

シロイヌナズナ *PUCHI* 遺伝子を介した
側生器官形成の解析

廣田 敦子

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18年12月25日提出

目次

I. 序論

- I-1. 花の形態形成
- I-2. 側根の形態形成

II. 材料と方法

- II-1. 植物材料と育成条件
- II-2. マップベースクローニング
- II-3. *puchi* 変異体の相補性試験
- II-4. コンストラクション
- II-5. 形質転換植物の作成
- II-6. RT-PCR
- II-7. *in situ* ハイブリダイゼーション
- II-8. β -Glucuronidase (GUS)染色
- II-9. 顕微鏡観察

III. 結果

- III-1. *puchi* 変異体の表現型
- III-2. *puchi* 変異体の原因遺伝子
 - III-2-1. *PUCHI* 遺伝子の同定
 - III-2-2. *PUCHI* タンパク質の機能予測
- III-3. 花の発生過程における *PUCHI* 遺伝子の機能の解析
 - III-3-1. *puchi* 変異体の地上部の詳細な表現型解析
 - III-3-2. *PUCHI* 遺伝子の地上部での発現
- III-4. 側根形成過程における *PUCHI* 遺伝子の機能の解析
 - III-4-1. 側根数の観察
 - III-4-2. オーキシンによる側根形成の誘導
 - III-4-3. *puchi* 変異体の側根の詳細な表現型解析
 - III-4-4. *puchi* 変異体の側根における細胞分化パターン形成
 - III-4-5. 側根形成過程での *PUCHI* 遺伝子の発現
 - III-4-6. *puchi* 変異体の側根におけるオーキシン勾配
 - III-4-7. 根での *PUCHI* 遺伝子の発現にオーキシンが与える影響

IV. 考察

- IV-1. *PUCHI* 遺伝子は AP2/EREBP ファミリーに属する転写因子をコードする
- IV-2. *PUCHI* 遺伝子は花発生過程で苞葉形成を抑制する
- IV-3. *PUCHI* 遺伝子は側根形成能を調節する
- IV-4. *PUCHI* 遺伝子は側根の発生過程で細胞分裂パターンを制御する

IV-5. *PUCHI*はオーキシンシグナルによって発現調節される

IV-6. 総合考察

V. 参考文献

VI. 謝辞

I. 序論

多くの高等植物は、主茎と主根からなる主軸と、それに付随する多数の側生器官によって構成される。胚発生以降の植物体にとって、体の大部分を占める側生器官をいかに形成していくかは、環境に適応した体つくりのために重要である。側生器官には、地上部では葉、花、そして葉茎、花で構成されるシュート(枝)が、地下部では側根が含まれる。

本研究では、植物の側生器官形成の中でも、地上部の花と地下部の側根の形作りで重要な働きをする *PUCHI* 遺伝子について分子遺伝学的解析を行った。

I-1. 花の形態形成

双子葉植物の芽生えは、二枚の子葉の間に茎頂分裂組織を持つ。この分裂組織は栄養成長の間、細胞分裂を繰り返す未分化な細胞集団として維持されると同時に、分化した細胞から構成される葉と茎を次々とつくり出す。1つの茎頂分裂組織に由来する茎と葉を一括してシュートという。それぞれの葉の根元には新しい腋芽とよばれる茎頂分裂組織が形成され、それが最初の茎頂分裂組織と同様に機能することで側生シュート(枝)が生じる。高等植物の体は基本的に無限成長を行い、その過程で連続して側生シュートを形成すると考えられる。

植物が生殖成長期に入ると茎頂分裂組織は花原基をつくる。花原基は花芽分裂組織として、がく、花弁、おしべといった花器官を順次つくり、最後に心皮をつくると分裂組織としての活動を停止する。ところが、この現象に例外があることは200年以上も昔に報告されている。ゲーテはバラの花の先に再度花芽がつく場合があることを記した。このときゲーテは、花がシュート同様に葉の腋から生ずることも記し、花から花が形成されたことから、花は葉の変形であるという考えを示した(図 I-1-1A)。また、シロイヌナズナの *LEAFY* 遺伝子の機能欠損変異体 *leafy (lfy)* では、花器官は全部葉に変化する (Weigel et al., 1992) (図 I-1-1C)。花器官の形成にはA,B,Cというそれぞれ異なったクラスに属する遺伝子の組合せが重要である。そしてA,B,C全てのクラスの遺伝子に変異が入った植物体では、花器官が全部葉に変化した (Bowman et al., 1989)。さらに、これらA,B,Cクラスの遺伝子と *SEP3* 遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現すると、葉が形成されるべき場所に花弁やおしべが形成された (Honma and Goto, 2001)。これらの結果は、花弁やおしべといった花器官は葉の変形した器官であることを示す。

高等植物の側生シュート(枝)は必ず葉の腋から形成される。花も被子植物の多くで葉の腋から形成される。したがってこれらの事実は、花は生殖のた

めに葉が花器官へと変形した側生シュート(枝)である事を示唆している。生殖成長過程において腋からこの花シュートを形成する葉は、一般的に苞葉と呼ばれる。苞葉を持つ植物にはキンギョソウやツユクサなどがある。中には赤い苞葉をつけるポインセチアや、花卉のような苞葉をつけるドクダミやハナミズキなど、栄養成長過程の本葉とは大きく異なる形態の苞葉をつくる植物もある(図 I-1-1D)。一方モデル植物のシロイヌナズナでは、栄養成長過程には茎頂分裂組織から葉を形成し、葉の腋から側生シュートを生ずる。そして生殖成長過程になると、茎頂分裂組織から葉様の構造は形成せず、花芽分裂組織直接つくり、花原基ができると考えられている。そのためシロイヌナズナでは花の根元に苞葉が観察されない(図 I-1-1B、図 I-1-2)。このように植物は栄養成長期から生殖成長期に変化すると、葉の形態や葉の腋からのシュート形成の様子を変化させるが、その変化の様子は種によって異なる。

本研究の目的の一つは、シロイヌナズナを用い、植物が栄養成長期から生殖成長期に移行するときに、側生シュートの形成を通じて地上部の体の構築様式を変化させる分子機構を解明することである。そのため、地上部で花シュートの基部だけで形態異常を示す *puchi* 変異体の分子遺伝学的解析を行った。

I-2. 側根の形態形成

シロイヌナズナの根系は、主根と側根によって構成される。主根は胚発生時に形成される根端分裂組織から生じる。シロイヌナズナの成熟した根の組織は、外から表皮細胞層、皮層細胞層、内皮細胞層がそれぞれ一層ずつ並び、そしてこの内側に一層の内鞘細胞層と導管や師管を含む中心柱が存在する(図 I-2-1)。また根の先端にはコルメラ細胞層や側部根冠細胞層も存在する。根端分裂組織にある静止中心 (quiescent center; QC) 細胞は各細胞層の幹細胞に接し、それらを未分化状態に保つ働きがある (van den Berg et al., 1997) (図 I-2-1)。一方、シロイヌナズナの側根は主根の内鞘細胞層の一部から生じる。分裂した内鞘細胞は主根と同様な根端分裂組織を持つ側根原基へと発生し、側根へと成長する (Malamy and Benfey 1997, Dubrovsky et al 2001)。シロイヌナズナの芽生えを観察すると、側根は地上部側から主根の先端側にかけて、長い順に並んでいる。このことから、側根は主として根の先端に近い場所で形成されることがわかる。そして、主根の根端分裂組織で作られた細胞が各細胞層へと分化する領域では、側根原基をつくる準備がすでに開始されることが知られている (Dubrovsky et al., 2006)。また根端分裂組織のすぐ上では、植物ホルモンのオーキシンが一部の内鞘細胞で蓄積することで側根形成誘導されるという最近の報告もある (Smet et al., 2007)。

このオーキシンは側根形成にとって非常に重要な因子として以前から報告されている。外から根にオーキシンを与えると側根数が増加することや、

オーキシンの輸送阻害剤の処理により側根数が減少することは良く知られている(Blakely et al., 1988; Laskowski et al., 1995; Reed et al., 1998; Casimiro et al., 2001)。またオーキシンのシグナル伝達経路も側根形成に重要であることが、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究により明らかになっている。*AXR5*、*SHY2*、*SLR*、*MSG2* そして *IAA28* の優性もしくは半優性の変異体では側根が生じないか、もしくは減少する。(Tian and Reed 1999; Rogg et al., 2001; Fukaki et al., 2002; Tatematsu et al., 2004; Yang et al., 2004)。これらの変異体は、オーキシン処理により発現が上昇する Aux/IAA ファミリーの遺伝子に変異が入り、Aux/IAA タンパク質が分解されずに安定した結果、オーキシン応答転写調節因子(AUXIN RESPONSE FACTOR; ARF)の働きを抑制し続けることで、オーキシンスイグナルを阻害する。*slr-1* 変異体では点変異により *IAA14* が安定化した結果、内鞘細胞の不等分裂以降の分裂が抑制されて側根を欠く(Fukaki et al., 2002)。IAA に機能を制御される ARF タンパク質も側根形成に重要である。ARF はオーキシン応答配列(Auxin Responsive Element; AuxRE)に結合し、その下流域にある遺伝子の転写を調節する。*slr-1* 変異体と同様、*arf7arf19* 二重変異体はほとんど側根を形成しない。したがって、*SLR*、*ARF7*、*ARF19* は側根形成において協調的に働いていることが考えられる(Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005)。*SLR*、*ARF7*、*ARF19* の遺伝子発現は内鞘細胞を含んで重複しており、*SLR* タンパク質は *ARF7* や *ARF19* タンパク質と相互作用する。(Fukaki et al., 2005)。この *SLR* と *ARF7* や *ARF19* との相互作用は、側根形成に必要なオーキシン応答性遺伝子の転写に重要である(Okushima et al., 2007)。

側根原基の発生の様子は詳しく観察されている(Malamy and Benfey 1997; Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2001)。まず導管に接した内鞘細胞のうち、一細胞もしくは二細胞が不等分裂し、周囲の内鞘細胞よりも短い娘細胞を生じる。短い娘細胞は秩序だった分裂を行い、側根原基をつくる。原基はさらに側根へと成長し、その先端には、主根の分裂組織とよく似た根端分裂組織を構築する(図 I-2-2)。

側根原基の発生過程にもオーキシンの働きは重要である。形成された側根原基では、原基の先端部を最大としたオーキシンの濃度勾配がつけられる。オーキシン勾配はオーキシンを細胞外へ排出する PIN ファミリーの働きにより形成される。そして PIN ファミリーの多重変異体では、根に外生オーキシンを処理すると内鞘細胞のすべてが垂層分裂と並層分裂を行うが、側根原基は形成されない。このことは、PIN ファミリーの重複的な働きによってオーキシン勾配が作られることで、正常な側根形成が行われることを示唆している(Benkova et al., 2003)。同様の現象は PIN タンパク質の細胞内局在の制御に重要な GNOM の変異体でも起こる(Geldner et al., 2004)。

この PIN と GNOM を介したオーキシシン輸送も側根原基の形成に重要である。しかし、ARF による転写調節を受けたオーキシシンシグナルや PIN ファミリーによるオーキシシン勾配が、側根形成の開始やその後の発生過程を制御する機構についてはほとんど明らかになっていない(図 I-2-2)。

本研究では、シロイヌナズナを用い、側根形成の開始や側根原基の発生機構を明らかにすることをもう一つの目的とした。そこで若い側根で形態異常が観察される *puchi* 変異体の解析を行った。



(Maizel and Weigel 2004)

図 1-1-1. 花はシュート(枝) の変形したものである

- (A) ゲーテが描いた花から花が生じたバラ。
- (B) シロイヌナズナの花序。
- (C) シロイヌナズナ *fy-12* の花序。
- (D) キンギョソウの苞葉。

シロイヌナズナ

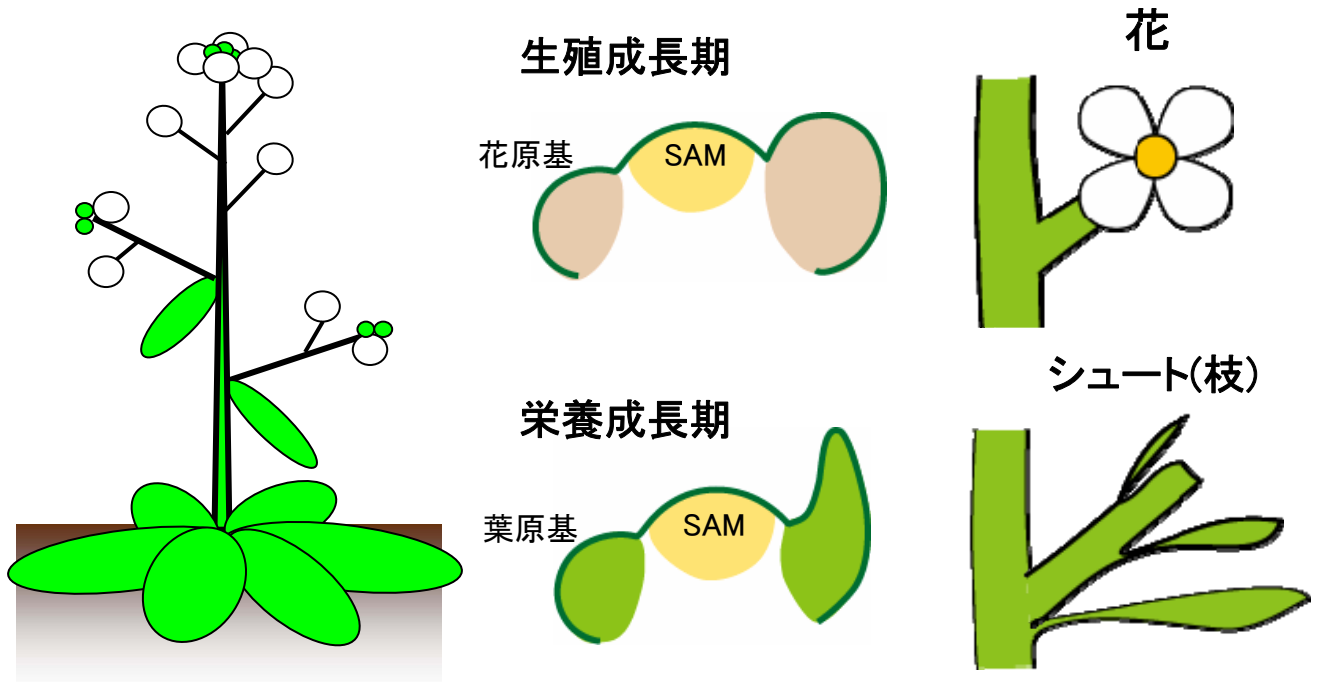


図 1-1-2. 栄養成長期から生殖成長期へのシロイヌナズナのシュート形成の変化

高等植物の地上部の体は葉、茎、花、そして、葉と茎のシュート(枝)で構成されえている。

シロイヌナズナは芽生え後の茎頂分裂組織(SAM)から葉を形成する。

葉の根元からは茎頂分裂組織が形成され、葉と茎のシュートをつくる。

一方生殖成長期には葉は形成されず花がつくられる。

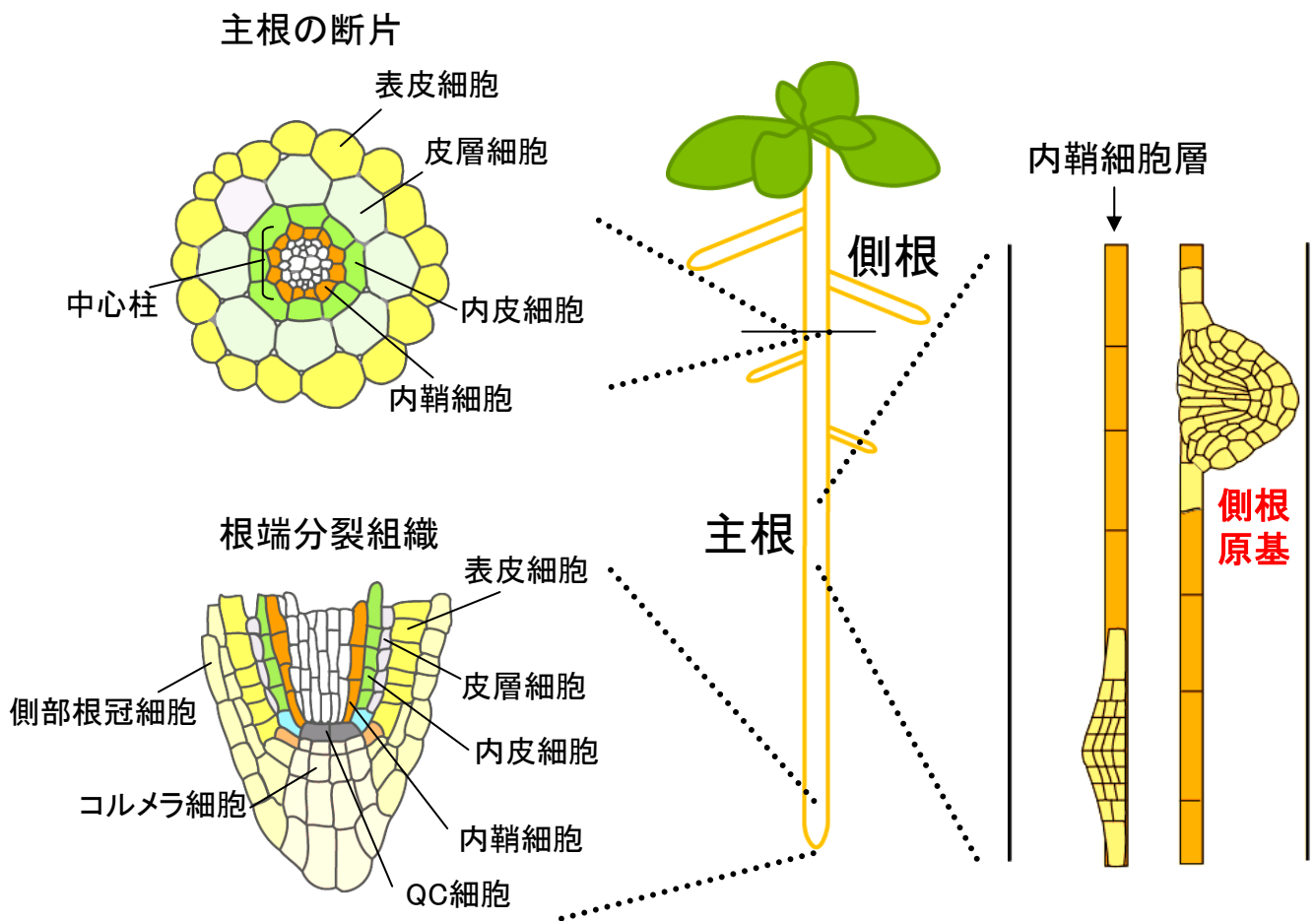


図 1-2-1. シロイヌナズナの主根の構造

主根の横断面の細胞構造と主根の根端分裂組織における縦断面の細胞構造。
 側根原基は主根の内鞘細胞層(オレンジ色)の一部の細胞が分裂し発生する。

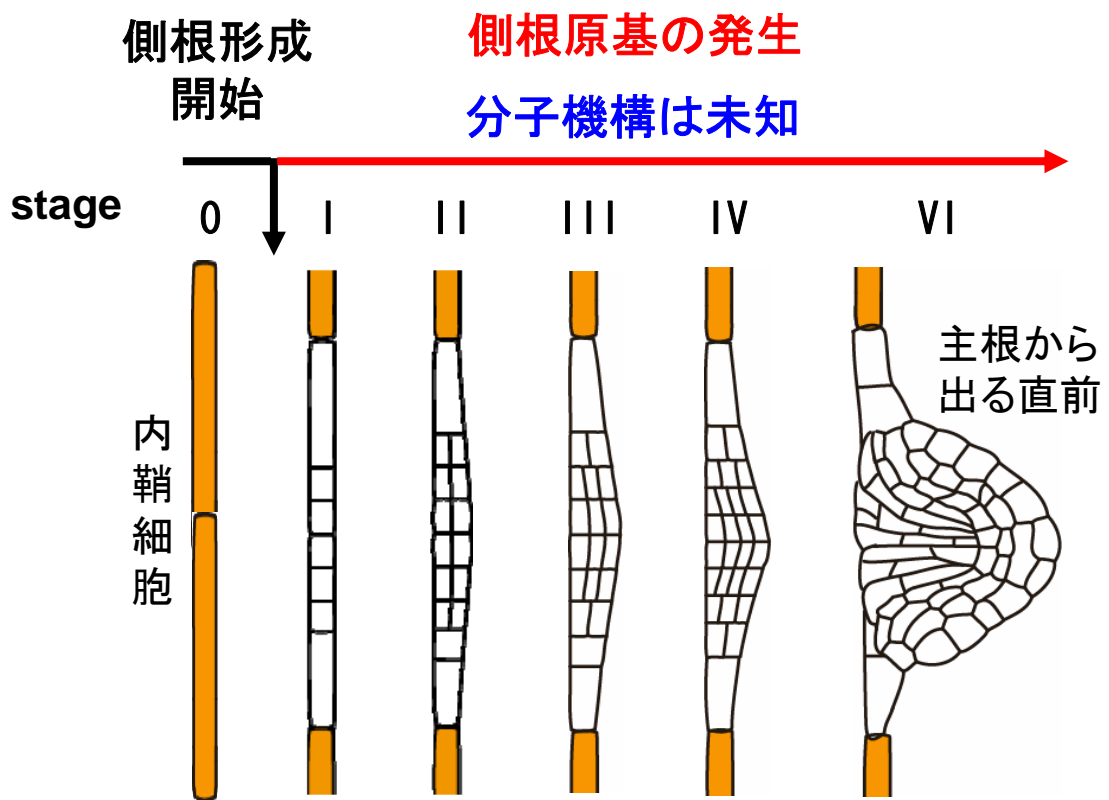


図 1-2-2. シロイヌナズナの側根の発生

Malamy ら(1997)によってstage分けされた側根の発生段階。
 主根の内鞘細胞が垂層分裂することで側根の発生は始まる(stage I)。
 その後、並層分裂が繰り返し起こり(stage II~IV)、stage IVでは四層の細胞層を持つ側根原基が形成される。その後側根原基は分裂や伸長を繰り返し、主根の根端分裂組織と同様な構造を形成する(stage VI)。
 この発生過程を制御する分子機構は未だわかっていない。

II. 材料と方法

II-1. 植物材料と育成条件

野生株として、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の Colombia (Col) を用いた。*puchi* 変異体のアレルには、*puchi-1* と TILLING 172F1 を *puchi-2* としてそれぞれ用いた。*puchi-1* 変異体は T-DNA 挿入系統 SALK_046393 から得られた (Alonso et al., 2003)。しかし、T-DNA の挿入箇所と *puchi* 変異体の表現型を示す遺伝子座が一致しなかったため、Col を用い戻し交配を三度行った後、*puchi* 変異体の表現型を示す個体から種子を採取し解析に用いた。*puchi-2* 変異体(172F1)は Targeting Induced Local Lesions in Genomes (TILLING)法による変異体コレクションから得た(Henikoff et al., 2004)。エンハンサートラップライン E1238 は The Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)から得た(ABRC Number: CS70083)。*prs* 変異体の種子は Dr. Okada (Kyoto University) から提供された。*Pro_{35S}:PUCHI-SRDX* 形質転換体の種子は Dr. Takagi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) から提供された。*Pro_{DR5}:GUS*、*PIN2-GFP*、*Pro_{SHR}:GUS* 系統の種子は、それぞれ Dr. T. Guilfoyle (University of Missouri)、Dr. B. Scheres (Utrecht University)、Dr. P. N. Benfey (Duke University)から提供された。*Pro_{SCR}:GFP* 系統は、以前当研究室の Dr. Saito らにより報告された系統を用いた (pspt 3-6; Saito et al., 2005)。

種子を 5%次亜塩素酸ナトリウムにより 20 分間室温で滅菌した後、ムラシゲスクーク培地(MS)プレート上に播いた。発芽を同調させるために、4°C、暗黒下に 2 日間置いた後、23°C、連続白色光の培養機に移して発芽、生育させた。芽生えの植物体にオーキシン極性輸送阻害剤およびオーキシンを処理するときは、それぞれ dimethylsulfoxid(DMSO)に溶解した 5 μ M 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA)、5 μ M 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)を加えた培地で植物体を生育させた。

