

原著論文

イネにおける *Tos17* でタグされた根の形態に関する突然変異系統の分子遺伝学的解析岩尾(虫鹿)純子¹⁾・湯尾崇央¹⁾・武田 真¹⁾・宮尾安藝雄²⁾・廣近洋彦²⁾・一井眞比古¹⁾¹⁾香川大学農学部, 木田郡三木町, 〒761-0795²⁾農業生物資源研究所, つくば市, 〒305-8602

摘要

植物の根は、作物の栽培上大変重要な器官であるにもかかわらず、その遺伝学的研究は少ないのが現状である。本研究では、イネ内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入変異系統群であるミュタントパネルを用いて、根の形態に関わる遺伝子の単離を目的として実験を行った。最初に、イネ品種日本晴由来のミュタントパネルの R₁ 世代 5,568 系統を水耕栽培し、幼苗期に根突然変異体を分離する系統をスクリーニングした。続いて、後代検定で根突然変異系統と確認された 56 系統について、*Tos17* をプローブとするゲノミックサザン分析による表現型との連鎖解析を行った。その結果、*Tos17* でタグされた根突然変異系統が 1 系統 (NC6949) 獲得された。詳細な形態観察により、この突然変異体は少冠根、少側根、矮性、細葉及び不稔の表現型を示すことが明らかとなった。この突然変異系統では、第 1 染色体短腕上に座乗する putative alliinase 遺伝子の第 3 エキソンに *Tos17* が挿入されていることが明らかとなった。我々はこの遺伝子を *OsAll1* (*Oryza sativa* alliinase 1) と名付けた。相補性検定により、*OsAll1* のゲノム配列全長を導入した形質転換イネでは、*osall1* 突然変異体で観察されたすべての形態異常が回復したことから、これらの形態異常は *OsAll1* 遺伝子の破壊に起因していることが示唆される。一方、イネゲノムには *OsAll1* 遺伝子を含め 4 個の alliinase 様遺伝子が存在する。カルス、葉及び根におけるこれらの遺伝子の発現様式を解析した結果、これらは独自の発現様式を示すことが明らかとなった。これらの結果から、*OsAll1* は進化の過程で他の alliinase 様遺伝子と機能的に分化したことが推察された。

キーワード

Oryza sativa L., レトロトランスポゾン, ミュタントパネル, alliinase, 冠根, 側根

緒言

植物の根は、養水分の吸収や植物体の支持の他に、植物ホルモンやアミノ酸の合成といった重要な役割を担っており、土壌環境に接し、植物体の生育と深く関わっている。しかし、根は普通土壌中にあるため、その観察や測定には多くの時間と労力が必要である。このことが根の研究を遅らせている原因の一つであり、地上部諸形質に比べて根の研究が極めて少ないのが現状である。

根の機能や生長は遺伝的な支配を受けており、その形態や養水分吸収能などに遺伝的変異があることが多くの

植物で認められている。これまでにイネでは、短根突然変異体 *rt* (Kitano and Futsuhara 1989), *srt1* (Ichii and Ishikawa 1997), *srt5* (Yao *et al.* 2002), 短側根突然変異体 *alf1* (Debi *et al.* 2003), 無根毛突然変異体 RH2 (Suzuki *et al.* 2003), 無側根突然変異体 *Lrt1* (Chhun *et al.* 2003a), オーキシン耐性の少側根突然変異体 *arm1* 及び *arm2* (Chhun *et al.* 2003b), 冠根原基形成に関与する突然変異体 *crl1* 及び *crl2* (Inukai *et al.* 2001a, b) などの根の形態に関わる突然変異体が単離され、解析されてきた。このうち原因遺伝子の単離にまで至ったのは *crl1* 突然変異体だけで、マップベースクローニングによって行われた (Inukai *et al.* 2005)。しかし、マップベースクローニングを行うためには、交配や大規模分離集団の解析が必要であり、遺伝子を単離するまでには非常に時間と手間がかかるという問題がある。そこで、遺伝子を効率的に単離することができる方

編集委員：門脇光一

2005年6月10日受領 2005年7月28日受理

Correspondence: demi0@excite.co.jp

法の1つとして、イネ内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の利用がある。

Tos17 は、通常の状態では不活性であるが、組織培養によって活性化し、増加したコピーはゲノム中に転移して、再分化によって不活性化するという特性を持つ (Hirochika *et al.* 1996). *Tos17* が遺伝子の中に挿入すると、遺伝子が破壊され、その機能は失われる。また、破壊された遺伝子には *Tos17* で「タグ」が付けられるため、形質変化との関連性を見つけることが容易となる。これまでに、品種日本晴の種子カルスからの再分化植物に由来する *Tos17* 挿入変異系統群 ‘ミュータントパネル’ が約 5 万系統作出された (Miyao *et al.* 2003). ミュータントパネルを利用して現在までに単離された遺伝子には、穂発芽遺伝子 *OsTATC* (Agrawal *et al.* 2001) やフィトクロム A 遺伝子 *PHYA* (Takano *et al.* 2001), セルロース合成に関与する遺伝子 *OsCesA4*, *OsCesA7*, *OsCesA9* (Tanaka *et al.* 2003) などがあるが、根の形態に関わる遺伝子はまだ単離されていない。したがって、*Tos17* でタグされた根の突然変異体の獲得が、根に関わる遺伝子の単離及び機能解明への近道となると考えられる。

