

# 論文の内容の要旨

## Studies on shoot regeneration from the epidermis of cultured stem segments of *Torenia fournieri* (トレニア茎断片培養系における表皮起源シュート再生の研究)

氏名 森中 初音

### 背景・目的

トレニア (*Torenia fournieri*) では茎断片から高い効率で直接シュート再生を誘導できる組織培養系が知られている。このシュート再生は、分化形質が発達した表皮を起源とする点やカルス形成を経ずに進行する点が、従来盛んに研究されてきたシロイヌナズナの2段階培養系におけるシュート再生と異なり、細胞リプログラミングや自己組織化の新たな側面を探る上で好適なモデルになると期待される。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、表皮細胞の脱分化から不定芽のシュート頂分裂組織 (SAM) の新構築に至る過程について新知見を得てその本質に迫ることを目指し、この系における細胞動態と遺伝子発現の解析を行った。

### 結果・考察

#### 1. 細胞脱分化から SAM 構築に至るまでの細胞動態

サイトカニンとして 1 mg/L のベンジルアデニン (BA) を含む培地に茎断片を置床し、連続明、22°C で培養したところ、培養開始後 8 日以降に旺盛な不定芽の形成が見られたため、これをシュート再生誘導の標準的な条件とした (図 1)。この条件下では、培養 2 日目までに、脱分化を反映すると思われる核と核小体の顕著な拡大が表皮細胞でみられた (図 2)。続いて培養 4 日目にかけて表皮での細胞分裂が活性化し、その後分裂が活発な状態が続いた。外植片表層の経時観察では、茎外植片の表皮細胞が分裂して密な細胞の集団が生じ、そこから不定芽が発達する過程を連続的に捉えることができた (図 3A)。不定芽が発達する領域の境界と元々の表皮細胞の境界との不一致から、SAM の予定領域は表皮細胞の分裂がある程度進行した後に決定されていることが示唆された (図 3B)。BA 無添加条件や暗所で培養したときには、細胞分裂頻度、不定芽形成頻度とも低く、とくに BA 無添加で著しく低かった (図 1B)。BA 無添加条件では表皮細胞の核と核小体あまり拡大しなかったことから、サイトカニンは培養初期の表皮細胞において細胞分裂活性化の前段階となる脱分化を促進することが推測された (図 2)。

#### 2. シュート再生過程における遺伝子発現の変化と特徴

##### 2-1. 培養過程全体を通じた遺伝子発現変動パターン

培養前の茎断片と標準再生条件で 1 日から 8 日間培養した外植片について、RNA-seq によりトランスクリプトームデータを取得した。このデータをもとに、経時的発現変動パターンによる遺伝子のクラスタリングと各クラスタの GO 解析を行ったところ、いくつかのクラスタで細胞動態や不定芽の発達と関連付けられる特徴的な結果が得られた (図 4)。培養開始後 1 日以内に発現が上昇し、その後やや低下するクラスタ 2 では、リボソ-

ム生成や翻訳など核小体に関連が深い GO タームが付与された遺伝子が顕著に濃縮されており、脱分化過程での核小体の発達が大規模な遺伝子の動員に支えられていることが示唆された。また、培養後期に発現が上昇するクラスター5には、器官・組織の発生に関わる GO タームが濃縮されており、その中には分裂組織関連のものもあった。

分裂組織関連の遺伝子については、主要な SAM 制御遺伝子に着目し、RT-qPCR 解析を行った結果、標準再生条件において培養 4 日目以降に発現上昇を示すことがわかった。この発現の上昇は標準再生条件、暗条件、BA 無添加条件の順で高く、不定芽の再生頻度と対応していた。これより、SAM 制御遺伝子の発現が、不定芽形成の鍵であることが示唆された (図 5)。

## 2-2. 培養初期におけるサイトカニンに依存した遺伝子発現プロファイルの変化

細胞学的な解析からは、サイトカニンが培養初期の脱分化～細胞分裂活性化の過程に関与していることが示唆された。この時期におけるサイトカニンの役割をさらに調べるため、培養前の茎断片および標準再生条件と BA 無添加条件で 3 時間から 48 時間培養した外植片について、RNA-seq により得たトランスクリプトームデータを比較した。2 つの条件間で有意な発現の差を示した遺伝子の数は、培養開始後 12 時間まではきわめて少なく、その後に急増した (表 1)。標準再生条件でより高い発現を示す遺伝子群には、リボソーム生合成などの核小体に関わる GO タームや、細胞周期の進行に関連する GO タームが付与された遺伝子が濃縮されており、細胞学的解析の結果と合わせて、サイトカニンが転写制御を介して脱分化～細胞分裂活性化を促進していることが示唆された。

