

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06694

研究課題名(和文)体細胞胚誘導の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms on somatic embryogenesis

研究代表者

岩瀬 哲(Iwase, Akira)

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・上級研究員

研究者番号：40553764

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)：本研究では、転写因子WIND1が体細胞胚を誘導する分子機構の一旦を明らかにした。WIND1を過剰発現したWIND1では、外因性のホルモンの添加や傷害ストレスを与えることなしに芽生えの組織から体細胞胚が誘導される。この過程での遺伝子発現変化を経時的かつ網羅的に捉え、WIND1の発現誘導によって胚発生に関わる転写因子の遺伝子が数多く発現上昇することを発見した。遺伝学的・生化学的な解析から、実際にこれらの転写因子がWIND1によって直接発現制御を受けていることや、WIND1による体細胞胚誘導にはエピジェネティックな制御が必要であることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで体細胞胚を誘導できる転写因子として、胚発生や植物幹細胞形成に関与するものが報告されていたが、本研究から新たにストレス応答性の転写因子によって体細胞胚誘導が起こることが示された。種々のストレス処理による体細胞胚誘導の系の報告があるが、その経路での重要因子の特定はほとんどなく、本研究で注目した転写因子がその経路で重要な働きを担うことが考えられる。また、ストレス応答性の転写因子による体細胞胚誘導においてエピジェネティックな制御が関与することも示された。これらの成果は、体細胞胚誘導が困難な植物種に対して、誘導の効率を上げるための重要な知見となり、普遍的な分子育種法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have revealed a molecular mechanism by which the transcription factor WIND1 induces somatic embryogenesis. In *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing WIND1, somatic embryos were induced from seedlings without the addition of exogenous hormones or wound stress. By capturing the temporal and comprehensive changes in gene expression during this process, we discovered that the expression of several key transcription factors involved in embryogenesis is significantly upregulated by the induction of WIND1 expression. Genetic and biochemical analyses have further demonstrated that these transcription factors are directly controlled by WIND1 and that epigenetic regulation is necessary for WIND1-mediated somatic embryogenesis.

研究分野：植物再生生理学

キーワード：分化全能性 体細胞胚 細胞リプログラミング 脱分化 再分化 カルス形成 転写因子 運命転換

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が有する柔軟な細胞分化の可塑性は、組織培養を用いたクローン増殖等、農業的にも古くから利用されてきたが、植物細胞がどのように分化全能性を再発揮するのか、そのメカニズムは不明な点が多く、21世紀の科学における重要な問いの一つとなっている。傷害ストレスが引き金になり、カルス形成の後に組織が再生することは200年以上前から記述されていた。また、筑波大学の鎌田博博士らの先駆的な研究から、浸透圧、熱、重金属などの環境ストレスによって、植物体の体細胞胚誘導能が昂進することがこれまで報告されている。これらの事実は、植物がストレスに対する生存戦略として細胞の多能性/全能性獲得をしていることを示している。

申請者はこれまで、植物体とカルスの遺伝子発現の比較解析を行い AP2/ERF 型転写因子 WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) を単離している。WIND1 は傷害ストレスによって誘導され、植物細胞の脱分化と引き続いて起こる組織再生を正に制御する。WIND1 を過剰に発現させたシロイヌナズナ、ナタネ、トマトおよびタバコ植物体は植物ホルモン無添加の培地でも種々の組織にカルスを形成する。カルス誘導は完全に分化していると考えられる根毛細胞においても観られる。さらに興味深い事に、WIND1 発現誘導後に生じたカルスでは、不定芽、不定根をはじめ、体細胞胚の再分化まで観察されることから、WIND1 は分化細胞に多能性や全能性を再獲得させる機能を有していることが明らかになった。WIND1 依存的な分化全能性発揮の分子メカニズムに関する次なる重要な問いの1つは、WIND1 がどのように体細胞胚を誘導するのかである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレスで誘導される体細胞胚形成の分子メカニズムの一端を明らかにすることであり、浸透圧や熱ストレスによっても発現が促進する転写因子 WIND1 の関与と、ヒストン修飾変化に着目する。種々のストレスによる細胞の脱分化とそれに続いて起こる再分化は多細胞生物に共通した生命現象であるが、体細胞から直接胚発生が起こる例は植物の他には知られていない。この分子メカニズムを解き明かすことは再生科学において独自性の高い研究となる。これまでの体細胞胚研究の多くは、作用点の広い外因性のホルモン添加を必要とし、誘導率が低い条件での検討を行なっているが、本研究では申請者が独自に見出したホルモンフリー条件かつ誘導率の高い実験系を基盤にしているため、体細胞胚誘導現象に特異的な変化をよりの確に捉えることができる。

