

植物の再生現象における分化全能性制御の分子機構

岩瀬 哲, 池内 桃子, 杉本 慶子

理化学研究所環境資源科学研究センター

〒230-0051 神奈川県横浜市鶴見区末広町 2-7-11

Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto

Molecular mechanisms on exerting totipotency in plant regeneration

Key words: callus, dedifferentiation, epigenetics, histone modification,

phytohormone, totipotency, transcription factor,

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa

230-0045, Japan

1. はじめに

生物の再生とは、個体の一部分が失われた時に、それに該当する部分が修復されたり、個体の一部から個体全体が作られたりする現象である。傷を負った生物が見せる再生現象にはいつも魅了されるが、そこに生物の生きようとする強い力を感じるためだろう。例えばイモリ(両生類)は切断された脚、傷害を受けた心臓や眼のレンズなども再生させる (Straube & Tanaka 2006)。私達ヒトでも、傷ついた皮膚や腸管の再生が日常的に起きているし (Staniszewska et al. 2011, van ES & Sato et al. 2012), 切り出した肝臓の一部を生体移植できるのも肝細胞に再生能力が備わっているからである (Yimlamai et al. 2014)。その他、非脊椎動物のヒドラ (刺胞動物), プラナリア (扁形動物), ナマコ (棘皮動物), ヤマトヒメミズ (環形動物), ショウジョウバエ (節足動物) など様々な生物種で組織レベルや個体レベルの再生現象が報告されている (Galliot et al. 2006, Hyman 1951, Gracia-Arraras et al. 2011, Yoshida-Noro & Tochinai 2010, Belacortu & Paricio 2011)。

植物も例外ではない (図 1, 筆者の iPhone で撮影)。寧ろ最も身近な生物と言える植物の再生現象の方が私たちにとってより馴染み深いかもしれない。剪定された街路樹は、やがて傷口周辺から多くの新芽を出す。挿し木や挿し葉法では、植物体の一部を切り取って土や水に挿しておくが、暫くすると切断面からは根や茎葉が出てきて新たな個

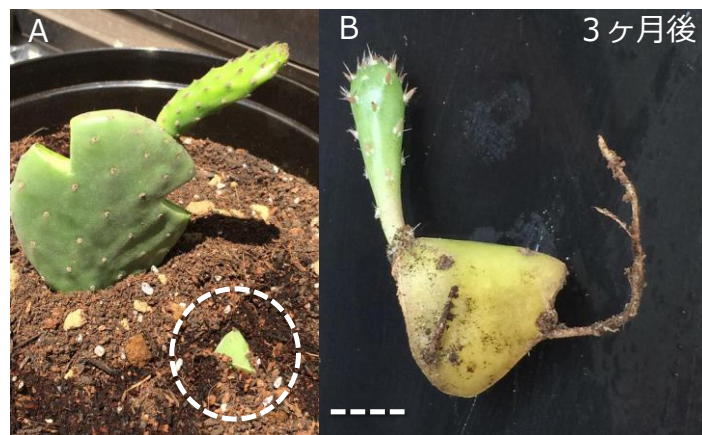


図 1. 傷害ストレスによる植物の再生 (A) ウチワサボテンの一部を切り取り、外植片としてそのまま土の上に置いておく (点線丸)。 (B) 3 ヶ月後、新しい芽と根が再生していた。この方法は江戸時代の農書にも紹介されている (岩崎 1833, 阿部 1837)。Scale: 1 cm。

A. Iwase -1

体が再生する。このような植物の再生能に基づいた増産法や育種法は園芸や農業で古くからよく利用されており、日本でも江戸時代に諸技術を体系的に纏めた著書も出ている（宮崎 1697, 岩崎 1833, 阿部 1837）。

1 つの細胞が、体を構成するすべての細胞に変化できる能力を分化全能性という。単離した 1 つの体細胞から植物体を再生させた歴史的な研究から (Steward et al. 1958, Nagata & Takebe 1971), 植物細胞は一度分化した後も分化全能性を発揮できることが知られている。植物の高い再生能力はこの分化全能性に裏打ちされたものと考えられるが、傷を受けた植物はどのように分化全能性を発揮し、また、通常の発生の過程において、不必要な分化全能性の発揮を抑えているのだろうか。本稿では、植物の分化全能性発揮の分子メカニズムの解明を目指す私たちの最近の取り組みから見えてきた事例を中心に紹介したい。種々の植物種のカルス（不定形の細胞塊）化、再生現象や由来となる細胞、それらの分子機構については私たちの他の総説により詳しくまとめているのでそちらも参照されたい (Ikeuchi et al. 2013, 岩瀬ら 2015, 池内ら 2015, Ikeuchi et al. 2016)。

2. 再生に寄与する細胞

傷害誘導性の再生様式は参加する細胞の分裂特性によってシンプルに二分できる。一つは傷害部位の周りの細胞が分裂を伴わずに再編成される場合であり、もう一つは新しく細胞分裂によって作られた細胞が参加する場合である。細胞分裂が起こる際には、さらに「幹細胞」（自己複製能と多分化能の両方を併せ持った細胞）の参加の有無でもその様式が分けられる。すなわち、予め存在した幹細胞、もしくは、脱分化などの過程を経て新しく作られた幹細胞が組織や器官を生み出すのか、傷害部位で分裂を再開した細胞が単に失われた部分を埋めるように用いられるかによって区別できる。動物では、これら分裂能の異なった細胞が混在して再生現象が遂行されると考えられている (Tanaka & Reddin 2011)。

動植物を問わず簡単に具体例を挙げてみよう。新しく分裂を伴わない再生は、例えばヒドラの傷修復の一形態として知られているが、既に存在していた細胞が移動して再生に寄与する

(Cummings & Bode 1984, Bosch 2007)。この種の再生現象が植物に存在しているのかはよく分かっていないが、細胞壁同士の接着によってレンガが積み重なるように体が作られ、細胞が移動できない植物においては困難かもしれない。植物で分裂を伴う再生に関しては、例えば部分的に切り込みが入った花茎の切断面を経時的に観察すると、維管束系と表皮の間にある髄 (pith) の細胞が細胞分裂をして、切断で生じた空間的なギャップを埋めていく様子が観察される

(Asahina et al. 2011, 朝比奈 2015)。プラナリアでは身体中に予め散在する幹細胞が傷害部位に集まって再生現象が起こると言われている (Baguna et al. 1989)。先端の芽（頂芽）を失った植物では脇芽が伸びてくるが、これも予め存在し、休眠状態であった幹細胞が成長を再開することによって起きていることが知られている (Müller & Leyser 2011)。一方、新しく幹細胞が作られる過程では、一度分化した細胞が脱分化し、分裂能と分化多能性をもった細胞が作られる。イモリの脚の切断時には、「再生芽」という比較的未分化な細胞塊が傷口に作られる (Maden 1976)。この中では傷害部位に存在していた様々な分化細胞が脱分化して細胞塊を形成しているが、例えば真皮細胞から脱分化した細胞から、もとの真皮細胞のみならず軟骨細胞も再生することが知られている (Kragl et al. 2009)。植物では、再生芽と同様に「カルス」と呼ばれる傷害誘導性の細

