

根端メリステムのサイズ制御機構

高橋 直紀¹・梅田 正明^{1,2}

¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

²科学技術振興機構・CREST

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

Mechanisms controlling root meristem size

Key words: root meristem, endoreplication, cytokinin

Naoki Takahashi¹, Masaaki Umeda^{1,2}

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,

Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

²JST, CREST, Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

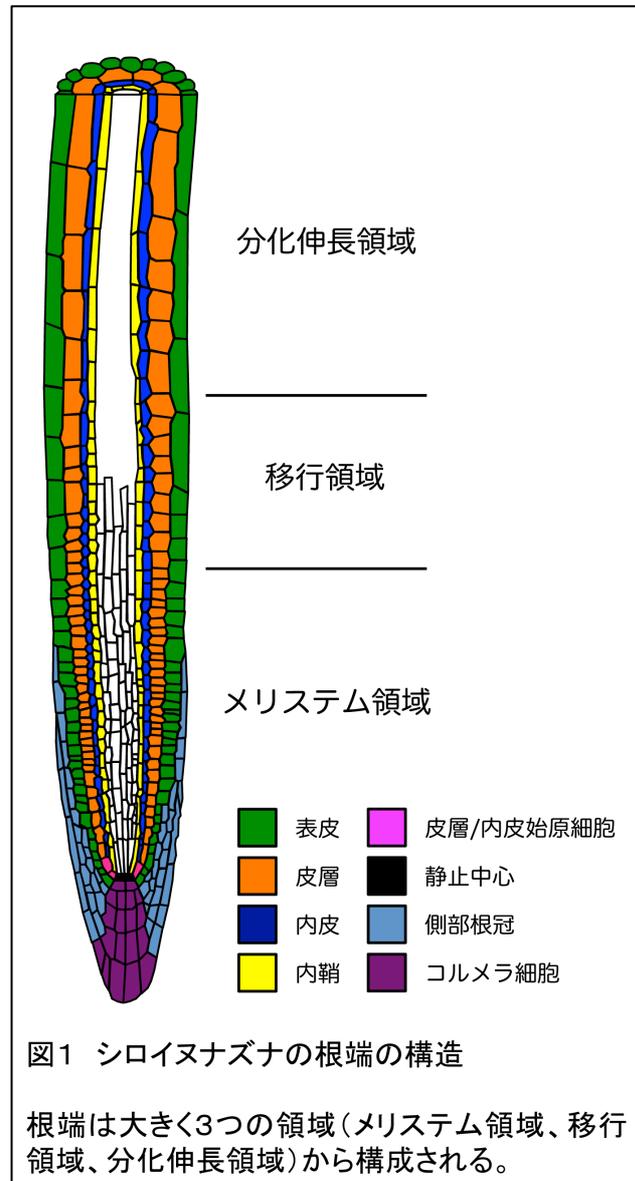
1. はじめに

植物の根は、土中から水分や養分、ミネラルなどを吸収するとともに、物質の貯蔵や栄養分の輸送などを行なう。さらには、植物体全体を頑強に支持する役割も果たすことから、その伸長は植物体全体の生育、成長に大きな影響を与える。主根を構成する細胞は、根端に存在する分裂領域（根端メリステム）での細胞増殖により作り出される。そして、それらの細胞が複数回の細胞分裂を繰り返した後に、分裂を停止し、細胞伸長を始める。つまり、根の伸長は、根端メリステムでの細胞分裂の速度と細胞伸長への転換のタイミングと、その後の細胞伸長の速度により決定されることとなる。一般的に、根の伸長スピードは根端メリステムのサイズと相関することから、根端メリステムのサイズ制御は根の成長において特に重要となる。例えば、土壌中に十分な栄養素が存在するなど、外部環境が植物の成長に適している場合、根端メリステムでの細胞分裂活性が高くなり、メリステムのサイズが拡大することで根の伸長が促進される。一方で、高温や乾燥などの環境ストレスに曝されると、根端メリステムでの細胞分裂が阻害されることで、メリステムサイズが縮小し、根の伸長が抑制される。最近の研究で、サイトカイニンやオーキシンなどの植物ホルモンが、根端メリステムのサイズ制御に重要な役割を果たしていることが報告されている。本稿では、根端メリステムサイズを制御する最近の知見を、我々の研究成

果も含めて紹介したい。

2. 根端の構造

シロイヌナズナの場合、根端メリステムの周りを根冠（コルメラと側根冠）が保護している。根冠は多細胞層からなる帽子状の構造をしており、土粒子などとの摩擦から根端メリステムを守っている。また、コルメラ層の上には、分裂活性の低い静止中心と呼ばれる細胞が存在する。静止中心は、周囲を取り囲むように存在する幹細胞の未分化状態の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。そして、メリステム領域では、活発な細胞分裂が行われており、主根を構成する細胞を生み出している。また、移行領域では、細胞分裂は停止しており、核 DNA 量の増加に伴った細胞伸長が行われている。さらに、分化伸長領域では、細胞が急激に伸長し始めることで細胞体積が著しく増加する（図1）。



3. 細胞周期制御による根端メリステムのサイズ制御

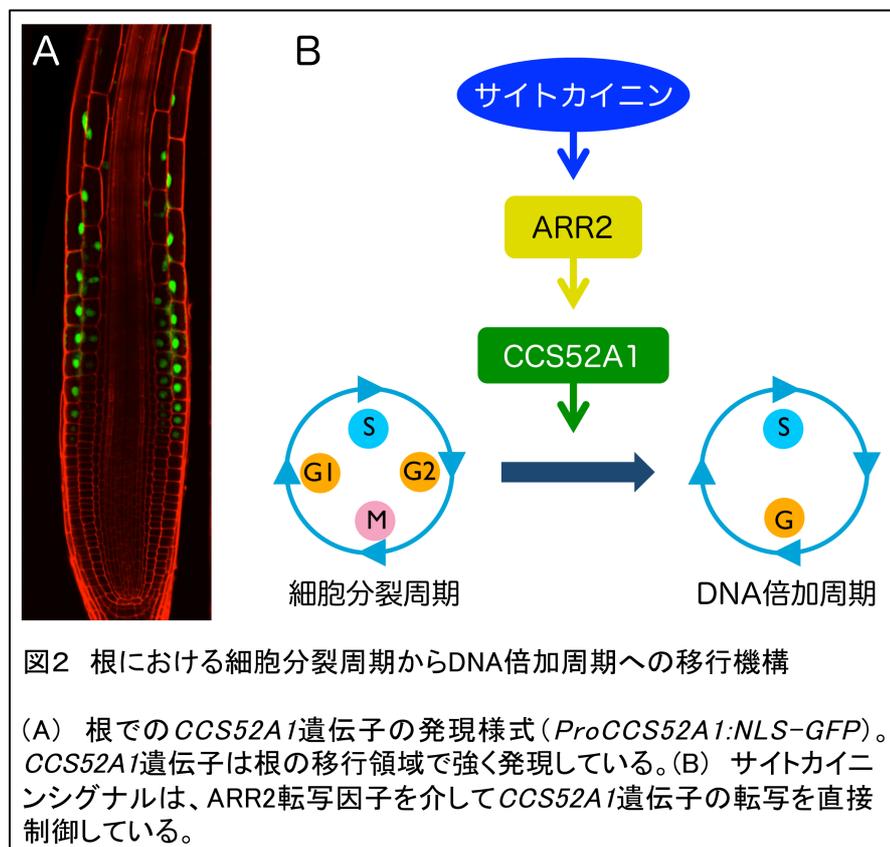
細胞分裂周期は、DNA複製を行うS期、染色体分離と細胞質分裂を行うM期、そしてS期とM期間に存在するG1とG2期からなる。根端メリステムでは、この細胞分裂周期が複数回繰り返されることにより細胞が増殖する。一方、分裂により作られた細胞は、根の移行領域に達すると細胞分裂を停止し、M期をスキップするDNA倍加周期に移行する。DNA倍加周期では、細胞分裂が行われず、S期とG期を繰り返すことにより、核内のDNA量が倍々に増加する。ま

た、それにともない、細胞体積も増加することから、根の移行領域では細胞伸長が同時に起きる。そのことから、根端メリステムから移行領域への移行は、細胞分裂周期から DNA 倍加周期への移行のタイミングと関連することになる。

現在までに、細胞分裂周期から DNA 倍加周期への移行には、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 活性の低下が必要であると考えられている (De Veylder et al., 2011)。CDK の活性低下の要因の一つとして、CDK と複合体を形成するサイクリンタンパク質の分解が挙げられる (Capron et al., 2003)。サイクリンタンパク質は E3 ユビキチンリガーゼである Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) 複合体によりユビキチン化され、分解制御を受けることが知られており (Boudolf et al., 2009)、APC/C の活性化因子の一つである CCS52A1 が DNA 倍加周期への移行を促進することが報告されている (Larson-Rabin et al., 2009)。根端においては、CCS52A1 遺伝子は移行領域で特異的に発現することで、細胞を DNA 倍加周期へと移行させ、細胞伸長を促進する (Vanstraelen et al., 2009; Takahashi et al., 2013) (図 2 A)。CCS52A1 を欠損した植物では、根端での DNA 倍加周期への移行が抑制されることから、根端メリステムサイズの拡大が観察される (Takahashi et al., 2013)。

根の移行領域での CCS52A1 遺伝子の発現制御には、サイトカニンシグナル

が直接関与していることが、我々の最近の研究により明らかにされている (Takahashi et al., 2013)。サイトカニンは細胞膜上の受容体ヒスチジンキナーゼによって感知され、そのシグナルが His-Asp リン酸リレーを介して転写



因子型レスポンスレギュレーター (type-B ARR) へと伝達され、その結果、様々な機能を有する初発応答遺伝子の転写が活性化される (Hwang et al., 2012)。我々は、*CCS52A1* 遺伝子の発現制御解析を行なったところ、type-B ARR の一つである ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 (ARR2) が *CCS52A1* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を活性化することを見出した (Takahashi et al., 2013)。ARR2 タンパク質は *CCS52A1* 遺伝子と同様に、根の移行領域で特異的に蓄積していることから (Kim et al., 2012; Takahashi et al., 2013)、根の移行領域でのサイトカイニンシグナルの活性化が、根端メリステムサイズの制御に非常に重要な役割を果たしていると考えられる (図 2B)。以前の研究で、根の移行領域で特異的にサイトカイニン量を低下させるだけで、根端メリステムサイズが拡大することが報告されている (Dello Ioio et al., 2007)。この結果からも、根の移行領域でのサイトカイニンシグナルの活性化が、根端メリステムのサイズ制御に重要な役割を果たしていることが伺える。

4. 植物ホルモン間のクロストークによる根端メリステムのサイズ制御

根端メリステムのサイズは、サイトカイニンの他にもオーキシンなどの植物ホルモンシグナルが、複雑かつ厳密に相互作用しながら制御されている。オーキシンシグナルの抑制に働く AUX/IAA ファミリーの SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2) は、サイトカイニンシグナルとオーキシンシグナルの両方の制御を直接受けることにより、根端メリステムサイズの制御において重要な

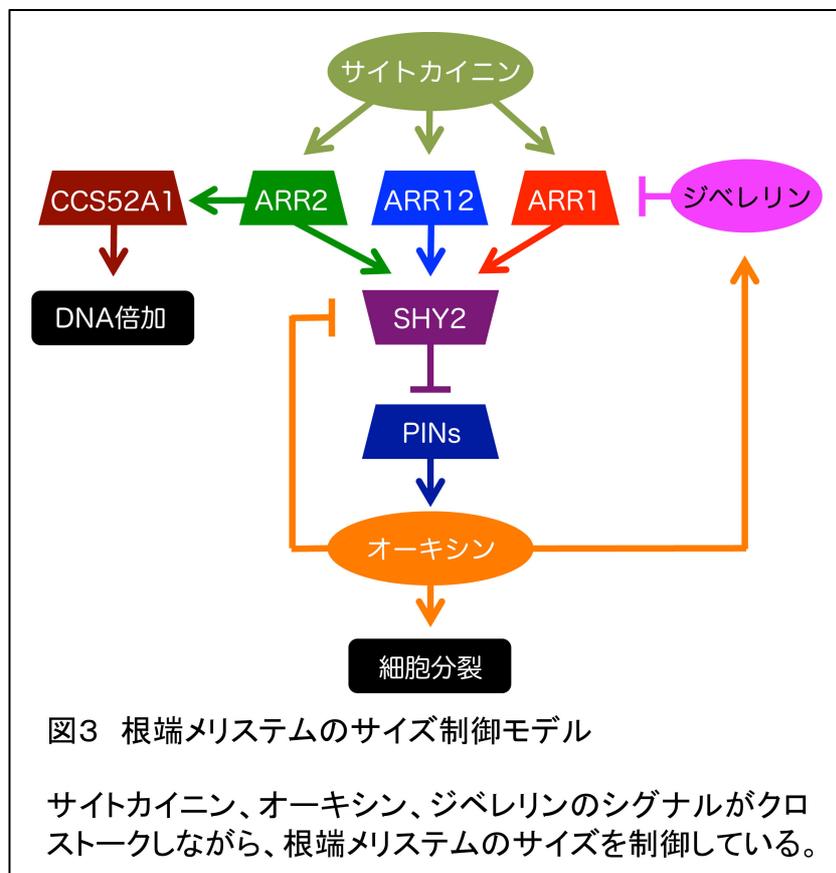


図3 根端メリステムのサイズ制御モデル

サイトカイニン、オーキシン、ジベレリンのシグナルがクロストークしながら、根端メリステムのサイズを制御している。

役割を果たしていることが知られている (Dello Ioio et al., 2008)。根端でのサイトカイニンシグナルが高い場合、サイトカイニンシグナルに関わる *ARR1* と *ARR12* が *SHY2* 遺伝子の転写を活性化することにより、オーキシンの輸送に関わる *PIN* 遺伝子の発現を低下させる (Dello Ioio et al., 2008)。そして、オーキシンの流れを阻害することにより、根端メリステムでの細胞分裂活性が抑制され、根端メリステムサイズが縮小する。逆に、オーキシニンシグナルが高い場合は、ユビキチンを介したタンパク質分解系により、*SHY2* タンパク質が速やかに分解され、*SHY2* によるオーキシニンシグナルの抑制が解除される (Tian et al., 2003)。根では、これらの植物ホルモンの量やシグナル強度が時空間的に厳密に制御されることにより、成長や環境に応じた根端メリステムサイズのコントロールがなされていると考えられる (図3)。

さらに、HD-zip III 型転写因子である *PHABULOSA* (*PHB*) と *PHAVULOTA* (*PHV*) もサイトカイニン合成を促進することで、根端メリステムのサイズ制御に関わっていることが知られている (Dello Ioio et al., 2012)。*PHB* はサイトカイニンの生合成に関わる *ISOPENTENYL TRANSFERASE 7* (*IPT7*) 遺伝子の発現を直接誘導することにより、根端でのサイトカイニンシグナルの活性化に関わる。そのため、*phb phv* 欠損変異体では、サイトカイニン欠損変異体と同様に、根端メリステムのサイズが拡大することで、野生型植物より根が伸長する。一方で、サイトカイニンシグナルが高いと、フィードバック制御が働くことで、*PHB* 遺伝子の発現抑制が行われる。さらに、*PHB* はマイクロ RNA である *MIR165/166* により抑制されることが知られているが (Carlsbecker et al., 2010)、サイトカイニンシグナルは *MIR165A* の転写も抑制することにより、*PHB* mRNA 量を適切に調節していることが報告されている (Dello Ioio et al., 2012)。これらの結果から、サイトカイニンは *PHB* や *MIR165A* の量を微調節することにより、外部環境に合わせた根端メリステムサイズを決めている可能性が考えられる。

5. DNA 損傷ストレスに応じた根端メリステムのサイズ制御

植物は紫外線などの環境ストレスを受けると、細胞内で活性酸素が蓄積し、DNA が損傷を受ける (Barzilai & Yamamoto, 2004; Baxter et al., 2014)。さらに、土壌中に含まれるアルミニウムやホウ素、また病原菌の感染などによっても DNA が損傷することが知られている (Rounds & Larsen, 2008; Ciccica & Elledge, 2010; Sakamoto et al., 2011; Song and Bent, 2014)。植物は DNA 損傷を受けると、根端メリステムのサイズを縮小させることで、根の伸長を積極的に抑制するこ

とが知られている (Adachi et al., 2011)。最近の我々の研究により、DNA 損傷に応じた根端メリステムサイズの縮小には、*de novo* のサイトニン合成が関わっていることが明らかにされている (未発表)。植物は DNA 損傷を受けると、根の移行領域でいくつかのサイトカイニン生合成遺伝子の発現を誘導することで、内在性のサイトカイニン量を増加させる。サイトカイニンの生合成に欠損がある変異体では、DNA 損傷を受けても根端メリステムサイズの縮小が抑えられることから、DNA 損傷ストレスに応じた根端メリステムサイズの制御に、根の移行領域でのサイトカイニン合成が必要不可欠であると予想される。最近の研究で、塩ストレスや低温ストレスなどによっても、根端メリステムが縮小することが報告されている (Liu et al., 2015; Zhu et al., 2015)。このことから、環境ストレスに応答した根の伸長抑制に、サイトカイニンが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

6. おわりに

上で述べたように、植物ホルモンが根端メリステムのサイズ制御に関与していることが現在までに明らかにされてきた。また、今回は紹介出来なかったが、サイトカイニンやオーキシン以外の植物ホルモンも、根端メリステムのサイズ制御に関与していることも報告されている。しかしながら、それら植物ホルモンが、どのように時空間的に統御され、クロストークしているのかを説明するまでには至っていない。その制御の詳細を明らかにするためには、鍵因子の分子機能を詳細に解明するとともに、新たな因子を同定する必要があると考えられる。さらには、根端メリステムから移行領域への移行の現場で起きている現象を細胞レベルで明確におさえることが重要であると考えられる。今後、根端メリステムサイズを制御する分子メカニズムの理解がさらに進むことで、メリステムサイズ制御に関わる鍵因子の活性を変化させ、根の成長を人為的にコントロールすることが可能になると考えられる。それにより、様々な環境に適応しうる植物の技術開発などに将来利用されることが期待される。

7. 謝辞

本稿で取り上げた我々の研究は、科学技術振興機構・CREST、科学研究費補助金 (研究課題番号: 22119009, 26291061, 26650099, 26113515, 26840096)、奈良先端科学技術大学院大学支援財団による助成のもと行われた。

引用文献

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., & Umeda, M. 2011. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 10004-10009.
- Barzilai, A., & Yamamoto, K. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 3: 1109-1115.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65: 1229-1240.
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S., Van Isterdael, G., Russinova, E., Kondorosi, E., Witters, E., De Jaeger, G., Inzé, D., & De Veylder, L. 2009. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiol.* 150: 1482-1493.
- Capron, A., Okrészl, L., & Genschik, P. 2003. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* 8: 83-89.
- Carlsbecker, A., Lee, J.Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M.A., Vatén, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J.L., Helariutta, Y., & Benfey, P.N. 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316-321.
- Ciccica, A., & Elledge, S.J. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40: 179-204.
- Dello Ioio, R., Galinha, C., Fletcher, A.G., Grigg, S.P., Molnar, A., Willemsen, V., Scheres, B., Sabatini, S., Baulcombe, D., Maini, P.K., & Tsiantis, M. 2012. A PHABULOSA/cytokinin feedback loop controls root growth in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 22: 1699-1704.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. 2007. Cytokinin determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17: 678-682.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., & Sabatini, S. 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322: 1380-1384.
- De Veylder, L., Larkin, J.C., & Schnittger, A. 2011. Molecular control and function of endoreduplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* 16: 624-634.

- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. 2012. Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 353-380.
- Kim, K., Ryu, H., Cho, Y.H., Scacchi, E., Sabatini, S., & Hwang, I. 2012. Cytokinin-facilitated proteolysis of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *Plant J.* 69: 934-945.
- Larson-Rabin, Z., Li, Z., Masson, P.H., & Day, C.D. 2009. *FZR2/CCS52A1* expression is a determinant of endoreduplication and cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 874-884.
- Liu, W., Li, R.J., Han, T.T., Cai, W., Fu, Z.W., & Lu, Y.T. 2015. Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 168: 343-356.
- Rounds, M.A., & Larsen, P.B. 2008. Aluminum-dependent root-growth inhibition in *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell-cycle arrest. *Curr. Biol.* 18: 1495-1500.
- Sakamoto, T., Inui, Y.T., Uruguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M., Umeda, M., Fukui, K., & Fujiwara, T. 2011. Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3533-3546.
- Song, J., & Bent, A.F. 2014. Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog.* 10: e1004030.
- Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., Matsunaga, S., Hwang, I., & Umeda, M. 2013. Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Curr. Biol.* 23: 1812-1817.
- Tian, Q., Nagpal, P., & Reed, J.W. 2003. Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant J.* 36: 643-651.
- Vanstraelen, M., Balaban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S.C., De Veylder, L., Mergaert, P., & Kondorosi, E. 2009. APC/C^{CCS52A} complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 11806-11811.
- Zhu, J., Zhang, K.X., Wang, W.S., Gong, W., Liu, W.C., Chen, H.G., Xu, H.H., & Lu, Y.T. 2015. Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via

ARR1/12. *Plant Cell Physiol.* 56: 727-736.

