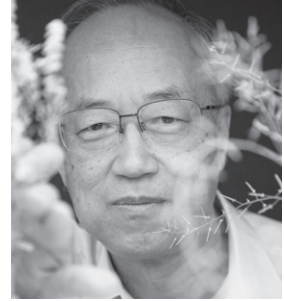


第50回内藤記念科学振興賞受賞研究

テーマ 「シロイヌナズナを用いた
植物分子生物学の確立」Establishment of Plant Molecular Biology
using Arabidopsis as a Model

研究者

龍谷大学農学部 特任教授

おか だ きよ たか
岡田 清孝

はじめに

第50回記念の年に科学振興賞をいただき、誠に嬉しく思っています。受賞題目は「シロイヌナズナを用いた植物分子生物学の確立」ですが、個人の力で1つの研究分野を確立することは到底不可能であり、これまでに共に研究を進めてきた多くの関係者との協力の結果です。種子植物（花をつける植物）における遺伝子制御機構の理解を目的とした研究は、1980年代半ばから「シロイヌナズナ」をモデル植物として集中的・網羅的に解析を進める手法が始まり、飛躍的な発展を遂げました。本稿では、植物分子生物学の発展の経緯とその中で私が関与した内容をまとめて紹介します。

シロイヌナズナの選択と研究インフラの構築

1940年代後半からアメリカで始まった分子生物学は、大腸菌とこの菌に感染するバクテリオファージを共通の研究対象とした少数の研究者グループによって研究が進展しました。研究対象生物を絞って研究を集中することによって研究材料の交換や共同研究が容易になるだけでなく、研究結果の相互検証が可能になるので、研究が確実・迅速に進展することになります。真核生物を対象とした分子生物学研究においてもこの研究手法の重要性は十分に認識されていたのですが、実際に研究が始まるのはかなり遅れました。日本の分子生物学の発展経緯を振り返ると、1972年から6年間続いた分子生物学シンポジウムや1978年に発足した日本分子生物学会の初期の年会の要旨集を見ても、真核生物の研

究はごく少数で、植物を対象とした研究発表はほとんど見当たりません。

植物の多様な形質を支配する遺伝子の構造や発現機構の解明を目指した研究は、一つのモデル植物を選択したことによって国際的に一気に拡大しました。分子生物学解析に適合した種子植物のモデルを選択するに当たっては、(1)植物のサイズが小さく、多数の植物体を扱うために大きな設備を必要としない、(2)栽培が容易で人工的な交配が可能、(3)世代時間が短い、(4)ゲノムサイズが小さい、(5)自家受精の能力を持つこと、などの条件に適合することが重要です。1980年代当時は遺伝子単離のために、まずその遺伝子の染色体上の位置を決めることが必要とされたことから、(6)染色体数が少ないこと、(7)二倍体であること（植物の中には倍数体も多い）、も重要な条件です。1980年の半ばになると、アブラナ科の野草であるシロイヌナズナがこれらの条件を満足することが認識され、この植物を対象とする分子生物学の新たな潮流が始まりました。図1にシロイヌナズナの特徴をまとめます。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の特徴

アブラナ科 シロイヌナズナ属

世代時間が短い。播種後1.5 - 2 週間で開花し、4-5週間で種子が得られる。
自家受精する。
草丈が小さい (20 - 30 cm)。
室内で栽培できる。

ゲノムサイズが小さい。
125 x 10⁶ 塩基対 / ハプロイド
(26,000 genes annotated)

染色体数が少ない (n = 5)。
詳細な遺伝子地図が作られた。
2000年12月に全ゲノム塩基配列が決定された。

多くのエコタイプがある。1000種のエコタイプの塩基配列を比較したデータベースが作成された。

遺伝子導入植物を作る簡便な手法が開発されるなど、実験解析技術が揃っている。

図 1

好都合なことに、シロイヌナズナは、1950年代からドイツで遺伝学の教材として用いられており、化学薬剤や放射線による突然変異誘発の手法が確立していました。さらに、1990年代には植物細胞に遺伝子を導入する技術と組み換え植物体を再生する簡便な技術が開発されたことによって、遺伝子解析研究はますます加速しました(図2)。

植物を対象とする分子生物学は、基礎生命科学の新たな学問分野というだけでなく、農学や薬学、環境科学などへの幅広い展開が期待される重要な分野です。シロイヌナズナを用いた研

究が植物科学全体の発展を牽引するだろうとの期待が、研究開始当初から関係者の間で共有されていました。そのためには、シロイヌナズナ研究に関わる研究インフラを充実させることが重要です(図3)。1990年に日本を含む7カ国のシロイヌナズナ研究者が研究推進委員会(Multi-national Coordinated Arabidopsis Genome Research Steering Committee)を設置し、国際研究集会の開催、ゲノム配列決定プロジェクトなど大型国際共同研究の提案と計画推進、突然変異体や遺伝子クローンの収集・保存・分与を行うリソースセンターの設立、データベースを集

シロイヌナズナ研究の歴史

- 1965 第一期研究の開始
ドイツで突然変異体の単離など基本的な研究がおこなわれるが、国際的な広がりにはなかった。
- 1985-87 第二期研究の開始
アメリカ、ヨーロッパ、日本、オーストラリアなどで分子遺伝学の本格的な研究が始まる。1987年に第3回国際シロイヌナズナ研究集会(ミシガン州立大学)が開かれ、以後研究発表の中心学会となる。
- 1990 遺伝子解析研究が本格的に始まる。
遺伝子導入の簡便な手法が考案され、遺伝子改変シロイヌナズナの作成ができるようになった。
基礎生物学研究所において第一回シロイヌナズナワークショップ、以後毎年開催。
- 1995 シロイヌナズナ的全ゲノムの塩基配列決定プロジェクト開始。日米英独仏の五カ国で。日本は千葉県立かずさDNA研究所が担当。
- 2000 ゲノムの塩基配列が決定される(当初は10年間の予定だったが5年で完了)。
遺伝子機能と遺伝子相互作用ネットワークの網羅的解析(オーム解析)が始まる。
他種植物ゲノムとの比較解析によって多様化や進化的機構の研究が始まる。
- 2010 シロイヌナズナ研究の成果が生態学や農学薬学に応用するなど研究の幅が広がってきた。

図2

シロイヌナズナ研究のインフラとリソース整備

利用者の互助組織・ネットワークを作る -- 情報交換の場を整備する。
国際共同研究の推進委員会(Multinational Coordinated Arabidopsis Genome Research Steering Committee)の設立(1990)。
シロイヌナズナ研究の内容を発表するワークショップを1990年から毎年開催。
国際シンポジウム --- 1987年から2年ごとに、1995年から毎年開催。2010年は横浜で開催。
国内学会シンポジウム --- 植物学・分子生物学・発生学・遺伝学などの学会でほぼ毎年開催。
実験手法を実地に教えるトレーニングコース 1991年から数年ごとに開催。
実験手法を解説するプロトコル集の刊行。
Nazuna メーリングリスト --- 1991年に設置。数百名が参加。
総合データベース (The Arabidopsis Information Resource (TAIR)) --- 2013年よりアメリカNSFが運営。

リソースセンターの設立 -- 植物リソース(種子やDNAクローンなど)を収集保存し配布する。
Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) Ohio State U. 1992年から活動。
Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) 1992年から活動。
仙台Arabidopsis Stock Center (宮城教育大) 1993年から2003年まで、その後 理化学研究所バイオリソースセンターに移管。

実験技術の開発
遺伝子クローニング技術や簡便な遺伝子導入技術が確立され(1993)、多くの研究者がトレーニングコース等で身につけた。

全ゲノム配列解読のプロジェクトが計画され完成した。
1995年に日本(かずさDNA研究所)・アメリカ3グループ・ヨーロッパ2グループによる国際的な共同研究として開始した。当初は10年間の計画だったが5年間で終了し、植物ゲノム配列決定の最初の例として2000年に発表公開された。遺伝子発現の網羅的な解析(オーム解析)が爆発的に発展する契機となった。
マイクロRNAなどの新たな機能分子の発見にもつながった。

植物分子生物学研究の論文を投稿するジャーナルが相次いで発刊された
Plant Molecular Biology (1981)、The Plant Cell (1989)、植物細胞工学 (1989)、The Plant Journal (1991)、Current Opinion in Plant Biology (1991)、Trends in Plant Science (1995)

大型の研究プロジェクト
食料問題・環境問題・エネルギー問題など地球規模の問題解決に研究に向けた幅広い植物研究が計画された。
2000年1月に今後10年間に打つべき課題を選定する会議が開かれ、The 2010 Projectとして発表された。
2010年に From Bench to bountiful Field Project が発表された。
シロイヌナズナ研究の成果を生態学や農学薬学に応用するなど研究の幅が広がっている。
近年は、モデル植物としてのシロイヌナズナに依存しない植物科学研究も増えてきた。
多様な「モデル植物」が用いられるようになった。-- (ゲノム解析技術の発展による)

