

胚器官増加型変異体を用いたイネの胚のパターン形成に関する
発生遺伝学的研究

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 10 年度博士課程進学

木苗 貴秀

指導教員 長戸 康郎

序論	1
第1章 胚器官増加型変異体の同定	
緒言	7
材料及び方法	8
結果	
胚器官増加型変異体の同定と遺伝学的解析	9
完成胚の表現型	9
胚発生の観察	20
<i>OSH1</i> の発現パターン	29
植物体の表現型	31
生殖成長器官の表現型	35
二重変異体の解析	35
考察	38
第2章 幼根を増加する <i>mr1</i> 変異体の解析	
緒言	42
材料及び方法	43
結果	
<i>mr1</i> 完成胚の表現型	44
<i>mr1</i> の胚発生	46
<i>mr1</i> における <i>OSH1</i> と <i>OsSCR</i> の発現	49
<i>mr1</i> 植物体の表現型	53
オーキシンに対する <i>mr1</i> 植物体の反応	57
二重変異体 <i>mr1 shl1-2</i> と <i>mr1 ral2-1</i> の解析	61
考察	64
第3章 シュートを頂端に分化し、幼根を増加する <i>apd1</i> 変異体の解析	
緒言	67
材料及び方法	68
結果	
<i>apd1</i> 完成胚の表現型	69
<i>apd1</i> の胚発生	71
<i>apd1</i> における <i>OSH1</i> と <i>OsSCR</i> の発現	75
<i>apd1</i> 植物体の表現型	78
オーキシンに対する <i>apd1</i> の幼根の反応	81

再分化培地から NAA とカイネチンを抜いた際の <i>apd1</i> のカルスの反応	81
二重変異体 <i>apd1 shl1-2</i> 、 <i>apd1 ral2-1</i> と <i>apd1 mr1</i> の解析	84
考察	87
第4章 多様な胚器官増加パターンを示す <i>are2</i> 変異体の解析	
緒言	92
材料及び方法	93
結果	
<i>are2</i> 完成胚の表現型	93
胚盤上皮細胞長と背腹領域の相関	97
<i>are2</i> の胚発生	97
<i>are2</i> における <i>OSH1</i> 、 <i>OsSCR</i> と <i>RAmy1</i> の発現パターン	100
<i>are2</i> 植物体の表現型	103
二重変異体 <i>are2 mr1</i> と <i>are2 apd1</i> の解析	106
考察	106
総合考察	111
摘要	118
謝辞	122
引用文献	123

序論

多細胞植物のライフサイクルには、配偶体世代と孢子体世代が存在する。高等植物において、配偶体とは減数分裂によって n の遺伝情報を持った花粉や卵のことであり、この配偶体が受精することで $2n$ の遺伝情報を持った孢子体が形成される。孢子体とは我々が日常、目にする植物体のことである。高等植物では花粉や卵として過ごす時間はごく短く、植物体として長い時期を過ごすことになるが、植物体となってから最初の発生が胚発生である。高等植物は、胚発生中に形成される分裂組織からの継続的な発生を行うため、茎頂分裂組織（SAM）と根端分裂組織は、それぞれ地上部と地下部の形態形成に重要な役割を担っている（Steeves and Sussex, 1989）。これら2つの分裂組織は、胚発生時に決められた数が、決められた位置に分化するため、植物の基本的な体制は胚発生時に決定されているといえる。したがって、胚発生の遺伝学的な理解、特に受精卵から器官分化に至るまでの胚発生初期のパターン形成は非常に重要なテーマであると考えられている（Steeves and Sussex, 1989; Scheres *et al.*, 1994）。

胚発生の形態的な観察は、古くからいくつかの植物種において報告されており（Raghavan, 1986）、一見、均一に見える細胞群から SAM や幼根などの器官が分化する過程は大変興味深い。しかし、この一見均一に見える細胞群では、すでに器官を分化する準備が整えられており、各細胞はことなる位置情報を持っていると言われている（Bai *et al.*, 2000）。このようなパターン形成の性質上、形態的な観察のみでは、1つの受精卵からどのようなメカニズムによって、安定的に器官を分化し、完成された胚になるのかは明らかにできない。

植物から離れて、生物界に目を向けると、胚発生に関して最も解析がすすんでいるのはショウジョウバエである。ショウジョウバエでは、多くの胚発生突然変異体が単離され、解析された結果、多くの遺伝学的モデルが構築されている（Alberts *et al.*, 1999）。例えば、胚のパターン形成に関しては、卵母細胞に局在する母性効果遺伝子が胚の極性を決定し、頭尾軸と背腹軸ができ、この軸に沿って段階的に領域が細分化していき、やがて体節が分化するというものである（Alberts *et al.*, 1999）。その後、分子生物学によってパターン形成変異体の原因遺伝子が単離され、その配列や発現が詳細に解析された結果、遺伝学的モデルの妥当性が証明された（Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1987; Driever and Nusslein-Volhard, 1988; St. Johnstone and Nusslein-Volhard, 1992）。また、胚のパターン形成に大きな役割を担うのは転写調節をつかさどるホメオボックス遺伝子群であることも明らかにされた（Alberts *et al.*, 1999）。このホメオ

ボックス遺伝子は、興味深いことに、昆虫であるショウジョウバエのみでなくセキツイ動物のマウスなど、多くの動物種において次々と発見され、やはり胚のパターン形成に重要な役割を持つことが明らかになった (Burglin *et al.*, 1998; Scott, 1992)。ショウジョウバエとマウスのような遠縁の生物種で、相同性の高い遺伝子が見出され、共通した発生モデルが適用されたことは、進化の観点からも非常に興味深い結果である。

近年になって、植物においても突然変異体の同定や分子遺伝学の進歩によって、形態形成に関する多くの研究が、精力的に行われるようになった。花の器官分化について統合的に説明できる ABC モデルは、分子生物学によってもその妥当性が証明され、代表的な発生遺伝学的モデルとなっている (Bowman *et al.*, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991)。植物の胚のパターン形成に関しては、極性の決定、軸の形成、領域の分化といった順に進行し、器官を分化するようになるとのモデルが考えられている (Jurgens, 2001; Laux *et al.*, 2004)。胚発生のパターン形成に関しても、変異体や実験的な手法を用いた解析が行われるようになってきたが、その重要性にも関わらず、依然として遺伝学的な情報量が十分ではないのが現状である。

現在、発生遺伝学のモデル植物として、双子葉植物ではシロイヌナズナやキンギョソウが、単子葉植物ではイネやトウモロコシが用いられ、突然変異体の同定によって、遺伝学的な見地からの解析が行われている。発生遺伝学のモデル植物としてイネが有利である点として、自家受粉すること、一世代のライフサイクルが比較的短期間であること、ゲノムサイズが比較的小さいこと、突然変異体の蓄積があること、マッピングのための DNA マーカーの数が多きこと、アグロバクテリウムによる形質転換が出来ること、などがあげられる。これらの性質に加えて、イネ (科) の胚発生では、SAM、胚盤、鞘葉、第 3 葉までの葉原基、幼根、エピブラスト、根鞘など、他の分類群では見られない高度な器官分化を行うため、多くの形質について解析することが可能である。

これまでも胚発生において、前述のモデル植物において、突然変異体が得られているが (Errampalli *et al.*, 1991; Clark and Sheridan, 1991; Heckel *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 1995)、最も多くの報告が行われているモデル植物はシロイヌナズナである。シロイヌナズナの完成胚は SAM、2 枚の子葉、胚軸、幼根から成る比較的単純な構造であり、受精卵から完成胚までの発生過程も良く知られている (Mansfield and Briarty, 1991)。また、胚発生のパターン形成に関する遺伝学的、生理学的な情報も蓄積されてきている (Laux *et al.*, 2004)。シロイヌナズナの卵や受精卵では、頂部側で細胞質が密になっており、基部側は液胞化しており、この時点ですでに極性が存在している

(Mansfield *et al.*, 1991)。これに対して、トウモロコシの卵は極性を持たず、受精直後に、シロイヌナズナのような極性を示すことが報告されている (Mol *et al.*, 1994)。シロイヌナズナでは、受精卵が頂部－基部方向に伸長し、小さくて細胞質が密な頂端細胞と長くて液胞化した基部細胞に不等分裂をする。その後、頂端細胞は胚として子葉、SAM、胚軸を形成し、基部細胞は胚柄と *hypophyseal cell* として発生する。このようにシロイヌナズナの胚では、安定した細胞系譜をたどって完成胚となることが見出されている (Mansfield and Briarty, 1991)。

Mayer ら (1991) は、シロイヌナズナを用いて、胚器官が形成されないいくつかの突然変異体を同定し、これらは胚の領域の欠損によるものであると解釈した。すなわち、SAM と子葉 (頂部領域) を欠損する *gurke* (*gk*)、胚軸 (中央部) を欠損する *fackel* (*fk*)、胚軸と幼根 (中央部領域と基部領域) を欠損する *monopteros* (*mp*)、SAM、子葉と幼根 (頂部領域と基部領域) を欠損する *gnom* (*gn*) である。このことから、シロイヌナズナの胚は、頂部－中央部－基部の 3 つの主要な領域から構成されることを提唱した。

その後、領域欠損型変異体の原因遺伝子が単離され、*GK* はアセチル CoA カルボキシラーゼ (Kajiwara *et al.*, 2004; Baud *et al.*, 2004)、*FK* はブラシノステロイド合成経路で働く C-14 ステロールリダクターゼ (Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000)、*MP* はオーキシン反応性の転写調節因子 (Hardtke and Berleth, 1998)、*GN* は *PIN-FORMED1* (*PIN1*) の細胞内の局在性に関与する ARF GEF であることが判明した (Shevell *et al.*, 1994; Steinmann *et al.*, 1999)。これらの遺伝子の発現パターンが解析されたが、欠損した領域における特異的な発現は見られなかったため、これらの遺伝子が領域特異的な機能を持っているという証拠は、未だ得られていない。

これらの解析の中で、*gn* では受精卵が十分に伸長せず、第 1 分裂において分裂方向が不安定となり、頂端細胞と基部細胞が正常に形成されなかったことから、頂部－基部の極性に異常をきたしたものと考えられた (Mayer *et al.*, 1993)。また、*gn* ではオーキシンの排出キャリア *PIN1* の細胞内における局在性が乱れており、これが原因でオーキシンの極性に異常が起きたことが示された (Steinmann *et al.*, 1999)。さらに、オーキシンへの反応に異常を示す *mp* や *bodenlos* (*bdl*) においても、受精卵の第 1 分裂後の頂端細胞における分裂方向が異常になる現象が見られた (Berleth and Jurgens, 1993; Hamann *et al.*, 2002)。このようにオーキシンに関連する異常を持つ変異体では、頂部－基部軸の形成に異常を示したことから、オーキシンの極性が、頂部－基部軸の形成に関与することが示唆された。

一方で、遺伝学的解析とは別に、オーキシンやオーキシン極性輸送阻害剤を処理した、セイヨウカラシナやコムギで興味深い結果がえられた。早いステージの未熟胚に、高濃度のオーキシンやオーキシン極性輸送阻害剤を処理したところ、胚器官分化前の球状胚で発生を停止した (Hadfi *et al.* 1998; Fischer and Neuhaus, 1996)。器官分化直前のステージで、オーキシン極性輸送阻害剤を処理した球状胚では、セイヨウカラシナでは高頻度で融合した子葉、まれに複数の幼根や双子胚を (Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.* 1998)、コムギでは胚器官 (胚盤、SAM や幼根) の増加や双子胚の形成を引き起こした (Fischer and Neuhaus, 1996; Fischer *et al.*, 1997)。この結果から、Fischer ら (1997) は、コムギ胚の軸形成や領域分化はオーキシン極性輸送と関連していることを提唱した。以上のような報告から、植物の胚では、オーキシンの極性によって、極性や頂部－基部軸が決定され则认为られている。

