

## 植物の茎における傷害に対する応答

森山 和 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

### 背景

陸上植物は根を張っているため自ら移動する事が出来ない。そのため低温や乾燥、食害などのストレスから逃れる事は困難であり、代わりにそれらのストレスに移動する事なく応答する能力を獲得してきた。物理的な傷害については組織癒合という傷を塞いで治す応答が行われることが知られているが、組織癒合の機構は未だ多くの不明な点を残しているため、私の所属する研究室では植物の茎部の皮層や髄における組織癒合過程における分子機構を明らかにする事を目的として研究を行っている。

先行研究により、モデル植物であるシロイヌナズナの花茎に人為的に傷害を加えると、その3日後には髄組織での細胞分裂が再開し、7日後には組織の修復がほぼ完了することや、そのための細胞分裂には植物ホルモンの1つであるオーキシンが関与していることが判明している。また、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析から、処理の1日後から3日後にかけて、癒合部において植物ホルモン関連遺伝子や転写制御因子関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子の発現が特異的に上昇する事が示されている。

私の行う研究では、その中でも処理の1日後に素早く発現が上昇するという特徴を持つ遺伝子、*EXP10* (At1g26770) に着目することとした。*EXP10*は細胞壁の構造に影響してこれを緩める作用をもつタンパク質エクспанシンをコードしている遺伝子だが、傷害応答に関わる詳しい働きは未判明であるため、形質転換などを利用して調査を進めることとした。

また、植物の組織癒合は農業技術である接ぎ木に深く関連するものだが、主にシロイヌナズナで研究が進んでいる反面、接ぎ木を直接利用するキュウリやトマトなどの農業作物ではあまり研究が進んでいない。このため私は農業的に接ぎ木の対象とされることの多いトマトの茎部での組織癒合についても調査した。

### 材料・方法

#### 1. シロイヌナズナの形質転換

モデル植物であるシロイヌナズナの、一般的に用いられる野生型品種 Columbia-0 を background として用いた。過剰発現のための *EXP10* の全長 cDNA と、その RNAi 導入形質転換体作製のための DNA をエンターベクター (pENTR/D-TOPO) に導入し、大腸菌を用いてプラスミドを増やして抽出した。その後シーケンチェックを行なって導入が成されたことを確認し、過剰発現のためのもの、RNAi 導入形質転換体のためのものをデスティネーションベクター (それぞれ pK2GW7.0、pK7GWIWG2(II),0、ともにカナマイシン耐性とスペクチノマイシン耐性を与える遺伝子をコード) に導入した。再び大腸菌を用いてプラスミドを増やして抽出、シーケンチェックを行なって導入を確認し、完成したベクターを *Agrobacterium* 法を用い、シロイヌナズナに形質転換を行なった。シロイヌナズナは 4°C、暗所にて 2~3 日間吸水させた後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度 1%) に Tween-20 を、2、3 滴加えた混合液に 5 分間浸して滅菌し、DW で 10 回洗浄して、1/2 濃度の

ムラシゲ・スクーグ培地 (和光純薬工業) 上に無菌播種し、インキュベーター内にて生育させ ( $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 22°C, 連続光)、ロゼット葉が十分に展開した後、育苗用培土 (コープケミカル株式会社) とバーミキュライトの混合培養土上に植物体を移植し、さらに育成したものをを用いた。

#### 2. トマトの組織観察

観察用のトマトは、接ぎ木の下側となる台木用の品種として広く用いられる LS-89 品種 (サカタのタネ) を用いた。もっとも発芽率がよく成長も安定していた、育苗用培土 (コープケミカル株式会社) を培養土として用い、培養室内 (26°C、明期 16h/暗期 8h) で育成した。播種後 14 日後の胚軸部の中心或いは播種後 21 日後の第一節間部の中心に、マイクロサージカルナイフで茎部直径の半分の深さとなるような切断傷を与える切断処理をそれぞれ行ない、その1日後、7日後に傷を与えた部位周辺約 5mm を切り出し、2.5% グルタルアルデヒド、1% パラフォルムアルデヒド混合液 (100mM リン酸バッファー pH7.4) 中にて、約 30 分間脱気した後、一晚固定した。同バッファーで 4 回洗浄したあとエタノールシリーズ (30%、50%、70%、90%、100%。50% エタノールによる脱水までは 4°C 下で行い、その他は室温) による脱水と、テクノビット樹脂と 100% エタノールの混合溶液による置換を行なった後に、テクノビット樹脂内に試料を包埋した。続いて切片をガラスナイフとマイクロトーム (Reichert EM-ULTRACUT, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて作成した。また、同実験を、無傷の播種後 14 日後の胚軸部の中心或いは播種後 21 日後の第一節間部の中心が輪切りとなるような形で行ない、胚軸部の組織と第一節間部の組織の相違を、切片を 0.1% (w/w) トルイジンブルーにて染色した後、光学顕微鏡 (DMRBm Leica, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

### 結果・考察

#### 1. シロイヌナズナの形質転換

T3 世代に於いてヘテロ接合の個体まで作製と選抜が完了した。

#### 2. トマトの組織観察

輪切りの試料の比較によって、維管束と表皮の組織が胚軸部と第一節間部で大きく異なり、第一節間部では中央に髄が存在することを確認した。維管束は配置が異なり、表皮組織は細胞層数が異なっていた。

切断処理を行なった試料では、切片作製を行った。

### 今後の展望

#### 1. シロイヌナズナの形質転換

継代を重ねて、ホモ接合の個体を得、その形質を組織癒合の観点から観察し、*EXP10* の組織癒合に於ける機能を調査する。

#### 2. トマトの組織観察

組織癒合過程を確認し胚軸と茎での基本的な形態変化を確認した後、植物ホルモンの作用や細胞壁成分の組織癒合に於ける変化に着目して、解析を行う。