

博士論文
令和 元 年度

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる
葉断面からの再生による栄養繁殖機構の解明

京都産業大学大学院
生命科学研究科
博士後期課程 4 年
学生証番号 659019
天野 瑠美

目次

要旨.....	4
総合序論	6
第 1 章 <i>Rorippa aquatica</i> の栄養繁殖の発生学的解析	12
1-1. 序論.....	13
1-2. 方法.....	15
1-2-1. 植物の栽培方法および栄養繁殖の条件	15
1-2-2. タイムラプスによる再生過程の観察.....	15
1-2-3. 葉片からの再生数の定量	16
1-2-4. 実体顕微鏡による再生過程の観察	16
1-2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による再生過程の観察	16
1-2-6. EdU による細胞増殖部位の可視化	17
1-2-7. 切片の作製および観察.....	18
1-2-8. qRT-PCR による遺伝子発現解析	18
1-3. 結果.....	20
1-3-1. タイムラプスによる栄養分体の再生過程の観察	20
1-3-2. 実体顕微鏡および SEM による栄養分体の再生過程の観察.....	21
1-3-3. 基部側断面からの再生数の定量	24
1-3-4. EdU の取り込みによる細胞増殖部位の特定.....	24
1-3-5. 切片による栄養分体が由来する細胞群の特定	26
1-3-6. 栄養分体の再生過程における細胞分裂関連遺伝子の発現.....	28
1-4. 考察.....	30
1-4-1. <i>R. aquatica</i> の栄養分体は根、シュートの順に <i>de novo</i> な器官形成によ って再生する	30
1-4-2. カルスを構成している細胞は傷を塞ぐ役割を担っている可能性がある.....	30
1-4-3. <i>R. aquatica</i> の再生には維管束形成層と内鞘様細胞が深く関与している	31
1-4-4. 葉の切断から数時間以内に再生のネットワークがはたらき始めている可	

能性がある.....	33
1-4-5. <i>R. aquatica</i> の再生には植物ホルモンが重要かもしれない.....	33
第2章 トランスクリプトーム解析による <i>Rorippa aquatica</i> の栄養繁殖機構 の解析 および栄養繁殖と植物ホルモンとの関係	35
2-1. 序論.....	36
2-2. 方法.....	39
2-2-1. 植物の栽培方法および栄養繁殖の条件	39
2-2-2. RNA-seq による遺伝子発現解析	39
2-2-3. 葉片におけるオーキシンの定量	40
2-2-4. 葉片におけるサイトカイニンの定量.....	41
2-2-5. オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、そしてそれらの阻害剤を含 む培地での葉片の培養	42
2-2-6. 切片によるロゼット葉の内部構造の観察	42
2-3. 結果.....	43
2-3-1. RNA-seq によるトランスクリプトーム解析	43
2-3-2. 葉片の先端部側と基部側における遺伝子発現プロファイルの比較	44
2-3-3. 組織培養によるモデル植物の再生に関わることが知られている遺伝子群 のオーソログの発現プロファイル	45
2-3-4. 維管束の発生に関与する遺伝子群のオーソログの発現プロファイル	49
2-3-5. 葉の切断直後に発現が変動する遺伝子群	50
2-3-6. 栄養分体の再生とオーキシンの関係.....	53
2-3-7. 栄養分体の再生とサイトカイニンの関係	59
2-3-8. 栄養分体の再生とジベレリンの関係.....	65
2-4. 考察.....	69
2-4-1. オーキシン極性輸送により葉片の基部側のみでオーキシン応答が活性化 される	69
2-4-2. 初発のオーキシン応答はオーキシン極性輸送に頼っているかもしれない	70
2-4-3. 栄養分体の再生しやすさには葉の内部構造も関係するかもしれない	71
2-4-4. <i>R. aquatica</i> 固有のサイトカイニン応答機構が存在する可能性がある ..	71

2-4-5. ジベレリンは根の再生に必須である	72
2-4-6. 維管束の発生に関与する遺伝子群の活性化は、植物のあらゆる器官の形成に共通する現象かもしれない.....	72
研究のまとめ	74
参考文献	77
謝辞.....	86

要旨

植物には受粉を通して有性生殖を行う種だけでなく、無性生殖を行う種も存在する。無性生殖の中でも、葉や根といった栄養器官から栄養分体 (plantlet) と呼ばれる新たな個体を再生するものを栄養繁殖という。一般に、植物は再生能力が高く、組織片を植物ホルモンで処理することで新しい器官を再生させることができる。このメカニズムについては、近年、モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究が盛んに行われている。一方で、栄養繁殖の詳細なメカニズムについての報告は少ない。

アブラナ科植物の *Rorippa aquatica* は、ちぎれた葉の断面から栄養分体を再生して繁殖する。この時、植物ホルモンによる処理は必要なく、水分条件さえ適切であれば、葉の基部側の断面から複数の栄養分体を再生する。本研究では、この *R. aquatica* を用いて葉断面からの栄養繁殖機構を遺伝子レベルで解明することを目的とし、各種解析を行った。

第1章では、*R. aquatica* の葉片からの栄養分体の再生過程を調べるため、各種顕微鏡を用いて葉断面の経時観察を行った。さらに、EdU によって増殖細胞を可視化することで、葉を切ってから1日目に細胞増殖が活発になっていることが明らかになった。栄養分体の由来を調べるために行った切片の作製からは、栄養分体は新規の (*de novo* な) 器官形成によって栄養分体が再生すること、そして、維管束の形成層や維管束を取り囲む葉肉細胞の増殖によって形成されることが明らかになった。加えて、再生部位における遺伝子発現の挙動を解析するため、経時的にサンプリングを行い、qRT-PCR によって細胞分裂に関与することが知られている遺伝子の発現解析を実施した。その結果、葉の切断から1日以内に、栄養分体が再生する葉片基部側において、細胞周期に関与する *CYCLINB1;1* (*CYCB1;1*)、そしてオーキシンによってカルス形成が誘導される経路ではたらく *E2 PROMOTER BINDING FACTOR a* (*E2Fa*) の発現が上昇していることが明らかになった。このことから、*R. aquatica* の栄養繁殖には植物

ホルモンの 1 つであるオーキシンの応答が重要である可能性が示唆された。

第 2 章では、*R. aquatica* の栄養繁殖に関与する遺伝子群を網羅的に解析するため、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、シロイヌナズナで知られている植物ホルモン依存的な再生経路が *R. aquatica* の葉片では基部側のみで活性化されていることが明らかになった。加えて、葉の切断直後にオーキシンの応答に関与する遺伝子が葉片の基部側で上昇しており、葉片の基部側にオーキシンが蓄積していたことから、葉片の先端部側から基部側へと向けたオーキシン極性輸送により、栄養分体の再生経路が基部側のみで活性化される可能性が示唆された。さらに、*R. aquatica* の栄養分体の再生とサイトカイニンの関係を調べるために行ったサイトカイニンの添加実験からは、*R. aquatica* の葉片からのシュートの再生にはサイトカイニンが必要であることが明らかになった。一方、葉片内のサイトカイニンの定量解析およびサイトカイニン応答性遺伝子の発現プロファイルの解析からは、*R. aquatica* のように自然条件下で新しい個体を再生するために、自然条件下では再生しない植物とは異なるサイトカイニン応答経路を獲得した可能性が示唆された。加えて、ジベレリンやジベレリン生合成阻害剤を含んだ寒天培地での *R. aquatica* の葉片の培養により、根の再生にはジベレリンが必須であることが明らかになった。

本研究によりもたらされたこれらの結果は、*R. aquatica* の栄養繁殖が、これまで報告されてきたシロイヌナズナの組織培養系でみられる再生や、栄養繁殖を行う他の植物種の再生とは異なるメカニズムを経ることを示唆する。

総合序論

自然界に存在する植物の中には、受粉を通して有性生殖を行う種だけではなく、無性生殖を行う種も存在する。無性生殖の中でも、葉や根のような栄養器官から栄養分体 (plantlet) と呼ばれる新たな個体が再生するものを栄養繁殖という (図 1)。この栄養繁殖は、イチゴのランナーやサツマイモの塊根からの再生のように 1 つの栄養器官から複数の個体が再生する場合が多いため、農業的にも重要な現象である。栄養繁殖をはじめとした自然界でみられる植物の再生については古くから知られ、生物の再生にまつわる研究は約 270 年も前から実施されてきた (Trembley, 1744; Birnbaum and Sanchez Alvarado, 2008)。植物の再生については草本植物だけでなく木本植物も含めたあらゆる種で研究されてきたが、そのほとんどは切片の作製による再生部位の観察に留まり、分子的なメカニズムの研究には至っていなかった。

ところが、植物の組織培養法の確立により、植物の再生メカニズムの研究は大きく前進した。植物は一般に再生能力が高く、組織片をオーキシンやサイトカイニンをはじめとした植物ホルモンで処理および培養することで分化した細胞が脱分化し、新しい個体を再生させることができることが発見された (Skoog and Miller, 1957)。この時、どの器官が再生するかはオーキシンの量とサイトカイニンの量のバランスで決まる。例えば、培地に含まれるサイトカイニンの量に対しオーキシンの量が多い場合は根を再生し、サイトカイニンの量に対しオーキシンの量が少ない場合はシュート (茎と葉) を再生する (図 1)。このような植物ホルモンによる処理を介した植物体の再生のメカニズムについては、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究が進められてきた。

植物ホルモンを含むカルス誘導培地でシロイヌナズナの組織片を培養した際、組織片が地中部由来である場合は側根の形成時と同様に維管束の内鞘の細胞が、組織片が地上部由来の場合は内鞘様細胞が分裂することでカルスが形成される (Sugimoto *et al.*, 2010)。さらに、このカルスでは側根の形成時に静止中心 (QC; quiescent center) の幹細胞特異的に発現する SCARECROW (SCR) や SHORT-ROOT (SHR)、そして WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)

などの遺伝子が発現しており、カルスは側根の性質を持つことが明らかになっている (Sugimoto *et al.*, 2010)。

また、シロイヌナズナの胚軸を切断すると、その傷を塞ぐためにカルスを形成することが知られている (Iwase *et al.*, 2005)。このカルスは「傷害応答性カルス」と呼ばれ、AP2/ERF ファミリーに属する転写因子 *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1* (*WIND1*) が高発現していることが報告されている (Iwase *et al.*, 2005)。加えて、この *WIND1* には *WIND2*、*WIND3*、*WIND4* といったホモログがあり、それぞれをシロイヌナズナで過剰発現させると、植物ホルモンを添加していない培地でもカルスを形成させることができる (Iwase *et al.*, 2011a; Iwase *et al.*, 2011b)。WIND 転写因子はサイトカイニン応答を高めることも示唆されており、*WIND1* の下流ではたらく因子の解析が進められている (Ikeuchi *et al.*, 2013)。

一方で、栄養繁殖は植物ホルモンによる処理は必要ないが、シロイヌナズナやタバコのような既存のモデル植物ではその性質が見られず、現在のところその詳細なメカニズムはほとんど報告されていない。

栄養繁殖を行う植物の 1 つであるコダカラベンケイソウ (*Kalanchoe daigremontiana*) は、葉縁の切れ込み (鋸歯) の部分から不定胚発生により栄養分体を再生して繁殖する。不定胚とは植物の組織や器官から形成される胚のことであり、受粉によって発生した胚と区別するために不定胚という個別の名称で呼ばれる。コダカラベンケイソウは、胚発生に重要な役割を果たす *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) に含まれる A、B、C の 3 つのドメインのうち、B ドメインにストップコドンが存在することで C ドメインが機能せず、これにより種子に乾燥耐性が備わらずに生育不能となるため、種子による繁殖ができない (Garcès *et al.*, 2007)。その代わり、葉縁において器官形成に関与する *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) と C ドメインが機能しない Kd *LEC1* の両方が発現することで、不定胚発生によって栄養分体を再生する (Garcès *et al.*, 2007)。また、Kd *LEC1* の C ドメインが機能するように設計された At *LEC1* とのキメラ Kd *LEC1* を発現させると、葉縁の栄養分体が種子休眠状態となって、栄養分体

の正常な再生に失敗することが知られている (Garcês *et al.*, 2014)。

ペペロミア属 (*Peperomia*) や *Sedum* 属の植物は、葉挿しによってカルス形成、根の再生、シュートの再生を経て栄養分体を再生することが発生学的な解析により明らかになっている (Hartmann *et al.*, 2001)。しかし、この再生過程を制御する因子等の分子的なメカニズムは明らかになっていない。

以上のように、栄養繁殖の形式には不定胚発生を経るものやカルスを経るもの等様々なタイプがあるが、一部の研究を除いて、そのメカニズムの遺伝子レベルでの報告はない。

北米の湖畔に生育する水陸両生でアブラナ科の *Rorippa aquatica* は、自然条件下において葉の断面から栄養分体を再生することで繁殖するという特徴を有している (図 2A; La Rue, 1943)。この一連の過程には水分以外の特別な条件は必要なく、水分状況さえ適切であれば、葉片の基部側の断面にのみ複数の栄養分体を再生する (図 2B-D)。さらに、*R. aquatica* はシロイヌナズナと同じアブラナ科で比較的近縁であるため (Nakayama *et al.*, 2014a)、シロイヌナズナの遺伝子配列情報を利用しながら、遺伝子レベルで研究を進めることができる。したがって、*R. aquatica* はこれまで詳細な研究がほとんど報告されてこなかった葉断面からの栄養繁殖のメカニズムの解明に理想的な材料であるといえる。さらに、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムが明らかになれば、発生学および進化学的な分野に新たな知見を提供できるだけでなく、植物育種をはじめとする農業分野への応用も可能であると考えられる。加えて、葉挿し等により栄養繁殖を行う他の植物種の再生メカニズムと *R. aquatica* で明らかになるメカニズムが種間で共通かどうか興味深い点である。

そこで、本研究では、*R. aquatica* の栄養繁殖機構の解明を目的として、発生学的解析による再生過程の観察、および RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現解析を行った。

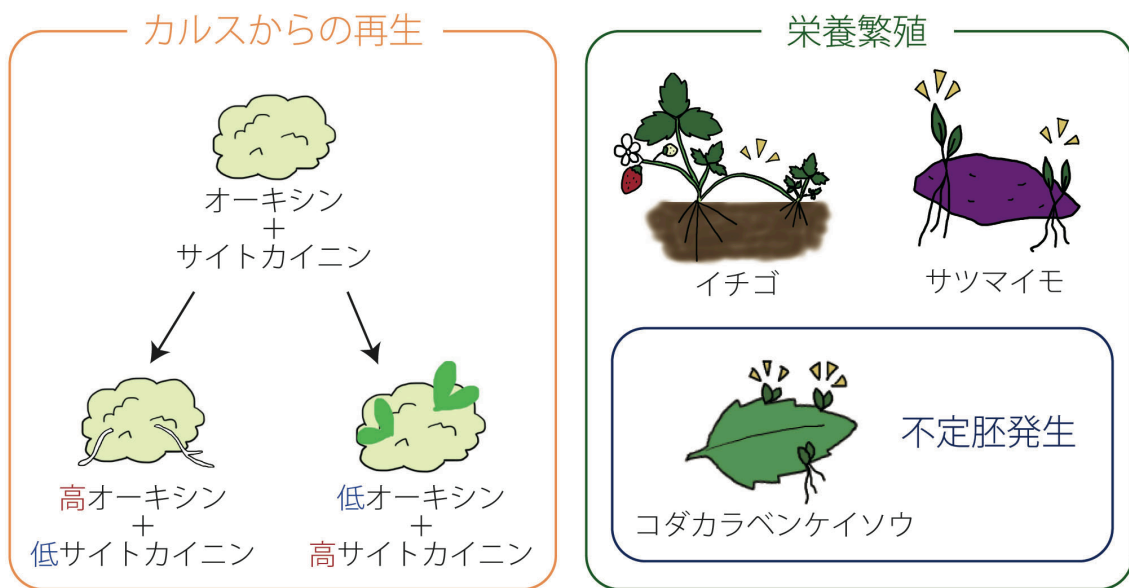


図 1 植物の再生

多くの植物では、組織片をオーキシシンとサイトカイニンを含む培地で培養するとカルスを形成する。形成されたカルスをオーキシシンとサイトカイニンの比率の異なる培地へ移すと根やシュートを再生（再分化）する。組織片の培養によるカルスの形成の誘導を経ることで栄養繁殖を行わない植物からも新しい器官を再生させることができる（左側）。栄養繁殖を行う植物の内、イチゴは親植物からランナーが伸長することで繁殖し、サツマイモは塊根から栄養分体を再生する。コダカラベンケイソウの葉縁の切れ込み部分からの栄養分体の再生は不定胚発生のメカニズムを経る（右側）。

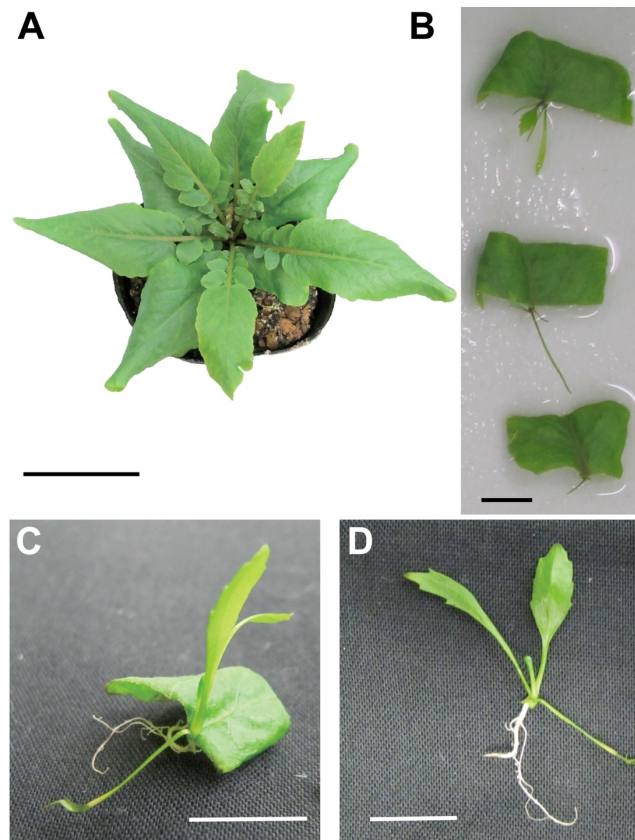


図 2 *R. aquatica* の栄養繁殖

R. aquatica の葉を複数の葉片に切り分けて水分のある状況に 2 週間ほど静置すると、葉片の基部側断面から新たな個体を再生する。(A) *R. aquatica* の植物体全体。(B) 1 枚の葉を切断して 3 枚の葉片とし、再生させた様子。(C) 基部側断面から再生した栄養分体。(D) もとの葉片 (C) から切り離した栄養分体。根とシュートが揃い、1 個体として独立している。スケールバーは (A) が 5 cm, (B-D) が 1 cm を示す。

第 1 章

Rorippa aquatica の栄養繁殖の発生学的解析

1-1. 序論

植物の中には、器官に傷がつくと、*in vitro* での培養を要することなく、自然条件下で不定根や不定芽と呼ばれる新しい根やシュートを再生するものが存在する。そして、再生する新しい器官の由来は、植物種や人為的な技術によって大きく異なることが知られている (Hartmann *et al.*, 2001)。草本植物の中でも、トマト、カボチャ、マメ、そしてカーネーションは、柔組織から新しい根を再生する (Stangler, 1949; Blazich *et al.*, 1979)。ユリ (*Lilium longiflorum*, *L. candidum*) の葉挿しでは、シュートの原基は鱗茎の柔組織に由来し、根の原基はシュートの原基のちょうど下に位置する柔組織から再生することが知られている (Walker, 1940)。一方、クラッスラ属 (*Crassula*) では、不定根は表皮に由来する (Hartmann *et al.*, 2001)。セントポーリア属 (*Saintpaulia*) の葉挿しでは既に分化した細胞から増殖した細胞が供給され、表皮直下の細胞層や皮層から新しいシュートが、維管束の間の細胞から新しい根が再生する (Venverloo, 1976)。さらに、シソ科のコレウス (*Coleus*) 属では、内鞘から新しい根が再生することが報告されている (Carson, 1929)。

また、傷がついた部位にカルスと呼ばれる細胞塊を形成した後に新しい根やシュートを再生する植物も存在する。マツの一種であるラジアータパイン (*Pinus radiata*) や *Sedum* 属の植物、セイヨウキヅタ (*Hedera helix*)、そして柑橘の一種である *Troyer citrange* が該当する (Cameron *et al.*, 1969; Yarborough *et al.*, 1967; Geneve *et al.*, 1991; Moreria-Dias *et al.*, 2000)。サツマイモの葉を葉挿しした場合も、葉の断面にカルスを形成した後に根が再生する (Hartmann *et al.*, 2001)。自然条件下で再生する植物の中でも、特に再生しやすい植物ではカルスが形成されることなく新しい根やシュートが再生し、再生しにくい植物ではカルスの形成を経て新しい器官を再生する傾向があるようである (Hartmann *et al.*, 2001)。さらに、カルスを形成せずに再生する植物種では、カルスを形成すること自体が新しい器官の再生を阻害するとも

考えられている (Hartmann *et al.*, 2001)。

加えて、新しい器官が再生する部位には極性があることも知られている。多くの植物では、根を切断した場合は先端部側の断面にシュートを、基部側の断面に根を再生する (Hartmann *et al.*, 2001)。マングローブ樹種の一つの *Kandelia candel* の胚軸を切断した場合も、先端部側の断面からシュートを、基部側の断面から根を再生する (Ogita *et al.*, 2004)。先端部側からシュートを、基部側から根を再生するこの極性には重力は関係しないことも知られている (Bloch, 1943)。なお、葉挿しの場合は、シュートと根の両方が基部側の断面から再生する (Hartmann *et al.*, 2001)。新しい器官の再生部位に関わるこれらの極性には、切断された器官内で植物ホルモンをはじめとした物質の分布が変化するためであると考えられてきた (Hartmann *et al.*, 2001)。実際、根の再生と植物ホルモンの一種であるオーキシンの動態に相関があるという報告がある (Haissig *et al.*, 1994; Maini, 1968; Robinson *et al.*, 1977; Skoog *et al.*, 1948; Warmke *et al.*, 1950)。さらに、近年、ペチュニア (*Petunia hybrida*) の葉柄から不定根が再生する際は、極性輸送によって葉身の頂点 (先端) から葉柄 (基部) へとオーキシンが輸送され、葉柄の断面にオーキシンが蓄積することで細胞分裂が活性化され、不定根が再生することが報告された (Druege *et al.*, 2016)。

以上のように、一言に再生と言っても、器官の切断面から直接再生する様式、カルスを経て再生する様式、新しい器官の由来、そして再生部位の極性に至るまで、植物種によって様々である。本章では、*Rorippa aquatica* の葉の断面からの栄養分体の再生がどの再生様式に該当するのか、再生する栄養分体はどこに由来するのか、どの部位に再生するのかを調べるため、葉の内部の細胞の観察をはじめとした発生学的手法を用いて再生過程の観察を行った。

