

令和元年6月10日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18572

研究課題名(和文) 切断組織の再生を制御する植物ホルモンと遺伝子の時空間的制御

研究課題名(英文) Spatio-temporal regulation of phytohormone and gene expression involved in tissue-reunion.

研究代表者

朝比奈 雅志 (ASAHINA, Masashi)

帝京大学・理工学部・准教授

研究者番号：00534067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シロイヌナズナの切断傷害を受けた花茎の癒合過程における、より詳細な時空間的な変化を明らかにすることを目的に、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法によって回収した極微量組織片からの内生植物ホルモン分析、RNA-Seq法を用いたトランスクリプトーム解析を行い、切断処理直後の遺伝子発現に関して新たな知見を得た。

さらに、ANAC071転写因子ファミリーが二次的に形成される導管組織の分化に深く関わっていること、胚軸間接ぎ木の接着過程における維管束組織の再生・再分化にも関わっていることを明らかとしたほか、RAP2.6L転写因子の接ぎ木接着過程における生理機能の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だ知見が乏しい傷害を受けた組織から維管束や表皮組織などが再生するリプログラミングの過程について、分子遺伝学的手法とともに、レーザーマイクロダイセクションなどの新たな技術と、微細構造観察・機器分析法を融合させた研究手法を取り入れて行い、極微量組織片からの内生植物ホルモン分析・遺伝子発現解析法を確立し、シロイヌナズナ切断組織再生の分子メカニズムに関する新たな知見を得た。

本研究によって得られた成果は、世界的にも重要な農業技術である接ぎ木への応用が期待できるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, to show the detailed spatial and temporal gene expression profile and localization of phytohormone in cells undergoing tissue reunion in incised Arabidopsis flowering stem, analysis of gene expression and quantification of phytohormone using different tissue cells separately collected by laser micro-dissection (LMD) were performed. From these results, we showed detailed spatio-temporal patterns of selected gene expression and endogenous phytohormone that correlate with tissue reunion.

In addition, we suggested that ANAC-TFs are involved in cell proliferation of vascular tissue during tissue-reunion process in incised Arabidopsis flowering stem and grafting of Arabidopsis seedlings. We also reported that JA and RAP2.6L are not needed for cell proliferation related to graft union of Arabidopsis seedlings.

研究分野：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ 組織癒合 植物ホルモン 接ぎ木 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は分化した細胞であっても、一定の条件下で単離・培養することで、個体を再生する分化全能性を持つ (Sugimoto, 2015; Ikeuchi et al. 2015)。また植物個体内であっても、茎を部分的に切断された場合、切断された組織はそれまでの細胞機能を転換し、一過的にメリステマティックな状態へと移行する現象が見られる。そして細胞分裂を開始して失われた組織を分化させ、元の組織同士を癒合させることで、個体機能の回復を図る (Flaishman et al. 2003)。このような分離した組織の癒合は植物では通常起こらないが、雌しべ形成時の心皮の結合や、傷害・接ぎ木などによる組織癒合時には、例外的に観察することができる (Kollmann & Glockmann, 1985; 朝比奈・佐藤, 2004; Asahina & Satoh, 2015; Notaguchi et al. 2015)。しかし、維管束の再生に関してはオーキシンが重要な因子である事が示唆されているものの (Sachs, 2000)、組織癒合に関する分子的な解析は、世界的にも全くなされていなかった (Reid & Ross, 2011)。

そこで申請者らは、作物生産において土壌病害を回避する目的で接ぎ木が行われているキュウリやトマトを用いて、切断された胚軸が癒合する過程を生理学的に解析し、子葉から供給されるジベレリンが皮層の細胞分裂開始に必須であり、同時に細胞接着に働くペクチンの合成を促進することを明らかにした。さらに、導管液中の無機元素も、組織癒合に必須であることを示した。また、シロイヌナズナ切断花茎を用いた研究から、組織癒合に必須な2種類の転写因子と植物ホルモンによる制御、組織癒合応答性遺伝子の同定に成功した。さらに、細胞壁酵素遺伝子 XTH19, 20 が、転写因子の一種によって直接制御を受け、癒合過程での組織再生に関わっている可能性を示唆した。興味深いことに、シロイヌナズナ花茎とキュウリやトマト胚軸では共通したプロセスが観察される一方、反応する組織や必要とするホルモンに違いがあることも判明した。さらに、申請者らが行った組織別遺伝子発現解析の結果、傷害部位では数細胞レベルで異なったパターンでの遺伝子発現が確認されており、傷害を受けてからの遺伝子発現が厳密に制御されている可能性が示された。