本研究において、ミュータントパネルから根の形態に関わる突然変異系統を選抜したところ、*Tos17* でタグされた根突然変異系統が 1 系統得られた。その系統は、冠根及び側根が少なく、矮性、細葉及び不稔の表現型を示した。また、この突然変異系統において、*Tos17* が挿入しているのは putative alliinase 遺伝子であることが分かり、この遺伝子を *OsAll1* (*Oryza sativa* alliinase 1) と名付けた。本論文では、RT-PCR による *OsAll1* の発現解析、及び *osall1* 突然変異体の根の形態に着目した特性調査結果について報告する。

材料及び方法

1. *Tos17* でタグされた根突然変異系統の選抜

独立行政法人 農業生物資源研究所から分譲されたイネ品種日本晴由来のミュータントパネルの R₁ 世代 5,568 系統を実験に供試した。各系統 20 粒を 0.2% ベンレート水和水で消毒後、催芽させ、浮き付きネットに播種した。pH 5.2 の水道水あるいは木村氏 B 水耕液 (一井 1995) で 2 週間培養し、根の形態に異常を示す個体が出現する系統をスクリーニングした。選抜した系統は表現型で分類後圃場に移植し、個体別に葉身のサンプリング及び採種をした。DNA は CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) を用いて個体別に抽出し、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Biosciences) を用いて *Tos17* をプローブとするゲノミックサザン分析を行った。各 R₁ 個体の遺伝子型は、R₂ 種子を用いた後代検定により推定し、得られたデータをもとに、*Tos17* と変異形質との連鎖解析を行った。

2. *Tos17* の隣接配列の解析及び 3 次元 PCR スクリーニング

Miyao *et al.* (1998) の方法に従った Suppression PCR により、変異形質と連鎖する *Tos17* バンドの隣接配列を取得した。シーケンシングには Big Dye Terminator sequencing reaction と ABI3100 DNA シークエンサー (ともに Applied Biosystems) を使用した。相同性検索は NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST 検索により行った。さらに、*OsAll1* が破壊された系統が他にないかどうかを、ミュータントパネル約 5 万系統のプール DNA を用い、Takano *et al.* (2001) の方法に従って 3 次元 PCR スクリーニングにより調査した。*OsAll1* に特異的な 2 組のプライマーペアを用いて、1 回目の PCR と nested PCR を行った。プライマーの配列は以下のとおりである；1 回目の PCR プライマー、
OsAll1F1, 5'-TTTGTGTGTGTGTGAAGGTGGG-3';
OsAll1R1, 5'-AGCAAAGCCAATGAGATCGAGG-3';
 nested PCR プライマー、
OsAll1F2, 5'-CGAAGTTTGTGGAGCTGAACACG-3';
OsAll1R2, 5'-CCTTGGTGAAGTTGCAGAAGCC-3'.

3. *OsAll1* の相補性検定

イネアノテーションデータベース RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System) で予測されている *OsAll1* 領域 (遺伝子番号; OJ1276_B06. Autopredgene 41) に開始コドンから約 1.5 kb 上流と終止コドンから約 300 bp 下流までを加えた合計約 6 kb のゲノム配列を、*osall1* 突然変異体に導入した。約 6 kb のゲノム配列は、KOD-plus-DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を添付の説明書に従って用い、nested PCR で増幅した。Nested PCR プライマーペアの上流プライマーには *Apal* サイトを、下流プライマーには *BamHI* サイトをアダプター配列として付加した。増幅したゲノム配列はシーケンシングにより変異がないことを確認後、pZP2H-lac ベクター (Fuse *et al.* 2001) に導入し、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 を用いて *osall1* 突然変異体に形質転換した。形質転換用の *osall1* 突然変異体のカルスは、ヘテロ個体の次代種子をカルス誘導する際に発芽したシュートから DNA を個体別に抽出し、*Tos17* の内部プライマーと遺伝子特異的なプライマーを組合せた PCR 検定により選抜した。カルスの再生は Hiei *et al.* (1994) の方法を変更して用い、T₀ 及び T₁ 植物についてはゲノミックサザンにより遺伝子導入を確認後、形態観察を行った。

4. *osall1* 突然変異体の形態的調査

osall1 突然変異体は、後述のようにホモ接合体が完全不稔である。そのため、ヘテロ個体の次代で分離した突然変異体ホモ型を播種後 7 日目に目視により選抜し、実験に供試した。*osall1* 突然変異体と日本晴を木村氏 B 水耕液 (pH 5.2) で水耕栽培し、播種後 10 日目に幼植物の草

丈、種子根長、最大冠根長、冠根数、側根数及び側根原基数をそれぞれ調査した。側根原基数は、0.01%メチレンブルーで染色した種子根について、光学顕微鏡で調べた。

5. *osall1* 突然変異体の生理的調査

特定の植物ホルモンあるいはシステイン合成経路の異常が原因となって *osall1* 突然変異体の根の形態異常が誘発されていないかどうかを調べるために、8種類の植物ホルモン (IAA, NAA, 2,4-D, ACC, GA, ABA, KIN 及び ZEA) と2種類のアミノ酸 (セリン及びシステイン) を投与した。アミノ酸処理を試みた理由は、結果の項で述べる。播種後7日目の日本晴及び *osall1* 突然変異体を各溶液で処理して7日間生育させ、形態調査と同様の項目を測定し、処理期間中の根の生長率を比較した。

