

## 論文内容の要旨

### 論文題目 Towards the understanding of diversified leaf morphogenesis in *Streptocarpus* (Gesneriaceae)

(ストレプトカルプス属(イワタバコ科)に見られる多様な葉の形態形成機構の理解を目指して)

氏名 西井かなえ

#### 序

植物のシュートは、茎頂の茎頂分裂組織(SAM)における細胞分裂活性により供給された細胞群より構成されている。SAMでは、中心部での幹細胞を維持するような機能とその周辺の細胞分裂活性によりその機能が果たされていることがモデル植物の研究から明らかになっている。ところが、イワタバコ科においてはこの通則から外れる植物が見られる。このような植物群で、シュートの形態形成機構がどのように行われているのか、また相違点はどのようなものであるのかという問題は大変興味深い。私は、イワタバコ科の中でも、特にストレプトカルプス属のシュート形成機構の解析を個体発生学的見地より追跡を行った。これまでの形態学研究により、ストレプトカルプス属の葉は介在分裂組織をもち、継続的に成長する機能を持つシュート様器官であることが示唆されている。また、一生を一枚の葉で過ごす一葉種やSAMを介さずに継続的に葉を形成するロゼット種など、多様なタイプが知られている。発芽直後に片方の子葉が継続的に成長を続け大子葉を形成する現象はストレプトカルプス属に共通に観察されるが、このような過程に対して phyllomorph concept が提出され(図1)、一葉種においてはこの大子葉のみで一生を過ごす。また、それ以降の phyllomorph 形成には、groove meristem (GM)と呼ばれる特殊な分裂組織の関与が示されており、葉器官の性質、発生機構ともにユニークである。そこで、私は一葉植物の大子葉形成過程、およびロゼット種のGMからの葉発生過程に着目し、これを解析して通常の葉形態形成機構と比較することにより、植物の形態形成機構のより深い理解を深めることを目的として研究を行った。

#### 結果と考察

##### 一葉植物の大子葉形態形成機構の解析

一葉種である *Streptocarpus wendlandii* を材料として、大子葉形成過程を解析した。まず子葉の拡大成長パターンを解析した結果、はじめは双方の子葉が相同に成長し、その後片方の子葉のみが継続的に成長を続けた。この成長は大子葉基部の細胞分裂活性の発現によるものであった(図2A)。形態学的解析により、大子葉基部には、特異的なトライコームの形成、および側脈の形成が観察された。この大子葉形成にかかわる内生因子として種々の植物ホルモンの影響を調べたところ、サイトカイニン類である6-ベンジルアミノプリン添加によって双方の子葉が大子葉化した(図2C-E)。これらの結果、相同成長期から不等成長期への転換に伴い、大子葉基部に特異的に基部分裂組織が形成され分裂活性を維持し、不等成長期特異的な新たな組織が形成され、またその転換はサイトカイニンによって調節されていると推定した。

##### ロゼット種の葉発生過程の解析

ロゼット種では、一葉種と同様な大子葉を形成した後、その介在分裂組織GMより継続的に葉を形成する。そこで、この葉の発生過程を解析し、通常のSAMからの葉形成過程と比較した。材料としては *S. rexii* を用いた。葉の発生パターンの解析結果、葉腋に存在するGMより葉が形成され、また新生葉に存在するGMから葉が形成されるという、側生的なパターンを示した(図3)。

そこで、第一葉の発生過程を解剖学的に詳細に解析したが、はじめ大子葉基部に細かな細胞塊が観察され、膨ら

み、次に膨らみの背軸側にトライコームの分化が観察され、背腹性のある葉が形成された(図4)。この結果、ロゼット種の葉発生過程はGM形成期とGMからの葉原基分化期に分けることができた。そこでGMの内部構造と細胞分裂活性を検出するため、BrdUを植物体に取り込ませ、その取り込み部位を検出すると同時に、隣接する切片をトルイジンブルー染色し、小型で細胞質濃度が濃いとされているGMを構成する可能性がある細胞を検出した。これらの細胞群の植物体内での位置を確定するため、細胞の位置情報をもとに3D画像を構築した(図5)。その結果、GM形成期にはGMで、葉原基分化期には葉原基を形成する可能性がある部位で活発なBrdUの取り込みが観察された。これらの観察は、まず形態形成中心としてGM形成がおり、そこから葉原基が分化するという2段階を経て葉が形成されることが示された。また、このGMは葉を形成すると同時にその役割を終え、消滅する可能性が示された。

