

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840098

研究課題名(和文)シロイヌナズナ切断組織の癒合過程における植物ホルモンの機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of phytohormone on the tissue-reunion process in incised tissue of Arabidopsis

研究代表者

朝比奈 雅志 (ASAHINA, Masashi)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：00534067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの花茎を部分的に切断すると、主として髓組織の細胞が切断3日後から細胞分裂を開始し、約7日間で癒合すること、切断1日後から3日後にかけて転写因子・細胞分裂及び植物ホルモンの合成・情報伝達に関連する遺伝子が誘導され、その後、細胞壁の分解・合成に関連する遺伝子の発現が上昇することを明らかにしている。本研究課題では、切断花茎の組織癒合過程における植物ホルモンと、組織癒合に関連する遺伝子発現の時間的変化を明らかにした。また機能欠損体の解析を行い、ジャスモン酸関連変異体やオーキシン応答転写調節因子であるarf6/8二重変異体では、組織癒合が阻害されることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we revealed that auxin and wound-inducible hormones contributed to the control of tissue reunion process in upper and lower part of incised stem by inducing the expression of plant-specific TFs, ANAC071 and RAP2.6L, respectively. In this study, analysis of tissue-specific gene expression and hormone biosynthesis during tissue-reunion process in incised Arabidopsis flowering stem were performed. Gene expression analyses show that expression of those TFs were up-regulated within 3 h after incision. We also found that some JA-related mutants showed incomplete healing process in tissue reunion, and arf6arf8 mutant showed inhibition of cell division in pith tissue after a week of incision.

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 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

植物は、茎が部分的に切断された場合、切断された組織は、細胞分裂を再開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が回復する (Flaishman et al, 2003; Reid and Ross, 2011; Ikeuchi et al, 2013)。組織が再生・癒合する際には、細胞壁の再生の他、プラズモデスムの後生的形成による細胞間の連絡、維管束組織の新生と連結といったダイナミックな発生現象が観察されることが報告されている (Kollmann & Glockmann, 1985)。しかし、維管束の再生に関しては、オーキシシンが重要なファクターであることが報告されているものの (Sachs, 2000)、その他の組織の再生・癒合に関しては、生理学的にも解析が不十分であり、分子的な解析は全くなされていなかった。

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。また、導管液によって供給されるホウ素などの無機元素も組織癒合に必須なことも示した。

一方、キュウリやトマトでは、癒合過程を遺伝学的・分子生物学的に解析することは困難であったため、申請者らは、シロイヌナズナの花茎を用いる新規の実験系を確立した。その結果、シロイヌナズナの花茎では、切断されると髓組織の細胞が細胞分裂を再開すること、この現象には、*ANAC071* と *RAP2.6L* の2種類の転写因子が深く関与していることを明らかにした。また、内生オーキシシン量の測定と遺伝子発現解析から、傷の上部では、極性輸送されてきたオーキシシンが蓄積することによってオーキシシン誘導性の *ANAC071* が発現し、傷の下部では、オーキシシンが枯渇することによって *RAP2.6L* が発現することを明らかにした。さらに、生合成欠損変異体を用いた解析から、これら転写因子の発現が、エチレンやジャスモン酸によっても促進的に制御されている可能性を示した (図1)。

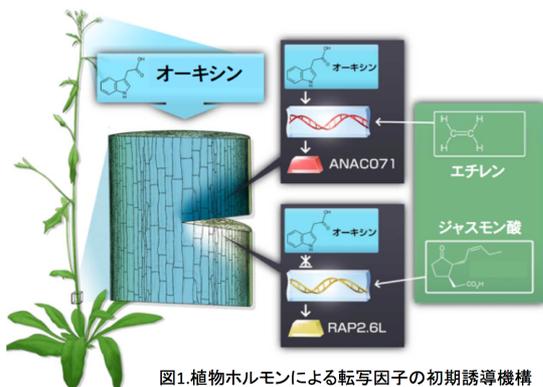


図1. 植物ホルモンによる転写因子の初期誘導機構

2. 研究の目的

本研究は、切断された茎の組織が再生し、組織癒合に至るプロセスの分子機構を明らかにするものである (図2)。前述の通り、植物の茎が切断されると、傷害を受けた組織の細胞は細胞分裂を再開し、失われた組織を分化させて機能が回復する。申請者はこれまでに、植物ホルモンによって制御される2種類の転写因子 *ANAC071*・*RAP2.6L* が、組織癒合に深く関与していることを明らかにした。しかし、植物ホルモンの詳細な局在変化やシグナル伝達系、下流遺伝子の機能については未解明である。

