

博士論文番号 : 0781010

茎頂分裂組織が肥大化する *SHOOT MERISTEMLESS* 新奇アリル *gorgon* の解析

高野 翔

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22年5月24日提出

目次

	ページ
I. 序論	4.
II. 材料と方法	8.
II-1. 植物と生育条件	
II-2. マッピングおよびシーケンス	
II-3. アレリズムテスト	
II-4. 二重変異体の作製	
II-5. コンストラクション	
II-6. 形質転換植物体の作製	
II-7. 組織学的、形態学的観察	
II-8. 発現解析	
II-9. 酵母を用いたタンパク質間の相互作用能の解析	
II-10. 抗 STM 抗体を用いたウェスタンブロット解析	
III. 結果	21.
III-1. <i>gorgon</i> 変異体の形態学的解析	
III-2. <i>gor</i> 変異体の原因遺伝子の同定	
III-3. <i>gor</i> 変異体における茎頂分裂組織関連遺伝子の発現パターンの解析	
III-4. <i>gor wus</i> 二重変異体および <i>gor clv3</i> 二重変異体の解析	
III-5. <i>gor</i> 変異がSTM自身の発現に与える影響の解析	
III-6. <i>gor</i> 変異体におけるSTMタンパク質の発現解析	
III-7. <i>gor</i> 変異型STMとPNYとの相互作用の解析	
III-8. 過剰発現体の解析	
IV. 考察	36.
IV-1. <i>gor</i> アリルは既知の <i>stm</i> アリルとは異なる影響を茎頂分裂組織の発生に与える新奇アリルである	
IV-2. <i>gor</i> 変異はSTMの機能の部分的な喪失を引き起こすかもしれない	
IV-3. <i>gor</i> 変異型STMが機能するためにはPNYが必要である	
IV-4. <i>gor</i> 変異はSTMタンパク質の性質にどのような影響を与えるのか	
IV-5. <i>gor</i> 変異は茎頂分裂組織の恒常性を乱す	
V. 図表	43.

VI.	参考文献	71.
VII.	謝辞	81.

I. 序論

植物と動物の発生様式には大きな違いが存在する。動物では、多くの場合、体を構成する器官のほぼすべてが胚発生中に形成され、胚発生の終結以降には新たな器官はほとんど形成されない。一方、高等植物の場合では、胚発生中には子葉、胚軸、幼根といったごく少数の器官のみが形成され、植物体の地上部を形作る器官はほぼすべて発芽後に茎頂分裂組織から新たに形成される (図 1.A-C)。茎頂分裂組織は植物の一生を通じて地上部器官を形成し続ける重要な組織である。そのため、植物の形作りの仕組みを理解するには茎頂分裂組織の形成・維持、およびそこから器官分化の制御機構を知ることが重要である。

茎頂分裂組織は表層から順にL1、L2、L3層と呼ばれるそれぞれ互いに独立した細胞系譜を持つ3つの層に区分することができる (図1.D)。L1、L2層では細胞が主に垂層分裂を行なうことで細胞層が保たれる。一方、L3層では細胞が様々な方向へ分裂するため、明確な細胞層は観察されない。L1、L2層はそれぞれ器官の表皮、皮層に分化し、そしてL3層は維管束と髄に分化する。これらとは別に、茎頂分裂組織は組織学的、機能的観点からいくつかの領域に区分することができる (図1.D)。中央にあるCentral Zone (CZ; 中央領域) では細胞の分裂活性が低く、細胞は未分化な状態を維持しつつ増殖する。CZにおいて増殖した細胞の一部は周辺部のPeripheral Zone (PZ; 周縁領域) へと押し出される。PZの細胞は活発に分裂し、葉や花などの側生器官の原基を形成する。茎頂分裂組織の内部下方にある領域はRib Zone (RZ; 髄状領域) とよばれ、茎の内部組織を形成する。

茎頂分裂組織は胚発生過程で子葉の間、胚の頂端部において形成される (図 1.A)。茎頂分裂組織は栄養成長期には多数の葉を形成し、その後、生殖成長期に移行し茎が抽臺を始めると、花器官を作り出す花芽分裂組織を連続して形成する (図 1.B-C)。植物が一生を通じて地上部の器官を形成し続けるためには、茎頂分裂組織に含まれる細胞がみずからの未分化な状態を維持したまま分裂を繰り返すこと、そして増殖した細胞の一部が器官原基へ取り込まれ、それらが各器官へと正しく分化していくことが重要である。また茎頂分裂組織のサイズを適切に保ち続けるためには、細胞の増殖と器官分化のバランスが高度に制御され続けることが重要である (Clark, 1997; Sharma et al., 2003)。しかし茎頂分裂組織の形成・維持機構、および茎頂分裂組織からの器官形成機構については未だ不明な点が数多く残っている。

これまでに、シロイヌナズナなどを用いた分子遺伝的解析から、茎頂分裂組織の形成と維持には2つの独立した経路である *WUSCHEL (WUS)*-*CLAVATA*

(*CLV*) 経路と *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* 経路が主に関与することが明らかになっている (図1.E)。 *WUS*は転写因子として機能するホメオドメインタンパク質をコードしており、形成中心と呼ばれる少数の細胞からなる小さな領域でのみ発現する。形成中心はCZのすぐ下側に存在し、この領域における *WUS*の発現がCZに存在する幹細胞の形成と維持に細胞非自律的に機能することが報告されている (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998)。一方、 *CLV3*はCZのL1層およびL2層において強く発現する分泌性の小さなタンパク質をコードしており (Fletcher et al., 1999)、受容体型キナーゼである *CLV1*のリガンドとして機能する (Lenhard et al., 2002; Ogawa et al., 2008)。 *CLV3*と *CLV1*を介した *CLV*情報伝達経路は *WUS*の発現領域を形成中心内に制限することで茎頂分裂組織のサイズを制御する。一方で *WUS*はCZにおける *CLV3*の発現を誘導する。これらのことから、 *WUS*と *CLV3*の発現の間には負のフィードバック制御が働くことが提唱されている (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。植物は、このフィードバックループによって形成中心および幹細胞の細胞数を常に調節することで、茎頂分裂組織のサイズを一定に維持していると考えられる。

*STM*はclass I knotted-like homeobox (KNOX) 型転写因子をコードする (Barton and Poethig, 1993; Long et al., 1996)。 *STM*は植物の一生を通じて茎頂分裂組織の未分化な領域で強く発現し、一方で器官原基では発現が抑制される。これまでに数多くの機能喪失型 *stm*変異体が単離、報告されている。強い *stm*アレルは胚発生過程で茎頂分裂組織を形成することができず、茎頂分裂組織を完全に欠失してしまうため、発芽後にほとんど葉を作り出せない。さらに、器官どうしの融合なども観察される。また、弱い *stm*アレルは胚発生過程で不完全な茎頂分裂組織を形成するが、発芽後にこれら茎頂分裂組織の細胞が器官原基に取り込まれ、すぐに分化してしまうため、茎頂分裂組織を維持し続けることができない (Endrizzi et al., 1996)。さらに、 *STM*の異所的な過剰発現は、茎頂部からの多数の未発達な葉原基の形成や、鋸歯状の葉の形成を引き起こし、正常な葉の発達を強く抑制する (Williams, 1998; Brand et al., 2002; Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002)。これらのことから、 *STM*は細胞の未分化状態を維持しつつ細胞分裂を促進することで、胚発生過程における茎頂分裂組織の形成と、胚発生の終結後における茎頂分裂組織の維持に寄与する因子であることが明らかになった。また、 *STM*は植物ホルモンであるサイトカイニンやジベレリンの生合成や分解に関わる遺伝子の発現を誘導・抑制することが示唆されている (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005)。 *STM*はこれらの遺伝子の発現の制御を介して茎頂分裂組織におけるホルモンのバランスを調節し、茎頂分裂組織の活性を維持していると考えられている。

KNOXタンパク質はthree amino acid loop extension (TALE) クラスのホメオドメインタンパク質に属する (Bürglin, 1997)。このクラスに属する別のクラスのホメオドメインタンパク質としてBELL1-like (BELL) が知られている。KNOXとBELLはそれぞれのN末端領域に存在する高度に保存されたMEINOXドメインおよびMIDドメインを介してお互いが直接結合し、ヘテロダイマーを形成することが報告されている (Byrne et al., 2003; Hake et al., 2004; Kanrar et al., 2006; Lee et al., 2008; Rutjens et al., 2009)。また近年の研究によって、KNOXタンパク質およびBELL型タンパク質は、それぞれがDNAに結合できること、さらにヘテロダイマーを形成することでDNAとの相互作用が強くなることが明らかになった (Smith et al., 2002; Chen et al., 2004; Viola and Gonzalez, 2006; Bolduc and Hake, 2009; Viola and Gonzalez, 2009)。KNOXタンパク質であるSTMに結合するBELL型タンパク質としては、PENNYWISE (PNY)、POUND-FOOLISH (PNF)、BELL1 (BEL1) およびARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX1 (ATH1) がこれまでに報告されている (Bellaoui et al., 2001; Byrne et al., 2003; Smith and Hake, 2003; Hackbusch et al., 2005; Kanrar et al., 2006; Rutjens et al., 2009)。PNY遺伝子は茎頂分裂組織において発現し、その発現領域はSTMの発現領域と一部重複する。また、*pny*単独変異体においては茎頂分裂組織の欠失は生じず、葉序や節間のわずかな乱れが観察されるのみであるが、*pny*変異は*stm*変異体の弱いアリの表現型を強め、茎頂分裂組織を欠失や器官の融合など強い*stm*変異アリのに似た表現型を引き起こす (Byrne et al., 2003; Bhatt et al., 2004; Kanrar et al., 2006)。これらのことから、PNYとSTMの相互作用は茎頂分裂組織の形成・維持に重要であると考えられている。

我々の研究室において、地上部の形態に異常を示す単一劣性変異体 *gorgon* (*gor*) が、モデル植物であるシロイヌナズナから単離された。*gor*変異体では生殖成長期に移行しても花が形成されないまま花茎の伸長と花茎先端部の著しい肥大化が進行し、その後、数多くの花や枝が茎頂部から一斉に形成される。前任者によって行なわれたマッピングおよびシークエンスによって、*gor*変異体においては *SHOOT MEISTEMLESS (STM)* 遺伝子内にミスセンス変異が生じていることが示された。この変異はホメオドメインの第3ヘリックス内に存在する高度に保存されたアミノ酸の1つに置換を引き起こす。しかし、*gor*変異体の表現型は、これまでに単離された*STM*の機能喪失型変異体の表現型とは全く異なる。そこで本研究では、植物の地上部の形態形成機構についての新たな知見を得ることを目的として、*gor*変異体を用いた解析を行なった。まず、*gor*変異が植物の形態形成におよぼす影響を、組織学的、形態学的に詳細に解析した。その結果、*gor*変異体においては、胚発生の終結以降に器官形成の遅延や茎頂分裂組織

の肥大化が生じていることが明らかになった。次に、*gor*変異体の原因遺伝子を同定するために、遺伝学的解析を行なったところ、*gor*変異体の原因遺伝子が実際に*STM*であることが示された。このことから、*gor*変異は既知の*stm*変異とは異なる影響を茎頂分裂組織の形成・維持に対して与えていることが示唆された。最後に、*gor*変異が*STM*の性質におよぼす影響を調べるため、過剰発現体の解析や、二重変異体の解析などを行なった。その結果、*gor*変異は*STM*の機能を部分的に喪失させる変異である可能性が示唆された。そこで、本論文では、*STM*新奇変異体である*gor*を用いた解析によって得られた結果から、*STM*が茎頂分裂組織の形成・維持に及ぼす影響について考察する。

II. 材料と方法

II-1. 植物と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の Columbia (Col) 株を野生型植物体として用いた。種子は表面を 5 %次亜塩素酸ナトリウム、0.02 % TritonX-100 で 10 分間滅菌した後、GM 培地 (4.6 g/l Murashige & Skoog plant salt mixture (和光純薬), 10 g/l sucrose, 0.1 g/l myo-inositol, 0.5 g/l 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid-KOH (pH 5.7), 0.5 % Gellan Gum) 上に蒔いた。発芽を同調させるため、4 °C 暗黒条件に 2 日間おいた後、23 °C 連続白色光条件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 °C 連続白色光条件下で育てた (Fukaki et al., 1996)。

gorgon (*gor*) 変異体は Col 系統の *zigzag* (*zig*) 変異体 (Kato et al., 2002) に対して EMS 処理を行い、そこから得られた劣性変異体である。本研究における解析には、Col との戻し交配を 5 回以上行い、*zig* 変異が抜けたことが確認された植物体を用いた。*gor* ホモ接合体からは種子がほとんど得られないため、*gor* のホモ接合体の解析は全て *gor* ヘテロ接合体から得られた次世代の植物体を用いて行なった。*gor* 変異体の芽生えおよび栄養成長期の植物体は野生型と外観上の違いがほぼ無いため、*gor* 変異を検出できる Polymerase Chain Reaction (PCR) プライマーセット (後述) を用いて変異部位を含む DNA 断片を増幅し、その断片中の変異部位を特異的に切断する制限酵素を用いてジェノタイピングを行なった。*stm-1* 変異体は Landsberg *erecta* (*Ler*) 系統の変異体であり (Barton and Poethig, 1993)、本研究では *stm-1* 変異体を Col に 5 回戻し交配したものを用いた (*stm-1C* 変異体)。*stm-11* 変異体は *Ler* 系統の変異体であり Kathryn Barton 博士より分与していただいた (Long and Barton, 1998)。本研究では *stm-11* 変異体を Col に少なくとも 4 回戻し交配したものを用いた。*stm-bum1-3* 変異体 (Col 系統)、*wus-1* 変異体 (*Ler* 系統)(Laux et al., 1996)、*clv3-2* 変異体 (*Ler* 系統)(Clark et al., 1995) および *pn1-40126* 変異体 (Col 系統)(Smith and Hake, 2003; Alonso et al., 2003) は Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から入手した。*ProCLAVATA3::GUS* (*ProCLV3::GUS*) (Brand et al., 2002) は Rüdiger Simon 博士より分与していただいた。*ProSHOOT MERISTEMLESS::GUS* (*ProSTM::GUS*) は相田光宏博士によって作製されたものを用いた。このコンストラクトは、*STM* 遺伝子の開始コドン ATG の上流約 7.6-kb (Bacterial artificial chromosome (BAC) F2401 塩基 35721 から 28120 に相当する) および stop コドンの下流約 0.8-kb (BAC) F2401 塩基 25195 から 24407 に相当する) を、pBI101 に由来する *GUS* 遺伝子の上流および下流にそれぞれ連結したものである。また ATG の直前の 2

塩基 AG は CC に改変されている。この完成したレポーター領域はバイナリーベクター pBIN19 を改変した pBIN50 (加藤壮英、奈良先端科学技術大学院大学、未発表) にクローニングされた。 *ProLEAFY::GUS* (*ProLFY::GUS*) (CS6297 Nossen 系統) および *ProAGAMOUS::GUS* (*ProAG::GUS*) (CS6351 Col 系統) は ABRC から入手した。

それぞれの変異体のジェノタイピングに用いたプライマーセットを以下に示す。

ジェノタイピングに用いたプライマーセット

gor

STM-F4 5'-ATGTAGCTGTGATCATGGACTGAC-3'

STM-R4 5'-TATGTTCCAAGTATACCGAGAACC-3'

gor 変異体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *MboII* により特異的に切断される。

stm-1

stm-1dCAPS-L 5'-TATGAACAATGAATTTGTAGATCGA-3'

stm-1dCAPS-R 5'-CATTTGTAGTGACGGCTCCA-3'

stm-1 変異体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *ClaI* により特異的に切断される。

または

STM-F3 5'-ACTAGCCTATTCTTTTTTCATTTCC-3'

stm-1dCAPS-NdeI-RV 5'-TCCTTTAAGCTCTCTATCCTCAGCAT-3'

stm-1 変異体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *NdeI* により特異的に切断される。

stm-11

stm-11dCAPsF

5'-GGGCTTGATCAATTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTCGTG
CAG TATGAG-3'

stm-11R 5'-CCCTAGTAACAACCATCAAAG-3'

野生型植物体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *MwoI* により特異的に切断される。

stm-bun1-3

stm-dCAPS-F1 5'-AAGAAGCTCGTCAACAACACTGCTTGATTG-3'

STM-R6 5'-ATTGAAACAAGCTAATAGACAAC-3'

stm-bun1-3 変異体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *ClaI* により特異的に切断

される。

wus-1

wus-1FW 5'-GGGAATTTAAATCATGCAAGCTCAGTTACTG-3'

wus-1RV 5'-TATTTGAATTAATGAATTATAGTTTGTACG-3'

野生型植物体ゲノム由来の PCR 断片が制限酵素 *RsaI* により特異的に切断される。

pny-40126

salk-040126-LP 5'-GGAAATGAAACTCCTTCAAAGCCA-3'

salk-040126-RP 5'-AATGATCGAAGAGCCAAGCCC-3'

salkLB 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

pny-40126 変異体ゲノムより約 400bp、野生型植物体ゲノムより約 1000bp の PCR 断片が生じる。

II-2. マッピングおよびシーケンス

マッピングおよびシーケンスによる *gor* の変異部位の同定は前任者である新濱充氏により、以下の方法で行なわれた。

gor 変異体 (Col) と野生型 (*Ler*) を交配した F2 世代において地上部の表現型を指標に変異の生じている遺伝子を探索した。Col と *Ler* の多型は ExTaq DNA polymerase (TaKaRa) を用いた PCR と制限酵素処理によって確認された。シーケンスには BigDye Terminator ver3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems) を用いた。

II-3. アレリズムテスト

STM 遺伝子上に *gor* 変異 (*G1016A*) と *stm-1* 変異または *stm-bum1-3* 変異をヘテロに持つ植物体を作製するため、*gor* ヘテロ接合体と *stm-1C* ヘテロ接合体または *stm-bum1-3* ヘテロ接合体を交配した。得られた F1 植物体についてそれぞれの変異を検出できる PCR プライマーセットを用いて遺伝子型を決定した。

II-4. 二重変異体の作製

gor wus 二重変異体を作製するため、*gor* ヘテロ接合体 (Col) と *wus-1* ヘテロ

接合体 (*Ler*) を交配した。それぞれの変異を検出する PCR プライマーセットを用いて *gor* 変異および *wus-1* 変異をヘテロに持つ F1 植物体を選抜し、自殖させた F2 世代を解析に用いた。両変異体の遺伝的背景の違いが表現型に影響を及ぼす可能性を考慮し、F2 世代で分離した *wus-1* 単独ホモ接合体と *wus gor* 二重ホモ接合体をジェノタイピングにより多数同定し、形態の比較を行った。

gor clv3 二重変異体を作製するため、*gor* ヘテロ接合体 (*Col*) と *clv3-2* ホモ接合体 (*Ler*) を交配した。*clv3-2* 変異体の表現型を示し、かつ *gor* 変異をヘテロに持つ F2 植物体を *clv3* ホモ *gor* ヘテロ接合体として選抜し、自殖させた F3 世代を解析に用いた。両変異体の遺伝的背景の違いが表現型に影響を及ぼす可能性を考慮し、F3 世代で分離した *gor* 変異をホモに持つ植物体を *clv3 gor* 二重変異体として、*gor* 変異を持たない植物体を *clv3* 変異体として、形態の比較を行った。

gor pny 二重変異体を作製するため、*gor* ヘテロ接合体 (*Col*) と *pny-40126* ホモ接合体 (*Col*) を交配した。それぞれの変異を検出する PCR プライマーセットを用いて *gor* 変異をヘテロに持ち、かつ *pny* 変異をホモに持つ F2 植物体を選抜し、自殖させた F3 世代を解析に用いた。F3 世代で分離した *pny* 単独ホモ接合体と *gor pny* 二重ホモ接合体をジェノタイピングにより多数同定し、形態の比較を行った。

II-5. コンストラクション

II-5-1. 野生型 *STM* ゲノム断片および *G1016A* 変異型 (*gor* 変異型) *STM* ゲノム断片のコンストラクション

野生型 *STM* ゲノム断片 (*genomic STM^{wl}*) を用いた相補性試験および、*gor* 変異体において同定された *STM* 上のミスセンス変異 (*G1016A*) を含む *STM* ゲノム断片 (*genomic STM^{G1016A}*) を用いた表現型再現実験のため、以下の手順 (図24.) でコンストラクトを作製した。

1. *ProSTM::GUS* で使用された *STM* のプロモーター領域を含むゲノム断片を作製するために、Recombination system (渡邊、奈良先端科学技術大学院大学、2006年、修士論文) を用い、*ProSTM::GUS* をバイナリーベクター pBIN50 上で改変した。
2. *ProSTM::GUS* を鋳型とし、*GUS* 領域および改変された *STM* の開始コドンの直前の2塩基を、Recombination system を用いて野生型 *STM* ゲノムおよび *G1016A* 変異型 *STM* ゲノムへの組み換えを試みた。その結果、*G1016A*

変異型*STM*ゲノムに組み換わったコンストラクトが得られたが、3'UTR内に1塩基の挿入が生じていた (*ProSTM7.6::STM^{G1016A} 3'UTR mutation*)。また、野生型*STM*ゲノムへと組み換わったコンストラクトは得られなかった。

3. 3'UTR内の変異を修正するため、また野生型*STM*ゲノム断片を得るために以下の操作を行なった。野生型*STM*ゲノム断片および*G1016A*変異型*STM*ゲノム断片を作製するための操作は、4.における鑄型となるゲノムDNAの由来以外はどちらとも同様のため、以下では野生型*STM*ゲノム断片の作製についてのみ記述する。
4. *STM*の第2エクソン内の*SacI*サイトから*ProSTM::GUS*で使用された下流領域までを野生型植物体から抽出したゲノムを鑄型にして、以下のプライマーセットを用いたPCR (PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を使用) によって増幅した。その際、3'末端に*PstI*サイトを付加した。

STMex2*SacI*F 5'-AGCAAGAGCTCTCCAAACCTTTC-3'

STM-*PstI*R 5'-TGATGATCTGCAGCTCGAGGCTGACCCGATGTATC-3'

5. 増幅された断片を制限酵素*SacI*および*PstI*で処理し、クローニングベクターpAN19へクローニングした。
6. *ProSTM7.6::STM^{G1016A} 3'UTR mutation*を制限酵素*SacI*で処理することで*ProSTM::GUS*で使用された*STM*の上流領域から*STM*の第二エクソンの*SacI*サイトまでを含む断片を得た。この断片を5.で作製したプラスミドの*SacI*サイトにクローニングすることで、*ProSTM7.6::STM^{wi}*が完成した。
7. 完成した*ProSTM7.6::STM^{wi}*を制限酵素*AscI*で処理し、pAN19からバイナリーベクターpBIN50へとクローニングした。
8. *ProSTM7.6::STM^{wi}*をアグロバクテリウムに導入し、その後、*stm-1C*変異体への形質転換を行ったが、表現型が相補された形質転換体を得られず、このコンストラクトは機能的では無いことが明らかになった。この原因を調べたところ、アグロバクテリウム中では*ProSTM7.6::STM^{wi}*の*STM*上流領域が何らかの理由で欠失してしまい、そのため完全な*STM*ゲノム断片が植物体に形質転換されないことが明らかになった。
9. より短い*STM*上流領域を用いることで、アグロバクテリウム中での問題は解決できると考えた。そこで、*ProSTM7.6::STM^{wi}*を制限酵素*KpnI*で処理し、再びライゲーションを行なうことで、*STM*の開始コドンの上流約4.4-kbに存在する*KpnI*サイトからその上流領域を取り除いた。

10. 以上の操作により *STM* の開始コドンの約4.4-kb上流から停止コドンの下流約0.8-kbまでの領域が含まれるバイナリーベクター(*genomic STM^{wt}*)が完成した (BAC F2401 塩基32578から24407に相当する)。

II-5-2. 野生型、*gor*変異型および*stm-1*変異型*STM*の過剰発現体の解析のためのコンストラクション

コンストラクションにはGatewayシステムを用いた。野生型*STM*および*gor*変異型*STM*の全長CDSを、それぞれの植物に由来するcDNAを鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用いたPCRにより増幅した。PCRには以下のプライマーセットを用いた。

STM-attB1Fnew

5'-AAAAGCAGGATTGATGGAGAGTGGTTCCAACAGCACTT-3'

STM-attB2

5'-AGAAAGCTGGGTAAAGCATGGTGGAGGAG-3'

増幅された断片に対し、さらに以下のプライマーセットを用いたPCRを行なうことによりアダプター配列が付加された。

attB1 adapter primer 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'

attB2 adapter primer 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

増幅された断片をGateway BP Clonase (Invitrogen) を用いてpDONR221にクローニングした。

野生型 *STM* の全長 CDS がクローニングされた pDONR221 ベクターを鋳型とし、QuickChange 法 (Wang and Malcolm, 1999) を用いて *stm-1* 変異の挿入を行なった。PCR には以下のプライマーセットを用いた。

STM-GuruMawa-F 5'-GGATAGAGAGCTTAAAGGACAG-3'

STM-GuruMawa-mR 5'-TCAGCTTATGGATCCACAAATTC-3'

Pro35S::STM^{wt}、*Pro35S::STM^{gor}*および*Pro35S::STM^{stm-1}*の構築のため、それぞれの全長CDSをGateway LR Recombination Reactions (Invitrogen) を用いてpDONR221からバイナリーベクターpGWB2 (Nakagawa et al., 2007)へとクローニングした。完成したコンストラクトは野生型Colに形質転換された。

II-6. 形質転換植物体の作製

各コンストラクトを含むバイナリーベクターを *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 株に導入した。これらのアグロバクテリウムを、花浸し法を用いて植物体に感染させ、T1 種子を得た。形質転換体はカナマイシン (20 µg/ml)

を含むアガロース培地上で選抜した。

genomic STM^{wt} または *genomic STM^{G1016A}* が形質転換された植物体における内生の *gor* 変異および *stm-1* 変異のジェノタイピングは、以下の方法で行なった。まず、以下に示すプライマーセットを用いた PCR により内生の *STM* のみを増幅し、その PCR 産物を鋳型としてそれぞれの変異を検出するプライマーセット (II-1. 参照) を用いて再び PCR と制限酵素処理を行なった。

STM-F3 5'-ACTAGCCTATTCTTTTTTCATTTCC-3'

STM-R7 5'-GTTTAGTTAGTGCTCAAAATGTCAG-3'

