

論文の内容の要旨

論文題目 Genetic studies on spatial regulation of vascular development
(維管束分化の空間的制御に関する遺伝学的研究)

氏名 小泉好司

1. 序論

シダ植物、種子植物の生活は、体内に張り巡らされた維管束によって支えられている。維管束は、水の通導、同化産物の転流、植物体の支持、情報の伝達など種々の役割を果たしており、連続した形で適切な場所に配置されてはじめて、その機能を十分に果たすことができる。この意味において、維管束の分化位置を決定する機構は、植物生理学上きわめて重要な研究課題と言えるが、実験的研究に乏しく、その理解は進んでいない。維管束パターン形成の基本理論に関しては、キャナライゼーション仮説と反応拡散プレパターン仮説が提示されているものの、いずれも作業仮説の域を出ていない。近年、分子遺伝学的手法の導入により、生理学的な方法では解析の難しかった形態形成の機構について重要な発見が相次いでおり、維管束分化の研究にもこの手法は大いに有効であると考えられる。そこで本研究は、維管束分化の空間的制御機構の解明を目指して、モデル実験植物であるシロイヌナズナを材料に、維管束のパターンに関する突然変異体の体系的な単離と解析を行った。

2. 結果

2. 1. 突然変異体の単離と遺伝解析

シロイヌナズナ (*Landsberg erecta* 系統) に EMS で突然変異を誘発し、2 回の自家受粉の後、M2 個体別に M3 種子を収穫することで M3 系統群を作出した。この M3 系統群を用いて芽生えの子葉における葉脈パターンに着目して突然変異体の選抜を行った。3400 系統についてスクリーニングした結果、14 系統の変異体が単離された。いずれの変異体においても葉脈形成の異常は、単因子の劣性形質であった。得られた変異体のうち 8 系統について相補性検定を行ったところ、2 つの変異のみが対立遺伝子関係にあった。つまりこれら 8 系統の変異体より、葉脈パターン形成に関する 7 つの遺伝子座と、その変異アリル 8 つを認めたことになる(表 1)。各遺伝子座を *vascular network defective* に因んで、*VAN1*~*VAN7* と名付けた。

DNA 多型を利用した染色体マッピングの結果、*VAN1* 遺伝子座は第 II 染色体の上端から約 25 cM に、*VAN2* は第 V 染色体の約 30 cM に、*VAN3* は第 V 染色体の約 25 cM に、*VAN4* は第 V 染色体の約 0 cM に、*VAN5* は第 I 染色体の約 20 cM に、*VAN6* は第 IV 染色体の約 25 cM に、*VAN7* は第 I 染色体の約 20 cM に、それぞれ位置することが判明した(図 1)。*VAN3* に関してはさらに精密なマッピングを行い、存在域を約 0.7 cM の区間に限定することができた(図 2)。*VAN7* 遺伝子座の領域には維管束分化にも関与する *EMB30/GNOM* 遺伝子座が存在する。*gnom* 変異体と *van7* 変異体を用いた相補性検定により、両遺伝子が同一であることが確認されたため、*van7* を *EMB30* の新しい変異アリルとして *emb30-7* と改名した。

2. 2. *van* 変異体の表現型

2. 2. 1. 葉脈

シロイヌナズナの子葉(野生型)では、中央部に主脈、その両側にループ状の側脈が見られる(図 3)。*van1*, *van2*, *van3*, *van4*, *van6* 変異体では、子葉葉脈の全体的なパターンは保たれていたが、側脈形成が不完全であり、ループの中断や断片化が観察された。特に *van3* 変異体の側脈は断片化が顕著であった。*van5-1*, *van5-2* 変異体では、側脈ループ形成不全に加え、葉脈の全体的なパターンも大きく乱れていた。*emb30-7*(*van7*) 変異体では、側脈部が欠損しており、子葉の中央部に、管状要素が散在していた。

シロイヌナズナのロゼット葉では、中央部に主脈、その両側に主脈から分岐する 2 次脈、またさらに 2 次脈から分岐する 3 次脈が見られる(図 4)。*van2*, *van3*, *van4*, *van6* 変異体のロゼット葉においては、断片化や(部分的)欠損など、主に 3 次脈の形成に異常が見られた。もしくは *van5-1*, *van5-2* 変異体のロゼット葉では、主脈、2 次脈の管状要素が増え、道管が束化していた。*emb30-7* 変異体においては、脈構造が複雑になり、また各脈の管状要素も増えていた。