2. 研究の目的

植物組織において、傷害によって引き起こされる遺伝子発現と、組織癒合の過程でおこる表皮や維管束組織等の再生に関する分子的な知見は未だ乏しい。組織再生・器官分化が、茎の内部組織で起こる現象であるため、従来の遺伝子発現解析や機器分析では、その動態の解析が困難であるためである。そこで本研究では、シロイヌナズナの切断傷害を受けた花茎が、失った表皮や維管束組織を再生/再分化させるプロセスに注目した。特に、組織再生に関わる転写制御因子と植物ホルモンによる遺伝子ネットワークの調節機構について、イメージング技術を用いて解析する。さらに、花茎において傷害を受けるまで細胞の脱分化を抑制しているメカニズムを明らかにすることで、植物特有の細胞分裂の再開と組織分化の協調的制御機構を明らかとすることを目的として (1) ANAC071、RAP2.6L など癒合関連遺伝子の詳細な発現部位の特定と時空間的变化、(2) 傷害を受けた組織において植物ホルモン合成誘導が誘導される部位の特定、(3) 維管束などの組織再生に必要な遺伝子の同定などを目指した。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における組織特異的な遺伝子発現解析

1ヶ月程度栽培したシロイヌナズナの花茎を、Asahina et al. (2011) の方法に従って切断処理を行い、癒合部を含む約 5-10 mm の領域を切断1時間後、1日後、3日後、5日後、7日後ごとにそれぞれサンプリングした。サンプリングした花茎を SCEM コンパウンドに包埋し、ドライアイス冷却ヘキササンで凍結後、川本法に従って凍結ミクロトームにて切片を作成した。この凍結切片から、LMD 装置を用いて組織癒合部の花茎を、切断部上側、下側、非切断部の領域に区分し、さらに表皮・皮層、維管束、髄の組織別に分けて回収した。その後、回収した組織から RNA を抽出し、QRT-PCR を用いた定量的遺伝子発現解析と RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。

(2) 組織癒合過程における植物ホルモンの時空間的局在変化

シロイヌナズナ切断花茎の植物ホルモンの組織別局在変化を明らかにするため、遺伝子発現解析と同様に、LMD を用いて切断花茎を部位・組織別に分けて回収した。回収した極微量組織から、80%メタノールを用いて植物ホルモンを抽出し、C18 カラムを用いて精製した。その後、LC-MS/MS を用いて植物ホルモン (オーキシン、ジャスモン酸、ジベレリン、サリチル酸、サイトカイニン類など) の一斉定量解析 (ホルモノーム解析) を行った。

(3) ANAC071、RAP2.6L 転写因子の生理機能と下流因子

シロイヌナズナ切断花茎の癒合には、ANAC071、RAP2.6L 転写因子が関与していることが既に分かっている。そこで、ANAC071、RAP2.6L 転写因子の生理機能と下流因子の探索のため、これらの転写因子や植物ホルモン関連変異体/形質転換体/変異株を用いて、切断花茎の癒合過程、及び胚軸間接ぎ木過程における微細構造の形質調査を行うとともに、癒合過程での遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 組織癒合過程における組織特異的な遺伝子発現解析

組織癒合過程において重要な転写因子である ANAC071 (Asahina et al. 2011) は、切断花茎の

癒合過程における細胞分化の他、シロイヌナズナ芽生えの接ぎ木接着過程における維管束組織の細胞分裂にも関与していることが明らかとなっている (Matsuoka et al. 2016)。ANAC071 は、切断処理 1 日後に傷側上部で発現が誘導され、特に「表皮・皮層」において高い発現が見られており、ANAC071 と同様に組織癒合に重要な転写因子である ANAC096 は、切断処理 1 日後の傷側上部の「表皮・皮層」、傷側下部の「維管束」において高い発現量を示していた。これら 2 つの転写因子は、「髄」では、発現量が低い傾向が見られ、細胞の分裂・伸長が開始する切断処理 3 日後では、全ての組織において発現量が低下していた。また、ANAC071・096 遺伝子のホモログである ANAC011 は、切断処理 1 日後の「維管束」で高い発現が見られたが、「表皮・皮層」や「髄」では、ほとんど発現していなかった。

