

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏 名 山木 辰一郎
指導教員 長戸 康郎

論文題目 イネにおける胚珠分化の発生遺伝学的研究

胚珠は高等植物における雌性配偶器官であり、大孢子形成、大配偶子形成、受精、胚発生といった主要な生殖活動の舞台となる。それ故、胚珠を正常に分化させられるか否かは植物にとって世代交代の成否に直接の影響を及ぼす重要な問題である。生物学的には、胚珠分化のメカニズムを解明することは植物の性と生殖についての理解を助ける興味深いテーマの 1 つである。また農学的には、胚珠分化の是非は種子数や種子稔性の制御といった農業形質と密接に関係しており、育種分野への応用が期待される事象である。

本研究では、イネにおいて胚珠分化に関わる遺伝的制御機構を解明することを目的に、野生型イネの胚珠分化過程の詳細な観察とシロイヌナズナ相同遺伝子の単離を行うとともに、胚珠分化に異常を示す新規の変異体を解析した。

1. 野生型イネにおける胚珠の分化様式

イネの雌蕊は単心皮、単胚珠である。胚珠は屈曲の弱い半倒生型で、頂部が花床側へと倒れる。また子房壁との連結組織である珠柄が形成されないため、合点が子房壁と直に接する特徴的な形態をとる。さらに合点から伸長した内珠皮が珠心のほとんどを包むのに対し、外珠皮は花柱側で内珠皮の 4 分の 1 程度までしか伸長しない。

胚珠分化過程の観察では、心皮原基の分化に続いて胚珠原基が分化していた。心皮が

閉じて子房室が形成される直前、胚珠原基の基部から珠皮原基が一重のリング状に分化し、心皮が閉じた直後に 2 枚に分かれて内珠皮と外珠皮になっており、他の植物ではあまり例のない特徴的な分化様式をとることが分かった。その後、両珠皮の伸長と同時に珠心内部では *Polygonum* 型の胚嚢分化がみられ、その過程で胚珠の頂部が花床側へと倒れていくことが分かった。

in situ ハイブリダイゼーションによるマーカー遺伝子の発現解析では、心皮原基分化直後、花分裂組織において *OSHI* (分裂組織の未分化細胞のマーカー) の発現が抑制されるとすぐに *OsMADS13* (胚珠のマーカー) の発現が始まっていた。また胚珠原基では *DROOPING LEAF* (心皮のマーカー) の発現がみられなかった。よって、胚珠原基が心皮から形成される一般的な分化様式とは異なり、イネの胚珠原基が花分裂組織から直接形成される可能性が示された。

2. イネにおける *AINTEGUMENTA* 相同遺伝子の解析

シロイヌナズナの *AINTEGUMENTA* (*ANT*) は分化直後の胚珠原基、珠皮原基で強く発現する。よってイネでも同様な発現がみられるならば、胚珠の分化過程を観察する上での良いマーカーとなる。そこでイネにおける *ANT* 相同遺伝子の同定を行った。

イネゲノムデータベース内で *ANT* と高い相同性を示す配列を複数得て、そのうちの 3 つに該当する cDNA をライブラリーから単離し、塩基配列を決定した。それら (*OsANT1*、*OsANT2*、*OsANT3*) の推定アミノ酸配列はそれぞれ *ANT* と同程度の相同性を示し、*ANT* に特徴的な AP2 domain 内でも相同性に大差はなかった。

RT-PCR により、*OsANT1* は葉身で、*OsANT2* は初期胚と根を除く広い範囲で発現することが分かったが、*OsANT3* については明確な発現部位を特定できなかった。よって、*OsANT1*、*OsANT2*、*OsANT3* では発現部位が分担され、機能分化が進んでいる可能性が示された。*in situ* ハイブリダイゼーションによる観察では、栄養生長期、*OsANT2* は分化直後の葉原基や発生が進んだ葉原基の維管束で強く発現していた。また胚珠分化過程では、胚珠原基で明確な発現がみられなかったが、珠皮原基で強く発現していた。よって、*OsANT2* は *ANT* と類似した発現パターンを示し、珠皮の分化過程を観察する上での良いマーカーになることが分かった。

3. 胚珠の原基分化を制御する *OVULELESS* 遺伝子の解析

イネ品種日本晴のカルス再分化集団から、雌蕊内部に胚珠が分化しない *ovuleless* (*ovl*) 変異体を得た。*ovl* ではまれに正常な胚珠が分化し、その頻度が種子稔性とよく一致していたため、*ovl* は雌性不稔性の系統であると判断した。

胚珠原基分化期、*ovl* では胚珠原基に似た突起がみられたが、その高さは野生型に比べて低かった。原基状突起からの珠皮分化はみられず、心皮の発達につれて子房壁内面と区別できなくなっていた。*in situ* ハイブリダイゼーションによる観察では、原基状突起において *OsMADS13* の発現がみられたことから、*ovl* では胚珠原基が分化するものの、以後のパターン形成へと進まないことが分かった。

