

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 11 年度博士課程進学

佐藤 奈美子

指導教官 東京大学教授 長戸康郎

論文題目 イネ茎頂分裂組織の分化および維持機構の遺伝学的解析

植物のシュートの形成は、茎頂分裂組織 (SAM) の活性に依存しており、シュートの人為的制御を展望する上で、SAM の分化および維持機構の解明が不可欠である。SAM についての遺伝学的研究は、シロイヌナズナで精力的に進められているが、単子葉植物ではほとんど行われていない。本研究では、イネの SAM の分化過程および維持過程に異常が見られる変異体を用い、SAM の分化から維持に至る遺伝的プログラムを解明することを目的とした。

### 1、茎頂分裂組織を欠失する *shootless* 変異体の解析

5 遺伝子座に由来する、SAM を欠失する *shootless* (*shl*) 変異体 (*shl1*~*shl5*) が得られた。ほとんどの *shl* 変異体では、胚発生過程で SAM が分化せず、完成胚ではシュート (SAM と 3 枚の本葉)、鞘葉およびエピブラストが欠失していた。*shl1*、*shl2*、*shl4* および *shl5* 変異体では、幼根は正常に分化していた。一方、*shl3* 変異体の幼根は胚発生過程で休眠することなく発根し、完成胚では褐変、枯死していた。また、*shl1*、*shl2*、*shl4* および *shl5* 変異体の胚では、正常な胚盤の分化が見られた。このように、胚盤および幼根は SAM とは遺伝的に独立に分化するのに対し、鞘葉およびエピブラストの分化は SAM の分化に依存していた。*shl* 変異体のカルスからの不定芽形成を

試みたところ、野生型のカルスからは、多くの不定芽が再分化してきたが、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体のカルスからは、全く再分化しなかった。このことから、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は、SAM の分化に一般的に必要なことが明らかになった。*shl* 変異体のカルスからは不定芽は分化しなかったが、不定葉が形成され、葉原基は SAM とは独立に分化し得ることが示唆された。

イネの胚発生初期に、SAM の分化予定領域で発現する、イネホメオボックス遺伝子 *OSHI* をプローブとして、*in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚では、*OSHI* の発現領域は野生型よりも極端に狭くなっていた。一方、*shl3* および *shl5* 変異体では、ほぼ正常な発現を示した。このことから、*shl1*、*shl2* および *shl4* 変異体の胚では、SAM の分化領域が正常に確保されておらず、一方、*shl3* および *shl5* 変異体では、SAM 分化予定領域が、比較的正常に確保されていると考えられた。したがって、*SHL1*、*SHL2* および *SHL4* 遺伝子は *OSHI* の上流で、*SHL3* および *SHL5* 遺伝子は *OSHI* の下流あるいは *OSHI* とは独立に SAM の分化過程で機能していることが明らかになった。

## 2、弱い表現型を示す *shootless2* 変異体および *shootless1* 変異体を用いた茎頂分裂組織の分化・維持機構の解析

分化後の SAM における *SHL* 遺伝子の機能を明らかにするため、弱い表現型を示す 3 系統の *shl2* 変異体 (*shl2-6*~*shl2-8*) と 1 系統の *shl1* 変異体 (*shl1-3*) を同定し、解析した。

弱い *shl2* 変異体の胚では、胚盤および幼根の他に、SAM、本葉およびエピブラストが分化した。しかし、鞘葉の分化は見られなかった。3 つの弱い *shl2* 変異体の間では、胚の表現型に強弱が認められた。すなわち、SAM の分化頻度は *shl2-6* 変異体で最も低く、*shl2-8* 変異体で最も高かった。また、*shl2-6* および *shl2-7* 変異体では、分化した SAM のほとんどが胚発生中に消失したが、*shl2-8* 変異体では完成胚でも SAM が観察された。胚における *OSHI* の発現領域は、野生型よりは狭かったが、3 変異体の間では、*shl2-8* 変異体で最も広く、*shl2-6* 変異体で最も狭かった。このように、3 つの弱い変異体の間で、胚での *OSHI* の発現領域の広さ、SAM 分化の頻度および SAM が維持される期間の間には、正の相関が認められた。したがって、SAM は、どれくらいの数の未分化な細胞が確保されているかによって、さまざまな程度に構築され、維持されることが示唆された。*shl1-3* 変異体は、*shl2-8* 変異体とほぼ同様の表現型を示した。*shl2-8* および *shl1-3* 変異体は、いずれも発芽したが、2 ヶ月以内に枯死した。

