

博士論文（要約）

イネにおける葉の軸方向の形態形成に関する 遺伝学的解析

本田 恵倫子

イネにおける葉の軸方向の形態形成に関する 遺伝学的解析

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

平成 26 年度博士課程進学 本田 恵倫子

指導教員 東京大学 伊藤 純一

目次

第1章 序論

第2章 葉の側方方向の形態形成に異常を持つ *lsy1* 変異体の解析

2-1 緒言

2-2 材料および方法

2-3 結果

2-4 考察

第3章 イネ **WOX3** 遺伝子の葉の形態形成における機能の解析

3-1 緒言

3-2 材料および方法

3-3 結果

3-4 考察

第4章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 総合考察 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第6章 摘要 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

謝辞 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

引用文献 学術雑誌論文として出版する計画がある内容に関する文献のため公表できない。5年以内に出版予定。

第1章 序論

世界の人口は増加を続け、現在 76 億人に上っている。世界の人口増加に伴う食料問題を解決する手段として、高収量の品種の登場が期待されている。かつて「緑の革命」では、半矮性変異体である *semi-dwarf1(sd1)* を用いた品種改良によりイネおよびコムギの倒伏性が克服され、収量が飛躍的に向上した (Khush, 2001)。

一方で、作物の収量性は炭水化物の貯蔵（シンク）量と光合成による炭水化物合成（ソース）量によって決定されるため、シンク能およびソース能の向上による品種改良も試みられてきた。このうちソース能、すなわち光合成効率は植物の葉の形態によって大きく左右される。*NAL1/GPS* 遺伝子は高収量品種タカナリにおいてその収量性に寄与する遺伝子として特定され、その変異体 *nal1* は細葉の形質を示した (Takai *et al.*, 2013)。また、半矮性および直立葉の形態を示す *osdwarf4-1* 変異体は、通常の 2 倍の栽植密度で栽培することで、原品種である日本晴と比較して単位面積当たり 1.3 倍の収量を得た (Sakamoto *et al.*, 2006)。これらの研究結果が示すように、葉の形態形成の制御機構の解明は、育種において重要な課題であると考えられる。

葉の初期分化過程

植物の葉は茎頂分裂組織（shoot apical meristem, SAM）の側面部(peripheral zone)に leaf founder cell と呼ばれる未分化な細胞が葉の始原細胞として決定されることによって分化が始まる。シロイヌナズナでは、*KNOTTED-like from Arabidopsis thaliana/BREVIPEDICELLUS* (*KNAT1/BP*)、*KNAT2*、*KNAT6*、*SHOOT MERISTEMLESS(STM)* などの *KNOX* 遺伝子と呼ばれるホメオボックス遺伝子が、SAM とその周縁部で発現し、細胞の未分化な状態を維持しているが (Long *et al.*, 1996, Endrizzi *et al.*, 1996)、葉原基では *KNOX* 遺伝子の発現が抑制される。シロイヌナズナでは *KNOX* の発現を抑制する因子として、*ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* と *BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1)*、*BOP2* が知られている。*AS1* は MYB ドメインをもつ転写因子であり、*LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* ドメインをもつ *AS2* (Iwakawa *et al.*, 2002) および LBD ファミリーに属する *JAGGED LATERAL ORGANS(JLO)* と 3 量体を形成し、*KNOX* 遺伝子を抑制する (Byrne *et al.*, 2000, Semiari *et al.*, 2001, Guo *et al.*, 2008)。*as1* および *as2* の変異体では葉原基の形成過程に異常は見られないが、*jlo* 変異体では葉序に異常が見られ、葉原基のラジアル化や発生の停止が起こる (Borghi *et al.*, 2007, Rast and Simon, 2012)。*BOP1*、*BOP2* は BTB/POZ ドメイン、

NPR ドメイン、Ankyrin repeat をもつ転写因子であり、機能が欠失すると *KNAT1/BP* の発現領域が拡大する。また、*BOP1*、*BOP2* の過剰発現体では *KNAT1/BP* の発現が抑制される (Norberg *et al.*, 2005, Ha *et al.*, 2007, Jun *et al.*, 2010, Ha *et al.*, 2010)。*bop1-1* 変異体では子葉原基の発達が遅れ、特に向軸側で未分化な状態が持続する (Ha *et al.*, 2003)。

更に、葉原基は初期発生過程において、頂部-基部軸、向軸-背軸、そして中央-側方軸の3方向の軸を獲得し、それぞれの軸に沿って異なる組織分化が起こる (Sylvester *et al.*, 1996)。これら3つの軸に沿った形態形成によって葉の最終的な形が決定される。

葉の向背軸方向の形態形成

植物の葉は通常、光合成の効率を最大にするために扁平な構造をとり (Govaerts *et al.*, 1996)、この扁平な形態の形成には向背軸方向の極性が重要である。キンギョソウの *PHANTASTICA* (*PHAN*) 遺伝子は MYB ドメインをもつ転写因子である (Waites *et al.*, 1998)。その機能欠失変異体である *phan* は葉身全体が背軸化した極性の無い棒状の葉を形成するほか、葉の向軸側が部分的に背軸化することにより、新たに形成された向背軸境界において異所的な葉身形成が見られる。このことから、葉の扁平な形態の形成には向背軸方向の極性、特にそれに伴う向背軸側の運命を持った細胞層の重なりが重要であることが明らかになった (Waites and Hudson 1995)。

N 末端側にホメオドメインおよびロイシンジッパーをもつ Class III ホメオドメインロイシンジッパー (*HD-ZIPIII*) 転写因子は向軸側の決定に関わる因子であると考えられている。シロイヌナズナの *phabulosa* (*phb*) および *phavoluta* (*phv*) の優性変異体は *phan* と同様、向背軸極性のない棒状の葉を形成するが、*phan* とは逆に葉身全体が向軸側化する

(McConnel and Barton, 1998, McConnel *et al.*, 2001)。 *PHB*、*PHV*、および近縁の *REVOLUTA* (*REV*) は *HD-ZIPIII* 遺伝子であり (McConnel *et al.*, 2001, Prigge *et al.*, 2005)、これらのコード領域内には、小分子 RNA の1つである *microRNA165* (*miR165*) および *miR166* の標的配列が存在する (Kidner and Martienssen 2004, Juarez *et al.*, 2004a)。 *miR165* および *miR166* は背軸側で発現し、*HD-ZIPIII* mRNA を分解することで *HD-ZIPIII* の発現領域を葉の向軸側に限局させる働きを担っていると考えられている

(Kidner and Martienssen 2004, Mallory *et al.*, 2004)。イネの *HD-ZIPIII* 遺伝子である *OSHB1*, *OSHB2*, *OSHB3*, *OSHB4* はシロイヌナズナの *HD-ZIPIII* 遺伝子のホモログであり、シロイヌナズナの *HD-ZIPIII* 遺伝子と同様に葉の向軸側領域で発現する (Itoh *et al.*, 2008a)。

一方、シロイヌナズナの *KANADI*, *YABBY*, *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* (*ARF3*)

/ETTIN (*ETT*) および *ARF4* 遺伝子は、背軸側の決定に関わる因子である。

KANADI (*KAN*) は GARP モチーフをもち、シロイヌナズナにおいて葉原基の背軸側で背軸側形成に関与する (Eshed *et al.*, 2001, Kerstetter *et al.*, 2001)。イネの *KAN* 遺伝子である *SHALLOT-LIKE1/ROLLED LEAF9* 遺伝子、トウモロコシの *KAN* 遺伝子である *milkweed pod1* 遺伝子も同様に葉の背軸側決定に働く (Zhang *et al.*, 2009a, Yan *et al.*, 2008, Candela *et al.*, 2008)。

YABBY 遺伝子は *YABBY* ドメインをもつ転写因子をコードし、シロイヌナズナの *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*)、*YAB2*、*YAB3*、*YAB5* の 4 つの遺伝子は背軸側および向背軸境界の決定に関わる (Siegfried *et al.*, 1999, Bowman 2000, Eshed *et al.*, 2004)。一方でトウモロコシの *YABBY* 遺伝子である *zyb4* および *zyb9* は葉の向軸側で発現し、*HD-ZIPIII* 遺伝子である *rolled leaf1* の下流で向軸側形成を担う (Juarez *et al.*, 2004b)。このように、向背軸方向の形態形成における *YABBY* 遺伝子の役割は植物種によって異なっている (Sarojam *et al.*, 2010)。

ARF3/ETT および *ARF4* 遺伝子は *AUXIN RESPONSE FACTOR* 遺伝子ファミリーに属する遺伝子であり、シロイヌナズナの *arf3 arf4* 二重変異体は葉が向軸側に巻く表現型を示す (Pekker *et al.*, 2005)。*ARF3* および *ARF4* は小分子 RNA の 1 種であるトランスアクティング siRNA (trans-acting small interfering RNA, ta-siRNA) の認識配列を持ち、その mRNA は特異的な tasiRNA である tasiR-ARF との結合を介して分解される (Fahlgren *et al.*, 2006, Hunter *et al.*, 2006)。*ARGONAUTE 7* (*AGO7*) と *Dicer-like protein 4* (*DCL4*) は、tasiR-ARF の生成に関与する遺伝子である。シロイヌナズナの *AGO7* は向軸側に発現し、*ARF3/ETT* と *ARF4* の mRNA 分解に関与することで *ARF3/ETT* と *ARF4* の発現を背軸側に限定する (Fahlgren *et al.*, 2006, Hunter *et al.*, 2006, Montgomery *et al.*, 2008)。

シロイヌナズナの *AS1* は *PHAN* のオルソログであり、Lansberg 背景の変異体ではキンギョソウの *phan* と同様に背軸側化した棒状の葉が見られるが (Xu *et al.*, 2003)、*AS1* および *AS2* は背軸側形成に関わる *YAB5*、*KAN2*、*ARF3/ETT* の発現を抑制することで向軸側の決定に関与する (Iwakawa *et al.*, 2007)。*ARF3/ETT* 遺伝子は *AS1*、*AS2* によってメチル化レベルの制御を受けることが知られている (Iwasaki *et al.*, 2013)。また、シロイヌナズナの *KAN1* は *AS2* のプロモーターに結合し、*AS2* の発現を直接抑制する (Wu *et al.*, 2008)。

これらの葉の向軸側および背軸側を決定する因子は、初期葉原基の向軸側および背軸側において発現し、その境界で互いを抑制しあうことで発現領域を維持し、葉の向軸および背軸特異的な構造を形成する。シロイヌナズナでは *HD-ZIPIII* 遺伝子である *PHB* および

PHV 遺伝子が向軸側で発現し、背軸側決定に関与する *KANADI* および *YABBY* 遺伝子の発現を抑制している (Eshed *et al.*, 2004)。

葉の中央-側方軸方向の形態形成

葉の発生過程における向背軸方向の遺伝的制御に関する研究と比較すると、中央-側方軸の遺伝的制御機構については、不明な部分が多い。シロイヌナズナの側方方向の形態形成に関与する遺伝子として初めて報告された *PRESSED FLOWER* (*PRS/WOX3*) は、N 末端側に DNA に結合するホメオドメインを、C 末端側に *WUS-box* モチーフをもつ *WUSCHEL*-like *HOMEODOMAIN* (*WOX*) サブファミリーに属するタンパク質をコードする (Matsumoto and Okada, 2001)。*PRS/WOX3* は花器官原基において、花卉や萼、雄蕊などの原基の側方先端部分で発現する (Matsumoto and Okada, 2001)。*prs* 変異体の花では側方に位置する萼が欠失し、向背軸側の萼は側方の細胞層の数が減少する。また托葉形成の異常、側方の雄蕊欠失などの側方器官の異常が観察される (Nardmann *et al.*, 2004)。

また、シロイヌナズナでは *PRS/WOX3* と *WOX1* が協働して葉の側方方向の形態形成に関わっている。シロイヌナズナでは *prs* 単独、または *wox1* 単独の変異では葉の表現型に異常が見られないが、*prs wox1* 二重変異体では萼、花卉の幅が細くなることに加えて、葉の幅が細くなる (Vandenbussche *et al.*, 2009, Nakata *et al.*, 2012)。また、葉縁における向背軸方向の細胞層数が野生型と比較して増加する (Nakata *et al.*, 2012)。葉の最も新しい葉原基から *n* 番目に古い葉原基 *P_n* と定義したとき、*PRS/WOX3* は *P1*、*P2* 葉原基の葉縁で発現し、*P3* から *P6* の葉原基では側方領域のうち、向軸側表面と背軸側表面の細胞層に挟まれた中央領域 (middle domain) で発現が見られる (Matsumoto and Okada, 2001, Nakata *et al.*, 2012)。これらのことから、シロイヌナズナにおいて *PRS/WOX3* 遺伝子は花器官だけでなく葉の側方方向の形態形成を担っていると考えられている。一方、タルウマゴヤシではシロイヌナズナ *WOX1* のオルソログである *STENOFOLIA* (*STF*) の機能喪失変異体が *prs wox1* 二重変異体と同様の表現型を示し (Tadege *et al.*, 2011)、*PRS* のオルソログである *LOOSE FLOWER* (*LFL*) は、花の形態形成にのみ関与する (Niu *et al.*, 2015)。また、ペチュニア、タバコ、マメの *WOX1* オルソログである *MAEWEST* (*MAE*)、*LAM1*、*LATHYROIDES* の機能喪失変異体も *prs wox1* 二重変異体と同様の表現型を示す (Vandenbussche *et al.*, 2009, Tadege *et al.*, 2011, Zhuang *et al.*, 2012)。これらの結果から、真正双子葉植物の葉の中央-側方方向の形態形成には *WOX1* が主に関与し、一部の種のみ *PRS/WOX3* が *WOX1* と協働している。

また、葉の中央-側方方向の形態形成は初期葉原基の向背軸性の確立と密接に関わってい

るとされている。葉の伸長は葉原基の向軸領域と背軸領域近接した場所でおこると考えられており (Waites and Hudson, 1995)、実際に葉原基の向軸性あるいは背軸性が失われると側方方向への葉の伸長が阻害される (Waites and Hudson, 1995, Eshed *et al.*, 2001, Eshed *et al.*, 2004)。シロイヌナズナでは *WOX1* 遺伝子と *PRS/WOX3* 遺伝子が葉原基側方の中央領域で向軸側および背軸側に特異的な遺伝子群を抑制することにより、葉を側方方向に伸長させる (Nakata *et al.*, 2012, Nakata and Okada, 2012)。また、タルウマゴヤシの *STF/WOX1* は、向軸側のアイデンティティを司る遺伝子 *AS2* を直接抑制することが知られている (Zhang *et al.*, 2014)。

イネ科植物の葉の形態の特徴

イネ科植物の葉は、大きく葉身と葉鞘の2つの部分に分けられる (図 1-A)。頂部側にある葉身は光合成を主とする部分で、中央部に中肋 (midrib) と呼ばれる筋状の構造を持つ。基部側にある葉鞘は植物体を物理的に支持する部分で、内部には多くの空隙が存在する。葉鞘は内側の若い葉を包み込むような構造をしており、葉縁は葉身と異なり、薄い膜状の構造を持つ。葉身-葉鞘境界にはラミナジョイントと呼ばれる葉緑体を含まない組織が存在し (図 1-B)、この組織が局所的に伸長することで葉身は背軸側に折れ曲がり、太陽光を効率よく受けることができるようになる。多くのイネ科植物の葉身-葉鞘境界の向軸側には、葉舌や葉耳といった特徴的な器官が存在する (図 1-C)。葉舌は葉鞘の最先端部から突出する膜状の構造物で、通常左右2つに分かれている。葉耳はラミナジョイントと葉鞘の境目に存在する一対の突起物で、毛をもつのが特徴である。このようにイネ科植物の葉は複雑な構造を持つが、他の植物と同様に一つの葉原基としてその発生を開始する。

イネの葉の発生と形態形成

イネ科植物では P1 葉原基は SAM の側面の小さな突起として現れるが、その細胞分裂活性は SAM よりもはるかに高くなっている (Itoh *et al.*, 2000)。また、P1 期から P2 期にかけて、SAM を包みこむように側方方向に成長する (Itoh *et al.*, 2005)。この特徴的の初期葉原基の発生は、双子葉植物とは大きく異なる点であり、中央側方方向の形態形成はイネ科では極めて初期に行われることが推測される。P1 以降の葉原基では、中肋の形成に関与する *DROOPING LEAF (DL)* の発現が中央領域で観察され (Yamaguchi *et al.*, 2004)、P2 葉原基はフード型を形成し、P3 葉原基では葉縁が伸長して SAM を包囲するようになる。P3 葉原基では葉身-葉鞘境界が分化し、その後葉舌原基が見られるようになる。

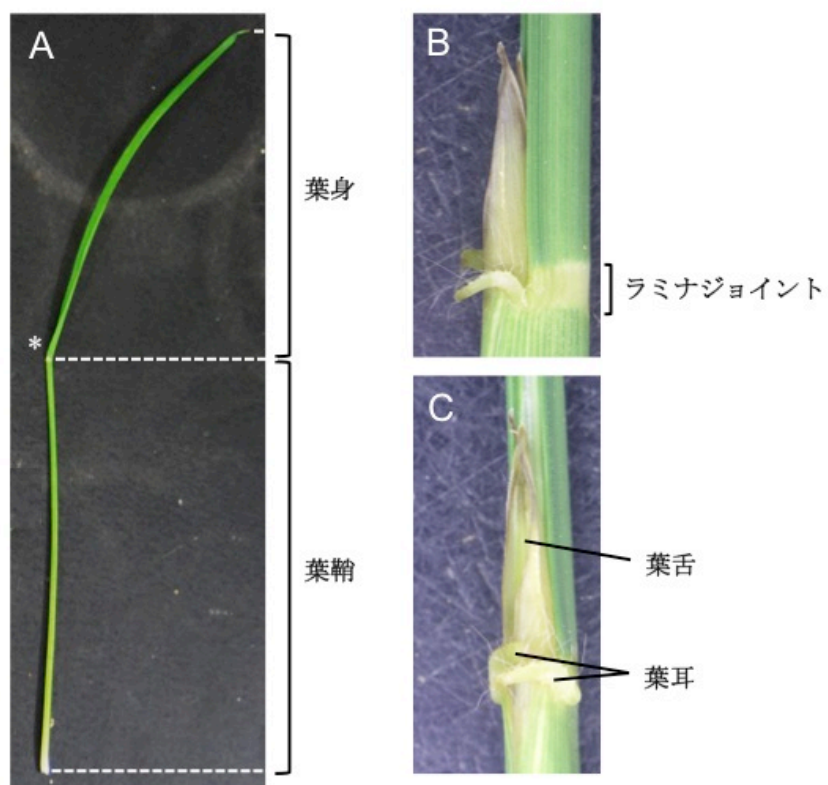


図 1-1 イネの葉の構造

(A) 野生型の葉の構造。星印は葉身-葉鞘境界を示す。
 (B, C) 葉身-葉鞘境界の構造。

更に後期の過程では葉身-葉鞘境界部にラミナジョイントが形成される。P3 葉原基では大維管束の配置が完了し、中肋部の維管束では木部と篩部が認められるようになり、頂部から基部に向かって小維管束の形成が開始される。頂部で表皮細胞の分化が開始されるのもこの時期である (Kaufman, 1959)。P4 葉原基では葉身が基底部で盛んに細胞分裂を行い、長軸方向への急速な伸長が起こる (Kaufman, 1959)。P5 葉原基では葉鞘が急速な伸長を初め、頂部から基部方向に向かって中肋部および葉鞘部の通気腔が形成される。また機動細胞、気孔などの特異的な表皮組織が分化する。さらに維管束の成熟が完了すると共に、維管束の周辺で厚壁細胞が分化する。P6 になると葉の構造はおおむね完成し、ラミナジョイントで葉身の屈曲が見られるようになる (Itoh *et al.*, 2005)。

以上の葉の発生過程は生育ステージを通じておおむね保存されているが、イネでは発芽後最初期に展開する第1葉と第2葉の形態は、それ以降の葉とは異なる。第1葉は非常に小さく、大部分が葉鞘様の組織からなり、先端でのみ葉身様の組織が見られる (星川, 1975)。第2葉は葉身と葉鞘の両方が発達するが、葉身は小さく中肋を持たない。

このように、イネの葉は複雑な発生過程を経て特有の形態に分化するが、その遺伝的制御機構についての理解は未だ十分ではない。本研究では、イネ科植物の葉の形態形成に特徴的な表現型を示す複数の変異体を用いて、葉の側方方向ならびに長軸方向の形態形成機構の理解を深めることを目的に解析を行った。第2章、第3章では、*leaf lateral symmetry 1 (lsy1)* と *nal2/3* 変異体を用いた、葉の側方方向の形態形成についての検討を行った。第4章では、*needle1 (ndl1)* 変異体を用いた、葉の長軸方向の形態形成についての検討を行った。

