

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

第2章緒言で述べたように、植物にとってのSAMの重要性は、シロイヌナズナでの精力的な遺伝学的解析を導いた。その結果、*STM*、*WUS*、*ZLL/PNH*、*CLV*などの遺伝子は、SAMの維持機構において中心的な役割を担っていると考えられている（総説参照: Bowman and Eshed, 2000; Clark, 1997; 2001; Doerner, 1999）。また、トウモロコシでも、SAMの葉原基分化予定領域で発現が抑制される*kn1*遺伝子が、SAMの維持に必要であるという知見が得られている（Vollbrecht et al., 2000）。イネでは、第1章および第2章で述べたように、少なくとも5つの遺伝子座に由来し、SAMの分化過程に異常の見られる*shl*変異体が存在し、これらの野生型遺伝子の中には、SAMの維持過程でも機能しているものがあることがわかっている。また、変異体の葉序や葉間期、葉の形態形成に異常の見られる、*SHO*遺伝子は、イネのSAMのオーガニゼーションと葉原基の分化パターンに不可欠な遺伝子である（Itoh et al., 2000）。

このように、SAMの維持機構に関する知見は、いくつかのモデル植物を用いてある程度得られてきている。しかし、SAMの維持機構には、さらに多くの遺伝子が関わっていると思われる。シロイヌナズナでは、Medford et al. (1992)によりさまざまなタイプのSAMの維持に異常の見られる変異体が同定されている。彼女らが報告した変異体については、その後の解析がそれほど進んでいない。したがって、それらの遺伝子が、SAMの維持過程でどのような機能を果たしているのか、さらに、これらの遺伝子が先に述べた*STM*、*WUS*、*ZLL/PNH*、*CLV*などどのような関係にあるのか、ほとんど明らかになっていない。その中で、*forever young* (*fey*) 変異体および*schizoid* (*shz*) 変異体については、Callos et al. (1994) および Parsons et al. (2000) によって、解析された。*fey* 変異体のSAMは扁平で、細胞の配列に異常があり、葉序も不規則であった。*FEY* 遺伝子は単離もされており、酸化還元酵素をコードすることがわかっている。一方、*shz* 変異体は、環境条件によって生育状態が変化し、細胞分裂や細胞の分化に異常が見られる変異体であった。葉柄からカルスが生じたり、維管束が過剰に形成されたり、

さらに、SAM での細胞分裂も異常で壊死する細胞もあった。このような、代謝系で働く可能性のある遺伝子や細胞分裂時に機能する遺伝子は、SAM の維持機構の遺伝子カスケードの中では比較的下流に位置するのではないと思われる。しかし、これは、SAM の維持機構の中で、これらの遺伝子の機能がより本質的ではないということの意味するのではない。植物は、多くの遺伝子が、さまざまなネットワークを形成しており、変異がおこったときに、表現型の変化を示す遺伝子が、植物にとって不要であるということはないのである。さらに、近年、*clv* 変異体の表現型のサプレッサーとして *POLTERGERST* 遺伝子が同定され (Pogany et al., 1998; Yu et al., 2000)、さらに多くの遺伝子が SAM の維持には関わっていると考えられる。

イネの SAM の維持に関する研究は、シロイヌナズナに比べて遅れている。これまでにイネの SAM の維持過程に関わる変異体として解析されているのは第 2 章で述べた *shl* 変異体および *sho* 変異体であり、シロイヌナズナと比べて数が少ない。生育相の転換に関わる変異体として解析された *plal* 変異体 (Itoh et al., 1998) や *moril* 変異体 (Asai et al., 2002) も、SAM の維持過程に関わる変異体ととらえることもでき、それらの変異体の解析では、シロイヌナズナでは得られなかった SAM に関する知見が得られているが、シロイヌナズナの例からも明らかのように、SAM の維持には他の多くの遺伝子が関与しているはずであり、それらの遺伝子についての解析が、SAM の発生の全体的な理解には必要であろう。

そこで、本章では、発芽後まもなく枯死する変異体を 16 系統同定、解析した。また、その中の 2 つの変異体をさらに詳細に解析した。いずれも SAM が維持されず、枯死するものであるが、*shl* 変異体とは異なる表現型を示した。

材料および方法

1、供試材料

イネ品種台中 65 号および金南風の受精卵に化学変異原 MNU (N-methyl-N-nitrosourea) を処理して得られた M₂ 集団から選抜された単因子劣性胚発生変異体のうち、胚の形態異常を示す約 120 系統を無菌的に MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上に播種し、発芽後枯死する 16 系統を同定し、材料とした。その中の興味深い 3 系統 (*odm81*、*odm129* および *odm247*) について、さらに詳細な

解析をおこなった。そのうち 2 系統 (*odm81* および *odm247*) は、対立遺伝子であることが確認された。遺伝的背景は、*odm129*、*odm148* および *odm164* が品種金南風であり、他の 13 系統は品種台中 65 号であった。植物体の生育環境については、第 2 章と同様にした。

2、樹脂切片の作成

第 1 章と同様に行った。

3、パラフィン切片の作成

第 2 章と同様に行った。

4、*in situ* ハイブリダイゼーション

第 1 章と同様に行った。

5、カルス誘導と再分化

第 1 章と同様に行った。

結果および考察

1、発芽後枯死する変異体の同定

MNU 処理した M₂ 集団をスクリーニングした結果、発芽後まもなく枯死する単因子劣性の 16 変異体を同定した (図 3-1)。

同定した変異体は、枯死時の SAM の形態で分類すると 4 つに分けられた。まず、SAM の形態はほぼ正常な 8 系統であるが、これらは、根の伸長とシュートの形態によってさらに 3 つのタイプに分けられた。根の伸長および地上部の形態がほぼ正常な変異体には、*odm271* 変異体と *odm298* 変異体があった (図 3-2)。この 2 系統は、それぞれ播種後 2 週間および 5 週間で葉が黄化し、枯死した。SAM の形は正常であり、層構造も正常であった (図 3-2 E、F)。したがって、この 2 系統の野生型遺伝子は、発芽後初期の植物体の正常な形態形成には必要ないが、その後ある時期からの SAM の維持に不可欠であると考えられた。

