

生存戦略としての細胞リプログラミング

オーガナイザー

岩瀬 哲, 池内 桃子

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

環境に応じて柔軟にその形を変える植物。私たちを魅了する植物の高い細胞分化の可塑性は、固着生活を営む植物の生存戦略の一つと考えられます。これは様々な外的シグナルに応答して個々の細胞が分化運命や発生プログラム、分裂パターン等を変更できること、すなわち細胞の高いリプログラミング能力に裏打ちされたものです。特に、傷害ストレスによって引き起こされる細胞の脱分化と、引き続いて起こる幹細胞化や組織・器官再生現象は植物細胞の分化可塑性を最も顕著に示す事例として特筆すべきものです。また、細胞リプログラミングの引き金は無生物的なストレスのみではなく、バクテリアから動物まで、様々な生物が各々の生存戦略として植物のリプログラミング能力を利用していいる事例も自然界に多く観られます。これまで、これらの現象の引き金となるストレス因子や植物ホルモンの関与が知られていましたが、分子生物学の発展に伴って、植物細胞のリプログラミング現象の一端を分子レベルで説明できる時代になりました。

本総説集では、さまざまな植物種（シロイヌナズナ・ヒメツリガネゴケ・ゼニゴケ・ミヤコグサ）を材料に、外的シグナル（傷害、光、バクテリア感染）に応答した細胞のリプログラミングに関する分子レベルでの最新の知見を紹介します。第1章では、種々のストレスによって誘導される「カルス化」の分子メカニズムについて概説します。第2章では、特に傷害シグナルによる傷修復と再生について、様々な組織で起こる応答を分類し、メカニズムを概観します。第3章では、傷ついた茎が再び癒合する際の分子ネットワークについて、第4章は傷ついたヒメツリガネゴケの茎葉体から幹細胞が誘導される際の分子機構を紹介します。第5章では、植物にとって最も重要な光シグナルと細胞分裂制御機構についてゼニゴケ等で見えて来た制御機構を、そして第6章では根粒菌によって引き起こされる植物細胞のリプログラミング現象について紹介します。

どの総説も、植物細胞のリプログラミング現象に魅了され、その謎に日々挑んでいる若手研究者達によるものです。シンポジウムおよびこの総説をまとめる過程を通して、研究者間の横のつながりが強化され、この大いなる謎に有機的に取り組んでいく土壤ができつつあります。また、科学は世代を超えた人類の共同作業と言いますが、この総説集が、分野、世代を超えた多くの人々、特に若い学生さんやそれを育む方々に生物の面白さを知って頂くきっかけを作り、この分野のみならず生命科学全体の発展の一助になることを切に願っております。

本総説は、基本的に2013年9月に開催された日本植物学会第77回大会におけるシンポジウムの講演内容を再構成したもので、シンポジウムの開催において大変お世話になった大会実行委員会の先生方、またこのレビューの発表の機会を与えてくださった広報委員の先生方に深くお礼申し上げます。

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～

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 1-7-22

Molecular mechanisms on callus formation: Accelerators and Brakes

Key words: callus, dedifferentiation, phytohormone

Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto
 RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1. はじめに

研究柄, 植物のモコモコした組織を探すことが癖になっている。意識して観てみると意外と身の回りに溢れていることに気づく(図 1; 全て筆者の iPhone で撮影)。瑞々しい細胞の塊と呼べるものから、木質化が進んだ瘤状のものまで様々であるが、共通項として挙げられることは、それらが通常の発生の道筋から外れた細胞塊だということである。これらの細胞塊を、ここでは総じてカルスと呼ぶことにする。カルスは、植物科学においては元来癒傷組織(ゆしょうそしき)とも訳されるように、傷ついた部位に形成される不定形の細胞塊を指す語である。高校や大学の生物学の実験で植物の組織培養を経験し、カルスと出会っている読者も多くいるかもしれないが、現在ではもっぱら、適度な植物ホルモンと栄養を含む培地上に置かれた組織片から生じる細胞塊を広く指す語として使われている。さらに、薬用植物のカルスから誘導された培養細胞が医薬品原料の生産に用いられたり、園芸植物の増産や品種改良にカルスが盛んに用いられたりするなど、カルスは私達の身近なところで長い間役立って来た。しかしながら、カルスがどのように形成されるのか、分子レベルでの詳細を私達はまだ理解していない。カルスは、例えば異常な細胞分裂など、由来となる細胞とは異なる性質を有し、また様々な組織を生み出す多分化能、時に不定胚を生み出す分化全能性を有することから、植物細胞のリプログラミング過程によって生じたものであることは疑いの余地がないだろう。本稿では、まず身近にみられるカルス形成について、その形成因子を概説するとともに、近年の急速な分子生物学の発展に伴って明らかにされつつあるカルス

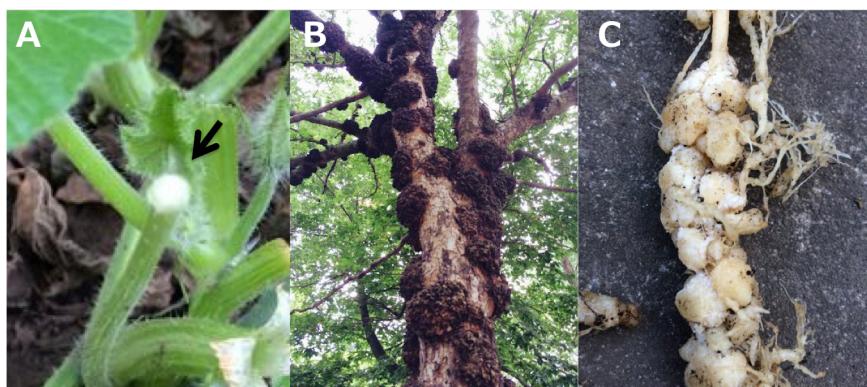


図 1. 身近に観られる「カルス」。(A) カボチャの葉柄の切断面に作られた細胞塊(矢印)。(B) アキニレの樹皮につくられた瘤。(C) ニガウリの根に作られた根瘤。

形成の分子メカニズムについて、形成促進因子（アクセル）と抑制因子（ブレーキ）に分けて紹介する。尚、本稿は基本的に私達の総説(Ikeuchi et al. 2013)の内容に基づいて加筆・再構成をしたものであるが、本稿では紹介仕切れなかった内容や写真が数多く掲載されているので、そちらも是非参照されたい。

2. 人口環境下と自然界でみられるカルス形成

2-1. 細胞培養条件下のカルス形成

植物組織片からのカルス誘導には、オーキシンとサイトカイニンと呼ばれる2種類の植物ホルモンが良く用いられる。通常、植物から組織を切り出し、この2種類のホルモンのある一定濃度の組み合わせで添加した培地上に置いておくと、主に組織の切断面からモコモコと細胞の塊が現れる(図2)。組織から単離したカルスはこのホルモンを含む培地上に置いておくだけで、比較的未分化な状態を維持したまま増殖し、定期的に一部をとって新しい培地上に置くことによって継代培養をすることができる。我が国の加藤らによって誘導されたBY2というタバコのカルス由来の培養細胞は(Kato et al. 1972)，誘導からこれまで40年以上継代培養されており、植物の生理機能を明らかにするための材料として現在も広く用いられている。大変面白い事に、培地に添加するオーキシンとサイトカイニンの濃度バランスを変えると、生じたカルスから更に根や茎葉を再分化させることができる。概して言えば、オーキシン比が高いと根が再分化し、サイトカイニン比が高いと茎葉が再分化する(図2)。SkoogとMillerによって示されたこの植物組織の再分化手法(Skoog and Miller, 1957)は現在も広く植物種に適用され、カルス細胞を増殖させた後に再分化させることで、種子をつけない有用品種を増産させる方法として用いられている。また、培養時にランダムに起こる遺伝的変異(ソマクローナル変異)を利用したり、アグロバクテリウムとの共存培養を経て外来遺伝子を植物ゲノムに組み込ませたりすることで、新しい形質をもった植物を生み出す基盤技術となっている。

2つの植物ホルモンに加えて、組織培養において植物細胞のリプログラミングを起こす引き金として重要な因子は傷害ストレスである。報告されているほとんどの方法において、組織培養の開始時には組織片、すなわち傷をつけた組織が用いられていると言っても過言ではない。シロイヌナズナを用いた組織培養法で頻繁に用いられる培地においても、植物体に全く傷をつけない条件下ではカルス化が起きないことがある(Iwase et al. 投稿中)。後述するように、傷害ストレスによってリプログラミングを促進する転写因子が誘導されることが近年分かってきたが、これらがどのように活性化するのかについては、まだ解明の途中段階である。切断部位に生じるスト

