

第4章 多様な胚器官増加パターンを示す *are2* 変異体の解析

緒言

植物の胚発生初期のパターン形成では、極性によって軸が形成され、その軸に沿って領域が分化するといわれており、これらの制御プロセスにおける遺伝学的情報を得ることは、胚発生を理解する上で非常に重要であるといえる。

双子葉植物では、胚の形態から頂部-基部軸と左右軸が存在すると考えられるが、近年、シロイヌナズナの変異体や実験的手法を用いた解析により、軸の形成に関する遺伝学的情報が得られている。シロイヌナズナにおける頂部-基部軸は、オーキシンの極性によって形成されるといわれている。オーキシンの極性は、オーキシンの排出キャリア *PIN* やオーキシン取込キャリア *AUXIN RESISTANT 1 (AUX1)* によって作り出されていると考えられている (Friml, 2003)。*gn* では *PINI* の局在性が乱されており、オーキシンの極性異常によって、受精卵の第一分裂から異常が起き、胚器官の形成にも重大な影響を与える (Steinmann *et al.*, 1999)。また、*PID* を過剰発現させることにより、細胞内での *PIN* タンパクの局在位置が変わることから、*PID* は *PIN* の局在性を決定する機能を持つと考えられている (Friml *et al.*, 2004)。さらに、*pin* と *pid* では花序や花の形成においても、類似した表現型を示すため、オーキシンの極性は、ライフサイクル全体で頂部-基部軸の形成に関与しているといわれている (Okada *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1996)。その他に、シロイヌナズナでは *tpl* 変異体が報告されている (Long *et al.*, 2002)。*tpl* では胚の頂部領域において、子葉と SAM を欠損し、代わりに SAM の位置に根を分化し、基部領域では正常に幼根を分化していた。この表現型から、胚の頂部-基部軸に変更が生じたもの、あるいは SAM が根端分裂組織に転換したものであると解釈されている。

また、シロイヌナズナでは、左右軸に沿って、左右対称な子葉を形成するが、これは子葉の境界領域を決定する *CUC1*、*CUC2*、*STM* の機能により、2つの子葉領域の大きさが左右対称に決定されるためである (Aida and Tasaka, 1999; Aida *et al.*, 2002)。生理学的実験では、セイヨウカラシナの未熟胚にオーキシン極性輸送阻害剤処理を行うと、子葉が融合する、左右非対称になるなどの異常が見られたため、双子葉植物では左右軸にもオーキシンが関連するといわれている (Liu *et al.*, 1993)。以上のように、双子葉植物では、軸の形成に関する発生モデルが構築されつつある。

単子葉植物のイネの胚では、頂部-基部軸、左右軸に加えて、背腹軸が存在すると考えられる。頂部-基部軸に沿って、頂部領域にシュート、基部領域に幼根が、背腹軸に沿って、背側領域に胚盤の一部、腹側領域にシュート、幼根および胚盤の一部が分化する。左右軸は線対称である。しかし、イネ胚では、軸の形成に関する遺伝学的情報は、ほとんど得られていない。

そこで我々は、イネの胚発生初期における、軸の形成に関する遺伝学的制御機構を解明するため、第 1 章において、胚器官増加型変異体を同定した。その中で第 2 のグループに分類された *are2* は、頂部領域と基部領域に幼根が、背側領域にシュートが分化するという新規の表現型を示したため、軸異常変異体であるとして、本章において、詳細な解析を行った。

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

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アンチセンスプローブを、ポリ A 末端を含まない *OSH1*、*OsSCR* と *RAmy1* 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。

結果

are2 完成胚の表現型

are2 完成胚では、多様なパターンでシュートや幼根数の増加が見られ、胚器官の位置や形態には重度の異常が観察された（図 4-1）。*are2*に見られた代表的な表現型としては、以下のようなものが存在した。

約 15%の *are2* では、頂部領域に幼根が分化し、基部領域にはシュートが 1 つ、その基部側に 1 つないし複数の幼根が分化していた（図 4-1A）。この胚のシュートは、鞘葉は形成されていたが、SAM が扁平で葉原基は分化していなかった。頂部領域には、細胞の配列から、4 つの幼根が向かい合って放射状に分化していることが観察された。維管束は、頂部領域と基部領域の幼根とシュートとの間に形成されていた。

約 15%の胚で、1 つないし複数のシュートが背側領域に、1 つないし複数の幼根が頂部領域と基部領域に分化していた（図 4-1B）。背側領域では、SAM からは第 3 葉までが分化し、胚盤が形成されていた。頂部領域の放射状に分化した幼根付近では、維管束の異所的な形成が見られた。

約 12%の *are2* ではシュートが欠損し、1 つないし複数の幼根が頂部領域と基部領域に分化していた（図 4-1C）。この胚において維管束は、頂部領域と基部領域の幼根の間と、頂部領域の幼根から頂部側の胚盤に向かって形成されていた。

図 4-1D、E は同一胚の切片であり、シュートと幼根の一组が、頂部-基部軸が左右方向に回転した状態で形成されており（図 4-1D、E）、胚の中央では基部領域にもう 1 つの幼根が分化していた（図 4-1E）。SAM からは第 3 葉までが分化していた。この器官増加パターンは約 8%の *are2* で見られた。維管束はシュートと腹側の幼根の間に形成されており、胚軸や胚盤において異所的な維管束の形成も見られた。

また、約 8%の胚では、シュートと幼根の一组を左右方向に並んで 2 つ分化していた（図 4-1F）。この胚では、二組のシュートと幼根の間にもう 1 つの幼根を分化しており、シュートは頂部領域に幼根は基部領域に分化していた。

are2 の器官増加パターンは、以下のタイプに分類された。腹側領域にシュートが、頂部領域と基部領域あるいは基部領域に幼根が分化する胚が約 15%（表 4-1：シュートの分化パターンが腹側に 1 つと腹側に複数かつ幼根の分化パターンが頂部と基部の合計、図 4-1A）、背側領域にシュートが、頂部領域と基部領域あるいは基部領域に幼根が分化する胚が約 15%（表 4-1：シュートの分化パターンが背側に 1 つと背側に複数の合計、図 4-1B）、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胚が約 12%（表 4-1：シュートの分化パターンがなし、かつ幼根の分化パターンが頂部と基部、図 4-1C）、シュートと幼根の位置が左右にずれ、頂部-基部軸が左右方向に回転したような器官分化をする胚が約 8%（表 4-1：シュートの分化パターンが腹側に 1

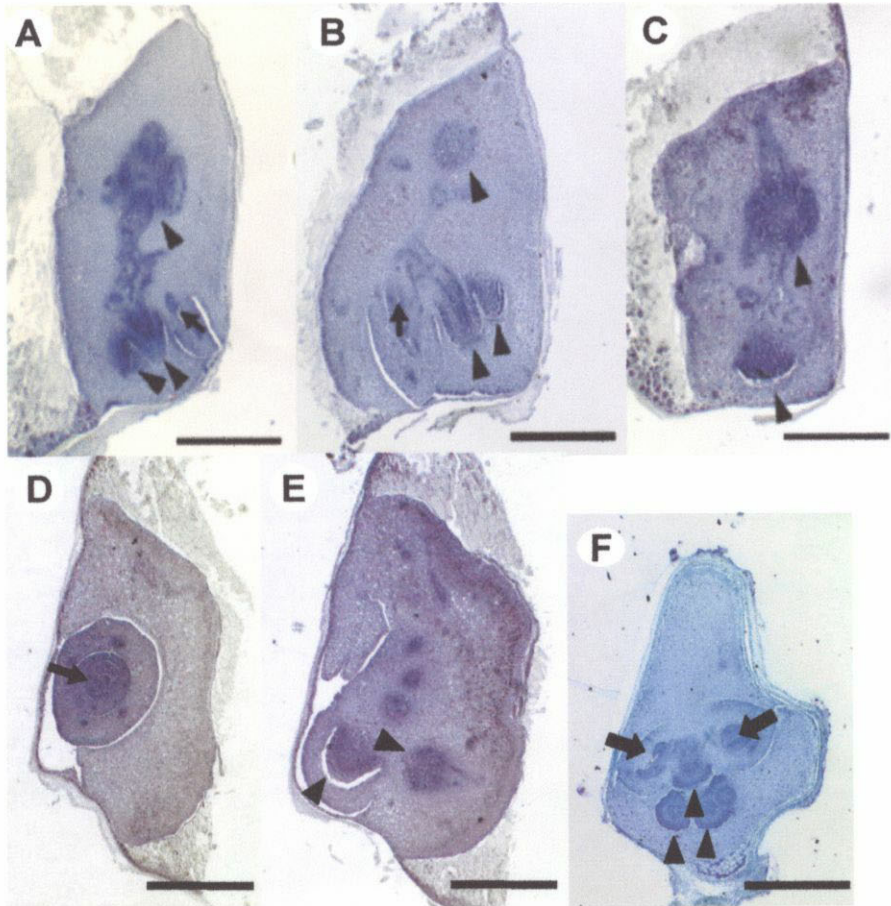


図4-1. *are2*の完成胚。A：シュートが背側領域に、幼根が頂部領域に向かい合って複数、基部領域に2つ分化している。B：シュートが背側領域に、幼根が頂部領域に放射状に、基部領域に2つ分化している。C：シュートが欠損し、幼根が頂部領域と基部領域に分化している。D、E：同一胚の切片。シュートが腹側領域に左右方向を向いて、幼根が基部領域に2つ分化している。F：シュートと幼根の一组が左右に並んで分化し、その中間にもう1つの幼根が分化している。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bar=500 μ m。

表4-1. *are2*におけるシュートと幼根の分化パターン

シュートの 分化パターン	幼根の分化パターン			計
	基部に1つ	基部に複数	頂部と基部	
腹側に1つ	21.2(11)	7.7(4)	13.5(7)	42.3(22)
腹側に複数	—	3.8(2)	1.9(1)	5.8(3)
背側に1つ	1.9(1)	3.8(2)	5.8(3)	11.5(6)
背側に複数	—	—	3.8(2)	3.8(2)
なし	17.3(9)	7.7(4)	11.5(6)	36.5(19)
計	40.4(21)	23.1(12)	36.5(19)	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。

つつ幼根の分化パターンが基部に複数、図 4-1D、E)、頂部-基部軸が複製されたような器官分化をする胚が約 8% (表 4-1: シュートの分化パターンが腹側に複数かつ幼根の分化パターンが基部に複数と、シュートの分化パターンが背側に複数かつ幼根の分化パターンが頂部と基部の合計、図 4-1F) 存在した。以上のように、*are2* における多様な器官増加パターンは、5 つのパターンに分類された。完成胚の観察から、*are2* では頂部-基部軸と背腹軸の極性の異常や頂部-基部軸の複製が起きていると考えられた。

