

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07461

研究課題名(和文) 傷害誘導性脱分化の分子ネットワーク解析

研究課題名(英文) Molecular network of wound-induced dedifferentiation

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物が傷害ストレスによってどのような遺伝子を発現させて細胞の脱分化を引き起こすのかについて解析した。遺伝子発現のスイッチタンパク質(転写因子)に着目し、この転写因子が傷害ストレス時に制御する遺伝子を網羅的に調べた。この結果、これまで組織培養条件下や局所的な組織・細胞破壊時に組織の再生現象に働くことが知られている別の転写因子、維管束の形成に關与する遺伝子、病害応答などに働く遺伝子などが発現の制御を受け、複雑なネットワークを形成していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

傷を受けた生物は、傷口において傷の修復や病原菌からの防御を行う必要があるが、植物も、傷害応答性のスイッチタンパク質によって再生から防御応答にわたるまで多岐に渡る生理現象を同時に引き起こしていることが明らかとなった。この解析から選抜されてきた遺伝子には、組織培養において再生を促進する機能を持つものや、病害ストレスから身を守るための機能を持つものが多く含まれていると考えられるため、これらの遺伝子の機能を利用した応用研究も期待される。

研究成果の概要(英文)：This study tried to elucidate which genes are involved in plants to induce cell dedifferentiation upon wounding stress. We focused on wound-inducible transcription factors and did comprehensive transcriptome analyses after injuring and after induction of the transcription factor. The results revealed that gene expression of other transcription factors known to be involved in tissue regeneration under tissue culture conditions are regulated by the transcription factor. Plus, genes involved in vascular bundle formation and disease response are regulated by the factor.

研究分野：植物生理学

キーワード：傷害ストレス 細胞リプログラミング 脱分化 再分化 転写因子 遺伝子発現ネットワーク 導管要素 病害応答

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。

1. 研究開始当初の背景

単離した葉肉プロトプラストから植物体を再生させた歴史的な研究から¹、植物細胞は一度分化した後も脱分化し、分化全能性を発揮できることが証明された。この能力に裏打ちされた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²。植物以外の生物においても傷害ストレスがその引き金になることが知られているが、傷害誘導性の細胞脱分化に関与する分子ネットワークの理解は、植物を含め他の生物でもあまり進んでいない。研究代表者はこれまでの研究において、この問いの解明に挑み、その一端を明らかにしてきた。植物細胞の脱分化に関与するマスター因子を単離するために、シロイヌナズナのカルス(分化多能性を有した不定形の細胞塊)由来の培養細胞を用いた遺伝子発現の比較解析を行い、AP2/ERF型転写因子の1つである *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1)* とそのホモログである *WIND2*、*WIND3*、*WIND4* を単離した^{3,4}。*WIND1* を過剰発現した機能獲得型のシロイヌナズナ、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した^{5,6}。この現象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⁷。面白い事に、遺伝子発現誘導系を用いて *WIND1* 誘導後に生じたカルスでは不定芽、不定根をはじめ、不定胚の再分化まで観察されることから⁸、*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。また *WIND1* は傷害応答性を有し、*WIND1* 機能抑制型の植物体では傷害部位からのカルス形成や再分化が抑えられる。これらの結果から、研究代表者は *WIND1* が傷害部位において細胞の脱分化を促進しカルス形成を正に制御するキープクターであることを明らかにした。