そこで本研究課題では、シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程における植物ホルモンの内生量・局在性の経時変化を、機器分析とイメージング解析技術を用いることで明らかにすること、またホルモンによって制御される転写因子と遺伝子発現ネットワーク、及び下流遺伝子の時空間的発現機構と遺伝子産物の分子機能を明らかにすることを目的とした。

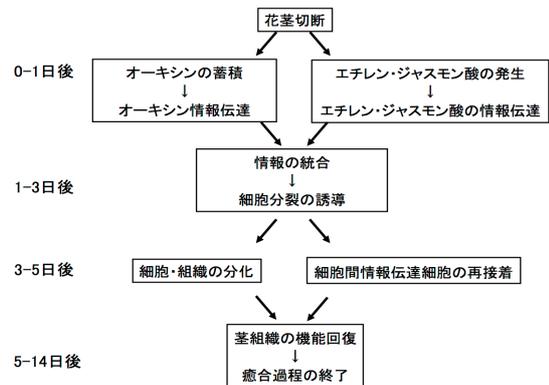


図2. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程に生じる生理現象

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ花茎が切断傷害を受けてから組織癒合に至るまでの遺伝子発現とオーキシシン・ジャスモン酸など植物ホルモンの局在変化の解明を目的として、花茎切断後24時間以内に生じる遺伝子発現の変化を詳細に解析するとともに、ジャスモン酸、オーキシシンなどの植物ホルモンの内生量の経時の変化を、質量分析計を用いて定量した。

(2) 切断された花茎の組織癒合過程において、植物ホルモンの応答性や遺伝子発現に組織や部位による違いがあるかについて検討するため、レポーター遺伝子を用いた組織化学的解析を行うとともに、組織標本から必要な領域を数細胞レベルで回収することが可能であるレーザーマイクロダイゼクション (LMD) 法を用いて、切断傷害を受けたシロイヌナズナ花茎の細胞を時期・部位別に回収し、遺伝子発現解析を行った。

(3) 組織癒合に深く関与している

ANAC071、RAP2.6L 転写因子は、オーキシシンによって制御されていることが分かっている。そこで、オーキシシン関連変異体/形質転換体 (*pin1*, *arf6/8*, *mIAA5* など) エチレン関連変異体 (*acs2*, *ein2*, *etr1*, *eto1* など)、ジャスモン酸関連変異体

(*aos*, *jar1*, *jaz10*, *opr3* など) をはじめとした変異株の形質調査と遺伝子発現を調査した。

この他、*ANAC071*、*RAP2.6L* の下流遺伝子の同定と組織癒合への影響を調査することを目的として、発現を時空間的に変化させることが可能となる薬剤誘導性プロモーターを用いた遺伝子組換え体の作出を試みた。

