

分裂組織形成に關与する
シロイヌナズナ CUC 遺伝子の分子遺伝学的解析

桧原 健一郎
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 16 年 1 月 8 日提出

目次

	ページ
序論	3
第一章;CUC1 過剰発現体を用いた異所的不定芽形成機構の解析	
要約	10
結果	12
考察	20
第二章;茎頂分裂組織形成、器官境界部形成に關与する新規変異体 の単離と同定	
要約	24
結果	25
考察	37
材料と方法	41
謝辞	47
参考文献	48
図表	55

序論

高等植物は動物と異なり、一生を通じて新しい器官を作り続ける(Steeves & Sussex 1989、図1)。植物は発芽後に芽生えの頂端部にある茎頂分裂組織(Shoot Apical Meristem (SAM))と呼ばれる組織から地上部のすべての器官を新たに発生させる。SAMは胚発生過程で生じる。また、SAMから形成される葉や花は、空間的・時間的に決められた位置に器官原基ができ、その原基が成長することでそれぞれの器官が形成される。繰り返し作られる原基の形成順序や配置パターンは植物種によって決まっており、これは葉序と呼ばれる。また多くの植物は、葉の基部に新しいシュートである側枝を形成する。この側枝をつくる腋生分裂組織は、葉と茎の接点上部に形成される。そして、主軸とは異なる方向に新しい軸を形成し、その側方に新しい器官を生み出すことで種に特有の形態を付与する。このように植物の発生過程において分裂組織が形成されるいくつかの過程が存在する。

SAMの構築

SAMは大きく中央部と周縁部と髄状部の3つの領域に分けられる(図1)。中央部は細胞分裂速度が遅く、周辺部に比べて液胞の多い細胞で構成される(原襄, 1994)。中央部において細胞が緩やかな細胞分裂を行うと、その過程で形成された娘細胞の一部は、次々と生じる新しい娘細胞によってしだいに周縁部や髄状部に追いやられる。この周縁部に移った細胞は比較的早い細胞分裂を行う。さらにその細胞集団の一部が分化のシグナルをうけて、葉や花の原基へと分化していく。この原基となる領域では細胞増殖が活発に起こり、SAMから独立してドーム状の原基の細胞集団が盛り上がる。栄養成長期に作られた一つの原基は基本的に一枚の葉に発生していく。一方、髄状部の細胞は分化して茎の内部組織を形成する。そして、SAMの中央部の細胞は自分自身を未分化な状態に保ちながら分裂を続け、新しい器官・組織を構成する細胞を供給し続ける。そのため、この領域の細胞は幹細胞とみなされる。

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のような双子葉植物の場合、SAMは胚発生過程において2枚の子葉原基の間に形成される(図1)。近年、モデル植物を用いた分子遺伝学的解析からSAMの形成や維持に関わる遺伝子が多く同定され、それらの間の相互関係もわかりつつある。シロイヌナズナでは、SAMの形成・維持に異常を示す変異体として*stm*(*shoot meristemless*)変異体(図2C)、*cup*(*cup-shaped cotyledon*)変異体(図2B)、*clv*(*clavata*)変異体、*wus*(*wuschel*)変異体などが単離されている(Barton & Poethig, 1993、Aida et al., 1997、Clark et al., 1993、Liljegen & Yanofsky, 1996、Laux et al., 1996)。

*stm*の強いアレルでは胚発生過程において全くSAMが形成されず、2枚の子葉が基部で融合してしまう(図2C)。そして、SAMを欠くために、発芽後はほとんど器官を形成せずに枯死してしまう(Barton & Poethig, 1993)。STMはclass KNOX(KN1-type homeo box)タンパク質をコードしており、胚発生において将来SAMを作る細胞(予

定 SAM 領域)で発現し、また発芽後も SAM で発現し続ける (Long et al., 1996、Long & Barton, 1998、2000)。シロイヌナズナでは STM の他に 3 つの class KNOX 遺伝子 (KNAT1、KNAT2、KNAT6) が逆遺伝学的手法によって単離されている (Lincoln et al., 1994、Semiarti et al., 2001)。そのうち、KNAT1 は花柄が短く、また鞘が下に向く bp (*brevipedicellus*) 変異体の原因遺伝子であった (Douglas et al., 2002、Venglat et al., 2002; 以後 BP と称する)。これらの遺伝子は SAM 中央部の未分化な細胞領域で発現し、SAM 周縁部の器官原基では発現が抑制される (Lincoln et al., 1994、Dockx et al., 1995、Laufs et al., 1998)。したがって、class KNOX 遺伝子は SAM 中央部における未分化な細胞の維持と周縁部における器官形成に伴う細胞の分化という 2 つの相反する事象の間のバランスを調節している遺伝子と考えられる (Reiser, 2000)。

トウモロコシの KN1 やシロイヌナズナの BP、そしてタバコの NTH15、NTH20 などをタバコやシロイヌナズナで過剰発現させると、本葉や茎生葉に深い切れ込みが生じ、その切れ込み付近から異所的な SAM が形成された (Sinha et al., 1993、Chuck et al., 1996、Nishimura et al., 2000)。一方、STM を過剰発現させた形質転換体では、BP の場合と異なり、極度の矮化と無秩序な不定芽の形成がみられた (Williams, 1998)。このことから class KNOX 遺伝子は様々な種において SAM の形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。もっとも STM と BP では、発現時期や SAM における発現パターン、そして過剰発現体の表現型に違いがみられることから、同じクラスの KNOX 遺伝子間においてもその機能には多様性があると考えられる。

STM や BP などのホメオボックス遺伝子は、多くの因子によって発現が調節されている。STM 以外の class KNOX 遺伝子の発現を負に制御する遺伝子として AS1 (*ASYMMETRIC LEAVES1*) と AS2 が知られている。これらの遺伝子の変異体では鋸歯化した本葉が生じ、葉の左右対称性が失われる。また、葉の向背軸にも異常を示す。これらの変異体の葉では BP、KNAT2、KNAT6 が異所的に発現している (Byrne et al., 2000、Ori et al., 2000、Semiarti et al., 2001、Xu et al., 2003)。また、キンギョソウの PHANTASTICA やトウモロコシの ROUGH SHEATH2 も、それぞれの種における KNOX 遺伝子の発現を負に制御している (Schneeberger et al., 1998、Timmermans et al., 1999)。

これらの遺伝子を単離してみると AS1、PHAN、RS2 は全て MYB ドメインを持つ相同なタンパク質をコードし、子葉や本葉といったほとんど全ての側生器官で発現していた (Waites et al., 1998、Timmermans et al., 1999、Tsiantis et al., 1999、Byrne et al., 2000)。また、AS2 は植物特有のタンパク質をコードしている。このタンパク質は核に局在するが、その機能はまだわかっていない。AS2 は、胚発生過程において子葉原基の向軸側 1-2 細胞層で発現が観察される (Iwakawa et al., 2002)。さらに AS1 と AS2 は *in vitro* でタンパク質間相互作用を示す (Xu et al., 2003)。これらのことから、これら二つの遺伝子は側生器官で協調して機能し、SAM 以外の器官で KNOX 遺伝子が発現することを抑制していると考えられる。

また、STM と AS1 との関係について解析された結果、*stm* 変異体において AS1 は SAM

にまで発現が広がっていた。これらの結果から、STM は SAM において AS1 の発現を負に制御していることが推測される。そして *stm as1* 二重変異体では *stm* の胚発生や栄養成長期での表現型が抑制された (Byrne et al., 2000)。この結果は、AS1 の欠損により胚発生過程の SAM には発現していない BP がこの時期に SAM 付近で発現できるようになり、STM の機能を代替した可能性が考えられる。それを支持する結果として *stm as1 bp* 三重変異体では、*stm* 変異体と同様に SAM が欠失する (Byrne et al., 2002)。このことから、SAM の形成・維持には STM が必須であるが、AS1 と STM が欠損していると STM の欠損を補う SAM 形成・維持のメカニズムが機能することが示唆される。

cuc 変異体の芽生え (図 2 B) は、2 枚の子葉が両方の縁で融合して 1 つのカップ状の子葉を形成し、SAM を欠失する。そのため、シュートを形成できずにそのまま枯死してしまう (Aida et al., 1997)。この変異体は CUC1 と CUC2 の二つの遺伝子の二重変異によって生じており、それぞれの遺伝子の単独変異体ではごく低頻度で子葉の片側が融合するといった極めて弱い異常しか示さない。CUC1 及び CUC2 はペチュニアの NAM (NO APICAL MERISTEM) 遺伝子と相同性が高く、ORF の 5' 末端側に高度に保存された領域 (NAC box: NAM・ATAF・CUC2) をコードしていた (Souer et al., 1996、Aida et al., 1997、Takada et al., 2001)。

NAC box をもつ遺伝子群 (NAC 遺伝子ファミリー) はシロイヌナズナにおいて大きな遺伝子ファミリーを形成している (Richmann et al., 2000)。また、多くの高等植物で NAC 遺伝子について報告されている。その中には、老化によって発現が上昇するトマトの LeSENU5 や、師管を移動し茎頂に蓄積する RNA として単離されたカボチャの CmNACP などが含まれる (John et al., 1997、Ruiz-Medrano et al., 1999)。シロイヌナズナでは CUC1 や CUC2 の他に、花卉や雄ずいの発生を制御する転写因子 APETALA3 の標的遺伝子である NAP や側根形成を促進する遺伝子である NAC1 などが単離されている (Sablowski & Meyerowitz, 1998、Xie et al., 2000)。このうち NAC1 タンパク質は、核に局在し、酵母やタマネギの細胞内で転写活性化能をもち、さらに *in vitro* で DNA に結合することが示唆された (Xie et al., 2000)。この報告から、NAC タンパク質は、転写因子として機能することが強く示唆される。

CUC1 および CUC2 は、STM と同様、胚発生過程において球状胚の子葉原基間の帯状に伸びた領域で発現を始める。この帯状の領域の中央部は予定 SAM 領域であり、外側の部分は将来子葉の境界部になる。そして発生が進み SAM が分化するに従い、STM の発現は外側から消えて予定 SAM 領域に限定され、発芽後も SAM の全域にわたり発現し続ける。逆に CUC1、CUC2 は内側の予定 SAM 領域から発現が消失し、胚発生後期では、子葉同士境界部および子葉と SAM の境界部に発現が限定される。発芽後、CUC1、CUC2 は本葉・花芽・花器官といった各器官原基の境界部で発現する。(Aida et al., 1999、Ishida et al., 2000、Takada et al., 2001)。

CUC1、CUC2、STM の関係を調べたところ、*cuc1 cuc2* 変異体では STM の発現が完全に欠失するが、逆に *stm* 変異体では CUC1、CUC2 は発現していた (Aida et al., 1999、Takada et al., 2001)。また CUC1 あるいは CUC2 を過剰発現させた植物体では、子

葉において STM が発現し、多数の不定芽が形成された (Takada et al., 2001、Ishida et al., unpublished results)。これらの結果から CUC1 と CUC2 は STM の上流で機能し、STM を介して SAM の形成を正に制御すると考えられる。

SAM の維持に關与する遺伝子として STM の他に、シロイヌナズナでは WUS、CLV1、CLV2、CLV3 遺伝子が知られている。CLV1、2、3 の変異体では、共通して SAM の肥大化による茎の帯化が見られる。このことから、これら CLV 遺伝子は SAM の大きさを規定すると考えられる。CLV1、CLV2 はレセプター様タンパク質をコードし、CLV3 は分泌性ペプチドをコードする (Clark et al., 1997、Jeongm et al., 1999、Fletcher et al., 1999、Rojo et al., 2002)。そして、CLV1 と CLV2 はレセプター複合体を形成し、それに CLV3 が相互作用すると考えられている。一方、wus 変異体の SAM は、数枚の葉を形成しては一時発生を停止し、しばらくするとまた葉の形成を行うといった過程を繰り返す。この変異体の SAM は扁平な構造をしており、幹細胞のマーカである CLV3 の発現が見られない。このことから、wus 変異体で正常な幹細胞が形成されないことが示唆された。WUS は KN1 型とは異なるタイプのホメオボックス遺伝子をコードしており、変異体の表現型や発現部位などから幹細胞の維持に關与すると考えられる (Mayer et al., 1998)。さらに二重変異体や過剰発現体の解析から CLV3 が CLV1、CLV2 レセプター複合体を介して WUS の発現を負に制御し、また WUS は CLV3 の発現を正に制御するというフィードバックループが存在することが示唆された (Schoof et al., 2000)。

現在のところ、この CLV-WUS の SAM の維持機構と STM による形成-維持機構は互いに独立した経路であると考えられている。しかし、少なくとも発芽以降の植物体では CLV3 が STM によって誘導された。また、STM と WUS を共発現させた場合、単独で発現させたときよりも胚軸や子葉における異所的な不定芽形成が促進された (Brand et al., 2002、Gallois et al., 2002)。これらの結果から、この二つの経路は相補的な役割をもち、協調して SAM の維持を行っていることが示唆される。

腋生分裂組織の構築

植物が種によって異なる多様な形態を示す要因の 1 つが分枝パターンである。シロイヌナズナの場合、ロゼット葉あるいは茎生葉の基部の向軸側に腋生分裂組織が形成される。腋生分裂組織は分裂組織として活性化すると側枝として伸長をはじめ。この腋芽の活性化に関して、頂芽優勢と呼ばれる現象が知られている。そして、頂芽優勢にはオーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンが關与することが示されている (Shimizu-Sato & Mori, 2001)。

一方、腋生分裂組織が形成される過程はほとんど解析されていない。この過程に関して二つの仮説が考えられる。1 つは、葉原基ができるときに、その脇に SAM の一部の細胞が残り、それがそのまま幹細胞として機能するという考え方である (detached meristems; Steeves & Sussex, 1989、Long & Barton, 2000)。もう 1 つは、部分的あるいは完全に分化した細胞から内生的に新しい幹細胞が生じるという考え方 (de

novo formation) である。これらに関してどちらが正しいという明確な答えは現在のところ得られていない。

腋生分裂組織が形成されない変異体としてトマトの *ls* (*lateral suppressor*)、*bl* (*blind*)、シロイヌナズナの *rev* (*revoluta*)、*ago1* (*argonaute1*)、*pnh* (*pinhead*)、*las* (*lateral suppressor*)、*caf* (*carpel factory*)、またイネでは *lax* (*lax panicle*)、*moc1* (*monoculm1*) などが単離されている (Grbic, 2001、Komatsu et al., 2003、Li et al., 2003)。このうち、トマトの *ls* 変異体は、栄養成長期の腋生分裂組織を完全に欠失する。LS 遺伝子は、転写因子と考えられている GRAS ファミリーに属するタンパク質をコードしていた (Schumacher et al., 1999)。最近、シロイヌナズナやイネにおいても LS 遺伝子と高い相同性を示すオーソログ (それぞれ *LAS*、*MOC1*) の変異体が *ls* 変異体と同様に腋芽を欠失していることが報告された (Greb et al., 2003、Li et al., 2003)。以上の結果から、この LS 遺伝子は植物種を超えて腋生分裂組織の形成に参与することが強く示唆される。*LAS* と *MOC1* はどちらも側生器官と SAM の境界部で発現しており、この領域で腋生分裂組織の形成に参与すると考えられる (Greb et al., 2003、Li et al., 2003)。

ls 変異体とは対照的に生殖成長期の腋生分裂組織に異常を示す変異体として、イネの *lax* 変異体が知られている。この変異体の原因遺伝子は、bHLH ドメインをもつ転写因子であり、この遺伝子も植物の器官境界部で発現していた (Komatsu et al., 2003)。シロイヌナズナには *LAX* 遺伝子に高い相同性を示す遺伝子は存在しない。このことから、この遺伝子はイネ科植物特異的な腋生分裂組織形成の調節因子であると推測される。腋生分裂組織形成に関わる遺伝子に、*LS/LAS/MOC1* のように種を超えて保存されているものと *LAX* のように特定の植物にしか存在しないものがあることは、腋生分裂組織の発生メカニズムには分裂組織を構築するという植物種を超えて普遍的な機構と種の多様性を生み出す要因となる種に特異的な機構が存在することを示唆している。また、どちらの種類の遺伝子も主軸の分裂組織と側生器官との境界部で発現していたことから、この葉脇にあたる細胞は、腋生分裂組織の適切な発生に必要な特殊化した能力を持つことが示唆される。

一般に腋生分裂組織は葉の表側の葉腋、つまり向軸側 (上側) に形成される。*PHB* (*PHABULOSA*)、*PHV* (*PHAVOLUTA*) の機能獲得型変異体 (*phb-d*、*phv-d*) では、扁平な葉ではなく、棒状の葉が生じる。*PHB*、*PHV* は、クラス ホメオドメイン-ロイシンジッパー (*HD-ZIP*) ファミリーに属する遺伝子で、葉の向軸側そして維管束に発現する (McConnell et al., 2001)。ところが *phb-d*、*phv-d* では *PHB*、*PHV* mRNA が背軸側にも異所的に発現しており、このことが葉の背軸側の向軸化を引き起こしたと考えられる。*phb-d* では、向軸化した葉が形成されるため、背軸側 (下側) にも腋芽が形成される (McConnell & Barton, 1998)。このことから腋芽の形成位置と葉の向背軸の間に密接な関係があることが強く示唆される。このことは、向軸側で発現が観察される *REV* や *PHN* の変異体において腋芽が高頻度で欠失することからも支持される (Otsuga et al., 2001、Lynn et al., 1999)。なお、腋芽形成における *REV* と *PNH*

の働きとしてもう一つの考え方がある。REV や PNH は葉の向軸側だけでなく維管束で強く発現している。これまでの解析から、腋生分裂組織や葉の上に生じる異所的な不定芽は、維管束の近傍から発生してくることが示されている。これらの結果から、分裂組織形成を正に制御する因子が維管束に存在する可能性が示唆される。REV、PNH は維管束由来で腋芽形成を正に制御する機構に関与しているのかもしれない。

シロイヌナズナで腋芽が形成されない別の変異体として *caf* が知られている。*caf* 変異体は、雌しべ形成後も花分裂組織の活性が低下しない。そのため、腋芽の欠失以外に、花芽の中から新しい花をつくるといった表現型も示す。CAF の原因遺伝子はショウジョウバエの *Dicer1* や線虫の *dcr-1* のホモログをコードしていた (Jacobsen et al., 1999、Schauer et al., 2002)。おもしろいことに、胚致死変異体である *sus1* (*suspensor1*) や胚珠の形成に異常を示す *sin1* (*short integuments1*) も CAF と同じ遺伝子の変異体であった。そのため、この遺伝子は DCL1 (*DICER-LIKE1*) と改めて名づけられた (Schauer et al., 2002)。DCL1 の変異が様々な表現型を引き起こすことから、この遺伝子が植物の発生において多面的な役割を持つことが示唆される。さらにこの変異体では複数の miRNA が著しく減少していることから DCL1 は miRNA の生産に重要であると考えられている。

一方、前述した PNH は、翻訳開始因子の eIF2C に相同性を示すタンパク質をコードしており、葉の向軸側と維管束に発現する (Lynn et al., 1999)。また、PNH に高い相同性を示す ARGONAUTE1 (*AGO1*) の変異体も棒状の葉が多数形成される (Bohmert et al., 1998)。pnh ago1 二重変異体では各単独変異体に比べて芽生えの発生が著しく遅れた。そして長期間培養した一部の芽生えから、向軸の性質を失って気孔に覆われた棒状の器官が形成された (Lynn et al., 1999)。これらの結果から PNH、AGO1 は共同して向軸形成に関与していることが示唆される。eIF2C ファミリーに属するタンパク質の一部は翻訳過程で機能しないことが示されている (Cikaluk et al., 1999)。そして、動物において、eIF2C ファミリーのタンパク質が miRNA の生産あるいは触媒として働くと考えられている miRNP 複合体に含まれることも示された (Mourelatos et al., 2002)。これらの事実は、PNH や AGO1 が miRNA を介した遺伝子発現制御の重要な役割を持つ可能性を示唆する。そして、この二つ遺伝子の変異体はどちらも腋芽を欠失する表現型を示す (Bohmert et al., 1998、Lynn et al., 1999、Mourelatos et al., 2002)。これらのことから miRNA は側生器官の軸決定のみならず、腋生分裂組織の形成機構にも関与することが示唆される。

本研究の目的と概要

これまで述べてきたように、既に分裂組織の形成に関与するいくつかの遺伝子が単離されている。しかし、これらの遺伝子に対する解析は断片的であり、分裂組織形成に関わる分子機構についてはまだそのほとんどが解明されていない。我々の研究室で単離された *cuc1 cuc2* 二重変異体の解析から、CUC1 および CUC2 は STM の上流で機能し、SAM 形成の主経路の中で重要な働きをしていることが推測された。本研究は、胚

発生過程と発芽後の植物体における CUC 遺伝子の分裂組織形成ならびに器官分離における機能についてより詳しく調べることを目的として、2 つの実験系を用いて研究を行った。

一つ目の研究は CUC1 遺伝子に着目して、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの制御下で、CUC1 を異所的に過剰発現させた形質転換体を作製し、その解析を行った。そして、この形質転換体から得られた結果を基に、CUC1 の胚発生過程と発芽後の植物体での機能の違いや CUC1 とクラス KNOX 遺伝子との関係などについて考察した。

二つ目の研究は分裂組織の形成や器官境界部の形成に関与する新規因子を同定するために、cuc2 エンハンサー変異体の単離・同定を行った。これらの解析から CUC1、CUC2 と協調して働くと考えられる CUC3 (CUP-SHAPED COTYLEDON3)、クロマチン制御を介した遺伝子発現制御に関わる CTE1 (CUC TWO ENHANCER1) /CHR2 (CHROMATIN REMODELING FACTOR SUBUNIT R2) そして ARF-GEF のひとつである GNOM が単離された。

これら 2 つの分子遺伝学的解析から CUC 遺伝子群は、これまで知られていた胚発生過程における SAM の形成や子葉や花における境界部の形成のみならず、植物の発生において腋生分裂組織の形成や植物の様々な境界部の形成・維持に重要な役割をもつことが明らかになった。そして CUC 遺伝子群が分裂組織形成や境界部の形成において鍵因子として機能することが強く示唆された。さらに、それらと協調して機能する遺伝子のネットワークの一部が明らかにされ、分裂組織形成に関わる分子機構全体の解明に対する新しい視点が確立できた。

第 1 章

CUC1 過剰発現体を用いた異所的不定芽形成機構の解析

要約

双子葉植物の茎頂分裂組織 (Shoot Apical Meristem (SAM)) は、胚発生過程で 2 枚の子葉の間に形成される。SAM は発芽後地上部のすべての器官を生み出す組織であり、この組織がどのように形成されるかを解明することは、植物の形態形成および発生過程を知る上で最も重要なテーマで 1 つである。現在までに SAM が形成されないシロイヌナズナの変異体として *stm* (*shoot meristemless*) と *cuc* (*cup-shaped cotyledon*) 変異体が単離されている。STM 遺伝子は、KNOX (*KN1-type homeo box*) 遺伝子の一つであり、胚の将来 SAM に分化する細胞で発現を始め、発芽後も植物の一生を通して主軸の SAM ならびに腋芽、花芽といった分裂組織で発現し続ける (Long et al., 1996)。一方、我々の研究室で単離した *cuc* 変異体は、遺伝学的解析から CUC1 と CUC2 の二つの遺伝子の欠損によって生じていることがわかった (Aida et al., 1997)。CUC1、CUC2 遺伝子はどちらも高等植物にのみ存在する NAC (*NAM · ATAF · CUC2*) box をもつ遺伝子であった。CUC1、CUC2 は胚発生過程の初期において、将来 SAM が形成される領域で発現する。そして、胚発生過程の後期に SAM 中央部における発現は消失し、SAM と子葉の境界部の発現は続いた (Aida et al., 1997、Takada et al., 2001)。これらの発現パターンや変異体の解析から CUC1、CUC2 は互いに重複した機能を持ち、胚発生過程における SAM 形成と器官境界部の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

stm 変異体の強いアリルでは子葉の基部で弱い融合が観察される。また、胚発生初期の STM の発現パターンは CUC1、CUC2 の発現パターンとよく似ていることからこの三つの遺伝子の関係について調べられた。その結果、*cuc* 変異体では STM の発現は観察されないが *stm* 変異体では CUC1、CUC2 どちらも発現しており、さらに三重変異体の表現型は *cuc* と同じであった。このことは、CUC1、CUC2 は STM の上流で働くことを強く示唆していた (Aida et al., 1999、Takada et al., 2001)。

本研究は、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターを利用して、CUC1 遺伝子を異所的かつ過剰に発現することで、CUC1 遺伝子のさらなる機能解析を行った。その結果、CUC1 過剰発現体 (35S::*CUC1* 植物) では、子葉上に異所的な分裂組織 (不定芽) が多数形成された。また、不定芽が形成される前から STM や *class* KNOX 遺伝子である BP (*BREVIPEDICELLUS*)、KNAT2、KNAT6 が子葉で異所的にあるいは過剰に発現することが明らかになった。さらに、*stm* 変異体において CUC1 を過剰発現させても異所的な不定芽形成は起こらず、BP、KNAT2、KNAT6 の異所的な発現や過剰発現も起こらないことを示した。これらの結果は、CUC1 が STM の発現誘導を介して異所的な不定芽の形成あるいは胚発生過程における SAM の形成を制御していることを強く示唆している。

as1 (*asymmetric leaves1*) および *as2* 変異体では、葉が顕著に鋸歯化し、左右対

称性を失う (Byrne et al., 2000、Semiarti et al., 2001)。AS1 は MYB ドメインをもつ転写因子で、葉全体で発現する (Byrne et al., 2000)。また、AS2 は植物特有の新規タンパク質でその発現は胚発生過程において子葉の向軸側の 1-2 細胞層で観察される (Iwakawa et al., 2002)。それぞれの遺伝子の変異体の解析などから、AS1、AS2 は葉において BP、KNAT2、KNAT6 を負に調節すること、一方で SAM では STM により AS1 が負に発現調節される可能性が示唆された (Byrne et al., 2000、2002、Semiarti et al., 2001、Ori et al., 2000)。この遺伝学的な調節機構の中で CUC がどのように位置づけられるのかを調べるために 35S::CUC1 植物やこれらの遺伝子の変異体を用いた遺伝学的解析を行った。本章では、35S::CUC1 植物を用いた解析結果を示し、SAM 形成に関わる CUC1 遺伝子、class KNOX 遺伝子ならびに AS 遺伝子との関係について議論する。

結果

、CUC1 過剰発現体 (35S::CUC1 植物) の作出

-1、CUC1 過剰発現体の表現型の解析とラインの選抜

シロイヌナズナの野生型 (Lansberg erecta : T0) を図 3 A に示した T-DNA を含むアグロバクテリウムを用いて形質転換して得られた種子 (T1) をカナマイシンを含む培地上に播種した。生き残った個体は土に移植して育て、個体ごとに種子 (T2) を回収した。その結果、カナマイシン耐性を示す独立の形質転換体が 85 ライン得られた。次に各 T2 種子をカナマイシンを含む培地に播種し、それぞれのラインの表現型を調べた。その結果、多くのラインの芽生えに共通して子葉の形態異常が見られた。シロイヌナズナの野生型の子葉は楕円形をしている (図 3 B 右上)。しかし、形質転換体の子葉には側面 2 箇所切れ込みが入っていた。そして、発芽後 10 日以上経つと子葉の切れ込み付近に不定葉のような器官が形成された (図 3 B 右下)。さらに、本葉にトライコームをもたないものや 2 枚の本葉が融合したもの、さらに本葉周辺がいびつになり内側にカールしたようなものなど様々な形態異常を示す個体もあった (Takada et al., 2001)。子葉か本葉に異常を示す個体は 29 ラインで観察され、中でも 15 ラインは子葉と本葉の両方で異常を示した。独立に作製した T1 から得られた T2 ラインの中で子葉と本葉両方で表現型を示す 6 ライン (S1-6、S2-6、S3-7、S4-11、S5-10、S6-10) を選抜し、以後これらのラインについての解析を行った。

-2、形質転換体における T-DNA のコピー数と CUC1 遺伝子の発現量

この 6 ラインにおける T-DNA のコピー数を調べるためにそれぞれのラインから抽出した DNA を Hind^{III}、BamH^I、Pst^I の 3 種類の制限酵素で切断し、CUC1 cDNA をプローブとしてハイストリンジェンシーの条件でサザンハイブリダイゼーションを行った (図 4 A)。その結果、S1-6、S5-10、S6-10 は 1 コピー、S3-7 は 2 コピー、S2-6、S4-11 は 3 コピー以上含むことがわかった。さらに、最も表現型の弱い S4-11 では T-DNA ベクターを 1 箇所切断する Hind^{III} と BamH^I で T-DNA と同じ大きさのバンドが現れたことからこのラインの少なくとも 1 コピーはゲノム上の同じ場所に T-DNA がくり返して入っていることが示唆された。