6. Alliinase 様遺伝子の解析

Alliinase 遺伝子はアリウム属で多重遺伝子族であることが知られているため、*OsAll1* 以外のイネ alliinase 様遺伝子を NCBI で BLAST 検索した。系統樹は、推定完全長アミノ酸配列を利用して ClustalW で作成した。さらに、日本晴のカルス、播種後10日目の幼植物の葉及び根から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて全 RNA を抽出し、Ready-To-Go™You-Prime First-strand Beads (Amersham Pharmacia Biothech) で逆転写した。逆転写及び RT-PCR によるイネ alliinase 様遺伝子の発現解析のために、遺伝子特異的プライマーを設計した。遺伝子特異的プライマーはゲノム DNA の混入による増幅を区別できるようにイントロンを含めて設計した。コントロールにはアクチン (Kojima *et al.* 2002) を用いた。遺伝子特異的プライマーは次のとおりである；

*OsAll1*RTF, 5'-TGTTCCGCTCCGTCGCATTGA-3';

*OsAll1*RTR, 5'-GCCATTGCCGGTCTTTGGAT-3';

*OsAll2*RTF, 5'-AGCAGGGCGATATCCTACATC-3';

*OsAll2*RTR, 5'-TGAACGATTAACGCGTAGCTGATC-3';

*OsAll3*RTF, 5'-GAGCACTTTCGTACGTAGAGC-3';

*OsAll3*RTR, 5'-GTGTATATCTACATCATTCGTC-3';

*OsAll4*RTF, 5'-GCAAGTTCATCGAGCTCAAC-3';

*OsAll4*RTR, 5'-CGATATCTAGAACCGAACTT-3'.

反応は全量 15 µl で PCR を行い、KOD-plus-DNA ポリメラーゼを用いた。反応条件は、94°C、2 分の熱処理後、94°C、15 秒の熱変性、55°C、30 秒のアニーリング、68°C、45 秒の伸長反応を 30 サイクル行い、最後に 68°C、6 分の最終伸長反応を行った。

結果

1. *Tos17* でタグされた根突然変異系統の選抜

イネ品種日本晴由来のミュータントパネル R₁ 世代 5,568 系統から根突然変異系統と思われる 236 系統を一次選抜し

た。その後、R₂ 世代の後代検定により、79 系統を根突然変異系統と判断した。このうち、約 60% が短根の表現型を示した (表 1)。短根の程度は、日本晴の根長の 10% 未満から 80% までと様々であった (データ省略)。他に、短側根などの側根異常 (約 13%) や短根毛 (約 8%) が観察された。これらのことから、根突然変異系統の中でも短根の出現頻度が高く、根の長さに関する変異が起こりやすいと推測された。また、単純な比較はできないが、別のイネ系統でアジ化ナトリウム処理による根の突然変異体の出現頻度は 10⁻⁵ 程度であったことから (Suzuki *et al.* 2003)、ミュータントパネルでは根に関する突然変異体の出現頻度が高いように思われる。続いて、79 系統のうち、植物体の枯死などにより連鎖解析できなかった 23 系統を除く 56 系統について、*Tos17* と変異形質との連鎖解析を行った。その結果、系統 NC6949 では、R₁ 及び R₂ 世代あわせて調査した 44 個体において、約 16 kb の *Tos17* のバンドが根の形態変異と共分離したため、*Tos17* でタグされていると判断した。系統 NC6949 での野生型と変異体型の分離比は、R₁ 及び R₂ 世代ともに 3:1 に適合した。しかし、残りの 55 系統では、変異形質と *Tos17* のバンドの間に連鎖は認められなかった (データ省略)。

2. *Tos17* でタグされた遺伝子の単離

根突然変異系統 NC6949 の *Tos17* でタグされた遺伝子が何であるかを調べるために、Suppression PCR によって *Tos17* の隣接配列の解析を行った。隣接配列の相同性検索の結果、*Tos17* は、第 1 染色体短腕に位置する putative alliinase 遺伝子 (BAC クローン OJ1276_B06) の第 3 エキソンに挿入されていることが明らかとなった (図 1A)。我々はこの遺伝子を *OsAll1* と名付けた。*Tos17* プローブを用いた連鎖解析をさらに確認するために、*OsAll1* をプローブとして再度ゲノミックサザン分析を行った (図 1B)。コントロールである日本晴には 12 kb のバンドが、根突然変異系統 NC6949 より分離する変異型ホモ個体では *Tos17* の挿入に起因すると推定される 16 kb のバンドが見られた。一方、形態的には正常な個体では、12 kb の

表 1. 後代検定で確認された根突然変異系統の特徴

特徴	系統数	(%) ¹⁾
短根	45 (18) ²⁾	60.0
長根	2 (1) ²⁾	2.5
冠根異常	6 (2) ²⁾	7.6
側根異常	10 (3) ²⁾	12.7
短根毛	6	7.6
巻き根	3 (1) ²⁾	3.8
細根	5	6.3
その他	2 (1) ²⁾	2.5
合計	79	