1-2. 方法

1-2-1. 植物の栽培方法および栄養繁殖の条件

本研究では、主に北米地域原産の *R. aquatica* の中でも、地域集団の 1 つである N 株を用いた。それぞれの個体は、プラスチック製のバット上にコンフォートサービスタオル（クラシエ）を 2 枚敷いて水道水を含ませ、3~4 枚の葉片に切り分けた親植物の葉を置いて栄養繁殖させた。この際、乾燥を防ぐためにバットの上からラップをかけた。栄養繁殖は 23°C の 24 時間明条件下で 20 日間行った。再生した栄養分体は培養土（バーミキュライト：赤玉土：メトロミック ス=3：1：1）が入った栽培ポットに鉢上げし、30°C の 24 時間明条件下で 40 日以上栽培した。2-3 日に 1 度、0.5 ml/L のハイポネックス溶液（窒素：リン酸：カリウム=6：10：5）を与えた。

形態学的観察および分子生物学的解析の材料を得るための栄養繁殖は、栽培ポットへの鉢上げ後 40 日以上経過した展開葉の内、生育の良い葉を無作為に切り取り、それらの葉を 1 枚あたり 3-4 枚の葉片に切り出して、水道水を含ませたコンフォートサービスタオル（クラシエ）を 2 枚敷いたプラスチック製のバット上で栄養繁殖させた。栄養繁殖は 23°C の 24 時間明条件下で行った。

1-2-2. タイムラプスによる再生過程の観察

栽培ポットへの鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取り、70 %エタノールで 2 分間洗浄した後、エタノールを滅菌水で 3 度洗い流した。洗浄した葉は 10 %の次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間滅菌し、滅菌水で 5 回すすいだ。滅菌した葉はクリーンベンチ内でメスを用いて 3-4 枚に切り出した後、マジェンタボックス（プラスチック製の植物培養容器）に作製した Murashige & Skoog (MS) 培地（MES 0.5 g/L, スクロース 10 g/L, PPM 0.1 %, 1/2MS, Gellan Gum 2.5 g/L）に置床し、23°C の 24 時間明条件下で培養した。この時、栄養分体が再生する葉片基部側断面をマジェンタボッ

クスの壁に沿わせるように葉片を置床した。培養開始から 3 日後の時点で、USB デジタルマイクロスコープ (Dino Lite Pro) をマジエントボックスの外側から設置し、1 時間に 1 枚の頻度で撮影を行うよう設定して、11 日間撮影を行った。

1-2-3. 葉片からの再生数の定量

葉片からの再生過程を調べるため、鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取って栄養繁殖させ、再生数を定量した。定量には計 60 枚の葉片を用いた。

1-2-4. 実体顕微鏡による再生過程の観察

栽培ポットへの鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取り、栄養繁殖させた。栄養繁殖に用いた 21 枚の葉片の内、無作為に選んだ 7 枚について、切り出しから数日ごと (0、3、6、8、10、14 日目) に先端部側断面および基部側断面を観察した。観察には CCD カメラ (EC3; Leica) を搭載した実体顕微鏡 (S8AP0; Leica) を用いた。

1-2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による再生過程の観察

鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取って栄養繁殖させた葉片を、切り出しから数日ごと (0、3、6、8、10、14 日目) に FAA 固定液 (酢酸 : ホルマリン液 : 脱イオン水 : エタノール = 1 : 2 : 7 : 10) で固定した。固定した葉片の内、各区画について 3 枚の葉片の先端部側および基部側の中肋断面部分を 5 mm 四方に切り取り、エタノールシリーズ (50、60、70、80、90、95、99.5、100 %) で段階的に脱水した。さらに、エタノール : 酢酸イソアミル = 1 : 1 液に置換した後、酢酸イソアミルに完全に置換した。

酢酸イソアミルに置換した試料は、臨界点乾燥装置 (JCPD-5; JEOL) を用いて表面を収縮させずに乾燥させた。臨界点乾燥装置の中の温度を 0°C まで下げ、

ろ紙を敷いて試料を入れた試料かごを装置内に入れた。試料内の酢酸イソアミルと装置内の二酸化炭素を親和させ、1 時間静置した。その後、装置内を臨界点状態（40℃、100 MPa）で 10 分間静置し、乾燥させた。

乾燥させた試料をカーボンテープで試料台に貼付けてスパッタリング装置に設置し、金属イオン（金パラジウム 80-20）でコーティングして伝導性を持たせた。スパッタリングは、装置内を真空にした後、電圧を 1.2 kV、電流を 10 mA にし、プラズマ状態を 10 分間安定させることで行った。

スパッタリングを行った試料は試料台ごと SEM（S-4300N; HITACHI）に設置し、観察を行った。臨界点乾燥以降の試料は試料台ごとシリカゲルを入れたタッパー内に保管し、乾燥状態を保った。

1-2-6. EdU による細胞増殖部位の可視化

再生中の葉片に EdU を取り込ませることによって、葉片の細胞分裂部位を可視化した。鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取り栄養繁殖させた葉片を、切り出しから数日ごと（0、1、2、3、6、8、10 日目）に 3 枚ずつ選び取り、先端部側および基部側の中肋断面部分を 5 mm 四方に切り取った。この時、根や葉が大きく再生している場合は葉片断面に収まる程度に切除した。切り取った葉片断片は、すでに報告されているプロトコール（Nakayama *et al.*, 2015）にしたがって処理し、蛍光標識した。EdU を取り込ませる時間は 3 時間とし、蛍光色素（Alexa Fluor® 488azide）を取り込ませた後、試料をスライドガラス上に移し、抱水クロラル溶液（抱水クロラル 200 g、グリセロール 20 g、脱イオン水 50 ml）で一晩透明化した。この間、試料の上からカバーガラスをしてプレパラートにし、アルミホイルで遮光した。観察は、CCD カメラ（DS-Ri1K10980; Nikon）が搭載された蛍光顕微鏡（ECLIPSE; Nikon）を用いて行った。

1-2-7. 切片の作製および観察

鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から生育の良い葉を無作為に切り取り栄養繁殖させた葉片を、切り出しから数日ごと（0、3、6、8、10、14 日目）に FAA 固定液（酢酸：ホルムアルデヒド：脱イオン水：エタノール＝1：2：7：10）で固定した。固定した葉片の内、各区画について 3 枚の葉片の先端部側および基部側の中肋断面部分を 5 mm 四方に切り取り、エタノールシリーズ（50、60、70、80、90、95、99.5 %）で段階的に脱水した。この時、根や葉が大きく再生している場合は葉片断面に収まる程度に切り、取り除いた。脱水した試料は、Technovit 7100（Heraeus Kulzer GmbH）を用いて樹脂包埋した。包埋した試料はミクロトーム（HM325; Thermo SCIENTIFIC）および 60°C に熱したパラフィン伸展機（DS-Ri1K10980; Nikon）を用いて厚さ 7 μm のパラフィンにし、0.1 %のトルイジンブルーで染色した。切片の観察には CCD カメラ（DS-Ri1K10980; Nikon）が搭載された実体顕微鏡（ECLIPSE; Nikon）を用いた。

1-2-8. qRT-PCR による遺伝子発現解析

新しい個体が再生するための遺伝子ネットワークがはたらき始める時期を調べるため、シロイヌナズナのカルス形成に関与することが知られている遺伝子について発現解析を行った。鉢上げ後 50 日以上経過した個体群から生育の良い葉を無作為に切り取り栄養繁殖させた葉片を、切り出しから数時間（0、3、6、12 時間）および数日ごと（1、2、3、6、8 日目）に先端部側および基部側の中肋断面部分を 3-5 mm 四方に切り取ってそれぞれサンプリングし、液体窒素で凍結した。この時、根や葉が大きく再生している場合は葉片断面に収まる程度に切除した。1 チューブあたりの葉片断片数は 8-10 枚で、反復数は 3 である。RNA の抽出には RNeasy[®] Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いた。cDNA の合成には Transcriptor Universal cDNA Master（Roche）を用い、PCR 逆転写プログラムは 25°C のアニールを 5 分、55°C の逆転写を 20 分、85°C の変性を 5

分に設定した。なお、RNase H 処理には、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) に含まれる RNase H 活性を示す試薬 Transcriptor Universal Reverse Transcriptase を用いた。

先行研究 (Nakayama *et al.*, 2014b) にて行なわれていた *R. aquatica* の茎頂および葉原基の RNA-seq で得られたリードから、アセンブリソフトウェアである Trinity を用いた *de novo* アセンブリによって得られた trinity_all-lineAJ.fasta をデータベースとして用いて、シロイヌナズナの *CYCB1;1* (AT4G37490) と *E2Fa* (AJ294534) の配列をクエリーにして Local Blast を行った。その結果、データベース内からそれぞれ c54018_g1_i1 および comp20497_c0_seq1 の配列を得た。DDBJ のデータベースの BLAST からシロイヌナズナの各配列と類似性が高いことを確認し、Primer Express 3.0 を用いてプライマーを設計した (表 1)。設計したプライマーと KAPA SYBR® FAST qPCR キット (日本ジェネティクス株式会社) を用いて qRT-PCR を行った。PCR プログラムは 95°C で 30 秒の 1 ステップを 1 サイクル、95°C の変性とアニールをそれぞれ 5 秒、60°C を 34 秒の 2 ステップを 40 サイクルに設定した。

表 1. qRT-PCR による解析に使用したプライマー配列

遺伝子名	プライマー名	配列 (5'-3')
Ra <i>TUB beta4</i>	NaTUB_RT_F1	TGGACCGTTTGGTCAGATTTT
	NaTUB_RT_R1	CACCGGATTGGCCAAAGA
Ra <i>CYCB1;1</i>	NaCYCB11_qRT_Forward3	TCAAGTTCTTGGTGATATTGGTAATGT
	NaCYCB11_qRT_Reverse3	TCTTTGCCGGCTCGTTCTT
Ra <i>E2Fa</i>	RaE2Fa_qRT_Forward2	ACTGTCATAACGGCAACTTCCA
	RaE2Fa_qRT_Reverse2	AGCTCGACAAACAACGCTGATT

1-3. 結果

1-3-1. タイムラプスによる栄養分体の再生過程の観察

R. aquatica は、自然条件下において、葉の断面から栄養分体を再生し繁殖する（図 2）。この時、葉の基部側の断面からのみ栄養分体を再生し、先端部側の断面からは再生しないという特徴がある（図 2B）。この再生過程を観察するために、タイムラプス撮影を行った。植物ホルモンを添加していない Murashige-Skoog 培地に置床後 8 日目以降において、基部側の葉脈の断面から複数の栄養分体が再生する様子を撮影することができた（図 3）。この時、水の場合（図 2B, C）とは異なり、基部側だけでなく先端部側からも盛んに再生した。さらに、基部側から再生した栄養分体は通常よりも生育が良かった（Data not shown）。

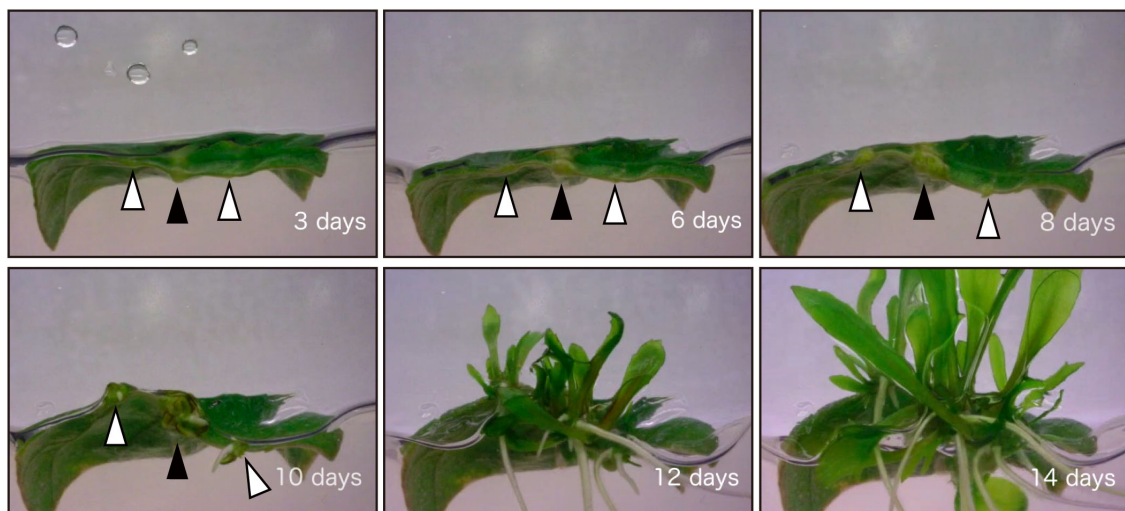


図 3 タイムラプスによる葉片基部側断面からの再生過程の経時観察

8 日目の矢じり部分から小さな根や緑色の突起が再生し，10 日目以降はそれぞれが大きな根とシュートへと成長した．黒い矢じりは中肋断面，白抜きの矢じりは中肋以外の主な葉脈の断面を示す．

1-3-2. 実体顕微鏡および SEM による栄養分体の再生過程の観察

R. aquatica の再生過程を明らかにするために、実体顕微鏡を用いて葉片の先端部側断面および基部側断面の経時観察を行った。先端部側では葉片の切断後 0-14 日目にかけて変化は見られなかった (図 4A-F)。一方、基部側では、葉の切断から 8 日目では中肋断面に小さな根を再生し (図 4J)、その後、シュートが再生し (図 4K)、1 つの栄養分体として大きく成長した (図 4L)。

次に、実体顕微鏡で観察した再生過程をより詳細に調べるために、SEM を用いて葉片の先端部側断面および基部側断面の経時観察を行った。基部側断面においては 0 日目から 3 日目の間は変化が見られなかったが (図 5G, H)、6 日後には維管束付近から根の原基のような構造が現れ (図 5I, M)、8 日後には根とシュートが再生し (図 5J)、10 日後および 12 日後には再生した根とシュートが大きく成長した様子を観察することができた (図 5K, L)。これらの観察により、栄養分体の再生には葉片の基部側の維管束が関与している可能性が示唆された。なお、先端部側断面においては、実体顕微鏡での観察と同様に根やシュートの再生は認められなかった (図 5A-F)。

加えて、再生途中に水分が不足した葉片では、葉の切断から 8-10 日後にかけて、中肋の断面や他の葉脈の断面にカルス状の細胞塊が形成されている様子が観察された (図 6A)。10 日目の葉片の基部側の中肋断面の突起を拡大すると、顆粒状の細胞が密集していた (図 6B)。この構造は、トウダイグサ科のナンヨウアブラギリ (*Jatropha curcas*) で観察されているカルスの exponential growth phase と呼ばれる分裂活性期の構造に酷似しており (dos Santos *et al.*, 2013)、このことは、*R. aquatica* の葉脈断面に形成される突起がカルスであることを示唆する。さらに、この葉脈断面のカルスを形成している顆粒状の細胞は 10 日目の先端部側の中肋断面および葉肉の断面においても観察された (図 6C-E)。加えて、カルスを構成している顆粒状の細胞の表面は滑らかではなく凹凸があり、この凹凸同士が接着している部位も確認された (図 6F, G)。なお、カルスが形成された葉片の断面からは、栄養分体は再生しなかった (Data not shown)。

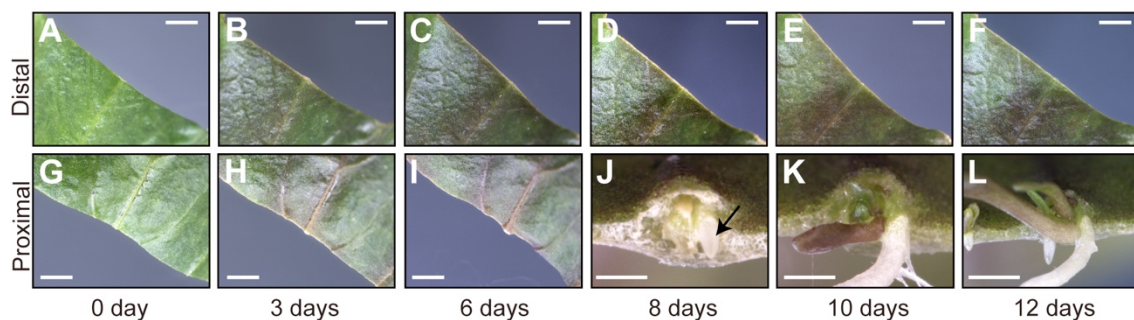


図 4 実体顕微鏡による再生過程の観察

(A-F) 先端部側断面の経時観察. 0 日目から 14 日目にかけて変化は見られなかった. (G-L) 基部側断面の経時観察. 8 日目の中肋断面に緑色の突起と小さな根が認められた (J). 10 日目の中肋断面からは小さな葉が再生していた (K). 14 日目には葉が大きく成長し、葉片の裏側に伸びた根も伸長していた (L). 8 日目以降, 根は葉片の裏側に伸長していた. スケールバーは 1 mm を示す.

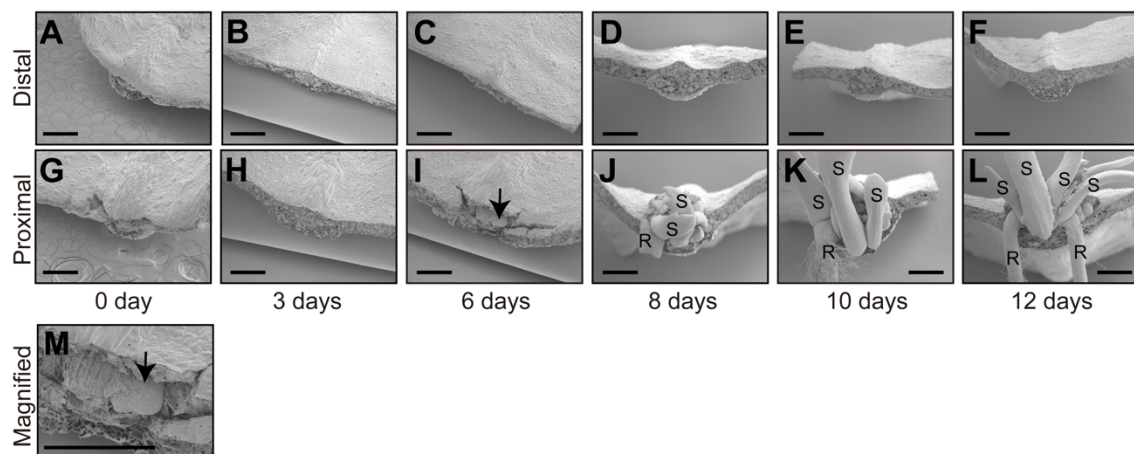


図 5 走査型電子顕微鏡 (SEM) による再生過程の観察

(A-F) 先端部側断面の観察. (G-L) 基部側断面の観察. (M) I の矢印部分の拡大図. 中肋の側面に形成された根の原基状の組織. S は再生した栄養分体のシュート, R は再生した栄養分体の根を示す. スケールバーは 500 μm を示す.

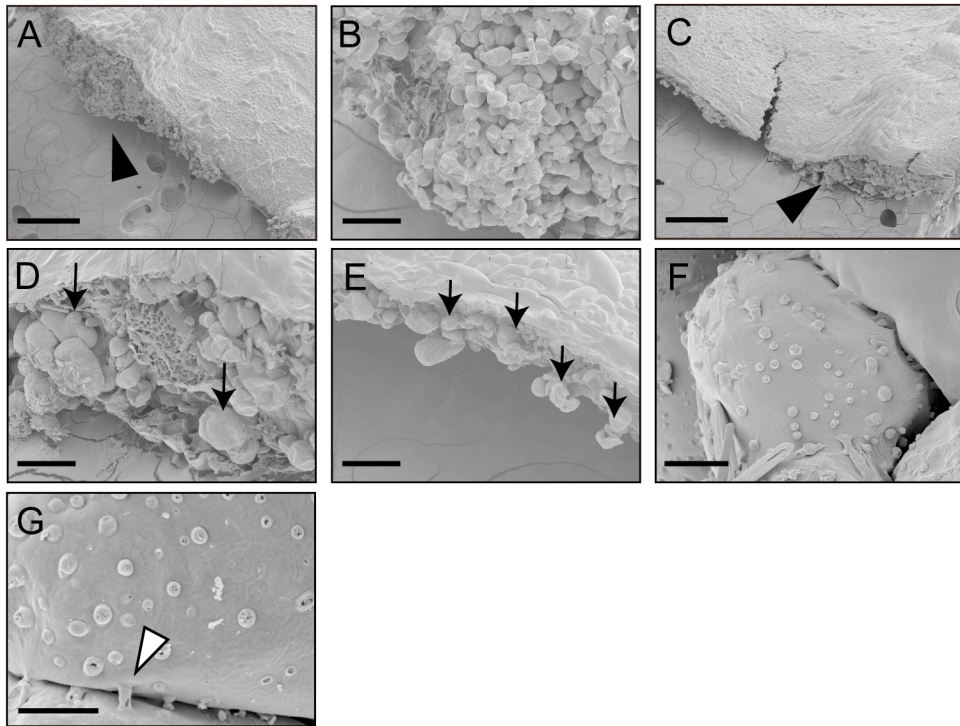


図 6 葉断面に形成されたカルス

(A) 水分が不足した葉片の基部側の中肋断面に形成されているカルス状の細胞塊。(B) Aの矢じり部分の拡大図。顆粒状の細胞が凝集していた。(C) 水分が不足した葉片の先端部側の中肋断面。(D) Cの矢じり部分の拡大図。基部側断面に形成されているカルス状の細胞塊を構成している細胞と同じ形態の細胞が確認できた(矢印)。(E) Cの葉肉部分の断面。中肋断面と同様の細胞が点在していた(矢印)。(F) Dでみられた細胞の表面の拡大図。(G) カルス状の細胞塊でみられた細胞同士の接着面の拡大図。白抜きの矢じりは細胞表面の凹凸同士が接着している部位を示す。スケールバーはA, Cが500 μm , B, D, Eが100 μm , Fが15 μm , Gが5 μm を示す。

1-3-3. 基部側断面からの再生数の定量

実体顕微鏡による観察から、*R. aquatica* の再生は 8 日目に中肋断面に小さな根を再生し、その後、シュートが再生して 1 つの栄養分体として大きく成長する過程を経ることが示唆された。これを確証するため、葉片の基部側断面から再生した個体を根とシュートの 2 つに分けて経時的に定量し、再生率を算出した。

葉片の切り出しから 7 日目までは再生は確認されず、8 日目に主に根を再生し、10 日目には多数のシュートの再生が認められた（図 7）。これにより、*R. aquatica* は根、シュート順で再生することで栄養分体が再生することが確かめられた。

