

シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に関する細胞壁酵素に関する研究

服部 優理那 (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】

植物では、接ぎ木や傷害によって茎組織が破壊されると、それを修復するように新たな組織が形成される。シロイヌナズナの花茎では傷害を受けてすぐに髄細胞が分裂し始め、通常 7 日程度で組織の癒合が完了する。

matrix metalloproteinase (MMP) は脊椎動物において細胞外マトリクスの分解、再編に関わっている。また、シロイヌナズナにおいては5つの MMP が発見されている。その中でも、*At2-MMP*が組織癒合の後期において、高い発現レベルが見られたため、組織癒合に関与しているのではないかと考えられた。

また、*At2-MMP*の傷害上部・下部での発現レベルの違いに差はなく、ともに増加していた。表現型の解析を行ったところ、*At2-MMP*欠損 mutant では正常な組織癒合が行われず、傷害部で異常な細胞分裂が促進された。

一方、*At2-MMP*の基質となるタンパク質が何であるか調べるため、浸漬培養した植物から分泌されるタンパク質を、プロテオミクス解析を行い、野生型、欠損変異体、過剰発現体を比較したところ、receptor-like protein kinase (FERONIA)が過剰発現体でのみ検出された。これらの結果から、傷害から1-3日後に FERONIA が細胞分裂を促進し、3-5日後になると、*At2-MMP*が FERONIA を分解することで細胞分裂が停止するという作用機構が考えられた。しかし、*FERONIA*欠損変異体では、傷害を受けた花茎の細胞分裂に変化は見られず、正常に癒合が完了した。そこで、新たに、プロテオミクス解析を行い、野生型、欠損変異体、過剰発現体を比較したところ、5つの receptor like protein kinase 等の制御系遺伝子が検出された。

また、*At2-MMP*には亜鉛結合ドメインがあり、酵素活性には亜鉛を必要とする。以前の研究で亜鉛存在条件、欠乏条件での組織癒合の確認をしたところ亜鉛欠乏条件で異常な組織癒合が確認されたが、追試がなされていなかった。

本研究では、*At2-MMP*の基質となっているタンパク質を同定し、その機能を明らかにすることで、*At2-MMP*による組織癒合の制御機構を解明する。

【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(*Colombia*)の *At2-MMP::GUS*形質転換体、及び欠損 mutant、wild type を用いた。個体は MS 寒天培地に播種し、その後、人口土に植え替えた。

① *FERONIA* 欠損 mutant のフェノタイプの観察

mutant が抽だいして約2週間後に花茎の第1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。

② プロテオミクス解析の結果により同定された5つの遺伝子の発現解析

ABRC で購入した T-DNA 挿入変異体の種子を蒔き、genotyping を行い、個体のホモ選抜を行った。

③ *At2-MMP::GUS*の形質転換、染色

形質転換体が抽だいして約2週間後に花茎の第1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、それぞれの切断部における GUS 染色性の違いを観察した。

④ 亜鉛欠乏条件で育てた個体と *At2-MMP* mutant の比較観察

亜鉛欠乏と存在の両方の条件の MS 培地で wild type を2週間培養した後、同条件の水耕栽培に移行し、抽だいして約2週間後に花茎の第1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。

【結果・考察】

① *FERONIA* 欠損 mutant のフェノタイプの観察

先行研究の結果と同様に、1、2、3、5、7日後どの花茎でも細胞分裂に変化が見られず、正常に癒合が完了した。この結果から、*FERONIA*は組織癒合に関わっていないと考えられた。

② プロテオミクス解析の結果により同定された5つの遺伝子の発現解析

現在、genotyping を進めている。

③ *At2-MMP::GUS*の形質転換、染色

形質転換体が5ライン得られ、傷を付けて5日目に GUS 染色を行ったところ、傷の上下で発現が見られた。

④ 亜鉛欠乏条件で育てた個体と *At2-MMP* 欠損 mutant の比較観察

現在、切片を作製して癒合過程を解析している。