

## 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

植物にとって非常に重要な器官である SAM の機能として、それ自身の維持と側生器官の分化のふたつがある。SAM 自身を正常に維持することのできない変異体は、主にシロイヌナズナで単離、解析されてきた。シロイヌナズナの *stm* の弱い変異体では、栄養生長期や生殖生長期に異常なシュートを形成し、SAM や花分裂組織の消失がみられた。このことは、*STM* 遺伝子が SAM の分化だけでなく、その後の indeterminate な細胞を維持し、SAM の正常なオーガニゼーションを保つ過程で機能していることを示している (Clark, 1997; Endrizzi et al., 1996)。また、最近 SAM の維持に関して *CLAVATA* (*CLV*) 遺伝子と *WUSCHEL* (*WUS*) 遺伝子の解析が進んでいる。*clv* 変異体の SAM の central zone (CZ) では、細胞数が異常に増加し、*CLV* 遺伝子は、CZ の細胞の増殖を制御している (Clark et al., 1993; 1995; Kayes and Clark, 1998)。さらに、分子生物学的および生化学的解析から、細胞内の *CLV* シグナル伝達系について明らかになってきた。*CLV1* 遺伝子は、セリン/スレオニン型リセプターキナーゼをコードし (Clark et al., 1997)、*CLV2* 遺伝子産物はそのリセプターの一部として結合し、*CLV3* 遺伝子産物は、そのリガンドとして機能していると考えられている (Fletcher et al., 1999; Jeong et al., 1999; Trotochaud et al., 1999; Brand et al., 2000)。一方、*wus* 変異体の SAM は扁平であり、植物体の発生は、しばしば停止する (Laux et al., 1996)。発現解析などから、*WUS* 遺伝子は stem cell アイデンティティーにとって不可欠であると考えられている (Mayer et al., 1998)。*CLV* 遺伝子と *WUS* 遺伝子は、stem cell とその下の organizing center の間でネガティブなフィードバック機構を形成して機能していることが明らかになった (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。さらに、*POLTERGEIST* 遺伝子は *WUS* 遺伝子とリダンダントな関係で機能する (Pogany et al., 1998; Yu et al., 2000)。そのほか、*zll/pnh* 変異体も発芽後早期に消失する異常な SAM を持つ (McConnell and Barton, 1995)。*ZLL/PNH* 遺伝子も単離され、その機能は、胚発生中の *STM* 遺伝子の発現抑制あるいは維管束からの SAM 活性を維

持するシグナル伝達経路に関係するのではないかと推測されている (Moissian et al., 1998; Lynn et al., 1999)。このように、シロイヌナズナでは SAM のオーガニゼーションの制御について研究が活発になされている。

単子葉植物では、双子葉植物に比べ、SAM の発生についての知見が少ない。しかし、トウモロコシでは、*kn1* タイプのホメオボックス遺伝子が SAM のオーガニゼーションに重要な役割を果たしていると考えられている (Kerstetter et al., 1997; Vollbrecht et al., 2000) が、SAM の維持に関わる変異体はほとんど得られていない。

ところで、SAM が維持される過程は、SAM から側生器官ができる過程とバランスをとっている。シロイヌナズナでは、二重変異体の解析などから、*STM* 遺伝子は、*CLV* 遺伝子と拮抗して未分化な SAM の細胞と側生器官を形成する細胞のバランスを取っていることがわかっている (Clark et al., 1996)。また、*MGOUN* 遺伝子は、SAM の *peripheral zone* の細胞が側生器官を形成するときに分配される程度を調節していると考えられている (Laufs et al., 1998)。単子葉植物では、トウモロコシの *narrow sheath (ns)* 変異体で、葉原基の *founder cell* が野生型に比べて減少しているという例があり、これは *NS* 遺伝子が葉原基の *founder cell* の確保に関与していることを示している (Scanlon et al., 1996; Scanlon and Freeling, 1997)。

側生器官の分化パターンの規則性 (葉序および葉間期) は、古くから興味を持たれてきた現象であるが、その制御機構については不明な点が多い。それを明らかにするには、SAM のオーガニゼーションの理解が不可欠であると考えられる。実際、シロイヌナズナの *clv* 変異体やトウモロコシの *abphyll* 変異体は、異常な葉序を示すが、その SAM は野生型より大きいし、形も異常である (Clark et al., 1993; 1995; Jackson and Hake, 1999)。また、イネの *plastochron 1* 変異体は大きな SAM を持ち、葉間期が野生型よりも短い (Itoh et al., 1998)。さらに、*shoot organization (sho)* 変異体の SAM は扁平であり、葉間期および葉序は異常である (Itoh et al., 2000)。これらの野生型遺伝子が、葉原基の発生に関してどのように関わっているかはそれぞれ異なると思われるが、一般に SAM のサイズや形は葉原基の分化パターンに非常に深く関わっていると考えられている。

これらの解析にも関わらず、SAM が維持される機構や葉原基分化との関連については、十分な理解がなされているわけではない。前章では、SAM の分化に *SHL* 遺伝子が不可欠であることを明らかにした。しかし、SAM を欠失する変異

体を用いたため、*SHL* 遺伝子が分化後の SAM においてどのような機能を持っているかは明らかにすることができなかった。そこで、本章では、*SHL* 遺伝子の全体的な機能を理解するため、弱い表現型を示す *shl* 変異体を同定し、解析した。

## 材料および方法

### 1、供試材料

受精卵に、化学突然変異源 MNU (N-methyl-N-nitrosourea) を処理した M2 集団から選抜された単因子劣性変異体のなかから、発芽後まもなく枯死した約 10 系統について対立性検定を行い、*SHL2* の対立遺伝子、*shl2-6*、*shl2-7*、*shl2-8*、および、*SHL1* の対立遺伝子 *shl1-3* を同定した。これらは、*shl2-7* および *shl1-3* が品種金南風、他の 2 系統は品種台中 65 号に由来する。なお、*SHL2* の弱い対立遺伝子の対照として、第 1 章で述べた *shl2-3* を、*shl1-3* の対照としては *shl1-2* を用いた。

### 2、生育環境

変異体の植物体は、土壌条件では枯死したので、6% シュークローズおよび 0.8% 寒天を含む MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) に完熟種子を置床し、無菌状態で育てた。

### 3、パラフィン切片の作成

胚発生中の種子や完熟種子、幼苗を 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、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、卵白グリセリンを塗ったスライドガラスに附着させた。染色はヘマトキシレンによりおこない、光学顕微鏡により観察した。

### 4、樹脂切片の作成

第 1 章と同様に行った。

### 5、走査型電子顕微鏡 (SEM)

第 1 章と同様に行った。

## 6、*in situ* ハイブリダイゼーション

第 1 章と同様に行った。

## 7、カルス誘導と再分化

第 1 章と同様に行った。

# 結果

## 1、胚発生過程

### 1-1 胚の形態

野生型、強い対立遺伝子 (*shl2-3*) および弱い対立遺伝子 (*shl2-6*、*shl2-7* および *shl2-8*) の変異体の胚発生過程の形態観察を行った。野生型では、受粉後 4 日目に鞘葉、SAM および幼根が、受粉後 5 日目には第 1 葉の原基が形成された (図 2-1 A)。一方、いずれの *shl2* 変異体の胚でも、受粉後 5 日目までは、鞘葉は分化せず、また、胚盤と幼根以外の器官は全く形成されず、*shl2-3* 変異体と弱い *shl2-6*~*shl2-8* 変異体を互いに区別することができなかった (図 2-1 B-E)。受粉後 6-7 日目になると、*shl2-3* 変異体ではそれ以上の形態変化が起こらなかったのに対し、*shl2-6*~*shl2-8* 変異体では、鞘葉は欠くものの、SAM、エピブラストおよび第 1 葉を分化するものが観察された (図 2-1 G-J)。このことは、鞘葉の分化にはエピブラストの分化に比べ、より完全な SAM の活性が必要であることを示唆している。*shl2-6* 変異体では、約 25% の胚で SAM を分化しなかったが、約 75% の胚では、SAM が分化した後、本葉を 1 あるいは 2 枚分化した。しかしその後、SAM は消失し、完成胚では SAM が認められなかった (図 2-1 M)。また、*shl2-7* 変異体では、約 10% の胚で SAM が分化しなかったが、ほとんどの胚では本葉を 1~3 枚分化した後 SAM が消失した (図 2-1 N)。これら 2 系統の変異体の SAM は、胚発生中に葉原基によって消費されたように見えた。それに対し、*shl2-8* 変異体では、SAM が分化しない胚は、約 5% にとどまり、ほとんどの完成胚は、SAM とともに 3 あるいは 4 枚の本葉を分化していた (図 2-1 O)。これらの結果は、*SHL2* が、SAM の維持に不可欠であることを示している。また、胚での表現型 (SAM

