

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 11 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07398

研究課題名(和文) 植物ホルモン非要求性脱分化の分子機構と内生植物ホルモンの役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of reprogramming that is regulated by changes in endogenous phytohormone levels

研究代表者

西浜 竜一 (Nishihama, Ryuichi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70283455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼニゴケ葉状体を切断すると、植物ホルモンフリー培地で効率よく葉状体が再生する。切断数時間後に内生オーキシン量の一時的な低下がみられたこと、またオーキシン含有培地では再生芽形成が抑制されたことから、オーキシンレベルの低下が細胞リプログラミングの引き金となることが示唆された。またオーキシン、サイトカイニン生合成遺伝子、およびある転写因子遺伝子の発現が、オーキシンレベル低下依存的に上昇することを見出した。この転写因子を強制発現させると、オーキシン含有培地でも再生芽が形成された。本研究により、内生植物ホルモンレベル変動とリプログラミングの関係、またその制御に関わる鍵因子を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は挿し木で増やせることや、単離した1細胞から個体を再生できることから、分化全能性があると古くから知られている。傷害が引き金となって分化全能性が発揮されることはわかっているものの、その分子的な仕組みについての詳細はあまりわかっていなかった。本研究ではコケ植物のゼニゴケを用いて、葉状体切断後に起こる植物ホルモン・オーキシンの内生レベルの一時的な低下が、分化全能性を発揮するための遺伝子発現変化(リプログラミング)を引き起こすことを示唆する結果が得られた。この成果は、この分野に新たな概念をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the liverwort *Marchantia polymorpha*, thallus regeneration occurs efficiently from excised thalli on phytohormone-free media. Based on the observations that the endogenous level of auxin decreased transiently a few hours after excision and that regenerative formation was repressed in the presence of auxin, transient reduction of auxin was suggested to trigger cellular reprogramming. In addition, genes for auxin and cytokinin biosynthesis and for a transcription factor were upregulated in auxin-reduction-dependent manner. Overexpression of this transcription factor promoted regenerative formation in the presence of auxin. This study revealed a relationship between changes in endogenous phytohormone levels and reprogramming of cells, and a key factor that links these two processes.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：リプログラミング 再生 オーキシン サイトカイニン 苔類ゼニゴケ コケ植物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1971年に長田・建部が示したタバコ葉肉プロトプラストからの植物体再生は日本発の偉大な業績であり、分化した1細胞から植物体を再生させることができる分化全能性を示している。植物が持つ分化全能性や再生能に基づき、細胞融合による育種、クローン培養、形質転換など農業的にも様々な重要な技術が開発されてきた。そのような技術は、2つの植物ホルモン、オーキシンとサイトカイニンの操作により実現されてきた。しかしながら、その歴史の長さにも関わらず、分化全能性を司るリプログラミング制御機構の分子レベルでの理解は最近になって始まったばかりである^{1,2)}。

分化細胞から再生に至る初期過程では、適切なホルモン条件において、傷シグナルを受けて細胞の分化状態が変化し、細胞周期が活性化される¹⁾。この状態が続くとカルスが形成される。被子植物を用いた解析から、カルス化に関連して発現する転写因子は数多く同定されている²⁾が、それらがどのように植物ホルモンの効果を仲介し、細胞脱分化や細胞周期再開に関わるのかについては不明な点が多い。その理由の一つに、関連遺伝子の重複に起因する障壁が挙げられる。

陸上植物の進化的基部に位置するコケ植物の高い再生能力は古くから知られており、しかもホルモンを要求しない³⁾。近年、コケ植物苔類に属するゼニゴケの分子遺伝学的ツールが急速に整備され、植物生物学の様々な問題に取り組むのに適したモデルとなってきた。ゲノム配列から、特に制御機能遺伝子の冗長性が低く、かつ被子植物で知られている制御システムの多くを既に獲得していて、それらが進化の過程で転用されてきたことが見えてきた。そこで申請者らは、ゼニゴケが植物再生における脱分化や細胞周期再開の分子機構を解析するのに優れたモデルであると考え、解析を行ってきた。これまでに、葉状体切断から細胞周期再開までの経時的な観察により、G1期で停止していた細胞が切断後24時間までにS期に入ること、さらにこの細胞周期再開には光が促進的に働き、光合成による糖の合成と赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムの活性化を介した制御機構の存在を明らかにし、報告した⁴⁾。

