

タイトル

不定胚形成メカニズムの解明にむけて

—不定胚形成と細胞接着—

京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 博士課程4年

高畑 公紀 (たかはた きみのり)

指導教官 佐藤 文彦 (さとう ふみひこ)

はじめに

植物は動物と異なり自ら移動することは出来ない。一方、植物には動物にはない可塑性をもって環境に適応している。例えば、植物の枝を折って、土に挿しておくで切り口から根が再生し、すくすくと植物は成長する。このような植物に備わる可塑性のメカニズム解明が私の取り組んでいる研究テーマである。

不定胚とは

植物が示す可塑性の一つに不定胚形成というものがある。通常植物は受精により種子が形成される(図1)。種子の中には種子胚という将来の植物にあたる組織があり、球状胚、心臓型胚、魚雷型胚と成長して発芽の時期を迎える。例えば柿の種を割ってみると種子の中に種子胚があることを簡単に確認できる。一方、不定胚形成というのは成長した植物の体細胞を植物ホルモン等の処理により前述の胚だけを作り出すことを指している。種子胚では胚は胚乳や種皮で覆われているが、不定胚ではそれらに覆われていない。また不定胚も種子胚と同じように成長し、完全な植物個体となる。

不定胚の重要性

この不定胚形成は生物学的に非常に重要な現象を示している。不定胚形成は一つの細胞にはその個体を作り出せる能力が備わっていることを証明している。これを分化全能性と呼んでいる。不定胚形成は分化全能性を如実に現しているにもかかわらず、そのメカニズムは解明されていない。また産業上にとってもこの不定胚形成は重要な技術である。有益であるが不稔な植物を不定胚形成技術を用いた人口種子という形で育種することができる。このため不定胚形成のメカニズムを解明することで生物学的疑問、産業上の技術革新に貢献できる。そのため特に不定胚形成に関与する遺伝子を単離、解析することとした。

不定胚の誘導

不定胚形成は数多くの植物種で観察されているが、すべての植物種で不定胚が誘導できるわけではなく、またその誘導頻度も植物種によって異なっている。一方、ニンジン¹は古くから不定胚形成系が確立しており、大量に同調した不定胚を容易に誘導することが出来る。そのためニンジン不定胚形成系を用いて不定胚形成に関与する遺伝子の単離を試みた。ニンジンを含む多くの植物種の不定胚形成法はほぼ同様の操作により誘導することが出来る(図2)。つまり体細胞を植物ホルモンの一種であるオーキシンを含んだ培地上で1~2ヶ月培養することにより、不定胚形成能を有する embryogenic cells (EC) を生じさせ、オーキシンを含んだ培地にて EC を維持、増殖させる。増殖した EC のうち 37 μ m - 63 μ m 径の細胞塊をオーキシンを含まない培地に移植することによって EC から不定胚を誘導することができる。不定胚形成能を有する EC の維持、増殖にはオーキシンが必要であるが、EC から不定胚を誘導する際にはオーキシン除去操作が必須となっている。オーキシン除去により初めて EC から不定胚が形成されるのである。私はこのオーキシン除去操作という点に注目した。オーキシン除去により不定胚形成に関与する遺伝子が発現上昇すると考え、オーキシン除去により一過的に発現上昇する遺伝子の単離を試みた。

オーキシン除去により一過的に発現上昇する遺伝子の単離

不定胚形成に関与する遺伝子を単離するために、オーキシンを除去した培地で6時間培養した EC (不定胚形成開始直後) とオーキシン存在下で培養している EC から cDNA を作製し、サブトラクションを行った(オーキシン除去培地培養 EC マイナス オーキシン含有培地培養 EC)。この結果不定胚形成開始直後に特異的に発現している遺伝子を濃縮したサブトラクションライブラリーを得た。この作成したサブトラクションライブラリー中から417クローン選抜し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに相同検索を用いて、その推定される機能を得た。推定される機能が不定胚形成に関与していると考えられるクローンについては RT-PCR 法、ノザン法を用いてその発現パターンを解析した。その結果オーキシン除去により一過的に発現上昇する *C-ESE1* (*Carrot Early Somatic Embryogenesis1*) の単離に成功した。

C-ESE1 の発現パターン

C-ESE1 はオーキシン除去後8時間でその発現量は最大となり、オーキシン除去後24時間目までは高発現を維持したが、その後発現は減少に転じ、球状胚、心臓型胚、魚雷型胚での発現は認められなかった(図3a)。また体細胞である実生や花芽における

C-ESE1 の発現を観察したところその発現は認められなかった (図 3b)。次に EC の培養過程においてオーキシン除去操作を行っても決して不定胚に発達することの出来ない non-embryogenic cells (NC) を得ることが出来る。この NC において *C-ESE1* の発現を確認したところ不定胚形成能を喪失した NC においては *C-ESE1* の発現は観察されなかった (図 4)。これらの結果より *C-ESE1* が不定胚形成能力を有する細胞に特異的に発現していると考えられた。さらに *C-ESE1* の発現が不定胚形成能の高い細胞において特異的に発現していることを確かめるために、以下の 2 つの実験を行った。(1)オーキシン除去によりすべての EC から不定胚が誘導するわけではなく、EC の大きさによって不定胚形成効率が大きく異なることが知られている。そこで EC を小 (37 μ m-63 μ m)、中 (63 μ m-1mm)、大 (1mm 以上) と分別し、不定胚形成効率と *C-ESE1* の発現比較を行った (図 5)。その結果 *C-ESE1* は不定胚形成効率の高い小さな細胞塊で強く発現しており、不定胚形成効率の低い大きな細胞での発現は非常に弱かった。またその発現はオーキシンの除去により促進されることが分かった。(2)EC からの不定胚形成においては、その不定胚形成は表面の細胞に特定されていることが明らかとなっている。そこで *C-ESE1* の EC における発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて決定することとした (図 6)。その結果、*C-ESE1* の発現は不定胚が形成される表面の細胞に特異的に発現していた。以上の 2 つの実験により *C-ESE1* は不定胚形成能のある細胞に特異的に発現している事が確かめられ、*C-ESE1* は不定胚形成に関与していることが示唆された。