この他、シロイヌナズナ組織癒合過程に応答することが報告されている遺伝子群 (Asahina et al. 2011) や、それらのホモログと考えられる遺伝子についても qRT-PCR 法を用いた発現解析を行い、時空間的発現変化を明らかにした。また、LMD 法を用いて回収した極微量組織からの RNA-seq 法を行い、切断処理 1 日後の花茎における部位・組織別遺伝子発現を網羅的に明らかとした (図 1)。

(2) 植物ホルモンの時空間的局在変化

シロイヌナズナ切断花茎の癒合に重要な植物ホルモンである IAA は、切断処理 1 時間後では、傷側上部の IAA の内生量が傷側下部と比較して高くなっており、特に維管束においては、下部の維管束と比べて、3 倍程度高い内生量を示した。切断処理 1 日後においては、切断処理 1 時間後より傷側上部の全ての組織において、IAA の内生量が減少していた (図 1)。

その他、JA 類や ABA、サイトカイニン類などの植物ホルモンについても、非切断処理から切断処理 1 時間後、1 日後といった組織癒合過程初期における組織ごとの内生量変化を示すことができた。今回の解析では GA は検出できなかったが、今後、LMD 法を用いた植物ホルモン分析の際の精製方法の改善や分析機器の性能の向上によって、より少ないサンプル量からの微量な植物ホルモンの分析が可能となると考えられた。