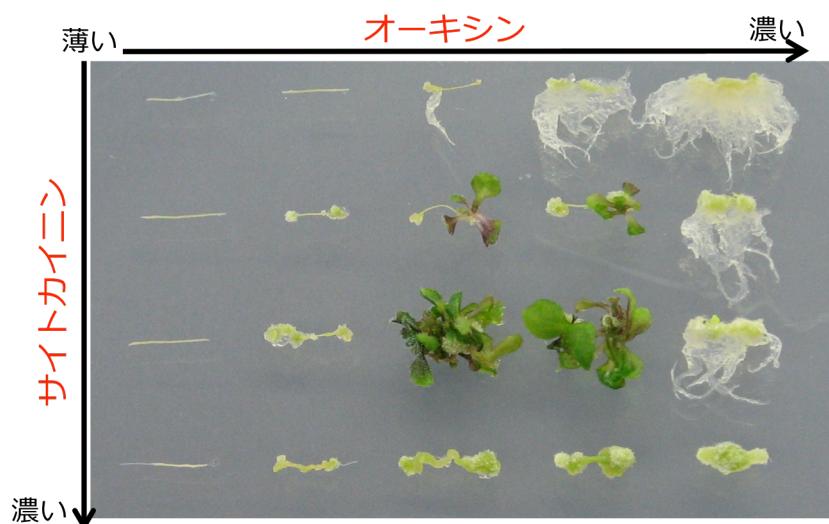


図2. シロイヌナズナ胚軸組織片からのカルス形成、根または茎葉の再分化。それぞれ異なる比率のオーキシン、サイトカイニン濃度の培地で培養した組織片を並べ直して撮影している。

レス誘導性の因子（例えば活性酸素種），切断面からの培地成分の供給促進，他の組織などから来る内生の諸因子（植物ホルモン等）の欠落等，様々な要因が引き金になっていることが考えられる。また傷害誘導性のリプログラミング因子の機能獲得および機能欠損植物体では，組織培養系でのカルス化や再分化にも影響が出る事から(Iwase et al. submitted)，組織培養系で観られる様々な現象は，植物体が傷を修復したり，組織を再生したりする機構が植物ホルモンなどの培地成分によってより顕在化されたものと考えてよいだろう。

一口にカルスと言っても，その生理状態は様々である。組織培養の分野では昔から，細胞塊の固さから compact callus であるとか friable callus などの用語が使われて来た。また，再分化のし易さや，一部再分化組織を生じたまま増殖するカルスもあり，茎葉を出し易いものを shooty callus，同様に根や不定胚を出し易いものを rooty callus, embryonic callus などと呼んだりしている (Zimmerman, 1993, Frank et al., 2000)。これらのカルスの特性は，カルス細胞の遺伝子発現に依存していると考えられる。実際，私達が行ったカルスの遺伝子発現の網羅的解析からも(Iwase et al. 2011a)，根の幹細胞維持に関する遺伝子（例えば *PLETHORA1*）を発現しているカルスや，茎頂分裂組織の幹細胞維持に必要な遺伝子(例えば *WUSHEL* や *SHOOT MERISTEMLESS*)を発現しているものが観られており，カルスの見た目も再分化の傾向も異なっている。実際，*PLT1* を発現しているカルスは，植物ホルモンを含まない培地にカルスを移植すると根を再分化する傾向が非常に高い。

このような遺伝子発現プロファイルの異なったカルスは，同一の組織片を同一の培地条件で培養した際にも出現しうる。シロイヌナズナの組織培養系で良く用いられる Callus Inducing Medium (CIM; Valvekens et al., 1988)で培養した根の組織片では，傷害部位のみならず非傷害部位からもカルスが出現してくる。Sugimoto らは，この系の非傷害部位からのカルス形成時に，*SCARECROW*(*SCR*)や *WUSHEL RELATED HOMEobox5* (*WOX5*)など根の幹細胞形成に関するマーカー遺伝子が強く発現することを発見している。また，側根が作られなくなる変異体ではカルスが形成されなくなることから，この条件下のカルスは側根原基形成の経路を経由して形成されていることを報告している(Sugimoto et al., 2010)。一方，私達が観察している傷害部位のカルスではこれらのマーカー遺伝子の発現は観られない。また，側根が作られなくなる変異体でも，傷害部位ではカルス化が起こる。これらの観察から，傷害部位で作られているカルスは，根のマーカー遺伝子を発現する非傷害部位のカルスとは，少なくともある程度は異なる経路で作られた，異なる遺伝子発現プロファイルのカルスであることが明らかとなった(Iwase et al., 2011a)。このように「カルス」という言葉で括られる細胞塊も，その生理状態は様々であり，遺伝子発現レベルで捉え直し分類する必要があるだろう。

2-2. 傷害誘導性のカルス形成

植物の個体を増やす手法として良く用いられる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，やがて切断面から根や茎葉が出てきて新たな個体が再生する。また，接ぎ木法では，例えば病害に強い種の根と，良い果実がつく種の地上部など，異なる種同士の茎を人為的に接着させ，通道組織を再生させて病害に強く収量の安定した個体を生み出したりする。切断面や接ぎ木面ではカルスの形成がよく観察され(Sass, 1932; Cline and Neely, 1983)，特に接ぎ木においてはカルス形成の度合いが，うまく接げるか否かに影響すると考えられている(Sass,

1932)。また皮が剥がれた樹木が樹皮を再生する現象は、約 200 年前には認知され研究されていたと指摘されている (Stobbe et al. 2002)。この過程の中では、surface callus と呼ばれる細胞塊が形成される(Sharples and Gunerry, 1933)。組織学的な観察から、このカルスは維管束の細胞、皮層の細胞、髓の細胞などから生じ、木部、師部、周皮、形成層を生み出す。このように、植物は自らカルスをつくる能力を有しており、傷害誘導性のカルス形成は傷の修復やその後の器官再生に重要な役割を担っている。

内在性の植物ホルモンやその応答経路が、傷害誘導性のカルス形成に関与していることが報告されている。シロイヌナズナ花茎を一部切断し、組織を癒合させる実験系においては、まず癒合面に不定形の細胞塊が形成される。この過程にはオーキシンとジャスモン酸の関与が報告されている (Asahina et al. 2011. 詳細は朝比奈らによる第 3 章を参照のこと)。私達は植物ホルモンを含まない培地上で、シロイヌナズナの黄化胚軸の切断面におけるカルス形成過程を観察しているが、切断面においてサイトカインの応答系が活性化していることを観察している(Iwase et al., 2011a. 詳細は後述)。

面白い事に、組織の再生様式は植物体の部位によって異なっており、例えば同じシロイヌナズナにおいても根端の分裂組織周辺では明確なカルス化を伴わない再生現象がみられる (Sena, 2009)。また、コケの一種であるヒメツリガネゴケでは、茎葉体の切断面の細胞から、原糸体の幹細胞がカルス化を伴わずに形成される(部位の違いによる再生様式の違いについては池内らによる第 2 章を、ヒメツリガネゴケ茎葉体からの原糸体再生の分子機構に関しては石川による第 4 章を参照のこと)。このような部位による修復反応の違いや、植物種による再生戦略の違いは何によって規定されているのだろうか? この問い合わせるために答えるためには同一種による総合的な研究を進めて行くとともに、種を超えた横断的な研究が必須である。

傷害誘導性の再生現象は、植物のみならず様々な動物にもみられている(Birnbaum and Sánchez Alvarado, 2009)。例えば両生類のイモリは切断された脚はおろか、傷害を受けた心臓や眼のレンズなども再生することが知られている (Straube and Tanaka, 2006)。イモリの例は高校生物でも取り上げられるため比較的良く知られているが、脊椎動物のみならず、刺胞動物(ヒドロ、クラゲ)、扁形動物(プラナリア)、棘皮動物(ヒトデ)、環形動物(ヤマトヒメミミズ)、節足動物(昆虫類)などでも観察されている。中には傷の修復にとどまらず、再生能を積極的に繁殖に利用している生物も報告されている。ヤマトヒメミミズは、自切と呼ばれる現象で一個体が自ら 10 個程に切れ、それぞれが個体として再生し増殖する(Yoshida-Noro and Tochinai, 2010)。培養環境下では、これが二週間おきに観察されるという(Yoshida-Noro and Tochinai, 2010)。このような自切による繁殖はプラナリアでも報告されている(Hyman 1951)。また、担子菌類の多くは胞子を形成し飛ばすための組織として子実体(キノコ)を分化させるが、傷害や様々なストレスによって子実体から再び菌糸体(気中菌糸)を再生させることも報告されている(Murata et al. 1998)。このように、傷害ストレスによる再生現象は多細胞生物に保存された共通の生存戦略であると考えられる。再生する組織の由来となる細胞が、細胞リプログラミング(脱分化や direct reprogramming)を経たものであるのか、幹細胞が活性化したものなのか、その様式についてはそれぞれの種で研究が進められている。研究途上であったり、それぞれの種で用いられている語の定義が必ずしも一定でなかったりするため一概には比べられないが、種によっては細胞リプログラミングと幹細胞の活性化も両方行っている場合がある。例えば植物は、頂芽を失うと腋芽を再生させるが、この場合は休眠し