図3

めたホームページの設置など、シロイヌナズナ研究を支えるインフラ構築と維持のための努力を続けています。私は1996年から2000年までこの委員会の委員を務めました。

1986年から私は、愛知県岡崎市にある岡崎国立共同利用機関（当時）・基礎生物学研究所の志村令郎先生の研究室で、シロイヌナズナを用いて植物の様々な能力や機能に関わる遺伝子を調べる研究を始めました。それと並行して、シロイヌナズナを共通基盤とした国内外の研究コミュニティを大きく育て、我が国の植物科学分野に分子生物学および分子遺伝学の研究手法を根付かせることにも努力してきました。基礎生物学研究所では、当時の岡田節人所長の支援を得て、シロイヌナズナを用いた研究の進展状況を話すワークショップや新たな実験解析技術を共有するためのトレーニングコースを開催しました。1990年から毎年開いたワークショップには、その後の日本の植物科学研究を支えた大学院生や若手研究者が多数参加して活発な情報交換が行われました。

シロイヌナズナの研究リソースに特化したリソースセンターは、1992年にアメリカ・オハイオ大学とイギリス・ノッthinghamに、1993年から宮城教育大（2003年に理化学研究所バイオリソースセンターに移管）に設置されました。シロイヌナズナの全ゲノム配列を決定するプロジェクトは、1995年に日本（かずさDNA研究所）のグループ・アメリカ3グループ・ヨーロッパ2グループによる国際的な共同研究として始まりました。当初は10年間の計画でしたが5年に前倒しして終了し、植物ゲノム配列決定の最初の例として2000年に発表公開され、その後の網羅的なオーム解析の発展の契機となりました。また、2000年1月には各国の研究者が今後10年間に行うべき課題を選定・提案する委員会が開かれ、「The 2010 Project」として発表されました。さらに2010年には後継プロジェクトとして「From Bench to bountiful Field Project」が発表され、実験室内での基礎研究から圃場や野外における農学や環境科学・生態学研究への展開を強力に促しています。また、植物分子生物学の論文増加に伴って、それを掲載する植物分子生物学専門

の学術雑誌や総説誌が国内外で相次いで創刊されました。

植物分子生物学の急速な発展は、これらの様々な研究インフラやリソースの構築と維持があったためと考えられます。私はこれらの主要なプロジェクトの運営に関わる委員や、雑誌のエディターなどとして、植物分子生物学勃興期にその一端に関わることができたことを幸運なことと感謝しています（文献1）。

シロイヌナズナの研究成果

私がシロイヌナズナを用いた植物分子生物学研究を開始した1986年当時を振り返ってみると、植物細胞の増殖や光合成に関わる遺伝子についての解析は進んでいたものの、胚形成や器官形成などの植物発生、代謝や物質輸送などの植物生理、環境応答、病虫害防御など今日の植物分子生物学の主要な対象となるほとんどの分野について、その過程に働く遺伝子は未同定の状態でした。取り組むべき作業は、(1)これらの過程に関わる突然変異体を単離して、変異遺伝子の染色体上の位置を決定し、(2)クロモソームウォーキング法を用いて遺伝子のクローニングを試みるという流れでした。2000年にシロイヌナズナの全ゲノム塩基配列が決定された後は、簡便な遺伝子導入植物の作成技術が考案され、イメージング解析技術が発展したために、研究が飛躍的に加速しました。

私は、(1)花・葉・根などの器官の形態形成と成長パターン、(2)植物の成長を制御する分裂組織の形成と維持、(3)表皮細胞の分化における側方抑制機構、(4)重力や光などの物理的環境に対する応答機構、の4つの領域を対象と定め、それらの形質が異常になった突然変異体を作成・単離し、変異遺伝子をクローニングして解析する作業を開始しました。私のグループが分離解析した突然変異体は、1988年の最初の論文で報告した5種の花の形態異常突然変異体を始めとして、40種を越えます。以下に代表的な変異体の解析から得られた知見を紹介します。

(1) 器官の形態形成と成長パターン

花は植物体の中で最も華やかで複雑な構造を

持つ複合器官であり、その形態を規定する遺伝機構の解明は心惹かれる対象です。シロイヌナズナの花は構成が単純で規則性が明確であることから花形成過程の制御機構の解析に適しており、多くの研究グループから様々な種類の興味深い突然変異体が報告されました。シロイヌナズナの花は外側から順に4枚のがく片、4枚の花弁、6本の雄しべ、2枚の心皮が融合した一本の雌しべが対称性を持って配置されており、花茎と花の中心を通る対称軸とそれに直交する対称軸が想定されます(図4-1)。花器官の位置決定においては、花茎に近い向軸側(adaxial side)と遠い背軸側(abaxial side)、左右の横側(lateral side)を区別する分子機構が働きます。花器官はそれぞれ特徴的な形態と機能を持つように成長します。

私のグループから最初に報告した花形態異常

突然変異体は、がく片を心皮に転換すホメオティック突然変異体F1-40とF1-48(いずれもap2のアリル)、花器官の成長が不十分で、一部の花が針状のフィラメントに退化するF1-54(後にfilamentous flower (fil)と命名)、雌しべが肥大化するF1-82(cvl1とfasの二重突然変異体)、心皮の融合が不完全なF1-89(leunigのアリル)などで(図4-2)、その後引き続いて様々な花形態と機能異常を示す突然変異体を分離して解析しました(文献2)。FIL遺伝子はzinc-fingerとHMGドメインを持つ核局在タンパク質をコードしており、4種類の花器官だけでなく葉においても、背軸側領域で発現し、背軸側領域の形成と分化に必要なマスター遺伝子であることが明確になりました(後述)(文献3、4、5)。PRS(PRESSED FLOWER)遺伝子の突然変異体は、横側の2枚のがく片が欠失し、残った向軸側と

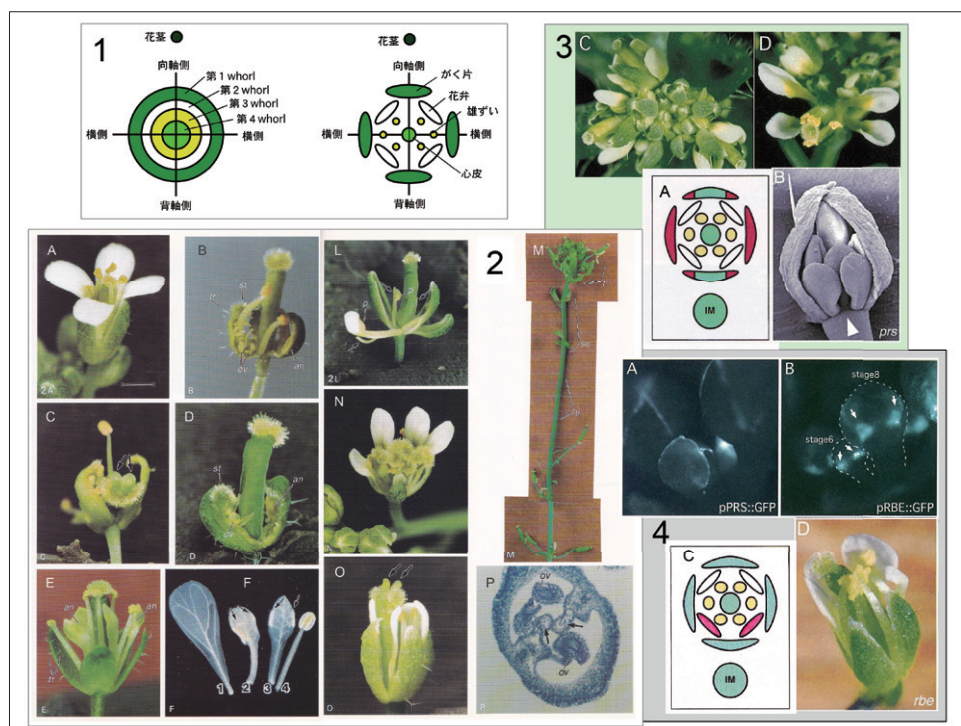


図4 花の構造と突然変異体1

- (1) ナズナ科の花の構造模式図。
- (2) A: 野生型のシロイヌナズナの花、B、C: F1-40変異体の花、D: F1-48変異体の花、E: apetala-2変異体の花、F: (1) 野生型の花弁、(2、3) 花粉嚢を持つap2変異体の花弁、(4) 野生型の雄しべ、L: F1-54変異体の花、M: F1-54変異体の花茎、N: F1-82変異体の花、O: F1-89変異体の花、P: F1-89変異体の雌しべの断面。文献2より転載。
- (3) prs変異体の花 A: 構造の模式図、赤色部分が欠失する。B: つぼみのSEM像、矢印は欠失したがく片の位置。C、D: 上から見た花の姿。文献5を改変。
- (4) A: pRPS::GFP、PRS遺伝子がかく片の周縁部で発現することを示す。B: pRBE::GFP、RBE遺伝子が花弁の原基で発現することを示す。C: rbe変異体の花の構造、赤色の花弁を欠失する。D: rbe変異体の花。文献6を改変。

