

植物の再生に関わるクロマチンの再構築の研究

得 字 圭 彦

生物資源科学科応用分子生物学講座助手

1. 目 的

植物細胞は一旦組織や器官に分化した後でも植物個体を再生する能力（分化全能性）を持っており、ニンジン体細胞からの胚形成はその最も端的な例であり、植物のもつ分化の能力を研究する上で重要な過程である。また、体細胞胚を利用した人工種子や、絶滅危惧植物種の保護は、将来の食料問題、環境問題に対処していくために、欠くべからざる技術として期待されている。近年、体細胞胚形成に関する分子生物学的研究より、この過程に関わる遺伝子が数多く単離されているが、体細胞が胚形成を行なう細胞へ変化する分子機構を説明するには至っていない。また、それら体細胞胚特異的な多数の遺伝子群の発現全体を調節するさらに高次の制御機構については、ほとんどわかっていない。このプロジェクトでは高次の遺伝子発現調節機構の候補としてクロマチン修飾に焦点を当て、この過程に関わる遺伝子を単離し、その構造と体細胞の胚化における機能について明らかにする事を目的とした。また、植物に広く保存された分化全能性という能力の発揮に、クロマチン修飾の関与が普遍的に関与するのかを確かめるために、同様な遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナからも単離し、組織培養による再生過程における役割を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

1) ニンジン体細胞からの胚化誘導時に発現するクロマチン修飾関連遺伝子の単離

ニンジンの芽生えを合成オーキシンである2,4-Dで24時間処理し、ホルモンを含まない培地で培養すると、一旦表皮として分化した細胞が表皮である事をやめ、胚を形成するようになる。この2,4-D処理したニンジン細胞に発現するクロマチン関連遺伝子をデジェネレートプライマーを用いたRT-PCR法によってクローニングした。

2) ニンジン表皮細胞の胚化過程におけるクロマチン関連遺伝子の発現解析

ニンジン表皮細胞からの胚化誘導過程及び胚形成過程における、クロマチン関連遺伝子の発現パターンを調べるため、ノーザンハイブリダイゼーションを行なった。また、発現領域の推移を調べるためにin situハイブリダイゼーションを行なった。

3) ニンジン表皮細胞の胚化と遺伝子発現に対する植物ホルモンの影響

ジベレリンはニンジン表皮細胞からの胚化に対して抑制的に働き、ジベレリン合成阻害剤であるウニコナゾールは表皮細胞を胚的なままに保持してしまう。これらのホルモン条件下でのクロマチン関連遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションで調べた。

