

論文内容の要旨

論文題目 A study on regulatory roles of auxin in early process of transdifferentiation into tracheary elements
(オーキシンによる管状要素分化転換初期過程の制御に関する研究)

氏名 吉田 彩子

序論

オーキシンは維管束の形成過程で重要な役割を果たすと考えられている。例えば傷口に IAA を塗布することで傷口に向かうような連続的な維管束が異所的に形成され、極性輸送阻害剤の処理により葉縁部の維管束形成が促進される。しかし維管束形成に関するオーキシンの分子機構はほとんど明らかになっていない。その大きな原因として維管束系を植物体から取り出して生理学的、分子生物学的な解析を行うことが困難である上に、近年活発に行われている遺伝学的解析も、維管束形成関連突然変異体が示す致死性の影響によりその詳細な分子機構の解析が難しいことが挙げられる。そこで、ヒヤクニチソウの葉肉細胞を用いた管状要素分化誘導系 (図 1) では維管束系の細胞のみを *in vitro* で培養できるため生理学的、分子生物学的な解析が容易であるという利点を生かし、この系を用いた解析を開始した。修士課程では極性輸送阻害剤により管状要素分化が阻害されること、この分化阻害が過剰量のオーキシンにより回復することを示した。博士課程では極性輸送阻害剤による分化阻害機構について調べるとともに、極性輸送阻害剤による分化抑制とオーキシン添加による分化回復の系を利用したマイクロアレイ解析を行うことで、管状要素分化過程におけるオーキシン制御の分子機構の解明を試みた。

結果と考察

(1) 管状要素分化系へのオーキシン極性輸送阻害剤の影響

オーキシン極性輸送阻害剤の NPA、TIBA、HFCA を管状要素の分化誘導培地に投与して培養すると、管状要素分化と細胞分裂が阻害された (表 1)。NPA、TIBA、HFCA は、ほぼ同じ阻害の様式を示した。この NPA による分化阻害効果は過剰量の NAA、IAA、2,4-D により回復した (図 2, 3)。これまで極性輸送阻害剤は細胞からのオーキシン排出を阻害して、オーキシン蓄積を引き起こすと考えられてきたが、私の結果からはむしろ、管状要素分化系では極性輸送阻害剤の投与で細胞がオーキシン欠乏状態になることを示唆した。

そこで細胞内の NAA を定量するために、培養開始時に $[^3\text{H}]$ -NAA を添加して 48 時間培養後の細胞内 NAA 量を測定した。その結果、NPA 処理で細胞内の遊離型 NAA が減少し、代謝型 NAA が増加していた (図 4B, C, D)。また代謝型 NAA の増加により細胞内の総 NAA 量は通常より増加していた (図 4A)。よって NPA による分化阻害の一因として、NPA が細胞からの NAA 排出を阻害して細胞内に NAA を蓄積させる一方で、NAA の代謝経路の活性化により NAA 代謝産物の生成が促進され、分化に必要な遊離型 NAA 量が減少して分化が阻害された可能性が考えられた。

これを更に確かめるために、DR5 (オーキシン誘導性プロモーター)::YFP (核移行型) をヒヤクニチソウに導入し、個々の細胞のオーキシン応答性を調べた。その結果、NPA 処理細胞では YFP 蛍光が顕著に減少していることが明らかになった (図 5)。一方、分化誘導培地の細胞は二次壁肥厚が開始した成熟過程にある管状要素を含めて強い蛍光が観察された (図 6)。この結果は、NPA が細胞内活性化型オーキシン量を減少させ、それに伴いオーキシンシグナル伝達活性が低下する可能性を強く示唆した。

NPA の作用時期を調べた NPA のパルス処理実験では、培養 36 時間目までの NPA 添加で管状要素分化が阻害された (図 7A, B)。培養開始時に NPA 添加した細胞に NAA を経時的に添加して分化回復のタイムコースを調べた実験から、NPA による分化阻害は NAA 添加後、同じタイムコースで回復することが分かった (図 7C)。よって NPA は少なくとも分化初期に阻害作用を示すことがわかった。