背軸側のがく片は幅が狭く、周縁部の組織が作られません。一部のがく片が欠損しているために、*prs*変異体の花は横から軽く押し潰したかのように広がっています(図4-3)。PRS遺伝子はWUSCHEL-type homeoboxモチーフを持つ転写因子で、花器官と葉の周縁部で発現します(文献5)。また、RBE (RABBIT EAR) 遺伝子は花卉の原基細胞で発現しますが、この遺伝子の欠損変異体*rbe*の花は4枚の花弁のうち向軸側の2枚の花弁が欠失または退化するために、残った2枚の花弁がミッキーマウスの耳のように見えます(図4-4D)。RBE遺伝子はzinc fingerモチーフを持ち、転写因子として働くものと考えられます(文献6)。FIL、PRS、RBEなどは、花の中に見いだされる軸に沿った器官形成に関わる遺伝子として注目されました。軸依存的な発現を規定するプロモーター領域の解析も進ん

でいます。

その他にも、興味深い花形態変異体が得られました。*vaj* (*vajra*) 変異体の花は、すべてのがく片と花弁の幅は狭くなり、つぼみの内部がのぞけます(図5-1)。VAJ遺伝子は翻訳に関わるelongation factor2 familyのメンバーです(文献7)。*stv* (*short valve*) 変異体の花は雌しべの形態異常を示します(図5-2B)が、STV遺伝子は複数の翻訳領域を持つmRNAの翻訳再開の鍵となるリボソームタンパク質RPL24をコードしています。雌しべの形成に関わるETT遺伝子のmRNAはETTタンパク質の翻訳領域の上流にuORFを持つことがわかっており、*stv*変異体ではETTタンパク質の合成量が減少するために雌しべの構造が異常になると考えられています(図5-2C)(文献8、9)。他方、SHD (SHEPHERD) 遺伝子が活性を失っ

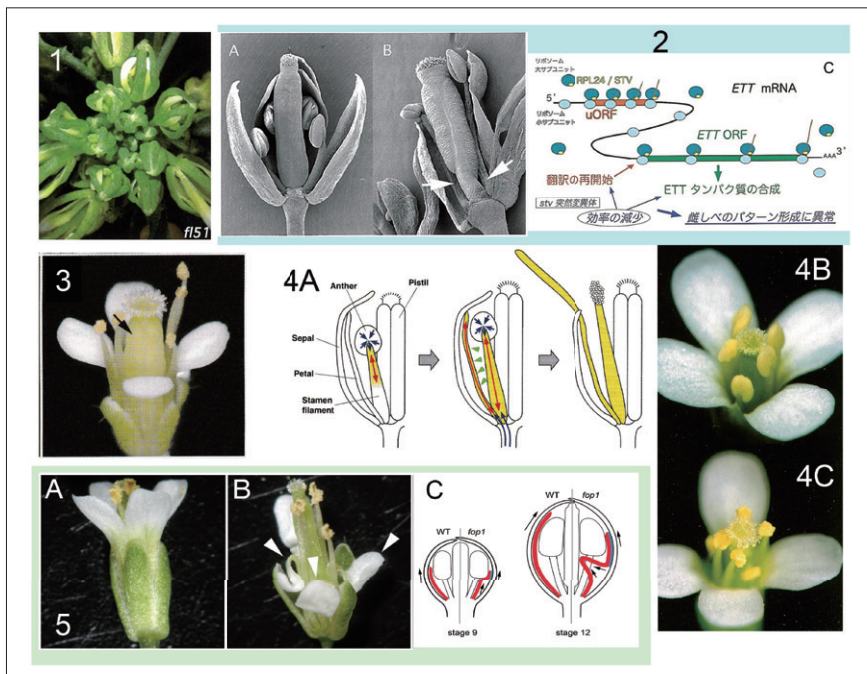


図5 花の構造と突然変異体2

- (1) *vaj*変異体の花。文献7を改変。
- (2) *stv*変異体の花。A: 野生型の雌しべ、B: *stv*変異体の雌しべ。雌しべの子房の領域が短い(矢印)。A、Bいずれも手前のがく片と花弁を除去してある。C: STV遺伝子(RPL24)のETT遺伝子mRNAの翻訳過程における役割。文献8を改変。
- (3) *shd*変異体の花。文献10を改変。
- (4) A: *dad*変異体の開花時の反応。組織の急激な伸長を赤色矢印、水の移動を青色矢印で示す。B: *dad*変異体の花。雄しべ先端の葯は膨らんでいるが開裂せず、内部の花粉を放出しない。C: 野生型の花。雄しべ先端に花粉が見える。文献13を改変。
- (5) A: 野生型の花。花弁はまっすぐに伸びる。B: *fop1*変異体の花。花弁は折れ曲がっている。C: 図の右半は*fop1*変異体の花弁が雄しべとがく片の間で引っかかるために折れ曲がる様子を示す。図の左半は野生型の花。花弁表面に分泌されたワックスが潤滑剤として働く。文献11を改変。

た変異体は、葉や根にも形態異常を示しますが、花では雌しべが太くなります（図5-3）。SHD遺伝子は熱ショックタンパク質の1つであるGRP94をコードしており、雌しべ形成の鍵タンパク質の一つであるCLVタンパク質の三次構造構築に関わっていると思われます（文献10）。VAJ、STV、SHDなどのhousekeeping genesの変異が特定の植物器官の形成異常として現れるのは、遺伝子ファミリーの役割分担を反映しているのでしょう。fop (folded petals) 変異体は、花器官の形やサイズは正常であるにも関わらず、開花時に花弁がうまく開かず、折れ曲がって引っかかる変異体として分離されました。シロイヌナズナなどナズナ科の花では、花弁は遅れて成長し、がく片と雄しべの間隙をすり抜けるように伸長しますが、この変異体ではうまくすり抜けるこ

とができないために折れ曲がります（図5-5B）。変異形質がよく似た二つの変異体の遺伝子のうち、FOP1遺伝子はwax ester synthaseを、FOP2遺伝子はhalf size ABC transporterをコードしており、いずれも花弁表皮細胞から外部にクチンやワックスを合成し分泌する過程に欠損を持つと考えられます（図5-5C）（文献11、12）。植物器官の表面の脂質が、狭い間隙をすり抜けて成長する際の潤滑剤として役立っていることを示しているのでしょう。dad1 (defective in anther dehiscence1) 変異体は、雄しべ先端の葯が開かないために内部の花粉が解放されません（図5-4B）。開花に際して花弁と雄しべの花糸領域に水が移動して急速に伸長し、葯のstomium細胞が細胞死を起こして花粉が解放されますが、これらの反応には植物ホルモン