領域の分化に関しては、シロイヌナズナの頂部領域の細分化モデルが報告されているが、軸に沿ってどのように領域が分化するかという遺伝学的情報は、ほとんど得られていない。頂部領域の細分化モデルとは、*CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*) と *CUC2* が、子葉間の境界領域で発現し、頂部領域はこの領域と 2 つの子葉領域へと細分化するというものである (Aida *et al.*, 1997; 2002)。子葉間の境界領域にはその後、SAM の発生と維持に必要な *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) が発現して SAM が形成される (Long *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996)。*CUC* 遺伝子は相同性が高く、*CUC1* と *CUC2* のどちらかに変異がおきても、ほとんど表現型は見られないが、二重変異体の *cuc1 cuc2* では、2 つの子葉が融合したカップ状の子葉を形成し、SAM を欠損する。このことから、*CUC* 遺伝子は、頂部領域を 3 つの領域に細分化することや SAM の分化に必要な *STM* の発現を促進することで、正常な器官分化を促すものと考えられている (Aida *et al.*, 1997; Aida and Tasaka, 1999)。また、パターン形成に関与する遺伝子の冗長性が示された。シロイヌナズナの左右相称性は、第一に子葉の形態によって確認することができるが、*CUC* 遺伝子はこの形質を決定する機能を持つと考えられる。しかし、*CUC* がどのような制御によって子葉間の境界領域で発現するのかは、解明されていない。

シロイヌナズナで報告されているパターン形成には、頂部－基部パターンの他に、放射パターンが存在する (Scheres *et al.*, 1995; Laux *et al.*, 2004)。胚軸や幼根に、外側から表皮、皮層、内皮、内鞘、維管束の順に胚発生中に次第に形成される、組織層のパターンのことである。放射パターンの形成は、8 細胞期から原表皮期にかけて開始されるといわれ、この時期に、胚全体で発現していた *ARABIDOPSIS THALIANA*

MERISTEM LAYER1 (ATML1) が表皮の 1 層のみで発現するようになり、以降、*ATML1* は表皮のみで発現するようになる (Lu *et al.*, 1996)。その後、内部の組織は、並層分裂によって基本分裂組織と前形成層になり、さらに並層分裂により、基本分裂組織は皮層と内皮に分化し、前形成層は内鞘と維管束になる (Scheres *et al.*, 1995)。

イネにおいても放射パターンに異常が見られる変異体、*globular embryo4 (gle4)* が得られ、基本分裂組織 (L2) と維管束 (L3) の分化に異常が起きていることが示されている (Kamiya *et al.*, 2003)。ただし、本研究では、シュートや幼根といった胚の器官分化に着目したため、パターン形成という言葉は、頂部－基部パターン形成を意味し、放射パターンに関するものではないことを述べておく。

胚のパターン形成とは別に、分子生物学的解析によって、植物でもトウモロコシでホメオボックス遺伝子 *KNOTTED1 (KNI)* が発見され、SAM の未分化な領域で発現していたため、SAM が継続的な器官の発生を行うという機能と合わせて、植物の発生に重要な役割を持つと推測されている (Vollbrecht *et al.*, 1991)。ホメオボックス遺伝子は、シロイヌナズナ、イネ、トマトなどでも発見され、SAM など組織特異的な発現が見られたため、細胞の未分化な状態の維持などに関与しているといわれている (Long *et al.*, 1996; Kano-Murakami *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1998)。イネにおける *KNI* 相同遺伝子 *OSHI* は、受粉後 3 日目における球状胚の頂部領域腹側の SAM 分化予定領域で発現を開始するため (Sato *et al.*, 1996)、このステージで、すでに周辺の細胞とは性質の違う細胞群 (領域) が生じていることを意味している。このことから、形態的には一見、均一に見える細胞も固有の位置情報を獲得しており、この位置情報がその後の器官発生の鍵を握っているものと考えられる。

また、イネでは変異体が蓄積されており、約 200 系統の胚発生変異体が報告されている (Hong *et al.*, 1995)。イネ胚発生変異体は、それまでに同定された変異体のグルーピングから、いくつかの胚発生の制御プロセスが存在するとの報告がなされている (Kitano *et al.* 1993)。個々の胚発生変異体の解析では、シュートを欠損する変異体や (Satoh *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2003)、双子葉植物では得られていない、胚の大きさの制御に関する変異体の解析が行われている (Hong *et al.* 1996)。しかし、胚発生初期のパターン形成に関する遺伝学的な制御機構については、イネを含め、単子葉植物ではほとんど報告されておらず、双子葉植物のシロイヌナズナのような遺伝学モデルの構築には至っていない。遺伝学的モデルを構築するためには、パターン形成に関する変異体の同定と解析によって遺伝学的知見を蓄積することが、現段階での有効なアプローチの 1 つであるといえる。しかし、約 200 という変異体数は決して十分な数であ

るとは言えない。したがって、新規の変異体の同定や対立遺伝子の出現は、胚発生のより広範囲かつ詳細な解析に役立つと期待出来る。そこで、本研究では、パターン形成に関する新たな知見を得るために、イネの受精卵に MNU 変異原処理を行った F₂ 世代から、胚発生突然変異体の同定を行った。本研究では、パターン形成に関する異常を示す指標として、シュートや幼根などの胚器官の数に着目して変異体の同定を行った。胚器官増加型変異体は、他のモデル植物でもほとんど報告がないため、これまでに得られていなかったパターン形成に関する遺伝学知見が得られることが期待された。また、同定された胚器官増加型変異体を用いて、胚発生や植物体の詳細な解析も行った。

イネは生物学的なモデル植物として使用される一方、作物としての価値も非常に高い。食料として利用されるのは胚乳であり、その胚乳は受精後、胚と同時に発生を開始するため、胚と胚乳の大きさの制御に相互作用があることがわかっている (Hong *et al.*, 1996)。さらに、植物は分裂組織から継続的な発生を行うが、SAM と根端分裂組織が分化する胚発生にはその後の発生プログラムが集約されているとも言える。胚発生のプログラムの解明によって、葉や穂などの他の器官の発生に適用できるモデルが構築される可能性も考えられる。したがって、胚発生における遺伝学的研究は、育種の観点からも潜在的に価値が高いことを述べておく。

第1章 胚器官増加型変異体の同定

緒言

イネでは、これまでに、約 200 系統の胚発生突然変異体 *organ differentiation mutant* (*odm*) が報告されており、それらの表現型には、無胚となるもの、器官分化が全く見られないもの、シュートあるいは幼根のいずれかを欠損するもの (Sato et al., 1999; Sato et al., 2003)、胚の大きさが変異するもの (Hong et al., 1996)、器官の数や位置が異常になるもの、胚あるいは器官の形態が異常になるもの、1 遺伝子の突然変異でありながら多様な表現型を示すものなどが報告されている (Hong et al., 1995)。このことから、胚発生にはいくつかの遺伝子群による制御過程が存在すると考えられている。中でも受精後の胚発生初期のパターン形成は、極性の決定、軸の形成、領域の分化といった順序で進行するといわれており、植物の基本的体制や器官形成に重要な影響を及ぼすと考えられている。

シロイヌナズナでは、パターン形成に関与するといわれるいくつかの胚発生変異体が報告されている。*gn* 変異体は、オーキシンの極性輸送に異常を生じた結果、子葉、SAM、幼根といった胚器官を欠損する、極性異常変異体であると考えられている (Mayer et al., 1991, 1993; Shevell et al., 1994; Busch et al., 1996; Steinmann et al., 1999)。*topless* (*tpl*) 変異体は、頂部領域において、SAM が欠損し、その位置に根を分化するため、頂部—基部軸の極性に異常をきたしたものの、あるいは、SAM の発生運命が根端分裂組織へと変更されたものとの解釈がなされている (Long et al., 2002)。領域の分化に関しては、いくつかの胚器官欠損型変異体が得られており、それらの表現型は領域の欠損が原因であるとの解釈から、シロイヌナズナの胚は、頂部、中央部、基部の 3 つの領域から構成され则认为られている (Mayer et al. 1991)。しかし、その後の解析においても、胚器官欠損型変異体の原因遺伝子が、欠損した領域に特異的に機能しているとの証拠は得られていない (Jang et al., 2000; Schrick et al., 2000; Berleth and Jurgens, 1993; Prezemeck et al., 1996; Hardtke and Berleth, 1998; Mayer et al., 1993; Shevell et al., 1994; Busch et al., 1996; Steinmann et al., 1999; Baud et al., 2004)。

イネの胚発生突然変異体においても、完成胚の形態から、領域が欠損もしくは縮小したと考えられる系統が存在するが、モデル植物においても胚のパターン形成に関する遺伝学的情報はひじょうに少ないのが現状である。

そこで本章では、胚発生初期のパターン形成やその胚器官分化との関連性について遺伝学的な解析を行うために、胚器官増加型変異体の同定を行った。これは、胚器官の欠損は、細胞分裂の異常などのパターン形成とは直接関与しない原因による場合があるが、器官の増加は、パターン形成の異常と関連する可能性が高いと考えたためである。その結果、これまでに同定されたイネ胚発生突然変異体の中から新たに判明したものと、今回新規に同定されたものを合わせて 9 系統の 1 遺伝子座劣性の胚器官増加型変異体を得られた。これらの系統を用いて、胚発生、植物体や二重変異体の解析を行った。また、ホメオボックス遺伝子 *OSHI* を領域分化のマーカーとして *in situ* hybridization も行った。

材料及び方法

植物材料

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種台中 65 号に MNU 処理を行って得られた F₂ 集団から 9 系統の 1 遺伝子劣性突然変異体を同定した。野生型と変異体の種子は、2%次亜塩素酸ナトリウムに浸潤した後、プラントボックス内の 6%スクロースと 1%アガロースを含み pH5.8 の MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上で発芽させた。植物体は、プラントボックス内で約 1 か月間、28℃で培養した後、ポットへ移植した。

パラフィン切片

様々なステージの発生中の胚を、FAA (ホルマリン：酢酸：50%エタノール=1：1：18) で固定し、エタノールシリーズにて脱水を行った。その後、キシレンに浸潤した後、パラフィン Paraplast Plus (Oxford Labware, St. Louis, MO) に包埋し、ミクロトームにより 8μm の切片を作成した。切片はヘマトキシリン染色し、光学顕微鏡 (Olympus AX-80, Tokyo, Japan) 下で観察を行った。

in situ hybridization

前述の方法で作成したパラフィン切片を、Vectabond (Vector Lab, Burlingame, CA) 処理したスライドガラスに貼付した。ジゴキシゲニンでラベルされたアンチセンスプローブを、ポリ A 末端を含まない *OSHI* をコードする領域から作成した。*in situ* hybridization とシグナルの検出方法は、Kouchi and Hata (1993) の方法によって行った。

二重変異体の作出

各遺伝子間の相互作用を解析するために、5 系統の胚器官増加型変異体とシュート欠損型変異体 *shl1-2* のヘテロ接合の植物体同士を交配し、F₃ 世代種子を用いて完成胚の観察を行った。

結果

胚器官増加型変異体の同定と遺伝学的解析

変異原処理を行ったイネの F₂ 種子完成胚の形態観察を行い、9 系統 (*odm14*、*odm69*、*odm87*、*odm107*、*odm132*、*odm169*、*odm326*、*odm331*、*odm400*) の器官増加型変異体を同定した。これら 9 系統のヘテロ個体の完成胚における、変異体の割合は約 25%を示した (表 1-1)。χ² 乗検定の結果、すべての系統で、野生型表現型 : 変異型表現型 = 3 : 1 に適合したため、本章で得られた 9 系統は 1 遺伝子劣性変異体であることが明らかになった。

また、これら 9 系統について対立性検定を行ったところ、*odm69* と *odm107* は対立関係にあることが判明した (表 1-2)。ただし、一部の組み合わせは未交配であるため、今後、さらなる検証の必要がある。これらのうち下記の系統は、その表現型から *odm14* = *apical displacement1* (*apd1*)、*odm69* = *aberrant regionalization of embryo1-1* (*are1-1*)、*odm107* = *are1-2*、*odm169* = *are2*、*odm326* = *multiple radicle1* (*mr1*)、*odm331* = *are4* と名付けた。

完成胚の表現型

野生型

野生型胚では、頂部領域にシュート、基部領域に幼根をそれぞれ 1 つずつ分化していた (図 1-1A)。頂部領域には、シュートと胚盤を分化しており、SAM からは第 3 葉原基までの分化が見られた。また、背側領域には胚盤の一部を分化し、胚乳と接する部位には胚盤上皮組織の分化が見られた。腹側領域には、シュート、胚盤の一部、幼根やエピブラストといった器官を分化していた。

