

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

朝比奈雅志¹, Pitaksaringkarn Weerasak²、佐藤忍²

1; 帝京大学 理工学部 バイオサイエンス学科 〒320-8551 栃木県宇都宮市豊郷台 1-1

2; 筑波大学 生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Involvement of phytohormone and cell wall metabolism on the tissue-reunion of incised tissue of plant.

Masashi ASAHINA¹, Weerasak PITAKSARINGKARN² and Shinobu SATOH²

Keywords; Arabidopsis, cell division, incised stem, phytohormone, tissue-reunion

1; Department of Biosciences, Teikyo University. 1-1, Toyosatodai, Utsunomiya, Tochigi,
320-8551, JAPAN.

2; Faculty of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba. 1-1-1, Tennoudai, Tsukuba,
Ibaraki, 305-8572, JAPAN.

1. はじめに

植物は様々な外環境の影響を絶えず受ける中で、その発生や機能を変化させ、環境に適応している (Reid and Ross 2011)。そのような環境要因の1つである傷害は、風や虫などの物理的・生物的要因、剪定や接ぎ木などの人為的要因等によって引き起こされる。高等植物では、通常、一旦分離した細胞同士が動物細胞のように再び接着することはないが、接ぎ木による他個体との接着や切断された組織の修復、雌しべが形成される際の心皮の結合の際には、例外的に離れた組織同士が再度接着することが知られている (Walker 1975; Stoddard & McCully 1980; Kollmann and Glockmann 1985; Siegel and Verbeke 1989; van der Schoot et al 1995; Richerdson et al 1996; Wang and Kollmann 1996)。茎が部分的に切断されると、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、プラズモデスマ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おり (Sachs 2000; Kollmann & Glockmann 1985)，その過程は①傷害の認知、②細胞分裂の誘起、③細胞の分化、④細胞間の接着と相互作用の成立、⑤増殖・分化の停止からなる一連の生理反応からなると考えられる (図 1 ; Asahina et al 2011; 朝比奈 2013)。本稿では、これまでに我々が行ってきたシロイヌナズナの切断花茎を用いた分子生物学的解析から得られた最近の結果を中心に紹介したい。

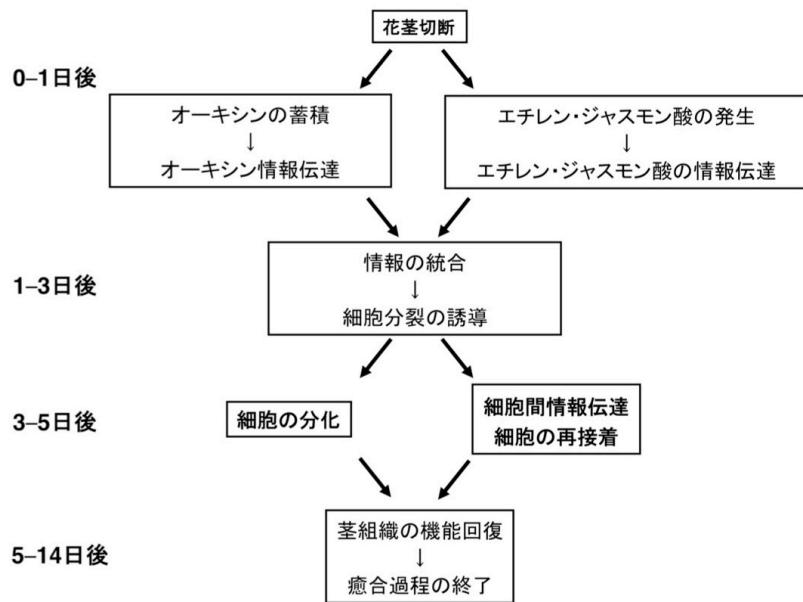


図1. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程に生じる生理現象

2. シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合

2-1. 形態学的解析

これまでに我々は、作物生産において土壤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（図2A），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（Asahina et al 2002, 2006, 2007; 朝比奈・佐藤 2004）。

