

突然変異体を用いたシロイヌナズナの根の
形態形成機構の分子遺伝学的研究

平成7年度 博士論文

生命科学研究科分子生物機構論専攻
和田 拓治 (学籍番号933210)

博士論文の要旨

平成8年1月10日

生命科学研究科分子生物機構論専攻

和田拓治

学籍番号 933210

博士論文

突然変異体を用いたシロイヌナズナの根の形態形成機構の分子遺伝学的研究

本論文では、シロイヌナズナの根の突然変異体を用いた分子遺伝学的な研究をおこなった。シロイヌナズナはゲノムサイズが半数体当たり 1×10^8 塩基対と高等植物の中では極端に小さく、世代期間が短いことから分子遺伝学的な研究を行うのには最適の材料である。その中でも、シロイヌナズナの根は構造が単純であるにもかかわらず、その細胞数や並び方は遺伝的に制御され、また種々の外的な刺激に反応しその形態が変化する。根の形態形成機構の研究は、植物の器官発生における細胞分裂と伸長の制御機構を知るための理想的なモデルであると考えられる。しかし、根の組織分化に関する遺伝子間の相互作用機構や、環境刺激に対する応答機構を支配する遺伝的な制御システムについてはほとんど解明されていない。

私は根毛の分化、根の形態形成機構および光に対する根の屈性機構にに興味をもち、その遺伝的制御機構を分子遺伝学的な手法を用いて明らかにした。本研究では以下の3つの研究題目について研究をおこなった。

1) 根毛形成開始を制御する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析。2) 根が太くなった RH32 突然変異体の分子遺伝学的な解析 3) 根の光屈性異常突然変異体 *rpt* (root phototropism) の遺伝学的解析。

1) 根毛形成開始を制御する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析。

T-DNAを導入したトランスジェニックシロイヌナズナ株をスクリーニングし、根毛の数が少なくなった突然変異体 *caprice* (*cpc*) を分離した。遺伝学的な解析からこの変異はT-DNAの挿入によること、すなわち T-DNA でタグされているを確かめた。T-DNAの近傍

の2kbのシロイヌナズナのゲノムDNA断片をinverse PCR法によって増幅し、その断片をプローブとしてゲノムライブラリーから独立した4個のクローンを単離した。次にこのゲノムクローンをプローブとして根のcDNAライブラリーのスクリーニングをおこない、cDNAクローンを得てその塩基配列を決定した。CPC遺伝子の全長は584bpで、動物の癌原遺伝子のひとつであるmyb遺伝子のDNA結合領域と相同性の高い部分をもっていた。

また根毛の形が異常になった*rhd2*, *rhd3*突然変異体との間で二重突然変異体を作製したところ、CPC遺伝子は根毛細胞(trichoblast)において根毛伸長の開始機構を支配しているが、いったん伸長を開始した後の根毛の伸長には関与しないことが解った。また、エチレンやオーキシンなどの根毛の数を増加させるような植物ホルモンを投与しても、*cpc*突然変異体の根毛の数が少ないという形質を相補することはできなかった。

一方、根毛が多くなった突然変異体として、*ttg*, *gl2*突然変異体が報告されている。二重突然変異体を用いた解析より、CPC遺伝子はGL2遺伝子よりも上流で働いていることが示唆された。

*ttg*突然変異体にトウモロコシのR遺伝子(*myc*のホモログ)を導入するとその表現型が野生型に復帰したことがすでに報告されている。このことより、TTG遺伝子は*myc*のホモログであると考えられている。トウモロコシのアンソシニン合成系の酵素は*myb*遺伝子のホモログであるC1遺伝子と*myc*遺伝子のホモログであるR遺伝子によってその発現が制御されていることが報告されている。

そこで私は根毛の形成開始においても、*myb*のホモログであるCPC遺伝子と*myc*のホモログであるTTG遺伝子によってGL2遺伝子の発現を制御しているというモデルを提唱した。CPC遺伝子には、他の植物の*myb*遺伝子のホモログであるGL1, C1遺伝子に存在する転写の活性化部位と考えられている酸性のアミノ酸に富んだ領域が存在しない。このことより、CPC遺伝子はDNAに結合するが、転写のリプレッサーとして働くのではないかと考えた。CPC遺伝子によってGL2遺伝子の発現が抑制されると、根毛がたくさん形成されるようになる。

このモデルは葉や茎に生じる表皮細胞の毛(トライコーム)の形成を決定する機構と極めて類似している。トライコームの場合、根毛形成時と逆にGL2遺伝子の発現がトライコームの形成を正に制御している。この場合のGL2遺伝子の発現を制御は*myb*のホモログであるGL1遺伝子と*myc*遺伝子のホモログであるTTG遺伝子によって正に制御されている。

2) 根が太くなったRH32突然変異体の分子遺伝学的な解析

根が太くなった変異体の一つであるRH32変異体は、通常8個である根の皮層の数が10個まで増加している。現在までのところ一つの細胞層の細胞の数が増える突然変異

体は他に報告されていない。

RH32 突然変異体は根以外の器官の細胞伸長が異常になるので、RH32 遺伝子は根の細胞における細胞分裂のパターンとほぼすべての組織における細胞伸長を制御すると考えられた。他の根が太くなる突然変異体や根毛形成異常の突然変異体と RH32 突然変異体の間で二重突然変異体を作った。各組合せの二重変異体では、RH32 突然変異体の形質とそれぞれの突然変異体の形質とが付加的になった。この結果は RH32 遺伝子が根の形成において既知の他の遺伝子とは異なった制御経路に関わっていることを強く示唆する。

また根毛伸長において、*AXR2*→RH32→*AUX1* という順序で遺伝子の制御がおこなわれていることがわかった。

また RFLP マッピングの結果、RH32 遺伝子は ADH 遺伝子から 1.4% の組換え率の位置にあることを明らかにした。

3) 根の光屈性異常突然変異体 *rpt* (root phototropism) の遺伝学的解析

我々の研究室では、既に根の光屈性の突然変異体として *rpt1*, *rpt2*, *rpt3* を分離している。私はこれらの突然変異体を用いて根の光屈性に関わる制御機構を調べた。まずシロイヌナズナの芽生えの根が胚軸の場合と同様に青色の光によって屈曲することを確認した。次に、青色光照射下で *rpt1*, *rpt2*, *rpt3* の突然変異体の光屈性を精密に調べたところ、各突然変異体では、根だけではなく胚軸の光屈性も減少していることがわかった。特に *rpt3* 突然変異体の胚軸は屈曲の度合いが他の 2 つの突然変異体に比べてもさらに小さかった。また胚軸を切断しても根は光に反応して屈曲することができる。以上の結果より、根と胚軸の光屈性は共通の遺伝的制御機構によって支配されていることが、光を受容する部位は胚軸と根で異なっていることがわかった。

青色光の受容体である *HY4* 遺伝子単独の変異では胚軸の光屈性には影響をおよぼさない。しかし、*hy4* と *rpt1* の二重突然変異体は、*RPT1* 遺伝子だけが変異したときよりもさらに胚軸の光屈性がなくなった。このことから、胚軸の光屈性に関しては *HY4* 遺伝子は *RPT1* 遺伝子と独立の経路に存在することが示唆された。

目次

第1部 序論	1
I なぜシロイヌナズナの根を研究するのか?	2
II シロイヌナズナの根の構造と現在までの研究の概観	2
III 本研究の目的	10
第2部 材料と方法	12
第3部 根毛形成開始を制御する <i>CPC</i> 遺伝子のクローニングと機能の解析	22
I 結果	23
II 考察	42
第4部 根が太くなった <i>RH32</i> 突然変異体の分子遺伝学的な解析	50
I 結果	51
II 考察	68
第5部 根の光屈性異常突然変異体 <i>rpt</i> (root phototropism) の遺伝学的解析	73
I 結果	74
II 考察	87
REFERENCE	90
日本語文献	100
謝辞	101

第 1 部 序論

序論

I) なぜシロイヌナズナの根を研究するのか？

シロイヌナズナの根はその構造が単純であり、細胞数やその配列の仕方は遺伝的に厳密に制御されているので、細胞数決定や組織分化に関する遺伝子を解析する目的に適していると考えられる。また、アラビドプシスはゲノムサイズが半数体当たり 1×10^8 塩基対と高等植物の中では極端に小さく、世代期間が短いことから分子遺伝学的な研究を行うのには最適の材料である。ここ数年は染色体上の RFLP マーカーが増えてきたことから、クロモソームウォーキングによって突然変異体より遺伝子を単離することが比較的容易になってきた。

特に、花器官においては分子遺伝学的な手法を用いて精力的な解析がおこなわれている。現在までにホメオチック突然変異体から MADS box をもつ遺伝子群がクローニングされ、花器官の形成における遺伝的ネットワークのモデルが提唱されている (Weigel と Meyerowitz, 1994)。

シロイヌナズナの根は構造が単純であるにもかかわらず、その細胞数や並び方は遺伝的に制御され、また種々の外的な刺激に反応し形態が変化する。根の形態形成機構の研究は、植物の器官発生における細胞分裂と伸長の制御機構を知るための理想的なモデルであると考えられる。しかし、根の組織分化に関する遺伝子間の相互作用機構や、環境刺激に対する応答機構を支配する遺伝的な制御システムについてはまだよく解明されていない。

そこで現時点までにわかっている根の知見をまとめ、これからの問題点そして私の研究について述べていきたいと思う。

II) シロイヌナズナの根の構造と現在までの研究の概観

II-1) シロイヌナズナの根の構造

シロイヌナズナの根は植物の中でも比較的簡単な構造をしているので、解剖学的に形態を観察するという目的には合致している。シロイヌナズナの根の構造については Dolan ら (1993) によって詳細な解析がされている。

一番外側の細胞層である表皮細胞 (epidermis) は 18 ~ 22 個の細胞列で構成されている。その内側にある皮層 (cortex) と内皮 (endodermis) はそれぞれ 8 個の細胞から構

成されている。この2つの細胞層は元々一つの始原細胞が periclinal division を行って、形成されるもので、元々 clonal な細胞である。また、表皮細胞と lateral root cap も同一の始原細胞が分裂してできるものである (図1、Dolan ら 1993)。

トランスポゾンを用いた解析からもこの説は支持されている (Dolan ら 1994)。

van den Verg ら(1995)は、laser ablation 実験より、根の細胞が分化するときどのような位置情報が提供されるのかを観察した。

1) 皮層/内皮の始原細胞を壊した場合

その内側の内鞘の細胞が、並層分裂をおこない、潰された皮層/内皮始原細胞の場所を埋め、新たに皮層と内皮に分裂する。

2) 表皮始原細胞を壊した場合

やはり、同じように壊れた表皮始原細胞に接している内側の皮層が表皮始原細胞に分化する。

3) 皮層/内皮の始原細胞の娘細胞を壊した場合

皮層/内皮の始原細胞が不均等な分裂をおこない、皮層と内皮に分化する前の娘細胞をレーザーで潰すと、もう一度始原細胞から娘細胞が分化する。そしてこの娘細胞は不均等な分裂をおこなって、内皮と皮層を生み出す。

しかし、連続する3つの娘細胞をレーザーで潰すと、始原細胞は娘細胞を生むが、不均等分裂をおこなって皮層と内皮に分化することはできない。

以上の結果より、根の分裂組織の細胞は均質な細胞群であり、再分裂して違うタイプの細胞をつくる柔軟な能力をもっている。しかし分裂した後、どのタイプの細胞を生み出すかという情報は隣り合っている同じ細胞層の細胞より与えられるようである。これらの分子的な機構については全くわかっていない。

また Benfey 博士のグループは特定の細胞層がなくなったり、増えたりした突然変異体を多数分離している。short-root (*shr*) 突然変異体は、内皮が欠失している。その一方、scarecrow (*scr*), pinocchio (*pic*) 突然変異体は、皮層が欠失している。

内皮、皮層、表皮、lateral root cap、中心柱は胚の apical cell に由来しているのに対して、静止中心 (central cell) と Columera root cap は hypophysis と呼ばれる basal cell が分裂してできた細胞に由来する (図1 ; Jurgens, 1995)。

II-2) 根毛の形成

根毛はすべての表皮細胞からでるわけではなく、皮層 (cortex) の縦の細胞壁に接している細胞からのみでることがわかっている (Dolan ら 1994, Galway ら 1994)。根毛をもった表皮細胞は trichoblast と呼ばれる。つまりシロイヌナズナの野生型の根では皮層の数は8個なので、根毛がでる表皮細胞列の数も8個である。trichoblast の長さは根毛を

もたない表皮細胞の長さには比較して短くなっている (Dolanら 1994)。

また核は、根毛伸長の過程で根毛の先端に位置するようになることが報告されている (Fahn, 1990)。根毛の伸長にはカルシウム・イオンやフォスファターゼが関与しているという報告もある (Schiefelbeinら、1992; Smithら、1994)。

ミシガン大学の Schiefelbein 博士のグループは、根毛の形態が異常になった突然変異体として *rhd1*, *rhd2*, *rhd3*, *rhd4*, *rhd6*, *tip1* 突然変異体を単離報告している (Schiefelbein と Somerville, 1990; Schiefelbeinら、1993; Masucci と Schiefelbein, 1994)。

また葉のトライコームの突然変異体である *gl2*, *ttg* はすべての表皮細胞が trichoblast になっている (Galway ら 1994)。

II-3) embryo-lethal の突然変異体よりえられる知見

G. Jurgens のグループは EMS 処理した種子の中より、胚発生の過程で致死にはならないが、形態の異常な胚を生じるシロイヌナズナの突然変異体 (パターン形成突然変異体) を多数分離した (Meyer ら、1991; Jurgens, 1995)。さらに彼等はこれらの突然変異体を、apical-basal 突然変異体、radial-pattern 突然変異体、shape change 突然変異体の3つの範疇に分類した。

apical-basal 突然変異体の中で、*monopteros* 突然変異体をカルス化し再分化培地におくと根の形成が観察されるが、*gnom* 突然変異体の場合は観察されない (Mayer ら、1993; Berleth と Jurgens, 1993)。*EMB30 (= GNOM)* 遺伝子は、胚の時だけではなく組織培養した時の根の形成にも必要であるらしい。最近 T-DNA tagging ラインより、*EMB30 (= GNOM)* 遺伝子がクローニングされた (Shevell ら、1993)。*EMB30* 遺伝子は、酵母のタンパク質分泌系で働く *Sec7* との類似性が指摘されているが、実際の機能についてはよくわかっていない。

II-4) 植物ホルモンと根の形態の関係

II-4-a) 重力屈性とオーキシンの関係

植物ホルモンの中でもオーキシンは根との関係が一番よく解析されている。特にオーキシンは根の重力屈性は密接に関わっているようである。オーキシンに対する抵抗性を調べるのには芽ばえの根の伸長の度合いで判断するのが容易である。オーキシンに対する抵抗性を獲得した *aux1* (Mirza ら、1984; Mirza, 1987; Pickett ら、1990), *axr1* (Estelle と

Somerville, 1987; Lincoln ら, 1990), *axr2* (Wilson ら, 1990; Timpte ら, 1992; Timpte ら, 1994), *axr4* (Hobbie と Estelle, 1995), *rgr1* (Simmons ら, 1995) といった突然変異体が分離されている。これらの突然変異体はオーキシンに対する抵抗性を獲得しただけではなく、根の重力屈性も異常になっている。このことから根におけるオーキシンの輸送が重力屈性に関与していることが示唆されている。

また *aux1*, *axr1*, *axr2* 突然変異体は寒天培地上において根毛の形成が観察されない。*axr2* 突然変異体は優性の突然変異体であり、花茎の重力屈性がなくなったり、細胞の伸長も異常になったりと様々な局面で形質の異常が認められた(Timpte ら, 1992)。

さらに *aux1*, *axr1*, *axr4* 突然変異体では、側根の数が野生型にくらべると少なくなっていることが報告されている(Hobbie と Estelle, 1995; Timpte ら, 1995)。この3つの突然変異体の間で二重突然変異体をつくると、さらに側根の数は少なくなる。

II-4-b) エチレン

植物ホルモンの中でエチレンだけが気体である。エチレン量が多くなると根毛が多くなる。

野生型の植物をエチレン合成の阻害剤であるAVG (アミノエトキシビニルグリシン), AIB (2-アミノイソ酪酸) を入れた培地上で植物を育てると、根毛の伸長が抑制されている。シロイヌナズナの芽ばえではエチレン合成の律速段階は S-adenosyl-L-methionine (SAM) から 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) を合成するACC synthase であり、AVG はこの過程を阻害する。また、ACC からエチレンを合成する酵素がACC oxidase であり、AIB はこの酵素の反応を阻害する (KieberとEcker, 1993)。逆にエチレン合成の前駆体である ACC を培地に加えると、ACC oxidase は構成的に存在しているので、エチレンが合成される。

エチレンが根毛形成のどの段階で必要とされているのかはよく解らない。

エチレン存在下の暗所で育てたシロイヌナズの芽生えは "triple response" と呼ばれる反応を示す (Guzman and Ecker 1990; Ecker 1995)。*"triple response"* とは、1) 胚軸が短くなるとともに肥大する、2) 根の伸長の阻害、3) apical hookの湾曲の強調、の以上3つの反応のことである。

この *"triple response"* を使って、エチレンに対する応答性が異常になった突然変異体が分離され、大きく2つのタイプに分類されている。

II-4-b-1) エチレンに応答しなくなった突然変異体

ein 1~7 突然変異体が分離されている (Guzman and Ecker 1990; Ecker 1995)。これらの突然変異体はエチレン存在下でも "triple response" をおこさなくなっている。この中より優性の突然変異体である *etr 1 (ein1)* から遺伝子がクロモソーム・ウォーキングによってクローニングされ、原核生物の two-component 制御系のヒスチジンキナーゼと相同性をもっていた (Changら, 1993)。

ein1 (etr1), *ein2* 突然変異体ともに根毛が短くなっている。また *ein2* 突然変異体は、サイトカニンに耐性の *ckr1* 突然変異体と同じであることがわかった (Ecker, 1995; Hobbie ら, 1995)。

II-4-b-2) エチレンがなくても "triple response" を起こす突然変異体

eto1~3 (Guzman and Ecker 1990; Ecker, 1995) 突然変異体はエチレンがなくても構成的に "triple response" を起こす。これは内在性のエチレン量が野生型にくらべて上昇しているためである。*eto1* 突然変異体は細胞が短くなっているために根毛の数が増加している (Masucci と Schiefelbein, 1994)。

また *ctr1* 突然変異体も *eto type* の突然変異体と同じように、エチレンがなくても構成的に "triple response" を起こす (Kieber ら, 1993)。しかし *ctr1* 突然変異体は内在性のエチレン量が多くなっているわけではなく、エチレンの合成阻害剤を加えた培地においても "triple response" を起こす。このことより、*ctr1* 突然変異体はエチレンを受容するシグナル伝達系が異常になっていると考えられている。T-DNA tagging line より *CTR1* 遺伝子はクローニングされ、Raf family のカイネースとホモロジーをもっていた。

ctr1 突然変異体は、根の横断面の切片を観察すると連続した3つの表皮細胞から根毛がでていた (Dolan ら, 1994)。ACC や AVG を培地に加えた実験より、エチレンがこの効果を生み出していることが提唱されている (Tanimoto ら, 1995)。しかし、*CTR1* 遺伝子は Raf type のセリン・スレオニン型のカイネースなので、エチレンと根毛形成、双方の signal transduction に関与している可能性もある (Dolan ら, 1994)。

II-5) 根の肥大

既にいくつかの根が太くなった突然変異体が単離されている。このうちの一つである *SABRE* 遺伝子は既にクローニングされているが、既知のタンパク質と相同性は見られなかった (Aeshbacherら, 1995)。エチレン合成の阻害剤である AVG を培地に加えると、*sabre* 突然変異体の根の肥大は減少し、野生型の根と同様の太さになる。また ethylene

insensitive の突然変異体である *etr1* 突然変異体との二重突然変異体でも同様に細胞膨張の抑制がおこった。これらの実験事実より *sabre* 突然変異体の根の肥大はエチレンに依存したものであることがわかる。

Benfey らのグループによって単離された *lion's tail*, *cobra* 突然変異体はシヨ糖存在下での根の細胞の膨張が見られる。シヨ糖の入っていない培地では野生型と同様の表現型を示すが、シヨ糖濃度をあげていくと、徐々に細胞が膨張しシヨ糖濃度4% くらいで最高になる (Benfey ら, 1993)。さらに彼等は、同様の表現型を示す *cob*, *qui*, *cud*, *pom1*, *pom2* 突然変異体も分離した (Hauser ら, 1995)。

また、18℃では野生型の表現型を示すが、31℃に移すと根が肥大する *rsw1*, *rsw2*, *rsw3* 突然変異体も報告されている (Baskin ら, 1992)。

II-6) 側根 (lateral root) と不定根 (adventitious root) の形成

最近根の中でも lateral root の形成というものに重点がおかれた研究がおこなわれている。側根は一度分化した主根の木部導管に接した pericycle という細胞層からでてくる (Dolan ら, 1993; Laskowski ら, 1995)。このような例は他の植物の分裂組織、たとえば地上部の meristem ではおこらないことである。

側根が形成されるときに発現する遺伝子がいくつか分離されている。タバコの hydroproline-rich glycoprotein (HRGPnt3) 遺伝子は細胞壁の強化にきいている酵素だと考えられている。この遺伝子上流領域にGUS遺伝子をつないだコントラクトを導入したトランスジェニック・タバコでは、側根が発生する場所の pericycle と発生段階の側根の先端が染まる (Keller と Lamb, 1989)。これは、pericycle から側根がでて主根をつきぬけていくときに側根の細胞壁を再強化しているのではないかと考えられている。また HRGPnt3 遺伝子は、側根だけではなく、不定根が形成されるときにも不定根のでる場所で発現していた (Vera ら, 1994)。

また Smith と Fedroff (1995) は、トランスポゾンを用いた enhancer trap によって、側根の原基が染まる植物体から、LRP1 遺伝子をクローニングした。LRP1 遺伝子は特に既知の遺伝子とホモロジーがなかった。

側根形成が異常になった突然変異体も分離されている (Celenza Jr. ら, 1995)。*af1-1* は側根が数多くでる突然変異体で、*af3-1*, *af4-1* は側根の数が減少した突然変異体である。

またトマトでも differential screening によって、側根の原基で発現する RSI-1 遺伝子がクローニングされている (Taylor と Scheuring, 1994)。

普通の培養条件下で不定根が発生するようになった *superroot* 突然変異体も分離されて

いる。この突然変異体は内在性のオーキシン量が多くなっていた (Boerjan ら, 1995)。

II-7) 根の刺激応答機構

II-7-1) 根の接触刺激応答

根の先端部に一定の強さの圧力刺激を与えるために、培地を45°傾けた状態で、上方より光を照射して培養する。

この状態では、根は重力屈性によって下方に伸びようとするが、培地が固くてシロイヌナズナの根は培地中に潜り込むことができない。従って、根の先端は常に一定の強さで寒天培地を押しながら伸長することになる。つまり、根の先端部では常に一定の強さの圧力を与え続けられたのと同じ状態になっていると考えられる。

根の先端部が常に一定の圧力刺激を受ける結果、野生型のシロイヌナズナの根は波形を描いて成長する (OkadaとShimura, 1990)。根の波形成長に異常がみられる突然変異体を分離した。現在までにwav1~6までの突然変異体を分離した (OkadaとShimura, 1990)。wav1突然変異体は、45°においても根の先端の回転が起こらないために、根は波形を描いて伸長しない。従って、根の先端における障害物回避反応が異常になったと考えられる。

wav2は根の先端の回転の回数が高率になったために、波形のピッチが急になっていると考えられる。

wav3,wav4突然変異体は根の先端が不規則な波形の形を描く。これは、回転の方向の転換がスムーズに起こらないためだと考えられる。

wav5-33突然変異体は、根の先端が左向きにしか回転しないために、根は培地上で円を描くように成長する。WAV5遺伝子は、重力屈性に関わるAUX1遺伝子と対立遺伝子であることが解った。

wav6突然変異体は、wav1突然変異体と同じように45°に傾けても根が波形を描かずに伸長する。WAV6遺伝子も、重力屈性を支配するAGR遺伝子の対立遺伝子であった。

また重力屈性が異常になったrgr1突然変異体も傾けた培地上では、wav5突然変異体と同じように根は円形を描いて伸長する (Simmonsら, 1995)。

II-7-2) 根の光屈性

シロイヌナズナの芽ばえを一方向からのみ光が照射される状態で培養すると、根は斜め下方に向かって伸長する。これは、根には負の光屈性と正の重力屈性という二つの性質が

あるためである。正の重力屈性とは、根が重力の方向を感知してその方向に伸びる性質であり、負の光屈性とは、根が光を受けると、光を避けるように光とは逆の方向に伸長する性質のことである。これら2つの刺激応答反応が働くと、シロイヌナズナの根は重力屈性と光屈性の二つの屈性のベクトルの和によって、斜め下方に向かって伸長する。

根の光屈性が異常になった突然変異体では、根は下方に向かって伸長する。我々は、現在までに光屈性を示さなくなった3つの突然変異体(*rpt1~3*)を分離している。*RPT1* 遺伝子は *WAV1* 遺伝子と同一であることが解っている (OkadaとShimura, 1992b; 1994)。

II-7-3) 根の重力屈性

オーキシン耐性の突然変異体はすべて根の重力屈性が異常になっている (II-4-a の項を参照)。その他の重力屈性の突然変異体として *agr* 突然変異体がある (BellとMaher, 1990)。*agr* 突然変異体は、オーキシンに対して抵抗性をもっていない。また根だけがエチレンに反応しない *eir1* 突然変異体は重力屈性が異常になっていることが報告されている (Romanら, 1995)。*eir1* 突然変異体はオーキシン耐性をもたないこととそのゲノム・マップ上での位置 (第5染色体の *TT3* 遺伝子と *LFY* 遺伝子の間) から、*agr* 突然変異体と *allelic* である可能性が強い。

光形態形成の突然変異体である *cop4* の根も重力屈性が異常になっている (Houら, 1993)。

II-7-4) 根毛の刺激応答

寒天培地上では根毛は比較的短く、根の伸長方向に対して垂直に伸びる。根が空中にでたときは、根毛は長く斜め前方に向かって伸長する (OkadaとShimura, 1994)。我々の研究室では、空中に根毛がでた時の反応が異常になった突然変異体をスクリーニングし、その解析をおこなっている。

III) 本研究の目的

以上述べてきたことがシロイヌナズナを中心として研究されている根の遺伝的制御機構の研究の概観である。突然変異体の解析を中心として下記の3つのアプローチで研究をおこなった。

- 1) 根毛形成を支配する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析。
- 2) 根が太くなっ

た RH32 突然変異体の分子遺伝学的な解析 3) 根の光屈性異常突然変異体 *rpt* (root phototropism) の遺伝学的解析の3つである。

III-1) 根毛形成を開始を制御する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析。

花形成の遺伝子については、突然変異体より既に多く遺伝子がクローニングされている (Weigel と Meyerowitz, 1994)。これまでに根で突然変異体からクローニングされた遺伝子は *SABRE* 遺伝子だけである (Aeshbacher ら, 1995)。しかし *SABRE* 遺伝子は根だけで特異的に発現しているわけではない。表現型がわかった突然変異体についてその遺伝子をクローニングし、分子レベルで構造、発現と機能を調べるのが重要である。