胚盤上皮細胞長と背腹領域の相関

are2 完成胚では、胚盤上皮組織の中央付近に凹凸が生じていた。そこで、胚盤の異常に関する情報を得るため、胚盤上皮細胞長の計測を行った。

野生型完成胚の中央縦断切片において、胚盤上皮組織を頂部から基部へ向かって 50 等分し、各位置における胚盤上皮細胞の長さを計測した (図 4-2A)。いくつかの胚の平均をとった後、移動平均を用いてグラフを作成した。その結果、野生型の胚盤上皮細胞長は基部に向かって減少する傾向を示し、13 目盛りと 37 目盛りの位置で極大が見られた (図 4-2B)。

are2 においても同様の方法で胚盤上皮細胞長を計測した。頂部領域に幼根とシュートが、基部領域に 1 つの幼根が分化している胚では、グラフは野生型と同様に基部に向けて減少する傾向を示した (図 4-2C、D)。基部領域に幼根が、背側領域にシュートが分化した胚では、胚盤上皮細胞長はシュートや幼根が分化していない頂部側で短く、胚器官が分化している基部側で長くなっており、グラフは全体的に増加する野生型と逆の傾向を示した (図 4-2E、F)。シュートが欠損し、幼根が頂部領域と基部領域に分化した胚では、頂部領域と基部領域の幼根に近い胚盤上皮細胞は長く、器官分化がなく胚盤が陥没した中央部では短くなっていた (図 4-2G、H)。

このように野生型や *are2* の完成胚における胚盤上皮細胞長は、シュートや幼根が分化した領域の近傍では比較的長く、それらが分化していない領域の近傍では比較的短い傾向が見られた。このことから、*are2* と野生型との胚盤上皮細胞長のパターンの違いは、背腹領域の位置関係に異常をきたしたことを反映したものであると考えられた。

are2 の胚発生

are2 では受粉後 5 日目までは球状胚であり、器官が分化していなかった (図 4-3A)。受粉後 6 日目では、器官分化は見られなかったが、胚の中央に、野生型では見られな

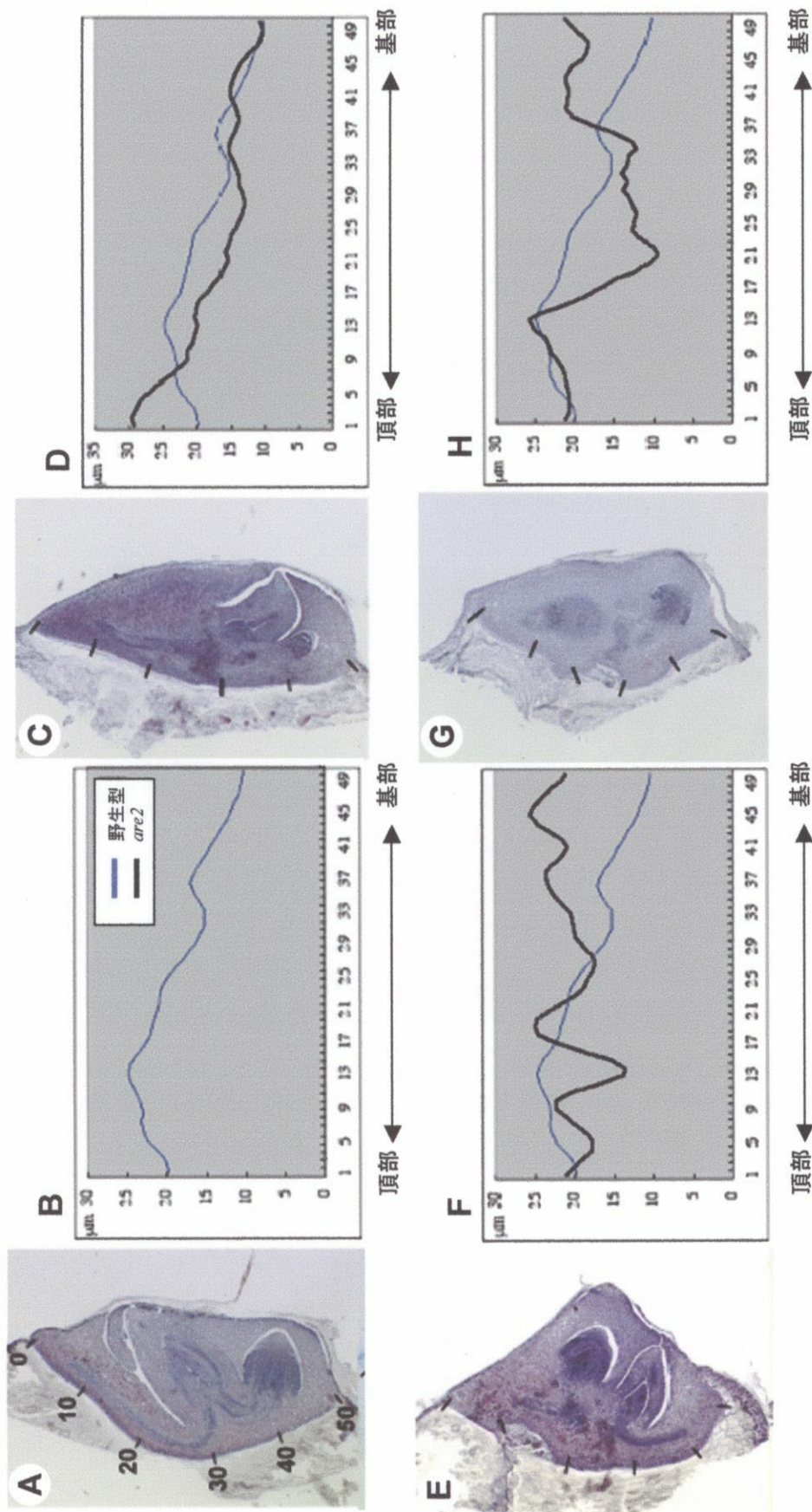


図4-2. 野生型と*are2*の胚盤上皮細胞長。A、B：野生型、A：胚乳に接する胚盤上皮細胞の境界線を50等分し、各位置における胚盤上皮細胞の長さを計測した。図では10目盛りごとに目盛りを記入してある。B：胚盤上皮細胞長。C～H：*are2*、C：頂部領域に幼根とシユートが、基部領域に幼根が分化した胚。D：Cの胚における胚盤上皮細胞長。E：基部領域に幼根が、背側領域にシユートが分化した胚。F：Eの胚における胚盤上皮細胞長。G：頂部領域と基部領域に1つずつの幼根を分化した胚。H：Gの胚における胚盤上皮細胞長。グラフは移動平均によって平滑化した。

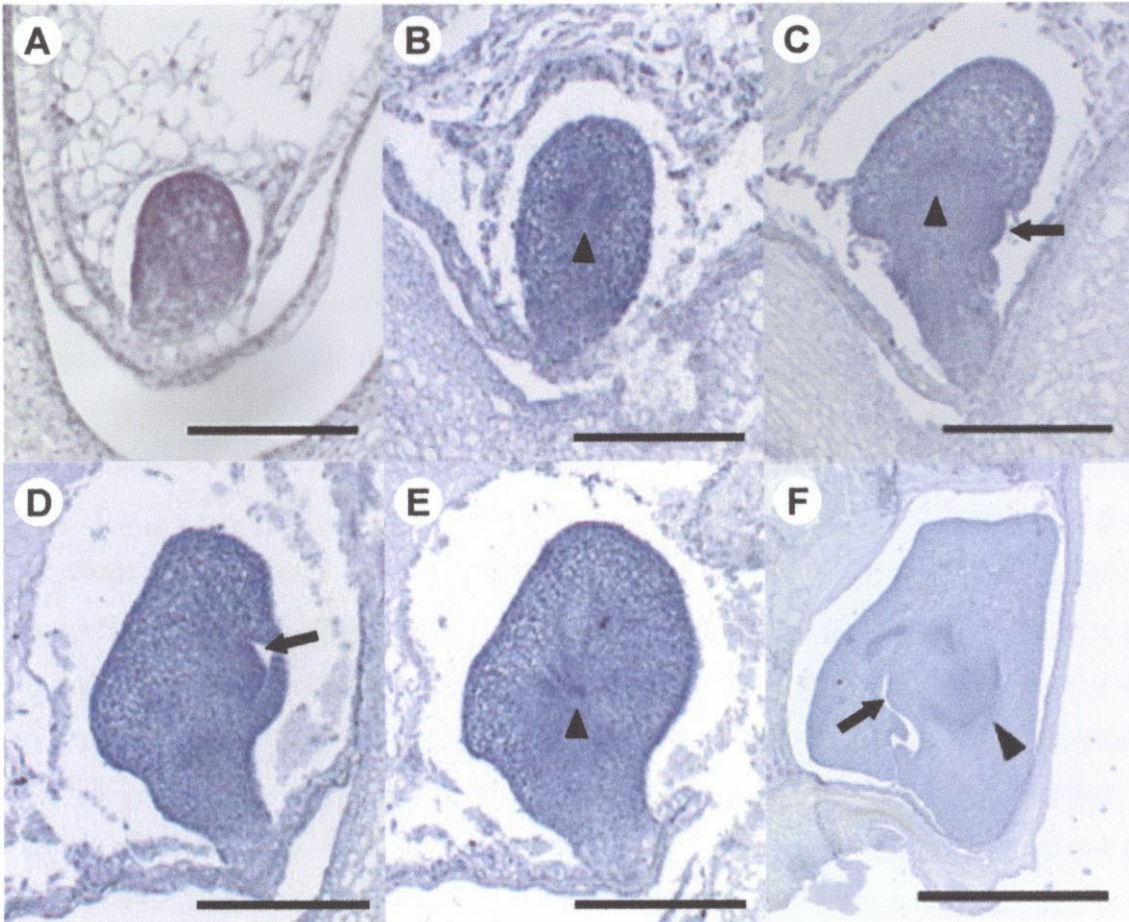


図4-3. *are2*の胚発生。A：受粉後5日目、B：受粉後6日目、C：受粉後7日目、D、E：同一胚の切片。受粉後9日目。F：受粉後12日目。矢印はSAM、矢頭は幼根を示す。Bar=100 μ m (A)、200 μ m (B~E)、500 μ m (D)。

い密な群が分化し、すでに胚の軸や領域に異常が起きていることが示された（図 4-3B）。受粉後 7 日目では、鞘葉と SAM が分化を開始し、将来の幼根に対応すると思われる密な細胞群が胚の頂部領域にも存在していた（図 4-3C）。受粉後 9 日目では、頂部領域の左右にずれた位置でシュートが形成され（図 4-3D）、幼根が基部領域の左右にずれた位置に分化するという（図 4-3E）、頂部－基部軸が回転したような器官分化を行なう胚が見られた。受粉後 12 日目では、シュートが背側領域に、幼根が基部領域に分化し、背腹軸の極性が逆転したような胚が見られた（図 4-3F）。