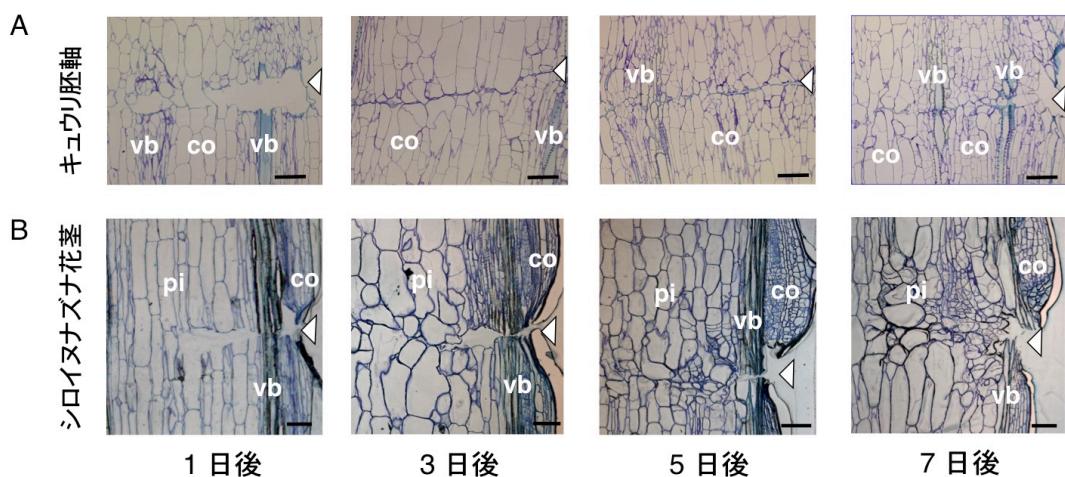


図2. キュウリ切断胚軸（A）とシロイヌナズナ切断花茎（B）の組織癒合過程
co:皮層, pi:髓, vb: 維管束組織。△:切断部位。トルイジンブルー染色。スケールは
100 μm。Asahina et al (2002; 2011) を改変。

しかし、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、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 (Asahina et al 2011)。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が (図 2B)，この時に茎生葉や茎頂を切除すると細胞分裂が阻害されることが分かった。この現象に対する植物ホルモンの影響について検討したところ、オーキシン外生投与により器官切除による阻害が回復すること、オーキシン極性輸送阻害剤 TIBA (triiodobenzoic acid) を投与した個体や、極性輸送欠損体 (*pin1-1*) で組織癒合が抑制されることが分かった。また、オーキシン内生量の測定、及びオーキシン誘導性プロモーターDR5::GUS 形質転換体 (Sabatini et al 1999) を用いた解析から、切断直後の切断部上側にオーキシンが蓄積していることが示された (Asahina et al 2011)。また、切断処理後、植物体を横に倒し、切断部位を下側に位置して栽培した場合には癒合は生じるが、傷口を上側にして植物体を栽培すると切断部の頂芽側における DR5::GUS および CycB::GUS (細胞分裂のマーカー) の発現の減少と共に、髓の細胞分裂が抑制された (図 3)。

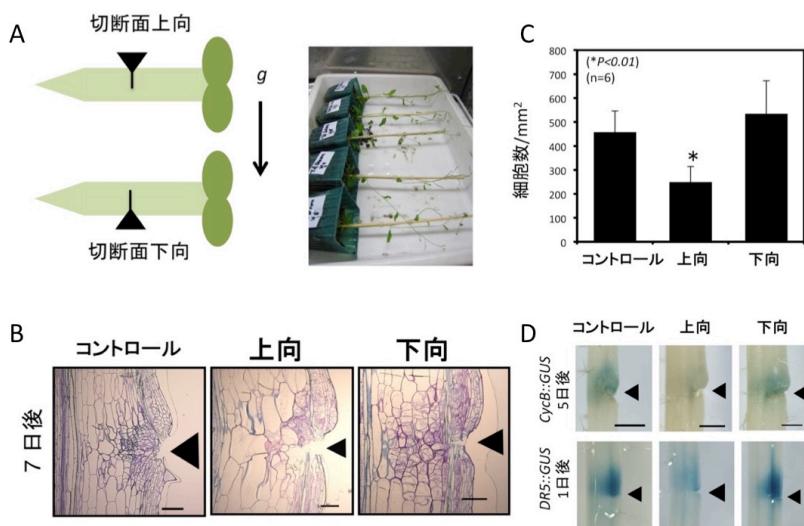


図3. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程に対する重力の影響

(A) 実験方法。シロイヌナズナの花茎をマイクロナイフで切断後、切断面を上向きまたは下向きにして1週間生育させた。(B) 通常の生育 (コントロール) と (A) のように生育させたシロイヌナズナ切断花茎の癒合部を、テクノビット樹脂切片を作成して観察した。観察は全て切断処理7日後に行った。◀: 切断部位。トルイジンブルー染色。スケールは100 μm。(C) 切断面を上向きまたは下向きにして生育した組織癒合部の細胞密度。計測は切断処理7日後に、Pitaksaringkarn et al (2014b) の方法に従って行った。(D) CyclinB::GUS、DR5::GUS植物を用いた組織化学的解析。Pitaksaringkarn et al (2014b) の図を一部改変。