枯死時の SAM の形態および根の伸長は比較的正常であるが、シュートが叢生

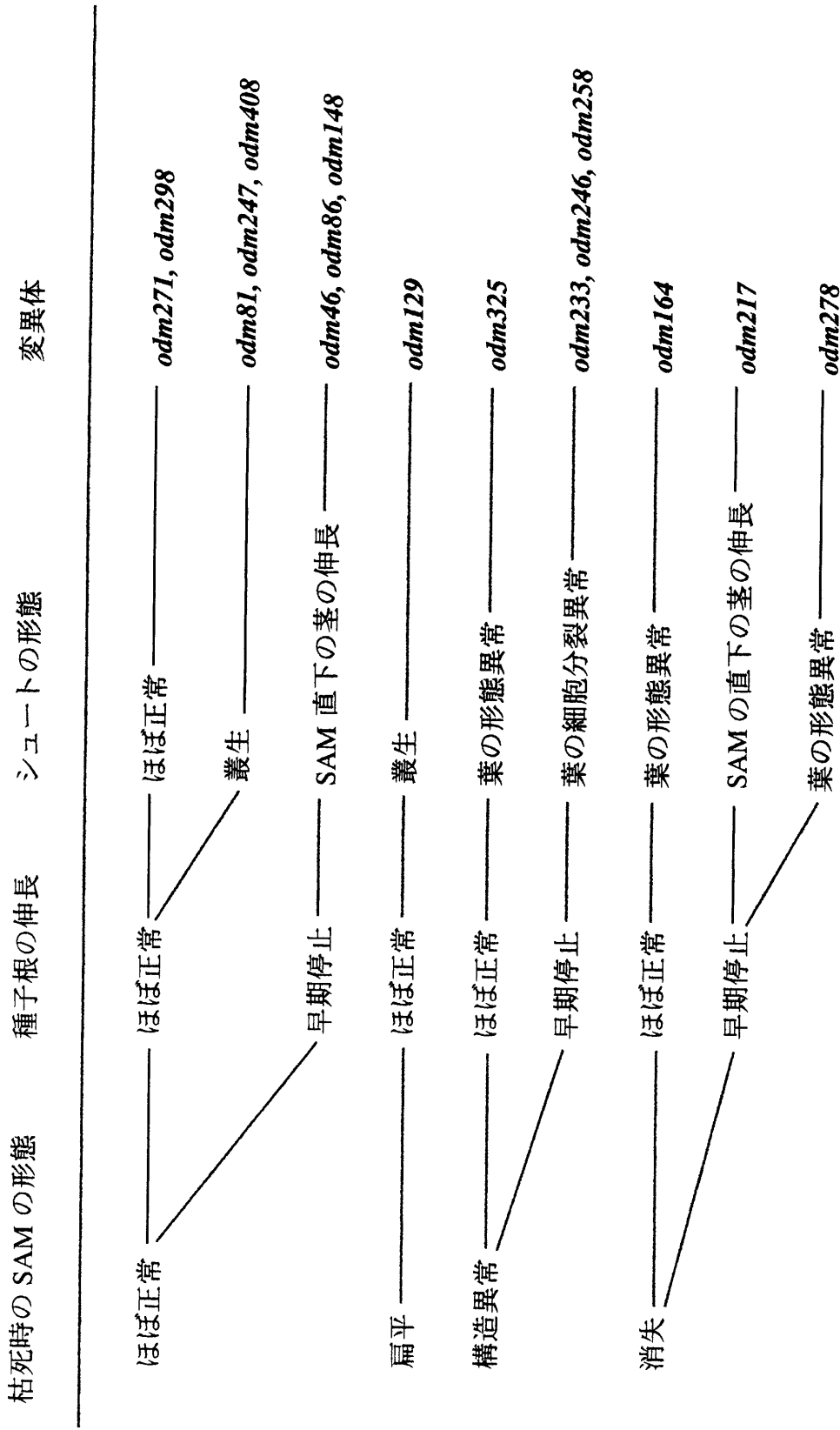


図 3-1 発芽後枯死する変異体の分類。

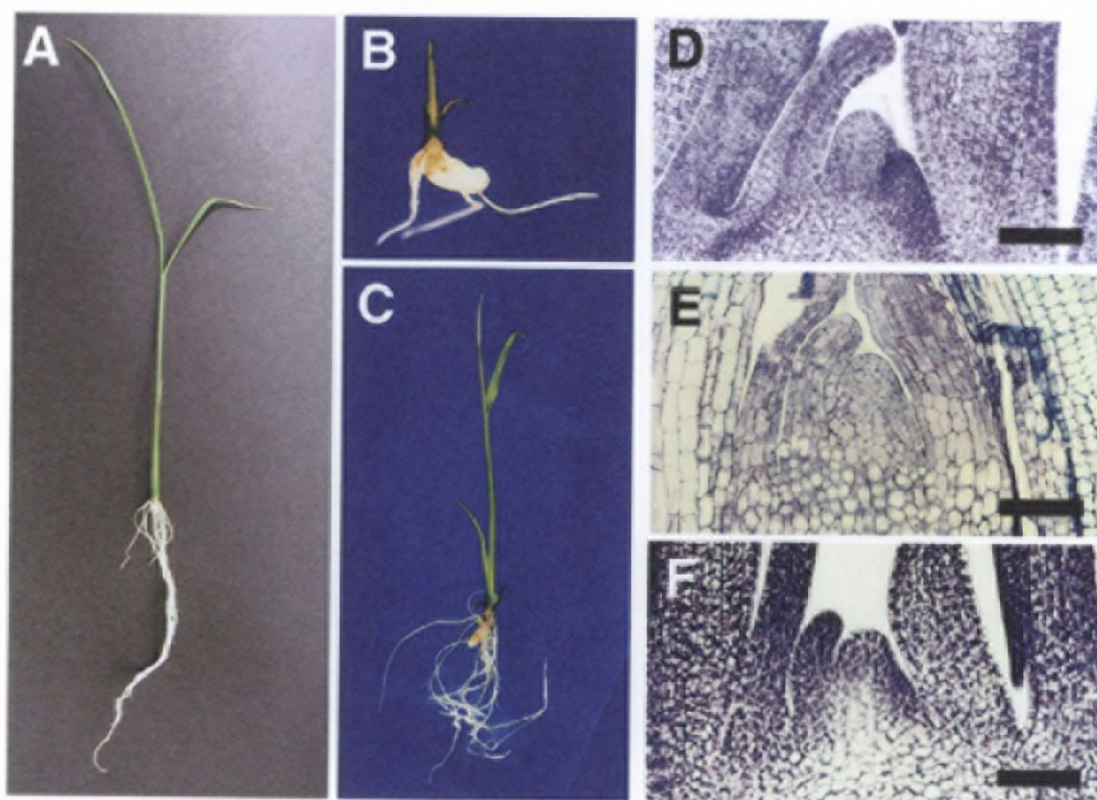


図3-2 野生型、*odm271* および *odm298* 変異体の植物体およびSAMの形態。
 A、D：野生型。B、E：*odm271* 変異体。C、F：*odm298* 変異体。A：播種後10日目の植物体。B：播種後1週間の植物体。C：播種後10日目の植物体。D：播種後10日目のSAM。E：播種後10日目のSAM。F：播種後2週間のSAM。シュートの形態およびSAMの形態ともにほぼ正常である。Bars=50 μ m。

になるものとしては、*odm81*、*odm247* および *odm408* 変異体があった (図 3-3)。この 3 系統は約 5 週間で枯死し始め、播種後約 10 週間で完全に枯死した。なお、*odm81* 変異体と *odm247* 変異体は対立関係にあることがわかった。このうち、*odm247* 変異体についてさらに詳細に解析した (後述)。