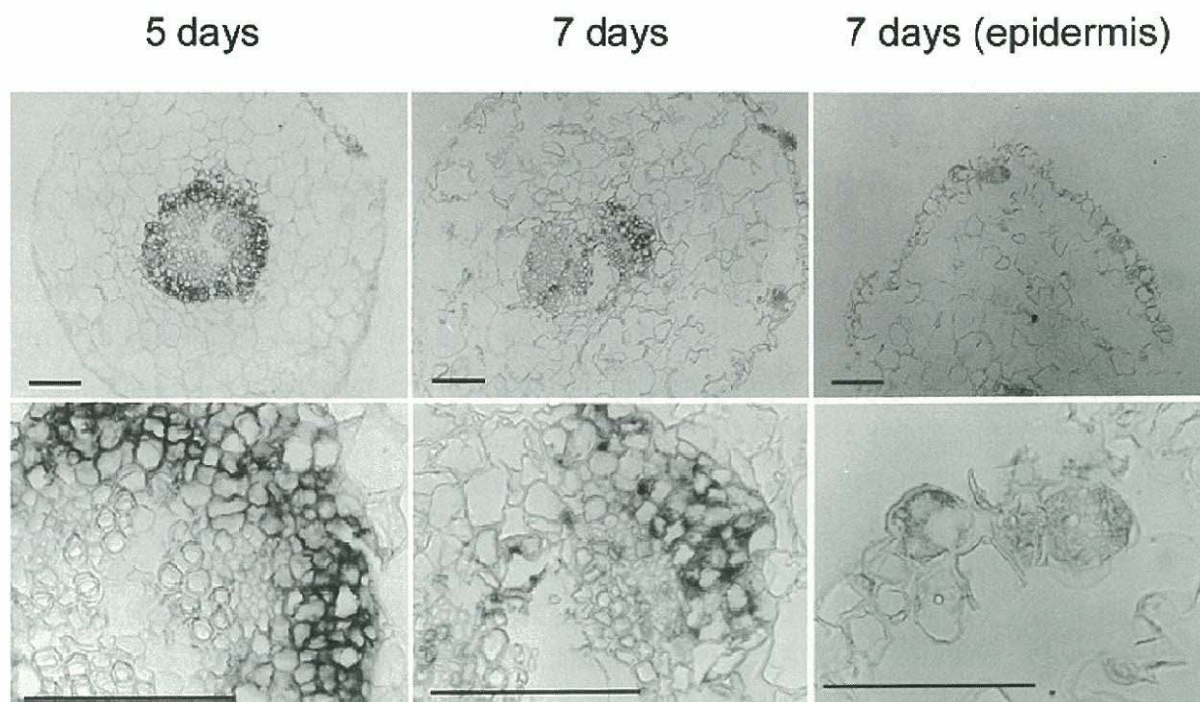
4) シロイヌナズナの苗条および根の再生に関わるクロマチン関連遺伝子の解析

モデル植物であるシロイヌナズナの組織培養では、オーキシンとサイトカイニンを含む培地でカルスを形成させ、インドール酢酸を含む培地に移植すると根が形成され、インドール酪酸とイ

ソペンテニルアデニンを含む培地では苗条が形成される。クロマチンの修飾が広く植物の再生現象に関与するのかを明らかにするため、各ホルモン条件のシロイヌナズナ細胞より、クロマチン関連遺伝子を単離した。

3. 結 果

- 1) ニンジンから単離したクロマチンリモデリング因子をコードする遺伝子 *SWICA1* (*SWI2/SNF2-like gene in carrot 1*) を単離し、この塩基配列を決定したところ、ATP アーゼドメインと思われるアミノ酸配列をコードしていると予想された。また、これと類似の *SWICA2* 遺伝子も単離した。リモデリング以外のクロマチン修飾には DNA のメチル化とヒストンのアセチル化がある。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) はヒストンにアセチル基を転移する酵素であり、これが働くことでクロマチン構造に緩みを生じ、遺伝子発現が活性化すると考えられている。一方、DNA メチルトランスフェラーゼ (MET) は DNA にメチル基を転移させて遺伝子発現を抑制する。ニンジンより HAT および MET をコードすると思われる遺伝子 *DcHAT1* と *DcMET1* を単離した。
- 2) 単離されたクロマチン関連遺伝子について、ニンジンの胚化過程における発現パターンをノーザンハイブリダイゼーションによって解析した。その結果、*SWICA1* および *SWICA2* は 2, 4-D 処理 1 時間という非常に早い段階で発現が始まり、ホルモン無しの培地に移植した後も発現が上昇し、培養 5~7 日目の表皮細胞が活発に分裂し始める時期にピークを迎えたが胚の形態形成が始まると発現が消失した。*SWICA1* の発現領域を明らかにするため、*in situ* ハイブリダイゼーションを行なったところ、胚化誘導処理を行なわない状態では道管付近の非常に限られた領域にのみ発現が見られた。2, 4-D による胚化誘導処理後は道管付近における発現は消失し、内鞘細胞で多量に発現していた。ホルモン無しの培地へ移植してから 5 日から 7 日目では内鞘での発現は低下し、さらに外側で活発に細胞分裂する細胞に多量に発現していた (図)。また、こ