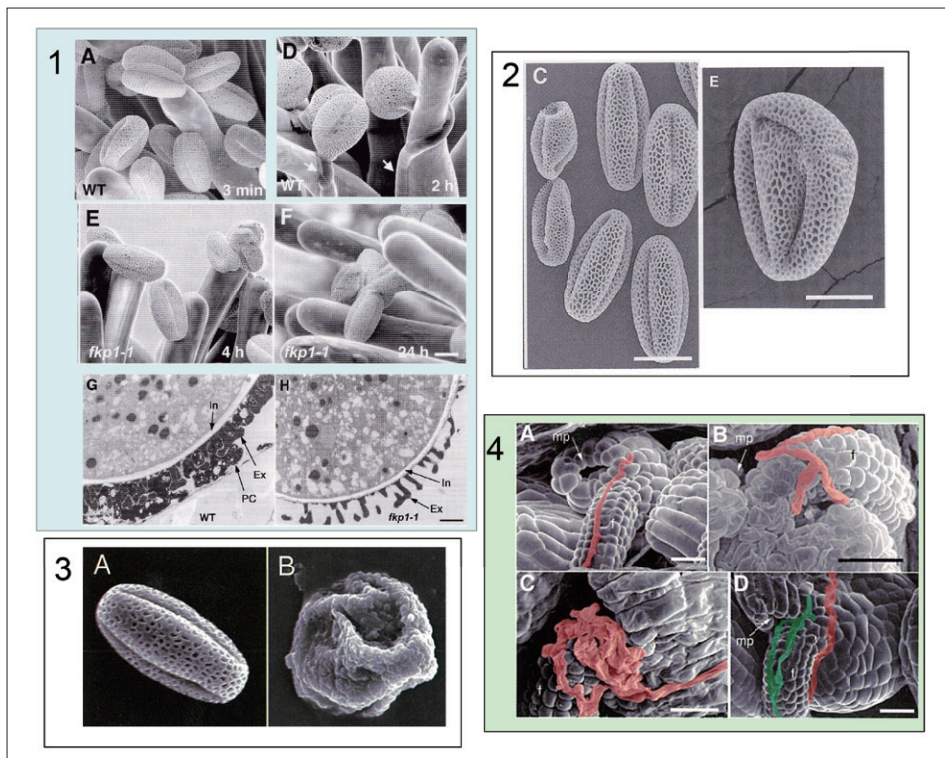


図6 (1) A:柱頭毛に付着させて3分後の野生型花粉。花粉はラグビーボール型のままで吸水は不十分。D: 2時間後の野生型花粉。花粉は吸水して丸くなり、花粉管(矢印)を伸ばしている。E: 柱頭毛に付着させて4時間後のflk変異体の花粉。花粉はラグビーボール型のままで吸水していない。F: 24時間後のflk変異体の花粉。吸水していない。G: 野生型花粉の外層構造。H: flk変異体の花粉の外層構造。脂質が欠損している。文献14を改変。
(2) C、E: カロチン合成酵素のGSLの欠損変異体の花粉。変異体花粉の表層の網目模様は野生型と変わらない。C図の右側の大きな花粉は野生型、左側の2個の小さな花粉が変異体の花粉。論文15を改変。
(3) A: 野生型の花。B: kom変異体の花。
(4) A-D: maa変異体の雌しべに野生型の花をつけた。花粉管(赤または緑)は珠柄(f)に沿って伸長するものの、珠孔(mp)に向かうことができず、迷走する。論文16より転載。

のジャスモン酸の一過的な合成が関わっていることが知られています(図5-4A)。予想通り、DAD1遺伝子はジャスモン酸合成に関わるphospholipase Aをコードしていることがわかりました(文献13)。

受精過程においては雌雄配偶体の間で何段階ものシグナルの受容が必要です。花粉が雌しべ先端の細長く伸びた細胞(柱頭毛)に付着すると、花粉は柱頭毛細胞から水分を供給されて丸く膨れ、雌しべの奥深くにある雌性配偶体に向けて花粉管を伸ばします。flk (flaky pollen) 変異体花粉の形態は正常に見えますが、花粉外層の脂質が欠損しているために柱頭毛に付着しても吸水せず、花粉管を伸ばすこともありません(図6-1E、F)(文献14)。kom (kompeito) 変異体の花粉は名前通りの形で、花粉外層の構造が異常になっているために、雌しべ先端に付着できません(図6-3)。花粉外層の構造が受精

第一段階の認識シグナルとなっていることを示す結果です。雄しべ先端の葯の内部で花粉が形成される過程では、多糖類のカロースが未熟な花粉の周りを充填しています。カロース合成酵素のGSL1と5の二重突然変異体では、花粉外層の構造は正常ですが小型で発芽しない未熟な花粉が形成されることから、カロースは外層構造の形成には関与しないことが明らかになりました(図6-2)(文献15)。雌しべの子房内に侵入した花粉管は、胚珠の開口部(珠孔)から内部に入って受精しますが、maa (magatama) 変異体の雌しべ内部では、花粉管が胚珠に向かうことができず、迷走します(図6-4)。胚珠から花粉管を誘導するシグナルが出されることの間接的な証拠となりました(文献16)。

葉は、茎の先端に維持される茎頂分裂組織(SAM, shoot apical meristem)から継続して作られる葉原基が成長して形づくられます(図7-1)。

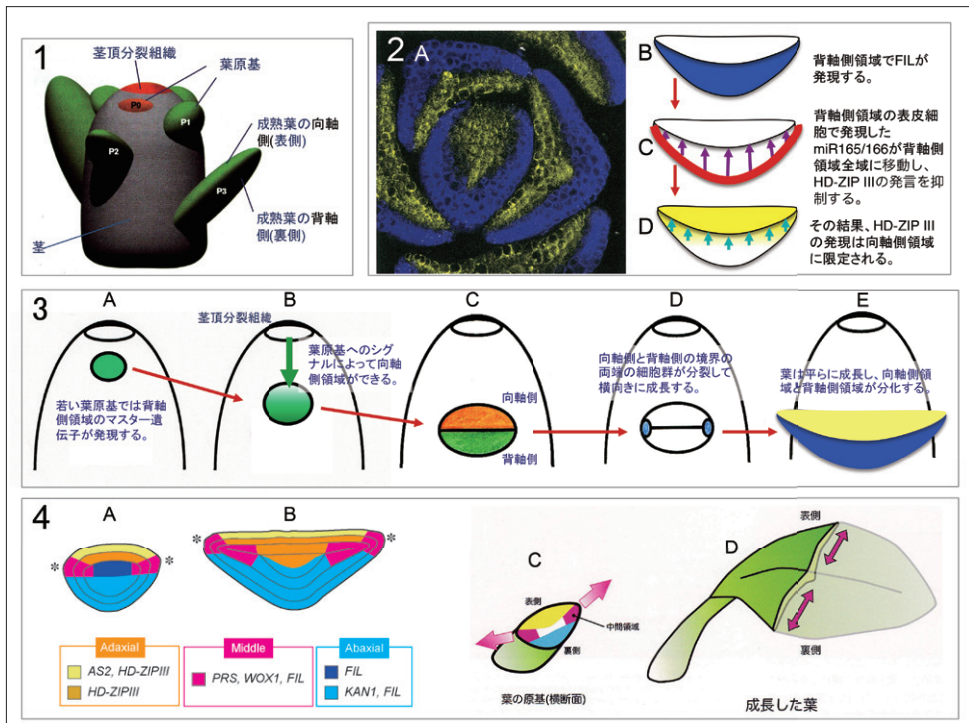


図7 (1) 茎頂分裂組織から葉が形成される様子。
 (2) A: 35Spro::miR-YFPとFILpro::GFPの両者を導入した転換体の葉の横断面。表側(向軸側)領域を黄色(YFP)、裏側(背軸側)領域を青色(GFP)で示す。B-D: 表側領域と裏側領域の境界が決まる機構の模式図。文献19を改変。
 (3) A-E: 茎頂分裂組織から作られた葉原基が成長する過程。
 (4) 葉が横方向に成長して平らな形を作る仕組み。A: P3ステージの若い葉の断面。赤色の中間領域ができる。B: P5ステージの若い葉の断面。中間領域(赤色)の細胞が活発に分裂して葉が広がる。*印の部分が葉縁部になる。C-D: 横方向への成長の模式図。文献21を改変。

若い葉原基は成長の初期段階で表（向軸側）と裏（背軸側）の領域が規定され、ついで葉縁部で特異的な遺伝子群が発現し、横に成長することによって平らな構造体を作ります。その機構はかなり複雑です（図7-3）。私達が見いだしたFIL遺伝子は葉原基の背軸側領域の形成と分化に必要なマスター遺伝子ですが、形成直後の葉原基では背軸側の細胞だけでなく向軸側の細胞でも発現しており、そのままでは葉は裏側組織のみを持つ針状の組織となります。茎頂分裂組織から葉原基に向かって流れるシグナルが向軸側組織の形成に必要であることは、1950年代の古典的な微小手術実験によって示されました。このシグナルの分子実体は未だ明確ではないのですが、私達は突然変異体の解析から succinic semialdehyde が機能しているとの仮説

を提唱しています（文献17、18）。葉原基がこのシグナルを受容すると茎頂分裂組織に近い側で向軸側組織形成のマスター遺伝子、homeoboxドメインを持つHD-ZIPⅢ、が発現します。HD-ZIPⅢ遺伝子の発現はmicroRNA165/166による翻訳抑制を受けており、FIL、miR165/166、HD-ZIPⅢの三者が互いに発現を制御し合うことによって、葉原基内に明確な向軸側と背軸側の境界が形成されると考えています（図7-2）（文献19）。私達はシミュレーションに基づいた境界決定機構の相互抑制モデルを提唱しました（文献20）。向軸側と背軸側の領域が決まると、境界面の端にある細胞群（中間領域の細胞）が活発に分裂して葉は平らに広がるように成長します（図7-4）。この中間領域の細胞が働くには、FIL遺伝子とPRS遺伝子（前述）など数種