2. 2. 2. 葉脈以外の維管束

胚軸維管束の縦方向の連続性に関して、微分干渉顕微鏡を用いて調査したが、*emb30-7*以外の *van* 変異体では、明瞭な異常は認められなかった(図 5 上 2 段)。*emb30-7* 変異体では、(通常、茎頂近くに位置する)道管の末端がしばしば胚軸の中央域に認められた。次に芽生えの胚軸基部の横断切片により、維管束内組織の構成と配置について調べた(図 5 下 2 段)。野生型では中央部に道管、その両側に篩部が存在するが、*van3* 変異体ではこれと同じ正常な維管束内組織の構成・配置が見られた。*van2*, *van4*, *van5-1*, *van5-2*, *van6* 変異体の場合、道管については概ね正常であったが、篩部が未発達で、その領域を特定できないことが多かった。またこれらの変異体では、中心柱の輪郭もいくらか歪んでいた。*van1* 変異体では、道管を含む、維管束内組織の配置全体が著しく乱れていた。*emb30-7* 変異体では、野生型と同じような維管束の構成をもつ個体と、維管束の片側にしか篩部の発達しない個体が観察された。

根の維管束を透明化材料を用いて観察した結果、道管の連続性に関しては、*van1* を除いて正常であることがわかった(図 6)。*van1* 変異体では、根端付近に道管が連続していない個所が認められた。また、すべての *van* 変異体で、根端の分裂域、伸長域が縮小している様子が観察された。

2. 2. 3. 外部形態

播種後 7 日目の芽生えでは、すべての *van* 変異体において主根の成長が強く抑制されていたが、それ以外の点、つまり子葉の展開、形、緑化、胚軸の伸長には重篤な障害は見られなかった(図 7)。播種後 20 日目になると、すべての変異体で大きさや葉の枚数に異常が見られ、その程度は *van3* < *emb30-7* < *van4* < *van2*, *van5-1*, *van5-2*, *van6* < *van1* の順で強かった(図 8)。最も強い *van1* 変異体は、ロゼット葉を 1 枚も展開せず、最も弱い *van3* 変異体は 7 枚以上のロゼット葉を展開した。なお、ロゼット葉の展開如何によらず、いずれの *van* 変異体も抽苔することなく枯死した。

2. 3. *van3* 変異体の維管束分化

van 変異体の中で変異の影響が最も維管束に限定的であった *van3* 変異体については、維管束分化過程のさらに詳細な解析を行った。*van3* 変異体のループの中断箇所には、丸い葉肉細胞のみが存在し、前形成層を構成するような細長い細胞は認められなかった(図 9)ことから、前形成層分化またはそれに先立つ段階に *van3* 変異が影響することが予想された。そこで維管束分化の各段階における *van3* 変異の影響を、分子マーカーを用いて追跡することを考え、*pTED3::GUS* 遺伝子(管状要素分化過程で発現)と *pAthb8::GUS* 遺伝子(前形成層分化過程で発現)の *van3* 変異体での発現を調べた。芽生えの子葉においては、形態に基づく予想の通り、*pTED3::GUS* 遺伝子(図 10)、*pAthb8::GUS* 遺伝子(図 11)とも、側脈ループの中断箇所には発現が認められなかった。さらに、胚発生後期過程における *pAthb8::GUS* 遺伝子の発現を調べたところ、杖型胚での初期発現域がすでに寸断されていることが明らかとなった(図 12)。なお、この時期の *van3* 胚の形態には全く異常が認められなかった。これらの結果から *VAN3* は前形成層分化以前の維管束パターン決定に関与していることが示された。

3. 考察

本研究では、シロイヌナズナから子葉の葉脈形成に異常が見られる突然変異体を新たに 14 系統単離し、そのうち 8 系統の遺伝解析を行った結果、葉脈形成に関与する 7 つの遺伝子座 *VAN1-VAN7*(但し、*VAN7* = *EMB30/GNOM*)を同定した。これら *VAN* 遺伝子座の変異体はいずれも、維管束分化の空間的制御機構を遺伝学的に解析するための、きわめて有効な道具になると期待される。とくに *van3* は、胚発生後期過程において、前形成層分化パターンに特異的な異常を示した点で注目される。この表現型は、*VAN3* 遺伝子が維管束分化の位置制御に直接関与することを示唆しており、*VAN3* 遺伝子の単離と 1 次機能の解明が、今後の研究の鍵になるものと考えられる。

