

令和元年5月20日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07408

研究課題名(和文) 葉断面からの再生をモデルとした種子植物の栄養繁殖の分子メカニズムの研究

研究課題名(英文) Studies on molecular basis for vegetative propagation of plant

研究代表者

木村 成介 (KIMURA, Seisuke)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40339122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物の*Rorippa aquatica*は、ちぎれた葉の根元側(基部側)の断面から不定芽を形成して無性的に繁殖している。本研究では、この植物をモデルとして、栄養繁殖のメカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、発生学的な解析により、葉の切断後、1日程度で基部側の維管束近傍の細胞分裂が活性化し、*de novo*な器官形成によって再生していることが明らかにした。また、経時的なトランスクリプトーム解析や生理学的解析の結果から、葉の切断後に極性輸送で基部側にオーキシンが輸送されて蓄積することが再生を誘導していることがわかった。また、シュートの再生にはサイトカニンが重要な役割を果たしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで適切なモデルが存在しなかったことにより研究がほとんど進んでいなかった栄養繁殖について、*R. aquatica*という新しいモデルを用いて研究することが特色である。本研究により、栄養繁殖のメカニズムについて多くの新たな知見が得られたことに大きな意義がある。また、本研究の成果を応用すれば、栽培作物などに高い再性能を付与できる可能性があり、有用作物の改良にも役に立つ。長期的に見れば優良な性質を持つ個体の大量培養、F1雑種系統の維持、絶滅危惧種の繁殖などにも応用可能であり、農業や園芸などの農学分野や保全生態学の分野で役に立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the mechanism of vegetative propagation in *Rorippa aquatica*, which is a perennial herbaceous semiaquatic plant. *R. aquatica* propagate asexually in nature by regeneration from leaf fragments. Morphological and anatomical observations showed that both root and shoot apical meristems emerged from the cutting surface of proximal side of the leaf fragment through cell proliferation at vascular tissue. To understand the underlying molecular mechanism for the regeneration, we performed time-series RNA-seq analyses and showed that many auxin-related genes were differentially expressed between the proximal and distal sides of leaf. The results of quantification of auxins and application experiments of auxins suggested that the accumulation of auxins in the proximal side of leaf fragments by polar auxin transport activates the molecular machinery for regeneration of plantlets in *R. aquatica*. We also found that cytokine is important for shoot regeneration.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：栄養繁殖 植物 不定芽 再生

1. 研究開始当初の背景

栄養繁殖は、植物が栄養器官から次世代を繁殖する無性生殖の一種であり、自然界では多くの植物が栄養繁殖により増殖している。北米の湖畔に生育するアブラナ科植物の *Rorippa aquatica* は、栄養繁殖能が高く、自然条件下において、ちぎれた葉の根元側（基部側）の断面から不定芽を形成して無性的に繁殖している。この一連の過程には特別な条件は必要なく、水分状況さえ適切であれば、葉断面に複数の不定芽を形成し植物体が再生する。植物の高い再生能は古くから知られ、形質転換や農業における種苗生産など様々な形で応用されており、今日の植物の関わる産業におけるその重要性は益々高まっていると言える。

一般に、植物の脱分化、再分化による植物体の再生は *R. aquatica* 以外の植物でも見られる現象であるが、植物ホルモンの添加など人工的な培地が必要である場合が多い。このような脱分化、再分化による再生過程については、モデル植物であるシロイヌナズナなどを用いた研究が進められているが、種子植物における栄養繁殖のメカニズムを分子レベルで解明しようとした研究例は少なかった。

R. aquatica はシロイヌナズナと近縁で、研究代表者の研究によりゲノム解読などが進められており、これまで適切なモデル植物が存在しなかったために研究を進めることができなかった栄養繁殖の研究をするためには理想的な研究材料である。そこで、本研究では、*R. aquatica* という葉の断面から再生する植物を新しいモデルとして、種子植物の栄養繁殖機構のメカニズムを解明しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* を用いて、葉断面からの栄養繁殖のメカニズムを解明することを目的とした。具体的には、以下の3点の研究を進めることで、栄養繁殖に重要な遺伝子群を同定し、その機能を明らかにすることを目指した。

- (1) 葉断面からの栄養繁殖の発生学および生理学的基盤の解析
- (2) トランスクリプトーム解析による栄養繁殖に重要な遺伝子群の解明
- (3) 栄養繁殖に重要な遺伝子の機能解析