根における栄養吸収と拡散障壁の形成

神谷岳洋

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Nutrient uptake and apoplastic barrier in roots

Keywords: apoplast, Casparian strip, suberin

Takehiro Kamiya

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657 Japan

1. はじめに

植物は独立栄養生物であり、光のエネルギーと無機栄養素を用いて有機物を合成し生育することが可能である。このうち、無機栄養素のほとんどは土壤に伸びた根を介して吸収される。これは、物質輸送の障壁として機能する内皮細胞と細胞膜に存在する輸送体タンパク質によりなされている。土壤中には無機栄養素以外にも植物の生育に不必要な物質や病原菌などが存在しているが、これらは容易に植物体内に侵入することはない。すなわち、土壤中の物質が拡散によってアポプラスト（細胞膜の外側の空間）を通り、維管束まで到達することはないと考えられている。これは、維管束を取り囲むようにして同心円状に存在する内皮細胞が拡散障壁（diffusion barrier）として機能するためである（図1）。

では、どのようにして内皮細胞を乗り越えるのだろうか。これは、細胞膜に存在する輸送体タンパク質によって行われる（図1）。輸送体タンパク質は基質特異性があり、植物の生育に必要な栄養を細胞内に取り込む。細胞内に取り込まれた栄養素は原形質連絡でつながったシンプラストで内皮細胞を通過し、維管束に到達し、植物体全体に輸送される。

栄養の吸収に関する研究は輸送体の解析が多く、これまでに必須元素の輸送体は全て同定されている。細胞レベルでの栄養素の輸送が明らかになる一方で、どのようにして土壤中の栄養が根を横断して導管に輸送されるのか、よりマクロな経路について明らかになっていることは少ない。本稿では、拡散障壁として機能する内皮細胞に見られる特殊な構造体であるカスパー線やスベリンの栄養吸収における役割やその形成機構について、最近の知見を紹介する。

2. 内皮細胞の拡散障壁としての機能

T.Kamiya-1

内皮細胞が障壁として機能する輸送経路は二つある (図1)。一つは、アポプラスト経路であり、もう一つは細胞を横切る経路 (Transcellular pathway: 細胞横断経路) である。細胞横断経路とは細胞膜から入り細胞膜から出ていくことにより細胞を横切る経路である。アポプラスト経路の障壁としてカスパリー線とスベリンが、細胞横断経路の障壁としてスベリンがそれぞれ機能している。以下、これらについて説明する。

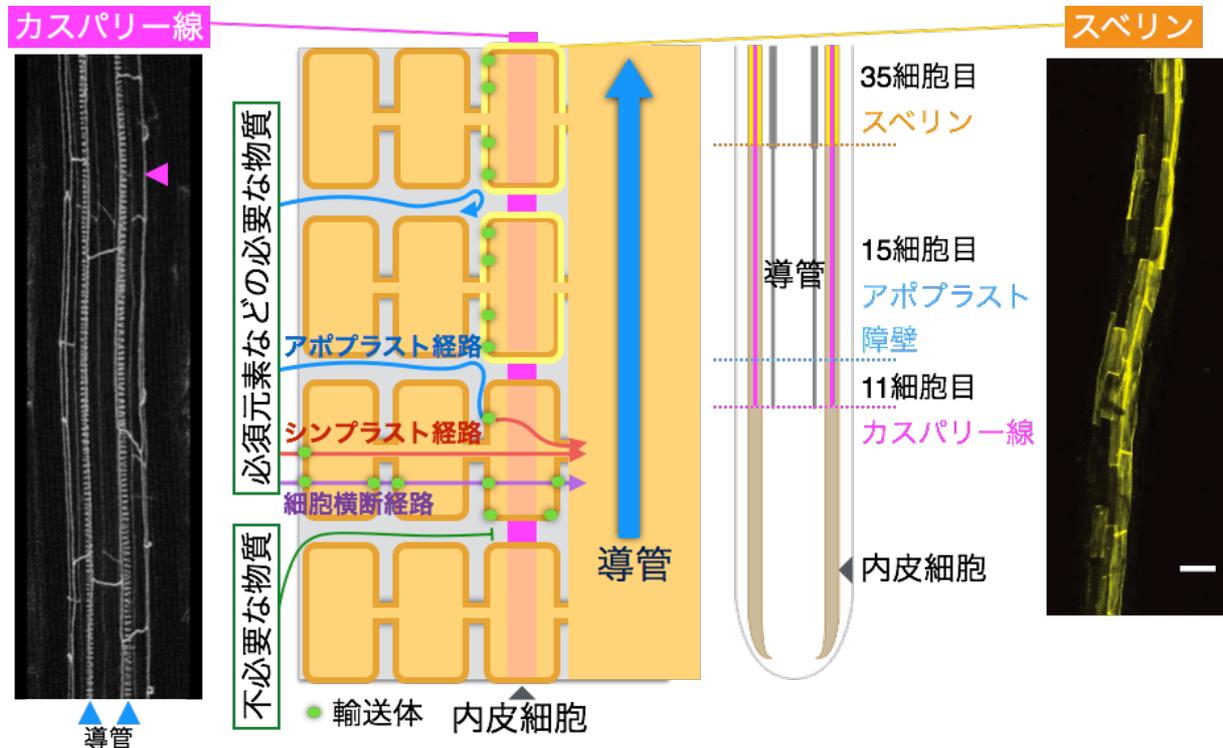


図1. シロイヌナズナの根における物質の輸送経路とカスパリー線およびスベリンの配置。土壌中の物質はアポプラスト経路 (青), シンプラスト経路 (赤), 細胞横断経路 (紫) を通り導管に輸送される。カスパリー線 (マゼンタ矢頭) は, 透明化した後リグニンの自家蛍光を観察した。中心にみえる螺旋状の構造 (青矢頭) は導管を示す。スベリンは Fluorol yellow 088 により染色した。スベリンの写真で黒く抜けているところは, スベリンが蓄積しない内皮細胞 (通

2-1. 細胞横断経路の障壁 (スベリン)

スベリンは長鎖脂肪酸を主成分とする, グリセロールや芳香族系化合物が含まれる疎水性のポリマーである。このスベリンは, 内皮細胞や外皮細胞の一次細胞壁が形成された後, その内側の表面を覆うように蓄積する (Schreiber 2010, Beisson et al. 2012)。その化学組成やいくつかの実験から, スベリンは水や溶質がアポプラストから細胞内に進入する際の障壁として機能し, 水や溶質の細胞内への移動をブロックすると言われている (Schreiber 2010, Geldner 2013)。すなわち, スベリンで覆われた内皮細胞では, たとえ細胞膜に輸送体が存在したとしてもその周りをスベリンで囲われているために, 基質は輸送体にアクセスできず内皮細胞に入ることはできないと考えられている (図1)。そのため, 内皮細胞を通過するには, スベリンで覆われていない内皮細胞 (通過細胞) を経由する必要がある (Geldner 2013, Barberon et al. 2014)。

一方で、根の水や溶質の透過性とスベリンの蓄積量には関連がないことを示す結果も得られており(Ranathunge & Schreiber 2011)、スベリンの細胞横断経路の障壁としての機能には結論が得られていなかった。この理由の1つとして、スベリンの物質透過性を評価する手法が間接的であることが挙げられる。これまでの実験では、根のスベリンの透過性を地上部に輸送された水や溶質の量で評価しており、実際にスベリンが蓄積する内皮細胞の透過性を観察したわけではない。

最近、Barberon et al. (2016)らは、fluorescein diacetate (FDA) をトレーサーとして利用し、内皮細胞におけるスベリンの障壁としての機能を評価する手法を確立した。FDA は細胞内に取り込まれると蛍光を発する試薬である。スベリンを蓄積しない株と野生型株を FDA 処理し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察したところ、スベリンを蓄積しない系統では内皮細胞内で蛍光が観察された。このことは、スベリンがアポプラストから内皮細胞内へと物質が輸送される経路において障壁として機能することを示した初めての例である。

また、同じ論文にてスベリンの蓄積が、周囲の栄養環境によって制御される機構について明らかにされた。これまでにスベリンの蓄積が塩ストレスといった周囲の環境により影響を受けることは報告されていたが、その機構については不明であった。Barberon et al. (2016) らは、培地の栄養条件によりスベリンの蓄積が変化することを示し、その変化は植物ホルモンであるアブシジン酸やエチレンを介して生じることを明らかにした。スベリンの蓄積を制御することにより、周囲の栄養環境に巧みに適応していることが示された。

2-2. アポプラスト輸送の障壁（カスパリー線）

カスパリー線は1865年にドイツの植物学者である Robert Caspary によって発見された構造体である。内皮細胞の周囲にバンド状に形成され、内皮細胞間の隙間を埋めるようにして形成される (Geldner 2013) (図1)。内皮細胞を原形質分離するとカスパリー線形成位置で隣り合う内皮細胞の細胞膜が接着していることから、カスパリー線は細胞膜に強固に結合していることが示されている (Alassimone et al. 2010)。カスパリー線は根端には形成されず、シロイヌナズナの場合、onset of elongation [根端側の内皮細胞の二倍の長さを示す内皮細胞として Alassimone (2010)らが定義。以下細胞数はこの定義に基づいて示す。] から数えておおよそ11細胞目でカスパリー線が形成されはじめ、15細胞目でアポプラスト障壁が観察される (Alassimone et al. 2010) (図1)。ちなみに、アポプラスト障壁の観察は、細胞壁を染める試薬である propidium iodide (PI) の中心柱への透過性で評価する方法が今のところ最も正確である (Alassimone et al. 2010)。

カスパリー線は何でできているのであろうか？その実体については、スベリンとリグニン、もしくは、これら両方からなるとの議論があるが、近年ひとつの結論が出た。Naseer (2013)らにより、シロイヌナズナの場合、カスパリー線のアポプラスト障壁としての機能はリグニンにより達成されていることが示された。これは、以下の結果によるものである。1) アポプラスト障壁の形成とリグニンの蓄積が近い位置で観察される。リグニンの蓄積 (透明化処理後のリグニンの自家蛍光により観察) は約11細胞目、アポプラスト障壁は15細胞目、スベリンの蓄積は35細胞目に観察される (図1)。2) スベリン合成変異株や内皮細胞特異的にスベリンを分解した株でもアポプラスト障壁が観察される。3) モノリグノールの合成阻害剤存在下や、リグニン合成変異株でアポプラスト障壁が形成されない。4) カスパリー線にリグニンが含まれる。これらの結果から、

リグニンがカスパリー線の実体であることが示された。

一方で、この論文の後、シロイヌナズナを用いて、スベリンもアポプラスト障壁として機能することを示唆する結果が報告されている。Yadav (2014) らは、スベリンモノマーを細胞外に供給する ABC 輸送体の三重破壊株 (*abcg2 abcg6 abcg20*) で、11-36 細胞ではアポプラスト障壁が形成されるものの、37 細胞以上で障壁が形成されないことを示した。また、筆者らも最近の研究により、Yadav らと同様の結果を得ている (投稿準備中)。では、どの位置でスベリンが障壁として機能しているのだろうか? 筆者らは、短時間根を PI 染色することにより、どこから PI が侵入するのかを調べたところ、PI の染色は側根の発生部位で観察された。すなわち、スベリンは側根発生部位ではアポプラスト障壁として機能することを示唆している (投稿準備中)。側根発生部位では、内皮の内側である内鞘細胞から側根が発生するため、内皮細胞同士の接着が剥がれカスパリー線が寸断される (Vermeer et al. 2014)。すなわち、内皮細胞と側根の表皮細胞の間にギャップが生じてしまう。スベリンは、このギャップを埋めているのではないかと筆者らは考えている。

また、スベリンがアポプラスト障壁として機能することがイネでも報告されている。イネには内皮に加えて外皮もアポプラスト障壁として機能することが知られている。外皮へのスベリンの蓄積に必要な遺伝子である *RCN1/OsABCG5* の破壊株では、スベリンが蓄積せず、アポプラスト障壁も形成されない (Shiono et al. 2014)。この結果は、外皮におけるスベリンがアポプラスト障壁として機能することを示している。

3. 障壁形成の分子機構

3-1. スベリン

先に述べたようにスベリンの主成分は脂肪酸である。これらは、プラスチドで合成された脂肪酸が、小胞体で修飾され合成されたものである。これまでにスベリンモノマーの合成に関与する酵素としてシトクローム P450 である *HORST (CYP86A1)* や *RALPH (CYP86B1)*、アシル基転移酵素 (*GPAT5*) が同定されており、これらの破壊株ではスベリンの蓄積が減少することが示されている (Höfer et al. 2008, Compagnon et al. 2009, Beisson et al. 2007)。また、これらの酵素や他のスベリンモノマー合成に関与する酵素の遺伝子発現を正に制御する転写因子として *MYB41* が同定されている (Kosma et al. 2014)。*MYB41* はアブシジン酸や塩ストレスによって発現誘導され、内皮細胞特異的に発現する。過剰発現株の葉ではスベリンの蓄積が観察されることや、スベリンの合成に関与する酵素の発現が上昇していることから、スベリンモノマーの合成の鍵となる転写因子である。合成されたモノマーは輸送体によりアポプラストに輸送されスベリンが合成されるが、この過程に関与する遺伝子は同定されていない (Beisson et al. 2012, Andersen et al. 2015)。

3-2. カスパリー線

カスパリー線は150年前に発見された構造体であるが、その形成機構は謎に包まれていた。ここ数年の間に、スイスのNiko Geldner博士と筆者が所属していたイギリスのDavid E. Salt博士のグループによりその形成機構が明らかになりつつあるので以下に紹介する。

ローザンヌ大学のNiko Geldner博士らのグループは内皮細胞特異的に発現する遺伝子の中から4回膜貫通ドメインを有する遺伝子群を同定しCasparian strip domain protein (CASP) と名付けた (Roppolo et al. 2011)。CASPは根の伸長領域の内皮細胞で特異的に発現し、カスパリー線が形成される位置 (内皮細胞同士が隣接する面) の細胞膜に極性を持って局在する (図2)。シロイヌナズナに5つの相同遺伝子が存在するが、そのうちCASP1とCASP3の二重変異株 (*casplcaspl3*) ではカスパリー線が正常に形成されず、アポプラスト障壁も形成されない (Roppolo et al. 2011, Hosmani et al. 2013)。本来カスパリー線が形成される位置にドット状にリグニンが蓄積し、また、内皮細胞の内鞘側と皮層側にもリグニンが蓄積する。このことから、CASPはカスパリー線形成に必要な遺伝子であることが示された。CASP様のタンパクはシロイヌナズナに多く存在し、内皮細胞以外にも発現しているが、その機能についてはわかっていない (Roppolo et al. 2011)。

CASPの発見を皮切りに、カスパリー線形成に関与する遺伝子が次々と同定されている。これら遺伝子は、二つの異なるスクリーニング手法を用いて同定された。

Niko Geldner博士らのグループは、レポーター遺伝子である β -glucuronidase (GUS) の基質の透過性を指標にした変異株のスクリーニングを行った。中心柱でGUSを発現させたシロイヌナズナを用い、根をGUSの基質で処理する。野生型株ではカスパリー線がアポプラスト障壁として機能するため、基質が中心柱に浸透せず染色されない。一方で、障壁が形成されない変異株では、基質が浸透し中心柱が青く染まる。この手法を用いて、*schengen* (*sgn*) と呼ばれる変異株を取得している。この変異株のうち、*sgn3*と*sgn4*について原因遺伝子が同定されているので以下に紹介する (Pfister et al. 2014, Lee et al. 2013)。

*sgn3*のカスパリー線は野生型株のように連続的ではなく、寸断されたパターンを示す (Pfister et al. 2014)。また、CASP1の局在もカスパリー線と同様に寸断されている。*sgn3*の原因遺伝子は leucine rich repeat receptor like kinase (LRR-RLK) をコードしており、内皮細胞で発現している。CASP1よりも根端側で発現が開始し、カスパリー線形成初期にパッチ上に局在するCASP1の周囲に局在していることから、SGN3の機能はCASP1を連続的に局在させることだと推測されている。

*sgn4*は、*sgn3*とは異なり、根の先端でのみアポプラスト障壁が崩壊している。カスパリー線の自家蛍光を観察したところ、野生型株よりも遅くカスパリー線が形成されることが示された。*sgn4*の原因遺伝子はRespiratory burst oxidase homolog F (RBOHF) をコードする (Lee et al. 2013)。SGN4は内皮細胞特異的に発現し、カスパリー線形成部位に局在する。カスパリー線形成位置での局所的な活性酸素の生成や、阻害剤を用いた解析により、SGN4とペルオキシダーゼであるPER64が協調して機能することにより、アポプラスト空間に存在するモノリグノールを重合しカスパリー線を形成することが明らかになった。また、PER64のカスパリー線形成位置への局在はCASPが担っていることも明らかとなった (図2)。

David E. Salt博士らのグループは、全く異なるアプローチによりカスパリー線変異株を単離した。彼らは多元素を同時分析する誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いて、地上部の元素含量が異なる変異株を複数単離している (Lahner et al. 2003)。その中の1つ、*enhanced suberin 1* (*esb1*) は地上部の複数の元素含量が野生型とは異なる変異株として単離された (Baxter et al. 2009)。その名が示すように内皮細胞に過剰にスベリンが蓄積する。その後の解

析により,ESB1はアポプラストに局在するタンパク質であり,カスパリー線形成位置に局在することが明らかとなった(Hosmani et al. 2013)。破壊株のカスパリー線は*casp1casp3*と同様のパターンを示し,PIを用いて障壁としての機能を評価したところ,*casp1casp3*や*sgn4*と同様に根の先端でアポプラスト障壁が形成されていないことが示された。ESB1は*dirigent protein*と呼ばれる遺伝子群に属する。*Dirigent protein*は立体異性体の形成に関与しているタンパク質が含まれており,リグニン合成に関与していることが示唆されるが,詳細なESB1の分子機能についてはわかっていない(図2)。

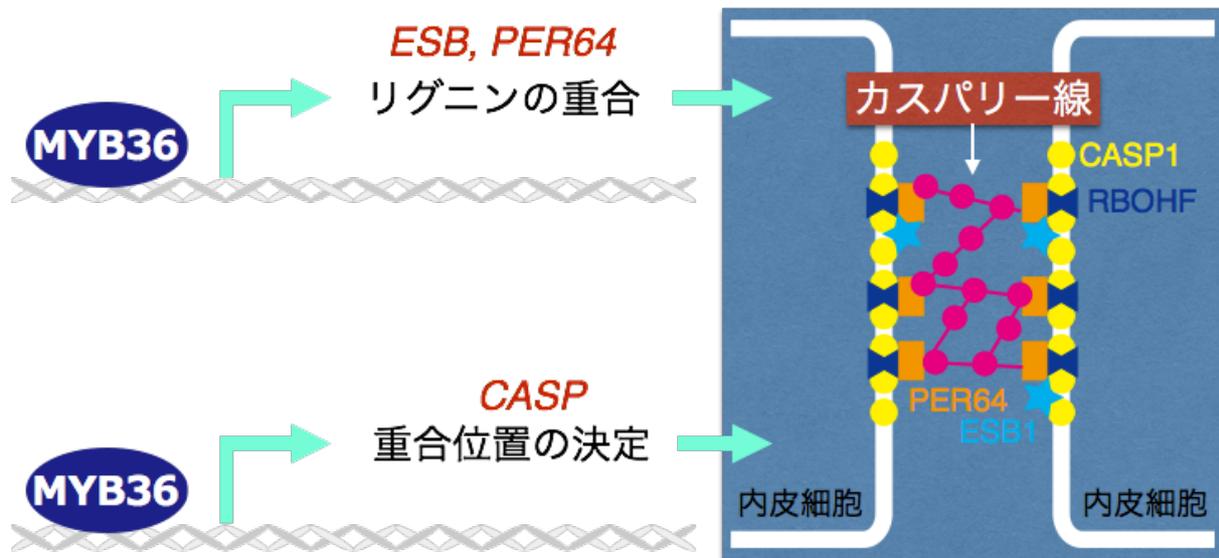


図2. カスパリー線形成の分子機構。MYB36はリグニンの重合および重合位置の決定に必要な遺伝子群を正に制御する。

*esb1*と同様のスクリーニングで得られた変異株の原因遺伝子としてカスパリー線形成のマスターレギュレーターであるMYB36転写因子が同定された(Kamiya et al. 2015)。*myb36*変異株は*esb1*と同様の元素含量のパターンを示す。一方で,カスパリー線の蓄積パターンはこれまでの変異株とは異なっており,カスパリー線形成位置には全くリグニンが蓄積せず,内皮と皮層のcell cornerにリグニンが蓄積する。原因遺伝子であるMYB36は内皮細胞特異的に発現している。マイクロアレイ解析の結果,カスパリー線の形成に必要な既知の遺伝子であるCASPファミリー,ESBファミリー,PER64の発現が変異株で低下していた。さらに,ChIP-qPCRの結果,MYB36はこれら遺伝子のプロモーターに直接結合することが示され,MYB36はリグニンの重合に必要な遺伝子群を制御していることが明らかとなった。また,*myb36*変異株で内皮細胞特異的にCASP1-GFPを発現させると,内皮細胞膜全体および細胞内に局在することからCASP1の極性を持った局在に必須であること,すなわち,カスパリー線が形成される位置を決定する遺伝子も制御していることが示された。さらに,MYB36を異所的に発現させると,同じ細胞層が接する位置(例えば,表皮と表皮の間にリグニンが蓄積するが,表皮と皮層の間には蓄積しない)にCASP1-GFPが局在すること,さらにCASP1-GFPの局在と同じ場所にリグニンが蓄積され,カスパリー線様の構造が形成されることから,MYB36がカスパリー線形成のマスターレギュレーターであることが示された(図2)。

一方で、異所的に形成されたカスパリー線様の構造は、*sgn3*変異株のように寸断されており、アポプラスト障壁としては機能しない (Kamiya et al. 2015)。このことは、MYB36に制御される遺伝子以外にもアポプラスト障壁として機能するカスパリー線の形成に必要な遺伝子があることを示している。これまで同定された遺伝子の中で、*SGN3*は*myb36*変異株で発現が低下しておらず、MYB36による発現制御を受けていないと考えられる。また、筆者らは*SGN3*と同様にMYB36の制御下に無いカスパリー線形成に必要な新規遺伝子を同定している。このことは、MYB36はリグニンの重合と重合位置位置の決定には十分であるが、障壁として機能するための連続した構造を作るのには他の遺伝子が必要であることを示唆している。

根のカスパリー線は内皮細胞の分化のマーカーとして長らく用いられてきた。分化については多くの研究がなされており、転写因子であるSHORTROOT (SHR) とSCARECROW (SCR) が内皮細胞形成のための分裂とその後の分化に中心的な役割を果たしていることがよく知られている (Petricka et al. 2012)。一方で、SHR、SCRとカスパリー線形成を結ぶ経路についてはわかっていなかった。筆者らのMYB36の発見に引続き、MYB36の発現がSCRにより直接制御されていることが報告された (Lieberman et al. 2015)。これらの発見により、内皮細胞の分裂から分化までがつながり、内皮細胞の分化の全体像が明らかになった。

4. カスパリー線とスベリンの同調した形成

興味深いことに、これまでに紹介したカスパリー線変異株 (*casplcasp3, esb1, myb36*) では、スベリンの異所的な蓄積が観察される (Hosmani et al. 2013, Kamiya et al. 2015)。野生型株において、スベリンの蓄積は35細胞以上で観察されるが、これらカスパリー線変異株では13細胞からスベリンの蓄積がみられる。すなわち、カスパリー線の寸断を補うようにスベリンの蓄積が起きてくるかのような現象が観察される。この蓄積がカスパリー線の機能であるアポプラスト障壁として機能しているかはわかっていないものの、上述したように側根発生部位ではスベリンがアポプラスト障壁として機能することから、障壁として機能することは十分に考えられる。

この同調したスベリンの蓄積はどのように起きるのであろうか？その手がかりとなる結果が*sgn3*を用いた解析により得られている。*sgn3*のスベリンの蓄積は、他のカスパリー線変異株とは異なり、野生型株と同様の位置から観察される。さらに、*sgn3*と*esb1*もしくは*casplcasp3*との多重変異株ではスベリンの蓄積は野生型と同様の位置からおきる (Pfister et al. 2014)。このことから、*sgn3*がカスパリー線の異常をなんらかの形で感知し、スベリンの蓄積を誘導していると推測される。

