

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440143

研究課題名(和文) シロイヌナズナの組織培養における側根原基から茎頂メリステムへの転換機構

研究課題名(英文) Mechanism of transdifferentiation from lateral root meristem to shoot apical meristem in Arabidopsis tissue culture

研究代表者

坂野 弘美 (BANNO, Hiroharu)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80340206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の遺伝子組換え体作成は、根、茎、葉などの細胞に外来遺伝子を導入し、その導入された単一細胞を組織培養することにより、外来遺伝子を組み込んだ個体を再生させる。しかし、再分化効率が低すぎるために遺伝子組換え体を作製できない植物種も少なくない。本研究では、根・茎などの地上部を再生させる分裂細胞を作り出すための研究を行った。その結果、無秩序に分裂する細胞から地上部組織を作り出すための分裂組織を作り出すスイッチとなるタンパク質と結合してそのスイッチを制御する可能性があるタンパク質を同定した。また、サイトカニン合成酵素の強制発現がESR1の発現を上昇させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genetically modified plants are produced by introducing extracellular genes to a single cell from plant tissues and regenerate the cell to a whole plant. However, some species cannot be produced since their regeneration efficiencies are too low. In this study, we identified proteins that interact with a switch protein for transition from unorganized dividing cells to meristematic cells producing leaves and stems. The proteins may cooperatively control the transition with the switch protein. Also, over expression of cytokinin synthesis genes up-regulate ESR1 expression.

研究分野：植物組織培養

キーワード：組織培養 個体再生

## 1. 研究開始当初の背景

組織培養によるシュート形成は、多くの植物種から遺伝子組換え体を作製する重要なステップであり、シュート形成効率が低すぎるために遺伝子組換え体を作製できない植物種、品種も少なくない。古典的な分化全能性研究は、組織培養に与える植物ホルモンの効果を中心としていたが、近年になり、植物ホルモンの作用機作や茎頂メリステム形成の分子機構が解明されつつあり、これらの知見を組織培養における茎頂メリステム形成に結びつける段階に入りつつある。

これまで、組織培養により細胞分裂が誘導される細胞の由来は不明であったが、Attaら(Plant J, 2009)は、シロイヌナズナの根及び胚軸切片を 2,4-D を含むカルス誘導培地で組織培養すると側根形成によく似た機構で細胞増殖が誘導され、その後のサイトカイニンを含むシュート誘導培地上での培養により、LRM 様構造が SAM 様構造に転換することを見いだした。また、Sugimotoら(Dev. Cell, 2010)は地上部の組織片からも、カルス誘導培地で培養することにより LRM に似た構造が形成され、その後にシュート誘導培地で培養することにより根切片からと同様な機構でシュートが形成することを報告している。従って、LRM 様構造経由の器官再分化は、シロイヌナズナの組織培養による器官再分化の一般的な機構であると考えられる。

シロイヌナズナ転写制御因子

### ENHANCER OF SHOOT

REGENERATION 1 (*ESR1*) は、組織培養における SAM 形成の制御に関与していると考えられていた (Banno et al., Plant Cell, 2001, Mase, et al. Plant Biotech., 2007)。我々が作製した *esr1 esr2* 二重変異株は、組織培養におけるシュート形成効率が著しく低下することを明らかにしている (Matsuo, et al., 2008)。

*ESR1*, *ESR2* は植物特有の DNA 結合モチーフである AP2/ERF ドメインを持つ AP2/ERF スーパーファミリーに属しているが、我々はこれまでの研究で、*ESR1* 産物のタンパク質としての機能を解析してきている (図 1)。それらの研究の中で、*ESR1* は転写活性化因子であり、AP2/ERF ドメインが GCCGCC 配列に結合し、*ESR* モチーフがその転写活性化能を担っていることを明らかに