GMはSAMと同様、葉の形態形成中心としての役割を担っている可能性が示されたが、最近GMにもSAMの維持に働くSTM遺伝子の発現が認められることがHarrisonら(2005)により示された。そこで、この2つの分裂組織を機能的に比較するため、SAMで機能を持つ他の主要な遺伝子を単離し、GMにおいて解析した。SAMでSTMと同様に分裂組織の維持と分化抑制に関わることが示されているクラス1KNOX遺伝子であるKNAT1、STM、そして、これらの遺伝子と相互作用しつつSAMで器官分化と形態形成にかかわるAS1・RS2・PHAN(ARP)遺伝子群に注目し、これらの遺伝子の発現パターンをin situ hybridizationにより調べた。SKN1(Streptocarpus KNAT1-like)、SPHAN(Streptocarpus PHAN-like)遺伝子を単離し(図6)、発現パターンを解析したところ、これらの遺伝子は大型葉を形成する際に大型葉基部で発現が観察され、その後GM形成部位で、さらに第一葉のGM、basal meristem(BM)、および葉身で発現が確認された(図7)。GMでのSPHAN遺伝子の発現開始時期は、SKN1、STM1遺伝子の発現に比べてやや遅れているように見られたが、ほぼ同時に発現が観察された。これらのSAM機能遺伝子は、GMの形成とphyllomorph形成過程にも機能を持っている可能性が示され、初期の大型葉形成にも重要な働きをしていると考えられる。また、複葉を形成する種ではARP遺伝子群とクラス1KNOX遺伝子群がSAMで同時に発現することが観察されるため、phyllomorphの形成にも類似した遺伝子間相互作用が関与する可能性が考えられる。

### イワタバコ科における進化発生学的解析

イワタバコ科全体においては、異型子葉形成は旧世界イワタバコ科の特徴であり、新世界イワタバコ科には観察されない。*S. rexii*での解析において、クラス1KNOX遺伝子であるSKN1が不等成長期に大型葉特異的に発現していたことから、成長能を持つphyllomorphの性質の付与にSKN1が関与している可能性が考えられる。そこで、イワタバコ科のそれぞれの形態タイプにおいて葉形態形成過程におけるSKN1遺伝子の発現を比較した。通常SAMと相同志葉を持つ新世界イワタバコ科の*Alloplectus vittatus*、通常SAMと不等子葉を持つ*S. glandulosissimus*、一葉種の*S. grandis*を材料として用いた。その結果、大型葉をもつ種においては大型葉基部でSKN1の発現が確認された(図8)。一方、相同志葉を持つ*A. vittatus*では、RT-PCR解析で子葉への発現は確認されなかった。また、SAM、GMでは、どの種においてもSKN1の発現が確認され、この遺伝子が分裂組織の維持を担っている可能性を示した。これらの結果は、通常SAMで機能を持つクラス1KNOX遺伝子が、ストレプトカルプスおよびその関連属のユニークな葉形成過程に深く関与していることを示唆している。

### 結論と今後の展望

ストレプトカルプスの大型葉形成、GMからのphyllomorph形成過程の解析結果、これらのユニークな葉形成過程に植物ホルモンであるサイトカニン、また分裂組織の維持に関わるクラス1KNOX遺伝子が関与していることが示された。近年、SAMにおいてクラス1KNOX遺伝子が制御因子としてサイトカニン合成を誘導することがわかっており(Jasinski et al. 2005, Yanai et al. 2005)。ストレプトカルプスでもサイトカニン添加によって双方の子葉にSTMの発現が持続することが示されている(Mantegazza et al. 2006)。このようなことから、SKN1もサイトカニンと密接な相互作用をし、大型葉を形成している可能性がある。イワタバコ科の大型葉形成機構は、生態学的にはより多くの光を受けるための適応である可能性がある(Burt 1970)。予備的な実験により光が大型葉化に必須であることが示されており、光、植物ホルモンであるサイトカニン、そして形態形成遺伝子のクラス1KNOX遺伝子が相互作用し、大型葉形成が制御されている可能性を考えた(図9)。そこで、今後はこのような大型葉形態形成の制御機構の実態を解明していきたい。



図1. Phyllomorph concept

ストレプトカルプスの葉の形態は、通常の葉とは異なることから、Jongら(1973)はphyllomorphという考えを提示した。Phyllomorphは、葉身を形成するbasal meristem(BM)、葉柄体(petiolode)を形成するpetiolode meristem、そして器官形成に関わるgroove meristem(GM)と呼ばれる介在分裂組織を持つ。

