

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650100

研究課題名(和文) ライブイメージングと「くっつきアッセイ」～心皮合着過程の新しい解析手法の開発

研究課題名(英文) Post-genital protodermal fusion during carpel development in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

相田 光宏 (Aida, Mitsuhiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授

研究者番号：90311787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：花を咲かせる植物群である被子植物では、心皮と呼ばれる器官が合着(がっちゃん)により融合し、袋状の雌しべを形成する。袋状の雌しべは内部にある種子を保護するために優れた構造であり、被子植物の生存と生殖に有利にはたらく特徴であると考えられる。本研究では、この心皮合着の分子メカニズムを明らかにするために、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて合着部位を観察するための基本的な手法を確立した。また合着する部位の細胞の性質の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A characteristic feature of flowering plants is the fusion of carpels, which results in the formation of a closed, vessel-like structure of the gynoecium. This closed structure contributes to protection of ovules inside, separation of the sites of pollination and fertilization, and promotion of seed dispersal. Using the model plant *Arabidopsis thaliana*, we have established an imaging method that is useful for in-depth analysis of carpel fusion at the cellular and molecular levels. We also analyzed structural and molecular changes associated with carpel fusion in detail.

研究分野：植物発生学

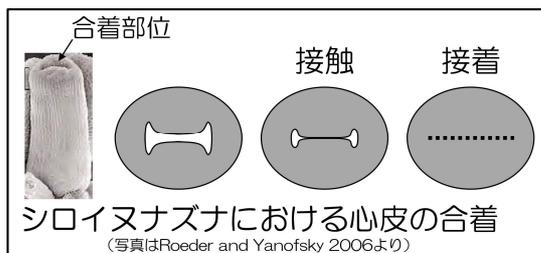
キーワード：雌しべ 細胞接着 細胞壁 生殖器官 表皮細胞 ペクチン クチクラ ATML1

### 1. 研究開始当初の背景

花を咲かせる植物群である被子植物では、心皮とよばれる扁平な器官が互いに合着(がっちゃん)することで、袋状の形をした雌しべをつくる。この袋状の形は、内部にある種子を外界から保護するために重要である。心皮の合着は、くっつきあう器官の表面どうしが互いに接触・接着して、ひとつながりの組織となる過程である。

これまで、心皮の合着は主に二つの側面から研究されてきた。ひとつはニチニチソウなどを用いた古典的な解析で、この研究から心皮の合着には表面の細胞どうしが相互作用することが重要であることが示唆された(Verbeke, 1992, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 43, 583-98)。もう一つはシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析で、これにより合着に関わるさまざまな遺伝子が同定された(Roeder and Yanofsky, 2006, in The Arabidopsis Book 4: e0075)。申請者も *SPT*、*CUC1*、*CUC2* とよばれる三つの遺伝子が協調して働き、シロイヌナズナの心皮の先端部分の合着を制御することを明らかにした(Nahar et al, 2012, Plant Cell Physiol 53, 1134-1143)。

しかし、心皮合着の際に起こるとされる細胞どうしの相互作用の実体はその後一切明らかにされておらず、合着にともなう起こる接着面の細胞の変化がどのようなものかについても分かっていない。また、合着の際の細胞の接着が、いつどのように起こるかについても明らかではなかった。この状況の打開には、細胞レベルでの形・生理的な変化と、遺伝子レベル・分子レベルでの発現を結びつけるような、新たな実験技術の開発が必要となっていた。



### 2. 研究の目的

心皮の合着における細胞どうしの相互作用と接着のしくみを明らかにするため、シロイヌナズナを用いた心皮のライブイメージング技術および、心皮合着の判定法である「くっつきアッセイ」の確立を目指す。これにより、心皮の合着にともなう細胞の変化、細胞間相互作用の実体、遺伝子機能の詳細を解明するための技術基盤が整う。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナから切除した花を生きた状態で培養する条件を検討し、これを用いて心皮の成長初期から接触・合着に至るまでの

過程を経時的に観察する実験系を確立する。これと平行して、心皮を臨界点乾燥処理することで組織をわずかに収縮させた後、組織の変形の様子を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察することで、細胞接着の有無を判定する。さらにクライオ SEM 法、組織切片、電子線トモグラフィーを行うことで、合着部位の細胞形態の詳細を明らかにする。また、組織の蛍光染色および免疫組織化学を行うことで、接着部位の細胞壁成分を明らかにするとともに、表皮特異的遺伝子である *ATML1* 遺伝子のレポーターを用いた発現解析を行い、合着部位の細胞の分化状態を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 1) 心皮合着部の形態変化