以上の結果から、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合には、オーキシンの極性輸送と蓄積が必須であることが判明した。

2-2. 組織癒合に関する転写因子の同定

シロイヌナズナ花茎の組織癒合過程における遺伝子発現の変化を明らかにするため、マイクロアレイ法を用いた解析を行なった。シロイヌナズナ花茎の第一節間または第二節間の花茎にマイクロナイフを用いて切断処理を施し、一定時間後に切断部を含む約5 mmの花茎を切り出して RNA

を抽出し、解析に用いた。

マイクロアレイ解析によって同定した遺伝子群の中から、癒合過程前半期で発現する転写因子に注目して解析を行った結果、NAC型転写因子ファミリーに属する *ANAC071*、およびERF/AP2型転写因子ファミリーに属する *RAP2.6L* が、切断1日後から3日後にわたって、癒合部特異的な発現を示していることが明らかとなった (Asahina et al 2011)。

さらに、CRES-T法 (Hiratsu et al 2003) を用いてこれらの機能を抑制した形質転換体や欠損変異体 *anac071* では組織癒合が阻害されていたことから、これらの転写因子は組織癒合に必須な機能を持っていることが示された。次に、切断面の上下の組織をそれぞれ分割して遺伝子発現を調べたところ、*ANAC071* は切断面の上側で、*RAP2.6L* は切断面の下側で特異的に発現が上昇することが判明した (図4)。これら転写制御因子の発現に対するオーキシンの影響を調べたところ、*ANAC071* の発現はオーキシンによって正に、*RAP2.6L* の発現は負に、それぞれ制御されていることが明らかとなった。これらの結果から、傷の上部ではオーキシンが蓄積することによって *ANAC071* が誘導され、傷の下部ではオーキシンが枯渇することによって *RAP2.6L* が誘導されることが明らかとなった (Asahina et al 2011; 朝比奈 2013)。

2-3. ジャスモン酸、エチレンの関与とオーキシン情報伝達

切断1日後のシロイヌナズナ切断花茎の癒合部において、エチレン合成に関わる1-アミノシクロプロパン1カルボン酸合成酵素 (*ACS2*)、およびジャスモン酸合成に関わるリポキシゲナーゼ (*LOX2* および *LOX3*) が強く発現していたことから、エチレン、ジャスモン酸の関与についても検討した。

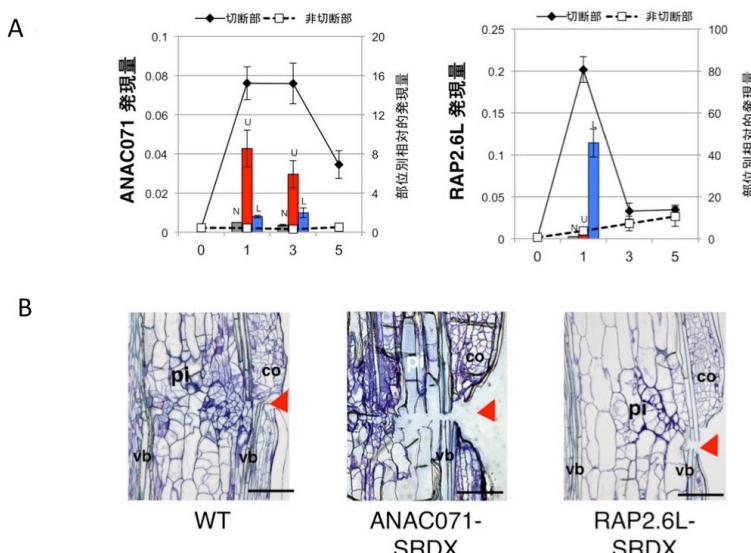


図4. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程におけるANAC071, RAP2.6L転写因子の関与

(A) 組織癒合過程におけるANAC071, RAP2.6L遺伝子の発現変化。実線は花茎切端部、点線は非切端部における発現量の日数変化を示す(左縦軸)。また、N(灰色)は非切端部、U(赤)は切端部上側、L(青)は切端部下側の花茎における発現量を示す(右縦軸; 非切端部の発現量を1とした相対的発現量として示す)。