## 2-3. 培養開始直後の遺伝子発現プロファイルの変化

トランスクリプトームデータに基づいてシュート頂、茎、葉、根の各部位で選択的に高い発現を示している遺伝子群を抽出し、これらの培養外植片における発現パターンを調べたところ、茎で高い発現を示す遺伝子のほとんどが培養開始直後に発現の低下を示した一方で、シュート頂、葉、根で高い発現を示していた遺伝子は多くが発現の上昇を示した (図 6)。このような変化は、外植片から茎の特徴が失われ、様々な部位の特徴を併せ持つ状態へ遷移したことを反映していると思われる。最近の研究から、多能性をもつ細胞ではいくつもの細胞のアイデンティティが混在するとの仮説が提唱されており、トレニアの外植片でみられた複数の部位の特徴を併せ持つ状態も、細胞リプログラミングによる多能性獲得と関連付けられる可能性がある。

異なるタイプの培養系間で、細胞リプログラミングの経路にどの程度共通性があるのかは、興味深い問題である。これを検討するため、シロイヌナズナの 3 つの培養系、すなわち傷害によるカルス誘導培養、オーキシンによるカルス誘導培養、プロトプラスト培養について、それぞれの初期に発現が上昇する遺伝子群を公表されているトランスクリプトームデータから特定した上で、各遺伝子のオルソログのトレニア茎断片培養系における発現を調べた。その結果、より多くのシロイヌナズナ培養系で共通して発現が上昇する遺伝子群ほど、トレニア茎断片培養系でも発現が上昇する割合が高い傾向が見られた (図 7)。トレニア培養系を含む全ての培養系で高い発現上昇を示した遺伝子群には、カルス形成への関与が報告されているヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HDA3* などが含まれており、リプログラミングの重要因子の候補として注目される (表 2)。

上記の発現上昇は、いずれも培養開始後 3 時間以内というごく早い時期に起き、サイトカニンを必要としていなかった。トレニアの茎断片培養系では、まず培養開始に伴う傷害などの刺激がこのような培養開始直後の変化を引き起こすことが、表皮細胞のリプログラミングにはたらいているのではないかと考えられる。

## まとめ・今後の展望

これまでシュート再生に関する分子生物学的な研究は、シロイヌナズナ 2 段階培養系におけるカルス経路の不定芽 SAM 形成過程に集中していたが、本研究で行った解析により、表皮細胞起源の直接シュート再生時の細胞動態と遺伝子発現について多くの知見を蓄積できた。本研究では、シロイヌナズナの 3 つのカルス誘導系とトレニアのシュート再生系で共通して発現上昇を示す遺伝子の特定も行った。これらの遺伝子には培養系の違いを超えて普遍的に細胞リプログラミングを制御する因子が含まれている可能性がある。今後これらの因子について空間的発現パターン解析や、リプログラミングに伴う細胞の変化やシュート再生における機能解析を行うことで、広く細胞リプログラミングを制御する分子ネットワークを明らかにできると期待される。