最も弱い表現型を示す *shl2-8* および *shl1-3* 変異体を用いて、シュートの構造および SAM の消失過程を調査した。いずれも、栄養生長初期には、葉形、葉の組織、葉序および葉間期などに異常が見られた。SAM は扁平であり、多くの場合、*OSHI* の発現領域が狭くなっており、未分化な細胞の割合が、野生型に比べて小さくなっていることがわかった。播種後 1 週間以降になると、SAM の L1 層からトライコームが分化し、*OSHI* の発現領域がより内部に限定されているものが見られた。また、SAM の位置に葉原基が分化し、*OSHI* の発現が見られないものもあった。これらのことは、SAM 内の未分化な細胞が減少し、外側の細胞から葉のアイデンティティを獲得し、やがて SAM が消失するという現象が起こっていることを示している。また、細胞分裂の S 期に特異的に発現する *histoneH4* 遺伝子を用い、*shl2-8* および *shl1-3* 変異体の SAM に対し、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ、野生型より多く、かつ、SAM 内の異常な部位での発現が見られた。これらの結果は、*shl2-8* および *shl1-3* 変異体の SAM のオーガニゼーションや、細胞分裂の空間的制御が異常であることを示している。

以上の解析から、*SHL2* および *SHL1* 遺伝子は、SAM の分化だけでなく、維持にも不可欠であり、さらに、葉の分化や形態形成にも関わっていることが明らかになった。

*shl* 変異体の胚および植物体の形態は、これまでにイネで解析されている *shoot organization (sho)* 変異体とよく似ていた。*shl2-6 sho2* 二重変異体を作成したところ、二重変異体は、*shl2-6* 変異体と同じ表現型を示した。このことから、*SHL2* 遺伝子は *SHO2* 遺伝子の上流で SAM の分化および維持に関わっていると考えられた。

### 3、茎頂分裂組織の維持に異常が見られる変異体の同定と解析

SAM の分化や維持には、*SHL* 遺伝子以外にも、多くの遺伝子が関与していると考えられたので、発芽後まもなく枯死する変異体を 16 系統同定、解析した。16 系統の変異体は、SAM だけでなく、植物体の他の部分（葉、根、SAM の直下の茎、分げつ芽）にもさまざまな異常を見せた。このことから、SAM の維持をつかさどる遺伝子には多種多様なものがあり、SAM の維持における遺伝的プログラムは、他の器官や植物体全体の発生を制御するプログラムとも絡み合った、非常に複雑なものであることが明らかになった。

16 系統の中から選抜して詳細に解析をおこなった *odm129* 変異体では、胚発生の遅れ、扁平でオーガニゼーションが異常な SAM、不規則な葉序、形態異常の葉といった表現型が見られ、その原因遺伝子は、イネの発生において多面的で重要な機能を持

っていると考えられた。さらに、*odm129* 変異体と *shl2-6* 変異体および *sho1* 変異体との二重変異体の表現型がいずれも相乗的であったことから、*odm129* の野生型遺伝子は、*SHL2* および *SHO1* 遺伝子と共同して SAM の分化および維持に関与していることが明らかになった。

#### 4、*aberrant regionalization of embryo 3* 変異体を用いた胚の領域化の解析

SAM の分化位置を決定する胚の軸分化および領域化の制御機構の解明のため、胚発生中に SAM や幼根が増加する *aberrant regionalization of embryo 3* (*are3*) 変異体の解析を行った。

*are3* 変異体の完成胚では、約 50% の個体で、SAM および幼根、あるいはいずれかが増加していた。増加した SAM の位置関係は、ひとつの鞘葉の中にふたつの SAM が形成されるものから、別々の鞘葉を持った SAM が離れた位置に形成されるものまで連続的であった。幼根は、互いに隣り合って、根端を胚柄に向けて増加した。また、胚盤が増加する場合もあった。SAM、幼根および胚盤の増加の間には、有意な相関が認められ、それらが一つのセットとして制御されていると考えられた。また、器官がどのように増加する場合でも、胚盤—SAM—幼根という位置関係は変わらなかった。

イネの胚には、その形態から、先端部—基部と背腹の 2 本の軸を想定することができる。*are3* 変異体では、胚盤—SAM—幼根の位置関係が保たれていたことから、先端部—基部軸に沿った領域分化はほぼ正常におこなわれていると考えられた。一方、*are3* 変異体の初期胚での *OSHI* の発現は、背側方向に拡大しており、背腹軸に沿った領域分化には大きな異常があり、それが器官増加につながっていると思われた。

以上の解析より、*ARE3* 遺伝子は、イネの初期胚において腹側あるいは背側の領域の広さを規定することで、特に背腹軸に沿った領域分化に関わっていると考えられる。さらに、*shl2-6 are3* 二重変異体を作成したところ、相乗的な表現型が見られたので、*SHL2* 遺伝子と共同して SAM の分化領域の確保を促進していることが明らかになった。

以上、本研究は、SAM に関わる多様な変異体を同定、解析し、イネの SAM の分化および維持過程に関与する遺伝子の機能解析と遺伝子間相互作用の解明をおこなったものである。