

第2章 幼根を増加する *mr1* 変異体の解析

緒言

胚発生初期における、領域分化プロセスの遺伝学的全貌は、未だ解き明かされてはいないが、近年、シロイヌナズナの胚発生変異体を用いた解析から、新たな知見が得られている。シロイヌナズナの胚は、領域欠損型変異体の解析から、頂部—中央部—基部の3つの主要な領域から構成されていると言われている (Mayer *et al.*, 1991)。この内、頂部領域は、子葉間の境界領域と2つの子葉領域へと、3つの詳細な領域に細分化し、それぞれの領域から SAM と子葉が分化するというモデルが提唱されている (Aida *et al.*, 1997; Aida and Tasaka, 1999)。子葉間の境界領域には *CUC1*、*CUC2* と *STM* が発現しており、2つの子葉領域を分離する機能を持つと言われている。そのため、*cuc1 cuc2* 変異体では、子葉間の境界領域が確立されず、1つのリング状の子葉領域を持つことになり、その結果、カップ状の子葉が形成される。また、*pin1* と *pinoid* (*pid*) では、*CUC1* や *CUC2* の発現領域に異常が起きており、2つの子葉領域が左右非対称に分化した結果、大きな子葉と小さな子葉、あるいは3つの小さな子葉を分化するなどの表現型が見られた (Furutani *et al.*, 2004)。以上のような、隣接する領域の大きさのバランスが維持されることで、正常な器官形成が行われるという胚発生の領域分化モデルが提唱されている。しかし、主要な領域における領域分化モデルは、構築されていない。

隣接する領域の大きさのバランスが維持されているというモデルは、SAM の central-peripheral 領域間の zonation においても知られている。野生型では、細胞が未分化な状態で維持されている central 領域と細胞が側生器官として分化する peripheral 領域の形や大きさは保たれているが、*stm* や *wuschel* (*wus*) では、central 領域の細胞を側生器官として使い果たしてしまい、発生を停止する (Clark *et al.*, 1996; Endrizzi *et al.*, 1996; Laux *et al.*, 1996)。一方で、*clavata1* (*clv1*)、*clv2*、*clv3* 変異体では、central 領域の拡大によって、peripheral 領域の拡大も招き、SAM 全体が巨大化する (Clark, 1997; Kayes and Clark, 1998)。*clv1*、*clv2*、*clv3* では、peripheral 領域の拡大によって、葉や花器官などの数が増加する。

また、*superman* (*sup*) では、花の分裂組織において、ウォール3の拡大によって雄しべが増加し、ウォール4の縮小によって雌しべが萎縮する (Bowman *et al.*, 1992)。*SUP* はウォール3と4の境界で発現していることから、ウォール3のウォール4への

拡大を抑制する、あるいはウォール 3 とウォール 4 の細胞増殖のバランスを制御することでウォール 3 と 4 の境界を決定する機能があると言われている (Bowman *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995)。

以上の隣接する領域間の制御モデルは、ほんの一例であるが、胚の頂部領域の細分化と *sup* の解析から得られたモデルでは、全体の領域の大きさは一定に保たれたままで、ある領域の縮小によって、隣接する領域の拡大がおきるものであった。これに対して、SAM の zonation モデルでは、ある領域の拡大によって、隣接する領域の拡大を招く、あるいは、ある領域の縮小によって、隣接する領域の縮小を招くものであった。また、領域の拡大によって、その領域から分化する器官数が増加したという観察結果がえられた。

一方で、遺伝学的解析とは別に、セイヨウカラシナやコムギの未熟胚に、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、胚器官の欠損や増加が見られたことが報告されている (Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.* 1998; Fischer and Neuhaus, 1996; Fischer *et al.*, 1997)。このことからオーキシンの極性輸送と胚の領域分化や器官数の増加には、関連性があることが強く示唆されている。

第 1 章では、イネの胚器官増加型変異体を同定し、パターン形成の特徴から、5 つのグループに分類を行った。その中の第 1 のグループに属する *mrl* と *apdl* は、頂部一基部領域の大きさに異常をきたす変異体であると考えられた。*mrl* は、完成胚において、縮小した頂部領域に 1 つの未発達なシュートを、拡大した基部領域に複数 (2~4) の幼根を形成していた。したがって、*mrl* は胚における頂部一基部領域の分化機構を明らかにするための有用な変異体であると考え、本章で詳細に解析を行った。

材料及び方法

植物材料

野生型と *mrl* の種子は、2%次亜塩素酸ナトリウムで滅菌した後、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。*mrl* 植物体は、プラントボックス内で 28°C で培養した。

パラフィン切片

第 1 章と同様の方法で行った。

***in situ* hybridization**

組織サンプルの準備は、第 1 章と同様の方法で行った。ジゴキシゲニンでラベルされた 2 種類のアンチセンスプローブを、それぞれポリ A 末端を含まない *OSH1* と *OsSCR* 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、第 1 章と同様の方法で行った。

植物体の 2,4-D 処理

エタノールを溶媒とした 2,4-D をろ過滅菌した後、2,4-D 濃度がそれぞれ、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M となるように MS 培地（植物材料参照）に添加した。野生型と *mr1* の種子を、2,4-D を添加した MS 培地に播種し、播種後 14 日目において、草丈、幼根長と冠根数を計測した。

二重変異体の作出

mr1 と器官欠損型変異体 *sh11-2* と *ral2-1* のヘテロ接合の植物体同士を交配し、 F_3 世代種子を用いて完成胚の観察を行った。

結果

***mr1* 完成胚の表現型**

mr1 の完成胚では、頂部領域に 1 つの未発達シュートを、基部領域に 1~4 つの幼根を分化していた（図 2-1）。すべての *mr1* において、シュートは形態異常を示し、第 1 葉ないし第 2 葉までの分化が見られた。シュートの向きは、腹側を向いている場合（図 2-1A）、左右方向を向いている場合（図 2-1B）が見られた。SAM のサイズは、野生型では高さ約 $45\ \mu\text{m}$ 、幅約 $40\ \mu\text{m}$ であったが、*mr1* では高さ $15\sim 70\ \mu\text{m}$ 、幅 $45\sim 90\ \mu\text{m}$ とばらつきが多く、*mr1* の SAM は野生型よりも扁平化している傾向が見られた。

増加した幼根の位置は、基部領域に限定されていた。*mr1* の約 65% で複数の幼根が分化し、そのうち 2 つの幼根が分化するものは 45%、3 つの幼根が分化するものは 17%、4 つの幼根が分化するものは 3% であった（表 1-3）。幼根が増加したときの配列は、頂部-基部方向に並んだものが変異体の約 40% を占めたが（図 2-1A）、背腹方向に並んだもの（図 2-1B）、左右方向に並んだもの（図 2-1C）もそれぞれ 13% ずつ

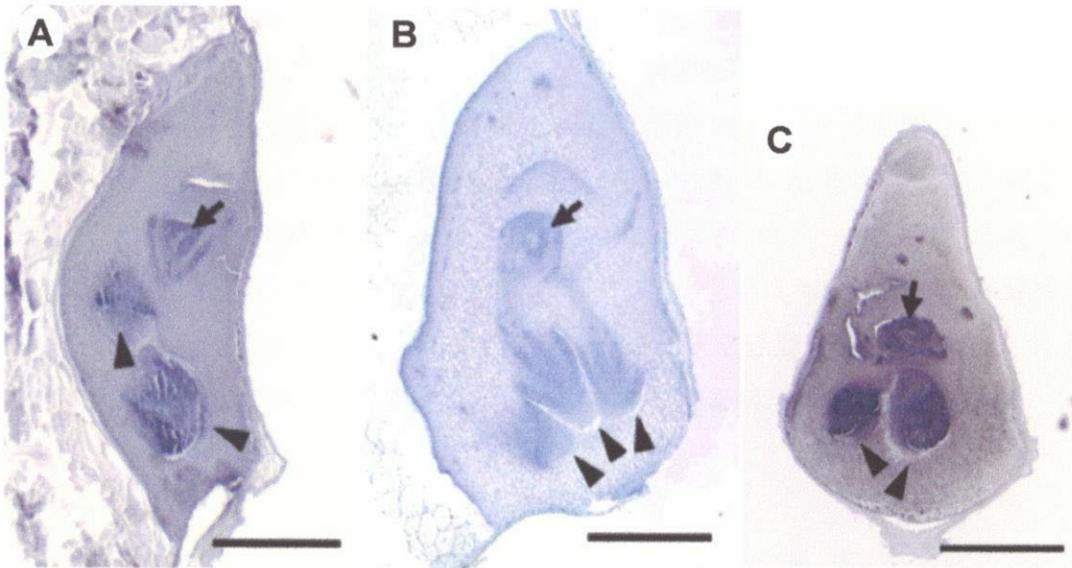


図2-1. *mr1*の完成胚。A：基部領域に頂部－基部方向に並んで2つの幼根を分化している。B：基部領域に背腹方向に並んで3つの幼根を分化している。C：左右方向の縦断切片。基部領域に左右方向に並んで2つの幼根を分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m。

存在した。このことから幼根が増加する方向は、一定ではないことが示された。幼根が増加した場合、それぞれの幼根のサイズは、野生型より小さいものの、表皮、皮層、内皮、維管束といった組織を正常に分化していた。幼根が増加した胚では、シュートとそれぞれの幼根の間に維管束が形成されていること、幼根の位置関係が一定でないことから、本来の幼根と付加的な幼根の区別はつかなかった。

胚長は野生型で 1800~2000 μm であったのに対し、複数の幼根が分化した *mr1* では 1500~1700 μm と短くなっていた。第 1 章において、*mr1* では頂部領域が縮小し基部領域が拡大するとの観察結果が得られているため、頂部領域と基部領域の境界線をシュートと幼根の中点を通る胚長に対する垂線として、完成胚における胚長と頂部と基部領域の長さを計測した (図 2-2)。その結果、頂部領域長は野生型では約 1400 μm であったのに対し、複数の幼根が分化した *mr1* では約 950 μm と野生型よりも 450 μm 短かった (図 2-2B)。一方、基部領域長は野生型では約 510 μm のところ、複数の幼根が分化した *mr1* では約 600 μm と約 90 μm 長くなっていた (図 2-2B)。このことは、頂部領域の縮小と基部領域の拡大を反映しているものと考えられた。以上の観察から、*mr1* では縮小した頂部領域に 1 つの未発達のシュートを分化すること、拡大した基部領域に、高い頻度で複数の幼根を分化することが明らかになった。

mr1 の胚発生

mr1 は受粉後 3 日目において、100 以下の細胞からなる胚長 50 μm 程度の小さな球状胚であり、すでにこのステージで野生型との違いが見られた (図 2-3A)。*mr1* では受粉後 6 日目で胚長 200 μm 程度の楕円型胚であり、器官分化は見られなかった (図 2-3B)。胚長 200 μm 程度の胚を比較すると、*mr1* では野生型より頂部領域が縮小し、基部領域が拡大しているため胚全体の形の違いが明確に見られた (図 1-5A、図 2-3B)。受粉後 7 日目では将来の幼根に対応すると思われる、小さく密な細胞群が基部領域で観察された (図 2-3C)。この細胞群は野生型に比べて基部領域で拡大していた。*mr1* では胚発生を通して、シュートの発生が遅れており、受粉後 9 日目で鞘葉と第 1 葉の分化が確認された (図 2-3D)。基部領域では 2 つの幼根原基が同時に分化を開始していた。受粉後 12 日目では、鞘葉、SAM、複数の幼根など完成胚で見られるほぼすべての胚器官が形成された (図 2-3E)。*mr1* ではその後、シュートの発達は旺盛ではなく、1 つないし 2 つの葉原基が分化した後、種子休眠に入った。

mr1 は野生型に比べて、拡大した基部領域を持つと見られたため、胚発生における頂部領域と基部領域の長さを計測した。頂部領域と基部領域は、前述のものと同様に定

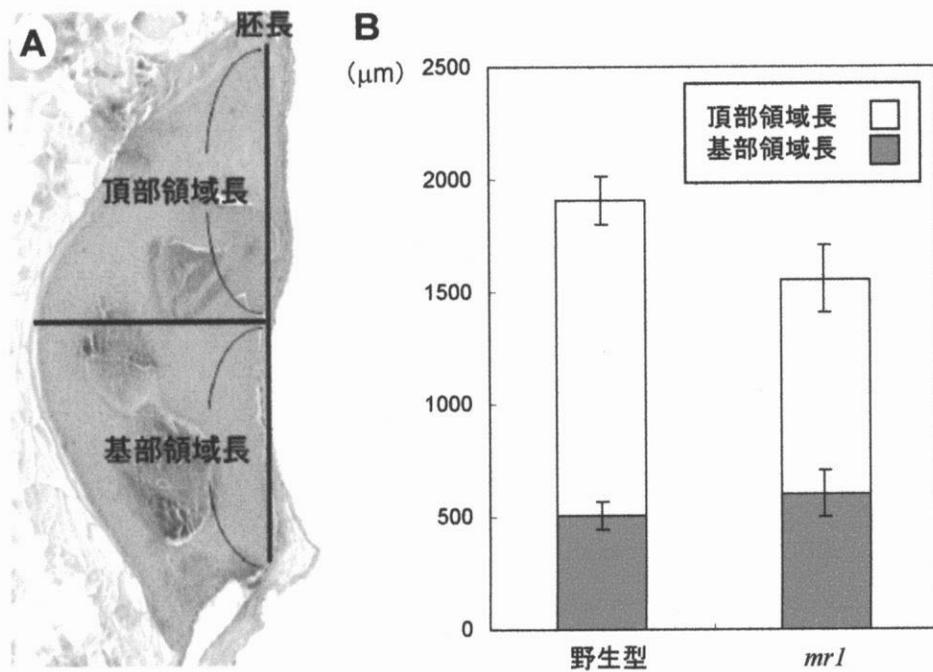


図2-2. 野生型と *mr1* の完成胚における胚長、頂部領域長と基部領域長。
 A: 胚長、頂部領域長と基部領域長の定義。胚長は胚柄から頂端までの長さ。頂部領域と基部領域の境界線はシュートと幼根の間を通る、胚長に対する垂線とした。B: 野生型と複数の幼根が分化した *mr1* の胚長、頂部領域長と基部領域長。