5. おわりに

わずか数年の間に、根における物質輸送の障壁の実体やその形成機構および制御が一気に明らかになってきた。また、カスパリー線とスベリンという全く組成が異なる障壁が、お互いの機能を補完するという巧みな制御機構を植物が有することも明らかになりつつある。一方で、上述したようにわからないことも多く残されている。また、栄養以外にもカスパリー線やスベリンは根から進入する病原菌や線虫などに対する障壁として機能するとも言われているが、実際に示した例はない (Franke et al. 2007, Holbein et al. 2016)。今後は、カスパリー線やスベリンの多面的な機

能や形成機構を明らかにしていきたい。また、その知見を活かして栄養欠乏や生物学的ストレス耐性の作物の作出を目指していきたいと考えている。

6. 謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、アバディーン大学 David E. Salt博士、ローザンヌ大学 Niko Geldner博士、東京大学 藤原徹教授、Baohai Li博士の協力を得て行われたものです。この場を借りて感謝いたします。また、研究の一部は、日本学術振興会海外特別研究員および科学研究費助成事業（26712008）の支援を受けて行われた。

引用文献

- Alassimone, J., Naseer, S., & Geldner, N. 2010. A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:5214-5219.
- Andersen, T.G., Barberon, M., & Geldner, N. 2015. Suberization-the second life of an endodermal cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28:9-15
- Barberon, M., Vermeer, J.E., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T.G., Humbel, B.M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D.E., & Geldner, N. 2016. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* 164:447-459
- Barberon, M., Geldner, N. Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. 2014. *Plant Physiol.* 166:528-537
- Baxter, I., Hosmani, P.S., Rus, A., Lahner, B., Borevitz, J.O., Muthukumar, B., Mickelbart, M.V., Schreiber, L., Franke, R.B., & Salt, D.E. 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 5:e1000492
- Beisson, F., Yonghua, L., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge J.B. 2007. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell* 19:351-368
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., & Pollard, M. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. 2012. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:329-337
- Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., Franke, R., & Pinot, F. CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha, omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. 2009. *Plant Physiol.* 150:1831-1843
- Franke, R., Shreiber, L. 2007. Suberin-a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. 2007. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:252-259
- Geldner, N. 2013. The Endodermis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 64:531-558
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., & Franke, R. 2008. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 59:2347-2360
- Holbein, J., Grundler, M.W., & Siddique, S. 2016. Plant basal resistance to nematodes: an update. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erw005
- Hosmani, P.S., Kamiya, T., Danku, J., Naseer, S., Geldner, N., Guerinot, M.L., & Salt, D.E. 2013. Dirigent

- domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:14498–503.
- Kamiya, T., Borghi, M., Wang, P., Danku, J.M., Kalmbach, L., Hosmani, P.S., Naseer, S., Fujiwara, T., Geldner, N., Salt, D.E. 2015. The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:10533-10538
- Kosma, D.K., Murmu, J., Razeq, F.M., Santos, P., Bourgault, R., Molina, I., & Rowland, O. 2014. AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *Plant J.* 80:216-229.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E., Guerinot, M.L., Harper, J.F., Ward, J.M., McIntyre, L., Schroeder, J.I., & Salt, D.E. 2003. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21:1215–1221.
- Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., & Geldner, N. 2013. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* 153:402–412.
- Lieberman, L.M., Sparks, E.E., Moreno-Risueno, M.A., Petricka, J.J., & Benfey, P. 2015. MYB36 regulates the transition from proliferation to differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:12099-12104
- Martinka, M., Dolan, L., Pernas, M., Abe, J., & Lux, A. 2012. Endodermal cell-cell contact is required for the spatial control of Casparian band development in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 110:361-371
- Naseer, S., Lee, Y., Lapiere, C., Franke, R., Nawrath, C., & Geldner, N. 2012. Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:10101–10106.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., & Benfey, P.N. 2012. Control of *Arabidopsis* root development. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63:563-590
- Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J.E., Yamazaki, M., Li, G., Maurel, C., Takano, J., Kamiya, T., Salt D.E., Roppolo, D., & Geldner, N. 2014. A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* 3:e03115
- Ranathunge, K., Schreiber, L. 2011. Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *J. Exp. Bot.* 62:1961-1974
- Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., Rubio, M.C., Dénervaud-Tendon, V., Vermeer, J.E., Gheyselinck, J., Xenarios, I., & Geldner N. 2014. *Plant Physiol.* 165:1709-1722
- Roppolo D, De Rybel, B., Dénervaud Tendon, V., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J.E., Yamazaki, M., Stierhof, Y.D., Beeckman, T., Geldner, N. 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473:380–383.
- Schreiber, L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends Plant Sci.* 15:546-553
- Shiono, K., Ando, M., Nishiuchi, S., Takahashi, H., Watanabe, K., Nakamura, M., Matsuo, Y., Yasuno, N., Yamanouchi, U., Fujimoto, M., Takanashi, H., Ranathunge, K., Franke, R.B., Shitan, N., Nishizawa, N.K., Takamura, I., Yano, M., Tsutsumi, N., Schreiber, L., Yazaki, K., Nakazono, M., & Kato, K. 2014.

- RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *Plant J.* 80:40-51
- Vermeer, J.E., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E.H., Maizel, A., & Geldner, N. 2014. A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in Arabidopsis. *Science* 345:875-876
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I.Q., Rothstein, S.J., & Reed, J.W. 2014. ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:3569-3588

シロイヌナズナにおける側根形成の制御機構

郷 達明¹・深城 英弘¹

¹神戸大学 大学院理学研究科 生物学専攻
〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1

Mechanisms controlling lateral root formation in *Arabidopsis*

Key words: lateral root formation, *Arabidopsis thaliana*

Tatsuaki Goh¹, Hidehiro Fukaki¹

¹Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

1. はじめに

植物が地中に張る根の全体を根系と呼ぶ。維管束植物は、それぞれの生育環境に適した形状の根系を発達させることによって、地上部を支え、水分や栄養を効率よく吸収している (Hodge et al, 2009)。根系は、胚発生で形成される幼根に由来する初生根 (種子根や主根)、根以外の組織から形成される不定根、そして、すでにある根から分岐して形成される側根によって構成される (Atkinson et al, 2014)。根系全体の形は、それぞれの根の数や成長の程度によって決まる。1本しかない初生根に対して、側根と不定根は発芽後に多数形成されることから、根系の大部分を占める。そのため、これらの根の形成は根系の形状に大きな影響を及ぼす。特にシロイヌナズナの側根形成については、変異体の単離・解析、遺伝子の発現パターンの解析、そして、イメージングによって、ここ15年ほどの間に大きく研究が進展してきた (Lavenus et al, 2013)。本総説では、シロイヌナズナにおける側根の形成機構について、最近の知見を中心に紹介する。

2. シロイヌナズナの側根形成

シロイヌナズナなどの真正双子葉植物は、よく発達した主根と、主根から分岐した側根から構成される主根型根系を形成する(図1) (Atkinson et al, 2014)。主根型根系の形状は、側根による分岐に大きく依存する。すなわち、側根が形成されるタイミングや頻度、側根が伸長する方向などによって、根系の形状は変化する。シロイヌナズナの側根は、すでに存在する根 (主根や側根、不定根など) の内部組織から発生する。根の横断面をみると、外側から表皮、皮層、内皮、内鞘が一層ずつ、同心円状にあり、その内側に水分や栄養を運ぶ維管束組織がある。側根は、維管束の原生木部に接した主に3列の内鞘細胞から形成される (図1C)。シロイヌナズナの根は2原型 (Diarch) の維管束構造をもつことから、2本の原生木部に接した内鞘細胞列から左右に側根が形成される (図1C)。側根の形成には、複数の重要な発生ステップがある (図1B,C)。まず木部に接した内鞘細胞から、側根のもととなる側根創始細胞が特定される (側根形成位置の決定)。次に、側根創始細胞の非対称分裂により側根形成が開始する (側根形成の開始)。その後、規則的な細胞分裂によりドーム状の側根原基が形成されて、側根の分裂組織 (メリステム) が新たに構築される (側根原基の発生と分裂組織の構築)。そして、新たに構築された分裂組織における活発な細胞分裂と伸長により側根原基は成長し、周囲にある親の根

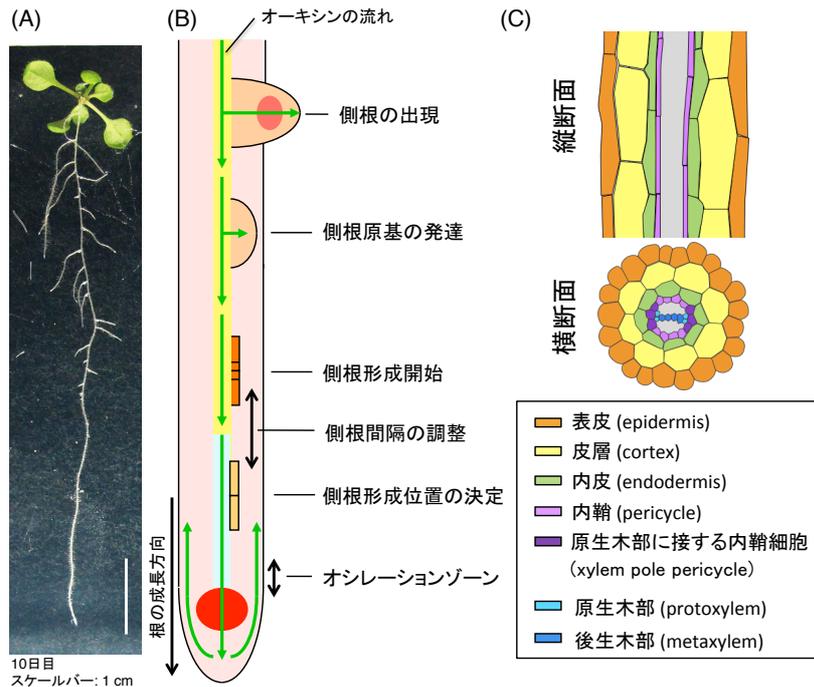


図1. シロイヌナズナの側根形成

(A) 発芽後10日目のシロイヌナズナの主根型根系。長く伸びた主根から、多数の側根が形成される。

(B) 側根形成の発生過程の模式図。

(C) シロイヌナズナの根の縦断面と横断面の模式図。横断面の濃い紫色で示した細胞が原生木部に接する内鞘細胞であり、側根の元となる細胞群である。

の組織（内皮，皮層，表皮）を押しのけて，親の根から土壤中へと成長する。

3. 側根形成位置の決定と間隔の調整

シロイヌナズナの根を観察すると，適度な間隔をもって側根が形成されている（図1A）。また，多くの場合，一カ所から，1本の側根が左右どちらかに形成される。間隔をもって側根を形成することは，広い範囲に効率よく根を張ることに重要と考えられる。

側根の間隔は，ある程度のばらつきはあるものの，周期的に形成される（Barlow & Adam, 1988, Charlton, 1983, Mallory et al, 1970）。そのため，側根の形成位置は，何らかの周期的なプログラムによって決まるのではないかと考えられてきた（Charlton, 1996）。オーキシンの応答を人工的なレポーター（DR5:GUS など）をもちいて観察すると，根端分裂組織の分裂領域から伸長領域への移行領域（オシレーションゾーン，図1B）において，オーキシン応答がおよそ4~6時間周期で変動することが見出された（De Smet et al, 2007, Moreno-Risueno et al, 2010, Xuan et al, 2015）。この結果，根の伸長にともなって，オーキシン応答が高い領域と低い領域が交互に現れる。そして，オーキシン応答が高い領域にある内鞘細胞が，側根のもととなる側根創始細胞として特定されて，その後，側根を形成することが示された。さまざまな観察から，根端における周期的なオーキシン応答と側根形成との間には，高い相関関係があることが示唆されている（周期的なオーキシン応答による制御）。

一方で，根の屈曲部位と側根形成位置の間にも相関があることが報告されている（Ditengou et al, 2008, Dubrovsky et al, 2008, Laskowski et al, 2008, Lucas et al, 2008, Richter et al, 2009）。例えば，45度に傾けた寒天プレート上で植物を生育させると，重力屈性と接触屈性により，根が寒天プレート上をジグザグ状に成長する。このとき，側根は屈曲部位の凸側より形成される（De Smet et al, 2007）。また，ピンセットなどで根を強制的に曲げた場合や，障壁にぶつかって根が曲がった場合にも，屈曲部分の凸側から側根が形成される（Ditengou et al, 2008, Dubrovsky et al, 2008, Richter et al, 2009）。屈曲部の凸側に側根を形成することで，親根の成長方向とは反対の方向に側根を形成することになり，広い範囲に根

を張ることにつながる (根の屈曲による制御)。

これら2つの仕組みのうち、どちらか片方だけでは、シロイヌナズナの側根の位置決定機構を十分には説明できない (Scheres & Laskowski, 2016)。根の屈曲による側根形成の誘導では、周期性が説明できず、一方、左右どちら側に側根を形成するのかは、周期的なプログラムだけでは決定することができない。この疑問について、Kircher と Schopfer (2016)らは興味深い実験を行った (Kircher & Schopfer, 2016)。彼らはさまざまな間隔で重力刺激を与えて、根の屈曲間隔を人為的に変化させた。面白いことに、屈曲間隔を変えても、側根の密度は変化しなかった。このことから、側根の形成頻度は、根の屈曲ではなく、周期的なプログラムによって決定されていることが示唆された。一方で、全体的な側根の形成頻度は変化しないものの、側根の形成位置は、屈曲の影響を受けて微妙に位置が調節される可能性が示唆された。たとえば、通常は屈曲部位の凸側から1本の側根が形成されるが、側根の形成頻度よりもゆっくりと屈曲させた場合は、屈曲部位に複数の側根が形成された。これらのことから、全体的な側根の形成頻度は周期的なプログラムでおおよそ決まるが、根の屈曲の影響を受けて、側根の局所的な位置 (向きや間隔) が制御されていることが示唆された (Scheres & Laskowski, 2016)。

周期的なオーキシン応答を生み出す分子機構については徐々に理解が進んできている。多くのオーキシン応答性遺伝子が人工的なオーキシン応答レポーター(DR5)と同調して、オシレーションゾーンにおいて周期的に発現変動する (De Smet et al, 2007, Moreno-Risueno et al, 2010)。また、根冠部におけるオーキシンの合成が重要であり、オーキシンの通り道にあたる側部根冠の周期的な細胞死によって、オシレーションゾーンへのオーキシンの供給が変動して、オーキシン応答の周期性が生み出されている可能性が示唆されている (De Rybel et al, 2012, Xuan et al, 2015, Xuan et al, 2016)。一方、根の屈曲による制御機構については、機械的な刺激による情報伝達や、細胞形状の変化に伴うオーキシンの流れの変化が側根形成位置の調整に関わることが示唆されているが、詳しい分子機構は明らかになっていない。今後、周期性を生み出す制御機構と局所的な位置の調整機構のそれぞれについて理解が進むとともに、両者の関係についても明らかになると期待される。さらに、これらに加えて、先に形成された側根がその近くに新たな側根を作らせないようにする機構 (側方抑制) (Laskowski et al, 2008, Lucas et al, 2008) や、水分や栄養の確保のために側根の位置や向きを調整する機構 (Hydropatterning など) (Bao et al, 2014) の存在も示唆されている。植物はこのような複数の制御機構を組み合わせ、側根の形成位置を制御して、生存に適した根系を構築していると考えられる (Malamy, 2005)。

4. 側根形成の開始

側根の形成予定位置が決まると、主に3列の木部に接した内鞘細胞列において、縦に並んだ2つの細胞が側根創始細胞 (founder cell) として特定される (図1 B, C) (Van Norman et al, 2013)。このわずかな数個の側根創始細胞から、側根が形成される。最初に側根創始細胞において局所的にオーキシン応答が高まる (De Rybel et al, 2010)。側根形成を開始する前の側根創始細胞は、形態的には他の内鞘細胞とは区別できず、大きな液胞をもち、分化した細胞のように見える。オーキシン応答の上昇に続いて、側根創始細胞の核が共通の細胞壁側に移動し、極性が確立される。そして、根の伸長方向に対して垂層方向に非対称に分裂することによって側根形成が開始する (図2) (De Rybel et al, 2010, Goh et al, 2012)。その結果、中央に2つの小さい細胞、隣接部に大きな細胞が生み出される。このように、オーキシンは側根創始細胞における非対称性の確立と細胞分裂の活性化を制御することによって、側根形

成の開始を促進する。オーキシンに応答した遺伝子発現は、オーキシン応答因子 Auxin Response Factor (ARF)と、ARFに結合して機能抑制する Aux/IAA タンパク質とからなるモジュールによって制御される。オーキシンが受容体 TIR1/AFBs によって受容されると、Aux/IAA リプレッサータンパク質の分解が促進される。その結果、パートナーである ARF が活性化し、下流の遺伝子発現を誘導する。側根形成の開始時には、SLR/IAA14-ARF7-ARF19 モジュールによる制御が特に重要であり、これらの変異体では側根形成が顕著に抑制される (Fukaki et al, 2005, Fukaki et al, 2002, Okushima et al, 2007, Okushima et al, 2005, Vanneste et al, 2005)。最近、オーキシンによる ARF の転写抑制の解除の仕組みが明らかにされた (Ito et al, 2016)。Aux/IAA タンパク質は転写補助抑制因子 TOPLESS (TPL) を介して転写メディエーター複合体の kinase モジュールと複合体を形成し、ARF のターゲット遺伝子の発現を抑制する。オーキシンにより Aux/IAA タンパク質の分解が促進されると、転写メディエーター複合体が活性化して、ARF によるオーキシンに応答した遺伝子発現が活発化する。

ARF7 と ARF19 は、側根創始細胞において、植物特異的な転写因子である *Lateral Organ Boundaries-domain 16 (LBD16)*, および複数の *LBD* 遺伝子の発現を誘導する (Okushima et al, 2007)。*LBD16* の発現は、側根創始細胞の核の移動や非対称分裂に先立って開始する。*LBD16* を含む遺伝子群の機能を抑制すると、側根創始細胞の核の移動が起きず、非対称性が確立されずに、側根形成が停止した。このことから、*LBD16* はオーキシン依存的に側根創始細胞で発現し、非対称性の確立を促進することによって、側根形成の開始を制御することが示唆された (図2) (Goh et al, 2012)。また、*LBD16* と同様に *ARF7* と *ARF19* の下流で発現する *LBD18* と *LBD33* は、細胞周期関連遺伝子の発現を誘導し、側根創始細胞の細胞分裂を活性化する (Berckmans et al, 2011)。単子葉類であるイネにおいても、*LBD16* の類似遺伝子である *Crown rootless 1 (CRL1)* が冠根形成を制御することが示されており (Inukai et al, 2005)、オーキシンにより誘導される *LBD* 遺伝子群を介した根の分岐機構は種間を超えて重要と考えられる。筆者らは、*LBD16* がシロイヌナズナの側根形成開始の鍵因子と考えて、*LBD16* の下流因子の探索と機能解析から、側根形成の開始を制御する分子機構の理解を目指している。

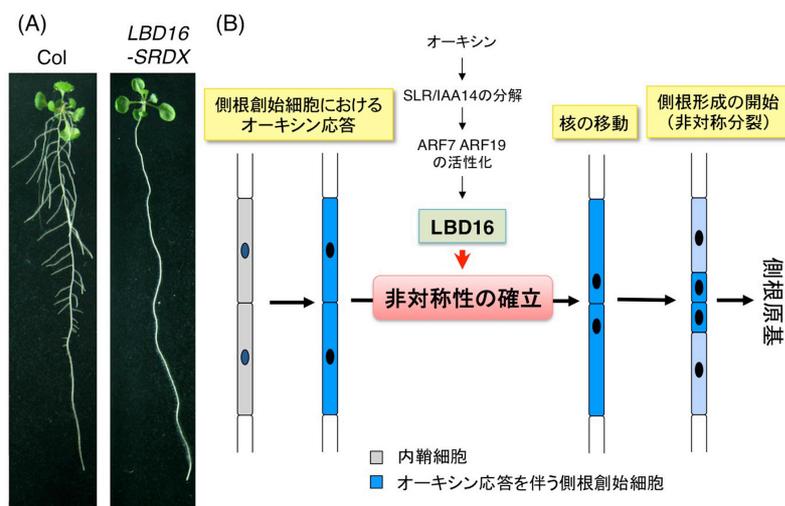


図2. オーキシンによる側根形成の開始の制御機構

(A) 野生型(Col:左)と *LBD16* の機能抑制型植物体 (*LBD16-SRDX*:右)。*LBD16* を機能抑制すると、側根形成の開始が抑制され、側根が形成されない。

(B) オーキシンによる側根形成開始の制御機構。側根創始細胞におけるオーキシン応答により、*LBD16* が発現する。その後、*LBD16* により側根創始細胞の非対称分裂が誘導され、側根形成が開始する。

5. 側根原基の発生

側根形成開始後、側根創始細胞の規則的な細胞分裂と細胞伸長によって、ドーム状の側根原基が形成される。やがて側根原基において、新たに分裂組織が構築されて、側根が形作られる (図3)。その

後の側根の成長は、主根と同様に、分裂組織における活発な細胞分裂と細胞伸長に依存する。主根の根端分裂組織は胚発生過程で形成されるのに対して、側根は、主根の根端分裂組織には依存せず、数個の分化した内鞘細胞に由来し、独自に根端分裂組織を構築する。このように主根と側根は由来する細胞の性質が異なり、その発生過程も異なるにもかかわらず、ほぼ同様な構造をもつ根端分裂組織を構築する。

Malamy と Benfey (1997)は、シロイヌナズナの側根の発生を詳細に観察し、細胞分裂や細胞伸長などの特徴をもとに、ステージ I から VII の発生ステージを経て、側根が形成されることを明らかにした (図 3) (Malamy & Benfey, 1997)。ステージ I では、先に述べたように、側根創始細胞が根の伸長方向に対して垂層方向に非対称分裂をすることによって、細胞形状の異なる 2 つの娘細胞が生み出される。ステージ II においては、並層方向に分裂することによって、2 層の細胞層からなる側根原基となる。ステージ III では、外側の細胞層が並層分裂して、3 層の側根原基となり、さらにステージ IV で内側の細胞層が並層分裂することによって、4 層からなるドーム状の側根原基が形成される。ステージ V, VI では、部位特異的な細胞分裂や細胞伸長によって、根端の分裂組織と同様なパターンが生み出される。ステージ VII ではさらに原基が発達し、周囲の細胞を押しよけるように、外へと伸長する。