¹⁾ 79 系統に対する占有率。

²⁾ () の数字は、突然変異ホモ個体から採種できなかったために、ヘテロ個体で変異を維持している系統数。

バンドをホモにもつ個体及び 12 kb と 16 kb のバンドをヘテロに持つ個体が検出された。これらの結果は、*Tos17* をプローブに用いた連鎖解析結果と一致していた。さらに、*osall1* 突然変異体における *OsAll1* 遺伝子の発現を RT-PCR により解析した結果、この遺伝子の転写産物は葉や根では検出されなかった(データ省略)。これらの結果から、根突然変異系統 NC6949 で見られる根の形態異常は、*Tos17* の挿入による *OsAll1* 遺伝子の破壊に起因していることが強く示唆される。*OsAll1* に特異的なプライマーとプール DNA を用いた 3 次元 PCR スクリーニングにより、*OsAll1* の allele の単離を試みた。これまでに出された 5 万系統についてスクリーニングを行ったが、NC6949 以外の新たな allele を単離することはできなかった(データ省略)。

3. *OsAll1* の相補性検定

系統 NC6949 でみられる根の形態異常が *OsAll1* 遺伝子

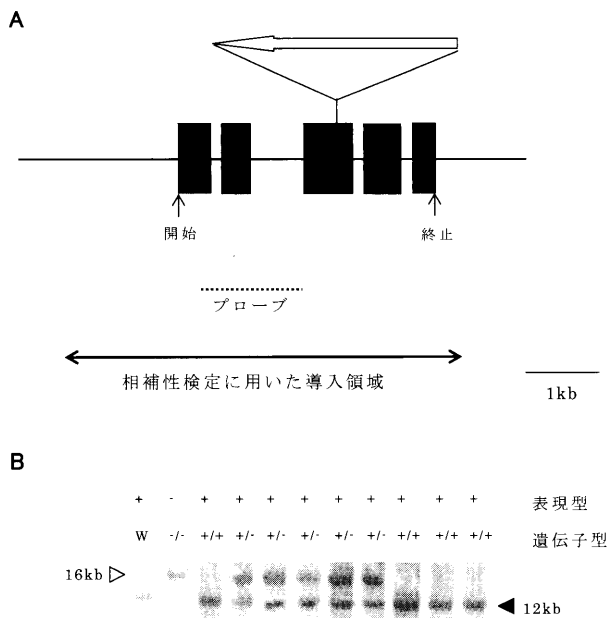


図 1. *OsAll1* 遺伝子の構造と連鎖解析

A は、*OsAll1* 遺伝子の構造を示す。黒いボックスがエクソン、線はイントロンを示す。開始と終止はそれぞれ開始コドン及び終止コドンを示し、白抜き矢印は、*Tos17* の挿入方向を示す。バーは 1 kb。点線で示した位置をプローブとして、B のゲノミックサザン分析に使用した。両矢印で示した断片を *osall1* 突然変異体への形質転換に用いた。B は *OsAll1* をプローブとしたゲノミックサザン分析の結果である。3 μ g のゲノム DNA を *Xba*I で消化した。表現型において、+ は野生型、- は *osall1* 突然変異体型を示す。遺伝子型においては、レーン W はコントロールとしての日本晴、+/+ は野生型ホモ接合体、+/- はヘテロ接合体、-/- は変異体ホモ接合体を示す。ホモ接合体は、弱勢のため 5 個体のバルクで DNA を抽出し、使用した。日本晴には約 12 kb のバンドが(黒い三角)、*osall1* 突然変異体型個体には約 16 kb の位置にバンドが(白い三角)検出された。

の破壊に起因していることを証明するために、約 6 kb の日本晴 *OsAll1* のゲノム配列を *osall1* 突然変異体に導入し、形質転換体を作出した(図 2)。 T_0 植物は 1 個体しか得られていないが、その形質転換体の根は日本晴と同程



図 2. *osall1* 突然変異体の形質転換体

相補性検定のため、プロモーター領域を含む約 6 kb の日本晴 *OsAll1* のゲノム配列を系統 NC6949 から分離した変異体ホモ型に導入し、形質転換体を作出した。写真は、形質転換体と同時期に再分化させた野生型ホモ個体(左)、相補性検定用 *osall1* 形質転換体の T_0 個体(中央)及び形質転換体と同時期に再分化させた *osall1* 突然変異体(右)の順でそれぞれ示す。A は、再分化培地で 3 週間栽培し、その後 2 週間ホルモンフリー培地で生育させた植物体で、B はその根部分の拡大。C は成熟期。バーは 5 cm (A)、1 cm (B) 及び 10 cm (C)。

度まで回復し、種子稔性があった。解析した個体数が1個体であることに問題は残るものの、遺伝子の導入により形質が相補されたことから、系統NC6949で見られた根の形態異常が*OsAll1* 遺伝子の破壊に起因していることが示唆される。