II-7. 組織学的、形態学的観察

II-7-1. 走査型電子顕微鏡を用いた観察

芽生えおよび花茎先端を FAA (3.7%ホルムアルデヒド、5%酢酸、50%エタノール) 中で室温、一晚固定した後、30%エタノール、滅菌水で各ステップ 20 分間ずつ処理し加水した。さらにアセトンシリーズ (25%, 50%, 75%, 90%, 100%×2) を用いて各ステップ 10 分間ずつ処理することでアセトンに置換し、臨界点乾燥を行った。試料台に試料を固定し、必要に応じてトリミングを行った。その後、イオンスパッタリング装置を用いて金蒸着を行い、観察した (Ishida et al., 2000)。

II-7-2. テクノビットを用いた組織切片の作製

試料を FAA 中で 4 °C、一晚固定した後、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。ミクロトームを用いて 5 μm の切片を作製した後、トルイジンブルーで染色し観察した。

II-7-3. 透明化処理

試料をエタノールと酢酸を 9:1 に混合した溶液中で 4 °C、一晚固定した後、エタノールシリーズにより水和した。その後、抱水クロラル溶液 (抱水クロラル 8 g, 50%グリセロール 2 ml, 滅菌水 1 ml) を用いて透明化を行なった。

II-7-4. アニリンブルー染色による観察

芽生えの茎頂部を観察するために、Bougourd らの方法に従いアニリンブルー染色による観察を行なった (Bougourd et al., 2000)。ただしサンプルのマウン

トには抱水クロラル溶液を用いた。観察には共焦点顕微鏡 FV1000 (Olympus) を用いた。

II-8. 発現解析

II-8-1. *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析

発芽 5 日目の芽生えを PFA 固定液 (4 % パラホルムアルデヒド, 26 mM NaCl, 1.4 mM Na₂HPO₄, 0.6 mM NaH₂PO₄) に浸透し、脱気後 4 °C で 1 晩固定した。固定した試料を脱水およびパラフィン包埋処理され、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ガラスに貼り付けた。ハイブリダイゼーションは基本的に Takada らの方法に従い (Takada et al., 2001)、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 T7RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写系で合成した。

STM 特異的アンチセンスプローブは以前に報告されているものを用いた (Long et al., 1996)。

WUS 特異的アンチセンスプローブの作製のため、WUS cDNA の開始コドンから *SpeI* サイトまでをプラスミドにクローニングしたものを鋳型とした。

II-8-2. β-glucuronidase (GUS) 染色と観察

試料を 90 %アセトンで 15 分間処理した後、GUS 染色液 (0.5 mg/ml X-gluc, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 0.1 % Triton X-100, 100 mM NaPO₄ (pH 7.0), 10 mM EDTA) に移して脱気した。脱気後、組織を GUS 染色液中に 37 °C、暗所にて適切な時間インキュベートし GUS 染色を行った。染色後、組織を 70%エタノール中に移し色素が十分抜けるまで約 1 晩脱色、固定した。その後、抱水クロラル溶液中にマウントし、観察を行った (Takada et al., 2001)。

II-8-3. リアルタイム RT-PCR 法による解析

1. RNA の抽出

植物体を液体窒素中で凍結させ、QIAGEN 社の Tissue Lyser システムを用いて破碎した。得られたサンプルから RNA を抽出した。RNA の抽出は QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit を用い、同社のプロトコルに従った。

2. DNA の除去と逆転写反応

1 μ g の total RNA から DNase I Amplification Grade (Invitrogen) を用いて DNA を除去した。続いて SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase を用いて SuperScript™ Preamplification System のプロトコルに従い、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして逆転写反応を行った。この反応液を 6 倍希釈し、リアルタイム RT-PCR に用いた。

3. リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR には LightCycler (Roche Diagnostics 社) を使用した。TaKaRa 社の SYBR® *Premix EX Taq*™ (Perfect Real Time) を使用し、同社のプロトコルに沿って行った。使用したプライマーセットを以下に示す。

<i>STM</i> :	F	5'-CCTAAAGAAGCTCGTCAACAACACT-3'
	R	5'-GGCGAGCTTTTGTGCTC-3'
<i>WUS</i> :	F	5'-GCGATGCTTATCTGGAACAT-3'
	R	5'-CTTCCAGATGGCACCACACTAC-3'
<i>CLV3</i> :	F	5'-GTTCAAGGACTTTCCAACCGCAAGGTTA-3'
	R	5'-CCTTCTCTGCTTCTCCATTTGCTCCAACC-3'
<i>PNY</i> :	F	5'-GTGGGTCGTGGGATTTACAC-3'
	R	5'-CATCAGAAACACCGCAGAGA-3'
<i>BP</i> :	F	5'- AACCAAAGAAAGCGTCACTG -3'
	R	5'-CATCACCCATGTAATGACCA-3'
<i>IPT7</i> :	F	5'-AACCTAACGGCCACCCAGTA-3'
	R	5'-TGTTGTTTCGCTGAGAGTTTCGA-3'
<i>AtGA20ox1</i> :	F	5'-AGCGAGGAGCTTATTTTCAGA-3'
	R	5'-GTTTTTCGGAGAGAGGCATA-3'
<i>TUB4</i> :	F	5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3'
	R	5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA-3'

II-9. 酵母を用いたタンパク質間の相互作用能の解析

II-9-1. 野生型 *STM*、*gor* 変異型 *STM* および *AtMPB2C* の全長 CDS の pGAD424 および pGBT9 へのクローニング

野生型STM、gor変異型STMおよびAtMPB2Cの全長CDSを野生型またはgor変異体に由来するcDNAを鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用いたPCRにより増幅した。PCRには以下のプライマーセットを用いた。

STM-EcoRIY2H 5'-GAAAGAATTCATGGAGAGTGGTTCCAACAGC-3'

STMcdDNA-BamHI 5'-ACCCGGGATCCTCAAAGCATGGTGGAGGAG-3'

AtMPB2C-EcoRIY2H 5'-GACGGAATTCATGTATGAGCAGCAGCAAC-3'

AtMPB2CcDNA-BamHIY2H

5'-TGAGGATTCCTTAATATGTAAAGGCTAGTGATTGC-3'

増幅された断片をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いてpCR-BluntII-TOPOにクローニングした。このプラスミドに対し制限酵素EcoRIおよびBamHIで処理することで全長CDSを含む断片を得た。その後、全長CDSを含む断片をpGAD424およびpGBT9にクローニングすることでpSTM-GAL4-AD、pSTM^{gor}-GAL4-AD、pATMPB2C-GAL4-AD、pSTM-GAL4-BD pSTM^{gor}-GAL4-BDおよびpATMPB2C-GAL4-BDが完成した。

II-9-2. 酵母への形質転換

完成したコンストラクト、また Harley Smith博士より分与していただいたpPNY-GAL4-BD (pBD-GAL4 Camに由来する; Kanrar et al., 2006) およびpPNY-GAL4-AD (pAG-GAL4-2.1に由来する) を以下の組み合わせで酵母へ形質転換した。

- STMおよびgor変異型STMタンパク質とPNYタンパク質の相互作用能の検定

Prey	Bait
pSTM-GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD
pSTM-GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pSTM-GAL4-AD	pPNY-GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pPNY-GAL4-BD
pPNY-GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD
pPNY-GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pPNY-GAL4-AD	pPNY-GAL4-BD

- STMおよびgor変異型STMタンパク質とAtMPB2Cの相互作用の検定

Prey	Bait
pSTM-GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD

pSTM-GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pSTM-GAL4-AD	pATMPB2C-GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pSTM ^{gor} -GAL4-AD	pATMPB2C-GAL4-BD
pATMPB2C-GAL4-AD	pSTM-GAL4-BD
pATMPB2C-GAL4-AD	pSTM ^{gor} -GAL4-BD
pATMPB2C-GAL4-AD	pATMPB2C-GAL4-BD

形質転換は Fast Yeast Transformation Kit (G-Biosciences/Genotech) を用い、同社のプロトコルに従って行なった。酵母は AH109 株を用いた。

II-9-3. Yeast two-hybrid アッセイおよび β -ガラクトシダーゼ活性測定

タンパク質間の相互作用能の検定は、以前に記述された方法に従って行なった (Fukaki et al., 2005)。

II-10. 抗 STM 抗体を用いたウェスタンブロット解析

II-10-1. 抗 STM 抗体の作製

抗 STM 抗体の作製に用いたペプチドは STM と STM のホモログタンパク質とを比較し、STM タンパク質中のアミノ酸配列の特異性、表面への露出性などを検討した後 (図 26.)、STM タンパク質のホメオドメイン前方の 232-248 (CETAIDRNNNGSSEEEVD) アミノ酸および N 末端に近い 39-55 (CHHGHQDHQHQQQEHDGYA) アミノ酸のペプチド配列を用いることにした。この 2 つの抗原部位はナンセンス変異である *stm-1* 変異や *stm-bum1-3* 変異の部位より N 末端側に位置する (図 18.C)。また、図 26.中に示す Robson and Gamier の文字列はアミノ酸配列から予測したタンパク質の二次構造 (H; α ヘリックス E; β ストランド C; ランダムコイル T; ターン)、Second structure の文字列は構造既知のタンパク質とのマルチプルアライメントから予測したタンパク質の二次構造 (H; α ヘリックス E; β ストランド L; ループ)、Accessibility の文字列は溶媒との接触率 (e; 接触率大 b; 接触率小)、そして Total の値は二次構造予測、Accessibility、Flexibility (柔軟性)、surface probability (表面への露出のしやすさ)、Antigenicity (抗原性)、Hydrophilicity (親水性)、および Dipole (極性)の全てを統合した予想抗原性を意味する。抗原となるペプチドの作製およびウサギによる抗血清の作製は MEDICAL and BIOLOGICAL

LABORATORIES CO.,LTD (Nagoya, Japan) に依頼した。

II-10-2. GST 融合 STM タンパク質発現ベクターのコンストラクション

野生型 *Ler* に由来する cDNA を鋳型とし、以下のプライマーセットを用いて増幅した *STM* の全長 CDS をクローニングしたプラスミドが、当研究室において既に作製されていた。

STMcdDNA-Bamh1F 5'-ACCCGGGATCCGAGAAGATGGAGAGTGGTT-3'

STMcdDNA-BamH1R 5'-ACCCGGGGATCCTCAAAGCATGGTGGAGGAG-3'

このプラスミドを *Bam*HI で処理することで、*STM* の全長 CDS を含む断片を得た。その後、全長 CDS を含む断片を pGEX6P-1 (GE healthcare) にクローニングすることで GST-STM 発現ベクターが完成した。

II-10-3. GST 融合 STM タンパク質の発現の発現誘導

完成した GST-STM 発現ベクター、および発現誘導のポジティブコントロールとして pGEX6P-1 空ベクターを大腸菌 BL21 株に形質転換した。発現誘導には 0.3 mM の Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を用いた。

II-10-4. 植物体からの全タンパク質の抽出

全タンパク質を抽出するサンプルとして、発芽後 7 日目の芽生えの根および子葉を切除した胚軸を含む茎頂部を約 50 mg 用いた。液体窒素で凍結させたサンプルを QIAGEN 社の Tissue Lyser システムを用いて破碎した。1000 μ l の 2 \times SDS サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 2 % 2-mercaptoethanol) を加えボルテックスでよく攪拌した後、サンプルを新しいチューブに移し替え、80 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。その後 15000 rpm、25 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し上清を回収し、これを全タンパク質抽出液とした。

II-10-5. ウェスタンブロット解析

10 % ポリアクリルアミドゲルを作製し、試料をアプライした後 20 mA (ゲル 1 枚あたり) の定電流で電気泳動を行なった。その後 15V の定電圧でゲル内のタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon; MILLIPORE 社) にセミドライ方式で転写した。この PVDF 膜を 1 時間、MT-TBS (5 % skim milk, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% Tween20) でブロッキングした後、T-TBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% Tween20) で液を交換しながら 5 分、15 分、5 分間振盪洗浄した。TBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM

Tris-HCl (pH 7.4) で 5 分間振盪洗浄した後、抗 STM 抗体を 1:1000 で希釈した MT-TBS を用いて振盪させながら 1 時間、常温で一次抗体反応を行なった。その後、先ほどと同様に T-TBS および TBS を用いて振盪洗浄した後、ECLTM Anti Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (from donkey) (GE healthcare) を 1:10000 で希釈した MT-TBS を用いて振盪させながら 1 時間、常温で二次抗体反応を行なった。バンドの検出には ECL Plus (GE healthcare) を使用し、LAS-1000 (FUJIFILM) を用いて化学蛍光画像を取得した。

III. 結果

III-1. *gorgon*変異体の形態学的解析

III-1-1. シロイヌナズナ劣性変異体*gorgon*

gorgon (*gor*) 変異体は、生殖成長期における地上部器官の形成に様々な異常を示す劣性の変異体として単離された。花茎先端部に形成される花や枝 (後述) がギリシャ神話に登場する蛇の髪を持つ女神ゴルゴンを思い起こさせることから、この変異体は*gorgon*変異体と名付けられた。

野生型植物体は生殖成長期に移行すると花茎を伸長させ、そして花茎先端部から花芽を連続して形成し続ける (図2.A, B)。また、生殖成長期にはロゼット葉および茎生葉の腋において形成された腋芽分裂組織から二次シュートが発達する (図2.B矢印)。一方、*gor*変異体では抽臺が野生型よりもわずかに遅れて開始される傾向があるが、花茎の伸長速度には顕著な異常は観察されなかった (図2.C)。しかし、抽臺後しばらくの間は花茎先端には明確な花芽は形成されずに突起状の構造物が形成され、花茎先端部が徐々に肥大化していった (図2.D)。その後、肥大化した先端部から多数の花や枝がほぼ同時に形成された (図2.E, F)。これらの枝の中には、枝同士が融合しているものも観察された (図2.G)。さらに*gor*変異体においては、ロゼット葉や茎生葉が正常に形成されるものの、その腋からは二次シュートがほとんど形成されなかった (図2.C矢印)。

III-1-2. 生殖成長期における*gor*変異体の表現型解析

*gor*変異体の生殖生長期は、その表現型から2つの発達段階に分けることができると考えられる。生殖生長期の初期では、肥大化した花茎先端部から花芽が形成されずに、突起状構造物が形成される。生殖生長期の後期では、花茎先端から複数同時に花や枝が形成される。このような表現型は、茎頂分裂組織に異常が生じていることに起因するのではないかと推測した。このことについて調べるため、2つの発達段階についてそれぞれ茎頂分裂組織を含む茎頂部や、そこから形成された器官の形態学的解析を行った。

III-1-2-1. 生殖成長期の初期における*gor*変異体の表現型解析

まず、抽臺開始直後の花茎を用いて生殖生長期の初期における*gor*変異体の表現型解析を行なった。この時期の野生型植物体の花茎先端部では、茎頂分裂組織を中心にして周辺部から花芽分裂組織がらせん状に連続して形成され (図3.A)、各花芽分裂組織からは花器官が形成される (図3.A矢印)。またこの様な

らせん状を示す花序のパターンは、花茎が伸長して花芽の形成が停止するまで維持される。一方、抽臺開始直後の*gor*変異体では、花茎先端の周辺部から複数の突起状の構造物が形成されていたものの、野生型植物体で観察される様ならせん状の花序は示しておらず、突起状の構造物からは花器官が形成されていなかった (図3.B矢尻)。また*gor*変異体における花茎先端中央部の領域は、野生型植物体の茎頂分裂組織と比較して著しく拡大していた (図3.B)。

*gor*変異体における肥大化した茎頂部、およびそこから形成された突起状の構造物についてより詳細に解析するために、レポーター遺伝子を用いた発現解析を行なった。まずは、分裂組織において幹細胞が含まれる領域で発現する*ProCLAVATA3::GUS (ProCLV3::GUS)* について解析を行なった。*ProCLV3::GUS*の活性は、野生型植物体の花茎先端部において茎頂分裂組織の中央部で観察された (図4.A)。また、発生初期の花芽分裂組織では*GUS*の活性は検出されなかったが、花芽の発生が進むと花芽分裂組織の中央部で再び活性が検出された (図4.A矢尻)。一方、*gor*変異体においては花茎先端の肥大化した中央部でのみ*ProCLV3::GUS*の活性が観察され、周囲の突起状の構造物では*GUS*の活性は観察されなかった (図4.D)。次に、花芽において強く発現するレポーター遺伝子である*ProLFAFY::GUS (ProLFY::GUS)* について調べたところ、このレポーターの活性は、野生型植物体において茎頂分裂組織ではほとんど観察されなかったが、花芽分裂組織および花器官の基部において主に観察された (図4.B)。一方、*gor*変異体においては*ProLFY::GUS*の活性は花茎先端の中央部ではほとんど観察されず、突起状の構造物でのみ観察された (図4.E)。また、*ProAGAMOUS::GUS (ProAG::GUS)* の活性は野生型植物体においては茎頂分裂組織では検出されず、花芽分裂組織でのみ検出された (図4.C)。一方、*gor*変異体においては*ProAG::GUS*の活性が花茎先端の中央部でのみ観察され、突起状の構造物では全く観察されなかった (図4.F)。

以上の解析から、*gor*変異体の花茎先端部の性質を以下の様に考えることができる。*gor*変異体の花茎先端の肥大化した中央部の領域では*ProCLV3::GUS*の活性が検出されることから、この領域は茎頂分裂組織としてのアイデンティティを有していると考えられる。しかしながら、同じ領域において異所的に*ProAG::GUS*の活性が検出されるため、*gor*変異体の茎頂分裂組織は、野生型植物体のものと完全に同一の性質を有するわけではないだろう。また、*gor*変異体の突起状の構造物においても野生型植物体の花芽分裂組織と同様に*ProLFY::GUS*の活性が検出されることから、この構造物は花芽分裂組織としてのアイデンティティを有していることが示唆される。しかし、突起状の構造物は花器官を形成しない。また、*CLV3*の発現は分裂組織における幹細胞の活性と

相関があることが報告されているが (Brand et al., 2000; Reddy and Meyerowitz, 2005)、*gor*変異体における突起状の構造物では*ProCLV3::GUS*活性が検出されない。このことから、突起状の構造物では幹細胞の確立に異常が生じており、そのために花器官を形成できないという可能性が考えられる。また、花芽分裂組織における幹細胞の確立には*WUS*の活性化が必要であることや、*AG*や*CLV3*の発現が*WUS*によって誘導されることが報告されている (Schoof et al., 2000; Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001)。そのため、突起状構造物における*ProCLV3::GUS*や*ProAG::GUS*の活性の欠失は、この構造物において*WUS*が発現しないことを示唆しているのかもしれない。

III-1-2-2. 生殖成長期の後期における*gor*変異体の表現型解析

花茎の伸長が更に進むと、*gor*変異体の花茎先端部では突起状の器官が形成される領域が茎頂の中央部に向かって拡大し、逆に中央部の茎頂分裂組織に相当する領域が縮小していった (図3.C, D)。やがて花茎先端の表面全体から、花や枝の原基が不規則な配置で形成された (図3.E)。そこで、生殖成長期の後期において*gor*変異体から形成された花についての形態学的解析を行なった。野生型植物体の花器官は、花芽分裂組織の外側から順に4つの同心円 (ウォール) 上に形成される。一番外側の第1ウォールからは4枚のがく片、第2ウォールからは4枚の花弁、第3ウォールからは6本の雄ずい、最も内側の第4ウォールからは2枚の心皮が形成される (図5.A-D)。心皮は融合して1つの雌ずいを形成し (図5.E 矢印)、その内部には胚珠が生じる。野生型植物体では一番内側の雌ずいが形成されると花芽分裂組織の活性が停止する (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001)。一方、*gor*変異体ではほぼ全ての花に顕著な形態異常が観察された。各花の表現型にはばらつきが見られたが、その多くは以下の二種類に大別された。一つは、ほぼ全ての花器官が心皮状の器官へと変化したものである (図5.F)。このタイプの花では、それぞれの花器官が先端部に柱頭状の構造を持ち、周縁部に胚珠状の器官を持つ。また、各ウォールから形成される器官の数が一定ではなく、配置が大きく乱れるため、明瞭な同心円状のウォール構造を示さない場合もあった。もう一つのタイプの花は、各ウォールの花器官のアイデンティティには大きな変化が見られないが、器官の数や形態が一部変化したものである。これらの花では野生型同様に第1ウォールにがく片が形成されるものの、がく片同士の融合がまれに観察された。また、第2ウォールでは花弁の数が減少する傾向があり、しばしばフィラメント状の器官が形成された (図5.G)。第3ウォールでは雄ずいの数が減少する傾向があり、まれに開裂しない葯を持つ雄ずいが形成された。第4ウォールでは開裂した心皮からなる雌ずいのような器

官が形成された。このように、それぞれのタイプの花の表現型は大きく異なっていたが、両者に共通した表現型も観察された。どちらのタイプの花でも、中央部に開裂した心皮状の器官が形成された後、野生型植物体の花のように花芽分裂組織の活性が停止することは無く、その内側から新たな花器官や花の様な器官が形成された (図5.H, I)。

以上の解析から、*gor*変異体の生殖成長期における2つの発達段階は次の様に特徴づけられる。1) 生殖成長期の初期では花茎先端部に肥大化した茎頂分裂組織が形成されるとともに、正常な花芽や側枝の形成が阻害される。2) 生殖成長期の後期では茎頂分裂組織から花芽が形成されるものの、個々の花芽では分裂組織の適切な停止ができずに心皮の内側から新たな花器官が形成される。

III-1-3. 栄養成長期における*gor*変異体の表現型解析

*gor*変異体における形態異常がいつから生じているのかを調べるため、発芽直後から栄養成長期についての詳細な観察を行なった。

発芽後直後の*gor*変異体の芽生えにおいては外観的な異常は観察されない (図6.A, D)。しかし、透明化処理を行ない、茎頂分裂組織を中心に観察を行なったところ、*gor*変異体の茎頂分裂組織は野生型植物体のものよりも大きいことが明らかになった (Data not shown)。そこで、より詳細な観察のために、アニリンブルー染色を用いた共焦点顕微鏡による解析を行なった (図6.B, E)。茎頂分裂組織のほぼ中央部を通過する縦断光学切片を作製し、そこに含まれる茎頂分裂組織の面積を野生型植物体と*gor*変異体とで比較した。その結果、発芽直後の*gor*変異体の芽生えにおいて、茎頂分裂組織のサイズが野生型植物体の約2倍に拡大していることが明らかになった (図6.G, H)。なお、ここでは茎頂分裂組織の領域を決める指標として、茎頂分裂組織に含まれる未分化な細胞は、小さく、細胞質を多く含む細胞であることを利用した。発芽後10日目の栄養成長期の植物体についてもテクノビットを用いた縦断組織切片を作製して観察を行った。野生型植物体の茎頂分裂組織はトルイジンブルーに対して染色性が高い小型の細胞からなり、L1、L2、L3の3層から成る整然とした層構造を示していた (図6.C)。一方、*gor*変異体の茎頂分裂組織ではL2、L3層に相当する明確な細胞層は観察されなかった。また、染色性が高い小さな細胞の占める領域が野生型に比べて特に下部方向へ拡大していた (図6.F)。以上から、*gor*変異体における茎頂分裂組織の肥大化が発芽直後から既に生じていることが明らかになった。

次により発生初期段階の影響を調べるため、走査型電子顕微鏡を用いて成熟胚の茎頂分裂組織を観察した。*gor*ヘテロ接合体より得られた次世代の成熟胚 ($n=45$) を観察したが、顕著に茎頂分裂組織のサイズが変化している個体は観察

されなかった。また、茎頂分裂組織で活性を示すマーカー遺伝子である *ProSHOOT MERISTEMLESS::GUS (ProSTM::GUS)* を用いて観察を行なったところ、*gor*ヘテロ接合体より得られた次世代の心臓型胚 (図7.A; 野生型植物体由来 n=11, 図8.B; *gor*ヘテロ接合体由来 n=24) および子葉屈曲期胚 (図7.C; 野生型植物体由来 n=10, 図8.D; *gor*ヘテロ接合体由来 n=23) においてGUSの活性が検出される領域が野生型と大きく異なるものは観察されなかった。以上の結果より、*gor*変異体において観察される茎頂分裂組織の異常は茎頂分裂組織が形成された後、胚発生の終結以降に生じることが明らかになった。

次に、*gor*変異体における栄養成長期の器官形成について解析するために、ロゼット葉の形成について観察を行なった。茎頂分裂組織の観察と同様アニリンブルー染色による共焦点顕微鏡像を用い、発芽直後の芽生えの第1、2葉の原基の面積を比較すると、*gor*変異体における第1、2葉の原基のサイズは野生型植物体の約2/3に減少していることが明らかになった (図6.B, E, G, H)。野生型のシロイヌナズナは発芽後に一対の子葉および第1、2葉を十字の配置に展開させる。その後、栄養成長期に形成されるロゼット葉はらせん状の葉序を示す (図8.A, B)。また、発芽直後の*gor*変異体の芽生えにおいても野生型と同様に子葉および第1、2葉が十字の配置に展開した。そしてその後、ほぼ全ての個体で葉序の乱れは観察されず、らせん状の葉序を示したが、まれにロゼット葉の第3~6葉が十字対生を示す個体も観察された (図8.C, D)。

以上の解析から、*gor*変異体においては、胚発生前より後に茎頂分裂組織の肥大化、および器官形成のわずかな遅延が生じることが明らかになった。

III-2. *gor*変異体の原因遺伝子の同定

III-2-1. マッピングおよびシーケンスによる解析

*gor*変異体の原因遺伝子を同定するために、前任者である当研究室の新濱氏によって生殖成長期の表現型に基づいた原因遺伝子のマッピングが行なわれた。その結果、*gor*遺伝子座は1番染色体南側の4つのBAC; F19K23、F24O1、T3P18、F23N19に含まれる64遺伝子内に存在することが明らかになった。これらの遺伝子の一部についてシーケンスを行なった結果、*gor*変異体には*At1g62360; SHOOT MERISTEMLESS (STM)* 遺伝子のコード領域において1塩基の置換 (コード領域上で1016番目の塩基であるGからAへの置換; *G1016A*) が生じていることが明らかとなった (図9.)。前任者による配列解析はコード領域に限られていたため、今回新たに*STM*コード領域の上流約7.6kb、下流約0.8kbおよびイント

ロンについてもシーケンスを行なった。その結果、この領域での変異箇所はコード領域内の*G1016A*変異のみであることが明らかとなった。

*STM*タンパク質はDNA結合ドメインであるホメオドメインを持つ転写因子である。ホメオドメインには3つのヘリックスが含まれ、そのうち3番目のヘリックスはDNAの認識部位として機能することが報告されている (Gehring et al., 1994; Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001; Chi, 2005)。*gor*変異体ではこの3番目のヘリックス内で高度に保存されているアミノ酸の1つに置換が起きていた (図9.B; 339番目のアルギニン (R) のリシン (K) への変異 (R339K))。