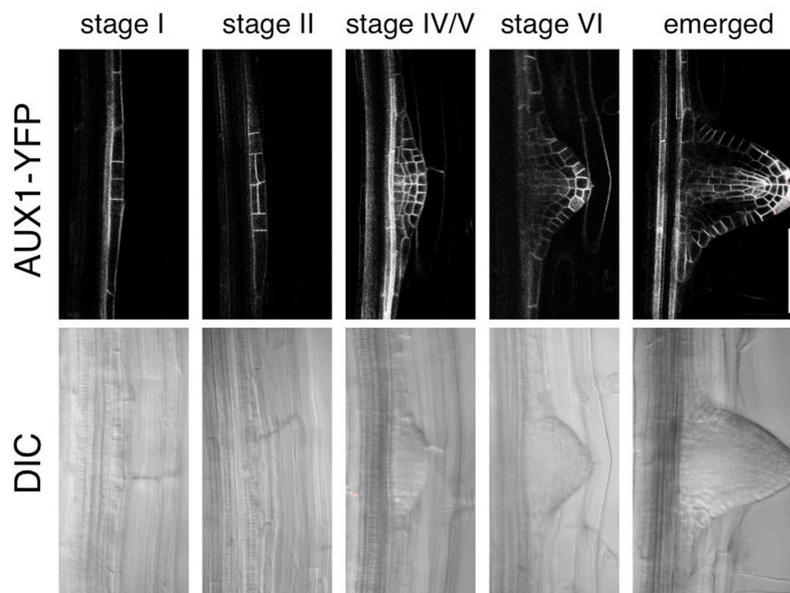


図 3. シロイヌナズナの側根原基の発達過程。

細胞膜マーカーとして AUX1-YFP を利用して、側根原基の発達を観察した。側根形成開始後、協調的な細胞分裂によって、ドーム状の側根原基が形成される。その後、側根の根端分裂組織が構築される。

Laskowski (1995)らは、器官自律的な発生が可能かという点に着目して、側根が二段階の発生プロセスによって形成される説を提唱した (Laskowski et al, 1995)。彼らは、根を 3 mm 長に断片化し、各断片に含まれる側根原基のステージを記録した後に、7 日間液体培養し、側根原基を再び観察して、側根原基の発達を確認した。培養 0 日目の段階で、1-2 層 (ステージ I もしくは II) からなる側根原基だった場合は、7 日経っても 2-3 層までしか発達しなかったのに対して、3-5 層 (ステージ III - V) だった原基は、側根として成熟した。このことから、初期の側根原基が発達するためには、周囲の組織から何らかの物質の供給が必要であり、一方、ある程度成熟した側根原基は、器官自律的に発生が進むことが示唆された。Malamy と Benfey (1997)の観察とあわせて考えると、側根形成の初期では、活発な細胞増殖により 4 層からなるドーム状の原基が作られ (stage I-IV)、その後に新たな分裂組織が構築される (stage V-VII) という二段階の発生プロセスによって、側根が形成されると考えられる。この二段階の発生プロセスは、側根原基の発生後期になると、根端分裂組織を構成する各組織に特異的な

遺伝子発現パターンが観察されることから支持されている (Malamy & Benfey, 1997, Tian et al, 2014a, Tian et al, 2014b)。

初期の発生ステージでは、ステージ I の非対称分裂によって生じた小さな娘細胞が、活発に細胞分裂する。一方で、隣接する内鞘細胞はほとんど分裂しない。この限局的な細胞分裂と、側根原基を覆う親根の組織 (内皮, 皮層, 表皮) の細胞間接着の緩みによって、側根原基はドーム状に発達する (Kumpf et al, 2013, Lucas et al, 2013, Swarup et al, 2008)。AP2/EREBP タイプの転写因子 *PUCHI* の変異体では、側根原基形成の初期において、分裂する領域が広がり、側根原基の発達が遅れ、また、基部が肥大化した側根が形成される (Hirota et al, 2007)。このことから、*PUCHI* は側根原基の細胞分裂パターンを適切に調整することによって、側根原基の形成を促進していると考えられる。また、受容体型キナーゼである *ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4)* の変異体でも、同様な細胞分裂の亢進が観察されることから、何らかの細胞間情報伝達が細胞分裂の活発な領域の制限に関わることが示唆されている (De Smet et al, 2008)。

4 層からなるドーム状原基が形成された後、根端分裂組織を構成する組織分化が進む。主根の根端分裂組織の構築や維持に関わる多くの遺伝子の変異体は、側根の根端分裂組織の構築や維持にも異常を示すことから、両者は共通した分子機構によって制御されることが示唆されている (Tian et al, 2014a)。しかしながら、先に述べたように、主根と側根は元になる細胞や発生過程が異なることから、どのようにして同様な形状や細胞パターンをもつ器官が形成されるのかは明らかになっていない。

側根形成は、数個の側根創始細胞に由来して、多細胞からなる組織化された新しい器官が形成されるダイナミックな発生プロセスである。このような発生プロセスを理解するためには、細胞がどのように分裂・変形して、器官を構築するのか、また、細胞の運命がいつ、どのように決まるのかを経時的に観察することが重要である。近年のライブイメージング技術の向上にともなって、シロイヌナズナの側根発生を経時的に顕微鏡観察することが可能になってきている。観察には、高解像度で汎用性が高い共焦点レーザー顕微鏡や、光によるダメージを低く抑えつつ、高速スキャンにより高精細な 3 次元画像を得ることができるライトシート顕微鏡が用いられる (Lucas et al, 2013, Maizel et al, 2011, Vermeer et al, 2014, von Wangenheim et al, 2016)。培地や照明装置を工夫することによって、顕微鏡下で植物を生育させたまま、約 2 日間にわたる側根の発生過程を経時的に観察することが可能になった。この方法により、側根の 3 次元形状の変化を可視化し、側根を覆う親根の組織 (特に内皮細胞) が側根の発達と密接に関わるが見出された (Kumpf et al, 2013, Lucas et al, 2013, Vermeer et al, 2014)。Maizel らのグループは、ライトシート顕微鏡をもちいて、側根創始細胞から側根へと発達するまでを経時的に観察し、細胞がどのように分裂して、側根の 3 次元形状を形成するのかを明らかにした (Maizel et al, 2011, Vermeer et al, 2014, von Wangenheim et al, 2016)。今後、側根発生過程のライブイメージングとトランスクリプトーム解析 (Lavenus et al, 2015, Voss et al, 2015) などと組み合わせて、細胞分裂、細胞形状の変化、細胞分化、遺伝子発現を統合的に解析することによって、側根発生の分子機構について、さらに理解が進むことが期待される。

6. おわりに

本稿では、シロイヌナズナの側根形成の分子機構について概説した。ここ数年の観察手法の進展により、細胞レベルから根系レベルまでの幅広い現象について、さまざまな機構が明らかにされてきた。

側根形成は、植物の器官発生の優れたモデル系と考えられ、器官形状の制御機構、細胞のアイデンティティの決定機構について、さらに理解が進むことが期待される。また、植物は、水分や栄養などの土壌環境に応じて、側根形成を調節して、適切な形状の根系を構築する。これは動くことができない植物にとって、重要な生存戦略となっている。今後、環境応答と側根形成の制御機構との関係を明らかにすることによって、さまざまな環境に適応した根系構造をもつ植物の作出へとつながることが期待される。

7. 引用文献

- Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voss, U., Sturrock, C., Mooney, S. J., Wells, D. M., & Bennett, M. J. 2014. Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiol.* 166: 538-550.
- Bao, Y., Aggarwal, P., Robbins, N. E., Sturrock, C. J., Thompson, M. C., Tan, H. Q., Tham, C., Duan, L., Rodriguez, P. L., Vernoux, T., Mooney, S. J., Bennett, M. J., & Dinneny, J. R. 2014. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 9319-9324.
- Barlow, P. W., & Adam, J. S. 1988. The Position and Growth of Lateral Roots on Cultured Root Axes of Tomato, *Lycopersicon-Esculentum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 158: 141-154.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S. P., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Alvim Kamei, C. L., Koncz, C., Bogre, L., Persiau, G., De Jaeger, G., Friml, J., Simon, R., Beeckman, T., & De Veylder, L. 2011. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell* 23: 3671-3683.
- Charlton, W. A. 1983. Patterns of Distribution of Lateral Root Primordia. *Annals of Botany* 51: 417-427.
- Charlton, W. A. (1996). Lateral Root Initiation. In *Plant Roots: The Hidden Half, 2nd edn.* (ed. Y. Waisel, A. Eshel & U. Kafkafi), pp. 149-173. New York: Marcel Dekker Inc.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Xuan, W., Overvoorde, P., Strader, L. C., Kepinski, S., Hoye, R., Brisbois, R., Parizot, B., Vanneste, S., Liu, X., Gilday, A., Graham, I. A., Nguyen, L., Jansen, L., Njo, M. F., Inze, D., Bartel, B., & Beeckman, T. 2012. A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nat Chem Biol* 8: 798-805.
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., Weijers, D., Bennett, M. J., & Beeckman, T. 2010. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20: 1697-1706.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F. D., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M. J., & Beeckman, T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134: 681-690.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M. P., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., Wang, J. Y., Meuli, N., Vanneste, S., Friml, J., Hilson, P., Jürgens, G., Ingram, G. C., Inzé, D., Benfey, P. N., & Beeckman, T. 2008. Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* 322: 594-597.
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T., & Palme, K. 2008. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 105: 18818-18823.

- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 8790-8794.
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., & Tasaka, M. 2005. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *Plant J.* 44: 382-395.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., & Tasaka, M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J.* 29: 153-168.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. 2012. The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* 139: 883-893.
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., & Tasaka, M. 2007. The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 2156-2168.
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., & Crespi, M. 2009. Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* 321: 153-187.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., & Matsuoka, M. 2005. *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17: 1387-1396.
- Ito, J., Fukaki, H., Onoda, M., Li, L., Li, C., Tasaka, M., & Furutani, M. 2016. Auxin-dependent compositional change in Mediator in ARF7- and ARF19-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 6562-6567.
- Kircher, S., & Schopfer, P. 2016. Priming and positioning of lateral roots in Arabidopsis. An approach for an integrating concept. *J Exp Bot* 67: 1411-1420.
- Kumpf, R. P., Shi, C. L., Larrieu, A., Sto, I. M., Butenko, M. A., Peret, B., Riiser, E. S., Bennett, M. J., & Aalen, R. B. 2013. Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 5235-5240.
- Laskowski, M., Grieneisen, V., Hofhuis, H., Hove, C., Hogeweg, P., Marée, A., & Scheres, B. 2008. Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. *PLoS Biol.* 6: e307.
- Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., & Sussex, I. M. 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121: 3303-3310.
- Lavenus, J., Goh, T., Guyomarc'h, S., Hill, K., Lucas, M., Voss, U., Kenobi, K., Wilson, M. H., Farcot, E., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Fukaki, H., Laplace, L., & Bennett, M. J. 2015. Inference of the Arabidopsis lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *Plant Cell* 27: 1368-1388.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., & Laplace, L. 2013. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18: 450-458.
- Lucas, M., Guédon, Y., Jay-Allemand, C., Godin, C., & Laplace, L. 2008. An auxin transport-based model of root branching in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* 3: e3673.
- Lucas, M., Kenobi, K., von Wangenheim, D., Vobeta, U., Swarup, K., De Smet, I., Van Damme, D., Lawrence, T., Peret, B., Moscardi, E., Barbeau, D., Godin, C., Salt, D., Guyomarc'h, S., Stelzer, E. H., Maizel, A., Laplace, L., & Bennett, M. J. 2013. Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlying tissues. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 110: 5229-5234.

- Maizel, A., von Wangenheim, D., Federici, F., Haseloff, J., & Stelzer, E. H. 2011. High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *Plant J.* 68: 377-385.
- Malamy, J. E. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* 28: 67-77.
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Mallory, T. E., Chiang, S. H., Cutter, E. G., & Gifford, E. M. 1970. Sequence and Pattern of Lateral Root Formation in 5 Selected Species. *American Journal of Botany* 57: 800-&.
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. 2010. Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329: 1306-1311.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 118-130.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., & Theologis, A. 2005. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 17: 444-463.
- Richter, G. L., Monshausen, G. B., Krol, A., & Gilroy, S. 2009. Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiol.* 151: 1855-1866.
- Scheres, B., & Laskowski, M. 2016. Root patterning: it takes two to tangle. *J Exp Bot* 67: 1201-1203.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J. D. G., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplace, L., & Bennett, M. J. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10: 946-954.
- Tian, H., De Smet, I., & Ding, Z. 2014a. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends Plant Sci.* 19: 426-431.
- Tian, H., Jia, Y., Niu, T., Yu, Q., & Ding, Z. 2014b. The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 33: 745-753.
- Van Norman, J. M., Xuan, W., Beeckman, T., & Benfey, P. N. 2013. To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* 140: 4301-4310.
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., Naudts, M., Iida, R., Gruissem, W., Tasaka, M., Inzé, D., Fukaki, H., & Beeckman, T. 2005. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 3035-3050.
- Vermeer, J. E., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H., Maizel, A., & Geldner, N. 2014. A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science* 343: 178-183.
- von Wangenheim, D., Fangerau, J., Schmitz, A., Smith, R. S., Lütte, H., Stelzer, E. H., & Maizel, A. 2016. Rules and Self-Organizing Properties of Post-embryonic Plant Organ Cell Division Patterns. *Curr. Biol.* 26: 439-449.

- Voss, U., Wilson, M. H., Kenobi, K., Gould, P. D., Robertson, F. C., Peer, W. A., Lucas, M., Swarup, K., Casimiro, I., Holman, T. J., Wells, D. M., Peret, B., Goh, T., Fukaki, H., Hodgman, T. C., Laplace, L., Halliday, K. J., Ljung, K., Murphy, A. S., Hall, A. J., Webb, A. A., & Bennett, M. J. 2015. The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* 6: 7641.
- Xuan, W., Audenaert, D., Parizot, B., Moller, B. K., Njo, M. F., De Rybel, B., De Rop, G., Van Isterdael, G., Mahonen, A. P., Vanneste, S., & Beeckman, T. 2015. Root Cap-Derived Auxin Pre-patterns the Longitudinal Axis of the Arabidopsis Root. *Curr. Biol.* 25: 1381-1388.
- Xuan, W., Band, L. R., Kumpf, R. P., Van Damme, D., Parizot, B., De Rop, G., Opendacker, D., Moller, B. K., Skorzinski, N., Njo, M. F., De Rybel, B., Audenaert, D., Nowack, M. K., Vanneste, S., & Beeckman, T. 2016. Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in Arabidopsis. *Science* 351: 384-387.

根粒形成における負の制御系

寿崎拓哉¹・西田帆那^{1,2}

¹筑波大学 生命環境系

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

²総合研究大学院大学 生命科学研究科

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

Molecular mechanisms involved in negative regulation of nodulation

Key words: Autoregulation of nodulation, legume, *Lotus japonicus*,
nodule development, root nodule symbiosis

Takuya Suzaki¹, Hanna Nishida^{1,2}

¹Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572, Japan

²School of Life Sciences, Graduate School for Advances Studies

Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Aichi, Japan

1. はじめに

根粒は、植物が土壌細菌の根粒菌と共生する過程において形成され、2種の生物間の栄養交換の場として機能する。一般的に真核生物は、体内に大気中の窒素ガスをそのままの形で取り入れることができないのに対し、マメ科などの一部の植物は、根粒を介して根粒菌が固定した窒素ガスをアンモニウムイオンなどの水溶性の窒素源として利用することが可能である。したがって、根粒菌と共生している状態では窒素栄養の乏しい環境においても生育することができる。根粒形成は、宿主特異性が厳密に決まった根粒菌が、そのパートナーである植物に感染することによって、根の一部の組織が脱分化し、根粒原基を形成するための細胞分裂の開始などの根粒発生プログラムが誘導される。根粒形成の誘導に関わる機構（正の制御系）に関しては、過去の総説を参照されたい（Brewin 1991, Crespi & Frugier 2008, Oldroyd 2013, Suzaki & Kawaguchi 2014, 寿崎&川口 2015）。

根粒は、植物に窒素源を供給する器官として機能する一方で、根粒を形づくるための発生プロセスや、根粒内部に細胞内共生した根粒菌が行う窒素固定反応においては、それらのエネルギー源として光合成産物である炭素源が使われる。したがって、植物側からすると、根粒形成は窒素源の供給という恩恵をもたらしてくれる一方で、本来自身の成長に利用されるべきはずの炭素源が根粒形成に搾取されるというコストを伴う。植物は、根粒形成に必要以上の炭素源を消費されることなく、効率よく窒素源を獲得するために、根粒をほどよい数に保つ機構を備えていることが古くから知られている。また、土壌中に十分な窒素栄養が存在する場合は、共生を介さずに窒素源を利用することができるため、根粒形成を停止することも知られている。近年の、主としてモデルマメ科植物ミヤコグサを用いた研究の進展により、前者の根粒の数を保つ制御系の分子メ

カニズムの理解が進んできた。本稿では、これらの根粒形成の負の制御系について紹介する。

2. Autoregulation of nodulation (AON)

AONは、根と地上部（シュート）を介した長距離シグナル伝達系をその制御系の基本骨格としており、植物体あたりに着生する根粒の数をコントロールするマメ科植物に広く保存された遺伝的機構である（図1; Caetano-Anolles & Gresshoff 1991, Oka-Kira & Kawaguchi 2006, Ferguson et al. 2010, Suzaki et al. 2015）。AONでは、根粒菌が植物の根に感染すると、根由来シグナルと呼ばれるシグナル分子の産生が誘導され、根由来シグナルが導管を通り根から地上部へと移行する。地上部において根由来シグナルがその受容体によって認識されると、シュート由来のシグナル分子の産生が誘導され、それが篩管を通り地上部から根へと運ばれる。根に到達したシュート由来シグナルは根粒形成に抑制的に作用することで、不必要な根粒形成が行われるのを防ぐと考えられている。Suzukiらは、ミヤコグサを用いた *split-root* という手法により、根を文字通り2つに分けて、それぞれの根に時間差をおいて根粒菌を感染させ、一方の根の根粒菌感染が他方の根の根粒形成に与える影響を調べた（Suzaki et al. 2008）。その結果、少なくとも3日間の時間差をおくと、遅れて感染させた方の根の根粒形成の抑制がみられ始め、5日以上時間差をおくと、根粒形成の十分な抑制効果がみられることがわかった。この結果は、AONを介した根粒形成の抑制が目に見える形にまで現れるまでには、根粒菌の感染後3日ほどの日数を要することを示している。この間、根粒菌感染による根由来シグナル産生、根由来シグナルのシュートへの移動、シュート由来シグナルの産生と根への移動といった分子レベルの事象が起こることが推察される。

ミヤコグサの *HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HARI)* 遺伝子は、コードするタンパクが最初に特定された AON 関連遺伝子である（Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002）。*har1* 変異体では、過剰な数の根粒が着生し、植物の成長が著しく阻害される。*har1* 変異体では、根粒菌非感染時における植物の成長は比較的正常なことから、根粒菌感染時における成長阻害は、過剰な根粒形成に起因していると考えられる。野生型と*har1* 変異体を用いた接木実験により、地上部を *har1* 変異体を用いた時においてのみ根粒の過剰着生が観察されたことから、地上部において機能する *HARI* 遺伝子が根粒数の制御に関わることが考えられる。*HARI* 遺伝子は、leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) をコードしており、非マメ科植物におけるその同祖遺伝子は、シロイヌナズナでは *CLAVATA1 (CLV1)*、イネでは *FLORAL ORGAN NUMBER 1* といった茎頂分裂組織の幹細胞の恒常性維持に関わる遺伝子である（Clark et al. 1997, Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002, Suzaki et al. 2004; Oka-Kira & Kawaguchi 2006）。*HARI* 遺伝子は、茎頂分裂組織ではほとんど発現しておらず、また *har1* 変異体では、茎頂分裂組織の維持に関連する表現型に顕著な異常はみられない。さらに、*HARI* 遺伝子の特定後、ダイズやタルウマゴヤシなど他のマメ科植物においても *HARI* の同祖遺伝子が、根粒数の制御に関わることが示された（Searle et al. 2003, Schnabel et al. 2005）。したがって、非マメ科植物では茎頂分裂組織の維持に働く主要制御遺伝子の1つが、マメ科植物では根粒数の制御系で働くと結論づけられる。このことは、根粒形成の進化の過程で、茎頂分裂組織の維持の主要制御遺伝子が根粒数の制御系に流用されたと言換えることができるかもしれない。

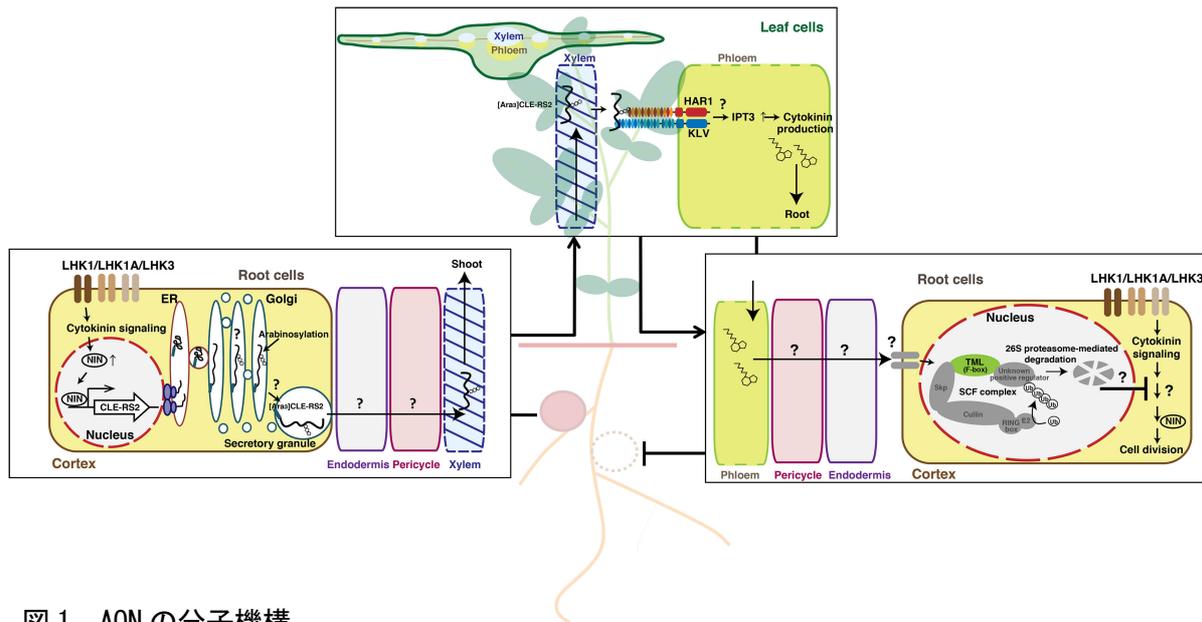


図 1. AON の分子機構

シロイヌナズナでは、CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE) ファミリーに属する低分子ペプチドである CLV3 が CLV1 のリガンドとして機能することが知られている (Ogawa et al. 2008)。CLV3 と CLV1 は茎頂分裂組織において、それぞれ幹細胞領域およびその下層の細胞群で発現し、CLV シグナル伝達系を介した細胞間コミュニケーションが幹細胞の維持に必須な機能を担う (Clark et al. 1997, Fletcher et al. 1999)。HAR1 遺伝子が特定された時分では、既に CLV1 と CLV3 の遺伝的な相互関係がある程度判明していたため、HAR1 のリガンド候補として CLE ファミリーに着目するのは AON 研究の必然的な流れであったと思われる。Okamotoらは、ミヤコグサのゲノム中から39種の CLE 遺伝子を同定し、根粒菌感染に応答した発現パターンを網羅的に調べた (Okamoto et al. 2009)。その結果、CLE-ROOT SIGNAL 1 (CLE-RS1)、CLE-RS2 と名付けた2つの CLE 遺伝子の発現が、根粒菌感染特異的に誘導されることを突き止めた。毛状根形質転換系によって、この2つの遺伝子をそれぞれ構成的に発現させると、いずれの遺伝子においても形質転換根だけでなく非形質転換根の根粒形成が著しく抑制されることがわかった。このことは、CLE-RS1/2 の構成的発現による根粒形成の抑制がシステム的に作用することを示している。CLE-RS1/2 による根粒形成の抑制は、har1 変異体の背景ではみられないことから、CLE-RS1/2 は HAR1 を介して機能することが示唆された。また、その後の研究により、CLEドメイン由来の12アミノ酸から成るアラビノース化された糖ペプチドが活性型の CLE-RS2 ペプチドであることが判明し、さらにそれが HAR1 と結合することも明らかとなった (Okamoto et al. 2013)。さらに、CLE-RS2 を根において構成的に発現させた植物の導管液から、活性型の CLE-RS2 ペプチドが検出されたことから、CLE-RS2 ペプチドが根からシュートへと実際に移動し得ることが示され、CLE-RS2 が根由来シグナルの有力候補であることが示唆された。HAR1 遺伝子は葉の篩部組織で発現することから (Nontachaiyapoom et al. 2007)、葉の篩部組織において CLE-RS2 と HAR1 の相互作用が起こると考えられる。現在のところ、CLE-RS1 については、活性型の構造は決定されておらず、導管液中に存在する可能性も未解明であるが、活性型の CLE-RS2 ペプチドを構成する CLEドメイン由来の12アミノ酸の配列が CLE-RS1 と -RS2 は同