4. *osall1* 突然変異体の形態的特性

系統NC6949のR₂世代の種子50粒を播種し、7日目に*osall1* 突然変異体を目視により選抜し、10日目にこれらの根の形態調査を行った。その結果、調査した10個体全ての*osall1* 突然変異体は、日本晴に比べて少冠根、少側根、矮性の表現型を示すことが観察された(図3A, B及び表2)。さらに、側根原基数を調査したところ、*osall1* 突然変異体では側根原基がほとんど見られず、側根原基の形成過程に異常があると思われた(図3C及び表2)。*osall1* 突然変異体は、成熟期でも草丈が20 cm程度の強い矮性形質を示し、葉身が細く、捲葉になる特徴が見られた。また、開花・出穂期になっても多くの突然変異体で

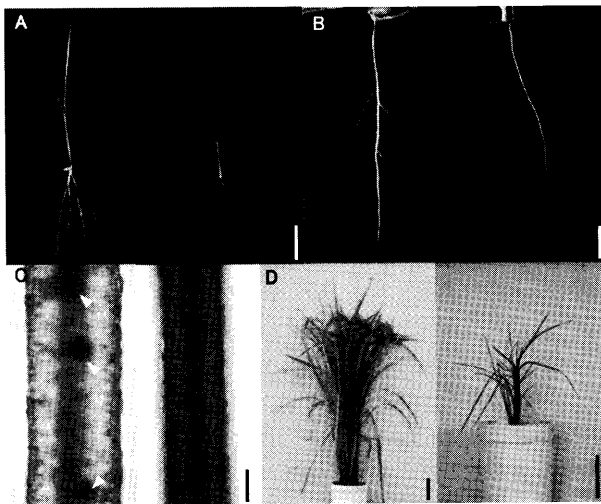


図3. 日本晴及び*osall1* 突然変異体の形態

日本晴(左)及び*osall1* 突然変異体(右)。播種後10日目の幼植物(A)、種子根(B)及び種子根上の側根原基(C)。原基は白い三角で示す。Dは成熟期の植物体。バーは3 cm (A)、1 cm (B)、0.2 mm (C)及び10 cm (D)。

表2. 日本晴及び*osall1* 突然変異体の幼植物の特性調査

特性	日本晴	<i>osall1</i>
草丈(cm)	10.8±0.6	5.7±1.0 ¹⁾
種子根長(cm)	6.5±0.7	5.2±1.0 ¹⁾
最大冠根長(cm)	8.5±0.7	3.2±2.1 ¹⁾
冠根数	4.4±0.8	1.7±0.8 ¹⁾
側根数	57.8±7.6	0.9±0.9 ¹⁾
側根長(mm)	19.7±5.7	1.8±0.8 ¹⁾
側根原基数 ²⁾	2.2±1.8	0.3±0.5 ¹⁾

播種後10日目の幼植物の形態を調査した。(n=10)

¹⁾野生型と比べて1%水準で有意差あり。

²⁾側根原基数は、伸長していない側根原基のみを種子根全体について調べた。

は出穂せず、わずかに出穂した場合には穎花が数個見られるだけの極めて小さな穂をつけ、完全不稔となった(図3D)。

5. *osall1* 突然変異体の生理的特性

植物体内では、各種植物ホルモンの合成、輸送及びシグナル伝達が複雑に影響し合いながら形態に作用している。そこで、8種類の植物ホルモン(IAA, NAA, 2,4-D, ACC, GA, ABA, KIN及びZEA)を投与し(0, 10⁻⁸~10⁻⁵M)、*osall1* 突然変異体の根の形態異常が、特定のホルモンが原因となって誘発されていないかどうかを調べた。また、alliinaseはalliinをallicinに加水分解する過程でalkyl sulfenateと2-aminoacrylateを生成し、2-aminoacrylateは中間産物としてシステイン生合成経路に関わっている。そのため、この経路の中間及び最終産物である2種類のアミノ酸(セリン及びシステイン)を投与し(0, 10⁻⁷~10⁻⁴M)、システイン生合成経路の異常が根の形態異常を引き起こしていないかどうかを調べた。その結果、どの処理区でも*osall1* 突然変異体の根の形態には目立った変化はなく、7日目以降の処理では野生型と同程度までには回復しないことが分かった(データ省略)。

6. イネ*alliinase* 様遺伝子の解析

データベース解析より、*alliinase* 様遺伝子は今回解析に用いた*OsAll1*以外にもイネゲノム中に3箇所あることが分かった。そこで、第1染色体長腕上にタンデムに並んでいる2つを*OsAll2*及び*OsAll3*(NCBIアクセッション番号; AK072165及びAK064938)、第5染色体短腕に位置している配列を*OsAll4*(AK071687)とそれぞれ名付けた。

これら4つの配列を他種の*alliinase* 様遺伝子と比較するために、ClustalWを用いて近隣結合法による系統樹を作成した(図4A)。その結果、*OsAll1*と*OsAll4*が同じグループに分類され、第1染色体長腕上にタンデムに並んでいる*OsAll2*及び*OsAll3*は、*OsAll1*とは別のグループに分類されることが分かった。また、*OsAll1*のグループは、*OsAll2*のグループに比べて、AAM14394(シロイヌナズナ)やAAM69848(タルホコムギ)の配列に近く、アリウム属の*alliinase* 様配列全般と遠かった。