これまでに数多くの機能喪失型の*STM*アレルが単離されており、いずれの変異体においても茎頂分裂組織を全く形成しない、または形成しても適切に維持できないことが報告されている (Barton and Poethig, 1993; Endrizzi et al., 1996; Felix et al., 1996; Long and Barton, 1998; Jasinski et al., 2005; Kanrar et al., 2006)。一方、*gor*変異体では*STM*遺伝子上に1塩基の置換が認められるものの、既知の*stm*変異体において観察される表現型とは全く異なり、茎頂分裂組織が肥大化する。そこで、*gor*変異体の表現型が*STM*遺伝子上の*G1016A*変異に起因するかどうかを調べるため、既知の機能喪失型*stm*劣性変異体と*gor*変異体を用いたアレリズムテスト、野生型*STM*ゲノム断片を用いた相補性試験および*G1016A*変異型*STM*ゲノム断片を用いた表現型再現実験を行った。

III-2-2. アレリズムテストによる解析

まず、*STM*の強い変異アレルである*stm-1*変異体を用いてアレリズムテストを行なった。*stm-1*変異体は*Ler*系統から得られたアレルであり、*Col*系統の変異体である*gor*とは遺伝的背景が異なる。そこで、アレリズムテストを行なうにあたり、変異体の背景を可能な限り合わせるために*stm-1*変異体を*Col*に5回バッククロスした植物体 (*stm-1C*変異体) を作製した。*Col*背景の*stm-1C*変異体においても*Ler*背景の*stm-1*変異体の様に子葉柄同士の融合が観察された (図10.A)。一方、*stm-1*変異体は発芽後ほとんど葉を形成しないが、*stm-1C*変異体は*stm-1*変異体よりも若干表現型は弱く、芽生えにおいて茎頂分裂組織が欠失または大きく減少するものの、再び葉を不連続に形成した。そして葉の形成の再開と停止を繰り返しつつ成長し、やぶ状の外観を示した (図10.B)。その後、*stm-1C*変異体は花茎を伸長させ、花を形成した (図11.C)。しかし、規則正しい花序は示さず、また、全ての花器官を形成する前に花芽分裂組織の活性が失われるために、雌ずいを欠いた花が形成された (図10.D)。また、*stm-1C*変異体においては葉や花柄どうしの融合も観察された。次に、*stm-1C*ヘテロ接合体と*gor*ヘテロ接合体を交配し、*STM*遺伝子上に両方の変異をヘテロに持つF1植物体 (*stm-1C/G1016A*)

を作製した。*stm-1C/G1016A*植物体の芽生えは、*stm-1C*変異体のような子葉柄の融合や茎頂分裂組織の欠失といった異常は示さず、*gor*変異体や野生型植物体と同様に発芽後すぐにロゼット葉を展開し始めた (図10.E)。その後も茎頂分裂組織は活性を失うことなく連続してらせん状の葉序を示すロゼット葉を形成し、生殖成長期に移行するとそのまま抽臺した (図10.F, H)。しかし、花茎先端に形成された花芽では、*stm-1C*変異体の様に花柄どうしが融合しているものなどが観察され、また、野生型植物体のようならせん状の花序は示さなかった (図10.G)。*stm-1C/G1016A*植物体において形成された多くの花の中央部には2枚の心皮からなる雌ずいが存在したが、心皮は融合せずに開裂していた (図10.I, J)。この表現型は野生型植物体とは異なり *gor*変異体において形成される花と酷似している (図5.H)。以上の観察から *stm-1C/G1016A*植物体は、*stm-1C*変異体と *gor*変異体の両方の特徴をあわせもつ表現型を示すことが明らかとなった。

さらに、*stm-1*とは異なるアリルであるCol系統の *stm-bum1-3*変異体を用いて、*gor*変異体とのアレリズムテストを行った。*stm-bum1-3*変異体は *stm-1C*変異体と比較すると表現型は弱く、発芽直後に葉を数枚形成するまで葉の発生が停止することはない (図11.A)。しかし、既知の機能喪失型 *stm*変異体と同様に発生の途中で茎頂分裂組織が維持できないため、葉序が乱れてやぶ状の表現型を示す (図11.B, C)。また、花芽分裂組織の活性は雄ずいを形成すると失われるために、形成された花は雌ずいを欠いていた (図11.D)。一方、*STM*遺伝子上に *stm-bum1-3*変異と *G1016A*変異をヘテロに持つF1植物体 (*stm-bum1-3/G1016A*) は葉を展開し続け (図11.E)、やがて抽臺を開始した (図11.F)。*stm-bum1-3/G1016A*植物体の花茎では、*gor*変異体の花茎と同様に先端部の肥大化が生じ、突起状の器官が形成された (図11.G, H)。また、多くの花の中央には開裂した心皮が形成され、その内側からは新たな花器官や花が形成された (図11.I, J)。これらの観察から、*stm-bum1-3/G1016A*植物体も *stm-1C/G1016A*植物体と同様に、野生型植物体とは異なり、*gor*変異体に近い表現型を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、*stm-1*変異または *stm-bum1-3*変異を含むゲノムでは *gor*変異体の表現型を完全には回復できないことが明らかになった。このことより、*gor*表現型を引き起こす変異は *stm-1*変異および *stm-bum1-3*変異型 *STM* とアレリックであること、またこの変異が *G1016A*変異に対応することが強く示唆された。

III-2-3. 野生型 *STM* ゲノム断片および *G1016A* 変異型 (*gor* 変異型) *STM* ゲノム断片による解析

次にコーディング領域の上流4.4kbおよび下流0.8kbを含む約8.1kbの野生型 *STM* ゲノム断片 (*genomic STM^{wt}*) を用いた相補性試験を行った。まずは *genomic*

STM^{wt} が機能的なゲノム断片であるかどうかを確かめるため、*stm-1C*ヘテロ接合体に対して *genomic STM^{wt}* の形質転換を行なった。その結果、次世代で得られた *stm-1C* ホモ接合体の T1 形質転換体は、全て野生型同様の表現型を示した (Data not shown)。このことから *genomic STM^{wt}* が機能的であることが確認された。そこで、この *genomic STM^{wt}* を *gor* ヘテロ接合体に対して形質転換し、T1 世代において独立した 10 ラインの *gor* ホモおよびヘテロ接合体を得た。全てのラインから得られた T2 世代の *genomic STM^{wt}* 形質転換体のうち、内生の *STM* 遺伝子上に *G1016A* 変異をホモに持つ植物体を観察したところ、全てのラインから、*gor* 変異体の表現型を示さずに、野生型植物体と見分けがつかない植物体を得られた (図 12.A, C)。以上の結果より、野生型 *STM* ゲノム断片により *gor* 変異体の表現型が完全に相補されることが示された。

最後に、*gor* 変異体において同定された *STM* 遺伝子上のミスセンス変異 *G1016A* が *gor* 表現型の原因であるかどうかを確かめるため、相補性試験に用いたゲノム断片に *G1016A* 変異が導入された *STM* ゲノム断片 (*genomic STM^{G1016A}*) を作製し、*stm-1C* ヘテロ接合体に対して形質転換を行なった。次世代以降に得られた独立した 7 ラインの *stm-1C* ホモ接合体の *genomic STM^{G1016A}* 形質転換体において、生殖成長期の初期における茎頂部の肥大化や、突起状の器官の形成、生殖成長期の後期における花茎先端部からの複数同時に生じる花や枝の形成など、*gor* 変異体と同様の表現型が観察された (図 12.B, D)。以上の結果より、*G1016A* 変異型 *STM* ゲノム断片により *gor* 変異体の表現型が引き起こされることが示された。一方、*genomic STM^{G1016A}* が野生型背景や *stm-1C* ヘテロ接合体背景に形質転換された植物体は野生型植物体と見分けがつかなかった (Data not shown)。このことから *gor* アリルは野生型 *STM* アリルに対して劣性であることが示された。

ここまでの結果より、*STM* 遺伝子のコード領域上のミスセンス変異 *G1016A* が実際に *gor* 表現型の原因であり、また、*gor* アリルは既知の機能喪失型 *stm* アリルとは全く異なる影響を茎頂分裂組織の発生に与える *STM* の新奇アリルであることが明らかになった。

III-3. *gor* 変異体における茎頂分裂組織関連遺伝子の発現パターンの解析

III-3-1. 定量的リアルタイム RT-PCR 法による解析

gor 変異と *stm* 変異が茎頂分裂組織の機能に与える影響の違いをより詳細に調べるため、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて茎頂分裂組織の形成と維持

に関わる遺伝子の発現量を比較した。サンプルには発芽後5日目の野生型植物体、*gor*変異体および*stm-1C*変異体の芽生えの地上部全体から抽出したRNAを用いた。

まず、茎頂分裂組織のサイズを制御する主要な因子である*WUS*および*CLV3*について調べたところ、*gor*変異体における両遺伝子の発現量はそれぞれ野生型の約6.4倍および約2.1倍に増加していた (図13.)。一方、*stm-1C*変異体において*CLV3*の発現量は約0.3倍に減少していた (図13.)。*stm-1C*変異体において*WUS*の発現量は平均約3.7倍と増加を示したが、繰り返し実験における結果のばらつきが非常に大きかった (図13.)。このばらつきは*stm-1C*変異体において茎頂分裂組織および葉の形成が不規則かつ不完全に起きていることを反映しているのかもしれない。茎頂分裂組織において発現し、*STM*とともに茎頂分裂組織の維持に関与している*PENNYWISE (PNY)*および*BREVIPEDICELLUS (BP)* (Byrne et al., 2002; Byrne et al., 2003; Bhatt et al., 2004) の発現量は、それぞれ*gor*変異体において野生型植物体よりもわずかに増加していた (図13.)。一方、*stm-1C*変異体においてはこれらの遺伝子の発現量がそれぞれ野生型植物体の約0.5倍、0.8倍に減少していた (図13.)。植物ホルモンの一種であるサイトカイニンは細胞分裂を促進することで茎頂分裂組織の活性に対して正に機能すること、一方、ジベレリンは器官分化を促進することで茎頂分裂組織の維持に対して負に機能することが知られている (Riou-Khamlichi et al., 1999; Higuchi et al., 2004; Fleet and Sun, 2005)。そこで、それぞれのホルモンの生合成に関わり、*STM*によって発現が制御されていることが示唆されている*ISOPENTENYL TRANSFERASE7 (IPT7)* および *ARABIDOPSIS THALIANA GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1 (AtGA20ox1)* の発現量について比較を行った (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005)。*gor*変異体において*IPT7*の発現量が野生型の約1.6倍に、*AtGA20ox1*は約1.5倍に増加していた (図13.)。*stm-1C*変異体においては*IPT7*の発現量は3.7倍に増加し、*AtGA20ox1*の発現量は*stm-1C*変異体と野生型でほとんど差が見られなかった (図13.)。

以上の結果から、*gor*変異体と*stm-1C*変異体とでは茎頂分裂組織の形成・維持に関わる遺伝子や植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子の発現に与える影響が大きく異なることが明らかとなった。

III-3-2. *in situ* ハイブリダイゼーション法およびレポーター遺伝子による解析

定量的リアルタイムRT-PCR法による発現量の解析を行なった遺伝子のうち、*WUS*および*CLV3*の発現量の変動が*gor*変異体において特に大きかった。そこで、これらの遺伝子の*gor*変異体における空間的な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法およびレポーター遺伝子を用いた解析を行った。発現パターンを解析するサンプルは、定量的リアルタイムRT-PCR法の場合と同様に発芽後5日目の芽生えを用いた。

まず *WUS* 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。その結果、野生型植物体において *WUS* は茎頂分裂組織のほぼ中心部で、表層から数えて3~4層目に位置する形成中心で特異的に発現していた (図14.A; Mayer et al., 1998)。一方、*gor* 変異体における *WUS* の発現領域は、野生型植物体における発現部位よりも上方および側方へと拡大し、L2層に相当する領域まで達していた (図14.B)。

次に *CLV3* の発現領域をレポーター遺伝子である *ProCLV3::GUS* を用いて調べた。野生型植物体において、*GUS* の活性は茎頂分裂組織の中央部で観察された (図14.C)。この結果はこれまでに報告されている *CLV3* の発現パターンと一致している (Brand et al., 2002)。一方、*gor* 変異体においては *GUS* の活性が強く検出される領域が茎頂分裂組織の中央部だけでなく茎頂分裂組織の上部全体にまで拡大しており、また葉原基でも弱い活性が検出された (図14.D)。

以上の解析から、*gor* 変異体の茎頂部では茎頂分裂組織のサイズを調節する重要な因子である *WUS* および *CLV3* の発現領域が著しく拡大していることが明らかとなった。またこの結果は、それぞれの遺伝子の発現量の上昇を支持するものである。一方、既知の *stm* 機能喪失変異体においては *WUS*、*CLV3* の発現領域は減少もしくは消失することが報告されている (Mayer et al., 1998; Brand et al., 2002)。このことから、*gor* 変異体とその他の *stm* 変異体では茎頂分裂組織に与える影響が大きく異なることが示唆される。

III-4. *gor wus* 二重変異体および *gor clv3* 二重変異体の解析

シロイヌナズナの茎頂分裂組織においては、*WUS* と *CLV3* の発現の間に負のフィードバック制御が働き、*CLV3* が *WUS* の発現領域を制限することが報告されている (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。*gor* 変異体においては、*WUS* の負の制御因子である *CLV3* の発現量の増加および発現領域の拡大が観察されるにも関わらず、*WUS* の発現量の増加および発現領域の拡大が観察される。これらのことから、*gor* 変異体においては *WUS-CLV3* 間のフィードバックが正常に機能せず、そのために茎頂分裂組織の肥大化が起こるという可能性が示唆される。そこで、*gor* 変異体において *WUS* および *CLV3* が機能的であるかどうかを解析するため、*gor* 変異体との二重変異体を作製し解析した。

*WUS*の強い機能喪失変異体である*wus-1*変異体の芽生えにおいては、発芽後葉を2枚程度形成すると一旦成長が停止する (図15.B)。その後、茎頂分裂組織からは葉や分裂組織状の組織群の形成が不規則に起こり、*wus-1*変異体は葉の形成の再開と停止を繰り返しながら成長してやぶ状の外観を示す (Laux et al., 1996)。一方、*gor wus*二重変異体の芽生えは、発芽後に全く葉を形成せずに成長が停止した (図15.C)。その後も*gor wus*二重変異体は器官形成を再開することは無く、そのまま枯死した。さらに、*gor wus*二重変異体では、それぞれの単独変異体とは異なり、子葉の基部が融合するという*STM*の強い機能喪失型変異体とよく似た表現型が観察された (図15.A-C)。これらのことから、*gor*変異体において葉を連続して形成するためには*WUS*の機能が必須であることが明らかになった。また*wus-1*変異体背景においても野生型*STM*は葉を形成することができるが、*gor*変異型*STM*はその機能を失っていることが示された。

*CLV3*の強い機能喪失変異体である*clv3-2*変異体では茎頂分裂組織が一定のサイズに保たれずに肥大化してしまう (図15.E; Clark et al., 1995)。一方、*gor clv3*二重変異の茎頂分裂組織は、*gor*変異体や*clv3*変異体の単独変異体のものよりも拡大していることが明らかになった (図15.D, F)。このことから*gor*変異体においても*CLV3*は茎頂分裂組織のサイズを抑制するために機能していることが示唆された。

以上の解析の結果より、*gor*変異体においても*WUS*および*CLV3*は機能的であり、茎頂分裂組織のサイズを制御していることが示唆された。

III-5. *gor*変異が*STM*自身の発現に与える影響の解析

*gor*変異体において、*gor*変異が*STM*自身の発現におよぼす影響を調べるため、定量的リアルタイムRT-PCR法を用いて*STM*遺伝子の発現量を比較した。サンプルには、発芽後5日目の芽生えの地上部全体から抽出したRNAを用いた。その結果、*gor*変異体における*STM*の発現量は野生型の約3.2倍に増加していた (図13.)。一方、既知の機能喪失型*stm-1C*変異体においては*STM*の発現量が野生型植物体の約0.4倍に減少していた (図13.)。

次に*gor*変異体における*STM*の空間的な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法およびレポーター遺伝子を用いた解析を行った。発現パターンを解析するサンプルは、リアルタイムRT-PCR法の場合と同様に発芽後5日目の芽生えを用いた。まず*STM*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ところ、野生型植物体において*STM*は茎頂分裂組織においてのみ発現し、葉原基では発現が消失していた (図16.A)。一方、*gor*変

異体においてSTMの発現領域は茎頂分裂組織全体および、茎頂分裂組織の下方の維管束付近にまで拡大していた。しかし、葉原基では野生型植物体同様にSTMの発現が消失していた (図16.B)。同様の解析をgorヘテロ植物体においても行なったが、野生型植物体との違いは観察されなかった (図16.C)。ProSTM::GUSを用いた解析でもほぼ同様の結果が得られた。ProSTM::GUSの活性は、野生型植物体の芽生えにおいて、茎頂分裂組織およびその側方に隣接する領域で検出された (図16.D)。また、これらの領域のうち、茎頂分裂組織の中央および葉原基におけるGUSの活性は弱く、茎頂分裂組織と葉原基の境界部では逆に強い傾向が見られた。一方、gor変異体では茎頂分裂組織とその側方に隣接する領域で野生型植物体と同様にGUSの活性が検出され、さらに茎頂分裂組織の下方にまでその領域が大きく拡大していた (図16.E)。

これらの結果から、gor変異によってSTM自身の発現量が増加し、発現領域が大きく拡大すること、これらの表現型はgorホモ植物体においてのみ観察されることが示された。

III-6. gor変異体におけるSTMタンパク質の発現解析

gor変異体におけるSTMタンパク質の発現を解析するために、本研究では抗STM抗体を作製した。そのため、シロイヌナズナに存在するSTM以外のKNOXタンパク質とSTMとを比較し、STMタンパク質に特異性が高く、かつタンパク質の表面に露出していると予想される2カ所のアミノ酸配列を抗原として用いた (図26.)。抗STM抗体の活性および特異性を評価するために、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 融合STMタンパク質 (GST-STM) の発現ベクターを作製し、大腸菌BL21株で発現させ、大腸菌から抽出した全タンパク質に対して抗STM抗体および抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行なった。その結果、どちらの抗体でもGST-STMの予想分子量である68~75 kDa (STMタンパク質; 42~49 kDa, GST; 26 kDa) の位置に特異的なバンドが検出された (図17.)。この結果より、抗STM抗体はSTMタンパク質を特異的に認識する機能的な抗体であると考えられる。

次に、発芽後7日目の野生型植物体、gor変異体、stm-11変異体、stm-1C変異体およびstm-bum1-3変異体のそれぞれの芽生えを用い、胚軸を含む茎頂部から全タンパク質を抽出して、抗STM抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行なった。その結果、野生型植物体から抽出したタンパク質では全長のSTMタンパク質の予想分子量である42~49kDaの位置にバンドが検出された (図18.A)。またミスセンス変異体であるgor変異体から抽出したタンパク質で

も野生型植物体と同様の位置にバンドが検出された (図18.A, C)。一方、ナンセンス変異体であるその他の*stm*変異体から抽出したタンパク質では、42~49kDaの位置にも、C末端を欠失したSTMタンパク質の予想分子量の位置にもバンドが検出されなかった (図18.A, C)。以上の結果から、*stm*機能喪失変異体においてはC末端側を欠失したSTMタンパク質の蓄積は検出感度以下に減少しているが、*gor*変異体においては野生型と同程度にまでSTMタンパク質が蓄積していることが明らかになった。

III-7. *gor*変異型STMとPNYとの相互作用の解析

*PNY*はBELL型ホメオドメインタンパク質ファミリーに属するタンパク質をコードしており、*PNY*タンパク質はSTMタンパク質と直接結合することが報告されている (Byrne et al., 2003; Kanrar et al., 2006; Rutjens et al., 2009)。*pny*単独変異体においては茎頂分裂組織の欠失は生じず、葉序や節間のわずかな乱れが観察されるのみである。しかし、*pny*変異は*stm*変異体の弱いアリの表現型を強め、茎頂分裂組織の欠失など強い機能喪失型*stm*変異体の表現型を引き起こすことから、*PNY*はSTMと共に茎頂分裂組織の形成・維持および生殖成長期の器官形成に機能することが示唆されている (Byrne et al., 2003; Smith and Hake, 2003; Bhatt et al., 2004; Kanrar et al., 2006; Rutjens et al., 2009)。そこで、*gor*変異がSTMとPNYの関係に与える影響について調べるため、タンパク質間相互作用および二重変異体における表現型について解析した。

III-7-1. Yeast two-hybrid法を用いた解析

Yeast two-hybrid法を用いて*gor*変異がSTMとPNYのタンパク質間相互作用に及ぼす影響を調べた。その結果、*gor*変異型STMタンパク質は野生型STMタンパク質と同様にPNYタンパク質との相互作用能を保持していることが示された (図19.A, B)。また、β-ガラクトシダーゼ活性測定の結果、*gor*変異型STMタンパク質は野生型STMタンパク質よりも強くPNYタンパク質と相互作用する可能性も示唆された (図19.C)。

III-7-2. *gor pny*二重変異体の観察

*gor*変異がSTMとPNYの遺伝的相互作用におよぼす影響および*gor*変異型STMタンパク質とPNYタンパク質が植物の発生に与える影響を調べるために、*gor pny*二重変異体を作製し、観察した。*PNY*の欠損変異体である*pny-40126* (Smith and Hake, 2003) について発芽後4日目の芽生えを透明化し茎頂部を観察したところ、野生型植物体と同じようにドーム状の茎頂分裂組織が維持されており、

そこからはほぼ同じ大きさの第1、第2葉が形成されていた (図20.A;野生型植物体については図6.Bを参照)。また、*pnv*単独変異体の茎頂分裂組織は野生型植物体と同様に連続してロゼット葉を形成し続け (図20.G, H)、その後生殖成長期に移行すると花茎を伸長させ、最終的に花を形成した (図20.K)。一方、*gor pny*二重変異体の発芽後4日目の芽生えについて透明化観察を行なったところ、茎頂分裂組織を完全に欠失したものや、葉が形成されているものの葉のサイズが小さく茎頂分裂組織が大きく減少しているものが観察された (図20.B)。また、*gor pny*二重変異体では、発芽直後のほぼ全ての芽生えにおいて子葉柄どうしが融合している個体が観察された (図20.E)。これらの子葉柄の融合や茎頂分裂組織の欠失、減少という表現型は機能喪失型*stm*変異体の表現型と非常に酷似している (図20.C, D)。*gor pny*二重変異体はいずれの個体も葉を数枚形成した後に成長が停止し、その後、これらの実生では葉の形成が再開されるものの、葉序の乱れや葉柄の融合など*stm*変異体に近い表現型が観察された (図20.F, I)。さらに、葉柄からの葉様構造物の異所的な形成も観察された (図20.F矢印)。*gor*および*pnv*の単独変異体がそれぞれ発芽後3~4週間程度で抽臺を開始するのに対し、*pnv gor*は発芽後6週間が経過しても抽臺することなく、その後枯死した (図20.J, K)。

以上の結果より、野生型STMタンパク質が発現する植物体は*pnv*変異体背景であっても茎頂分裂組織を形成・維持すること、器官どうしを分離すること、葉を連続して形成することができるが、一方、*gor*変異型STMタンパク質が発現する植物体は茎頂分裂組織の形成・維持、連続した葉の形成、器官の分離に*PNY*の機能を必要とすることが示された。

III-8. 過剰発現体の解析

これまでに野生型STMの過剰発現は正常な葉の発達を強く抑制することが報告されている (Williams, 1998; Brand et al., 2002; Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002)。そこで、*gor*変異型STM (*STM^{gor}*) を野生型植物体背景においてCaMv 35S プロモーターの制御下で過剰発現させた際の植物の発生に与える影響を調べた。比較のために野生型STM (*STM^{wi}*) および*stm-1*変異型STM (*STM^{stm-1}*) の過剰発現体も作製した。*stm-1*変異はナンセンス変異であるため (図10.B)、*STM^{stm-1}*に由来するタンパク質はホメオドメインを完全に欠失しており、また、*stm-1*変異体の表現型からも*stm-1*変異は強い機能喪失型の変異であると考えられる (Long et al., 1996; Long and Barton, 1998)。

まずは、野生型 STM の過剰発現体 ($Pro35S::STM^{wt}$) について解析した。T1世代の $Pro35S::STM^{wt}$ においては強い表現型を示すラインと (25 %, $n=40$) 弱い表現型を示すライン (75%, $n=40$) の2種類が観察された。表現型が強いラインでは、顕著に小さな子葉や茎頂部における多数の突起状の器官形成が観察され (図21.C)、その後も子葉は発達せずに茎頂部から未発達な葉原基様構造物の形成が形成され続けた (図22.A, B)。表現型が弱いラインでは、子葉柄の幅が広く小さな子葉が形成され、本葉の発達も著しく阻害された (図21.C)。その後、本葉は発達するものの鋸歯状の形態を示した (図22.C)。また、この表現型の強さの違いは形質転換体における STM の発現量の違いとよく一致していた (図21.E)。しかしながら、どちらの形質転換ラインにおいても gor 変異体で観察されるような茎頂分裂組織の肥大化は示さなかった。このことは、 gor 変異体の表現型が単純に野生型 STM の発現領域が拡大したことや、発現量が増加したことに起因するものではないことを示唆している。次に gor 変異型 STM の過剰発現体 ($Pro35S::STM^{gor}$) について解析した。 $Pro35S::STM^{gor}$ においても、表現型の弱い STM^{wt} 過剰発現体のラインと同等の STM の発現量の増加が確認された (図21.E)。しかし、子葉や葉の形態、葉序に大きな乱れは観察されず、多くのラインは野生型植物体と見分けがつかなかった (図21.A, B, 図22.D; 80.8 %, $n=52$)。また同様に、機能喪失型変異を含む STM^{stm-1} の過剰発現体においても、野生型 STM の過剰発現体のような表現型は示さず、多くのラインは野生型植物体と見分けがつかなかった (図22.F; 70.6 %, $n=17$)。これらのことから、 gor 変異型 STM は野生型 STM が有する、葉原基様構造物を形成する機能や葉の発達を抑制する機能を喪失していることが示唆される。また、 STM^{gor} や STM^{stm-1} を発現させたいくつかのラインで stm 機能喪失型変異体のような数枚の葉を形成した後成長が停止するという表現型が観察された (図22.E; STM^{gor} , 19.2 %, $n=52$, 図21.G; STM^{stm-1} , 29.4 %, $n=17$)。これまでのところ、この表現型の原因は不明であるが、可能性として、35Sプロモーターを用いて変異型 STM を過剰発現したことで、優性阻害的な効果やジーンサイレンシングが生じ、そのために野生型 STM の機能が乱れたのかもしれない。