一であること、各遺伝子の構成的発現の表現型が非常に類似していることから、*CLE-RS1* も *-RS2* と同様に根由来シグナルとして機能する可能性が高い。

CLE-RS1/2 の発現誘導機構についても、近年理解が進んできた。*RWP-RK* タイプの転写因子である *NODULE INCEPTION (NIN)* は、根粒形成の正の制御因子として機能する一方で、*CLE-RS1* および *CLE-RS2* のプロモーター領域に直接結合し、これら2つの遺伝子の発現を誘導する働きをもつことが示されている (Schauser et al. 1999, Soyano et al. 2013, Soyano et al. 2014)。したがって、*NIN* は標的遺伝子を使い分けることにより、根粒形成の正と負の両方の制御を仲介することが考えられる。今後は、*NIN* が時空間的に具体的にどのようなメカニズムにより、根粒形成の正負両方の制御を可能にしているのかが解明されることを期待したい。

ミヤコグサでは、これまでのところ、*har1* 変異体に加えて *klavier (klv)* と *too much love (tml)* と名付けられた2つの根粒過剰着生変異体が単離されている (Oka-Kira et al. 2005, Magori et al. 2009)。*har1* 変異体とそれぞれの2重変異体の解析から、*KLV* および *TML* はともに *HAR1* と同一の経路で働くことが示されている。また、接木実験の結果、*KLV* はシュートにおいて機能し、*TML* は根のしかも *HAR1* の下流において機能することも判明した。*KLV* は *LRR-RLK* をコードし、シロイヌナズナにおける *KLV* 同祖遺伝子 *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2)* は茎頂分裂組織の維持に関わる (Kinoshita et al. 2010, Miyazawa et al. 2010)。*klv* 変異体では、*CLE-RS1/2* による根粒形成阻害がみられず、また、*KLV* と *HAR1* は物理的な相互作用をすることが示されている。したがって、*CLE-RS1/2* は *HAR1* と *KLV* を構成因子とする受容体複合体によって認識される可能性が考えられる。*klv* 変異は非共生時にも多面的な異常を呈し、帯化を引き起こす茎頂分裂組織の維持の異常、葉脈の形態異常、花成の遅延などが観察される (Oka-Kira et al. 2005)。これらの表現型は *har1* 変異体ではみられないことから、*KLV* は発生過程に応じて相互作用するタンパク質を変えて働く可能性が推察される。*TML* 遺伝子は、Kelch リピートをもつ F-box タンパク質をコードする (Takahara et al. 2013)。一般的に、F-box タンパク質は、*SKP1*, *CULLIN*, *E3* ユビキチンリガーゼから構成される *SCF* 複合体の構成因子として機能し、標的タンパク質の分解に関わると考えられている。*TML* を含む *SCF* 複合体の標的タンパク質の特定は、*AON* の分子メカニズムの理解に大きく貢献する可能性がある点で、今後の重要な課題といえる。

AON において機能することが想定されているシュート由来の根粒形成抑制物質 (Shoot-derived inhibitor; *SDI*) の産生が *CLE-RS1/2-HAR1* のシグナル伝達系の制御下にあると仮定すると、*har1* 変異体では *SDI* の産生が抑えられ、逆に *CLE-RS1/2* の構成的発現では *SDI* の産生が促進されることが予想される。Sasaki らは、*har1* 変異体、*CLE-RS1* または *-RS2* の構成的発現体を用いて、地上部の植物ホルモンを網羅的に定量し、サイトカイニン合成系の中間産物である *iPRPs* の量が、*har1* 変異体では減少し、逆に *CLE-RS1* または *-RS2* の構成的発現体では増加することを発見した (Sasaki et al. 2014)。また、合成サイトカイニンであるベンジルアデニンを子葉の切り口から投与したところ、濃度依存的な根粒形成の抑制がみられた。*tml* 変異体において同様のサイトカイニン投与実験を行っても根粒形成の抑制がみられなかったことから、サイトカイニンが作用するためには *TML* が必要であることが示唆された。さらに、標識したサイトカイニンが、実際にシュートから根端まで長距離移動し得ることも明らかとなった。サイトカイニン生合成経路では、*isopentenyltransferase (IPT)* が *iPRPs* の合成に重要な役割を担うことが知られている。ミヤコグサ

では、根粒菌感染依存的にシュートにおいて *IPT3* の遺伝子の発現が誘導されることもわかった。これらの結果は、*CLE-RS1/2-HAR1* の下流において、サイトカイニンの合成が促進され、それが *SDI* 様の機能をもつことを示唆している。

SDI の特定が長らくの重要課題であった AON 研究において、本研究はサイトカイニンが *SDI* の分子実体の 1 つである可能性を提示した点でインパクトのある成果をもたらしたと思われる。その一方で、未解決の重要な課題を残している。というのも、根粒形成研究のごく初期から様々な研究によりサイトカイニンは根粒形成の正の制御因子として働くことが明確に示されており (Suzaki et al. 2013)、本研究結果はこれらの先行研究結果と矛盾する。サイトカイニンが根粒形成に正に作用することを示した例として、サイトカイニンが直接添加された根や、サイトカイニンシグナル伝達系を構成的に活性化させるような遺伝的背景では、根粒発生プログラムが自発的に誘導され、根粒様の構造が形成されることが知られている (Tirichine et al. 2007, Heckmann et al. 2011)。また、サイトカイニン受容体の多重変異体では、根粒形成が完全に抑圧されることから、サイトカイニンシグナリングの活性化は根粒形成に必要十分と理解されている (Held et al. 2014)。地上部由来のサイトカイニンがどのような作用機構により根粒形成を負に制御するのかは全く不明である。地上部由来のサイトカイニンによって誘導される二次的な因子が実際の *SDI* として働く可能性も考えられる。続報の発表を期待したい。

3. 窒素栄養による根粒形成の抑制

土壌中に窒素栄養の 1 つである硝酸イオンが過剰に存在すると、根粒共生が阻害されることが古くから知られている。高濃度の硝酸イオンは根粒形成の様々な側面に作用し、根粒発生の開始、根粒の肥大成長、窒素固定活性などを阻害し、根粒の老化を促進する (図 2)。本現象は、ダイズを用いて生理学的な解析が進められており、日本語でわかりやすく書かれた総説が発表されているので参照していただきたい (大山ら 2006)。これらの阻害は可逆的な作用であり、培地に硝酸イオンを添加した場合、根粒の肥大成長や窒素固定活性は急速に抑制され、無窒素条件に戻すと速やかに回復することが明らかにされている (Fujikake et al. 2002)。

硝酸イオンによる根粒共生の抑制は、「局所的阻害」と「全身的阻害」に大別される。局所的阻害は、硝酸イオンに直接接触している根や根粒で強く起こり、根に硝酸イオンが高濃度に蓄積することや、根粒表皮から吸収された硝酸イオンが皮層に集積することによりもたらされると考えられている (Ohyama et al. 1993, Mizukoshi et al. 1995)。一方、全身的阻害は根粒着生部位とは異なる根に与えられた硝酸イオンによって引き起こされる間接的な阻害である。Yashima らは、ダイズを用いた二重ポット実験を行い、根を上下二つのポットに分けて、それぞれに無窒素または 5 mM 硝酸培地を与えた。下部ポットに硝酸培地を処理した場合、上部ポットには直接硝酸イオンを与えていないのにも関わらず根粒共生の抑制が観察された。このことから、硝酸イオンに接触していなくとも根全体の窒素栄養状態を感知し十分な量の硝酸イオンが供給されている場合には根粒共生が抑制されることが示唆されている (Yashima et al. 2003)。また、硝酸イオンの添加によって根粒に分配される光合成産物量が減り、代わりに側根への分配量の増加が観察されることなどから、硝酸イオン添加による光合成産物の根粒への供給低下が共生阻害に関与する可能性が示されている (Fujikake et al. 2003)。さらに、グルタミンやアスパラギンといった硝酸イオンの同

化産物によるフィードバック阻害や、根粒内への酸素供給量の低下など、本現象の理解に向けた種々の作業仮説が提唱されている (Schuller et al. 1988, Vessey et al. 1988, Bacanamwo & Harper 1997, Neo & Layzell 1997, Gordon et al. 2002)。

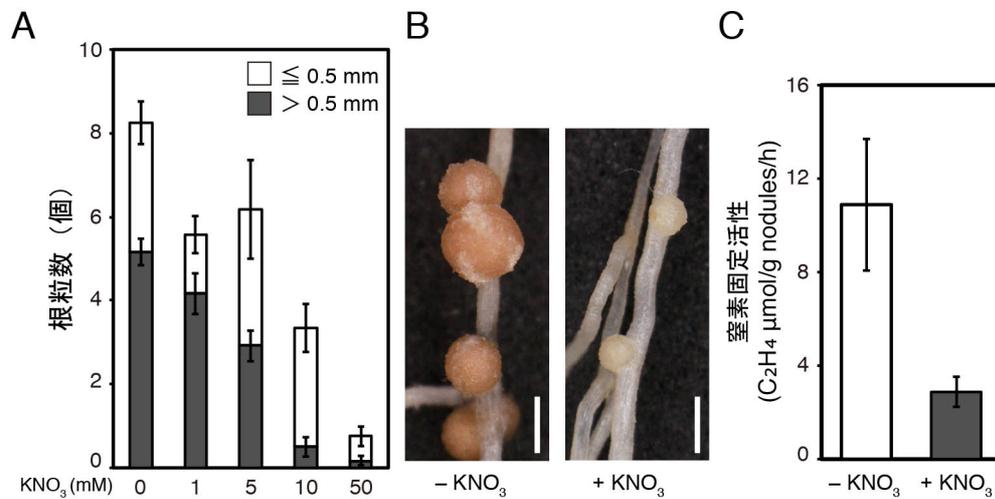


図2. 硝酸が野生型ミヤコグサ (MG-20) の根粒共生に与える影響.

(A) 根粒数, (B) 根粒サイズ, (C) 窒素固定活性. (A), (B) 根粒菌感染と同時に KNO₃ (B では 10 mM の KNO₃) を処理後 21 日目の表現型. (C) 成熟根粒形成後 10 mM の KNO₃ を 24 時間処理し, 窒素固定活性を測定. Scale bars = 1 mm.

現代の農法における農作物の生産時には多量の窒素肥料が使用されており, 窒素肥料の生成時に多くの化石燃料が消費されることによって多量の二酸化炭素が排出され, また, 過剰に施肥された窒素肥料が河川や地下水に流れ込み環境汚染を引き起こしている。大気中の窒素を利用する共生窒素固定作用は, 環境保全型の作物生産にとって重要な生物学的機能となり得る。しかしながら, 共生窒素固定のみで安定的に多収量を確保することが困難なため, 化学態の窒素肥料に依存したマメ科作物の栽培が行われているのが現状である。そこでは, 窒素肥料に含まれる硝酸態窒素は根粒共生を抑制するため, 生物学的な窒素固定作用のメリットを活かすことができない。窒素栄養による根粒共生抑制の機能解明と知見の利用によって共生窒素固定能力を活用した低窒素肥料施肥農法が可能になれば, 持続可能な農業実現の一助となることが期待される。

3-1. 硝酸による根粒形成の抑制における AON の関与

窒素栄養による根粒形成の抑制については, 前述のように生理学研究の歴史的経緯がある。具体的な分子メカニズムという点では, 理解は非常に乏しいものの, 本現象と AON の接点が示唆されている。AON に関わる遺伝子の突然変異体は根粒過剰着生が顕著な表現型として観察される。その一方で, 高濃度の硝酸存在下でも根粒形成数の減少が起こらない, つまり硝酸耐性を示すことも知られている (Magori et al. 2009)。実際に, ダイズの根粒過剰着生の突然変異体が *nitrate-tolerant symbiotic (nts)* と名付けられていることから推測されるように, そもそもそれらの変異体は高濃度の硝酸イオン存在下でも根粒形成を行うダイズ変異体スクリーニングによって単

離されている (Carroll et al. 1985)。後に, *nts* 変異体の 1 つの原因遺伝子は *HARI* の同祖遺伝子として LRR-RLK をコードすることが判明し, *nodule autoregulation receptor kinase (nark)* 変異体と改名されている (Searle et al. 2003)。また, 根粒菌感染誘導性の *CLE-RS2* 遺伝子は, 硝酸を与えただけでも発現誘導を受けることがわかっている (Okamoto et al. 2009)。これらの点から, 硝酸に応答して AON を介して根粒形成を抑制する制御系の可能性が示唆されている。根粒数のコントロールが主たる機能である AON によって本現象の一側面を説明できる可能性がある一方で, AON に依存した研究のみでは多面的に作用する本現象の全容を理解するのは困難と思われる。

3-2. 硝酸による根粒形成の抑制に関わる遺伝的機構

我々は, 窒素栄養に応答した根粒形成抑制の分子メカニズムを理解することを目的に, 最近, 高濃度の硝酸存在下においても根粒形成を行うミヤコグサ突然変異体のスクリーニングに着手し, *nitrate tolerant (nit)* と名付けた新規な硝酸耐性変異体を単離している (図 3)。根粒を過剰に形成する AON 変異体とは異なり, 正常な数の根粒が形成されることが本変異体の特徴である。*nit* 変異体を用いることにより, 硝酸による根粒形成の抑制の様々な側面にアプローチすることが可能であると考えられる。将来的には, 得られた知見や作成した材料を利用して, 窒素肥料施肥と共生窒素固定を併用した農法が実現する可能性を期待している。

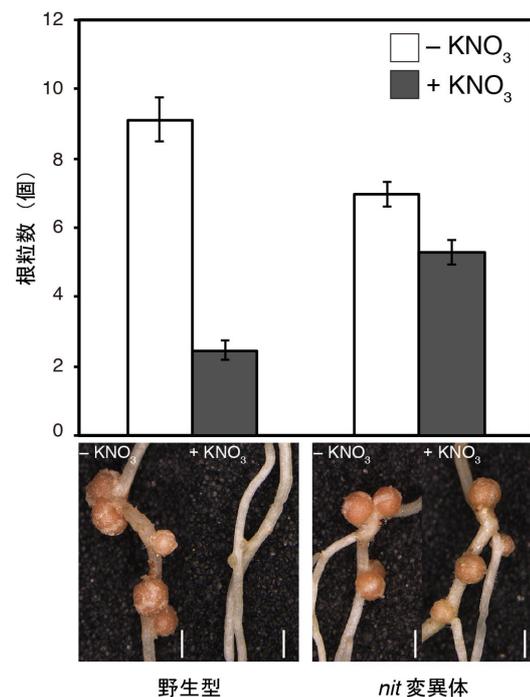


図 3. *nit* 変異体の表現型.

根粒菌感染と同時に 10 mM の KNO₃ を処理後 21 日目の表現型.

Scale bars = 1 mm.

4. おわりに

本稿では, 根粒形成を負に制御する機構に焦点を当てて近年得られている知見を概説した。AON に関しては, この数年の研究の進展によって, 根由来シグナル, その受容機構, SDI (の候補), 関連因子が示され, 分子基盤を理解する上で役者が揃ってきた印象がある。AON は, 植物の遠距離シグナル伝達系のわかりやすい例といえるので, 分野外からも注目されるような研究成果が今後ももたらされることを期待したい。その一方で, 窒素栄養による根粒形成の抑制は, 分子レベルでわかっていることは少ない。筆者らが単離した *NIT* 遺伝子の機能解析の研究が, そのメカニズムの解明の一助となることを期待して研究を進めていきたい。

5. おわりに

本稿で紹介した筆者らの研究は, 基礎生物学研究所・川口正代司教授の協力を得て行われたものです。この場を借りて感謝いたします。

引用文献

- Bacanamwo, M., & Harper, J.E. 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100: 371-377.
- Brewin, N.J. 1991. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 191-226.
- Caetano-Anolles, G., & Gresshoff, P.M. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 345-382.
- Carroll, B.J., McNeil, D.L., & Gresshoff, P.M. 1985. Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4162-4166.
- Clark, S.E., Williams, R.W., & Meyerowitz, E.M. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.
- Crespi, M., & Frugier, F., 2008. De Novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* 1: re11.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., & Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61-76.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., & Meyerowitz, E.M. 1999. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.
- Fujikake, H., Yashima, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. 2002. Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N₂ fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 211-217.
- Fujikake, H., Yamazaki, A., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Matsushashi, S., Ito, T., Mizuniwa, C., Kume, T., Hashimoto, S., Ishioka, N.S., Watanabe, S., Osa, A., Sekine, T., Uchida, H., Tsuji, A., & Ohyama, T. 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J. Exp. Bot.* 54: 1379-1388.
- Gordon, A.J., Skøt, L., James, C.L., & Minchin, F.R. 2002. Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *J. Exp. Bot.* 53: 423-428.
- Heckmann, A.B., Sandal, N., Bek, A.S., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M.W., Tirichine, L., & Stougaard, J. 2011. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1385-1395.
- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M.S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L., & Szczyglowski, K. 2014. *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell* 26: 678-694.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2010. RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development* 137: 3911-3920.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata,

- S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., & Stougaard, J. 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420: 422-426.
- Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., Tanaka, A., Sato, S., Tabata, S., & Kawaguchi, M. 2009. *TOO MUCH LOVE*, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 259-268.
- Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G.J., Sato, S., Hayashi, M., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, K., Sawa, S., Fukuda, H., & Kawaguchi, M. 2010. The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development* 137: 4317-4325.
- Mizukoshi, K., Nishiwaki, T., Ohtake, N., Minagawa, R., Ikarashi, T., & Ohyama, T. 1995. Nitrate transport pathway into soybean nodules traced by tungstate and $^{15}\text{NO}_3^-$. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41: 75-88.
- Neo, H.H., & Layzell, D.B. 1997. Phloem glutamine and the regulation of O_2 diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113: 259-267.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., & Kawaguchi, M. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429.
- Nontachaiyapoom, S., Scott, P.T., Men, A.E., Kinkema, M., Schenk, P.M., & Gresshoff, P.M. 2007. Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 769-780.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., & Matsubayashi, Y. 2008. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319: 294.
- Ohyama, T., Nicholas, J.C., & Harper, J.E. 1993. Assimilation of $^{15}\text{N}_2$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ by partially nitrate-tolerant nodulation mutants of soybean. *J. Exp. Bot.* 44: 1739-1747.
- 大山卓爾, 伊藤小百合, 大竹憲邦, 末吉邦 2006. 硝酸イオンによるダイズ根粒の肥大生長と窒素固定活性の阻害機構. *化学と生物* 44: 752-759.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K.-i., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., & Kawaguchi, M. 2005. *klavier (klv)*, a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J.* 44: 505-515.
- Oka-Kira, E., & Kawaguchi, M. 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 496-502.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., & Kawaguchi, M. 2009. Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50: 67-77.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. 2013. Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat. Commun.* 4: 2191.
- Oldroyd, G.E.D. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic

- associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 252-263.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. 2014. Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat. Commun.* 5: 4983.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195.
- Schnabel, E., Journet, E.-P., Carvalho-Niebel, F., Duc, G., & Frugoli, J. 2005. The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a *CLVI*-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* 58: 809-822.
- Schuller, K.A., Minchin, F.R., & Gresshoff, P.M. 1988. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soyabean cv. Bragg and a supernodulating mutant: effects of nitrate. *J. Exp. Bot.* 39: 865-877.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., & Gresshoff, P.M. 2003. Long-distance signaling in nodulation directed by a *CLAVATA1*-like receptor kinase. *Science* 299: 109-112.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & Hayashi, M. 2013. NODULE INCEPTION directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* 9: e1003352.
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. 2014. NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 14607-14612.
- Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y., & Hirano, H.-Y. 2004. The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* *CLAVATA1*. *Development* 131: 5649-5657.
- Suzaki, T., Ito, M., & Kawaguchi, M. 2013. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.* 4: 42.
- Suzaki, T., & Kawaguchi, M. 2014. Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 16-22.
- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316: 111-158.
- 寿崎拓哉, 川口正代司 2015. 根粒初期発生における細胞プログラミング機構. *BSJ Review* 6A: 63-71.
- Suzuki, A., Hara, H., Kinoue, T., Abe, M., Uchiumi, T., Kucho, K.-i., Higashi, S., Hirsch, A.M., & Arima, S. 2008. Split-root study of autoregulation of nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* 121: 245-249.
- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takeda, N., Suzaki, T., & Kawaguchi, M. 2013. TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 54: 433-447.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrechtsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., &

- Stougaard, J. 2007. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315: 104-107.
- Vessey, J.K., Walsh, K.B., & Layzell, D.B. 1988. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean. *Physiol. Plant.* 74: 137-146.
- Yashima, H., Fujikake, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. 2003. Systemic and local effects of long-term application of nitrate on nodule growth and N₂ fixation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 49: 825-834.