次にこれらの形質転換体の本葉における CUC1 の発現量を定量的な RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、野生型植物の本葉における CUC1 mRNA の発現量はきわめて低いが、これらの 6 ラインの本葉で異所的かつ増幅された CUC1 の発現が認められた (図 4 B)。しかし、後述する表現型の強弱 (表 1) と発現量の間、挿入したコピー数と発現量の間に関係はみられなかった。

これらの実験から今回選抜した 6 ラインは、1 コピー以上の T-DNA を持ち、また挿入された T-DNA によって CUC1 が異所的に発現していることが明らかになった。以後これらの形質転換体を 35S::CUC1 植物と呼ぶ。

、35S::CUC1 植物の形態学的解析

選抜した6ラインの表現型を詳しく解析したところ、子葉における共通した表現型として、(1)子葉に切れ込みが生じること、(2)S4-11を除く5ラインでは発芽後10日目くらいから子葉の向軸側から不定葉のような器官が生じることが認められる(表1)。

35S::CUC1植物の子葉には、側面2箇所に対称性をもって切れ込みが生じた(図3B左下)。その切れ込みは胚発生後期の子葉屈曲胚から成熟胚の時期に認められた(図5A、B)。発芽後の子葉の維管束のパターンに大きな異常は観察されなかったが、子葉の切れ込みは先端部と基部にある維管束のループの接点で観察されることが多かった(図5C、D)。子葉の周縁細胞を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察すると、野生型で子葉の周縁を細長い細胞が取りまいているのに対し(図5I)、35S::CUC1植物の子葉では切れ込み付近で局所的に細胞が小さくなっていた(図5J)。

さらに多くの35S::CUC1植物の子葉表面に不定葉のような器官が生じた。この子葉上に形成された器官をSEMで詳しく観察したところ、葉序をもって不定葉を生じる場合と(図6A、B)、無秩序に多数の葉原基が形成されている場合(図6C、D)がみられた。このことは、子葉から(1)不定葉のみが形成される場合と、(2)SAMが形成され、そこから秩序だてて不定芽が生じる場合があることを示唆している。後者を今後、不定芽と呼ぶ。

野生型子葉の向背軸側の表面は図5E、Gのようにジグソーパズルの一片のような形に分化した細胞の集合でできている。また多数の孔辺細胞も存在していた。しかし、35S::CUC1植物の子葉で不定芽が形成される付近の向軸側あるいは背軸側の表皮細胞は、小さく丸い細胞であった(図5F、H)。そして、その領域内に孔辺細胞やジグソーパズルの一片のような形態を示す表皮細胞は観察されなかった。これらの小さく丸い細胞は不定芽形成以降も正常な子葉の表皮細胞や孔辺細胞に分化することはなかった(data not shown)。これらの結果から、この領域の表皮細胞は未分化もしくはそれに近い状態に保たれており、その中から不定芽が形成されると考えられる。また、不定芽が形成された位置について調べたところ、不定芽は子葉の維管束上もしくはそれに隣接した領域に形成されることが多かった(図6E、F)。

、35S::CUC1 植物の子葉における不定芽形成機構の解析

35S::CUC1植物は子葉に切れ込みが入り、不定芽が生じる。そして生じた不定芽は、SAMに極めて類似した構造をしていた。そこで、胚発生時にSAMの形成や維持に関わることが明らかにされている遺伝子が35S::CUC1植物の子葉でも異所的に発現していると考えられる。このことを検証するために以下の実験を行った。なお、これ以降の実験は6ラインのうちS2-6を用いて行った。

-1. RT-PCR による発現解析

シロイヌナズナのSAMの形成や維持に関わる遺伝子としてclass KNOX遺伝子であ

る STM (SHOOT MERISTEMLESS) やそのサブファミリーに属する BP/KNAT1 (BREVIPEDICELLUS/knotted-like from *Arabidopsis thaliana*)、KNAT2、KNAT6 が知られている (Long et al., 1996、Lincoln et al., 1994、Semiarti et al., 2001、Pautot et al., 2001、Douglas et al., 2002、Venglat et al., 2002)。また、SAM の幹細胞の維持に関わる遺伝子として非 KN1 型のホメオボックス遺伝子である WUS (WUSCHEL) が、そして SAM 形成や器官分離に関わる NAC 遺伝子として CUC1 と重複して働く、CUC2 が知られている (Mayer et al., 1998、Aida et al., 1997)。これらの遺伝子が、35S::CUC1 植物の子葉において発現しているかどうかを RT-PCR で調べた (図 7 A)。

野生型の子葉では、CUC1 の弱い発現が観察された。STM 及び BP は、PCR のサイクル数をあげると観察されることもあったが (data not shown)、その発現は非常に弱かった。しかし、WUS や CUC2 はまったく観察されなかった。

不定芽がまだ生じていない 35S::CUC1 植物の子葉 (発芽後 7 日目) では、class KNOX 遺伝子の発現が誘導されていた (図 7 A)。ところが、不定芽が形成された後の子葉 (発芽後 14 日目) では、WUS や CUC2 の発現も観察された。もっとも CUC2 の発現は弱くて観察されない場合もあった。つまり、CUC1 が異所的に子葉で発現すると STM を含む class KNOX 遺伝子の発現が不定芽形成前から子葉上に異所的に発現し、不定芽形成後に WUS や CUC2 も異所的な発現を示した。

次に、生じた不定芽における CUC1、STM、BP、WUS の発現パターンを in situ ハイブリダイゼーションで調べた。CUC1 は、子葉上に異所的に形成された器官原基で強く発現し、不定芽の中央部で発現が減少していた (図 7 B)。この発現パターンは、35S プロモーターの性質を反映していると考えられる。不定芽の中央部で STM、BP の強いシグナルが検出されるが、器官原基でこれらの遺伝子の発現は弱かった (図 7 C、D)。WUS は不定芽直下のごく限られた細胞で発現していた (図 7 E)。これらの発現パターンは発芽後に野生型の SAM でみられる各遺伝子の発現パターンに類似している。なお、CUC2 は発現を検出することができなかった。これらの結果から 35S::CUC1 植物の子葉上の不定芽において STM、BP、WUS が発芽後の野生型の SAM でみられる発現領域に相当する場所で発現していることが示された。このことは、この不定芽が野生型の SAM とほぼ同じ構造と機能を持つことを強く示唆している。

-2. 5' STM::GUS、5' BP::GUS の発現解析

RT-PCR の結果から不定芽が形成される前に 35S::CUC1 植物の子葉で STM や BP が異所的発現していることがわかった。そこで STM あるいは BP 遺伝子の 5' 上流域とレポーター遺伝子 (uidA) である GUS を結合したキメラ遺伝子を形質導入した植物 (5' STM::GUS、5' BP::GUS) と 35S::CUC1 植物を掛け合わせて (35S::CUC1/5' STM::GUS 植物、35S::CUC1/5' BP::GUS 植物)、芽生え以降の 35S::CUC1 植物における STM と BP の空間的な発現パターンを解析した。

5' STM::GUS の GUS 活性は野生型では芽生え以降 SAM で特異的に検出できる (図 8 A、

C)。しかし、35S::CUC1/5'STM::GUS 植物における GUS の発現領域は芽生え 2 日目で既に SAM だけではなく子葉にまで広がっていた (図 8 B)。しかし、この広がった GUS の発現領域は、子葉の切れ込み付近と 2 つの切れ込みの間の領域に限定された (図 8 D)。さらに、強い GUS 活性は子葉の背軸側と不定芽で検出された (図 8 E、F)。これらの芽生えにおける STM の発現パターンは *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた STM の発現パターンと同じであった (data not shown)。ここで見られる 5'STM::GUS の発現領域は、35S::CUC1 植物の子葉の 2 つの切れ込みの間に存在する小さく丸い細胞領域に限定されていた。このことは、35S::CUC1 植物の子葉の表現型が STM の発現と強く相関していることを示唆している。また、子葉上に不定芽が形成されるとその領域でも STM の強い発現が観察された (図 8 E)。これは、不定芽が形成されるときに、その領域でさらに強く STM が誘導される可能性を示唆する。

一方、35S::CUC1/5'BP::GUS では、発芽後 2 日目において、すでに子葉に切れ込みが形成されているにもかかわらず、野生型と同様に、SAM と胚軸でのみ GUS が検出された (図 8 G、H)。そして、芽生え後 4 日目で始めて 35S::CUC1/5'BP::GUS 植物において異所的な GUS の発現が子葉上に認められた。しかし、その発現パターンは 35S::CUC1/5'STM::GUS 植物の場合と異なり、切れ込みの間でも発現していたが維管束でもっとも強く発現していた (図 8 I、J)。また、子葉切片の観察を行ったところ、35S::CUC1/5'STM::GUS 植物の場合と異なり維管束周辺で強い GUS 活性が検出された (図 8 K)。

-3 胚発生過程における CUC1、STM、BP の関係。

35S::CUC1 植物の胚における CUC1、STM、BP の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。CUC1 は心臓胚期までは野生型と同様に予定 SAM 領域でのみ発現がみられた (図 9 A)。しかし心臓胚後期から魚雷胚期になると子葉原基で異所的発現が観察された。この時期では、まず子葉の向軸側で発現が観察されることが多く (図 9 B)、その後発生が進むに連れて子葉全体に広がった (data not shown)。そして魚雷胚後期から子葉屈曲胚期になると発現は胚軸の維管束付近でもみられ、成熟胚期になると胚軸全体と根端で観察された (図 9 C、D)。これらの広範囲にわたる発現は 35S プロモーターの活性によるものと考えられる。一方、子葉原基で CUC1 の異所的発現が観察される胚発生後期になると、予定 SAM 領域近傍の本来 CUC1 の発現が観察される場所でその発現が観察されなかった。これは、異所的発現が強いために、実験上この領域の弱い発現を検出できなかったのかもしれない。

STM は、心臓胚期から魚雷胚期までは野生型と同様の発現パターンであったが、魚雷胚後期から子葉原基で異所的な発現が観察された (図 9 E、F)。この発現は、子葉原基の背軸側で観察されることが多く、発現時期は CUC1 の発現が子葉全体に広がる時期に対応していた。その後発生が進むと、子葉全体に発現は広がったが、子葉の背軸側の発現が強かった (図 9 G、H)。なお、CUC1 と違って、胚軸や根端付近では、胚発生を通して、STM の異所的な発現は観察されなかった。

次に BP の発現を調べたところ、35S::CUC1 植物の胚において野生型と同様に胚軸上部の内皮細胞層周辺に限定された発現を示した (図 9 I、J)。そして、胚発生過程を通して、異所的な発現はまったく見られなかった。この結果と先に述べた 35S::CUC1/5'BP::GUS 植物における GUS の発現解析をあわせて考えると、BP は CUC1 や STM と違って 35S::CUC1 植物の胚発生過程では異所的に発現せず、発芽後から異所的に子葉に発現することが示唆される。

in situ ハイブリダイゼーションによる解析から、35S プロモーターで過剰発現させた CUC1 は胚発生後期において、STM の異所的な発現を引き起こす可能性が高い。一方、BP が発芽直後に子葉で異所的に発現するのは、CUC1 による直接的な影響ではなく、間接的に制御されている可能性が高い。このことは、35S::CUC1 植物の子葉における STM と BP の発現制御が異なることを示唆している。

・ 様々な変異体下における CUC1 過剰発現の影響

CUC1 を 35S プロモーターにより過剰発現させることにより、子葉に不定芽が形成され、それに対応するように SAM の形成や維持に関わる遺伝子が子葉、あるいは子葉に生じた不定芽で誘導された。そこで、35S::CUC1 植物でみられる子葉の切れ込みや不定芽の形成にこれらの遺伝子が必須であるのかどうかについて、これらの遺伝子の変異体 (*cuc1 cuc2*、*wus*、*stm*、*bp*) と 35S::CUC1 植物を掛け合わせることで、遺伝学的な解析を行った。

-1. *stm* 変異体を用いた解析

stm 変異体の強いアリル (*stm-1*) は SAM が形成されずに 2 枚の子葉が基部で融合する (図 10 A、Long et al., 1996)。35S::CUC1 植物を導入した *stm* 変異体 (35S::CUC1/*stm* 植物) の芽生えは、*stm* 変異体と同様に SAM が形成されずに 2 枚の子葉が基部で融合した (図 10 B)。その上、この芽生えの子葉は、野生型に 35S::CUC1 を導入した植物に比べて小さいながらも同様の切れ込みが生じた。しかし、不定芽は形成されなかった。子葉に生じた切れ込み付近の表面細胞を SEM で観察すると未分化と考えられる小さな細胞からなる領域は観察されなかった (図 10 C)。この結果、STM 遺伝子が欠損すると 35S::CUC1 によって引き起こされる表現型が弱まることが示唆される。逆に言うと、CUC1 の異所的な発現は、STM の発現を介して子葉の切れ込みの間の未分化な細胞領域の形成や、その領域における不定芽の形成を誘導したことを示しており、これらの現象に STM は必須であることを強く示唆している。一方、35S::CUC1/*stm* 植物の子葉においても切れ込みは生じたので、切れ込みの形成に STM は関与しない可能性が高い。

35S::CUC1 植物を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果から、発芽後の子葉における BP の異所的な発現は、胚発生過程の子葉で異所的に発現している CUC1 もしくは STM により誘導された可能性が示唆される。そこでこのことを確かめるために、35S::CUC1/*stm* 植物の子葉における BP、KNAT2、KNAT6 の発現を RT-PCR 法を

用いて調べた。その結果、35S::CUC1/stm 植物の子葉で BP の異所的発現は見られず、また KNAT2、KNAT6 の発現は 35S::CUC1 植物に比べて弱く野生型の子葉における発現とほぼ同じであった (図 10 E)。このことから、発芽後に 35S::CUC1 植物の子葉に見られる BP、KNAT2、KNAT6 の異所的あるいは過剰な発現は、子葉において異所的に発現した STM の機能に依存していることが強く示唆される。

-2. bp 変異体を用いた解析

35S::CUC1 植物の子葉における BP の異所的発現がこの植物の発芽後の子葉の表現型に影響を及ぼすかどうかを調べるために bp-101 変異体 (材料と方法参照) に 35S::CUC1 植物をかけあわせた (35S::CUC1/bp 植物)。bp 変異体は子葉の形態に異常を示さない。一方、35S::CUC1/bp 植物では、35S::CUC1 植物と同様に子葉に切れ込みが生じ、異所的な不定芽形成もみられた (図 10 D)。このことから、BP は 35S::CUC1 植物の子葉における切れ込みの形成や異所的な不定芽の形成に関与していないことが強く示唆された。また、35S::CUC1/bp 植物の子葉を用いた RT-PCR の結果、BP 遺伝子の欠損は 35S::CUC1 植物における STM、KNAT2、KNAT6 の異所的あるいは過剰発現に影響を及ぼさないことが示された (図 10 F)。

-3. cuc1 cuc2 二重変異体を用いた解析

cuc1 cuc2 二重変異体の芽生えは、2 枚の子葉の境界部が盛り上がることで 1 つのカップ状の子葉を形成し、さらに SAM が欠失している (図 11 A)。cuc1 cuc2 二重変異体に 35S::CUC1 植物を導入した植物体 (35S::CUC1/cuc1 cuc2 植物) の芽生えでは、子葉の融合は抑えられ、中央に SAM が形成された (図 11 B)。この結果から導入した 35S::CUC1 植物により、完全でないながらも cuc1 cuc2 二重変異体の子葉の分離や SAM 形成が相補できたと考えられる。35S::CUC1/cuc1 cuc2 植物では CUC2 は完全に欠失している。ところが、35S::CUC1 により部分的に二重変異体の形質を相補できたことは、CUC1 と CUC2 の機能が互いに重複しているという以前の考えを支持する (Aida et al., 1997, Takada et al., 2001)。一方、この植物体において 35S::CUC1 植物にみられたものと同様の子葉の切れ込みが見られ、しかもその間に未分化な細胞領域も形成された。そして、子葉の上に不定芽も形成された (data not shown)。このことは、35S::CUC1 植物の形質が現れるために CUC2 が必要ではないことを示唆している。

-4. wus 変異体を用いた解析

芽生えにおいて野生型の SAM はドーム状の構造をしている。しかし wus 変異体では SAM の中央部分が扁平になる。そして、通常より遅れて数枚の本葉を形成した後に発生を停止してしまう (Laux et al., 1996)。35S::CUC1 を導入した wus-1 変異体 (35S::CUC1/wus 植物) の芽生えにおいて、SAM は wus-1 変異体の表現型を示した。一方、子葉には 35S::CUC1 植物と同様に切れ込みや小さく丸い細胞の領域が形成され、不定芽も観察された (data not shown)。このことは、35S::CUC1 植物の表現型が現れ

るために WUS の機能を必要としないことを示している。

・ CUC と AS を介した SAM 形成機構の解析

-1. as1、as2 変異体と 35S::CUC1 植物との関係

STM は SAM の形成や維持に必須であり、stm 変異体のシビアなアリルでは SAM を完全に欠失する。一方、この stm 変異体の表現型は AS1 (ASYMMETRIC LEAVES1) や AS2 の欠損によって抑制される (Byrne et al., 2000、2002)。つまり stm as1 あるいは stm as2 二重変異体は SAM を生じ、芽生え以降の発生が進む。as1 や as2 変異体では左右対称性が乱れた本葉が形成され、それらの本葉では BP、KNAT2、KNAT6 が異所的に発現している (Byrne et al., 2000、Semiarti et al., 2001)。これらの class KNOX 遺伝子は SAM で発現しており、逆に AS1 や AS2 は側成器官で発現が観察される (Lincoln et al., 1994、Long et al., 1996、Pautot et al., 2002、Byrne et al., 2000、Ishikawa et al., 2002)。これらの結果から AS1 や AS2 は、側生器官において STM を除く class KNOX 遺伝子の発現を抑制し、また SAM では STM によって AS1 が負に制御されていると考えられる (Baurle & Laux, 2003)。つまり、stm as1 二重変異体では胚発生過程において野生型では胚軸で発現している BP が AS1 の変異により SAM 付近でも発現するようになることで、BP が STM の機能を代替し、stm 変異体の表現型が抑制されたと考えられている。実際、stm as1 bp 三重変異体は stm と同様に SAM が欠失していた (Byrne et al., 2002)。このように AS 遺伝子は、KNOX の発現制御を介して SAM 形成に重要な役割を果たす。そこで CUC と AS 遺伝子との関係について調べるために以下の実験を行った。

まず、35S::CUC1 植物における AS1、AS2 の働きについて調べるために as1-1、as2-5 変異体と 35S::CUC1 植物をかけあわせた (35S::CUC1/as1 植物、35S::CUC1/as2 植物)。35S::CUC1/as1 植物あるいは 35S::CUC1/as2 植物では、35S::CUC1 植物が示す子葉の表現型が促進され、子葉全体が未分化な細胞の特徴を持つ領域に覆われ、子葉のサイズも小さくなった (図 11 E、F)。これは 35S::CUC1 植物の中でも S3-7 のような強い表現型を示すラインに類似していた (図 11 C、D)。このことから AS1、AS2 遺伝子は 35S::CUC1 植物の表現型を抑制するように機能していることが示唆される。

これまでの解析結果から 35S::CUC1 植物の表現型の多くが、STM の機能に依存し、BP には依存しないことを示している。そこで stm as1 二重変異体における CUC1 の異所的発現の影響について調べた。おもしろいことに 35S::CUC1/stm as1 植物では、35S::CUC1/as1 植物と同様に子葉表面全体が小さく丸い細胞で覆われ、不定芽も形成された (図 11 G)。このことから 35S::CUC1 は、stm 変異の存在下では AS1 によって子葉における不定芽形成が抑制されていたことが示唆される。さらに興味深いことに、35S::CUC1/stm as1 植物において、stm 変異が存在しているにもかかわらず不定芽が形成されたことから、STM と AS1 が同時に欠損している場合、CUC1 は STM に依存しない経路を介して不定芽形成を誘導したことが強く示唆される。

-2. CUC1、CUC2、AS1 の遺伝学的関係

次に正常な発生過程における AS1 と CUC1、CUC2 との関係を詳しく調べるために *cuc1 cuc2 as1* の三重変異体を作製した。その結果、三重変異体において SAM の欠失あるいは子葉の融合といった表現型が部分的に抑制された(図 11 H、I)。しかも、おもしろいことに *stm as1* 二重変異体では、ほぼすべての個体で SAM が形成されるが *cuc1 cuc2 as1* 三重変異体では、約 12.9% (37/290 個体) でしか SAM は形成されなかった。次に *cuc1 cuc2 as1* 三重変異体における SAM 形成が *stm as1* で見られたように STM の代わりに BP が胚発生過程で SAM 付近に発現した結果生じたものかどうかを確認するために *cuc1 cuc2 as1 bp* 四重変異体を作製した。予想に反してこの四重変異体でも SAM は形成された(図 11 J)。このことは BP の機能なしでも AS1 の変異によって *cuc1 cuc2* 変異体における SAM の欠失が相補できたことを示唆している。このことから、正常な発生過程でも AS1 が *cuc1 cuc2* 変異体において SAM の形成あるいは境界部の形成を負に制御していることが示唆される。また、*cuc1 cuc2* の SAM 形成を AS1 の変異だけで完全に戻せないことから、CUC 遺伝子は、STM-AS-BP 経路を介するだけでなく、別の SAM 形成に關与する因子を介して SAM 形成を正に制御している可能性が高い(図 12)。

考察

35S::CUC1 植物の子葉は以下の3つの特徴をもつ。(1) 子葉の側面2箇所に対称性をもった切れ込みが形成される。(2) 切れ込み付近の周縁細胞もしくは切れ込みと切れ込みの間の表皮細胞が小さく丸いといった未分化な細胞の特徴を持つ、(3) さらにその未分化な細胞領域に不定芽や不定葉が生じる。

35S::CUC1 は STM の異所的発現を介して子葉上の不定芽形成を誘導する

胚発生初期において CUC1 と CUC2 は頂端部での STM の発現を誘導する(Aida et al., 1999、Takada et al., 2001)。この調節機構は胚発生過程における SAM 形成の必須かつ重要なプロセスである。今回の解析において 35S プロモーターを用いた過剰発現体の解析から、CUC1 を異所的に発現させると胚発生後期に STM が子葉原基で異所的に発現し、さらに発芽後胚性器官である子葉の上に不定芽が形成されることがわかった(Takada et al., 2001)。今回の解析は以前からの CUC が STM の発現を誘導し、それによって SAM が形成されるという考え方を強く支持している。

一方、35S::CUC1/stm 植物では、切れ込みの間の未分化な細胞の特徴を持つ領域は消失し、不定芽形成も起こらなかった。このことは、CUC1 による STM の誘導とそれにより異所的に発現した STM が不定芽形成に必須であることを示唆する。これは、カルスにおいて CUC1 を過剰発現させると不定芽形成が促進されるが、stm 変異存在下では、促進できないという結果と一致する(Daimon et al., 2003)。そしてこれらの結果から、CUC1 は STM の発現を誘導し、STM の機能を介して胚における SAM の形成や不定芽の形成を正に制御するという仮説が強く示唆される。

35S::CUC1 植物における小さく丸い細胞領域の形成や不定芽形成に必要である STM 遺伝子は胚発生後期から子葉原基の背軸側の基部に異所的に発現した。また発芽後以降も STM の異所的な発現が子葉の切れ込みの間の背軸側に維持された。35S::CUC1 植物の胚発生過程において、CUC1 は胚全体で発現が観察されるのに対し、STM の発現領域は背軸側に限定される。このことから、CUC1 は STM の発現を誘導できるが、STM の異所的発現は CUC1 のみで維持されるのではなく、時間的・空間的に別の因子によっても制御されていることが示唆される。そして、STM の発現は背軸側に限定されていたが、不定芽は常に向軸側にのみ生じた。この結果は STM タンパク質が子葉の向軸側の細胞に対して細胞非自立的に働きかけた可能性を示唆している。トウモロコシの class KNOX タンパク質の一つである KN1 (KNOTTED1) タンパク質は葉において細胞間を移動することが示されている(Kim et al., 2002)。この報告から、STM タンパク質も子葉の背軸側から向軸側に移動している可能性が示唆される。

35S::CUC1 は STM の異所的発現を介して class KNOX 遺伝子の発現を制御する

35S::CUC1 植物において BP は STM と同様に子葉に不定芽が形成される前から子葉で異所的に発現していた。しかし、この BP の異所的発現は芽生え以降にのみ観察され

た。また 35S::CUC1/stm 植物において BP の異所的発現は観察されなかった。これら
のことから 35S::CUC1 植物における BP の異所的な発現誘導は STM を介していること
が強く示唆される。

一方、35S::CUC1/bp 植物の解析から 35S::CUC1 植物にみられる異所的な BP の発現
はこの植物の形質があらわれるのに必須ではないことが示唆される。35S::BP 植物で
子葉に顕著な表現型が現れない (Lincoln et al., 1994)。このことと今回得られた
結果は矛盾しない。また、35S::CUC1 植物において、同じ class KNOX 遺伝子の KNAT2、
KNAT6 の子葉における発現上昇が観察された。35S::CUC1/stm 植物の解析から、これ
らの遺伝子の発現上昇も STM を介して誘導されたと考えられる。SAM 形成におけるこ
れら遺伝子の機能は、ほとんど不明である。しかし、BP、KNAT2 が芽生えの SAM にお
いて発現していることから、STM を除く class KNOX 遺伝子も、秩序だった SAM の構
築あるいはその維持過程で機能していると推測される。(Lincoln et al., 1994、Laufs
et al., 1998)。今後これらの遺伝子の機能解析が進むことを期待したい。

CUC1 は STM に依存的な経路と非依存的な経路を介して SAM 形成を正に制御する

35S::CUC1/as1 植物や 35S::CUC1/as2 植物の芽生えにおいて子葉表面の小さな細胞
領域が子葉全体に広がり、35S::CUC1 植物の表現型が強調された。これは AS1 や AS2
が異所的に発現した CUC1 の機能を空間的に抑制していたことを示唆している。さら
に 35S::CUC1/stm as1 植物において STM が欠失しているにもかかわらず、小さな表面
細胞と異所的な不定芽が生じた。この結果は、AS1 遺伝子が欠損すると胚発生や栄養
成長期における stm 変異体の表現型が完全に抑制され、野生型の表現型に復帰する
という Byrne らの報告と一致する (Byrne et al., 2000、2002)。またこのことから、
35S::CUC1/stm as1 植物における異所的な不定芽形成は stm as1 二重変異体で見られ
る STM を介さない SAM 形成機構と同じ機構を利用している可能性が考えられる。

as1 や as2 の変異が stm 変異体の表現型を抑制することから、STM を介さない未知
の SAM 形成経路が存在することが推測される。一方、cuc1 cuc2 二重変異体では胚発
生過程において STM の発現は完全に欠失し、SAM は形成されない (Aida et al., 1997、
1999、Takada et al., 2001)。これらの結果から as1 変異は cuc1 cuc2 変異体の表現
型を抑制することも期待できる。そこでこの点を確認するために cuc1 cuc2 as1 三重
変異体を作製した。この三重変異体において、子葉の融合が弱まり、SAM は形成され
た。このことは、予想通り cuc1 cuc2 二重変異体の表現型の一部が AS1 遺伝子によ
って強められていた可能性を示唆している。しかし、cuc1 cuc2 as1 三重変異体にお
ける SAM の形成頻度は stm as1 二重変異体に比べて極めて低かった。このことは、cuc1
cuc2 二重変異体と stm 変異体における表面上は同じである SAM 形成の欠如という表現
型に違いがあることを示唆している。そして、これは CUC1 遺伝子が STM のみを介し
て SAM 形成を制御するのではなく、それ以外の因子を介して別の経路で SAM 形成を制
御している可能性を示唆する。この因子に関して以下の 2 つの可能性が考えられる。
(1) CUC 遺伝子が STM の発現を調節する経路 (STM-AS-BP 経路) とは別に、SAM 形成

に関わるまったく未知の経路を正に制御している(図12; Y因子)。 (2) CUC遺伝子がSTM-AS-BP経路と協調的に働く因子も制御している(図12; X因子)。 (1)の可能性が正しいとするとその実体はまだまったくつかめていない。一方、(2)の可能性が正しいとすると、それに関与する遺伝子の候補としてBLR/PNY/RPLが考えられる(Byrne et al., 2003、Smith & Hake, 2003、Roeder et al., 2003)。BLRはBEL1様のホメオドメインタンパク質をコードしている。blr変異体はbp変異体やstm変異体の表現型を強調する。さらに、stm as1 blr三重変異体では再びSAMが形成されなくなる(Byrne et al., 2003)。また、BLRはin vitroの解析からSTMやBPと相互作用することが示されている。おもしろいことにBLR遺伝子は35S::CUC1植物の子葉において異所的に発現しており、さらに35S::CUC1/stm植物でも異所的に発現していた(Kariya et al., unpublished results)。このことからCUC1はSTMの発現を誘導すると同時にBLRのようなSTM、BPと相互作用する因子を誘導することでSAM形成や不定芽形成を正に制御している可能性が考えられる。