以上のように、*are2* では、胚発生初期から多様な器官分化パターンを示し、これらは、軸の極性の異常が原因であることが示唆された。

are2 における *OSHI*、*OsSCR* と *RAmy1* の発現パターン

are2 の胚発生における領域分化を解析するために、3 つの分子マーカー、*OSHI*、*OsSCR* と *RAmy1* を用いて *in situ hybridization* を行った。

are2 における受粉後 5 日目の *OSHI* の発現は、球状胚において、左右方向にずれた領域で発現しているものが見られた（図 4-4A～D）。これは、頂部－基部軸が左右方向に回転したものと考えられた。受粉後 7 日目では、基部領域の胚盤付近から胚の中央にかけて拡大した発現に加え、頂部領域の左右にずれた領域の 2 箇所が発現しているものが見られた（図 4-4E～H）。頂部領域での発現は、頂部領域の幼根付近での発現に対応するものと考えられた。受粉後 9 日目では、将来の頂部領域と基部領域の幼根に対応すると思われる、胚の内部で発現するものが見られた（図 4-4I）。受粉後 9 日目の別の胚では、背側領域での発現が見られ、発現に対応した位置に、SAM が分化していた（図 4-4J）。この胚では、背腹軸の極性が逆転していると考えられた。また、受粉後 9 日目の別の胚では、頂部領域腹側の SAM での発現に加え、背側領域と基部領域へ発現が拡大しているものも見られた（図 4-4K）。この胚では、頂部領域の著しい拡大が起こっていたため、軸が複製されている可能性が示唆された。以上のように、*are2* では、胚発生初期から、多様なパターンで *OSHI* の発現領域に異常が認められた。これらの発現領域の異常は、*are2* 完成胚から予測された、軸の極性の異常や複製などと一致していた。

次に、*OsSCR* の発現パターンを解析した。*are2* では受粉後 5 日目の球状胚において、表皮の内側の層でリング状に発現を開始しており、部分的に表皮側へ発現部位が増加していた（図 4-5A）。受粉後 6 日目の球状胚では、リング状の発現を継続していたが、全体的に表皮側へ発現部位が増加し、また、胚の形態が楕円型をしていたため、

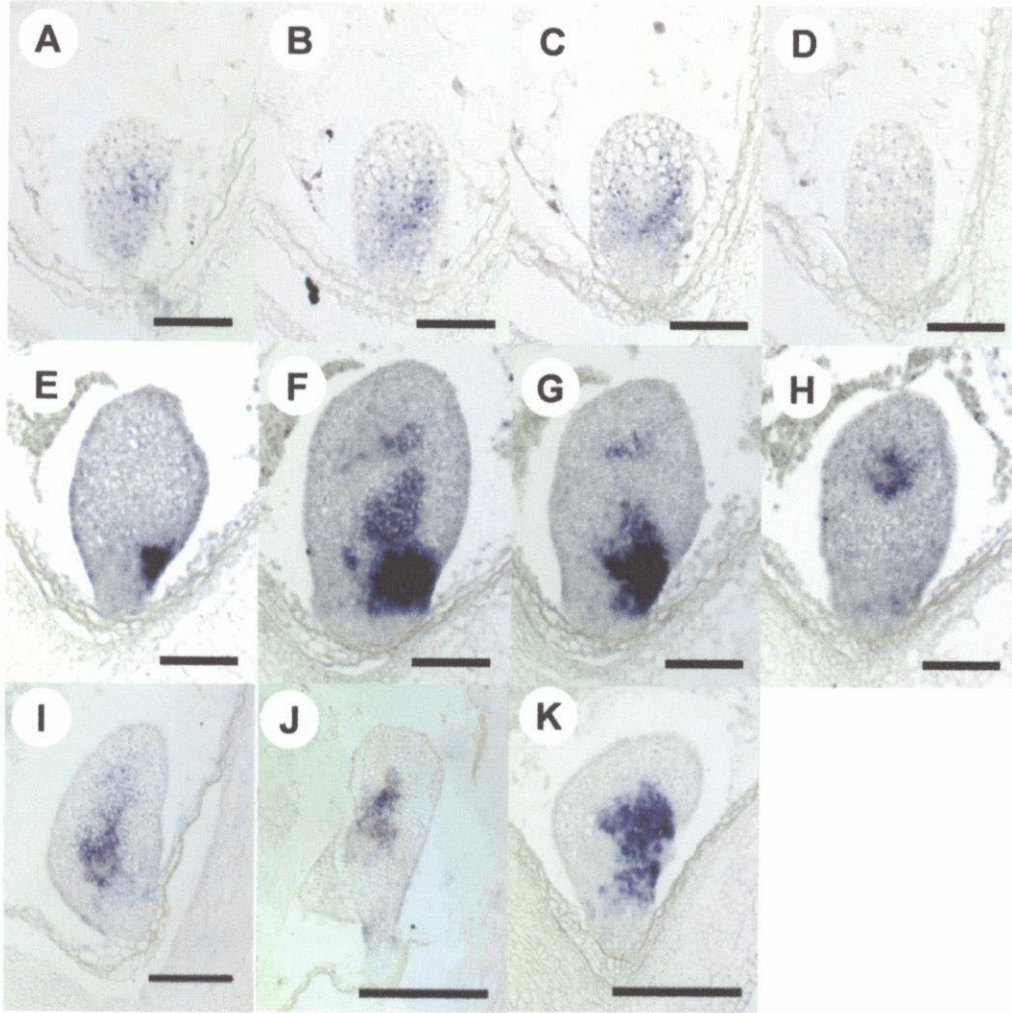


図4-4. *are2*における*OSH1*の発現パターン。A~D: 同一胚の切片。受粉後5日目。E~H: 同一胚の切片。受粉後7日目。I~K: 受粉後9日目。I: 内部で発現している。J: 背側で発現している。K: 腹側で発現している。Bar=100 μ m (A~I) 、200 μ m (J, K) 。

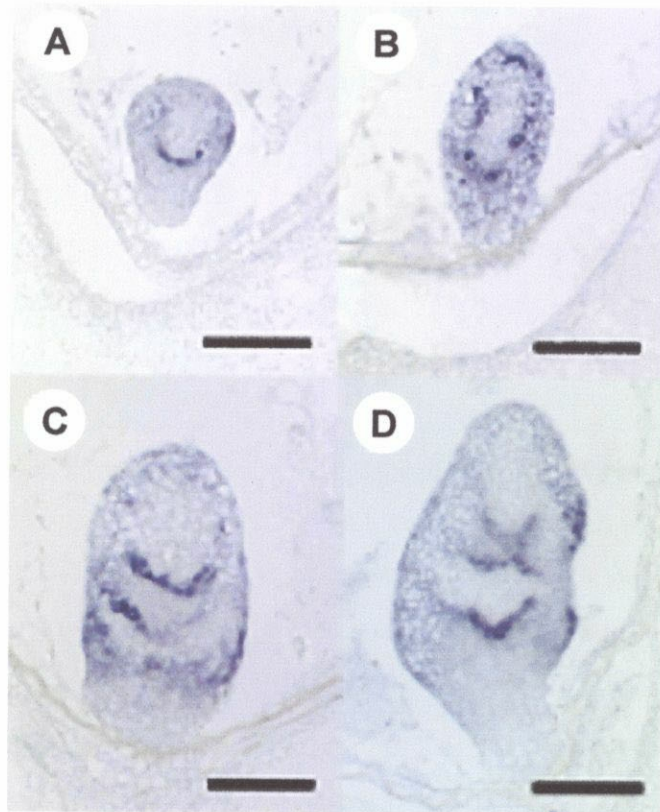


図4-5. *are2*における*OsSCR*の発現パターン。A：受粉後5日目、B：受粉後6日目、C：受粉後7日目、D：受粉後9日目。Bar=100 μ m。

OsSCR の発現も楕円状となっていた (図 4-5B)。受粉後 7 日目では、2 つのアーチ状の発現が頂部-基部方向に並び、さらに基部側の胚柄付近でも発現が拡大していた (図 4-5C)。この発現パターンは、頂部領域と基部領域の幼根に対応したものであると考えられた。受粉後 9 日目において、頂部領域と基部領域において、それぞれ幼根に対応した位置にアーチ状の発現が見られた (図 4-5D)。以上のように、*are2* では *OsSCR* は球状胚でリング状に発現を開始し、次第に発現部位が増加した後、幼根の増加を反映して、発現部位が増加したものと考えられた。*OsSCR* の発現パターンからも、*are2* では胚発生初期から軸の極性などの異常がおきていることを支持する結果が得られた。

さらに、イネのアミラーゼをコードし、胚発生において胚盤上皮細胞で特異的に発現する遺伝子 *RAmy1* をプローブに *in situ hybridization* を行った。野生型では受粉後 4 日目から頂部側の胚盤上皮細胞で発現を開始し (図 4-6A)、その後基部側へ発現が拡大していき、受粉後 7 日目では胚盤上皮細胞のほぼ全域で発現するようになった (図 4-6B)。

これに対し、*are2* では受粉後 9 日目の胚盤上皮細胞で、頂部側と基部側から同時に発現を開始した (図 4-6C)。受粉後 11 日目では、頂部側と基部側から発現が開始しており、さらに、頂部領域の発現が腹側へ拡大しているものも見られた (図 4-6D)。以上のように、*are2* では、頂部側から開始すべき *RAmy1* の発現が、頂部側と基部側から同時に開始していたことから、頂部-基部軸の異常がおきているといえた。また、*RAmy1* の発現が腹側にも拡大したことから、背腹軸の異常が示された。

胚の観察結果を総合すると、*are2* では胚発生初期から、頂部-基部軸と背腹軸の極性の異常や頂部-基部軸の複製などがおきたことで、領域の位置関係に異常をきたしていると考えられた。また、軸の極性の異常や複製によって、領域の大きさが影響され、その結果、胚器官が増加したことが示唆された。

***are2* 植物体の表現型**

are2 の発芽後 14 日目の植物体は草丈約 3cm で矮化しており、第 1 葉、第 2 葉の分げつの伸長が見られた。幼根の長さは約 7cm とやや伸長阻害を受けていた (図 4-7A)。発芽後 30 日目では、草丈は約 10cm、分げつ数は 13~15 本と叢生の草型を示した (図 4-7B)。幼根は約 10cm と伸長阻害を受けていた。*are2* はその後の生育においても、分げつの増加と矮化による叢生の草型を示した。また、発芽後 100 日後を経ても生殖成長への転換は見られなかった。

