新規ホルモン様物質が「ストリゴラクトン」、あるいはその代謝産物であることが示された (Umehara et al. 2008, Gomez-Roldan et al. 2008)。

ストリゴラクトンは、もともと根寄生植物であるストライガ (*Striga*) およびオロバンキ (*Orobanche*) の種子発芽を誘導する因子として単離された物質である (Cook et al. 1966)。ストライガの仲間は全世界に42種存在しているが、その中でも被害が大きいのが *Striga hermontica* である。*S. hermontica* はソルガム、トウモロコシなどのイネ科の作物に広く寄生し、寄生した作物の収量を大きく減少させる。被害面積はアフリカを中心に3000~5000万ヘクタールに及び、その被害額は年間70億米ドルに及ぶと言われている (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) online: <http://www.fao.org/docrep/006/y5031e/y5031e0a.htm>)。作物に寄生し十分に成長したストライガは、直径0.3mmほどの種子を、1株あたり25000~200,000粒まき散らす。その種子は10~20年間にわたり発芽能力を維持しているため、一度ストライガに侵食された農地では、ストライガを根絶することが難しく、重大な問題になっている。一方、オロバンキは全世界に150種が存在しているが、大きな農業被害を及ぼしているのは *Orobanche ramosa* と

Orobanche minor の 2 種である。 *O. ramosa* は地中海沿岸地域に自生する寄生植物で、主にマメ科作物に寄生する。エジプト、モロッコ、チュニジアなどでは、豆類生産量の約 30% が *O. ramosa* によって失われていると言われている (FAO online: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematicsitemap/theme/biodiversity/weeds/issues/oro/jp/>)。 *O. minor* は北半球の広い範囲に自生しており、ナス科、アブラナ科、セリ科などの野菜類に寄生して、各地で深刻な農業被害を与えている。

ストライガとオロバンキはどちらも他の植物に寄生しなければ成長することができないため、その種子は必ず宿主となる植物の根の近くで発芽する。従って、これらの寄生植物の種子は、宿主となる植物の根を何らかの方法で感知して発芽すると考えられていた。Cool et al. (1966) は、ワタの根滲出液中にストライガ種子の発芽を誘導する物質を発見し、ストリゴールと名付けた。その後、ストリゴールと同様にストライガやオロバンキの種子発芽を促進する物質がワタ以外の植物からも見いだされた。これらの物質は三環系のテルペノイドにラクトン環がエノールエーテル結合した基本骨格を共通して持っており、総称してストリゴラクトンと呼ばれるようになった (図 28)。しかし、植物がなぜ寄生植物の発芽を促進する物質を分泌しているのかは、ストリゴラクトンの発見以来、長らく不明のままであった。

2005 年に大阪府立大の秋山らによるアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) に関する研究を通して、植物がストリゴラクトンを分泌している理由の一端が明らかになった。AM 菌は植物と共生しなければ成長することができない絶対共生菌であり、植物から有機物をもらい自らの菌糸を成長させる代わりに、土壌中のリンなどの無機養分を植物に供給している (reviewed by Bonfante and Anca, 2009)。宿主植物にとっても AM 菌との共生は土壌から効率的に栄養素を獲得するための重要な手段であり (Smith et al. 2003)、多くの陸上植物が AM 菌と共生関係にある (Van Der Heijden et al. 1998)。孢子から

発芽した AM 菌の菌糸が植物の根に寄生するメカニズムは完全には解明されていないが、菌糸が感染する前段階として、菌糸が宿主植物の根の近くまで伸長すると激しく分岐する現象が起きることは知られており (Mosse et al. 1975, Giovannetti et al. 1993)、AM 菌は宿主となる植物の根から何らかの情報を認識して、菌糸の分岐を行っていると考えられていた。

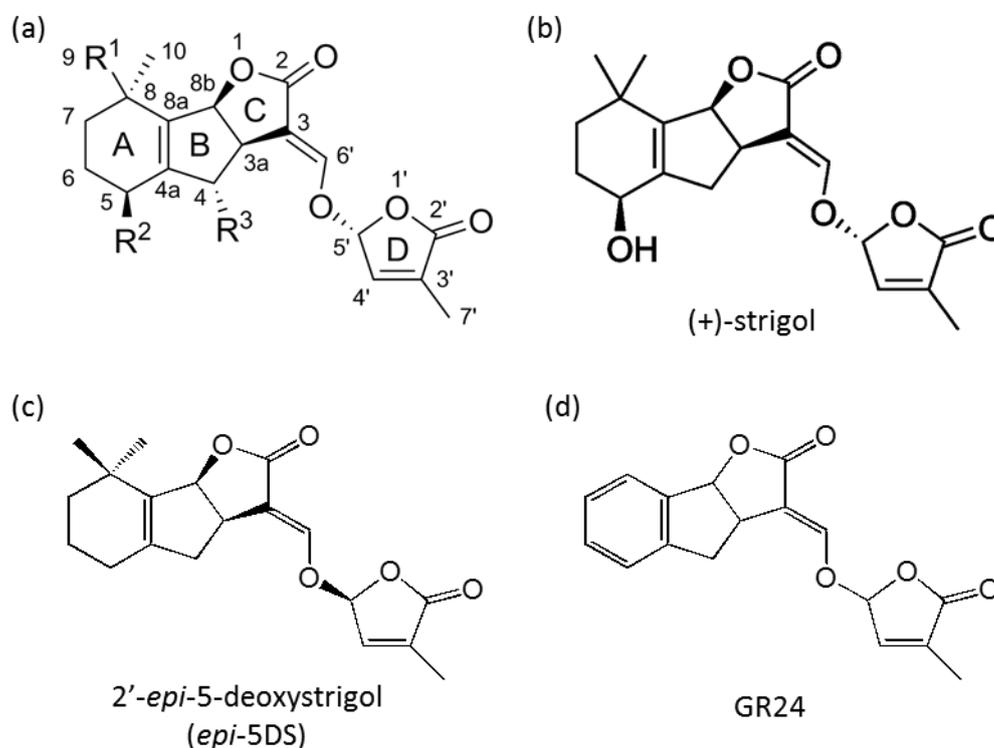


図 28 ストリゴラク톤の構造

(a) ストリゴラク톤の基本骨格。ストリゴラク톤は A, B, C 環と D 環 (ラクトン環) がエノールエーテル結合した基本骨格を持つ。

(b) 天然ストリゴラク톤 (+)-strigol. $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$.

(c) 天然ストリゴラク톤 2'-*epi*-5-deoxystrigol (*epi*-5DS). $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$.

(d) 人工ストリゴラク톤 GR24. $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$.

秋山らは、マメ科植物のモデル植物の1つであるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を水耕栽培し、その水耕液から AM 菌の菌糸分岐を誘導する物質を精製したところ、その物質がストリゴラクトン的一种である 5-デオキシストリゴールであることを発見した (Akiyama et al. 2005)。5-デオキシストリゴールだけではなく、ストリゴールおよびストリゴラクトンの合成アナログである GR24 によっても AM 菌の菌糸分岐は誘導された (Akiyama et al. 2005)。そのため、AM 菌は宿主植物が分泌するストリゴラクトンを感知して、菌糸を分岐させ宿主に感染する、言い換えると、植物が根からストリゴラクトンを分泌している理由の1つは、AM 菌の共生を促すためと考えられるようになった。しかし、ストリゴラクトンは AM 菌と共生関係にないアブラナ科の植物にも存在することが知られていたため (Westwood 2000, Goldwasser et al. 2008, Yoneyama et al. 2008)、AM 菌との共生以外にも機能があることが示唆されていた。

前章で示したように、イネの *d10* および *d17* 変異体の原因遺伝子である *D10* および *D17* や、シロイヌナズナの *MAX3* および *MAX4*、エンドウの *RMS1* および *RMS5* は、カロテノイド酸化開裂酵素 (Carotenoid Cleavage Deoxygenase; CCD7、CCD8) をコードしているため (表 2)、腋芽の成長を抑制している新規ホルモン様物質はカロテノイドから生成される可能性が示唆されていた。一方、カロテノイド代謝の変異体やイソプレノイドの合成阻害剤を用いた研究により、ストリゴラクトンはカロテノイドから合成されると推測されていた (Matusova et al. 2005, López-Raíz et al. 2008)。

そこで、*D10* および *D17* とストリゴラクトンの関係について調査するため、Umehara et al. (2008) はイネの *d10-1*、*d17-1* 変異体を用いて、これらの変異体の根浸出物および植物体内におけるストリゴラクトン濃度を調べ、*d10-1* および *d17-1* 変異体ではストリゴラクトンが検出されないことを明らかにした。また、*d3-1* 変異体では *D10* 遺伝子の発現が野生型よりも高まっていることから、新規ホルモン様物質が蓄積していると考えられていたが、実際に *d3-1* 変異体

ではストリゴラクトンが野生型よりも蓄積していることが明らかにされた。更に、*d3-1*、*d10-1*、*d17-1* 変異体にストリゴラクトンを投与すると、*d3-1* 変異体は変化がないが、*d10-1*、*d17-1* 変異体の枝分かれが正常に回復することが示された。Gomez-Roldan et al. (2008) によるエンドウの *rms* 変異体を用いた試験においても、同様の結果が得られたことから、腋芽の成長を抑制する新規ホルモン様物質の正体がストリゴラクトン、あるいはその代謝産物であると考えられるようになった (Umehara et al. 2008、Gomez-Roldan et al. 2008)。

表 2 *d* 変異体のストリゴラクトンに対する応答性

Gene	Protein	Responsiveness to SLs in loss-of-function mutant
<i>D3</i>	F-box LRR (Ishikawa et al. 2005)	Insensitive (Umehara et al. 2008)
<i>D10</i>	CCD8	Sensitive (Umehara et al. 2008)
<i>D14</i>	Putative Hydrolase	unknown
<i>D17</i>	CCD 7 (Umehara et al. 2008)	Sensitive (Umehara et al. 2008)
<i>D27</i>	Iron containing protein (Lin et al. 2009)	Sensitive (Lin et al. 2009)

前章で示したように、*D3*、*D10*、*D14*、*D17*、*D27* 遺伝子は同一の経路で腋芽の成長を制御していると考えられるため、これらの遺伝子は全てストリゴラクトンの生合成または受容・シグナル伝達に関与していると考えられている。*D3* は F-box LRR タンパク質をコードし (Ishikwa et al. 2005)、*d3* 変異体はストリゴラクトンに対して非感受性を示すことから (Umehara et al. 2008)、*D3* はストリゴラク

トンの受容またはシグナル伝達で機能していると考えられている。一方、*D10*、*D17* はそれぞれカロテノイド酸化開裂酵素である CCD8 と CCD7 をコードしており、*d10*、*d17* 変異体はストリゴラクトンの内生量が著しく減少しており、ストリゴラクトンに対して感受性を示すことから、ストリゴラクトンの生合成に関与していると考えられている。また、*D27* 遺伝子は植物固有の鉄含有タンパク質 (Iron Containing Protein) をコードしており、その変異体 *d27-1* はストリゴラクトンの内生量が減少していることが示されたため (Lin et al. 2009)、*D27* もストリゴラクトンの生合成に関与していると考えられている。

一方、*d14* 変異体の原因遺伝子である *D14* は、加水分解酵素 (α / β hydrolase) をコードしていることが明らかになったものの、その詳細な機能については不明であった。そこで、ストリゴラクトンによる腋芽の成長制御システムにおける *D14* 遺伝子の機能について明らかにするため、*d14* 変異体のストリゴラクトンに対する応答性およびストリゴラクトン内生量について解析した。

2-2 材料と実験方法

2-2-1 植物体材料

イネ (*Oryza sativa* L.) の野生型としてジャポニカ品種であるシオカリを用いた。d3-1、d10-1、d14-1、d17-1 は、シオカリを遺伝的背景とする Id 系統 (Kinoshita and Takahashi 1991, Ishikawa et al. 2005) を用いた。植物体は温室または人工気象室 (明条件, 28°C, 10 時間; 暗条件, 24°C, 14 時間) で育成した。

2-2-2 二重変異体の作成

d10-1 d14-1 二重変異体は d10-1 と d14-1 を交配した後、分離した F2 世代から d10-1 と d14-1 の両方の変異を含む個体を選抜した。d10-1 の判別は DNA 塩基配列の決定により行った。DNA 塩基配列の決定は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行い、PCR 産物を ABI 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で分析することにより行った。d14-1 の判別は、5' -GTGCTGTCGCATGGCTTCG-3' および 5' -CACCTGCTGTATCTCCTCCA-3' のプライマーセットを用いた PCR を行い、増幅 DNA 断片のサイズを比較することにより行った。

2-2-3 ストリゴラクトン処理

イネ個体へのストリゴラクトン処理、および、イネの内生ストリゴラクトンである *epi*-5DS の LC/MS-MS による測定は Umehara et al. (2008) に従った。まず、殺菌処理した種子を滅菌水中で 2 日間発芽させた後、0.6%寒天で固化した水耕培養液 (Kamachi et al. 1991) に移植し、5 日間育成した。育成した幼植物体を滅菌した水耕培養液に移植し、さらに 7 日間育成した。すなわち、発芽後 7 日目に固体培地から水耕培養液へと移植し、発芽後 14 日目の幼植物体を分析に用いた。低リン状態での育成は、発芽後 7 日目までは通常と同じように育成し、その後、リン酸の量を減らして作成した水耕培養液に移植し、7 日間育成して行った。ストリゴラクトン処理は、発芽