2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの研究や国内外の関連研究から、植物細胞脱分化のアクセルとブレーキを司るキープクターが存在することや、分化多能性の細胞塊であるカルスを形成する分子経路は複数あることが明らかになってきた。植物細胞の脱分化を分子レベルで包括的に理解するためには、キープクターが直接制御する因子は何か、さらには、細胞脱分化を司る実行因子群を実際に特定し、それらの発現が時間的にどのように変化するかをまず理解する必要がある。そこで本研究では、特に傷害誘導性の脱分化経路に着目し 1. 野生株および *WIND1* 発現関連植物体の経時的な遺伝子発現プロファイルを取得し比較した。 2. *WIND1* のゲノム上の結合部位をクロマチン免疫沈降-シーケンシング法(ChIP-seq)で同定した。さらに 3. これらの解析および既得データから抽出される重要下流因子の機能解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、*WIND1* 機能獲得および機能抑制植物体を用いた遺伝子発現やゲノム DNA への結合能の経時変化データを得ることで、*WIND1* が直接制御する因子や、脱分化の実行因子群の経時的な遺伝子発現のダイナミズムを明らかにした。重要な下流候補因子に関しては脱分化の形質を確認するために研究代表者が独自に開発した簡便で再現性の高い葉柄傷害部位におけるカルス化実験系等による機能解析を行った。

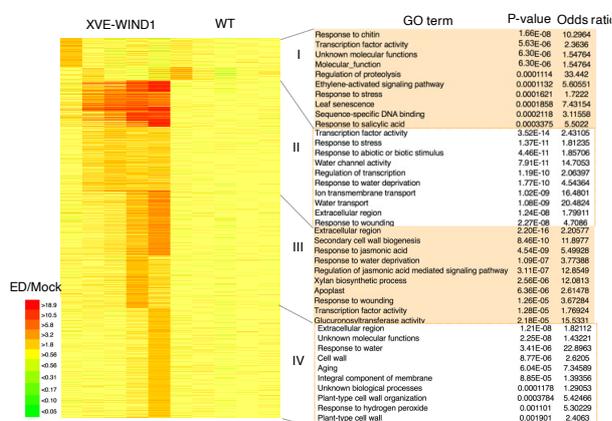


図1. *WIND1*による遺伝子発現誘導
*WIND1*による遺伝子発現変化をヒートマップで示した。17-エストラジオール (ED) 処理後1, 3, 6, 12, 24時間後の遺伝子発現を XVE-*WIND1*および野生株 (WT)について示した。値はDMSO処理(コントロール)した植物体に対する倍数変化。*WIND1*によって誘導された遺伝子を、k-meansクラスターリングに基づいて4つのクラスに分類した。クラスIには、*WIND1*誘導後1時間または3時間以内に一過性に発現する274遺伝子が含まれる。クラスIIには、*WIND1*の活性化後に構成的に発現する728遺伝子が含まれる。クラスIIIの721遺伝子とクラスIVの667遺伝子は、*WIND1*の誘導後、それぞれ12時間と24時間から発現する。それぞれのクラスの遺伝子群に対する遺伝子オントロジー解析の結果を表した。傷害応答、細胞壁、病害応答に関与する遺伝子等が有意に発現していることが明らかになった。

4. 研究成果

WIND1 の発現誘導系を用いた経時的トランスクリプトーム解析から、*WIND1* によって発現が促進する 2390 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子は発現のパターンによって大きく 4 つのグループに分けることができた。誘導後早いタイミングで発現上昇する遺伝子には、病害に対する防御応答の機能が知られているものが多く集まっていた。*WIND1* 誘導後 3 時間以降 24 時間後まで発現上昇が持続する遺伝子には、傷害応答が知られている遺伝子群や種々の転写因子の遺伝子などが有意に存在していることが分かった。さらに誘導後 6 時間や 12 時間で発現上昇する遺伝子の中には、細胞壁関連遺伝子や機能未知の遺伝子群などが有意に存在していた (図 1)。実際、これまでに報告されている傷害誘導性遺伝子群、維管束細胞誘導に関わる遺伝子群、病原バクテリアである *Pseudomonas syringae* の応答に関与する遺伝子群とのベン図解析を用いた比較においても、*WIND1* 誘導性遺伝子は統計的に有意に重複することが分かった。さらに *WIND1* の機能抑制型植物体 (*WIND1*-SRDX) では、傷口のカルス化のみならず、葉柄接ぎ木(接ぎ葉)における組織再癒合や導管の再結合が有意に抑えられることが明らかとなった (図 2)。傷害部位におけるカルス化、維管束再生、病害応答に関わる *WIND* 転写因子の下流遺伝子を探索するため、これらのベン図解析の代わりに存在する遺伝子について、*WIND1*-SRDX 株や *wind* 関連機能欠損株を用いた解析をさらに進めた結果、*WIND* 転写因子の下流には、RAP2.6L、ERF115 などの細胞リプログラムに関与する転写因子、VND7、LBD30 などの導管要素誘導機能を有する転写因子、ALD1 などの病害応答シグナル物質の生合成に関わる酵素遺伝子が存在することが明らかとなった⁹。

