

イネ茎頂分裂組織の分化および維持機構の  
遺伝学的解析

東京大学大学院農学生命科学研究科  
生産・環境生物学専攻  
平成 11 年度博士課程進学  
氏名 佐藤 奈美子  
指導教官 長戸 康郎

# 目次

## 序論

植物における茎頂分裂組織	2
植物の胚発生	4
SAM と葉	6
イネの発生の遺伝学的解析と育種	9

## 第1章 茎頂分裂組織を欠失する *shootless* 変異体の解析

緒言	11
材料および方法	13
結果	
完成胚の形態	14
胚発生過程	21
不定芽形成能力	21
イネホメオボックス遺伝子、 <i>OSHI</i> の発現	24
考察	
SAM 分化における <i>SHL</i> 遺伝子の位置づけ	28
<i>SHL</i> 遺伝子と胚器官	30
葉原基と SAM	31

## 第2章 弱い表現型を示す *shootless2* および *shootless1* 変異体を用いた 茎頂分裂組織の分化・維持機構の解析

緒言	32
材料および方法	34
結果	
胚発生過程	35
栄養生長期の表現型	41
再分化個体の解析	51
<i>shl2</i> 対立遺伝子間の表現型の相関	51
<i>shl2 sho2</i> および <i>shl1 sho2</i> 二重変異体の解析	51
考察	
シュートの発生における <i>SHL2</i> および <i>SHL1</i> 遺伝子の機能	56

SAM 分化および維持についての新しい見解	57
<i>shl2</i> 変異体および <i>shl1</i> 変異体と <i>sho</i> 変異体の比較から	58
<i>SHL</i> 遺伝子と胚盤	59
第3章 茎頂分裂組織の維持に異常が見られる変異体の同定と解析	
緒言	60
材料および方法	61
結果および考察	
発芽後枯死する変異体の同定	62
<i>odm129</i> 変異体の解析	72
<i>odm247</i> 変異体の解析	82
第4章 <i>aberrant regionalization of embryo 3</i> 変異体を用いた胚の領域化の解析	
緒言	94
材料および方法	96
結果	
完成胚の形態	96
胚発生過程	98
胚発生中の <i>OSHI</i> および <i>OsSCR</i> 遺伝子の発現	104
栄養生長期の形態	109
<i>shl are3</i> および <i>sho are3</i> 二重変異体の解析	109
考察	
<i>are3</i> 変異体における器官の増加様式	112
<i>are3</i> 変異体の表現型の解釈	112
<i>ARE3</i> 遺伝子の機能	115
総合考察	
SAM の分化とイネの胚	118
SAM の維持と植物体	123
イネの SAM の分化および維持の遺伝的骨格	124
摘要	125
謝辞	129
引用文献	131

## 序 論

私たち人間は、生物界の一員である。わたしたちを取り巻く多くの生物が、両親の配偶子の接合によって自らの一生を開始する。この接合によって生まれたひとつの細胞である接合子が、それぞれの生物の形へと生長していくのである。人間自身を含めたあらゆる生物が形作られていく様は、人間の関心をとらえてはなさなかった。その結果、生物の発生は、今日までに、さまざまな考え方でとらえられてきた。17世紀から18世紀にかけては、成体の主要な構成はすべて、接合子のなかにあらかじめ前成されており、個体発生とはそのように前もってつくられている複雑さが展開するものであるとする、前成説が主流であったし、その後、18世紀から19世紀には、比較的単純に構成されている接合子が胚発生をおこなう過程で複雑な形態を徐々に発達させていくという後成説が台頭してきた。人間は、各時代時代で、自らの知識の粋を結集して、生物について考えを巡らせてきたのである。今日に至るまで、そのような人間の営みにかわりはない。

19世紀、ついに、人間は、遺伝と進化という科学的概念を手に入れた。メンデルがエンドウマメを用いた実験で遺伝の現象を発見し、ダーウィンやウォレスが太平洋の島に生息する生物の観察によって進化論を確立するためのヒントを得た (Darwin, 1859; Mendel, 1865; Wallace, 1855)。いかなる生物のかたちも、つきつめるとある遺伝子の機能によってつくられ、その遺伝子は、世代を越えて受け継がれる。しかし一方で、生物は、世代を重ねる間に変化もするというのである。

その後、遺伝と進化の有無については賛否両論、さまざまな論議がなされてきたが、最終的には遺伝と進化という概念は受け入れられ、遺伝子とはどのようなものなのか、遺伝子と生物のかたちがどのようにつながるのか、進化のしくみはどのようなものなのか、などといった、遺伝子と進化にまつわる疑問の解決が試みられるようになった。しかし、解析を進めれば進めるほど、疑問は次のステージへと進み、生物の完全な理解など、あり得ないのではないかという思いが頭をよぎる。さらに、次々とわき出る疑問の中には、生物の本質から離れて、袋小路に入ってしまうようなものもある。

そんな生物学研究の中で、突然変異体を用いた生物の解析は、生物の本質から離れることなく、遺伝子と生物を結びつけて理解するのに非常に有効であった。ショウジョウバエや線虫、シロイヌナズナなどでは、突然変異体を用いた遺伝学

的解析によって、生物の表現型を遺伝子のネットワークで語る事が可能になった (Brenner, 1974; Lewis, 1978; Meyerowitz and Pruitt, 1985; Meyerowitz, 1989)。つまり、それらの生物のからだの構造などの調節が、多くの遺伝子の協調によるものであることが示され、また、その協調のしかたが明らかになったのである。

一方で、遺伝子そのものを単離し、解析する試みもなされ、これを、前述の突然変異体を用いた解析と統合することで、生物についての理解はさらに深まった。例として、ショウジョウバエの体の基本設計がなされる胚発生過程について述べる。ショウジョウバエのからだは、他の多くの生物と同様、背腹と前後で非対称である。これはつまり、からだに背腹軸と前後軸が存在することを意味している。これらの軸は、胚発生初期に形成される。遺伝学的解析によって、ショウジョウバエの胚発生初期の遺伝子には、背腹軸に関与するものと前後軸に関与するもののふたつの遺伝子群に分かれて機能しているものがあることが明らかになった。その後の遺伝子の単離で、それらの遺伝子間の相互作用のしかたが分子生物学的に証明されたのである (総説参照: St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992)。また、植物でも、シロイヌナズナの花で、変異体の解析から ABC モデルと呼ばれるモデルがたてられた (Bowman et al., 1991)。がく片、花弁、雄しべおよび心皮といったシロイヌナズナの花器官が、A、B および C グループに属する数個の遺伝子の組み合わせによってそのアイデンティティを獲得するというのである。その後、遺伝子の単離によってその発現や実際の機能の仕方などが明らかにされ、このモデルが正しいことが確かめられた (Weigel and Meyerowitz, 1993; 1994)。

このように、いくつかの分野では生物についての理解は深まり、それが他の分野にも応用されて、研究の進展も見られる。しかし、いまだ数多くの謎が植物の発生には残っている。

### 植物における茎頂分裂組織

植物のシュートとは、葉、茎および花などの植物の地上部のほとんどを含む部分である。葉は光合成器官で植物の生育に不可欠であり、茎も植物の体制を維持するのに重要であり、さらに、花は生殖器官として植物の生活環のなかで大きな役割を果たす。これらシュートの形成は、茎頂分裂組織 (shoot apical meristem, SAM) の活性に依存する。したがって、植物の形づくりに、SAM は非常に重要である。また、重要であるだけでなく、生活環を通して細胞分裂活性を維持し、ある規則を保って器官を分化し続けていくという現象には、単純に興味をそそら

れる。

そこで、SAM については、植物学者の間で、古くから研究が重ねられた。研究は、まず、形態観察から始まり、さまざまな植物種で、さまざまなタイプの SAM が観察された（総説参照: Steeves and Sussex, 1989; 原, 1972）。SAM は、デボン紀に生息していたリア植物群にはじまり、進化の過程で淘汰されることなく維持され続けた器官なのである（西田, 1998）。しかし、その構造は変異に富んでいる。多くのシダ植物の茎頂には、1 つの倒四面体の始原細胞があり、その 3 つの側面に対して平行な面で規則的に細胞分裂が起こる。始原細胞の 3 側面から切り出された派生細胞は細胞分裂を頻繁に繰り返す。始原細胞と派生細胞群をあわせた領域が分裂組織を構成していることになる。裸子植物はシダ植物よりも複雑な分裂組織を持つ。始原細胞は複数個あり、始原細胞群の側部には、表面に垂直な面で細胞分裂が繰り返されて作られる表層、始原細胞群の直下には中央母細胞群と周辺帯、さらにその下に髄状分裂組織がある。なお、以下、ここで述べた中央母細胞群を central zone (CZ)、周辺帯を peripheral zone (PZ)、髄状分裂組織を rib zone (RZ) と呼ぶ。これらの細胞群は、細胞の形、染色性などの違いから、区別できる。進化した被子植物の SAM は、複層の場合もある外衣 (tunica) とそれに包まれた内体 (corpus) で構成される。これは、外衣では垂層分裂しかおこらないために生じた区別である。一方、被子植物の SAM も CZ、PZ および RZ という細胞群に分けてとらえることもできる。つまり、被子植物の SAM の構造をとらえるにはふたつの視点があるということになる。ひとつは SAM を細胞群でとらえるもの、もうひとつは、層構造でとらえるものである。

被子植物の SAM については、形態観察のみならず、遺伝学的、生理学および分子生物学的研究がなされつつある。それにより、SAM における細胞群や層構造が重要なものであることが示唆された。SAM の発生に関する変異体は、主にシロイヌナズナで単離され、解析された。変異体には、SAM の CZ で細胞の異常増殖がみられる *clavata* (*clv*) 変異体、SAM の幅が広くなり、2 つに分裂することもある *mgoun* (*mgo*) 変異体、一方、SAM が消失する変異体としては、*shoot meristemless* (*stm*) 変異体、*wuschel* (*wus*) 変異体、*zwille/pinhead* (*zll/pnh*) 変異体および *cup-shaped cotyledon* (*cuc*) 変異体などが同定された (Barton and Poethig, 1993; McConnell and Barton, 1995; Laux et al., 1996; Aida et al., 1997; Laufs et al., 1998)。これらを材料として解析をおこなった結果、SAM における細胞群ごとの機能は次のように考えられている。すなわち、CZ では SAM 自身の維持と PZ へ