35S::CUC1植物の子葉では発芽後10日以上経つと未分化な細胞領域の一部から不定芽や不定葉が形成された。不定芽が形成された後の子葉では、STMやBPの他にWUSやCUC2も発現していた。In situハイブリダイゼーション解析からSTM、BP、WUSは、形成された不定芽において野生型のSAMに見られる発現パターンに極めて類似した発現を示した。そしてこの形成された不定芽の中には、その後本来の野生型のSAMと同様の機能を示し、正常なシュートを発生させるものもあった。このことから生じた不定芽は野生型のSAMと同様の機能を持つことが示唆される。また、35S::CUC1/stm植物では子葉に不定芽が形成されない。そして35S::CUC1/5' STM::GUS植物の観察からSTMは不定芽が形成されるとそこで強い発現を示した。このことから35S::CUC1植物の子葉上の未分化な細胞領域の限られた領域で不定芽の形成が誘導され、その誘導にはSTMが関与している可能性が示唆される。一方、Galloisらは芽生えにおいてSTMとWUSを共に異所的に発現させた場合、子葉や胚軸に不定芽が形成されることを報告した(Gallois et al., 2002)。このことから、この場合は不定芽の形成開始にSTMとともにWUSが働くことが示唆された。けれども、35S::CUC1植物においてWUSは不定芽でのみ発現が検出され、しかも35S::CUC1/wus植物では不定芽が生じた。このことから35S::CUC1の子葉における不定芽形成にWUSを必要としないと考えられる。この差がどこから生じたのだろうか? CUC1はSTMの上流に位置していることや35S::CUC1植物はSTM以外にBLR等の因子も誘導したことなどから、35S::CUC1植物ではWUSの機能を代替する他の因子が誘導された可能性が考えられる。

35S::CUC1植物における不定芽形成の位置的情報

35S::CUC1植物の子葉上で不定芽は維管束周辺で形成された。カルスなどから不定芽が形成されるときにも、その基部に維管束細胞が分化していることが知られている。また、35S::BP植物や35S::KN1植物では、本葉上の不定芽は維管束周辺に形成される(Sinha et al., 1993、Lincoln et al., 1994、Chuck et al., 1996)。これらの知

見は、維管束の位置と不定芽の形成に何らかの相関がある可能性を示唆する。このことは維管束系から不定芽の形成開始を決める何らかの因子が誘導されている可能性を示唆する。もし、これらの因子が遺伝子として存在、制御されるならば、35S::CUC1植物を用いたマイクロアレイ解析などからその候補が得られる可能性がある。もっとも、35S プロモーターは維管束で強い活性を持つことが知られており、35S::CUC1植物の子葉においても、CUC1が維管束近傍で特に強く発現していたことに起因するのかもしれない。

子葉における切れ込みの位置的情報

35S::CUC1植物の子葉では、胚発生後期から対称性を持った切れ込みが生じる。そして、切れ込みの生じる場所はほぼ決まっており、一対だけ生じる。これは35S::CUC1植物の弱い表現型を示すライン (S4-11) や 35S::CUC1/stm 植物、35S::CUC1/bp 植物でも観察された。これらの結果は、この現象が STM や BP とは別の因子による影響である可能性を示唆する。現在までに、35S::CUC1植物以外に子葉に切れ込みが生じる変異体や形質転換体の報告はない。今のところ、なぜこの植物体の子葉に切れ込みが生じたのかは不明である。CUC1、CUC2は胚発生過程でSAM形成のほかに子葉の分離でも重要な働きをする (Aida et al., 1997)。35S::CUC1植物における切れ込みの形成は、CUC1の胚発生過程における子葉の分離で果たす機能と関係しているのかもしれない。なお35S::CUC1植物の表現型である切れ込みの形成、小さく丸い細胞領域の形成、子葉におけるSTMの発現誘導、そして異所的な不定芽形成は子葉の限られた領域で起こる。このことは、野生型では一見均一に見える子葉においても、この領域が空間的に特殊化した領域である可能性を示唆している。

第 2 章

分裂組織形成、器官境界部形成に関する新規変異体の

単離と同定

要約

子葉の境界部や茎頂分裂組織の形成機構を理解していくうえで、それらの形成過程に異常を示す変異体は非常によいツールとなり、それらに対する分子遺伝学的解析は多くの有意義な知見を与えてくれる。しかし、CUC1 や CUC2 のように機能的に重複した遺伝子の場合、それぞれの単独変異体はほとんど表現型を示さない。そのため、それぞれの遺伝子のもつ生物学的な機能を十分に理解することが困難である。そこで、CUC1、CUC2 と協調して働き、子葉の境界部や SAM の形成に関与する新しい遺伝子を単離し、それらとの関係を解析することで CUC1 や CUC2 遺伝子の機能をさらに詳しく解析することが重要になってくる。この目的のために、cuc2 変異体を変異原処理し、芽生えにおいてカップ型の子葉を形成するあるいは SAM を欠失する表現型を指標にして新しい cuc2 エンハンサー変異体の単離を試みた。得られた cuc2 エンハンサー変異体は子葉の形態、SAM の有無、その他の表現型などから 4 つの表現型グループに分けられた。これらの cuc2 エンハンサー変異体の半数は cuc1 変異体の新規のアリルであった。残りのすべての変異体に対してマッピングを行ったところ、cuc2 変異体の表現型を促進する CUC1 遺伝子以外の変異として、NAC 遺伝子の一つで CUC1 や CUC2 と同一のサブファミリーに属する CUC3 (CUP-SHAPED COTYLEDON3) が単離された。さらにクロマチン構造の変化を介して転写制御に働く SNF2-type クロマチンリモデリング因子と考えられる CHR2 (CHROMATIN REMODELING FACTOR SUBUNIT R2) が単離された。そして ARF-GEF の一つである GNOM の新しい変異も見つかった。cuc2 単独変異体の表現型を促進するこれらの遺伝子は、CUC1、CUC2 と協調して、あるいは CUC1、CUC2 を制御することによって SAM や器官境界部の形成に関与することが強く示唆される。本章では、CUC1、CUC2 の制御に関わるこれらの遺伝子に関する解析結果を示し、SAM 形成や器官の分離に関する新しい研究の展開について議論する。

結果

． cuc2 エンハンサー変異体の単離

cuc2 変異体の種子約 5000 粒を EMS 処理し、その M1 世代の各植物体から種子を個体毎に回収し別々のラインとした。そして各ラインの M2 種子を個別に播種し、カップ型の子葉を持つ芽生えが出るラインや SAM 形成に異常を示すラインの選抜を行った。その結果、87 ラインでカップ型子葉をもつあるいは SAM に異常が認められた。次にこれらのラインが実際に遺伝する形質を持っているかどうかを調べるために、それ自身あるいは兄弟の M2 の芽生えを土に植え替えて、自家受精させて M3 世代を得た。この M3 種子を用いて表現型や分離比をより詳細に調べた。

． エンハンサー変異体の芽生えの表現型

M3 の解析から、芽生えにおいてカップ型の子葉の形成あるいは SAM の欠失などの表現型が遺伝形質として同定できたラインは 14 ラインであった。この 14 ラインは表現型によって以下の 4 つのクラスに分類した (図 13、表 2)。

クラス 1 : 高頻度 (全体の約 1/4) で cuc1 cuc2 様のカップ型子葉をもつ芽生えを生じ、SAM は形成されずに芽生えで枯死する (6 ライン、図 13 A)。

クラス 2 : 高頻度で cuc1 cuc2 様のカップ型子葉を持つ個体あるいは stm 変異体のように子葉の基部が融合した芽生えが観察される。しかし、播種後 10 日程度たつと、これらの芽生えの子葉基部から本葉が形成され、それは正常な発生を続けて結実する (4 ライン、図 13 B-D)。

クラス 3 : 低頻度でカップ型子葉あるいは融合した子葉をもつ芽生えが観察される。そして、これらの子葉に表現型をもつ芽生えの多くは SAM が形成されず枯死する (3 ライン、図 13 E、F)。また、cuc1 cuc2 二重変異体では根に異常を示さないが、このラインでは根が短くなるという表現型も観察される。

クラス 4 : 低頻度でカップ型子葉あるいは融合した子葉をもつ芽生えが観察される。そして、これらの子葉に表現型をもつ芽生えの多くは SAM が形成されず枯死する。また、クラス 2 と異なりそれぞれの芽生えにおいて根が短くて、側根もほとんど形成されない (1 ライン、図 13 G、H)。

． cuc1 アリルの同定

cuc2 変異存在下でカップ型子葉の芽生えを生じる変異体の候補として第一に挙げられるのは CUC1 遺伝子の新しい変異体である。そのため、得られた 14 ラインすべてに対して CUC1 ORF 領域のゲノムの塩基配列を調べた。その結果、クラス 1 に属する 6 ラインとクラス 2 に属する 1 ラインにおいてこの領域内に変異が確認された (図 14A、B)。このことからこれら 7 ラインは CUC1 の新しいアリルと考えられる。これら 7 ラインのうち、クラス 1 に属する 6 ラインは NAC ドメイン内のアミノ酸が別のアミノ酸あるいは終止コドンへ置換していた。そして、これらの変化したアミノ酸はすべて NAC

ドメインの中でも CUC1、CUC2 そしてペチュニアの NAM (Souer et al., 1996) の間で保存されたアミノ酸であった(図 14 B)。もう一つのクラス に属する U124 (cuc1-6) ラインは、CUC1 の C 末端側でアミノ酸置換が見つけた。この NAC タンパク質の C 末側の最後の 3 - 5 アミノ酸は CUC1、CUC2 そしてそれらと相同性の高い遺伝子間で保存されている(図 14 D)。この変異体の単離によってこの C 末に存在する最後の 3-5 アミノ酸も CUC1 が機能するために重要な役割を担うことが強く示唆される。

・ CUP-SHAPED COTYLEDON3 (CUC3) の単離とその解析

-1. CUC3 のマッピングと同定

クラス 中の CUC1 ORF 内に変異を持たないライン (B24、E68、X84) に対して、マッピングで原因遺伝子の同定を試みた。最初に 3 ラインのうち X84 ラインを用いてマッピングを行ったところ、原因遺伝子は一番染色体の南側約 130cM 付近にマップされた。そして、42 個体の F2 解析により、原因遺伝子座が ATPASE と nga692 のマーカー間の約 3.5 BAC (T23E18-F28016) に存在することが明らかになった(図 15 A)。この領域内の予想される遺伝子の中に、CUC1 や CUC2 と相同性の高い NAC box 遺伝子である At1g76420 遺伝子が含まれていた。そのため、野生型と X84 ラインでこの予想遺伝子領域のゲノムの塩基配列を調べて比較した。その結果、X84 において予想第 1 エキソンと第 2 イントロンの境界部の配列が AG:GT から AG:AT へと置換しているのが見つかった。この塩基は高等植物のイントロンとエキソンの境界部で保存されており、スプライシングに重要と考えられている (Brown, 1996)。そこで RT-PCR 解析を行ったところ、X84 では予想される mRNA とは長さが異なる At1g76420 の転写産物の存在が確認され、しかもその発現量が減少していた(図 15 C)。このことから、この遺伝子が X84 の原因遺伝子と考えられる。そこでクラス に属する残り 2 ラインに関してこの At1g76420 遺伝子のゲノム領域の塩基配列を調べた。その結果、B24 と E68 において At1g76420 がコードする NAC ドメイン領域内の保存されたアミノ酸に置換を引き起こす 1 塩基置換が存在していた(図 15 A、B)。また、高田らによって、本研究と独立に行われた cuc2 エンハンサー変異体のスクリーニングで得られた fun3 においても同じ遺伝子内に 1 塩基置換が見つかった(図 15 A、B)。なお、この fun3 も cuc2 変異存在下でカップ型の子葉をもつ芽生えを生じ、またそれから SAM が形成される。B24、E68、fun3 でみられた塩基置換により、NAC ドメイン内の保存性の高いアミノ酸が別のアミノ酸にそれぞれ置換されていた(図 15 B)。

この 4 ラインは cuc2 変異存在下でカップ型の子葉を持つ芽生えを生じることから、この At1g76420 遺伝子を CUP-SHAPED COTYLEDON3 (CUC3) と命名した。この遺伝子はすでに Vroemen らによってエンハンサートラップ法を用いた解析から単離されていた。しかし、彼らの単離したこの遺伝子の変異体では cuc2 の表現型をエンハンスするが二重変異体でもカップ型子葉をもつ芽生えは 0.2%程度しか生じない (Vroemen et al., 2003)。この理由として、彼らの単離した cuc3-1 において CUC3 の転写産物が発現し

ていることが確認されている。そのため、cuc3-1はCUC3のきわめて弱いアレルであると考えられる。現在までに我々はLerバックグラウンドで上記の4ライン(X84; cuc3-101、B24; cuc3-102、E68; cuc3-103、fun3; cuc3-104)そしてColバックグラウンドのT-DNA挿入ラインのcuc3変異体としてcuc3-105を単離している。なお、このcuc3-105もColバックグラウンドのcuc2変異体(cuc2-3)と二重変異体になると、高頻度でカップ型子葉を持つ芽生えが生じた(表5)。現在、CUC3のゲノム領域を用いたcuc3変異体に対する相補性試験を行っている。また、以後の解析には、nullアレルと考えられるX84(cuc3-101; Lerバックグラウンド)とcuc3-105(Colバックグラウンド)を用いた。

-2. CUC3のタンパク質の構造

シロイヌナズナのゲノム中に109個のNACドメインをもつ遺伝子が存在している。CUC3のNACドメインはその中でもCUC1やCUC2のNACドメインと相同性が高かった(Riechmann et al., 2000、Taoka et al., submitted、図16A)。シロイヌナズナにおいてCUC1やCUC2と相同性の高い遺伝子(CUC-type NAC遺伝子)は12個確認された。NACドメインはこれまでの解析からDNA結合能やタンパク質間相互作用に関するドメインであると考えられている(Xie et al., 2000、Taoka et al., submitted)。NAC遺伝子の多くはNACドメイン以外の領域で保存されたモチーフを持たない。しかし、NAC1などいくつかのNACタンパク質においてNACドメインを除くC末端は転写活性化能をもつことが示唆されている(Xie et al., 2000、Duval et al., 2002)。CUC-type NAC遺伝子の中には、2つほど保存されたモチーフがある。1つは前述したC末端の最後の3-5アミノ酸である。CUC1は、この領域に変異が入ると機能を欠損することや、培養細胞や酵母を用いたin vitroの実験結果から、この領域はCUC1やCUC2の転写の活性化に影響を及ぼすことが示唆されている(Takada et al., 2001、Taoka et al., submitted)。もう1つは、CUC1、CUC2そしてNAMや側根形成に關与するNAC1(Xie et al., 2000)などがもつC末端側に保存された7アミノ酸である(図14C)。しかし、この二つのモチーフは、どちらもCUC3に存在しなかった(図16A)。CUC3がCUC1やCUC2とよく似たNACドメインをもつことはこれらが機能的に類似していることを示唆する。しかし、CUC3のC末側がCUC1、CUC2とは異なることからCUC3は他の2つとは異なる機能をもつ可能性も示唆される。

-3. CUC-type NAC 遺伝子サブファミリーの解析

NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、TIAR BLAST2.0 (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>)、Rice BLAST (<http://riceblast.dna.affrc.go.jp/>)の配列データベースをもちいて検索したところ、CUC-type NAC遺伝子はペチュニア、イネでも見つかった。興味深いことにイネにおいて、特にCUC1やCUC2のNACドメインと高い相同性を示す遺伝子は見つからなかった。しかし、CUC3のNACドメインと相同性の高い遺伝子はペチュニア(NH16)とイネ(OsJNBa0016N23.29)で見つかった(図

16 B)。もっとも、この 3 種類の植物から得られた遺伝子間で NAC ドメインを除く C 末側で保存された配列は見つけれなかった。

シロイヌナズナにおいて CUC1、CUC2 の NAC ドメインと高い相同性をしめす遺伝子 (CUC-type NAC 遺伝子) は CUC3 を含めて 12 個存在する。これらの mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた (図 16 C)。その結果、花芽、鞘、芽生えで高い発現が観察されるのは、CUC1、CUC2、CUC3 のみであった。また At2g24430 と At3g18400 は、根でのみ特異的に発現していた。

CUC-type NAC 遺伝子のうち、現在までに At2g24430 と NAC1 に関して Col バックグラウンドの T-DNA 挿入ラインを単離した (at2g24430-1、nac1-101)。そして、それらを CUC1、CUC2、CUC3 それぞれの Col バックグラウンド変異体と (cuc1-5、cuc2-3、cuc3-105) と掛け合わせて二重変異体を作製した。なお、At2g24430 と NAC1 のどちらの単独変異体においても地上部において明確な表現型は認められなかった。そして、at2g24430、nac1 と各 cuc 変異体との組み合わせでできた二重変異体を観察したところ、いずれにおいても顕著な地上部の表現型は観察されなかった (表 4)。これらの解析から胚発生過程において CUC1、CUC2、CUC3 と協調して SAM 形成や子葉の分離に参与する NAC タンパク質は他に存在しない可能性を示唆している。

-4. 芽生えにおける cuc3 の表現型と cuc1 との関係

cuc2 エンハンサーとして単離された cuc3 の表現型を解析するため、Ler と戻し交配を行って、cuc3-101 単独変異体を得た。cuc3-101 単独変異体の芽生えは cuc1 あるいは cuc2 の芽生えと同様に顕著な表現型は示さなかった。もっとも cuc3-101 は、cuc1-1 や cuc2-1 よりも若干高い頻度で融合した子葉を持つ芽生えが観察された (表 3)。

次に CUC1 遺伝子と CUC3 遺伝子の関係を調べるために cuc1 cuc3 二重変異体を作製した。また、戻し交配を行った cuc3 と再度 cuc2 を掛け合わせて cuc2 cuc3 二重変異体を作製した。さらに Col アリルの cuc1-5、cuc2-3、cuc3-105 を用いてそれぞれの間の二重変異体、三重変異体を作成した。なお、cuc1-5 cuc2-3 二重変異体ではこれまでの結果と同様にカップ型子葉をもつ芽生えが生じ、SAM は観察されなかった (data not shown)。これらの変異体の芽生えを観察したところ、Ler、Col のバックグラウンドに関係なく cuc2 cuc3 二重変異体では高頻度 (Ler ; 87%、Col ; 98%) でカップ型子葉を持つ芽生えが生じた (表 5)。そして cuc2 cuc3 二重変異体のカップ型子葉の中から低頻度 (Ler ; 29%、Col ; 29%) で SAM が形成された (表 5)。カップ型子葉をもつ芽生えに生じた SAM は野生型の SAM と同様の発生を続け、花を作り、結実した (図 20 B)。

一方、cuc1 cuc3 二重変異体も cuc2 cuc3 と同様に高頻度 (Ler ; 91%) でカップ型子葉をもつ芽生えを生じる (図 17 B)。しかし、cuc1 cuc3 二重変異体では、cuc2 cuc3 よりも高頻度で SAM が形成された (図 17 C、表 5)。cuc1 cuc3 や cuc2 cuc3 二重変異体で、SAM は発芽後 2 日目の芽生えにおいてすでに野生型の芽生えと同様に 2 枚の子

葉の中心部に形成されていた(図 17 E、G、H)。もっとも、2 日目の野生型の SAM では、すでに第一、二葉の原基が伸長している。しかし、カップ型子葉をもつ芽生えの SAM では非常に小さな本葉原基しか発生していなかった(図 17 E、G、H)。この本葉形成の遅延のため、これらの植物では発芽後 10 日程度たってから本葉を形成した SAM を目視することができるようになったと考えられる。cuc1 cuc3 は cuc2 cuc3 よりも高い頻度で SAM を形成したが、cuc1/+ cuc2 cuc3 や cuc1 cuc2/+ cuc3 さらに cuc1 cuc2 cuc3 三重変異体ではカップ型子葉をもつ芽生えが生じたが、SAM は形成されなかった(data not shown、図 17 D、表 5)。これらの結果から、CUC3 遺伝子は胚発生過程において SAM の形成および境界部の形成に CUC1、CUC2 と重複して機能することが強く示唆される。しかし cuc1 cuc2 二重変異体では 100%カップ型の子葉を生じ、SAM は形成されない(図 17 F)ことから、CUC3 は、CUC1、CUC2 と重複的な機能をもつが胚発生過程におけるそれらの役割分担が CUC1、CUC2、CUC3 の間で異なっていることが強く示唆される。

-5. 地上部における表現型の解析

cuc1 cuc3 あるいは cuc2 cuc3 は、SAM を形成して地上部の発生を進行する。CUC3 の発芽後の発生における機能を調べるために、cuc3 単独変異体や cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 二重変異体における栄養成長期や生殖成長期における地上部の表現型について調べた。

-5-1. 本葉における CUC3 の影響

cuc3 変異体は cuc1 や cuc2 変異体と同様に本葉に異常を示さない。しかし、cuc2 cuc3 二重変異体は、2 枚の本葉間の融合が観察された(図 17 I-K)。この表現型は、cuc1 cuc3 二重変異体や、cuc1 の弱いアレルである cuc1-6 と cuc2 との二重変異体、あるいは第 1 章で述べた cuc1 cuc2 as1 三重変異体の SAM から作られる本葉で観察されることはなかった(表 5、data not shown)。

-5-2 側枝における CUC3 の影響

野生型において、ロゼット葉や茎生葉の原基は螺旋状に配向して発生していく。また、その葉腋から腋生分裂組織が形成され、それらは側枝として伸長する(図 18 A)。この腋芽の発生や花茎の形成過程において cuc2 cuc3 二重変異体では、興味深い幾つかの表現型が観察された。

(1) 葉序の異常と腋生分裂組織の欠失 ; cuc2 cuc3 二重変異体の花茎は、しばしば野生型で見られる螺旋葉序に乱れが生じて、側枝が欠損していた(図 18 B)。側枝が観察されない茎生葉の基部の縦断切片を観察すると、腋生分裂組織が完全に欠失していた(図 18 D)。また、茎生葉だけではなく栄養成長期に形成されたロゼット葉の葉腋に形成される腋芽も高頻度で欠失していた(図 18 E、F)。

(2) **側枝が上方にずれる (側枝と主茎との融合)**; 野生型では茎生葉の葉腋に形成された腋生分裂組織は、主茎の SAM と同様に葉を作りながら茎を伸長させていく。しかし、*cuc2 cuc3* ではしばしば茎生葉から離れた位置で側枝が伸長した (図 18 G)。このような側枝が形成された要因として、腋生分裂組織の形成する場所が上方にずれてしまったことが考えられる。そこでこのような表現型をもつ側枝周辺の組織を透明化して維管束系の配向を観察した。その結果、側枝の維管束が主茎の維管束と交わることなく主茎の中を伸長しているのが観察された。そして、その側枝の維管束は茎生葉の基部から始まっていた (図 18 H、I)。このことは、腋生分裂組織の形成される位置がずれたのではなく、茎生葉の葉腋に正常に形成された腋芽が主茎としばらく分離されない状態で主茎とともに伸長し、しばらくしてから分離した可能性を強く示唆する。

(3) **茎と茎生葉の融合**; 側枝と主軸の融合以外にも、*cuc2 cuc3* 二重変異体の花茎では茎生葉と主茎が融合していることも観察された (図 18 C)。このような融合が生じると図 18C のように花茎が湾曲していた。

(4) **茎生葉と花柄の融合**; 野生型では一般に茎生葉の葉腋に腋生分裂組織が生じ、直接花芽が形成されることはほとんどない。しかし、*cuc3* 単独変異体や *cuc2 cuc3* 二重変異体では、茎生葉から腋生分裂組織ではなく花分裂組織が直接生じ、しかもその花柄と茎生葉が融合していることがあった (図 18 J)。このような場合、茎生葉が花柄を取り巻くようにして融合していた (図 18 K)。その融合部分を SEM で観察すると花柄と茎生葉の間の表面細胞は、花柄や茎生葉のものとは異なっていた。(図 18 L)。

側枝には主茎から形成される側枝 (二次シュート) と側枝から形成される二次側枝 (三次シュート) がある (図 19 A)。これらのシュートでは側枝の異常が生じる頻度が異なることが知られている。例えば、*fil* (*filamentous flower*) 変異体では三次シュートにのみ腋生分裂組織の欠失が観察される (Sawa et al., 1998)。そのため、側枝の表現型を *cuc1*、*cuc2*、*cuc3* 変異体、*cuc1 cuc3*、*cuc2 cuc3* 二重変異体の花茎で調べた (図 19 B、C)。その結果、*cuc3* 変異体では側枝の異常は三次シュートで顕著に見られた。しかし、*cuc3* 変異体で見られる表現型は *cuc1*、*cuc2* 単独変異体では認められない。また *cuc1 cuc3* 二重変異体でも *cuc3* 変異体と同程度の頻度でしか異常を示さなかった。しかし *cuc2 cuc3* 二重変異体においてもっとも顕著に異常がみられた。一方、*cuc2* エンハンサーとして単離された *cuc1-6 cuc2* の二重変異体や *cuc1 cuc2 as1* の花茎においてもこれらの異常はほとんど観察されなかった (data not shown)。このことから、CUC3 は腋生分裂組織の形成や地上部の茎と側生器官との境界部の決定に重要な役割を果たすことが強く示唆される。

-5-3. 花柄の表現型

さらに *cuc1* や *cuc2* では観察されなかった新しい表現型として *cuc3* 変異体では花柄が野生型に比べて茎に対して鋭角に上に向かって形成された。この表現型は *Ler*、

Col バックグラウンドどちらのアリルでも観察された (data not shown、図 24 B)。また、この表現型は、特に *cuc2 cuc3* 二重変異体において顕著であった (図 20 B)。さらにこの表現型に対しても、*cuc1 cuc3* 二重変異体において強調した効果は観察されなかった (図 20 C)。上向きになった花柄基部を観察すると茎に花柄が融合したような跡がついていた。この跡は *cuc2 cuc3* 二重変異体においてもっとも顕著に現れた (図 20 E)。花柄基部の維管束パターンを観察すると、野生型では維管束が花柄と茎の接点で湾曲し、花柄の維管束と茎の維管束は比較的早く融合してひとつになっていた (図 20 F)。しかし、*cuc2 cuc3* 二重変異体では茎由来の維管束の湾曲部が観察されず、また花柄由来の維管束と茎の維管束はすぐに融合せず、そのまま平行に茎の中を配向していた (図 20 G)。このことからこのような跡は花柄がしばらく茎と融合していたためにできたと考えられる。

-5-4. 花器官における *cuc3* の影響

cuc1 や *cuc2* の花は低頻度でがく片の融合が観察される。しかし、*cuc3* のがく片はほとんど融合しない。一方、雄ずい同士、雄ずいと雌ずいの融合が低頻度で観察された (data not shown)。*cuc2 cuc3* や *cuc1 cuc3* 二重変異体においてがく片同士が融合の程度は強まるが、*cuc1 cuc2/+* や *cuc1/+ cuc2* に比べて、融合の程度は低かった。また、雄ずい同士、雄ずいと雌ずいの融合も二重変異体で特に強調されることはなかった (data not shown)。これらのことから *CUC3* が花器官の分離過程において *CUC1* や *CUC2* ほど機能していない可能性が示唆される。

-6. *CUC3* の発現解析

-6-1. 胚発生過程における *CUC3* の発現

CUC3 の mRNA の胚発生過程における発現パターンを調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。*CUC3* は最初に 32 細胞期胚の頂端領域全体で検出された (図 21 A)。初期心臓型胚において *CUC3* は子葉原基の間で発現していた (図 21 B、C)。この領域は組織学的な解析によって将来 SAM へと分化する領域 (予定 SAM 領域) を含むと考えられる (Barton & Poethig, 1993)。これら初期胚における *CUC3* の発現パターンは *CUC1*、*CUC2* や *STM* の発現領域と部分的に重なる。しかし、*CUC1* や *CUC2* の発現が最外層の細胞 (L1 層) でほとんど検出されないのに対して、*CUC3* は L1 層でもっとも強く発現が観察しており、L2、3 層における発現はほとんど検出できなかった (図 21 B、C、Takada et al., 2001、Aida et al., 1999)。後期心臓型胚から魚雷胚期の間においても *CUC3* は子葉間の L1 層で発現していた (図 21 D)。そして、子葉屈曲胚では、*CUC3* は *CUC1* や *CUC2* 同様に子葉原基と予定 SAM 領域との境界部で検出された (図 21 E)。この時期になると L1 より下層でも発現がみられた。

-6-2. 生殖成長期における CUC3 の発現

次に花茎における CUC3 の発現を調べた。CUC3 は花序分裂組織 (Inflorescence Meristem (IM)) と花分裂組織 (Floral Meristem (FM)) の境界部で強く発現していた (図 22 A、B)。また、発生の進んだ花柄の基部と茎との境界部分の上部で強く発現していた (図 22 B、C)。

また、FM だけでなく腋生分裂組織が形成される予定領域においても、IM と腋生分裂組織の境界で CUC3 の強い発現が観察された (図 22 A、C)。そして腋生分裂組織形成後は、腋生分裂組織と形成葉の間および花茎と腋生分裂組織の間の両方の境界部に CUC3 の発現がみられた (図 22 F)。