そこで、T-DNAを導入したトランスジェニックシロイヌナズナ株をスクリーニングし、根毛の数が少なくなった突然変異体 *caprice* を分離した。この突然変異体から遺伝子をクローニングし、根毛伸長開始時におけるこの遺伝子の役割について考察をおこなった。

III-2) 根が太くなった RH32 突然変異体の分子遺伝学的な解析

Benfey 博士のグループによって特定の細胞層がなくなる突然変異体が単離され精力的に解析が進められている。しかし一つの細胞層の中の細胞の数が変化している突然変異体についてはまだ報告されていない。この突然変異体を解析すれば、根の細胞分裂の機構を考察することができる。

そこで、通常8個である根の皮層の数が10個まで増加している RH32 変異体に焦点を絞り、RH32 遺伝子の作用機構について遺伝学的な解析によって考察を試みた。

III-3) *rpt* (root phototropism) 突然変異体の遺伝学的解析

シロイヌナズナの根は光を反応して光と逆の方向に屈曲する (Okada と Shimura, 1992a , 1992b)。根の重力刺激反応にくらべて光屈性の方はまだ研究の手がつけられていない状態である。我々の研究室では、既に根の光屈性の突然変異体として *rpt1*, *rpt2*, *rpt3* を分離している。これらの突然変異体を解析し、光屈性における根と胚軸の関係について解析を行った。

第2部 材料と方法

第2部 材料と方法

A) 植物の形態の観察および遺伝学的解析法

1) 種子の入手

本研究で用いた植物はシロイヌナズナ(学名 *Arabidopsis thaliana*)である。用いた株は、Landsberg erecta, Wassilewskija (WS), Columbia 株の3種類である。

突然変異体の種子のうち、*eto1-1*, *ein1-1*, *ein2-1*, *axr2-1*, *rhd2-1*, *rhd3-1*, *hy4-1*, *det2-1*の種子は、Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, OH, USA)より入手した。

2) 植物の生育

培養条件は特別な場合を除き、22℃、連続光のもとで培養した。

植物体には、市販の40wの白色蛍光灯を2本と植物育成用(ナショナル、ホモルクス)の蛍光灯を1本30cm位離して連続的に照射している。明るさは3000lux位である。

土にはパーミキュライトとパーライトを1:1で混合したものをを用いた。

3) 根の形態の観察

a) 培地

根の形態を観察するためには、寒天培地を垂直に立て、根が寒天培地の表面を這うようにして、根の表面の形態を実態顕微鏡等で観察する。そのために、透明なプラスチック・シャーレ(栄研器材株式会社の滅菌2号角シャーレ〔14cm X 10cm〕)を使用した。

寒天培地は、シロイヌナズナ用の栄養塩溶液(岡田ら、1992)を蒸留水で1/2に希釈したものに、寒天末(ナカライ・特級)を1.5%の濃度になるように加え、オートクレーブ後シャーレに注いで固化させる。この濃度の寒天培地を用いれば、シロイヌナズナの根は寒天表面を這って成長し、培地中に潜り込むことはほとんどなかった。

寒天培地に植物ホルモンやその阻害剤を加える場合は、オートクレーブ後50℃まで冷や

してから添加した。

b) 種子の滅菌

寒天培地に種子をまくときはカビ等の混入を避けるために、次亜塩素酸ナトリウムの水溶液で事前に種子を滅菌した。

シロイヌナズナの種子を1.5mlのエッペンチューブに入れる。そこに、10%のハイター（花王）、0.02%のTriton X-100を含む滅菌蒸留水を0.5ml加え、ボルテックスで攪拌した後、3～5分間室温で放置する。その後滅菌蒸留水で5回洗い、寒天培地上に種をまいた。

種子をうえた寒天培地は、休眠を打破し発芽をそろえ、かつ早く花を咲かせるために、遮光した状態で4℃に2～4日間おく。

c) 顕微鏡による観察

根の形態は実体顕微鏡OLYMPUS SZH-IDDLによって観察した。ノマルスキー顕微鏡はOLYMPUS BH-2を用いた。根の横断切片は根を5%低融点アガロースに埋め、マイクロサイザーDTK-3000W（堂阪イーエム）を用いて作製した。

4) 光屈性の観察

シロイヌナズナ芽ばえの根の光屈性の観察は以下の手順でおこなった。

1. 4℃から取り出した種をまいたシャーレを、3mm厚の黒いアクリル板（アクリライト502, 三菱レイヨン）で光のあたる方向以外の3方向を遮蔽する。

2. 22℃の恒温インキュベーター内で、一方向からのみ蛍光灯の光をあてる。蛍光灯はシャーレの端から5cm離す。この状態で3日間培養する。

光源は、

青色—東芝 FL20S-B と照明用の青色フィルム（東京舞台照明 照明用フィルム72番）

赤—東芝 FL20S-BRF と赤色のアクリル板（三菱レイヨン、アクリルライトS-102）

白一市販の蛍光灯を使用した。

5) 電子顕微鏡による観察

a) 花、茎

サンプルを 10cc 程度のカルノア液 (酢酸イソアミル:エタノール=1:3) 中で一晩以上固定する。

固定したサンプルをエタノールで 2 回洗う。次に、サンプルの表面を固くするためにエタノールに 2% のタンニン酸が解けた液で一晩固定する。

翌日、サンプルをエタノールで 2 回洗い、エタノール:酢酸イソアミル=1:1 の液に 15 分つける。その後、酢酸イソアミルに 15 分間つける。

その後、JCPD-3 (日本電子) で臨界点乾燥をおこなった。金蒸着は、日電子技術サービスの JFC-1100 形イオンスパッタリング装置をおこない、走査型電子顕微鏡 S-800 型 (日立製作所) で観察した。

b) 種子

シロイヌナズナの種子は十分に乾燥しているので、固定および臨界点乾燥はおこなわず、試料台に貼り付けて、金蒸着をおこない、観察した。

c) 胚軸

胚軸は臨界点乾燥の時に細胞が shrink したので、Green と Linstead (1990) の記述に従い、胚軸のレプリカをつくる方法を用いた。

まず、Kerr 社 (MI, USA) の Extrude Wash Tube に芽生えをおしつけて、型をとる。これがサンプルのネガとなる。次に、この型の中に 5 Minute Epoxy Gel (ACE Hardware Corporation, IL, USA) を注ぎ、サンプルのポジを作る。このポジを試料台に市販の瞬間強力接着剤で張り付け、金蒸着をおこない、観察をおこなった。

6) 遺伝学的な解析

a) 遺伝学的掛け合わせ

遺伝学的な掛け合わせは岡田ら（1992）の記述に従って行った。ピンセットはスイス A. Dumonte Fils 社製の DUMOXEL 5番を用いた。花粉の混入を防ぐためにピンセットと指先は95%のエタノールで消毒した。まず、まだ雄しべのやくが開裂していないつぼみを雌親を選ぶ。このつぼみをピンセットで開き、めしべ以外のものを削除する。約2日後にめしべの先端の柱頭毛に花粉がついていないことを確認してから、別の株の展開した花を選び、軽く花粉をつけた。

b) 二重突然変異体の作製

劣性の突然変異体どうしをかけあわせるとF1世代の植物は野生型の表現型を示す。F2世代の種子を100個程度まき、片方の突然変異体の形質を示すものを4～5個体、土に植え換える。これらの植物体の自家受粉した種子を収穫し、次世代の植物を観察して二重突然変異体の判定をおこなう。

最終的には、それぞれの親株と掛け合わせをおこなった。両親ともに相補しなかった株が二重突然変異体である。

7) トランスジェニック・ラインの作製

T-DNA 挿入株は in planta 法を改良した方法でおこなった (Changら, 1994)。アグロバクテリアは *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif株を用いた。

8) 統計的処理

標準誤差の計算、t検定などの統計処理は、Microsoft社のEXCEL Ver.5で行なった。

B) 分子生物学的解析

1) 試薬と酵素

一般的な試薬はナカライテスク（京都）、和光純薬（大阪）より購入した。制限酵素は宝酒造（京都）または New England Biolabs (MA, USA) より購入した。またPCRの酵素には、AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer) を使った。[α - 32 P] dCTP はアマシヤムより購入した。

2) PCR を用いた解析

PCR 反応はGeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer) を用いた。

a) inverse PCR (IPCR) 法

a-1) left boader 近傍の配列の増幅

T-DNA に隣接しているゲノム DNA 断片を分離するのに、inverse PCR 法を用いた (Deng ら, 1992; Rolfs ら, 1992)。使用したプライマーは、

LB1 CAC GCC ATC GAT GTA ATA ATT GTC ATT GTC ATT AGA TTG T

LB2 GAG CTA TTG GCA CAC GAA GAA TGG T

PCR の条件は、94℃ X 30秒、60℃ X 30秒、72℃ X 30秒の反応を 35 cycle おこなった。

a-2) right boader 近傍の配列の増幅

CAPRICE 遺伝子のT-DNA 挿入部位に欠失が起こっていないことを確かめるために、T-DNA の right-border に近接しているゲノム配列の増幅も同じく inverse PCR 法でおこなった。使用したプライマーは、

RB380 ATC GTT GCG GTT CTG TCA GTT C

RB2111 GGT ACT GTG TAA TGA CGA TG

b) RACE PCR (rapid amplification of cDNA ends)法

Clontech 社の Marathon cDNA Amplification Kit を使い、付属の protocol に従って実験を行った。根の poly (A)+RNA 1 μ g を鋳型として cDNA を合成した。CAPRICE 遺伝子内の特定のプライマーを合成し、PCR 法により遺伝子を増幅した。

3' race に使用したプライマーは、

RC1 GGG AAG CTG TGA AGA TGT CAG (254 ~ 274)

5' race に使用したプライマーは、

RC2 AAC TCC CAC CTG TCG CCA ACG (312 ~ 332)

RC3 TCC CGG GAT CCT TCC GGC GAT C (333 ~ 354)

RC4 CCG GCG ATC AAC TCC CAC CTG (321 ~ 341) である。

() は、各プライマーの CAPRICE cDNA 上での位置を表す (転写開始点より数える。3 章の図 6 参照) 。

PCR 反応は、LA PCR kit (宝酒造) を使って行なった。反応は、94 $^{\circ}$ C X 30 秒、58 $^{\circ}$ C X 30 秒、72 $^{\circ}$ C X 2 分を 35 cycle おこなった。電気泳動後、ゲルから切出し、Gene Clean で溶出をおこない、プラスミド・ベクターにクローニングしてシーケンスをおこなった。

3) シーケンス反応

シーケンスは、蛍光自動シーケンサー (ABI, Model 370A) を用いておこなった。反応は、Dye primer cycle sequencing FS kit 及び Dye terminator cycle sequencing FS ready reaction kit (Perkin elmer) を用いて行った。

4) 植物体からの RNA の単離

a) total RNA の単離

方法は Current Protocol の記述に従った。2~4 g の組織を液体窒素で凍らせながら乳鉢中でつぶし、グアニジンチオシアナネートを含んだバッファー中で攪拌し、超遠心を行うことによってRNA を沈澱させ、tissue resuspension solution (5mM EDTA , 0.5% Sarkosyl , 5% 2-mercaptoethanol) に懸濁して回収した。

b) poly (A)⁺ RNA の分離

total RNA から poly (A)⁺ RNA の分離は Oligotex-dT30 [Super] (日本ロッシュ) を用いて行った。根の total RNA に対して 0.5~1% の範囲で poly (A)⁺ RNA が回収できた。

5) シロイヌナズナの root cDNA ライブラリーの作製

cDNA ライブラリー作製のためには、ZAP-cDNA synthesis kit (STRATEGENE) を使用し、付属の protocol に従って実験を行った。5 ug の根の poly (A)⁺ RNA を出発点にして、3' 端に XhoI 切断部位のついたオリゴdT プライマーをアニールさせて、1st strand の cDNA の合成を行った。

5' 端は EcoRI , 3' 端には XhoI の部位がついているので、EcoRI と XhoI で切断した ZAPII vector にクローニングした。

ファージのパッケージングには Gigapack II Packaging Extracts (Strategene) を使用した。パッケージングしたファージを 3×10^6 個、LB plate にまき cDNA のスクリーニングを行った。

6) 植物からの DNA の分離

シロイヌナズナのゲノム DNA の分離方法は、Doyle と Doyle (1990) の記述に従った。一度に多量のサンプルを処理する時に便利である。

発芽後 3 - 4 週間の展開したロゼッタ葉を 2 - 3 枚、ピンセットで 1.5ml のエッペンチューブにとり 200ml の CTAB buffer { 3% cetyltrimethylammonium bromide, 1.4M NaCl , 0.2% 2-mercaptoethanol , 20mM EDTA , 100mM Tris-HCl (pH8.0) } を加え、pellet

pestle (Kontes) で粉碎した。さらに 300ml の CTAB buffer を加えて、60℃で30分保温した。その後クロロホルムを加えて、上清を回収して、イソプロパノール沈澱をおこなった。RNase 処理、フェノール処理、エタノール沈澱をおこなった後、最終的に10-25 ml の TE に溶かした。

7) サザン解析

Current Protocol の方法に従った。0.5 ~ 1 mg 程度の植物の DNA を制限酵素で切断し、アガロース電気泳動をおこなった。泳動後、ゲルを 0.25 M 塩酸に浸し、10分間振とうする。その後、変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で30分間、1回、中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 1mM EDTA) で20分間、2回振とうした。

DNA の吸着には HybondN (Amersham) を用い、UV stratalinker 2400 (Stratagene) を使い UV 照射によって DNA を固定した。

プローブは、Random primer labelling kit (宝酒造) を使って、[α -³²P] dCTP で標識した。ハイブリダイゼーションは、[5XSSC, 0.1% N-Laurorylsarcosine, 0.02% SDS, 1% Blocking reagent (Boehringer)] の溶液中で一晩おこなった。

8) ゲノムライブラリーの作製

DNA の単離方法は Current Protocol の記述に従った。WS 株の地上部を集め、液体窒素で凍らせながら乳鉢で組織をつぶし、塩化セシウムとエチジウムブロマイドを使って超遠心によって単離した。

単離した DNA を Sau3AI で部分分解し、ショ糖密度勾配遠心を使って15~20kb の断片が入った画分を集め、BamHI で切断した λ DASH II ベクターにクローニングした。

スクリーニングの方法は、Molecular Cloning の記述に従った。

9) RFLP マッピング

a) CAPS marker によるマッピング

CAPS marker によるマッピングは、Konieczny と Ausbel (1993) の記述に従った。PCR 反応は、9 4 °C X 3 0 秒、6 0 °C X 3 0 秒、7 2 °C X 1 分の反応を 4 0 サイクルおこなった。

また RH32 遺伝子をマッピングにする時に使用した 31B3 marker は以下の手順で作成した。まず 31B3 clone をプローブにしてシロイヌナズナ WS 株のゲノム・ライブラリーをスクリーニングした。この中で 31B3 clone がハイブリする約 2kb の DNA 断片をプラスミド・ベクターにクローニングして、シークエンスをおこない、PCR 用の primer を作成した

primer 31B3A ACG CAA GGG AAT GGA AAA GG

primer 31B3B CCT CCC TGT ATG AAT CTC ATC

この primer で PCR 反応を行った後、制限酵素 BsrI (NEB) で切断した。

b) SSLP marker によるマッピング

SSLP はゲノム中にランダムに存在する repetitive sequence の前後の sequence が ecotype 間で違うことを利用して PCR を利用して多系を探すものである。Bell と Ecker (1994) の記述に従って実験をおこなった。

C) Recombinant Inbrees (RI) line を使ったマッピング

まず、Columbia 株と Landsberg erecta 株の DNA を適当な制限酵素で切断した時に、多型のあるゲノム断片を用意する。RI line (合計 1 0 0 ライン) の各ラインから DNA を抽出し、ゲノム断片の多型がでたのと同じ制限酵素で切断し、ナイロン・メンブレンフィルターにプロットする。このフィルターをもちいてサザン・プロットをおこなうと目的の遺伝子を簡単にマッピングすることができる (Lister と Dean, 1993)。

CPC 遺伝子のマッピングの場合は、inverse PCR の 2kb の断片を使って、マッピングをおこなった。Columbia 株と Landsberg 株それぞれのゲノム DNA を BamHI で切断したところ、Columbia 株では 24kb の位置に、Landsberg 株では 16kb の位置にバンドが検出された。この多型を利用して、100 系統の RI ラインから抽出した DNA を BamHI で切断し、ナイロン・メンブレンにプロットした。解析は map marker (Lander ら, 1987) でおこなった。

第3部 根毛形成開始を制御する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析

第3部 根毛形成開始を制御する *CPC* 遺伝子のクローニングと機能の解析

I. 結果

1) *caprice* 突然変異体の分離

私は、根の形態形成に関わる遺伝子のクローニングを目指して、*in planta* 法を改変した方法 (Changら, 1994) で作製した T-DNA のトランスジェニック・ラインを使って根の突然変異体のスクリーニングを行った (スクリーニングの方法は材料と方法を参照)。その中より根毛が少なくなった突然変異体を 1 ライン単離した (図 1)。私は、根毛が出たり出なかったりすることから、この突然変異体の名前を *caprice* [*cpc*] (日本語で“気紛れ”という意味) と名付けた。また *cpc* 突然変異体の根毛の長さは野生型と変わらなかった (図 1)。

まずこの突然変異体の変異がどのようなものであるかを調べるために、シロイヌナズナの野生型の WS 株ともどし交雑を行った。その結果は図 2 に示す。もどし交雑をおこなった F1 世代では、14 個体ともに野生型の表現型を示した。F2 世代では 324 個体中、257 個体が野生型の、67 個体が *cpc* 突然変異体の表現型を示した。F2 世代での野生型：突然変異体の比がほぼ 3 : 1 であることから *cpc* 突然変異体は劣性の 1 遺伝子の変異によって起こったと考えられる。

2) T-DNA 近傍のシロイヌナズナのゲノムの単離

T-DNA のレフト・ボーダーをプローブとして、*Hind* III で切断した DNA に対して、サザンブロットを行うと、4.9kb の位置に一本だけバンドが現れた (図 3)。T-DNA のバンドが一箇所に一本だけ挿入されているだけだったので、*inverse* PCR 法で T-DNA 近傍のシロイヌナズナのゲノム DNA を分離を試みた (Deng ら, 1992)。まず、*cpc* 突然変異体の DNA を *Hind* III で切断し、1% のアガロースゲルに泳動した後、4kb~6kb に相当する部分のゲルを切出し、DNA を抽出した。この DNA に DNA ライゲースを加え、セルフ・ライゲーションを行った後、レフト・ボーダーを外向きに増幅させるプライマーを用いて PCR 反応を行った (図 4)。

その結果、約2kbの断片が増幅された。次にこの断片を使い、サザンプロットを行った。*cpc* 突然変異体ではレフトボーダーをプローブとした時と同じように4.9kbの位置に、野生型WS株では約11kbの位置にバンドが検出された(図3)。

一方、シロイヌナズナのT-DNAタギング・ラインから植物を単離しても、T-DNAの挿入部位と変異している遺伝座が異なっているということが報告されている(Castleら, 1993)。つまりアグロバクテリアを植物に感染させる過程で、なんらかのsomaclonalな変異が誘発され突然変異体が生じることがあるらしい。私は野生型と*cpc* 突然変異体でこのRFLPを利用して、T-DNAの挿入と変異遺伝子座の連鎖を調べた(図3)。

1回もどし交雑を行ったF2世代の植物の*cpc* 突然変異体の表現型のものからDNAを抽出しサザンプロットを行った。図3は、11個体のF2世代の*cpc* 突然変異体でのサザン・プロットの結果を示す。全ての個体で突然変異型の4.9kbのバンドしか検出されなかった。F2世代の植物の*cpc* 突然変異体の表現型のもの残り13個体、合計24個体についてサザンプロットを行うと、全ての個体で突然変異型の4.9kbのバンドしか検出されなかった。調べた24個体については相同染色体が両方ともT-DNA挿入型になっていた。つまり、F2世代において $24 \times 2 = 48$ 本の染色体はすべてT-DNA挿入型になっていた。計算上、T-DNAの挿入部位と*cpc* 遺伝子座は組換え率2%以下の位置にあることになる。この結果より、かなり高い確率でT-DNAの挿入によって*cpc* 突然変異が起きたといえるので、クローニングに向けた実験をすすめることにした。

3) *caprice*遺伝子のクローニングとその構造

inverse PCR法で分離した2kbのDNA断片(図4)をプローブとして、シロイヌナズナのゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。約10万個のファージをスクリーニングし、4種類の独立のファージを単離した。そして、これらのファージ・クローンを*EcoRI*と*XbaI*で切断し、inverse PCR法で分離した2kbのDNA断片をプローブとしてサザン・プロットをおこなった。そしてプローブがハイブリダイズした断片の中から*EcoRI*で切断した4.4kb、*XbaI*で切断した7.3kbと5kbの3種類の断片をプラスミドベクターにクローニングした(図5)。ついで遺伝子のcDNAクローンを分離するために*XbaI*で切断した5kbの断片をプローブとして使用し、根のcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

シロイヌナズナの根のpoly(A)⁺RNAからcDNAを合成後、ファージにin vitro パッケージングをした直後の一度も増幅をおこなっていないcDNAライブラリーから300万個のファージをスクリーニングした。その結果、プローブにハイブリダイズする5個のポシテ

イブ・クローンを分離した。図6には単離されたcDNAのうち一番長かったものを示した。cDNAの全長は584bpであり、一番長いORFを翻訳すると94アミノ酸で分子量は11kDであった。翻訳開始点の上流には2つの終始コドンが存在した。

シロイヌナズナ野生型WS株の根と地上部それぞれから抽出した0.5ugのpoly(A)⁺RNAをゲルに流してノーザン・ブロットを行ったが、シグナルは検出されなかった。根で60万個に一個しかポジティブ・クローンが得られなかったことを考え併せても、CPC遺伝子は根で発現している非常に転写量が少ない遺伝子だと考えられる。

またCPC遺伝子のゲノム領域のシーケンスも行った。その結果CPC遺伝子は2つのイントロンをもち、3つのエキソンより構成されていた。1つ目のイントロンはcDNAの233番目と234番目の間で、長さが73bpであった。2つ目のイントロンはcDNAの321番目と322番目の間で513bpであった(図6)。2つ目のイントロンによってmyb領域は第2エキソンと第3エキソンに分断されていた。またCPC遺伝子の転写開始点から終結点までは、ゲノム上で1170bpの領域をカバーしていた。

またT-DNAはmyb領域中に挿入されており、T-DNA挿入部位の6塩基は欠失していた(図6)。T-DNAのレフト・ボーダーには一本しか挿入されていなかったが、ライト・ボーダーは2本の断片になってtandemになって挿入されていた(図4)。

また転写開始点の35bp上流には、TATAボックス様の配列が存在していた(図6下線部)。

4) CAPRICE 遺伝子はmyb region をもつ

データベースでホモロジーサーチを行った結果、CPC遺伝子は癌原遺伝子の一つであるmybタンパク質のDNA結合領域とホモロジーをもつことがわかった(図7)。このmyb領域は動物、酵母、植物で広く保存され、ヘリックス・ターン・ヘリックスの構造をとり、DNAに結合し転写因子としてその下流にある遺伝子の発現を制御している。(Ogataら, 1992; Ogataら, 1994)。

植物のmyb遺伝子の中で、突然変異体から分離されその機能がわかっているものとして以下のものが挙げられる。トウモロコシのアントシアニンの合成系の酵素の転写を制御しているC1遺伝子(Paz-Arezら, 1987)とPL遺伝子(Coneら, 1993)。同じくトウモロコシの果皮、穂軸等の花器官に存在する赤色素フラボフェン類の合成系の酵素の転写を制御しているP遺伝子(Grotewoldら, 1991)。また、シロイヌナズナの葉の表面にはトライコームと呼ばれるその先端が3つに分枝した毛が存在する(図12)。トライコームも根毛と同じように表皮細胞が先端成長したものである。このトライコームの形成を制御し

ている *GL1* 遺伝子 (Oppenheimer ら, 1991) も *myb* のホモログである。その他にはキンギョソウでは花卉の表皮細胞の形を決定している *Mixta* 遺伝子も *myb* 領域をもっている (Noda ら, 1994)。

CPC 遺伝子とこれら植物の *myb* 遺伝子との相同性はトウモロコシの *C1* 遺伝子 (とは 51 残基中 25 残基で 49%、*PL* 遺伝子とは 51 残基中 26 残基で 51% であった (図 7)。また、*P* 遺伝子とは 51 残基中 20 残基で 39% の相同性があった。シロイヌナズナの *GL1* 遺伝子とは 51 残基中 21 残基で 41%、キンギョソウの *Mixta* 遺伝子とは、51 残基中 17 残基で 33% とこの中では一番相同性が低かった。

myb 領域に特徴的な周期的に存在する 2 つのトリプトファン残基 (それぞれ、図 7 の 25 番目と 44 番目) は保存されていた。このトリプトファン残基を他のアミノ酸に置換すると *myb* タンパク質の DNA 結合活性が消失することが報告されている (Saikumar ら, 1990; Ogata ら, 1992)。

myb 領域の外側の領域にはそれぞれの遺伝子間でホモロジーはなかった。

5) *CPC* 遺伝子は本当に一つの *myb* 領域しかもたないのか?