IV. 考察

シロイヌナズナの単一劣性変異体 *gor* は、地上部器官の形成に多面的な影響を引き起こす。*gor* 変異体は、生殖成長期において花茎先端部から花や枝を複数同時に形成するという特徴的な表現型を示す。しかし、*gor* 変異体において発生の最も初期に観察される表現型は、発芽直後から生じる茎頂分裂組織の肥大化と器官形成の遅延である。*gor* 変異体の原因遺伝子は *classI knotted-like homeobox (KNOX)* 型タンパク質をコードする *STM* であり、*gor* 変異体においては *STM* のホメオドメイン内に1アミノ酸の置換を引き起こすミスセンス変異が生じていた。

IV-1. *gor* アリルは既知の *stm* アリルとは異なる影響を茎頂分裂組織の発生に与える新奇アリルである

gor 変異体は *STM* の新奇ミスセンス変異体である。しかし、*gor* 変異体の表現型は *STM* の機能喪失型変異体の表現型とは大きく異なる。これまでに知られている全ての機能喪失型 *stm* 変異体では、胚発生中に茎頂分裂組織を欠失してしまう。もしくは胚発生中に細胞数が減少した不完全な茎頂分裂組織を形成するものの、茎頂分裂組織に含まれる細胞がすぐに器官原基へと取り込まれてしまうため、茎頂分裂組織を維持し続けることができない。このような胚発生時の茎頂分裂組織の形成および維持における異常のために、*stm* 変異体において胚発生の終結以降に作られる地上部器官の多くは、茎頂部に時折形成される不完全な分裂組織様の細胞群から不規則、不連続に形成される。さらに *stm* 変異体の子葉、ロゼット葉および花器官どうしの基部では、器官の融合が観察される (Barton and Poethig, 1993; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996)。一方、*gor* 変異体においては、胚発生中に野生型植物体と同様の茎頂分裂組織が形成される。そしてこの茎頂分裂組織は、胚発生の終結以降も生殖成長期の後期まで消費されずに維持され、地上部器官を連続して形成し続ける。また、子葉およびロゼット葉どうしは融合せずに分離している。花器官の発生においても、*stm* アリルと *gor* アリルの影響は大きく異なる。*stm* 変異体においては花芽分裂組織がしばしば花器官を形成する途中で消費されてしまうため、最も内側の器官である心皮を欠失した花が形成される (Barton and Poethig, 1993; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996)。一方、*gor* 変異体においては、花芽分裂組織の活性は心皮を形成した後も停止せずに、開裂した心皮の内側から新たな花器官や花が形成される。

これらのことから、これまでに報告されている機能喪失型 *stm* 変異体では分裂組織の活性が低下するが、一方、*gor* 変異体においては野生型植物体以上に分裂組織の活性が高くなっていることが明らかになった。

*gor*変異体では変異型*STM*遺伝子の発現領域が茎頂分裂組織からその下部領域にまで拡大しているが、変異型*STM*遺伝子は葉原基では発現していない。このことから、*gor*変異体の地上部における様々な表現型は、*gor*変異型*STM*が茎頂分裂組織、もしくはその下部領域に含まれる細胞群に異常を引き起こすことに起因すると考えられる。野生型植物体の茎頂分裂組織では、細胞が未分化な状態を維持しつつ、中央領域で分裂を繰り返す。増殖した細胞の一部は周縁部へと押し出され器官原基へ取り込まれ、その後器官へと分化していく。したがって、茎頂分裂組織のサイズを適切に保つためには細胞の増殖と分化のバランスを適切に制御することが重要となる。*gor*変異体の芽生えでは、茎頂分裂組織のサイズの拡大と一致して、茎頂分裂組織の中央領域のマーカである*WUS*や*ProCLV3::GUS*の発現領域が野生型植物体と比較して有意に拡大している。一方、*gor*変異体では第1、第2葉の葉原基のサイズが野生型植物体と比較して有意に小さくなる。また、*gor*変異体においては胚発生が終結するまで茎頂分裂組織の形態的な異常は観察されない。これらのことから、*gor*変異体における茎頂分裂組織の拡大は、胚発生の終結以降に形成される器官原基への細胞の取り込みが遅延または減少したため、中央領域に細胞が過剰に蓄積することが原因であると考えられる。また、生殖成長期の初期の*gor*変異体において観察される*ProCLV3::GUS*の活性が高く、周囲に突起状の構造物を形成する、著しく肥大化した茎頂分裂組織においても、同様の現象が起きていると考えられる。*gor*変異体において茎頂分裂組織から形成される突起状構造物は、花芽分裂組織のマーカ遺伝子である*ProLFY::GUS*の活性が検出されるものの花器官を形成しない。これは茎頂分裂組織からの細胞の供給が減少、もしくは遅延したために、花器官への分化に十分な細胞が花芽分裂組織へと供給されなかったことに起因するのではないだろうか。

これらのことより、*gor*アレルは既知の機能喪失型*stm*アレルとは異なる数多くの影響を茎頂分裂組織の機能に与える新奇*STM*アレルであることが明らかになった。

IV-2. *gor*変異は*STM*の機能の部分的な喪失を引き起こすかもしれない

*gor*変異体においては、*STM*遺伝子のコード領域にミスセンス変異が生じており、その変異が*gor*表現型の原因であることが明らかになった。この変異は*STM*の性質にどのような影響を与えているのだろうか。

*gor*変異体の表現型と既知の機能喪失型*stm*変異体の表現型は全く逆であることから、1つの可能性として、*gor*アレルは*STM*の機能獲得型アレルであること

が考えられる。つまり、*gor*変異によって*STM*の機能が亢進する、または、新たな機能が付加されるため、*gor*アリルが茎頂分裂組織に与える影響が、これまでの*stm*アリルとは全く異なるという可能性である。しかし以下の2つの理由から、この可能性は低いと考えられる。

第一に、*gor*ヘテロ接合体や、*gor*変異型*STM*ゲノム断片を野生型植物体に導入した形質転換体は*gor*変異体の表現型を全く示さず、野生型植物体と見分けることができない。これらのことは、*gor*アリルは野生型*STM*アリルに対して劣性であることを示唆している。また、*gor*変異型*STM*を野生型植物体において過剰発現させても、大多数のラインは野生型植物体と見分けがつかず、残りのラインでも*gor*表現型を示すものはなかった。これらのことから、コピー数や各アリルの発現量が問題である可能性は低く、*gor*アリルは野生型*STM*アリルに対して常に劣性であることが強く示唆される。

第二に、野生型*STM*を異所的に過剰発現させた植物体では、茎頂部における未発達な葉原基様器官の形成や、子葉およびロゼット葉の発達の強い抑制が観察されるが、*gor*変異体のような茎頂分裂組織の肥大化や形態異常を全く示さない。これらのことは、*gor*変異型アリルの表現型が、単純な*STM*の発現領域の拡大や、発現量の増加に起因するわけではないこと示唆している。また、*gor*変異を含む*STM*を異所的に過剰発現させても、多くのラインでは子葉の形態、葉の発達および葉序に異常は観察されなかった。これは、機能喪失型変異である*stm-1*変異を含む*STM*を異所的に過剰発現させても同様であった。このことから、*gor*変異型*STM*は野生型*STM*が有する葉の分化を抑制する機能や、葉様構造物を形成する機能を喪失している可能性が高いこと、また、*gor*変異によって*STM*に新たな機能が付加された可能性が低いことが示唆される。

したがって、*gor*アリルは*STM*の機能が単純に亢進したアリルや、新たな機能を獲得したタイプのアリルではなく、*STM*の機能を部分的に喪失したアリルである可能性が高いと考えられる。

IV-3. *gor*変異型*STM*が機能するためには*PNY*が必要である

*gor*アリルが部分的な機能喪失型アリルであるという性質は、*PNY*との関係における解析の結果からも支持される。*pn**y*単独変異体においては、葉序や節間のわずかな乱れが観察されるが、器官どうしの融合は生じずに茎頂分裂組織はほぼ完全に維持される。一方、*gor pn**y*二重変異体は、茎頂分裂組織を維持することができず、また、器官どうしが融合するという機能喪失型*stm*変異体と同様の表現型を示す。これらのことは、*gor*変異型*STM*アリルは野生型*STM*アリルとは

異なり、*PNY*の非存在下では細胞分裂を促進して茎頂分裂組織を維持すること、器官どうしを分離することができないことを示している。

*gor*変異型*STM*アリの機能は、*PNY*の機能に依存していることが明らかになったが、それでは、*gor*変異型*STM*タンパク質は、タンパク質としての分子的機能的なレベルで*PNY*タンパク質の存在を必要としているのだろうか。*STM*や*PNY*が属する*KNOX*型タンパク質と*BELL*型タンパク質は、それぞれに保存されたN末端領域を介して結合し、ヘテロダイマーを形成することが報告されている (Bellaoui et al., 2001; Smith et al., 2002; Byrne et al., 2003; Smith and Hake, 2003; Hackbusch et al., 2005; Kanrar et al., 2006)。さらに、*KNOX*型タンパク質および*BELL*タンパク質はそれぞれがDNAに結合すること、ヘテロダイマーを形成することで標的DNAへの結合能が高くなることが報告されている (Smith et al., 2002; Chen et al., 2004; Viola and Gonzalez, 2006; Bolduc and Hake, 2009; Viola and Gonzalez, 2009)。Yeast two-hybrid法を用いた解析により、*gor*変異型*STM*タンパク質は野生型*STM*タンパク質と同様に*PNY*タンパク質と相互作用することが明らかになった。

これらのことより、*gor*変異型*STM*タンパク質が標的DNAへ結合するためには、*PNY*タンパク質が必要となるという可能性が示唆される。つまり、*gor*変異型*STM*タンパク質は単独では標的DNAと結合ができない、もしくは親和性が低い、*PNY*タンパク質とヘテロダイマーを形成することによって、いくつかの標的DNAとの親和性が高くなるのかもしれない。

IV-4. *gor*変異は*STM*タンパク質の性質にどのような影響を与えるのか

抗*STM*抗体を用いたウェスタンブロッティング解析より、*stm*機能喪失変異体においては*STM*タンパク質の蓄積は検出感度以下に減少しているが、一方、*gor*変異体においては*STM*タンパク質が野生型と同程度に蓄積していることが明らかになった。このことから、*gor*変異体の表現型は他の*stm*変異体のように*STM*タンパク質が消失または減少したために引き起こされる表現型ではなく、*STM*タンパク質が十分に存在するにもかかわらず引き起こされる表現型であると考えられる。これまでの解析から*gor*変異は*STM*の機能の部分的な喪失を引き起こす可能性が高いことが示唆されたが、それでは*gor*変異によって*STM*タンパク質の機能にどのような異常が生じているのだろうか。

IV-4-1. *STM*の細胞間移行に関わるATMPB2Cとの相互作用

KNOX型タンパク質であるトウモロコシのKNOTTED1 (KN1) タンパク質やSTMタンパク質は自身のmRNAと結合し、タンパク質およびmRNAのプラズマ膜を介した細胞間移行を促進する能力を持つことが報告されている (Lucas et al., 1995; Jackson, 2002; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003; Kim et al., 2005)。この細胞間移行の生理的意義については不明であるが、ホメオドメインがタンパク質およびmRNAの移行に必要なかつ十分であることがわかっている (Kim et al., 2005; Tassetto et al., 2005)。また、STMタンパク質やKN1タンパク質のホメオドメインに結合し、これらのタンパク質の細胞間移行を抑制する因子として、viral movement protein binding protein (MPB2C) がタバコから単離された (Kragler et al., 2003; Curin et al., 2007; Winter et al., 2007)。MPB2CのシロイヌナズナのコモログであるAtMPB2CもMPB2Cと同様にSTMタンパク質の細胞間移行を抑制することがこれまでに報告されている (Winter et al., 2007)。このことから、*gor*変異によってSTMタンパク質とAtMPB2Cとの相互作用に異常が引き起こされる可能性や、そのためにSTMタンパク質またはmRNAの細胞間移行能に何らかの変化が引き起こされる可能性が考えられる。しかし、Yeast two-hybrid法を用いた解析では、*gor*変異はSTMタンパク質とAtMPB2Cとのタンパク質間相互作用能に影響を及ぼさず、*gor*変異型STMタンパク質は野生型STMタンパク質と同様にAtMPB2Cとの相互作用能を保持していた (サプリメンタルデータ図S1.)。

このことから、少なくとも*gor*変異がSTMタンパク質とAtMPB2Cとの相互作用を乱すために、*gor*変異型STMタンパク質においては、AtMPB2CによるSTMタンパク質の細胞間移行の抑制が働かなくなるという可能性は低いと考えられる。しかしながら、この可能性を否定するためには植物体内での野生型STMタンパク質および*gor*変異型STMタンパク質の挙動を組織、細胞レベルで詳細に解析する必要がある。

IV-4-2. *gor*変異はSTMタンパク質のDNA結合能に影響するのではないだろうか

STMタンパク質はホメオドメインを含む転写因子である。これまでに、STMのホメオドメインはDNAに直接結合することが*in vitro*の実験系の結果から報告されている (Viola and Gonzalez, 2006, 2009)。*gor*変異は3番目のヘリックス内で高度に保存されているアミノ酸の1つである339番目のアルギニン (Arg; R) のリシン (Lys; K) への置換を引き起こす。Arg339は典型的なホメオドメインのコンセンサス配列中の53番目のアルギニン (Arg53) と一致する。ほぼ全てのホメオドメインの第3ヘリックスにおいて、4つのアミノ酸が高度に保

存されており (Trp48, Phe49, Asn51, Arg53; WFXNXR)、これらのアミノ酸はホメオドメインがDNAに結合するために中心的に機能する(Gehring et al., 1994; Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001)。このうちArg53はホメオドメインとDNAの結合に重要なアミノ酸であり、DNAの糖-リン酸主鎖に直接水素結合することが報告されている (図23) (Kissinger et al., 1990; Wolberger et al., 1991; Gehring et al., 1994; Chi, 2005)。これまでにヒトのホメオドメインタンパク質であるNKX2.5やショウジョウバエのホメオドメインタンパク質であるPBにおいて、Arg53がHisに置換されることでDNA結合能が減少すること (Benassayag et al., 1997; Kasahara and Benson, 2004)、また、ショウジョウバエのROUGHタンパク質において、gor変異体と同様にArg53がLysへと置換されることで機能喪失型の表現型が引き起こされることが報告されている (Heberlein et al., 1994)。したがって、gor変異はSTMタンパク質のDNA結合能に影響するという可能性が強く示唆される。しかしながら、シロイヌナズナのホメオドメインタンパク質においてはWFXNXR配列は高度に保存されているものの、WUSなどを含むいくつかのホメオドメインタンパク質ではgor変異型STMタンパク質と同様のWFXNXK配列を有している (テーブル1.)。また、これまでにWUSはDNAに直接結合することが*in vitro*の実験系の結果より報告されている (Lohmann et al., 2001; Lenhard et al., 2002)。このことより、Arg53からLysへのアミノ酸置換は必ずしもホメオドメインとDNAの結合を完全に喪失させるものではないかもしれない。

以上より、gor変異は、STMタンパク質のDNA結合能を完全に喪失させるわけではないが、標的DNAとの親和性または特異性を変化させるという可能性が示唆される。そのためにgor変異体においてはSTMのいくつかの下流遺伝子の発現制御が乱れているのではないだろうか。

IV-5. gor変異は茎頂分裂組織の恒常性を乱す

gorアリルは茎頂分裂組織において細胞の過剰な蓄積を引き起こし、茎頂分裂組織の恒常性を乱す新奇のSTMアリルである。本研究における遺伝学的解析によって、gorアリルは機能を獲得したアリルはなく、むしろ部分的に機能を喪失したアリルである可能性が示唆された。さらにホメオドメインタンパク質の構造とDNAとの相互作用におけるこれまでの知見を考慮すると、gor変異が引き起こすアミノ酸置換 (Arg53 Lys) はSTMタンパク質と標的DNAとの親和性または特異性に影響を及ぼす可能性も示唆された。また、gorアリルが引き起こす茎頂分裂組織の肥大化を含む地上部の形態異常は、野生型STMアリル

によって完全に相補される。本研究における結果からSTMが茎頂分裂組織の形成・維持に及ぼす影響について次のように考察できる

一つの可能性として、以前の研究から、STMは単独で、またPNYと共に茎頂分裂組織の形成、茎頂分裂組織に含まれる細胞の未分化状態の維持、細胞分裂の促進などに機能し、茎頂分裂組織の活性を促進的に制御する因子であると考えられていた。しかし、それだけでは無く、STMは茎頂分裂組織に含まれる細胞の過剰な蓄積を抑え、恒常性を維持するために茎頂分裂組織の活性を抑制的にも制御する因子であるのかもしれない。gorアリルは、この抑制的な機能の喪失を引き起こす部分的な機能喪失型アリルであるために、gor変異体においては茎頂分裂組織における細胞の過剰な蓄積や、茎頂分裂組織の肥大化が生じると考えられる。

また別の可能性として、gor変異によってSTMタンパク質の性質が変化することにより、本来の標的以外の遺伝子の発現に影響が及ぶ結果、茎頂分裂組織の恒常性が乱れるのかもしれない。

現段階ではこれらの可能性は切り分けることができないが、gor変異によってアミノ酸置換が引き起こされるホメオドメイン内で高度に保存されたアミノ酸:Arg339が茎頂分裂組織の恒常性の維持に重要であると考えられる。今後、野生型STMタンパク質とgor変異型STMタンパク質の下流で発現が変動する遺伝子群を比較、同定することによりSTMが茎頂分裂組織の恒常性を維持するために担う機能がより明らかになると考えられる。

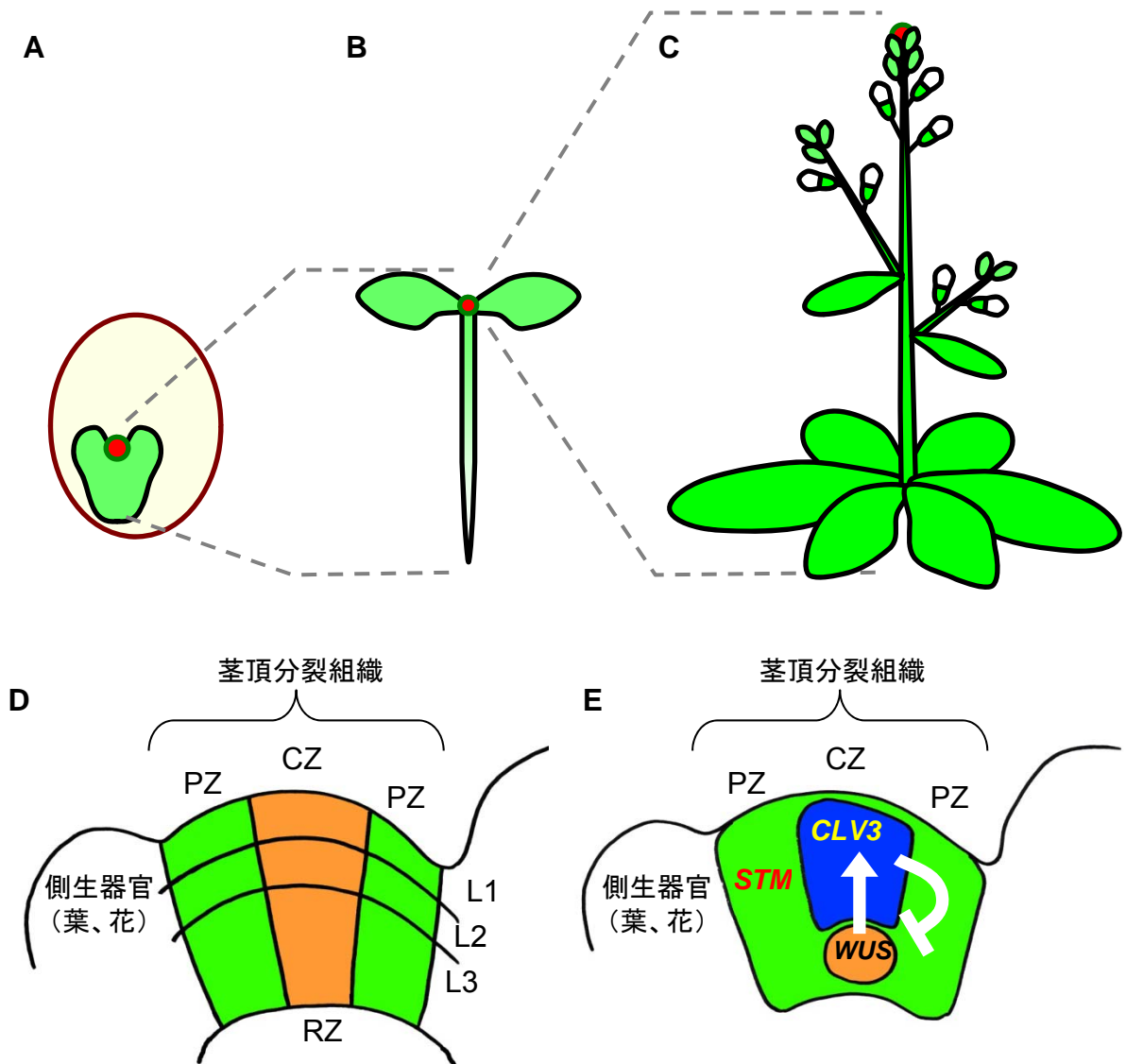


図1. シロイヌナズナおよび茎頂分裂組織の模式図

(A-C) シロイヌナズナの模式図

(A) 心臓型胚 (B) 芽生え (C) 栄養成長期の地上部

高等植物のほぼ全ての地上部器官は、胚発生期に形成された茎頂分裂組織から胚発生の終結以降に形成される。

それぞれの赤い丸は茎頂分裂組織の位置を示す。

(D) 茎頂部の縦断面の模式図

茎頂分裂組織は細胞の性質からCentral Zone (CZ; 中央領域)、Peripheral Zone (PZ; 周縁領域)、Rib Zone (RZ; 髄状組織) に区別することができる。