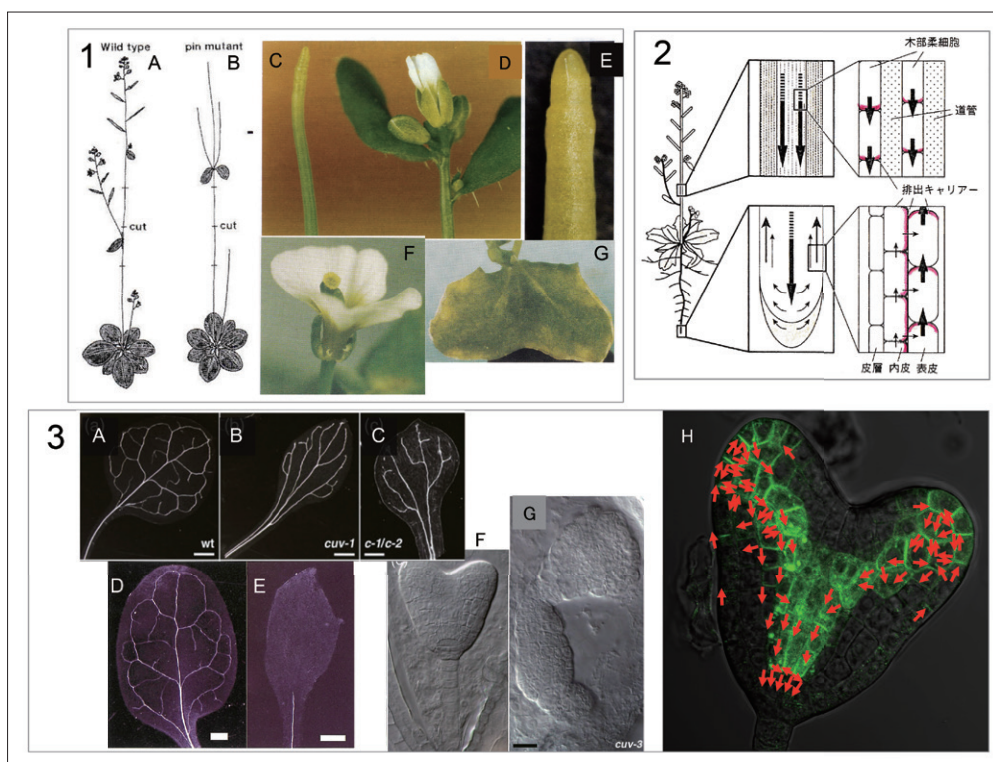


図8 (1) A: 野生型シロイヌナズナの姿。B: pin1変異体の姿。花茎につぼみができず、葉序も異常になる。C、E: pin1変異体の花茎の先端。D: 野生型の花茎の先端。F: pin1変異体で稀に作られる花。がく片と花弁の形や数が異常になり、雄しべは欠失し、雌しべの内部構造も異常になる。G: pin1変異体の形態が異常になった葉。文献22を改変。(2) 根と茎の細胞間をオーキシシンが輸送される仕組み。赤色は細胞内からオーキシシンを排出するPINタンパク質の局在位置を示す。オーキシシンは矢印の向きに植物体内を移動する。(3) A、D: 野生型の葉の維管束パターン。B、C: cuv変異体の葉の維管束パターン。E: nov変異体の葉。維管束はほとんど形成されていない。F: 野生型の心臓型胚。G: cuv変異体の心臓型胚。細胞分裂のパターンが大きく乱れている。H: 野生型の心臓型胚の内部に見られるPINタンパク質の位置を緑（GFP）で示した。赤矢印は隣接する細胞間のオーキシシン輸送の方向を示す。文献24、25を改変。

類の遺伝子が必要です。PRS遺伝子が欠損すると葉は幅が狭くなり、背軸側（裏側）の細胞が向軸側（表側）に侵入して、表と裏の境が不明瞭になります（文献 21）。

(2) 分裂組織の形成と維持

1990年代には、代表的な植物ホルモンであるオーキシンが細胞を介して植物体内を定まった方向に輸送されることが知られていましたが、極性輸送の役割や輸送システムの仕組みについては不明でした。私達の研究グループは1991の論文で茎の先端に花を作ることができないpin1 (pin-formed1) 変異体ではオーキシンの極性輸送能が極端に低下することを見いだしました（図 8-1）（文献22）。この突然変異体は花以外の器官の形態や、重力屈性などの環境応答にも

異常が見られます。続いてドイツのグループがPIN遺伝子をクローニングし、PINタンパク質が細胞内のオーキシンの細胞外排出に関わっていることを確認しました（文献23）。PINタンパク質は膜タンパク質ですが、直方体状の植物細胞の特定の方向の細胞膜にのみ局在します。茎内部の細胞では下方向に、根の表皮細胞では上方向に局在するので、茎では細胞内に取り込まれたオーキシンは下方に、根の表皮組織では上方に輸送されることになります（図 8-2）。オーキシンの役割は広範囲に渡りますが、ほぼすべての現象においてPINタンパク質を介した極性輸送が関与していることがわかりました。葉の維管束パターンがうまく形成されないnov (no vein) 変異体やcuv (clumsy vein) 変異体は、PINタンパク質の局在が異常になっていることがわかりま

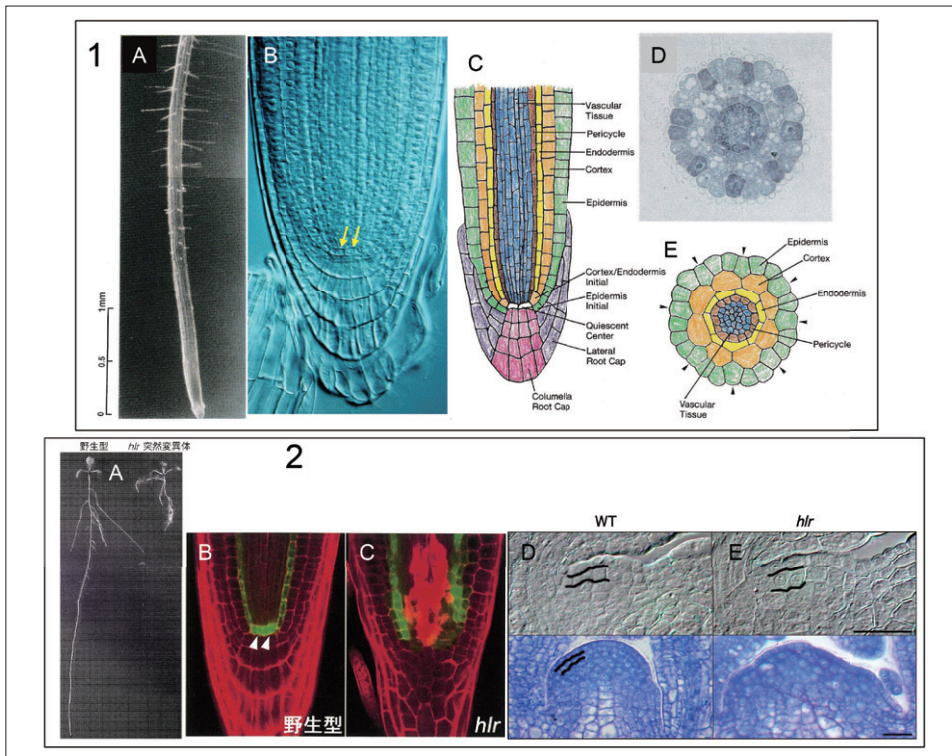


図 9 (1) シロイヌナズナの根の構造。A：シロイヌナズナの根の先端部。B：根端内部の細胞配列。黄色矢印は 4 個の静止中心細胞のうちの 2 個を示す。C：根端部の縦断面の細胞配列。D、E：横断面の細胞配列。C、E 図の緑色は表皮、黄色は内皮、白色は静止中心の細胞を示す。根毛は E 図に矢頭で示す 8 個の表皮細胞から生じる。
(2) A：右は *hhr* 変異体、左は野生型の発芽後 10 日目の芽生え。*hhr* 変異体は根の伸長が遅れる。B：野生型の根端。C：*hhr* 変異体の根端。緑色の細胞は内皮組織の細胞と静止中心細胞（白矢頭）を示す。変異体では根端分裂組織の構造が乱れて、壊死した細胞（中心部の赤色）がある。D：野生型の茎頂分裂組織。E：*hhr* 変異体の茎頂分裂組織。変異体では茎頂の分裂組織の細胞配列も乱れている。文献 26 を改変。

した(図8-3A-E)(文献24、25)。成長途中の心臓型胚では、オーキシンがY字状に輸送されることが必要ですが(図8-3H)、*nov*変異体や*cuv*変異体では胚の発生過程も異常になります(図8-3G)。

植物体の根端にも分裂組織があり、植物は生涯を通して分裂組織の活性を維持します。シロイヌナズナの根は細く細胞数も少ないのですが、植物の根に共通した構造を持っています(図9-1)。根は5層の同心円状の組織を持ち、先端の根端分裂組織が細胞分裂を継続し根が伸びていきます。根端分裂組織の構造を維持し、統制された細胞分裂活性を制御するのは、中心に位置する4個の静止中心細胞です。根が短く成長が悪い*hlr* (halted root) 変異体は、静止中心細胞が保持できず、根端分裂組織が崩壊しますが、同時に茎頂分裂組織も変形して機能が低下します(図9-2)。HLR遺伝子はタンパク質分解に関わる26S proteasomeのサブユニットRPT2をコードしています(文献26、27)。変異形質との関連は明確にはなかったのですが、茎頂と根端の両方の分裂組織に共通した維持機構の存在を示しています。