### 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを用いて、1. ストレス誘導性体細胞胚形成における WIND1 の役割、2. WIND1 に制御される体細胞胚誘導に関わる遺伝子の同定、3. 体細胞胚誘導における WIND1 とヒストンアセチル化の関係、4. 体細胞胚誘導が起こる細胞/組織の特定、の4つの課題に取り組んだ。

#### 【1. ストレス誘導性体細胞胚形成における WIND1 の役割】

傷害ストレスと同様に、高浸透圧ストレス処理をした後、直ちに WIND1 の発現が上昇することをこれまでの予備実験から見出している。そこで、高浸透圧処理による体細胞胚誘導条件と高濃度オーキシン処理による体細胞胚誘導条件において、野生株と WIND1 機能抑制変異体(WIND1-SRDX)の体細胞胚誘導率を比較した。

#### 【2. WIND1 に制御される体細胞胚誘導に関わる遺伝子の同定】

WIND1 の過剰発現で体細胞胚が誘導される系にヒストンアセチル化(HAT)阻害剤を処理する。この実験系において、経時的トランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現の差異から重要な遺伝子を特定する。変異体、マーカーラインを用いた遺伝学的解析を進め、WIND1 下流の体細胞胚誘導に関与する因子を同定する。

#### 【3. 体細胞胚誘導における WIND1 とヒストンアセチル化の関係】

WIND1 発現誘導系植物を用いて経時的ヒストン ChIP-seq 解析を行い、どの領域のヒストンアセチル化が変化するかをゲノムワイドに捉え、課題2の遺伝子発現解析との相関から体細胞胚誘導に関与する重要因子を絞り込む。WIND1 タンパク質とヒストン修飾酵素が相互作用するという仮説を立て、Y2H 法や Co-IP 法によりその関係性を明らかにする。

#### 【4. 体細胞胚誘導が起こる細胞/組織の特定】

高浸透圧処理による体細胞胚誘導条件や WIND1 誘導で生じる体細胞胚形成は、どの細胞・組織から生じるか特定するために、染色液(SudanRed など)や胚性遺伝子マーカー(LEC2-GFP など)を用いて、WIND1 誘導後の組織学解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 【1. ストレス誘導性体細胞胚形成における WIND1 の役割】

発芽後のシロイヌナズナ植物体に対して、マンニトールを用いた既報の体細胞胚誘導法を試した。野生株における体細胞胚誘導の割合が数%であったものの、WIND1 機能抑制変異体(WIND1-SRDX)では体細胞胚の誘導が抑えられる結果を得た。しかしながら、繰り返しの実験において野生株での体細胞胚誘導がばらついたため、統計的に有意な結果となっていない。一方、シロイヌナズナ未熟胚に高濃度オーキシンを処理して体細胞胚を誘導する既報の手法においては、WIND1-SRDX 植物体は再現良く体細胞胚誘導を抑えた。これらの結果から、少なくとも高濃度オーキシンストレスによる体細胞胚誘導では WIND1 が関与していることが明らかとなった。