II-2. マップベースクローニング

puchi-1 変異体と *Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta(Ler)とを交配した F2 世代において、*puchi* 変異体の側根の表現型を指標に *PUCHI* の遺伝子座を探索した。Col と Ler の多型は ExTaq DNA polymerase (Takara, Kyoto, Japan)を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR)と制限酵素処理によって確認された。原因遺伝子の配列決定には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems)を用いた。

II-3. *puchi* 変異体の相補性試験

BAC コンテイング: T28N17 を鋳型に *PUCHI* を含むおよそ 4.4 kb を PCR によって増幅した(*gPUCHI4.4*)。PCR には以下のプライマーを用いた。

pPUCHIXbaI_F1

(5'-GGCTCTAGATTTAGAACTCTATGTAACATCCGGACACG-3')

t0.9PUCHIBamHI_R

(5'-GAAGGATCCGTTTGGACTAGTATAACAGGATTGG-3')

増幅された断片は制限酵素 *XbaI* と *BamHI* で処理され、pBluescript II にクローニングされた。その後、*gPUCHI4.4* は pBluescript II からバイナリーベクター pBIN19 へサブクローニングされた。

BAC コンテイング: T28N17 を鋳型に *PUCHI* を含むおよそ 8.3 kb を PCR によって増幅した(*gPUCHI8.3*)。PCR には以下のプライマーを用いた。

PUCHI8.3_F1 (5'-GGACGGGTTTGGATTGATATAACAC-3')

PUCHI8.3_1R (5'-AGTCCAATTTTATAGACTTATGCTTGC-3')

増幅された断片は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit により pCR-BluntII-TOPO にクローニングされた。制限酵素 *KpnI* と *NotI* で処理され pUC19 にサブクローニングされた。また pCR-BluntII-TOPO にクローニングされた *gPUCHI8.3* は *BamHI* で処理され、*PUCHI* を含むおよそ 6.7 kb(*gPUCHI6.7*)が、pUC19 にサブクローニングされた。その後、*gPUCHI8.3* と *gPUCHI6.7* は、それぞれ pUC19 からバイナリーベクター pBIN19 のマルチクローニングサイトを改変した pBIN19AN へとサブクローニングされた。

II-4 コンストラクション

PUCHI の過剰発現体の解析のため、*PUCHI* の ORF は BAC コンテイング:T28N17 を鋳型として以下のプライマーセットを用いた PCR により増幅された。

PUCHIGW_F1

(5'-AAAAAGCAGGCTAGATGTCAACCTCCAAAACCCTA-3')

PUCHI GW_R

(5'-ACAAAGCTGGGTGAAAGACTGAGTAGAAGCCTGT-3')

増幅された断片は Gateway BP Clonase(Invitrogen)を用いて *pDONR221* にクローニングされた。*Pro35S:PUCHI* と *Pro35S:PUCHI-GFP* の構築のため、ORF は Gateway LR recombination reactions (Invitrogen)を用いて *pDONR221* からバイナリーベクター pGWB2 と pGWB5 へそれぞれサブクローニングされた。GWB ベクターは Dr. Nakagawa(Shimane University) から提供された。

PUCHI の発現解析のため、*PUCHI* の 5'上流域 2.5 kb は BAC コンテイング

グ:T28N17 を鋳型として以下のプライマーセットを用いた PCR により増幅された。

pPUCHIXbaI_F

(5'-GGCTCTAGATTTAGAACTCTATGTAACATCCGG-3')

pPUCHIXbaI_R

(5'-GGCTCTAGAGATGATGAAGAAATGGTTTTTTTG-3')

増幅された断片は制限酵素 *Xba* I で処理され pBluescript II へクローニングされた。*ProPUCHI2.5::GUS* の構築のため、*PUCHI* の 5' 上流域は、pBluescript II からバイナリーベクター pBI101 の *GUS* 遺伝子の 5' 上流域へとサブクローニングされた。

PUCHI の 5' 上流域が含む三箇所のオーキシン応答配列(AuxRE)にそれぞれ点変異を挿入した(図 II-1)。まず(Step I)、*gPUCHI4.4* を鋳型とし、*PUCHI* の翻訳開始点に最も近い AuxRE に、QuikChange™ 法(Wang and Malcolm, 1999) を用い、点変異の挿入を行った。PCR には以下のプライマーを用いた。

pPUCHI 156_F (5'-CAAGCTCATTaTCTCTCTATTTATAAC-3')

pPUCHI 156_R (5'-GTTATAAATAGAGAGAtAATGAGCTTG-3')

次に(Step II)、他の二箇所の AuxRE に点変異を挿入するため、*gPUCHI4.4* を鋳型とし、点変異の導入された二箇所の AuxRE をそれぞれ両端に含む約 500-bp の断片が PCR により増幅された。PCR には以下のプライマーを用いた。

pPUCHI 1020_F (5'-CAAGGTGAtAAAATTGTTCTCATTTC-3')

pPUCHI 528_R (5'-GCAAAATCTGGAATaTCACAGTAACC-3')

最後に(Step III)、Step I の産物を鋳型とし、Step II の産物をプライマーとし、PCR を行った(Kirsch and Joly, 1998)。三箇所に点変異の入った *PUCHI* の 5' 上流域 2.5 kb はバイナリーベクター pBI101 の *GUS* 遺伝子の 5' 上流域に挿入された(*ProPUCHI2.5m3::GUS*)。

PUCHI と GFP との融合タンパク質の発現解析のため、pUC19 にサブクローニングされた *gPUCHI6.7* を鋳型とし、QuikChange™ 法により *PUCHI* の 5' 上流域に *GFP* 遺伝子を挿入した。PCR には以下のプライマーを用いた。

PUCHIN_F (5'-ATGTCAACCTCCAAAACCCTAGACCATAATAAACC-3')

PUCHIN_R (5'-GATGATGAAGAAATGGTTTTTTTGAAGGAGGTTTC-3')

GFP 遺伝子が挿入された *gPUCHI6.7* は、*Bam* HI で処理され、pUC19 からバイナリーベクター pBIN19AN にサブクローニングされた。

II-5. 形質転換植物の作成

各コンストラクトを含むバイナリーベクターはアグロバクテリア MP90

株に導入された。これらのアグロバクテリアを植物に感染させ、形質転換植物体 T1 種子をえた。T1 種子はカナマイシン(35 µg/ml)、またはハイグロマイシン(20 µg/ml)を含むアガロース培地上に播いて選抜した。

II-6. RT-PCR

液体窒素で凍結粉碎した組織から、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA の抽出を行った。抽出した RNA を鋳型とした cDNA の合成には SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)を用いた。合成した cDNA を鋳型とした PCR は、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒の条件で行った。PCR による増幅は、*PUCHI*は 35 回、*ACT8*は 25 回行った。オーキシン処理による転写量の変化を検出する場合、7 日目の芽生えを、MS 液体培地で 23°C 白色光下で 30 分間前処理した後、1 µM NAA もしくは DMSO を含む MS 液体培地でそれぞれ 23°C 白色光下で処理し、RT-PCR に用いた。*ACT8* の発現はコントロールとして示した(Hibara et al., 2003)。PCR には以下のプライマーセットを用いた。

PUCHI_Rf (5'-CTCCACAGTTTGTTCATCGATC-3')

PUCHI_Rr (5'-GACTGAGTAGAAGCCTGTAG-3')

ACT8_Df (5'-GAGAGATTCAGGTGCCAG-3')

ACT8_Dr (5'-AGAGCGAGAGCGGGTTTTCA-3')

リアルタイム PCR による転写産物の定量化には、合成した cDNA を 1/60 に希釈し鋳型とし、LightCycler® Systems (Roche)と SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa)を用いて行った。*β-TUBULIN* の発現はコントロールとして用いた(Lorrain et al., 2004)。リアルタイム PCR には以下のプライマーセットを用いた。

PUCHI LCL (5'-ACGGCTCGTTATCTTCTTCACT-3')

PUCHI LCR (5'-TGGACTTATTATGTTCTTCGCTTG-3')

β-TUBULIN_F (5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3')

β-TUBULIN_R (5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA-3')

II-7. *in situ* ハイブリダイゼーション

以下に示すプライマーセットを用いて PCR で増幅した DNA 断片を鋳型とし、RNA プローブを *in vitro* 転写系で作成した。アンチセンスプローブには T7 ポリメラーゼを、センスプローブには SP6 ポリメラーゼを用いた。

AP2_f2 (5'-CTCCACAGTTTGTTCATCGATC-3')

PUCHI_markR (5'-GACTGAGTAGAAGCCTGTAG-3')

LFY_F (5'-AGGAAGTGGTACTGGGACG-3')

LFY_R (5'-TCCAAATGGCAAAGCTGACG-3')

組織の固定、脱水、包埋、切片の作成、切片の前処理、ハイブリダイゼーシ

ョン、プローブの免疫化学的検出は、Aida らの方法に従った (Aida et al., 2002)。

II-8. β -Glucuronidase (GUS)染色

GUS 活性を検出するために、根を GUS 染色液中 (50 mM sodium phosphate (pH 7.2), 0.5 mM ferricyanide, 0.5 mM ferrocyanide, and 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) で 37°C に静置し染色した。

II-9. 顕微鏡観察

側根原基の観察を行うため、Aida らの方法に従い根を透明化した (Aida et al., 1997)。根を 8 g 抱水クロラル、1 ml グリセロール、2 ml 蒸留水の混合液により透明化し、Eclipse E800 Nomarski microscope (Nikon) を用いて顕微鏡観察を行った。また、さらに詳細に側根原基の細胞構造や GUS 染色を行った根を観察するため、Malamy らの方法を用いた (Malamy and Benfey., 1997)。この方法では水で洗った根を 4% HCl、20% MeOH の水溶液中に浸し 55°C で 15 分間処理した。次に根を 7% NaOH を含む 60% EtOH の水溶液に浸し室温で 15 分間処理した。その後、40%、20%、10% の EtOH 水溶液において、根をそれぞれ室温で 10 分間処理した。最後に根を 10% EtOH 水溶液に 50% グリセロールを加えた混合液中において室温で 30 分間処理した後、顕微鏡観察を行った。この方法で処理した根は室温保存で一ヶ月以上経過しても顕微鏡観察が可能であった。

蛍光実体顕微鏡での観察には、MZ16FA (Leica Microsystems GmbH) を用いた。共焦点蛍光顕微鏡での観察は、FV1000 (Olympus) を用いた。花柄と根は 0.001% FM4-64 (Invitrogen)、50 μ g/ml propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co., St. Louis) でそれぞれ組織を染色した。GFP 蛍光は、488 nm の波長で励起し、490–540 nm の波長で検出した。FM4-64 の蛍光は、543 nm の波長で励起し、590–690 nm の波長で検出した。PI の蛍光は、543 nm の波長で励起し、560–660 nm の波長で検出した。

走査型電子顕微鏡による観察を行うため、抽苔前の花序を FAA (3.7% フォルムアルデヒド、5% 酢酸、50% エタノール) 固定液中で一晩固定した後、エタノールシリーズ (50%、75%、85%、95%) で各 20 分間処理し脱水した。さらにアセトンシリーズで (25%、50%、75%、100%) で各ステップ 20 分間処理してアセトン置換を行い、臨界点乾燥を行った。試料台に試料を固定し、イオンスプラッターコーターを用いて金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡により観察した。

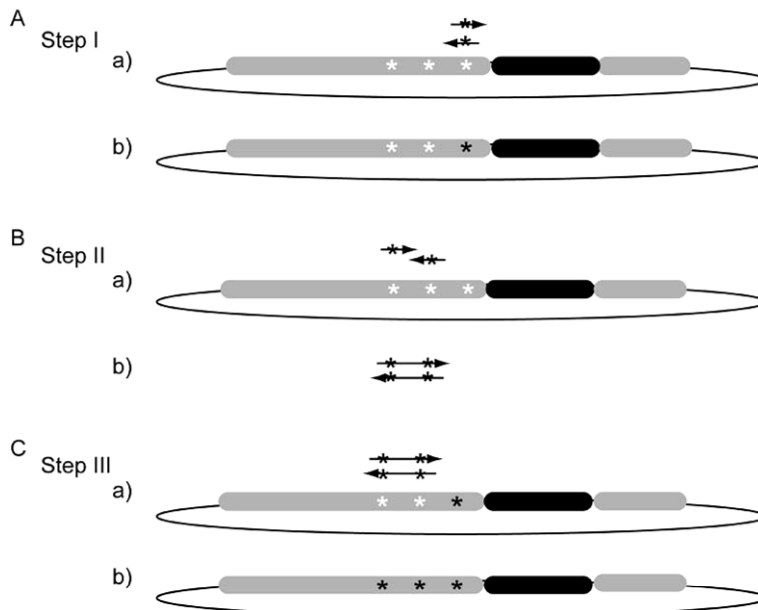


図 II-1. *PropUCHI2.5m3:GUS*コンストラクションの模式図

(A) Step I; *gPUCI4.4*を鋳型とし、*PUCHI*の翻訳開始点に最も近いAuxREに、QuikChange™法を用い、PCRにより点変異の挿入を行った。点変異の入ったプライマー(矢印)と、変異を入れる前の*gPUCI4.4*を(a)に示す。変異を入れた後の*gPUCI4.4*を(b)に示す。

(B) Step II; 他の二箇所のAuxREに点変異を挿入するため、*gPUCI4.4*を鋳型とし、点変異の導入された二箇所のAuxREをそれぞれ両端に含む約500-bpの断片をPCRにより増幅した。点変異の入ったプライマー(矢印)と、変異を入れる前の*gPUCI4.4*を(a)に示す。変異を入れた後のPCR産物を(b)に示す。

(C) Step III; Step Iで一箇所のAuxREに点変異が入った*gPUCI4.4*を鋳型とし、Step IIのPCR産物をプライマーとし、PCRを行った。プライマー(Step IIのPCR産物; 矢印)と、Step Iで一箇所のAuxREに変異が入った*gPUCI4.4*を(a)に示す。三箇所のAuxREに変異を入れた後の*gPUCI4.4*を(b)に示す。白い星は野生型のAuxREを示し、黒い星は点変異の入ったAuxREを示す。黒い棒は*PUCHI*のORF、灰色の棒は*PUCHI*の5'上流域、および3'下流域を示す。

III. 結果

III-1. *puchi* 変異体の表現型

当研究室で所有するシロイヌナズナ T-DNA 挿入系統から、花柄の基部に一对の小さなピン状の突起を持つ新奇の突然変異個体が得られた。我々は、その系統を突起物の形状から *puchi-1* 変異体と名づけた。野生株との戻し交配により *puchi-1* 変異体の表現型と T-DNA は遺伝学的に連鎖しないことが分かった。*puchi-1* 変異体の突起状構造物は、ほぼすべての花柄の基部に形成されていた(図 III-1-1A-D)。また、突起状構造物の形成以外、植物体の地上部の形態や生育に *puchi-1* 変異体と野生株との間で大きな違いは見られなかった(図 III-1-1E)。

野生株と *puchi-1* 変異体の 9 日目の芽生えを観察すると、*puchi-1* 変異体の側根は野生株の側根に比べ生育が悪かった(図 III-1-1F, G)。個々の側根をよく観察すると、*puchi-1* 変異体の若い側根は、野生株の側根より基部が膨らんでおり、基部で屈折してから伸長する側根も多く見られた(図 III-1-1H, I)。もっとも、植物体が生育すると、*puchi-1* 変異体の側根は野生株と見分けがつかない生育を示した(図 III-1-1J)。一方、主根の生育では野生株と *puchi-1* 変異体で大きな違いは見られなかった(図 III-1-1F, G)。

つまり、*puchi-1* 変異体は、花柄の基部の突起状構造物の形成、若い側根における形態異常、といった表現型を示すことが分かった。

次にこれらの表現型が同一遺伝子座の変異によるものかを調べた。*puchi-1* 変異体と野生株とを交配して得られた F1 植物では、花柄の基部にも芽生えの側根の形態にも *puchi-1* 変異体の表現型は見られなかった。さらに F2 植物では、約 1/4 の個体 (25.6%*puchi-1* 変異体、n=164) で *puchi-1* 変異体の花柄の基部の突起状構造物と側根の形態異常が観察された。そしてこの二つの表現型は分離することはなかった。つまり、F2 植物体では 3 対 1 の分離比で、野生型と *puchi-1* 変異体を得られた。そして *puchi-1* 変異体の表現型は分離しなかったため、*puchi-1* 変異体の表現型は一遺伝子座の劣性変異によるものであることが強く示唆された。

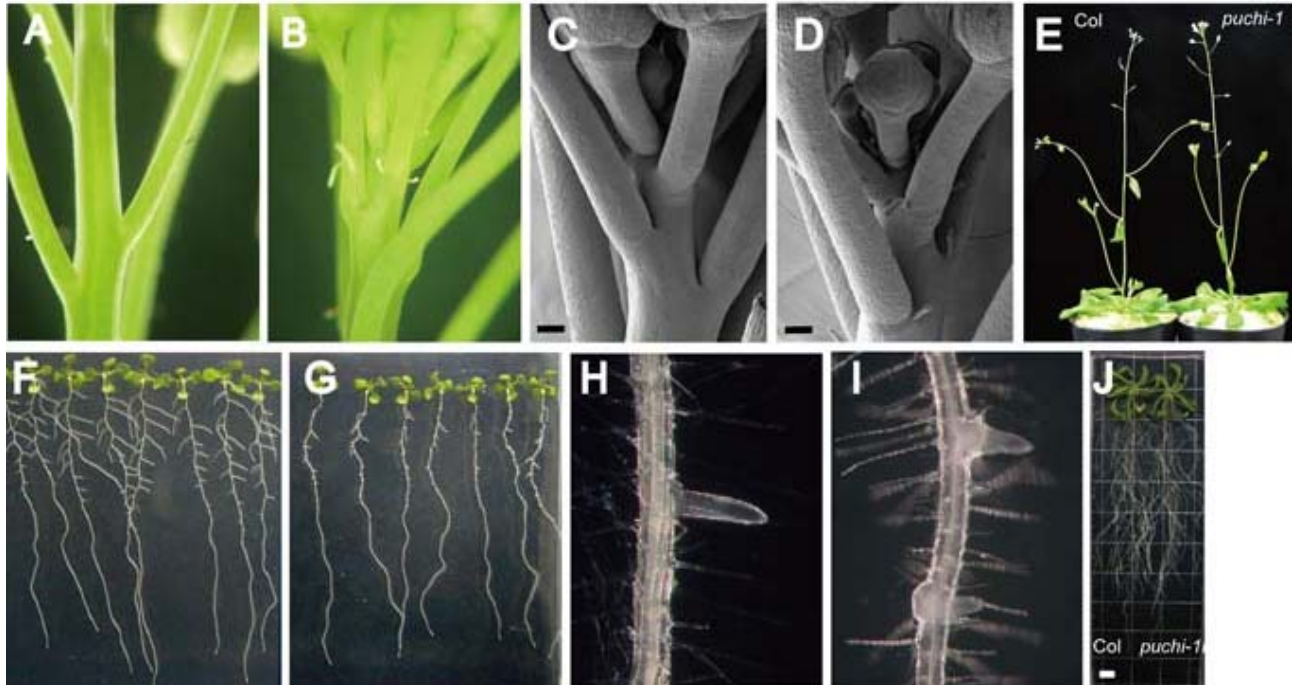


図 III-1-1. *puchi-1*変異体の花柄の基部と側根の表現型

(A, B) 野生株の花柄の基部(A) と、*puchi-1*変異体の花柄の基部 (B)
 (C, D) 野生株の花柄の基部の走査型電子顕微鏡写真(C)と、
*puchi-1*変異体の花柄の基部の走査型電子顕微鏡写真(D)
*puchi-1*変異体ではほとんどの花柄の基部に一对の突起が観察できる。
 (E) 発芽33日目の野生株(左)と、*puchi-1*変異体 (右)
 (F, G) 発芽9日目の野生株の芽生え(F)と、*puchi-1*変異体の芽生え(G)
 (H, I) 野生株の若い側根 (H) と、*puchi-1*変異体の若い側根の拡大写真(I).
 (J) 発芽後20日目の野生株(左)と、*puchi-1*変異体 (右)
 Bars in (C,D) = 100 μ m. Bar in (J) = 1 cm.

III-2. *puchi* 変異体の原因遺伝子

III-2-1. *PUCHI* 遺伝子の同定

puchi-1 変異体の原因遺伝子を同定するため、側根の表現型に基づいたマップベースクローニングを行った。*PUCHI* 遺伝子座は 5 番染色体北側の BAC コンティグ; F20L16、 T28N17、 T1A4 に含まれる 26 遺伝子間に存在することがわかった。このうちいくつかの遺伝子配列を調べたところ、*puchi-1* 変異体の *At5g18560* 遺伝子の翻訳領域においてフレームシフト変異を引き起こす 28 塩基対の欠失が認められた(図 III-2-1A)。

そこで *At5g18560* 遺伝子の 186 番目のグルタミンを終止コドンへ変化させる点変異を持つ TILLING 172F1 系統を取り寄せ、その変異のホモ個体を調べたところ *puchi-1* 変異体と同様に花柄の基部の突起状構造物や若い側根の形態異常が観察された。次に、*puchi-1* と 172F1 系統を交配したところ、F1 世代の植物は *puchi-1* 変異体と同様に花柄基部の突起状構造物の形成および側根の形態異常を示した。これらの結果は *puchi-1* 変異体と 172F1 系統がアレルックであることを示しており、172F1 系統を *puchi-2* とした(図 III-2-1A)。

さらに、*At5g18560* 遺伝子の 5' 上流 5.5 kb と 3' 下流 1.7 kb を含む 8.3 kb の野生型ゲノム断片と、5' 上流 3.9 kb と 3' 下流 1.7 kb を含む 6.7 kb の野生型ゲノム断片をクローニングし、*puchi-1* 変異体に形質導入した。その結果、いずれの野生型ゲノム断片を導入した場合にもすべての T1 植物体で *puchi* 変異体の側根の表現型は相補された。さらに地上部の表現型もそれぞれ複数の T1 植物体で相補された(それぞれ 9/10, 5/6) (図 III-2-1B,C)。

これらの結果により *PUCHI* が *At5g18560* 遺伝子であると断定した。

III-2-2. *PUCHI* タンパク質の構造予測

PUCHI の完全長 cDNA 配列は Genoscope (GeneBank accession number: BX832365) によって報告されている。*PUCHI* はひとつのエクソンから構成され、イントロンはない。また *PUCHI* は N 末端側に核移行シグナルドメインと DNA 結合配列とされる AP2 ドメインを含む 348 アミノ酸をコードする(図 III-2-2A)。AP2 ドメインを含むタンパク質は AP2 /EREBPs (Ethylene Responsive Element Binding Protein) ファミリーと呼ばれる植物特異的な転写因子群に含まれる (Riechmann and Meyerowitz, 1998; Alonso et al., 2003)。予測される *PUCHI* タンパク質の AP2 ドメインは、このファミリーの中でもシロイヌナズナ LEAFY PETIOLE (LEP) (van der Graaff et al., 2000)、DORNROSCHE/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 (DRN/ESR1) (Banno et al., 2001, Kirch et al., 2003) の AP2 ドメインと高い相同性を示した(図 III-2-2C)。 *PUCHI* と LEP タン

パク質のアミノ酸配列を比較すると、AP2 ドメインでは 95%の高い相同性を示した。しかし、AP2 ドメイン以外の領域では、*LEP* 遺伝子を含め *PUCHI* と高い相同性を示す遺伝子はシロイヌナズナに見当たらなかった。したがって、*PUCHI* はシロイヌナズナにおいて単一遺伝子であることが示唆される。一方 *PUCHI* はトウモロコシの BRANCHED SILKLESS1 (BD1) (Chuck et al., 2002) や、イネの FRIZZY PANICLE (FZP) (Komatsu et al., 2003) とも AP2 ドメインにおいて 96%の高い相同性を示した(図 III-2-2B)。もっとも、これらのタンパク質の中でも、AP2 ドメイン以外の領域で *PUCHI* と高い相同性を示すアミノ酸配列はデータベース上には見当たらなかった。