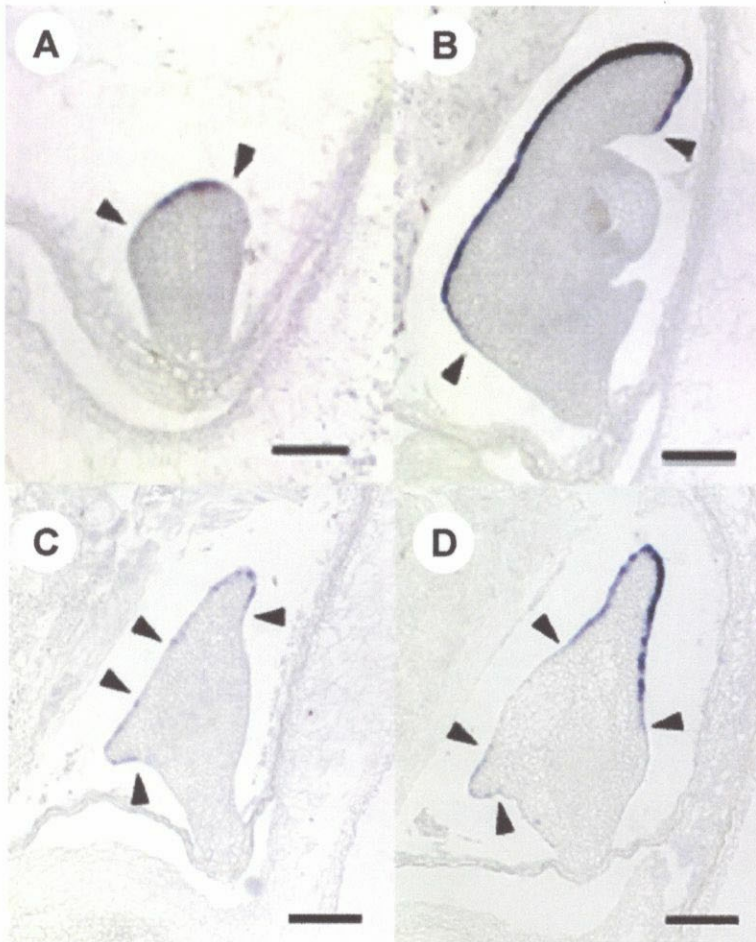


図4-6. 野生型と*are2*の胚発生における*Ramy1A*の発現パターン。A、B：野生型、A：受粉後4日目、B：受粉後7日目。C、D：*are2*、C：受粉後9日目、D：受粉後11日目。矢頭の間が*Ramy1A*の発現。Bar=100 μ m。



図4-7. *are2*の植物体。A：発芽後14日目、B：発芽後30日目。Bar= 1 cm。

これらのことから、*are2* は栄養成長期においても、葉や根の伸長や分けつの成長に異常がおきていること、生殖成長への転換のタイミングに異常を持つことが明らかになった。

二重変異体 *are2 mrl* と *are2 apd1* の解析

遺伝子間の相互作用を解析するために、*are2* と器官増加型変異体 *mrl* と *apd1* との二重変異体を作成し、完成胚の観察を行った。

are2 mrl では、新規の表現型が得られず、野生型：*are2 : mrl* の表現型が、63 : 27 : 22 で存在した。*are2 apd1* においても新規の表現型が得られず、野生型：*are2 : apd1* の分離比が、33 : 17 : 9 であった。このことから、軸の極性や数を制御する *ARE2* は、頂部－基部領域の大きさを制御する *MRI* や *APD1* の上位で機能していると考えられた。

考察

are2 表現型の解釈

これまでに解析した領域分化異常変異体、*mrl*、*apd1* では頂部－基部軸と背腹軸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おこっていた。これに対し *are2* では、頂部領域に幼根が、背側領域にシュートが分化するなどの多様な器官増加パターンが見られたため、頂部－基部軸や背腹軸の極性の異常や、頂部－基部軸の複製によって、その後の領域の発生運命が変更されているものと考えられた。初期胚発生の解析からも、軸の極性に異常をおこしているとの仮説を支持する結果が得られたため、*are2* は頂部－基部軸と背腹軸の極性が変更される、頂部－基部軸が複製されるといった異常をおこす軸異常変異体であることが明らかにされた。したがって、*ARE2* は胚発生初期の頂部－基部軸と背腹軸の正常な極性の決定に必要な遺伝子であると考えられた。また、*are2* では、一見、軸の極性は正常で幼根が増加している胚が見られたが、これは軸が複製されたことで、領域の拡大がおきたものと考えられた。したがって、*ARE2* は軸の極性の決定のみではなく、軸の複製の抑制にも機能するものと考えられた。*are2* では、多様な胚器官増加パターンを同程度の頻度で引き起こすことから、軸の形成が不安定であったといえた。

頂部領域と基部領域の大きさの制御には、補償的な相互作用が働くことが *mrl* と *apd1* の解析から見いだされている。しかし、*are2* における本章で用いた分子マーカー

の発現は、いずれも拡大する傾向が見られた。また、完成胚においてシュートと幼根の双方が増加する胚も得られている。したがって、*are2* においては頂部領域と基部領域ともに拡大していたことが示唆され、隣接する領域間の補償的な相互作用は確認できなかった。このことから、軸の異常により領域の位置関係に異常がおきた場合は、位置関係が正常な状態である時のような、隣接する領域間の補償的な相互作用を喪失するのではないかと考えられた。

以上のように *are2* は、頂部-基部軸と背腹軸の双方の極性に異常をきたし、かつ、頂部-基部軸が複製する場合もある、軸異常変異体であることが明らかにされた。

***are2*における軸の変更のモデル化**

are2 では、頂部-基部軸と背腹軸の極性異常や頂部-基部軸の複製がおきていることが示された。そこで、これらの軸は器官分化以前の胚でどのように変更されたのかを考察し、モデル化した。

野生型胚における軸を、頂部-基部軸とそれに直交する背腹軸として示した（図 4-8A 左）。野生型では、双方の軸に沿って、領域が分化する。領域の位置関係と大きさは正常に制御され、頂部領域と基部領域に 1 つずつのシュートと幼根を分化する（図 4-8A 右）。

これに対し、*are2* の特徴的な表現型である、幼根が頂部領域と基部領域に、シュートが基部領域に分化した胚では、本来の頂部-基部軸が背腹軸に、本来の背腹軸が頂部-基部軸に置き換わっていると考えることができた（図 4-8B 左）。その結果、本来の頂部領域は基部領域に発生運命が変更され、ここには十分なスペースが存在するため、頂部領域にも幼根が分化したものと考えられた（図 4-8B 右）。また、頂部領域と基部領域に幼根が、背側領域にシュートが分化するタイプでは、前述のタイプ同様、頂部-基部軸と背腹軸が置き換わっていると考えられた。このタイプでは、頂部-基部の極性が前述のタイプと逆になっており、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と考えられた（図 4-8C）。シュートが欠損し、頂部領域と基部領域に幼根が分化した胚では、頂部-基部軸の極性が異常をきたし、軸の両側に基部領域が分化したことが推測された（図 4-8D）。また、シュートと幼根の一组が左右にずれて分化する胚では、頂部-基部軸が左右方向に回転した状態になることで、このような器官分化をしたものと説明できる（図 4-8E）。また、シュートと幼根の一组を左右に並んで分化していた胚では、頂部-基部軸が複製されたことにより、器官の増加を招いたものと考えられた（図 4-8F）。以上のように、*are2* における 5 つの器官増

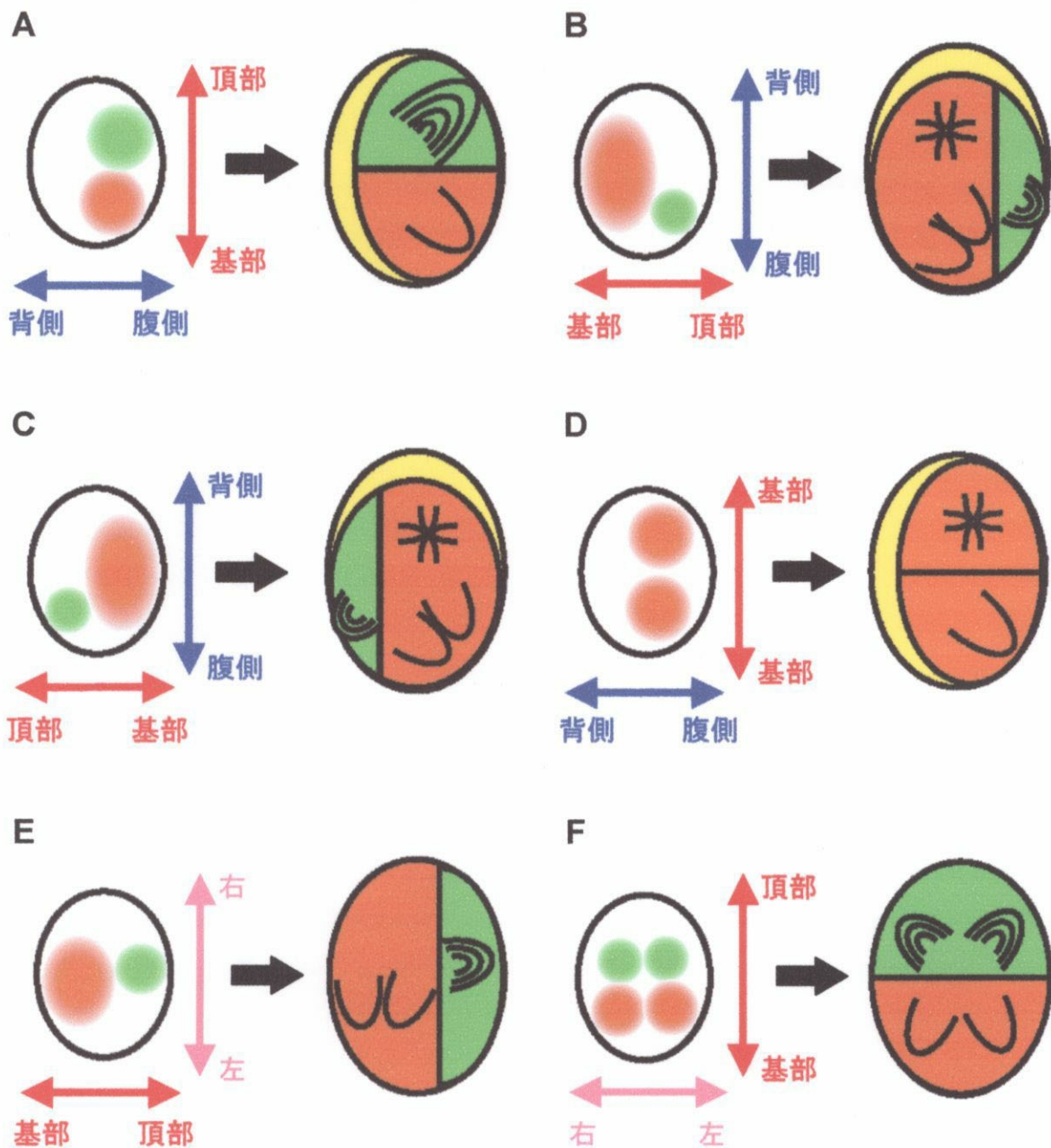


図4-8. 野生型と*are2*における軸の形成。A：野生型の胚発生。胚発生初期において頂部－基部軸と背腹軸が決定し、これに沿った領域分化がおき（左）、その結果、シュートと幼根が1つずつ分化する（右）。B～F：*are2*の胚発生。B：頂部－基部軸が背腹軸に、背腹軸が頂部－基部軸に変更した胚。C：頂部－基部軸が背腹軸に、背腹軸が頂部－基部軸に変更した胚。Bとの違いは、頂部－基部軸の極性が逆転しているところ。D：頂部－基部軸の極性に異常をきたした胚。E：腹側方向から見た胚。頂部－基部軸が左右方向に回転した胚。F：腹側方向から見た胚。頂部－基部軸が左右に並んで複製された胚。