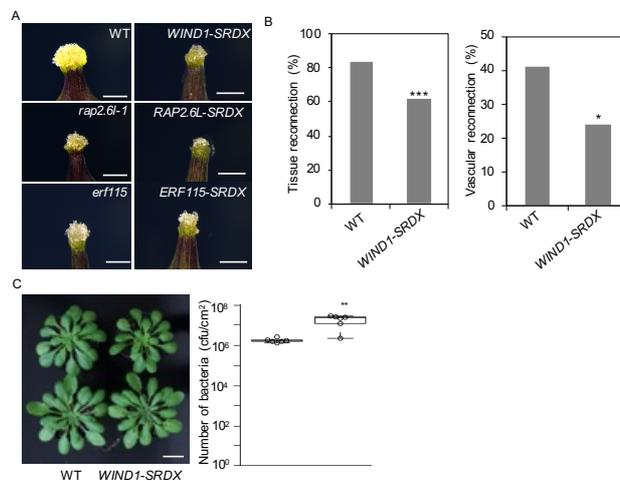


図2. *WIND*転写因子は種々の再生現象と病害応答を制御する。(A)遺伝子発現解析から絞り込んだ*WIND1*下流候補遺伝子の機能欠損および抑制株では、*WIND1*機能抑制株(*WIND*-SRDX)と同様に傷害部位のカルス化が抑えられた。スケールバーは1mm。(B) *WIND1*機能抑制株(*WIND*-SRDX)では、葉柄の接ぎ木(接ぎ葉)における組織再結合と導管の再結合が抑制される。(C) *WIND1*機能抑制株(*WIND*-SRDX)では、病原性バクテリア (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) への感受性が上がる。スケールバーは2cm。病害応答テストは、理化学研究所Anuphon Laohavisit博士の協力によって遂行された。

他方、*WIND1*-GFP ラインを用いた傷害ストレス後の ChIP-seq 解析も行い、傷害後 3 時間や傷害誘導カルスの中での *WIND1* の直接下流因子の選抜にも取り組んだ。興味深いことに、*WIND1* の直接ターゲットとなる遺伝子は傷害直後とカルス中では変化することや、ゲノムへの結合のパターンも変化することなどが明らかとなった。この解析によって、*WIND* 転写因子の下流で起こる遺伝子発現ネットワークをより詳細に理解できただけでなく、新規な仮説に基づいた分子機能の特異性についても研究を始めることができた。