C-ESE1 の機能解析

次に *C-ESE1* の全長配列を単離し、コンピューターによる機能予測を行うと共に、*C-ESE1* の発現を抑制することで *C-ESE1* の生体内での機能を明らかにすることとした。*C-ESE1* は全長 1523 塩基を含み、推定アミノ酸残基は 443 残基であった。推定タンパク質の予想される分子量は 48.73KDa であった。この推定アミノ酸中には複数の細胞を架橋し、細胞接着に関与すると考えられている agglutinin domain が存在していた (図 7)。またタンパク質 *C-ESE1* には二つの膜貫通ドメインの存在が予想され、細胞接着に関与すると考えられる agglutinin domain が細胞外に配向するように膜中に挿入されると予想された。この予想された機能を実証するために *C-ESE1* の発現が低下した形質転換体を作成した。*C-ESE1* の発現低下は継代培養を行った細胞においても安定に観察されたことより、*C-ESE1* の発現低下が EC の表現型に及ぼす影響を観察した (図 8a)。まずオーキシンを含んだ培地で培養した EC における形態変化を観察した。その結果、コントロール細胞では 1mm 以上の細胞塊を含む不規則なサイズの細胞塊を形成した。

一方、*C-ESE1* の発現が低下した形質転換体 EC ではその細胞塊は $63\mu\text{m}$ - 1mm 径とサイズが小さくなるとともに、球形の細胞塊を形成していることが観察された。*C-ESE1* 発現抑制 EC の表現型と予想される機能から *C-ESE1* の発現抑制によって細胞接着が弱まっているのではないかと考え、細胞塊を固定後、切片を作成し、透過型電子顕微鏡を用いた細胞微細構造の観察を行った (図 8b)。その結果コントロール EC では各々の細胞が密に接着し、細胞塊を形成しているのに対して *C-ESE1* 発現抑制 EC では著しい細胞間隙が観察された。この形質転換 EC の観察から細胞塊の形成には、積極的に細胞接着を維持する機構が存在することを示唆しているとともに、*C-ESE1* が細胞接着に関与する分子であることが示唆された。

不定胚形成時における *C-ESE1* の影響

C-ESE1 の発現抑制によって EC の細胞塊構造に変化が認められた。そのため *C-ESE1* 発現抑制 EC をオーキシンを含まない培地に移植し、不定胚形成時における *C-ESE1* の役割を明らかにすることを試みた。その結果、*C-ESE1* 発現抑制 EC からの不定胚形成はコントロール EC に比べて明らかに遅れが見られた (図 9)。球状胚の形成に 10 日程度の遅れが観察された。しかしながら *C-ESE1* 発現抑制 EC からの不定胚誘導の進行 (球状胚の形成) には明らかな遅れが観察されたものの、その不定胚の形態には異常が見られず、コントロール EC から誘導した不定胚と同様の形態を示した (図 9)。また最終的に形成された不定胚頻度にも影響は見られなかった。以上の実験結果より *C-ESE1* は不定胚形成初期において重要な役割を担っていることが示唆された。

C-ESE1 と細胞接着

C-ESE1 は細胞接着を通じて不定胚形成初期に関与している事が明らかとなった。そこで *C-ESE1* による細胞接着機構メカニズムを明らかにすることとした。特に細胞の表面構造ならびに細胞壁を構成する多等類成分の分析を行った。*C-ESE1* 発現抑制 EC の細胞表面構造を走査型電子顕微鏡を用いて観察した (図 10a)。コントロール EC の細胞表面が突起状構造に覆われているのに対し、*C-ESE1* 発現抑制 EC の表面は滑らかであった。このことから *C-ESE1* は細胞表面の突起状構造形成に関与していることが明らかとなった。また *C-ESE1* アミノ酸配列中には多糖類が結合し、細胞接着に関与していると考えられている agglutinin domain が存在することから、この突起状構造は多糖類で構成されていると予想された。そこでこの突起状構造の組成を明らかとすることを目的に、多糖類を特異的に染色する PATAg (periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate)により突起状構造が染色されるかを検討した (図 10b)。その結果

C-ESE1 により形成される細胞表面上の突起状構造は PATAg に特異的に染色され、その組成は多糖類で構成されていることが分かった。これらのことより、*C-ESE1* は細胞表面上に存在する多糖類で構成された突起状構造を介して細胞接着に関与している事が明らかとなった。

