

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23657036

研究課題名(和文)シロイヌナズナ胚の簡単な培養系の確立と新規胚誘導因子の解析

研究課題名(英文)Development of a simple method for the induction of somatic embryos from *Arabidopsis thaliana* seedlings

研究代表者

高田 忍 (Takada, Shinobu)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40456992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：不定胚は体細胞から作られる胚であり、胚発生研究、育種などに利用されている。本研究では、シロイヌナズナの芽生えから、正常胚の形態に近い不定胚を誘導するための新しい手法の開発を試みた。また、表皮は胚発生で最初に分化する組織であり、胚発生の進行に必須であると考えられている。そこで、胚特異的な遺伝子の発現と、表皮分化との関係についても解析した。

研究成果の概要(英文)：Somatic embryos are formed from somatic or vegetative tissues of the plants. Somatic embryos are useful for the studies of embryogenesis and also for plant breeding. However, direct induction of normal-looking somatic embryos from plant seedlings is not easily feasible. In this study, we tried to develop a simple method to induce somatic embryos from *Arabidopsis thaliana* seedlings.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：表皮分化 不定胚 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

不定胚は体細胞から作られる胚であり、胚発生研究、育種などに利用されている。脱分化させた組織(カルス)にオーキシン除去などの操作を行うことで不定胚誘導されることが、ニンジンなどの研究によって明らかにされて来た。

現在まで、モデル植物であるシロイヌナズナの芽生えから直接不定胚を誘導する方法がいくつか報告されている。例えばオーキシン存在下で芽生えを液体培養すると、個体表面から不定胚が誘導できる(Mordhorst et al, 1998)。しかしこの方法ではオーキシンの作用により胚の形態が異常になる。一方、*LEC1*、*LEC2*、*BBM*などの遺伝子の過剰発現によってオーキシンの添加なしに子葉から直接不定胚を誘導できるという報告もあるが、この方法では複数の胚が融合して発生してしまう(Lotan et al, 1998; Stone et al, 2001; Boutilier et al, 2002)。これは隣接する複数の細胞から胚発生が誘導された結果だと考えられる。シロイヌナズナの芽生えから、正常胚の形態に近い不定胚を誘導するためには何らかの工夫が必要である。

表皮は植物の胚発生で最初に分化する組織であり、表皮形成が異常となる *atml1;pdf2* 二重変異体では胚発生の進行が停止する(San-Bento et al, 2014; Ogawa et al, 2015)。また、後期胚発生を制御する *LEC1* や *FUS3* は、表皮で強く発現することが報告されている(Lotan et al, 1998; Gazzarrini et al, 2004)。ニンジンでは、胚の表皮特異的に発現する *EP2* 遺伝子が、不定胚への分化ポテンシャルを持つ未分化細胞で強く発現することが示されている(Sterk et al, 1991)。さらに、表皮におけるオーキシンの極性輸送が子葉の形成に必要であることも示唆されている(Furutani et al, 2004)。これらのことから、表皮の形成は、胚発生の正常な進行に必須であると考えられるが、表皮分化と胚発生進行との直接のつながりは分かっておらず、表皮形成が胚の形成に積極的な役割を持つとは考えられていなかった。

2. 研究の目的

植物の胚は胚珠の中で発生するため、経時的な観察や外科的な実験操作が困難である。また、生化学的、分子生物学的な実験に必要な大量の材料を得ることも難しい。不定胚の安定した培養が可能となれば、(1)レポーター遺伝子を用いた細胞分裂や細胞運命の経時的な観察、(2)レーザーなどを使った外科的な細胞除去実験、(3)マイクロインジェクションによる分子の直接注入、(4)特定の細胞を分離しておこなうマイクロアレイ解析やプロテオーム解析などが可能となる。本研究の目的は、モデル植物であるシロイヌナズナの芽生えから不定胚を大量に誘導・培養する新しい方法を確立することである。さらに、表皮分化のマスター転写因子 *ATML1* を用いて、

表皮形成と胚発生の進行との関係を明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

(1) メリステモイド特異的遺伝子のプロモーターを用いた誘導実験

気孔前駆細胞(メリステモイド)特異的なプロモーター制御下で *LEC2* を発現させることで、メリステモイドから不定胚を誘導する。メリステモイドは単一の細胞からなり、隣接して発生することはなく必ず一定の間隔で作られるため、一細胞から不定胚が誘導でき、誘導された不定胚が融合することはないと期待できる。また、メリステモイド特異的なプロモーターであるので、胚誘導と同時にプロモーター活性が消失し、過剰な *LEC2* の発現が起きないと思われる。エストロゲン添加によってメリステモイドで *LEC2* が発現する発現誘導系を利用することで、胚誘導のタイミングや程度を自由に調節する(図1)。