ていた幹細胞が活性化されている(Müller and Leyser, 2011)。また、私達ヒトでも傷害からの再生現象が観られるが、例えば皮膚の再生は皮膚の幹細胞によるものであるのに対し(Staniszewska et al. 2011), 傷害を受け腸管の再生現象では、脱分化と呼べる現象も起きていることが報告されている(van ES and Sato et al. 2012)。傷害ストレスによる再生現象を誘導・実行する分子の実体は何なのか。プラナリアで近年明らかにされたように(Liu et al. 2013), 再生能の異なる近縁種との比較からその謎を解き明かすことは、一つの有効なアプローチであろう。

2-3. 他生物によって引き起こされるカルス形成

バクテリアの一種であるアグロバクテリウム *Agrobacterium tumefaciens* (近年の再分類で学名は *Rhizobium rhizogenes* に変更されている)は、多くの植物種に根頭癌腫病(クラウンゴール)を引き起こす事が知られている(Gohlke and Deeken, 2014)。このバクテリアは植物の傷害部位から感染しカルスを植物に作らせるが(Nester et al., 1984), この機構は驚きに溢れている。傷ついた植物の組織が放出するアセトシリンゴン(フェノール性物質の一種)を感知したアグロバクテリウムは、自身が有する環状の DNA の一部(T-DNA と呼ばれる)を切り出して、植物細胞の核の中に送り込み、最終的には植物の DNA に自らの T-DNA を組み込む。この T-DNA には、オーキシン合成遺伝子(Sitbon et al., 1991), サイトカイニン合成遺伝子(Akiyoshi et al., 1983, 1984), さらにはオパインという特殊なアミノ酸を作る遺伝子の配列がコードされており(Nester et al., 1984), これによって感染された植物は傷口にカルスを形成し、その活発に分裂する細胞では同時にアグロバクテリウムが好物とするオパインが作られる。クラウンゴールの細胞は、バクテリアを除去した後も植物ホルモンを含まない培地で継代培養ができるが、この事例からもカルスの誘導と維持にはオーキシン、サイトカイニンが重要な働きを担っている事が分かる。

アグロバクテリウムの場合は、植物ホルモンの合成遺伝子を直接植物に組み込むという離れ業を行うが、その他多くの微生物では、自らオーキシンやサイトカイニンを合成し (Morris, 1986; Glick, 1995), それらを用いて植物細胞のリプログラミング等に用いていることが知られている(Manulis et al., 1998)。バクテリアの一種である *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* や *P. agglomerans* pv. *Betae* も植物に感染しカルスを作らせる事が知られているが(Barash and Manulis-Sasson, 2007), このバクテリアも自ら植物ホルモンを生産する。加えて type III secretion system によって植物細胞内に送り込まれるエフェクタータンパク質を複数有しており、このいくつかの機能を欠損させると感染はできてもカルス化が起きない。驚くべきことに、このバクテリアが有するオーキシンやサイトカイニンの合成酵素遺伝子を欠損させても、腫瘍は小さくなるものの形成そのものは阻害されない(Barash and Manulis-Sasson, 2009)。このことから、このバクテリアによるカルス形成にはエフェクタータンパク質の働きが必須であると考えられている(Barash and Manulis-Sasson, 2009)。このエフェクタータンパク質が植物細胞のオーキシン、サイトカイニン応答を変化させることが報告されているが(Weinthal et al., 2010), その作用点については明らかになっていない。今後このようなエフェクタータンパク質の同定と機能解析は、植物細胞のリプログラミング制御機構解明のひとつの有力な手段になるとを考えている。

植物にもウィルス性の腫瘍形成があることが知られている。創傷腫瘍ウィルス(Wound tumor viruses; WTVs)は、二本鎖RNAを有する第3群のウィルスで、宿主となるクローバーなどの植物に瘤をつくりさせる。このウィルスによって形成される腫瘍は比較的に分化が進んでおり、宿主の表

皮や髓に囲まれて木部や師部に似た組織 (psuedophloem) や、また分裂組織が観察される (Lee, 1955)。同様に第3群のウィルスである Rice gall dwarf virus は、イネやコムギなどのイネ科植物を宿主とし腫瘍形成を誘導する。このウィルスや WTV の二本鎖 RNA はそれぞれ 12 のタンパク質をコードしていると考えられているが (Zhang et al., 2007), これらの中で、どのタンパク質がどのように植物細胞のリプログラミングを引き起こしているかは、まだ分かっていない。

他の生物種による植物細胞のリプログラミングも数多く報告されている。例えば、根こぶ病を引き起こす原生生物 phytomyxea (Malinowski et al., 2012) や線形類に属すネコブセンチュウ (Jammes et al., 2005), いわゆる「虫こぶ」をつくらせる昆虫類 (Tooker et al., 2008) 等が挙げられる。これらの中には、作物に甚大な被害を起こすものがあるが、感染や病徵が現れる際の分子メカニズムを解明する事は農業的にも大変重要である。一方、植物にとっても我々人類にとっても非常に重要な瘤がある。その一つは、根粒菌がマメ科植物に作らせる根粒であるが、これに関しては、寿崎らによる第6章を参照されたい。

2-4. 植物の種間雑種によるカルス形成

植物のある種間で交雑をすると、誕生した雑種の個体にカルスができることがある。これは遺伝的腫瘍と呼ばれており、アブラナ科アブラナ属、ナス科チョウセンアサガオ属、ナス科ニコチアナ属、ユリ科ユリ属などで報告されている (Ahuja, 1965)。例えば、タバコの雑種 *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii* に作られたカルスは植物ホルモンを添加しない培地でも継代培養が可能であり、また個体を再生させる事もできる (White, 1939; Ichikawa and Syōno, 1988)。面白いことに、このタバコの遺伝的腫瘍では個体の老化が進むとカルス形成が進む。若い個体でも、植物体に傷をつけることでカルスが形成される (Udagawa et al., 2004)。原因を究明する一連の研究から、偶然、*N. glauca* のゲノムに毛状根を植物に作らせることで有名なバクテリア *Agrobacterium rizogenes* の root-inducing (Ri) プラスミドの遺伝子配列によく似た領域が見つかり、実際この領域にコードされた遺伝子はタバコに形態変化を起こす機能があることが分かった (Aoki and Syono, 1999)。しかしながら、タバコではこの遺伝子配列を持たない種の組み合わせでも遺伝的腫瘍が起こることがわかり、水平伝播によって挿入されたと考えられるこのバクテリア由来の遺伝子が腫瘍化の主たる原因ではないことが報告されている (Kung, 1989)。植物ホルモンとの関係については内生量の変化が起きているという報告がある (Kehr, 1951; Kung, 1989; Ichikawa and Syōno, 1991) が、分子レベルでの解析はあまり進んでいない。ヒマワリの種間雑種 *Helianthus annuus* × *H. tuberosus* に観られる遺伝的腫瘍では、胚発生や分裂組織の形成に重要な遺伝子の異所的な発現が報告されている (Chiappetta et al., 2006, 2009)。

3. カルス形成の分子メカニズム

傷害誘導性のカルス形成は傷口で特異的に観られるが、これは部位特異的な制御機構が存在することを示唆している。また、植物細胞では一度分化した細胞 1 つからでもカルス化を経て個体を再生でき、分化全能性を有することが 1950 年代後半～1970 年代にかけて既に明らかにされている (Steward 1959, Nagata and Takebe 1971)，通常の発生・分化段階ではこの能力を抑え込む機構が必要に違いない。ここ二十余年に渡る植物の分子遺伝学解析の進展に伴って、カルス化に関する様々な変異体が単離されてきた。これにより、カルス化に関する遺伝子も徐々に明らか

になってきている(表1)。これらの因子は、カルス化を促進するアクセル因子と、抑制するブレーキ因子に大別できる。実際、私達の研究からも傷口で発現が促進し、カルス化を促進する転写因子(Iwase et al. 2011a, 2011b)が見つかり、さらに最終分化細胞が脱分化しないようにする機構(Ikeuchi and Iwase et al., submitted)も見えつつある。この節では、それらの因子を紹介するとともに、特にカルス化の特徴の一つである細胞分裂の昂進や再開との関連に着目して概説したい。

