

ヒメツリガネゴケ —植物ホルモン、分化、そして進化—：総説

日渡祐二^{1, 2}・西山智明^{1, 3}・長谷部光泰^{1, 2}

¹〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38

基礎生物学研究所種分化機構第二研究部門

²〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38

総合研究大学院大学生命科学研究科分子生物機構論専攻

³〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

Y. Hiwatashi^{1, 2}, T. Nishiyama^{1, 3} and M. Hasebe^{1, 2}: *Physcomitrella patens* subsp. *patens*—plant hormone, differentiation and evolution: a review (¹Speciation mechanisms 2, National Institute for Basic Biology, 38 Nishigonaka, Myodaiji, Okazaki, 444-8585 Japan. ²Department of Molecular Biomechanics, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies, 38 Nishigonaka, Myodaiji, Okazaki, 444-8585 Japan. ³Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo, 111-0033 Japan)

Abstract. The moss, *Physcomitrella patens* subsp. *patens* has been used as an excellent model to study molecular mechanisms of development regulated by plant hormones for the following reasons. (1) The same kinds of plant hormones found in higher plants, such as auxin and cytokinin, also have distinct effects on the moss development, (2) the developmental processes caused by the plant hormones can be easily observed at the cellular level, and (3) the techniques for genetics and molecular biology including the gene targeting technique are well established. In this review, we summarize previous physiological and molecular biological studies on plant hormones in *P. patens*, and introduce the gene tagging and gene/enhancer trap systems we recently established. Comparisons of developmental mechanisms between the moss and other plants will give evolutionary insights in the future.

1. はじめに

植物ホルモンは、植物によって生産される低濃度で植物の生理現象を調節する物質である。植物ホルモンとしてこれまでに認知されているのは、オーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイドの6種類の低分子化合物である。これらのうち、特にオーキシシンとサイトカイニンは、古くから植物ホルモンとして認められ、細胞増殖や細胞分化といった植物が生育していく上で不可欠な現象に関与することが知られている。植物ホルモンに関わる膨大な研究が、これまでに主に高等植物について行われており、植物ホルモンの生合成、シグナル伝達などの作用機構が明らかになりつつある。一方、コケ植物にも、高等植物と共通な植物ホルモンが存在し、その生理的現象を調節することがわかっている。特にオーキシシンとサイトカイニンは、セン類配偶体世代に

おいて細胞の分化に関与し、配偶体の形態形成に重要な役割を担うことから、古くからセン類を材料にした研究が行われてきた(総説として Schumaker & Dietrich 1997, 1998)。とりわけ、ヒメツリガネゴケ(新称) *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (ヒョウタンゴケ科, Funariaceae) は、分子遺伝学的な解析に有利なユニークな性質を持つことから近年脚光をあびている(総説として Cove et al. 1997, Reski 1998)。

我々は、ヒメツリガネゴケを用いて植物ホルモンを研究する意義が大きく2つあると考えている。一つは、ヒメツリガネゴケを用いて陸上植物に普遍的なホルモン生合成、作用機構を明らかにすることに貢献できるかもしれないということである。ヒメツリガネゴケは、被子植物に比べて体制が単純であり、細胞レベルでホルモンの作用機構を解析できるというメリットを持っている。また、原糸体と茎葉体では細胞分裂様式などが異なっており、細胞分裂など植物の生存に直接影響

し、植物ホルモン関連で被子植物では従来単離できなかった突然変異体を単離できるかもしれない。そして、その原因遺伝子が単離できれば遺伝子ターゲティングなどの技術を用いて遺伝子機能の解析が行えるはずである。もう一つの意義は、ヒメツリガネゴケと、研究が進んでいる被子植物のホルモン作用機構を比較することにより、陸上植物の進化における植物ホルモンの関わりについて推測できることである。植物ホルモンは陸上植物の形態形成に必要な不可欠な働きをしている。従って、陸上植物の形態進化メカニズムを明らかにする上で植物ホルモンの作用機構の進化を理解することは必要不可欠である。

本稿では、ヒメツリガネゴケの紹介とともに、植物ホルモン、特にオーキシンとサイトカイニンの細胞分化への作用機構についてまとめた。また、分子生物学的手法より得られた最近の知見や、現在当研究室で取り組んでいる研究についても紹介する。

2. ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*) について

ヨーロッパを中心に実験材料として普及している *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. subsp. *patens* Tan は、元来、英国の Gransden Wood, Huntingdonshire で1962年に採集された野生株を H.L.K. Whitehouse 博士が培養し始めたものである (Ashton & Cove 1977)。その後 Engel (1968) によって1胞子由来の系統が培養増殖され、これが現在世界中の研究室で用いられている。