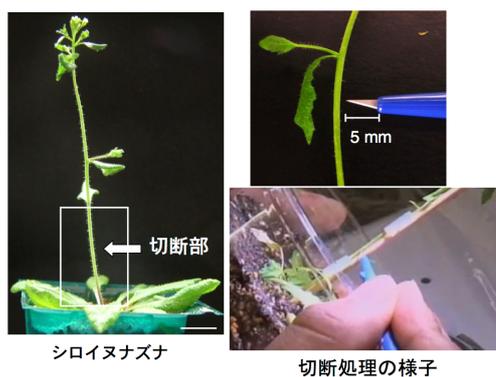


図3.シロイヌナズナを用いた花茎切断実験の様子

4. 研究成果

(1) 切断処理を行ったシロイヌナズナ花茎 (図3) の JA 及び JA-Ile 内生量は切断後 30 分以内に上昇し、1 時間後をピークに以降は減少することが分かった。この JA 及び JA-Ile 内生量の増加は、切断部位から離れた非切断部の花茎においても見られた。一方、IAA の傷の上部への蓄積は、切断 1 分後から 30 分以内に開始することが分かった。JA・エチレン関連遺伝子は、切断処理 30 分後以降に発現の誘導がみられたが、JA 関連遺伝子の多くが同じ個体の非切断部の花茎においても発現が誘導されていたのに対し、エチレン合成遺伝子 ACS2 は発現誘導が切断部のみで見られた。また、切断部位における *ANAC071* 及び *RAP2.6L* 遺伝子の発現は、切断処理後 3 時間以内に誘導されることが分かった。イメージング質量分析計による植物ホルモンの解析方法は現在のところ有効な方法が確立されていないため実現には至らなかったが、LC-MS/MS を用いた微量試料からの一斉解析の結果、植物ホルモンの基礎的な位置情報を得ることができたと考えている。

(2) 抽台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 日後、3 日後、5 日後、7 日後ごとにサンプリングし、川本法に従って凍結切片を作成した。切断処理後、一定時間ごとに

サンプリングした花茎を OCT コンパウンドに包埋し、ドライアイス冷却ヘキサンで凍結後、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組織を部位別に回収し、マイクロアレイ法によって同定した組織癒合・傷害応答に関与する遺伝子から、*IAA5*、*JAR1* などの植物ホルモン関連遺伝子、*ANAC071*、*RAP2.6L* などの情報伝達・転写因子に関わる遺伝子、*CYCB1;1*、*XTH19* などの細胞分裂・細胞壁関連の遺伝子など 21 種類に注目し、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。

その結果、転写因子である *ANAC071* は傷の上部の特に表皮・皮層、維管束組織で高く発現していること、*RAP2.6L* は傷の下部の特に表皮・皮層、維管束組織で高く発現していることが分かった。その他の遺伝子も、組織や部位、切断後の日数によって発現量が異なるなど、傷害部位では数細胞レベルで異なったパターン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 (図4)。

今後、RNA-seq 法などの網羅的発現解析や組織分化のマーカー遺伝子を用いた解析を合わせて進めることで、組織癒合過程における傷害や植物ホルモンの情報伝達、組織再分化などの分子メカニズムの理解につながると期待される。

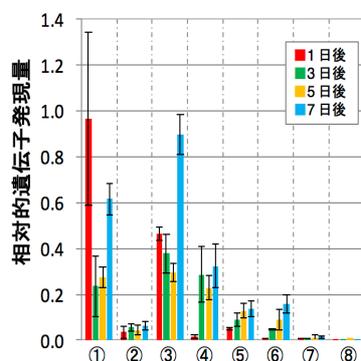


図4.シロイヌナズナ花茎切断部におけるANAC071の発現量

①表皮・皮層(上部)、②、表皮・皮層(下部)、③維管束(上部)、④維管束(下部)、⑤維管束(上部)、⑥維管束(下部)、⑦維管束(無傷)、⑧癒合部

(3) オーキシシン応答因子である *arf6arf8* 二重変異体を用いた結果から、*ANAC071* と *RAP2.6L* の切断花茎の癒合部での発現が抑制され、組織癒合が強く阻害されることが分かった。一方、非切断花茎における *RAP2.6L* の発現は、野生型と比較して上昇していた。また、切断花茎の癒合過程では、ジャスモン酸合成遺伝子の発現上昇と、ジャスモン酸内生量の増加が確認された。さらに、JA 関連変異体では正常な組織癒合が生じないこと、*arf6arf8* の癒合部では、ジャスモン酸合成遺伝子の一種である *DAD1* の発現が、強く抑制されていることが分かった。以上の結果より、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合において、ジャスモン酸は重要な働きを有していること、オーキシシンによる *ANAC071*・

RAP2. 6L 転写因子とジャスモン酸生成遺伝子の発現調節に、*ARF6* と *ARF8* が必須の因子であることが示唆された。また、JA 生成遺伝子の変異体での遺伝子発現を行ったところ、*aos* と *jar1* 変異体では、JA 生成遺伝子や *RAP2. 6L* の発現が抑制されていることが分かった。