加パターンは、軸の極性異常（図 4-8A～E）や複製（図 4-8F）によって説明できた。*are2* では、これらの軸の異常に加え、各領域の大きさが変更されるため、胚器官の増加パターンの多様性を生み出していたといえる。領域の大きさの制御に関しては、軸の異常によって領域の位置関係に変更が生じ、領域の大きさが変更されたか、あるいは、*ARE2* が領域の大きさの制御にも、直接機能している可能性も考えられた。*are2* では、一見、軸に異常が見られない胚では、器官増加がおきていない事が多いため、前者である可能性が高いと考えられた。

したがって、*are2* は、複数の軸の極性に異常をきたす変異体であるといえたが、軸の変更パターンが不安定になる原因は不明であるため、これについては、今後の課題になると思われる。

イネ胚における軸の形成

本章での解析により、*are2* では頂部－基部軸と背腹軸の極性が変更される、頂部－基部軸が複製する異常がおきており、*ARE2* は胚発生初期における、これらの軸の決定機構に機能を持つと考えられた。

シロイヌナズナの胚における頂部－基部軸は *PIN*、*PID*、*GN* などの解析からオーキシンの極性によって決定されるといわれている（Friml *et al.*, 2003, 2004; Steinmann *et al.*, 1999）。領域分化異常変異体の *mrl* と *apdl* では、オーキシンに関する異常が見られたこと、*are2* でも植物体のシュートで、*mrl* や *apdl* と類似した多面的な表現型が見られたことから、イネでもパターン形成に対するオーキシンの関与が示唆される。また、近年、*pin1 pid* 二重変異体では、2 つの子葉の左右相称性が崩れることから、*PIN1* と *PID* は、左右軸の形成にも冗長的に機能していることが報告された（Furutani *et al.*, 2004）。したがって、シロイヌナズナでも複数の軸の形成に関与する遺伝子の存在は知られているといえる。

一方、動物の胚では頭尾軸、背腹軸と左右軸の 3 つの軸が存在し、これらはほとんどの場合、独立した遺伝子の制御を受けていると考えられていた。しかし近年、マウスで *LEFTY1* や *NODAL* が頭尾軸と左右軸の双方の決定に関与することが報告されたため（Yamamoto *et al.*, 2004）、複数の軸の形成に関与する遺伝子が存在することが明らかにされている。

本章で解析をおこなった *ARE2* は、イネ胚発生の頂部－基部軸と背腹軸の極性の決定、軸の増加の抑制において重要な役割を担っている遺伝子であることが明らかにされた。また、軸は極性の存在によって形成されるため、極性の異常とも密接に関連し

ていると考えられた。イネ胚では複数の軸が、遺伝学的に独立ではなく、連動して制御される場合があることが示された。したがって、イネにおける軸異常変異体として、*are2* は貴重な材料として利用できるといえる。しかし、イネ胚の軸形成に関する情報は、未だ少ないため、今後もより多くの変異体の同定と解析が望まれる。

総合考察

本研究では、イネの胚発生初期のパターン形成における遺伝学的機構を解明することを目的として、9系統の胚器官増加型変異体を同定し、解析を行った。その結果、軸の形成と領域の分化に関する新たな知見を得ることができた。これまで植物において、胚器官が増加する変異体はほとんど報告されていなかったが、今後、胚発生初期のパターン形成のメカニズムを遺伝学的に解析するために、有効な材料であることが示された。

胚器官増加型変異体の原因遺伝子の機能

第1章では、9系統、8遺伝子座に由来する、1遺伝子劣性の胚器官増加型変異体が得られた。これらの系統における胚発生や植物体の観察を行い、パターン形成の特徴から5つのグループに分類した。5つのグループとは、I：幼根が増加する変異体 (*mr1*、*apd1*)、II：多様なパターンで胚器官が増加する変異体 (*are2*)、III：シュートと幼根が増加する変異体 (*are1*、*are4*、*odm400*)、IV：巨大胚でシュートと幼根が増加する変異体 (*odm132*)、V：胚発生後期にシュートと幼根が増加し、栄養成長期にも異所的なSAMを分化する変異体 (*odm87*)、である。それぞれのグループにおける、原因遺伝子の機能は、I：頂部－基部領域の大きさの制御、II：頂部－基部軸と背腹軸の極性と頂部－基部軸の数の制御、III：背側領域の分化、IV：背側領域の分化と胚の大きさの制御、V：胚発生後期における背側領域の維持と栄養成長期におけるSAM分化の抑制、であると考えられた。パターン形成の制御プロセスは、極性の決定、軸の形成、領域の分化の順に進行していくと考えられており、グループIIは軸の形成機構に、グループI、III、IV、Vは領域の分化に関与する遺伝子に変異がおきたものと考えられた。また、グループ4の *ODM132* は、軸の制御に加えて胚の大きさも制御しており、2つの異なるメカニズムに関与するユニークな機能を持つ遺伝子であると考えられた。胚の大きさは、胚乳側の因子である *GE* と *RE* によって制御されているとの報告がなされているが (Hong *et al.*, 1996)、*ODM132* は胚の領域分化の制御機構に関与していたため、胚側の因子が胚の大きさを制御する新規の機能を持つ可能性がある。

以上のように、本報告で得られた胚器官増加型変異体の原因遺伝子は、すべてパターン形成に関連する機能を持ち、これらの変異体の存在によって、パターン形成には軸の形成や領域の分化などの制御機構が存在し、軸の形成機構では、頂部－基部軸や

背腹軸が連動して制御され、領域の分化機構では、頂部-基部領域と背腹領域は独立して制御されることが示された。

胚の極性と軸の決定

イネの胚には、頂部-基部、背腹、左右の 3 つの軸が存在すると考えられ、これら 3 つの軸は、極性によって決定されると考えられる。イネ (科) の胚では、*are2* のような、複数の軸の極性が異常になる表現型を胚乳との位置関係で認識できるが、双子葉植物の胚では、それができないため、複数の軸の極性の異常を認識することは難しい。これは、軸形成に関する解析を行うためにイネの胚が有利な点である。

この極性を決定する 1 つの因子は、他の植物の報告からも、現在のところオーキシンとする説が有力である。シロイヌナズナの *gn* ではオーキシン排出キャリア PIN の細胞内の局在性が乱され、オーキシンの極性に異常をきたした結果、頂部-基部軸が正常に形成されず、SAM、子葉、幼根などの胚器官の欠損が見られた (Mayer *et al.*, 1991, 1993; Shevell *et al.*, 1994; Busch *et al.*, 1996; Steinmann *et al.*, 1999)。また、生理学的実験では、セイヨウカラシナやコムギの胚発生初期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することで、球状胚のまま発生を停止することが報告されているが、これもオーキシンの極性の異常を人為的に引き起こしたことにより、胚の極性と軸が形成されずに、器官を欠損したものと考えられた (Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.*, 1998; Fischer and Neuhaus, 1996; Fischer *et al.*, 1997)。イネ胚発生変異体には、胚器官を分化せずに球状胚で発生を停止する変異体が数系統得られている (Hong *et al.*, 1995)。極性を完全に失った場合は、それ以降の軸の形成や領域の分化が行われず、器官を欠損すると思われる。したがって、器官増加型変異体だけでなく、器官分化が起こらない変異体の中にも頂部-基部などのパターン形成に異常をきたした変異体が存在する可能性があるため、詳細な解析が望まれる。実際、そのうちの *gle4* は、胚の放射パターンに異常をきたしたものであるとの報告がなされている (Kamiya *et al.*, 2003)。

本報告で解析を行った *ARE2* は、頂部-基部軸と背腹軸の極性あるいは頂部-基部軸の数の制御に関与するとの結論が得られた。シロイヌナズナの *pin* や *pid* では、頂部領域の器官が欠損する、子葉の左右相称性が崩れるなどの事から、PIN や PID は頂部-基部軸と左右軸の双方に機能する遺伝子であるということができ、また、これらの遺伝子はオーキシンの極性の創出に機能していることが明らかにされている (Okada *et al.*, 1991; Berleth and Jurgens, 1993; Bennett *et al.*, 1996; Friml *et al.*, 2004; Furutani *et al.*, 2004)。ARE2 の複数の軸に対する機能を統一的に説明するための有力な仮説の 1 つと

して、*ARE2* もオーキシンに関与する機能を持つことが考えられた。*are2* 胚では、維管束の走向に異常が見られたこと、植物体では分げつの増加、葉の伸長阻害が起きたことなど、オーキシンが関与すると思われる表現型を示したことも、この仮説を支持していた。

シロイヌナズナの *tpl* は頂部と基部に根を形成するため、*are2* における頂部領域と基部領域に幼根を分化する胚のように、軸の極性異常をおこしたように見えるが、頂部領域に分化した根では、幼根で発現するマーカー遺伝子の発現が見られないことから、栄養成長における根が、胚発生時に分化したものであるといわれている (Long *et al.*, 2002)。したがって、*tpl* は頂部-基部軸の変異体ではなく、SAM の発生運命が根端分裂組織に変更されたものである可能性が高い。このことから、*are2* は、新規の軸異常変異体であるといえた。

左右軸に関しては、双子葉植物、単子葉植物ともに左右相称である。シロイヌナズナでは、子葉の左右相称性が崩れる、子葉が融合する、3 枚以上が形成されるなどの表現型を示す変異体の同定によって、左右の領域の分化に関するアプローチが行われている。子葉が融合する *cuc* 変異体の解析から、シロイヌナズナの胚の左右相称性は *CUC* や *STM* の子葉間の境界領域での発現が、2 つの子葉領域の大きさを決定していることが知られている (Aida *et al.*, 1999, 2002)。しかし、左右軸がどのように形成されるかは、明らかにされていない。本報告では、器官増加型変異体の胚の観察には、主に縦断切片を用いたため、左右の形態については着目していないが、*are2* において、左右方向に頂部-基部軸が回転する現象が見られたことから、頂部-基部軸と背腹軸のみでなく、左右軸も連動して制御されていることが示唆された。また、領域の大きさや分化に異常をきたす *mrl*、*are1*、*are4*、*odm400*、*odm132* においても、シュートや幼根が左右非対称に分化している場合も多く見られたため、左右軸の形成機構は今後の課題といえる。

