

# トレニア茎断片培養系を用いた不定芽形成初期過程の解析

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 修士課程2年(助成時)  
博士課程1年(現在)

森中 初音

## 1. 背景と目的

一般に植物は動物と比べて高い再生能力を持ち、比較的容易に組織、器官、時には個体全体を再生する。このような高い再生能力は、植物の発生の際立った特徴として研究者の関心を集めてきた。

植物の再生の代表例に、細胞の脱分化とシュート頂分裂組織(SAM)の新構築を基盤とする、シュートの再生、すなわち不定芽の形成がある。シュート再生の分子生物学的な研究は、モデル植物のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて活発に行われている。シロイヌナズナのほとんどの組織はそのままではシュートを再生できないが、植物ホルモンであるオーキシンで処理し、不定形な細胞塊であるカルスを形成させるとシュートを再生できるようになる。このカルスは、内鞘や内鞘様の中心柱柔細胞を起源とすることが明らかにされている。シロイヌナズナを用いたシュート再生の研究の大半はこのようなカルスの誘導とそのカルスからの不定芽SAMの誘導からなる2段階培養系を用いて行なわれている。

一方、植物によっては、カルス培養段階の要らないシュート再生系が知られている。トレニア(*Torenia fourmieri*)の不定芽形成誘導系もその一つである(図1)。この培養系は、植物ホルモンのサイトカイニンを含む培地で茎断片を培養して、表皮からの不定芽形成を誘導するもので、培養の条件やSAMの起源となる細胞の種類などが、シロイヌナズナの2段階培養系とは大きく異なっている。本研究では、トレニア茎断片培養系のこうした特色に着目し、脱分化からSAMの新構築に至る過程について新たな知見を得、それらの本質に迫ることを目指して、この系における不定芽形成初期過程の細胞学的・分子生物学的解析を行った。

## 2. 結果と考察

### 2.1 不定芽形成初期過程の細胞学的解析

文献を参考に茎断片の培養条件を再検討し、不定芽形成誘導のための標準条件を、サイトカイニンとして1mg/Lのベンジルアデニン(BA)添加、光は連続明、温度は22°Cと定めた。培養外植片における細胞分裂を外植片表層の連続的な観察や新生細胞壁の可視化・計数などにより解析した結果、培養開始後2~4日後に細胞分裂が活性化し、細胞分裂が集中的に起こる領域が出現し、そこから不定芽のSAMが形成される様子を捉えることができた(図3)。また、培養開始後1~2日目には、表皮細胞の核の酢酸カーミン染色性が増大した。これは表皮細胞の脱分化を反映したものと考えられる。

BA無添加培地や暗所で培養したときには、不定芽形成頻度が標準条件よりも著しく低かった(図2)。これらの条件では、核の酢酸カーミン染色性は増大したものの、細胞分裂の頻度が標準条件よりも低く、サイトカイニンや光が脱分化後の細胞分裂の活性化を増強することが示唆された(図3B)。

### 2.2 不定芽形成初期過程の遺伝子発現解析

RT-qPCRによる遺伝子発現解析：主要なSAM関連遺伝子について、植物体各部での発現と培養外植片での経時的発現変動を調べた(図4)。STM2の発現は培養開始前から高く、全ての条件で培養開始後2日目までに急激に低下した。培養4日目以降にはSTM1、CUC1/2、WUSの発現が上昇し、STM2の発現も上昇

に転じた。対照条件や表皮での発現の結果から、4日目以降の発現上昇の中でも *STM2*、*CUC1/2*、*WUS* の発現上昇と不定芽形成の関連がうかがわれた。

**トランスクリプトーム解析：RNA-seq** 解析を行い、標準条件と対照条件で培養した外植片のトランスクリプトームデータを得た。シロイヌナズナ2段階培養系におけるオーキシン応答型カルス形成は、側根形成の制御プログラムに依拠していることが知られている。シロイヌナズナの側根形成とオーキシン応答型カルス形成に関与している遺伝子のうち、*WOX5* や *PLT1/2* などは、トレニア茎断片培養系の茎外植片ではほとんど発現が見られなかった。また、*LBD17/29* のように標準条件よりも対照条件で発現が高いものもいくつかあり、総じてトレニア茎断片培養系の不定芽形成初期過程は側根形成との関連が低く、シロイヌナズナの2段階培養系とは異なる分子経路を辿っていることが示唆された(図5)。*ESR1/2* の発現が培養初期に著しく増大していることから、傷害応答経路の関与が考えられた(図5)。

### 3. 今後の展望

本研究で行った解析により、トレニア茎断片培養系で不定芽形成の分子生物学的な研究を行う基盤が整った。トランスクリプトーム解析の結果は、この不定芽形成の分子経路と、シロイヌナズナの2段階培養系におけるシュート再生の分子経路に大きな違いがある可能性を示した。今後は、これらの分子経路の相違点と共通項を洗い出し、トレニアとシロイヌナズナの両方で機能解析を進めることで、脱分化やSAM新構築の機構について、それぞれの培養系に特有の多様な側面と普遍的な枠組みを明らかにしていきたいと考えている。

