

博士論文番号：0281024

オーキシンを介した胚頂端領域のパターン形成機構の解析

古谷 将彦

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 形質発現植物学講座

(田坂 昌生 教授)

平成 15 年 1 月 6 日提出

目次

本論文の要旨	3 - 4
はじめに	5 - 9
第 1 章 胚発生期におけるオーキシン生合成	10 - 38
序論 / 材料と方法 / 結果 / 考察 / 図と表	
第 2 章 <i>PIN-FORMED1</i> と <i>PINOID</i> は子葉の境界部形成と子葉の発達を制御する	39 - 70
序論 / 材料と方法 / 結果 / 考察 / 図と表	
第 3 章 子葉形成に関わる新規因子 <i>MACCHI-BOU (MAB)</i> の探索と同定	71 - 95
序論 / 材料と方法 / 結果 / 考察 / 図と表	
第 4 章 結論と考察	96 - 121
結論と考察 / 図と表 / 参考文献	
謝辞	122

本論文の要旨

高等植物の地上部を構成する葉や花といった器官は、茎頂に存在する分裂組織から形成される。茎頂分裂組織の中心部の細胞は、未分化な状態を保ちながら増殖を続け、周辺部へと移行した細胞群は、器官原基もしくは器官境界部へと分化決定がなされ、それぞれの領域を形成する。そして、器官原基は、茎頂分裂組織周辺部に、種に特有の一定の角度を保って発生する。これまでの研究により、植物ホルモンのオーキシンのこの器官形成パターンの構築に非常に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、その詳細な分子機構は、いまだ分かっていない。そこで、器官形成の分子メカニズムを解明することを目的に、高等植物の生活環において最初に形成される葉様器官である子葉に着目して研究を行った。球状型胚期の頂端領域において、将来茎頂分裂組織を形成する領域は中央部に、将来子葉原基を形成する領域と、将来子葉境界部を形成する領域は周辺部に位置する。この配置は、胚発生以後の茎頂分裂組織と葉原基の分布パターンとほぼ対応しており、子葉形成機構の解明はそれ以後の葉様器官形成機構の解明に繋がると期待される。

まず、胚発生期におけるオーキシンの挙動を詳細に理解するため、その出発点であるオーキシンの生合成部位の同定を試みた（第1章; Furutani et al., 2003）。オーキシン生合成に関与すると示唆されている遺伝子の胚発生における発現解析を行った。その結果、これらの遺伝子は時空間的に厳密に制御された発現パターンを示すことが明らかになった。そして、既に示されているオーキシン排出キャリアーの局在データと、ここで得られたオーキシン生合成に関与する遺伝子の発現解析の結果を合わせて想定できるオーキシンの分布パターンは、既に報告されているオーキシン分布と大部分で一致した。また、オーキシン関連変異体において、オーキシン生合成の律速因子である *YUCCA* 遺伝子の発現が乱れた。これは、オーキシンによる自身の生合成に対するフィードバック機構の存在を示唆している。

つぎに、オーキシンと胚頂端領域のパターン形成の関係を分子レベルで調べるため、この過程における *PIN-FORMED1 (PIN1)* と *PINOID (PID)* の機能について調べた（第2章; Furutani et al., 2004）。*PIN1* は、オーキシンの極性輸送を促進するオーキシン排出キャリアーと考えられている膜タンパク質をコードしており、オーキシン分布を制御することで器官形成を促進すると示唆されている。一方、*PID* はオーキシンで誘導される Ser/Thr kinase をコードしており、*PIN* の細胞内局在を制御することで、オーキシンの極性輸送を制御すると考えられている。これらの単独変異体の芽生えは、子葉の発達に比較的穏やかな欠損を示したが、*pin1 pid* 二重変異体は子葉を形成できなか

った。この二重変異体では、胚発生を通して子葉境界部形成に必須な *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)*、*CUC2* および *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* の発現領域が周辺部に広がっていた。一方、*pin1* および *pid* 単独変異体の胚では、それらの発現の広がりは一過的であった。*cuc* および *stm* と *pin1 pid* との三重および四重変異体の解析から、*pin1 pid* 二重変異体において異所的に発現した *CUC1*、*CUC2* および *STM* 遺伝子が、子葉原基の発達を抑制していることが示された。これらの結果から、*PIN1* と *PID* が機能重複的に子葉発生に大きく寄与すること、そして *PIN1* と *PID* が *CUC1*、*CUC2* および *STM* といった子葉形成の負の因子を制御することで子葉形成に関与することが示唆された。

さらに、子葉形成に関わる新規因子の単離を目的に、*pid* 変異を増幅する変異体の原因遺伝子として *MACCHI-BOU (MAB)* 遺伝子の単離を行った（第3章）。その結果、*MAB1* から *MAB4* までの4遺伝子座を得ることができた。*mab3* 変異体は、第2章で示した *pid* 変異を増幅する *pin1* 変異体の新しいアレルであった。このことは、今回行ったスクリーニングによって器官形成に関わる因子が単離されていることを示している。*MAB1* 遺伝子をクローニングした結果、ミトコンドリア型 pyruvate dehydrogenase E1 subunit β をコードする遺伝子であった。代謝に関与する因子が器官形成に関わるという報告はこれまでになく、*MAB1* は器官形成の新しい側面を示す因子であるといえる。

器官発生パターンに対して、これまでに実験発生学的研究が行われ、それらの結果に基づきいくつかの説が唱えられている。これらの説はそれぞれの視点に立った実験結果のみを考慮したもので、総合的に説明できるものではない。そこで、今回得られた結果をふまえ新たな器官発生モデルを提唱すると同時に、これまでの説を検証した（第4章）。

はじめに

高等植物の地上部を構成する葉や花といった器官は、茎頂に存在する分裂組織（SAM）からつくられる（図 0.1A,B）。組織学的観察により、被子植物の茎頂分裂組織中心部では細胞分裂速度が遅く細胞がやや大きいのに対して、周辺部では分裂速度が速く細胞が小さいことが示されている。その形態等に基づき、茎頂分裂組織を中心部（central zone; CZ）と周辺部（peripheral zone; PZ）と髄状部（rib zone; RZ）に区画化することができる（Vernoux et al., 2000; Carles and Fletcher, 2003）（図 0.1C）。RZ の細胞群は分裂組織下部に位置し、茎の中心部へと分化していく。CZ の細胞群は未分化な状態を維持しながら増殖を続け、CZ から PZ へ移行した細胞は器官原基もしくは器官境界部への分化決定がなされ、それぞれの領域を形成する（図 0.2A）。PZ に器官原基は種に特有の一定の角度（葉序; phyllotaxis）を保って発生する（図 0.2B）。この器官発生パターンに対しては、これまでに実験発生学的、生理学および分子遺伝学的な研究が行われ、それらの結果に基づきおもに以下の 3 つの説が唱えられている。

1) 若い器官原基の切除または破壊により葉序が乱れることが示され、その結果から「field theory」と呼ばれるモデルが提唱されている（Snow and Snow, 1931; Wardlaw, 1949; Steeves and Sussex, 1989）。形成された器官原基は、器官原基誘導を阻害する拡散性阻害因子を生産することで、その周辺部の器官原基形成を阻害する。そして、既存の器官からある程度離れ、拡散性阻害因子の影響が十分小さい領域に、次の器官原基が形成されるというものである。

2) 細胞壁を緩め細胞伸長に必要な酵素である「expansin」を、将来器官原基を形成する領域に投与もしくは発現させることにより、器官原基形成を促進できることが示された（Fleming et al., 1997; Reinhardt et al., 1998; Piens et al., 2001）。この結果から、ずり応力が最大で張力が最少になる位置に器官原基が形成されるという力学的観点によるモデルが提唱されている。

3) 近年、分子遺伝学的解析等により、器官発生に植物ホルモンであるオーキシンが非常に重要な役割を果たすことが示されてきている。オーキシンは、その生合成部位からの極性をもった輸送により不等分布を示し、さまざまな発達および生理現象を引き起こすと示唆されている。オーキシン極性輸送を薬剤により阻害した植物体やオーキシンの極性輸送に欠損のあるシロイヌナズナ変異体では、器官原基を形成できずに花茎がピン状になる（Okada et al., 1991; Reinhardt et al., 2000）。また、こういったピン状の花茎に対して外部からオーキシンを投与することで、器官原基を誘導することができる（Reinhardt et al., 2000; Reinhardt et al., 2003）。これらのことから、オーキシ

ンと器官原基形成は密接に関与していることが示唆されるが、いまだその機構解明には至っていない。

これらのモデルはそれぞれの視点にたった実験結果のみを考慮したもので、総合的に説明できるものではない。そこで、器官形成の分子メカニズムを解明し、あらたな統合モデルを提案することを目的に、高等植物の生活環において最初に形成される葉様器官である子葉に着目して研究を行うことにした。

子葉は胚発生期に形成される。双子葉植物の胚発生期において、受精卵は不等分裂を行い頂端細胞と基部細胞に分かれ、頂端細胞がさらに分裂を繰り返し球状の胚本体を形成する。その後、球状型胚の頂端領域から2か所盛り上がりが生じ、子葉原基そして子葉へと発達していく（図 0.3A）。球状型胚の頂端領域は、その後の発生運命から3つに領域に分けることができる（Aida et al., 1999）。将来茎頂分裂組織を形成する PS（presumptive SAM）領域、将来子葉の境界部となる BCM（boundary of cotyledon margins）領域、そして将来子葉原基を形成する CP（cotyledon primordia）領域の3つである。PS領域は胚頂端領域の中心に位置し、その周辺部にBCMとCP領域が存在する（図 0.3B）。この配置は胚発生期以後における茎頂分裂組織と葉原基の分布パターンにほぼ対応しており、胚発生期の子葉形成機構の解明は、その後の器官形成機構の解明にも繋がると期待される。

私は、上で述べた3つの器官形成モデルの中でも、既に多くの情報が蓄積し、分子レベルでの実体に迫りやすいオーキシンによる器官形成機構に注目し、その解明から他のモデルの可能性について議論したいと考えている。第1章では、胚発生期におけるオーキシンの挙動の解明に向け、その生合成部位の同定を行った。第2章では、既存の子葉形成に異常を示す変異体を用いた分子遺伝学的解析を行い、第3章では子葉形成過程に関わる新規因子の単離と同定を行った。第4章では、第1章から第3章までの結果から、これまでに提唱されている器官形成モデルを検討する。

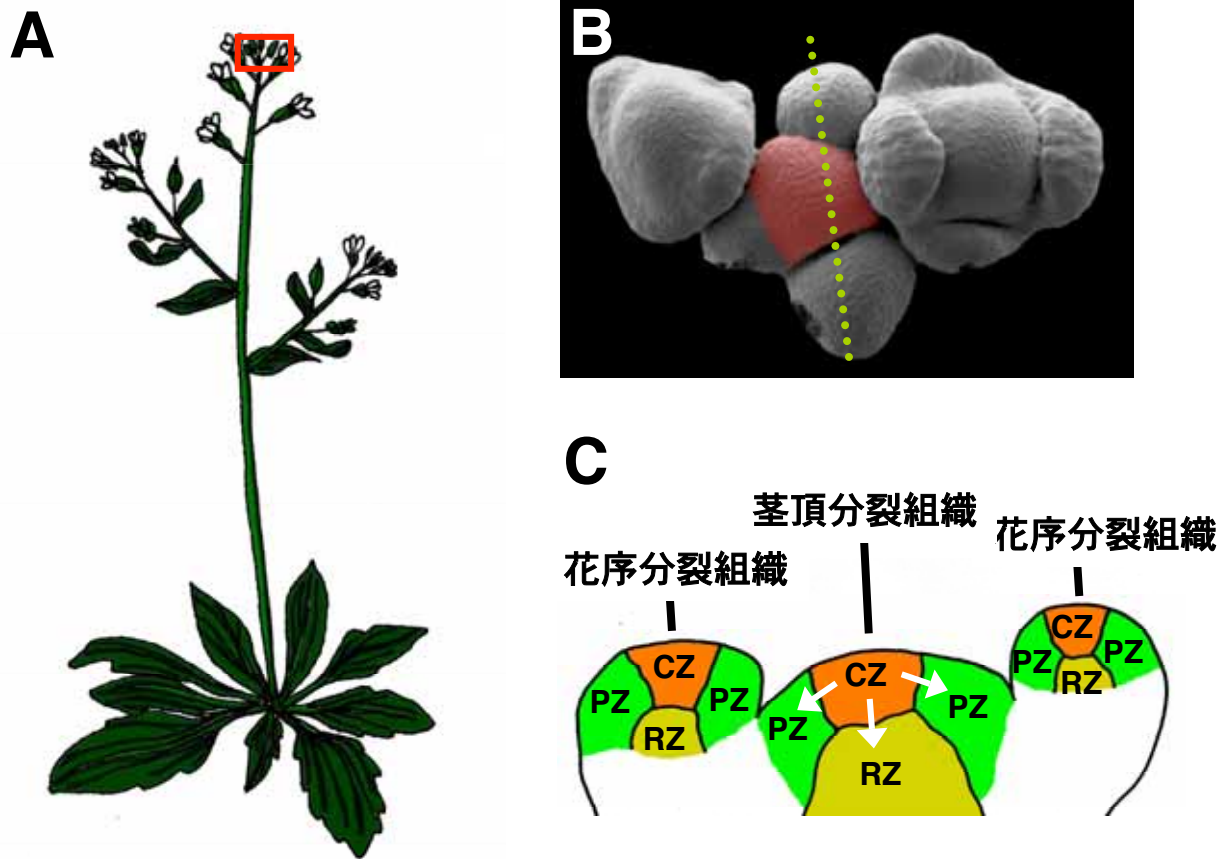


図 0.1. シロイヌナズナの地上部

(A) シロイヌナズナの地上部の模式図。(B) Aの四角で囲んだ部位の、走査型電子顕微鏡による像。赤い領域は茎頂分裂組織を示す。(C) Bの黄土色の点線で示した面で切断した茎頂の模式図。オレンジの領域は分裂組織の中心部 (CZ)、黄緑の領域は分裂組織の周辺部 (PZ)、黄土色の領域は分裂組織の随部 (RZ) を示す。

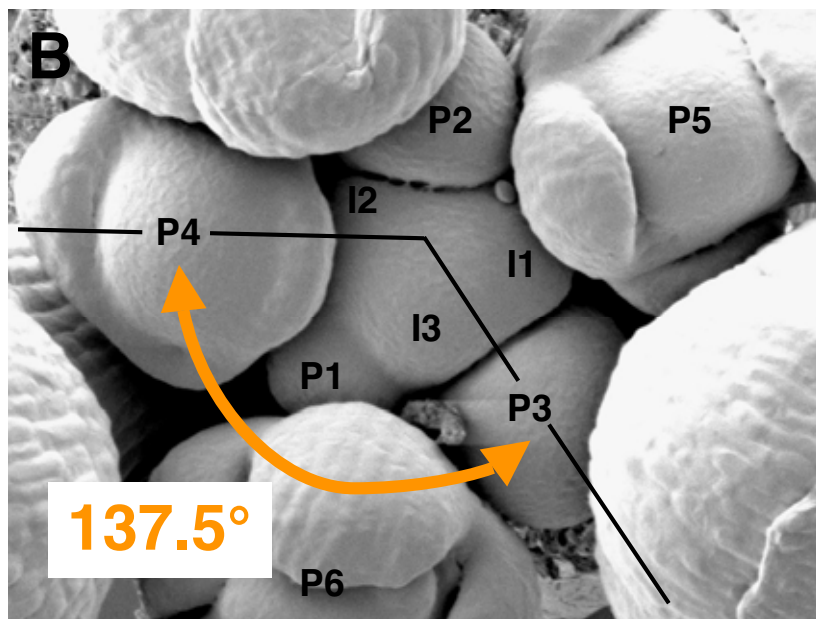
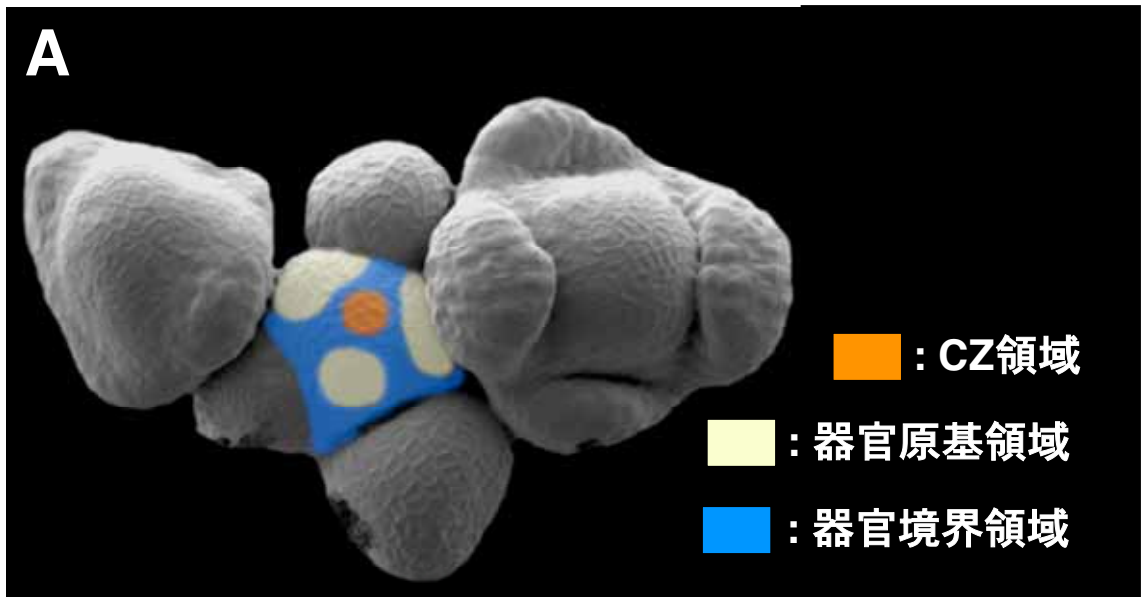


図 0. 2. 茎頂分裂組織からの器官形成

(A) シロイヌナズナの茎頂分裂組織。中央にCZ領域（オレンジ色）が、その周辺に器官原基領域（クリーム色）と器官境界領域（青色）が形成される。(B) 走査型電子顕微鏡によるシロイヌナズナの茎頂の像。発達した器官原基を若いものからP1、P2、P3、・・・とし、これから器官原基へと発達していくであろう領域を順にI1、I2、I3とする。隣合った器官原基との成す角度は、137.5°である。

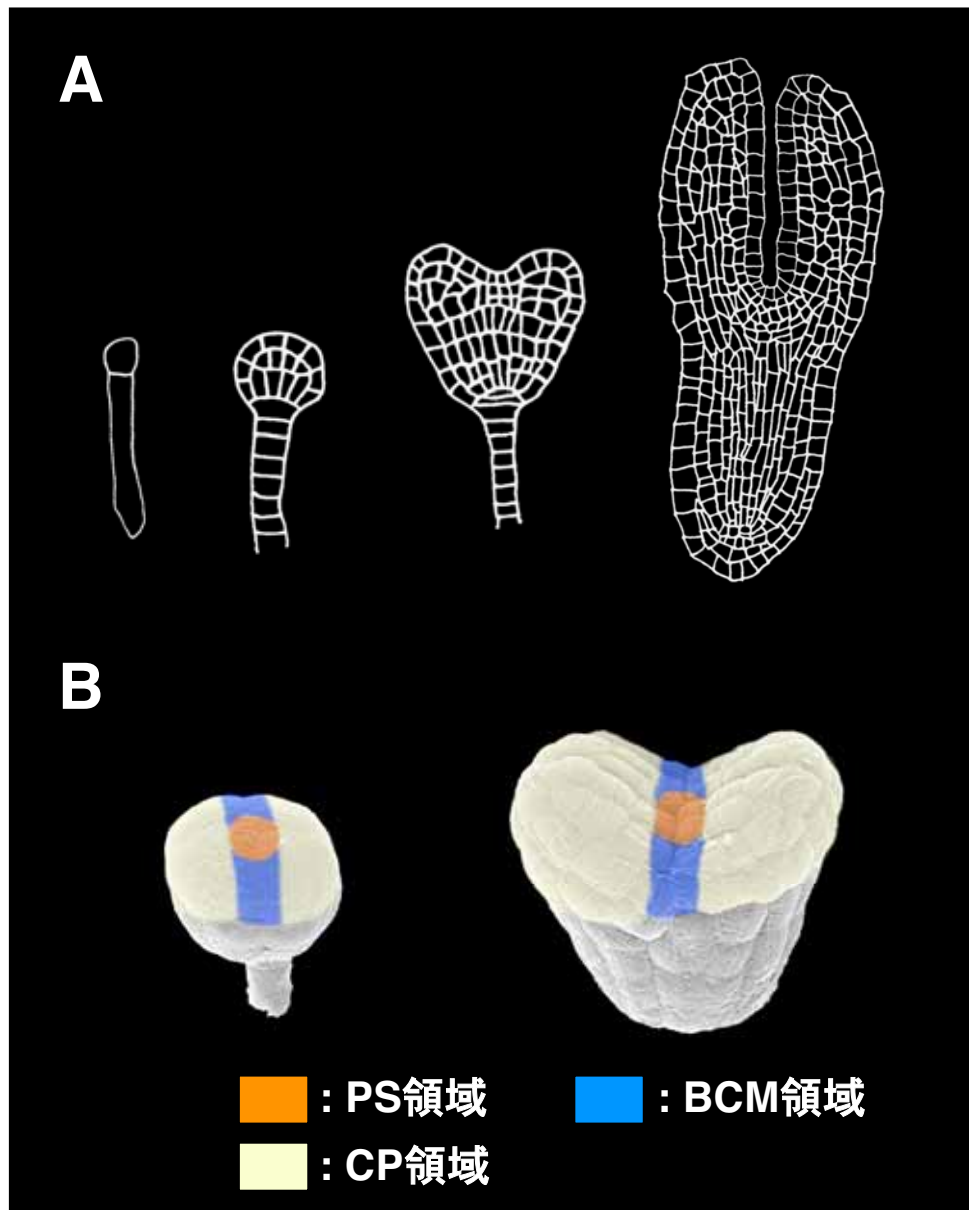


図 0.3. シロイヌナズナの胚発生と胚頂端領域

(A) シロイヌナズナの胚発生の模式図。左から順に、接合子の不等分裂直後、球状型胚期、心臓型胚期、魚雷型胚期の胚。(B) 球状型胚および心臓型胚の頂端領域の模式図。中央にPS領域（オレンジ色）、その周辺部にBCM領域（青色）とCP領域（クリーム色）が形成される。それぞれの領域の説明は本文を参照。

第 1 章

胚発生期におけるオーキシン生合成

序論

オーキシンはさまざまな植物の成長および発達に関わる植物ホルモンである。細胞膜に局在するオーキシン排出キャリアーの働きによって、オーキシンは細胞間を輸送される。オーキシン応答性のレポーター遺伝子である *DR5rev::GFP* や抗オーキシン抗体を用いたこれまでの解析により、胚発生期にオーキシンは非対称に蓄積し、その分布が劇的に変動することが示された (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002; Benková et al., 2003; Friml et al., 2003) (図 1.1)。オーキシンは接合子が不等分裂した直後の頂端細胞およびその後の胚本体で蓄積し、頂端—基部軸に沿って非対称な分布を示す。球状型胚期になると基部側にオーキシンのピークが移行し、胚柄上部の細胞と原根層と呼ばれる細胞で蓄積が観察される。その後、心臓型胚期初期には、胚基部領域におけるオーキシンの蓄積に加えて子葉原基の先端にもオーキシンのピークが現れる。それ以降、このオーキシン分布を基本的に維持したまま胚発生は進行する。

胚発生期におけるオーキシン分布の重要性は、生理学および遺伝学的解析によって示されている。胚に対するオーキシンおよびオーキシン極性輸送阻害剤の投与によって、オーキシン分布の攪乱とともに頂端—基部軸そして胚頂端領域のパターン形成に異常が引き起こされる (Friml et al., 2003; Sauer and Friml, 2004)。また、オーキシン極性輸送に必須なオーキシン排出キャリアーである PIN-FORMED 7 (PIN7)、PIN4 および PIN1 の胚発生における役割についても調べられている (Okada et al., 1991; Friml et al., 2002; Friml et al., 2003)。PIN7 は不等分裂以後の基部細胞由来の細胞において頂端側の細胞膜に局在し、球状型胚期にはその配向が逆になる。PIN4 は球状型胚期後期から原根層の表面とそれと接する胚柄細胞の基部側の細胞膜で検出される。PIN1 は球状型胚期初期まで胚の内側の細胞境界面に局在し極性を示さない。それ以降、PIN1 の局在は前形成層細胞では基部側に、子葉原基周辺の表皮細胞層では頂端側に移行する。これら PIN の配向は胚発生におけるオーキシンのピークをよく説明できる。たとえば、前球状型胚期の胚柄において頂端側に局在する PIN7 は、胚柄から胚本体にオーキシンを輸送していることが考えられ、実際胚柄より胚本体にオーキシンが蓄積することをうまく説明できる。また、*pin7*、*pin4*、*pin1* 変異体は、それぞれ初期胚の形態に、原根層および胚柄細胞における細胞分裂パターンに、胚頂端領域のパターン形成に

異常を示す。さらに、*pin7*、*pin4* 変異体ではその表現型に対応する時期でオーキシンの分布が乱れていることが確認された。これらの結果は、PIN によるオーキシンの極性輸送がオーキシン分布を確立し、胚のパターン形成に重要な働きをしていることを示唆している。これまでの研究は、オーキシン分布および極性輸送に焦点を当てて行われてきたが、その出発点である生合成部位についてはいまだ分かっていない。オーキシン極性輸送阻害剤 naphthylphthalamic acid (NPA) および小胞輸送阻害剤 BFA を投与し、オーキシン生合成部位からの輸送を遮断した球状型胚において、オーキシンのピークが胚頂端領域、原根層周辺に存在する (Friml et al., 2003)。その部位でオーキシンが生合成されていることが間接的に予想されるが、直接生合成部位を調べた研究はいまだ行われていない。

植物体内で活性を示すオーキシン、indole-3-acetic acid (IAA) の生合成経路について、これまで生化学的もしくは遺伝学的な解析が行われ、いくつかの生合成経路が明らかにされている。それは、大きく分けてトリプトファン (Trp) からの生合成経路 (Trp 依存的経路) と Trp の前駆体からの生合成経路 (Trp 非依存的経路) である (Normanly et al., 1995; Slovin et al., 1999)。多くの植物は、両方の生合成経路を使って IAA 生合成を行っていると考えられている。

Trp 非依存的経路に関しては、その存在が示唆されているにもかかわらず、その経路に関わる酵素や中間産物はいまだ報告されていない (Winter, 1966)。一方、ニンジン胚の発生において、大量に存在する遊離 IAA の大半が Trp 依存的経路を介して生合成されていることが示唆されている (Ribnicky et al., 2002)。Trp 依存的経路における中間産物および関連酵素等に関する報告は数多くなされ、Trp から tryptamine、indole-3-acetaldoxime (IAOx) そして indole-3-pyruvic acid (IPA) への変換が Trp 依存的生合成経路の最初の触媒反応であると示唆されている (図 1.2)。

Tryptamine が IAA の前駆体であることは、生理活性測定や植物体における蓄積の解析等によって示唆されている (Winter, 1966; Cooney and Nonhebel, 1991)。Tryptamine から N-hydroxyl-tryptamine への変換を触媒する flavin monooxygenase (FMO) 様の酵素である YUCCA がシロイヌナズナから単離され、それに対する解析から tryptamine を介したオーキシン合成経路の重要性が示されている (Zhao et al., 2001)。YUCCA 遺伝子の過剰発現体では、遊離オーキシンが蓄積し、高濃度オーキシン反応を示す。YUCCA 様遺伝子、YUCCA2 および YUCCA3 の過剰発現体においても同様の表現型が観察され、YUCCA、YUCCA2 そして YUCCA3 が tryptamine 経路における律速因子であることが示唆された。また、ペチュニアの *floozy* (*fzy*) 変異体は、花器官の形

成、維管束のパターンおよび頂芽優勢に欠損を示すなど、オーキシンの関連した表現型を示す。その原因遺伝子である *FZY* は、シロイヌナズナの *YUCCA* のオルソログであり、*FZY* の過剰発現体はオーキシンの余剰な蓄積を引き起こすと共に高濃度オーキシン反応を示す (Tobefia-Santamaria et al., 2002)。これらのことから、ペチュニアにおいても *YUCCA* 様酵素が IAA 生合成における律速因子であることが示唆される。

Trp から生じる 2 つめの IAA 前駆体、indole-3-acetaldoxime (IAOx) は、indole glucosinolate の前駆体でもある。Cytochrome P450 monooxygenase である CYP79B2 と CYP78B3 は、in vitro で Trp から IAOx への変換を触媒することが示されている (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000)。CYP79B2 の過剰発現体において indole glucosinolate、indole-3-acetonitrile (IAN) そして遊離 IAA の増加が確認されることから、これらの酵素が植物体においても Trp から IAOx への変換を触媒することが示唆される (Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002)。高濃度オーキシン反応を示す変異体 *superroot1 (sur1)* および *sur2* の原因遺伝子が、IAOx からの indole glucosinolate 生合成経路に関わる C-S lyase と cytochrome P450 (CYP83B1) をコードしていることが示され、IAOx が IAA 生合成と indole glucosinolate 生合成の代謝分岐点であることが示されている (Delarue et al., 1998; Bak et al., 2001; Mikkelsen et al., 2004)。Trp から生じる 3 つ目の前駆体 IPA に関しては、微生物において $\text{Trp} \rightarrow \text{IPA} \rightarrow \text{IAA}$ という経路が見つかっており、植物でも重要な経路であると考えられているが (Koga, 1995)、この経路に関わる酵素の単離には至っていない。

また、最終的に IAA への変換を触媒する酵素として、IAAld oxidase と nitrilase が報告されている (Bower et al., 1978; Bartling et al., 1992; Bartel and Fink, 1994; Bartling et al., 1994; Sekimoto et al., 1997; Seo et al., 1998)。IAAld oxidase は IAAld を基質としており、シロイヌナズナでは aldehyde oxidase isozyme (AAO1) として単離された (Seo et al., 1998)。Nitrilase は、IAN を加水分解し IAA への変換を触媒する酵素で、シロイヌナズナでは *NIT1*、*NIT2* そして *NIT3* 遺伝子がコードしている。

今回の研究では、胚発生期におけるオーキシンの生合成部位を同定するため、これまでに Trp 依存的オーキシン生合成経路への関与が報告されている遺伝子の胚における発現解析を行った。その結果、それぞれの経路に関わるオーキシン生合成酵素遺伝子の発現が胚発生期を通してさまざまな部位で観察された。このうち、*YUCCA*、*YUCCA3*、*AAO1* はオーキシン輸送阻害剤実験から予想できるオーキシン生合成部位とよく一致しており、これらの遺伝子の発現部位がオーキシン生合成の主要な場であることが強く示唆された。また、オーキシン関連変異体において、オーキシン合成の律速因子であ

る *YUCCA* および *YUCCA3* の発現パターンを調べたところ、発現やそのパターンに異常が生じていることが明らかになり、最終産物であるオーキシシンからその生合成酵素遺伝子に対するフィードバック制御機構が存在することが示唆された。

材料と方法

植物材料と育成条件

野生型として、*Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* (Ler)を用いた。*pin1-3* (Ler) (Bennett et al., 1995)、*mp-rtl* (Ler) (Aida et al., 2002) 変異体アレルを用いた。植物体は Fukaki らの方法に従い、23℃、白色光連続照射下で鉢植えの状態で生育させた (Fukaki et al., 1996)。In situ hybridization 法に用いるため、生育させた植物体の鞘をサンプルとして用いた。胚発生ステージは、Jürgens と Mayer によって定められた基準に従った (Jürgens and Mayer, 1994)。

In situ hybridization

以下に示すプライマーセットを用いて PCR で増幅したものを鋳型にした。アンチセンスプローブを T3、T7 および SP6 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写系で作成した。

YUCCA-FW: CATATCATCCTCGTACACGG

YUCCA-RV: GCACATATTCCTGGTGGACC

YUCCA2-FW: GAATCCATGATCCGTACGTG

YUCCA2-RV: ATGTTGAGGACGAGCCAATG

YUCCA3-FW: GCGTTGCATCTGGGTCAATG

YUCCA3-RV: GAAATACAACGACGATGACG

AAO1-FW: GATATAAGCCCGCTTATGCC

AAO1-RV: ATCTGTACGCAGGATCGTTG

CYP79B2-FW: CCTCAAACCTCTTCGGATCTC

CYP79B2-RV: TGA TAGACTCCATCAGCTC

CYP79B3-FW: CAAACTCTTCGGATCTCACG

CYP79B3-RV: GTAAAGGTCCTCCGACAATC

CYP83B1-FW: CACGACCA AGAAATCTCT CC

CYP83B1-RV: GCAATCCCAAGATGCATGGC

NIT1-FW: ACCTTTGGGACAAGTTCTCG

NIT1-RV: TGAGATTCAACGCCCAACGC

NIT2-FW: TTGGTACGACGACAAAGAGC

NIT2-RV: GGCTACATGGTTGTAGAATG

NIT3-FW: ATCGGTGCTGCTATTTGCTG

NIT3-RV: GAATACAAGAGGAGAGAACC

CYP79B2 と *CYP79B3* および *NIT1* と *NIT2* は相同性が高いため、UTR (untranslated region) を含む領域をテンプレートに用いた。これらの遺伝子

のほぼ全長を鋳型にして作成したプローブを用いた場合も、基本的に同じ結果が得られた。その他の遺伝子に関しては、ほぼ全長を鋳型にして作成したプローブを用いた。組織の固定、脱水、包埋、切片の作成、切片の前処理、ハイブリダイゼーション、プローブの免疫化学的検出は、Aida らの方法に従って行った(Aida et al., 2002)。

結果

YUCCA 遺伝子の発現パターン

Tryptamine から N-hydroxyl-tryptamine への変換を触媒する *YUCCA* 様酵素が胚のどの部位で機能しているか調べるため、*YUCCA*、*YUCCA2* そして *YUCCA3* 遺伝子の発現解析を胚に対して行った。*YUCCA2* 遺伝子については、胚発生期において *in situ hybridization* でシグナルを確認することができなかった。*YUCCA* は球状型胚期初期に、胚頂端領域の中心部で最初に発現が観察された（図 1.3A）。心臓型胚期になると、子葉の境界部でもシグナルが検出された（図 1.3B,C）。さらに発生が進むにつれて、2 枚の子葉の境界部中心からシグナルがみられなくなり、発現は茎頂分裂組織と子葉との境界部に限定された（図 1.3D,E）。*YUCCA3* は、16 細胞期において、胚柄の基部側に最初に発現が観察された（図 1.4A）。球状型胚期から心臓型胚期にかけて胚柄において発現が確認されたが、原根層においてシグナルを検出することができなかった（図 1.4B,C）。発生が進むにつれて胚本体の基部領域でシグナルが検出された（図 1.4C）。魚雷型胚になると、静止中心と始原細胞群を含む幼根の先端部位で発現していたが、コルメラ細胞での発現は見られなかった（図 1.4D,E）。胚発生後期になると、少数の胚で *YUCCA3* の弱いシグナルが子葉の境界部で検出された。

CYP79B2 と *CYP79B3* の発現パターン

Trp から IAOx への変換を触媒する *CYP79B2* と *CYP79B3* の胚発生期における機能部位を同定するため、それらの遺伝子の発現解析を行った。*CYP79B2* 遺伝子の発現は、心臓型胚期以降で確認された。心臓型胚期において、子葉原基と基部領域を結ぶ前形成層の交差部位付近でドット状に発現していた（図 1.5A）。シグナルのドット数は、個体によって 0 から 2 点まで変化していた。心臓型胚期後期になると、胚軸の前形成層および幼根の始原細胞周辺でもドット状に発現するようになった（図 1.5B）。さらに発生が進むにつれて、シグナルは幼根の静止中心付近に限られるようになった（図 1.5C）。これらの発現についても、個体によってドット数に差があった。*CYP79B3* に関しては、魚雷型胚期以降の胚において *CYP79B2* と同様に幼根の静止中心周辺でドット状に発現していた（図 1.6A,B）。ドット状の発現の出現頻度は、*CYP79B2* の場合と比べて低かった。このことから、*CYP79B2* と *CYP79B3* はともにドット状の発現を示し、ドットの出現頻度に個体差があることが示された。

Indole glucosinolate 生合成に関与する *CYP83B1* の発現パターン

CYP83B1 は、オーキシン前駆体 IAOx から IAOx N-oxide への変換を触媒し、indole glucosinolate 生合成経路に関与する。この酵素が、胚発生期にどの部位で機能しているのかを調べるため、in situ hybridization で発現解析を行った。*CYP83B1* のシグナルは、心臓型胚および魚雷型胚において検出された (図 1.7A-D)。心臓型胚期に *CYP83B1* は子葉原基と基部領域を結ぶ前形成層の交差部位付近および静止中心周辺で、魚雷型胚期には静止中心周辺でドット状に発現していた。