シロイヌナズナの根の cDNA library screening より分離した *CPC* 遺伝子の長さは 584bp と非常に短かった (図 6)。現在までに単離されている動物や酵母の *myb* 遺伝子は、それぞれのリピートが 51 から 54 アミノ酸残基で構成される 3 つの *myb* リピートを持ち、植物の *myb* 遺伝子の場合には 2 つの *myb* リピートをもっている (Ogata ら, 1994)。*CPC* 遺伝子は他の植物の *myb* タンパク質で 2 番目にあたる *myb* リピートと相同性のある配列しかもっていない。

そこで単離できた *CPC* の cDNA クローンは、cDNA の合成が途中で止まっているだけで、実際の *CPC* 遺伝子の RNA はもっと長いものである可能性も考えられる。

また *CPC* 遺伝子と同じく *myb* 領域をもつトウモロコシの花器官で発現している *P* 遺伝子には選択的スプライシングにより 1802bp と 945bp の 2 種類の転写産物が存在していることが報告されている (Grotewold ら, 1991)。遺伝子として機能をもっているのは長いほうの 1802bp の転写産物のみである (Grotewold ら, 1994)。一方、945bp の転写産物は *myb* 領域を途中までしかもたず、機能をもったタンパク質をコードしていない。私が分離した 5 つの cDNA も選択的スプライシングでつくられらた機能をもったタンパク質をコードしていない転写産物に対応している可能性もある。

そこで、以下の 2 つの手段でさらに長い *CPC* 遺伝子の ORF の検索を試みた。

1) 5'RACE, 3'RACE 法。 2) *CPC* 遺伝子周辺のゲノム領域のシーケンスをおこな

う。

5-1) RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法による 5' 端、3' 端の分離

5-1-a) 'race 法による 3' 端の単離

rc1プライマー（材料と方法を参照）を用いて RACE PCR を行ったところ、330bp と 860bp の 2 本のバンドを増幅することができた。860bp のバンドは 2 番目のイントロンが挿入されたままのものであった。双方の 3' 端はともに cDNA の 3' 端と一致した。

5-1-b) 'race 法による 5' 端の単離

rc2, rc3, rc4 の各プライマー（材料と方法を参照）を用いて RACE PCR をおこなった。PCR の反応条件を変えたり PCR の酵素を何種類か試してみたが、うまく目的の断片を増幅することができなかった。

5-2) CPC 遺伝子周辺のゲノム領域のシーケンス

RACE 法によっても、さらに長い RNA を得ることができなかったため、さらに CPC 遺伝子近辺のゲノム領域を 7.9kb のシーケンスをおこなった（図 5）。これは CPC cDNA の上流 4kb、下流 2.7kb 含む領域である。

しかし、他に ORF や myb 領域とホモロジーをもつ領域が見つからなかった。さらに XbaI で切断した 5kb のゲノム断片を用いたときに、CPC 遺伝子とは別に 51cDNA が単離されてきた。51cDNA のシーケンスとゲノム・シーケンスを比較したところ、51cDNA は CPC 遺伝子の転写開始点の 3.4kb 上流から CPC 遺伝子とは逆向きに転写されていることがわかった（図 5）。そこで 5' 端は RACE PCR 法で増幅することができなかったが、51cDNA よりもさらに上流に CPC 遺伝子のエクソンが存在するとは考えにくい。3' 端は race 法によって確認できたことを考え併せると、得られた cDNA が CPC 遺伝子の全長であると考えてよさそうである。

6) caprice 突然変異体の遺伝学的な解析

普通シロイヌナズナの野生型の根は根の表皮細胞から出る。野生型は18~22個の表皮細胞をもっている。表皮細胞の内側の細胞層は皮層 (cortex) と呼ばれる8個の細胞層があり、根毛が生じる表皮細胞 (trichoblast) はこの皮層の繋ぎ目 (periclinal wall) に接している細胞のみである (序論の図1を参照)。また残りの表皮細胞は根毛をもたない (atrichoblast)。また根毛のでる縦の細胞列では全ての表皮細胞が根毛をもつ。trichoblast は atrichoblast に比較して細胞の長さが短くなっている (Dolanら, 1994; Galway ら, 1994)。

シロイヌナズナでは既に根毛の数が多くなった突然変異体として *transparent testa glabra* (*ttg*), *glabrous2* (*gl2*) が同定されている (Galwayら, 1994; Schiefelbein 私信、図1)。これら2つの突然変異体は元々葉のトライコームの突然変異体として分離されたものである (図12)。*ttg*, *gl2* 突然変異体では、全ての表皮細胞列が根毛をもっている (図8)。

逆に根毛の数が少なくなった *cpc* 突然変異体では縦の細胞列の数は野生型と同じく8列と決っている。しかし、野生型では根毛のでる細胞列ではすべての表皮細胞が根毛を出す、*caprice* 突然変異体では根毛のでる細胞列において根毛のでる細胞とでない細胞がある (図8)。そこでこの突然変異体が根毛のでるべき細胞列において根毛がでたりでなかったりする、英語で "気紛れ" という意味の *caprice* という名前をつけた。

a) *gl2* 突然変異体との二重突然変異体

gl2 突然変異体と *cpc* 突然変異体の二重突然変異体は *gl2* 突然変異体の突然変異体の表現型をしめす (図9)。つまりすべての表皮細胞が根毛をもつ表現型を示す。このことから、根毛形成の制御過程において *CPC* 遺伝子は *GL2* 遺伝子よりも上流で働いていることが示唆された。

b) 根毛の形態の突然変異体との二重突然変異体

根毛の形そのものが異常になった突然変異体として既にミシガン大学の Schiefelbein 博士のグループによって *rhd1*, *rhd2*, *rhd3*, *rhd4*, *rhd6*, *tip1* 等の突然変異体が発表されている (Schiefelbein と Somerville, 1990; Schiefelbein ら, 1993; Masucci と Schiefelbein, 1994)。

rhd2-1 突然変異体は、根毛が短くなった突然変異体である。この突然変異体と *cpc* 突然変異体との二重突然変異体は、根毛の数は少なくなり、かつでてきた根毛は短くなる (図10)。

rhd3-1 突然変異体は、根毛が波形の成長を示す突然変異体である。この突然変異体と *pc* 突然変異体との二重突然変異体は、根毛の数は少なくなるが、でてきた根毛は波形の成長を示すようになる (図 10)。

cpc と *rhd2-1*、*cpc* と *rhd3-1* の各二重突然変異体の表現型はともに双方の突然変異体の付加的な表現型を示した。つまり *CPC* 遺伝子はある表皮細胞から根毛がでるかどうかが決定することに影響を及ぼすが、ひとたび根毛の伸長が開始すれば、もう根毛の伸長や形には影響をおよぼさないことが示唆された。

c) エチレン量過剰の突然変異体 *eto1* との二重突然変異体

暗所生育下で芽生えのエチレンに対するが異常になった突然変異体のスクリーニングの過程で、*eto1-1* 突然変異体はエチレンが存在しない時でもあたかもエチレンをかけられた時のような "triple response" と呼ばれる反応を示すことで単離された。これは内在性のエチレン量が多くなったためである (Guzman と Ecker, 1990)。

eto1-1 突然変異体の根では、根毛の数が多くなっている (Masucci と Schiefelbein, 1994)。これは根の表皮細胞の縦方向の長さが短くなっているためである。*eto1-1* 突然変異体では根毛の数は少なくなっていた。*cpc, eto1-1* 二重突然変異体 *cpc* 突然変異体の表現型を示した (図 11A)。つまり内在性のエチレン量を増やしてみても *caprice* 突然変異体の根毛の数を野生型のレベルまで復帰させることはできなかった。

またオーキシンとして $1\mu\text{M}$ の IAA (インドール酢酸) の入った培地に植えてみても根毛の数は野生型に比較すると少ないままである (図 11B)。

これらの結果より、*cpc* 突然変異体の根毛の数が少ないという表現型は、根毛が形成されるのに必要なオーキシンやエチレンといった植物ホルモンの添付によって相補できるものではないことが確認できた。これらの実験事実からも *cpc* 突然変異体の表現型はオーキシンやエチレンといった植物ホルモンの欠如によってできたものではなく、根毛をつくるためのシグナル伝達系そのものが壊れたためにできたものであると考えられる。

7) *CAPRICE* 遺伝子座のマッピング

最近シロイヌナズナでは、Recombinant inbred line から抽出した DNA を使ったマッピングの方法が用いられるようになってきた (Lister と Dean, 1993)。Columbia 株と Landsberg 株から抽出した DNA でサザン・プロットをおこなった時に多系のであるゲノム断片さえあれば簡便にその断片の遺伝子座を決定することができる (材料と方法を参照)。

その結果、*CPC* 遺伝子は第2染色体の下方にあるRFLP マーカー *mi473* から組換え率 0 の位置にあることが判明した (図2)。この近くには既にマッピングされている根毛の突然変異体はなかったが、*embryo lethal* の突然変異体の一つである *emb39* が 1cM 以内の位置にマップされていた (Pattonら, 1991)。5-2) の項で述べた 51cDNA が *EMB39* 遺伝子である可能性も考えられる。

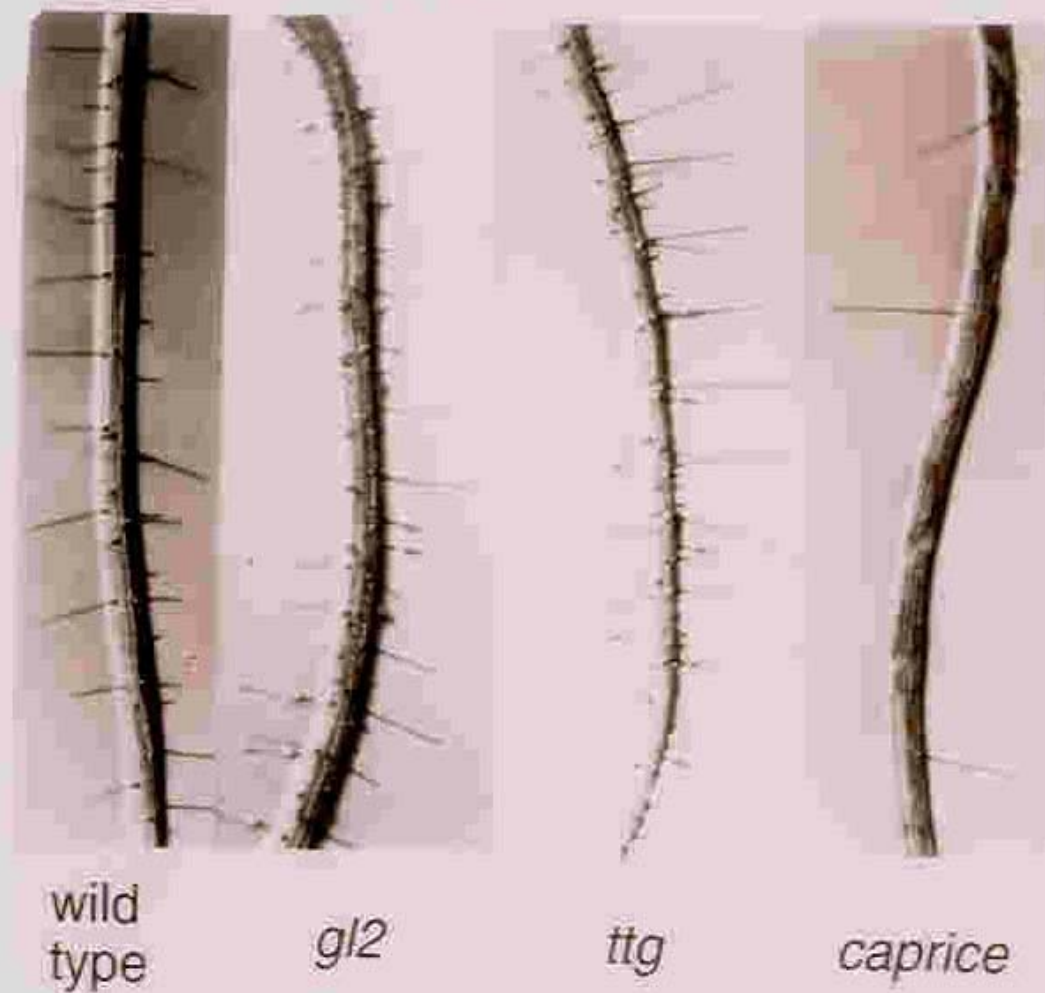
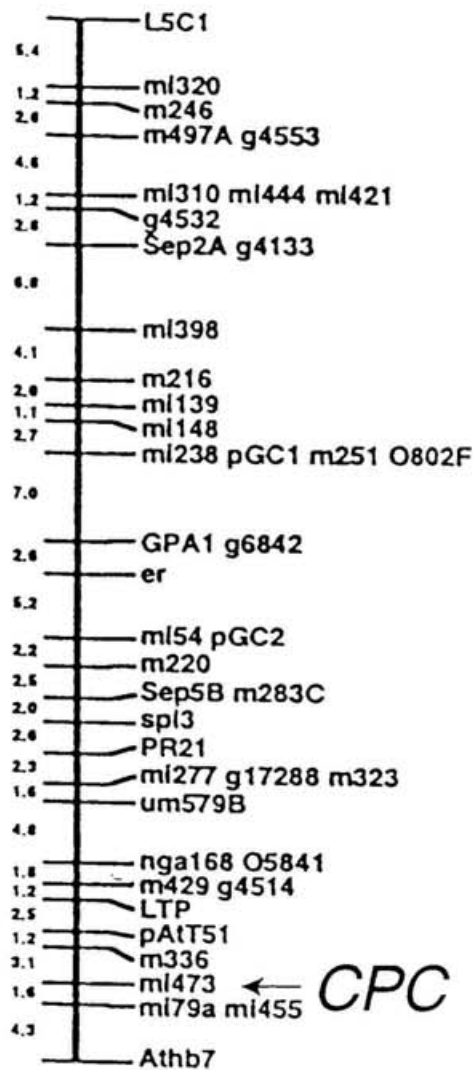


図1 根毛の突然変異体

私がT-DNA ターギング・ラインより単離した *caprice* 突然変異体は根毛の数が野生型に比べて少なくなっている。 *gl2*, *ttg* 突然変異体は逆に根毛の数が多くなった突然変異体である。

2



		total	wt	<i>cpc</i>
<i>cpc</i> X <i>wt</i>	F1	14	14	0
	F2	324	257	67
			(79%)	(21%)

図 2 *CPC* 遺伝子は第 2 染色体の下方に存在する RFLP マーカーの mi473 近傍に位置している。またもどし交雑の結果、劣性の変異であることが解った。

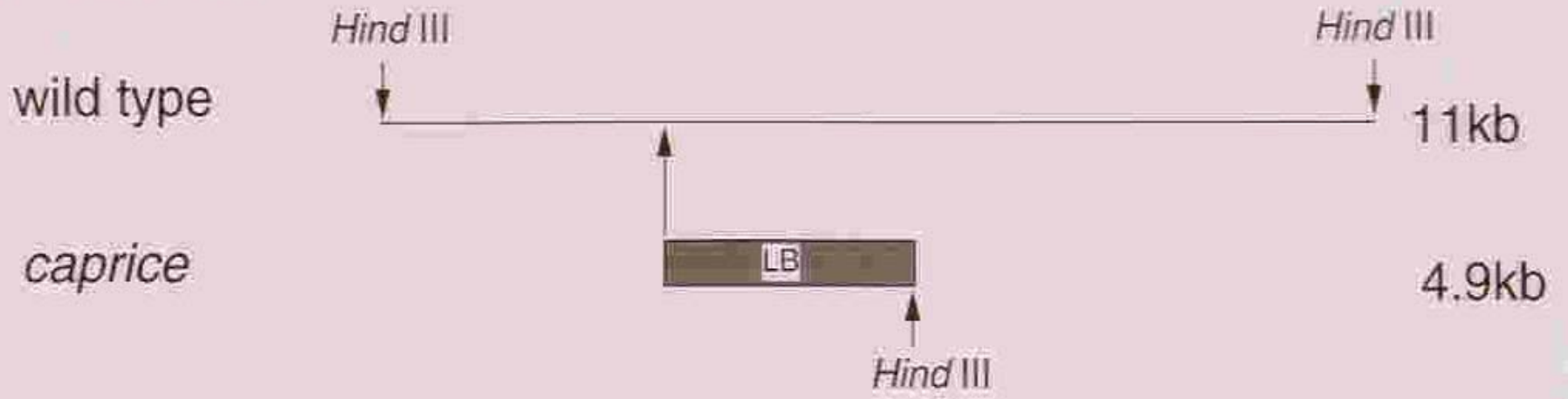
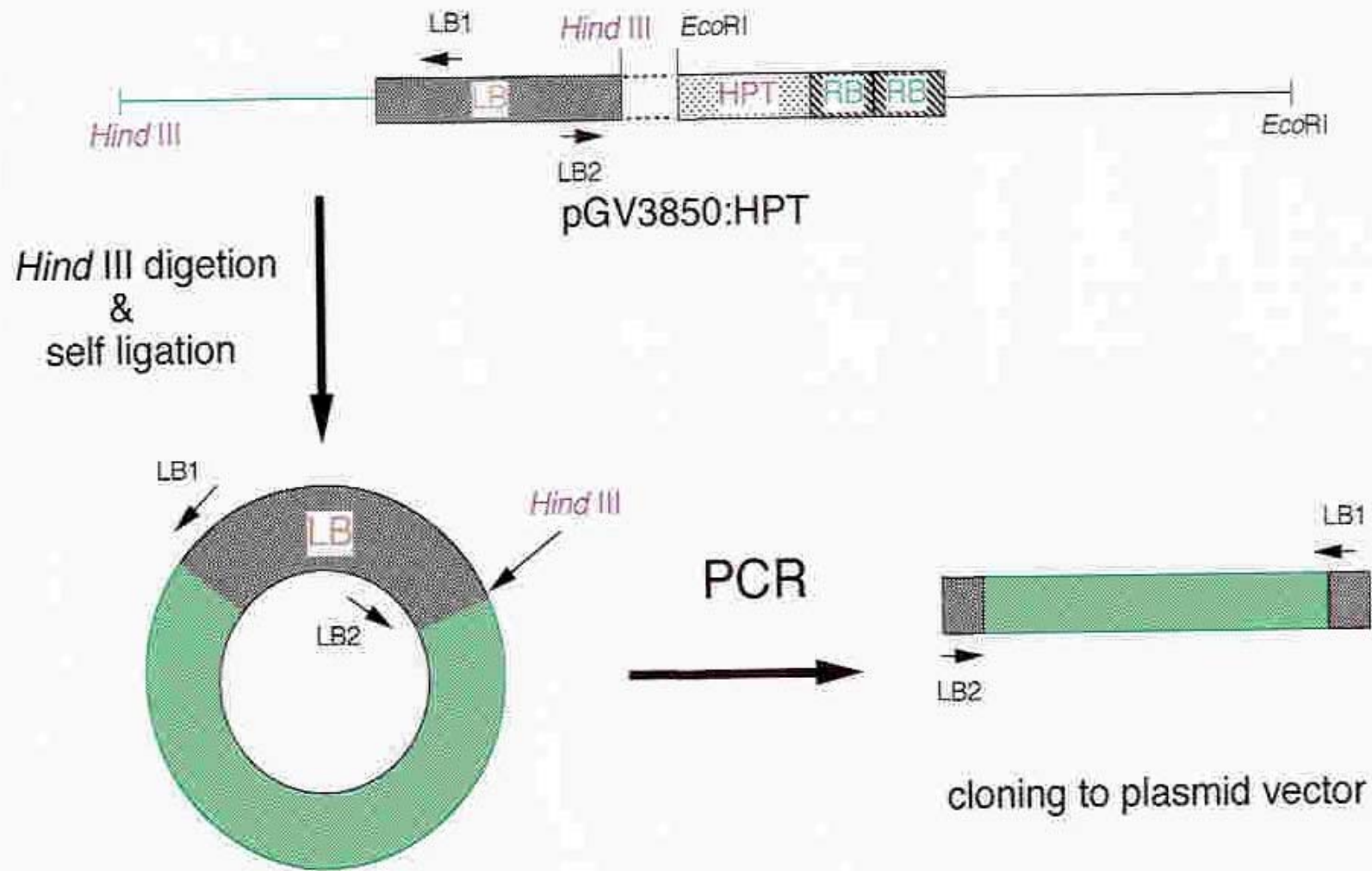


図3 inverse PCR 断片とcaprice 遺伝子座の連鎖検定

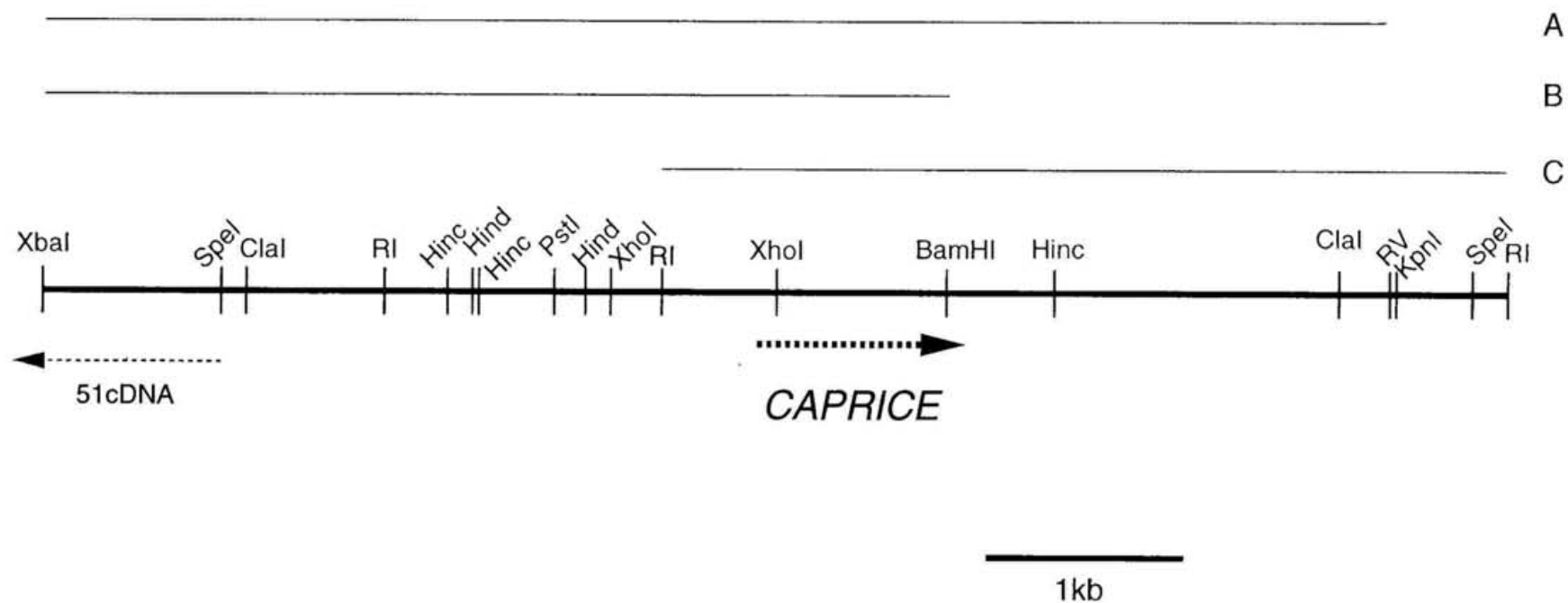
HindIIIで切断したDNAでinverse PCRで得られた約2kbの断片をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、野生型では11kbの位置にバンドがあるが、caprice突然変異体ではT-DNAのレフト・ボーダー内にHind III部位があるために4.9kbの位置にバンドが生じる。



34

図4 inverse PCR の手順

caprice 突然変異体より抽出した DNA を *Hind* III で切断し、セルフ・ライゲーションをおこなった。T-DNA のレフト・ボーダーを外向きに増幅させるプライマーを使って PCR 反応をおこない、2kb の DNA 断片を増幅した。



35

図5 CPC 遺伝子の制限酵素地図

A, B, C はゲノム・ライブラリーより分離したDNA 断片で、それぞれ 7.3kb, 5kb, 4.4kb である。根のcDNA ライブラリーのスクリーニングには B 断片を用いた。

TTCTTAATCAGTCAATATTTAAATAATGGAGGATGATGATAAGTATTTAAATAAATAATTTATTCT
 AGGATTAATCAGACATGCGCAGTTATATAATAATCAGTTTGATTTTCTTTTCCTTTTCGAGCCC

10 20 30 40 50 60
 CTCTCTCTCTCACTCTTTTCTTTTCCGAGAACCCAACAAAAAAGCTACTATTAATCC

70 80 90 100 110 120
 TTCCCCCTCGTGAGGAAATCATTTCTTCTTGTTCGAGATTTATTCTCTTTCTCTCTCT

130 140 150 160 170 180
 CTTTCTCTGTGTGTTTCGTGTCTTCAGATTAGTTCGATGTTTCGTTTCAGACAAGGCGGAA
 M F R S D K A E

190 200 210 220 230 240
 AAAATGGATAAACGACGACGAGACAGAGCAAAGCCAAGGCTTCTTGTTCGGAAGAGGTG
 K M D K R R R R Q S K A K A S C S E E V

250 260 270 280 290 300
 AGTAGTATCGAATGGGAAGCTGTGAAGATGTCAGAAGAAGAAGATCTCATTTCTCGG
 S S I E W E A V K M S E E E E D L I S R

310 320 330 340 350 360
 ATGTATAAACTCGTTGGCGACAGGTGGGAGTTGATCGCCGGAAGGATCCCGGGACGGACG
 M Y K L V G D R W E L I A G R I P G R T

T-DNA

370 380 390 400 410 420
 CCGGAGGAGATAGAGAGATA TTGGCT TATGAAACACGGCGTCGTTTTTGCCAACAGACGA
 P E E I E R Y W L M K H G V V F A N R R

430 440 450 460 470 480
 AGAGACTTTTTTAGGAAATGATTTTTTTTGTGGATTAAAAGAAAATTTTCTCTCCTT
 R D F F R K *

490 500 510 520 530 540
 AATTCACAAGACAAGAAAAAAGGAAATGTACCTGTCTTGAATTACTATTTTGAATGT

550 560 570 580
 ATAATTATCTATATATATAAGAAGAAAAAATGCTTAGGAATTT

図6 CAPRICE cDNAの構造

CAPRICE cDNAの塩基配列とその上流配列を示す。全長は584 bp で ORF を翻訳すると94アミノ酸であった。caprice 遺伝子の上流のゲノム配列にはTATA boxの配列が存在した(下線部で示す)。Myb 領域に相当するアミノ酸は、黒抜きで示した。2つの下向きの矢印はイントロンの位置を示している。

CAPRICE	WEAVKMS	EEEE	DLIS	RM	YKLV	GDR	WELI	AGRI	PGRT	PE	TER	YWL	LMKH	GVV
GL1	VNKG	NFT	EQ	EED	LI	IRL	HRL	LLGN	RWS	LI	AKRV	PGRT	DNQV	KNYW
C1	IRRG	NI	SY	DE	ED	LI	IRL	HRL	LLGN	RWS	LI	AGRL	PGRT	DN
PL	IKRG	NI	SY	DE	ED	LI	IRL	HRL	LLGN	RWS	LI	AGRL	PGRT	DN
P	VKRG	NI	SKE	EED	II	IKL	HAT	LG	NRWS	LI	ASHL	PGRT	DN	EIKNYW
Mixta	IKRG	PF	SL	QEE	QTI	IQL	HALL	GN	RWS	SAI	ASHL	PKRT	DN	EIKNYW
h-myb	VKKT	SWT	EE	ED	RI	IY	QAH	KRL	GN	RWAE	IAKLL	PGRT	DN	AIKNH
d-myb	IKKT	AWT	EK	EDE	IY	QAH	LEL	GN	QWAKI	AKLL	PGRT	DN	AIKNH	NSTMRRK

37

図7 Myb領域の比較

トウモロコシの C1 (Paz-Arez ら, 1987), PL (Cone ら, 1993), P (Grotewold ら, 1991), シロイヌナズナ GL1 (Oppenheimer ら, 1991), キンギョソウの Mixta (Noda ら, 1994) 各遺伝子, 及びヒト (Majello ら, 1986) とハエ (Katzen ら, 1985) の myb 遺伝子との比較。

