

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18565

研究課題名(和文) 脱分化から茎葉再分化への分子カスケード

研究課題名(英文) Dedifferentiation to redifferentiation: Molecular mechanism on de novo shoot formation at wound site

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・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)：傷害ストレスによって誘発される植物のカルス形成と、引き続いて起こる組織の再分化は自然界でも組織培養環境下でも見られるが、その分子メカニズムは良くわかっていない。本研究では、シロイヌナズナの傷害応答性転写因子に着目することで、植物が傷口で細胞リプログラミングを引き起こすだけでなく、茎葉再分化を積極的に促進するための階層的な転写因子ネットワークを有していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Callus formation and successive de novo organogenesis are seen in nature and in vitro; however, the molecular mechanisms underlying this control remain poorly understood. In this study, we investigated how wound induced-transcription factors promote callus formation and shoot regeneration at wound site of Arabidopsis.

研究分野：植物生理学

キーワード：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 傷害応答 ストレス 分化全能性

1. 研究開始当初の背景

傷害ストレスからの器官再生現象は動植物問わず広く見られる¹。植物では傷害部位をカルス細胞で覆うことで外界から生体内部を保護し、更に組織・器官を再分化させて傷を修復することが知られている。分化全能性に裏打ちされた植物のこの柔軟な細胞分化の可塑性は、挿し木や葉挿しによるクローン増殖等、農業的にも古くから利用されてきた。傷害部位において一度分化した細胞が分裂を再開し、幹細胞を新生する等の劇的な変化が起きるにも関わらず、一連の分子メカニズムは分からないことが多い。研究代表者はシロイヌナズナを用いたこれまでの研究から、傷害部位で発現が上昇しカルス形成を正に制御する転写因子 WIND1 を見出している^{2,3}。興味深いことに、WIND1 の過剰発現によって生じるカルスは、シロイヌナズナに限らず、トマトやタバコにおいても葉茎の再生が起り易い^{4,5}。これらの事実から WIND1 の下流因子には、細胞分裂を促進する因子のみならず茎葉への再分化を促進する因子が存在することが予想された。

2. 研究の目的

WIND1 の過剰発現植物では、組織培養条件において茎葉再分化を促進することが知られている複数の転写因子の遺伝子が発現上昇しており、これらの転写因子が WIND1 の下流因子として存在することが予想された。本研究では、茎葉再生を司る転写因子が WIND1 の下流因子として存在し、細胞分裂および茎葉への再分化を促進するという仮説を立て、傷害誘導性のカルス形成と茎葉再分化現象における役割や、WIND1 による発現制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

生化学的および分子遺伝学的アプローチを用いて解析を進めた。着目する遺伝子の機能欠損、機能獲得変異体やマーカーラインを用いてカルス形成や茎葉形成を評価し機能解析を進めると共に、遺伝子一過的発現系、ChIP-qPCR 解析、EMSA 解析等を組み合わせ、遺伝子発現の制御様式や WIND1 が結合する cis 配列を決定した。

4. 研究成果

WIND1 遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナでどのような遺伝子が発現しているかを調べた所、転写因子 ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 (ESR1) の遺伝子が多く発現していた。傷口で WIND1 が ESR1 遺伝子の発現を制御しているのであれば、傷口で ESR1 遺伝子の発現が促進されるはずである。実際、RT-qPCR 法によって ESR1 遺伝子の発現量を複数の組織の傷口で測定したところ、どの組織でも、傷つけてから数時間以内に発現量が上昇した。

また、プロモーターレポーター解析においても、傷口の維管束柔組織や前形成層の細胞、維管束の周りの葉肉細胞で特異的に ESR1 遺伝子のプロモーター活性が確認された。ESR1 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をつないだ ESR1-GFP タンパク質を ESR1 プロモーターで発現させたシロイヌナズナ (ESR1-GFP) でも、傷口の細胞の核で蛍光が観察された。傷をつけた後の WIND1 遺伝子の発現は ESR1 遺伝子より先に見られたこと、また、WIND1 の機能を抑制したシロイヌナズナ (WIND1-SRDX) では ESR1 遺伝子の発現が抑えられたことから、WIND1 が ESR1 遺伝子の発現に関与することが示唆された。実際 GFP 抗体を用いた ChIP-qPCR 解析、EMSA 解析および LUC レポーターを用いたトランスアクトベクションアッセイによって、WIND1 が ESR1 の翻訳開始点の約 150bp 上流の領域に直接結合し、ESR1 の発現を正に制御することが明らかになった。