PUCHI の細胞内局在を調べるため、*PUCHI*-GFP 融合タンパク質を CaMV 35S による転写制御下において発現させた (*Pro_{35S}:PUCHI-GFP*)。 *Pro_{35S}:PUCHI-GFP* を *puchi* 変異体に導入した T1 植物では、側根の形態異常は相補されており、根の表皮細胞の核で強い GFP 蛍光が観察された(図 III-2-3A)。

次に、*PUCHI* が AP2 転写因子ファミリーに含まれるタンパク質をコードすることから、CREST 法(the chimeric repressor silencing technology; Hiratsu et al., 2003)を用い、*PUCHI* の転写活性化能について検証を行った。*PUCHI* と転写抑制ドメイン SRDX との融合タンパク質を CaMV 35S プロモーターを用いて野生株で発現させた (*Pro_{35S}:PUCHI-SRDX*)。 *PUCHI* が転写活性化能を有するならば、*Pro_{35S}:PUCHI-SRDX* が導入された植物体では SRDX によって *PUCHI* の標的遺伝子の転写が抑制され、*puchi* 変異体の表現型が再現されることが期待できる(Hiratsu et al., 2003)。この実験の結果、*Pro_{35S}:PUCHI-SRDX* を導入した T2 植物のなかに、*puchi* 変異体の地上部でみられる花柄の基部の突起状構造物が形成する系統が 15 系統中 3 系統現れた(図 III-2-3B,C)。なお、側根の表現型を再現する系統は見られなかった。したがって、*PUCHI* は少なくとも地上部では転写の活性化に関与していると示された。

さらに、*PUCHI* の発現している器官を調べるため RT-PCR を行った。その結果、*PUCHI* は根と開花後の花において強く発現していることが示された(図 III-2-4)。

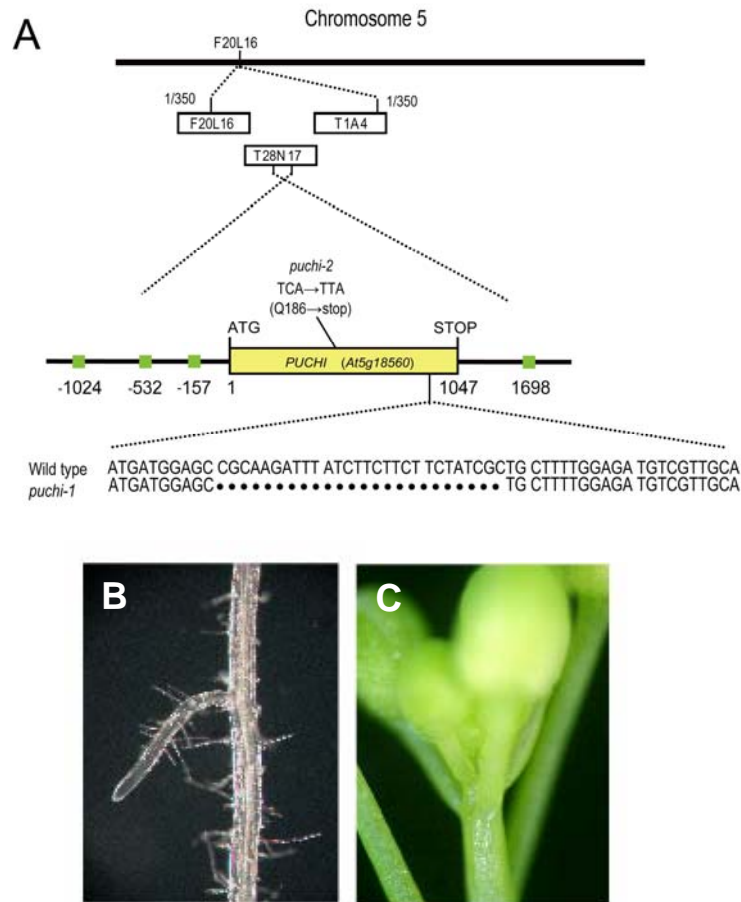


図 III-2-1. *PUCHI* 遺伝子の同定

- (A) *PUCHI* 遺伝子座は5番染色体のBACコンティグ; F20L16とT1A4の間に位置付けられた。BAC名の上に示す数字は*puchi-1*変異体とLerを交配したF2個体のうち、これらのBAC上で染色体の組み替えを起こした個体数を示している。黄色のボックスは*PUCHI* のORFを示し、緑色のボックスはAuxREを示す。ORFの下に示す数字は 翻訳開始点(ATG)からの塩基数を示す。
- (B) *PUCHI*を含む6.7kbのゲノム断片を導入した *puchi-1*変異体の側根。
- (C) *PUCHI*を含む6.7kbのゲノム断片を導入した *puchi-1*変異体の花柄の基部。

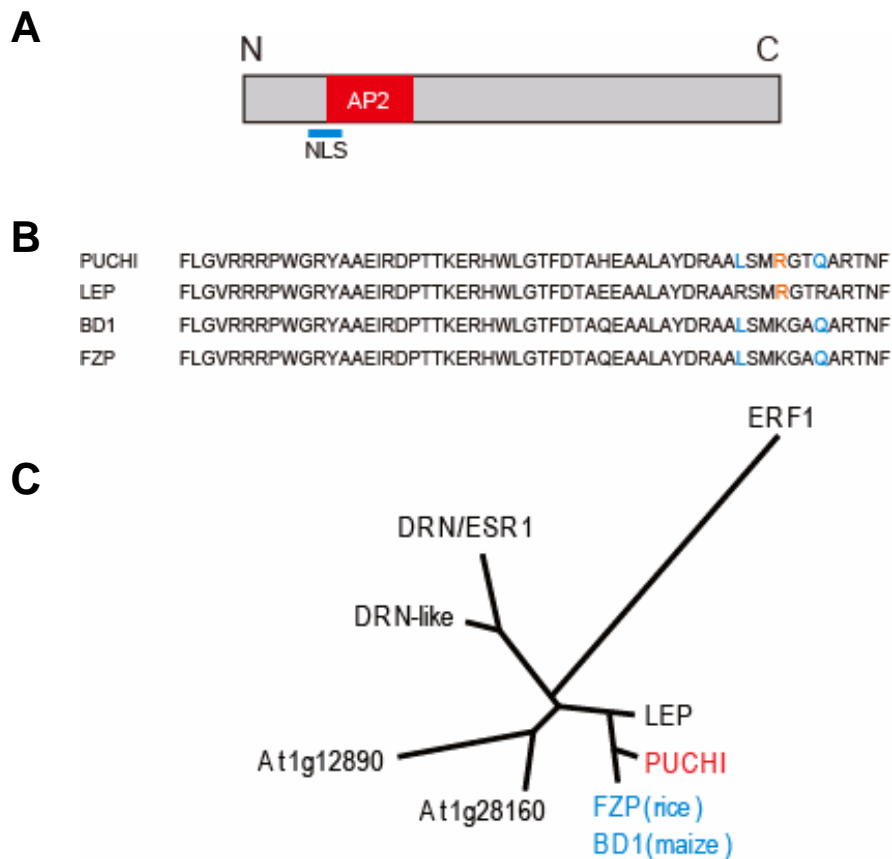


図 III-2-2. PUCHIタンパク質の構造予測

(A) アミノ酸配列から予測されるPUCHIの構造。

PUCHIは核移行シグナルドメイン(NLS; 青色の棒)と、APETALA2 (AP2) DNA結合ドメイン(赤色のボックス)をN末端側に含む。

(B) 予測されるAP2ドメインの比較。

PUCHI、LEP、BD1、FZPの間で、アミノ酸配列はよく保存されている。

PUCHI、BD1、FZPでは保存されLEPでは保存されていないアミノ酸を青色で、

PUCHI、LEP だけで保存されている配列をオレンジ色で示す。

(D) PUCHI と、PUCHIと相同性の高いAP2ドメインを含むシロイヌナズナAP2/EREBP

ファミリータンパク質(黒色)と、トウモロコシのBD1、イネのFZP(青色)でのAP2ドメインによる系統樹。

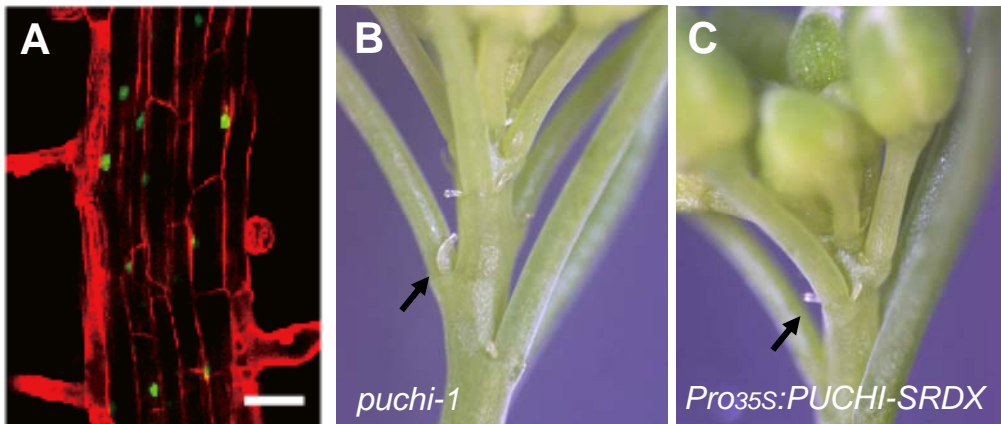


図 III-2-3. PUCHIタンパク質の機能予測

(A) *Pro35s:PUCHI-GFP*を導入した*puchi-1*変異体の根でのGFP蛍光。
PUCHI-GFPは核で強く発現している。

Bar = 50 μ m.

(B, C) CREST法によるPUCHIの転写活性化能の検証

*puchi-1*変異体の花柄の基部(B)に形成される一対の突起(矢印)。

野生株に*Pro35s:PUCHI-SRDX*を導入した系統の花柄の基部(C)。

*puchi-1*変異体と同様に一対の突起が形成されている(矢印)。

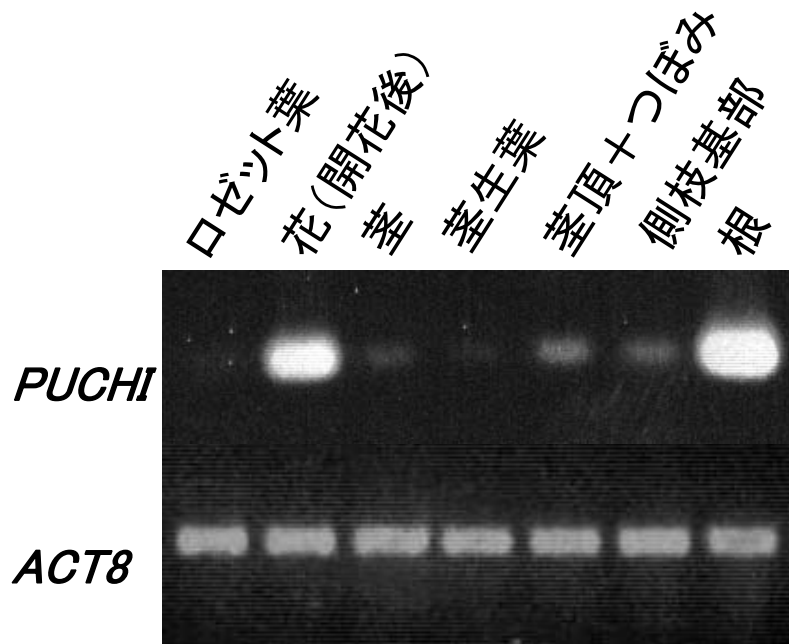


図 III-2-3. RT-PCRによる各器官での*PUCHI*の発現解析
 ロゼット葉、開花後の花、莖、莖頂とそれに付随するつぼみと、
 側枝基部はそれぞれ発芽後40日の植物体から採取し、RNAを調整した。
 根は発芽後20日の植物体から採取し、RNAを調整した。
 コントロールとして*ACT8*を用いた。

III-3. 花の発生過程における *PUCHI* 遺伝子の機能の解析

III-3-1. *puchi-1* 変異体の地上部の詳細な表現型解析

シロイヌナズナでは、花柄の基部には何も形成されない。しかし *puchi* 変異体のほぼ全ての花柄の基部には一対の突起が形成された。さらに時折、*puchi* 変異体の突起の間には、扁平な葉のような構造物も観察された。一方、がく・花弁・おしべ・めしべなどの花器官の形態や生殖能力に異常は見られなかった。

そこで、*puchi* 変異体の花柄の基部の構造物がいつから形成されるのかを調べるため、野生株と *puchi-1* 変異体の花原基の初期発生過程を SEM で詳細に観察した(図 III-3-1)。一般にシロイヌナズナの花の形成過程は、原基の発生からめしべの成熟まで詳細に観察されており 20 段階に分けて記されている(Bowman et al., 1989, Smyth et al., 1990)。それによると、花の発生はまず茎頂から花芽の膨らみが現れることで確認できる(stage1)。この茎頂から生じた膨らみが丸い花原基へと成長し(stage2)、花原基からは最初のがくの発生が始まる(stage3)。stage2 においては、野生株の花原基は丸い形をしているのに対し、同時期の *puchi-1* 変異体の花原基には、花原基を取り囲むよう背軸側に突出している突起状および扁平状の構造が観察された(図 III-3-1B,D)。これらの構造物は、花の発生ステージが進むにつれて花の根元に残り、成熟した花柄の基部で見られる構造物と同様な形態へと成長する様子が観察された(図 III-3-1A,B)。これらの構造物は形態的に最初 *puchi-1* 変異体の花原基の大部分を占めたにもかかわらず、この構造以外の部分の花原基からは、その後正常に花器官がつくられ、成熟しても花に形態異常は見られなかった。

次に *puchi* 変異体で形成される一対の突起状および葉様の扁平状構造物の性質について分子遺伝学的な解析を行った。多くの双子葉植物の普通葉の基部には一対の托葉が形成される(図 III-3-2A)。シロイヌナズナの場合、葉の基部にある一対の托葉は非常に未熟であり、形態は突起状で、その大きさはトライコームよりも小さい。しかし、形態的特徴だけではこれらの構造物の持つ性質を判断できない。そこで、シロイヌナズナの托葉で GFP 蛍光が観察されるエンハンサートラップライン (E1238、図 III-3-2C) と *puchi-1* 変異体とを交配した。すると、F2 植物から得られた *puchi-1* 変異体の花柄の基部の突起状構造物において GFP の蛍光が観察された(図 III-3-2D)。このことは、*puchi-1* 変異体の突起状構造物が托葉の性質を持つことを示唆する。シロイヌナズナ *PRESSED FLOWER (PRS)* は、器官の側部形成に必要な遺伝子である。この遺伝子の機能欠損変異体 *prs* の葉では、基部の両側に行える托葉は形成されない(Matsumoto and Okada, 2001, Nardmann et al., 2004) (図 III-3-2E)。そこで *prs* 変異体と *puchi-1* 変異体との二重変異体

を作製したところ、*puchi-1* 変異体特有の花柄の基部の突起状構造物がまったく形成されなかった。しかし、二重変異体のいくつかの花柄の基部で、葉様の扁平状構造物は形成された(図 III-3-2F,G)。これらの結果から、*puchi-1* 変異体の花柄の基部の一对の突起状構造物は托葉に対応し、その間に形成される扁平状の構造物は未熟な葉であることが強く示唆された。一般的に花シュートの基部の葉は苞葉とよばれる。この点から考えると *puchi* 変異体では苞葉が形成されたと示唆される。

次に、野生株と *puchi-1* 変異体とで形態に違いが見られる Stage2 の花原基において、花芽が形成される過程での構造物の特徴について調べた。そのため、花芽決定に必要な転写因子 *LEAFY(LFY)* (Weigel et al., 1992) や、側生器官の裏側組織に特異的に発現する *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* (Sawa et al., 1999b) の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。野生株の花原基では、*LFY* はほぼ全体で発現していた(図 III-3-3A)。一方、*puchi-1* 変異体の花原基では、*LFY* は原基の向軸側で強く発現し、未熟な苞葉と思われる部分では発現していなかった(図 III-3-3B)。このことは、stage2 の花原基の背軸側にみられる構造物は、花の性質を持たないことを示唆している。また、野生株の花原基では *FIL* は花原基の背軸側で発現していた(図 III-3-3C)。そして、*puchi-1* 変異体の花原基でも、*FIL* は花原基の背軸側、つまり未熟な苞葉が形成されるところで発現していた(図 III-3-3D)。

III-3-2. *PUCHI* 遺伝子の地上部での発現

野生株での *PUCHI* の mRNA の蓄積を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。茎頂の縦断切片と横断切片での結果から、*PUCHI* のシグナルは、発生初期の花原基 (stage0-2) において、向軸側に偏って検出された(図 III-3-4A,B,D)。また、stage2 の花原基の中でも、より発生の進んだ花原基では *PUCHI* のシグナルは検出されなかった(図 III-3-4A,B,D)。花原基がさらに発生しても *PUCHI* の発現はその後見られることはなかったため、*PUCHI* は発生初期の花原基で一過的に発現していることが示された。なお、このような一過的な *PUCHI* の発現は腋芽の発生初期でも観察された(図 III-3-4C)。

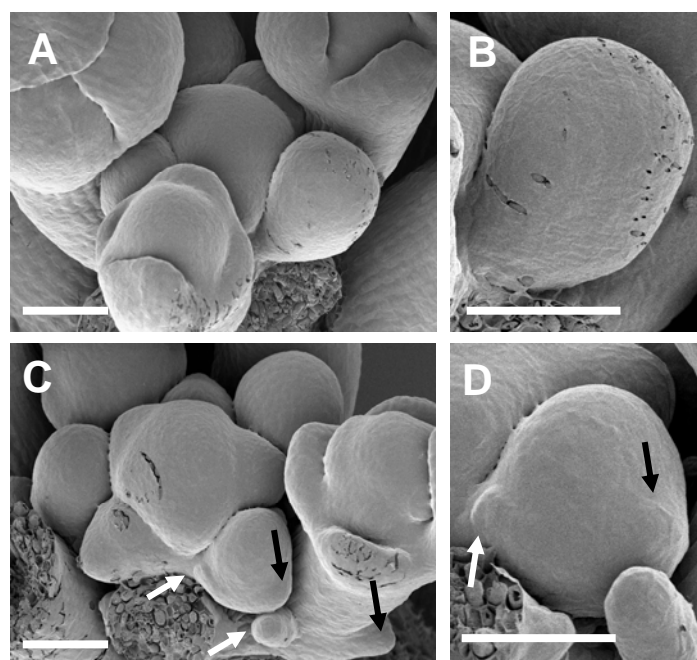


図 III-3-1. *puchi-1* 変異体の花柄の基部で見られる突起および扁平状構造物の形成過程

(A) 走査型電子顕微鏡で観察した野生株の花序の中心。花原基の発生が見られる。

(B) (A)のstage 2の花原基の拡大写真。丸い形が確認できる。

(C) 走査型電子顕微鏡で観察した*puchi-1* 変異体の花序の中心。

(D) (C)のstage 2の花原基の拡大写真。

すでに突起(白色矢印)や扁平状構造物(黒色矢印)と思われる膨らみが見られる。

Bars = 50 μ m.

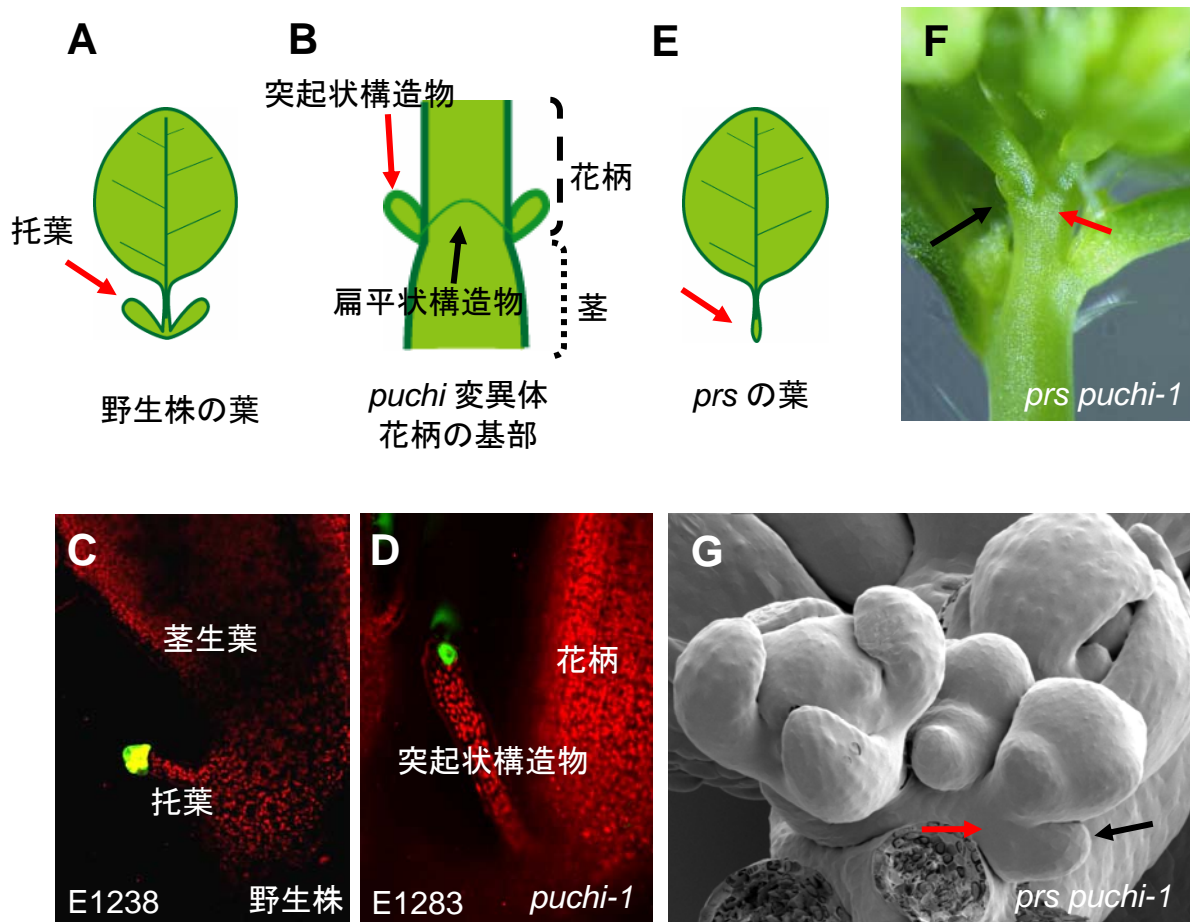


図 III-3-2. *puchi* 変異体の突起状構造物の性質

- (A) 双子葉植物の葉の模式図。双子葉植物の葉の基部には一対の托葉がある(赤色矢印)。
 (B) *puchi* 変異体の花柄の基部の模式図。
 一対の突起状構造物(赤色矢印)と、その間に扁平状構造物を持つ(黒色矢印)。
 (C) 托葉マーカーE1238の野生株での発現。
 (D) 托葉マーカーE1238の*puchi-1* 変異体での発現。
 (E) *pressed flower*, (*prs*) 変異体の葉の模式図。*prs* の葉では托葉が形成されない(赤色矢印)。
 (F, G) *prs puchi* 二重変異体。
 扁平状構造物は形成される(黒色矢印)が、突起は形成されない(赤色矢印)(F)。
 走査型電子顕微鏡で観察すると、突起はまったく形成されていないことがわかる(G)。