<引用文献>

1. Nagata & Takebe, *Planta*, 1971.
2. Vogel, *Science*, 2005.
3. Iwase *et al.*, *Biotech Lett*, 2005
4. Iwase *et al.*, *Curr Biol*, 2011
5. Iwase *et al.*, *Plant Signal Behav*, 2013
6. Iwase *et al.*, *J Plant Res*, 2015
7. Ikeuchi, Iwase *et al.*, *Nat Plants*, 2015
8. Ikeuchi *et al.*, *Plant Cell*, 2015
9. Iwase *et al.*, *New Phytol*, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iwase A, Kondo Y, Laohavisit A, Takebayashi A, Ikeuchi M, Matsuoka K, Asahina M, Mitsuda N, Shirasu K, Fukuda H, and Sugimoto K	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 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 Yasunori Ichihashi, Tsuneo Hakoyama, Akira Iwase, Ken Shirasu, Keiko Sugimoto, Makoto Hayashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Common Mechanisms of Developmental Reprogramming in Plants-Lessons From Regeneration, Symbiosis, and Parasitism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 Article 1084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.01	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 Momoko Ikeuchi, David S. Favero, Yuki Sakamoto, Akira Iwase, Duncan Coleman, Bart Rymen, and Keiko Sugimoto	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akira Iwase, Kento Mita, David S.Favero, Nobutaka Mitsuda, Ryosuke Sasaki, Makoto Kobayshi, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Miyako Kusano, Akira Oikawa, Hitoshi Sakakibara, Kazuki Saito, Jun Imamura, Keiko Sugimoto	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 M, Iwase A, Rymen B, Lambolez A, Kojima M, Takebayashi Y, Heyman J, Watanabe S, Seo M, De Veylder L, Sakakibara H, Sugimoto K	4. 巻 175
2. 論文標題 Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1158-1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.17.01035	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 M, Shibata M, Rymen B, Iwase A, Bagman AM, Watt L, Coleman D, Favero DS, Takahashi T, Ahnert SE, Brady SM, Sugimoto K	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akira Iwase
2. 発表標題 Wound-induced molecular network leading to plant regeneration
3. 学会等名 The 3rd International Conference on "Plant Cells & Tissues In Vitro" VISCEA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩瀬哲, 竹林有理佳, 草野都, 及川彰, 榊原均, 今村順, 杉本慶子
2. 発表標題 WIND誘導による多能性獲得時の代謝産物変化とその役割
3. 学会等名 日本植物学会 第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植物の再生を司る分子メカニズム
2. 発表標題 岩瀬 哲
3. 学会等名 帝京大学バイオサイエンス学科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩瀬 哲
2. 発表標題 傷口から蘇る:ストレスから植物体再生までの分子機構
3. 学会等名 植物学会第82回 大会 シンポジウム「植物細胞のリプログラミング制御 ~その鍵は動的恒常性の維持と打破にあり~」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 哲
2. 発表標題 植物の再生を司る分子メカニズム ~カルス形成は遺伝的多様性を生み出す機構!??~
3. 学会等名 変異機構研究会「第31回夏の学校」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 哲、池内桃子、Bart Rymen、杉本慶子
2. 発表標題 傷害応答性転写因子による植物の再生メカニズム
3. 学会等名 第一回 再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 哲
2. 発表標題 植物の再生を司る因子を探索し利用する
3. 学会等名 第36回 日本植物細胞分子生物学会 金沢大会 シンポジウム 「難培養植物への挑戦と新たな形質転換植物系の開発に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 哲、光田展隆、池内桃子、鈴木孝征、杉本慶子
2. 発表標題 分化全能性を制御する仕組みと応用
3. 学会等名 平成29年度 岡山大学資源植物科学研究所 共同研究拠点ワークショップ 『植物体再生技術とその分子基盤』(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩瀬 哲
2. 発表標題 Stress-induced plant cell reprogramming: Accelerators and brakes for regeneration
3. 学会等名 東京大学理学部 臨時生物科学セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira lwase
2. 発表標題 Wound-induced cellular reprogramming in Arabidopsis
3. 学会等名 FASEB-Mechanisms in Plant Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩瀬 哲	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 102
3. 書名 アグリバイオ2018年10月号 特集植物の増殖技術と生産技術 - 細胞培養や接ぎ木の利用 - 植物の再生現象を司る転写因子とその利用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脱分化能及び再分化能が増強された形質転換植物又はその一部	発明者 杉本慶子 アリスラン ボレス 高橋達也 ダ ンカンコールマン 岩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-061954	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------