日本にはニセツリガネゴケ *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. subsp. *californica* (Crum & Anderson) Tan が分布しており (Iwatsuki 1956, Tan 1979)、その生活史についての研究も行われている (Une & Tateishi 1996)。しかし、従来、*Physcomitrella patens* subsp. *patens* には和名がなかったため、ここで「ヒメツリガネゴケ」という和名を提唱したい。

3. ヒメツリガネゴケの特徴

ヒメツリガネゴケは、大きさが数ミリメートルと小さいため培養が容易であり、また、実験条件下での世代交代が可能でその時間は1世代約4か月であるという特徴を持っている。ヒメツリガネゴケの染色体数は $n=27$ であり (Reski et al. 1994)、ゲノムサイズは約

480Mb と推定され (Reski 1998)、実験材料として用いられている高等植物の中で最小のゲノムサイズをもつシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の約3倍程度であると考えられている。

また、近年、遺伝子導入系が確立され、外来遺伝子を導入した形質転換体を比較的容易に得られるようになった (Schaefer et al. 1991, Sawahel et al. 1992, Cho et al. 1999)。さらに、最近、ヒメツリガネゴケは植物では例外的に高い頻度で相同組換えを起こすことが示され、ヒメツリガネゴケが遺伝子ターゲティングなどを用いた遺伝子機能解析に適した性質を持っていることもわかってきた (Kammerer & Cove 1996, Schaefer & Zryd 1997)。

4. 培養条件下におけるヒメツリガネゴケの生活史と発生

ヒメツリガネゴケでは、培養条件により一定の分化を制御することが可能であり、短時間で明確な形態形成が起こるので、その観察が容易である。そのため、ヒョウタンゴケ (*Funaria hygrometrica*)、ヤノウエノアカゴケ (*Ceratodon purpureus*) とともに、配偶体の発生・分化の研究材料として広く用いられてきた。図1にヒメツリガネゴケの生活史の概略を示す (Ashton et al. 1979b, McClelland 1987)。ヒメツリガネゴケは、胞子が発芽すると細胞が一行に並んだ原糸体 (protonema) を形成する。原糸体は、原糸体先端の頂端細胞 (apical cell) と先端細胞から数細胞基部側の細胞が分裂し、新たな頂端細胞を形成する。原糸体には、一次クロロネマ (primary chloronema)、二次クロロネマ (secondary chloronema)、カウロネマ (caulonema) と呼ばれる3つの型が存在する。胞子発芽後の最初の細胞分裂では、一次クロロネマ頂端細胞 (primary chloronemal apical cell) と一次クロロネマ次頂端細胞 (primary chloronemal subapical cell) が形成される。一次クロロネマ頂端細胞は、細胞分裂を繰り返すことにより直線状に配列した一次クロロネマ次頂端細胞を形成する (図1 a, b)。一次クロロネマ次頂端細胞は、順次、一次クロロネマ側枝始原細胞 (primary chloronemal side branch initial cell) を形成し、この細胞が一次クロロネマ頂端細胞と一次クロロネマ次頂端細胞に分裂する。しばらくすると、一次クロロネマ頂端細胞は、カウロネマ頂端細胞 (caulonemal apical cell) へと変化する (図1 c)。

一次クロロネマ細胞は、細胞内に丸く大きな葉緑体を密に持ち、隣接する細胞同士を隔てる細胞壁（隔壁，septum）を細胞の長軸に対して垂直に形成する。一方，カウロネマ細胞は、クロロネマ細胞から分化してできる細胞で、紡錘型の葉緑体を細胞中にまばらに持ち、隔壁を細胞の長軸に対して斜めに形成する。カウロネマ細胞は、一次クロロネマ細胞と同じようなパターンで成長していく。カウロネマ次頂端細胞から，カウロネマ側枝始原細胞（caulonemal side branch initial cell）が形成される（図1d）。カウロネマ側枝始原細胞は、85-90%が二次クロロネマ頂端細胞（secondary chloronemal apical cell），5-6%がカウロネマ頂端

細胞，残りの数%が芽(bud)と呼ばれる細胞塊（図1e）になるか，カウロネマ側枝始原細胞のまま発生が止まってしまう。芽と運命づけられたカウロネマ側枝始原細胞は，通常，規則正しく分裂し茎葉体を形成する（図2）。まず細胞が丸く膨らみ，基部側に液胞が位置し，先端側は細胞質の割合が多くなる（図2-1）。そして，伸長方向に対して斜め方向の分裂で，細胞質に富んだ茎葉体茎頂端細胞（gametophore shoot apical cell）と液胞に富んだ次頂端細胞が形成される（図2-2）。次頂端細胞は2つに分裂し，娘細胞の1つが葉原基細胞，もう1つは茎原基細胞となる（図2-4）。葉原基細胞，茎原基細胞は更に分裂を繰り返し，葉と茎を形成する。