(B) ANAC071-SRDX、RAP2.6L-SRDX形質転換体の切断花茎における組織癒合。観察は全て切断処理7日後に行った。co:皮層、pi:髓、vb:維管束組織。◀:切端部位。

トルイジンブルー染色。スケールは100 μm。Asahina et al (2011)を改変。

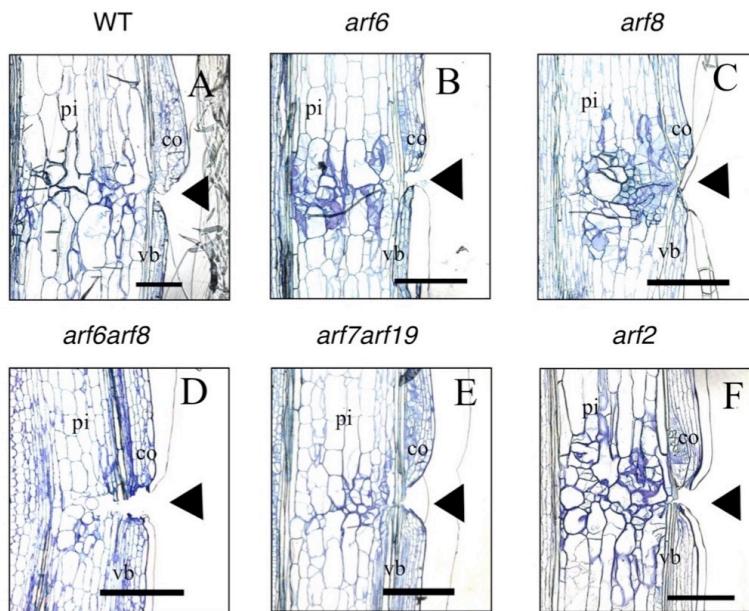


図5. ARF遺伝子欠損変異体の切斷花茎における組織癒合

(A) 野生型 (B) *arf6*欠損変異体 (C) *arf8*欠損変異体 (D) *arf6, 8*二重欠損変異体 (E) *arf7, 19*二重欠損変異体 (F) *arf2*欠損変異体。観察は全て切斷処理7日後に行った。co:皮層, pi:髓, vb: 維管束組織, ▲: 切断部位, トルイジンブルー染色, スケールは100 μm。Pitaksaringkarn et al (2014a)の図を一部改変。

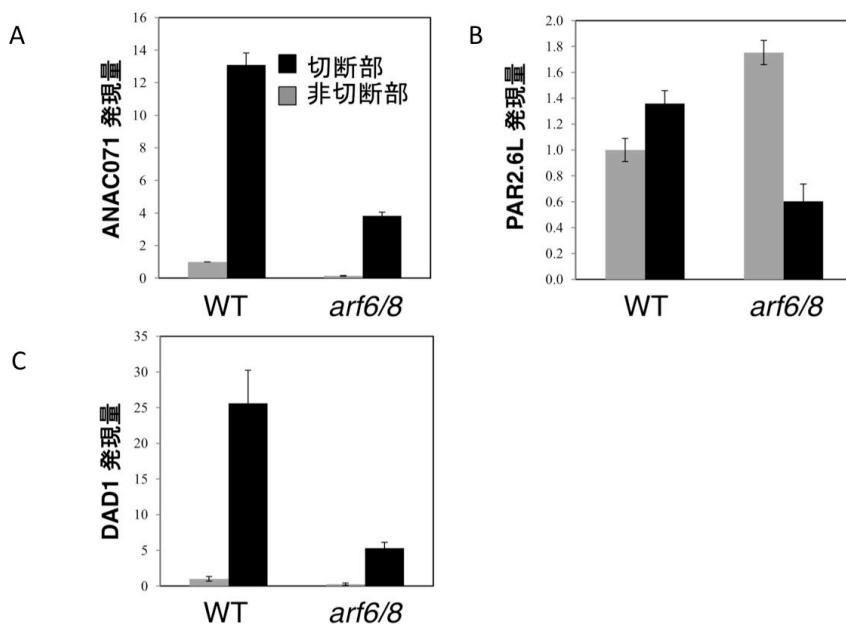


図6. *arf6/8*遺伝子欠損変異体の切斷花茎における遺伝子発現解析

(A) ANAC071 (B) RAP2.6L (C) DAD1。解析は全て、切斷処理1日後の花茎から癒合部を含む約1 cmの領域を切り出し、リアルタイムPCRを用いて行った。Pitaksaringkarn et al (2014a)の図を一部改変。