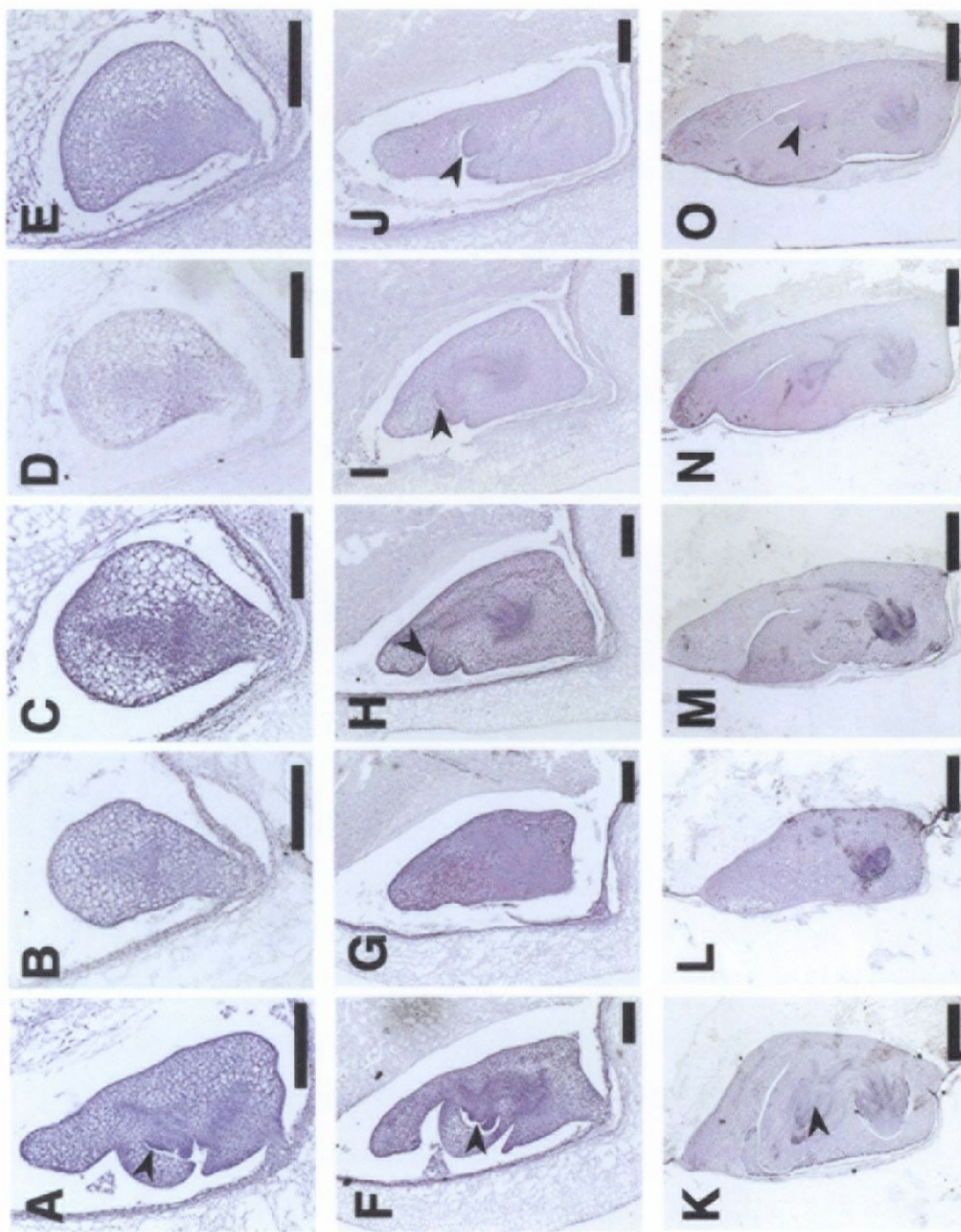


図2-1 野生型および *sh12* 変異体の胚発生過程。  
 A、F、K：野生型。B、G、L：*sh12-3* 変異体。C、H、M：*sh12-6* 変異体。D、I、N：*sh12-7* 変異体。  
 E、J、O：*sh12-8* 変異体。A-E：受粉後5日目。F-J：受粉後7日目。K-O：完成胚。G、L、MおよびN  
 では、SAM（黒矢頭）が見られない。A-E：Bars=150  $\mu$ m。F-J：Bars=200  $\mu$ m。K-O：Bars=500  $\mu$ m。

の分化頻度および完成胚での SAM の存在頻度) から、*shl2-8* 変異体が最も弱く、ついで、*shl2-7*、*shl2-6* 変異体の順に強くなり、*shl2-3* 変異体が最も強いと考えられた。

*shl1-3* 変異体の胚発生過程は、*shl2-8* 変異体とほぼ同様であり、SAM は約 7 割の個体で胚発生中に消失していた。

なお、第 1 章で述べたように、*shl* 変異体では幼根が増加する場合があります、それは、弱い *shl* 変異体でもみられた。かつ、増加様式が強い *shl* 変異体と弱い *shl* 変異体では異なっていた (図 2-2)。強い *shl* 変異体では、幼根の分化領域が拡大して、その場所にクラスター状に幼根が分化していたが、弱い *shl* 変異体では、本来の幼根と離れて、胚盤化した第 1 葉の近くにもうひとつの小さな幼根が分化していた。このような幼根の増加は、より多くの葉を分化した個体でより頻繁に見られた。弱い *shl* 変異体で形成された 2 つめの幼根は、強い *shl* 変異体で形成されたものとは性質の異なるものであると思われ、興味深い。

もうひとつ興味深いことに、*shl2-6*~*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体の第 1 葉は、分化位置は正常であるが、野生型よりも厚く、その表皮細胞は胚盤上皮組織に特異的な柵状であった。さらに、*shl2-6* および *shl2-7* 変異体では、しばしば第 2 葉の胚盤化も確認された。本葉の胚盤化は、形態的なものだけでなく、機能的なものでもあることが、*shl* 完成胚に対し、*RAmy1A* をプローブとして用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、証明された (図 2-3)。本葉の胚盤化のメカニズムを明らかにする一つの手がかりとして、胚発生過程での *RAmy1A* の発現を調査したところ、*shl2* 変異体での発現は野生型に比べて遅れていた (図 2-4)。野生型では *RAmy1A* は、受粉後 4 日目、つまり本葉が分化する以前から先端部背側の胚盤上皮細胞で発現し始め、その発現は受粉後 7 日目には胚盤上皮細胞全体に広がった。しかし、*shl2-6* 変異体では、本葉が分化する以前 (受粉後 7 日目) には発現が見られず、第 2 葉を分化した受粉後 9 日目に胚盤上皮組織の一部と胚盤化した第 1 葉で *RAmy1A* の発現が見られた。

なお、第 1 章と同様に *shl2-8* 変異体の胚盤上皮細胞についての観察を行ったところ、胚盤上皮細胞は、先端部から基部まで柵状を示し、細胞長も野生型と大きく異なることはなかった。