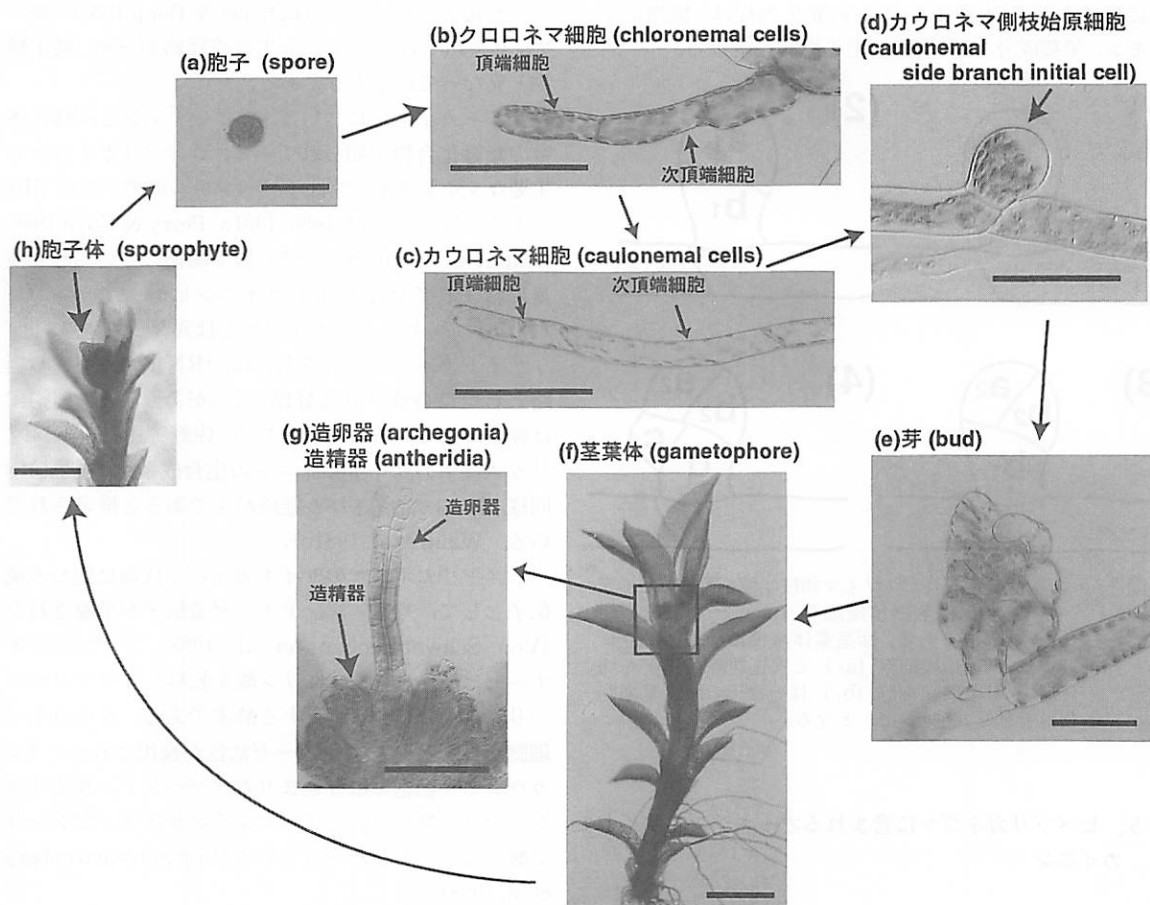


図1. 培養条件下におけるヒメツリガネゴケの生活環と形態形成。
 (a)胞子。(b)クロロネマ細胞。(c)カウロネマ細胞。(d)カウロネマ側枝始原細胞。(e)芽。(f)茎葉体。(g)造卵器と造精器。これらは茎葉体の茎頂部に形成する。(h)胞子体。
 (a)のスケールは30 μm 。(b)と(c)と(g)のスケールは100 μm 。(d)と(e)のスケールは50 μm 。(f)のスケールは500 μm 。(h)のスケールは200 μm を示す。

互いに親子関係にありかつ、接している茎頂頂端細胞、葉原基細胞、茎原基細胞がどのように違っているのかを研究することにより、植物の主要な栄養器官である頂端分裂組織、葉、茎の形態形成過程解明の糸口が得られるかもしれない。茎葉体の成長に伴い、適時、仮根(rhizoid)原基細胞が形成され、伸長する。また、葉の形成過程で、葉の付け根に多細胞性の粘液毛(mucilage hair)が形成される。葉は、中肋部分を除いて一層の細胞からなり、茎の中には、道束が形成される。通常、原糸体、茎葉体ともに25度で培養するが、15度で培養すると、茎葉体の茎頂に、造卵器(archegonium)と造精器(antheridium)を形成し(図1g)、受精後、胞子体(sporophyte)が茎葉体上に形成される(図1h)。以上の発生過程は、植物ホルモン、栄養成分、光、温度などの影響を受ける。