寄生植物コシオガマの吸器形成機構

若竹 崇雅^{1,2}, 吉田 聡子^{3,4}, 白須 賢^{1,2}

¹東京大学大学院 理学系研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

²理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0051 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

³奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

〒630-0192 生駒市高山町 8916-5

⁴奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構

〒630-0192 生駒市高山町 8916-5

Developmental study of haustorium in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*

Key words: Auxin, Haustorium, Parasitic plant, Root development

Takanori Wakatake^{1,2}, Satoko Yoshida³, Ken Shirasu^{1,2}

¹Graduate School of Science, The University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1-7-22 Suehiru-cho, Tsurumi-ku Yokohama 230-0045, Kanagawa, Japan

³Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

⁴Institute for Research Initiatives, Division for Research Strategy, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama-cho, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

1. はじめに

他の植物から栄養を奪う独特な生存戦略をとる寄生植物は、被子植物の系統樹上に広く分布しており、少なくとも独立に11回進化したと考えられている (Barkman et al., 2007)。その中でも、ハマウツボ科に属する根寄生植物は精力的に研究が進められている。その理由の一つは、農業に与える経済的な損害が非常に大きいからである。ハマウツボ科に属する *Striga* 属と *Orobanche* 属はさまざまな農業作物に寄生し、収量を大幅に減収させる。とりわけアメリカでの *Striga* 属による被害は深刻で、25ヶ国合わせて1億もの人が影響を受け、その被害額は一年で10億ドルにも上ると推計されている (reviewed in Spallek et al., 2013)。現在、これら寄生植物の効果的な除去手段はなく、早急な解決方法の開発が望まれている。もう一つの理由としては、ハマウツボ科には異なる宿主依存度の寄生植物が属しているということが

ある。寄生植物は、宿主への依存度合いによって、条件的半寄生（光合成能を持ち独立して生活できるが、宿主植物が近傍にいる場合には寄生を開始する）、絶対半寄生（光合成能を持つが、生活には宿主の存在が不可欠）、絶対全寄生（光合成能をもたず、栄養は完全に宿主依存）と分類される。ハマウツボ科には、条件的半寄生に分類される *Tryphysaria* 属、絶対半寄生に分類される *Striga* 属、絶対全寄生に分類される *Orobanche* 属などすべてのクラスの寄生植物がそろっている。これらに加えて、非寄生植物である *Lindenbergia* 属があるので、寄生形質の獲得から光合成能を失うまでの進化の過程を、同じ科に属する現生種を用いて研究することができる。このことから、進化の研究の非常に良いモデルとなっている。私たちの研究グループで扱っているのは主に、ストライガ (*Striga hermonthica*, *Striga asiatica*) とコシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) の3種で、いずれもハマウツボ科に属する寄生植物である。

ハマウツボ科植物を含めた寄生植物全般に共通するのは、他植物に付着し、その組織に侵入するための特別な器官を発達させてきたことである。これらの器官を総称して「吸器 (haustorium)」と呼んでいる。ハマウツボ科寄生植物は、自らの根の一部を吸器へと変形し宿主植物に寄生する。この総説では根系構築の一例として、根寄生植物の吸器形成について、これまでの知見を概説した後、私たちの研究グループでの最近の研究成果について紹介する。

2. ハマウツボ科寄生植物を用いた吸器の研究

2-1. 吸器誘導メカニズム

効率よく寄生を行うには宿主植物の存在を適切に認識する必要がある。絶対寄生植物にとって宿主は必要不可欠な存在なので、宿主の存在しないところで発芽することは自殺行為になってしまう。寄生植物の持つ宿主植物認識機構として、宿主植物の分泌するストリゴラクトンを用いた発芽制御がある。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は、もともとストライガの種子の発芽を誘導する物質 (Strigol) として、ワタの根から同定された (Cook et al., 1966)。土壤中では不安定なストリゴラクトンを発芽のシグナルとして利用することで、宿主植物のごく近傍での発芽が可能となっている。

同様に、他の植物がないところに吸器を形成しても意味がなく、どこに他の植物が存在するかを適切に認識することは吸器形成においても重要である。寄生植物がどのように宿主植物を認識し吸器を形成するのか調べるために、根の滲出液や抽出液から吸器誘導物質 (HIF: haustorium inducing factor) を単離、同定する研究が行なわれてきた。その結果、ソルガムの根の抽出液から 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) が *S. asiatica* の吸器を誘導する物質として同定された (Chang and Lynn, 1986)。一般にベンゾキノン類は、植物内でシキミ酸経路、フェノール酸の酸化脱炭酸、ペルオキシダーゼやラッカーゼによる細胞壁フェノールの分解などによって生じる (Caldwell and Steelink, 1969)。しかし、DMBQがソルガムの根から検出されたのは、ソルガムの根を物理的に磨り潰した時か、ストライガと共培養した時だけであった (Chang and Lynn, 1986)。このことから、寄生植物が動的にHIFの生成を制御することで、宿主植物の近傍での吸器形成を可能にしていることが考えられた。その後の研究から、ストライガ根端で生成された H_2O_2 が宿主植物のペルオキシダーゼを活性化し、

このペルオキシダーゼが細胞壁のフェノールを酸化することでHIFが生成されるというメカニズムが提唱されている (Kim et al., 1998, Keyes et al., 2007)。

DMBQ が吸器誘導能をもつ物質として同定されたことから、他のフラボノイドやキノンなどのフェノール誘導体が同じように吸器誘導活性を持つかどうかテストされた。その結果、活性に差はあるものの、シリング酸やバニリン酸やクマル酸などの単純な構造を持つフェノール類、ペオニジンやペラルゴニジンなどのフラボノイドも吸器を誘導できることが分かった (Albrecht et al., 1999)。DMBQ を含むベンゾキノンのアナログのうち、吸器誘導活性を持つものが特定の範囲の酸化還元電位を持つことから、HIF シグナリングには酸化還元サイクルが関わっていることが示唆されている (Smith et al., 1996)。ハマウツボ科条件的半寄生植物の *Tryphysaria versicolor* から単離されたキノン還元酵素をコードする *TvQR1* をノックダウンした際、誘導される吸器の数が減少することが示された (Bandaranayake et al., 2010) ことから、吸器形成を開始するシグナルとして、酸化還元シグナルが関わっていることが現在のモデルとなっている。

2-2. 吸器の発生と組織学

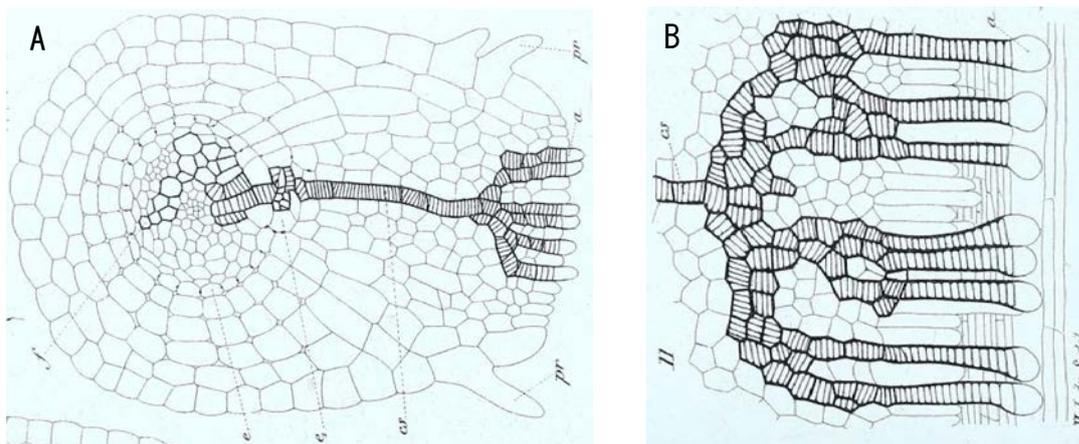


図 1 *Pedicularis sylvatica* (シオガマギク属) における吸器横断切片の模式図 (A)右側に向かって伸びる吸器の全体像。(B)宿主とのインターフェイス部分の拡大図。Sablon ML du, 1887 Figure 9, 11 より再掲。縞模様を持つ細胞は道管要素を表す。

寄生植物が吸器を介してどのように宿主植物の組織に侵入するかを理解するため、吸器を構成する細胞の特性や構造、その発生についての研究が行われてきた。1887年には既にシオガマギク属の半寄生植物における吸器の構造が研究されており、道管要素が寄生植物の維管束から宿主植物の方向へと連なっている様子が描かれている(図 1A) (Sablon ML du, 1887)。この吸器の中に作られる、寄生植物の維管束と宿主植物の維管束をつなぐ構造はxylem bridgeと呼ばれており、他の科の寄生植物が寄生する際にもしばしば観察される。また、xylem bridgeに沿ってサイズの小さい細胞が分化しており、特殊な細胞種である可能性を示唆している。宿主植物と接する部分には長く伸びた独特な形状をした細胞が描かれている(図 1B) (Sablon ML du, 1887)。宿主とのインターフェイス部分には特殊な細胞が分化してくることが知られ

ており、これらの細胞のうち一部は宿主の道管要素の細胞壁のピット部分を貫通した後に道管要素へと分化することで、道管要素同士の完全な連結を可能としていることが *Striga asiatica* で示されている (Dörr, 1997)。

吸器の発生初期については、同じハマウツボ科の *Agalinis purpurea* という半寄生植物を使って詳細に調べられている (Baird and Riopel, 1984)。HIF に最も高い感受性を示すのは根端のメリステム領域と伸長領域が切り替わる領域であり、最初に形態上の変化が観察されるのは内側の皮層である。皮層細胞は液胞化し、放射方向へと体積を増大する。根が側方向へと膨らむのが目で確認できるようになる頃、表皮細胞では垂層分裂が起こり、内側の皮層や内鞘細胞などの深部ではまず並層分裂が起こる。その後、細胞分裂を繰り返しこぶ状の吸器を形成していくが、細胞数が多くなっていくため、並層分裂か垂層分裂かの区別は難しくなっている。ただし、表皮及び外側の皮層は HIF 処理後 48 時間までは並層分裂をせず、層を保っている様子が観察されている (Baird and Riopel, 1984)。吸器の発生には吸器毛(haustorial hair) と呼ばれる根毛細胞と似た構造を持つ細胞の分化が伴う。この細胞は粘着物質を分泌し、宿主植物への密着に機能していると考えられている (Baird and Riopel, 1983, Heideg-Jorgensen and Kujit, 1995)。最近になって、コシオガマ変異体の解析から、この吸器毛の発生は根毛と同じ発生プログラムを介していることが遺伝学的に証明された (Cui et al., 2016)。興味深いことに、コシオガマの根毛変異体は吸器毛を作ることはできないが、吸器を形成し宿主内に侵入することができる。変異体における吸器の内部構造は野生型と変わりなく、インターフェイス部分の伸長した細胞層の形成は根毛の伸長とは異なるプログラムで制御されていることが明らかになった。吸器の形成は、既存の発生プログラムの流用と寄生植物にユニークな遺伝的プログラムの獲得が組み合わせられることで成立したと考えられる。

2-3. 吸器のトランスクリプトーム解析

アメリカの研究チームを中心として Parasitic Plant Genome Project (<http://ppgp.huck.psu.edu/>) が立ち上げられている。このプロジェクトでは、寄生形質獲得に寄与した変化と、寄生形質の獲得の結果起こった変化をゲノムワイドに明らかにすることを目的として、比較ゲノム解析が行われている。具体的には、ハマウツボ科に属する非寄生植物である *Lindenbergia* 属、条件的半寄生植物の *Triphysaria* 属、絶対半寄生植物の *Striga* 属、絶対全寄生植物の *Orobanch* 属などのトランスクリプトーム解析が精力的になされている。このプロジェクト中では吸器が寄生をするうえで重要な役割を担うとし、吸器の発生段階ごとのトランスクリプトームデータを得ることに焦点を当てている。さまざまな宿主依存度を持つ植物種を使った比較トランスクリプトーム解析から、宿主との接触後に発現が上昇する 180 遺伝子が同定されており、これらの遺伝子群にはプロテアーゼ、細胞壁修飾酵素、細胞外分泌タンパク質が特に多く含まれている。宿主と接触する前の段階で、HIF に応答する 100 遺伝子も同定しており、前の 180 遺伝子と合わせてハマウツボ科寄生植物における“parasitism genes”と定義されている (Yang et al., 2014)。

3. モデル植物としてのコシオガマ

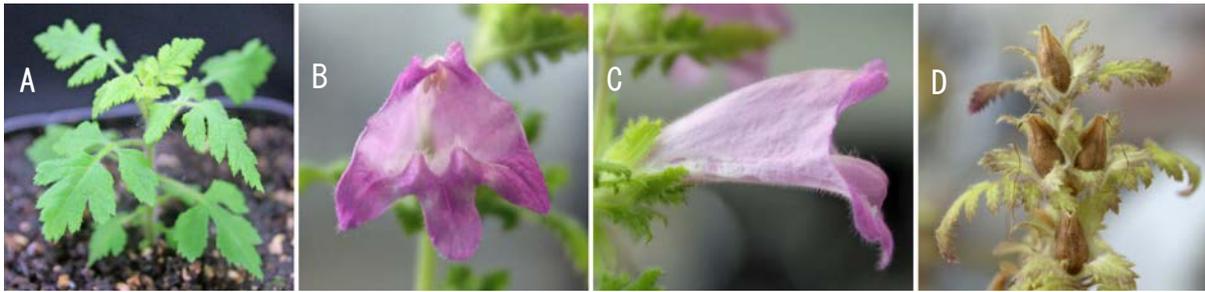


図2 コシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) (A)植物体, (B)(C)花, (D)果実

私たちの研究グループではコシオガマをハマウツボ科寄生植物の吸器研究のモデル植物としている (図2)。コシオガマはハマウツボ科コシオガマ属の条件的半寄生植物で、東アジアに自生する。日本国内でも見つけることができ、花の色の異なるエコタイプも観察されている。コシオガマは自家受粉をする短日植物で、人工気象器の中で容易に栽培することができ、約3ヶ月で次世代の種子が得られる。人工的に交配させる方法も確立しており、遺伝学に適している。私たちの研究グループでは、岡山県で採取されたコシオガマを研究室環境で数世代自殖させ、野生型として研究に使用している。この野生型をもとに、EMSを変異原としたスクリーニングから、吸器にさまざまな表現型を示す変異体の単離にも成功している (Cui et al., 2016)。当研究グループではゲノムの解析も進んでおり、ゲノムリシーケンスによる変異体原因遺伝子の同定も可能となっている。また、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた形質転換法を確立しており、誘導された毛状根を用いた分子生物学的解析をともなった寄生実験も可能である (Ishida et al., 2011)。コシオガマは *T. versicolor* と同様に、幅広い植物種を宿主とすることができる。これまでのところ、シロイヌナズナ、イネ、ソルガム、トマト、ササゲ豆に寄生できるが、ミヤコグサとダイズには寄生できないことを確認している。吸器の発生過程は、先行研究のあるハマウツボ科条件的半寄生植物である *A. purpurea* や *T. versicolor* とほとんど同じである。宿主植物、またはDMBQなどのHIFを用いて *in vitro* で吸器の誘導ができる (図3)。

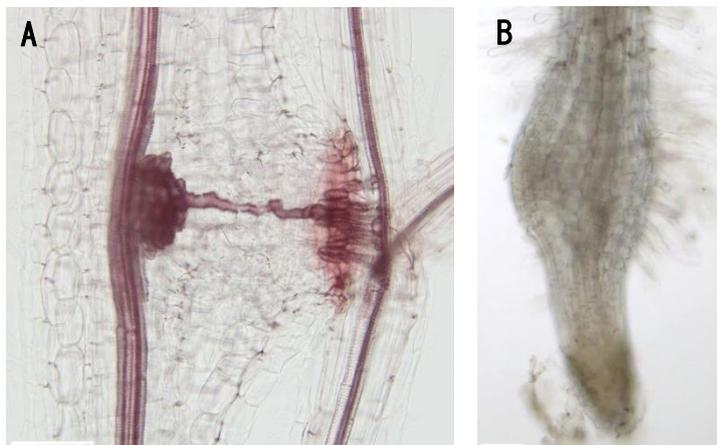


図3 コシオガマ吸器 (A)シロイヌナズナ根(右)に寄生するコシオガマ吸器(左)。サフラニン染色で道管要素が赤く染まって見える。(B)DMBQによって誘導されたコシオガマ吸器。Bars = 100 μ m

4. 吸器形成とオーキシン

indole-3-acetic acid (IAA) に代表される植物ホルモンのオーキシンは、植物における器官発

生で重要な役割を持つことが知られている。例えば、オーキシンの濃度勾配の極大点が茎頂分裂組織では葉原基の、根の内鞘細胞では側根原基の発生パターンを制御している。そして、植物体内でのオーキシンの濃度勾配は、細胞間輸送と生合成や異化などの代謝によって制御されている。ハマウツボ科寄生植物を使った先行研究から、オーキシンが吸器の形成に関わることが示唆されている。オーキシン輸送阻害剤、抗オーキシン剤と過剰量のオーキシンが寄生効率を減少させることが完全寄生植物の *Orobanche aegyptiaca* で示されている (Bar-Nun et al., 2008)。 *T. versicolor* では、オーキシン輸送阻害剤と抗オーキシン剤が吸器の発生を減少させることが報告され、また、 *IAA2* オーキシン応答性プロモーターの活性が *DMBQ* に応答して上昇することが示されている (Tomilov et al., 2005)。

私たちはコシオガマでのトランスクリプトーム解析から、 *DMBQ* 応答遺伝子として *PjYUC3* を同定した (Ishida et al., submitted)。 *YUCCA* ファミリー遺伝子はフラビンモノオキシゲナーゼをコードしている遺伝子であり、オーキシン生合成の主要経路で働く鍵遺伝子である (Zhao et al., 2001, Mashiguchi et al., 2011)。シロイヌナズナでは 11 遺伝子が *YUCCA* ファミリーに属しており、3 重変異体や 4 重変異体では著しい発生の阻害が引き起こされる (Cheng et al., 2006)。これらのことから、 *YUCCA* ファミリー遺伝子によるオーキシンの時間的な生合成の制御は、発生過程で重要な役割を担っていると考えられている。 *PjYUC3* をコシオガマで過剰発現させると、側根の形成が促進され根が短くなるという昂進されたオーキシン応答の表現型がみられることと、実際に *IAA* の内生量が増加していることから、 *PjYUC3* はシロイヌナズナ *YUCCA* ファミリーと同様に、オーキシン生合成に関与していることが示唆された。 *PjYUC3* プロモーターは *HIF* 処理や宿主植物の根によって吸器毛を含む表皮細胞で発現が誘導され、吸器の発生が進むと吸器の頂端部分で最も強い発現を示した。オーキシン応答のマーカーである *DR5* プロモーターの発現パターンを解析すると、 *PjYUC3* と同様に吸器の頂端部分で強い発現がみられた。吸器頂端で作られた新たなオーキシン応答の極大点は、吸器頂端が宿主植物の組織に侵入していく段階まで維持されている様子が観察されている。また、 *PjYUC3* を *RNAi* 法でノックダウンすると寄生効率が減少し、 *PjYUC3* を表皮特異的に発現誘導すると表皮での細胞分裂と吸器毛様の細胞の誘導ができ、吸器発生の初期に起こるイベントを再現することができたことから、 *PjYUC3* はオーキシン生合成に関わる遺伝子で、吸器発生初期特異的に機能するということがいえる。これまでのところ、4 つのコシオガマ *YUCCA* ファミリーの遺伝子を同定しており、そのうち *PjYUC2* と *PjYUC4* はシロイヌナズナの *YUCCA* ファミリーのうち根で発現がみられる *AtYUC3,5,7,8,9* と遺伝子系統樹上で同じクレードに属する。 *PjYUC3* はこのクレードのちょうど外側に位置している。 *S. asiatica*, *O. aegyptiaca*, *T. versicolor* の EST 配列から同定したそれぞれの種における *PjYUC3* のホモログは、地上部や吸器誘導前の根では発現がなく、吸器誘導後のみ発現がみられることから、他のハマウツボ科寄生植物においても吸器発生時に同様の機能を有することが示唆された。シロイヌナズナの研究からは、オーキシン応答の極大点の形成には、 *PIN* ファミリーや *AUX/LAX* ファミリーなどのオーキシン輸送体による細胞間極性輸送が重要な役割を持つことが示されている。そのため、吸器頂端でのオーキシン応答の極大点の形成と維持にも、今回同定された *PjYUC3* による生合成だけでなく、オーキシン輸送体による極性輸送が

関与している可能性が考えられる。YUCCA ファミリー遺伝子やオーキシン輸送体などのオーキシン関連遺伝子の進化が、吸器形成能の獲得にどれだけ寄与しているのか興味深い点である。

5. おわりに

次世代シーケンサーの登場によって、分子遺伝学の対象となる生物種の幅は飛躍的に広がった。私たちの研究グループでは、ハマウツボ科の根寄生植物であるストライガとコシオガマについて、ゲノム情報、トランスクリプトーム情報、形質転換法の確立などによって研究環境を整備してきた。これらのリソースを用いた研究から、吸器という寄生植物にユニークな器官の発生の一端が、オーキシンという一般的な植物ホルモンのユニークな制御によって、遂行されていることが明らかになりつつある。根系の構築という観点からみると、吸器の形成は環境に応答した器官発生の一例とみることができるであろう。寄生植物は宿主植物が近くにいるという環境を認識し、それに対する応答として吸器を形成するのである。今のところ、HIFを用いた宿主植物認識システムと、オーキシンを介した器官発生のシステムがどのようにつながっているのか不明である。今後の研究の大きな課題の一つであろう。

多様な植物種を研究することで、従来行われてきたモデル植物の研究からだけではわからない、植物が持つ普遍性や、それぞれの種の持つ特殊性が明確になっていくのではないだろうか。今後寄生メカニズムの詳細が明らかになっていけば、寄生雑草の防除法の確立が可能になるかもしれない。

6. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、JSPS DC1 の支援を得て遂行した。

7. 引用文献

- Albrecht, H., Yoder, J.I., & Phillips, D.A. 1999. Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria*. *Plant Physiol.* 119: 585-591.
- Bandaranayake, P.C.G., Filappova, T., Tomilov, A., Tomilova, N.B., Jamison-McClung, D., Ngo, Q., Inoue, K., & Yoder, J.I. 2010. A single-electron reducing quinone oxidoreductase is necessary to induce haustorium development in the root parasitic plant *Triphysaria*. *Plant Cell* 22: 1404-1419
- Baird, V.W.M., & Riopel, J.L. 1983. Experimental studies of the attachment of the parasitic angiosperm *Agalinis purpurea* to a host. *Protoplasma* 118: 206-208
- Baird, V.W.M., & Riopel, J.L. 1984. Experimental studies of haustorium initiation and early development in *Agalinis purpurea* (L.) RAF. (*Schrophulariaceae*). *Amer. J. Bot.* 71 (6) : 803-814
- Barkman, T.J., McNeal, J.R., Lim, S., Coat, G., Croom, H.B., Young, N.D., & dePamphilis, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evol. Biol.* 7: 248
- Bar-Nun, N., Sachs, T., & Mayer, A.M. 2008. A role for IAA in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobancha aegyptiaca*. *Ann. Bot.* 101: 261-5