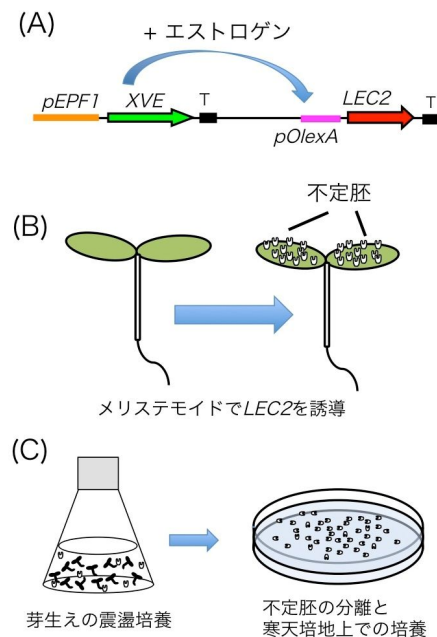


図1 不定胚誘導実験の概略

エストロゲン誘導性ベクターを用いて、*LEC2* の発現をメリステモイドで誘導する(A)。メリステモイドから作られた不定胚を震盪培養で分離し、寒天培地上で培養する(B、C)。

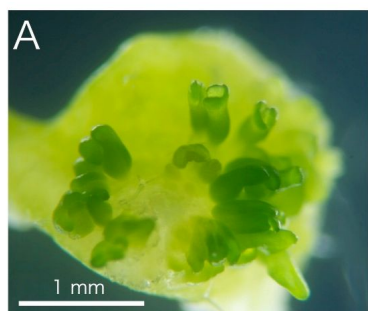
(2) *ATML1* を芽生えで過剰発現し、胚特異的遺伝子の発現に与える効果を調べる

ATML1 は *LEC1* や *FUS3* と同様に胚の表皮で発現するため、*LEC1* や *FUS3* の発現を正に制御している可能性がある。そこで、エストロゲン誘導系を用いて、芽生え全体で *ATML1* を発現させ、胚特異的な遺伝子発現に与える影響を調べる。

4. 研究成果

(1) メリステモイドから不定胚を誘導するメリステモイド特異的なプロモーターで *LEC2* を誘導できる形質転換体を作成した。こ

の形質転換体を用いることで子葉の表面から不定胚を誘導することができたが、融合して発生する不定胚の頻度が高かった。そこで、vortex による激しい攪拌や、震盪培養、レーザー処理等で細胞を遊離させてから不定胚の誘導を試みた。種々の方法を試したが、多くの細胞は途中で死んでしまい、寒天培地上で胚発生の進行を観察するまでには至っていない。



LEC2をメリステモイドで誘導



芽生えを震盪培養

図2 メリステモイドからの不定胚誘導

(A) *LEC2* をメリステモイドで発現させた子葉の表面。不定胚が誘導されている。(B) 芽生えの震盪培養。

(2) 表皮分化のマスター転写因子と胚発生の関係を調べる

ATML1 の過剰発現で不定胚が誘導された我々は、地上部の表皮分化を促進するマスター制御遺伝子 *ATML1* を過剰発現することで、側根原基から組織塊が生じることを示した。これらの組織は緑色の部分と白い部分から成り、培養を続けると新しい葉や根を作った。また、これらの構造は Sudan Red によって比較的強く染色された。このことから、この組織塊は、不定胚であると考えられる。

ATML1 の過剰発現は胚関連遺伝子の発現を促進する

定量的な RT-PCR 解析の結果、*ATML1* 誘導後の根で、*LEC1*、*LEC2*、*FUS3* など、胚の成熟に重要な遺伝子の発現が上昇することが分かった。このことから、表皮分化（または表皮分化のマスター制御遺伝子）は、胚発生の進行に必要なだけでなく、胚特異的な遺伝子発現や胚発生の進行に積極的な役割を持つことが示唆された。また、今回確立した *ATML1* の誘導条件を、*LEC1*、*LEC2*、*FUS3* 以外の下流遺

伝子 (e.g. *KAT1*) の発現解析にも利用し、論文として報告することができた (Takada et al., 2013)。

(3) 今後の展望

本研究により、*ATML1* が胚発生特異的な遺伝子発現を誘導できることが示された。*atml1;pdf2* 変異体の強いアリルが胚致死となる原因の一つは、これら胚発生ではたらく遺伝子の発現が異常になるからかもしれない。今後は、gain-of-function 実験だけでなく、生化学的な実験と、変異体の解析とを組み合わせ、*ATML1* による *LEC1*、*LEC2*、*FUS3* 遺伝子の発現制御の意義とメカニズムを明らかにしていきたい。

また、*ATML1* の過剰発現によって不定胚が形成される場所は側根原基の付け根に限定されていた。シュートの identity が無いことと、オーキシン濃度が高いことが、*ATML1* による新たな胚発生の誘導に必要なのかもしれない。今後は、オーキシンや細胞タイプによる *ATML1* の胚誘導能の違いを検証したい。