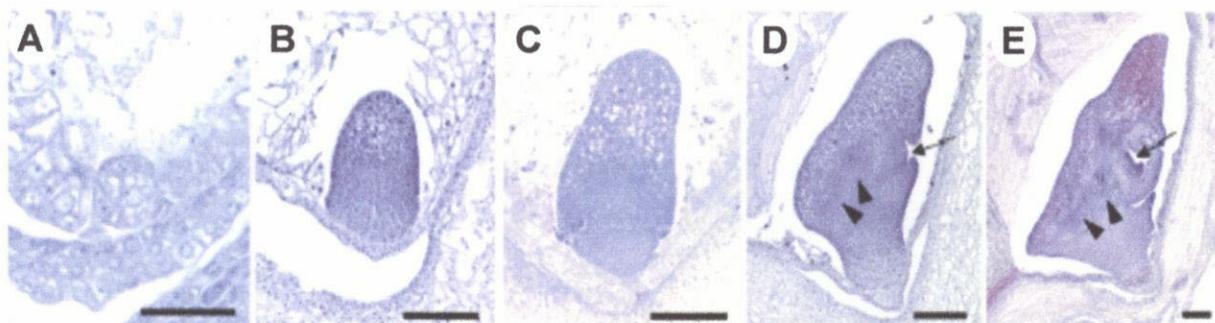


図2-3. *mr1*の胚発生。A：受粉後3日目、B：受粉後6日目、C：受粉後7日目、D：受粉後9日目、E：受粉後12日目。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=50 μ m (A)、100 μ m (B~E)。

義した (図 2-2A)。また、横軸に胚長をとり、同じ胚長の時の野生型と *mr1* における頂部-基部領域の長さを比較した。その結果、*mr1* の頂部領域の長さは、計測を行ったいずれのステージにおいても野生型に比べて短い傾向を示した (図 2-4A)。一方で、*mr1* の基部領域長は、計測を行ったいずれのステージにおいても野生型より大きな値を示した (図 2-4B)。

以上の結果から、*mr1* では胚発生初期から、頂部領域の縮小と基部領域の拡大がおきており、頂部-基部領域の大きさは補償的な関係にあることが推測された。また、拡大した基部領域には、複数の幼根が同時に分化を開始することが明らかになった。

mr1 における *OSHI* と *OsSCR* の発現

mr1 における胚の領域分化の調査を行うため、本章では *OSHI* と *OsSCR* をプローブとして *in situ hybridization* を行った。

mr1 における *OSHI* の発現は、受粉後 5 日目から見られた (図 2-5A)。発現領域は頂部領域の腹側で見られたが、発現領域が縮小し、頂部側へのずれが見られた。受粉後 6 日目でも発現領域の縮小が見られた (図 2-5B)。*OSHI* の発現解析から、*mr1* では SAM 分化予定領域が縮小し、正常な発達を行っていないことが明らかにされた。このことから、*mr1* では胚発生初期から、頂部領域が縮小し、シュートの発生が遅延していることの要因となっていると考えられた。

次にシロイヌナズナの *SCARECROW* (*SCR*) のイネにおける相同遺伝子 *OsSCR* をプローブとして発現解析を行った。野生型では、受粉後 3 日目の球状胚において、表皮より 2、3 細胞内側でリング状の発現が見られた (図 2-6A)。受粉後 4 日目の鞘葉分化期では、幼根の内皮でアーチ状の発現が見られた (図 2-6B)。受粉後 5 日目では、幼根の内皮での発現は継続しており、新たに若い葉原基や SAM の L1 でも発現が見られるようになった (図 2-6C)。

mr1 では受粉後 5 日目からリング状の発現が見られ、発現領域は頂部側にずれており、発現の見られない基部側の領域が野生型よりも拡大していた (図 2-6D)。受粉後 7 日目では基部領域で *OsSCR* を発現する部位の増加が見られた (図 2-6E)。受粉後 9 日目では、*OsSCR* の発現は、幼根の内皮でアーチ状に見られ、2 つの幼根に対応した位置での発現が確認された (図 2-6F)。このことから、*mr1* では、受粉後 7 日目頃から、基部領域で *OsSCR* の発現部位が増加を開始したことが明らかにされた。

in situ hybridization と胚発生の結果から、*mr1* では受粉後 5 日目から、頂部領域で SAM 分化予定領域の縮小と基部領域の拡大がおきていることがわかった。その結果、

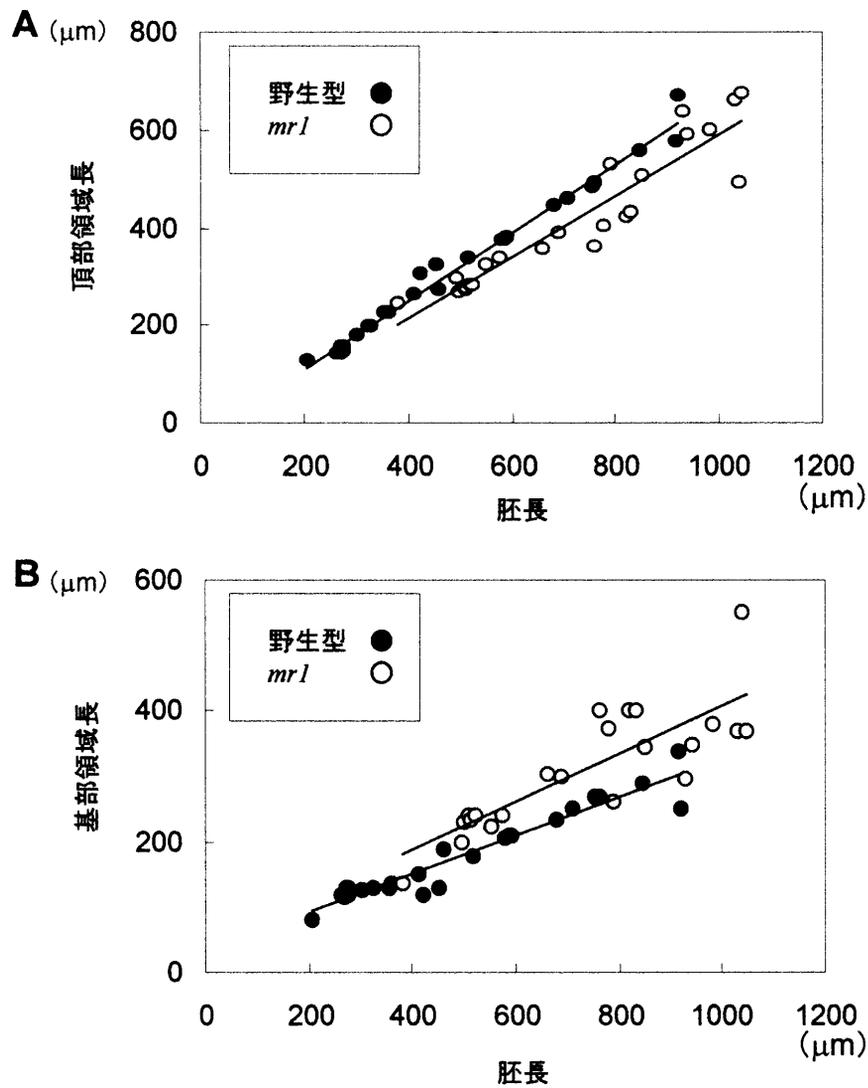


図2-4. 野生型と*mrl*の胚発生における頂部領域長と基部領域長。
A：頂部領域長、B：基部領域長。頂部領域と基部領域の境界線の定義は、図2-2と同様に行った。黒丸は野生型、白丸は*mrl*、直線は近似直線を示す。

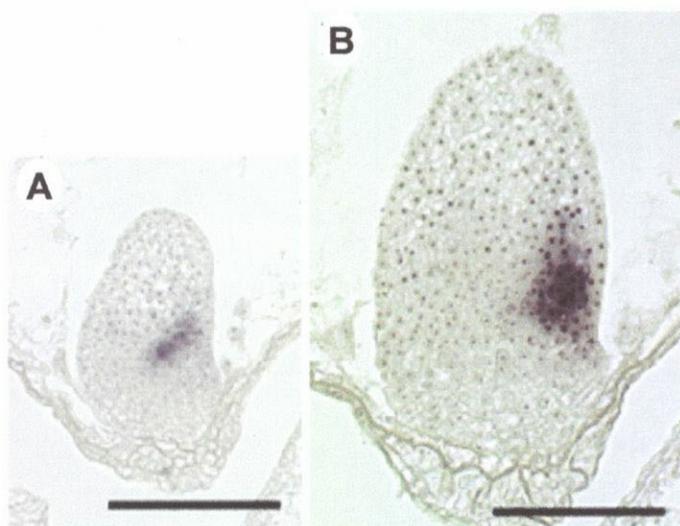


図2-5. *mrl*における*OSH1*の発現パターン。A：受粉後5日目、B：受粉後6日目。Bars=100 μ m。



図2-6. 野生型と *mr1* における *OsSCR* の発現パターン。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~F: *mr1*、D: 受粉後5日目、E: 受粉後7日目、F: 受粉後9日目。Bars=50µm (A、D)、100µm (B、E)、200µm (C、F)。

基部領域では、受粉後 7 日目に幼根分化予定領域が増加していた。したがって、*mr1* では、胚発生初期において、頂部領域の縮小を基部領域の拡大が補うような補償的な制御が行われていることが示唆された。

mr1 植物体の表現型

mr1 胚からは、発芽時に 1 つの貧弱なシュートと複数の幼根が伸長した (図 2-7A)。発芽後 30 日目では、主茎の葉と分げつの葉の長さはほぼ等しいか、分げつの葉の方がより長くなっていた (図 2-7B)。また、分げつ数の増加も旺盛で、10 本以上の分げつが見られた。発芽後 120 日目の *mr1* は、草丈 20cm 程度で、出穂していなかった (図 2-7C)。その後も約 1 年程度の生育を行ったが、生殖成長への転換は観察されなかった。栄養成長全体を通して、*mr1* のシュートには多面的な異常が見られたため、*mr1* のシュートに見られるいくつかの特徴について詳細を解析した。

第 1 の特徴は、著しく矮化したことであった。発芽後 30 日目までの野生型と *mr1* の草丈を計測したところ、発芽直後から伸長が強く阻害されていた (図 2-8A)。伸長を完了した第 7 葉の葉身と葉鞘を合計した長さは、野生型では約 50cm であったが、*mr1* では約 4cm であった (図 2-8B)。また、第 7 葉葉身の中央付近の幅は、野生型において約 6mm であったのに対し、*mr1* では約 2mm であった (図 2-8C)。このように *mr1* のシュートでは、葉の長さ、幅ともに野生型の同じ葉位の葉よりも伸長が強く阻害されていた。そこで、シュートにおける細胞分裂の活性を調査するため、細胞分裂の S 期に発現する *Histone H4* の発現を発芽後 10 日目のシュートで解析した。その結果、*mr1* の葉原基では *Histone H4* のシグナルが野生型よりも著しく減少していた (図 2-8D、E)。特にプラストクロン 4 以降の葉原基では発現がほとんどみられなくなっていた。このことは、*mr1* の葉原基における細胞分裂活性の低下を示した。また、SAM では野生型は 1~2 シグナルであったのに対し、*mr1* では 4~5 シグナルが観察された (図 2-8D、E)。このことから、*mr1* では SAM や葉原基での細胞分裂のパターンに異常をきたしており、シュートの伸長阻害との関連が示唆された。

第 2 に、非常に多くの分げつを伸長することがあげられた (図 2-9A)。そこで、主茎において、分げつ芽が伸長するタイミングについて解析を行った。野生型では、SAM から第 5 葉が分化するステージにおいて、第 1 葉の分げつ芽はプロフィールを分化し、第 2 葉の分げつ芽は伸長を開始していなかった (図 2-9B)。このように、野生型ではプラストクロン 5 の葉原基の分げつ芽から、伸長を開始していた。しかし、*mr1* では同じステージにおいて、第 1 葉の分げつ芽は第 1 葉を、第 2 葉の分げつ芽も第 1



図2-7. *mrl*の植物体。A：発芽後7日目、B：発芽後30日目、C：発芽後120日目。Bars=1cm (A、B)、10cm (C)。

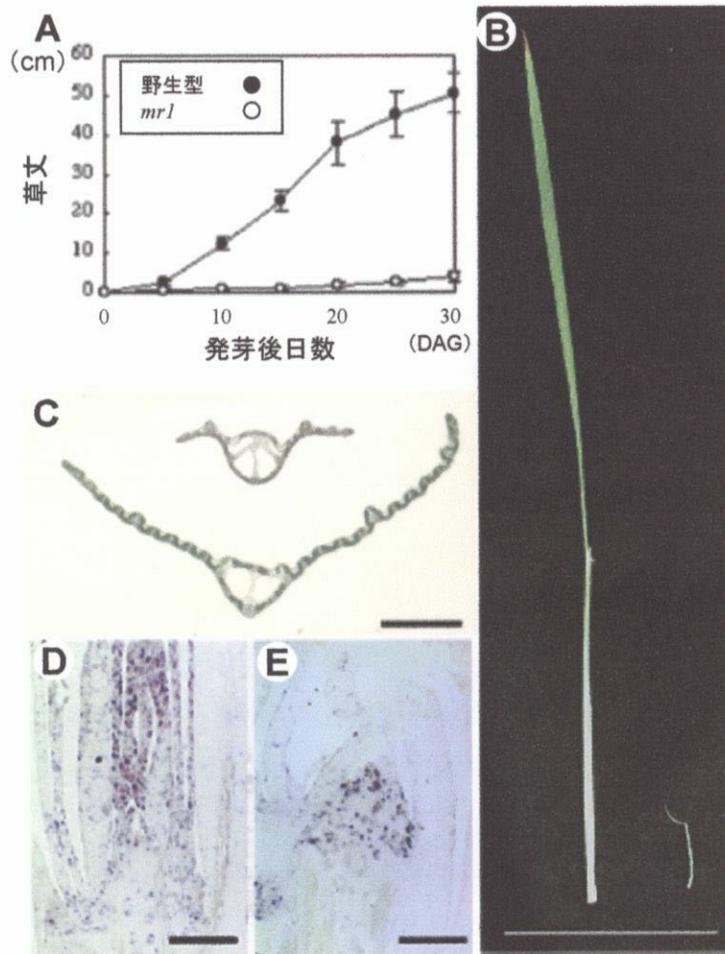


図2-8. 野生型と *mr1* の草丈、第7葉、SAM付近における *Histone H4* の発現パターン。A: 野生型と *mr1* の発芽後30日目までの草丈、B: 野生型 (左) と *mr1* (右) の第7葉、C: 野生型 (下) と *mr1* (上) の第7葉葉身中央部の横断切片、D、E: 発芽後10日目のSAM付近縦断切片における *Histone H4* の発現パターン、D: 野生型、E: *mr1*。Bars=10cm (B)、1mm (C)、200 μ m (D、E)。