ほとんどの *van* 変異に共通する、特筆すべき性質として、主要な維管束走向(胚軸や根の中央維管束、子葉、ロゼット葉の主脈)に比べ、副次的な維管束走向(子葉の側脈、ロゼット葉の 3 次脈)により強く影響すること、葉脈の全体的なパターンよりも、維管束の連続性に強く影響することの 2 点が挙げられる。このような遺伝的障害に対する感受性の違いは、維管束の分化位置決定機構が、中心的な維管束の走向、全体的なパターンの維持に関しては比較的安定で、副次的な維管束の連続性に関して脆弱なプログラムを採用していることを意味する。現在までに、葉脈パターン形成の制御機構については、キャナライゼーション仮説(図 13A)と反応拡散プレパターン仮説(図 13B)が提示されているが、維管束の全体的なパターンよりも連続性の方が脆弱である、という本研究の結果は、パターン形成に連続性が求められるキャナライゼーション仮説からは説明が困難であり、パターンの断片化が容易に生じ得る反応拡散プレパターン仮説を支持するものと考えている。

表 1. 子葉の側脈部の維管束に異常の見られる変異体の相補性検定^a.

male female	L1315	L1727	L3302	L3409	L3992	L4622	L4668	L4503
L1315								
L1727	0/33 ^c							
L3302	0/26	1/36						
L3409	0/20	0/38	0/70					
L3992	0/20	0/28	0/77	0/53				
L4622	0/49				18/94 ^d		0/33	
L4668	0/22	0/68	0/41	0/20	0/45			
L4503	1/55	0/128	0/60	0/31	0/21	0/59	0/31	

^aヘテロ接合体間の交配による。^b変異体数。^c観察総数。
^d $\chi^2 = 1.4$ (3:1), $0.25 > P > 0.01$.

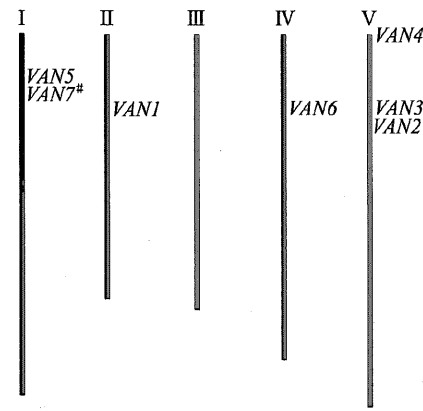


図 1. VAN 遺伝子の染色体上の位置。
EMB30/GNOM.

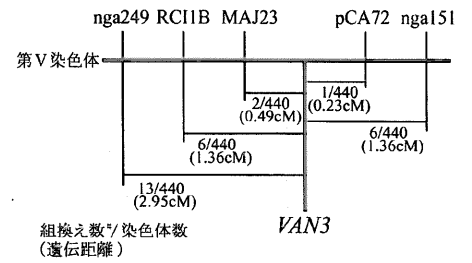


図 2. VAN3 遺伝子座の精密マッピング。

^avan3 変異体 (Landsberg erecta 系統) と野生型 (Columbia 系統) を交配して得られた F2 のうち、VAN3 野生型アリルに関してホモ接合 (VAN3/VAN3) ないしはヘテロ接合 (VAN3/van3) と判断されたものを用いて、各 DNA 多型マーカーと VAN3 遺伝子座との組み換え数を調べた。この際、DNA 多型マーカーと VAN3 遺伝子座の両方がヘテロ接合であった場合は組み換えなしと判断した。

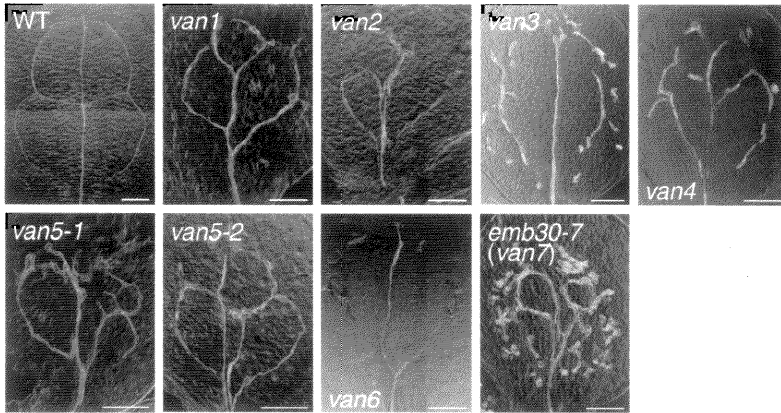


図 3. 野生型および van 変異体の子葉の維管束。観察には播種後 7 日目の芽生えを用いた。Bar = 100 μm.