枯死時の SAM の形態はほぼ正常であるが、幼根が早期に伸長を停止し、播種後 1 週間から 10 日で枯死するものには、*odm46*、*odm86* および *odm148* 変異体が含まれる (図 3-4)。この 3 系統では、SAM 自体はなめらかなドーム状の外形と層構造を持っていたが、枯死時には、SAM の直下の茎が伸長し、葉原基が形成されないか、異常な位置から分化していた (図 3-4 D-G)。なお、*odm148* 変異体では、胚軸の伸長も見られた (図 3-4 C)。これらのことから、この 3 系統の野生型遺伝子は、発芽後の SAM だけでなく、幼根の root apical meristem (RAM) の発生にも関与していることが明らかになった。さらに、SAM の直下の茎の伸長抑制という発生プロセスでも機能していることが明らかになった。

次に、SAM の形態が扁平な変異体 *odm129* 変異体は、本研究で得られた変異体の中ではユニークであった (図 3-5)。図 3-1 では、シュートの形態を叢生としたが、これは、この系統の中で最も長く (播種後 20 日程度) 生育を続けた個体に関してのことであり、多くの個体は胚発生以後新たに葉を分化することなく、播種後 1 週間以内に枯死した。この変異体についてはさらに詳細に解析した (後述)。

odm325 変異体は、枯死時に SAM の層構造異常を示すとともに、葉の形態異常を示した (図 3-5 C-F)。播種後 2 週間程度は生育し続ける個体が多かったが、シュートの形態は、個体差が大きかった。長く生育し続けた場合は、地上部の形態は比較的正常なものもあったが、葉序の異常、葉身の歪曲、葉身の短縮を示す個体も多かった。このことは、*odm325* 変異体の野生型遺伝子は、SAM の構造維持および葉の形態形成に広範囲に関わっていることを示している。

枯死時の SAM の層構造が異常であり、胚発生以後に葉原基を分化することなく、播種後非常に早い時期に枯死した系統には、*odm233*、*odm246* および *odm258* 変異体があった (図 3-6)。これらの系統では、枯死時の SAM の形がドーム状だけでなく、三角形にちかいものから釣り鐘型ものまで、個体間変異が大きかった。*odm233* および *odm258* 変異体の完成胚の SAM には L1 層が存在したが、枯死時には、L1 層で並層分裂が見られるなど、層構造が崩壊していた (図 3-6 D、F)。*odm246* 変異体は、完成胚の時点で、すでに SAM 内の細胞の配列が異常になっており、枯死時にも層構造は見られなかった (図 3-6 E)。これらの系統の SAM で

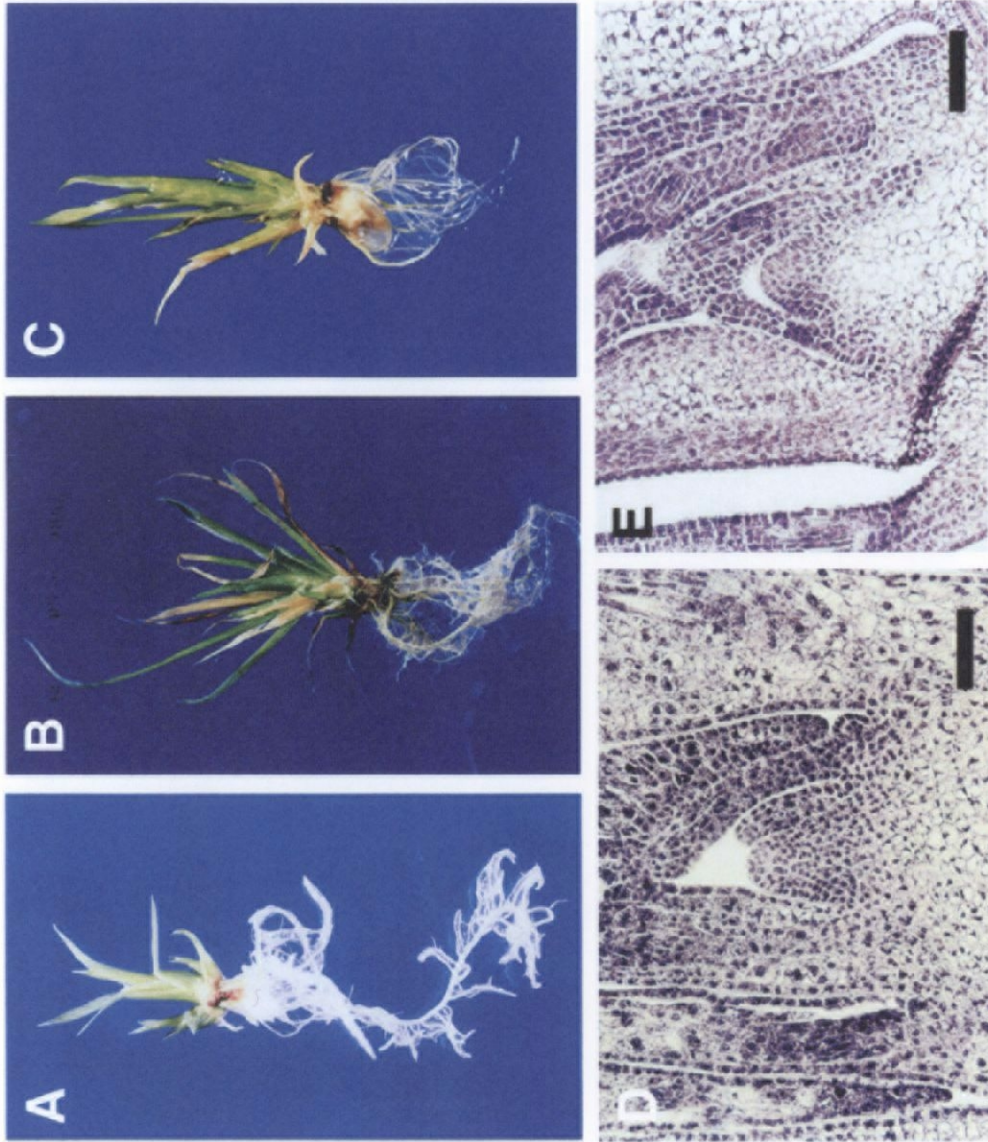


図 3-3 *odm81*、*odm247* および *odm408* 変異体の植物体および SAM の形態。
 A : 播種後 3 週間の *odm81* 変異体の植物体。B、D : *odm247* 変異体。B : 播種後 3 週間の植物体。D : 播種後 3 週間の SAM。C、E : *odm408* 変異体。C : 播種後 3 週間の植物体。E : 播種後 2 週間の SAM。SAM の形態はほぼ正常であるが、シュートは叢生である。Bars = 50 μ m。