第2章 葉の側方方向の形態形成に異常を持つ *lsy1* 変異体の解析

2-1 緒言

序論でも述べた通り、葉の発生過程における中央-側方軸の遺伝的制御機構についての報告は少ない。しかし、その中でもトウモロコシの *NARROW SHEATH1* (*NS1*) と *NS2* (*NS2*) は比較的古くから葉の中央-側方方向の形態形成に関わる遺伝子とし解析が進められてきた (Nardmann *et al.*, 2004)。*NS1* と *NS2* は共に *WOX3* 遺伝子のホモログであり、*NS1* および *NS2* 遺伝子の単独の変異では表現型が現れないが、*ns1 ns2* 二重変異体では細い葉を分化する。*ns1 ns2* では将来葉縁になる部分の leaf founder cell の細胞数が減少し、成熟葉では葉縁を含む葉の側方領域を欠失する (Scanlon *et al.*, 1996)。また、*NS1*、*NS2* 遺伝子は葉原基の葉縁先端で発現し、SAM の P0 葉原基 (leaf founder cell) でも発現が見られる他、花器官原基の先端でも発現が見られる (Nardmann *et al.*, 2004)。これらのことから、*NS1*、*NS2* は分裂組織からの葉原基や花器官の分化に関与すると共に、器官の側方方向の形態形成を担うと考えられている。

トウモロコシの *ns1 ns2* 変異体と同様なイネの変異体として、*narrow leaf2* (*nal2*) と *nal3* が報告されている。*NAL2* と *NAL3* はイネの 11 および 12 番染色体上に重複して存在する遺伝子であり、トウモロコシの *NAL2/3* のオルソログである。*NAL2/3* はトウモロコシの *NS1/2* と同様に葉の側方方向の形態形成に関わる遺伝子と考えられており、*nal2 nal3* 二重変異体の葉は葉縁を欠いた細い葉を分化し、小維管束の数が減少する。一方で、*NAL2/3* の過剰発現体は広葉の表現型を示し、小維管束の数が増加することから、*NAL2/3* はイネの葉縁における葉の側方方向の伸長、および小維管束の形成に関与すると考えられている (Ishiwata *et al.*, 2013)。また、*nal2/3* 二重変異体は、側根、小穂、穀粒にも特徴的な表現型が認められている (Ishiwata *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013)。

オオムギの *narrow leafed dwarf1* (*nld1*) 変異体の葉は、イネ *nal2 nal3* やトウモロコシ *ns1 ns2* と同様に葉縁を含む葉の側方領域を欠くが、原因遺伝子はやはり *NS1/2* のオルソログであった (Yoshikawa *et al.*, 2016)。したがって、イネ科植物の側生器官の側方領域の形態形成に共通して重要な役割を担っているのは、*WOX3* ファミリーに属する遺伝子であると考えられている。しかし、単子葉植物における *WOX3* 遺伝子の機能に関しては、未だ不明の部分が多い。特に、単子葉植物には二種類の *WOX3* 遺伝子が存在するが、それらの機能分化については明らかとなっていない (後述)。

イネ *leaf lateral symmetry1* (*lsy1*) は葉の側方領域を左右非対称に欠く表現型を示す変異体として報告された (Obara *et al.*, 2004)。更に Yew はインド型品種 *Kasalath* との間の

F₂ 集団を用いた map-based cloning により、原因となる候補遺伝子として *LSY1* (*Os05g0118700*) を特定した (Yew, 2010)。*LSY1* 遺伝子は第 5 染色体短腕に存在する 286 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、WUSCHEL (WUS) -box モチーフと、それに近接した WOX3-特異的モチーフ (van der Graaff *et al.*, 2009) を持つことから、WOX3 遺伝子ファミリーに属することが示されている。さらに Yew は *lsy1* の変異が *LSY1* 遺伝子のイントロン部分における巨大な non-coding 配列の挿入によるものと推論した (Yew, 2010)。本章では、この *lsy1* 変異体の表現型解析および系統解析を通じ、*LSY1* 遺伝子のイネの葉の側方方向の形態形成における機能を理解することを目的として検討を行った。

2-2 材料および方法

材料

leaf lateral symmetry1 (lsy1) は、本研究室の Obara らにより、 γ 線照射(300Gy)したイネ日本晴由来の M₂ 集団より同定された変異体で、遺伝学的には単一遺伝子による劣性の変異あると考えられる (Obara *et al.*, 2004)。*nal2/3* 変異体は既に *nal2* と *nal3* の二重変異体として報告のある九州大学の標識遺伝子系統 FL90 を用いた (Ishiwata *et al.*, 2013)。

植物体の育成

形態観察に用いる野生型および *lsy1* 変異体は、*LSY1/lsy1* の自殖種子から分離したホモ個体を用いた。また、Real-time PCR に用いる野生型は日本晴を用いた。*lsy1 nal2/3* 三重変異体は、*LSY1/lsy1* ヘテロ個体と *NAL2 NAL3/nal2 nal3* ダブルヘテロ種子を交配して得た F₂ 集団から分離した個体を PCR による遺伝子型判別によって決定した。遺伝子型の判別に使用したプライマーの配列は表 2-1 に示した。

種子は、土播きの場合、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 30 分間消毒後、3 回以上水洗し、28 度で 24 時間インキュベート後、ホーネンス培土 (ホーネンアグリ、新潟) へ播種した。培地に播種する場合は、籾を除去した種子を土蒔きと同様の条件で消毒後、3 回以上滅菌水で洗浄し、クリーンベンチ内で MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上に播種した。

パラフィン切片の作製

表2-1 *lsy1*の遺伝子型同定に用いたプライマーの配列

用途とプライマー名称	Forward primerの配列	Reverse primerの配列
<i>LSY1</i> _wtゲノムの検出		
LSY1_2F	5'-TCTCCTGCGCCCACTACTAC	5'-
LSY1cDNACHECK1R		GTTGTCCACTAGCTTCCCCA
<i>lsy1</i> ゲノムの検出		
LSY1_2F	5'-TCTCCTGCGCCCACTACTAC	5'-
LSY1 insertionR		GAATCCGCTTTATTCGCTGA

パラフィン切片用のサンプル（茎頂付近組織、小穂、葉など）は実態顕微鏡下で切り出した後、パラホルムアルデヒド固定液（PFA）（1% Triton X-100, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液）に浸漬し、脱気した後、4°C で 24 時間固定した。その後 0.1M リン酸緩衝液、エタノールシリーズ(30、50、70、90、99%)の順で 1 時間ずつ脱水し、再度 99%エタノールで 24 時間サンプルを処理することによって完全に脱水した。次に 99%エタノールで 1 回処理した後、エタノール-ヒストクリア混合液（エタノール:ヒストクリア = 3:1、1:1、1:3）でそれぞれ 1 時間ずつ脱エタノールを行った後、100%ヒストクリア溶液で 24 時間サンプルを処理することによって完全に脱エタノールを行った。ヒストクリア溶液を 1 度交換し 1 時間置いた後、サンプル入り溶液に固体パラプラストを加え、62°C のオーブンで 24 時間処理することで徐々にパラプラストへ置換した。その後 12 時間ごとに 4 度パラプラスト液を交換し、サンプルを包埋した。パラフィン包埋した組織はミクロトームを用いて厚さ 8 μm の切片とし、MAS コートされたスライドガラス（松浪硝子工業、大阪）上で接着させ、42°C で 12 時間以上乾燥させた。

組織切片の染色

前述の方法で作製したパラフィン切片を、ヒストクリア 2 回、エタノール:ヒストクリア = 1:1 溶液の順で 5 分間ずつ脱パラフィンし、エタノールシリーズ(99、99、90、75、70、50、30%エタノール、H₂O) で 3 分間ずつ置換した後、ヘマトキシリンで組織を染色した。同じ条件でエタノールシリーズ、ヒストクリアを逆行し、Poly-mount™ (Polyscience. Inc., USA) で封入後、光学顕微鏡で観察した。

葉原基の左右差計測

発芽後 20 日目の野生型、*lsy1*、*nal2/3*、*lay1 nal2/3* の SAM 付近の組織切片を作製し、撮影した写真を画像データとして取り込み、ImageJ により中央部から葉縁部までの維管束の背軸側の頂点を連結し、葉の左右それぞれの長さとして計測し、差の絶対値を葉原基サイズの左右差として算出した。計測には基部側から頂部側に向かって観察した時、P1 が SAM から初めて分離した切片を使用し、P2 から P5 までの葉原基で計測を行った。また、野生型、*lsy1*、*nal2/3*、*lay1 nal2/3* それぞれにおいて計測した左右差を葉原基の齢ごとに分けてデータを解析した。

花の形態観察

野生型、および *lsy1* の出穂前の小穂を取り出し、実態顕微鏡下で穎の構造と花の内部組織を観察した。

根の形態観察

MS 培地に *lsy1* ヘテロ種子を播種し、播種後 2 週間後に表現型から *lsy1* 変異体を特定し、その根の形態を野生型と比較、観察した。また、抗生物質を含む MS 培地で育成した過剰発現体についても同様に観察を行った。

相補性試験

LSY1 遺伝子の上下領域約 5kbp を含む領域を、制限酵素サイト(*KpnI* および *ApaI*)を付加したプライマー (表 2-2) および KOD-Plus-Neo (東洋紡、大阪) を用いた PCR で増幅し、制限酵素処理および QIAEX II(QUIAGEN, Germany)によるゲル抽出を経て TOPO® XL PCR Cloning Kit(Life Technologies, CA, USA)によりサブクローニングを行った。ECOS™ Competent E. coli DH5α (ニッポンジーン、東京) に形質転換し、プラスミド抽出後、目的断片をシーケンスによって確認し、目的配列を *HindIII* および *ApaI* によって切り出した。その後、ゲル抽出した断片を pPZP2H-lac ベクター(Fuse *et al.*, 2001)へ挿入し、DH5α 大腸菌を用いてストレプトマイシンおよびカナマイシンを含む LB 培地により選抜を行った。作製したコンストラクトをアグロバクテリウム (strain EHA105) に導入した後、N6D 培地で誘導した *lsy1* ホモのカルスにアグロバクテリウム法を用いて形質転換を行った(Hiei *et al.*, 1994)。再分化個体は培地から取り出して水浸し、28°C で 3 日間培養後、ホーネンス培土(ホーネンアグリ、新潟)およびナブラ養土 (ヤンマー、大阪) を混合した土に移植し、東京大学農学部内のバイオトロンで育成した。コントロールとして pPZP2H-lac の空ベクターを用いた形質転換体を同様にして作成した。

CRISPR/Cas9 システムを用いた *lsy1* アレルの作製

異なる *LSY1* 機能喪失体を得るために、CRISPR/Cas9 システムを用いた。CRISPR-P プログラム (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>) (Lei *et al.*, 2014)を用いて、ターゲットとする配列を表 2-3 のように決定し、表 2-4 に示したプライマーを用いて目的該列の増幅、確認をおこなった。single guide RNA (sgRNA) をクローニングするベクター (pZK_gRNA) と

表2-2 *lsy1*の相補性試験に用いたプライマーの配列

プライマー名	配列
<i>LSY5k-KpnIF</i>	5'-ACggtaccCAAGTGACCCGTCACTATAGGCAC
<i>LSY5k-ApaIR</i>	5'-caGGGCCCcggctctctctagtgacctgatttc

表2-3 CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した*lsy1*アレルの遺伝子型

<i>LSY1</i>	CGCCG AAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA	
<i>lsy1-cc1</i>	CGCCG ATA CGCGCGCAGATACAGCAGATCA CGCCG AAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA	T insertion A insertion
<i>lsy1-cc2</i>	CGCCG AAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA CGCCG AAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA	A insertion A insertion
<i>lsy1-cc3</i>	CGCCG--CGCGCGCAGATACAGCAGATCA CGCCG ACTA CGCGCGCAGATACAGCAGATCA	AA deletion CT insertion
<i>lsy1-cc4</i>	CGCCG AAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA CGCCG A -----GCAGATACAGCAGATCA	A insertion 7 base deletion
<i>lsy1-cc5</i>	CGCCG AGAC CGCGCGCAGATACAGCAGATCA CGCCG A -CGCGCGCAGATACAGCAGATCA	G insertion A deletion

赤字は Cas9 のターゲット部位を、青字は PAM シーケンスを示す。
緑字はターゲット部位に挿入された塩基および欠失した塩基を示す。

表2-4 CRISPR/Cas9 システムでの*lsy1*変異体作製に使用したプライマーの配列

用途とプライマー名称	プライマー配列
PAM シーケンス増幅	
Crispr/cas1F	GTTGAGGGCTCCGACGCCGAACG
Crispr/cas1R	AAACCGTTTCGGCGTCCGAGCCCT
塩基配列確認用増幅	
LSY1_1F	CCTAGTACCCTTTCTGTCTC
nested pcr-R(LSYseqR)	GTAGTAGTGGGCGCAGGAGA
塩基配列確認	
CRseqLSY2F	TAGGACAGGAGGAGGGATAT

sgRNA、Cas9、NPTII の入っている一体型バイナリーベクター (pZH_OsU6gRNA_MM Cas9) (Mikami *et al.*, 2015) は、旧農業資源生物研究所 (現農研機構) 農業生物先端ゲノム研究センターゲノム機能改変研究ユニットの遠藤真咲博士から供与していただいた。LSY1 の target guide RNA を組み込んだ pZH_OsU6gRNA_MM Cas9 は既報にしたがって作製した (Mikami *et al.*, 2015)。作製したコンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、N6D 培地で誘導した T-65 の胚盤由来カルスにアグロバクテリウム法により形質転換を行った (Hiei *et al.*, 1994)。再分化個体は相補性試験と同様に培養、または抗生物質を含む MS 培地に移植し、28°C のインキュベーターで培養した。

3' rapid amplification of cDNA ends (3' RACE)

lsy1 cDNA 断片の決定のために、*lsy1* cDNA をテンプレートに用いて *LSY1* の 3' 非翻訳領域に特異的なプライマーおよび 3' RACE 用プライマーを用いて 2 段階に増幅した (表 2-5)。増幅した断片は pCR4 (Invitrogen, USA) に挿入後、シーケンスして配列を決定した。

系統樹解析

LSY1 の系統関係を明らかにするために、LSY1 のアミノ酸配列を用いて NCBI データベースより BLAST 検索を用い、全アミノ酸配列が既知の WOX3、または WOX3 様タンパク質と高い相同性を持つタンパク質の配列情報を得た。得られた配列の Accession No. を表 2-6 に示す。用いた配列の植物種は、単子葉植物から *Oryza sativa*、*Brachypodium distachyon*、*Sorghum bicolor*、*Setaria italica*、*Zea mays*、*Hordeum vulgare*、*Juncus effusus*、双子葉植物から *Arabidopsis thaliana*、*Petunia x hybrida*、*Vitis vinifera*、*Solanum lycopersicum*、裸子植物から *Gnetum gnemon*、*Picea abies*、*Pinus sylvestris*、*Ginkgo biloba* である。これらの配列情報を MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETIC ANALYSIS (MEGA; Mac OS v5.2, Tamura *et al.*, 2011) によってアラインメントし、系統樹を作成した。アウトグループとしてシロイヌナズナの WUS のアミノ酸配列を利用した。系統樹の信頼性は 1000 回の Bootstrap 試行により解析した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面構造の観察

表2-5 3'RACE法による *lsy1* の遺伝子配列決定に用いたプライマー

用途とプライマー名称	Forward primerの配列	Reverse primerの配列
Nested 1 st PCR		
LSY1_sequenceF	5'-TGATGATGCTGGAGGAGATG	5'-
ADAPTER2		GGCCATGGACTGAGGTAACC
Nested 2 nd PCR		
LSY1real-timeF	5'-AACGCGGCGCAGATACAG	5'-
ADAPTER1		CCATGGCCTACCTCTAGATGA
塩基配列確認		C
3'raceLSYF	5'-CGGCGCAGATACAGCAGAT	

サンプルを実態顕微鏡下で切り出し、パラフィン切片を作製するときと同様な方法によって固定、脱気を行ったが、脱水は 1% Triton X-100 を加えた条件で行った。その後、既報（佐藤 田中、1990）に従って 3-methyl-acetate (TBA) による置換を行った。TBA 置換後はサンプルを TBA とともに凍結させ、臨界点乾燥装置を用いて凍結乾燥した。サンプルはカーボンテープを用いて実態顕微鏡下で SEM 用のステージに接着した。その後、Pt イオンコーティングを 90 秒行い、SEM (Hitachi S-4000, 日立製作所、東京) を用いて 10kV の電圧下で察した。

in situ ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーションおよびアルカリフォスファターゼを用いた発色反応は既報 (Kouchi and Hata, 1993) に則って行った。プローブにはジゴキシゲニンでラベルした *LSY1* のアンチセンス RNA を用いた。*LSY1* のプローブは、Zero Blunt TOPO ベクター (Thermo Fisher Scientific, USA) にサブクローニングした *LSY1* の cDNA を鋳型に作製した。使用したプライマー配列の情報を表 2-7 に示す。

2-3 結果

lsy1 変異体の栄養生長期における表現型

lsy1 変異体は、葉の片側が欠け左右非対称な葉を形成する、または中肋が複数形成される変異体として Obara らにより同定され、Yew により原因遺伝子の候補が示されていた (Obara *et al.* 2004, Yew 2010)。本研究では *lsy1* のより詳細な表現型解析を行った。

播種後 9 日目の *lsy1* の幼苗における表現型を野生型と比較すると、*lsy1* は野生型と比べて矮生～やや矮性でその程度は個体によって異なっていた。(図 2-1A)。

続いて組織切片を作成し、シュートの内部構造を観察した。野生型と *lsy1* の葉原基を比較すると、*lsy1* では葉鞘が内部の葉を包み込まないなどの異常がみられ、P2、P3 などの初期の葉原基において、すでに SAM を包み込む構造を形成していないものが見られた(図 2-1F)。また *lsy1* の葉原基には葉の片側が欠けるものの他に、左右両方の側方構造が失われているもの(図 2-1G)や、野生型と同様に両側に葉縁が形成されるもの(図 2-1H)、2 カ所以上の葉縁を形成するもの(図 2-1I)が確認された。

lsy1 変異体における葉の異常が現れるタイミングと、その程度を明らかにするため、野生型、*lsy1* 変異体の P2 から P5 までの葉原基において、葉の中心部から左右の葉縁までの

表2-6 系統樹解析に使用した遺伝子の名称と対応するアミノ酸配列のAccession numbers

Gene name	Accession No.	Gene name	Accession No.
<i>LSY1</i>	CAM32354.1	<i>JwPRSa</i>	BAJ14111.1
<i>NAL2/3</i>	BAE48302.1	<i>JwPR Sb</i>	BAJ14112.1
<i>ZmNS1</i>	CAM32346.1	<i>BdWOX3</i>	XP_003566641.1
<i>ZmNS2</i>	AAR31212.1	<i>BdWOX3B-like</i>	XP_003577178.1
<i>ZmWOX3A</i>	NP_001106239.1	<i>GbWOX3B</i>	CAT02904.1
<i>ZmWOX3B</i>	NP_001106240.1	<i>PaWOX3</i>	AGL53581.1
<i>AtWOX3/PRS</i>	CAM32354.1	<i>PsWOX3</i>	FM882158.1
<i>Sb05g003490</i>	XP_002449019.1	<i>GgWOX3</i>	CAT02931.1
<i>Sb09g002010</i>	XP_002440499.1	<i>PhWOX3</i>	ACU68503.1
<i>SiWOX2-like</i>	XP_004960326.1	<i>VvWOX3</i>	XP_002281707.1
<i>SiWOX3A-like</i>	XP_004978415.1	<i>SIWOX3-like</i>	XP_004251286.1
<i>NLD</i>	MLOC_7772.1	<i>AtWUS</i>	NP_565429.1
<i>HvWOX3</i>	MLOC_53697.2	<i>LFL</i>	AIR72306.1

At: *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Bd: *Brachypodium distachyon* (ヤマカモジ)、Gb: *Ginkgo Biobla* (イチョウ)、Gg: *Gnetum gnemon* (グネツム)、Hv: *Hordeum vulgare* (オオムギ)、Jw: *Juncus wallichianus* (イグサ)、Pa: *Picea abies* (トウヒ)、Ph: *Petunia x hybrida* (ペチュニア)、Ps: *Pinus sylvestris* (アカマツ)、Sb: *Sorghum bicolor* (ソルガム)、Si: *Setaria italica* (アワ)、Vv: *Vitis vinifera* (ブドウ)、Zm: *Zea maize* (トウモロコシ)。

表2-7 in situ hybridizationプローブ作製用プライマーの配列

名称	プライマー配列
M13-F	TGTAACGACGGCCAGT
T7-TOPOLSYanti	tccAATACGACTCACTATAGGGcaggaaacagctatgaccatg