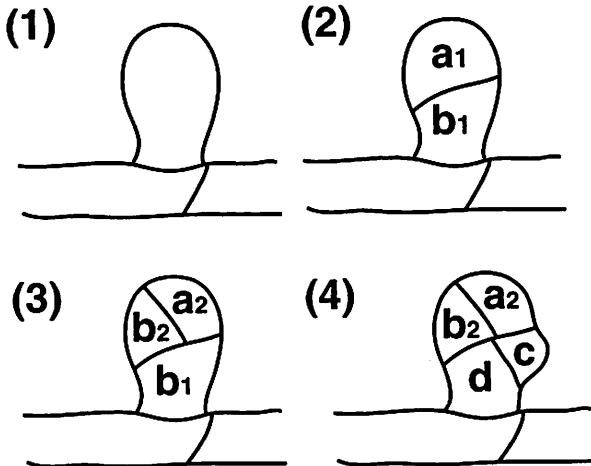


図2. 芽の初期発生。(1)カウロネマ側枝始原細胞が、丸く膨らむ。(2)茎葉体茎頂頂端細胞(a₁)と次頂端細胞(b₁)が形成される。(3)茎葉体茎頂頂端細胞(a₁)は新たな茎頂頂端細胞(a₂)と次頂端細胞(b₂)を切り出す。(4)次頂端細胞(b₁)は分裂し、葉原基細胞(c)と茎原基細胞(d)となる。

5. ヒメツリガネゴケに含まれるオーキシシンとサイトカイニン

セン類にも被子植物と同じようにオーキシシンとサイトカイニンが存在する。オーキシシンには多数の類縁化合物が知られているが、インドール-3-酢酸(IAA)は被子植物において最も普遍的な天然オーキシシンである(総説として、小柴 1998)。ヒメツリガネゴケでは、

IAA が同定されており、生体内での主要なオーキシシンであると考えられている(Ashton et al. 1985, Bhatla & Dhingra-Babbar 1990)。

被子植物では、オーキシシン生合成系として、トリプトファンを前駆体とするトリプトファン経路とトリプトファンを経由しない非トリプトファン経路が存在する(総説として、小柴 1998)。トリプトファン経路には、インドールアセトアミド経路、インドール-3-ピルビン酸経路、インドール-3-アセトアルデヒド経路、トリプタミン経路、そしてインドールアセトニトリル経路の4つの経路が知られている。ヒョウタンゴケでは、トリプトファン経路のうちインドールアセトアミド経路およびインドール-3-ピルビン酸経路のみ存在することが報告されている(Lehnert & Bopp 1983)。従って、セン類ではオーキシシン生合成経路が一部、被子植物と異なっているようである。

サイトカイニンについても、オーキシシンと同様に多数の類縁化合物が知られている。ヒメツリガネゴケの主要なサイトカイニンはイソペンテニルアデニン(iP)である(Wang et al. 1980, 1981a, Perry & Cove 1986, Reutter et al. 1998)。一方、被子植物において最も多量に含まれているサイトカイニンはt-ゼアチン(t-Zeatin)で、ヒメツリガネゴケとは異なっている。

サイトカイニンの合成系には、tRNA から生じる経路と新たに合成される経路の2つがあり、被子植物では後者が主である(総説として、佐野 1998)。ヒメツリガネゴケのサイトカイニンの生合成系は、被子植物同様、新たに合成される経路が主であると推定されている(Wang et al. 1981b)。

ヒメツリガネゴケのサイトカイニン代謝に関わる遺伝子として、アデノシンキナーゼ遺伝子が単離された(Von Schwartzenberg et al. 1998)。アデノシンキナーゼは、アデノシンにリン酸を転移してアデノシン-リン酸(AMP)を生成する酵素である。カウロネマ細胞からアデノシンキナーゼ活性が検出されること、カウロネマ細胞に取り込ませたイソペンテニルアデノシンがリン酸化されてイソペンテニルアデノシン-リン酸になることがわかっている(Von Schwartzenberg et al. 1998)。

6. オーキシシンおよびサイトカイニン添加による分化の誘導

ヒメツリガネゴケをオーキシシンまたはサイトカイニ

ンを添加した培地で培養すると、それぞれのホルモンに特異的な細胞や組織の分化を短時間に引き起こすことができる (Ashton et al. 1979b, McClelland 1987).