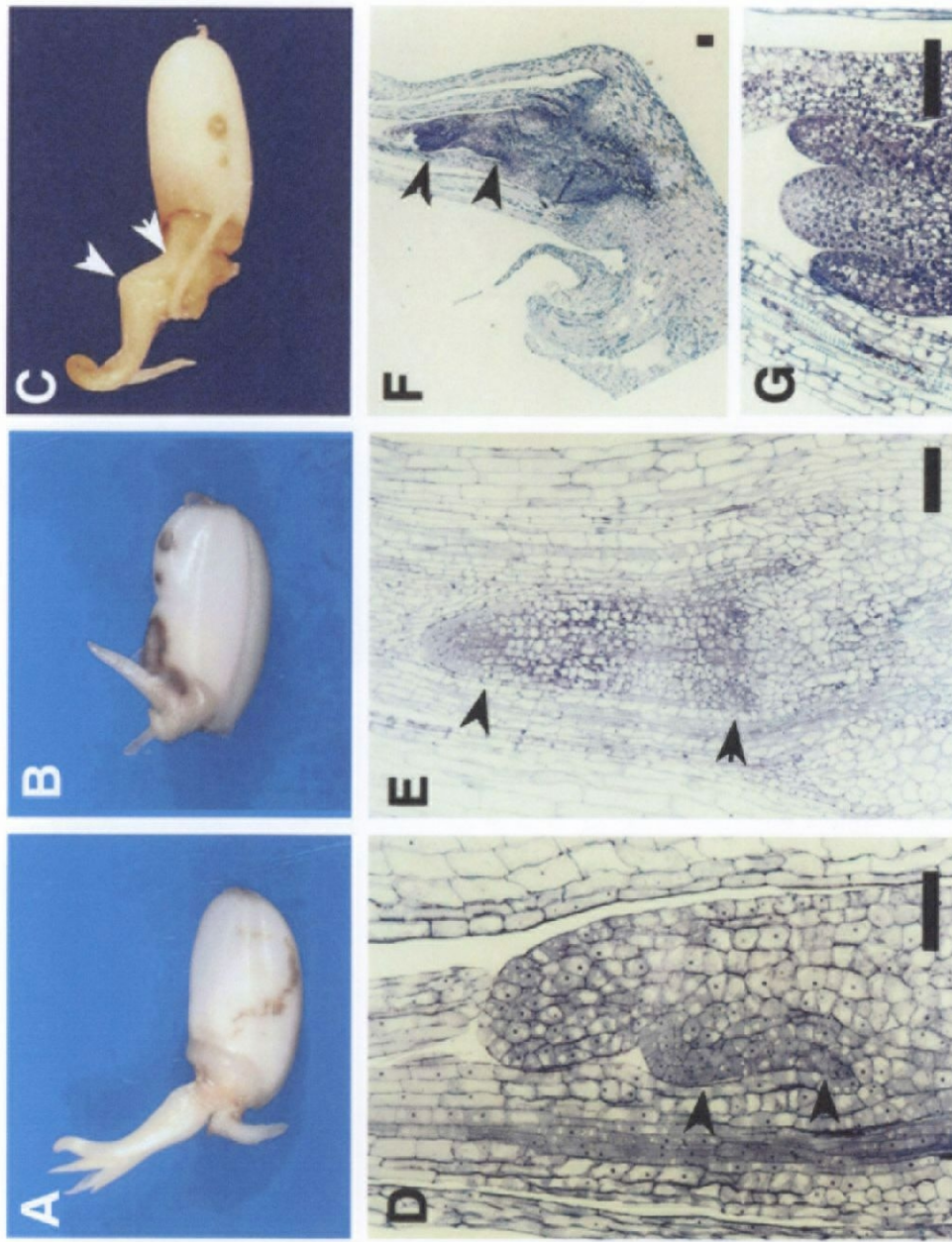


図3-4 *odm46*、*odm86*および*odm148*変異体の植物体およびSAMの形態。
 A、D : *odm46*変異体。B、E : *odm86*変異体。C、F、G : *odm148*変異体。A、B : 播種後9日目の植物体。
 C : 播種後10日目の植物体。D、E、G : 播種後1週間のSAM。F : 播種後1週間シュート切片 (GはFの拡大)。
 SAM自体の形態はほぼ正常であるが、その直下の茎 (黒矢頭) の伸長が見られる。根の伸長は早期に停止する。
*odm148*変異体では、胚軸 (白矢頭) の伸長も見られる。Bars= 50 μ m。