胞塊を作り (Birnbaum & Sánchez Alvarado 2009), そこで新しく幹細胞を作って組織を再分化させる。以降, このカルス化を伴う植物の再生に焦点を絞って話を進める。

3. カルスは再生現象に寄与する

傷害部位で作られるカルスは傷口を覆って塞ぐだけでなく, 再生組織・器官に細胞を供給したり, 新しく幹細胞を作ったりする場となる (Bostock & Stermer 1989, Stobbe et al. 2002, Ikeuchi et al. 2013, 池内ら 2015, 長谷部 2015, Melnyk & Meyerowitz 2015)。組織培養条件下では, カルス形成がより顕著に観察される。20 世紀半ばの金字塔とも呼べる研究から, 2 つの植物ホルモン, すなわちオーキシンとサイトカイニンのバランスが植物細胞の脱分化と再分化に重要な働きを持ち, これらのバランスを変えることでカルスをカルスのまま培養したり, カルスから根や茎葉を人為的に再生させたりできることが分かった (Skoog & Miller 1957)。植物組織を切り小片に分けた外植片を植物ホルモンを含む培地で培養する方法は, 現在でも植物組織培養法の基本法となっている。一般的には, オーキシンの比率が高いと根に, サイトカイニンの比率が高いと茎葉への再分化が見られる。また, 高濃度のオーキシンを用いてカルスを誘導した後に, オーキシンを含まない培地でカルスを培養することで不定胚と呼ばれる体細胞由来の胚も誘導できる (Zimmerman 1993)。不定胚形成は, 体細胞から植物が有する全ての幹細胞が再形成されることから, 分化全能性発揮の指標となる。一度分化した細胞を単離して, 分化全能性の証明を行った研究においても組織培養条件下でまずカルスを形成させている (Steward et al. 1958, Nagata & Takebe 1971)。従って, カルス誘導時には分化多能性や全能性を獲得する機構が存在することが考えられる。

4. 傷害ストレスで発現する因子がカルス化を促進する

組織培養による再分化を利用した膨大な研究は, これまで半世紀以上, 基礎科学にも応用科学にも貢献してきたが (Thorpe 2007), 植物が様々な刺激に対してどのように分化多能性や全能性を発揮するのか, その分子メカニズムは近年になって漸く明らかになってきた。

私たちは植物細胞の脱分化状態を規定する因子を単離する目的で, モデル植物であるシロイヌナズナ植物体とカルス由来の培養細胞の遺伝子発現比較解析を行い (Iwase et al. 2005), 培養細胞で高発現している植物特異的 AP2/ERF ファミリーの転写因子 WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) を単離した。驚いたことに, 植物体全体で恒常的に発現するプロモーターを用いて *WIND1* 遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ植物体 (*WIND1* 過剰発現株) では, 植物ホルモンを含まない培地でも葉, 胚軸, 根からカルスを形成する (図 2)。このカルスは

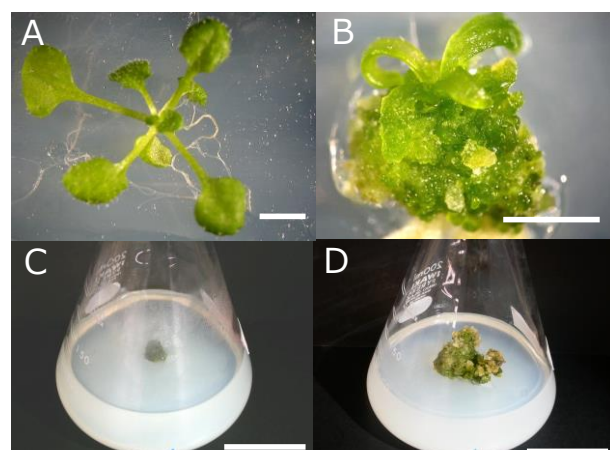


図 2. *WIND1* 遺伝子はカルスの誘導とカルスの維持に機能する (A) シロイヌナズナ野生株 (21 日齢)。 (B) *WIND1* 過剰発現株 (48 日齢)。 (C) 過剰発現株から単離したカルス。 (D) 21 日後のカルス。 全て植物ホルモンフリーの培地で培養した。 Scale: 3 mm (A, B), 3 cm (C, D)。

継代培養可能であり (Iwase et al. 2011a), この原稿を著している今日現在, 8 年を超えてホルモンフリーで継代培養している *WIND1* 誘導カルス株が存在している。このことは, *WIND1* がカルス誘導だけでなくカルス状態を維持する働きを有していることを示している (図 2)。

WIND1 は傷害応答性の遺伝子として他のグループの研究でリストアップされていたことから (Delessert et al. 2004), 傷をつけた植物体で *WIND1* やパラログ遺伝子である *WIND2*, *WIND3*, *WIND4* の遺伝子発現を経時的に調べたところ, これらの遺伝子は傷害ストレスによって数時間内に発現誘導されることが分かった。実際, *WIND1* のプロモーター活性は傷害部位やカルスで特異的に高い。さらに *WIND1* 過剰発現株 (通常条件ではカルス化しない弱い形質の個体) では, 胚軸の傷害部位におけるカルス形成が促進され, 逆に *WIND1* 機能抑制変異体では抑えられる。植物ホルモンとの関連を調べるためにオーキシン濃度とサイトカイニン濃度を変えた種々の培地を用い, 胚軸切片の組織培養アッセイを行ったところ *WIND1* 機能獲得変異体では野生株と比べてサイトカイニン応答が高まり, 逆に機能抑制変異体では抑えられていることが分かった。サイトカイニン応答を正に制御する Type-B ARR 転写因子の機能欠損変異体では, *WIND1* 過剰発現によるカルス化が抑制される。また, 野生株の胚軸の傷害部位では, Type-B ARR 転写因子依存的に反応する TCS プロモーターの活性が高まるが, *WIND1* 機能抑制変異体では抑えられる。*WIND1* を過剰発現させて誘導したカルスでは ARF 転写因子依存的なオーキシン応答性 DR5 プロモーターの活性はみられない上, 組織培養のアッセイにおいても *WIND1* 機能獲得および抑制変異体の両方でオーキシン応答に顕著な変化は見出せなかった。これらの検討から, *WIND* 転写因子群は少なくとも Type-B ARR 依存的なサイトカイニン応答を高めることによって植物細胞のカルス化を促進する重要な因子であることが明らかになった (Iwase et al. 2011a, Iwase et al. 2011b)。*WIND1* 過剰発現株では, 野生株と比べてサイトカイニン合成系の遺伝子発現が促進し, 実際サイトカイニン合成が促進していることから, *WIND1* は傷害部位でサイトカイニン合成を高める機能を有している可能性が示唆される (Iwase et al. 2011a)。

