

様 式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成27年度）

1. 機関番号

1

4

6

0

3

2. 研究機関名

奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名

挑戦的萌芽研究

4. 補助事業期間

平成26年度～平成28年度

5. 課題番号

2

6

6

5

0

1

0

0

6. 研究課題名

ライブイメージングと「くつつきアッセイ」～心皮合着過程の新しい解析手法の開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
90311787	アイダ ミツヒロ	バイオサイエンス研究科	准教授
	相田 光宏		

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

心皮の接着時における表皮細胞の性質の変化を明らかにするため、表皮の運命決定を支配する転写因子ATML1の発現解析を行った。A TML1の転写活性およびタンパク質の蓄積をモニターする二種類のレポーター遺伝子を含む形質転換体を用い、それぞれの植物体から切除した雌しべを寒天で包埋して観察を行ったところ、いずれの場合でも良好な蛍光画像が得られた。雌しべの接触部と非接触部でシグナルを比較したところ、転写活性のレポーターではシグナルに違いは見られなかったが、タンパク質の蓄積レベルをモニターするレポーターでは、接触部でのシグナルが有意に低下することが分かった。また、ATML1のターゲット遺伝子であるPDF1の発現を解析したところ、やはり接触部で発現が低下することが分かった。以上から、心皮の接着には転写因子ATML1の発現低下が伴うことが明らかになった。

さらに接触部位の微細構造と細胞壁の組成についても解析を行った。組織切片を作製して電子線トモグラフィー解析を行ったところ、接触部の細胞表面にはクチクラ様の構造と中葉に類似した構造がともに観察された。クチクラの染色剤であるオーラミンを用いた染色から、接触部にクチクラが存在することが支持された。一般にクチクラは表皮細胞どうしの接着を防ぐ役割を持つことから、心皮の接着にはクチクラの消失または変成が伴う可能性が示唆された。一方、中葉は隣り合う細胞の間に存在するペクチンに富んだ構造で、細胞どうしの接着を促進すると考えられている。そこで、ペクチンを特異的に認識する二種のモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、いずれの抗体でも接触面においてシグナルが観察された。このことは、心皮の接着においてもペクチンを介した細胞接着が関与する可能性を示している。

10. キーワード

(1) 細胞接着	(2) 細胞壁	(3) ペクチン	(4) クチクラ
(5) 表皮細胞	(6) 転写因子	(7) ATML1	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)
当初予定していた臨界点乾燥法による心皮接着判定法（くっつきアッセイ）の確立に関しては、計画策定当初は想定していなかったアーティファクトが判明したため、この方法では判定できないことが分かった。そこで、実験計画を変更して、接着部位の細胞壁組成の解析を行うことで、心皮接着に伴う細胞の性質変化を明らかにする実験を進めることにした。その結果、表皮細胞特異的遺伝子の発現パターンおよび細胞壁の特徴が明らかとなり、期待以上の進展が見られた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)
今後は接着の分子メカニズムを明らかにするため、クチクラやペクチンに関連した突然変異体の表現型解析を行う。また、接着に関わる分子を同定するために、遺伝学的スクリーニングや、接着部位と非接着部位のトランスクリプトームを比較する研究も重要だと考えられる。さらに、接着が起こらない突然変異体について、表皮細胞表面のATML1発現解析、細胞表面の微細構造の解析、細胞壁成分の解析を行うことも有効であろう。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)
(理由)
臨界点乾燥法による心皮接着判定法の確立を進めていたが、実験計画を作成した当初は想定していなかったアーティファクトが判明したため、この方法では接着が判定できないことがわかった。そこで計画を変更し、接着部位の細胞壁組成と遺伝子発現の解析を行うことで、心皮接着に伴う細胞の性質変化を明らかにする実験を進めることにした。これにより、研究遂行に想定以上に時間がかかった。
(使用計画)
追加実験（微細構造の解析・突然変態の表現型解析）のための試薬と消耗品、植物育成用の消耗品、学会発表の旅費、論文投稿料として使用する。

13. 研究発表 (平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計 (1) 件／うち査読付論文 計 (1) 件／うち国際共著 計 (0) 件／うちオープンアクセス 計 (0) 件

著 者 名		論 文 標 題				
Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S		Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique.				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Plant Cell Physiol		有	57	2 0 1 6	462-472	—
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1093/pcp/pcw027						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

(学会発表) 計 (4) 件／うち招待講演 計 (2) 件／うち国際学会 計 (2) 件

発 表 者 名		発 表 標 題	
Tsujiro R, Yokoi A, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M.		Carpel closure by protodermal tissue adhesion in Arabidopsis thaliana	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
24th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)		2016年03月18日～ 2016年03月23日	Tucson Marriott University Park (アメリカ合衆国)

発 表 者 名		発 表 標 題	
Tsujiro R, Yokoi A, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M.		Carpel closure by protodermal tissue adhesion in Arabidopsis thaliana	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
8th Plant Biomechanics International Conference (国際学会)		2015年11月30日～ 2015年12月04日	名古屋大学 (愛知県名古屋市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
相田光宏	どうやって袋をつくるのか～心皮の発生について、	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
遺伝学研究所研究会「植物の生殖成長期の発生を制御する分子機構」(招待講演)	2015年11月06日～ 2015年11月07日	国立遺伝学研究所 (静岡県三島市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Mitsuhiro Aida	Shaping Plant Organs by the Meristems	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
7th PSDB Annual National Convention, Philippine Society for Developmental Biology (招待講演)	2015年10月24日	University of Santo Tomas (フィリピン)

[図書] 計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

[出願] 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計 (0) 件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: —

17. 備考

植物発生学 (相田研究室) のホームページ
<http://bsw3.naist.jp/aida/>
 Plant Developmental Biology (Aida Lab Home)
<http://bsw3.naist.jp/aida/?cate=392>
 Plant Developmental Biology
<http://bsw3.naist.jp/eng/courses/courses108.html>
 植物発生学 (相田研究室)
<http://bsw3.aist-nara.ac.jp/courses/courses108.html>