## 1-2 OSH1 の発現

*shl2-6*~*shl2-8* 変異体の胚における SAM の分化過程について知見を得るため、

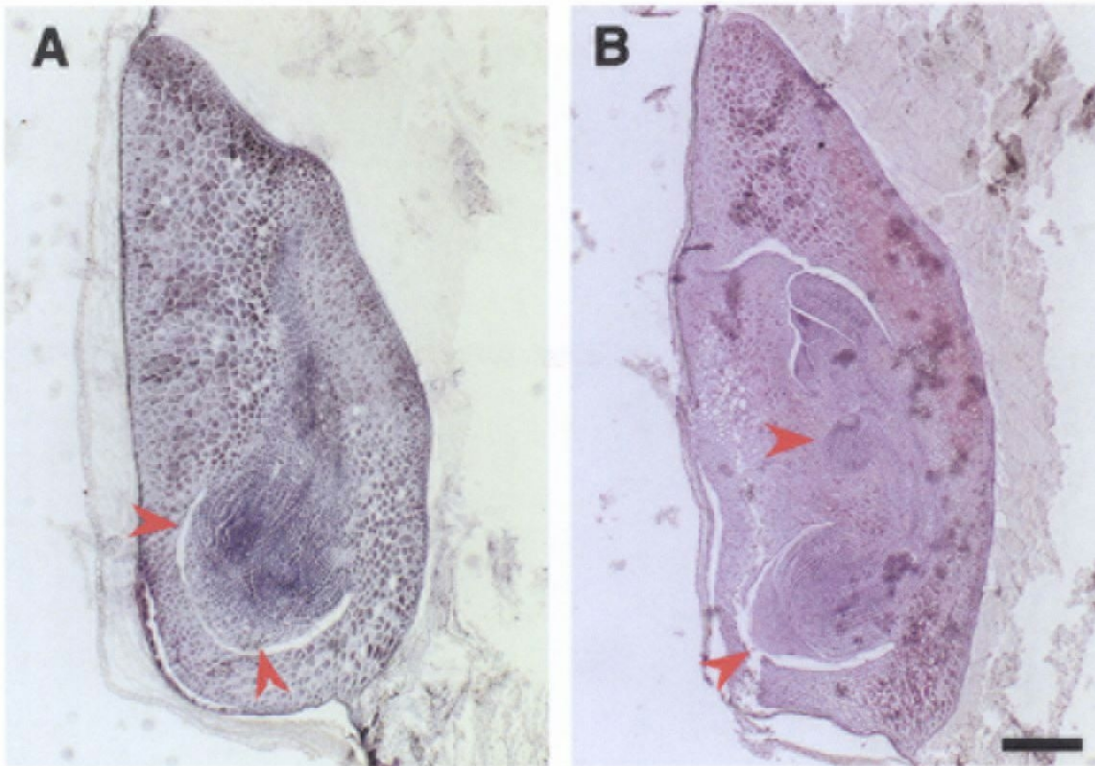


図2-2 *sh1* 変異体に見られる幼根の増加様式。

A : *sh12-3* 変異体。 B : *sh12-8* 変異体。 赤矢頭は幼根を示している。 Bar=200  $\mu$ m。

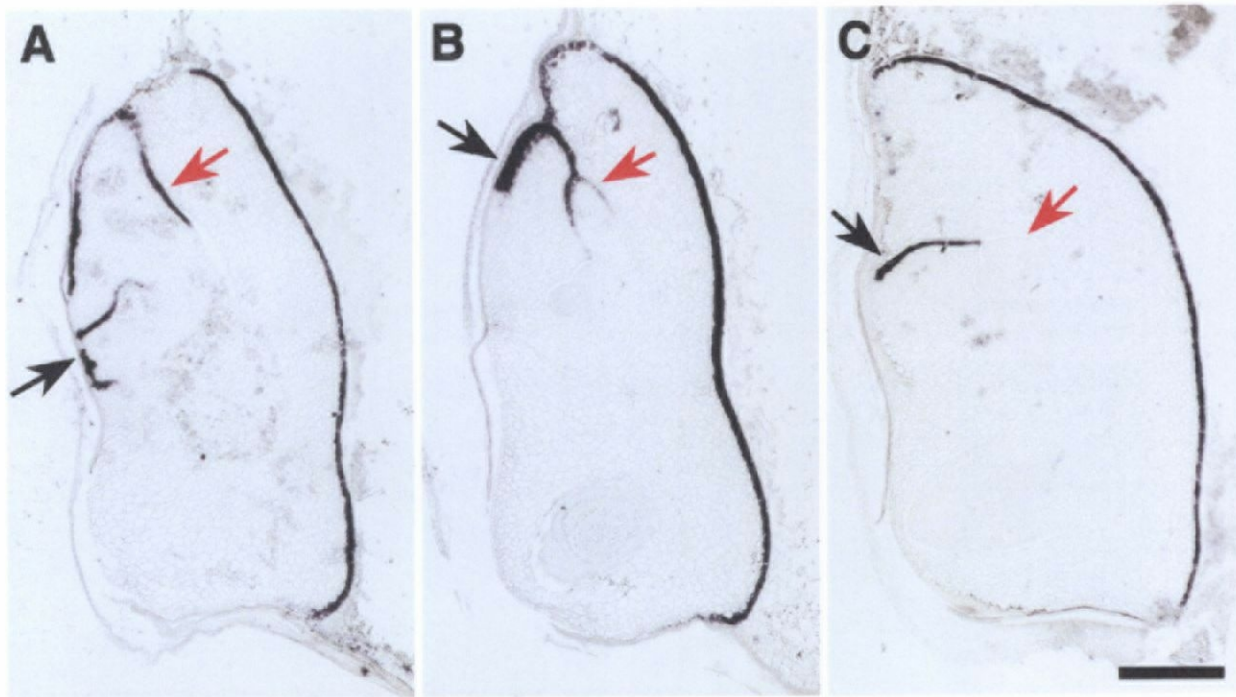


図2-3 浸漬後1日目の *shl2* 変異体の本葉における *RAmy1A* の発現パターン。  
A : *shl2-6* 変異体。B : *shl2-7* 変異体。C : *shl2-8* 変異体。黒矢印は第1葉を、赤矢印は第2葉を示している。Bar=0.5mm。



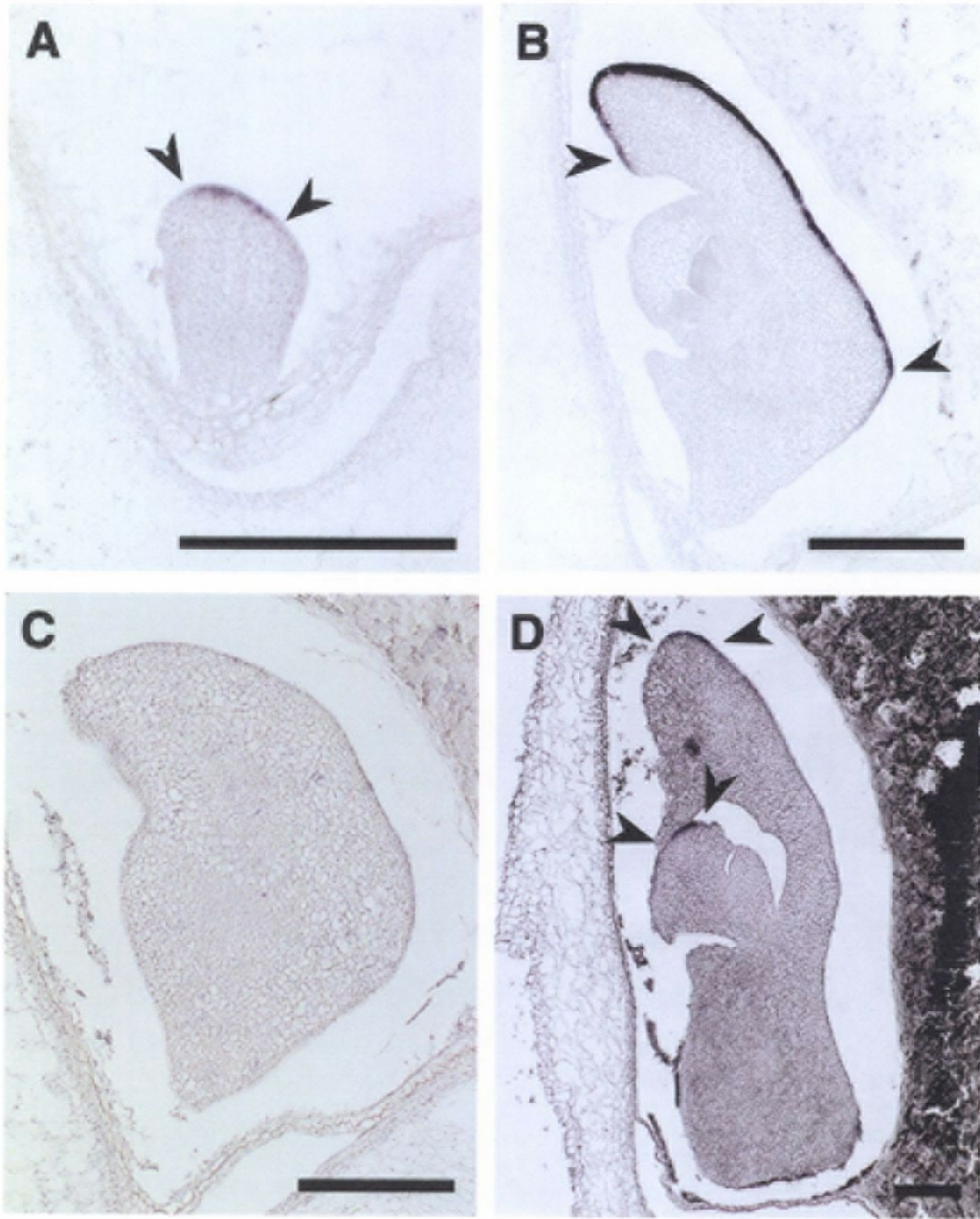


図2-4 野生型および *sh12* 変異体の胚発生過程における *RAmy1A* の発現パターン。  
 A：受粉後4日目の野生型。B：受粉後7日目の野生型。C：受粉後7日目の *sh12-6* 変異体。D：受粉後9日目の *sh12-6* 変異体。黒矢頭の間で発現が見られる。Bars=200  $\mu$ m。

*OSHI* の発現パターンを調査した。強い変異体 (*shl2-3*) の受粉後 4 日目の胚では、*OSHI* は非常に狭い領域での発現しかみられなかった (図 2-5 B)。それに対し、*shl2-6*~*shl2-8* 変異体の胚における *OSHI* の発現領域は、野生型よりも狭いが、*shl2-3* 変異体よりも広がった (図 2-5 A-E)。*shl2* 変異体の間でも、SAM を分化しない *shl2-*

3 変異体で最も発現領域は狭く、最も弱い表現型を示す *shl2-8* 変異体で最も発現領域は広く、中間的な表現型を示す *shl2-7* および *shl2-8* 変異体での発現領域はそれらの中間であった。つまり、*shl2* の対立遺伝子間で、胚の表現型 (SAM の表現型) の強弱と *OSHI* の発現領域の広さとの間には密接な関連が見られた。これは、強い変異体では、SAM 分化予定領域が SAM の分化には狭すぎ、弱い変異体では、SAM ができる程度の SAM 分化予定領域は確保していることを示している。*shl2-3* 変異体の胚では、受粉後 7-8 日目には *OSHI* の発現はほとんど消えるが、*shl2-6*~*shl2-8* 変異体の胚では、野生型より狭い領域で発現が維持された (図 2-5 G-J)。その後、*shl2-6* と *shl2-7* 変異体では、SAM が消失するとともに *OSHI* の発現もなくなった (図 2-5 M, N)。しかし、もっとも弱い *shl2-8* 変異体においては、胚発生を通して *OSHI* の発現がみられた (図 2-5 O)。

胚発生過程の形態同様、*shl1-3* 変異体における *OSHI* の発現は、*shl2-8* 変異体に準じており、受粉後 5 日目の胚では、強い対立遺伝子である *shl1-2* 変異体より広い領域での発現が見られた (図 2-6)。

これらのことから、*SHL2* 遺伝子が SAM の分化領域の確保を通して SAM の分化に関わっていること、SAM 内の indeterminate な細胞の確保を通して SAM の維持に関わっていることが明らかになった。

## 2、栄養生長期の表現型

*shl2-6*~*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体は、発芽した。しかし、*shl2-6* 変異体と *shl2-7* 変異体は、数枚の形態が異常な葉を出した後枯死した。枯死した個体に SAM はみられなかった。これに対し、多くの *shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体は数週間生き続けた。そこで、*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体の植物体を詳細に解析した。