- Caldwell, E.S., & Steelink, C. 1969. Phenoxy radical intermediate in the enzymatic degradation of lignin model compounds. *Biochim. Biophys. Acta.* 184: 420-431.
- Chang, M. & Lynn, D.G. 1986. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.* 12 (2) : 561-579.
- Cheng, Y., Dai, X., & Zhao, Y. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 1790–9.
- 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: 1189-1190.
- Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K., Saucet, S.B., Toyooka, K., Yoshida, S., & Shirasu, K. 2016. Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Phys.* 170: 1492-1503
- Dörr, I. 1997 How *Striga* parasitizes its host: a TEM and SEM study. *Annals of Botany* 79:463–472.
- Heide-Jorgensen, H.S., & Kuijt, J. 1993 Epidermal derivatives as xylem elements and transfer cells: a study of the host-parasite interface in 2 species of *Triphysaria* (Scrophulariaceae). *Protoplasma* 174: 173-183
- Ishida, J.K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S., & Shirasu, K. 2011 *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PLoS ONE* 6: e25802
- Keyes, W.J., Palmer, A.G., Erbil, W.K., Taylor, J.V., Apkarian, R.P., Weeks, E.R., & Lynn, D.G. 2007. Sernagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *Plant J.* 51: 707-716.
- Kim, D., Kocz, R., Boone, L., Keyes, W.J., & Lynn, D.G. 1998. On becoming a parasite: Evaluating the role of wall oxidase in parasitic plant development. *Chem. Biol.* 5: 103-117.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., & Kasahara, H. 2011 The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:18512-7
- Sablon ML du. 1887 Recherches sur les organes d'absorption des ptantes parasites (Rhinanthées et Santalacées). *Ann. Sci. Nat. Ser. 7 [Bot]* 6:90-117 + 3 plates
- Smith, C.E., Ruttledge, T., Zeng, Z., O'Malley, R.C., & Lynn, D.G. 1996. A mechanism for inducing plant development – the genesis of a specific inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11786-11790.
- Spallek, T., Mutuku, J.M., & Shirasu, K. 2003. The genus *Striga*: a witch profile. *Mol. Plant Pathol.* 14: 861-869.
- Tomilov, A.A., Tomilova, N.B., Abdallah, I., & Yoder, J.I. 2005. Localized Hormone Fluxes and Early Haustorium Development in the Hemiparasitic Plant. *Plant phys.* 138: 1469–1480.
- Yang, Z., Wafula, E.K., Honaas, L.A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., Huang, K., Bandaranayake, P.C.G., Wu, Biao., Der, J.P., Clarke, C.R., Ralph, P.E., Landherr, L., Altman, N.S., Timko, M.P., Yoder, J.I., Westwood, J.H., & dePamphilis, C.W. 2014. Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Mol. Biol. Evol.* 32(3): 767–790

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., & Chory, J. 2001.
A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306–9

作物生産における根伸長角度の遺伝的改良

宇賀優作¹, 木富悠花^{1,2}¹ 農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター

〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

² 東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Prospects of genetic improvement for root growth angle in crop production

Yusaku Uga¹, Yuka Kitomi^{1,2}¹ Institute of Crop Science, National Agriculture and Food Research Organization

2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

1-1-1, Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

Keywords: auxins, drought avoidance, grain yield, phytoremediation, quantitative trait locus

1. はじめに

陸上植物の生存にとって土壤中に存在する水と養分を獲得することは必須である。しかし、これらの資源は土壤中に不均一に分布する。たとえば、リンなどの養分は土壤中を移動しにくく、土壌表層に偏在する傾向にある。一方、水や水溶性の窒素などの養分は土壌下層に移動しやすい。そのため、陸上植物の根系分布、とくに、垂直方向の根系分布は土壌からの水や養分の獲得に大きく影響する (Gewin 2010, Lynch 1995)。それゆえに、多くの植物は気候や地域により異なる土壌環境に適応した根系をそれぞれ進化させてきた。同様に、作物においても養水分不足は生産性に大きく影響するため、劣悪な土壌環境で栽培するのに適した根系分布を持つことは重要である (de Dorlodot et al. 2007)。たとえば、灌漑施設のない農地を干ばつが襲った場合、深刻な減収が想像できるが、浅根型 (根が土壌浅層に伸長する性質) の品種より深根型 (根が土壌深層に伸長する性質) の品種は土壌深層に偏在する水を効率的に吸収することで干ばつを回避できると期待される (Fukai and Cooper 1995, Kirkegaard et al. 2007, Manschadi et al. 2006)。一方、畑作物にとって過剰な降雨による土壌の浸水は酸欠状態による根腐れをもたらす。この場合、浅根型の品種は土壌表層近くの酸素により多くアクセスすることで根腐れを回避できると期待される (Omori and Mano 2007)。このように、根系分布は非生物学的ストレスの回避に大きく影響すると考えられる。世界三大作物のイネ、コムギ、トウモロコシはイネ科の単子葉植物である。単子葉植物の根系は種子から発生する 1 から数本の種子根とその後稈から伸長する多数の冠根からなる (Rich and Watt 2013)。この根系分布はおもに最長根長と根伸長角度のバランスによって決定する

(Abe and Morita 1994, Araki et al. 2002)。とくに、根伸長角度は根の伸長方向を決定し、根系分布に大きく影響する。たとえば、地表面に対して根伸長角度が小さいと浅根になり、根伸長角度が大きいと深根となる (図 1)。さらに、最長根長が長くなることで土壌深層へより根系が分布することが可能である。

近年の地球温暖化による土壌環境の劣化に対し、根系の遺伝的改良への期待が大きくなっている (Gewin 2010)。しかし、根系は地下に存在するため、自然環境下での根系の選抜育種はほとんど進んでいない。また、品種改良に利用できる遺伝子の情報もほとんどない。そこで、著者らはより多くの研究者や育種家に根系形態、とくに、根伸長角度の遺伝的改良の可能性を知ってもらいたいと考え、本稿をまとめた。はじめに、根伸長角度がどのようにして決まるのか、その遺伝的制御機構について述べたい。つぎに、自然変異から見出した根伸長角度に関する量的形質遺伝子座 (quantitative trait locus, QTL) を用いた品種改良の研究事例から作物生産における根伸長角度の遺伝的改良の有用性について議論したい。

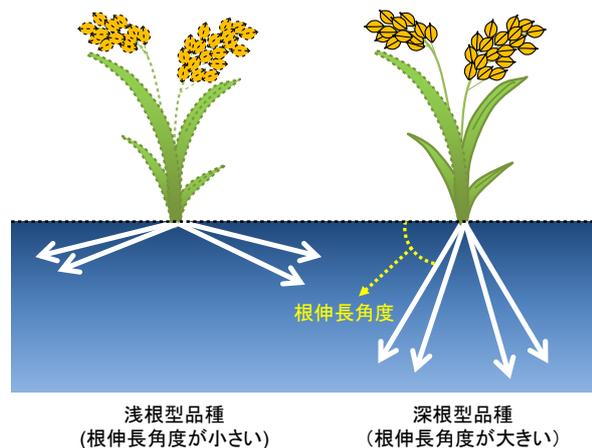


図 1. 根伸長角度と根系分布

2. 根伸長角度はどのようにして決まるのか？

根伸長角度は重力や光、水分といった様々な環境刺激に対する根の屈性反応の総和として決定されると考えられる (Oyanagi et al. 1993)。以下の章ではこれらの刺激に対する根の屈性反応について簡潔に説明する。

2-1. 重力屈性

環境刺激の中で重力は根伸長角度を決定する主な要因であり、根は重力方向に従って下方へ伸長する。維管束植物では根端のコルメラ細胞内に存在するアミロプラストの沈降が重力方向の感知に寄与すると考えられている (Haberlandt 1900, Němec 1900)。このアミロプラストが平衡石として機能することが根の重力屈性に重要であるという仮説はデンプン-平衡石仮説 (starch-statolith hypothesis) と呼ばれ、これまでに様々な実験によって支持されてきた。たとえば、ホスホグルコムターゼ活性が損なわれデンプンを合成できないシロイヌナズナ突然変異体では重篤な重力屈性異常が観察され、また、野生型のシロイヌナズナの根端からコルメラ細胞を除去すると重力屈性が大幅に阻害されることが報告されている (Blancaflor et al. 1998, Tsugeki and Fedoroff 1999)。植物を回転などにより重力方向を変化させると、コルメラ細胞内のアミロプラストは新たに下側となった方向へと沈降し、その結果として細胞内の小胞体に物理刺激が加わる (Leitz et al. 2009)。この物理刺激によりイオンチャネルが開いてコルメラ細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、結果として生じた細胞質 pH 変化が引き金となってオーキシン排出担体 PIN-FORMED (PIN) タンパク質の局在が変化する (Boonsirichai et al. 2003,

Harrison and Masson 2008)。一方で、デンプン-平衡石仮説以外の重力感受機構も存在していると考えられている。Wolverton ら (2002) は、根の伸長帯が重力シグナルに関与していることを報告している。伸長帯を形成する細胞にはコルメラ細胞のように平衡石となるようなものが存在していないため、この重力感受機構はコルメラ細胞内で起こっている重力感受機構とは異なると考えられている。

2-2. 光屈性

光も根の伸長方向を変化させる要因のひとつである。シロイヌナズナの根は一方向からの青色光に対して負の光屈性を示す。青色光受容体の突然変異体であるシロイヌナズナの *phototropin 1* (*phot1*) および *phot2* では青色光に対する根の屈性反応に異常が認められる (Liscum and Briggs 1995, Sakai et al. 2001)。反対に、根は phytochrome A (*phyA*) に受容される赤色光に対しては弱い正の光屈性を示すことが知られている (Kiss et al. 2003)。また、赤色光を処理した黄化実生に青色光を照射すると青色光反応による屈性に異常が生じることが報告されている (Briggs 1963)。*phyA* は赤色光だけでなく青色光も受容できることや (Pratt and Coleman 1974), *phyA* は *phot1* の配向を制御するといわれていることから (Han et al. 2008), 根の光屈性においても *phyA* と *phot1* は機能的に相互作用しているのではないかと推測されている。

2-3. 水屈性

根は正の水分屈性を示し、水を得るために水分勾配に従って根を伸長させることができる (Takahashi et al. 2002)。水分屈性に異常が認められる突然変異体として、根を水分勾配に従って発達させることができない *no hydrotropic response1* (*nhrl*)、水分屈性が弱くなった *mizukusseil* (*miz1*) および *miz2*、水分勾配存在下においてより根系を発達させる *altered hydrotropic response1* (*ahr1*) などが挙げられる (Eapen et al. 2003, Kobayashi et al. 2007, Miyazawa et al. 2009, Saucedo et al. 2012)。Moriwaki ら (2012) は光によって水分屈性が強められ、また、LONG HYPOCOTYL 5 (*HY5*) が仲介する光シグナル伝達には *MIZ1* 発現および水分屈性が必要であることを示しており、これらから水分屈性と光屈性には密接な関連があると推測される。*HY5* は赤色光および青色光受容により活性化される光シグナル伝達経路の鍵となる bZIP 型転写因子であり、*hy5* 変異体の根における水分屈性は野生型と比較して弱まっていることが報告されている (Moriwaki et al. 2012)。この光によって強化される水分屈性は根をより下方へ伸長させて植物体をしっかりと支えるだけでなく、より土壌表層部で起こりやすい乾燥ストレスからの回避に役立っていると推察される。

3. 根の屈曲はオーキシンシグナルによって制御される

近年の研究から、根の重力による屈曲制御機構がより明らかとなってきた。根の屈曲は伸長帯先端部 (distal elongation zone, DEZ) での細胞伸長が偏差的に起こることに起因しており、この偏差的な細胞伸長は伸長が抑制される側の細胞にオーキシンが不均等に集積することが原因で生じる (Cholodny 1927, Ishikawa and Evans 1993, Went 1926)。上述のように、重力方向

が転換するとコルメラ細胞で重力刺激が受容され、結果としてオーキシン排出担体である PIN タンパク質の局在が変化する。シロイヌナズナにおいてコルメラから側部根冠 (lateral root cap) にかけての細胞では、PIN3 と PIN7 が重力方向の転換に伴って細胞の下側へと局在を移してオーキシンの不均等な流れを形成する (Friml et al. 2002, Kleine-Vehn et al. 2010)。これらに加え、側部根冠から伸長帯先端部の表皮細胞に存在する PIN2 およびオーキシン流入担体である AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) も根における重力応答に応じたオーキシンの流れの形成に関与している (Müller et al. 1998, Swarup et al. 2005)。

オーキシンシグナルの伝達は AUXIN (Aux) /INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) と AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) の 2 種類のタンパク質の相互作用によって仲介されていることが知られている (Liscum and Reed 2002)。オーキシンは TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1) /AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB) によって受容され、オーキシン応答性の転写を抑制する Aux/IAA のユビキチン化を促進する (Gray et al. 2001)。ユビキチン化された Aux/IAA は 26S プロテアソームによって分解され、その結果 ARF のオーキシン応答性転写因子としての機能が回復する (Gray et al. 2001)。植物では Aux/IAA と ARF の下流で機能する数多くの転写因子によるシグナル伝達により、重力屈性を含む様々なオーキシン応答性の形態変化が生じる。シロイヌナズナの Aux/IAA と ARF によるオーキシンシグナル伝達系に関連した突然変異体において重力屈性異常が認められていることから、形態変化を通じた環境適応にオーキシンが深く関与していると考えられる (Leysner et al. 1996, Tian and Reed 1999, Nagpal et al. 2000, Fukaki et al. 2002, Yang et al. 2004)。

イネにおいても、オーキシン関連の突然変異体において重力応答の異常が報告されている。その例として、*crown rootless4 (crl4) losgnom1*, *crl1/adventitious rootless1 (arl1)*, *crl5* および *Osiaa* 変異体が挙げられる。*CRL4/OsGNOM1* はシロイヌナズナにおいて ADP ribosylation factor を活性化させる guanine exchange factor (Arf-GEF) と相同性の高いタンパク質をコードし、オーキシンの適切な集積と濃度勾配の維持に重要な役割を果たしている (Kitomi et al. 2008, Liu et al. 2009)。*CRL1/ARL1* および *CRL5* はそれぞれ LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) /ASYMMETRIC LEAVES LIKE (ASL), APETALA2 (AP2) /ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (ERF) をコードし、Aux/IAA および ARF によるオーキシンシグナル伝達系路上で機能する転写因子である (Inukai et al. 2005, Kitomi et al. 2011, Liu et al. 2005)。また、Aux/IAA タンパク質の迅速な分解に重要なドメインにアミノ酸変異が生じた複数の *Osiaa* 変異体において、シロイヌナズナの *iaa* 変異体と同様にオーキシンシグナル伝達が阻害された結果として観察される異常な表現型が報告されている (Jun et al. 2011, Kitomi et al. 2012, Zhu et al. 2012)。

近年では突然変異体だけでなく、重力応答に関与する QTL も同定・単離された。根伸長角度を制御する QTL である *DEEPER ROOTING 1 (DROI)* は Aux/IAA および ARF によるオーキシンシグナルによりその発現を負に制御されることが判明しており、その発現量低下が重力刺激を受感した根における偏差的な細胞伸長に深く関与している (Uga et al. 2013a)。これらの報告から、イネにおいてもシロイヌナズナと同様にオーキシンの極性輸送やシグナル伝達は重力応答時の根伸長角度を決定する重要な因子であることが推察される。

4. 作物生産における根伸長角度の有用性

本章では、*DRO1* を用いたフィールド実験から重力屈性に関与する遺伝子が根伸長角度の遺伝的改良のターゲットとして有用であることを紹介する。根系分布の遺伝的改良は、作物の生産性向上するうえで重要な戦略であると認識されている (de Dorlodot et al. 2007)。根系分布を改変する手法として、遺伝子工学的なアプローチとともに注目されている手法としてゲノム育種が挙げられる。ゲノム育種とは作物種内に見られる自然変異を活用し、その変異に関与する QTL を検出・同定した後、対象 QTL を持った個体を QTL 近傍の DNA マーカーによって短期間に選抜する育種法である。ゲノム育種で重要なことは対象品種の不良形質を改善するために利用可能な QTL を同定することである。そのためには対象品種に対してすぐれた形質を持った品種またはアリールを見出す必要がある。

様々な作物で根系形態に幅広い自然変異が存在することは以前から知られている (O'Toole and Bland 1987)。栽培イネでも根長や根の太さなどの根系形態について多様な品種内変異が報告されている (Henry et al. 2011, Lafitte et al. 2001, O'Toole and Bland 1987, Uga et al. 2009)。一方、根伸長角度についてはあまり報告されていない (Kato et al. 2006, Uga et al. 2009)。これらの自然変異を育種素材として利用することは有用と考えられる。しかし、大量の植物体の根を地面から掘り起し、有望な根系を持った系統を選抜することは大変な労力と時間を要するため、実際の育種事業の中で根系が育種対象となることはこれまでほとんどなかった。近年、ゲノム研究の進展に伴い、有用な QTL を対象品種に導入しようとするゲノム育種の試みが盛んになっている。しかし、根系についてこれまでに目立った成功事例はほとんど報告されていない (Steele et al. 2006)。

アジアで広く栽培されている水稲品種 IR64 は一般的な灌漑水田では多収であるが、干ばつには非常に弱く、天水田での栽培では減収となる。その一因として、IR64 は根が浅く張り、根長が短いため、干ばつ時に土壤深層の水分を十分に獲得できないことが考えられる (図 2b)。一方、フィリピン在来の陸稲には干ばつに強い品種がいくつ存在する。Kinandang Patong (KP) は灌漑水田で栽培すると収量は低い、降雨依存的な畑や天水田では干ばつによる減収の被害は水稲よりも小さい。これは水稲とは対照的に KP が深くて長い根系を持っており、干ばつ時に土壤深層の水を効率的に吸収できることによると推察される (図 2b)。そこで、著者らはゲノム育

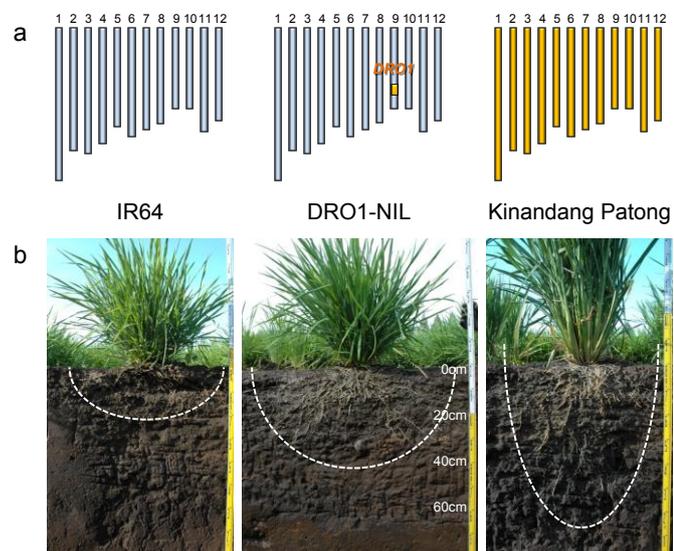


図 2. *DRO1* の根系分布に対する影響

(a) 各系統のグラフィカルジェノタイプ。1 から 12 はイネの染色体番号を示す。青のボックスは IR64 の遺伝子型、橙のボックスは Kinandang Patong の遺伝子型をそれぞれ表す。DRO1-NIL は *DRO1* の周辺領域だけが Kinandang Patong のゲノム由来である。(b) 畑における IR64 および DRO1-NIL, Kinandang Patong の根系分布の違い。各系統の画像は平均的な個体を表す。各画像の白の破線は各系統の最大根域を示す。Uga et al. (2013a) より改変。

種法を用いて KP の持つ旺盛な根系形態を IR64 に導入することで干ばつ耐性の向上を試みている。上述で紹介した *DRO1* は IR64 と KP の交雑集団を用いた QTL 解析により第 9 染色体に同定した QTL である (Uga et al. 2011)。KP は機能型 *DRO1* を持ち、根伸長角度が地表面に対して大きく、深根となる。一方、IR64 は非機能型 *DRO1* を持つため、根伸長角度が小さく、浅根となる (Uga et al. 2013a)。

著者らは作物生産における *DRO1* の有用性を明らかにするため、準同質遺伝子系統 (near-isogenic line, NIL) を育成した (Uga et al. 2013a)。本系統 (*DRO1*-NIL) は IR64 に KP を交配した後、IR64 を連続戻し交配するとともに、*DRO1* 近傍のゲノム領域だけが KP 由来となるように DNA マーカーを用いて選抜し、最終的に IR64 を遺伝背景として *DRO1* 領域のみが KP 型となった系統である (図 2a)。IR64 と *DRO1*-NIL を畑圃場で栽培し、塹壕法により実際の土壌中における根系形態の違いを観察したところ、IR64 と *DRO1*-NIL はともに最長根長は 40 cm 程度と同じであった。しかし、IR64 の根は地表面から 20 cm の深さまでしか根が張っていないのに対し、*DRO1*-NIL は地表面から 40 cm まで根が張っていることが分かった (図 2b)。この違いは *DRO1*-NIL の根伸長角度が IR64 よりも大きくなり、下に向かって根が伸長したことによると考えられる。同様の結果は水田でも観察された (Uga et al. 2015a)。より詳細な形態観察を行った結果、*DRO1* は根伸長角度に関与するものの、根長や根量などの他の根系形態にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった (Uga et al. 2013a)。オーキシシグナル経路に関与する遺伝子が壊れた場合、一般的に重力屈性がおかしくなるとともに、冠根の発達異常や地上部が矮性になるなどの表現型に対する負の影響が多面に現れる。そのため、重篤な表現型を示すオーキシシグナル関連の突然変異体は育種素材としては使えないことが多い。一方、*DRO1* はオーキシシグナル経路に含まれる遺伝子であるにも関わらず根伸長角度のみに大きく影響することから、育種素材として有用な遺伝子と考えられる。そこで、著者らは浅根型の IR64 と深根型の *DRO1*-NIL を用いて根伸長角度の違いが干ばつ耐性、多収性、ファイトレメディエーションにどのような効果をもたらすのか、フィールド試験を通して検証した。

4-1. 干ばつ耐性 (干ばつ回避能力)

イネではこれまでに多くの干ばつ耐性に関与する QTL が報告されている (Bernier et al. 2007, Courtois et al. 2000, Lanceras et al. 2004, Yue et al. 2005, Zou et al. 2005)。たとえば、Bernier ら (2007) は干ばつ条件下で収量に関与する主要な QTL を第 12 染色体に見出し報告している。しかし、これらの報告ではどのような形質が収量に関与しているのか、その因果関係までは分かっていない。ま