・ で示したのは myb 領域に保存されているトリプトファン残基である。

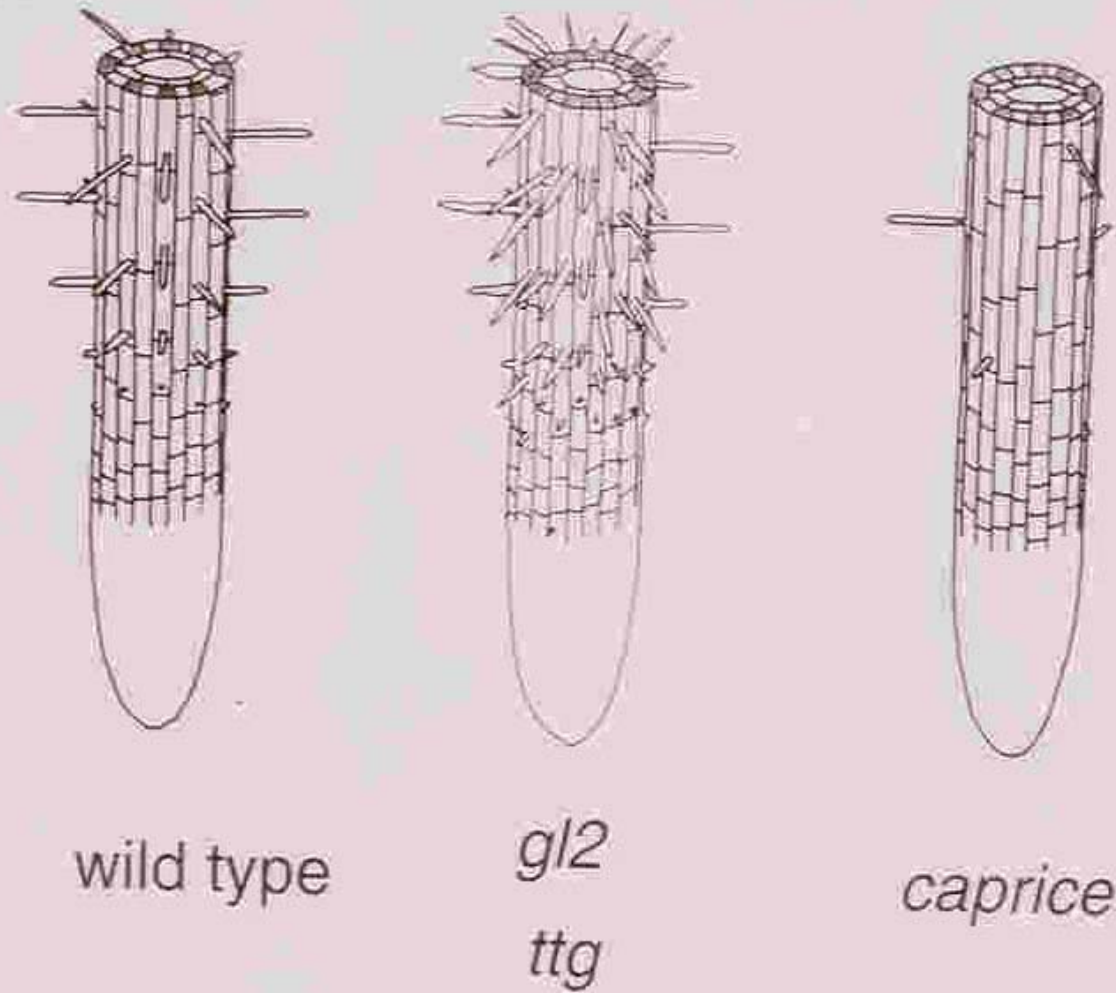


図8 根毛の突然変異体の模式図

シロイヌナズナの野生型の根では8個の表皮細胞列から根毛がでてくる。根毛がでることになった1本の細胞列からはすべての表皮細胞から根毛がでる。gl2, ttg 突然変異体ではすべての細胞列から根毛がでている。cpc 突然変異体では根毛のでるべき細胞列において、根毛がでる表皮細胞とでない細胞がある。

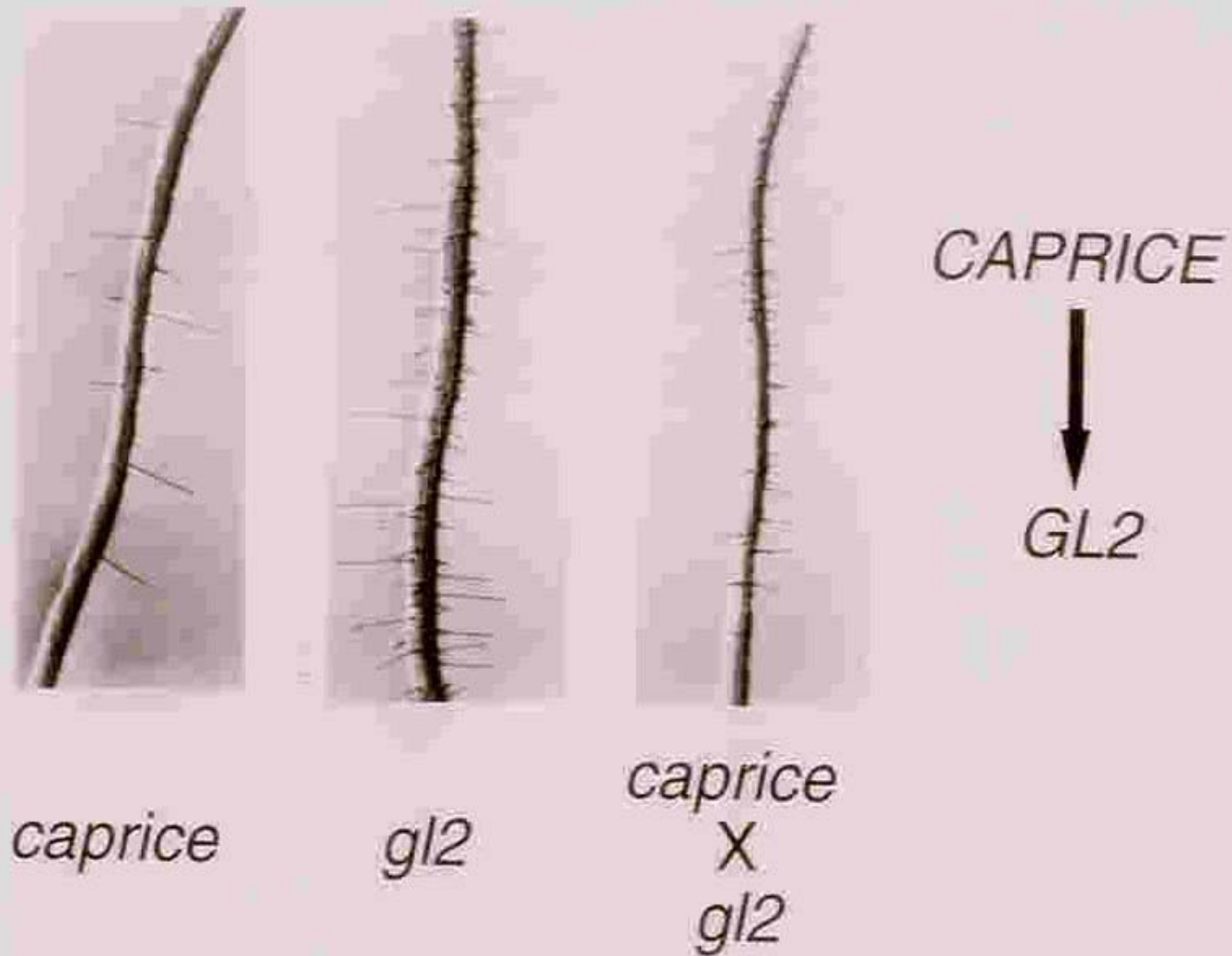


図9 *cpc* X *gl2* 二重突然変異体

cpc X *gl2* 二重突然変異体は *gl2* 突然変異体の表現型を示す。GL2 遺伝子は CPC 遺伝子よりも上流で働いていることが示唆される。

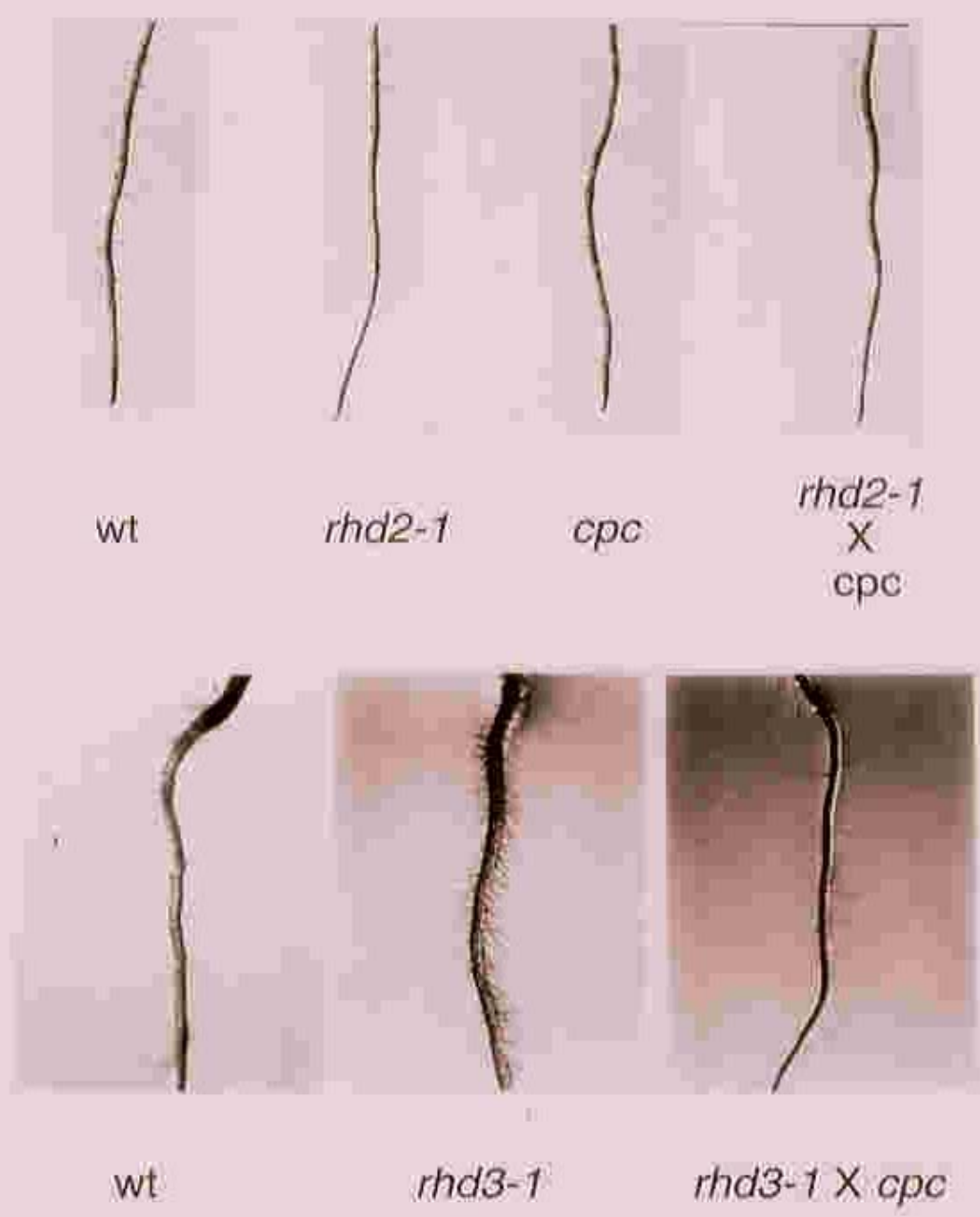
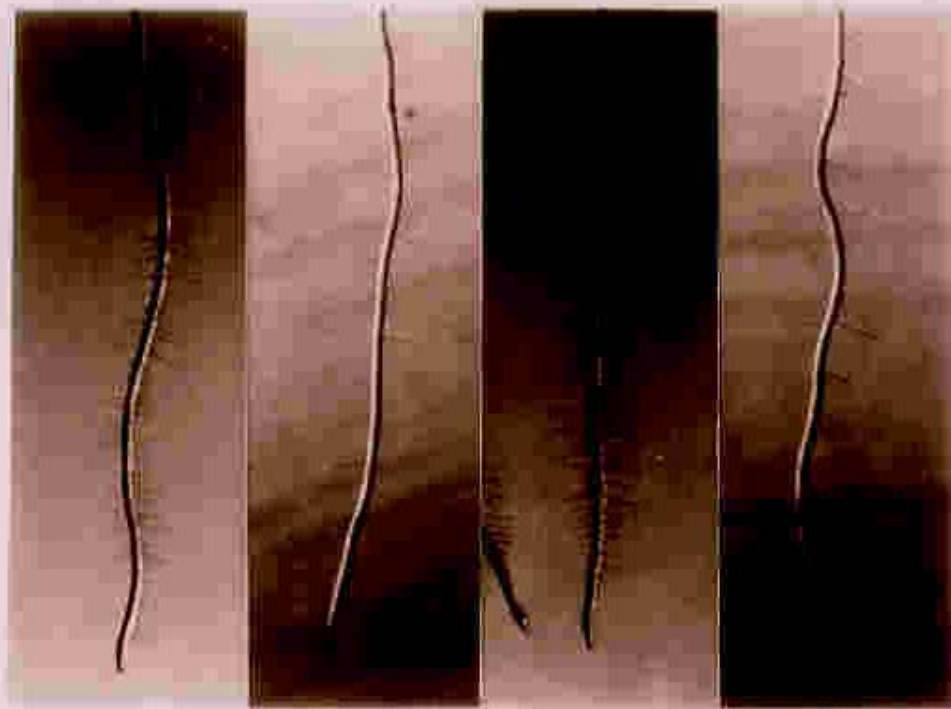


図10 *cpc* 突然変異体と根毛の形の突然変異体との二重突然変異体

(上段) *cpc* 突然変異体と *rhd2-1* 突然変異体 (根毛が短い) の二重突然変異体
 (下段) *cpc* 突然変異体と *rhd3-1* 突然変異体 (根毛が波型) の二重突然変異体

A



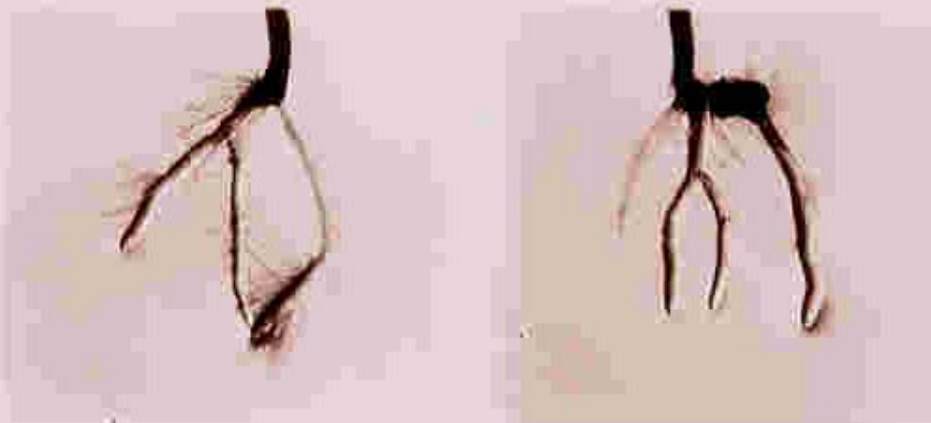
wt

cpc

eto1-1

cpc X *eto1-1*

B



wt

cpc

図 1-1 (A) *cpc* 突然変異体と *eto1-1* 突然変異体の二重突然変異体
(B) オーキシシンとして $1\mu\text{m}$ の IAA (インドール酢酸) を加えた
培地で育てた *cpc* 突然変異体。

II. 考察

1) 根毛の数が少ない既知の突然変異体の関連

根毛の数が少ない突然変異体としては、既に *rh6* 突然変異体が単離、報告されている (Masucci と Schiefelbein, 1994)。

RHD6 遺伝子は、第1染色体の *AP1* 遺伝子から 5cM 以内のところに位置しているので、*cpc* 突然変異体とは明らかに別の遺伝子である。*rh6* 突然変異体の表現型はホルモンに依存したものであった。オーキシンやエチレン合成の前駆体である ACC を培地に加えると根毛の数は同じ条件で育てた野生型と変わらなくなることが報告されている (Masucci と Schiefelbein, 1994)。

一方、*cpc* 突然変異体は、オーキシンを加えた培地で育てても同じ条件で育てた野生型に比較すると根毛は少ないままである (図 11B)。また *cpc* を *eto1-1* と二重突然変異体をして内在性のエチレン量を増やしてみても根毛の数は多にならない。このように、*cpc* 突然変異体の根毛の数が少ないのは、オーキシンやエチレン等の植物ホルモンに依存しない欠陥であると考えらる。

2) *myb* と *myc* による遺伝子発現調節機構

トウモロコシのアントシアニン合成系の酵素群の遺伝子は、*myb* である C1 遺伝子と *myc* である R 遺伝子によりその転写が制御されていることが既に詳細に報告されている (Kleinら, 1989; Rothら, 1991; Goffら, 1992)。R 遺伝子は N 末に転写の活性化部位と考えられる酸性のアミノ酸に富んだ部位をもち、C 末に *myc* とホモロジーのあるヘリックス-ループ-ヘリックスの構造をとって DNA に結合する部位をもっている (Ludwigら, 1989; Goffら, 1990; Goffら, 1992)。

トウモロコシのアントシアニン合成系の酵素の一つである Bz1 遺伝子の転写には C1 と R 遺伝子両方の発現が必要である。R, C1 のどちらの遺伝子がつぶれてもアントシアニンは合成されなくなる (図 13)。

このような *myb* と *myc* のホモログである 2 つの DNA 結合タンパク質による転写制御系はトウモロコシのアントシアニン合成の酵素にだけではなく、シロイヌナズナの根毛と葉のトライコームの形成においても働いていると考えられる。

シロイヌナズナの *ttg* 突然変異体は葉のトライコームがなくなるということと (図 12)、

種皮の色が薄くなった（アントシアニンが合成されなくなっている）突然変異体として分離された(Koornneef, 1981)。しかし、*ttg* 突然変異体の表現型はそれだけでなく根毛の数も増加していることが解った(Galwayら, 1994)。これらの形質は独立に単離された10個の*ttg* 突然変異体で観察されることから、1遺伝子の変異によるものであると考えられている。

TTG 遺伝子はまだクローニングされていない。しかし、その代わりにシロイヌナズナのR遺伝子を*ttg* 突然変異体で過剰発現させると表現型が野生型に復帰することから、*TTG* 遺伝子は *myc* のホモログではないかと考えられている(Loyd ら, 1992; Galway ら, 1994)。

また *gl1* 突然変異体は葉のトライコームはなくなるが、根毛の表現型は正常である(Galway ら, 1994、図12)。*cpc* 突然変異体は根毛の数は少なくなるが、葉や茎のトライコームは野生型と変わりなく生えている。

シロイヌナズナにおいてトライコームの形成、アントシアニンの合成、根毛の形成、それぞれにおいての発現を制御する *myc* の方はすべて *TTG* 遺伝子である。そしてパートナーの方の *myb* はトライコームの形成に関しては *GL1* 遺伝子、根毛の形成に関しては *CPC* 遺伝子というように標的となる遺伝子によって変化するものではないかと推察される(図13)。

また、シロイヌナズナでは、*tt1*~*tt10* までのアントシアニン合成能が減少した突然変異体が単離報告されている(Koornneef, 1990; Shirley ら, 1995)。これらの遺伝子のほとんどのものはアントシアニン合成の過程での酵素をコードしている遺伝子であると考えられる。既に、*TT3*, *TT4*, *TT5* 遺伝子がクローニングされ、これらはそれぞれ Dihydroflavonol 4-reductase (DFR), Chalcone synthase, Chalcone isomerase といった酵素をコードしていた(Feinbaum と Ausbel., 1988; Shirley ら, 1992)。しかし、まだクローニングされていない transparent testa (*tt*) の突然変異体の遺伝子のなかには、*myb* のホモログがあると推測される。Shirley ら(1995)は、*tt3* 突然変異体以外で *DFR* (*TT3*) 遺伝子の発現が低下しているのが *tt8*, *ttg* 突然変異体だけであることを確かめた。そこで、彼らは *TTG* 遺伝子と *TT8* 遺伝子が協同して *DFR* (*TT3*) 遺伝子の発現を制御している可能性を指摘し、*TT8* 遺伝子が *myb* ではないかと推測している。

3) *CPC* 遺伝子と *TTG* 遺伝子のターゲットは *GL2* 遺伝子であろう

GL2 遺伝子は既にクローニングされ、ホメオボックスをもつことから転写因子であることが示唆されている(Rerie ら 1994)。二重突然変異体を用いた解析より、*CPC* 遺伝子

はGL2遺伝子よりも上流で働いていることが示唆された(図9)。一方、*gl2*突然変異体と*ttg*突然変異体の根毛の表現型は同じなので、二重突然変異体を用いた解析によりその上下関係を明らかにすることはできない。

GL2遺伝子のプロモーター領域にGUS遺伝子をつなげたトランスジェニック植物の解析により、GL2遺伝子は根毛のでていない表皮細胞列で発現していた(Marksら、私信)。GL2遺伝子は表皮細胞で発現して、発現した細胞列から根毛がでることをおさえていると考えられる。*gl2*突然変異体ではすべての表皮細胞でGL2遺伝子が発現しなくなるために、すべての表皮細胞から根毛がでてくると解釈される。

野生型のシロイヌナズナで*R*遺伝子を過剰発現させたトランスジェニック植物では根毛の数が野生型と比較してかなり少なくなる(Galwayら、1994)。この結果より、*R*遺伝子のホモログであるTTG遺伝子もGL2遺伝子の場合と同じように根毛がでることを抑えていると考えられる。

これらの結果をふまえて、根毛形成の過程において図14に示すような系があるのではないかと推察した。結果として、GL2遺伝子の発現量が多くなれば根毛の数は少なくなり、GL2遺伝子の発現量が少なくなれば根毛の数は多くなる。そして、GL2遺伝子の発現を制御しているのがmybであるCPC遺伝子とmycであるTTG遺伝子であると考えられる。CPC遺伝子には、GL1、C1遺伝子に存在する転写の活性化部位と考えられている酸性のアミノ酸に富んだ領域が存在しない。このことより、CPC遺伝子はDNAに結合するが、転写のリプレッサーとして働くのではないかと考えた。

野生型では、転写のactivatorであるTTG遺伝子とrepressorであるCPC遺伝子の+と-の相互作用によって適当な量のGL2遺伝子の転写がおこなわれていると考えられている。

*gl2*突然変異体では、GL2遺伝子そのものがつぶれているので、どの表皮細胞でもGL2遺伝子が発現せずに、根毛の数が多くなる。

*ttg*突然変異体では、GL2遺伝子の転写を正に制御しているTTG遺伝子が欠損しているため、野生型に比べるとGL2遺伝子の発現が減少し、根毛の数が増加する。結果的に*gl2*突然変異体と*ttg*突然変異体の根の表現型は同じになる。

一方、*cpc*突然変異体では、GL2遺伝子の転写を負に制御する因子であるCPC遺伝子が欠損しているため、GL2遺伝子の発現量は通常よりも多くなり、根毛の数が少なくなると考えられる。

一方、トライコームの形成においては根毛の場合とは逆にGL2遺伝子の発現がトライコームの形成をpositiveに制御していると考えられる。そして、GL1遺伝子とTTG遺伝子はそれぞれ転写のactivatorとしてGL2遺伝子の発現を制御していると考えられる。

3) 植物の myb 遺伝子

その他に植物で機能のわかっているmyb 遺伝子として以下のものがある。トウモロコシの果皮、穂軸等の花器官に存在する赤色素フラボフェン類の合成系の酵素の転写を制御しているP 遺伝子 (Grotewoldら, 1991)。P 遺伝子は、C1, PL 遺伝子とは異なり、パートナーとして myc のホモログを必要としない (Grotewoldら, 1994)。P 遺伝子には選択的スプライシングによって、1802bp と 945bp の2種類の転写産物が存在する。945bp の転写産物には myb 領域が欠失しており、機能をもつのは 1802bp の転写産物だけであることがわかっている (Grotewoldら, 1994)。その他にはキンギョソウの花弁の表皮細胞の形の決定に関与している Mixta 遺伝子もmyb 領域をもっている (Nodaら, 1994)。

既に、トウモロコシ (Marocco ら, 1989)、キンギョソウ (Jackson ら, 1991; Sablowski ら, 1994)、ペチュニア (Avila ら, 1993; Solano ら, 1995)、オオムギ (Wissenbach ら, 1993; Gublar ら, 1995) などでトウモロコシのC1 遺伝子をプローブとして、myb のホモログがクローニングされている。これらの遺伝子の機能は不明であるが、キンギョソウのmybホモログの一つである花で特異的に発現しているMyb305 は花弁でのカルコンシンターゼ遺伝子の発現に関わっていることが示唆されている (Sablowski ら, 1994)。またオオムギでは、ジベレリンによりその発現が誘導されるGAmbyb 遺伝子はこ粉層で α -アミラーゼ遺伝子の発現を制御しているらしい (Gublar ら, 1995)。

シロイヌナズナでもホモロジーによりmyb のホモログはいくつか分離されている (Shinozaki ら, 1992; Urao ら, 1993; Li & Parish, 1995)。ATmyb2 遺伝子は乾燥や塩、アブシジン酸でその発現が誘導される (Urao ら, 1993)。

4) CPC 遺伝子はDNA 結合タンパク質か?

動物の myb タンパク質は連続して存在する3つのmyb ドメインと呼ばれるモチーフをもつ。そのそれぞれが、helix-turn-helix と呼ばれる高次構造をとり、DNA に結合する。また植物では今のところ2つのmyb ドメインをもつものしか単離されていない。

欠失変異体を用いた実験より、動物の系では1つ目の myb region を欠失させても、myb タンパク質のDNA 結合能には影響を及ぼさないことが報告されている (Sakura ら, 1989; Howeら, 1990)。このことから DNA に結合する時に myb ドメインは2つあれば十分なようである。

しかし、本研究で私がクローニングをした CPC 遺伝子は植物での2つ目の myb 領域も欠失しており、たった1つの myb 領域しか存在しなかった。果たしてたった一つのmyb 領域だけで CPC 遺伝子は DNA に結合することができるのであろうか?

