

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03704

研究課題名(和文) 植物の器官再生を制御する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of plant regeneration

研究代表者

杉本 慶子 (SUGIMOTO, Keiko)

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・チームリーダー

研究者番号：30455349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物の再生はオーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンによって著しく促進されるが、そのメカニズムは断片的にしか理解されていない。本研究では、enhanced yeast-one-hybrid解析を基に網羅的な転写制御ネットワークを構築し、この分子機構の解明を進めた。またクロマチンレベルの制御が器官再生において果たす役割を検討した。さらに、プロトプラストの実験系を導入し、高度に分化した細胞が脱分化を介して個体再生を行うしくみの解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ホルモンを用いた組織培養技術の確立は20世紀の植物生理学の発展の金字塔のひとつといっても過言ではないが、そのしくみについては驚くほど分かっていない。本研究は植物の器官再生を司る鍵遺伝子の転写制御関係を包括的に明らかにしようとする点に学術的意義がある。近年ゲノム編集技術が急速に進歩しているが、多くの主要作物において形質転換後の器官再生、特に茎葉再生の効率の低さが大きなボトルネックとなっている。本研究から茎葉再生制御のしくみが明らかになれば新たな組織培養技術の開発につながり、こうした問題の解決に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Plant regeneration is enhanced by auxin and cytokinin but molecular mechanisms underlying this control still remains obscure. In this study we developed a comprehensive gene regulatory network for plant regeneration based on enhanced yeast-one-hybrid analysis.

研究分野：植物細胞生物学、発生遺伝学

キーワード：器官再生 植物ホルモン 脱分化 再分化 シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞に比べて一般的に植物細胞は高い再生能力を示し、根や茎などの器官が傷害を受けてももとの形状を回復したり、新たな器官形成を誘導したりすることができる。こうした植物の再生能力は古くから知られており、接ぎ木や挿し木による有用品種の大量繁殖にも広く利用されてきた。一方、20世紀初頭からの生理学実験から、オーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが植物の器官再生を著しく向上させることが明らかになり、これらの植物ホルモンを培地に加えて外植片からカルスを形成し、さらにそのバランスを変えて茎葉や根を再生するという組織培養技術が活用されてきた。いったん最終分化した植物細胞が全能性を維持していることは、単一分化細胞がプロトプラスト化によって脱分化し、個体再生することを示した歴史的な実験から証明されているが、外植片からの器官再生には細胞の脱分化ではなく、比較的未分化な細胞の活性化を伴う場合があることも最近分かってきた。しかし植物細胞がどのようにこれらの分化転換を制御し、また植物ホルモンがどのようにこれらの過程を促進するのかがまだよくわかっていない。

私たちは器官再生が主に傷口で誘導されるという点に着目し、傷害ストレスによって植物細胞が脱分化、再分化する分子機構の解明を進めてきた。特に傷口で特異的に発現し、植物細胞の脱分化を促進する転写因子 WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) を発見し、WIND1 がサイトカイニンに対する応答性を高めることによって脱分化を誘導することを示した。直近の成果としては、WIND1 が茎葉再生を促進することの知られる *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 (ESR1)* の発現を直接誘導し、傷口でのカルス化及び茎葉再生を促進することを明らかにした。さらに組織培養条件下でオーキシンやサイトカイニンがどのように器官再生を促進するかを転写制御レベルで包括的に理解するため、enhanced yeast-one-hybrid 実験系を開発した Siobhan Brady 博士 (UC Davis) との共同研究を始め、植物の器官再生を司る転写制御ネットワークの構築を進めた。この実験系では再生に関与する(もしくは関与が予測される) 鍵遺伝子 48 個のプロモーターに結合する転写因子を網羅的に探索し、これまでに 1,162 個の転写因子-プロモーター結合を確認した。