### 2-1 栄養生長初期

発芽後 1 週間までの *shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体は、小さくて細い葉を

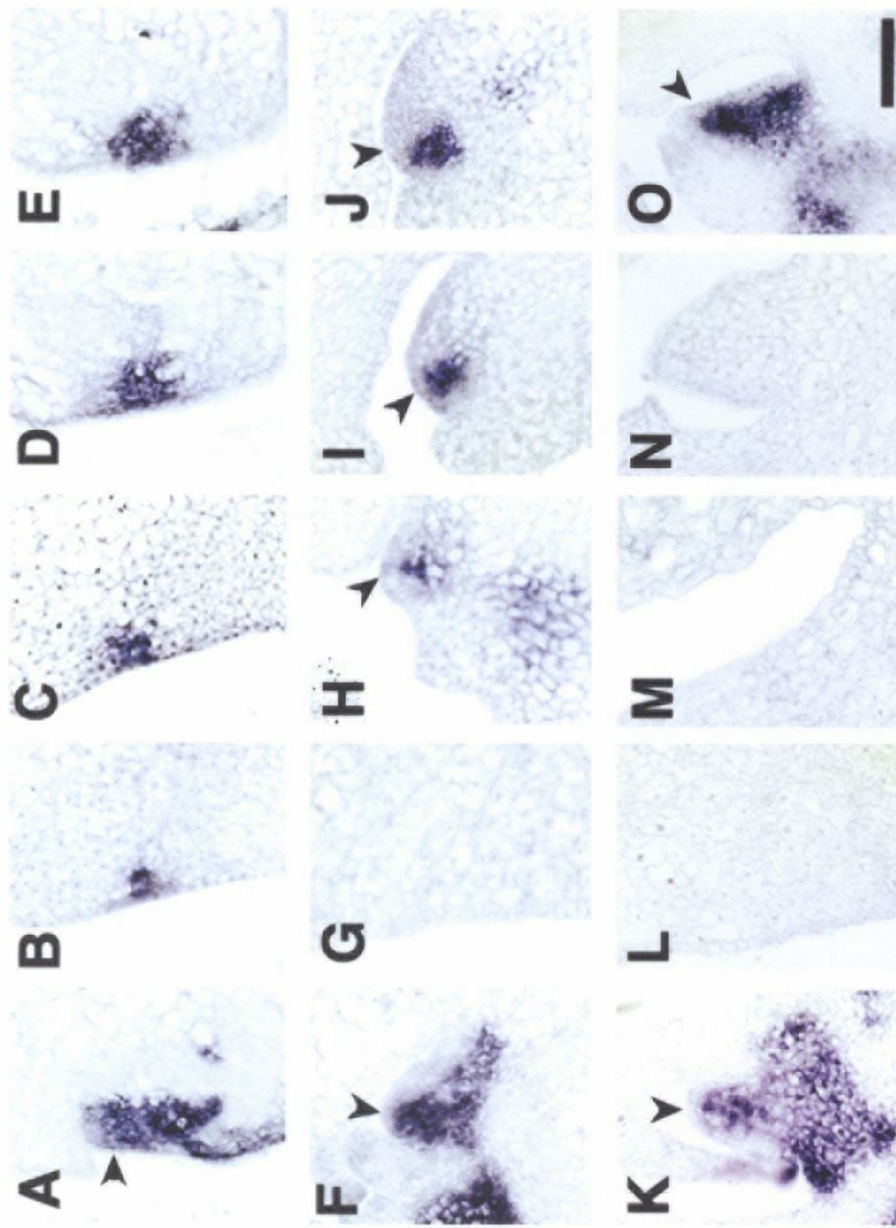


図 2-5 野生型および *shi2* 変異体における *OSH1* の発現パターン。  
 A、F、K：野生型。B、G、L：*shi2-3* 変異体。C、H、M：*shi2-6* 変異体。D、I、N：*shi2-7* 変異体。  
 E、J、O：*shi2-8* 変異体。A-E：受粉後 4 日目。F-J：受粉後 7 日目。K-O：受粉後 10 日目。黒矢頭は SAM を  
 示している。Bar=50  $\mu$ m。

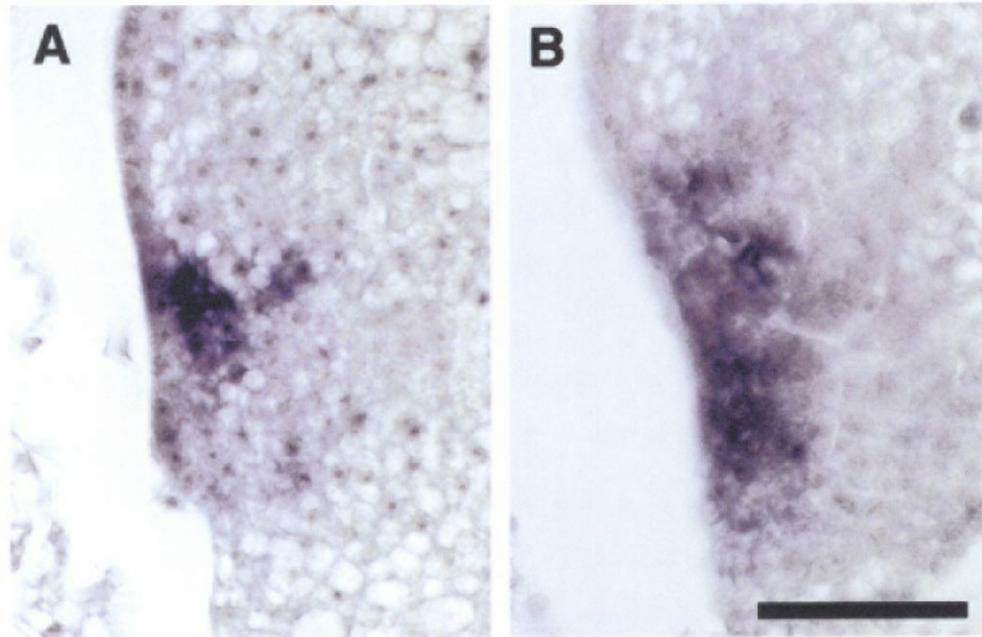


図2-6 *shil-2* および *shil-3* 変異体における *OSHI* の発現パターン。  
A : *shil-2* 変異体。B : *shil-3* 変異体。いずれも受粉後 5 日目の胚であり、*shil-3* 変異体  
における *OSHI* の発現領域は、*shil-2* 変異体よりも広い。Bar=50 $\mu$ m。

不規則な葉序で分化した (図 2-7 B、図 2-8 A)。葉間期も異常であり、野生型の約半分で、2 日に満たない値であった。葉の形態は個体によって大きく異なり、葉の幅は、野生型よりは狭いものの、糸状のものから比較的広いものまで変異が大きかった。SEM による観察から、葉原基の段階ですでに幅が狭く、founder cell として recruit される細胞の数が野生型より少ないと推測できた (図 2-7 C)。

発芽後 1 週間目の多くの植物体では、最後の葉の腋に SAM が存在していなかった。また、いくつかの個体では通常 SAM によって占められている位置に、トライコームを生じたドーム状の構造物や葉原基が存在した (図 2-8 D)。shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の植物体の多くが発芽後 10 日程度で枯死することを考えると、これらの結果は SAM が葉原基に消費されたことを示している。生き続けた shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM の形は扁平であり、SAM の幅は野生型より広がったが、SAM の高さは野生型の約 2 分の 1 と、低かった (図 2-7 E-G、図 2-8 B-D)。

形の異常な SAM のオーガニゼーションを調べるために *OSHI* をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM では、*OSHI* の正常な発現を示すものもあったが、多くの場合発現領域が狭くなっていた (図 2-7 F、G、図 2-8 C、D)。特に、peripheral zone (PZ) および rib zone (RZ) での発現が抑制されていた。これらの結果は、栄養生長初期の shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM では、indeterminate な細胞の割合が野生型に比べ減少していることを示している。これが葉間期の短縮と不規則な葉序に関係している可能性が考えられる。

次に、shl2-8 変異体および shl1-3 変異体における、細胞分裂の S 期に特異的に発現する histone *H4* 遺伝子の発現を調査した。発芽後 1 週間の野生型の SAM では、中央縦断切片当たり、PZ の 2 個以下の細胞でしか発現がみられなかったが、shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM では、野生型よりも多くの細胞でシグナルが検出された (図 2-8 B、図 2-9)。これは、shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM において細胞分裂が頻繁に起こっていることを示している。それに加え、shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM での histone *H4* の発現は PZ に限られておらず、CZ でも多くの発現がみられた。これらの結果は、shl2-8 変異体および shl1-3 変異体の SAM のオーガニゼーションや、細胞分裂の空間的制御が異常であることを示している。

