

## シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における

## マトリクスメタロプロテアーゼの作用機構に関する研究

小山 初音 (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・目的】

接ぎ木や傷害において茎組織が切断されると、それを修復するように新しい組織が形成される。シロイヌナズナ花茎は傷害を受けると、すぐに髄細胞が分裂を始め、組織癒合は通常 7 日で完了する。

先行研究から、*Matrix metalloproteinase (MMP)*の発現レベルが組織癒合の終期で上昇することが確認された。MMP は脊椎動物で細胞外マトリクスの分解と再編に関わるプロテアーゼであり、植物における機能の大部分が未知である。一方で、切断してない花茎ではほとんど発現が確認されなかったことから、MMPの発現が組織癒合に何らかの関連があると推測された。

次に MMP の発現部位を real time PCR によって解析した。その結果、通常は MMP の発現は地下部で見られるが、傷害を与えると傷害部の上部、下部で発現があることが確認された。

また、欠損変異体である *mmp* で癒合実験を行ったところ、本来癒合が完了する 7 日後に異常な細胞分裂が確認された。この *mmp* を background として MMP を過剰発現させると 7 日後に正常な癒合が完了した。WT を background とした MMP の過剰発現体でも正常に癒合が完了した。*mmp* の癒合部の細胞について解析を行うと、*at2-mmp* では WT に比べて細胞数が増加し、細胞分裂領域が拡大しており、*mmp* では癒合部の細胞分裂が促進されることが示された。これらの結果から MMP は組織癒合の終期に細胞分裂を停止させていると推測された。一方、プロテアーゼである MMP の内生基質の探索を目的とした浸漬培養で、WT、*mmp*、*MMPOX(WT)*を用いて、培地中の分解産物のプロテオミクス解析が行われた。その結果、*MMPOX(WT)*の浸漬培養でのみ見られるペプチドがいくつか見出された。

本研究では MMP の組織癒合過程における作用、プロテオミクス解析で得られたペプチドと組織癒合の関係を明らかにすることを目的とした。

## 【材料・方法】

研究材料には、モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の *MMP:GUS* 形質転換体、及びペプチドの欠損変異体を用いた。個体は MS 寒天培地に播種し、播種から 2 週間後で人工土に植え替えた。

1. *MMP:GUS* 形質転換体の染色

*pAt2-MMP:GUS* 形質転換体が抽臺して 7-10 日後に、花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 日後にサンプリングし、それぞれ切断部における GUS 染色性の違いを観察した。

## 2. 欠損変異体(mutant)の形態観察

*mutant* が抽臺して 7-10 日後に、花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から 0, 1, 3, 5, 7 日後にサンプリングし、Technovit 樹脂に包埋した。その後、切断部位の組織癒合の経過について形態学的観察を行った。

## 【結果・考察】

1. *MMP:GUS* 形質転換体の染色

観察を行った結果、切断から 3, 5, 7 日後の花茎の切断部で GUS の染色性が高かった。一方、切断から 0, 1 日後の組織癒合前期、及び組織癒合完了後の切断から 10, 14 日後では GUS の染色が確認できなかった。これは、real time PCR から得られた組織癒合終期に *MMP* の発現レベルが高くなるという結果と一致した。

また染色は切断部の上部、下部で確認されたが、染色は表面に限定されており、髄組織での染色は確認できなかった。今後は、染色部位を特定するために GUS 染色後の花茎を Technovit 樹脂に包埋し観察を行う予定である。

2. *mutant* の形態学的観察

現在 genotyping により選抜した *mutant* のホモ個体を培養中である。