表 1-1. 胚器官増加型変異体のヘテロ個体後代における変異体の分離比

系統	変異体	調査個体数	変異体数	分離比(%)
<i>odm14</i>	<i>apical displacement1 (apd1)</i>	276	62	22.5
<i>odm69</i>	<i>aberrant regionalization of embryo1-1 (are1-1)</i>	2818	682	24.2
<i>odm87</i>	<i>odm87</i>	261	61	23.4
<i>odm107</i>	<i>aberrant regionalization of embryo1-2 (are1-2)</i>	320	87	27.2
<i>odm132</i>	<i>odm132</i>	319	82	25.7
<i>odm169</i>	<i>aberrant regionalization of embryo2 (are2)</i>	320	77	24.1
<i>odm326</i>	<i>multiple radicle1 (mr1)</i>	150	33	22.0
<i>odm331</i>	<i>aberrant regionalization of embryo4 (are4)</i>	250	52	20.8
<i>odm400</i>	<i>odm400</i>	74	18	24.3

表 1-2. 胚器官増加型変異体の対立性検定

	<i>apd1</i>	<i>are1-1</i>	<i>odm87</i>	<i>are1-2</i>	<i>odm132</i>	<i>are2</i>	<i>mr1</i>	<i>are4</i>
<i>are1-1</i>	—							
<i>odm87</i>	—	—						
<i>are1-2</i>	—	+	—					
<i>odm132</i>	ND	—	—	—				
<i>are2</i>	—	—	—	—	ND			
<i>mr1</i>	—	—	—	—	ND	—		
<i>are4</i>	—	—	ND	ND	ND	—	—	
<i>odm400</i>	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND

＋は対立遺伝子、－は対立関係なし、NDは未交配を示す。

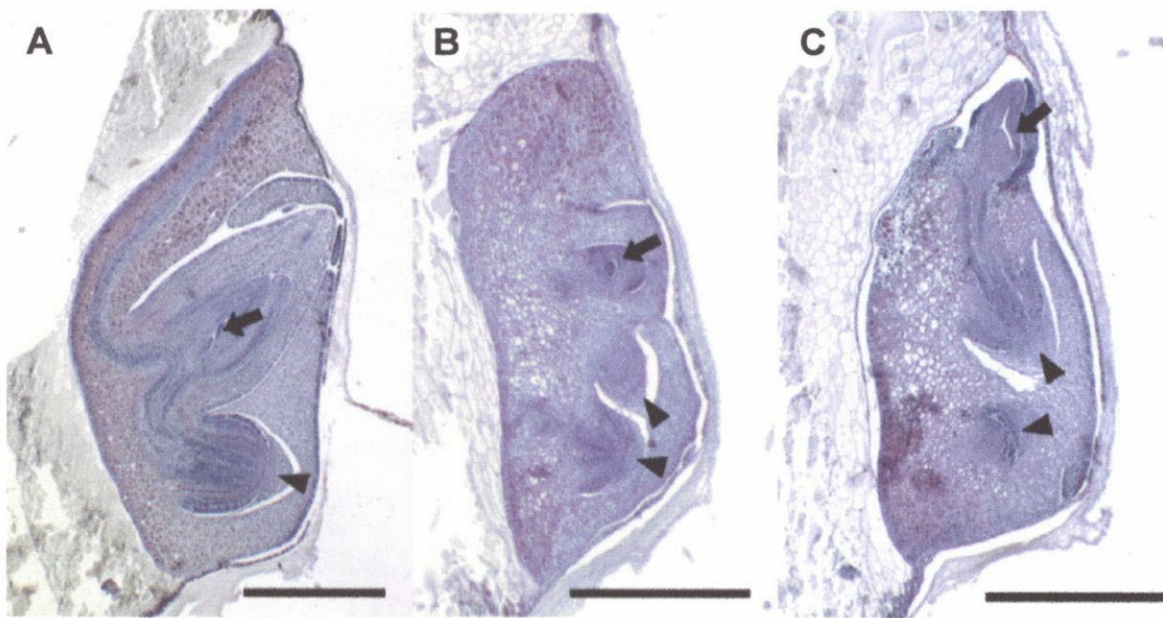


図 1-1. 野生型と幼根が増加する変異体の完成胚。A : 野生型、B : *mr1*、C : *apd1*。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m。

幼根が増加する変異体 (*mr1*、*apd1*)

幼根が増加する変異体として、*mr1* と *apd1* が得られた。*mr1* の頂部領域では、1 つの未発達なシュートが分化する胚が 81%、シュートが欠損する胚が約 14%、2 つの SAM が分化する胚が約 5% 見られた (図 1-1B、表 1-3)。基部領域では、複数 (2 つ～4 つ) の幼根が分化する胚が 66%、1 つの幼根が分化する胚が 29%、幼根が欠損する胚が 5% 見られた (図 1-1B、表 1-3)。したがって、*mr1* は頂部領域に 1 つの未発達なシュートが、基部領域に複数の幼根が分化する変異体であった。*mr1* に関する詳細な解析は第 2 章で行った。

apd1 では頂部領域において、胚盤やシュートが強い生育阻害を受け、頂端に 1 つの未発達なシュートが分化する胚が約 85%、シュートが欠損する胚が約 16% 存在した (図 1-1C、表 1-4)。基部領域では、1 つの幼根が分化する胚が 60%、2 つの幼根が分化する胚が 40% を占めていた。*apd1* では 3 つ以上の幼根が分化する胚は観察されなかった。このことから *apd1* は、頂部領域の頂端に 1 つの未発達なシュートが、基部領域に 1 つないし 2 つの幼根が分化する変異体であるといえた。*apd1* に関する詳細な解析は第 3 章で行った。

多様なパターンで器官が増加する変異体 (*are2*)

are2 は、今回得られた他の器官増加型変異体には見られない、多様な器官増加パターンを示した。代表的な表現型として、頂部領域において、シュートの頂部側にも幼根が分化するもの (図 1-2A)、シュートが欠損し頂部領域と基部領域に幼根が分化するもの (図 1-2B)、シュートが背側領域に、幼根が頂部領域と基部領域に分化するもの (図 1-2C)、シュートと幼根の一组が左右に並んで分化し、その間にもう 1 つの幼根が分化するもの (図 1-2D) などが見られた。器官増加する変異体の割合は 50% であった (表 1-5)。このことから、*are2* では、頂部－基部軸と背腹軸の極性が変更される、あるいは頂部－基部軸が複製されるといった異常をきたすことが示唆された。*are2* に関する詳細な解析は第 4 章で行った。

シュートと幼根が増加する変異体 (*are1-1*、*are1-2*、*are4*、*odm400*、*odm87*)

シュートと幼根が増加する変異体として、*are1-1*、*are1-2*、*are4*、*odm400*、*odm87* が得られた。このうち *are1-1*、*are1-2*、*are4*、*odm400* の 4 系統の典型的な表現型では、腹側領域に本来のシュートと幼根が分化し、背側領域には腹側領域と鏡像対称に、胚盤、シュートと幼根の一组が分化していた (図 1-3A～K)。*are1-1* では、背側領域に

表 1-3. *mrl* におけるSAMおよび幼根数から見た胚の頻度

SAMの数	幼根の数					計
	0	1	2	3	4	
0	3.4 (2)	6.9 (4)	3.4 (2)	—	—	13.8 (8)
1	1.7 (1)	22.4 (13)	39.7 (23)	13.8 (8)	3.4 (2)	81.0 (47)
2	—	—	1.7 (1)	3.4 (2)	—	5.2 (3)
計	5.2 (3)	29.3 (17)	44.8 (26)	17.2 (10)	3.4 (2)	100.0 (58)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、（）内の数字は調査した胚の数を示す。

表 1-4. *apdl* におけるSAMおよび幼根数から見た
胚の頻度

SAMの数	幼根の数		計
	1	2	
0	2.2 (1)	13.3 (6)	15.5 (7)
1	57.8 (26)	26.7 (12)	84.5 (38)
計	60.0 (27)	40.0 (18)	100.0 (45)

数字は%、 () 内の数字は調査した胚の数を示す。

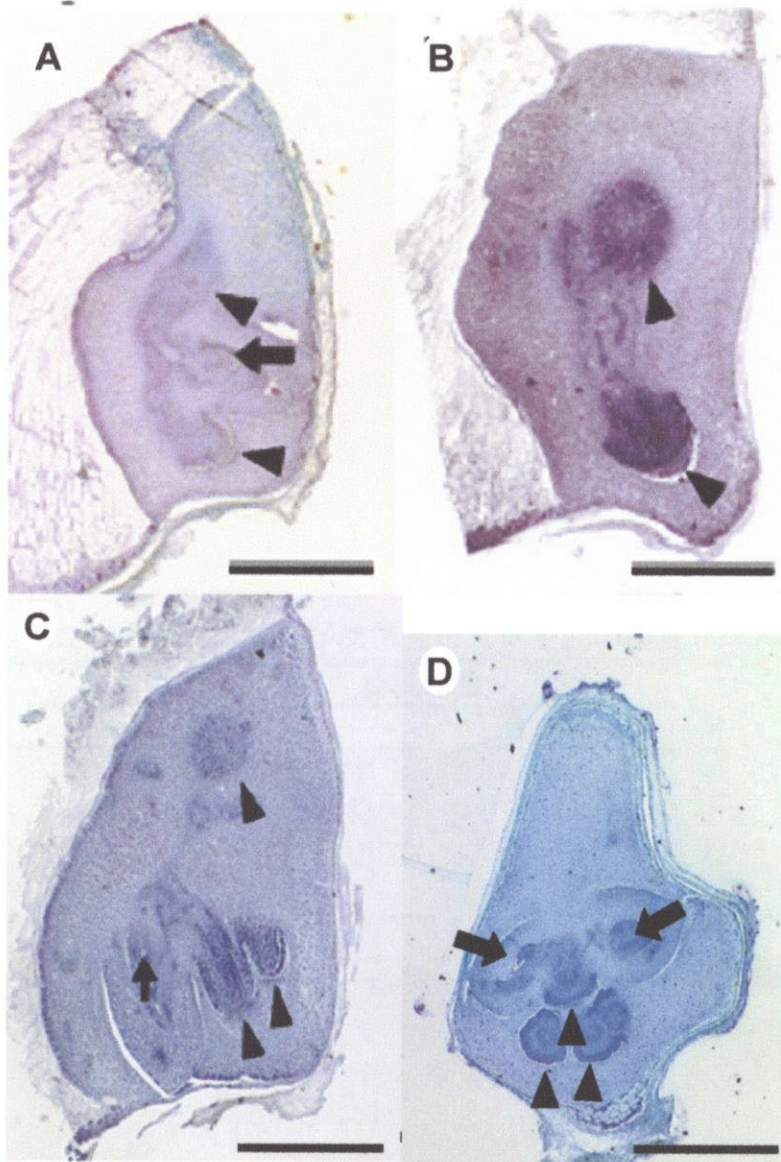


図 1-2. 多様なパターンで器官が増加する変異体の完成胚。
A～D: *are2*、A: 頂部領域にシュートと幼根が、基部領域に幼根が分化している。B: シュートが欠損し、頂部領域と基部領域に幼根が分化している。C: シュートが背側領域に、幼根が頂部領域と基部領域に分化している。D: シュートと幼根の一组が左右に並んで分化し、その中間にもう1つの幼根が分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。
Bars=500 μ m。

表 1-5. *are2* におけるSAMおよび幼根数から見た胚の頻度

SAMの数	幼根の数				計
	1	2	3	4	
0	25.0 (13)	9.6 (5)	5.8 (3)	—	40.4 (21)
1	25.0 (13)	15.4 (8)	9.6 (5)	—	50.0 (26)
2	1.9 (1)	3.8 (2)	—	1.9 (1)	7.7 (4)
3	—	—	1.9 (1)	—	1.9 (1)
計	51.9 (27)	28.8 (15)	17.3 (9)	1.9 (1)	100.0 (52)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、()内の数字は調査した胚の数を示す。