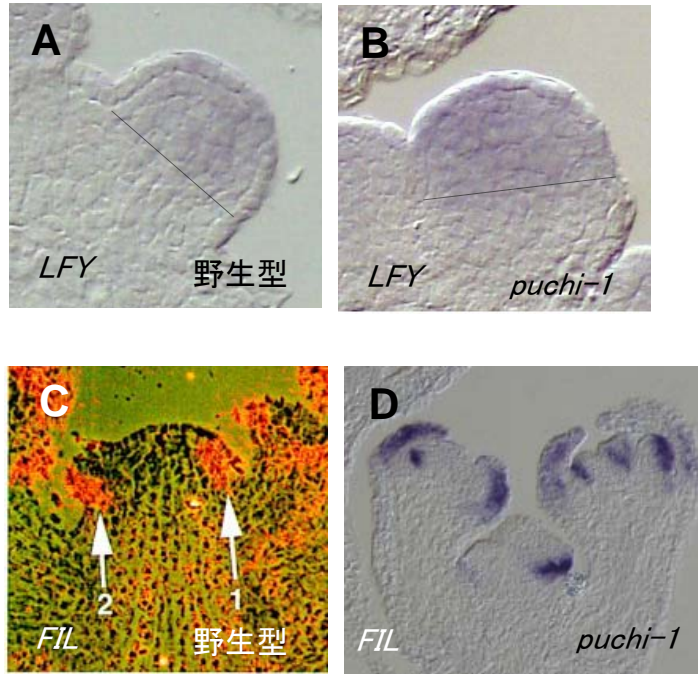


図 III-3-3. *puchi* 変異体でのLFYとFILの発現

(A, B) 野生株(A)と、*puchi* 変異体(B)でのLFYの発現。

(C, D) 野生株(C; Sawa et al., 1999)と、*puchi* 変異体(D)でのFILの発現。

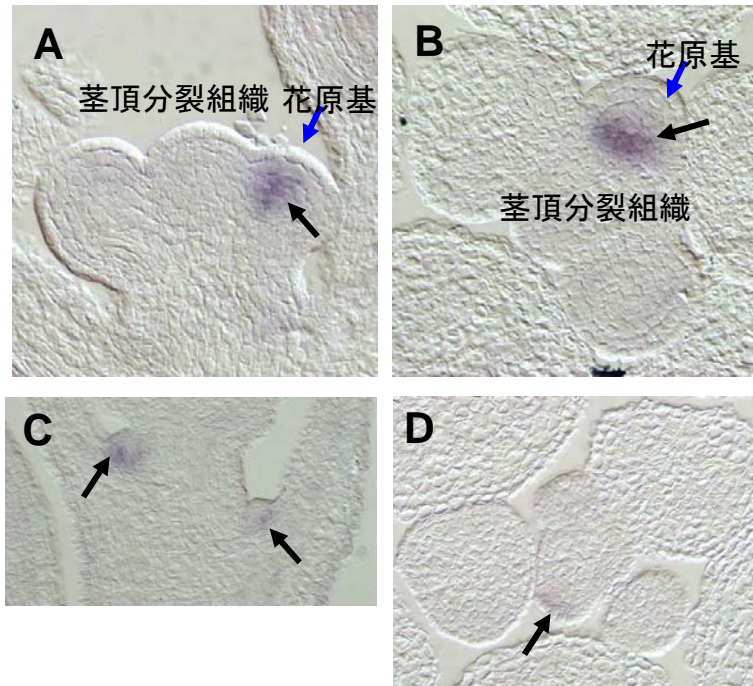


図 III-3-4. 地上部での *PUCHI* の発現

野生株の花序分裂組織での *PUCHI* 特異的なプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション。

(A) 花序分裂組織の縦断切片。

(B) 花序分裂組織の横断切片。

PUCHI mRNAは、stage 2の花原基で向軸側に発現している。

花原基がstage 2の後半まで成長すると*PUCHI* mRNAの発現は消えた。

(C) 腋芽での*PUCHI*の発現。腋芽が成長すると*PUCHI* mRNAの発現は見られなくなる。

(D) (B)の連続切片。stage 0-1と思われる花でも*PUCHI* mRNAが検出できた。

III-4. 側根形成過程における *PUCHI* 遺伝子の機能の解析

III-4-1. 側根数の観察

発芽後 9 日目の *puchi-1* 変異体の芽生えにおいては、主根の長さは野生株とほとんど差がない(図 III-4-1A)。しかし、伸長している側根数は野生株と比べて少なく、また個々の側根は短く見えた。これは *puchi-1* 変異体で側根の生育に異常が起こっていることを示唆する。そこでまず野生株と *puchi-1* 変異体で側根原基も含めた全側根数を数えた。その際、発生初期の側根も識別できるよう、側根マーカーを利用した。*SCARECROW (SCR)* 遺伝子は、側根形成の発生段階で発現していることが報告されている(Maramy and Benfy, 1997)。この *SCR* の 5' 上流域を用いて GFP を発現させる *Pro_{SCR}:GFP* を交配によって *puchi-1* 変異体に導入した。すると、発芽後 10 日目の *puchi-1* 変異体では、予想に反して野生株よりも原基も含めて側根数が 1.5 倍にも増加していた(野生株, 31 個 SE±0.7, n = 25; *puchi-1* 変異体, 47 個, SE±1.7, n = 37) (図 III-4-1B)。そして、野生株では隣り合って生じる側根はあまり観察されないが、*puchi-1* 変異体ではしばしば観察できた(図 III-4-1C)。

III-4-2. オーキシシンによる側根形成の誘導

オーキシシンによって側根形成が誘導されることはよく知られている。野生株と *puchi-1* 変異体での側根形成の様子を観察するため、種子をオーキシシン極性輸送阻害剤 (1-N-naphthylphthalamic acid; NPA) を 5 μ M 含んだ培地で発芽させ 5 日間育てた後、人工オーキシシン (naphthaleneacetic acid; NAA) を 1 μ M 含んだ固形培地上に芽生えを移した。NPA 培地では側根原基の形成はまったく行われていなかったが(図 III-4-2F,G)、オーキシシン培地に移してから 24 時間で野生株の主根の一部の内鞘細胞が並層分裂を行った(図 III-4-2A,C)。これに対し、*puchi-1* 変異体をオーキシシン培地に移した後、24 時間でほとんど全ての内鞘細胞が並層分裂を行った(図 III-4-2B,D)。この現象をより詳しく調べるために、細胞周期の M 期マーカー *Pro_{CycB1;1}:CycB1;1(NT)-GUS* を導入した野生株と *puchi-1* 変異体で同様の実験を行った。この結果、*puchi-1* 変異体の内鞘細胞では野生株よりも盛んに細胞分裂が起こっていることが確かめられた(図 III-4-2H,I)。さらにオーキシシンを含む固形培地上で、植物体をそのまま長時間生育させておくと、*puchi-1* 変異体の並層分裂した内鞘細胞からは多数の側根が形成される様子が観察された(図 III-4-2E)。

これらの結果から、*PUCHI* は野生株においてオーキシシンシグナルによって内鞘細胞の分裂が誘導されるのを抑制する働きを持つことが示唆され、野生株の正常な生育過程において、*PUCHI* は側根形成を負に制御している可能性が示唆される。

III-4-3. *puchi* 変異体の側根の詳細な表現型解析

puchi-1 変異体に生じる側根は野生株より多い。では、なぜ一見して *puchi-1* 変異体の芽生えでは野生株よりも身長している側根が少なく、また短く見えるのか。*puchi-1* 変異体で生じる個々の側根について観察を行った。

puchi-1 変異体の側根は、野生株の側根に比べ側根の基部が明らかに膨らんでいた。そして多くの側根が基部で折れ曲がっていた。このことから、*puchi-1* 変異体では側根発生の初期過程に異常がある可能性が考えられた。そこで、まず野生株と *puchi-1* 変異体の側根の基部を横断切片により観察した。野生株の側根では中心柱の周りに同心円状に主根と同様に一層ずつの組織層が見られた(図 III-4-3A)。一方 *puchi-1* 変異体の膨らんだ側根基部を調べたところ、野生型と比べ中心柱の外周の細胞数が増加しており、特に主根の基部-先端軸の方向に多くの細胞が存在していた。そしてこれらの増加した細胞集団は野生株のような明確な層構造を示さなかった(図 III-4-3B)。このことは、*puchi-1* 変異体において細胞数の増加によって側根基部が膨らんだことを示している。そして、増加した細胞群は同心円状の層構造を示さないため、*puchi-1* 変異体の側根は基部から屈折して伸長していることが考えられる。

次に *puchi-1* 変異体の側根の発生過程について詳細な観察を行った。野生株の側根原基の形成は、主根の中心柱に含まれる内鞘細胞の一部が、主根の基部-先端軸に対し垂直に分裂(垂層分裂)し、周囲よりも短い内鞘細胞列が現れることで始まる(stage I; Malamy and Benfey 1997, Dubrovsky et al 2001)。続いて分裂した内鞘細胞のいくつかは主基部-先端軸に対し並行に分裂(並層分裂)し二層になる(stage II)。さらに細胞伸長と並層分裂がおこり原基は三層(stage III)、四層と成長する(stage IV)。この間、各細胞層の細胞数は、垂層分裂によって増加し続ける。この stage IV 以降も細胞分裂と細胞伸長は繰り返され側根原基はドーム型へと成長する(図 I-2-2.)。

野生株と *puchi-1* 変異体の側根原基の発生の様子を観察すると、最初の並層分裂が起こるまでそれぞれの分裂パターンや最外層の細胞数に違いは見られなかった(図 III-4-4A,D、図 III-4-5A)。その後、側根原基が stage III まで成長すると、*puchi-1* 変異体の側根原基では野生株よりも最外層の細胞数が垂層分裂によって増加していた(図 III-4-4B,E)。そして、これを確かめるために野生株と *puchi-1* 変異体の側根原基の最外層の細胞数を定量的に比較した。2層以上に成長した細胞層領域 (more than one cell layers(MOL)、図に青線で記す)を設定し、stage III および stage IV の初期と思われる側根原基において、MOLでの最外層の細胞数をそれぞれ数えた。その結果、*puchi-1* 変異体では野生株と比べ、統計的に有意に細胞数が増加していた。(図 III-4-5B, early stage III、野生株; 6.5 ± 0.2 SE, $n = 13$ 、*puchi-1* 変異体; 8.6 ± 0.5 SE, $n = 13$) (図

III-4-5B, early stage IV、野生株; 7.9 ± 0.4 , $n = 13$ 、*puchi-1*変異体; 10.3 ± 0.4 , $n = 13$)。したがって、側根原基の発生初期において、*puchi-1*変異体の側根原基では各細胞層で起こる垂層分裂の頻度が野生株の側根原基よりも多くなっていると示唆される。

側根原基の成長が進むにつれて、*puchi-1*変異体の側根原基は野生型よりも平らな形を示すので(図 III-4-4C,F)、次にMOLの幅を測定した。その結果、三層および四層の側根原基では、野生株と*puchi-1*変異体において大きな違いは見られなかった(図 III-4-5C, early stage III、野生株; $104.1 \mu\text{m} \pm 4.4 \text{ SE}$, $n=13$ 、*puchi-1*変異体; $102.0 \mu\text{m} \pm 6.4 \text{ SE}$, $n=13$) (図 III-4-5C, early stage IV、野生株; $103.1 \mu\text{m} \pm 6.6 \text{ SE}$, $n=16$ 、*puchi-1*変異体; $112.8 \mu\text{m} \pm 5.1 \text{ SE}$, $n=16$)。しかし、四層よりも成長が進み、まだ主根から外へ出現していない原基についてMOLの幅を測定すると、*puchi-1*変異体の側根原基は野生株の側根原基よりも15%程度広がっていた。(図 III-4-5D、野生株; $129.2 \mu\text{m} \pm 5.3 \text{ SE}$, $n=26$ 、*puchi-1*変異体; $149.0 \mu\text{m} \pm 4.4 \text{ SE}$, $n=28$)。さらに、二層以上の細胞層の領域(more than two cell layers(MTL)、図に緑線で記す)の幅も、*puchi-1*変異体の側根原基で野生株の側根原基より31%程度広がっていた(図 III-4-5D、野生株; $76.9 \mu\text{m} \pm 2.8 \text{ SE}$, $n=26$ 、*puchi-1*変異体; $100.3 \mu\text{m} \pm 4.1 \text{ SE}$, $n=28$)。これらの結果、*puchi-1*変異体の側根原基が平らであることは、原基の幅が野生型よりも広がったためと考えられる。

*puchi-1*変異体で側根原基の幅が広がることから、*puchi-1*変異体の側根原基では、原基周辺部での細胞分裂が野生株の側根原基よりも盛んに起こっていることが考えられる。これを確認するため、細胞周期のG2-M期のカーカーである*ProCycB1;1::CycB1;1(NT)-GUS*の発現を、野生株と*puchi-1*変異体の側根原基で観察した(Colón-Carmona et al., 1999)。その結果、側根原基全体のなかでGUSの発現頻度は、一見野生株と*puchi-1*変異体の間に大きな違いは見られなかった。したがって、*puchi-1*変異は側根原基全体における細胞周期のG2/M期の頻度や期間には大きな影響を与えないことが考えられる(図 III-4-6A,B)。ところが、MOLの外側、側根原基の周辺部でのGUSの発現頻度を観察したところ、*puchi-1*変異体では野生株よりも高頻度でGUSの発現が観察された(図 III-4-6B,C、表 III-4-1 $P < 0.01$, Fisher's exact test)。この結果は、PUCHIが少なくとも側根原基において細胞が増殖する領域を制限するために働いていることを示唆している。

主根から出現した直後の若い側根を観察すると、*puchi-1*変異体では野生株で見られない大きく成長した細胞で構成される余分な組織が基部周辺で観察された(図 III-4-7A,B矢印)。この側根基部における余分な組織は、*puchi-1*変異体の側根原基が成長し野生株よりも広がった領域と一致する。

III-4-4. *puchi* 変異体の側根における細胞分化パターン形成

したがって、*puchi-1*変異体の側根の基部は、野生株の側根原基より多数の細胞から構成されている。そこで若い側根基部の細胞分化パターンを調べた(図 III-4-7C-F)。野生株の根において、*Pro_{SHR}:GUS*は中心柱で発現し(Helariutta et al., 2000)、*Pro_{SCR}:GFP*は内皮細胞で発現する(Di Laurenzio et al., 1996)。*puchi-1*変異体の若い側根では、*Pro_{SHR}:GUS*の発現は、側根の基部で野生株よりも広がって観察された(図 III-4-7C,D)。同様に、*Pro_{SCR}:GFP*の発現も*puchi-1*変異体では野生株よりも基部側で広がって観察された(図 III-4-7E,F)。加えて、野生株の側根基部で、*Pro_{SCR}:GFP*は内皮細胞層のみで発現が観察されるにもかかわらず(図 III-4-7E)、*puchi-1*変異体の若い側根の基部では、*Pro_{SCR}:GFP*の発現が一部の側根表皮にも広がっていた(図 III-4-7F、矢頭)。しかしながら、野生株でも*puchi-1*変異体でも*Pro_{SHR}:GUS*が側根の中心付近で発現し、その外側に*Pro_{SCR}:GFP*の発現が見られる、という空間的模式は同じであった。

次に若い側根の根端における細胞、分化パターンを観察した。野生株では、主根から出てきたばかりの若い側根では、先端のコルメラ細胞層や、コルメラ細胞と中心柱との間に見られる静止中心 (quiescent center; QC) 細胞が明瞭に区別できる(図 III-4-8A,B)。ところが*puchi-1*変異体ではコルメラ細胞層の分布パターンが乱れ、細胞分布だけからQC細胞を特定することが困難であった(図 III-4-8C,D)。*Pro_{SCR}:GFP*は、野生株の主根の根端ではQC細胞と一層の内皮細胞で発現する。そのため*Pro_{SCR}:GFP*が発現する細胞はU字型に分布する。そして野生株の側根原基でも*Pro_{SCR}:GFP*はQC細胞と内皮細胞層で発現し、主根の先端同様U字型のシグナルが観察できる(図 III-4-8E)。一方*puchi-1*変異体の側根原基では、*Pro_{SCR}:GFP*の発現がしばしばQC細胞付近と思われる根端の二層で広がって観察された(図 III-4-8F)。これらの結果から、*puchi-1*変異は若い側根でのQC細胞付近の分化のパターンにも影響を与えていると考えられる。興味深いことに、*puchi-1*変異体の成長した側根の根端では、細胞パターンは野生株とあまり変わらない(図 III-4-8G,H)。したがって、若い時期の側根において、*PUCHI*は細胞パターンの形成や細胞の分化に必要であることが考えられる。

III-4-5. 根形成過程での *PUCHI* 遺伝子の発現

PUCHI 遺伝子は側根の発生初期に重要であることが、これまでの*puchi-1*変異体の解析から強く示唆される。そこで、*PUCHI*の根での発現パターンを調べた。まず野生株の根で*PUCHI*特異的プローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったが、*PUCHI*のmRNAを検出できなかった。これは、根における*PUCHI*の存在量が非常に微量であることが原因と考えられる。そこで、相補性試験に用いた6.7 kbゲノム断片に含まれる*PUCHI*のORFの5'末端の上流にGFP遺伝子を挿入し(*genomic*

GFP-PUCHI)、この DNA 断片を *puchi-1* 変異体に導入した。得られたすべての T1 植物体で、側根基部の膨らみが回復していた。また T1 植物の約半数(10/21)で、花柄の基部の突起状構造物も形成されなかった。これは導入した *GFP-PUCHI* 融合タンパク質が植物体内で機能的であることを示している。以降の観察には、*genomic GFP-PUCHI* を導入した T2 植物のうち、野生型と *puchi-1* 変異体の側根の表現型が約 3:1 の比率で現れる系統において、野生型を示す根を用いた。これらの系統では、*puchi-1* 変異体のゲノムに *genomic GFP-PUCHI* が一箇所挿入されていると考えられる。GFP が発現している細胞は、若い側根や stage VI の側根原基の基部で観察された(図 III-4-9A,B)。より主根の先端側を低倍率で観察すると、内鞘細胞層において GFP の蛍光クラスターが点在して観察された(図 III-4-9C)。GFP 蛍光クラスターは数個の細胞で構成され、個々の細胞は周囲の細胞より短かった。これは GFP 蛍光クラスターの部分が、側根原基が形成されるごく初期の領域である可能性を強く示唆する。この GFP 蛍光クラスターを高倍率で観察すると、stage II から stage IV の側根原基が見られた(図 III-4-9D,E)。これら発生初期の側根原基では含まれる全ての細胞で GFP の蛍光が観察された。なお、内鞘細胞層の一部では数個の一層に並んだ GFP 蛍光を見せる内鞘細胞のクラスターも観察できた(図 III-4-9F)。これらの内鞘細胞も他の内鞘細胞より短いため、非常に若い側根原基 stage I である可能性が高い。さらに、周囲の内鞘細胞と大きさの変わらない二つか三つの内鞘細胞でも GFP 蛍光を観察できた(図 III-4-9G-I)。stage I もしくは、大きな内鞘細胞で GFP 蛍光が観察されたときには、しばしば一層外側に隣接する内皮細胞でも GFP 蛍光が観察できた。しかし、stage II よりも成長が進んだ側根原基では、一層外側に隣接する内皮細胞での GFP 蛍光は見られなかった。*GFP-PUCHI* は細胞内では核で強く、細胞質でも弱く発現が観察された。

さらにレポーター遺伝子である GUS を用いて *PUCHI* プロモーターの活性を検出した。相補性試験で用いたゲノム断片 6.7 Kb のうち、*PUCHI* の 5' 上流域約 3.9 Kb 制御下で GUS 遺伝子を発現させる DNA 断片 (*ProPUCHI3.9:GUS*) を構築し、野生株に導入した。*ProPUCHI3.9:GUS* 系統の側根での GUS の発現パターンは、基本的に *GFP-PUCHI*-系統と同様であった(図 III-4-10A-C)。

III-4-6. *puchi* 変異体の側根におけるオーキシン勾配

側根原基でのオーキシンの局所的な蓄積は、側根が正常に発達するために必要不可欠である (Benkova et al., 2003)。*PUCHI* は側根原基でのオーキシン勾配に影響を与えるのだろうか？ そこで側根原基において、オーキシン応答配列 (AuxRE) からなる DR5 プロモーター制御下で転写された GUS の発現 (*ProDR5:GUS*) を野生株と *puchi-1* 変異体とで比較した(図 III-4-11)。

AuxRE は、外生オーキシンの早期に応答し転写量を変化させる遺伝子群の転写調節領域として単離され、この AuxRE にはオーキシン応答転写調節因子 (ARFs) が AuxRE に結合して転写調節を行うことが知られている (Ulmasov et al., 1999)。野生株の stage I から stage IV の側根原基では、*ProDR5::GUS* は原基中央部で強い発現を示す (Benkova et al., 2003) (図 III-4-11A-C)。そこで、*puchi-1* 変異体での *ProDR5::GUS* の発現を観察したところ、野生株と同様に側根原基の中央で強い発現が観察された (図 III-4-11D-F)。したがって、*puchi-1* 変異体の表現型が現れる発生段階の側根原基では、*puchi* 変異はオーキシンの蓄積に影響を与えないことが考えられる。

さらに stage IV よりも成長が進んだ側根原基では、野生株において *ProDR5::GUS* の発現は側根の根端をピークとする勾配を示す (図 III-4-12A,C)。ところが、*puchi-1* 変異体での *ProDR5::GUS* は、根端付近の非常に狭い領域で、先端よりも少し内側で強く発現していた (図 III-4-12B,D)。側根原基でのオーキシンの蓄積には、オーキシンの細胞外への流出を担う PIN タンパク質の働きが重要である (Benkova et al., 2003)。そこで、stage IV よりも発生の進んだ側根原基において、根の先端から基部側へのオーキシンの流れに重要な PIN2 の発現パターンを、PIN2-GFP 融合タンパク質の発現によって観察した。野生株では PIN2-GFP の発現は最外層の細胞で観察された (図 III-4-12E,G)。これに対し、*puchi-1* 変異体では、PIN2-GFP を発現している細胞が、しばしば最外層より内側の細胞でも観察された (図 III-4-12F,H)。野生株と *puchi-1* 変異体のいずれの側根原基でも、PIN2-GFP は細胞の中で主に基部側に配向して発現していた (図 III-4-12E-H)。これらの結果から、*puchi-1* 変異は stage IV よりも発生の進んだ側根原基において、PIN2 が発現する細胞層の数に影響を及ぼしたが、PIN2 の細胞内局在には影響を与えなかったことが考えられる。この *puchi-1* 変異体における PIN2 の発現の変化は、オーキシンの蓄積を反映する *ProDR5::GUS* の発現の変化の原因となっているかもしれない。さらにこの *puchi-1* 変異体での PIN2 の発現領域やオーキシン蓄積パターンの異常は、若い側根での QC 付近の細胞パターンの構築に関与している可能性がある。

III-4-7. 根での *PUCHI* 遺伝子の発現にオーキシンが与える影響

オーキシンが側根の形成や発生過程に重要であることはよく知られている。そして、*puchi-1* 変異体の根の内鞘細胞の分裂は外生オーキシンにより強く誘導される。このことは *PUCHI* の発現がオーキシンスIGNALに關与することを示している。そこで、まず *PUCHI* の発現がオーキシンの影響を受けるかどうかを調べた。発芽後 7 日目の野生株に 1 μ M NAA を処理し、RT-PCR により *PUCHI* mRNA を検出した。その結果、オーキシン処理後

90 分後で *PUCHI* mRNA の発現量が上昇し、150 分後でも上昇したままだった(図 III-4-13A)。またオーキシン処理後 90 分後での *PUCHI* mRNA の発現上昇は、定量的 RT-PCR によっても検出された(図 III-4-13B)。これは、*PUCHI* の転写がオーキシンによって活性化することを示唆する。