後 7 日目の植物体を所定の濃度で GR24 を加えた水耕培養液に移植し、7 日間育成して行った。

2-2-4 LC/MS-MS によるストリゴラクトンの定量

epi-5DS の測定は、発芽後 14 日目の個体の根および水耕培養液を回収し、重水素でラベルした *epi*-5DS を内部標準として加え、酢酸エチルで *epi*-5DS を抽出した後、LC/MS-MS で分析を行い、ピーク面積から濃度を算出した。

2-3 結果

2-3-1 *d10-1 d14-1* 二重変異体

まず、*D14* が *D10* と同一の経路によって腋芽の成長を制御していることを確認するために、*d14-1* と *d10-1* の二重変異体を作成し、その表現型が *d10* 変異体、*d14* 変異体それぞれと異なるか観察した。

野生型 (WT) および *d10-1* 変異体、*d14-1* 変異体、*d10-1 d14-1* 二重変異体を、播種後 6 週間後の個体において比較すると、*d10-1* 変異体および *d14-1* 変異体は、野生型より分けつ数が多く、稈長が短くなる典型的な分けつ矮性の表現型を示した(図 29)。*d10-1 d14-1* 二重変異体も同様に分けつ矮性の表現型を示し、*d10-1* 変異体、*d14-1* 変異体、*d10-1 d14-1* 二重変異体の間に明確な違いは見られなかった(図 29)。第 8 葉展開期の個体において、成長した腋芽の数を測定したところ、野生型と *d10-1* 変異体、野生型と *d14-1* 変異体、野生型と *d10-1 d14-1* 二重変異体との間では明確な差が見られたものの、*d10-1* 変異体ならびに *d14-1* 変異体と *d10-1 d14-1* 二重変異体の間では、有意な差は見られなかった(図 29)。以上の結果から、*d10* 変異体、*d14* 変異体および *d10-1 d14-1* 二重変異体の表現型は同一の表現型であり、つまりは *D10* と *D14* は同一の経路、すなわちストリゴラクトンを介して腋芽の伸長を抑制していると考えられた。

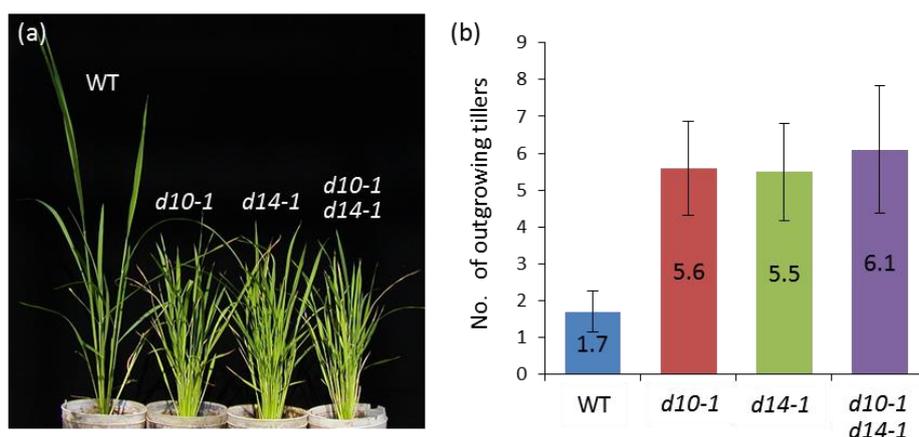


図 29 *d10-1 d14-1* 二重変異体の表現型

(a) 播種後 6 週間目の個体。左から WT (シオカリ), *d10-1*, *d14-1*, *d10-1 d14-1* 二重変異体。

(b) 第 8 葉展開期の分けつ数. 2 mm 以上の腋芽を成長した分けつとして計測した. エラーバーは標準偏差を示す ($n = 8$).

2-3-2 ストリゴラクトンによる相補試験

次に、ストリゴラクトンを *d14* 変異体に与えることにより、分けつ矮性の表現型が回復するかを検証した。ストリゴラクトンの合成アナログである GR24 を $1 \mu\text{M}$ の濃度で水耕液に加えて *d3-1*, *d10-1*, *d17-1* を育成すると、ストリゴラクトン非感受性変異体である *d3-1* 変異体では変化が見られないが、ストリゴラクトン感受性変異体である *d10-1* および *d17-1* 変異体では、第 1 節および第 2 節の腋芽の伸長が抑制され、野生型の表現型を回復する (Umehara et al. 2008、図 30)。しかし、同様の実験を *d14-1* 変異体で行っても、第 1 節および第 2 節の腋芽の伸長は抑制されなかった (図 30)。さらに、*d10-1 d14-1* 二重変異体においても同様の試験を行ったが、*d10-1 d14-1* 二重変異体では *d14-1* 変異体と同様に第 1 節および第 2 節の腋芽の伸長は抑制されなかった (図 30)。

d14-1 変異体の GR24 に対する応答性について、より詳細に評価するために、発芽後 1 週間の個体を 0、0.01、0.1、 $1 \mu\text{M}$ の GR24 を含む水耕液で 1 週間育成し、伸長した第 1 節、第 2 節の腋芽を数えた。WT では水耕液中の GR24 濃度に関わらず、第 1 節、第 2 節の腋芽は全く伸長しなかった (Umehara et al. 2008、図 31)。対して、*d3-1* 変異体では水耕液中の GR24 濃度に関わらず、第 1 節、第 2 節の腋芽のほとんどが伸長した (Umehara et al. 2008、図 31)。*d10-1* 変異体では水耕液中に GR24 を含まない場合は、*d3-1* と同様に形成されたほとんどの腋芽が伸長したが、 $0.1 \mu\text{M}$ の GR24 を含む水溶液では第 1 節腋芽の伸長が完全に抑制され、 $1 \mu\text{M}$ の GR24 を含む水溶液では第 2 節腋芽も完全に抑制されるようになった (Umehara et al. 2008、図 31)。*d14-1* 変異体で同様の試験を行ったところ、水耕液中の GR24 濃度に関わらず、第 1 節、第 2 節の腋芽はほぼ全てが伸長するとい

う *d3-1* 変異体と同様の結果となった (図 31)。以上の結果から、*d14* 変異体は *d3* 変異体と同様にストリゴラクトン非感受性変異体であると考えられた。

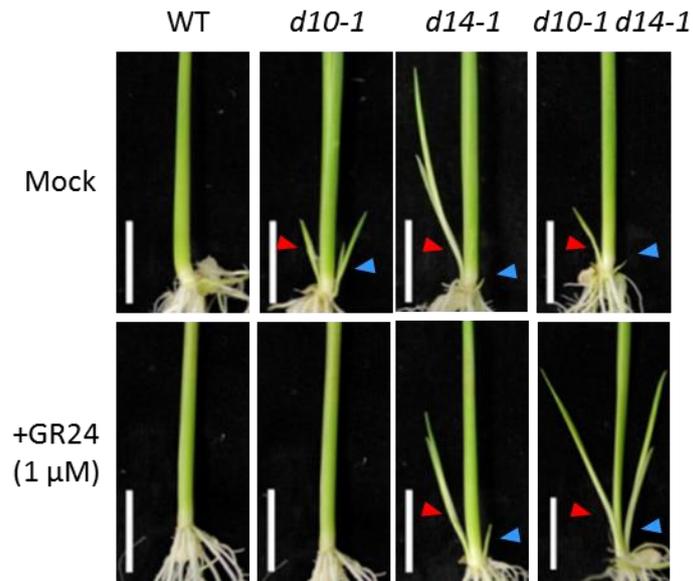


図 30 ストリゴラクトン (GR24) による相補実験

発芽後 1 週間の WT および *d* 変異体 (*d10-1*, *d14-1*, *d10-1 d14-1*) の各個体を、 $1 \mu\text{M}$ の GR24 を含む水耕液に移し 1 週間育成した。青い矢頭は第 1 節の腋芽，赤い矢頭は第 2 節の腋芽を示す。WT では第 1, 第 2 節の腋芽は成長しなかったため確認できないが，*d10-1*, *d14-1*, *d10-1 d14-1* 二重変異体ではどちらも成長した。GR24 で処理すると *d10-1* では腋芽の成長が抑制されるが，*d14-1*, *d10-1 d14-1* 二重変異体では腋芽は成長した。スケールバーは 1 cm を示す。

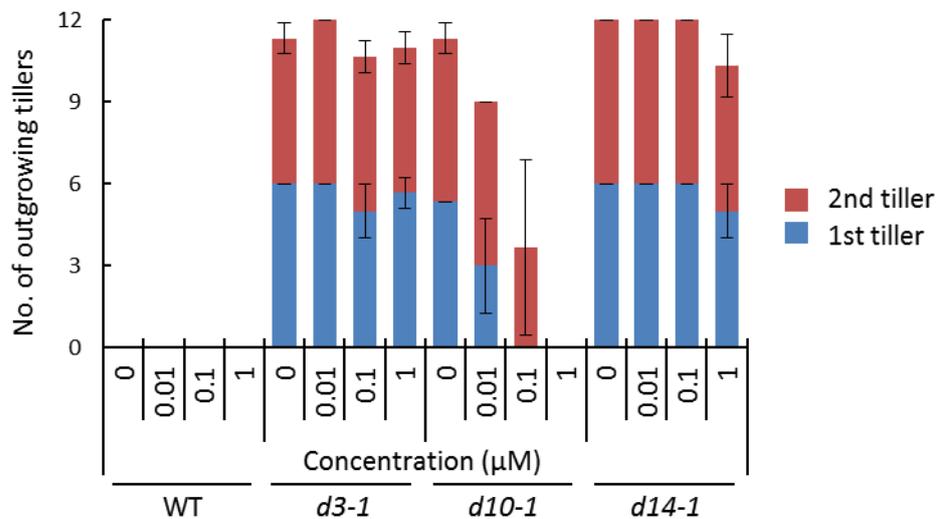


図 31 GR24 による相補実験

発芽後 1 週間の WT および *d* 変異体 (*d3-1*, *d10-1*, *d14-1*) の各個体を、0.01, 0.1, 1 μM の GR24 を含む水耕液に移し 1 週間育成した。それぞれ 6 個体の第 1 節 (青) および第 2 節 (赤) の腋芽について観察し、2 mm 以上の腋芽を成長した分けつとして計測した。試験は 3 回行い、その平均と標準偏差を示した。*d3-1*, *d10-1* の結果は Umehara et al. (2008) より引用した。

2-3-3 *d14* 変異体ではストリゴラクトンが多く合成されている

ストリゴラクトンの生合成は負のフィードバックによる制御を受けており、ストリゴラクトン非感受性の *d3* 変異体では、内生のストリゴラクトンである 2'-*epi*-5-deoxystrigol (*epi*-5DS) が野生型よりも多く蓄積されている (Umehara et al. 2008、図 32)。ストリゴラクトンの生合成は土壌または水耕液中のリン酸濃度に依存して制御されていることが知られており (Yoneyama et al. 2007(1), Yoneyama et al. 2007(2), Umehara et al. 2010)、リン酸を除いた水耕液で育成した *d3-1* 変異体の根には、リン酸を含む水耕液で育成した個体の根よりも多くのストリゴラクトンが蓄積していることが知られている (Umehara et al. 2008、図 32)。さらに、ストリゴ

ラクトンは根から分泌されることから、水耕液中にも存在し、*d3-1* 変異体を育成した水耕液には野生型を育成した水耕液よりも高濃度のストリゴラクトンが含まれる (Umehara et al. 2008、図 32)。対して、ストリゴラクトン生合成欠失体である *d10-1* 変異体および *d17-1* 変異体の根および水耕液では、リン酸の有無に関わらず、ストリゴラクトンは検出されない (Umehara et al. 2008、図 32)。

これまでの実験結果から、*d14* 変異体はストリゴラクトン非感受性の変異体と考えられたため、*d3* 変異体と同様にストリゴラクトンを蓄積している可能性が考えられた。そこで、まず *d14-1* 変異体の根に含まれる epi-5DS 濃度を測定した。

リン酸を含む水耕液で育成した *d14-1* 変異体の根には野生型よりも非常に多くのストリゴラクトンが蓄積しており、その値は *d3-1* 変異体よりも高く、測定した試料の中で最も高かった (図 32a、WT P+, 16 pg/gFW; *d3-1* P+, 19 pg/g FW; *d10-1* P+, 0 pg/gFW; *d14-1* P+, 157 pg/gFW; *d17-1* P+, 0 pg/g FW)。さらに、リン酸を含まない水耕液で育成した *d14-1* 変異体では、より多くのストリゴラクトンが蓄積していた (図 32a)