この他、理化学研究所・産業技術総合研究所との共同研究の結果、薬剤誘導性プロモーターを用いた *ANAC071* 及び *RAP2. 6L* 遺伝子組換え体および、プロモーターGFP 形質転換体の作出に成功した。今後、形質転換体の形質調査を進めることで、転写因子の発現部位、発現時期と組織癒合との関連性を確認することができると考えている。

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 7 件)

① Asahina M, Satoh S. Molecular and Physiological Mechanisms Regulating Tissue Reunion in Incised Plant Tissues. (2015) *Journal of Plant Research*, 128:381-388. 査読有
doi: 10.1007/s10265-015-0705-z.

② 朝比奈雅志, Pitaksaringkarn Weerasak, 佐藤忍. 植物の切断組織における組織癒合へのホルモンと細胞壁代謝の関与 (2015) *植物科学の最前線*, BSJ-Review 6A:31-40. 査読有
<http://bsj.or.jp/jpn/general/bsj-review.php>

③ Pitaksaringkarn W, Matsuoka K, Asahina M, Miura K, Sage-Ono K, Ono M, Yokoyama R, Nishitani K, Ishii T, Iwai H, Satoh S. XTH20 and XTH19 regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. (2014) *Plant Journal*, 80(4): 604-614. 査読有
doi: 10.1111/tpj.12654.

④ Asahina M, Tamaki Y, Sakamoto T, Shibata K, Nomura T, Yokota T. Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. (2014) *Phytochemistry*. 104: 21-29. 査読有
doi: 10.1016/j.phytochem.2014.04.017.

⑤ Bidadi H, Matsuoka K, Sage-Ono K, Fukushima J, Pitaksaringkarn W, Asahina M (以下6名). CLE6 expression recovers

gibberellin deficiency to promote shoot growth in *Arabidopsis*. (2014) *Plant Journal*. 78(2):241-252. 査読有
doi: 10.1111/tpj.12475.

⑥ Matsuoka K, Furukawa J, Bidadi H, Asahina M, Yamaguchi S, Satoh S. Gibberellin-Induced Expression of Fe-Uptake-Related Genes in *Arabidopsis*. (2014) *Plant and Cell Physiology*. 55(1): 87-98. 査読有
doi: 10.1093/pcp/pct160.

⑦ Pitaksaringkarn W, Ishiguro S, Asahina M, Satoh S. ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. (2014) *Plant Biotechnology*. 31, 49-53. 査読有
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.1028b>

[学会発表] (計 20 件)

① 第57回日本植物生理学会、中野渡幸、小倉健太郎、伴瀬真麻、松岡啓太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、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組織特異的な遺伝子発現と植物ホルモンの解析、岩手大学(岩手県盛岡市)、2016年3月18-20日

② 第57回日本植物生理学会、中野渡幸、小倉健太郎、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、岩手大学(岩手県盛岡市)、2016年3月18-20日

③ 第57回日本植物生理学会、Pitaksaringkarn W, Matsuoka K, Asahina M, Yokoyama R, Nishitani K, Iwai H, Satoh S、傷によって誘導される茎の健全性の維持、岩手大学(岩手県盛岡市)、2016年3月18-20日

④ 第57回日本植物生理学会、松岡啓太、菅原恵理、田熊一貴、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の細胞分裂を誘導する植物ホルモンの作用機構、岩手大学(岩手県盛岡市)、2016年3月18-20日

⑤ 第57回日本植物生理学会、Yoshihara S, Aohara T, Matsuoka K, Asahina M, Satoh S、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与、岩手大学(岩手県盛岡市)、2016年3月18-20日

⑥ 第50回植物化学調節学会、中野渡幸、小倉健太郎、伴瀬真麻、松岡啓太、湯本絵美、

横田孝雄、山根久和、佐藤 忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ切断花茎における時空間的遺伝子発現と植物ホルモンの解析、東京大学農学部（東京都文京区）、2015年10月23-25日