の細胞供給のための細胞分裂がおこなわれ、PZ では側生器官分化のための細胞分裂ののち、側生器官が形成される。さらに、RZ は茎の形成に参与している。先に述べた変異体の野生型遺伝子は、相互作用しながら固有の領域で機能している。その各論については、各章の緒言にゆずる。SAM の層構造については、近年、カバノキやシロイヌナズナを用いた細胞学的研究の進展が顕著である。これらの植物の SAM に蛍光物質を注入することによって、SAM で層構造を形成する各細胞群は、原形質連絡で結ばれて symplasmic field と呼ばれる細胞のグループをつくっていることが明らかになった (Rinne et al., 1998; Gisel et al., 1999)。さらに、SAM の活性の調節にこの symplasmic field が重要であることがわかっている。このように実験的に証明された SAM 内の細胞群と層構造は、さまざまなマーカー遺伝子の発現からも裏付けられる。

このように、SAM の発生分化および維持の研究は、主にシロイヌナズナで精力的におこなわれてきた。しかし、世界の主食作物の多くを占める単子葉植物の SAM についての研究はいまだ深まっておらず、ゲノムサイズが比較的小さく、遺伝子単離や形質転換も比較的容易なイネにおける SAM 発生の解析は進展を期待される。

## 植物の胚発生

冒頭でも述べたように、生物の生活環は、両親の配偶子が接合するところから始まることが多い。接合子が細胞分裂をおこない、ひとつの細胞群からある生物のかたちをとって存在するようになる初期の過程が胚発生である。動物では、胚発生時に体制のほとんどが決定し、その後の発生では、胚発生時に決定された領域の精密化がおこる。よって、動物学者にとって、胚発生研究は非常に重要な位置を占め、モデル動物であるショウジョウバエや線虫の胚発生研究の成果には目をみはるものがあった。ショウジョウバエの研究で得られた知見は、他の動物にも応用することができ、それによって動物の胚発生研究は飛躍的に進展した。

被子植物の胚発生の様式は、大まかにまとめると次のようになる。すなわち、受精卵は初期の細胞分裂で、胚本体と胚柄にわかれて分化する。胚本体は、ある時期までは形態的分化の見られない球状胚のステージを経て、SAM や根端分裂組織 (RAM) および特有の胚器官の形成などをおこなうようになる。これらの過程には、極性の形成、位置情報の確立、器官・組織・細胞分化、形態形成など、多くの発生現象が凝縮して表れる。この点は、動物の胚発生と共通する。しかし、

それに加えて植物は、胚発生中に分化した SAM および RAM の活性によって、胚発生以後も生育し続けるという特徴を持つ。つまり、胚発生は、その後の形態形成に非常に強い影響力を持つ。それゆえ、胚発生中の極性形成やパターン形成は、植物学者にとって興味ある課題であり、古くからさまざまな植物の形態観察や組織化学的観察が行われてきた。Wardlaw (1968) は、極性の形成には化学的物質勾配や電気ポテンシャル的勾配が影響していると考えたが、彼の時代には、物理化学的知見や原形質の性質についての知見が不足しており、極性の実体はわからなかった。

被子植物の胚発生の遺伝的メカニズムは、変異体の単離で、解明へと向かうことになった。この過程で、ショウジョウバエなどの動物における胚発生研究に刺激を受けたことはいうまでもない。シロイヌナズナ、イネおよびトウモロコシでは、数多くの胚発生変異体が単離された (Sheridan, 1988; Mayer et al., 1991; Jurgens et al., 1991; Hong et al., 1995)。

特に、シロイヌナズナを解析材料として用いた Jurgens らは、他の植物を用いた研究者らに先駆けて、1991 年に、胚発生変異体の同定を報告し、胚のパターン形成について遺伝学的考察を加えた。彼らは、シロイヌナズナの胚には、頂部-基部軸と放射軸があり、それぞれの要素に子葉、胚軸および幼根と、表皮、基本分裂組織および維管束があるとした (Mayer et al., 1991; Jurgens et al., 1991)。また、同定した変異体をこれらの要素の一部を欠失した変異体と考え、解析をすすめていった。今日までに、*GNOM* (*GN*)、*MONOPTEROS* (*MP*)、*FACKEL* (*FK*)、*KNOLLE* (*KN*)、*KEULE* (*KEU*) などの遺伝子が単離され、これらの遺伝子は、基本的発育に不可欠な物質、つまり、胚発生における小胞輸送、オーキシンやステロールの合成、輸送に関係する物質をコードするものであることがわかっている (Shevell et al., 1994; Busch et al., 1996; Lukowitz et al., 1996; Hardtke and Berleth, 1998; Jang et al., 2000; Schrick et al., 2000; Assaad et al., 1996; 2001)。

シロイヌナズナに多少の遅れをとったものの、イネでの胚発生変異体の同定も行われ、1993 年には、Kitano et al. (1993) がイネの胚発生時に働く制御プロセスについて考察した。すなわち、胚での形態形成が起こる以前に、器官の分化決定、器官の大きさや位置の制御が行われるというのである。さらに、近年、イネでは、胚の領域化に関わると考えられ、シロイヌナズナではこれまでに報告されていない、胚器官の増加やその位置に異常が見られる変異体が単離されている (Kinae et al., 1998; 1999)。その他にも、Hong et al. (1995) によって報告されて

いるように、多種多様な変異体の単離がなされており、今後の解析が期待される。それによって、いつの日かイネの胚発生が遺伝学的に解明されるであろうと思われる。ある植物での胚発生の遺伝学的解明は、ショウジョウバエがそうであったように、他の植物の胚発生の遺伝学的解明の飛躍的進展につながるであろう。

この項では、胚発生についてのさまざまな用語を用いた。最後に、それらについて言及しておく。まず、“パターン”とは、異なる細胞集団が幾何学的に一定の規則をもって配置される様式である。ここで言う、細胞集団が持つ規則というのは、細胞のオーガニゼーションの様式やタンパクの蓄積、遺伝子の発現などである (Lindsey and Topping, 1993)。このパターン形成の説明として、Wolpert (1969) は、位置情報という概念を用いた。位置情報とは、発生中の多細胞系において、個々の細胞が認知する全体の中での位置的情報であり、パターン形成に組み込まれるときには位置価となる。細胞は、与えられた位置価を自分自身のゲノムの状態に照らし合わせて遺伝子を発現するのである。次に、“領域”とは、多細胞動物の発生初期に、ある特定の器官原基が形成される部域、あるいは、その器官原基の分化を支持する働きの空間的広がり、で、“場”という概念の特性を持ったものと定義される。すなわち、“領域”というのも、位置情報と同様に一概念であるが、位置情報が個々の細胞の位置的情報であったのに対し、領域は、特定の分化能力が分布している比較的広い部域を指す。位置情報と場は、それぞれ別の人物によって提唱された概念であるが、生体の一部分が全体との調和を保って形態形成が進むという考え方が根本にはあり、共通するところも多い。最後に、“極性”とは、細胞、細胞群、組織あるいは個体が、一つの方向に沿って、その各部分相互の相対的位置関係に関連して、形態的あるいは生理的特性の差異を示すことであり、ここでの、一つの方向というのが、“軸”と呼ばれるものである。つまり、なんらかの極性が存在するところには、軸が存在することになる。第4章では、これらの概念を用い、イネの変異体の解釈をおこなってみる。

## SAM と葉

葉は、植物のシュートを、茎とともに構成し、光合成をおこなって植物の生存に直接的に貢献する重要な器官である。その形態も植物種あるいは発生段階によって多様であり、古くから人間の注目を浴びてきた。さらに、その起源についても、コケ類の葉と他の維管束植物の葉では異なると考えられるように、さまざまな植物の葉を、ひとまとめにして理解することは困難である。そこで、ここでは、

被子植物の葉について、葉と SAM の関係に絞って、これまでの研究について振り返ることにする。

被子植物の葉は、通常 SAM から分化する。分化時の葉の空間的配列は葉序と呼ばれる。葉序の研究は、まず、さまざまな植物の葉序を記述するところからはじまり、その過程で、SAM 自体の生長と葉原基の形などの生長様式の相互作用が葉序に影響することが明らかになった (Richards and Schwabe, 1969)。しかし、形態的観察だけでは、葉序決定のメカニズムの解明には至らなかった。そこで、形態的観察に外科的実験が加えられ、葉序の決定機構に関して、これまでにいくつかの仮説が立てられてきた (Snow and Snow, 1931; Richards, 1948; Plantefol, 1949; Wardlaw, 1949; Williams, 1975)。その中でも、広く受け入れられているのが、化学物質の濃度勾配が関与するという仮説と、物理的な力が関与するという仮説である。前者は、SAM の中心や古い葉原基から次の葉原基の発生を抑制する因子が放出され、その因子の濃度の最も低いところに次の葉原基が形成されるというものである。一方、後者は、SAM の内体からの圧力と外皮の細胞での局所的な細胞壁のゆるみによって次の葉原基が形成される位置が決まるという考え方、いわゆる buckling theory であり、Green (1992) によって提唱された。

近年、それぞれの仮説を裏付ける実験的証拠が挙がっている。まず、古くからオーキシンの極性輸送が葉序の決定に関わることは示唆されていた (Schwabe, 1971) が、Vernoux et al. (2000) は、*pin-formed 1* 変異体を用いた解析によって、オーキシン極性輸送が器官の生長や分離、位置取りに影響することを証明した。オーキシンは、先程述べた、次の葉原基の発生を抑制する因子そのものではないが、間接的に、次の葉原基が前の葉原基の近辺に形成されることを防いでいるという。また、トウモロコシの *terminal ear 1 (tel)* 変異体は葉序に異常が見られたが、その野生型遺伝子の発現は、次の葉原基の中央脈が分化すると思われる領域を除く、半円状の領域で見られた (Veit et al., 1998)。これらのことから、*TE1* 遺伝子は、その発現領域において、葉原基の分化を抑制する働きを持つのではないかと予測されている。一方の物理的な力による説明に対する裏付けは、より直接的である。Expansin という細胞壁の伸展性を増加させるタンパク質をプラスチックビーズ表面にまぶしてトマトの SAM に置いたところ、本来次の葉原基ができる位置以外の位置にも葉様器官が分化した (Fleming et al., 1997)。これは、細胞壁のゆるみという物理的な現象が葉原基形成の原動力になることを示している。また、Reinhardt et al. (1998) は、トマトで遺伝子ファミリーを形成する expansin

の一つである *LeExp18* が葉原基分化予定領域で発現することを示し、さらに、Pien et al. (2001) が植物組織の内部で *expansin* の発現を起こさせる手法によって、ほぼ完全な葉の形成を誘導することに成功したことで、*expansin* が、実際、植物体内で葉原基形成に携わっているであろうことが推測された。

葉序については、シロイヌナズナ、トウモロコシおよびイネの変異体の解析から SAM の大きさや形が重要であるという知見が得られている (Clark et al., 1993; Jackson and Hake, 1999; Itoh et al., 2000) が、いまだ葉序決定のメカニズムはほとんど明らかになっていないといつてよい。したがって、メカニズム解明の一つの方法として、さらに多くの葉序の変異体の解析およびその野生型遺伝子の相互作用の解明が望まれる。