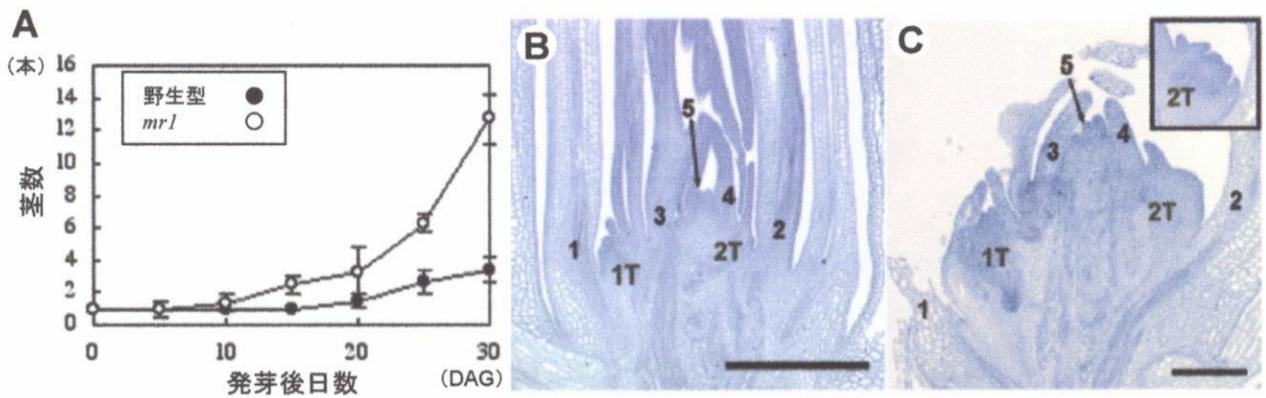


図2-9. 野生型と *mr1* の分げつ数とSAM付近の縦断切片。A：野生型と *mr1* の発芽後30日目までの茎数（主茎と分げつの合計数）、B：野生型の第5葉分化期（発芽後5日目）のSAM付近縦断切片、C：*mr1* の第5葉分化期（発芽後7日目）のSAM付近縦断切片。右上は同一個体の第2葉分げつ。数字は葉位、1 Tは第1葉分げつ、2Tは第2葉分げつを示す。Bars=200 μ m。

葉の分化を開始していた（図 2-9C）。このように *mr1* では、プラストクロン 4 の葉原基の分げつ芽から伸長を開始していた。加えて、野生型の 2 次分げつは発芽後 30 日目に伸長を開始するが、*mr1* の 2 次分げつは発芽後 14 日目に伸長を開始していた。以上のことから *mr1* では、分げつ芽が伸長を開始するタイミングが野生型より早くなっていることが示された。したがって、*mr1* では、頂芽優勢が弱まっている可能性が示唆された。

第 3 に、*mr1* では SAM の成長に異常が見られたことである。発芽後 7~40 日目までの野生型と *mr1* における SAM の高さ、幅を計測したところ、高さ、幅ともに *mr1* では野生型より小さい値を示した（図 2-10A、B）。発芽後 80 日目の生殖成長に転換する直前における、野生型の SAM のサイズは、高さ約 85 μm 、幅約 130 μm であった。しかし発芽後 80 日目の *mr1* においては、高さ約 40 μm 、幅約 70 μm であった。この値は、発芽後 40 日目のものとほぼ同じであり、*mr1* の SAM が正常な成長を行っていないことを示していた。このことが原因で、*mr1* が生殖成長に転換しない可能性が考えられた。

第 4 に、*mr1* 植物体はスクロースを含む栄養培地上でのみ生育できることである。培地からスクロースを除去した場合、*mr1* は 2 か月以上生き延びることができなかった。葉の縦断切片から、*mr1* の葉肉細胞に含まれる葉緑体が、野生型に比べ非常に少なく、細胞の空胞化も見られたため（図 2-11A、B）、*mr1* では葉緑体が少ないことなどが原因で代謝の異常がおき、生育にスクロースを必要とした可能性が示唆された。

mr1 のシュートでは上記のように多面的な表現型が観察されたが、一方で、根系には大きな異常は見られなかった。一個体当たりの根の数は、分げつの増加により *mr1* の方が多かったが、一節当たりから分化する冠根数は、野生型と *mr1* とともに、第 1 節では 6 本であり、ほぼ等しかった（図 2-12A、B）。幼根と冠根は、伸長速度は野生型より遅かったが、幼根、冠根とも表皮、皮層、内皮、維管束、根端分裂組織には、形態的な異常は認められなかった。したがって、*mr1* ではシュートに異常を持つ変異体であると結論づけられた。

オーキシンに対する *mr1* 植物体の反応

コムギなどではオーキシンによって胚器官の増加が促されるとの報告がなされていること、*mr1* ではシュートにおいて多面的な表現型が観察されたことから、*mr1* では植物ホルモンに関する異常が生じている可能性が考えられた。そこで、通常の MS 培地（無処理区）をコントロールとして、合成オーキシン 2,4-D をそれぞれ 10^{-9} 、 10^{-8} 、

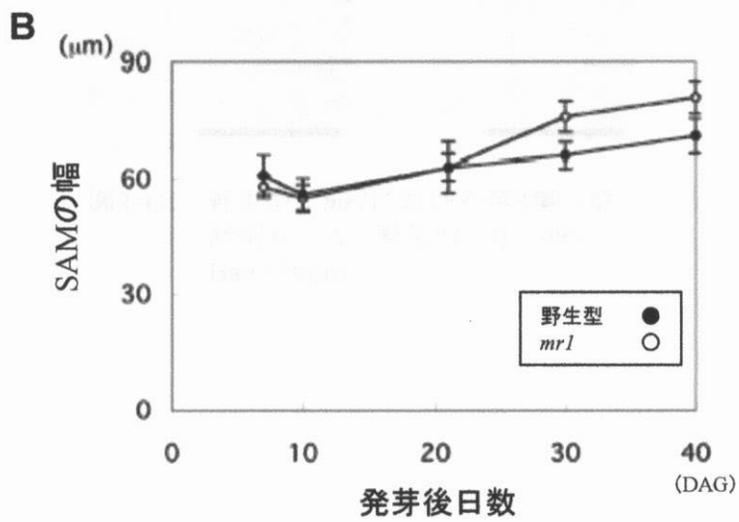
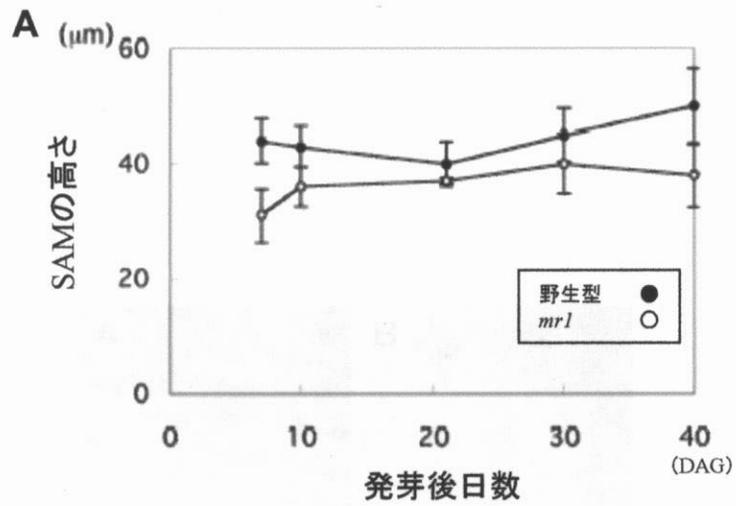


図2-10. 野生型と *mr1* におけるSAMの高さと幅。A : SAMの高さ。B : SAMの幅。

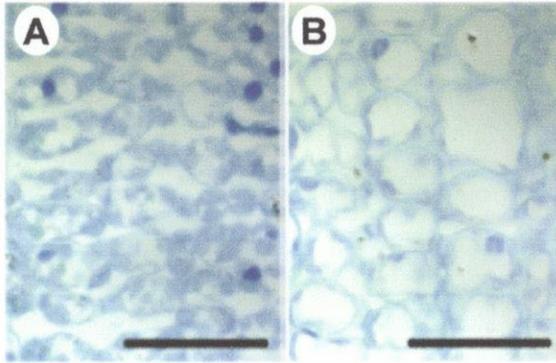


図2-11. 野生型と *mrl* における第8葉の縦断切片。A：野生型、B：*mrl*。
Bars=50 μ m。

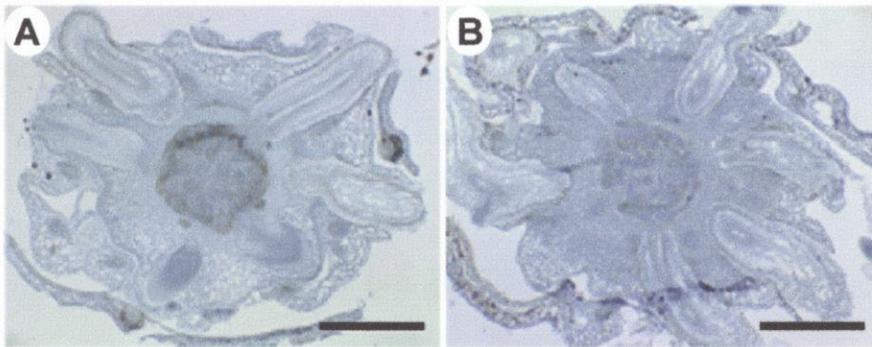


図2-12. 野生型と *mr1* における第1節の横断切片。A：野生型、B：
mr1。Bars=300 μ m。

10^{-7} 、 10^{-6} M の濃度で含む MS 培地に播種し、14 日間生育した際の野生型と *mr1* のオーキシンに対する反応の差異を解析した。

野生型と *mr1* の草丈を、無処理区、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M 処理区のそれぞれで測定した。無処理区での草丈を 1 として、2,4-D 処理区での草丈を割合で示した。その結果、野生型では 10^{-9} M 処理区において 1.1 と徒長した草丈を示し、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M と濃度が高くなるにつれて、それぞれ 1.0、0.9、0.5 と伸長阻害が強くなっていた (図 2-13A)。これに対し *mr1* では、 10^{-9} 、 10^{-8} M 処理区ともに 1.3 と徒長した草丈を示し、 10^{-7} 、 10^{-6} M 処理区においても 1.0 を示し、ほとんど伸長阻害が見られなかった (図 2-13A)。

次に、各 2, 4-D 濃度において、野生型と *mr1* の幼根の長さを計測した。野生型において無処理区では 12cm であり、 10^{-9} M 処理区でも約 12cm、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M と濃度が高くなるにつれて、それぞれ 10cm、6cm、1cm と伸長阻害が強くなっていた (図 2-13B)。*mr1* において無処理区では 6cm であり、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} M 処理区ではそれぞれ 5cm、6cm、6cm と有意な伸長阻害は見られず、 10^{-6} M 処理区において 1.5cm になり、伸長阻害が見られた (図 2-13B)。

さらに、各 2, 4-D 濃度における、野生型と *mr1* の冠根数の計測を行った。野生型では、無処理区では 9 本、 10^{-9} 、 10^{-8} M 処理区では 8 本、9 本とほぼコントロールと等しく、 10^{-7} 、 10^{-6} M と濃度が高くなるにつれて、14 本、22 本と冠根数が増加していた (図 2-13C)。これに対し、*mr1* では、無処理区で 11 本であったのに対し、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M 処理区のそれぞれで、10 本、12 本、9 本、10 本とコントロールと大きな差は見出せなかった (図 2-13C)。

草丈、幼根長、冠根数のいずれの計測結果においても、*mr1* の 2,4-D に対する反応は、野生型に比べて弱い、もしくはより高濃度で処理した場合に反応が見られたことから、オーキシンに対する感受性が低下している可能性が示唆された。

二重変異体 *mr1 sh11-2* と *mr1 ral2-1* の解析

遺伝子間の相互作用を解析するため、*mr1* に対し、完成胚においてそれぞれシュートと幼根を欠損する *sh11-2* と *ral2-1* を交配し、二重変異体の完成胚の観察を行った。

mr1 sh11-2 では、*sh11-2* と同様に SAM が欠損しており (図 2-14A、B)、頂部領域が著しく縮小したと見られる胚も存在した (図 2-14B)。*mr1 sh11-2* の基部領域では、3 つの幼根が分化するもの (図 2-14A)、2 つの幼根が分化するもの (図 2-14B) など、複数の幼根が分化する胚が高頻度で観察された。1 つの胚に分化する幼根数の平均は、