shl2-8 変異体の葉には形態的異常が見られた。比較的幅の広い葉の先端は 2 つ

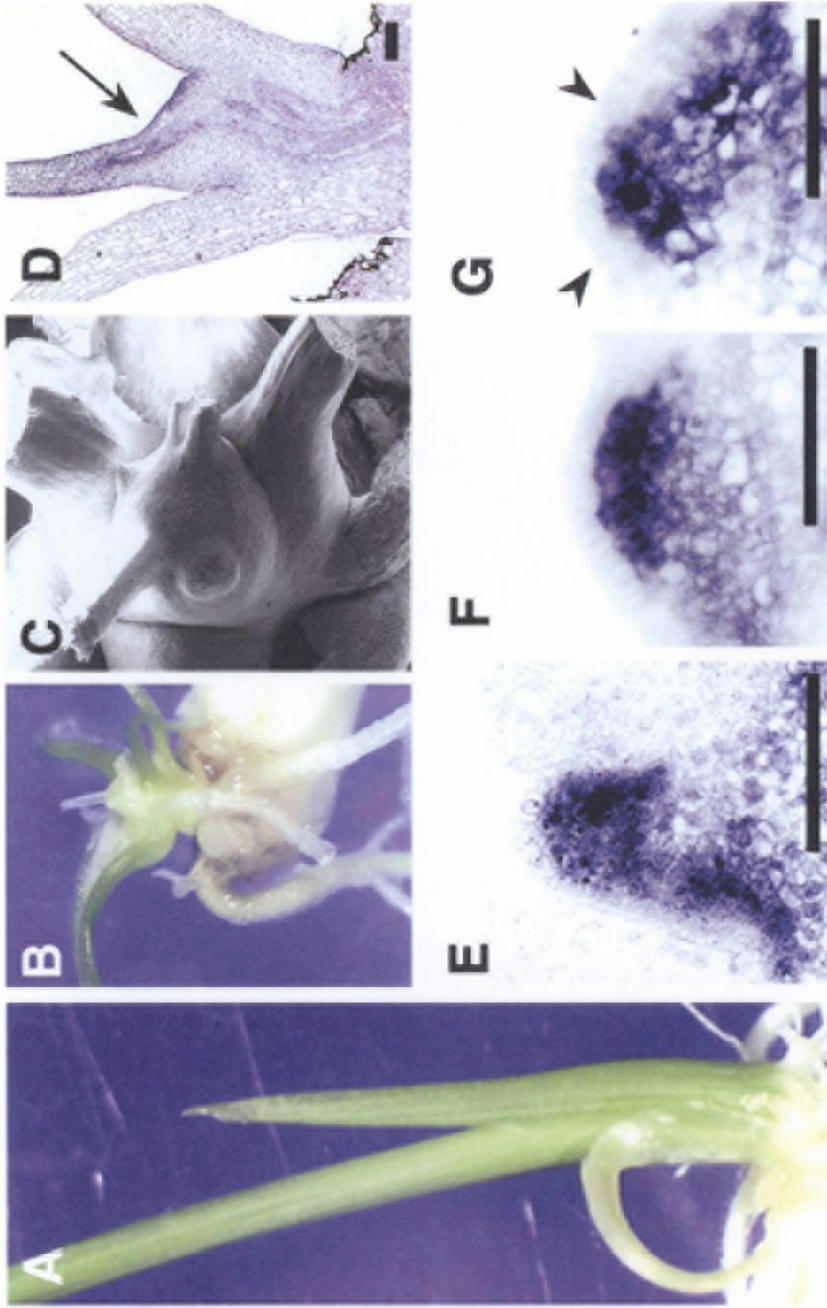


図 2-7 栄養生長初期の *sh12-8* 変異体の表現型。

A : 播種後 1 週間の野生型の植物体。B : 播種後 1 週間の *sh12-8* 変異体の植物体。C : *sh12-8* 変異体の茎頂。不規則な葉序を示す。D : 播種後 1 週間の *sh12-8* 変異体の植物体の縦断切片。SAM の位置に葉原基 (黒矢印) が分化している。E : 野生型の SAM における *OSHI* の発現パターン。F、G : *sh12-8* 変異体の SAM における *OSHI* の発現パターン。G : PZ (黒矢頭) および RZ での発現が抑制されている。Bars=50  $\mu$ m。

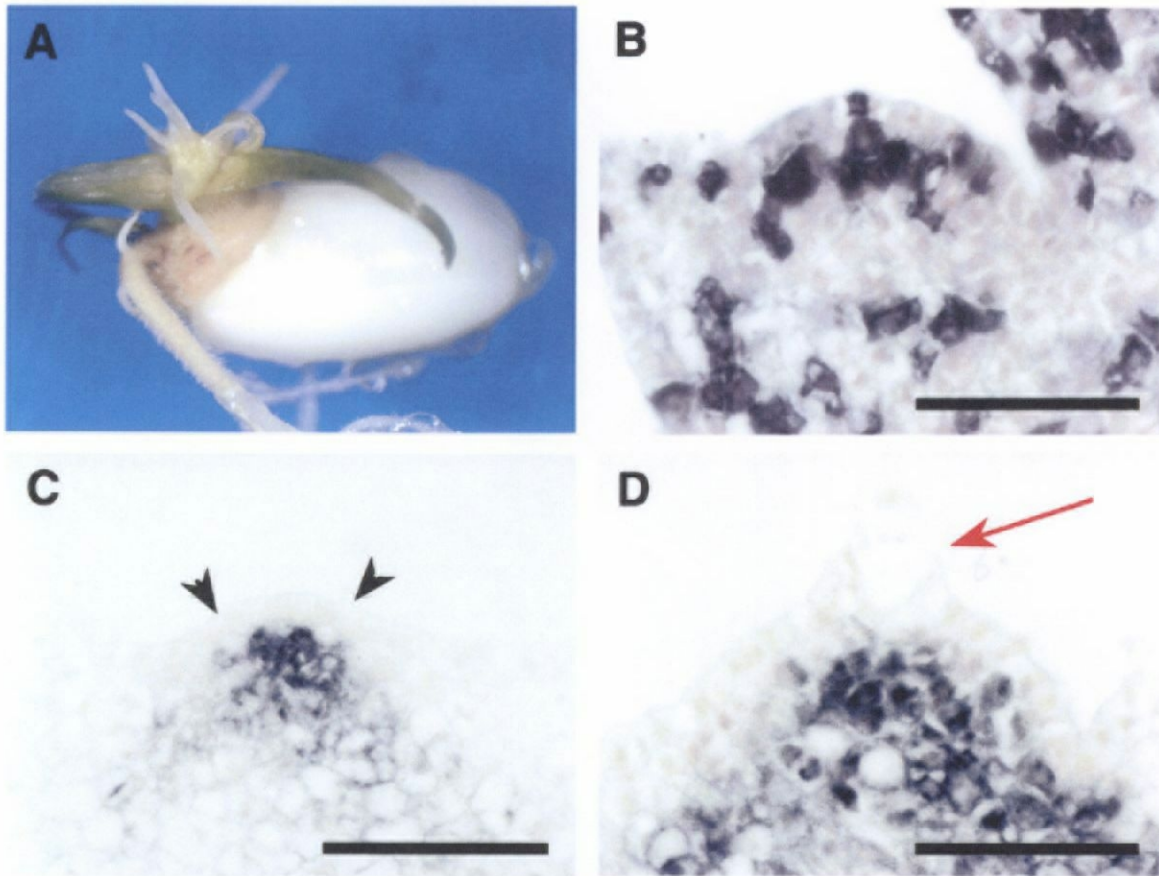


図2-8 *shll-3* 変異体の栄養生長初期の表現型。

A : 播種後1週間の *shll-3* 変異体の植物体。B : *shll-3* 変異体における histone *H4* の発現パターン。多くの細胞でシグナルが見られる。C、D : *shll-3* 変異体における *OSHI* の発現パターン。C : PZ (黒矢頭) および RZ での発現が抑制されている。D : SAM にトライコーム (赤矢印) が生じている。Bars=50  $\mu$ m。

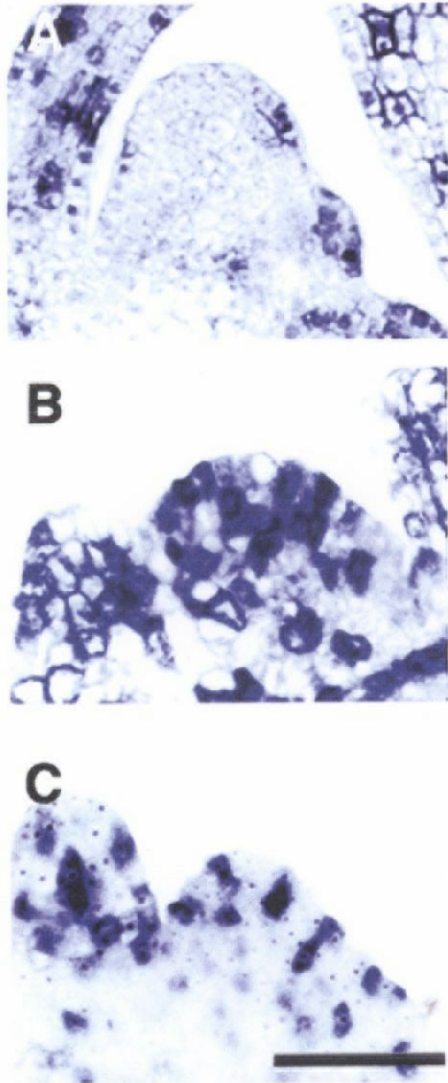


図2-9 野生型および *sh12-8* 変異体の SAM における histone *H4* 遺伝子の発現パターン。  
A : 播種後 1 週間の野生型の SAM。 B : 播種後 1 週間の *sh12-8* 変異体の SAM。  
C : 播種後 3 週間の *sh12-8* 変異体の SAM。 変異体の SAM では、多くのシグナルが見られる。 Bar=50 $\mu$ m。



あるいは3つに分かれていることがしばしばあった(図 2-10 C)。また、多くの葉が組織学的異常を示した。葉の基部の向軸側表皮では、垂層分裂が過剰に起こり、先端部の向軸側表皮では細胞が異常肥大していた(図 2-10 D、E)。なお、糸状の葉の組織分化は正常だった(図 2-10 F)。これらの傾向は、*shl1-3* 変異体でも同様に見られた。

したがって、栄養生長初期の *shl2-8* および *shl1-3* 変異体は、葉原基の分化パターン(葉序および葉間期)だけでなく、葉の形態(外観および組織学的形態)にも異常が見られることが明らかになった。

## 2-2 栄養生長後期

発芽後 2-3 週間の *shl2-8* 変異体(図 2-11 A)は、いくつかの特徴で栄養生長初期のものと区別することができた。葉は依然として細く小さいが、大きさは安定しており、葉序はほぼ互生であった(図 2-11 B)。また、組織学的にも正常であった(図 2-10 G)。その後、葉はさらに短くなり、発芽後 2 ヶ月目には葉が形成されなくなり、植物体の生長も止まった。ただし、葉が形成されなくなってからも茎の伸長はしばらく続いた(図 2-11 C)が、その後枯死した。このことから、茎の生長は葉の生長と比べて、SAM からの影響を受けるまでに比較的長い時間がかかることが示唆された。また、図 2-11 C のように、枯死時の茎頂にアイデンティティー不明の細胞塊が見られた植物体もあった。