葉序が SAM における葉の空間的発生パターンであるのに対し、葉の時間的発生パターンは、葉間期と呼ばれる。葉間期に関する研究は、葉序に関するものに比べ、立ち後れており、単離された変異体も少ない。トウモロコシの *tel* 変異体は、葉序とともに葉間期が短くなるという異常を示し、シロイヌナズナの *altered meristem program 1* 変異体は、子葉の増加と栄養生長期の葉原基形成速度の上昇がみられた (Chaudhury et al., 1993) が、それらの解析が葉間期調節プログラムの解明につながったとは言い難い。イネで単離された *plastochron 1* 変異体では、葉間期に異常が見られ、伊藤 (2000) は、形が一定な SAM の大きさは、葉間期を制御するという結論を出した。葉間期決定メカニズムについても、未解明な点は多く、さらなる研究が望まれる。

SAM と葉の関係として近年注目されているのは、葉の向軸—背軸方向の極性の決定機構である。葉の向軸あるいは背軸という用語は、SAM に近い側あるいは SAM から遠い側という意味あいで見られる。近年の解析から、SAM は、単なる位置的な参照点ではなく、遺伝子発現の面から考えても葉の極性と密接に関わっていることが証明された。SAM の維持機構に異常が見られる変異体として単離された *pnh* 変異体の野生型遺伝子、*PNH* 遺伝子は、*ARGONAUTE* 遺伝子と共同して *STM* 遺伝子の発現に関与しており、その発現は維管束で強く、SAM と葉の向軸側で弱く見られた (McConnell and Barton, 1995; Bohmert et al., 1998; Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999)。また、葉の向軸側のアイデンティティーを決定するのに必要なシグナルのリセプターをコードしていると考えられる *PHABLOSA* 遺伝子も SAM および葉の向軸側での発現が見られた (McConnell et al., 2001)。さらに、葉の背軸側のアイデンティティーを促進する *KANADI* 遺伝子を

過剰発現させた個体では SAM が形成されなかった (Kerstetter et al., 2001)。これらのことは、SAM を含めたシュートの central 部と葉の向軸側、peripheral 部と葉の背軸側がそれぞれユニットをつくっている、あるいは、SAM を含めたシュートの central—peripheral 方向のアイデンティティーが側生器官の向軸—背軸方向の極性と深く関係しているという考え方によく合致する。

最後に、近年、イネにおいて、葉の形態や分化様式から、SAM 内にある極性が存在する可能性が示唆されていることを付け加えておく。それは、*decussate* 変異体で、葉身と葉鞘の境界が一定の規則性を持って傾斜していたことから推測された (伊藤, 2000)。このことについての解析は、ほとんど進んでいない状況であるが、非常に興味深いものであるので、今後の解析が期待される。

### イネの発生の遺伝学的解析と育種

以上、非常に的を絞って、植物の発生のいまだ謎として残されている部分について述べてきたが、もちろん、このほかに膨大な、興味深い発生機構がいまだ解明されずにいる。したがって、植物の発生研究はこれからも知的好奇心を持った人間によって続けられるであろう。ただし、人間を植物の発生研究に向かわせるのは、知的好奇心だけではない。もうひとつの動機を挙げるとすれば、それは、植物の人為制御を可能にするため、というものである。

人間は農耕することで比較的安定な食糧供給がなされる生活形態を手に入れた。以来、人間は、農作物に選抜を加え、農耕に適したものを残してきた。これからの時代は、これらの古典的な育種法に加え、植物の発生メカニズムを念頭に置いた遺伝的改変をおこなっていくことが望まれる。したがって、イネの発生メカニズムを遺伝学的に解明することは、今後のイネ育種に非常に重要であると思われる。さらに、冒頭にも述べたように、SAM は多くの農業形質を有する植物のシュート部分がそれに由来するという器官であり、葉はシュート部分の重要な一部である。また、胚発生過程は植物の生活環を通じておこるさまざまな発生現象が凝縮されたものであると考えられる。よって、SAM、葉および胚発生についての遺伝学的研究は、農学および育種学的観点からも非常に重要なのである。

本研究は、イネの SAM の分化および維持機構の遺伝学的解明を目的として、変異体を用いた解析をおこなった。第 1 章では、SAM の分化機構を解明するために、SAM を欠失する *shootless (shl)* 変異体の解析をおこない、第 2 章では、*SHL* 遺伝子の機能が、SAM の維持にも及ぶであろうと予想し、*shl* 変異の弱い対立遺

伝子の単離および解析をおこなった。第 3 章では、SAM の維持機構についてさらなる情報を得るために単離した、発芽後枯死する変異体を解析し、第 4 章では、SAM の分化機構を知るには、胚発生初期の軸の分化や領域化についての知見を得る必要性が示唆されたため、胚器官が増加する変異体、*aberrant regionalization of embryo 3* を用いた解析をおこなった。最後に総合考察では、前 4 章で明らかになった変異体の野生型遺伝子の相互関係から、SAM の分化および維持をめぐる発生プロセスとそこでの遺伝子の機能とそれらの間の相互作用および SAM の分化の舞台となったイネの胚について考察した。

# 第1章 茎頂分裂組織を欠失する *shootless* 変異体の解析

## 緒言

序論で述べたように、植物の形づくりにおける SAM の重要性は言うまでもない。したがって、SAM が胚の中で分化し、その後ライフサイクルを通して維持されていく遺伝的機構を明らかにすることが、植物の理解に不可欠である。SAM の分化の制御機構を明らかにするには、SAM を欠失する変異体の同定が重要であるが、その数も少なく、十分な解析は行われていない。

これまでに、SAM の分化に異常が見られる変異体はいくつかの植物種で同定されている。双子葉植物では、シロイヌナズナで、強い表現型、中間的な表現型および弱い表現型を示す多くの *shoot meristemless* (*stm*) 変異体が知られている。*stm* の強い変異体では、SAM が欠失し、弱い変異体では、SAM の維持に異常が見られるので、*STM* 遺伝子は、植物のライフサイクルを通して SAM の分化および維持に必要であると考えられている (Barton and Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996)。*STM* 遺伝子は、KNOTTED タイプのホメオドメインを持つタンパク質をコードしていた (Long et al., 1996)。また、胚で SAM を欠失する *cup-shaped cotyledon* (*cuc*) 変異体は、*cuc1* と *cuc2* の二重変異体であることが明らかになった (Aida et al., 1997)。*cuc1* と *cuc2* のそれぞれの単独の変異体は、異常な表現型をほとんど示さないため、それらはリダンダントな機能を持っていると予想された。*CUC1* および *CUC2* 遺伝子は単離され、ペチュニアの *NO APICAL MERISTEM* (*NAM*) 遺伝子と相同性の高い配列を有していることが明らかになり、その領域は NAC ボックスと命名された (Souer et al., 1996; Aida et al., 1999; Takada et al., 2001)。*CUC* および *NAM* 遺伝子はいずれも SAM と側生器官の境界や器官同士の境界で発現する (Souer et al., 1996; Aida et al., 1999; Ishida et al., 2000; Takada et al., 2001)。*STM* 遺伝子と *CUC* 遺伝子の関係は、変異体での *in situ* ハイブリダイゼーション実験、二重変異体の解析および *CUC1* 遺伝子の過剰発現などで調査された。その結果、*CUC* 遺伝子は *STM* 遺伝子の上流で機能していることや *CUC1* 遺伝子が単独で *STM* 遺伝子の発現を誘導できることが明らかになっている (Ishida et al., 2000; Takada et al., 2001)。先程述べたペチュニアの *NAM* 遺伝子は、形態観

察、塩基配列および *in situ* ハイブリダイゼーション実験の結果から、SAM の位置決定に必要であると考えられている (Souer et al., 1996)。これらの遺伝子は SAM の分化過程において重要な機能を果たしているが、SAM の分化機構についてはいまだ不明な点が多い。

単子葉植物では、トウモロコシにおいて、幼根は分化するがシュートを欠失する変異体が少なくとも 3 系統得られているが、それらについてはいまだ詳細な解析がされていない (Sheridan and Clark, 1987, 1993; Sheridan, 1988; Clark and Sheridan, 1991)。植物で最初に発見されたホメオボックス遺伝子である *kn1* 遺伝子は *STM* 遺伝子のホモログであり、SAM の分化に関わっていると考えられてきたが、*kn1* 遺伝子の劣性変異体では、バックグラウンドによっては胚で表現型の変化が観察されなかった (Kerstetter et al., 1997)。しかし、*kn1* 遺伝子の発現場所 (Smith et al., 1995) やトウモロコシの倍数性 (Gaut and Doebley, 1997)、バックグラウンドによる表現型の変化 (Vollbrecht et al., 2000) および過剰発現個体の表現型 (Muller et al., 1995; Chuck et al., 1996; William-Carrier et al., 1997) から考えて、*kn1* は他の遺伝子と重複して SAM の維持に関与していると考えられた (Kerstetter et al., 1997; Vollbrecht et al., 2000)。

イネでは、最も多くの 4 遺伝子座に由来する 7 つの *shootless* (*shl*) 変異体が同定されている (Hong et al., 1995) が、やはり詳細な解析はなされていない。いずれも幼根は分化するが、シュート (SAM) を欠失するものである。また、遺伝子座によって変異体の表現型に違いも認められる。イネのホメオボックス遺伝子であり、*kn1* 遺伝子の ortholog である *OSHI* (Matsuoka et al., 1993) は、球状胚の将来 SAM が分化する予定領域で発現し始める (Sato et al., 1996)。*OSHI* が SAM の分化に関わっているという直接的な証拠はないが、*OSHI* は、SAM の有用な分子マーカーであろう。いずれにせよ、単子葉植物においても、SAM 分化の制御機構はほとんど明らかになっていない。*OSHI* などの分子マーカーを利用しながら、イネで得られた多くの *shl* 変異体を解析することにより、これまでに得られていない新しい知見が期待できる。

イネ科植物の胚は高度に発達しており、複雑であるため、胚特異的な器官のアイデンティティや機能、相互関係について、議論が続いている (Brown, 1960)。しかし、これまでの議論は解剖学的あるいは進化学的知見に基づいたものであり、遺伝学的解析は全くなされていない。したがって、*shl* 変異体などの器官欠失型変異体の解析は、これらの問題に新しい知見を加えることができると考えられる。

本章では、すでに Hong et al. (1995) によって報告されている 4 遺伝子座に由来する 7 つの *shl* 変異体と新たに同定した 5 つの変異体についての解析をおこなひ、SAM の分化の遺伝的制御機構について考察した。