(2) マイクロアレイによる管状要素分化転換過程のオーキシン作用の解析

NPA と NAA のパルス処理実験により、管状要素分化を自在に停止・再開できるようになった。そこでこれを利用して、NPA で分化阻害した際と、NAA で分化回復した際のマイクロアレイを行い、オーキシンにより制御される分化ステージとその分子機構の解析を試みた。

まず NPA で阻害される分化ステージを調べるために、培養開始時に NPA 添加して 24、36、48、60、72 時間培養した細胞での遺伝子発現プロファイルを、約 9000 個の遺伝子に対応できるマイクロアレイシステムで解析した。これまでに山田ら (2002) により、分化進行に伴って様々な発現パターンを示す 24 グループ、523 遺伝子が知られており (図 8A, B) A、B グループにはステージ 1 (脱分化過程) で発現抑制される遺伝子、C グループにはステージ 1 で発現誘導される遺伝子、D、E、F グループにはステージ 2

(分化能制限過程) 及びステージ 3 (管状要素特異的分化過程) で発現誘導される遺伝子が含まれる (図 8A, B)。これらの遺伝子発現パターンを分化進行の指標として、NPA 処理細胞でのステージの進行を調べた。すると A、B、C グループに属するステージ 1 で発現が変動する遺伝子は、NPA 投与により発現レベルが高いままに保たれる傾向があった (図 8B)。一方、D、E、F グループのような分化誘導条件においてステージ 2 及び 3 で発現誘導される遺伝子は発現抑制された (図 8B)。よって NPA はステージ 1 から 2 への移行を阻害すると考えられた。

次に NPA による阻害を NAA で打ち消した際の遺伝子の発現を調べることで、オーキシンの分化誘導の分子機構を調べるとともに、オーキシンの制御される維管束細胞への分化転換のキー遺伝子の同定を試みた。NPA 処理して 60 時間培養した細胞に NAA を添加して、0.7、4、12、24 時間後の細胞における遺伝子発現パターンを調べた。すると、ステージ 1 で発現抑制される A1 グループの遺伝子群は NAA 添加 4 時間後から発現抑制された (図 9)。これに対してステージ 2 で発現誘導される D3 グループの遺伝子群は NAA 添加 40 分後もしくは 4 時間後から発現誘導された (図 10)。一方、最終的な管状要素分化過程ステージ 3 で発現誘導される E4 グループに属する遺伝子群の一部は、24 時間目から発現上昇がみられた (図 11)。

個々の遺伝子機能に注目すると、*AUX/IAA* ファミリーの遺伝子ホモログは、NAA 添加後 0.7 時間から迅速に発現誘導された。さらに 4 時間後にはオーキシン取り込みキャリアーの *AUX1* ホモログが発現誘導された (図 12, 13)。よって管状要素分化過程におけるオーキシン作用として、オーキシン取り込みキャリアーの生産を誘導し、細胞内へのオーキシンの取り込みを促進して分化促進する、というポジティブフィードバック作用が示唆された。*AUX1* ホモログの遺伝子発現誘導に伴って *ARF* ファミリーの遺伝子ホモログも発現誘導され、オーキシンスIGNALが増強されていることが裏付けられた。

さらにステージ 3 への移行に必要なブラシステロイドの生合成遺伝子 *DWF4* や、維管束細胞への分化転換のキー遺伝子である NAC ドメイン転写因子でシロイヌナズナの *VND* ファミリーの遺伝子ホモログ、また前形成層及び未成熟な木部で発現する *ZeHB13* も NAA 添加 4 時間後から発現誘導された (図 12, 13)。*ZeHB13* がオーキシンの下流で比較的初期に発現誘導されたことから、NAA で分化回復した際に発現誘導される遺伝子は、維管束分化の初期過程で機能することが示唆された。興味深いことに、サイトカイニンの分解に関与するサイトカイニンオキシダーゼ遺伝子ホモログの発現が NAA 添加により上昇したことから、管状要素分化過程でオーキシンの下流でサイトカイニンの分解が起きる可能性が示唆された。