1) Sugiyama (2015) *J. Plant Res.* 128: 349-359. 2) Ikeuchi et al. (2013) *Plant Cell* 25: 3159-3173. 3) Vöchting (1885) *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 16: 367-414. 4) Nishihama et al. (2015) *J. Plant Res.* 128: 407-421.

2. 研究の目的

ゼニゴケの葉状体を切断し、頂端を含む断片(頂端断片)と含まない断片(基部断片)に分けて植物ホルモンフリー培地で培養すると、基部断片の切断面においてだけ葉状体の再生がみられる。頂端断片はそのまま頂端からの成長を続け、切断面から再生は起こらない。以上のことから、頂端で産生される拡散性物質により細胞の脱分化が抑制され、その物質が植物ホルモン・オーキシンであるとの仮説を立て、検証した。

被子植物においては植物ホルモン操作で脱分化を制御できるが、その分子的な制御機構の理解は未だ十分ではない。本研究では、ホルモン非存在下で効率よく再生し、分子遺伝学的実験が迅速に行えるコケ植物苔類ゼニゴケを用いて、細胞リプログラミングに関与する遺伝子を同定し、その分子機構を明らかにすることが目的の1つである。また、オーキシンの外部添加により再生芽形成が抑制されるというデータが得られ、内生植物ホルモン量の変化が再生の初期過程において重要な働きをしていることが示唆された。そこで、その役割を解明することで細胞の脱分化や細胞周期再開の分子機構の理解を深めることも目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではまず、葉状体切断片においてオーキシンが細胞周期再開の前後どちらの過程を抑制するのか、細胞周期マーカーなどを用いた細胞生物学的な解析により明らかにする。次に、切断片における内生のオーキシンとサイトカイニンの量を経時的に定量する。さらに、経時的なトランスクリプトーム変化を比較解析し、時間依存的に発現変動する遺伝子群を割り出す。さらに、オーキシンやサイトカイニンがどのような遺伝子の発現を制御することで再生を抑制するか明らかにする。そのために、内生および外生ホルモン量を増減させた条件やホルモン応答を変化させた条件におけるトランスクリプトーム変化を比較解析し、ホルモン依存的に発現変動する遺伝子群を割り出す。

また、ゼニゴケがもつ唯一の転写活性化型 AUXIN RESPONSE FACTOR である MpARF1 と、転写抑制型 MpARF2 の再生における機能を明らかにする。また、これらが共通の標的遺伝子に対して拮抗的に働く可能性を、効果の評価が容易な再生芽形成抑制系を使って検証する。拮抗機能が示唆されたら、共通の標的遺伝子をトランスクリプトーム解析により解明する。

以上の解析で同定された遺伝子について、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて KO 株を作成し、再生能やマーカー遺伝子発現を解析することで、脱分化における機能を明らかにする。

4. 研究成果

葉状体を切断し、様々なタイミングでチミジンアナログ 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を取り込ませ S 期進行細胞を可視化するアッセイを行ったところ、切断後に起こる表皮細胞の G1 期から S 期への移行がオーキシン添加により阻害されることが明らかとなった。このことから添加オーキシンは細胞周期再開よりも前の過程で再生を抑制することがわかった。

次に葉状体切断から細胞周期再開の過程における内生のオーキシンとサイトカイニンの量を経時的に定量した。その結果、基部断片において、インドール酢酸 (IAA) が切断 3 時間後に一過的に減少しその後再び上昇すること、サイトカイニン前駆体が大きく減少することが明らかとなった。

