

2-3 再分化植物体

odm129 変異体の胚盤由来のカルスからの再分化を試みた。得られた再分化個体は、胚発生を経た植物体のように枯死することなく生長し続けた。再分化植物体の形態は、胚発生を経た植物体と似ており、また、再現性もあったため、得られた植物体が体細胞変異によるものではないと考えられた。

再分化植物体は、一年以上花芽を分化しなかった。また、SAM は、胚発生中および胚発生を経た植物体同様、幅が広く、扁平であった。*OSHI* の発現パターンを観察したところ、扁平な SAM の L2 層以下の広い領域で *OSHI* の発現が見られた (図 3-11 A)。また、ひとつの SAM がふたつに分裂し、*OSHI* の発現が 2 箇所に分かれて観察されるものもあった (図 3-11 B)。

葉序は、野生型では互生であるのに対し、*odm129* 変異体の再分化植物体では不規則であった (図 3-12 A)。不規則な葉序は、SAM のオーガニゼーション異常によるものであると思われる。これは、第 2 章でも述べたように、いくつかの植物で示されている (Clark et al., 1993; Jackson and Hake, 1999; Itoh et al., 2000)。

葉序の異常とともに、葉の形態にも様々な異常が見られた。まず、葉身と葉鞘の境界が水平でなく、斜めになっていたり、葉舌が欠失したりしていた葉が多く見られた (図 3-12 B)。さらに、しばしば 2 枚の葉の融合が見られた。2 枚の葉が融合している箇所には互いの表皮は見られなかった。融合には、ふたつのタイプがあるように見えた。一つは、ひとつの SAM がふたつに分裂し、その後、それぞれの SAM から葉が近くに分化し、2 枚の葉が同調して生長した結果、背軸側同士で融合したというタイプである (図 3-13 A)。もう一つは、同じ SAM から、隣に近接して分化した 2 枚の葉の葉原基が融合したものの、葉縁は別々に生長したというタイプである (図 3-13 B)。*odm129* 変異体で 2 枚の葉が融合する原因として、SAM のほぼ同じ高さのところで 2 つの葉原基が近接して分化したことが考えられる。

2-4 *odm129* 変異体と *shl* および *sho* 変異体の二重変異体

odm129 変異体と *shl2-6* 変異体の二重変異体では、SAM が形成されず、維管束の走向が個体によってばらついており、先端部胚盤の生長が不十分であった (図 3-14 B、C)。また、*odm129* 変異体と *sho1* 変異体の二重変異体でも、*shl* 変異体との二重変異体と同様、SAM の分化は抑制されており、発芽しなかった (図 3-14 E、F)。しかし、*odm129* 変異体と *sho1* 変異体の二重変異体の胚では、SAM が分

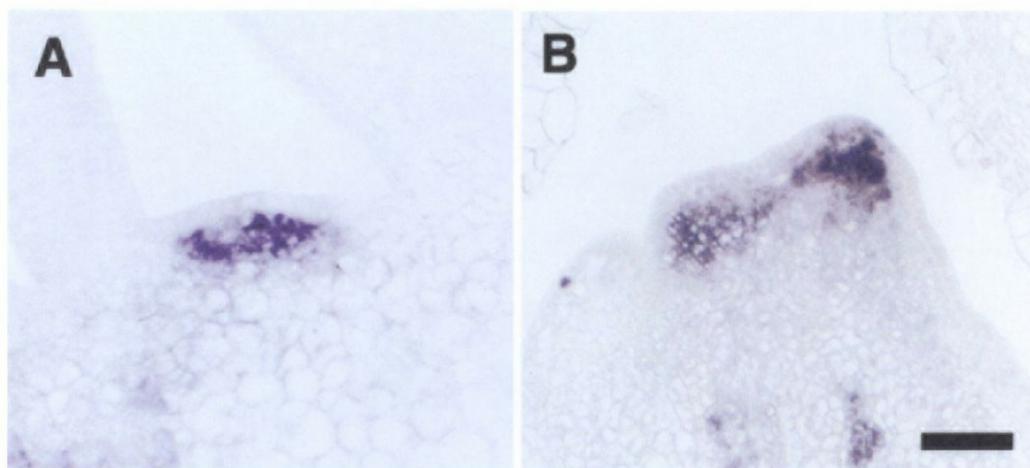


図3-11 *odm129* 変異体の再分化植物体のSAMにおける *OSH1* の発現パターン。
B : SAM がふたつに分かれている。Bar=50 μ m。

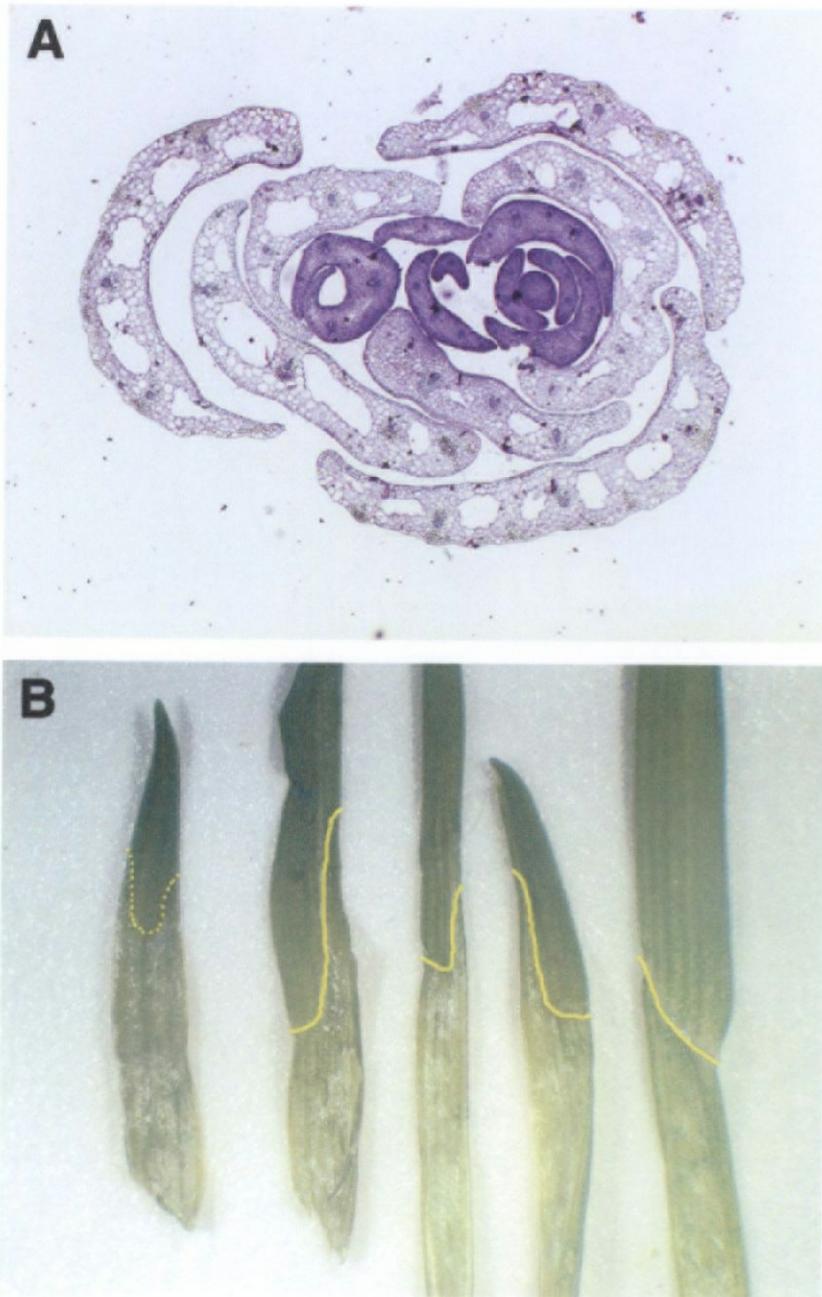


図3-12 *odm129* 変異体の再分化植物体の葉序と葉身-葉鞘の境界。
 A: 再分化植物体の横断切片。B: 再分化植物体の葉。黄色の実線は葉舌が存在する葉身-葉鞘の境界を、黄色の点線は葉舌が存在しない葉身-葉鞘の境界を示している。