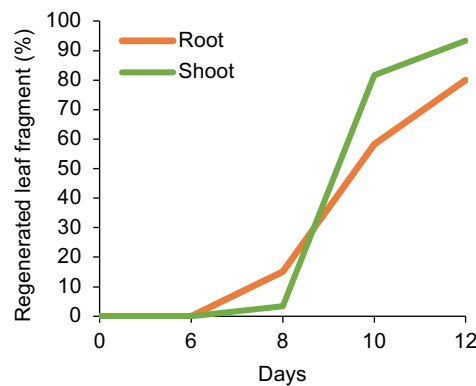


図 7 *R. aquatica* の葉片 1 枚あたりの再生数の定量

計 60 枚の葉片からの再生数を根およびシュートの 2 つに分類して定量し、それぞれを再生していた葉片の割合 (%) を算出した。

1-3-4. EdU の取り込みによる細胞増殖部位の特定

葉片内における細胞分裂部位を調べるために、葉片に EdU を取り込ませることで増殖細胞を可視化した。EdU はヌクレオチドの 1 つであるチミジンのアナログであり、葉片に取り込ませることで細胞周期の S 期に核酸に取り込まれ、増殖した細胞の核を蛍光標識することができる。

基部側では、0 日目ではシグナルが確認できなかったが、1 日目から 3 日目に

かけては中肋の維管束周辺にシグナルが見られ、そのシグナル数は日数が経過するにつれて増加した（図 8C-E）。これにより、栄養分体が再生する際の細胞増殖は維管束周辺で起こることが明らかになった。加えて、葉脈の断面におけるカルスや根の再生を経た栄養分体の再生が確認できるのは葉片の切り出しから 8 日目以降だが、そのための細胞増殖は早い時期に始まっていることも明らかになった。

先端部側では、観察を行った全ての日数において、基部側のようなシグナル数の増加は観察されなかった（図 8A, B, E）。

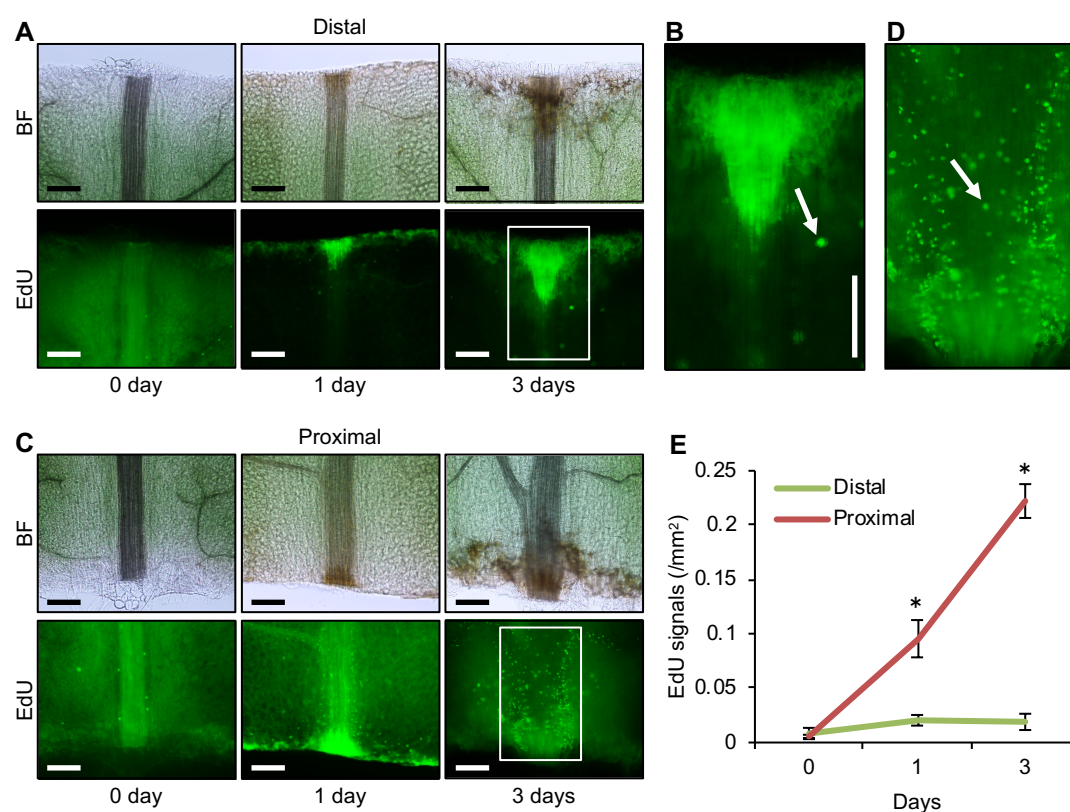


図 8 EdU を用いた細胞増殖部位の可視化

(A) 先端部側断面の観察。(B) A にて白く囲った先端部側の 3 日後の葉片の拡大図。(C) 基部側断面の観察。(D) C にて白く囲った基部側の 3 日後の葉片の拡大図。(E) EdU のシグナル数の定量。BF は明視野 (Bright Field) を示す。矢印は代表的な EdU のシグナルを示す。スケールバーはそれぞれ 1 mm を示す。

1-3-5. 切片による栄養分体が由来する細胞群の特定

栄養分体を構成している細胞の由来を調べるために、中肋部分の切片を作製した。

中肋部分の横断切片では、基部側の 3 日目以降において中肋の維管束周辺に小さな細胞が密集していた（図 9A, B）。特に 6 日目では形成層の細胞が分裂しているように見え（図 9A-C）、8 日後では分裂した維管束の形成層と維管束を取り囲む細胞から根の構造に近い細胞塊が形成されている様子が観察できた（図 9A, B）。10-12 日目では、根とシュートが再生していた（図 9A）。先端部側では内部構造の変化は確認できなかった（図 9A）。

中肋の維管束部分の縦断切片では、基部側においては、葉の切断後 0 日目と比較すると 3 日目や 6 日目に維管束の内部や周辺に小さな細胞が密集していた（図 10A, B）。8 日後では維管束が上下に割れて維管束内部のおそらく形成層部分に分裂組織状の細胞塊が形成されていた（図 10A, C）。10-12 日後では、葉片の維管束と再生したシュートの維管束が結合しているように見えた（図 10A）。これらのことから、栄養分体は維管束組織の細胞に由来することが示唆された。一方で、先端部では基部側のような変化は見られなかった（図 10A）。

また、SEM による観察でみられたカルスを構成している顆粒状の細胞表面の凹凸部分（図 6F, G）が濃く染色された（図 11）。

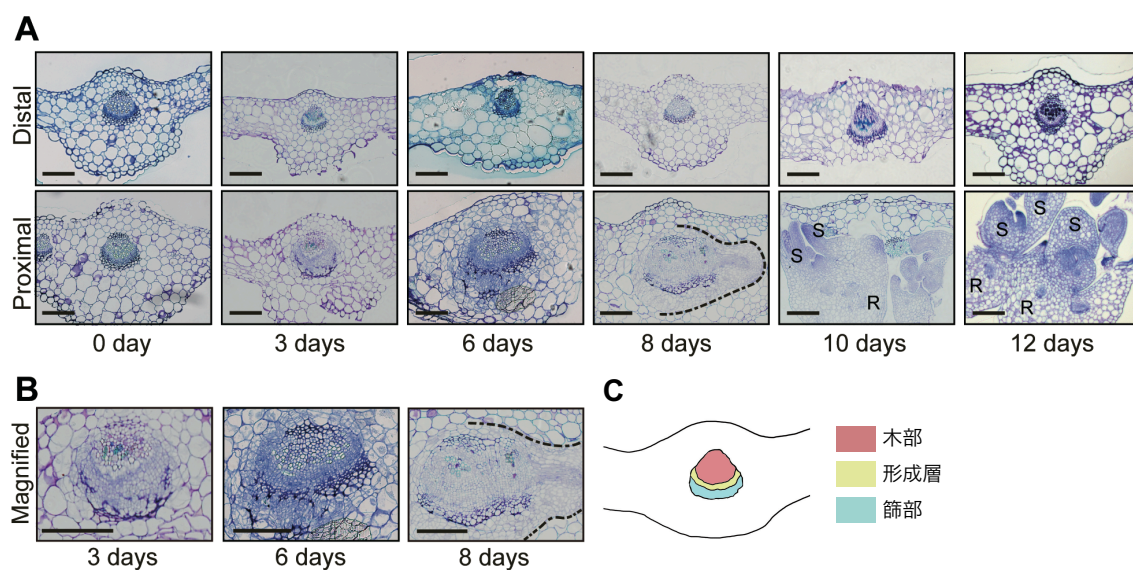


図 9 維管束の横断切片

(A) 先端部側（上段）と基部側（下段）の中肋の横断切片．(B) 基部側の横断切片の拡大図．基部側の 3 日後から 8 日後にかけて維管束部分に細かい細胞が密集していた．S は再生したシュートを、R は再生した根を示す．点線部分は形成層と維管束を取り囲む細胞から伸びた分裂組織状の細胞群を示す．(C) 維管束の構造の模式図．各写真の上方が向軸側、下方が背軸側である．スケールバーは 200 μm を示す．

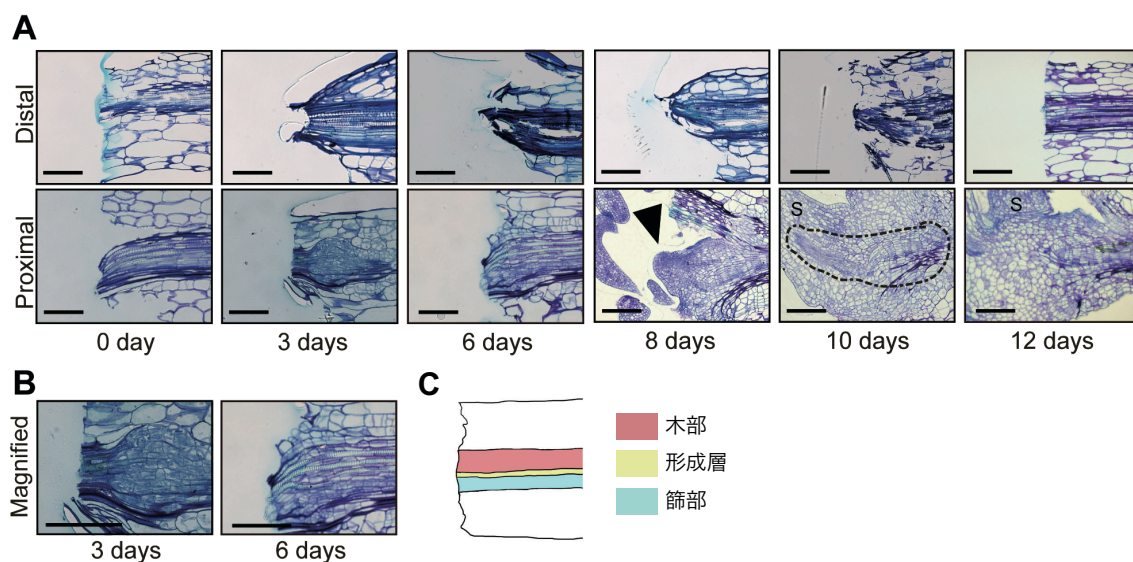


図 10 維管束の縦断切片

(A) 先端部側（上段）と基部側（下段）の中肋の縦断切片．(B) 基部側の縦断切片の拡大図．基部側の 3 日後と 6 日後に維管束の内部と周辺で細胞が分裂していた．矢じりは形成層部分から現れた分裂組織状の細胞群，S は再生したシュート，点線部分は再生したシュートの維管束ともの葉片の維管束が結合しているように見える部位を示す．(C) 維管束の構造の模式図．各写真の上方が向軸側、下方が背軸側である．スケールバーは 200 μm を示す．

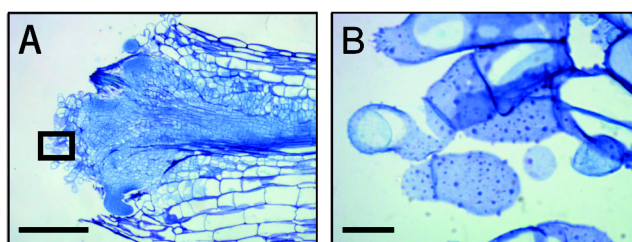


図 11 カルスの切片

(A) 水分が不足した葉片の基部側に形成されたカルス。(B) A の四角く囲われた部分の拡大図。細胞表面の凹凸が粒状に染色されている。各写真の上方が向軸側、下方が背軸側である。スケールバーは A が 200 μm , B が 50 μm を示す。

1-3-6. 栄養分体の再生過程における細胞分裂関連遺伝子の発現

葉片の基部側断面からの再生に伴って遺伝子の発現が変化し始める時期を調べるため、細胞分裂に関与する遺伝子の発現を qRT-PCR で経時的に解析した。今回は、*CYCLINB1;1* (*CYCB1;1*) と *E2 PROMOTER BINDING FACTOR a* (*E2Fa*) の発現を解析した。*CYCB1;1* は細胞周期の G2 期から M 期のチェックポイントで発現する遺伝子である。*E2Fa* は細胞周期に関与するだけでなく、組織培養によるシロイヌナズナのカルスの形成過程において、オーキシンによってカルスの形成が誘導される際の遺伝子の経路でもはたらくことが知られている (Ikeuchi et al., 2013)。この経路では、*AUXIN RESPONSE FACTOR7* (*ARF7*) や *ARF19* がオーキシンを感知し、*LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN* (*LBD*) 転写因子ファミリーの発現を調節する。*LBD* ファミリーの中でも *LBD18* および *LBD33* の発現は、細胞周期の再開に必要な遺伝子群の発現を促進する *E2Fa* の発現を促進する (Inzé and De Veylder, 2006; Ikeuchi et al., 2013)。

CYCB1;1 は先端部側においては発現が上昇しなかったが、栄養分体が再生する基部側においてのみ、葉片の切り出しから 1 日目以降に発現が上昇し続けた (図 12)。*E2Fa* は、先端部側においては *CYCB1;1* と同様に発現が上昇しなかったが、基部側においては 1 日目から 2 日目にかけて急激に発現が上昇した (図 12)。以上のことから、遺伝子発現レベルで解析した場合においても、細胞分裂は少なくとも葉の切断から 1 日後に活性化されることが明らかになった。

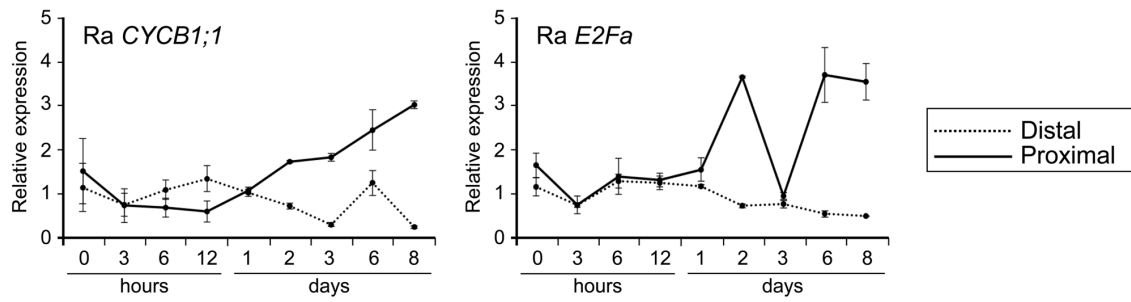


図 12 細胞分裂に関与する遺伝子の発現解析

(A) *Ra CYCB1;1* の発現. (B) *Ra E2Fa* の発現. 点線が先端部側, 実線が基部側の発現量を示す. 発現量は *TUB-beta4* で正規化した. 反復数は 3 である.

1-4. 考察

1-4-1. *R. aquatica* の栄養分体は根、シュートの順に *de novo* な器官形成によって再生する

基部側断面からの再生数の定量、実体顕微鏡による観察、そして SEM による観察から、*R. aquatica* は葉の切断から 8 日後以降に葉片基部側の葉脈断面から根、シュートの順で栄養分体を再生することが明らかになった（図 4-7）。

ペペロミア属 (*Peperomia*)、マンネングサ属 (*Sedum*) の葉挿しでは、葉柄の基部側断面にカルスを形成した後に根が再生し、最終的にシュートが再生することが明らかになっている (Hartmann et al., 2001)。これらについては遺伝子の発現等を解析した分子的なデータは示されていないが、*R. aquatica* の基部側断面からの再生と共通する部分があるかもしれない。

さらに、ハート型胚のような胚発生に特徴的な構造がみられず、切片の作製からも多数の細胞が分裂して根やシュートの再生が観察されたことから、*R. aquatica* はコダカラベンケイソウで知られているような 1 つの細胞から 1 個体が分化する不定胚発生ではなく、器官 1 つひとつが別々に再生する *de novo* な器官形成が起きていることが強く示唆される。

1-4-2. カルスを構成している細胞は傷を塞ぐ役割を担っている可能性がある

SEM を用いた観察によって、水分が不足した葉片の基部側の断面にはカルスが形成されていることが明らかになった（図 6A, B）。さらに、カルスを構成している顆粒状の細胞は先端部側の断面でも確認された（図 6C-E）。カルスが形成された葉脈の断面からは根やシュートが再生しなかったことから、顆粒状の細胞群は切断面を塞ぐために分裂した細胞であると考えられる。加えて、顆粒状の細胞の表面には互いに接着する凹凸があり、これらの凹凸はトルイジンブルーによって濃く染色された（図 11）。このことから、細胞表面の凹凸は細胞同士

の接着に重要なはたらきをもつ多糖類であるペクチンやセルロースの凝集体かもしれない。

傷を塞ぐための機構には、傷害応答性のカルスと接ぎ木による傷を塞ぐ組織癒合の 2 種類がある。前者については、シロイヌナズナの胚軸を切断した際に傷害応答性遺伝子 *WIND1* の発現が上昇して傷口にカルスが形成されることが知られている (Iwase *et al.*, 2005; Iwase *et al.*, 2011a; Iwase *et al.*, 2011b)。今回 *R. aquatica* で観察された先端部側断面の顆粒状の細胞については、シロイヌナズナの傷口にカルスができるメカニズムと共通の部分があるかもしれない。

後者については、キュウリやトマトの胚軸を傷付けると、子葉から供給されたジベレリンが細胞分裂を開始させ、細胞接着にはたらくペクチンの合成を促進することで組織癒合を引き起こすことが明らかになっている (Asahina *et al.*, 2002; Asahina *et al.*, 2006; Asahina *et al.*, 2007)。また、シロイヌナズナの花茎に傷を付けると、NAC 転写ファミリーである *ANAC071* および AP2/ERF 転写ファミリーである *Related to APETALA2 6l* (*RAP2.6L*) の発現によって細胞分裂が誘導されて組織が癒合するといった遺伝子の解析も行われている (Asahina *et al.*, 2011)。*R. aquatica* の葉片はもとの葉から完全に切り離されているため、先端部側の断面で細胞分裂が誘導されても組織癒合が起こることはないが、例えば切断面からの乾燥を防ぐための防御機構として類似した現象が起きているのかもしれない。

1-4-3. *R. aquatica* の再生には維管束形成層と内鞘様細胞が深く関与している

切片の観察から、細胞分裂は維管束形成層と維管束を取り囲む細胞で特に活性化されることが明らかになった (図 9, 10)。維管束形成層および維管束を取り囲む細胞については、新しい器官や組織を形成する能力を持つという複数の報告がある。

まず、形成層には幹細胞のように細胞の運命が決定していない未分化な細胞が存在していることが知られている (Miyashima *et al.*, 2013)。 *R. aquatica* の場合、中肋の維管束部分の横断切片では形成層が分裂している部位が観察された (図 9B)。したがって、 *R. aquatica* の栄養分体の再生には形成層が深く関与している。

次に、維管束を取り囲む細胞群は、根では特に内鞘と呼ばれ、葉ではしばしば内鞘様細胞と呼ばれる。植物の根では、内鞘の細胞が分裂することで側根が形成される (図 13; Malamy and Benfey, 1997; Sugimoto *et al.*, 2010)。そして、シロイヌナズナの根を培養して形成されたカルスは内鞘細胞に由来するという報告がある (Sugimoto *et al.*, 2010)。加えて、シロイヌナズナのカルスは、胚軸、子葉、そして花弁といったもとの器官の由来に関わらず、根のマーカ―遺伝子を発現し、側根のアイデンティティをもつことが報告されている (Sugimoto *et al.*, 2010)。この他にも、培養されたシロイヌナズナの葉では内鞘様細胞が分裂することが知られており (Liu *et al.*, 2014)、 *R. aquatica* もこれらの例に違わないようである。しかしながら、シロイヌナズナで報告されている形成層や内鞘様細胞の分裂は培養実験系によるものであり、細胞分裂やその後の器官の再生を水のみで成し得る *R. aquatica* の強い再生能力を支えるメカニズムの解明には、さらなる解析が必要である。

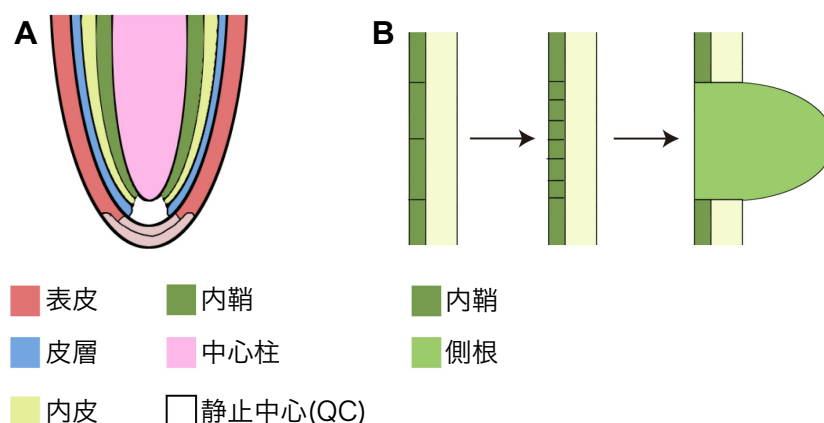


図 13 シロイヌナズナの根の構造

(A) 根の細胞層の模式図。(B) 側根の形成過程の模式図。

1-4-4. 葉の切断から数時間以内に再生のネットワークがはたらき始めている可能性がある

EdU による分裂細胞の可視化および葉片断片の qRT-PCR から、栄養分体の再生の先駆けとなると考えられる細胞分裂は、葉の切断から 1 日後に既に起きていることが明らかになった (図 8, 12)。このことから、葉の切断から数時間単位で再生に関わるネットワークがはたらき始めていると考えられる。特に、葉の切断という傷害に対する応答はより早い時間に起きているだろう。実際、傷害応答性のカルスの形成を誘導する *WIND1* はシロイヌナズナの胚軸の切断後数時間以内に発現するため (Iwase *et al.*, 2011)、*R. aquatica* においても葉片の切り出しからより早い段階での発現解析を詳細に行う必要がある。