3. 研究の方法

種子植物の栄養繁殖機構の解明を目指して、特殊な条件を必要とせず葉の断面から不定芽を再生するアブラナ科植物の *R. aquatica* を用いたトランスクリプトーム解析を行った。また、オーキシンなどの植物ホルモンや外的環境要因が不定芽形成に与える影響を調べ、オーキシンの極性輸送が不定芽形成に関係しているかどうかを調べた。得られた知見をもとに、再生過程に働く遺伝子群の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 葉断面からの栄養繁殖の発生学および生理学的基盤の解析

本研究ではまず、*R. aquatica* の葉片からの再生過程の詳細を明らかにするため発生学的解析をおこなった。これまでに行っていた再生過程のタイムラプス撮影や実体顕微鏡観察により、*R. aquatica* の葉を切断すると、葉片の基部側から1週間ほどで根が出現し、また、10日~12日ほどでシュートが観察できるようになることがわかっていった。再生中の組織の切片を作成し、再生過程を経時的に観察したところ、栄養分体は *de novo* な器官形成によって再生しており、維管束近傍、おそらく形成層の細胞に由来することが明らかになった。また、葉を切断して数日後には分裂している細胞が観察できたが、EdU によって分裂細胞を可視化することで、葉を切ってから1日目に細胞分裂が活発になっていること確認することができた。qRT-PCR によって細胞分裂に関与することが知られている *CYCLINB1;1* (*CYCB1;1*) の発現解析を行ったところ、葉の切断から1日以内に、栄養分体が再生する葉片基部側において、発現の上昇がみられた。以上の結果から、*R. aquatica* では、葉の切断後、1日程度で基部側の維管束近傍の細胞分裂が活性化し、*de novo* な器官形成によって根やシュートが再生していることが明らかとなった。

(2) トランスクリプトーム解析による栄養繁殖に重要な遺伝子群の解明

R. aquatica をモデルとしてトランスクリプトーム解析などを行うためには、ゲノム配列情報が必要となる。これまでの研究で、*R. aquatica* のゲノムをイルミナおよび PacBio プラットフォームでシーケンシングし、1,797本の配列からなるドラフトゲノム (Genome size = 440Mbp, $N_{50} = 1,355,881$ bp) を得ていた。このゲノム情報をリファレンスとして、再生過程のトランスクリプトーム解析を行った。

R. aquatica の栄養繁殖は、葉片の先端部側の断面からは再生せず、基部側の断面からのみ再生するという特徴がある。そこで、先端部側と基部側を比較することで、再生に必要な遺伝子を絞り込むことができると考えた。経時的な遺伝子発現変動を観察するため、0、1、3、6、9、12、15、18、21時間後および1、2、3、4、6、8、10、12日後の計17点について、葉片の先端部側と基部側の比較トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、切断後初期の段階ではオーキシン応答性の遺伝子の発現が顕著に上昇していることが明らかとなった。オーキシンの内生量を測定したところ、*R. aquatica* では、葉の切断後に基部側で IAA-Asp などの蓄積がみられた。シロイヌナズナでは同様の蓄積は観察されなかった。オーキシンやオーキシン極性輸送阻害剤の添加実験により、オーキシンが根の再生を促進することもわかった。これらの結果から、*R. aquatica* では、葉の切断後に極性輸送で基部側にオーキシンが輸送されて蓄積することが再生のトリガーになっていると考えられた。

トランスクリプトーム解析の結果から、葉の切断後しばらくするとサイトカニン関係の遺伝子の発現に変動がみられた。サイトカイニンの内生量を測定すると、サイトカイニン前駆体の量がシュートの再生してくるタイミングで上昇することがわかった。また、サイトカニンを添加するとシュートの再生が促進された。以上の結果から、再生過程におけるシュートの再生にはサイトカニンが重要であることが示された。

(3) 栄養繁殖に重要な遺伝子の機能解析

トランスクリプトーム解析の結果を解析すると、切断後、維管束幹細胞の維持に関わる遺伝子群の発現が変動していた。このことから、維管束の細胞が再生に関わると考えられ、発生学的な解析の結果と一致した。また、シロイヌナズナなどの組織培養の研究から、*in vitro* の再生に関わる遺伝子が多く同定されているが、これらの遺伝子の発現は *R. aquatica* の再生過程においても葉片の基部側のみで上昇していた。*R. aquatica* では、植物ホルモンの添加なしに再生関係の遺伝子群が活性化すると考えられ、現在、切断後の早期に発現が上昇する転写因子などの機能解析をすすめる準備をしている。