同様の傾向は、根に含まれる epi-5DS だけではなく、水耕液中の epi-5DS にも見られ、*d14-1* 変異体を育成した水耕液中には野生型を育成した水耕液よりも高濃度の epi-5DS が含まれていた (図 32b)。したがって、*d14* 変異体は *d3* 変異体と同様にストリゴラクトンを蓄積する変異体であると考えられた。

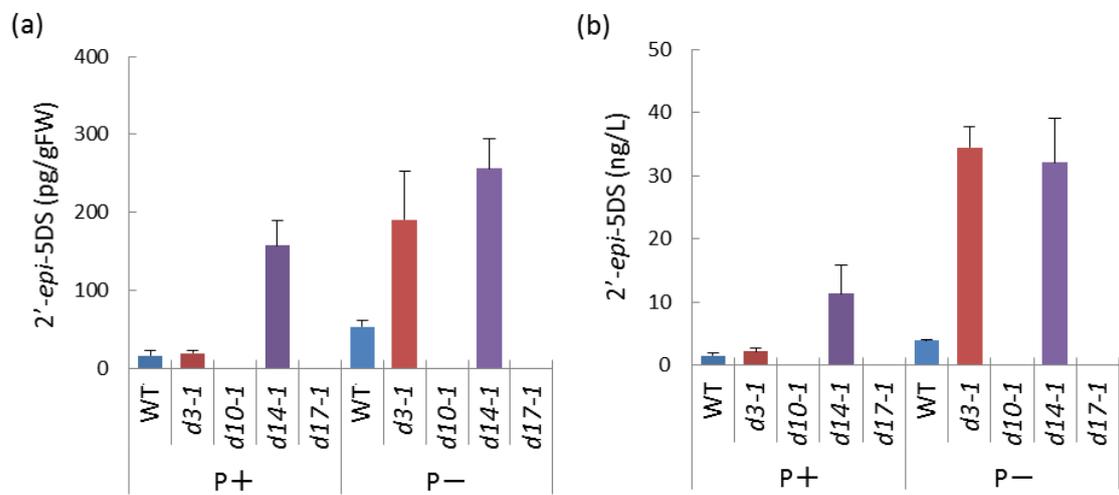


図 32 *d* 変異体におけるストリゴラクトン量の測定結果

野生型 (WT)と *d* 変異体の根 (a) および水耕液中 (b) に含まれるストリゴラクトン量. リン酸を含む水溶液 (P+)とリン酸を含まない水溶液 (P-)で1週間育成し, 根および水耕液中に含まれる *epi*-5DS量をLC-MS-MSで測定した. FW, flesh weight. エラーバーは標準偏差 (n = 3)を示す. *d3-1*, *d10-1*, *d17-1*の結果は Umehara et al. (2008)より引用した.

2-4 考察

これまでの解析から、イネの *D14* 遺伝子は *D3*、*D10*、*D17*、*D27* 遺伝子とともに、ストリゴラクトンの生合成もしくは受容・シグナル伝達に関与していると示唆されていたが、その詳細な機能については不明であった。そこで、ストリゴラクトンによる腋芽の成長制御システムにおける *D14* 遺伝子の機能について明らかにするため、*d14* 変異体のストリゴラクトンに対する応答性およびストリゴラクトン内生量について解析した。

2-4-1 ストリゴラクトン経路における *D14* の機能

まず、*D14* が *D3*、*D10*、*D17* と同様にストリゴラクトン経路において機能していることを確認するために、*d10-1 d14-1* 二重変異体の表現型を確認した。もし、*D14* が *D10* とは独立して腋芽の伸長を抑制しているのであれば、*d10-1 d14-1* 二重変異体は *d10-1* 変異体と *d14-1* 変異体の表現型が相加的になり、*d10-1* 変異体、*d14-1* 変異体それぞれよりも、伸長する腋芽の数が増える可能性が高いと考えられる。しかし、*d10-1* 変異体、*d14-1* 変異体、*d10-1 d14-1* 二重変異体では、伸長する腋芽の数に有意な差はなく、これら変異体の表現型は同一であると考えられた。したがって、*D14* は *D3*、*D10*、*D17* と同様にストリゴラクトン経路において機能していることと考えられた。

次に、*D14* のストリゴラクトン経路における機能について解析するため、ストリゴラクトン供与による相補実験を行った。Umehara et al. (2008) によると、 $1 \mu\text{M}$ の GR24 を水耕液に加えて *d3-1*、*d10-1*、*d17-1* を育成すると、ストリゴラクトン非感受性変異体である *d3-1* 変異体は変化が見られないが、ストリゴラクトン感受性変異体である *d10-1* 変異体および *d17-1* 変異体では第 1 節および第 2 節の腋芽の伸長が抑制され、野生型の表現型に回復する (図 31)。同様の試験を、*d14-1* 変異体を用いて行ったところ、*d14-1* 変異体では表現型が回復せず (図 30、31)、*d14* 変異体は *d3* 変異体と同様に、ストリ

ゴラクトンに対して非感受性の変異体であると考えられた。さらに *d10-1 d14-1* 二重変異体も、*d14-1* 変異体と同様に、ストリゴラクトンに対して非感受性を示した。表現型の解析から、*D10* と *D14* は同一の経路で腋芽の伸長を抑制していると考えられたため、*d10* 変異体の表現型がストリゴラクトンによって回復するには、*D14* 遺伝子の機能が必要であると考えられた。

前章で述べたように、*d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d17-1*, *d27-1* 変異体では、*D10* 遺伝子の発現が上昇しており、ストリゴラクトンの生合成にはフィードバック制御機構が存在することが示唆されていた。実際に、*d3-1*, *d10-1*, *d17-1* 変異体における内生ストリゴラクトン量を比較すると、*d10-1*, *d17-1* 変異体では内生ストリゴラクトンが検出されないが、*d3-1* 変異体では内生ストリゴラクトンが野生型よりも蓄積していることが確認されている (Umehara et al. 2007、図 32)。*d14-1* 変異体における内生ストリゴラクトン量を分析したところ、根中、水耕液中どちらも野生型より多く (図 32)、*d14-1* 変異体は *d3-1* 変異体と同様にストリゴラクトンを蓄積する変異体であると考えられた。

以上をまとめると、*d14-1* 変異体は、ストリゴラクトンの生合成は正常に行われるが、ストリゴラクトンに対して非感受性を示す変異体であると考えられた。そのため、その原因遺伝子である *D14* の機能としては 2 つの可能性が考えられる (図 33)。1 つは受容体やシグナル伝達因子として、ストリゴラクトンの受容に関与している可能性、2 つめは酵素として、ストリゴラクトンをさらに生理活性のある形態に代謝している可能性である。

第一章で述べたように、*D14* タンパク質は加水分解酵素スーパーファミリーに属するタンパク質であり、酵素活性に必要な catalytic triad も保存されている (data not shown)。しかし、加水分解酵素スーパーファミリーに属するタンパク質には、実際に加水分解酵素として機能するものの他に、*GID1* のように植物ホルモンの受容体として機能するものもあり、*D14* タンパク質の二次配列の

みでは、そのどちらの可能性も検証することはできない。

この2つの可能性を検証するには、シロイヌナズナやエンドウマメで行われているように接木実験を行えば良いが、イネを材料にした接木実験はわずかに報告例があるものの（猪ノ坂，1957；原田，2014）、技術的に大変難しく、筆者も試みたものの成功には至っていない。

近年、Kagiyama et al. (2013) により、D14 タンパク質が合成ストリゴラクトン GR24 に直接結合することが示された。また、ペチュニアにおいて、D14 のホモログである PhDAD2 と D3 のホモログである PhMAX2 が、ストリゴラクトン濃度依存的に複合体を形成することが明らかにされている (Hamiaux et al. 2012)。D3 タンパク質は SCF 複合体を形成する F-box タンパク質の一種であり、タンパク質の特異的分解に関与していると考えられている (Ishikawa et al. 2005)。以上をまとめると、D14 タンパク質と D3 タンパク質を含む SCF 複合体がストリゴラクトンの受容体であり、この SCF 複合体により何らかのタンパク質が特異的に分解されることが、ストリゴラクトンシグナル伝達の開始点であると考えられる。

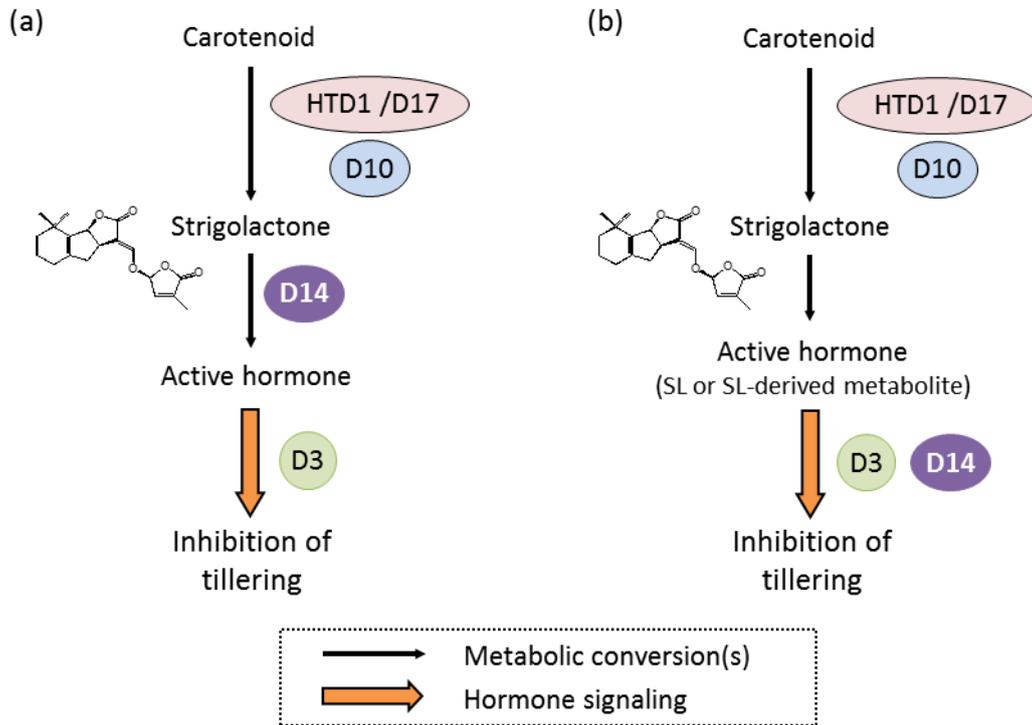


図 33 ストリゴラクトン経路における D3, D10, D14, D17 の働きのモデル

(a) D14 がストリゴラクトンの代謝に関わっている場合

(b) D14 がストリゴラクトンの受容、シグナル伝達に関わっている場合

Umehara et al. (2008)より引用

第 3 章

ストリゴラクトンがイネの根の成長に与える影響

3-1 序論

リン酸 (H_3PO_4) は植物の発生と成長に必須な栄養素である。一般に、リン酸は高 pH 土壌においてはカルシウムと、低 pH 土壌においては鉄やアルミニウムと結合し、不溶化するため、植物が利用できる土壌中のリン酸量は限られている (for review see Bielecki 1973)。そのため、植物は土壌中からリン酸を吸収するために、さまざまな戦略を進化させてきた (for review see Raghothama et al. 1999)。例えば、イネ、ムギ類は根からムギネ酸とよばれる有機酸を分泌し、土壌中の二価の金属イオンとキレート錯体を形成することにより、不溶化しているリン酸を可溶化し、吸収することができる。また、リン酸欠乏状態においてストリゴラクトンの生合成量が増加することは、植物が土壌中のリン酸欠乏に適応するための戦略の一つと考えられている (Gomez-Roldan et al. 2008, Umehara et al. 2008, Yoneyama et al. 2007, 2008, Umehara et al. 2010)。

ストリゴラクトンは主に 2 つの効果で植物にリン酸欠乏への適応力を付与していると考えられている。1 つはアーバスキュラー菌根 (AM) 菌の共生を促して、リン酸の吸収を促す効果である。AM 菌は多くの植物の根に寄生し、根の内外に菌糸を伸ばして植物のリン酸吸収を助けている共生菌である。ストリゴラクトンは AM 菌が根に寄生するために必要な「菌糸の分岐現象 (Hyphal branching)」を引き起こすことが明らかになっており、リン酸欠乏時の植物は、根から通常よりも多くのストリゴラクトンを分泌して AM 菌の共生を促し、より多くのリン酸を吸収しようとしていると考えられている。

2 つめは植物の地上部の枝分かれを抑制して、限られたリン酸を有効に活用する効果である。ストリゴラクトンは腋芽の成長を抑制することが明らかになっている (Gomez-Roldan et al. 2008, Umehara et al. 2008)。リン酸欠乏時の植物は、体内のストリゴラクトン濃

度を上昇させ、腋芽の成長を抑制することにより無秩序に成長することなく、限られたリン酸を効率的に利用して成長していると考えられている (Umehara et al. 2008, 2010)。