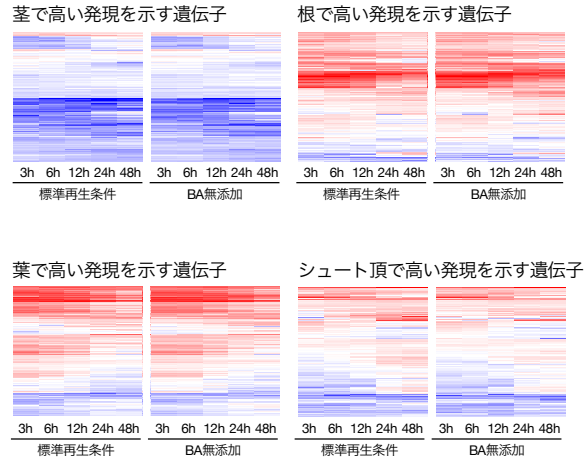
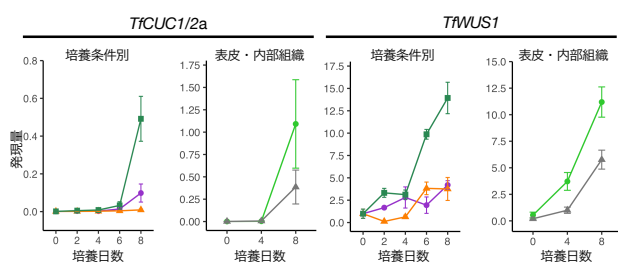
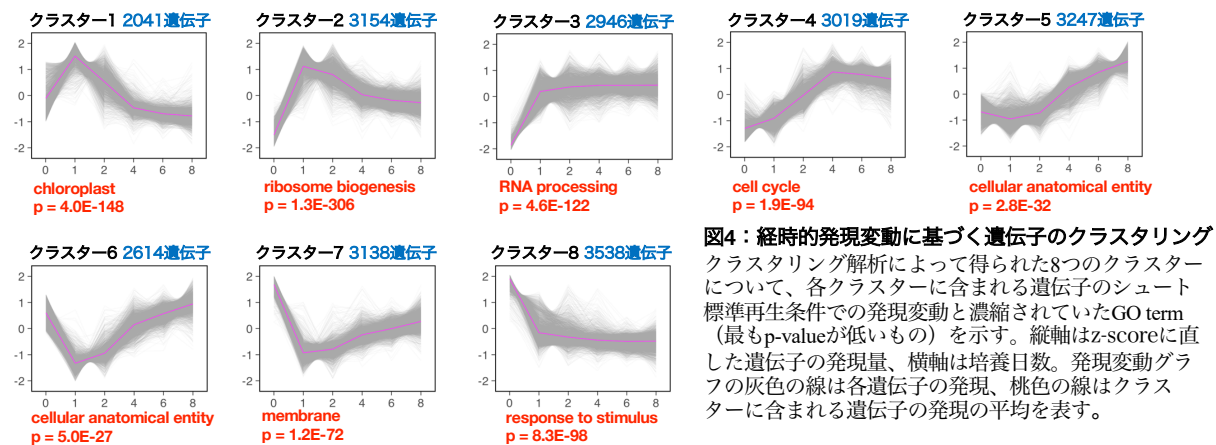
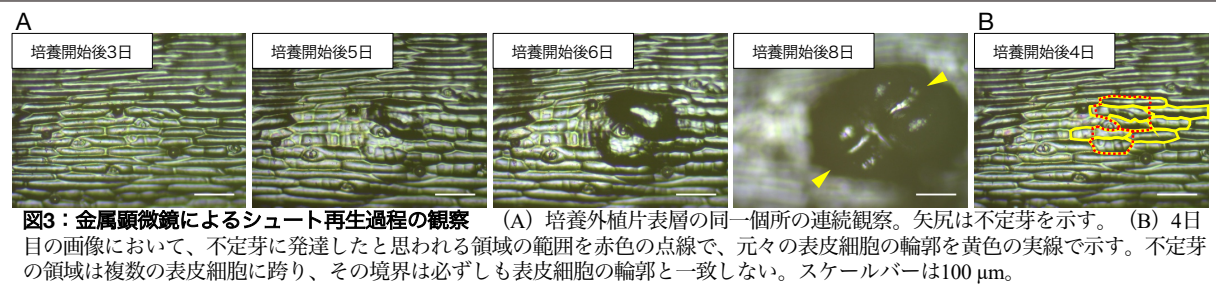
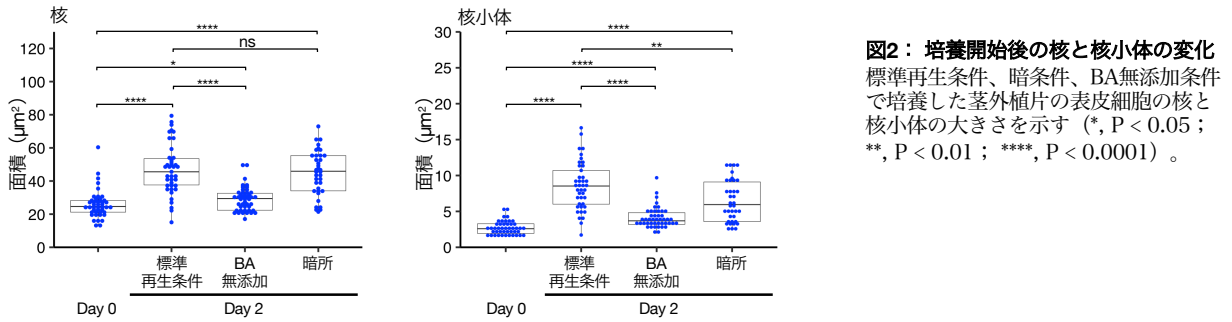
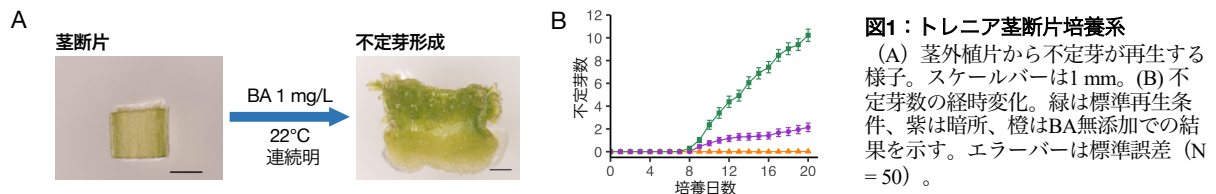
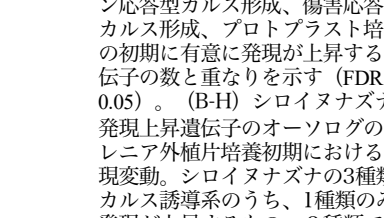
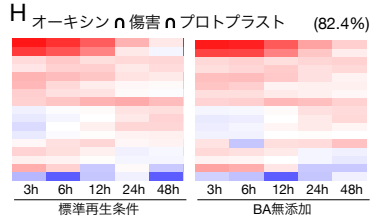
