

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15146

研究課題名(和文)植物細胞リプログラミングにおけるWOX遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of WOX genes in the control of plant cell reprogramming

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・訪問研究員

研究者番号：00633570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は体が傷つくと傷口にカルスという細胞塊を形成して傷口を塞いだり細胞塊から新たな再生芽や不定根を作るが、こうした異なる再生現象が相互にどのような関係にあるのかについてはこれまで分かっていなかった。本研究では、ホメオボックス型の転写因子をコードするWOX遺伝子が、傷口で機能して塞ぐ作用と再生芽・不定根を作る作用のトレードオフを制御していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織培養系での再生芽誘導はゲノム編集技術などの多くの重要な応用技術の中核をなすステップである。本研究では、再生芽誘導効率を負に制御する遺伝子を同定して機能解析を進めた。この遺伝子の配列や機能は陸上植物に広く保存されているため、本研究の成果が農作物での組織培養効率を高めることにつながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Upon tissue damage, plants activate cell proliferation to develop a cell mass called callus at wound sites. Callus has physiological roles to heal the wound sites and also to serve as a cellular source for de novo organogenesis, yet the relationship between multiple physiological outputs remained unknown. We previously performed time-course RNA-seq analyses after wounding. Using the RNA-seq dataset, we searched novel regulators of callus formation and have identified a WUSCHEL RELATED HOMEBOX (WOX). The expression of WOX is rapidly induced upon wounding and loss-of-function of WOX leads to a severe defect in callus growth. wox mutant is defective in tissue repair and organ reconnection, suggesting that WOX is required for certain aspect of regenerative response. Conversely, WOX has a negative impact on de novo organogenesis. This study revealed that WOX mediates the tradeoff between distinct physiological outputs of calli.

研究分野：植物発生学

キーワード：器官再生 細胞リプログラミング 転写制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は一般的に高い再生能力を持ち、傷口に細胞塊であるカルスを形成してそこから再生芽や不定根を形成して個体全体を再生することができる。また、カルスには傷口を塞いで治癒する作用を持つことも知られているが、器官新生と治癒という異なる再生現象の関係については全く分かっていなかった。私たちはこれまでに、AP2/ERF 型転写因子の WOUND-INDUCED DEDIFFERENTIATION1-4 (WIND1-4) を中心とした研究を進め、植物細胞リプログラミングの分子機構の解明を進めてきた。WIND1-4 は傷シグナルによって速やかに発現が誘導され、その下流ではカルス形成、シュート再生、胚の形成など様々な細胞リプログラミング現象を引き起こすことを示してきた。WIND1 の下流で働く遺伝子の機能を解析するなかで、標的遺伝子候補として *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN BOX* (*WOX*) 遺伝子を発見した。*WOX* の機能欠損突然変異体 (*wox* 変異体) は、カルスが小型化するという表現型に加え、組織培養において茎葉再生が促進するという興味深い表現型を示すことを見出した。

### 2. 研究の目的

*WOX* 遺伝子が植物の器官再生において果たす役割を明らかにすることを本研究の目的とする。具体的には、*WOX* 遺伝子が傷口あるいは組織培養の条件下においてどのような外的刺激によって活性化されるのかを遺伝子発現制御の観点から明らかにする。また、*WOX* 遺伝子はホメオボックス型の転写制御因子をコードしているため、*WOX* は転写制御を介して再生現象を制御していると想定できる。そのため、*WOX* がどのような下流標的遺伝子群を制御しているのかを明らかにすることを目指して研究を行った。

### 3. 研究の方法

*WOX* 遺伝子の上流発現制御については、切断刺激、および組織培養の培地に含まれる植物ホルモンの影響を、qRT-PCR 法を用いて調べることにした。*WOX* の下流遺伝子群については、野生型と *WOX* 変異体で発現している遺伝子を、RNAseq 法を用いて網羅的に比較することによって調べた。さらに、*WOX* が直接遺伝子座に結合して制御する標的遺伝子群を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP-seq) によって調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) *WOX* 遺伝子の発現を制御する機構の解析

これまでに WIND1 が *WOX* 遺伝子の発現を制御している可能性が示唆されていたため、その可能性を検討した。シロイヌナズナの培養細胞に WIND1 を過剰発現させると、*WOX* プロモーターの制御下でルシフェラーゼ遺伝子を発現させたレポーターコンストラクトの発現を強く活性化することができたため、WIND1 は *WOX* の発現を誘導するのに十分であることが分かった。シロイヌナズナの植物体において WIND1 の機能抑制型 WIND1-SRDX の形質転換体と野生型で、切断後の *WOX* 発現を比較したところ、切断刺激による発現誘導が顕著に抑制されることが分かった。その一方で WIND1-SRDX においても *WOX* の発現誘導が認められることも分かった。したがって、WIND1 は切断刺激による *WOX* の転写誘導に関与するものの、切断刺激によって活性化されて WIND1 を介さずに *WOX* の転写を誘導するシグナル伝達経路の存在も強く示唆された。ホルモンの影響を調べるために、オーキシンおよびサイトカイニンを投与してから数時間以内で時系列の遺伝子発現解析を行った。その結果、オーキシン投与によって *WOX* の発現が速やかに誘導されることが分かった。サイトカイニン投与による発現変動は認められなかった。以上の結果を総合し、切断刺激あるいはオーキシンが *WOX* の転写を誘導していると結論づけた。