また、CPC 遺伝子は他の myb タンパク質で保存されている37番目のアスパラギン酸

(D)がプロリン(P)に変換されている。トウモロコシのアンソシアニン合成の突然変異体である *C1-1* ではこの部分のアスパラギン酸がグルタミン酸に変化している(Paz-Arez ら 1990)。 *C1-1* 突然変異体では遺伝子内の他の部位にも変異が入っているため、この部位が突然変異の原因になっているとは明確に言及することはできない。トウモロコシの胚のカルスの系を利用したトランジェント・アッセイでは、*myb* 領域だけD → Eの変換をおこなったコンストラクトではルシフェラーゼの転写は野生型にくらべて幾分低下はするが、まったくなくなるわけではなかった(Goffら, 1991; Frankenら, 1994)。

5) これからの課題

すでにMarks 博士のグループによって *GL2* 遺伝子のプロモーター領域に GUS 遺伝子をつないだ植物体を作成されている。この植物体の根では根毛がでない表皮細胞列が特異的に染まる (Mark, 私信)。つまり *GL2* 遺伝子の発現は根毛がでることをおさえていると考えられる。この[*GL2* 遺伝子のプロモーター+ GUS]のトランスジェニック植物を *cpc* 突然変異体と遺伝的に掛け合わせる。次世代の植物体の GUS 遺伝子 遺伝子の染色パターンを観察すれば、*GL2* 遺伝子の発現に対する *CPC* 遺伝子が与える影響をみることができる。この掛け合わせた植物では、すべての根毛列で GUS 遺伝子の発現が観察されるのではないかと期待される。

現在、*CPC* 遺伝子座を含んだゲノム領域をアグロバクテリアで *cpc* 突然変異体に導入する相補性試験を行っている。*cpc* 突然変異体を野生型に復帰させるゲノム断片が確定できれば、*CPC* 遺伝子のプロモーター+ GUSのコンストラクトを導入したトランスジェニック植物を作製し、どの細胞で *CPC* 遺伝子の発現が認められるかを観察する。*CPC* 遺伝子は根毛のでている細胞列で発現して、*GL2* 遺伝子の発現を抑えていることが期待される。

また *CPC* 遺伝子の cDNA をカリフラワー・モザイクウイルスの 35S プロモーターに接続したコンストラクトを導入した *CPC* 遺伝子を過剰発現させるためのコンストラクトも現在作成している。この *CPC* 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニック植物の表現型は、*cpc* 突然変異体とは逆で根毛の数が野生型に比べて増加すると予想される。

このようなトランスジェニックの植物体をもちいた解析をおこなえば、根毛形成における *CPC* 遺伝子の役割についての理解を深めることができるであろう。



wild type



ttg



gl1



gl2

図1.2 トライコームの突然変異体

シロイヌナズナの葉の表面にはトライコームと呼ばれる先端が3つに分かれた毛が生えている。ttg-1, gl1-1 突然変異体はこのトライコームが欠失している。gl2-1 突然変異体では葉の縁にだけトライコームが生えている。

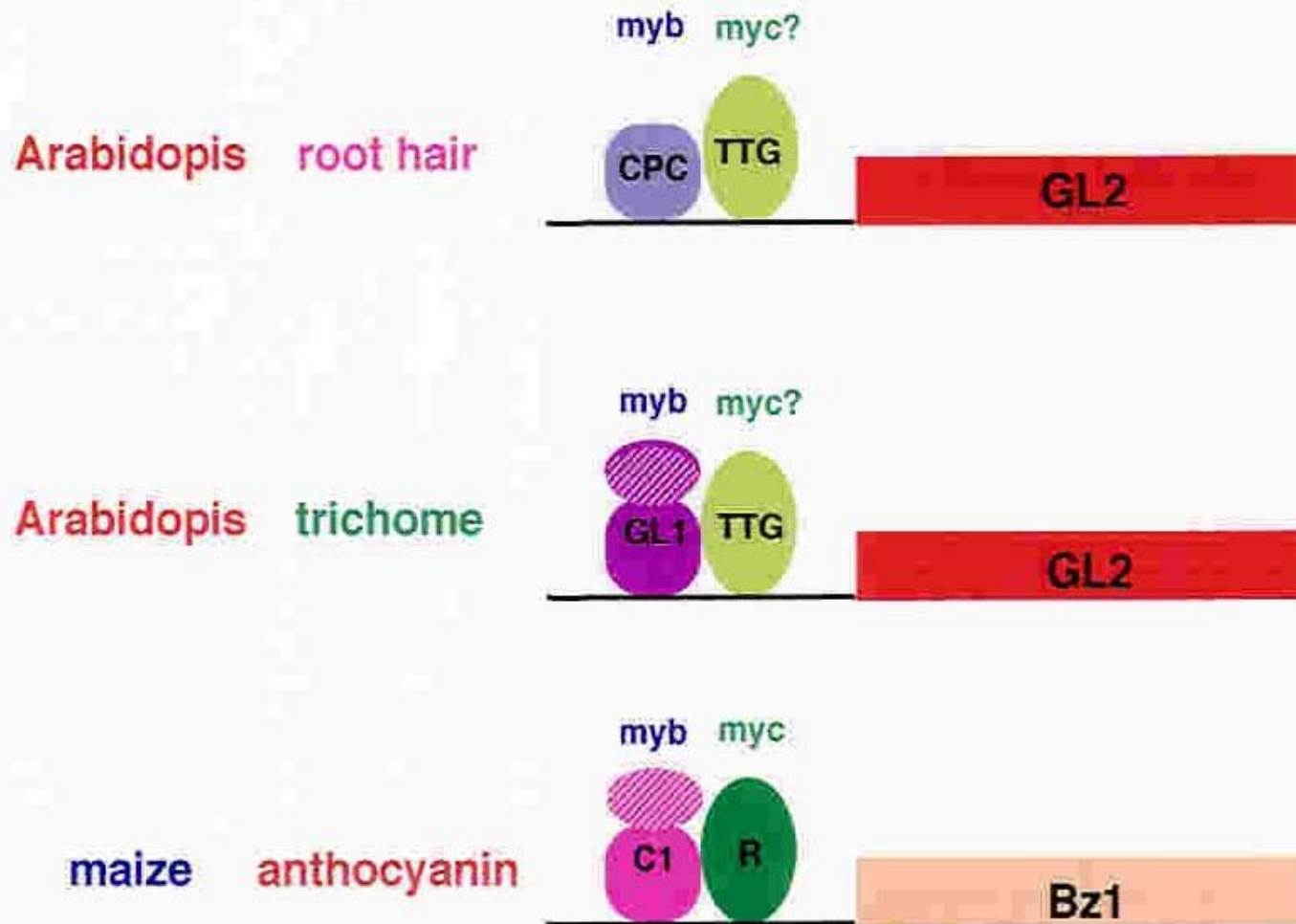


図13 植物におけるmybとmycによる遺伝子発現制御機構

トウモロコシのアントシアニン合成系の酵素はC1(myb)とR(myc)によりその転写が制御されている。同様の機構がシロイヌナズナの葉のトライコームと根毛の形成にも働いていると考えられる。この時mycのほうはTTG遺伝子で共通であり、mybのほうを変える。網目で示した部分は酸性のアミノ酸残基に富んだ領域(転写の活性化部位)である。

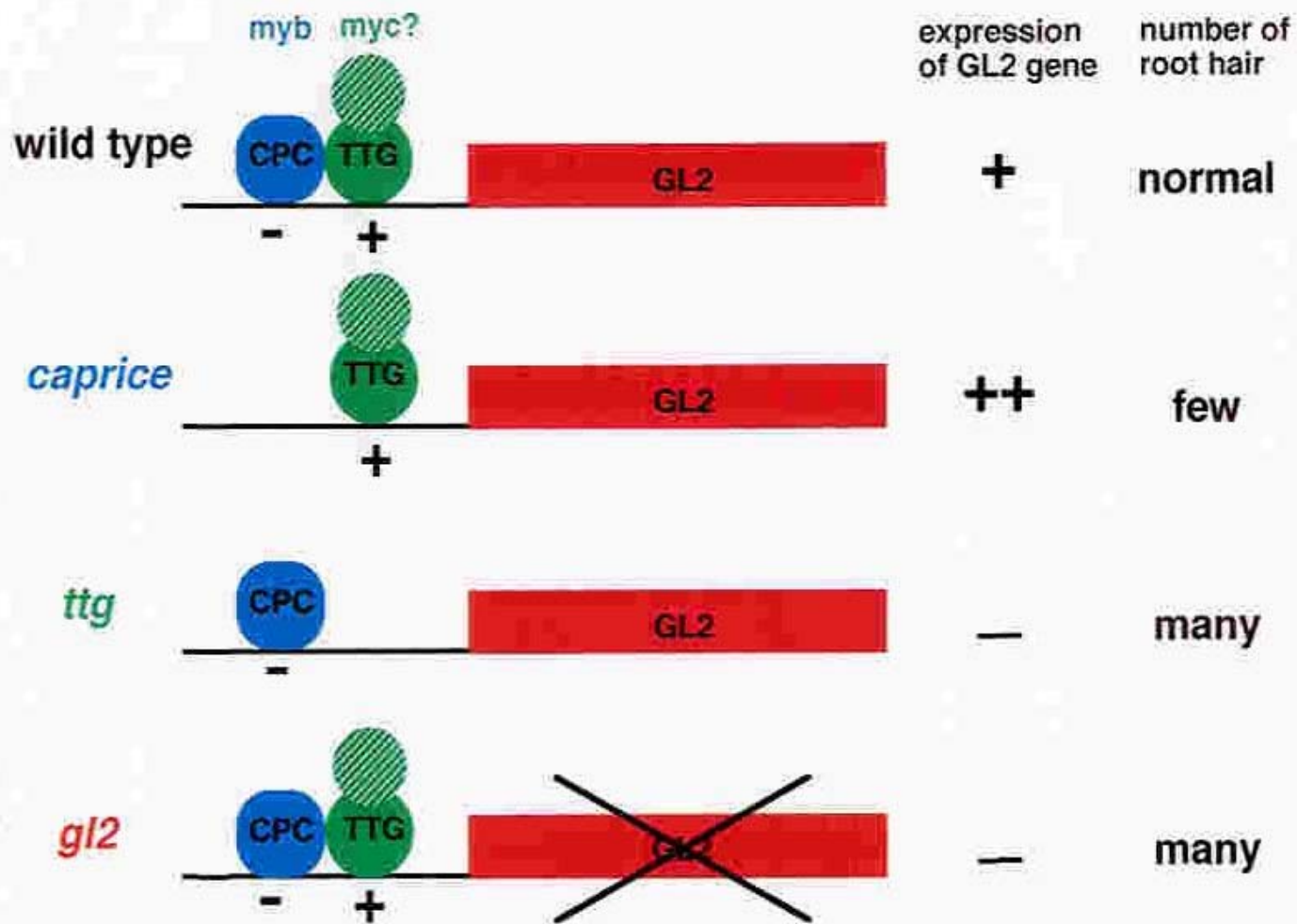


図14 CPC 遺伝子とTTG 遺伝子による根毛伸長開始の機構のモデル

CPC 遺伝子はリプレッサーとして、TTG 遺伝子はアクチベーターとして共同してGL2 遺伝子の転写を制御していると考えた。GL2 遺伝子の発現量が増えると、根毛の数は減少する。

第4部 根が太くなった RH32 突然変異体の分子遺伝学的な解析

1. 結果

1) 根の表現型

RH32 突然変異体はEMS 処理した植物体 (WS株) のなかより分離した。RH32 突然変異体の根の表現型として以下の3つの点が挙げられる (図1)。

- 1、野生型にくらべて根が太くなっている。
- 2、皮層の数が野生型では8個なのに10個まで増加している。
- 3、根毛が長く斜め前方に向かって伸長する。

図2は根の表皮細胞を走査型のレーザー顕微鏡で観察したものである。RH32 突然変異体の表皮細胞の形は野生型に比較して、根が伸長する方向に対して短く、横の方向に長くなっている。野生型の根では、伸長方向の細胞の長さが250 μm 程度なのに対して、RH32 突然変異体では、150 μm 程度になっていた。根の細胞は縦の方向に伸長しなくなるので、根の伸長も野生型に比べると遅くなっている。

また野生型の根の直径が $85 \pm 0.89 \mu\text{m}$ であるのに対して、RH32 突然変異体の根の直径は $149 \pm 5.2 \mu\text{m}$ であった (値は野生型、RH32 突然変異体、それぞれ10個体ずつの根の横断面の長さを計測し、平均値 \pm 標準誤差で示した)。

一般に植物ホルモンの中で、縦方向の細胞の伸長にはジベレリンが、横の方向の膨張にはエチレンが働いていると言われている (Shibaoka, 1994)。ジベレリンやエチレン合成の阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン (AVG)、2-アミノイソ酪酸 (AIB) を加えるとRH32 突然変異体の細胞の膨張が抑制されて、根の太さが野生型のレベルにまで戻らないかと考え、図3に示すような実験をおこなった。

図3に示すように、5 μM のAVGを培地に加えた時は根毛は短くなるが、細胞の形は変わらず、根の太さも変わらなかった。また100 μM のGA3を加えたときも根の太さは変化しなかった。結果は示さないが、AIBを加えた時もRH32 突然変異体の根の太さに変化は見られなかった。

RH32 遺伝子は、植物ホルモンが関与した細胞の形を決定する制御経路とは独立した制御経路に位置して、細胞伸長に関わっていると考えられる。

野生型シロイヌナズナの表皮細胞上において根毛の位置は、表皮細胞の根の先端に近い場所である。図4に示すようにノマルスキー顕微鏡で観察すると、野生型の根毛は次の表皮細胞との境目ではなく、少し余裕をおいた位置からでてくる。このような形態に対して、RH32 突然変異体では次の細胞との境目から根毛が斜め下方に向かって突出してい

た。

また野生型ともどし交雑をおこなったところ、F2 世代で野生型と突然変異体の比が 3 : 1 になったことから、RH32 突然変異体は劣性の 1 遺伝子の変異によっておこったことがわかった (表 1)。

2) 根以外の器官の表現型

細胞の膨張が観察されるのは根だけではなく、胚軸や花茎、花においても観察された (図 5、6)。走査型電子顕微鏡で観察すると RH32 突然変異体の胚軸や茎の細胞は野生型に比べて膨張し、結果として各器官の形態は太くなっていた (図 5)。またシロイヌナズナ野生型の種子の形はだ円形であるが、RH32 突然変異体の種子は円形に近い形になっていた。

RH32 突然変異体の花も伸長が抑えられた形態を示した。また走査型電子顕微鏡で観察すると、がくの外側の表面の細胞は野生型では縦長の細胞であるが、RH32 変異体では横長の細胞になっている。さやにおいても同様に細胞の膨張が観察された (図 6)。

3) RH32 突然変異体と他の根の突然変異体との二重突然変異体の解析

a) エチレンの突然変異体との二重突然変異体

ein1-1, *ein2-1* 突然変異体はエチレンに反応しない突然変異体である (Guzman と Ecker, 1990; Ecker, 1995)。これら 2 つの突然変異体は、野生型に比べて根毛が短くなっている (図 7A)。それに対して、内在性のエチレン量が増加している *eto1-1* 突然変異体は根毛が長くなるとともに、根毛の数も増加している (図 7A)。これらのエチレンの突然変異体と RH32 突然変異体の間で二重突然変異体を作製し、RH32 突然変異体のエチレンに対する反応の解析をおこなった。

その結果、RH32 X *ein2-1* 二重突然変異体ではさらに根毛が短くなった。それに対して、RH32 X *eto1-1* 二重突然変異体ではさらに根毛の長さが長くなった (図 7B)。これらの結果より RH32 変異体は野生型と同じようにエチレンに対して反応を示すと結論できる。

b) 根が太くなった突然変異体との二重突然変異体

シロイヌナズナでは、既に根が太くなった突然変異体がいくつか分離されている。このうちのひとつである *sabre* 突然変異体からは既に遺伝子がクローニングされている (Aeshbacher ら, 1995)。

我々の研究室でも、RH32 突然変異体以外にもいくつかの根が太くなった突然変異体を分離している。まず、46-1 突然変異体は *pom1* 突然変異体 (Hauser ら, 1995) の allele であった (図 8 A)。その他にも、*rot433* 突然変異体 (図 8 B)、15-31 突然変異体 (図 8 C) を分離した。野生型とのもどし交雑の結果、これら 3 つの突然変異体は F2 世代で野生型と突然変異体の比が 3 : 1 になったことから、劣性の 1 遺伝子の変異によって生じたものであることがわかった (表 1)。また光形態の突然変異体である *det2-1* 突然変異体はわい性の植物 (Chory ら, 1991, 図 8 D) であるが、根も太くなっていた。

これらの根が太くなった突然変異体と RH32 突然変異体の間で二重突然変異体を作製した (図 8)。それぞれの突然変異体と RH32 突然変異体の二重突然変異体は付加的な形質を示し、さらに根の太さが太くなった。この形質より、根の形の制御にはいくつかの遺伝子がきいていてそれらは独立に細胞の形の制御に関わっていることが示唆される (図 10)。

また RH32 X *pom1* 二重突然変異体の根の表皮細胞を走査型のレーザー顕微鏡で観察した (図 2)。二重突然変異体の表皮細胞の形は各突然変異体よりもさらに細胞の形が短くなっており、縦と横の長さがほとんど変わらなくなっていた。

c) オーキシン耐性の突然変異体との二重突然変異体

既にオーキシン耐性の突然変異体として分離されている *aux1-1* (Estille ら, 1987; Lincoln ら, 1990), *axr2-1* (Wilson ら, 1990) 突然変異体との間で二重突然変異体を作製した。この 2 つの突然変異体には共通した性質が存在する。1) オーキシンに対する耐性 2) 寒天面上で根毛が観察されない 3) 重力屈性が異常になっている、の 3 つの点である。

c-1) *aux1-1* 突然変異体との二重突然変異体 (図 9 B)

RH32 *aux1-1* 二重突然変異体では、根は太いままであるが、寒天面上で根毛の伸長がみられなくなる。もちろん重力屈性はなくなったままである。この二重突然変異体の表現型より、根毛の形成に関しては *aux1-1* の変異の方が epistatic に働くことが示唆された。

c-2) *axr2-1* 突然変異体との二重突然変異体 (図 9 A)

RH32 *axr2* 二重突然変異体では、RH32 *aux1-1* 二重突然変異体の時とは違った表現型が観察される。意外なことに、根はさらに太くなり、根毛の伸長はさらに増大する。この2つの性質を考えあわせると、*axr2*は優性の突然変異体であり細胞伸長にもいくらかの影響を及ぼしていることが考えられる。

4) RH32 突然変異体の allele

現在までに私が単離した根が太い突然変異体は、すべてRH32 突然変異体とは allelic ではなかった。しかし他のグループによって分離された根の太い突然変異体で ADH 遺伝子の近くにマッピングされた突然変異体があったので種子を交換して相捕性試験を行った。

一つは Jason Reed 博士によって分離された *shy409* 突然変異体 (Landsberg 株) である。彼は胚軸が伸長する突然変異体である *hy3* 突然変異体の伸長を抑える suppresser 突然変異体をスクリーニングし、*shy409* 突然変異体を分離した (Reedら1993)。掛け合わせの結果、*shy409* 突然変異体と RH32 変異体は allelic であった。

また Hermann Hofte 博士によってトランスポゾン・タギング・ラインから分離してきた *bot1* 突然変異体 (Columbia 株) も RH32 突然変異体と allelic であった。

5) RH32 遺伝子のマッピング

近年は CAPS や SSLP などの PCR を用いた簡便なマッピング法が開発された (Konieczny と Ausbel, 1993; Bell と Ecker, 1994)。この2つの方法を用いて RH32 遺伝子のマッピングを行った (材料と方法参照)。

RH32 (WS株) を野生型の Landsberg 株と掛け合わせた F₂ 世代の突然変異体 143 個体から DNA を抽出し、マッピングをおこなった。CAPS マーカーの一つである ADH 遺伝子 (第1染色体) でマッピングしたところ、286本の染色体のうち4本が組み変わっていただけであり、組換え率は 1.4% であった (表2)。

また、ADH 遺伝子がハイブリダイズする4つの YAC クローン (6A6, 6A7, 7D10, 17A11) のうち3つ (6A6, 6A7, 7D10) に 31B3 遺伝子がハイブリダイズするという報告があった (Pat Dunn と Joe Ecker, 私信)。31B3 遺伝子はアメリカのミシガン州立大学のグループが random に cDNA のシーケンスをおこなっている EST (expressed sequence tag) clone の中の一つである。そこで、31B3 遺伝子のゲノムクローンを分離し、シーケンスを行い、PCR のためのプライマーを設計し CAPS mapping を行った (材料と方法

を参照)。その結果、ADH marker でマッピングをした時に組換わっていた植物と同じ植物の染色体が組み換わり、ADH gene でマッピングした時と同じ 1.4% の組換え率であった。つまり、RH32 遺伝子から ADH 遺伝子、31B3 遺伝子はともに同じくらいの距離が離れていた。

1.4% の組換え率というのは、シロイヌナズナのゲノムでは、YAC (Yeast Artificial Vector) で 1 個か 2 個の距離であった。これは、クロモソーム・ウォーキングによって遺伝子をクローニングすることも十分に可能な距離である。しかし RH32 突然変異体と allelic である *bot1* 突然変異体 (フランスの Hermann Hofte が単離) がトランスポゾンでタグgingのされており、彼が遺伝子のクローニングを進めているので (Hofte, 私信)、これ以上遺伝子のクローニングに向けた実験をおこなうことは中止した。

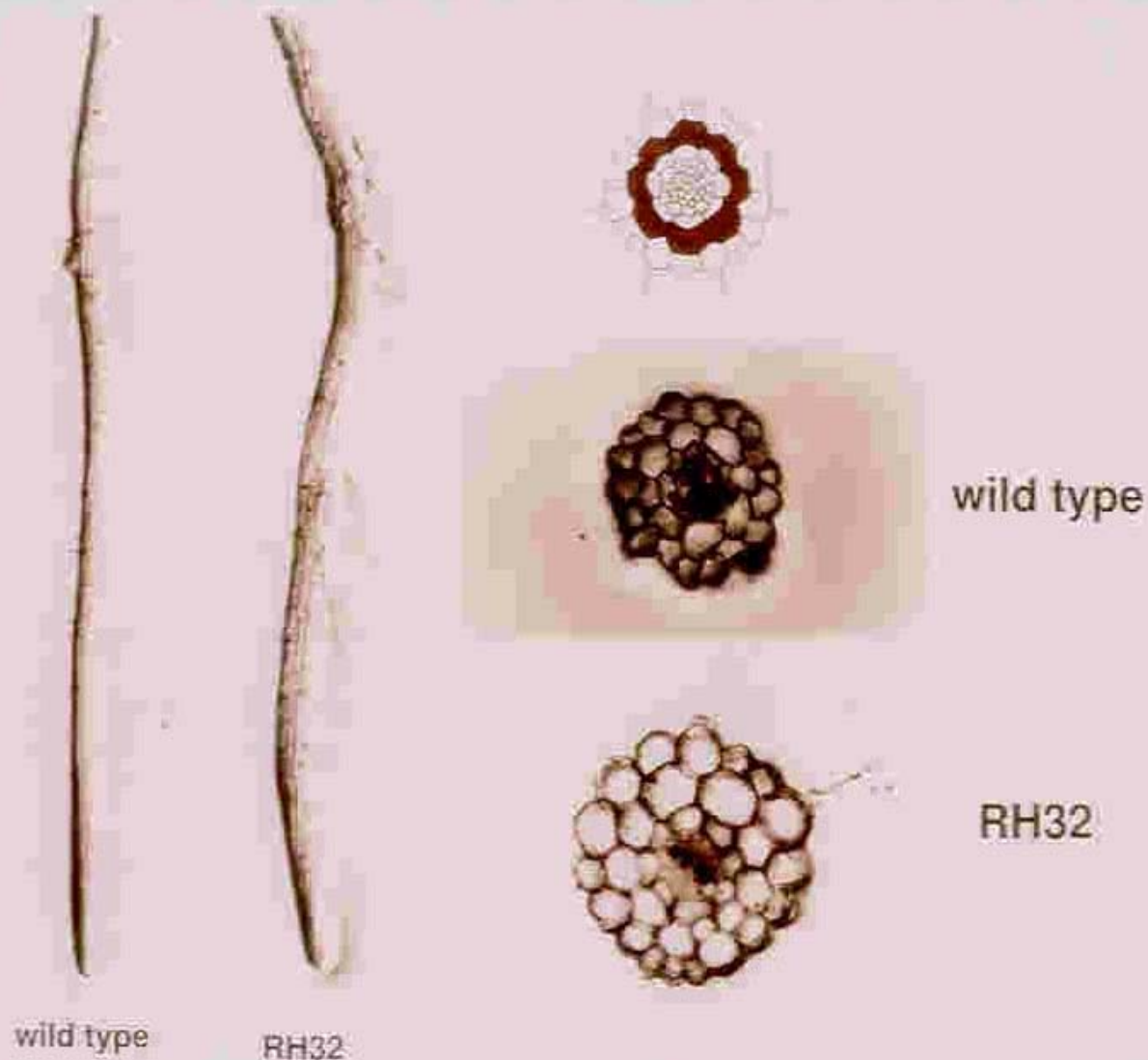


図1 根が太くなった RH32 突然変異体

〔左図〕 RH32 突然変異体の根は野生型の根と比較すると太くなっていることがわかる。また根毛も長くなり、斜め下方に向かって伸長する。

〔右図〕 根の伸長領域の断面図。野生型では外側から二層目の細胞層である皮層の数は8個である〔赤色で示した部分〕。ところが、RH32 突然変異体では10個になっている。



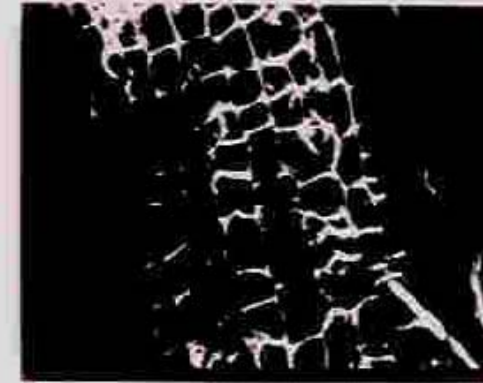
wild type



RH32



46-1



RH32X46-1

図2 走査型レーザー顕微鏡で観察した根の表皮細胞。

野生型に比較すると、RH32, 46-1 各突然変異体の表皮細胞は伸長方向に短く、横にながくなっている。RH32 X 46-1 二重突然変異体では、その形質がさらに極端になっている。wild typeの写真で1個の細胞の側邊を矢印で示した。