まとめと展望

これらの結果から管状要素分化過程でのオーキシンの作用機構は以下のように考察される (図 14A, B)。管状要素分化過程では分化に必要な量の遊離型オーキシンが受容されて、オーキシンスIGNALが活性化され、その下流でステージ 2 の進行に必要な遺伝子群が発現誘導される。極性輸送阻害剤は細胞内にオーキシンを蓄積させることにより、遊離型オーキシンの減少を引き起こし分化を阻害するが、過剰量オーキシンの投与により、減少したオーキシンが補われて分化が回復する (図 14A)。オーキシンの下流ではステージ 1 の完了とステージ 2 の進行が起きる。ステージ 2 におけるオーキシン誘導性のイベントとしては、*AUX/IAA* 遺伝子発現による初期のオーキシン応答、次いでオーキシン取り込みキャリアーの生産によるオーキシンスIGNALのポジティブフィードバックと、*ARF* 遺伝子による更なるオーキシンスIGNALの増強が起きる。さらにステージ 3 への移行に必要なブラシステロイド生合成、サイトカイニン分解も遺伝子発現プロファイルにより示唆された。また前形成層で発現するホメオボックス遺伝子や維管束細胞への分化転換のキー遺伝子である NAC ドメイン転写因子などの、維管束特異的な運命決定に関与する遺伝子が比較的早い時期にオーキシンスIGNALに誘導され維管束分化が進行する (図 14B)。

今後はオーキシンスIGNALで発現誘導される遺伝子の機能解析を進めることにより、維管束への分化転換初期過程でオーキシンスIGNALで制御されるキーイベントの分子機構が明らかになると考えられる。

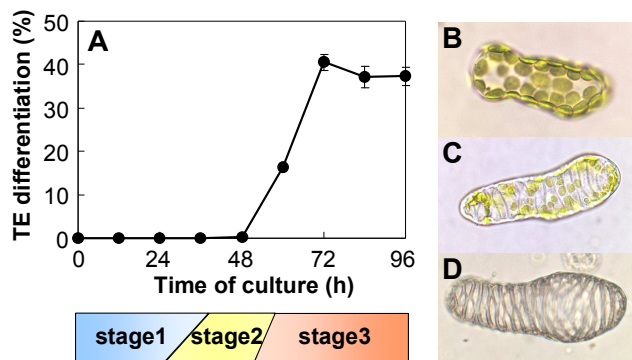


図 1 ヒヤクニチソウ葉肉細胞からの管状要素細胞の分化誘導系
機械的に単離した葉肉細胞を、オーキシンとして NAA、サイトカイニンとして BA を加えた培地中で培養すると、単細胞のまま高頻度かつ同調的に、道管の構成要素である管状要素細胞への分化が起こる (A)。この培養過程は、葉肉細胞の脱分化過程であるステージ 1、維管束細胞への分化能制限過程であるステージ 2、管状要素分化特異的なイベントが行われるステージ 3 に分けられる。(B) 単離直後の葉肉細胞、(C) 未成熟な管状要素、(D) 成熟した管状要素