AAO1 遺伝子の発現パターン

IAAld から IAA への変換を触媒する *AAO1* が、胚発生期にどこで機能しているか調べるため、胚に対して発現解析を行った。*AAO1* の発現は 32 細胞期から心臓型胚期初期にかけて検出された。*AAO1* のシグナルは、おもに原根層とそれに接する胚柄細胞で検出された (図 1.8A-D)。心臓型胚期初期の胚において、しばしば片側もしくは両方の子葉原基と思われる部位で発現が確認できた (図 1.8C,D)。片側の子葉原基に *AAO1* の発現が確認された胚では原根層および胚柄において強い *AAO1* の発現が確認されたが、両方の子葉原基に *AAO1* の発現が確認された胚では原根層および胚柄における *AAO1* の発現は弱かった (図 1.8C,D)。

NIT 遺伝子の発現パターン

IAN を加水分解し IAA へ変換する酵素であると示唆されている *NIT* をコードするシロイヌナズナ *NIT1*、*NIT2* および *NIT3* の胚発生期における発現解析を行った。胚発生初期では胚乳細胞で (図 1.9A)、心臓型胚期後期では子葉境界部付近で (図 1.9B)、*NIT1* の弱い発現が確認された。魚雷型胚期では胚軸と幼根に (図 1.9C)、成熟胚期において幼根で弱い *NIT1* の発現を検出した (図 1.9D,E)。 *NIT2* も、球状型胚期および心臓型胚期に胚乳で強いシグナルが観察された (図 1.9A,B)。心臓型胚期後期では、胚乳細胞のほかにも胚軸および幼根の上部で、*NIT2* の発現がみられた (図 1.9C)。魚雷型胚期以降、前形成層と幼根の先端を除く胚全体に *NIT2* の発現は広がり、特に胚軸および幼根において強い発現を示した (図 1.9D-F)。 *NIT3* は、8 細胞期の胚柄の頂端細胞において (図 1.10A)、また球状型胚期から心臓型胚期にかけて原根層で発現していた (図 1.10B,C)。心臓型胚期中期から魚雷型胚期にかけて *NIT3* のシグナルは検出されなかった。魚雷型胚期以降になると、幼根で再びシグナルを検出された (図 1.10D,E)。

***YUCCA* および *YUCCA3* の発現に対する *pin1* および *mp* 変異の影響**

これまでの研究により、胚発生以後に形成された若い器官において、オーキシン極性輸送阻害剤 NPA がオーキシン生合成に対してフィードバック阻害を引き起こすことが示されている (Ljung et al., 2001)。胚発生において、同様にオーキシン生合成がオーキシンによるフィードバック制御を受けるかどうかを調べるため、オーキシン関連変異体の胚において、オーキシン生合成の律速因子である *YUCCA* および *YUCCA3* 遺伝子の発現解析を行った。まず、オーキシン排出キャリアーをコードし胚頂端領域のパターン形成に関与することが示されている *PIN1* 遺伝子の変異が、胚頂端領域に発現する *YUCCA* に与える影響を調べた。*pin1-3* 変異のホモ接合体は完全に不稔であるために、*pin1-3/+*の鞘に対して発現解析を行った。*pin1-3/+*の鞘に含まれる 26.1%の心臓型胚および魚雷型胚 (46 個中 12 個の胚) で、*YUCCA* は頂端領域でスポット状に発現ししていた (図 1.12A,B)。この結果から、*pin1* 変異体の胚では *YUCCA* の発現が減少し、より限定された発現をすることが示された。次に、胚の基部領域で発現する *YUCCA3* に対する *MONOPTEROS (MP)* の影響を調べた。*MP* はオーキシン応答を仲介する転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)をコードし、幼根形成に必須な遺伝子である。*mp-rtl* 変異のホモ接合体は完全に不稔であるために、*mp-rtl/+*の鞘に対して *YUCCA3* の発現解析を行った。9.7%の球状型胚 (31 個中 3 個の胚) において、胚柄部での *YUCCA3* の発現が確認できなかった。また、心臓型胚期以降の 24.2%の胚 (66 個中 16 個の胚) で、シグナルを検出することができなかった (図 1.12C,D)。このことから、*YUCCA3* の発現は一部の *mp* 変異体で欠失し、その割合が胚発生後期に増加することが示唆された。

考察

今回、胚発生期において、Trp 依存的 IAA 生合成経路に関わる遺伝子の発現解析を行った。興味深いことに、Trp 依存的 IAA 生合成経路に関与する遺伝子の多くは、胚発生期において時期および部位特異的な発現パターンを示し、時空間的に厳密に制御されていることが示唆された。また、*CYP79B2* および *CYP79B3* のように、不規則なドット状に発現するものもあった。今回得られた結果は、既に報告されている PIN の局在データ (Friml et al., 2002; Friml et al., 2003; Benková et al., 2003) と共に、胚におけるオーキシン分布を説明する上で重要な基礎になる。また、今回の結果より、オーキシン生合成の律速因子 *YUCCA* および *YUCCA3* の発現制御にオーキシンによるフィードバック制御機構が関与することも示唆された。なお、今回は各遺伝子の mRNA の局在を調べた結果を示しており、この発現パターンが酵素活性の部位を反映すると仮定して、以下の考察を行った。

胚発生期におけるオーキシン生合成

胚発生において、*YUCCA2* の発現は in situ hybridization で検出されなかったが、*YUCCA* および *YUCCA3* が時期そして部位特異的に発現しており、これらが胚発生期に機能していることが示唆された (図 1.15 : 緑の矢印)。*YUCCA*、*YUCCA2* および *YUCCA3* は、tryptamine から N-hydroxyl-tryptamine への変換を触媒し、この反応がオーキシン合成における律速段階であることが示唆されている (Zhao et al., 2001)。球状胚の中心部とその後の子葉と茎頂分裂組織との境界部の表皮細胞層で *YUCCA* が発現していたことより、IAA が *YUCCA* を介して胚頂端領域で生合成されることが示唆される (図 1.13A)。このことは、オーキシン極性輸送阻害剤 NPA や小胞輸送阻害剤 BFA を投与しオーキシン合成部位からの輸送を遮断した球状胚において、胚頂端領域にオーキシンのピークが存在することと一致する (Friml et al., 2003)。また、球状胚期に前形成層の PIN1 および PIN4 の局在が基部側に向かう極性を示し、原根層にオーキシンピークを形成する (図 1.13B) ことから、胚頂端領域の中心部で合成された IAA を PIN1 および PIN4 が原根層へと輸送していることが示唆される (Steinmann et al., 1999; Friml et al., 2002; Friml et al., 2003)。また、心臓型胚期には表皮細胞層の PIN1 が子葉原基の先端側に向かう極性をもって局在し、子葉原基先端にオーキシンピークが形成されること (Friml et al., 2003; Benková et al., 2003) から、子葉境界部で合成された IAA が、表皮細胞層の PIN1 によって子葉先端部へと輸送されることが考えられる (図 1.13A)。

一方、*YUCCA3* は球状型胚期初期では胚柄で、球状型胚期後期では原根層の上部で、それ以降では幼根の末端部で発現する。このことから、IAA の生合成は胚柄および胚基部領域において起こることが示唆される。このことは、NPA や BFA 投与によりオーキシン合成部位からの輸送を遮断した胚において、球状型胚期初期でオーキシンのピークが胚柄に、球状型胚期後期に胚頂端領域のほか原根層周辺部に局在することと一致する (Friml et al., 2003)。一方、PIN7 は、球状型胚期初期まで胚柄細胞において頂端側に局在し、球状型胚期後期になると基部側に局在が移行することが示されている (Friml et al., 2003)。このことは、16 細胞期から球状型胚期初期にかけて胚柄の基部側で *YUCCA3* によって合成された IAA が、PIN7 によって頂端側に輸送され、後期になると胚柄の頂端側で IAA が生合成され、PIN7 によって基部側に輸送されることを示唆している (図 1.13A)。また、心臓型胚期において、PIN1 および PIN4 が静止中心近傍の前形成層細胞において基部側に局在し、原根層および静止中心で *DR5rev::GFP* のシグナルが検出されている (Friml et al., 2002; Friml et al., 2003) (図 1.13B)。この時期に、*YUCCA3* を介して前形成層の基部で IAA が合成され、その合成された IAA が PIN1 および PIN4 によって原根層に輸送されることが示唆される。以上の考察は、*YUCCA* および *YUCCA3* による N-hydroxyl-tryptamine への変換から最終産物である IAA の生合成までが同じ細胞で起きることを想定している。しかし、アルカロイドの生合成経路において、一連の中間産物の生成に関わる酵素が異なる組織に局在することから、中間産物が細胞間を移行することが示唆されている (St-Pierre et al., 1999; Burlat et al., 2004)。IAA 生合成の場合も同様に、*YUCCA* および *YUCCA3* によって変換された N-hydroxyl-tryptamine もしくはその下流の IAA 前駆体が *YUCCA* および *YUCCA3* の発現部位から輸送され、異なる領域で IAA へと変換される可能性は捨てきれない。

IAAld から IAA への変換を触媒する IAAld oxidase をコードする *AAOI* (Seo et al., 1998) は、球状型胚期から心臓型胚期初期にかけて原根層で、また心臓型胚期初期に発達し始めた子葉原基で弱い局在を示した。この結果は、原根層および発達を開始して間もない子葉原基において IAAld が IAA に変換されることを示唆する (図 1.15：水色の矢印)。PIN4 および PIN7 は同時期に原根層で発現することより (Friml et al., 2002; Friml et al., 2003)、この PIN4 および PIN7 によって胚本体もしくは胚柄の基部側にオーキシンが極性輸送されていることが予想される (図 1.13A)。

今回の発現解析で、*NIT* 遺伝子が胚発生期においてさまざまな時期および部位で発現していることが示された。*NIT* は IAN から IAA への変換を触媒しうる酵素であるが (Bartling et al., 1992; Bartel and Fink, 1994; Bartling et al.,

1994)、一般に植物体内でこの酵素の基質が IAN であるかどうかは明らかではない (Vorwerk et al., 2001)。また、IAN は IAOx または indole glucosinolate から生じるが、胚発生において IAOx への変換を触媒する *CYP79B2*、*CYP79B3* および indole glucosinolate 生合成に必須な *CYP83B1* の発現と *NIT* の発現は時期および部位がほとんど重ならない。これらのことから、胚において *NIT* が IAN → IAA 経路で働いているかどうか疑わしい。しかし、原根層における *NIT3* の発現や子葉境界部での弱い *NIT1* の発現が確認されており、*YUCCA* および *YUCCA3* の発現と部分的に重なっている。この点を考えると、*NIT1* や *NIT3* が一部の組織で *YUCCA* および *YUCCA3* 由来の IAN から IAA への変換に関わっている可能性も捨てきれない (図 1.15 : 緑の破線矢印)。

胚発生における *CYP79B2*、*CYP79B3* および *CYP83B1* の役割

CYP79B2 および *CYP79B3* による Trp → IAOx への変換は indole glucosinolate および IAA 生合成に関わり、*CYP83B1* は IAOx を indole glucosinolate 生合成経路における次の中間産物への変換に関わっていることが示唆されている (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Bak et al., 2001; Zhao et al., 2002)。また、*cyp83b1/sur2* 変異体が、IAA レベルの上昇とともに高濃度オーキシン反応を示すこと (Delarue et al., 1998; Bak et al., 2001)、そしてその表現型が *cyp79b2 cyp79b3* 二重変異によって抑制されること (Celenza et al., 2005) から、*CYP79B2* および *CYP79B3* によって変換された IAOx が indole glucosinolate 生合成と IAA 生合成の分岐点であると考えられている。今回の発現解析から、胚発生において *CYP79B2* および *CYP79B3* の発現パターンと *CYP83B1* との発現パターンがよく似ていることが示された。このことは、胚発生において、*CYP79B2* および *CYP79B3* によって Trp から変換された IAOx は、*CYP83B1* によって indole-3-acetaldoxime N-oxide に変換され indole glucosinolate 生合成経路に供されていることを示唆している。したがって、これらの酵素は胚発生において indole glucosinolate 生合成に関与することが示唆される (図 1.15 : 赤い矢印)。また、胚発生では *CYP83B1* の発現と *NIT* の発現は重なることはなく、*CYP79B2*、*CYP79B3* および *CYP83B1* を介して生合成された indole glucosinolate が IAN を介して IAA に変換される可能性は低いと考えられる。さらに、これら遺伝子の発現部位はランダムで、NPA や BFA といったオーキシン輸送阻害剤投与実験の結果から予想されるオーキシン合成部位とは一致しない。これらのことから、*CYP79B2*、*CYP79B3* および *CYP83B1* は胚におけるオーキシン生合成の主要な経路であるとは考えにくい。

***PIN1* および *MP* は *YUCCA* 遺伝子の発現を制御する**

pin1 変異体の胚において、*YUCCA* の胚頂端領域の周辺部における発現が減退し、*mp* 変異体の胚において、*YUCCA3* の発現が部分的に失われていた。*PIN1* はオーキシン排出キャリアーをコードし、その変異体は子葉の発達に異常を生じる (Okada et al., 1991; Gälweiler et al., 1998; Aida et al., 2002)。*MP* はオーキシン応答性のシス配列に結合する転写活性化因子をコードし、その変異体は原根層において異常な分裂を示し幼根の形成に異常を示す (Berleth and Jürgens, 1993; Ulmasov et al., 1997a; Hardtke and Berleth, 1998)。これらのことは、正常なオーキシン極性輸送および応答が、*YUCCA* および *YUCCA3* の発現に重要であることを示しており、オーキシンとその生合成との間にフィードバック制御機構が存在することを示唆する (図 1.14A,B)。子葉の境界部で発現しその形成に必須な *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)* および *CUC2* の発現が *pin1* 変異体で乱れること (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001; Aida et al., 2002)、胚基部領域で発現しその領域の幹細胞ニッチの形成に必須な *PLETHOLA (PLT)* の発現が、*mp* 変異体において部分的に欠失することが示されている (Aida et al., 2004)。また、*YUCCA* および *YUCCA3* が、*CUC* および *PLT* に部分的に似た部位特異的な発現パターンを示すことから、*YUCCA* が *CUC* の制御を、*YUCCA3* が *PLT* の制御を受ける可能性が示唆される。この場合、オーキシンによるその生合成酵素遺伝子への発現制御は、*CUC* や *PLT* といった領域形成に必須な因子を介した間接的なものであることが考えられる。一方、すでに領域化および分化した器官において、NPA 処理によってオーキシン生合成が阻害されること (Ljung et al., 2001) が示されており、IAA が合成部位から輸送されなくなりオーキシンがその合成部位に蓄積することで、オーキシン生合成阻害を誘導しているという、直接的なフィードバック制御機構の可能性も考えられる。オーキシンとその生合成との間のフィードバック制御機構を解明することは、オーキシンのさまざまな機能を考えるうえで非常に重要な知見となるであろう。

Trp 依存的 IAA 合成経路における新たな経路

シロイヌナズナにある 4 種のアルデヒド酸化酵素のうち、AAO1 だけが IAAld に高い基質親和性を示す。このことから、AAO1 が IAAld → IAA の変換を触媒する唯一の酵素であることが示唆されている (Seo et al., 1998)。その *AAO1* の発現は、胚発生を通して *YUCCA* および *YUCCA3* の発現とほとんど重なることがなかった。このことは、*YUCCA* および *YUCCA3* によって Trp から変換された N-hydroxyl-tryptamine が IAAld を経ることなく、IAA 合成を行っていることを示唆する (図 1.15: 緑の矢印)。N-hydroxyl-tryptamine

から IAA までの中間経路の可能性としては、*YUCCA* および *YUCCA3* の発現と部分的に重なっていた NIT が IAN を IAA に変換すること（図 1.15：緑の破線矢印）、もしくは IAN を介さない新規の経路を経ることが考えられる。逆に、IAAld を IAA に変換する AAO1 (Seo et al., 1998) に対して、IAAld を供給する経路の可能性としては、十のメンバーから成る *YUCCA* ファミリーに属する *YUCCA*、*YUCCA2* および *YUCCA3* 以外の FMO 様酵素 (Zhao et al., 2001) を介することが考えられる。つまり、*AAO1* とよく似た発現をする *YUCCA* ファミリーメンバーが存在する可能性である。もちろん、*AAO1* に IAAld を供給する他の経路の可能性もある。微生物では、 $\text{Trp} \rightarrow \text{IPA} \rightarrow \text{IAAld} \rightarrow \text{IAA}$ という経路も見つかっており、この経路は植物でも重要であると考えられている (Koga et al., 1995)。もしかすると、球状型胚期から心臓型胚期初期にかけて、この経路によって生成された IAAld を *AAO1* が IAA に変換するのかもしれない。以上の結果から、今回発現解析した遺伝子だけでオーキシン合成経路を完全に網羅しているわけではないこと、そしてこれまでに報告されていない経路および酵素が存在することが示唆された。オーキシン合成経路の解明には、さらなる分子遺伝学的および生化学的解析が必要であろう。

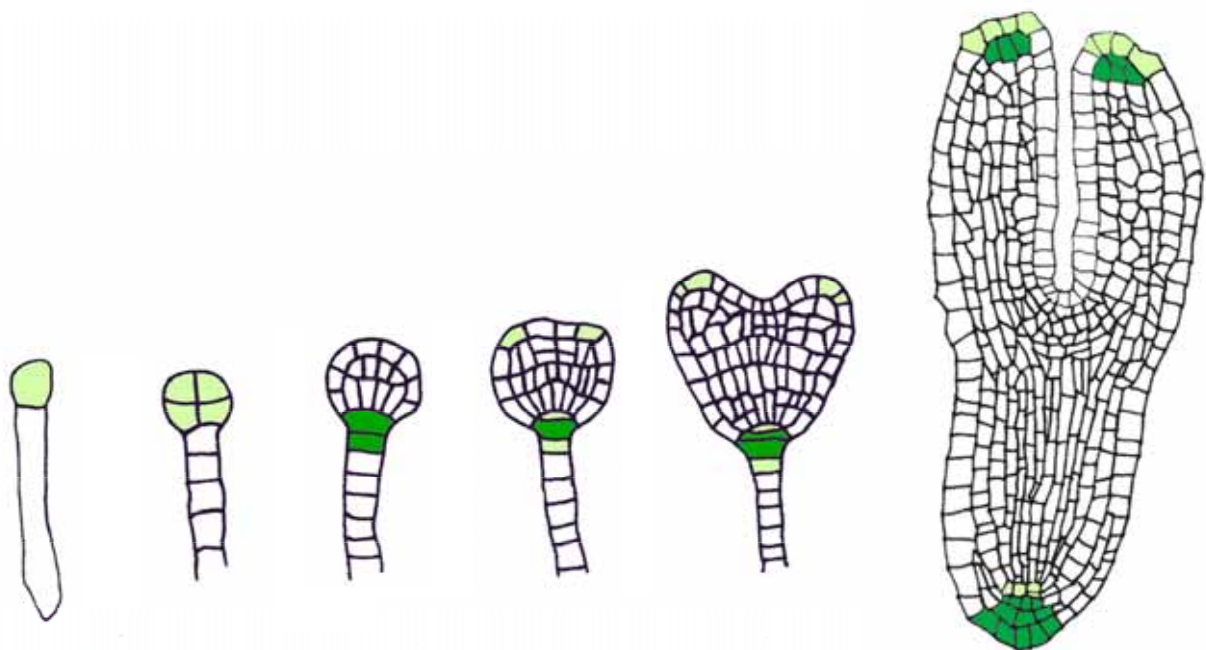


図 1. 1. 胚発生期におけるオーキシンの分布

シロイヌナズナの胚発生の様式図。左から順に、接合子の不等分裂直後、8細胞期、球状型胚期、心臓型胚期初期、心臓型胚期中期、魚雷型胚期の胚。緑は、オーキシンのピークを示し、色の濃淡はオーキシンの蓄積量を示している。

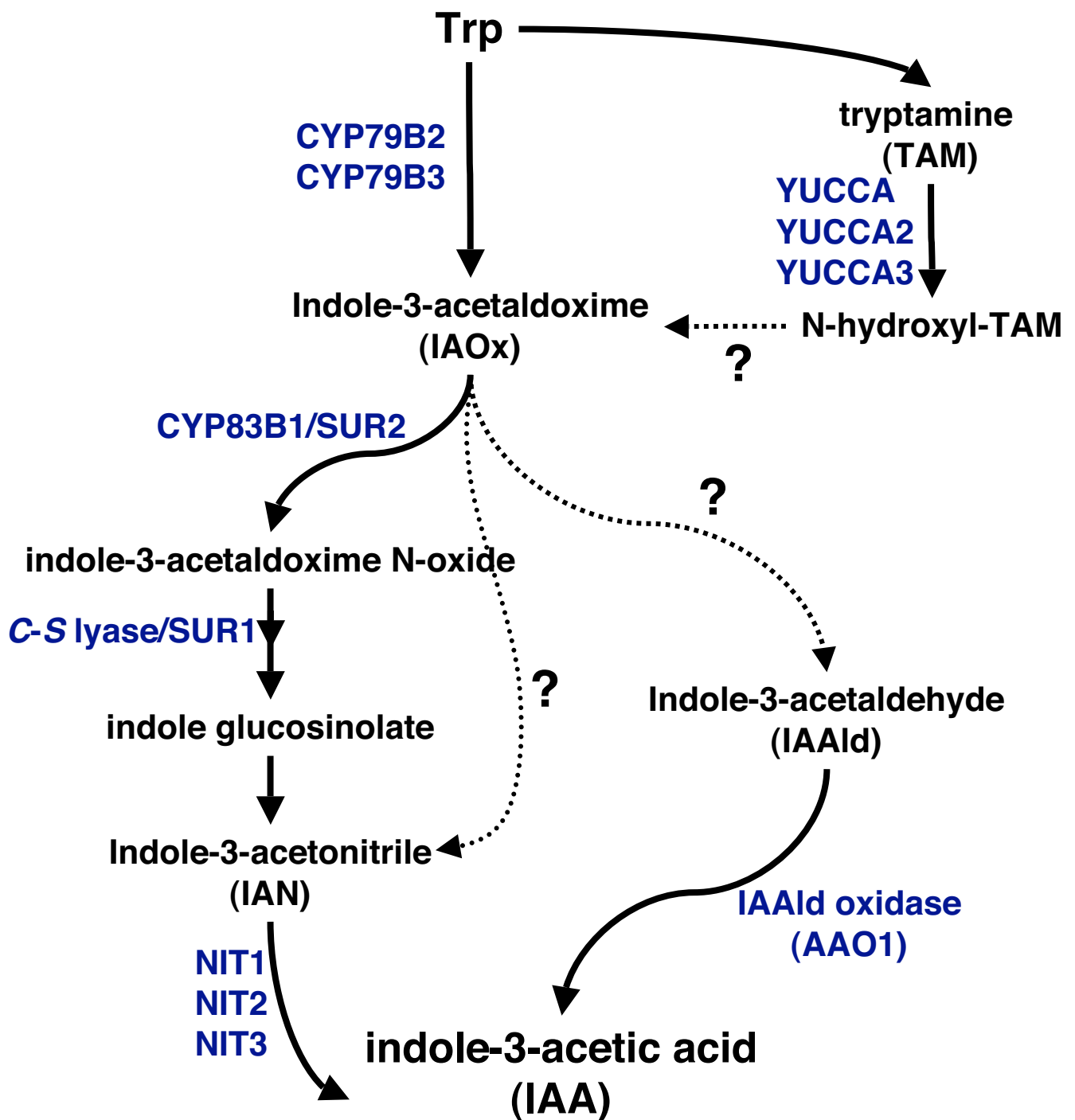


図 1. 2. Trp依存的IAA生合成経路

Trp依存的IAA生合成経路に関与する、シロイヌナズナから単離されている酵素を青字で記した。関与する酵素が植物から単離されていない変換は、点線で示している。

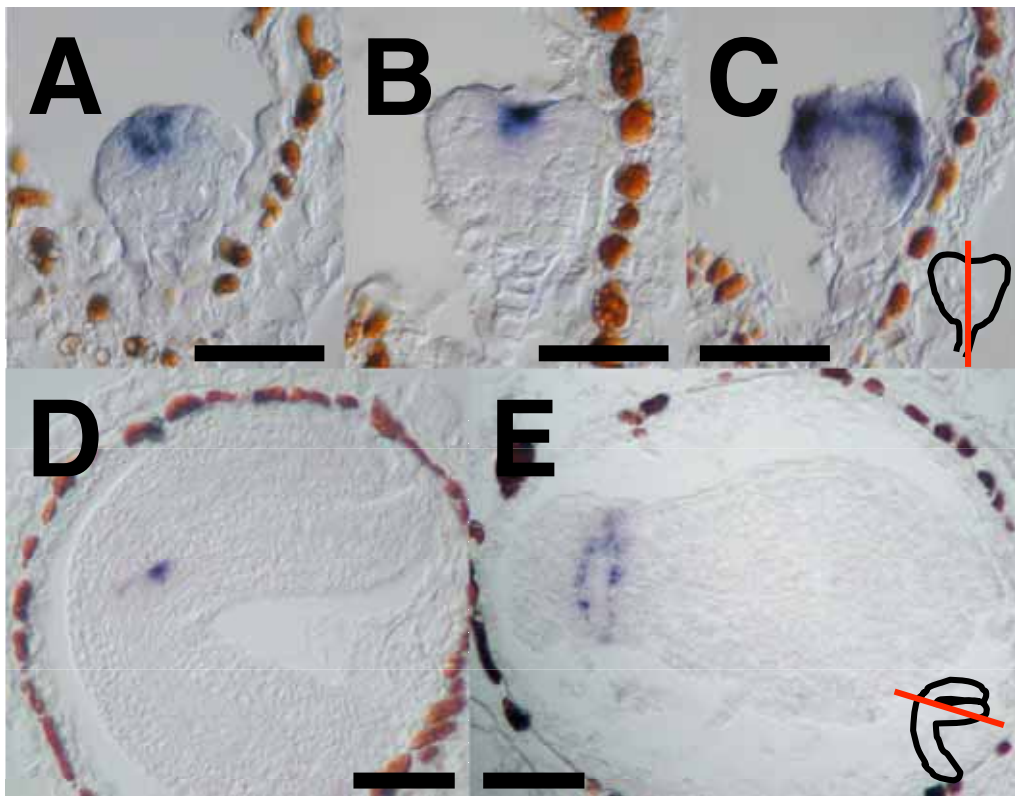


図 1. 3. 胚発生期の *YUCCA* 遺伝子の発現パターン

(A-E) 球状型胚期 (A)、心臓型胚期 (B,C)、子葉屈曲期 (D,E) における *YUCCA* の発現。野生型胚の矢状断面 (C) と前額断面 (A,B,D)。
(C,E) 胚の模式図における赤い線は切断面を示す。A-E におけるスケールバーは、50 μm 。

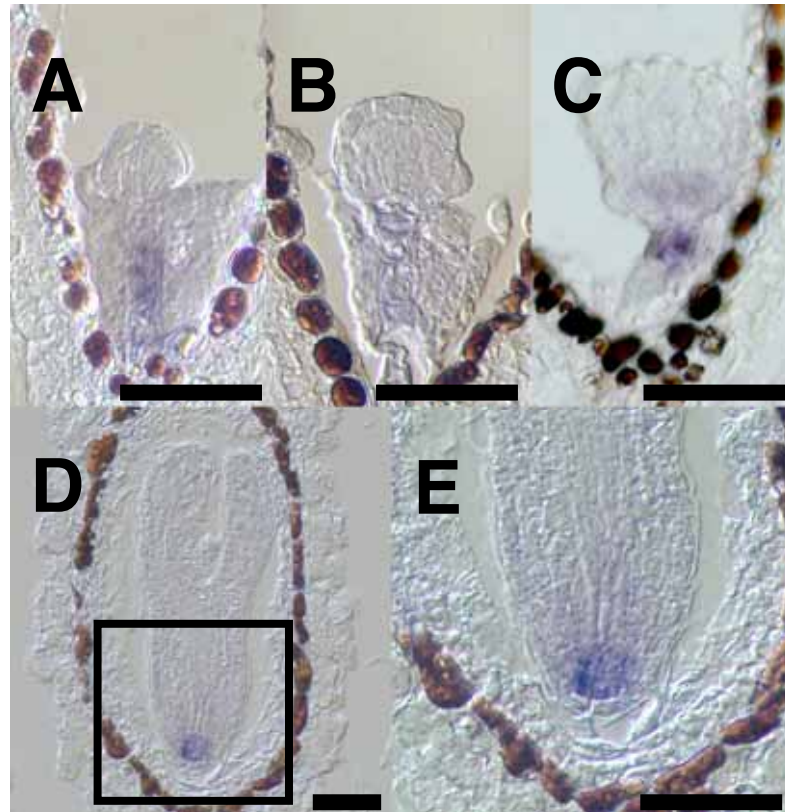


図 1. 4. 胚発生期の *YUCCA3* 遺伝子の発現パターン

(A-E) 16細胞期 (A)、心臓型胚期初期 (B)、心臓型胚期中期 (C)、魚雷型胚期 (D,E) における *YUCCA3* の発現。EはDにおける黒枠を拡大した図。A-Eにおけるスケールバーは、50 μm 。

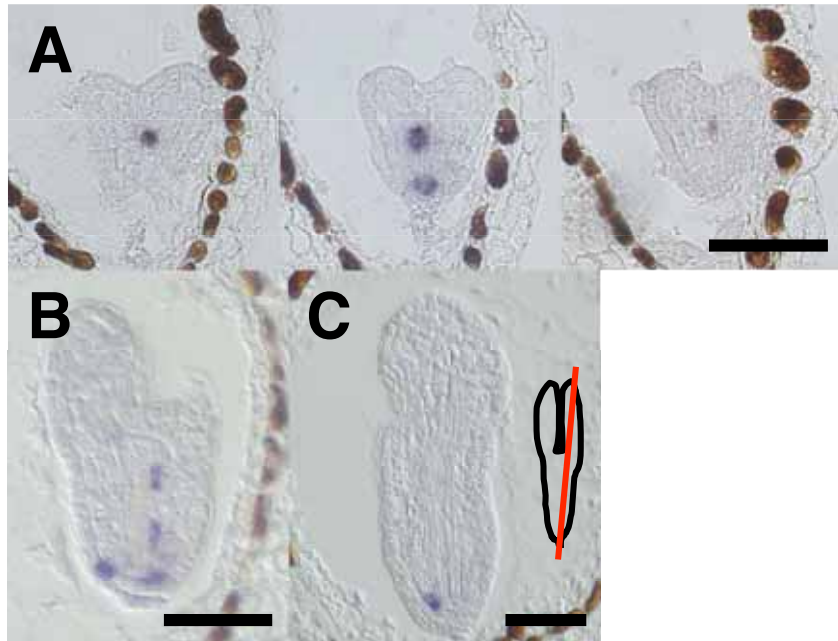


図 1. 5. 胚発生期の*CYP79B2*の発現パターン

(A-C) 心臓型胚期中期 (A)、心臓型胚期後期 (B)、魚雷型胚期C) における*CYP79B2*の発現。(A) 心臓型胚の連続切片。(C) 赤い線は切断面を示す。A-Cにおけるスケールバーは、50 μ m。

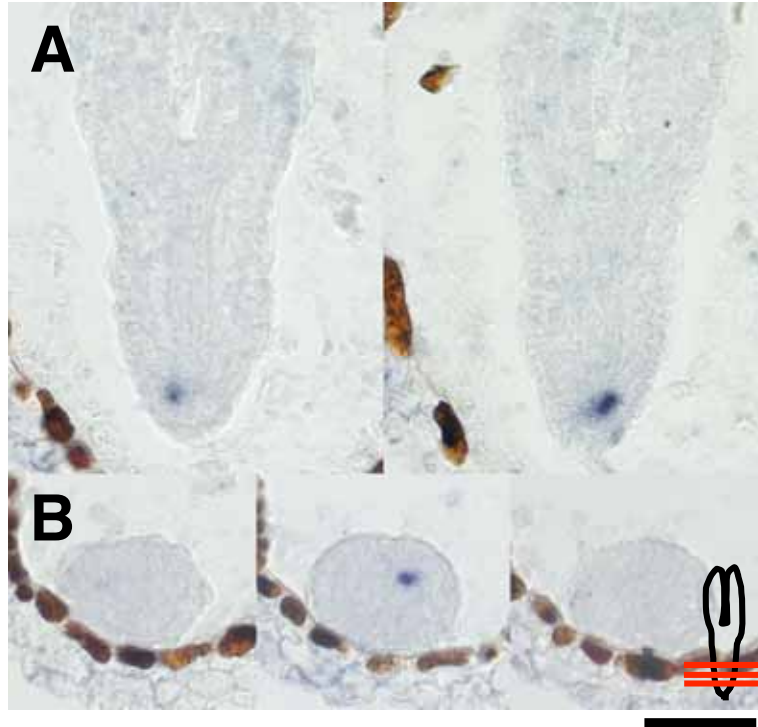


図 1. 6. 胚発生期の*CYP79B3*の発現パターン

(A,B) 魚雷型胚期の*CYP79B3*の発現パターン。(A) 魚雷型胚の連続縦断切片。(B) 魚雷型胚の連続横断切片。赤い線は切断面を示す。スケールバーは50 μ m。

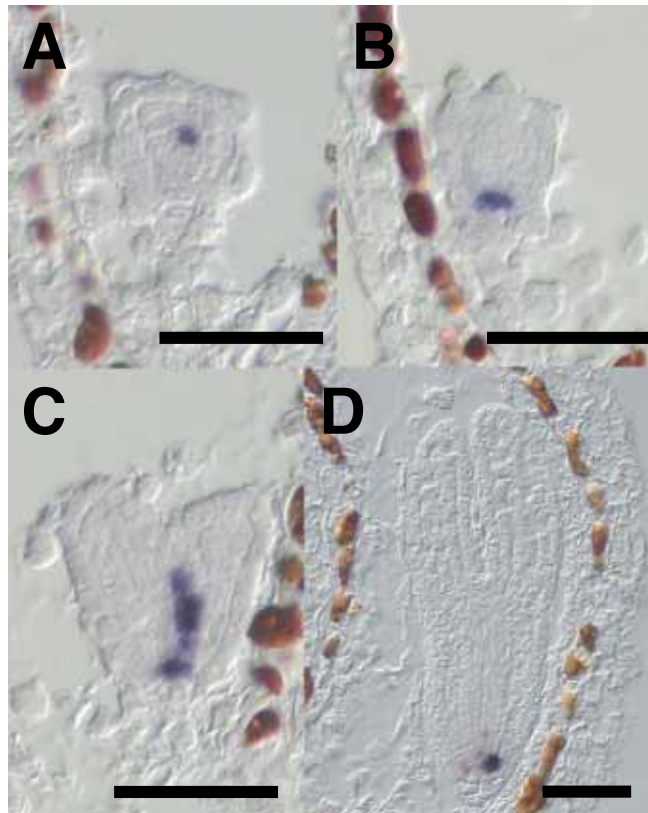


図 1. 7. 胚発生期の*CYP83B1*の発現パターン

(A-D) 心臓型胚期初期 (A,B)、心臓型胚期中期 (C)、子葉屈曲期 (D) における*CYP83B1*の発現。スケールバーは50 μ m。

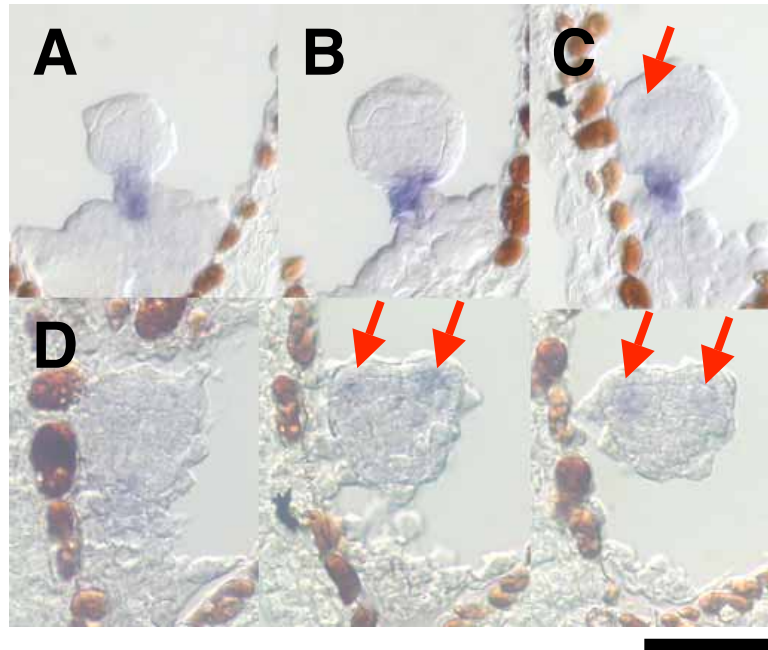


図 1. 8. 胚発生期のAAO1の発現パターン

(A-C) 32細胞期 (A)、球状型胚期 (B)、心臓型胚期初期 (C) における AAO1 の発現。(D) 単一の心臓型胚期中期胚の連続切片における AAO1 の発現。