(3) 表皮細胞の分化における側方抑制機構

根の表面には根毛が密生しており、土中の水分やイオン類、栄養分を吸収します。根毛は根の表皮細胞の一部が細い円筒状に伸びたものですが、すべての表皮細胞から生じるわけではありません。シロイヌナズナの根においては、根毛を生じる細胞(根毛細胞)は一列に並んでおり、8つの列を作っています。根毛細胞の列の間には非根毛細胞の列があります(図10-1)。私達が見いだした*cpc* (caprice) 突然変異体では根毛の数が極端に少なくなることから、CPC遺伝子は根毛の形成に必要であると考えられます(図10-1、3)(文献28)。CPC遺伝子はR3-type mybドメインを持つタンパク質をコードしますが、驚いたことにCPC遺伝子は根毛細胞ではなく、非根毛細胞で発現しており、CPCタンパク質は隣の根毛細胞の核内に移動することがわかりました(図10-2)(文献29、30)。他の研究グループでも根毛形成に関わる多くの遺伝子が

解析され、それらの知見から、homeoboxドメインを持つGL2タンパク質が存在すると根の表皮細胞の根毛形成を抑制すること、非根毛細胞の核内ではWER (WEREWOLF)・TTG (TRANSPARENT TESTA GLABRA)・GL3 (GLABRA3) の三つのタンパク質が転写調節複合体を形成してGL2 (GLABRA2)、CPC、TRY (TRYPTICON, CPCのホモログ) 遺伝子などの転写が誘導されること、CPCとTRYタンパク質は原形質連絡(plasmodesmata)を通して隣接する根毛細胞に移動し、上記の転写複合体の形成を妨害してGL2遺伝子などの転写を抑制すること、が示されました(図10-4A)(文献31-33)。CPC遺伝子を根の全細胞で強制的に発現させるとすべての表皮細胞から根毛が形成されます(図10-3E)。CPCとTRYタンパク質は隣接する表皮細胞に移動して分化方向を変える側方抑制機構のシグナル分子として働いていることが明確になりました。

一方、葉の表皮細胞の一部はendo-reduplicationを繰り返して巨大化し、トライコーム(星状毛)を形成します。トライコームの形成過程においては、根毛形成と類似した遺伝子機構が働いていることがわかりました。GL2遺伝子がトライコーム形成を促進する鍵遺伝子として働き、トライコーム形成細胞内ではGL1 (GLABRA1, WERのホモログ)・TTG・GL3の三つのタンパク質が転写調節複合体を形成してGL2、CPC、TRY遺伝子などの転写を誘導します。CPCとTRYタンパク質は隣接する表皮細胞に移動して上記の転写複合体の形成を妨害するので、GL2遺伝子などの転写が抑制され、その細胞はトライコームを形成することができません(図10-4B)。根と同様な側方抑制機構が作用した結果、トライコームは野原に生える樹木のように葉表面にまばらにかつ均等に分布することになります(図10-5A)。CPCとTRY遺伝子が共に機能を欠損した二重突然変異体では、側方抑制が働かないために、トライコームの束ができます(図10-5C)(文献31)。また、この二重突然変異体の根では根毛が全くできなくなります。トライコームは、葉を食べる昆虫に対する防御装置でもあります。葉が食われると植物ホルモンのジャス

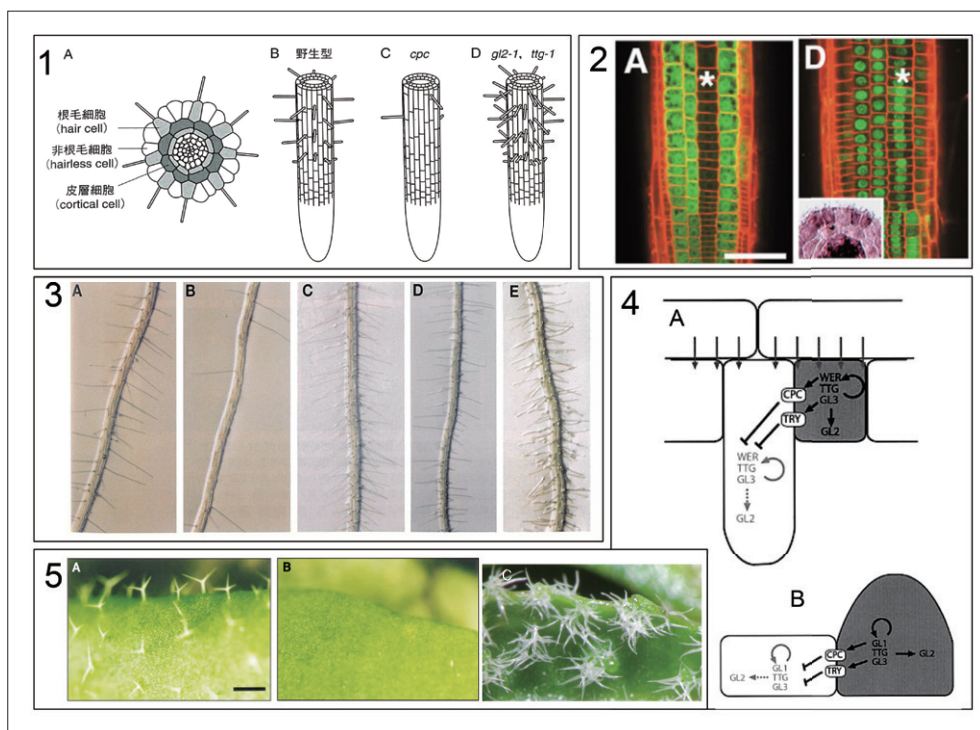


図10 (1) 根毛形成パターンが変化する突然変異体。A: 根の横断面。根毛細胞と非根毛細胞の配置を示す。B: 野生型。C: 根毛が減る *cpc* 変異体。D: すべての表皮細胞が根毛を作る *gl2* 変異体と *ttg* 変異体。
 (2) A: *CPCpro::GFP* を導入した転換体の根。CPC 遺伝子は非根毛細胞で転写され、根毛細胞 (*) では転写されない。D: *CPCpro::CPC::GFP* を導入した転換体の根。非根毛細胞で転写・翻訳された CPC タンパク質が根毛細胞 (*) に移動し核内に留まることがわかる。右下の挿入は CPC 遺伝子の mRNA が非根毛細胞にあることを確認した *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。文献30を改変。
 (3) A: 野生型、B: *cpc* 変異体、C: *ttg* 変異体、D: *gl2* 変異体、E: *35Spro::CPC* 導入株の根。文献28を改変。
 (4) A: 根毛細胞と非根毛細胞における遺伝子発現制御ネットワーク。文献31より転載。B: 葉表皮のトライコーム形成細胞と非形成細胞における遺伝子発現制御ネットワーク。文献31より転載。
 (5) 葉表皮のトライコームの形態。A: 野生型。トライコームはまばらに均等に生じる。B: *35Spro::CPC* を導入して CPC 遺伝子を強制的に発現させるとトライコームはできなくなる。C: *cpc try* 二重変異体では側方抑制機構が働かなくなるので、トライコームの束ができる。文献28を改変。

モン酸合成が促進され、新たに作られる葉ではトライコームが密に形成されます (文献32)。この応答機構に関わる遺伝子 URM9, 23 (UNARMED9, 23) の解析から、植物の細胞分化の柔軟性についても知見を得ることができました (文献32)。

(4) 物理的環境に対する応答

研究開始の時点での私達の研究グループのもう一つの研究テーマは、物理的な環境シグナルによって植物が成長パターンを変化させる際の分子機構の解明でした。シロイヌナズナの芽生えを用いて、これらの反応に異常を示す多様な突然変異体をスクリーニングするために、寒天培地を入れた角型のシャーレを使った手法を開

発しました。寒天培地を垂直に立ててシロイヌナズナの芽生えを発芽させ、成長途中でシャーレの向きを変えたり、黒紙で覆って一方から光を当てるなどの操作を加えることによって、重力屈性や光屈性を検出できます (図11-1)。この方法を用いて多数の屈性異常変異体を分離しました (図11-2) (文献33, 34)。光屈性を示さない *rpt* (root phototropism) 変異体の解析から、青色光が光屈性を誘導すること、RPT1 遺伝子は青色光の受容体であり、RPT2, 3は光シグナルの細胞内伝達機構の主要因子であることがわかりました (文献35-39)。また、寒天培地の一部を取り除いて根が培地から離れた状態にすると、根毛が斜め前向きに長く伸びます (図11-3)。これは根の先端が固形物に接触せず、水分の供