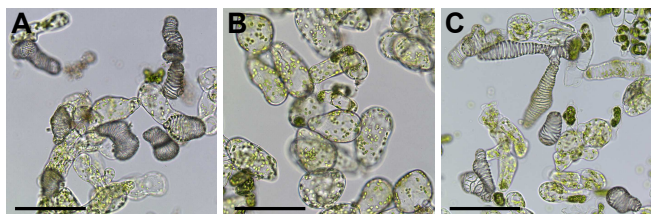
表 1 オーキシン極性輸送阻害剤の管状要素分化への影響

	Concentration (μM)	TE differentiation (%)	Cell division (%)	Cell viability (%)
NPA	0	29.1±2.1	15.7±2.5	66.5±1.2
	10	2.2±0.1	7.8±1.6	69.5±1.0
	20	0.6±0.2	7.7±2.0	66.2±3.2
	50	0.0±0.1	3.3±1.3	55.4±4.3
TIBA	0	30.9±1.3	32.3±2.6	76.2±0.5
	0.5	6.7±1.2	21.4±1.5	75.2±1.1
	1	0.8±1.1	10.9±3.9	73.4±0.6
	10	0.0±0.0	3.8±2.3	49.2±2.8
HFCA	0	30.9±1.3	32.3±2.6	76.2±0.5
	10	16.1±4.5	20.9±1.7	71.7±3.0
	20	5.1±3.5	28.3±1.4	69.8±3.2
	50	0.2±0.3	21.0±4.5	72.9±2.0

培養開始時にオーキシン極性輸送阻害剤を添加し、96 時間培養後、管状要素分化率と細胞分裂率を計測した。ここでは 3 つの独立に培養したサンプルから得られた平均値 ± 標準偏差を表示している。

図 2 NPA 処理細胞

分化誘導培地 (A)、もしくは分化誘導培地に 20 μM NPA を添加した培地 (B) で 96 時間培養したヒヤクニチソウの細胞。20 μM NPA による管状要素分化阻害効果は最終濃度 10.7 μM NAA により打ち消された (C)。Bars = 100 μm



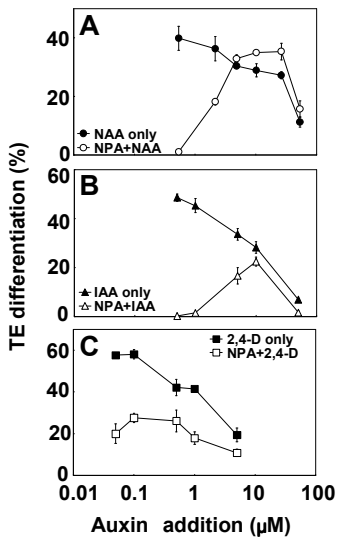


図3 様々な濃度のオーキシン添加による NPA の管状要素分化阻害効果の打ち消し作用
 20 μM NPA を含む分化誘導培地に、様々な濃度の NAA (A)、IAA (B)、2,4-D (C) を添加し、96 時間後に分化率が回復するかを調べた。このときグラフには示さなかったが、分化誘導培地では 36.1% (A) または 47.4% (B, C) の細胞が管状要素に分化した。一方、20 μM NPA の添加によって分化は完全に抑制された。

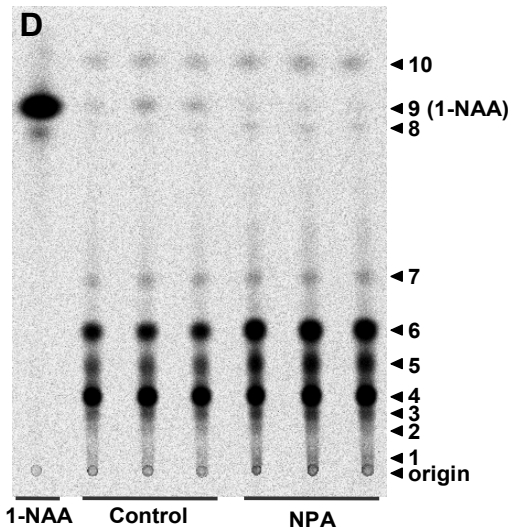
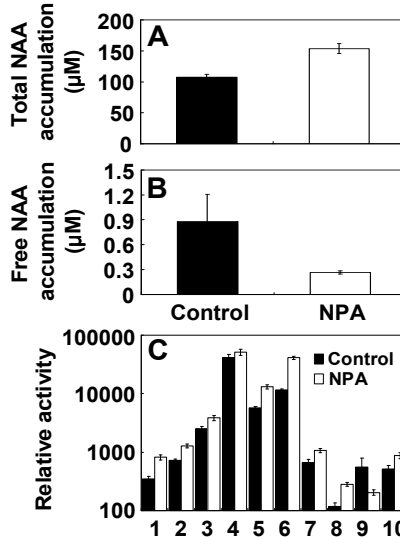