一方でリンの吸収、AM 菌の共生、植物の形態の関係については古くから作物学的な研究が行われており、磯部と坪木 (1998) は、土壤有効態リン含有量が少ない環境でイネ科作物およびマメ科作物を栽培し、AM 菌の接種による生育促進効果について検討した結果、マメ科作物は AM 菌の接種により有意な生育促進効果が得られたのに対し、イネ科作物では AM 菌接種の有無によりリンの吸収量が変わらず、AM 菌を接種せずとも十分な生育を示したことを報告している。この理由としては、イネ科作物は根系が発達しており、AM 菌が感染しなくても土壤から十分なリンを吸収できるためと考えられている (磯部と坪木, 1998)。

水稲は低リン耐性が強いことが知られており、その理由の 1 つとして低リン条件下においても水稲は根系の発達が比較的良好で、高いリン吸収能を維持することが報告されている (但野と田中, 1980)。また、斉藤と田中 (1983) は、完全培養液で生育させた水稲をリン欠除培養液に移し、植物体内のリン含有量が通常値から低下していく経過における根の生育の変化について検討し、培養液の切り替え直後は、一時的に根部乾物重、根長、根の太さが完全培養を続けた場合より大きくなることを報告している。

以上より、イネはリンの欠乏に対して、AM 菌の共生に頼るだけでなく、自身の根を成長させることによりリン吸収能を維持していると考えられる。そして、この現象はストリゴラクトンによって制御されている可能性がある。

ストリゴラクトンの根の成長に対する影響については、ペチュニアの *MAX4/RMS1/D10* ホモログである *Decreased Apical Dominance1 (DAD1)* の機能欠失変異体 *decreased apical dominance (dad)1-1* は根部の重量が減少することが報告されて

いる (Snowden et al. 2005)。また、シロイヌナズナおよびトマトを用いた研究により、ストリゴラクトンを外生的に与えると根毛の密度が上昇することが示されている (Koltai et al. 2010, Kapulnik et al. 2010, Ruyter-Spira et al. 2010)。リン吸収には、根長が長い方が、また根毛が多いほうが有利であることから (米山ら 1990)、これらの植物においてストリゴラクトンにより根毛密度が上昇するという現象は、リンの吸収を促進するためである可能性が考えられる。

そこで本章では、リン欠乏時においてイネの根が成長する現象がストリゴラクトンの影響によるものなのかを検討するために、ストリゴラクトンの受容および生合成の機能欠失体である *d3-1* および *d10-1* をリン欠乏状態で生育させ、イネの根の成長におけるストリゴラクトンの影響について観察した。

3-2 材料と実験手法

3-2-1 植物と生育方法

イネ野生型 (WT) 植物として、*Oryza sativa* cv. Shiokari (品種名：シオカリ) を用いた。d3-1, d10-1, d14-1, d17-1, d27-1 として、シオカリを遺伝的背景とする Id3, Id10, Id14, Id17, Id27 を用いた (Kinoshita and Takahashi 1991, Ishikawa et al. 2005)。根系の観察では、市販の育苗用培土を入れた 1.2 L (1/5000 a) のワグネルポットに、萌芽状態の種子を直接播種し、加温していない夏季のガラス温室内で育成した個体を用いた。

3-2-2 鞘葉節冠根の観察

次亜塩素酸で表面を殺菌した種子を、滅菌水中で 30℃、2 日間発芽させた。萌芽状態の種子を 12 ml の 1/2 MS 培地 (含 0.8% アガロース、3% ショ糖) に移植し、24℃、白色蛍光灯下 (16 時間明期、8 時間暗期) で育成した。リン欠乏状態での育成は、リン酸を加えずに作成した 1/2 MS 培地 (リン欠培地; 含 0.8% アガロース、3% ショ糖) に萌芽状態の種子を移植し、同様の条件で育成した。移植後 14 日後に幼植物体を培地から抜き取り、地上部の長さ、種子根長、冠根数、各冠根長を計測した。ストリゴラクトンの添加試験では、萌芽状態の種子を GR24 (最終濃度 0.01, 0.1, 1, 10 μ M) を含む 1/2 MS 培地 (含 0.8% アガロース、3% ショ糖) に移植し、上記の条件で育成した。実験期間中は培地中の GR24 の濃度を維持するために、初めに培地に添加した量の GR24 を 3 日おきに培地に吸収させた。

3-2-3 根端細胞の観察

根端分裂組織の観察には、発芽後 4 日の個体の鞘葉節冠根を用いた。根端から約 2 cm をカミソリで切り取り、10 μ M のプロピジウムアイオダイドに 5 分間浸漬して細胞を染色した。染色した根を蒸留水で 3 回洗浄し、抱水クロラール溶液 (抱水クロラール-グリ

セロール-水，8 : 1 : 2) で透明化して染色された細胞を観察した。細胞の観察には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV 1000, OLYMPUS) を用いた。根の成熟細胞の長さの測定は、皮層の第 2 層目の細胞列を用いた。WT は 54 細胞、*d10-1* は 36 細胞、*d14-1* は 51 細胞の細胞長を測定した。根端分裂組織の細胞数は、皮層の第 1 層目の細胞列において、静止中心から細胞伸長を開始している細胞までの細胞数を、WT は 7 個体、*d10-1* は 10 個体、*d14-1* は 7 個体で測定した。

3-2-4 統計的解析

共分散性の解析は F-test により行った。すなわち、P 値が 0.05 以上の場合に 2 データは共分散であると判断した。平均値の差の有意性の判定は、2 データが共分散の場合は Student の t-test で、共分散でない場合は Welch の t-test で行った。

3-3 結果

3-3-1 *d* 変異体では根部の成長が抑制されている

発芽後 6 週目の *d10-1* (ストリゴラクトン欠失変異体)、*d14-1* (ストリゴラクトン非感受性変異体) の地上部および根の形態を観察した (図 34)。地上部は第 1 章で報告されているように、*d10-1*、*d14-1* では稈長が短くなるとともに分げつ数が著しく増加した (表 3、図 34、Ishikawa et al. 2005)。根を肉眼で観察すると、*d10-1*、*d14-1* では WT に比べて根が全体的に短く、最も長い根は *d10-1* では WT の 63.8%、*d14-1* は WT の 57.3% となった (表 3)。根の乾物重量を測定したところ、*d10-1*、*d14-1* では WT よりも軽かった (表 3)。

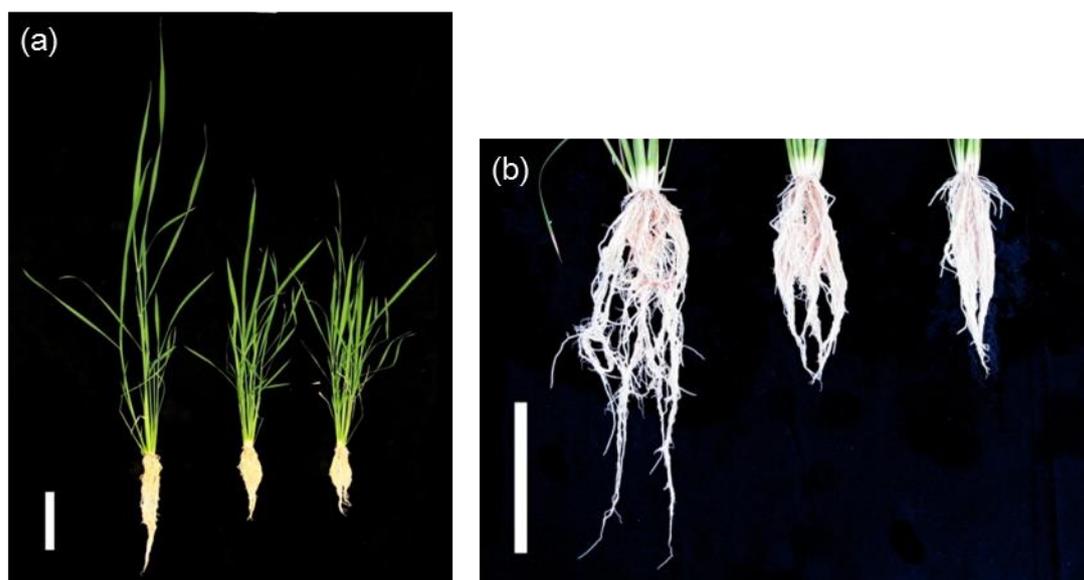


図 34 *d* 変異体の根の形態

(a) 播種後 6 週間の植物体。野生型 (左)、*d10-1* 変異体 (中央)、*d14-1* 変異体 (右)。

(b) 野生型 (左)、*d10-1* 変異体 (中央)、*d14-1* 変異体 (右) の根の拡大図。スケールバーは 10 cm を示す。

表 3 *d10-1* および *d14-1* 変異体の根の表現型

Character	Wild type	<i>d10-1</i>	<i>d14-1</i>
Plant height (mm)	552.0±11.4	411.7±14.7	425.7±5.3
No. of tillers (/plant)	4.7±0.5	11.7±1.7	11.0±1.6
Longest root length (mm)	226.7±18.0	144.7±11.0	130.0±6.7
Total dry weight (g)	2.30±0.21	1.74±0.23	1.64±0.30
Dry weight of roots (g)	0.42±0.06	0.33±0.02	0.28±0.01

Each value represents the mean ± S.D. of 3 plants.

3-3-2 *d* 変異体では冠根の伸長が抑制されている

イネの根系は主に 2 種類の根で構成されている。すなわち、種子根と冠根である (図 35 a、Hoshikawa 1989)。種子根は胚から発生した根であるのに対し、冠根は茎内部の維管束周辺から発生する不定根である (reviewed by 森田・阿部 1994)。イネを含む単子葉植物の根系はほとんど冠根から成り立っており、種子根は生育初期の一定期間のみ機能している (Hoshikawa 1989)。図 34 と表 3 で示したように、*d10-1* および *d14-1* では WT よりも根が短かった。この現象をより詳細に解析するため、発芽後 14 日の *d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27-1* および WT の種子根と冠根を観察した。今回用いた実験系では、発芽後 14 日の WT 個体には 1 本の種子根と鞘葉節から発生した平均 5 本の冠根が存在していた (図 35 a, b)。この種子根と冠根のパターンは WT 以外の *d* 変異体においても保存されていた (図 30 c, d)。種子根の長さを測定すると、*d* 変異体では 5WT よりもやや短い傾向が認められたものの、有意な差ではなかった (図 35 e)。一方、冠根は *d3-1*, *d10-1*, *d14-1*, *d17-1*, *d27-1* の全てで WT よりも有意に短くなっていた (図 35 f)。鞘葉節から発生した冠根の数、冠根の総数は *d* 変異体と WT で差はなかった (data not shown)。

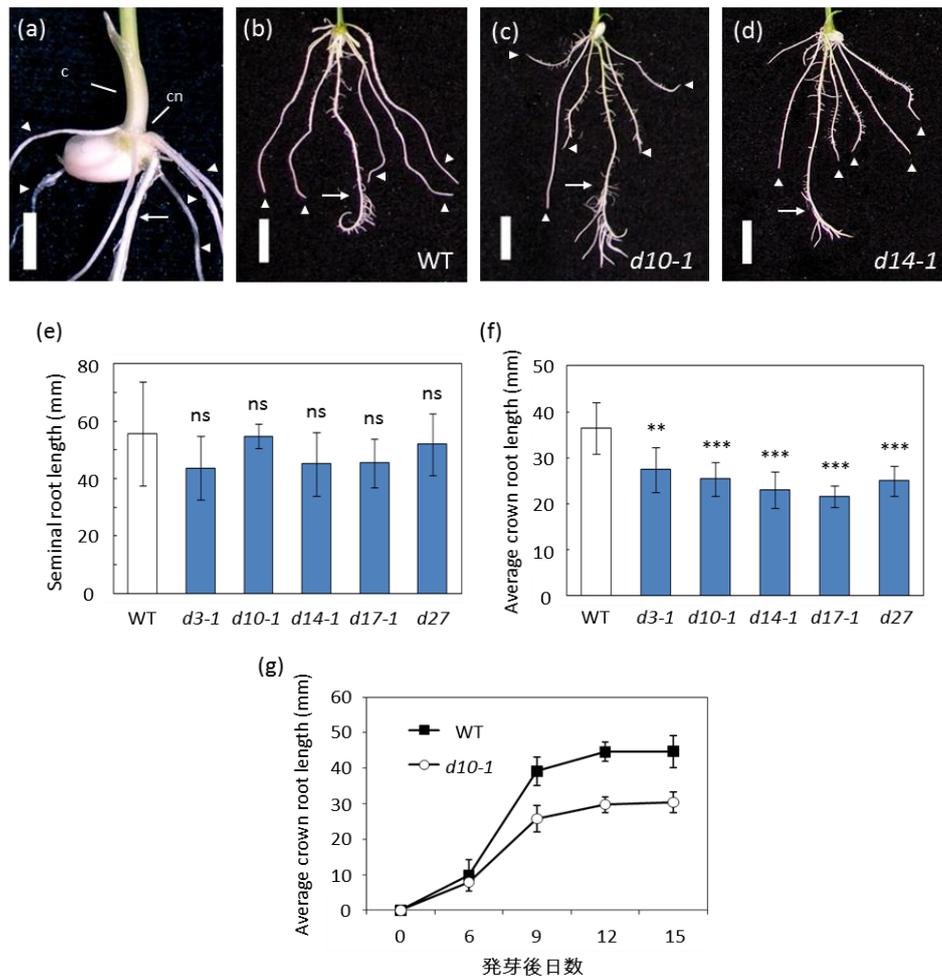


図 35 *d* 変異体の根の表現型

(a) 種子根と鞘葉節から発生した冠根。c, coleoptile (鞘葉); cn, coleoptilar node (鞘葉節)。

(b-d) 播種後 14 日の WT (b), *d10-1* (c), *d14-1* (d) における根の形態。白矢印は種子根を, 白矢頭は鞘葉節から発生した冠根を示す。スケールバーは 5 mm (a), または 1 cm (b-d)。