## 材料および方法

### 1、供試材料

すでに報告されている 4 つの遺伝子座 (*SHOOTLESS 1 (SHL1) ~SHL4*) に由来する 7 つのシュート欠失変異体 (Hong et al., 1995)、*shl1-1*、*shl1-2*、*shl2-1*、*shl2-2*、*shl2-3*、*shl3* および *shl4-1* を用いた。これらは、受精卵に、化学突然変異源 MNU (N-methyl-N-nitrosourea) を処理した M<sub>2</sub> 集団から選抜された単因子劣性変異である。さらに、その後、MNU 処理後代から *shl2-4*、*shl2-5*、*shl4-2* および新規の遺伝子座に由来する *shl5* の 4 つの変異体を同定した。これらの遺伝的背景は、*shl2-5* および *shl4-2* が品種金南風であることを除き、すべて品種台中 65 号である。

### 2、樹脂切片の作成

胚発生中の種子や完熟種子を FAA (ホルマリン:氷酢酸:70%エタノール=1:1:18) で固定した。エタノールにより脱水した後、浸透液を組織に浸透させ、重合液 (浸透液:硬化剤=15:1) 中に包埋、硬化させた。浸透液、硬化剤には樹脂 Technovit 7100 (Kulzer, Germany) を用いた。マイクロトームにより厚さ 3~5  $\mu\text{m}$  の切片を作成しスライドガラスに付着させた。切片は 0.05% トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡で観察した。

### 3、走査電子顕微鏡 (SEM)

再分化培地上のカルスをも 2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1M のリン酸緩衝液で 4°C、16 時間固定し、0.1M リン酸緩衝液で洗浄した。その後、1% のオスミウム酸で後固定し、ふたたびリン酸緩衝液で洗浄した。試料を、エタノールにより脱水し、酢酸イソアミルに置換してから臨界点乾燥をおこなった。さらにプラチナでイオンコートした後、加速電圧 15kV の走査電子顕微鏡 (Hitachi S-4000, Tokyo) で観察した。

#### 4、*in situ* ハイブリダイゼーション

受粉後 4~6 日目の子房および吸水後 2~4 日目の種子を、3%パラホルムアルデヒド (TAAB 社) と 0.25%グルタルアルデヒド (TAAB 社) を含む 0.1M のリン酸緩衝液 (pH7.2) 中で 1 時間脱気、4℃一定で固定し、0.1M リン酸緩衝液で洗浄した。エタノールにより脱水し、キシレンに置換した後、Paraplast Plus (Oxford Labware, St. Louis, MO) に包埋した。ミクロトームにより厚さ 8 $\mu$ m の切片を作成し、Vectabond (Vector Lab. Burlingame, CA) でコーティングをしたスライドガラスに付着させた。プローブには *RAmy1A* と *OSHI* の poly(A)をのぞいた cDNA を転写して得た、Digoxigenin でラベルしたアンチセンス mRNA を用いた。*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫学的検出については Kouchi and Hata (1993) を参考にしておこなった。

#### 5、カルス誘導と再分化

シュート欠失変異体の完熟種子は、実体顕微鏡下でその外観から選抜し、播種 2 日後も発芽が見られなかったことで確認できた。完熟種子は、2%の次亜塩素酸ナトリウムで 30 分間殺菌した後、滅菌水で洗浄した。その後、カルス誘導培地 (N6 (Chu et al., 1975)、3%シュークロース、0.2%2,4-D、0.2%ゲランガム、pH5.8) に置床し、暗所、28℃一定にて約 1 ヶ月培養した。カルスの直径がおよそ 5mm になったころに種子とカルスを分離し、再分化培地 (MS (Murashige and Skoog, 1962)、3%ソルビトール、3%シュークロース、0.2% casamino acid、0.2% 6-benzylaminopurine、0.1%ナフタレン酢酸 (NAA)、0.4%ゲランガム) に移植し、明所、28℃一定にて培養した。移植後 3 週間でシュートが再分化していないカルスは新しい再分化培地に再び移植した。再分化培地に移植してからさまざまなステージのカルスを、樹脂切片作製や走査電子顕微鏡観察のため固定した。

## 結果

### 1、完成胚の形態

*sh1* 変異体の完成胚は、ほとんどの場合、シュート (SAM と 3 枚の本葉) を欠失し、胚に特異的である鞘葉およびエピブラストも欠失していた (図 1-1)。この

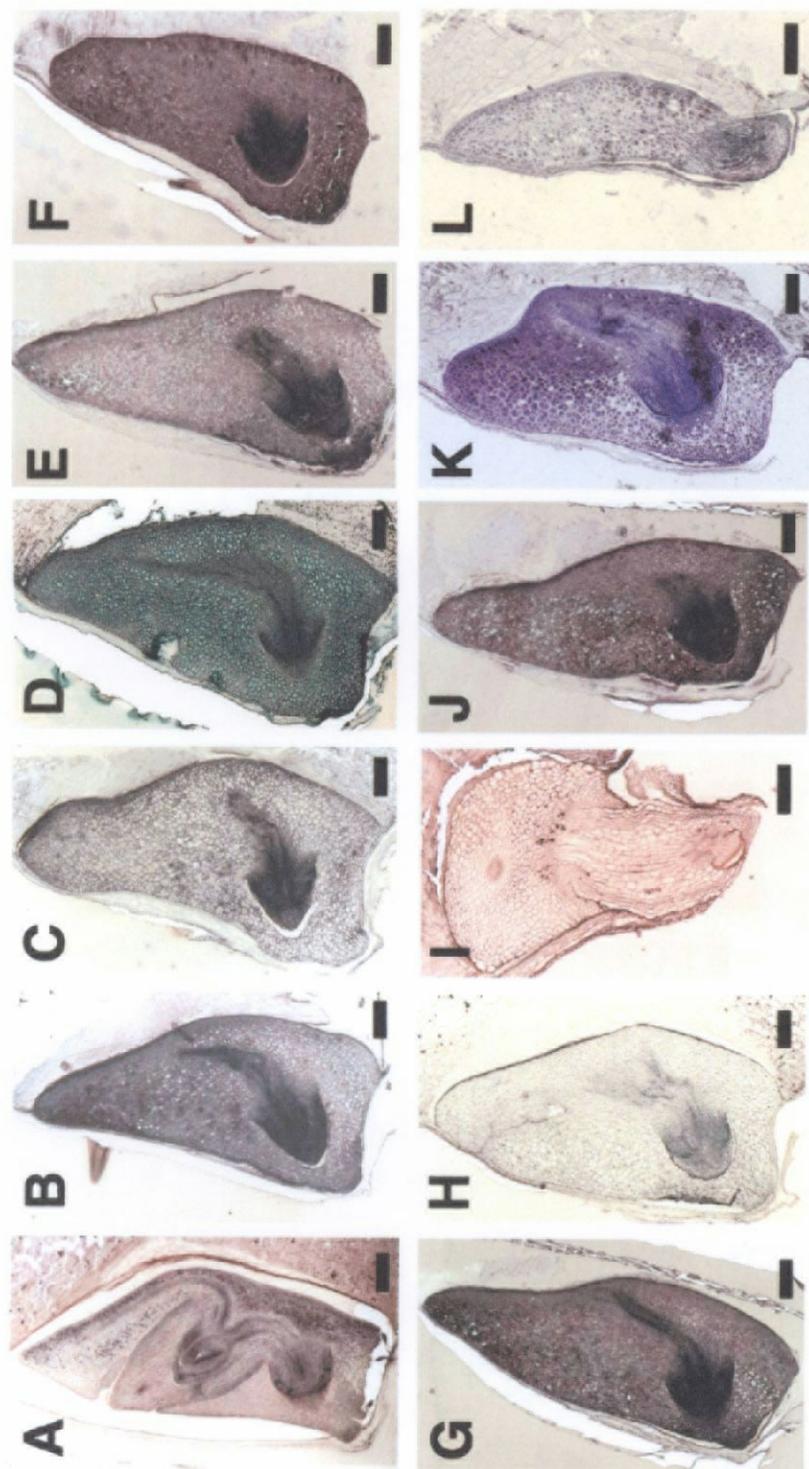


図1-1 野生型および *sh1* 変異体の完成胚の表現型。

A : 野生型。 B : *sh11-1* 変異体。 C : *sh11-2* 変異体。 D : *sh12-1* 変異体。 E : *sh12-2* 変異体。 F : *sh12-3* 変異体。  
 G : *sh12-4* 変異体。 H : *sh12-5* 変異体。 I : *sh13* 変異体。 J : *sh14-1* 変異体。 K : *sh14-2* 変異体。 L : *sh15* 変異体。  
 Bars=200  $\mu$ m。

ことは、鞘葉とエピブラストの分化は SAM の分化と密接に関係していることを示している。幼根は *shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体では、正常に分化しており、完熟種子を吸水させると、正常に発根した。ただし、幼根は、非常に低頻度ながら 2 つに増加するものもあった。これらの 3 遺伝子座に属する系統の変異体の胚は、形態的には互いに見分けがつかなかった。一方、*shl3* 変異体の胚は形態的に *shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体と異なるだけでなく、幼根は胚発生過程で休眠することなく発根し、完熟種子では褐変、枯死していた。また、*shl3* 変異体の完成胚は、胚の上部の発達が悪く、多くの細胞が空胞化していた。*shl5* 変異体の完成胚は日本のひょうたん型であり、他の変異体と形態的に区別することができた。*shl5* 変異体の幼根は、形態的には大きな異常は見られなかったが、完熟種子を吸水させても発根がおこらなかった。

*shl1*、*shl2*、*shl4* および *shl5* 変異体の胚の胚乳側の表皮細胞は胚盤上皮組織特有の柵状の形態を示したため、胚盤が分化していると考えられた (図 1-2)。このことを確かめるため、イネの主要な  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子である、*RAmy1A* をプローブとし、濾紙上で 3 日間浸漬した種子を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。野生型の発芽種子では、*RAmy1A* は、胚の胚盤上皮組織と胚乳の糊粉層で強く発現する (Sugimoto et al., 1998)。*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚では、胚乳に面した表皮細胞で、シグナルが検出された (図 1-3)。また、*shl5* 変異体では、腹側の基部方向に発現が拡大していたが、本来の部位で発現していた。このように、*shl1*、*shl2*、*shl4* および *shl5* 変異体では、胚盤は分化し、正常に機能していると考えられる。しかし、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚でみられたシグナルは、図 1-3 C および D に示されたように、先端部に限定されていることが頻繁にあった。そこで、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体での胚盤の分化パターンを明らかにするため、胚の背側の胚盤上皮細胞の細胞長を計測したところ、先端から基部に向けて、図 1-4 のようなパターンが見られた。すなわち、野生型の胚盤上皮細胞は、先端より 10~15% の部位で最も長くなった後、基部に向けて徐々に短くなっていくが、先端から約 60% のところで一時的に少し長くなる部位が見られた。*shl* 変異体では、最長となる部位は、野生型より先端部によっており、細胞の短い領域が拡大していた。また、*shl* 変異体では野生型で胚盤の先端に向かう維管束が、背側中央に向かうものも観察され、胚盤の発達に異常が認められた。さらに、胚の正面から見た胚盤の外形も、野生型では左右対称なものに対し、*shl* 変異体では非対称なものが多く見られた (図 1-5)。