表1. シロイヌナズナで報告されているカルス形成のアクセル因子とブレーキ因子

遺伝子座	遺伝子名	タンパク質ファミリー	機能(予期されているものも含む)	文献
【アクセル因子】				
AT2G42430	<i>LBD16</i>	LOB-domain transcription factor (TF)	オーキシン応答/側根形成	Fan et al. (2012)
AT2G42440	<i>LBD17</i>	LOB-domain TF	オーキシン応答	Fan et al. (2012)
AT2G45420	<i>LBD18</i>	LOB-domain TF	オーキシン応答/側根形成	Fan et al. (2012)
AT3G58190	<i>LBD29</i>	LOB-domain TF	オーキシン応答/側根形成	Fan et al. (2012)
AT3G16857	<i>ARR1</i>	GARP TF	サイトカイニン応答	Sakai et al. (2001)
AT5G07210	<i>ARR21</i>	GARP TF	サイトカイニン応答	Tajima et al. (2004)
AT1G12980	<i>ESR1/DRN</i>	AP2/ERF TF	サイトカイニン応答/茎葉再生	Banno et al. (2001)
AT1G24590	<i>ESR2/DRNL/BOL</i>	AP2/ERF TF	サイトカイニン応答/茎葉再生	Ikeda et al. (2006); Marsch-Martinez et al. (2006)
AT1G78080	<i>WIND1/RAP2.4b</i>	AP2/ERF TF	傷害誘導性脱分化	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G22190	<i>WIND2/RAP2.4d</i>	AP2/ERF TF	傷害誘導性脱分化	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G36060	<i>WIND3/RAP2.4a</i>	AP2/ERF TF	傷害誘導性脱分化	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT5G65130	<i>WIND4</i>	AP2/ERF TF	傷害誘導性脱分化	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G21970	<i>LEC1</i>	CCAAT-box binding TF	胚発生	Lotan et al. (1998)
AT1G28300	<i>LEC2</i>	B3 domain TF	胚発生	Stone et al. (2001)
AT5G13790	<i>AGL15</i>	MADS box TF	胚発生	Harding et al. (2003)
AT5G17430	<i>BBM</i>	AP2/ERF TF	胚発生	Boutilier et al. (2002)
AT5G57390	<i>EMK/AIL5/PLT5</i>	AP2/ERF TF	胚発生	Tsuwamoto et al. (2010)
AT1G18790	<i>RKD1</i>	RWP-RK domain TF	配偶子形成	Köszegi et al. (2011)
AT1G74480	<i>RKD2</i>	RWP-RK domain TF	配偶子形成	Köszegi et al. (2011)
AT5G53040	<i>RKD4</i>	RWP-RK domain TF	傷害誘導性脱分化	Waki et al. (2011)
AT2G17950	<i>WUS</i>	Homeodomain TF	幹細胞維持	Zuo et al. (2002)
【ブレーキ因子】				
AT3G50360	<i>KRP2</i>	CDK inhibitor	細胞増殖抑制	Anzola et al. (2010)
AT5G48820	<i>KRP3</i>	CDK inhibitor	細胞増殖抑制	Anzola et al. (2010)
AT1G49620	<i>KRP7</i>	CDK inhibitor	細胞増殖抑制	Anzola et al. (2010)
AT5G49720	<i>TSD1/KOR1/RSW2</i>	Endo-1,4-β-d-glucanase	セルロース生合成	Frank et al. (2002); Krupková and Schmülling (2009)
AT1G78240	<i>TSD2/QUA2/OSU1</i>	S-adenosyl-L-Met-dependent methyltransferase	ペクチン生合成 (?)	Frank et al. (2002); Krupková et al. (2007)
AT2G23380	<i>CLF</i>	PRC2	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化	Chanvivattana et al. (2004)
AT4G02020	<i>SWN</i>	PRC2	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化	Chanvivattana et al. (2004)
AT4G16845	<i>VRN2</i>	PRC2	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化	Chanvivattana et al. (2004); Schubert et al. (2005)
AT5G51230	<i>EMF2</i>	PRC2	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化	Chanvivattana et al. (2004); Schubert et al. (2005)
AT3G20740	<i>FIE</i>	PRC2	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化	Bouyer et al. (2011)
AT2G30580	<i>At BMI1A</i>	PRC1	ヒストン H2A Lys-119 ユビキチン化	Bratzel et al. (2010)
AT1G06770	<i>At BMI1B</i>	PRC1	ヒストン H2A Lys-119 ユビキチン化	Bratzel et al. (2010)
AT2G25170	<i>PKL</i>	CHD3/4-like chromatin remodeling factor	ヒストン H3 Lys-27 トリメチル化 と ヒストン脱アセチル化 (?)	Ogas et al. (1997, 1999)
AT2G30470	<i>VAL1/HSI2</i>	B3 domain TF	栄養相転換時における胚性の抑制	Tsukagoshi et al. (2007)
AT4G32010	<i>VAL2/HSL1</i>	B3 domain TF	栄養相転換時における胚性の抑制	Tsukagoshi et al. (2007)

3-1. 植物ホルモン関連のカルス化アクセル/ブレーキ因子

2-1 節で触れたように、CIM で形成されるカルスには側根原基形成を経由したものがある (Sugimoto et al. 2010)。側根原基形成はオーキシンのシグナルによって活性化されるが、この経路で機能することが知られている LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) ファミリー転写因子に属す LBD16, LBD17, LBD18, LBD29 の遺伝子は、それぞれシロイヌナズナで過剰発現させると植物ホルモンを添加しない培地においてもカルスを形成させる(表 1; 図 3)。また、機能欠損(*lbd16*)または抑制型(35S:LBD16-SRDX)の植物体では、逆に植物ホルモンを含む培地(CIM)においてもカルス化が抑制される(Fan et al. 2012)。オーキシンに応答し LBD の発現を正に制御する転写因子として AUXIN RESPONSIVE FACTOR7 (ARF7) と ARF19 が報告されているが(Okushima et al., 2007; Lee et al., 2009), *arf7 arf19* 二重変異体でもカルス化は抑制される。さらに *arf7 arf19* 植物で *LBD16* を過剰発現させると再びカルス化能が回復する事から(Fan et al. 2012), ARF7 や ARF19 の下流因子として存在する LBD 転写因子群が、側根原基形成を経由したカルス形成のアクセル因子であることは明らかである。筆者らも *LBD16* を過剰発現させたシロイヌナズナ植物体で、植物ホルモンを含まない培地においても根にカルスが形成される事を確認している (Ikeuchi et al., 2013 ; 図 3)。LBD と細胞周期再開の関連としては、*LBD18* と *LBD33* の二量体が *E2 PROMOTER BINDING FACTOR a* (*E2Fa*) の発現を高めるという報告がある(Berckmans et al., 2011)。転写因子 *E2Fa* は DIMERIZATION PARTNER (DP) と二量体となって DNA の複製に必要な種々の遺伝子の発現を促進することから(Inzé and De Veylder, 2006), ARF→LBD→E2Fa という転写因子ネットワークがオーキシンによる細胞周期制御の一つを担っていると考えられる。

細胞周期を再活性化するには、細胞周期のブレーキを外すという戦略もある。Cyclin Dependent Kinase (CDK)を阻害する KIP-RELATED PROTEIN (KRP)をコードする遺伝子はオーキシンによって発現抑制される。転写のアダプターパク質である PROPORZ1 (PRZ1)がこのプロセスに関与している事が報告されている(Anzola et al., 2010 ; 表 1)。*prz1* 変異体は、野生株が側根を形成するオーキシン濃度の培地でもカルスを形成する。この過剰な細胞分裂は *KRP2*, *KRP3*, *KRP7* 遺伝子の転写量が低いことによって引き起こされている(Sieberer et al., 2003)。PRZ1 は *KRP2*, *KRP3*, *KRP7* 遺伝子のプロモーターにそれぞれ直接結合することや、*prz1* 変異体では *KRP7* の 5'UTR 領域に入るヒストン H3-K9/K14 のアセチル化マークのレベルが下がることから、オーキシン処理によってヒストンのアセチル化レベルが下がることで KRP の発現量が下がり、結果として過剰な細胞分裂が引き起こされていると考えられている(Anzola et al., 2010)。実際 *KRP* の発現量をアンチセンス法で抑えるとカルス化が促進し、また *prz1* 変異体で *KRP7* の発現量を上げるとカルス化の形質が抑えられることも報告されている(Anzola et al., 2010)。オーキシンによって PRZ1 がどのように制御されているかは明確になっていないが、これらの結果はオーキシンによる細胞分裂活性化経路には、PRZ1 依存的な

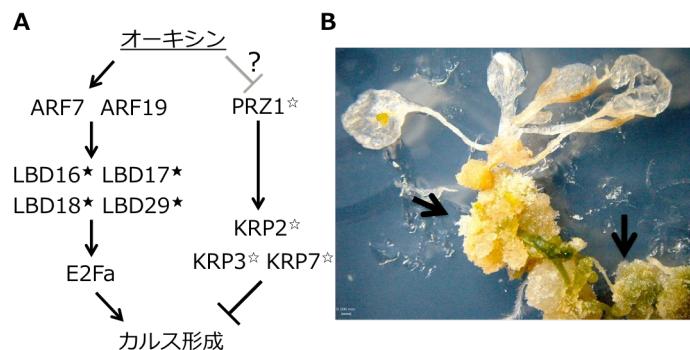


図3. オーキシン関連のカルス化アクセル/ブレーキ因子。(A) 予想される経路。★機能獲得/☆機能抑制変異体でカルス化が観られる因子。→は促進、ーは抑制作用を表す。(B) *LBD16*の強制発現(35S:*LBD16*)によるカルス形成。ホルモンフリーの培地で育てた3ヶ月齢のT1植物。主に胚軸と根からカルス化が観られた(矢印)。地上部は白化している。