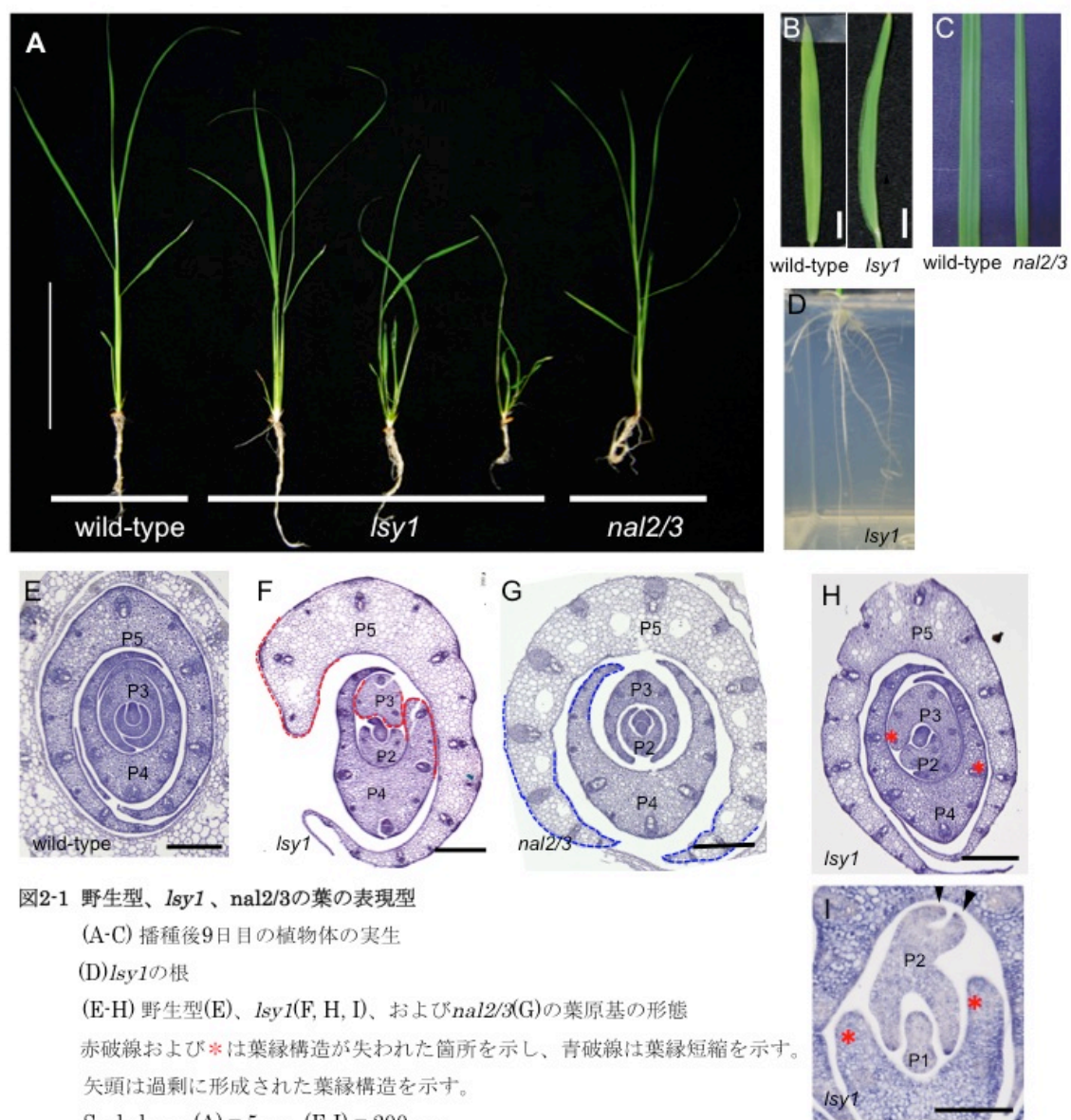


図2-1 野生型、*lsy1*、*nal2/3*の葉の表現型

(A-C) 播種後9日目の植物体の実生

(D) *lsy1*の根

(E-H) 野生型(E)、*lsy1*(F, H, I)、および*nal2/3*(G)の葉原基の形態

赤破線および*は葉縁構造が失われた箇所を示し、青破線は葉縁短縮を示す。

矢頭は過剰に形成された葉縁構造を示す。

Scale bars (A) = 5 cm, (E-I) = 200 μ m

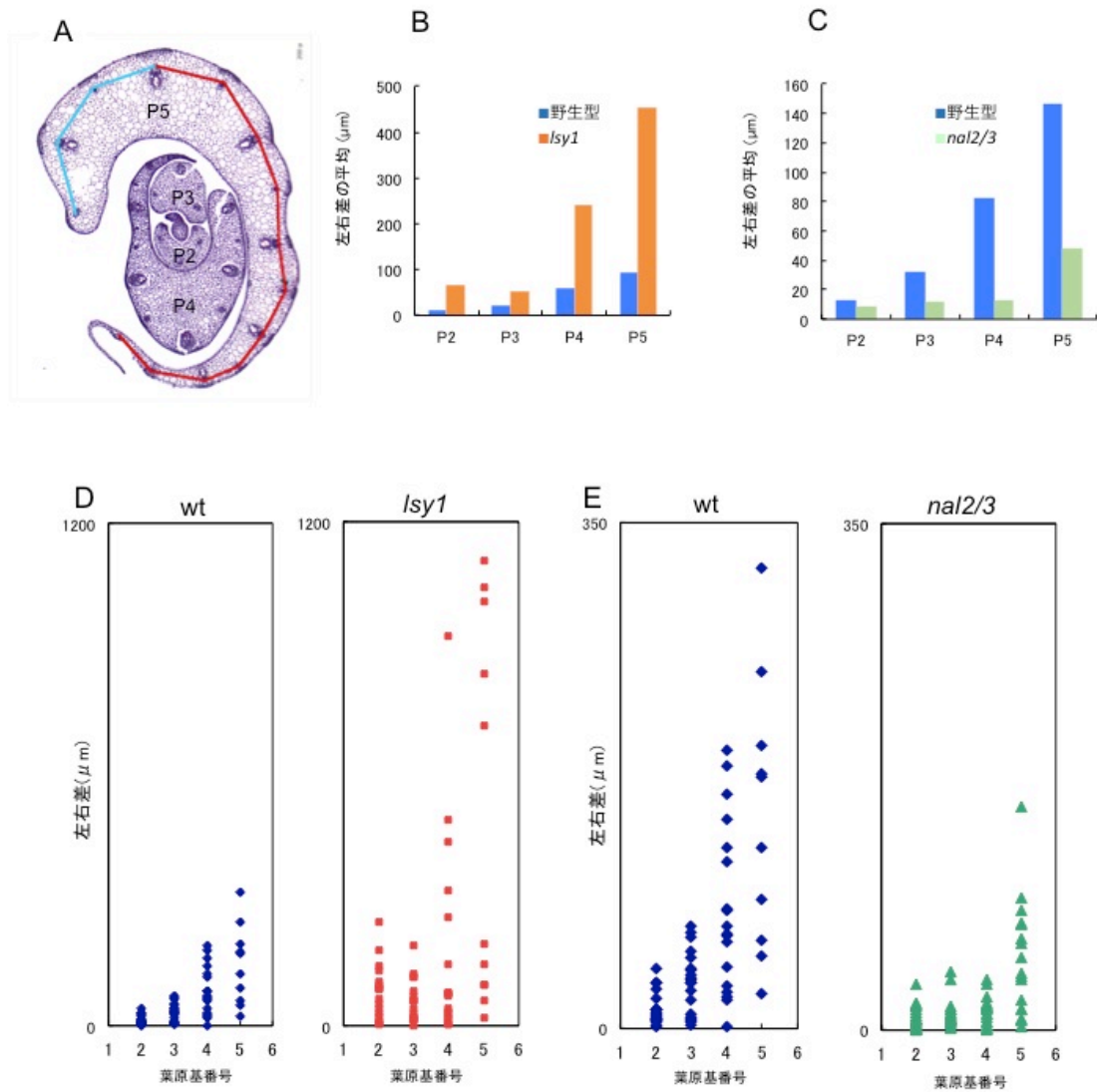


図2-2 葉原基の序列ごとの葉身の左右差

- (A) 葉原基の左右の測定方法。横断切片のうち、基部側から数えて初めてSAMからP1葉原基が分かれた切片を使用し、中央維管束から大小の維管束の最外縁を図のように直線で結び、左右の長さの差を求めた。
- (B) 野生型および*lsy1*における葉原基サイズの左右差の平均値
- (C) 野生型および*nal2/3*における葉原基サイズの左右差の平均値
- (D) 野生型および*lsy1*における、計測した葉原基サイズの左右差のプロット
- (E) 野生型および*lsy1*における、計測した葉原基サイズの左右差のプロット

距離の差を調査した (図 2-2A)。その結果、*lsy1* では P2 から P5 のいずれのステージにおいても、葉の左右差は野生型よりも大きく (図 2-2B)、また、各サンプルの分散も大きかった (図 2-2D)。これらの観察結果から、*lsy1* 変異体の葉は確かに左右の葉縁構造が不規則に失われる表現型を示し、その異常は初期の葉原基から生じていることが明らかになった。

LSY1 遺伝子が根において機能するかを確認するため、MS 培地上に播種した野生型と *lsy1* における根の構造を比較した。しかし、両者の根の構造に大きな違いは見られなかった (図 2-1D)。この結果から、*LSY1* は根の形態形成には関与しないと考えられた。

***lsy1* 変異体の生殖生長期における表現型**

lsy1 の小穂は内穎が 2 つに割れる、外穎の先端部が屈曲する、心皮の形成不全により胚珠のが突出する、胚嚢の形成不全が生じる、などの異常を示すことが報告されている (Obara *et al.*, 2004)。本研究によりそれらの表現型の確認と、生殖成長期における、より詳細な表現型の解析を行った (図 2-3, 図 2-4, 図 2-5)。

野生型と *lsy1* の穂を比較すると、穂のサイズ、小穂数に大きな異常は認められなかったが、小穂軸が波打つように曲がっており、小穂構造や芒の伸長に異常が認められた (図 2-3A)。小穂の構造を実体顕微鏡下で観察したところ、野生型の内穎と外穎はぴったりと閉じられている (鉤合、図 2-3B) のに対し、*lsy1* の小穂では穎が閉じず、内部の花器官が露出していた (図 2-3C,E)。変異体の花の内穎の構造を観察すると、内穎が 2 つまたは 3 つに割れ、護穎が過剰に伸張したもの (図 2-3D)、内穎が縮小し鉤合を示さなくなっているもの (図 2-3C)、内穎を欠くもの (図 2-3E) などが観察された。一方外穎は、先端が突出する、折れ曲がるなどの形態異常を示した (図 2-3C-E)。*lsy1* の花器官では、雌蕊において心皮から胚珠が突出し、水風船様の構造を形成しているものが認められた (図 2-4B)。また、しばしば柱頭の本数が 3 または 4 本に増加していた (図 2-4M)。*lsy1* の雄蕊は野生型 (図 2-4A) と同様に 6 本形成されることが多かったが、花糸が波打つように曲がる、葯が反り返る、葯の色が薄く半透明である、葯室の形成が非対称である、などの形態異常が見られた (図 2-4B,K,M)。また、*lsy1* の小穂ではまれに一つの穂の内部に 2 つの小花様の構造を形成した (図 2-4C)。

次に、*lsy1* の小穂の内部構造を組織切片により観察した。異常な穎構造のうち、内穎が 2 つに分かれているものは野生型と同様に左右それぞれが外穎との鉤合を示していた (図 2-4E)。一方、縮小した内穎はその側方領域の形態が異常で、鉤合を示さなくなっていた (図 2-4G)。雌蕊においては、*lsy1* では心皮が癒合せず、珠皮の成長が不完全であること、胚珠組織が肥大していることが確認された (図 2-4L)。雄蕊においては、野生型では葯室が均等



図2-3 野生型と *lsy1* の花の表現型

(A) 野生型と *lsy1* の小穂の形態。

(B) 野生型の花の外観。

(C-E) *lsy1* の外観。いずれも穎構造に異常が見られる。

(C) 内穎の縮小した花。(D) 内穎が2枚に分かれ、外穎の先端が内穎側に屈曲した花。

(E) 内穎の消失した花。

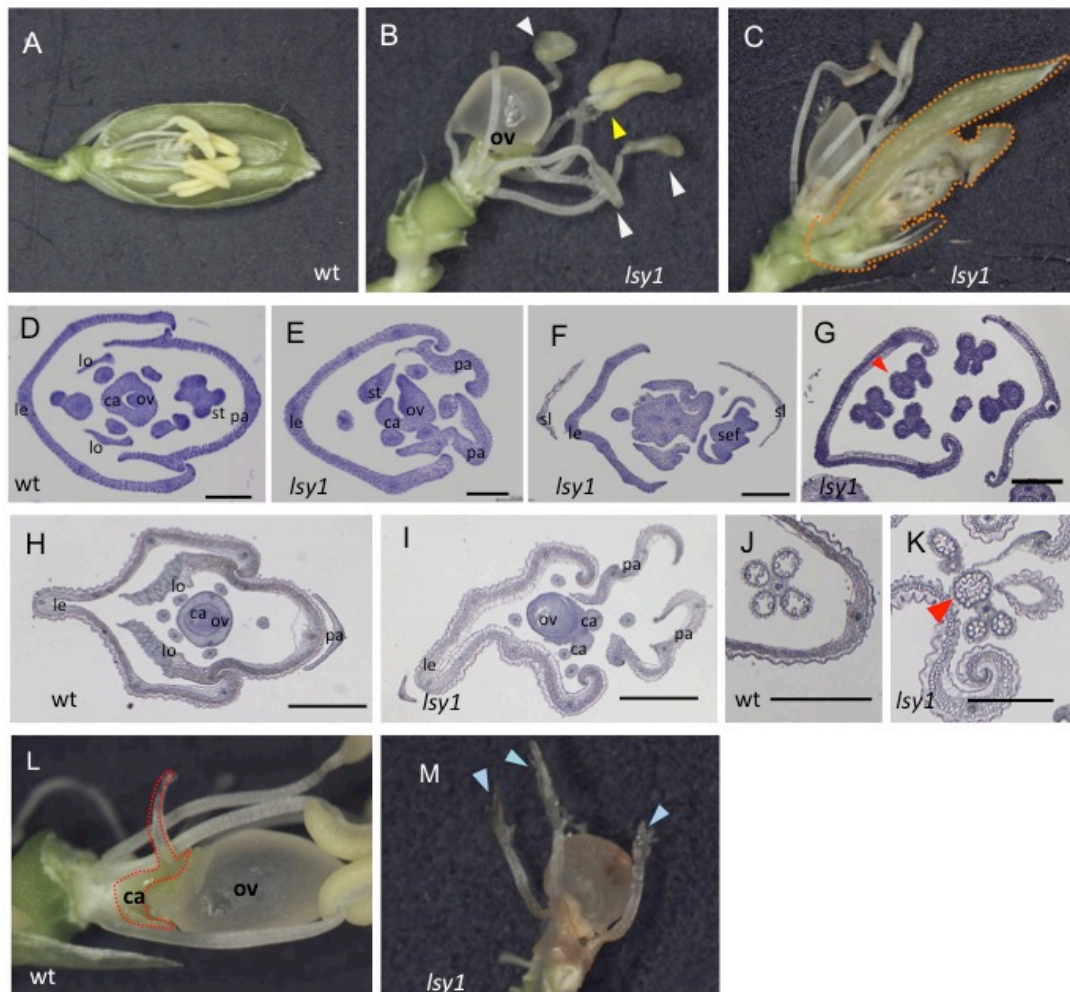


図2-4 野生型と *lsy1* の花の表現型

(A-C) 野生型(A)、*lsy1* の花(B,C)の内部構造。

黄矢頭は正常に分離していない葯室、白矢頭は半透明な葯室、
点線の内部は二次的な花様の構造を示す。

(D-G) *Stage Sp8* における野生型(D)、および *lsy1* (E-G) の花組織の組織切片。

(H,I) 野生型(H)、および *lsy1* (I) の成熟した花組織の組織切片。

(J,K) 野生型(J)、および *lsy1* (K) の成熟した葯室。矢頭は不完全に分離したまま成熟した葯を示す。

(L) *lsy1* の花の内部構造。点線は胚珠を包み込めていない心皮を示す。

(M) *lsy1* の雌蕊。矢頭は雌蕊を示す。

sl: 護穎、le: 外穎、pa: 内穎、lo: 鱗皮、st: 雄蕊、ca: 心皮、ov: 胚珠、sef: 2 次的な花様の構造

Scale bars = 500 μ m

に4つに分かれる(図 2-4J)のに対して、*lsy1* では2つの葯室の分離が不完全なもの(図 2-4G 矢頭)、2つの葯室が融合し、一つの大きな葯室を形成するものなどが確認された(図 2-4K)。小穂内部に小花様の構造を持つものにおいては、異所的な小花は内穎と護穎の間に生じていた(図 2-4F)。

続いて *lsy1* の穎の発生過程を走査電子顕微鏡で観察したところ、*lsy1* の内穎は野生型と比較して長軸方向への伸長が不良であるもの、内穎に切れ込みがあるものが見られた(図 2-5)。このことから、*lsy1* の内穎の異常は側方方向だけでなく長軸方向にも認められること、またその異常は発生の初期段階から生じていることが示唆された。

これらの結果から、*lsy1* は生殖成長期において、穂の構造には大きな影響を与えないものの、小穂や花器官では内穎、心皮、珠皮の不完全な伸長、葯室の分化異常などが見られると共に、柱頭数の増加や、過剰な小花の形成など、多面的な異常が観察されることが明らかになった。

***lsy1* 変異体の相補性試験および CRISPR/Cas9 による *LSY1* 機能喪失変異体の作製**

Os05g0118700 は *lsy1* 変異体の原因遺伝子の候補として同定されたが(Yew 2012)、真に *lsy1* 変異体の原因遺伝子であるかは明らかになっていなかった。そこで Os05g0118700 遺伝子のコード領域およびその上流と下流約 2kbp を含む配列を *lsy1* 変異体に導入することによって、*lsy1* の表現型の相補性試験を行った。しかし、この Os05g0118700 遺伝子を含む遺伝子断片は *lsy1* の表現型を回復することができなかった(図 2-6)。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、Os05g0118700 遺伝子の遺伝子破壊を行い、*lsy1* 変異体の表現型が再現できるかを試みた。Os05g0118700 遺伝子のコード領域をターゲットとした sgRNA を設計し、変異導入を行ったところ、*lsy1* 様の表現型を示す形質転換体を複数得ることができた。これらの形質転換体における Os05g0118700 遺伝子の配列を決定したところ、5種類の独立したバイアレリックな変異を持つことが明らかとなった。これらの形質転換体のシュートでは、いずれも *lsy1* と同様に、葉の側方方向を左右非対称に欠く表現型が観察された(図 2-7B)。また、形質転換体の茎頂付近の横断切片を観察したところ、*lsy1* と同様の、葉の側方における不規則な欠損や(図 2-7C,E)、過剰な葉縁の形成が認められた(図 2-7F)。更に、小穂においても *lsy1* と同様に穎同士が鉤合していない表現型を示した(図 2-7A)。