次に *C-ESE1* 発現抑制により細胞表面上の突起状構造を構成する多糖類が培地中へ分泌する可能性について検討する事とした。コントロール EC ならびに *C-ESE1* 発現抑制 EC をオーキシン含有培地で 2 週間培養後、培養液を回収し同培地中における多糖類成分の分析を行った。まず、回収した多糖成分を HPLC により分子量分布分析したところコントロール培地から回収した多糖の平均分子量が 10 万であるのに対して、*C-ESE1* 発現抑制 EC 培地から回収した多糖では 4 万-10 万と幅広い分子量を示した。次に回収した多糖成分の組成を分析した (Table 1)。*C-ESE1* 発現抑制 EC の培地からはアラビノース、キシロースそしてフコースをより多く含む多糖類が培地中に分泌されていることが分かった。特にアラビノースとキシロースの絶対量の増加は大きかった。一方、マンノースとガラクトースを含む成分の分泌はわずかに多いのみであった。ウロン酸とグルコースの分泌量変化はそれ程認められず、ラムノースの分泌量については減少していた。これらのことより *C-ESE1* 発現抑制 EC ではその培地にアラビノース、キシロース残基を多く含む多糖類が分泌されていることが明らかとなった。この多糖類成分が突起状構造を構成していたものと同様であるかは不明であるが、同一である可能性は高いと考えられる。

結論

本研究により次のことが明らかとなった。(1) 不定胚形成開始直後の細胞にのみ特異的に発現する *C-ESE1* を単離した。(2) 単離した *C-ESE1* は細胞表面上に存在する多糖類で構成された突起状構造形成に関与していた。(3) この突起状構造を介して *C-ESE1* は細胞接着に関与していた。(4) そして *C-ESE1* は不定胚形成初期に関与する事が示唆された。これらの実験結果は不定胚形成初期には細胞接着による積極的な細胞塊形成が必要である事を示した。そして不定胚形成メカニズムには、細胞接着がその一端を担っている事を明らかとしたことで、不定胚形成機構の生物学的疑問、産業上の技術革新に貢献できたと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり実際に指導して下さった京都大学大学院生命科学研究科佐藤文彦教授に感謝いたします。京都大学生存圏研究所の竹内美子博士、京都大学大学院

農学研究科藤田稔教授には電子顕微鏡の技術を教えて頂き、糖成分の分析には京都大学大学院農学研究科東順一教授より助言を頂き感謝します。また筑波大学大学院生物科学系鎌田博教授には不定胚全般の知見を助言頂き感謝いたします。

参考文献

Takahata, K., Takeuchi, M., Fujita, M., Azuma, J., Kamada, H. and Sato, F. Isolation of putative glycoprotein gene from early somatic embryo of carrot and its possible involvement in somatic embryo development. *Plant Cell Physiol.*45: 1658-1668, 2004