傷害ストレスによって発現が上昇し, 未分化性の高い細胞塊形成に関与する転写因子は, 動物においても報告されている。例えば, この稿の冒頭に取り上げた動物の傷害ストレスによる再生現象においても, 哺乳類の iPS 細胞誘導技術で用いられるいわゆる Yamanaka-factors (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, Takahashi & Yamanaka 2006) のホモログ遺伝子が発現してくるという報告がある。イモリのレンズと脚の再生時には *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* のホモログ遺伝子が (Maki et al. 2009), また, ゼブラフィッシュ尾の再生とアメリカツメガエルの脚の再生における再生芽形成時には *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* のホモログ遺伝子が発現することが報告されている (Christen et al. 2010)。傷害ストレスによる細胞脱分化関連因子の発現という機構は, 動植物に共通であることを示している。

5. カルス誘導の分子経路

一口にカルスと言っても, その生成機構や生理状態は多岐に渡る (Ikeuchi et al. 2013, 岩瀬ら 2015)。シロイヌナズナでは, 少なくとも 2 つのカルス誘導経路があることが分かってきた。シロイヌナズナで頻繁に用いられているカルス誘導培地 (CIM) 条件では, カルスは傷口のみならず傷口から離れた非傷害部位にも形成される。非傷害部位のカルス化では, 根の幹細胞形成に関与するマーカー遺伝子が強く発現することが見出され (Atta et al. 2009, Sugimoto et al. 2010), 実際,

側根形成ができなくなる変異株では、非傷害部位からのカルス誘導が抑制される (Sugimoto et al. 2010, Iwase et al. 2011a)。一方、傷害部位に誘導されるカルスではこれらの根のマーカー遺伝子の発現は見られず、さらに側根形成ができなくなる変異株でも傷害部位でのカルス化は起こる (Iwase et al. 2011a)。これらの観察から、非傷害部位で形成されるカルスは側根形成の分子経路を介して作られるが (Sugimoto et al. 2010)、傷害部位で作られているカルスは、側根形成経路とは (少なくともある一部分は)異なる経路で作られていることが明らかとなった (Iwase et al. 2011a)。側根形成はオーキシシンシグナルの制御下にあり、実際、上記した側根形成ができなくなる変異株の原因遺伝子はオーキシシン応答性である。側根形成を正に制御するオーキシシン応答性の LBD 転写因子を過剰発現することで、ホルモンフリーの培地でもカルスが形成される (Fan et al. 2012)。この結果は側根原基形成経路を介したカルス化経路が実際に存在することを実証している。前述したように、WIND は傷害部位でサイトカイニン応答を高めていることから、この2つの分子経路はオーキシシン応答優位な経路とサイトカイニン応答優位な経路として区別できるのかもしれない。

6. 再生における WIND の分子機能とその応用

最近の私たちの研究から、WIND1 の役割は単にカルス形成を促進するだけでなく再分化を制御することも明らかになってきた。これについて記述する前に、まずシロイヌナズナの組織培養法と、現在考えられている組織培養の再生過程における生理的反応ステップについて紹介したい。

シロイヌナズナの再分化誘導には2段階の培養法が広く用いられている (Valvekens et al., 1988, Ozawa et al. 1998, Che et al. 2002)。具体的には、根や胚軸の切片をオーキシシンに富んだカルス誘導培地(CIM)で数日間培養し、その後組織片をサイトカイニンに富んだ茎葉再分化培地 (SIM) やオーキシシンに富んだ根誘導培地 (RIM) に移植・培養して再分化を促進するという方法である (Valvekens et al. 1988)。オーキシシンとサイトカイニンの適度な配分を設定すれば 1 段階の培養でもカルス化と再分化を連続的に誘導できるため (Lloyd et al. 1986)、必ずしも 2 段階の培養が必須というわけではない。組成を変えた複数の培地を段階的に用いる方法は、再分化までの時間短縮や再分化頻度を高めるために検討されてきた結果である。しかしこの事実は、分化した細胞の再分化過程には段階があることと、それぞれの段階には作用するホルモンと組み合わせに適性があることを示唆している。セイヨウヒルガオの再分化系を用いた実験から、組織培養環境下の器官再分

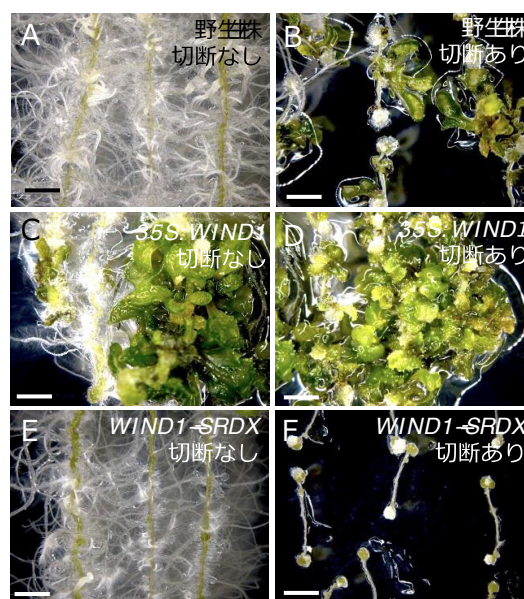


図3. 傷害処理による *WIND1* の発現は再分化能の獲得に寄与する (A-F) 7 日齢のシロイヌナズナ植物体を根の切断あり、なしで処理して CIM で 4 日間処理した後、SIM で 21 日間培養した。WIND1 過剰発現株 (35S:*WIND1*) では切断処理なしでも茎葉の再生がみられ、逆に WIND1 機能を抑制した株 (*WIND1-SRDX*) では切断処理をしても茎葉の再分化は抑えられた。Scale: 3 mm. Iwase et al. (2015) より許可を得て改変、転載。

化は3つの段階に分けられることが示された (Christianson & Warnick 1983, 1985)。すなわち 1. 応答能の獲得 (acquisition of competence), 2. 器官形成の誘導 (organogenesis induction), 3. 形態的な分化 (morphological differentiation) である。このうち第1のステップは幅広い組成のホルモン培地が適用できるのに対して, 第2のステップでは最適なホルモン組成の範囲が狭く, 方向性を持った再分化誘導にはホルモンの種類やバランス条件の詳細な検討が必要になる。第3のステップでは外因性のホルモンの影響を受けにくくなるため (Christianson & Warnick 1983, 1985, Sugiyama 2015), ホルモンを含まない培地がよく用いられる。いわゆる脱分化と呼ばれる過程は第1のステップ, すなわち反応能の獲得に含まれると考えられており, シロイヌナズナの系では CIM での処理がそのステップに該当する (Che et al. 2006, Duclercq et al. 2011, Sugiyama 2015)。さらにカルス化や再分化が抑制される一連の変異株の解析から, 第1の応答能の獲得のステップには細胞増殖能の獲得と分化能の獲得が含まれると考えられている (Sugiyama 2000, Ohtani & Sugiyama 2005, Ohtani et al. 2013)。