している。(Matsuo, et al., 2009)、*ESR1*

## 2. 研究の目的

*ESR1*, *ESR2* は組織培養過程において、シュート誘導培地中のサイトカイニンにより発現が誘導されるが、この発現誘導にはカルス誘導培地での前培養が必須である (Banno et al., 2001)。このことは、植物組織片をカルス誘導培地で培養することにより LRM 様構造が形成され、その後でしかサイトカイニンによるシュート分化誘導を受けないことを意味している。また、蛍光タンパク質及び、GUS をレポーターに用いた実験から、*ESR1* はカルス誘導培地で前培養した根切片をシュート誘導培地に移すと、その直後から LRM 様構造中の数細胞で発現し始め、その *ESR1* を発現している細胞が増殖して SAM 様構造を形成することを見出した (Matsuo et al., 2011)。*ESR1* はその後も発現を続け、*ESR1* の発現が続いた場所のみから *ESR2* が発現し、その *ESR2* の発現は初期の SAM 形成中に始まることが明らかとなった。これらの結果は、*ESR1* が LRM から SAM への転換に関わり、その後、*ESR1*, *ESR2* が初期の SAM 形成に関わっている可能性を示唆している。従って、*ESR1* がシュート分化へと導く分子機構を明らかにすることは、どのようにして LRM から SAM 形成に至るかを解明するための重要な鍵になると考えられる。本研究では、LRM 内の数細胞で *ESR1* の発現が誘導される分子機構を中心に、組織培養による SAM 形成における *ESR1*, *ESR2* の機能の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) *ESR1* の発現を制御する因子の同定

我々は、*ESR1* プロモーター(*ESR1p*::GFP 及び *ESR1p*::GUS を組み込んだシロイヌナズナの培養組織を用いて、シュート再生過程における *ESR1* の詳細な発現パターンを調べてきた。*ESR1* は、カルス誘導培地 (CIM) では発現が検出されないが、シュート誘導培地 (SIM) に移して 1 日目から発現が検出され、その *ESR1* を発現する細胞群が増殖し、5~7 日後に SAM の形成に至ることを見いだした。従って、LRM において、*ESR1* の発現を誘導する因子こそが LRM から SAM への転換のスイッチになっていると推定され

る。そこで我々は、LRM において *ESR1* の発現を制御している因子の同定を試みた。*ESR1p::LUC* (ルシフェラーゼ) を組み込んだ根切片を CIM 上で 4 日間培養することにより、LRM 様構造を誘導した後に、アクティベーションタギングベクターをアグロバクテリウムを介して形質転換し、サイトカニンを含まない MS 培地に移して培養したときに、LUC 活性を示す形質転換組織をルミネッセンスイメージングシステムを用いてスクリーニングした。もし、形質転換体が LUC 活性を示せば、アクティベーションタギングにより強制発現させた遺伝子の効果によって *ESR1* プロモーターが活性化されたことを意味する。

(2) *ESR1*, *ESR2* と他の SAM 形成に関わる遺伝子の発現パターンの解析

*ESR1p::GFP* あるいは、*ESR2p::CFP* を導入したシロイヌナズナ個体を作成した。25 年度は、さらに、*WUS*, *CUC1* のプロモーター::レポーター (YFP) を構築し、*ESR1p::GFP* 及び *ESR2p::CFP* を組み込んだ株に導入した。その形質転換体を用いて、*ESR1*, *ESR2* とこれらの遺伝子の培養組織における発現の詳細な位置関係を解析した。*esr1* あるいは *esr2* 変異株に上記の *WUS*, *CUC1* プロモーター::YFP を導入し、発現パターンを調べた。

(3) ESR モチーフに結合するタンパク質の同定

*ESR1*・*ESR2* は植物特有の DNA 結合モチーフである AP2/ERF ドメインを持つ AP2/ERF スーパーファミリーに属している。*ESR1* と *ESR2* のアミノ酸配列を比較したとき、AP2/ERF ドメインは非常によく似ているが、それ以外の領域では、C 末端領域に短い類似配列 (ESR モチーフ) が見られる以外には相同性がない。エフェクターリポーターアッセイにより、ESR モチーフは転写活性化能を担っているが、組織培養におけるシュート形成促進能を指標にして、部分的な欠失が *ESR1* の活性に与える影響を調べたところ、ESR モチーフを強力な転写活性化能をもつ VP16 ペプチド配列と交換すると、シュート形成能を失うことが明らかになっている

(Nomura et al., 2009)。すなわち、ESR モチーフは転写活性化能だけでなく、*ESR1* の活性に必須な未知の機能を持つと考えられる。そこで我々は、ESR モチーフに結合する

タンパク質の同定を試みた。ESR モチーフは酵母細胞においても強い転写活性化能を持つため、通常の酵母 Two-Hybrid System を用いることはできない。そこで我々は、酵母 Split-Trp センサーを応用した方法で ESR モチーフに結合するタンパク質の同定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *ESR1* の発現を制御する因子の同定