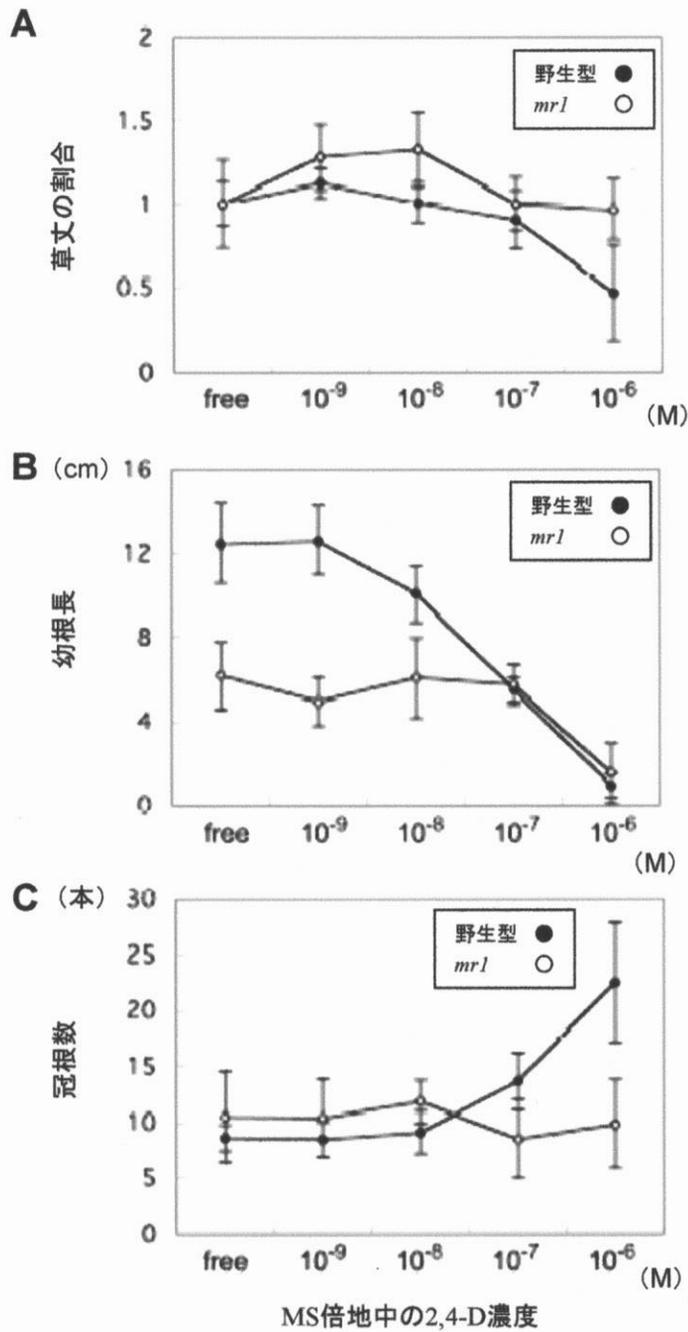


図2-13. 各濃度で2,4-Dを含むMS培地における播種後14日目の野生型と*mr1*の各計測値。A: MS培地で生育した植物体の草丈を1とした時の2,4-Dを含むMS培地で生育した植物体の草丈の割合、B: 各濃度における幼根長、C: 各濃度における冠根数。freeはMS培地、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} は各濃度 (M) で2,4-Dを含むMS培地を示す。

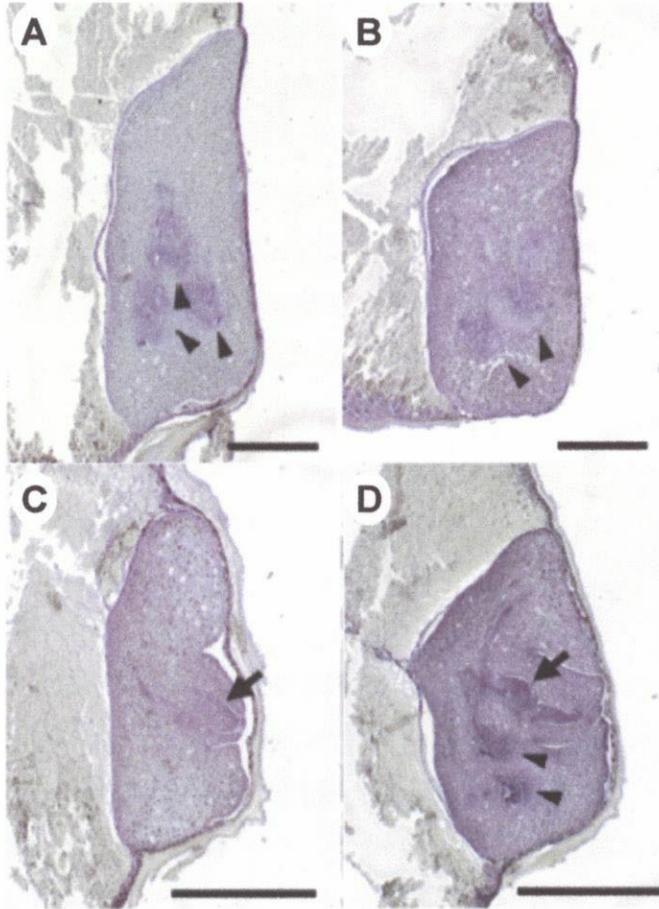


図2-14. *mr1*と胚器官欠損型変異体との二重変異体の完成胚。A、B: *sh11-2 mr1*、A: シュートが欠損し、3つの幼根が分化している。B: シュートが欠損し、2つの幼根が分化している。頂部領域の縮小が見られる。C: *ral2-1*、D: *ral2-1 mr1*。未発達なシュートと2つの幼根を分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bars=500 μ m。

mr1 で約 1.8 であったのに対し、*mr1 sh11-2* では約 2.6 と増加していた。このことから、*mr1 sh11-2* の基部領域は、*mr1* の基部領域よりも拡大していると考えられた。

ral2-1 は、未発達なシュートが形成され、幼根が欠損する変異体である (図 2-14C)。*ral2-1* では、まれに痕跡状の幼根が形成される場合も見られることと、栄養成長では冠根が分化することから、根を分化する機能は保たれているため、基部領域が欠損あるいは縮小した変異体であると考えられている。*ral2-1 mr1* では、胚長の値は *ral2-1* と同様に 900~1300 μm と小さく、頂部領域に 1 つの形態異常のシュートを、基部領域に大きさは小さいが組織は正常な幼根を 2 つ分化していた (図 2-14D)。*ral2-1 mr1* は発芽直後に枯死する致死型であったことから、シュートはそれぞれのシングルミュタントより深刻な表現型であると思われた。一方、形成された 2 つの幼根は発根後しばらくは正常な成長を示した。*ral2-1 mr1* では基部領域で幼根の増加が見られたことから、基部領域は拡大していると考えられた。

考察

mr1 の表現型の解釈と *MRI* の機能

mr1 では、胚発生初期において、軸の形成や背腹領域の分化は正常に保たれたまま、頂部領域の縮小と基部領域の拡大が観察された。したがって、*MRI* は頂部-基部領域の大きさの制御に機能していると考えられた。

また、栄養成長期において、*mr1* のシュートには多面的な表現型が観察されたが、根系の表現型にはほとんど異常が観察されなかった。胚発生と栄養成長の結果を総合的に考察すると、*mr1* では、頂部領域に分化する器官であるシュートの発生はライフサイクルを通じて影響を受けているが、基部領域に分化する器官である根の発生はほとんど影響を受けていないといえた。このことから、*MRI* は胚発生において、頂部領域の正常な発生に機能しているものと推察された。したがって、*mr1* における基部領域の拡大は、頂部領域の縮小の影響を受けた二次的なものであり、イネ初期胚では、頂部領域の縮小を基部領域の拡大が補償する、隣接する領域間の補償的な制御機構が存在するとの結論が得られた。また、頂部-基部領域の大きさが変更された結果、縮小した頂部領域ではシュートの発生が遅れ、拡大した基部領域では複数の幼根の分化が見られたことから、領域の大きさと器官の数、位置や発達に関連性があることが確認された。*mr1* では頂部領域における SAM の幅、高さや向きと、基部領域における幼

根の数や位置が一定ではなかったことから、頂部領域の縮小とそれに伴う基部領域の拡大のパターンが一定ではないことが示唆された。

上記のような *MRI* の機能を基に、*MRI* と *SHL1*、*RAL2* との相互作用は、以下のように推察された。*mr1 shll-2* では、それぞれのシングルミュータントよりも基部領域が拡大していたが、*MRI* と *SHL1* は共に、頂部領域側で機能する遺伝子であるため、頂部領域の大きさの維持を介して基部領域の拡大を冗長的に抑制していると考えられる。*shll* のアレルでは、まれに 2 つの幼根を分化することも、この解釈を支持するものであるといえる。また、*SAM* は全ての二重変異体で欠損しており、*SAM* の分化には *SHL1* の機能が必須であるといえた。*ral2-1 mr1* では、基部領域に 2 つの幼根を分化する胚が見られたことから、基部領域の拡大が起きたものと考えられた。したがって、領域の分化に関しては *MRI* が *RAL2* の上位で機能しており、*RAL2* の変異によって基部領域が縮小する以前に、*MRI* の変異によって基部領域の拡大がおきたものと推察された。

MRI の栄養成長期における詳細な機能は不明であるが、シュートでの多面的な表現型と胚との機能を統一的に説明するための 1 つの仮説として、オーキシンなどの植物ホルモンに関与する機能を持つことがあげられる。*mr1* では、外生オーキシン処理に対して、低感受性をきたしている可能性があるとの結果が得られた。Fischer ら (1997) は、コムギの胚の軸形成や領域分化は、胚柄から頂部側へのオーキシン極性輸送によって決定されているとのモデルを提唱しているため、オーキシンに関する異常によって領域分化が影響を受けている可能性は考えられる。しかし、本研究ではオーキシンについて十分な解析を行っていないため、今後さらなる解析が必要である。

イネ胚における頂部－基部領域の大きさの制御

mr1 の解析によって、イネ胚発生初期におけるパターン形成のメカニズムの一つが明らかにされた。頂部－基部領域の分化機構において、頂部領域と基部領域の大きさは、補償的に制御されるというモデルである。また、領域の大きさは胚器官の数、位置や発達に影響を与えることも明らかにされた。

胚発生において隣接する領域の大きさが補償的に制御されるというモデルは、シロイヌナズナの領域欠損型変異体では、報告されていない。このことは、イネとシロイヌナズナでは胚の領域分化機構が異なっているか、あるいは、シロイヌナズナの領域欠損型変異体では、領域の完全な欠損により領域間の相互作用を失っているため、隣接する領域の拡大が見られなかったと考えることができる。

植物において、隣接する領域が補償的に制御されるというモデルは、胚以外の発生プロセスでも報告されている。例えば、双子葉植物における葉原基での向軸-背軸面の領域分化である。キンギョソウの *phantastica* (*phan*) では、葉原基において向軸領域のアイデンティティを決定する *PHAN* の変異により、葉の向軸領域を喪失し、背軸領域のみから構成される針状の葉を形成する (Waites and Hudson, 1995)。また、シロイヌナズナの gain of function 変異体 *phabulosa-1d* (*phb-1d*) では、向軸領域のアイデンティティを決定する *PHB* の過剰発現によって、向軸領域が拡大した結果、背軸領域の縮小あるいは喪失を招き、針状の葉を形成することが報告されている (McConnell and Barton, 1998)。このことから、キンギョソウとシロイヌナズナの葉原基における向軸-背軸領域の分化は、補償的に制御されていることが知られている。また、花分裂組織における ABC モデルでは、クラス A とクラス C 遺伝子が互いに抑制的な発現制御を受けていることが知られている (Bowman *et al.*, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Drews *et al.*, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994)。

動物界では、類似したモデルとしてショウジョウバエの胚発生における、頭尾軸に沿った領域分化機構の存在が知られている。母性効果遺伝子の 1 つ、*bicoid* (*bcd*) はその転写産物が、卵母細胞の頭部側に局在し、その濃度依存的に頭部-尾部領域の境界が決定されている (Frohhofer and Nusslein-Volhard, 1986, 1987; Berleth *et al.*, 1988)。Bcd タンパクの濃度が野生型よりも低い胚では、頭部領域が縮小し、尾部領域が拡大し、野生型より Bcd タンパクの濃度が高い胚では、頭部領域が拡大し、尾部領域が縮小するというものである (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1987; Driever and Nusslein-Volhard, 1988)。近年、*bcd* 相同遺伝子がイネにおいても単離され、イネ胚の頂端部で発現していたとの報告もあるため (Xing *et al.*, 2001)、ショウジョウバエの領域分化モデルとの類似性に関連を持つものであるかもしれない。*MRI* はヘテロ個体の後代で野生型と変異体の表現型が 3:1 に分離するため、母性効果遺伝子ではなく、胞子体で発現する遺伝子であるという相違点があるが、植物の胚発生においても、補償的な領域分化を行っているという共通点は興味深く、このような領域の制御は、生物の発生において一定の大きさの領域を有効に活用するために適用されているのかもしれない。

本章では、幼根増加型変異体 *mrl* の解析から、胚の領域分化機構に関する新規のモデルを構築することができた。したがって、胚器官増加型変異体は、胚パターン形成の遺伝学的情報を得るために有用であるといえ、今後さらなる解析が望まれる。

第3章 シュートを頂端に分化し、幼根を増加する *apd1* 変異体の解析

緒言

第1章において、幼根が増加する変異体 *mrl* と *apd1* が同定され、頂部-基部領域の大きさの制御に異常が起きていることが示された。第2章では、*mrl* の解析により、*MRI* は頂部領域の正常な発達に機能していること、初期胚発生では頂部-基部領域の大きさが補償的に制御されていること、基部領域の拡大の結果、複数の幼根を分化したことが明らかにされた。隣接する領域の大きさが補償的に制御されるモデルは、ショウジョウバエの胚発生における頭部-尾部領域の分化や (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1987; Driever and Nusslein-Volhard, 1988; St. Johnstone and Nusslein-Volhard, 1992)、シロイヌナズナ、キンギョソウの葉原基における、向軸-背軸領域の分化などのモデルとの類似性が見られた (Waites and Hudson, 1995; McConnell and Barton, 1998)。これらのことから、器官増加型変異体は、胚発生のパターン形成についての遺伝学的知見を得るために有効であるといえた。

また、領域間の制御とは別に、領域が拡大した結果、器官が増加する変異体は、植物においてもいくつか得られている。シロイヌナズナの *clv1*、*clv2*、*clv3* は、いずれも SAM の central 領域の拡大がおこり、この拡大によって側生器官を分化する peripheral 領域の拡大を誘発し、葉や花器官数の増加がおきる (Clark *et al.*, 1993, 1996; Kayes and Clark, 1998; Laufs *et al.*, 1998)。CLVは、central 領域の未分化な細胞の分裂の制御、あるいは central 領域と peripheral 領域のバランスの制御に機能していると言われている。また、トウモロコシの *abphyll1* (*abph1*) は、胚発生において SAM が分化した当初から拡大しており、2つの葉原基を対生に分化した (Jackson and Hake, 1999)。 *abph1* では、SAM の構造や組織は正常だが SAM 全体の大きさが拡大しており、それに伴う leaf founder cell の増加によって、同時に二つの葉原基を分化したものと考えられる。これらの変異体では、SAM において、領域が拡大した結果、その領域から発生する器官が増加した。したがって、領域の拡大と器官数の増加には相関関係が存在すると思われる。