種子胚形成

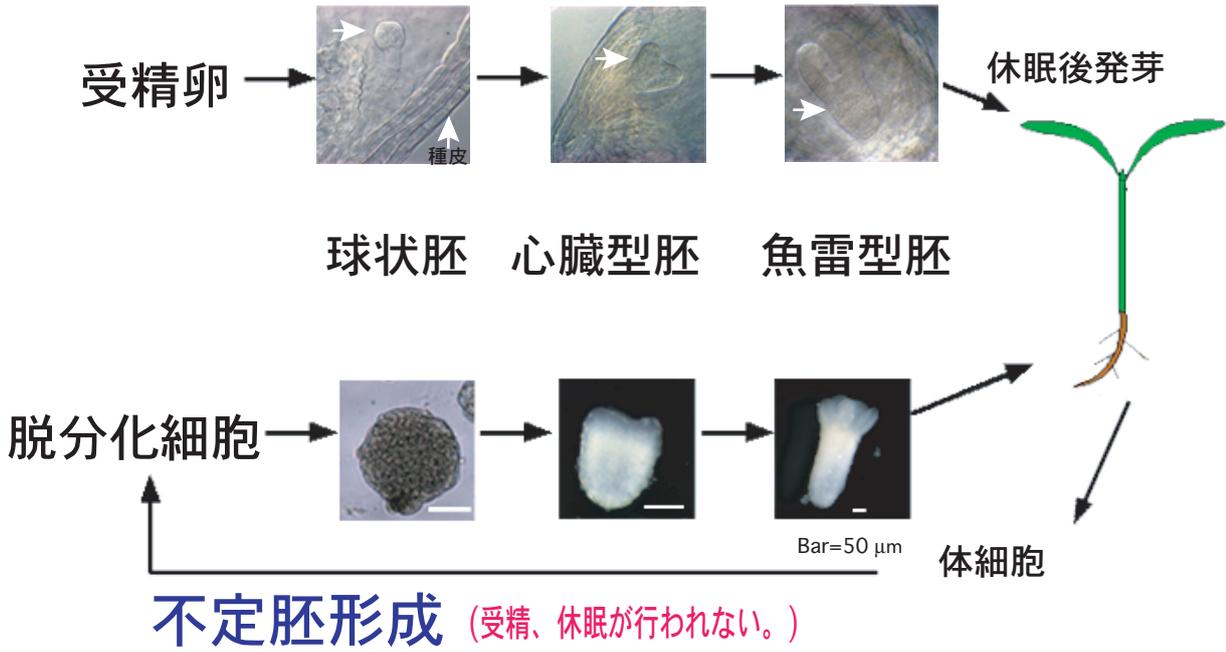


図1 種子胚形成と不定胚形成

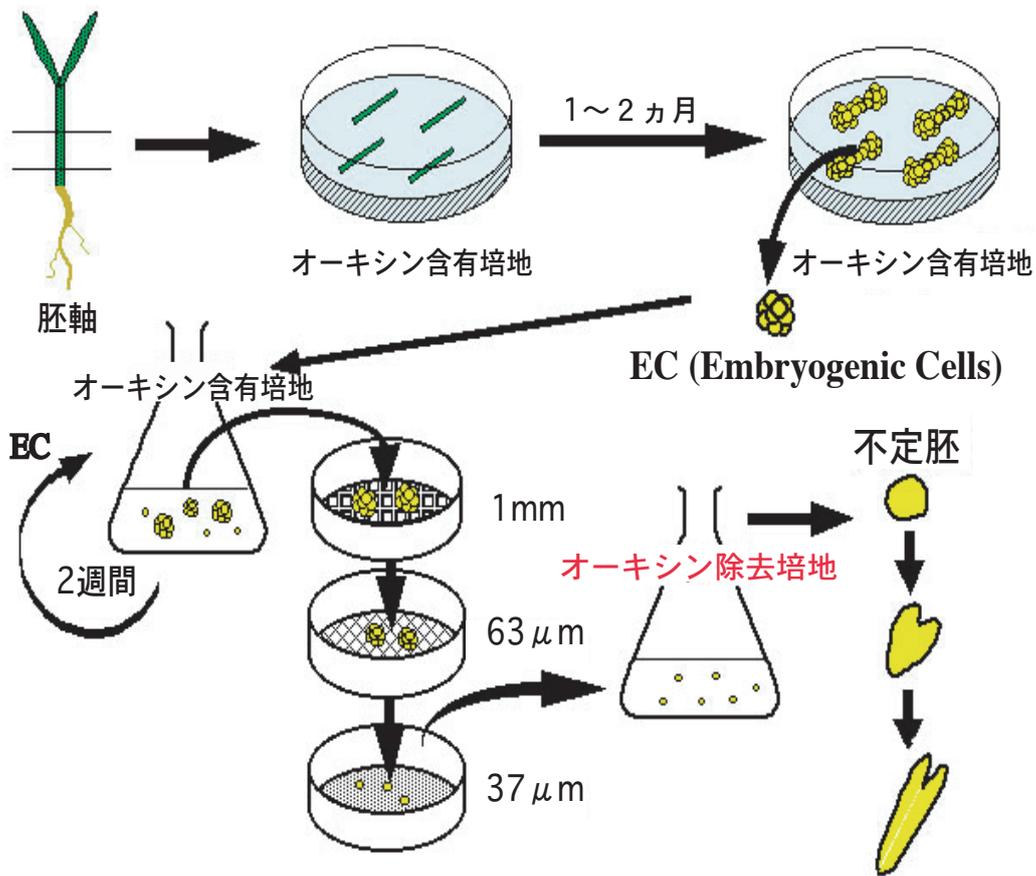


図2 ニンジンからの不定胚誘導

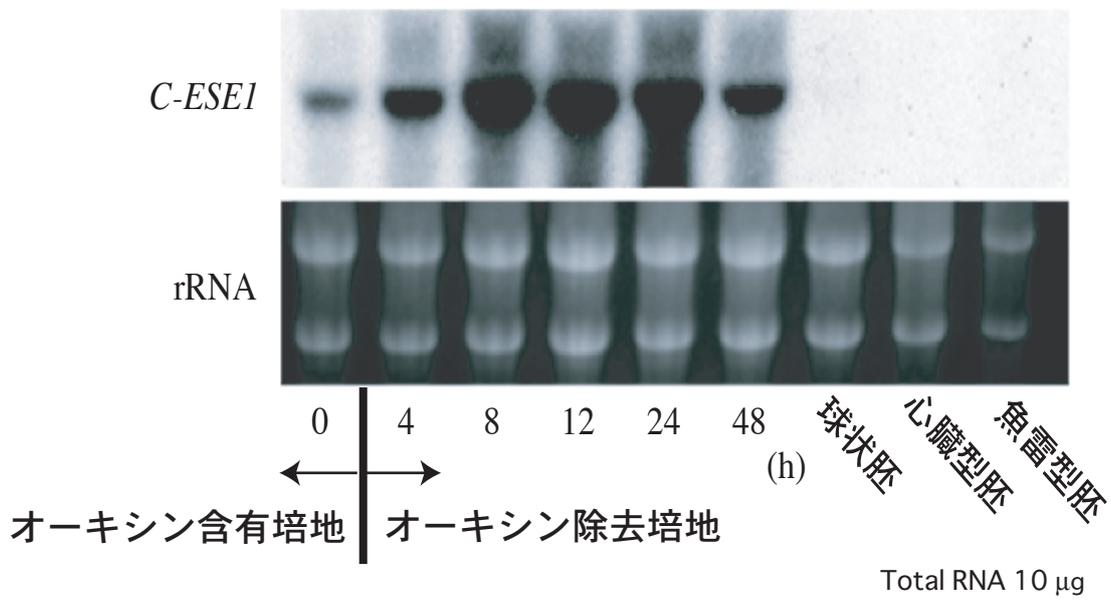