オーキシン信号伝達経路の関与を調べたところ、オーキシン依存的な遺伝子発現制御が再生抑制に関わっていることが明らかとなった。そこで再生に伴う遺伝子発現制御を明らかにするため、オーキシン非存在下および存在下における切断後の経時的な遺伝子発現変動を RNA-seq 解析により調べた。オーキシン非存在下では、細胞周期関連遺伝子の発現は 12 時間目まで一定で、基部断片においてのみ 24 時間目で上昇した。このことから細胞周期再開が 24 時間目までに起こることが示唆された。オーキシン濃度が低下したタイミングで、基部断片のみにおいて有意に発現変動する遺伝子が約 3,000 個あり、その中には数十の転写調節因子が含まれることがわかった。また、オーキシン生合成遺伝子の発現が切断 3 時間後で一過的に減少し、その後再び上昇することがわかった。サイトカイニンに関しては、活性化酵素遺伝子が 6 時間目以降に発現上昇した。興味深いことに、これら植物ホルモン生合成遺伝子の発現上昇は、オーキシン存在下では抑えられていた。以上のことから、切断後に起こる一過的なオーキシンレベルの低下と、サイトカイニン合成の活性化が引き金となって起こる遺伝子発現調節が、リプログラミング制御に関わっていることが示唆された。

オーキシン濃度低下に依存して発現変動する転写因子遺伝子はあまり多くはなかった。ここではそのうちのひとつ (TF-A と呼ぶ) に着目した。この遺伝子の発現は基部断片においてのみ誘導されたが、オーキシン添加条件では誘導が抑制された。TF-A の機能誘導株を作出したところ、誘導依存的にオーキシン含有培地においても再生芽形成を促進できることがわかった。逆に、SRDX リプレッサードメインを融合した TF-A の誘導株を作出したところ、通常培地での再生芽形成が誘導依存的に遅延することが明らかとなった。しかしながら、TF-A 変異体は再生に大きな異常を示さなかったことから、TF-A と並行して機能する遺伝子の存在が示唆された。これらの結果から、TF-A は基部断片においてオーキシン濃度低下に依存して発現が誘導され、再生芽形成を促進する機能を持つ転写因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Aki, S.S., Mikami, T., Naramoto, S., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Kyojuka, J., Kohchi, T., Umeda, M. (2019) Cytokinin signaling is essential for organ formation in *Marchantia polymorpha*. doi: 10.1093/pcp/pcz100.
2. Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., Kohchi, T. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* 13: e0205117. doi: 10.1371/journal.pone.0205117.
3. Sugano, S.S., Nishihama, R. (2018) CRISPR/Cas9-based genome editing of transcription factor genes in *Marchantia polymorpha*. *Methods Mol. Biol.* 1830: 109-126. doi: 10.1007/978-1-4939-8657-6_7.
4. 西浜 竜一, 河内孝之 (2018) 新しいモデル生物 : 苔類ゼニゴケ 領域融合レビュー 7: e008. doi: 10.7875/leading.author.7.e008
5. Yamaoka, S., Nishihama, R., Yoshitake, Y., Ishida, S., Inoue, K., Saito, M., Okahashi, K., Bao, H., Nishida, H., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T. (2018) Generative cell specification requires transcription factors evolutionarily conserved in land plants. *Curr. Biol.* 28: 479-486. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.053.
6. Mano, S., Nishihama, R., Ishida, S., Hikino, K., Kondo, M., Nishimura, M., Yamato, K.T., Kohchi, T., Nakagawa, T. (2018) Novel gateway binary vectors for rapid tripartite DNA assembly and promoter analysis with various reporters and tags in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* 13: e0204964. doi: 10.1371/journal.pone.0204964.
7. Ikeda, Y., Nishihama, R., Yamaoka, S., Arteaga-Vazquez, M.A., Aguilar-Cruz, A., Grimanelli, D., Pogorelcnik, R., Martienssen, R.A., Yamato, K.T., Kohchi, T., Hirayama, T., Mathieu, O. (2018) Loss of CG methylation in *Marchantia polymorpha* causes disorganization of cell division and reveals unique DNA methylation regulatory mechanisms of non-CG methylation. *Plant Cell Physiol.* 59: 2421-2431. doi: 10.1093/pcp/pcy161.
8. Kato, H., Nishihama, R., Weijers, D., Kohchi, T. (2018). Evolution of nuclear auxin signaling:

lessons from genetic studies with basal land plants. *J. Exp. Bot.* 69: 291-301. doi: 10.1093/jxb/erx267.

9. Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R. et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* 171: 287-304. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030.
10. Kato, H., Kouno, M., Takeda, M., Suzuki, H., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T. (2017) The roles of the sole activator-type auxin response factor in pattern formation of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 58: 1642-1651. doi: 10.1093/pcp/pcx095.

〔学会発表〕 (計 7 件)

<口頭発表>

1. Nishihama, R., Kohchi, T. Connections between apical cell function and auxin response in the liverwort *Marchantia polymorpha*. JPR 国際シンポジウム"Apical stem cell(s): evolutionary basis for 3D body plans in land plants" 第 82 回日本植物学会大会 広島 (2018)
2. 灰庭瑛実, 片山みなみ, 鈴木秀政, 西浜竜一, 河内孝之 ゼニゴケの転写活性化型・抑制型 ARF による拮抗的なメリステム形成制御 第 82 回日本植物学会大会 広島 (2018)
3. Nishihama, R., Suzuki, H., Kato, H., Kohchi, T. Roles of auxin in the formation of stem cells in *Marchantia polymorpha*. The 65th NIBB Conference: Renaissance of *Marchantia polymorpha* -the genome and beyond-. Okazaki. (2017)
4. 西浜竜一 植物再生における極性と細胞周期制御 基生研研究会「細胞分化を誘導する細胞周期制御システム」 岡崎 (2016)

<ポスター発表>

1. Ishida, S., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Yamaoka, S., Kohchi, T., Nishihama, R. Cellular reprogramming as a response to the loss of apical dominance in the liverwort *Marchantia polymorpha*. EMBO Workshop: New shores in land plant evolution. Lisbon, Portugal. (2018)
2. Ishida, S., Yamaoka, S., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Kohchi, T., Nishihama, R. Tissue regeneration is associated with temporal changes in the levels of auxin and gene expression in *Marchantia polymorpha*. The 65th NIBB Conference: Renaissance of *Marchantia polymorpha* -the genome and beyond-. Okazaki. (2017)
3. Ishida, S., Yamaoka, S., Nishihama, R., Kohchi, T. Phytohormonal regulation of tissue dedifferentiation and cell-cycle re-entry during regeneration in the liverwort *Marchantia polymorpha*. Auxin 2016. Sanya, China. (2016)

〔図書〕 (計 1 件)

1. 西浜竜一 講談社 京大発! フロンティア生命科学 (京大大学生命科学研究科編) 「体を守るしくみ 動物と植物の生体防御機構」 pp. 207-209. (2018)

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 石田咲子

ローマ字氏名: (Sakiko Ishida)

研究協力者氏名: 鈴木秀政

ローマ字氏名: (Hidemasa Suzuki)

研究協力者氏名: 灰庭瑛実

ローマ字氏名: (Emi Hainiwa)

研究協力者氏名: 山岡尚平

ローマ字氏名: (Shohei Yamaoka)

研究協力者氏名：重信秀治
ローマ字氏名：(Shuji Shigenobu)

研究協力者氏名：榊原均
ローマ字氏名：(Hitoshi Sakakibara)

研究協力者氏名：河内孝之
ローマ字氏名：(Takayuki Kohchi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。