これらのことから、Os05g0118700 遺伝子が確かに *lsy1* 変異体の原因遺伝子であることが明らかとなった。

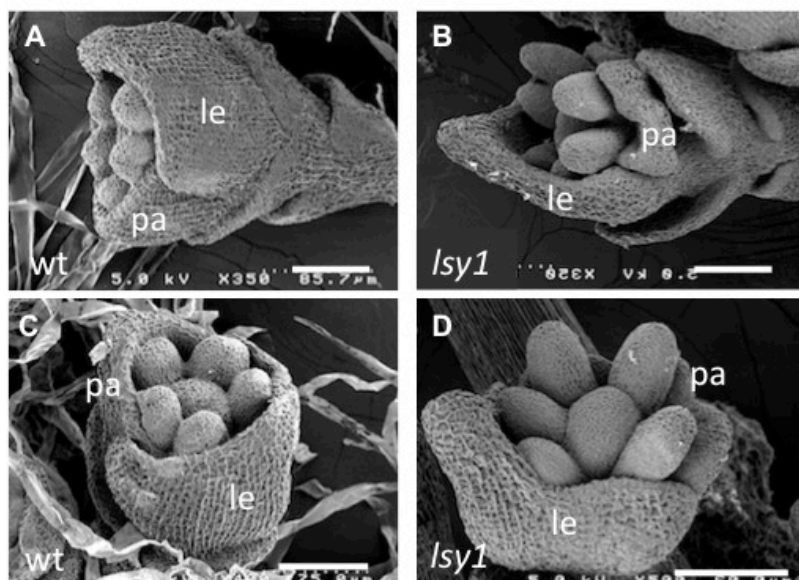


図2-5 野生型と *lsy1* の花原基の走査電子顕微鏡写真

(A,C)野生型、(B,D)*lsy1* le:外穎、pa:内穎

Scale bars = 50 μ m

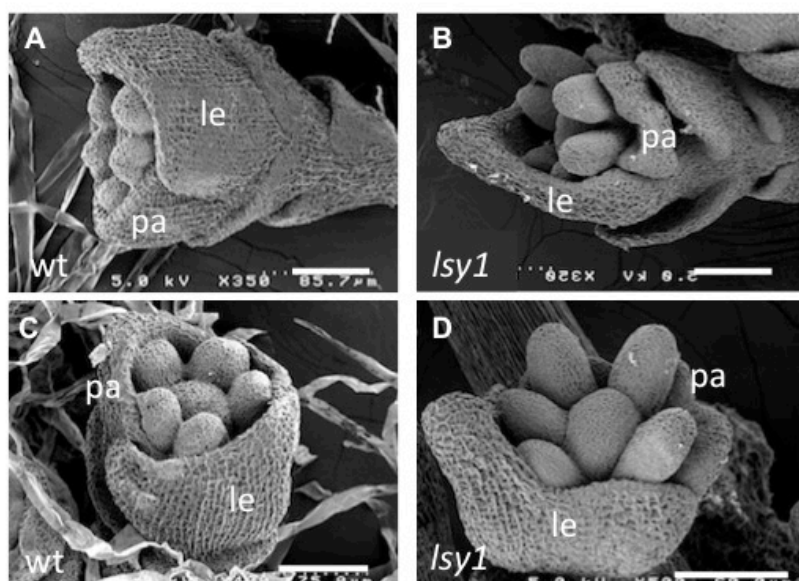


図2-5 野生型と*lsy1*の花原基の走査電子顕微鏡写真

(A,C)野生型、(B,D)*lsy1* le:外穎、pa:内穎

Scale bars = 50 μm

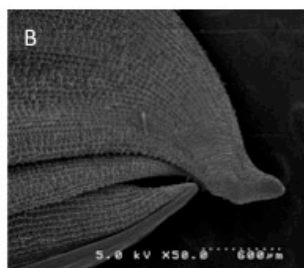
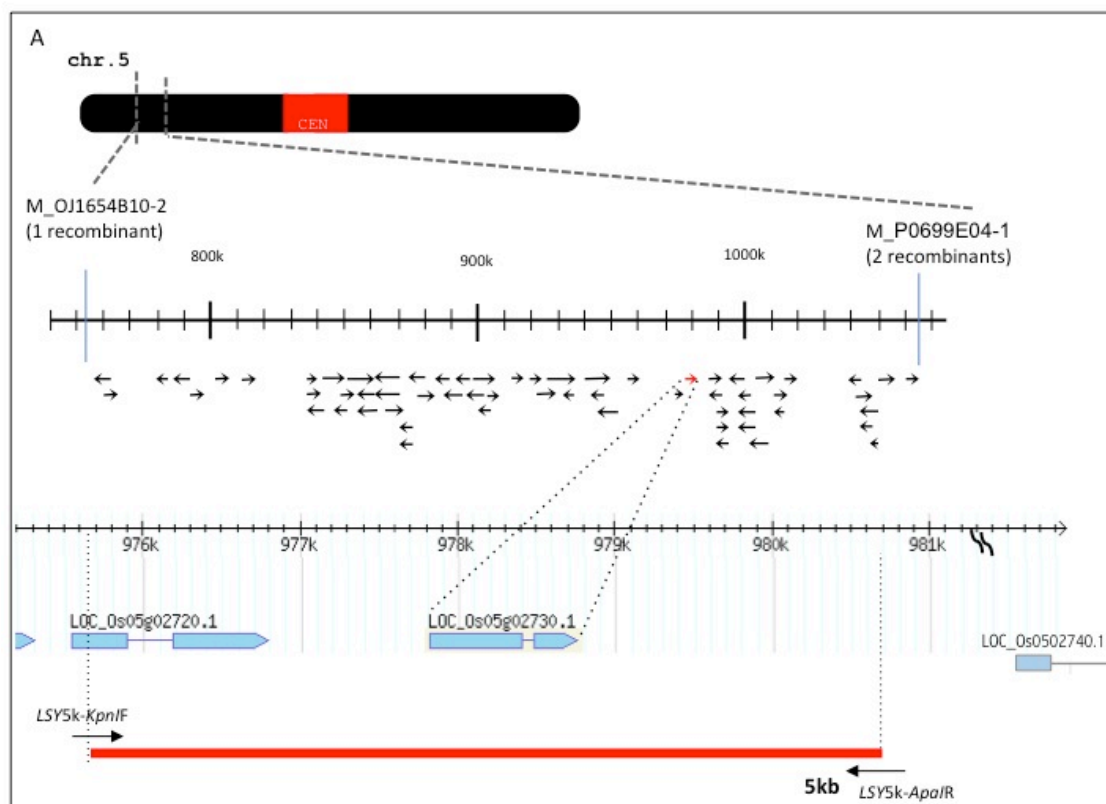


図2-6 *LSY1*遺伝子

- (A) *lsy1*の遺伝子座の位置および相補性試験に用いた領域（赤線）。
- (B) *LSY1*を含む5kbの遺伝子を導入した*lsy1*の穎。

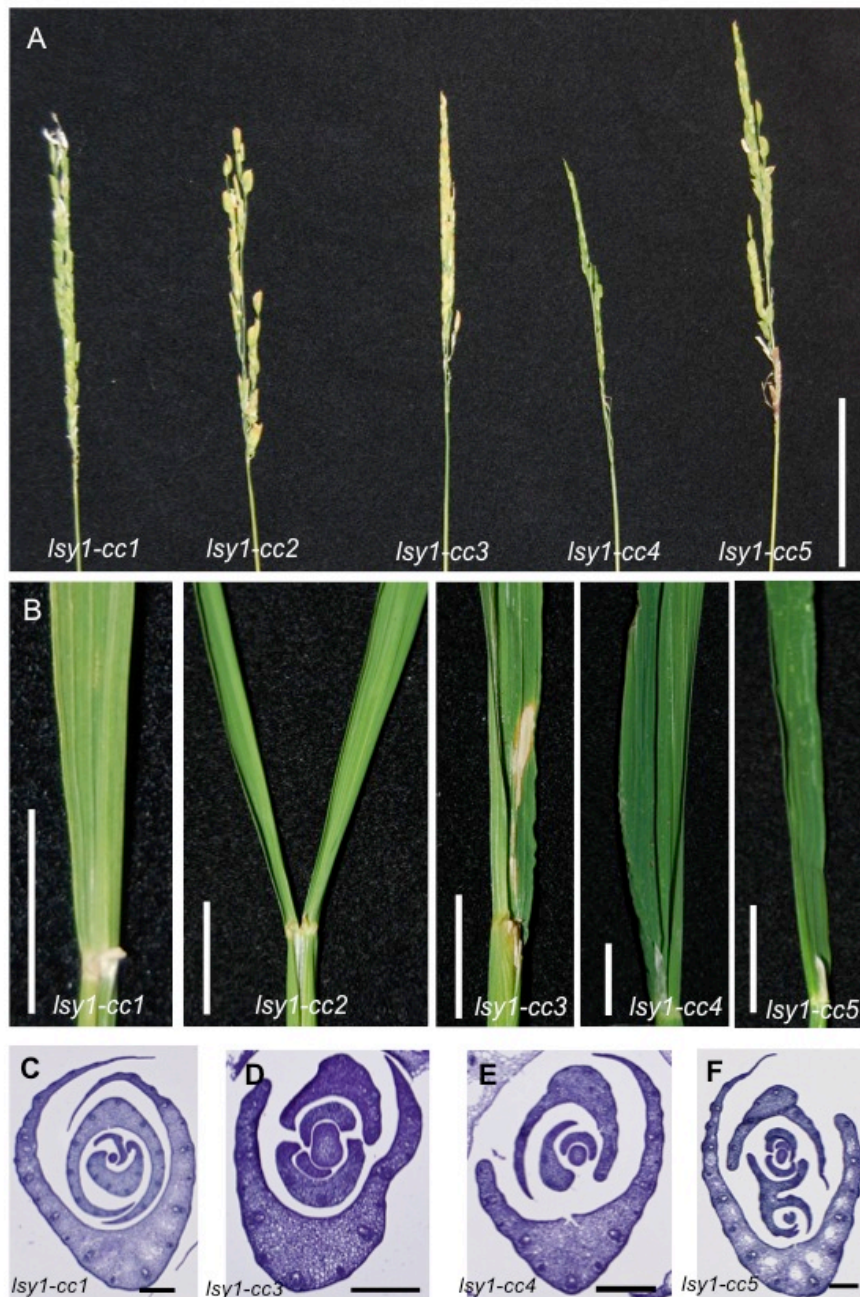


図2-7 CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した*Isy1*アレルの表現型

(A) 各アレルの穂の表現型。 (B) 各アレルの葉の表現型。

(C-F) 各アレルの横断切片。

Scale bars A = 5cm, B = 1cm, C-F = 100 μ m

lsy1 変異体における *LSY1* 転写産物の解析

lsy1 では *LSY1* (Os05g0118700) 遺伝子のイントロンに巨大な DNA 配列の挿入があることが報告されている。この変異が *LSY1* 遺伝子の機能にどのような影響を与えるのかを確かめる為に、3' RACE により *lsy1* の mRNA 配列を調査した。その結果、*lsy1* では、*LSY1* のスプライシングが異常になっており、本来イントロンである部分が転写され、早期にストップコドンを生じる異常な転写産物が生産されていることが明らかとなった (図 2-8)。このことから、*lsy1* 変異体内では不完全な *LSY1* mRNA が生成され、本来の機能を喪失していることが推測された。

LSY1 の分子系統解析

LSY1 遺伝子と他の相同遺伝子との系統関係を明らかにするため、単子葉植物、双子葉植物、裸子植物の *LSY1* ホモログのアミノ酸配列全体を用いて分子系統解析を行った (図 2-9、表 2-6)。その結果、既報の通り *LSY1* は *WOX3* 遺伝子に分類されたが、単子葉類における *WOX3* 遺伝子は少なくとも 2 遺伝子以上存在し、それらの転写産物はその配列からそれぞれ異なるサブクレードに属する事が明らかになった。イネの *WOX3* 遺伝子ホモログには *LSY1* の他に、葉の葉縁の分化に関与する *NAL2/3* が存在したが、*LSY1* および *NAL2/3* はそれぞれ異なるサブクレードに分類された。

NAL2/3 の属するサブクレード (Monocot *WOX3* Subclade II) には、トウモロコシの葉および花器官の側方構造の形成に関わるとされる *NS1/2* や、オオムギの葉の側方形成に関わる *NLD*、イグサ科 *Juncus wallichianus* の P0 および P1 の葉縁先端で発現する *JwPRSa* などが含まれる。一方、*LSY1* の属するサブクレード (Monocot *WOX3* Subclade I) には、*Juncus wallichianus* の P0 葉原基分化領域で発現する *JwPR Sb* が含まれるが、このクレードに属する各遺伝子の機能に関する報告はない。

このように、単子葉類の *WOX3* サブファミリーには *LSY1* と *NAL2/3* がそれぞれ属する 2 つの異なるサブクレードが存在するのに対して、双子葉植物や裸子植物の *WOX3* 遺伝子はそれぞれ一つのクレードが認められ、その中には単一の *WOX3* 遺伝子が認められた。このことから、単子葉類の *WOX3* はサブファミリー間で機能分化しており、*LSY1* 遺伝子と *NAL2/3* 遺伝子はイネにおいて異なる機能を保持している可能性が示唆された。

lsy1 と *nal2/3* の表現型比較

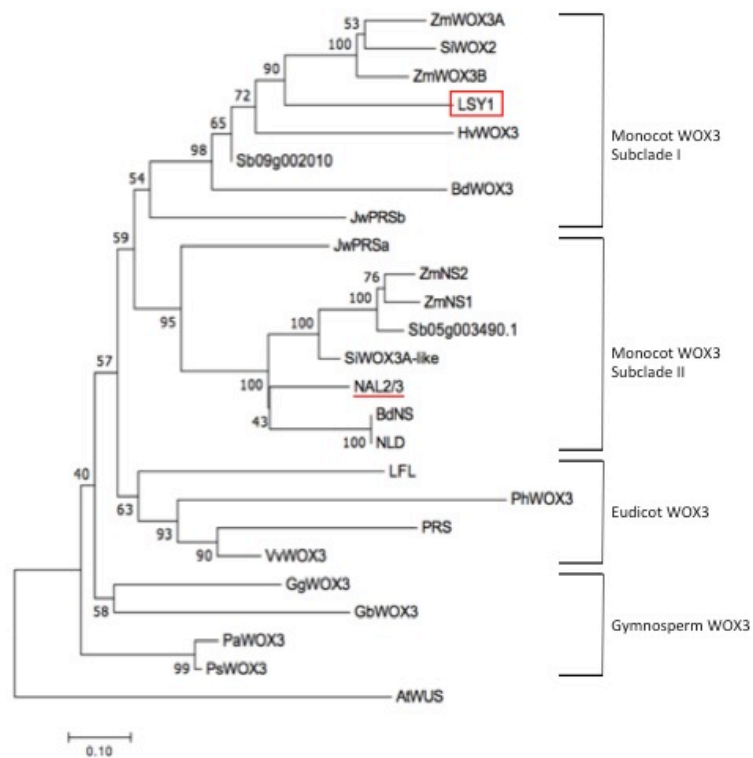


図2-9 WOX3遺伝子の系統樹

イネWUSをアウトグループとして、MEGA7.0を用いて近接結合法により作製した。各ノードに示した数値はブートストラップ法による信頼度 (%) を示す。

LSY1 と異なる *WOX3* サブファミリーに属する *NAL2/3* 遺伝子は重複した機能を持ち、その二重変異体である *nal2/3* は矮性で葉の葉縁を大きく欠く変異体として Ishiwata らによって報告された (Ishiwata *et al.*, 2013)。そこで、両遺伝子の機能の違いを明らかにするため、*nal2/3* と *lsy1* との表現型を比較した。

nal2/3 の幼苗は、葉身を左右対称に欠く細葉を形成し、葉鞘が内部の葉を包み込まない表現型を示した (図 2-1A,C)。この結果は Ishiwata らの観察と一致した (Ishiwata *et al.*, 2013)。

次に、*nal2/3* の茎頂付近の横断切片を観察した (図 2-1G)。野生型では P4、P5 の葉原基において、内側の葉原基を包み込むような葉縁の伸長が観察されるのに対し (図 2-1E)、*nal2/3* では葉縁の伸長が抑制され、P5 でも左右の葉縁は重ならなかった (図 2-1G)。また、*nal2/3* は *lsy1* とは異なり P3 までは葉原基に顕著な異常は見られなかった (図 2-1G)。

さらに、*lsy1* と同じ方法で、野生型と *nal2/3* の葉原基の成長の左右差を野生型と比較した (図 2-2)。すると、*nal2/3* の葉原基サイズの左右差は野生型と比較して小さくなっており、この結果は組織切片における *nal2/3* の葉縁の短縮を反映していると考えられた (図 2-2D、2-2E)。また、*lsy1* で見られたような葉の左右差のばらつきは見られなかった (図 2-2B、図 2-2C)。

以上の観察結果から、*lsy1* の葉原基では葉の側方方向の構造を片側または両側で欠失することがあるのに対し、*nal2/3* の葉原基では両側の葉縁が均等に短縮すること、さらに、*lsy1* では P2 葉原基の段階で既に側方方向の形態形成に異常がみられるのに対し、*nal2/3* では主に P3 以降の葉原基で異常が見られること、が明らかになった (図 2-1G、図 2-2E)。これらのことから、*LSY1* 遺伝子と *NAL2/3* 遺伝子は葉の側方方向の形態形成に関して異なる機能を持つことが示唆された。

***LSY1* 遺伝子の組織別発現**

LSY1 の発現部位を明らかにするため、野生型における葉身、葉鞘、SAM 付近、根、花、小穂における *LSY1* の発現を Real-time PCR によって解析した (図 2-10)。その結果、野生型の SAM 付近および花、幼穂で高い発現が見られ、特に幼穂においては極めて高い発現が見られた。この結果から、*LSY1* は SAM 付近や花、幼穂といった、器官形成が活発に生じている組織で機能していることが推測された。

栄養成長期の SAM 周辺における *LSY1* 遺伝子の空間的発現

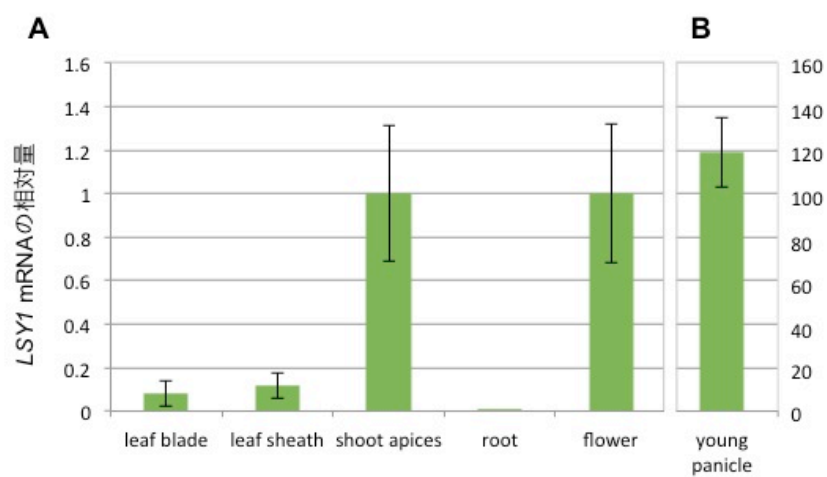


図2-10 野生型イネ各部位における $LSY1$ のReal-time PCR

(A) 茎頂付近の量を1としたときの葉身、葉鞘、根、花における $LSY1$ mRNAの相対量

(B) 茎頂付近の量を1としたときの、小穂における $LSY1$ mRNAの相対量

栄養成長期の SAM 周辺における *LSY1* 遺伝子の空間的な発現パターンを明らかにするため、茎頂付近の横断切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った(図 2-11)。*LSY1* は P1 葉原基において、葉原基の側方先端を含む広い領域で発現が見られ、SAM そのものでは発現が認められなかった。P2 では発現領域が葉縁方向へ縮小し、P3 では葉縁部分でのみ発現が見られた(図 2-11 A, C-G)。この結果から、*LSY1* は SAM から葉原基が発生する際、P1 葉原基の側方先端を含むやや広い領域で発現を開始し、P2、P3 と成長するにつれて発現領域が側方から側方先端へ限定されることが明らかになった。このことから、*LSY1* は葉の発生の初期から、葉の側方方向の形態形成に関与すると考えられた。

一方、*LSY1* ホモログである *NAL2/3* の発現パターンも調査した (図 2-11)。野生型の葉原基における *NAL2/3* の発現は P1、P2、P3 葉原基における葉縁先端の 1 点で観察された (図 2-11B、図 2-11H-L)。この結果から、*NAL2/3* と *LSY1* はいずれも葉原基の側方で発現が見られるが、*LSY1* では P1、P2 では比較的広い領域で発現するのに対し、*NAL2/3* は P1 以降の葉縁の先端で限定的に発現していることが明らかとなった (図 2-11M)。このことは既に報告のある *NAL2/3* 遺伝子の発現パターンの報告とも一致していた (Ishiwata *et al.*, 2013)。

また、組織別の発現解析では、*LSY1* の根での発現は見られなかったが、SAM 周辺の切片において *LSY1* の発現は側根の原基においても確認された(図 2-11N)。このことから、根の発生の初期に、*LSY1* は何からの機能を果たしている可能性がある。

小穂における *LSY1* 遺伝子の空間的发現

lsy1 変異体では小穂や花に異常が認められたことから、小穂の発達過程における *LSY1* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって観察した (図 2-12)。内穎分化期 (Sp4, Itoh *et al.* 2005) の花芽では、*LSY1* は副護穎、護穎、外穎、内穎原基、および花メリステムの先端で発現が見られた (図 2-12A)。雄蕊分化期 (Sp6) の花芽では護穎、内外穎の先端で発現する他、雄蕊の四隅、内穎の鉤部分で発現が見られた (図 2-12B)。また *LSY1* は雄蕊分化期の雌蕊原基では将来心皮が発生する領域で発現がみられ、心皮分化期 (Sp7) では心皮の頂部先端でも発現が観察された (図 2-12C, D)。胚珠分化期 (Sp8) では、*LSY1* は穎の縁や葯の四隅で発現が見られたほか、心皮の癒合部分および柱頭の外周縁部分で発現がみられた (図 2-12E, F)。これらの発現パターンは *lsy1* の小穂や花の表現型から推測される *LSY1* の機能部位と一致していた。