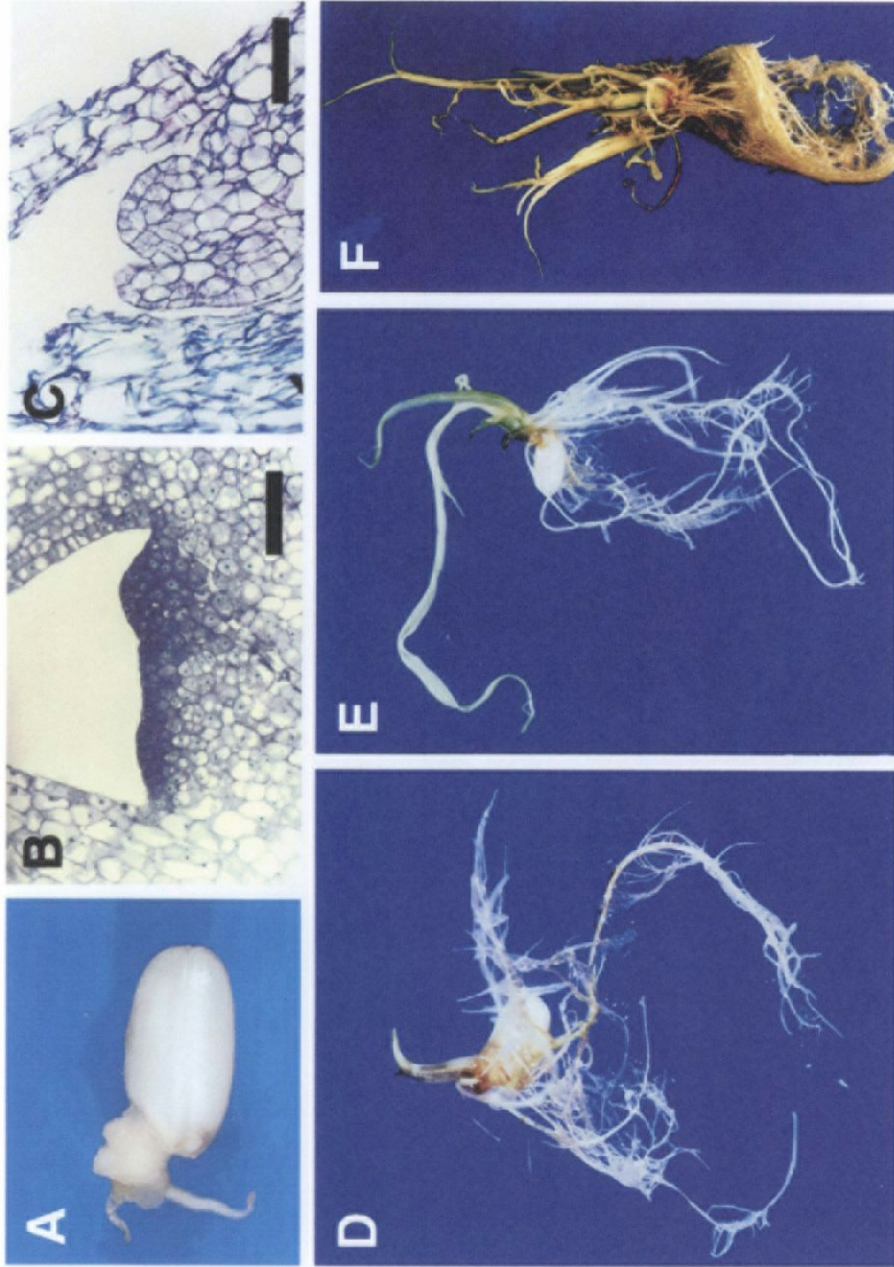


図 3-5 odm129 および odm325 変異体の植物体および SAM の形態。
 A、B : odm129 変異体。C-F : odm325 変異体。A : 播種後 5 日目の植物体。B : 播種後 3 日目の SAM。
 C : 播種後 10 日目の SAM。D-F : 播種後 2 週間目の植物体。odm129 変異体の SAM は扁平である。odm325 変異体のシュートの形態には個体差がある。Bars= 50 μ m。

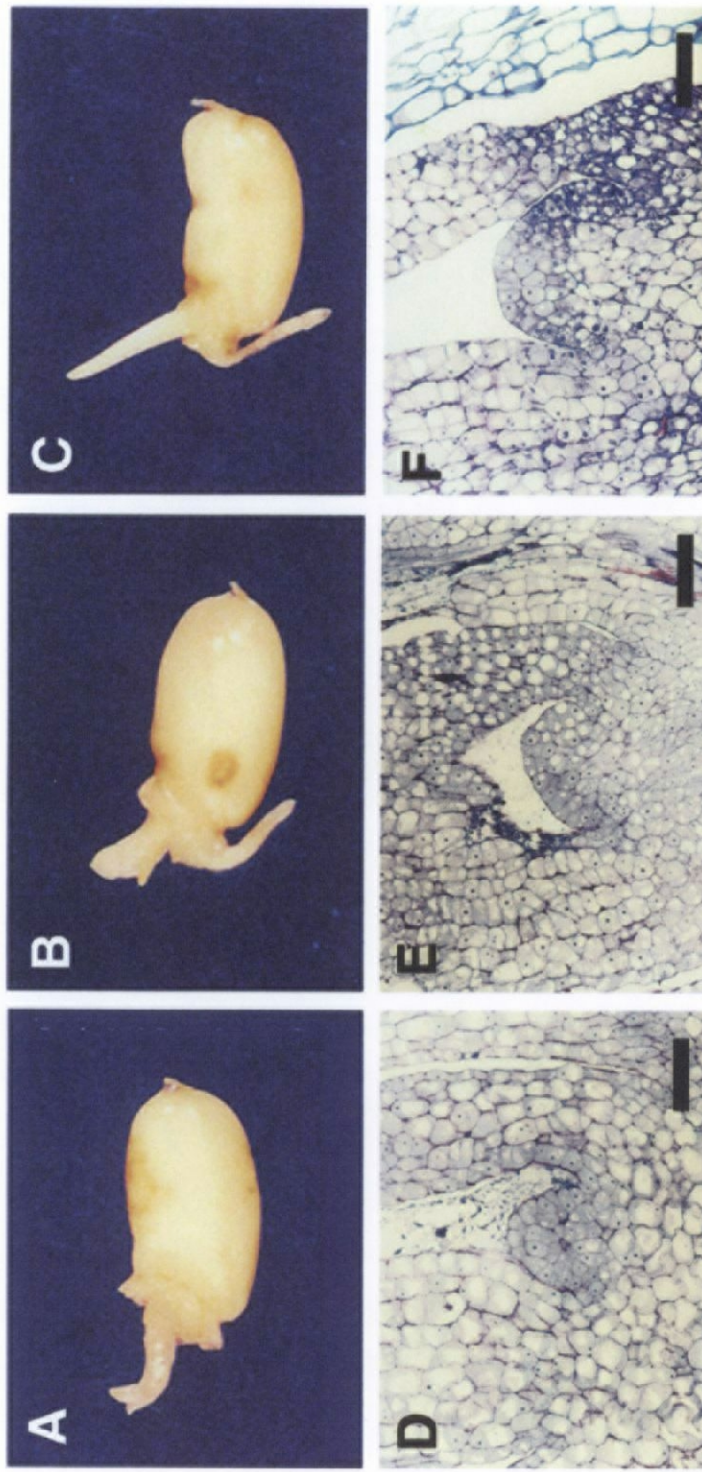


図 3-6 *odm233*、*odm246* および *odm258* 変異体の植物体および SAM の形態。
 A、D : *odm233* 変異体。B、D : *odm246* 変異体。C、F : *odm258* 変異体。A-C : 播種後 3 日目の植物体。
 D、E : 播種後 3 日目の SAM。F : 播種後 1 週間の SAM。SAM および葉で細胞分裂パターン異常が見られる。幼根の伸長は早期停止している。Bars= 50 μ m。

は、細胞分裂パターンの制御が異常になっていると考えられる。幼根の伸長も発芽後早期に停止し、葉の細胞分裂様式も異常であった。この3系統の野生型遺伝子は、発生の早い時期から、植物体全体の細胞分裂パターンの制御に必要なのではないかと考えられた。