(C,D) 赤い矢印は子葉原基領域における AAO1 の弱い発現を示す。スケールバーは、50 μ m。

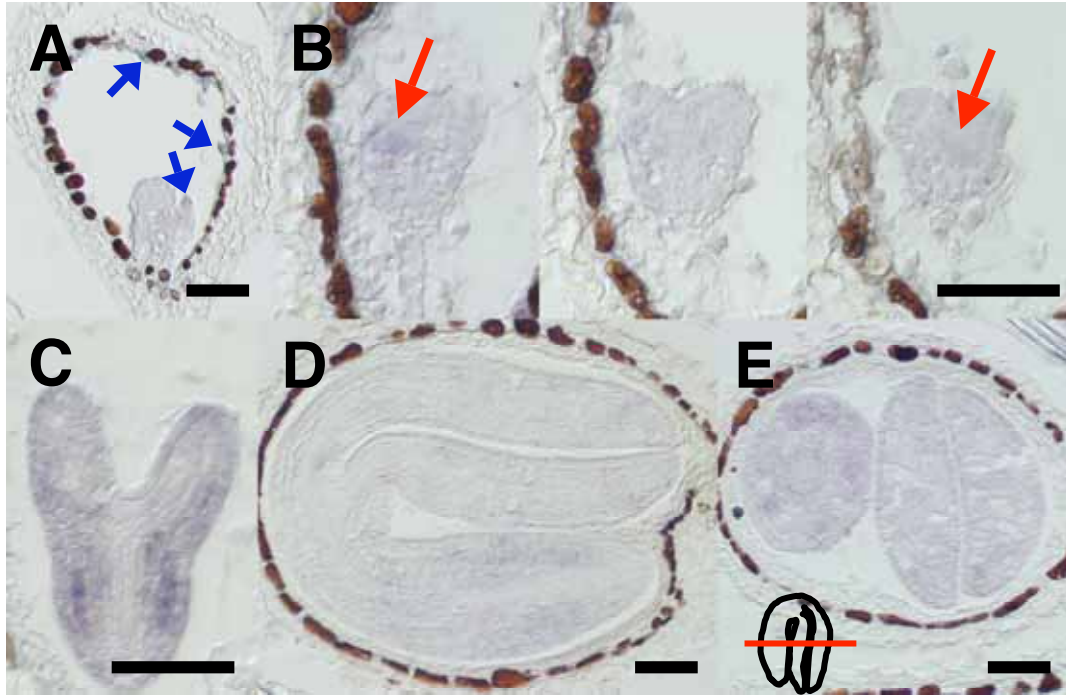


図 1. 9. 胚発生期の*NIT1*の発現パターン

(A-E) 球状型胚期 (A)、心臓型胚期中期 (B)、心臓型胚期後期 (C)、成熟胚期 (D,E) における*NIT1*の発現。Aにおける青い矢印は、胚乳細胞における*NIT1*の発現を示す。(B) 単一の心臓型胚の連続切片。赤い矢印は子葉境界部における*NIT1*の弱い発現を示す。Eにおける胚の模式図の赤い線は切断面を示す。A-Eにおけるスケールバーは、50 μm 。

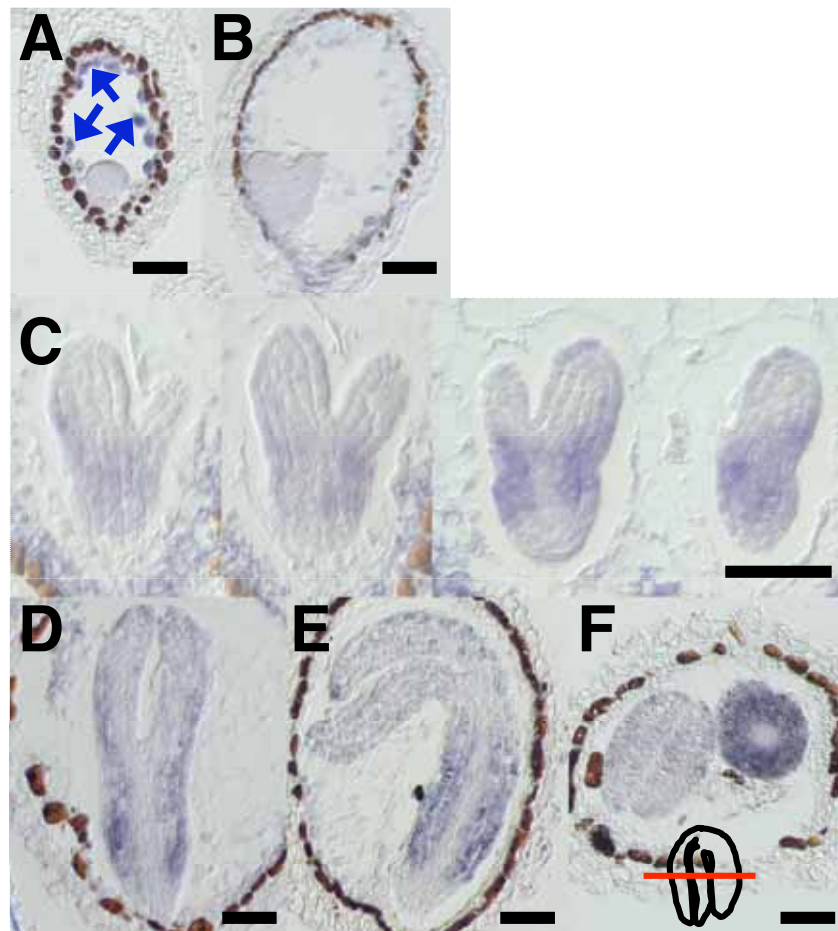


図 1. 10. 胚発生期の*NIT2*の発現パターン

(A-F) 球状型胚期 (A)、心臓型胚期初期 (B)、心臓型胚期後期 (C)、魚雷型胚期 (D)、子葉屈曲期 (E)、成熟胚期 (F) における*NIT2*の発現。Aにおける青い矢印は胚乳における*NIT2*の発現を示す。(C) 単一の心臓型胚の連続切片。(F) 胚の模式図の赤い線は切断面を示す。A-Fにおけるスケールバーは、50 μm 。

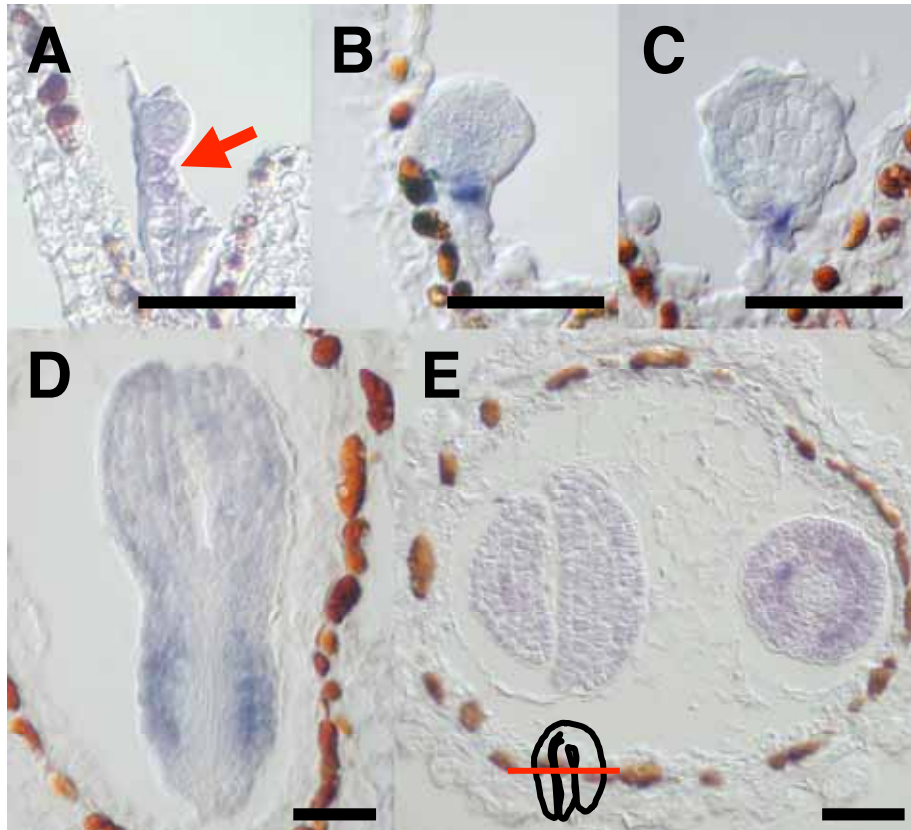


図 1. 11. 胚発生期の*NIT3*の発現パターン

(A-E) 8細胞期 (A)、球状型胚期 (B)、心臓型胚期初期 (C)、魚雷型胚期 (D)、成熟胚期 (E) における*NIT3*の発現。(A) 赤い矢印は原根層における*NIT3*の発現を示す。(E) 胚の模式図の赤い線は切断面を示す。A-Eにおけるスケールバーは、50 μm 。

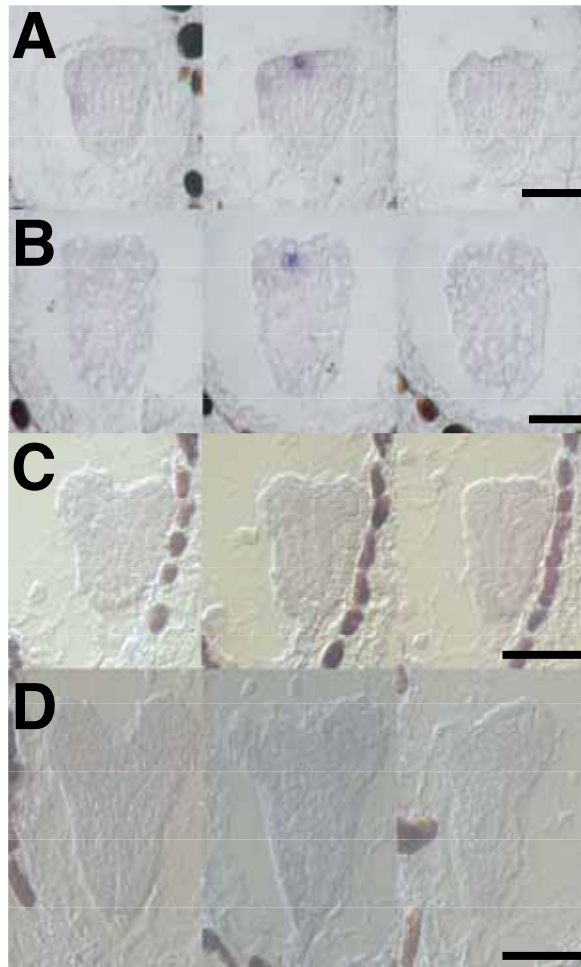


図 1. 12. *pin1*変異体における *YUCCA*および*mp*変異体における *YUCCA3*の発現

(A,B) *pin1-3*変異体における *YUCCA*の発現。(C,D) *mp-rt*変異体における *YUCCA3*の発現。心臓型胚 (A,C) と魚雷型胚 (B,D) の連続切片。A-Dにおけるスケールバーは、50 μ m。

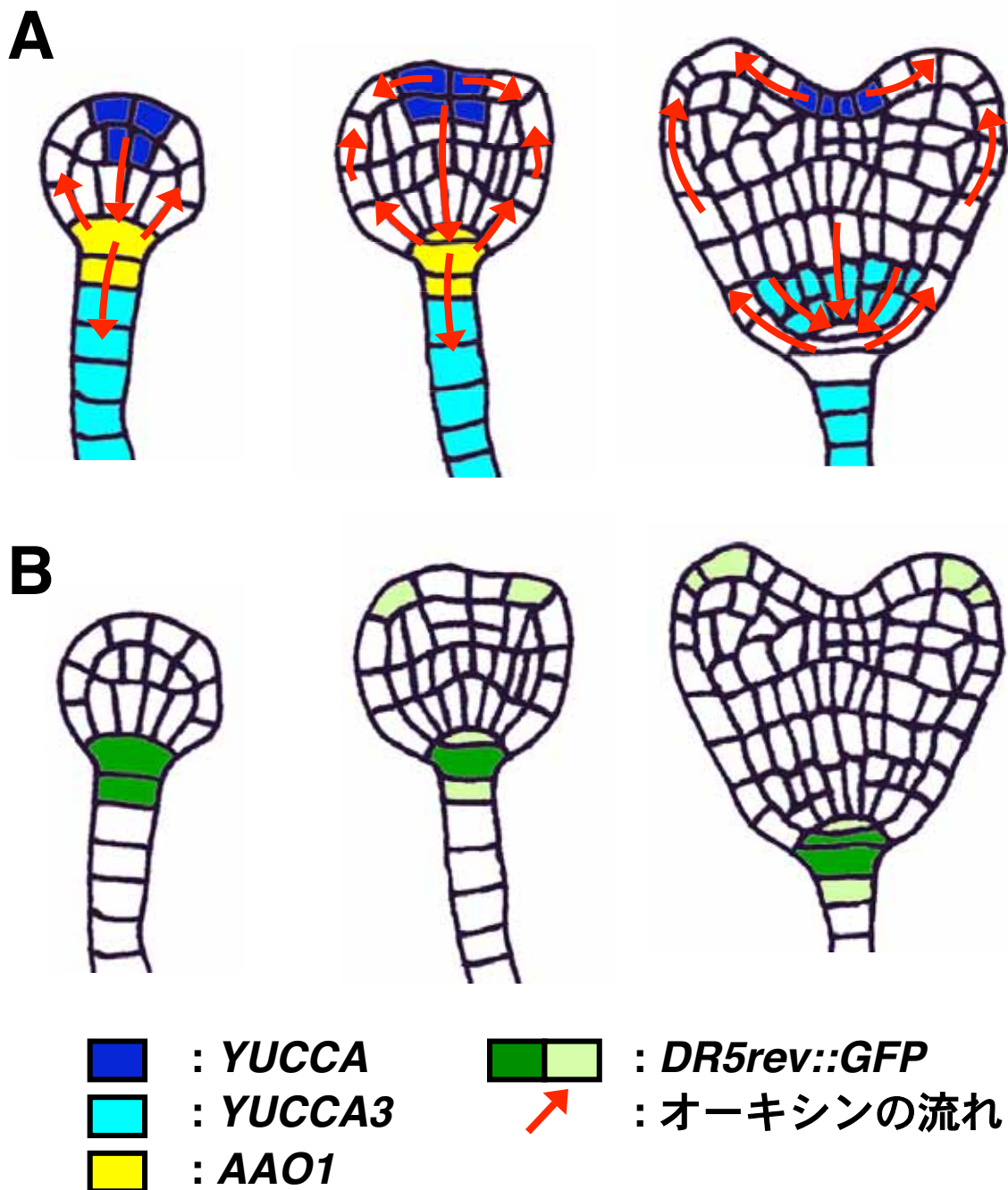


図 1. 13. 胚発生期のオーキシン生合成

(A) シロイヌナズナの胚発生初期における *YUCCA* (青色)、*YUCCA3* (水色)、*AAO1* (黄色) の発現パターンと、PINの細胞内局在から想定されるオーキシンの流れ (赤い矢印) の模式図。(B) 胚発生初期における *DR5rev::GFP* (緑色) の発現パターンの模式図。色の濃淡はシグナルの強さを表す。左から球状型胚、心臓型胚期初期の胚、心臓型胚期中期の胚の模式図。

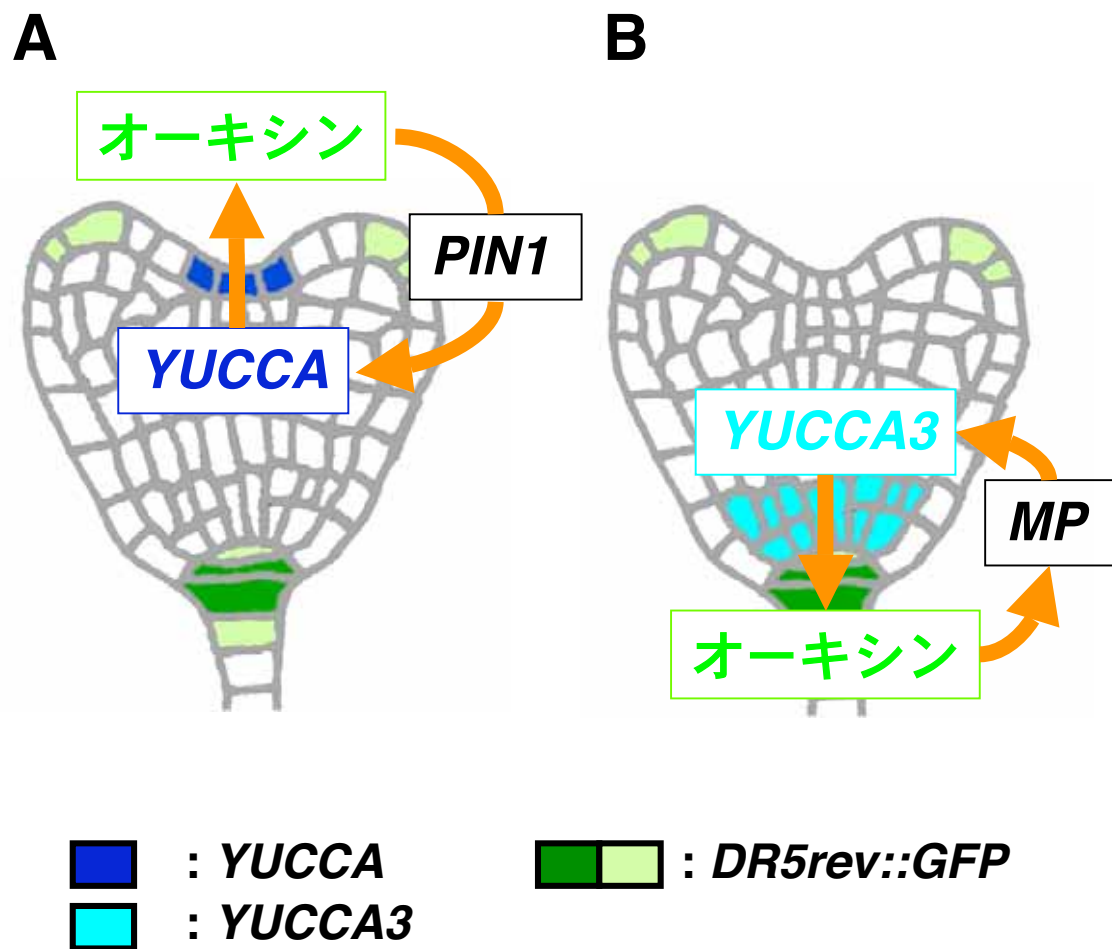


図 1. 14. オーキシシンとその生合成との間のフィードバック制御機構
 (A) *PIN1*を介した*YUCCA*（青色）の制御機構のモデル図。(B) *MP*を介した*YUCCA3*（水色）への制御機構のモデル図。緑色は、*DR5rev::GFP*の発現を示している。色の濃淡は発現の強さを示している。

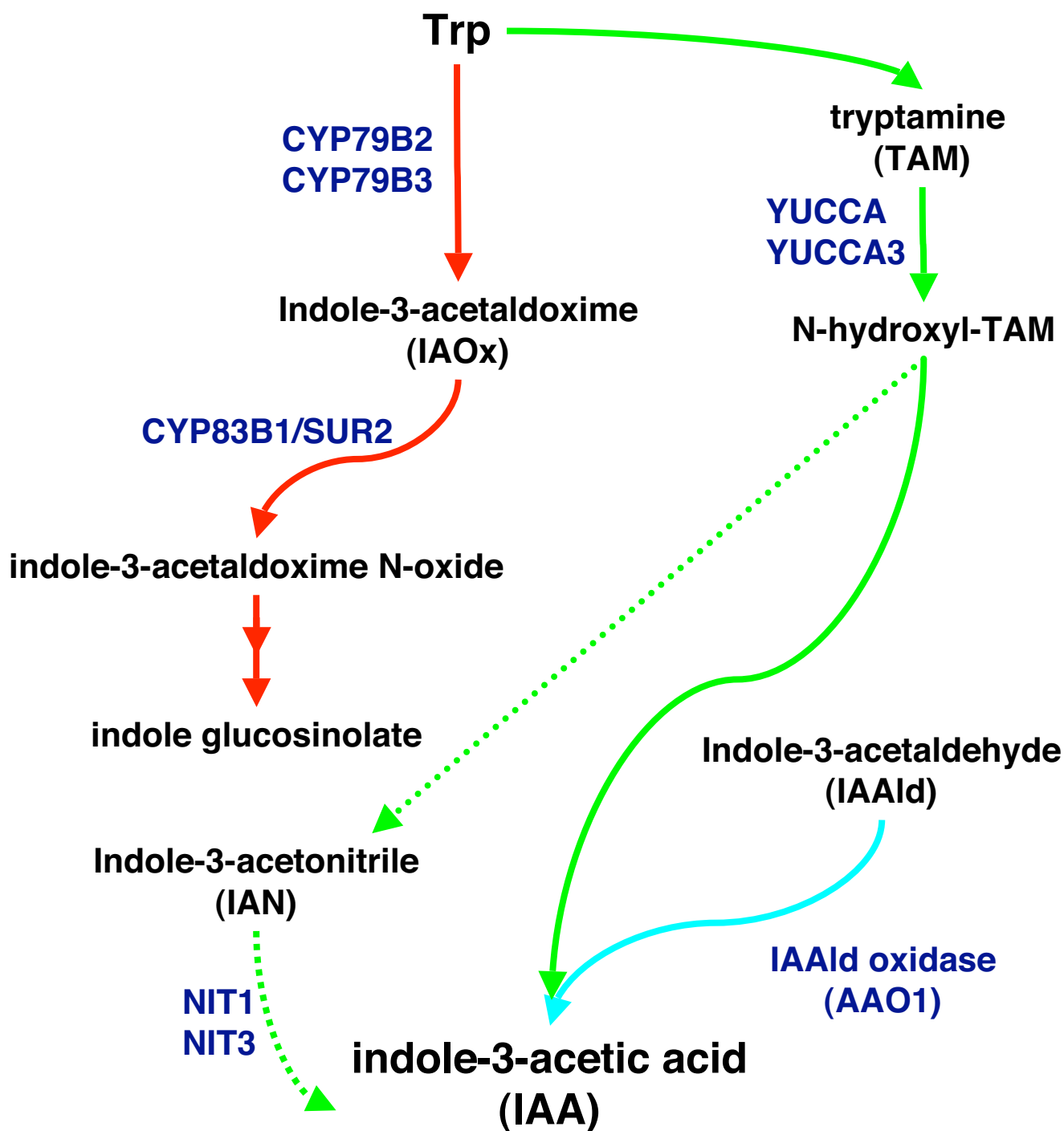


図 1. 15. 胚発生期のTrp依存的IAA生合成経路

CYP79B2、CYP79B3およびCYP83B1を介したindole glucosinolate生合成経路を赤い矢印で示した。YUCCAおよびYUCCA3を介したIAA合成経路を黄緑色で、AAO1を介したIAA合成経路を水色で示した。YUCCAおよびYUCCA3を介したIAA合成経路は、部分的にNIT1およびNIT3を介する（黄緑色の点線矢印）。

第 2 章

PIN-FORMED1 と *PINOID* は 子葉の境界部形成と子葉の発達を制御する

序論

双子葉植物の芽生えの地上部は、真中に茎頂分裂組織を、そしてそれを挟む形で 2 枚の子葉を対称に有し、全体として 2 つの対称面をもつ線対称性を示す。この対称性の形成は、胚発生初期にまで遡ることができる。胚発生初期において、放射状パターンを示す球状の胚から大きさの等しい 2 つの子葉原基が発達してくる (Long and Barton, 1998; Bowman and Eshed, 2000; Jürgens, 2001; Aida et al., 2002; Furutani et al., 2003) (図 0.3)。どのようにして線対称性を持った子葉原基形成が行われるのかは非常に重要な問題であり、これまでさまざまな生理学および遺伝学的解析が行われてきた。これまでの研究により、オーキシンは胚頂端部のパターン形成を含めさまざまなパターン形成に重要な役割を果たすことが示されてきた。第 1 章で示したように、胚発生を通じてオーキシンは時空間レベルで厳密に制御されて生合成され、オーキシンの輸送を制御する PIN の配向も同様に厳密な制御を受けている。その結果として、オーキシンは特異的な不等分布を示す。このオーキシンの不等分布は、胚のパターン形成で重要な役割を担うことが示されてきた。

(Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002; Benková et al., 2003; Friml et al., 2003)。たとえば、胚に外部からオーキシンやオーキシン極性輸送阻害剤を投与すると、子葉の発生位置が異常になったり子葉が融合するなど、胚頂端領域に影響が表れる (Liu et al., 1993; Hadfi et al., 1998; Friml et al., 2003)。これは、オーキシン極性輸送が子葉原基の対称な位置での発生と子葉の境界部の形成に重要であることを示唆している。また、同様のことは遺伝学的な研究によっても支持されている。シロイヌナズナの突然変異体 *pin-formed1* (*pin1*)、*monopteros* (*mp*)、*pinoid* (*pid*) では、子葉のパターンが乱れる (Okada et al., 1991; Berleth and Jürgens, 1993; Bennett et al., 1995)。これらの変異体は、子葉のほかに茎頂分裂組織から形成される器官にも異常を示し、ピン状の花茎を示す。*PIN1* 遺伝子は、オーキシン極性輸送を促進するオーキシン排出キャリアーと考えられるタンパク質をコードしており (Gälweiler et al., 1998)、オーキシン分布を制御することで器官形成に関与することが示唆されている (Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2003)。*MP* 遺伝子は、*in vitro* でオーキシン応答シス配列に結合する転写活性化因子をコードしており、オーキシン誘導性遺伝子の転写活性化を介して器官発生を促進していると考え

えられる (Ulmasov et al., 1997a; Hardke and Berleth, 1998)。また、*PID* 遺伝子は、オーキシンで誘導される Ser/Thr リン酸化酵素をコードしている (Christensen et al., 2000; Benjamins et al., 2001)。*pid* 変異体の花茎は *pin1* 変異体と同様にオーキシン輸送能が低下している (Bennett et al., 1995)。*PID* 遺伝子を過剰発現させた植物体においてさまざまな PIN の細胞内局在が基部側から頂端側に移行することから、*PID* は PIN の細胞内局在を制御することでオーキシン極性輸送に関与していることが示唆される (Friml et al., 2004)。

pin1 および *mp* 変異体の胚において、子葉境界部形成に関わる *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)* と機能的重複性をもつ *CUC2* の発現が調べられた (Aida et al., 2002)。これらの遺伝子は、NAC ファミリーに属する機能の重複した転写因子で、子葉の境界部で子葉の分離を促進しており、両者の二重変異体は子葉の融合を引き起こす (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001)。これら 2 つの遺伝子は、野生型の胚において子葉の境界部でストライプ状に発現するが、*pin1* や *mp* 変異体の胚で *CUC1* の発現は胚頂端領域周辺に広がり、*CUC2* の発現は中心に限定される。また、*pin1* および *mp* の変異が *CUC1* と *CUC2* の発現に与える影響は、それぞれの変異と *cuc1* および *cuc2* 変異との二重変異体における境界部の表現型をうまく説明できるものであった。これらの結果から、*PIN1* および *MP* 遺伝子が *CUC1* および *CUC2* の発現の制御を介して境界部形成を制御していることが示唆される。また、茎頂分裂組織形成と維持に必要な *kn1* タイプのホメオボックス遺伝子、*SHOOT MERISTEMLESS (STM)* (Barton and Porthig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996) が子葉の分離にも部分的に寄与しており (Aida et al., 1999)、その効果は *pin1* 変異存在下で顕著に現れる (Aida et al., 2002)。

オーキシンと胚頂端領域のパターン形成との関係をさらに分子レベルで調べるため、この過程における *PIN1* と *PID* の機能について調べた。その結果、*pin1* と *pid* との二重変異体では子葉を形成できずに、放射パターンしか示さなかった。この二重変異体では、胚発生を通して *CUC1*、*CUC2* および *STM* の発現領域が周辺部に広がっていた。一方、*pin1* および *pid* の単独変異体の胚では、それらの発現の広がりが穏やかで一過的であった。また、三重および四重変異体の解析から、*pin1pid* 二重変異体において異所的に発現した *CUC1*、*CUC2* および *STM* 遺伝子が、子葉原基の発達を抑制していることが示された。これらの結果から、*PIN1* と *PID* が機能的に重複して線対称性の確立と子葉発生に大きく寄与すること、*PIN1* と *PID* が *CUC1*、*CUC2* および *STM* といった子葉形成の負の因子を制御することで子葉形成に関与することが示唆された。

材料と方法

植物材料と育成条件

野生型として、*Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta (Ler)を用いた。以下に示す変異体アレルを用いた。*cuc1-1* (Ler) (Takada et al., 2001)、*cuc2* (Ler) (Aida et al., 1997)、*pin1-3* (Ler) (Bennett et al., 1995)、*pin1-6* [Wassilewskija (WS)] (Vernoux et al., 2000)、*pin1-201* [Columbia (Col)]、*pid-2* (Ler) (Christensen et al., 2000)、*pid-7.1.2.6* (WS)、*pid-3* (Col) (Bennett et al., 1995)、*stm-1* (Ler) (Barton and Poethig, 1993)。*pin1-201* アレルは、第3イントロン内に T-DNA の挿入があり、PIN1 が全く機能していないと考えられる。このアレルは *Arabidopsis* Biological Resource Center (SALK_047613) (Alonso et al., 2003)から入手したアレルで、野生型 Col と4回バッククロスした後表現型解析および *pin1 pid* の二重変異体の作成に使用した。*pid-7.1.2.6* アレルは271番目のコドンをストックドンに変換する点変異 (Q271 stop) を持っている。全タンパク質の3分の1を欠いており、機能を完全に失っていると考えられるアレルである。胚の表現型観察や in situ hybridization には、Fukaki らの方法に従い生育させた植物体の鞘を用いた (Fukaki et al., 1996)。胚発生のステージは、Jürgens と Mayer が定めた基準に従った (Jürgens and Mayer, 1994)。

芽生えの表現型の解析

芽生えの表現型解析のための種子は、表皮を16.7% 次亜塩素酸、0.17% トライトン-X100 で10分間滅菌したのち、ムラシゲースクーク培地プレート上に播いた。発芽を同調させるため、4℃、暗黒下に3日間置いた後、23℃、連続白色光の培養器に移して発芽させた。

二重、三重、四重変異体の作成

pin1-3 pid-2 二重変異体を作成するため、*pin1-3/+*植物体と *pid-2/pid-2* 植物体を交配した。そのF2個体群の中から、変異をチェックできるPCRプライマーを用いて *pin1-3/+ pid-2/pid-2* 植物体を選抜し、自家受粉させた。F3個体群の中に含まれる二重変異体をPCRチェックおよび新しい表現型の有無で選別した。*pin1-6 pid-7.1.2.6* および *pin1-201 pid-3* 二重変異体も同様の表現型を示した。*pin1 pid cuc1*、*pin1 pid cuc2* および *pin1 pid stm* 三重変異体を作成するため、*pin1-3/+ pid-2/pid-2* 植物体と *cuc1-1/cuc1-1*、*cuc2/cuc2*、*stm-1/+* 植物体をそれぞれ交配した。それぞれのF2個体群の中から、*cuc1-1* のホモ接合体、*cuc2* のホモ接合体、*stm-1* のヘテロ接合体をPCRチェックによって選抜した。これらの植物体に対して、さらに、*pin1-3* についてヘテロ接合か

つ *pid-2* についてホモ接合である植物体を、PCR によるチェックおよび花茎がピン状になるという表現型を指標に、目的とする多重変異体の親株を選抜した。次にそれぞれの親株に由来する F3 個体群の中から、三重変異体の表現型を解析したのち、PCR によるチェックを行うことによって遺伝子型を確かめた。*STM* と *PIN1* の遺伝子座は、ともに第一染色体上で非常に近いところに位置する。今回得られた F3 集団において新規の表現型が表れる頻度はおよそ 2.4% (n=127) で、この頻度は *pin1 stm* 二重変異体の場合とほぼ一致する (Aida et al., 2002)。*pin1 pid cuc1 cuc2* 四重変異体を作成するため、*pin1-3/+ pid-2/pid-2 cuc1-1/cuc1-1* の植物体と *pin1-3/+ pid-2/pid-2 cuc2/cuc2* の植物体を交配した。F2 個体群の中から、*pin1-3/+ pid-2/pid-2 cuc1-1/cuc1-1 cuc2/+* の植物体を選抜した。F3 個体群の中から、四重変異体の芽生えの表現型を調べた。

組織観察

芽生えの維管束観察のため、Aida らの方法に従い芽生えを透明化した (Aida et al., 1997)。芽生えをエタノールと酢酸 (9:1) の混合液中において室温で一晩固定した。エタノールシリーズ (90%、85%、70%、50%、30%) で各ステップ 20 分ずつかけて水和させた後、8g 抱水クロラル、1ml グリセロール、2ml 蒸留水の混合液中で透明化した。

走査型電子顕微鏡

胚珠から取り出した胚および芽生えは FAA (3.7% フォルムアルデヒド、5% 酢酸、50% エタノール) 固定液中に室温で一晩固定した後、エタノールシリーズ (50%、70%、85%、99.5%) で各ステップ 20 分ずつかけて脱水した。さらにアセトンシリーズ (25%、50%、75%、100%) で各ステップ 20 分ずつかけてアセトンに置換し、臨界点乾燥を行った。試料台上に試料を固定し、イオンスプラッタコーターを用いて金蒸着を行い、観察した。

In situ hybridization

In situ hybridization は、第 1 章の材料と方法に記した方法に従った。*PID* のアンチセンスプローブ用のテンプレートは、アミノ酸 44-417 に当たる 1122bp の領域を PCR によって増幅したものをを用いた。以下の遺伝子のプローブはこれまでに報告されているものを使った。*ANT* (Long and Barton, 1998)、*CUC1* (Takada et al., 2001)、*CUC2* (Aida et al., 1999)、*FIL* (Sawa et al., 1999)、*STM* (Long et al., 1996)。対照実験として、野生型胚において *FIL*、*PID*、*CUC1* および *CUC2* 遺伝子の発現を調べた。どのプローブを用いた場合でも、野生

型において異常な発現パターンを示す胚の出現頻度は 5% 以下であった (*FIL* の場合 3/88、*PID* の場合 4/104、*CUC1* の場合 6/113、*CUC2* の場合 6/132)。

β -Glucuronidase (GUS) 染色

GUS 活性を検出するため、胚を Takada らによって報告されている GUS 染色溶液 (1.9mM X-Gluc、0.5mM $K_3Fe(CN)_6$ 、0.5mM $K_4Fe(CN)_6$ 、0.3% トライトン X-100) で 37°C、45 分間染色した (Takada et al., 2001)。染色した胚をエタノールシリーズ (30、50、70、90、100%) で各ステップ 15 分ずつかけて脱水した。さらにエタノールシリーズ (90、70、50、30%) で各ステップ 15 分ずつかけて水和した後、観察した。

オーキシシン投与

植物体を第 1 章の材料と方法に記した条件下で育成し、親植物体とした。いくつかの鞘が発達を始めた時点で (およそ 3 週間程) すべての発達途上の鞘を切り落とした後、オーキシシン溶液 (10 μ M の 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D)、0.01% の Silwet L-77) を植物体に霧吹きで大量に吹きかけた (図 2.11B)。対照実験として、オーキシシンを含まない 0.01% の Silwet L-77 溶液を植物体に吹きかけた (図 2.11A)。オーキシシン処理は週に一度、一ヶ月間 (計 4 回) 行った。オーキシシン投与による親植物体への影響は、ほとんど観察されなかった。オーキシシン処理区および対照区の親植物体から種子を回収し、プレート上に播いて表現型解析を行った。*DR5::GUS* の染色は、オーキシシン処理後 7 日経た鞘から取り出した胚について行った。