胚珠の分化異常以外に、*ovl* では生殖生長の様々な段階で器官分化が停止し、それ以降の器官が欠失する表現型がみられた。器官が欠失した小花において分裂組織の痕跡が確認できなかったことから、*ovl* では分裂組織の維持が野生型よりも早い時期に停止し、その後の器官分化によって分裂組織の細胞が消費されると考えられた。また分裂組織が器官分化の早い時期に消失しやすいとか、1次枝梗内で先端に近いほど器官の欠失が著しいといった特定のパターンが見出せなかったことから、*ovl* では生殖生長期のランダムな発生段階で分裂組織が消失していると考えられた。

よって、*OVL* には胚珠原基をパターン形成へと移行させる機能があること、*OVL* が生殖生長期の分裂組織の維持に関わることが考えられ、さらに胚珠分化の制御と生殖生長期の分裂組織の維持に共通した機構が存在する可能性が示された。

また *ovl* では胚珠が分化しないため、雌蕊内部が空洞化する。従って *ovl* は花粉管誘導における胚珠の役割を明らかにするための良い材料になると考え、*ovl* の雌蕊における花粉管伸長を観察した。野生型の雌蕊において、花粉管は柱頭から花柱へと伸長する。子房室に進入すると、子房壁と胚珠の隙間を伸長し花床側の外穎寄りに位置する珠孔へと達する。*ovl* の雌蕊においても花粉管は子房室へ到達し、空洞化した子房室の内面に沿って伸長し花床側へと達していた。よって、子房室内の花床側への花粉管誘導には胚珠が必要でないことが分かった。

4. 珠皮の分化を制御する *GYPSE EMBRYO* 遺伝子の解析

イネ品種台中 65 号の *MNU* 変異原処理集団から、種子中の胚の位置に異常を示す *gypsy embryo* (*gym*) 変異体を得た。*gym* では約 6% の種子で胚の位置が野生型に比べて頂部側へとずれていた。*gym* の受粉 5 日後の雌蕊では約 6% の頻度で異所的に発生する胚がみられたことから、*gym* の種子における胚の位置異常は胚発生が異所的に開始されることに起因し、*gym* では受精前の段階で卵細胞の位置が異常になっていると推測された。

開花期の雌蕊において、*gym* の約 10% の胚珠では胚珠の屈曲が弱まり、直生型に近くなっていた。それらの胚珠では卵細胞が花柱側へとずれていたことから、*gym* の種子における胚の位置異常は卵細胞の位置異常に起因することが示された。またそれらの胚珠では内珠皮の花柱側が十分に伸長せず、さらに低頻度で内珠皮と外珠皮の代わりに 1

枚の厚い珠皮が形成されていた。この珠皮の伸長は著しく抑制されており、これを内珠皮として扱った場合、内珠皮の伸長程度は胚珠の屈曲の強弱とよく一致していた。よって、イネにおいて胚珠の屈曲の強弱は内珠皮の伸長程度によって制御されると考えられた。

胚珠原基分化期、*gym* の胚珠原基は野生型に比べて大きく、さらに珠皮原基の花柱側も野生型に比べて大きかった。また珠皮原基の花柱側が内珠皮と外珠皮に分かれず、1枚の厚い珠皮のままである場合も観察された。さらに野生型の花分裂組織では心皮原基の分化とともに *OSHI* の発現が抑制されるが、*gym* では花分裂組織の頂部で遅い時期まで発現が維持され、さらに胚珠原基、珠皮原基の花柱側でも発現が異所的に残存していることが分かった。さらにその領域では *OsMADS13* と *OsANT2* の発現が野生型に比べて遅い時期まで開始されないことが分かった。よって、*gym* では花分裂組織の有限性が部分的に失われ、花分裂組織に由来する未分化細胞が胚珠アイデンティティーの確立を遅らせ、正常な珠皮分化を妨げていると考えられた。従って、*GYM* は花分裂組織の有限性の獲得に関係すると推測された。

花分裂組織が増大し花器官数が増加する *fon2-3* との二重変異体 *gym fon2-3* では心皮が無限生長的に分化し、花分裂組織の有限性が大幅に失われた。よって、*GYM* と *FON2* は冗長性をもって花分裂組織の有限性の獲得に機能すると考えられた。

一般に、胚珠の屈曲の強弱は花粉管の受け入れに関係する形質であるといわれていることから、*gym* の雌蕊における花粉管伸長を観察した。すると、*gym* の直生型に近い胚珠では半倒生型の胚珠に比べて卵細胞の受精効率が低かった。よって、イネにおいても胚珠の屈曲の強弱は花粉管の受け入れに関係すると考えられた。また *gym* において胚の位置異常の頻度が卵細胞の位置異常の頻度よりも低いことは、卵細胞の位置に依存した受精効率の差によって説明できることが分かった。

以上の解析から、イネにおける胚珠の分化様式には特徴的な点が数多くみられることが分かった。また単子葉植物においては現在までに胚珠分化に関する変異体は得られておらず、本研究で得られた2つの変異体はその先駆けとなるものである。今後それらを用いて解析を発展させることは、単子葉植物における胚珠分化のメカニズムを解明することにつながり、ひいては植物全体の性と生殖を理解するための大きな助けになると考えられる。