枯死時に SAM が消失する系統は、*odm164*、*odm217* および *odm278* 変異体であり、播種後1週間から10日で枯死した(図3-7)。*odm164* 変異体には、発芽しないものもあった。これは、*odm164* 変異体では、胚発生過程に SAM が消失する個体が約半数あったためであり、*odm164* の野生型遺伝子は、イネの栄養生長初期の SAM の維持に不可欠な遺伝子であると考えられた。発芽個体の葉は細くて小さかったが、葉序は互生であった(図3-7 A)。葉の横断面を観察すると、維管束は分化しており、背腹性も見られたが、細胞の配列などに異常が見られた。*odm164* 変異体は、発芽後3、4枚出葉し、枯死した。枯死時には SAM の位置に葉が生じており(図3-7 D)、その半数は、糸状であった。この糸状の葉は、シロイヌナズナの *zll* 変異体やトウモロコシの *kn1* 劣性変異体、イネの *shl* 変異体でも見られ、SAM が維持不能になってそこから葉が生じる、あるいは、葉に転換するときの一般的な表現型であろうと考えられる(McConnel and Barton, 1995; Vollbrecht et al., 2000)。なお、*odm164* 変異体の幼根は、地上部の生長が長く続く個体では比較的正常に伸長したが、初期に枯死する個体ではほとんど伸長しなかった。以上、*odm164* 変異体の形態は、第2章で述べた *shl2* 変異体と似ていた部分もあったので、対立性検定をおこなったが、異なる遺伝子座であることがわかった。

odm217 変異体の葉の形態は比較的正常であったが、SAM の直下の茎が伸長し(図3-7 E)、さらに細胞分裂パターンが異常になって肥大した個体もあった。枯死時には SAM は消失していた。また、*odm217* 変異体の幼根は5mm程度伸長した時点で先端付近が褐変し、伸長を停止した(図3-7 B)。したがって、*odm217* の野生型遺伝子は、SAM および RAM 自身だけでなく、そこから少し離れた部分での細胞分裂パターンの制御や細胞の生存に必要であると考えられた。

odm278 変異体の葉は、*odm164* 変異体のものよりも、小さくて細く、幼根の伸長は約5mmで停止した(図3-7 C)。このことから、*odm278* の野生型遺伝子は、SAM の維持だけでなく、RAM の維持にも関与していると思われ、*odm164* 変異体および *odm217* 変異体と同様、本章で解析した変異体の中には似たものはないように見えた。

以上16系統のうち、表現型が安定しており、発芽植物体あるいは再分化植

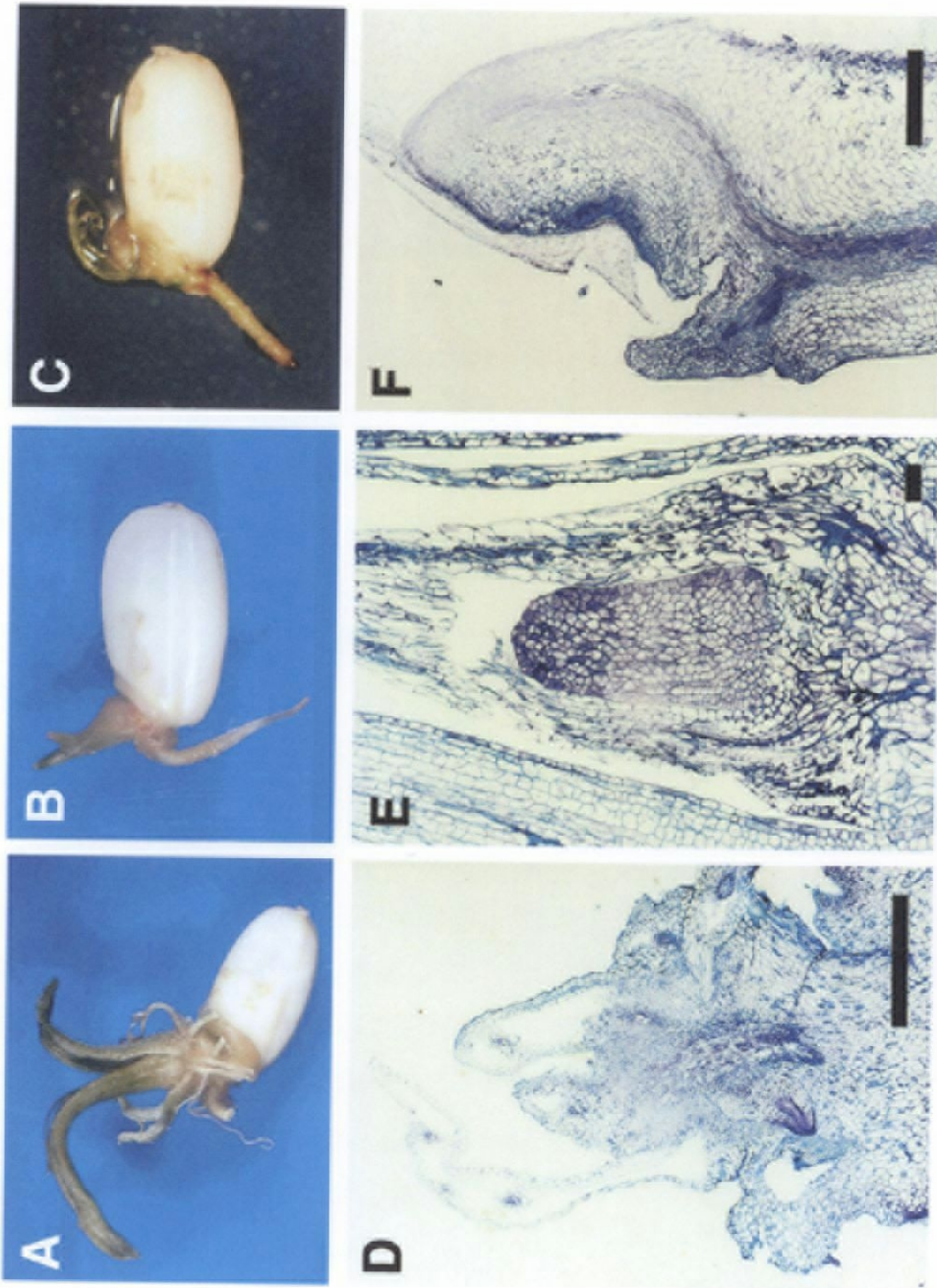


図3-7 *odm164*、*odm217*および*odm278*変異体の植物体および枯死時のSAMの形態。
 A：播種後6日目の*odm164*変異体の植物体。B：播種後5日目の*odm217*変異体の植物体。C：播種後1週間の
*odm217*変異体の植物体。D：播種後1週間の*odm164*変異体の茎頂。E：播種後10日目の*odm217*変異体の茎頂。
 F：播種後3日目の*odm278*変異体の茎頂。Bars=50 μ m。

物体が比較的長期間生き続けた *odm129* 変異体および *odm247* (*odm81*) 変異体は、主に SAM で機能し、その発生過程で興味深い機能をしているのではないかと考えられたので、さらに解析をおこなった。

2、*odm129* 変異体の解析

2-1 胚発生過程

odm129 変異体の胚では、野生型同様、受粉後 4 日目には鞘葉の突起が観察された (図 3-8 A、D)。受粉後 8~10 日目には第 1 葉、幼根も分化した (図 3-8 E)。しかし、その後新たな葉原基は分化せず、完成胚でも、胚は小さく、本葉は 1 枚のみで、幼根の発達も不十分であった (図 3-8 F)。また、SAM は非常に扁平であった。しかし、すべての個体において SAM は分化した。この形態は、野生型の受粉後 5 日目の胚に相当すると考えられた。この発生の遅れが、形態だけのものなのか、遺伝子発現にも当てはまるものなのかを明らかにするため、*OSHI* の発現を調査した。野生型では受粉後 20 日目にはエピブラストでの発現が消失するが、*odm129* 変異体の受粉後 20 日目の胚では、野生型胚の受粉後 5 日目で見られたように、SAM からエピブラスト、幼根にかけての領域で強い発現がみられた (図 3-9)。このように、少なくとも *OSHI* の発現に関しては、形態の分化に対応した遅れが見られた。