クロマチン制御を介した *KRP* の遺伝子発現抑制という道筋があることを示唆するものである。

サイトカイニン関連因子でカルス形成との関与が明らかになっているものには、type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORs (ARRs)がある(表 1; 図 4)。type-B ARR はいわゆる二成分制御系によってリン酸化され活性化する転写因子であり、多くの下流遺伝子の発現を誘導する(Hwang et al., 2012)。サイトカイニンを含む培地で *ARR1* を発現させたシロイスナズナを育てると、カルス形成が促進する(Sakai et al., 2001)。またリン酸化ドメインを欠損させ恒常的活性型にした *ARR1* や *ARR21* 分子を強制発現させたシロイスナズナでは、植物ホルモンを含まない培地でもカルスを形成する(Sakai et al., 2001; Tajima et al., 2004)。このことから、*ARR1* 依存的なサイトカイニン応答系の活性化もカルス形成には十分であることが分かる。

細胞分裂の再活性化に関与する type-B ARRs のターゲット候補としては、Cyclin D3 (CYCD3) が有力かもしれない。CYCD3 はサイトカイニン処理後一時間で発現量が促進する上に、CYCD3 の過剰発現はサイトカイニンを含まない誘導培地においてカルス化を促進する(Riou-Khamlichi et al., 1999)。さらに面白い事に、CYCD3;1 とそのホモログである CYCD3;2 と CYCD3;3 の三重変異体ではサイトカイニン応答が抑制されることから、CYCD3 はサイトカイニンシグナルの下流因子として機能している事が報告されている(Dewitte et al., 2007)。

AP2/ERF 転写因子ファミリーに属す ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 (ESR1) と ESR2 は、サイトカイニンを介したカルス化に関与する他の候補因子である(表 1; 図 4)。ESR1 も ESR2 もシロイスナズナにおいて単独で過剰発現させることで、植物ホルモンを含まない培地でもカルスが生じる(Banno et al., 2001; Ikeda et al., 2006)。また BOLITA (BOL) というアクチベーションタグラインでは、*ESR2* の過剰発現がおきており、ここでもカルス化が観察されている(Marsch-Martinez et al., 2006)。ESR を過剰発現させた植物ではサイトカイニン応答が昂進しており、また、サイトカイニンレセプターの機能欠損変異株である cytokinin response1/Arabidopsis histidine kinase4 で ESR を発現させるとサイトカイニン応答の一つの指標である茎葉の再生能が戻る(Banno et al., 2001; Ikeda et al., 2006)。ESR2 は CYCD1;1 と DOF 転写因子の一つである OBF BINDING PROTEIN1 (*OBP1*) の発現を直接誘導することが報告されている (Ikeda et al., 2006)。この *OBP1* は過剰発現によって細胞周期関連遺伝子の発現を誘導し、G1 期を短くする事で細胞周期を促進していることが報告されている(Skirycz et al., 2008)。具体的には *OBP1* が CYCD3;3 と S 期特異的な転写因子である DOF2;3 のプロモーターに直接結合することが示されている(Skirycz et al., 2008)。カルス化の際にこれらの ESR を介した転写ネットワークが実際に細胞周期を活性化させるのかについては更なる検証が必要である。しかし、これらの知見は、細胞周期の再活性化が様々な階層の転写因子によって支配されている可能性を示している。また、そもそも ESR1 は過剰発現によってサイトカイニン非依存的に茎葉再生を起こす遺伝子として単離されており(Banno et al., 2001)，カルス化と茎葉再生との関連を解き明かすための重要な因子としても注目される。

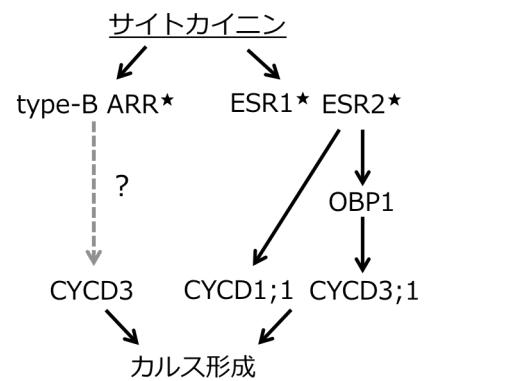


図4. サイトカイニン関連のカルス化アクセル因子と、予想される経路。

★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。

3-2. 傷害応答性のカルス化アクセル因子

傷害による細胞リプログラミング現象が多細胞生物に広く観られることは2-2節で述べた。植物で観られるカルス化においても、自然界か組織培養条件下(2-1節)かに関わらず、傷害が重要な引き金になっている。この経路に関わる分子機構は、近年になって漸くいくつかの重要因素が単離されてきたにすぎない。

私達が現在研究を進めているAP2/ERFファミリーの転写因子WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1(WIND1)は、シロイヌナズナのカルス由来の培養細胞で高発現している因子として選抜されてきた(Iwase et al. 2005)。WIND1とそのホモログであるWIND2, WIND3, WIND4をそれぞれシロイヌナズナで過剰発現させると、植物ホルモンを含まない培地でも茎葉、胚軸、根などにカルスが生じる(表1)。また過剰発現体から得られたカルスはホルモンフリー培地で継代培養が可能である(Iwase et al. 2011a; 2011b)。シロイヌナズナの近縁種である*Thellungiella halophila*のWIND1ホモログ(*ThWIND1-Like*)をシロイヌナズナで発現させると、やはり外因性のホルモン非依存的にカルスが形成される(Zhou et al., 2012)。またシロイヌナズナWIND1(AtWIND1)のカルス誘導能は、ナタネ、トマト、タバコでも確認されたことから、WIND1分子によるカルス化経路は少なくともある範囲の双子葉植物では保存されているようである(Iwase et al. 2013)。WIND1はRAP2.4とも呼ばれており(Okamuro et al., 1997), 傷害応答性があることも報告されていた(Delessert et al., 2004)。実際シロイヌナズナにおいてWIND1~4は傷害処理後数時間以内に傷口で発現が誘導され、傷害部位におけるカルス化を正に制御することが、機能獲得型変異体(35S:WIND1)と機能抑制型変異体(*Pro_{WIND1}:WIND1-SRDX*)を用いた解析から明らかとなっている(Iwase et al. 2011a)。加えてこれらの変異体を用いた実験から、組織培養系におけるカルス形成と器官の再分化に関してもWIND転写因子が重要な働きを担っていることが最近の解析からも見えてきている(Iwase et al. Submitted)。

WIND1によるカルス誘導は、*arr1 arr12*二重変異体では強く抑制される(Iwase et al., 2011a)。また、傷害ストレスは傷口でのtype-B ARR依存的なサイトカイニン応答を高めるが、機能抑制型変異体(*Pro_{WIND1}:WIND1-SRDX*)植物ではこれが抑えられることから、WIND転写因子はサイトカイニン応答を高めていることが示唆されている(Iwase et al., 2011a)。WIND1の下流因子の解析を現在進めているが、少なくとも

type-B ARR遺伝子の発現量はほとんど変化していないため(Iwase et al., in preparation), type-B ARRのタンパク修飾レベルでの制御やtype-B ARRのcis配列に結合する他の因子による制御があるのかもしれない。

ヒメツリガネゴケでは、茎葉体を切断すると切断面において細胞のリプログラミングが起こり、原糸体の頂端幹細胞が再生してくるが、この系を用いて傷

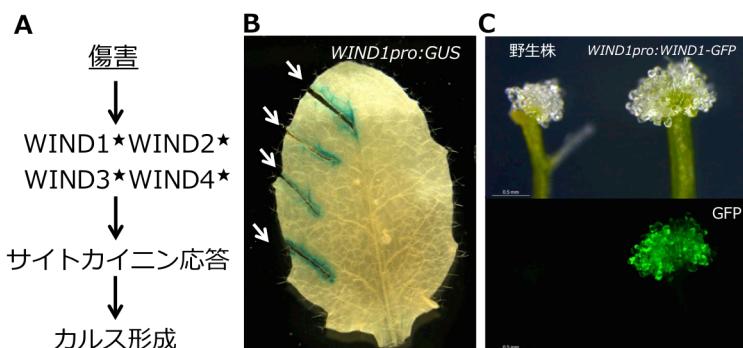


図5. 傷害応答性のカルス化アクセル因子
(A) 予想される経路。★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。
(B) シロイヌナズナWIND1pro:GUS植物の葉。一部(矢印)を切断後、24時間後にGUS染色した。切断部位でWIND1のプロモーター活性(青色)が上昇している。(C) 野生株とWIND1pro:WIND1-GFP植物の根を切断し、ホルモンフリーの培地で16日間培養した。切断部位に生じたカルスでWIND1-GFPタンパク(蛍光緑)が観られる。