シロイヌナズナの若い心皮(心皮原基)は筒状の形状をもち、初めは先端部が開いている。発生が進むと内壁2カ所の向かい合う位置に隆起が形成され、それらが成長して接触が始まり、合着に至る。

組織切片および Cryo-SEM による合着部の形態観察を行ったところ、隆起表面にある表皮細胞の細胞壁は、接触が起こる前では丸く膨らんだ形状を持つが、接触が進むに従って扁平になり、最終的には互いにかみ合う形へと変形していくことが明らかになった。

#### 2) 心皮合着部におけるイメージング技術の確立

表皮特異的遺伝子 *ATML1* のレポーター(*pATML1::NLS:3xGFP*)を用いて、合着部における遺伝子発現を観察するための条件検討を行った。植物体より切除したつぼみの先端部を開いて雌しべを露出させ、MS アガー片に包埋して共焦点顕微鏡で観察したところ、良好な GFP シグナルが得られた。

次に、蛍光の経時観察のための培養条件を検討した。培地に添加する塩類および糖のさまざまな組み合わせについて検討したところ、もっとも良好な条件で培養開始後 72 時間まで成長が継続し、48 時間まで GFP の蛍光が持続した。

#### 3) 合着の判定方法の確立

臨界点乾燥後の合着部を SEM で観察すると、向かい合って接触する細胞の一部が互いに引っ張り合うような構造が観察され、これを「引っ張り構造」と名付けた。この構造が、臨界点乾燥による組織のわずかに収縮で非接着部に隙間が空き、接着部の細胞壁の変形により生じたものと仮定し、より詳細な解析を行った。

あらかじめ細胞壁の分解酵素であるペクチナーゼで処理したところ、引っ張り構造が解消されたことから、この構造は細胞壁中の何らかの成分に依存することが示唆された。一方、心皮接着面以外の本来は接着が起こらない組織について詳細な観察を行ったところ、これらの部位でも一部引っ張り構造

が観察された。このことから、引っ張り構造は組織の固定後のどこかの段階で生じたアーティファクトであり、本来の組織間の接着を反映したものではないことが示唆された。

#### 4) 合着部位の微細構造の解析

組織切片を作製し、走査透過電子顕微鏡法により取得した厚切り樹脂切片のトモグラフィ解析を行い、合着部位の微細構造を解析した。その結果、接触部の細胞壁表面には電子密度の高いクチクラ様の薄膜構造が観察された。この構造は、茎頂分裂組織や若い葉原基の表面で観察される前クチクラに類似していた。合着が進むにしたがって、クチクラ様構造は薄くなり、ところどころ消失している部位も観察された。クチクラは一般に表皮細胞どうしの接着を防ぐ役割を持つことから、心皮の合着の際にはクチクラの消失または変成がともなう可能性が示唆された。

一方、クチクラ様構造の直下には中程度の電子密度を持つ厚い層が存在していた。この層は組織内部にある細胞壁中葉と連続して存在しており、電子密度も中葉と同様であった。中葉はペクチンと呼ばれる細胞壁成分に富む構造で、隣り合う細胞どうしの接着を促進する役割を持つことが知られている。

次に、実際に合着部位の細胞壁にクチクラが存在するかどうかを検証するために、クチクラの染色剤であるオーラミンを用いて染色を行った。その結果、合着部位およびその周辺の細胞表面において明確な染色が見られた。染色の程度は様ではなく、向かい合う組織が接触した部位で特に強く観察された。このことは、心皮合着部位の表面の細胞壁にクチクラが存在すること、およびその組成は様でないことを示唆する。

最後に合着部位の細胞壁に、実際にペクチンが存在するかどうかを検証するために、ペクチンを認識する二種類のモノクローナル抗体 LM19 および LM20 を用いて免疫組織化学法による染色を行った。その結果、いずれの抗体でも明瞭な染色が見られた。以上から、合着部位の細胞壁はペクチンにとんだ部位を含むことが示唆された。