IM の横断切片の観察から CUC3 の発現は IM と FM の基部に加えて、ステージ 1-2 にある FM の一部で強い発現が検出された (図 22 A、B、D-F)。また、本葉と托葉の境界部でも発現が観察された (図 22 D、E)。

シロイヌナズナの花器官の原基は 4 つの「whorl」と呼ばれる同心円状の領域から生じる。そしてそれぞれ外側からがく片、花弁、雄ずい、心皮の順に形成される (Coen & Meyerowitz, 1991)。花における CUC3 の発現を観察するとステージ 2-3 の FM ではがくの原基と内側の分裂組織との境界で発現が見られた (図 23 A)。ステージ 4-5 の FM になると、がく原基と内側の分裂組織との境界だけでなく、雄ずい原基と内側分裂組織の境界部で発現が観察された (図 23 B)。ステージ 7 以降の FM では、各 whorl の境界部で CUC3 の発現が観察されたがシグナルは弱く、境界部での発現領域も限られた数細胞のみであった (図 23 C)。ステージ 8 になると生殖器官の発達が起こり、雌ずいでは隔壁の原基や胚珠の原基が生じる (Smyth et al., 1990)。この時期に CUC1、CUC2 はどちらも隔壁が融合する部分に発現する。しかし、CUC3 は心皮の内側で発現し、隔壁の融合部分には発現しなかった (図 23 E、Takada et al., 2001、Ishida et al., 2000)。その後 CUC3 は、胚珠同士、胚珠と心皮、胚珠と隔壁との境界部に発現し、発生が進むに連れてその発現は胚珠と心皮の境界部に限定された (図 23 D、F、G)。

シロイヌナズナにおいて、隔壁原基の基部から胚珠原基が生じる。胚珠原基は珠心・合点 (珠皮)・珠柄の 3 つの領域からなる。CUC3 の発現を観察したところ CUC2 と同様に、珠心と合点との境界部で、珠心を取り囲むように発現していた (図 23 H、I、Ishida et al., 2000)。

-6-3. cuc 変異体における CUC3 の発現

cuc1、cuc2、cuc3 ではどの組み合わせの二重変異体においてもカップ型子葉をもつ芽生えを生じた。cuc1 cuc2 二重変異体の胚において CUC3 は正常に発現しているのだろうか？ cuc1 cuc2 二重変異体の胚における CUC3 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、CUC3 は発現していた。しかし、cuc1 cuc2 二重変異体では SAM 領域全体で発現し、シグナルも弱かった (図 21 F、G)。このことから少なくとも CUC3 の発現に CUC1、CUC2 の機能を必要としないことが推測される。さらにそれを支持する結果として、35S::CUC1 植物の子葉において CUC3 の異所的な発現は観察されなかつ

た (data not shown)。これらの結果から CUC3 遺伝子は CUC1 や CUC2 によって発現調節は受けないことが示唆される。

-7. cuc1 cuc3 と cuc2 cuc3 における STM の発現

cuc1 cuc2 二重変異体の胚で STM は発現せず、SAM が完全に欠失している。cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 二重変異体はカップ型子葉をもつ芽生えにおいても SAM をもつ個体がいる。そこで、cuc1 cuc3 や cuc2 cuc3 の胚における STM の発現を調べた。cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 二重変異体のどちらにおいても STM の発現していない胚と STM の発現が正常な場所に観察される胚がみられた (図 21 I、J)。そして、cuc1 cuc3 (23/25 個体) の方が cuc2 cuc3 (23/67 個体) より発現している胚の頻度は高かった。cuc1 cuc3 二重変異体では高頻度で SAM が形成される。この事と STM の発現頻度と間には相関がみられる。そして、SAM が形成されない個体では cuc1 cuc2 と同様に STM がまったく発現していないと推測される。

STM は野生型の胚では予定 SAM 領域全体に発現している (Long et al., 1996、図 21 H)。しかし、興味深いことに cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 に見られた STM の発現は野生型とは異なり、予定 SAM 領域の L1 層で発現が消失していた (図 21 J)。このことから CUC3 は主に L1 層で発現する事と関連がある可能性が高い。

-8. LATERAL SUPPRESSOR と CUC との関係

これまでの解析から CUC3 は胚発生過程における SAM 形成だけではなく、発芽後の腋生分裂組織の形成にも影響を及ぼす事が強く示唆される。これまでに腋生分裂組織形成に異常を示す変異体はいくつか単離されているがその中にトマトの lateral suppressor (ls) 変異体が知られている。この変異体は、栄養成長期の腋生分裂組織を完全に欠失する。LS 遺伝子は、転写因子と考えられている GRAS ファミリーのタンパク質をコードしていた (Schumacher et al. 1999)。シロイヌナズナにおいても LS 遺伝子と高い相同性を示す LAS (LATERAL SUPPRESSOR) 遺伝子が単離され、この変異体も栄養成長期の腋芽を欠失し、また生殖成長期の腋芽にも低頻度で異常を示した (Greb et al. 2003)。また、LAS は本葉と SAM の境界部で発現しており、葉腋における腋生分裂組織の形成に関与すると考えられる (Greb et al. 2003)。この LAS の発現パターン、そして変異体の表現型などから LAS と CUC 遺伝子との間に何らかの遺伝学的関係が存在すると考えられる。そこで、las-101 変異体を Col バックグラウンドの T-DNA 挿入ラインから単離し、特に側枝の表現型が顕著であった CUC2 と CUC3 のそれぞれの Col バックグラウンド変異体と (cuc2-3、cuc3-105) と掛け合わせて二重変異体を作製した。

las-101 変異体を詳しく観察すると、報告された側枝の表現型のほかにも cuc3 単独変異体で観察された花柄が上向きになる表現型が観察された (図 24 A-C)。cuc2 las 二重変異体は、芽生えにおいて明確な表現型を持たなかった。しかし、抽台後は cuc3 変異体で観察される側枝と主茎の融合による茎生葉と側枝のずれが観察された (図 23

D)。cuc3 las 二重変異体の芽生えにおいては、高頻度で本葉同士の融合が観察された(図 24 J、表 5)。そして、生殖成長期になるとこの二重変異体では腋生分裂組織の欠失、側枝と主茎の融合による側枝と茎生葉のずれ、花柄と茎生葉の融合など cuc2 cuc3 で見られた側枝に関連した異常が観察された。また、花柄が上向きになる表現型はより強調され、茎には花柄の跡が残った(図 24 F-I)。これらの結果から LAS は腋生分裂組織の形成や側生器官の境界部の形成において、CUC2 や CUC3 遺伝子と協調して働くことが強く示唆される。

・ CUC TWO ENHANCER1 (CTE1)の単離とその解析

-1. CTE1 のマッピングと同定

クラス に分類されたエンハンサー変異体(H48、L77、T59)はクラス 、 の cuc2 エンハンサー変異体と異なり、カップ型の子葉をもつ芽生えが生じる頻度が低い。しかし、クラス とは異なり、カップ型子葉を生じた芽生えにおいて高頻度で SAM を欠失していた。また、これらのラインは共通して根が短くなった。これら 3 ライン間でアレルリズムテストを行った結果、どのライン同士の組み合わせでも F1 世代の芽生えに同様の異常が現れた(data not shown)。このことからこれら 3 ラインは同じ遺伝子の変異である可能性が強く示唆される。そこでこれらの変異体の原因遺伝子を単離するため、H48 ラインを用いてマッピングを行った。その結果、この原因遺伝子は二番染色体の南側約 72cM 付近にマップされた。また、103 個体の F2 解析により、原因遺伝子座は F4I8 と T3F17 の各 CAPS マーカー間の約 1.5 BAC (F4I8-T3F17) に存在することが明らかになった(図 25 A)。この領域に存在する予想遺伝子に対して H48 のゲノムの塩基配列を調べた結果、At2g46020 遺伝子に変異が見出された。そこで他の 2 ライン(T59、L77)に対してもこの遺伝子領域の塩基配列を調べた。しかし、この領域内に変異がみつからなかった。

公示されているシロイヌナズナのゲノムデータベースの情報によると At2g46020 遺伝子は、SWI/SNF 型 ATP 依存性クロマチンリモデリング因子(CHR2)であることがわかった。しかし、At2g46020 のコードする予想タンパク質には他の CHR がもつ N 末構造が欠失していた。そこで、At2g46020 の 5' 末側の次の予想遺伝子 At2g46010 付近の予想ペプチドを調べた。するとそこに SWI/SNF タンパク質が持つ N 末側構造をコードする領域がみつかった。そこで AT2g46010 と At2g46020 をまたぐようにプライマーを作製し、cDNA を鋳型にして RT-PCR を行った。その結果、この二つの予想遺伝子は、つながった一つの遺伝子として転写される可能性が示された(図 25 A)。

つながった At2g46010 と At2g46020 領域 (At2g46010-46020) の塩基配列を T59 と L77 ラインのゲノムで再度調べたところ、この 2 ラインでは、At2g46010 内においてそれぞれ 1 塩基置換が見つかった。このことは統一した At2g46010-46020 がこれらの変異体の原因遺伝子であることを強く示唆する。この遺伝子に生じた変異は cuc2 変異をエンハンスしたことから、この At2g46010-46020 遺伝子を CTE1 (CUC TWO

ENHANCER1) と命名した。現在までにこの遺伝子の変異体として Ler バックグラウンドで上記 3 ライン (H48 ; cte1-1、T59 ; cte1-2、L77 ; cte1-3) と、Col バックグラウンドの T-DNA 挿入ラインとして 1 ライン (cte1-4) 得られている。また、この Col アリルの cte1-4 と Col アリルの cuc2-3 変異体を掛け合わせて二重変異体を作製したところ、やはり cuc2 変異体の表現型を強調した。このことから At2g46010 が CTE1 遺伝子であることが強く示唆される。現在、CTE1 のゲノム領域を用いてこれらの変異体に対する相補性試験を行っている。

-2. CTE1 のタンパクの機能

CTE1 は N 末側に SWI/SNF ファミリーに特徴的な ATPase ドメインを持つ。また、CTE1 のこの領域には、他の SWI/SNF ファミリーのタンパク質にも存在する SNF_2、HELICc ドメインが含まれていた (図 25 B)。また、CTE1 は、SWI/SNF ファミリーの中でもシロイヌナズナの Brahma や出芽酵母の SNF2 が属する SNF2 サブファミリーともっとも高いアミノ酸相同性を示したことから、このサブファミリーの一員であると考えられる。SWI/SNF タンパク質の機能は DNA の組み換えから DNA 修復といった多岐に及ぶ。しかし SNF2 サブファミリーは機能的・構造的に高く保存されており、クロマチンリモデリングの 2 MDa 巨大複合体の中心的な役割を担い、転写調節に参与する。シロイヌナズナのゲノム上には、29 個の SWI/SNF 型 ATPase をもつ遺伝子が存在し、その中でも SNF2 サブファミリーに属する遺伝子が 4 つ存在する (図 25 C、Verbsky & Richards, 2001)。この中で花成制御に異常を示す lfy 変異体のエンハンサーとして SYD (SPLAYED) が単離されている (Wagner & Meyerowitz, 2002)。SYD は SAM や側生器官の向軸側で発現し、変異体の表現型から生殖成長期における胚珠形成や花成制御、花器官の発生など様々なプロセスに働くと考えられる。そして、CTE1 はシロイヌナズナにおいて SYD ともっとも相同性が高かった (図 25 B、C)。

-3. cte1 の表現型の解析

先に述べたように cuc2 cte1 二重変異体では低頻度でカップ型子葉を持つと同時に芽生えにおいて発生の遅れや根が短くなるなどの表現型を示した。このような cuc2 単独変異体に見られない表現型について調べるために野生型と戻し交配を行い、cuc2 変異を除いた cte1-1 や Col バックグラウンドの cte1-4 変異体を解析した。cte1 単独変異体では、cuc2 cte1 とは異なり、カップ型子葉をもつ芽生えは生じなかった。そして、芽生え後の発生は遅れ、根が短くなった (図 26 A、C、D)。また、本葉は上偏成長し、葉の鋸歯化も見られた (data not shown)。さらに抽台後の花茎は丈が短く、腋生分裂組織の欠失や側枝が形成される場所に葉を一枚のみ形成するなどの異常が観察された (図 26 B、E-G)。また、cte1 変異体は、雄ずい、雌ずい共に異常を示し、不稔であった (data not shown)。これらの表現型は cuc2 変異存在下でも強調されなかった。このことから、芽生えの子葉以外の表現型に CUC2 は関与していないことが示唆される。また、cte1 の表現型の解析から CTE1 が植物の発生において広範囲の現

象に關与している可能性が高い。

・ GNOM の同定

クラス の変異体 T123 は、cuc3 や cte1 とは異なり、カップ型子葉をもつ芽生えだけではなくチューブ型の子葉をもつ芽生えも生じる (図 27 A)。また、根は極端に短く、ほとんど側根を作らない (data not shown)。

透明化処理を行って、この変異体の芽生えにおける維管束パターンを調べた結果、維管束の分化に異常がみられた (図 27 B、C)。このラインの表現型は、すでに本研究室で cuc1 のエンハンサーとして単離された gnom の新しいアリルとよく似ていた。そこで、T123 のゲノムの GNOM 領域の塩基配列を調べた結果、この領域内に 1 塩基置換が見つかった。この塩基置換により 568 番目のグリシンがグルタミン酸に置換する。おもしろいことに、この 568 番目のグリシンは cuc1 のエンハンサーとして独立に単離された gnom アリルでも変異していた (古谷ら ; 未発表)。もっとも同じアミノ酸に変異をもつがこれと今回単離された gnom アリル (gnom-568E) は変異した塩基が異なっていた。このアミノ酸が GNOM においてどのように機能するのかについてまだわかっていない。しかし、これらの変異体を解析することによって新しい知見が得られる可能性は高い。

考察

cuc2 変異体を変異原処理し、カップ型の子葉を持つ芽生えを生じる 14 ラインのエンハンサー変異体を得た。そしてそれらの原因遺伝子として CUC1、CUC3、CTE1、GNOM の 4 つの遺伝子座を同定した。また、これらの変異体を解析することによって CUC1 や CUC2 の植物の発生における新しい機能、役割分担が明らかになった。さらに新たに CUC 遺伝子の発現制御に関わると予想される遺伝子も単離された。

胚発生過程における CUC3 の機能

cuc2 エンハンサーとして単離された CUC3 遺伝子は CUC1、CUC2 そしてペチュニアの NAM 遺伝子と高い相同性を示す CUC-type NAC 遺伝子に属している。そして、cuc3 変異体は cuc1、cuc2 どちらと二重変異体を作製してもカップ型子葉を持つ芽生えを生じ、多くの芽生えで SAM が欠失した。さらに CUC3 の発現パターンは CUC1、CUC2 と似ており、胚発生初期には将来 SAM が形成される領域で、また発生が進むと子葉と SAM との境界部で発現する。このことから CUC3 遺伝子は CUC1、CUC2 と機能的に重複した遺伝子であり、胚発生過程における SAM の形成や器官境界部の形成に関与していることが強く示唆される。

もっとも、cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 二重変異体は、cuc1 cuc2 二重変異体とは異なり、半数以上の芽生えは SAM を持ち、発芽後それらは発生を続け、ほぼ正常に結実する。またカップ型子葉の形成頻度も cuc1 cuc2 は 100%であるが、これら 2 つの二重変異体は 100%に達することはない。このことから CUC3 は胚発生過程における SAM 形成や器官境界部の形成に関して CUC1 や CUC2 に比べて補助的な機能を担っている可能性が高い。

一方、cuc3 単独変異体は cuc1 や cuc2 単独変異体より高い頻度で子葉が融合していた。胚発生過程で CUC1、CUC2 は主として L2、3 層で発現している (Takada et al., 2001、Aida et al., 1999)。これに対して、CUC3 は将来 SAM が形成される付近の L1 層で強く発現している。また、cuc1 cuc3、cuc2 cuc3 二重変異体で L1 層の STM の発現が消失していた。このことから CUC3 は、L1 層での STM の発現制御を介して CUC1 や CUC2 とは別経路で SAM 形成や器官分離に働くのかもしれない。また、CUC3 は CUC1 や CUC2、ペチュニアの NAM に共通して存在する C 末端側の保存されたアミノ酸配列をもたない。このことは、CUC3 が CUC1 や CUC2 とは異なる機能をもつ、あるいは発現制御を受ける可能性を示唆している。

ペチュニアの nam 変異体では、cuc1 cuc2 同様にカップ型子葉を持つ芽生えが生じる。しかし、それらには SAM が低頻度で形成される (Souer et al., 1996)。このことは、ペチュニアの胚発生において境界部の形成と SAM 形成に NAM だけでなく NAM と重複した機能をもつ NAC 遺伝子も機能している可能性を示唆している。ゲノムデータベースの検索からペチュニアには、CUC3 と相同性の高い NH16 遺伝子が存在することがわかった。この遺伝子がペチュニアにおいて CUC3 と同様の働きをしているのかも

しれない。一方、興味深いことにイネや小麦等の単子葉植物において CUC1、CUC2、NAM と相同性が極めて高い遺伝子は見つけれない。このことから単子葉植物の胚発生過程における SAM 形成には双子葉植物と異なるメカニズムが存在することを強く示唆している。

腋生分裂組織形成過程における CUC3 の機能

シロイヌナズナを含む多くの高等植物において、地上部の器官を生み出す分裂組織の形成過程は、大きく (1) 胚発生過程における将来主茎を構築する SAM の形成、(2) 葉腋に形成される腋生分裂組織形成、(3) 植物片の組織培養から得られる不定芽形成の 3 つに分けられる。cuc1 cuc2 二重変異体は、胚発生で生じる SAM を欠如し、カルスからの不定芽形成も著しく減少する (Aida et al., 1997)。また、CUC1 あるいは CUC2 を過剰発現させると、植物体では子葉上に不定芽が形成され、またカルスの場合、不定芽形成効率が上昇する (Takada et al., 2001、Dimon et al., 2003、Hibara et al., 2003、Ishida et al., unpublished results)。これらの結果から、CUC1 と CUC2 が胚における SAM 形成と不定芽形成に関与することが示唆される。一方、今回得られた cuc3 変異体や cuc2 cuc3 二重変異体の花茎の異常から、CUC3 が腋生分裂組織形成に関与することが強く示唆される。ペチュニアの NAM cDNA を用いたコサプレッションラインにおいて、nam 変異体では観察されない腋生分裂組織の欠失という異常を示すラインが得られている。このラインでは NAM 以外のいくつかの NAC 遺伝子の発現が減少していた (Souer et al., 1998)。このことからペチュニアに存在する CUC-type NAC 遺伝子の中には腋生分裂組織形成に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆される。

胚発生やカルスの場合とは異なり、腋生分裂組織形成の異常は cuc2 cuc3 二重変異体においてもっとも顕著であった。このことから腋芽形成には CUC3 だけではなく、CUC2 も機能していることが示唆される。一方、腋生分裂組織の表現型に対して CUC1 の変異はほとんど影響を及ぼさなかった。この理由として、3 つの仮説があげられる。

(1) 地上部の発生に関して CUC1 は CUC3 と同一経路上で働く、そのため cuc1 変異は cuc3 変異が存在すると、特に表現型に影響しない、(2) CUC1 は腋生分裂組織の形成過程で働いていない、(3) cuc1-1 変異体は null ではない (Takada et al., 2001) ため、CUC1 の機能が部分的に残っており、顕著な表現型として現れない。現在、(3) の可能性を検証するために、cuc1 (cuc1-7) を用いて、cuc3 と二重変異体を作製している。

cuc3 las 二重変異体は、cuc2 cuc3 二重変異体と同様に腋芽の形成に異常を示した。CUC3 と LAS はどちらも地上部において SAM と側成器官の境界部で発現している。これらの結果から CUC3 と LAS 遺伝子は、共に腋芽の形成に関して正に制御していることが示唆される。LAS 遺伝子はトマトの LS 遺伝子やイネの MOC1 遺伝子と相同性の高い GRAS タンパク質をコードしており、これらの遺伝子はすべてそれぞれの植物における腋生分裂組織の形成に関与している (Schumacher et al., 1999、Greb et al., 2003、

Li et al., 2003)。この事から、LAS 遺伝子群は進化上機能的に保存されていると考えられる。一方、CUC3 に相同性の高い遺伝子も単子葉、双子葉植物で見つかった。このことから腋生分裂組織の制御機構そのものが進化的に保存されている可能性も示唆される。そうだとすると、シロイヌナズナだけではなく、イネやトウモロコシといった単子葉植物における CUC3 に似た遺伝子の機能を解析することは、高等植物に普遍的な腋生分裂組織形成の分子メカニズムを知る上で重要になるだろう。

茎頂分裂組織と側生器官の境界部における CUC3 の機能

cuc3 変異体や cuc2 cuc3、cuc2 las、cuc3 las 二重変異体では、本葉と茎、花柄と茎、本葉同士など多くの側生器官や軸生器官の間で融合が観察された。このことは、多くの器官の境界部で細胞増殖あるいは細胞伸長を制御することで、器官同士あるいは主軸と側生器官を分離し独立させ、それを維持する機構が働いていることを示唆する。そして、CUC3 はその過程に関わると考えられる。実際に、CUC3 のエンハンサートラップラインを用いた解析から、CUC3 が器官の分化後も境界部で発現が維持していることが示されている (Vroemen et al., 2003)。そして今回得られた結果から CUC2、CUC3、LAS 遺伝子が器官の境界部を形成し、維持する機構に関わる因子であることが強く示唆される。

CUC3 の C 末端側の機能

CUC3 は CUC1 や CUC2、そしてペチュニアの NAM がもつ C 末側の 2 つの保存されたアミノ酸配列を持っていなかった。CUC1 において C 末端最後の保存された 5 アミノ酸に変異が起こると NAC ドメインに変異をもつアシルと同じ性質を示す。また、CUC2 タンパク質の機能解析からこの C 末端の保存配列は転写の活性化に関係することが示されている (Taoka et al., submitted)。一方、これとは別に CUC1、CUC2 など共通して存在する C 末側に保存された 7 アミノ酸をコードする塩基配列は、最近植物で報告されている miRNA164 の結合サイトである (Reinhart et al., 2002)。そして、miRNA による mRNA の分解過程に関わるシロイヌナズナの Dicer ホモログ (DCL1) の変異体で CUC1 や CUC2 mRNA は多く蓄積していた (Kasschau et al., 2003)。この 7 アミノ酸を別のアミノ酸に置換した CUC2 タンパク質を作成したところ、このタンパク質は野生型の CUC2 と同様の機能を示した (Taoka et al., submitted)。このことからこの保存された 7 アミノ酸領域はそのアミノ酸配列そのものより、それに対応する mRNA の塩基配列が機能的に重要であり、その配列によって CUC1、CUC2 遺伝子の発現調節が行われている可能性が高い。CUC3 は、これらの C 末端最後のアミノ酸配列や 7 アミノ酸の領域が保存されていなかった。このことから、CUC3 は、CUC1、CUC2 と異なる発現あるいは機能調節を受ける可能性が考えられる。

一方、DCL1 の変異体の一つである *carpel factory* (caf) や eIF2C ファミリーの遺伝子で miRNA を介した遺伝子発現の調節過程に関与すると考えられる PINHEAD (PNH) の変異体は腋生分裂組織形成に異常を示す (Jacobsen et al., 1999、Lynn et al.,

1999)。そこで、これらの変異体において CUC2、CUC3、LAS がどのように発現調節されているかを調べることは今後の重要な課題の一つと考えられる。

CTE1 の機能とその働き

CTE1 は、SNF2 サブファミリーに属する SWI/SNF 型 ATPase をコードすると考えられる。このグループに属するタンパク質は機能的、構造的に酵母からヒトまで保存されている。SNF2 サブファミリーを含む複合体は、ゲノムの局所的な場所で転写調節因子や基本転写因子のシスエレメントへの接触性を制御することによって、特定の遺伝子の転写を調節すると考えられている。これはヌクレオソーム構造を変化させる、あるいは DNA 上のヌクレオソームの位置を変えることによって引き起こされる (Wagner, 2003)。これらの活性は *snf2p/brm* (ともに SNF2 サブファミリーに属する SWI/SNF ATPase) の ATPase が転写の活性化や抑制化に関与する結果と一致する (Narlikar et al., 2002)。これらの報告から CTE1 も特定の遺伝子の転写調節に関与することが示唆される。*cuc2 cte1* でカップ型子葉をもつ芽生えが生じたことから、CTE1 は CUC の下流因子、あるいは CUC1 や CUC3 の発現を調節している可能性がある。現在、*cuc1 cte1*、*cuc3 cte1* 二重変異体の作製を行い、それらの表現型について解析を行っている。また、*cte1* や *cte1 cuc2* 二重変異体におけるこれらの遺伝子の発現を調べることも重要である。シロイヌナズナにおいて CTE1 ともっとも相同性の高い SYD 遺伝子も SAM の維持や花成への移行、花の各器官の identity を決める因子の発現など様々な発生の現象に関与している (Wagner & Meyerowitz, 2002)。この *cte1* や *syd* 変異体の解析によってクロマチンを介した SAM 形成における新しい制御機構が明らかになることが期待される。

GNOM を介した CUC の発現制御

cuc2 エンハンサーとして単離された GNOM は、オーキシンの排出キャリアーである PIN1 の正しい配置のために重要な因子である (Steinmann et al., 1999)。Aida らの解析から *cuc1 pin1* 二重変異体ではつぼ型の子葉をもつ芽生えが生じることが示された (Aida et al., 2002)。CUC1 mRNA の *pin1* 変異体では、胚頂端部において発現は広がり逆に CUC2 の発現は弱まって発現領域が縮小する。また、*cuc2 pin1* 変異体でも低頻度であるがつぼ型の子葉をもつ芽生えが生じた。この結果は、胚頂端部での正しいオーキシン分布が胚発生過程における CUC の発現に影響を及ぼし、パターン形成に関係する可能性を示唆する。*cuc2* エンハンサー変異体として *gnom* が単離されたのは PIN1 あるいは、その他のタンパク質の輸送やそれによって生じる極性を持つこれらのタンパク質の細胞内局在が乱れることによって CUC1 や CUC3 の発現が乱れ、その結果としてカップ型やチューブ型の子葉をもつ芽生えが生じた可能性を示唆する。この GNOM アリルと古谷らが単離したアリルとは異なる塩基の変異により、同一のアミノ酸に置換が生じていた (Furutani et al., unpublished results)。これらのアリルを用いた解析から GNOM の新しい機能が見出されることが期待される。

材料と方法

植物と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の Landsberg erecta (Ler) と Columbia(Col) ecotype を野生型として用いた。

種子は 10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.01% triton X-100 で 5 分間滅菌して GM もしくはカナマイシンを含む寒天培地上にまき、発芽を同調させるため、4 暗黒下に 2 日置いてから、23 連続白色光照射下の培養器に移して発芽させた。発芽後約 2 週間で土に移植して 23 連続白色光下で育てた。

側枝の表現型の統計をとるために植物は 23 10/14 h (Light/Dark) 条件下で 30 - 35 日間土の上で育てた。その後 16/8 h (Light/Dark) 条件下で 30 日間生育させて表現型を観察した。

培地の組成

本研究で用いた培地の組成は以下の通りである。

(1)GM (germination medium) : 0.5%gellan gum、4.6 g/l Murashige & Skoog salt base (MS salt base)、10 g/l sucrose、0.1 g/l myo-inositol、0.5 g/l MES-KOH.

(2)カナマイシンを含む寒天培地:1.0%agar、4.6 g/l Murashige & Skoog salt base (MS salt base)、10 g/l sucrose、0.1 g/l myo-inositol、0.5 g/l MES-KOH.