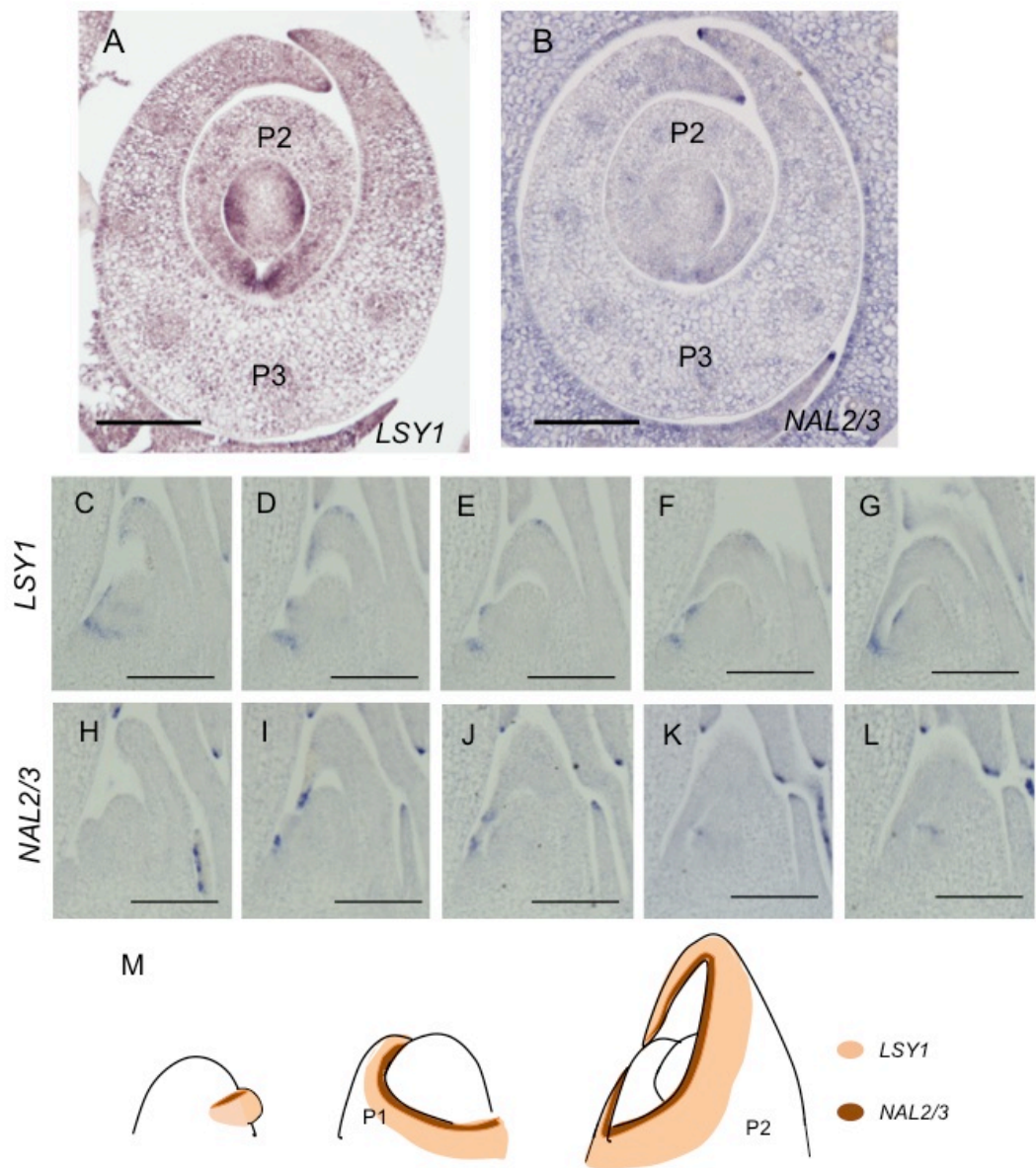


図2-11 野生型イネにおける $LSY1$ および $NAL2/3$ の*in situ* ハイブリダイゼーション

(A,B) 葉原基基部横断切片における検討 (A) $LSY1$ 。 (B) $NAL2/3$ 。

(C-G) 葉原基の連続縦断切片における $LSY1$ の発現。

(H-L) 葉原基の連続縦断切片における $NAL2/3$ の発現。

(M) 葉原基における $LSY1$ および $NAL2/3$ の発現部位の模式図。

Scale bars =100 μm

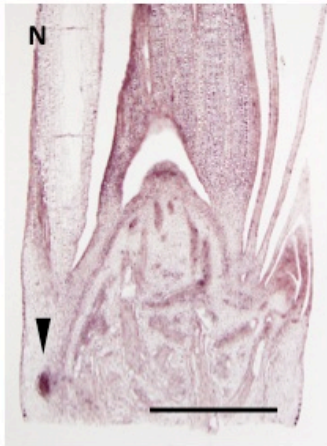


図2-11 野生型イネにおける $LSY1$ および $NAL2/3$ の*in situ* ハイブリダイゼーション(続き)
 (N) 根原基における $LSY1$ の*in situ* ハイブリダイゼーション。Scale bar =500 μ m

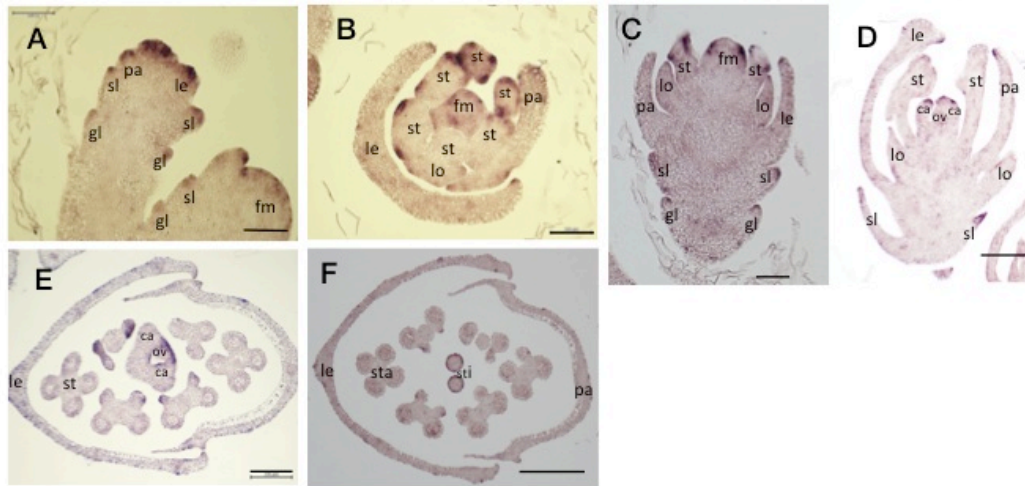


図2-12 野生型の花および若い花芽における $LSY1$ の*in situ* ハイブリダイゼーション

(A) *Stage Sp4*の縦断切片。副護穎、護穎、内穎、外穎原基の先端で発現が見られる。

(B) *Stage Sp6*の横断切片。雄蕊の四隅、外穎の側方先端、内穎の鉤部分で発現が見られる。

(C) *Stage Sp6*の縦断切片。新たに花メリステム側方での発現が見られる。

(D) *Stage Sp7*の縦断切片。内穎と外穎の先端、および心皮の先端で発現が見られる。

(E, F) *Stage Sp8*の横断切片。心皮の癒合部分および柱頭の外縁で発現が見られる。

gl:副護穎、sl:護穎、le:外穎、pa:内穎、lo:鱗皮、st,sta:雄蕊、ca:心皮、ov:胚珠、sti:柱頭

Scale bars (A-C) = 100 μ m, (D-F) = 200 μ m

2-4 考察

初期葉原基の発生における *LSY1* 遺伝子の役割

イネの葉の形態形成過程は、まず P1 において SAM から葉原基が分離し、P2 では基部で SAM の周囲を囲んだ僧帽形の葉原基を形成する。P3 では完全に SAM を包み込むとともに、葉原基が長軸方向へ伸長し葉舌原基と葉身-葉鞘境界が決定される。その後 P4 では葉身、P5 では葉鞘の急激な伸長が起こり、P6 で葉の形態が完成する (Itoh *et al.*, 2005)。すなわち、イネでは P2 までに葉原基の概形が決定され、P3 までに頂部-基部軸のアイデンティティーが確立し、P4 以降に顕著な葉の拡大が起こるといえる。

lsy1 変異体の最大の特徴は葉の側方を大きく欠いた左右非対称な葉を形成することである。*lsy1* の葉原基の発生過程を観察すると、P2 の段階で既に形態異常が見られた。また *lsy1* 変異体の発生過程における葉原基の左右差の計測結果から、側方方向の形態の異常は、ごく初期から生じており、その程度は葉によって異なることが明らかとなった。このことは、*LSY1* 遺伝子が単に葉原基の側方方向の伸長に関わっているだけではなく、葉の発生初期における葉の側方への伸長領域の確立を担っていることを示唆している。このことは、*LSY1* が葉原基の非常に早い時期から、葉縁を含む広い領域で発現していたことから支持される。また、正常な葉の葉縁において見られる膜状の構造が、*lsy1* 変異体の葉でも時に観察されたことから、*LSY1* 遺伝子が単独で葉縁のアイデンティティーを決定しているわけではないと考えられた。

一方、*nal2/3* の葉原基では両側の葉縁が均等に短縮し、その表現型は主に P3 以降の葉原基側方で見られた。これらのことから、*LSY1* 遺伝子と *NAL2/3* 遺伝子は葉の側方方向の形態形成に関してそれぞれ異なる役割を担っていることが推測された。

生殖成長における *LSY1* 遺伝子の役割

生殖生長期の *lsy1* では、穎の形態異常や心皮の不完全な融合などの表現型が確認されたことから、*LSY1* が栄養成長期の葉と同様に、穎や心皮などの葉的器官の側方領域の確立や伸長に関わることが推測された。一方で、内穎が外穎様の形態を示す、2 次的な花組織が形成されるなどのホメオティックな表現型も確認され、*LSY1* が生殖成長期の花器官のアイデンティティーの決定にも関わることを推測された。発現パターンからは、*LSY1* は穎の側方先端や心皮の将来癒合する部分などで確認された。これらの発現箇所は *lsy1* 変異体において異常が見られた部分と一致していた。

lsy1 の花の形態異常において特徴的な表現形は、雄蕊において葯室の分離が不完全で、2 つの葯が部分的に融合したものが確認されたことであった。イネの花器官形成のうち、雄蕊の葯室形成には向背軸パターンが重要であることが報告されている(Toriba *et al.*, 2010)。イネの側生器官の向背軸パターンを決定する遺伝子 *PHB3* および *ETT3* は、雄蕊の発生初期に花の内側を向軸側、外側を背軸側としてそれぞれ発現する。しかし発生が進むとそれらの発現パターンは大きく変化し、*ETT3* の発現は雄蕊原基の向軸および背軸側へ、*PHB3* の発現は雄蕊原基の側方へと変化する。この向背軸性の変化により葯室のパターン形成がなされ、雄蕊原基の向軸側と背軸側の間にできる四隅から葯が形成されると考えられている (Toriba *et al.*, 2010, Toriba *et al.*, 2011)。

in situ ハイブリダイゼーションにより、*LSY1* 遺伝子は将来葯室の形成される雄蕊原基の四隅で発現していることが明らかになった。この *LSY1* の発現パターンは、ちょうど雄蕊原基の向軸側と背軸側の発現境界に当てはまる (図 2-13)。このことを考慮すると、*lsy1* の葯室の形成不全は雄蕊の背腹性の異常であり、*lsy1* では向軸側と背軸側の境界が乱されることによって、葯室の分離異常がおこったと考えられる。従って、*LSY1* 遺伝子は花原基の向背軸性の制御を担っていることが推測された。

葉の側方方向の形態形成と *WOX3* 遺伝子サブファミリーの機能分化

現在、単子葉植物で葉縁の形態形成に関わる遺伝子として知られているのは、イネの *NAL2/3* (Cho *et al.*, 2013, Ishiwata *et al.*, 2013)、トウモロコシの *NS1/2* (Scanlon *et al.*, 1996, Nardmann *et al.*, 2004)、オオムギの *NARROW LEAFED DWARF1* (*NLD1*) (Yoshikawa *et al.*, 2016)、そして本研究で解析を行った *LSY1* である。これらの遺伝子は、いずれも *WOX3* サブファミリーに属している。本研究の系統解析から、裸子植物および双子葉植物の *WOX3* 遺伝子は植物種にひとつずつしか存在しない一方で、調査した全てのイネ科植物で、2 つの *WOX3* サブクレードが存在することが明らかとなった (図 2-9)。このことはイネ科植物が分化した以前にこれらの遺伝子が重複し、その後機能分化を起こした可能性を示している。

葉原基において *LSY1* と *NAL2/3* は異なる発現パターンを示した。*LSY1* は P1 葉原基の側方先端を含むやや広い領域で発現を開始し、P2、P3 と成長するにつれて発現領域が側方から側方先端へ限定されるのに対して、*NAL2/3* は P1 以降の葉縁の先端のみで発現が見られた。Nardmann らも過去にイネ *WOX* 遺伝子ファミリーの網羅的な *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、葉原基における *OsWOX3* (*LSY1*) と *OsNS* (*NAL2/3*) の発現の違いを報告している (Nardmann *et al.*, 2007)。イグサ科の 2 つの異なる *WOX3* ホモログ *PRSa*

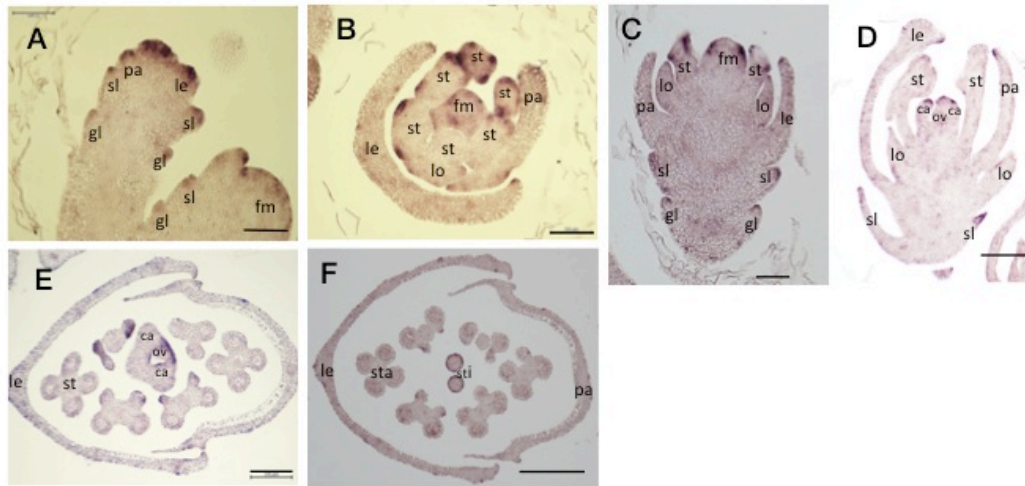


図2-12 野生型の花および若い花芽における $LSY1$ の*in situ* ハイブリダイゼーション

(A) *Stage Sp4*の縦断切片。副護穎、護穎、内穎、外穎原基の先端で発現が見られる。

(B) *Stage Sp6*の横断切片。雄蕊の四隅、外穎の側方先端、内穎の鉤部分で発現が見られる。

(C) *Stage Sp6*の縦断切片。新たに花メリステム側方での発現が見られる。

(D) *Stage Sp7*の縦断切片。内穎と外穎の先端、および心皮の先端で発現が見られる。

(E, F) *Stage Sp8*の横断切片。心皮の癒合部分および柱頭の外縁で発現が見られる。

gl:副護穎、sl:護穎、le:外穎、pa:内穎、lo:鱗皮、st,sta:雄蕊、ca:心皮、ov:胚珠、sti:柱頭

Scale bars (A-C) = 100 μ m, (D=F) = 200 μ m

と *PRSc* はそれぞれサブクレード II とサブクレード I に分類されるが、これらの発現する部位や時期は異なり、*PRSa* は P0 の葉原基に分化する予定領域の側方先端および P1 以降の葉原基の葉鞘の側方先端に、*PRSc* は P0 の葉原基に分化する予定領域に発現する。加えて単面葉で葉身が向背軸方向に平らに延びる *Juncus prismatocarpus* では発現が P3 以降の葉身の向軸側と背軸側の葉縁様の構造に見られる (Yamaguchi *et al.*, 2010)。このように、二つの *WOX3* サブクレード間で遺伝子発現領域は重複するものの、植物種によって、異なる領域で発現しており、この発現の差が機能分化に部分的に貢献しているものと考えられた。

このことは生殖生長期においても当てはまる。*LSY1* の mRNA は小穂において非常に高い発現量を示し、変異体ではこれまでに述べたような各器官の様々な形態異常がみられた。一方で、*NAL2/3* 遺伝子は穎の側方先端および内穎の鉤合部の構造でのみ発現が確認され、*nal2/3* 変異体の表現型も穎の鉤合に異常が見られるのみで、その他の形態異常は確認されていない (Cho *et al.*, 2013, Ishiwata *et al.*, 2013)。このことから、*LSY1* と *NAL2/3* の生殖成長期における機能は大きく異なっていると考えられる。

第3章 イネ *WOX3* 遺伝子の葉の形態形成における機能の解析

3-1 緒言

第二章の解析により、*LSY1* は葉縁の形態形成に関わる *WOX3* 遺伝子の内の一つであること、双子葉植物や裸子植物では *WOX3* が単一のクレードを形成するのに対し、イネ科単子葉植物のもつ2種類の *WOX3* が二つのサブクレードに分かれ、*LSY1* と *NAL2/3* はそれぞれ異なるサブクレードに分類されること、*lsy1* 変異体の葉原基の表現型は、*nal2/3* 変異体の葉原基とは異なっていることなどが明らかとなった。これらのことから、イネ科を含む単子葉植物では *WOX3* 遺伝子の機能分化が起こっていることが推測された。しかしながら、これらの機能分化が発生遺伝学的にどのような違いに由来しているのかは明らかではない。

植物の葉の側方方向への伸長には葉の向背軸方向の極性が重要であるとされている。キンギョソウの *phan* 変異体やシロイヌナズナの *phb*、*phv* 変異体は、それぞれ葉原基の背軸側化および向軸側化によって向背軸極性を失うことで、側方方向への葉の伸長を示さなくなる (Waites *et al.*, 1995, McConnel and Barton, 1998, McConnel *et al.*, 2001)。また、*phan* では葉の向軸側の部分的な背軸側化により異所的な葉身形成が観察される (Waites and Hudson 1995)。これらのことから、向背軸方向の極性、特に向軸側、背軸側それぞれの identity を持った細胞層が近接することが葉の葉縁の形態形成において重要であることが示唆されている。

シロイヌナズナでは、葉縁における向背軸性の維持には、*WOX1* 遺伝子および *WOX3* 遺伝子が関与していると推測されている。葉原基の側方領域において、*WOX1* 遺伝子と *PRG/PRS/PRW/PRX* 遺伝子が葉原基側方の中央領域(middle-domain)で発現し、向軸側および背軸側特異的な遺伝子群を抑制し、側方領域のアイデンティティを確立することで向背軸性を維持し、葉の側方方向への伸長を促すとされる (Nakata *et al.*, 2012, Nakata and Okada, 2012)。

イネ科植物における葉の向背軸性と側方方向の形態形成の関わりに関しては未だ不明であり、トウモロコシの *NS1/2* や *NAL2/3* の解析においても葉の向背軸性との関連は示されていない。しかし、第2章の結果から、葯の形態形成において *LSY1* が向背軸性の制御に関与する可能性が示された。本章では、*LSY1* 遺伝子の過剰発現体を作製するとともに、イネの葉の向軸側形成に関与する *OsHB3* 遺伝子、および背軸側形成に関与する *OsETT3* 遺伝子等をマーカー遺伝子とした遺伝子発現解析により *LSY1* の向背軸性との関わりを調査した。更に、*lsy1 nal2/3* 重変異体の解析を行い、二つの *WOX3* サブファミリー間

の遺伝的関係を考察した。最後に、*LSY1* 遺伝子と葉の表皮構造との関わりについても解析を行った。

3-2 材料および方法

材料

*leaf lateral symmetry1 (lsy1)*は、本研究室の Obara らにより、 γ 線照射(300Gy)したイネ日本晴由来の M_2 集団より同定された変異体で、遺伝学的には単一遺伝子による劣性の変異あると考えられる (Obara *et al.*, 2004)。*nal2/3* 変異体は既に *nal2* と *nal3* の二重変異体として報告のある九州大学の標識遺伝子系統 FL90 を用いた (Ishiwata *et al.*, 2013)。

植物体の育成

形態観察に用いる野生型および *lsy1* 変異体は、*LSY1/lsy1* の自殖種子から分離したものを用いた。ただし、Real-time PCR に用いる野生型は日本晴を用いた。*lsy1 nal2/3* 三重変異体は、*LSY1/lsy1* ヘテロ個体と *NAL2/3/nal2/3* のダブルヘテロ個体を交配して得た F_2 集団から分離した個体を PCR による遺伝子型判別によって決定した。遺伝子型の判別に使用したプライマーの配列は表 3-1 に示した。