栄養生長後期にも、SAM の位置に、トライコームを生じたドーム状の構造物や葉原基がみられた(図 2-11 E)。栄養生長後期の SAM でも *OSHI* の発現を調査したところ、栄養生長初期同様、発現領域は狭かった(図 2-11 D、E)。

この時期の SAM における *OSHI* の発現には二つのパターンが見られた。一つは、SAM の位置にトライコームを生じたドーム状の構造物がある場合であり、その場合、より内部に *OSHI* の発現が限定された(図 2-11 E)。これは、このドーム状の構造が、外側の層から葉に転換していくことを示していると思われる。もうひとつは、*OSHI* が全く発現していない場合であり、これは、SAM 全体が葉原基に転換したことを示唆している(図 2-11 F)。前者は、後者への移行過程であると考えられる。

栄養生長後期においても、*shl1-3* 変異体は *shl2-8* 変異体と同様の表現型を示したので、*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体における SAM の消失過程を次のようにまとめることができる。*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体の SAM は、

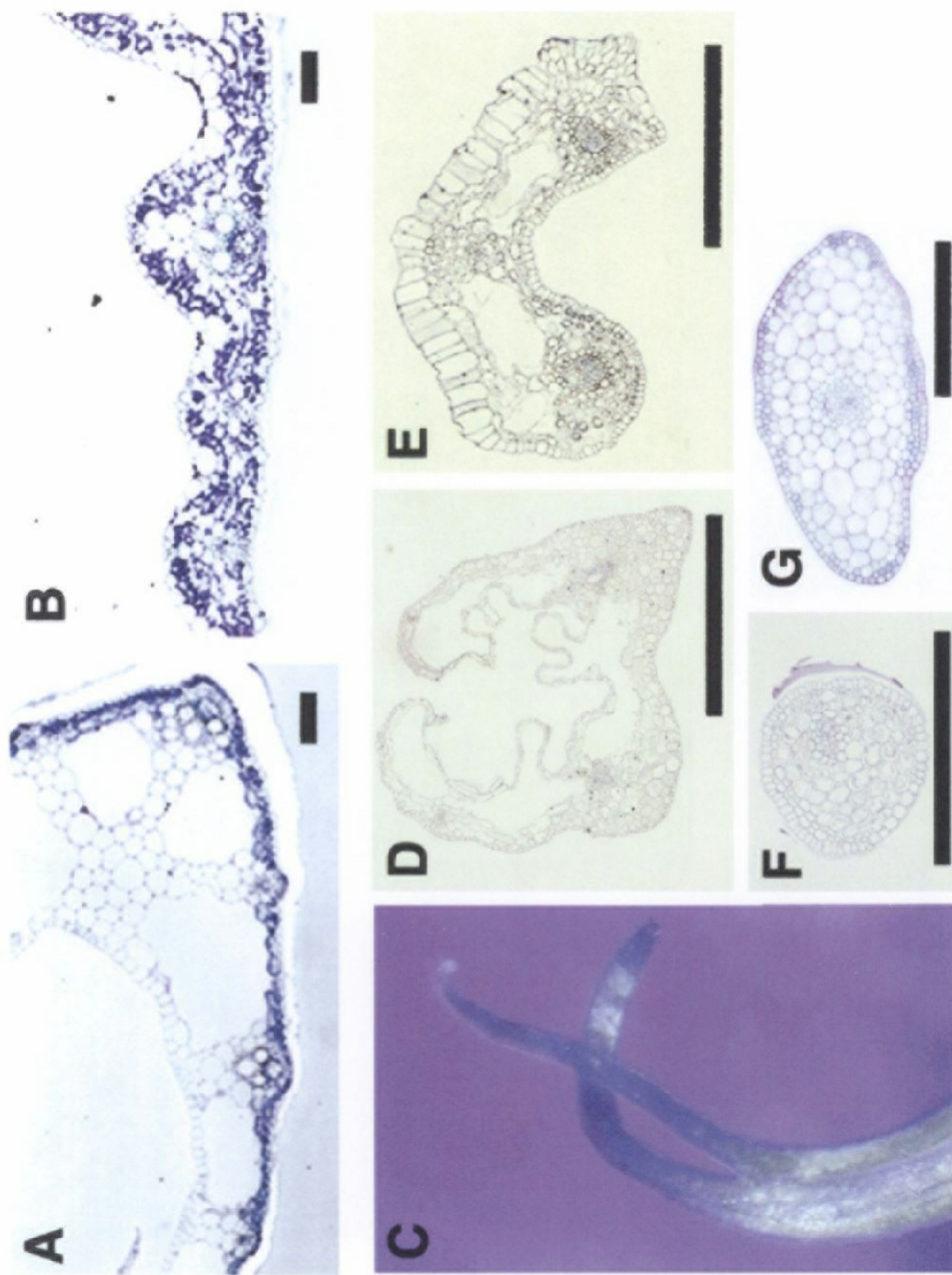


図 2-10 *shl2-8* 変異体の葉の形態。

A : 野生型の葉の葉鞘の横断切片。 B : 野生型の葉の葉身の横断切片。 C-F : 栄養生長初期の *shl2-8* 変異体の葉。  
 C : 葉の先端が 2 つに分かれている。 D : 比較的幅の広い葉の基部の横断切片。 E : D の葉の先端部の横断切片。  
 F : 糸状の葉の横断切片。 G : 播種後 3 週間目の細い葉の横断切片。 A、B : Bars=1mm。  
 D、E : Bars=200  $\mu$ m。 F、G : Bars=100  $\mu$ m。

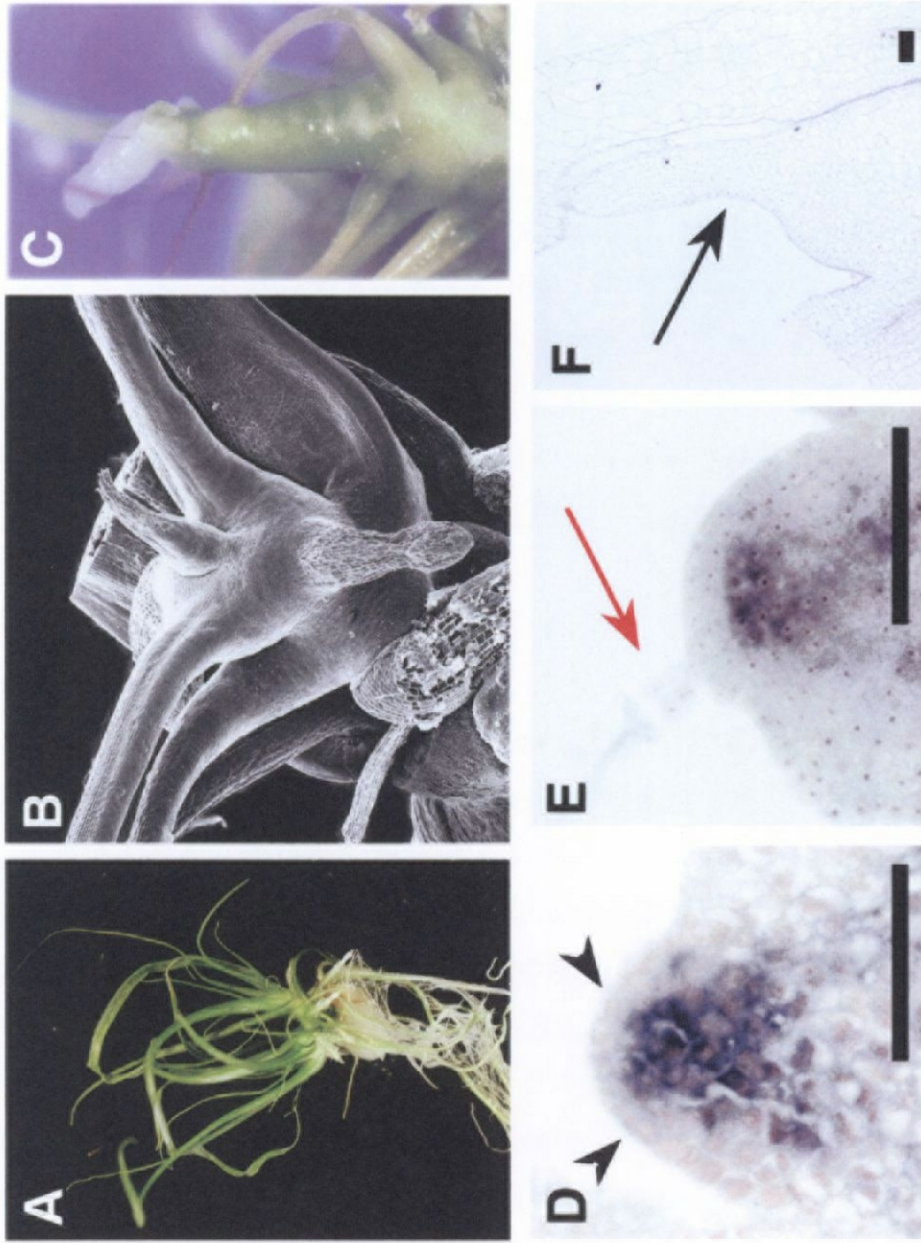


図 2-11 栄養生長後期の *sh12-8* 変異体の表現型。  
 A : 播種後 3 週間の *sh12-8* 変異体。 B : 栄養生長後期には *sh12-8* 変異体の葉序は互生に戻る。 C : 播種後 2 ヶ月  
 の *sh12-8* 変異体の茎頂。 D-F : *sh12-8* 変異体の茎頂での *OSHI* の発現パターン。 D : *OSHI* の発現は両側の  
 PZ (黒矢頭) で抑制されている。 E : SAM にトライコーム (赤矢頭) が生じている。 F : SAM の位置に  
 葉原基 (黒矢頭) が形成され、*OSHI* の発現が見られない。 Bars=50  $\mu$ m。