胚の領域の制御

領域の分化について精力的に解析が進められているのが、シロイヌナズナにおける頂部-基部軸に沿った、頂部-中央部-基部領域の分化である。シロイヌナズナの胚は、この 3 つの主要な領域から構成され、頂部領域はさらに、将来 SAM を分化する子葉間の境界領域と 2 つの子葉領域に細分化する (Aida *et al.*, 1997; 2002, Aida and Tasaka, 1999)。しかし、主要な領域の相互関係については情報が得られていなかった。本研究では、グループ I の *mrl* と *apdl* の解析から、頂部-基部領域の大きさは、胚発生の

初期、後期を通じて補償的に制御されるというモデルが得られた。この隣接する領域の補償的な制御は、グループⅢの *are1*、*are4*、*odm400* とグループⅣの *odm132* の解析から、背腹領域の大きさの制御にも適応されると考えられた。これらの変異体では、背側領域が欠落し、背側領域に腹側領域が拡大あるいは鏡像対称に複製したものと考えられた。この制御モデルは、これまでに得られていなかった、主要な領域間の相互作用に関する新規の情報である。

隣接する領域の大きさが補償的に制御される発生モデルは、双子葉植物の葉原基における向背軸の領域分化や (Waites and Hudson, 1995; McConnell and Barton, 1998)、花の ABC モデルにおけるクラス A とクラス B 遺伝子の発現領域などがある (Bowman *et al.*, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Drews *et al.*, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994)。これらのモデルにおける領域の制御は、複数の領域が一定の大きさの組織を分け合うもので、全体の組織の大きさは変更されない。これに対し、SAM の zonation では、*clv* で見られたように、central 領域の拡大によって、peripheral 領域も拡大するといった、隣接する領域が補償的に制御されない場合もある (Clark *et al.*, 1993, 1996; Kayes and Clark, 1998; Laufs *et al.*, 1998)。odm87 における胚器官分化後の腹側領域の拡大においても、データが少ない状況ではあるが、本来の背側領域が維持されなかった結果、腹側領域が拡大していることから、おそらく補償的な制御が行われているものと推察される。領域の分化は器官分化以前に行われるが、*apd1* と *odm87* では本来の胚器官分化後も、領域の大きさに変更が生じ、拡大した領域に器官が分化したため、領域の大きさは器官分化以降にも補償的に制御されていることが明らかにされた。このことから、*MRI*、*ARE1*、*ARE2* や *ARE4* のように器官分化前に機能する遺伝子と、*APDI* と *ODM87* のように器官分化以降に機能するものと、領域の大きさを制御する遺伝子が機能するタイミングには少なくとも 2 つ以上が存在し、時間軸に沿った遺伝子の発現制御が行われていることが示唆された。

二重変異体の解析からは、頂部領域の大きさの確保には、*MRI* と *APDI* に加え、SAM の分化と維持に機能する *SHL1* も冗長的に関与していることが判明した。*SHL1* では、*OSHI* の発現領域が縮小していること、まれに 2 つの幼根が分化することも、*SHL1* が頂部領域の大きさの確保に機能するとの説を支持している。

イネでは、基部領域を欠損し頂部領域の胚盤のみから構成される *club-shaped embryo* (*cle*) (Hong *et al.*, 1995) や基部領域の欠損によって幼根を欠損する *rall* (Scarpella *et al.*, 2003) などの領域欠損型変異体を得られており、これらを含めた解析により、領

域の欠損と大きさの変更にはどのような関連性があるのかを解明する事が、今後のイネ胚における領域分化モデルの構築に必要となるであろう。

イネ胚におけるパターン形成の発生遺伝学的モデル

本研究で得られた 8 つの遺伝子のパターン形成において推察される機能を、図 5-1 に示した。

イネの胚発生のパターン形成は、極性の決定、軸の形成、領域の分化を経て器官が分化するという順序で進行すると考えられる。胚には、おそらく受精卵の時点から、オーキシンの濃度勾配などによって極性が生じており、この極性に沿って頂部-基部、背腹、左右の 3 つの軸が形成される。双子葉植物のシロイヌナズナや単子葉植物のコムギでは、極性を生じさせたオーキシンは軸の形成にも関与しているといわれている。また、*are2* の表現型からもオーキシンなどの極性に関する異常がおきた結果、複数の軸の形成に影響を受けた可能性が考えられる。しかし、オーキシンのみの極性によって、3 つの軸が形成できるかどうかは今後の検証が必要である。これら 3 つの軸は、*are2* の解析により、必ずしも遺伝学的に独立に制御されているわけではないことが明らかになった。また、*are2* では、分子マーカーの発現が拡大していたこと、シュートと幼根が増加していたことから、それらが分化する領域が拡大していることが示された。軸の形成の異常によって、領域の拡大がひきおこされたことや、*are2* と領域の大きさに異常をきたす *mr1*、*apd1* との二重変異体は、全て *are2* の表現型を示したことから、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ことが確認された。

領域の分化では、胚発生初期において、*MRI* が頂部領域の大きさの確保に、*ARE1*、*ARE4*、*ODM400*、*ODM132* が背側領域の分化に機能することで、頂部-基部領域あるいは、背腹領域の分化を制御していることが示された。また、*SHL1* も *MRI* と冗長的に頂部-基部領域の大きさの制御に関与していた。胚発生後期においては、*APD1* が頂部-基部領域の大きさの制御に、頂部領域の正常な発達を介して、基部領域の拡大を抑制していることが明らかにされた。*ODM87* は、胚発生後期に背側領域の維持を介して、腹側領域の拡大を抑制していると考えられた。したがって、イネ胚では胚発生を通じて、隣接する領域の大きさが補償的に制御されることがあきらかにされた。また、頂部領域において、*mr1* では *OSHI* の発現領域が縮小するため、*MRI* は *OSHI* の上位で機能しており、*apd1* では *OSHI* の発現はほぼ正常であったため、*APD1* は *OSHI* の下位もしくは別の経路で機能していることが明らかにされた。

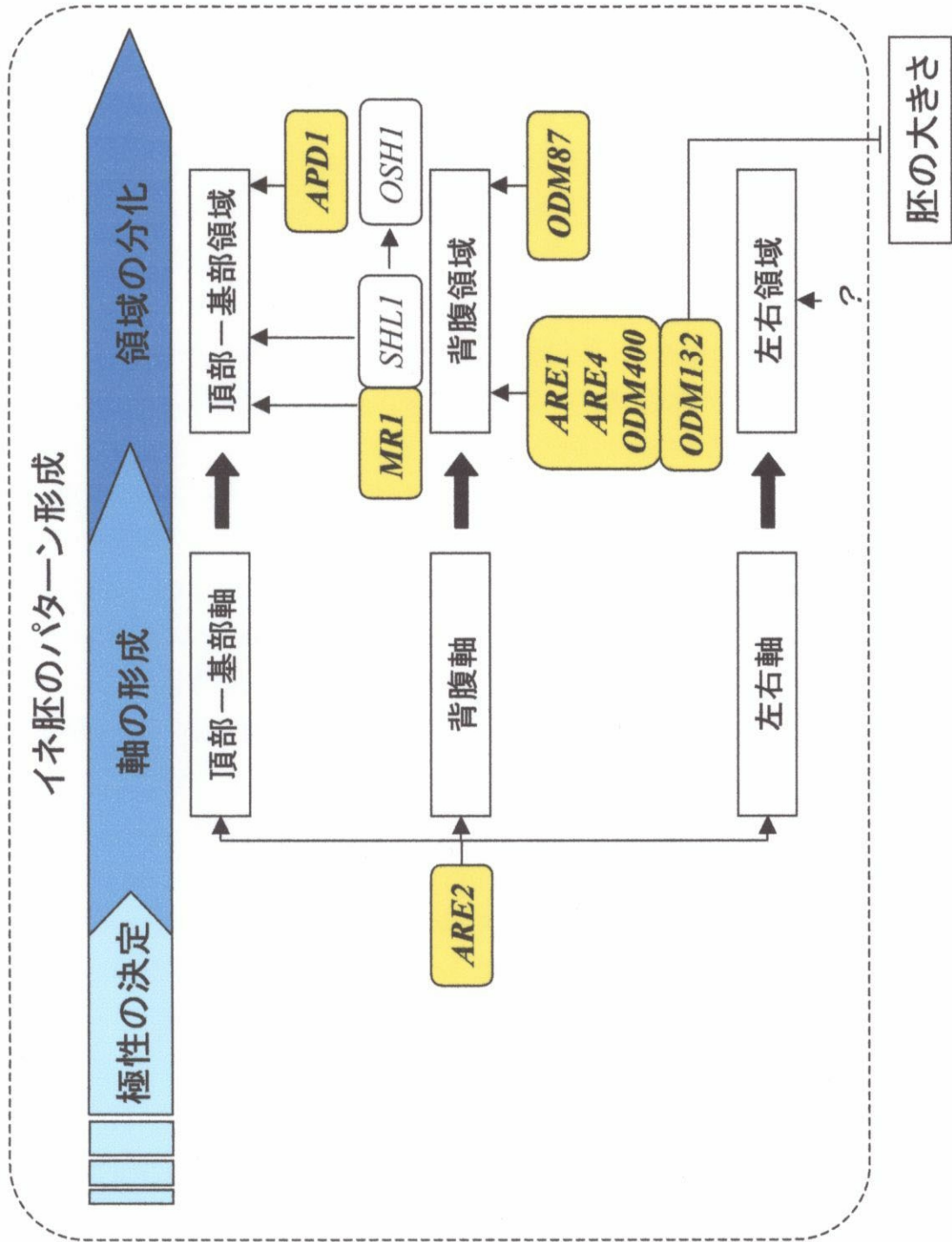


図5-1 本報告から推察されたイネの軸形成に関する遺伝子の制御プロセス。
黄色の枠内は本研究で解析した遺伝子、細字は既に報告されている遺伝子を示す。

イネの胚で見られたような補償的な領域の制御機構は、シロイヌナズナやキンギョソウの葉の向軸-背軸領域、ABCモデルのクラス A とクラス C 遺伝子の発現領域の制御に類似していると考えられた。動物ではショウジョウバエの胚における頭部-尾部領域の決定機構にも類似しており (Frohnhofner and Nusslein-Volhard, 1986, 1987; Berleth *et al.*, 1988)、領域の大きさを制御するモデルとして共通性が存在したことは興味深い。また、グループ I の変異体ではオーキシン処理に対する反応の異常が認められたこと、グループ I、III、V の変異体では、いずれも分げつの増加、草丈の伸長阻害といった表現型を示したことから、これらの原因遺伝子がオーキシンに関与する可能性が示唆された。シロイヌナズナでも、オーキシンの極性異常によって、領域 (中央部と基部領域) が欠損する *mp* や *bd1* が知られている (Berleth and Jurgens, 1993; Hamann *et al.*, 1999)。イネでも基部領域を欠損する *rall* が得られているが、*rall* では頂部領域の拡大は認められない。また、イネと他の植物体との情報を総合すると、オーキシンは植物におけるモルフォゲンとして多くの制御プロセスで機能を持つと考えられた。しかし、複雑な発生プロセスを 1 つの分子が制御しているとは考えにくいこと、シロイヌナズナの領域欠損型変異体の *fk* はブラシノステロイド合成経路に関与する遺伝子の変異体 (Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000)、*gk* はアセチル CoA カルボキシラーゼをコードする遺伝子の変異体であったことから (Kajiwara *et al.*, 2004; Baud *et al.*, 2004)、パターン形成に役割を持つ新たな遺伝子や分子の同定が望まれる。