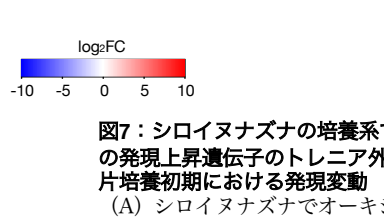
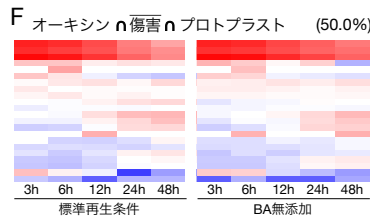
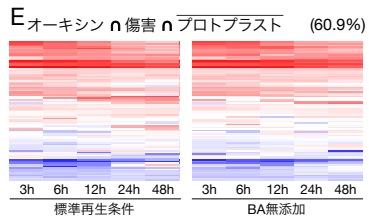
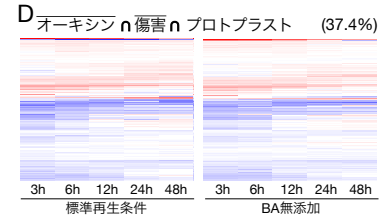
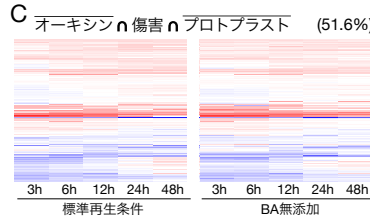
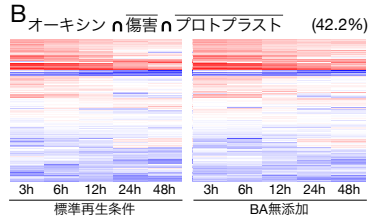
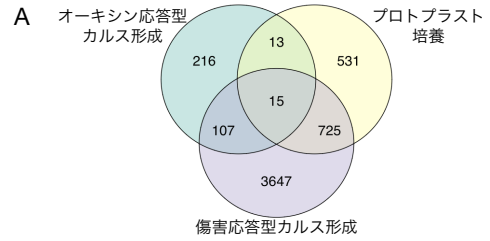