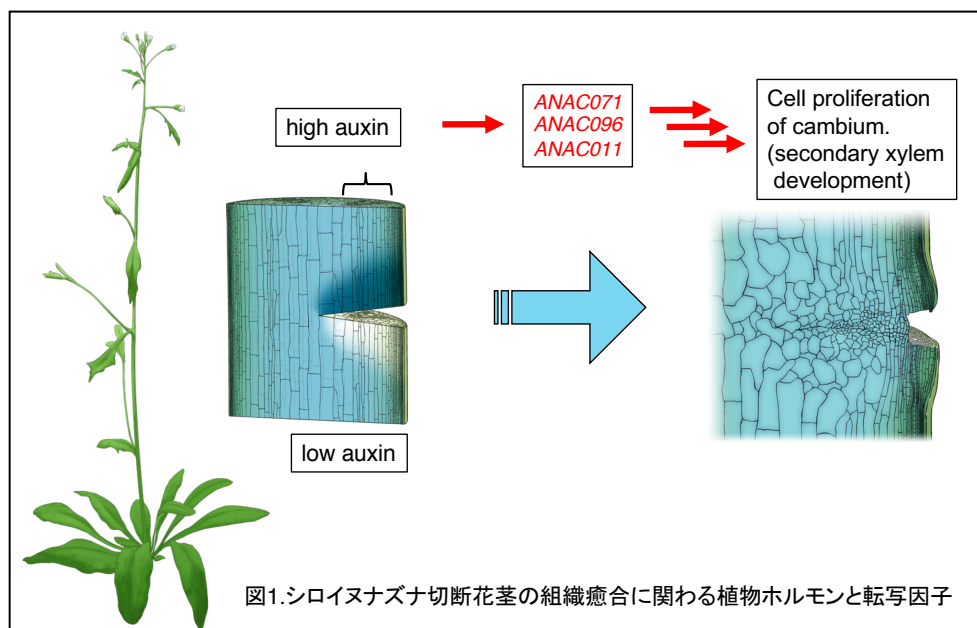


図1.シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に関わる植物ホルモンと転写因子

(3) ANAC071、RAP2.6L 転写因子の生理機能と下流遺伝子

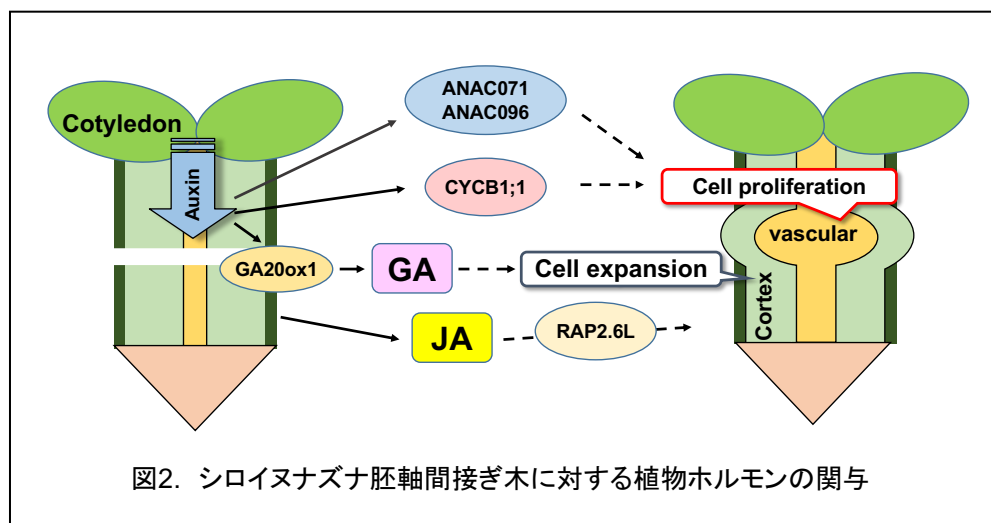
シロイヌナズナの胚軸における傷の修復を明らかにするために、実体顕微鏡下でシロイヌナズナ芽生えの胚軸接ぎ木を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、接ぎ木 7 日後における接ぎ木部は、維管束組織が細胞分裂により肥大し、肥大した維管束組織を包むように皮層の細胞が成長を起こしていた。

次に、接ぎ木過程における植物ホルモンの作用を調べるために、植物ホルモン阻害剤の投与を行った。その結果、ジベレリン合成阻害剤は、皮層細胞の成長だけを抑制したのに対して、オーキシン極性輸送阻害剤は、皮層細胞の成長と維管束組織の分裂を抑制した。オーキシン阻害剤の投与は、ジベレリン合成遺伝子の発現も減少させた。このことから、ジベレリンはオーキシンによって生合成が誘導され、皮層細胞の成長を促進していることが示唆された。

また、ANAC071 とそのホモログである ANAC096 は、ともに接ぎ木部で遺伝子発現の誘導が起こったが、オーキシン阻害剤の投与により、その発現が抑制された。さらに ANAC071 と ANAC096 の二重欠損株においては、接ぎ木過程における植維管束組織の細胞分裂の抑制が観察された。以上のことから、接ぎ木過程におけるオーキシンによる維管束組織の細胞分裂の促進には、ANAC071、ANAC096 転写因子が関与していることが明らかとなった。

直接的なターゲット遺伝子の解明には至らなかったが、以上の結果及び子葉を用いた維管束細胞分化誘導アッセイを用いた予備的実験などの結果から、維管束幹細胞の分化誘導や増殖に関わる遺伝子が、ANAC071 の下流候補遺伝子として考えられた。

次に、シロイヌナズナの胚軸間接ぎ木における RAP2.6L と、その発現を調節すると考えられるジャスモン酸 (JA) に注目し、胚軸間接ぎ木への役割を明らかにすることを目的として行った。その結果、JA と RAP2.6L 遺伝子は傷害や胚軸間接ぎ木の過程で誘導されてくるものの、癒合過程で生じる細胞増殖には直接関与していないことが明らかとなった (図 2)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 朝比奈雅志, 植物の接ぎ木接着に関わる植物ホルモンの分子機構. (2018) アグリバイオ, vol2(11), p8-12, 北隆館 (査読無し)
- ② Matsuoka K, Yanagi R, Yumoto E, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, RAP2.6L and jasmonic acid-responsive genes are expressed upon Arabidopsis hypocotyl grafting but are not needed for cell proliferation related to healing. (2018) Plant Molecular Biology. 96(6) pp 531-542 (査読有り)
DOI: 10.1007/s11103-018-0702-4
- ③ Xu D, Miao J, Yumoto E, Yokota T, Asahina M, Watahiki M, YUCCA9-mediated auxin biosynthesis and polar auxin transport synergistically regulate regeneration of root systems following root cutting. (2017) Plant and Cell Physiology, 58 (10), 1710-1723 (査読有り)
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx107>
- ④ Matsuoka K, Sugawara E, Aoki R, Takuma K, Terao-Morita M, Satoh S, Asahina M. Differential cellular control by cotyledon-derived phytohormones involved in raft reunion of Arabidopsis hypocotyls. (2016) Plant and Cell Physiology. 57 (12): 2620-2631 (査読有り)
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw177>
- ⑤ 松岡啓太, ハニエビダディ, 朝比奈雅志, 佐藤忍, 地上部ジベレリンによる根の機能制御, (2016) 植物の生長調節, 51(2) p116-122 (査読有り)
https://doi.org/10.18978/jscrp.51.2_116