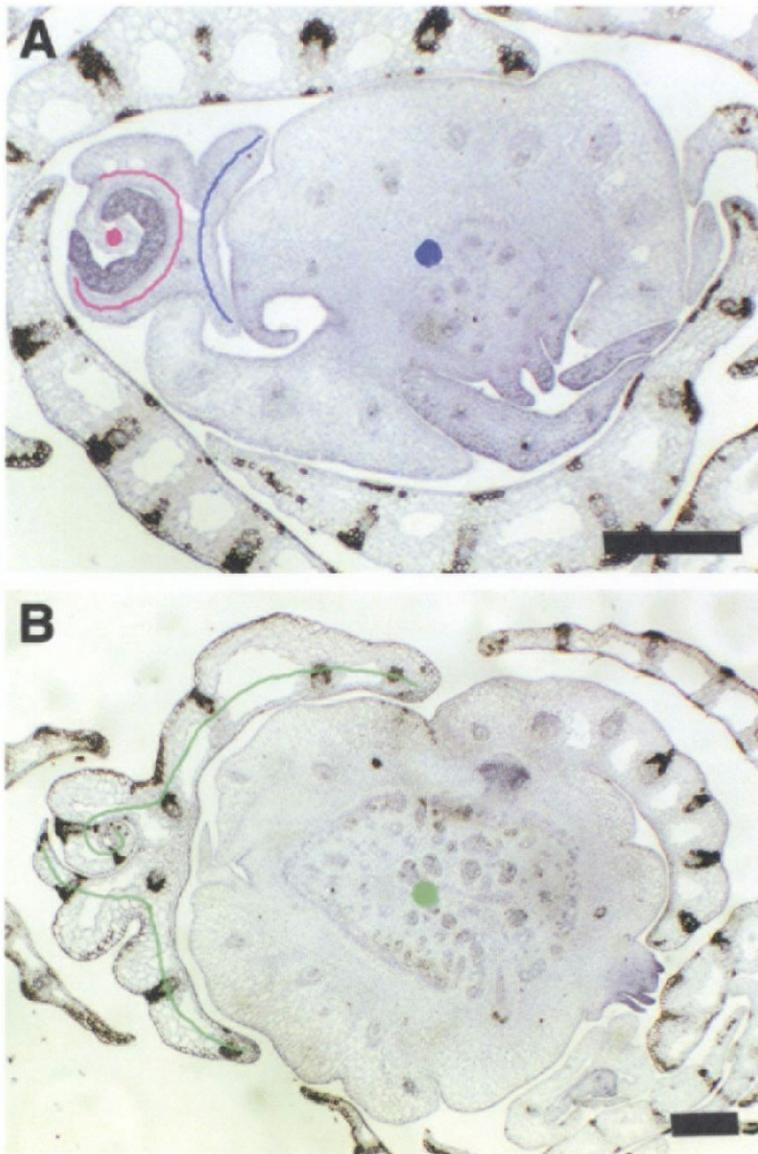


図3-13 *odm129* 変異体の再分化植物体の横断切片。

A : 背軸側同士で融合している2枚の葉。ピンクと青の実線は、融合した2枚の葉を示す。ピンクと青の丸は、それぞれの葉が分化したときのSAMの位置を表している。B : SAMの周囲に隣接して分化し、融合している2枚の葉。緑の実線は、融合した2枚の葉を示し、緑の丸は、2枚の葉が分化したときのSAMの位置を表している。