カルス化を促進するという WIND1 の機能は, 組織培養における器官再分化の段階において応答能の獲得ステップに働くことが予想される。そこで, 組織培養条件の再分化過程における傷害処理と WIND1 の役割をより明確に理解するために, 傷害処理なしの組織培養と, WIND1 機能をコントロールした植物体での組織培養を行った。すなわち WIND1 の発現が CIM における処理を代替できるかについて検討した。

驚いたことに, 野生株では, 地上部を残した状態の無傷の根からは CIM (カルス誘導培地) 処理後に SIM (茎葉誘導培地) で培養しても茎葉の再分化は全く見られず, 代わりに多くの側根の形成が観察された (図3)。この原因は, 例えば地上部からもたらされる物質やシグナルによる影響など様々な原因が考えられるが, 植物組織の切断処理によって誘導される因子が茎葉への再分化能の獲得を促進していることが一つの原因として考えられた。切断によって発現促進する WIND1 の働きが分化能獲得の実体であるという仮説を検証するために, WIND1 の弱い過剰発現体 (35S:WIND, 育成してもカルス化までは起こらない) を同様に無傷のまま SIM で処理したところ, 予想通り根から茎葉の再分化が起こった (図3)。さらに, WIND1 の遺伝子発現誘導系植物 (外部から薬剤を処理することによって WIND1 が発現する配列をゲノムに導入した植物体) を用いて, ホルモンフリーの培地で WIND1 の発現誘導あり・なしの比較実験を行ったところ, やはり誘導時のみで無傷の植物体の根から SIM で茎葉の再分化が起こった。逆に WIND 機能を抑制した植物体 (WIND1-SRDX) では, 通常の切断処理を行った培養を行っても茎葉再分化がほとんど起こらなかった (図3)。これらの結果から, 組織培養における組織の切断処理は WIND1 のような傷害応答性の脱分化因子を発現させる役割があること, また WIND1 には分化能の獲得機能もあり, CIM の処理を実際に代替できることが明らかとなった (Iwase et al. 2015)。切断処理を行っても, CIM での処理をしないと茎葉の再分化には大幅な時間がかかるが (Valvekens et al. 1988), WIND1 の発現を誘導した植物体では, 短時間の誘導でも続く SIM の処理で茎葉が再分化する (Iwase et al. 2015)。組織培養では, 一般的に植物組織の切断と, 多数の組織片の培地への植え替えが必要であり, 処理行程の煩雑さを招いている。WIND1 のような因子の機能利用によって, 切断処理を必要とせず, 且つ培養時間を短縮させた簡便で効率的な組織培養が可能になるかもしれない。

CIM を利用したシロイヌナズナのカルス化には少なくとも2つの経路があることは前項で述べた。CIM-SIM の2段階培養の系では茎葉の再生が傷害部位と非傷害部位の両方のカルスから見られる。面白いことに、*WIND1* 機能抑制変異株では非傷害部位のカルスからも茎葉の再分化が抑えられる (Iwase et al. 2015)。非傷害部位のカルスでいつ *WIND1* が発現してくるのかについては、より詳細な検討が必要であるが、この結果は *WIND1* が非傷害部位でのカルスでも再分化能を付与していることを示している。

WIND1 の発現が CIM 処理の代替となるように、他の分化関連転写因子が次のステップである器官形成の誘導を担えるかもしれない。そして、*WIND1* と組み合わせて発現させることで、効率が良く再分化の方向性が明確な分化転換を誘発できるのではないか。このような考えに基づいて、B3 ドメイン転写因子 *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*) 転写因子を *WIND1* と発現させる実験を行った。*LEC2* は過剰発現によって不定胚を誘導できることが報告されている (Stone et al. 2001)。私たちの行った黄化芽生えを用いた実験でも、遺伝子発現誘導系を用いて *LEC2* を過剰発現することで不定胚を誘導することができた。しかし、ここでの不定胚誘導は、脱分化傾向が強いと考えられる傷害部位か、茎葉分裂組織周辺の比較的分化度合いが低いと考えられる組織に限られていた (図4)。*LEC2* を発現誘導する前に *WIND1* を誘導すると、予想通り変化の起きる領域が広がり、用いた胚軸組織全体から不定胚の形成がみられた (図4)。これは、再分化の応答能を有していなかった分化細胞が *WIND1* によって再分化の応答能を獲得し、続く *LEC2* の制御による不定胚形成の誘導を可能にした結果だと考えられる。これらの発見から、複数の転写因子をスイッチとして用いることで外因性の植物ホルモンなしで細胞の脱分化と再分化をコントロールできることが実証された (Iwase et al. 2015)。

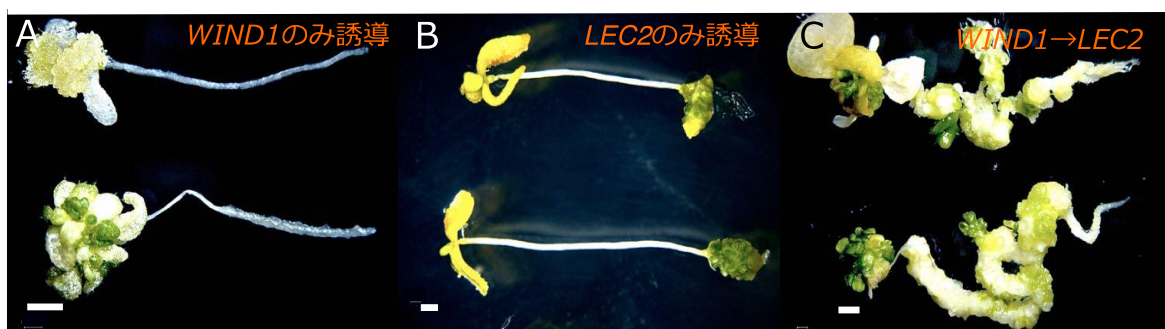


図4. *WIND1* と *LEC2* の2段階の誘導は体細胞胚誘導を促進する (A~C) 7日齢のシロイヌナズナ黄化植物体を胚軸部分で二分し、地上部側を培養した。(A) *WIND1* 誘導系植物体 (*XVE:WIND1*) を誘導剤 (17β -estradiol) を含む植物ホルモンフリー培地で25日間培養した。(B) *LEC2* 誘導系植物体 (*35S:LEC2-GR*) を誘導剤 (dexamethasone) を含む植物ホルモンフリー培地で25日間培養した。(C) *WIND1* と *LEC2* を両方誘導可能な植物体 (*XVE:WIND1/35S:LEC2-GR*) を 17β -estradiol 入り培地で4日間培養後、dexamethasone 入り培地で21日間培養した。2段階誘導の植物体では、胚軸部分からも盛んに不定胚を形成するカルスが生じている。Scale: 1 mm。Iwase et al. (2015) より許可を得て改変、転載。