図 3 a *C-ESE1*の不定胚における発現

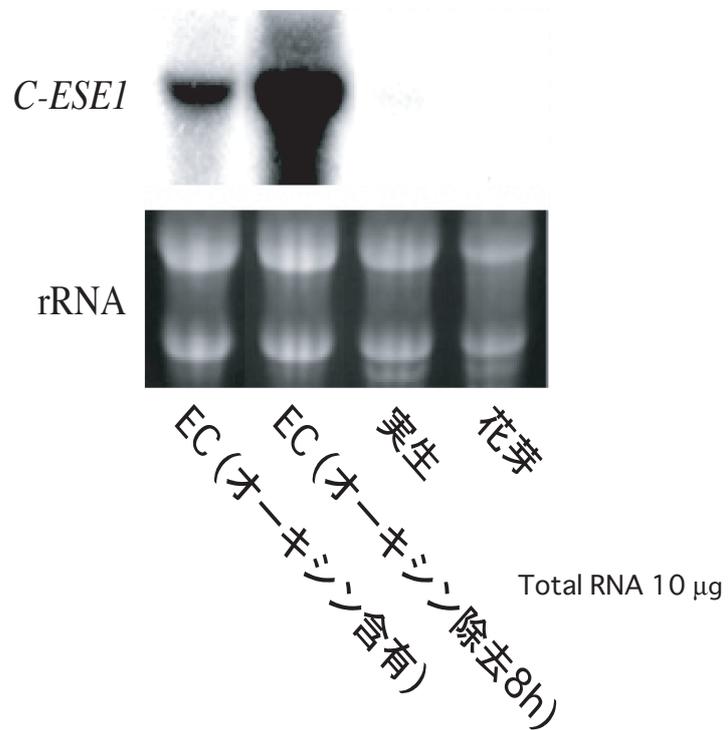


図 3 b 体細胞における*C-ESE1*の発現

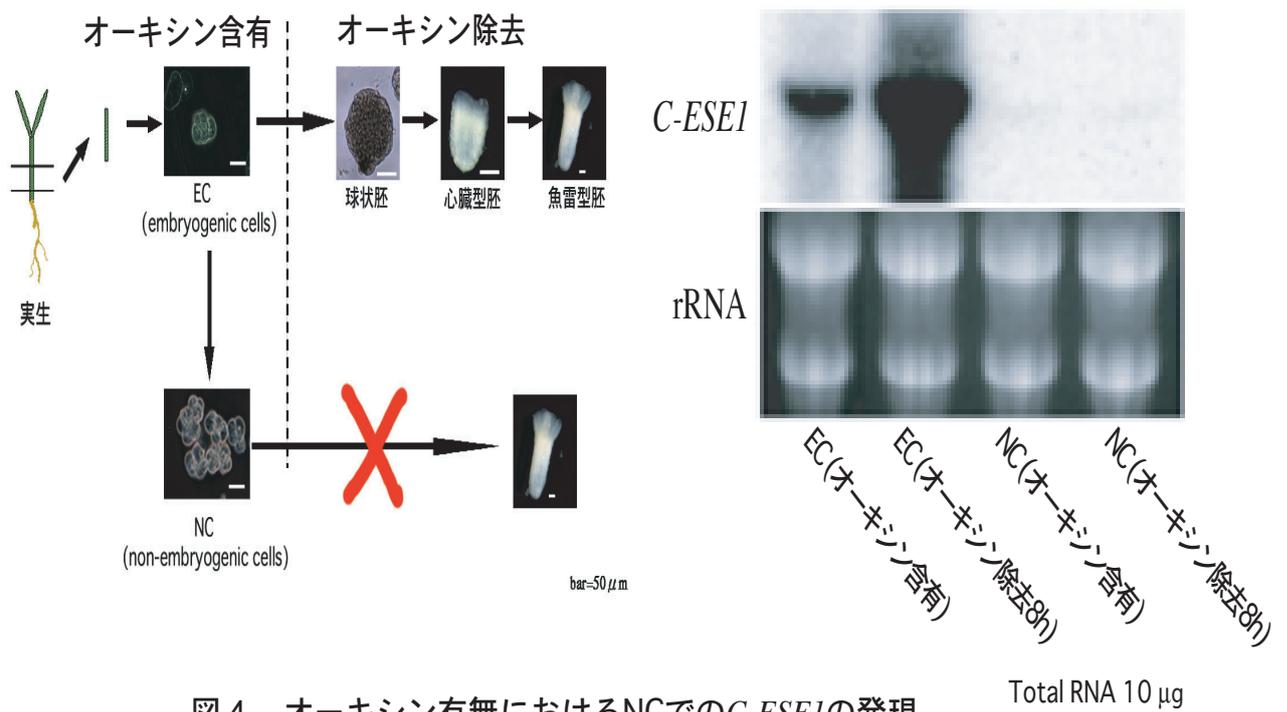


図4 オーキシン有無におけるNCでの*C-ESE1*の発現