害誘導性のリプログラミングに関わる重要因子の探索や、細胞周期再開の分子メカニズムの解析も精力的に進められている(Ishikawa et al., 2011)。詳細は石川による第4章を参照されたい。

傷害は植物においても組織や器官の再生を伴うことが多いが、この分子メカニズムについてもまだ分からぬ事が多い。シロイヌナズナ等を用いた解析で見えてきた組織や発生段階による応答性の違いや関与する因子に関しては、池内らによる第2章を参照されたい。また、シロイヌナズナ花茎の癒合現象に関わる因子に関しては、朝比奈らによる第3章を参照されたい。

3-3. 胚発生、分裂組織の幹細胞維持に関する因子はカルス化を促進する

胚性や分裂組織の未分化性の維持に関する因子の過剰発現体が、植物種を問わずカルスを形成するという報告が近年多くみられている(表1)。これは、植物で細胞塊を形成させるには比較的未分化な細胞状態を規定する因子を細胞中で多く出すことで十分であることや、逆に通常の細胞分化ではこれらの因子の発現を時間的、空間的に正しく制御することが必要であることを示している。CCAAT-box 結合転写因子である LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), B3 ドメイン転写因子の LEC2, MADS box 転写因子 AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) はそれぞれ転写活性化因子として胚発生時に機能するが、これらを単独で過剰発現させると植物ホルモンを含まない培地でもいわゆる embryonic callus が生じる。また遺伝子発現の誘導系を用いて embryonic callus を植物体に作らせた後に発現誘導を抑える事で、植物体を再生する事もできる (Lotan et al., 1998; Stone et al., 2001; Harding et al., 2003; Gaj et al., 2005; Umehara et al., 2007; Thakare et al., 2008)。ナタネ(*Brassica napus*; Bn)で最初に単離された AP2/ERF 転写因子ファミリーに属す BABY BOOM (BBM)も胚発生時に発現してくるが、この因子(BnBBM)を発現させたナタネやシロイヌナズナ、さらにはコシヨウ、タバコ、ポプラの近縁種等においても植物ホルモンを添加しない培地で embryonic callus が生じるため、得られた不定胚からの植物体再生を通して植物体の増産への応用が試みられている (Boutilier et al., 2002; Srinivasan et al., 2007; Deng et al., 2009; Heidmann et al. 2011)。これは BBM による embryonic callus 誘導/胚性獲得機能が、少なくともある範囲の双子葉植物で保存されていることを示唆している。シロイヌナズナにおいて BBM と配列の近い EMBRYOMAKER (EMK)は AINTEGUMENTA-LIKE5 (AIL5)や PLETHORA5 (PLT5)という名前でも知られているが、過剰発現で同様の現象が起きることが報告されている (Tsuwamoto et al., 2010)。

RKD (RWP-RK domain-containing)転写因子は、雌性配偶子(卵細胞)形成や初期の胚発生で機能することが報告されている。RKD1 と RKD2 は卵細胞で発現しているが、シロイヌナズナの過剰発現体は植物ホルモンフリーの培地でもカルスを形成する(Kőszegi et al., 2011)。面白い事に、RKD2 で誘導したカルスの遺伝子発現プロファイルをみると、オーキシンを用いて誘導したカルスよりも卵細胞のプロファイルに近い(Kőszegi et al., 2011)。これは体細胞に卵細胞様の遺伝子発現プロファイルを持たせてもカルスを生じさせられることを示唆しており、前述し

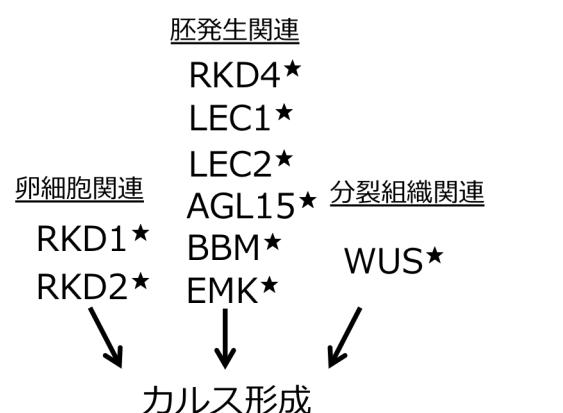


図6. 胚発生、分裂組織の幹細胞維持等で機能することが知られているカルス化アクセサリ因子。★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。

たようにカルスといつても様々な生理状態が存在することを意味している。*RKD4* は初期胚で発現し胚発生で機能しているが、遺伝子発現誘導系を用いて *RKD4* を過剰発現させると植物ホルモンフリーの培地でも葉や根がカルス化する。この際、初期胚で発現している遺伝子が数多く発現しており、さらに、カルスになった細胞で *RKD4* の発現誘導を止めると不定胚形成が起こる(Waki et al., 2011)。

植物の分裂組織は、植物の体を作り出す細胞の永続的な供給源であるが、これは分裂組織が内包する幹細胞の働きによるものである。幹細胞を維持する機能を持つ因子の過剰発現体が、細胞の塊であるカルスを形成させるのは事象として比較的受け入れやすいかもしれない。ホメオドメインを有する転写因子 *WUSCHEL* (*WUS*)は、茎頂分裂組織の organizing center で発現し、幹細胞の未分化性を維持する働きを有している(Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998)。*WUS* 過剰発現体では植物ホルモン無添加の培地でもカルスが形成され、さらに面白い事に体細胞胚も出現する(Zuo et al., 2002)。*WUS* は私達が調べた 3 種類のカルス株の遺伝子発現プロファイルのうち、2 つの株で高発現している(Iwase et al., 2011a)。*WUS* の機能解析を進めることで、茎葉幹細胞の維持機構とカルス形成や不定胚形成のそれぞれの事象の関連を理解することができるであろう。

3-4. 正しい細胞接着はカルス形成のブレーキ？

植物の体作りはレンガを用いた建築に例えられる。すなわち、頂端に存在する幹細胞が生み出す細胞やその後分裂して増える細胞を一つ一つ積み合させて体作りをしている。このため、レンガ同士の接着がうまく行かなければ正しい建築は成り立たない。細胞同士の接着を主に担っているのが細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多糖類であるが、近年これらの合成に関わると考えられる酵素遺伝子の機能欠損変異体でカルス形成が起ることが複数報告されている。タバコ (*Nicotiana plumbaginifolia*) の GLUCURONYL-TRANSFERASE1 (*GUT1*) の変異体は茎葉の頂端にカルスを形成する(Iwai et al., 2002)。*GUT1* タンパクは植物のペクチンの構成成分の一つであるラムノガラクトロン-Ⅱにグルクロン酸を転移する働きを持つ。*GUT1* 変異体ではラムノガラクトロン-Ⅱのグルクロン酸レベルが下がっており、一次細胞壁のマトリックス形成に異常が起きている。

シロイヌナズナの *tumorous shoot development1* (*tsd1*) と *tsd2* 変異体は、植物ホルモンフリーの培地でも経代培養可能なカルスを形成する(Frank et al., 2002)。*TSD1* は別グループの研究過程から *KORRIGAN1* (*KOR1*) や *RADIAL SWELLING2* (*RSW2*)とも呼ばれているが、セルロース合成に関与する膜結合型の endo-1,4-b-D-glucanase をコードしている(Nicol et al., 1998; Zuo et al., 2000; Lane et al., 2001; Krupková and Schmülling, 2009)。*tsd1/kor1/rsw2* 変異体では、セルロース合成が正常に行われず、更にペクチンの組成も変化し、結果として茎葉と根の組織化に異常が起こる(Nicol et al., 1998; His et al., 2001)。*TSD2* は別グループの解析から *QUASIMODO2* (*QUA2*) や *OVERSENSITIVE TO SUGAR1* (*OSU1*) という名前でも知られており、ゴルジ体局在のメチルトランスフェラーゼをコードしていると考えられている(Mouille et al., 2007; Ralet et al., 2008; Gao et al., 2008)。*TSD2/QUA2/OSU1* がどのように細胞壁の生合成に関与しているかは未知であるが、*tsd2/qua2/osu1* 変異株はペクチンの構成成分の一つであるホモガラクトロンが 50% も減少している(Krupková et al., 2007; Mouille et al., 2007; Ralet et al., 2008)。

tsd1/kor1/rsw2 変異体のカルス形成は、茎頂分裂組織関連因子の発現異常とサイトカイニン応

答の促進に起因しているかもしれない(Krupková and Schmülling, 2009)。例えば普通 *SHOOTMERISTEMLESS* や *CLAVATA3* の発現は茎頂分裂組織の中に制限されているが, *tsd1/kor1/rsw2* 変異体のカルスではこれらのマーカー遺伝子の発現が観察されている(Krupková and Schmülling, 2009)。また, *tsd1/kor1/rsw2* 変異体ではサイトカイニンの応答が昂進しており, サイトカイニン分解酵素の遺伝子である *CYTOKININ OXIDASE1* を *tsd1/kor1/rsw2* 変異体で発現させると, カルス化の形質が抑制される(Krupková and Schmülling, 2009)。これらの報告は, 細胞壁成分の正しい合成が組織の秩序立った分化に必須であり, 同時に体細胞の過剰な増殖を抑えるブレーキになっていることを示している。これらの細胞壁関連変異体で起こる細胞の増殖は, 細胞間コミュニケーションの欠落による間接的な影響かもしれない。