の時期に活発に細胞分裂をしている表皮細胞に発現が見られたが、分裂していない細胞には発現していなかった。

DcHAT1 のノーザンハイブリダイゼーションの結果、2,4-Dによる胚化誘導処理時に一過的な発現の上昇が見られた。この時期に、ヒストンのアセチル化阻害剤であるトリコスタチンAを与えると表皮細胞からの胚化が阻害された。*DcMET1* は胚化誘導時期において発現量が低かったためノーザンハイブリダイゼーションでは検出する事ができなかった。

- 3) ジベレリンの合成阻害剤であるウニコナゾールを与えると、再生した胚の表皮から二次胚を形成する。クロマチンリモデリング因子 *SWICA1* は形態形成時には発現しないはずであるが、ウニコナゾール存在下では高い発現を示した。
- 4) シロイヌナズナのEST配列データベースよりニンジン *SWICA1* と相同性の高い遺伝子を見出した。この配列をもとにプライマーを作製し、カルスから単離したRNAを鋳型としてRT-PCRを行ない、当該ESTの増幅を試みた。そして、増幅断片をクローニングすることに成功した。

4. 考 察

本研究ではまずニンジンからクロマチンの修飾に関わる遺伝子 *SWICA1*, *SWICA2*, *DcHAT1*, *DcMET1* をクローニングした。さらに、表皮細胞からの直接胚化過程における遺伝子発現パターンを解析した結果、*SWICA1*, *SWICA2* が胚化誘導処理中に発現し始め、胚の形態形成が始まるまで発現しつづけた。*SWICA1* の mRNA の局在パターンは最初維管束領域に見られるが、徐々に外側のあらたに分裂した細胞や、表皮細胞から分化転換し、活発に細胞分裂を始めた胚形成前駆細胞に発現する事がわかった。このことから、*SWICA1*, *SWICA2* は、一旦分化した細胞が脱分化し多分化的な能力を獲得する段階に関与するのではないかと考えられる。しかし、これら遺伝子は胚の形態形成の段階には寄与していないものと推測される。また、*SWICA1* はジベレリン合成を阻害し、胚から二次胚を形成するようなホルモン条件下で過剰に発現する事から、通常の発生において一旦分化した細胞ではその発現がジベレリンによって抑制されており、胚化しないように制御されていると考えられる。2,4-Dによる表皮細胞の胚化は、ジベレリンによる抑圧から解除がおこり、*SWICA1* を発現させ、*SWICA1* によるクロマチンリモデリングにより胚形成関連遺伝子の転写が活性化するような機構によるのではないかと考えている。

さらに、ヒストンアセチル化酵素の遺伝子 *DcHAT1* および DNA メチル化酵素 *DcMET1* を単離し、*DcHAT1* は2,4-Dによる胚化誘導過程で一過的な発現上昇が見られた。この時期にヒストンアセチル化阻害剤であるトリコスタチンAを与える事によって、表皮細胞の胚化は抑制された。これらの事より、胚化誘導の非常に初期に起こるヒストンアセチル化も、クロマチンリモデリングと同様にこの分化状態の転換に際しての遺伝子発現の変化に関与する可能性が示唆された。今後は、形質転換植物を用いたこれらクロマチン関連遺伝子の機能解析により、クロマチン修飾を介した植物体細胞の胚化機構に迫る事ができると考えられる。

今回の研究では、シロイヌナズナについてもその再生過程におけるクロマチン修飾の役割を解明するため、ニンジン *SWICA1* と類似のESTをPCRによってクローニングする事ができた。今後はこの遺伝子の発現解析や機能阻害実験を行なうことができる。シロイヌナズナは高等植物におけるモデル生物として広く研究されており、全ゲノム配列も解読されている。シロイヌナズナを用いた研究によって、植物に広く保存されている分化全能性に共通の分子機構を解明する事が今後の目標である。