まず、エチレン非感受性変異体 *ein2* を用いて同様の切断処理を行ったところ、切断部位の細胞分裂・伸長に変化が生じ、正常な組織癒合が起こらなかった。また、*ein2* では花茎切断部における *ANAC071* の発現が抑制されていたことから、*ANAC071* はエチレンによって正に制御されていることが明らかとなった。

次に、ジャスモン酸メチルを花茎に投与すると、*RAP2.6L* の発現が誘導されることが分かった。さらに、ジャスモン酸関連変異体では正常な組織癒合が生じないこと、花茎切断後にジャスモン酸の内生量が増加していたことなどから、癒合部における *RAP2.6L* の発現はジャスモン酸によつても調節されていることが示された(Asahina et al 2011, 朝比奈 2013)。

一方、オーキシン応答因子である *arf6arf8* 二重変異体の切断花茎では、組織癒合が強く阻害されることが分かった(図 5)。また、*arf6arf8* 二重変異体を用いた発現解析の結果、*ANAC071* と *RAP2.6L* の切断花茎での発現が抑制されること、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ることが分かった(図 6A,B)。さらに、*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(図 6C)。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、オーキシンによる *ANAC071*・*RAP2.6L* 転写因子とジャスモン酸合成遺伝子の発現調節に、*ARF6* と *ARF8* が重要な因子として働いていることが示された(Pitaksaringkarn et al, 2014a)。

以上の結果、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程では、花茎切断によって生じたオーキシン、エチレン、ジャスモン酸といった植物ホルモンのシグナリングが、*ANAC071*・*RAP2.6L* 転写因子の発現を介して、細胞分裂等の遺伝子発現を制御している可能性が示された(図 7)。

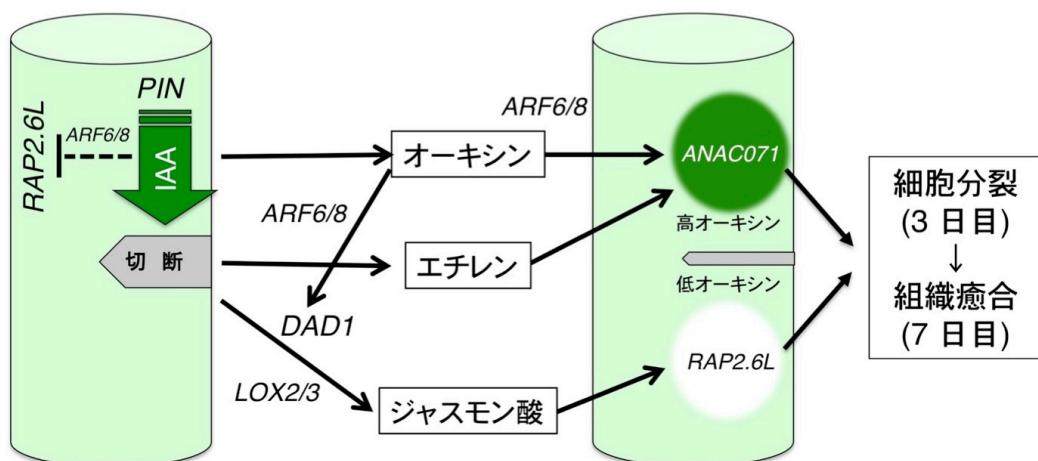


図7. 組織癒合初期過程における遺伝子発現と植物ホルモン作用のモデル

花茎が切断されると、傷の上部では蓄積したオーキシンによって *ANAC071* が誘導され、傷の下部ではオーキシンが枯渇することによって *RAP2.6L* が誘導される。それぞれの遺伝子の発現はエチレンとジャスモン酸によっても調節される。オーキシンの情報伝達には、*ARF6/8* が関与している。これら転写因子の作用によって細胞分裂が誘導され、組織癒合が起こると予想される。