種子は、土蒔きの場合、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 30 分間消毒後、3 回以上水洗し、28 度で 24 時間インキュベート後、ホーネンス培土（ホーネンアグリ、新潟）へ播種した。培地にに播種する場合は、籾を除去した種子を土蒔きと同様の条件で消毒後、3 回以上滅菌水で洗浄し、クリーンベンチ内で MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上に播種した。

パラフィン切片の作製

パラフィン切片用のサンプル（茎頂付近組織、小穂、葉など）は実態顕微鏡下で切り出した後、パラホルムアルデヒド固定液 (PFA) (1% Triton X-100, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液) に浸漬し、脱気した後、4°C で 24 時間固定した。その後 0.1M リン酸緩衝液、エタノールシリーズ(30、50、70、90、99%)の順で 1 時間ずつ脱水し、再度 99%エタノールで 24 時間サンプルを処理することによって完全に脱水した。次に 99%エタノールで 1 回処理した後、エタノール-ヒストクリア混合液（エタノール:ヒ

表3-1 *lsy1 nal2/3* 3重変異体の遺伝子型同定に用いたプライマーの配列

<i>NAL3</i> ゲノムの検出*	
<i>nalcheck_bglII_F</i>	5'-GCCAACAGTATGATATCACATAATCACAGA
<i>nalcheck_bglII_R</i>	5'-TGTTCTAGTTCAATCGCGCG
<i>NAL2</i> _wtゲノムの検出	
<i>nal2detectF</i>	5'-GATGCCTCAGACCCCTTCGACG
<i>nal2detectR</i>	5'-AGCTAGCTTAGAGTGGAAGT
<i>nal2</i> ゲノムの検出	
<i>nal2detectF</i>	5'-GATGCCTCAGACCCCTTCGACG
<i>nal2detectinR</i>	5'-GCAGTTGCCGACGCTGACG

**NAL2*ゲノムと*NAL3*ゲノムの両方のPCR産物を生成するが、
*NAL2*ゲノム由来のPCR産物はBgl IIで切断され、
*NAL3*ゲノム由来のPCR産物はBgl IIで切断されず、
*nal3*ゲノムからはPCR産物が得られないことで*NAL3*と*nal3*が識別できる。

ストクリア = 3:1、1:1、1:3) でそれぞれ 1 時間ずつ脱エタノールを行った後、100%ヒストクリア溶液で 24 時間サンプルを処理することによって完全に脱エタノールを行った。ヒストクリア溶液を 1 度交換し 1 時間置いた後、サンプル入り溶液に固体パラプラストを加え、62°C のオーブンで 24 時間処理することで徐々にパラプラストへ置換した。その後 12 時間ごとに 4 度パラプラスト液を交換し、サンプルを包埋した。パラフィン包埋した組織はミクロトームを用いて厚さ 8 μm の切片とし、MAS コートされたスライドガラス（松浪硝子工業、大阪）上で接着させ、42°C で 12 時間以上乾燥させた。

組織切片の染色

前述の方法で作製したパラフィン切片を、ヒストクリア 2 回、エタノール:ヒストクリア = 1:1 溶液の順で 5 分間ずつ脱パラフィンし、エタノールシリーズ(99、99、90、75、70、50、30%エタノール、H₂O) で 3 分間ずつ置換した後、ヘマトキシリンで組織を染色した。同じ条件でエタノールシリーズ、ヒストクリアを逆行し、Poly-mount™ (Polyscience. Inc., USA) で封入後、光学顕微鏡で観察した。

LSY1 遺伝子過剰発現体 (*pACT::LSY1*) の作製

LSY1 の cDNA 配列は、制限酵素配列 (*Xba*I および *Sma*I) を付加したプライマー (表 3-2) および KOD-Plus-Neo (東洋紡、大阪) を用いた PCR により増幅し、Zero Blunt TOPO ベクター (Thermo Fisher Scientific, USA) にサブクローニングした。プラスミドの抽出、制限酵素処理およびゲル抽出を経て、イネのアクチンプロモーターおよび nos ターミネーターからなるカセットを有する pAct-nos/Hm2 binary vector (Sentoku *et al.*, 2000) に LSY1 の cDNA 配列を導入しコンストラクトを作成した。LSY1 のシークエンスを確認後、コンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、N6D 培地で誘導した T65 および日本晴の胚盤由来カルスにアグロバクテリウム法により形質転換を行った(Hiei *et al.*, 1994)。再分化個体は相補性試験と同様に培養、または抗生物質を含む MS 培地に移植し、28°C のインキュベーターでしばらく培養した。またコントロールとして空の pAct-nos/Hm2 ベクターを用いて同様に形質転換を行った。

走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面構造の観察

サンプルを実態顕微鏡下で切り出し、パラフィン切片を作製するときと同様な方法によ

表3-2 *pACT::LSY1*作製のためのサブクローニングに使用したプライマーの配列

用途とプライマー名称	Forward primerの配列	Reverse primerの配列
<i>pACT::LSY1</i> の作製のためのサブクローニング		
LSY_pact XbaI-F	5'-GCTctagaGGAATTCGCCCTTCTAGGTA	
LSY_pact-SmaI-R		5'-gacgtcgtctagccctaattCCCGGgag

って固定、脱気を行ったが、脱水は 1% Triton X-100 を加えた条件で行った。その後、既報（佐藤 田中、1990）に従って 3-methyl-acetate (TBA) による置換を行った。TBA 置換後はサンプルを TBA とともに凍結させ、臨界点乾燥装置を用いて凍結乾燥した。サンプルはカーボンテープを用いて実態顕微鏡下で SEM 用のステージに接着した。その後、Pt イオンコーティングを 90 秒行い、SEM (Hitachi S-4000, 日立製作所、東京) を用いて 10kV の電圧下で察した。

***in situ* ハイブリダイゼーション**

in situ ハイブリダイゼーションおよびアルカリフォスファターゼを用いた発色反応は既報（Kouchi and Hata, 1993）に則って行った。プローブにはジゴキシゲニンでラベルした *NAL2/3*、*OSHB3*、*OsETT3*、*DL*、*LSY1* のアンチセンス RNA を用いた。*NAL2/3*、*OSHB3*、*OsETT3* のプローブは既報のものを用いた (Nagasaki *et al.*, 2007, Ishiwata *et al.*, 2013)。

Real-time PCR による遺伝子発現量の解析

Real-time PCR に用いる葉鞘、葉身、根、SAM 付近のサンプルは、播種後 14 日目の植物体から取得し、液体窒素を用いて凍結させた。葉鞘と葉身のサンプルはそれぞれの中央部 2 cm、根のサンプルは切り落とした根全体、SAM 付近のサンプルは最も外側の葉を取り除いた後の茎頂を含む 1cm 程度の組織を用いた。いずれのサンプルも、3 つの異なる植物体から得たサンプルを 1 組とし、葉鞘、葉身、根、SAM 付近のサンプルはそれぞれ 3 セット、花および花序は 1 セットのサンプルを得た。その後、TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA) を用いて RNA を抽出し、抽出した RNA は DNase I （タカラバイオ、滋賀）処理後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) を用いた逆転写反応によって cDNA を作製した。定量的 Real-time PCR 解析は、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix を用い、StepOne™ Real-Time PCR System (Life technologies) によって行った。プライマーセットの他に、FAM™ で標識した目的遺伝子 (*LSY1*、*NAL2/3*、*OsHB3*、*OsETT3*、*DL*) の TaqMan プローブ、内部標準遺伝子としてアクチンの TaqMan プローブを用いた。*OSHB3*、*OsETT3* のプローブは既報のものを用いた (Nagasaki *et al.*, 2007, Ishiwata *et al.*, 2013)。*LSY1*、*NAL2/3* および *DL* のプライマーおよびプローブの配列を表 3-3 に示す。Real-time PCR は 3 回反復した。目的遺伝子とアクチンとの相対発現量を算出し、他の遺伝子および他の組織との発現量比較に用いた。

表3-3 Real-time PCRに使用したプライマーおよびプローブの配列

用途とプライマー名	プライマーの配列	備考
LSY1 Real-time PCR		
LSY1real-timeF	5'-AACGCGGCGCAGATACAG	
LSY1real-timeR	5'-TGGAACCAGTAGAAGACGTTCTTG	
LSY1_probe	5'-CGGCGCACCTCTCGACGTACG	プローブ配列
NAL2/3 Real-time PCR		
NALreal-timeF	5'-GCTGAAAACGTTGGAGCTGT	
NALreal-timeR	5'-TTAATTGGTGGAGGTGGAGC	
NAL_probe	5'-CCGACCAAGAGCACCAGCGGC	プローブ配列
DL Real-time PCR		
DLreal-timeF	5'-TTTATGCAGTGGGCGAAGTG	
DLreal-timeR	5'-GGTTGCTGTTGGAGGTCGAA	
DL_probe	5'-ACCCCGCTGCTCATCGACG	プローブ配列

3-3 結果

LSY1 遺伝子過剰発現体の表現型

LSY1 遺伝子の機能についての更なる情報を得るため、*LSY1* 遺伝子の過剰発現体 (*pACT::LSY1*) を作製し表現型の観察を行った (図 3-1)。まず、*pACT::LSY1* の導入カルスは空ベクターを導入したコントロールと比較して、植物体の再分化が約 1 ヶ月遅延した。また再分化後の個体はシュートを多数分化し続けたが、主根の成長はほとんど確認できなかった (図 3-1B)。また、それぞれのシュートにおいて葉縁が向軸側へ向かって過剰に巻き込まれていた (図 3-1C, D)。*pACT::LSY1* 個体は培地上で生育させると細かい側根を多数形成したが、冠根の成長が早期に停止していた (図 3-1E)。*pACT::LSY1* は培地上で約 4 ヶ月生育させても生殖成長に移行しなかった。

次に、*pACT::LSY1* の SAM 付近の内部構造を、組織切片を作成して観察した。*pACT::LSY1* のほとんどの葉原基は葉縁が内向きに丸まっており、そのために野生型で見られるような正常な鞘構造を形成していなかった。また野生型と比較して葉原基の中央部分の厚みが薄く、一部の維管束は葉の向軸側に寄っていた (図 3-1G)。

変異体及び過剰発現体における分子マーカー遺伝子の発現パターン

lsy1 変異体では先端が二つに分かれた葉や 2 枚の葉が側方で融合したような形態を持つ葉が観察されることが明らかになっている (Obara *et al.*, 2004)。また、Yew は *lsy1* の葉の維管束構造の向背軸性に異常がみられることを報告している (Yew, 2010)。第 2 章では、葯の表現型から、*lsy1* の背腹性の異常との関連を示唆した。そして、本解析で作成した *LSY1* の過剰発現体は、葉縁が向軸側に巻き込むという向背軸方向の形態形成異常を予想させる表現型が観察された。そこで野生型、*lsy1*、*LSY1* の過剰発現体の葉原基において、いくつかのマーカー遺伝子を用いて、葉の向背軸性との関わりを解析した (図 3-2)。

中肋形成に関わる *DROOPING LEAF (DL)* 遺伝子は、野生型の P1 から P4 の葉原基において、維管束を除いた葉原基の中央領域で発現する (図 3-2A)。*DL* は *lsy1* においても野生型と同様に葉の中央領域で発現がみられた (図 3-2B)。一方で、向背軸方向に注目すると、野生型では *DL* の向軸側での発現領域が背軸側と比較して広がっているのに対して、*lsy1* では *DL* が背軸側のより広い領域で発現し、向軸側での発現領域がやや狭くなっていた (図 3-2A, B)。*pACT::LSY1* における *DL* の発現は野生型と同様、葉の中央部分で見られたが、野生型では P4 においても強い発現が見られるのに対し、*pACT::LSY1* では *DL* シ

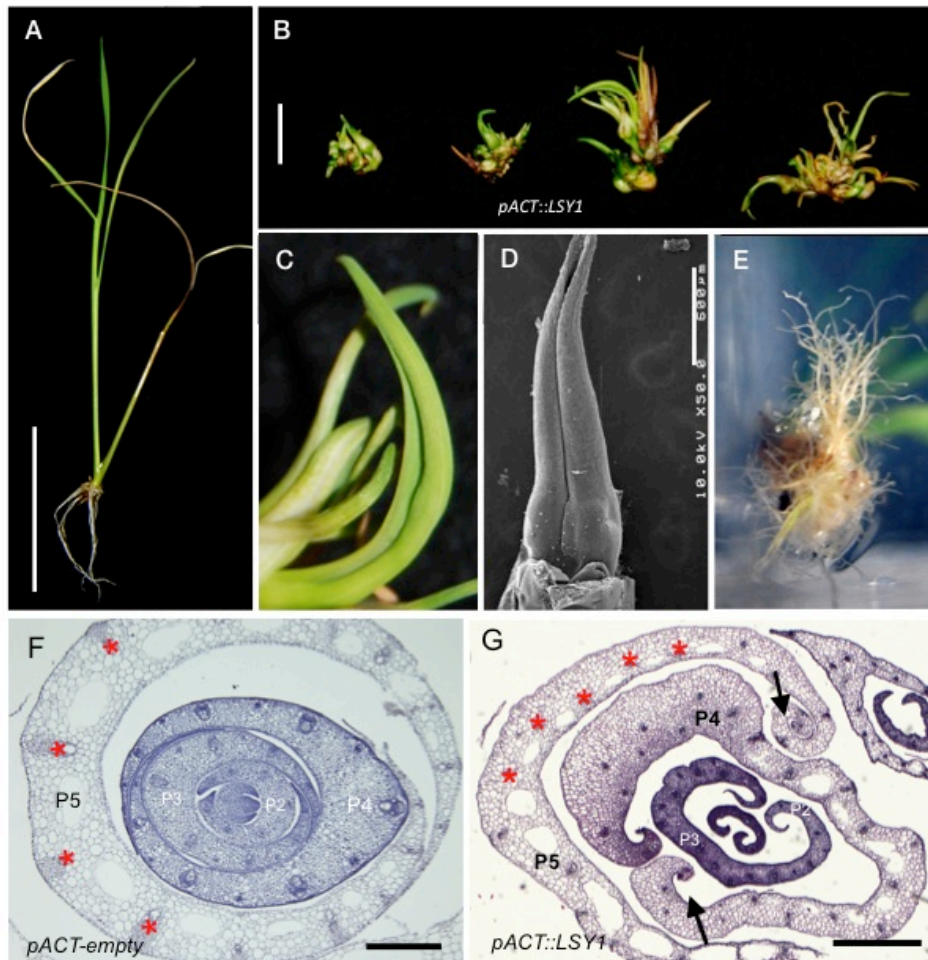


図3-1 *LSY1*過剰発現体(*pACT::LSY1*)の表現型

(A) 空ベクターを導入した植物体の表現型。

(B, C) *pACT::LSY1*導入植物体の表現型。

(D) SEMによる*pACT::LSY1*の葉の形態。

(E) MS-HF培地における*pACT::LSY1*植物体の根の形態。

(F, G) SAM付近の葉原基の組織切片。(F) empty vector (G) *pACT::LSY1*。

*は維管束の位置を示す。*pACT::LSY1*の葉原基は葉縁部が長く、先端が内向きに丸まる(矢印)。

Scale bars (A) =5 cm, (B),(C) =1 cm, (D) =600 μm, (F,G) = 200μm, (H,I) = 300μm

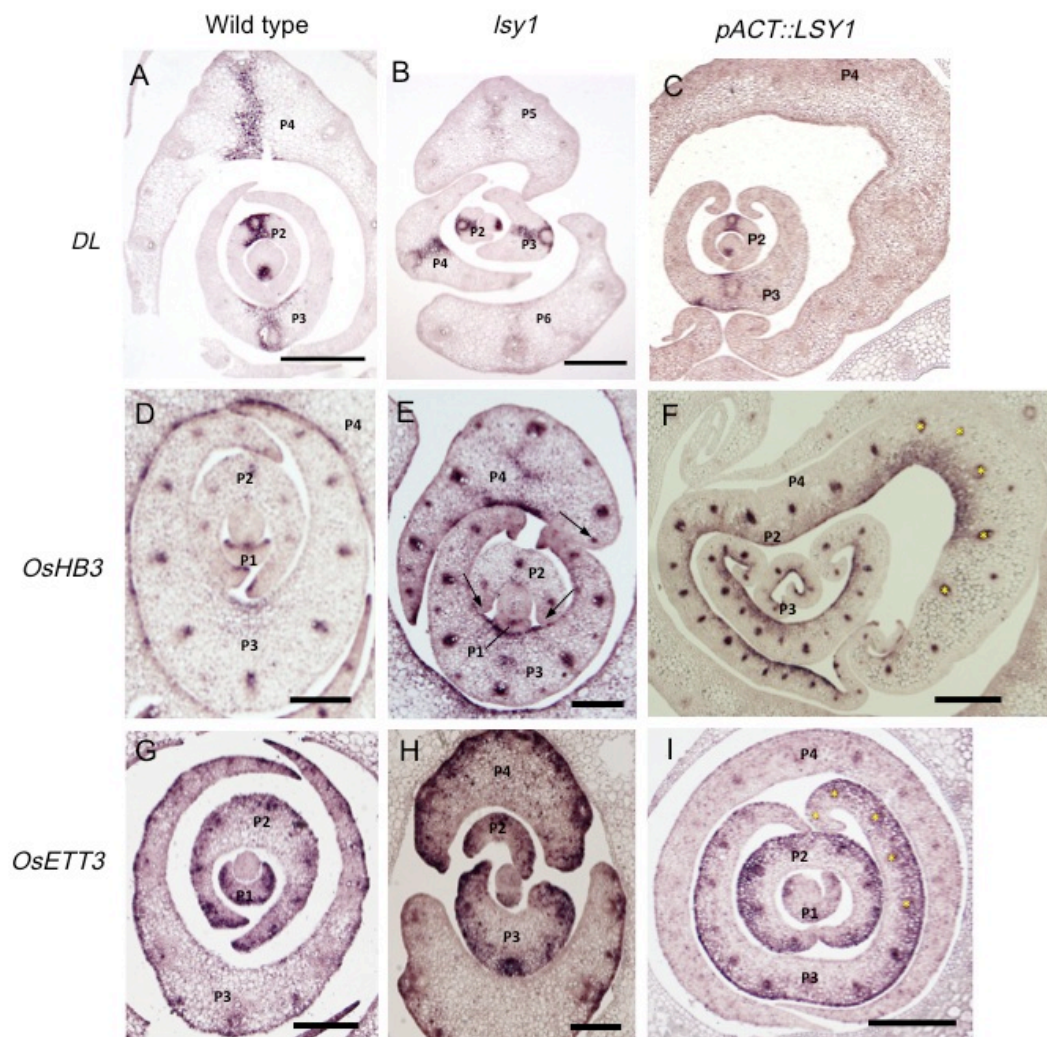


図3-2 野生型、*lsy1*、*pACT::LSY1*における中肋・向背軸マーカー遺伝子の*in situ*ハイブリダイゼーション
 (A,D,G) 野生型、(B, E, H) *lsy1*、(C,F,I) *pACT::LSY1*
 (A-C) *DL* probeによる中肋部の染色。(D-F) *OsHB3* probeによる向軸側表面の染色。
 (G-I) *OsETT3* probeによる背軸側表面の染色。発現領域の拡大している箇所を*で示す。
 Scale bars = 200 μ m

グナルの減衰が野生型よりも早く、P3 で発現が減衰し、P4 で消失していた (図 3-2C)。また、*pACT::LSY1* の P3 における *DL* の背軸側での発現領域は、野生型の P3 と比較して拡大していた (図 3-2C)。

次に向軸側の細胞運命の決定に関与していると考えられているイネの *HD-ZIP III* 遺伝子の一つである *OSHB3* 遺伝子の発現を調査した。野生型の葉原基における *OSHB3* 遺伝子の発現は向軸側の表面と葉縁の向軸側先端で発現が見られた (図 3-2C)。この発現パターンは野生型と *lsy1* の間で大きな違いはみられなかったが (図 3-2C, D)、葉縁構造がみられない *lsy1* の葉原基の端では *OsHB3* の発現は観察されなかった (図 3-2D)。一方、*pACT::LSY1* における *OSHB3* の向軸側、および葉縁における発現パターンは野生型と類似していたが、向軸側表面だけでなく葉の内側にまで *OsHB3* の発現領域が拡大していた (図 3-2F)。

更に、背軸側の細胞運命の決定に関与していると考えられている *ETTIN* 遺伝子のイネホモログの一つ、*OsETT3* の発現領域の変化を調査した。*OsETT3* は、野生型では背軸側の領域と葉縁の背軸側先端で発現が見られ (図 3-2G)、*lsy1* でも葉の大部分でその発現パターンは野生型と一致していた (図 3-2H)。また野生型の葉縁先端にみられるような強い発現は観察されなかった (図 3-2H)。*pACT::LSY1* における *OsETT3* の発現パターンは *OSHB3* と同様、葉原基における背軸側での発現領域が維管束付近まで拡大していた (図 3-2I)。