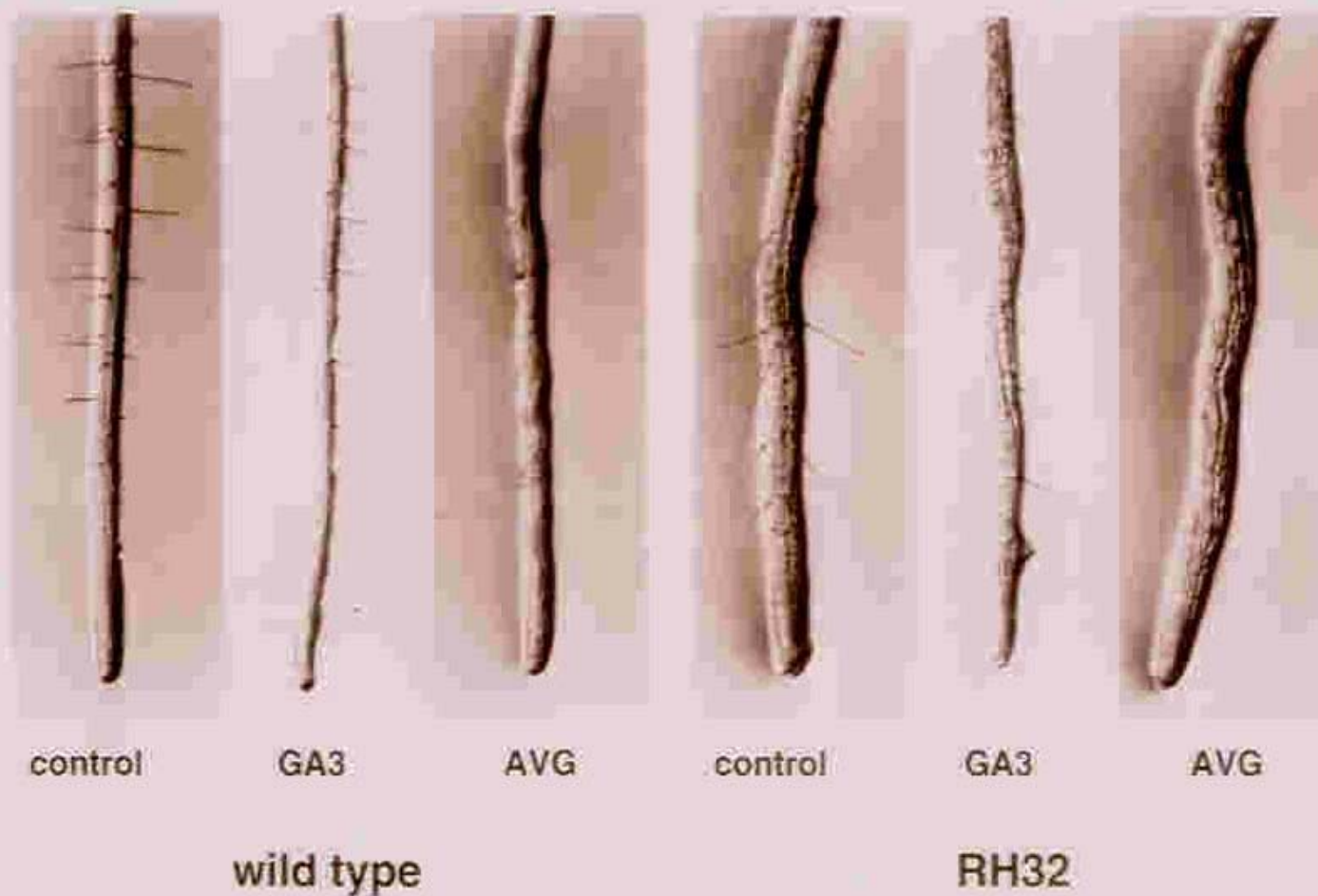


図3 GA3とエチレン生合成の阻害剤であるAVGを加えた培地で生育させた野生型とRH32突然変異体の根。

GA3 (ジベレリン, 100 μ M) やエチレン生合成の阻害剤であるAVG (アミノエトキシピニルグリシン .5 μ M) を加えてもRH32突然変異体の根は肥大したままである。



wild type



RH32

図4 ノマルスキ－顕微鏡で観察した野生型と RH32 突然変異体の根

RH32 突然変異体は根毛の着生位置が野生型にくらべて下方にずれている。

wild type

RH32



hypocotyl



stem



seed



図5. RH32 突然変異体と野生型の各器官の走査型電子顕微鏡写真

胚軸 (hypocotyl) や茎 (stem) においても、表皮細胞は膨張していた。また野生型の種子 (seed) が三角形であるのに対して、RH32 突然変異体の種子は円形になっていた。

wild type



RH32



sepal



silique



sepal



silique



図6 RH32 突然変異体と野生型の花序

RH32 突然変異体の花も野生型に比較すると伸長が抑えられている。走査型電子顕微鏡で観察すると、がくや莢などの各器官の細胞が縦に短く横に膨張している

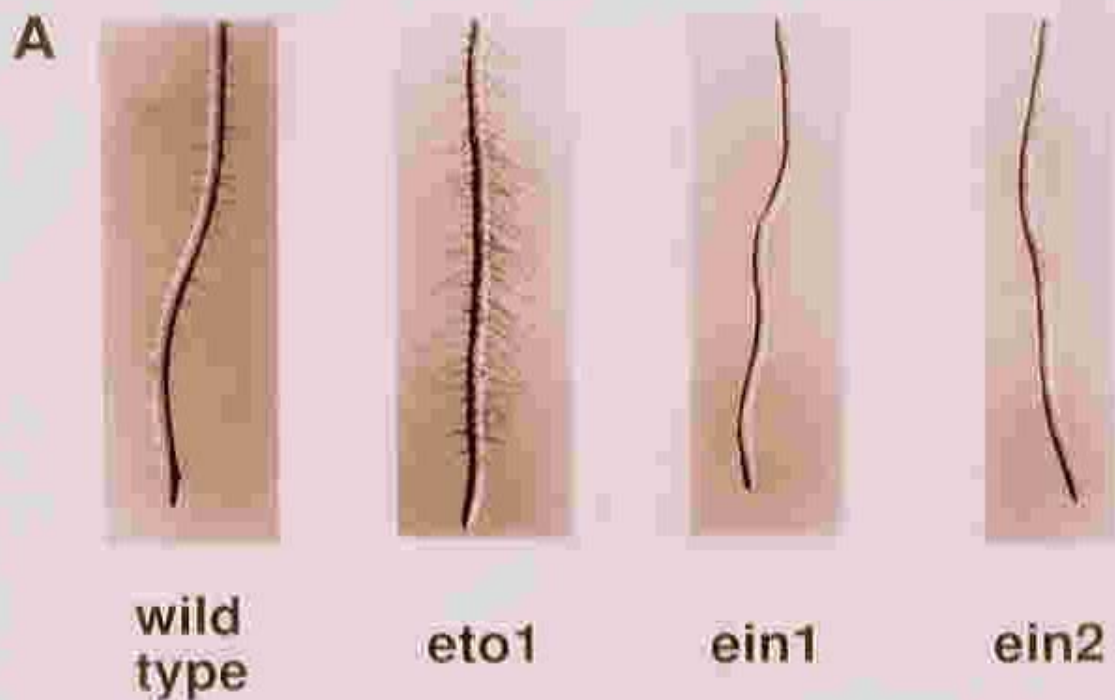


図7 (A) 植物体内のエチレン量が過剰になった *eto1-1* 突然変異体は根毛の数が多くなると同時に長くなっている。これに対して、エチレンに反応しない突然変異体である *ein1*, *ein2* 突然変異体は根毛が短くなっている。(B) RH32 突然変異体とエチレン反応突然変異体との二重突然変異体

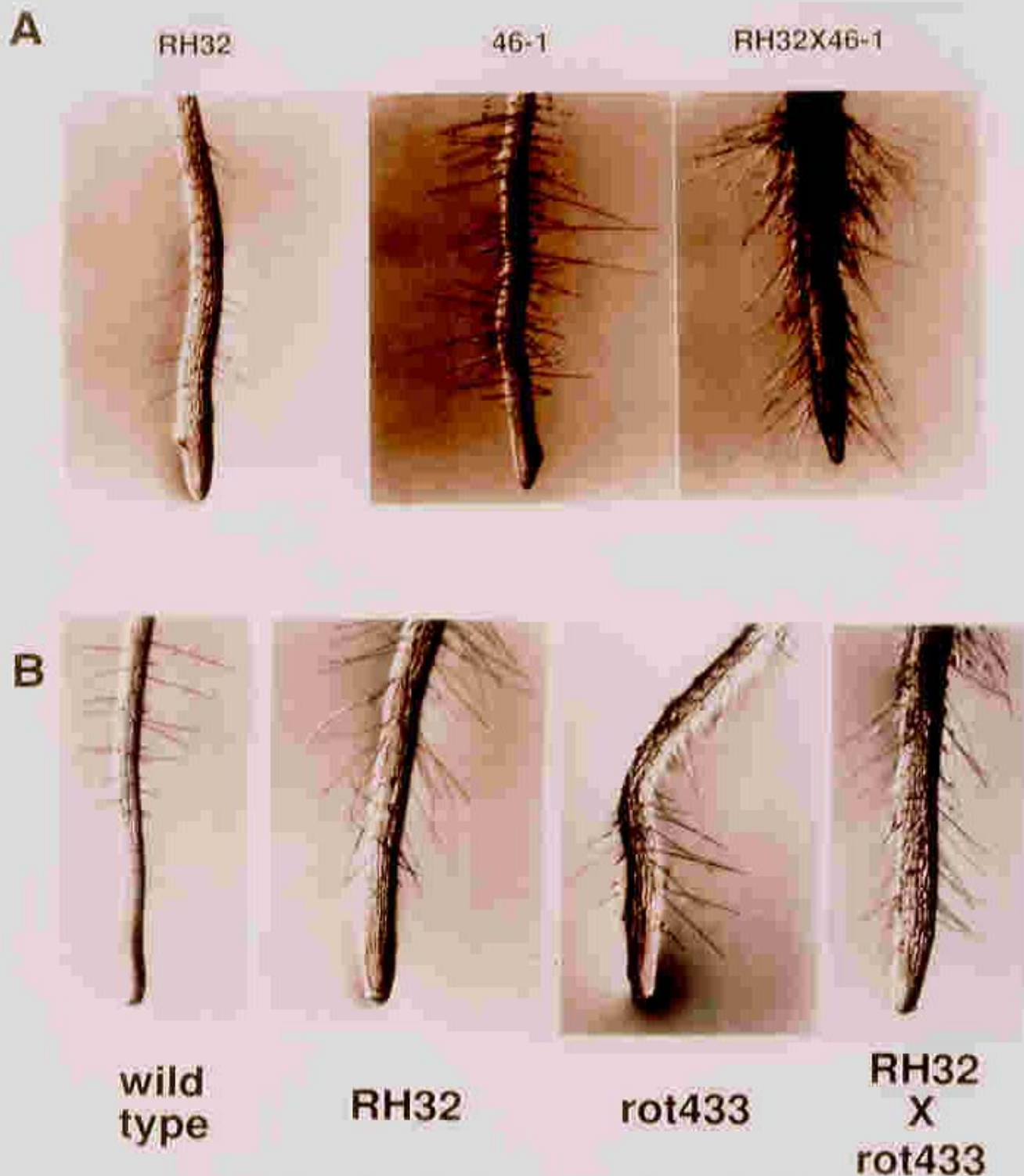


図8 RH32 突然変異体とその他の根が太くなった突然変異体との二重突然変異体

(A) RH32 突然変異体と 46-1 突然変異体の二重突然変異体

(B) RH32 突然変異体と rot433 突然変異体の二重突然変異体

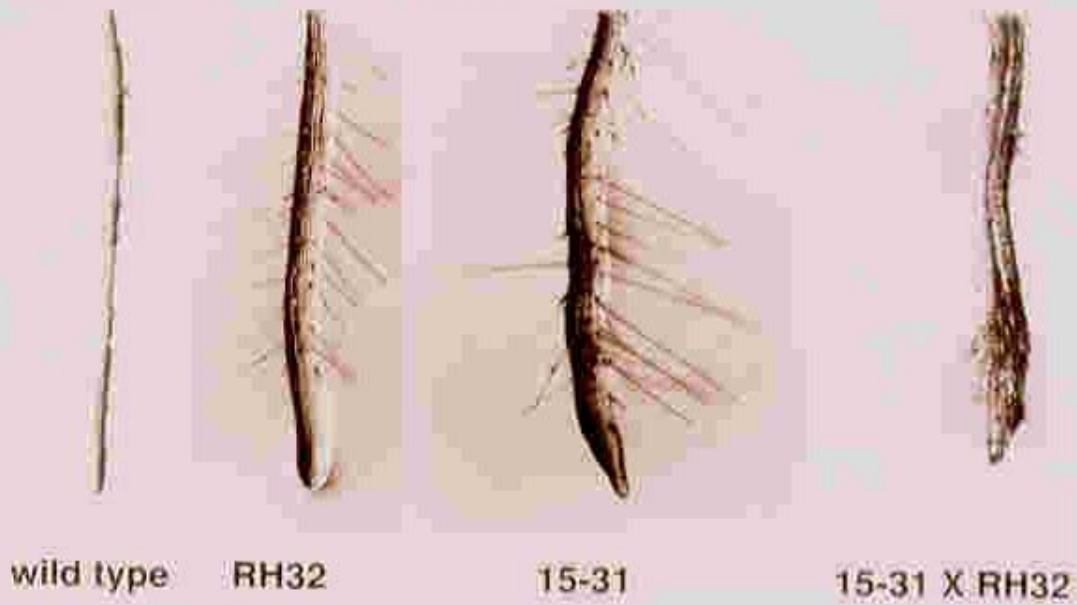
C**D**

図8 (前ページの続き) RH32 突然変異体とその他の根が太くなった突然変異体との二重突然変異体

(C) RH32 突然変異体と 15-31 突然変異体の三重突然変異体

(D) RH32 突然変異体と *det2-1* 突然変異体の二重突然変異体

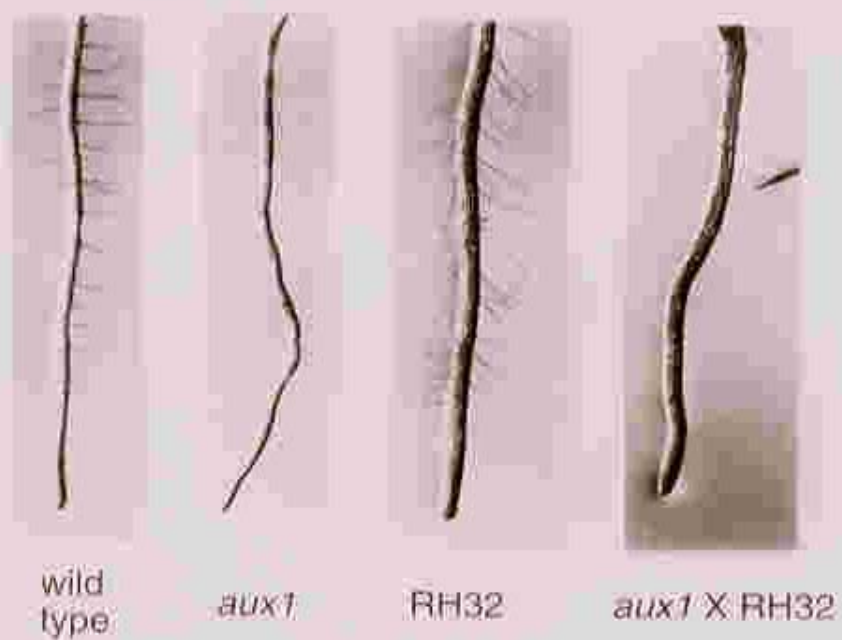
A**B**

図9 オーキシン耐性の突然変異体と RH32 突然変異体の二重突然変異体
 (A) RH32 突然変異体と *aux1-33* 突然変異体の二重突然変異体
 (B) RH32 突然変異体と *aux2-1* 突然変異体の二重突然変異体

掛け合わせの種類 (♀X♂)		調べた植物の総数	表現型	
			野生型	突然変異体
RH32 X wild type	F1	6	6	0
	F2	699	545 (78%)	154 (22%)
46-1 X wild type	F1	7	7	0
	F2	474	359 (76%)	115 (24%)
15-31X wild type	F1	8	8	0
	F2	65	49 (75%)	16 (25%)
rot433X wild type	F1	7	7	0
	F2	158	132 (84%)	26 (16%)

表1 RH32 突然変異体と他の根が太い突然変異体の遺伝学的解析

mutant	marker	map position	RFLP			recombination value
			total number	WS type	Landsberg type	
RH32	ADH	I, 113.7	286	282	4	1.4%
	nga111	I, 106.4	64	61	3	4.7%
46-1	PVV4	I, 25.2	44	42	2*	4.5%
	nga59	I, 16.3	44	42	2*	4.5%

*recombination observed at the same plants

表2 CAPS 及び SSLP マーカーを用いた RH32 遺伝子と 46-1 遺伝子のマッピング

II. 考察

1) 根毛の位置

Masucci と Schiefelbein (1994) は根毛の位置について詳細な観察をおこなった。その結果は以下の通りである。まず、内在性のエチレン量が過剰になっている突然変異体である *eto1-1* 突然変異体では根毛の位置が野生型に比べて上になっていた。野生型の植物を ACC の入った培地で育てても同様のことが観察される。一方、エチレンに反応しない *etr1* 突然変異体では根毛の位置が野生型に比べて下になっていた。

RH32 突然変異体では、根毛が長くなったり、根の細胞の伸長が抑えられるという性質は *eto1-1* 突然変異体に類似していた。しかし、表皮細胞上での根毛の位置は、*etr1* 突然変異体のように野生型にくらべて根毛の位置がさらに下になっている (図4)。

野生型のシロイヌナズナの根が寒天面から空中にでたときは根毛が長くなり、斜め前方に向かって伸長する。RH32 突然変異体の根毛の形態は野生型の根が空中にでたときの形態と類似している (Okada と Shimura, 1994)。

2) 側根と不定根

RH32 突然変異体は側根が殆どでない。しかし、主根の先端をカミソリの刃で切り取ると、側根の形成が促進され観察することができる。側根も主根と同様に太くなっていた。

また胚軸だけを切り取って、培地に移すと胚軸から不定根が突出してくる。RH32 突然変異体は不定根も太くなっていた。

RH32 突然変異体は主根が太いだけでなく、二次根の原基も野生型に比べて太くなっているようである。

3) 皮層の数の増加

RH32 突然変異体では皮層の数が8個から10個に増加している。

Nicotiana plumbaginifolia の *hyp2* 突然変異体は、通常根で2層である皮層が3層になっている (Traas ら 1995b)。*hyp2* 突然変異体では始原細胞から内皮と皮層が分化した

後で、もう一度内皮が分裂して3層目の皮層が生まれる。*hyp2*突然変異をジベレリン(GA3)を加えた培地で生育させると皮層の数は野生型の数に戻る。逆に野生型の植物をジベレリン合成の阻害剤である *paclobutrazol* を加えた培地で生育させると、皮層が3層にまで増加した。従って、*hyp2*突然変異体の皮層の数の増加はジベレリンに依存したものであるといえる。

シロイヌナズナでは、ニューヨーク大学の Benfey 博士のグループによって特定の細胞層がなくなった突然変異体の解析がなされている (Benfey ら, 1993 ; Scheres ら, 1995)。 *short-root* (*shr*) 突然変異体は、内皮が欠失している。その一方、 *scarecrow* (*scr*)、 *pinocchio* (*pic*) 突然変異体は、皮層が欠失している。

一方、RH32 突然変異体では分化した後の皮層が横分裂をおこない、細胞数を増やしていると考えられる。私が分離した他の根が太くなった突然変異体は皮層の数には変化がなかった。根端が肥大した突然変異体のなかでも、皮層の数が10個に増加するのは今のところRH32 突然変異体にだけである。

4) 根が太い突然変異体の考察

根が太い突然変異体の中で遺伝子がクローニングされているのは、今のところ *SABRE* 遺伝子だけである (Aeshbacher ら, 1995)。 *SABRE* 遺伝子は、既知のタンパク質と特にホモロジーがなかった。

私は RH32 突然変異体以外にも根が太くなった突然変異体として *rot433*, *pom1*, *det2* を単離している。これらの突然変異体と RH32 突然変異体との二重突然変異体ではさらに根が太くなった。これは、根が太くなる、つまり根の細胞が横に肥大するのには、いろいろな遺伝子が関与していて、これらの遺伝子は独立の経路に位置していると考えられる (図10)。

New York University の Benfey 博士のグループは、根が太くなった突然変異体の解析を精力的にすすめている (Benfey ら, 1993 ; Hauser ら, 1995)。彼らは、それらの突然変異体を培地に加えたシヨ糖の濃度に依存して根が肥大していくことから CORE (Conditional Root Expansion) mutant と名付けた。シヨ糖がなくても根が肥大している *sabre*, *pom1* 突然変異体以外に、 *lit*, *cob*, *qui*, *cud*, *pom2* 突然変異体を単離している。この中で *cud* 突然変異体だけが優性の突然変異体である (Hauser ら, 1995)。 *lit*, *cob*, *qui*, *cud*, *pom2* 突然変異体はシヨ糖に対する反応が異常になった突然変異体と考えることもできる。

これら CORE mutant に対して、RH32 突然変異体は細胞伸長においてもっと構成的なものが欠損した突然変異体だと考えることができる。

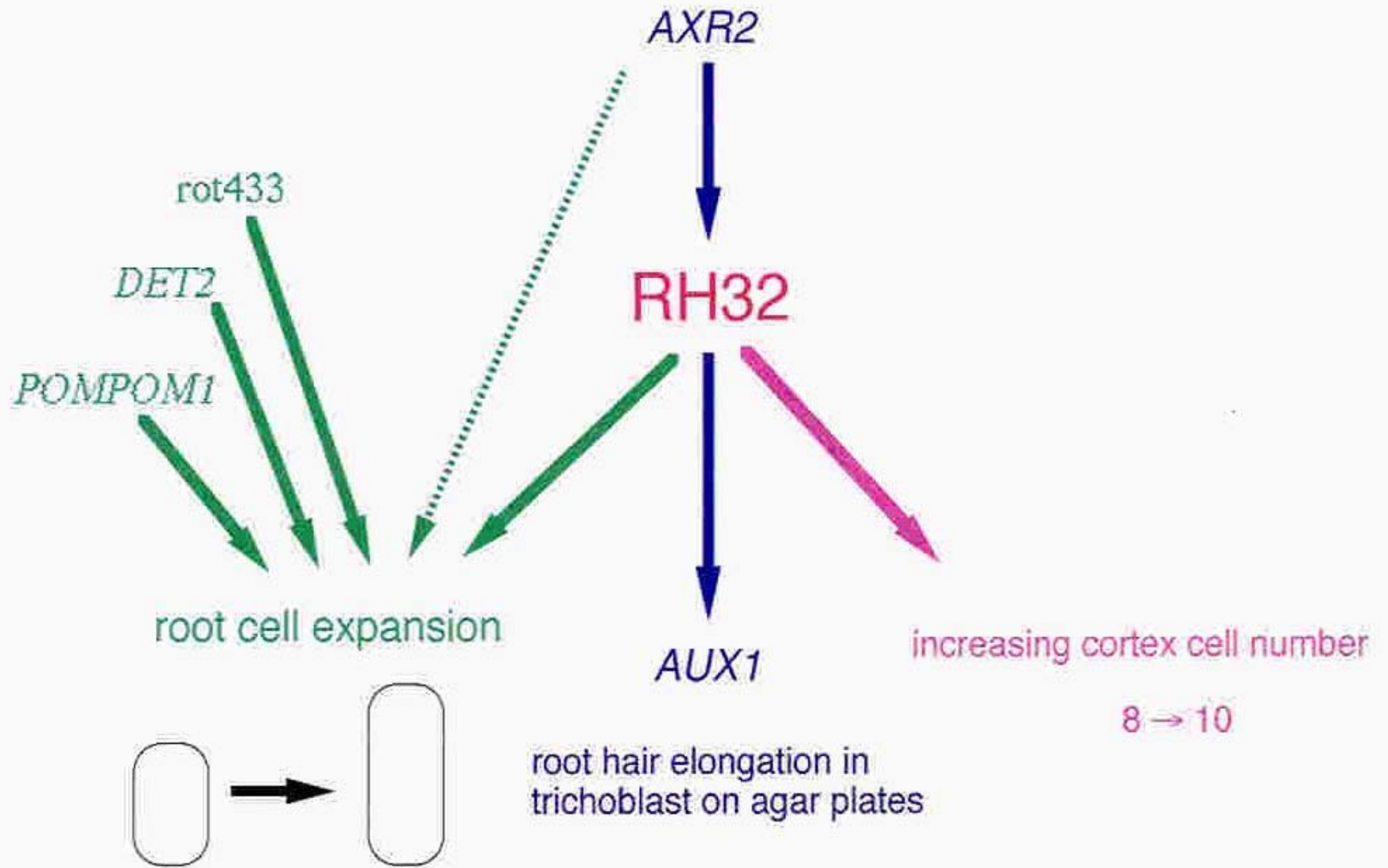


図10 根毛伸長と根の細胞伸長における *RH32* 遺伝子の役割

5) RH32 遺伝子を介した寒天面上での根毛形成についての考察

一般にオーキシン耐性をもった突然変異は寒天面上でほとんど根毛を形成しない。*aux1*, *axr2-1* (Wilson ら, 1990; Masucci と Schiefelbein, 1994) 突然変異体はその中の代表的なものである。両方の突然変異体ともに根の重力屈性が異常になっている。*axr2* は優性の突然変異体で、植物体はわい性で胚軸や花茎の重力屈性も異常になっている (Timpte ら, 1992)。

aux1 X RH32 二重突然変異体は、根は RH32 変異体のように太いままで、全く根毛を形成しなくなった。一方、*axr2* X RH32 突然変異体では、根毛の数が更に多くなり、そのうえ根の太さもさらに増大する。寒天面での根毛伸長に関していえば、*AXR2*→*RH32*→*AUX1* という順序で遺伝子が作用していると考えられる (図 10)。

6) 微小管の並び方

根の細胞の形が変化するという事は、たとば微小管の並び方などが変化しているということが考えられるのではないだろうか？野生型の表皮細胞の微小管は細胞が伸長する方向に対して垂直に並んでいる (Shibaoka, 1994)。

Hauser ら(1995)は、チューブリンの抗体を使って根が太くなった突然変異体の根を抗体染色した。その結果、*qui*, *cud*, *cob* 各突然変異体では、根の表皮細胞の微小管の並び方が野生型に比較するとランダムになっていた。

また、Traas (1995a)らも *ton* (*tonneau*) 突然変異体をチューブリン抗体染色した。その結果、分化した細胞で微小管の並び方がランダムになっていた。それとともに、細胞分裂前期に分裂面を取り囲むように形成される前期微小管束 (preprophase band of microtubules) が形成が *ton* 突然変異体では観察されないことを報告している。

7) 細胞伸長の分子マーカー

既知の遺伝子のなかで微小管の他に細胞の形の形成に関わっていそうな遺伝子はないだろうか？

細胞が分裂を行う時は細胞壁の分解と再構築が必須である。キシログリカンは、植物細胞壁のマトリックス高分子群の主要メンバーの一つであり、セルロース繊維間の架橋をおこなっている。従って、細胞壁の形態を変化させるときは、このキシログリカン鎖の転移

が必要である。シロイヌナズナで、キシログルカン転移酵素 (EXT) の cDNA がクローニングされている (Okazawaら, 1994)。根が太くなった突然変異体では、キシログルカン転移酵素の発現が変化している可能性も考えられる。シロイヌナズナの茎頂で特異的に発現している meri-5 タンパク質はそのアミノ酸配列の一部が EXT 遺伝子と相同性をもっていた (Medfordら, 1991)。

西洋ワサビの ペルオキシダーの cDNA をタバコで過剰発現させると、茎の細胞がさらに長くなることが観察された (Kawaokaら, 1994)。シロイヌナズナで単離された2つのペルオキシダーゼ遺伝子のうちの *pxrEa* は根で特異的に発現している (Intaprukら, 1993)。この *pxrEa* 遺伝子の発現が RH32 遺伝子の根で低下している可能性も考えられる。エチレン存在下で野生型シロイヌナズナのペルオキシダー活性は上昇するが、エチレンに反応しないと突然変異体である *etr1-1 (ein1)* ではその誘導が観察されなかったという報告もある (Bleeckerら, 1988)。