次に、イネの4つの*alliinase* 様遺伝子それぞれに特異的なプライマーを用いたRT-PCRにより、播種後10日目の*alliinase* 様遺伝子の発現を解析した(図4B)。その結果、イネの4つの*alliinase* 様遺伝子は独自の遺伝子発現様式を示すことが明らかとなった。*OsAll1*の遺伝子は、カルスで強く、葉ではわずかに発現していることが明らかとなった。一方、*OsAll1*遺伝子の転写産物は根では検出されなかった。*OsAll4*の転写産物は、解析したいずれの組織でも検出されなかった。*OsAll2*及び*OsAll3*は葉で強く発現していることが明らかとなった。

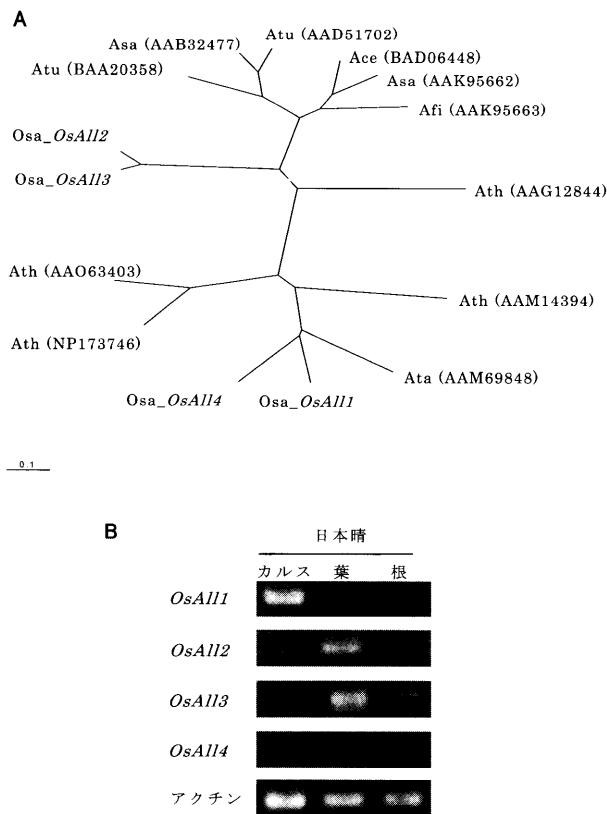


図 4. Alliinase 様遺伝子の解析

A は、近隣結合法で作成した Alliinase 様遺伝子の系統樹。イネ及び他の植物の推定完全長アミノ酸配列を用いて ClustalW で作成した。植物種は次のとおりである：Ace, *Allium cepa* (タマネギ)；Afi, *Allium fistulosum* (ネギ)；Asa, *Allium sativum* (ニンニク)；Ata, *Aegilops tauschii* (タルホコムギ)；Ath, *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)；Atu, *Allium tuberosum* (ニラ)；Osa, *Oryza sativa* (イネ)。アリウム属は、イネ alliinase 様遺伝子に近縁な配列のみを表示した。() 内の番号は NCBI のアクセッション番号を示す。B は RT-PCR によるイネ alliinase 様遺伝子の発現解析。それぞれの alliinase 様遺伝子に特異的なプライマーを用い、コントロールとしてアクチンを使用した。全 RNA は、日本晴のカルス及び播種後 10 日目の日本晴の葉及び根から抽出した。

考察

本研究では、5,568 系統のミュータントパネルから、根変異系統と思われる 236 系統を一次選抜したが、後代検定により確認できた根突然変異系統は 79 系統のみであった。イネ幼苗期の根の伸長は種子の生理的状态や栽培環境等の影響を受けるとみられ、このことが一次選抜で誤判定を招いた原因の一つであると思われた。さらに、連鎖解析した 56 系統のうち、*Tos17* でタグされた系統は 1 系統 (NC6949) だけであった (約 1.8%)。ミュータントパネル由来の突然変異体のうち *Tos17* の挿入に起因するものは 5 ~ 10% であると報告されているが (Hirochika 2001), 本研究の値は報告されているよりも若干低かった。

本研究の根突然変異体では、*Tos17* の挿入により *OsAll1*

の機能が破壊されていることが考えられる。イネには 4 個の alliinase 様遺伝子が存在し、近隣結合法で作成した系統樹では 2 つのグループに大別されることが明らかとなった。RT-PCR による alliinase 様遺伝子の発現解析の結果では、それぞれの遺伝子は独自の発現様式を示していたが、大別されたグループ内の遺伝子間では比較的似た発現様式を示していた。しかしながら、*osall1* 突然変異体では顕著な根の形態異常が観察されたことから、根の形態形成などについて *OsAll1* の機能が他のイネ alliinase 様遺伝子では補償されないことが示唆された。本論文では、*osall1* 突然変異体の根の形態に焦点を当て解析・議論したが、*OsAll1* 遺伝子の機能解明には詳細な遺伝子発現様式の解明や *osall1* 突然変異体の根以外の組織・器官における形質評価などの総合的な解析が必要であると考えられる。

