

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18564

研究課題名(和文) 最終分化細胞が分裂しないのはなぜか？

研究課題名(英文) Why and how terminally differentiated cells are kept quiescent

研究代表者

池内 桃子 (Ikeuchi, Momoko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：00633570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞体制を維持するためには、成熟した器官を構成する最終分化細胞は分裂を停止し機能と構造を維持しなければならない。私はこれまでにヒストン修飾酵素PRC2が細胞の分化状態を維持する機能を担うことを明らかにしてきた。本研究ではさらにPRC2による細胞分裂停止のメカニズム解明を進めた。一方で、傷害などのストレスに曝された際には分化細胞が分裂を再開して器官再生に寄与する例を新たに見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Plant cells display remarkable plasticity, yet the potential needs to be controlled in the context of multicellular organisms. We have revealed that a histone modifier PRC2 plays key roles in the maintenance of cellular differentiation status. In this study, I further studied how PRC2 prevents proliferation of terminally differentiated cells. I also found an example of mitotic re-entry and cellular de-differentiation of fully differentiated cells, when plants are exposed to wounding stress.

研究分野：生物学

キーワード：細胞分裂 細胞分化 再生

1. 研究開始当初の背景

植物細胞が持つ高い分化可塑性は、植物が発生の可塑性や再生能力を発揮する上で重要な性質である。その一方で、多細胞体制の秩序を維持するためには、完成した組織では分化細胞は分裂せずに特殊化した機能を発揮し組織の構造を保持しなければならないが、その分子機構は長年未解明であった。私はこれまでの研究によって、ヒストン修飾 (H3K27me3) を担う酵素であるポリコム抑制複合体 2 (PRC2) が植物細胞の分化完了後に分化状態を積極的に維持していることを明らかにした (Ikeuchi et al., 2015)。PRC2 の機能欠損体は、細胞伸長・核内倍加を経て高度な細胞分化を完了した根毛が細胞分裂を再開して細胞塊であるカルスと胚様体を形成するという驚くべき表現型を示した。さらに、この表現型には細胞脱分化を司る WIND3 および胚形成を司る LEC2 の脱抑制が関わっていることを示し、PRC2 によるリプログラミング因子の発現抑制が、成熟した細胞の分化状態維持機構の一端を担っていることを明らかにした。しかし、LEC2, WIND3 の過剰発現体が示す根毛の表現型が PRC2 変異体よりも顕著に弱いことから、これら以外の経路の存在が示唆された。他の経路の候補として想定したのが、細胞分裂制御である。PRC2 変異体の根毛を時系列に沿って観察すると、カルス化・胚形成よりも圧倒的に早く細胞分裂が始まることから、PRC2 依存的な分裂停止の解除が primary な表現型ではないかと考えられる。また、PRC2 変異体において M サイクリンである CYCB1;2-YFP が根毛の間期の核でも発現していることが分かったため、PRC2 変異体ではサイクリン遺伝子の脱抑制が起こっている可能性が考えられる。さらに、ChIP-chip データを解析した結果、G1/S, M サイクリンなどに加え E2Fa の相互作用因子である DPa および CDK 抑制因子である KRP など多くの細胞周期コア制御因子の遺伝子が、根端分裂組織の細胞と比べて根毛細胞において選択的に高い H3K27me3 の修飾を持つことが分かった。以上のデータから、PRC2 が細胞周期コア制御因子を直接抑制することで分化細胞の分裂再開を防いでいる可能性が示唆されていた。

このように植物は通常の生育条件では細胞の分化状態を維持する仕組みを持つが、傷などのストレスに曝露された条件で傷口を塞ぐために細胞塊であるカルスを形成しさらに茎葉や根などの器官を再生する現象が知られている。このとき、幹細胞的な性質を持った比較的未分化な細胞が由来となっている例が多いものの、植物種によっては成熟した器官の表皮細胞など高度に分化した細胞が由来となる例もあることが知られている (Ikeuchi et al., 2016)。しかし詳細な組織学的あるいは生理学的解析は、これまでに行われていなかった。