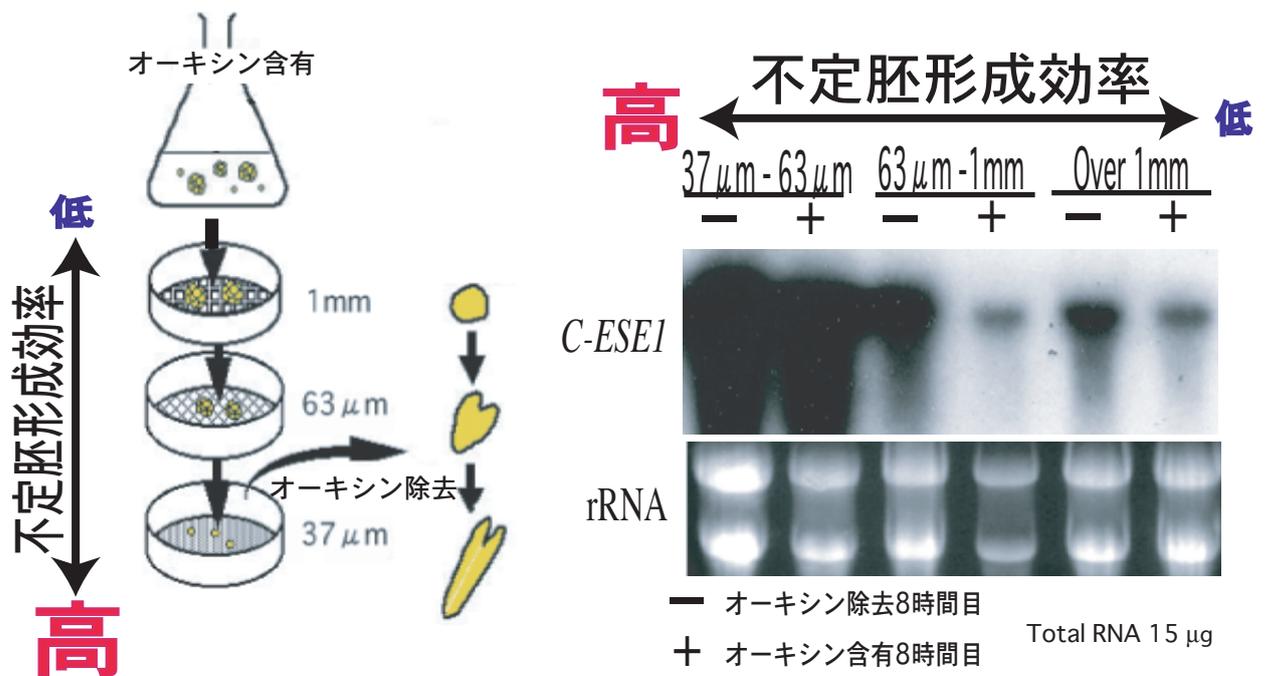


図5 細胞塊サイズと*C-ESE1*の発現

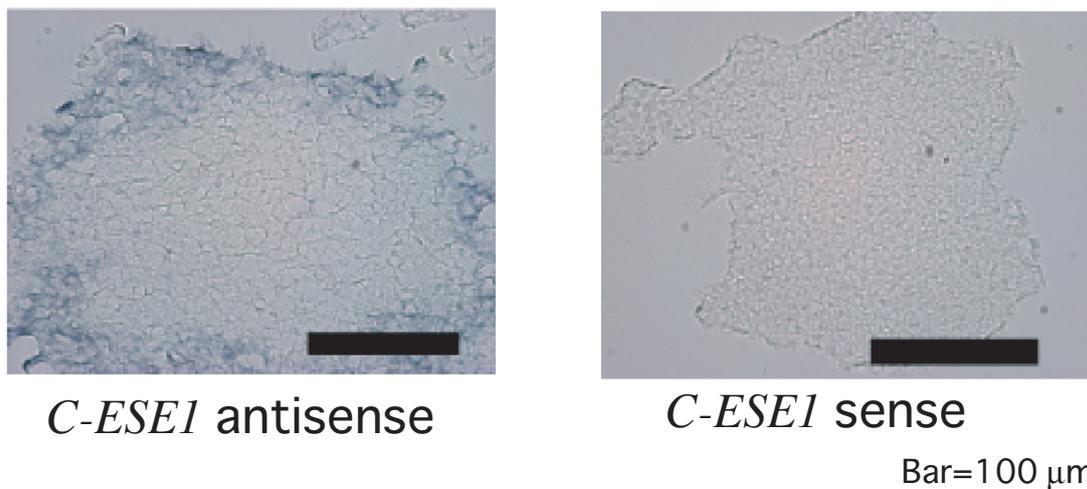


図6 *C-ESE1*の発現部位を*in