(e, f) *d* 変異体における種子根 (e) と鞘葉節冠根 (f) の長さ。種子根の長さは 10 個体について調べた。鞘葉節冠根の長さは鞘葉節から発生した冠根 5 本の平均値を 10 個体について調べた。エラーバーは標準偏差 (n = 10) を示す。ns, WT との有差なし; *, 有意水準 5%, ***, 有意水準 0.1% で WT との有差あり。

(f) WT と *d10-1* 変異体における冠根長の経時的変化。各数値は 6 個体について調べた平均値、エラーバーは標準偏差 (n=6) を示す。

*d*変異体で冠根が短くなった原因としては、冠根の伸長速度が遅かった可能性と冠根が短いまま伸長が停止した可能性が考えられた。そこで、*d10-1*およびWTにおける冠根の伸長を経時的に観察した。WTでは、発芽後5日で冠根の発生が目視で確認できた(data not shown)。発生した冠根は発芽後6~9日に急激に伸長した後、発芽後12日以降はほとんど伸長しなくなった(図35g)。*d10-1*においても冠根の発生、伸長、伸長停止の時期はWTとほぼ同じであった。しかし、*d10-1*では各観察日において冠根が短く、最終的にWTよりも短いまま伸長が停止した(図35g)。したがって、*d*変異体において冠根が短くなったのは、伸長が停止するタイミングが変化しているわけではなく、伸長速度が遅くなっているためと考えられた。

3-3-3 ストリゴラクトンは冠根の伸長を促進する

*d*変異体において冠根が短くなった現象がストリゴラクトンによる影響なのかを検討するために、ストリゴラクトン欠失変異体である*d10-1*およびストリゴラクトン非感受性変異体である*d14-1*にストリゴラクトンを外因的に与え、冠根の伸長が回復するのか検討した。合成ストリゴラクトンの一種であるGR24を0.01、0.1、1 μ Mの各濃度で与えたところ、*d10-1*ではGR24の濃度依存的に冠根の伸長が回復し、1 μ MのGR24存在下ではWTと同じ長さになった(図36a)。しかしながら、*d14-1*ではGR24を与えても冠根の長さに大きな変化はなかった(図36a)。WTにおいては、1 μ MのGR24を与えることにより冠根がやや伸長した傾向が見られたが、有意な冠根長の変化は見られなかった(図36a)。

次にWTおよび*d14-1*に対してさらに高濃度のストリゴラクトンを与え、冠根の長さを比較した。Minakuchi et al. (2010)によると、10 μ M以上の高濃度のGR24をWTに与えると、WTにおいても腋芽の伸長が阻害されることが知られている。そこでWTおよび*d14-1*を10 μ MのGR24存在下で育成したところ、WTでは冠根の

顕著な伸長が見られた (図 36 b)。しかし、*d14-1* では冠根の長さに変化は見られなかった (図 36 b)。以上の結果より、*d10-1* および WT ではストリゴラクトンにより冠根の伸長が促進され、*d14-1* ではストリゴラクトンによる冠根の伸長が見られないことが確認された。

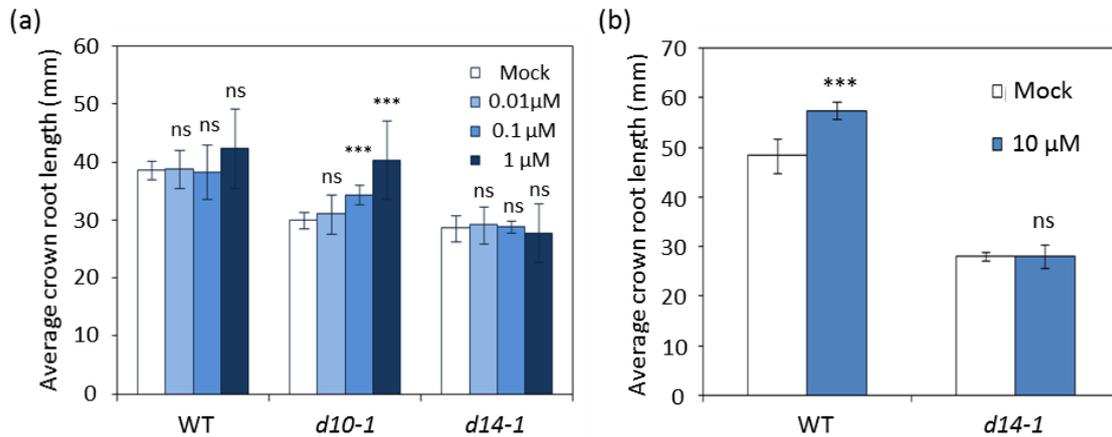


図 36 ストリゴラクトンによる冠根長の変化

(a) ストリゴラクトンによる相補実験. GR24 濃度が 0.01, 0.1, 1 μM になるように, GR24 (1% アセトンに溶解) を培地に加えた. Mock 処理として 1% アセトンを加えた. 各値は 8 個体の平均値 \pm 標準偏差を示す. ns, Mock 処理との有意差なし; ***: 有意水準 0.1% で Mock 処理と有意差あり.

(b) 高濃度 (10 μM) の GR24 添加による冠根長の変化. GR24 濃度が 10 μM になるように, GR24 (1% アセトンに溶解) を培地に加えた. Mock 処理として 1% アセトンを加えた. 各値は 8 個体の平均値 \pm 標準偏差を示す. ns, Mock 処理との有意差なし; ***: 有意水準 0.1% で Mock 処理と有意差あり.

3-3-4 *d* 変異体ではリン欠乏による冠根の伸長促進が起きない

水耕培養液で育成したイネを完全培養液からリン欠乏培養液に移すと、一時的に冠根の伸長が促進され、完全培養液で育成した時よりも根部乾物重が増加する (斉藤・田中 1983)。また、リン

が欠乏した状態で植物を育成すると、根および水耕液に含まれるストリゴラクトンの濃度が上昇することが知られている (Umehara et al. 2008, Yoneyama et al. 2007, 2008, López-Ráez et al. 2008)。図 36 で示したように、外因的にストリゴラクトンを与えることにより冠根の伸長は促進される。これらの結果から一つの可能性が考えられた。それはリン欠乏状態における冠根の伸長が、ストリゴラクトンによる影響である可能性である。そこで、この可能性を検証するために、WT、*d10-1*、*d14-1* をリン欠乏状態で育成し、完全栄養状態で育成した場合と比較した。齊藤・田中 (1983) と同様に、WT をリン欠乏状態で育成すると、冠根の伸長が促進され、冠根は完全栄養状態で育成した場合よりも約 15%長くなっていた (図 37 a, c)。一方、*d10-1* 変異体および *d14-1* 変異体ではリン欠乏状態で育成しても、冠根の長さに変化はなかった (図 37b, c)。

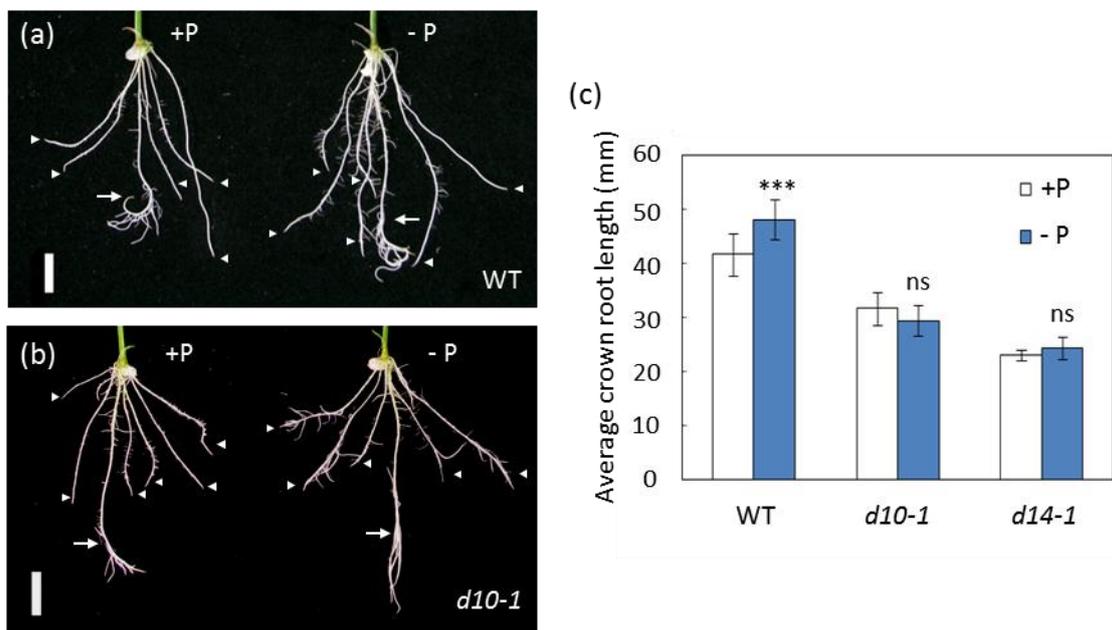


図 37 リン欠乏と根の成長の観察

(a, b) 発芽後 14 日の WT および *d10-1* 変異体。左はリンを含む通常の培地 (リン酸 600 μ M) で育成したもの (+P), 右はリンを含まない培地で育成したもの (-P) を示す。白矢印は種子根, 白矢頭は冠根を示す。スケールバー: 1 cm。

(c) リン欠乏が冠根長に及ぼす影響。白棒はリンを含む通常の培地（リン酸 600 μ M）で育成したときの冠根長（+P）、青棒はリンを含まない培地で育成したときの冠根長（-P）を示す。各値は 18 個体の平均値 \pm 標準偏差を示す。ns, +P 培地との有意差なし； ***: 有意水準 0.1% で +P 培地と有意差あり。

3-3-5 *d* 変異体では根端における細胞分裂が抑制されている

根端は根冠を除外すると、細胞の活動状態により、大きく分裂帯と伸長帯に分けられる（reviewed by 森田・阿部 1994, Ishikawa and Evans 1995）。根端分裂組織で形成された細胞は分裂帯において細胞分裂を複数回繰り返した後、伸長帯において細胞伸長を起こし、成熟細胞へと分化する。分化した成熟細胞の大きさはほとんど変わることはないため、根の伸長という現象は、分裂帯における細胞分裂と伸長帯における細胞伸長の問題として考えることができる。

d 変異体において冠根の伸長が抑制されている原因が細胞分裂の変化によるものなのか、細胞伸長の変化によるものなのかを解析するために、まず成熟細胞の大きさを比較した。*d10-1* および *d14-1* においても成熟細胞の形態や配置に大きな変化はなかった（図 38 a-c）。また、成熟細胞の長さも WT、*d10-1*、*d14-1* の間で大きな変化はなかった（図 38 d）。

次に分裂帯について観察した。分裂帯の細胞は伸長帯の細胞や分化した成熟細胞よりも小さいため、プロピジウムアイオダイドにより細胞膜を染色すると、分裂帯はより強く染色されているように見えた（図 33 e-g）。WT、*d10-1*、*d14-1* で分裂帯の根軸方向の長さを比較すると、*d10-1*、*d14-1* では分裂帯が短くなっていた（図 38 e-g）。より詳細に分裂帯の長さを比較するために、静止中心から細胞伸長している初めの細胞までの長さを測定した（図 38 h-j）。その結果、*d10-1* および *d14-1* では WT よりも分裂帯の長さが短くなっていることが確認された（WT, $799 \pm 74 \mu\text{m}$; *d10-1*, $584 \pm 86 \mu\text{m}$; *d14-1*, $542 \pm 102 \mu\text{m}$ ）。分

裂帯の細胞の大きさは WT、*d10-1*、*d14-1* で大きな差はなかった (図 38 h-j)。

最後に分裂帯の細胞数について計測した。皮層において、静止中心から細胞伸長している初めの細胞までの数を計測したところ、*d10-1* および *d14-1* では WT よりも細胞数が減少していた (図 38 k)。以上の結果より、*d10-1* および *d14-1* では細胞伸長よりも、分裂帯における細胞分裂が抑制されていると考えられた。