また細胞の分裂様式から最外層から順にL1層、L2層、L3層に区別することができる。

(E) 茎頂分裂組織におけるSTM、WUS、CLV3の発現領域の模式図

STMは茎頂分裂組織の未分化な領域で発現する。

WUS-CLV3の発現にはフィードバックループが存在する。

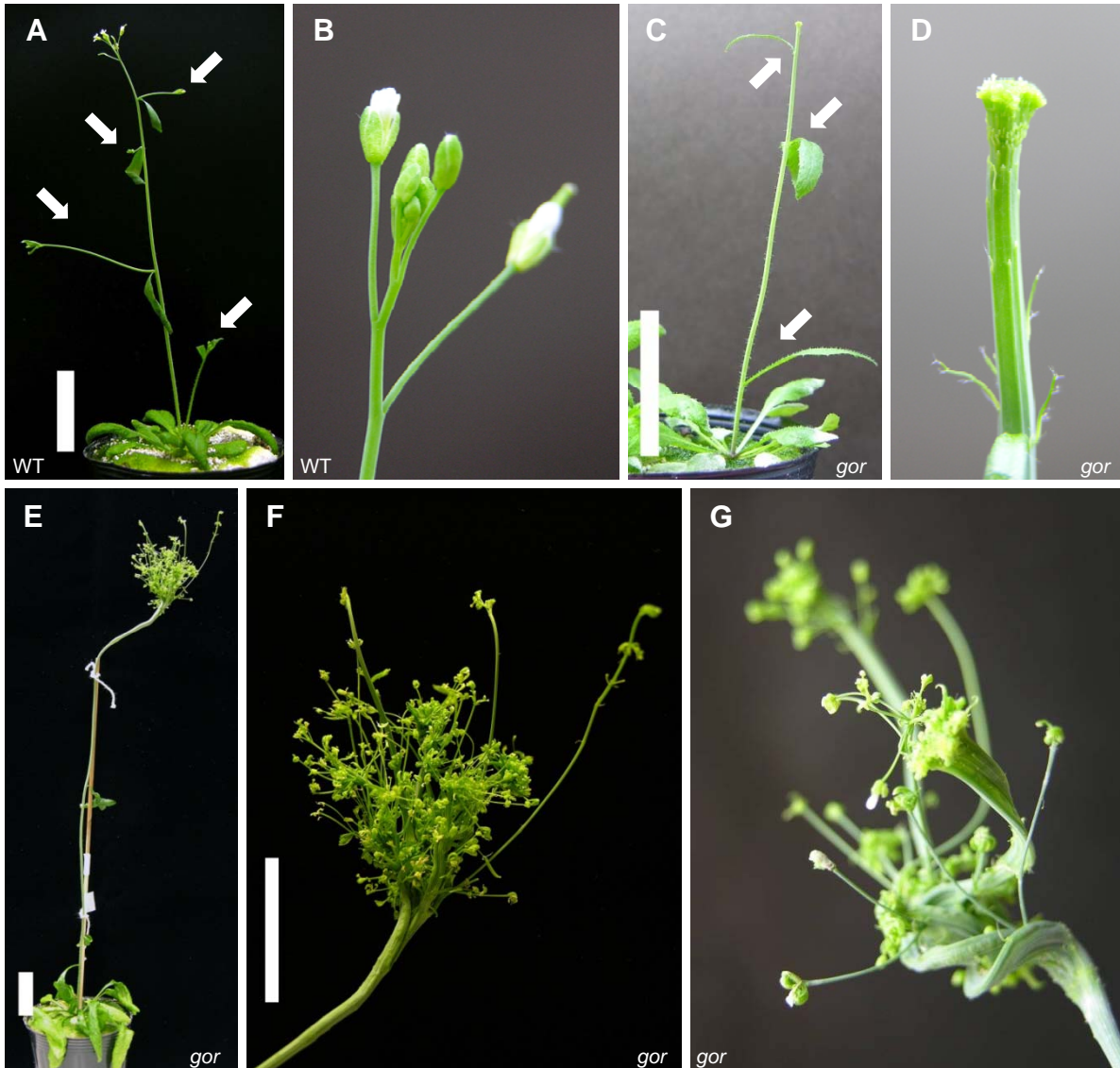


図2. *gor*変異体の生殖成長期の表現型

(A, B) 野生型植物体の生殖成長期の地上部

(A) 発芽後26日目の植物体

ロゼット葉、茎生葉の腋から二次シュート(矢印)が形成される。

(B) (A)の花茎の拡大写真。花茎先端からは連続して花芽が形成される。

(C-H) *gor*変異体の生殖成長期の地上部

(C) 発芽後26日目の植物体

ロゼット葉、茎生葉の腋から二次シュート(矢印)が形成されない。

(D) (C)の花茎先端。花芽が形成されないまま抽臺が進行する。

(E) 発芽後約7週目の植物体

茎頂部から花や花をつける枝が複数同時に形成される。

(F) (G)の花茎先端の拡大写真

(H) *gor*変異体の花茎先端部では枝どうしの融合が生じる。

Bars = 3 cm

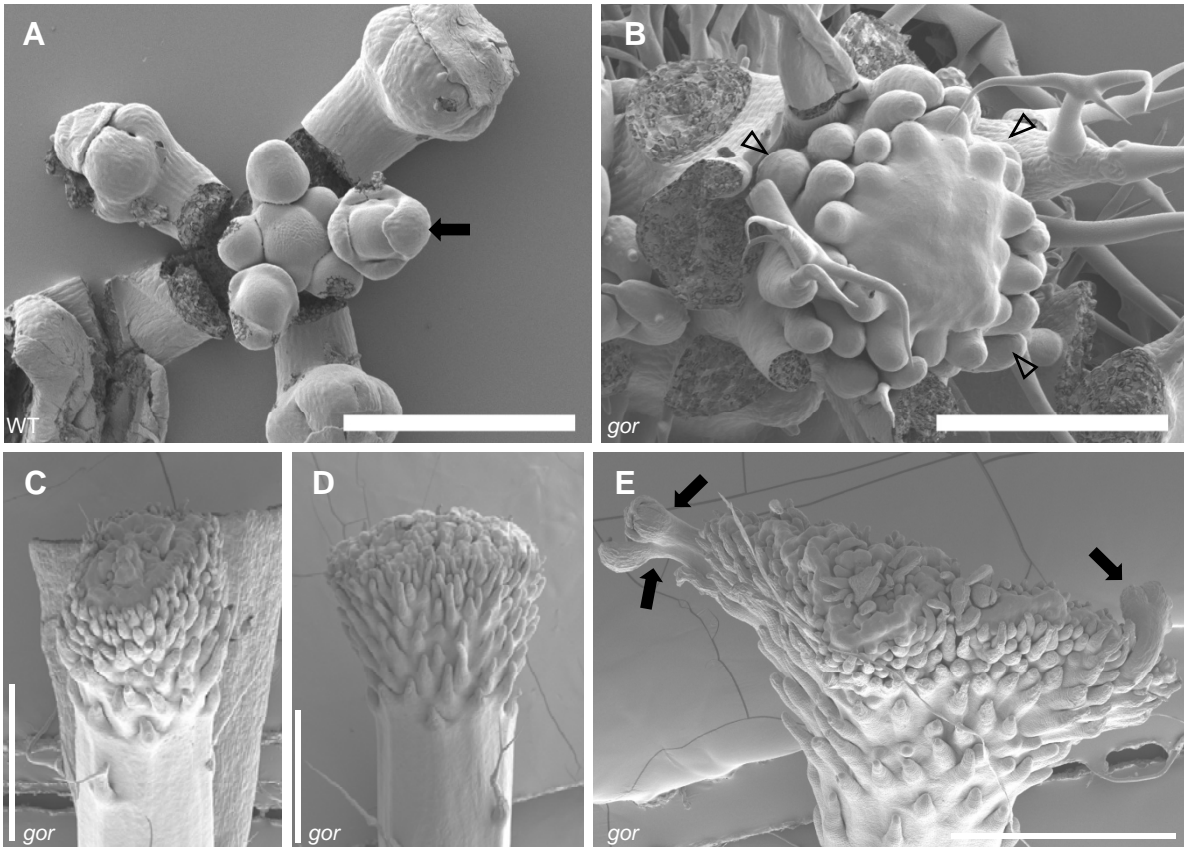


図3. SEMを用いた花茎先端部の表現型解析

野生型植物体 (A) および *gor*変異体 (B-E) の花茎先端部のSEM像

(A, B) 抽臺開始直後の花茎先端部

野生型植物体 (A) では花序分裂組織を中心に花芽分裂組織がらせん状に連続して形成される。花芽分裂組織からは花器官 (矢印) が外側のウォールから順に形成されいく。

一方、*gor*変異体 (B) では肥大化した茎頂分裂組織を中心に周囲に突起状の構造物 (矢尻) が形成される。

(C-E) *gor*の花茎先端部 (CからEの順に花茎の伸長が進行する)

(C, D) 花茎の伸長に伴い、突起状の構造物が次第に花茎先端を覆ってゆく。

(E) 花茎先端ほぼ全てが突起状の構造物や花芽 (矢印) に覆われる。

Bars in (A, B) = 300 μ m, (C-E) = 1 mm。

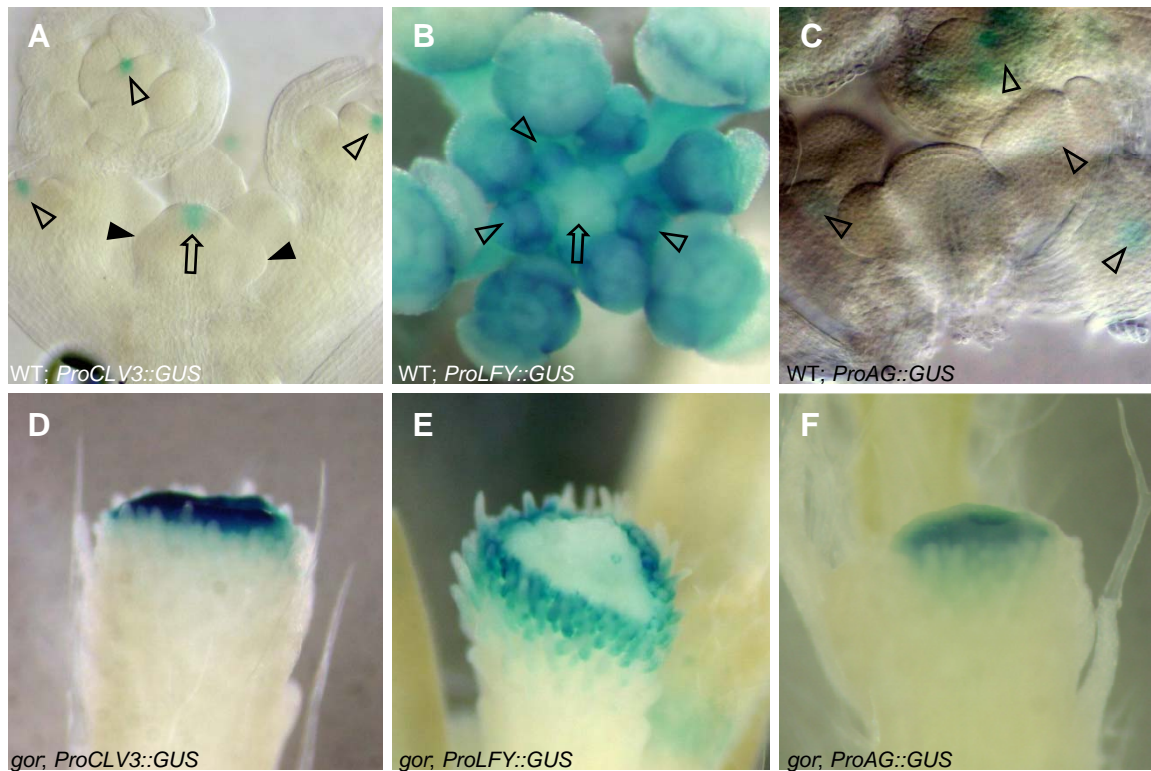


図4. レポーター遺伝子を用いた*gor*変異体の花茎先端部における*CLV3*、*LFY*および*AG*の発現パターンの解析。

野生型植物体 (A-C) および *gor*変異体 (D-F) の花茎先端部のGUS染色像

(A, D) *ProCLV3::GUS*によるGUS染色

野生型植物体 (A) では、GUSの活性が花序分裂組織の中央部 (矢印)、発生の進んだ花芽分裂組織の中央部 (矢尻△) で検出される。形成されたばかりの花芽 (矢尻▲) では検出されない。

*gor*変異体 (D) では、GUSの活性が花茎先端の肥大化した茎頂分裂組織でのみ強く検出される。

(B, E) *ProLFY::GUS*によるGUS染色

野生型植物体 (B) においてGUSの活性は、花序分裂組織 (矢印) では弱く、花芽分裂組織 (矢尻△) では強い。

*gor*変異体 (E) ではGUSの活性が突起状の器官で強く検出される。

(C, F) *ProAG::GUS*によるGUS染色

野生型 (C) ではGUSの活性が花芽分裂組織や葯の基部や花糸 (矢尻△) において検出される。

*gor*変異体 (F) ではGUSの活性が花茎先端の肥大化した茎頂分裂組織でのみ強く検出される。

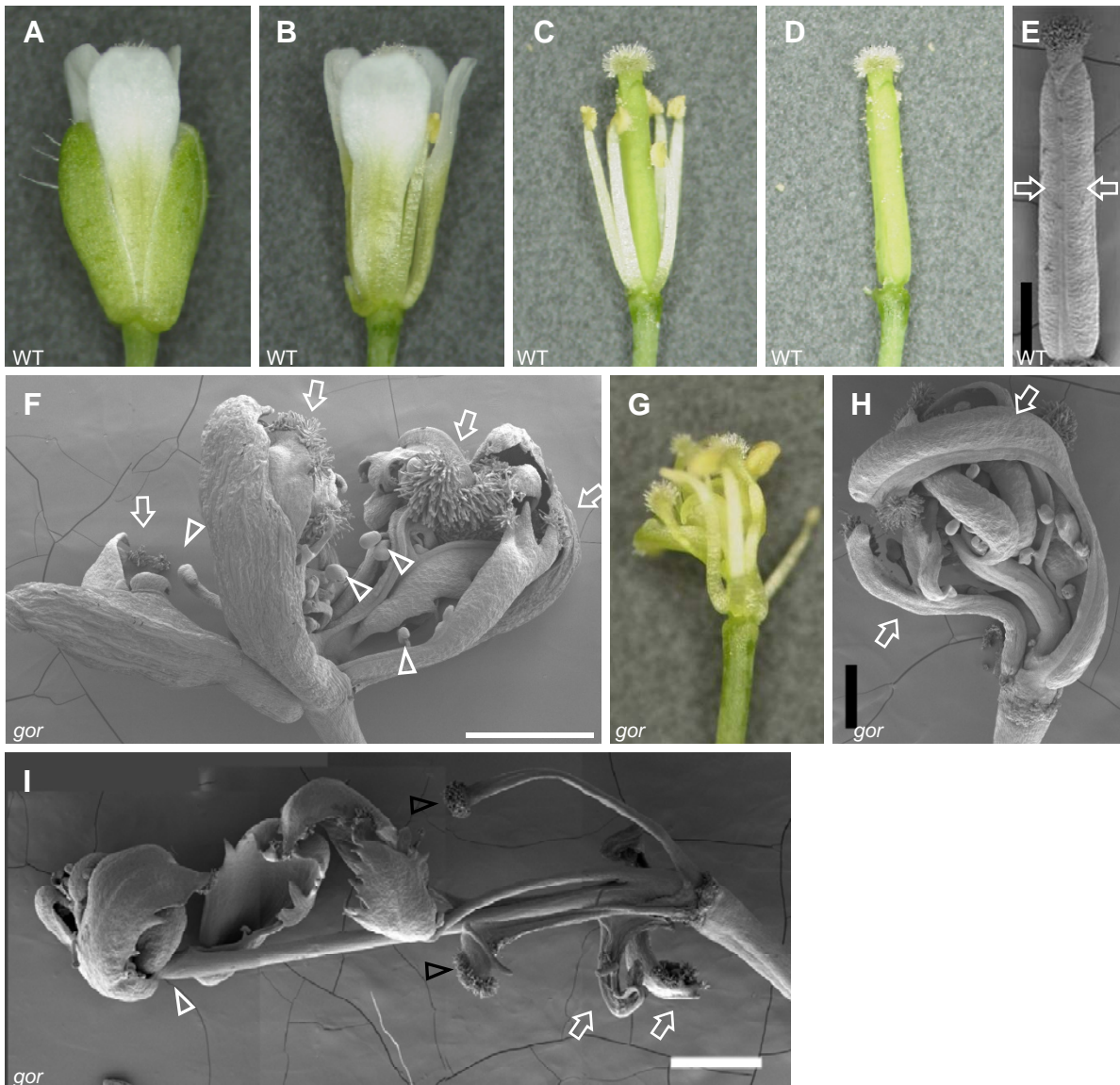


図5. 花器官における表現型解析

(A-E) 野生型植物体の花

外側のウォールから順に、花弁、雄ずい、雌ずいが形成される。(B-E) では外側の花器官を適宜取り除いた。

(E) 雌ずいは2枚の心皮 (矢印) が融合して形成される。

(F-I) *gor*変異体の花

(F) ほぼ全ての花器官が心皮の特徴を有した花。花器官の先端に柱頭状の組織 (矢印) や、縁に胚珠状の器官 (矢尻) が形成される。

(G) 第2ウォールに形成されたフィラメント状の花器官。観察のため第1ウォールのがくは取り除いた。

(H) 第1-第3ウォールに相当する部位の器官を取り除いた花。心皮に相当する器官 (矢印) の内側から新たな器官が形成される。

(I) 花の中央から新たに形成された花 (白矢尻)。最初に形成された花の第3ウォールに形成された器官 (黒矢尻)、および第4ウォールに形成された器官 (矢印)。

Bars in (E, F) = 500 μ m, (H, I) = 1 mm

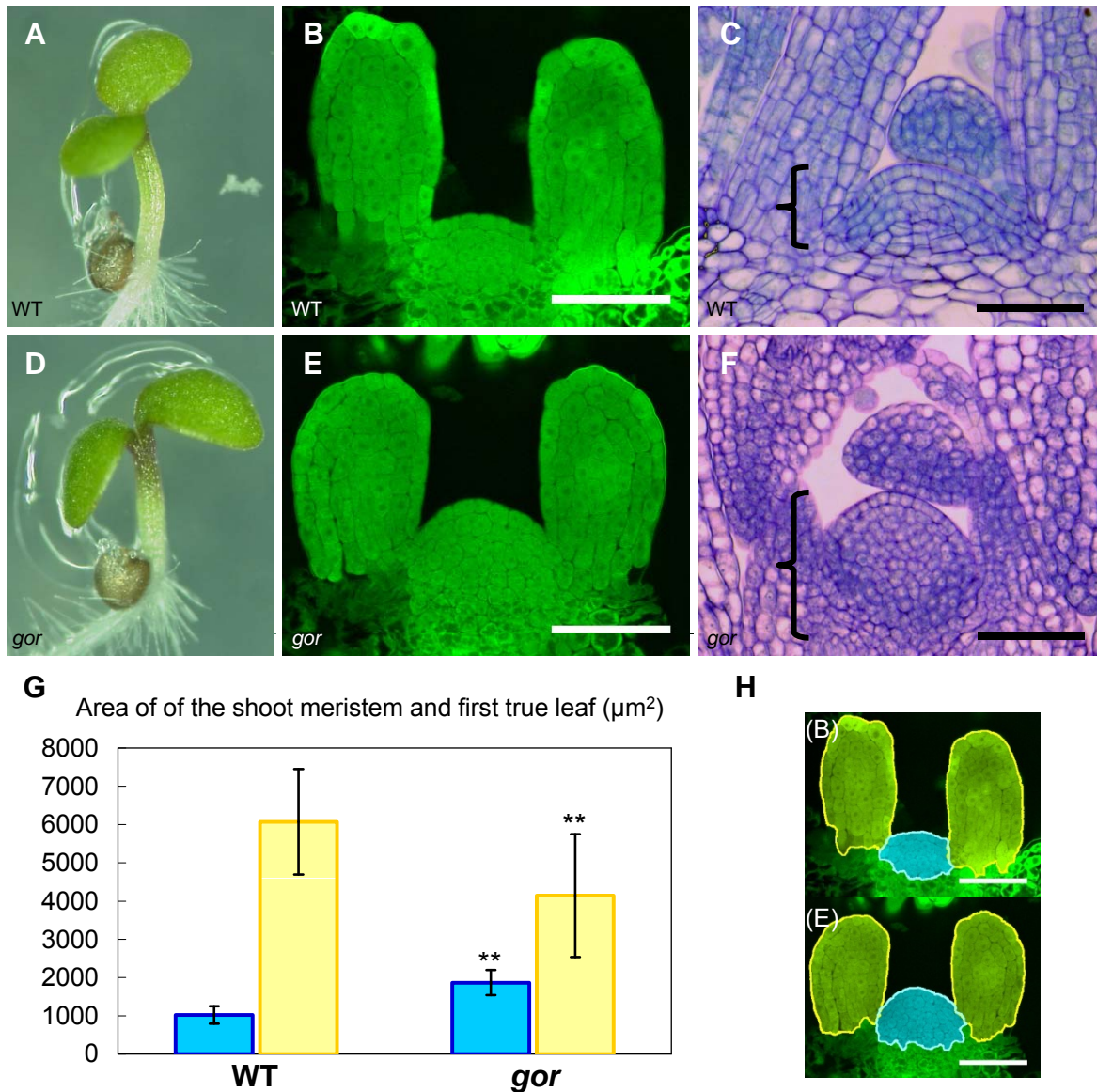


図6. 茎頂部の表現型解析

野生型植物体 (A-C)および*gor*変異体 (D-F)

(A, D) 発芽後4日目の植物体

外観に大きな違いは観察されない。

(B, E) 発芽後4日目の茎頂部のアニリンブルー染色像

(C, F) 発芽後10日目の縦断切片のトルイジンブルー染色像。

茎頂分裂組織において小さな細胞の占める領域を { で示す。

Bars = 50 μm

(G) 野生型植物体 (n=25) および*gor*変異体 (n=10) の茎頂分裂組織の面積 (青)

野生型植物体 (n=48) および*gor*変異体 (n=17) の葉原基の面積 (黄)

それぞれの平均値とSDを示す。

野生型植物体と*gor*変異体における測定値をt検定により検証した結果、有意差が得られた($P < 0.01$ [**])。

(H) (G)において測定した茎頂分裂組織および葉原基の領域を、それぞれ青と黄で示す。

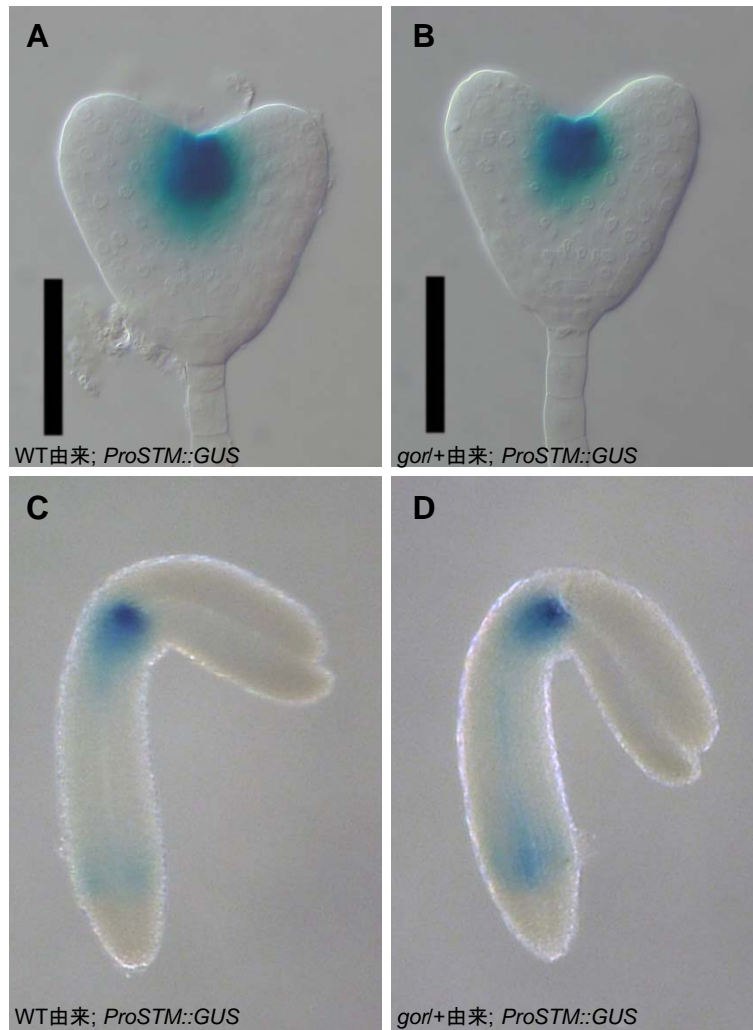


図7. 胚におけるSTMの発現パターンの解析

心臓型胚 (A, B) および子葉屈曲期胚 (C, D) における *ProSTM::GUS* の GUS 染色
 (A, C) 野生型植物体由来の心臓型胚 (A; n=11) および子葉屈曲期胚 (C; n=10)
ProSTM::GUS の活性は、主に子葉原基の間、茎頂分裂組織予定領域で検出される。
 (B, D) *gor*ヘテロ接合体由来の心臓型胚 (B; n=24) および子葉屈曲期胚 (D; n=23)
ProSTM::GUS の活性は、主に子葉原基の間、茎頂分裂組織予定領域で検出される。
 野生型植物体由来の胚と比較して、GUSの活性が検出される領域が顕著に変化している胚は観察されなかった。

Bars = 50 μm

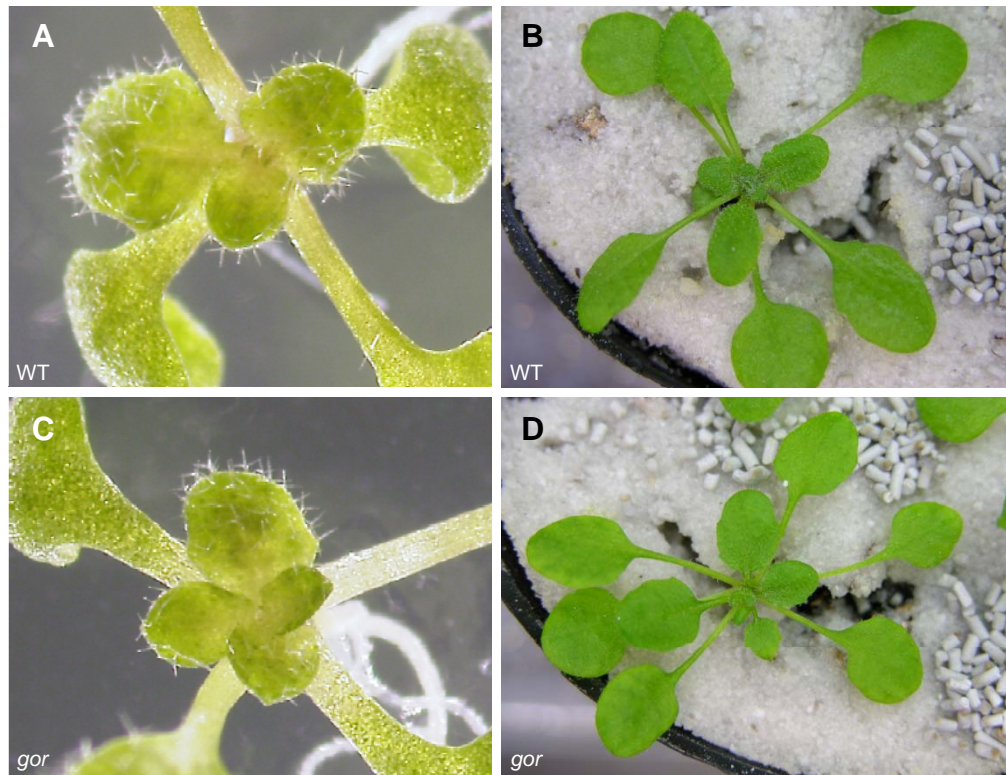


図8. *gor*変異体の栄養成長期の表現型

野生型植物体 (A, B) および *gor*変異体 (C, D) の栄養成長期の地上部
(A, C) 発芽後11日目の植物体

野生型植物体 (A) のロゼット葉はらせん状の葉序を示す。

*gor*変異体 (C) ではまれに第3~6葉の葉序が十字対生を示す個体が観察される。

(B, D) は発芽後15日目の植物体

野生型植物体 (B) も *gor*変異体 (D) も葉序に大きな異常は観察されない。

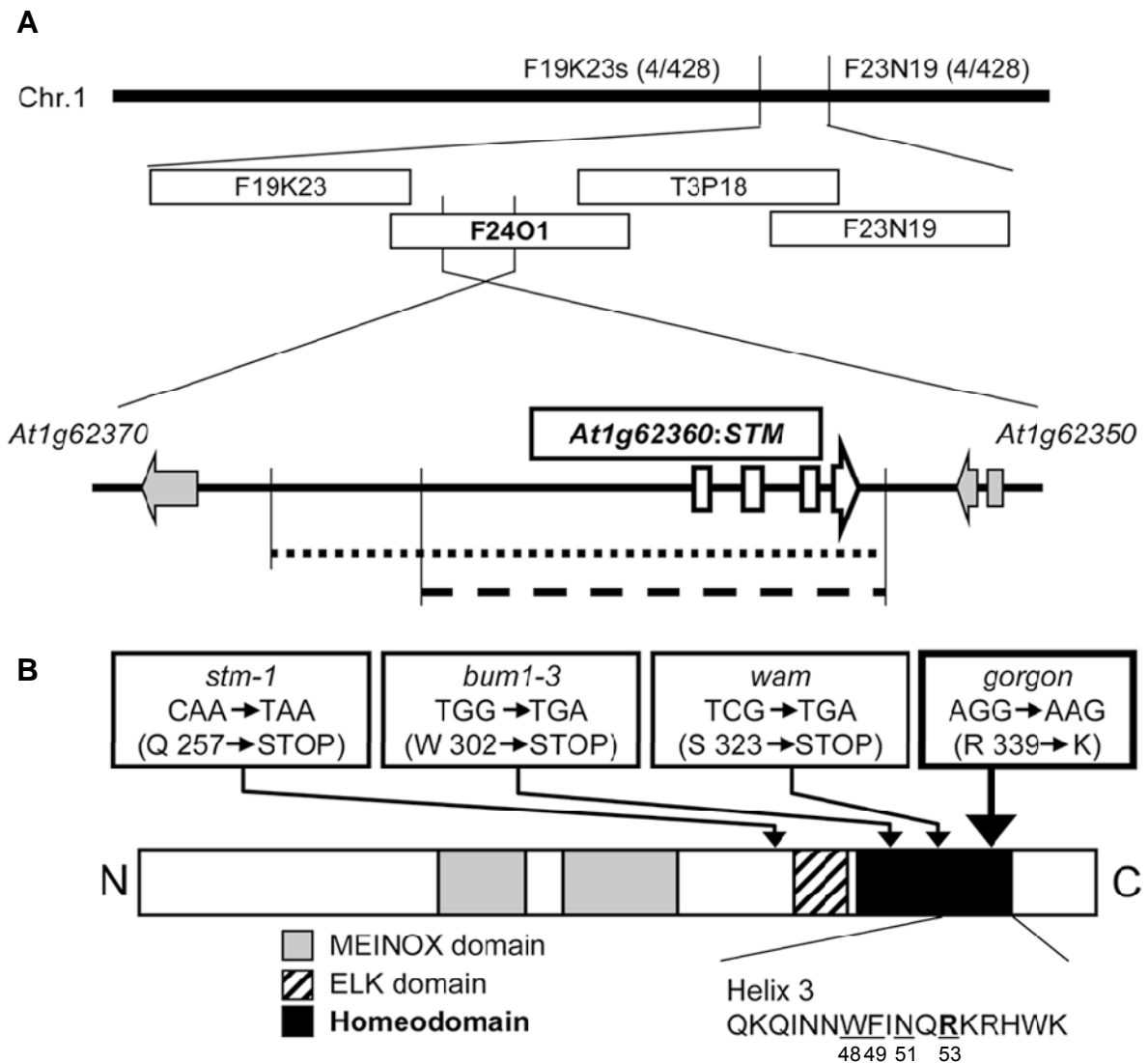


図9. *gor*変異体においてはSTM遺伝子上に1塩基の置換が生じている

(A) *gor*変異の位置

*gor*変異は1番染色体のBAC; F19K23とF23N19の間に位置づけられた。
 染色体上の数字は*gor*変異体とLerを交配したF2個体のうち、*gor*表現型と連鎖した染色体の組み換えを起こした個体数を示す。
 遺伝子下の点線はシーケンスを行なった領域 (約11.3-kb)、破線は相補性試験および表現型再現実験に用いたゲノム断片 (約7.6-kb) を示す。