図4 細胞内総 NAA 量の測定と、遊離型および代謝型 NAA の分離

ヒヤクニチソウ細胞を標識/非標識 NAA を含む分化誘導培地、または標識/非標識 NAA と 20 μM NPA を含む培地で 48 時間培養した。培養後、細胞を培地から分離して、メタノールで NAA とその代謝産物を抽出した。このメタノール抽出液の RI カウントを液体シンチレーションカウンターで測定した後、スタンダードの標識 1-NAA と共に、薄層クロマトグラフィーで分離して、オートラジオグラフィーで検出した。(A) 推定総 NAA 濃度、(B) 推定遊離型 NAA 濃度、(C) D の各々のスポットの放射活性、(D) 薄層クロマトグラフィーのオートラジオグラフィー。測定値は 3 もしくは 4 サンプルの平均 ± 標準偏を示す。この実験は 2 回繰り返され、再現性のある結果が得られた。

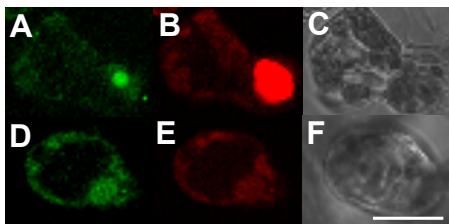


図5 NPA 処理細胞での DR5 プロモーター活性

核移行シグナルを持つ 35S::CFP と DR5::YFP をパーティクルボンバードメント法で、分化誘導条件または 20 μM NPA 添加して 48 時間培養した細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。分化誘導培地 (A, B, C) または NPA 添加培地 (D, E, F) の培養細胞における CFP 蛍光像 (A, D)、YFP 蛍光像 (B, E)、明視野像 (C, F)。Bar = 30 μm

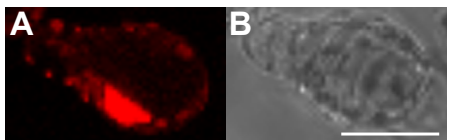


図6 未成熟な管状要素での DR5 プロモーター活性

DR5::YFP をパーティクルボンバードメント法で分化誘導培地で 48 時間培養した細胞に導入したところ、二次壁肥厚が始まっている未成熟な管状要素で YFP 蛍光が観察された。Bar = 30 μm

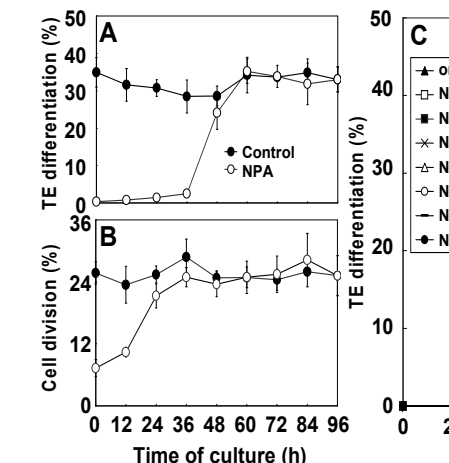
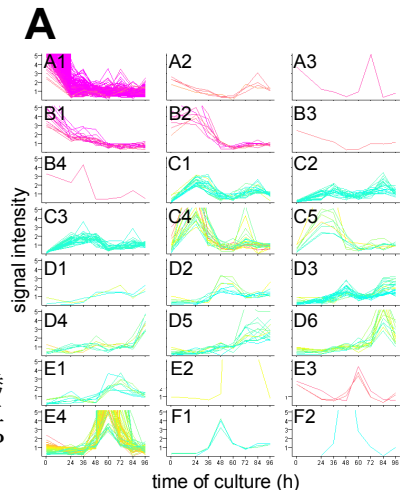