もともと不十分な数の indeterminate な細胞 (*OSHI* の発現で示される) でなりたっている。発生が進むにつれ、indeterminate な細胞がある限度を超えて減少すると、SAM の L1 層はトライコームを形成することも可能になるなど、SAM の細胞は表層から徐々に葉のアイデンティティを獲得していく。その後、indeterminate な細胞が全く消失すると、SAM は完全に葉原基に転換し、その植物体の発生はとまる。

### 3、再分化個体の解析

*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子が SAM の分化や維持に一般的にどう関わっているか調べるために、カルスからの再分化を試みた。*shl2-6*~*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体のカルスからはシュートが再分化した。再分化した不定芽は、胚発生を経た植物体よりも大きく育ち、組織学的にも正常であった。しかし、発芽個体と同様に、葉は細く、葉間期は短く、成熟する以前に枯死した。葉序については、興味深いことに、不規則から互生へ、互生から不規則へ、互生のみなどのさまざまなものが観察された。

### 4、*shl2* 対立遺伝子間の表現型の相関

1-1 で述べたように、胚における SAM の分化頻度は、*shl2-3*、*shl2-6*、*shl2-7*、*shl2-8* 変異体の順に高くなり、対立遺伝子の強弱が区別できた。また、弱い *shl2* 変異体における SAM の消失時期は表 2-1 のようになっていた。すなわち、*shl2-6* 変異体では、SAM は胚発生中に消失し、*shl2-7* 変異体ではほとんどの SAM が胚発生中に消失したものの、6%の種子は発芽し、栄養生長初期に SAM が消失した。*shl2-8* 変異体では、約 70%の種子が発芽し、そのうちの 3分の1の個体は播種後 1 週間以後まで SAM が維持された。このように、対立遺伝子間で、SAM の分化頻度と SAM の維持期間の間に有意な相関が認められた。さらに、それらの形質と *OSHI* の発現領域の広さの間にも有意な相関が見られた (表 2-2)。このように、SAM の分化予定領域の広さ、分化頻度、維持される期間は、互いに密接に関連していることが明らかになった。しかも、対立遺伝子の強弱により、表現型が連続的に変化しており、SAM は漸次的に分化すると考えられる。

### 5、*shl2 sho2* および *shl1 sho2* 二重変異体の解析

*shl2* 変異体および *shl1* 変異体の胚および植物体、再分化個体の形態は *sho*

表2-1 弱いshl2変異体におけるSAMの消失時期

遺伝子型	胚発生中	SAMの消失時期	
		播種後1週間以内	播種後1週間以後
<i>shl2-6</i> (n=200)	100%	0%	0%
<i>shl2-7</i> (n=109)	94%	3%	3%
<i>shl2-8</i> (n=75)	31%	50%	19%

表2-2 野生型および*shl2*変異体におけるSAMに関する形質の相関

遺伝子型	<i>OSHI</i> の発現している 細胞数*	SAMの分化頻度(%)	SAMの消失時期
<i>shl2-3</i>	4.5±1.7	21.4	—
<i>shl2-6</i>	8.0±2.2	72.5	受粉後7～8日
<i>shl2-7</i>	8.6±1.5	87.2	受粉後8～10日
<i>shl2-8</i>	9.2±1.6	92.9	播種後1～2週間
野生型	11.8±1.3	100.0	播種後14～16週間

\*：中央縦断切片当たりの数。胚は、SAM分化直前のものを用いた。

変異体と非常によく似ていた (図 2-12 A、C)。まず、胚では、鞘葉が欠失し、第 1 葉が大きくなり、その表皮は胚盤上皮細胞に特異的な柵状の形態をとった (図 2-12 A)。また、*OSHI* の発現領域は野生型よりも狭かった (図 2-12 B)。幼苗期の植物では、いずれも細く短い葉を短い葉間期かつ不規則な葉序で分化した (図 2-12 C、D)。さらに、SAM は扁平であった。このように高度に類似した表現型から、これらの遺伝子は、同じ遺伝的カスケードのなかで機能することが予測された。

*SHL2* 遺伝子と *SHO* 遺伝子の遺伝的相互関係をみるために、*shl2-6 sho2* 二重変異体を作成した。*shl2-6* 変異体は、*shl2-7* 変異体および *shl2-8* 変異体よりも強い表現型を示し、*sho2* 変異体は他の *sho* 変異体よりも弱い表現型を示す。そこで、*shl2-6* 変異体と *sho2* 変異体を区別するのは、胚の形態からも植物体の形態からも比較的容易であった。F<sub>1</sub> 植物体は正常な形態を示し、F<sub>2</sub> 世代の胚を観察したところ、二重変異体の特徴を示す個体を特定することはできず、正常型:*shl2-6:sho2* が 47 : 29 : 14 の割合で分離した。つまり、*shl2* 変異体の表現型は *sho2* 変異体の表現型の上位であった。このことから、*SHL2* 遺伝子は *SHO2* 遺伝子の上流で SAM の発生に関わっていることが明らかになった。

同様に、*shl1-3 sho2* 二重変異体を作成したところ、F<sub>2</sub> 世代の胚の形態からは、*shl1-3* 変異体と *sho2* 変異体を区別することができなかったが、発芽植物体の形態から、*shl1* 変異体の表現型が *sho2* 変異体の表現型の上位であることがわかった。したがって、*SHL1* 遺伝子も *SHO2* 遺伝子の上流で機能しているということになる。

*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体と *sho* 変異体には違いもあった。第一に、*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体が生殖生長が始まる以前に枯死するのに対し、*sho* 変異体は生殖生長までおこなうことであった。第二に、*sho* 変異体の胚発生過程での *OSHI* の発現領域は、*shl2* 変異体よりは広く、野生型よりは狭かった。第三に、*sho* 変異体の葉には組織学的な異常が見られなかった。これらの相違点は、*shl2* 変異体および *shl1* 変異体の表現型が、*sho* 変異体のものよりも、多くの点でより強いことを示している。したがって、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、*SHO* 遺伝子の上流で、シュートの発生の基本的なプロセスに関わっていると考えられる。

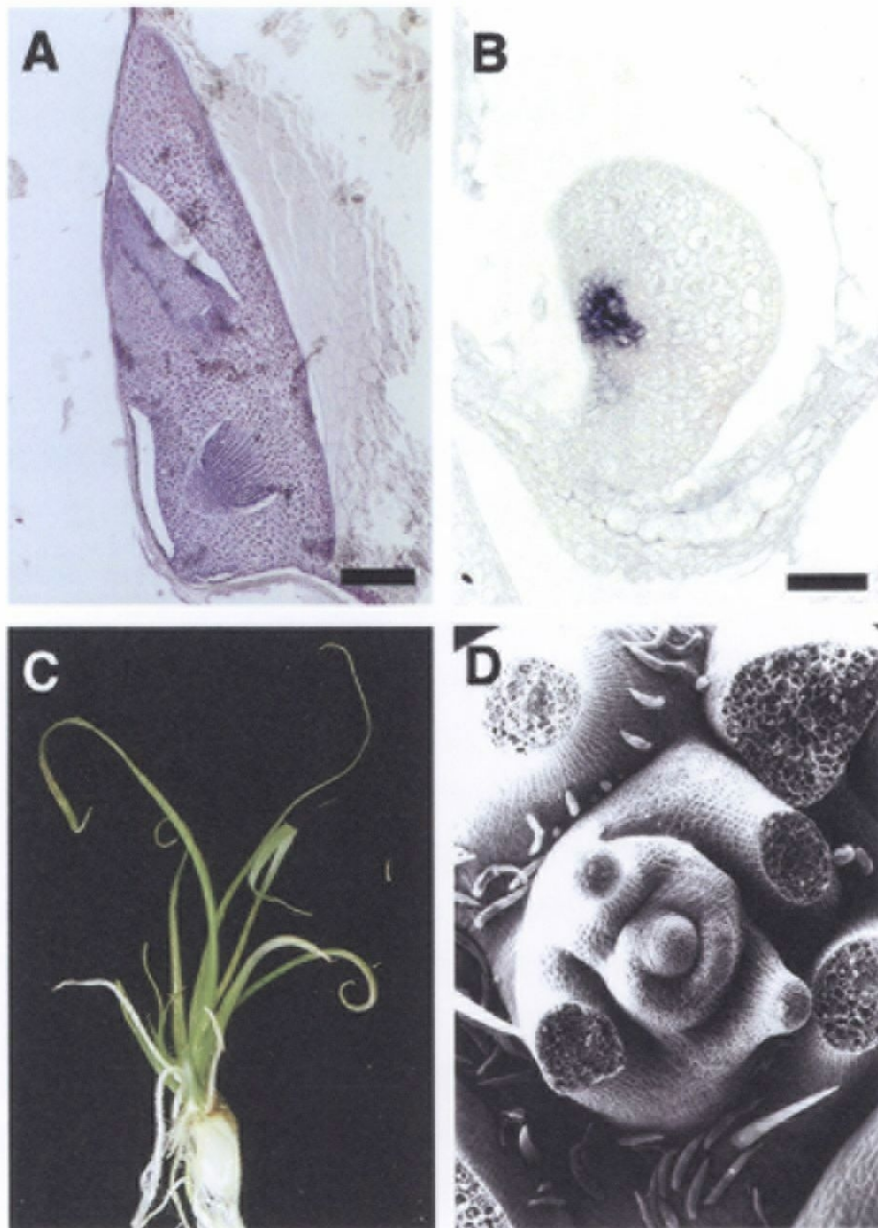


図2-12 *sho2* 変異体の表現型。

A : 完成胚。B : 受粉後 4 日目の胚での *OSHI* 遺伝子の発現パターン。C : 播種後 2 週間目の植物体。D : 播種後 2 週間目の茎頂。不規則な葉序を示している。