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析した。

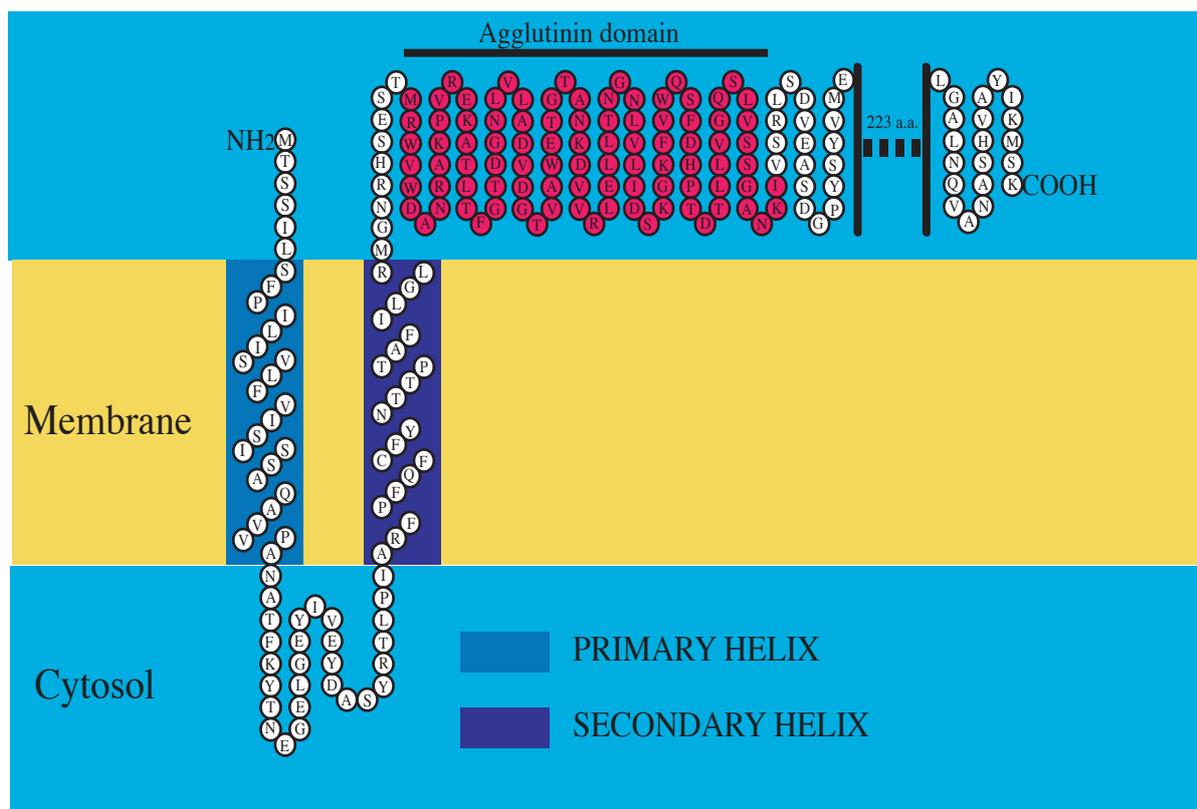
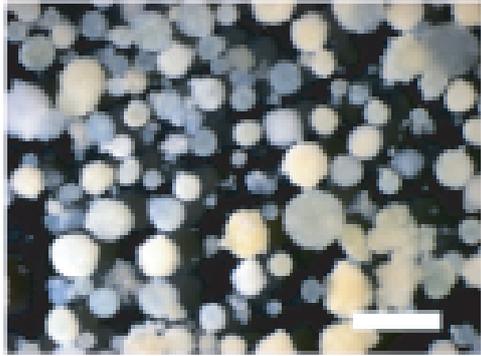
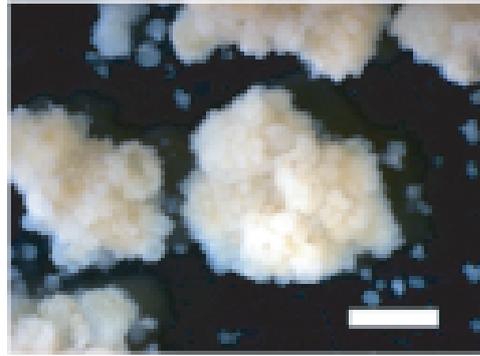