また、双子葉植物、単子葉植物の双方で、変異体を用いた解析や生理学的な実験から、胚の極性の決定や軸の形成にオーキシンの極性輸送が関与することが報告されている。セイヨウカラシナやコムギの未熟胚に、オーキシンやオーキシン極性輸送阻害剤処理を行った結果、胚器官の増加などが見られ (Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.* 1998;

Fischer *et al.*, 1997)、胚でのオーキシン濃度測定などから、胚柄から頂部側に向かってオーキシン極性輸送が行われ、その濃度勾配によって胚の器官分化領域が決定するというモデルが提唱された (Fischer-Iglesias *et al.*, 2001)。シロイヌナズナにおいても、胚のステージによってオーキシンの局在性が変化していたことから、オーキシンの濃度勾配によって頂部-基部軸が形成されるとの報告がある (Friml *et al.*, 2003)。gnでは、PIN1の局在性に異常が見られたため、細胞レベルの極性異常によって軸形成や領域分化に異常をおこし、胚器官の分化が正常に開始されなかったものと考えられている (Steinmann *et al.*, 1999)。これらの報告から、近年、植物の胚発生におけるパターン形成とオーキシンとの関連が注目されている。また、イネの幼根増加型変異体 *mr1* でもオーキシンに対する反応の異常が観察されている。

本解析に用いた *apdl* は、縮小した頂部領域の頂端に1つの未発達のシュートが、拡大した基部領域に2つの幼根が分化する幼根増加型変異体であった。完成胚において幼根のみ増加する表現型は *mr1* と似ていたが、*mr1* の幼根の増加様式は多様であったのに対し、*apdl* では幼根は多くても2つであり、それらの位置や方向が一定であるという相違が見られた。そこで、*apdl* の解析を行い、*MRI* と *APDI* の領域分化における機能の類似性と相違性について調査を行った。

材料及び方法

植物材料

第1章と同様の方法で行った。

パラフィン切片

第1章と同様の方法で行った。

in situ hybridization

第2章と同様の方法で行った。

植物体の 2,4-D 処理

第2章と同様の方法で行った。

カルスの誘導と再分化培地での処理

野生型と *apd1* の種子を、30g/l のスクロース、2mg/l の 2,4-D、2g/l のゲルライトを添加した pH5.8 の N6 培地 (Chu *et al.*, 1975) に播種し、28°C で 30 日間培養し、カルスを誘導した。再分化培地は、30g/l のソルビトール、30g/l のスクロース、2g/l のカザミノ酸、2mg/l のカイネチン、1mg/l の NAA、4g/l のゲルライトを添加した MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) を pH5.8 に調整したものを使用した。N6 培地上で誘導された直径約 1mm のカルスを再分化培地に移植し、28°C で培養した。

二重変異体の作出

ヘテロ接合の *apd1* に対し、ヘテロ接合の *mrl* と *sh11-2* の交配を行った。二重変異体の表現型の観察には、F₃ 世代の種子を用いた。

結果

apd1 完成胚の表現型

apd1 の完成胚では、全ての胚で頂端付近に 1 つの未発達なシュートを、基部領域には約 60% の胚で 1 つの (図 3-1A)、約 40% の胚で 2 つの幼根が分化していた (図 3-1B)。3 つ以上の幼根が分化する胚は見られなかった。頂部領域において、ほとんどの胚で、葉原基の発達は阻害され形態異常を示し、第 1 葉あるいは第 2 葉までの分化しか見られなかった。胚盤や鞘葉は約 55% の胚で欠損に近い重度の (図 3-1B)、約 45% の胚で比較的軽度の生育阻害が見られた (図 3-1A)。基部領域では、2 つの幼根が分化した場合、頂部側の幼根は胚の中央付近に胚柄を向いて、基部側の幼根は腹側を向いて、一定の位置に形成されていた。2 つの幼根が分化した場合、頂部側の幼根のみが、シュートと維管束で連結していたため (図 3-1B)、頂部側の幼根が本来のものにあたと推察された。また、胚盤側の細胞には液胞化が見られた。以上のように、*apd1* 完成胚では頂部領域で胚盤や鞘葉の強い生育阻害が見られ、頂部領域の頂端に 1 つの未発達のシュートが、基部領域には 1 つあるいは 2 つの幼根が分化する変異体であることが示された。

野生型と *apd1* の完成胚におけるシュートと幼根の位置を定量的に表すため、胚柄から SAM と根端分裂組織への距離について、中央縦断切片を用いて計測した。その結果、野生型の胚柄から SAM までの距離は約 830 μ m、胚柄から根端分裂組織までの距離は

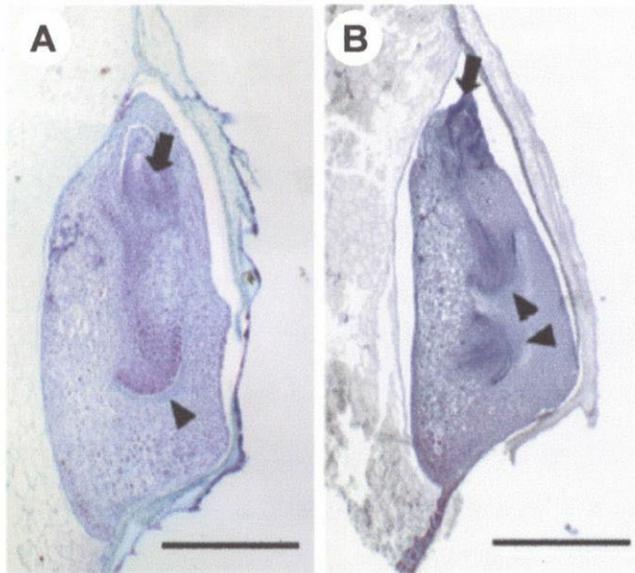


図3-1. *apd1*の完成胚。A：頂部領域の頂端にシュートが、基部領域に1つの幼根が分化している。B：頂部領域の頂端にシュートが、基部領域に2つの幼根が分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bar=500 μ m。

約 270 μm であった (表 3-1)。これに対し、1つの幼根が分化した *apdl* では、胚柄から SAM までは約 1130 μm 、胚柄から根端分裂組織までは約 330 μm であり、SAM と幼根ともに野生型よりも頂部側へずれていた (表 3-1)。2つの幼根が分化した *apdl* では、胚柄から SAM までは約 1070 μm 、胚柄から頂部側幼根の根端分裂組織までは約 500 μm 、基部側幼根の根端分裂組織までは約 280 μm であった (表 3-1)。したがって、*apdl* の基部側幼根は野生型の幼根と胚柄からほぼ等しい距離に位置するが、SAM と頂部側幼根は双方とも 230 μm 程度、頂部側へずれていることが明らかになった。この時、野生型の胚長は約 1930 μm であったが、*apdl* では胚盤の生育異常により幼根が 1つのものは約 1370 μm 、2つのものは約 1240 μm であった。このことから、*apdl* では、胚柄から SAM と幼根への距離が野生型よりも長くなった原因は、胚全体が大きくなったためではなく、SAM と頂部側幼根が、頂部側にずれたことが原因であるといえた。

また、*apdl* における頂部領域と基部領域の大きさを示すために、頂部領域と基部領域の長さを計測した。頂部領域と基部領域の境界線を、シュートと幼根 (2つの幼根が分化している場合は頂部側の幼根) の中点を通る胚長に対する垂線として定義し、頂部領域と基部領域の長さを計測した (図 3-2)。野生型では頂部領域長は約 1400 μm 、基部領域長は約 500 μm であった (図 3-2B)。これに対し、1つの幼根が分化する *apdl* では頂部領域長は約 550 μm 、基部領域長は約 830 μm 、2つの幼根が分化する *apdl* では頂部領域長は約 410 μm 、基部領域長は約 830 μm であった (図 3-2B)。したがって、*apdl* では、幼根の数に関わらず、野生型に比べて頂部領域が縮小し、頂端に1つの未発達のシュートを、基部領域が拡大し、1つないし2つの幼根を分化する頂部-基部領域の大きさに異常をきたす変異体であることが示された。

apdl の胚発生

apdl の受粉後 3日目の胚は胚長約100 μm の球状胚を示し、野生型との区別がつかなかった。受粉後 4日目では SAM、鞘葉と胚盤の分化が見られた (図 3-3A)。SAM の位置は *apdl* 完成胚のように頂端ではなく、野生型と同様に頂部領域の腹側に分化していた。胚盤と鞘葉は同じステージの野生型に比べ、わずかに成長が阻害されていた。このステージでは、幼根は1つのみ分化しており、その位置は野生型とほぼ同様の位置に見られた。受粉後 5日目には、SAM からは第1葉原基が分化していた (図 3-3B)。胚盤と鞘葉の生育阻害は顕著になり、鞘葉は SAM を覆っていなかった。また、シュートと幼根原基の位置は頂部側へずれていた。受粉後 12日目では、SAM からは第2葉原基が分化しており、第1葉は強い成長阻害を受け、形態異常を示した (図 3-

表3-1. 完成胚における胚柄からSAMと根端分裂組織までの距離と胚長。単位は μm 。

| | 胚柄から根端分裂組織までの距離 | 胚柄からSAMまでの距離 | 胚長 |
|----------------------|---|--------------------|--------------------|
| 野生型 | 270.7 \pm 35.7 | 827.4 \pm 74.1 | 1926.0 \pm 176.0 |
| <i>apd1</i> (幼根1つの胚) | 325.0 \pm 43.1 | 1133.0 \pm 102.9 | 1373.0 \pm 114.1 |
| <i>apd1</i> (幼根2つの胚) | 276.0 \pm 26.5 ^{*1)} 496.9 \pm 46.2 ^{*2)} | 1069.0 \pm 68.6 | 1237.0 \pm 70.1 |

*1) 胚柄と基部側幼根の根端分裂組織との距離。

*2) 胚柄と頂部側幼根の根端分裂組織との距離。

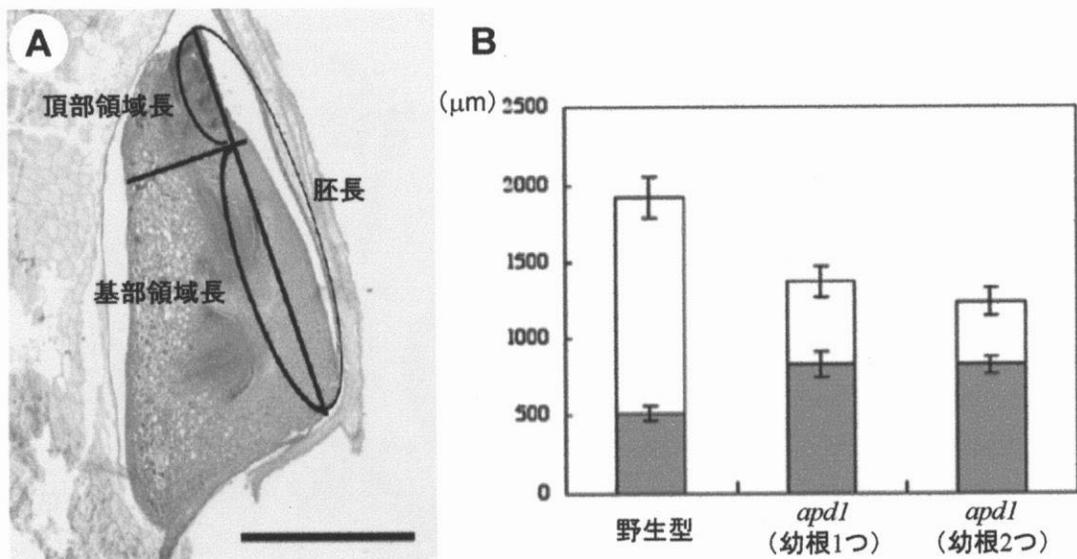


図3-2. 野生型と*apd1*の胚長、頂部領域長と基部領域長。A：胚長、頂部領域長と基部領域長の定義。胚長は胚柄から頂端部までの長さ。頂部領域と基部領域の境界線はシュートと幼根の間を通る、胚長に対する垂線とした。B：野生型と*apd1*（幼根が1つの胚と2つの胚）における胚長、頂部領域長と基部領域長。

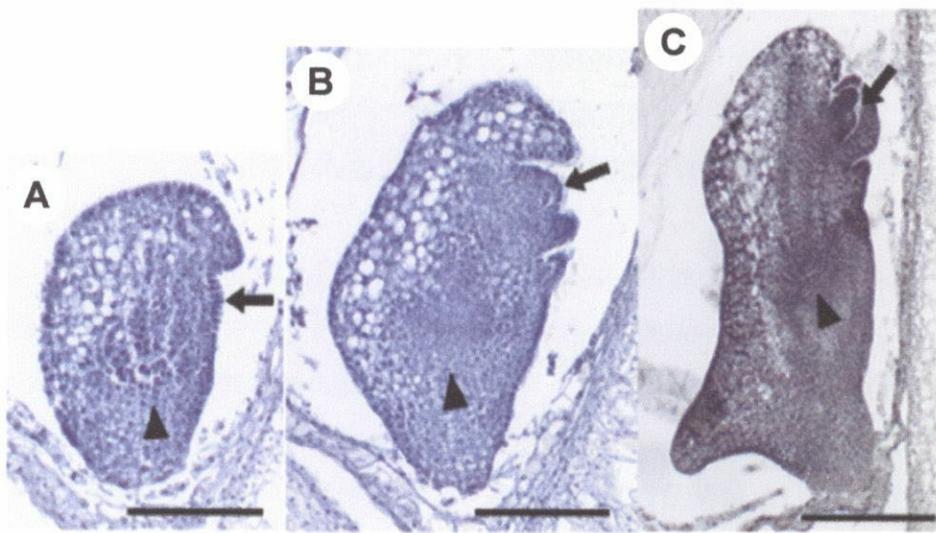


図3-3. *apd1*の胚発生。A：受粉後4日目、B：受粉後5日目、C：受粉後12日目。Bar=100 μ m。

3C)。胚盤と鞘葉も強く成長が阻害され、この胚では鞘葉はほぼ欠損していた。その結果、シュートは胚の頂端付近に位置するようになっていた。基部領域では頂部側幼根の基部側の領域が拡大し、頂部側幼根の頂部側へのずれがさらに顕著になっていた。しかし、このステージでは、拡大した基部領域に 2 つめの幼根の分化が見られなかった。このことから、完成胚における頂部側幼根は、本来の幼根として先に分化し、基部側の幼根は、その後、拡大した基部領域に分化を開始することが明らかになった。基部側幼根は、早い胚でも受粉後 8 日目から分化を開始していた。