1-4-5. *R. aquatica* の再生には植物ホルモンが重要かもしれない

植物は、胚軸や根といった組織片を植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンを含む培地で培養してカルスを形成させることで、そのカルスから新たな根やシュートを再生させることができる (Skoog and Miller, 1957)。植物の再生にはオーキシンとサイトカイニンが非常に重要である。

qRT-PCR で解析した遺伝子の中でも、栄養分体が再生する基部側で発現が上昇した *E2Fa* はシロイヌナズナにおいてオーキシンによってカルスの形成が誘導される経路ではたらく (Ikeuchi *et al.*, 2013)。このことから、少なくとも *R. aquatica* の再生にはオーキシンが重要なはたらきをもつことが示唆される。これを確かめるには、葉片断面へのオーキシンの塗布やオーキシンを含む培地での葉片の培養といった生理学的な実験の他、オーキシンによってカルスの形成が誘導される経路の上流ではたらく *ARF7* や *ARF19*、そして *LBD* ファミリーの発現解析が必要である (図 11A)。シロイヌナズナにおいて、*arf7 arf19* 二重変異体はカルス誘導培地上においてもカルスを形成しないが、*arf7 arf19* 二重変異体で *LBD16* を過剰発現させるとカルスを形成することも明らかになっており (Fan *et al.*, 2012; Ikeuchi *et al.*, 2013)、*LBD* ファミリーも *R. aquatica*

の再生に重要であることが予想される。

また、*R. aquatica* が葉片の基部側からのみ栄養分体を再生することについて、オーキシン極性輸送の関与が考えられる。オーキシンの1つである IAA(indole-3-acetic acid; インドール酢酸) は方向性をもって輸送されることが知られている。これをオーキシン極性輸送といい、葉では先端部側から基部側へと輸送される。仮に、*R. aquatica* の葉がもともと先端部側から基部側に向けたオーキシン極性輸送の性質が葉片として切り出されてからも維持されているならば、先端部側に蓄積した IAA が基部側へと輸送されて栄養分体を再生することも考えられる。特に、多くの植物において根は高濃度のオーキシンを含む培地で再分化することが知られているため、今回、顕微鏡等による経時観察によって明らかになったシュートよりも根が先に再生することに関しても、オーキシン極性輸送で説明ができるかもしれない。*R. aquatica* の再生とオーキシンの極性輸送およびオーキシンの生合成の関係については、次章で実験と議論を行う。

第 2 章

トランスクリプトーム解析による
Rorippa aquatica の栄養繁殖機構の解析
および栄養繁殖と植物ホルモンとの関係

2-1. 序論

研究の対象となる現象の分子メカニズムを明らかにすることは、その現象を理解する上で重要である。栄養繁殖は新しい器官の再生時の組織の観察のような形態学的、あるいは発生学的な解析は現在で言うところの非モデル植物を用いて古くから実施されてきたものの (Carson, 1929; Walker, 1940; Stangler, 1949; Yarborough *et al.*, 1967; Cameron *et al.*, 1969; Vencerloo, 1976; Blazich *et al.*, 1979; Geneve *et al.*, 1991; Moreria-Dias *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2001)、分子レベルでの研究に関する報告は限られている。第 1 章では、*R. aquatica* の栄養繁殖は *de novo* な器官形成であることが明らかになったことから *R. aquatica* の栄養繁殖には器官形成に関する遺伝子群が再生に深く関与している可能性が予想される。しかしながら、果たしてそれらの遺伝子が実際に *R. aquatica* や *R. aquatica* 以外の *de novo* な器官形成により再生する植物の再生部位で活性化されているかは明らかになっていない。これは、シロイヌナズナのような既存のモデル植物は栄養繁殖をせず、対して栄養繁殖をする植物の多くは分子レベルでの研究が困難であることが大きな原因であると推測される。この点で、第 1 章のように形態観察を行った上で分子レベルでの研究が実施可能な *R. aquatica* をモデルとすることは、栄養繁殖の分子メカニズムを明らかにする点で有効である。

栄養繁殖による植物の再生の分子メカニズムがほとんど明らかになっていない一方で、*in vitro* な条件での植物の組織培養における再生の分子メカニズムは、組織培養手法の確立および近年のモデル植物を用いた多くの研究により明らかにされてきた。植物ホルモンを用いた組織培養により新しい器官の再生を誘導する際は、まず、器官の切断により傷害応答性の *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION* (*WIND*) 転写因子群の発現が上昇する。そして、オーキシンとサイトカイニンを用いたカルス誘導培地 (*CIM*; Callus inducing medium) 前培養によってカルスの形成を誘導する段階で、*PLETHOLA3*

(*PLT3*)、*PLT5*、*PLT7*が下流の*PLT1*、*PLT2*、*CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*)、そして *CUC2* を誘導することで、細胞が分化全能性を獲得する (図 14A; Aida, 1997; Kareem *et al.*, 2015)。その後、サイトカイニンを多く含んだシュート誘導培地 (SIM; Shoot inducing medium) でカルスを培養すると、サイトカイニンに応答して *WUSCHEL* (*WUS*)、*ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* (*ESR1*)、*ESR2*、そして *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) が誘導され、シュートが再生する (図 14A; Kirch, 2003; Chandler *et al.*, 2007)。加えて、CIM で *PLT3*、*PLT5*、*PLT7* によって誘導された *CUC2* は、SIM で誘導された *STM* と協調してシュートの分裂組織を形成する (Gordon *et al.*, 2007; Ikeuchi *et al.*, 2016)。

また、植物ホルモンを使用せずにシロイヌナズナの若い葉から根を再生させる培養系が確立され、その分子メカニズムも明らかになってきている。播種後 12 日のシロイヌナズナの芽生えの葉を B5 培地 (Gamborg's B5 培地) で培養すると、*WUSCHEL RELATED HOMEBOX11* (*WOX11*) と *WOX12* の発現が活性化され、葉の前形成層と柔組織の細胞で細胞の運命転換が起こる (Liu *et al.*, 2014)。*WOX11* と *WOX12* は転写因子である *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16* (*LBD16*) と *LBD29*、そして *WOX5* の発現を誘導し、根の分裂組織が形成されて根が再生する (図 14B; Liu *et al.*, 2014)。*LBDs* と *WOX5* は根の内鞘から側根の分裂組織を形成する際にもはたらくことが知られている (Ditengou *et al.*, 2008; Goh *et al.*, 2012)。このことから、側根の発生と B5 培地を用いた葉からの根の再生は共通の経路を経る可能性が示唆されている (Ikeuchi *et al.*, 2016)。さらに、葉からの根の再生における *WOX11* の誘導にはオーキシン応答性の因子が必要であり、オーキシン応答因子 *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) が *WOX11* の発現を直接制御すると考えられている (図 14B; Liu *et al.*, 2014)。

ただし、このような *in vitro* での再生はあくまで人為的に再生を誘導したからこそ起こる現象であり、栄養繁殖のように自然条件で起こる再生と同一であるかどうかはわからない。自然条件で起こる再生の分子メカニズムを明らかに

するには、自然条件で再生する植物を用いて解析を行う必要がある。そこで、本章では、栄養繁殖の分子メカニズムを明らかにするために、*R. aquatica* の葉片を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析により、*R. aquatica* の葉片からの栄養分体の再生にはたらく遺伝子群を網羅的に解析した。

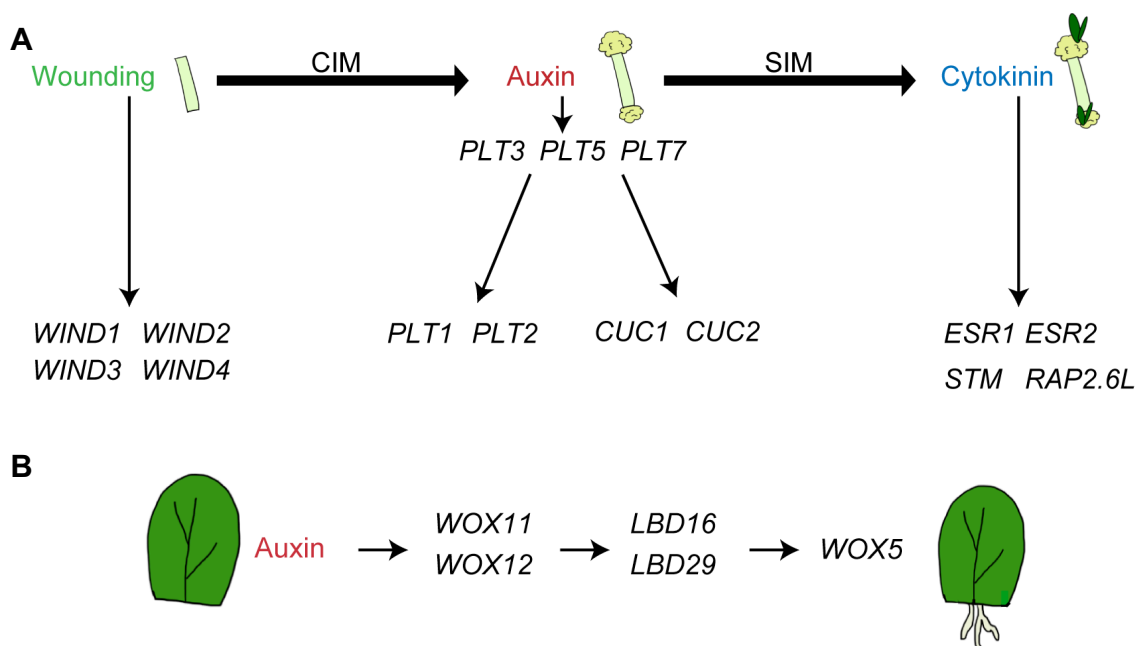


図 14 シロイヌナズナを用いた *in vitro* の研究で知られている再生経路

(A) シロイヌナズナの組織培養で知られている再生経路. Ikeuchi *et al.*, 2016 をもとに作成した. (B) 組織培養によりシロイヌナズナの若い葉から根を再生させる際の再生経路. Liu *et al.*, 2014 をもとに作成した.

2-2. 方法

2-2-1. 植物の栽培方法および栄養繁殖の条件

第1章 1-2-1.と同様に行った。

2-2-2. RNA-seq による遺伝子発現解析

葉片からの再生過程における遺伝子の発現を網羅的に調べるため、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。鉢上げ後 50 日以上経過した個体群から生育の良い葉を無作為に切り取り栄養繁殖させた葉片を、切り出しから数時間 (0、1、3、6、9、12、15、18、21 時間後) および数日ごと (1、2、3、4、6、8、10、12 日後) の計 17 点において、先端部側および基部側の中肋断面部分を 3-5 mm 四方に切り取ってそれぞれサンプリングし、液体窒素で凍結した。この時、根や葉が大きく再生している場合は葉片断面に収まる程度に切除した。1 チューブあたりの葉片断片数は 8-10 枚である。RNA の抽出には RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。抽出した RNA は Agilent RNA6000 Nano Assay (Agilent) で質を確認し、RNA integrity number (RIN) 値が 8.0 以上のものを RNA-seq のライブラリーの作製に使用した。反復数は 3 である。ライブラリーの作製は、Illumina TruSeq[®] Stranded RNA LT kit (Illumina) のプロトコルに従って実施した。作製したライブラリーは QuantiFluor[®] dsDNA System (Agilent) で濃度を定量し、Agilent High Sensitivity DNA Assay (Agilent) で質を確認した。プールしたライブラリーは NextSeq500 (Illumina) でシークエンスし、75 bp のシングルエンドリードが得られた。得られたリードは BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用いて *R. aquatica* の *de novo* アセンブリされた DNA コンティグ (Nakayama *et al.*, 2014b; Nakayama *et al.*, 2018) にマッピングされた。転写産物の発現および発現変動遺伝子群 (differentially expression genes; DEGs) は EdgeR GML アプローチを用いて定義され、false discovery rate (FDR) が 0.01 より小さい遺伝子群が DEGs

として分類された。DEGs を用いた Gene ontology (GO) enrichment 解析には、BiNGO のアドオン (<http://apps.cytoscape.org/apps/bingo>) を搭載した Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) を用いた。p 値の算出には Benjamini-Hochberg 法を採用した。Blast2GO の結果はアノテーションデータとして使用された。それぞれの解析には統計ソフト R を使用した。*R. aquatica* のオーソログの発現プロファイルのグラフの作成には、R のパッケージである ggplot2 と gridExtra を用いた。

2-2-3. 葉片におけるオーキシンの定量

葉片内のオーキシン量を定量するため、それぞれのタイムポイントにおいて、葉片の先端部側と基部側の断片を別々にサンプリングし、液体窒素で凍結させた。反復数は 3 である。IAA、IAA-Asp、そして IAA-Glu の LC-MS/MS 解析は、既に報告された方法 (Sugawara et al., 2015) に従って実施した。凍結したサンプル (30 mg) は、Tissue Lyser (Qiagen) を用いて、[phenil-¹³C₆]IAA、[¹³C₄, ¹⁵N]IAA-Asp、そして [¹³C₅, ¹⁵N]IAA-Glu を含んだ 0.3 ml の 80% アセトニトリル/1% 酢酸水溶液中で 3 mm のジルコニアビーズによって破碎した。抽出物を 13,000 ×g で 4°C で 3 分間遠心し、上清を収集した。上清の抽出は内部標準の追加をせずに 2 度繰り返した。上清をプールした後、2 ml の 1% 酢酸水溶液を加え、溶液が 1 ml より少なくなるまで Speed Vac で蒸発させた。溶液を 1 ml の Oasis HLB カラム (Waters) に移し入れ、1 ml の 1% 酢酸水溶液で洗浄した。IAA、IAA-Asp、そして IAA-Glu を 2 ml の 80% アセトニトリル/1% 酢酸で溶出し、溶液が 1 ml より少なくなるまで Speed Vac で蒸発させた。IAA、IAA-Asp、そして IAA-Glu を含む断片を、1 ml の Oasis WAX カラム (Waters) に移し入れた。1 ml の 1% 酢酸水溶液および 2 ml の 80% アセトニトリル水溶液による洗浄の後、2 ml の 80% アセトニトリル/1% 酢酸水溶液で IAA を溶出し、2 ml の 80% アセトニトリル/0.8% ギ酸で IAA-Asp および IAA-Glu を溶出し、それぞれの断片を乾燥させるため蒸発させた。それぞれの

断片を 30 μl の 1%酢酸水溶液で再溶解し、ZORBAX Eclipse XDB-C18 カラム (1.8 mm, 2.1 \times 50 mm; Agilent) を用いて Agilent 6420 Triple Quad system (Agilent) へ注入した。IAA の定量のための HPLC 解析は、0.01%酢酸水溶液 (溶媒 A) と、アセトニトリル/0.1%酢酸 (溶媒 B) で実施した。流量が 0.2 ml min⁻¹ の時、3%の溶媒 B を 3 分間、3–15%の溶媒 B を 20 分間とした。UPLC カラムの温度は 40°C とした。IAA と[phenyl-¹³C₆]IAA (正イオン状態) の MS/MS 解析は、既に報告された方法に従って実施した (Sugawara *et al.*, 2015)。IAA-Asp および IAA-Glu の定量のための HPLC 解析は、0.1%ギ酸水溶液 (溶媒 A) と、アセトニトリル/0.05%ギ酸 (溶媒 B) で実施した。流量が 0.2 ml min⁻¹ の時、3–8%の溶媒 B を 2 分間、8–11%の溶媒 B を 7 分間、そして 11–15%の溶媒 B を 15 分間とした。UPLC カラムの温度は 30°C とした。IAA-Asp と[¹³C₄, ¹⁵N]IAA-Asp (正イオン状態) の MS/MS 解析は、capillary voltage を 4,000 V、fragmentor voltage を 95 V、collision energy を 19 V、dwell time を 250 ms、そして、MS/MS transition (m/z) を、ラベルをしていない IAA-Asp に対しては 291/130、[¹³C₄, ¹⁵N]IAA-Asp に対しては 296/130 とした。IAA-Glu と[¹³C₅, ¹⁵N]IAA-Glu (正イオン状態) の MS/MS 解析は、capillary voltage を 4,000 V、fragmentor voltage を 95 V、collision energy を 20 V、dwell time を 250 ms、そして、MS/MS transition (m/z) を、ラベルをしていない IAA-Asp に対しては 305/130、[¹³C₄, ¹⁵N]IAA-Asp に対しては 311/130 とした。

2-2-4. 葉片におけるサイトカイニンの定量

葉片内のサイトカイニン量を定量するため、それぞれのタイムポイントにおいて、葉片の先端部側と基部側の断片を別々にサンプリングし、液体窒素で凍結させた。サイトカイニンの溶出および検出は、既に報告された方法に従って実施された (Kojima *et al.*, 2009; Kojima and Sakakibara, 2012)。

2-2-5. オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、そしてそれらの阻害剤を含む培地での葉片の培養

葉片からの栄養分体の再生に対するオーキシン、サイトカイニン、そしてそれぞれの阻害剤の効果を調べるため、鉢上げ後 50 日以上経過した個体群から生育の良い葉を無作為に切り取り、70%エタノールで 2 分間滅菌した。滅菌した葉を滅菌水で 3 度洗浄し、葉片に切り出して、0.8%の寒天培地上で培養した。寒天培地には、それぞれ、可搬性オーキシンの IAA (094-00183; Wako)、オーキシン輸送阻害剤 NPA (BPX7G; 東京化成工業)、オーキシン生合成阻害剤 PPBo (P1974; 東京化成工業)、サイトカイニン t-Zeatin (Z0012; 東京化成工業)、ジベレリン GA₃ (071-02813; Wako)、そしてジベレリン生合成阻害剤 PAC (P2299; 東京化成工業) を DMSO (043-0721; Wako) に溶解して含ませた。それぞれの濃度は、IAA が 1 μM、NPA が 1 μM、PPBo が 100 pM、t-Zeatin が 10 μg/ml、GA₃ が 100 μM、そして PAC が 10 μM である。培養開始から 22 日後に観察し、葉片 1 枚あたりの平均再生数を算出し、t 検定を行った。個体数はそれぞれ n = 32 である。

2-2-6. 切片によるロゼット葉の内部構造の観察

栄養繁殖をしない植物と栄養繁殖をする植物の葉の内部構造を比較するため、シロイヌナズナと *R. aquatica* のロゼット葉の切片を作製した。シロイヌナズナは播種後 40 日が経過して抽台した個体、*R. aquatica* は鉢上げ後 50 日以上経過した個体それぞれから生育の良いロゼット葉を無作為に切り取り、「1-2-7. 切片の作製および観察」の手順に従って切片にして写真を撮影した。切片の作製時、植物の葉の細胞は維管束の周辺は他の葉肉細胞と細胞の大きさや局在が異なるため、樹脂に包埋する組織は葉の中肋を避けた部分を 5 mm 四方に切り出したものとし、観察時は維管束部分を避けた。撮影した写真は、Microsoft PowerPoint (バージョン 16.30) の図形のフリフォームを使用して、葉肉部分と細胞間隙部分を塗り分けた。

2-3. 結果

2-3-1. RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

R. aquatica の葉断面からの栄養繁殖には、葉片の先端部側からは栄養分体を再生せず、基部側の断面からのみ再生するという特徴がある。この特徴を利用し、先端部側の断面と基部側の断面の網羅的な遺伝子発現を比較することで、栄養分体の再生に関与する遺伝子群を絞り込むことができると仮定した。そこで、*R. aquatica* にみられる葉片の基部側断面からの栄養繁殖のメカニズムを遺伝子レベルで解析するため、葉片の先端部側および基部側の中肋部分を 3–5 mm² に切り出して経時的に RNA を抽出し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。RNA を抽出するタイムポイントは、葉を切断してから 0、1、3、6、9、12、15、18、そして 21 日後および 1、2、3、4、6、8、10、12 日後の計 17 点とした（図 15）。RNA-seq で得られた配列は先行研究において *R. aquatica* のシュートから *de novo* アッセンブリによって作製された RNA コンティグにマッピングし、132,566 個の転写産物が得られ、N50 は 1,903 を示した。

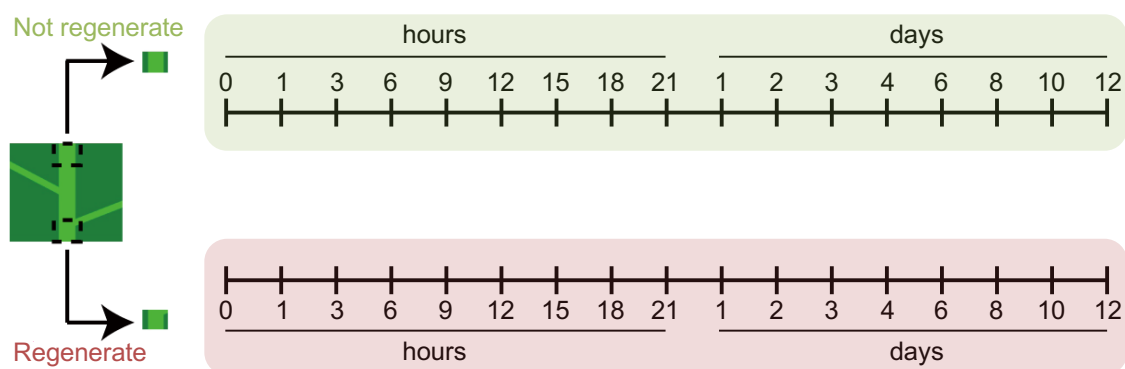


図 15 トランスクリプトーム解析の概要

葉の切断から 12 日後の計 17 点について、先端部側と基部側に分けてトランスクリプトーム解析を行った。

2-3-2. 葉片の先端部側と基部側における遺伝子発現プロファイルの比較

R. aquatica の葉片の先端部側と基部側における遺伝子の発現を網羅的に比較するため、edgeR を用いて葉片の先端部側と基部の発現変動遺伝子群 (DEGs; Differentially expressed genes) を定義し、Generalized linear model (GML) アプローチにより False discovery rate (FDR) < 0.01 を示す DEGs が 45,897 個得られた。

栄養分体を再生しない先端部側と栄養分体を再生する基部側の遺伝子発現プロファイルを比較するため、DEGs を用いて主成分分析 (PCA; Principal component analysis) を行った。はじめの 3 つの構成要素 (PC1 から PC3) はバリエーションの 60%を示し、7 つの構成要素の固有値は 1 より大きかった (図 16A)。PCA のマップは、PC1 vs. PC2、PC1 vs. PC3、そして PC2 vs. PC3 について 2 次元的に作成された (図 16C-E)。図 16C-E のドットはそれぞれ先端部側と基部側の各タイムポイントにおける遺伝子群を示す。同じタイムポイントのドットの距離は、先端部側と基部側の遺伝子群の類似性を示す。つまり、同じタイムポイントのドットの距離が近ければ先端部側と基部側の遺伝子群が類似しており、ドットの距離が離れていれば遺伝子群が異なる。図 16C に注目すると、早いタイムポイントでは先端部側と基部側のドットの距離が近く、遅いタイムポイントであるほど先端部側と基部側のドットの距離が遠くなった。この結果は、葉の切断後、時間を経るに連れて、葉片の先端部側と基部側では異なる遺伝子群がはたらいっていることを示す。これにより、先端部側と基部側の遺伝子発現プロファイルを比較することで栄養分体の再生に関与する遺伝子群を絞り込むことができるという仮定が立証された。各タイムポイントにおける先端部側と基部側の DEGs の数は、葉の切断から時間を経るに連れて増加した (図 16B)。