結果

pin1 および *pid* 単独変異体における異常な子葉発生

シロイヌナズナの野生型の芽生えは、大きさの等しい 2 枚の子葉を線対称の位置に、その中心に一つの茎頂分裂組織をもっている (図 2.1A)。*pin1* 変異体の芽生えは、しばしば子葉の数、位置、分離そして大きさに異常を示し、その程度には個体差があった (図 2.1B) (Aida et al., 2002)。3 つの強い *pin1* 変異体アレル間で、異常な子葉の出現頻度はほぼ等しかった (表 2.1)。*pid* 変異体の芽生えも、*pin1* 変異体とよく似た子葉の表現型を示した (図 2.1C)。しかし、*pin1* 変異が頻繁に子葉の融合を引き起こすのに対し、*pid* 変異は子葉の融合よりも数の増減を引き起こす傾向があった。また、強いアレルである *pid-7.1.2.6* および *pid-3* の芽生えで、低頻度ではあるが子葉を欠いた表現型を示すものがあった。中間的な強さの *pid-2* アレルは、上記の 2 つの強いアレルのものより若干弱い表現型を示した (表 2.1)。*pin1* および *pid* 変異体の芽生えの表現型は、胚発生期にさかのぼることができ、子葉原基が非対称な位置に生じている胚が観察された (図 2.1D-F)。

次に、*pin1* および *pid* 変異体の胚における子葉の発生を詳細に解析するため、胚頂端領域で特異的な発現パターンを示すマーカー遺伝子の発現解析を行った。*AINTEGUMENTA (ANT)* 遺伝子は、野生型の心臓型胚期初期に胚頂端領域の周辺部全域でリング状に発現する (図 2.2A)。*FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* は、心臓型胚期初期に将来子葉原基を形成する領域の背軸側で帯状に発現し、線対称性を示す (図 2.1B)。

これらのマーカー遺伝子の発現を *pin1-3* および *pid-2* 変異体で調べた。*pin1-3* 変異のホモ接合体は完全に不稔であり、また *pid-2* 変異のホモ接合体の稔性も極めて低い。そのため解析には各変異のヘテロ接合体の鞘を用いた。*pin1-3/+* および *pid-2/+* の鞘の中の調べたすべての胚で *ANT* 遺伝子はリング状に発現していた。この発現パターンは野生型におけるものと同じであり、このことから *pin1-3* および *pid-2* 変異は *ANT* 遺伝子の発現に全く影響を与えないことが示された。一方、*pin1-3/+* および *pid-2/+* の鞘に含まれる胚の一部で、*FIL* の発現が乱れていた。*pin1-3/+* の鞘に含まれる 26.5% (49 個中 13 個) で、*FIL* 遺伝子が胚頂端領域を完全に囲むリング状に発現していたり (図 2.1C)、リングの一部が開いたような発現パターンを示した。リング状の *FIL* の発現パターンは、心臓型胚期後期の胚においても同様に観察された (図 2.4B)。一方、*pid-2/+* では鞘に含まれる胚のうち 20.9% (62 個中 13 個) で、*FIL* の発現部位が野生型と同様に 2 箇所認められるものの、これらの強さや大きさが異っており、非対称性を示した (図 2.2D)。これらのことから、*pin1*

および *pid* 変異は放射状パターンを示す *ANT* の発現には影響を与えず、*FIL* の発現パターンの線対称性を乱すことが強く示唆された。特に、*pin1* 変異によって劇的に *FIL* の発現が乱されており、放射状のパターンに近くなっていた。

***pin1 pid* 二重変異体の表現型**

子葉形成における *PIN1* と *PID* 間の遺伝学的関係を調べるため、*pin1 pid* 二重変異体を作成した。二重変異体の表現型は個体間でばらつきがあり、最も強い表現型を示す芽生えでは、完全に子葉を欠失して線対称性を失い放射状パターンを示した（図 2.3A,D; 表 2.2）。少し穏やかな表現型を示す芽生えでは、未発達の子葉と思われる小さな隆起が観察された。その隆起の表皮細胞は、野生型の子葉のものと比べて小さく丸みを帯びていた（図 2.3B,E; 表 2.2）。弱い表現型を示す芽生えは、向軸側の縁に沿って膨らみをもった小さく平たい構造物を持っていた（図 2.3C; 表 2.2）。すべての *pin1 pid* 二重変異体の芽生えは、本葉を形成することのできる茎頂分裂組織をもっていたが、その本葉原基の発生パターンは異常でしばしば本葉が融合した（図 2.3D: 矢じり）。二重変異体の茎頂分裂組織は本葉を作り続け、やがて *pin1* および *pid* 単独変異体と同様ピン状の花茎を形成した。上記の表現型は、異なる *pin1* および *pid* アレルの 3 つの組み合わせで同様に観察された（表 2.2）。観察された *PIN1* と *PID* の遺伝学的関係はアレルに非依存的であったことから、*PIN1* と *PID* は機能重複的に子葉形成を促進し、線対称性の確立に働くが、一方で茎頂分裂組織の形成もしくは維持にはこれらの遺伝子が必須ではないと結論付けることができる。

pin1 pid 二重変異体の胚において子葉形成およびその対称性について調べるために、*ANT* および *FIL* の発現解析を行った。*pin1 pid* 二重変異体は完全に不稔であるため、解析には *pin1-3/+ pid-2/pid-2* の鞘を用いた。心臓型胚期初期において、*ANT* の発現に異常は見られなかった。一方、同時期の胚の 18.9%（37 個中 7 個）において、*FIL* がリング状に発現していた（図 2.4A）。また、心臓型胚期後期においても、*FIL* がリング状に発現していた（図 2.4C）。これらの結果から *pin1 pid* 二重変異体の胚では線対称性は確立されないが、放射状パターンは保持されていることが示された。

***PID* の発現パターン**

これまでの研究により *PID* は主に発達過程の子葉原基で発現することが報告されていたが、胚における詳しい発現解析は行われていなかった（Christensen et al., 2000; Benjamins et al., 2001）。そこで、胚発生期における

PID の機能を評価するため、詳細な発現解析を行った。

球状型胚期では、*PID* の mRNA は対峙する 2 つの領域で発現しており、これらの領域は長軸に沿って胚上部 4 分の 3 を占めていた (図 2.5A,F)。心臓型胚期初期の胚では、*PID* は子葉原基の境界部と原基の基部を含んだ 2 つの領域で発現していた (図 2.5B,C,F)。将来茎頂分裂組織を形成する領域や子葉原基の先端部では *PID* の発現は検出できなかった (図 2.5C,E)。心臓型胚期後期から魚雷型胚期にかけて、*PID* の発現は子葉原基の境界部だけではなく子葉原基の向軸側でも検出された (図 2.5D,F)。子葉境界部におけるシグナルは他の領域のものより強かった。これらの結果から、*PID* が、子葉の境界部で発現していることが初めて明らかとなった。

PIN1 が *PID* の発現に影響を及ぼす可能性を検証するため、*pin1-3/+* 植物体の鞘を用いて、胚における *PID* の発現を調べた。心臓型胚期初期において、2 つの *PID* 発現領域のうち、片方の発現が著しく低下している胚が観察された (57 個中 12 個)。さらに、両方ともに発現が著しく低下する胚も低頻度ではあるが確認された (57 個中 5 個) (図 2.6A)。一方、心臓型胚期後期から魚雷型胚期にかけて、すべての胚で野生型胚と同様に *PID* が子葉原基とその境界部で発現していた (図 2.6B)。これらのことから、胚発生初期の *PID* の発現は部分的に *PIN1* の活性を必要とし、胚発生後期のものは必要としないことが示された。

***pid* 単独変異体および *pin1pid* 二重変異体における *CUC1* と *CUC2* の発現**

CUC1 と *CUC2* は子葉の境界部の成長を阻害することで境界部形成を促進する因子であり、野生型胚では子葉原基の境界部でストライプ状に発現する (図 2.7A,B)。これまでの研究により、*pin1* 変異によって心臓型胚期初期の *CUC1* の発現が胚頂端領域全体に広がること、一方で *CUC2* の発現が胚頂端領域中心に限定されることが示されている (Aida et al., 2002)。今回、まず心臓型胚期後期の *CUC1* と *CUC2* の発現を調べた。その結果、*CUC1* の発現は、心臓型胚期より限定され、子葉原基の一部の領域でスポット状に観察された (図 2.8A)。同時期の *CUC2* の発現は、主に胚頂端領域の中心で検出されたが、しばしば子葉原基の一部でも観察された (図 2.8B)。

次に、*CUC1* と *CUC2* の発現に対する *pid* 単独変異および *pin1 pid* 二重変異の影響を調べた。*pid-2/+* の鞘に含まれるおよそ 10% の心臓型胚期初期の胚において、*CUC1* および *CUC2* のストライプ状の発現がわずかに太くなったり中心からずれたりしていた (*CUC1*: 42 個中 3 個、*CUC2*: 47 個中 5 個; 図 2.7C,D)。心臓型胚期後期に入り子葉が発達するにつれて、*CUC1* の発現が三又に分かれていたり曲がったり *CUC2* の発現が分かれていたり途切れたりす

る胚がごく低頻度で見られた。しかし、それらを除けばほとんど野生型と変わらない発現パターンを示した。これらのことから、*pid* 変異は *CUC1* および *CUC2* の発現にあまり影響しないことが示された。

pin1 pid 二重変異体の胚における *CUC1* および *CUC2* の発現を調べるため、*pin1-3/+ pid-2/pid-2* の鞘に含まれる胚について解析を行った。心臓型胚期初期では、*CUC1* の発現が胚頂端領域ほぼ全域に広がっている胚が 23.6% (55 個中 13 個) 観察された (図 2.7E)。この発現パターンは、*pin1* 単独変異体の胚で見られたものと基本的に同じであった。しかし、心臓型胚期後期になると、*pin1* 単独変異体の胚の場合とは異なり、*CUC1* の発現は胚頂端領域全体に広がったままであった (図 2.8C)。一方、*CUC2* の発現は 19.0% の心臓型胚 (42 個中 8 個) で中心部のみあるいは中心部と周辺部の一部で観察された (図 2.7F)。この発現パターンは心臓型胚期後期になっても維持された (図 2.8D)。

以上をまとめると、心臓型胚初期では *pin1* 単独変異体および *pin1 pid* 二重変異体共に *CUC1* の発現が胚頂端領域の周辺部に広がる。心臓型胚期後期になると *pin1* 単独変異体では *CUC1* の発現領域がスポット状の領域に限定されてくるが、*pin1 pid* 二重変異体では広がったままである。このことは、心臓型胚期後期の *pin1* 単独変異体における *CUC1* の発現領域の縮小は *PID* によるものであることを示している。一方、*pin1* 単独変異体では *CUC2* の発現が心臓型胚期初期および後期とも減少するが、*pin1 pid* 二重変異体では逆に *CUC2* がわずかに広がる傾向が見られた。

***pin1 pid cuc1*、*pin1 pid cuc2* および *pin1 pid cuc1 cuc2* 変異体の表現型**

つぎに *pin1 pid cuc1* および *pin1 pid cuc2* 三重変異体を作成した。これにより、*pin1 pid* 二重変異体から *CUC1* または *CUC2* の活性が取り除かれ、*pin1 pid* 二重変異体における *CUC1* と *CUC2* の発現領域の拡大が表現型に及ぼす影響を調べることができると考えられる。

pin1 pid cuc1 三重変異体は *pin1 pid* 二重変異体に比べて子葉の発達が著しく回復しており、カップ状の融合した子葉を形成した (図 2.9B)。子葉の融合度合いには個体差があり、子葉基部で部分的に融合する個体から完全に融合する個体までであった。一方、*pin1 pid cuc2* 三重変異体の多くは *pin1 pid* 二重変異体と区別がつかなかったが、一部の個体では子葉の大きさがある程度回復し、部分的に融合していた。(図 2.9C)。これらの結果から、*pin1 pid* 二重変異体における異所的な *CUC1* の広がりが子葉の形成を阻害しており、*CUC2* の活性は二重変異体における子葉の形成阻害に部分的に寄与していることが示された。なお、それぞれの組み合わせの三重変異体で子葉が融合し

ていたのは、*cuc1* もしくは *cuc2* 変異によって子葉を分離する活性が部分的に低下したためだと考えられる。

さらに *pin1 pid cuc1 cuc2* 四重変異体を作成して *pin1 pid* 二重変異体から *CUC1* と *CUC2* の機能を両方とも除いたところ、すべての芽生えで子葉の成長がほぼ完全に回復した (図 2.9D)。また、四重変異体の子葉は *pin1 pid cuc1* 三重変異体に比べてさらに強い融合を示した。この結果も、*pin1 pid* 二重変異体における子葉の発達抑制という表現型が *CUC1* と *CUC2* の異所的な活性によるものであることを強く示唆している。

次に、四重変異体における対称性について調べるため、芽生えにおける対称性の良いマーカーとなる子葉の維管束パターンを観察した。野生型および *cuc1 cuc2* 二重変異体における維管束の配向は、線対称性を示した (Aida et al., 1997) (図 2.9A,E,G)。一方、*pin1 pid cuc1 cuc2* 四重変異体の維管束の配向は放射状パターンを示し (図 2.9F,H)、すでに報告されている *pin1 cuc1 cuc2* 三重変異体の維管束パターンと同様であった (Aida et al., 2002)。これらの結果は *pin1 pid* 二重変異体の芽生えが線対称性を欠失していた結果と合致し、*cuc1* および *cuc2* 変異によって対称性の欠損は回復されないことを示している。

最後に、*cuc1* および *cuc2* 変異が *pid* 単独変異に与える影響について調べた。*pid cuc1* 二重変異体の芽生えでは、*pid* 単独変異体のものと比べ子葉の融合度合いがわずかに増したが、子葉融合の起こる頻度は変わらなかった。一方、*pid cuc2* 二重変異体の芽生えは、*pid* 単独変異体と区別がつかず、同じ表現型を示した。これらのことから、*cuc1* および *cuc2* 変異は *pid* 単独変異体の表現型に対して顕著な影響を与えないことが示された。

***pin1 pid* 二重変異体における *STM* の発現とその活性**

次に、*CUC1* と *CUC2* の下流で茎頂分裂組織の形成と子葉分離に関与する *STM* 遺伝子 (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001) に対する *pin1 pid* 二重変異の影響について調べた。野生型の初期心臓型胚において *STM* は子葉の境界部でストライプ状に発現するが (図 2.10A)、*pin1 pid* 二重変異体の胚では胚頂端領域全体に広がって発現していた (図 2.10B)。

pin1 pid 二重変異体から *STM* の活性を除くため、*pin1 pid stm* 三重変異体を作成した。*pin1 pid* 二重変異にさらに *stm-1* という強いアレル (図 2.10C) を加えると、*pin1 pid* 二重変異体の比較的穏やかな表現型でみられるよりも大きな子葉が形成され、部分的ではあるが子葉の発達が回復した (図 2.10D)。しかし、*stm* 変異による子葉発達の回復度合いは、*cuc1* の場合よりも弱かった。これらの結果から、異所的な *STM* の活性が *pin1 pid* 二重変異体における

子葉原基の発達抑制に部分的に寄与していることが示された。

野生型および *CUC* 変異体の胚に対するオーキシン処理の影響

もし、*CUC1* および *CUC2* に対する *pin1* および *pid* 変異の影響がオーキシン分布の変化によるものならば、外からオーキシンを投与することで *CUC1* および *CUC2* の発現に影響が現れ、正常な子葉形成に乱れが生じると期待できる。実際これまでの研究で、オーキシンの投与により、子葉の融合を含めたさまざまな子葉形成異常が引き起こされることが示されている (Liu et al., 1993; Hadfi et al., 1998; Friml et al., 2003)。この仮説をさらに強固なものにするため、*cuc1* および *cuc2* 単独変異体の胚に対してオーキシンを投与しその影響を調べた (材料と方法; 図 2.11A,B)。

まず、野生型の胚を人工オーキシン 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) で処理したところ、処理した胚に由来する芽生えのうち 3.0%が弱い子葉融合を示し、6.4%が完全なカップ型の子葉融合を示した (図 2.12A; 表 2.3)。完全な融合を示した芽生えの維管束はかなり不規則であり、線対称性が失われていた (図 2.12B)。また、2,4-D 処理区の胚において、オーキシン応答レポーター遺伝子 *DR5::GUS* の活性が非処理区の胚に比べて広い領域で検出された (図 2.12C,D)。これらの結果から、胚にオーキシンを投与することで、胚頂端領域のオーキシン分布が変化するとともに子葉の融合が起こることが示された。また、このことからオーキシン処理区の胚で *CUC* 遺伝子の活性が下がっていることが予想される。

次に、*cuc1* および *cuc2* 単独変異体の胚に対して 2,4-D 処理を行った。興味深いことに、*cuc1* 単独変異体にオーキシンを処理すると野生型の場合に比べて強いカップ型の子葉融合を示す頻度が有意に高くなった (表 2.3)。しかし、*cuc2* 単独変異体に対するオーキシンの影響は野生型のものとほぼ同じであった (表 2.3)。カップ型の表現型は通常 *cuc1 cuc2* 二重変異体のみで起こることおよび *cuc1* と *cuc2* 変異はともにオーキシンの感受性そのものには影響しないこと (Daimon et al., 2003) を考慮し、オーキシン投与により主に *CUC2* の活性が減少すると考えると、上記の結果をうまく説明できる。

考察

PIN1 および *PID* 遺伝子の胚頂端領域における役割を調べた。各遺伝子の単独変異体の芽生えは子葉の発達と線対称性の形成に関して比較的穏やかな異常しかみられなかったが、二重変異体は非常に強い表現型を示し、子葉を完全に欠損し、かつ放射対称を示す芽生えが数多く観察された。また、二重変異体の表現型がアレルの組み合わせに依存しないことから、*PIN1* と *PID* 遺伝子間の機能的重複性が強く示唆された。今回得られた結果から、胚発生期の線対称性の確立および子葉発達過程に *PIN1* と *PID* 遺伝子が極めて重要な機能をもつことが示唆される。

胚頂端領域のパターン形成における *PIN1* および *PID* の役割

胚の頂端領域は、その後の発生運命から3つの領域に分けることができる (Aida et al., 1999) (図 2.13A)。野生型胚において、*CUC1* と *CUC2* は将来茎頂分裂組織を形成する領域 (PS) と子葉の境界領域 (BCM) で発現し、*FIL* は子葉原基 (CP) の背軸側で発現する。これら3つの遺伝子の発現は、線対称性を示す。一方、*ANT* 遺伝子は CP と BCM 全領域で発現し放射パターンを示す。*pin1* と *pid* の単独変異体および *pin1 pid* 二重変異体のいずれもが茎頂分裂組織を形成できたことから、*PIN1* および *PID* は PS 領域の確立に必須ではないことが示唆される。このことは、*pin1* および *pid* 変異体の PS 領域で上記のマーカー遺伝子の発現に異常がみられないことと一致する。

一連の線対称性マーカー遺伝子の発現パターンから、*PIN1* と *PID* が CP および BCM 領域からなる周辺部のパターン形成を制御していることが示された。まず、心臓型胚期初期の *pin1* 変異体の胚において、*CUC1* と *FIL* が周辺部でリング状に発現し、CP と BCM 領域が胚頂端領域の周辺部で重なっていた (図 2.13B)。一方、*pid* 変異体の胚の周辺部において、*CUC1*、*CUC2* および *FIL* の発現の乱れは比較的穏やかであり、CP と BCM 領域が重なることはほとんどなかった。このことから、心臓型胚期初期における CP と BCM の線対称性をもった配置にはおもに *PIN1* が必要で、*PID* はあまり機能していないことが示唆される。胚発生が進むにつれて、*pin1* 単独変異体の胚において周辺部に広がっていた *CUC1* の発現がスポット状に限定されることから、周辺部における BCM 領域が狭くなっていることが示唆される (図 2.13C)。一方、同時期の *pin1 pid* 二重変異体では *CUC1* の発現が周辺部全体に残っていた (図 2.13D)。これらのことから、心臓型胚期後期の *pin1* 変異体における BCM 領域の縮小は *PID* に依存していることが示唆される。このことは、*PIN1* 活性の欠失による損失を心臓型胚期後期の *PID* の活性が部分的に補償

しうることを示している。

***PIN1* および *PID* は *CUC1*、*CUC2*、*STM* の活性を抑制することで子葉の発達を促進している**

pin1 pid 二重変異体の胚頂端領域で *CUC1* および *CUC2* の発現が子葉領域まで広がっていることから、これらの遺伝子の異所的な活性によって子葉原基の発達が抑制されていることが示唆される。このことは、*pin1 pid* 二重変異体から *CUC1* と *CUC2* の活性を排除すると、子葉の発達が回復して完全に融合したカップ型の子葉が形成されたことから裏付けられる。つまり、*PIN1* と *PID* は子葉原基上で *CUC1* と *CUC2* の発現および活性を抑制することで、子葉原基の発達を促していることが示唆される。*pin1* 単独変異体の心臓型胚期初期において *pin1 pid* 二重変異体と同様に *CUC1* の発現が周辺部へ広がっているにもかかわらず、二重変異体でみられるような著しい子葉発達不全はみられなかった。この理由として、*pin1* 単独変異体における *CUC1* の発現の拡大が一過的で、心臓型胚期後期には周辺部から排除されるためと考えられる。

pin1 pid 二重変異体の胚は著しい子葉発達不全を引き起こすにもかかわらず、*ANT* や *FIL* といった器官発達に関わる遺伝子 (Long and Barton, 1998; Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999) が発現していた。この結果は、二重変異体において子葉発生プログラムの少なくとも一部は開始していることを示唆している。このことは、*pin1 pid cuc* 三重変異体および四重変異体において子葉の発達が回復することと矛盾しない。つまり、*PIN1* と *PID* の活性をとくに欠失していても、子葉形成の負の因子である *CUC* の活性を取り除けば子葉の形成が進行すると考えられる。

pin1 変異体の花序においても (Vernoux et al., 2000)、*LFY* や *ANT* といった原基特異的な遺伝子の発現が確認され、それらの発現部位が境界部特異的な遺伝子 *CUC2* の発現部位と重なっていた。このことから、胚と同様 *pin1* 変異体の花茎においても、境界部特異的な因子の異所的活性によって原基の発達が抑制されていること、原基の発達能力そのものは保持されていることを示唆している。これらのことから、*PIN1* と *PID* は胚そして花茎において原基形成の正の制御因子を促進するのではなく、*CUC1*、*CUC2* や *STM* といった負の制御因子を抑制することで結果として原基形成を促していると考えられる。

オーキシンと胚頂端領域のパターン形成

近年、器官原基が生じる際に、原基の先端部にオーキシン濃度のピークが

形成されることが明らかにされた (Benková et al., 2003; Friml et al., 2003)。胚においては、オーキシンのピークが子葉と幼根の原基先端に形成される。これらのピークの形成には *PIN1* および *PIN* ファミリーに属する他のメンバーが部分的に機能重複して関与していることが示唆されている (Benková et al., 2003)。オーキシン勾配が最大になる部位と *CUC1* および *CUC2* の発現部位から、オーキシンが *CUC* の発現を負に制御していることが示唆される (図 2.14D)。このことは、オーキシン投与によって子葉融合が引き起こされるという今回の実験結果と一致する。*cuc2* 変異体よりも *cuc1* 変異体の方がオーキシン投与による子葉融合の頻度が高かったことおよび、*cuc1* と *cuc2* 変異はオーキシンの感受性そのものに影響しないこと (Daimon et al., 2003) から、*CUC1* よりも *CUC2* の方がオーキシンによる抑制を受けやすいと考えられる。

今回の結果から、胚頂端領域周辺部のパターン形成において *PID* は *PIN1* と部分的に重複した機能をもつことが示された。*PID* の転写物はおもに子葉原基の境界部に、そしてわずかに子葉原基の基部に存在していた (図 2.14B-D)。また、心臓型胚期初期の *PID* の発現が *PIN1* に依存していることも明らかになった。*PID* がオーキシンによって誘導される遺伝子であることを考慮すると、*PID* の発現開始には *PIN1* によって形成されたオーキシン分布が関与していると予想できる。

これまでの研究により *PID* がオーキシンの極性輸送を促進することが示唆されている (Benjamin et al., 2001; Friml et al., 2004)。*PID* 遺伝子を異所的に発現させることで、*PIN* ファミリーに属するさまざまなメンバーの細胞内局在を基部側から頂端側に移行させることができる (Friml et al., 2004)。また、野生型花茎の器官原基の背軸側で *PIN1* は細胞の頂端側に局在するが、*pid* 変異体の花茎においてはこれが逆転し、基部側に局在する (Friml et al., 2004)。これらのことから、*PID* は *PIN* の細胞内局在を制御することが示唆される。また、*pin1 pin3 pin4 pin7* 四重変異体の胚がしばしば子葉を欠失するなど、*PIN1* は他の *PIN* と機能的に重複している (Friml et al., 2003)。このことから、*PID* は *PIN1* 以外の *PIN* タンパク質の局在も調節しており *pin1 pid* 二重変異体では *PIN1* に加えて複数の *PIN* タンパク質の局在が乱れたために強い表現型が表れたのかもしれない。また、*PID* の発現が子葉原基境界部で *CUC* やいくつかのオーキシン合成酵素遺伝子の発現部位 (第 1 章参照) と重なっていることから、以下のような仮説を立てることもできる。球状型胚期後期に *PIN1* が極性をもった局在および発現パターン (Steinmann et al., 1999; Vernoux et al., 2000) を示すようになり、胚頂端領域にオーキシンの不等分布が形成される (図 2.14A)。この時期の *PIN1* の極性は *PID* 非依存的に決定される。次に、オーキシンの不等分布に依存して *PID* が子葉原基基部に誘導

される（図 2.14B）。誘導された *PID* は *PIN1* および *PIN* と重複した機能をもつ他の *PIN* の局在を制御して、オーキシンの子葉原基へと輸送をさらに促進する（図 2.14C）。これによって子葉原基でオーキシンの蓄積が進む。一方、子葉境界部ではオーキシンが減少する。この増強されたオーキシンの不等分布により *CUC1* および *CUC2* の発現が子葉原基境界部に限定され、この領域のみで子葉の成長が抑制される（図 2.14D）。

今後さらに、胚頂端領域のパターン形成におけるオーキシンの役割を理解するには、1）線対称性の起源ともいえる球状型胚期後期における *PIN1* の発現および細胞内局在の変化を制御する分子機構、2）オーキシン輸送の調節機構に対する *PID* の機能、3）オーキシンによる *CUC* の発現の制御機構、4）*CUC* による原基形成の負の制御機構、の解明が必要となる。

表 2.1. 子葉の表現型とその頻度

遺伝型 (エコタイプ)	子葉の数とその頻度 (%)				観察した芽生 えの総計
	0 [*]	1 [†]	2 [†]	3 [*]	
<i>pin1-3</i> (Ler)	0	28.1	55.2	16.7	96
<i>pin1-6</i> (WS)	0	33.9	54.8	11.3	62
<i>pin1-101</i> (Col)	0	35.7	50.3	14.0	171
<i>pid-2</i> (Ler)	0	4.1	73.1	22.8	342
<i>pid-7.1.2.6</i> (WS)	11.4	18.8	59.4	10.4	96
<i>pid-3</i> (Col)	2.5	10.0	53.3	34.2	120

^{*}子葉が完全に欠失する。
[†]一枚葉もしくは融合した子葉を形成する。
[†]野生型の芽生えは、二枚の子葉を持つ。
^{*}余分な子葉を形成し、三枚の子葉を持つ。

表 2. 2. *pin1 pid* 二重変異体の子葉の表現型とその頻度

遺伝型 (エコタイプ)	子葉の表現型とその頻度 (%)			観察した芽生 えの総計
	強い*	中程度§	弱い¶	
<i>pin1-3 pid-2</i> (Ler)	47.3	43.6	9.1	110
<i>pin1-6 pid-7.1.2.6</i> (WS)	58.3	27.8	13.9	36
<i>pin1-101 pid-3</i> (Col)	58.8	20.6	20.6	34

*完全に子葉を欠失する (図 2.3 参照)。

§未発達の子葉を形成する (図 2.3 参照)。

¶向軸側の縁に沿って膨らみをもった平たい構造物を形成する (図 2.3 参照)。

表 2.3. 胚発生に対するオーキシン投与の影響

遺伝型	子葉の表現型とその頻度 (%)			観察した芽生 えの総計
	カップ型 [‡]	部分的な融合 [¶]	正常	
<i>Ler</i>	-	-	-	-
<i>cuc1</i> [†]	0	0.5	99.5	-
<i>cuc2</i> [†]	0	0.5	99.5	-
<i>Ler</i> + 2,4-D	6.4	3.0	90.6	202
<i>cuc1</i> + 2,4-D	28.3	4.2	67.5	166
<i>cuc2</i> + 2,4-D	3.0	7.4	89.6	230

[‡]完全に子葉が融合し、カップ型の子葉を形成する。
[¶]子葉の基部で部分的に誘導する。
[†]Aida et al., 1997.に基づく。

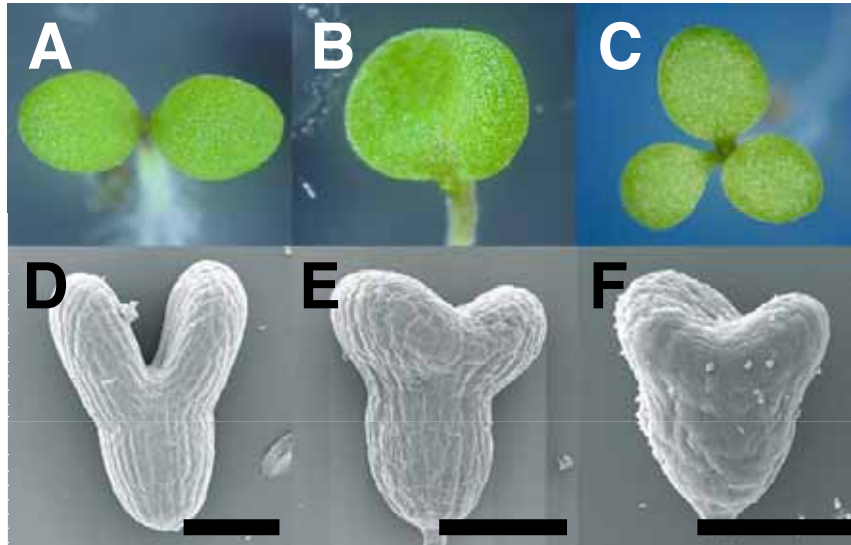


図 2. 1. 野生型、*pin1*および*pid*変異体の子葉の発達

野生型 (A)、*pin1-3* (B) および*pid-2* (C) 変異体の 5 日目の芽生え。(D-F) 野生型 (D)、*pin1-3* (E) および*pid-2* (F) 変異体の胚の走査型電子顕微鏡による像。D-Fにおけるスケールバーは、50 μ m。

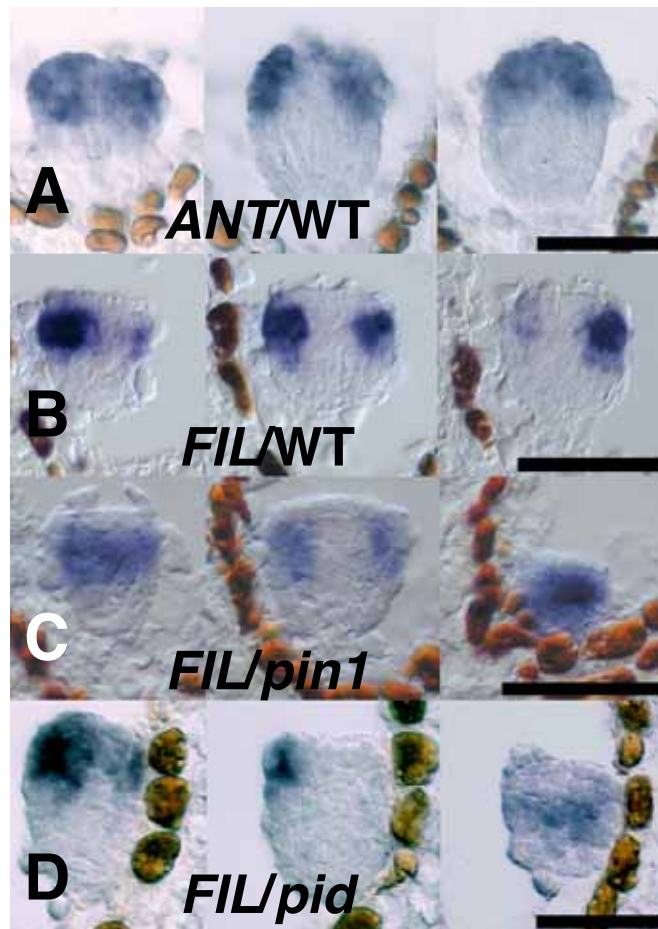


図 2. 2. 子葉マーカー遺伝子の発現パターン

野生型の胚における *ANT* (A) の発現。野生型胚 (B) 、 *pin1-3* (C) *pid-2* (D) 変異体の胚における *FIL* の発現。A-Dは、心臓型胚期初期胚の連続縦断切片。A-Dにおけるスケールバーは、50 μ m。

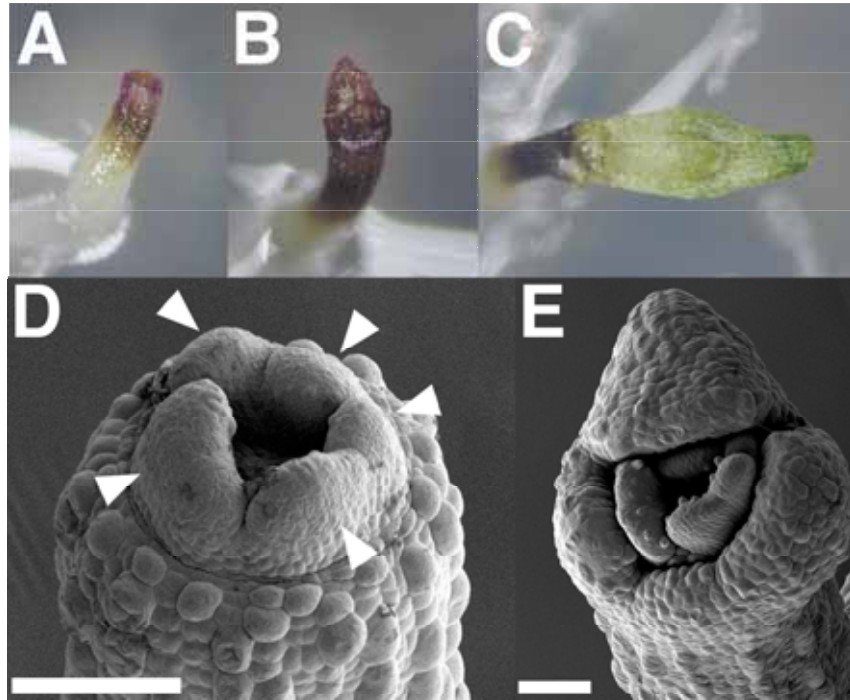


図 2. 3. *pin1 pid*二重変異体の表現型

(A-E) *pin1-3 pid-2*二重変異体の播種後5日目の芽生え。*pin1-3 pid-2*二重変異体は強い表現型 (A,D)、中程度の表現型 (B,E)、弱い表現型 (C) を示す。(D,E) 走査型電子顕微鏡による像。Dにおける矢じりは葉序パターンが異常で融合した本葉を示す。D,Eにおけるスケールバーは、100 μ m。

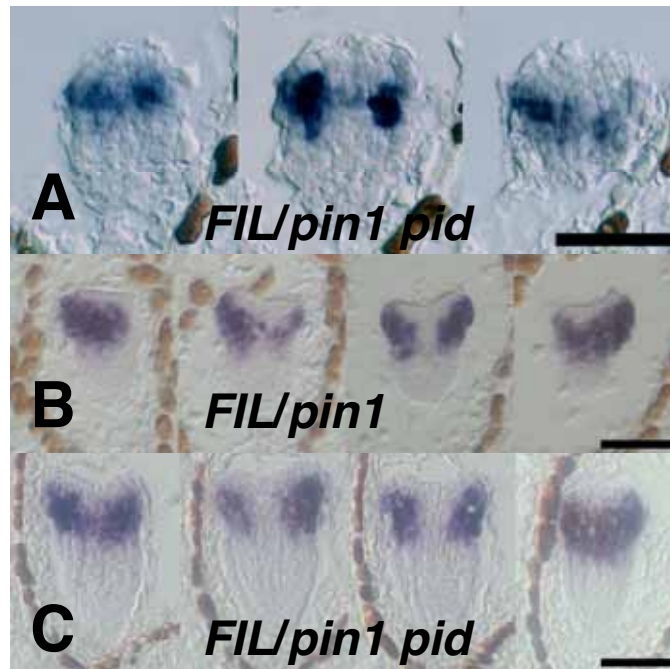


図 2. 4. *pin1*および*pin1 pid*二重変異体における*FIL*の発現
*pin1-3 pid-2*二重変異体 (A,C) および*pin1-3*単独変異体 (B) の胚における *FIL*の発現。心臓型胚期初期胚 (A) と心臓型胚期後期 (B,C) の連続縦断切片。A-Cにおけるスケールバーは、50 μ m。