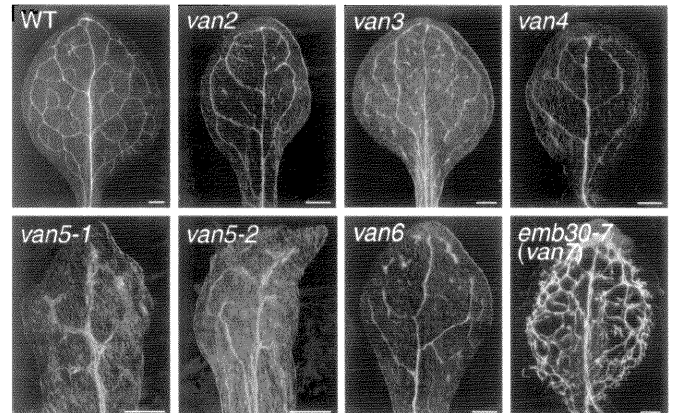


図 4. 野生型および van 変異体の第 1 葉の維管束。観察には播種後 20 ~ 26 日目の植物体を用いた。Bar = 500 μm.

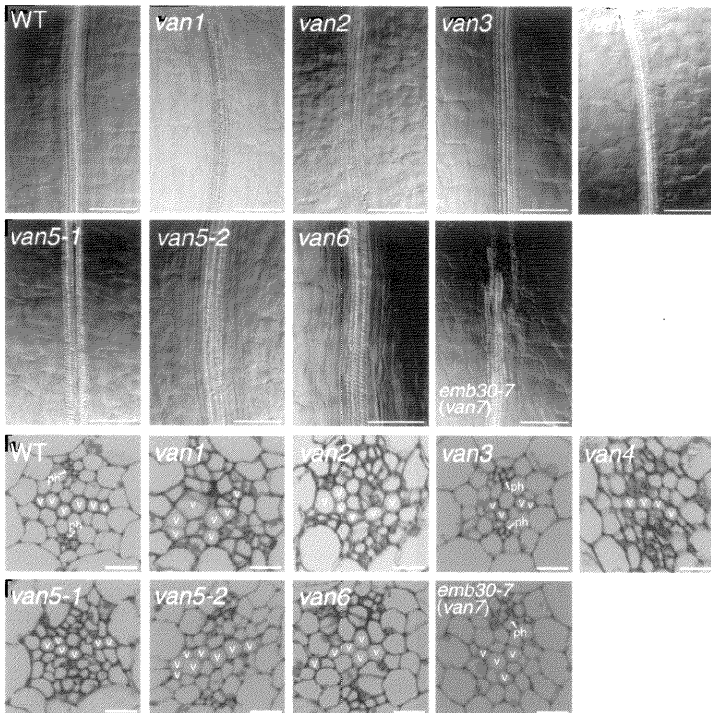


図 5. 野生型および van 変異体の胚軸部の維管束。播種後 7 日目の芽生えにおける、胚軸中央部の道管 (上 2 段) と、胚軸基部の維管束の横断面 (下 2 段)。v は道管、ph は篩部を示す。Bar = 50 μm (上 2 段), 10 μm (下 2 段)。

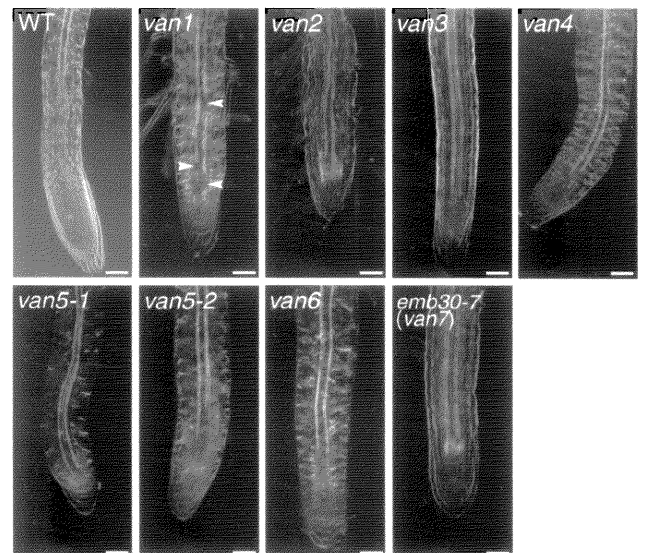


図 6. 野生型および van 変異体の根端部における道管。観察には播種後 7 日目の芽生えを用いた。矢頭は道管が途切れているところを示す。Bar = 50 μm.