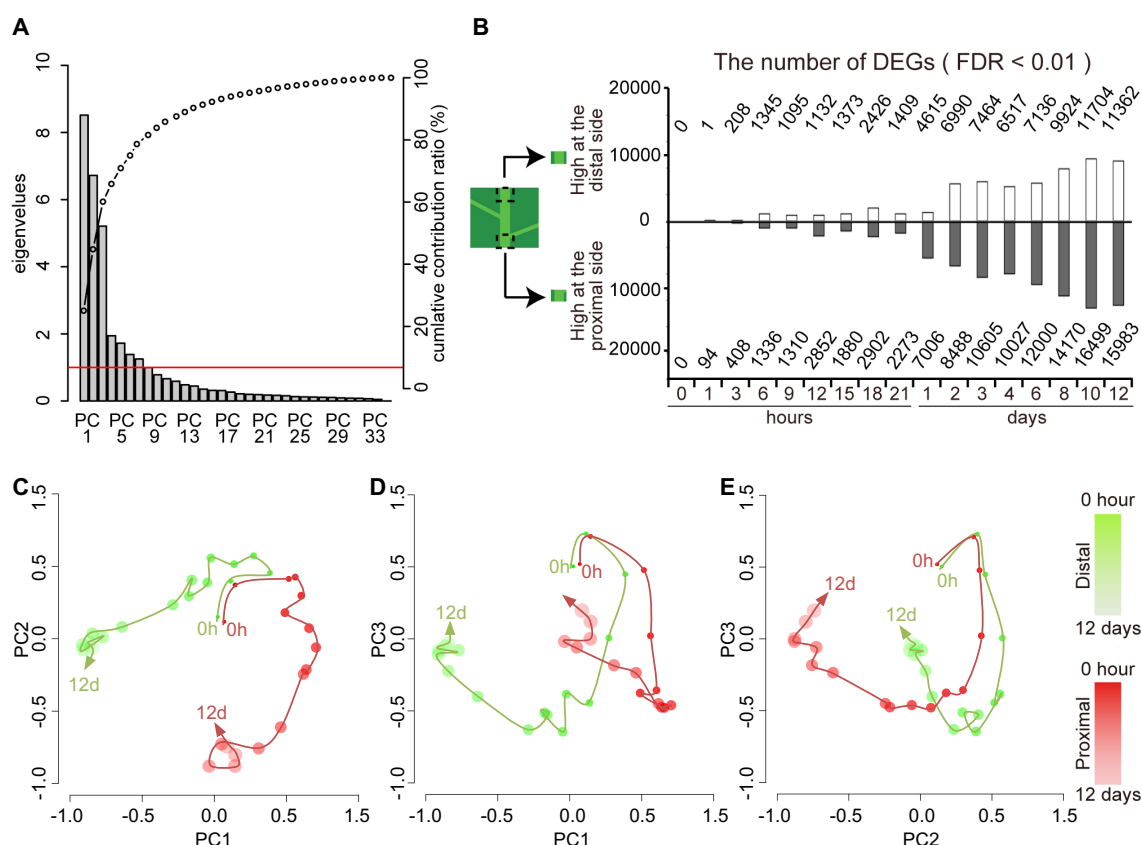


図 16 葉片の先端部側と基部側での主成分分析

(A) PCA の固有値と寄与率. バーと円はそれぞれ固有値と寄与率を示す. (B) 先端部側と基部側における, それぞれのタイムポイントでの発現変動遺伝子数. (C-E) 2 次元的に表した PCA の結果. ドットは各タイムポイントでの遺伝子発現プロファイルを示す. ドットを繋ぐ矢印は時系列を示す.

2-3-3. 組織培養によるモデル植物の再生に関わることが知られている遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

モデル植物を用いた *in vitro* な条件での組織培養では、植物ホルモンであるオーキシンによってカルスと呼ばれる未分化な細胞塊が形成され、根の再分化が誘導される。サイトカイニンを多く含む培地でカルスを培養すると、シュートの再分化が誘導される。このオーキシンやサイトカイニンを用いた *in vitro* な条件ではたらく遺伝子群とその経路については、近年、シロイヌナズナを用いた研究により報告されている (図 17A; Ikeuchi *et al.*, 2016)。さらに、シロイヌナズナの若い葉では、オーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンを添

加せずとも葉の断面から根が再生することが報告されている（図 18A）。この時には、*WOX11*、*LBD16*、そして *WOX5* の発現が活性化される。*R. aquatica* の栄養分体は葉片の基部側からのみ再生するため、これらの遺伝子群は *R. aquatica* では葉片の基部側でのみ発現が上昇しているはずである。これらの遺伝子群の発現が *R. aquatica* の葉片の基部側でのみ上昇しているかを確かめるため、*R. aquatica* のトランスクリプトームデータを用いて、シロイヌナズナで知られる再生経路ではたらく遺伝子群のオーソログの発現プロファイルを解析した。

発現プロファイルの解析の結果、上記の遺伝子群のオーソログの発現は基部側のみで上昇していた（図 17B-D）。具体的には、傷害に応答して発現が上昇する *Ra WIND1* は、葉の切断後 1 時間で、先端部側と基部側の両方で発現が上昇した（図 17B）。このことから、*R. aquatica* の葉片における傷害に対する応答は先端部側と基部側の両方で起こることが示唆された。*Ra WIND1* のホモログである *Ra WIND3* は *Ra WIND1* よりも遅いタイムポイントで基部側のみで発現が上昇した（図 17B）。シロイヌナズナでも *WIND3* は *WIND1* よりも遅いタイムポイントで発現が上昇する。さらに、シロイヌナズナでは *WIND3* は細胞分裂のタイミングで発現が上昇し、*WIND3* により傷害応答性のカルス形成が誘導されることが知られている。*R. aquatica* では *Ra WIND3* が基部側のみで発現が上昇したことから、*Ra WIND3* が基部側でのカルス形成に関与する可能性がある。

シロイヌナズナの組織培養においてオーキシンに応答して発現が上昇する *PLT* や *CUC* のオーソログは、*R. aquatica* の葉片において基部側のみで発現が上昇した（図 17C）。特に、*Ra PLT3* は時間を経るに連れて発現が上昇する点でシロイヌナズナと似た発現パターンを示した（図 17C ; Ikeuchi et al., 2017）。*Ra PLT5* は葉の切断後ただちに発現が上昇する点ではシロイヌナズナと類似していたが（図 17C; Ikeuchi et al., 2017）、遅いタイムポイントで基部側のみで発現が上昇した（図 17C）。*Ra PLT5* のはじめの一過的な発現は傷害に応答した結果であり、その後の発現は傷害応答ではなく基部側からの再生に関与してい

る可能性がある。*PLT7* はシロイヌナズナとは少々異なる発現パターンを示した (図 17C; Ikeuchi *et al.*, 2017)。*PLT* はシロイヌナズナでは competency の獲得に関与することが示唆されている。*R. aquatica* では *Ra PLT* 遺伝子群が基部側で発現が上昇したことから、葉片の基部側での competency の獲得に関与しているかもしれない。サイトカイニンに応答して発現が上昇する *ESR* と *STM* も、*R. aquatica* の葉片では基部側のみで発現が上昇した。注目すべきことに、シロイヌナズナでシュートの再生に関与することが知られている *RAP2.6L* (Yang *et al.*, 2018) のオーソログは、*R. aquatica* の葉片では初期のタイムポイントにおいて、栄養分体が再生しない先端部側のみで発現が上昇した (図 16C)。

さらに、シロイヌナズナの若い葉から根が再生する際に発現が活性化される *WOX11*、*LBD16*、そして *WOX5* についても、*R. aquatica* では基部側のみで発現が上昇した (図 18B-D)。

以上をまとめると、シロイヌナズナの組織培養による再生経路に関与する遺伝子群は、*R. aquatica* の葉片では基部側のみで発現が活性化され、*R. aquatica* の基部側からの栄養分体の再生に関与することが示唆された。一方で、シロイヌナズナとは異なる発現プロファイルを示す遺伝子群も存在したことから、再生に関与することは共通していても、再生経路が全く同じであるとは言い切れない。加えて、予想どおりシロイヌナズナの *in vitro* の再生経路ではたらく遺伝子群のオーソログの発現が *R. aquatica* の葉片の基部側でのみ上昇していたことから、今回得られたトランスクリプトームデータは、今後の解析にも引き続き用いることのできる信頼性の高いものであると言える。

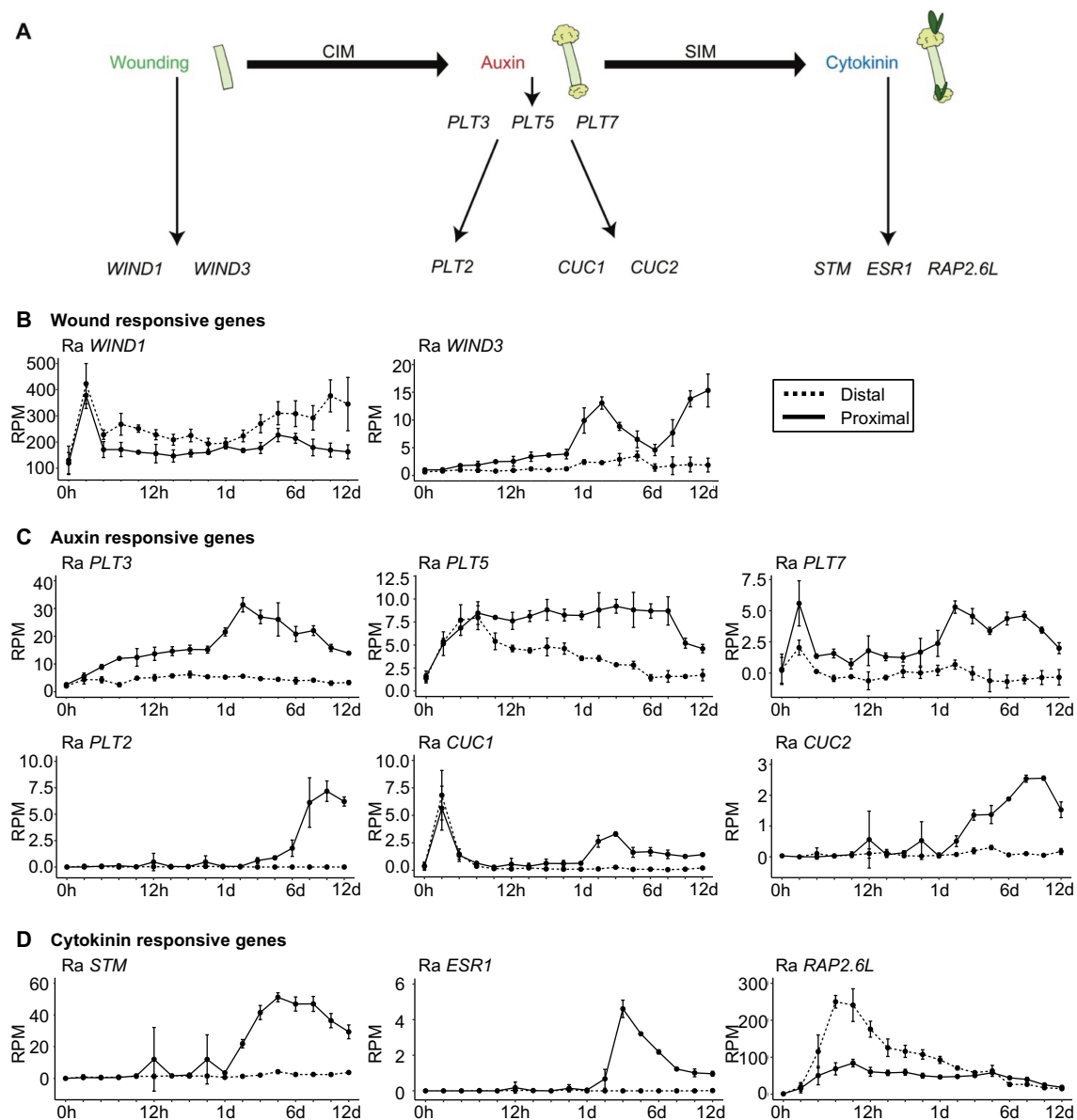


図 17 シロイヌナズナの組織培養で知られている再生経路に関する遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

(A) シロイヌナズナの組織培養で知られている再生経路の模式図. Ikeuchi *et al.*, 2016 をもとに作成した. (B) 傷害応答性遺伝子のオーソログの発現プロファイル. (C) オーキシシン応答性遺伝子のオーソログの発現プロファイル. (D) サイトカイニン応答性遺伝子のオーソログの発現プロファイル. 発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した. 点線が先端部側, 実線が基部側での発現プロファイルを示す. エラーバーは SD である.

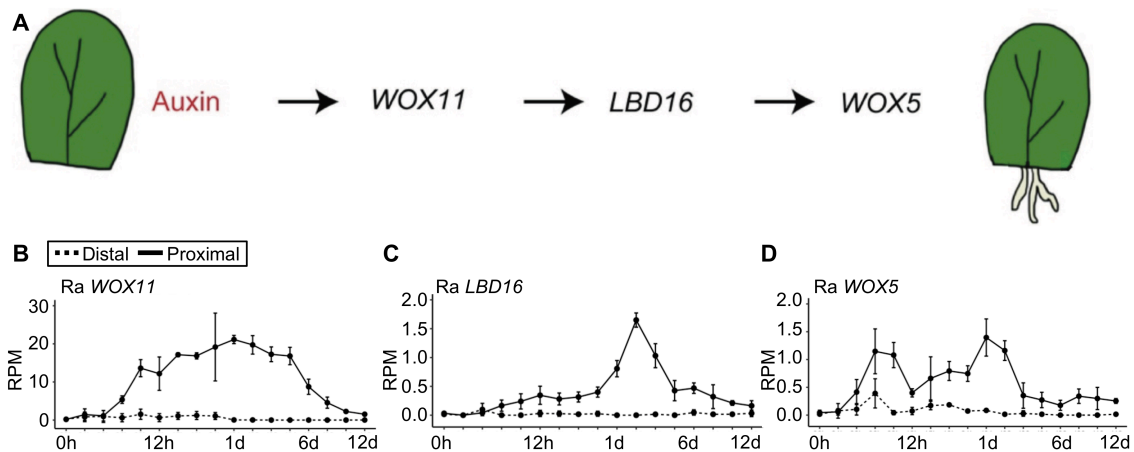


図 18 シロイヌナズナの若い葉から根を再生させる培養系で知られている遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

(A) シロイヌナズナの組織培養で知られている再生経路の模式図. Liu *et al.*, 2014 をもとに作成した. (B) WOX11 のオーソログの発現プロファイル. (C) LBD16 のオーソログの発現プロファイル. (D) WOX5 のオーソログの発現プロファイル. 発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した. 点線が先端部側, 実線が基部側での発現プロファイルを示す. エラーバーは SD である.

2-3-4. 維管束の発生に関する遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

トランスクリプトームデータを解析する中で、維管束の発達に関する遺伝子群が基部側で上昇していることを発見した。クラス III ホメオドメインロイシンジッパー (*HD-ZIP III*) 転写因子である *REVOLUTA* (*REV*)、*PHABULOSA* (*PHB*)、*PHAVOLUTA* (*PHV*)、*ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN* (*ATHB8*)、そして *ATHB15* は、維管束の発達を調節する主要な遺伝子群である (Lucas *et al.*, 2013)。加えて、ペプチドである tracheary element differentiation inhibitory factor (TDIF) とその受容体 TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (TDR/PXY) は維管束の幹細胞の維持を調節する (Hirakawa *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2013)。TDIF は *CLAVATA3/ESR-RELATED 41* (*CLE41*) と *CLE44* にコードされている。*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 4* (*WOX4*) の発現は TDIF によって活性化され、TDR のシグナリングは *WOX4* を経て促進される (Ji *et al.*, 2009;

Hirakawa *et al.*, 2010; Suer *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2013)。これらの遺伝子群のオーソログは *R. aquatica* の基部側で発現が上昇していた (図 19A-F)。これらの結果は、第 1 章にて実施した切片の作製による葉片の内部構造の観察で維管束内部と周辺の細胞が増殖していたことと一致している (図 9, 10)。加えて、形成層のマーカーのオーソログである *Ra HOMEBOX GENE 8* (*Ra HB8*) と *Ra HB15* の発現も基部側のみで上昇していたことから (図 19G, H)、幹細胞の活性化が誘導されている可能性がある。

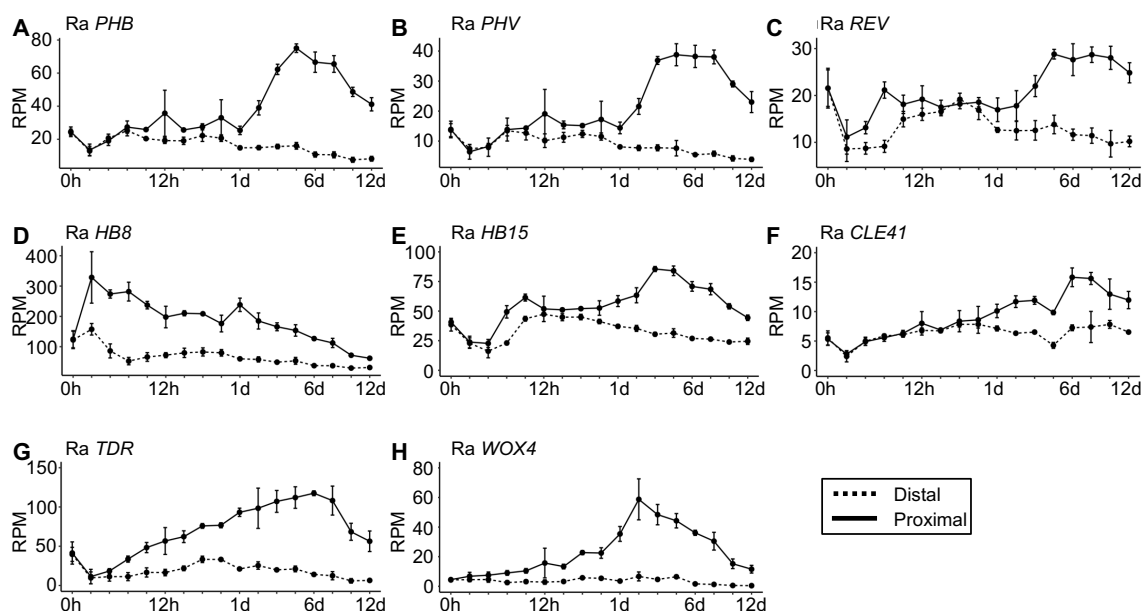


図 19 維管束の発達に関する遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した。点線が先端部側、実線が基部側での発現プロファイルを示す。エラーバーは SD である。

2-3-5. 葉の切断直後に発現が変動する遺伝子群

基部側での細胞増殖や器官形成に関与する遺伝子群の発現を活性化させる重要な因子を探索するため、全てのタイムポイントにおける先端部側と基部側の DEGs (図 16B) について Gene ontology 解析 (GO 解析) を行った。先端部側と比べて、基部側では "auxin response"、"auxin transport"、"auxin signaling"、"auxin homeostasis"、そして "auxin metabolism" が上昇してい

た（図 20A, B）。ここで、正常に生育している植物にとって、葉の切断は非常に重大な事象であると考えられる。したがって、傷害への応答に加え、その後の再生に関与する根源の重要な因子に関与する遺伝子は葉の切断直後に発現が変動する可能性がある。そこで、今回解析した 17 点のタイムポイントの中でも葉の切断直後にあたる 1 時間後に先端部側と基部側で発現が異なった 94 個の遺伝子群に注目した。すると、94 個の遺伝子群のうち、21 個、つまり 28.7% の遺伝子が *INDOLE-3-ACETIC INDUCIBLE* (*IAA*)、*PIN-FORMED* (*PIN*)、*GRETCHEN HAGEN3* (*GH3*)、*HD-ZIP*、そして *SMALL AUXIN UPREGULATED-like* (*SAUR-like*) といったオーキシンに関連する遺伝子群のオーソログだった（図 20C）。これらのオーソログの発現量は葉の切断後 0 時間と比較すると 1 時間後に基部側で 2 倍以上上昇しており（図 20D-H）、*R. aquatica* の栄養繁殖にはオーキシンが重要であることが示唆された。

2-3-6. 栄養分体の再生とオーキシンの関係

葉の切断直後にオーキシンに関連する遺伝子群の発現が基部側で上昇したことから（図 20C-H）、*R. aquatica* の基部側にはオーキシンが蓄積していると予想した。これを検証するため、*R. aquatica* の葉片内のオーキシン量を定量した。予想通り、*R. aquatica* の葉片内のオーキシン（IAA）量は葉の切断から 0 時間では先端部側と基部側では有意差がみられなかったが、葉の切断から 1 日後では先端部側よりも基部側に多く蓄積していた（図 21A）。IAA の代謝物も同様に葉を切ってから 1 日後に基部側に多く蓄積しており、特に IAA-Asp は先端部側と比較すると約 30 倍高く蓄積していた（図 21A）。加えて、トランスクリプトームデータを用いて IAA の代謝に関与する *GRETCHEN HAGEN3*（*GH3*）のオーソログの発現プロファイルを調べると、葉片の基部側で発現が上昇していた（図 21B）。

次に、オーキシンは葉の先端部側から基部側へ向かって極性輸送されることが知られているため、*R. aquatica* の葉片では、オーキシンが先端部側から基部側に輸送されることで基部側に蓄積すると予想した。オーキシンの極性輸送において中心的にはたらくオーキシン排出輸送タンパク質をコードする *PIN-FORMED 1*（*PIN1*）のオーソログの発現を qRT-PCR で解析すると、葉片の先端部、中央部、基部の順に発現が高いという勾配がみられた（図 22A, B）。さらに、トランスクリプトームデータを用いて *Ra PIN1* 以外のオーキシン輸送タンパク質をコードする遺伝子群のオーソログの発現プロファイル調べたところ、*Ra PIN1* や *Ra PIN3* だけでなく *ATP-BINDING CASSETTE B*（*ABCB*）の発現が変動していた（図 22C-I）。