Bars=250 μ m。

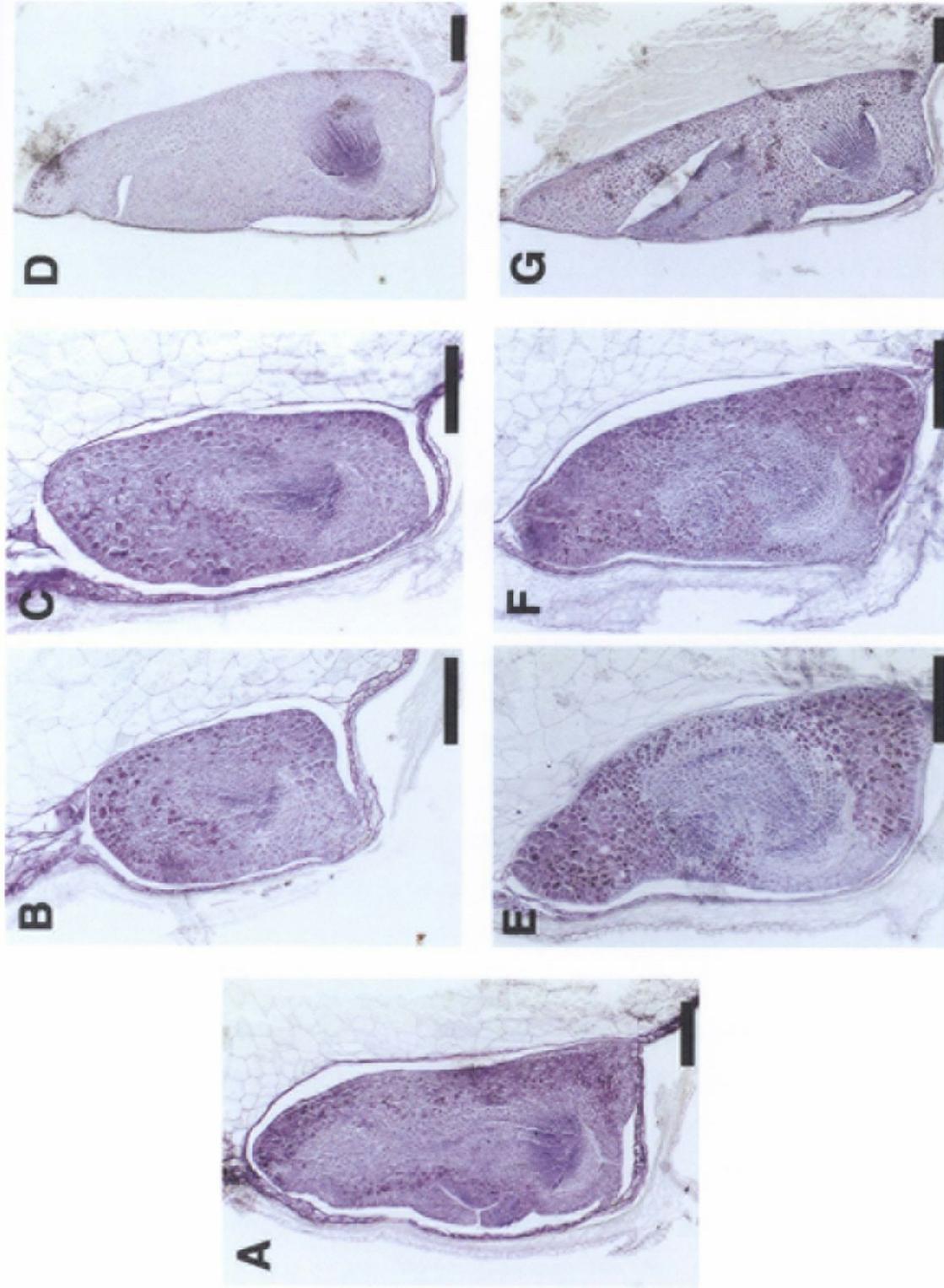


図3-14 *odm129*変異体と *sh12-6*および *sho1*変異体の二重変異体。
 A : *odm129*変異体。B、C : *odm129*変異体と *sh12-6*変異体の二重変異体。D : *sh12-6*変異体。E、F : *odm129*
 変異体と *sho1*変異体の二重変異体。G : *sho1*変異体。Bars=200 μ m。

化するであろう領域には細胞質の密な細胞群があった。また、維管束の走向が比較的一定しており、先端部胚盤の生長が比較的順調に進行していた。胚盤についての特徴はそれぞれ、*shl* 変異体および *sho* 変異体のものであり、*odm129* の野生型遺伝子が、*SHL2* 遺伝子および *SHO1* 遺伝子と共同して SAM の分化および維持に関わっていることを示している。

以上の解析から、*odm129* の野生型の遺伝子は、正常な速度での胚の全体的生長、胚発生中の SAM の分化、胚発生中および栄養生長期の SAM の正常なオーガニゼーションの維持、葉の正常な形態形成など、多面的で重要な機能を持っていることが明らかになった。

SAM における領域の分化および器官分化のプロセスには次のようなものがあると考えられている。すなわち、CZ のアイデンティティーの付与および維持、CZ から PZ への細胞供給経路、PZ のアイデンティティー付与あるいは維持、PZ から器官への細胞供給経路、器官のアイデンティティー付与あるいは維持である（総説参照: Steeves and Sussex, 1989; Lenhard and Laux, 1999）。これらは、同時に SAM 内で起こっている現象であり、いずれの過程に異常が生じても、SAM のオーガニゼーションおよび器官分化に異常が出る。

シロイヌナズナの *mgoun* (*mgo*) 変異体では、CZ から PZ への細胞供給経路、あるいは、PZ から器官分化する時点で細胞の供給状況が異常になるため、葉原基の分化速度は遅くなり、大きな SAM が生じ、その後、その SAM が分裂していくと考えられている (Laufs et al., 1998)。*odm129* 変異体の発芽植物体および再分化植物体の SAM での *OSHI* の発現から、少なくとも CZ のアイデンティティーの付与および維持はなされていると思われ、SAM が扁平で大きくなり、あるとき分裂するという表現型は、*odm129* 変異体と *mgo* 変異体で似ていた。しかし、*odm129* と *shl2-6* 変異体との二重変異体は、*shl2-6* 変異体よりも SAM の欠失の頻度が高かったので、*odm129* 変異体で積極的に CZ のアイデンティティーを持った細胞が増殖しているとも考えにくかった。また、*mgo* 変異体は発生を停止することはないし、弱い *stm* 変異体との二重変異体でも SAM は形成される。したがって、*odm129* の野生型遺伝子は、シロイヌナズナにおける *MGO* 遺伝子よりも多面的な機能を持っていると考えられた。

なお、受粉後約 20 日目の *odm129* 変異体の胚をオーキシンを添加した培地に置床したところ、カルスとシュートを生じた。このシュートがカルスから生じた

ものであるとすると、*odm129* 変異体ではサイトカイニンの添加なしで再分化が起こることになる。一方、カルスとシュートが別々に生じたものであるならば、実験に用いた培地のオーキシンの濃度は、野生型に対しては、シュートの伸長抑制から枯死という影響を及ぼすものであったので、*odm129* 変異体では、オーキシンに対する応答に異常が見られたことになる。これは、サンプル数が非常に少ない、予備的な実験であるが、いずれにしても、*odm129* の野生型の遺伝子が植物ホルモンの生合成あるいは感受性に関与している可能性が示唆された。

3、*odm247* 変異体の解析

odm81 変異体と *odm247* 変異体は、同一遺伝子座に由来する対立遺伝子であった。両者の表現型は互いに酷似していたので、ここでは、*odm247* 変異体を解析した。

3-1 完成胚の形態

完成胚で分化する本葉の枚数や全体的な胚形は正常であったが、SAM、本葉、維管束および幼根を除く部分で細胞は空胞化、肥大していた（図 3-15 A）。

3-2 播種後の形態

odm247 変異体では、播種後 5 週間ごろから主茎の SAM が枯死した。しかし、新たな分げつを形成することで 1 年以上生育するものもあった。ただし、そのような個体でも、花芽は形成しなかった。また、葉身および葉鞘の伸長が極端に抑制されており（図 3-15 B、図 3-16）、播種後 9 週間たっても、分げつが多く、葉の小さい植物体だった（図 3-15 B）。

個体別に各葉位の葉長（葉鞘+葉身）を調べたところ、いずれの個体も図 3-17 に見られるように、波形を描いていた。すなわち、第 7 あるいは 8 葉の葉長はその前後の葉より短いという興味深い結果が得られた。

出葉速度は、発生の初期においては野生型よりも速い傾向が見られた（図 3-18）。しかし、植物体の出葉数にはかなりの個体差があった。花芽を形成することなく、小さな葉を分化し続けるという面では、栄養生長初期が永続する *mor1* 変異体（Asai et al., 2002）と似ていた。そこで、*odm247* 変異体で、栄養生長初期の延長が見られるのかどうかを知るため、*odm247* 変異体の茎、葉と SAM について以下の解析を行った。