形質転換植物

(1) 35S::CUC1 植物

CUC1 過剰発現体 (35S::CUC1 植物) は高田忍博士 (Tubingen 大学) によって作られた系統を用いた (Takada et al., 2001)。

(2) 5' STM::GUS 植物

5' STM::GUS の導入された野生型植物は Kathy Barton 博士 (Carnegie 研究所) よりいただいた。

(3) 5' BP::GUS 植物

5' BP::GUS の導入された野生型植物は Sarah Hake 博士 (California 大学 Berkeley 校) よりいただいた。

かけあわせに用いた変異体

cuc1-1 cuc2-1、stm-1、wus-1、as1-1、as2-5 はそれぞれ以前に報告されているアリルを用いた (Aida et al., 1997、Barton & Poethig, 1993、Laux et al., 1996、Byrne et al., 2000、Semiarti et al., 2001) 。bp-101 は Ler バックグラウンドのアリルとして我々の研究室で単離した。bp-101 はこれまで報告された bp 変異体同様に花柄の発生に異常を示す。BP 遺伝子のゲノム領域の塩基配列から bp-101 ではホメオドメイン内の保存されたアミノ酸 (Trp326) が終止コドンに変換されていた。

Col バックグラウンドの cuc3-105、las-101、nac1-101、at2g24430-1、cte1-4 は、Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL) コレクションから単離した。cuc1-5 は、John Innes 研究所の Robert Sablowski 博士から分与していただいた。cuc2-3 は、Description of the Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL (前 GARLIC)) コレクションから単離した。単離された Col 変異体はそれぞれの遺伝子と T-DNA に特異的なプライマーを用いて T-DNA の挿入を確認し、また野生型と 2 - 3 回戻し交配を行ってから実験に用いた。

35S::CUC1 植物と bp-101、stm-1、wus-1、5' STM::GUS、5' BP::GUS との二重変異体および cuc1 cuc2 との三重変異体の作製

(1) 変異体との掛け合わせ

それぞれのヘテロ接合体あるいはホモ接合体に 35S::CUC1 (S2-6、S3-7) を交配し、得られた F1 をカナマイシンを含む培地で選抜した。生存した個体は、各遺伝子の変異を検出するプライマーを用いた PCR 解析を行いそれぞれの変異をもつ個体を選抜した。そして次世代 (F2) にホモ接合体でかつ、カナマイシン耐性を示す植物体 (35S::CUC1/bp、35S::CUC1/stm、35S::CUC1/wus、35S::CUC1/cuc1 cuc2) の表現型の解析を行った。

(2) 形質転換体との掛け合わせ

35S::CUC1 (S2-6、S3-7) 植物に 5' STM::GUS あるいは 5' BP::GUS のキメラ遺伝子をもつ形質転換体を交配し、得られた F1 の根の一部を GUS 染色してキメラ遺伝子を持つ個体を選抜した。そして得られた F2 個体を解析に用いた。

走査型電子顕微鏡を用いた解析

35S::CUC1 の子葉および芽生えは FAA (3.7%ホルムアルデヒド、5%酢酸、50%エタノール) 中に 4 で一晩固定した後、エタノールシリーズで脱水した。次にエタノールで脱水したサンプルをアセトンに置換してから臨界点乾燥を行った。試料台上にこの試料を固定し、イオンスプラッタコーターを用いて金属蒸着し、走査型電子顕微鏡で観察した。胚は、種子から取り出して FAA 中で固定後、100 µg/ml ポリ-L-リジン (in 10 mM Tris-HCl [pH8.0]) でコーティングしたカバーガラス破片に接着させた。その後の操作は子葉・芽生えと同様に行った。

組織学的観察 (組織切片と透明化処理)

組織切片作製には、以下の方法を用いた。適当な大きさに切り出した組織を PFA (4% パラホルムアルデヒド in PBS [pH6.8]) 中に入れ、4 で一晩固定した後、エタノールシリーズで脱水した。脱水した組織は Kulzer 社のマニュアルに従ってテクノビット 7100 に包埋した。次にミクロトームを用いて 3 - 5 µm の切片を作製しスライドガラスに貼付した。染色には 0.05% トルイジンブルーを用いた。

芽生え、花茎の透明化はエタノールと酢酸を 9 : 1 の割合に調整した混合液中に一晩以上固定し、次にエタノールシリーズ (90%・70%・50%・30%、順に各 20 分) で水和させた後、透明化液 (8 g 飽水クロール、1 ml グリセロール、2 ml 蒸留水) 中で透明化した。

GUS (β -glucuronidase) 染色と観察

GUS 活性の検出は、GUS 基質液 (1.9 mM X-gluc、3.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ 、3.0 mM $K_4Fe(CN)_6$ 、3.0% Triton X-100 in PBS) に植物体を浸し、脱気した後、37 °C で 3-12 時間程度インキュベートすることで行った。その後、PBS で洗浄し、エタノールシリーズ (90%・70%・50%・30%、順に各 20 分) で脱水した後観察するか、あるいは前述の透明化処理を行ってから観察した。

サザンハイブリダイゼーション解析

DNA 抽出

CUC1 過剰発現体 (発芽後約 5 週間) は一晩ほど暗所においてから液体窒素中で粉碎し、CTAB 法を用いて抽出した。

ナイロンメンブレンへの DNA のプロットング

2 μ g の DNA を 6 時間程度制限酵素で切断し、0.7% のアガロースゲルで電気泳動した。泳動後のゲルは 0.2 M HCl で 10 分間酸分解した後、1.5 M NaCl、0.5 M NaOH で 45 分間変性させ、次に 1 M Tris-HCl (pH7.4)、1.5 M NaCl で 30 分間中和し、最後にもう一度 1 M Tris-HCl (pH7.4)、1.5 M NaCl で 15 分間処理した。処理後のゲルを 20 \times SSC (3 M NaCl、0.3 M クエン酸ナトリウム) 中でナイロンメンブレン (Hybond-N+; Amersham 社) にプロットングした。

ECL 法を用いたハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは Amersham 社の ECL direct nucleic acid labelling and detection system のプロトコールに従った。ハイブリダイゼーションは 42 °C のインキュベーター中で振とうしながら一晩行った。洗浄は 5 \times SSC で 5 分行った後で、一次洗浄液 (6 M 尿素、0.4% SDS、0.5 \times SSC) で 3 回 (20 分 \times 1、10 分 \times 2) 行った後、二次洗浄液 (2 \times SSC) で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次洗浄は 42 °C で、二次洗浄は室温で行った。洗浄後 X 線フィルム (HyperfilmTMECLTM; Amersham 社) に 1 分から 2 時間露光して現像した。

プローブに使用した配列

CUC1 プローブは p4-6 と p4-5 (配列は下記に示す) のプライマーを用いて PCR で増幅した断片をラベルして用いた。

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 解析

RNA の抽出

RNA の抽出は、QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit を用い、同社のハンドブックに従って行った。各サンプルは液体窒素中で凍らせて乳鉢で粉末状にしたものを用いた。抽出用バッファーには RLT バッファーを用いた。

DNA の除去と逆転写反応

1 µg の全 RNA からライフテック社の DNaseI (Amplification grade) を用いて同社のプロトコールに従い DNA を除いた。続いて反応液の全てを用いてライフテック社のキット、SuperScript™ Preamplification System を用い、同社のプロトコールに従い、Oligo (dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして逆転写反応を行った。このようにして得られた反応液のうち 1 µl を PCR 反応に使用した。

PCR に使用した配列

以下のプライマーを用いて各 cDNA を PCR で増幅した。

CUC1 : p4-6 (5' -TCTGAGCCTTGGGAGCTTCC-3') λ p4-5 (5' -ACCGCATGGCGATCAGAGAG-3') λ CUC2 : CUP3 (5' -CAGCCAATATCTTCCACCGGG-3') λ CUP11 (5' -GGAGAGGTGGGAGTGAGACGGA-3') λ STM : STMhf (5' -GCCCATCATGACATCACATC-3') λ STMhr (5' -CTGGATCTTCACCAAGACAC-3') λ BP : KNAT1f (5' -GACAACGTAAGCGATGTTG-3') λ KNAT1r (5' -GTAA TTCTGTTTCCCCTCC-3')、 WUS : WUSF (5' -GATTGAGGGCAAGAACGTC-3')、 WUSR2 (5' -GTAATGATGATCCATGTTTGCCC-3') λ KNAT2 : KNAT2RF (5' -AGAATGTGTGTTTCCGCTC-3') λ KNAT2RR (5' -TGCTTCTCTTGGTAGCTTCC-3')、 KNAT6 : KNAT6-f1 (5' -ATGTACAATTTCCATTCCG CCGGTG-3') λ KNAT6-r1 (5' -TCATTCTCGGTAAAGAATGATCCACTAG-3') λ CUC3 : F15M4.8-F (5' -GAATTCATGATGCTTGCAGGTGGAAGATG-3') λ F15M4.8-R (5' -CTCGAGCTACAGCTGGAATCCTAAAG-3') λ NAC1 : NAC1RF (5' -CATTCTCTGAGCTCTCCAAAG-3') λ NAC1RR (5' -CACTCGATCATCAGCAATTCC-3') λ At2g24430 : 24430inF (5' -CCAAGCTTTCATATAGAACCTCC-3') λ 24430CR (5' -ATCTCGAGTCAATAAGATGGCCAGTATC-3') λ At3g04060 : 3-04060RF (5' -TACGAGGCATCAAGAATCGTC-3') λ 3-04060RR (5' -CAAGACCATCACACGATGAC-3') λ At3g18400 : MYF24inF (5' -GCAAGCTTACAGGCTTGAGAGC-3') λ MYF24inR (5' -CATCTCGAGTCCATA TTAACGCTTC-3')、 At3g29035 : 3-29035RF (5' -TGGGGAGATAGTAGAAGGAG-3')、 3-29035RR (5' -GCAATCAAGATTCAGTGGAC-3') λ At5g18270 : 5-18270RF (5' -CAATCTCCCAAATCTGCAAG-3')、 5-18270RR (5' -AATTAGAAGTCCCACAAGTCC-3')、 AtNAC4 : AtNAC4RF (5' -GCTAGATGGAAAACCTCTCTG-3') λ AtNAC4RR (5' -GAAAGTTCAAGATCAACCG-3') λ AtNAC5 : AtNAC5RF (5' -ACTTGCCGAAAACCGCAAAG-3') λ AtNAC5RR (5' -CAGAAAGGTTCAAGATCAAC-3') λ AtNAC6 : AtNAC6RF (5' -TACGAGGCATCAAGAATCGTC-3') λ AtNAC6RR (5' -CCAATTCTTCTGTACCGGAC-3') λ ACT8 : ACT8f (5' -ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3') λ ACT8r (5' -TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC-3')

定量的 RT-PCR

定量性のある最適な PCR サイクルを決定するために、まず各遺伝子 (CUC1、ACT8) の特異的プライマーで PCR を行い、12 - 26 サイクルの間の 2 サイクル毎にサンプルの回収を行った。その後、PCR 産物を 95 °C、10 分処理し、3 - 4 時間かけて徐々に室温に戻し、1%アガロースゲルで電気泳動を行った。次に ECL 法を用いたハイブリダイゼーションを行い、X 線フィルム (Hyperfilm™ECL™;Amersham 社) で像を確認した。そのフィルムを EPSON スキャナーで取り込み、NIH image を用いてカイネティクス分析を行い、各遺伝子 (もしくはそれを特異的に増幅するプライマー) に対して定量性のある PCR サイクルを決定した。今回用いたサイクルは ACT8(15 サイクル)、CUC1(19 サイクル) で、プライマーは上記に示したものをを用いた。

In situ ハイブリダイゼーション解析

胚は PFA (4%パラホルムアルデヒド、26 mM NaCl、1.4 mM Na₂HPO₄、0.6 mM NaH₂PO₄) 中に 4 °C で 12-16 時間固定した。花茎や花芽は FAA (3.7%ホルムアルデヒド、5%酢酸、50%エタノール) で 4 時間固定した。各固定試料は Lincoln らの方法に従って、脱水・パラフィン包埋を行った (Lincoln et al., 1994)。ミクロトームを用いて厚さ 8 μm の連続切片を作製し、3-アミノプロピルトリエトキシシランでコーティングしたスライドグラス (Matunami) に貼り付けた。ハイブリダイゼーションは基本的に Aida らの方法に従い (Aida et al., 1999)、ハイブリダイゼーションの温度は 45 °C で行った。Digoxigenin (DIG) でラベルした RNA プローブは、SP6、T3 または T7 RNA ポリメラーゼによる in vitro 転写系で合成した。使用したプローブは以下に示す。

CUC1 : 453 塩基対 (453 bp、NAC box は含まない) の PCR 産物をプラスミドにクローニングしたものをを用いた。

CUC2 : 第 3 エキソンに相当する 558 塩基対 (558 bp、NAC box は含まない) の PCR 産物をプラスミドにクローニングしたものをを用いた (Aida et al., 1997)

CUC3 : 5' - と 3' -UTR を除く cDNA をプラスミドにクローニングしたものをを用いた。また、このクローニングした cDNA を EcoT22I で切断し、NAC box を含まないアンチセンスプローブも用いたが発現パターンは前者と変わらなかった。

STM : 第 81 アミノ酸から 3' UTR までに相当する領域 (約 1.0 Kbp) をプラスミドにクローニングしたものをを用いた (Long et al., 1996)

KNAT1 : California 大学 Berkeley 校の Sarah Hake 博士よりいただいた EcoR I でサブクローニングした cDNA (約 1.4 Kbp、homeo box を含むが 3' 末を欠く) をを用いた (Chuck et al., 1996)。

WUS：名古屋大学の町田泰則博士よりいただいた WUS cDNA をクローニングしたプラスミドから SalI、SpeI で cDNA (約 1.2 Kbp) を切り出し、ポリ A を除去してサブクローニングしたものをを用いた。

cuc2 変異体に対する変異原処理とスクリーニング

cuc2-1 は種子を EMS 処理 (0.4%EMS、8 時間処理) し、約 5,000 の M1 世代の植物を自家受精させた。得られた M2 種子は M1 植物毎に個別回収し、プレートに蒔いた。芽生えにおいて、カップ型子葉あるいは SAM に異常が見られるラインは、土に植え替えて自家受精させ、M3 世代で、変異体の表現型や分離比を観察した。

Map-based クローニング

cuc2 エンハンサー変異はそれぞれ、分子マーカーである CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) と SSLP (simple sequence length polymorphism) を用いて座上染色体の決定、ならびに変異領域の特定を行った。cuc2 エンハンサー変異体(Ler) をそれぞれ野生型 (Col) と掛け合わせ、それぞれの F2 個体を得た。芽生えでカップ型子葉や SAM を欠失した F2 個体を選抜し、ゲノム DNA を抽出してマッピングを行った。cuc3 変異体に関しては、第一染色体南側に存在する At1g76420 の予想 ORF 領域を、cte1 に関しては、第二染色体南側に存在する At2g46010 と At2g46020 の予想 ORF 領域にプライマーを作製し、PCR で増幅させた。この PCR 産物を鋳型に用いて、シーケンス反応を行い、野生型と変異体との塩基配列を比較し、それにより変異部位を同定した。

謝辞

本研究は、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において、田坂昌生教授の下で平成 11 年 6 月から平成 15 年 12 月にかけて行われました。本研究を行うにあたり、終始熱心な御指導を賜りました田坂昌生教授に心からお礼申し上げます。当研究室において相田光宏博士、石田哲也博士、田岡健一郎博士、大門靖史博士らの研究が今回の実験の礎となっており、多くの貴重な助言、情報をいただきました。ここで厚くお礼申し上げます。fun3 変異体の種子を分与していただき、また研究室配属当初から様々な実験に関して常に極め細やかなご指摘をくださいました高田忍博士には心から感謝いたします。様々な実験や研究生活において数多くの有益な助言や励ましをいただいた鹿内利治教授（現九州大学）、加藤壮英博士に深く感謝申し上げます。

5' STM::GUS 形質転換体、5' BP::GUS 形質転換体、cuc1-5 変異体、as1-1 変異体と as2-5 変異体の種子はそれぞれ Kathy Barton 博士（Carnegie 研究所）、Sarah Hake 博士（California 大学 Berkeley 校）、Robert Sablowski 博士（John Innes 研究所）、町田泰則博士（名古屋大学）に快く分与していただきました。ここに深く感謝いたします。

cuc2 エンハンサー変異体のスクリーニングは技術補佐員の上田典子さんに手伝っていただきました。cuc2 エンハンサー変異体の中で gnom のアリルに関しては古谷将彦君に重要な助言をいただき、また実験を行っていただきました。Casper Vroemen 博士、Sacco C. de Vries 博士（Wageningen 大学）には、CUC3 遺伝子に対して貴重な情報と示唆を与えていただきました。ここに深く感謝いたします。

5 年間の奈良での研究生活を共に過ごし、様々なご協力をいただいた形質発現植物学講座の皆様方に心から感謝いたします。最後に研究生活を常に支えてくれた山口の家族、両親に深く感謝いたします。

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.
- An, Y. Q., McDowell, J. M., Huang, S., McKinney, E. C., Chambliss, S., and Meagher, R. B. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10, 107-121.
- 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.
- Baurle, I., and Laux, T. (2003). Apical meristems: the plant's fountain of youth. *Bioessays* 25, 961-970.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 17, 170-180.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M., and Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 129, 565-575.
- Brown, W. S. J. (1996). Arabidopsis intron mutations and pre-mRNA splicing. *Plant J.* 10, 771-780
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R. A. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* 408, 967-971.
- Byrne, M. E., Groover, A. T., Fontana, J. R., and Martienssen, R. A. (2003). Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the Arabidopsis homeobox gene BELLRINGER. *Development* 130, 3941-3950.
- Byrne, M. E., Simorowski, J., and Martienssen, R. A. (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* 129, 1957-1965.
- Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S. (1996). KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* 8, 1277-1289.
- Cikaluk, D. E., Tahbaz, N., Hendricks, L. C., DiMattia, G. E., Hansen, D., Pilgrim, D., and Hobman, T. C. (1999). GERp95, a membrane-associated protein that

- belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 10, 3357-3572.
- Clark, S. E., Running, M. P., and Meyerowitz, E. M. (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397-418.
- Clark, S. E., Williams, R. W., and Meyerowitz, E. M. (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89, 575-585.
- 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.
- Dockx, J., Quaedvlieg, N., Keultjes, G., Kock, P., Weisbeek, P., and Smeekens, S. (1995). The homeobox gene ATK1 of *Arabidopsis thaliana* is expressed in the shoot apex of the seedling and in flowers and inflorescence stems of mature plants. *Plant Mol. Biol.* 28, 723-737.
- Douglas, S. J., Chuck, G., Dengler, R. E., Pelecanda, L., and Riggs, C. D. (2002). KNAT1 and ERECTA regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 547-558.
- Duval, M., Hsieh, T. F., Kim, S. Y., and Thomas, T. L. (2002). Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol. Biol.* 50, 237-248.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.
- Gallois, J-L., Claire, W., Reddy, G. V., and Sablowski, R. (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129, 3207-3217.
- Grbić, V. (2001). Axillary meristem development. In *Meristematic Tissues in Plant Growth and Development* (ed. M. T. McManus and B. E. Veit), pp.142-171. Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd.
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.* 17, 1175-1187.
- Hibara, K., Takada, S., and Tasaka, M. (2003). CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J.* 36, 687-696.
- Ishida, T., Aida, M., Takada, S., and Tasaka, M. (2000). Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis*

- thaliana. *Plant Cell Physiol.* 41, 60-67.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol.* 43, 467-478.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P., and Meyerowitz, E. M. (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126, 5231-5243.
- Jeongm, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11, 1925-1934.
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A. and Grierson, D. (1997). Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33, 641-651.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA unctioin. *Dev. Cell* 4, 205-217.
- Kim, J. Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z., and Jackson, D. (2002). Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 4103-4108.
- Komatsu, K., Maekawa, M., Ujiie, S., Satake, Y., Furutani, I., Okamoto, H., Shimamoto, K., and Kyojuka, J. (2003). LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 11765-11770.
- Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger, J., and Traas, J. (1998). MGOUN1 and MGOUN2: two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125, 1253-1260.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 87-96.
- Li, X., Quan, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., and Li, J. (2003). Control of tillering in rice. *Nature* 422, 618-621.
- Liljegren, S. J., and Yanofsky, M. F. (1996). Genetic control of shoot and flower meristem behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 865-869.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., and Hake, S. (1994). A

- knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6, 1859-1876.
- 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.
- Long, J. A., and Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* 125, 3027-3035.
- Long, J., and Barton, M. K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. *Dev. Biol.* 218, 341-353.
- 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.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.
- McConnell, J. R., and Barton, M. K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* 125, 2935-2942.
- McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M. K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411, 709-713.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720-728.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Nishimura, A., Tamaoki, M., Sakamoto, T., and Matsuoka, M. (2000). Over-expression of tobacco knotted1-type class1 homeobox genes alters various leaf morphology. *Plant Cell Physiol.* 41, 583-590.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L., and Hake, S. (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* 127, 5523-5532.
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M. J., Drews, G. N., and Clark, S. E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* 25, 223-236.
- Pautot, V., Dockx, J., Hamant, O., Kronenberger, J., Grandjean, O., Jublot, D.,

- and Traas, J. (2001). KNAT2: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell* 13, 1719-1734.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616-1626.
- Reiser, L., Sanchez-Baracaldo, P., and Hake, S. (2000). Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol. Biol.* 42, 151-166.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., and Yu, G.-L. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2105-2110.
- Roeder, A. H., Ferrandiz, C., and Yanofsky, M. F. (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Curr. Biol.* 13, 1630-1635.
- Royo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., and Fletcher, J. C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* 14, 969-977.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B., and Lucas, W. J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126, 4405-4419.
- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y., and Okada, K. (1999). FILAMENTOUS FLOWER controls the formation and development of arabidopsis inflorescences and floral meristems. *Plant Cell* 11, 69-86.
- Schauer, E. S., Jacobsen, E. S., Meinke, W. D., and Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci.* 7, 487-491.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. (1999). The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VH D protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 290-295.
- Schneeberger, R., Tsiantis, M., Freeling, M., and Langdale, J. A. (1998). The rough sheath2 gene negatively regulates homeobox gene expression during maize leaf development. *Development* 125, 2857-2865.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jurgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100, 635-644.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y.

- (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128, 1771-1783.
- Shimizu-Sato, S., and Mori, H. (2001). Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127, 1405-1413.
- Sinha N. R., Williams, R. E., and Hake, S. (1993). Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* 7, 787-795.
- Smith, H. M., and Hake, S. (2003). The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* 15, 1717-1727.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.
- 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 meristem and primordia boundaries. *Cell* 85, 159-170.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Bliiek, M., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R. (1998). Co-suppression of nam and homologous genes leads to a reduction in axillary meristem formation and increased leaf and stem size in *Petunia* : A possible role for NAC domain genes in plant development. *Flow. Newslett.* 26, 36-46.
- Steeves, T. A., and Sussex, I. M. (1989) *Patterns in Plant Development*, 2nd. Edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K., and Jurgens, G. (1999). Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.
- 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. NAC domain mediates functional specificity of CUC1 and CUC2; domain analysis of CUC1 and CUC2. (Submitted).
- Timmermans, M. C. P., Hudson, A., Becraft, P. W., and Nelson, T. (1999). ROUGH SHEATH2: a myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* 284, 151-153.
- Tsiantis, M., Schneeberger, R., Golz, J. F., Freeling, M., and Langdale, J. A. (1999). The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot

- and dicot plants. *Science* 284, 154-156.
- Venglat, S. P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., Martienssen, R., Selvaraj, G., and Datla, R. (2002). The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 4730-4735.
- Verbsky, M. L., and Richards, E. J. (2001). Chromatin remodeling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 494-500.
- 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.
- Waites, R., Selvadurai, H. R., Oliver, I. R., and Hudson, A. (1998). The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* 93, 779-789.
- Wagner, D. (2003). Chromatin regulation of plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 20-28.
- Wagner, D., and Meyerowitz, E. M. (2002). *SPLAYED*, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 12, 85-94.
- Williams, R. W. (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* 20, 280-282.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y., and Huang, H. (2003). Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130, 4097-4107.
- 原 襄 (1994). 植物形態学. 朝倉書店

表1. 35S::*CUC1*植物の表現型が現れる頻度

ライン	子葉の切れ込み	不定芽形成	本葉異常
S1-6 (n=105)	54.3%	5.7%	51.4%
S2-6 (n=84)	91.7%	29.8%	32.1%
S3-7 (n=80)	72.5%	43.8%	75.0%
S4-11 (n=77)	11.7%	0.0%	19.5%
S5-10 (n=46)	50.0%	19.7%	26.1%
S6-10 (n=90)	42.2%	6.7%	40.0%

35S::*CUC1*植物の各ラインにおける表現型をもつ個体の出現頻度を%で示した。

子葉の切れ込み:芽生えにおいて子葉の切れ込みを持つ個体の頻度。

不定芽:芽生え14日目で子葉上に不定芽および不定葉が形成された個体の頻度。

本葉異常:本葉融合・トライコームの欠失した本葉・カールした本葉など本葉に形態異常を示した個体の頻度。

n 観察した個体数

表2. *cuc2*エンハンサー変異体の分類

クラス	line No.	Cotyledon	Meristem	Root
	K21, N39, O14, S137, T58, V63	cup	L	n.p.
	B24, E68, U124, X84, <i>fun3</i>	cup, fused, stm	S	n.p.
	H48, T59, L77	cup, fused, stm	S	short root
	T123	cup, fused, monocot	S	short root lateral root less

*cuc2*エンハンサー変異体として単離された各ラインの特徴を分類した。

Cotyledon:cup;カップ型子葉、**fused**;子葉の片側での融合、**stm**;子葉基部での子葉融合、**monocot**;一枚の子葉のみ形成する個体。

Meristem:播種後15日目でカップ型子葉を持つ芽生えにおいて**SAM**が確認されない (**L**)と観察される (**S**) 場合に分類した。

n.p. : 異常が観察されなかったライン。

表3. 各 *cuc* 単独変異体の芽生えにおける子葉の融合率

	子葉の融合率
<i>cuc1-1</i> (n=252)	0.8%
<i>cuc2-1</i> (n=312)	1.3%
<i>cuc3-101</i> (n=145)	7.6%

n=観察した個体数

表4. 各 *cuc* 変異体と他の *NAC* 遺伝子の変異体との関係

	<i>cuc1-5</i>	<i>cuc2-3</i>	<i>cuc3-105</i>	<i>nac1-101</i>	<i>at2g24430-1</i>
<i>cuc1-5</i>	No	cup	cup	No	No
<i>cuc2-3</i>		No	cup	No	No
<i>cuc3-105</i>			No	No	No
<i>nac1-101</i>				No	No
<i>at2g24430-1</i>					No

各遺伝子型の単独、二重変異体の芽生えの地上部の表現型について観察を行った。*cuc1 cuc3*、*cuc2 cuc3*二重変異体では、低頻度で子葉の融合も観察されるが高頻度で現れる表現型のみを記した。

No:異常を示さない、あるいは低頻度でのみ表現型をもつ。

cup:カップ型子葉をもつ芽生えを生じる。

カップ型の子葉を持つ芽生えが生じたのは、*cuc1*、*cuc2*、*cuc3*変異体の組み合わせの二重変異体だけだった。

表5. 二重・三重変異体における表現型

	カップ型子葉	SAM	本葉融合
<i>cuc1-1 cuc2-1</i>	100%	No	n.d.
<i>cuc1-5 cuc2-3</i>	100%	No	n.d.
<i>cuc1-1 cuc3-101</i>	91.5%(374)	92.4%(79)	No
<i>cuc1-5 cuc3-105</i>	100%(98)	99.0%(110)	No
<i>cuc2-1 cuc3-101</i>	87.3%(190)	29.3%(58)	29.4%(17)
<i>cuc2-3 cuc3-105</i>	98.3%(184)	29.3%(181)	33.3%(60)
<i>cuc1-1 cuc2-1 cuc3-101</i>	100%(5)	No	n.d.
<i>cuc3-105 las-101</i>	No	No	74.1%(89)