#### 5) 合着部位における遺伝子発現解析

心皮の合着にともなう表皮細胞の性質の変化を明らかにするために、表皮の運命決定を支配し、地上部器官の表皮細胞特異的に発現する転写因子 ATML1 の発現解析を行った。まず ATML1 遺伝子の転写活性をモニターするレポーター (*pATML1::NLS:3xGFP*) を用いて解析を行ったところ、接触部位と非接触部位でシグナルの強度に違いは見られなかった。一方、ATML1 タンパク質の蓄積をモニターするレポーター (*gATML1-3xGFP*) を用いて解析したところ、非接触部位に対して接触部位におけるシグナル強度が有意に低下していた。このことから、心皮の合着にともなう、ATML1 タンパク質レベルの低下が

起こることが示唆された。

次に、ATML1 タンパク質によって転写が制御されることが分かっているターゲット遺伝子 PDF1 の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析したところ、接触部位において PDF1 mRNA レベルの低下が起こることが明らかになった。このことは、合着にともなう ATML1 タンパク質の蓄積量が低下することとよく一致していた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計3件)

Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S (2016). Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. *Plant Cell Physiol* 57, 462-472. [doi: 10.1093/pcp/pcw027](https://doi.org/10.1093/pcp/pcw027).

Gonçalves B, Hasson A, Belcram K, Cortizo M, Morin H, Nikovics K, Vialette-Guiraud A, Takeda S, Aida M, Laufs P, Arnaud N (2015). A conserved role for *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes during ovule development. *Plant J* 83, 732-742. [doi: 10.1111/tjpi.12923](https://doi.org/10.1111/tjpi.12923).

Kamiuchi Y, Yamamoto K, Furutani M, Tasaka M, Aida M (2014). The *CUC1* and *CUC2* genes promote carpel margin meristem formation during Arabidopsis gynoecium development. *Front. Plant Sci.* 5, 165. [doi: 10.3389/fpls.2014.00165](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00165).

##### [学会発表](計9件)

Carpel Closure by Protodermal Tissue Adhesion in Arabidopsis thaliana. Aida M. 第58回日本植物生理学会年会シンポジウム”Augmented Symplasm: supracellular structure associated with the secondary organogenesis.” 2017/03/16. 鹿児島大学群元キャンパス(鹿児島県鹿児島市) Carpel closure by protodermal tissue adhesion in Arabidopsis thaliana. Tsujino R, Yokoi A, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M. 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction. Tucson Marriott University Park, Tucson, USA. 2016/03/18-03/23.

Carpel closure by protodermal tissue adhesion in Arabidopsis thaliana. Tsujino R, Yokoi A, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M. The 8th Plant Biomechanics International Conference. 愛知県名古屋市, 名古屋大学. 2015/11/30-12/04.

どうやって袋をつくるのか～心皮の発生について. 相田光宏. 遺伝学研究所研究会「植物の生殖成長期の発生を制御する分子機構」国立遺伝学研究所, 静岡県

三島市. 2015/11/06.

Shaping Plant Organs by the Meristems. Mitsuhiro Aida. 7th PSDB Annual National Convention, Philippine Society for Developmental Biology. Manila, Philippines. 2015/10/24.

表皮と表皮の出会い～心皮の後天的融合について. 市川ひとみ, 岩野恵, 辻野理恵子, 高山誠司, 相田光宏. 植物電子顕微鏡若手ワークショップ 2014. 理化学研究所 横浜研究所(神奈川県横浜市). 2014/12

Carpel closure by post-genital protodermal fusion in Arabidopsis thaliana. Tsujino R, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M. 5th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium, Horizons in Plant Biology. Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany. 2014/11/24-26.

表皮と表皮の出会い～心皮の後天的融合について. 相田光宏. 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学への期待」国立遺伝学研究所, 静岡県三島市. 2014/10/18.

シロイヌナズナ心皮における後天的融合過程の解析. 辻野理恵子, 市川ひとみ, 岩野恵, 高山誠司, 相田光宏. 日本植物学会第78回大会. 神奈川県川崎市, 明治大学. 2014/9/16.

〔図書〕(計1件)

植物学の百科事典 (2016). 日本植物学会 編, [丸善出版](#), ISBN-13: 978-4621300381. 成長様式, pp. 460-461, 相田光宏 (1項目の分担執筆).

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

プレスリリース

「透明作物を短時間で作製する手法 "TOMEI"の開発 ～作物の内部構造の解析やバイオマス定量解析が可能に～」2016/03/01  
<http://www.naist.jp/pressrelease/2016/03/000616.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相田 光宏 (Aida, Mitsuhiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号: 90311787