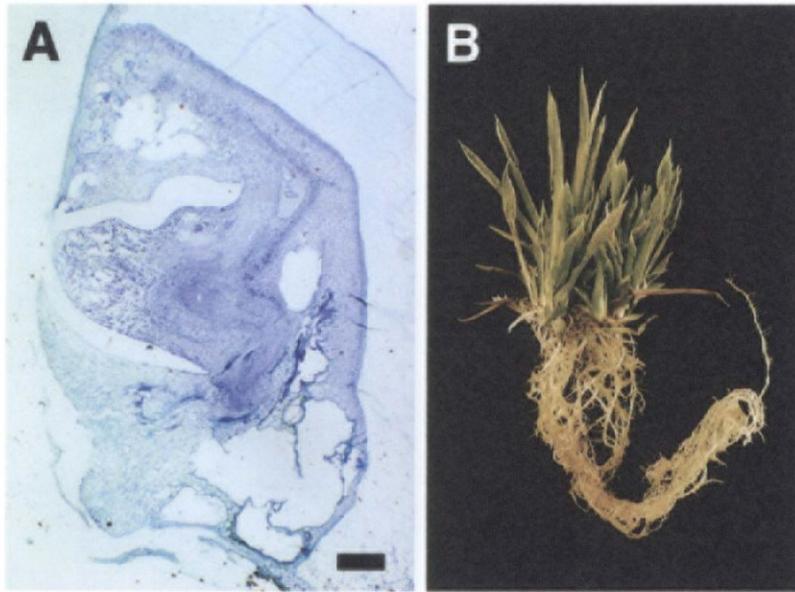


図3-15 *odm247* 変異体の形態。

A : 完成胚。 B : 播種後9週間目の植物体。 A : Bar=200 μ m。

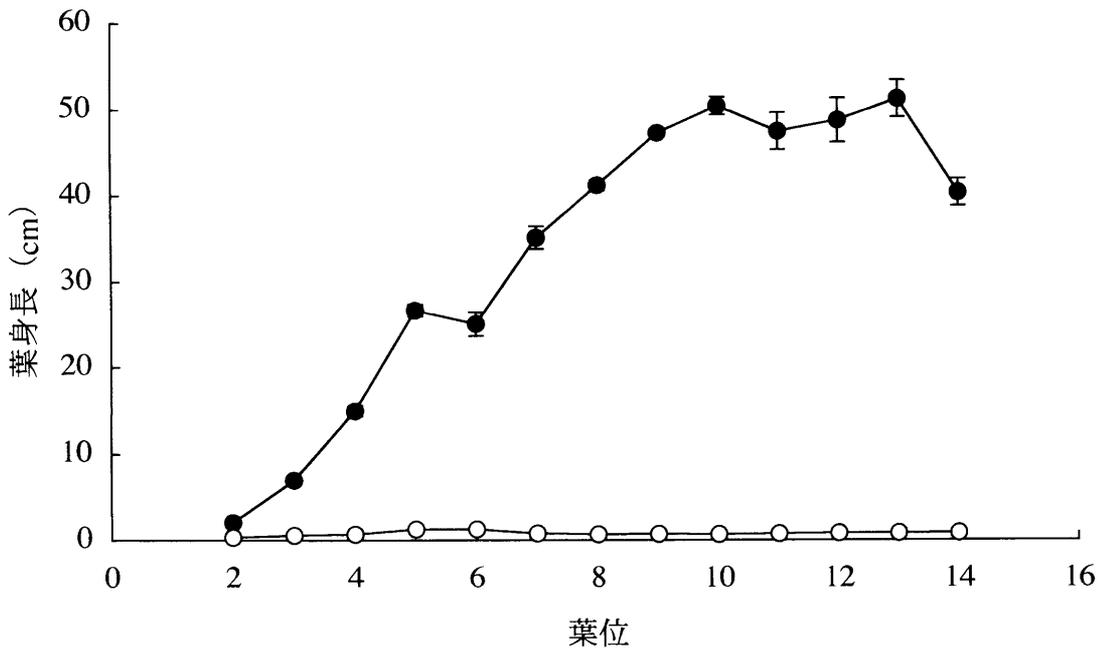
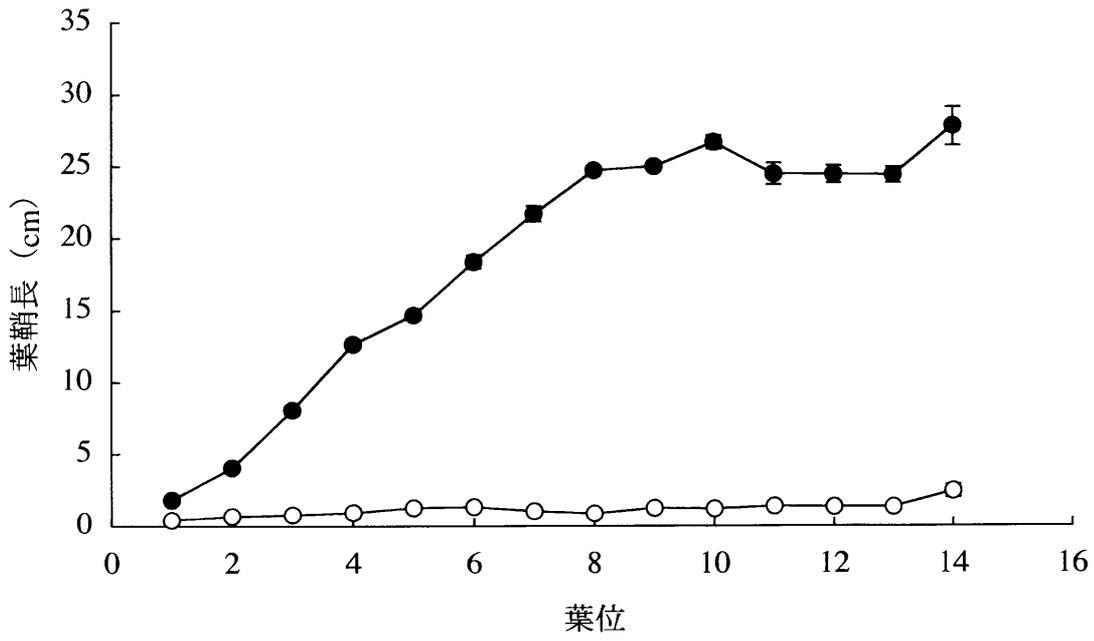