第 5 部 根の光屈性突然変異体 rpt (root phototropism) 突然変異体の遺伝学的解析

第5部 根の光屈性突然変異体 *rpt* (*root phototropism*) 突然変異体の遺伝学的解析

I. 結果

1) 根の光屈性のなくなった突然変異体の分離

シロイヌナズナ野生型の芽ばえでは、一方向からのみ光が照射される状態で培養すると、根は斜め下方に向かって伸長する。これは、根には負の光屈性と正の重力屈性という二つの性質があるためである(OkadaとShimura, 1992a, 1992b)。正の重力屈性とは、根が重力の方向を感知してその方向に伸びる性質であり、負の光屈性とは、根が光を受けると、光を避けるように光とは逆の方向に伸長する性質のことである。これら2つの刺激応答反応が働くと、シロイヌナズナの根は図1に示すように重力屈性と光屈性の二つの屈性のベクトルの和によって、斜め下方に向かって伸長する。

図1は、野生型と突然変異体の種子を種子をまいた直後、すぐに横から光を照射し、3日間生育させたものである。我々の研究室ではEMSで変異原処理をしたシロイヌナズナのLandsberg株の種子の中から光屈性のなくなった突然変異体として*rpt1*, *rpt2*, *rpt3*を単離し既に報告している(OkadaとShimura 1992a, 1994、図1)。これらの突然変異体では種子を寒天培地にまいた直後から一方向から光を照射すると、根は光に反応せずに重力にだけ反応して真下に向かって伸長する。相補性試験の結果、これら3つの突然変異体は独立の遺伝子座に変異が生じたものであることがわかっている(OkadaとShimura 1992a, 1994)。

私は本論文において2種類の方法を用いて光屈性の観察および測定をおこなった。

A、種子を寒天培地にまいた直後から光を照射する。この方法だと光を照射してから3日目の芽生えを観察するだけである。3日間以内の芽生えの光屈性を観察しようとしても、芽生えが十分に生育していないために屈曲の角度を計測することはできない。

B、種子を寒天培地にまき、発芽を促進させるために24時間白色光を照射する。この段

階では芽生えはほとんど発芽していない。その後、暗所で48時間生育させる。この段階では、シロイヌナズナの芽生えはモヤシのようになっている。最初から暗所下におくと芽生えの発芽効率は著しく減少する。このモヤシになった植物体に対して一方向から光照射をおこなって根と胚軸の光屈性の経時変化を詳細に調べた。比較的短い照射時間での胚軸や根の光屈性を調べるにはこの方法を用いた。以下の記述では特に記載のない限りBの方法で実験をおこなった。

また屈曲の度合いは図2に示すような方法で測定しました。根も胚軸も光に全く反応していない状態を90°とした。芽生えに光を照射すると胚軸は光の方向に向かって屈曲し、90°よりも小さな値に変化していく。根の場合は光とは反対の方向に屈曲して、胚軸の場合と同様に角度の値は小さくなっていく。

図1での実験はAの方法で芽生えの光屈性を観察している。胚軸や根の屈曲する角度をより正確に観察するにはBの方法のほうが適していると考えられる。Bの方法で一方向から48時間光を照射し、胚軸と根の曲がりぐあいを調べた結果をまとめたのが表1である。各値は数十個体の角度を測定し、平均値±標準誤差で表した。

その結果、野生型の根は $46.8^{\circ} \pm 2.7^{\circ}$ 屈曲していた。野生型に比較して、*rpt1*は $84.5^{\circ} \pm 4.2^{\circ}$ 、*rpt2*は $84.3^{\circ} \pm 2.9^{\circ}$ 、*rpt3*は $93.6^{\circ} \pm 2.1^{\circ}$ と各突然変異体の根は光によってほとんど屈曲していなかった。

2) 根と胚軸は青色の光に反応して屈曲する

我々の研究室では突然変異体をスクリーニングする段階では市販の白色蛍光灯を使用し実験をおこなった。一方、シロイヌナズナの胚軸が青色の光によって屈曲することは既に詳細に報告されている(Steinzら, 1985; Konjevicら, 1989; LiscumとBriggs, 1995)。

そこで、私は根について白色、青色、赤色の光での屈曲反応を調べた(光源の種類については材料と方法を参照)。実験はBの方法でおこなった。一方向から36時間、光を照射し、胚軸と根の曲がる角度を調べた。その結果を表2に示す。白色光照射下では、胚軸は $53.2^{\circ} \pm 5.5^{\circ}$ 、根は $10.9^{\circ} \pm 2.5^{\circ}$ 、青色光照射下では、胚軸は $51.1^{\circ} \pm 1.9^{\circ}$ 、根は $14.3^{\circ} \pm 2.8^{\circ}$ の角度でそれぞれ屈曲していた。赤色光照射下では、胚軸は $86.8^{\circ} \pm 2.7^{\circ}$ 、根は $92.6^{\circ} \pm 4.9^{\circ}$ の角度で、ほとんど屈曲していなかった。この実験より、根も胚軸と同様に青色光に反応して屈曲するが、赤色の光には反応しなことがわかった。

hy4 突然変異体の胚軸は青色光照射下では胚軸の伸長が抑制されないので(AhamadとCashmore, 1993)、青色光の受容体がつぶれていると考えられている。しかし、*hy4*突

然変異体の胚軸の光屈性が正常であることは既に報告されている (Liscum と Briggs, 1995)。私は、*hy4* 突然変異体の根の光屈性が正常であるかどうかを調べた。表 1 に示すように、胚軸、根ともに *hy4* 突然変異体の光屈性 (胚軸 $17.6^{\circ} \pm 3.7^{\circ}$ 、根 $52.5^{\circ} \pm 3.3^{\circ}$) は野生型 (胚軸 $13.3^{\circ} \pm 2.8^{\circ}$ 、根 $46.8^{\circ} \pm 2.7^{\circ}$) とほとんど変わらなかった。t 検定の結果も根、胚軸ともに有意な差はなかった。

これらの結果より、根と胚軸は青色光に反応して屈曲するが、青色光照射下で胚軸の伸長を抑制している HY4 遺伝子の関与している系統とは別の系統であることが示唆された。

3) *rpt* 突然変異体の胚軸の光屈性

Liscum と Briggs (1995) によって報告された胚軸の光屈性のなくなった *nph* (nonphototropic hypocotyl) 1 突然変異体は、根の光屈性も異常になっていた。そこで B の方法で野生型と *rpt* 突然変異体の胚軸の光屈性についても調べてみた。その結果、光を照射して 48 時間後では、*rpt1*, *rpt2*, *rpt3* 各突然変異体ともに根の光屈性だけではなく、胚軸の光屈性も野生型 ($13.3^{\circ} \pm 2.8^{\circ}$) に比べて弱くなっていた (表 1)。特に *rpt3* 突然変異体 ($68.6^{\circ} \pm 2.4^{\circ}$) は *rpt1* ($31.8^{\circ} \pm 7.3^{\circ}$), *rpt2* ($33.8^{\circ} \pm 4.1^{\circ}$) 突然変異体に比べてより光屈性を示さなくなっていた〔 () 内の値は、平均値 \pm 標準誤差を表している〕。

また青色光照射下での野生型と各突然変異体の胚軸の光屈性の経時変化を示したのが図 3 である。*rpt1*, *rpt2* 各突然変異体は、光照射 12 時間後と 72 時間後を比べると 21° , 11° とそれぞれ角度の変化があるのに対して、*rpt3* 突然変異体では光照射時間を長くしてみても胚軸の角度の変化はほとんど観察されなかった。*rpt3* 突然変異体は他の 2 つの突然変異体に比較して、胚軸がより光に反応しない突然変異体であることがわかった。

4) HY4 遺伝子の胚軸の光屈性への影響について

HY4 遺伝子は既にクローニングされ青色光の受容体であることが示唆されている (Ahmad と Cashmore, 1993)。しかし、表 1 および 2) の項で述べたように *hy4* 突然変異体の胚軸と根の光屈性は両方ともに野生型と区別できない。同様の結果は Liscum と Briggs ら (1995) によっても観察されている。青色光受容体の一つである HY4 遺伝子は本当に根や胚軸の光屈曲反応には関与していないのであろうか？

HY4 遺伝子だけがつぶれているだけでは、光屈性に関する限り野生型との表現型に違いが観察されなかったため、*rpt* 突然変異体と二重突然変異体にした時に胚軸の光屈性に

影響をおよぼすかどうかを調べた。そこで *rpt1 X hy4* 二重突然変異体を作製し、その光屈性を調べた。表3に示すように、発芽直後からの連続光照射下では、*rpt1 X hy4* の二重突然変異体の胚軸の光屈性は *rpt1* 突然変異体に比較してさらに弱くなっていた。t検定をおこなった結果も $P = 0.008$ で明らかに有意であった。

また図4で示すようにエチオレートした植物に光を照射して胚軸の光屈性の経時変化も調べた。*rpt1* 突然変異体と *rpt1 X hy4* の二重突然変異体の胚軸の光屈性は光照射、4時間後と8時間後の段階では $P < 0.01$ 以下で、12時間後では $P = 0.02$ でt検定の結果それぞれ有意であった。しかし光照射24時間以後の段階では検定の結果ほとんど差がなくなっていた。

5) *rpt1* 突然変異体では側根の光屈性も弱い

植物の根は発芽した後、まず主根が成長する。その後主根上から側根が分化し、地下で根系のネットワークを発達させる。我々の培養条件では、培養後7日目くらいより側根の原基が主根上に出現し、側根の伸長が開始される。私は側根も主根の場合と同じように光に反応して屈曲するかどうかを調べてみた。

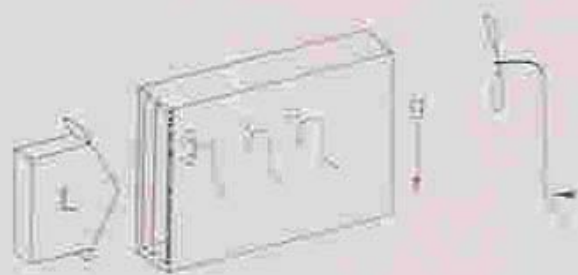
種子を寒天培地に植えて5日間白色光照射下で培養する。そして側根を早く出させるために芽生えの主根の先端をナイフで切り取った。この処理を行うと、主根が伸びられないために通常よりも早く側根の形成が開始される。この状態でさらに5日間、白色光照射下のもとでこれらの芽生えを培養した。

その後2日間一方向から光を照射して観察をおこなうと、野生型の芽ばえでは側根も主根のときと同じように光と反対の方向に屈曲して伸長した。主根が光屈性を示さなくなった *rpt1* 突然変異体では、側根も光に反応して屈曲しなかった(図5)。この結果より、根の側根の光屈性も主根と同じ経路で制御されていることがわかった。

6) 根の光屈性は胚軸によって支配されているのか?

シロイヌナズナの種子を寒天培地に植えて、1週間後に胚軸を切り取る。その後一方向から2日間光を照射した。野生型では光と反対の方向に屈曲したが、*rpt1*, *rpt2* 突然変異体の根は光に反応して屈曲することはなく、そのまま真下に向かって伸長していた(図6)。

この結果より、根が光に反応して曲がる時には光は根端で感知されていると推測される。胚軸から植物ホルモンのような物質が根に伝達されて、胚軸にある光受容体が根の光屈性を支配しているようなことはないようである。

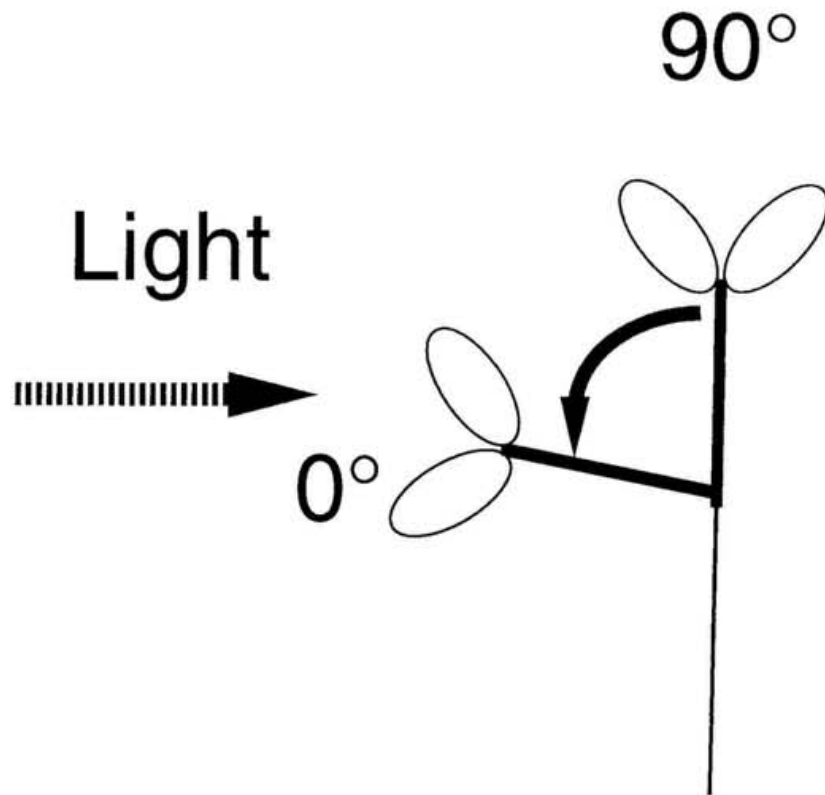


wild type

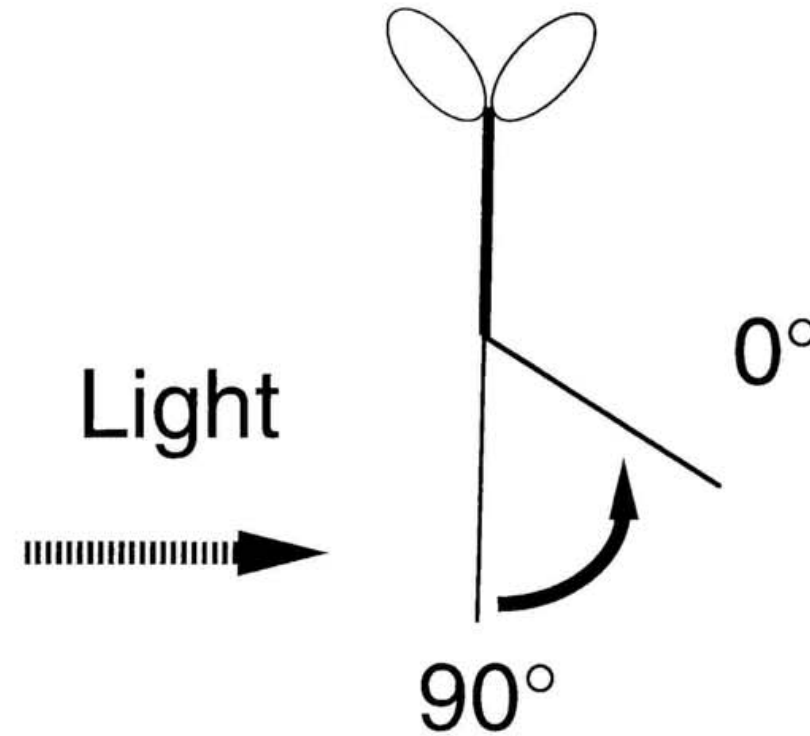
*rpt1**rpt2**rpt3*

図1 光屈性を示さない突然変異体

左図のようにシロイヌナズナ¹の芽生えに一方向からのみ光を照射すると、光屈性と重力屈性によって根は斜め下方に向かって伸長する。しかし、光屈性をしめさなくなった突然変異体である *rpt1*, *rpt2*, *rpt3* 突然変異体は重力だけを感じて真下に伸長する。



胚軸の光屈性の測定



根の光屈性の測定

図2 根と胚軸の光屈性の測定

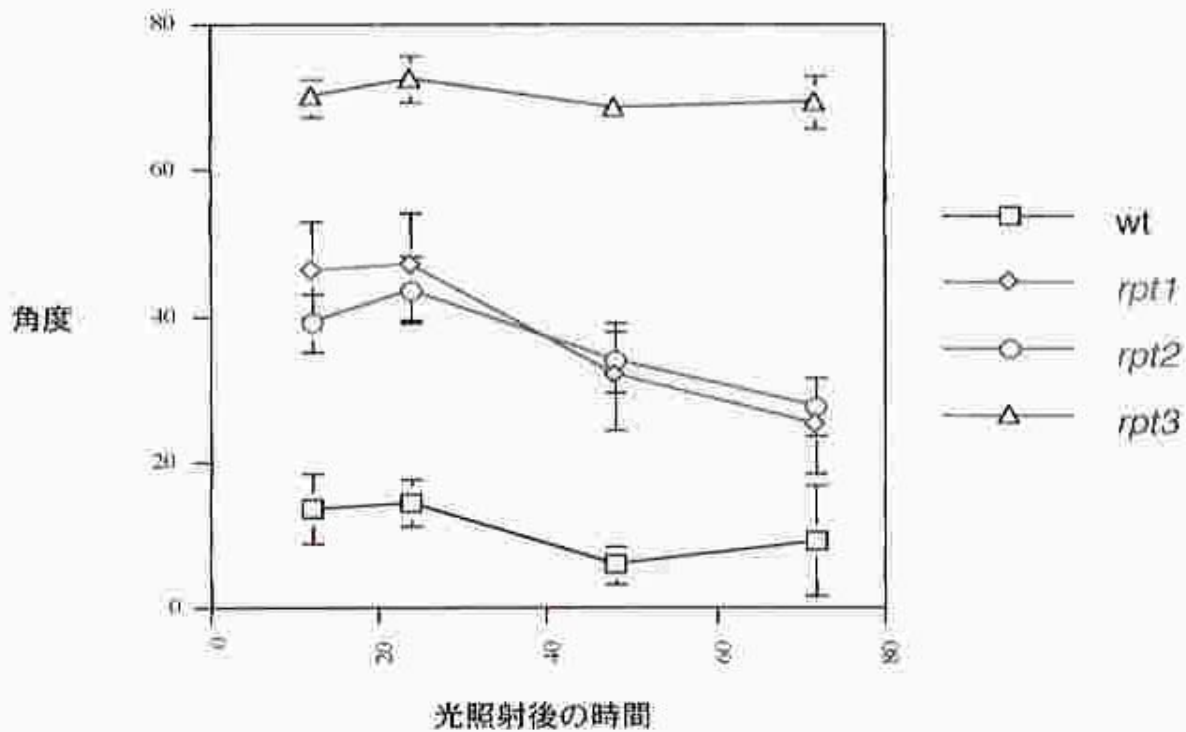


図3 *rpt* 各突然変異体の胚軸の光屈性の経時変化

種子を寒天培地に植えた後、1日間明所で発芽を誘導させる。その後暗所で2日間生育させ、青色光を照射して野生型と各突然変異体の光屈性の経時変化を調べた。

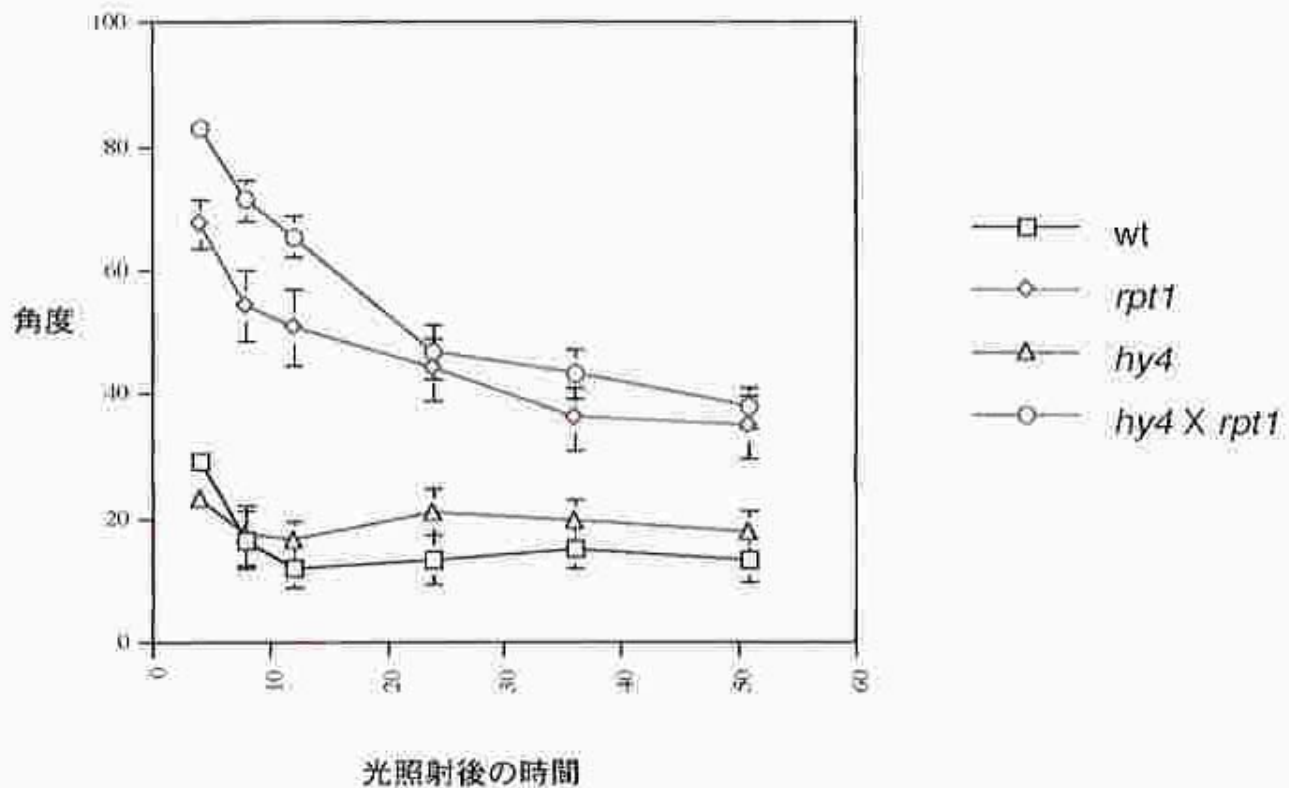
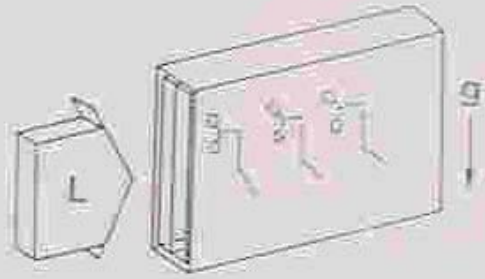


図4 *hy4 X rpt1* 二重突然変異体の胚軸の光屈性の経時変化

図3と同じ手順で実験をおこなった。光照射、4～12時間後では *hy4 X rpt1* 二重突然変異体の胚軸は *rpt1* 突然変異体の胚軸よりもさらに光に対して反応しなくなっている。



28



wild type



rpt1

図5 側根の光屈性

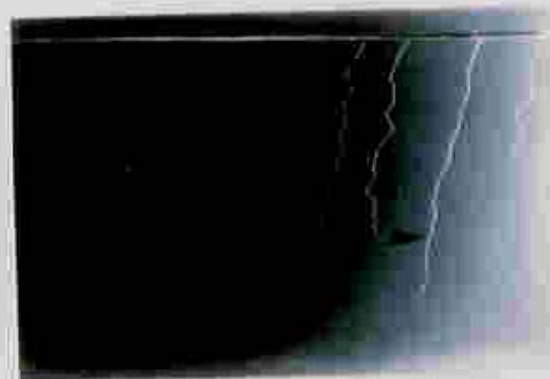
野生型の側根は光に反応して屈曲する。それに対して *rpt1* 突然変異体はその側根も光屈性を示さずに、真下に向かって伸長する。



wild type



rpt1



rpt2

図6 根は胚軸がなくとも屈曲する

シロイヌナズナ¹の根は胚軸を切断した後でも光に反応して屈曲する。矢印より下の部分が胚軸切断後、一方向から光を照射して根が伸長した領域である。

	curvature (°)					
	wt(31)	rpt1(23)	rpt2(24)	rpt3(27)	hy4(25)	hy4 X rpt1(33)
hypocotyl	13.3 ± 2.8	31.8 ± 7.3	33.8 ± 4.1	68.6 ± 2.4	17.6 ± 3.7	37.7 ± 3.5
root	46.8 ± 2.7	84.5 ± 4.2	84.3 ± 2.9	93.6 ± 2.1	52.5 ± 3.3	93.8 ± 1.9

84

表1 *rpt* 各突然変異体の光照射48時間後の光屈性

種子を寒天培地にまいて1日間明所で発芽を促し、2日間暗所生育トさせる。その後青色光を48時間照射し胚軸と根の屈性を観測した。数値の表し方は表1と同じである。

	角度(°)		
	white(13)	blue(37)	red(21)
hypocotyl	53.2 ± 5.5	51.1 ± 1.9	86.8 ± 2.7
root	10.9 ± 2.5	14.3 ± 2.8	92.6 ± 4.9

表2 各波長の光に対してのシロイヌナズナ野生型芽生えの根と胚軸の光屈性値は平均値 ± 標準誤差で表した。観測した植物体の数を光の色の横の () 内に表した。

	curvature (°)				
	wt (26)	rpt1(25)	rpt2(14)	hy4(14)	hy4 X rpt1(18)
hypocotyl	8.2 ± 1.8	21.9 ± 3.9	12.7 ± 3.7	22.6 ± 6.5	42.8 ± 7.1
root	42.3 ± 2.9	94.2 ± 3.1	95.2 ± 4.2	42.1 ± 4.8	98.3 ± 2.5

表3 種子をまいた直後から光を照射した時の胚軸と根の光屈性

種子を寒天培地にまいた直後から光照射をおこない、それぞれの植物体の光屈性を調べた。数値の表し方は表1と同じである。

II. 考察

1) 胚軸と根の光屈性のなくなった突然変異体

rpt1, *rpt2*, *rpt3* 各突然変異体はともに根と胚軸、両方の光屈性が異常になっていた。Liscum と Briggs (1995) によって詳細に解析された *nph1* 突然変異体でも同様の結果が報告されている。彼らは *nph1* 突然変異体の 5 つの allele を分離し、それぞれの根と胚軸の光屈性を調べた。*nph1-1*, *nph1-3*, *nph1-4* は全く胚軸が光屈性を示さなかった。これら 3 つの強い allele に対して、*nph1-2* は弱い allele で野生型と強い allele の中間の表現型を示した。このように *nph1* 突然変異体は allele によって胚軸の光屈性に強弱の差があることが報告されている。

一方、*rpt1*, *rpt2*, *rpt3* 各突然変異体は一つの遺伝子座の突然変異に対して、いくつもの allele をとっているわけではない。ここで述べた、*rpt1*, *rpt2* 突然変異体はたまたま弱い allele がとれただけかもしれない。*rpt3* 突然変異体に関しても強い allele がとれただけかもしれない。従って、*RPT3* 遺伝子が *RPT1*, *RPT2* 遺伝子よりもより強く胚軸の光屈性に影響を及ぼしていると結論づけることはできない。

