

ジャカリン様レクチンによる傷害誘導性細胞分裂における細胞壁分布パターンに関する研究

若月 采玖也（筑波大学生物学類）

指導教員：岩井 宏暁（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

植物は動くことができないため、様々な環境ストレスに対して応答、適応する能力を身につけている。特に傷害ストレスは、風や圧力、草食動物など多岐にわたり、植物体の発達の維持に甚大な影響を与える。このため、植物は傷害を受けると、傷ついた部位に傷害誘導性の植物ホルモンや転写因子を集め、細胞分裂を活性化させて傷を癒す能力を有している。この一連のプロセスは組織癒合と呼ばれ、植物の挿し木などにも応用されている。

組織癒合は植物に広くみられ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の花茎では、傷害後 3 日で細胞増殖が確認され、7 日後には完全な組織癒合が成立し、傷が回復することが報告されている^[1]。さらに、シロイヌナズナの組織癒合における細胞増殖に関わる因子として、At2-MMP とジャカリンが同定された。At2-MMP はメタロプロテアーゼの一種で、組織癒合において細胞増殖を負に制御する役割を果たす。傷害から 5 日後にかけて徐々に産生され、その後の組織の回復に重要な役割を担うことが報告されている^[2]。さらに、ジャカリンは At2-MMP の分解ターゲットとして同定され、ジャカリンが欠損した変異体では傷口の細胞増殖が阻害される。このことから、ジャカリンは組織癒合における細胞増殖を正に制御する因子であると考えられる。しかし、ジャカリンによって誘導される細胞増殖の詳細な機構については、まだ解明されていない点が多く存在する。

そこで本研究では、ジャカリン処理後の組織がどのように増殖し、またどのようにその過程が誘導されるのかを明らかにするため、メチル化ペクチンの分布に着目することとした。ペクチンは細胞壁の主要成分であり、細胞壁の柔軟性や柔軟な細胞接着に必須である。ペクチンはゴルジ体でメチル化された状態で合成され、その後細胞壁に分泌される。このため、合成直後のペクチンはメチル化ペクチンであり、細胞増殖が盛んな領域では多く存在することが知られている。一方、メチル化ペクチンは細胞壁においてメチル基が除去され、脱メチル化ペクチンへと変化する。細胞増殖を伴う未分化な状態から分化へ転換する際には、脱メチル化ペクチンが多く分布するようになる。例えば、植物の分裂組織に近い部位ではメチル化ペクチンが多く、分裂組織から離れるにつれて脱メチル化ペクチンが多いことが報告されている^[3]。本研究では、メチル化および脱メチル化ペクチンの分布を可視化することで、ジャカリンによって誘導される細胞増殖過程における、増殖から分化への転換がどのように進行するのかについて考察した。

【材料・方法】

・シロイヌナズナの生育、切断処理およびジャカリン処理

シロイヌナズナの野生型 (WT Columbia-0) を用いて、インキュベーター内で栽培を行った。4~5 週間後、20 cm 程の長さに育った個体に切断処理を行った。茎の半分までマイクロナイフで切り込みを入れた後に、傷口にコントロールとして蒸留水 (DW)、または 0.001% ジャカリンのどちらかを 1 μ L 塗布した。

・サンプリング

切断処理 7 日後に、コントロール処理とジャカリン処理のそれぞれのサンプルについて、Technovit 樹脂溶液を用いた樹脂サンプルの作成を行った。カルノフスキー固定液 (pH 7.0) で固定した後、0.1 M リン酸バッファーを用いた洗浄、エタノールによる脱水を行い、Technovit7100 樹脂溶液に置換した。

・免疫組織化学染色による観察

樹脂サンプルをマイクロトームにより組織切片を作成し、それらに脱メチル化ペクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体である LM19 と、メチル化ペクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体である LM20 を用いて免疫染色化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果・考察】

ジャカリン処理では傷口付近での顕著な細胞増殖が観察されたのに対し、コントロール処理では観察されなかったことから、ジャカリンによって、傷口付近の組織での細胞増殖が誘導されたことが示唆された。

LM20 によって染色されたメチル化ペクチンのシグナルは、コントロールにおいては、傷口付近の組織では弱く、傷口奥の組織において比較的強いシグナルが観察された。また、ジャカリン処理においては、傷口付近の組織の顕著な細胞増殖が観察された部位において、LM20 のシグナルが強く観察された。一方で、傷口奥においてはほとんどシグナルが観察されなかった。

次に、LM19 によって染色された脱メチル化ペクチンのシグナルは、コントロールにおいては、傷口付近から全体的に弱く分布していた。一方、ジャカリン処理においては、ほとんどシグナルは観察されなかった。

以上の結果から、ジャカリン処理により傷口周辺で局所的な細胞増殖が誘導されていたことが確認されたこと、また、その増殖が起こっている組織はメチル化ペクチンが多く、未分化状態で細胞分裂を維持する傾向があることが示唆された。こういった未分化状態の細胞が多く存在することは、維管束組織への分化が多く起こることにつながるため、傷害部分を癒合し機能を回復する活着を促進する可能性がある。

【引用文献】

- [1] Asahina *et al.* (2011) PNAS, 108, 16128-16132.
- [2] Afifah Machfuudzoh *et al.* (2023) Plant and Cell Physiology. 65, 1821-1832.
- [3] Robert Palin *et al.* (2012) Biosystems, 109, 397-402.