(B) STMタンパク質の構造

STMタンパク質はMEINOX domain、ELK domainおよびHomeodomainを持つ。
*gor*変異および既知の*stm*の変異部位をそれぞれ示す。
 タンパク質下のアミノ酸配列はホメオドメインの第3ヘリックスのアミノ酸配列および高度に保存された4つのアミノ酸 (WFxNxR[・]) を示す。
*gor*変異によって置換が生じた339番目のアルギニン、典型的なホメオドメインコンセンサス配列中の53番目のアルギニン (R) に相当する。

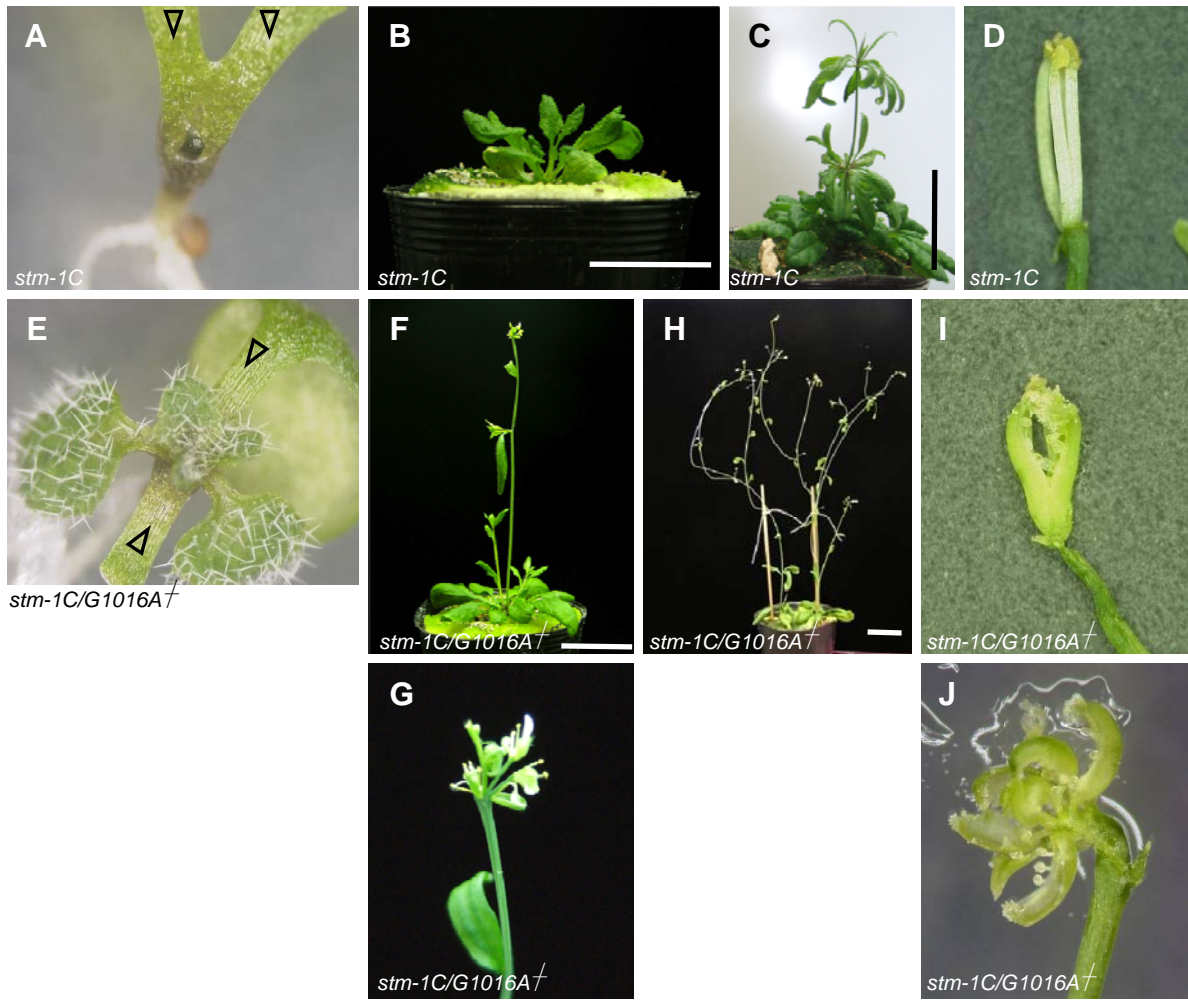


図10. *stm-1*変異と*G1016A*変異 (*gor*変異) 間のアレリズムテスト

*stm-1C*変異体 (A-D) および*stm-1/G1016A*植物体 (E-J) の表現型

(A,E) 発芽後7日目の芽生え (矢尻; 子葉柄)

*stm-1C*変異体 (A) では子葉柄どうしの融合や葉の形成の停止が観察された。

一方、*stm-1/G1016A*植物体 (E) では子葉の融合は観察されず、葉は連続して形成された。

(B, F, G) 発芽後26日目の植物体

*stm-1C*変異体 (B) は抽臺していないが、*stm-1/G1016A*植物体 (F) は抽臺している。

*stm-1/G1016A*植物体の花茎先端 (G) では花柄どうしが融合し、規則正しい花序が形成されない。

(C,H) 抽臺した*stm-1C*変異体およびほぼ同時期の*stm-1/G1016A*植物体

(D, I, J) 花器官 (観察のため花の中央部に形成される器官以外を取り除いた)

*stm-1C*変異体 (D) では、雄ずいを形成するとの花芽分裂組織が活性が停止し、心皮が形成されない。*stm-1/G1016A*植物体 (I, J)では心皮が開裂し、その内側から新たな器官が形成される。

Bars = 3 cm

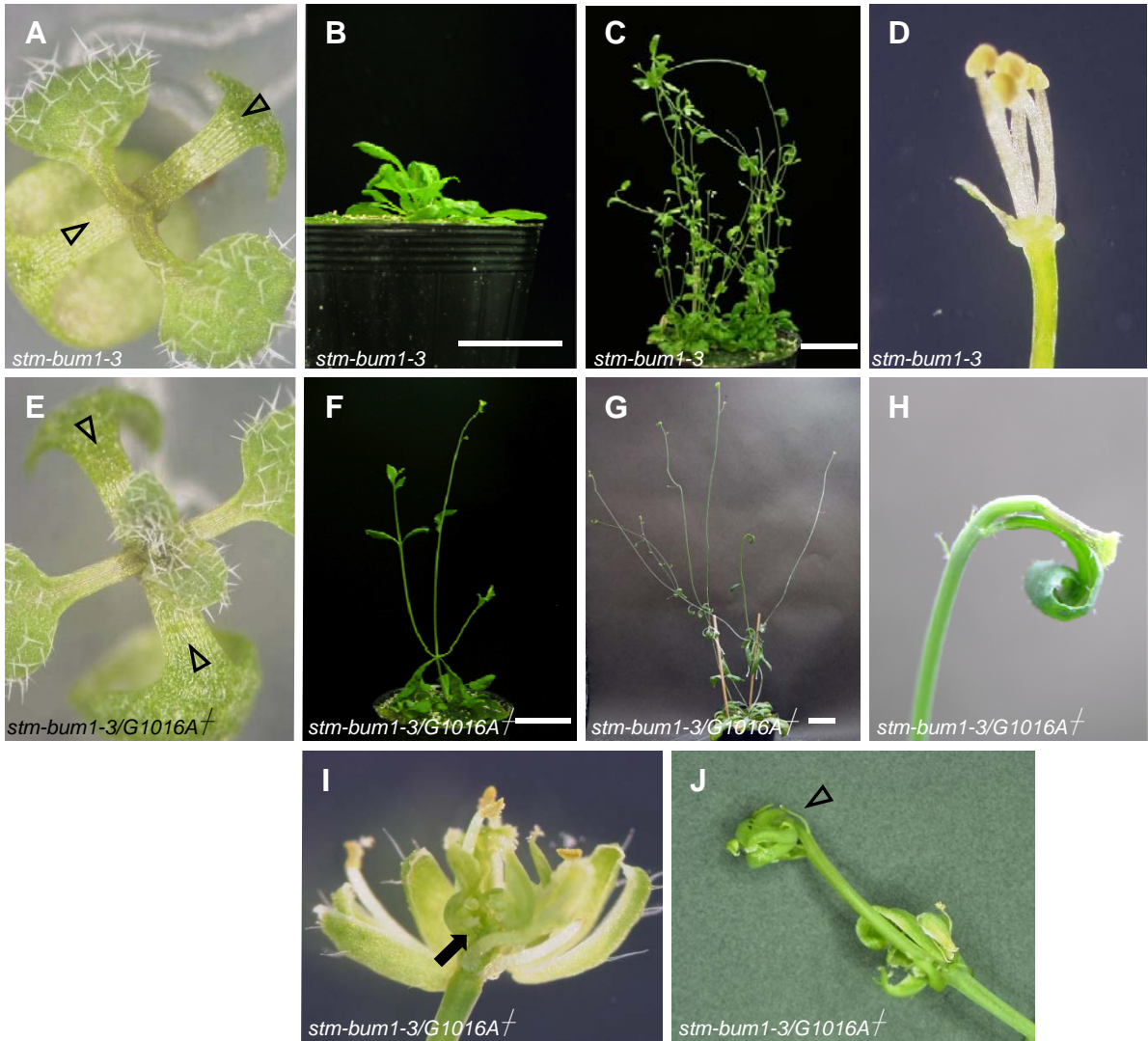


図11. *stm-bum1-3*変異とおよび*G1016A*変異 (*gor*変異) 間のアレリズムテスト

*stm-bum1-3*変異体 (A-D) および*stm-bum1-3/G1016A*植物体 (E~J) の表現型
(A, E) 発芽後7日目の芽生え (矢尻:子葉柄)

*stm-bum1-3*変異体 (A) では葉を数枚形成した後、葉の成長が停止した。一方、*stm-bum1-3/G1016A*植物体 (E) では葉が連続して形成された。

(B, F) 発芽後26日目の植物体

*stm-bum1-3*変異体 (B) は抽臺していないが、*stm-bum1-3/G1016A*植物体 (F) は抽臺している。

(C, G, H) 抽臺した*stm-bum1-3*変異体および、ほぼ同時期の*stm-bum1-3/G1016A*植物体

(H) (G) の花茎先端の拡大写真。花茎先端に突起状の器官が形成された。

(D, I, J) 花器官

*stm-bum1-3*変異体 (D) では、花芽分裂組織は雄ずいを形成すると活性が停止し、心皮が形成されない。(D) では観察のため花の中央部に形成される器官以外を取り除いた。)

*stm-bum1-3/G1016A*植物体 (I, J) では、心皮の開裂が生じ、その心皮の内側から新たな器官 (I; 矢印) や花 (J; 矢尻) が形成される。

Bars = 3 cm



図12. 野生型STMゲノム断片による相補性試験およびG1016A変異型 (*gor*変異型) STMゲノム断片による表現型再現実験

(A, C) 野生型STMゲノム断片が形質転換された*gor*ホモ接合体 (*genomicSTM^{wt}*) 独立した全てのラインにおいて、茎生葉の腋における側枝の形成や (A; 矢印)、花茎先端部からの連続した花芽の形成 (C; (A) の花茎先端部の拡大写真) など、野生型植物体と同様の表現型を示す個体を得られた。

Bar = 3 cm

(B, D) G1016A変異型STMゲノム断片が形質転換された*stm-1C*ホモ接合体 (*genomicSTM^{G1016A}*)

独立した全てのラインにおいて、茎生葉の腋における側枝の欠失や (B; 矢印)、花茎先端部からの花や枝の形成 (D; (B) の茎頂部の拡大写真) など、*gor*変異体と同様の表現型を示す個体を得られた。一部の茎生葉やロゼット葉の腋から側枝が形成されていたが (B; 矢印)、このような表現型は*gor*変異体においても稀に観察される。

Bar = 3 cm

(B) の挿入図は、生殖成長期の初期における花茎先端部。花芽が形成されずに、突起状の器官が形成される。

Bar = 500 μm

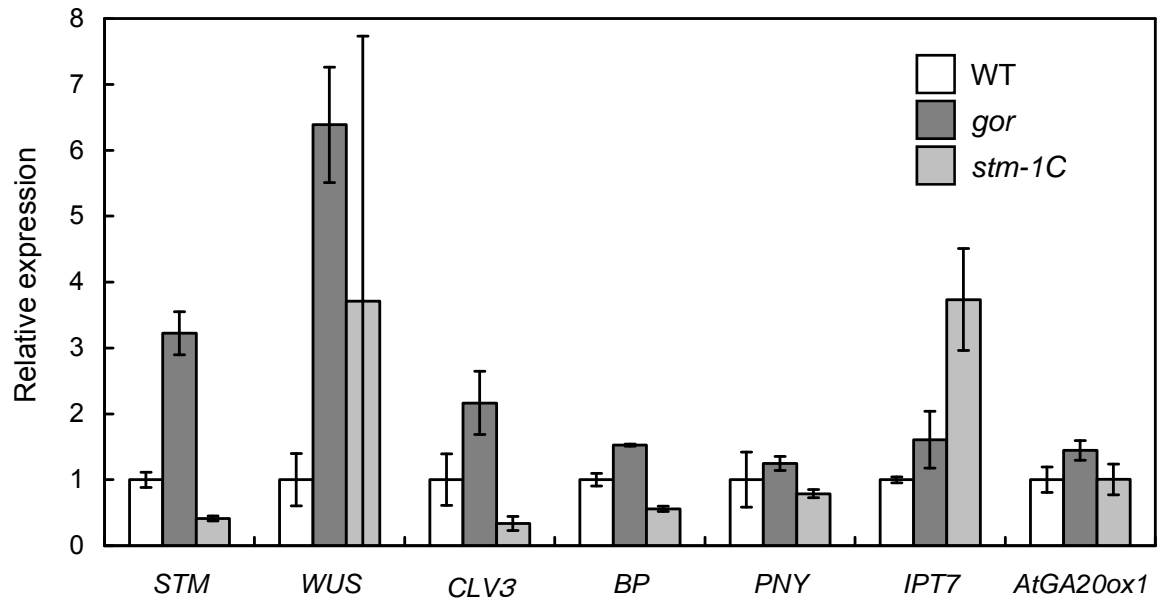


図13. リアルタイムRT-PCRによる茎頂分裂組織関連遺伝子の発現解析

1サンプルあたり10個体の各遺伝子型の植物体（発芽後5日目）から抽出したRNAを用い、各遺伝子について独立して3回のリアルタイムRT-PCRをおこなった。

各遺伝子の発現量はTUB4の発現量を内部標準として標準化した。

グラフの縦軸は野生型植物体における各遺伝子の発現量の平均を1としたときの相対値。バーは標準偏差を示す。

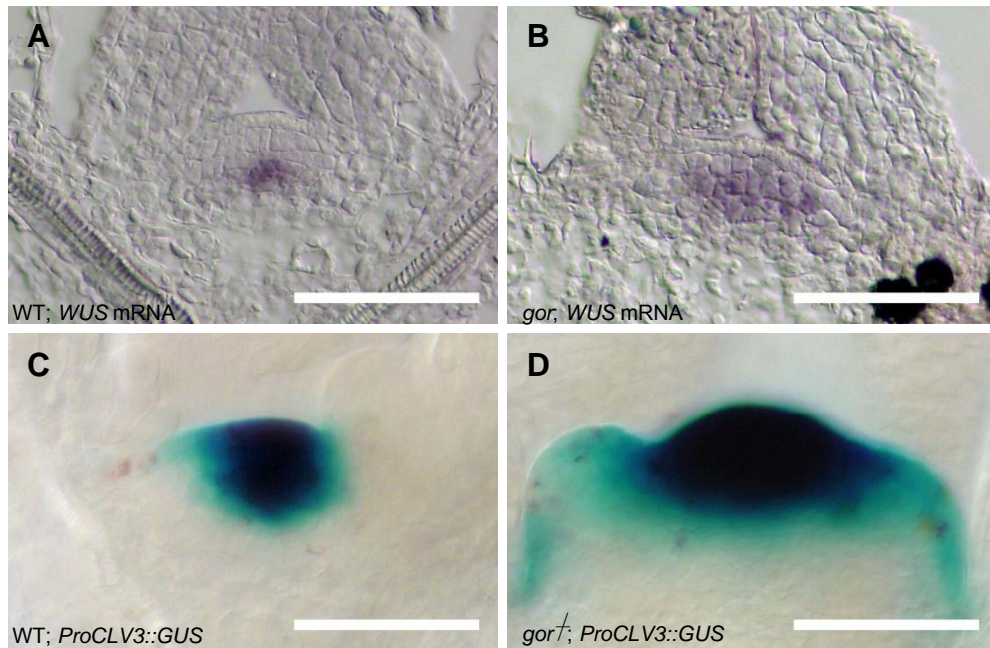


図14. *gor*変異体における*WUS*、*ProCLV3::GUS*の発現パターンの解析

野生型植物体 (A, C) および*gor*変異体 (B, D) 発芽後5日目の茎頂部の縦断像
(A, B) *WUS*特異的プローブを用いた*in situ* ハイブリダイゼーション

野生型植物体 (A) においては*WUS*は茎頂分裂組織内の形成中心においてのみ
の発現するが、*gor*変異体 (B) においては*WUS*は本来の発現領域よりも上方およ
び側方へと拡大した領域で発現する。

(C, D) *ProCLV3::GUS*によるGUS染色

野生型植物体 (C) においてGUSの活性は茎頂分裂組織の中央領域でのみ検出さ
れる。一方、*gor*変異体 (D) においてはGUSの活性は茎頂分裂組織全体で強く検
出され、また葉原基においても弱く検出される。

Bars = 50 μ m

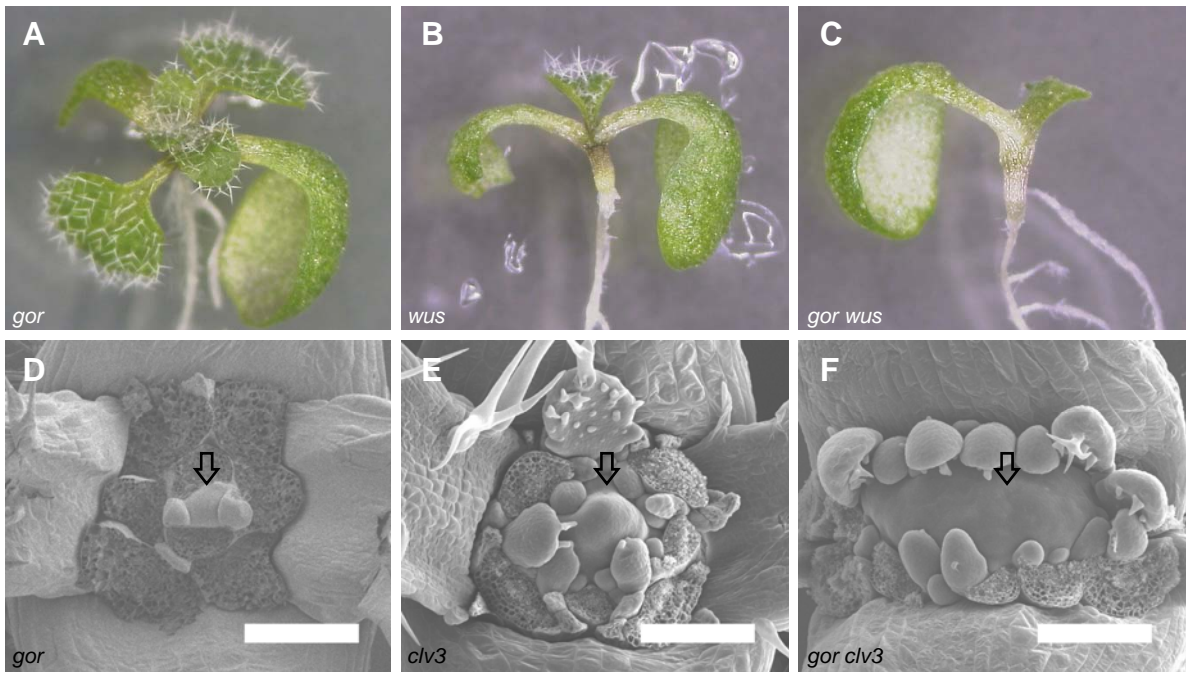


図15. *gor wus*二重変異体および*gor clv3*二重変異体の表現型解析

(A-C) *gor wus*二重変異体の解析 発芽後7日目の植物体

*gor*単独変異体 (A) は葉を連続して形成した。*wus*単独変異体 (B)は葉を2枚程度形成した後、成長を一旦停止した。その後、*wus*単独変異体は葉の形成の再開と停止を繰り返し、やぶ状の表現型を示す。*gor wus*二重変異体 (C) は葉を全く形成せず、そのまま枯死した。

子葉の一部はジェノタイピングのため切除してある。

(D-F) *gor clv3*二重変異体の解析 発芽後7日目の茎頂部のSEM像

*gor clv3*二重変異体の茎頂分裂組織 (F; 矢印) は、*gor*や*clv3*単独変異体の茎頂分裂組織 (D, E; 矢印) よりも拡大していた。

Bars = 50 μ m

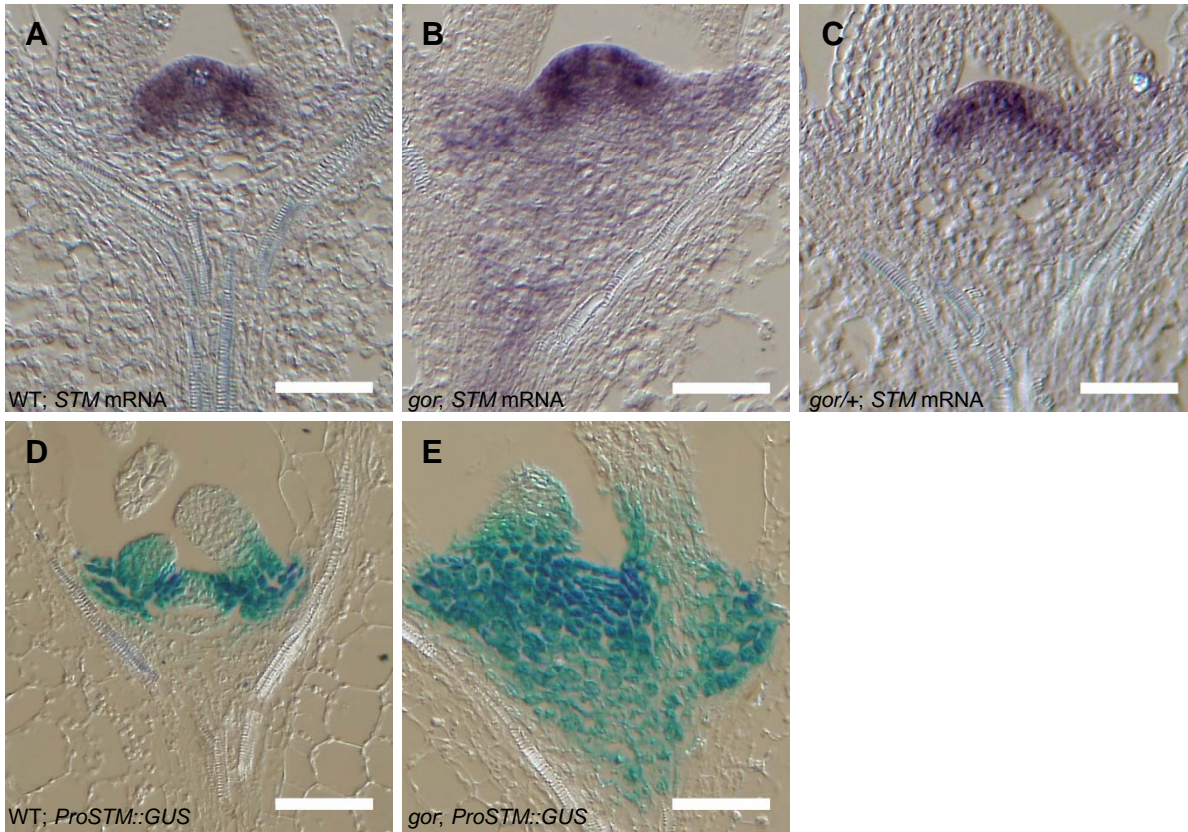


図16. *gor*変異体におけSTMの発現パターンの解析

発芽後5日目の野生型植物体 (A, D)、*gor*変異体 (B, E) および*gor*ヘテロ植物体 (C) における茎頂部の縦断切片

(A-C) STM特異的プローブを用いた*in situ* ハイブリダイゼーション

野生型植物体 (A) および*gor*ヘテロ植物体 (C) ではSTMの発現が茎頂分裂組織において観察され、葉原基では発現が消失する。

*gor*変異体 (B) でもSTMの発現は茎頂分裂組織において観察され、葉原基では発現が消失する。また、*gor*変異体においてはSTMの発現領域が茎頂分裂組織の下部領域まで拡大する。