本研究では、胚器官増加型変異体を同定し、解析することにより、イネの胚発生パターン形成に関する、新規の遺伝学的情報を得ることができた。しかし、パターン形成に関しては、極性の決定機構など解明すべき多くの課題が残されている。本研究で得られた胚器官増加型変異体のほとんどは独立した遺伝子座に由来するものであり、胚のパターン形成にはさらに多くの遺伝子が関与していると予想される。したがって今後も、本研究で得られた変異体に加えて、新たな胚器官増加型変異体の同定も行うことで、イネ胚発生のパターン形成に関する遺伝学的情報が蓄積されていくことが期待される。

摘要

植物の胚発生初期におけるパターン形成は、植物の体制を決定する上で、非常に重要な制御過程であるといえる。パターン形成は、厳密な遺伝的制御の下に、極性の決定、軸の形成、領域の分化の順に進行し、シュートや幼根といった胚器官の形成に至ると考えられている。近年、シロイヌナズナでは、頂部-基部軸に沿った頂部、中央部、基部の3つの領域の形成に関する解析が精力的に進められているが、未解明の部分は多く残されているのが現状である。

一方、単子葉植物では、胚のパターン形成に関する遺伝学的研究はほとんど行われていない。イネ(科)の胚では、双子葉植物の胚と比較すると、頂部-基部軸と左右軸に加えて背腹軸が存在すること、より複雑な胚器官を分化することから、双子葉植物では得られてない情報が得られることが期待される。そこで、本研究では、地上部と地下部を形成するために重要な胚器官である、シュートと幼根の数に着目し、それらが増加する変異体を同定し、胚のパターン形成に関する発生遺伝学的解析を行った。

胚器官増加型変異体の同定

台中65号にMNU処理を行った後代のF₂集団から、種子の表現型の観察によって、胚器官増加型変異体の同定を行った。その結果、9系統の1遺伝子劣性の胚器官増加型変異体を得ることができた。これら器官増加型変異体を、胚における器官分化パターンの特徴から、5つのグループに分類した。第1のグループは、幼根が増加する変異体、*multiple radicle1* (*mr1*) と *apical displacement1* (*apd1*) である。このグループでは、縮小した頂部領域に1つの未発達のシュートが、拡大した基部領域に複数の幼根が分化していたため、頂部-基部領域の大きさに異常をきたした変異体であると推察された。第2のグループは、多様なパターンで胚器官を増加する *aberrant regionalization of embryo2* (*are2*) である。*are2* では、胚におけるシュート、幼根の分化パターンは多様で、頂部領域に幼根が分化するものや背側領域にシュートが分化するものも見られたため、頂部-基部軸と背腹軸の双方の極性に異常をきたしたものと考えられた。第3のグループには、シュートと幼根が増加する *are1*、*are4*、*odm400* を分類した。これらの変異体では、本来の腹側領域での胚器官に加えて、典型的な場合には背側領域にもシュートと幼根を鏡像対称に分化していたため、背側領域が欠失し、腹側領域が複製されたものと考えられた。従って、このグループは、背側領域の分化に異常をきたす変異体であると考えられた。第4のグループには、*odm132* を分類した。この変異体は、

第 3 のグループと同様に、背側領域にも鏡像対称にシュートと幼根を分化するが、胚盤が拡大した巨大胚でもあった。このことから、*odm132* の原因遺伝子は、背側領域の分化と胚の大きさの決定という 2 つの異なる過程に関与する、興味深い機能を持つことが示唆された。第 5 のグループには、*odm87* を分類した。この変異体では、本来の胚器官分化後に、腹側領域が背側領域へと拡大し、異所的なシュートと幼根を分化した。したがって、胚発生後期に背腹領域の大きさを制御する遺伝子に変異がおきたものと考えられた。これらの器官増加型変異体は、他の植物種では報告されていないものであり、またグループごとに異なる制御過程に異常をきたしたものであると推察されたため、胚のパターン形成機構を明らかにするための有用な材料であると考えられた。

幼根を増加する *mrl* 変異体の解析

第 1 のグループに分類された *mrl* は、軸は正常であったが、頂部領域の縮小と基部領域の拡大がおき、その結果、頂部領域に 1 つの未発達なシュートが、基部領域に複数（最大 4 個）の幼根が分化した。胚発生の形態的観察および *OSHI* や *OsSCR* などの分子マーカーを用いた解析から、*mrl* 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、基部領域で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。幼根の増加は基部領域に限られるが、それらの位置、方向は一定していなかった。また、植物体ではシュートにおいて、分けつの増加、葉の伸長阻害や生殖成長への転換が見られないなど多面的な表現型を示したことから、*MRI* は、シュートを分化する頂部領域の発達に機能していると考えられた。したがって、基部領域の拡大は、頂部領域の縮小の結果であるといえ、頂部-基部領域の大きさは補償的に制御されていることが明らかになった。また、*mrl* に外生オーキシン処理を行い、草丈や根の反応を計測したところ、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。他のモデル植物では、頂部-基部軸の形成にはオーキシンの極性が関与しているとの報告が得られているため、*mrl* の表現型の異常にオーキシンが関与している可能性が見出された。また、シュートの分化に必要な *SHL1* 遺伝子との関係を明らかにするために、*mrl shl1* 二重変異体を作成したところ、*mrl* よりも多くの幼根が分化する傾向が見られ、二重変異体ではそれぞれのシングルミュータントよりも基部領域の拡大が顕著になっていると考えられた。*MRI* と *SHL1* はいずれも、頂部領域で機能している遺伝子であるため、これらの遺伝子は、頂部領域の大きさの確保を介して、基部領域の拡大を冗長的に抑制していると考えられた。以上のように、*mrl* の解析から、

イネの初期胚発生における、頂部－基部軸に沿った領域の大きさの制御機構に関する新たな知見を得ることができた。

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

第 1 のグループに分類された *apd1* は、軸は正常であったが、頂部領域の縮小と基部領域の拡大がおき、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 2 つの幼根が分化した。*apd1*、*mrl* とともに第 1 のグループに分類されたが、完成胚における両者の表現型の相違は、*apd1* では胚の頂端にシュートが分化すること、基部領域に分化する幼根は最大でも 2 つまでで、これら 2 つの幼根の配置が一定であったことである。胚発生の形態的観察や分子マーカーを用いた解析の結果、本来のシュートおよび幼根の分化以前の表現型にはほとんど異常は観察されず、本来のシュートおよび幼根が分化した直後から頂部領域の縮小と基部領域の拡大が始まり、胚盤や鞘葉の発達阻害によって、シュートが次第に頂端に位置するようになること、基部領域では本来の幼根が分化した後に、拡大した領域に 2 つめの幼根が分化することが明らかになった。植物体では、主に栄養成長初期のシュートで葉の伸長阻害や褪色、分げつの増加、ラミナジョイントが大きく屈曲するなど多面的な表現型が見られた。このことから、*APDI* は、シュートを分化する頂部領域の発達に機能すると考えられ、胚発生後期において頂部領域の正常な大きさの確保を介して、基部領域の拡大を抑制していると考えられた。また、オーキシン処理した野生型個体は *apd1* に類似した表現型を示したことから、*apd1* ではオーキシン濃度が高くなっている可能性が示唆された。また、*shl1 apd1* と *mrl apd1* 二重変異体では、それぞれの遺伝子の機能からは説明できない新規の表現型である、軸の異常が観察された。このことから、*APDI* は、*MRI* などの他の遺伝子と冗長的に胚発生初期のパターン形成に関与することが示唆された。

第 1 のグループに属する変異体の解析により、イネの胚発生初期、後期ともに、頂部－基部領域の大きさは補償的に制御されていること、基部領域の拡大によって幼根の増加をまねくことが明らかになった。

多様な胚器官増加パターンを示す *are2* 変異体の解析

第 2 のグループに分類された *are2* は、頂部領域に幼根が、背側領域にシュートが分化するなどの多様な器官増加パターンを示す変異体であった。野生型胚の胚盤上皮細胞の長さは、腹側頂部領域で長く、背側基部領域で短い傾向を示した。しかし、*are2* では一定の傾向を示さない、背側の細胞の方が長くなるなどの野生型とは異なるパタ

ーンを示した。このことから、*are2* では背腹軸に沿ったパターンにも異常がおきていることが推測された。胚発生過程や分子マーカーの解析からは、胚発生初期から、頂部-基部領域と背腹領域の位置関係に異常をきたしたことが確認された。これらの領域は軸に沿って分化するため、*are2* は、頂部-基部軸と背腹軸の双方の極性に異常をきたす変異体であることが示された。さらに、*are2* の胚の中には、頂部-基部軸と背腹軸が置き換わったものであると解釈できるものもあったため、イネ胚では 2 つの軸の形成を、1 つの遺伝子が制御する可能性があることが示された。また、*are2 mrl* と *are2 apd1* を解析したところ、二重変異体は *are2* の表現型を示したため、*ARE2* が *MR1* と *APD1* の上位で軸の形成に機能しているものと考えられた。

以上、本研究では、9 系統の胚器官増加型変異体を同定、解析し、イネの胚のパターン形成における軸の形成や領域の分化に関する遺伝学的情報を得ることができた。また、胚器官増加型変異体は、他のモデル植物ではほとんど報告がないため、パターン形成の遺伝学的解析を行うための貴重な材料であることが明らかにされた。