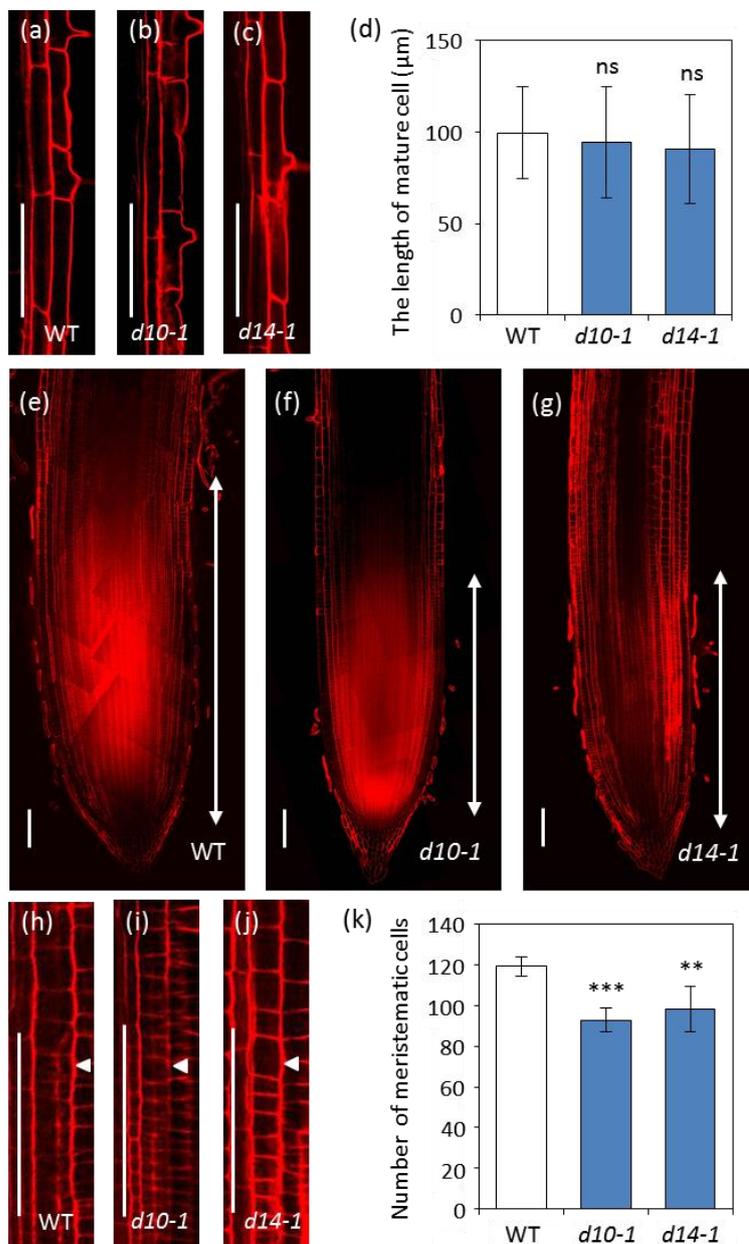


図 38 根の細胞の組織学的解析

(a-c) 野生型 (a), *d10-1* 変異体 (b), *d14-1* 変異体 (c) の成熟細胞 (表皮). スケールバーは 100 μm を示す. (d) 表皮の成熟細胞の長さ. 各値は 36~54 細胞の平均値 \pm 標準偏差を示す. ns, not significant (WT との有意差なし).

(e-g) 根の先端部の垂直切片. 白矢印は分裂帯の長さを示す. スケールバーは 100 μm を示す.

(h-j) 分裂帯と伸長帯の細胞. 野生型 (h), *d10-1* 変異体 (i), *d14-1* 変異体 (j). 白矢頭は分裂帯と伸長帯の境界を示す. スケールバーは 100 μm を示す.

(k) 分裂帯の細胞数. 分裂帯の細胞数は、皮層の最も外側の細胞列で静止中心から伸長を開始している細胞までを計測した. 各値は 7~10 個体の平均値と標準偏差を示す. **, ***, 有意水準 1%, 0.01% で野生型と有意差あり.

3-4 考察

本章では、まずストリゴラクトンの欠失変異体および非感受性変異体である *d* 変異体において、冠根の伸長が抑制されることを明らかにし (図 34、表 3)、合成ストリゴラクトン GR24 を *d10-1* 変異体および *d14-1* 変異体に与えると、*d10-1* 変異体は短根の表現型が完全に回復するが、*d14-1* 変異体では冠根の伸長に変化はなかったこと (図 35)、また野生型のイネに 10 μ M という高濃度の GR24 を与えることで冠根の伸長が促進されることを示した (図 36)。以上の結果より、ストリゴラクトン、またはストリゴラクトンの代謝物は、イネにおいて冠根の伸長を促進する働きがあると考えた。

地上部の成長と地下部の成長は相互依存的に関連しており、栄養成長期のイネにおいては、地上部と地下部の重量比を示す S/R 比 (shoot-root ratio) は、環境条件が一定の場合、大きく変動することなく成長が進行する (森田 1994)。そのため、一般的に地上部が成長不良の個体は、地下部の成長も不良になる。先の章でも述べたように、*d* 変異体の地上部は多分げつつ矮性を示すことから、発芽後 6 週間目の *d* 変異体において、根の長さが短くなり根量が減少していたことは、地上部の形態異常により光合成の効率が低下したことによる間接的な影響である可能性は否定できない。しかし、発芽後 14 日のイネにおいてはその可能性は低いと考えられる。なぜならば、発芽後 14 日のイネ個体はおおよそ第 3 葉が展開するステージであるが、一般に第 3 葉展開期までのイネ個体は胚乳依存的に成長しているとされており (星川 1977)、実際に野生型と *d* 変異体で地上部の成長 (高さ、分げつ数) や種子根の長さに有意な差は見られなかった (data not shown)。さらに、今回実験に用いた培地にはショ糖を加えていたため、冠根の発生や成長に必要な栄養分は十分に足りていると考えられる。そのため、発芽後 14 日の *d* 変異体において鞘葉節冠根が野生型より短くなったのは、地上部の成長とは独立した現象であり、ストリゴラクトンが冠根の成長に必要であることを示していると考えられる。

同じく、トマト、シロイヌナズナを用いた実験では、ストリゴラクトンの欠失変異体および非感受性変異体の側根密度が増加することが知られており、これらの植物ではストリゴラクトンが側根の発生を抑制していると考えられている (Koltai et al. 2010, Kapulnik et al. 2010, Ruyter-Spira et al. 2010)。しかし、今回実験に用いたイネにおいては、*d* 変異体と野生型で種子根の側根密度にほとんど変化はなかった (data not shown)。これは双子葉類と単子葉類の根系の違いに起因した種間差であると推察される。トマトやシロイヌナズナなどの双子葉類では、一本の種子根から発生した多数の側根が根系を主に構成しているのに対し、イネなどの単子葉類では、茎から発生した不定根である「冠根」が根系を主に構成している。そのため、双子葉類で見られたストリゴラクトンが側根の発生を抑制するという現象が、イネにおいて見られなかったことは矛盾する結果ではないだろう。しかし、今回の実験では種子根の先端に通常の生育環境では見られない異常な側根が多数発生していることから、側根の発生を正しく評価できていない可能性も考えられる (図 35)。イネにおけるストリゴラクトンと側根の成長の関係についてはさらに研究を進める必要があるだろう。

また、図 38 に示したように、*d10-1* 変異体と *d14-1* 変異体では根端の分裂帯が短くなっており、分裂帯の細胞数が減少していた。*d* 変異体と WT では根の細胞の大きさはほとんど同じであったことから (図 38)、*d* 変異体においては根端分裂組織、分裂帯における細胞数が減少していたと考えられた。つまり、ストリゴラクトンは根端において細胞分裂を促進する働きがあると考えられた。シロイヌナズナにおいても、ストリゴラクトン欠失変異体および非感受性変異体では根端の細胞数が減少することで主根 (種子根) が短くなることが報告されており、この結果からもストリゴラクトンが根端において細胞分裂を促進していることが示唆される (Kapulnik et al. 2010, Ruyter-Spira et al. 2010)。ストリゴ

ラクトンがどのように細胞分裂を制御しているのかに関しては、シロイヌナズナのストリゴラクトンおよびオーキシシンに関する突然変異体の解析より、ストリゴラクトンがオーキシシンの局在を制御することで細胞分裂を促進していると考えられている

(Kapulnik et al. 2010, Ruyter-Spira et al. 2010)。オーキシシンは側根や不定根の形成過程において、サイクリンとサイクリン依存性キナーゼの発現を誘導し、細胞分裂を制御している (for review see 関根 2000)。したがって、根端分裂組織においては、ストリゴラクトンはオーキシシンを介してサイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼの発現を制御し、細胞分裂を制御していると予想される。しかし、ストリゴラクトンの細胞分裂制御に関してはまだ明らかになっていないことも多い。ストリゴラクトンは腋芽の伸長を抑制する働きがあるほか (Gomez-Roldan et al. 2008, Umehara et al. 2008)、中胚軸の伸長も抑制することが知られている (Hu et al. 2010)。これらの組織においては、ストリゴラクトンは細胞分裂を抑制していると考えられる。一方、*d*変異体はWTよりも茎が細いことから、ストリゴラクトンは茎の形成層においては細胞分裂を促進していると考えられる。以上のようにストリゴラクトンは組織に依存して細胞分裂を促進的にも抑制的にも制御していると考えられるが、そのメカニズムについてはまだ分かっておらず、今後さらに研究を進める必要がある。

結論

枝分かれ（分枝）という現象は、植物の形態形成において重要な現象の1つである。特にイネにおいては、枝分かれは分げつと呼ばれ、収量に直接的に影響することから、農業的にも重要な意味を持つ。そのため、イネの分げつ制御のメカニズムを明らかにすることは、重要な研究課題である。

イネの分げつ制御メカニズムについて解明するため、まず初めに、分げつが極端に増加する突然変異体である *d* 変異体 (*d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27*) を用いて、形態学的な観察と分子遺伝学的な解析を行い、*d* 変異体では腋芽の休眠が弱くなっていること、*D10* と *D14* 遺伝子が、それぞれカロテノイド酸化開裂酵素と加水分解酵素をコードする遺伝子であることを明らかにした（第1章）。次に、*D14* 遺伝子の機能について明らかにするため、植物の枝分かれを制御する植物ホルモンであるストリゴラクトンを用いて相補実験を行い、*D14* 遺伝子がストリゴラクトンの受容またはシグナル伝達に関与していることを明らかにした（第2章）。さらに、ストリゴラクトンが根の形態に及ぼす影響について解析を行い、ストリゴラクトンがリン酸欠乏時に根の伸長を促進することを明らかにした（第3章）。以上の実験の結果、本研究では次のような結論を得た。

1 *D10* および *D14* はストリゴラクトンを介して、イネの分げつを抑制的に制御する遺伝子である。

d 変異体 (*d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27*) は、茎や葉が短くなる矮性という表現型と、分げつが極端に増加する多分げつ性という2つの形態学的な表現型を示す変異体である（図4、6）。*d* 変異体では腋芽の形成は正常に行われているが（図5）、形成された腋芽のほとんどが休眠することなく成長していた（図4）。そのため、*d* 変異体の原因遺伝子 *D3*、*D10*、*D14*、*D17*、*D27* は、いずれもイネの腋芽成長を抑制的に制御していると考えられた。

マップベースドクローニングにより原因遺伝子を特定した結果、*D10*はカロテノイド酸化開裂酵素 *OsCCD8* をコードする遺伝子であり（図 8、9）、シロイヌナズナ *MAX4* のホモログであることが明らかになった（図 10）。また、*D14* は加水分解酵素と予想されるタンパク質をコードする遺伝子であることが明らかになった（図 11、12、13）。

シロイヌナズナの *more axillary growth (max)* 変異体は、*d* 変異体と同様に、腋芽の休眠が弱くなることで、分枝が極端に増加する変異体であり、これまでに *max1*, *2*, *3*, *4* 変異体が報告されていた（Stirnberg et al. 2002、Booker et al. 2004、Sorefan et al. 2005）。Turnbull et al. (2002) による *max* 変異体を用いた接木実験の結果から、腋芽の成長を抑制する新規ホルモン様物質の存在が示唆されており、*MAX2* は新規ホルモン様物質の受容またはシグナル伝達に、*MAX1*、*MAX3*、*MAX4* は新規ホルモン様物質の生合成に関与していると考えられていた。既に単離されていたイネの *D3* は、F-box タンパク質をコードしており、シロイヌナズナの *MAX2* のホモログであることが明らかになっていた（Ishikwa et al. 2005）。また、同じく *D17* は *CCD7* をコードする *MAX3* のホモログであることが明らかになっていた（Umehara et al. 2008）。*D3*、*D10*、*D17* が *MAX2*、*MAX4*、*MAX3* とホモログの関係にあったことから、イネにおいてもシロイヌナズナと同じく、新規ホルモン様物質が腋芽の成長を抑制的に制御しており、*D3*、*D10*、*D17* 遺伝子はこの新規ホルモン様物質の生合成または受容・シグナル伝達に関与していると考えられた。