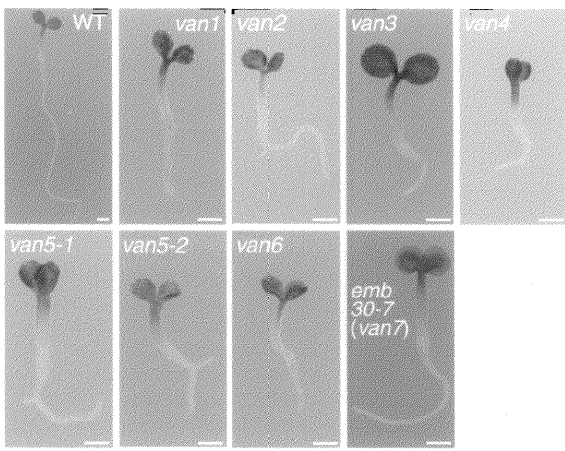


図7. 野生型および *van* 変異体の播種後7日目の芽生え。
Bar = 500 μ m.

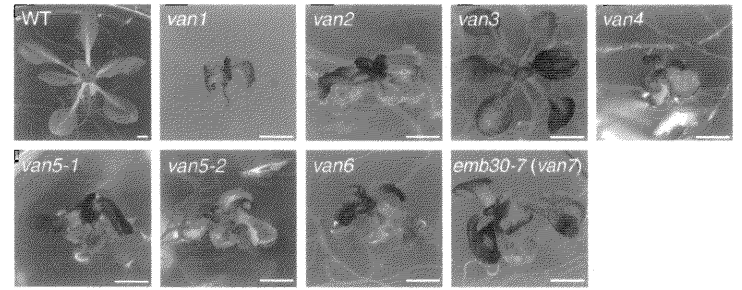


図8. 野生型および *van* 変異体の播種後20日目の植物体。
Bar = 2.5 mm.

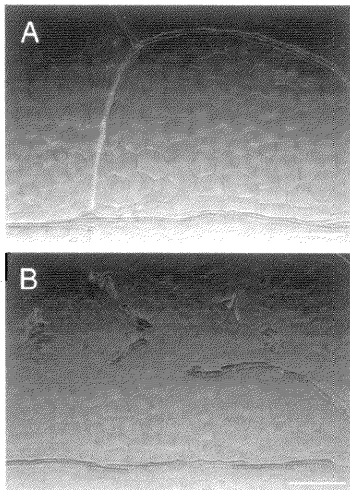


図9. 野生型 (A) および *van3* 変異体 (B) の子葉の側脈部の維管束。
観察には播種後7日目の芽生えを用いた。
Bar = 50 μ m.

