

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770053

研究課題名(和文) 傷害ストレスは如何にして脱分化を誘導するのか？

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of wound-triggered cell dedifferentiation

研究代表者

岩瀬 哲 (IWASE, AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40553764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：WIND1はシロイヌナズナにおいて傷害部位での細胞の脱分化とカルス形成を正に制御する転写因子であるが、傷害ストレスやその他のストレスがどのようにWIND1の発現を活性化させるかは分かっていない。本研究では酵母ワンハイブリッド解析から選抜されてきた熱ショック応答に関連する因子が、WIND1の上流因子として植物細胞の脱分化に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：WIND1 is wound inducible transcription factor which positively regulates cell dedifferentiation and callus formation at wound site of Arabidopsis. Yeast one hybrid analysis revealed that a heat shock (HS)-related transcription factor is one candidates of WIND1-upstream factor. This factor is upregulated by not only heat shock but also by wound. When plants are treated on heat-stress condition, WIND1 expression is upregulated and plant comes to form callus easily. WIND1 loss of function suppresses this callus induction, suggesting WIND1 participates in heat inducible cell dedifferentiation. Level of WIND1 expression in the loss-of-function mutant of the HS-related transcription factor is smaller than that of wild-type plants under both normal and heat stress condition. These results and other observations clarified that there is HS-triggered cell dedifferentiation cascade, which is mediated by HS-related factor and WIND1.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：脱分化 分化全能性 カルス形成 ストレス応答 AP2/ERF型転写因子 細胞リプログラミング 植物ホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

植物の脱分化細胞塊であるカルスは植物組織の傷害部位に形成され、活発に分裂する不定形の細胞で構成されている。傷害によるカルス形成に関しては200年以上前から報告があるとされる。20世紀半ばに植物組織片からの脱分化と再分化には、植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンの濃度比が影響を与える事が示され、*in vitro*でのカルス培養法と組織の再分化法が確立された。またニンジン細胞の不定胚誘導系を用いた研究により、熱ストレスや浸透圧、重金属イオン等のストレスが外因性の植物ホルモン非依存的に植物細胞の脱分化を促進することが明らかになっている。これらの基礎的研究から、植物の脱分化細胞は長年に渡り植物細胞の生理機能の解明等、基礎科学の実験材料としてのみならず有用物質生産や新品種作製等の応用科学にも広く用いられてきた。しかし、傷害をはじめとするストレスがどのように脱分化を促進するのか、また脱分化細胞の細胞特性がどのように維持されるのかといった分子メカニズムはこれまでほとんど明らかにされておらず、広く生物科学における重要な研究課題の一つとなっている。

### 2. 研究の目的

このような背景から、申請者は、脱分化の誘導およびその維持に必須な遺伝子を明らかにしようと考え、シロイヌナズナ植物体を用いた研究から、AP2/ERFファミリーに属す転写因子 *WIND1* が傷害ストレスで発現が促進し細胞の脱分化を促進する事をこれまでに明らかにしてきた。しかし *WIND1* がどのような因子によって発現誘導されるかは明らかになっていない。本研究では、*WIND1* の上流因子の探索を通して、傷害やその他のストレスがどのような分子メカニズムで *WIND1* を活性化するかを明らかにすることを目的とした。より具体的には、*WIND1* の発現を促進する転写因子を単離すること、傷害によって誘導される因子として活性酸素種(ROS)が知られているため、ROS が *WIND1* の発現やカルス形成へどのような影響を与えるかに関して研究を進めた。

### 3. 研究の方法

*WIND1* の発現を促進する転写因子を単離するために、*WIND1* プロモーター配列を bait とし、Yeast One Hybrid (Y1H) システムによる *WIND1* の直接上流転写因子のスクリーニングを行った。候補因子に対して、培養細胞を用いた一過的遺伝子発現系により *WIND1* のプロモーター配列に対して転写活性化能を調べた。さらに Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法によって、上流候補因子が直接 *WIND1* のプロモーターに結合するか確かめた。また、候補因子の機能欠損株における、ストレス時/非ストレス時の *WIND1* の発現や、カルス誘導時における形質を調べた。