D10 および *D14* 遺伝子の発現パターンを解析すると、*d* 変異体 (*d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27*) では生合成に関与すると予想された *D10* 遺伝子の発現が大きく上昇しており（図 18）、新規ホルモン様物質の生合成には、*D10* の発現を制御する負のフィードバックが存在していると考えられた。また、この結果から、*D3*、*D10*、*D17* だけではなく *D14*、*D27* も新規ホルモン様物質を介した共通した経路で機能していると考えられた。

腋芽の成長制御メカニズムとして古くから知られている頂芽優勢

という現象と、新規ホルモン様物質との関係について検討するため、*d*変異体を用いて Decapitation 実験を行った。イネは、栄養成長期には茎がほとんど伸長せず、Decapitation 処理を行うことが難しくかったため、まず生殖成長期の個体を材料に用い、穂を取り除くことで Decapitation 処理と同様の効果があることを確認した(図 20)。次に切断面にオーキシンを与えることで Decapitation 処理の効果が打ち消されることを確認した(図 20)。これらの結果により、イネにおいても、オーキシンを介した頂芽優勢が機能していることが確かめられた。

d10 変異体では、Decapitation 処理をしなくても、通常は休眠している腋芽が成長しているため(図 21、22)、頂芽優勢が弱くなっていると考えられた。また、*d10* 変異体ではオーキシンの内生量が増加しているにもかかわらず頂芽優勢が弱くなっていること(図 23)、また *D10* 遺伝子の発現は、Decapitation 処理をすることで減少し、切断面にオーキシンを与えると維持される(図 25)ことから、*D10* はオーキシンの下流で頂芽優勢を制御していることが示唆された。しかし、*d10* 変異体においても、切断面にオーキシンを塗布することで、完全ではないものの腋芽の成長が抑制される(図 22)ことから、*D10* を介さずにオーキシスが頂芽優勢を制御する経路も存在すると考えられた。

その後、Umehara et al. (2008)および Gomez-Roldan et al. (2008)によって、腋芽成長を制御している新規ホルモン様物質が、ストリゴラクトンであることが明らかになった。*d3* 変異体はストリゴラクトンに対して非感受性を示す(図 31、Umehara et al. 2008)ことから、*D3* はストリゴラクトンの受容またはシグナル伝達に関与していると考えられた。また、*d10*、*d17* 変異体はストリゴラクトンに対して感受性を示す(図 30、31、Umehara et al. 2008)ことから、*D10*、*D17* はストリゴラクトンの合成に関与していると考えられた。

一方、*d14* 変異体は、ストリゴラクトンを外生的に供与しても、

表現型が回復せず（図 30、31）、内生ストリゴラクトン量が大きく増加していた（図 32）ため、*d3* 変異体と同じく、ストリゴラクトンの受容またはシグナル伝達に関与していると考えられた。Kagiyama et al. (2013)、Hamiaux et al. (2012)により *D3* と *D14* がストリゴラクトンの存在下で、直接結合することが確かめられているため、*D3* と *D14* の複合体がストリゴラクトンの受容体であると考えられる。

2 ストリゴラクトンは、リン酸欠乏時に根の伸長を促進する。

近年の研究により、ストリゴラクトンには大きく2つの機能があることが明らかにされた。1つは根から分泌されたストリゴラクトンがAM菌の共生を促す機能（Akiyama et al. 2005）である。2つめは植物体内で腋芽の成長を制御する植物ホルモンとしての機能（Umehara et al. 2008）である。

ストリゴラクトンは、植物がリン酸欠乏に直面したときに内生量が増加することため（Yoneyama et al. 2007(1), Yoneyama et al. 2007(2), Umehara et al. 2010）、ストリゴラクトンは土壌有効態リンが欠乏した時に、地上部では分枝を抑制して限られたリン資源を少数の枝に集中投資し、一方で地下部ではAM菌の共生を促進してリン酸の吸収を促進していると考えられるようになった。

しかし、本研究の結果、イネにおいては、ストリゴラクトンはこれら2つの効果だけではなく、「根の伸長促進」という効果によっても、リン酸欠乏に対する適応を行っていると考えられた。

播種後6週間の *d10*、*d14* 変異体の根の形態を観察すると、野生型よりも根の長さは短くなり、乾物重は小さくなっていた（図 34、表 3）。播種後14日の *d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体において、種子根と冠根の成長を野生型と比較したところ、種子根の長さや冠根の数は野生型と有意差がなかったが（図 35）、冠根の長さは野生型より有意に短くなっていた（図 35）。

ストリゴラクトンに対して感受性の *d10* 変異体と非感受性の *d14*

変異体に、外生的に合成ストリゴラクトン GR24 を与え、冠根の長さが回復するか相補試験を行ったところ、*d10* 変異体はストリゴラクトンの濃度依存的に冠根の長さが回復したのに対し、*d14* 変異体はストリゴラクトンの濃度に関わらず冠根が短いままだった (図 36)。高濃度のストリゴラクトンを与えると野生型では冠根が伸長したが、*d14* 変異体では変化はなかった (図 36)。以上の結果から、ストリゴラクトンには冠根の伸長を促進する効果があると考えられた。

イネでは、水耕培養液で育成した個体をリン酸欠乏培養液に移すと、一時的に冠根の伸長が促進することが知られている (斉藤・田中 1983)。実際に、野生型のイネを、リン酸を含む培地で発芽させた後、リン酸を含まない培地で育成すると一時的に冠根が伸長した (図 37)。一方、*d10* 変異体および *d14* 変異体は同様の試験を行っても、冠根の伸長が観察されなかった (図 37)。従って、イネがリン酸欠乏時に一時的に冠根を伸長させる現象は、ストリゴラクトンに依存する現象であると考えられた。

d10、*d14* 変異体と野生型の根端分裂組織を比較すると、伸長帯および分裂帯の細胞の大きさに違いはなかったが (図 38)、*d10*、*d14* 変異体は分裂帯が短く、細胞数が少なくなっていた (図 38)。従って、*d* 変異体は細胞伸長ではなく、分裂帯における細胞分裂が抑制された結果、根が短くなっていると考えられた。すなわち、ストリゴラクトンには根の細胞分裂を促進する効果があると考えられた。

土壌からリン酸を吸収するには、根長が長い方が有利であるため (米山ら 1990)、ストリゴラクトンによって根の伸長が促進されることは、イネがリン酸欠乏の状態に陥ったときに、土壌からのリン酸吸収を促進するために行う応答反応の 1 つであると考えられた。

以上をまとめると、イネのリン酸欠乏に対する応答反応は、①限られたリン酸資源を節約するために、腋芽の成長を抑制して分けつゝの発生を抑える、②土壌からのリン酸吸収を促進するために、AM 菌の共生を促すとともに、自身の根系を伸長させる、という 2 つの戦略で成り立っていると考えられた。そして、*D10*、*D14* 遺伝子と、こ

れら遺伝子によって制御されているストリゴラクトンは、イネのリン酸欠乏に対する応答反応を統合制御する役割を担っていると考えられる。本研究によって、イネの分げつ制御メカニズムと、そのメカニズムの中心に位置するストリゴラクトンの機能について、一部を明らかにできたことは、大きな意義を持つことと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、熱心なご指導と、適切なお助言をして頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科の経塚淳子博士に心より深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

設備、試薬を使用させていただいた石川県立大学の故大山莞爾博士および竹村美保博士に心より深く感謝いたします。お二人のご理解とご協力のおかげで研究を続けることができました。ありがとうございました。

ストリゴラクトンによる相補試験をしていただきました山口伸次郎博士および梅原三貴久博士に心より深く感謝いたします。お二人との出会いが本研究のブレイクスルーになりました。ありがとうございました。

d10、*d14* 変異体の根の細胞観察を行うにあたり多大なご協力をいただきました亀岡啓博士に心より深く感謝いたします。ありがとうございました。

実験に使用したシオカリ、*d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体およびマップベースドクローニングに使用した変異体とカサラスの交配 F1 世代を提供していただいた岡山大学の前川雅彦博士に深く感謝いたします。同じく、*d3*、*d10*、*d14*、*d17*、*d27* 変異体を提供していただいた北海道大学の高牟禮逸朗博士および帯広畜産大学の大西一光博士に深く感謝いたします。また、*fc1* 変異体を提供していただいた東京大学大学院の根本圭介博士、名古屋大学の山口智治博士、九州大学の佐藤光博士に深く感謝いたします。さらに、表現型の比較にあたり、ご指導をいただきました東京大学大学院の阿部淳博士に深く感謝いたします。

内生オーキシン量の測定にあたり多大なるご協力を頂きました理化学研究所植物科学センターの榊原均博士ならびに小嶋美紀子博士に深く感謝いたします。オーキシン輸送速度の測定にあたり、多大なるご協力を頂きました東京大学大学院の中嶋正敏博士に深く感謝いたします。ベクター作成にあたり pGWB5 および pGWB6 を提供していただいた島根大学の中川強博士に深く感謝いたします。D10 タンパク質の細胞内局在を観察するにあたり、*35S::S9::DsRed2* ベクターとご指導をしていただいた東京大学大学院の堤伸浩博士、有村慎一博士に深く感謝いたします。実験に協力していただいた岩田広隆氏、大島健司氏、小林薫博士に感謝いたします。

最後に、研究と論文作成にあたり、協力、叱咤激励していただいた職場の上司、同僚、友人そして両親に感謝いたします。ありがとうございました。

参考文献

1. Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: pp.824-827.
2. Arimura, S., Takusagawa, S., Hatano, S., Nakazono M., Hirai A., and Tsutsumi N. (1999) A novel plant nuclear gene encoding chloroplast ribosomal protein S9 has a transit peptide related to that of rice chloroplast ribosomal protein L12. *FEBS Lett.* 7: pp.231-234.
3. Auldridge M.E., Block A., Vogel J.T., Dabney-Smith C., Mila I., Bouzayen M., Lundback M., DellaPenna D., McCarty D.R., and Klee H.J. (2006) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* 45: pp.982-993.
4. Auldridge M.E., McCarty D.R., and Klee H.J. (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol.* 9: pp.315-321. Review.
5. Bainbridge K., Sorefan K., Ward S., and Leyser O. (2005) Hormonally controlled expression of the Arabidopsis MAX4 shoot branching regulatory gene. *Plant J.* 44: pp.569-280.
6. Bialeski R.L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: pp.225-252. Review
7. Bennett T., Sieberer T., Willet B., Booker J., Luschnig C., and Leyser O. (2006) The Arabidopsis MAX pathway controlling shoot branching by regulating auxin transport. *Curr. Biol.* 16: pp.553-563.
8. Beveridge C.A., Ross J.J., and Murfet I.C. (1996) Branching in Pea (Action of Genes Rms3 and Rms4). *Plant Physiol.* 110: pp.859-865.
9. Beveridge C.A., Symons G.M., Murfet I.C., Ross J.J., and Rameau C. (1997) The rms1 mutant of pea has elevated Indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap

Zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol.* 115: pp.1251-1258.

10. Beveridge C.A., Symons G.M., and Turnbull C.G.N. (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol.* 123: pp.689-698.
11. Beveridge C.A., Weller J.L., Singer S.R., and Hofer M.I. (2003) Axillary meristem development. Budding relationship between networks controlling flowering, branching, and photoperiod responsiveness. *Plant Physiol.* 131: pp.927-934.
12. Bonfante, P., Anca, I.A. (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, pp.363-383.
13. Booker J., Auldridge M., Wills S., McCarty D., Klee H., and Leyser O. (2004) *MAX3/CCD7* is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* 14 : pp.1232-1238.
14. Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stirnberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., and Leyser O. (2005) *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* 8: pp.443-449.
15. Brody M.S., Vijay K., and Price C.W. (2001) Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the sigma(B) transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 183: pp.6422-6428.
16. Chatfield S.P., Stirnberg P., Forde B.G., Leyser O. (2000) The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: pp.159-169.
17. Cline MG. (1991) Apical dominance. *Bot. Rev.* 57: pp.318-358. Review.
18. Cline M.G. (1996) Exogenous auxin effect on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Ann. Bot.* 78: pp.255-266.
19. Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E. (1966) Germination of

- witchweed (*Striga lutea* Lour.)—Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: pp.1189-1190.
20. Cubas P., Lauter N., Doebley J., Coen E. (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18: pp.215-222.
 21. Doebley J and Stec A. (1991) Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129: pp.285-295.
 22. Doebley J., Stec A., and Hubbard L. (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: pp.485-488.
 23. Foo E., Turnbull C.G., and Beveridge C.A. (2001) Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol.* 126: pp.203-209.
 24. Foo E., Bullier E., Goussot M., Foucher F., Rameau C., and Beveridge C.A. (2005) The branching gene *RAMOSUS1* mediate interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 17: pp.464-474.
 25. Friml J. (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.* 6: pp.7-12 Review.
 26. Gao, Z., Qian, Q., Liu, X., Yan, M., Feng, Q., Dong, G., Liu, J., Han, B. (2009) Dwarf 88, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Mol Biol.* 71: pp.265-76.
 27. Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernes, A. S. and Logi, C. (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during preinfection stages. *New Phytol.* 125: pp.587-593.
 28. Gocal G.F.W, Pharis R.P., Yeung E.C. and Pearce D. (1991) Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green1. *Plant Physiol.* 95: pp.344-350.