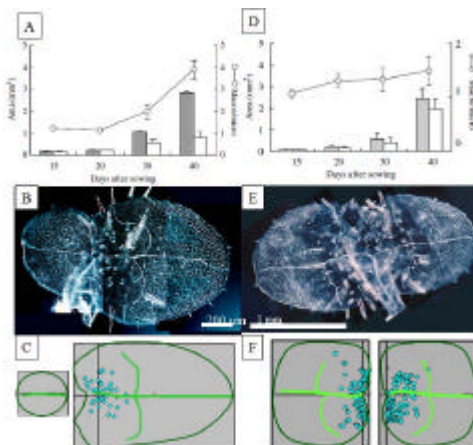
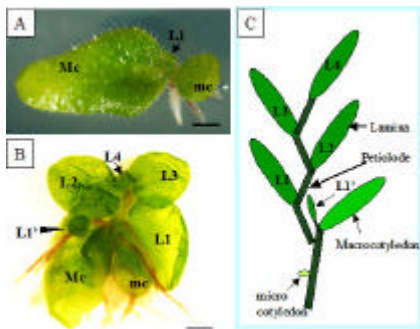


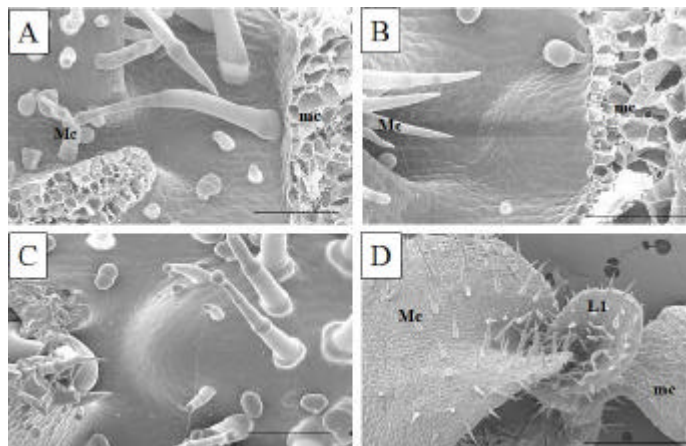
図2. 一葉種 *S. wendlandii* の大型葉成長過程とサイトカイニンの影響

A. 発芽後の子葉面積の変化。B. 異型子葉を形成した植物体の透明化観察。大型葉基部に特異的に側脈が観察される(B)。C. アニリンブルー染色によって検出された隔壁の分布。大型葉基部に特異的に分布している。D-F.  $10^{-6}$ M 6-ベンジルアミノプリン添加培地で育成すると双方の子葉が大型葉化する。

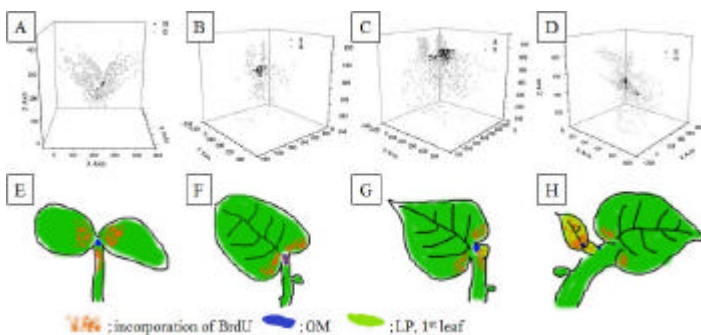




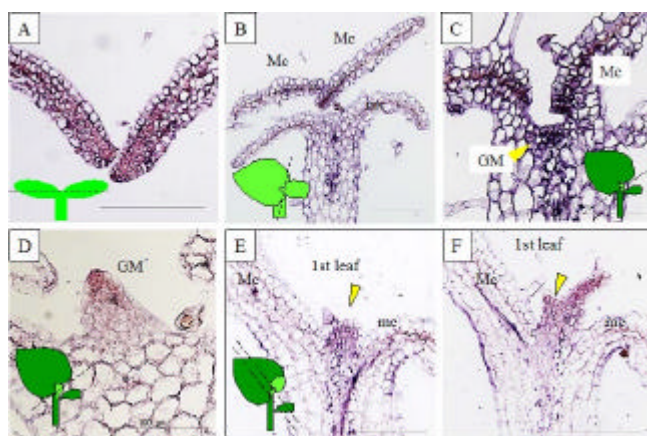
**図3**  
**ロゼット種 *S. rexi* の葉の発生パターン**  
 大子葉形成後、葉腋に第一葉が形成され(A)その後引き続き側生的なパターンで葉腋に葉が形成される(B,C)。