3-5. エピジェネティックな制御によるカルス形成のブレーキ

DNA そのものや DNA が巻き付くヒストンタンパク質が化学的修飾を受けると, DNA 配列の変化を伴わずに, 時に世代を超えて遺伝子発現の多様性が生みだされる。従来の DNA 配列を重視した遺伝学に対して, このような制御に基づいた遺伝学をエピジェネティクスという。エピジェネティックな変化を起こす制御因子は, DNA のメチル化やヒストンの修飾を通してクロマチンの状態を変化させ, 転写因子の DNA への接触の度合いなどを変化させて遺伝子発現を制御する。エピジェネティック制御因子による大規模なクロマチン状態の変化は細胞の分化や脱分化をコントロールする中心的な役割をしていると考えられている(Gaspar-Maia et al., 2011; Grafi et al., 2011)。ほ乳類では, 発生運命の決まった細胞は通常クロマチンを閉じた状態にしていき, 分化と共に比較的安定した遺伝子発現プロファイルになっていくのに対し, 多能性を持つような細胞はクロマチンを開いた状態にし, ダイナミックな遺伝子発現変化に対する準備をしている (Gaspar-Maia et al., 2011)。植物でも同様の制御があるかについてはまだ判然としないところが多いが, いくつかの細胞学的な研究から, 植物のクロマチン状態も細胞の分化状態に伴って変化していることが報告されている(Zhao et al., 2001; Verdeil et al., 2007)。

Polycomb Repressive Complex1 (PRC1) と *PRC2* は進化的に保存されたタンパク質複合体であり, ヒストンの化学的修飾に関与している。動物では *PRC2* はヒストン H3 の 27 番目のリジンをトリメチル化(H3K27me3)するが, このヒストンマークはいわゆる閉じたクロマチン状態をつくり, 遺伝子の発現を抑える。一方, *PRC1* はヒストン H2A の 119 番目にあるリジンをモノユビキチン化するが (H2AK119ub), このヒストンマークも近傍にある遺伝子発現に抑制的に働く。ショウジョウバエで異所的な器官形成をする変異体から初めて *PRC* が見つけられたように, *PRC* は様々な細胞の発生運命を維持する働きをする(Ringrose and Paro, 2004)。

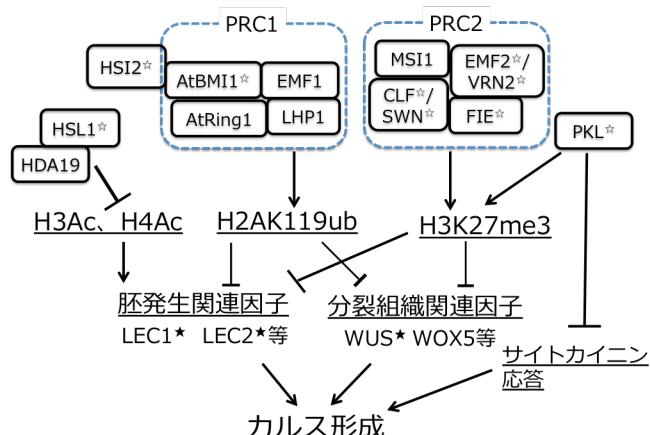


図7. エピジェネティック制御因子によるカルス化経路。
Ac;アセチル化。ub;ユビキチン化。me3;トリメチル化。
☆機能抑制/★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。→は促進、—は抑制作用を表す。

植物では、PRC が分化している器官で胚発生と分裂組織のプログラムを抑えている、ということが多い事例によって示されている。シロイヌナズナでは PRC を構成するタンパク質の多くが重複してコードされているが、これらの二重変異体、例えば PRC2 の *CURLY LEAF (CLF)* と *SWINGER (SWN)* の二重変異体 *clf swn* や、*VERNALIZATION2 (VRN2)* と *EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2)* の二重変異体 *emf2 vrn2* は、発芽後まもなくしてカルスを生じる(Chanvivattana et al., 2004; Schubert et al., 2005)。同様のカルス形成が他の PRC2 の構成要素の一つ *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* の変異体でも報告されている(Bouyer et al., 2011)。植物での PRC1 の存在は長い間知られていなかったが、哺乳類での RING finger タンパク質のホモログである At-BMI1A と At-BMI1B が近年になって同定されている(Sanchez-Pulido et al., 2008)。PRC2 の変異体と同様に, *At-bmi1a-1 bmi1b* の二重変異体は発芽後早い段階でカルスを形成してしまう(Bratzel et al., 2010)。

これらの PRC2 や PRC1 変異体の形質は胚発生関連因子である *LEC1, LEC2, AGL15, BBM* の異所的な過剰発現や *WUS* や *WUSHEL RELATED HOMEOBOX5 (WOX5)*などの幹細胞関連因子の異所的な発現によって引き起こされている(Bratzel et al., 2010; Bouyer et al., 2011)。前述したように、これらの遺伝子のほとんどは過剰発現でカルスが生じる。さらに、これらの遺伝子のほとんどには H3K27me3 や H2AK119ub のヒストンマークが入っていることが示されている。つまりこれらの遺伝子が PRC1 や PRC2 の直接的なターゲットになっており、発現が抑えられることでカルス化が抑えられていることを強く示唆している(Bratzel et al., 2010; Bouyer et al., 2011; Yang et al., 2013)。

PICKLE (PKL) タンパク質は Chromodomain-Helicase-DNA binding3 (CHD3) グループに分類されるクロマチンリモデリングファクターであり、過剰な細胞分裂を抑えるのに中心的な役割を担っているようである。*pkl* 変異体も発芽後すぐにカルスを生じる(Ogas et al., 1997, 1999)。CHD3/CHD4 クラスのクロマチンリモデリング因子は、動物ではヒストンの脱アセチル化酵素として機能する(Hollender and Liu, 2008)。カルス誘導のアッセイ系で、外因性のサイトカイニンに対するレスポンスが上がっている変異体として *cytokinin-hyper-sensitive2* が単離されているが、この原因遺伝子は *pkl* 変異の別アリルであることが最近の研究で明らかにされている(Furuta et al., 2011)。ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A を野生株に処理するとサイトカイニン応答の亢進が再現されるので、PKL はヒストンの脱アセチル化に働くことが示唆される(Furuta et al., 2011)。さらに PKL は、H3K27me3 の修飾にも関わっているようである。これは *pkl* 変異体では *LEC1* と *LEC2* の H3K27me3 マークのレベルが下がっていることから予想されている。結果として *pkl* 変異体では *LEC1* や *LEC2* 発現の抑制解除が起りカルスが誘導される(Zhang et al., 2008, 2012)。

クロマチン制御因子が直接転写因子に作用しクロマチン状態を変化させることで、転写因子のターゲット遺伝子の発現を制御するという例が近年報告されている。PRC1 の構成要素である At-BMI1 タンパク、B3 ドメイン転写因子である VP1/ABI3-LIKE1 (VAL1; HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE2 [HSI2] としても知られている)と結合し、H2AK119ub を介して *LEC1* と *LEC2* の発現を抑えている(Yang et al., 2013)。また、VAL1/HSI2 のホモログである VAL2/HSI2-LIKE1 (HSL1) は、HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19) と結合し、アセチル化されているヒストン H3(H3Ac) と H4(H4Ac) を脱アセチル化することによって *LEC1* と *LEC2* の発現を抑えている(Zhou et al., 2013)。これらの報告以前に VAL1/HSI2 と VAL2/HSL1 は、

機能重複した転写抑制因子として、芽生え時に胚発生関連因子の発現を抑えることで栄養相への転換をもたらしていると報告されていた(Tsukagoshi et al., 2007)。また *hs12 hs11* 二重変異体では芽生え後にカルスが生じる (Tsukagoshi et al., 2007)。これらを総合して考えると、H2AK119ub や H3/H4Ac の脱アセチル化によっても発芽後の組織でのカルス化が抑制されていることが窺える。