7. *WIND* 遺伝子と機能の保存性

シロイヌナズナ近縁種である *Thellungiella halophila* (salt cress) の *WIND1* オルソログ (*ThWIND1-L*) は、傷害応答性があり、*ThWIND1-L* を発現させたシロイヌナズナはホルモンフリーの培地で

カルス化することが他の研究グループから報告された (Zhou et al. 2012)。これは、近縁種の *WIND1* オルソログ遺伝子でも私たちの研究結果が再現できることを示している。WIND 因子が植物界に広く保存されていれば、傷害によるカルス化が植物の進化上いつ獲得されたのかを推測することができる。また様々な作物で組織培養を用いた応用研究にも展開できるかもしれない。このような興味から、Reciprocal BLAST 法による簡易的なオルソログサーチを行い WIND 転写因子群の植物界における保存性を調べた。

ゲノム情報が明らかになっている 20 種の植物、すなわち、双子葉植物 12 種、単子葉植物 4 種、シダ植物 1 種、コケ植物 1 種、緑藻類 2 種について解析を行った結果、緑藻類であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) とボルボックス (*Volvox carteri*) 以外の植物には、WIND1 オルソログが存在していることが示唆された (図 5)。AP2/ERF 転写因子は緑藻には既に存在していることが知られているため (Magnani et al. 2004)、AP2/ERF 転写因子の中でも WIND クレードの遺伝子は陸上化とともに獲得されたのかもしれない。さらに、これらの遺伝子配列をアミノ酸に変換し、保存ドメインを比較すると、シダの一種 *Selaginella moellendorffii* や コケ植物蘚類の一種 *Physcomitrella patens* のオルソログでは高等植物間で保存性の高いアミノ酸配列が見られないことが分かった。ゼニゴケの WIND1 オルソログをシロイヌナズナで発現させてもカルス化はみられなかったことから、この 2 種のアミノ酸配列の差異の中にシロイヌナズナでのカルス化に関わる領域があると考えられる (岩瀬 未発表)。コケ植物においては、苔類、蘚類、ツノゴケ類において、それぞれ植物ホルモンを用いてカルスが得られ培養細胞化されているが (Ono 1973, Sokal et al. 1997, Ono et al. 1992)、例えば蘚類ヒメツリガネゴケの葉状体の切断処理では、傷害部位の細胞から原糸体の幹細胞が直

接誘導され、明瞭なカルス化はみられない (Ishikawa et al. 2011, 石川 2015)。苔類ゼニゴケでは、葉状体の切断面から葉状体が再生するが (Kubota et al. 2013, Nishihama et al. 2015)、この際一度小さな細胞塊が傷害部位で生じるものの、すぐに形態形成に移行するようである。コケ植物における株化されたカルス細胞は、外因性の植物ホルモン処理によって再分化への移行が抑えられている状態なのかもしれない。

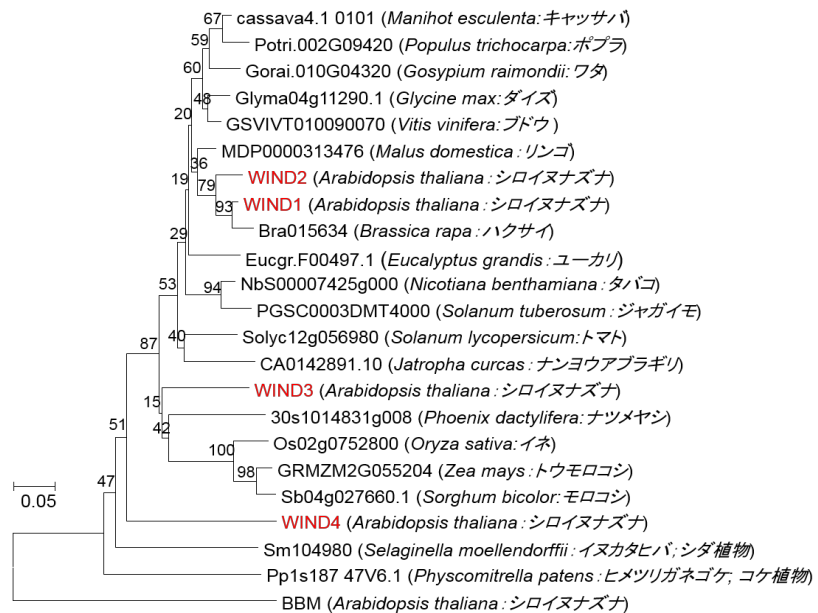


図 5. シロイヌナズナ *WIND* のオルソログは広く種子植物に保存されている シロイヌナズナの他の AP2/ERF 転写因子である *BBM* 遺伝子をアウトグループとして分子系統樹を作成した。赤字はシロイヌナズナ *WIND* (*WIND1*~*WIND4*)。枝分かれ上の数字はブートストラップ確率を示している (500 replicates)。枝分かれの先は種々の植物の遺伝子名を記してある。Iwase et al. (2013) より許可を得て改変、転載。

WIND のオルソログが種子植物に広く保存されているならば、それぞれの植物が保持する WIND 因子群の機能も保存されており、それらやシロイヌナズナの WIND を利用することによって作物の組織培養の効率が改善できるはずである。実際、シロイヌナズナ *WIND1* (*AtWIND1*) の発現誘導系や過剰発現用のコンストラクトを導入したナタネ (*Brassica napus*)、トマト (*Solanum lycopersicum*) やタバコ (*Nicotiana tabacum*) では、シロイヌナズナと同様に、ホルモンフリーの培地でもカルス形成が観察された(Iwase et al. 2013)。この結果は、WIND によって促進される細胞脱分化のカスケードが少なくともある範囲の植物種で保存されていることを示している。シロイヌナズナにおける *AtWIND1* の分化能の獲得機能に関しては前項で述べたが、作物でも再分化の効率化が起こせるのかを調べるために、発現誘導系を導入したナタネで組織培養条件下での茎葉再分化実験を行った。この結果、再分化能が低く外植片としては通常用いない、茎葉分裂組織から離れた部位の胚軸切片において、WIND1 の誘導をかけた培地では、誘導をかけなかった場合と比べて 1 切片あたり 20~50 倍という高い頻度で再分化組織が得られることが分かった。芽生えの胚軸を用いた通常のナタネの形質転換法では、再分化能の比較的高い茎頂分裂組織に近い胚軸切片が限定的に用いられたりするが、その限定的な組織を用いた通常法と比べても、上記の結果は 10 倍以上の高い再分化効率であった (Iwase et al. 2015)。この結果は、シロイヌナズナでみられた結果と同様に、WIND1 の誘導によって再分化能の低い組織に応答能の獲得と再分化能の付与がなされたためだと考えられる。また、少なくともナタネのような近縁種の作物でも、シロイヌナズナの WIND1 機能による再分化の効率化が可能である事を実証するものである。