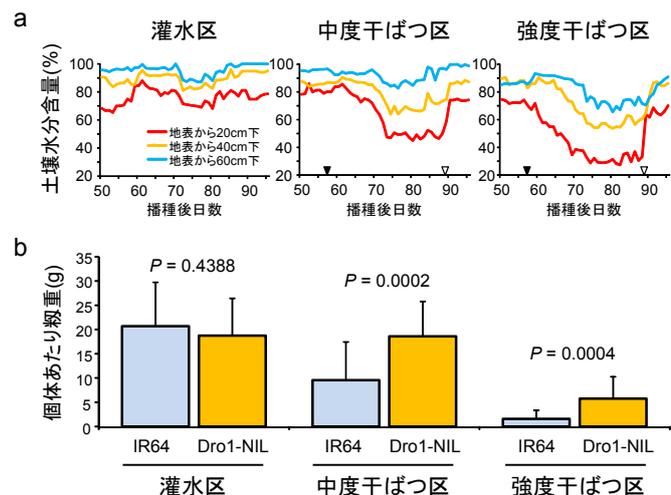


図 3. 干ばつ耐性に対する *DRO1* の効果

(a) 各処理区における土壌水分含量の経時的変化。黒矢頭は灌水制限開始日、白矢頭は再灌水日を示す。(b) 各処理区における IR64 および *DRO1*-NIL の個体あたり粒重の比較。Uga et al., 2013a より改変。

た、根系形質を改良した系統が干ばつ耐性に効果を示したとの報告はこれまでにほとんどない。著者らは根伸長角度の違いが干ばつ耐性にどう影響するのかを明らかにするため、DRO1-NIL に対して干ばつ処理試験を行った。コロンビアの国際農業研究センター内にある干ばつ耐性検定圃場に 3 つの水ストレス処理区（灌水区、中度干ばつ区、強度干ばつ区）を設け、IR64 と DRO1-NIL の干ばつ耐性の程度をそれぞれ調査した（図 3a）。驚いたことに、一日 2.5mm だけ灌水した中度干ばつ区では IR64 が灌水区に比べ収量が半分に減ったのに対し、DRO1-NIL はほとんど収量が減らなかった（図 3b）。強度干ばつ区では IR64 はほとんど収穫できなかったが、DRO1-NIL は灌水区の 30%程度の収量を確保できた。このことから、浅根型イネに機能型 *DRO1* を導入することで、干ばつ耐性が改善されることが分かった（図 4a）。

4-2. 多収性（窒素獲得能力）

栽培学的知見から水田では深根のほうが浅根より多収になる傾向があるとこれまで言われてきた（Kawata et al. 1978, Morita 1993, Morita et al. 1988）。しかし、同じ遺伝背景を持つ系統間で根系分布と収量との関係を調べた研究はほとんどない。そこで、著者らは DRO1-NIL を用いて根伸長角度の違いが収量に影響するかを調査した（Arai-Sanoh et al. 2014）。2 か年の水田における収量試験の結果、両年ともに DRO1-NIL は IR64 に対して約 10%増収となった。収量構成要素を見ると、穂数や粒数に差はなく、登熟歩合や 1000 粒重が DRO1-NIL で有意に高くなっていることが分かった。つまり、シンクサイズが変わったわけではなく、ソース能力の向上が考えられた。窒素は光合成酵素を合成するのに必須であり、光合成能力と葉の窒素含量とは正の相関がみられる（Makino et al. 1988, Ookawa et al. 2003, San-oh et al. 2006）。そこで、DRO1-NIL は根からの窒素吸収量が増えることでソース能力が向上したのではないかと考え、両系統で葉に含まれる窒素含量を測定した。その結果、両系統間で出穂期前には差が見られなかった窒素含量が出穂期以降に DRO1-NIL は IR64 よりも有意に高くなっていることが分かった（Arai-Sanoh et al. 2014）。水田の窒素源は地力として含まれる窒素と肥料として投入される窒素の 2 つが主である。通常イネ栽培では出穂期前の追肥は行わないため、出穂期以降の土壌浅層では窒素が減少する。よって、出穂期以降は深層からの窒素吸収がより重要になると言われる（Toriyama 2001）。以上のことから、DRO1-NIL では出穂期以降の土壌深層からの窒素吸収が IR64 よりも優れているため、多収になったと推察される。収穫後、水田における根の張りを両系統で確認したところ、両系統ともに浅層に分布する根は根腐れが見られたが、DRO1-NIL は IR64 より深層により多く根が分布していた。深層に分布する DRO1-NIL の根は根端が白く旺盛で、一部の根は耕盤層を貫通していた。これらのことから、DRO1-NIL の旺盛な深根は生育後期に土壌深層からより多くの窒素を獲得するのに有利に働き、その結果 IR64 よりも登熟がよくなったと推察される（図 4b）。

4-3. ファイトレメディエーション

有害金属による土壌汚染は人の健康や自然環境に対し重大な問題である。この問題に対して、高い重金属吸収能を持つ植物を利用したファイトレメディエーションは土壌の浄化技術として有望と考えられる（Salt et al. 1998）。一方、低い重金属吸収能を示す品種は人間が日々

の生活で作物から摂取する重金属を減らすことが期待できる (Ishikawa et al. 2005)。重金属の一種であるカドミウムは人を含む生物にとって非常に有害な金属である。近年、植物におけるカドミウムトランスポーターの生理・分子メカニズムがかなり研究されてきた (Uraguchi and Fujiwara 2012)。イネではマンガンや鉄、カドミウムの輸送に関与する遺伝子 *osnramp5* の突然変異体を用いた低カドミウム吸収品種が開発され、根からのカドミウム吸収が抑制されていることが分かった (Ishikawa et al. 2012, Ishimaru et al. 2012)。一方、土壌中の根系分布、とくに、根伸長角度が重金属の吸収効率にどう影響するかはよく分かっていない。そこで、著者らは根伸長角度とカドミウム吸収効率との関係を明らかにするため、カドミウム汚染水田で DRO1-NIL を栽培した。湛水状態では植物はカドミウムを吸収しにくいいため、栄養成長期に灌漑用水を減らし、土壌表層を乾かすことで土壌中の可吸態カドミウムの濃度を上げた。この条件で、イネが吸収したカドミウム量を計測した結果、藁と籾に含まれるカドミウム濃度は DRO1-NIL よりも IR64 でそれぞれ有意に高くなっていった (Uga et al. 2015a)。これらのことから浅根型品種はカドミウムの吸収効率を上げることが可能であると期待できる (図 4c)。反対に、深根型品種は土壌表層のカドミウムの吸収を回避するうえで有望な遺伝資源になると考えられる。

5. おわりに

DRO1-NIL を用いたフィールド試験の結果から、根伸長角度の遺伝的改良が作物生産にとって様々なメリットをもたらすことが分かってきた (図 4)。種もしくは個体として生存・繁殖できればいい野生植物と異なり、作物は可能な限り最大限の子実の収穫を求められる。つまり、人類 (農家) にとって理想的な作物とは環境ストレスのない最適な環境で高い収量が得られ、かつ、干ばつや塩害などのストレス環境下においても一定レベルの安定した収穫が可能であることである。根量や根長などの量的な形態の改変は植物が獲得した資源を地上部と取り合うトレードオフを考慮しなければいけない。言い換えれば、環境ストレスの小さいときに不必要に根系に資源を分配することは収量への悪影響が懸念される。一方、*DRO1* は根伸長角度を変化させるが地上部および地下部バイオマスには影響しないことから、根伸長角度の改変による地上部との資源のトレードオフはほとんど生じないと期待できる。根の角

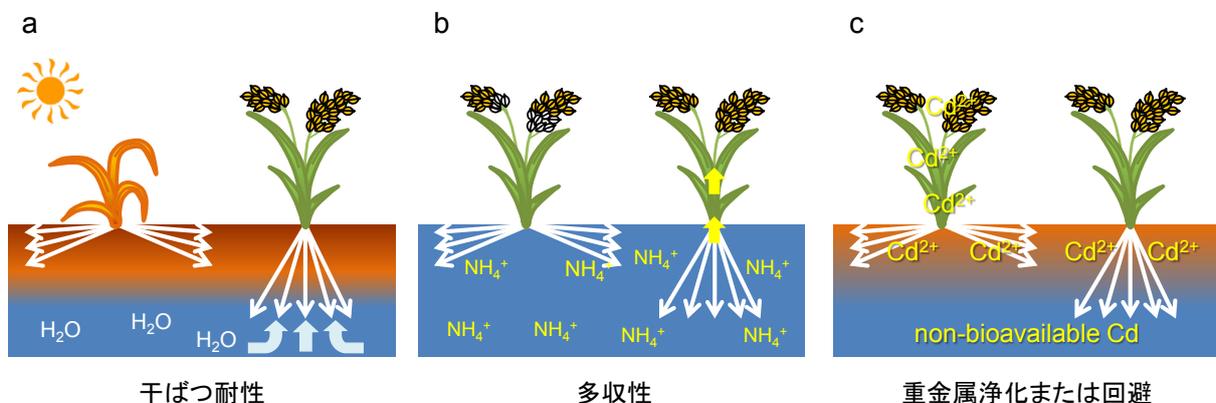


図 4. 根伸長角度の遺伝的改良が作物生産にもたらす様々なメリット

度が変わっても量的に根系形態が変わることがないことから、根系分布の遺伝的改良のターゲットとして根伸長角度を最初に検討することは一考の価値があると著者らは考える。現在、著者らは様々なイネ品種で根伸長角度の改良を可能にするために異なる解析集団を用いてこれまでに根伸長角度に関する QTL を複数見出し、マップベースクローニングを進めている (*qSOR1*, Uga et al. 2012; *DRO2*, Uga et al. 2013b; *DRO3*, Uga et al. 2015b; *DRO4* & *DRO5*, Kitomi et al. 2015)。このように述べると根伸長角度は非常に有望な形質とみなせるが、留意する点もある。最初に述べたように養水分はそれぞれの性質に従って土壤中に偏在する。また、栽培環境ごとに土壤中の養水分の分布や濃度も異なる。ヘテロな土壤環境で資源を最大限に獲得するためにはどのような根系が理想なのか、まだ十分な知見はない。たとえば、干ばつが起りやすく、リンが欠乏した地域で作物を栽培する際、水の獲得を積極的にするためには深根型が有効であるが、リンを積極的に吸収するためには浅根型が有利と考えられる。この場合、どのような根系分布が最適であるのか、その答えはよくわかっていない。今後、同じ遺伝背景（品種、系統など）に異なる根系 QTL をそれぞれ導入した NIL や複数の根系 QTL を集積した系統などを用いて、遺伝子（遺伝子型）と土壤環境との相互作用がより詳細に明らかになれば、個々の土壤環境にあった根系の理想的なモデルが提唱できるのではないかと期待する。

5. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト (QTL-4003)、農林水産省ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト (RBS-2009)、および科学研究費助成事業 (23380189) の支援を得て遂行した。

6. 引用文献

- Abe, J. & Morita, S. 1994. Growth direction of nodal roots in rice: its variation and contribution to root system formation. *Plant Soil* 165: 333–337.
- Arai-Sanoh, Y., Takai, T., Yoshinaga, S., Nakano, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Kondo, M., & Uga, Y. 2014. Deep rooting conferred by *DEEPER ROOTING 1* enhances rice yield in paddy fields. *Sci. Rep.* 4: 5563.
- Araki, H., Morita, S., Tatsumi, J., & Iijima, M. 2002. Physio-morphological analysis on axile root growth in upland rice. *Plant Prod. Sci.* 5: 286–293.
- Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D., & Atlin, G. 2007. A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. *Crop Sci.* 47: 507–518.
- Blancaflor, E.B., Fasano, J.M., & Gilroy, S. 1998. Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116: 213–222.
- Boonsirichai, K., Sedbrook, J.C., Chen, R., Gilroy, S., & Masson, P.H. 2003. ALTERED RESPONSE TO GRAVITY is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 15: 2612–2625.
- Briggs, W.R. 1963. Mediation of phototropic responses of corn coleoptiles by lateral transport of auxin.

- Plant Physiol.* 38: 237–247.
- Cholodny, N. 1927. Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. *Biol. Zent.* 47: 604–626.
- Courtois, B., McLaren, G., Sinha, P.K., Prasad, K., Yadav, R., & Shen, L. 2000. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Mol. Breed.* 6: 55–66.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagé, L., Price, A., Tuberosa, R., & Draye, X. 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci.* 12: 474–481.
- Eapen, D., Barroso, M.L., Campos, M.E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J.G., & Cassab, G.I. 2003. A *no hydrotropic response* root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 536–546.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., & Palme, K. 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809.
- Fukai, S. & Cooper, M. 1995. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res.* 40: 67–86.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., & Tasaka, M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 153–168.
- Gewin, V. 2010. An underground revolution. *Nature* 466: 552–553.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. 2001. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271–276.
- Haberlandt, G. 1900. Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 18: 261–272.
- Han, I.S., Tseng, T.S., Eisinger, W., & Briggs, W.R. 2008. Phytochrome A regulates the intracellular distribution of phototropin 1-green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 2835–2847.
- Harrison, B.R. & Masson, P.H. 2008. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J.* 53: 380–392.
- Henry, A., Gowda, V.R.P., Torres, R.O., McNally, K.L., & Serraj, R. 2011. Variation in root system architecture and drought response in rice (*Oryza sativa*): Phenotyping of the OryzaSNP panel in rainfed lowland fields. *Field Crops Res.* 120: 205–214.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., & Matsuoka, M. 2005. *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17: 1387–1396.
- Ishikawa, S., Ae, N., & Yano, M. 2005. Chromosomal regions with quantitative trait loci controlling cadmium concentration in brown rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 168: 345–350.
- Ishikawa, H. & Evans, M.L. 1993. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102: 1203–1210.
- Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa,

- N.K., & Nakanishi H. 2012. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 19166–19171.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., *et al.* (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium Transport. *Sci. Rep.* 2: 286.
- Jun, N., Gaohang, W., Zhenxing, Z., Huanhuan, Z., Yunrong, W., & Ping, W. 2011. OsIAA23-mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in rice. *Plant J.* 68: 433–442.
- Kato, Y., Abe, J., Kamoshita, A., & Yamagishi, J. 2006. Genotypic variation in root growth angle in rice (*Oryza sativa* L.) and its association with deep root development in upland fields with different water regimes. *Plant Soil* 287: 117–129.
- Kawata, S., Soejima, M., & Yamazaki, K. 1978. The superficial root function and yield of hulled rice. *Jpn. J. Crop Sci.* 47: 617–628.
- Kirkegaard, J.A., Lilley, J.M., Howe, G.N., & Graham, J.M. 2007. Impact of subsoil water use on wheat yield. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 303–315.
- Kiss, J.Z., Mullen, J.L., Correll, M.J., & Hangarter, R.P. 2003. Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol.* 131: 1411–1417.
- Kitomi, Y., Inahashi, H., Takehisa, H., Sato, Y., & Inukai, Y. 2012. OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. *Plant Sci.* 190: 116–122.
- Kitomi, Y., Ito, H., Hobo, T., Aya, K., Kitano, H., & Inukai, Y. 2011. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRRI*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J.* 67: 472–484.
- Kitomi, Y., Kanno, N., Kawai, S., Mizubayashi, T., Fukuoka, S., & Uga, Y. 2015. QTLs underlying natural variation of root growth angle among rice cultivars with functional allele of *DEEPER ROOTING 1*. *Rice* 8: 16.
- Kitomi, Y., Ogawa, A., Kitano, H., & Inukai, Y. 2008. *CRL4* regulates crown root formation through auxin transport in rice. *Plant Root* 2: 19–28.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., & Friml, J. 2010. Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 22344–22349.
- Kobayashi, A., Takahashi, A., Kakimoto, Y., Miyazawa, Y., Fujii, N., Higashitani, A., & Takahashi, H. 2007. A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4724–4729.
- Lafitte, H.R., Champoux, M.C., McLaren, G., & O'Toole, J.C. 2001. Rice root morphological traits are related to isozyme group and adaptation. *Field Crops Res.* 71: 57–70.
- Lanceras, J.C., Pantuwan, G., Jongdee, B., & Toojinda, T. 2004. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol.* 135: 384–399.
- Leitz, G., Kang, B.H., Schoenwaelder, M.E., & Staehelin, L.A. 2009. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells. *Plant Cell* 21: 843–860.

- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., & Estelle, M. 1996. Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J.* 10: 403–413.
- Liscum, E. & Briggs, W.R. 1995. Mutations in the *NPH1* locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7: 473–485.
- Liscum, E. & Reed, J.W. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49: 387–400.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H., & Wu, P. 2005. ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J.* 43: 47–56.
- Liu, S., Wang, J., Wang, L., Wang, X., Xue, Y., Wu, P., & Shou, H. 2009. Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family. *Cell Res.* 19: 1110–1119.
- Lynch, J.P. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109: 7–13.
- Makino, A., Mae, T., & Ohira, K. 1988. Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* 174, 30–38.
- Manschadi, A.M., Christopher, J.T., de Voil, P., & Hammer, G.L. 2006. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Funct. Plant Biol.* 33: 823–837.
- Morita, S. 1993. Root system distribution and its possible relation to yield in rice. In: Low-input sustainable crop production systems in Asia, KSCS, Korea, pp 371–377.
- Morita, S., Suga, T., & Yamazaki, K. 1988. The relationship between root length density and yield in rice plants. *Jpn. J. Crop Sci.* 57: 438–443.
- Miyazawa, Y., Takahashi, A., Kobayashi, A., Kaneyasu, T., Fujii, N., & Takahashi, H. 2009. GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 149: 835–840.
- Moriwaki, T., Miyazawa, Y., Fujii, N., & Takahashi, H. 2012. Light and abscisic acid signalling are integrated by *MIZ1* gene expression and regulate hydrotropic response in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 35: 1359–1368.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman E., & Palme, K. 1998. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903–6911.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle M., & Reed J.W. 2000. *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* 123: 563–574.
- Němec, B. 1900. Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 18: 241–245.
- Omori, F. & Mano, Y. 2007. QTL mapping of root angle in F₂ populations from maize ‘B73’ x teosinte ‘*Zea luxurians*’. *Plant Root* 1: 57–65.
- Ookawa, T., Naruoka, Y., Yamazaki, T., Suga, Y., & Hirasawa, T. 2003. A comparison of the accumulation and partitioning of nitrogen in plants between two rice cultivars, Akenohoshi and

- Nipponbare, at the ripening stage. *Plant Prod. Sci.* 6, 172–178.
- O'Toole, J.C. & Bland, W.L. 1987. Genotypic variation in crop plant root systems. *Adv. Agr.* 41: 91–143.
- Oyanagi, A., Nakamoto, T., & Morita, S. (1993) The gravitropic response of roots and the shaping of the root system in cereal plants. *Env. Exp. Bot.* 33: 141–158.
- Pratt, L.H. & Coleman, R.A. 1974, Phytochrome distribution in etiolated grass seedlings as assayed by an indirect antibody-labeling method. *Am. J. Bot.* 61: 195–202.
- Rich, S.M. & Watt, M. 2013. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *J. Exp. Bot.* 64: 1193–1208.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., & Okada, K. 2001. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6969–6974.
- Salt, D.E., Smith, R.D., & Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643–68.
- San-oh, Y., Sugiyama, T., Yoshita, D., Ookawa, T., & Hirasawa, T. 2006. The effect of planting pattern on the rate of photosynthesis and related processes during ripening in rice plants. *Field Crops Res.* 96, 113–124.
- Saucedo, M., Ponce, G., Campos, M.E., Eapen, D., García, E., Luján, R., Sánchez, Y., & Cassab, G.I. 2012. An altered hydrotropic response (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin. *J. Exp. Bot.* 63: 3587–3601.
- Steele, K.A., Price, A.H., Shashidhar, H.E., & Witcombe, J.R. 2006. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theor. Appl. Genet.* 112: 208–221.
- Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.M., Haseloff, J., Beemster, G.T., Bhalerao, R., & Bennett, M.J. 2005. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.* 7: 1057–1065.
- Takahashi, N., Goto, N., Okada, K., & Takahashi, H. (2002) Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 203–211.
- Tian, Q. & Reed, J.W. 1999. Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126: 711–721.
- Toriyama, K. 2001. Soil and plant science now developed from field study – Acquisition and analysis of data from the new view point. 1. Growth of rice plant in the larger size paddy field and the variability in soil nitrogen fertility. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nut.* 72, 453–458.
- Tsugeki, R. & Fedoroff, N.V. 1999. Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12941–12946.
- Uga, Y., Ebana, K., Abe, J., Morita, S., Okuno, K., & Yano, M. 2009. Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breed. Sci.* 59: 87–93.

- Uga, Y., Hanzawa, E., Nagai, S., Sasaki, K., Yano, M., & Sato, T. 2012. Identification of *qSOR1*, a major rice QTL involved in soil-surface rooting in paddy fields. *Theor. Appl. Genet.* 124: 75–86.
- Uga Y., Kitomi, Y., Ishikawa, S., & Yano, M. 2015a. Genetic improvement for root growth angle to enhance crop production. *Breed. Sci.* 65: 111-119.
- Uga Y., Kitomi, Y., Yamamoto, E., Kanno, N., Kawai, S., Mizubayashi, T., & Fukuoka, S. 2015b. A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of *DEEPER ROOTING 1*. *Rice* 8: 8.
- Uga, Y., Okuno, K., & Yano, M. 2011. *Dro1*, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. *J. Exp. Bot.* 62: 2485–2494.
- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi, Y., Inukai, Y., Ono, K., Kanno, N., et al. 2013a. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 45: 1097–1102.
- Uga, Y., Yamamoto, E., Kanno, N., Kawai, S., Mizubayashi, T., & Fukuoka, S. 2013b. A major QTL controlling deep rooting on rice chromosome 4. *Sci. Rep.* 3: 3040.
- Uraguchi, S. & Fujiwara, T. 2012. Cadmium transport and tolerance in rice: Perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice* 5: 5.
- Went, F. 1926. On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* 30: 10–19.
- Wolverton, C., Mullen, J.L., Ishikawa, H., & Evans, M.L. 2002. Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. *Planta* 215: 153–157.
- Yang, X., Lee, S., So, J.H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., & Estelle, M. 2004. The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF^{TIR1}. *Plant J.* 40: 772–782.
- Yue, B., Xiong, L., Xue, W., Xing, Y., Luo, L., & Xu, C. 2005. Genetic analysis for drought resistance of rice at reproductive stage in field with different types of soil. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1127–1136.
- Zhu, Z.X., Liu, Y., Liu, S.J., Mao, C.Z., Wu, Y.R., & Wu, P. 2012. A gain-of-function mutation in *OsIAA11* affects lateral root development in rice. *Mol. Plant* 5: 154–161.
- Zou, G.H., Mei, H.W., Liu, H.Y., Liu, G.L., Hu, S.P., Yu, X.Q., Li, M.S., Wu, J.H., & Luo, L.J. 2005. Grain yield responses to moisture regimes in a rice population: association among traits and genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 112: 106–113.