ROS の関与を調べる実験においては、ROS として  $H_2O_2$  を処理した植物体における遺伝子解析や、活性酸素種の蓄積に関するシロイヌナズナ変異株を用いたカルス誘導アッセイ等を行った。

### 4. 研究成果

Y1H スクリーニングを行った所、上流転写因子候補の一つとして熱ショックに関連する転写因子 HSF が単離された。実際 HSF の過剰発現 (*HSF<sub>ox</sub>*) は、培養細胞を用いた一過的遺伝子発現系において *WIND1* のプロモーター配列に対してコントロールベクター比で約 40 倍の転写活性化能を有していた。*HSF* のホモログ遺伝子も同様に転写活性化能を有していたが、これらの因子は熱ストレスのみならず傷害によっても遺伝子発現が促進することが報告されている。実際、*HSF* の mRNA 量は傷害ストレスを与えた組織では、調査した最も早い試験区である処理後 1 時間で上昇していた。これらの因子は public database (Atted-II) においても *WIND1* の共発現遺伝子として高位にランクされるが、これはシロイヌナズナ生体内での *WIND1* 発現パターンが *HSF* と似ていることを示しており、*HSF* が *WIND1* の発現を正に制御する可能性を示唆するものである。

*WIND1* は熱ストレスでも発現誘導され脱分化を促進することが予想されたため、野生株と *WIND1* 機能抑制株 (*WIND-SRDX*) に熱ストレスを与え、その後植物ホルモンを含まない通常条件で培養したところ、野生株ではカルス化が観られたのに対し、*WIND-SRDX* では観られなかった。この結果から、*WIND1* 依存的な熱ストレス誘導性の脱分化経路がシロイヌナズナに存在することが分かった。さらに、*HSF* の機能欠損株では、熱ストレス誘導性のカルス化が抑制されること、通常条件および熱ストレス条件下で *WIND1* の発現がコントロールに比べて抑えられることから、熱ストレス→*HSF*→*WIND1*→脱分化という経路が存在することが明らかとなった。

*HSF* による *WIND1* の発現制御が直接的であるか、別の因子を介した非直接的なものかについては、現在 ChIP 法により解析を進めている段階で、結論には至っていない。*HSF* が認識するシス配列を有する既知の遺伝子のプロモーターに対しては、免疫沈降後に単離されるゲノム DNA の断片が有意に濃縮していることから、ChIP 実験は良好に進んでいる。

シロイヌナズナの黄化胚軸を切断すると、切断面にカルスが形成される。この実験系において、 $H_2O_2$  生成を可視化するために 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 染色を行ったところ、切断面において  $H_2O_2$  が生成していることが確認された(図1:茶色に染まっている部分)。しかしながら、 $H_2O_2$  を処理した植物体では、 $H_2O_2$  応答性が知られている *glutathione S-transferase tau 5 (GSTU5)* の発現

上昇は観られたものの、WIND1 の発現上昇

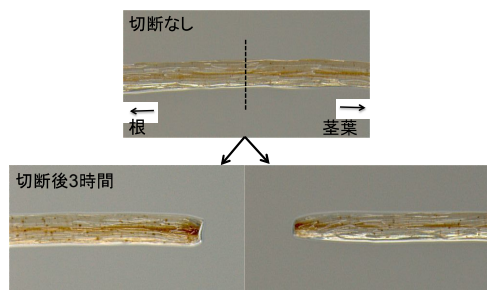


図1. DAB染色によりシロイヌナズナ胚軸切断面において $H_2O_2$ が生成していることが示された。

は観られなかった(図 2)。さらに、傷害時の ROS の過剰な蓄積が起こる変異株(*mpk8-1*、*mpk8-2* 等)や、逆に傷害時の ROS の蓄積が起こりにくい変異株(*MPK8-GFP*、*rbohD-1* 等)のいずれにおいても、傷害誘導性のカルス形成には影響が見られなかった。これらの結果から、シロイヌナズナの切断胚軸におけるカルス形成においては、傷害部位で生成する  $H_2O_2$  の関与は非常に少ないことが示唆された。