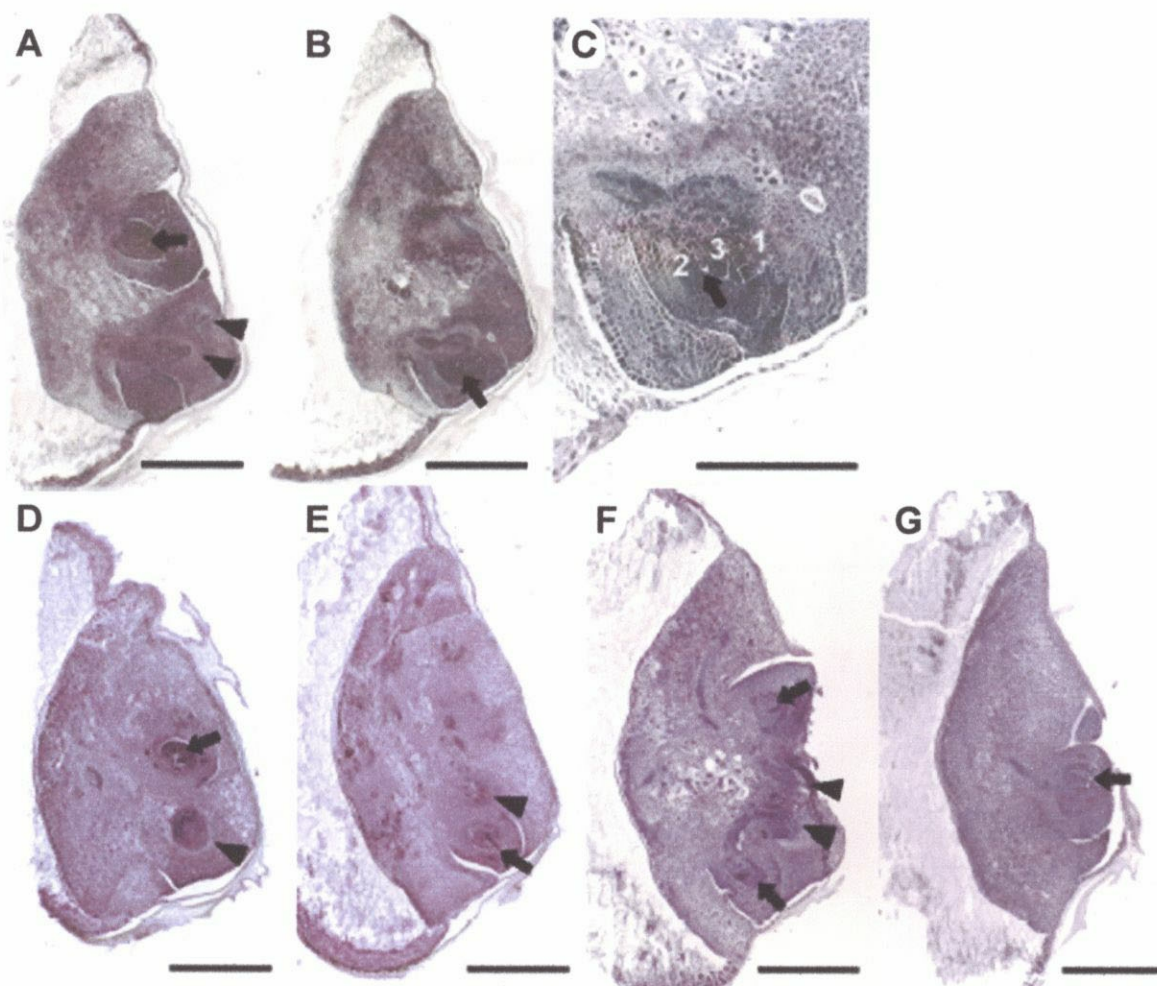


図 1-3. シュートと幼根が増加する変異体の完成胚。A、B : *are1-1* (同一胚の切片)、C : Bの背側領域のシュートの拡大写真、数字は葉位を示す。D、E : *are1-2* (同一胚の切片)、F、G : *are4* (同一胚の切片)、H~K : *odm400* (同一胚の切片)、L、M : *odm87*、L : 腹側領域に本来のシュートと幼根が、背側領域に1つの幼根が分化している。M : 腹側領域に本来のシュートと幼根が、背側領域に1つの幼根と1つのSAMが分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m (A、B、D~M)、300 μ m (C)。

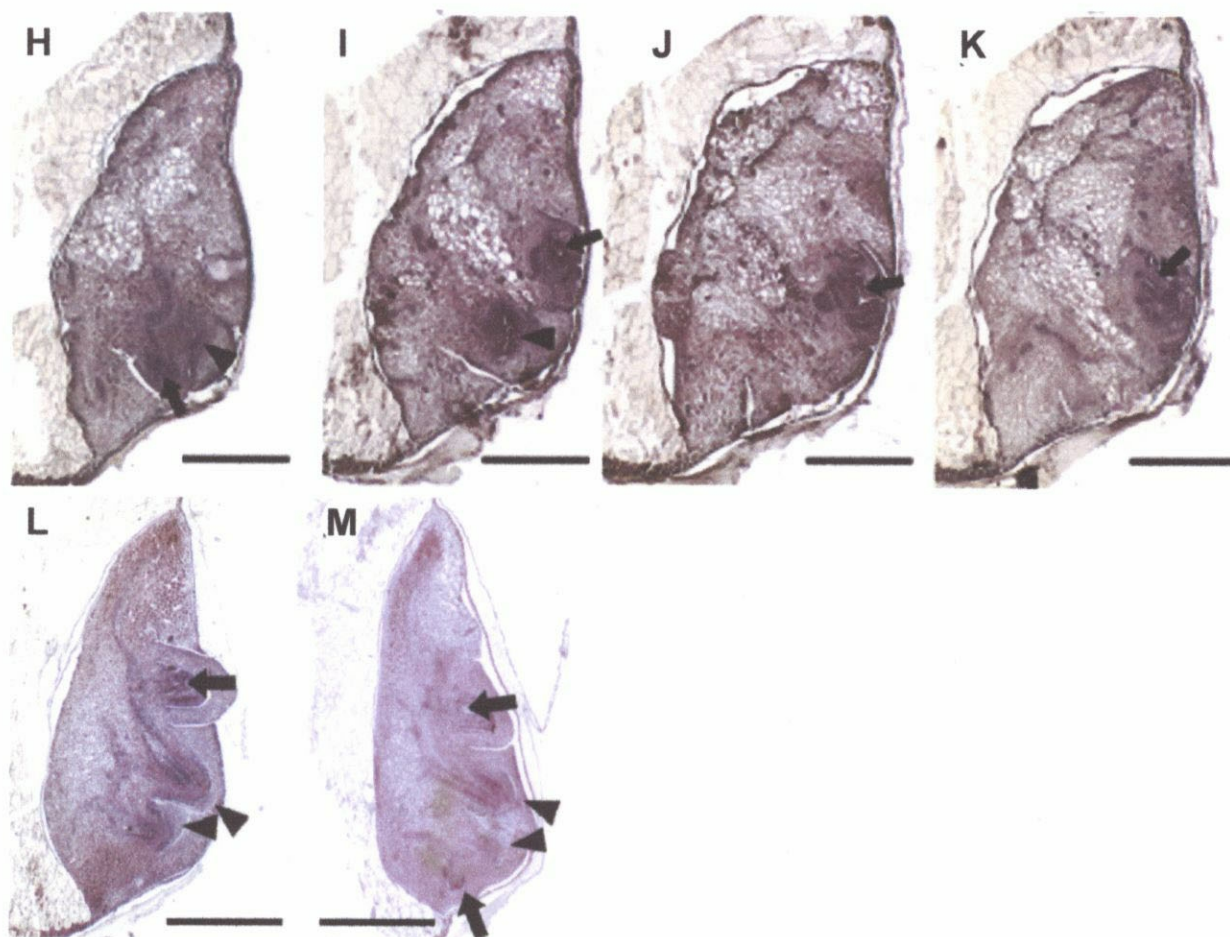


図 1-3. シュートと幼根が増加する変異体の完成胚。(続き)

分化したシュートの葉も本来のシュートに対して鏡像対称に形成されていることも示された（図 1-3C）。このような器官を鏡像対称に増加するパターンは、上記の 4 系統において共通して観察することができた。さらに、これら 4 系統で共通した特徴として、細胞の液胞化がおきており、この現象は特に胚の中央部で顕著に見られた。*odm400* では、細胞が液胞化した領域が胚盤まで拡大し、胚盤上皮組織は正常に分化せず、胚乳との境界に凹凸が見られた（図 1-3H~K）。これら 4 系統間では、胚器官の増加パターンに共通性が見られたが、器官が増加する頻度において相違が見られた。*are1* (*are1-1* と *are1-2* の合計) では、SAM あるいは幼根のいずれかを 3 つ以上分化する頻度が、3.2%と低かったのに対し（表 1-6）、*are4* と *odm400* では、それぞれ 15%、20%と高くなっていた（表 1-7、8）。これは、*are4* と *odm400* では鏡像対称の器官分化に加えて、それ以外にも異所的に SAM あるいは幼根を分化している胚が見られたためである。また、器官が増加した胚の割合は、*are1*、*are4*、*odm400* で、それぞれ約 28%、約 38%、約 43%であった（表 1-6~8）。このことから、*are1*、*are4*、*odm400* における器官数が増加する頻度は、*odm400* が最も高く、続いて *are4*、*are1* の順に低くなっていることが明らかになった。

odm87 は、腹側領域に分化する本来のシュートと幼根に加えて、約 62%の胚で背側領域に、もう 1 つの幼根が（図 1-3L、表 1-9）、5%の胚で背側領域に幼根と SAM が分化していた（図 1-3M、表 1-9）。背側領域に分化した SAM からは、葉原基の分化がほとんど見られず、また、胚における細胞の液胞化も見られなかったため、前述の 4 系統とは異なる器官増加パターンであると考えられた。

巨大胚でシュートと幼根が増加する変異体 (*odm132*)

odm132 は、全ての胚において胚盤が肥大成長する巨大胚であり、約 17%の胚で胚器官の増加が見られた。そのうち約 5%の胚で、腹側領域に本来のシュートと幼根が分化し、背側領域にも腹側領域と鏡像対称に、胚盤、シュートと幼根の一組が分化する器官増加パターンを示した（図 1-4A、B、表 1-10）。

胚発生の観察

野生型と器官増加型変異体における胚発生の観察を行った。野生型胚は、受粉後 3 日目では球状胚であり（図 1-5A）、受粉後 4 日目に頂部領域の腹側に SAM と鞘葉、基部領域に幼根原基を分化開始し（図 1-5B）、受粉後 5 日目には SAM から第 1 葉を（図 1-5C）、受粉後 7 日目には第 2 葉を分化していた（図 1-5D）。

表 1-6. *arel* (*arel-1* と *arel-2*) におけるSAMおよび幼根数から見た胚の頻度

SAMの数	幼根の数				計
	0	1	2	3	
0	8.7 (11)	6.3 (8)	—	—	15.1 (19)
1	4.8 (6)	52.4 (66)	6.3 (8)	—	63.5 (80)
2	2.4 (3)	15.1 (19)	0.8 (1)	0.8 (1)	19.0 (24)
3	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	—	2.4 (3)
計	16.7 (21)	74.6 (94)	7.9 (10)	0.8 (1)	100.0 (126)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、() 内の数字は調査した胚の数を示す。

表 1-7. *are4* におけるSAMおよび幼根数から見た胚の頻度

SAMの数	幼根の数						計
	0	1	2	3	4	5	
0	2.9 (1)	—	—	—	—	—	2.9 (1)
1	11.8 (4)	47.1 (16)	8.8 (3)	—	—	—	67.6 (23)
2	—	2.9 (1)	11.8 (4)	—	—	—	14.7 (5)
3	2.9 (1)	2.9 (1)	5.9 (2)	—	—	2.9 (1)	14.7 (5)
計	17.6 (6)	52.9 (18)	26.5 (9)	—	—	2.9 (1)	100.0 (34)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、（）内の数字は調査した胚の数を示す。

表 1-8. odm400 におけるSAMおよび幼根数から見た胚の頻度

SAMの数	幼根の数				計
	1	2	3	4	
1	57.5 (23)	5.0 (2)	2.5 (1)	2.5 (1)	67.5 (27)
2	7.5 (3)	10.0 (4)	7.5 (3)	—	25.0 (10)
3	2.5 (1)	—	2.5 (1)	—	5.0 (2)
4	—	2.5 (1)	—	—	2.5 (1)
計	67.5 (27)	17.5 (7)	12.5 (5)	2.5 (1)	100.0 (40)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、() 内の数字は調査した胚の数を示す。