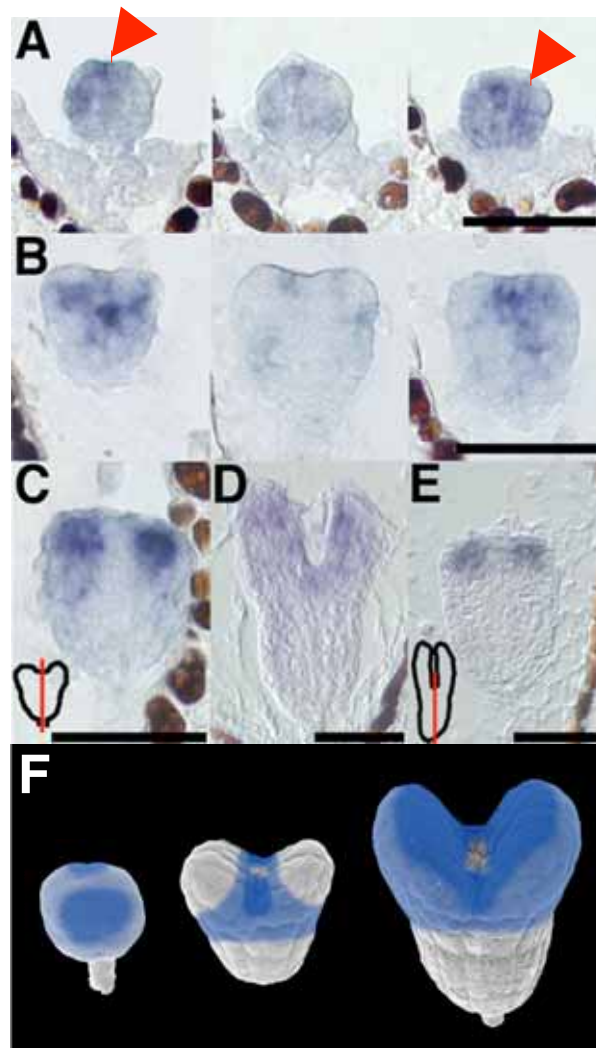


図 2. 5. 野生型胚におけるPIDの発現パターン

球状型胚期 (A)、心臓型胚期 (B,C)、魚雷型胚期 (D,E) の野生型胚におけるPIDの発現。(A,B) 野生型胚の連続縦断切片。野生型胚の矢状断面 (C,E) と前額断面 (D)。(F) 球状型胚期 (左)、心臓型胚期 (中央)、魚雷型胚期 (右) におけるPIDの発現パターンの模式図。Aにおける矢じりは、PIDの強い発現部位を示す。(C,E) 胚の模式図で、赤い線は切断面を示す。A-Eにおけるスケールバーは、50 μ m。

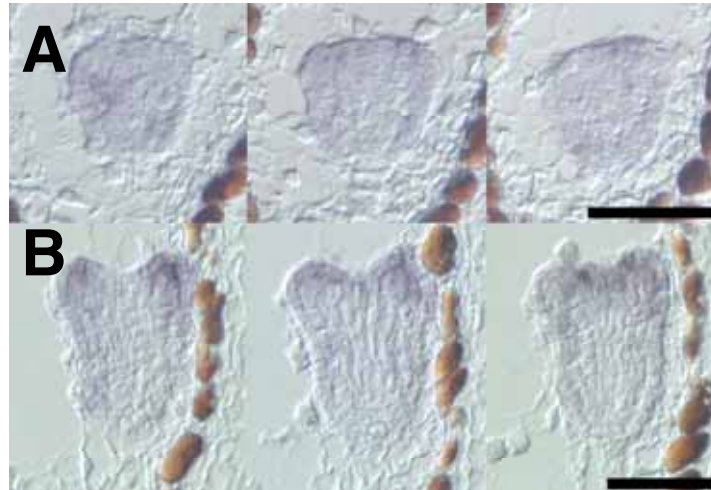


図 2. 6. *pin1*変異体の胚におけるPIDの発現パターン

心臓型胚期初期（A）および魚雷型胚期（B）の*pin1-3*変異体の胚におけるPIDの発現。（A,B）野生型胚の連続縦断切片。A,Bにおけるスケールバーは、50 μ m。

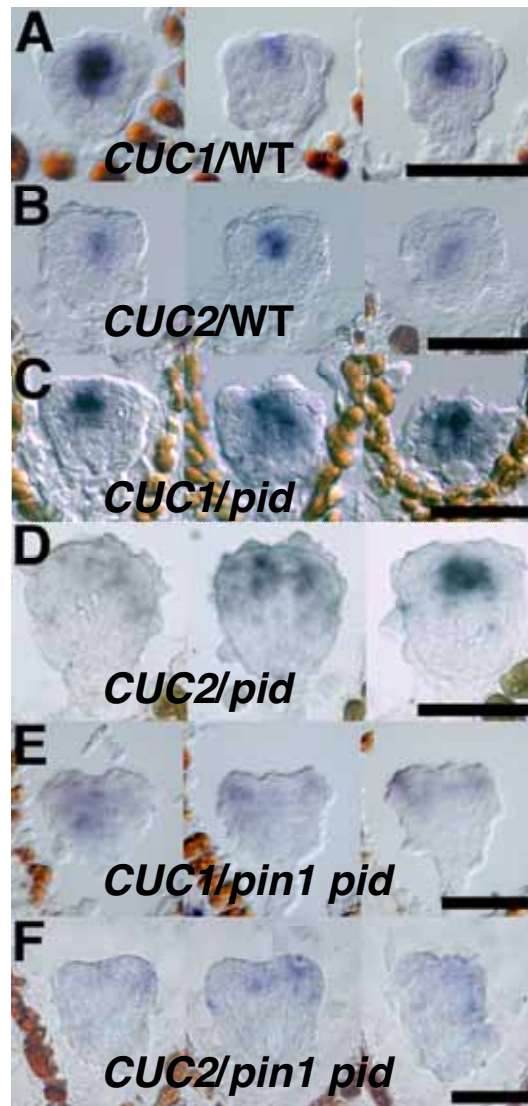


図 2. 7. *pid*および*pin1 pid*二重変異体の心臓型胚における
*CUC1*と*CUC2*の発現パターン

野生型 (A,B)、*pid-2*単独変異体 (C,D)、*pin1-3 pid-2*二重変異体 (E,F) の胚における*CUC1* (A,C,E) と*CUC2* (B,D,F) の発現。(A-F) 野生型胚の連続縦断切片。A-Fにおけるスケールバーは、50 μ m。

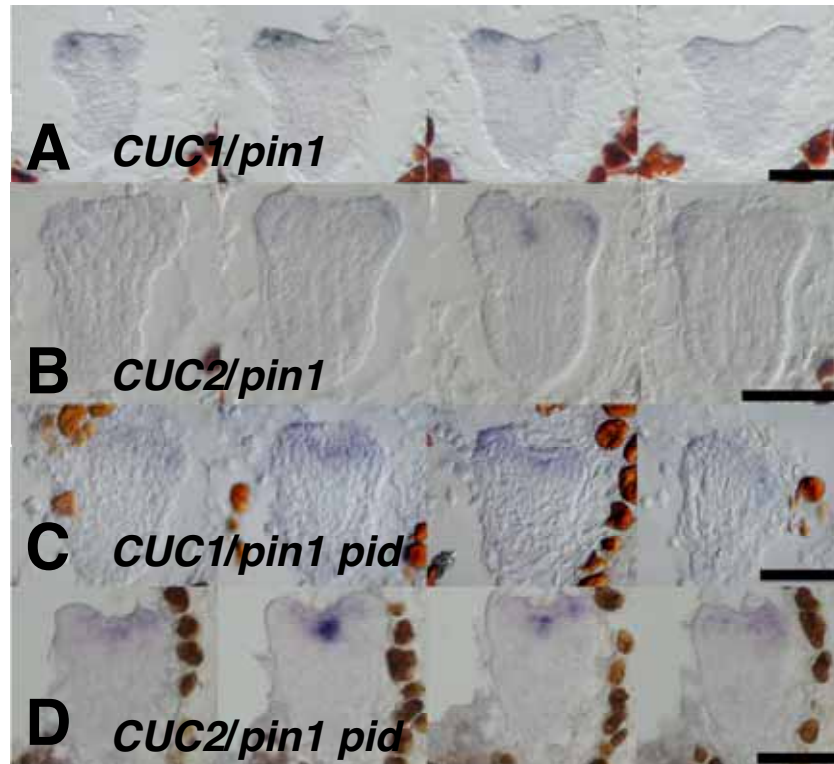


図 2. 8. *pin1*および*pin1 pid*二重変異体の心臓型胚期後期における*CUC1*と*CUC2*の発現パターン

*pin1-3*単独変異体 (A,B) 、 *pin1-3 pid-2*二重変異体 (C,D) の心臓型胚期後期の胚における*CUC1* (A,C) と*CUC2* (B,D) の発現。(A-D) 胚の連続縦断切片。A-Dにおけるスケールバーは、50 μ m。

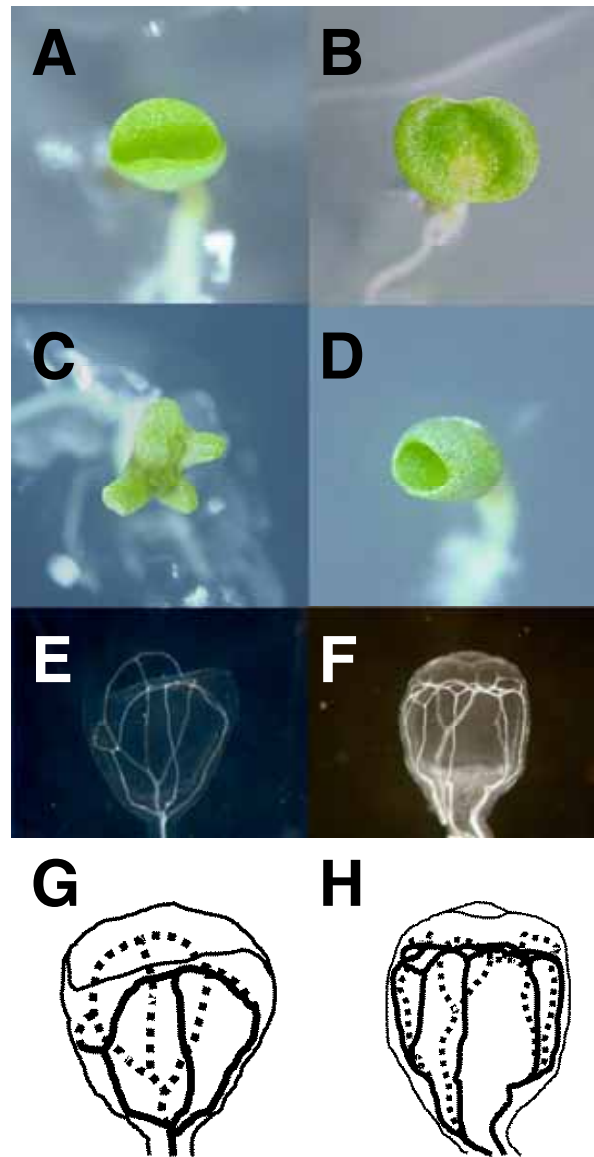


図 2. 9. *pin1* *pid*と*cuc*の三重および四重変異体の表現型

(A-D) *cuc1-1 cuc2* (A) 、 *pin1-3 pid-2 cuc1-1* (B) 、 *pin1-3 pid-2 cuc2* (C) 、 *pin1-3 pid-2 cuc1-1 cuc2* (D) の播種後5日目の芽生え。

(E,F) *cuc1-1 cuc2* (E) と *pin1-3 pid-2 cuc1-1 cuc2* (F) の播種後7日目の芽生えを維管束を可視化するため、透明化した。(G,H) *cuc1-1 cuc2* (G) と *pin1-3 pid-2 cuc1-1 cuc2* (H) の維管束パターンの模式図。

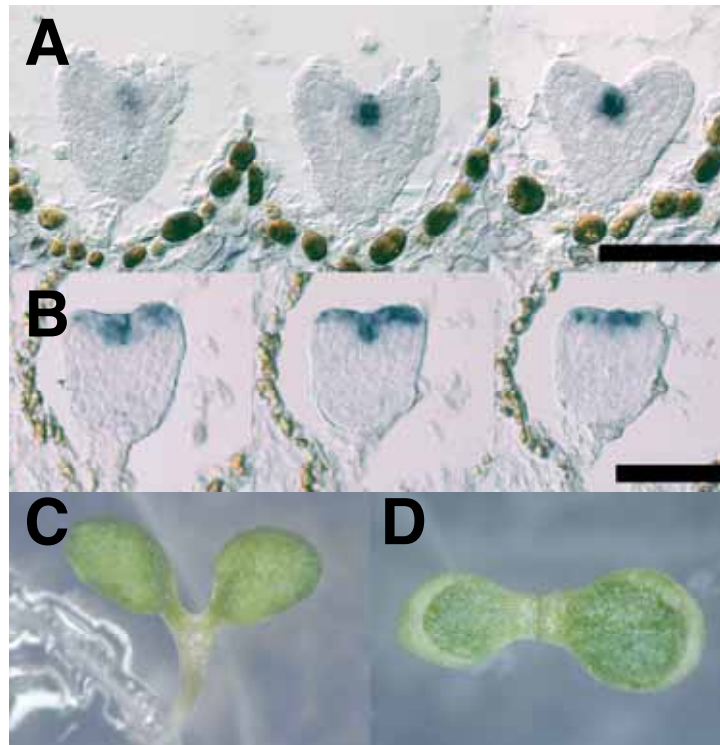


図 2. 10. *STM*、*PIN1*、*PID*の関係

(A,B) 野生型 (A) 、*pin1-3 pid-2*二重変異体 (B) の心臓型胚における*STM*の発現。(A,B) 胚の連続縦断切片。*stm-1*単独変異体 (C) と*pin1-3 pid-2 stm-1*三重変異体 (D) の播種後5日目の芽生え。A,Bにおけるスケールバーは、50 μ m。

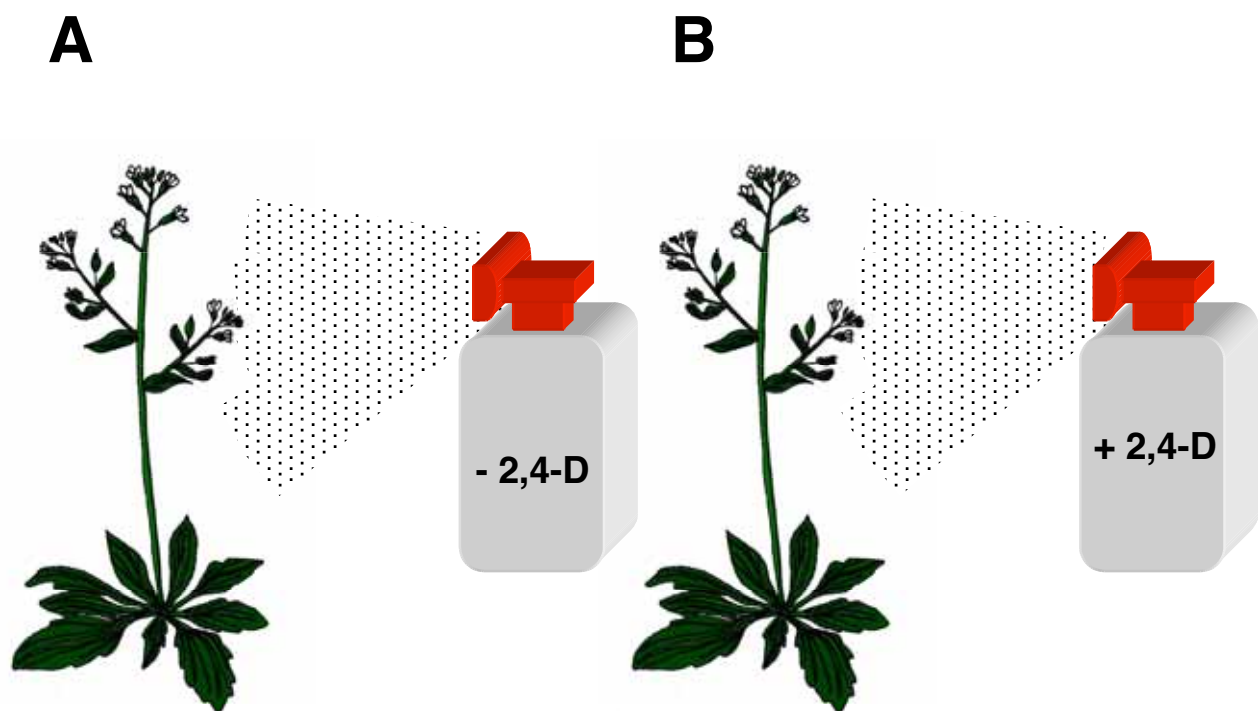


図 2. 11. オーキシン投与

(A,B) 播種後およそ三週間ぐらいの植物体の発達途中の鞘をすべて切り落とし、材料とした。(A) オーキシン非処理区。オーキシンを含まない溶液を植物体に霧吹きで大量に吹き付けた。(B) オーキシン処理区。10 μ Mの2,4-Dを含んだ溶液を、大量に吹き付けた。それらの植物体から得られた胚および種子を回収し解析に用いた。

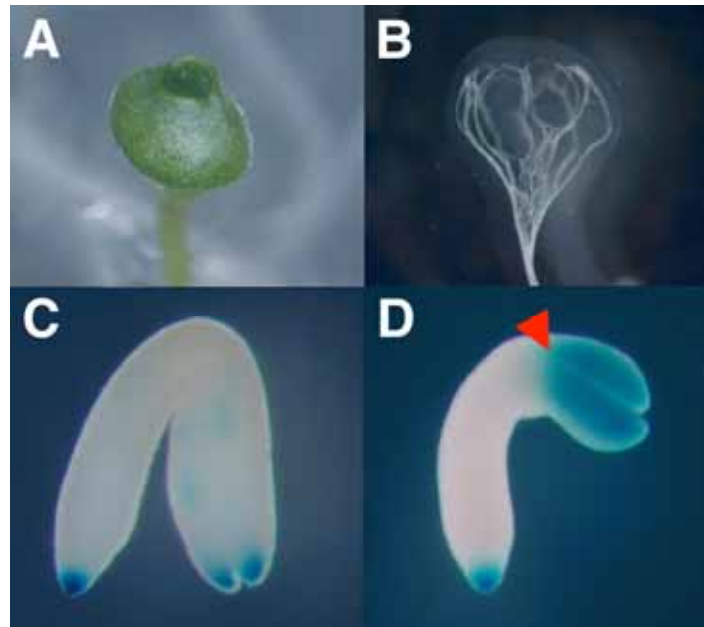


図 2. 12. 胚に対するオーキシン投与の影響

(A,B) 2,4-Dを投与した胚の播種後5日目の芽生え。Bは、芽生えの維管束を可視化するため、透明化した。(C,D) 成熟胚における*DR5::GUS*の発現パターン。2,4-D非処理区(C)と2,4-D処理区(D)。Dにおける赤い矢じりは子葉の融合を示す。

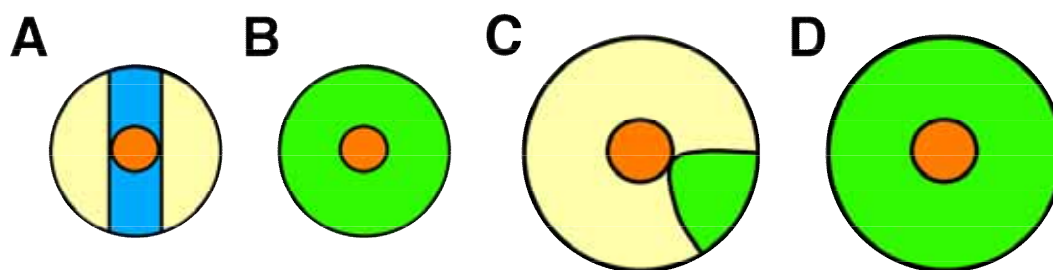


図 2.13. 変異体における胚頂端領域のパターン

(A,B) 心臓型胚期初期の胚頂端領域を上から見た模式図。(A) 野生型の胚頂端領域は、将来茎頂分裂組織を形成する領域 (PS; オレンジ) と将来子葉の境界部を形成する領域 (BCM; 水色) と将来子葉原基を形成する領域 (CP; クリーム色) の三つの領域に分けることができる。(B) *pin1-3* 単独変異体および *pin1-3 pid-2* 二重変異体の胚頂端領域において、CP領域とBCM領域が混合していた (緑色)。(C,D) 心臓型胚期後期の胚頂端領域を上から見た模式図。*pin1-3* 単独変異体の胚頂端領域において、BCM領域が狭まる (C) 一方、*pin1-3 pid-2* 二重変異体の胚頂端領域において、BCMとCPは混合したままである (D)。

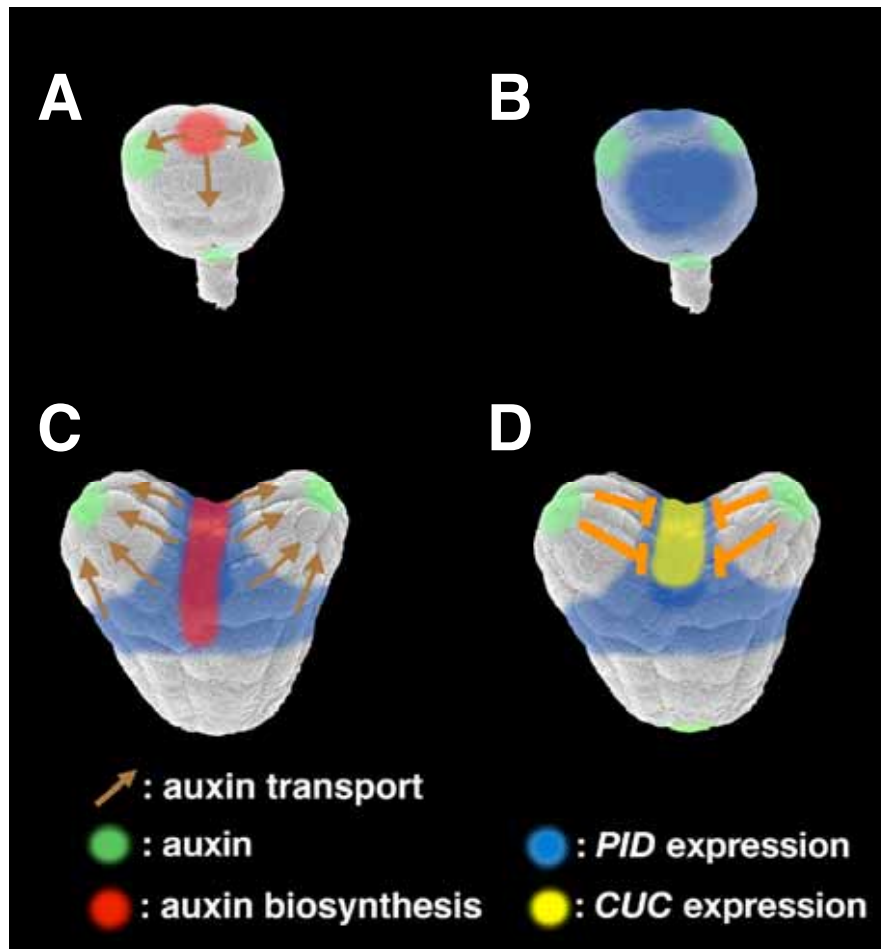


図 2. 14. 胚頂端領域のパターン形成モデル

(A) 球状型胚の胚頂端領域の中心部でオーキシンが合成され（赤）、*PIN1*によって子葉予定領域へ輸送される（茶色の矢印）。その結果、子葉予定領域において、オーキシンが線対称に蓄積する（緑）。(B) そのオーキシン分布に基づいて、*PID*は胚頂端領域で二つの強い発現が誘導される（青）。(C) 子葉境界部で合成されたオーキシン（赤）を、*PIN1*と*PID*が協調して子葉原基の先端へオーキシンを輸送し（茶色の矢印）、そこでのオーキシンの蓄積を促進する（緑）。(D) 子葉原基に蓄積したオーキシン（緑）は、*CUC*の発現（黄）が胚頂端領域の周辺部に広がらないように阻害する（オレンジ）。

第3章

子葉形成に関わる新規因子 *MACCHI-BOU (MAB)* の探索と同定

序論

高等植物の地上部の花や葉といった器官は側方器官と呼ばれ、茎頂分裂組織から発生する。側方器官は茎頂分裂組織の周辺領域から一定のパターンをもって発生し、そのパターンは葉序と呼ばれる。これまでの生理学および分子遺伝学的研究により、その過程に植物ホルモンであるオーキシンが非常に重要な役割を示すことが示されている (Reinhardt et al., 2000)。オーキシン極性輸送阻害剤 NPA を植物体に投与することより、器官発生が阻害されてピン状の花茎を示し、その花茎に再びオーキシンを投与することで器官形成は再開する。また、シロイヌナズナ変異体において、オーキシンの極性輸送に欠損をもった *pin-formed1 (pin1)* と *pinoid (pid)* およびオーキシン応答に異常を示す *monopteros (mp)* 変異体の花茎が、同じように器官形成に異常を示し、ピン状の花茎を示す (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995)。PIN1 遺伝子はオーキシンの排出を促進する膜タンパク質をコードしており (Gälweiler et al., 1998)、オーキシンの極性輸送を促進する。PID 遺伝子はオーキシンで誘導される Ser/Thr リン酸化酵素をコードしており (Christensen et al., 2000; Benjamins et al., 2001)、PIN の局在を制御することでオーキシン極性輸送を促進していることが示唆されている (Friml et al., 2004)。MP 遺伝子は in vitro でオーキシン応答シス配列に結合する転写活性化因子をコードしており、オーキシン誘導性遺伝子の転写活性化を介して器官発生を促進していると考えられている (Ulmasov et al., 1997a; Hardke and Berleth, 1998)。茎頂分裂組織周辺部の表皮細胞層において、器官が発達し始める前から PIN1 の細胞内局在が器官予定領域の中心部側に片寄っており、*pid* 変異体においてはその極性をもった細胞内分布が著しく乱れていた (Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2003; Friml et al., 2004)。これらのことから、器官予定領域での PIN1 の極性をもった局在が、オーキシンの蓄積を促進し、器官の発達を促していることが示唆される。さらに、PID は器官予定領域での PIN1 の配向を制御することで、器官形成を促進していることが示唆される。

第2章において示したように、花茎の場合とは異なり *pin1* および *pid* 単独変異体において子葉を欠失するようなことはほとんど見られないが、*pin1 pid* 二重変異体の芽生えは子葉を欠失した (Furutani et al., 2004)。また、マーカ遺伝子の発現解析から、胚頂端領域において胚発生初期の線対称性をもったパターン形成の開始には PIN1 が必須であり、胚発生後期では PIN1

と *PID* が協調してパターン形成に関与していることが示されている。これらのことから、*PID* は胚発生後期において *PIN1* とは異なる他の *PIN* ファミリーメンバーの局在を制御すること、そして初期における *PIN1* の局在の制御に *PID* だけではなくほかの因子も関与していることが示唆される。また、*pid* 変異体の花茎の表現型が *pin1* 変異体のものに比べて少し弱いことから、花茎においても *PIN1* 局在の極性を制御する因子が *PID* 以外にも存在することが示唆される。

胚頂端領域の線対称性をもったパターンが形成される球状型胚期後期以降、子葉原基領域において *PIN1* の細胞内局在は極性を示すようになる (Benková et al., 2003)。この *PIN1* 局在の極性の変化は、茎頂分裂組織からの器官形成時にも見られる (Reinhardt et al., 2003)。*PIN1* の細胞内局在の変化を可能にしているのは、細胞膜とエンドソーム間の *PIN1* のリサイクリングである。このリサイクリングは ARF-GEF (ADP ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor) である *GNOM* 依存的に行われ、*gnom* 変異体の胚では *PIN1* がランダムに細胞内で局在する (Steinmann et al., 1999; Geldner et al., 2001; Geldner et al., 2003)。胚頂端領域において、どのような分子機構で *GNOM* を介した *PIN1* の細胞内局在が極性を示すようになるか分かっていない。そこで、器官形成時の *PIN* の細胞内局在を制御する分子機構を含め、オーキシンを介した器官形成機構を分子レベルで解明することを目的に、*PID* と機能重複的に器官形成を促進する因子を遺伝学的に単離することを試みた。子葉発達の欠失という表現型を指標にスクリーニングを行い、*pid* エンハンサーとして *macchi-bou (mab)* 変異体を単離した。その結果、*MAB1*、*MAB2*、*MAB3*、*MAB4* の 4 遺伝子座得ることができた。*mab1*、*mab3*、*mab4* 変異は、胚だけに限らず花茎においても *pid* 変異を増強し、二重変異体の花茎においても器官の欠失を示した。このことから、*MAB1*、*MAB3* および *MAB4* は子葉を含む器官形成一般に機能していることが示唆された。一方、*mab2 pid* 二重変異体においては、子葉形成および茎頂分裂組織の機能に欠損がみられ、*MAB2* は子葉形成および茎頂分裂組織の機能維持に関わっていることが示唆された。*mab3* 変異体は、*pin1* 変異体の新たなアレルであり、第 2 章において示した *pin1* 変異が *pid* 変異を増強することを確認できた。また、*mab1* 変異体において、pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit をコードする遺伝子に変異を確認した。

材料と方法

植物材料と育成条件

野生型として、*Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* (Ler) と Columbia (Col) を用いた。以下に示す変異体アレルを用いた。*pin1-201* (Col) (第 2 章)、*pid-2* (Ler) (Christensen et al., 2000)、*pid-3* (Col) (Bennett et al., 1995)。植物の生育条件は、第 1 章の材料と方法に従った。

変異原処理

(スクリーニング 1) 野生型 (Col) の種子に速中性子線を照射した後、ムラシゲースクーク培地プレート上に播種した。育成した M1 世代の自家受粉による種子をすべて回収し、その M2 世代種子をムラシゲースクーク培地プレート上に播種して、子葉の表現型を指標にスクリーニングを行った (図 3.1A)。その結果、*mab4* 変異体を単離した。野生型 (Col) の種子を 0.3% EMS (ethylmethanesulfonate) 溶液に室温で十六時間浸した後、10 回水洗いしてムラシゲースクーク培地プレート上に播種した。育成した M1 世代の自家受粉による種子をすべて回収し、その M2 世代種子をムラシゲースクーク培地プレート上に播種して、子葉の表現型を指標にスクリーニングを行った (図 3.1A)。その結果、*mab1-1* と *mab3-1/pin1-202* 変異体を単離した。

(スクリーニング 2) *pid-2* 単独変異体 (Ler) の種子 4500 粒を 0.4% EMS (ethylmethanesulfonate) 溶液に室温で十二時間浸した後、10 回水洗いしてムラシゲースクーク培地プレート上に播種した。育成した M1 世代の自家受粉による種子をすべて回収し、その M2 世代種子をムラシゲースクーク培地プレート上に播種して、子葉の表現型を指標にスクリーニングを行った (図 3.1B)。その結果、*mab2*、*mab3-2/pin1-203*、*mab3-3/pin1-204* 変異体を単離した。

mab pid 二重変異体の作成

スクリーニング 1 により単離された *mab1-1*、*mab3-1/pin1-202* および *mab4* 単独変異体は、それぞれ稔性をもつ。それぞれについてホモ接合である植物体と、*pid-3* についてホモ接合および *pid-2* についてホモ接合である植物体を交配させた。*mab1-1* と *mab3-1/pin1-202* に関しては、その F2 個体群の中から *mab1-1* と *mab3-1/pin1-202* についてホモ接合かつ、*pid* についてヘテロ接合である植物体を PCR によって変異チェックを行い選抜した。それぞれの F3 個体群の中に含まれる二重変異体を PCR によるチェックおよび新しい表現型の有無で選抜した。*mab1-2 pid-3* 二重変異体も同様に作成した。*mab4* の場合、*pid* 変異体との F2 個体群の中から、新しい表現型の有無および *pid*

変異の PCR によるチェックを行い選抜した。

走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡による芽生えの観察は、第 2 章の材料と方法に記した方法に従って行った。花茎における観察も同様に行った。

mab1 の相補性実験

以下に示すプライマーセットを用いて、BAC コンテイング：K16E14 を鋳型に MAB1 遺伝子を含むおよそ 5kb を PCR によって増幅した。

K16E14-fw; ATCACTTTGCAGATCCCTTC

K16E14-rv; GAGATTGCTTCCGTTTCAAG

この PCR 産物を pBIN19 にサブクローニングし、それを基に *mab1-1* 単独変異体に形質転換を行った。

In situ hybridization

第 1 章の材料と方法に記されている方法に従って、In situ hybridization を行った。*MAB1* アンチセンスプローブ作成のため、以下に記すプライマーセットを用いた PCR 産物をプラスミドにクローニングしたものを鋳型とした。

pdhe1-b-for in situ-fw : GGGAATCTTGAGGCAAAGAG

pdhe1-b-for in situ-rv : TCAAGGAAGACAACAGGGTC

形質転換植物の作成

MAB1-GFP

MAB1 の cDNA のコード領域を以下に記すプライマーセットを用いて RT-PCR を行い増幅した。その PCR 産物を、バイナリーベクターである pGWB5 のカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターと *GFP* 遺伝子との間にサブクローニングした。このプラスミドをアグロバクテリアの MP90 株に形質転換し、植物体 (Col) に感染させた。形質転換植物体 T1 種子をカナマイシン (50 μ g/ml) を含むアガロース培地上に播種し選抜した。

GW-cPDHE1b-stop-rv; AGAAAGCTGGGTCTTTCGATCTGTAACAAGCTCTC

GW-cPDHE1b-fw ; AAAAAGCAGGCTGGATGTTGGGAATCTTGAGGCA

結果

MACCHI-BOU (MAB)の単離

オーキシンを介した子葉形成機構を分子レベルで解明することを目的に、以下に記す2つの方法で *pid* エンハンサー *macchi-bou (mab)* 変異体の単離を行った。

スクリーニング 1) 野生型 (Col) を変異原 (エチルメタンスルホネート (EMS) あるいは中性子線) 処理し、子葉の発達に異常を示す変異体を単離した。単離した子葉発達に異常を示す変異体と *PINOID* の弱い変異アレルである *pid-2* を交配し、F₂ 世代の芽生えの表現型から子葉発達を欠損する *pid* エンハンサー変異体を選抜した (材料と方法; 図 3.1A)。

スクリーニング 2) *pid-2* 変異体を変異原 (EMS) 処理し、M₂ 個体の中から子葉発達を欠損する *pid* エンハンサーを選抜した (材料と方法; 図 3.1B)。

この2つのスクリーニングによって、*mab1*、*mab2*、*mab3* および *mab4* 変異体を単離した (図 3.2A-H)。*mab1*、*mab3-1* および *mab4* はスクリーニング 1 によって、*mab2*、*mab3-2* および *mab3-3* はスクリーニング 2 によって得られた。*mab1*、*mab2*、*mab3* および *mab4* 変異体について、それぞれの原因遺伝子の同定を行うために、マップベースクローニングを行った。その結果、*MAB1* 遺伝子座が 5 番染色体南側の BAC コンティグ; MXI22 から MFG13 の間に、*MAB2* 遺伝子座が 1 番染色体中央の BAC コンティグ; T22H22 から T5A14 の間に、*MAB3* 遺伝子座が 1 番染色体南側の BAC コンティグ; F17O7 から F28O16 の間に、*MAB4* 遺伝子座が 4 番染色体南側の BAC コンティグ; F3L17 から F10M6 の間に存在することがわかった (図 3.3)。*pid* エンハンサーの既知の原因遺伝子は、第 2 章で示したように *PIN1* 遺伝子 (*Atlg73590*) であり、これは 1 番染色体南側に存在し *MAB3* 遺伝子座のマップポジションに近い。そこで、*mab3* 変異体において *PIN1* 遺伝子をシークエンスしたところ、*mab3-1* 変異体において 599 番目のアミノ酸セリン (AGC) がアスパラギン (AAC) へと変換するグアニンからアラニンへの点変異を、*mab3-2* 変異体において第 1 イントロンの 3' 末端の AG から AA への点変異を、*mab3-3* 変異体において 495 番目のアミノ酸トリプトファン (TGG) を STOP コドン (TGA) に変換するグアニンからアデニンへの点変異を確認した (図 3.4A)。*mab3-1* 変異体において、変異が存在した 599 番目のセリンはシロイヌナズナの PIN ファミリーにおいて保存されているアミノ酸で (図 3.4B)、10 番目の膜貫通ドメイン近傍に位置するものである (図 3.4C)。*mab3-2* 変異体では、イントロンを取り除くことができず、短いタンパク質ができていることが考えられる。*mab3-3* 変異体においても、アミノ酸 494 番目以降を欠くタンパ