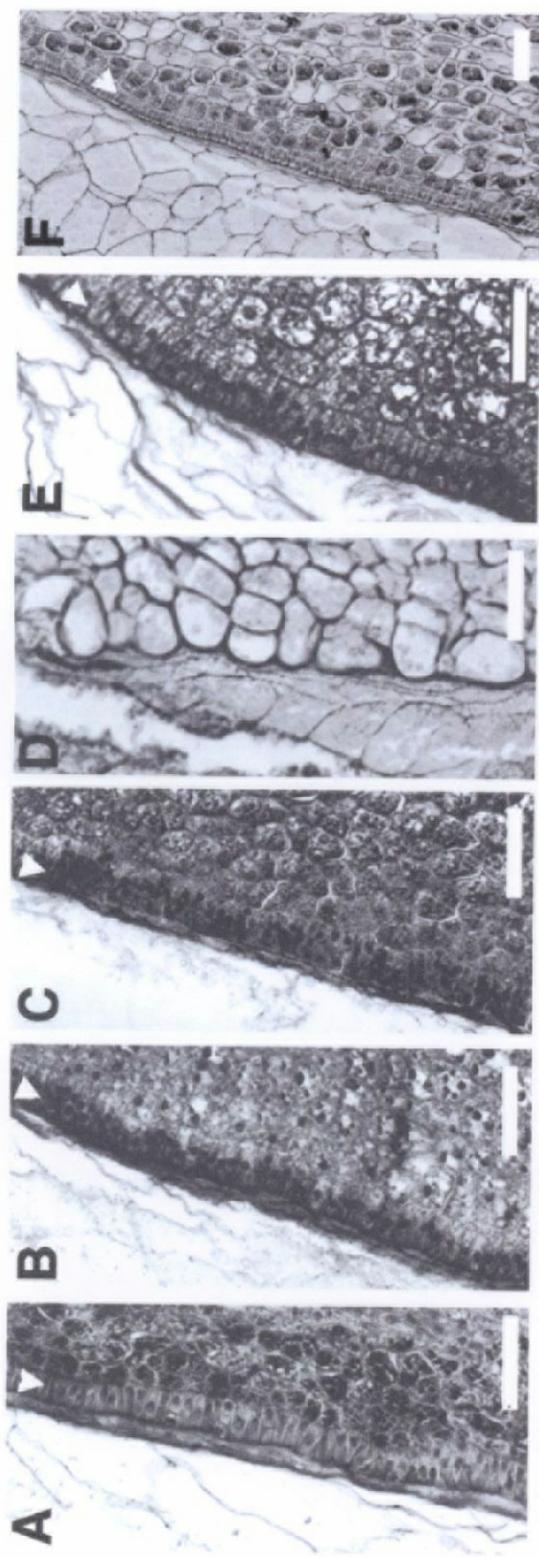


図 1-2 野生型および *sh1* 変異体の胚の胚乳側先端部の表皮細胞。

A : 野生型。 B : *sh1-1* 変異体。 C : *sh1-2* 変異体。 D : *sh1-3* 変異体。 E : *sh1-4* 変異体。 F : *sh1-5* 変異体。  
 野生型および *sh1-3* 変異体を除いた *sh1* 変異体では、柵状の形態を示す細胞 (白矢頭) が存在した。 Bars=0.1mm。

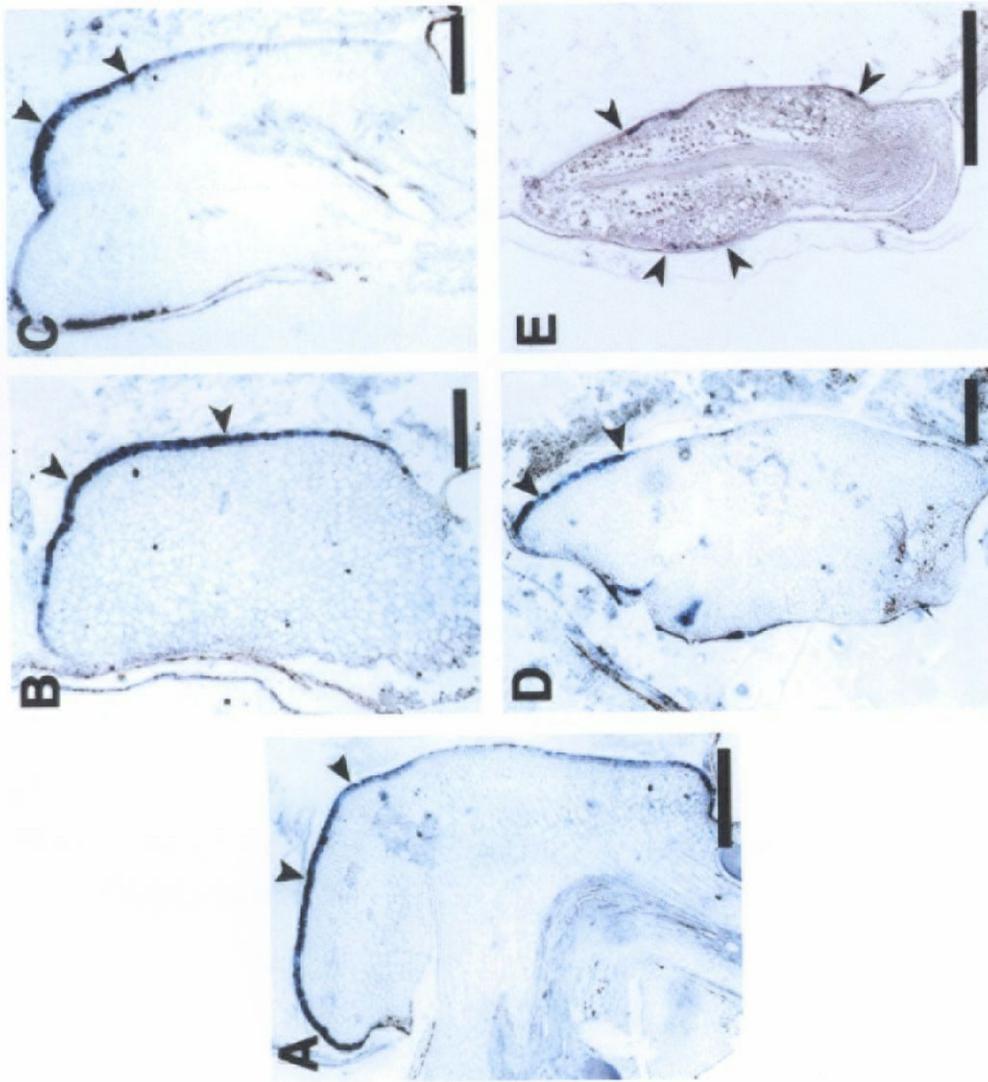


図1-3 発芽した野生型および *sh1* 変異体の胚における  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *RAmy1A* の発現パターン。  
 A : 野生型。 B : *sh1/1* 変異体。 C : *sh1/1* 変異体。 D : *sh1/4* 変異体。 E : *sh1/5* 変異体。 シグナルが胚乳に面した表皮細胞 (黒矢頭) で見られる。 Bars=0.5mm。

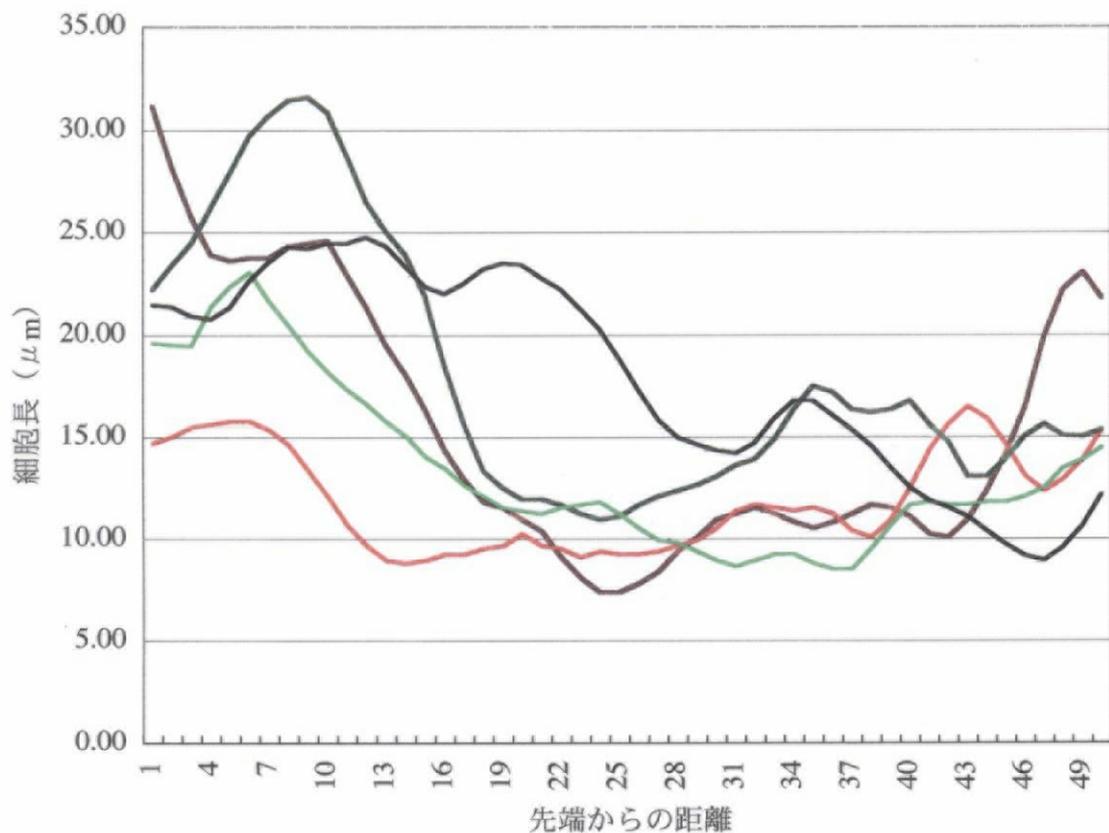


図1-4 野生型および *sh1* 変異体の胚盤上皮細胞長。

黒線：野生型。濃い赤線と赤線：*sh1-1* 変異体。濃い緑の線と緑の線：*sh2-4* 変異体。横軸は胚の背側の上皮組織を 50 等分した位置を示し、縦軸はその位置の細胞の長さの移動平均を示している。