2. 研究の目的

野生型植物では最終分化細胞は通常の生育条件で分裂を行わないので、そこで働いている分裂停止のメカニズムを調べる。また、分裂を再開してしまうと細胞の分化状態が維持できないのではないかとという仮説を立て、これを検証する。これらの研究によって細胞分裂停止の仕組みと意義の両面からアプローチする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの PRC2 変異体において根毛細胞が細胞分裂再開と脱分化を起こすという表現型について、特に細胞分裂制御因子に着目した解析を進める。並行して野生型植物でも他の細胞種や他の植物種で類似の現象がないか探索を行う。

4. 研究成果

PRC2 変異体の表現型において、細胞分裂の活性化と細胞脱分化を脱共役するために、細胞分裂の阻害剤としてアフィディコリンの投与を行って表現型評価を試みた。結果的には、植物の成長が止まってしまい根毛の表現型を評価することは困難であった。また、PRC2 変異体の根毛細胞で M サイクリンである CYCB1;2-YFP が変異体の間期の核で異時的に発現しているという予備的な観察結果に基づきさらに詳細な観察を行った結果、CYCB1;2-YFP のシグナルが検出された根毛はすでに多細胞化したものに限られていることが明らかとなったため、遺伝子発現抑制の解除による異時的な発現ではなく、タンパク質が細胞分裂完了後に分解されていないという解釈がより妥当であるとの結論に至った。また、細胞分裂コア制御因子を異所的に活性化することによって PRC2 の根毛が示す表現型を模倣できるかどうかを調べるために、35S::E2Fa 35S::DPa 過剰発現体を取り寄せて交配により共通過剰発現体を作出したうえで表現型観察を行ったが、期待したような顕著な表現型が認められず細胞分裂の異所的な活性化を引き起こすことはできなかった。しかし意外なきっかけで研究の糸口を掴むことができた。植物の再生現象に関する総説の執筆時に (Ikeuchi et al., 2016) 網羅的な文献調査を行い、自然界で見られる様々な再生現象について再生芽の起源となっている細胞種を調べた。体性幹細胞とも呼べるような比較的未分化な細胞が起源となっている例が多いものの、イワタバコ科植物などいくつかの例では PRC2 変異体と同様に高度に分化した細胞が分裂して脱分化し、新たなメリステムを構築して再生芽を作っているようであった。しかし論文で報告されていた組織学解析は不十分だったためイワタバコ科植物を入手し実際に観察を行った。論文ではオーキシンとサイトカイニンを含む培地で外植片を培養

時にシュート再生が誘導されると報告されていたが、実際にはホルモンフリーの条件でも高頻度でシュート再生が誘導できた。さらに外植片を準備せずとも、生きた植物体の葉に小さな傷ができた部位からもシュート再生が起こっており、傷ストレスによってシュート再生が誘導されていることが強く示唆された。光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて詳細な組織学的観察を行ったところ、発達した液胞を持ち分化細胞の特徴を備えた表皮細胞が分裂し、徐々に小さな細胞になっていき最終的にはメリステムを構築するということが分かった。イワタバコ科植物とシロイヌナズナの相違点を比較するためにシロイヌナズナの成熟葉を切断し傷口を観察したところ、比較的未分化な細胞を含む維管束だけでなく、葉肉細胞や表皮細胞など高度に分化した細胞でも細胞分裂が誘導されることが分かった (Iwase et al., 2017)。さらに表皮細胞特異的なプロモーターである ATML1 を使って Cre recombinase を発現させ lox 部位で組み換えを起こし細胞系譜を調べる実験を行ったところ、表皮細胞由来のカルスができていたことが明らかになった。シロイヌナズナの葉を切断する実験系では根の再生が起こるが、根は維管束由来であり表皮細胞由来の細胞は分裂するものの器官再生には参加しなかった。以上の結果、最終分化細胞の中にも刺激を受け取って分裂を再開できる細胞とできない細胞があること、そして分裂再開は必ずしも細胞脱分化を引き起こすものではなく二つはある程度独立した現象であるということが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)すべて査読あり