PUCHI の 5' 上流領域約 1 kb 以内にオーキシン応答配列(AuxRE; TGTCxC)が三つ存在する(二つは転写方向に対する逆転配列;GxGACA) (図 III-2-1A)。さらに、3' 下流領域約 1 kb 以内にも AuxRE が一つ存在する。これらの AuxRE が *PUCHI* の発現にかかわる可能性がある。この可能性を検証するために、まず *PUCHI* の 5' 上流域の三つの AuxRE を含む 2.5 kb プロモーター領域制と GUS 遺伝子を結合し、野生株に導入した (*PropUCHI2.5::GUS*、図 III-4-14A)。得られた 8 系統すべての T1 植物において、GUS は stage VI の側根原基の基部でリング状に発現していた(図 III-4-14C)。この発現様式は、*genomic GFP-PUCHI* 系統の GFP の発現や *PropUCHI3.9::GUS* 系統での GUS の発現と比べ、基本的に似ている(図 III-4-10D-F)。もっとも、これらの形質転換体の GUS は、側根原基の基部中央部での発現が失われており、また主根先端付近でも弱く発現が見られることがあった。次に、*PropUCHI2.5::GUS* の AuxRE にそれぞれ点変異(TGTCxC を TATCxC へ)を施した *PropUCHI2.5m3::GUS* を構築し、野生株に導入した(図 III-4-14B)。薬剤耐性により得られた T1 植物では、10 系統のうち 7 系統での GUS の発現が見られなかった(図 III-4-14D)。次に 3 系統のうち 1 系統では側根原基の基部に弱い斑状の発現が見られた(図 III-4-13E)。この系統は T2 世代で薬剤耐性による分離比から、ゲノム中に一箇所 *PropUCHI2.5m3::GUS* が挿入されていることがわかった。残りの 2 系統では、*PropUCHI2.5::GUS* と同様に側根原基の基部で発現が見られた(図 III-4-13F)。この 2 系統はそれぞれゲノム中に複数箇所 *PropUCHI2.5m3::GUS* が挿入されていることがわかった。これらの結果は、*PUCHI* の 5' 上流域の少なくとも一つ以上 AuxRE が *PUCHI* の側根基部での発現に重要であることを示唆している。

次に、オーキシンでの *PUCHI* の転写誘導における *PUCHI* の 5' 上流域の AuxRE の働きを調べるため、*PropUCHI2.5::GUS* 系統と *PropUCHI2.5m3::GUS* 系統の発芽後 7 日目の T2 植物を 5 μ M の NAA で処理した。すると、*PropUCHI2.5::GUS* 系統では側根の基部だけでなく、主根の根端分裂組織でつくられた細胞が伸長する伸長領域でも GUS の強い発現が見られた(図 III-4-15E,F)。なお、側根基部の GUS の発現は NAA 処理によって明瞭な変化が見られなかった(図 III-4-15A,B)。一方、*PropUCHI2.5m3::GUS* 系統の T2 植物に同様のオーキシン処理を行っても、主根の伸長領域および側根原基基部で GUS の発現上昇は見られなかった(図 III-4-15C,D,G,H)。これらの結果は、主根伸長領域で *PUCHI* の 5' 上流域の少なくとも一つ以上の AuxRE

がオーキシンに応答し *PUCHI* の発現上昇に関与することを示唆している。

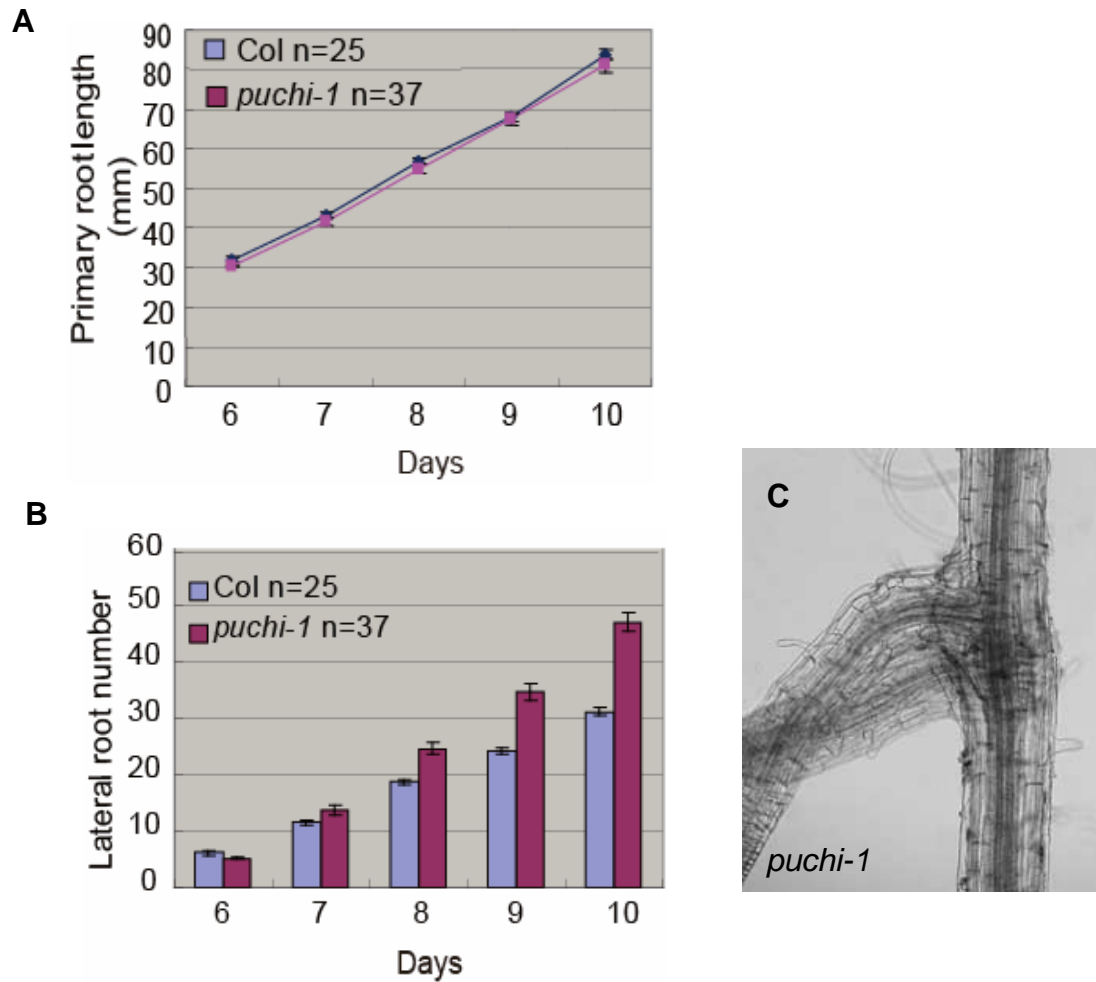


図 III-4-1. 野生株と*puchi-1*変異体での主根長と側根数の比較
 (A) 野生株の側根基部の主根長。
 青色のグラフは野生株、赤色のグラフは*puchi-1*変異体。
 (B) 野生株と*puchi-1*変異体の側根数。
 青色のグラフは野生株、赤色のグラフは*puchi-1*変異体。
 (C) *puchi-1*変異体でしばしば観察される、隣り合って生じる側根。

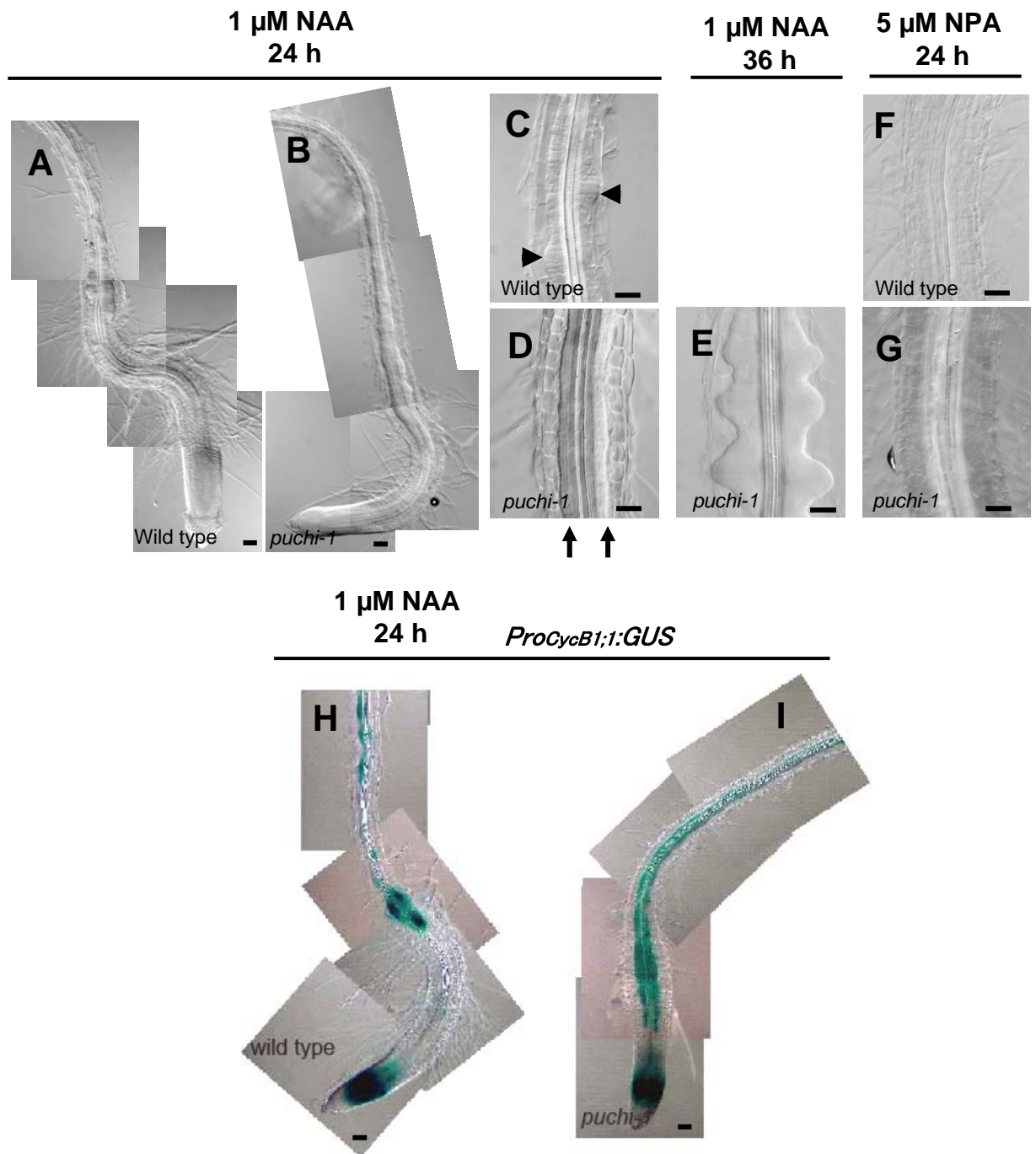


図 III-4-2. オーキシンによる側根形成の誘導

5 μM NPA培地で発芽させ、5日間育てた野生株と*puchi-1*変異体を1 μM NAA培地で生育させた。(A-D) NAA培地で24時間生育させた野生株(A, C)と、*puchi-1*変異体(B, C)。(C)と(D)はそれぞれ(A)と(B)の根の拡大写真。矢尻; 野生株で形成が誘導された側根原基。矢印; *puchi-1*変異体の全体で分裂した内鞘細胞層。*puchi-1*変異体の内鞘細胞では全体で並層分裂が起こる。(E) NAA培地で36時間生育させた*puchi-1*変異体。*puchi-1*変異体の全体で分裂した内鞘細胞からも側根は形成される。(F, G) コントロールとして、NAA培地へ移さなかった野生株(E)と*puchi-1*変異体(F)。(H, I) NAA培地で24時間生育させた野生株(I)と、*puchi-1*変異体(J)での*ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS*の発現。Bars = 50 μm.

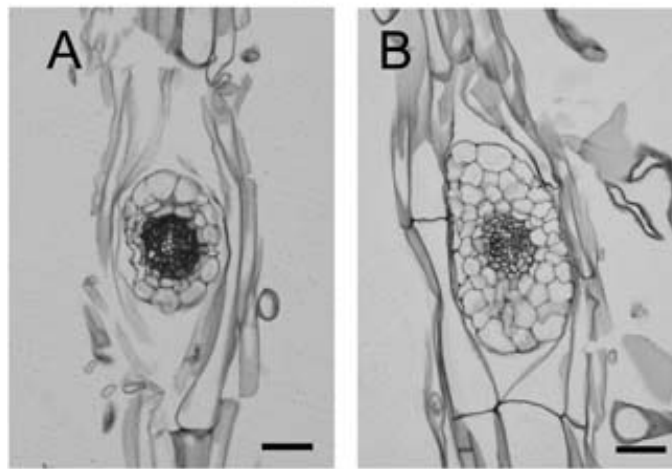


図 III-4-3. 野生株と*puchi-1*変異体での若い側根の横断面
(A, B) 野生株の5mmより短い側根の基部の横断面(A) *puchi-1*変異体の5mmより短い側根の基部の横断面(B)。
Bars = 50 μ m.

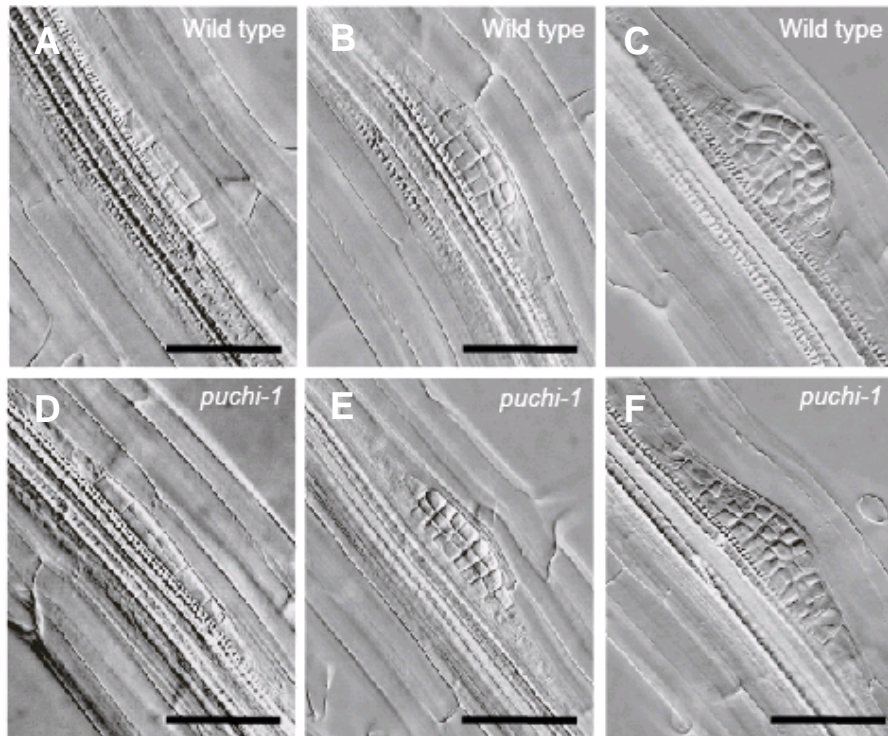


図 III-4-4. 野生株と*puchi-1*変異体の側根原基の発生
 (A-C) 野生株の側根原基の微分干渉顕微鏡像。
 (D-F) *puchi-1*変異体の側根原基の微分干渉顕微鏡像。
 stages II初期の側根原基 (A, D)、stage IIIの側根原基(B, E)、
 stage IVより発生の進んだ側根原基(C, F)。
 Bars = 50 μ m.

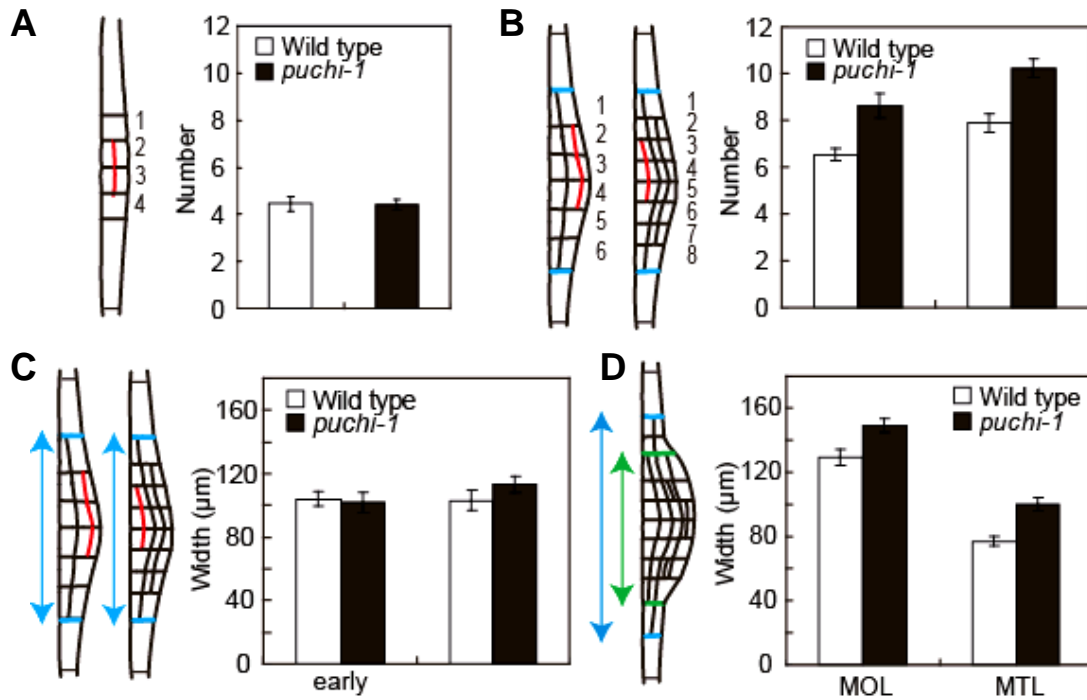


図 III-4-5. 野生株と*puchi-1*変異体の側根原基における細胞数と幅の比較

(A) 野生株と*puchi-1*変異体におけるstage II初期の側根原基の最外層の細胞数の比較。主根の内鞘細胞が垂層分裂した後、次の並層分裂が1-2細胞でしか起こっていない(図の赤い線)側根原基では、野生株でも*puchi-1*変異体でも最外層の細胞数は変わらなかった。

(B) 野生株と*puchi-1*変異体におけるstage III 初期およびstage IV初期の側根原基のMOLでの最外の細胞数の比較。三層目の並層分裂が1-3細胞でしか起こっていない(図左の赤い線)側根原基と、四層目の並層分裂が1-3細胞でしか起こっていない(図右の赤い線)側根原基において、MOLでの最外層の細胞数の比較。図の青いラインはMOLの両端を示す。

(C) 野生株と*puchi-1*変異体におけるstage III 初期およびstage IV初期の側根原基のMOLの幅。図の青いラインはMOLの両端を示し、青矢印はMOLの幅を示す。

(D) 野生株と*puchi-1*変異体におけるstage IVよりも成長した側根原基のMOLの幅。図の青と緑の線はMOLとMTLの両端をそれぞれ示し、青と緑の矢印はMOLとMTLの幅をそれぞれ示す。

Bars = 50 μm.

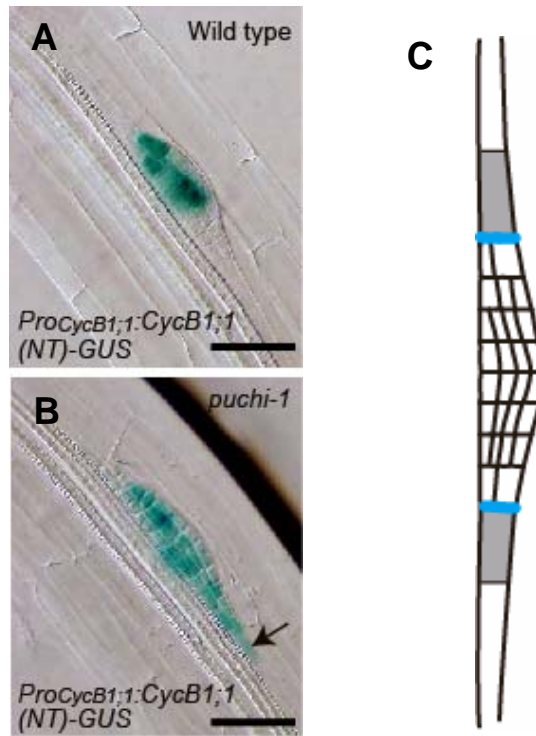


図 III-4-6. 野生株と*puchi-1*変異体の側根原基における*ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS*の発現
 (A, B) 野生株(A)と*puchi-1*変異体(B)におけるstage IV の側根原基での*ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS*の発現。
*puchi-1*変異体の側根原基ではGUSのシグナルがMOLよりも外で観察される。
 (C) MOLの外の細胞を灰色で示す。
 Bars = 50 μ m.

表 III-4-1. $Pro_{CycB1;1}::CycB1;1(NT)-GUS$ がMOLの外側に隣接する細胞で
発現しているstageIVの側根原基

	GUS がMOLの外側に隣接する細胞で 発現している stage IVの側根原基数	観察に用いたstageIV の側根原基の数
野生株	0	24
<i>puchi-1</i>	8	25

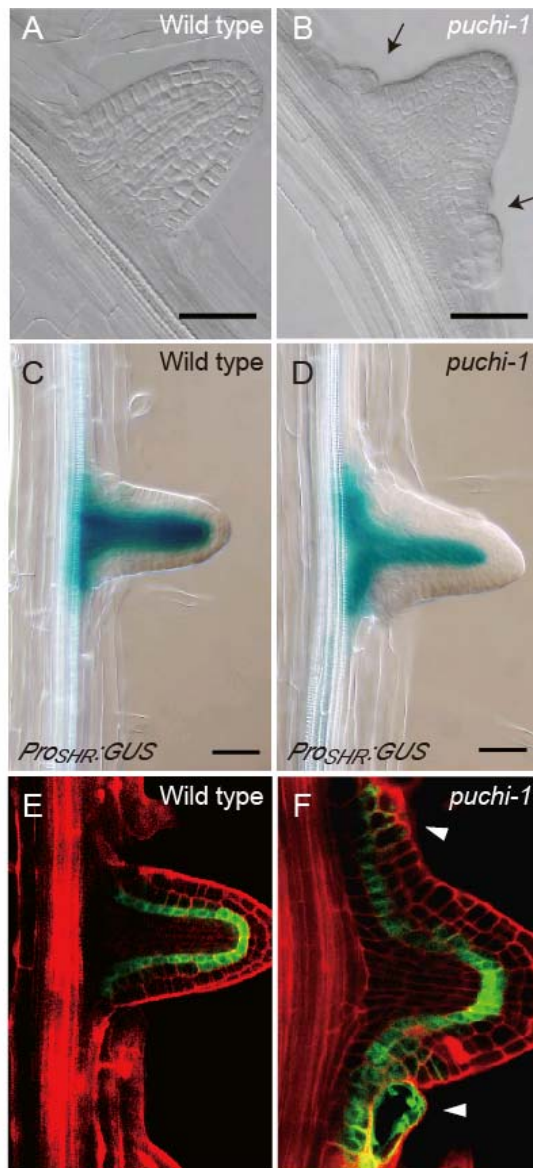


図 III-4-7. 野生株と*puchi-1*変異体の若い側根の形態と分化パターン

(A, B) 主根から出現したばかりの野生株(A) と*puchi-1*変異体(B) の若い側根の微分干渉顕微鏡像。

puchi-1 変異体の側根は、野生株の側根では見られない余分な細胞群を基部に持つ(矢印)。

(C, D) 野生株(C) と*puchi-1*変異体(D) の若い側根における*ProSHR:GUS* の発現パターン。

(E, F) 野生株(E) と*puchi-1*変異体(F) の若い側根における*ProSCR:GFP* の発現パターン。

矢頭は*puchi-1*変異体の側根の表層に現れた*ProSCR:GFP* の発現を示す。

Bars = 50 μ m.