続いて、*R. aquatica* の葉片からの栄養分体の再生にオーキシンの生合成が関与しているかどうかを調べた。葉片内でオーキシンの生合成が活性化されているかどうかを確認するために、トランスクリプトームデータを用いてオーキシン生合成に関与する遺伝子群のオーソログの発現プロファイルを調べるとオーキシン生合成に関与する遺伝子群は主に葉片の先端部側で発現が活性化されて

いた（図 23）。

さらに、*R. aquatica* の栄養繁殖とオーキシンの関係をさらに調べるため、IAA、オーキシン輸送阻害剤ナフタレン酸（NPA）、またはオーキシン生合成阻害剤 4-フェノキシフェニルボロン酸（PPBo）をそれぞれ含む寒天培地で *R. aquatica* の葉片を培養した。IAA を含んだ培地では、水だけでは栄養分体を再生しない先端部側からもシュートや栄養分体を再生した（図 24A, C, D）。このことから、葉片の先端部側にも栄養分体を再生する能力があり、通常の水のみの状態では栄養分体を再生するためのオーキシン量が不足していることが示唆された。NPA を含んだ培地では基部側からの根と栄養分体の再生が抑制され（図 24A, B, D）、根と栄養分体の再生にはオーキシンの輸送が必要であることが明らかになった。さらに、先端部側からはシュートの再生が誘導された（図 24A, B）。PPBo を含んだ培地では、基部側からの根、シュート、そして栄養分体の再生が阻害され、*R. aquatica* の栄養繁殖にはオーキシンの生合成も必要であることが明らかになった。

以上をまとめると、*R. aquatica* の葉片は、先端部側から基部側へと向かうオーキシン極性輸送により基部側にオーキシンが蓄積することで栄養分体が再生すること、そして、栄養分体の再生にはオーキシンの極性輸送だけでなくオーキシンの生合成も必要であることが明らかになった。加えて、オーキシンの生合成に関与する遺伝子の発現が上昇するタイムポイントよりもオーキシンの応答が上昇するタイムポイントが早いことから、*R. aquatica* の葉片における初発のオーキシン応答はオーキシン極性輸送に頼っていると考えられる。

ここで、オーキシンは膜輸送されることから、葉に細胞が密に詰まって細胞同士が接している面積が大きければ、オーキシンがより効率的に輸送され、栄養繁殖が起こりやすいと仮定した。そこで、切片の作製により、シロイヌナズナと *R. aquatica* の葉の口ゼット葉の内部構造の観察を行った。シロイヌナズナをはじめとした多くの植物は、向軸側に葉肉細胞が密に詰まった柵状組織、背軸側に葉肉細胞の局在がまばらで細胞間隙が多い海面状組織が存在するのに対し、*R. aquatica* の葉の内部は柵状組織と海綿状組織の区別がつかず、全体的に細胞が

密に詰まった構造をしていた (図 25)。このことから、葉の内部構造の相違は栄養繁殖能に何らかの関係があることが推察された。

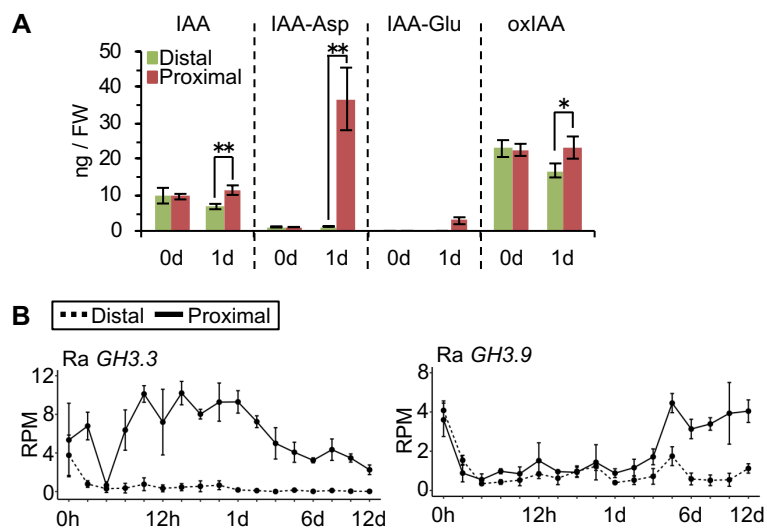


図 21 *R. aquatica* の葉片の基部側におけるオーキシンの蓄積

(A) 葉片内のオーキシン内生量の定量。有意差は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)で示した。エラーバーはSEを示す。n = 4である。(B) *GH3.3*および*GH3.9*のオーソログの発現プロファイル。(発現量はRPM (Reads Per Million mapped genes)で示した。点線が先端部側、実線が基部側での発現プロファイルを示す。エラーバーはSDを示す。n = 3である。

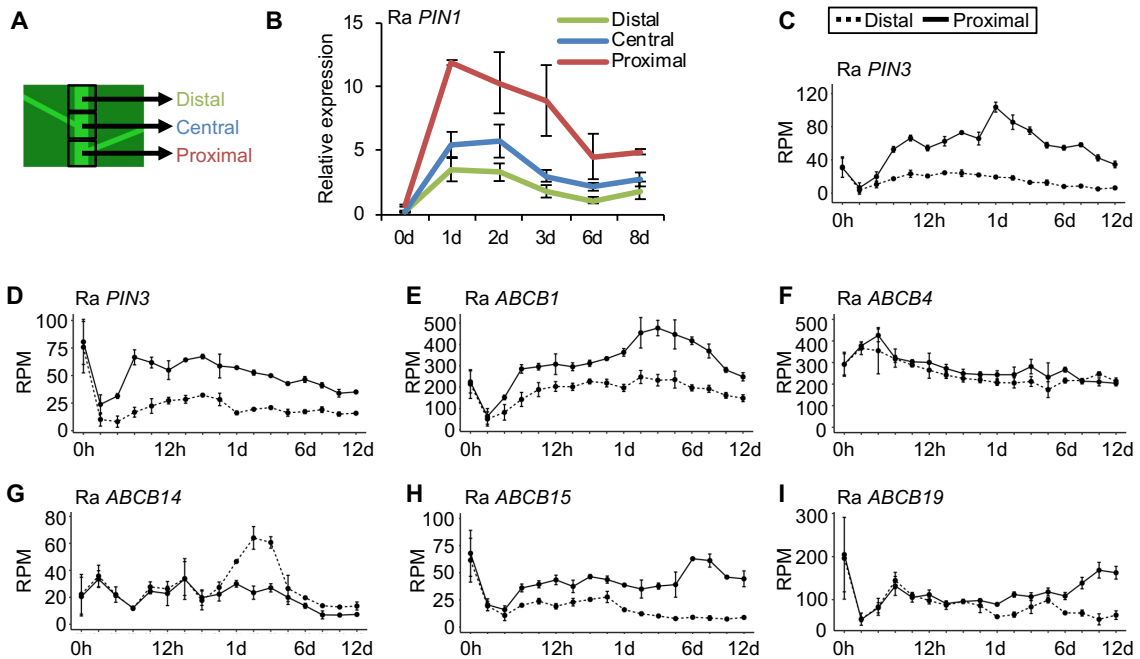


図 22 オーキシン輸送タンパク質をコードする遺伝子群のオーソログの発現解析

(A) qRT-PCR を実施した葉片の部位を示す模式図. (B) qRT-PCR によるオーキシン排出輸送タンパク質 *Ra PIN1* の発現. エラーバーは SE を示す. $n = 3$ である. (C-I) オーキシン輸送タンパク質をコードする遺伝子のオーソログの発現プロファイル. 発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した. 点線が先端部側, 実線が基部側での発現プロファイルを示す. エラーバーは SD を示す.

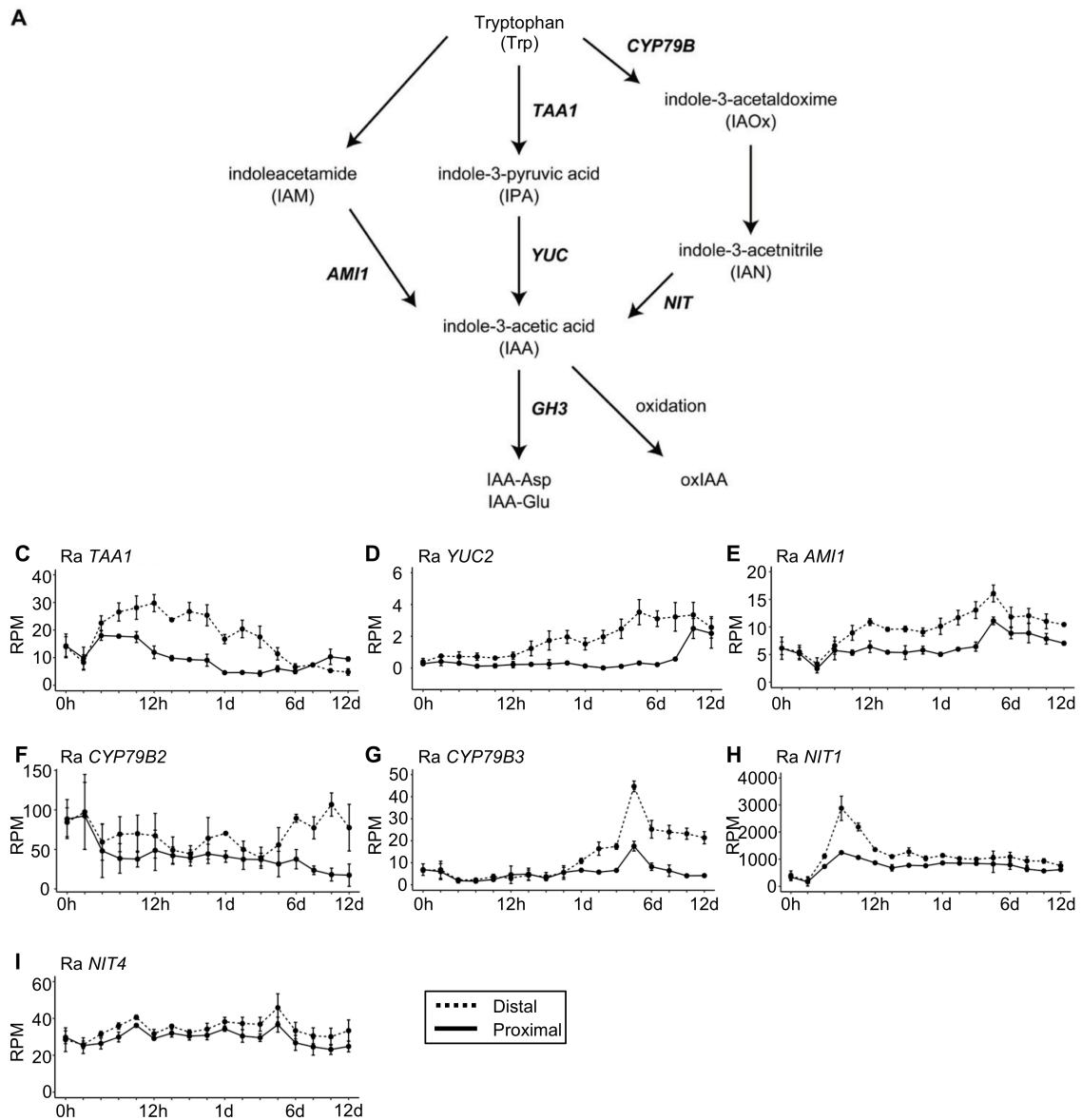


図 23 オーキシン生成遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

(A) オーキシン生成経路の模式図. Mashiguchi et al., 2011 と Korasick et al., 2013 をもとに作成した。(B-H) オーキシン生成遺伝子のオーソログの発現プロファイル。(発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した。点線が先端部側、実線が基部側での発現プロファイルを示す。

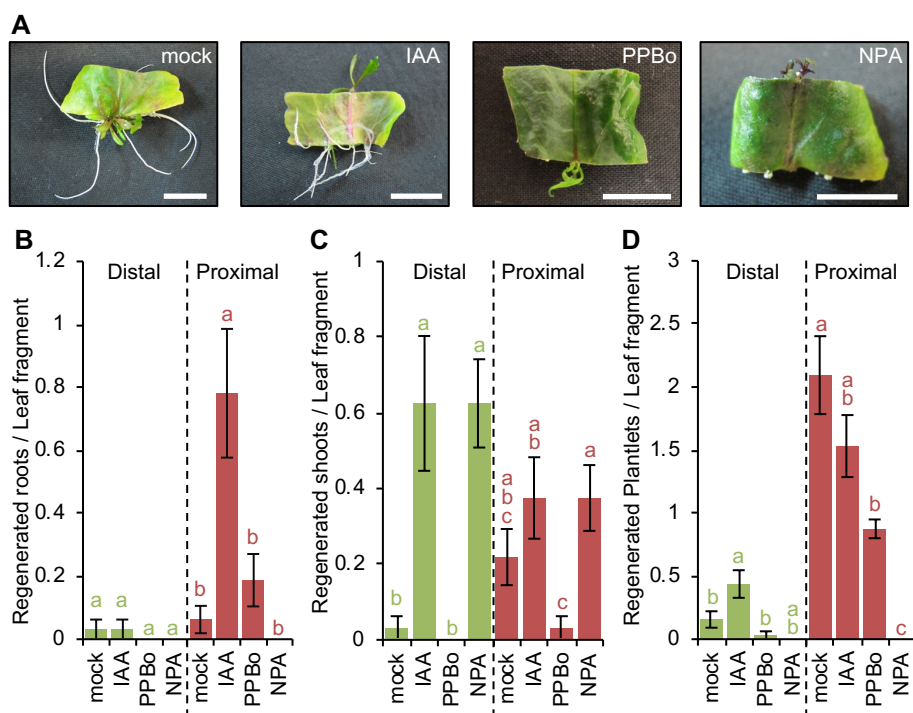


図 24 *R. aquatica* の栄養繁殖とオーキシンの関係

(A) IAA, NPA, PPBo をそれぞれ含んだ培地で培養した *R. aquatica* の葉片. (B-D) IAA, NPA, PPBo をそれぞれ含んだ培地での根 (B), シュート (C), そして栄養分体 (D) の再生効率. 濃度は IAA が 1 μM , NPA が 1 μM , PPBo が 30 μM である. 緑色のバーが先端部側, 赤色のバーが基部側のデータを示す. $n = 32$ である. 有意差は Tukey-Kramer test ($p < 0.05$) で示した. Tukey-Kramer test は先端部側と基部側それぞれ別々に実施した. エラーバーは SE を示す. スケールバーは 1 cm を示す.

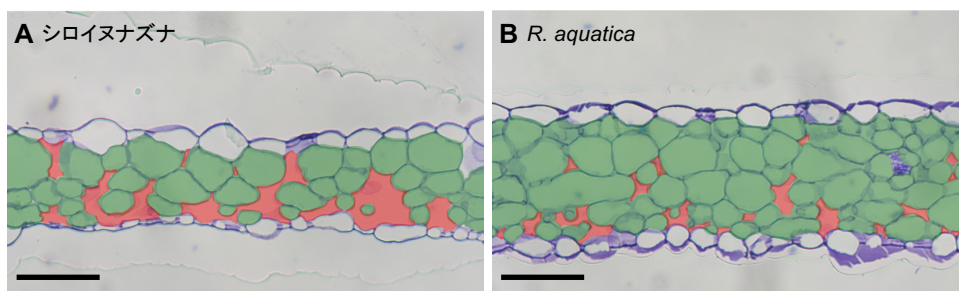


図 25 シロイヌナズナと *R. aquatica* の葉の内部構造

緑色は葉肉細胞, 赤色は細胞間隙を示す. 写真上部が向軸側, 下部が背軸側である. シロイヌナズナよりも *R. aquatica* の方が細胞間隙が少ない. スケールバーは 100 μm を示す.

2-3-7. 栄養分体の再生とサイトカイニンの関係

GO 解析により、*R. aquatica* の葉片の基部側では、“cytokinin response” と “cytokinin signaling” が上昇していた (図 20B)。シロイヌナズナや他の植物では、サイトカイニンはシュートの再生を誘導する。さらに、サイトカイニン応答性の *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1* (*ARR1*)、*ARR10*、そして *ARR14* は、オーキシン生合成遺伝子である *YUC1* と *YUC4* の発現を制御することにより、サイトカイニン濃度の高い領域を形成し、その領域からシュートが再生する (Meng *et al.*, 2017)。したがって、*R. aquatica* のシュート再生にもサイトカイニンが寄与するかどうかを調べることにした。

まず、*R. aquatica* の葉片からのシュートの再生時の葉片内のサイトカイニン量に変化があるかどうかを調べるため、サイトカイニンの内生量を定量した。サイトカイニンにはイソペンテニルアデニン (iP) 型とトランスゼアチン (tZ) 型の 2 種類の活性型がある (図 26A)。*R. aquatica* の葉片を用いた今回の定量では、どちらの活性型も検出できなかった。iP 型の前駆体であるイソペンテニルアデニンリボシド (iPR; iP riboside) とイソペンテニルアデニンリボシドリン酸 (iPRPs; iPR phosphates)、tZ 型の前駆体であるトランスゼアチンリボシド (tZR; tZ riboside) とトランスゼアチンリボシドリン酸 (tZRP; tZR phosphates) は、葉の切断から 3 日後までは先端部側と基部側の両方で増加したが、8 日後以降は先端部側では減少し、基部側ではピークを迎えた (図 26B)。不活性型であるイソペンテニルアデニン-7-グルコシド (iP7G; iP-7-glucoside) は基部側で増加し、トランスゼアチン-O-グルコシド (tZOG; tZ-O-glucoside) は先端部側と基部側の両方で類似した増減を示した (図 26B)。基部側で活性型サイトカイニンの前駆体と不活性型サイトカイニンが増加したこれらの結果は *R. aquatica* の葉片の基部側ではサイトカイニンの蓄積が長期間続くことを示す。加えて、前駆体の内生量が増加する時期がシュートの再生の時期である 8 日後以降と重なっていたことから、*R. aquatica* のシュートの再生に関与することを示唆する。

次に、*R. aquatica* の葉片内でサイトカイニンの応答が起きていることを確かめるため、葉片の再生過程のトランスクリプトームデータを用いてサイトカイニン応答性の遺伝子の発現プロファイル調べた。サイトカイニン応答性遺伝子の *ARR* 遺伝子群は、タイプ A とタイプ B の 2 種類に分類される。前者はサイトカイニンの応答を負に制御し、後者はサイトカイニンの応答を正に制御する (Zurcher and Muller, 2016)。タイプ A の *ARR* 遺伝子群のオーソログは、主に先端部側で発現が上昇した (図 27A)。これは、葉片の先端部側ではサイトカイニンへの応答が抑制されていることを示唆する。一方、タイプ B の *ARR* 遺伝子群のオーソログは、主にシュートが再生する遅いタイムポイントで基部側で発現が上昇したことから (図 27B)、シュートを再生させるために基部側でサイトカイニン応答が上昇したと考えられる。葉の切断直後に先端部側と基部側の両方で発現が上昇した *Ra ARR1* の発現プロファイルは、傷害に応答したものであると考えられる (図 27B)。サイトカイニンシグナリング遺伝子である *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2* (*AHK2*)、*AHK4/CYTOKININ RESPONSE1/WOODEN LEG* (*AHK4/CLE1/WOL*) のオーソログは基部側で発現が上昇し、*AHK3* は主に先端部側で発現が上昇した (図 27C)。サイトカイニン生合成遺伝子のオーソログについても発現プロファイルを作成したが、多くは先端部側と基部側での明確な発現量の違いはみられず、サイトカイニンは葉片内の特定の場所で生合成されているわけではないようである (図 28)。

R. aquatica の栄養繁殖とサイトカイニンの関係をさらに調べるため、*R. aquatica* の葉片をサイトカイニン (tZ; t-Zeatin) が含まれた寒天培地で培養した。tZ を含んだ培地で培養された葉片の基部側からは、tZ を含んでいない培地で培養された場合と比べて、約 3 倍の数のシュートが再生し、根の再生数は減少した (図 29A-C)。これにより、栄養分体の再生数も減少した (図 29D)。加えて、先端部側の断面においてもシュートの再生が誘導された (図 29A, C)。これらのことから、シロイヌナズナだけでなく *R. aquatica* の栄養繁殖においても、シュートの再生はサイトカイニンによって誘導されることが示された。根および栄養分体の再生数の減少は tZ と PPBo の両方を含む培地でも観察された

が（図 29E, H）、この培地では tZ のみの培地で培養した際のような先端部側からのシュートの再生は観察されなかった（図 29C, G）。このことは、先端部側からのシュートの再生には、サイトカイニンだけでなくオーキシンも必要であることを示す。

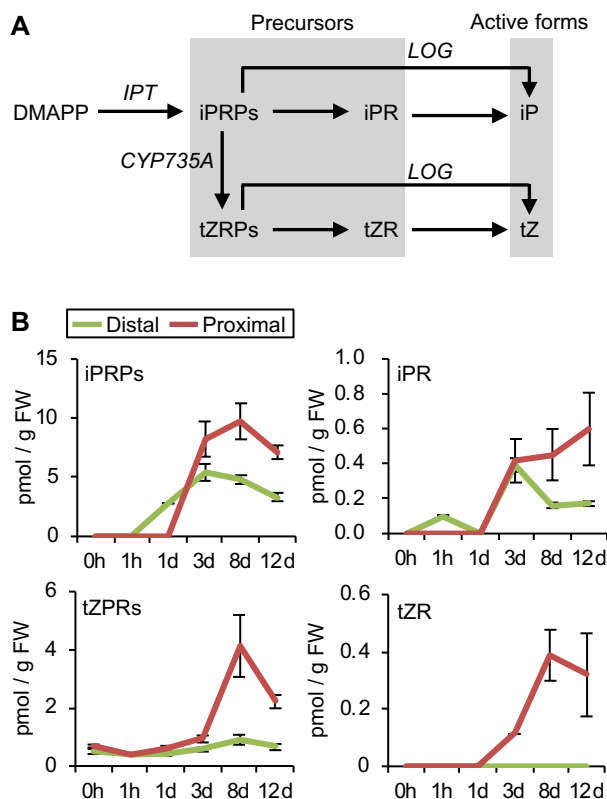


図 26 サイトカイニンの内生量の定量

(A) サイトカイニン生合成遺伝子も含めたサイトカイニン生合成経路の模式図. (B) 葉片内のオーキシン内生量の定量. 活性型である iP と tZ は検出できなかった. エラーバーは SD を示す.