⑦ 第50回植物化学調節学会、松岡啓太、菅原恵理、田熊一貴、佐藤忍、朝比奈雅志、共焦点顕微鏡を用いたシロイヌナズナ芽生えの胚軸間接ぎ木の形態観察、東京大学農学部（東京都文京区）、2015年10月23-25日

⑧植物電子顕微鏡若手ワークショップ2015、朝比奈雅志、植物切断組織の癒合と植物ホルモンの関与、理化学研究所横浜事業所（神奈川県横浜市鶴見区）、2015年9月25日

⑨日本植物学会第79回大会、松岡啓太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ花茎切断処理による遺伝子発現の誘導と植物ホルモンの関与、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）、2015年9月6-8日

⑩ 日本植物学会第79回大会、松岡啓太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、組織癒合に関わるANAC071転写因子のオーキシンによる発現制御、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）、2015年9月6-8日

⑪ 日本植物学会第79回大会、中野渡幸、島田菜美、名城やよい、仁平彩也香、松岡啓太、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植物組織癒合部の遺伝子発現解析、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）、2015年9月6-8日

⑫第12回日本ナス科コンソーシアム、朝比奈雅志、青木亮、久保直樹、鈴木英理奈、恒川優穂、松岡啓太、佐藤忍、植物切断組織の癒合と植物ホルモンの関与、明治大学農学部（神奈川県川崎市生田）、2015年9月4-5日

⑬ シロイヌナズナ国際会議(ICAR2015)、Matsuoka K, Yumoto E, Okugawa D, Saito N, Nakahara Y, Yokota T, Yamane H, Satoh S, Asahina M, Gene Expression Analysis of Phytohormone-related Gene After Incision Treatment in Arabidopsis Flowering Stem. パリ（フランス）、2015年7月5-9日

⑭ シロイヌナズナ国際会議(ICAR2015)、CLE6 expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in Arabidopsis. Bidadi H, Matsuoka K, Sage-Ono K, Fukushima J, Pitaksaringkarn W, Asahina M, Yamaguchi S, Sawa S, Fukuda H, Matsubayashi Y, Ono M, Satoh S. パリ

（フランス）、2015年7月5-9日

⑮ 2015年度植物細胞周期合同セミナー、朝比奈雅志、植物の傷害組織における細胞分裂の誘導と植物ホルモンの関与、サンヒルズ三河湾（愛知県蒲郡市）、2015年6月12-13日

⑯ 第56回日本植物生理学会年会、松岡啓太、湯本絵美、奥川大樹、齋藤朴、中原陽平、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ切断花茎における遺伝子発現に対するジャスモン酸の影響、東京農業大学（東京都世田谷区）、2015年3月16-18日

⑰ 第56回日本植物生理学会年会、松岡啓太、湯本絵美、奥川大樹、齋藤朴、中原陽平、横田孝雄、山根久和、佐藤忍、朝比奈雅志、シロイヌナズナ花茎切断処理に応答する植物ホルモン関連遺伝子の発現解析、東京農業大学（東京都世田谷区）、2015年3月16-18日

⑱ Cell aggregation meeting 2014、朝比奈雅志、植物の傷害組織における細胞分裂の誘導と遺伝子ネットワークの解析、アクロス福岡（福岡県福岡市）2014年12月6日

⑲ Plant Reprogramming Workshop、Asahina M、Mechanism of the tissue reunion in incised tissues of plants、理化学研究所横浜事業所（神奈川県横浜市鶴見区）、2014年11月28日

⑳ JSCR-PGRSA joint meeting、Asahina M、Pitaksaringkarn W、Matsuoka K、Shimizu M、Ishiguro S、Yumoto E、Yokota T、Yamane H、Satoh S、Involvement of ARF6 and ARF8 auxin response factors and jasmonic acid in tissue reunion process of incised Arabidopsis inflorescence stems、サンフランシスコ（アメリカ）、2014年7月13-17日

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science/research.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝比奈 雅志 (ASAHINA, Masashi)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：00534067

(2) 研究分担者

研究者番号： ()
(3) 連携研究者 ()
研究者番号：