図3-16 野生型および *odm247* 変異体の葉位による葉鞘および葉身長の変化。

● : 野生型。○ : *odm247* 変異体。バーは標準誤差を示す。

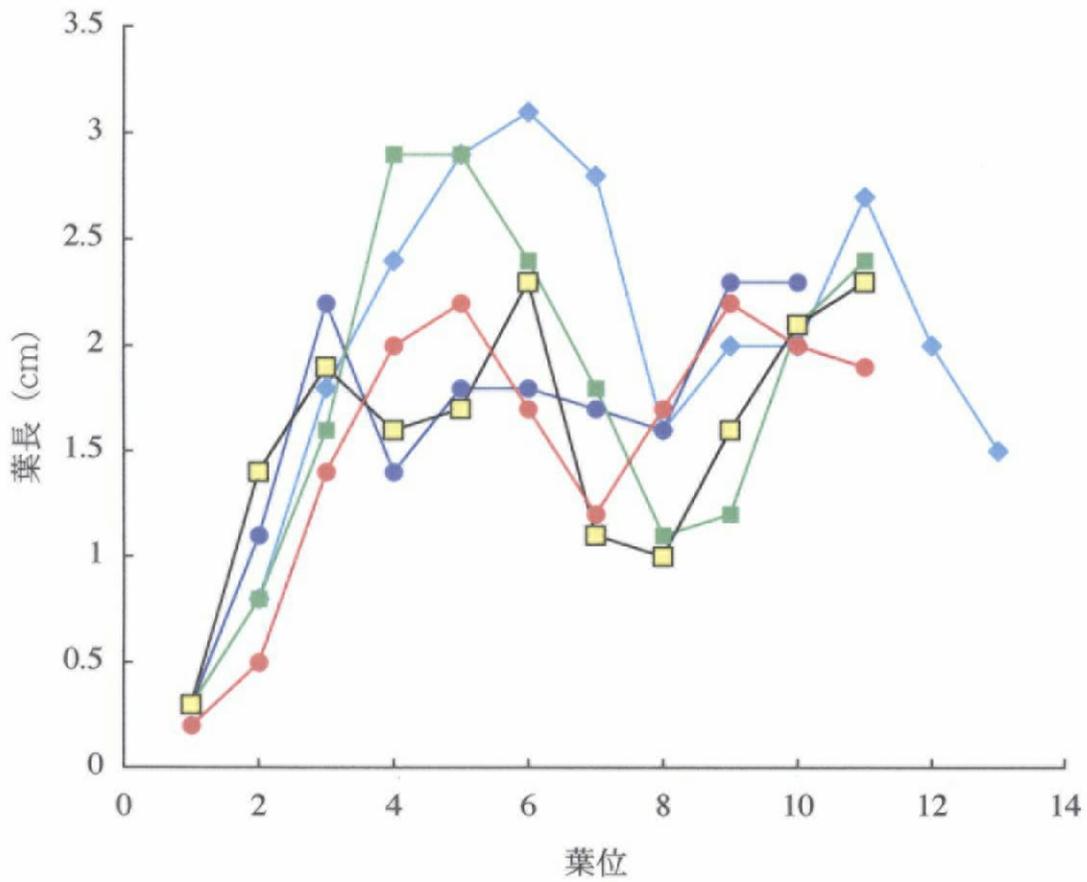


図3-17 播種後4週間目の *odm247* 変異体の葉長。

それぞれの折れ線は、別々の個体の葉長を示している。いずれの個体でも、第7あるいは8葉は、その前後の葉より短い。

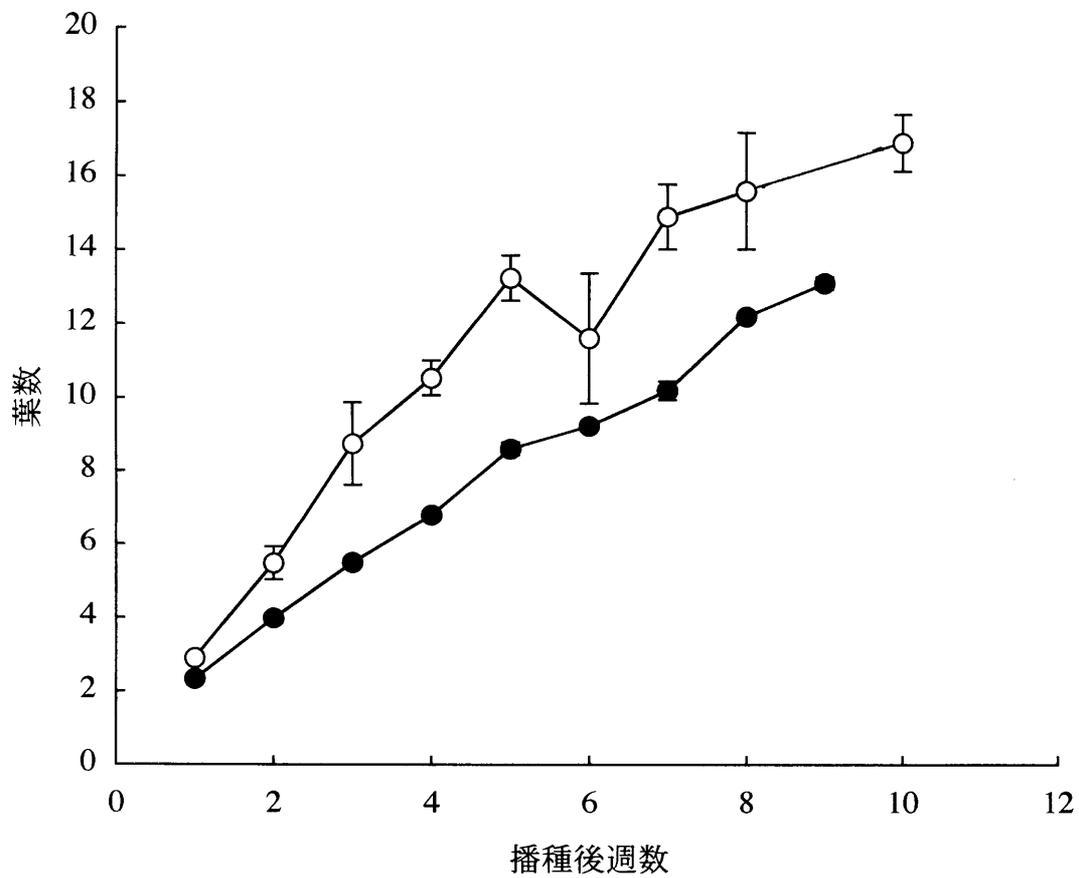


図3-18 野生型および *odm247* 変異体の出葉速度。
 ●：野生型。○：*odm247* 変異体。バーは標準誤差を示す。

まず、縦断切片による、茎の内部構造を観察した。野生型においては第 4~5 葉が着生する部位より上の茎では節および節間の分化と維管束の規則的な走向が見られるが、それより下位の茎には、節および節間は形成されず、維管束が不規則に走っている。一方、*odm247* 変異体では、播種後 16 週間で 20 枚以上出葉した植物体の多くで、節および節間の形成が見られず、維管束の走向もランダムであった (図 3-19)。しかし、節および節間の形成においても個体差が大きく、第 16 葉のファイトマーに節が形成されているものがあつた。しかし、いずれにせよ、節および節間の形成は、*odm247* 変異体では野生型と比べて大幅に遅れていた。

葉については、野生型では第 4 葉から中肋が認められるのに対し、*odm247* 変異体では個体差はあつたが、第 14 葉で初めて中肋とわかる構造が形成されていた (図 3-20)。なお、*odm247* 変異体の葉の細胞には分化異常がみられ、ところどころに空胞化した細胞があつた。野生型の葉鞘には、中肋部分に複数の通気腔が形成されていたが、*odm247* 変異体では通気腔は発達せず、葉身同様、細胞に分化異常が見られた。なお、細胞の空胞化や変形は、SAM から分化してしばらくたった P3 の葉から起こり始めていた (図 3-21)。

野生型および *odm247* 変異体の SAM の大きさや形を経時的に計測した結果、野生型の SAM では、発育とともに高さおよび幅が増大するのに対し、*odm247* 変異体では、ほとんど変化が見られなかった (図 3-22)。つまり、野生型では発育とともに SAM が扁平になっていくが、*odm247* 変異体では、変化がなく一定だった。

播種後 1 週間における *odm247* 変異体の SAM の細胞の分裂頻度を調査するため、*histoneH4* をプローブに用いた *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ、野生型では中央縦断切片あたり平均 1.9 個の細胞でシグナルが検出されたが、*odm247* 変異体では平均 3.7 個のシグナルがみられた (図 3-23)。野生型の胚発生時に第 2 葉から第 3 葉を分化しているときの SAM における分裂頻度は、発芽後のものより高く (Asai et al., 2002)、*odm247* 変異体において、播種後 1 週間の SAM の分裂頻度が高いことは、SAM が野生型の発生のごく初期の状態にある可能性を示唆していた。