オーキシシンとしてナフタレン酢酸 (NAA) を培地に添加した場合、500 nM 程度の濃度からクロロネマ細胞の分裂・伸長が阻害され始め、またクロロネマ細胞とカウロネマ細胞に色素沈着が観察される。添加濃度が 2.5-50 μM の場合、クロロネマ細胞およびカウロネマ側枝始原細胞は、ほとんどカウロネマ細胞へと分化する。添加濃度が 12.5-50 μM と高くなるにつれて、正常な茎葉体が形成されなくなり、短く太い茎だけの尖塔型をした茎葉体を形成するようになる。また茎葉体から、通常培地に植えたときより多数の仮根が形成される。

サイトカイニンがカウロネマ側枝始原細胞から芽を誘導する現象は、*Tortella caespitosa* (Gorton & Eakin 1957)、ヒョウタンゴケ (Brandes & Kende 1968) など古くから観察され注目されてきた。ヒメツリガネゴケでは、サイトカイニンであるベンジルアミノプリン (BAP) を培地に添加すると、5 μM 以上の濃度でカウロネマ側枝始原細胞がほとんど芽へと誘導される。しかし、芽はカルス状となり正常な茎葉体は形成されない。

7. 分化に対するオーキシシンおよびサイトカイニンの作用機構

配偶体世代の分化におけるオーキシシンおよびサイトカイニンの作用機構を調べるために、英国 Leeds 大学の Cove らは、外生的に与えたオーキシシン、サイトカイニンに対する反応を指標に単離した突然変異体 (NAA resistant mutant: *nar* および BAP resistant mutant: *bar*) や、野生型に比べて多数の茎葉体を形成する突然変異体 (over-producing gametophore: *ove*) を単離、解析した (Ashton et al. 1979a, b)。これらの突然変異体は形態的特徴やホルモン応答性の違いによりいくつかのカテゴリーに分類された。例えば、カテゴリー 4 に分類される *bar* 突然変異体は、クロロネマのみ形成しカウロネマや茎葉体を形成しない (Ashton et al. 1979b)。この突然変異体をオーキシシン添加培地で培養すると、カウロネマや茎葉体が分化して野生型と同様の表現型に回復する。このことはクロロネマからカウロネマへの分化にオーキシシンが必要であり、カテゴリー 4 の *bar* 突然変異体はオーキシシン合

成系に関わる遺伝子が機能欠損している可能性が高いことを示している (Ashton et al. 1979b)。また、カテゴリー 10 に分類される *ove* 突然変異体はサイトカイニン非添加培地で多数の茎葉体を形成する突然変異体として単離され、野生型をサイトカイニン添加培地で培養したときと同じような形態を示す (Ashton et al. 1979a)。この突然変異体を培養した培地中に含まれる iP 量を測定すると野生型を培養したときと比べ 100 倍以上の iP が検出された (Wang et al. 1981a)。従って、芽の分化をサイトカイニンが誘導すること、*ove* 突然変異体はサイトカイニンを過剰に合成し、細胞外へ放出するために茎葉体を多数形成することが推定される (Wang et al. 1981b)。

Cove らはオーキシシン・サイトカイニン添加による野生型の形態変化と突然変異体表現型の比較、および突然変異体のホルモン応答性を調べることによって、配偶体の細胞分化におけるオーキシシンとサイトカイニンの作用について詳細に調べた。その結果、オーキシシンはクロロネマ細胞およびカウロネマ側枝始原細胞からカウロネマ細胞への分化に必要であり、さらに正常な茎葉体形成にも関与していることがわかった。また、サイトカイニンは芽の分化を誘導し茎葉体の形成を制御すること、さらにカウロネマの形成にも関与しているらしいことも明らかとなった (図 3, Ashton et al. 1979a, b, Ashton et al. 1990)。

最近、Reski らのグループは 2 種類のサイトカイニン感受性突然変異体 (P24, PC22) を用いてサイトカイニンの作用機構を解析した (Reutter et al. 1998)。P24 突然変異体は芽が形成されない突然変異体として、PC22 突然変異体は色素体の分裂と茎葉体形成に変異をもつ突然変異体として知られている (Abel et al. 1989, Ye et al. 1989)。PC22 では、長期間培養すると野生型に比べて少数の芽が形成されるが、芽は数個の変形した葉状の器官をつけるだけで発生しない。これらの突然変異体内で細菌由来のイソペンテニルトランスフェラーゼ遺伝子 (*ipt*) を発現させて内生 iP 量を増加させたところ、P24 は芽と正常な茎葉体を形成した。一方、PC22 では葉緑体は野生型とほぼ同様に分裂したが、茎葉体は正常に発生しなかった。このことから、カウロネマ側枝始原細胞からの茎葉体形成は、(1)芽形成と(2)その後の茎葉体形成の 2 つのプロセスに分解でき、*ipt* 遺伝子の発現に伴うサイトカイニン量の増加は、(1)のプロセスには関与しているが、(2)には関与していないことがわかる (Reutter et al. 1998)。

また、(2)のプロセスがサイトカニンによって直接制御されていないことも示している (Reski 1999)。さらに野生型とこれらの変異体の中で iP 含量に差が見られないため、これらの変異はサイトカニン合成系ではなく、サイトカニンのシグナル伝達系に起因しているらしい。また、これらの *ipt* 導入形質転換体で

は iP 量の増加とともに IAA 量も増加しており、オーキシンの代謝系とサイトカニンの代謝系とで何らかの相互作用があると思われる (Reutter et al. 1998)。