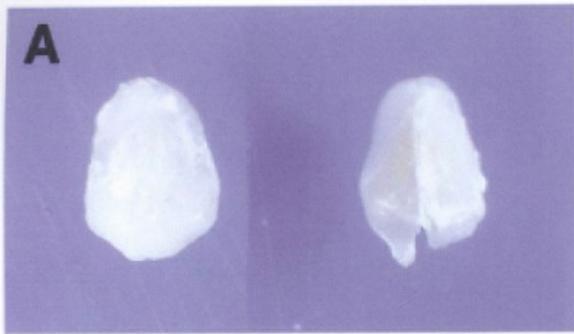


図1-5 浸漬後1日目の野生型および *sh12-4* 変異体の完成胚の胚盤の外形。

A : 野生型。B : *sh12-4* 変異体。左の 2 つの胚の胚盤はほぼ左右対称であるが、他の 3 つは非対称になっている。

以上、完成胚における解剖学的解析、*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析から、胚盤および幼根は SAM とは遺伝的に独立に分化するのに対し、鞘葉およびエピブラストの分化は SAM の分化に依存していることが明らかになった。さらに、胚盤の発達には SAM の分化が影響していることが示唆された。

## 2、胚発生過程

野生型の球状胚は、受粉後 3 日目まで続くが、この段階で、背側（胚乳側）の細胞の液胞化の程度は腹側よりも高い（図 1-6 A）。したがって、イネの胚は受粉後 3 日目には背腹性を獲得していると考えられる。受粉後 4 日目には、腹側に鞘葉の突起が生じ（図 1-6 B）、その後、形態的に SAM および幼根が観察され、受粉後 5 日目には、第 1 葉原基が分化し、ほとんどの胚器官が形成される（図 1-6 C）。

*shl1*~*shl5* 変異体の胚は、受粉後 3 日目までは、野生型と区別がつかなかった。その後、受粉後 4 日目になっても、変異体の胚では鞘葉の突起がみられず（図 1-6 D、G、J）、受粉後 5 日目になっても胚盤と幼根原基以外の器官は形成されなかった（図 1-6 E、H、K）。この傾向は、受粉後 7 日目になっても変わらず、ほとんどの個体で SAM の分化が認められないまま、幼根は正常に発生を続けた（図 1-6 F、L）。ただし、*shl3* 変異体では、受粉後 7 日目に鞘葉の分化が見られる個体や、発根している個体もあった（図 1-6 I）。なお、変異体の胚でも、受粉後 4 日目には、胚の背側で細胞の液胞化の程度の違いが見られ、背腹性は獲得していると考えられた。

## 3、不定芽形成能力

*shl* 変異体が、胚発生中に SAM を欠失することは、必ずしも、不定芽形成能力の欠如を示すわけではない。もし、SAM の欠失が、SAM の分化に先立つ胚発生特有の領域化の異常によるものであったとしたら、領域化という過程を経ない不定芽形成は正常に行われると思われる。そこで、*shl* 変異体のカルスからの不定芽形成を試みた。なお、*shl3* および *shl5* 変異体の完成胚からは、カルスが形成されなかった。しかし、*shl5* 変異体は、受粉後 7~10 日目の胚を用いることでカルスを誘導することができた。

野生型のカルスからは、多数の不定芽が再分化してきたが、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体のカルスからは、全く再分化しなかった（図 1-7）。ただし、*shl5* 変異体のカルスからは、低頻度ながら不定芽が分化した。なお、いずれのカルスから

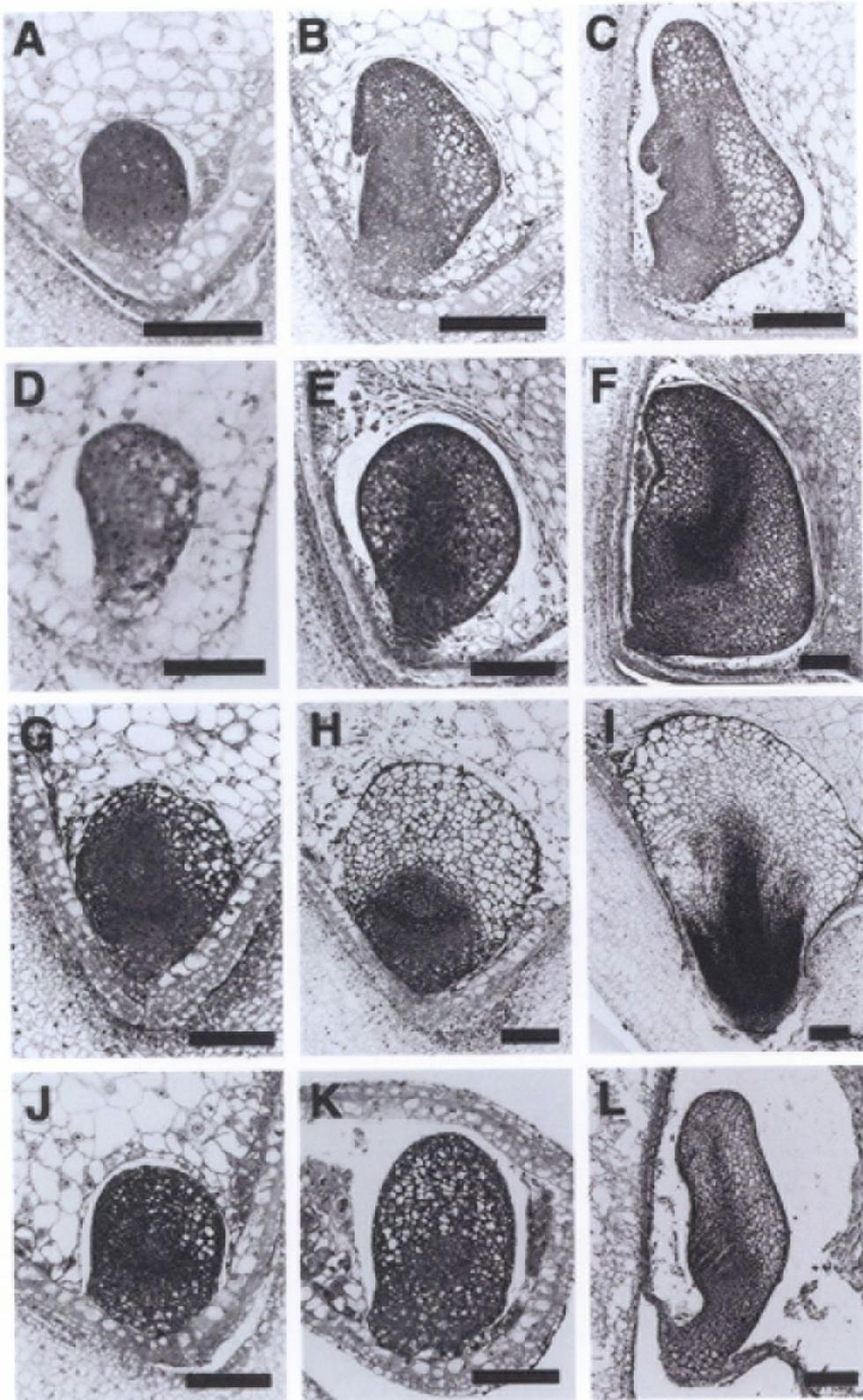


図1-6 *sh1* 変異体の胚発生過程。

A-C: 野生型における受粉後 3、4、5 日目の胚。D-F: *sh1-1* 変異体における受粉後 4、5、7 日目の胚。G-I: *sh3* 変異体における受粉後 4、5、7 日目の胚。J-L: *sh5* 変異体における受粉後 4、5、7 日目の胚。Bars=0.1mm。

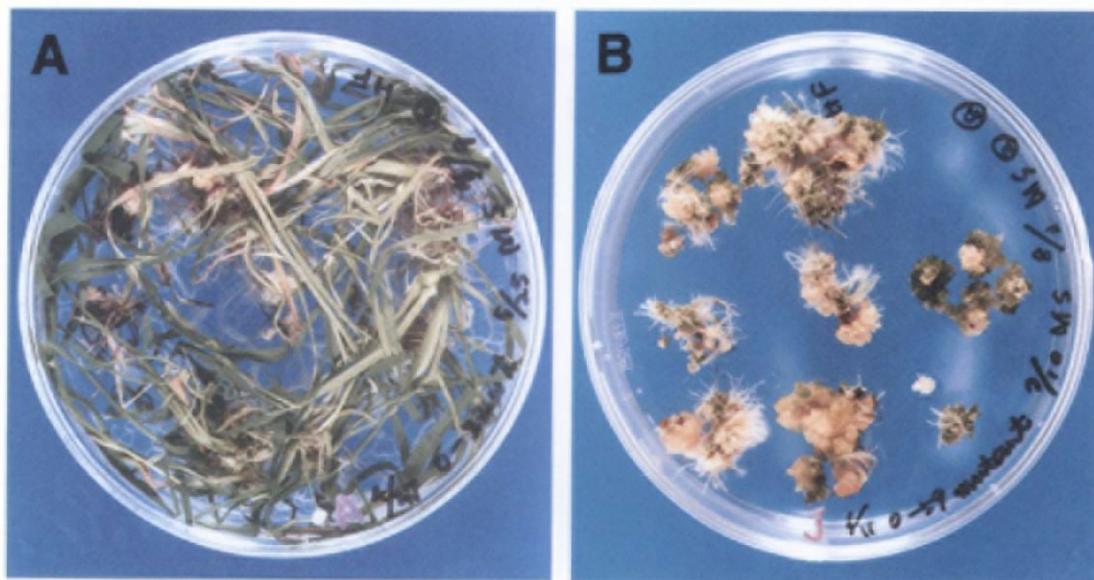


図1-7 胚盤由来のカルスからの不定芽の再分化。

A：野生型のカルス。多数の不定芽が再分化している。B：*sh12-3* 変異体のカルス。不定芽の再分化は見られない。不定根の分化はいずれのカルスでも見られる。

も不定根は分化した。このことから、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は、SAM の分化に一般的に必要なことが明らかになった。再分化培地に移植してから約 10 日後、*shl* 変異体のカルスからは、シュートは再分化してこなかったものの、小さな葉状器官が生じた (図 1-8 A)。なお、この器官は、野生型のカルスからも分化した。それらには、トライコーム、気孔およびいぼ状突起といった、野生型イネの葉にみられる表面構造が分化しており、その器官が不定葉であることを示していた (図 1-8 B)。これらの不定葉は、十分発育することなく分化後 40 日以内に枯死した。不定葉の根元に、細胞学的および解剖学的観察によって SAM 様の器官を見つけることはできなかった (図 1-8 C)。さらに、SAM のマーカーとして *OSHI* を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、野生型の不定芽分化では、葉原基が、*OSHI* の発現する SAM から分化したことが確認された (図 1-9 A)。一方、*shl* 変異体の初期の不定葉の根元には、*OSHI* の発現はみられなかった (図 1-9 B)。したがって、葉原基は SAM とは独立に分化し得ること、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は SAM の分化には関わっているが、葉の分化には直接関わっていないということが明らかになった。