Iwase A, Harashima H, Ikeuchi M, Rymen B, Ohnuma M, Komaki S, Morohashi K, Kurata T, Nakata M, Ohme-Takagi M, Grotewold E, Sugimoto K. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ESR1* in Arabidopsis. *Plant Cell* 2017, 1:54-69. doi: [10.1105/tpc.16.00623](https://doi.org/10.1105/tpc.16.00623)

Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 2016, 143: 1442-1451. doi: 10.1242/dev.134668

Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Harashima H, Shibata M, Ohnuma M, Breuer C, Morao AK, de

Lucas M, De Veylder L., Goodrich J, Brady SM, Roudier F, Sugimoto K. PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. *Nature Plants* 2015, 1:15089. doi: 10.1038/nplants.2015.89

Ikeuchi M, Iwase A, Sugimoto K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* 2015, 28: 60-67. doi: 10.1016/j.pbi.2015.09.004

Iwase A, Mita K, Nonaka S, Ikeuchi M, Koizuka C, Ohnuma M, Ezura H, Imamura J, Sugimoto K (2015) WIND1-based acquisition of regeneration competency in Arabidopsis and rapeseed. *Journal of Plant Research* 2015, 128:389-397. doi: 10.1007/s10265-015-0714-y

岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子: “植物の再生現象における分化全能性制御の分子機構” *BSJ review*, 2016, 7D:161-176. http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-review_7D_161-176.pdf

池内桃子, 岩瀬哲, 杉本慶子: “傷付いた植物はどのように修復・再生するのか” *BSJ review*, 2015, 6A:23-30. http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-Review_6A_2-22.pdf

岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子: “カルス形成の分子メカニズム～アクセル因子とブレーキ因子～” *BSJ review*, 2015, 6A:2-22. http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-Review_6A_23-30.pdf

[学会発表](計10件)

Ikeuchi M “Wound induced cellular reprogramming in plants” 名古屋大学 ITbM (名古屋・愛知) 2017年3月24日

Ikeuchi M “Identification of novel regulator required for wound-induced cellular reprogramming in *Arabidopsis thaliana*” 日本植物生理学会年会、鹿児島大学 (鹿児島・鹿児島) 、2017年3月16日

Ikeuchi M “Transcriptome and hormonal analysis of wound-induced callus formation in Arabidopsis”, CSHA, 淡路夢舞台(淡路・兵庫), 2016, December 1st.

池内桃子 “分化を完了した植物細胞の脱分化と細胞分裂再開” シンポジウム「細胞分化を誘導する細胞周期制御システム」、基礎生物学研究所(岡崎・愛知)、2016年11月21日

Ikeuchi M “Stress induced cellular reprogramming in plants”, 新学術領域環境記憶統合若手の会、KKR 熱海(熱海・静岡)、2016年10月12日

Ikeuchi M “Epigenetic control of plant regeneration and stem cell formation” 日本植物生理学会年会、岩手大学(盛岡・岩手)、2016年3月19日

池内桃子 「植物細胞の分化可塑性およびその抑制機構」日本植物学会 若手奨励賞受賞講演、朱鷺メッセ(新潟・新潟)、2015年9月6日

Ikeuchi M “PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis” FASEB Mechanisms in Plant Development, Vermont (USA), 2015, August 3rd.

池内桃子 “PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis” 日本エピジェネティクス研究会年会、東京一ツ橋学術総合センター(千代田・東京)、2015年5月28日

Ikeuchi M “Epigenetic control of plant cell differentiation and environmental response” 日本植物生理学会年会、東京農業大学(世田谷・東京) 2015年3月16日

〔その他〕
プレスリリース
植物が傷口で茎葉を再生させる仕組み
http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170117_2/

植物の分化全能性抑制の分子メカニズムの一端を解明

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150630_1/

植物細胞の“分化の逆戻り”を制御する仕組みを発見
<http://www.natureasia.com/ja-jp/nplants/interview/contents/4>

アウトリーチ
池内桃子 「細胞を作る、とどめる - 静かなる植物の精緻な営み - 」法政女子高校、東京、2017年1月12日

6. 研究組織
(1) 研究代表者
池内 桃子 (Ikeuchi, Momoko)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号: 00633570