8. 植物ホルモン作用機作の分子機構の解明に向けて

これまで述べてきたように、ヒメツリガネゴケを実験材料として、オーキシンやサイトカニンに関わる様々な知見が見いだされてきた。また、いくつかの突然変異体が単離され、それらを用いた生理学的・遺伝学的な解析により細胞レベルでの作用が明らかにされてきた。しかしながら、突然変異の原因遺伝子は全く単離されておらず、ホルモン作用機作の遺伝子レベルでの分子機構の解明は行われてこなかった。これは、遺伝子地図が作られておらず、点突然変異体からの原因遺伝子単離が困難であったからである。そのため、オーキシンおよびサイトカニンの生合成系やシグナル伝達系、そして、それらの結果としての分化を制御する遺伝子の同定を行うことができなかった。そこで、我々は、(1)目印 (タグ) 付き突然変異体を作製しタグを指標とした原因遺伝子の単離と解析、(2)ジーントラップ法を用いた細胞・組織特異的の発現を示す遺伝子の単離と解析という2つのアプローチから研究を進めている。どちらの実験系も、出芽酵母で開発されたシャトルミュータジェネシス法 (Siefert et al. 1986, Ross-Macdonald et al. 1997) を応用して確立した、植物では初めての実験系である (Nishiyama et al. 投稿中)。この方法は、以下の3つのステップから構成されている (図4)。(1)大腸菌内でヒメツリガネゴケゲノム DNA ライブラリーを作成する。(2)大腸菌内でヒメツリガネゴケゲノム DNA 断片上にタグ (トランスポゾン) を挿入する。(3)タグが挿入されたヒメツリガネゴケゲノム DNA 断片を、相同組換えによりヒメツリガネゴケゲノム中に導入する。得られた突然変異体からは、タグを手がかりに突然変異の原因遺伝子を単離できるはずである。また、この方法はタグの中にレポーター遺伝子を入れておくことにより、ジーントラップ法に用いることができる。これらタグ付き突然変異体の解析から、多数の茎葉体形成変異系統が得られ、そのうちのいくつかはサイトカニン応答性が変異していた。また、ジーントラップ法では特定の細胞・組織にレポーター遺伝子の発現を示すトラップ系統が既に約130系統得られている。今後、ヒメツリガネゴケからホルモンの作用に関わる遺伝子を単離・解析すること

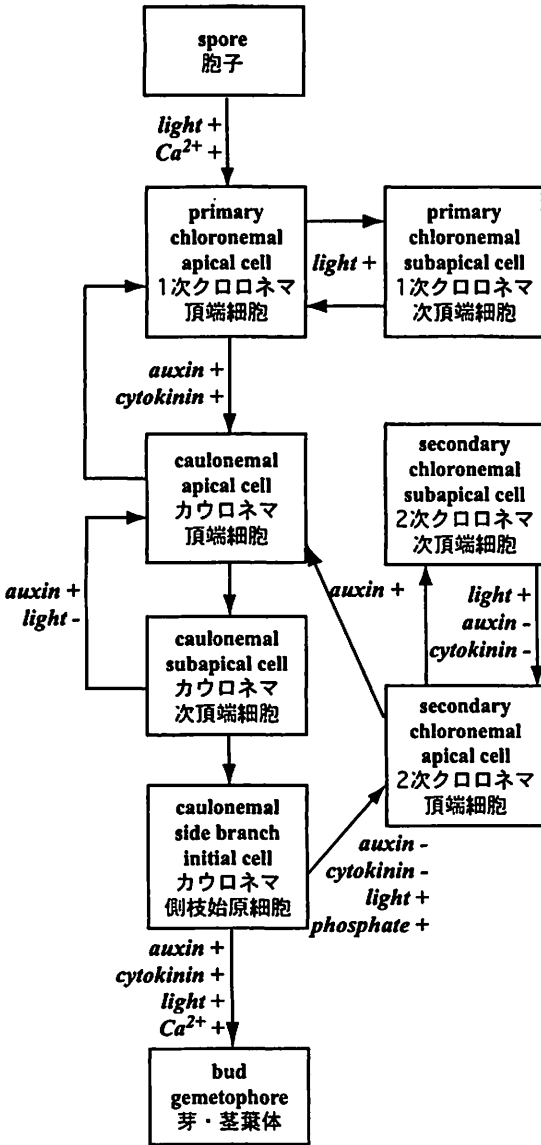
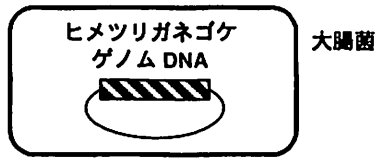
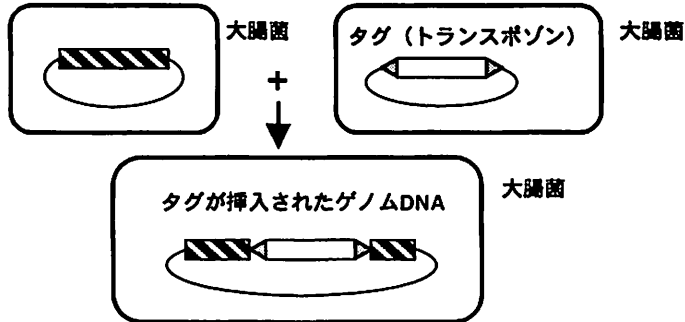