こうした転写レベルでの再生制御機構の解明に加えて、私たちは細胞の分化転換がクロマチンレベルで制御されるしくみについても解析を進めており、ヒストン修飾を触媒する POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX2 (PRC2) が最終分化細胞の脱分化を抑制し、分化状態を積極的に維持することを発見した。さらに最近、ヒストンバリエーションの変異体では、オーキシン、サイトカイニンをを用いた組織培養条件下の茎葉再生が著しく昂進することを見いだした。これらの結果から、私たちはヒストンバリエーションによるクロマチンレベルの制御が組織培養条件下において茎葉再生に抑制的に働くという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、外植片とプロトプラストという二つの再生系を用いて、オーキシンとサイトカイニンが植物細胞の分化状態を転換し、カルス形成、器官再生を促進する分子機構の解明を進めることを目的とした。まず外植片からの再生系を用いて、現在構築中の再生転写ネットワークから予想される転写制御関係を検証した。この実験では既知の再生制御因子を軸とした転写制御ネットワークを明らかにするとともに、新規の制御因子を同定し、器官再生における役割を解明することを目指した。次に外植片からの再生系においてヒストンバリエーションが器官再生を抑制するしくみの解明を目指した。さらに高度に分化した細胞からの脱分化、再分化を経た個体再生を解析する系としてプロトプラストからの再生系を導入し、上記の解析から明らかになる転写レベル及びクロマチンレベルでの再生制御機構が最終分化細胞からの全能性発揮にどう関与するかを検証した。

3. 研究の方法

enhanced yeast-one-hybrid 解析の結果をさらに詳細に解析し、注目する転写因子が実際に再生誘導時に下流標的遺伝子のプロモーターに結合し、発現を制御しているのか、またその転写制御関係が再生に寄与しているのかどうかを調べた。またヒストンバリエーション変異体の表現型解析を通して器官再生のどのステップを制御しているかを明らかにするとともに、このしくみによって発現制御を受ける遺伝子を同定し、ヒストンバリエーションが茎葉再生を抑制する分子機構を解析した。さらに外植片からの器官再生を制御する鍵遺伝子の欠損変異体や過剰発現体から調整する葉肉プロトプラストを用いて脱分化、再分化の表現型を解析し、最終分化細胞からの全能性発揮を制御する分子機構の解明に着手した。

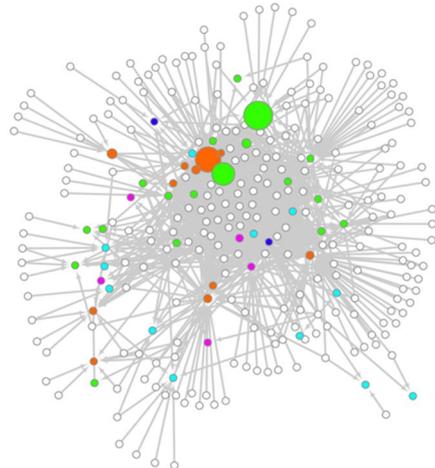


図1 enhanced yeast-one-hybrid 解析から予想される植物の再生を司る遺伝子発現制御ネットワークの全体像。

4. 研究成果

(1) 器官再生を司る転写制御ネットワークの解明

enhanced yeast-one-hybrid 解析から得られた1,162個の転写因子-プロモーター結合について詳細なネットワーク解析を行った (Ikeuchi and Shibata et al. 2018, 図1)。特に傷害誘導することの分かっている転写因子と植物ホルモンによって誘導されることが分かっている転写因子がどういった下流遺伝子のプロモーターに結合し、ネットワークを形成するのかを検討したところ、傷害誘導性の遺伝子発現ネットワークと植物ホルモン誘導性の遺伝子発現ネットワークは多層的に交差し、協調的にストレス応答、サイトカイニン、オーキシン、細胞増殖、発生に関与する多くの遺伝子の発現を制御することが見えてきた (図2)。またこれまでに再生に関与することが報告されている *PLETHORA3* (*PLT3*) 遺伝子、*ESR1* 遺伝子と高温ストレスによって活性化することの知られている *HEAT SHOCK FACTOR B1* (*HSFB1*) 遺伝子が転写制御ネットワークのハブとして機能することが予測された (図2)。さらにサイトカイニンシグナルを制御する *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (*ARR*) 転写因子がストレス応答 (*HSFB1*, *HSFB2A*, *WRKY48*)、幹細胞維持、リプログラミング (*HSFB4*, *WIND3*, *ERF115*, *PSK5*)、茎葉形成 (*WUS*, *CUC1*, *ESR2*)、オーキシン応答 (*ARF19*, *LBD18*) 等、複数のシグナル経路に作用する遺伝子の発現を直接制御することが示唆された (図3)。