形態観察から得られたシュートと幼根の頂部側へのずれを、定量的に示すため、胚発生の各ステージにおける胚柄から SAM と根端分裂組織への距離を計測した。その結果、鞘葉分化期では野生型と *ap1* における、胚柄から SAM までの距離と胚柄から根端分裂組織までの距離はほぼ等しく、その後、発生が進むにつれて、*ap1* における胚柄から SAM への距離と胚柄から根端分裂組織への距離は野生型のものよりも次第に長くなっていた (図 3-4)。

これらの観察から、*ap1* において、SAM や幼根は、受粉後 4 日目の器官分化開始時にはほぼ正常な位置に分化するが、その後、しだいに頂部側にずれていくことが明らかになった。また、基部領域の拡大も、受粉後 4 日目以降にしだいに顕著になり、拡大した領域に基部側の幼根が分化することが明らかになった。したがって、*mrl* の解析によって示された頂部-基部領域の大きさの補償的な制御機構は、胚器官分化後にも存在すると考えられた。

ap1 における *OSHI* と *OsSCR* の発現

ap1 胚の領域分化に関する情報をえるため、イネのホメオボックスクラス 1 遺伝子 *OSHI* とシロイヌナズナの *SCARECROW* のホモログ遺伝子 *OsSCR* をプローブとして *in situ hybridization* を行った。

ap1 における *OSHI* の発現は、受粉後 3 日目の球状胚では、野生型とほぼ同様の位置である、頂部領域の腹側で見られた (図 3-5A)。受粉後 5 日目では鞘葉や胚盤が発育阻害を受けているが、SAM やその周辺組織での発現パターンは野生型とほぼ同様であった (図 3-5B)。受粉後 7 日目では、シュートや幼根が頂部側へずれているのともなって、*OSHI* の発現領域も頂部側へずれており、基部領域の拡大が確認されたが、SAM や幼根周辺での組織特異的な発現パターンは野生型と同様のものを示した (図 3-5C)。以上の結果から、*ap1* では SAM や周辺領域に対応した発現パターンは、野

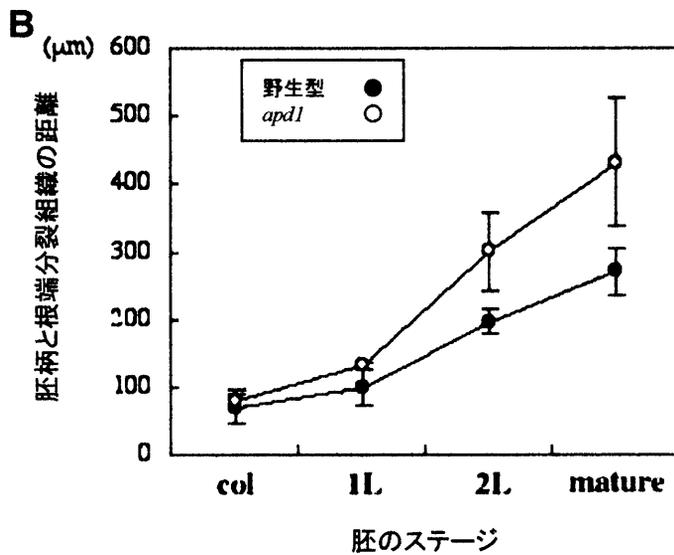
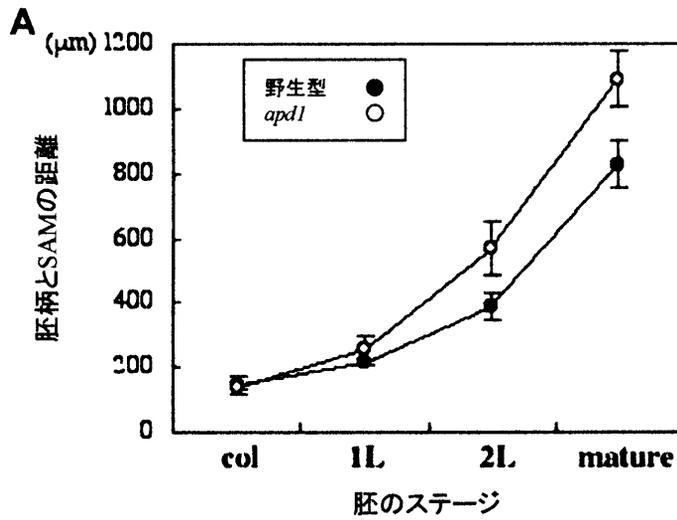


図3-4. 胚発生における胚柄からSAMと根端分裂組織までの距離。A：胚柄とSAMの距離、B：胚柄と根端分裂組織（2つの場合は頂部側）の距離。col：鞘葉分化期。1L：第1葉分化期。2L：第2葉分化期。mature：完成胚。

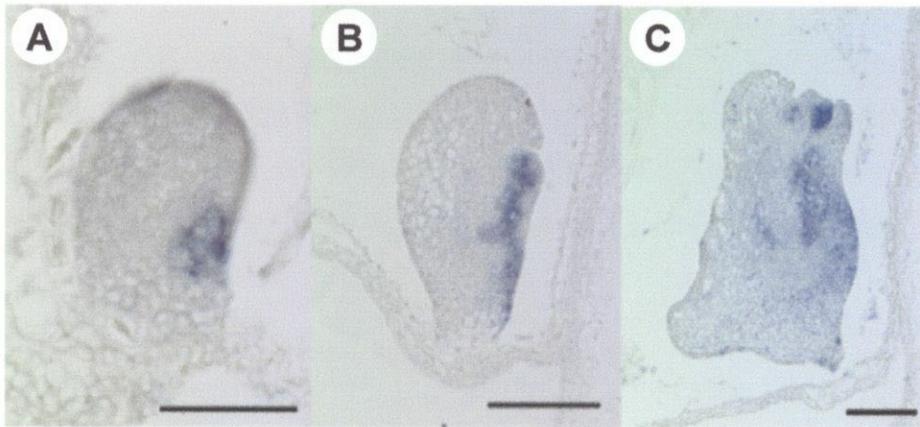


図3-5. *apd1*における*OSH1*の発現パターン。A：受粉後3日目、B：受粉後5日目、C：受粉後7日目。Bar=100 μ m。

生型と等しく、頂部領域の縮小と基部領域の拡大は、器官分化後に顕著になることが確認された。

apdl における *OsSCR* の発現は、受粉後 4 日目までは野生型とほぼ同様であった。受粉後 5 日目には、頂部側にずれた幼根の内皮に対応した領域で、アーチ状の発現が見られた (図 3-6A)。受粉後 9 日目では、頂部側へのずれが顕著になった幼根の内皮に対応したアーチ状の発現が見られた (図 3-6B)。しかし、このステージにおいて、拡大した基部領域には、基部側の幼根に対応するような発現が見られなかったため、これよりも遅いステージから基部側の幼根が分化を開始するものと思われた。

in situ hybridization の観察結果からは、*apdl* では器官分化前の頂部-基部の領域分化には、明確な異常を確認することはできなかった。しかし、SAM や本来の幼根を分化した後に、頂部領域の縮小と基部領域の拡大が起きた結果、シュートが胚の頂端に移動し、2 つめの幼根が分化することが明らかにされた。したがって、*apdl* では、*mrl* のように胚発生初期から頂部-基部領域の大きさに異常をきたすのではなく、胚器官の分化後において、頂部領域の縮小と基部領域の拡大が起きることが明らかになった。

***apdl* 植物体の表現型**

apdl 種子からは弱いシュートの発芽と 1 つないし 2 つの幼根の発根が見られ、発芽後 14 日目で草丈は約 2cm、幼根の長さは 2 つの発根が見られた場合、長い方が約 2cm であった (図 3-7A)。葉には伸長阻害と褪色がおきていた。また、野生型では伸長しない、第 1 葉の葉腋から分げつが伸長するなどの異常が見られた。発芽後 30 日目には *apdl* の草丈は約 12cm で葉の矮化、細化が見られたが、葉の色は淡緑色への復帰が見られた (図 3-7B)。いくつかの葉ではラミナジョイントが直角に曲がっていた。分げつ数は、野生型では 3~4 本であったが、*apdl* では平均 5.6 本と多くの分げつが伸長していたが、この時期以降は旺盛な分げつの伸長は見られなくなり、野生型とほぼ等しい分げつ数になっていった。栄養成長後期の *apdl* では徐々に表現型が復帰し、草丈は約 60cm、葉の矮化と細化以外はめだった異常はなかった。生殖成長期に転換すると出穂したが、桿長は約 40cm、一穂あたりの 1 次枝梗は 1~3 本であり、穎花数は 5~10 程度の短穂を示した (図 3-7C)。花器官の数や形態や種子の稔性はほぼ正常であった。これらのことから、*apdl* のシュートの異常は、発芽後 30 日目以降の栄養成長期では、葉の伸長阻害以外の表現型は復帰していく傾向があるといえた。

apdl の栄養成長期における多面的な表現型には、野生型にオーキシン処理を行った時の表現型とのいくつかの類似点が見られた。例えば、発芽直後の *apdl* では、葉の伸

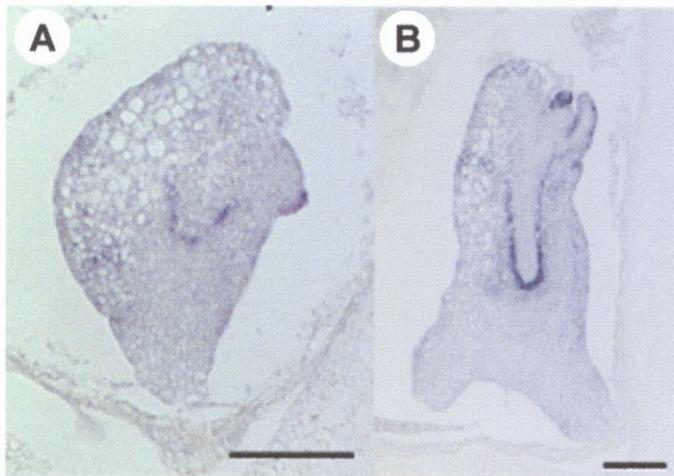


図3-6. *apd1*における*OsSCR*の発現パターン。A : 受粉後5日目、B : 受粉後9日目。
Bar=100 μ m。

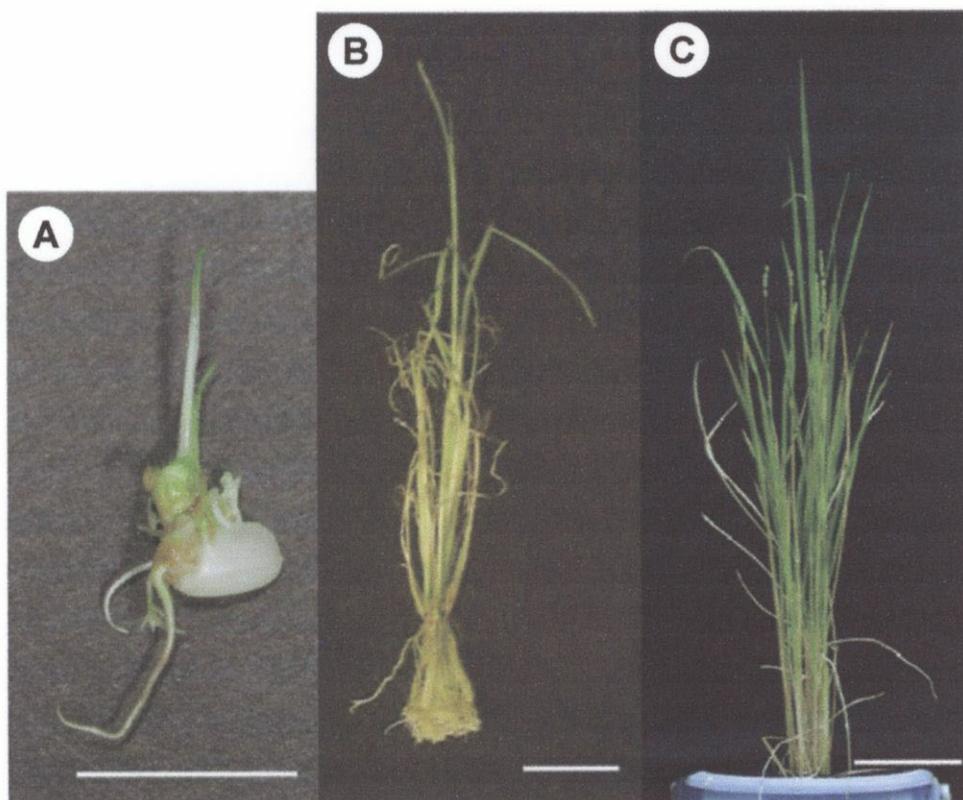


図3-7. *apd1*の植物体。A：発芽後14日目、B：発芽後30日目、C：発芽後120日目。Bar=2cm (A)、3cm (B)、10cm (C)。

長阻害と褪色、幼根の伸長阻害が見られた。これは、合成オーキシシン 2,4-D を 10^{-5} M 含む MS 培地上で野生型種子を発芽させた時の植物体と類似していた (図 3-8A、B)。発芽後 21 日目の *apdl* と 10^{-6} M の 2,4-D を含む MS 培地上で生育した野生型のシュートにおいて、草丈は約 10cm で葉の矮化と細化がおき、似た草型を示した (図 3-8C、D)。しかし、発芽後 21 日目では、*apdl* において観察された第 2、第 3 葉葉腋からの分げつの伸長は 2,4-D 処理した野生型では観察されなかった。発芽後 21 日目の *apdl* と 10^{-6} M の 2,4-D を含む MS 培地で生育した野生型では、根の伸長阻害が見られた (図 3-8E、F)。しかし *apdl* では冠根は 10 本程度であったのに対し、2,4-D 処理した野生型では 20 本程度の冠根が分化し、根毛の増加も見られるといった相違点も存在した。*apdl* と地上部に 200ppm の NAA を散布した野生型では、いくつかの葉においてラミナジョイントが直角に曲がる異常がおきていた (図 3-8G、H)。さらに、*apdl* と 10^{-6} M の 2,4-D を含む MS 培地上で発芽した野生型では中胚軸の徒長が見られた (図 3-8I、J)。以上のように、栄養成長期の *apdl* に見られる多面的な表現型のいくつかには、野生型にオーキシシン処理を行った時との類似性が観察された。