各遺伝子型における芽生えの表現型について%で示した。

カップ型子葉: *cuc*変異体と同じカップ型子葉をもつ芽生えと*stm*変異体のような子葉基部側での融合もつ芽生えの割合。

SAM: カップ型子葉をもつ個体の中で、芽生え後18-24日目に本葉を形成している (SAMをもつ) 個体の割合。

本葉融合: 芽生え後18-24日目の個体で本葉が融合している個体の割合。

()内は観察した個体数を示す。

No: 100個体以上を観察し、異常が観察されなかった場合。

SAMをもたない個体では本葉を観察できないのでn.d.と表記した。

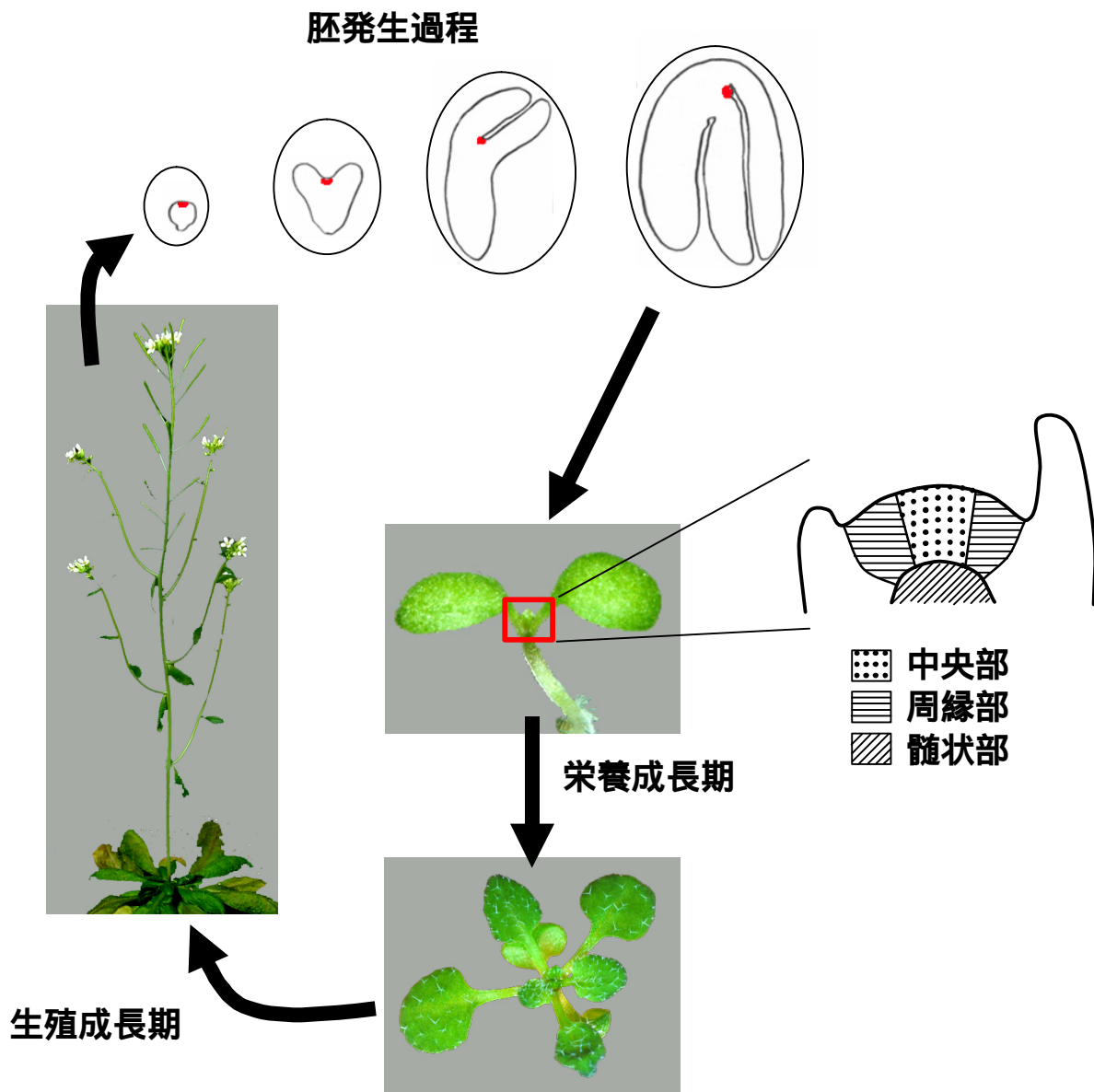


図1. シロイヌナズナの発生と茎頂分裂組織の構造

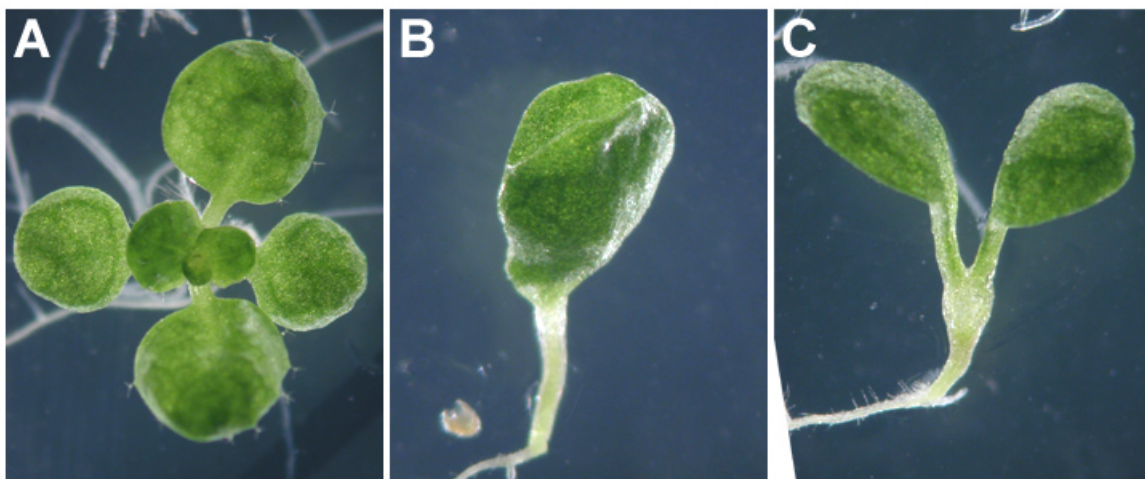


図2. *cuc*変異体と*stm*変異体の表現型
(A)野生型、(B)*cuc*変異体、(C)*stm*変異体の15日目の芽生え。

(A)



(B)

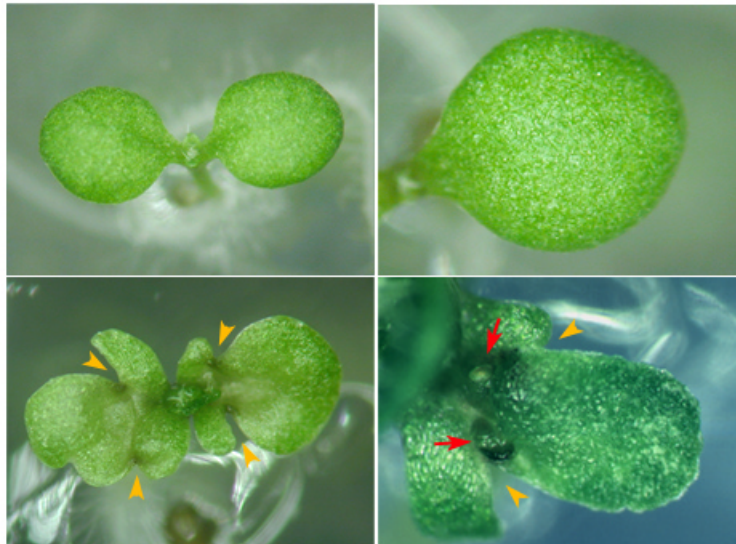


図3. *CUC1*過剰発現体の作製とその表現型

(A) *CUC1*過剰発現体作製のためのコンストラクト。

(B)上: 野生型(Ler)の芽生え(左図; 発芽後7日目)と子葉(右図)。

下: 形質転換体の芽生え(左図; 発芽後7日目)と子葉(発芽後10日目)。形質転換体では子葉の側面2箇所(矢尻)に切れ込みが生じ、発芽後10日目くらいから切れ込み付近に不定葉のような異所的な構造物(矢印)が形成された。

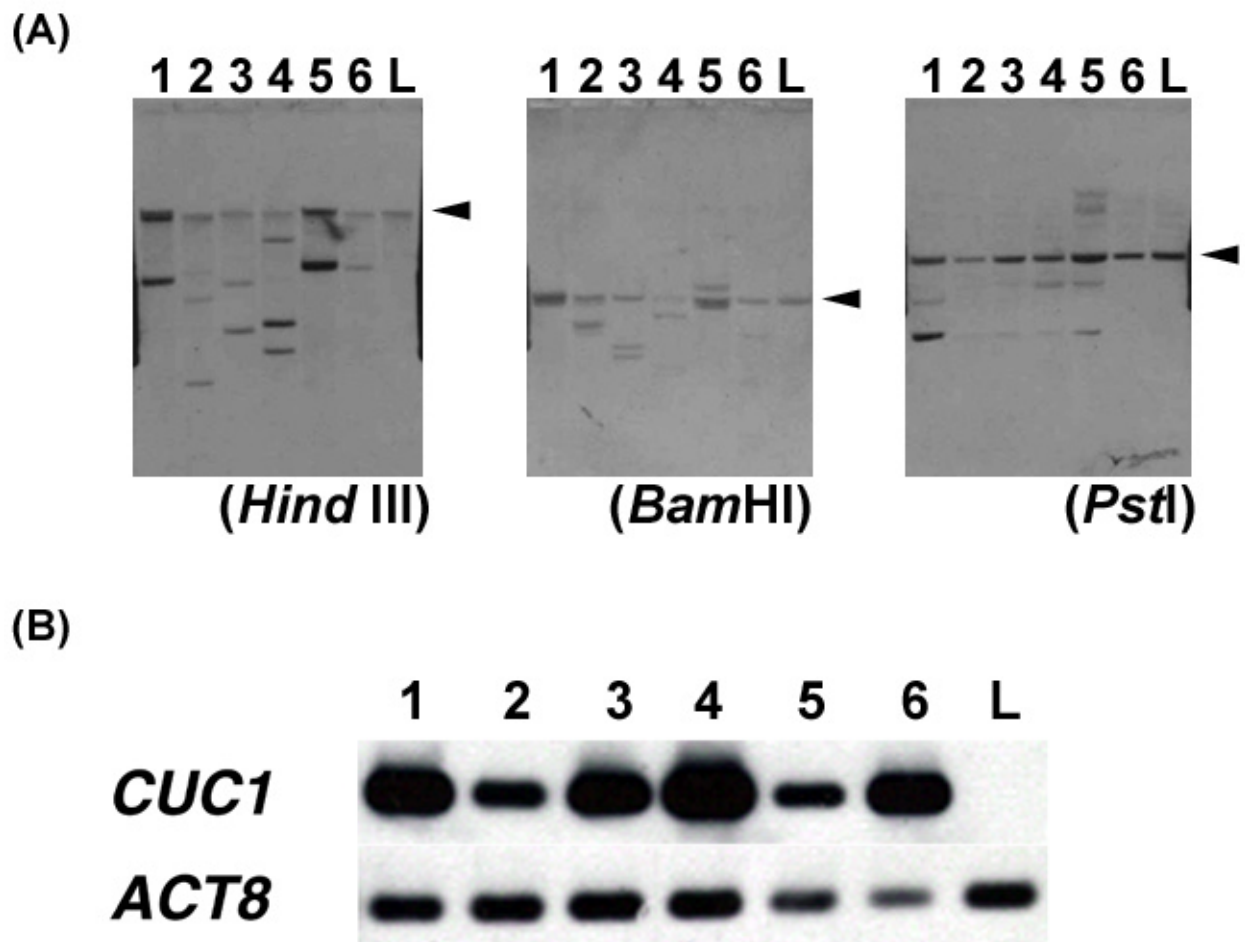


図4. *CUC1*過剰発現体におけるT-DNAのコピー数と*CUC1*の発現量
 (A)*CUC1*過剰発現体の各ライン(1-6)と野生型(L)におけるサザンブロット。プローブとして*CUC1* ORFを用いた。矢尻は内在性の*CUC1*のバンドの位置を示す。
 (B)RT-PCR法による*CUC1*過剰発現体(1-6)と野生型(L)の本葉における*CUC1*の発現量の比較。内部標準遺伝子として*ACT8*を用いた。
*CUC1*過剰発現体はそれぞれ1:S1-6、2:S2-6、3:S3-7、4:S4-11、5:S5-10、6:S6-10のライン(表1)に相当する。

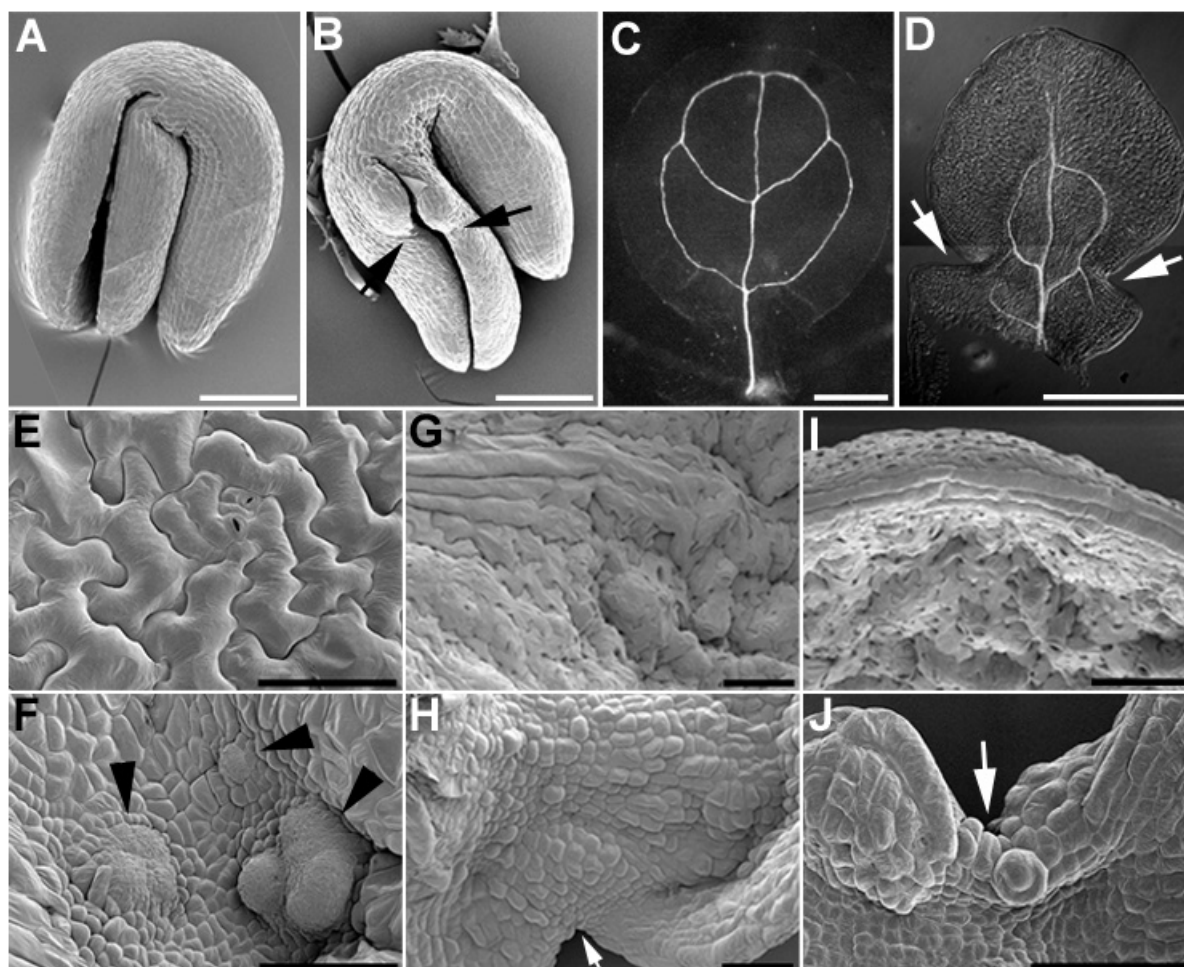


図5. **35S::CUC1**植物における子葉の表現型

(A)野生型と(B)**35S::CUC1**植物の成熟胚。子葉の切れ込みは胚発生過程ですでにみられた。

(C、E、G、I)野生型と(D、F、H、I)**35S::CUC1**植物の子葉。

(C、D)子葉の維管束パターン。(E、F)向軸側の子葉表面細胞。

(G、H)背軸側の子葉表面細胞。(I、J)子葉の周縁細胞。

矢印は子葉の切れ込みを示し、矢尻は子葉に形成された不定芽を示す。

Bars=100 μ m。

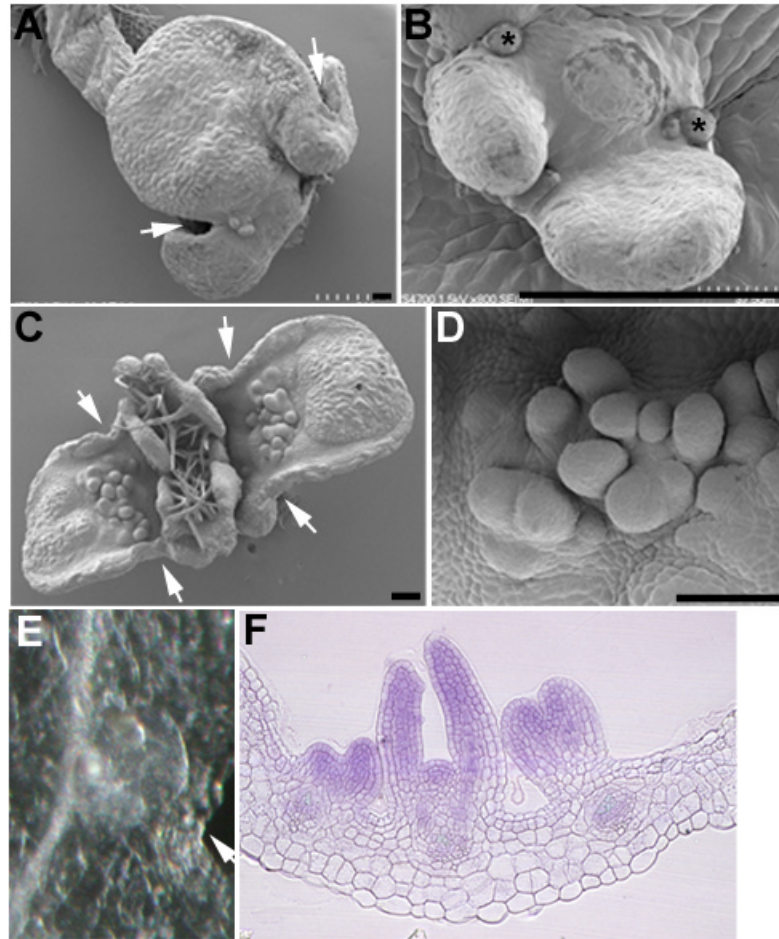


図6. **35S::CUC1**植物の子葉上に形成された不定芽・不定葉
 (A)**35S::CUC1**植物の子葉。切れ込み(矢印)付近に異所的な器官が形成されている。(B)(A)の異所的な器官の拡大図。異所的な器官は葉序をもち、基部側には托葉(星印)も観察された。
 (C)**35S::CUC1**植物の芽生え。**35S::CUC1**植物では多数の不定葉が形成される場合もあった。(D)(C)の拡大図。
 (E、F)不定芽と維管束の位置関係。(E)子葉の切れ込み付近(矢印)に不定芽が形成されている。(F)**35S::CUC1**植物の子葉の横断切片。子葉上に形成された不定芽は子葉の維管束付近に観察された。
 Bars=100 μ m。

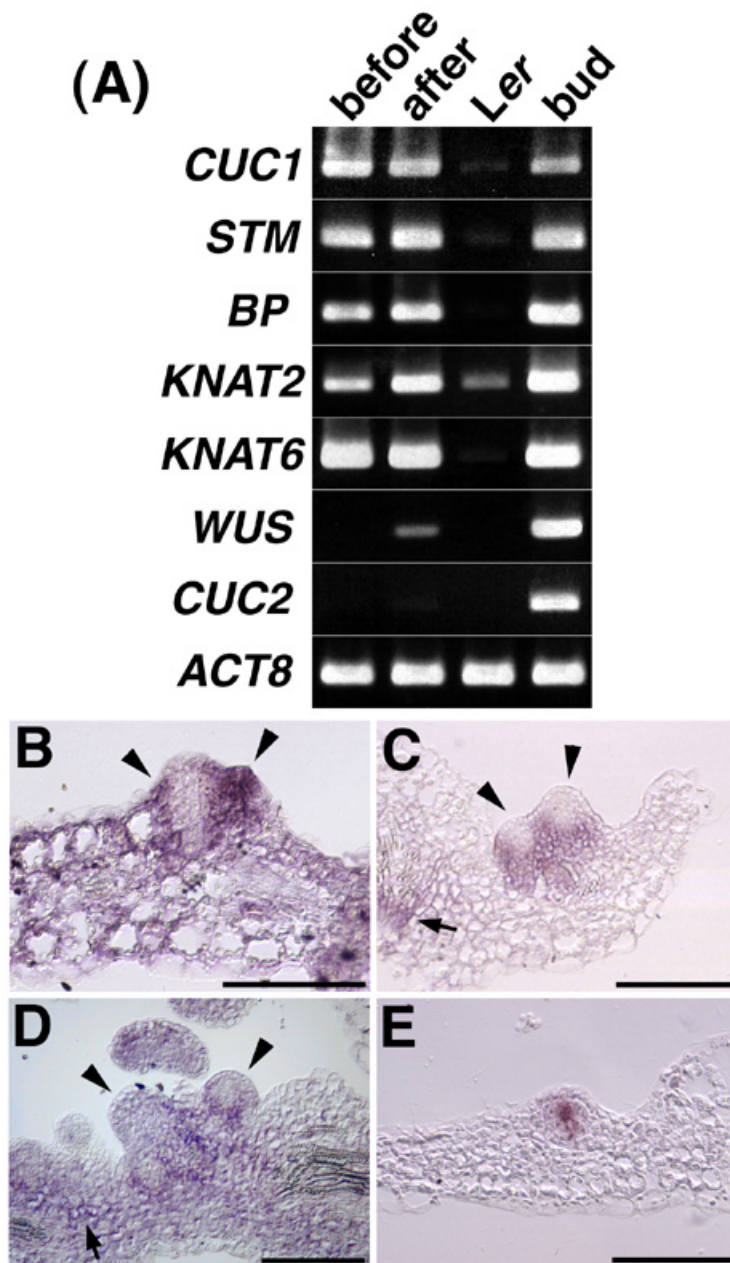


図7. *35S::CUC1*植物におけるSAMの形成や維持に関わる遺伝子の発現
 (A) *35S::CUC1*植物の不定芽形成前の子葉(**before**; 7日目)、不定芽形成後の子葉(**after**; 14日目)、野生型の子葉(**Ler**) と花芽(**bud**)のRNAを用いた半定量的RT-PCR。 *35S::CUC1*植物の子葉では、不定芽が形成される前から **class I KNOX**遺伝子の異所的発現が観察された。

内部標準遺伝子として*ACT8*を用いた。

(B-E) *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた子葉上の不定芽における *CUC1*(B)、*STM*(C)、*BP*(D)、*WUS*(E)の発現パターン。矢尻は葉原基を示す。*STM*、*BP*は不定芽以外にも子葉での異所的発現が観察された(矢印)。

Bars=100 μ m。

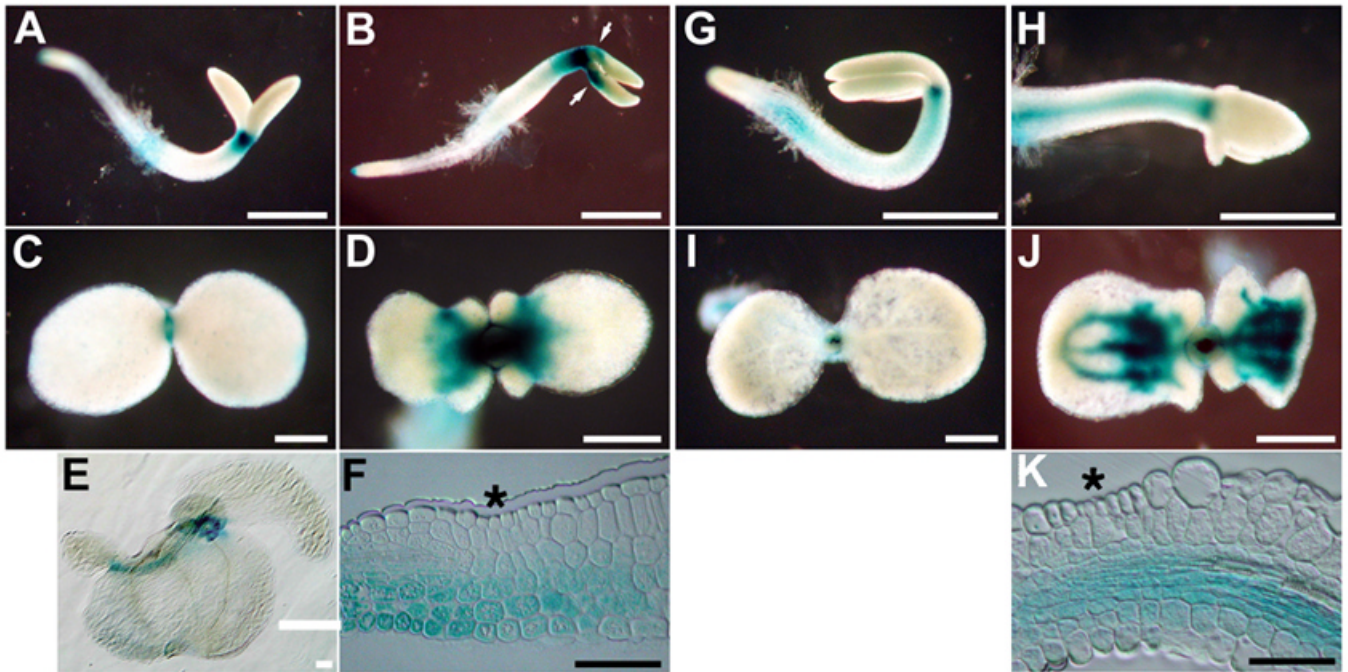


図8. $35S::CUC1$ 植物における $pSTM::GUS$ と $pBP::GUS$ の発現パターン

(A, B, F, G) 2日目の芽生え、(C, D, F, I-K) 4日目の芽生え、(E) 10日目の子葉。野生型(A, C)と $35S::CUC1$ 植物(B, D-F)における $pSTM::GUS$ の発現パターン。野生型(G, I)と $35S::CUC1$ 植物(H, J, K)における $pBP::GUS$ の発現パターン。 $pSTM::GUS$ は $35S::CUC1$ 植物の芽生え直後から切れ込みの間で異所的に発現していた(B, 矢印)。この発現は4日目(D)や10日目(E)でも維持されていた。 $pBP::GUS$ は $35S::CUC1$ 植物の子葉において2日目では検出できなかった(H)が4日目では維管束に強い発現が観察された(J)。(F) $35S::CUC1/pSTM::GUS$ 植物と(K) $35S::CUC1/pBP::GUS$ 植物の子葉の縦断切片。 $pSTM::GUS$ は背軸側で強い発現が観察されたのに対し、 $pBP::GUS$ は維管束で強い発現が観察された。星印は子葉の表面細胞が小さく丸くなっている領域を示す。Bars=0.5 mm。

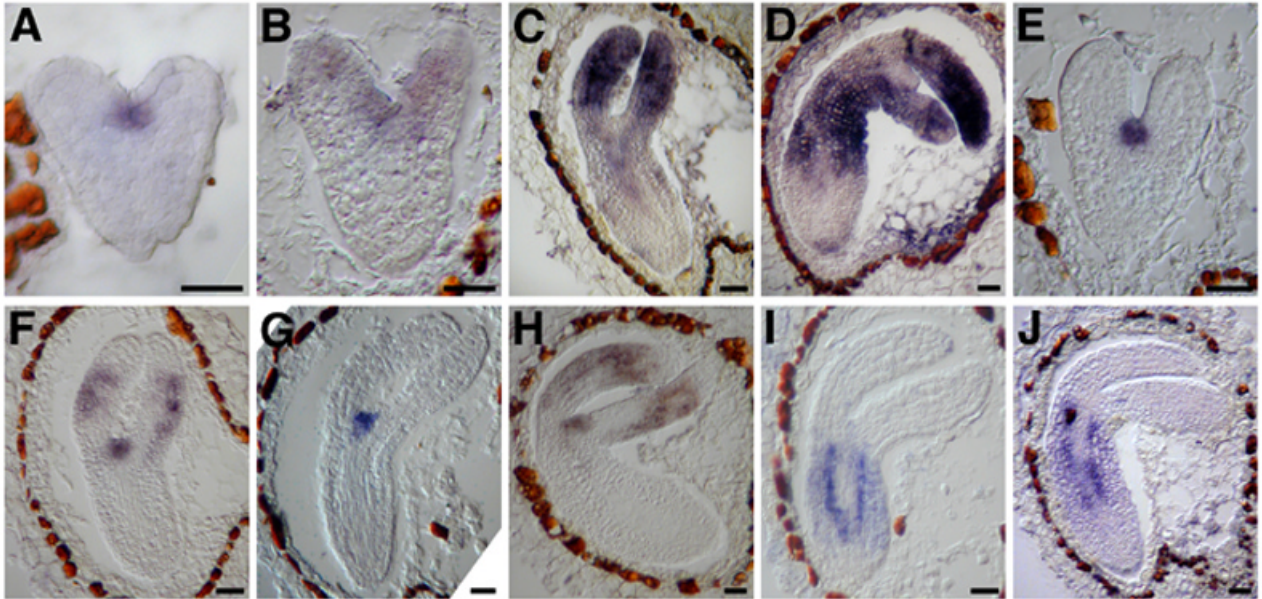


図9. *35S::CUC1*植物における*CUC1*、*STM*、*BP*の発現パターン
 (G、I)野生型、(A-F、H、J)*35S::CUC1*植物の胚における
CUC1(A-D)、*STM*(E-H)、*BP*(I、J)の発現パターン。
*CUC1*は初期心臓型胚期まで発現パターンに変化は見られない(A)が
 その後子葉の向軸側で発現しはじめ(B)、胚発生後期にはSAMを除く
 胚全体では発現が観察される(C、D)。魚雷胚期から子葉の背軸側で
*STM*の異所的な発現が観察される(F)。胚発生過程を通して*BP*の
 異所的な発現は観察されなかった(J)。Bars=20 μ m。