A : Bar=200  $\mu$ m。 B : Bar=50  $\mu$ m。



## 考察

本章の解析から、*shl2* および *shl1* の弱い変異体では、SAM の分化と維持の両方に異常が見られることがわかった。さらに、葉原基の分化パターンや葉の形態にも同様に異常が見られた。したがって、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、SAM の分化および維持に不可欠であるだけでなく、葉の分化や形態形成にも関与しており、シュートの形づくりに関し重要な機能を果たしていることが明らかになった。

### 1、シュートの発生における *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子の機能

*shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体で SAM が葉原基に転換するとき形成されるトライコームはさまざまな位置にあり、SAM の L1 層全体が一度に、あるいは不特定の部域から葉のアイデンティティーを持ったように思われた。このような SAM が消失するプロセスから、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、SAM の CZ-PZ 間の細胞分配を制御しているというよりは、CZ の indeterminate な細胞のアイデンティティーを維持する過程で機能していると考えられた。

*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子と同様に、SAM の分化と維持の両方に関わっている遺伝子として、シロイヌナズナの *STM* 遺伝子が知られている (Barton and Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996)。*STM* 遺伝子は、*kn1* タイプのホメオボックス遺伝子であり、イネの *OSHI* の ortholog である (Long et al., 1996)。また、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、マッピングの結果から、*OSHI* とは異なる遺伝子であることが確認されている (北野 and 松岡, 私信)。したがって、*STM* 遺伝子は、*SHL2* 様の遺伝子の下流で働いていると考えるのが妥当なのではないかと思われた。シロイヌナズナで SAM と側生器官の境界を決定し、*STM* 遺伝子の発現を誘導することで SAM の分化に関わっているとされる遺伝子は、*CUC1* 遺伝子および *CUC2* 遺伝子である (Aida et al., 1997; Aida et al., 1999; Ishida et al., 2000; Takada et al., 2001)。*SHL2* 遺伝子が SAM と側生器官の境界を決定している可能性はあるが、*CUC* 遺伝子は、SAM の維持という面では critical な機能は果たしていないと考えられている。また、マッピングの結果、これまでイネにおいて単離されてきた *OsNAC* 遺伝子と *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は一致していなかった (菊池, 2000)。シロイヌナズナでは、*WUS* 遺伝子も *CLV* 遺伝子とともに stem cell の保持を通して SAM の維持に関わっていることがわかっている

(Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。 *wus* 変異体は、 *shl2* 変異体および *shl1* 変異体と同様 SAM を維持できない変異体であるが、その “stop-and-go mode” と呼ばれる生長様式や生長が止まったときの SAM の状態 (Laux et al., 1996) から、 *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、 SAM の維持に、 *WUS* 遺伝子とは異なる関わり方をしていただろうと思われる。したがって、 *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、これまでシロイヌナズナで解析された SAM に関わる遺伝子とは異なる機能を持つ遺伝子である可能性が高い。

単子葉植物の SAM の発生における遺伝学的解析は遅れている。イネ以外の単子葉植物で、 SAM に関わる遺伝子として解析されたのは、トウモロコシの *kn1* 遺伝子であるが、 *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子はそれとは SAM における機能が異なる遺伝子であると考えられる。それは、先ほど、 *STM* 遺伝子の部分で述べたように、 *SHL* 遺伝子の下流で機能していると思われる *OSHI* が *kn1* 遺伝子の ortholog であるからである。したがって、本研究は、単子葉植物における SAM をめぐる遺伝子ネットワークの解明を新たな段階へ進めたと思われる。

興味深いことに、 *shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体では、葉序や葉間期にも異常が見られる。本章緒言でも述べたように、イネの *sho* 変異体、トウモロコシの *abphyll* 変異体およびシロイヌナズナの *clv* 変異体の解析から、葉序や葉間期は、 SAM の形や大きさに影響されることがわかっている (Clark et al., 1993; 1995; Jackson and Hake, 1999; Itoh et al., 2000)。 *shl2-8* 変異体および *shl1-3* 変異体の SAM も扁平な形態をとり、また、分子マーカーの発現パターンから推測されたように、 indeterminate な細胞の確保や細胞分裂の空間的配置に異常が見られた。 *SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子は、 SAM のオーガニゼーションを正常に行うことによって、葉序や葉間期の制御にもたずさわっているのである。

## 2、 SAM 分化および維持についての新しい見解

第一章緒言で述べたように、これまでに、 SAM の分化過程に異常が見られる変異体はいくつか同定されてきたが、 SAM のアイデンティティーがどのように確立されていくかということについては、いまだ明らかになっていない。 *shl2* 変異体の解析により、 SAM の分化について、新しい知見を導くことができた。

本研究では、胚発生中の胚での *OSHI* の発現領域の広さ、 SAM 分化の頻度および SAM が維持される期間の間には、正の相関があることが明らかになった。すなわち、 SAM の分化や維持の程度が、 SAM に確保されている indeterminate な

細胞の数によっているのである。これは、SAM の分化が“全か無か”のプロセスで制御されているわけではないことを示している。SAM は、どれくらいの数の indeterminate な細胞がそこに確保されているかによって、さまざまな程度に構築される。SAM の分化予定領域 (indeterminate な細胞の数) が非常に狭い場合は、*shl2* の強い変異体で見られたように SAM が形成されず、分化予定領域がある程度確保されている場合は、*shl2* の弱い変異体で見られたように不完全ながらも SAM が形成される。さらに、不完全さの程度により、SAM が維持されている期間が異なってくるのである。SAM の分化についてのこのような見解は、他の植物ではいまだ報告されていない。

### 3、*shl2* 変異体および *shl1* 変異体と *sho* 変異体の比較から

*shl2* 変異体および *shl1* 変異体は、*sho* 変異体の表現型をより強くしたものであるととらえることができた。前項で述べた、SAM の分化における“漸進的”プロセスは、両変異体の比較の際にも当てはまる。すなわち、胚発生中の *OSHI* の発現がより広い、つまり、シュート分化予定領域がより広く確保されている *sho* 変異体では、SAM が確実に分化し、生殖生長まで生長が見られた。SAM の分化に関しては、*shl2* 変異体および *sho* 変異体の表現型の強さと *OSHI* の発現領域の広さ (シュート分化予定領域の広さ) が、非常にきれいに対応づけられる。これは、*SHL* 遺伝子および *SHO* 遺伝子が働く遺伝的カスケードが、SAM の分化において中心的なものであることを示唆している。

発芽後、*shl2* 変異体および *shl1* 変異体においても、*sho* 変異体においても、*OSHI* の発現領域は狭くなっており、SAM の形、葉序および葉間期に関する異常が見られた。また、二重変異体の解析から、発芽後も、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子と *SHO* 遺伝子は同じ遺伝的カスケードの中で機能していると考えられた。これらのことは、*SHL2* 遺伝子および *SHL1* 遺伝子や *SHO* 遺伝子が *OSHI* よりも上流で機能し、SAM のオーガニゼーションに関わっていることを示唆していた。SAM の維持に関して考えると、*SHL* 遺伝子が、*SHO* 遺伝子の上流で多面的にそれに関与している (SAM の維持につながるさまざまな現象のうち、より多くのものに関わる) のではないかと考えられた。

発芽後の *shl2* 変異体および *shl1* 変異体で見られた、葉の向軸側表皮の異常は、*sho* 変異体では見られず、*shl2* 変異体および *shl1* 変異体の形質としては注目に値した。序論でも述べたように、葉の向軸—背軸方向の極性は、SAM との位置関

係によって決まるなど、葉の形態形成と SAM が切り離せないことは、これまでの解析から明らかになっている。shl2 変異体および shl1 変異体の葉で見られた組織学的異常から、イネにおいても、SAM と葉の向軸側には密接な関係がある可能性が示唆された。

#### 4、SHL 遺伝子と胚盤

第 1 章で明らかになったように、SHL 遺伝子は、胚盤の発達に関わっている。本章では、胚発生中の *RAmy1A* の発現が野生型に比べ、shl 変異体で遅れていることも明らかになった。また、弱い shl 変異体の完成胚における胚盤は、強い変異体の胚盤ほど発達の不良が見られなかった、つまり、胚盤の発達異常は対立遺伝子間の強さに相関がある。このことは、shl 変異体における胚盤の異常が SHL 遺伝子の欠損による直接的なものである、つまり、胚盤の発達は SAM の分化領域の確保と相関があるのではないかと考えられた。

また、弱い shl 変異体の解析で興味深かったのは、sho 変異体でも見られる形質であるが、分化した本葉が胚盤のアイデンティティーを持っていたことである。shl 変異体のうちで、強い変異体 (shl2-6 および shl2-7 変異体) の多くの胚では本葉が 2 枚胚盤化され、弱い変異体 (shl2-8 変異体) では本葉の胚盤化は第 1 葉でしか見られなかった。このことは、第 1 葉 (および第 2 葉) 分化時にも、胚盤分化のプログラムが発現していることを意味している。かつ、SAM の分化領域および SAM の活性が正常に近いほど、本葉が胚盤化する枚数は少なくなる傾向がある。つまり、SHL 遺伝子は、本葉の脱胚盤化を促し、本葉を本葉たらしめていることになる。

shl 変異体および sho 変異体で本葉が胚盤化するのとはどのような機構によるのであろうか。十分な解析はおこなっていないが、一つの可能性として、胚盤のアイデンティティーを獲得するプログラムが遅延したことで、本来の胚盤の発達は遅れて、そのプログラムが働いている間に形成された本葉が胚盤化したことが考えられる。このプログラムの遅延は、SAM の分化領域の縮小あるいは SAM の活性の異常によって引き起こされるであろう。