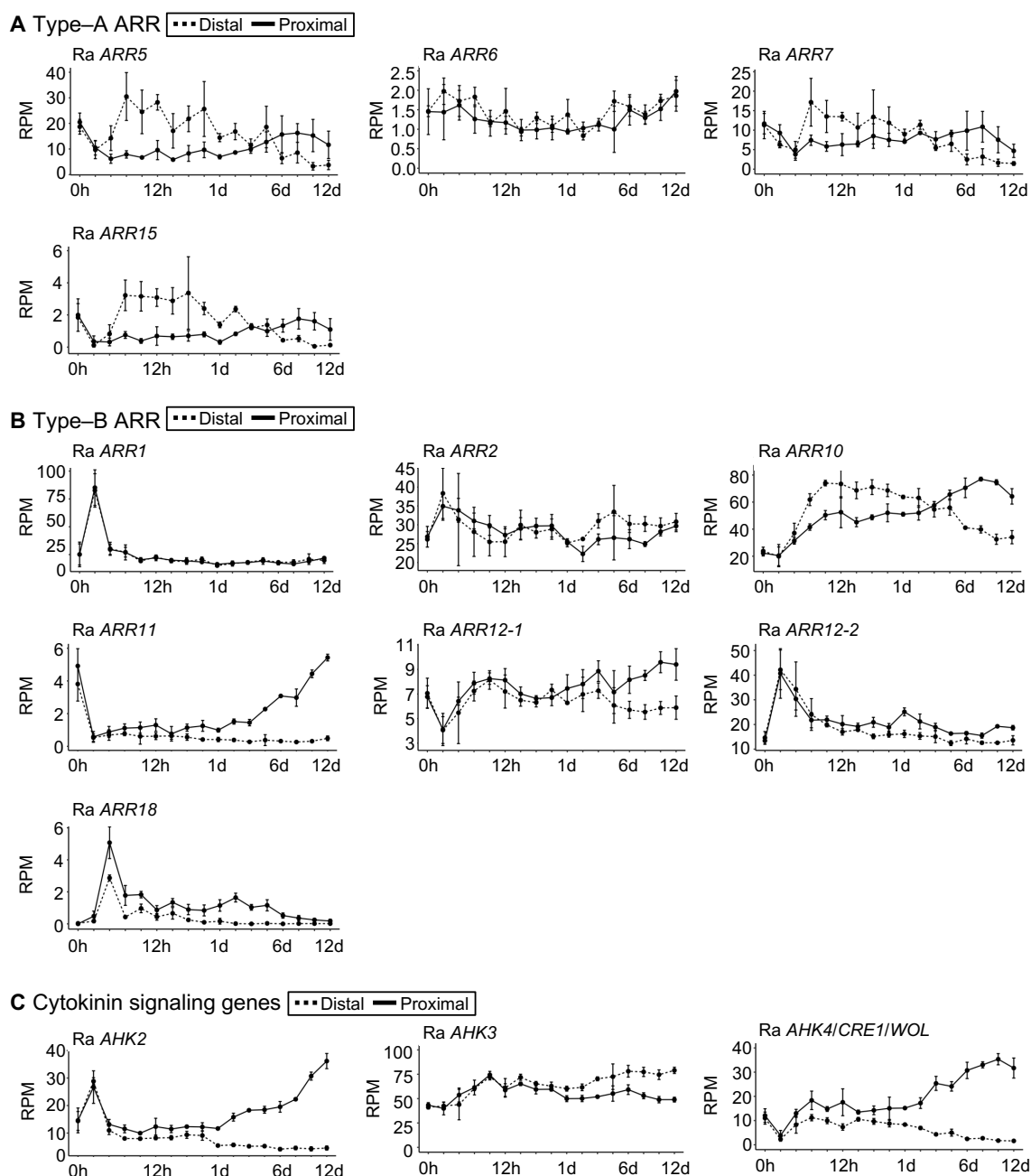


図 27 サイトカイニン応答遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

(A) タイプ A ARR 遺伝子のオーソログの発現プロファイル. (B) タイプ B ARR 遺伝子のオーソログの発現プロファイル. (C) サイトカイニンシグナリング遺伝子のオーソログの発現プロファイル. 発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した. 点線が先端部側, 実線が基部側での発現プロファイルを示す. エラーバーは SD を示す.

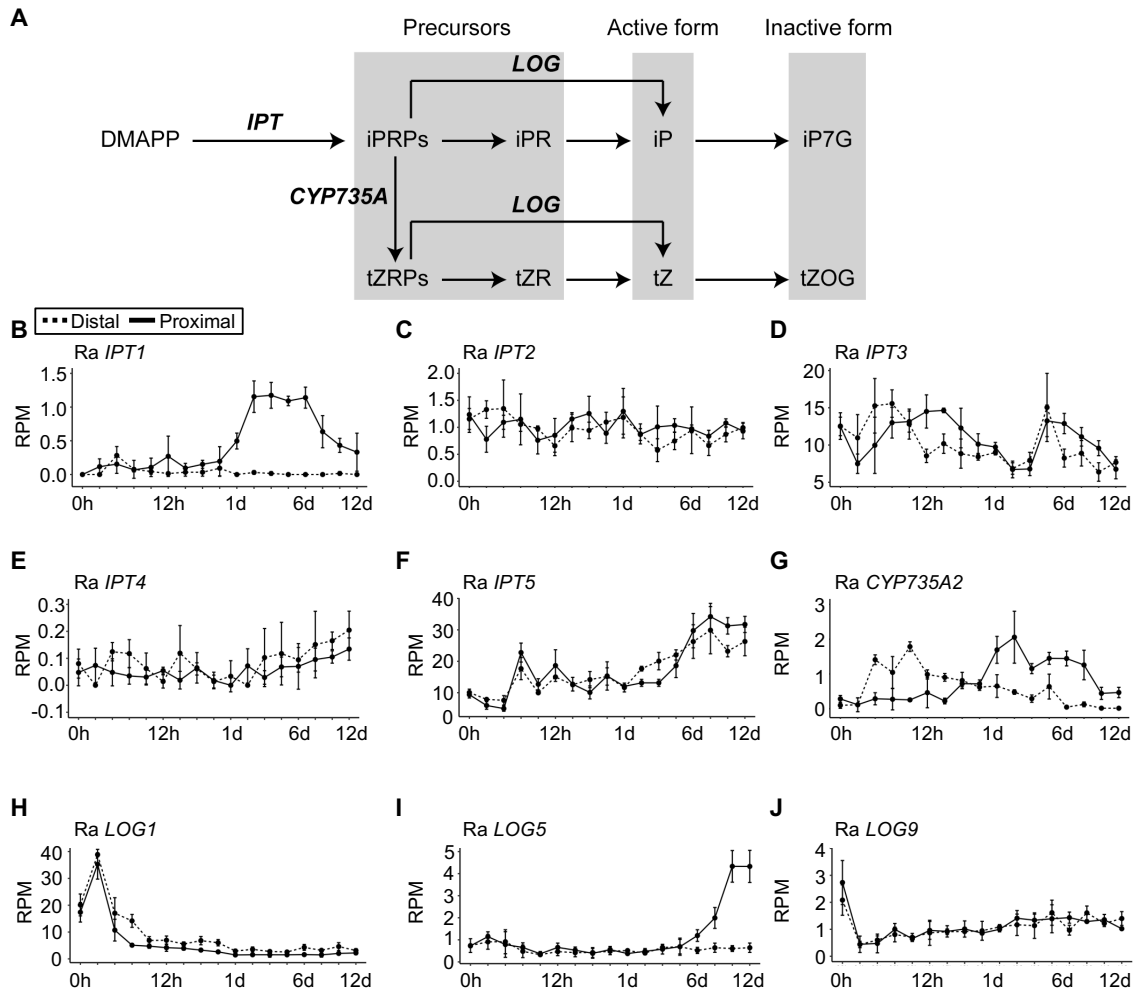


図 28 サイトカイニン生合成遺伝子群のオーソログの発現プロファイル

(A) サイトカイニン生合成遺伝子も含めたサイトカイニン生合成経路の模式図. (B–J) サイトカイニン生合成遺伝子のオーソログの発現プロファイル. 発現量は RPM (Reads Per Million mapped genes) で示した. 点線が先端部側, 実線が基部側での発現プロファイルを示す. エラーバーは SD を示す.

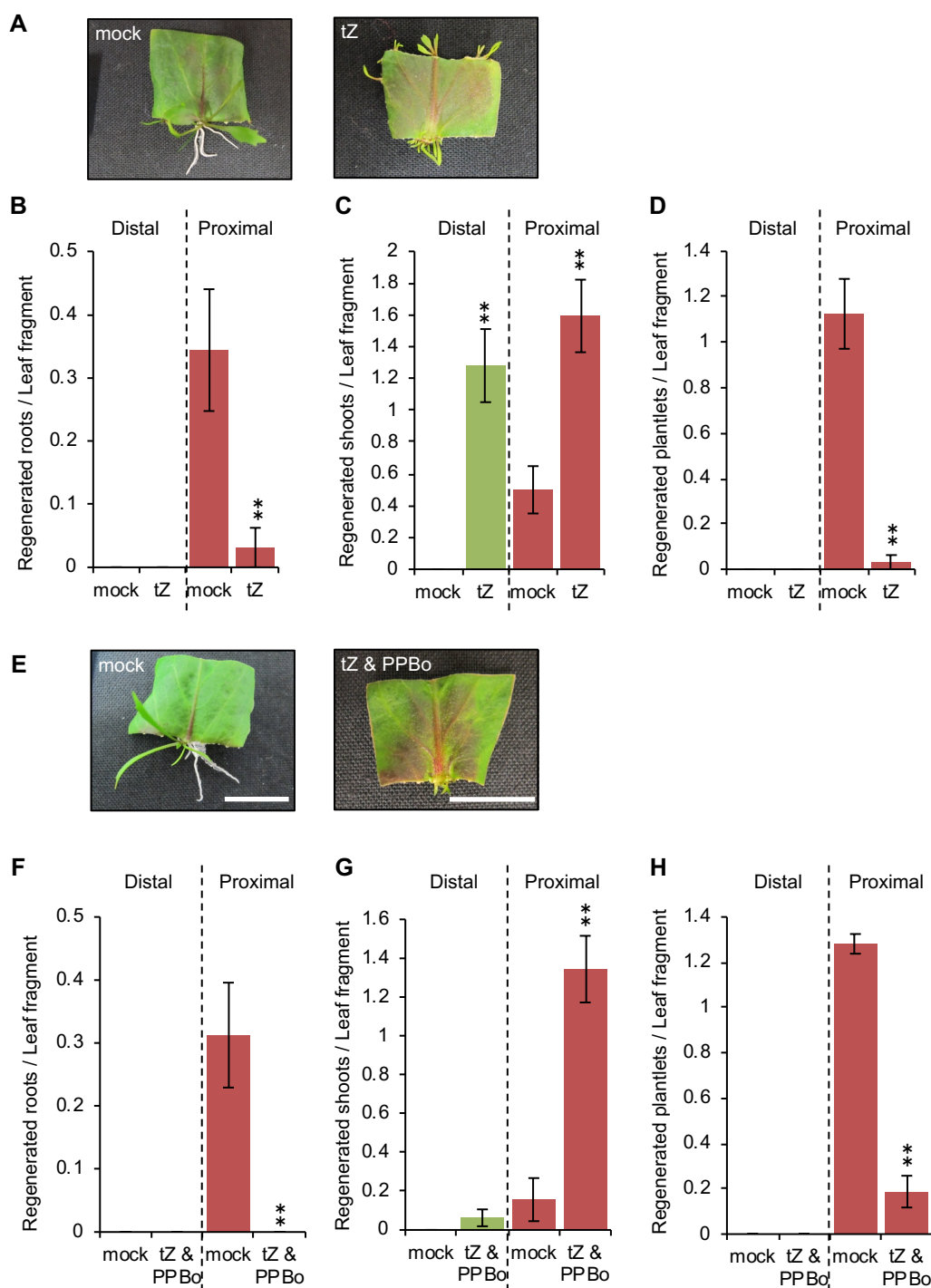


図 29 *R. aquatica* の栄養繁殖とサイトカイニンの関係

(A) t-Zeatin を含んだ培地で培養した葉片。(B-D) t-Zeatin を含んだ培地での根 (B)、シュート (C)、そして栄養分体 (D) の再生効率。濃度は $10 \mu\text{g/L}$ である。(E) t-Zeatin と PPBo を含んだ培地で培養した葉片。(F-H) t-Zeatin を含んだ培地での根 (F)、シュート (G)、そして栄養分体 (H) の再生効率。濃度は t-Zeatin が $10 \mu\text{g/L}$ 、PPBo が $30 \mu\text{M}$ である。緑色のバーが先端部側、赤色のバーが基部側のデータを示す。(B-D), (F-H) 共に $n = 32$ である。有意差は $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Student's t-test) で示した。Student's t-test は先端部側と基部側それぞれ別々に実施した。エラーバーは SE を示す。スケールバーは 1 cm を示す。

2-3-8. 栄養分体の再生とジベレリンの関係

シロイヌナズナの組織培養では、ジベレリン (GA_3) を添加するとシュートの再生が抑制され、ジベレリン生合成阻害剤パクロトラゾール (PAC) を添加するとシュートの再生が促進される (Ezura *et al.*, 1995)。一方で、サイトカニンによって再生が誘導されたシュートの成長を促進するためにもジベレリンはしばしば用いられてきた (Ananthakrishnan *et al.*, 2003; Gu and Zhang *et al.*, 2005)。そこで、*R. aquatica* の栄養繁殖とジベレリンの関係を調べることとした。*R. aquatica* の葉片を GA_3 を含む培地で培養すると、根のみの再生数が増加した一方で、シュートの再生が完全に抑制された (図 30A-C)。 GA_3 を含む培地で再生した根は対象区 (mock) よりも伸長していた (図 30A)。これは、ジベレリンがもつ細胞身長の効果が影響した結果かもしれない。加えて、シュートの再生が完全に抑制されたことにより、栄養分体の再生は観察されなかった (図 29D)。対して、PAC を含んだ培地では、根の再生が完全に抑制され、これにより栄養分体の再生も完全に抑制された (図 30A, B, D)。*R. aquatica* の栄養繁殖におけるジベレリンの効果は、シュートの再生に関してはシロイヌナズナの知見 (Ezura *et al.*, 1995) と同様であるが、根の再生に対するジベレリンの影響はこれまでに報告がなく、本研究が初めての報告である。

一般に、植物の組織培養ではオーキシンによって根の再生が誘導される (Skoog and Miller, 1957)。したがって、*R. aquatica* の根の再生におけるジベレリンの役割をさらに調べるため、 GA_3 と PPBo、そして PAC と IAA を含む培地で *R. aquatica* の葉片を培養した。 GA_3 と PPBo の培地では根と栄養分体の再生が有意に減少した (図 30E, F, H)。このことは、*R. aquatica* はオーキシンの生合成が阻害された状態であっても、ジベレリンがあれば根を再生できることを示唆する。なお、 GA_3 と PPBo の培地においては、シュートの再生数に有意差はみられなかった (図 30G)。

一方、PAC と IAA を含む培地では PAC による根の再生の阻害は IAA によって回復すると予想していたが、予想に反して、根と栄養分体の再生が完全に抑制

された（図 30I, J, L）。細胞が伸長しておらず根が肉眼で観察できない可能性を考慮して実体顕微鏡による観察を実施したが、伸長していない小さな根は観察できなかった（Data not shown）。根の分裂組織ができているかどうかを確認するために切片を作製して葉片の内部構造も観察したが、細胞は分裂していたものの、根の分裂組織は観察できなかった（Data not shown）。これらの結果は、ジベレリンは根の再生過程の中でも特に分裂組織の形成に必須であることを示唆する。なお、この培地では葉片の先端部側と基部側の両方でシュートが再生したが（図 30I, K）、これは IAA による効果であると考えられる。

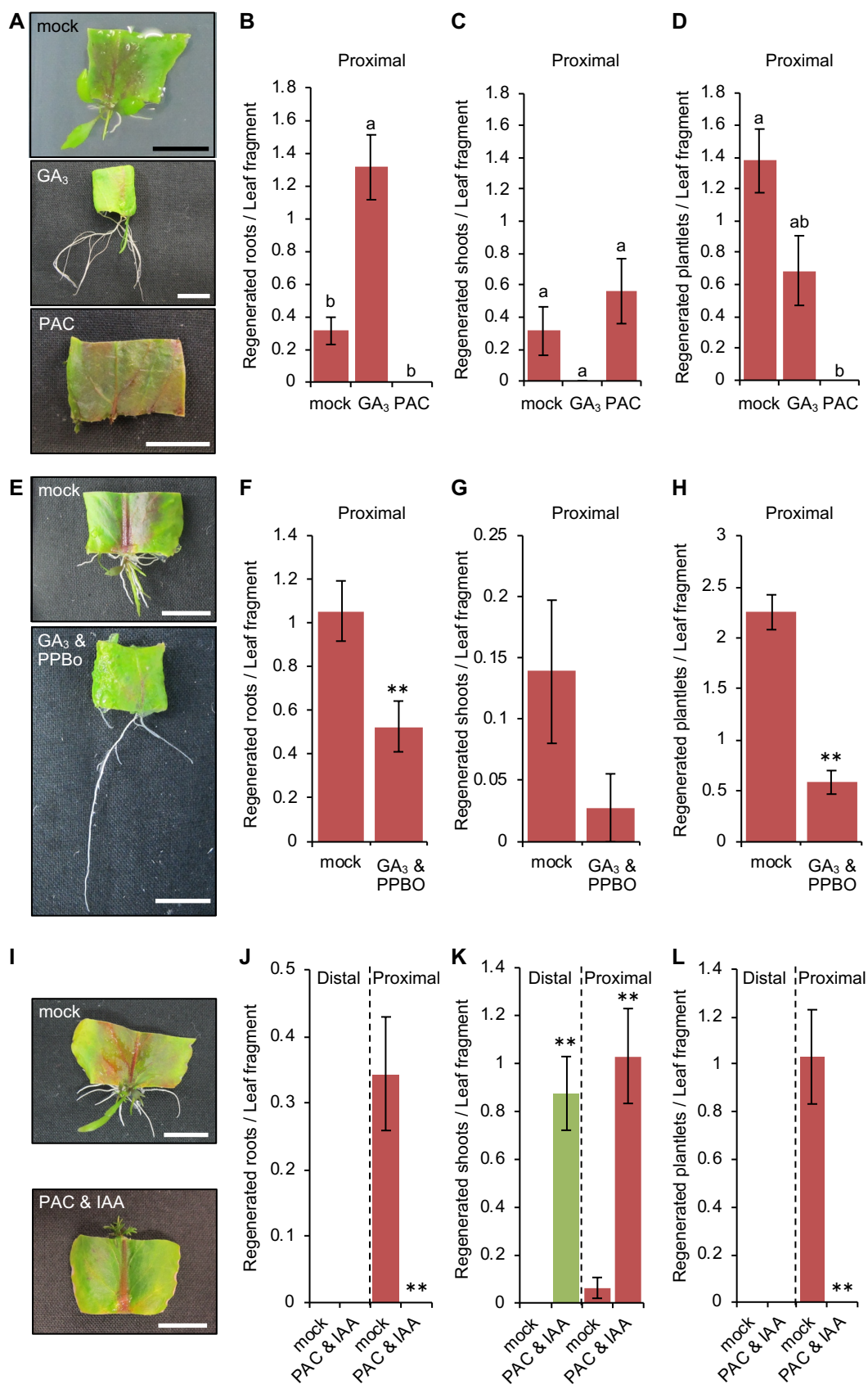


図 30 *R. aquatica* の栄養繁殖とジベレリンの関係

(A) GA₃ または PAC を含んだ培地で培養した葉片. (B-D) GA₃ または PAC を含んだ培地での, 基部側における根 (B)、シュート (C)、そして栄養分体 (D) の再生効率. 先端部側からは再生がみられなかった. 濃度は GA₃ が 100 μM, PAC が 10 μM である. $n = 16$ である. 有意差は Tukey-Kramer test ($p < 0.05$) で示した. (E) GA₃ と PPBo を含んだ培地で培養した葉片. (F-H) GA₃ と PPBo を含んだ培地での, 基部側における根 (F)、シュート (G)、そして栄養分体 (H) の再生効率. 先端部側からは再生がみられなかった. 濃度は GA₃ が 100 μM, PPBo が 30 μM である. $n = 32$ である. 有意差は $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Student's t-test) で示した. (I) PAC と IAA を含んだ培地で培養した葉片. (J-L) PAC と IAA を含んだ培地での根 (J)、シュート (K)、そして栄養分体 (L) の再生効率. 濃度は PAC が 10 μM, IAA が 1 μM である. 緑色のバーが先端部側, 赤色のバーが基部側のデータを示す. $n = 32$ である. 有意差は $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Student's t-test) で示した. Student's t-test は先端部側と基部側それぞれ別々に実施した. エラーバーは全て SE を示す. スケールバーは 1 cm を示す.