表1：標準再生条件とBA無添加条件間で有意な発現量の差を示す遺伝子の数

	3h	6h	12h	24h	48h
標準再生条件で発現が高い	2	0	17	275	814
標準再生条件で発現が低い	0	0	3	362	1126

FDR < 0.05



log<sub>2</sub>FC  
-10 -5 0 5 10

図7：シロイヌナズナの培養系での発現上昇遺伝子のトレンシア外植片培養初期における発現変動

(A) シロイヌナズナでオーキシシン応答型カルス形成、傷害応答型カルス形成、プロトプラスト培養の初期に有意に発現が上昇する遺伝子の数と重なりを示す (FDR < 0.05)。(B-H) シロイヌナズナの発現上昇遺伝子のオーソログのトレンシア外植片培養初期における発現変動。シロイヌナズナの3種類のカルス誘導系のうち、1種類のみで発現が上昇するもの、2種類で上昇するもの、3種類で発現が上昇するものについて示す。ヒートマップは培養開始前との発現量の比を対数(底は2)で示したものの。数字は培養時間。カッコ内の数字は、トレンシア外植片培養初期でも有意な発現の上昇がみられたものの割合。

表2：シロイヌナズナの3種類のカルス形成誘導系で共通して発現の上昇を示した遺伝子

AGI	遺伝子名	トレンシアのオーソログ	有意な発現の上昇
AT4G36670	POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6 (PMT6)	TfB096621	+
AT4G36670	POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6 (PMT6)	TfB101385	+
AT3G07390	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 12 (AIR12)	TfA043399	+
AT1G21750	PDI-LIKE 1-1 (PDIL1-1)	TfA023511	+
AT2G15760		TfB102428	+
AT1G09970	LRR XI-23	TfB077885	+
AT1G09970	LRR XI-23	TfA029790	+
AT3G44750	HISTONE DEACETYLASE 3 (HDA3)	TfB090237	+
AT3G04120	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1 (GAPC1)	TfB100536	+
AT3G04120	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1 (GAPC1)	TfA002952	+
AT1G68560	ALPHA-XYLOSIDASE 1 (XYL1)	TfA011629	+
AT3G54960	PDI-LIKE 1-3 (PDIL1-3)	TfB087184	+
AT4G36670	POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6 (PMT6)	TfB089190	ns
AT3G07390	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 12 (AIR12)	TfB097832	+
AT3G44750	HISTONE DEACETYLASE 3 (HDA3)	TfA014513	+
AT4G36670	POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6 (PMT6)	TfB077745	ns
AT3G44750	HISTONE DEACETYLASE 3 (HDA3)	TfB086922	ns

該当遺伝子とトレンシアのオルソログを示す。トレンシア外植片培養初期でも有意な発現の上昇がみられたものを+記号で示している。

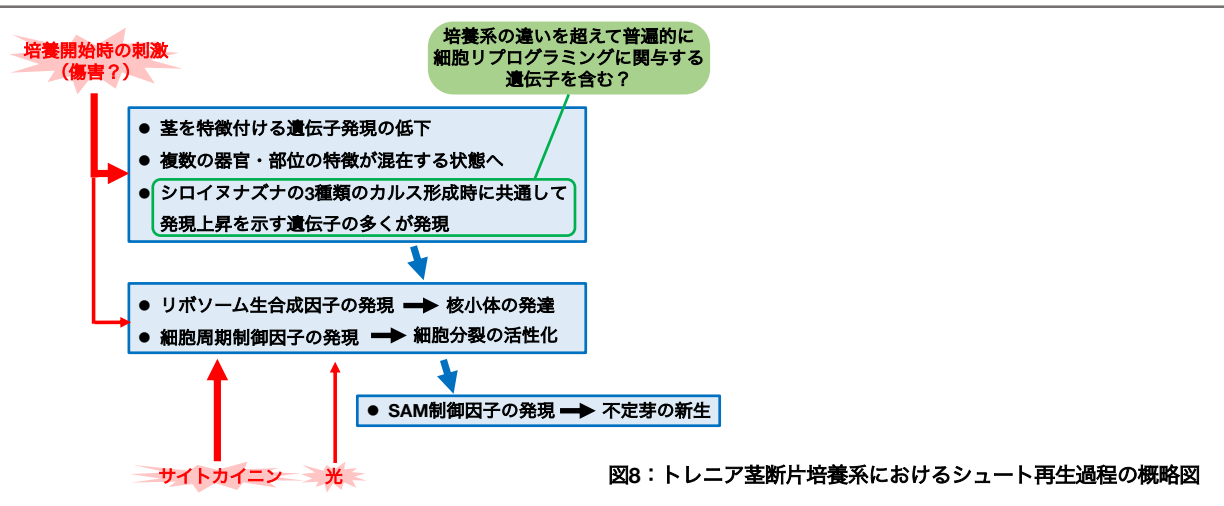


図8：トレンシア茎断片培養系におけるシュート再生過程の概略図