これらの表現型は、*odm247* 変異体では、栄養生長初期から後期への転換が遅れ、栄養生長初期が延長していることを示している。

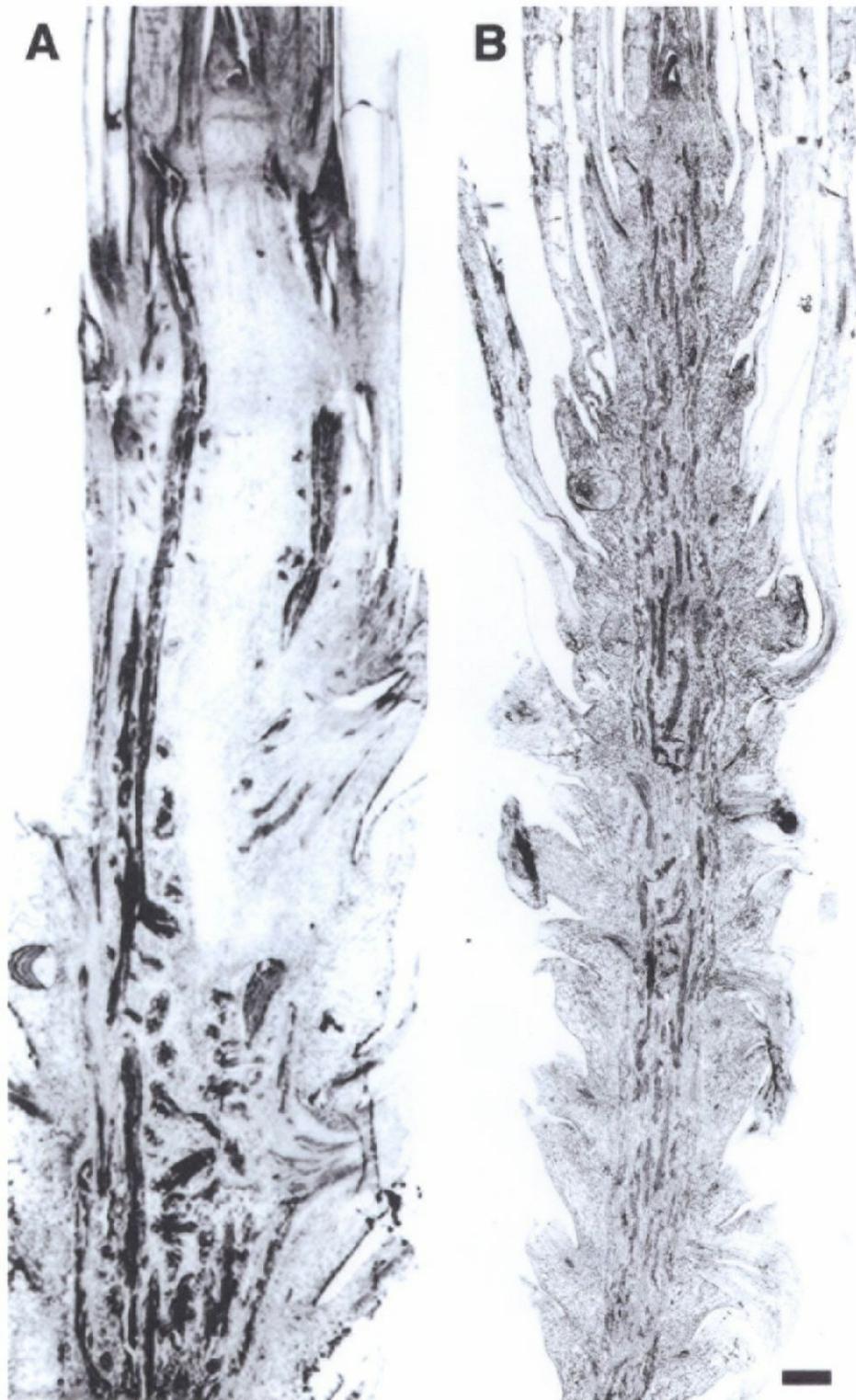


図3-19 野生型および *odm247* 変異体の茎の内部構造。

A : 播種後 30 日目の野生型。B : 播種後 100 日目の *odm247* 変異体。野生型では、上部の茎の維管束は規則的に走っているが、*odm247* 変異体では、上部の茎でも維管束の走向が不規則である。Bar=400 μ m。

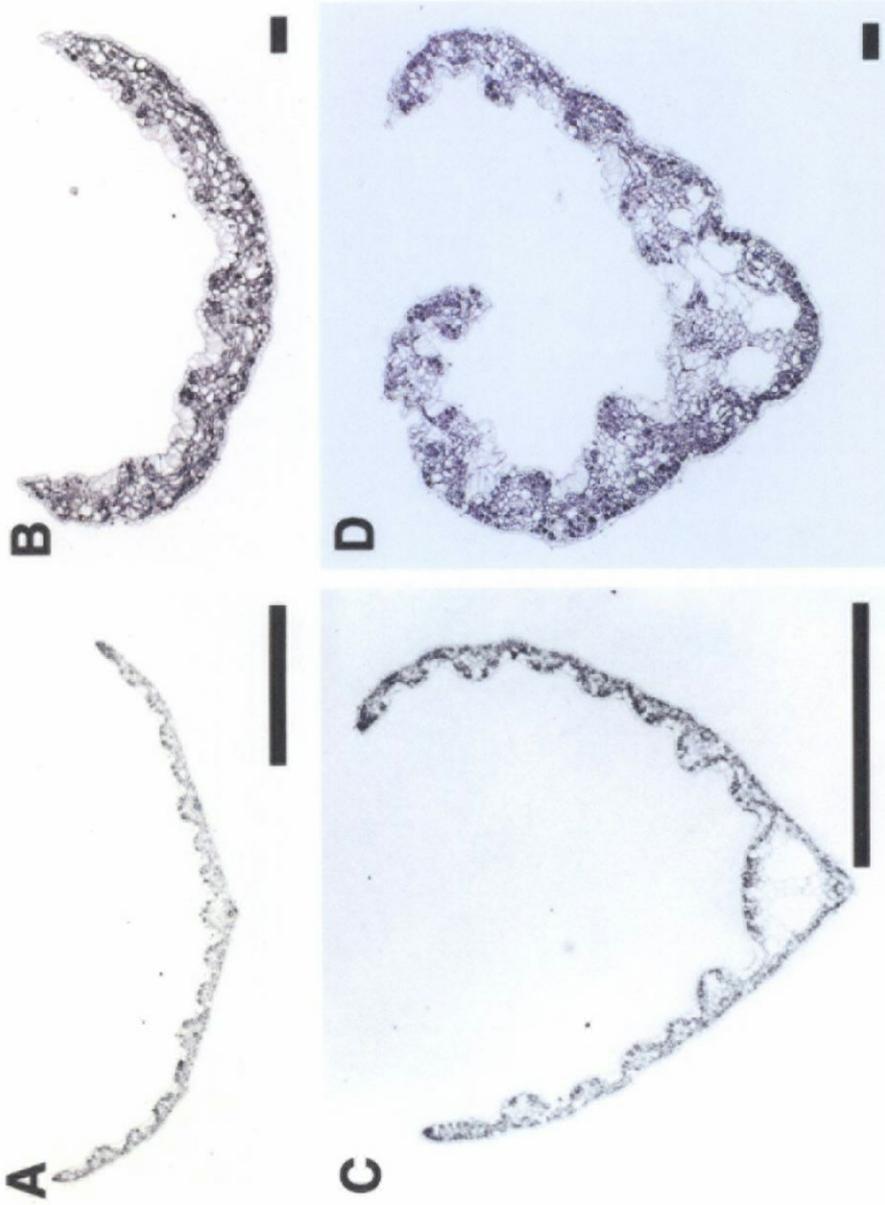


図 3-20 野生型および *odm247* 変異体の葉身の横断切片。A、C：野生型。B、D：*odm247* 変異体。A、B：第 3 葉。C：第 4 葉。D：第 14 葉。野生型では第 4 葉で中肋の形成が見られるが、*odm247* 変異体では、第 14 葉になるまで中肋と思われる構造は発達していない。Bars= 100 μ m。