オーキシシンに対する *apdl* の幼根の反応

apdl 植物体の表現型からオーキシシンに関連する異常をもつ可能性が示唆されたため、幼根の合成オーキシシン 2,4-D に対する反応を観察するため、無処理区をコントロールとして、2,4-D を 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M の濃度で添加した MS 培地で発芽後 14 日目の幼根長の計測を行った。

野生型では、無処理区で約 12.5cm、 10^{-8} M 処理区で約 10cm、 10^{-7} M 処理区で約 5.5cm、 10^{-6} M 処理区で約 0.9cm と濃度が高くなるにつれて強く伸長阻害を受けた (図 3-9A)。*apdl* では無処理区で約 1.4cm、 10^{-8} M 処理区で約 0.9cm、 10^{-7} M 処理区で約 0.7cm、 10^{-6} M 処理区で約 0.6cm であった (図 3-9A)。*apdl* では、全ての処理区において、野生型よりも幼根長が短くなっていたが、無処理区での幼根長を 1 とした時の各処理区における幼根長の割合は、野生型と *apdl* でほぼ等しいとの結果が得られた (図 3-9B)。2,4-D による幼根長が伸長阻害を受ける割合に関しては異常がなかったため、*apdl* の幼根において、オーキシシンに反応した伸長阻害がおきたことが示された。

再分化培地から NAA とカイネチンを抜いた際の *apdl* のカルスの反応

野生型と *apdl* における、胚盤由来の直径約 1mm のカルスを、再分化培地 (以下 re 処理区)、NAA を除いた再分化培地 (以下 re-N 処理区)、カイネチンを除いた再分化

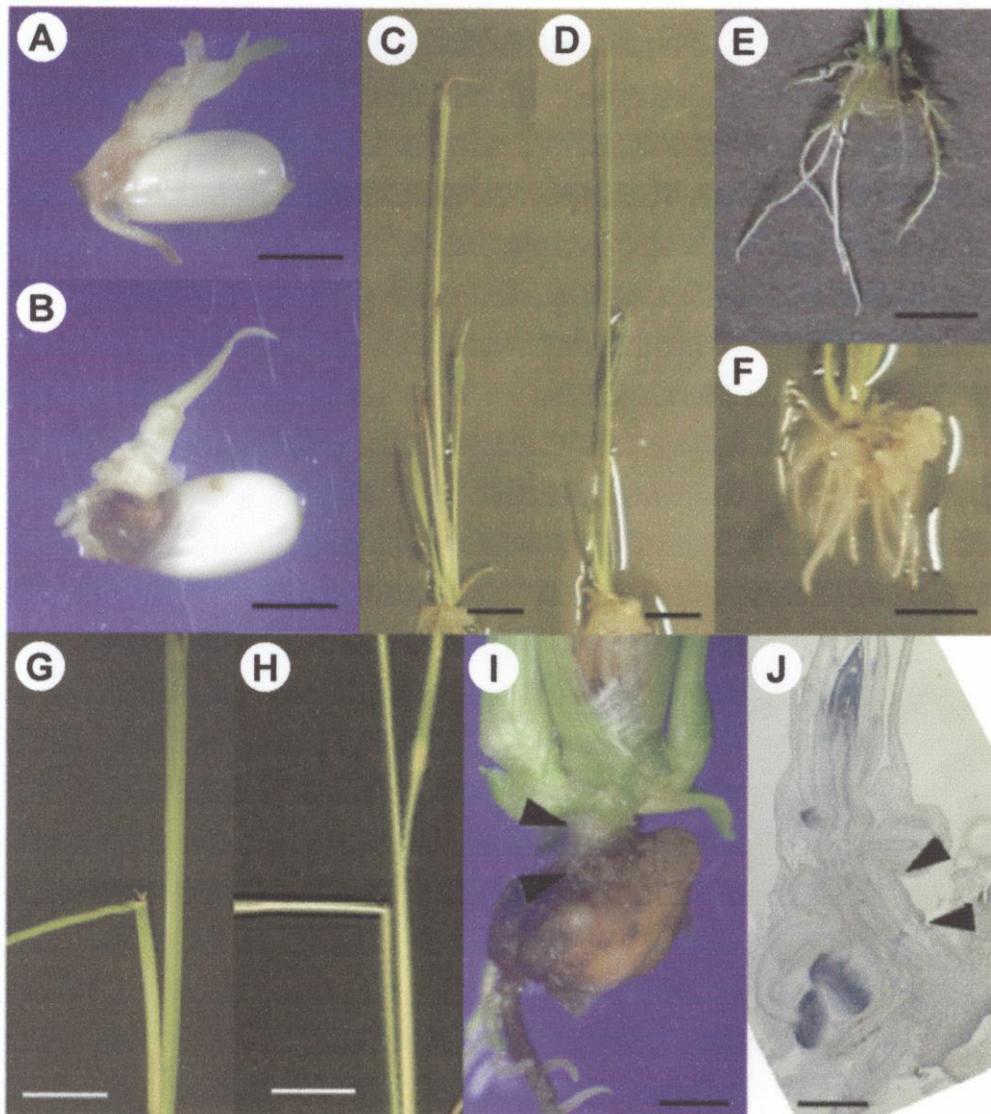


図3-8. *apd1*とオーキシン処理した野生型の表現型。A：発芽後10日目の*apd1*種子。B：2,4-Dを 10^{-5} M含むMS培地で生育した発芽後20日目の野生型種子。C：発芽後21日目の*apd1*のシュート。D：2,4-Dを 10^{-6} M含むMS培地で生育した発芽後21日目の野生型のシュート。E：発芽後38日目の*apd1*の根。F：2,4-Dを 10^{-6} M含むMS培地で生育した発芽後21日目の野生型の根。G：発芽後40日目の*apd1*のシュートにおけるラミナジョイント。H：500ppm NAAを地上部に噴霧した発芽後20日目の野生型の第3葉のラミナジョイント。I：発芽後20日目の*apd1*の徒長した中胚軸。J：2,4-Dを 10^{-6} M含むMS培地で生育した発芽後10日目の野生型の中胚軸。矢頭の間が中胚軸。Bar=5mm (A、B)、1cm (C~H)、1mm (I、J)。

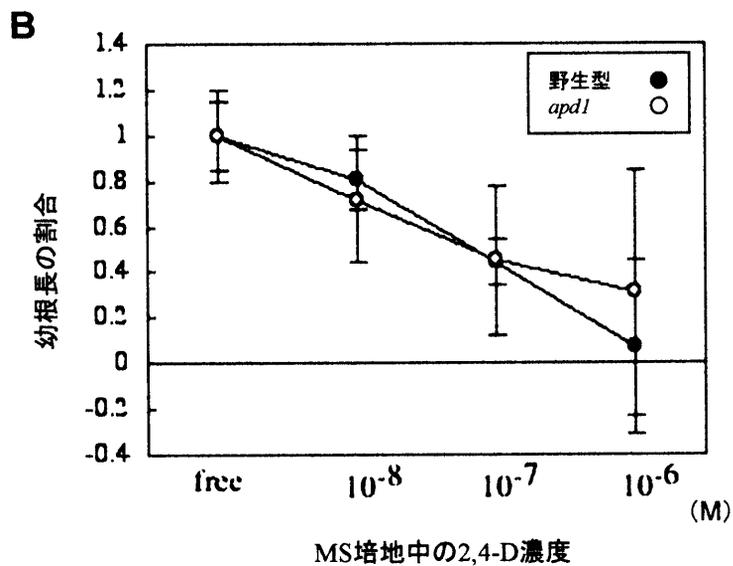
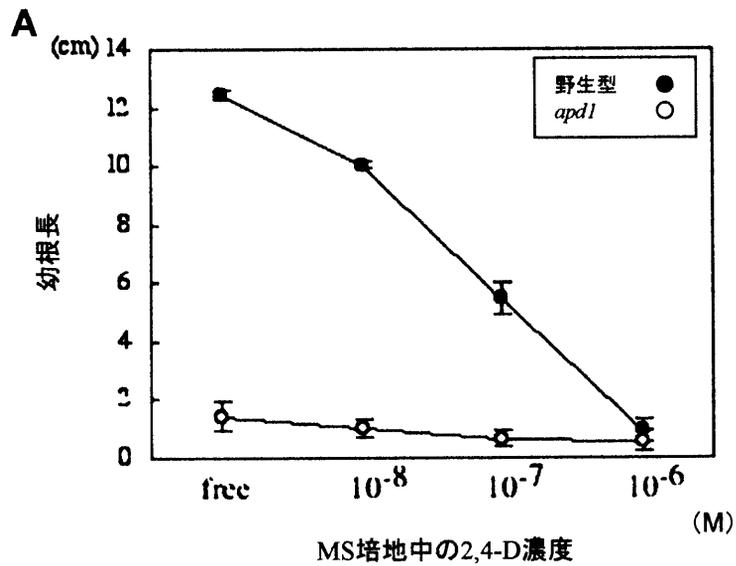


図3-9. 各濃度で2,4-Dを含むMS培地における播種後14日目の野生型と*apd1*の幼根長。A: 幼根長。B: MS培地の幼根長を1とした時の各処理区における幼根長の割合。freeはMS培地、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} は各濃度 (M) で2,4-Dを含むMS培地を示す。

培地（以下 re-K 処理区）、NAA とカイネチン両方を除いた再分化培地（以下 re-H 処理区）の 4 処理区に移植し、28 日後のカルスの状態を調べた。カルスの状態は、不定芽、グリーンスポット、不定根のいずれかを分化したものを再分化した状態、カルスの形態を維持したものをカルスの状態、褐変枯死したものを枯死した状態と定義した。

その結果、野生型のカルスは re 処理区では、約 50%が再分化し、約 20%がカルスの状態を継続し、約 30%が枯死した（図 3-10A）。re-N 処理区では、約 20%が再分化し、約 10%がカルスの状態を継続し、約 70%が枯死した（図 3-10A）。

apd1 のカルスは re 処理区において、約 30%が再分化し、約 40%がカルスの状態を継続し、約 30%が枯死した（図 3-10B）。re-N 処理区では、約 20%が再分化し、約 60%がカルスの状態を継続し、約 20%が枯死した（図 3-10B）。re-H 処理区では、野生型は約 40%が器官分化し、約 30%がカルスの状態を継続し、約 30%が枯死した（図 3-10A）。しかし、*apd1* では 90%以上がカルスの状態を継続し、枯死したものは見られなかった（図 3-10B）。

以上のことから、野生型のカルスに比べ、*apd1* のカルスは NAA を与えない条件下で生存している割合が高いことがわかった。また、*apd1* のカルスは、いずれの各処理区においても、カルスの状態を維持している割合が、野生型よりも高くなっていた。高濃度のオーキシンは、カルス化を誘導し、脱分化した状態を維持することから、1 つの可能性として、*apd1* カルスの細胞内でオーキシンの濃度が高くなっていることが示唆された。

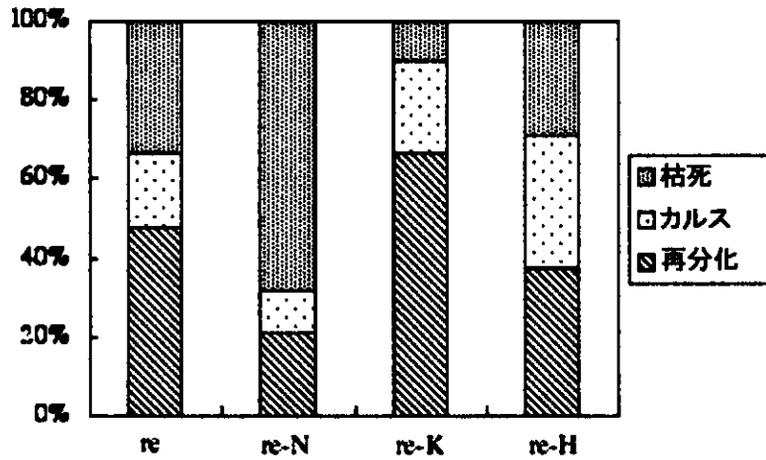
植物体の表現型や合成オーキシン反応実験から、*apd1* は野生型にオーキシン処理を行った際の表現型に類似していたこと、オーキシンに対する幼根の伸長阻害の割合は正常であったこと、*apd1* のカルスはオーキシンを含まない再分化培地上で枯死せずにカルスの状態を維持したことから、*apd1* 細胞ではオーキシン濃度が高くなっているという仮説が導き出された。しかし、植物体におけるオーキシンの効果は、濃度、組織やステージによって様々であり、実験にはカルスを使用していることから、この仮説についてはさらなる検証が必要である。

二重変異体 *apd1 sh11-2*、*apd1 ral2-1* と *apd1 mrl* の解析

apd1 と *sh11-2*、*ral2-1*、*mrl* との二重変異体を作成し、完成胚の表現型の観察を行った。

sh11-2 apd1 では、すべての胚でシュートが欠損し、2 つないしそれ以上の幼根を分化していた（図 3-11）。幼根が数えられる胚において、*sh11-2 apd1* の幼根数の平均は