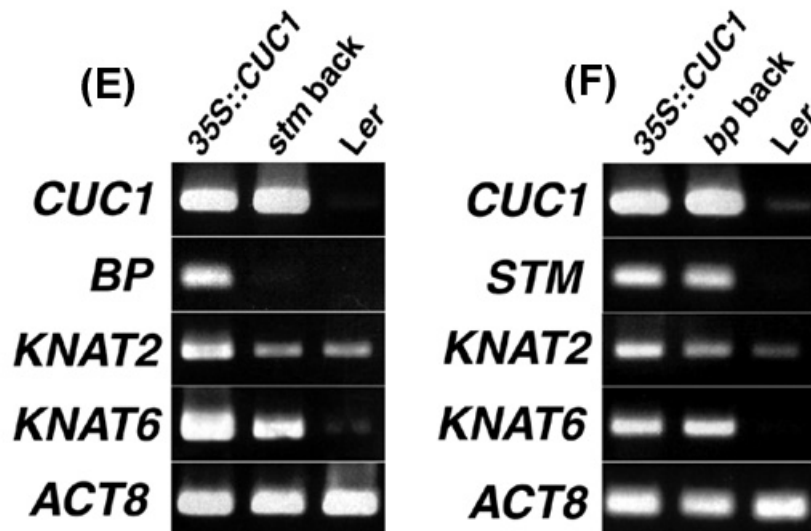
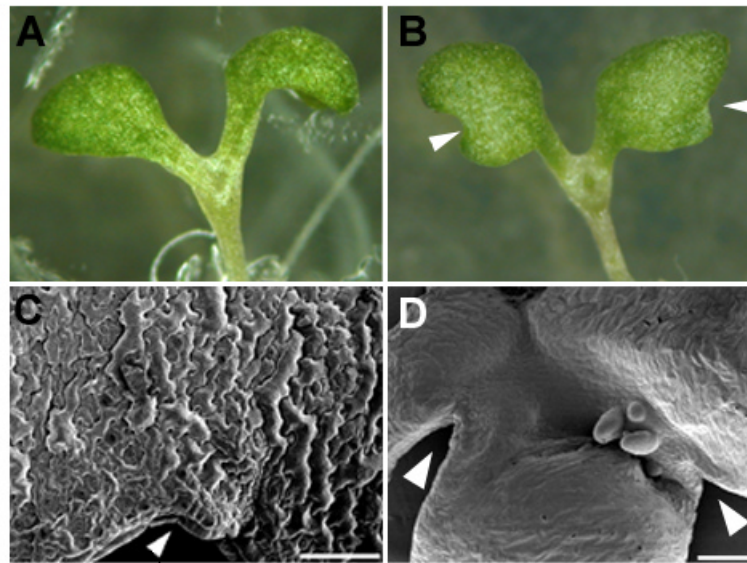


図10. *35S::CUC1/stm*植物、*35S::CUC1/bp*植物の表現型と遺伝子の発現
 (A)*stm-1*、(B)*35S::CUC1/stm*植物の芽生え(10日目)、
 (C)*35S::CUC1/stm*植物の子葉の切れ込み付近のSEM像。
*35S::CUC1/stm*植物の芽生えでは子葉に切れ込み(矢尻)を持つが、小さく丸い細胞領域や不定芽は形成されなかった。
 (D)*35S::CUC1/bp*植物の子葉のSEM像。*35S::CUC1/bp*植物の子葉では、切れ込み(矢尻)は生じ、不定芽も形成された。
 (E-F)*35S::CUC1/stm*植物、*35S::CUC1/bp*植物の子葉における各遺伝子の発現。レーンはそれぞれ、*35S::CUC1*;不定芽形成前の*35S::CUC1*植物の子葉(7日目)、*stm back*; *35S::CUC1/stm*植物の子葉(14日目)、*bp back*;不定芽形成前の*35S::CUC1/bp*植物の子葉(7日目)、*Ler*;野生型の子葉(7日目)に由来する。
 Bars=100 μ m。

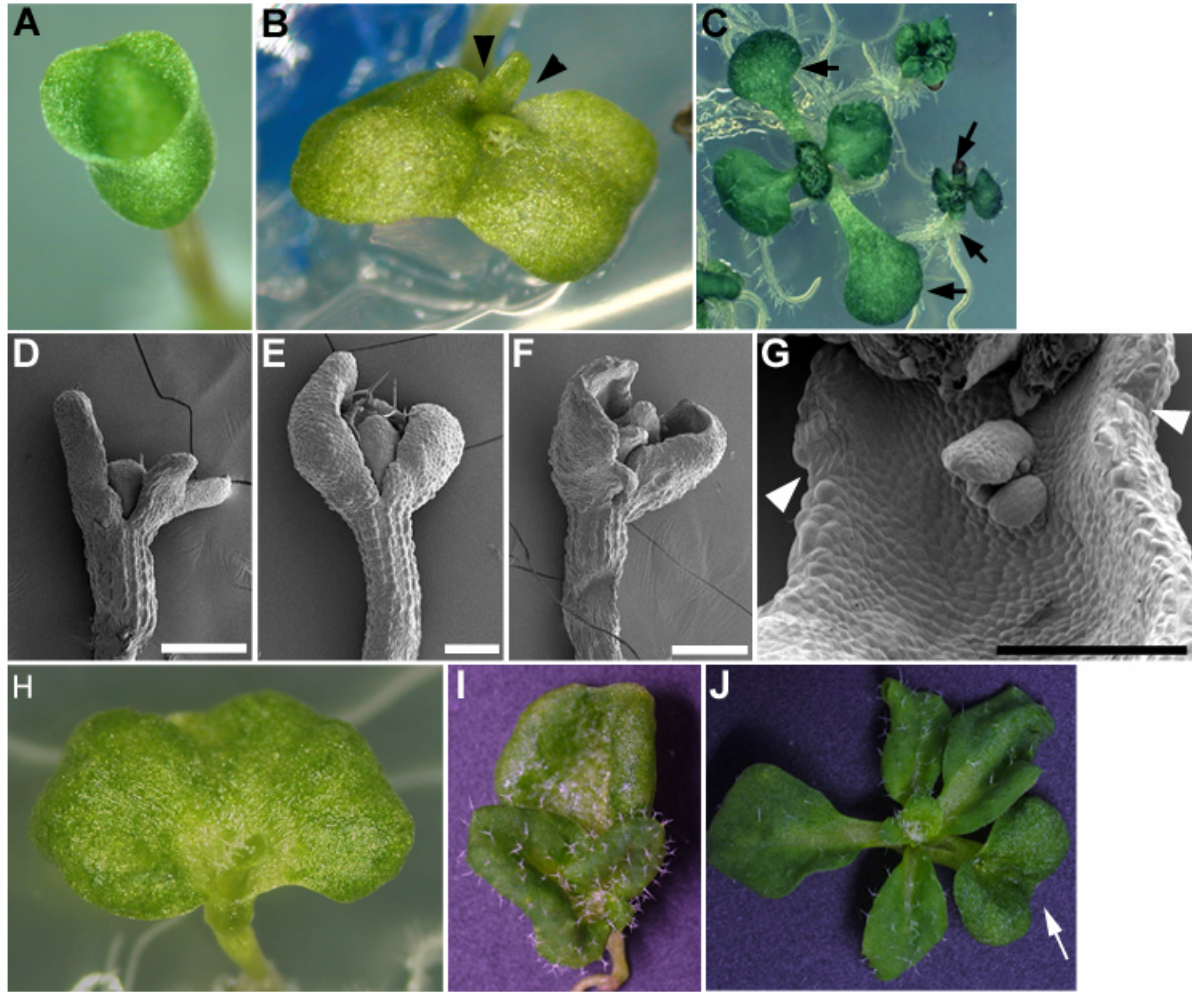


図11. *CUC1*と*AS1*、*AS2*との遺伝学的関係

- (A) *cuc1 cuc2*二重変異体と(B) *35S::CUC1/cuc1 cuc2*植物の芽生え。
*35S::CUC1/cuc1 cuc2*植物では、子葉の融合は弱まり、SAMも形成される。また、*35S::CUC1*植物の表現型(切れ込み(矢尻))も観察される。
- (C) 野生型と*35S::CUC1*(S3-7)植物の芽生え(14日目)。*35S::CUC1*(S3-7)植物では個体、子葉ともに小さくなる(矢印)。
- (D) *35S::CUC1*(S3-7)植物、(E) *35S::CUC1*(S2-6)/*as1*植物、(F) *35S::CUC1*(S2-6)/*as2*植物の芽生え(7日目)。
*as1-1*あるいは*as2-5*変異をもつ*35S::CUC1*(S2-6)植物では子葉が非常に小さくなり、切れ込みも明確でなくなる。また、子葉が下偏成長し、上向きになる。
- (G) *35S::CUC1/as1 stm*植物の子葉のSEM像(10日目)。
*35S::CUC1/as1 stm*植物の子葉では、STMの機能が欠失しているにもかかわらず、不定芽が形成される。
- (H、I) *cuc1 cuc2 as1*の芽生え。SAMは低頻度で形成され、子葉の融合は弱まる。
- (J) *cuc1 cuc2 as1 bp*四重変異体の芽生え(18日目)。この四重変異体でも*cuc1 cuc2 as1*三重変異体と同様に子葉の融合は弱まり、またSAMは形成される。矢印はカップ型子葉を示す。Bars=250 μ m。

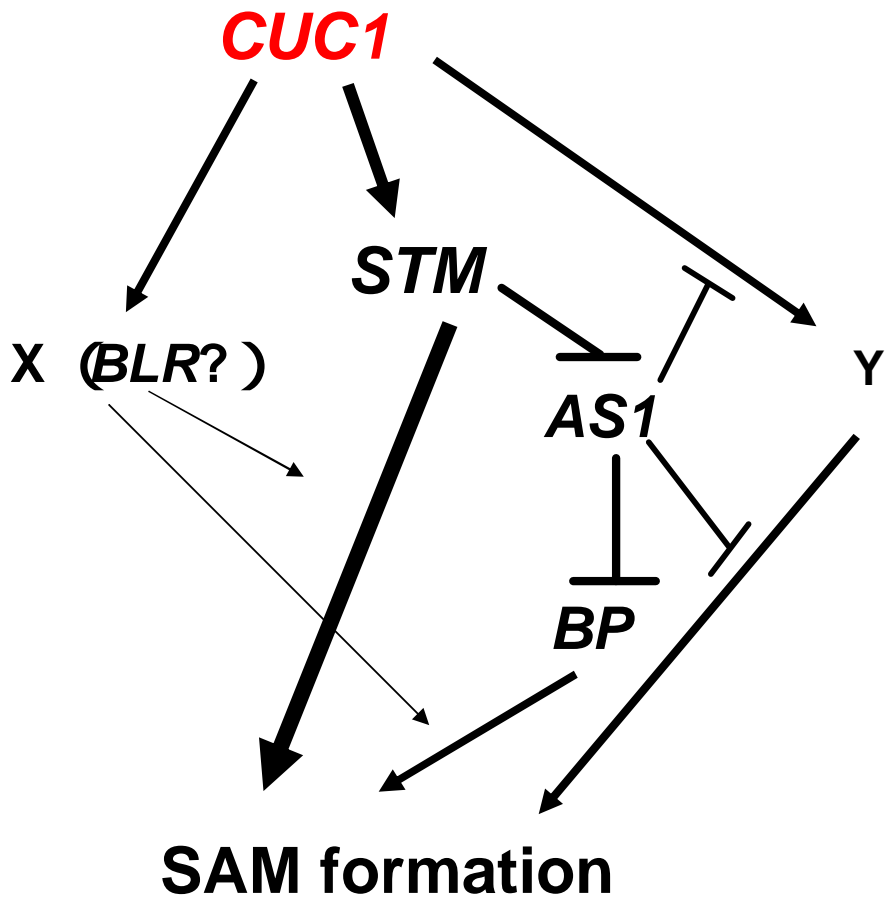


図12. SAM形成過程におけるCUC1による遺伝子の発現制御ネットワーク



図13. *cuc2*エンハンサー変異体の各クラスの表現型

(A)*cuc2-1*変異体の芽生え。

(B)V63(クラスⅠ)のカップ型子葉を持つ芽生え。

(C-E)X84(クラスⅡ)の芽生え。クラスⅡのラインではカップ型子葉(C)や*stm*変異体に似た子葉(D)を持つ芽生えが生じる。また、発芽後10日くらいたつと本葉(矢印)を形成する。

(F-G)H48(クラスⅢ)の芽生え。クラスⅢのラインでもクラスⅡのようにカップ型子葉(F)や*stm*変異体様の子葉をもつ芽生えが生じる。

(H-I)T123(クラスⅣ)の芽生え。クラスⅣのラインではカップ型子葉(H)や一枚子葉(I)をもつ芽生えが生じる。

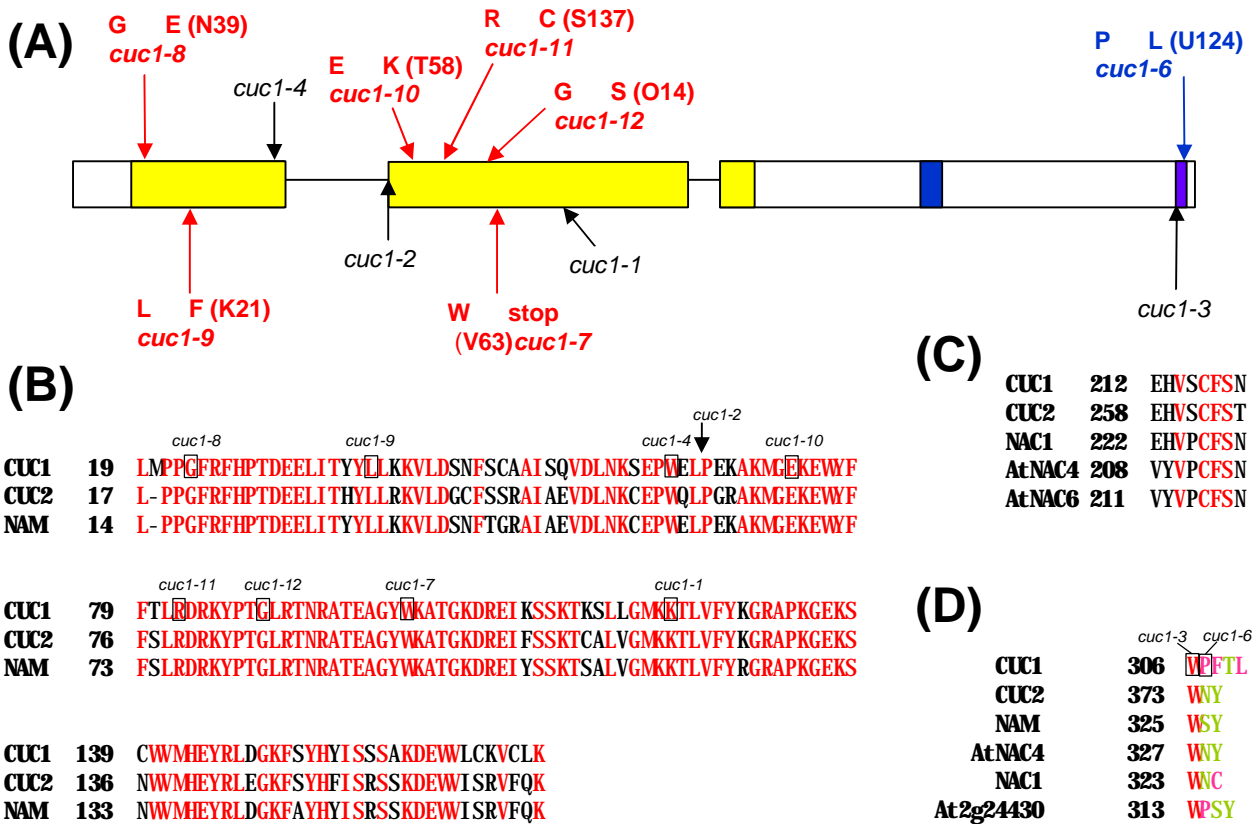


図14. *cuc1*アレルの同定とNACタンパク質間の比較

(A) *CUC1*の遺伝子構造と各*cuc1*アレルの変異の位置。

*cuc2*エンハンサー変異体として単離された*cuc1*アレルの変異部位とアミノ酸変化を示す。()内は*cuc2*エンハンサー変異体のライン番号(表2参照)。ボックスはそれぞれ、黄色ボックス NACドメイン、青色ボックス、紫色ボックス、C末側の保存されたモチーフ(C、D)。

(B-D) NACタンパク質の比較。

(B) *CUC1*、*CUC2*、*NAM*のNACドメインの比較。

囲みは*cuc1*アレルの変異部位を示す。*cuc1-2*は第一イントロンと第二エクソンの境界部に変異を持つ(矢印)。

(C) シロイヌナズナの5つのNACタンパク質で保存されているC末側のモチーフ。

(D) *CUC-type* NACタンパクのC末端のアミノ酸配列。いくつかの遺伝子でトリプトファンが保存されている。またその後に非極性側鎖(桃色)あるいは非荷電極性側鎖(緑色)をもつアミノ酸が存在する。(B-D)比較したNACタンパクの中で保存されているアミノ酸を赤色で示す。

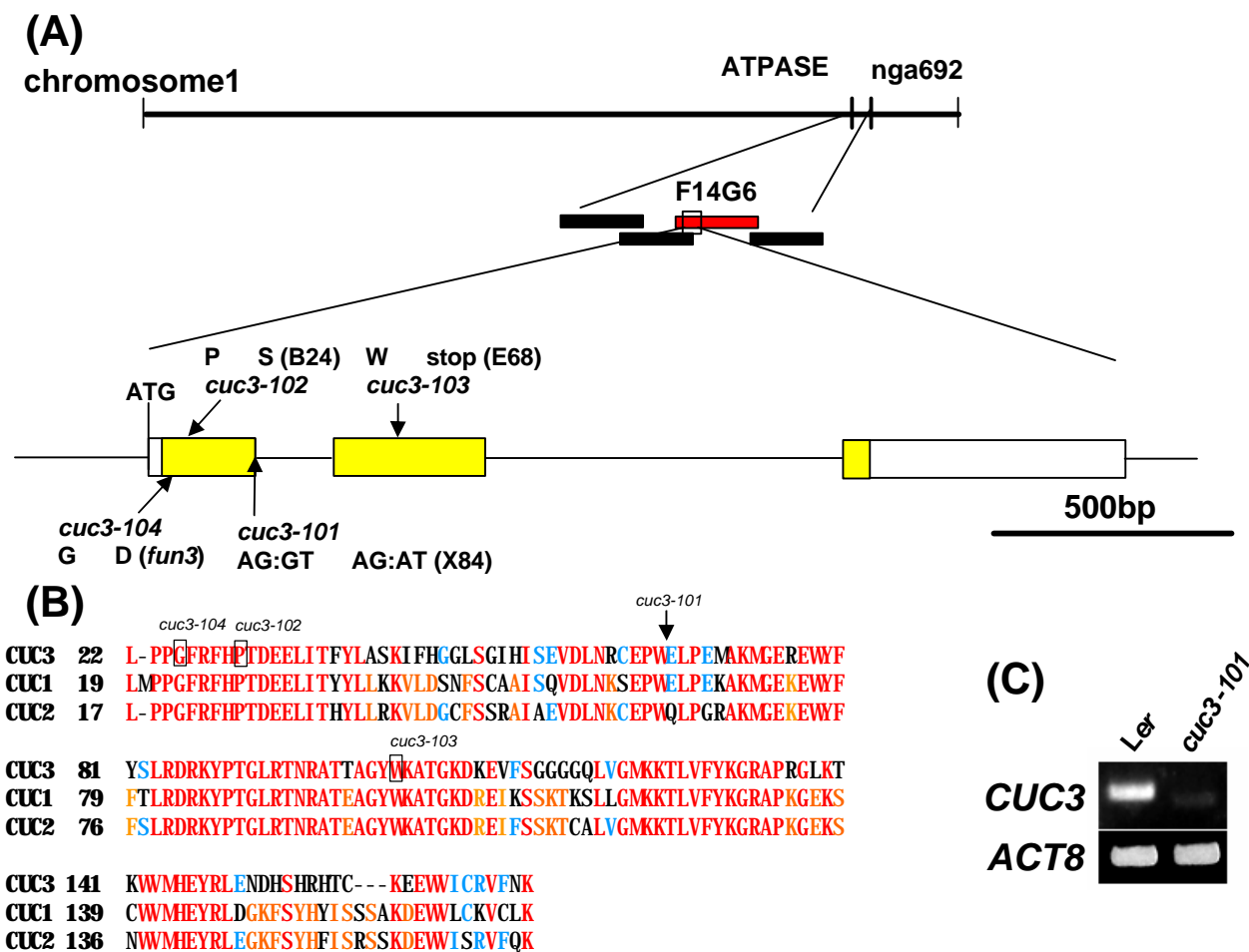


図15. *CUC3*遺伝子座のマッピング。

(A) *CUC3*の第一染色体におけるマップポジションと遺伝子構造。

赤色ボックス ;*CUC3*(*At1g76420*)遺伝子が存在するBAC、ボックス ;*CUC3* ORF、黄色ボックス ;NACドメイン、を示す。直線はイントロンまたは非翻訳領域を示す。各アレルにおける変異部位は矢印で記す。

(B) *CUC3*、*CUC1*、*CUC2*のNACドメインの比較と*cuc3*変異体の変異部位。

3つの*CUC*タンパク質間で保存されているものは赤色、*CUC3*と*CUC1*あるいは*CUC2*とで保存されているものは水色、*CUC1*と*CUC2*で保存されているものは橙色で示す。

(C) *cuc3-101*変異体における*CUC3*の発現。

*cuc3-101*変異体はスプライシング部位に変異をもつ。RT-PCRの結果、*cuc3-101*変異体において*CUC3*転写産物は野生型より短くなっており、また発現も減少していた。内部標準遺伝子として*ACT8*を用いた。

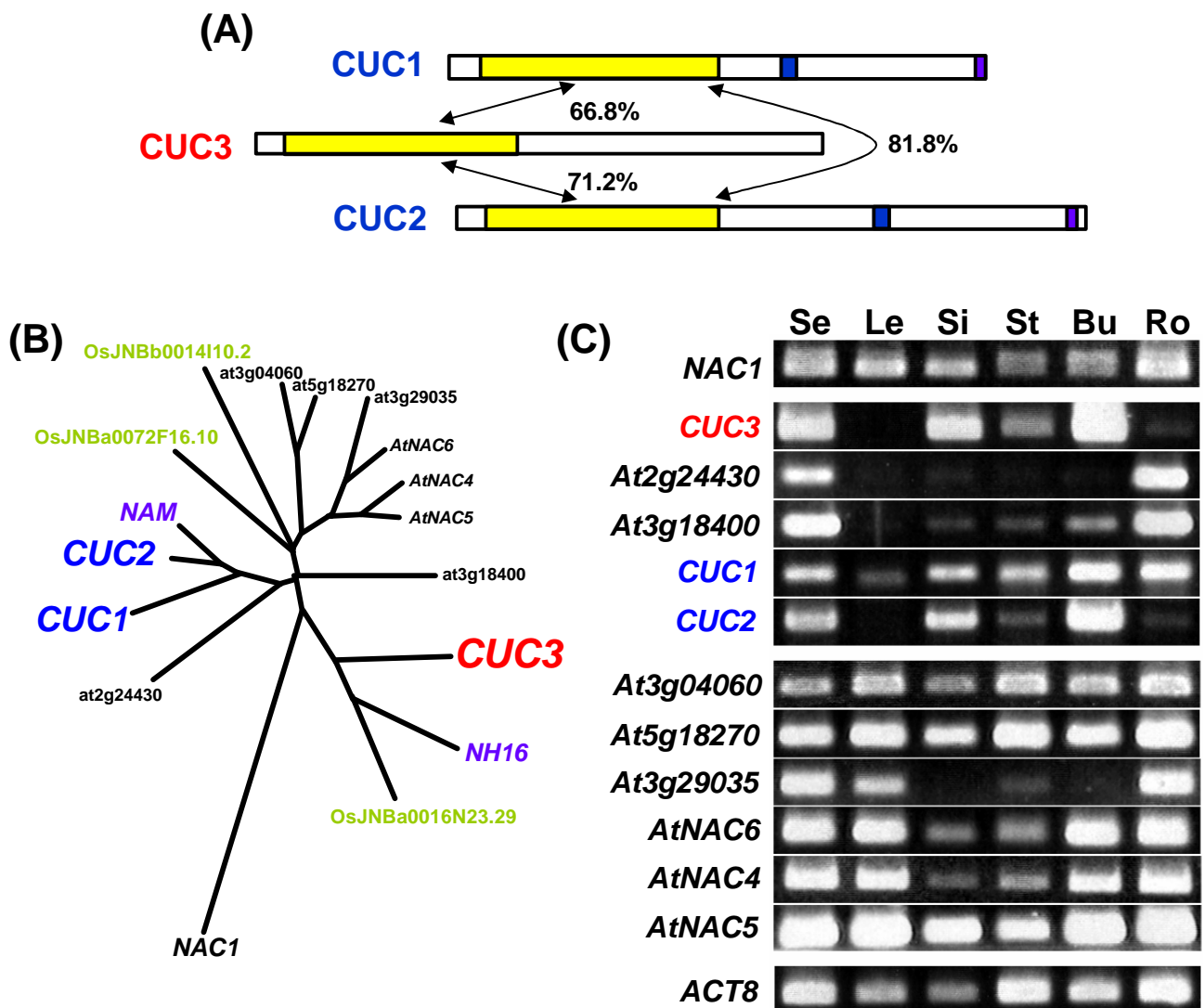


図16. **CUC**タンパク質の比較と**CUC-type NAC**遺伝子の発現解析

(A)**CUC1**、**CUC2**、**CUC3**のタンパク質の比較。

ボックスはそれぞれ、黄色ボックス、NACドメイン、青色ボックス、紫色ボックス、C末側の保存されたモチーフ(図14. C、D参照)。数値は各タンパク質間のNACドメインにおけるアミノ酸相同性の値を示す。

(B)**CUC-type NAC**遺伝子の系統樹。

CUC1、**CUC2**、**CUC3**のNACドメインと高い相同性を示す遺伝子をデータベースから抽出し、それらのNACドメインを用いて系統樹を作製した。緑色はイネ、紫色はペチュニアから得られた遺伝子、その他はシロイヌナズナ由来の遺伝子を示す。

(C)**CUC-type NAC**遺伝子の発現解析。

野生型(Ler)の各組織における**CUC-type NAC**遺伝子の発現。Se: 5日目の芽生え(根を含む)、Le: 本葉、Si: 鞘、St: 茎、Bu: 花芽、Ro: 根。内部標準遺伝子として**ACT8**を用いた。

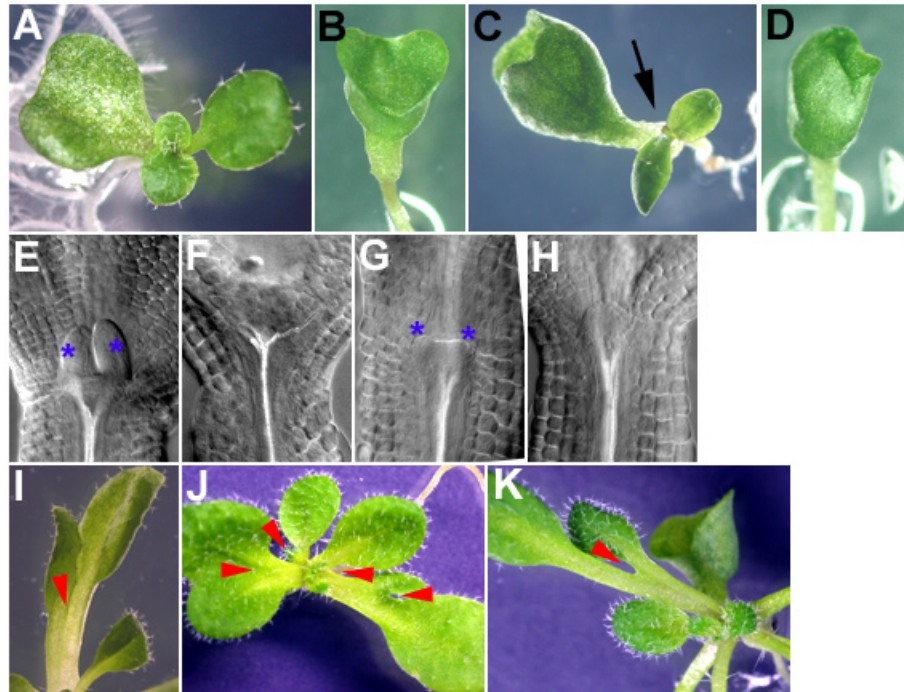


図17. *CUC3*と*CUC1*の遺伝学的関係と芽生えの表現型

(A)*cuc3-101*の芽生え。*cuc3*変異体は低頻度(表3)で子葉が融合している。

(B)*cuc1-1 cuc3-101*二重変異体におけるカップ型子葉をもつ芽生え。

(C)*cuc1-1 cuc3-101*二重変異体から形成されたSAM(矢印)。*cuc1 cuc3*では*cuc2 cuc3*と同様にカップ型子葉の芽生えを生じ、SAMも形成された。

(D)*cuc1-1 cuc2-1 cuc3-101*三重変異体の芽生え。三重変異体の芽生えはカップ型子葉をもち、SAMは形成されなかった。

(E)野生型(Ler)、(F)、*cuc1-1 cuc2-1*(G)*cuc1-1 cuc3-101*、(H)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体の芽生え後2日目のSAMの観察。