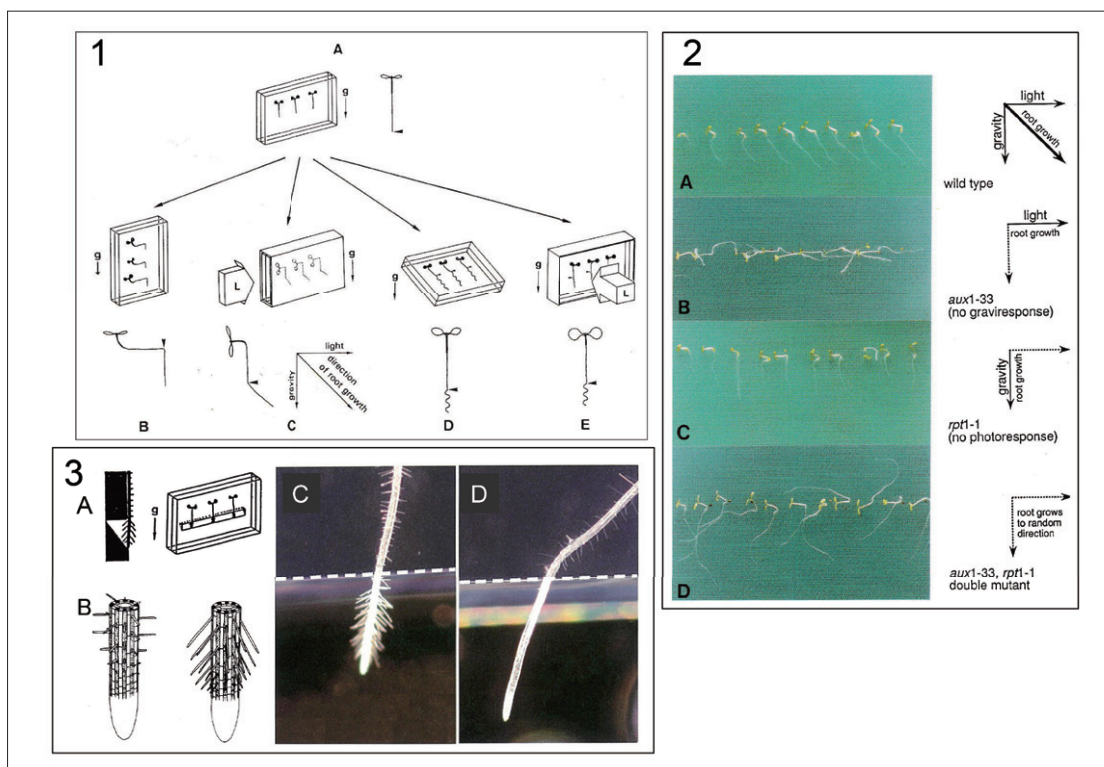


図11 (1) 寒天培地を用いた刺激応答反応に異常を示すシロイヌナズナ突然変異体のアッセイ系。重力屈性 (B)、重力と光の屈性 (C)、重力屈性と接触応答 (D)、光屈性と接触応答 (E) を検定することができる。文献33より転載。
 (2) 1Cのアッセイ系での各種変異体の反応。白色光を左サイドから照射して24時間後の様子を示す。A: 野生型、B: *aux1* 重力屈性変異体、C: *rpt1* 光屈性変異体、D: *aux1-rpt1* 二重変異体。野生型の根は重力と光の影響を受けて斜め右方向に伸びる。*aux*変異体では光屈性は正常、*rpt*変異体では重力屈性は正常なので、それぞれ右向き、下向きに伸びる。二重変異体の根はランダムな方向に伸びる。文献34を改変。
 (3) A: 寒天培地の一部を除去したアッセイ系を示す。B: 野生型の反応の模式図。寒天培地上では根毛は短く表皮細胞から直角に伸びるが、寒天培地から離れると根毛は長く先端に向かって斜めに伸長する。根毛形成細胞は変化しない。C: 野生型の根。D: *tmd*変異体の根。

給が低下することによって誘導される反応と考えられますが、GPI anchor proteinをコードするTMD (TIMID) 遺伝子の欠損変異体は、この反応が不完全になることがわかりました (図11-3 D)。さらに、寒天培地の上では根の成長パターンがはっきりと観察できるので、側根が水平に伸びる変異体を見いだすことができましたが、この変異体は光形態形成における重要なシグナル伝達因子HY5 (LONG HYPOCOTYL5) の変異であることが判明しました。当時光生物学の多くの研究者が競っていたHY5遺伝子のクローニングに成功し、その後の研究の発展に繋がりました (文献40、41)。

シャーレを斜めに置いたり正面から光を当てると根が寒天培地に押し付けられ、根は波型を繰り返すように成長します。根端部がZ巻き方向に

回転すると反時計回りの波型、S巻き方向に回転すると時計回りの波型に成長しますが、寒天培地を45度斜め置いた場合に、根端の回転方向は約5時間ごとに反転することがわかりました (図12-1)。この特殊な伸長パターンは根が土中で障害物を回避する反応の結果と考えられます (文献42)。波型成長が異常になるwav (wavy growth) 変異体を単離したところ (図12-2)、wav1は光受容体をコードするRPT1遺伝子、wav2はBUD EMERGENCE 46 ファミリー遺伝子、wav3はRING-finger type E3 ligase、wav5はオーキシン極性輸送と重力屈性に関わるAUX1 (AUXIN RESPONSE1) をそれぞれコードする遺伝子の変異であることがわかりました (文献43、44)。

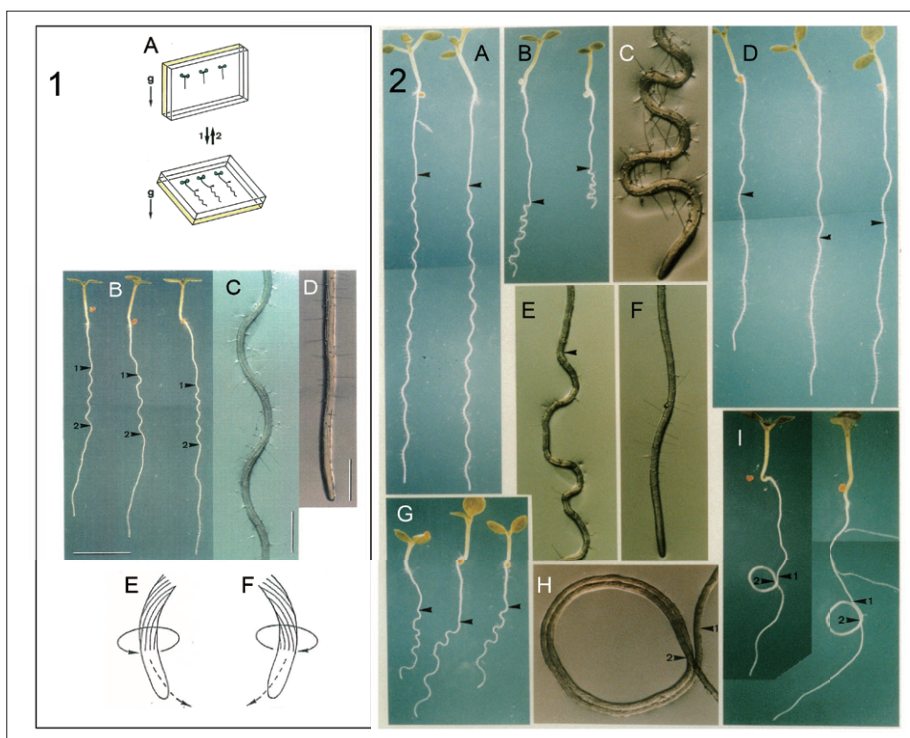


図12 (1) A: 45度斜めに置いた寒天培地上で野生型の根は波型に成長する。B: 垂直に立てた培地上で発芽させ、根の先端が1の位置の時点で培地を斜めにし、2の位置の時点で再度垂直に立てて育てた。C: 波型成長する根は回転していることがわかる。反時計回りの波型成長の際はZ巻き方向に(E)、時計回りの波型成長の際はS巻き方向に(F)、回転して成長する。D: まっすぐ下向きに成長する根は、回転しない。文献42より転載。
(2) 波型成長が異常になる変異体。A-Hの矢印の位置で培地を斜めにした。Iでは矢印1で斜めに、矢印2で垂直に戻した。A: 野生型、B: wav2変異体。C: wav2変異体(B)の拡大図。D: wav1変異体。E: wav4変異体(G)の拡大図。F: wav1変異体(D)の拡大図。G: wav4変異体。H: wav5変異体。I: wav5変異体。根端はS巻き方向にのみ回転し、逆向きに回転しないので、根は時計回りに輪を描いて成長する。文献42より転載。