(4) その他の成果

R. aquatica がなぜ葉の断面から再生できるのかを明らかにするため、シロイヌナズナとの比較解析をおこなった。*R. aquatica* とシロイヌナズナの葉を切断して湿った状態においておくと、シロイヌナズナの葉はすぐに褐変していくのに対して、*R. aquatica* の葉は長期間褐変が抑えられ、緑色に保たれていた。また、葉片の光合成活性を測定すると、シロイヌナズナの葉片の光合成活性はすぐに低下するのに対して、*R. aquatica* の場合は光合成活性の低下が抑えられていた。葉の横断切片を観察すると、*R. aquatica* の葉は、海綿状組織がほとんど見られず、維管束周りの柔組織も含めて、葉の全体的に細胞が密に詰まっていた。以上の結果から、*R. aquatica* が葉の断面から再生できるのは、葉の構造により切断後も組織が長持ちし、また、細胞が密であるので根の再生に必要なオーキシンが十分量供給されるからではないからかと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Saori Miyoshi, Seisuke Kimura, Ryo Ootsuki, Takumi Higaki, Akiko Nakamasu, Developmental analyses of divarications in leaves of an aquatic fern *Microsorium pteropus* and its varieties, *PLOS ONE* (2019) 14: e0210141 | 10.1371/journal.pone.0210141 (査読あり)
2. Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Plant Temperature Sensors, Review, *sensors* (2018) 18: 4365 | 10.3390/s18124365 (査読あり)
3. Kaoru Okamoto Yoshiyama, Seisuke Kimura, Ser-Gln sites of SOG1 are rapidly hyperphosphorylated in response to DNA double-strand breaks, *Plant Signaling and Behavior* (2018) 13: e1477904 | 10.1080/15592324.2018.1477904 (査読あり)
4. Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yuki Okegawa, Kaori Kaminoyama, Manabu Fujie, Yasunori Ichihashi, Tetsuya Kurata, Ken Motohashi, Ihsan Al-Shehbaz, Neelima Sinha, Seisuke Kimura, Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions in North American Lake cress, *Scientific Reports* (2018) 8: 3302 | 10.1038/s41598-018-21646-w (査読あり)
5. Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Ryotaro Yamada, Masahiko Yoshimura, Takaho A. Endo, Seisuke Kimura, Hua Zhang, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara, Keiko U. Tori, Chemical hijacking of

- auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair, *Nature Chemical Biology* (2018) 14: 299-305 | 10.1038/nchembio.2555 (査読あり)
6. Kaoru Okamoto Yoshiyama, Kaori Kaminoyama, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Increased phosphorylation of Ser-Gln sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell* (2017) 29: 3255-3268 | 10.1105/tpc.17.00267 (査読あり)
 7. Akiko Nakamasu, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, Asymmetries in leaf branch are associated with differential speeds along growth axes: A theoretical prediction, *Developmental Dynamics* (2017) 246: 981-991 | 10.1002/DVDY.24587 (査読あり)
 8. Hokuto Nakayama, Neelima Sinha, Seisuke Kimura, How Do Plants and Phytohormones Accomplish Heterophylly, Leaf Phenotypic Plasticity, in Response to Environmental Cues, *Frontiers in Plant Science* (2017) 8: 1717 | 10.3389/fpls.2017.01717 (査読あり)
 9. Yaichi Kawakatsu, Hokuto Nakayama, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, A *GLABRA1* ortholog on LG A9 controls trichome number in the Japanese leafy vegetables Mizuna and Mibuna (*Brassica rapa* subsp. *Nipposinica* L. H. Bailey): evidence from QTL analysis, *Journal of Plant Research* (2017) 130: 539-550 | 10.1007/s10265-017-0917-5 (査読あり)

[学会発表](計 20 件)

1. アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の茎生葉上の新奇分裂組織を用いた栄養繁殖、池松朱夏、佐々木亜美、天野瑠美、坂本智昭、木村成介、第60回日本植物生理学会年会、名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市)、2019年3月13日-3月15日(ポスター)
2. *Rorippa aquatica* の栄養繁殖を調節する植物ホルモンの解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、坂本智昭、笠原博幸、榊原均、Ali Ferjani、木村成介、第60回日本植物生理学会年会、名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市)、2019年3月13日-3月15日(ポスター)
3. *Rorippa aquatica* は茎生葉上の新奇分裂組織を栄養繁殖に用いる、池松朱夏、木村成介、新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ、小豆島ふるさと村(香川県、小豆郡)、2018年10月4日~6日(口頭)
4. *Rorippa aquatica* を用いた葉の断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、木村成介、新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ、小豆島ふるさと村(香川県、小豆郡)、2018年10月4日~6日(口頭)
5. Adaptation of plants to aquatic environments: Studies on heterophylly and vegetative propagation in semi-aquatic plant, *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, Ikematsu Shuka, Tomoaki Sakamoto, Rumi Amano, The 46th Naito Conference on "Mechanisms of Evolution and Biodiversity", CHA[^]TERAISE[^] Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan, Oct.2-5, 2018 (poster)
6. *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、坂本智昭、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018年9月14日~16日(ポスター)
7. *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、坂本智昭、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物形態学会第30回大会、広島県情報プラザ(広島県広島市)、2018年9月13日(ポスター)
8. (招待講演) Adaptation of plants to aquatic environments: Studies on vegetative propagation in semi-aquatic plant, *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, 第59回日本植物生理学会年会シンポジウム「Amazing Development -Revealing Unusual Developmental

Phenomena in Plants 植物が見せるユニークな発生および成長様式を読み解く」, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2018年3月28日 (口頭、英語)

9. *Rorippa aquatica*の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、桶川友季、本橋健、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2018年3月28日-3月30日 (ポスター)
10. *Rorippa aquatica*の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物学会第81回大会、東京理科大学 (千葉県・野田市) 2017年9月8-10日 (口頭)
11. *Rorippa aquatica*における栄養繁殖とオーキシンの関係の解析、桃井理沙、天野瑠美、中山北斗、小島美紀子、竹林裕美子、榊原均、木村成介、日本植物学会第81回大会、東京理科大学 (千葉県・野田市) 2017年9月8-10日 (ポスター)
12. *Rorippa aquatica*の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、桶川友季、本橋健、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物形態学会第29回大会、東京理科大学 (千葉県・野田市) 2017年9月7日 (ポスター)
13. 非モデル植物*Rorippa aquatica*にみられる栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、坂本智昭、桃井理沙、郡司玄、Ali Ferjani、木村成介、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市) 2017年3月16日~18日 (口頭)
14. (招待講演) Adaptation of plants to aquatic environments: Studies on heterophylly and vegetative propagation in semi-aquatic plant, *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, CSRS seminar, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan, Jan. 24, 2017
15. Developmental and molecular studies on the mechanism of vegetative propagation in *Rorippa aquatica*, Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Risa Momoi, Shizuka Gunji, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference, Awaji, Japan, Nov.29-Dec. 2, 2016
16. (招待講演) Vegetative propagation in *Rorippa aquatica*: Understanding plant regeneration using non-model species, Rumi Amano, Risa Momoi, Seisuke Kimura, The 45th Plant Biotechnology Symposium "International Plant Meeting in Kyoto 2016- Plant Development and Environment-", Kyoto Sangyo University, Kyoto, Nov 25, 2016
17. (招待講演) 水中への適応戦略としての異形葉性と栄養繁殖、木村成介、日本植物学会第80回大会シンポジウム「Induced Development: 環境要因に誘発される発生の多様性と共通性」、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)、2016年9月16日
18. *Rorippa aquatica*の栄養繁殖とオーキシンの関係の解析、桃井理沙、天野瑠美、中山北斗、木村成介、日本植物学会第80回大会、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)、2016年9月16日~19日
19. アブラナ科 *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、郡司玄、Ali Ferjani、木村成介、日本植物学会第80回大会、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)、2016年9月16日~19日
20. アブラナ科 *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、郡司玄、Ali Ferjani、木村成介、日本植物形態学会第28回大会、琉球大学 (沖縄県・中頭郡)、2016年9月15日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.seisukekimura.com>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：フェルジャニ アリ

ローマ字氏名：FERJANI, Ali

研究協力者氏名：池内 桃子

ローマ字氏名：IKEUCHI, Momoko

研究協力者氏名：坂本 智昭

ローマ字氏名：SAKAMOTO, Tomoaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。