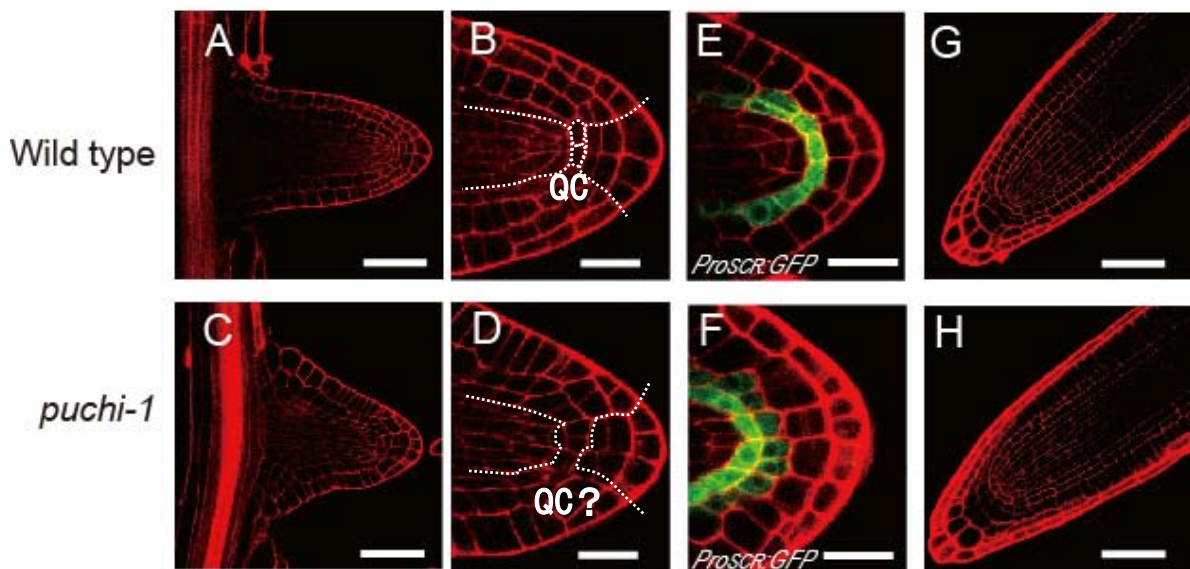


図 III-4-8.野生株と*puchi-1*変異体の側根における静止中心細胞付近の細胞パターン
 (A-D) 野生株(A)と*puchi-1*変異体(C)の若い側根における細胞パターン
 (B, D) はそれぞれ(A)と(C)における側根QC細胞付近の拡大図。
 (E, F) 野生株(E)と*puchi-1*変異体(F)の若い側根のQC細胞付近における
ProSCR:GFP の発現。

(G, H) 野生株(G)と*puchi-1*変異体(H)の側根(5 mm 以下)のQC細胞付近における
 細胞パターン

Bars in (A, C, G)、(H) = 50 μ m

Bars in (B-F) = 20 μ m.

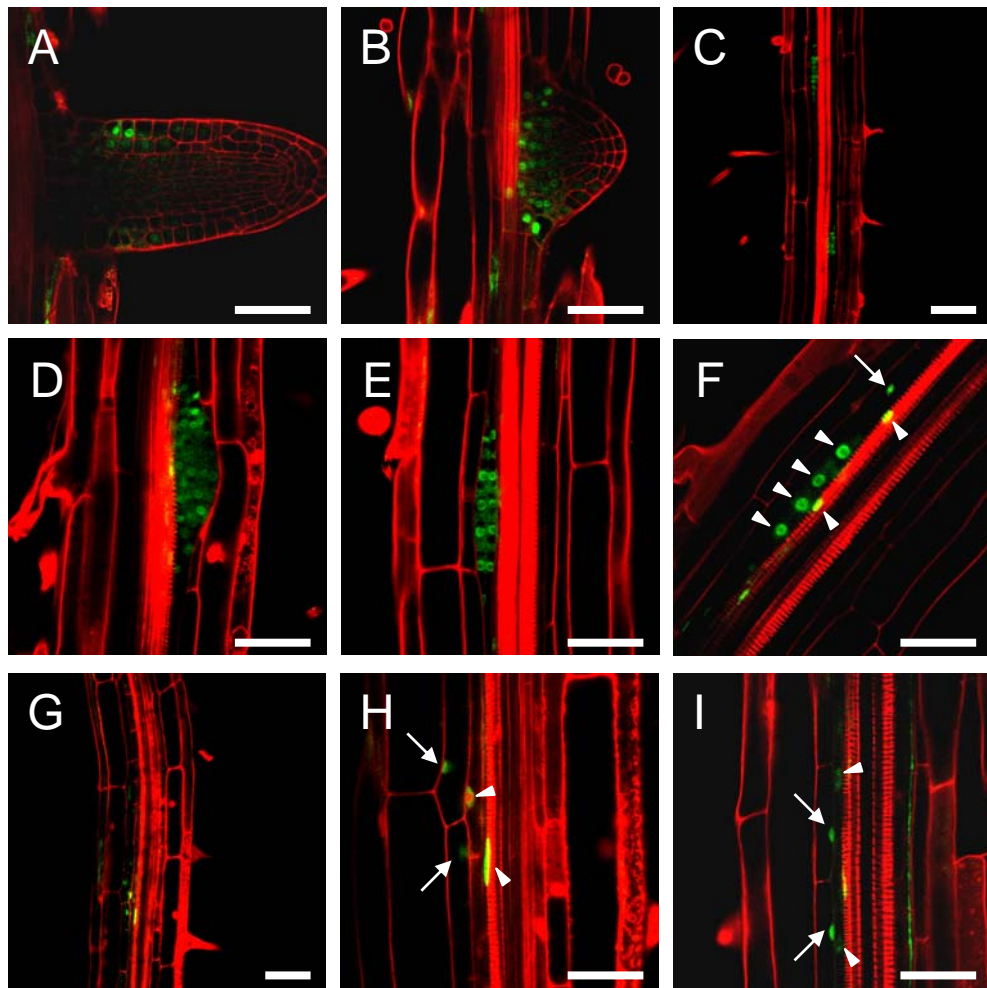


図 III-4-9. *puchi-1* 変異体に導入した*genomic GFP-PUCHI* の発現パターン

(A) 若い側根原基でのGFP-PUCHIの発現。

(B) stage VIの側根原基でのGFP-PUCHI の発現。

(C, G) 主根の中のGFP-PUCHIの発現。

(D) stage IVの側根原基でのGFP-PUCHI の発現。

(E) stage IIの側根原基でのGFP-PUCHI の発現。

(F) stage Iと思われる側根原基でのGFP-PUCHI の発現。

(H, I) 周囲の細胞と同じ大きさのGFP-PUCHI の発現。(H)は(G)の拡大写真。

(F, H, I) 矢尻は内鞘細胞でのGFP蛍光、矢印は内皮細胞でのGFP蛍光。

Bars in (A, B, D-F, H, I) = 50 μ m.

Bars in (C, G) = 100 μ m.

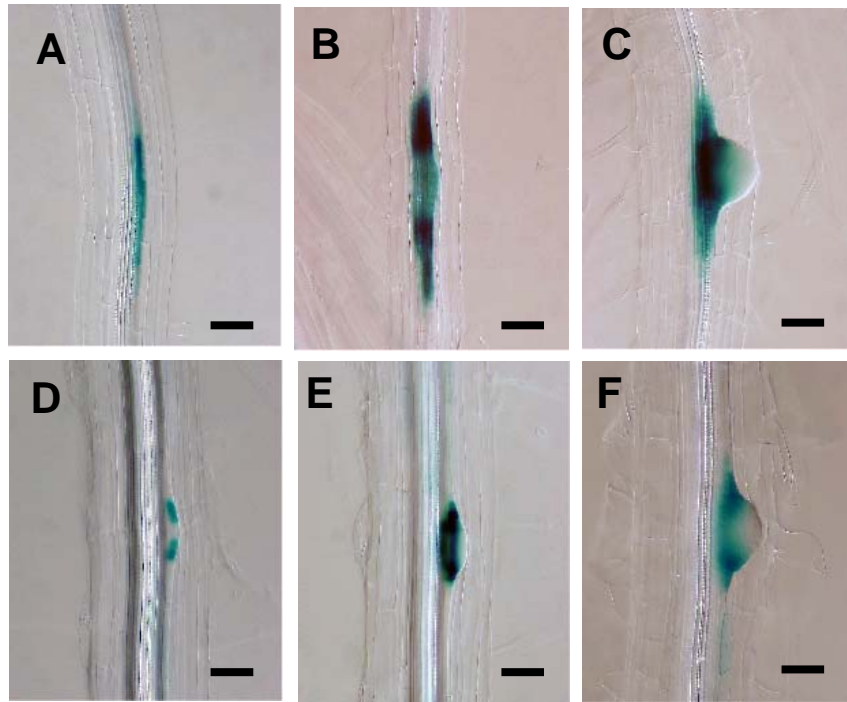


図 III-4-10. 野生型に導入した*PropUCHI3.6:GUS*と*PropUCHI2.5:GUS*の発現パターン
(A-C) *PropUCHI3.6:GUS* の発現パターン
(D-E) *PropUCHI2.5:GUS* の発現パターン
Bars = 50 μ m.

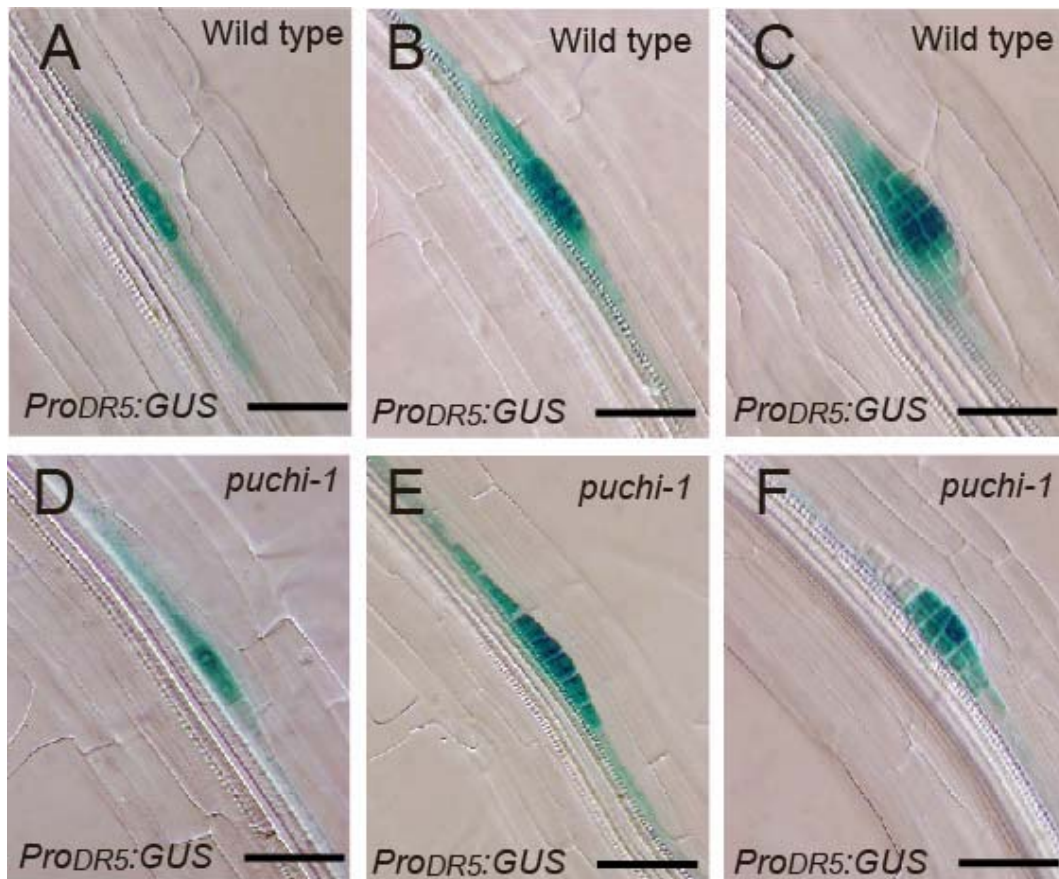


図 III-4-11.側根原基での *ProDR5:GUS* の発現パターン

(A-C) 野生株での *ProDR5:GUS* の発現パターン。

stage Iの側根(A)、stage II の側根(B)、and stage IVの側根(C)

(D-F) *puchi-1* 変異体での *ProDR5:GUS* の発現パターン。

stage Iの側根(D)、stage II の側根(E)、and stage IVの側根(F)

GUS染色時間、2時間。

Bars = 50 μ m.

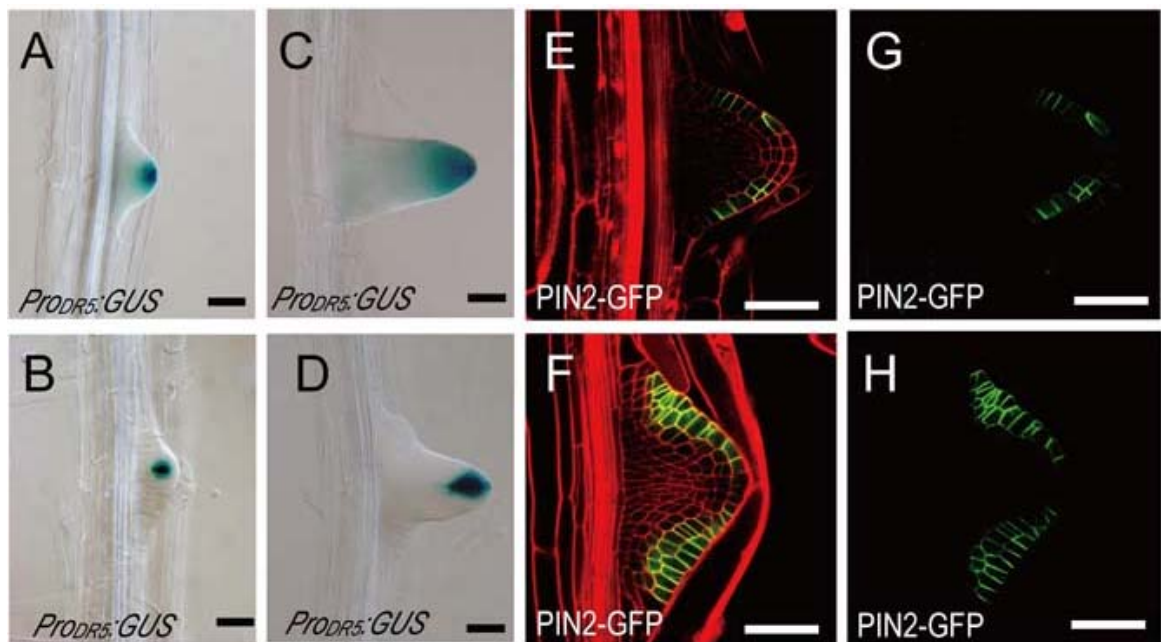


図 III-4-12. *puchi-1*変異体の側根でのオーキシン蓄積と細胞分化パターン

(A-D) 野生株での *ProDR5:GUS* の発現 (A, C) と、*puchi-1*変異体での *ProDR5:GUS* の発現(B, D)。側根原基での *ProDR5:GUS* の発現 (A, B) と、若い側根での *ProDR5:GUS* の発現(C, D)。

(E-H) 野生株の側根原基での PIN2-GFP の発現(E, G) と、*puchi-1*変異体での PIN2-GFP の発現(F, H)。

Bars= 50 μ m.

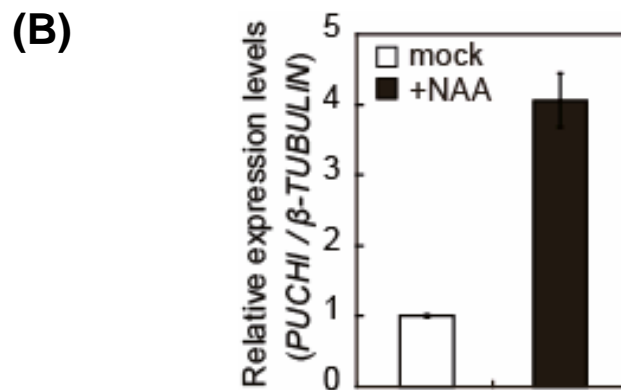
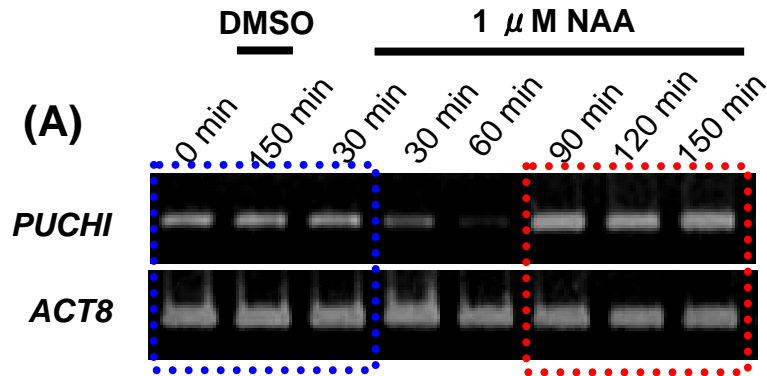


図 III-4-13.オーキシンによる*PUCHI*の発現誘導

(A) RT-PCRによる発芽後7日目の野生株での*PUCHI*の発現解析。

1 μ M NAA 処理前やDMSO処理(青枠)と比べ、NAA処理90分以降(赤枠)では、*PUCHI* mRNAの発現が誘導されている。

ACT8 の発現をコントロールとして示す。

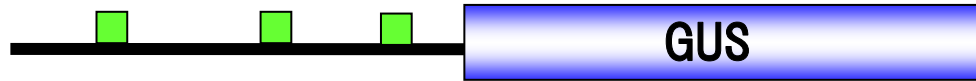
(B)リアルタイムPCRによる発芽後7日目の野生株での*PUCHI*の発現解析。

(A)と同様の実験を行い、90分間のmock処理およびNAA処理での*PUCHI* mRNAの発現量を測定した。

縦軸はmock処理での*PUCHI* mRNAの発現量を1とし、mRNAの発現量の相対値を示す。この測定法においても90分間のNAA処理によって*PUCHI* mRNAの発現量は著しく上昇することが確認された。

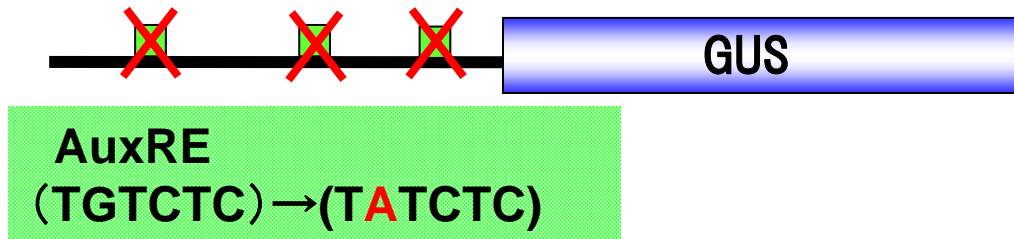
(A)

ProPUCHI2.5:GUS



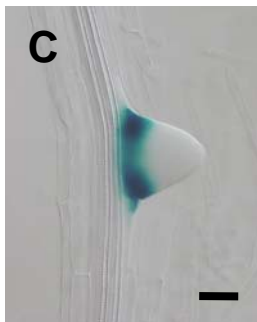
(B)

ProPUCHI2.5m3:GUS

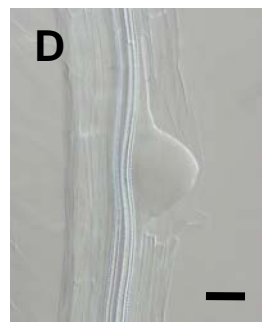


ProPUCHI2.5:GUS

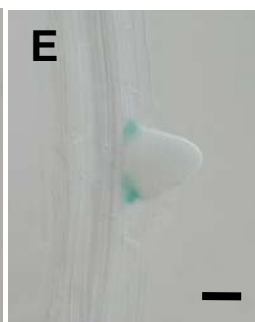
ProPUCHI2.5m3:GUS



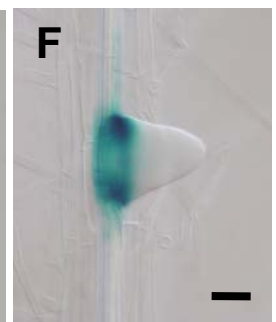
8/8



7/10



1/10



2/10

図 III-4-14. *PUCHI*の発現へのAuxREの働き

(A, B) *ProPUCHI2.5:GUS*と*ProPUCHI2.5m3:GUS*の模式図。緑色はAuxREを示す。

*ProPUCHI2.5m3:GUS*のAuxREドメインには点変異を施してある。

(C) 野生株での*ProPUCHI2.5:GUS*の発現。

8系統得られたT1植物のうちすべての系統で、若い側根の基部でGUSの発現を確認できた。

(D, E, F) 野生株での*ProPUCHI2.5m3:GUS*の発現。

10系統得られたT1植物のうち、7系統ではGUSの発現が確認されなかった(D)。

そして、1系統では弱いGUS発現が確認された(E)。残りの2系統では*ProPUCHI2.5:GUS*の発現が確認された(F)。後にこの2系統には*ProPUCHI2.5m3:GUS*が2コピー以上挿入されていることが確認された。

GUS染色はそれぞれ3時間 (C)と、72時間(D, E, E)。

Bars= 50 μ m.

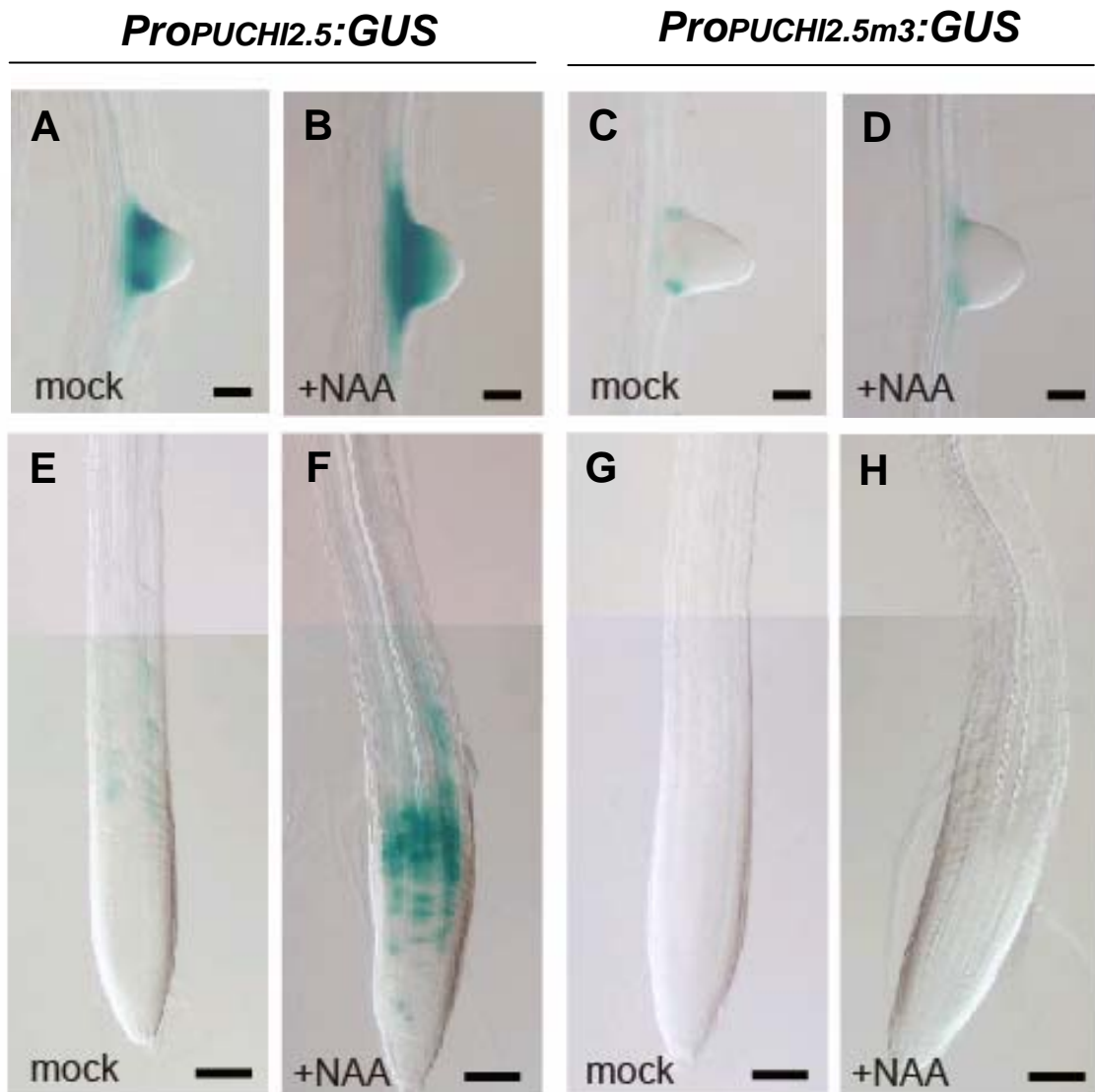


図 III-4-15.オーキシンでの*PUCHI*の転写誘導におけるAuxREの働き

ProPUCHI2.5:GUS (A, B, E, F)と、*ProPUCHI2.5m3:GUS* (C, D, G, H)の発現へのNAAの影響。コントロールとしてDMSO処理、12時間後のGUS発現(A, C, D, G)と、5 μ M NAA 処理、12時間後のGUS発現 (B, D, E, G)。若い側根(D-G)と、主根の先端部分(H-K)。主根の先端部分ではNAAにより*ProPUCHI2.5:GUS*の発現が誘導される。一方、*ProPUCHI2.5:GUS*の発現はNAAにより発現は誘導されない。

Bars in (B-G) = 50 μ m.