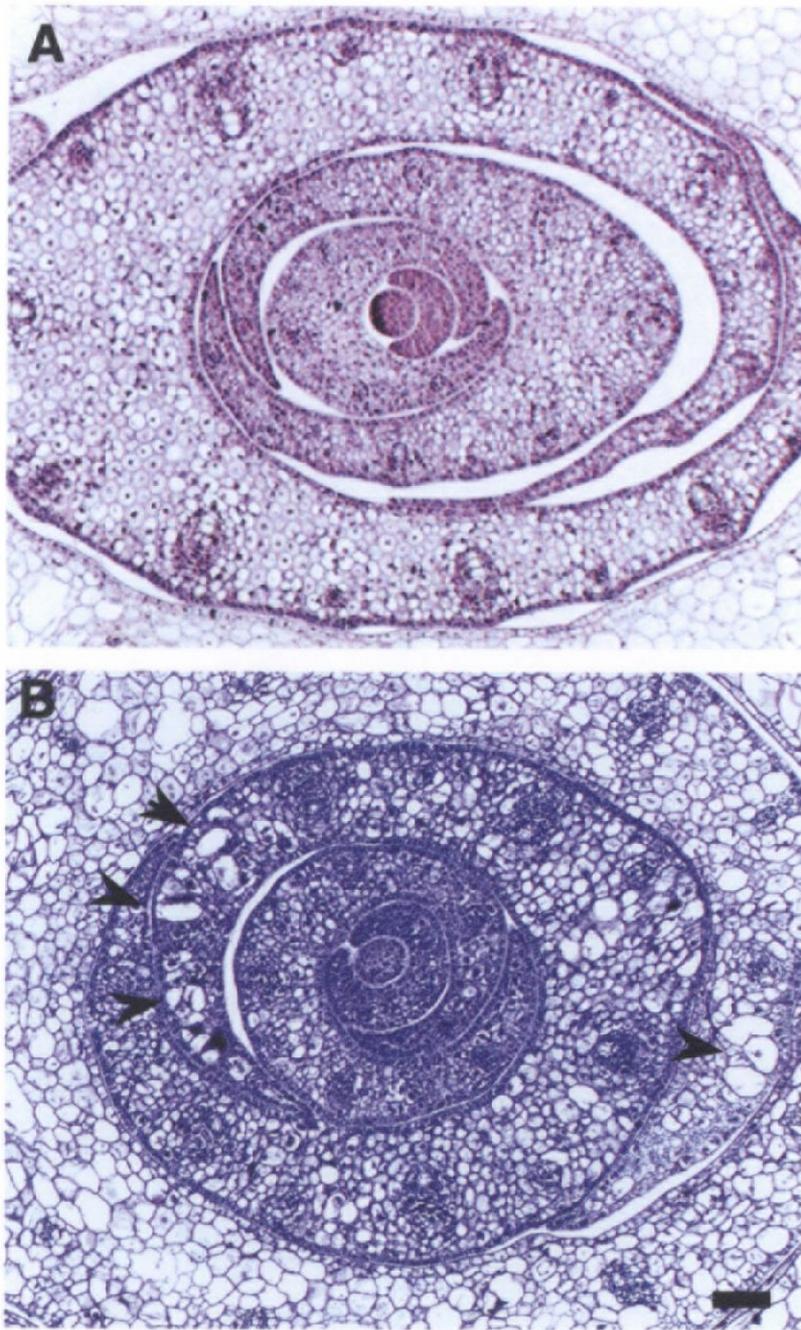


図3-21 野生型および *odm247* 変異体の SAM 付近の横断切片。

A : 野生型。B : *odm247* 変異体。 *odm247* 変異体では、P3 の葉から細胞の空胞化や変形が見られる。黒矢頭は、細胞の異常が顕著な部位を示している。 Bar=50 μ m。

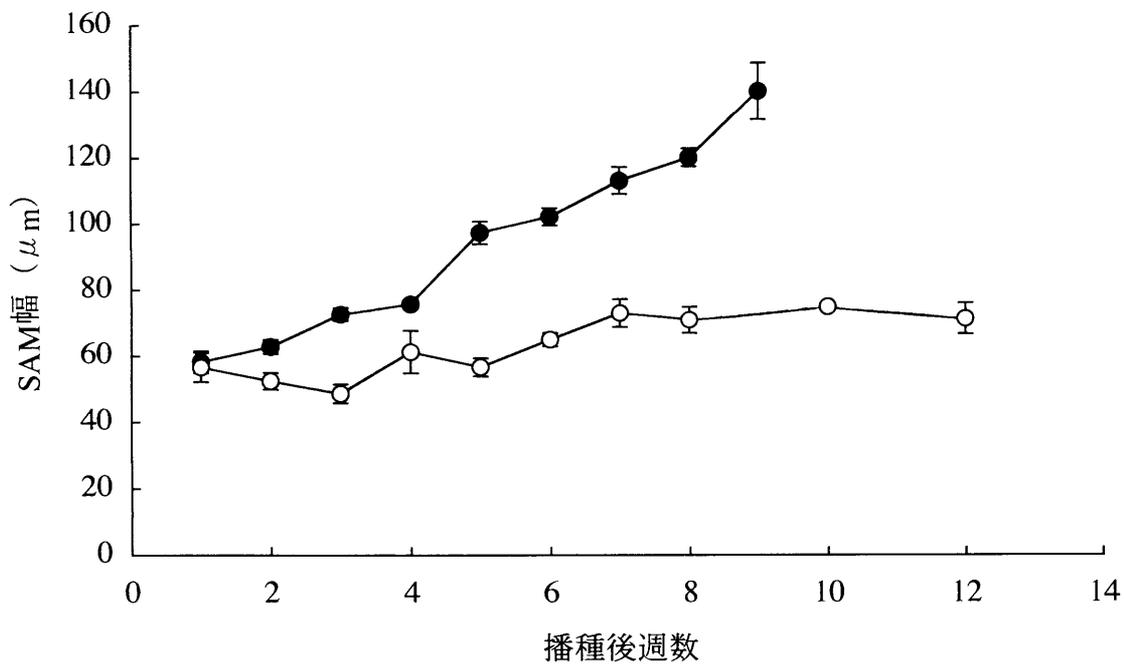
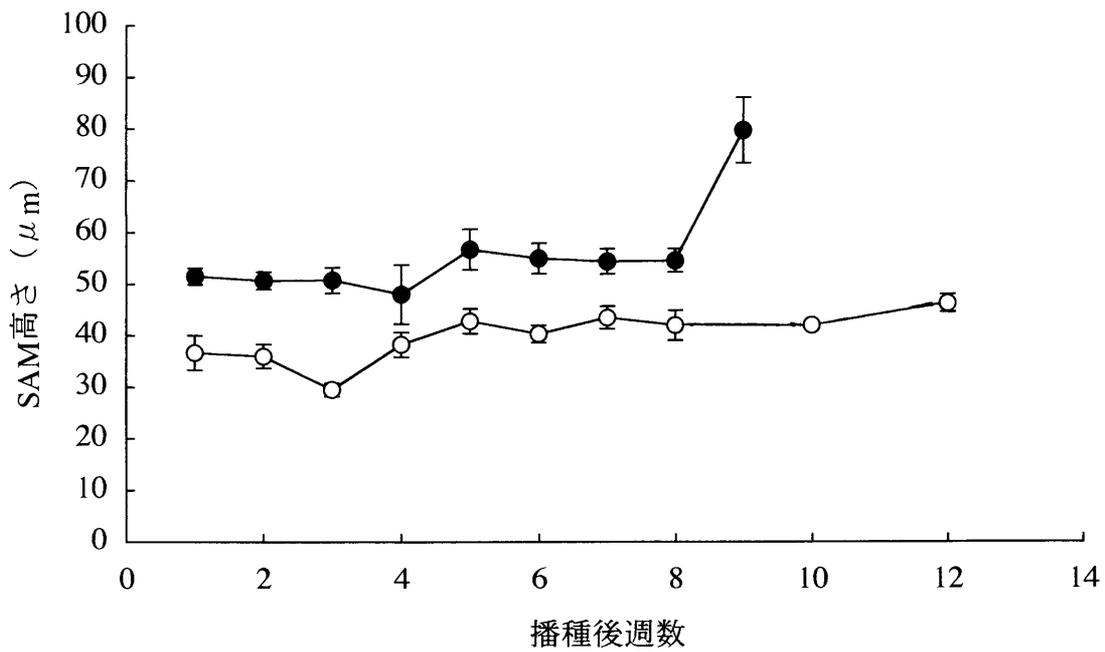