2-4. 考察

2-4-1. オーキシン極性輸送により葉片の基部側のみでオーキシン応答が活性化される

いくつかのモデル植物では、AP2/ERF 転写因子である *WIND* ファミリーの発現が傷害後に上昇する。本研究で得られたデータは、Ra *WIND1* の発現が葉片の先端部側と基部側の両方で上昇していたことから（図 17B）、葉片の先端部側と基部側の両方で傷害に対する応答が起きていることを示唆する。しかしながら、栄養分体の再生に必要なオーキシン応答は基部側のみで上昇していた。そして、オーキシンである IAA とその代謝物は基部側に蓄積していた（図 21A）。加えて、基部側からの栄養分体の再生は PPBo の添加によって阻害され（図 24D）、オーキシン生合成遺伝子のオーソログは主に先端部側で発現が上昇していた（図 23）。これらの結果から、初めから葉片に含まれていたオーキシンだけでなく、葉片内で新たに合成されたオーキシンが極性輸送によって先端部側から基部側に輸送され、基部側での再生経路の活性化を引き起こすというモデルを提唱できる（図 31）。

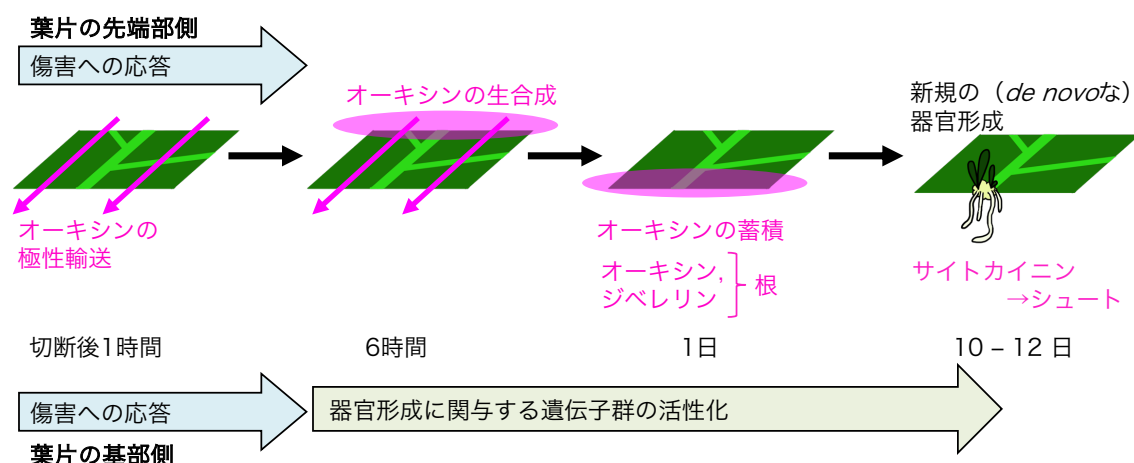


図 31 *R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムのモデル図

R. aquatica の葉片では、先端部側と基部側の両方の断面で傷害に対する応答が起こる一方で、器官形成に関与する遺伝子群の活性化は基部側のみで起こり、栄養分体が再生する。器官形成に関与する遺伝子群の活性化は、葉の切断後も維持されたオーキシン極性輸送によりオーキシンが先端部側から基部側へと輸送されること、先端部側で生合成されたオーキシンが極性輸送によって基部側へと輸送されること、そして、基部側にオーキシンが蓄積することによって誘導される。また、栄養分体の再生を根の再生とシュートの再生に分けて考えると、オーキシンとジベレリンによって根の再生が誘導され、サイトカイニンによってシュートの再生が誘導される。この時、根はシュートよりも先に再生する。

2-4-2. 初発のオーキシン応答はオーキシン極性輸送に頼っているかもしれない

トランスクリプトーム解析から、オーキシンへの応答は、葉の切断から 1 時間の間に基部側のみで上昇することがわかった (図 20C-H)。一方、オーキシンの生合成に関与する遺伝子は基部側よりも先端部側で上昇し (図 20A, 23)、上昇するタイムポイントは基部側でオーキシン応答が上昇するタイムポイントよりも遅かった (図 20A, B)。これらのことから、葉の切断後すぐに基部側で上昇するオーキシン応答はあらかじめ葉片に含まれていたオーキシンに対する応答であると考えられる。加えて、葉の切断後 1 時間で基部側のみで上昇する遺伝子群にオーキシン輸送体の 1 つである *PIN3* が含まれていたことから (図 20C, E)、葉が切断された時点で葉片内に含まれていたオーキシンが基部側に輸送され、基部側でオーキシンに対する応答が上昇したと考えられる。オーキシン応答の開始よりも遅くに先端部側でオーキシン生合成遺伝子が上昇したことについて

ては、葉を切断されると直ちに葉片内のオーキシンが基部側に集中して局在することで、葉片の先端部側のオーキシン量が減少したことが原因かもしれない。しかしながら、不足したオーキシンを補うために先端部側でオーキシンの生合成を活性化したとしても、先端部側から基部側へと向けた極性輸送によりオーキシンが輸送されて基部側で消費されることで、先端部側からは栄養分体が再生しないのだろう。

2-4-3. 栄養分体の再生しやすさには葉の内部構造も関係するかもしれない

切片によるシロイヌナズナと *R. aquatica* のロゼット葉の内部構造の観察から、栄養繁殖をしないシロイヌナズナと比較すると、栄養繁殖をする *R. aquatica* は細胞間隙が少ないことがわかった (図 25)。このことから、*R. aquatica* の葉では葉肉細胞同士が接している面積が大きいことでオーキシンがより効率的に膜輸送され、栄養繁殖が起こりやすい環境となっていることが示唆された。*R. aquatica* 以外にも、ペペロミア属 (*Peperomia*) やセントポーリア属 (*Saintpaulia*)、そしてペチュニア (*Petunia hybrida*) のような葉から栄養繁殖をする植物の葉の細胞間隙の大きさを細胞の詰まり具合を観察、定量し、栄養繁殖をしない植物と比較することが、この仮説の確証を得る筋道となるだろう。

2-4-4. *R. aquatica* 固有のサイトカイニン応答機構が存在する可能性がある

シロイヌナズナでは *WIND3* がサイトカイニンの経路を活性化することが示唆されている (Ikeuchi et al., 2015)。*R. aquatica* では *Ra WIND3* が上昇する 1 日後以降に、サイトカイニン応答を正に制御するタイプ B *ARR* の *Ra ARR10*、*Ra ARR11*、そして *Ra ARR12* が基部側で上昇していた (図 17B, 27B)。ところが、*R. aquatica* の葉片でサイトカイニンの内生量を定量したところ、活

性型のサイトカイニンは検出限界以下だった。一方で、サイトカイニンシグナリング遺伝子の発現が上昇していたことから（図 27C）、サイトカイニンは *R. aquatica* の葉片内で機能していると考えられる。一般に、サイトカイニンがシュートの再生を誘導することが知られているが、自然条件下でシュートを再生させることのできる *R. aquatica* には、たとえ活性型のサイトカイニン量がわずかであったとしても応答しやすい機構が備わっているのかもしれない。

2-4-5. ジベレリンは根の再生に必須である

GA₃ や PAC を含んだ培地での *R. aquatica* の葉片の培養により、ジベレリンは葉の再生を抑制することを確認した（図 30A, C）。組織培養において、ジベレリンはシュートの再生や発生におけるはたらきについてしばしば注目されてきた（Ezura *et al.*, 1995; Ananthakrishnan *et al.*, 2003; Gu and Zhang, 2005）。本研究では、ジベレリンのシュートの再生に対する効果を再確認しただけでなく、ジベレリンが根の再生に必須であることを発見した（図 30A, B, I, J）。これは、根かシュートのどちらか一方の再生を目的とした組織培養ではなく、根とシュートの両方を再生する *R. aquatica* だからこそ発見できた事象である。*R. aquatica* を用いてさらに解析を進めることで、栄養繁殖のメカニズムだけでなく、これまで知られていなかった植物の再生における植物ホルモンの新規の役割も明らかにできるだろう。

2-4-6. 維管束の発生に関与する遺伝子群の活性化は、植物のあらゆる器官の形成に共通する現象かもしれない

第 1 章において、*R. aquatica* の葉片の基部側の断面から栄養分体が再生する際に維管束の内部や周辺の細胞が活性化することが明らかになった（図 9, 10）。そして、本章では、*R. aquatica* の葉片の基部側のみで維管束の発生に関与する遺伝子群や、形成層のマーカーとして知られる遺伝子群の発現が上昇し（図 19）、維管束の幹細胞の活性化が誘導されていることが示唆された。ここ

で、近年、ブドウネアブラムシ (*Daktulosphaira vitifoliae*) がブドウの野生種のひとつである *Vitis riparia* の葉に寄生するために「虫こぶ」と呼ばれる瘤状に隆起した器官を形成する際にも、植物側では *CRE1* や *REV* のような維管束の発生に関与する遺伝子群の発現が上昇することが報告された (Schultz *et al.*, 2019)。栄養分体と虫こぶはその形態も役割も互いに大きく異なるが、新しい器官を形成するという点では共通している。このことから、維管束の発生に関与する遺伝子の発現の上昇は植物の既存の器官に新たな器官を生じる際の共通のシグナルであると考えられる。そして、新たな器官を形成するために維管束の幹細胞が細胞の供給源として重要な役割を果たすことも共通しているかもしれない。

研究のまとめ

これまで、*in vitro* での培養によって誘導される器官の再生に関与するいくつかのメカニズムはモデル植物を用いて報告されてきた (Ikeuchi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b; Ikeuchi *et al.*, 2016)。しかしながら、自然条件下で再生することのできる非モデル植物の再生のメカニズムはほとんど知られていなかった。そこで、本研究では、*R. aquatica* を用いることでの自然条件下での再生（栄養繁殖）のメカニズムの解析を行った。そして、*R. aquatica* の葉片では、先端部側から基部側へ向けたオーキシンの極性輸送によって基部側の断面にオーキシンが蓄積することで、基部側の断面からのみ栄養分体が再生することを提唱した。RNA-seq によるトランスクリプトームデータを用いたオーキシン生合成遺伝子の発現プロファイルとオーキシン内生量の定量からは、オーキシンは葉片の先端部側で生合成されていることが示唆された。

葉片の切片の観察からは、*R. aquatica* の栄養分体は維管束の形成層と維管束を取り囲む葉肉細胞に由来することがわかった。既に報告されているシロイヌナズナを用いたいくつかの研究では、カルスは、培養された器官に関わらず、内鞘様細胞に由来することが知られている (Sugimoto *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014)。したがって、*R. aquatica* の葉においても内鞘様細胞が存在しており、それらの細胞が栄養分体の再生に関与していると考えられる。シロイヌナズナの若い葉を *in vitro* で培養した場合に観察される根の再生では、傷害がオーキシンの供給を誘導し、内鞘様細胞の役割をもつ前形成層と柔組織細胞での *WOX11* と *WOX12* の発現を誘導する (Liu *et al.*, 2014)。その後、*LBD16* と *LBD29* の発現が誘導され、最終的に、LBD ファミリーが細胞分裂を促進し、*WOX5* の発現を誘導することで根が再生する (Liu *et al.*, 2014)。これらの遺伝子群のオーソログは、*R. aquatica* において基部側のみで発現が上昇していた (図 17B-D)。したがって、*R. aquatica* における根の再生は、シロイヌナズナの根の再生と同様の経路を辿るかもしれない。加えて、葉片の基部側におけるオーキシンへの応答が葉の切断後 1 時間という早いタイムポイントで起きたことから (図 20C-H)、*R. aquatica* ではオーキシンへの応答が起こりやすいことも

考えられる。

さらに、サイトカイニンについて注目すると、活性型のサイトカイニンは検出限界以下だったにもかかわらず、サイトカイニンシグナリング遺伝子群は基部側のみで活性化されていた(図 27C)。そのようなサイトカイニン応答の獲得が、自然条件下におけるシュートの再生に重要な役割を果たすのだろう。加えて、*R. aquatica* の栄養繁殖において、ジベレリンは根の再生に必須であることも明らかになった(図 30A, B, I, J)。これまでジベレリンはシュートの再生や発生に関して注目されてきたが、根の再生に関する報告や知見はなかった。*R. aquatica* の栄養繁殖において、シュートの再生にはサイトカイニン、根の再生にはジベレリン、全体を調節するオーキシンといった各植物ホルモンの役割があるのかもしれない。

本研究では、*R. aquatica* の栄養繁殖におけるオーキシンとサイトカイニン、そしてジベレリンの効果を解析した。これまで、他の植物を用いたいくつかの先行研究では、器官の発生にはオーキシンとサイトカイニン、オーキシンとジベレリンのような植物ホルモン間の複雑な作用が関与することが報告されている。したがって、本研究で注目した植物ホルモン以外の植物ホルモンの役割を理解することで、自然条件下で栄養分体を再生する植物と再生しない植物の違いを明らかにできるかもしれない。さらなる生理学的な解析や今回得られたトランスクリプトームデータの活用により、*R. aquatica* の栄養繁殖の理解につながる植物ホルモン間の相互関係を明らかにできるだろう。さらに、農学的な観点からみると、栄養繁殖は、受粉しにくい植物の増殖や遺伝子型を維持しながらの植物の生殖方法として活用されてきた。今後、栄養繁殖の分子的なメカニズムを明らかにすることは、栄養繁殖に関する発生学および農学的な研究の発展に寄与するだろう。

参考文献

- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M.** (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* **9**: 841–857.
- Ananthakrishnan, G., Xia, X., Elman, C., Singer, S., Paris, H.S., Gal-On, A., Gaba, V.** (2013) Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. *Plant Cell Rep* **8**: 739–746.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M. et al.** (2011) Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (38) : 16128–16132.
- Asahina, M., Gocho, Y., Kamada, H., Satoh, S.** (2006) Involvement of inorganic elements in tissue reunion in the hypocotyl cortex of *Cucumis sativus*. *J Plant Res* **119** (4) : 337–342.
- Asahina, M., Iwai, H., Kikuchi, A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Kamada, H., Satoh, S.** (2002) Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* **129** (1) : 201–210.
- Asahina, M., Yamaguchi, Y., Hanada, A., Kamiya, Y., Kamada, H., Satoh, S. et al.** (2007) Effects of the removal of cotyledons on endogenous gibberellin levels in hypocotyls of young cucumber and tomato seedlings. *Plant Biotechnol.* **24**:99–106.
- Birnbaum, K.D., Sánchez Alvarado, A.** (2008) Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* **132** (4) : 697–

710.

- Blazich, F.A. and Heuser, C.W.** (1979) A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **104**:63–67.
- Bloch, R.** (1943) Polarity in plants. *Bot. Rev.* **9**:261–310.
- Cameron, R.J. and Thomson, G.V.** (1969) The vegetative propagation of *Penus radiata*: Root initiation in cuttings. *Bot. Gaz.* **130**:242–251.
- Carson, M.C.** (1929) Origin of adventitious roots in Coleus cuttings. *Bot. Gaz.* **87**:119–126.
- Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., Werr, W.** (2007) The AP2 transcription factors DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* **134** (9) : 1653–1662.
- Chen, L., Tong, J., Xiao, L., Ruan, Y., Liu, J., Zeng, M. et al.** (2016a) YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in Arabidopsis. *J Exp Bot* **67** (14) : 4273–4284.
- Chen, X., Cheng, J., Chen, L., Zhang, G., Huang, H., Zhang, Y. et al.** (2016b) Auxin-Independent NAC Pathway Acts in Response to Explant-Specific Wounding and Promotes Root Tip Emergence during *de novo* Root Organogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **170** (4) : 2136–2145.
- Ditengou, F.A., Teale, W.D., Kochersperger, P., Flittner, K.A., Kneuper, I., van der Graaff, E. et al.** (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (48) : 18818–18823.
- dos Santos, D.N., Nunes, C.F., Soares, J.D.R., Valente, T.C.T., Alves,**

- E., Labory, C.R.G. et al.** (2013) Cytological characterization of *Jatropha curcas* callus in different periods of cultivation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **13**: 228–233.
- Druege, U., Franken, P., Hajirezaei, M.R.** (2016) Plant Hormone Homeostasis, Signaling, and Function during Adventitious Root Formation in Cuttings. *Front Plant Sci* **7**: 381.
- Ezura, H., Harberd, N.P.** (1995) Endogenous gibberellin levels influence in-vitro shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **197**: 301–305.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., Hu, Y.** (2012) LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cell Res* **22** (7) : 1169–1180.
- Garcês, H.M., Champagne, C.E., Townsley, B.T., Park, S., Malho, R., Pedroso, M.C. et al.** (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (39) : 15578–15583.
- Garcês, H.M., Koenig, D., Townsley, B.T., Kim, M., Sinha, N.R.** (2014) Truncation of LEAFY COTYLEDON1 protein is required for asexual reproduction in *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol* **165** (1) : 196–206.
- Geneve, R.L.** (1991) Patterns of adventitious root formation in English Ivy. *J. Plant Growth Regul.* **10**:215–220.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., Fukaki, H.** (2012) The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* **139** (5) : 883–893.
- Gordon, S.P., Heisler, M.G., Reddy, G.V., Ohno, C., Das, P., Meyerowitz, E.M.** (2007) Pattern formation during *de novo* assembly of the

- Arabidopsis shoot meristem. *Development* **134** (19) : 3539–3548.
- Gu, X.F., Zhang, J.R.** (2005) An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants. *Plant Cell Rep* **23**: 775–779.
- Haissig, B.E. and Davis, T.D.** (1994) A historical evaluation of adventitious rooting research to 1993. In T.D. Davis and B.E. Haissig, eds. *Biology of adventitious root formation*. New York: Plenum Press.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.** (2001) *Hartmann and Kester's plant propagation: principles and practices, 7th edition.*: NJ, USA: Prentice–Hall.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M. et al.** (2008) Non–cell–autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15208–15213.
- Hirakawa, Y., Kondo, Y., Fukuda, H.** (2010) TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 2618–2629.
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Harashima, H., Shibata, M., Ohnuma, M. et al.** (2015a) PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. *Nat Plants* **1**: 15089.
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y. et al.** (2017) Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. *Plant Physiol* **175** (3) : 1158–1174.
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Sugimoto, K.** (2015b) Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 60–67.

- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., Sugimoto, K.** (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* **143** (9) : 1442–1451.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A.** (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* **25** (9) : 3159–3173.
- Inzé, D., De Veylder, L.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77–105.
- Iwase, A., Ishii, H., Aoyagi, H., Ohme–Takagi, M., Tanaka, H.** (2005) Comparative analyses of the gene expression profiles of Arabidopsis intact plant and cultured cells. *Biotechnol Lett* **27** (15) : 1097–1103.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T. et al.** (2011a) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Curr Biol* **21** (6) : 508–514.
- Iwase, A., Ohme–Takagi, M., Sugimoto, K.** (2011b) WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signaling & Behavior* **6** (12) : 1943–1945.
- Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., Scanlon, M.J.** (2009) WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol* **152**: 1346–1356.
- Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A.J., Trivedi, Z.B. et al.** (2015) PLETHORA Genes Control Regeneration by a Two–Step Mechanism. *Curr Biol* **25** (8) : 1017–1030.
- Kirch, T., Simon, R., Grünewald, M. Werr, W.** (2003) The DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 Gene of Arabidopsis Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral Organ Development. *The Plant Cell Online* **15** (3) : 694–705.

- Kojima, M., Kamada–Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M. et al.** (2009) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS–probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* **50** (7) : 1201–1214.
- Kojima, M., Sakakibara, H.** (2012) Highly sensitive high-throughput profiling of six phytohormones using MS–probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **918**: 151–164.
- La Rue, C.D.** (1943) Regeneration in *Radicula aquatica*. *Mich Acad* **28**: 51–61.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H. et al.** (2014) WOX11 and 12 are involved in the first–step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **26** (3) : 1081–1093.
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S., Helariutta, Y. et al.** (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integ Plant Biol* **55**: 294–388.
- Maini, J.S.** (1968) The relationship between the origin of adventitious buds and the orientation of *Populus tremuloides* root cuttings. *Bul. Ecol. Soc. Amer.* **49**:81–82.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N.** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* **124** (1) : 33–44.
- Meng, W.J., Cheng, Z.J., Sang, Y.L., Zhang, M.M., Rong, X.F., Wang, Z.W. et al.** (2017) Type–B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Specify the Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation

- of WUSCHEL. *Plant Cell* **29** (6) : 1357–1372.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.Y., Helariutta, Y.** (2013) Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J* **32** (2) : 178–193.
- Moreria–Dias, J.M., Molina, R.V., Bordón, Y., Guardiola, J.L., García–Luis, A.** (2000) Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Ann. Bot.* **85**:103–110.
- Nakayama, H., Fukushima, K., Fukuda, T., Yokoyama, J., Kimura, S.** (2014a) Molecular phylogeny determined using chloroplast DNA inferred a new phylogenetic relationship of *Rorippa aquatica* (Eaton) EJ Palmer & Steyermark (Brassicaceae) — Lake Cress. *Am. J. Plant Sci.* **5**: 48–54.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N. et al.** (2014b) Regulation of the KNOX–GA gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress. *Plant Cell* **26**: 4733–4748.
- Nakayama, H., Kawade, K., Tsukaya, H., Kimura, S.** (2015) Detection of the cell proliferation zone in leaves by using EdU. *Bio–Protocol* **5**: e1600.
- Nakayama, H., Sakamoto, T., Okegawa, Y., Kaminoyama, K., Fujie, M., Ichihashi, Y. et al.** (2018) Comparative transcriptomics with self–organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions of North American Lake cress. *Sci Rep* **8**: 3302.
- Ogita, S., Yeung, E.C., Sasamoto, H.** (2004) Histological analysis in shoot organogenesis from hypocotyl explants of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) . *J Plant Res* **117** (6) : 457–464.

- Robinson, J.C. and Schwabe, W.W.** (1977) Studies on the regeneration of apple cultivars from root cuttings. II. Carbohydrate and auxin relations. *J. Hort. Sci.* **52**:221–233.
- Schultz, J.C., Edger, P.P., Body, M.J.A., Appel H.M.** (2019) A galling insect activates plant reproductive programs during gall development. *Sci. Rep.* **9**:1833.
- Skoog, F. and Miller, C.O.** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11** (118–130) .
- Skoog, F. and Tsui, C.** (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem and callus. *Amer. J. Bot.* **35**:782–787.
- Stangler, B.B.** (1949) An anatomical study of the origin and development of adventitious roots in stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* Bailey, *Dianthus caryophyllus* L., and *Rosa delicta* Rehd. Ph.D. dissertation. Cornell Univ. Ithaca NY.
- Suer, S., Agusti, J., Sanchez, P., Schwarz, M., Greb, T.** (2011) WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 3247–3259.
- Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K. et al.** (2015) Distinct Characteristics of Indole–3–Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant Cell Physiol* **56** (8) : 1641–1654.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., Meyerowitz, E.M.** (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* **18** (3) : 463–471.
- Trembley, A.** (1744) Mémoires pour Servir a L’histoire d’un Genre de Polypes d’eau Douce, a Bras en Forme de Cornes (Leiden: Jean and Herman Verbeek) .

- Venverloo, G.J.** (1976) The formation of adventitious organs. III. A comparison of root and shoot formation on *Nautilocalyx* explants. *Z. Pflanzenphysiol.* **80**:310–22.
- Walker, R.I.** (1940) Regeneration in the scale leaf of *Lilium candidum* and *L. longiflorum*. *Amer. J. Bot.* **27**:114–17.
- Warmke, H.E. and Warmke, G.L.** (1950) The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*. *Amer. J. Bot.* **37**:272–280.
- Yang, S., Poretska, O., Sieberer, T.** (2018) ALTERED MERISTEM PROGRAM1 Restricts Shoot Meristem Proliferation and Regeneration by Limiting HD-ZIP III-Mediated Expression of RAP2.6L. *Plant Physiol* **177** (4) : 1580–1594.
- Yarborough, J.A. and Tukey, J.H.B.** (1967) Regeneration in the foliage leaf of *Sedum*. *Amer. J. Bot.* **19**:443–453.
- Zurcher, E. and Muller, B.** (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. *Int Rev Cell Mol Biol* **324**: 1–38.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導およびご鞭撻を賜りました、京都産業大学生命科学部 木村成介 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、貴重なご指導およびご鞭撻を賜りました、京都産業大学生命科学部 坂本智昭 研究助教、池松朱夏 博士、上ノ山華織 様、東京大学大学院理学研究科 中山北斗 助教、東北大学 岡本（愿山）郁 博士、理化学研究所 岩瀬哲 博士、池内桃子 博士に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究において走査型電子顕微鏡による観察にご協力いただきました、東京学芸大学 Ferjani Ali 教授、郡司玄 様、オーキシンの定量解析にご協力いただきました、東京農工大学 笠原博幸 教授、理化学研究所 竹林裕美子 様、サイトカイニンの定量解析にご協力いただきました、理化学研究所 榊原均 博士、小嶋美紀子 様 に、この場をお借りして御礼申し上げます。

加えて、本研究は日本学術振興会 研究者養成事業 特別研究員 DC2 (17J03754) の助成を受けて遂行することができました。

最後に、様々なご考慮、ご協力くださいました、桃井理沙 さん、小俣恵美 さんをはじめ京都産業大学生命科学部 木村研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。