#### 4、イネホメオボックス遺伝子、*OSHI* の発現

*OSHI* は、球状胚でシュートの分化予定領域で発現し始め、その後も SAM からエピブラストおよび幼根にかけて発現する (Sato et al., 1996)。特に SAM の葉原基およびその予定領域では発現が抑制されるため、SAM 内の未分化な細胞のマーカーと考えられている (Sentoku et al., 1999)。SAM を欠失する *shl* 変異体で、SAM の分化予定領域が正常に確保されているのかどうかを明らかにするため、受粉後 4 日目の野生型の胚および受粉後 5 日目の変異体の胚を用いて、*OSHI* をプローブに、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚では、*OSHI* の発現領域は野生型よりも極端に狭くなっていた (図 1-10 A、B-H、J、K)。一方、*shl3* および *shl5* 変異体の胚では、*shl5* 変異体で発現部位に多少の異常が見られたものの、発現領域の広さはほぼ正常であった (図 1-10 I、L)。なお、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体における *OSHI* の発現領域については、受粉後 6 日目には多少の拡大が見られたが、その後、受粉後 7 日目以降には徐々に発現が見られなくなった。また、*shl3* 変異体においては受粉後 7 日目頃、*shl5* 変異体においては腹側の表皮に限定されたのち、受粉後 10 日目頃に、*OSHI* の発現は見られなくなった。このことから、*shl1*、*shl2* および *shl4*

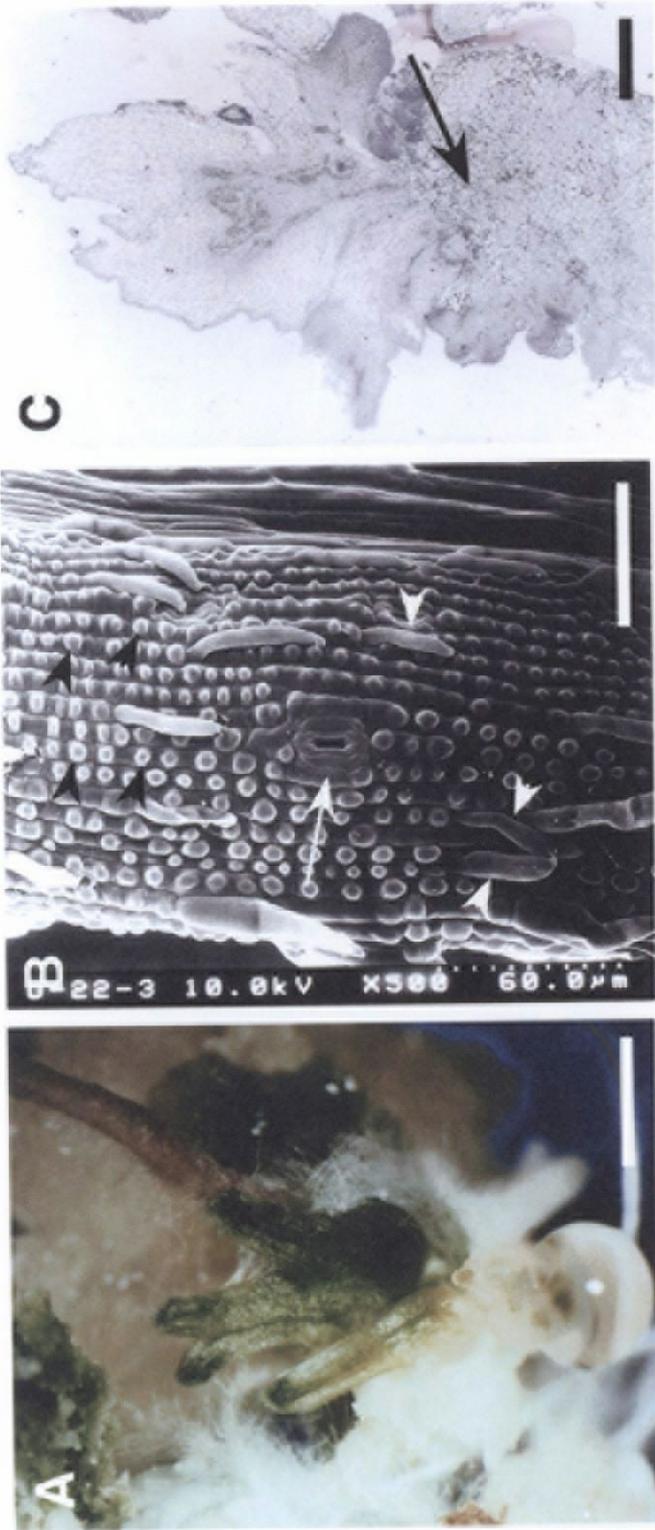


図1-8 *sh1*変異体のカルルスに生じた不定葉。  
 A：不定葉の外観。B：不定葉の表面構造。気孔（白矢印）、トライコーム（白矢頭）およびいぼ状突起（黒矢頭）が分化している。C：不定葉の縦断切片。不定葉の根元（黒矢印）にSAM様の器官は見られない。A：Bar=1mm。  
 B：Bar=0.05mm。C：Bar=0.5mm。

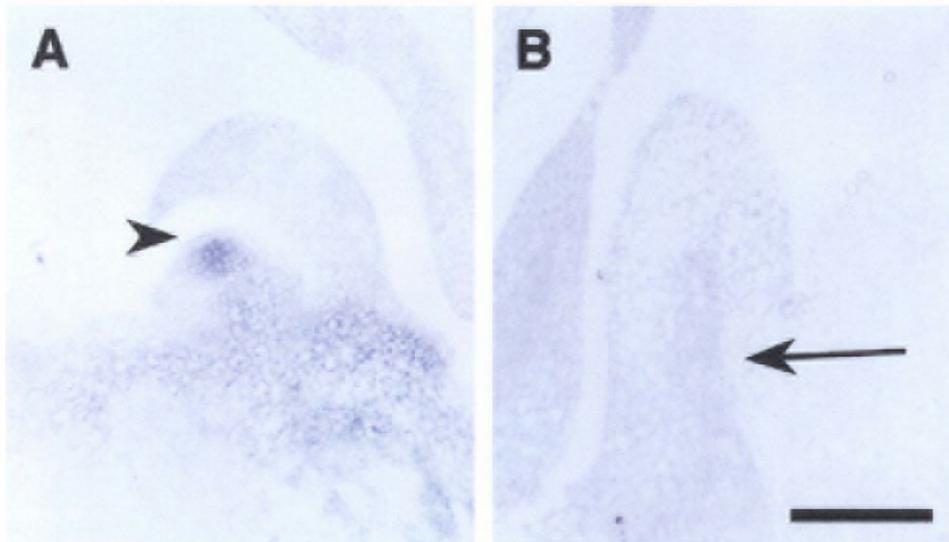


図 1-9 再分化過程での *OSHI* の発現。

A : 野生型カルスからの不定芽。SAM (黒矢頭) での *OSHI* の発現が見られる。

B : *sh12* のカルスからの不定葉。不定葉の根元 (黒矢印) には *OSHI* の発現は見られない。Bar=0.1mm。

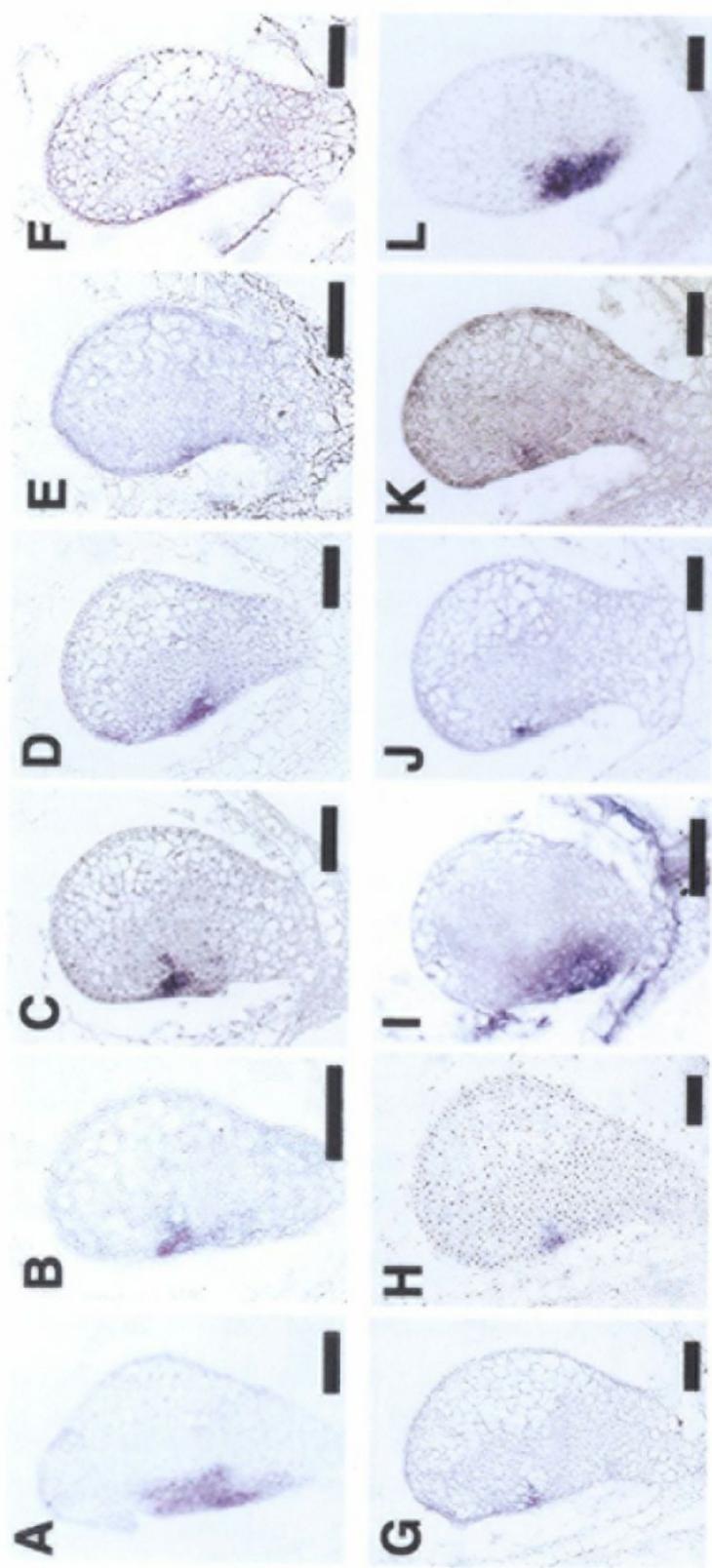


図 1-10 野生型および *shl* 変異体の胚における *OSHI* の発現パターン。

A : 野生型。B : *shl1-1* 変異体。C : *shl1-2* 変異体。D : *shl2-1* 変異体。E : *shl2-2* 変異体。F : *shl2-3* 変異体。  
 G : *shl2-4* 変異体。H : *shl2-5* 変異体。I : *shl3* 変異体。J : *shl4-1* 変異体。K : *shl4-2* 変異体。L : *shl5* 変異体。  
 野生型の胚は、受粉後 4 日目もの、*shl* 変異体の胚は、受粉後 5 日目ものを用いた。*shl11*、*shl12* および *shl4*  
 変異体の胚では *OSHI* の発現領域が非常に狭い。*shl3* および *shl5* 変異体の胚では *OSHI* の発現領域は野生型と  
 変わらない。Bars=50  $\mu$ m。