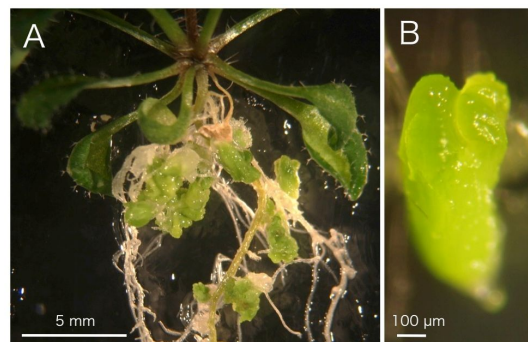


図3 *ATML1* によって誘導された不定胚

(A) *ATML1* の過剰発現体。根から緑色の構造が生じている。(B) 拡大すると不定胚のような形態をしているのが分かる。

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)

Shinobu Takada* and Hiroyuki Iida
Specification of epidermal cell fate in plant shoots. (mini review article)
Frontiers in Plant Science 5:49. (2014).
査読有り

*Author for correspondence.
doi: 10.3389/fpls.2014.00049

Shinobu Takada*, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
Induction of epidermal cell fate in *Arabidopsis* shoots. (addendum)
Plant Signaling & Behavior 8:e26236 (2013).
査読有り

*Author for correspondence.
doi: 10.4161/psb.26236

Shinobu Takada*, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
ATML1 promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots. Development 140, 1919-1923 (2013).
査読有り
*Author for correspondence.
doi: 10.1242/dev.094417

[学会発表](計 17 件)

高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ACR4 functions downstream of ATML1 to promote embryonic development.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 17 日

飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
Transcriptional and post-transcriptional regulation of *ATML1*, a key regulator for epidermal cell identity.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 17 日

高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ATML1 activates expression of *ACR4* during the initiation of epidermal cell fate.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 18 日

飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
表皮分化のマスター遺伝子である *ATML1* の位置依存的な発現および転写活性の制御について.
日本植物学会 第 78 回大会 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)
2014 年 9 月 13 日

Nozomi Takada, Ayaka Yoshida, and Shinobu Takada
ATML1 activates the expression of *ACR4* during initiation of epidermal cell fate.
第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)
2014 年 3 月 18 日

Shinobu Takada, Ayaka Yoshida, Hiroyuki Iida, and Nozomi Takada
Transcriptional regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis thaliana* shoots.
第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)
2014 年 3 月 20 日

Shinobu Takada, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
ATML1 promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots.

24th International Conference on Arabidopsis Research (Sydney Convention and Exhibition Centre, シドニー, オーストラリア). 2013 年 6 月 26 日

Nozomi Takada, Ayaka Yoshida, and Shinobu Takada
ARABIDOPSIS CRINKLY 4 is a downstream target of ATML1-mediated transcriptional regulation.
24th International Conference on Arabidopsis Research (Sydney Convention and Exhibition Centre, シドニー, オーストラリア). 2013 年 6 月 25 日

高田 忍、高田 希、吉田 彩香
ATML1 promotes epidermal cell differentiation in the post-embryonic development
第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学 岡山県・岡山市) 2013 年 3 月 21 日

吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
Regulation of epidermis-specific expression of *ATML1*
第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学 岡山県・岡山市) 2013 年 3 月 21 日

高田 忍、吉田 彩香、高田 希
シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は表皮分化を正に制御する
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
2012 年 12 月 13 日

吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
ATML1 の表皮特異的な発現における autoregulation の役割
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
2012 年 12 月 13 日

Shinobu Takada, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
ATML1 regulates epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots.
23rd International Conference on Arabidopsis Research (Hofburg Imperial Palace, ウィーン, オーストリア). 2012 年 7 月 4 日

高田 忍、吉田 彩香
ATML1 regulates epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots
第 53 回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都府・京都市) 2012 年 3 月 16 日

高田 忍、吉田 彩香
Transcriptional regulation of epidermis-specific gene expression

第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ
横浜(神奈川県・横浜市)2011年12月13日

高田忍、吉田彩香
シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は表皮特異的
な遺伝子の発現を正に制御する
第 75 回大会日本植物学会 東大駒場キャン
パス(東京都・目黒区駒場)
2011年9月17日

吉田彩香、Gerd Jürgens、高田忍
ATML1 の表皮特異的な発現を決める遺伝子の
探索
第 75 回大会日本植物学会 東大駒場キャン
パス(東京都・目黒区駒場)
2011年9月19日

[その他]
ホームページ
http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~shinobu_takada/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 忍 (TAKADA, Shinobu)
大阪大学・理学研究科・助教
研究者番号: 40456992

(2)研究協力者

高田 希 (TAKADA, Nozomi)
吉田 彩香 (YOSHIDA, Ayaka)
飯田 浩行 (IIDA, Hiroyuki)
伊藤 みはる (ITO, Miharuru)