図7 NPA パルス処理による分化への影響と NPA 処理細胞への NAA パルス処理による分化回復のタイムコース
 (A, B) 培養開始時から 20 μM NPA を 12 時間毎にパルス処理し、96 時間目に管状要素分化率 (A) と分裂率 (B) を計測した。
 (C) 培養開始時に 20 μM NPA 処理した細胞に、最終濃度 10.7 μM になるように NAA をパルス処理し、240 時間目まで分化回復のタイムコースを調べた。

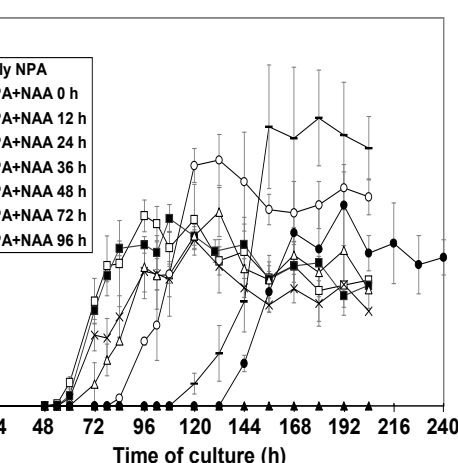
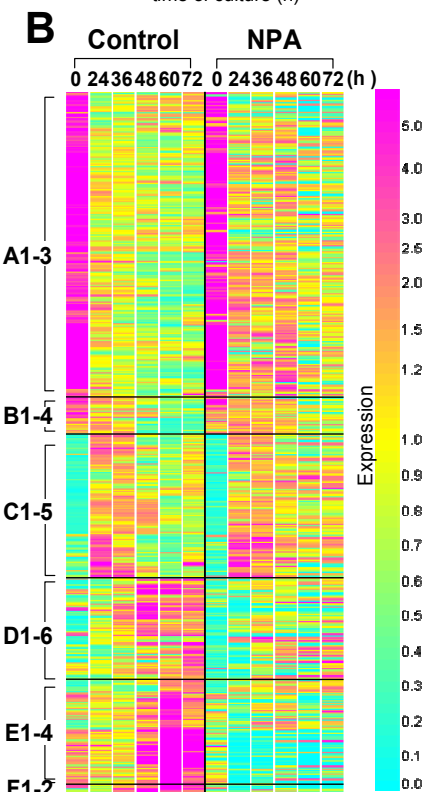


図8 分化に伴って様々な発現パターンを示す遺伝子群と、それらの発現に NPA が及ぼす影響

(A) 出村ら (2002) により、分化誘導条件で 8 倍以上発現変動する 523 遺伝子について、発現パターンの違いに基づいたクラスタリングにより、A から F までの 24 種類の遺伝子群へのグループ分けが行われた。(B) 分化誘導条件 (Control) の 523 遺伝子に対応する 20 μM NPA で分化を阻害した際の A から F グループの遺伝子のジーンツリー。カラースケールは発現量が何倍変化したかの度合いを示す。