変異体の胚では、SAM の分化領域が正常に確保されておらず、一方、*shl3* および *shl5* 変異体では、*OSHI* で示される SAM 分化予定領域については、比較的正常に確保されていると考えられた。よって、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は *OSHI* の上流で機能し、*SHL3* および *SHL5* 遺伝子は *OSHI* の下流あるいは *OSHI* とは独立に機能していることが明らかになった。

## 考察

### 1、SAM 分化における *SHL* 遺伝子の位置づけ

今日までに、その劣性突然変異によって SAM を欠失する遺伝子でクローニングされている例は多くない。*STM* 遺伝子は、胚発生時の SAM の分化やその後の SAM の central zone の未分化細胞の維持に必要であり (Endrizzi et al., 1996)、*NAM* 遺伝子は、SAM の分化に直接関わっているというよりは、SAM や葉原基の位置を決定しているものであると考えられている (Souer et al., 1996)。*CUC1* 遺伝子および *CUC2* 遺伝子についても、SAM の分化にかかわるというよりは、胚発生や花の形成時に whorl 内の器官の分離に機能しているのではないかと考察されてきた (Aida et al., 1997) が、近年の解析で胚発生時に *STM* 遺伝子の上流で機能し、SAM の分化に関与していることが明らかになった (Ishida et al., 2000; Takada et al., 2001)。トマトの *Defective embryo and meristems* (Keddie et al., 1998) 遺伝子は単離されたが、いまだ SAM の分化に関わっているのか維持に関わっているのか特定はされていない。SAM の分化には非常に多くの遺伝子が関わっていると思われるので、SAM の分化における遺伝子のカスケード全体を明らかにするためには、さらに多くの突然変異体が必要である。

イネでは、少なくとも 5 遺伝子座が SAM の分化に不可欠であることが明らかになった。*shl* 変異体の胚では、胚盤は背側に、幼根の先端は胚柄を向いて基部側に形成された。また、細胞の液胞化の程度から考えて背腹性は胚発生初期に獲得しており、それは、*OSHI* の発現が腹側の SAM 分化予定領域でみられたことで確かめられた。よって、*SHL* 遺伝子は、頂端部—基部軸および背腹軸の決定には関与していないと思われる。また、再分化試験から、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は、不定芽形成に不可欠であることがわかった。このことから、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子が胚発生時特有の領域化の過程で機能しているのではなく、

SAM の分化領域に限った機能を持っているのではないかということが示唆された。*OSHI* をプローブとして用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚では、*OSHI* の発現領域が野生型の胚より極端に狭まっていた。*OSHI* は、本章緒言で述べたように、イネの胚における SAM 分化予定領域の有用なマーカーである。このことは、*shl1*、*shl2* および *shl4* の胚では、SAM が分化すべき領域が空間的に不足していることを示している。したがって、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は、SAM の分化予定領域の確保に必要な遺伝子であると推察された。

イネでは、SAM と幼根は欠失するが、*OSHI* の発現は正常である変異体として、*organless 1 (orl1)* 変異体が知られている (Hong et al., 1995; Sato et al., 1996)。これらの結果をまとめると、イネの胚における SAM の分化に関する遺伝的カスケードは、次のように考えることができる。*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は *OSHI* の上流で機能し、*SHL3*、*SHL5* および *ORL1* 遺伝子は、*OSHI* の下流あるいはそれとは独立に機能している。*SHL1*~*SHL5* 遺伝子がシュートの分化に特異的に関係するのに対し、*ORL1* 遺伝子はシュートと幼根の両方の分化に必要である。

動物で単離され、体制の確立に非常に重要な役割を持っていることが明らかにされたホメオボックス遺伝子であるが、今日までの解析から、植物の SAM の発生においても、中心的な役割を果たしていると考えられるようになっている。シロイヌナズナの *CUC* 遺伝子もホメオボックス遺伝子である *STM* 遺伝子の上流で機能、つまり、*CUC* 遺伝子は *STM* 遺伝子の発現に必要である (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001)。また、トウモロコシの *rough sheath 2 (rs2)* 変異体では、葉で異所的な KNOX タンパク質の蓄積が見られたことから、*RS2* 遺伝子は、*KNOX* 遺伝子の発現を抑制していると考えられている (Schneeberger et al., 1998; Timmermans et al., 1999; Tsiantis et al., 1999)。これは、*RS2* 遺伝子と相同性の高い配列を持つ、シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1)* 遺伝子および *AS2* 遺伝子、また、キンギョソウの *PHANTASTICA (PHAN)* 遺伝子についても同様のことが言える (Waites and Hudson 1995; Waites et al., 1998; Byrne et al., 2000; Semiarti et al., 2001)。さらに、シロイヌナズナでは、葉の細胞の *KNOX* 遺伝子への反応性を制限する要因である可能性のある遺伝子、*SERRATE* 遺伝子および *PICKLE* 遺伝子が同定されており、ホメオボックス遺伝子をめぐる遺伝子ネットワークが明らかになりつつある (Eshed et al., 1999; Ori et al., 2000; Prigge and Wagner, 2001)。イネでは、*shl* 変異体における *OSHI* の発現パターンから、SAM

の分化時には、*SHL* 遺伝子がホメオボックス遺伝子である *OSHI* の上流で機能していることが明らかになった。イネにおけるホメオボックスを含んだ、*SAM* の発生における遺伝子ネットワークの解明は遅れている。よって、本章の解析を開始点とする、今後の解析が望まれる。

## 2、*SHL* 遺伝子と胚器官

シュート欠失突然変異は、*SAM* だけでなく、他の胚器官の分化にも影響をおよぼしているので、*shl* 変異体の特徴から、それらの器官の相互関係について考察することができる。

イネ科植物の胚は、シュート、幼根以外にも、胚盤、鞘葉、エピブラストといった胚特異的な器官を持った複雑なものであり、それぞれの器官の機能やアイデンティティーについては Brown (1960) がまとめたように、議論の余地が残されている。胚盤は、一般に子葉あるいは子葉の一部とされており、鞘葉も、子葉、葉鞘や葉舌のような子葉の一部、分げつ芽、葉あるいは2枚の子葉が融合したもの、などと考えられている (Sargent and Arber, 1915; Roth, 1955)。エピブラストについても同様に、子葉、葉耳や葉舌という子葉の一部あるいは葉など、さまざまな器官と相同なものと解釈されてきた (Boyd, 1931; Sargent and Arber, 1915; Roth, 1955)。現在でも多くの議論がなされているが、もっとも多くの人から賛同を得ている解釈は、イネ科植物において子葉に当たるのは、胚盤と鞘葉である、というものである。これは、子葉が、葉のような形態をした器官であり、本葉の物理的保護もおこなう、といった機能面からの推察である (Eames, 1961)。つまり、イネ科の胚において子葉に当たるのはどの部分かということが解決すれば議論はかなり進んだことになる。しかし、子葉と *SAM* の関係については、双子葉植物においても特定されていない。シロイヌナズナの *stm* 変異体では、*SAM* が欠失しても子葉は正常に分化している (Barton and Poethig, 1993)。このことは、子葉の分化と *SAM* の分化が遺伝的に独立であることを意味する。しかし、近年、*stm* 変異体において、*SAM* は発生のごく初期で消失したのであり、やはり子葉は *SAM* と発生的に関連していると考えられている (Kaplan and Cooke, 1997; Kerstetter and Hake, 1997)。この場合、子葉は *SAM* の最初の側生器官である。

他の単子葉植物の胚の観察からも、イネ科の胚盤が子葉（の一部）であることは明らかであると考えられるが、鞘葉やエピブラストのアイデンティティーは不明である。*shl* 変異体の表現型から、胚盤の分化は *SAM* の分化と独立であるが、

鞘葉およびエピプラストの分化は SAM の分化に依存することが明らかになった。したがって、少なくともイネでは子葉の分化は SAM の分化と独立なものであると考えられる。また、鞘葉は、胚盤とアイデンティティーが異なるか、子葉（胚盤）の一部だとしても、その分化は SAM の分化に依存していることになる。

胚盤の分化が SAM の分化と独立である一方で、胚盤の発達は、SAM の活性あるいは *SHL* 遺伝子の活性に関係があると考えられた。*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚盤では、*RAmy1A* の発現する領域が小さくなっており、外形も非対称なものが多く見られた。したがって、*SHL* 遺伝子は、SAM の分化領域の確保を通して、胚の維管束の走向、胚盤の発達に関わっていると考えられた。

### 3、葉原基と SAM

葉原基のほとんどは、SAM 内の一部の細胞群の細胞分裂と生長のパターンの変化により形成される。しかし、シダ植物の *Pteridium* (Whittier, 1962) や、双子葉植物の *Begonia hispida* (Sattler and Maier, 1977) などにおいて、SAM がなくても葉が分化するという例も報告されてきた。ただし、これらの報告で、SAM の欠失の証明が不完全だったため、説得力を欠き、最近まで、葉の分化には SAM が必要であると考えられてきた。しかし、トウモロコシの変異体である *Lax midrib-O* では、葉から葉が分化した (Schichnes et al., 1997)。この変異体の解析から、葉の発生に必要な細胞増殖のためのシグナルは SAM からくる必要はないことが示された。ただし、この変異体は優性であり、この葉はシュートの一部である葉以外の器官からできたものではないので、葉の形成における SAM の重要性は完全に否定することはできなかった。

今回の解析では、SAM を分化しない *shl* 変異体のカルスから不定葉が分化した。このことは、葉の分化に SAM が分化していることが必ずしも必要ないことを意味している。つまり、葉の分化の遺伝的カスケードは、SAM からのシグナルを受けることなく働き始めるのである。ただし、生じた不定葉には明確な背腹性や完全な維管束組織はなく、また十分には生長しなかった。このことは、SAM からのシグナルが葉の十分な分化や生長に必要であることを示しているであろう。