次に ESR1 遺伝子が傷口のカルス形成に関わるかを調べた。ESR1 遺伝子の機能を抑制したシロイヌナズナ (*esr1* と ESR1-SRDX) および、ESR1 遺伝子が多く発現するようにしたシロイヌナズナ (*esr1-D* と ESR1-GFP) を用い、傷口でのカルス形成能を野生株と比較したところ、野生株と比べ、*esr1* と ESR1-SRDX はカルス形成が抑制され、*esr1-D* と ESR1-GFP はカルス形成が促進された。これにより、ESR1 遺伝子は傷口において、カルス形成を促進する機能を持つことが明らかになった。続いて、ESR1-GFP タンパク質を ESR1 プロモーターで発現させたシロイヌナズナ (ESR1-GFP) を用いて、傷をつけた組織(花茎、葉、子葉および根)を植物ホルモンを添加しない培地で培養した。用いたシロイヌナズナ野生株では、植物ホルモンを添加した培地で培養しないと茎葉は再生しないが、ESR1-GFP は植物ホルモンの添加なしに茎葉が再生した。ESR1-GFP では、傷をつけた後の ESR1 遺伝子の発現量がピーク時には野生株に比べ2倍ほど増えていたことから、傷口で ESR1 遺伝子の発現量を増加させると茎葉の再生が促進されると予想された。これを検証するため、遺伝子発現のタイミングを制御できる遺伝子発現誘導系のシロイヌナズナの葉を用いて、傷をつけた後に ESR1 遺伝子の発現を誘導したところ、培地に植物ホルモンを添加しない条件でも、傷口からの茎葉再生が著しく促進された。このことから、傷口で ESR1 遺伝子の発現量を増加させると茎葉の再生が促進されることが明らかになった。

ESR1 も転写因子であるため発現を制御する遺伝子(群)が存在すると考えられる。そこで、茎葉が著しく再生する組織培養の条件を用いて、ESR1 によって茎葉再生が制御される遺伝子を RT-qPCR 法で探索し

た。この組織培養条件では、*ESR1* 遺伝子の機能を抑制した *esr1* と *ESR1-SRDX* は、野生株に比べて茎葉の再生が抑えられ、逆に *ESR1* 遺伝子が多く発現するようにした *esr1-D* と *ESR1-GFP* では茎葉の再生が促進された。組織培養条件で茎葉再生に関与することが既に報告されている 12 個の転写因子の遺伝子について、野生株と *esr1* を比較したところ、*esr1* では *ESR2*、*CUC1*、*RAP2.6L*、*WUS*、*STM* の 5 個の遺伝子の発現が抑制された。この結果から、*ESR1* が制御する遺伝子には茎葉再生に関わる 5 個の転写因子が含まれることが分かった。これらの解析から、傷をつけたシロイヌナズナの組織には、*WIND1*→*ESR1* という転写因子のネットワークが存在し、そのネットワークによって傷口のカルス形成や茎葉再生が促進されることが明らかになった。これは、傷を受けた植物が単に傷口でカルス形成を誘導し傷を塞ぐだけでなく、そのカルスから新しい組織を再生させるための分子経路を持つことを示している。

その他、本研究では、*ESR1* 遺伝子の傷口での発現が植物ホルモンのオーキシンとサイトカイニンによって相乗的に促進することなども明らかにした。サイトカイニン応答に関わる *ARR1* と *ARR12* の機能抑制二重変異体 (*arr1*, *arr12*) でも、傷ストレス後の *ESR1* の発現量が減少することなども見いだすことができた。

<引用文献>

¹Stappenbeck and Miyoshi (2009) Science 324, 1666-1669.

²Iwase et al. (2005) Biotechnology Letters 27, 1097-1103.

³Iwase et al. (2011) Current Biology 21, 508-514.

⁴Iwase et al. (2013) Plant Signaling & Behavior 8, e27432.

⁵Iwase et al. (2015) Journal of Plant Research, 128, 389-397.