[学会発表] (計 32 件)

- ① 山田一貴、中野渡幸、野田幸男、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、Tissue-specific analysis of gene expression and endogenous phytohormone in tissue-reunion process of Arabidopsis incised flowering stem using laser microdissection. 植物生理学会第 59 回年会、2018 年
- ② 松岡啓太、飯野宏美、野沢直由、近藤侑貴、佐藤忍、朝比奈雅志、ANAC genes are involved in the formation of wound-induced cambium during tissue-reunion process. 植物生理学会第 59 回年会、2018 年
- ③ 横川裕理、ハニエビダディ、小野公代、小野道之、松岡啓太、朝比奈雅志、岩井宏暁、佐藤忍、シロイヌナズナ切断花茎におけるエクспанシンの発現と機能の解析、植物生理学会第 59 回年会、2018 年
- ④ 松岡啓太、朝比奈雅志、傷害誘導性 ANAC 転写因子の機能解析 -柔細胞から形成層細胞への転換、2018 年度植物細胞周期合同セミナー、2018 年
- ⑤ 山田一貴、中野渡幸、野田幸男、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、LMD 法を用いた時空間的遺伝子発現解析とホルモン分析、2018 年度植物細胞周期合同セミナー、2018 年
- ⑥ Yamada K, Nakanowatari M, Noda Y, Yumoto E, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Spatio-temporal analysis of gene expression and phytohormones during