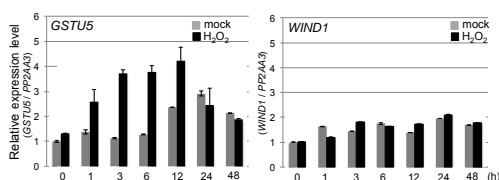


図2.  $H_2O_2$  (2mM) 処理した植物体では WIND1 の発現は上昇しない。

## 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 4 件)

Akira Iwase, Masaru Ohme-Takagi and Keiko Sugimoto. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1943-1945 (2011) 査読あり  
doi: 10.4161/psb.6.12.18266

Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto and Akira Iwase. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173 (2013) 査読あり  
doi: 10.1105/tpc.113.116053

Rebecca Lyons, Akira Iwase, Thomas Gansewig, Alexander Sherstnev, Celine Duc, Geoffrey J. Barton, Kousuke Hanada, Mieko Higuchi-Takeuchi, Minami Matsui, Keiko Sugimoto, Kemal Kazan, Gordon G. Simpson.

Ken Shirasu. The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Scientific Reports* 3: 2866 (2013) 査読あり  
doi: 10.1038/srep02866

Akira Iwase, Nobutaka Mitsuda, Momoko Ikeuchi, Mariko Ohnuma, Chie Koizuka, Koich Kawamoto, Jun Imamura, Hiroshi Ezura, Keiko Sugimoto. Arabidopsis WIND1 induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Signaling & Behavior* 8: e27432 (2013) 査読あり  
doi: 10.4161/psb.27432

[学会発表](計 9 件)

Iwase A, Ohme-Takagi, and Sugimoto K. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. International Conference on Arabidopsis Research (Madison USA, June 23, 2011)

岩瀬 哲、杉本 慶子 WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. International symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change" (倉敷市 2011 年 12 月 10 日)

Akira Iwase, Keiko Sugimoto. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. Keystone Symposia: Nuclear Events in Plant Gene Expression and Signaling (New Mexico, USA, March 7, 2012).

Akira Iwase, Keiko Sugimoto. WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation. 第 53 回日本植物生理学会年会 (京都市 2012 年 3 月 17 日)

Akira Iwase, Keiko Sugimoto. MOLECULAR NETWORK OF PLANT DEDIFFERENTIATION. 23rd International Conference on Arabidopsis Research (Vienna, Austria, July 4, 2012)

Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Mariko Ohnuma, Keiko Sugimoto. Molecular network of plant dedifferentiation. The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium (Okazaki, Aichi, November 20, 2012)

Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Mariko Ohnuma, Keiko Sugimoto. Plant cell dedifferentiation under environmental stress. 第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山市,

March 21, 2013)

岩瀬哲、池内桃子、杉本慶子 ストレスによる細胞リプログラミング 第 77 回日本植物学会年会 (札幌市、2013 年 9 月 13 日)

Akira Iwase, Mariko Ohnuma, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. ESR1 functions downstream of WIND1 to mediate wound-induced cell reprogramming in Arabidopsis. 第 55 回日本植物生理学会年会 (富山市、2014 年 3 月 18 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：植物の脱分化細胞製造方法及び植物細胞の脱分化誘導剤  
発明者：岩瀬哲、杉本慶子、池内桃子  
権利者：独立行政法人理化学研究所  
種類：特願  
番号：2014-090532  
出願年月日：2014 年 4 月 24 日  
国内外の別：国内特許

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://cellfunction.riken.jp/News/News\\_newest\\_.html](http://cellfunction.riken.jp/News/News_newest_.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩瀬 哲 (IWASE AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40553764