**表 1-9. odm87におけるSAMおよび幼根数から見た
胚の頻度**

SAMの数	幼根の数		計
	1	2	
1	33.3 (20)	61.7 (37)	95.0 (57)
2	—	5.0 (3)	5.0 (3)
計	33.3 (20)	66.7 (40)	100.0 (60)

—は観察されなかった組み合わせ、数字は%、
() 内の数字は調査した胚の数を示す。

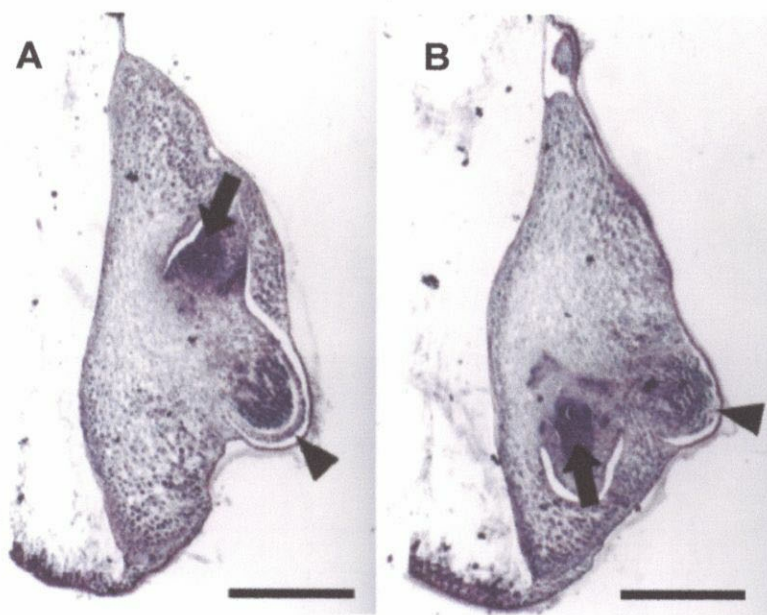


図 1-4. 巨大胚でシュートと幼根が増加する変異体。A、B : *odm132* (同一胚の切片)。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m。

**表 1-10. odm132におけるSAMおよび幼根数から
見た胚の頻度**

SAMの数	幼根の数		計
	1	2	
1	82.7 (67)	6.2 (5)	88.9 (72)
2	6.2 (5)	4.9 (4)	11.1 (9)
計	88.9 (72)	11.1 (9)	100.0 (81)

数字は%、（）内の数字は調査した胚の数を示す。

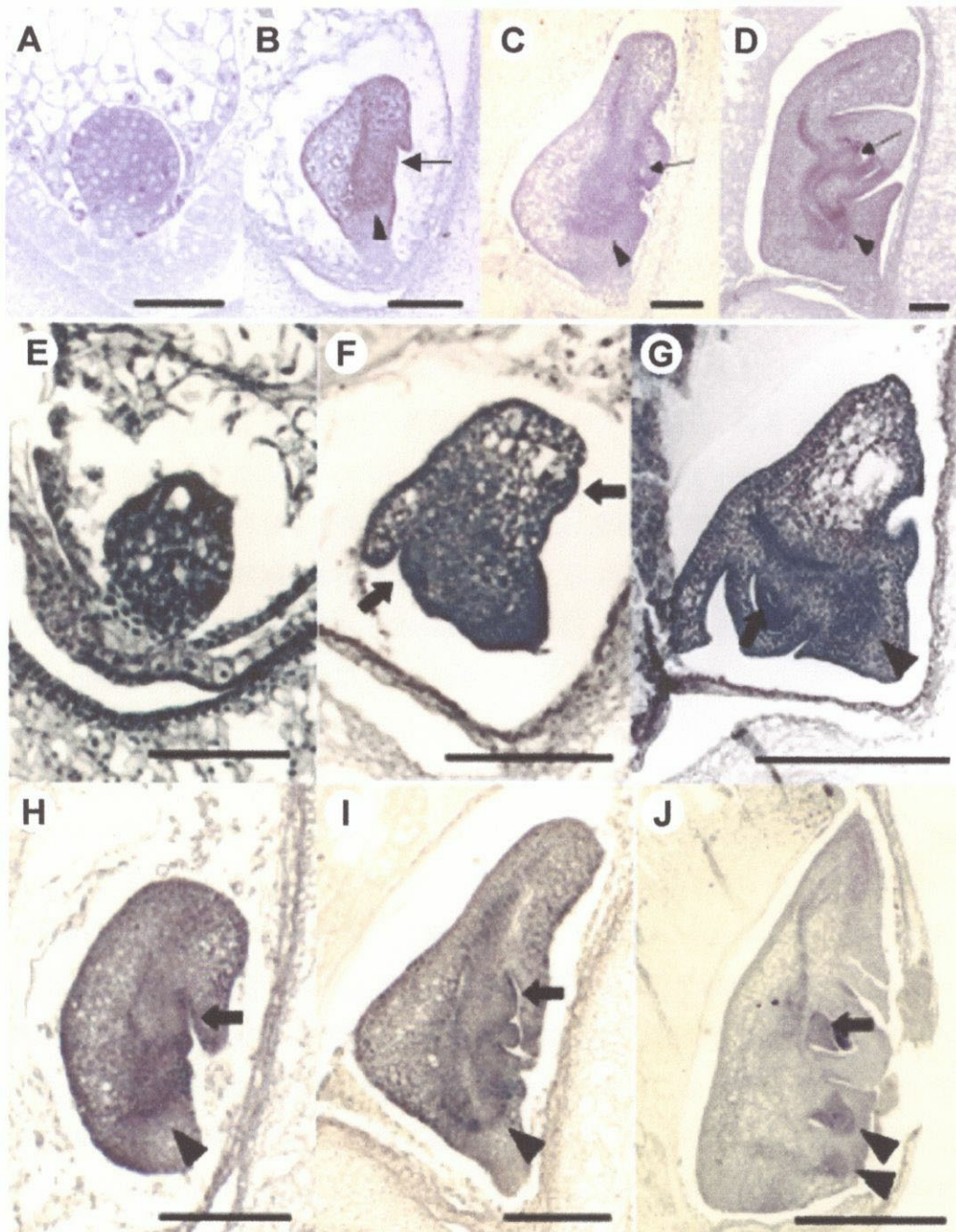


図 1-5. 野生型、*arel-2*、*odm87*の胚発生。A～D：野生型、A：受粉後3日目、B：受粉後4日目、C：受粉後5日目、D：受粉後7日目、E～G：*arel-2*、E：受粉後4日目、F：受粉後6日目、G：受粉後9日目、H～J：*odm87*、H：受粉後5日目、I：受粉後6日目、J：受粉後11日目。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=100 μ m (A～F、H、I)、300 μ m (G)、500 μ m (J)。

mrl は、受粉後 3 日目の球状胚から発生が遅延するという異常が見られ、その後、受粉後 8 日目までは器官分化が観察されず、胚全体の形態は、頂部領域が縮小し、基部領域が拡大した楕円型胚を示した。受粉後 9 日目で、縮小した頂部領域に 1 つの SAM、拡大した基部領域に複数の幼根が同時に分化した（詳細は第 2 章を参照）。*apd1* は、受粉後 4 日目までは、野生型とほぼ同様の発生を示したが、受粉後 5 日目以降から、頂部領域の縮小によって、シュートと胚盤の生育阻害と基部領域の拡大が顕著になり、受粉後 8 日目以降に、拡大した基部領域に 2 つ目の幼根が分化した（詳細は第 3 章を参照）。したがって、幼根が増加する変異体の 2 系統は、頂部領域の縮小と基部領域の拡大がおきる、頂部－基部領域の大きさの制御に異常がおきた変異体であると考えられた。

are2 では、受粉後 5 日目までは球状胚であった。受粉後 7 日目において、SAM は背側領域あるいは、頂部領域において分化を開始し、幼根は頂部領域や基部領域から分化を開始した。完成胚で形成される SAM や幼根は、このステージで同時に分化を開始していた（詳細は第 4 章を参照）。このことから、*are2* では、胚発生初期から頂部－基部軸と背腹軸の配置や極性に異常をきたしたことが示された。

are1-2 は受粉後 4 日目において球状胚であり、一部の細胞に液胞化が見られた（図 1-5E）。受粉後 6 日目では、腹側と背側の領域から同時に鞘葉と SAM が分化を開始している胚が見られた（図 1-5F）。受粉後 9 日目では本来の位置のシュートは細胞の液胞化で痕跡しか見られなかったが、背側領域に第 1 葉までをもつシュートと胚盤を分化した胚が見られた（図 1-5G）。この胚の基部領域には 1 つの幼根を分化していた。このことから、*are1-2* では 2 つのシュートが胚の背側と腹側の領域から同時に分化を開始するために鏡像対称に器官を形成することが明らかになった。このような背側と腹側の領域から同時に器官を分化する胚発生は、*are1-1*、*are4*、*odm400* においても観察された。*are1*、*are4*、*odm400* に見られた器官の増加は、胚発生初期から、背側領域の欠損により、腹側領域が背側領域に複製あるいは拡大したものと考えられた。したがって、これらの系統では、背側領域の分化に異常をきたしたことが示された。

odm87 は、受粉後 5 日目で SAM、鞘葉、第 1 葉と幼根原基を分化していたが、胚全体の形態異常を示した（図 1-5H）。受粉後 6 日目では、頂部領域では胚盤、鞘葉、SAM からは第 1 葉の、基部領域では幼根の発達が見られたが、2 つめの SAM や幼根は見られなかった（図 1-5I）。受粉後 11 日目では、頂部領域においてシュートで第 2 葉までの分化が観察され、背側領域が拡大し、2 つめの幼根を分化していた（図 1-5J）。このことから、*odm87* では本来の器官が分化した後に、背側領域に腹側領域が拡大し、

2 つめの幼根や SAM が分化するものと考えられた。したがって、*odm87* では、器官分化以降の背側領域の維持に異常がおきたと考えられた。

胚発生の解析から、今回同定した 9 系統の中には、軸の形成に異常をきたすものと、領域の分化に異常をきたすものが観察された。また、複数の器官を同時に分化開始するものと、本来の器官を分化した後に、異所的な器官を分化開始するものが観察された。このことから、今回得られた器官増加型変異体は、それぞれ異なる制御プロセスの異常を原因として、器官が増加したことが示された。

OSH1 の発現パターン

胚器官増加型変異体における初期胚の領域分化についての知見を得るため、イネのホメオボックス遺伝子 *OSH1* を用いて *in situ hybridization* を行った。

野生型では、受粉後 3 日目の球状胚において、頂部領域腹側の SAM の分化予定領域で発現を開始し（図 1-6A）、受粉後 4 日目では SAM と幼根の周辺で発現し、根端分裂組織で抑制されるといった発現パターンを示した（図 1-6B）。受粉後 5 日目以降も SAM やその周辺組織で発現していたが、根端分裂組織では発現していなかった（図 1-6C）。

幼根が増加する変異体 *apd1* と *mrl* における *OSH1* の発現解析の詳細は、第 2 章（*mrl*）と第 3 章（*apd1*）で述べるが、*mrl* では観察を行った受粉後 5 日目以降の全てのステージにおいて、*OSH1* の発現領域が縮小していたため、これは頂部領域の縮小を反映したものであると考えられた。*apd1* では、胚発生初期での *OSH1* の発現や組織特異的な発現はほぼ正常であったが、器官分化以降に、基部領域の拡大による発現領域の頂部側へのずれが確認された。

are2 での分子マーカーの発現解析の詳細は、第 4 章で述べるが、*OSH1* の発現には、頂部－基部軸が左右方向に回転したような発現パターンや、背側領域と腹側領域の 2 箇所が発現が見られるなどの異常が認められた。このことから、*are2* は胚の頂部－基部軸と背腹軸の極性が変更されている、あるいは頂部－基部軸が複製されているといった異常がおきたことが示された。

are1-1 では、受粉後 7 日目の球状胚において、腹側領域での発現が胚柄付近で背側領域へ拡大していた（図 1-6D）。受粉後 8 日目においても、胚柄付近において背腹領域で対称的な発現が見られた（図 1-6E）。