少冠根及び少側根の *osall1* 突然変異体は、側根原基の形成過程に異常があると思われた。側根形成開始の鍵となるシグナルはオーキシンであり (Casimiro *et al.* 2001), オーキシンは、生合成、輸送及び情報伝達を通じて植物器官に作用している。シロイヌナズナではこれまでに、オーキシン生合成経路の異常により側根原基の生長・伸長が抑制されている *alf3* (Celenza *et al.* 1995), 側根の形成を促進するオーキシングナルに関与する NAC1 (Xie *et al.* 2000) などが報告され、オーキシン以外でも ABA が側根の発達を阻害することが報告されている (Smet *et al.* 2003)。さらに、サイトカイニン根のオーキシンレベルを高め、オーキシンがエチレンの発生を促し、エチレンの作用で根の伸長が抑制されると考えられている (副島 1998)。このように、植物ホルモンは互いに影響し合い、根の形態に作用している。また、リン濃度が低下しても側根形態に変化を示さないシロイヌナズナの *lpr1* 突然変異体の例もあるように (López-Bucio *et al.* 2005), 栄養成分もまた根の形態に関与していることが知られている。本研究の *osall1* 突然変異体における 8 種類の植物ホルモンの投与実験ではこの突然変異体の形態異常が回復しないことから、少なくとも *OsAll1* は植物ホルモン合成経路には関与しないことが示唆された。*OsAll1* が植物ホルモン情報伝達系や栄養成分などの既知の側根形成機構に関わるのか、もしくは全く新たな根の形態形成機構に関与するかについては、さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。

Alliinase は維管束鞘細胞に存在する酵素で、粉碎などにより細胞が破壊されると葉肉貯蔵細胞に存在する alliin を alliin に加水分解する (Nock and Mazelis 1986)。この alliin には抗菌作用や血圧低下作用があるとされており、タマネギやニンニクでよく研究されている。Alliin 加水分解の中間産物として、alkyl sulfenate と 2-aminoacrylate が生成され、alkyl sulfenate はアリウム属特有の alliin 生成の反応系に進み、2-aminoacrylate は中間産物としてシステイン生合成経路に関わっている。そのため、alliinase は

S-alk (en) yl-L-cysteine sulfoxide lyase という別名も持っている (Manabe *et al.* 1998). そこで, *osall1* 突然変異体にシステイン生合成経路の中間産物及び最終産物である2種類のアミノ酸を投与したが, *osall1* 突然変異体の根の形態は回復しなかった. イネやシロイヌナズナではalliinaseの基質であるalliinの存在は報告されていないため, *OsAll1* がアリウム属で報告されているalliinaseと同じ働きをしているかどうかは, 現在はまだ分からない.

本研究では, *OsAll1* の破壊によりイネの根の形態異常が引き起こされることを遺伝学的手法で示すことができた. しかし, alliinaseの酵素活性の測定を行っていないこともあり, 根の形態異常につながる生理的なメカニズムを明らかにできていない. 今後は, *osall1* 突然変異体の生化学的解析や, イネalliinase様遺伝子間での相互作用を調査することが必要である. イネにおけるalliinaseの研究は本報告が初めてであり, *osall1* 突然変異体は, イネにおけるalliinaseの機能の解明にもつながる可能性を持つ, 非常に面白い材料であるといえる. さらに, *OsAll1* の機能解明は, 根系育種の基盤となる根の形態の形成機構についての新たな情報をもたらすと期待される.

謝辞

本研究は, 農林水産省「イネゲノムプロジェクト」の「ミュータントパネルを利用した遺伝子機能の解析」の助成を受けて実施した. 本研究の遂行に当たり, 独立行政法人農業生物資源研究所の皆様には, 技術的なご指導をいただいた. さらに, 香川大学農学部植物育種学研究室の皆様には実験の遂行にご協力いただいた. ここに記して心からの感謝の意を表する.

引用文献

- Agrawal, G.K., M. Yamazaki, M. Kobayashi, R. Hirochika, A. Miyao and H. Hirochika (2001) Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene. *Plant Physiol.* 125: 1248–1257.
- Casimiro, I., A. Marchant, R.P. Bhalerao, T. Beeckman, S. Dhooge, R. Swarup, N. Graham, D. Inze, G. Sandberg, P.J. Casero and M. Bennett (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* 13: 843–852.
- Celenza Jr, J.L., P.L. Grisafi and G.R. Fink (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Develop.* 9: 2131–2142.
- Chhun, T., S. Taketa, S. Tsurumi and M. Ichii (2003a) The effects of auxin in lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 39: 161–170.
- Chhun, T., S. Taketa, S. Tsurumi and M. Ichii (2003b) Interaction between two auxin-resistant mutants and their effects on lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 54: 2701–2708.

