

## 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ス結合タンパク質の関わり

大場裕介 (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】

植物は自然界において風や害虫による食害の影響で茎組織が傷害を受けることがあり、この傷を修復するメカニズムが存在する。このメカニズムのことを組織癒合と呼んでいる。組織癒合に関する研究がシロイヌナズナを用いて行われており、シロイヌナズナの茎では傷害を受けて3日後から髄細胞の細胞分裂が開始し、7日後に傷口がふさがり組織癒合が完了する(Asahina *et al.*, 2011)。

これまでの研究により組織癒合時に傷の上側ではオーキシンの蓄積、エチレンにより転写因子であるANAC071が誘導され、傷の下側ではオーキシンの枯渇、ジャスモン酸により転写因子であるRAP2.6Lが誘導されることが知られている(Asahina *et al.*, 2011)。ANAC071の下流遺伝子は調べられていたが、RAP2.6Lの下流遺伝子は調べられてこなかった。そのためRAP2.6Lの下流遺伝子の候補の一つとしてPlasmodesmata callose binding protein (PDCB)がピックアップされた。

PDCBは原形質連絡の頸部領域においてカロースと結合し原形質連絡の輸送を抑制する働きをもつとされているPDCBファミリーの一種のタンパク質である(Simpson *et al.*, 2009)。このPDCBは生理学的に不明な点が多いタンパク質であるが組織癒合において重要な働きがあるのではないかと考えた。

そこで本研究ではこのPDCBが組織癒合において、どのような制御を受けているのか、またどのような機能があるのかを明らかにすることを目的とした。

### 【材料】

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた。

Wild type (WT)、*pcb* mutant、

*proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体、ジャスモン酸情報伝達関連遺伝子欠損変異体 (*jar1*、*fin219*、*coi1*)、*RAP2.6L-SRDX* 形質転換体をMS培地に播種してから人工土に植え替え、あるいは直接人工土に播種し生育させた。

### 【方法】

① *jar1*、*fin219*、*coi1*、*RAP2.6L-SRDX* 形質転換体における *PDCB2* の発現解析

抽苔してから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1日後にサンプリングを行い、qRT-PCRにより *PDCB* の発現量を解析した。

② *pcb* mutant、*proPDCB::SP:EYFP::PDCB2* 形質転換体の表現型観察

抽苔してから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7日後にサンプリングを行い、Technovit 樹脂に包埋、切片の作製を行った。その切片をトルイジンブルーにより染色し、形態学的観察を行った。

### 【結果・考察】

① *jar1*、*fin219*、*coi1*、*RAP2.6L-SRDX* 形質転換体における *PDCB* の発現解析

どの変異体、形質転換体でも WT と同様に切断処理により *PDCB* の発現が上昇した。この結果から *PDCB* はジャスモン酸や *RAP2.6L* の制御下にはないと考えられる。

② *pcb* mutant、*proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体の表現型観察

*pcb* mutant では、髄細胞の過剰な押し出しが起こり、傷口の上側の皮層の厚みが増すとといった表現型が観察された。また、相補実験を兼ねて作成した *proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体ではこのような表現型が解消された。この結果から *PDCB* は組織癒合における髄、皮層の細胞分裂を制御しているのではないかと考えられる。

### 【今後の展望】

今後の展望としては、図1で表されるような仮説を立証していきたいと考えている。

*PDCB* の誘導機構の面ではジャスモン酸による制御下にあることが示されたので傷害時に上昇することが知られている ROS とエチレンによる制御の可能性が浮上した。このため、*PDCB* と ROS やエチレンの関係性について今後調べていく。

作用の面では *proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体を用いての YFP 蛍光観察によるタンパク質の局在調査、*PDCB* はカロースと結合することが知られているため、*pcb* mutant におけるカロース局在の調査、*PDCB* は原形質連絡による輸送を抑制しているため、癒合部における原形質連絡を介した物質輸送の調査を考えている。

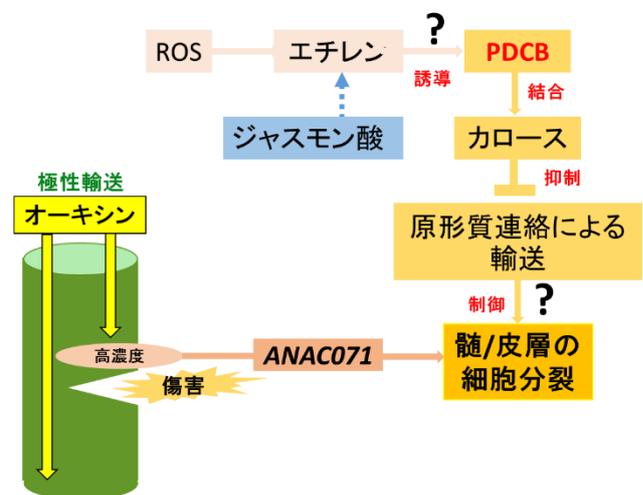


図1. *PDCB* の組織癒合における誘導機構と作用の仮説