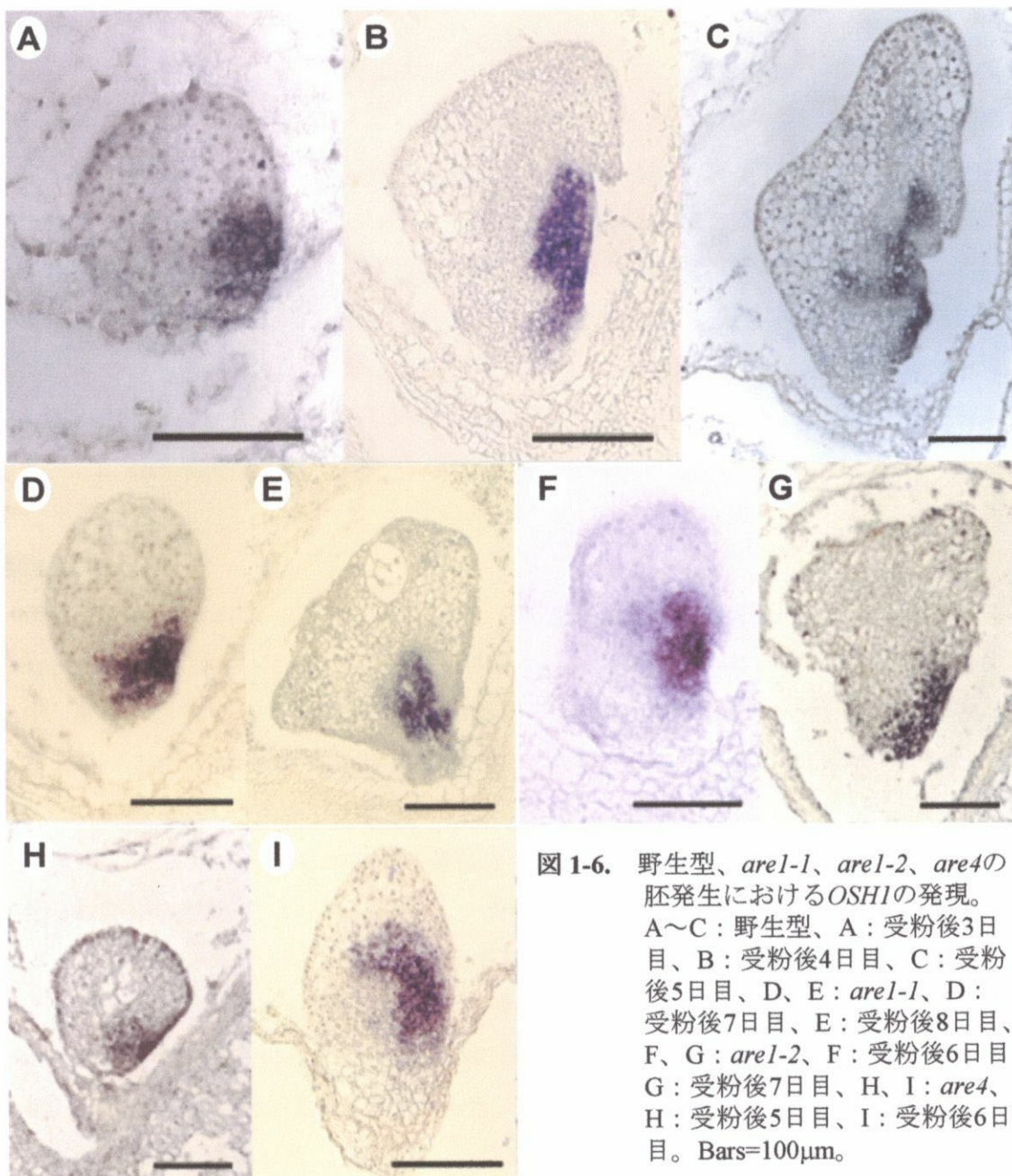


図 1-6. 野生型、*arel-1*、*arel-2*、*are4*の胚発生における $OSH1$ の発現。
A~C: 野生型、A: 受粉後3日目、B: 受粉後4日目、C: 受粉後5日目、D、E: *arel-1*、D: 受粉後7日目、E: 受粉後8日目、F、G: *arel-2*、F: 受粉後6日目、G: 受粉後7日目、H、I: *are4*、H: 受粉後5日目、I: 受粉後6日目。Bars=100 μ m。

arel-2 では、受粉後 6 日目の球状胚では、腹側領域の発現が背側領域へ拡大して見られた (図 1-6F)。受粉後 7 日目では、胚柄付近で背側領域への発現の拡大が見られた (図 1-6G)。

are4 では、受粉後 5 日目の球状胚で、本来の発現よりも背側領域へ発現が拡大している胚が見られた (図 1-6H)。受粉後 6 日目の器官未分化の楕円型胚では、頂部側において背側領域に発現が拡大する胚が見られた (図 1-6I)。

このように、*arel-1*、*arel-2* と *are4* の胚発生初期における *OSHI* の発現は、本来の腹側領域での発現に加え、胚柄付近あるいは頂部側で背側領域への拡大が見られた。

以上の観察から、*arel-1*、*arel-2* と *are4* では、腹側領域で発現する *OSHI* が背側領域へ拡大する傾向が見出された。これら変異体では、胚発生初期の背側領域の欠損によって、腹側領域が背側領域に複製あるいは拡大したものと考えられ、*OSHI* の解析からも、この仮説を支持する結果が得られた。

植物体の表現型

野生型では発芽時にシュートと幼根を 1 つずつ伸長させ、発芽後 14 日目で草丈は約 20cm、幼根の長さは約 12cm になった (図 1-7A)。発芽後 30 日目では、草丈 50cm になり、主茎は第 8 葉までを抽出し、第 3 葉、第 4 葉の腋芽からの分げつの伸長が見られた (図 1-7B)。発芽後 120 日目では出穂、稔実しており、桿長は約 80~90cm、一穂あたりの穎花数は 120~150 程であった (図 1-7C)。

同定した 9 系統の胚器官増加型変異体では、栄養成長期の植物体にも表現型の異常が見られた。*arel-1* では、2 つのシュートの発芽が同時に観察された (図 1-7D)。*arel-1* の 2 つのシュートは、発芽後 5 日目において、いずれも草丈が約 5cm であり、その後もほぼ等しい成長を示した。葉はやや矮化し濃緑色であった。発芽後 60 日目でも草丈は、約 12cm と矮化が見られ、特に葉身の長さが短くなっていた (図 1-7E)。*arel-1* では、分げつ数はほぼ正常であった。受粉後 90 日目では、葉身の長さがほぼ正常に復帰した葉も見られた (図 1-7F)。このことから、*arel-1* における矮化は、栄養成長の初期で強く、その後、徐々に復帰していく傾向があることがわかった。また、*arel-1* と *arel-2* の葉身の表面には白い小さな瘤状の組織が見られたため、*arel-1* の第 7 葉の横断切片を作成し、野生型との比較を行った。その結果、野生型では維管束は葉肉細胞に覆われ、葉身の内部に存在していたが、*arel-1* では維管束鞘細胞が増殖し、葉肉細胞を侵食して表皮まで達しており、この細胞群が瘤として見られることが明らかになった (図 1-7G、H)。葉に瘤ができる変異体としてトウモロコシの *Knotted1* な

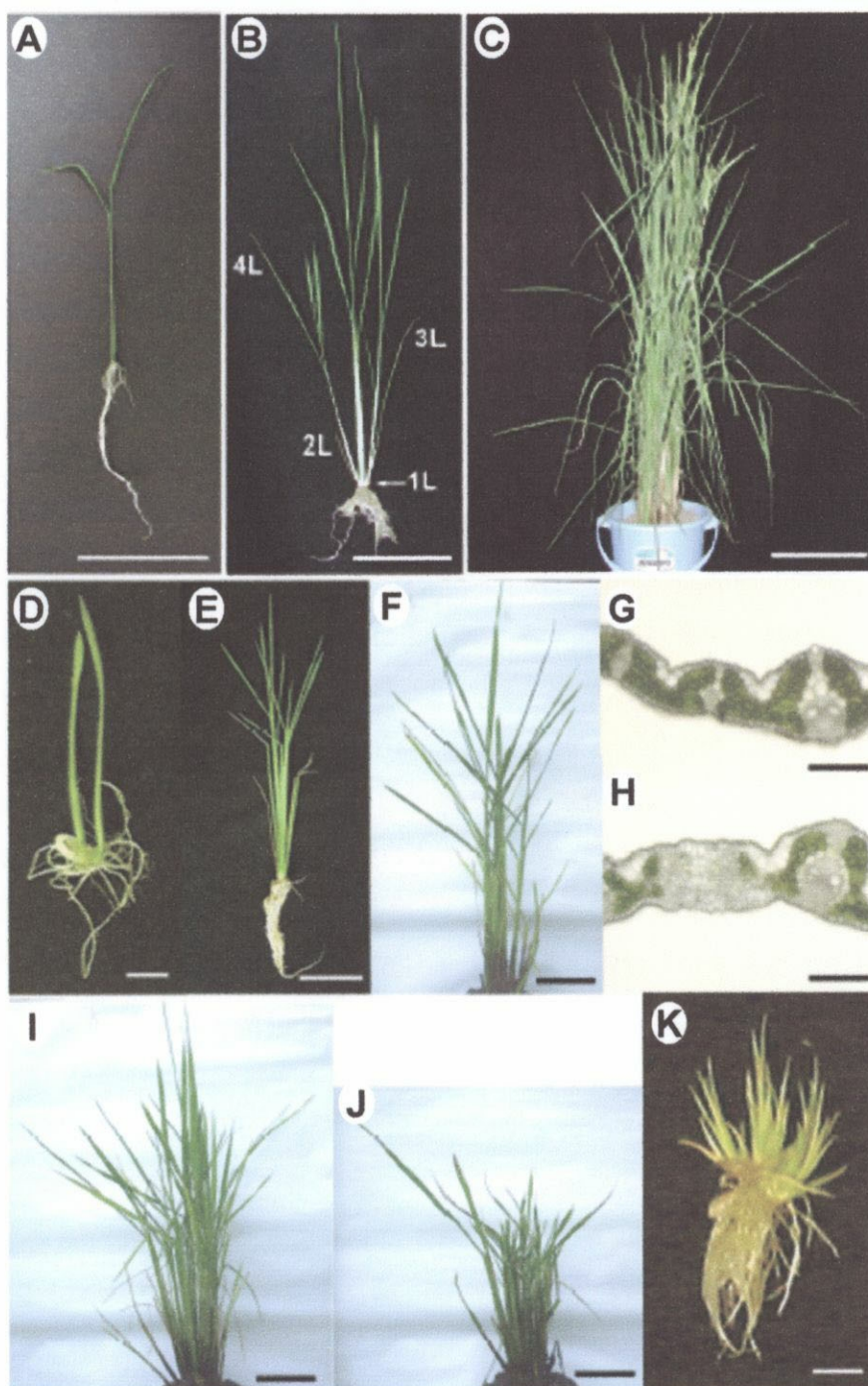


図 1-7. 野生型、*arel-1*、*arel-2*、*are4*、*odm400*の植物体。A～C：野生型、A：発芽後10日目、B：発芽後30日目、1L～4Lは葉位を示す。C：発芽後120日目、D～F：*arel-1*、D：発芽後5日目、E：発芽後60日目、F：発芽後90日目、G：野生型の第7葉の葉身中央横断切片、H：*arel-1*の第7葉の葉身中央横断切片、I：発芽後90日目の*arel-2*、J：発芽後90日目の*are4*、K：発芽後21日目の*odm400*。Bars= 5cm (A、F、I、J)、10cm (B)、20cm (C) 1cm (D、K)、3cm (E)、200 μ m (G、H)。

