

10. キーワード

- | | | | |
|---------------|----------------|-------------|---------|
| (1) 植物 | (2) 表皮細胞 | (3) 胚軸 | (4) 茎 |
| (5) 次世代シーケンサー | (6) トランスクリプトーム | (7) シロイヌナズナ | (8) 協調化 |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当初、細胞層特異的な核の回収法 (INTACT法) による細胞層特異的な次世代シーケンサーによる転写解析を計画していたが、本法を胚軸に適用させるためには、いくつかの条件検討が必要であることが分かった。元々、INTACT法は、シロイヌナズナの根を用いた研究に用いられていた (Deal and Henikoff, 2010)。シロイヌナズナの根の組織は、細胞破碎や核回収には適していると考えられる。一方、胚軸などの地上部の組織は、表面にワックスなどを蓄積することや、細胞壁そのものが肥厚していることなどから、細胞破碎や核回収が根と比べると難しいと考えられる。そこで、本研究においても、破碎法の検討や、核回収の効率化などを行っているが、実験間のバラツキが大きいと考えられ、個別遺伝子の定量PCRでも結果が振れている可能性が高い。共同研究で行っていた、茎の細胞層特異的な次世代シーケンサーによる転写解析では、本研究課題とは異なる、レーザーによる細胞分取法を用いており、計画されていたように、結果を取得できた。また、当初から計画していた、他の発現解析データによる器官成長の協調化に關与する遺伝子群の候補を絞りこむことができ、現実的に体系的な遺伝子破壊株のスクリーニングを行える数にできたことが、その後の解析の高速化につながっていると考えられる。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

INTACT法による表皮細胞層特異的な核の回収については、さらに回収法の条件検討を行う必要がある。これまでの条件検討から、胚軸組織からの核の回収における前段階の組織を物理的に、出来るかぎり断片化していたが、そのステップが不十分と考えられる。最外層のワックスを効率よく除去するために、物理的な破碎の前に、各種界面活性剤の処理を検討する。また、現在、播種後1週間、暗所で生育させた黄化芽生えを用いているが、最外層のワックスや細胞壁の蓄積が低いことが想定されるより早い段階の芽生えを使用することも考えている。また、データのバラツキの原因のひとつと考えられる回収された核が少ないことについては、上記の条件検討に加えて、出発材料を増やすことも検討する。共同研究で行っている表皮特異的な転写解析とそれに引き続く、体系的な遺伝子破壊株のスクリーニング後の解析を引き続き行う。これまでに得られた器官成長が不全な遺伝子破壊株に関する遺伝子群については、さらに、プロモーターレポーターによる発現確認、蛍光タンパクとの融合遺伝子を用いた解析から、局在解析を行う。また、遺伝子破壊株の組織レベルの観察を行う。また、協調化に關する検証として、上記の遺伝子群に關する表皮もしくは内部細胞層特異的な発現形質転換体を作成し、表現型を観察する。また、協調的な伸長に關与していることの証明のためには、人為的に特定のタイミング、組織で発現誘導する系統や、組織の伸長により発現する遺伝子 (細胞伸長をモニターして発現する遺伝子) の取得をこれまでのデータを再考し、行っていく。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

現在までの達成度に記載したように、当初予定していた、研究計画のうち、次世代シーケンサーによる発現解析のための材料の確認作業が遅れたことが第一の理由である。それに伴って計画していた、形質転換植物を用いた解析や、海外学会への参加等が出来なくなった状況により、このような業務に關する予算をやむなく、繰り越すことになった。

(使用計画)

H26年度においては、H25年度に計画していた次世代シーケンサーによる発現解析を行う予定である。さらに、それに引き続く体系的な遺伝子機能スクリーニングを効率的に行うため、H25年度に購入した実体顕微鏡にカメラ撮影用機器をセットアップするための予算執行を行う。また、その後には計画している、より詳細な分子生物学的な解析を行うことや、国内外での成果を学会、原著論文作成を行う。また、研究実績の概要で記載した、共同研究により、得られた結果をもとにした同様な解析も並行して行う。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名		論文標題			
Keiko Sakakibara, Pascal Reisewitz, Tsuyoshi Aoyama, Thomas Friedrich, Sayuri Ando, Yoshikatsu Sato, Yosuke Tamada, Tomoaki Nishiyama, Yuji Hiwatashi, Tetsuya Kurata, Masaki Ishikawa, Hironori Deguchi, Stefan A. Rensing, Wolfgang Werr, Takashi Murata, Mitsuyasu Hasebe and Thomas Laux		WOX13-like genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss Physcomitrella patens			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Development	有	141	2014	1660-1670	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1242/dev.097444					

著者名		論文標題			
Bo Xu, Misato Ohtani, Masatoshi Yamaguchi, Kiminori Toyooka, Mayumi Wakazaki, Mayuko Sato, Minoru Kubo, Yoshimi Nakano, Ryosuke Sano, Yuji Hiwatashi, Takashi Murata, Tetsuya Kurata, Arata Yoneda, Ko Kato, Mitsuyasu Hasebe, Taku Demura		Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Science	有	343	2014	1505-1508	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1126/science.1248417					

著者名		論文標題			
Minoru Kubo, Akihiro Imai, Tomoaki Nishiyama, Masaki Ishikawa, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Kurata, Yuji Hiwatashi, Ralf Reski and Mitsuyasu Hasebe		System for stable b-estradiol-inducible gene expression in the moss Physcomitrella patens			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PLoS ONE	有	8	2013	e77356	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.pone.0077356					

〔学会発表〕計(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
Tetsuya Kurata		Coordinated leaf growth through the action of sister Zn-finger transcription factors in Arabidopsis	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本植物生理学会		2014年03月18日～2014年03月18日	富山大学

発表者名		発表標題	
倉田 哲也、大島 真澄		シロイヌナズナの器官成長に必要なZnフィンガー転写因子の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本植物学会		2013年09月13日～2013年09月13日	北海道大学

〔図書〕計(1)件

著者名		出版社		
Naoyuki Uchida, Tomoaki Sakamoto, Masao Tasaka and Tetsuya Kurata		Humana Press		
書名【発行確定】		発行年	総ページ数	
Arabidopsis Protocols		2 0 1 4	11	

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.備考

--