2-2 播種後の形態

odm129 変異体は低頻度で発芽し、播種後 5 日目の植物体は、小さな鞘葉と本葉を 1 枚出し、種子根が発根していた。発芽した *odm129* 変異体のほとんどの幼苗は、新たに葉を分化することなく、播種後 6 日目頃には、SAM の細胞は肥大、液胞化して、活性を失った。一方、種子根の生長は遅かったが、枯死することはなかった。また、1% に満たない頻度で、播種後 20 日以上生存し続ける叢生の個体もあった。これらの比較的長期生存する個体の葉の形態は異常で、葉序も不規則であった (図 3-10 A)。

播種後の SAM は、野生型よりも非常に扁平であり、もともとの SAM がふたつに分裂するものもあった (図 3-10 B、C)。*OSHI* は SAM のうち、通常、CZ および PZ と思われる部位で発現していたが、RZ での発現はみられなかった (図 3-10 D)。

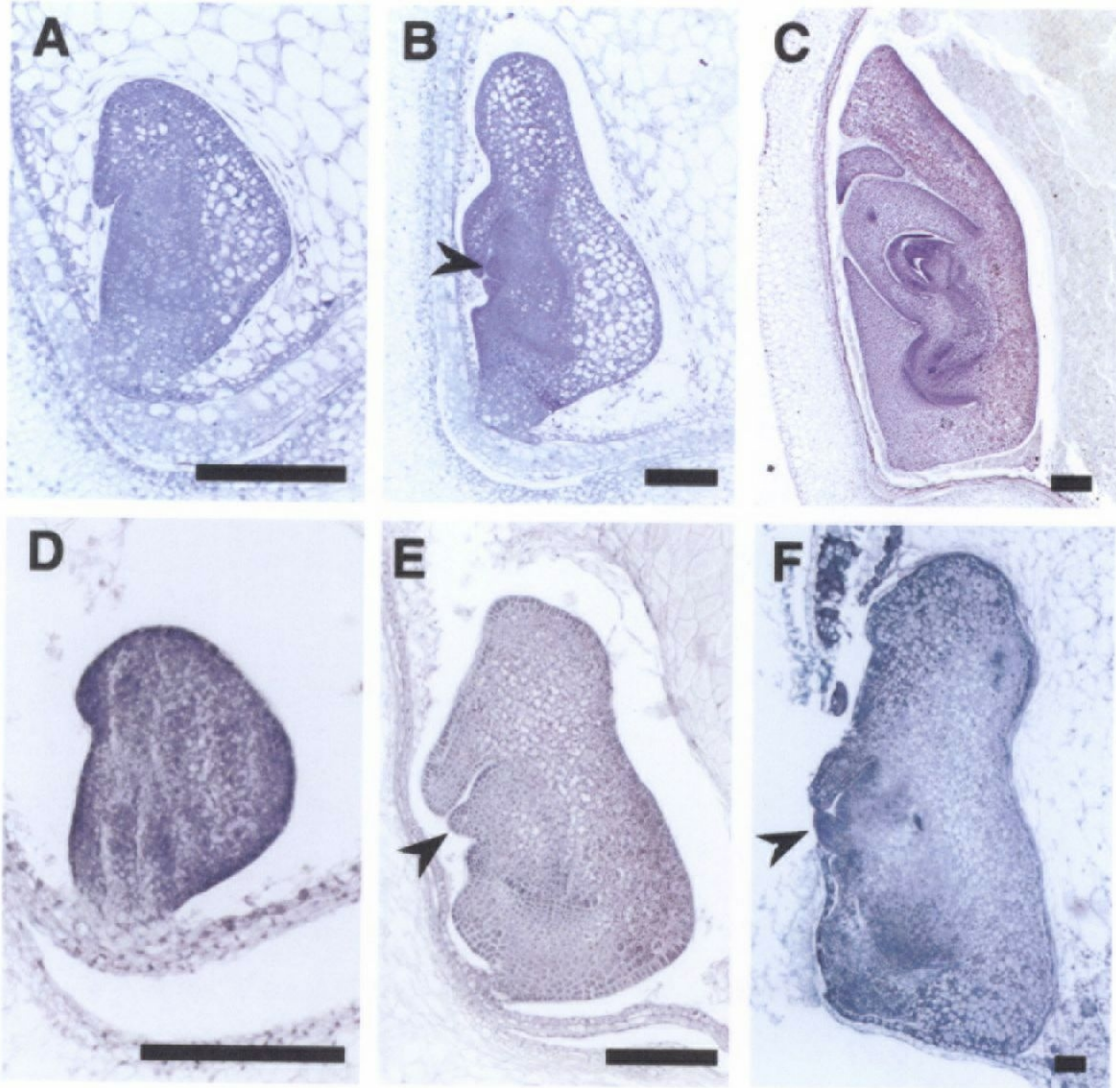


図3-8 野生型および *odm129* 変異体の胚発生過程。

A-C: 野生型。D-F: *odm129* 変異体。A、D: 受粉後4日目。B: 受粉後5日目。