- Debi, B.R., J. Mushika, S. Taketa, A. Miyao, H. Hirochika and M. Ichii (2003) Isolation and characterization of a short lateral root mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 165: 895–903.
- 副島 洋 (1998) 根とサイトカイニン, “根の事典” 根の事典編集委員会編, 朝倉書店, 東京. 142–144.
- Fuse, T., T. Sasaki and M. Yano (2001) Ti-plasmid vectors useful for functional analysis of rice genes. *Plant Biotechnol.* 18: 219–222.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* 6: 271–282.
- Hirochika, H. (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Current Opinion in Plant Biol.* 4: 118–122.
- Hirochika, H., K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa and M. Kanda (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7783–7788.
- Ichii, M. and M. Ishikawa (1997) Genetic analysis of newly induced short-root mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 47: 121–125.
- 一井眞比古 (1995) 水耕法, “植物遺伝育種学実験法” 谷坂隆俊編, 朝倉書店, 東京. 145–146.
- Inukai, Y., T. Sakamoto, M. Ueguchi-Tanaka, Y. Shibata, K. Gomi, I. Umemura, Y. Hasegawa, M. Ashikari, H. Kitano and M. Matsuoka (2005) *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an auxin response factor in auxin signaling. *The Plant Cell* 17: 1387–1396.
- Inukai, Y., M. Miwa, Y. Nagato, H. Kitano and A. Yamauchi (2001a) *RRL1*, *RRL2* and *CRL2* loci regulating root elongation in rice. *Breed. Sci.* 51: 231–239.
- Inukai, Y., M. Miwa, Y. Nagato, H. Kitano and A. Yamauchi (2001b) Characterization of rice mutants deficient in the formation of crown roots. *Breed. Sci.* 51: 123–129.
- Kitano, H. and Y. Futsuhara (1989) Inheritance and gene expression of a root growth inhibiting mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Proc. of the 6th Intl. Congr. of SABRAO*: 349–352.
- Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, T. Sasaki, T. Araki and M. Yano (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* 43: 1096–1105.
- López-Bucio, J., E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, A. Pérez-Torres, R.A. Rampey, B. Bartel and L. Herrera-Estrella (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in Arabidopsis. Identification of *BIG* as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* 137: 681–691.
- Manabe, T., A. Hasumi, M. Sugiyama, M. Yamazaki and K. Saito (1998) Alliinase [S-alk (en) yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive) Purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *Eur. J. Biochem.* 257: 21–30.
- Miyao, A., K. Tanaka, K. Murata, H. Sawaki, S. Takeda, K. Abe, Y. Shinozuka, K. Onosato and H. Hirochika (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *The Plant Cell* 15: 1771–1780.
- Miyao, A., M. Yamazaki and H. Hirochika (1998) Systematic screening of mutants of rice by sequencing retrotransposon-insertion

- sites. *Plant Biotechnol.* 15: 253–256.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
- Nock, L.P. and M. Mazelis (1986) The C-S lyases of higher plants: preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*). *Archives of Biochem. and Biophys.* 249: 27–33.
- Smet, I.D., L. Signora, T. Beeckman, D. Inze, C.H. Foyer and H. Zhang (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant J.* 33: 543–555.
- Suzuki, N., S. Taketa and M. Ichii (2003) Morphological and physiological characteristics of a root-hairless mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* 255: 9–17.
- Takano, M., H. Kanegae, T. Shinomura, A. Miyao, H. Hirochika and M. Furuya (2001) Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *The Plant Cell* 13: 521–534.
- Tanaka, K., K. Murata, M. Yamazaki, K. Onosato, A. Miyao and H. Hirochika (2003) Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall. *Plant Physiol.* 133: 73–83.
- Xie, Q., G. Frugis, D. Colgan and N-H. Chua (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Develop.* 14: 3024–3036.
- Yao, S-G., S. Taketa and M. Ichii (2002) A novel short-root gene that affects specifically early root development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 163: 207–215.

Breeding Research 7: 171–178 (2005)

Molecular Genetic Analysis of a *Tos17*-Tagged Mutant Line Related to Root Morphology in Rice

Junko Iwao-Mushika¹⁾, Takahisa Yuo¹⁾, Shin Taketa¹⁾, Akio Miyao²⁾, Hirohiko Hirochika²⁾ and Masahiko Ichii¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

²⁾ National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Although plant roots are one of the most important organs for crop cultivation, root studies lag behind due to various difficulties. The objective of the present study was to isolate genes related to root morphology using ‘mutant panel’, rice retrotransposon *Tos17*-insertion mutant lines. First, we grew 5,568 R₁ lines regenerated from tissue culture of *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare in water culture, and screened the lines which segregated root mutants at the seedling stage. Then, 56 root mutant lines that were confirmed by the progeny test, were analyzed by genomic Southern hybridization using *Tos17* as a probe. As a result of linkage analysis, we obtained one *Tos17*-tagged mutant line, NC6949. The phenotype of this mutant line was as follows: dwarf, narrow leaves and reduced numbers of crown roots and lateral roots. In this line, *Tos17* was inserted in the third exon of the putative alliinase gene on the short arm of chromosome 1 and the presence of this insertion cosegregated with the mutant phenotype. We designated the gene tagged by *Tos17*, as *OsAll1* (*Oryza sativa* alliinase 1). In a complementary experiment in which a 6kb genomic fragment containing alliinase/ORFs and its putative promoter region was introduced into the *osall1* mutant, the root morphology in the transgenic plant was rescued. Based on these observations, it was concluded that the abnormal root morphology of the *osall1* mutant obtained in this study was caused by knock out of the *OsAll1* gene. In the rice genome, at least 3 other alliinase-like gene sequences are present and form a multigene family, but their expression patterns were different, suggesting that *OsAll1* was functionally differentiated from the others.

Key Words: *Oryza sativa* L., retrotransposon, mutant panel, alliinase, crown root, lateral root.