2日目の野生型の芽生えでは、2つの発達した葉原基(星印)が観察された。

cuc1 cuc2(F)ではSAM様の構造は観察されなかった。しかし、*cuc1 cuc3*、*cuc2 cuc3*では、SAMが形成される付近でSAM様の構造物が観察された。

また、未発達の葉原基(星印)も見られる。

(I-K)*cuc2 cuc3*における本葉の融合。(I, J)*cuc2-1 cuc3-101*(Lerバックグラウンド)、(K)*cuc2-3 cuc3-105*(Colバックグラウンド)。矢尻は融合部分を示す。

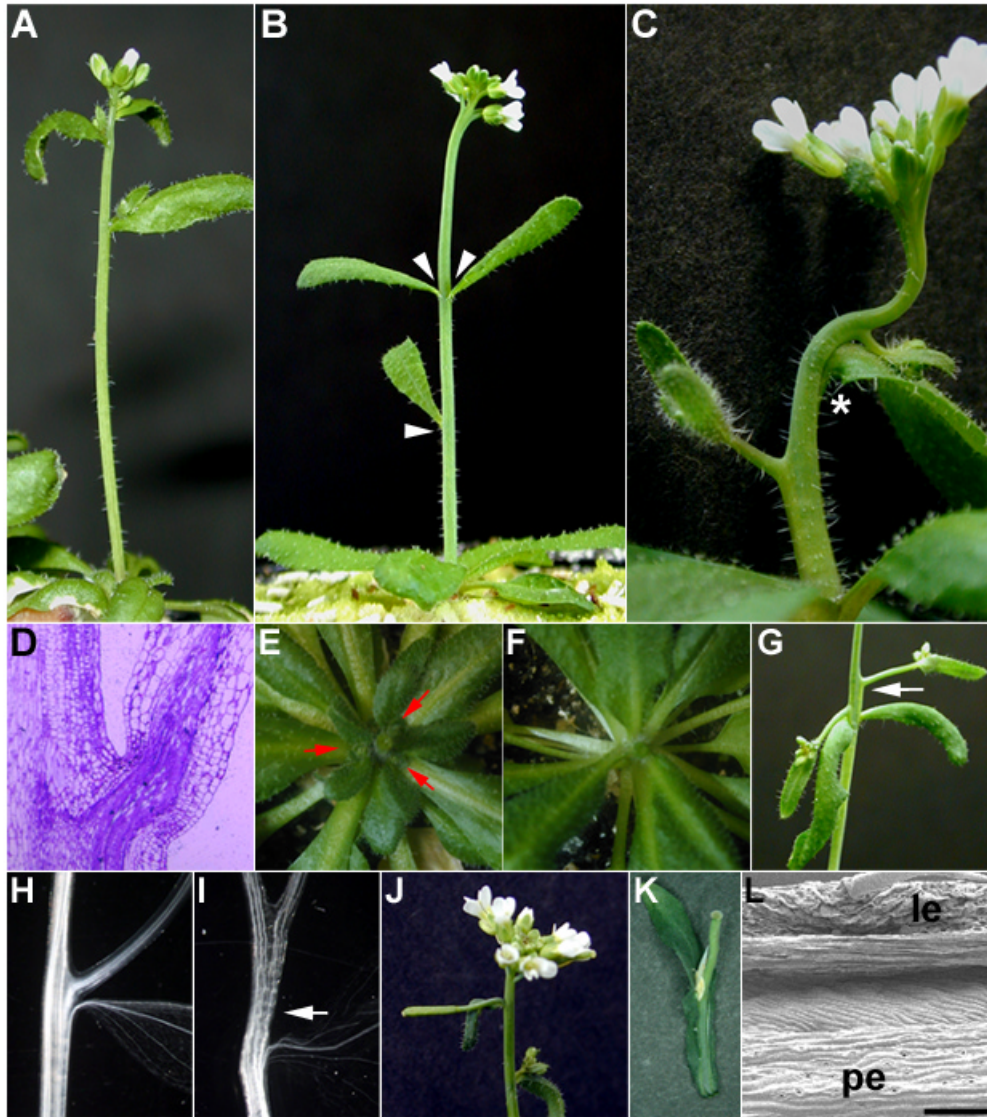


図18. *cuc2 cuc3*二重変異体の側枝の表現型

(A)野生型(Ler)、(B、C)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体の花茎。

野生型の花茎では茎生葉は螺旋葉序をもって配向し、その葉腋には腋芽が形成される(A)。*cuc2 cuc3*二重変異体の花茎では葉序が乱れ、また腋芽の欠失(矢尻)や本葉と茎との融合(星印)が観察される。

(D)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体の葉腋の縦断切片。

(E)野生型(Ler)と(F)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体のロゼット葉。

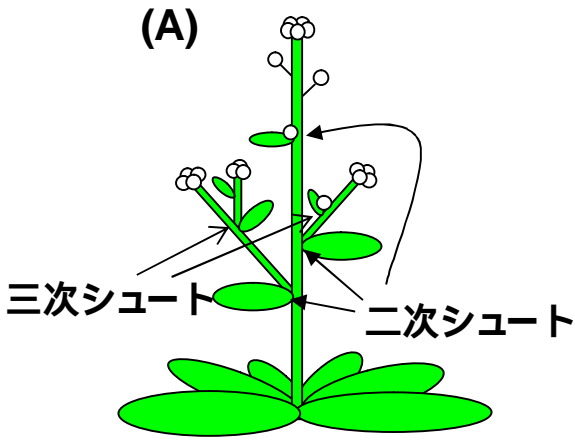
野生型で観察される腋芽(赤矢印)が*cuc2 cuc3*では観察されない。

(E)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体に見られる腋芽の茎生葉基部からのずれ。

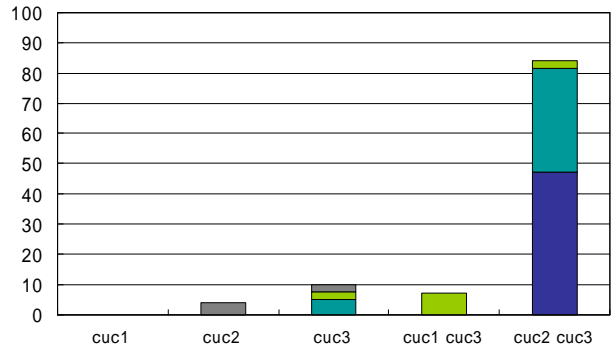
(H)野生型(Ler)と(I)*cuc2-1 cuc3-101*二重変異体の葉腋の維管束パターン。野生型において側枝は茎生葉の葉腋から伸長するが*cuc2 cuc3*では、その位置がずれて発生する。矢印は、ずれた側枝を示す。

(J、K)*cuc3-101*における花柄と茎生葉の融合。

(L)茎生葉と花柄の融合部分のSEM像。le；茎生葉、pe；花柄。Bar=0.5mm。



(B)



■ 腋生分裂組織の欠失
 ■ 側枝と花茎の融合
 ■ 花柄と茎生葉の融合
 ■ その他

(C)

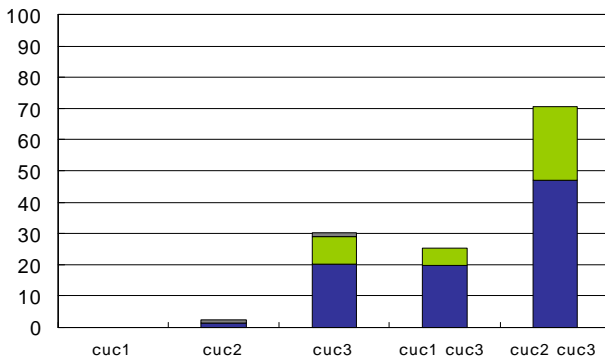


図19. *cuc3*変異体における側枝異常の頻度

(A)シロイヌナズナの花茎の模式図。

主茎から形成される側枝を二次シュート、二次シュートから形成される側枝を三次シュートと呼ぶ。

(B)二次シュート、(C)三次シュートにおける*cuc1*、*cuc2*、*cuc3*の単独変異体および、*cuc1 cuc3*、*cuc2 cuc3*二重変異体の表現型の頻度。

*cuc3*は単独でも側枝の異常を示す。さらに*cuc2*変異によってその表現型は強調される。しかし *cuc1*変異は*cuc3*変異体の表現型を強調しなかった。表現型 腋生分裂組織の欠失 (図18 B)、側枝と花茎の融合 (図18 G)、花柄と茎生葉の融合 (図18 J)。

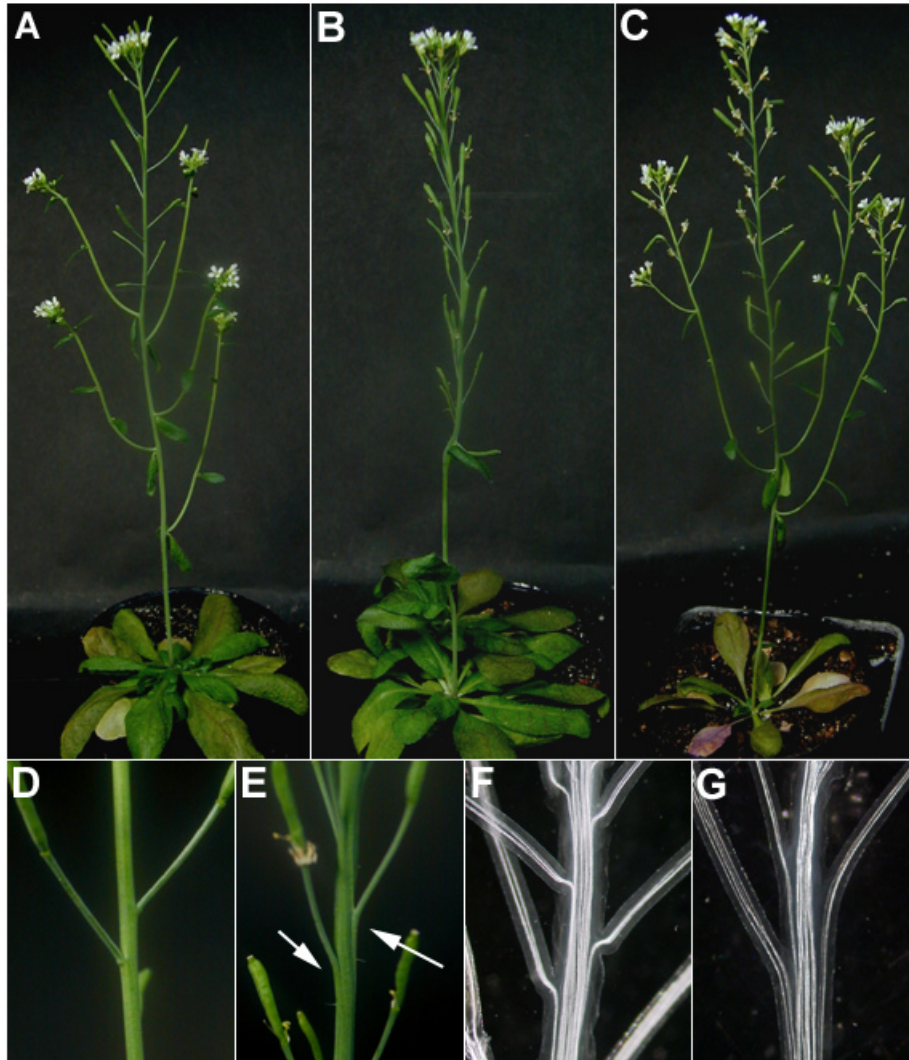


図20. *cuc1 cuc3*、*cuc2 cuc3*二重変異体における花柄の表現型
 (A、D)野生型(Ler)、(B、E)*cuc2-1 cuc3-105*、(C)*cuc1-1 cuc3-101*
 二重変異体の花茎。*cuc2 cuc3*の花柄は上向きに発生する。また、
 花柄の基部には花柄が融合してできた跡が見られる(矢印)。
 (F)野生型(Ler)、(G)*cuc2-1 cuc3-101*の花茎の維管束パターン。
 野生型では花柄と茎との境界部に維管束の湾曲が観察されるが
*cuc2 cuc3*では観察されなかった。

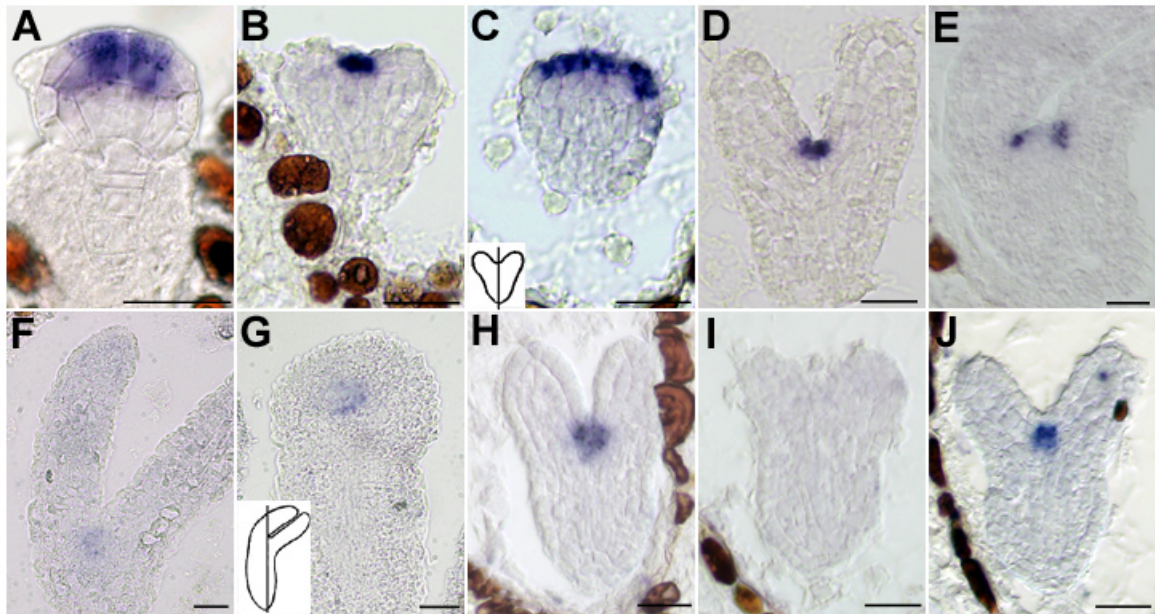


図21. 胚発生過程における*CUC3*の発現パターンと二重変異体における*STM*の発現パターン

(A-E、H)野生型、(F、G)*cuc1-1 cuc2-1*二重変異体、(I)*cuc2-1 cuc3-101*、(J)*cuc1-1 cuc3-101*二重変異体における(A-G)*CUC3*、(H-J)*STM*の発現パターン。

(A)32細胞期胚、(B、C)初期心臓型胚、(D、H-J)魚雷胚、(E-G)子葉屈曲胚。切片は、C、Gを除いてすべて前額縦断切片。C、Gの切片はそれぞれ左下模式図で切片の位置を示す。Bars=20 μ m。

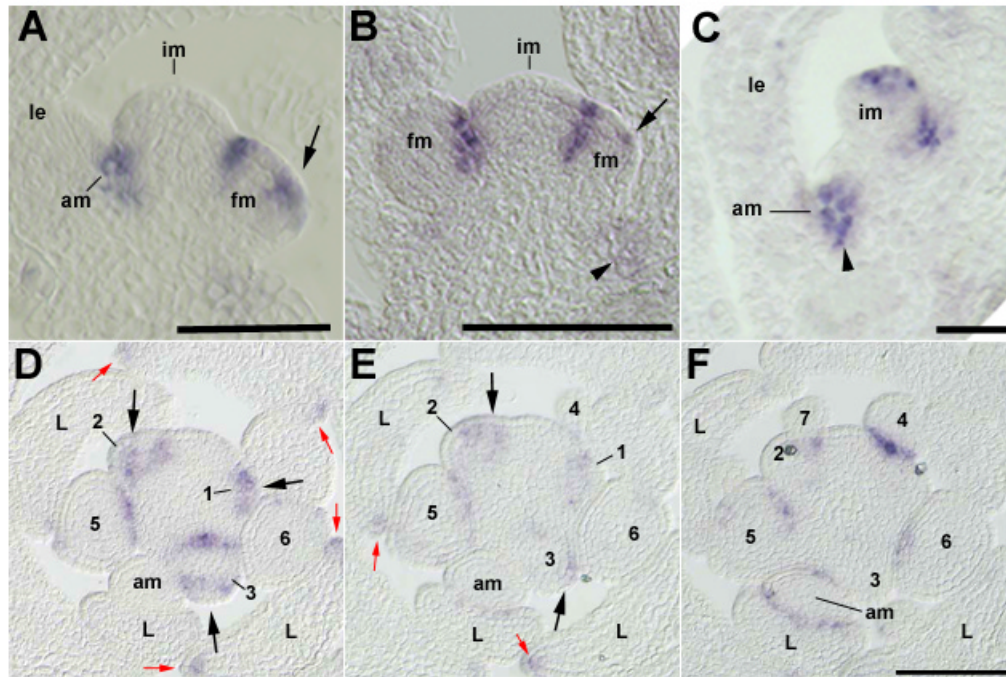


図22. 野生型の花序分裂組織における**CUC3**の発現パターン。
 (A、C)生殖成長期に移行した直後の花序分裂組織の縦断切片。
 (B)花芽形成を進める花序分裂組織。
CUC3は花原基の境界部や腋生分裂組織が形成される場所(am)、
 花柄基部(矢尻)で発現していた。また、**CUC3**はステージ1-2の
 花原基の頂端部でも発現していた(矢印)。
 (D-F)花序分裂組織の連続横断切片。
CUC3は花原基の早い時期から全体で発現し、その後境界部の発現
 のみが残る。また托葉と本葉との境界部でも発現していた(赤矢印)。
 1-7; 最も若い花原基からの順番、L; 茎生葉、am; 腋生分裂組織、
 im; 花序分裂組織、fm; 花分裂組織。Bars=50 μ m。

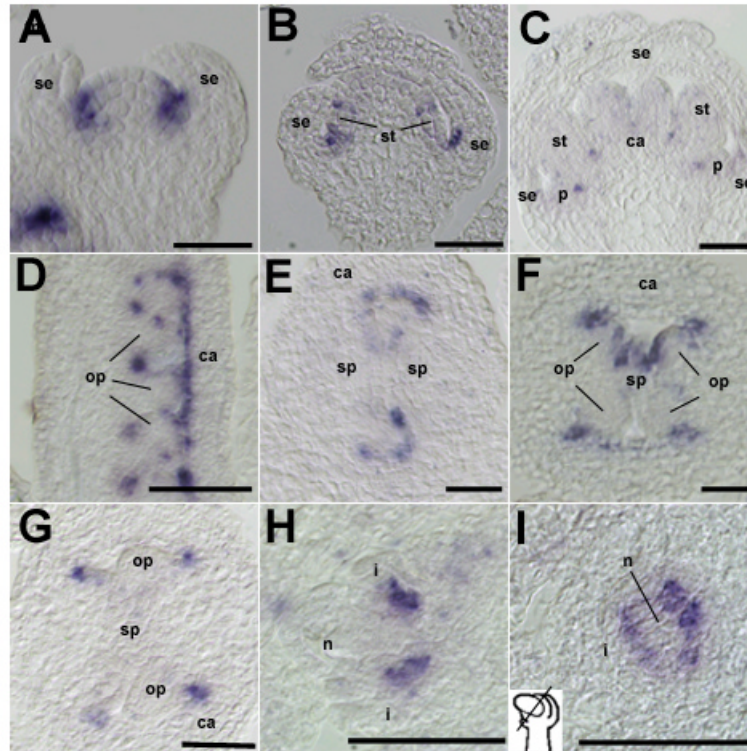


図23. 野生型の花や胚珠における**CUC3**の発現パターン。
 (A)ステージ3、(B)ステージ4、(C)ステージ7の花原基の縦断切片。
CUC3は花器官と花分裂組織、花器官同士の境界部で発現していた。
 (D)ステージ8後期の雌ずいの縦断切片。
 (E-G)ステージ8-9の雌ずいの横断切片。
 雌しべにおいて**CUC3**は、胚珠と心皮のあるいは胚珠と隔壁との境界部で発現していた。
 (H)ステージ12初期の胚珠の縦断切片、(I)斜断切片(切片方向は下模式図で示す)。**CUC3**は珠心と珠皮との境界部で発現していた。
 花のステージはSmyth et al., 1990に従った。
se ; がく、**p** ; 花びら、**st** ; 雄しべ、**ca** ; 心皮、**op** ; 胚珠原基、
sp ; 隔壁、**n** ; 珠心、**i** ; 珠皮。Bars=50 μ m。



図24. *CUC*と*LAS*との遺伝学的関係

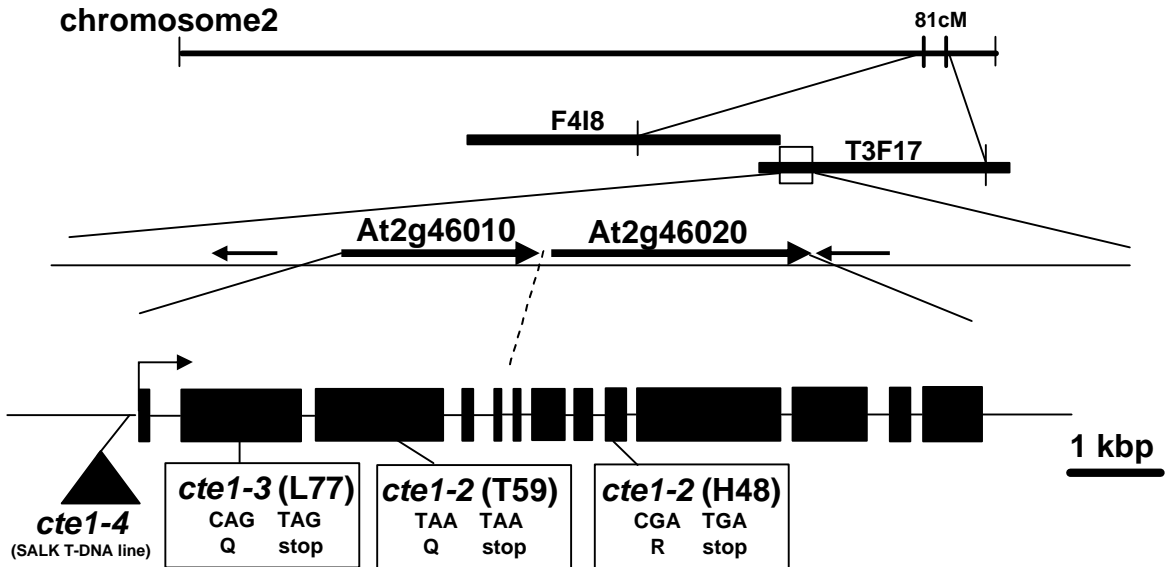
(A)野生型(Col)、(B)*cuc3-105*、(C)*las-101*変異体における花柄の表現型。

*las*変異体では*cuc3*と同様に花柄が上向きになる表現型を持つ。

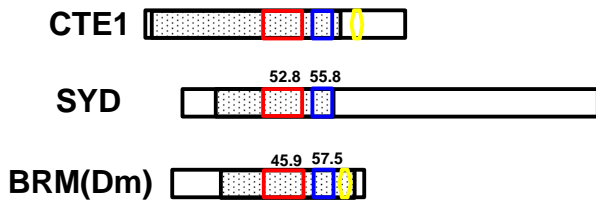
(D)*cuc2-3 las-101*二重変異体の花茎。*cuc2 las*では、側枝と主茎が融合する表現型(矢印)が観察される。

(E、G、I、J) *cuc3-105 las-101*二重変異体、(F)*cuc2-3 cuc3-105*二重変異体、(H)野生型(Col)。*cuc3 las*二重変異体では側枝の欠失(矢尻)や側枝と主茎の融合(矢印)など*cuc2 cuc3*で見られた側枝の表現型が観察される。*cuc3 las*では*cuc2 cuc3*と同様に花柄が上向きなる表現型が強調される(F、G)。さらに主茎には花柄の跡が残る(I)。また、芽生えにおいて高頻度で本葉の融合(星印)が観察される。

(A)



(B)



(C)

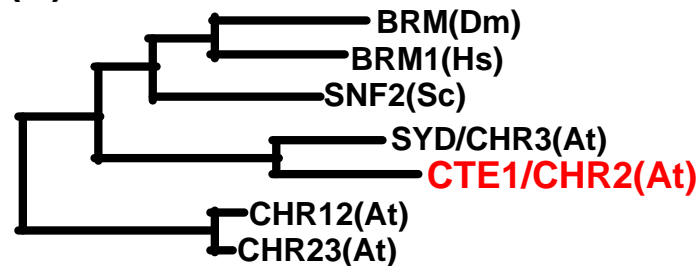


図25. *CTE1*遺伝子座のマッピングとタンパク質構造

(A) *CTE1*の第二染色体におけるマップポジションと遺伝子構造。

ボックスはエキソン、直線はイントロンまたは非翻訳領域を示す。下部に各アレルにおける変異部位を矢印で記す。三角はT-DNA挿入部分を示す。

(B) *CTE1*、*SYD*、*BRM*のタンパク質構造。

赤色囲み *SNF_2*ドメイン、青色囲み *HELICc*ドメイン、黄色囲み *BROMO*ドメイン、網掛け部 *ATPase*ドメイン。数値は*CTE1*の各ドメインに対するアミノ酸の相同性を示す。

(C) *SNF2*サブファミリーの系統樹 (Verbsky & Richard, 2001 を改変)。

Arabidopsis (At)、budding yeast (Sc)、*Drosophila* (Dm)、human (Hs)。

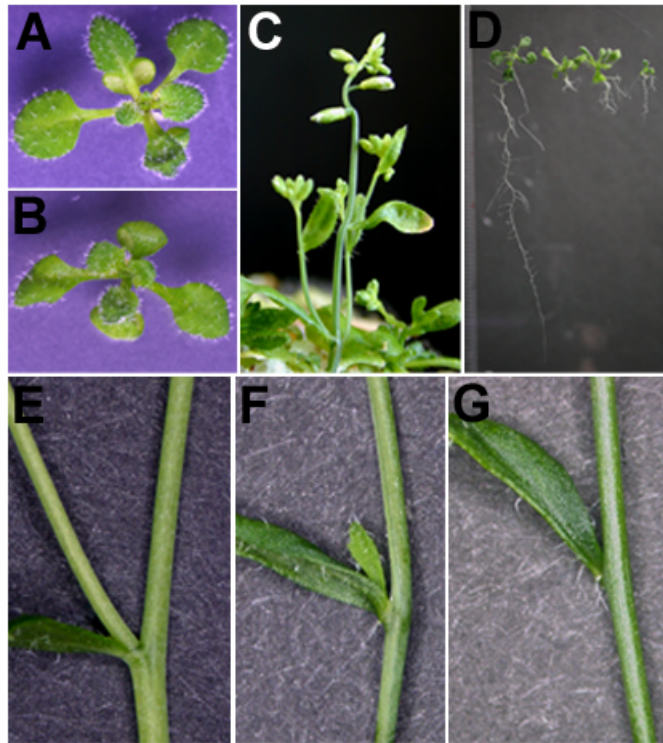


図26. *cte1*変異体の表現型

(A)野生型(Col)、(B)*cte1-4*(Col)の芽生え。

(C)*cte1-1*(Lerバックグラウンド)の花茎の表現型。

(D)野生型(Col; 左)、*cte1-4* (右から3個体) の根の長さの比較。

*cte1*変異体では根が極端に短くなる。

(E)野生型(Col)、(F、G)*cte1-4*の側枝の表現型。

*cte1*変異体では側枝に一枚の葉のみを形成したり(F)、側芽の欠失(G)といった異常を示す。

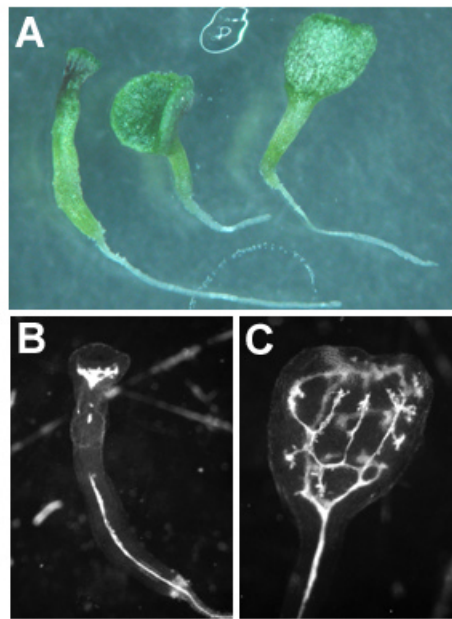


図27. *gnom-568E cuc2*二重変異体の芽生えと維管束パターン
 (A)*gnom-568E cuc2*二重変異体の芽生え。
 左からチューブ型子葉、融合子葉、カップ型子葉をもつ個体。
 (B、C)芽生えの維管束パターン。
*gnom-568E cuc2*二重変異体の維管束は途切れたり、いびつな形状となる。