当初、35S プロモーターのエンハンサー配列を用いたアクティベーションタギングベクターを用いたが、その後、我々はエストロゲンの添加により発現を誘導できるアクティベーションベクターを開発した。この系では、35S プロモーターを用いて人工転写制御因子 XVE を発現させるが、XVE タンパク質は、エストロゲンレセプターのエストロゲン結合領域が細胞質において HSP90 複合体に結合して核に移行できないために機能しない。しかし、エストロゲンを加えると、エストロゲンがレセプター部に結合することにより立体構造が変化し、XVE が HSP90 複合体から解放されて核に移行する。XVE は、LexA の DNA 結合領域を持ち、その認識配列 LexA OP に結合する。また、植物でも機能できる動物ウイルス由来の強力な転写活性化能を持つ VP16 ペプチドにより強力にその近傍遺伝子の発現を誘導する。このベクターの利点は、薬剤で表現型が誘導されるために、薬剤を投与した場合と投与しない場合で比較すればエンハンサー配列の挿入によりその表現型が引き起こされる証明になる。*ESR1p::LUC* を導入したシロイヌナズナの根切片由来の培養組織に誘導アクティベーションベクターを導入し、約 10,000 の形質転換カルスをスクリーニングした。その結果、エストロゲン依存的にルシフェラーゼ活性が上昇する 2 つのカルスを得た。これらのカルス中の T-DNA 挿入場所を調べたところ、1 つは、*IPT4* 遺伝子の翻訳開始コドンの上流約 400bp に、もう 1 つは、*IPT8* 遺伝子の翻訳開始コドンの上流約 700bp に T-DNA が挿入されていた。これらの遺伝子はいずれもサイトカニン合成酵素をコードしている。*ESR1* は、LRM 様組織を誘導した後、サイトカニンを加えることにより、LRM 様組織の一部で発現を開始し、その細胞が増殖し

て SAM を形成させることが明らかになっているため、*IPT* 遺伝子の発現誘導によりサイトカイニンが合成され、その結果、*ESR1* プロモーターが活性化されたと推定される。

(2) *ESR1*, *ESR2* と他の SAM 形成に関わる遺伝子の発現パターンの解析

WUSp::YFP, CUC1p::YFP を導入したシロイヌナズナを作製した。それらを組織培養し、シュート再生過程における発現パターンを調べた。しかし、いずれも発現量が少ないためか、自家蛍光以上の蛍光を検出できず、組織培養過程における発現パターンの解析に用いることができなかった。

(3) ESR モチーフに結合するタンパク質の同定

Split-Trp法を用いてESRモチーフに結合するタンパク質の探索を行った。その結果、4種類のタンパク質 (At2G05540, At3G02220, At3G51780, At4G28703) を同定したが、すべて機能が未知のタンパク質であった。ESR1は転写制御因子であることから、その結合タンパク質も核に存在すると考えられるが、これらのうちの1つ ESR1-Interacting Candidate 1 (EIC1; At3G02220) はGFPとの融合タンパク質が核に局在することを明らかにした。

EIC1-GFP融合遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの制御下でタマネギ表皮細胞にパーティクルガンを用いて導入し、蛍光を観察した。その結果、EIC1-GFP融合タンパク質は核特異的に局在した。このことは、EIC1タンパク質が核タンパク質であることを示しており、転写制御因子であるESR1と核内で相互作用するという仮説と矛盾しない。その後、酵母細胞からの共免疫沈降実験により、酵母内で、ESR1との相互作用が検出されたが、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて相互作用を調べたところ、ESR1とEIC1の結合は見られなかった。これらの結果は、ESR1とEIC1の相互作用には真核生物特有の修飾が必要である可能性を示唆している。あるいは、酵母細胞におけるESR1とEIC1の結合は酵母細胞の核タンパク質により仲介されていた可能性も排除できない。

## 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2件)

- ① Aoshima, K., Kurachi, K., Yamada, K., Banno, H., Cloning of EgEXPA1 promoter by adaptor ligation mediated PCR, Annual Report of Res. Inst. Bio. Func., 査読無, in press, 2016
- ② Kubo, C., Nomura, N., Matsuo, N., Banno, H. Identification of proteins that interact with a plant nuclear protein using the yeast split-Trp sensor, Plant Biotechnology, 査読有, 31, 289-291, 2014.

[学会発表] (計1件)

- ① 坂野弘美、久保久保慈子、青木一宏和、志水裕司、シロイヌナズナ ESR1 結合タンパク質の同定、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学(富山県・富山市)。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 弘美 (BANNO, Hiroharu)  
中部大学・応用生物学部・教授  
研究者番号：80340206

(2) 研究分担者

中村 研三 (NAKAMURA, Kenzo)  
中部大学・応用生物学部・教授  
研究者番号：80164292