C、E: 受粉後10日目。F: 完成胚。黒矢頭は、第1葉を示している。Bars=100 μ m。

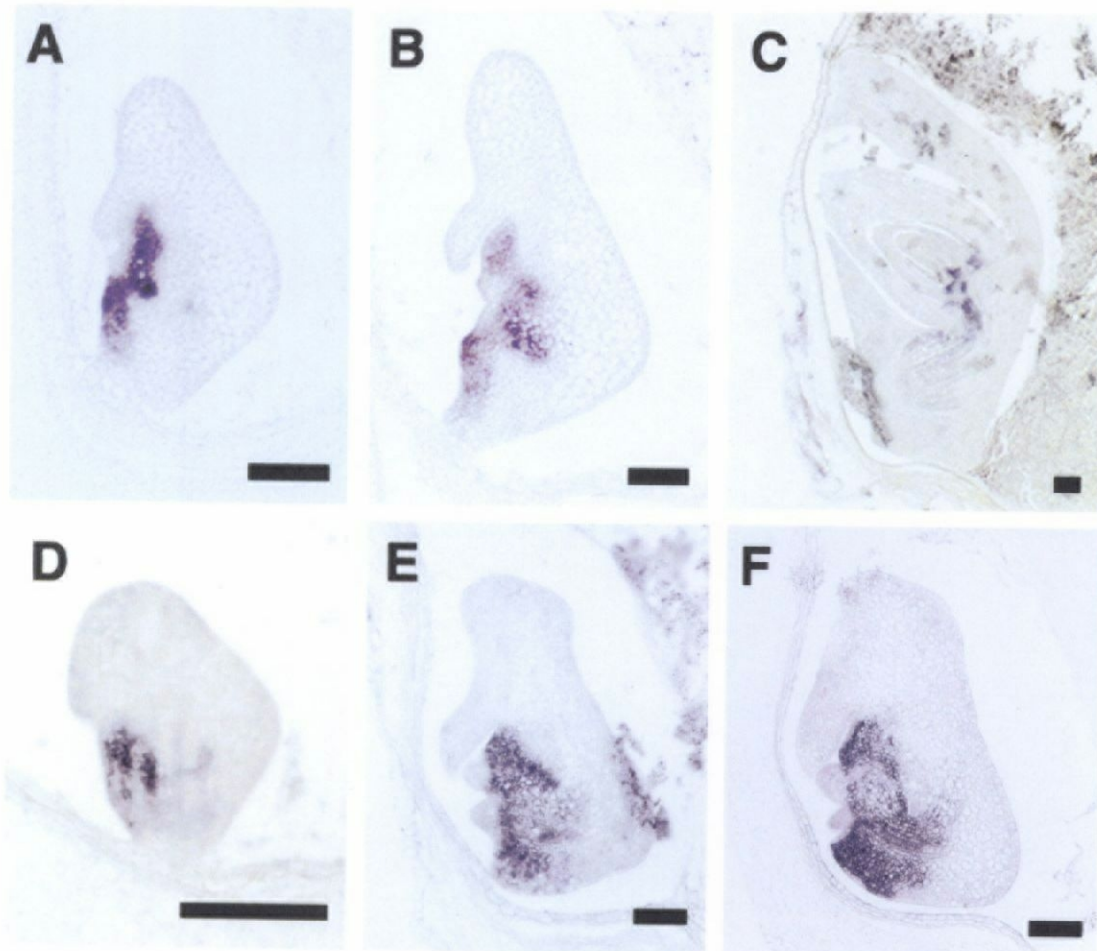


図3-9 野生型および *odm129* 変異体の胚発生過程での *OSHI* の発現パターン。
 A-C: 野生型。D-F: *odm129* 変異体。A、D: 受粉後 4 日目の胚。B: 受粉後 5 日目の胚。C: 受粉後 20 日目の胚。E: 受粉後 15 日目の胚。F: 受粉後 20 日目の胚。野生型ではエピプラストなどでの発現がなくなる受粉後 20 日目にも、*odm129* 変異体の胚では、野生型胚の受粉後 5 日目と同様、SAM からエピプラスト、幼根にかけた領域で強い発現が見られる。Bars=100 μ m。

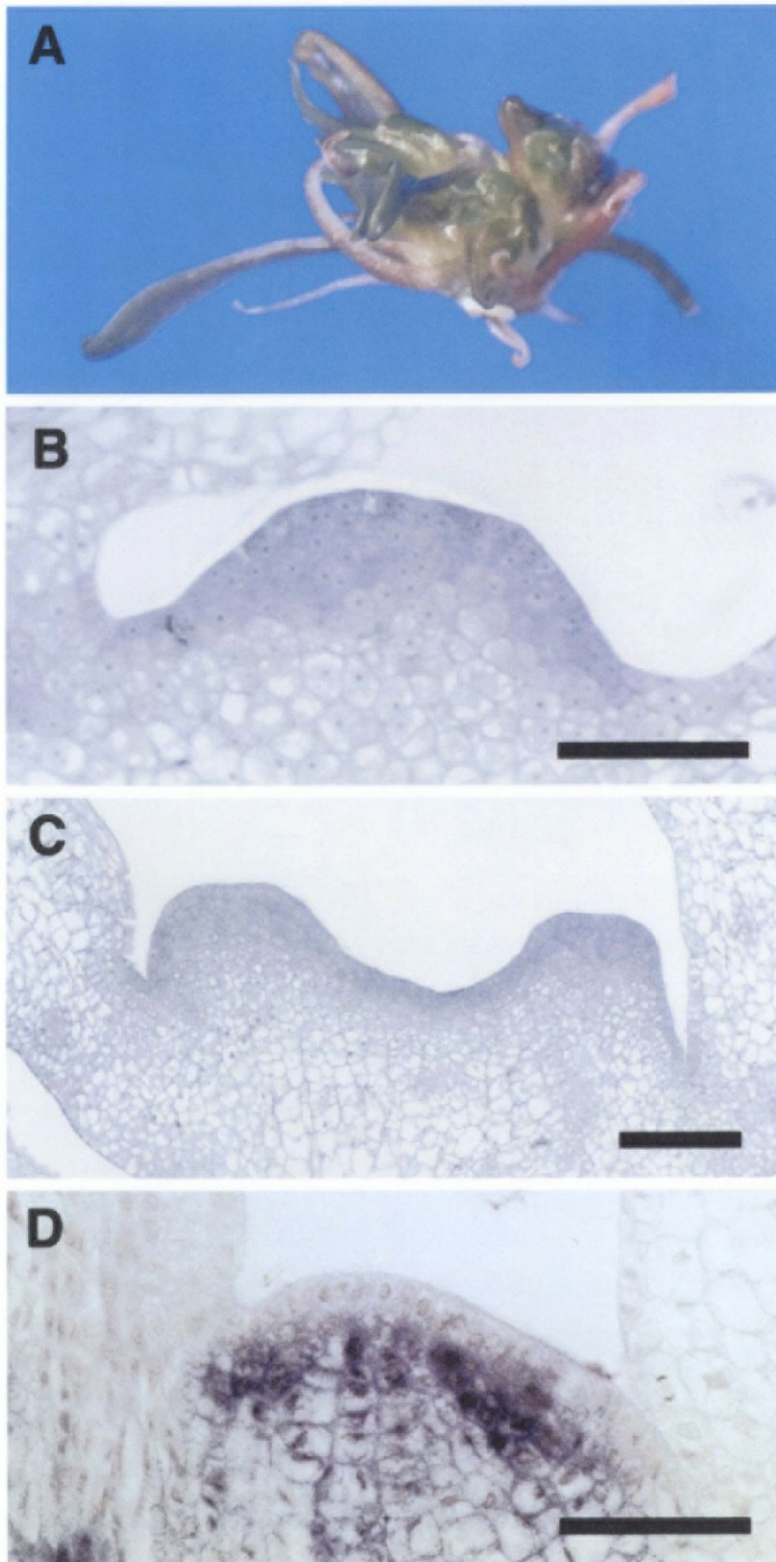


図3-10 *odm129* 変異体の播種後の植物体。

A : 播種後 20 日目の叢生の植物体。B : 播種後 4 日目の SAM。C : 播種後 10 日目の SAM。
ふたつに分裂している。D : 播種後 4 日目の SAM における *OSHI* の発現パターン。

Bars=50 μ m。