29. Goldwasser, Y., Yoneyama, K., Xie, X. & Yoneyama, K. (2008) Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul.* 55: pp.21-28.
30. Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pages, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, pp.189-194.
31. Goto, Y., Tanabe, M., Ishibashi, T., Tsutsumi, N., Yoshimura, A. and Nemoto, K. (2005) Tillering behavior of the rice fine culm 1 mutant. *Plant Prod. Sci.* 8: pp.68-70.
32. Hamiaux C., Drummond R. S., Janssen B. J., Ledger S. E., Cooney J. M., Newcomb R. D., Snowden K.C. (2012) DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol.* 22: pp.2032-2036.
33. Hewlet A., Prinsen E., Schell J., Onckelen H.V., andSchmulling T. (1994) Promoter tagging with a promoterless ipt gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. *Plant J.* 6: pp.879-891.
34. Hu Z., Yan H., Yang J., Yamaguchi S., Maekawa M., Takamure I., Tsutsumi N., Kyojuka J. Nakazono M. (2010) Strigolactones Negatively Regulate Mesocotyl Elongation in Rice during Germination and Growth in Darkness. *Plant Cell Physiol.* 51: pp. 1136-1142.
35. Hubbard L., McSteen P., Doebley J., and Hake S. (2002) Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* 162: pp.1927-1935.
36. Ishikawa S., Maekawa M., Arite T., Onishi K., Takamure I., and Kyojuka J. (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* 46: pp.79-86.
37. Jain M., Kaur N., Garg R., Thakur J.K., Tyagi A.K., and Khurana J.P. (2006)

Structure and expression analysis of early auxin responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integ Genomics* 6: pp.47-59.

38. Johnson X., Brcich T., Dun EA., Goussot M., Haurogne K., Beveridge C.A., and Rameau C. (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant J.* 142: pp.1014-1026.
39. Kagiya M., Hirano Y., Mori T., Kim S.Y., Kyojuka J., Seto Y., Yamaguchi S., Hakoshima T. (2013) Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes Cells.* 18: pp.147-60.
40. Kaneko T., Tanaka N., and Kumasaka T. (2005) Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.* 14: pp.558-565.
41. Kinoshita, T. and Takahashi, M. (1991) The one hundredth report of genetic studies on rice plant. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 65: pp.1-61.
42. Koltai H., Dor E., Hershenhorn J., Joel D.M., Weininger S., Lekalla S., Shealtiel H., Bahattacharya C., Eliahu E., Resnick N., Barg R., Kapulnik Y. (2010) Strigolactones effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *J Plant Growth Regul* 29: pp.129-136.
43. Lazar G., and Goodman H.M. (2006) MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 103: pp.472-476.
44. Leyser H.M., Lincoln C.A., Timpte C., Lammer D., Turner J., and Estelle M. (1993) *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 364: pp.161-164.
45. Leyser O. (2003) Regulation of shoot branching by auxin. *TRENDS in Plant Science* 8: pp.541-545.
46. Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y. (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the bi-

- osynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell*. 21: pp.1512-25.
47. Lincoln C., Britton J.H., and Estelle M. (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: pp.1071-1080.
 48. Liu W., Wu C., Fu Y., Hu G., Si H., Zhu L., Luan W., He Z., Sun Z. (2009) Identification and characterization of *HTD2*: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta*. 230: pp.649-58.
 49. López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P, Bouwmeester H. (2008) Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol*. 178: pp.863-874.
 50. Matusova, R. et al. (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol*.139: pp.920-934.
 51. McCouch S.R., Teytelman L., Xu Y., Lobus K.B., Clare K., Walton M., Fu B., Maghirang R., Li Z., Xing Y., Zhang Q., Kono I., Yano M., Fjellstorm R., DeClerk G., Schneider D., Cartinhours S., Ware D., and Stein L. (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA. Res.* 9: pp.199-207.
 52. Medford J.I., Horgan R., Ei-Sawi Z., and Klee H.J. (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* 1: pp.403-413.
 53. Mora, C., Tittensor, D., Adl, S., Simpson, A. and Worm, B. (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biol.* 9: pp.1-8.
 54. Morris D.A. (1977) Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.): some implications for polarity and apical dominance. *Planta* 136: pp.91-96.

55. Morris S.E., Turnbull C.G.N., Murfet C., and Beveridge C.A. (2001) Mutational analysis of branching in pea. Evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant Physiol.* 126: pp.1205-1213.
56. Mosse, B. and Hepper, C. (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5: pp.215-218.
57. Napoli C. (1996) Highly branched phenotype of the petunia dad1-1 mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* 111: pp.27-37.
58. Nardini M. and Dijkstra B.W. (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol.* 9: pp.732-737.
59. Nelson D.R., Schuler M.A., Paquette S.M., Reichhart D.W., and Bak S. (2004) Comparative Genomics of Rice and Arabidopsis. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot. *Plant Physiol.* 135: pp.756-772.
60. Nordstrom A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek C., Astot C., Dolezal K., and Sandberg G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci* 101: pp.8039-8044.
61. Raghothama, K.G. (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: pp.665-693. Review.
62. Romano C.P., Cooper M.L., Klee H.J. (1993) Uncoupling Auxin and Ethylene Effects in Transgenic Tobacco and Arabidopsis Plants. *Plant Cell* 5: pp.181-189.
63. Ruyter-Spira C., Kohlen W., Charnikhova T., van Zeijl A., van Bezouwen L., de Ruijter N., Cardoso C., Lopez-Raez J.A., Matusova R., Bours R. (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol.* 155: pp.721-734.
64. Sakamoto T. (2006) Phytohormones and rice crop yield: strategies and opportunities for genetic improvement. *Transgenic Res.* 15: pp.399-404.

65. Schwartz S.H., Qin X., and Loewen M.C. (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* 279: pp.46940-46945.
66. Shen Y.J., Jiang H., Jin J.P., Zhang Z.B., Xi B., He Y.Y., Wang G., Wang C., Qian L., Li X., Yu Q.B., Liu H.J., Chen D.H., Gao J.H., Huang H., Shi T.L., Yang Z.N. (2004) Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol.* 135: pp.1198-1205.
67. Shimizu-Sato S. and Mori H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127: pp.1405-1413. Review.
68. Smith, S.E., Smith, F.A., Jakobsen, I. (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133: pp.16-20.
69. Snowden K.C., Simkin A.J., Janssen B.J., Templeton K.R., Loucas H.M., Simons J.L., Karunairetnam S., Gleave A.P., Clark D.G., and Klee H.J. (2005) The decreased apical dominance/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17: pp.746-759.
70. Sorefan K., Booker J., Haurogne K., Goussot M., Bainbridge K., Foo E., Chatfield S., Ward S., Beveridge C., Rameau C., and Leyser O. (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous diacygenase like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Gen. Dev.* 17 : pp.1469-1474.
71. Stirnberg P., Sande K., and Leyser H.M.O. (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129: pp.1131-1141.
72. Takeda T., Suwa Y., Suzuki M., Kitano H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Matsuoka M., and Ueguchi C. (2003) The *OstB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *P. Journal* 33: pp.513-520.

73. Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., and Mori H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45: pp.1028-1036.
74. Thimann K.V. and Skoog F. (1933) Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc Natl Acad Sci* 19: pp.714-716.
75. Tremousaygue D., Garnier L., Bardet C., Dabos P., Herve C., Lescure B. (2003) Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* 33: pp.957-966.
76. Turnbull C.G., Booker J.P., and Leyser H.M. (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: pp.255-262.
77. Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Chow T.Y., Hsing Y.I., Kitano H., Yamaguchi I., and Matsuoka M. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: pp.693-698.
78. Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Yamaguchi, S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: pp.195-200.
79. Umehara, M., Hanada, A., Magome, H., Takeda-Kamiya, N., Yamaguchi, S (2010) Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol.* 51: pp.1118-1126.
80. Van Der Heijden M.G.A., Klironomos J., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engell, R., Bollerl, T., Wiemken, A., Sanders, I. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: pp.69-72.
81. Westwood, J. H. (2000) Characterization of the *Orobanchae-Arabidopsis* system for

studying parasite-host interactions. *Weed Sci.* 48: pp.742-748.

82. Woo H.R., Chung K.M., Park J.H., Oh S.A., Ahn T., Hong S.H., Jang S.K., and Nam H.G. (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: pp.1779-1790.
83. Wu W.R., Li W.M., Tang D.Z., Lu H.R. and Worland A.J. (1999) Time-related mapping of quantitative trait loci underlying tiller number in rice. *Genetics* 151: pp.297-303.
84. Yamagishi J., Miyamoto N., Hirotsu S., Laza L. and Nemoto K. (2004) QTLs for branching, floret formation, and pre-flowering floret abortion of rice panicle in temperate japonica \times tropical. *Theor Appl Genet.* 109: pp.1555-1561.
85. Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Sekimoto, H. (2007) Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* 225: pp.1031-1038.
86. Yoneyama, K., Xie, X.N., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. (2007) Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: pp.125-132.
87. Yoneyama, K. et al. (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* 179: pp.484-494.
88. Zou J., Chen Z., Zhang S., Zhang W., Jiang G., Zhao X., Zhai W., Pan X., and Zhu L. (2005) Characterization and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 222: pp.604-612.
89. Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L. (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J.*

48: pp. 687-698.

90. 番保徳 (1997) イネの DNA・RNA 単離法. 細胞工学別冊 新版植物の PCR 実験プロトコール 島本功、佐々木卓治 監修 (秀潤社) : pp. 34-40.
91. 川崎務 (1997) PCR 解析用の簡便なイネゲノム DNA の単離法. 細胞工学別冊 新版植物の PCR 実験プロトコール 島本功、佐々木卓治 監修 (秀潤社) : pp. 67-68.
92. 小林 創平, 福田 善通, EBRON L. A., 大崎 満, 佐藤 雅志, KHUSH G. S. (2002) イネの分げつ数に関する QTL 解析 育種学研究 = Breeding research 4: pp. 272.
93. 槻木竜二、木村泰裕、岡田清孝 (2005) GUS. 改定 3 版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編 島本功、岡田清孝、田畑哲之 監修 (秀潤社) : pp. 181-185.
94. 原田竹雄 (2014) 種子を利用した接ぎ木による農作物の栽培方法. 特許出願 WO 2014073595 A1.
95. 星川清親 (1977) 解剖図説 イネの生長 (農山漁村文化協会)
96. 猪ノ坂 正之 (1957) 稲及び麦類の接木に関する研究 (予報) 日本作物學會紀事 26: pp. 83.
97. 磯部勝孝, 坪木良雄 (1998) , イネ科・マメ科作物のアーバスキュラー菌根菌感染による生育促進効果と根の形態、リン吸収の関係. 日作紀 67: pp. 347-352.
98. 中川強 (2005) Gateway ベクター. 改定 3 版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編 島本功、岡田清孝、田畑哲之 監修 (秀潤社) : pp. 289-295.
99. 森田茂紀 (1994) 根ハンドブック 森田茂紀・阿部淳編. 根研究会, 東京
100. 森田ゆたか (2006) 東京大学大学院修士論文
101. 斉藤久登, 田中明 (1983) リン不足が水稻根の生育に及ぼす影響, 土肥誌 54: pp. 485-489.

102. 佐々木治人 (1999) 植物の栽培法. [実験]生産環境生物学 東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 編, 朝倉書店 : pp. 1.
103. 関根政実 (2000) 植物細胞の分裂(町田泰則・福田裕穂監修), 秀潤社: pp. 26-36.
104. 但野利秋, 田中明 (1980) 低リン酸培養液濃度が初期生育に及ぼす影響の作物種間差, 土肥誌 51: pp. 399-404.
105. 寺田理枝 (2005) イネのアグロバクテリウムによる形質転換法. 改定 3 版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編 島本功、岡田清孝、田畑哲之 監修 (秀潤社) : pp. 139-144.
106. 大島健司 (2008) 東京大学大学院修士論文
107. 米山忠克, 堀江秀樹, 建部雅子, 丹野文雄 (1990) 植物の根量とリン吸収の関係, 土肥誌 61: pp. 382-385.

論文目録

- (1) Ishikawa S., Maekawa M., Arite T., Onishi K., Takamure I., Kyo-zuka J. (2005), “Suppression of Tiller Bud Activity in Tillering Dwarf Mutants of Rice.”, *Plant & Cell Physiology* Vol.46, No.1, pp.79-86.
- (2) Arite T., Iwata H., Ohsima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyo-zuka J. (2007), “*DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice.” *The Plant Journal* Vol.51, No.6, pp.1019-1029.
- (3) Arite T., Umehara M., Ishikawa S., Hanada A., Maekawa M., Yamaguchi S., Kyo-zuka J. (2009), “*d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers.”, *Plant & Cell Physiology* Vol.50, No.8, pp.1416-1424.
- (4) Arite T., Kameoka H., Kyo-zuka J. (2012), “Strigolactone Positively Controls Crown Root Elongation in Rice”, *Journal of Plant Growth Regulation* Vol.31, No.2, pp.165-172.