また、*RPT1* 遺伝子の染色体上での位置をマッピングすると、*NPH1* 遺伝子の近くになったことから、おそらく 2 つの遺伝子は同一のものであろうと考えられる (Liscum と Briggs ら, 1995; 石黒ら、未発表)。

2) 根と胚軸は共通の機構によって屈曲する

rpt1, *rpt2*, *rpt3* そして *nph1* 突然変異体は根と胚軸両方の光屈性が異常になっている。もちろん、まだ単離できていないだけで、根および胚軸のどちらかだけの光屈性が異常になった突然変異体が存在する可能性も否定はできない。Liscum と Briggs (1995) が分離した *nph1* 以外の 3 つの nonphototropic hypocotyl 突然変異体 (*nph2*, *nph3*, *nph4*) の中に根の光屈性は正常なものがあるかもしれない。彼等はこの 3 つの胚軸の光屈性突然変異体の根の光屈性については調べていない。

しかし、今までのところの実験事実からは根と胚軸の光屈性は共通の青色光受容の遺伝的制御機構によって支配されていると考えられる。

シロイヌナズナの芽生えの胚軸を切り取った後でも野生型の根は光に反応して屈曲した。それに対して、*rpt1*, *rpt2* 突然変異体では胚軸を切断すると根は屈曲しなかった。この結

果より、根端に光の刺激を感知する受容体があり、根の光屈性を制御していると考えられる。また *RPT1*, *RPT2* 遺伝子は胚軸と根の両方で発現してそれぞれの光屈性を制御していると考えられる。*RPT1*, *RPT2*, *RPT3* の各遺伝子が光受容体そのものであるか、光を受容して根と胚軸を曲げる制御系の途中の位置しているかどちらかは今のところ明らかではない。

rpt1, *rpt2*, *rpt3* 突然変異体は、同じような表現型を示すことから二重突然変異体を用いた解析で、その遺伝的な上下関係を明らかにするのは困難である。

3) *HY4* 遺伝子と光屈性の関係

HY4 遺伝子はN末端が大腸菌の *photolyase* とC末端がラットの平滑筋のトロポミオシンAとホモロジーをもっていた。この構造の解析により、*HY4* 遺伝子は青色光の受容体であると考えられている。しかし、バキュロウィルスで発現させた*HY4* タンパク質は *photolyase* の活性はもっていなかった (Lin ら, 1995)。

HY4 遺伝子は青色の波長の光を受容して胚軸が伸長することを抑制している。しかし *hy4* 突然変異体の根と胚軸の光屈性は正常である。このことから、胚軸が光の方向を向くこと、青色光照射下で胚軸の伸長を抑えることは遺伝的に全く別の制御機構によって制御されていると今までは考えられていた (Liscum と Briggs, 1995)。

種をまいた直後から一方向から光照射した場合は、*hy4 X rpt1* 二重突然変異体では、*rpt1* 突然変異体にくらべてさらに胚軸の光屈性が弱くなった。一度、暗所で生育させた植物体でも、光照射4～12時間後の *hy4 X rpt1* 二重突然変異体の胚軸の光屈性は *rpt1* 突然変異体のよりもさらに弱くなっていた (図4および表3)。

本研究において初めて *HY4* 遺伝子は *RPT1* 遺伝子と同時につぶれた時だけではあるが胚軸の光屈性に影響をおよぼすことが明らかとなった。おそらく *HY4* 遺伝子は青色光受容の過程で *RPT1* 遺伝子とは独立した経路上に位置しているのであろう (図7)。

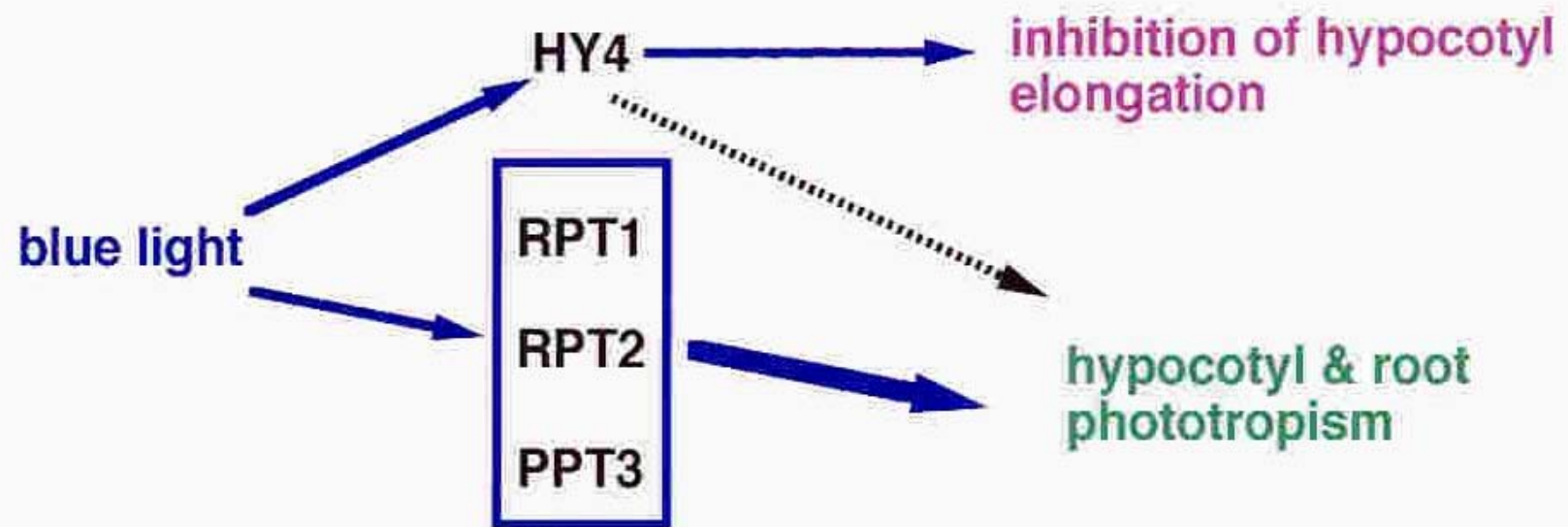


図7 シロイヌナズナの青色光受容の遺伝的制御経路

REFERENCE

- Aeshbacher, R.A., Hauser, M.-T., Feldmann, K.A. & Benfey, P.N. (1995) The SABRE gene is required for normal cell expansion in Arabidopsis *Genes Devel.* 9 330-340
- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristic of a blue-light photoreceptor *Nature* 366 162-166
- Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987) *Current protocol in molecular biology* John Wiley and Sons, New York
- Avila, J., Nieto, C., Canas, L., Benito, M.J. & Paz-Arez, J. (1993) *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and animal myb proto-oncogens *Plant J.* 3, 553-562
- Baskin, T.I., Betzner, A.S., Hoggart, R., Cork, A. & Williamson, R.E. (1992) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana* *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 427-437
- Bell, C.J. & Maher, E.P. (1990) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with abnormal gravitropic responses *Mol. Gen. Genet.*, 220 289-293
- Bell, C.J. & Ecker, J.R. (1994) Assignment of microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis* *Genomics*, 19 137-144
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.-T. & Aeschbacher, R. A. (1993) Root development in *Arabidopsis* : four mutants with dramatically altered root morphogenesis *Development* 119 57-70
- Berleth, T. & Jurgens, G. (1993) The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo *Development* 118 575-587
- Bleecker, A. B., Estele, M. A., Somerville, C. & Kende, H. (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana* *Science*, 241, 1086-1089
- Boerjan, W., Cervera, M.-T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Belline, C., Caboche, M., Van Onckelen, H. Van Montagu, M. & Inze, D. (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction *Plant Cell* 7, 1405-1419
- Castle, L.A., Errampalli, D., Atherton, T.L., Franzmann, L.H., Yoon, E.S. & Meinke, D.W. (1993) Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis* *Mol. Gen. Genet.* 241, 504-514
- Celenza Jr., J.L., Grisafi, P.L. & Fink, G.R. (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* *Genes Devel.* 9, 2131-2142

- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. & Meyerowitz, E.M. (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators Science, 262, 539-544
- Chang, S. S., Park, S. K., Kim, B. C., Kang, B. J., Kim, D. U. & Nam, H. G. (1994) Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta Plant J., 5 551-558
- Chory, J., Nagpal, P. & Peto, C. (1991). Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* Plant Cell 3, 445-459
- Cone, K.C., Cocciolone, S.M., Burr, F.A. & Burr, B. (1993) Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in plant Plant Cell 5 1795-1805
- Deng, X. -W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A., M. Feldmann, K., A. & Quail, P.H. (1992) COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with a zinc-binding motif and a G β homologous domain Cell 71 791-801
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts., K. & Scheres., B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root Development 119 71-84
- Dolan, L., Duckett, M. D., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C. Poethig, S. & Roberts., K. (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis* Development 120 2465-2474
- Dooner, H.K., Robbins, T.P. & Jorgensen, R.A. (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis Annu. Rev. Genet. 25, 173-199
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue Focus 12, 13-15
- Ecker, J.R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants Science 268, 667-675
- Estelle, M. A. & Somerville, C. (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology Mol. Gen. Genet. 206 200-206
- Fahn, A. (1990) In Plant anatomy Pergamon Press.
- Franken, P., Schrell, S., Peterson, P .A., Seadler, H. & Wienand, U. (1994) Molecular analysis of protein domain function encoded by the myb-homologous maize gene C1, Zm1 and Zm38 Plant J. 6 21-30

- Feinbaum, R.L. & Ausbel, F.M. (1988) Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene *Mol. Cell. Biol.* 8 1985-1992
- Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W. & Schiefelbein, J.W. (1994) The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root *Dev. Biol.* 166 740-754
- Goff, S. A., Klein, T.M., Roth, B.A., Fromm, M.E., Cone, K.C., Radicella, J.P. & Chandler, V.L. (1990) Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues *EMBO J.* 9, 2517-2522
- Goff, S. A., Cone, K.C. & Fromm, M.E. (1991) Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1 : comparison of wild type and dominant inhibitor proteins *Genes Devel.* 5 298-309
- Goff, S. A., Cone, K.C. & Chandler, V.L. (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene : evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins *Genes Devel.* 6 864-875
- Green , P.B. & Listead, P. (1990) A procedure for SEM of complex shoot structures applied to the inflorescence of snapdragon *Protoplasma*, 158, 33-38
- Grotewold, E., Athma, P. & Peterson, T. (1991) Alternatively spliced products of the maize P gene encode proteins with homology to the DNA-binding domain of myb-like transcription factors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 4587-4591
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B. & Peterson, T. (1994) The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset *Cell* 76 543-553
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K. & Jacobsen, J.V. (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells : Evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter *Plant Cell*, 7, 1879-1891
- Guzman, P. & Ecker, J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants *Plant Cell*, 2, 513-523
- Hauser, M.-T., Morikami, A. & Benfey, P. N. (1995) Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis* *Development* 121 1237-1252
- Hobbie, L. & Estelle, M. (1995) The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation *Plant J.* 7 211-220

- Hobbie, L., Timpte, C. & Estelle, M. (1995) Molecular genetics of auxin and cytokinin *Plant Mol. Biol.*, 26, 1499-1519
- Hou, Y., von Arnim, A.G. & Deng, X.-W. (1993) A new class of Arabidopsis constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development *Plant Cell*, 5, 329-339
- Howe, K.M., Reakes, C.F.L. & Watson, R.J. (1990) Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myc protein with DNA *EMBO J.* 9, 161-169
- Intapruk, C., Yamamoto, K., Fujiyama, K., Takano, M. & Shinmyo, A. (1993) Cloning of cDNA encoding two peroxidases of Arabidopsis thaliana and their organ-specific expression *J. Ferment. Bioeng.* 75, 166-172
- Jackson, D., Cullanez-Macia, F., Prescott, A.G., Roberts, K. & Martin, C. (1991) Expression patterns of myb genes from Antirrhinum flowers *Plant Cell* 3, 115-125
- Jurgens, G. (1995) Axis formation in plant embryogenesis : cues and clues *Cell* 81 467-470
- Kawaoka, A., Kawamoto, T., Moriki, H., Murakami, A., Murakami, K., Yoshida, K., M., Takano, M. & Shinmyo, A. (1994) Growth-stimulation of tobacco plant introduced the horseradish peroxidase gene pxC1a *J. Ferment. Bioeng.* 78, 49-53
- Keller, I. & Lamb, C.J. (1989) Specific expression of a novel cell wall hydroproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation *Genes Devel.* 3, 1639-1646
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. & Ecker, J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinase *Cell* 72 427-441
- Kieber, J. J. & Ecker, J.R. (1993) Ethylene gas: it's not just for ripening any more! *Trends Genet.*, 9 356-362
- Konieczny, A. & Ausbel, F. M. (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers *Plant J.*, 4 403-410
- Konjevic, R., Steinitz, B. & Poff, K.L. (1989) Dependence of the phototropic response of Arabidopsis thaliana on fluence rate and wavelength *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9876-9880
- Koornneef, M. (1981) The complex syndrome of the ttg mutants *Arabid. Inform. Serv.* 18, 45-51

Koornneef, M. (1990) Mutations affecting the testa color in Arabidopsis Arabid. Inform. Serv. 27 , 1-4

Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Day, M.J., Lincoln, S.E. & Newberg, L. (1987) Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations Genomics, 1, 174-181

Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Lloyd, A.M., Paparozzi, E.T. & Marks, M.D. (1994) Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA genes in Arabidopsis trichome development Plant Cell 6 1065-1076

Laskowski, M. J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C. & Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process Development 121 3303-3310

Leyser, H.M.O., Lincoln, C.A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J. & Estelle, M. (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1 Nature 364 161-164

Li, S.F. & Parish, R.W. (1995) Isolation of two novel myb-like genes from Arabidopsis and studies on the DNA-binding properties of their products Plant J. 8, 963-972

Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A., Jorns, M.S., Dutton, P.L. & Cashmore, A.R. (1995) Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1 Science 269 968-970

Lincoln, C., Britton, J. H. & Estelle, M. (1990) . Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis Plant Cell , 2, 1071-1080

Liscum, E. & Briggs, W . R. (1995) Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli Plant Cell , 7, 473-485

Lister, C. & Dean, C. (1993) Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in Arabidopsis thaliana Plant J. 4, 745-750

Lloyd, A.M., Walbot, V. & Davis, R.W. (1992) Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by regulators R and C1 Science 258 1773-1775

Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L. & Wessler, S.R. (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a similar to transcriptional activators and contains and contains the myc-homology region Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7092-7096

Marocco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Arez, J., Saedler, H., Salamini, F. & Rohde, W. (1989) Multiple genes are transcribed in Hordeum vulgare and Zea mays that carry

the DNA binding domain of the myb oncoproteins *Mol. Gen. Genet.* 216, 183-187

Maher, E. P. & Martindale, J. B. (1980). *Biochem. Genet.* 18 1041-1053

Masucci, J. D. & Schiefelbein, J. W. (1994) The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process *Plant Physiol.* 106 1335-1346

Mayer, U., Torres Ruiz, R.A., Berleth, T., Misera, S. & Jurgens, G. (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo *Nature* 353 402-407

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

Medford, J.I., Elmer, J.S. & Klee, H.J. (1991) Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems *Plant Cell* 3, 359-370

Mirza, J. I., Olsen, G. M., Iversen, T. H. & Maher, E.P. (1984) The growth and gravitropic responses of wild-type and auxin-resistant mutants of *Arabidopsis* *Physiol. Plant.*, 60 516-522

Mirza, J. I (1987) The effects of light and gravity on the horizontal curvature of roots of gravitropic and agravitropic *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Physiol.* 83 118-120

Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P. & Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor *Nature.*, 369, 661-664

Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. & Nishimura, Y. (1992) Solution structure of a DNA-binding unit of Myb : A helix-turn-helix related motif with conserved typtophans forming a hydrophobic core *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 6428-6432

Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. & Nishimura, Y. (1994) Solution structure of specific DNA complex of myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices *Cell* 79, 639-648

Okada, K. & Shimura, Y. (1990). Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus *Science*, 250, 274-276.

Okada, K. & Shimura, Y. (1992a). Mutational analysis of root gravitropism and phototropism of *Arabidopsis thaliana* seedlings *Aust. J. Plant Physiol.* , 19, 439-448.

Okada, K. & Shimura, Y. (1992b). Aspects of recent developments in mutational studies

Okada, K. & Shimura, Y. (1994) Modulation of root growth by physical stimuli In Arabidopsis (ed. Meyerowitz, E.M. & Somerville, C.R.) , pp. 665-684 Cold Spring Harbor Lab. Press.

Okazawa, K., Sato, Y., Nakagawa, T., Asada, K., Kato, I., Tomita, E. & Nishitani, K. (1993) Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls J. Biol. Chem. 268, 25364-25368

Oppnheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J. & Marks, M.D. (1991) A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules Cell 67 483-493

Patton, D.A., Franzmann, L.H. & Meinke, D.W. (1991) Mapping genes essential for embryo development in Arabidopsis thaliana Mol. Gen. Genet. 227, 337-347

Paz-Arez, J., Ghosal, D., Wieland, U., Peterson, P. A. & Seadler, H. (1987) The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators EMBO J. 6 3353-3358

Paz-Arez, J., Ghosal, D. & Seadler, H. (1990) Molecular analysis of the C1-I allele from Zea mays : a dominant mutant of the regulatory C1 locus EMBO J. 9 315-321

Pickett, F. B., Wilson, A. K. & Estelle, M. (1990) The aux1 mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance Plant Physiol., 94, 1462-1466

Reed, J., Nagpal, P., Poole, D., Furuya, M. & Chory, J. (1993) Mutations in the gene for the red far-red light receptor phytochrome-B affect cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development Plant cell 5 147-157

Rerie, W.G., Feldmann, K.A. & Marks, D.M. (1994) The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in Arabidopsis Genes & Development 8 1388-1399

Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. & Weber-Rolfs, I. (1992) PCR: Clinical diagnostics and Research Springer-Verlag

Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M. & Ecker, J.R. (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana : five novel mutant loci integrated into a stress response pathway Genetics , 139, 1393-1409

- Roth, B. A., Goff, S.A., Klein, T.M., & Fromm, M.E. (1991) C1- and R-dependent expression of the maize Bz1 gene requires sequences with homology to mammalian myb and myc binding sites *Plant Cell* 3, 317-325
- Sablowski, R.W.N., Moyano, E., Cullianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C. & Bevan, M. (1994) A flower specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes *EMBO J.* 13, 128-137
- Saikumar, P., Murali, R. & Reddy, E.P. (1990) Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8452-8456
- Sakura, H., Kanei-Ishi, C., Ngase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J. & Ishi, S. (1989) Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 5758-5762
- Scheffler, B., Franken, P. Schutt, E., Schrell, A., Seadler, H. & Wienand (1994) Molecular analysis of C1 alleles in *Zea mays* defines regions involved in the expression of this regulatory gene *Mol. Gen. Genet.* 242 40-48
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C. & Weisbeek, P. (1994) Embryonic origin of *Arabidopsis* primary root and root meristem initials *Development* 120 2475-2487
- Scheres, B., Laurenzio, L.D., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., Weisbeek, P. & Benfey, P.N. (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis *Development* 121 53-62
- Schiefelbein, J. & Somerville, C. (1990) Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell* 2 235-243
- Schiefelbein, J.W., Shipley, A. & Rowse, P. (1992) Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana* *Planta* 187, 455-459
- Schiefelbein, J., Galway, M., Masucci, J. & Ford, S. (1993) Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana* *Plant Physiol.* 103 979-985
- Shevell, D.E., Leu, W.-M., Gilmor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A. & Chua, N.-H. (1994) EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7 *Cell* 77 1051-1062
- Shibaoka, H. (1994) Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules : Alternations in the cross-linking between microtubules and plasma membrane *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 527-544

- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T. & Koizumi, M. (1992) Nucleotide sequence of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a myb homologue *Plant Mol. Biol.* 19, 493-499
- Shirley, B.W., Hanley, S. & Goodman, H.M. (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome : analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations *Plant Cell* 4 333-347
- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M. & Goodman, H.M. (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis *Plant J.* 8 659-671
- Simmons, C., Migliaccio, F., Masson, P., Casper, T. & Soll, D. (1995) A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology *Physiol. Plant.* 93 790-798
- Smith, R.D., Wilson, J.E., Walker, J.C. & Baskin, T.I. (1994) Protein-phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis* root *Planta* 194, 516-524
- Smith, D.L. & Fedoroff, N.V. (1995) LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of *Arabidopsis* *Plant Cell* 7, 735-745
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas. L., Diaz, I. & Paz-Ares, J. (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB. Ph3) from *Petunia hybrida* *EMBO J.* 14, 1773-1784
- Steinitz, B., Ren, Z. & Poff, K.L. (1985) Blue and green light-induced phototropism in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa* L. seedlings *Plant Physiol.* 77, 248-251
- Tanimoto, M., Roberts, K. & Dolan, L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana* *Plant J.* 8, 943-948
- Taylor, B. H. & Scheuring, C.H. (1994) A molecular marker for lateral root initiation : The RSI-1 gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia *Mol. Gen. Genet.* 243, 148-157
- Timpte, C., Wilson, A. K. & Estele, M. (1992) Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence *Planta* 188 271-278
- Timpte, C., Wilson, A. K. & Estele, M. (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response *Gene* 138, 1239-1249
- Timpte, C., Lincoln, C., Pickett, F.B., Turner, J. & Estele, M. (1995) The AXR1 and AUX1

genes of Arabidopsis function in separate auxin-response pathways *Plant J.* 8, 561-569

Torres-Ruiz, R. A. & Jurgens, G. (1994) Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development *Development* 120 2967-2978

Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D. & Caboche, M. (1995a) Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase band *Nature* 375 676-677

Traas, J., Laufs, P. Julien, M. & Caboche, M. (1995b) A mutation affecting etiolation and cell elongation in *Nicotina plumbaginifolia* causes abnormal division plane alignment and pattern formation in the root meristem *Plant J.* 7 785-796

Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. & Shinozaki, K. (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene products binds to the conserved MYB recognition sequence *Plant Cell* 5, 1529-1539

van den Berg, C., Wilemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. & Scheres, B. (1995) Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signaling *Nature* 378 62-65

Vera, P., Lamb, C. & Doerner, P.W. (1994) Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein HRGPnt3 gene expression during the initiation of lateral root meristems *Plant J.*, 6, 717-727

Weigel, D. & Meyerowitz, E.M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes *Cell* 78 203-209

Wilson, A.K., Pickett, F.B., Turner, J.C. & Estelle, M. (1990).A dominant mutation in Arabidopsis confers resistance to auxin, etylene and abscidic acid *Mol. Gen. Genet.*, 222, 377-383

Wissenbach, M., Uberlacker, B., Vogt, F., Becker, D., Salamini, F. & Rohde, W. (1993) Myb genes from *Hordeum vulgare* : tissue-specific expression of chimeric myb promoter/gus gens in transgenic tobacco *Plant J.* 4, 411-422

日本語文献

石黒澄衛、岡田清孝 (1994) 根の形成に關与する遺伝子 細胞工学別冊
植物細胞工学シリーズ1 植物の形を決める分子機構 p24-33 秀潤社

岡田清孝、志村令郎 (1991) 遺伝的プログラムによる形の制御
植物細胞工学 3 371-380

岡田清孝、小牧正子、志村令郎(1992). ラボマニュアル 植物遺伝子の機能解析、
岩淵雅樹・志村令郎 編 p125-140, 丸善

岡田清孝 (1994) 胚および根の形成と分化に關する突然変異体 植物細胞工学 6
209-216

高橋知巳、野村照明、石井俊輔 (1994) myb 遺伝子による細胞癌化 実験医学
12、807-812

西谷和彦 (1994) 細胞壁構築に關与する新しい酵素 植物細胞工学 6、130-
136

柴岡弘郎 (1995) 植物の形の制御と微小管 蛋白質核酸酵素 34、33-42

白石英秋、岡田清孝、志村令郎 (1991). アラビドプシスとその変異体 現代化学
増刊20 植物バイオテクノロジーII, p181-187

溝口剛、林田信明、平山隆志、浦尾剛、岩崎俊介、篠崎一雄 (1994) 植物プロテ
インキナーゼの多様な機能 蛋白質核酸酵素 39、2131-2149

謝辞

3年間、常に僕を励ましながらい直接指導をして頂き、また熱心に議論して頂いた京都大学理学部の岡田清孝教授に感謝いたします。遺伝学のおもしろさを教えていただいたことにも感謝しております。博士課程の最初の2年間は指導教官として、最後の1年間は特別研究学生としてお世話になりました。

最後の1年間研究を指導して頂いた基礎生物学研究所の長濱嘉孝教授に心より感謝いたします。

また、研究に関して貴重な助言を頂き実験結果について熱心に議論して頂いた京都大学理学部の志村令郎教授に感謝いたします。

京都大学理学部の石黒澄衛博士には実際の実験上のことから様々なことまで相談にのっていただきました。感謝いたします。

本研究で使った突然変異体のうち、46-1, 15-31 突然変異体は現在は東京大学遺伝子実験施設におられる望月伸悦博士が分離したものです。感謝いたします。

私が3年間大学院博士後期課程の研究をおこなったきた基礎生物学研究所遺伝子発現統御第1部門および京都大学大学院理学部生物科学研究科応答機構学講座の皆様へ感謝致します。特に、伊藤寿朗君、小山時隆君、澤進一郎君、岡本淳君には実験材料を分けて貰ったり様々なことを議論して頂いたりしました。ありがとうございました。また、*caprice* 突然変異体分離したT-DNA タギング・ラインを作製していただいた基礎生物学研究所の技官の河合明子さんに感謝します。

また博士課程の最後の1年間、京都大学では後輩の久保深雪さんと橋達彦君には実験をおこなう上でお世話になりました。ありがとうございました。

また、実験器具を使えるように便宜をはかっていただいたり、僕の議論につき合っていた京都大学理学部の志村研究室の皆様へ感謝いたします。特に、大野睦人博士、井上邦夫博士、星島一幸博士、片岡直行博士には貴重な助言をいただきました。現在 Cold Spring Harbor 研究所におられる渡我部昭哉博士、熊本大学の松尾勲博士にも感謝いたします。

実験をする上で便宜をはかって頂いた堀内嵩教授を始めとする基礎生物学研究所遺伝子統御第2部門の皆様へ感謝します。同部門の小林武彦博士にはよく議論につきあっていただき感謝いたします。

大学院修士課程の時は京都大学人間・環境学研究科の豊島善則教授、椎名隆博士にお世話になりました。

最後に、僕が京都大学4回生の時に研究指導をしていただき、また岡田教授の元で研究がおこなえるように配慮していただいた奈良先端科学技術大学院大学の安田國雄教授に感謝いたします。

参考となる論文

In vitro analysis of light-induced transcription in the wheat psbD/C gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short-term-illuminated seedlings
Takuji Wada, Yuichi Tsunoyama, Takashi Shiina, and Yoshinori Toyoshima
Plant Physiology, 104 , 1259-1267 (1994)

実験講座 遺伝子クローニング法の実際2 遺伝子タギング法
石黒 澄衛、和田 拓治、望月 伸悦、岡田 清孝、志村 令郎
植物細胞工学 Vol.6 No.2 142-147 (1994)