A 野生型カルスの各処理区における反応



B *apd1*カルスの各処理区における反応

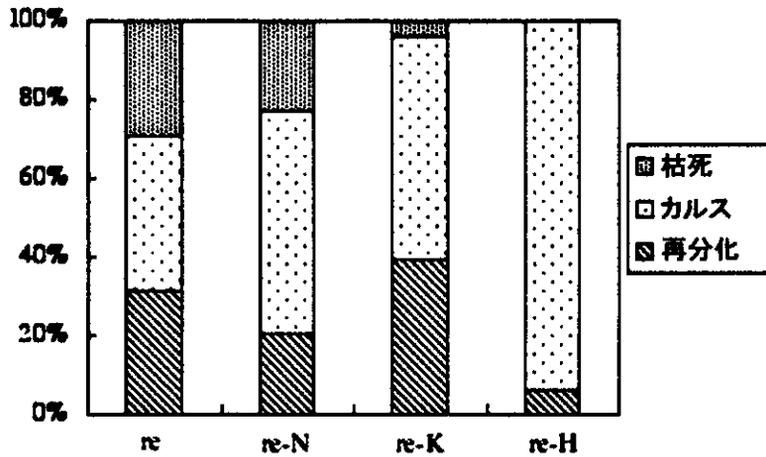


図3-10. 4つの処理区における野生型カルスと*apd1*カルスの反応の割合。A：野生型カルスの反応。B：*apd1*カルスの反応。re：再分化培地、re-N：再分化培地からNAAを除いたもの、re-K：再分化培地からカイネチンを除いたもの、re-H：再分化培地からNAAとカイネチンを除いたもの。再分化はシュート、グリーンスポット、あるいは根を分化したカルス、カルスはカルスの状態を維持したカルス、褐変は褐変枯死したカルスを示す。

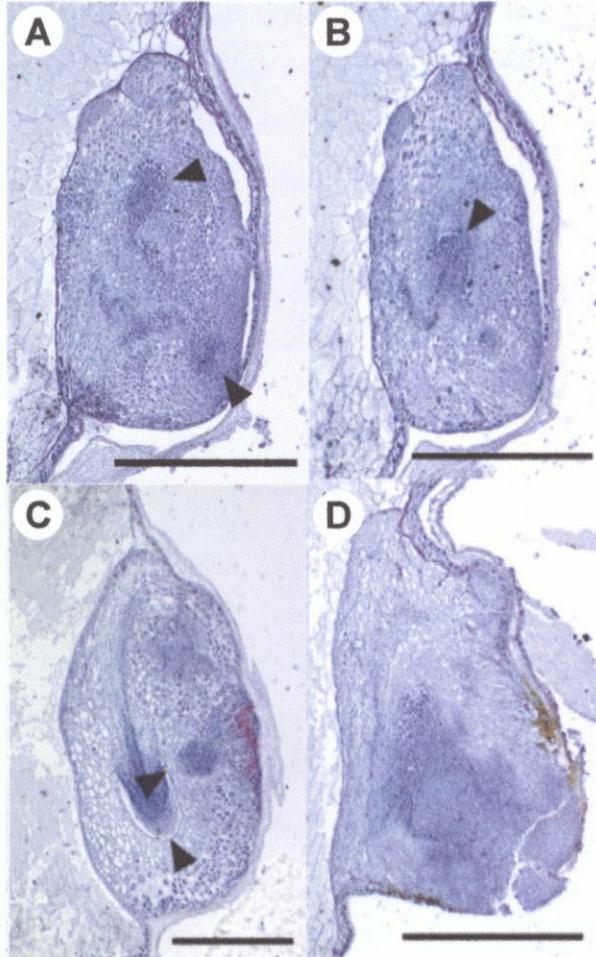


図3-11. *sh11-2 apd1*二重変異体の完成胚。A、
 B：同一胚の切片。シュートが欠
 損し、3つの幼根が分化している。
 C：シュートが欠損し、2つの幼根
 が分化している。D：複数の幼根
 が近接して分化している。矢頭は
 幼根を示す。Bar=500 μ m。

2.6であり、*apd1*の平均1.4を上まわっていた。このことから、*shl1-2 apd1*では、それぞれのシングルミュータントよりも基部領域が拡大したものと考えられた。また、幼根が腹側を向いて1つ、基部側を向いて1つ、別の切片の中央部に頂部側を向いて1つの合計3つの幼根を分化している胚も見られた(図3-11A、B)。この胚では、*apd1*よりも頂部側にずれた位置に幼根を分化しており、基部領域が*apd1*よりも拡大したものと考えられた。2つの幼根を背腹方向に並んで分化している胚では、腹側の幼根は背側を向いていた(図3-11C)。重度の異常を示す*shl1-2 apd1*では、複数の幼根と思われる組織が近接して基部領域に分化していた(図3-11D)。*shl1-2 apd1*では、*apd1*よりも基部領域の拡大が顕著になったことに加え、幼根の向きが異常となる新規の表現型が観察されたため、幼根の極性の異常もおきていると考えられた。*shl1-2 apd1*の表現型から、シュート形成には*SHL1*が必須であり、基部領域の拡大の抑制を介した幼根数の決定には*APD1*と*SHL1*が冗長的に機能していると考えられた。

*ral2-1*は、形態異常のシュートを分化し、幼根を欠損する変異体である。*ral2-1 apd1*では、新規の表現型が得られず、*ral2-1: apd1*の分離比は26:22であったため、*RAL2*の方が*APD1*よりも上位で機能していると考えられた。

*mr1 apd1*では、シュートは頂端には位置しておらず、頂部領域の基部より(図3-12A)や背側領域(図3-12D)に分化していた。前者の胚では、鞘葉の分化は見られるが、葉原基がない未発達なシュートを分化し、基部領域に4つの幼根を分化していた(図3-12A~C)。後者の胚では、背側領域に1つの未発達なシュートを分化しており、基部領域に4つの幼根を分化していた(図3-12D~F)。*mr1 apd1*では、幼根数が平均2.7であり、*apd1*の1.4、*mr1*の1.8よりも増加していたため、いずれのシングルミュータントよりも基部領域が拡大したものと考えられた。また、シュートが形成された位置が*apd1*や*mr1*の様に頂部領域に限られていなかったことから、胚の軸形成に*APD1*と*MRI*が冗長的に機能している可能性が示唆された。

考察

*apd1*の表現型の解釈と*APD1*の機能

*apd1*胚は、胚発生初期において、軸の形成や領域の分化には異常が認められなかったが、胚器官分化後に頂部領域の縮小と基部領域の拡大がおきる変異体であることが明らかになった。*apd1*の胚発生、栄養成長期と生殖成長期における表現型の異常は、

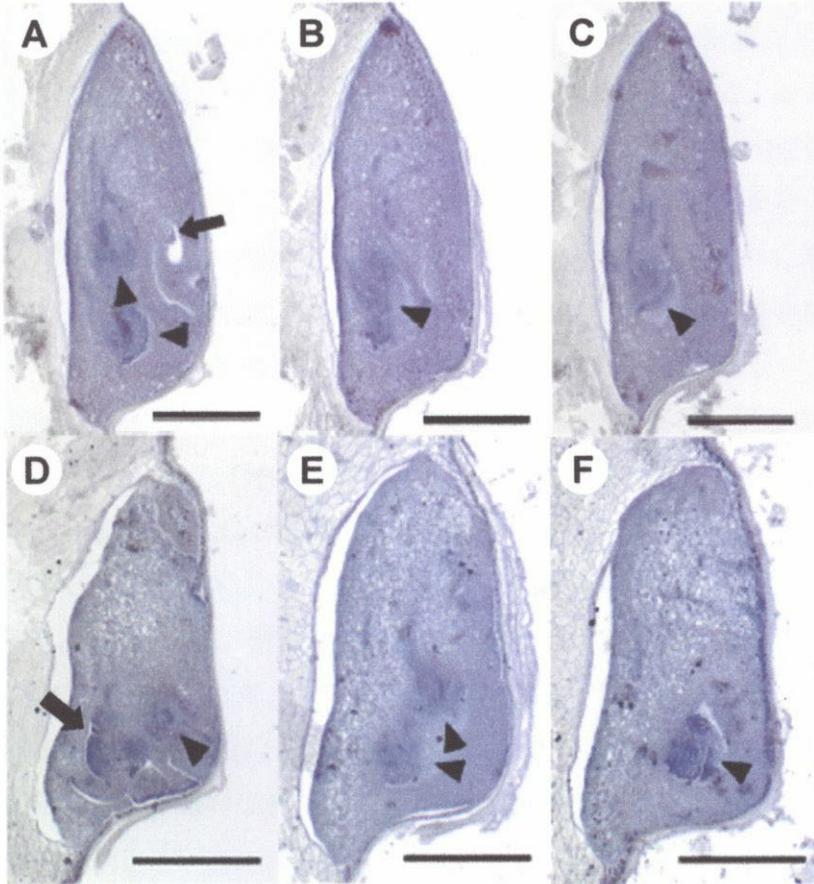


図3-12. *mr1 apd1*二重変異体の完成胚。A~C：同一胚の切片。1つのシュートと4つの幼根が分化している。D~F：同一胚の切片。背側領域に1つのシュートが、基部領域に4つの幼根が分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bar=500 μ m。

主に頂部領域の器官である胚盤やシュートに多面的に観察されたが、根系の異常は伸長阻害以外には見られなかったため、*APDI* は、頂部領域やシュートの発達に機能しており、基部領域の拡大は、頂部領域の縮小を補償する二次的な結果であると考えられた。このことから、胚器官分化後にも、頂部-基部領域の大きさの補償的な制御機構が存在するものと考えられた。以上のことから、*APDI* は、頂部-基部領域の大きさの制御において、*MRI* と類似した機能を持つことが推測されたが、相違点として *MRI* よりも遅いタイミングで機能を開始したことがあげられた。*apdl* では、*mrl* との相違点として、幼根は増加しても2つまでであったこと、2つの幼根の向きや位置はほぼ一定であったことがあげられるが、これは、基部領域が拡大を開始するタイミングが遅いため、領域や器官がある程度発達し、基部領域が拡大するスペースに制約が生じたためである可能性が考えられた。また、縮小した頂部領域では、胚盤や鞘葉の強い発達阻害によって、シュートが頂端に位置する現象が見られた。

以上のような *APDI* の機能をふまえて、二重変異体の表現型の解釈を行った。*shll-2 apdl* と *mrl apdl* では、それぞれのシングルミュータントよりも基部領域が拡大していたため、*APDI* と *SHL1*、*MRI* が、頂部領域の大きさの維持を介して、基部領域の拡大を冗長的に抑制していると考えられた。しかし、二重変異体では、これまでに推測された *APDI* の機能のみでは、説明できない表現型が見られた。すなわち、*shll-2 apdl* では幼根の向きにも異常が見られたことと、*mrl apdl* において、背側領域にシュートが分化していたことである。このことから、*APDI* は、胚器官分化以降に機能するだけでなく、胚発生初期に、軸の形成などのプロセスにも *SHL1* や *MRI* と冗長的に機能することが示唆された。

***APDI* のオーキシンとの関連性**

apdl の表現型を統一的に解釈する1つの仮説として、オーキシンに関する異常が考えられた。植物体の表現型、幼根やカルスのオーキシンに対する反応実験から、オーキシン濃度が上昇している可能性が示唆された。もし、*apdl* でオーキシン濃度の上昇がおきているならば、コムギで提唱されている、胚柄から頂部側へ向かってオーキシンが極性輸送され、その濃度勾配によって軸が形成されるというモデルを用いて (Fischer *et al.*, 1997)、*apdl* 胚の表現型が説明できる。すなわち、*apdl* では、オーキシン濃度の上昇により、野生型に比べ胚柄からの濃度勾配が全体的に高くなった結果、SAM や幼根などの胚器官が、野生型より胚柄から遠位にずれて形成されたという解釈である。

また、コムギの未熟胚におけるオーキシン濃度を検出した結果、球状胚では胚全体でほぼ均一であったため、受動的な拡散が起きており、胚器官分化期の胚では基部領域の胚柄付近と胚盤上皮組織で高濃度となっていたため、能動的な極性輸送が行われていることが報告されている (Fischer-Iglesias *et al.*, 2001)。この報告における、オーキシンの局在性が変化する時期は、器官分化開始期であり、オーキシンの濃度が高い領域は、胚盤と胚柄付近であった。これらは、*apdl* において異常が見られた時期と領域が一致する。したがって今後、*apdl* におけるオーキシン濃度などに関する詳細な解析が望まれる。

領域の拡大と器官の増加

apdl の解析から、胚発生後期においても頂部-基部領域の大きさは補償的な制御の下にあるというモデルが適合することが明らかになった。*mrl* と *apdl* では、拡大した基部領域に複数の幼根を分化することが示されたが、領域の拡大によって、その領域から分化する器官数が増加する現象は、他の変異体においても見られた。

トウモロコシの *abphl* では、胚発生時から拡大した SAM をもち、leaf founder cell 領域の拡大により、二つの葉原基を対生に分化するが、SAM のサイズが復帰するとこの現象も復帰する (Jackson and Hake, 1999)。したがって、領域の大きさと分化する器官数の間には相関があると考えられ、*mrl* や *apdl* において、幼根数にばらつきが見られたのは、基部領域の拡大の程度によるものではないかと推測される。

花芽分裂組織で提唱されている ABC モデルでは、クラス A とクラス C の発現領域は互いに抑制的であることが明らかになっている (Coen and Meyerowitz, 1991; Smyth *et al.*, 1990; Bowman *et al.*, 1991)。クラス A の発現の縮小によって、クラス C 発現領域が拡大し、雄しべと雌しべが増加し、クラス C の発現の縮小によって、クラス A 発現領域が拡大し、花弁とがくが増加する。このように、分裂組織における領域の大きさは、器官数と密接な関わりをもっている。このことから、胚器官を分化する腹側領域では、胚発生後期においても胚器官を分化する能力を維持していることが示唆された。

本研究で得られた *mrl* と *apdl* は、いずれも頂部領域の大きさの維持に機能していたが、これとは逆に、基部領域の大きさを維持している遺伝子が存在する可能性が考えられる。イネには、基部領域を欠損し、胚にシュートのみを分化する *radicleless1* (*rall*) 変異体が存在するが、これは維管束形成に異常をきたしたものであり (Scarpella *et al.*, 2003)、頂部領域の大きさに影響が見られていない。今後は、基部領域の大きさの制御に関連する変異体の同定も望まれる。

新規の変異体 *apd1* の解析から、*APDI* は *MRI* と異なる制御プロセスで、頂部－基部領域の大きさの制御に機能することが明らかになった。また、二重変異体の解析から、*APDI* は、領域の分化のみでなく、軸の形成に関与している可能性も示唆された。今後は、*APDI* の胚発生初期の機能も解明されていくことが期待される。