どの *KN1* タイプ遺伝子が過剰発現する優性変異体が知られているため、*are1-1* の SAM 付近における *OSHI* の発現パターンを解析したが、*OSHI* の発現パターンは正常で、葉での発現は見られなかった。*are1-2* の発芽後 90 日目の植物体は、*are1-1* よりも矮化が強く、分げつが増加する傾向が見られた (図 1-7I)。

are4 においても、2 つのシュートの発芽が同時に見られ、発芽後 90 日目では、*are1-2* よりもさらに矮化と分げつの増加の程度が強く見られた (図 1-7J)。*are1-1*、*are1-2*、*are4* の植物体では、葉序や葉間期に目立った異常は見られなかった。栄養成長期においてこれら 3 系統は、矮化、葉身の瘤、分げつの増加などの類似したの表現型を示した。これら 3 系統は、その後、生殖成長に転換し、稔性は低下しているものの稔実することが確認された。

odm400 の植物体は、受粉後 21 日目において、草丈が 3cm 程度の極矮性で、多いときは 10~15 本程度の分げつを分化していた (図 1-7K)。また、根の伸長も強く阻害されていた。*odm400* は、この状態からほとんど成長せずに発芽後 1~2 ヶ月で枯死したため、生殖成長への転換はいまのところ観察されていない。

odm87 では、発芽後 7 日目で 1 つの白くて弱いシュートの発芽と 2 つの幼根の発根が観察された (図 1-8A)。その後の植物体には、2 種類の表現型が見られた。弱い表現型のものは、発芽後 40 日目では、矮化し、10~15 本の分げつを分化する叢生の草型を示した (図 1-8B)。この植物体では根の伸長も阻害されていた。強い表現型のものは、発芽後 21 日目でほとんどシュートの成長は見られず、胚から複数のシュート状の器官を分化していた (図 1-8C)。この器官の解析を行ったところ、シュート状の器官の基部にはドーム状の構造があり、そこで *OSHI* の発現が見られたため、この器官は SAM を持つシュートであると考えられた (図 1-8D)。SAM の細胞は発芽後 21 日目の時点で液胞化しており *OSHI* の発現も薄くなっていたため、SAM の活性の低下あるいは喪失が、その後、シュートが発生を停止する原因ではないかと考えられた。*odm87* 完成胚では、背側領域には SAM が 1 つしか分化していなかったが、栄養成長期に入ると、胚から 2 つないし 3 つのシュートが分化したことから、胚発生後にも異所的な SAM が分化したことが示された。

odm132 はほとんどの植物体が発芽直後に褐変枯死したため、植物体の解析を行うことができなかった。

以上のように、同定された 9 系統の胚器官増加型変異体では、栄養成長期以降の異常も観察された。胚器官増加型変異体の植物体は、矮化や分げつの増加による叢生の草型を示す傾向が見られた。

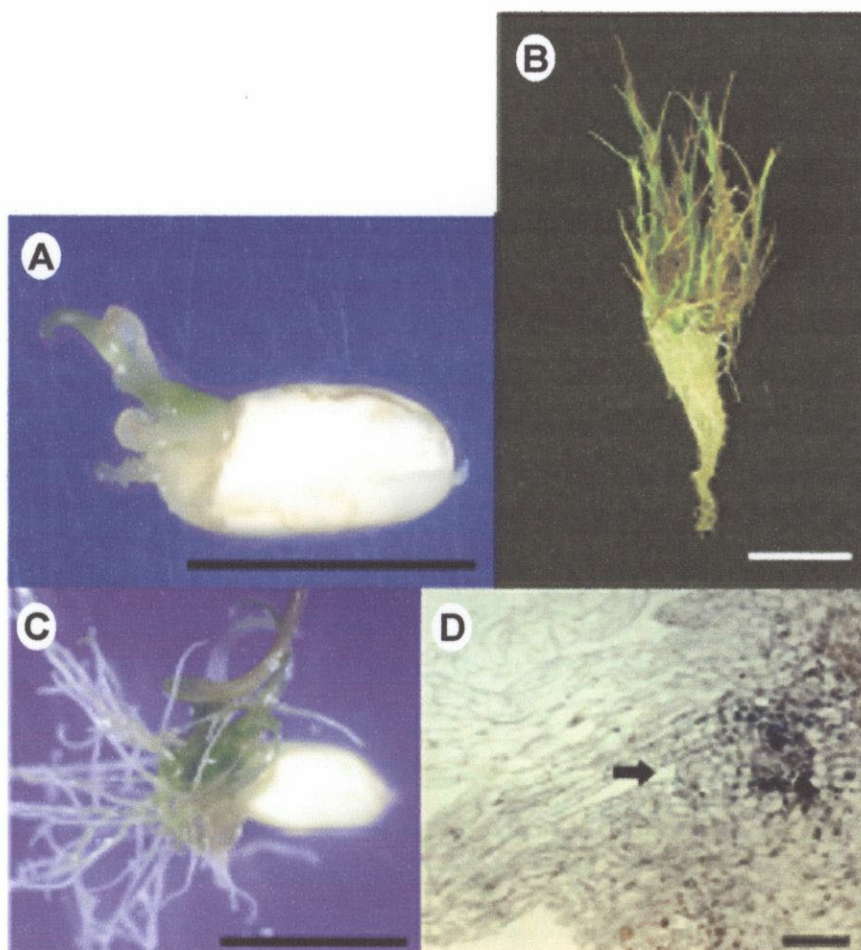


図 1-8. *odm87* の植物体。A：発芽後7日目、B：発芽後40日目、C：発芽後21日目、D：発芽後21日目の背側領域に分化したSAMでの*OSH1*の発現。矢印はSAMを示す。Bars = 1cm (A、C)、3cm (B)、50 μ m (D)。

生殖成長器官の表現型

生殖成長に転換する *arel-1*、*arel-2*、*are4*、*apd1* のうち、*arel-2* と *apd1* の穂と花の形態観察を行った。*apd1* の穂と花の表現型は、ほぼ正常であった（詳細は第 3 章参照）。

野生型の穂では、1 次枝梗は 12~14 本、穎花数は 120~150 程度であった（図 1-9A）。これに対して、*arel-2* の穂は野生型に比べて短く、一次枝梗数は 1 本ないし 2 本、穎花数は 10 程度であった（図 1-9B）。野生型の穎花は外穎と内穎によって閉じていたが（図 1-9C）、*arel-2* では、穎は外穎、内穎ともに細化しており、そのため穎花が閉じていなかった（図 1-9D）。また野生型では、花器官として 2 つの鱗皮、6 本の雄しべと 1 本の雌しべを形成していた（図 1-9E）。これに対して、*arel-2* の花器官では主に雄しべに異常が見られ、花糸の先端に柱頭が分化しているもの（図 1-9F）や雄しべが棒状の器官に転換しているものなど（図 1-9G）が存在した。*arel* における稔性の低下は、これら花器官の異常によって引き起こされていると考えられた。*are4* においても、*arel-2* と類似した、短穂や花器官のアイデンティティ異常といった表現型を示した。このように、*arel-1*、*arel-2* や *are4* では胚発生から生殖成長までライフサイクル全体を通して表現型に異常が見られることがわかった。

二重変異体の解析

胚器官増加型変異体同士、あるいは胚器官欠損型変異体との二重突然変異体を作出し、遺伝子間の相互作用について解析を行った。

arel-1 と完成胚においてシュートのみを欠損する変異体 *shl1-2*（図 1-10A）との二重変異体 *arel-1 shl1-2* は、シュートを欠損し、胚の中央部に 1 つの幼根を分化していた（図 1-10B）。*arel-1 shl1-2* では、シュートを分化していない背側領域の拡大が見られたことから、背側領域に腹側領域が複製あるいは拡大されていると考えられた。このことから、領域の分化においては *arel-1* の表現型が見られ、シュートの形成には *shl1-2* の表現型が見られたといえる。したがって、領域の分化には *ARE1* が上位で機能し、シュート形成には *SHL1* の機能が必須であると考えられた。

arel-1 odm87 は、不安定な器官分化を示し、多様な表現型が見られた。背側領域に 1 つの形態異常のシュートを、基部領域に 2 つの幼根を分化するものなど、いずれのシングルミュータントにも見られない新規の表現型を示した（図 1-10C）。このことか

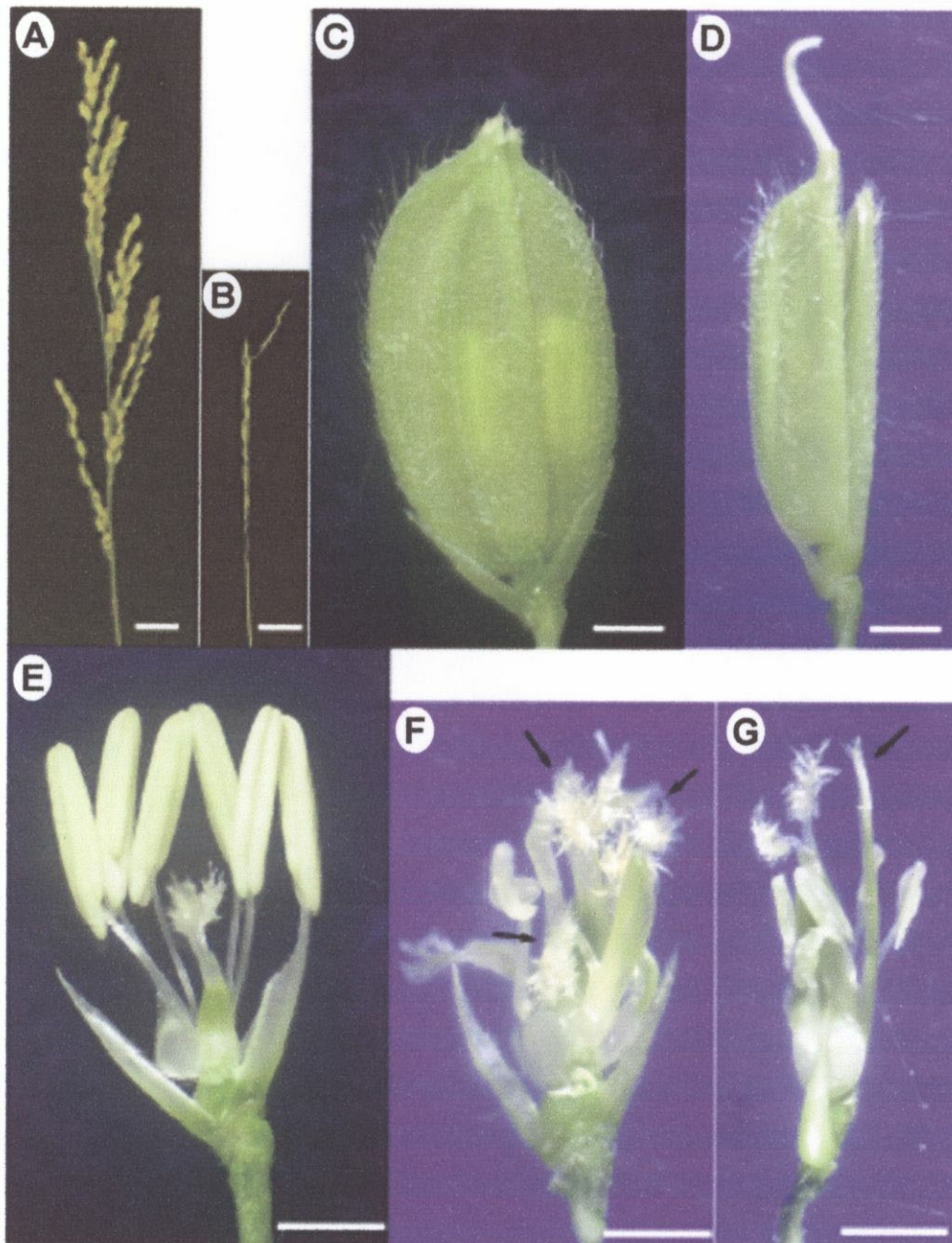


図 1-9. 野生型と *arel-2* の生殖成長期の表現型。A: 野生型の穂、B: *arel-2* の穂、C: 野生型の穎花、D: *arel-2* の穎花、E: 野生型の穎を除去した花、F、G: *arel-2* の穎を除去した花。矢印はアイデンティティ異常の器官を示す。Bars=2cm (A、B)、1mm (C-G)。