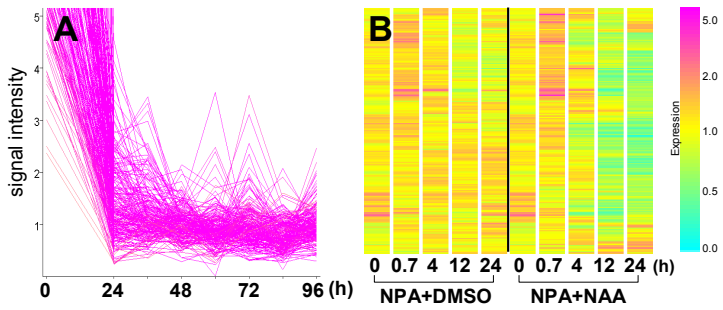


図9 ステージ 1 で発現抑制される A1 グループの遺伝子群の挙動

(A) 分化誘導条件でステージ 1 で発現抑制される A1 グループの遺伝子群、(B) NPA で分化阻害した際 (NPA+DMSO) と NAA で分化回復させた際 (NPA+NAA) の A1 遺伝子群のジーンツリー。カラースケールは発現量を示す。A1 グループの遺伝子群は NPA で分化を阻害したときは発現量は変化しないが、NAA で分化を回復させると発現抑制される。

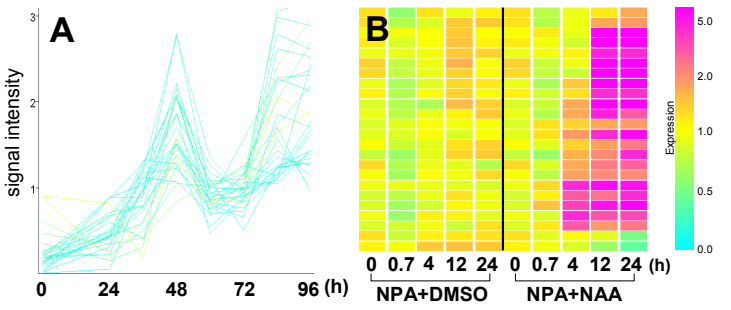


図10 ステージ 2 から発現誘導される D3 グループの遺伝子

(A) 分化誘導条件でステージ 2 から発現誘導される D3 グループの遺伝子群、(B) NPA で分化阻害した際 (NPA+DMSO) と NAA で分化回復させた際 (NPA+NAA) の D3 遺伝子群のジーンツリー。カラースケールは発現量を示す。D3 グループの遺伝子群は NPA で分化阻害したときは発現量は変化しないが、NAA で分化を回復させると発現誘導される。

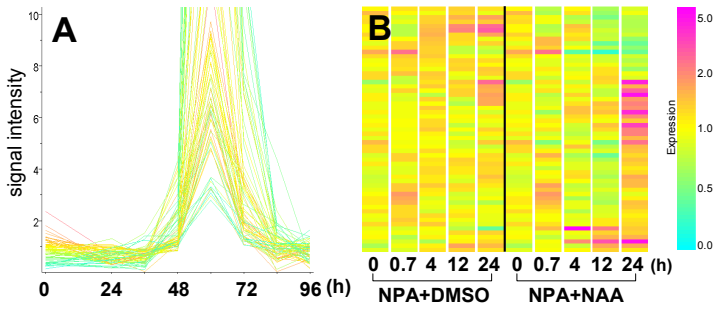


図11 ステージ 3 に一過的に発現誘導される E4 グループの遺伝子群

(A) 分化誘導条件でステージ 3 に一過的に発現誘導される E4 グループの遺伝子群、(B) NPA で分化阻害した際 (NPA+DMSO) と NAA で分化回復させた際 (NPA+NAA) の E4 遺伝子群のジーンツリー。カラースケールは発現量を示す。NAA で分化を回復させると、E4 グループに属する遺伝子群の一部では、24 時間目から発現上昇がみられた。