- tissue-reunion in incised Arabidopsis flowering stems. *International Plant Molecular Biology* 2018、2018 年
- ⑦ 朝比奈雅志、松岡啓太、佐藤忍、われても末に? 切断組織の修復と再生、植物学会第 82 回大会、2018 年
 - ⑧ 山田一貴、中野渡幸、湯本絵美、野田幸男、横田孝雄、山根久和、筒井大貴、野田口理孝、鈴木孝征、佐藤忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における植物ホルモンと遺伝子発現の時空間的解析、植物化学調節学会第 53 回年会、2018 年
 - ⑨ 松岡啓太、後藤香菜、吉田一希、近藤侑貴、佐藤忍、朝比奈雅志、組織癒合に関わる ANAC 転写因子の下流遺伝子の解析、植物化学調節学会第 53 回年会、2018 年
 - ⑩ 朝比奈雅志、植物切断組織における癒合過程の時空間的解析、第 9 回植物電子顕微鏡若手ワークショップ、2018 年
 - ⑪ Yamada K, Nakanowatari M, Yumoto E, Noda Y, Koike R, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Spatio-temporal analysis of gene expression and phytohormones during tissue-reunion in incised Arabidopsis flowering stems. 第 60 回日本植物生理学会年会、2018 年
 - ⑫ 朝比奈雅志、植物切断組織の癒合に関与する植物ホルモンと転写因子の時空間的制御、第 53 回京都バイオテクシンポジウム「再生と改変～植物の再分化能力の秘密に迫る～」、2018 年
 - ⑬ 朝比奈雅志、なぜ接ぎ木が可能になるのか～接ぎ木接着にかかわる植物ホルモンの分子メカニズム、未来へのバイオ技術勉強会「接ぎ木で産業革命を興す!」、2018 年
 - ⑭ 朝比奈雅志、植物切断組織の癒合と植物ホルモン、第 7 回植物電子顕微鏡若手ワークショップ、2017 年
 - ⑮ 中野渡幸、山田一貴、松岡啓太、湯本 絵美、横田 孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、Spatio-temporal analysis of gene expression and phytohormones during tissue-reunion in incised Arabidopsis flowering stem using laser micro-dissection. 第 58 回植物生理学会年会、2017 年
 - ⑯ Asahina M, Nakanowatari M, Matsuoka K, Pitaksaringkarn W, Satoh S, Molecular mechanisms regulating tissue reunion in incised plant tissues. 第 58 回植物生理学会年会、2017 年
 - ⑰ 松岡啓太、松倉有輝、川尻佳樹、佐藤忍、朝比奈雅志、Functional Analysis of NAC-type Transcriptional Factors during Tissue Reunion in Arabidopsis flowering stem、第 58 回植物生理学会年会、2017 年
 - ⑱ 松岡啓太、松倉有輝、川尻佳樹、佐藤忍、朝比奈雅志、ANAC 転写因子は傷害部の癒合における二次的な形成層の形成に関わる、2017 年度植物細胞周期合同セミナー、2017 年
 - ⑲ 山田一貴、中野渡幸、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、LMD 法を用いた時空間的遺伝子発現解析と植物ホルモン分析、2017 年度植物細胞周期合同セミナー、2017 年
 - ⑳ Nakanowatari M, Yamada K, Matsuoka K, Yumoto E, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Spatio-temporal analysis of gene expression and phytohormones during tissue-reunion in incised Arabidopsis flowering stem using laser micro-dissection. *Plant Biology* 2017、2017 年
 - ㉑ 大場裕介、吉原さくら、青原勉、松岡啓太、朝比奈雅志、佐藤 忍、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合における原形質連絡カロール結合タンパク質の関わり、植物学会第 81 回大会、2017 年
 - ㉒ 中野渡幸、山田一貴、松岡啓太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、LMD 法を用いたシロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における時空間的遺伝子発現解析と植物ホルモン分析、植物学会第 81 回大会、2017 年
 - ㉓ Yamada K, Nakanowatari M, Yumoto E, Noda Y, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Tissue-specific analysis of gene expression and endogenous phytohormone in tissue-reunion process of Arabidopsis incised flowering stem using laser microdissection. *Taiwan-Japan Plant Biology* 2017、2017 年
 - ㉔ Matsuoka K, Iino H, Nozawa N, Kondo Y, Satoh S, Asahina M, Functional Analysis of NAC-type Transcriptional Factors during Tissue Reunion in Arabidopsis flowering stem, *Taiwan-Japan Plant Biology* 2017、2017 年
 - ㉕ 山田一貴、中野渡幸、湯本絵美、野田幸男、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、LMD 法を用いたシロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における時空間的遺伝子発現解析と植物ホルモン分析、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年
 - ㉖ 松岡啓太、阿部薫、津吉菜摘、佐藤忍、朝比奈雅志、組織癒合に関わる ANAC 転写因子の機能と標的遺伝子、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年
 - ㉗ 朝比奈雅志、シロイヌナズナ切断組織の癒合と時空間的遺伝子発現解析、2016 年度 細胞周期合同セミナー、2016 年
 - ㉘ Nakanowatari M, Ogura K, Banse M, Matsuoka K, Yumoto E, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Analysis of tissue-specific gene expression and hormone biosynthesis

during tissue-reunion process in incised Arabidopsis flowering stem. 22nd International Plant Growth Substances Association (IPGSA) conference. 2016年

- ②9 中野渡幸、小倉健太朗、伴瀬真麻、佐藤忍、朝比奈雅志、レーザーマイクロダイセクション法を用いたシロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における時空間的遺伝子発現解析、日本植物学会第80回大会、2016年
- ③0 中野渡幸、小倉健太朗、伴瀬真麻、山田一貴、佐藤忍、朝比奈雅志、LMD法を用いたシロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における時空間的遺伝子発現解析、植物化学調節学会第51回大会、2016年
- ③1 松岡啓太、柳来樹、佐藤忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ芽生えの胚軸間接ぎ木におけるRAP2.6Lとジャスモン酸の機能、植物化学調節学会第51回大会、2016年
- ③2 Asahina M, Nakanowatari M, Matsuoka K, Yumoto E, Shibata K, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Analysis of Tissue-reunion Process in Incised Tissue of Plants. 第13回日本ナス科コンソーシアム年会、2016年

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science_asahina.html

※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。