謝辞

本研究を行うにあたり、長い間、適切なお指導をしてくださいました東京大学大学院農学生命科学研究科の長戸康郎教授に深く感謝いたします。また、日頃から貴重なご助言をいただきました現東京大学大学院理学系研究科の平野博之教授、現保全生態学研究室の吉田薫助教授、現茨城大学農学部の久保山勉助教授、東京大学大学院農学生命科学研究科の伊藤純一助手に感謝いたします。また、サンプルのご提供やご助言をいただきました、名古屋大学生物分子応答研究センターの松岡信教授、名古屋大学大学院生命農学研究科の北野英巳教授、九州大学大学院農学研究院の佐藤光教授に、この場を借りて御礼申し上げます。最後に、育種学研究室の高木俊江さん、そして育種学研究室の皆様、たいへん長い間、お世話になりました。厚く御礼申し上げます。皆様のお力添えをいただき、本研究を遂行することができました。ありがとうございました。

引用文献

- Aida, M., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9, 841-857.
- Aida, M., and Tasaka, M. (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 126, 1563-1570.
- Aida, M., Furutani, M., Traas, J. and Tasaka, M. (2002) Roles of *PIN-FORMED1* and *MONOPTEROS* in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 129, 3965-3974.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1999) *Molecular Biology of The Cell* 3rd ed., Garland Pub.
- Bai, S., Chen, L., Yund, M. A. and Sung, Z. R. (2000) Mechanisms of plant embryo development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 50, 61-88.
- Baud, S., Bellec, Y., Miquel, M., Bellini, C., Caboche, M., Lepiniec, L., Faure, J. and Rochat, C. (2004) *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO reports* 5, 515-520.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P.A., Walker A. R., Schulz, B. and Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M. and Nusslein-Volhard, C. (1988) The role of localization of *bicoid* RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 7, 1749-1756.
- Berleth, T. and Jurgens, G. (1993) The role of the *MONOPTEROS* gene in organizing the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118, 575-587.
- Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. and Meyerowitz, E.M. (1992) *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* 114, 599-615.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M. (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112, 1-20.
- Burglin, T. R., Finney, M., Coulson, A. and Ruvkun, G., (1989) *Caenorhabditis elegans* has scores of homeobox-containing genes. *Nature* 341, 239-43.

- Busch, M., Mayer, U. and Jurgens, G. (1996) Molecular analysis of the *Arabidopsis* pattern formation gene *GNOM*: gene structure and intragenic complementation. *Mol Gen Genet* 250, 681-691.
- Chu, C. C., Wang, C. S., Sun, C. C., Hsu, C., Yin, K. C. and Chu, C. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. *Scient. Sin.* 18, 659-668.
- Clark, J. K. and Sheridan, W. F. (1991) Isolation and characterization of 51 embryo-specific mutations of maize. *Plant Cell* 3, 935-951.
- Clark, S. (1997) Organ Formation at the Vegetative Shoot Meristem. *Plant Cell* 9, 1067-1076.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin J. Z. and Meyerowitz E. M. (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567-1575.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz E. M. (1993) *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397-418.
- Coen, E.S. and Meyerowits, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.
- Drews, G.N., Bowman, J.L. and Meyerowits, E.M. (1991) Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65, 991-1002.
- Driever, W. and Nusslein-Volhard, C. (1988) The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54, 95-104.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T. (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* 10, 967-979.
- Errampalli, D., Patton, D., Castle, L., Mickelson, L., Hansen, K., Schnall, J., Feldmann, K. and Meinke, D. (1991) Embryonic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 149-157.
- Fischer, C. and Neuhaus, G. (1996) Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J.* 9, 659-669.
- Fischer, C., Speth, V., Fleig, E.S. and Neuhaus, G. (1997) Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of auxin polar transport. *Plant Cell* 9, 1767-1780.

- Fischer-Iglesias, C., Sundberg, B., Neuhaus, G. and Jones, A.M. (2001) Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *Plant J.* 26, 115-129.
- Friml, J. (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.* 1, 7-12.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jurgens, G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P. B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P. J., Palme, K. and Offringa, R. (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306, 862-865.
- Frohnhofer, H.G. and Nusslein-Volhard, C. (1986) Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*. *Nature* 324, 120-125.
- Frohnhofer, H.G. and Nusslein-Volhard, C. (1987) Maternal genes required for the anterior localization of *bicoid* activity in the embryo of *Drosophila*. *Genes & Dev.* 1, 880-890.
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas J., Kato, T., Tasaka, M. and Aida, M. (2004) *PIN-FORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development* 131, 5021-5030.
- Hadfi, K., Speth, V. and Neuhaus, G. (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 125, 879-887.
- Hamann, T., Mayer, U. and Jurgens, G. (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 126, 1387-1395.
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. and Jurgens, G. (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. *Genes & Dev.* 16, 1610-1615.
- Hardtke, C.S. and Berleth, T. (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 17, 1405-1411.
- Heckel, T., Werner, K., Sheridan, W. F., Dumas, C. and Rogowsky, P. M. (1999) Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific mutants of maize. *Planta* 210, 1-8.

- Hong, S.K., Aoki, T., Kitano, H. and Nagato, Y. (1995) Phenotypic diversity of 188 rice embryo mutants. *Dev. Genet.* 16, 298-310.
- Hong, S. K., Kitano, H., Satoh, H. and Nagato, Y. (1996) How is embryo size genetically regulated in rice? *Development* 122, 2051-2058.
- Jackson, D. and Hake, S. (1999) Control of phyllotaxy in maize by the *abphyll* gene. *Development* 126, 315-323.
- Jang-Chyun, J., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., Aida, M., Yoshida, S. and Sheen, J. (2000) A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 14, 1485-1497.
- Janssen, B. J., Williams, A., Chen J. J., Mathern, J., Hake, S. and Sinha, N. (1998) Isolation and characterization of two knotted-like homeobox genes from tomato. *Plant Mol. Biol.* 36, 417-425.
- Jurgens, G. (2001) Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J.* 20, 3609-3616.
- Kajiwara, T., Furutani, M., Hibara, K. and Tasaka, M. (2004) The *GURKE* gene encoding an acetyl-CoA carboxylase is required for partitioning the embryo apex into three subregions in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1122-1128.
- Kamiya, N., Nishimura, A., Sentoku, N., Takabe, E., Nagato, Y., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2003) Rice *globular embryo 4 (gle4)* mutant is defective in radial pattern formation during embryogenesis. *Plant Cell Physiol.* 44, 875-883.
- Kano-Murakami, Y., Yanai, T., Tagiri, A. and Matsuoka, M. (1993) A rice homeotic gene, *OSHI*, causes unusual phenotypes in transgenic tobacco. *FEBS* 334, 365-368.
- Kayes, J. M. and Clark, S. E. (1998) *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* 125, 3843-3851.
- Kitano, H., Tamura, Y., Satoh, H. and Nagato, Y. (1993) Hierarchical regulation of organ differentiation during embryogenesis in rice. *Plant J.* 3, 607-610.
- Kouchi, H. and Hata, S. (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNA representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* 238, 106-119.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K. and Traas, J. (1998) Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1375-1390.

- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. and Jurgens, G. (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 87-96.
- Laux, T., Wurschum, T. and Breuninger, H. (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell Suppl.* S190-S202.
- Liu, C., Xu, Z. and Chua, N. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5, 621-630.
- Long, J.A., Woody, S., Poethig, S., Meyerowitz, E. M. and Barton, M.K. (2002) Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the *TOPLESS* locus. *Development* 129, 2297-2306.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K. (1996) A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379, 66-69.
- Lu, P., Porat, R., Nadeau, J. A. and O'Neill, S. D. (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* 8, 2155-2168.
- Mansfield, S.G., Briarty, L. G. and Erni, S. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Can. J. Bot.* 69, 447-460.
- Mansfield, S.G., and Briarty, L. G. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69, 461-476.
- Mayer, U., Buettner, G. and Jurgens, G. (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117, 149-162.
- Mayer, U., Torres-Ruiz, R. A., Berleth, T., Misera, S. and Jurgens, G. (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 353, 402-407.
- McConnell, J.R. and Barton, M.K. (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125, 2935-2942.
- Mol, R., Matthys-Rochon, E. and Dumas, C. (1994) The kinetics of cytological events during double fertilization in *Zea mays* L. *Plant J.* 5, 197-206.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1987) Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238, 1675-1681.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stage of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 677-684.

- Przemeck, G. K. H., Mattsson, J., Hardtke, C. S., Sung, Z. R. and Berleth, T. (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200, 229-237.
- Raghavan, V. (1986) Embryogenesis in Angiosperms. Cambridge University Press.
- Sakai, H., Medrano, L. J. and Meyerowitz, E. M. (1995) Role of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature* 378, 199-203.
- Sato Y., Hong S. K., Tagiri A., Kitano H., Yamamoto N., Nagato Y. and Matsuoka M. (1996) A rice homeobox gene, *OSHI*, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8117-8122.
- Satoh, N., Hong, S.K., Nishimura, A., Matsuoka, M., Kitano, H. and Nagato, Y. (1999) Initiation of shoot apical meristem in rice: Characterization of four *SHOOTLESS* genes. *Development* 126, 3629-3636.
- Satoh, N, Itoh, J. and Nagato, Y. (2003) The *SHOOTLESS2* and *SHOOTLESS1* genes are involved in both initiation and maintenance of the shoot apical meristem through regulating the number of indeterminate cells. *Genetics* 164, 335-346.
- Scarpella, E., Rueb, S. and Meijer, A. H. (2003) The *RADICLELESS1* gene is required for vascular pattern formation in rice. *Development* 130, 645-658.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek P. (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120, 2475-2487.
- Scheres, B., Laurenzio, L. D., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P. and Benfey, P. N. (1995) Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121, 53-62.
- Schrick, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J. and Jurgens, G. (2000) *FACKEL* is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes & Dev.* 14, 1471-1484.
- Scott, M. P. (1992) Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 13, 551-553.
- Shevell, D.E., Leu, W. M., Gillmor, C. S., Xia, G., Feldmann, K. A. and Chua, N. H. (1994) *EMB30* is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to *Sec7*. *Cell* 77, 1051-1062.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.

- St. Johnstone, D. and Nusslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.
- Steeves, T. A. and Sussex, I. M. (1989) Patterns in Plant Development 2nd ed., Cambridge University Press.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gaelweiler, L., Palme, K. and Jurgens, G. (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. and Hake, S. (1991) The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350, 241-243.
- Waites, R. and Hudson, A. (1995) *PHANTASTICA*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121, 2143-2154.
- Weigel, D. and Meyerowitz, E. M. (1994) The ABCs of Floral Homeotic Genes. *Cell* 78, 203-209.
- Xing, Y. Z., An, G. Y. and Zhu, Z. P. (2001) Rice *bicoid*-related cDNA sequence and its expression during early embryogenesis. *Cell Research* 11, 74-80.
- Yamamoto, M., Saijoh, Y., Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Ang, S. L., Hamada, H. and Meno, C. (2004) *Nodal* antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* 428, 387-392.