図3. オーキシン・サイトカニンおよびその他の因子の細胞分化への作用 (Cove & Knight 1993, Knight 1994)。

(1) 大腸菌内でのヒメツリガネゴケゲノムDNAライブラリーの作成



(2) 大腸菌を用いたヒメツリガネゴケゲノムDNAへのタグ (トランスポゾン) の挿入



(3) タグ挿入ゲノムDNAのヒメツリガネゴケへの導入

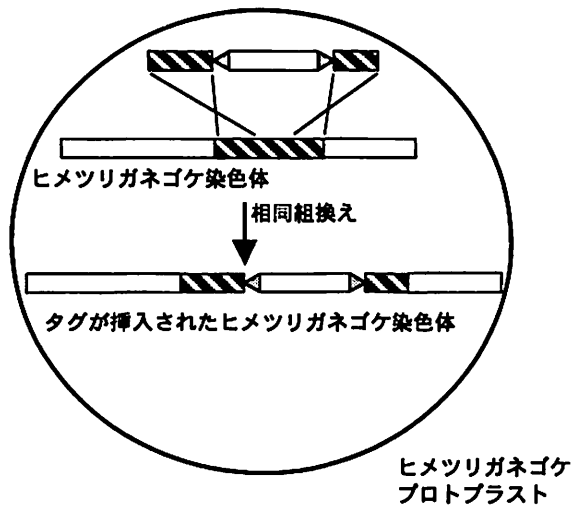


図4. ヒメツリガネゴケにおけるシャトルミュータジェネシスの模式図.

によって、オーキシシンやサイトカイニンが制御する分化の分子機構の解明に寄与できるのではないかと考えている。

このようにヒメツリガネゴケを用いた植物ホルモンに関する研究は新たな局面を迎えている。加えて、ヒメツリガネゴケは、容易に遺伝子ターゲティングがで

きるため、遺伝子の機能解析を試みようとする他分野の研究者にも注目されており、今後、ヒメツリガネゴケが実験材料として広く活用されていくと期待される。そして、ヒメツリガネゴケを用いた研究を通して、植物の生理現象を担う分子機構、それに伴った陸上植物の形態の進化機構が解明されることを期待したい。

付 記

ヒメツリガネゴケの入手法, 培養法, 実験法については, 当研究室のウェブページ (<http://www.nibb.ac.jp/~mhasebe>) で紹介している。参考にして頂けると幸いです。

謝 辞

本総説を書く機会を与えて下さった出口博則, 長谷川二郎両先生, ニセツリガネゴケについて有益な情報を頂いた畦浩二, 土永浩史両先生, 和名を考案して頂いた榊原恵子氏に感謝致します。また, 出口博則先生にはヒメツリガネゴケの学名についてご教示頂き重ねて感謝申し上げます。