このことから、*lsy1* 変異体の葉原基では *DL* の発現部位や一部の異常な *lsy1* 変異体の葉原基では向軸側領域が縮小していること、過剰発現体では葉の成長過程に異常が見られること、向軸側、背軸側両方の領域が拡大していることなどが示唆された。

変異体及び過剰発現体における分子マーカー遺伝子の発現量

野生型と *lsy1* 変異体の SAM 付近の組織を用いた Real-time PCR により、これら 3 つのマーカー遺伝子の発現量を相対的に比較した。その結果、いずれの遺伝子においても *lsy1* 変異体と野生型の組織間で発現量の有意な差は見られなかった (図 3-3)。

次に、*pACT::LSY1* の SAM 付近における遺伝子発現量を Real-time PCR により解析した (図 3-4)。まず、*pACT::LSY1* における *LSY1* の発現量を調査した。その結果、過剰発現体では野生型の 50 倍以上の発現量が観察された。続いて *OSHB3*、*OsETT3*、*DL* の発現量を調査したところ、*OSHB3* は野生型と比較して有意差が見られなかったが、*OsETT3* の発現量は野生型と比較して約 2.5 倍に上昇し、*DL* の発現量は野生型と比較して約 50% まで減少していた (図 3-4B)。

これらの結果から、*LSY1* の過剰発現は葉の向背軸領域や中央領域のマーカー遺伝子の発

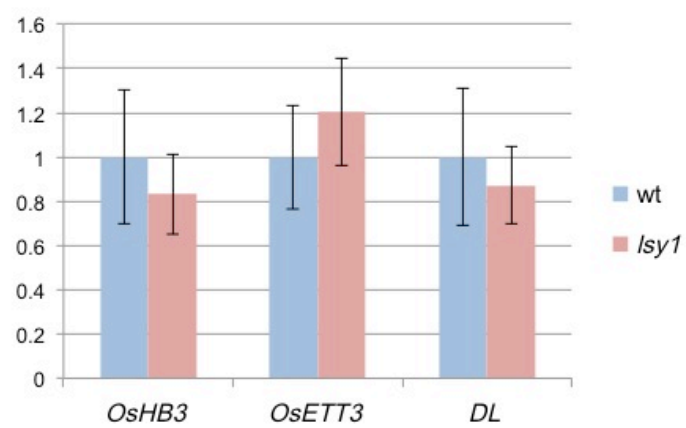


図3-3 Real-time PCRによる中肋・向背軸マーカ遺伝子の発現量

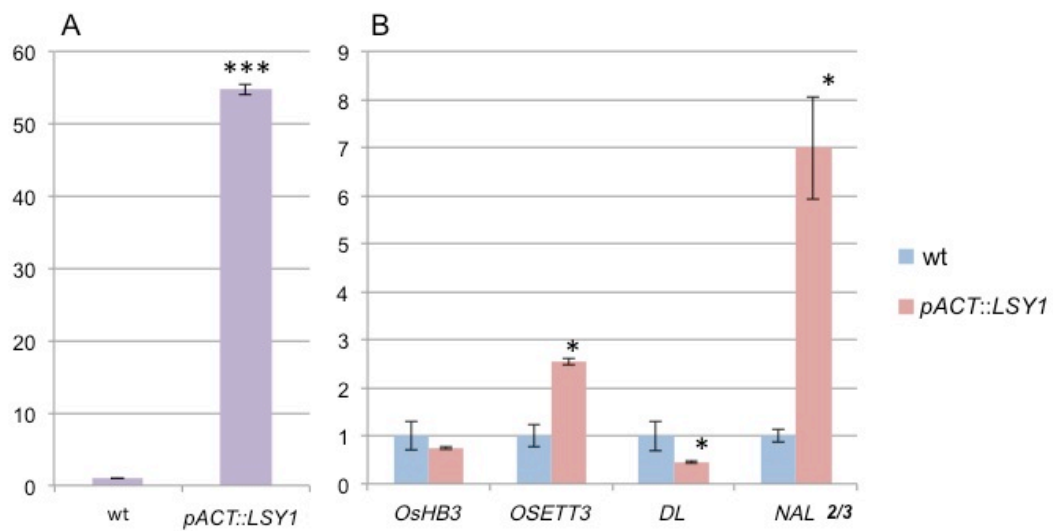


図3-4 Real-time PCRによる*pACT::LSY1*の遺伝子発現量の比較

(A) 野生型を1とした時の*LSY1* mRNAの発現量

(B) 野生型を1とした時の*OsHB3*、*OSETT3*、*DL*、および*NAL2/3* mRNAの発現量

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

現領域および時期に影響を与えることが明らかとなった。また、*pACT::LSY1* の葉では葉縁が強く向軸側に巻くこと、*pACT::LSY1* の SAM 付近ではコントロールと比較して *OsETT3* の発現が増加していたこと、*DL* の発現領域が背軸側でやや広がっていたことなどから、特に背軸側の組織形成や細胞増殖が促進されていることが示唆された。

***LSY1* と *NAL2/3* の遺伝子間相互作用の解析**

LSY1 と *NAL2/3* の機能分化と遺伝子間相互作用を明らかにするため、まず、*lsy1*、*nal2/3* 変異体それぞれの遺伝的背景における *NAL2/3*、*LSY1* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって観察した。*lsy1* の葉原基における *NAL2/3* の発現は野生型と同様に葉縁部分で見られた(図 3-5B)。同様に、*nal2/3* の葉原基における *LSY1* の発現も P1 葉原基、および P2、P3 葉原基の側方および葉縁で見られた (図 3-5A)。このことから *NAL2/3*、*LSY1* は両者とも互いの発現領域に影響を与えないことが示唆された。

次に、茎頂付近から得られたサンプルを用いて、*lsy1* 変異体における *NAL2/3* の発現量、および *nal2/3* における *LSY1* の発現量を Real-time PCR によって比較した。その結果、*lsy1* では *NAL2/3* の発現量は野生型と比べて有意な変化が見られなかったが、*nal2/3* において *LSY1* の発現量が 2 倍に増加していた (図 3-5C)。一方、*pACT::LSY1* でも *NAL2/3* の発現量を調査したところ、7 倍に上昇していた (図 3-4B)。

次に表現型における遺伝子間相互作用を、*lsy1* と *nal2/3* の三重変異体を作成することによって調査した (図 3-6)。*lsy1 nal2/3* 三重変異体の実生は *lsy1*、*nal2/3* と比較してさらに矮性で、葉には強いねじれが生じていた (図 3-6A)。葉原基の横断切片を観察すると *lsy1 nal2/3* 三重変異体の葉原基は、*nal2/3* と同様に葉の両側の側方を欠く表現型を示したが、その異常の程度は *nal2/3* よりも強く、葉縁が丸くなっていた (図 3-6D)。*lsy1 nal2/3* 三重変異体における葉縁の表現型を定量化するため、P4 の葉原基の左右の長さの差を測定した (図 3-6E)。第 2 章で述べた通り、*lsy1* の葉原基の左右差は野生型よりも大きく、個体間差が大きいのが特徴であった。一方、*nal2/3* は左右差が野生型よりも小さかった。それに対して、*lsy1 nal2/3* 三重変異体の P4 の葉の左右差は *lsy1* と *nal2/3* の中間の値を示し、個体間差は *nal2/3* よりも大きかった。また、野生型、*lsy1*、*nal2/3*、*lsy1 nal2/3 lsy1 nal2/3* 三重変異体の葉原基の維管束の数を計測したところ、三重変異体の P4 の維管束数は、*lsy1*、*nal2/3* と比較して更に少なくなっていた (図 3-6F)。このことから、*lsy1 nal2/3* 三重変異体の表現型は相加的であると考えられた。

以上の結果から、*LSY1* および *NAL2/3* はそれぞれ独立に葉の形態形成に関与していることが示唆された。

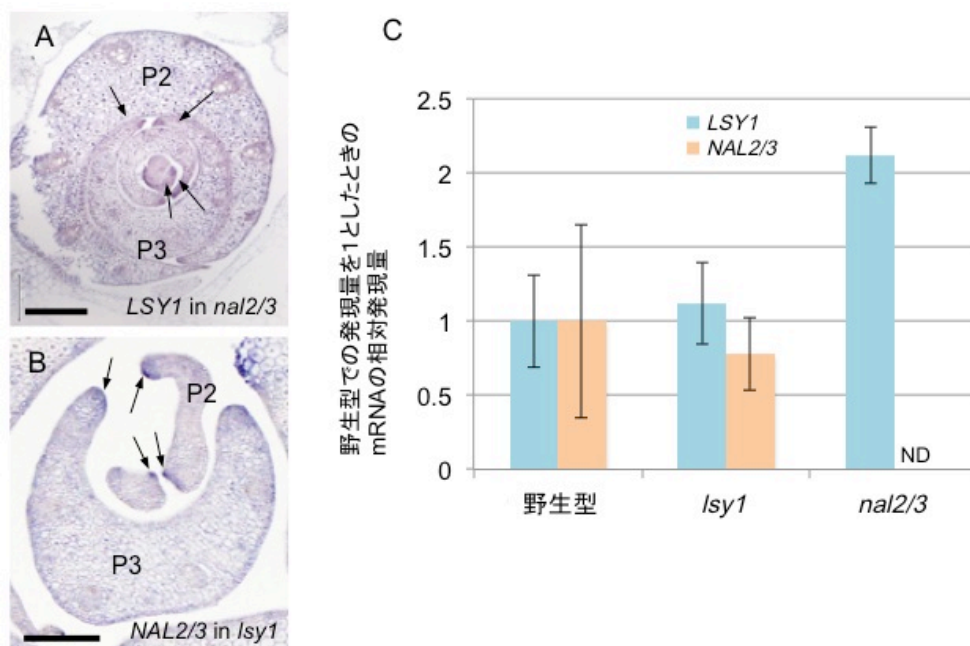


図3-5 *Isy1* および *nal2/3* 変異体における *LSY1* および *NAL2/3* 遺伝子の発現

(A) *nal2/3* 変異体のシュートにおける *LSY1* の in situ ハイブリダイゼーション

(B) *Isy1* 変異体のシュートにおける *NAL2/3* の in situ ハイブリダイゼーション

(C) RT-PCR法によるシュートにおける *LSY1* および *NAL2/3* の発現

矢印は遺伝子の発現部位を示す。Scale bars = 100μm

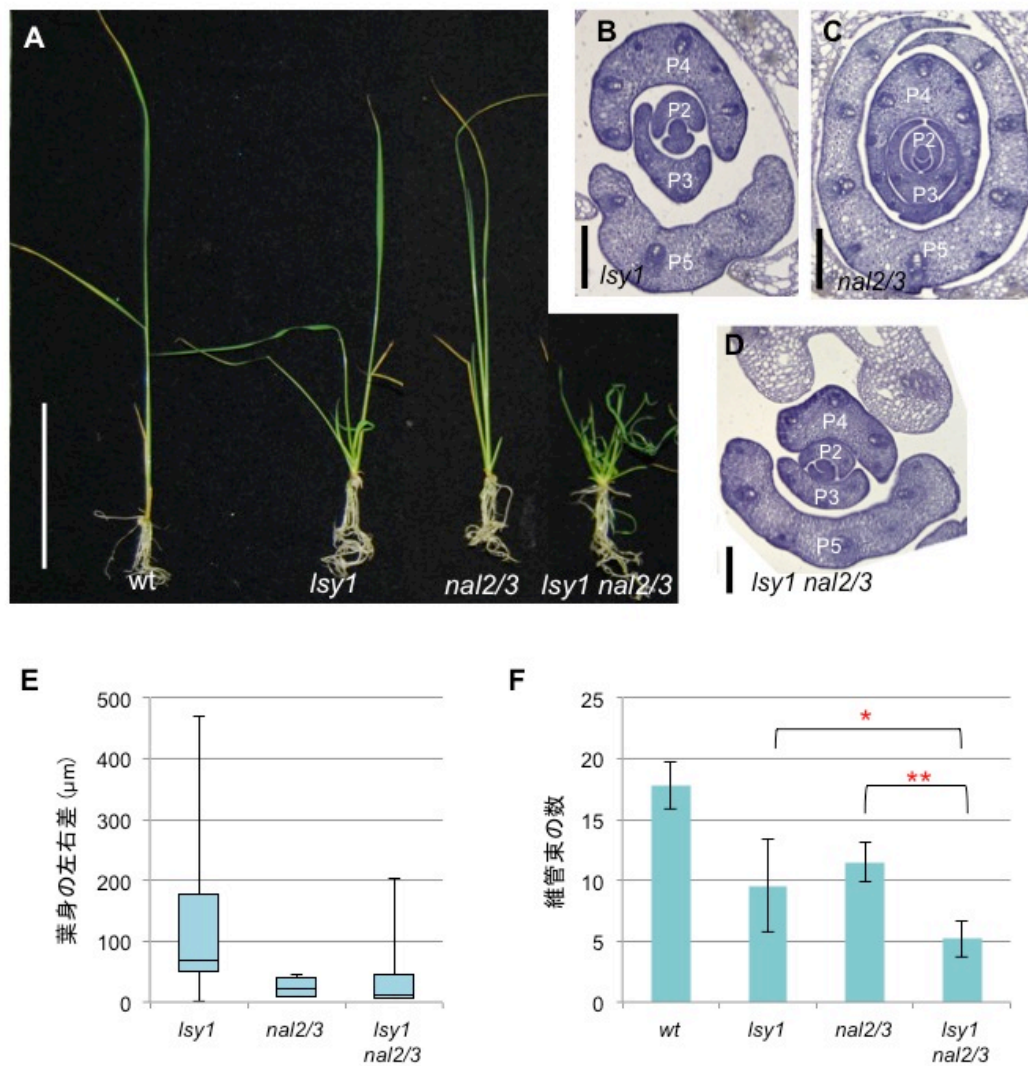


図3-6 *lsy1 nal2/3* 3重変異体の表現型

(A) 播種後14日目の野生型, *lsy1*, *nal2/3*, *lsy1 nal2/3* 3重変異体の植物体

(B-D) SAM付近における横断組織切片 (B)*lsy1*, (C) *nal2/3*, (D) *lsy1 nal2/3* 3重変異体

(E) P4葉原基の葉身の左右差 (F)P4葉原基の維管束の数

Scale bars: A = 5cm, B-D = 200μm

LSY1 と葉の表面構造の関連

イネの葉や穎におけるトライコーム（毛茸、毛状突起）の有無は、収穫時や脱穀時の粉塵発生に関わっており、農業的な重要形質となりうる。コシヒカリや日本晴、T-65 など多くのイネ品種において植物体の表面に形成されるトライコームは、その形状から 1 細胞からなる bristle と 2 細胞からなる hair の 2 種類に分類される。さらに bristle-type のトライコームは形状およびその存在場所により、向軸側に存在する bristle-type Ia、背軸側に存在し、Ia よりやや小さい bristle-type Ib、Ib よりさらに小さく、葉の表面に対し垂直に立っている bristle-type II の 3 種類に分類されるとの報告もある（Yamamoto *et al.*, 1997）。

Angeles-Shim らは、無毛のアフリカイネ *O. glaberrima* の無毛性に関与する遺伝子を、コシヒカリとの染色体置換系統を用いたポジショナルクローニングおよび相補性試験から特定し、*DEP(deplious)*とした。また同時期に Zhang らも同遺伝子を特定し *NUDA* と名付けた（Angeles-Shim *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012）。無毛 *O. glaberrima* における *DEP* のアミノ酸配列をコシヒカリと比較すると、3 つのアミノ酸置換および 1 アミノ酸欠失が見られたが、*O. glaberrima* の無毛および有毛の品種間、およびコシヒカリと T-65 の無毛変異体間のアミノ酸配列を比較したところ、それぞれの間でアミノ酸配列の変異は見られなかった。また、*O. glaberrima* とコシヒカリの *DEP* 遺伝子上流 2kbp の領域にも差異は見られなかった（Angeles-Shim *et al.*, 2012）。

これらの研究により同定された無毛性の原因遺伝子 *DEP/NUDA* 遺伝子は *LSY1* と同一な遺伝子（Os05g0118700）であった。しかしながら、上記の解析においては葉の形態形成の異常は報告されていない。そこで *LSY1* における葉のトライコームとの関わりを明らかにするため、野生型、*lsy1* の葉、穎および *LSY1* の過剰発現体の葉の表面構造を SEM により観察した（図 3-7）。

まず、野生型では葉縁でに沿ったトライコームの形成が見られたのに対して（図 3-7A）、*lsy1* ではほとんど見られなかった（図 3-7B）。葉の向軸側表面では、bristle-type Ia のトライコームが機動細胞列上に形成されており、bristle-type II のトライコームや hair の存在も確認された（図 3-7C）。一方、*lsy1* の葉の向軸側表面では hair は観察されたが、bristle-type のトライコームは確認できなかった（図 3-7D）。また穎の表面においては、野生型では穎に細長いトライコームが多数見られ、穎の表皮細胞列の間から規則的に 2 細胞性の hair と考えられるトライコームが形成されていた（図 3-7E,G）。一方、*lsy1* では長いトライコームは見られず、表皮細胞列間の hair 様のトライコームのみが確認された（図 3-7F,H）。これらの結果から、*lsy1* では hair 様のトライコームの分化は起こるが bristle-type のトライコームが形成されないことが明らかとなった。したがって、葉の表面構造に関し

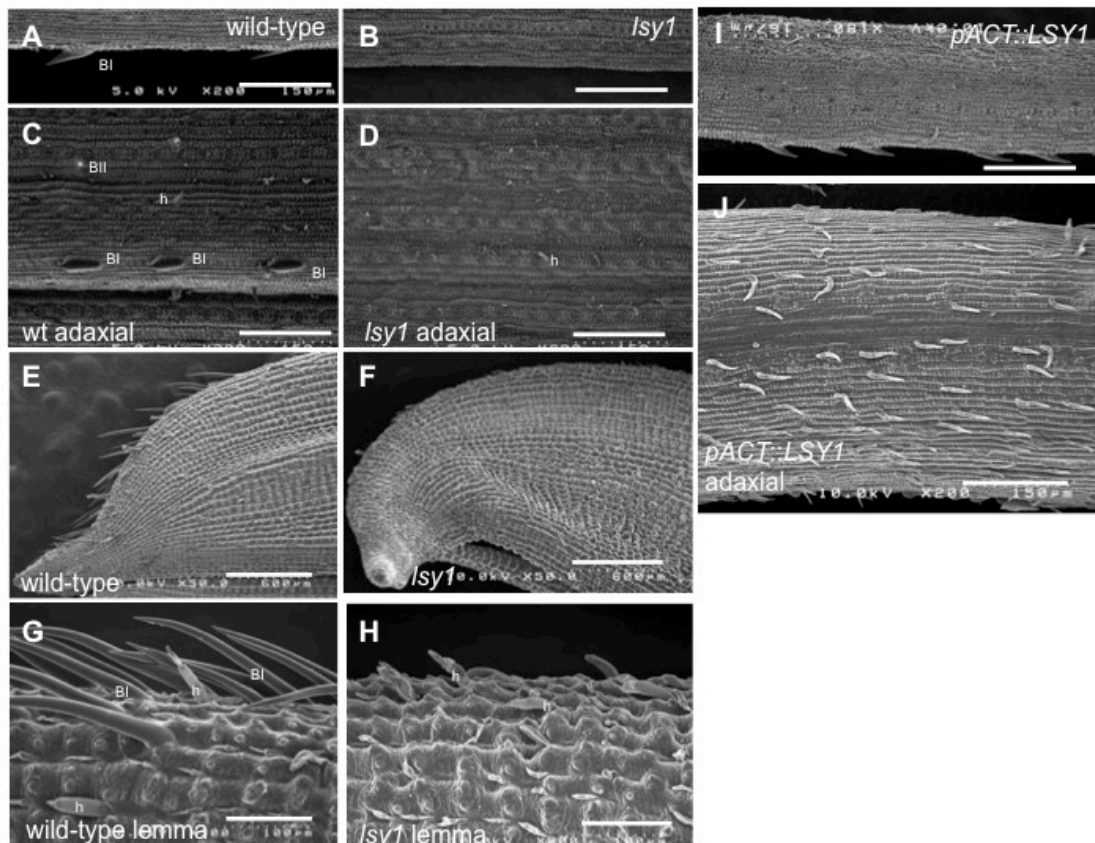


図3-7 野生型と *lcy1* および *pACT::LSY1* の表面構造

(A, C, E, G) 野生型。 (B, D, F, H) *lcy1* (I-K) *pACT::LSY1*

(A, B, D) 葉縁における毛茸の構造 (C, D, J) 葉の向軸側表面 (E-H) 穎の表面

h: hair、BIa: bristle-type Ia、BII: bristle-type Ib

Scale bars: A-D, I, J = 150μm, E, F = 600μm, G, H = 100μm

て *lsy1* と *dep/nuda* は同一の表現型を示すことが明らかになった。

次に *LSY1* の過剰発現体の葉の表面構造を観察した。*pACT::LSY1* では、向軸表面に hair が多数確認された (図 3-7I) ほか、葉縁のトライコームも野生型と比較して多く確認された (図 3-7J)。