Bars in (H-K) = 100 μ m.

IV. 考察

シロイヌナズナ *PUCHI* 遺伝子は AP2/EREBP ファミリーに属する転写活性化因子をコードする可能性が高い。この遺伝子の劣性変異体 *puchi-1* は花柄の基部に苞葉状の構造が形成されている。そして根では側根数が増加し、各側根原基において細胞分裂パターンが乱れる。*in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、地上部で *PUCHI* mRNA は発生初期の花原基の向軸側で発現していた。また、根では GFP-*PUCHI* 融合タンパク質の発現は発生初期の側根原基におけるすべての細胞で観察され、その後側根へと成長する過程において側根の基部で継続して観察された。さらに *PUCHI* 遺伝子の転写量は外生オーキシンによって増加し、*PUCHI* 遺伝子のプロモーター活性は主根の先端において顕著に外生オーキシン処理により応答し増大した。

IV-1. *PUCHI* 遺伝子は AP2/EREBP ファミリーに属する

転写因子をコードする

PUCHI 遺伝子は AP2/EREBP ファミリーに属する転写因子様タンパク質をコードし、予測されるタンパク質 *PUCHI* の AP2 ドメインはシロイヌナズナ *LEP*、*DRN/ESR1*、*DRL/ESR2* の AP2 ドメインと高い相同性を示す。*LEP*、*DRN/ESR1*、*DRL/ESR2* は過剰発現植物の解析により、葉柄の形成や茎頂分裂組織の維持に必要な因子と考えられる (van der Graaff et al., 2000; Kirch et al., 2003)。しかしながら、これらの因子の機能欠損変異体では、野生株と異なる表現型は報告されていない (van der Graaff et al., 2000; Kirch et al., 2003; Ikeda et al., 2006)。*PUCHI* 過剰発現体の地上部は葉柄のない葉身だけの本葉を形成した (IV サプリメンタルデータ 1)。これは *LEP* の優性変異体で報告されている表現型と酷似している。この結果から、*PUCHI* と *LEP* では地上部の側生器官形成に関して何らかの機能の類似を持つ可能性が考えられる。しかし、*PUCHI* を *puchi-1* 変異体において同様に過剰に発現させても、花柄の基部の表現型が相補されなかった (データ示さず)。また、*LEP* 遺伝子は地上部では若いシュートで主に発現しており (van der Graaff et al., 2000)、*PUCHI* 遺伝子の地上部での発現と大きく異なる。これらのことから、*PUCHI* と *LEP* は野生株の地上部において協調して働いているとは考えにくい。

予測される *PUCHI* の AP2 ドメインは、トウモロコシの *BD1* やイネの *FZP* の AP2 ドメインと相同性が高い。*BD1* や *FZP* は花原基の花芽の性質に重要な因子であることが報告されている。よって *PUCHI* が *BD1* や *FZP* のオーソログとして機能することが考えられる。一方、C 末端側では *PUCHI* と *BD1* や *FZP* との間に相同な配列が見当たらない。そして、*bd1* 変異体や

fzp 変異体での根における表現型が報告されておらず、*BD1* 遺伝子は根では転写産物が検出できない(Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003)。これらのことから *PUCHI* は *BD1* や *FZP* と異なる機能を持っている可能性が高い。

過剰発現させた *PUCHI-GFP* の細胞内局在から、*PUCHI* は核で機能していることが示された。また、CREST 法(Hiramatsu et al., 2003)により、*PUCHI* と転写抑制ドメインとの融合タンパク質を野生株で過剰発現させると、*puchi-1* 変異体の地上部の表現型が再現された。これらの結果から、少なくとも花では *PUCHI* は転写活性化因子として機能することが示唆される。

IV-2. *PUCHI* 遺伝子は花発生過程で苞葉形成を抑制する

puchi 変異体では、花シュートの基部に一对の突起とその間に扁平状の構造物が形成される。一方、花器官や植物体の成長に大きな違いは見られなかった。この *puchi-1* 変異体の突起状構造物では、本葉の基部にある托葉の GFP マーカーの発現が示された。一方、*puchi-1* 変異体と托葉を欠失する *prs* 変異体との二重変異体では、*puchi-1* 変異体の突起状構造物を欠失した。これらの結果から突起状構造物が托葉の特徴を持ち、その形成には *PRS* 遺伝子を必要とすることが示唆される。そして *PRS* が器官の側部形成を担う因子であるため、*puchi-1* 変異体の一对の突起状構造物は、それぞれ独立した器官ではなく、なんらかの単一の器官の側部を構成することも示唆された(Matsumoto and Okada, 2001, Nardmann et al., 2004)。 *puchi* 変異体において、突起状構造物が托葉の性質を持つのであれば、その間の扁平な構造物は葉である可能性が高い。つまり *puchi* 変異体の発生初期の花原基で形成されていた構造物は、未熟な苞葉であったことになる。したがって、*puchi* 変異はシロイヌナズナに内在する苞葉形成能を高め、そのため *puchi* 変異体では未熟ながらも苞葉形成が観察できるようになったと考えられる。この考えは、花芽で発現する *LFY* 遺伝子は、野生株の花原基全体で発現が検出されるにもかかわらず、*puchi-1* 変異体の花原基において苞葉が現れる背軸側では発現していなかったことから支持される。一方側生器官の向背軸形成に必要な *FIL* 遺伝子は、野生株でも *puchi-1* 変異体でも発生初期の花原基では背軸側にだけ発現が見られた。このことから、*puchi* 変異が花の発生過程における背腹軸形成には影響を及ぼさないことが示唆される。

puchi-1 変異体の突起状および扁平状の構造物は、走査型電子顕微鏡観察から花器官が発生する前(stage II)の花原基ですでに形成されていたことがわかった。したがって、*PUCHI* 遺伝子は stage II までの発生初期の花原基で機能することが示唆された。

in situ ハイブリダイゼーション法では、*PUCHI* は発生初期の花原基において向軸側で発現していること、その発現は stage I から stage II の花原基

でのみ観察されることが示された。つまり、*PUCHI* は苞葉が形成される背軸側ではなく、花芽が形成される部分で一過的に発現していることがわかった。さらに、この *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出された *PUCHI* の発現は、融合タンパク質 GFP-*PUCHI* の発現パターンとも一致した（データ示さず）。

これらの結果から、少なくとも苞葉形成は花原基の stage I-II といった非常に限定された発生段階において、*PUCHI* によって制御されていることが考えられる。

自然界には花シュートを苞葉の向軸側の根元から形成する植物が多く存在する。また、近年シロイヌナズナの花原基が苞葉原基と考えられる構造を一部含むという可能性は、いくつかの変異体の遺伝学的解析から報告されていた。*Ify* 変異体に見られる葉状の花シュートの基部には苞葉が形成される (Weigel et al., 1992)。他にも花器官の形成ができなくなる、もしくは花の形態異常が見られる *FIL* の劣性変異体 *filamentous flower (fil)* や、*unusual floral organs (ufo)*、*apetala1 (ap1)* において、苞葉が形成されると報告されている (Levin and Meyerowitz, 1995; Sawa et al., 1999a; Schultz and Haughn, 1991; Weigel et al., 1992; Wilkinson and Haughn, 1995)。また、野生株でも *LFY* のプロモーター制御下で特異的にジフテリア毒素を発現すると、花が形成されなくなる代わりに苞葉が形成された。これらのことから、正常な花器官形成が抑制されると苞葉形成が促進されると考えられている。さらに、*LFY* のプロモーター制御下でジフテリア毒素を発現させた植物体の苞葉原基は、花原基が丸い形をしているのに対し、上部が平らな三角形を示す (Nilsson et al., 1998)。そして、この苞葉原基同様 *puchi-1* 変異体の stage I から stage II の花原基も上部が平らな三角形を示す。

また、側生器官の成長に重要な遺伝子 *JAGGED (JAG)* が過剰発現している *jag-5D* 変異体では、花器官形成にほとんど異常が見られないものの、花柄の基部には苞葉が形成された (Dyner et al., 2004; Ohno et al., 2004)。そして *JAG* の発現を抑制している *BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1)* および、*BOP2* に変異を持つ *bop1bop2* 二重変異体でも同様に苞葉が形成される。さらに花原基の発生過程の非常に早い時期には、苞葉原基と思われる形態が花原基で観察されている (Kwiatkowska, 2006)。これらの結果も、*PUCHI* の解析結果と同様に、シロイヌナズナの野生株の花の原基にも苞葉をつくる性質が少なからず保持されているが、苞葉の発生は抑制されているという考え方を支持する。

現在得られている結果から、野生株において *PUCHI* が花芽形成の促進に働くことで苞葉形成を抑制しているのか、それとも *PUCHI* が直接的に苞葉原基に働きかけてその発生を抑制しているのか、は明確ではない。今後その点を定性的に明らかにすることが大きな課題であり、上記の苞葉形成にかか

わるとされる遺伝子と *PUCHI* との関係を明らかにすることで、これに対する答えが得られると考えられる(図 IV-1-1)。

IV-3. *PUCHI* 遺伝子は側根形成能を調節する

puchi-1 変異体の芽生えでは、野生株と比べ、側根の数が少なく、また形成された側根は短く見えた。ところが、発芽後 10 日目の *puchi-1* 変異体の根では、野生株よりも側根の数が 1.5 倍にも増加していた。そして *puchi-1* 変異体の根では、しばしば側根が近接して形成されていた。これらのことから、*PUCHI* は側根形成において、個々の側根形成自体を抑制するか、もしくは、形成された側根の周囲の内鞘細胞から新たに側根が形成されるのを抑制する働きを持つ可能性が示唆される。

外生オーキシンによって側根形成を誘導すると、野生株では内鞘細胞層の一部が分裂をはじめ側根が形成される。これに対し、*puchi-1* 変異体では内鞘細胞層全体がいっせいに分裂を始めた。細胞周期マーカー *ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS* の発現から、オーキシン処理により *puchi-1* 変異体の内鞘細胞での細胞分裂が他の細胞層や、野生株の内鞘細胞の分裂よりも盛んに起こっていたことがわかった。なお、いっせいに分裂した *puchi-1* 変異体の内鞘細胞は、さらにオーキシン処理を続けると個々の側根を作り出した。この結果から、*puchi-1* 変異体では個々の独立した側根を作り出す機構は損なわれておらず、また将来側根にならない内鞘細胞の分裂抑制が野生株よりも弱いことが考えられる。これらの結果から、野生株において *PUCHI* は側根形成自体を抑制し側根数を制御しているというよりも、内鞘細胞の分裂を抑制することで、側根数を制御していることが示唆される。

PropUCHI2.5:GUS は外生オーキシンにより主根の先端の伸長領域で発現が上昇した。この領域では内鞘細胞の一部でオーキシンが極性輸送により蓄積されることで将来側根を形成する細胞の運命が決定されるという報告がある(Smet et al., 2007)。野生株の根の伸長領域では、極性輸送により内鞘細胞で内生オーキシンが蓄積されたとき、そこから側根を作り出す機構が存在する可能性が高い。そして *PUCHI* の転写はこの伸長領域付近で外生オーキシンによって活性化される。

融合タンパク質 GFP-*PUCHI* を発現するように改変した *PUCHI* を含む 6.7 kb のゲノム断片を *puchi-1* 変異体に導入したところ、この形質転換植物の側根は野生株と同様の形態を示し、表現型が相補された。よって GFP-*PUCHI* は本来の *PUCHI* の機能を有していると考え、この形質転換植物における GFP-*PUCHI* の発現を調べた。その結果、stage I 以降の個々の側根原基において GFP-*PUCHI* が発現していた。さらに、周囲の細胞と大きさが変わらない為に形態的に他の内鞘細胞と区別出来ないが、一部の連続した内鞘細胞でも GFP-*PUCHI* が発現していた。現在得られている結果からは

明確に示す事は出来ないが、これらの内鞘細胞群が将来側根原基に分化して行く可能性は高い。また非常に興味深いことに、それら内鞘細胞群の一層外側に隣接する内皮細胞でも GFP-PUCHI の発現が見られた。

これらの結果から、*PUCHI* は側根原基の発生が始まる以前から何らかの働きを持っており、側根周辺の異所的な内鞘細胞の分裂を抑制する機能を持つ可能性が高いと考えられる。もっとも、*PUCHI* が内鞘細胞の分裂を抑制する詳細な機構や、この機構が側根の数の制御に及ぼす影響を知るには、更なる解析が必要となるであろう。なお、外生オーキシン処理により誘導される *ProPUCHI2.5:GUS* の発現は、内鞘細胞よりも外側の内皮細胞や皮層細胞で観察された。これらの結果を基に更に解析を行えば、側根形成過程における *PUCHI* の分子機能がさらによく理解できると期待する。

IV-4. *PUCHI* 遺伝子は側根原基の発生過程で細胞分裂パターンを制御する

主根のなかでは、将来側根原基となる内鞘細胞が垂層分裂し、次に並層分裂を行うことで、主根とは垂直方向に新たな成長軸をもつ側根原基が作られる。この側根原基の発生過程が進むにつれて、分裂を起こす細胞は原基中央部で盛んに分裂するようになり、やがてドーム型の側根原基が作られる。野生株におけるこの発生過程では、原基内で細胞数が増加し、原基全体の幅も増大する。*puchi-1* 変異体の stage III、stage IV といった側根原基では、野生株よりも垂層方向への細胞数の増加が観察された。これは *puchi-1* 変異体において、この発生段階での stage の指標となる並層分裂に対し、野生株よりも高い頻度で垂層分裂が起こっていることが考えられる。そして *puchi-1* 変異体では、四層よりも発生の進んだ側根原基において原基の基部の幅が野生株より更に増大していた。これらの事実は、*PUCHI* が発生初期の側根原基の細胞分裂パターンの制御に関わる事を示唆している。さらに、*ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS* の発現解析から、*PUCHI* が側根原基基部の細胞分裂の抑制に関与する事も示された。そして、前述の GFP-PUCHI を発現させた形質転換植物では、発生初期の側根原基全体で融合タンパク質の発現が見られた。これらの結果から、*PUCHI* は側根原基周辺部ので機能する何らかの因子とともに、原基周辺部の細胞増殖を特異的に抑制することが示唆された。一方、*ProSHR:GUS* や *ProSCR:GFP* の変異株における発現解析から、その領域における細胞の分化パターンに *PUCHI* が大きな影響を与えないことも示唆された。

したがって、*PUCHI* は発生初期の側根原基の全体で細胞増殖の制御を介して形態形成に寄与していることが示唆された。

なお、*PUCHI* が細胞分裂パターンに影響を及ぼすことは、*PUCHI* 過剰発現体の表現型からも支持される。野生株の根端分裂組織では各細胞層が基部-先端軸に対し垂層分裂している。一方 *PUCHI* 過剰発現体の主根の先端付近

では、垂層分裂以外の細胞分裂も起こっていた(サプリメントデータ 2)。この事は、*PUCHI* が側根原基形成の初期における細胞分裂の制御に関与するだけでなく、*PUCHI* には一般に細胞分裂パターンの制御に関与する機能が存在し、そのために異所的に過剰に発現すると正常な分裂領域における細胞分裂パターンが乱されてしまう可能性を示唆している。さらに、*PUCHI* 過剰発現体では主根先端部分がしばしば折れ曲がったような形態を示し、折れ曲がった先が伸長した。この折れ曲がった先ではコルメラ細胞で見られるデンプン粒の蓄積や、オーキシンの蓄積と思われる *ProDR5::GFP* の発現も見られた(サプリメントデータ 3)。この *PUCHI* 過剰発現体の主根の先端が折れ曲がる表現型は非常に興味深い、この現象を理解するには更なる解析が必要である。

GFP-PUCHI の発現は、側根原基が stage IV 以上に成長すると原基の基部側のみで見られた。これは *PUCHI* の機能は側根へと成長する過程において基部を形成するために依然として必要とされていることが考えられる。

主根および側根での *QC* 細胞とその周辺の細胞分化パターンの形成は、*PIN* タンパク質によってつくられるオーキシンの蓄積パターンに大きく依存する(Friml et al., 2003; Benkova et al., 2003; Blilou et al., 2005)。側根原基においてオーキシンの蓄積パターンを示す *ProDR5::GUS* の発現は原基中央部で強く見られる。*puchi-1* 変異体において細胞分裂パターンの異常が表れている stage IV の側根原基で *ProDR5::GUS* の発現パターンは野生株との違いが見られない。したがって、野生株の初期の側根原基が stage IV に成長するまでは、オーキシンの蓄積パターンの構築に *PUCHI* は関係しないと考えられる。一方、*puchi-1* 変異体の主根から出現した直後の若い側根では、根端分裂組織において一過的に *QC* 細胞とその周辺の細胞パターンが崩れる表現型を示す。そして、野生株の根端では *QC* 細胞一層で発現する *ProSCR::GFP* の発現が、*puchi-1* 変異体の若い側根の根端では二層で見られた。したがって *puchi-1* 変異体の若い側根の根端では細胞パターンと分化パターンの両方が野生株とは異なっていることが示唆される。さらに、野生株の若い側根では *ProDR5::GUS* の発現パターンが側根の先端を極大とし基部側に向かって勾配を見せるのに対し、*puchi-1* 変異体の若い側根では *ProDR5::GUS* の発現が先端の非常に細い領域に限られるようになり、発現の極大も先端ではなく内側へシフトした。つまりオーキシン蓄積パターンも野生株と *puchi-1* 変異体の若い側根では異なることが強く示唆される。*puchi-1* 変異体における *PIN2* の発現の変化は、オーキシンの蓄積を反映する *ProDR5::GUS* の発現の変化の原因となっていることが考えられる。さらに *puchi-1* 変異体での *PIN2* の発現領域やオーキシン蓄積パターンの異常は、若い側根での *QC* 細胞付近の細胞分化パターンの構築に関与している可能性がある。これらの知見から *PUCHI* が若い側根においてオーキシンの分布を

介して QC 細胞付近の細胞分化パターンの構築に関与する可能性が二つ示唆される。一つは、野生株において *PUCHI* はこの時期に直接的にオーキシンの分布を制御して QC 細胞とその周辺の細胞分化パターン構築に働きかける。そして、変異株では *PUCHI* が正常な機能を失うために表現型が生じたと言う考え方である。もう一つは、野生株において *PUCHI* によって制御される細胞分裂パターンはオーキシンが分布するために非常に重要であるため、変異株では QC 構築以前の側根原基の細胞分裂パターンの異常が原因となって、それより後の QC 細胞や根端分裂組織の構築に影響がでたという可能性である。現時点でどちらが正しいかを明確にする事はできない。今後この問題を明らかにすることで、側根形成に伴う胚発生以降における QC 細胞や根端分裂組織の構築過程を知る手がかりが得られると考えられる。

puchi-1 変異体のさらに成長した側根の根端分裂組織は、野生株の主根や側根の根端分裂組織と大きな違いが見られなかった。また側根原基先端側の GFP-*PUCHI* の発現は原基の成長とともに除かれていった。これらの結果から、*PUCHI* は側根の根端分裂組織形成時になんらかの影響を与えるが、主根や側根の分裂組織の維持には働かないと考えられる。

IV-5. *PUCHI* 遺伝子はオーキシンによって発現調節される

PUCHI の根における発現は外生オーキシンによって誘導された。さらに *PUCHI* の 5' 上流域には三つの AuxRE が存在する。また外生オーキシンで処理すると、主根の先端で *ProPUCHI2.5::GUS* の発現が現れた。さらに 5' 上流域の三つの AuxRE に点変異を施した *ProPUCHI2.5m3::GUS* の主根先端では、オーキシン処理によってほとんど発現が誘導されなかった。これらの結果から、*PUCHI* の側根における発現量は ARF を介したオーキシンシグナルによって制御されていると考えられる。一方、外生オーキシン処理による側根基部での *ProPUCHI2.5::GUS* の発現はおそらく飽和状態にあり、外生オーキシンによる発現誘導を受けなかったことが考えられる。なお、*ProPUCHI2.5::GUS* と *ProPUCHI2.5m3::GUS* では、GUS の発現パターンは変わらなかった。したがって、*PUCHI* の 5' 上流の三つの AuxRE は、*PUCHI* の発現パターンではなく、*PUCHI* の発現量を上昇させるために重要な *cis* 配列であることが示唆される。

ARF7 と ARF19 は側根形成に重要な転写因子である。そしてその転写活性は SLR/IAA14 によって調節されていることが報告されている (Okushima et al., 2005; Fukaki et al., 2005)。マイクロアレイ解析において、*slr-1* 変異体や *afr7afr19* 二重変異体では、外生オーキシン処理による *PUCHI* の発現誘導が起らないことが報告されている (Okushima et al., 2005; Vanneste et al., 2005)。このことから、*PUCHI* は ARF7, ARF19 そして SLR の下流因子として、側根形成が誘導された後、側根の形成や発生

に關与していることが考えられる。*PUCHI* も *ARF* による発現制御を受けることが考えられるが、側根形成に重要な *ARF7* や *ARF19* による *PUCHI* の発現制御の有無については、更なる解析が必要と思われる(図 IV-2-1)。

IV-6. 総合考察

シロイヌナズナ *puchi* 変異体に関する本研究から植物の側生器官形成について次の様な総合的な考察を加えることができる。

シロイヌナズナにおいて花シュートの基部には葉は観察されない。しかし、今回の研究から、葉を形成する性質は内在している可能性が高い事が示された。これは、花シュートも他のシュート同様に葉の根元から発生する事を示唆する。そして、シロイヌナズナにおいてこの花シュートの基部の葉の形成は *PUCHI* によって抑制されていると考えられる。これより、植物の地上部の側生器官形成は葉と葉の脇から生じる新たなシュートの形成という同一の基本構造を常に保持しつつも、*PUCHI* のような因子によって一部の構造を変形させることで、種に特有の体づくりを行っていることが考えられる。

一方、シロイヌナズナの側根形成過程では、*PUCHI* を介したオーキシンシグナルによる細胞分裂並びに分裂パターンの制御が必要な事が明らかになった。一般に、植物における側根の発生過程に、オーキシンによる細胞増殖の制御機構が関与する事はこれまでも知られていたが、本研究よりオーキシンによる細胞分裂の制御機構の分子の実態の一端が明らかになった。今後はこの分子機構のより詳細な機能実態の解明と、その機構が他の種においても普遍性をもつのかに関する研究を引き続き行って行く必要がある。