おわりに

私の研究手法はシロイヌナズナを用いた分子遺伝学解析ですが、対象とした現象は多様で統一感に乏しいと言えます。大学院生やポストドク研究生、研究室のスタッフがそれぞれ別のテーマを持って研究していた時期が長く、「院生がそれぞれ小企業の社長ですね」と評されたこともあります。私は研究室のメンバーに「うちでは一人で国内外の一つのラボを相手にしているのだから、そのつもりで」とハッパをかけていました。研究室全体で大きな一つのテーマを追いかけて、国際的な独走状態になることは研究者の一つの理想形であると思いますが、私は新しい理想的なモデル植物が導入された時期に植物科学に入った幸運を思い、シロイヌナズナを用いた研

究の幅広い可能性を多くの研究者に紹介することが自分の責任の一部と考えてきました。私の研究室で扱った研究は巣立った研究者が引き継いだ内容もありますが、国内外の研究者が独自に展開していったものも多数あります。シロイヌナズナ研究者の間には、これまで密接な協力の気運が満ちていたのですが、今後は薄れて行くのかもしれませんが。現在、私は先端研究を続ける環境にはいませんが、国内外の数多くの研究者の協力と競争の中で植物分子生物学発展のための基礎工事の一端を担うことができ、十分に満足しています。最後に、これまでお世話になった先生方、研究室のスタッフ、学生、共同研究者の方々、内藤記念科学振興財団の皆様に深く感謝いたします。

— 参考文献 —

1. K.Okada (2010) *J. Plant Res.* 123: 267-273.
2. M.K.Komaki, K.Okada, E.Nishino, Y.Shimura (1988) *Development* 104, 195-203.
3. S.Sawa, K.Watanabe, K.Goto, E.Kanaya, E.H.Morita, K.Okada (1999) *Genes & Dev.* 13, 1079-1088.
4. S.Sawa, T.Ito, Y.Shimura, K.Okada (1999) *Plant Cell* 11, 69-86.
5. N.Matsumoto & K.Okada (2001) *Genes & Dev.* 15, 3355-3364.
6. S.Takeda, N.Matsumoto, K.Okada (2003) *Development* 131, 425-434.
7. N.Yagi, S.Takeda, N.Matsumoto, K.Okada (2009) *Plant Cell Physiol.* 50, 515-527.
8. T.Nishimura, T.Wada, K.T.Yamamoto, K.Okada (2005) *Plant Cell* 17, 2940-2953.
9. T.Nishimura, T.Wada, K.Okada (2004) *Biochemical Society Transaction* 32, 611-613.
10. S.Ishiguro, Y.Watanabe, N.Ito, H.Nonaka, N.Takeda, T.Sakai, H.Kanaya, K.Okada (2002) *EMBO J.* 21, 898-908.
11. S.Takeda, A.Iwasaki, N.Matsumoto, T.Uemura, K.Tatematsu, K.Okada (2013) *Plant Physiol.* 161, 1242-1250.
12. S.Takeda, A.Iwasaki, K.Tatematsu, K.Okada (2014) *Plants* 3, 348-358.
13. S.Ishiguro, A.Kawai-Oda, J.Ueda, I.Nishimura, K.Okada (2001) *Plant Cell* 13, 2191-2209.
14. S.Ishiguro, Y.Nishimori, M.Yamada, H.Saito, T.Suzuki, T.Nakagawa, H.Miyake, K.Okada, K.Nakamura (2010) *Plant Cell Physiol.* 51, 896-911.
15. L.M.Enns, M.M.Kanaoka, K.U.Torii, L.Comai, K.Okada, R.E.Cleland (2005) *Plant Molec. Biol.* 58, 333-349.
16. K.K.Shimizu & K.Okada (2000) *Development* 127, 4511-4518.
17. K.Toyokura, K.Watanabe, A.Oiwaka, M.Kusano, T.Tameshige, K.Tatematsu, N.Matsumoto, R.Tsugeki, K.Saito, K.Okada (2011) *Plant Cell Physiol.* 52, 1340-1353.
18. K.Toyokura, K.Yamaguchi, S.Shigenobu, H.Fukaki, K.Tatematsu, K.Okada (2015) *Plant Cell Physiol.* 56, 1229-1238.
19. K.Tatematsu, K.Toyokura, S.Miyashima, K.Nakajima, K.Okada (2015) *Plant J.* 82, 596-608.
20. T.Tameshige, H.Fujita, K.Watanabe, K.Toyokura, M.Kondo, K.Tatematsu, N.Matsumoto, R.Tsugeki, M.Kawaguchi, M.Nishimura, K.Okada (2013) *Plos Genetics* 9, e1003655.
21. M.Nakata, N.Matsumoto, R.Tsugeki, E.Rikirsch, T.Laux, K.Okada (2012) *Plant Cell* 24, 519-535.
22. K.Okada, J.Ueda, M.K.Komaki, C.J.Bell, Y.Shimura (1991) *Plant Cell* 3, 677-684.
23. L.Galweiler, C.Guan, A.Muller, E.Wisman, K.Mendgen, A.Yephremov, K.Palme (1998) *Science* 282, 2226-2230.
24. R.Tsugeki, F.A.Ditengou, Y.Sumi, W.Teale, K.Palme, K.Okada (2009) *Plant Cell* 21, 3133-3151.
25. R.Tsugeki, N.Tanaka-Sato, N.Maruyama, S.Terada, M.Kojima, H.Sakakibara, K.Okada (2015) *Plant J.* 81, 183-197.
26. M.Ueda, K.Matsui, S.Ishiguro, R.Sano, T.Wada, I.Paponov, K.Palme, K.Okada (2004) *Development* 131, 2101-2111.

27. M.Ueda, K.Matsui, S.Ishiguro, T.Kato, S.Tabata, M.Kobayashi, M.Seki, K.Shinozaki, K.Okada (2011) *Plant Cell Physiol.* 52, 1628-1640.
28. T.Wada, T.Tachibana, Y.Shimura, K.Okada (1997) *Science* 277, 1113-1116.
29. T.Wada, T.Kurata, R.Tominaga, Y.Koshino-Kimura, T.Tachibana, K.Goto, M.D.Marks, Y.Shimura, K.Okada (2002) *Development* 129, 5409-5419.
30. T.Kurata, T.Ishida, C.Kawabata-Awai, M.Noguchi, S.Hattori, R.Sano, R.Nagasaka, R.Tominaga, Y.Koshino-Kimura, T.Kato, S.Sato, S.Tabata, K.Okada, T.Wada (2005) *Development* 132, 5387-5398.
31. S.Schellmann, A.Schnittger, V.Kirik, T.Wada, K.Okada, A.Beermann, J.Thumfahrt, G.Jurgens, M.Hulskamp (2002) *EMBO J.* 21, 5036-5046.
32. Y.Koshino-Kimura, T.Wada, T.Tachibana, R.Tsugeki, S.Ishiguro, K.Okada (2005) *Plant Cell Physiol.* 46, 817-826.
33. R.Tominaga, M.Iwata, K.Okada, T.Wada (2007) *Plant Cell* 19, 2264-2277.
34. Y.Yoshida, R.Sano, T.Wada, J.Takabayashi, K.Okada (2009) *Development* 136, 1039-1048.
35. K.Okada & Y.Shimura (1992) *Cell* 70, 369-372.
36. K.Okada & Y.Shimura (1992) *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 439-448.
37. T.Sakai, T.Wada, S.Ishiguro, K.Okada (2000) *Plant Cell* 12, 225-236.
38. T.Kagawa, T.Sakai, N.Suetsugu, K.Oikawa, S.Ishiguro, T.Kato, S.Tabata, K.Okada, M.Wada (2001) *Science* 291, 2138-2141.
39. A.Harada, T.Sakai, K.Okada (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100, 8583-8588.
40. M.Ohgishi, K.Saji, K.Okada, T.Sakai (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101, 2223-2228.
41. S.Inada, M.Ohgishi, T.Mayama, K.Okada, T.Sakai (2004) *Plant Cell* 16, 887-896.
42. T.Oyama, Y.Shimura, K.Okada (1997) *Genes & Dev.* 11, 2983-2995.
43. L-H.Ang, S.Chattopadhyay, N.Wei, T.Oyama, K.Okada, A.Batschauer, X-W.Deng (1998) *Molec.Cell* 1, 213-222.
44. K.Okada & Y.Shimura (1990) *Science* 250, 274-276.
45. S.Mochizuki, A.Harada, S.Inada, K.Sugimoto-Shirasu, N.Stacey, T.Wada, S.Ishiguro, K.Okada, T.Sakai (2005) *Plant Cell* 17, 537-547.
46. T.Sakai, S.Mochizuki, K.Haga, Y.Uehara, A.Suzuki, A.Harada, T.Wada, S.Ishiguro, K.Okada (2012) *Plant J.* 70, 303-314.