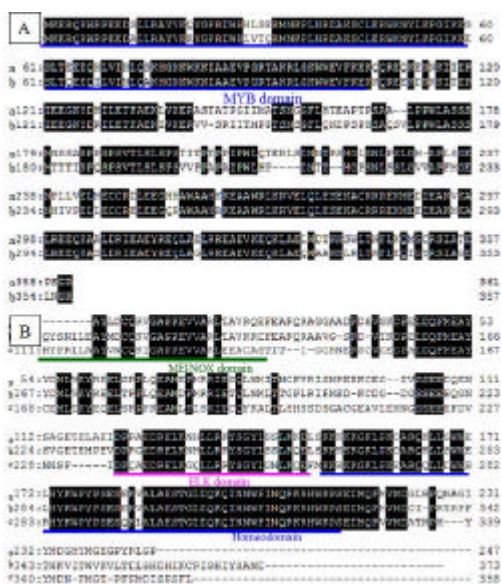
**図4. 第一葉形成過程 (走査型電子顕微鏡写真)**  
 まず小さな細胞群が大子葉基部に観察され(A)、膨らみ(B)、その一部にトライコームが観察され(C)、葉の形成が起こる(D)。



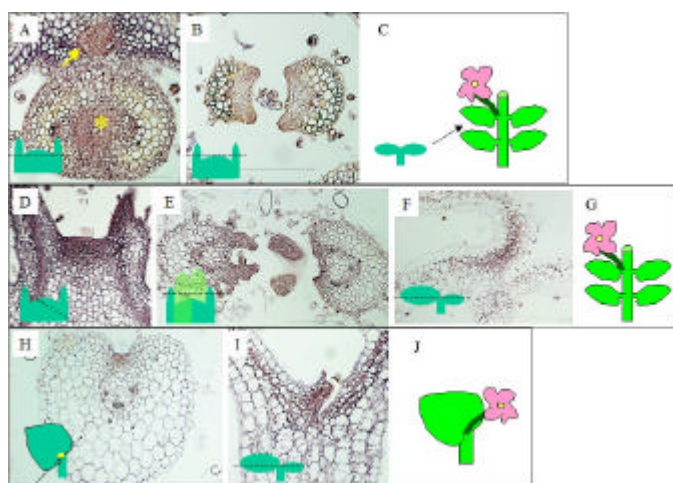
**図5. 第一葉形成過程における BrdU の取り込み部位と GM の変化**  
 A. 相同成長期 B. GM 形成期 C. 葉原基形成期 D. 新生葉  
 灰色の丸; BrdU 取り込み部位 黒の丸; GM E-F. BrdU 取り込み部位 (オレンジ) と GM (青) の位置の変化のモデル図、それぞれ A-D に対応



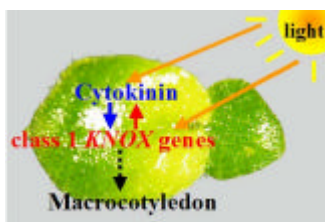
**図7. 第一葉形成過程における *SKN1* 遺伝子の *in situ hybridization***  
 紫色がシグナル。A. 発芽直後の子葉の縦切り切片。双方の子葉基部にシグナルが見られる。B. 異型子葉期。大子葉基部にのみシグナルが観察され、小子葉には観察されない。C. GM 形成期。GM (矢頭) でシグナルが見られる。D. GM が膨らむ時期には、頂部でシグナルが見られる。E-F. 新生葉では基部 (E) および葉身 (F) でシグナルが見られる。



**図6**  
**A. 得られた *SPHAN* 遺伝子の推定アミノ酸配列**  
 a. *SPHAN*  
 b. *PHANTASTICA* (*Antirrhinum majus*)  
**B. 得られた *SKN1* 遺伝子部分配列の推定アミノ酸配列**  
 a. *SKN1*  
 b. *SNAP1* (*A. majus*)  
 c. *SSTM1*



**図8. イワタバコ科の異なる形態タイプにおける *SKN1* 遺伝子の *in situ hybridization***  
 A-C. *A. vittatus*, 相同子葉, SAM を持つ。A. SAM の横切り切片。アスタリスク; SAM, 矢印; 側芽 B. 若い葉の横切り切片 D-G. *S. glandulosissima*, 不等子葉, SAM をもつ。D. SAM の縦切り切片 E. 葉の横切り切片 F. 異型子葉 H-J. *S. grandis*, 一葉種。H. GM の横切り切片 I. 異型子葉 C. G. J. 各形態タイプのスキーム図



**図9. 大子葉形成機構のモデル図**