これまでの研究報告から、地上部と地下部の器官形成過程において、幹細胞の維持機構等分子メカニズムの類似性が示されてきつつある。しかし、花と側根といった地上部と地下部の側生器官で *PUCHI* の様に同一の分子が重要な働きを持つ事が明らかになった事例は少ない。*PUCHI* は花や側根の発生過程で、一部の組織形成を負に制御し、器官が正常な形態で生じるように他の遺伝子の転写調節に關与していると考えられる。しかし、それぞれの場面において、*PUCHI* が実際に発現している細胞と *PUCHI* の影響が強く見られる細胞が必ずしも一致していない。また、側根の場合に見られた *PUCHI* の細胞分裂の制御機構がそのまま花においても機能しているのかどうかは不明である。今後、個々の現象における *PUCHI* の発現制御や *PUCHI* によって転写制御を受ける因子について解析を行う必要があるであろう。また、*PUCHI* の場合と同様に地上部と地下部の両方で形態形成に關与する新奇の因子が見つかったり、あるいはそこで機能する機構の類似性と特殊性に関する知見が積み重なってくると、地上部と地下部の形態形成における過程や進化を知る事が可能になってくるであろう。

野生型の花原基

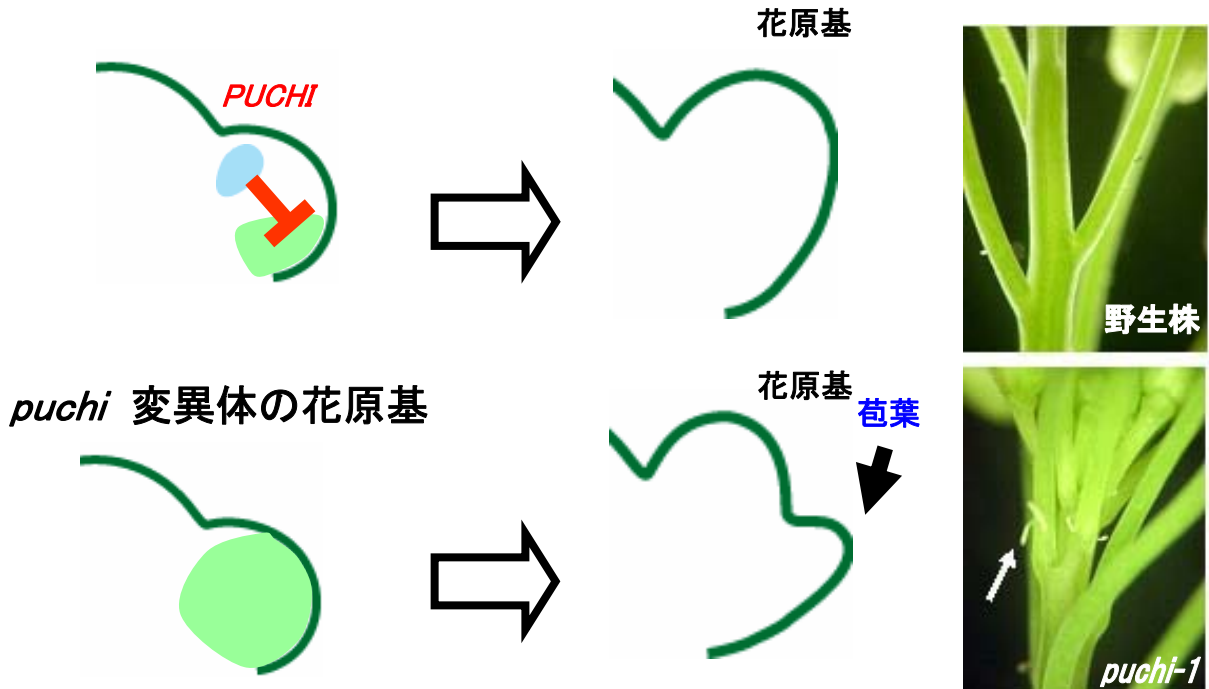


図 IV-1-1. 地上部でのPUCHIの働き

シロイヌナズナの野生株の中で、*PUCHI*は花原基の向軸側で発現し、背軸側の苞葉形成を抑制する働きを持つ。一方、*puchi*変異体では苞葉形成を抑制できないため苞葉が形成される。シロイヌナズナでも他の植物と同様に葉の腋に花を形成しているが、この葉を*PUCHI*が押さえることで、花は茎頂分裂組織から直接生じたような形態で形成される。

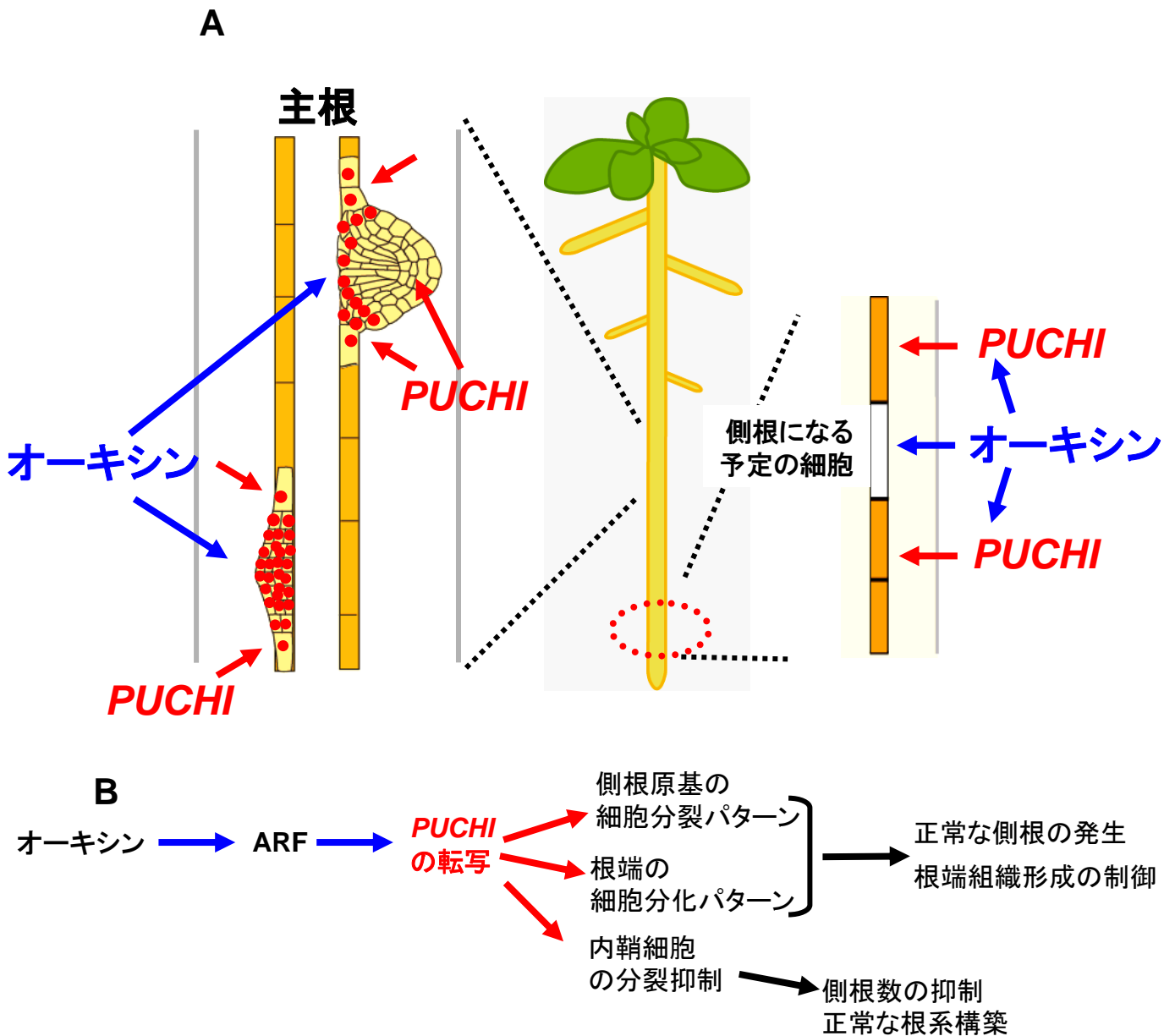


図 IV-2-1. 根でのPUCHIの働き

PUCHIはARFを介したオーキシシン信号の下流で側根原基の形態構築、および側根周辺の内鞘細胞の増殖抑制に働く。青矢印はオーキシシン信号を示し、赤矢印はPUCHIの働きを示し、黒矢印はPUCHIの影響により野生株で制御されている現象を示す。

(A)根でのPUCHIの働きの模式図。赤色はPUCHIの発現を示す。

(B)PUCHIを介したオーキシシン信号の流れ。

PUCHIはオーキシシンに発現量を調節され、内鞘細胞の分裂や側根原基の発生を調節する因子である。

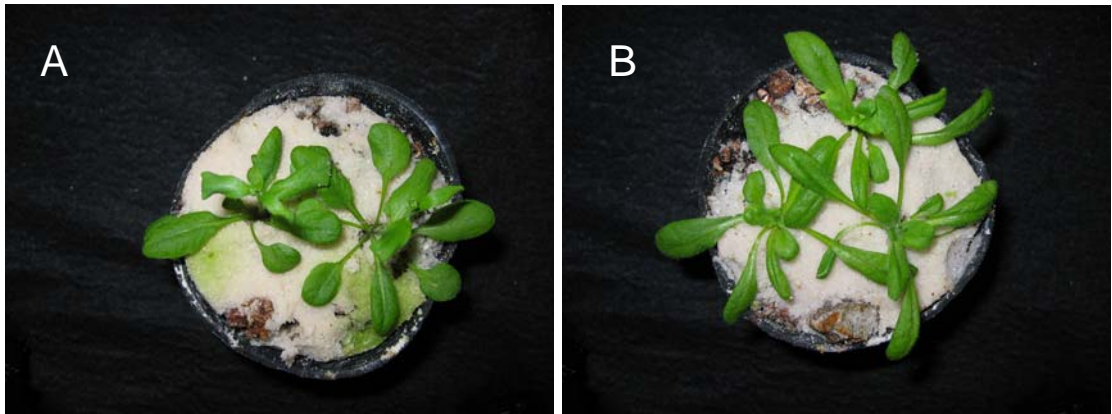


図 IV サプリメンタルデータ 1. *Pro35s:PUCHI* の地上部の表現型

(A) 野生株のロゼット葉。

(B) *Pro35s:PUCHI* のロゼット葉。

野生株に比べ、葉身が葉の基部まで広がり、葉柄を作らないことが多い。

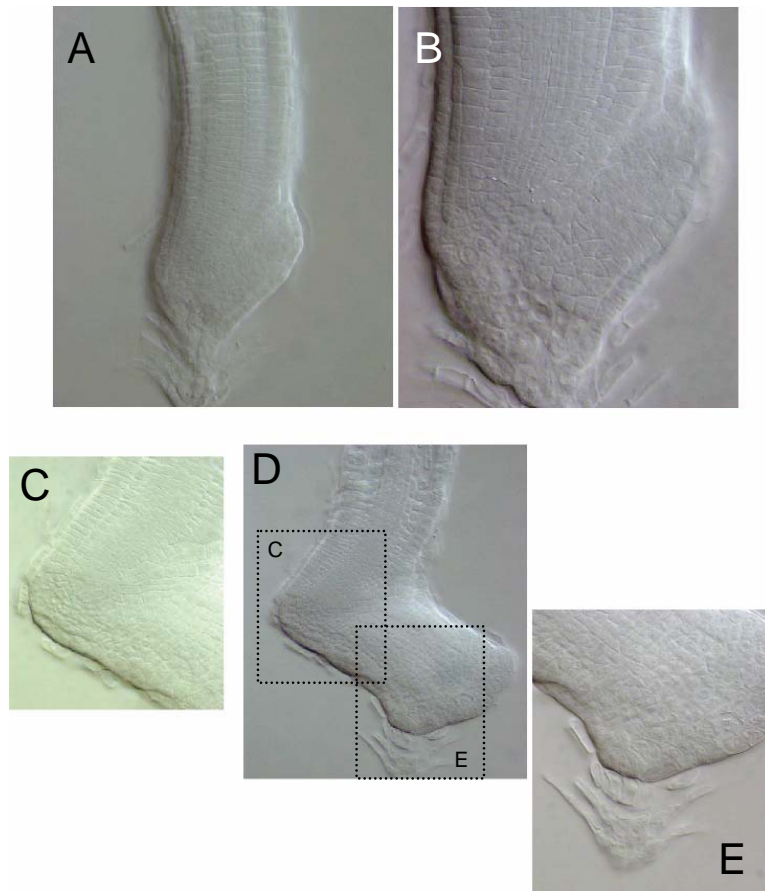


図 IV サプリメンタルデータ 2. *Pro35s:PUCHI* の根の表現型 I

(A-E) *Pro35s:PUCHI* の芽生えでの主根の先端。

(B) (A)の拡大写真。分裂パターンの異常がみられる。

(C, E)(D)の拡大写真。

(C) 主根の先端付近が折れ曲がったように成長する。

(E)はがれた根冠から根の先端であることが考えられるが、根端としての細胞パターンは見られない。

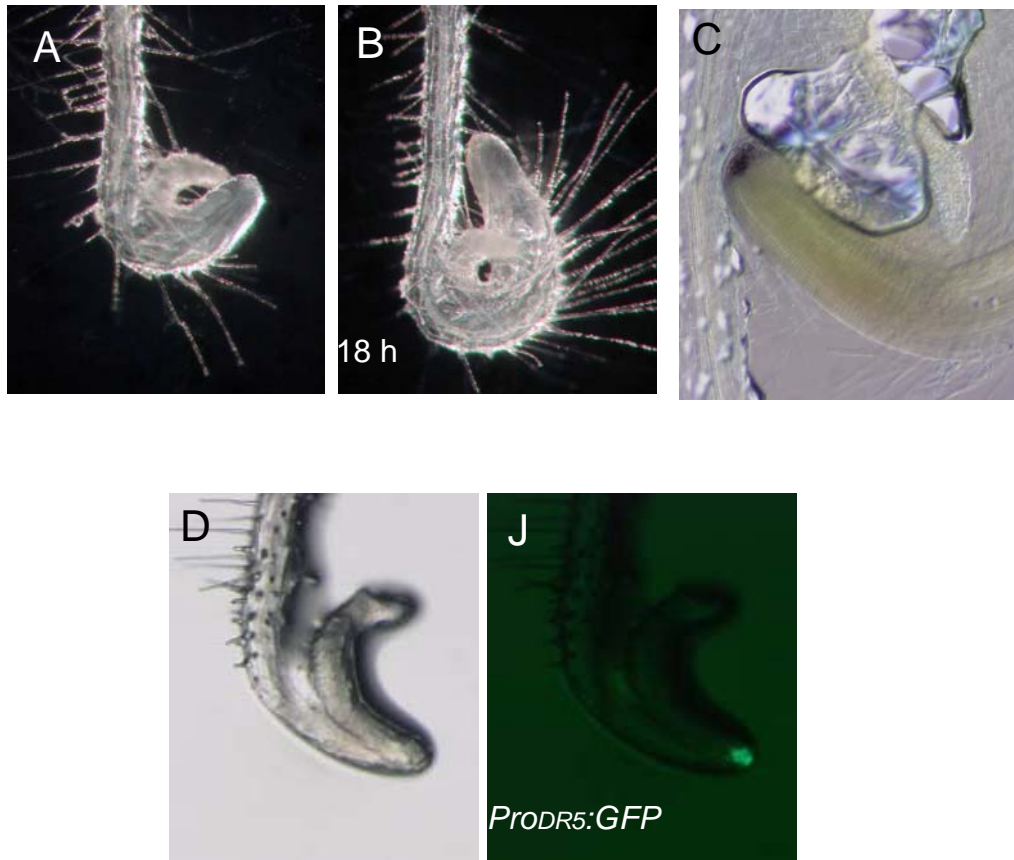


図 IV サプリメンタルデータ 3. *Pro35S:PUC1* の根の表現型 II

(A, B) *Pro35S:PUC1* の根は折れ曲がった先が伸長する。(G)は(F)の18時間後。

(C) *Pro35S:PUC1* の根は折れ曲がった先にはデンプン粒の蓄積が見られる。

(D, E) *Pro35S:PUC1* の根は折れ曲がった先には*ProDR5:GFP*も発現する。

(E)は(D)の蛍光像。

V. 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., 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.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C. and Ecker J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Banno H., Ikeda Y., Niu Q.W. and Chua N.H. (2001). Overexpression of *Arabidopsis ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* 13, 2609-2618.
- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jurgens G. and Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Blakely L.M., Blakely R.M., Colowit P.M. and Elliott D.S. (1988). Experimental Studies on Lateral Root Formation in Radish Seedling Roots: II. Analysis of the Dose-Response to Exogenous Auxin. *Plant Physiol.* 87, 414-419.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. and Scheres B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.
- Bowman J.L., Smyth D.R. and Meyerowitz E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1, 37-52.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inze D., Sandberg G., Casero P.J. and Bennett M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral

- root initiation. *Plant Cell* 13, 843-852.
- Chuck G., Muszynski M., Kellogg E., Hake S. and Schmidt R.J.** (2002). The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize. *Science* 298, 1238-1241.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503–508.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N.** (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423–433.
- Dinneny J.R., Yadegari R., Fischer R.L., Yanofsky M.F. and Weigel D.** (2004). The role of *JAGGED* in shaping lateral organs. *Development* 131, 1101-1110.
- Dubrovsky J.G., Rost T.L., Colon-Carmona A. and Doerner P.** (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30-36.
- Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernandez-Barrera A., Shishkova S. and Gonzalez I.** (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann. Bot.* 97, 903-915.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.
- Fukaki H., Nakao Y., Okushima Y., Theologis A. and Tasaka M.** (2005). Tissue-specific expression of stabilized *SOLITARY-ROOT/IAA14* alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44, 382-395.
- Fukaki H., Tameda S., Masuda H. and Tasaka M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29, 153-168.
- Geldner N., Richter S., Vieten A., Marquardt S., Torres-Ruiz R.A., Mayer U. and Jurgens G.** (2004). Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 131, 389-400.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., and Benfey, P.N.** (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through

- radial signaling. *Cell* 101, 555-567.
- Henikoff S., Till B.J. and Comai L.** (2004). TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.* 135, 630-636.
- 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.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T. and Ohme-Takagi M.** (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34, 733-739.
- Honma T. and Goto K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525-529.
- Ikeda Y., Banno H., Niu Q.W., Howell S.H., Chua N.H.** (2006). The *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2* gene in *Arabidopsis* Regulates *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* at the Transcriptional Level and Controls Cotyledon Development. *Plant Cell Physiol.* 47, 1443-1456.
- Kirch T., Simon R., Grunewald M. and Werr W.** (2003). The *DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell* 15, 694-705.
- Kirsch R.D. and Joly E.** (1998). An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 1848-1850.
- Komatsu M., Chujo A., Nagato Y., Shimamoto K. and Kyojuka J.** (2003). *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development* 130, 3841-3850.
- Kwiatkowska D.** (2006). Flower primordium formation at the *Arabidopsis* shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth. *J. Exp. Bot.* 57, 571-580.
- Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C. and Sussex I.M.** (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303-3310.
- Levin J.Z. and Meyerowitz E.M.** (1995). *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* 7, 529-548.
- Lorrain S., Lin B., Auriac M.C., Kroj T., Saindrenan P., Nicole M.,**

- Balague C., and Roby D.** (2004). VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell* 16 2217-2232.
- Malamy J.E. and Benfey P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33-44.
- Matsumoto N. and Okada K.** (2001). A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers. *Genes Dev.* 15, 3355-3364.
- Morita M.T., Kato T., Nagafusa K., Saito C., Ueda T., Nakano A. and Tasaka M.** (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 47-56.
- Nardmann J., Ji J., Werr W. and Scanlon M.J.** (2004). The maize duplicate genes *narrow sheath1* and *narrow sheath2* encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development* 131, 2827-2839.
- Nilsson O., Wu E., Wolfe D.S. and Weigel D.** (1998). Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J* 15, 799-804.
- Ohno C.K., Reddy G.V., Heisler M.G. and Meyerowitz E.M.** (2004). The *Arabidopsis* *JAGGED* gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* 131, 1111-1122.
- Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A. and Tasaka M.** (2007). ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of *LBD/ASL* Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007 19, 118-130.
- Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Lui A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G. and Theologis A.** (2005). Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 17, 444-463.
- Reed R.C., Brady S.R. and Muday G.K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 1369-1378.
- Riechmann J.L. and Meyerowitz E.M.** (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* 379, 633-646.
- Rogg L.E., Lasswell J., Bartel B.** (2001). A gain-of-function mutation in

- IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* 13, 465-480.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P. and Scheres B. (1999).** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463-472.
- Saito C., Morita M.T., Kato T. and Tasaka M. (2005).** Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell* 17, 548-558.
- Sawa S., Ito T., Shimura Y. and Okada K. (1999a).** *FILAMENTOUS FLOWER* controls the formation and development of *Arabidopsis* inflorescences and floral meristems. *Plant Cell* 11, 69-86.
- Sawa S., Watanabe K., Goto K., Liu Y.G., Shibata D., Kanaya E., Morita E.H. and Okada K. (1999b).** *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev.* 13, 1079-1088.
- Schultz E.A. and Haughn G.W. (1991).** *LEAFY*, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 771-781.
- Smet, I.D., Tetsumura, T., Rybel, B.D., Frey, N.F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inze, D., Bennett, M.J. and Beeckman, T. (2007)** Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134, 681-690
- Smyth D.R., Bowman J.L. and Meyerowitz E.M. (1990).** Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.
- Tatematsu K., Kumagai S., Muto H., Sato A., Watahiki M.K., Harper R.M., Liscum E. and Yamamoto K.T. (2004).** *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 379-393.
- Tian Q. and Reed J.W. (1999).** Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126, 711-721.
- Ulmasov T., Hagen G. and Guilfoyle T.J. (1999).** Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 19, 309-319.
- van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. and Scheres B. (1997).** Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis*

- root meristem. *Nature* 390, 287-289.
- van der Graaff E., Dulk-Ras A.D., Hooykaas P.J. and Keller B. (2000).** Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127, 4971-4980.
- Vanneste S., Rybel B.D., Beemster G.T., Ljung K., Smet I.D., Van Isterdael G., Naudts M., Iida R., Gruissem W., Tasaka M., Inze D., Fukaki H. and Beeckman T. (2005).** Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3035-3050.
- Wang W. and Malcolm B.A. (1999).** Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680-682.
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., Yanofsky M.F. and Meyerowitz E.M. (1992).** *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843-859.
- Wilkinson M.D. and Haughn G.W. (1995).** *UNUSUAL FLORAL ORGANS* Controls Meristem Identity and Organ Primordia Fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7, 1485-1499.
- Wilmoth J.C., Wang S., Tiwari S.B., Joshi A.D., Hagen G., Guilfoyle T.J., Alonso J.M., Ecker J.R. and Reed J.W. (2005).** *NPH4/ARF7* and *ARF19* promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* 43, 118-130.
- Yang X., Lee S., So J.H., Dharmasiri S., Dharmasiri N., Ge L., Jensen C., Hangarter R., Hobbie L. and Estelle M. (2004).** The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF (TIR1). *Plant J.* 40, 772-782.

VI. 謝辞

本研究は、奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科形質発現植物学講座の田坂昌生教授のご指導のもと、平成15年10月から平成19年2月まで行われました。

本研究を行うにあたり、田坂昌生教授には終始熱心に指導していただき、かつ研究の進展を暖かく見守っていただきましたことを心より感謝申し上げます。

当講座の相田光宏助手、そして神戸大学理学部の深城英弘助教授は、常に有益な知見や重要な助言を与えてくださり、また議論に多く時間を割いてくださいました。ここに心より感謝申し上げます。

本研究は奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の加藤壮英助手により *puchi-1* 変異体が単離されて始まりました。表現型の解析、遺伝子単離の礎を築いてくださり、また終始熱心な助言を与えてくださいましたことに深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、様々な視点からご助言くださいましたバイオサイエンス研究科の教官、職員の皆様に深く感謝申し上げます。

当講座の森田美代助教授、古谷雅彦助手、新浜充 COE 特別研究員、浅沼千裕秘書、技術補佐および院生の皆様、そして奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科植物組織形成学講座の奥島葉子助手には、本研究や研究生活を支えていただき、また様々な助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。