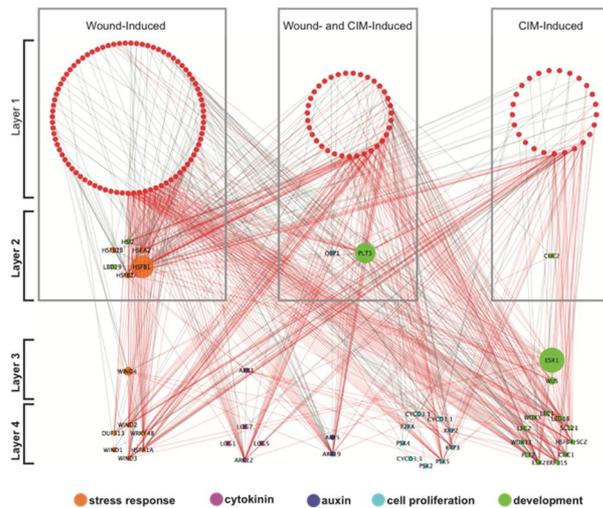


図2 enhanced yeast-one-hybrid 解析から予想される植物遺伝子発現制御ネットワークの詳細。傷害誘導性の遺伝子発現ネットワークと植物ホルモン誘導性の遺伝子発現ネットワークは多層的に交差し、協調的にストレス応答、サイトカイニン、オーキシン、細胞増殖、発生に関与する多数の遺伝子の発現を制御する。なかでも *HSFB1*, *PLT3*, *ESR1* が転写制御ネットワークのハブとして機能する。

(2) ヒストンバリエーションによる器官再生抑制機構の解明

野生型とヒストンバリエーション変異体を用いて RNAseq 解析を行い、CIM でのカルス形成時、SIM 移行後の茎葉再生時に野生型と変異体間で発現量に違いがみられる遺伝子を探索し、ヒストンバリエーションの制御下にあると予想される遺伝子群を抽出した。またこれらのデータと既報のヒストンバリエーション蓄積領域を示す ChIPseq data を比較し、ヒストンバリエーションが蓄積することで直接遺伝子を制御すると予想される遺伝子領域を同定した。さらにこうした遺伝子発現の異常が変異体の茎葉再生昂進という表現型の原因となっているかどうかを分子遺伝学的に検討した。特に植物ホルモンの合成や応答に関与する遺伝子がヒストンバリエーションの制御下にある可能性がみえてきたため、阻害剤を用いた実験によってこの仮説をさらに検討した。

(3) プロトプラストからの脱分化、再分化を経た植物体再生機構の解明

最終分化細胞からのリプログラミングの過程を単一細胞レベルでより直接的に解析するため、シロイヌナズナの本葉から葉肉プロトプラストを単離し、オーキシン、サイトカイニンなどの植物ホルモンを添加した培地上で細胞リプログラミングを誘導する実験系の確立を進めた。再現性よく細胞リプログラミングを起こす培養条件の確立に成功し、野生型植物と変異体や薬剤処理した植物体との表現型の比較が可能になった。これまでに報告されている脱分化制御因子やカルス形成制御因子、茎葉再生制御遺伝子、及び本研究でこれまでに再生における役割を解明してきた制御因子がシロイヌナズナの葉肉プロトプラストからの脱分化、カルス化を経た再分化に関与するかどうかを検討した。またプロトプラスト実験系を用いて RNAseq 解析を行う実験系を確立し、野生型にみられる経時的な遺伝子発現の変化や薬剤投与下での遺伝子発現の変化を解析した。