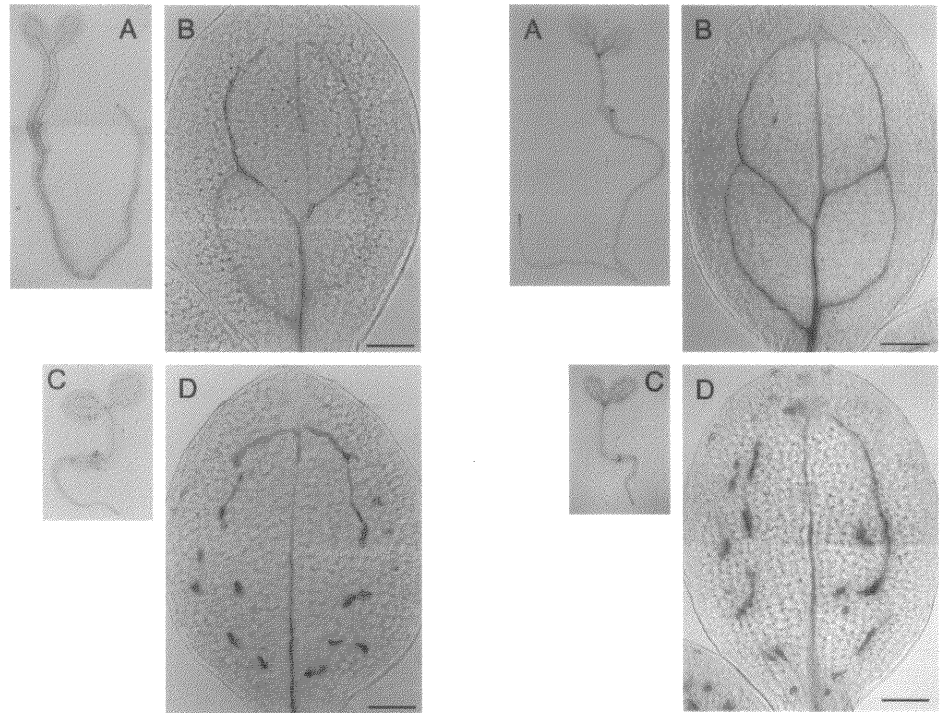


図10. 野生型および *van3* 変異体の芽生えにおける *pTED3::GUS* 遺伝子の発現。
(A) 播種後7日目の野生型の芽生え。(B) (A) の子葉部の拡大。(C) 播種後7日目の *van3* 変異体の芽生え。(D) (C) の子葉部の拡大。Bar = 100 μ m.

図11. 野生型および *van3* 変異体の芽生えにおける *pAthb8::GUS* 遺伝子の発現。
(A) 播種後7日目の野生型の芽生え。(B) (A) の子葉部の拡大。(C) 播種後7日目の *van3* 変異体の芽生え。(D) (C) の子葉部の拡大。Bar = 100 μ m.

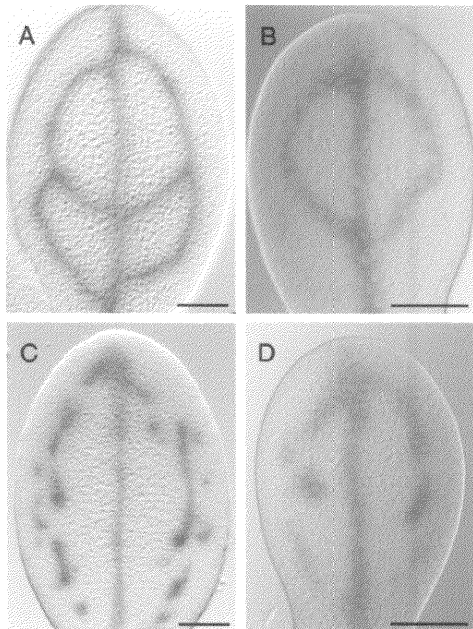


図12. 野生型および *van3* 変異体の胚発生後期における *pAthb8::GUS* 遺伝子の発現。
(A) 野生型の逆U字型胚の子葉部。(B) 野生型の杖型胚の子葉部。(C) *van3* 変異体の逆U字型胚の子葉部。(D) *van3* 変異体の杖型胚の子葉部。Bar = 100 μ m.

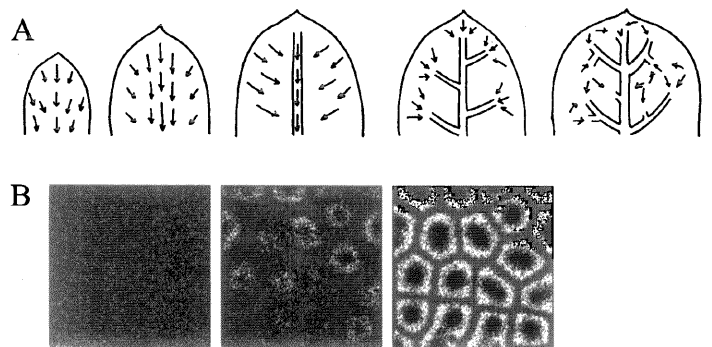


図13. 葉脈形成を説明する仮説。

(A) キャナライゼーション仮説。オーキシンの極性輸送において輸送量と輸送能力との間に正のフィードバックが存在し、これによって自然に形成されたオーキシンの流路に従って、維管束が連続的に分化すると考える。Sachs, T. (1989). *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 8, 168-183より。
(B) 反応拡散プレパターン仮説。相互作用を行う拡散性の2つ(またはそれ以上)の因子が存在し、それら因子の拡散速度に大きな違いがある場合、各因子の濃度の不均一な空間パターンが自律的に形成される。このようなパターンが葉脈の分化を指令すると考える。Nelson, T. and Dengler, N. (1997) *Plant Cell* 9, 1121-1135より。