

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ックスメタロプロテアーゼの機能に関する研究

小柴 峻 (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】

自然界では、高等植物は常に草食動物や風などの生物的または非生物的なストレスに曝されている。傷害、特に茎の場合は、組織間での水や物質の移動のサポートを担っているために、植物の生存を脅かす可能性がある。そのため、植物は傷ついた茎を再生する機能を備えており、これを組織癒合と呼ぶ。シロイヌナズナ花茎では、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ている。MMP は、活性部位に亜鉛イオンを含むプロテアーゼファミリーで、脊椎動物で細胞外マトリクスの分解に関わることで知られているが、植物における機能の大部分が未知である。シロイヌナズナでは、*At1-MMP* から *At5-MMP* が確認されており、MMPファミリーを形成している。また、MMP は組織癒合後期の 3 日から 7 日にかけて発現していることがわかっている。特に、*At2-MMP* は切断処理後、3 日から 7 日まで発現が上昇している。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、*At2-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。このことから *At2-MMP* は、組織癒合に関しての寄与している可能性が高いと考えた。

また、欠損変異体である *at2-mmp* の組織癒合実験では、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。*at2-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、*at2-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。しかし、現在までにこの表現型が観察される場合とそうでない場合があり、表現型の出現頻度が不明であった。一方、プロテアーゼである MMP のターゲットとなる内生基質タンパク質の探索を目的とした浸漬培養で、WT、*mmp*、MMP 過剰発現体(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 MMP のターゲットとなるタンパク質の分解産物ペプチドが網羅的に解析されている。現在までにレセプターキナーゼに着目した実験がなされてきたが、有力な候補が見出されていない。そこで本研究では、(1)*at2-mmp* の異常な細胞分裂を示す表現型の出現頻度の観察、(2)MMP のターゲットとなる内生基質タンパク質ライブラリーより新規候補タンパク質を同定することを目的に実験を行った。本研究により MMP の組織癒合過程における機能を明らかにできることを期待している。

研究材料には、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の WT、欠損変異体である *at2-mmp* を用いた。

1. *at2-mmp* の異常な細胞分裂を示す表現型の出現頻度の観察

WT と *at2-mmp* が抽臺して 7 日から 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ージェリーナイフを用いて切断した。切断から 7 日後、サンプリングをし、Technovit 樹脂に包埋した。その後、切断部位の組織癒合について形態学的解析を行った。

2. MMP のターゲットとなる内生基質タンパク質ライブラリーより新規候補タンパク質の検索

プロテオミクス解析による検出量が、*At2-MMP* OX > WT > *at2-mmp* の順であり、細胞外シグナルに関与している可能性の高い候補タンパク質を調査した。

【結果・考察】

1. *at2-mmp* の異常な細胞分裂を示す表現型の出現頻度の観察

WT と *at2-mmp* で異常な細胞分裂を示す表現型の出現頻度比較観察を行った結果、WT では 9% 程度と低い頻度で観察された対し、*at2-mmp* では、約 64% の頻度で観察された。高い頻度で異常な細胞分裂を示すことは確認できたが、常に表現型が観察できる変異体ではないことが示された。そのため、今後の実験も MMP のターゲットとなる内生基質タンパク質ライブラリーの検索についても、この頻度を考慮して行う必要があると考えられる。

2. MMP のターゲットとなる内生基質タンパク質ライブラリーより新規候補タンパク質の検索

ライブラリーを検索した結果、レセプターキナーゼ意外にも新しくレクチンと GPI アンカー型タンパク質が関係していることが示され、合計 4 種類が MMP のターゲットとなっている可能性が高いことが見出された。今後、当該レクチンを投与して組織癒合実験を行ったり、変異体を用いた表現型観察を行ったりする実験を計画している。

【材料・方法】