8. 分化状態の維持には脱分化因子の発現を能動的に抑える必要がある

傷害ストレスによるカルス化は、傷害部位で局所的にみられる反応である。細胞の脱分化を傷害部位のみで進める機構があり、その一端を WIND が担っていることを私たちは明らかにしてきた。一方で、分化全能性を発揮し易い植物でも、通常の発生・成長の過程では特殊な構造と生理機能を有した多細胞の体を維持するために、不必要な分化全能性の発揮を抑えなければならない。そこには能動的な抑制機構があるはずである。

私たちはカルス化が促進する変異株の解析を進める中で (Ikeuchi et al. 2013, 岩瀬ら 2015), 驚くべき現象を見出した(図 6)。

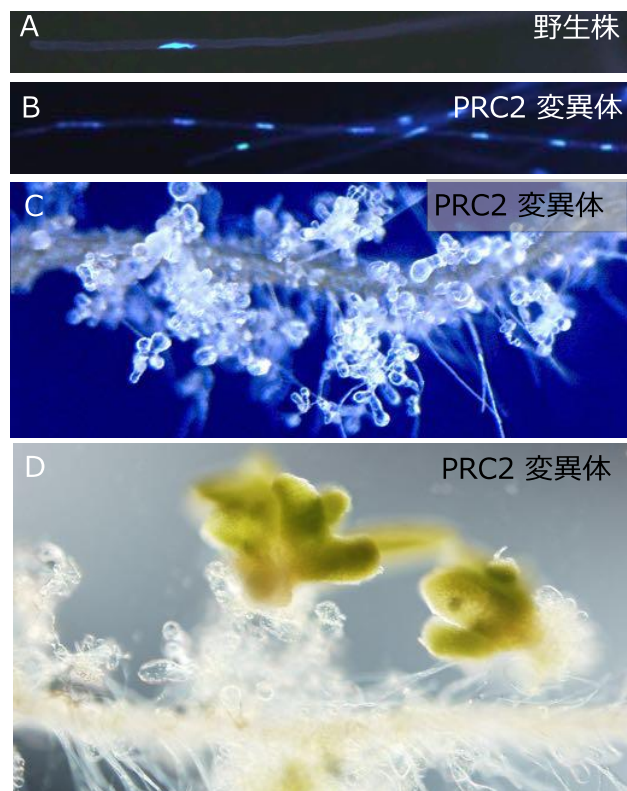


図 6. シロイヌナズナ PRC2 変異体では根毛細胞も脱分化する (A) 野生株の根毛細胞の DAPI 染色像。核 (青) が一つ見える。(B) PRC2 変異体の根毛細胞の DAPI 染色像。根毛の中に核が複数存在していることが分かる。(C) PRC2 変異体の根毛細胞から生じたカルス。(D) PRC2 変異体の根毛細胞から生じたカルスから不定胚様の組織が生じている。

シロイヌナズナの PRC2 (Polycomb repressive complex 2) というタンパク質複合体の機能が欠損した PRC2 変異体の根では、根毛細胞をはじめとする様々な細胞が分裂を開始し、カルスのみならず不定胚様の組織を形成したのである (Ikeuchi & Iwase et al. 2015)。驚きの主な要因は2点あった。第一に、この変化は培地に植物ホルモンを添加することなく通常の培養条件で起こること。第二に、根毛細胞という高度に分化した細胞が、あるタンパク質複合体の機能が損なわれただけで、脱分化したことである。根毛細胞は根の表皮細胞の一部が伸長成長によって巨大化した1個の細胞であり、水分や無機塩類を土壌中から吸収する高度に機能化した最終分化細胞である。シロイヌナズナの根毛細胞では、核内倍加と呼ばれる現象、すなわち細胞の分裂を経ずに DNA 複製のみが進行する特殊な細胞周期が起こっており、これによって核の中の DNA 量が増加し、細胞の巨大化が引き起こされる。核内倍加はシロイヌナズナの根端において、細胞分裂を盛んに行う分裂組織の細胞が分裂を止め、細胞伸長に移行する際に起こる現象であることから細胞分化の1つの指標となっている (Breuer et. al. 2014)。

PRC2 変異体では、最終分化細胞の分化状態の維持ができずにカルス化や不定胚様組織の形成が起きているという仮説のもと、核の大きさの比較や分化マーカーの発現の有無など種々の検討を行った。この結果、PRC2 変異体の根毛細胞は、野生株と同様に一旦は核内倍加を伴う正常な細胞分化を行っており、PRC2 変異体のみが時間の経過とともに DNA 合成期(S 期)を伴う細胞周期で分裂してカルス化していることが明らかとなった (Ikeuchi & Iwase et al. 2015)。

PRC2 はどのように細胞の脱分化を抑えているのだろうか。PRC2 は真核生物に広く保存されており、ヒストン H3 タンパク質を構成するアミノ酸のうち 27 番目のリジンをトリメチル化 (H3K27me3) する働きを持っている (He et al. 2013)。このメチル化されたヒストンは結果としてクロマチン構造を閉じた状態に変え、その領域にある遺伝子発現を抑える。つまり、PRC2 変異体では H3K27me3 による遺伝子発現抑制機構が働かないために、不用意な遺伝子発現を起こしやすい状態になっていることが考えられる。そこで、PRC2 変異体の根でカルス形成に關与する遺伝子を調べたところ、カルス化

促進因子の *WIND1*, *WIND2*, *WIND3* 遺伝子や胚発生制御因子の *LEC2* 遺伝子の発現が上昇していることが分かった。シロイヌナズナの根のゲノム上で、どの遺伝子が PRC2 による発現抑制を直接受けているかを網羅的に調べたところ、*WIND3* や *LEC2* などの遺伝子領域が H3K27me3 でマークされていること、すなわち PRC2 の直接のターゲットになっていることが分かった。さらに *WIND3* または *LEC2* 遺伝子を強制的に発現させることでも、根毛