ク質ができていることが考えられる。さらに、*mab3-1* 変異体と *pin1-201* 変異体を用いて相補性実験を行った。*mab3-1* 変異のホモ接合体は稔性を示すが、*pin1-201* 変異をホモでもつ植物体は不稔であるため、*mab3-1* のホモ接合体と *pin1-201* のヘテロ接合体を交配した。その F1 個体群の中から、それぞれの変異を PCR でチェックし、*mab3-1* 変異についてヘテロ接合かつ *pin1-201* 変異についてヘテロ接合である植物体を選抜した。この選抜個体 11 個中 3 個体が子葉の融合を示し、花茎は 11 個体すべてピン状の形態および *mab3-1* 変異体の表現型を示した（以下に記す“*mab3* の表現型”の項を参照）。*mab3-1* 変異が *pin1-201* 変異を相補しないことが示された。これらのことより、*mab3* 変異体が *pin1* 変異体のアレルであることが示され、この 3 つの新規 *pin1* アレルを *mab3-1/pin1-202*、*mab3-2/pin1-203*、*mab3-3/pin1-204* と名づけた。

***mab1* 変異体の表現型**

mab1 単独変異体は、スクリーニング 1 により単離され、稔性をもつ。この変異体の芽生えの表現型を観察したところ、およそ 22% の個体で子葉の発達に異常が見られた（図 3.5A；表 3）。*mab1* 変異体の根は短く、根毛が少なかった。*mab1* 単独変異体の花茎は、ピン状の花茎を示す *pin1* 変異体と異なり、花や葉といった側方器官を形成した（図 3.5B）。

mab1 と *pinoid* の強いアレルである *pid-3* との二重変異体を作成し、表現型を調べた。*pid-3* 単独変異体においておよそ 2% で子葉を欠失する（第 2 章の表 2.1）が、*mab1 pid-3* 二重変異体の芽生えはおよそ 36% で 2 枚とも子葉を欠失し、およそ 64% で片側のみ子葉の発達が抑制されていた（図 3.5C）。*pid-3* 単独変異体の本葉はほとんど融合することなく発生し、抽苔後も花や茎生葉といった器官をわずかながら形成した（図 3.5E）。一方、*mab1 pid-3* 二重変異体の本葉は高頻度で融合し（図 3.2E）、抽苔後は器官形成を行わずピン状の花茎を示し（図 3.5F）、*pin1 pid* 二重変異体の表現型と似ていた。これらの結果から、子葉形成および花や茎生葉といった葉様器官形成過程において *mab1* 変異と *pid* 変異がお互いを増強し合うことが示された。

***mab2* 変異体の表現型**

mab2 変異体は、スクリーニング 2 より *pid-2* 変異との重複により子葉が形成できない変異体として単離された（図 3.6G）。胚発生の後、小さな本葉を数枚形成した後、茎頂分裂組織から器官形成は行われず、抽苔もしなかった（図 3.6H,I）。さらに茎頂分裂組織を SEM で詳細に観察したところ、発生途中で発達を停止している本葉原基が観察された（図 3.2F と図 3.6I）。また、*mab2* 単独変異体を単離したところ、芽生えにおいて、およそ 23% で子葉の

融合および3つ葉が出現した(図 3.6B,C; 表 3)。子葉の間から発生する本葉の発生パターンは、野生型と比べて乱れを生じた(図 3.6D,E)。根の表現型は野生型と変わらなかった。*mab2* 単独変異体は抽苔が遅れ、抽苔後も花茎の高さが野生型より低く、全ての花柄の基部に苞葉様の器官が形成された(図 3.6F)。また、花卉および雄蕊の発達に異常を示し、不稔であった。これらのことから、*mab2* 変異は器官形成に異常を示し、*pid* 変異との重複によって増強されることが示された。

***mab3* 変異体の表現型**

mab3-1/pin1-202 変異体はスクリーニング 1 により単離され、稔性をもつ *pin1* アレルである。*pin1* の強いアレルである *pin1-201* 単独変異体の芽生えはおよそ 50%で子葉発達に異常を示す(第 2 章の表 2.1)が、*mab3-1/pin1-202* 単独変異体の芽生えは、およそ 17%で子葉の発達に異常を示した(図 3.7A,B; 表 3)。*mab3-1/pin1-202* 単独変異体の花茎は、強い *pin1* アレルのものとは異なり、花や茎生葉などを形成し稔性を示した(図 3.7C)。さらに、花茎における器官形成過程を詳細に解析するため、SEM で観察した。その結果、*mab3-1/pin1-202* 単独変異体において、わずかにピン状の花茎を示すものや器官の発達不全を示すものがあつた(図 3.7D)。また、*mab3-1/pin1-202* 単独変異体の萼の発生が、野生型のものに比べて遅くなっていた(図 3.7E,F)。*mab3-1/pin1-202* 変異は花茎における *pid* 変異を増強した(図 3.7G,H)。*mab3-1/pin1-202 pid-3* 二重変異体の芽生えにおいて、片側の子葉の発達がしばしば観察され(図 3.2G)、*pin1-201 pid-3* 二重変異体のもの比べて比較的弱い表現型を示した。これらのことから、*mab3-1/pin1-202* 変異は弱い *pin1* アレルであることが示唆される。

mab3-2/pin1-203 および *mab3-3/pin1-204* 変異はスクリーニング 2 により単離された。*mab3-2/pin1-203 pid-2* および *mab3-3/pin1-204 pid-2* 二重変異体の芽生えは、*pin1-3 pid-2* 二重変異体とほぼ同程度の表現型を示すことから、*mab3-2/pin1-203* および *mab3-3/pin1-204* 変異は *pin1-3* 変異と同程度の強さのアレルであることが示唆された。

***mab4* 変異体の表現型**

mab4 変異体はスクリーニング 1 により単離され、稔性をもつ。*mab4* 単独変異体の芽生えは、およそ 4%で子葉の融合および3つ葉を示した(図 3.8A; 表 3)。また、本葉や根に表現型は確認できなかった。花茎において、花器官に異常がみられ、萼の融合や花卉および雄蕊の数の減少が確認された。花茎における器官形成を詳細に解析するため、SEM で *mab4* 単独変異体の花茎を

観察した。その結果、花序分裂組織からの花原基発生パターンは正常であったが、花芽分裂組織からの萼原基の発生に異常が見られた。野生型の花芽分裂組織における萼原基の発生に比べ、*mab4* 単独変異体のものは位置の異常や発生の遅延を示した (図 3.8C,D)。

mab4 pid-3 二重変異体の芽生えにおける表現型は、*pin1-201 pid-3* 二重変異体のものとはほぼ同程度であった (図 3.2D,H)。本葉の融合そしてピン状の花茎を示した (図 3.2H, 図 3.8F)。これらのことから、*mab4* 変異は子葉形成および花茎における器官形成時に *pid* 変異を増強することが示された。

MAB1 は pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit をコードする

MAB1 遺伝子をクローニングするため、MXI22 から MFG13 の BAC 間に含まれるいくつかの遺伝子について、シークエンスを行った。その結果、*mab1* 変異体において *At5g50850* 遺伝子中に点変異が存在した。その変異は、グアニンをアラニンに変換し 298 番目のアミノ酸グリシン (GGT) をアスパラギン酸 (GAT) に変える (図 3.9A)。この *At5g50850* 遺伝子中に存在する点変異が *mab1-1* 変異体の表現型を引き起こしているかを確かめるため、*At5g50850* の 5' 上流およそ 1k bp (base pair) および 3' 下流およそ 800bp をふくむ野生型ゲノム断片を、*mab1-1* 単独変異体に導入した。*At5g50850* 遺伝子を形質転換した *mab1-1* 変異体の芽生えは、*mab1-1* 単独変異体を示す根および子葉の表現型を相補していた。また、現在、*mab1-1 pid-3* 二重変異体に掛け合わせで導入中である。これらのことは、*MAB1* が *At5g50850* であることを示唆している。

mab1-1 変異が機能欠損をひきおこしているのか確かめるため、*Arabidopsis* Biological Resource Center から T-DNA ライン (SALK_111681) (Alonso et al., 2003) を入手した。このラインにおいて、*At5g50850* 遺伝子の 309bp 上流に T-DNA の挿入が確認された。*mab1-1* 変異体と同様、このラインと *pid-3* 変異体との二重変異体を作成すると、子葉を欠失するという表現型を示した (図 3.5D)。そこで、このラインを *mab1-2* 変異体とした (図 3.9A)。*mab1-2* 単独変異体の芽生えにおいて、根が短くなるという表現型は確認されたが、子葉の融合や数に異常は見られなかった。これらのことから、*mab1-1* 変異そして *mab1-2* 変異が機能欠失変異であること、そして *mab1-2* 変異体は弱いアレルであることが示された。

MAB1 遺伝子は、シロイヌナズナにおいて唯一のミトコンドリア型 pyruvate dehydrogenase (PDH) E1 β サブユニットをコードしていた。PDH E1 β サブユニットは PDH E1 α サブユニットとヘテロダイマーを形成して、ピルビン酸をアセチル Coenzyme A (CoA) に変換し、解糖系と TCA 回路を結び

付けていると考えられている。*mab1-1* 変異体において変異のあったグリシンは、多くの生物種の PDH E1 β サブユニットに保存されているアミノ酸であった (図 3.9B)。

MAB1 の局在

胚発生期における MAB1 の機能部位の同定するため、*MAB1* のアンチセンスプローブを用いて *in situ hybridization* を行った。*MAB1* は球状型胚期に胚本体、胚乳および胚柄でシグナルが検出された (図 3.10A)。心臓型胚期になると、胚本体の子葉原基および原根層上部においてシグナルがとくに強くなった (図 3.10B,C)。その後、発生が進むにつれてシグナルが弱くなり、魚雷型胚期以降になるとほとんど *MAB1* の発現を確認することはできなくなった (図 3.10D,E)。また、対照実験として *MAB1* のセンスプローブを用いて *in situ hybridization* を行ったところ、シグナルを検出することができなかった (図 3.10F)。これらのことから、*MAB1* は球状型胚期から魚雷型胚期にかけて胚本体、胚柄および胚乳で発現していることが示された。

つぎに、MAB1 の細胞内局在を調べるため、35S プロモーター制御下で MAB1 の C 末に GFP を融合させたタンパク質を発現させた。そのラインの根および根毛において、GFP シグナルを蛍光顕微鏡で観察したところ、ドット状のシグナルが多数観察された (図 3.10G,H)。この結果から、MAB1 は多数の小さなオルガネラに局在することが示唆された。また、MAB1 は TargetP プログラム (Emanuelsson et al., 2000) によって、ミトコンドリア移行シグナルを持つとされ、GFP シグナルが検出された小さなオルガネラはミトコンドリアであることが強く示唆された。

考察

本研究において、*pid* 変異を増幅するような変異体の原因遺伝子として *MAB* 遺伝子の単離を行い、*MAB1* から *MAB4* まで 4 遺伝子座得ることができた。シーケンスおよび相補性実験の結果から、*MAB3* は第 2 章で示したように器官形成に重要な役割を果たす *PIN1* 遺伝子であることが確認された。このことは、今回行ったスクリーニングによって器官形成に関わる因子が単離されていることを示している。*MAB1* 遺伝子のクローニングを行った結果、ミトコンドリア型 PDH E1 β サブユニットをコードする遺伝子であることが分かった。代謝に関わるような因子が器官形成に関与するという報告はこれまでほとんどなく、*MAB1* 遺伝子は器官形成の新しい側面を示す因子であると言える。

***MAB* は *PID* と機能重複的に器官形成に関わる**

pid 単独変異体は、子葉および花茎の器官形成に異常を示すものの、完全に欠失することはまれである (Bennett et al., 1995; 第 2 章)。今回単離された *mab* 変異によって、子葉および花茎における器官形成における *pid* 変異の影響が増強され、器官形成が行えなくなった。このことは、*pid* 単独変異体の子葉および花茎の器官原基にわずかではあるが、器官形成を十分行えるだけのオーキシンが蓄積し、*CUC* の活性を器官原基領域からわずかに排除していること、そして、さらなる *mab* 変異によってオーキシン分布を介した *CUC* 活性の排除が行えなくなっていることが考えられる。*PID* は *PIN* の細胞内局在の制御を介して器官原基でのオーキシン蓄積を促進している (Friml et al., 2004; 第 2 章) ことを考え合わせると、*MAB* の機能としていくつかの可能性が考えられる。

1) *PID* がおもに子葉原基境界部および子葉原基の基部で発現しており、子葉原基先端ではほとんど発現していないことから、子葉原基先端部で *MAB* は *PID* と機能重複的に *PIN* の細胞内局在を制御している。

2) *MAB* は *PIN* を介さず、別の何らかの形でオーキシンの極性輸送に関与する。

3) *MAB* はオーキシンの応答に関わり、器官形成を促進している。

4) *MAB* はオーキシン代謝に関わり、*mab* 変異によってオーキシン量が減少し器官原基に蓄積するオーキシンが減る。

5) *MAB* は器官原基へのオーキシン蓄積には関与せず、その後の *CUC* の排除過程に関わる。

6) *MAB* はこれまでに知られていないオーキシンを介さない器官形成過程

に関与する。

今回、単離した *MAB1*、*MAB4* に関して、それらの変異体と *pid* 変異体との二重変異体の表現型が、*pin1 pid* 二重変異体のものとほとんど同じであったことから、これらの因子はオーキシンを介した器官形成過程に関わることが予想され、上記の機能仮説の 1) から 4) のいずれかの機能を持っていることが示唆される。*MAB3* に関して、*mab3-1/pin1-202* 変異体は、PIN1 の C 末にアミノ酸置換を引き起こす点変異を持っており、弱い表現型を示す。これまで弱い *pin1* アレルは報告されておらず、この変異が PIN1 の機能に対してどのような影響を与えるのかを調べることによって、PIN1 タンパク質の機能および細胞内局在制御機構に新たな知見をあたえるであろう。*MAB2* については、*mab2 pid* 二重変異体の子葉欠失という表現型のほかに、*pin1 pid* 二重変異体では見られなかった本葉原基の発達にも異常を示した。このことは、*mab2* 変異によって茎頂分裂組織の機能にも異常が生じていることを示している。また、*mab2* 単独変異体の花茎において、花柄の基部に苞葉をもつという表現型を示した。このような表現型は、オーキシ関連変異体でこれまで報告されていない。これらのことは、*MAB2* がオーキシンを介した器官形成に関与している可能性のほかに、上記の機能仮説 5) もしくは 6) に相当する機能をもっている可能性も示唆する。現在 *MAB2* のクローニングを試みており、*MAB2* の同定そしてその解析は、新たな器官形成機構の解明の糸口となることが期待される。

***MAB1* の器官形成過程における機能**

mab1-1 変異体は、器官形成過程における *pid* 変異を増強するエンハンサーとして単離され、*pin1 pid* 二重変異体と同様の表現型を示した。クローニングの結果、*MAB1* はミトコンドリア型 PDH E1 β サブユニットをコードしていた。シロイヌナズナのゲノム中には、ミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニットをコードする遺伝子が 2 つ (*At1g24180* と *At1g59900*)、ミトコンドリア型 PDH E1 β サブユニットをコードする遺伝子が 1 つ (*MAB1/At5g50850*) 存在する (Mooney et al., 2002)。PDH E1 β サブユニットは PDH E1 α サブユニットとヘテロダイマーを形成し、ピルビン酸を脱炭酸してアセチル CoA に変換する反応を触媒する。これまで、シロイヌナズナのミトコンドリア型 PDH E1 β サブユニット (*MAB1/At5g50850*) が、in vitro においてミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニット (*At1g59900*) と $\alpha 2 \beta 2$ のヘテロダイマーを形成し、ピルビン酸を脱炭酸することが示されている (Szurmak et al., 2003)。これらのことから、植物体内で *MAB1* はピルビン酸を基質とし、アセチル CoA への変換を触媒することが示唆される (図 3.11A)。

MAB1 の器官形成における役割について、いくつかの可能性が考えられる。まず、*mab1* 変異によってアセチル CoA 量が減少し、その上流の代謝産物もしくは 2 次代謝産物が蓄積し、そのことによって、オーキシン代謝に何らかの影響を及ぼし、器官形成時に必要とされるオーキシンが不足する可能性がある。また、哺乳動物において、PDH 活性が細胞内カルシウム濃度の制御を介して、細胞増殖に関わるインシュリンの分泌に関与することが示唆されている (McCormack et al., 1990)。カルシウム結合タンパク質が PID と相互作用し、PID の活性を制御することが示唆されており (Benjamins et al., 2003)、*MAB1* は細胞内カルシウム濃度を調節することで、PID および PID と機能重複性を示す因子の活性を制御し器官形成過程に関わっていることが示唆される。また、胚発生期において *MAB1* は細胞増殖が活発であると予想される部位において強い発現を示し、細胞増殖活性の低い胚発生後期においては発現が確認されなかった (図 3.10)。これらのことから、もしかすると *MAB1* は器官形成時の細胞増殖を促進することで器官形成を促進しているかもしれない。

アミノ酸結合型 IAA に対する感受性が低下している変異体として単離された *iar4* 変異体において、ミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニット (At1g24180) の機能が欠損していた (LeClere et al., 2004)。この変異体において、解糖系および TCA 回路に異常は見られず、人工オーキシンである 2,4-D に対して低感受性を示した。一方、*MAB1* とヘテロダイマーを形成しピルビン酸を基質とするもう 1 つのミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニット (At1g59900) に T-DNA が挿入されている系統は、アミノ酸結合型 IAA に対して野生型と同様の感受性を示し、表現型を示さなかった。*IAR4* が、IAA および結合型 IAA の前駆体となりうる indole-3-pyruvate から indole-3-acetyl-coenzyme A への変換に関わる可能性が示唆されている。これらのことから、*MAB1* はミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニット (At1g59900) および *IAR4*/At1g24180 とヘテロダイマーを形成しピルビン酸を基質に解糖系および TCA 回路に関与する (図 3.11A) 一方で、*IAR4*/At1g24180 とヘテロダイマーを形成し indole-3-pyruvate を基質としてオーキシンの代謝に関わっている可能性も示唆される (図 3.11B)。

今後、*MAB1*、ミトコンドリア型 PDH E1 α サブユニットをコードする *At1g59900* および *IAR4*/At1g24180 間の遺伝学的関係や、オーキシン量、カルシウム濃度および PIN の細胞内局在に対して *mab1* 変異がどのような影響を与えるか詳細に調べることで、器官形成過程における *MAB1* の機能が明らかになってくるであろう。そのことによって、器官形成過程における代謝の果たす役割が明らかにされ、新たな器官形成機構の一面を示すことができるだ

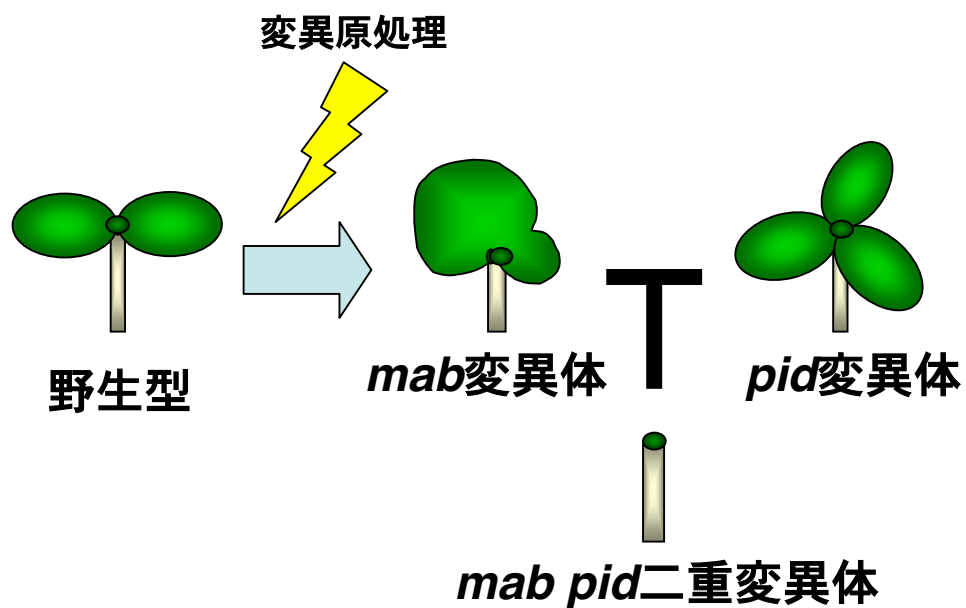
ろう。また、残りの *MAB2* および *MAB4* においても、それらのクローニングそして解析を通して、これまでに明らかにされていない器官形成機構が解明されるであろう。

表 3. *mab* 単独変異体の表現型とその頻度

遺伝型 (エコタイプ)	子葉の数とその頻度 (%)			観察した芽生え の総計
	1 [†]	2 [‡]	3 [#]	
Col	-	-	-	-
Ler	-	-	-	-
<i>mab1-1</i> (Col)	21.6	77.9	0.5	199
<i>mab1-2</i> (Col)	0	100	0	62
<i>mab2</i> (Ler)	8.6	77.1	14.3	35
<i>mab3-1</i> (Col)	16.5	82.6	0.9	333
<i>mab4</i> (Col)	3.3	96.2	0.5	210

[‡]一枚葉もしくは融合した子葉を形成する。
[†]野生型の芽生えは、二枚の子葉を持つ。
[#]余分な子葉を形成し、三枚の子葉を持つ。

A



B

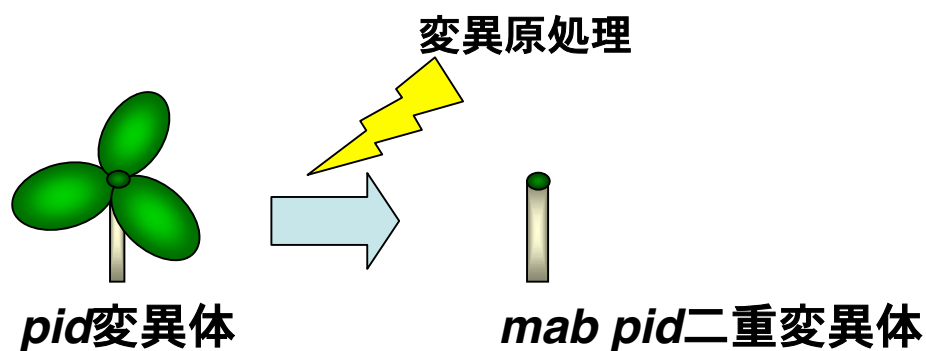


図 3. 1. *mab*変異体の単離方法

(A) スクリーニング 1。野生型を変異原処理し、子葉の発生に異常を生じるラインを選抜する。そのラインと*pid*変異体を交配し、二重変異体を作成する。その二重変異体において子葉が欠失すれば、そのラインを*mab*変異体とする。(B) スクリーニング 2。 *pid*変異体を変異原処理し、子葉を欠失するラインを選抜する。

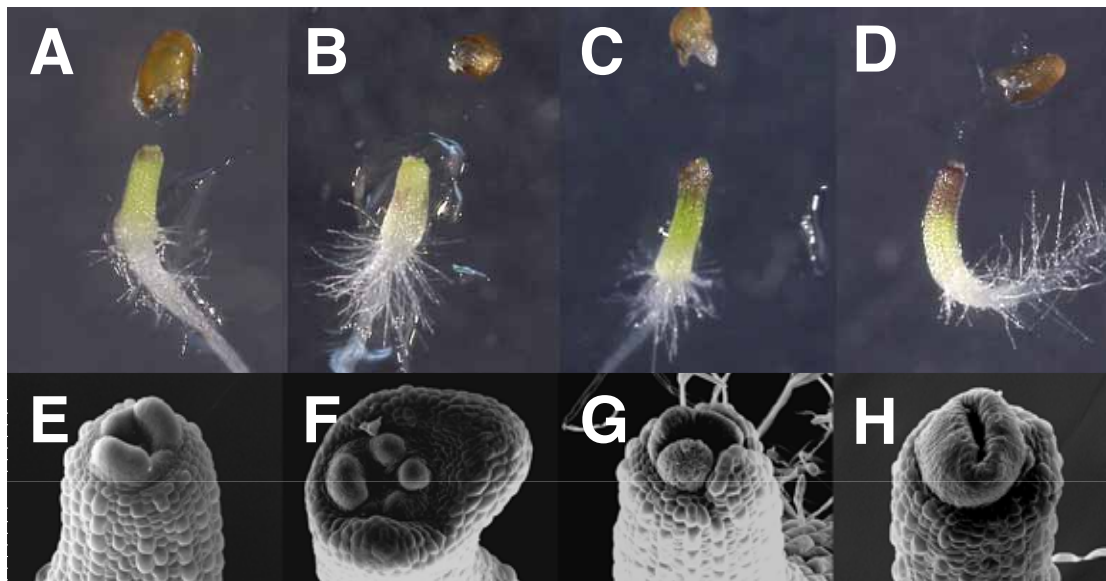


図 3. 2. *mab pid*二重変異体の子葉の表現型

(A-H) *mab1-1 pid-3*二重変異体 (A,E) 、*mab2 pid-2*二重変異体 (B,F) 、*mab3-1 pid-3*二重変異体 (C,G) 、*mab4 pid-3*二重変異体 (D,H) の播種後 5 日目の芽生え。(E-H) 走査型電子顕微鏡による像。

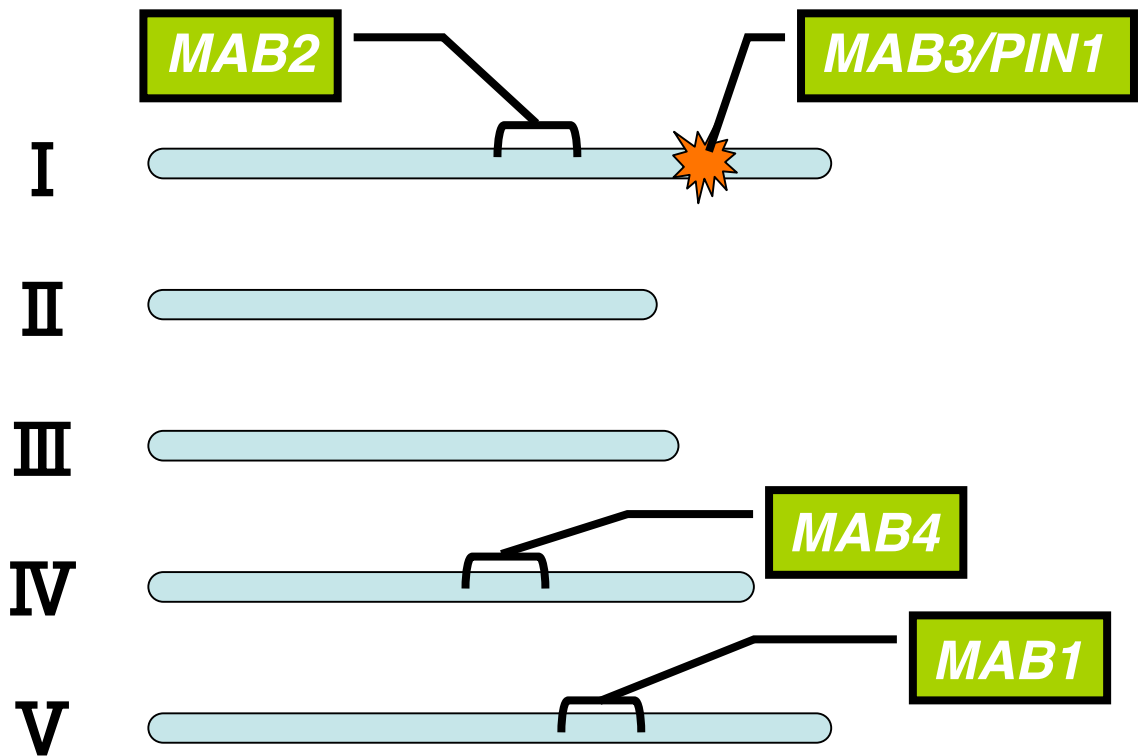
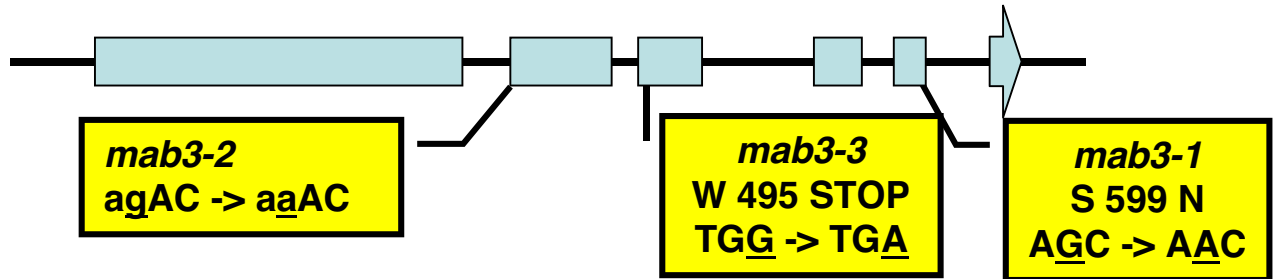


図 3. 3. *MAB*遺伝子座のマッピングポジション

水色の棒は染色体を示す。左の数字は、染色体番号を示す。*MAB3*は*PIN1*と同一であった。*MAB1*は第5染色体上BACコンティグ 8 つの領域に、*MAB2*は第1染色体上BACコンティグ 4 つの領域に、*MAB4*は第4染色体上BACコンティグ 4 つの領域に限定された。

A

At1g73590/PIN-FORMED1 (PIN1)



B

		*
PIN1	581-	GIVPFVFAKEYNVHPDILSTAVIFGMLIALPITLLYYILLGL-
PIN2	606-	GIVPFVFAKEYNVHPDILSTAVIFGMLVALPVTVLYYVLLGL-
PIN3	599-	GIVPFVFAKEYNVHPAILSTGVIFGMLIALPITLVYYILLGL-
PIN4	575-	GIVPFVFAKEYNVHPTILSTGVIFGMLIALPITLVYYILLGL-
PIN5	309-	SITSFIFFAKEYGLHADVLSTAVIFGMLVSLPVLVAYYAALEF-
PIN6	529-	GIVPFVFAREYNLHPDLLSTLVIFGMIVSLPVTILYYVLLGL-
PIN7	529-	GIVPFVFAKEYNVHPAILSTGVIFGMLIALPITLVYYILLGL-

C

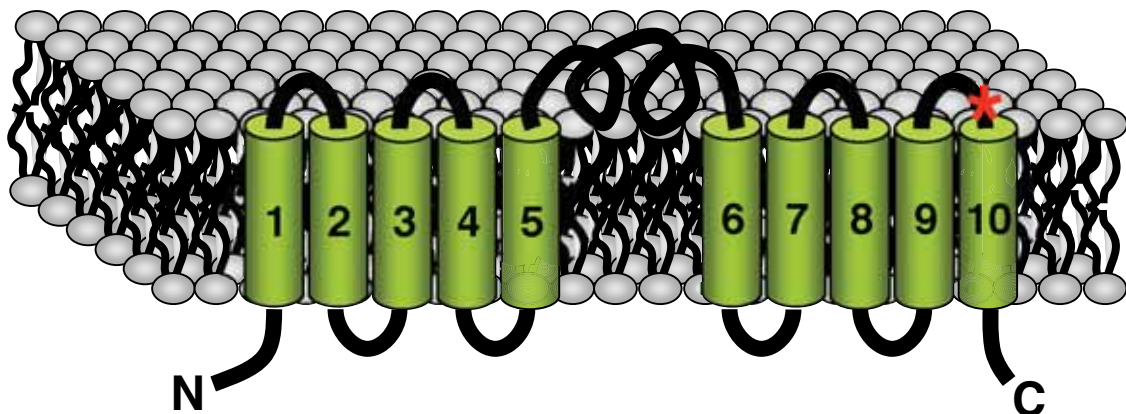


図 3. 4. MAB3/PIN1のクローニング

(A) MAB3/PIN1遺伝子における*mab3-1*、*mab3-2*、*mab3-3*変異部位。

(B) シロイヌナズナPINファミリーのC末のアミノ酸配列。アスタリスクおよび赤字は、*mab3-1*変異体において変異があったアミノ酸を示す。このアミノ酸はすべてのPINで保存されている。(C) PIN1の予想されるタンパク構造。*mab3-1*変異部位を赤いアスタリスクで示す。緑色の棒の部分は、膜貫通ドメインと示す。

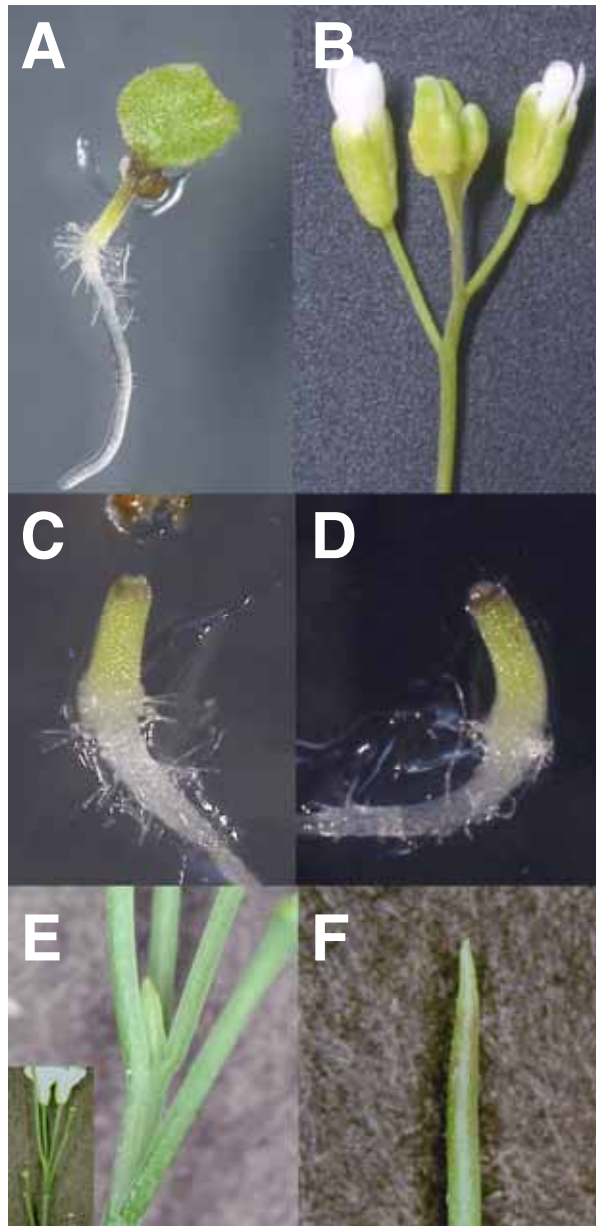


図 3. 5. *mab1*単独変異体と*mab1 pid*二重変異体の表現型

(A,B) *mab1-1*単独変異体の5日目の芽生え (A) と花茎 (B)。
 (C,D) *mab1-1 pid-3*二重変異体 (C) と*mab1-2 pid-3*二重変異体 (D)の5日目の芽生え。(E,F) *pid-3*単独変異体 (E) と*mab1-1 pid-3*二重変異体 (F) の茎頂。Eにおける左下の図は、*pid-3*単独変異体の花茎。