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 6 件)

- ① Kobayashi K, Iwase A (2017) Simultaneous but spatially different regulation of non-photosynthetic callus formation and photosynthetic root development after shoot removal. Plant Signaling & Behavior, e1338999. 査読有り
- ② 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 (2017) WIND1 Promotes Shoot Regeneration through Transcriptional Activation of

ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 in Arabidopsis. The Plant Cell 29, 54-69. 査読有り

- ③ Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K (2016) Plant regeneration : cellular origins and molecular mechanisms. Development 143, 1442-1451. 査読有り
- ④ Ikeuchi M, Iwase A, Sugimoto K (2015) Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. Current Opinion in Plant Biology 28, 60-67. 査読有り
- ⑤ Ikeuchi M*, Iwase A*, Rymen B, Harashima H, Shibata S, Ohnuma M, Breuer C, Morao A, de Lucas M, De Veylder L, Goodrich J, Brady S, Roudier F, Sugimoto K. (2015) PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. Nature Plants 1, 15089. *equally contributed. 査読有り
- ⑥ Iwase A, Mita K, Nonaka S, Ikeuchi M, Koizuka C, Ohnuma M, Ezura H, Imamura J, Sugimoto K (2015) WIND1-based acquisition of regeneration competency in Arabidopsis and rapeseed. Journal of Plant Research 128, 389-397. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- ① Akira Iwase, Bart Rymen, Momoko Ikeuchi, Ayako Kawamura, Takamasa Suzuki, Nobutaka Mitsuda and Keiko Sugimoto. Wound-induced cellular reprogramming in Arabidopsis. 第 59 回日本植物生理学会. 第 59 回日本植物生理学会. 2018 年 3 月 28 日
- ② Akira Iwase, Nobutaka Mitsuda, Kengo Morohashi, Takamasa Suzuki, Hirofumi Harashima, Momoko Ikeuchi, Bart Rymen, Erich Grotewold and Keiko Sugimoto. WIND1-induced cellular reprogramming in Arabidopsis. Cold Spring Harbor Asia, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response. 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市, 兵庫県) 2016 年 12 月 1 日
- ③ 岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子. ストレスで誘起される細胞リプログラミングの分子機構. 日本植物学会第 80 回大会シンポジウム Induced Development : 環境要因に誘発される発生の多様性と共通性 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市, 沖縄県) 2016 年 9 月 16 日
- ④ 岩瀬哲. 植物の脱分化・再分化にかかわ

る分子(転写因子と代謝産物)新学術領域 発生ロジック メタボローム研究会 鶴岡メタボロームキャンパス(山形県・鶴岡市)2016年2月13日

- ⑤ Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. Epigenetic control of plant cell dedifferentiation and redifferentiation. CREST Symposium “Towards Increased Plant Productivity through Understanding of Environmental Responses and Epigenetic Regulation” 理化学研究所(神奈川県・横浜市)2015年11月24日
- ⑥ Akira Iwase, Hirofumi Harashima, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. Shoot regeneration pathway upon stresses. 新学術領域研究「植物野成長可塑性を支える環境認識と記憶の自立分散型統御システム」第1回若手の会. ホテルウェルシーズン浜名湖(静岡県・浜松市). 2015年11月18日
- ⑦ Akira Iwase, Hirofumi Harashima, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. WIND1-derived redifferentiation pathway in Arabidopsis. IPBM (International Congress of Plant Molecular Biology) イグアス(ブラジル)2015年10月27日
- ⑧ 岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子. 分化した植物細胞はどこまで可塑性を発揮できるのか? 日本植物学会第79回大会シンポジウム 細胞機能の変容と循環を視る~可逆性と不可逆性から探る細胞分化の本質~ 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)2015年9月6日
- ⑨ Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. WINDs mediated-plant cell dedifferentiation pathway in Arabidopsis. International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium and Technical Workshop 2015 名古屋大学(愛知県・名古屋市)2015年8月27日
- ⑩ Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. Epigenetic control of plant cell dedifferentiation under environmental stresses. Cold Spring Harbor Asia Conferences, Frontiers of Plant Biology: Epigenetics & Development 蘇州(中国)2015年6月8日
- ⑪ Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto. Epigenetic control of plant cell dedifferentiation under environmental stresses. 第9回日本エピジェネティクス研究会年会 学術総合センター(東京都・千代田区)2015年5月26日

[図書](計 2件)

1. 岩瀬哲, 杉本慶子. 植物学の百科事典(共著:傷害応答担当)丸善 2016年6
2. 岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子. 植物の再生現象における分化全能性制御の分子機構 BSJ Review (植物科学の最前線)2016年

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○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

植物が傷口で茎葉を再生させる仕組み - 組織培養による植物の量産や有用物質生産に期待-

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170117_2/

6. 研究組織

(1)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・研究員

研究者番号: 40553764

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()