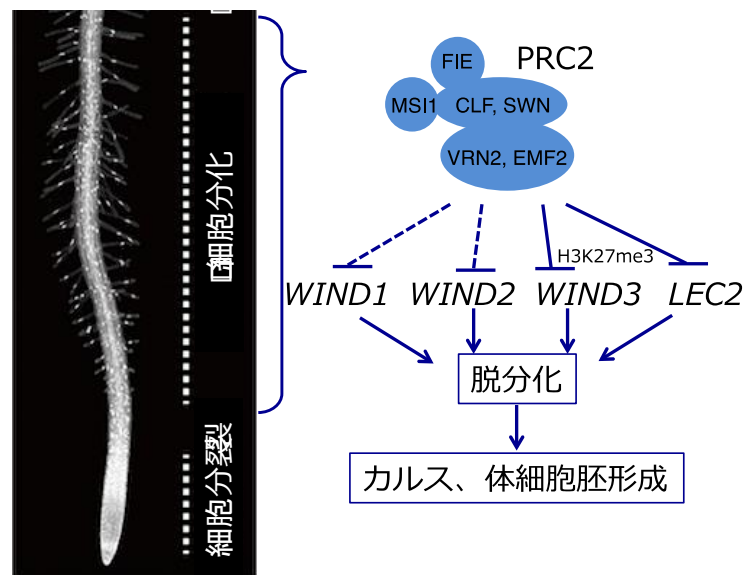


図7. PRC2 は、分化した根毛細胞や根の細胞において *WIND* や *LEC2* などの遺伝子の発現を、直接的 (実線) または間接的 (破線) に抑えることで、細胞の脱分化を抑え、分化が完了した状態を維持している。

細胞を分裂させられることを確認した。これらの結果から、根毛細胞などの一度分化が完了した植物細胞には遺伝子発現レベルで脱分化を抑えるメカニズムがあり、それがヒストンのメチル化を介したクロマチン構造の制御によって行われていることが分かった (図 7, Ikeuchi & Iwase et al. 2015)。つまり通常の細胞分化には WIND や LEC2 のような全能性発現関連因子の発現を抑える機構が必要だということである。WIND3 や LEC2 遺伝子の過剰発現によって引き起こされる根毛細胞のカルス化の頻度は PRC2 変異体よりも低い。また、これらの因子の発現抑制による PRC2 変異体の表現型の抑圧も完全でないことから、PRC2 変異体で観察される根毛細胞の脱分化には、他にもさまざまな因子が関与していることが予想される。実際 PRC2 のターゲットとなる遺伝子はシロイヌナズナで 4000 以上に登るとも考えられており (Zhang et al. 2007)、今後、さらなる関連因子の探索を継続することで、植物細胞が PRC2 を通してどのように分化状態を維持するのか、その分子メカニズムのさらなる詳細が明らかになると期待している。

9. 終わりに

私達のこれまでの WIND や PRC2 に関する研究成果から、傷害ストレスによって局所的に誘導される細胞脱分化の機構や、通常の発生・分化の段階で脱分化を抑える機構が見えてきた。ここでは遺伝子発現を制御する転写因子が重要因子として存在し、その発現がヒストンの修飾を介したクロマチンレベルで制御されていることも分かってきた。私たちは WIND1 が制御する遺伝子の解析も網羅的に進めているが、WIND1 の下流には別の転写因子も数多く存在しており、転写因子ネットワークが存在していることが明らかにされつつある (Iwase et al. in preparation, Ikeuchi et al. in preparation)。今後ネットワークに関与する因子について、網羅的に捉えるアプローチと因子同士一つ一つの関係性を明らかにしていくアプローチを両方進めて行き、植物細胞の脱分化と再分化に関わる分子ネットワークを着実に明らかにして行きたい。

また、WIND を軸とした脱分化誘導現象において、ストレスとヒストン修飾によるクロマチン変化の関連が浮かび上がってきたことから、ストレスとエピジェネティックな変化がどのように関連し、細胞の脱分化を促進するのかという次なる問いも生じる。種々のストレスがヒストン修飾の変化を誘導し、クロマチン構造を変化させて脱分化関連転写因子の発現を促進するという仮説のみならず、ストレス誘導性の転写因子によってクロマチン構造が変化し、種々の脱分化関連因子の発現が促進するという仮説も立てることができる。ほ乳類の分化した細胞では、iPS 細胞誘導技術で用いられる転写因子群 (Yamanaka-factors) が複数の階層のエピジェネティックな発現抑制制御を受けていることが分かってきた (Hawkins et al. 2010)。さらに、発現誘導された Yamanaka-factors は、「パイオニア転写因子」としてヌクレオソームに結合し閉じたクロマチン構造を開き、自身を始め下流遺伝子群の転写活性を促進する働きを有する可能性が示唆されている (Soufi et al. 2015)。様々な刺激に対してエピゲノムがどのように変化し、ゲノム上のどの遺伝子領域が転写制御を受けやすくなるのか、または受けにくくなるのかについて網羅的に理解することは、細胞の分化や脱分化を理解するため今後益々重要なアプローチとなる。ストレス誘導時や脱分化関連転写因子の誘導時におけるクロマチン構造の変化を経時的かつゲノムワイドに捉える研究を進めることで、植物の分化全能性発揮のダイナミズムを明らかにして行きたい。

謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、新学術領域研究 (22119010, 26291064), 科学研究費助成事業 (24770053, 15K18565, 15K18564), および理化学研究所基礎科学特別研究員制度の支援を得て遂行した。

引用文献

- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., & Nishimura, T. 2011. Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 16128-16132.
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P., & Chriqui, D. 2009. Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant J.* 57: 626-644.
- Baguna, J., Salo, E., & Auladell, C. 1989. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 86: 77-86.
- Birnbaum, K.D. & Sánchez Alvarado, A. 2008. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* 132: 697-710.
- Bosch, T.C.G. 2007. Why polyps regenerate and we don't: Towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev. Biol.* 303: 421-433.
- Bostock, R.M. & Stermer, B.A. 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 343-371.
- Breuer, C., Braidwood, L., & Sugimoto, K. 2014. Endocycling in the path of plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 78-85.
- Che, P., Gingerich, D.J., Lall, S., & Howell, S.H. 2002. Global and Hormone-Induced Gene Expression Changes during Shoot Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2771-2785.
- Che, P., Lall, S., Nettleton, D., & Howell, S. 2006. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Phys.* 141: 620-637.
- Christen, B., Robles, V., Raya, M., Paramonov, I., Carlos, J., & Belmonte, I. 2010. Regeneration and reprogramming compared. *BMC Biol.* 8:5.
- Christianson, M.L. & Warnick, D.A. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Dev. Biol.* 95: 288-293.
- Christianson, M.L. & Warnick, D.A. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. *Dev. Biol.* 112: 494-497.
- Cummings S.G. & Bode H.R. 1984. Head regeneration and polarity reversal in Hydra attenuata can occur in the absence of DNA synthesis. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194: 79-86.
- Delessert, C., Wilson, I.W., Van Der Straeten, D., Dennis, E.S., & Dolferus, R. 2004. Spatial and temporal

- analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol. Biol.* 55: 165-181.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., & Sangwan, R.S. 2011. De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci.* 16: 597-606.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., & Hu, Y. 2012. Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res.* 22: 1169-1180.
- Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., de Rosa, R., & Chera, S. 2006. Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17: 492-502.
- Garcia-Arraras, J.E., Valentín-Tirado, G., Flores, J.E., Rosa, R.J., Rivera-Cruz, A., San Miguel-Ruiz, J.E., & Tossas, K. 2011. Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*. *BMC Dev. Biol.* 11: 61
- Hawkins R.D., Hon, G.C, Lee, L.K., Ngo, Q., Lister, R., *et al.* 2010. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* 6:479-491.
- He, C., Huang, H., & Xu, L. 2013. Mechanisms guiding Polycomb activities during gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 4: 454.
- Hyman, L.H. 1951. The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria. McGraw Hill, New York
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173.
- Ikeuchi, M., Ogawa Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143: 1442-1451.
- Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., Kimura, M., Sugimoto, N., Akita, A., Oguri, Y., Friedman, W.E., Hasebe, M., & Kubo, M. 2011. Physcomitrella cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924-2938.
- Iwase, A., Ishii, H., Aoyagi, H., Ohme-Takagi, M., & Tanaka, H. 2005. Comparative analyses of the gene expression profiles of *Arabidopsis* intact plant and cultured cells. *Biotechnol. Lett.* 27: 1097-1103.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., & Ohme-Takagi, M. 2011a. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 508-514.
- Iwase, A., Ohme-Takagi, M., & Sugimoto K. 2011b. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signal Behav.* 6: 1943-1945.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Ikeuchi, M., Ohnuma, M., Koizuka, C., Kawamoto, K., Imamura, J., Ezura, H., & Sugimoto, K. 2013. *Arabidopsis* WIND1 induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Signal Behav.* 8: e27432.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Ikeuchi, M., Ohnuma, M., Koizuka, C., Kawamoto, K., Imamura, J., Ezura, H., & Sugimoto, K. 2015. WIND1-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed. *J. Plant Res.* 128: 389-397.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., & Tanaka, E.M. 2009. Cells keep

- a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460: 60-65.
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka, M., & Kohchi, T. 2013. Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:167-172.
- Lloyd, M., Barnason, R., Rogers, S.G., Byrne, M.C., Fraley, R.T., & Horsch, R.B. 1986. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 234: 464-466.
- Maden M. 1976. Blastemal kinetics and pattern formation during amphibian limb regeneration. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36: 561-74.
- Magnani, E., Sjölander, K., & Hake, S. 2004. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16: 2265-2277.
- Maki, N., Suetsugu-Maki, R., Tarui, H., Agata, K., Del Rio-Tsonis, K., & Tsonis, P. 2009. Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in newts. *Dev. Dyn.* 238: 1613-1616.
- Melnyk, C.W. & Meyerowitz, E.M. 2015. Plant grafting. *Curr. Biol.* 25:R183-188.
- Müller, D. & Leyser, O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.* 107: 1203-1212.
- Nagata, T. & Takebe, I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsudam Y., Kubota, A., & Kohchi, T. 2015. Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant. Res.* 128: 407-421.
- Ohtani, M. & Sugiyama, M. 2005. Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 43: 479-490.
- Ohtani, M., Demura, T., & Sugiyama, M. 2013. *Arabidopsis* ROOT INITIATION DEFECTIVE1, a DEAH-Box RNA Helicase Involved in Pre-mRNA Splicing, Is Essential for Plant Development. *Plant Cell* 25: 2056-2069.
- Ono, K. 1973. Callus formation in liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Jap. J. Genet.* 48: 69-70.
- Ono, K., Izumi, Y., & Takamiya, M. 1992. Isolation, Culture and Thallus Regeneration of Protoplasts from the Hornwort *Anthoceros punctatus* L. Cultured Cells. *Plant Tissue Cult. Lett.* 9: 27-31.
- Skoog, F. & Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Sokal, I., Kuta, E., & Przywara, L. 1997. Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 38: 99-107.
- Soufi, A., Garcia, M. F., Jaroszewicz, A., Osman, N., Pellegrini, M., & Zaret, K.S. 2015. Pioneer Transcription Factors Target Partial DNA Motifs on Nucleosomes to Initiate Reprogramming. *Cell* 161: 555-568.
- Staniszewska, M., Słuczanska-głabowska, S., & Drukała, J. 2011. Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49: 375-380.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., & Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.

- Stobbe, H., Schmitt, U., Eckstein, D., & Dujesiefken, D. 2002. Developmental Stages and Fine Structure of Surface Callus Formed after Debarking of Living Lime Trees (*Tilia* sp.). *Ann. Bot.* 89: 773-782.
- Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., & Harada, J.J. 2001. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11806-11811.
- Straube, W.L. & Tanaka, E.M. 2006. Reversibility of the differentiated state: Regeneration in amphibians. *Artificial Organs* 30: 743-755.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E.M. 2010. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* 18: 463-471.
- Sugiyama, M. 2000. Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro. *Int. Rev. Cytol.* 196: 67-84.
- Sugiyama, M. 2003. Isolation and initial characterization of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are impaired in root redifferentiation. *Plant Cell Physiol.* 44: 588-596.
- Sugiyama, M. 2015. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *J. Plant Res.* 128: 349-359.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Tanaka E.M. & Reddien P.W. 2011. The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell* 21: 172-85.
- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Mol. Biol.* 37: 169-180.
- Valvekens, D., Montagu, M.V., & Lijsebettens, M.V. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5536-5540.
- van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Martens, A.C., Barker, N., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. 2012. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* 14: 1099-1104.
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., & Camargo, F.D. 2014. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 157: 1324-1338.
- Yoshida-Noro, C. & Tochinal, S. 2010. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Deve. Growth Differ.* 52: 43-55.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V, Pellegrini, M., Goodrich, J., & Jacobsen, S. E. 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5: e129
- Zhou, C., Guo, J., Feng, Z., Cui, X., & Zhu, J. 2012. Molecular characterization of a novel AP2 transcription factor ThWIND1-L from *Thellungiella halophila*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 110: 423-433.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- 朝比奈雅志, Pitaksaringkarn Weerasak, 佐藤忍. 2015. 植物の切断組織における組織癒合へのホルモンと細胞壁代謝の関与. *BSJ-Review6A*: 31-40.
- 阿部喜任 1837. 草木育種後編.

- 池内桃子, 岩瀬哲, 杉本慶子 2015. 傷付いた植物はどのように修復・再生するのか. BSJ-Review6A: 23-30.
- 石川雅樹 2015. ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構. BSJ-Review 6A: 41-50.
- 岩崎常正 1833. 草木育種.
- 岩瀬哲, 池内桃子, 杉本慶子 2015. カルス形成の分子メカニズム～アクセル因子とブレーキ因子～. BSJ-Review6A: 2-22.
- 長谷部光泰 2015. 植物と動物の発生における相違点と類似点. 生体の科学 66: 261-266.
- 宮崎安貞 1697. 農業全書.