(D, E) *ProSTM::GUS*によるGUS染色

in situ ハイブリダイゼーション同様に、*gor*変異体 (E) において*ProSTM::GUS*の活性が検出される領域が野生型植物体 (D) と比較して拡大する。

Bars = 50 μm

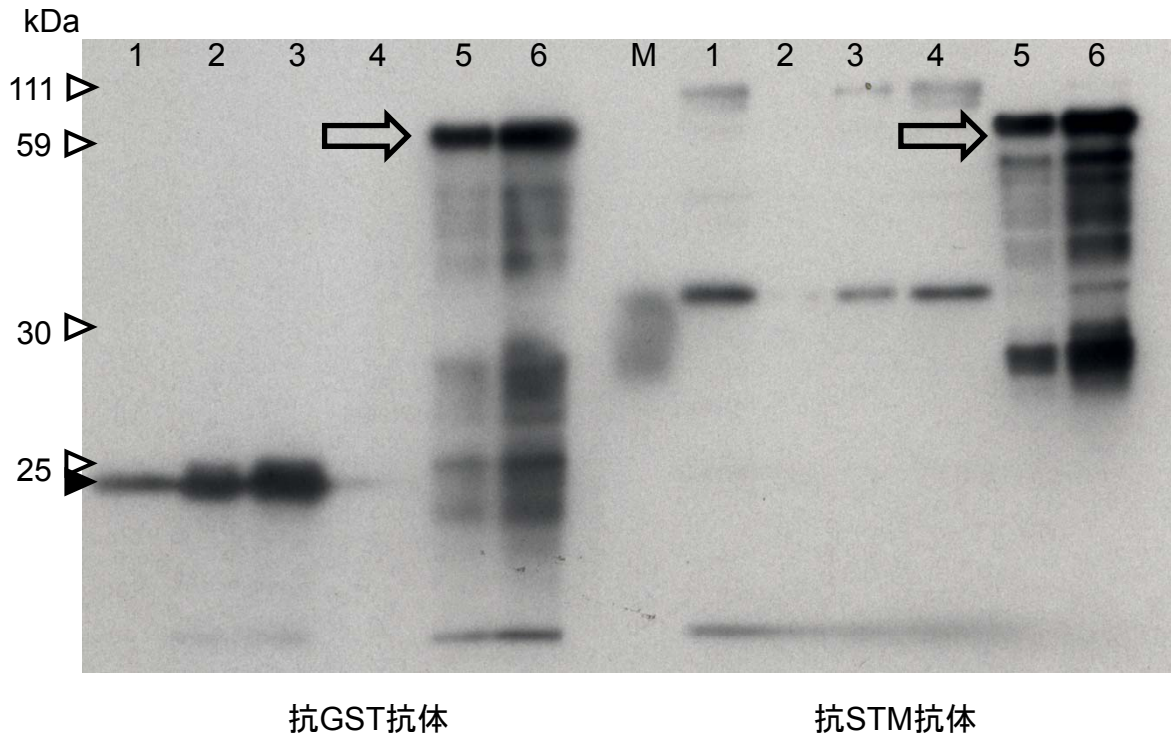


図17. GST融合STMタンパク質を用いた抗STM抗体の検定

抗STM抗体および抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティング解析

抗STM抗体がSTMを認識する機能的な抗体であるかどうかを評価するため、GST融合STMタンパク質 (GST-STM) 含む大腸菌から抽出した全タンパク質に対して抗STM抗体および抗GST抗体を用いてウェスタンブロッティング解析を行なった。発現誘導系およびウェスタンブロッティング解析のポジティブコントロールとしてGSTを用いた。

それぞれのレーンには1; GST (IPTGによる発現誘導時間: 0 min, 以下同様)、2; GST (45 min)、3; GST (90 min)、4; GST-STM (0 min)、5; GST-STM (45 min)、6; GST-STM (90 min) を発現するベクターが形質転換された大腸菌から抽出した全タンパク質、および、M; 分子量マーカーを泳動した。

GSTの予測分子量は26 kDaであり、GST-STMの予測分子量は68~75 kDaである。

抗GST抗体を用いた解析ではGST (黒矢尻) とGST-STM (矢印) の予測分子量に近い位置にバンドが検出された。また、抗STM抗体を用いた解析ではGST-STM (矢印) の予測分子量に近い位置にバンドが検出された。

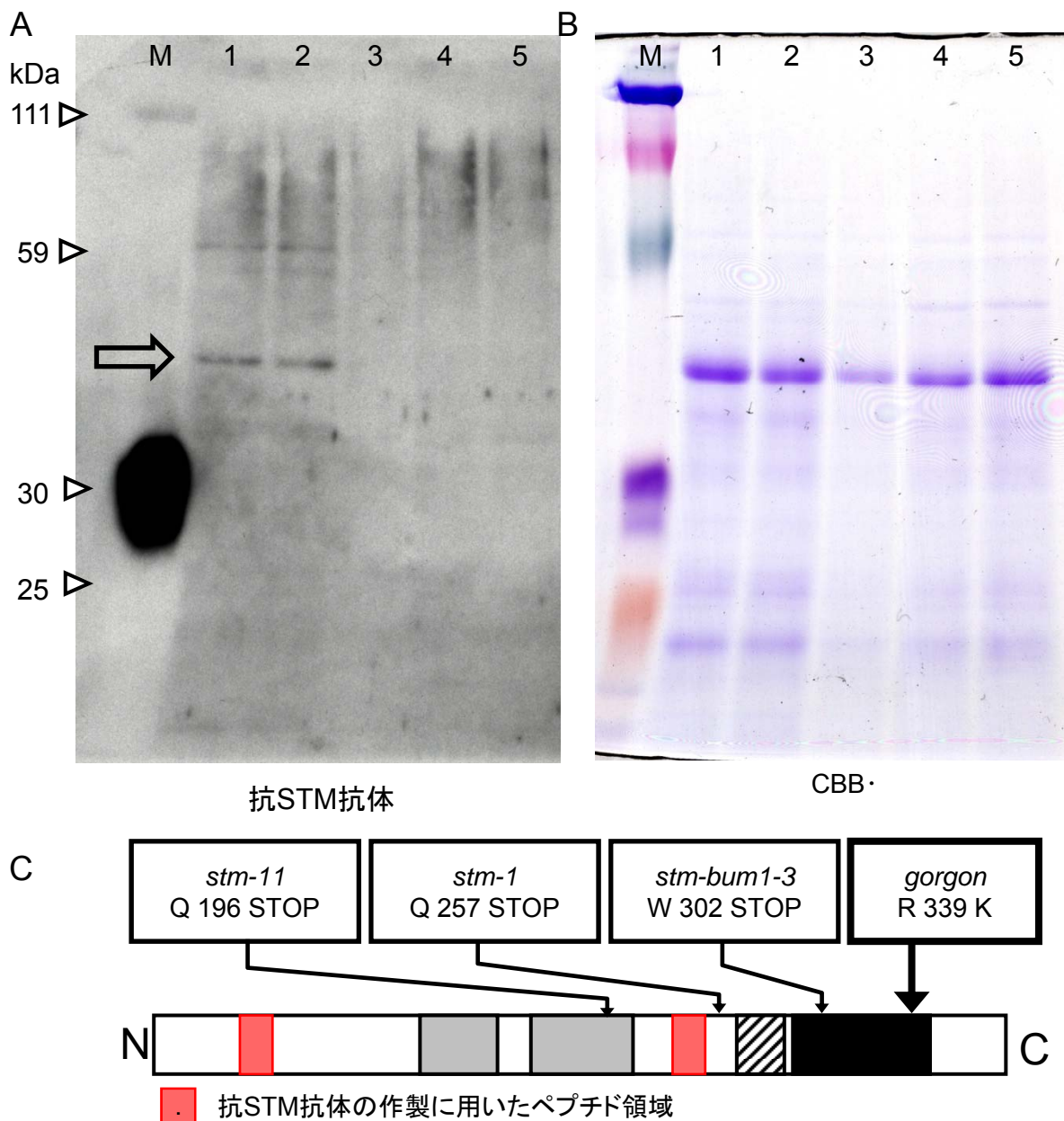


図18. 抗STM抗体を用いたウェスタンブロットティング解析

(A, B) 抗STM抗体を用いたウェスタンブロットティング (A) およびCBB染色像 (B) それぞれのレーンには1; 野生型植物体 (予測分子量: 42-49 kDa, 以下同様)、2; *gor*変異体 (42-49 kDa)、3; *stm-1C*変異体 (32 kDa)、4; *stm-bum1-3*変異体 (38 kDa)、5; *stm-11*変異体 (24 kDa) から抽出した全タンパク質、およびM; 分子量マーカーを泳動した。

野生型植物体および*gor*変異体から抽出したタンパク質においてのみ、STMの予想分子量に近い位置に抗STM抗体特異的なバンド (矢印) が検出された。

(C) 抗STM抗体作製のために用いたペプチド領域と、各変異体における変異部位

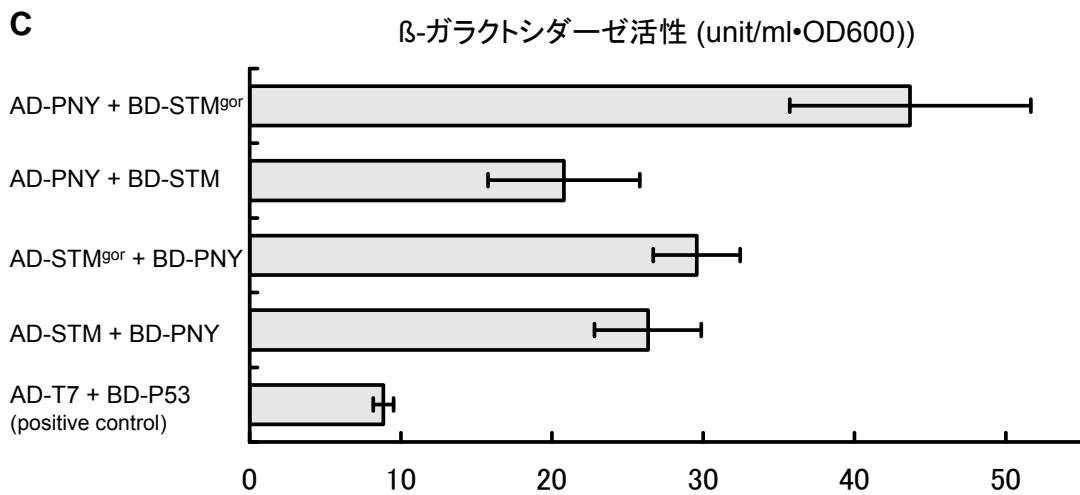
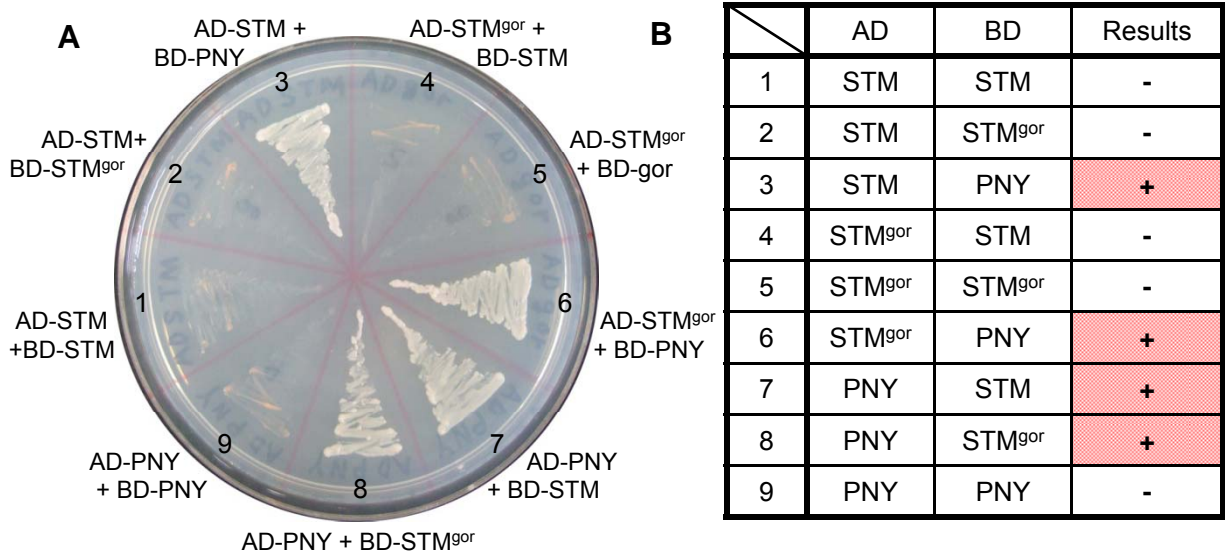


図19. *gor*変異がSTMタンパク質とPNYタンパク質との相互作用に与える影響の解析

(A, B) Yeast two-hybrid法を用いた解析

野生型STMタンパク質および*gor*変異型STMタンパク質 (STM^{gor})とPNYタンパク質との相互作用能のTrp-/Leu-/His-/Ade- 選択培地による検定。

(C) β-ガラクトシダーゼ活性測定

STM - PNYおよびSTM^{gor} - PNYの相互作用能の違いを定量的に示すため、β-ガラクトシダーゼ活性測定を行なった。

PreyとしてPNYを用いた場合、BaitとしてSTMを用いたものよりもSTM^{gor}を用いたものの方が高いβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。

AD-T7 + BD-P53は実験のポジティブコントロールとして用いられた。

それぞれの値は3回の実験の平均値と標準偏差を示す。

酵母内では*gor*変異はSTMとPNYの相互作用を阻害せず、STM^{gor}はPNYと結合することが示された。

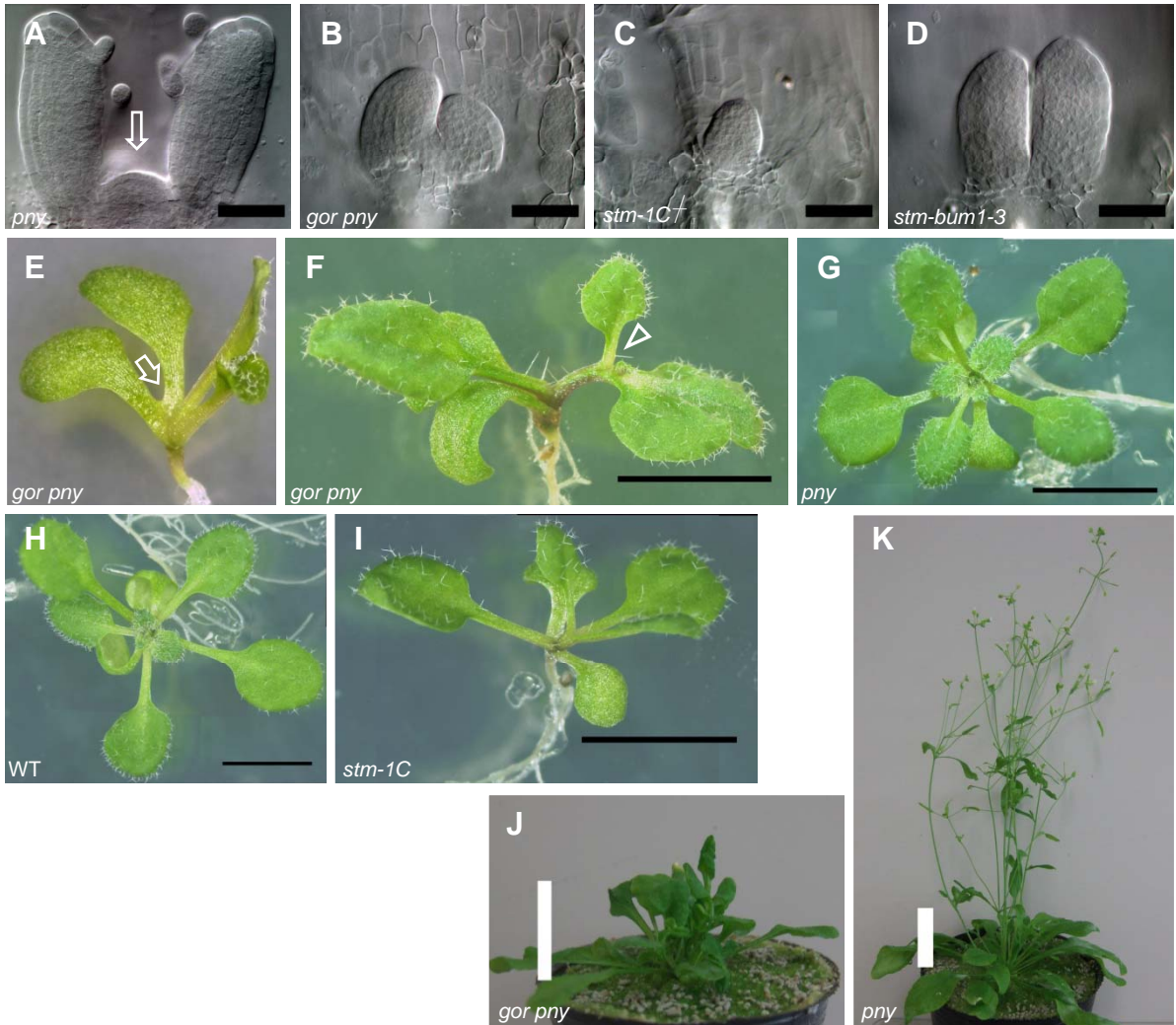


図20. *gor pny*二重変異体の表現型解析

(A-D) 発芽後4日目の茎頂部の透明化像

*pny*単独変異体 (A) はドーム状の茎頂分裂組織を形成する (矢印)。一方、*gor pny*二重変異体 (B)、*stm-1C*変異体 (C) および*stm-bum1-3*変異体 (D) では茎頂分裂組織のサイズが大きく減少する。

Bars = 50 μ m

(E-I) 発芽後7日目 (E) および発芽後14日目 (F-I) の植物体

(E, F) *gor pny*二重変異体では子葉柄の融合 (E; 矢印) や葉柄の融合、葉柄からの異所的な葉の形成 (F; 矢尻) が観察され、規則正しい葉序を示さない。

(G, H) *pny*単独変異体 (G) は野生型植物体 (H) とほぼ同様の葉序を示す。

(I) *stm-1C*変異体では葉序が乱れる。

Bars = 5 mm

(J, K) 発芽後6週間の植物体

*pny gor*変異体 (J) は花成に移行せず、そのまま抽臺すること無く枯死する。

一方、*pny*単独変異体 (K) は抽臺する。

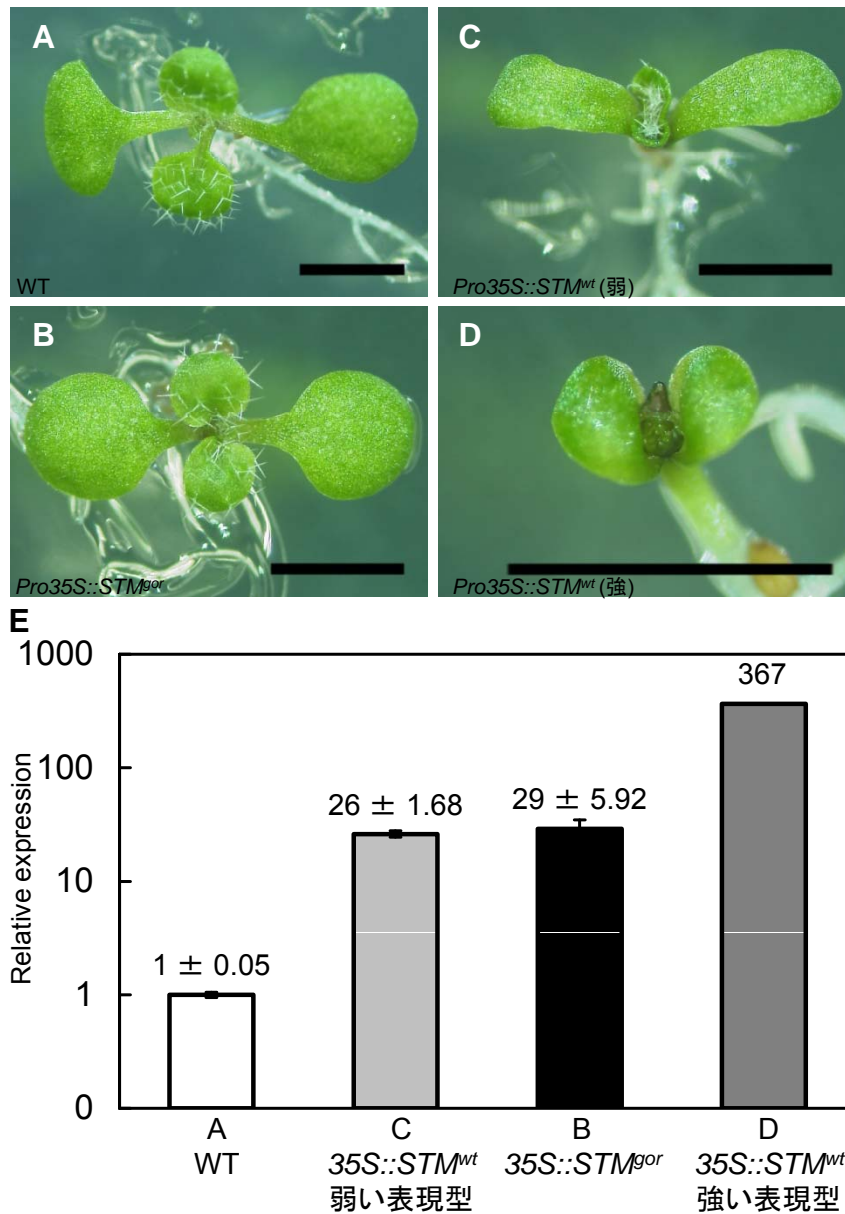


図21. 野生型STMおよびgor変異型STMの過剰発現体

(A-D) 発芽後7日目の芽生え (形質転換体の背景は全てCol)

Pro35S::STM^{wt}形質転換体 (B, D) の子葉では葉柄と葉身が明確に区別できず、発達が遅れる。また葉の形成が遅延する。表現型の強いライン (D) では茎頂部に複数の葉原基様の器官が形成される。

Pro35S::STM^{gor}形質転換体 (C) の子葉は野生型植物体 (A) と同様に葉柄と葉身が明確に区別できる。また葉の形成は遅延していない。

Bars = 2 mm

(E) リアルタイムRT-PCRによるSTMの発現解析

地上部全体をサンプルとしてRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを行なった。グラフの縦軸は野生型植物体におけるSTMの発現量の平均を1としたときの相対値、バーは標準偏差を示す。

(A-C) については1サンプルあたり8個体を用いて、独立した3回の実験を行なった。

(D) については1サンプルあたり4個体を用いて1回の実験を行なった。

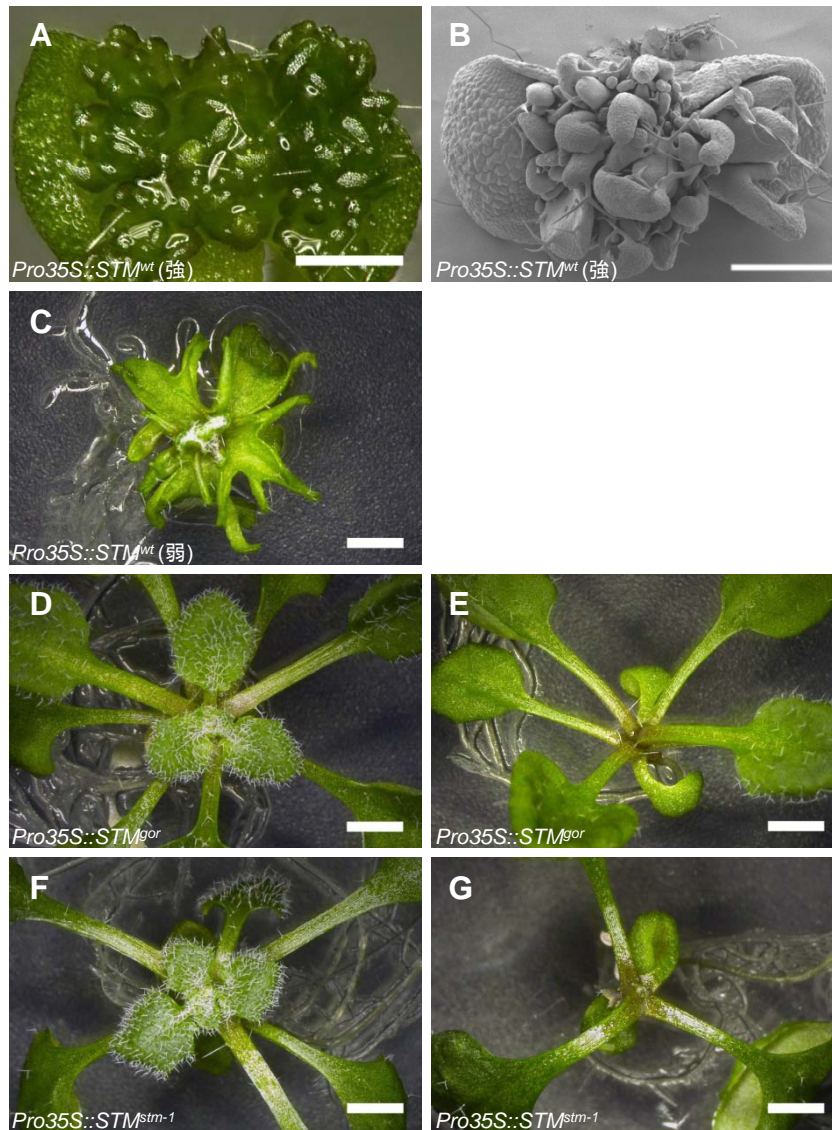


図22. 野生型STM、gor変異型STMおよびstm-1変異型STMの過剰発現体

発芽後25日目の芽生え (形質転換体の背景は全てCol)