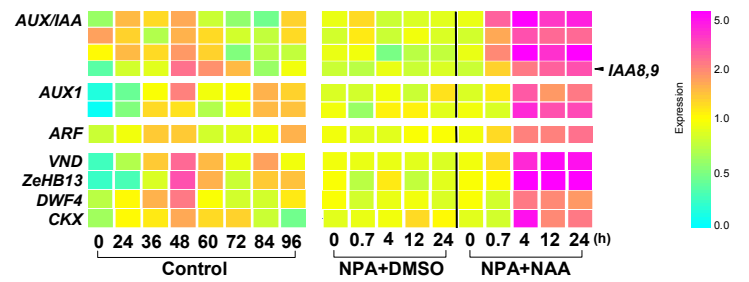


図12 植物ホルモンと維管束分化関連遺伝子ホモログ

分化誘導条件 (Control) と NPA による分化阻害時 (NPA+DMSO) および NAA による分化回復時 (NPA+NAA) のオーキシン取り込みキャリアー遺伝子ホモログ (*AUX1*)、オーキシシンシグナル伝達遺伝子ホモログ (*AUX/IAA*, *ARF*)、ブラスノステロイド生合成遺伝子ホモログ (*DWF4*)、NAC ドメイン転写因子でシロイヌナズナの *VND* ファミリー遺伝子ホモログ (*VND*)、クラス II ホモオボックス遺伝子 (*ZeHB13*)、サイトカニンオキシダーゼ遺伝子ホモログ (Cytokinin oxidase; *CKX*) の発現パターン。オーキシシンシグナル伝達遺伝子ホモログの中には維管束分化との関連が示唆されている *IAA8* または *IAA9* ホモログが含まれていた。カラースケールは発現量を示す。

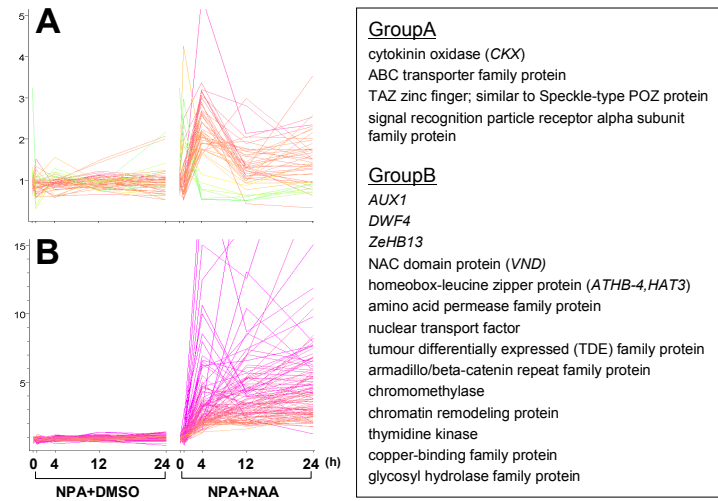


図13 NAA で分化を回復させた際に 2 倍以上発現誘導される遺伝子群

(A) NAA 添加 0.7 または 4 時間後に一過的に発現上昇するパターンを示すもの、(B) NAA 添加 0.7 または 4 時間から発現が上昇し、それが維持されるパターンを示すもの。縦軸はシグナル量を示す。表には各グループに含まれる遺伝子の予想される機能を示す。

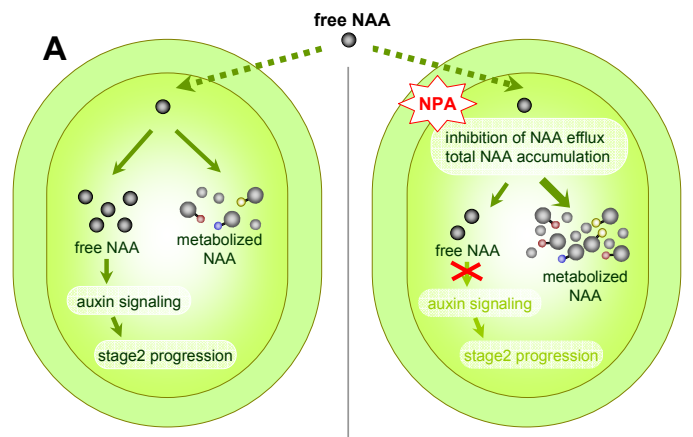


図14 オーキシンによる管状要素分化初期過程の制御機構

(A) 分化転換過程に対する細胞内遊離型/代謝型 NAA と極性輸送阻害剤の作用機作 (B) オーキシンで制御される分化初期過程の諸イベント