#### (2) *WOX* が制御する下流現象の解析

*wox* 変異体が顕著な表現型を示す二つの実験系、すなわち、葉柄の切断面にカルスが形成される系と茎葉が胚軸組織片から再生する組織培養系において、RNAseq を用いて野生型と *wox* 変異体の比較トランスクリプトーム解析を行った。それぞれの実験系で *wox* 変異体は、切断面に形成されるカルスが小型化するという表現型と、組織培養系で茎葉再生が促進するという一見すると大きく異なる表現型を示すが、興味深いことに野生型と *wox* 変異体で顕著に発現が異なる遺伝子群は両実験系で類似しているという結果が得られた。いずれの実験条件においても、細胞壁の再構成に関与する酵素の遺伝子群の発現量が *wox* 変異体では著しく低下していた。したがって、*WOX* が制御する現象は両実験系でおそらく共通しているものと考えられる。さらに、ChIP-seq によって *WOX* が直接結合する遺伝子座を網羅的に同定した結果、上記の酵素遺伝子群には *WOX* が直接結合していることが明らかとなった。したがって、*WOX* は直接的に細胞壁のリモデリングに関与する酵素の遺伝子発現を誘導しているといえる。この結果を受けてさらに詳細な組織学的解析を進めたところ、葉柄の切断面のカルス、および組織培養系の胚軸組織片の両方において、野生型には見られる高度に肥大化した細胞が *wox* 変異体には欠失していることが明らかとなった。おそらく、*WOX* は特殊化した細胞を形成するのに必要な因子であり、二次的な影響として茎葉再生効率に影響しているのだろうと現在考察している。

#### (3) 新規表現型の発見

WOX はカルスにおいて特殊化した細胞を形成する機能を持つことが見えてきたため、次にこの細胞の生理機能を調べることにした。こうした形態的特徴を持つ細胞種が接ぎ木の境界において形成されることが報告されていたため、葉柄で接ぎ木を行う実験系を確立し、表現型の評価を行った。その結果、野生型では高頻度で接ぎ木が成功したのに対して、*wox* 変異体では器官を物理的に再結合することができず接ぎ木はまったくできなくなっていた。したがって、WOX の機能によって形成される特殊化したカルスの細胞は、傷口を塞いで器官を再結合するという生理機能を持つことが分かった。

以上の結果に基づき、WOX は傷口の治癒に関与するという機能を持つことが分かった。興味深いことに、WOX の機能が失われると器官新生の効率が向上していたことから、治癒と器官新生という異なる再生現象の間にトレードオフのような関係があることが初めて示唆された。今後は、野生型と *wox* 変異体のカルスに含まれる細胞種の詳細な解析や、WOX 下流標的遺伝子の機能解析を進めることによって、詳細なメカニズムが明らかになるものと期待できる。また、接ぎ木や組織培養による器官再生系は農業的な応用において極めて重要な現象であり、WOX の機能解析を通してこうした再生現象のメカニズムが明らかになれば、農作物のバイオテクノロジー効率化に貢献できることが大いに期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

すべて査読あり

1. **Ikeuchi M**, Favero S, Sakamoto Y, Iwase A, Coleman D, Rymen B, Sugimoto K. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual Review of Plant Biology* 2019, 70: 377-406, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434.
2. **Ikeuchi M**, Shibata M, Rymen B, Iwase A, Bågman AM, Watt L, Coleman D, Favero DS, Takahashi T, Ahnert SE, Brady SM, Sugimoto K. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. *Plant and Cell Physiology* 2018, 59: 765-777, doi: 10.1093/pcp/pcy013.
3. **Ikeuchi M**, Iwase A, Rymen B, Lambomez A, Kojima M, Takebayashi Y, Heyman J, Watanabe S, Seo M, De Veylder L, Sakakibara H, Sugimoto K. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 2017, 175: 1158-1174, doi: 10.1104/pp.17.01035.
4. 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.

〔学会発表〕(計6件)

1. **Ikeuchi M**, Iwase A, Sugimoto K “WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 13 mediates the tradeoff between tissue repair and *de novo* organogenesis in Arabidopsis” International symposium Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Sendai, 2019, May.
2. **Ikeuchi M**, Iwase A, Sugimoto K “Balancing act in the control of plant cell reprogramming”, 日本植物生理学会国際シンポジウム「植物の細胞はどのように分化運命を記憶し、それを書き換えるのか」名古屋、2019年3月
3. **Ikeuchi M**, Iwase A, Sugimoto K “How plants restart a brand-new life after injury” Gordon Research Conference: Plant Molecular Biology, NH, 2018, June.
4. **Ikeuchi M**, Iwase A, Sugimoto K “Wound-induced WOX plays key roles in callus growth and organ regeneration in *Arabidopsis thaliana*” 日本植物生理学会、札幌、2018年3月
5. **池内桃子**, 岩瀬哲, 杉本慶子「カルス形成と茎葉再生における WOX 遺伝子の機能」日本植物学会、野田、2017年9月

6. **Ikeuchi M** “Emergency response and safety locking system of plant cell differentiation” Plant Cells in Vitro: Fundamentals & Applications II, Vienna, 2017, June.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://cellfunction.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者  
なし

(2) 研究協力者  
なし

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。