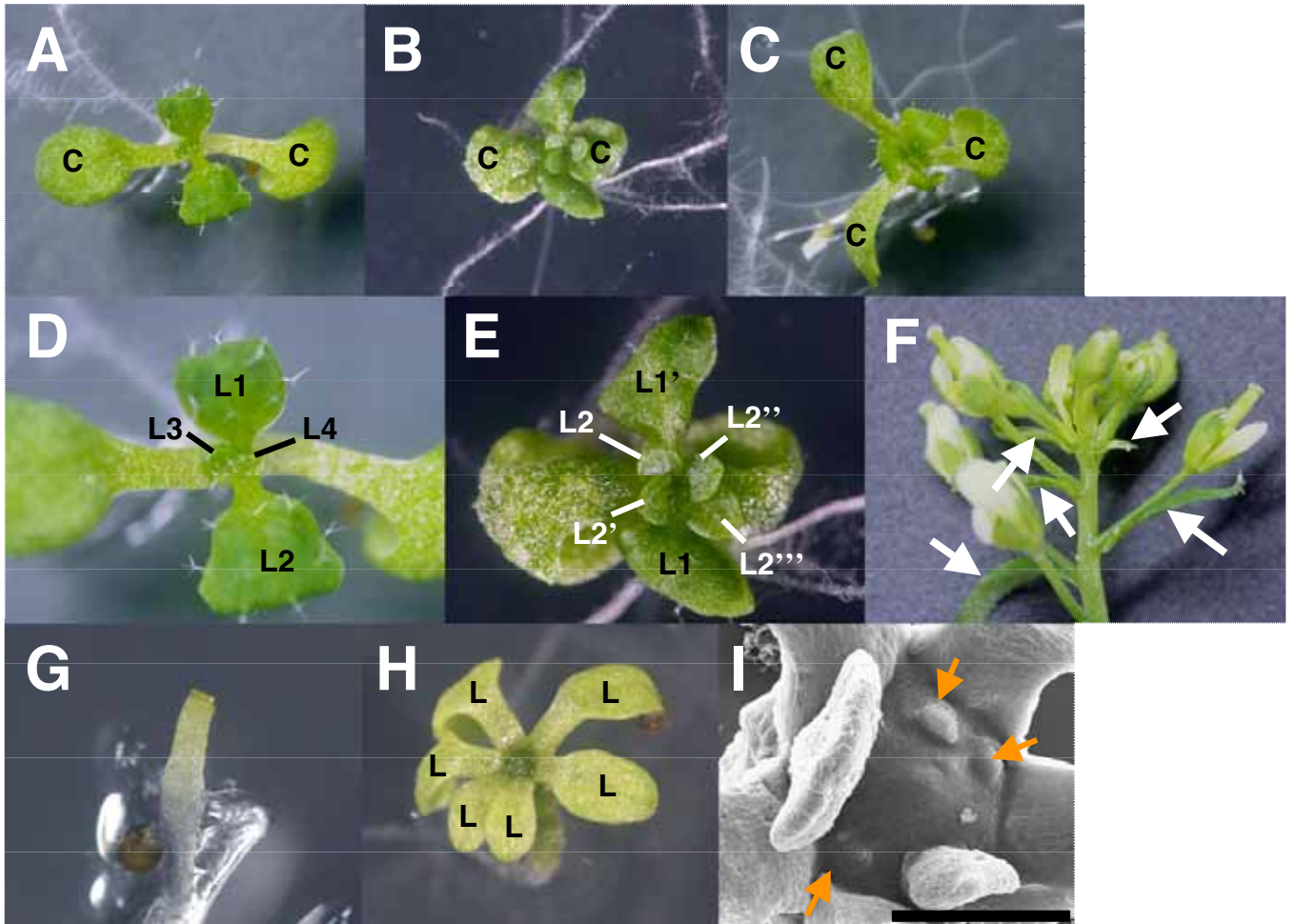


図 3. 6. *mab2*単独変異体および*mab2 pid*二重変異体の表現型

(A-E) 野生型の芽生え (A,D) と*mab2*単独変異体の芽生え (B,C,E)。(A-C) 図中における”C”は、子葉を示す。(D,E) DはAの、EはBの拡大図。DにおけるL1,2,3,4は発生する順番に番号をつけた本葉を意味する。EにおけるL1,1',2,2',2'',2'''は、L1とL1'が、L2、L2'、L2''とL2'''が、ほぼ同時に発生し、順番を決めることができない本葉を意味する。(F) *mab2*単独変異体の花茎。白い矢印は、花柄の基部に存在する苞葉を示す。(G-I) *mab2 pid-2*二重変異体の5日目 (G) と12日目 (H,I) の芽生え。(H) 図中の”L”は、本葉を示す。(I) 走査型顕微鏡による像。オレンジの矢印は、発生途中で停止した本葉を示す。Iのスケールバーは400 μ m。

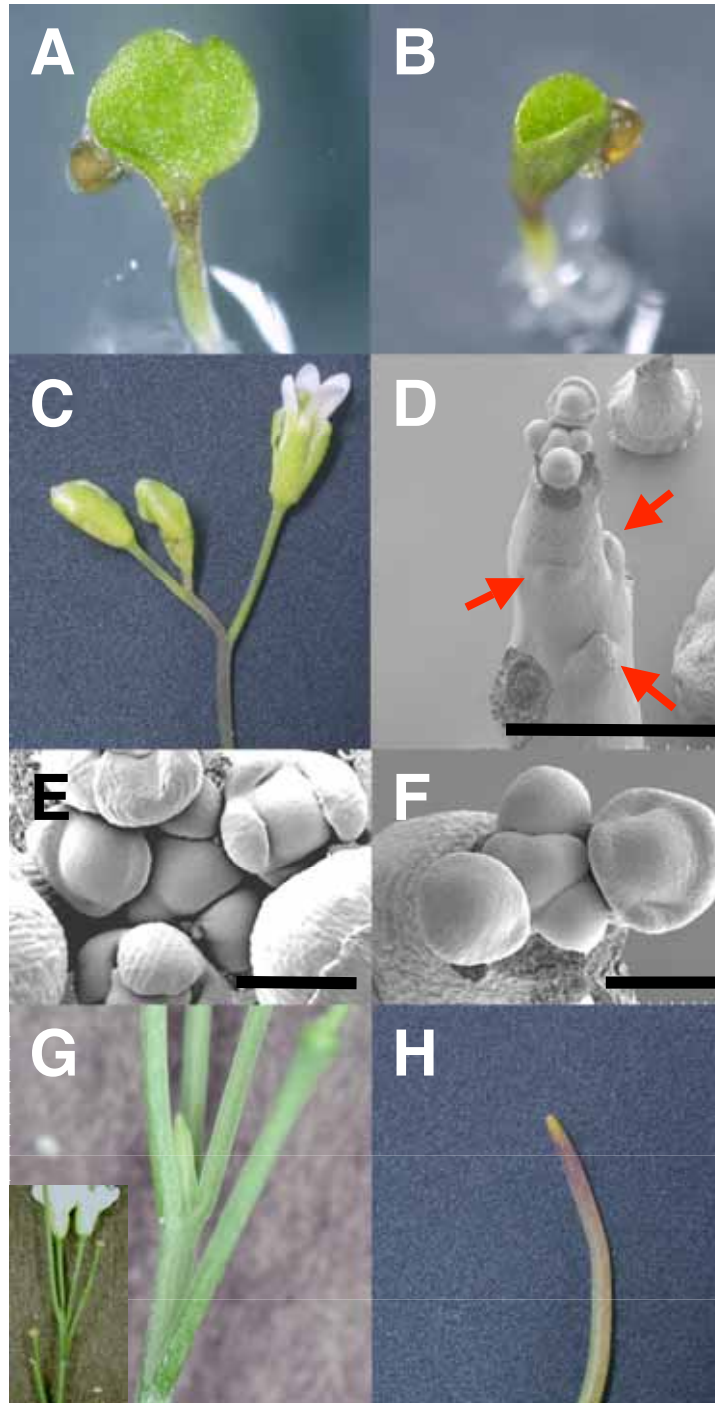


図 3. 7. *mab3-1*変異体および*mab3-1 pid*二重変異体の表現型

(A,B) *mab3-1*単独変異体の5日目の芽生え。子葉が部分的に融合したり (A)、完全に融合しカップ型を示す個体 (B) もある。(C,D) *mab3-1*単独変異体の花茎。(D,E,F) 野生型 (E) および*mab3-1*単独変異体 (D,F) の茎頂の走査型電子顕微鏡図。FはDを上から観察した図。Dにおける赤い矢印は発達が停止した器官原基を示す。(G,H) *pid-3*単独変異体 (G) および*mab3-1 pid-3*二重変異体 (H) の茎頂。Gにおける左下の図は*pid-3*単独変異体の花茎。Dのスケールバーは500 μ m、E,Fのスケールバーは100 μ m。

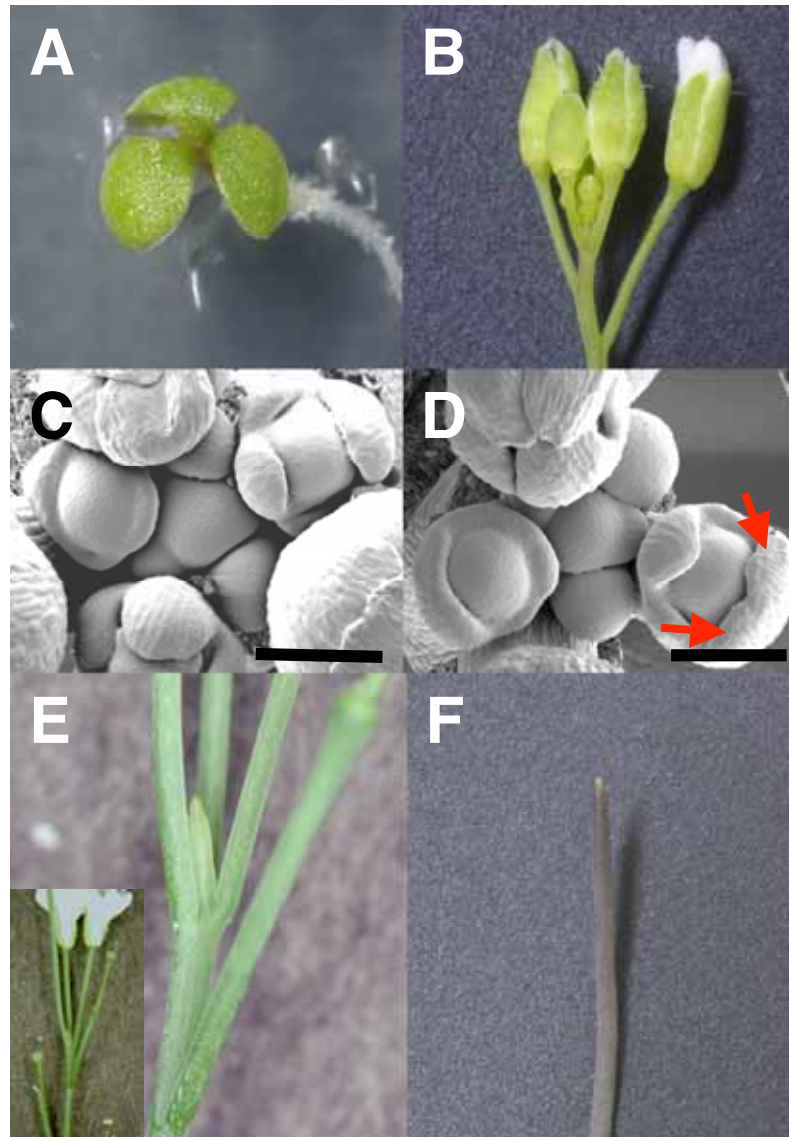
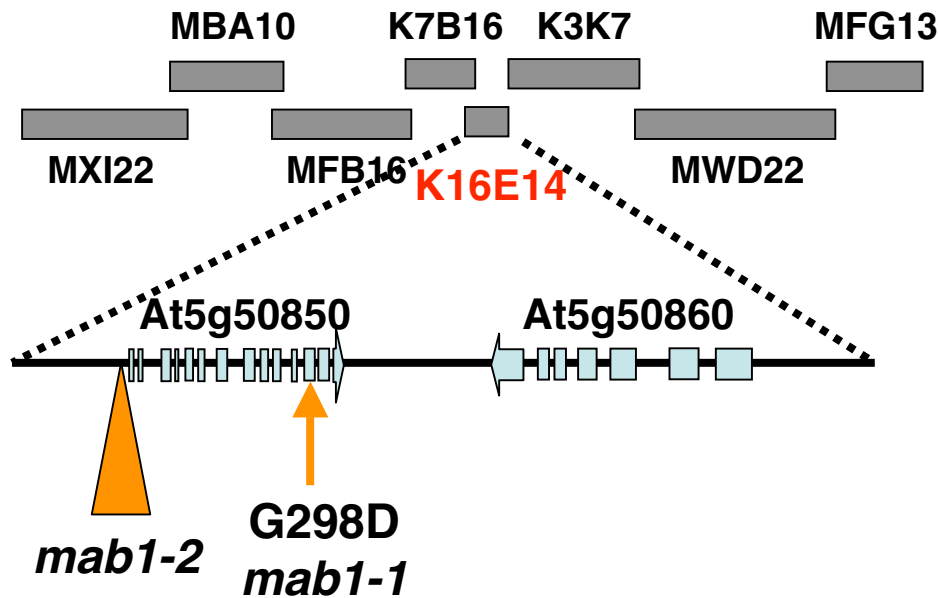


図 3. 8. *mab4*単独変異体および*mab4 pid*二重変異体の表現型

(A,B) *mab4*単独変異体の5日目の芽生え(A)と花茎(B)。(C,D)野生型(C)および*mab4*単独変異体(D)の茎頂の走査型顕微鏡による像。(E,F) *pid-3*単独変異体(E)および*mab4 pid-3*二重変異体(F)の茎頂。Dの赤い矢印は萼の発生異常を示す。Eにおける左下の図は*pid-3*単独変異体の花茎。C,Dにおけるスケールバーは100 μ m。

A



B

<i>A. thaliana</i>	293	VTVEEGFPQHGVC	AEICASVVEES	-FSY-LDAPVERIA-GADV	ELPYTANLERLAL	QIE	349
<i>Z. mays</i>	298	VTVEEGFPQHGIG	AEICMSVVEES	-FEY-LDAPVERIA-GADV	MPYAANLERMAV	POVD	354
<i>P. sativum</i>	283	VTVEEGFPQHG	VGAELCTSVIEES	-EGY-LDATVERIG-GADV	MPYAGNLERLVV	PHVE	339
<i>H. sapiens</i>	290	VTVEGGWPQFG	VGAELCARIMEGPA	ENF-LDAPAV-RVTGADV	MPYAKILEDNSI	PQVK	347
<i>S. cerevisiae</i>	296	ITVESTFPSFG	VGAELVAQVMESEAF	DY-LDAPIQRVT-GADV	PTPYAKELEDF	AFDTP	353
<i>D. melanogaster</i>	286	VTVENGWPHG	VGAELCARIMEDQTF	-FELDAP-VWRCAGVD	VPMPYAKTLEA	HALPRVQ	343
<i>R. prowazekii</i>	256	VIVEEGWFFAG	VGASIASIVMKE-AF	DYLDAP-IEIVSGKDV	-PLPYAVNLEK	LAMP	312
<i>A. suum</i>	291	VTVESGWPNC	GVAELISARVTESDA	EGYLDG-PILRVTGVD	-VMPYAQPLETA	ALQPA	348

図 3. 9. MAB1のクローニング

(A) MAB1遺伝子座。mab1-1変異体においてAt5g50850遺伝子中に点変異が存在する（オレンジの矢印）。灰色の棒は、BACコンティグを示す。mab1-2変異体においてAt5g50850遺伝子の5'上流にT-DNAが挿入している（オレンジの矢じり）。(B) ミトコンドリア型PDHE1βのさまざまな生物種間のアミノ酸配列比較。黒い線で囲んだアミノ酸は全ての生物種で保存されている。赤いアスタリスクで示したグリシンは、mab1-1変異体において変異のあったアミノ酸である。

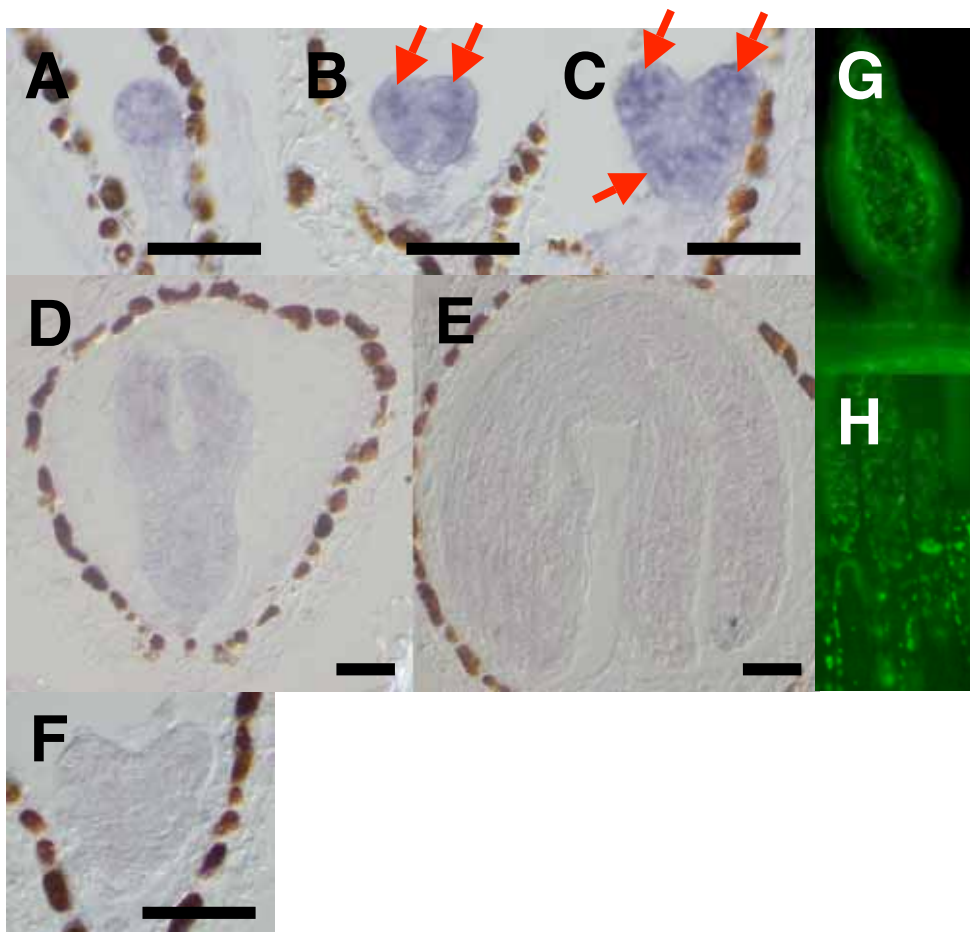
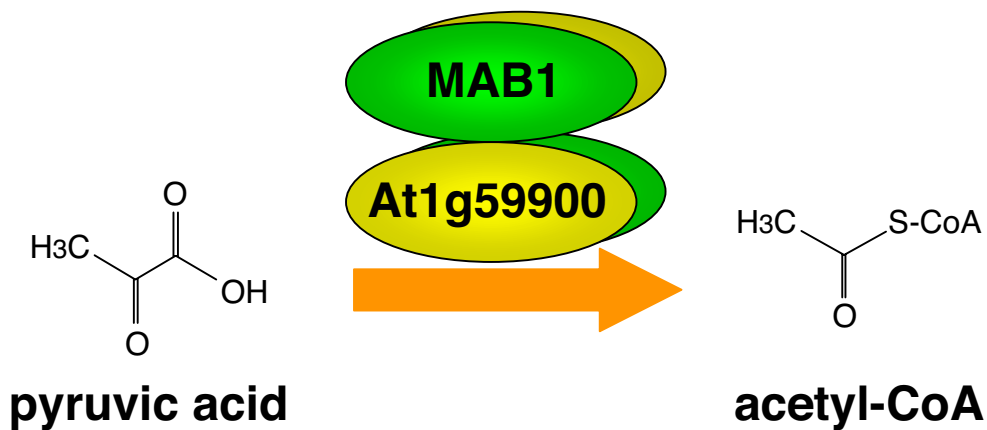
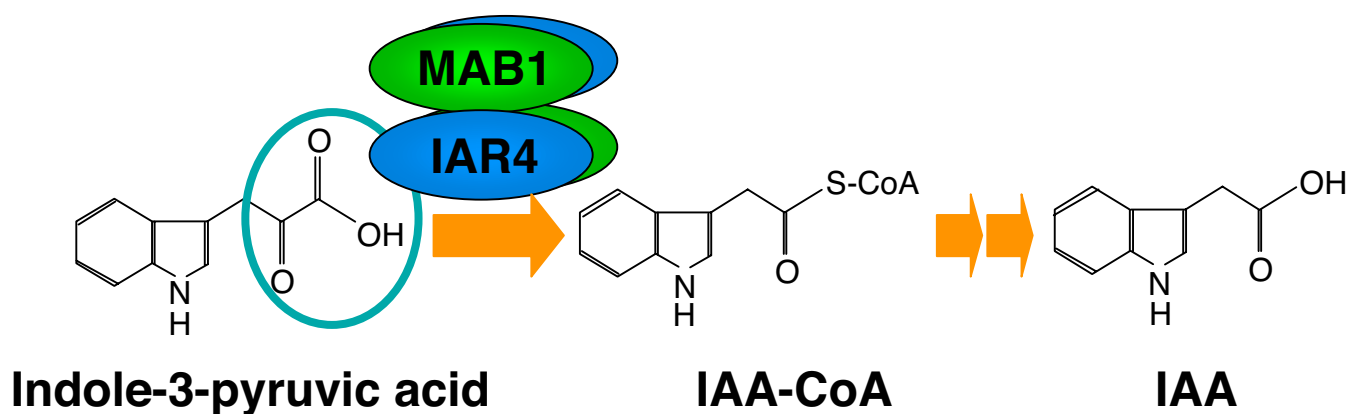


図 3. 10. 胚発生期の*MAB1*の発現パターンと*MAB1*-GFPの局在

(A-E) 球状型胚期 (A)、心臓型胚期初期 (B)、心臓型胚期中期 (C)、魚雷型胚期 (D)、成熟胚期 (E) における*MAB1*の発現。(B,C) 赤い矢印は*MAB1*の発現が強い部位を示す。(F) *MAB1*のセンスプローブを用いた場合、シグナルは検出できない。A-Fにおけるスケールバーは、50 μ m。(G,H) 35S::*MAB1*-GFPの根毛 (G) および根の表皮細胞 (H) におけるGFPシグナル。

A**B****図 3. 11. *MAB1*の機能仮説**

(A) *MAB1* (緑) と *At1g59900* (黄) がヘテロテトラマーを形成して、ピルビン酸をアセチルCoAに変換する。(B) *MAB1* (緑) と *IAR4* (青) がヘテロテトラマーを形成し、インドールピルビン酸をIAA-CoAに変換する。インドールピルビン酸の丸で囲んだ部位にヘテロテトラマーが作用する。

第 4 章

結論と考察

本研究の目的は、高等植物における茎頂分裂組織からの器官形成機構を分子レベルで解明することである。そこで、植物の生活環において最初に形成される子葉に着目して、シロイヌナズナを材料に分子遺伝学的手法を用いて解析を行った。既知の因子 *PIN1* や *PID* を用いた解析から、オーキシンを介した器官形成機構についてあらたな事実を明らかにした。また、器官形成に関わる新規因子を 3 つ単離し、その 1 つを同定した。その結果は、器官形成機構に新たな一面を提示するものであった。本章では第 1 章から第 3 章までに示した実験結果をふまえて、高等植物の器官形成機構について考察するとともに、これまでに提唱されている 3 つの器官形成説について検証を行い、新たなモデルを提唱する。

子葉形成機構

第 2 章における *pin1* および *pid* 変異体を用いた解析から、子葉形成および器官形成機構におけるオーキシンの役割について新たな知見が得られた。*PIN* が器官予定領域にオーキシンを蓄積し、器官の発達を促進していることが示唆されてきた (Benková et al., 2003) が、オーキシンの蓄積した後どのような分子機構によって器官原基が発達するかについて、ほとんど分かっていなかった。*pin1 pid* 二重変異体の芽生えは子葉を欠失したが、*pin1 pid cuc1 cuc2* 四重変異体の芽生えにおいて子葉の発達が回復した。この結果は、*PIN1* および *PID* の活性が欠損して胚頂端領域にオーキシンのピークが形成されなくても、胚頂端領域の周辺部から *CUC* の活性が失われれば、子葉の分化および発達は正常に進行することを示唆している。このことは、オーキシンの胚頂端領域において子葉の分化および発生を正に制御しているのではなく、負の因子である *CUC* の活性を抑制することで器官形成を促進することを示唆している (Furutani et al., 2004) (第 2 章：図 2.14)。つまり、胚頂端領域周辺部において、オーキシンは境界領域の分布を制御しており、子葉領域の分化および形成には直接関わってはいないと考えられる。

また、第 1 章において、オーキシン生合成の律速酵素の可能性が高い *YUCCA* が子葉境界部で発現し、その発現パターンそのものがオーキシンを介した位置情報によって制御される正のフィードバック機構が存在することが示唆された。このことも考え合わせると、次のような胚頂端領域のパターン形成モデルを提唱することができる。まず、球状型胚期において放射状パターンを示す胚頂端領域の中心部でオーキシンが生合成される。その後、

周辺領域の原表皮層の細胞において、PIN1 の細胞内局在が子葉予定領域側に移行し、その結果としてオーキシンは原表皮細胞層を介して子葉予定領域に極性輸送される (図 4.1A)。こうして子葉予定領域に蓄積したオーキシンは、子葉の発達を負に制御する因子である *CUC* を抑制する (図 4.1B)。そのことで、子葉原基が発達しうるニッチが形成され、そこで盛り上がりが生じ子葉原基へと発達していく。図 4.3C に示すように、子葉原基の発達が不十分な場合、子葉領域に対して子葉境界部つまりオーキシンの生合成領域が相対的に広くなる。そのため、子葉原基へ大量のオーキシンを供給することができる。それに伴って、子葉境界部への抑制効果は大きなものとなり子葉境界部が狭められ、子葉原基の発達が促進される (図 4.1C)。また一方で、図 4.1D に示すように、子葉原基が異常に発達した場合、子葉領域に対して子葉境界部が相対的に狭くなる。その結果、子葉原基へのオーキシン供給量が減少し、それに伴って、子葉境界部に対する抑圧効果も低下する。そして、子葉境界部が広がり、子葉原基領域が狭められる (図 4.1D)。このようなフィードバック制御機構が存在すれば、オーキシンを介した胚頂端領域のパターン形成に最終的に安定性がもたらされることが予想される。たとえ何らかの原因でオーキシンおよび子葉境界部の分布が乱れても、このフィードバック機構が乱れを補うように働き、空間的にほぼ一定のパターンを保つことが予想される。たとえば、*pin1* および *pid* 単独変異体の胚頂端領域において、オーキシンの分布が大きく乱れることが想定されるが、芽生えにおいて表現型を示さない個体が相当数存在する。このことは、オーキシン分布の乱れがフィードバック制御機構によって、ある程度補償されていることを示唆する。また、子葉境界部が乱れた場合においても、同様にフィードバック制御機構による補償作用を示唆する例がある。*CUC1* および *CUC2* は子葉境界部形成に必須な転写因子で、最近の研究によって *CUC1* および *CUC2* が microRNA による発現制御を受けることが示されている (Rhoades et al., 2002; Kasschau et al., 2003; Vazquez et al., 2004; Mallory et al., 2004; Laufs et al., 2004)。*CUC1* および *CUC2* の mRNA は、microRNA との結合を介した切断によって、負の発現制御を受ける。microRNA の結合配列にアミノ酸置換と伴わない塩基置換を行い、microRNA による発現抑制を解除した *CUC1* を植物体で発現させると、器官の境界部が拡大することが示されている (Mallory et al., 2004; Laufs et al., 2004)。その植物体の胚発生期において、同様に子葉境界部も広がっていることが期待される。実際に、芽生えにおいて子葉の発達に異常を示す個体が存在する一方、全く正常な芽生えを示す個体が存在し (Mallory et al., 2004)、フィードバック制御機構による補償作用の存在が示唆される。

本研究によって、オーキシンが子葉領域の分化および形成に関わっていな

いことが示唆された。では、一体どのようなメカニズムで、子葉領域は形成されるのであろうか。これまでに、子葉を欠失する変異体として *gurke* (*gk*) 変異体が単離されている (Torres-Ruiz et al., 1996)。また、本研究における *mab* 変異体のスクリーニングにおいても、*gk* 変異体の新しいアレルが単離された。マップベースクロニングを行い、*GK* 遺伝子を単離したところ、acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACC1*) をコードする遺伝子であった (Kajiwara et al., 2004)。*ACC1* は細胞質中で acetyl-CoA から malonyl-CoA への変換を触媒する酵素で長鎖脂肪酸の伸長に関わっていることが示されているが (Baud et al., 2003; Baud et al., 2004)、子葉形成にどのように関与しているか、いまのところ分かっていない。今後、*GK* 遺伝子の子葉形成における役割を明らかにすることで、子葉の分化機構の解明へとつながっていくであろう。また、今回単離した子葉形成に関わる *MAB* 遺伝子群のいずれかが子葉分化過程で機能している可能性もある。*MAB* を詳細に解析することで、上記の胚頂端領域のパターン形成モデルおよび子葉の分化過程を分子レベルで検証することが可能になるであろう。

現在提唱されているオーキシンを介した葉序パターンモデルの問題点と新たなモデル

オーキシンは、器官の形成促進および位置決めに非常に重要な役割をもっていることが示された。もともとオーキシンは、古典的な葉序パターンモデルにおけるシグナル分子の候補の一つと考えられてきた。近年、頂端分裂組織にパターンをもったオーキシンの分布を形成する分子メカニズムの一端が明らかにされ、このモデルがさらに強化された (Reinhardt et al., 2003)。Reinhardt らによって提唱されているオーキシンを介した葉序パターンのモデルを示す (図 4.2)。以下では、器官予定領域を順に I1、I2、I3、・・・と呼び、既に形成されている器官を若い順に P1、P2、P3、・・・と呼ぶ。

オーキシンの排出キャリアーである PIN1 は茎頂分裂組織の表層の細胞で発現し、各細胞において PIN1 は頂端側の細胞膜に局在する。オーキシンのソースは茎頂分裂組織から離れた基部側に位置し、オーキシンは PIN1 によって求頂的に輸送される。同じ細胞層において、オーキシンの流入キャリアーである AUXIN RESISTANT1 (*AUX1*) (Bennett et al., 1996) も発現して、オーキシンの輸送に補助的に働く。一方、器官原基においては、PIN1 は前形成層細胞の基部側にも局在し、器官の先端に蓄積したオーキシンの求基的に輸送される (図 4.2A：下段 P1)。そのため、発達中の器官の近傍ではオーキシンが茎頂分裂組織へ到達できない (図 4.2A)。一方、茎頂分裂組織内の周りの器官からある程度距離のある領域にはオーキシンが到達する (図 4.2A：

II)。この領域におけるオーキシンの求頂的な流れは、その領域におけるオーキシンの蓄積を誘導し、その領域において新しい器官原基の発達を促進する（図 4.2B：P1）。この一連のオーキシン分布を基にしたメカニズムは、葉序パターンを維持しながら器官原基を次々と生じる現象をうまく説明できる。

このモデルが正しいとすると、実際どのような因子が PIN の細胞内局在を制御しているのかが大きな問題となってくる。オーキシン分布が PIN の細胞内局在を制御するということも考えられるが（Reinhardt et al., 2003）、それでは葉序形成の最も初期に形成されるオーキシンの勾配を説明できない。PIN を介したオーキシンのピーク形成が植物の器官形成において重要な要素であることに間違いはないが、葉序形成を行ううえで最初のオーキシン勾配を形成するさらなる別の因子を想定する必要がある。また、上記のモデルに従えば、茎頂分裂組織の頂端領域に PIN によって求頂的に輸送されてきたオーキシンが高濃度に蓄積するはずであるが、これまでに茎頂分裂組織の頂端領域にオーキシンが蓄積するという報告はない（Benková et al., 2003）。そこで、本研究による結果を考慮し、新たなモデルを提唱する（図 4.3）。

第 1 章で示したように、胚発生期において *YUCCA* は子葉の境界部で発現し、その場でオーキシンの生合成を行っていることが示唆されている。胚頂端領域におけるオーキシン生合成部位が、そのまま茎頂分裂組織に当てはまるとしたら、器官原基の境界部でオーキシンが生合成されることが予想される。*YUCCA* のオルソログであるペチュニアの *FLOOZY* (*FZY*) の発現が花芽分裂組織において花弁原基および雄蕊原基の境界部でみられること（Tobefña-Santamaria et al., 2002）は、上記の茎頂におけるオーキシンソースに関する予想を強く支持する。また、これまでに示されている器官原基での求基的（CZ → PZ 方向）な PIN1 の局在（Reinhardt et al., 2003）、第 1、2 章で示したオーキシン合成遺伝子発現に対するフィードバック制御機構およびオーキシンによる器官境界領域の排除も考慮に入れる。

オーキシンは器官境界部で生合成され、そこから PIN を介して器官領域へと輸送される（図 4.3B：水色領域）。器官原基の周辺部で生合成されたオーキシンは、その場で蓄積することなく PIN によって器官原基へと輸送される。そのため、既に存在する器官がオーキシンを確保しようと競合し、それぞれの器官原基周辺部においてオーキシン濃度は低下する。一方、器官原基から十分離れた部位は、生合成されたオーキシンが器官に輸送されることなくその場で蓄積しやすくなる（図 4.3B：点線で囲まれた領域）。その領域に蓄積したオーキシンは、PIN の局在を制御してさらにオーキシンの蓄積を促進する（図 4.3C）。オーキシンの蓄積に伴って *CUC* の活性は排除され、器官原基

の発達が促進される（図 4.3D : I4）。また、器官境界部からのオーキシンの供給量と、器官の拡大による境界部の排除との間にあるオーキシンのフィードバック機構によって、器官原基の大きさは規定される。

この新たな葉序形成モデルにおけるオーキシン分布は、茎頂分裂組織の先端にオーキシンのピークを形成することではなく、実際のオーキシン分布を反映している（Benková et al., 2003）（図 4.3C）。しかし、いずれのモデルにおいても、オーキシンによる PIN の局在の制御を仮定しており、最初に形成される位置情報がどのように確立されるかに関して説明していない。これは、オーキシンを重要視するこれらのモデルの弱点と言えるだろう。最初の位置情報がいかにして確立されるかという問題は、第 3 章で単離した子葉形成に関わる因子 *MAB* を解析することで今後明らかにされる可能性がある。

Field theory とオーキシンを介した器官形成

オーキシンによる葉序形成モデルのほかに、field theory と呼ばれるモデルがある（Snow and Snow, 1931; Wardlaw, 1949; Steeves and Sussex, 1989）。このモデルでは、既に形成されている器官からの、器官形成の開始を阻害する拡散分子の産出を想定する。既存の器官に近接する領域は拡散性阻害因子の濃度が高いため、新たに器官は形成されない。そして、拡散性阻害因子の影響を受けないある程度距離の離れた領域に次の器官が形成され、その結果として一定の葉序を示すというモデルである（図 4.4B）。このモデルは、若い器官原基 I1 の切除により I3 の位置が切断面側に移行し葉序が乱れるという、外科手術的な実験の結果を受けて提唱されている（図 4.4A）。Reinhardt らの提唱するオーキシンを介した葉序形成モデルは、この実験結果を説明することはできない。Reinhardt らのモデルによれば、器官を誘導するオーキシンは茎頂分裂組織の基部側から求頂的に輸送されてくるため、器官原基 I1 を切除しても I3 領域への求頂的なオーキシンの輸送は正常に行われ I3 の位置が切断面側に移行することはない。では、今回新たに提唱した葉序形成モデルはどうであろうか。オーキシンシンクとしての器官原基の切除によって、切断面周辺部で合成されたオーキシンはもはや I1 へ輸送されなくなり、切断面周辺部で器官によるオーキシンの競合状態に変化がもたらされる（図 4.4C）。その結果、オーキシンのピークは、本来形成されるはずであった部位から切断面側にずれて形成される（図 4.4D）。その結果、本来の器官原基予定領域から切断面側にずれた位置に器官原基が形成され、葉序が乱れる。このように、field theory の根拠となった実験結果を、今回提唱した器官形成モデルで説明することができる。しかし、このことは field theory を否定するものではない。今回の結果をふまえて、field theory の可能性について議論

を行う。

CUC が field theory で想定されている拡散性の器官形成阻害因子に相当するかということについてまず考察する。CUC は NAC ファミリーに属する転写因子で核内に存在する。茎頂分裂組織周辺部の細胞同士は、プラスモデスマータでつながっておりタンパク質や mRNA が移動できる可能性があるが (Rinne and van der Schoot, 1998)、CUC の mRNA は器官境界部に局在しており、器官領域で誘導され拡散していることはありえない。また、心臓型胚で mRNA の存在場所と CUC2-GFP の局在が重なることから (Taoka et al., 2004)、CUC タンパク質も細胞間を拡散する可能性は低い。これらの点から、CUC そのものが拡散性阻害因子である可能性は考えにくい。

もっとも、器官境界部での CUC の発現を誘導する拡散性阻害因子が存在することも考えられる。この場合、器官とその周辺部に存在する阻害因子によって CUC は誘導される。一方、第 2 章で示したように器官領域において CUC はオーキシンを介した抑制制御も受けており、両方の制御の結果として器官の境界部だけで CUC の発現が誘導されることが考えられる。このことを踏まえると、拡散性の阻害因子だけでなく、器官領域にオーキシンの蓄積を促進し CUC の発現を抑制する器官促進因子を想定する必要がある。

実際、そのような器官促進因子と拡散性阻害因子の両方を想定した反応拡散モデルと呼ばれるモデルが提唱されている (Meinhardt, 2003)。このモデルでは、自己触媒的に合成される拡散速度の遅い促進因子と、促進因子に正に制御され促進因子を阻害する拡散性の阻害因子を想定することで、自律的に葉序パターンが構築される。この反応拡散モデルは、最初の位置情報を必要せずに、促進因子と阻害因子の相互作用およびそれらの拡散速度の差によって、最終的なパターンを自律的に形成する。促進因子は時空間的に距離を開けてピークを形成し、阻害因子はその促進因子のピークを取り囲むような濃度勾配を形成する。このモデルにおいて、促進因子より阻害因子が優勢であるような領域において、CUC が誘導され器官境界部を形成し、逆に阻害因子より促進因子のほうが優勢であるような領域では、CUC の発現が抑制され器官形成が促されると考えられる。この反応拡散モデルは葉序パターンをうまく説明できるが、唯一にして最大の問題は、それらの因子がまだひとつも単離、同定されていないことにある。