2-4. 細胞壁多糖の代謝とエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素遺伝子の関与

組織癒合時には細胞分裂や細胞形態の劇的な変化が生じることから、細胞壁多糖の変化を解析したところ、ペクチン性の分岐したアラビナンが増加していることが判明した (Pitaksaringkarn et al 2014b)。一方、マイクロアレイ法により切断後1~3日目に発現のピークを迎える細胞壁関連遺伝子の解析を行ったところ、同定された遺伝子群の中にはペクチンなどの細胞壁多糖を分解する酵素の遺伝子が多数含まれていたが、細胞壁多糖の合成に関わる遺伝子はほとんど含まれていなかつた。また、細胞壁マトリックス多糖であるキシログルカンとセルロースの間の水素結合を切断するエクスパンシン (Expansin 10) とキシログルカン鎖間のつなぎ換えを行うエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) (*XTH20*) は、各々、切断後1日目と3日目に強く発現しており、細胞壁ネットワークの修飾と再構築が癒合過程に関与している可能性が示唆された。

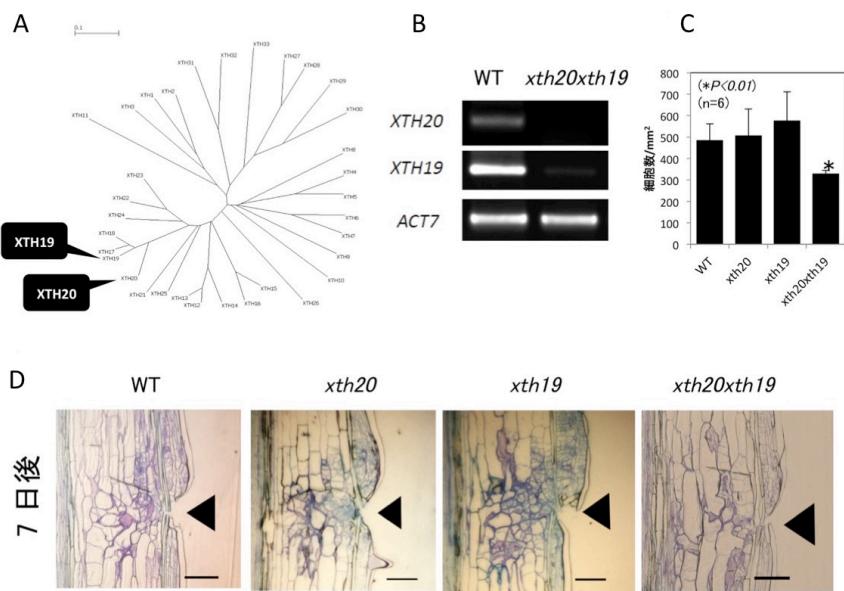


図8. 組織癒合に対するXTH遺伝子の関与

(A) シロイヌナズナXTH遺伝子の分子系統樹。 (B) RT-PCRによるXTH19, 20遺伝子の発現解析。 (C) *xth19, 20*欠損変異体における組織癒合部の細胞密度。計測は切断7日後に行った。 (D) *xth19, 20*, 及び二重欠損変異体の切断花茎の組織癒合部。観察は全て切断処理7日後に行った。▲: 切断部位、トルイジンブルー染色、スケールは100 μm 。
Pitaksaringkarn et al (2014b)の図を一部改変。

そこで、*XTH20*の癒合過程における発現を詳細に調べたところ、*XTH20*の発現がオーキシンによって正に制御されており、ANAC071-SRDX形質転換体及び*anac071*欠損体では*XTH20*遺伝子の発現が抑制されること、35S::ANAC071過剰発現体では逆に発現が上昇していることが分かった (Pitaksaringkarn et al 2014b)。

次に、*XTH20*と相同性の高い*XTH19*との二重欠損変異体の切断花茎における癒合過程を調べたところ、*XTH19, 20*二重変異体では組織癒合過程での細胞分裂が強く阻害されていたことから、*XTH19, 20*は組織癒合過程における髄組織の細胞分裂に関与していることが示された (図8)。

また、ゲルシフトアッセイ (Electrophoresis Mobility Shift Assay)においてANAC071タンパクが*XTH19, 20*のプロモーター領域に結合すること (図9)，およびシロイヌナズナの葉において