#### 【2. WIND1 に制御される体細胞胚誘導に関わる遺伝子の同定】

WIND1 過剰発現による体細胞胚誘導時にヒストンアセチル化酵素(HAT)阻害剤を処理したところ、体細胞胚誘導効率が大幅に下がった。この実験系において、経時的トランスクリプトーム解析を行った。WIND1 発現誘導後に *LEC2*、*LEC1* などの胚発生関連転写因子の遺伝子が発現上昇するが、HAT 阻害剤を処理した試験区では、発現促進が抑えられた。*lec2* 機能欠損変異体と WIND1 発現誘導系植物を掛け合わせたところ、*lec2* 変異を有する後代の植物体では体細胞胚誘導が大幅に抑えられた。ゲルシフトアッセイから、WIND1 が *LEC2* のゲノム領域に直接結合できることもわかった。これらの結果から、WIND1 による体細胞胚誘導には、直接下流因子として存在 *LEC2* が必要であることが明らかとなった。

#### 【3. 体細胞胚誘導における WIND1 とヒストンアセチル化の関係】

WIND1 発現誘導系植物を用いて経時的なヒストン ChIP-seq 解析を行った所、WIND1 の誘導によってヒストンアセチル化が増すゲノム領域が存在することが明らかとなった。この中には、*LEC2* 領域も含まれていたため、2 での検討の結果と矛盾しない。WIND1 タンパク質をベイトに用いた Y2H 法と Co-IP 法を行った所、両方の解析で WIND1 が ADA2 という HAT との結合能を有するタンパク質と結合することがわかった。同時に、実際に ADA2 が HAT と結合すること、WIND1 は直接 HAT とは結合しないことも確かめた。これらの結果から、*LEC2* 領域は WIND1 と ADA2 を介したヒストンアセチル化酵素の複合体によってヒストンのアセチル化が起こるといふ次の仮説を立てることができた。現在、この仮説を証明する実験を進めている。

#### 【4. 体細胞胚誘導が起こる細胞/組織の特定】

胚を特異的に染める染色液(SudanRed)を用いた実験から、WIND1 誘導で生じる体細胞胚形成は茎頂付近の本葉の付け根付近の内部の組織細胞から起こることがわかった。現在、別のマーカーラインを用いたより高い解像度の実験を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Serivichyaswat Phanu T., Bartusch Kai, Leso Martina, Musseau Constance, Iwase Akira, Chen Yu, Sugimoto Keiko, Quint Marcel, Melnyk Charles W.	4. 巻 149
2. 論文標題 High temperature perception in leaves promotes vascular regeneration and graft formation in distant tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwase Akira, Takebayashi Arika, Aoi Yuki, Favero David S, Watanabe Shunsuke, Seo Mitsunori, Kasahara Hiroyuki, Sugimoto Keiko	4. 巻 39
2. 論文標題 4-Phenylbutyric acid promotes plant regeneration as an auxin by being converted to phenylacetic acid via an IBR3-independent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 51～58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1224b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Lambolez Alice, Kawamura Ayako, Takahashi Tatsuya, Rymen Bart, Iwase Akira, Favero David S, Ikeuchi Momoko, Suzuki Takamasa, Cortijo Sandra, Jaeger Katja E, Wigge Philip A, Sugimoto Keiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Warm Temperature Promotes Shoot Regeneration in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 pcac017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwase Akira, Kondo Yuki, Laohavisit Anuphon, Takebayashi Arika, Ikeuchi Momoko, Matsuoka Keita, Asahina Masashi, Mitsuda Nobutaka, Shirasu Ken, Fukuda Hiroo, Sugimoto Keiko	4. 巻 232
2. 論文標題 WIND transcription factors orchestrate wound induced callus formation, vascular reconnection and defense response in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 734～752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17594	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Duncan Coleman, Ayako Kawamura, Momoko Ikeuchi, David Seth Favero, Alice Lambolez, Bart Rymen, Akira Iwase, Takamasa Suzuki, Keiko Sugimoto	4. 巻 184
2. 論文標題 The SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates shoot regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 330-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩瀬 哲, 竹林 有理佳, 河村 彩子, 鈴木孝征, 杉本慶子
2. 発表標題 シロイヌナズナ体細胞胚誘導の分子メカニズム
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩瀬 哲, 竹林 有理佳, 河村 彩子, 鈴木 孝征, 杉本 慶子
2. 発表標題 A possible function of WIND1 transcription factor as an epigenetic regulator
3. 学会等名 第63回植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------