(A-C) *Pro35S::STM*形質転換体

表現型にばらつきが見られたが、全てのラインにおいて葉の発達が抑制された。表現型が強いライン (A, B; SEM像) では子葉がほとんど発達せずに茎頂部に多数の葉原基様の器官が形成された。表現型が弱いラインでは子葉が発達せず、鋸歯状の葉が形成された。(A, B) および (C) の表現型が現れた割合はそれぞれ 25.0 %、75.0 %である (n = 40ライン)。

(D, E) *Pro35S::STM^{gor}*形質転換体

多くのラインで野生型植物体と同様の表現型が観察された (D)。いくつかのラインで *stm* 変異体様の表現型が観察された (E)。(D) および (E) の表現型が現れた割合はそれぞれ80.8 %、19.2 %である (n = 52ライン)。

(F, G) *Pro35S::STM^{stm-1}*形質転換体

多くのラインで野生型植物体と同様の表現型が観察された (F)。いくつかのラインで *stm* 変異体様の表現型が観察された (G)。(F) および (G) の表現型が現れた割合はそれぞれ70.6 %、29.4 %である (n = 17ライン)

Bars = 2 mm

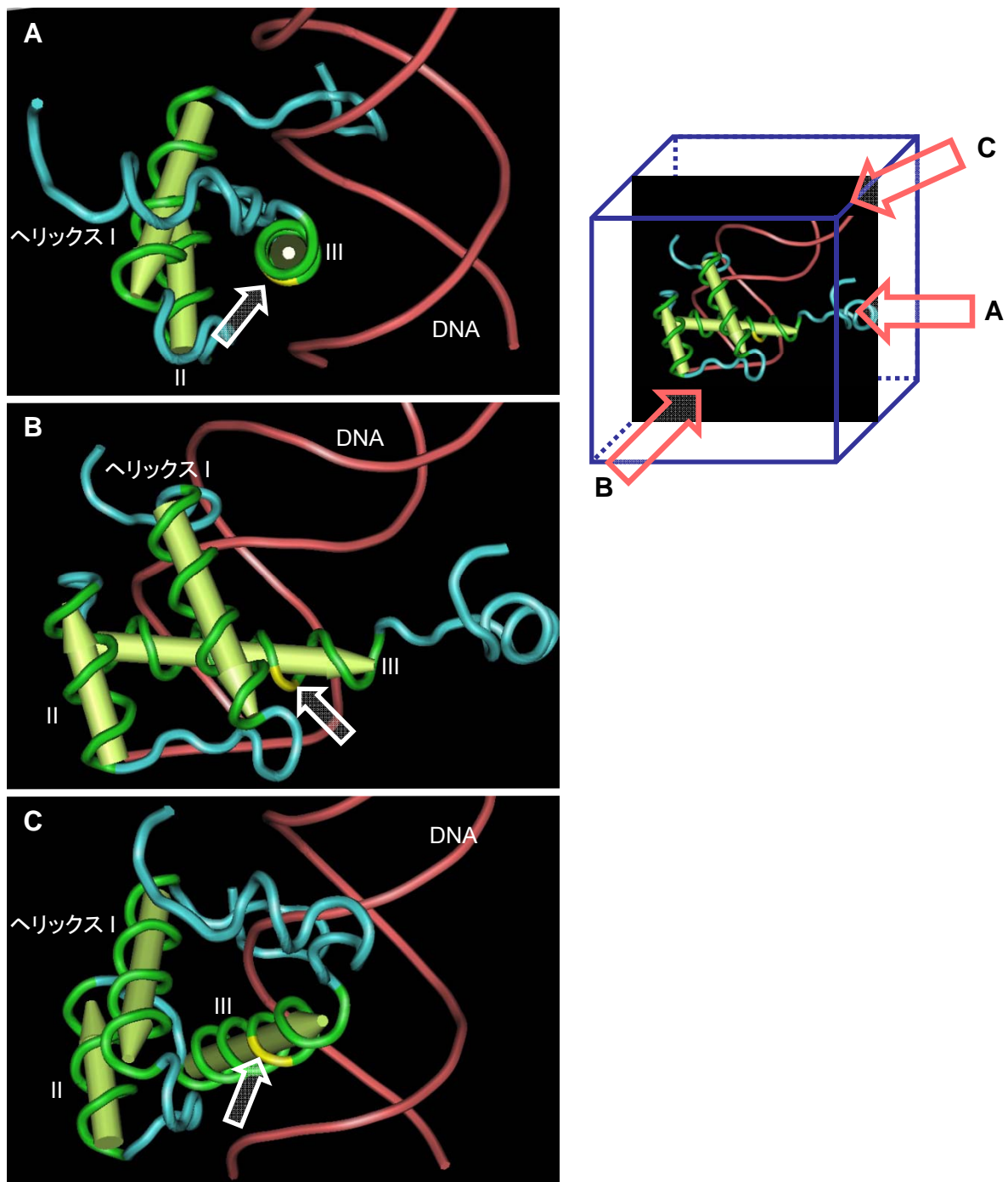


図23. ホメオドメインの立体構造とArg339の位置

(A-C) KNOX・タンパク質と同様にTALEクラスに属する酵母のMAT a1 alpha 2のホメオドメインと二本鎖DNAの立体構造 (NCBI MMDB ID: 71555)。

ホメオドメインとDNAの結合にはホメオドメイン中の第3ヘリックス (III) が中心的に機能する。第3ヘリックスは二本鎖DNAの主溝 (Major groove) にはまり込むような立体構造を有する。

gor変異によりアミノ酸置換が引き起こされるアルギニン (Arg339; 矢印, 黄色) は典型的なホメオドメインの53番目のアルギニン (Arg53) に相当する。

Arg53はDNAのリン酸主鎖と水素結合すること、ホメオドメインとDNAの結合にとって重要な機能をするのがこれまでに報告されている。

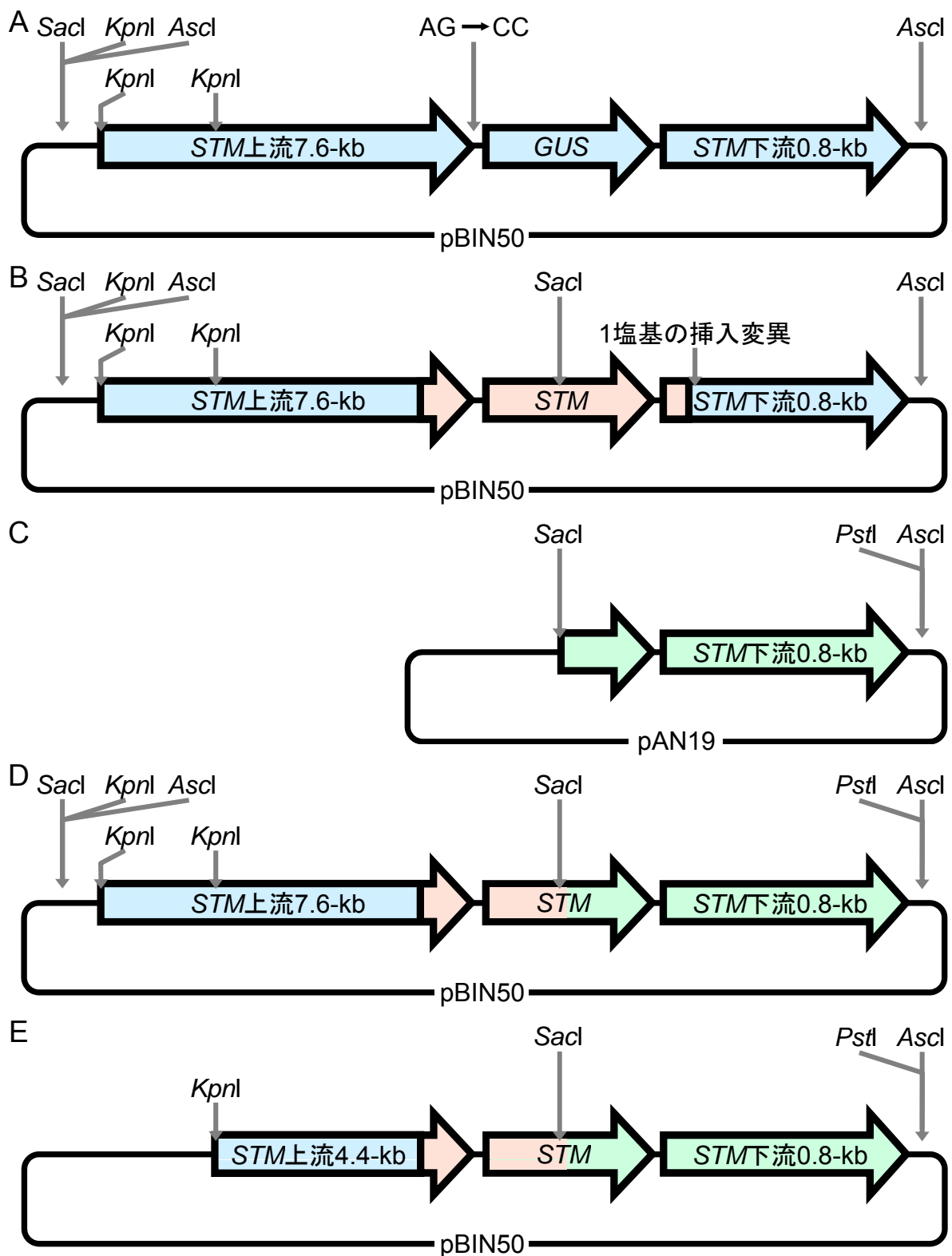


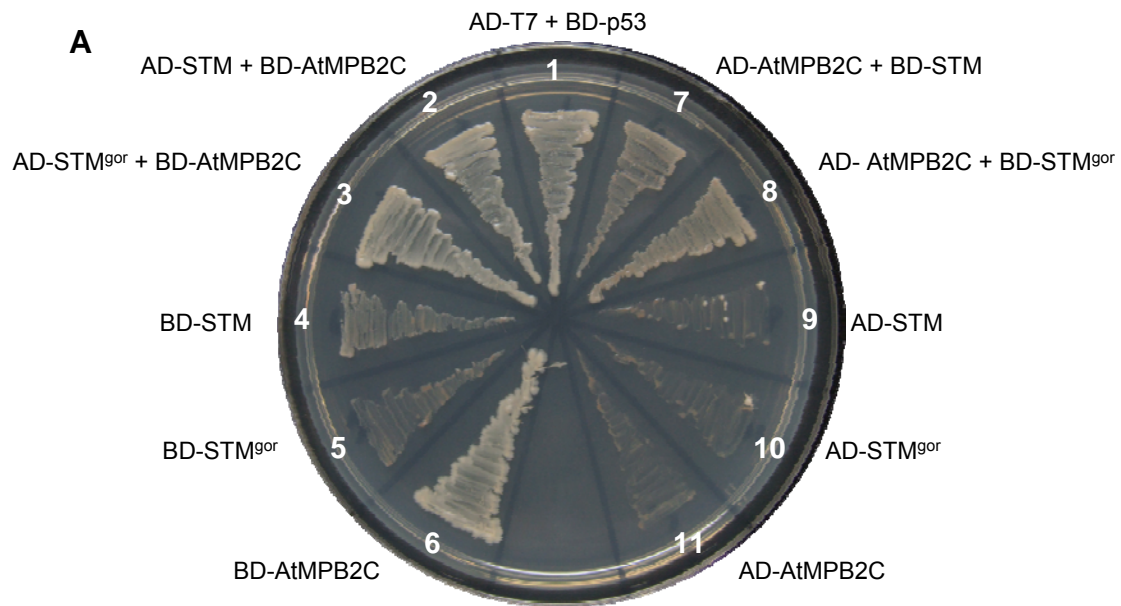
図24. genomic STM^{wt}コンストラクションの模式図

(A-B) 材料と方法II.5-1. 1-2; Recombination systemによる組み換え

(C) 材料と方法II.5-1. 3-5; 第2エクソンから下流領域のクローニング

(D) 材料と方法II.5-1. 6-8; 上流領域と下流領域のライゲーションおよびpBIN50へのサブクローニング

(E) 材料と方法II.5-1. 9-10; プロモーター上のKpnIサイトより上流領域の削除



B

	AD	BD	Results
1	T7	p53	+(positive control)
2	STM	AtMPB2C	+
3	STM ^{gor}	AtMPB2C	+
4	empty	STM	-
5	empty	STM ^{gor}	-
6	empty	AtMPB2C	+
7	AtMPB2C	STM	+
8	AtMPB2C	STM ^{gor}	+
9	STM	empty	-
10	STM ^{gor}	empty	-
11	AtMPB2C	empty	-

サプリメンタルデータ図S1. gor変異がSTMタンパク質とAtMPB2Cとの相互作用に与える影響の解析

(A, B) Yeast two-hybrid法を用いた解析

野生型STMタンパク質およびgor変異型STMタンパク質 (STM^{gor})とAtMPB2Cとの相互作用能のTrp-/Leu-/His-/Ade- 選択培地による検定。

BaitとしてAtMPB2Cを用いたものは単独で偽陽性を示す (2, 3, 6)。

酵母内ではgor変異はSTMとAtMPB2Cの相互作用を阻害せず、STM^{gor}はAtMPB2Cと結合することが示された。

テーブル 1.

シロイヌナズナのホメオドメインタンパク質におけるWFXNxR配列の一覧

Class	AGI code	タンパク質名	WFXNxR		
BELL	At4g32980	ATH1	WFINAR		
	At5g41410	BEL1	WFINAR		
	At4g36870	BLH2, SAW1	WFINAR		
	At1g75410	BLH3	WFINAR		
	At2g23760	BLH4, SAW2	WFINAR		
	At1g19700	BEL10, BLH10, BLH5	WFINAR		
	At5g02030	BLH9, BLR, HB-6, LSN, PNY, RPL, VAN	WFINAR		
	At2g35940	BLH1, EDA29	WFINAR		
	At2g27220	BLH5	WFINAR		
	At1g75430	BLH11	WFINAR		
	At2g16400	BLH7	WFINAR		
	At4g34610	BLH6	WFINAR		
	At2g27990	BLH8, PNF, POUND-FOOLISH	WFINAR		
	HD-Zip	Class I	At3g01470	ATHB-1, ATHB1, HAT5, HD-ZIP-1	WFQNRR
At3g61890			ATHB-12, ATHB12	WFQNKR	
At1g69780			ATHB13	WFQNRR	
At4g40060			ATHB-16, ATHB16	WFQNRR	
At5g15150			ATHB-3, ATHB3, HAT7	WFQNRR	
At5g65310			ATHB-5, ATHB5	WFQNRR	
At2g22430			ATHB6	WFQNRR	
At2g46680			ATHB-7, ATHB7	WFQNKR	
At4g36740			ATHB40, HB-5	WFQNRR	
At2g36610			ATHB22	WFQNRK	
At3g01220			ATHB20	WFQNRR	
At5g03790			ATHB51, LMI1	WFQNRR	
At1g27050			ATHB54	WFQNRR	
At1g26960			ATHB23	WFQNRR	
At5g66700			ATHB53, HB-8, HB53	WFQNRR	
At5g53980			ATHB52	WFQNKR	
At2g18550			ATHB21, HB-2	WFQNRR	
Class II			At2g01430	ATHB-17, ATHB17	WFQNRR
			At4g16780	ATHB-2, ATHB2, HAT4	WFQNRR
			At2g44910	ATHB-4, ATHB4	WFQNRR
		At4g17460	HAT1	WFQNRR	
		At5g06710	HAT14	WFQNRR	
		At5g47370	HAT2	WFQNRR	
		At4g37790	HAT22	WFQNRR	
		At3g60390	HAT3	WFQNRR	
		At2g22800	HAT9	WFQNRR	
		At1g70920	ATHB18	WFQNRR	
Class III		At2g34710	ATHB-14, ATHB14, PHB, PHB-1D	WFQNRR	
		At1g52150	ATHB-15, ATHB15, CAN, CNA, ICU4	WFQNRR	
		At4g32880	ATHB-8, ATHB8	WFQNRR	
		At1g30490	ATHB9, PHV	WFQNRR	
		At5g60690	IFL, IFL1, REV	WFQNRR	
Class IV		At4g00730	AHDP, ANL2	WFQNRR	

		At1g79840	GL2	WFQNRR
		At4g21750	ATML1	WFQNKR
		At4g25530	FWA, HDG6	WFQNKR
		At3g61150	HD-GL2-1, HDG1	WFQNRR
		At2g32370	HDG3	WFQNKR
		At1g73360	ATHDG11, EDT1, HDG11	WFQNRR
		At1g05230	HDG2	WFQNKR
		At4g17710	HDG4	WFQNKR
		At1g34650	HDG10	WFQNRR
		At3g03260	HDG8	WFQNKR
		At5g17320	HDG9	WFQNKR
		At5g46880	HB-7, HDG5	WFQNRR
		At5g52170	HDG7	WFQNRR
		At1g17920	HDG12	WFQNRR
		At4g04890	PDF2	WFQNKR
KNOX	Class I	At4g08150	BP, BP1, KNAT1	WFINQR
		At1g70510	ATK1, KNAT2	WFINQR
		At1g23380	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S	WFINQR
		At1g62360	BUM, BUM1, SHL, STM, WAM, WAM1	WFINQR
	Class II	At5g25220	KNAT3	WFINQR
		At5g11060	KNAT4	WFINQR
		At4g32040	KNAT5	WFINQR
	At1g62990	IXR11, KNAT7	WFINQR	
LD	At4g02560	LD	FFVTQK	
PHD-finger	At3g19510	HAT3.1	WFKHRR	
	At4g29940	PRHA	WFKNTR	
Similar to HOX7 (tomato)	At5g44180		WFCHRR	
	At1g28420	HB-1	WFCHRR	
	At4g03250	HOX7, Similar, to	WFCHRR	
WOX	At5g46010		WFHNRK	
	At3g18010	WOX1	WFQNHK	
	At1g20710	WOX10	WFQNRR	
	At3g03660	WOX11	WFQNRR	
	At5g17810	WOX12	WFQNRR	
	At4g35550	HB-4, WOX13	WFQNRR	
	At1g20700	ATWOX14, PALE2, WOX14	WFQNRR	
	At5g59340	WOX2	WFQNHK	
	At2g28610	PRS, PRS1, WOX3	WFQNHK	
	At1g46480	WOX4	WFQNHK	
	At3g11260	WOX5	WFQNHK	
	At2g01500	HOS9, PFS2, WOX6	WFQNHK	
	At5g05770	WOX7	WFQNHK	
	At5g45980	STPL, WOX8	WFQNRR	
	At2g33880	HB-3, STIMPY, STIP, WOX9	WFQNRR	
	At2g17950	PGA6, WUS, WUS1, WUSCHEL	WFQNHK	

タンパク質の名称とクラスはArabidopsis Transcription Factor Database に従って分類された (AtTFDB; <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/>)。青色の列はホメオドメインのコンセンサス配列中の53番目のアミノ酸がアルギニン (R) では無く、リシン (K) であるタンパク質を示す。STM は黄色で示す。

VI. 参考文献

- 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., Risseeuw, 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.
- Banerjee-Basu, S., and Baxevanis, A.D. (2001).** Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucl Acids Res* **29**, 3258-3269.
- 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**, 823-881.
- Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S.E., Modrusan, Z., Crosby, W.L., and Haughn, G.W. (2001).** The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* **13**, 2455-2470.
- Benassayag, C., Seroude, L., Boube, M., Erard, M., and Cribbs, D.L. (1997).** A homeodomain point mutation of the *Drosophila* proboscipedia protein provokes eye loss independently of homeotic function. *Mech Dev* **63**, 187-198.
- Bhatt, A.M., Etchells, J.P., Canales, C., Lagodienko, A., and Dickinson, H. (2004).**

VAAMANA—a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 103-111.

Bolduc, N., and Hake, S. (2009). The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *Plant Cell* **21**, 1647-1658.

Bougourd, S., Marrison, J., and Haseloff, J. (2000). Technical advance: an aniline blue staining procedure for confocal microscopy and 3D imaging of normal and perturbed cellular phenotypes in mature *Arabidopsis* embryos. *Plant J* **24**, 543-550.

Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M., and Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 565-575.

Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* **289**, 617-619.

Bürglin, T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl Acids Res* **25**, 4173-4180.

Byrne, M.E., Simorowski, J., and Martienssen, R.A. (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1957-1965.

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.

Chen, H., Banerjee, A.K., and Hannapel, D.J. (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *Plant J* **38**, 276-284.

Chi, Y.I. (2005). Homeodomain revisited: a lesson from disease-causing mutations. *Hum Genet* **116**, 433-444.

Clark, S.E. (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. *Plant Cell* **9**, 1067-1076.

Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.

Curin, M., Ojangu, E.L., Trutnyeva, K., Ilau, B., Truve, E., and Waigmann, E. (2007). MPB2C, a microtubule-associated plant factor, is required for microtubular accumulation of tobacco mosaic virus movement protein in plants. *Plant Physiol* **143**, 801-811.

De Buck, S., Podevin, N., Nolf, J., Jacobs, A., and Depicker, A. (2009). The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J* **60**, 134-145.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z., and Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* **10**,

967-979.

- Felix, G., Altmann, T., Uwer, U., Jessop, A., Willmitzer, L., and Morris, P.C.** (1996). Characterization of *waldmeister*, a novel developmental mutant in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **47**, 1007-1017.
- Fleet, C.M., and Sun, T.P.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 77-85.
- 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.
- Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1996). *SGR1*, *SGR2*, *SGR3*: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**, 945-955.
- 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.
- Gallois, J.L., Woodward, C., Reddy, G.V., and Sablowski, R.** (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 3207-3217.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wüthrich, K.** (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- Hackbusch, J., Richter, K., Müller, J., Salamini, F., and Uhrig, J.F.** (2005). A central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and

- subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **102**, 4908-4912.
- Hake, S., Smith, H.M., Holtan, H., Magnani, E., Mele, G., and Ramirez, J.** (2004). The role of *knox* genes in plant development. Annu Rev Cell Dev Biol **20**, 125-151.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., and Tsiantis, M.** (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. Curr Biol **12**, 1557-1565.
- Heberlein, U., Penton, A., Falsafi, S., Hackett, D., and Rubin, G.M.** (1994). The C-terminus of the homeodomain is required for functional specificity of the *Drosophila rough* gene. Mech Dev **48**, 35-49.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R., and Kakimoto, T.** (2004). *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 8821-8826.
- 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.
- Jackson, D.** (2002). Double labeling of KNOTTED1 mRNA and protein reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. Plant Physiol **129**, 1423-1429.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A.,**

- Hedden, P., and Tsiantis, M.** (2005). KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* **15**, 1560-1565.
- Kanrar, S., Onguka, O., and Smith, H.M.** (2006). *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of KNOX-BELL homeodomain heterodimers. *Planta* **224**, 1163-1173.
- Kasahara, H., and Benson, D.W.** (2004). Biochemical analyses of eight NKX2.5 homeodomain missense mutations causing atrioventricular block and cardiac anomalies. *Cardiovasc Res* **64**, 40-51.
- Kato, T., Morita, M.T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., and Tasaka, M.** (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 33-46.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., and Jackson, D.** (2003). Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 4351-4362.
- Kim, J.Y., Rim, Y., Wang, J., and Jackson, D.** (2005). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev* **19**, 788-793.
- 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.

- Kissinger, C.R., Liu, B.S., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B., and Pabo, C.O.** (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-590.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A., and Waigmann, E.** (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol* **132**, 1870-1883.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jürgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Lee, J.H., Lin, H., Joo, S., and Goodenough, U.** (2008). Early sexual origins of homeoprotein heterodimerization and evolution of the plant KNOX/BELL family. *Cell* **133**, 829-840.
- Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T.** (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195-3206.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G., and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805-814.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral

- patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J.A., and Barton, M.K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-3035.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S.** (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980-1983.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayashi, Y.** (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.
- Reddy, G.V., and Meyerowitz, E.M.** (2005). Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science* **310**, 663-667.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., and Murray, J.A.** (1999).

Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.

Rutjens, B., Bao, D., van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeekens, S., and Proveniers, M. (2009). Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant J* **58**, 641-654.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jürgens, 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.

Sharma, V.K., Carles, C., and Fletcher, J.C. (2003). Maintenance of stem cell populations in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11823-11829.

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.

Smith, H.M., Boschke, I., and Hake, S. (2002). Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9579-9584.

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.

Tassetto, M., Maizel, A., Osorio, J., and Joliot, A. (2005). Plant and animal homeodomains use convergent mechanisms for intercellular transfer. *EMBO*

Rep **6**, 885-890.

- Viola, I.L., and Gonzalez, D.H.** (2006). Interaction of the BELL-like protein ATH1 with DNA: role of homeodomain residue 54 in specifying the different binding properties of BELL and KNOX proteins. *Biol Chem* **387**, 31-40.
- Viola, I.L., and Gonzalez, D.H.** (2009). Binding properties of the complex formed by the *Arabidopsis* TALE homeodomain proteins STM and BLH3 to DNA containing single and double target sites. *Biochimie* **91**, 974-981.
- 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.
- Williams, R.W.** (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* **20**, 280-282.
- Winter, N., Kollwig, G., Zhang, S., and Kragler, F.** (2007). MPB2C, a microtubule-associated protein, regulates non-cell-autonomy of the homeodomain protein KNOTTED1. *Plant Cell* **19**, 3001-3018.
- Wolberger, C., Vershon, A.K., Liu, B., Johnson, A.D., and Pabo, C.O.** (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**, 517-528.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., and Ori, N.** (2005). *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* **15**, 1566-1571.

VII. 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、田坂昌生教授のもとで平成 17 年 6 月から平成 22 年 1 月にかけて行なわれました。本研究を行なうにあたり、田坂昌生教授には御指導、御助言を賜りましたことを心からお礼申し上げます。また、形態統御機構研究グループの相田光宏特任准教授には、常日頃より熱心な御指導、御助言をいただき、かつ本研究の進展を暖かく見守っていただきました。ここに心より感謝申し上げます。また、*gorgon* 変異体を発見し、マッピングおよびシーケンスを行ない、*STM* 遺伝子上の変異を同定していただいた新濱充博士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を頂きました森田美代准教授、古谷雅彦助教、打田直行助教、武田征士特任助教、またバイオサイエンス研究科の教官、職員の皆様に深くお礼申し上げます。最後に、奈良での 5 年間の研究生活を共にすごし、様々な場面でお世話になりました形質発現植物学講座の皆様、そして研究生活を支えてくれた両親、弟、友人達に心より感謝申し上げます。