図3-22 野生型および*odm247*変異体のSAMの高さおよび幅の変化。

●：野生型。○：*odm247*変異体。バーは標準誤差を示す。なお、野生型の播種後8週間目および9週間目のSAMは、それぞれ苞原基分化期および一次枝梗分化期であった。

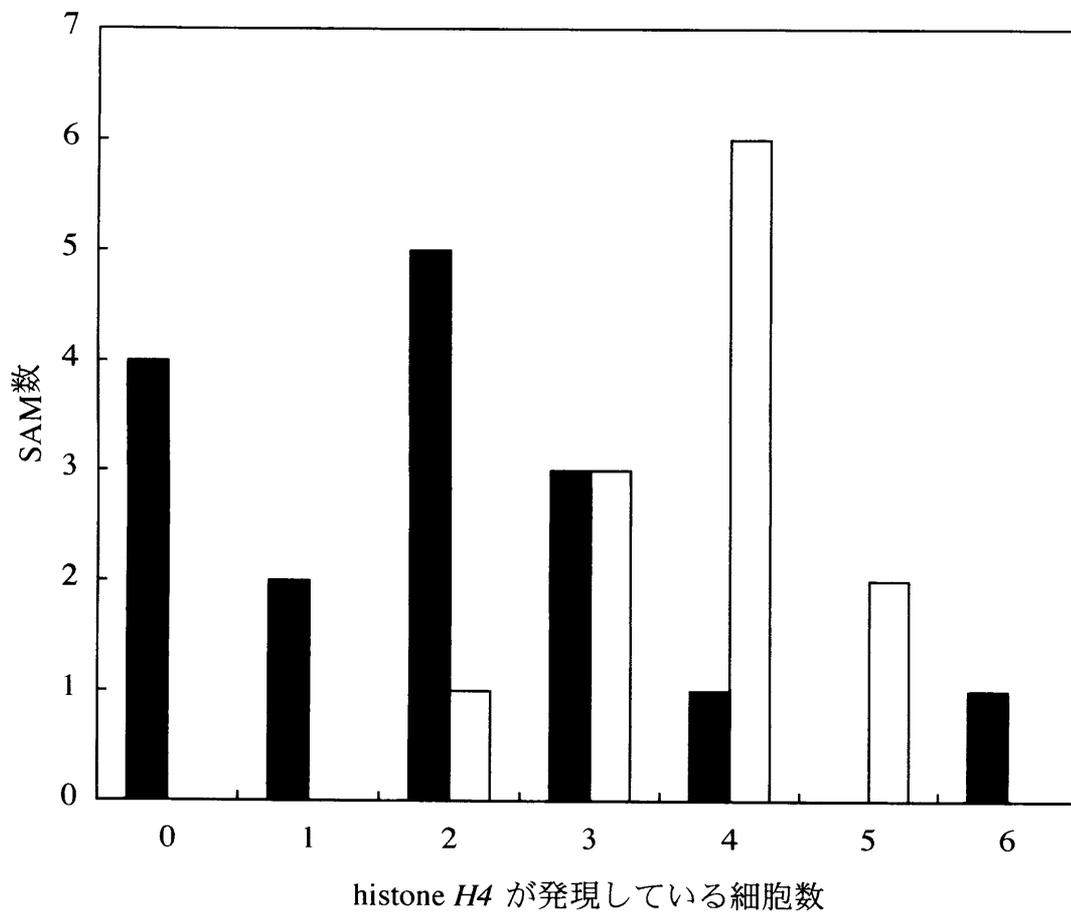


図3-23 野生型および *odm247* 変異体の SAM における中央縦断切片当たりの histone H4 が発現している細胞数。

■ : 野生型。 □ : *odm247* 変異体。

これまでに相転換を制御する遺伝子の変異体として、トウモロコシでは *Teopod1* (*Tp1*)、*Tp2*、*Tp3* および *Hairy-sheath frayed-1*、イネでは *plastochron1* (*plal*) および *mori1*、シロイヌナズナでは *hasty* (*hst*) が同定されている (Poethig, 1988; Dudley and Poethig, 1991; 1993; Bertrand-Garcia and Freeling, 1991; Itoh et al., 2000; Asai et al., 2002; Telfer and Poethig, 1998)。トウモロコシの変異体では栄養生長初期が延長し、シロイヌナズナの *hst* 変異体では栄養生長初期が短縮し、生殖生長の開始が早まった。イネの *plal* 変異体では栄養生長期（および生殖生長期）の延長がみられ、*mori1* 変異体では栄養生長初期が半永久的に続いた。これらの変異体の野生型遺伝子は、さまざまな生育相の長さの制御やある生育相での形質発現に、それぞれ独自の方法で関わっている、つまり、生育相の転換に本質的に関わっていると考えられるので、その変異体は、ヘテロクロニー変異体とされている。*odm247* 変異体では、栄養生長初期の延長は見られたが、同時に成熟した器官での細胞異常もみられた。したがって、*odm247* の野生型遺伝子は、栄養生長初期から栄養生長後期への転換を直接制御するヘテロクロニー遺伝子ではないと考えられた。

odm247 の野生型遺伝子は、SAM の維持だけでなく、器官の成熟にも関わっていることが明らかになった。また、*odm247* 変異体の形態は、未熟な器官と成熟した器官では異なる発生のしくみが働いていることを示唆した。

以上、発芽後枯死する変異体の解析によって、SAM の維持には機能を異にする多くの遺伝子が関与していることがわかった。また、それらの遺伝子は、SAM の発生だけでなく、葉、SAM のすぐ下の茎、幼根の発生にも関わるものが多く、イネの SAM の維持機構をめぐる複雑な遺伝的カスケードの存在が示唆された。