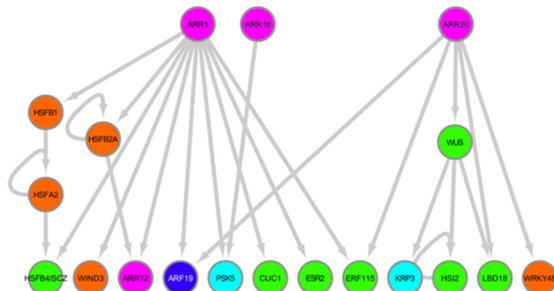


図3 サイトカイニンシグナルを制御する *ARR* 転写因子はストレス応答 (*HSFB1*, *HSFB2A*, *WRKY48*)、幹細胞維持、リプログラミング (*HSFB4*, *WIND3*, *ERF115*, *PSK5*)、茎葉形成 (*WUS*, *CUC1*, *ESR2*)、オーキシン応答 (*ARF19*, *LBD18*) 等、複数のシグナル経路に作用する遺伝子のプロモーターに直接結合する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Favero David S., Kawamura Ayako, Shibata Michitaro, Takebayashi Arika, Jung Jae-Hoon, Suzuki Takamasa, Jaeger Katja E., Ishida Takashi, Iwase Akira, Wigge Philip A., Neff Michael M., Sugimoto Keiko	4. 巻 30
2. 論文標題 AT-Hook Transcription Factors Restrict Petiole Growth by Antagonizing PIFs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1454 ~ 1466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.017	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 Ikeuchi Momoko, Favero David S., Sakamoto Yuki, Iwase Akira, Coleman Duncan, Rymen Bart, Sugimoto Keiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Molecular Mechanisms of Plant Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annual Review of Plant Biology	6. 最初と最後の頁 377 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-arplant-050718-100434	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 該当する

1. 著者名 Iwase Akira, Mita Kento, Favero David S., Mitsuda Nobutaka, Sasaki Ryosuke, Kobayashi Makoto, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Kusano Miyako, Oikawa Akira, Sakakibara Hitoshi, Saito Kazuki, Imamura Jun, Sugimoto Keiko	4. 巻 442
2. 論文標題 WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in Brassica napus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 40 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.07.006	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 Ikeuchi Momoko, Shibata Michitaro, Rymen Bart, Iwase Akira, Bagman Anne-Maarit, Watt Lewis, Coleman Duncan, Favero David S, Takahashi Tatsuya, Ahnert Sebastian E, Brady Siobhan M, Sugimoto Keiko	4. 巻 59
2. 論文標題 A Gene Regulatory Network for Cellular Reprogramming in Plant Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 770 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy013	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Keiko Sugimoto
2. 発表標題 Epigenetic control of cellular reprogramming in plants
3. 学会等名 Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Sendai Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Sugimoto
2. 発表標題 Epigenetic control of cellular reprogramming in plants
3. 学会等名 International Conference on Arabidopsis Research, Wuhan China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Sugimoto
2. 発表標題 Molecular mechanism of cellular reprogramming in plants
3. 学会等名 ENS Lyon, France (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Sugimoto
2. 発表標題 Transcriptional control of stress-induced cellular reprogramming in plants
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Meeting, Gyeongju, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Sugimoto
2. 発表標題 Molecular mechanism of cellular reprogramming in plants
3. 学会等名 Academia Sinica, Taipei Taiwan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimoto Keiko
2. 発表標題 Cellular reprogramming in plant regeneration
3. 学会等名 Canada-Japan Joint Meeting on Genetic Network and Cellular Wiring (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本 慶子
2. 発表標題 Cellular reprogramming in plant regeneration
3. 学会等名 第50回日本発生生物学会大会シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞機能研究チーム http://cellfunction.riken.jp/ Cell Function Research Team http://cellfunction.riken.jp/TOP_E.html
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----