引用文献

- Abel, W. O., Knebel, W., Koop, H.-U., Marienfeld, J. R., Quader, H., Reski, R., Schnepf, E. & Spörlein, B. (1989). A cytokinin-sensitive mutant of the moss, *Physcomitrella patens*, defective in chloroplast division. *Protoplasma* 152: 1-13.
- Ashton, N. W. & Cove, D. J. (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 154: 87-95.
- Ashton, N. W., Cove, D. J. & Featherstone, D. R. (1979a). The isolation and physiological analysis of mutants of the moss, *Physcomitrella patens*, which overproduce gametophore. *Planta* 144: 437-442.
- Ashton, N. W., Grimsley, N. M. & Cove, D. J. (1979b). Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427-435.
- Ashton, N. W., Schulze, A., Hall, P. & Bandurski, R. S. (1985). Estimation of indole-3-acetic acid in gametophyte of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 164: 142-144.
- Ashton, N. W., Cove, D. J., Wang, T. L. & Saunders, M. J. (1990). Developmental studies of *Physcomitrella patens* using auxin and cytokinin sensitivity mutants. In Pharis, R. P. & Rood, S. B. (eds.), *Plant Growth Substances*: 57-64. Springer-Verlag, Berlin.
- Bhatla, S. C. & Dhingra-Babbar, S. (1990). Growth regulating substances in mosses. In Chopra, R. N. & Bhatla, S. C. (eds.), *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*: 79-102. CRC Press, Florida.
- Brandes, H. & Kende, H. (1968). Studies on Cytokinin-controlled bud formation in moss protonemata. *Plant Physiol.* 43: 827-837.
- Cho, S. H., Chung, Y. S., Cho, S. K., Rim, Y. W. & Shin, J. S. (1999). Particle bombardment mediated transformation and GFP expression in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Cells* 9: 14-19.
- Cove, D. J. & Knight, C. D. (1993). The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell* 5: 1483-1488.
- Cove, D. J., Knight, C. D. & Lamparter, T. (1997). Mosses as model systems. *Trends in Plant Science*. 2: 99-105.
- Engel, P. P. (1968). The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Am. J. Bot.* 55: 438-446.
- Gorton, B. S. & Eakin, R. E. (1957). Developmental of gametophyte in the moss *Tortella caespitosa*. *Bot. Gaz.* 119: 31-38.
- Iwatsuki, Z. (1956). Bryological miscellanies. IV-V. *J. Hattori Bot. Lab.* 17: 59-63.
- Kammerer, W. & Cove, D. J. (1996). Genetic analysis of the result of retransformation of transgenic lines of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 250: 380-382.
- Knight, C. D. (1994). Studying plant development in mosses: the transgenic route. *Plant Cell Environ.* 17: 668-679.
- 小柴共一 (1998). オーキシンの生合成. 福田裕穂, 町田泰則, 神谷勇治, 服部東穂 (監). *植物ホルモンのシグナル伝達*: 27-38. 秀潤社, 東京.
- Lehnert, B. & Bopp, M. (1983). The hormonal regulation of protonema development in mosses. I. Auxin-cytokinin interaction. *Z. Pflanzenphysiol.*

- 110: 379-391.
- McClelland, D. J. (1987). Protonemal branching patterns in *Physcomitrella patens*. *Br. Bryol. Soc. Bull.* 49: 20-22.
- Perry, K. C. & Cove, D. J. (1986). Transfer RNA pool size and half lives in wild-type and cytokinin over-producing strains of the moss *Physcomitrella patens*. *Physiol. Plant.* 67: 680-684.
- Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Sakakibara, K., Kato, M. & Hasebe, M. Genetagging and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. 投稿中.
- Reski, R., Faust, M., Wang, X. H., Wehe, M. & Abel, W. O. (1994). Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. *Mol. Gen. Genet.* 244: 352-359.
- Reski, R. (1998). Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot. Acta* 111: 1-15.
- Reski, R. (1999). Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* 208: 301-309.
- Reutter, K., Atzorn, R., Hadeler, B., Schmülling, T. & Wang, T. L. (1998). Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in *budding* and in *plastid division*. *Planta* 206: 196-203.
- Ross-Macdonald, P., Sheehan, A., Roeder, G. S. & Snyder, M. (1997). A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 190-195.
- 佐野 浩 (1998). サイトカイニンの初期作用. 福田裕穂, 町田泰則, 神谷勇治, 服部東穂 (監). 植物ホルモンのシグナル伝達: 68-74. 秀潤社, 東京.
- Sawahel, W., Onde, S., Knight, C. D. & Cove, D. J. (1992). Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 315-316.
- Schaefer, D., Zryd, J.-P., Knight, C. D. & Cove, C. D. (1991). Stable transformation of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 418-424.
- Schaefer, D. G. & Zryd, J.-P. (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11: 1196-1206.
- Schumaker, K.D. & Dietrich, M.A. (1997). Programmed changes in form during moss development. *Plant Cell* 9: 1099-1107.
- Schumaker, K.D. & Dietrich, M.A. (1998). Hormone-induced signaling during moss development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 501-523.
- Seifert, H. S., Chen, E. Y., So, M. & Heferon, F. (1986). Shuttle mutagenesis: A method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 735-739.
- Tan, B. C. (1979). A new classification for the genus *Physcomitrella* B.S.G. *J. Hattori Bot. Lab.* 46: 327-336.
- Une, K. & Tateishi, Y. (1996). Life cycle of *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. subsp. *californica* (Crum & Anderson) Tan in Japan. *Hikobia* 12: 151-156.
- Von Schwartzberg, K., Kruse, S., Reski, R., Moffat, B. & Laloue, M. (1998). Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *Plant J.* 13: 249-257.
- Wang, T. L., Cove, D. J., Beutelmann, P. & Hartmann, E. (1980). Isopentenyladenine from mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 19: 1103-1105.
- Wang, T. L., Horgan, R. & Cove, D. (1981a). Cytokinins from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 68: 735-738.
- Wang, T. L., Beutelmann, P. & Cove, D. J. (1981b). Cytokinin biosynthesis in mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 68: 739-744.
- Ye, F., Gierlich, J., Reski, R., Marienfeld, J. R. & Abel, W. O. (1989). Isoenzyme analysis of cytokinin sensitive mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Science* 64: 203-212.

(受理: 1999年12月5日)