図7 予想される*C-ESE1*の膜貫通ドメインとagglutinin domain

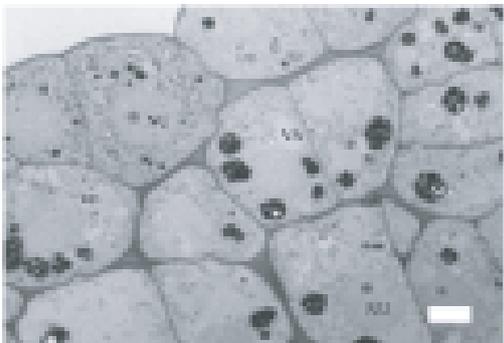


*C-ESE1*発現抑制EC

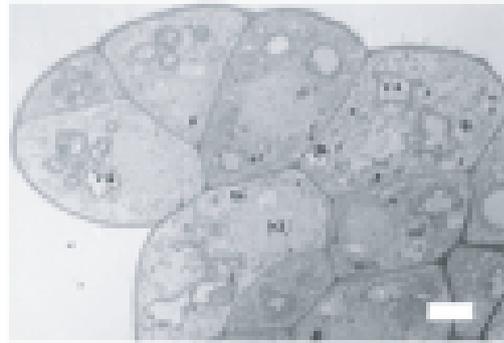


Control EC Bar=1 mm

図 8 a 形質転換体ECの実体顕微鏡像



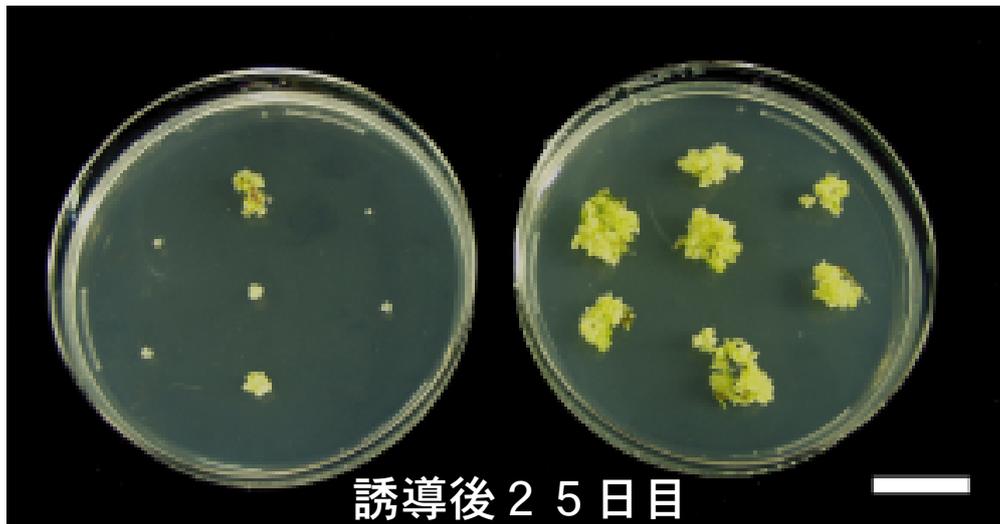
*C-ESE1*発現抑制EC



Control EC

NU, 核 ; SG, デンプン粒 ; VA, 液泡
Bar=5 μ m

図 8 b 形質転換体ECの透過型電子顕微鏡像

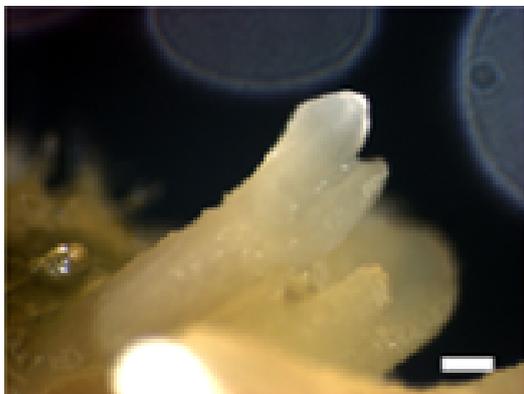


誘導後25日目

*C-ESE1*発現抑制EC

Control EC

Bar=2 cm



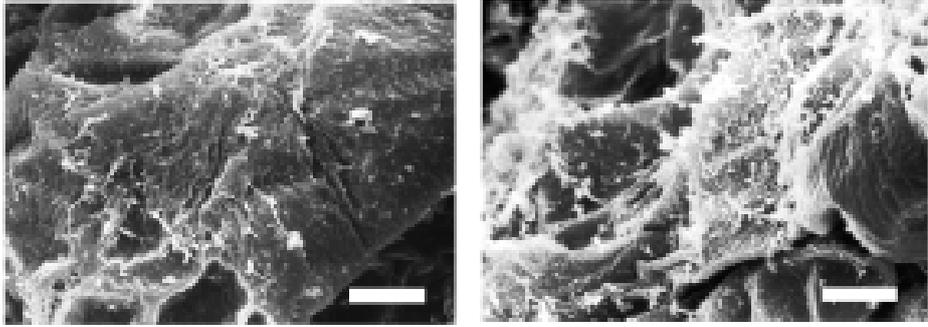
*C-ESE1*発現抑制EC



Control EC

Bar=0.2 mm

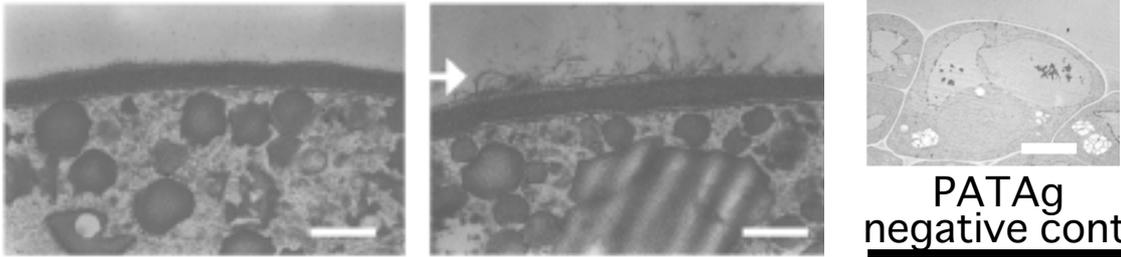
図9 形質転換体ECからの不定胚誘導



*C-ESEI*発現抑制EC

Control EC Bar=5 μ m

図10a 形質転換体ECの走査型電子顕微鏡による細胞表面観察



*C-ESEI*発現抑制EC

Control EC

PATAg
negative control

Uranyl acetate,
Reynold's
lead citrate 染色

PATAg染色

PATAg法：糖を特異的に染色する。

Bar=1 μ m

図10b 形質転換体ECにおけるPATAg法による細胞表面上の突起状構造の染色

Table 1 *C-ESEI*発現抑制ECとコントロールECの培養後、
濾過により回収された培地中の多糖成分の組成

糖残基	糖含有量, $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 培地		^a %
	コントロール培地 +/-SD	<i>C-ESEI</i> - 発現抑制培地 +/-SD	
Arabinose	1281 +/- 209	2636 +/- 653	206
Xylose	483 +/- 52	823 +/- 94	171
Fucose	71 +/- 19	115 +/- 34	161
Mannose	185 +/- 36	245 +/- 29	133
Galactose	2343 +/- 264	2960 +/- 475	126
Uronic acid	1392 +/- 162	1449 +/- 151	104
Glucose	333 +/- 28	310 +/- 92	93
Rhamnose	126 +/- 18	98 +/- 30	64

SDは少なくとも3回の独立した実験から算出した。

^a
% (*C-ESEI*発現抑制ECの培養培地における糖含量/
コントロールECの培養培地における糖含量)

オーキシンを含む培地でECを2週間培養し、その培養培地を
分析に用いた。それぞれ約3.0gの細胞を移植し、2週間後に
約5.5gの細胞を得た。