LSY1 がトライコームの形成に関与するならば、*LSY1* は野生型の葉においてトライコームの発生過程で発現している可能性がある。このことを明らかにするため、*LSY1* の発現を野生型の P4 葉原基の葉身部表面において観察した (図 3-8)。その結果、*LSY1* は葉縁だけでなく、葉の向背軸側表面の細胞で規則的に発現している様子が確認された。この発現はトライコームが分化するタイミングと場所に一致することから、*LSY1* 遺伝子は発生が進んだ葉原基では、表皮細胞の一部の細胞で特異的に発現し、トライコームの分化に関与している可能性が示唆された。

次に表皮構造における *WOX3* サブファミリー間の機能分化と遺伝子間相互作用を明らかにするため、*nal2/3* 変異体および *lsy1 nal2/3* 三重変異体の葉の向軸側表面の構造を観察した。*nal2/3* 変異体では、野生型と同様に hair および bristle-type のトライコームの存在が確認された (図 3-9C)。一方、*lsy1 nal2/3* 三重変異体では hair は観察されたが、bristle-type のトライコームは確認できなかった (図 3-9D)。それに加えて、三重変異体では表皮細胞列が乱れている傾向が観察された。この細胞層の乱れは、三重変異体の植物体で見られた葉のねじれと関連があると考えられた。

以上の結果から、*LSY1* 遺伝子は葉および穎のトライコーム形成に関与すること、イネにおける 3 つの *WOX3* 遺伝子は共同して表皮細胞の形態に関わっていることが示唆された。

3-4 考察

LSY1 遺伝子は向軸-背軸性を制御することにより葉の側方方向の形態形成を担う

本章の解析から、*LSY1* は向背軸性を制御することによって葉の側方方向の形態形成に関与することが明らかとなった。まず、*lsy1* 変異体における向背軸マーカー遺伝子の発現解析の結果から、葉縁構造ができていない *lsy1* 変異体の葉原基の端では *OsHB3* 遺伝子の発現が観察されない場合が観察された。従って、*LSY1* 遺伝子は向軸側領域での遺伝子発現も弱いながらも正に制御することにより、向背軸境界の確立に関与していると考えられる。一方で、*LSY1* 過剰発現体においては、*OsHB3* および *OsETT3* 遺伝子の発現領域が野生型と比較して葉の内部方向に拡大していた。さらに、Real-time PCR により背軸領域のマーカー



図3-8 P4 葉原基における $LSY1$ 遺伝子の*in situ*ハイブリダイゼーション
 矢印は $LSY1$ が発現している箇所を示す
 Scale bar = 200 μ m

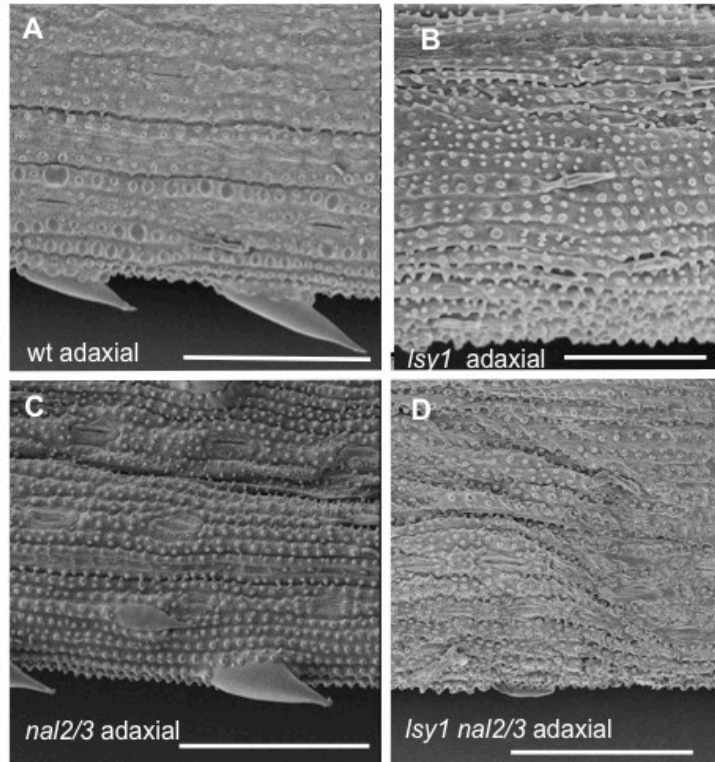


図3-9 *nal2/3* および *lsy1 nal2/3* 3重変異体の表面構造
 (A) 野生型 (B) *lsy1* (C) *nal2/3* (D) *lsy1nal2/3*
 Scale bars = 100μm

一遺伝子である *OsETT3* 遺伝子の発現が野生型と比較して 2.5 倍に増加していたことから、*LSY1* が向軸側と背軸側の双方の遺伝子の発現領域を正に制御しうること、背軸側の遺伝子を発現量を増大させることが確認された。これらの結果を合わせて考えると、*LSY1* は葉原基の側方領域で向軸側と背軸側の遺伝子（特に背軸側遺伝子）の発現を制御すると推測される。今回の解析結果から得られた *LSY1* 遺伝子の機能モデルは以下の通りである（図 3-10）。野生型では *LSY1* は葉原基の側方で発現し、向軸、背軸の遺伝子発現を正に制御する。その結果、葉原基の側方末端では向軸性、背軸性に関わるそれぞれの遺伝子発現が近接、または重複し、葉縁の形態形成と伸長が生じる。一方、*lsy1* 変異体では、*LSY1* の機能欠損により向背軸性に関わる遺伝子発現が不完全となり、それぞれの遺伝子発現が近接しない葉縁部が生じる。その結果、葉縁が欠失する。一方、*LSY1* 過剰発現体においては、*LSY1* 遺伝子が葉全体で機能することによって、向背軸性両方の遺伝子、特に背軸側の運命決定に関わる遺伝子が葉原基全体で強く発現することによって、葉原基の広い範囲で側方の方向への伸長と葉縁の形成、内側への過剰な細胞増殖が起こる。

WOX3 が向背軸性の制御に関わることは、双子葉植物においても明らかとなっている。*WOX3* およびその近縁 *WOX1* 遺伝子の変異体であるシロイヌナズナの *prs wox1* やペチュニアの *maw chsu* 変異体では、*WOX3* および *WOX1* 遺伝子の発現が失われることで、葉の背軸側の細胞列が増加し、葉縁が背軸側から向軸側へ巻き上げられる表現型を示す (Vandenbussche *et al.*, 2009)。また、これらの変異体において、背軸側マーカー遺伝子 (*prs wox1* では *ARF4*、*maw* では *ARF4*、*KANADI*、*ETTIN*) の発現量が野生型と比較して有意に増加していた (Vandenbussche *et al.*, 2009)。このことから、シロイヌナズナやペチュニアにおいては、*WOX3* および *WOX1* は葉の背軸側の細胞増殖を抑制していることが示唆された (Nakata *et al.* 2012, Vandenbussche *et al.*, 2009)。一方、*Nicotiana sylvestris* の *bladeless lam1* の原因遺伝子 *NsSTF1* の過剰発現体は、葉縁が背軸側から向軸側へ巻き上げられる表現型を示す (Tadege *et al.*, 2011)。このように、*WOX3* および *WOX1* は背軸性の遺伝子発現に関与するが、それらの下流で働くメカニズムは種により必ずしも一定していない。

今回の解析では、*LSY1* は主に背軸側遺伝子の発現を正に制御することが明らかになった。これらのことから双子葉植物、単子葉植物の両方で *WOX3* が向背軸遺伝子の発現領域を制御すること考えられる。しかし、単子葉植物においては *WOX3* 遺伝子の発現領域が双子葉植物の発現領域とは大きく異なっている。ことから、向背軸性の制御と葉の側方方向への伸長に関わる機構は、双子葉植物のものとは異なっている可能性が考えられる。シロイヌナズナ *PRS*、*WOX1* の葉原基側方における発現は、P3 から P6 の葉原基の 6 層の細胞のうち中央の 2 細胞列でのみ観察されるのに対し (Nakata *et al.*, 2012)、*LSY1* および *NAL2/3*、

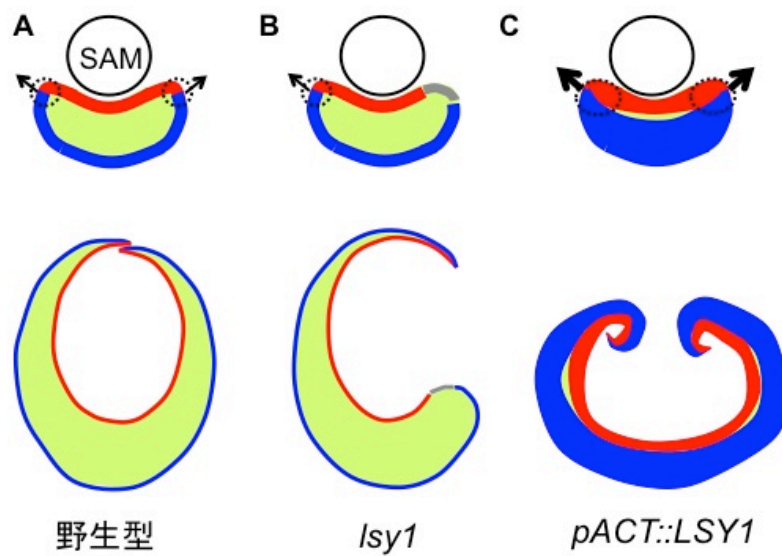


図3-10 野生型、*lsy1*変異体およびLSY1過剰発現体における向背軸形成遺伝子の発現領域

野生型(A)、*lsy1*変異体(B)およびLSY1過剰発現体(C)における初期葉原基（上段）およびその後（下段）の葉の向背軸パターンニングと側方方向の形態形成をシェーマとして示した。

赤、青はそれぞれ向軸、背軸のアイデンティティーをもつ領域を示す。*lsy1*変異体では葉縁の向軸側アイデンティティーを担う遺伝子が発現しない場合がある（灰色）。

向背軸境界（破線で囲んだ部分）で葉は側方方向（矢印で示す）に伸長するとされている。

NS1/2 (Nardmann *et al.*, 2004) では *LSY1* の P1、P2 葉原基でのやや広い側方全体での発現を除き、葉縁の先端でのみ発現が見られる。双子葉植物の葉の形成過程と比較し、イネの葉原基が SAM を包み込むように形成されることを考慮すると、*LSY1* が葉縁において背軸側の遺伝子発現を正に制御することで葉縁の伸長に関わるという仮説は理にかなっているかもしれない。

LSY1 過剰発現体の葉では、*DL* 遺伝子の発現量が減少し、中肋形成が抑制された。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは葉原基における *DL* の発現は野生型よりも早く減衰した。*dl* 変異体では葉原基の中央部における細胞増殖が抑制されることによって、成熟葉では中肋を欠き、垂れ葉の表現型を示す (Yamaguchi *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2011)。*DL* の発現制御機構に関しては明らかになってはいないが、*DL* は YABBY タンパク質をコードし、双子葉植物においては背軸側決定および向背軸境界の決定に関わる (Siegfried *et al.*, 1999, Bowman 2000)。*LSY1* 過剰発現体の葉では、本来発現していない *LSY1* が葉の中央部で発現することによって、*DL* の発現維持に必要な向背軸境界が乱され、その結果 *DL* 遺伝子発現が減少した可能性がある。

一方、これまでの解析から *DL* 遺伝子が中肋形成のみならず葉の中央ドメインの伸長および側方ドメインとの相互作用を担う可能性が示唆されている (Itoh *et al.*, 2008b)。このことと初期葉原基の *LSY1* および *DL* の発現領域を考慮すると、*LSY1* の過剰発現体において *DL* が減少することは、葉原基の初期形態形成において、側方で発現する *LSY1* が *DL* の発現領域を葉原基の中央部のみに抑制することで、葉原基の側方ドメインの位置を決定しているという可能性も考えられる。このことは *lsy1* 変異体で複数の中肋を持った葉を形成したとする Obara らの報告 (Obara *et al.*, 2001) を支持するものであるが、本解析では *DL* の発現は *lsy1* 変異体で変化せず、異所的な中肋形成も確認できなかったことから、今後更に検討する必要があると思われる。

***LSY1* 過剰発現体に認められた根の異常と他の *WOX* 遺伝子との関連**

LSY1 の過剰発現体は、シュートや根に顕著な異常を示した。これと類似した表現型をもつのが、イネにおける *QUISENT-CENTER SPECIFIC HOMEBOX (QHB)* およびシロイヌナズナ *WUS (AtWUS)* の過剰発現体である。これらの *WOX* 遺伝子の過剰発現体は多げつ性を示し、葉の形態および根の分化に異常が見られる。*QHB* は根の静止中心で発現し、冠根における根の形成に関わる (Kamiya *et al.*, 2003)。*AtWUS* は SAM の L3 層下で発現し、幹細胞の分裂を制御することで SAM における幹細胞維持に関わる (Mayer *et al.*, 1998)。

LSY1 の mRNA は根に発現が認められたが、*lsy1* 変異体では根に関する異常は観察されなかった。一方で *LSY1* の過剰発現体では冠根の発生が抑制され、発生後も早期に伸長を停止するという表現型を示した。*LSY1* の過剰発現体の表現型は根のメリステムにおける幹細胞の異常に起因すると考えられる。以上から *LSY1* は他の *WOX* 遺伝子と協同し、根の幹細胞の維持に関わる機能を持つことが示唆される。また、*NAL2/3* の mRNA は側根に発現が認められ、*nal2/3* 変異体では側根および根毛の形成が障害されることが報告されている (Cho *et al.*, 2013, Yoo *et al.*, 2013)。このことから、*LSY1* と *NAL2/3* は根の成長においても異なる機能を担っていると考えられる。

***LSY1* と *NAL2/3* の機能分化と遺伝子間相互作用**

LSY1 遺伝子と *NAL2/3* 遺伝子では、機能欠失変異体や過剰発現体の表現型に違いが見られた。*lsy1* では P2 から葉の側方領域を左右非対称に欠く表現型を示したのに対し、*nal2/3* 2 重変異体では P4 以降で葉縁が左右対称に短縮した。*lsy1* では花器官原基の形成異常が認められたが、*nal2/3* では認められなかった。*LSY1* 過剰発現体は、葉が薄く、葉縁が向軸側に巻き込まれるなどの形態異常を伴ったが、*NAL2/3* 過剰発現体の表現型は葉が側方方向に拡大し、維管束の数が増えたが、大きな形態異常は見られなかった (Ishiwata *et al.*, 2013)。

遺伝子間相互作用の解析においては、*lsy1 nal2/3* 三重変異体の植物体は *lsy1* 変異体、および *nal2/3* 二重変異体よりも強い矮性を示し、その葉の表現型は *lsy1* と *nal2/3* 両方の性質を併せ持っていた。また、それぞれの遺伝子発現に関しては、*lsy1* 変異体における *NAL2/3* mRNA の発現、*nal2/3* 変異体における *LSY1* mRNA の発現も野生型の葉原基における発現パターンと概ね一致していた。一方で、*nal2/3* 変異体において *LSY1* 遺伝子の発現が増加し、*LSY1* の過剰発現体では *NAL2/3* 遺伝子の発現は若干増加していた。これらの発現変化がそれぞれの遺伝子の発現領域が変化したことによる二次的な効果であるのか、*LSY1* 遺伝子と *NAL2/3* 遺伝子が互いに発現を調節する機構が存在するのかについては、今後の検討課題であるが、以上の結果を総合すると、*LSY1* と *NAL2/3* はそれぞれ異なる機能を持ち、独立して葉の側方方向の形態形成に関与していると考えられる。すなわち、イネでは二種類の *WOX3* 遺伝子が機能分化していることを示している。

一方で、双子葉植物では *WOX* 遺伝子ファミリー間で機能分化、または協調して葉の側方方向の形態形成を行っていることが示唆されている。シロイヌナズナでは *WOX3* 遺伝子である *PRS* と *WOX1* が協同して向背軸遺伝子を抑制することで葉縁の形態形成に関与することが明らかになっている (Nakata *et al.*, 2012)。ペチュニアでは *WOX1* 遺伝子である *MAEWEST* (*MAW*) が花器官および葉の側方方向の形態形成に重要であることが知られて

いる(Vandenbussche *et al.*, 2009)。特に *maw* 変異体でみられる心皮や花卉、柱頭の融合不全は、*LSY1* における雌性組織の異常と類似している。双子葉植物において *WOX1* が葉の側方方向の形態形成に関わっているという例は他にも、*Medicago truncatula* の *stenofolia* (Tadege *et al.*, 2011)、*Nicotiana sylvestris* の *bladeless lam1* (Tadege *et al.*, 2011)、*Pisum sativum* の *lathyloides* (Zhuang *et al.*, 2012)、*Lotus japonicus* の *narrow organs1* (Zhuang *et al.*, 2012)など多く報告されている。これらの知見から、双子葉植物においては *WOX1* 遺伝子も側方方向の形態形成に重要な役割を果たすことが推測される。一方で、単子葉植物においては *WOX1* 遺伝子のオルソログは見つかっていない。*WOX* 遺伝子ファミリーの系統解析による分類は様々なものが報告されているが、Nardmann らは、裸子植物と被子植物の *WOX* ファミリーの系統解析を行い、裸子植物には *WOX3* 遺伝子はあるが *WOX1* 遺伝子のオルソログが見つからないこと、原始的な被子植物であるアムボレラには *WOX1* 遺伝子のオルソログがあること、*WOX1* と *WOX3* が系統解析上近縁であると考えられることから、裸子植物における *WOX3* が、被子植物への移行の段階で *WOX1* および *WOX3* のクレードに分かれたと主張し (Nardmann and Werr, 2013)、Ishiwata らは、双子葉植物の *WOX1* の機能が単子葉植物ではイネおよびトウモロコシの *NAL2/3* および *NS1/2* などの *WOX3* に置換されたと提唱した (Ishiwata *et al.*, 2013)。本研究における解析も、このことを部分的に支持する結果となった。すなわち、向背軸関連遺伝子の制御によって葉縁の形態形成制御するというこれまで双子葉植物で示されていた *WOX1* と *WOX3* の機能が、単子葉植物では二つの *WOX3* の機能分化によって保存されていると考えられた。これらの機能分化の多様性が、双子葉植物および単子葉植物の多様な葉の形態形成に関与すると推測される。

毛茸の形成における *LSY1* 遺伝子の役割

lsy1 変異体の葉では *bristle-type* のトライコームが形成されなかった。これらの結果は *LSY1* 遺伝子と同一な *DEP/NUDA* 遺伝子がトライコームが形成に関わるとする報告と矛盾しない (Angeles-Shim *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2012)。一方で、*LSY1* 遺伝子を原因とする無毛の変異体や系統では、葉の形態形成異常は報告されていない。このことは、*DEP/NUDA* 遺伝子の解析で用いられた変異体や系統は *lsy1* の弱いアレルである可能性がある。実際、これらの報告では少なくとも正常型の変異型でタンパクのアミノ酸変異は確認されていない。

P4 葉原基では、葉原基の表皮細胞のうち特定の細胞列で *LSY1* の発現が観察された。このことから、*LSY1* は P4 葉原基の表皮で将来毛茸を形成する細胞列でのみ毛茸の形成を制

御していると考えられる。一方、過剰発現体の葉の表面では、多数の過剰な hair と葉縁に分化するトライコームが確認された。また、野生型の類で見られた細長いトライコームに類似したものの確認された。これらの結果は、*LSY1* 遺伝子の過剰かつ異所的な発現が、葉の様々なトライコームの形成を促したことによるものと推測される。一方で、*LSY1* の過剰発現体の葉において **bristle-type** の毛茸は確認できなかった。

イネ科におけるトライコームの形成機構については、未だ不明な点が多い。最近オオムギの *NAL2/3* のオルソログである *NLD1* が、葉原基の表皮細胞のうち特定の細胞列のみで発現していること、*nld1* 変異体ではトライコームの密度と数が少なくなっていることが報告された (Yoshikawa *et al.*, 2016)。この報告から、イネ科の祖先種においてトライコームの形成に関与していた *WOX3* が、その後の進化の過程で2つのサブクラスに分かれ、それらの機能が種ごとに分化した可能性が考えられた。

第4章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 総合考察 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第6章 摘要 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

謝辞 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

引用文献 学術雑誌論文として出版する計画がある内容に関する文献のため公表できない。5年以内に出版予定。