拡散性阻害因子をコードする遺伝子に変異が入った場合を想定してみよう。この場合、胚頂端領域および茎頂分裂組織の周辺部において器官形成を阻害することができなくなり、芽生えにおいて子葉が、そして茎頂分裂組織から発生する器官同士が融合することが予想される。そのような表現型を示す、これまでに単離されている突然変異体は、ペチュニアの *no apical*

*meristem (nam)*変異体 (Souer et al., 1996)、シロイヌナズナの *cuc1 cuc2 cuc3* 変異体 (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003)、キンギョソウの *cupliformis (cup)*変異体 (Weir et al., 2004) など、いずれも NAC ファミリーに属するメンバーの機能欠損変異体であった。そのほかに、シロイヌナズナにおいて *pin1* および *gnom* 変異体などオーキシン極性輸送に欠損を示す変異体も同じ表現型を示した (Okada et al., 1991; Mayer et al., 1993)。しかし、これらの遺伝子の発現パターン、タンパク質の局在および機能を考えると、いずれの因子も拡散性阻害因子およびそれに関与する因子である可能性は極めて低い。これらの点から、拡散性阻害因子として機能をもっているタンパク質およびその周辺で機能するタンパク質をコードする遺伝子に変異が入っている変異体は、今のところ単離されていないと考えられる。その原因として、

- 1) そもそも拡散性阻害因子が存在しない、
- 2) そういった変異体は胚致死を示すために、これまでの芽生えを対象にしたスクリーニングでは単離されない、
- 3) 機能重複性がある一つが機能を欠損しても他の因子が相補するなどの要因が考えられる。今後の解析によって、拡散性阻害因子が同定され、field theory および反応拡散モデルが実証されるかもしれない。

力学的観点からの葉序形成モデルとオーキシンを介した器官形成

トマトの茎頂分裂組織の I1 領域において、細胞壁の伸展に関わる *expansin* をコードする遺伝子の一つの発現が上昇することが示され、器官原基が発達する際に細胞壁の伸展性の増大が関わっていることが示唆された (Reinhardt et al., 1998)。また、I2 領域において *expansin* を外から投与すると (図 4.5A)、I2 から器官らしき隆起が形成され (図 4.5B)、葉序パターンが投与前のものと逆向きになる (図 4.5C)。この結果を受け、茎頂分裂組織において力学的な変化が器官形成を促進するというモデルが提唱されている (Fleming et al., 1997)。本研究による結果から、このモデルの検証を行う。

たしかに *expansin* の投与によって器官形成は促進されるが、投与した I2 領域は将来の器官予定領域であり、既にそこに位置情報が存在する可能性が高い。茎頂分裂組織の発生に多面的に関与する *PINHEAD/ZWILLE (PNH)* 遺伝子は、茎頂分裂組織を含む器官領域の向軸側で発現する遺伝子であり、I2 領域において局所的な発現を示す (Lynn et al., 1999)。このことは、茎頂分裂組織にすでに I2 領域としての位置情報が存在することを示唆する。つまり、*expansin* は位置情報そのものに関与するのではなく、位置情報が確立された後の器官の発達を促進すると考えられる。I2 領域に *expansin* を投

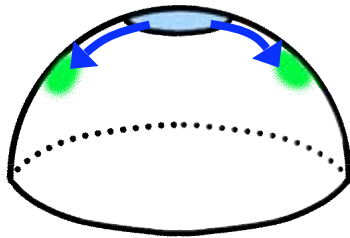
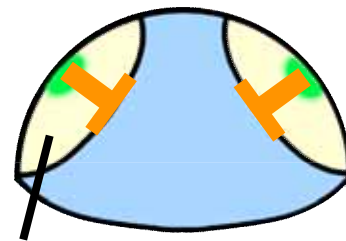
与した例では、そこでの器官発達が早まったと考えられる。なぜ葉序パターンが逆になったかということについては、次のような解釈ができる。I2での器官の発達が早まったことで、I2のオーキシシンシンクとしての容量が大きくなるとともに、器官の境界部つまりオーキシシン生合成領域が減少する（図4.5D,E）。その結果、オーキシシンのピークの位置が逆側に移行し、その部位で器官原基の発達を促し、葉序パターンが逆になったと考えられる（図4.5E）。また、今回提唱した器官形成モデルにおいて、**expansin**は、器官予定領域にオーキシシンが蓄積し *CUC* の活性が除かれた後の、器官原基の発達する際の細胞伸長に関わっていることが示唆される。この場合、**expansin**はオーキシシンによって器官領域に誘導されることが考えられる。

Expansin 投与による I2 の器官発達の早まりが葉序パターンに及ぼす影響について、PIN の細胞内局在、オーキシシンの分布、およびマーカー遺伝子の発現解析等を詳細に調べることにより、器官形成における **expansin** の役割が明らかになるだろう。

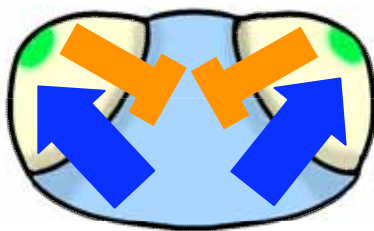
おわりに

茎頂分裂組織からの器官形成およびそのパターン形成の問題は、古くから実験生物学者、分類生物学者および理論生物学者などの興味を引き、かなりの研究結果が蓄積している。近年、器官形成過程におけるオーキシシンとその輸送の役割についての研究が盛んに行われている。しかし、オーキシシンの輸送を制御する分子機構やオーキシシンの下流でどのような分子機構が働いているのか、さらにはオーキシシンの出発点であるその生合成についても全くといっていいほど分かっていない。本研究は、器官形成過程におけるオーキシシンの役割を分子レベルで解明することを目的に、高等植物の生活環において最初に形成される子葉に着目して行われた。その結果、オーキシシンの生合成経路および器官形成過程においてオーキシシンの下流で何が起こっているかについて、新たな知見を得ることができた。特に、第1章においては *YUCCA* が子葉境界部で発現することを示し、これまで提唱されていた子葉形成時のオーキシシンの合成部位に対して明確な証拠を示した。また、第2章においては、オーキシシンの下流に *CUC* の制御機構が存在することを示し、器官形成におけるオーキシシンの役割を示すことができた。これらの結果を基に、第4章においてこれまで提唱されている葉序パターンモデルについて検証し、さらに新しいモデルを提唱した。しかしながら、本研究によって器官形成過程における分子機構が完全に解明されたわけではない。本研究の第3章において、器官形成に関わる新規因子 *MAB* を *pid* エンハンサー変異体の原因遺伝子として単離したことで、近い将来これらの因子の解析から器官形成機構に

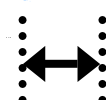
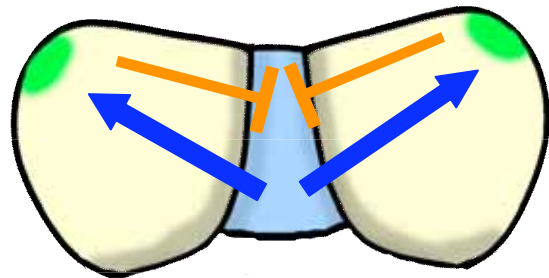
ついでに新たな知見が得られることが期待できる。また、今回提唱したモデルが、実際に植物体で行われている器官形成を完全に説明しうるものなのかは今のところ判断しがたい。近年、コンピューターを用いたシミュレーション技術が発展を遂げている。その技術を用いコンピューター上で、今回提唱したモデルおよびこれまでに提唱されていたモデルを再現し、新たに実験等によって得られる結果と照らし合わせることで、モデルの検証を行えるであろう。今後、こういった数理的観点から生物を見直すという立場も、生物を理解するうえで重要になってくると思われる。

A**B**

子葉原基

C

子葉境界部

D

子葉境界部

図 4. 1. オーキシンを介した子葉形成モデル

(A-E) 胚頂端領域の模式図。(A) 胚頂端領域の中心部（水色）で生合成されたオーキシンは子葉予定領域に輸送され（青い矢印）、蓄積する（黄緑色）。(B) 子葉予定領域に蓄積したオーキシンは子葉境界部を抑制し（オレンジのT字印）、その領域に子葉原基の発達を促す（クリーム色）。その一方で、子葉境界部でオーキシシンが生合成され子葉原基へと輸送される（青い矢印）。子葉が未発達な場合（C）および子葉が異常に発達した場合（D）の胚頂端領域。それぞれの場合の説明は本文を参照。矢印の太さは、それぞれの効果の強さを示す。

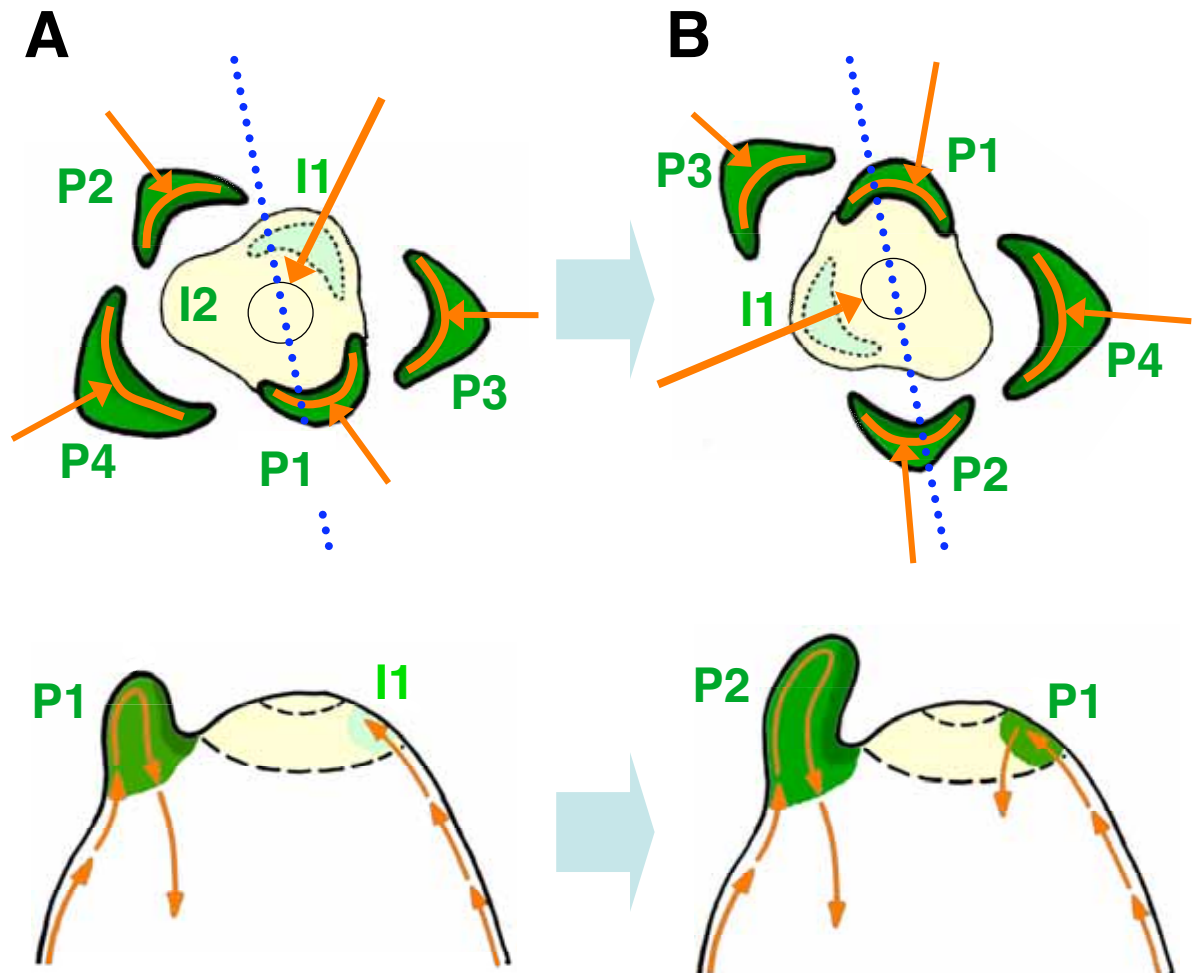


図 4. 2. Reinhardtらによるオーキシンを介した葉序形成モデル

(上段) 上から見た茎頂の模式図。発達中の器官原基を若い順に、P1、P2、P3・・・とし、これから発達してくる器官原基を順にI1、I2・・・とした。(下段) 上段青色の破線における切断面の模式図。オーキシンは求頂的に輸送される(オレンジの矢印)。器官原基(緑色)の先端に蓄積したオーキシンは、前形成層を介して求基的に輸送され(オレンジの弧)、茎頂分裂組織へ到達できない。一方、器官原基に囲まれていないI1領域(黄緑色)にはオーキシンが到達し、器官の形成を促す。

(B) AにおけるI1がP1に発達した際の茎頂の模式図。I1から成長したP1で、求基的な輸送が始まる。

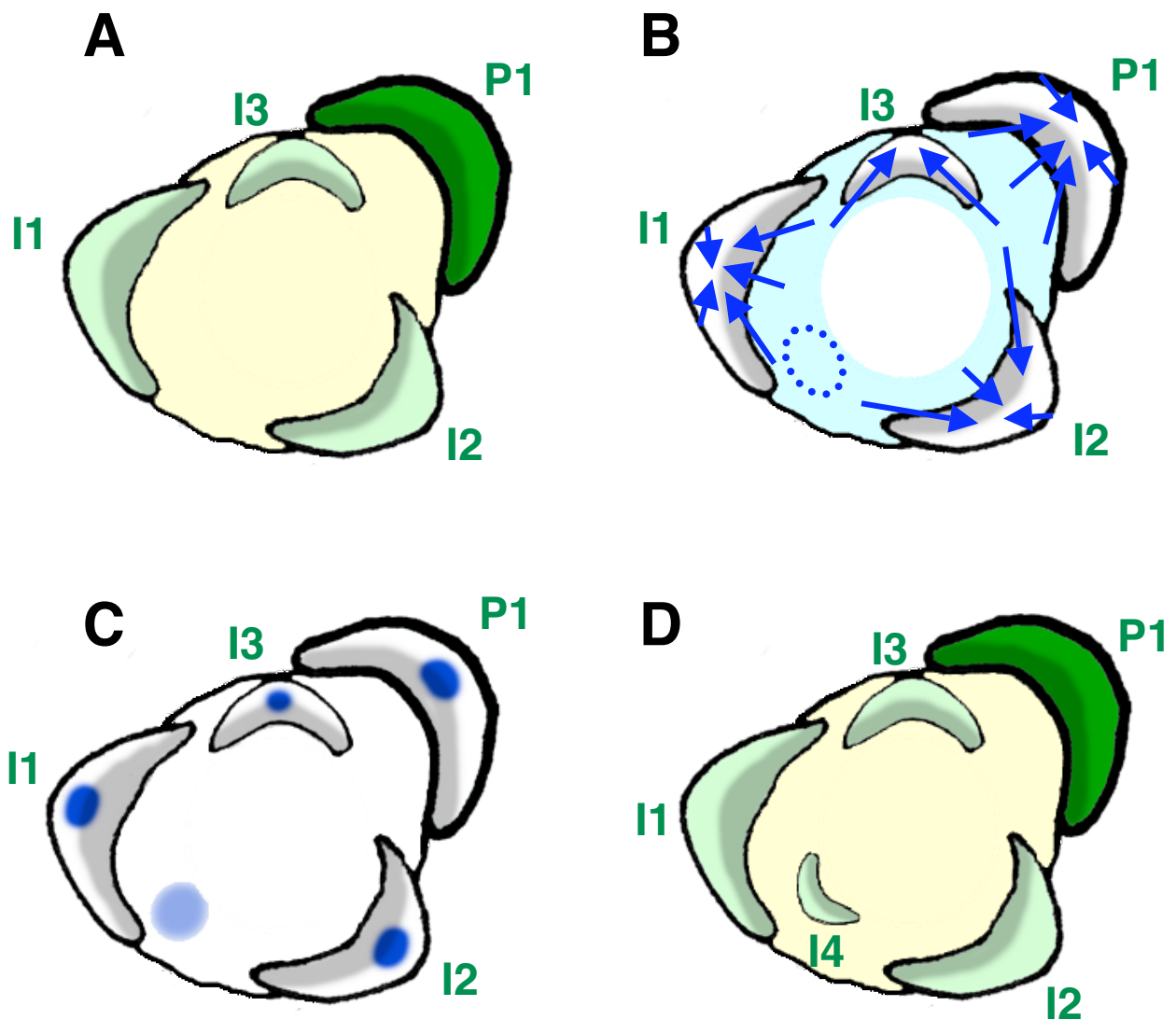


図 4. 3. オーキシンを介した葉序形成の新たなモデル

(A-D) 上から見た茎頂の模式図。(A,D) 茎頂分裂組織はクリーム色で、器官原基は緑色で示す。(B) オーキシン生合成部位を水色で、オーキシンの流れを青色の矢印で示す。(C) 青色はオーキシンの蓄積を示す。Bにおいて青色の破線で囲まれた領域で生合成されたオーキシンは、周囲の器官原基へ輸送されることなく蓄積する。(D) 蓄積したオーキシンが器官原基I4を誘導する。

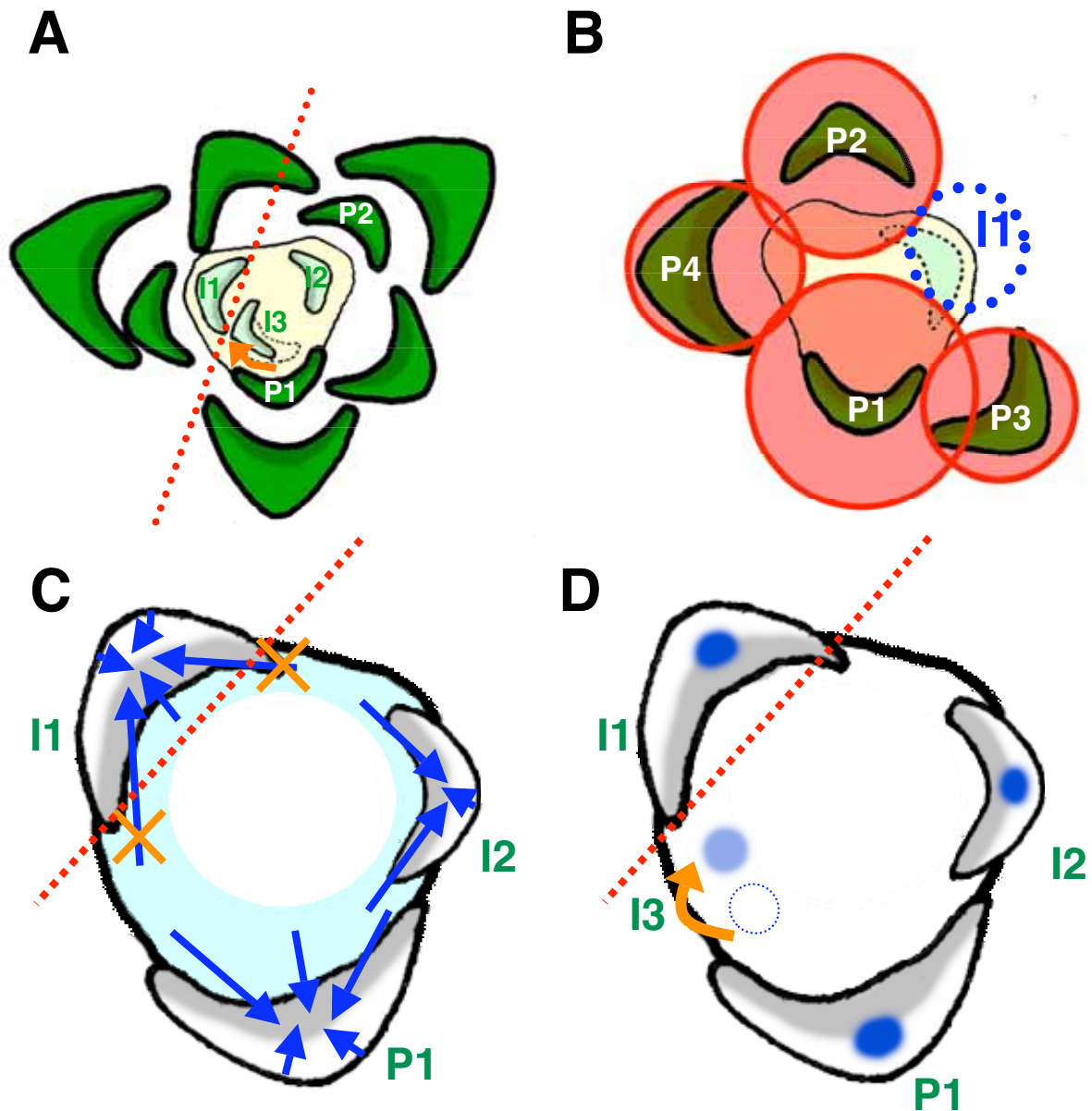


図 4. 4. Field theory

(A-D) 上から見た茎頂の模式図。緑色は器官原基を示す。クリーム色の領域は茎頂分裂組織を示す。(A) 切除によってI1を孤立させると、I3の位置が切除面に向かって移行する。(B) field theoryの模式図。それぞれの器官原基から器官形成を阻害する因子が拡散によって周辺部へと移行する(赤い領域)。その拡散因子の影響の少ない領域(青い破線で囲んだ領域)に次の器官原基が形成される。

(C,D) I1の切除によるオーキシンの流れ(C)および蓄積(D)の変化の模式図。赤い破線は切断面を、青い矢印はオーキシンの流れを、水色の領域はオーキシン生合成部位(C)を、青い領域はオーキシンの蓄積(D)を、オレンジのバツ印は阻害されたオーキシンの流れを、オレンジの矢印はオーキシン蓄積部位の移行を示す。

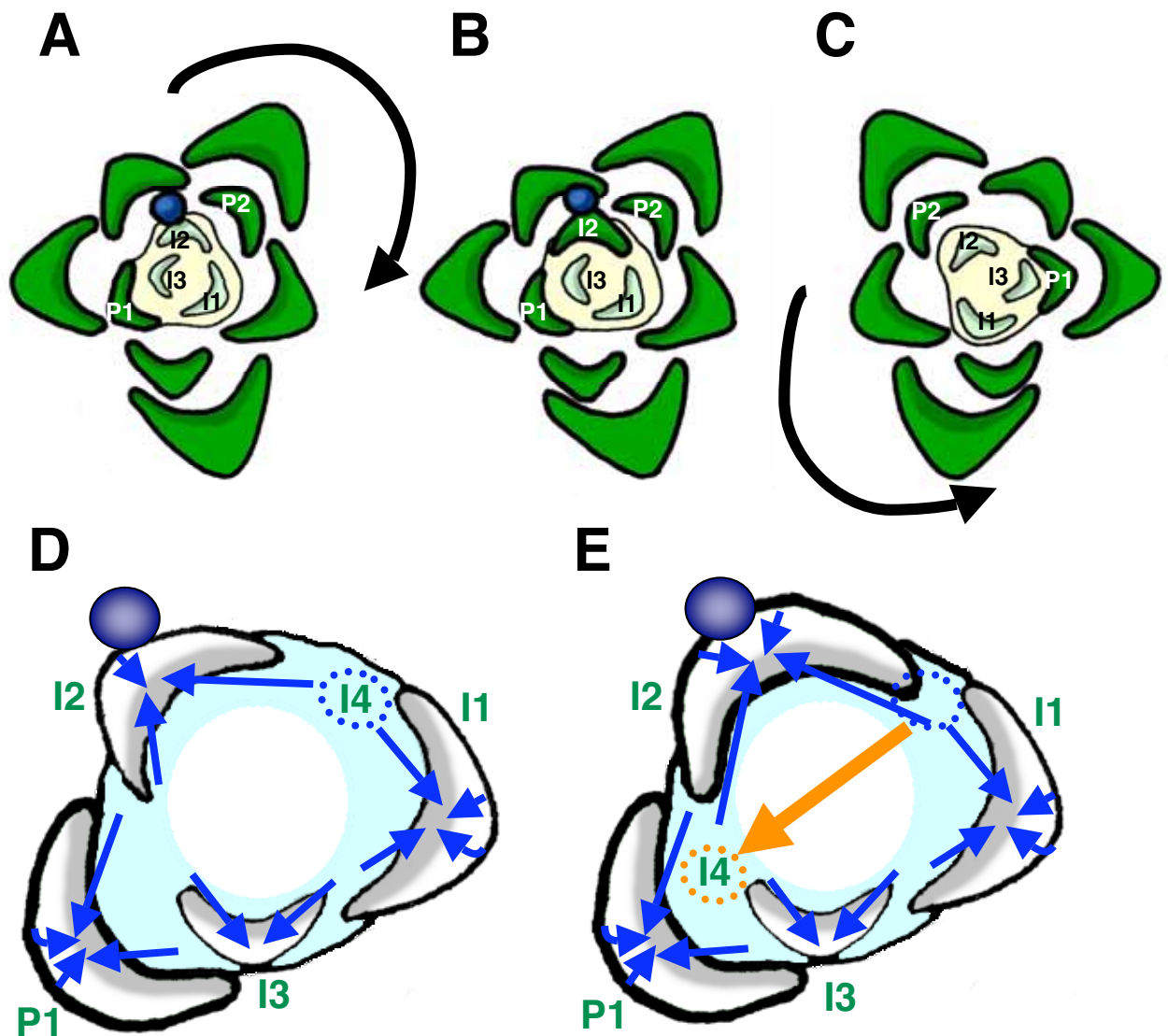


図 4.5. 力学的観点からの葉序モデル

(A-E) 上から見た茎頂の模式図。(A) expansinをまぶしたビーズ（青い丸）をI2領域に置く。(B) expansinが投与されたI2は、I1よりも先に器官原基へと発達する。(C) その後の葉序パターンが逆になる。(D,E) 茎頂におけるオーキシンの生合成部位（水色の領域）とその流れ（青い矢印）の模式図。(D) expansinを投与した直後の茎頂。(E) expansinを投与し、I2が発達した後の茎頂。I2の発達に伴って、オーキシンの流れの空白領域（オレンジの破線で囲んだ領域）が、それまでの場所（青い破線で囲んだ領域）から移行する（オレンジの矢印）。

参考文献

- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and 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., Ishida, T. 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., Vernoux, T., 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.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y-S., Amasino, R. and Scheres, B.** (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**, 109-120.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Bak, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A., Galbraith, D. W. and Feyereisen, R.** (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 101-111.
- Bartel, B. and Fink, G. R.** (1994). Differential regulation of an auxin producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**, 6649-6653.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithöfer, A. and Weiler, E. W.** (1992). Cloning and expression of an *Atabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem*. **205**, 417-424.
- Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R. C. and Weiler, E. W.** (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilase from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**,

6021-6025.

Barton, M. K. and Poethig, R. S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**, 823-831.

Baud, S., Guyon, V., Kronenberger, J., Wullemme, S., Miquel, M., Caboche, M., Lepiniec, L. and Rochat, C. (2003). Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 75-86.

Baud, S., Bellec, Y., Miquel, M., Bellini, C., Caboche, M., Lepiniec, L., Faure, J. D. and Rochat, C. (2004). *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO Rep.* **5**, 515-520.

Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. and Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**, 4057-4067.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.

Bennett, S. R. M., Alvarez, J., Bossinger, G. and Smyth, D. R. (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**, 505-520.

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. and Jürgens, G. (1993). The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**, 575-587.

Bower, P. J., Brown, H. M. and Purves, W. K. (1978). Cucumber seedling indoleacetaldehyde oxidase. *Plant Physiol.* **61**, 107-110.

Bowman, J. L. and Eshed, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci.* **5**, 110-115.

Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M. and St-Pierre, B. (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and *geraniol 10-hydroxylase* in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J.* **38**, 131-141.

Carles, C. C., and Fletcher, J. C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* **8**, 394-401.

Celenza, J. L., Quiel, J. A., Smolen, G. A., Merrikkh, H., Silvestro, A. R., Normanly, J. and Bender, J. (2005). The Arabidopsis ATR1 Myb Transcription Factor Controls Indolic Glucosinolate Homeostasis. *Plant Physiol.* **137**, 253-62.

Christensen, S. K., Dagenais, N., Chory, J. and Weigel, D. (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase *PINOID*. *Cell* **100**, 469-478.

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.

Cooney, T. P. and Nonhebel, H. M. (1991). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and incorporation of ^2H from $^2\text{H}_2\text{O}$ into indole-3-acetic acid, D- and L- tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* **184**, 368-376.

Daimon, Y., Takabe, K. and Tasaka, M. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes promote adventitious shoot formation on calli. *Plant Cell Physiol.* **44**, 113-121.

Delarue, M., Prinsen, E., Van Onckelen, H., Caboche, M. and Bellini, C. (1998). *Sur2* mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J.* **14**, 603-611.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and Heijne, G. (2000). Predicting

subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* **300**, 1005-1016.

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 meristem and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* **10**, 967-979.

Fleming, A. J., McQueen-Mason, S., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. (1997). Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* **276**, 1415-1418.

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G. and Palme, K. (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 661-673.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jürgens, 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.

Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1996). Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 933-943.

Furutani, M., Aida, M. and Tasaka, M. (2003). Pattern Formation during Dicotyledonous Plant Embryogenesis. In *Morphogenesis and Pattern Formation in Biological Systems* (ed. T. Sekimura, S. Noji and P. K. Maini), pp. 139-152. Springer-Verlag Tokyo.

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

- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. and Palme, K.** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**, 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jürgens, G.** (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Glawischnig, E., Hansen, B. G., Olsen, C.E. and Halkier, B. A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**, 8245-8250.
- Hadfi, K., Speth, V. and Neuhaus, G.** (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* **125**, 879-887.
- 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.
- Hull, A. K., Vij, R. and Celenza, J. L.** (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**, 2379-2384.
- Jürgens, G.** (2001). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J.* **20**, 3609-3616.
- Jürgens, G. and Mayer, U.** (1994). *Arabidopsis*. In *Embryos: Colour Atlas of Development* (ed. J. Bard), pp. 7-21. London: Wolfe.
- Kajiwarra, 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.

Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. and Carrington, J. C. (2003). PI/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**, 205-217.

Koga, J. (1995). Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochem Biophys Acta.* **1249**, 1-13.

Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H. and Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristem. *Development* **131**, 4311-4322.

LeClere, S., Rampey, R. A. and Bartel, B. (2004). *IAR4*, a gene required for Auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*, encodes apyruvate dehydrogenase E1 α Homolog. *Plant Physiol.* **135**, 989-999.

Liu, C., Xu, Z. and Chua, N.-H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* **5**, 621-630.

Ljung, K., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**, 465-474.

Long, J. A. and Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-3035.

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.

Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P. and Barton, M. K. (1999). The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**, 469-481.

Mallory, A. C., Dugas, D. V., Bartel, D. P. and Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* **14**, 1035-1046.

Mayer, U., Büttner, G. and Jürgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* **117**, 149-162.

McCormack, J. K., Longo, E. A., and Corkey, B. E. (1990). Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochem. J.* **267**, 527-530.

Meinhardt, H. (2003). Complex pattern formation by a self-destabilization of established patterns: chemotactic orientation and phyllotaxis as examples. *C R Biol.* **326**, 223-237.

Mikkelsen, M. D., Hansen, C. H., Wittstock, U. and Halkier, B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem.* **275**, 33712-33717.

Mikkelsen, M. D., Naur, P. and Halkier, B. A. (2004). *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J.* **37**, 770-777.

Normanly, J., Slovin, J. P. and Cohen, J. D. (1995). Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* **107**, 323-329.

Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.

Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C. and Fleming, A. (2001). Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 11812-11817

Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. (1998). Localized

upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* **10**, 1427-1437.

Reinhardt, D., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-518.

Reinhardt, D., Pesce, E., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-260.

Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L.P., Burge, C. B., Bartel, B. and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520.

Ribnicky, D. M., Cohen, J. D., Hu, W-S. and Cooke, T. J. (2002). An auxin surge following fertilization in carrot: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* **214**, 505-509.

Rinne, P. L. H. and van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-1485.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. and Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463-472.

Sauer, M. and Friml, J. (2004). In vitro culture of *Arabidopsis* embryos within their ovules. *Plant J.* **40**, 835-843.

Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E. H. and Okada, K. (1999). *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev.* **13**, 1079-1088.

Sekimoto, H., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (1997). Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidases. *J Biol Chem.* **272**, 15280-15285.

Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M. and Koshiba, T. (1998). Higher activity of an aldehyde oxidases in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**, 687-693.

Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. and Bowman, J. L. (1999). Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**, 4117-4128.

Slovin, J. P., Bandurski, R. S. and Cohen, J. D. (1999). Auxin. In: *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier: Amsterdam. pp.115-140.

Snow, M. and Snow, R. (1931). Experiments on phyllotaxis. I. The effect of isolating a primordium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* **221**, 1-43.

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. and Koes, R. (1996). The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at the meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-170.

Steeves, T. A. and Sussex, I. M. (1989). Organogenesis in the shoot: leaf origin and position. In: *Patterns in Plant Development*, 2nd edn, pp.100-123. Cambridge University Press, Cambridge.

Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C., L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. and Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**, 316-318.

St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A. and De Luca, V. (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* **11**, 887-900.

Szurmak, B., Strokovskaya, L., Mooney, B. P., Randall, D. D. and Miernyk, J.A. (2003). Expression and assembly of *Arabidopsis thaliana* pyruvate dehydrogenase in insect cell cytoplasm. *Protein Expr Purif.* **28**, 357-361.

Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. and Tasaka, M. (2001). The *CUP-SHAPED*

COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-1135.

Taoka, K., Yanagimoto, Y., Daimon, Y., Hibara, K., Aida, M. and Tasaka, M. (2004). The NAC domain mediates functional specificity of CUP-SHAPED COTYLEDON proteins. *Plant J.* **40**, 462-473.

Tobeña-Santamaria, R., Bliet, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J. N., Souer, E. and Koes, R. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes. Dev.* **16**, 753-63.

Torres-Ruiz, R. A., Lohner, A. and Jürgens, G. (1996). The *GURKE* gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J.* **10**, 1005-1016.

Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1997a). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.

Vazquez, F., Gascioli, V., Crete, P. and Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr. Biol.* **14**, 346-351.

Vernoux, T., Autran, D. and Traas, J. (2000). Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Mol Biol.* **43**, 569-581.

Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P. and Traas, J. (2000). *PIN-FORMED 1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* **127**, 5157-5165.

Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E. W. and Pitrowski, M. (2001). Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the *NIT1/NIT2/NIT3*-gene cluster. *Planta* **212**,

508-516.

Vroemen, C. W., Mordhorst, A. P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M. A. and de Vries, S. C. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.

Wardlaw, C. W. (1949). Experiments on organogenesis in ferns. *Growth* **13** (Suppl.), 93-131.

Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z. and Davies, B. (2004). *CUPLIFORMIS* establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* **129**, 5409-5419.

Winter, A. (1966). A hypothetical route for the biogenesis of IAA. *Planta* **71**, 229-239.

Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. and Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**, 306-309.

Zhao, Y., Hull, K. A., Gupta, R. N., Goss, A. K., Alonso, J., Ecker, R. J., Normanly, J., Chory, J. and Celenza, L. J. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* **16**, 3100-3112.

謝辞

本研究は、奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科形質発現植物学講座の田坂昌生教授の御指導のもと、平成 12 年 6 月から平成 17 年 1 月までの約 5 年間にわたって行われました。本研究を行うにあたり、終始変わらぬ熱心なご指導と暖かい御批判を賜りました田坂昌生教授に心から感謝申し上げます。また、常に数多くの有益な御助言、御批判を賜りました相田光宏助手に深く感謝申し上げます。

平成 14 年 4 月より日本学術振興会特別研究員に採用され、研究奨励金を御支給いただいた日本学術振興会に深く感謝申し上げます。また、同特別研究員に対する科学研究費補助金（特別研究員奨励費）を御支給いただいた文部科学省に深く感謝申し上げます。

本論文第 2 章の *pin1-201* 変異体の単離および第 3 章の *mab4* 変異体のスクリーニングにご協力いただいた奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の加藤壮英助手に深く感謝申し上げます。また、第 3 章の *mab1* および *mab3-1/pin1-202* 変異体のスクリーニングにご協力いただいた当講座助手の深城英弘助手に深く感謝申し上げます。また、第 2 章の *PIN1* と *PID* の解析において、数多くの有益な御助言、御批判をいただいた Dr. Teva Vernoux と Dr. Jan Traas (Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA) に深く感謝申し上げます。

そして、いろいろとお世話になりましたバイオサイエンス研究科の教官、職員の皆様、そして当講座の教官、技官、院生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に本研究を行うにあたり、常に私を励まし支えてくれた私の家族に感謝いたします。