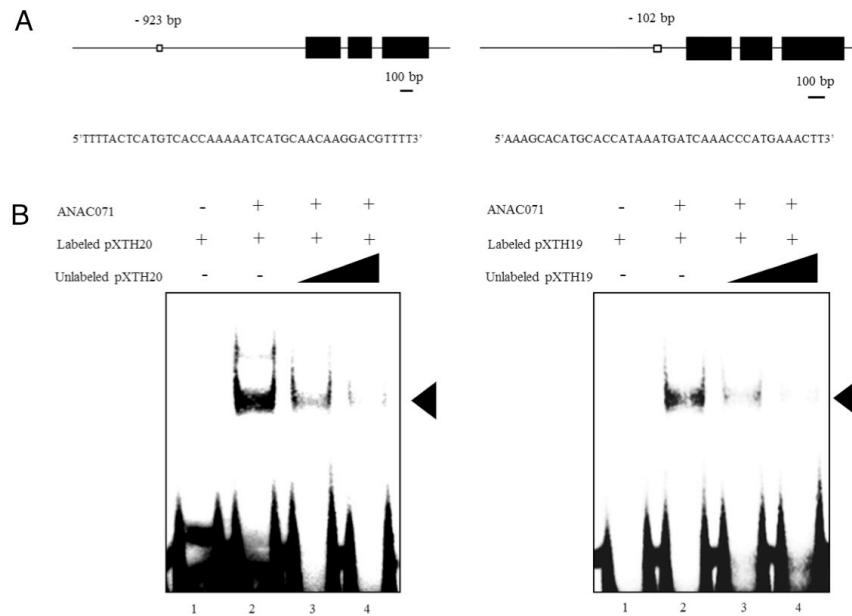


図9. XTH20, 19遺伝子プロモーター領域に対するANAC071の結合

(A) 実験に使用したオリゴヌクレオチドの配列（左; XTH20, 右; XTH19）。予想されるコア結合配列（□；CACC）は、プロモーター領域の上流-923 bpまたは-102 bpの位置に存在している。黒のボックス（■）はエキソンを示す。（B）ゲルシフトアッセイの結果。左; XTH20, 右; XTH19。▲（矢頭）はタンパク質/DNA複合体の位置を示す。Pitaksaringkarn et al (2014b)の図を一部改変。

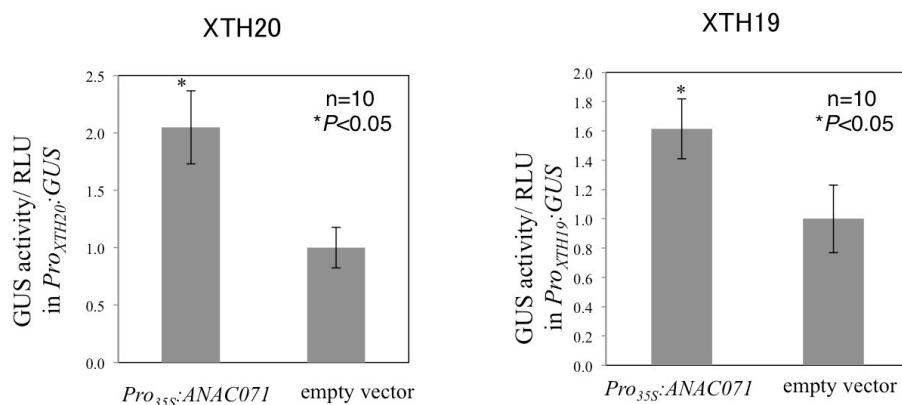


図10. XTH20, 19遺伝子の発現に対するANAC071の一過的発現の影響

ANAC071を35Sプロモーターを用いてシロイヌナズナ葉で一過的に発現させた場合のXTH遺伝子発現に対する影響を、XTH20::GUS、XTH19::GUS植物を用いて解析した。同時にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、内部標準として用いた。解析には、感染後3日目の葉を用いた。Pitaksaringkarn et al (2014b)の図を一部改変。

アグロバクテリウムを介して *ANAC071* を一過的に発現させると *XTH20, 19* のプロモーター活性が高まることが示された（図 10）。以上の結果から、オーキシンで誘導された *ANAC071* によって直接制御を受けて発現した *XTH20, 19* がキシログルカンの再編を通して癒合過程の細胞分裂に関与していることが示された（Pitaksaringkarn et al 2014b）。

3. 今後の展望

以上より、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に必須の転写因子と植物ホルモンおよび細胞壁代謝の働きが明らかとなった。組織癒合のような植物の有する再生能力は接ぎ木としても利用され、果菜類や果樹の苗の生産に無くてはならない農業技術となっている（尾形 2005）。しかし、接ぎ木親和性の分子メカニズムに関する詳細は明らかとなっていない。形態学的知見が詳しく得られている一方、生理学的、分子生物学的知見は未だ不足しているのが現状である。また、組織間・個体間の親和性により癒合が影響を受けるため、接ぎ木においては、その親和性と活着性が、実用性の面においてもっとも大きな問題となっている。現在までに構造上の相違、組織分化の欠損、二次代謝産物の相違等を考えられているが、接ぎ木親和性の分子メカニズムに関する詳細は明らかとなっていない。今後、接ぎ木や傷害における植物組織治癒の分子的メカニズムの解明を目指していきたいと考えている。

4. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、理化学研究所・神谷勇治先生、東北大学・山口信次郎先生、西谷和彦先生、横山隆亮先生、埼玉大学・高木優先生、産業技術総合研究所・光田展隆先生、名古屋大学・石黒澄江先生、帝京大学・横田孝雄先生、山根久和先生には、研究材料のご提供、ご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。また、研究を共に進めてくれました、筑波大学・松岡啓太博士（現・帝京大学）、東克也君、清水美甫さん、及び植物生理学研究室の皆さん、帝京大学・植物生理学研究室の皆さんにお礼申し上げます。

本研究の一部は、科学研究補助金・若手研究B(26840098)、特定領域研究・植物メリシステムと器官の発生を支える情報統御系(21027004)、新学術領域研究・植物細胞壁の情報処理システム(24114006)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・植物オキシリピンの生理機能の解明とその応用(S1311014)、帝京大学理工学部教育研究推進特別補助金(H21-22, H24-25)の支援を受けて行いました。

引用文献

- 朝比奈雅志 (2013) 植物切断組織の癒合における植物ホルモンおよび転写因子の役割。植物の生長調節 48 : 14-23
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, Yamazaki T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Okada K, Nishimura T, Koshiba T, Yokota T, Kamada H and Satoh S** (2011) Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*: **108** (38) 16128-16132.
- Asahina M, Gocho Y, Kamada H and Satoh S** (2006) Involvement of inorganic elements in tissue-reunion in the hypocotyl cortex of *Cucumis sativus*. *J Plant Res* **119**:337-342.
- Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H and Satoh S** (2002) Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue-reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* **129**: 201-210.
- 朝比奈雅志・佐藤忍 (2004) 切断組織の癒合とジベレリンの関与。植物の生長調節 36 : 135-141

- Asahina M, Yamauchi Y, Hanada A, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S and Yamaguchi S** (2007) Effects of the removal of cotyledons on endogenous gibberellin levels in hypocotyls of young cucumber and tomato seedlings. *Plant Biotechnol* **24**:99-106.
- Flaishman MA, Loginovsky K and Lev-Yadun S** (2003) Regenerative xylem in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* **22**:253-258.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T and Ohme-Takagi M** (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**:733-739.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A** (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell*. **25**(9): 3159–3173.
- Kollmann R and Glockmann C** (1985) Studies on graft unions.I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* **124**: 224-235.
- Mattsson J, Sung ZR and Berleth T** (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* **126**: 2979-2991.
- 尾形凡生 (2006) 接ぎ木の生理。植物の生長調節 **40** : 131-138
- Pitaksaringkarn W, Ishiguro S, Asahina M, Satoh S** (2014a). ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Biotechnol.* **31**, 49–53.
- Pitaksaringkarn W, Matsuoka K, Asahina M, Miura K, Sage-Ono K, Ono M, Yokoyama R, Nishitani K, Ishii T, Iwai H, Satoh S** (2014b). XTH20 and XTH19 regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* **80**, 604–614.
- Reid JB and Ross JJ** (2011) Regulation of tissue repair in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*: **108** (42) 17241-17242.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfels H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P and Scheres B** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* **99**: 463-472.
- Sachs T** (2000) Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant Cell Physiol* **41**: 649-656.
- Siegel BA and Verbeke JA** (1989) Diffusible factors essential for epidermal cell redifferentiation in *Catharanthus roseus*. *Science* **244**: 580-582.
- Stoddard FL and McCully ME** (1980) Effects of excision of stock and scion organs on the formation of the graft union in coleus: A histological study. *Bot Gaz* **141**: 401-412.
- van der Schoot C, Dietrich MA, Storms M, Verbeke JA and Lucas WJ** (1995) Establishment of a cell-to-cell communication pathway between separate carpels during gynoecium development. *Planta* **195**: 450-455.
- Walker DB** (1975) Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. *Am J Bot* **62**: 457-467.
- Wang Y and Kollmann R** (1996) Vascular differentiation in the graft union of in-vitro grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *J Plant Physiol* **147**: 521-533.