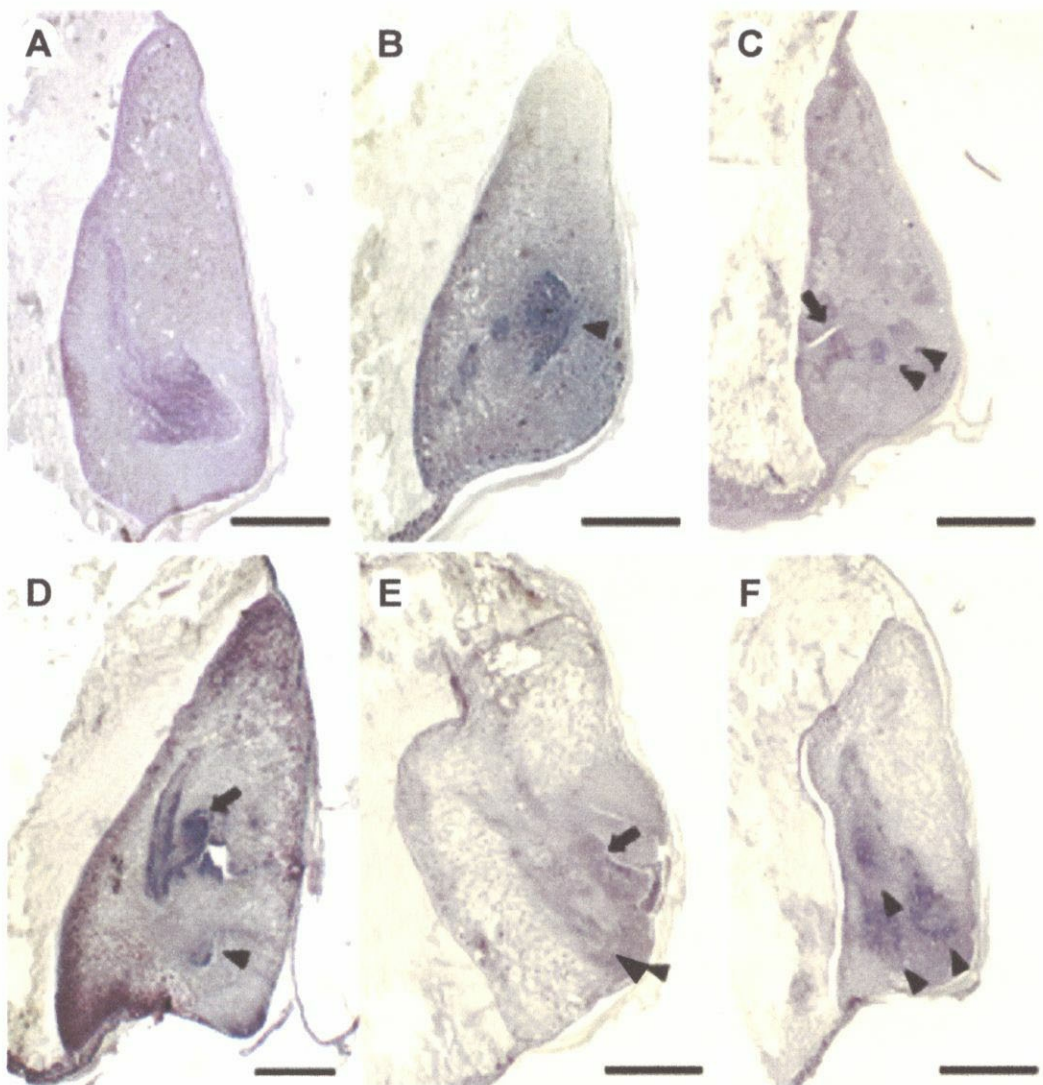


図 1-10. 胚器官増加型変異体を含む二重変異体。A : *shll-2*、B : *arel-1 shll-2*、C : *arel-1 odm87*、D : *odm132 arel-1*、E、F : *mrl are4*、E : 頂部領域にシュートが、基部領域に2つの幼根が分化している。F : シュートが欠損し、基部領域に3つの幼根が分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m

ら、胚の軸の形成あるいは領域分化の制御に、*ARE1* と *ODM87* が冗長的に機能していると考えられた。

odm132 are1-1 では、*odm132* と同様に胚盤が肥大成長する巨大胚を示し、かつ、*are1-1* で見られたような細胞の液胞化が見られた（図 1-10D）。シュートと幼根は全体的に基部領域よりも胚の内部に分化していた。このことから、胚の大きさの制御には、*ODM132* が上位で機能していると考えられた。しかし、観察した 5 つの *odm132 are1-1* からは器官が増加した胚が得られなかったため、腹側領域の背側領域への拡大は確認されなかった。*odm132 are1-1* に関しては、今後、より多くの二重変異体の観察が必要である。

mr1 are4 は、背側領域の細胞が *are4* より広い領域で液胞化し、器官は主に腹側領域の胚柄付近に分化していた。1 つのシュートと 2 つの幼根を分化するもの（図 1-10E）、シュートを欠損し 3 つの幼根を分化するもの（図 1-10F）などが見られた。このことから、*mr1 are4* では、頂部領域はそれぞれのシングルミュータントよりも縮小あるいは欠損しており、基部領域は拡大しているものと考えられた。したがって、*MRI* と *ARE4* は、頂部領域に対して冗長的に、基部領域に対しては冗長的あるいは、いずれかの遺伝子が上位で機能していると考えられた。

mr1 odm87 では新規の表現型が得られず、野生型：*mr1*：*odm87* = 224：99：78 であったため、二重変異体では、*mr1* のような頂部－基部領域の分化異常が起きており、*odm87* のような背腹領域の分化異常は起きていないことがわかった。このことから、*MRI* は *ODM87* の上位で機能すると考えられた。

これら二重変異体の完成胚の表現型からいくつかの遺伝子間の相互関係が推察されたが、遺伝子の冗長的な機能により、二重変異体では複雑な表現型を示すことが多いため、今後も引き続き、詳細かつ広範囲な二重変異体の解析が必要である。

考察

Hong ら（1995）が同定したものと本章において新たに同定されたものを加えると、現在までに、9 系統の胚器官増加型変異体 that 得られたことになる。この 9 系統の解析結果にもとづいて、原因遺伝子の機能を推察し、パターン形成の特徴から 5 つのグループに分類した（表 1-11）。

表 1-11. 胚器官増加型変異体9系統の分類

グループ		胚の表現型	推定される原因遺伝子の機能		変異体名
I	頂部領域の縮小、基部領域の拡大（幼根増加）		頂部－基部領域の大きさの制御		<i>mrl</i>
	背側領域でシュート分化、頂部領域で幼根分化		頂部－基部軸および背腹軸の極性あるいは頂部－基部軸の数の制御		<i>apd1</i>
II	頂部－基部軸の複製				<i>are2</i>
III	背腹領域で鏡像対称に胚器官分化		背側領域の分化		<i>are1-1, are1-2</i>
					<i>are4</i>
					<i>odm400</i>
IV	背腹領域で鏡像対称に胚器官分化、巨大胚		背側領域の分化および胚の大きさの制御		<i>odm132</i>
V	背側領域で胚器官増加		器官分化以降の背側領域の維持と器官分化の抑制		<i>odm87</i>

第 1 のグループには、幼根が増加する変異体 *mrl* と *apd1* を分類した。これらの系統では、頂部－基部軸と背腹軸は正常に形成されていたが、頂部領域の縮小によるシュートや胚盤の発達阻害と、基部領域の拡大による幼根の増加が観察されたため、頂部－基部領域の大きさの制御に異常が起きているものと考えられた。詳細については、*mrl* は第 2 章で、*apd1* は第 3 章で解析を行った。

第 2 のグループには、多様なパターンで器官が増加する *are2* を分類した。完成胚では、頂部領域と基部領域に幼根が分化する、頂部領域や背側領域にシュートが分化する、シュートと幼根の一組を複数分化するなどの表現型が見られた。また、*OSHI* の発現が、左右方向にずれている、2 つの領域に別れているといった異常が見られたことから、頂部－基部軸と背腹軸の極性の変更あるいは、頂部－基部軸の複製がおきた軸異常変異体であると考えられた。*are2* は、第 4 章で詳細な解析を行った。

第 3 のグループには、*are1-1*、*are1-2*、*are4*、*odm400* を分類した。これら 4 系統の完成胚では、典型的な場合、腹側領域に分化する本来のシュートと幼根の一組を、背側領域にも鏡像対称に分化していた。また、胚発生や *OSHI* の解析から、胚発生初期から腹側領域が背側領域に拡大あるいは複製されているものと考えられた。これは、背側領域が欠損したことが原因であると考えられた。したがって、第 3 のグループに属する 4 系統は、背側領域の分化に異常をきたした変異体であるといえた。

第 4 のグループには、*odm132* を分類した。*odm132* の完成胚における器官増加パターンは、第 3 のグループと類似していたため、同様の理由により、背側領域の分化に異常をきたしたものと考えられたが、巨大胚でもあることから、背側領域の分化と胚の大きさの決定との双方に機能する遺伝子に変異を起こしていることが示唆された。イネにおける胚の大きさの制御は、巨大胚変異体 *giant embryo* (*ge*) と、小胚変異体の *reduced embryo* (*re*) の解析から、*GE* と *RE* は胚乳の大きさを決定する因子であることが示されている (Hong *et al.*, 1996)。また、*ge* では胚器官の増加は報告されていない。*ODM132* が胚の領域分化に機能するのであれば、胚側の因子として胚の大きさを制御する新規の遺伝子である可能性が高い。現在のところ、*ODM132* が、胚乳側で機能しているかどうかは不明であるが、一つの遺伝子が胚の領域分化と大きさを制御しているという現象は、パターン形成と胚と胚乳の大きさの制御との関連について情報を得るための変異体として興味深い。

第 5 のグループには、*odm87* を分類した。*odm87* では、胚発生初期においては、軸の形成や領域の大きさに異常は認められなかった。胚発生後期になると、腹側領域が背側領域へと拡大し、この領域に 2 つめの幼根や SAM を分化した。したがって、

odm87 では、本来の胚器官分化後に、背側領域の縮小あるいは欠損によって腹側領域が拡大する、背腹領域の大きさに異常がおきた変異体であると考えられた。SAM は、発芽直後の栄養成長期においても分化することがあったため、ODM87 は背側領域の維持のみでなく、器官の分化の抑制にも機能していることが示唆された。

また、すべての胚器官増加型変異体において、栄養成長や生殖成長における異常が観察されたことから、これらの遺伝子は、多面的な機能を持つことが推測された。植物体における多面的な表現型や、コムギの未熟胚のオーキシン極性輸送阻害剤処理によって、器官増加が報告されていることから (Fischer *et al.*, 1997; Fischer-Iglesias *et al.*, 2001)、器官増加型変異体の原因遺伝子が植物ホルモンに関与する可能性は十分に考えられる。

本章で同定された胚器官増加型変異体 9 系統は、いずれも胚のパターン形成における制御プロセスに異常をきたしたものと考えられ、5 つのグループに分類された。これら 5 つのグループは、軸の形成と領域の分化に関与する制御プロセスに異常をきたしたものであった。軸の形成に関与するグループ II では、頂部－基部軸と背腹軸の極性の変更あるいは、頂部－基部軸の複製がおきたと考えられた。このことから、複数の軸が、1 つの遺伝子によって制御されている場合があることが示された。また、多様な表現型が見られたことから、軸の形成が不安定であることが、胚器官数の増加が見られたことから、軸の異常によって領域の大きさが影響を受けたことが示唆された。

領域の分化に関与するグループでは、グループ I は頂部－基部領域の大きさの制御に、グループ III、IV は背側領域の分化に、グループ V は背側領域の維持に関与していた。したがって、頂部－基部領域と背腹領域は、異なるプロセスで制御されていることが明らかにされた。また、領域間の相互作用を調節する遺伝子、領域の発達を促す遺伝子と一旦分化した領域を維持する遺伝子が存在することが示唆された。軸の形成に異常が起きた場合は、領域の分化にも異常をきたすが、領域の分化に関与するプロセスに異常がおきた変異体では、軸に異常は認められなかったことから、軸の形成プロセスは領域の分化プロセスの上位に存在するものと考えられた。

以上のようなパターン形成に関する知見が得られたため、これまでにほとんど得られていなかった胚器官増加型変異体は、パターン形成に関する遺伝学的解析を行うための材料として、有用であると思われる。