3-6. その他の制御機構

シロイヌナズナの組織培養系(Valvekens et al. 1988)において、カルス化や根や茎葉への再分化が抑えられる温度感受性変異体が数多く単離されている (Yasutani et al. 1994; Sugiyama 2003; Konishi and Sugiyama; 2003)。この中で、*SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE2 (SRD2)* 遺伝子の機能欠損変異体はカルス化やそれに引き続く茎葉の再分化が抑えられるが(Ozawa et al., 1998; Ohtani and Sugiyama, 2005), *SRD2* 遺伝子は small nuclear RNA (snRNA) の転写に必要なヒトの SNAP50 遺伝子と配列相同性が高い。実際、*srd2* 変異株では制限温度下で snRNA の転写ができない。snRNA はスプライソームの構成要素として RNA スプライシングで機能すると考えられているため(Burge et al., 1999), SRD2 を介した snRNA が CIM でのカルス形成時の pre-mRNA のスプライシングに関与し(Ohtani and Sugiyama, 2005), この過程によって作られる何らかのタンパク質がカルス形成と茎葉再生に作用していることが予想される。実際、カルス誘導時にはダイナミックな核タンパク質の変化が起きていることがプロテオミクスアプローチによって示されているが(Chitteti and Peng, 2007; Chitteti et al., 2008), カルス誘導時の snRNA のターゲットとなる分子が特定できれば大きな進展に繋がると期待される。

光と生物の応答との関係は、根本的でありながら未知の部分も多く大変興味深い。私たちも、光照射の有無によってカルス化の度合いが変化することを確認している(Ikeuchi, unpublished)。光シグナルと細胞周期や細胞リプログラミングとの関連については、西浜らによる第 5 章を参照されたい。

4. おわりに

オーキシンとサイトカイニンによるカルス化経路でそれぞれ重要な因子である LBD や ARR を含め、様々な転写因子がカルス化に関与することが分かってきた。これらの因子が、どのように細胞分裂を亢進するのか、また、どのように分化全能性を発揮させるのかに関しては、細胞レベルでの更なる研究を進めて行く必要がある。本稿で独立して紹介した各事象や各因子のいくつかに関しては、私たちが現在進めている研究から制御関係にあるものが分かりつつある (Ikeuchi and Iwase et al. submitted; Iwase et al. in preparation)。今後の研究によっては、独立と思われていた転写因子同士の上下関係が見えてくるかもしれないし、共通の下流因子等も単離されてくるかもしれない。もしくは、やはり全く独立した細胞リプログラミング経路であった、などということが分かっても面白い。

少なくともシロイヌナズナにおいては、胚発生時に機能する因子や分裂組織の維持に関わる因子を単独で過剰発現させるだけでカルスが誘導できるということが分かってきた (図 6)。この事実からまず示唆されるのは、カルスを作るという目的に対して通常の発生・分化で使われる因子を利用することでも達成可能だということである。また 1 つの転写因子でリプログラミングが可能であるというのは、iPS 細胞を作る際に 4 つの転写因子が必要なこと(Takahashi and Yamanaka,

2006) とは対照的である。様々なエピジェネティック因子がこれらの植物の転写因子の発現を制御していることも分かってきたが(図7), 例えば, PRC2 の機能欠損に観られるように, 一種類のヒストンマークが入らないだけで複数のカルス化に関与する転写因子が一斉に発現してくることも, iPS 細胞の4つの因子がそれぞれDNAメチル化, H3K9me3, H3K27me3などの異なる階層のマークで別々に制御されていること(Hawkins et al., 2010)とは対照的である。発生と分化を正しく進めつつも, 高い分化の可塑性は維持していかなくてはならないという植物のジレンマは, このような汎用性が高く効果的な因子群を, クロマチンレベルで時間的, 空間的に発現制御しつつ, 場合によってはブレーキを外して一気に発現させるというようなシステムで支えられているのかかもしれない。

環境ストレスに素早く対応し, なんとしてもその場で生き抜いて行く。現在見えてきている様々なカルス化のアクセルとブレーキ機構は, そんな「植物らしさ」とも言うべき, 植物細胞が持つ高い分化の可塑性を支えるメカニズムの一端を映し出そうとしている。細胞リプログラミングの理解に対してよりクリアな像を結ぶためには, 個々の事象に対して, 細胞レベル, 分子レベルでの更なる理解が必要であり, またそれぞれの事象がどのように関連してくるのか横断的・総合的な研究を進めて行く必要がある。未知の機構の探索を含め, 研究課題が尽きることがないようと思われる。また我が国は, 基礎, 応用の両面において植物リプログラミング研究の大國であることは研究の歴史から見て疑う余地はない。蓄積している知見やノウハウを十分に活かしつつ, 植物らしさの一端を今後も解き明かしながら, 組織培養の効率化等の応用研究にも取り組んで行きたいと考えている。

5. 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「大地環境変動に対する植物の生存・成長突破力の分子的統合解析」(22119010), および科学研究費助成事業(24770053)の支援を得て遂行した。

6. 引用文献

- Ahuja, M.R. 1965. Genetic control of tumor formation in higher plants. *Q. Rev. Biol.* 40: 329–340.
- Akiyoshi, D.E., Morris, R.O., Hinz, R., Mischke, B.S., Kosuge, T., Garfinkel, D.J., Gordon, M. P., and Nester, E.W. 1983. Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 407–411.
- Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W., and Gordon, M.P. 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5994–5998.
- Anzola, J.M., Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., Müllner, A.E., and Luschnig, C. 2010. Putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10308–10313.
- Aoki, S. and Syono, K. 1999. Function of Ngrol genes in the evolution of *Nicotiana glauca*: Conservation of the function of NgORF13 and NgORF14 after ancient infection by an *Agrobacterium rhizogenes*-like ancestor. *Plant Cell Physiol.* 40: 222–230.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., and 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.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.W., and Chua, N.H. 2001. Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* 13: 2609–2618.

- Barash, I., and Manulis-Sasson, S. 2007. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *Trends Microbiol.* 15: 538–545.
- Barash, I. and Manulis-Sasson, S. 2009. Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 133–52.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S.P., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Kamei, C.L., Koncz, C., Bogre, L., Persiau, G., De Jaeger, G., Friml, J., Simon, R., Beeckman, T., De Veylder, L. 2011. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell* 23: 3671–3683.
- Birnbaum, K. D., and Sánchez Alvarado, A. 2008. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 132, 697–710. Bostock, R.M., Stermer, B.A. 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 343–371.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.M., van Lammeren, A.A.M., Miki, B.L.A., Custers, J.B.M., and van Lookeren Campagne, M.M. 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737–1749.
- Bouyer, D., Roudier, F., Heese, M., Andersen, E.D., Gey, D., Nowack, M.K., Goodrich, J., Renou, J.P., Grini, P.E., Colot, V., and Schnittger, A. 2011. Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet.* 7: e1002014.
- Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., Pozo, J.C.D., and Calonje, M. 2010. Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr. Biol.* 20: 1853–1859.
- Burge, C.B., Tuschl, T., and Sharp, P.A. 1999. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In The RNA World (Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F., eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 525–560.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.-H., Sung, Z.R., and Goodrich, J. 2004. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development* 131: 5263–5276.
- Chiappetta, A., Michelotti, V., Fambrini, M., Bruno, L., Salvini, M., Petrarulo, M., Azmi, A., Van Onckelen, H., Pugliesi, C., and Bitonti, M.B. 2006. Zeatin accumulation and misexpression of a class I knox gene are intimately linked in the epiphyllous response of the interspecific hybrid EMB-2 (*Helianthus annuus* x *H. tuberosus*). *Planta* 223: 917–931.
- Chiappetta, A., Fambrini, M., Petrarulo, M., Rapparini, F., Michelotti, V., Bruno, L., Greco, M., Baraldi, R., Salvini, M., Pugliesi, C., and Bitonti, M.B. 2009. Ectopic expression of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. *Ann. Bot.* 103: 735–747.
- Chitteti, B.R., and Peng, Z. 2007. Proteome and phosphoproteome dynamic change during cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Proteomics* 7: 1473–1500.
- Chitteti, B.R., Tan, F., Mujahid, H., Magee, B.G., Bridges, S.M., and Peng, Z. 2008. Comparative analysis of proteome differential regulation during cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Proteomics* 20: 4303–4316.
- Cline, M.N. and Neely, D. 1983. The histology and histochemistry of wound-healing process in geranium cuttings. *J. Am. Soc. Horticul. Sci.* 108: 496–502.
- Delessert, C., Wilson, I.W., Van Der Straeten, D., Dennis, E.S., and Dolferus, R. 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in Arabidopsis leaves. *Plant Mol. Biol.* 55: 165–181.
- Deng, W., Luo, K., Li, Z., and Yang, Y. 2009. A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 177: 43–48.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A.A., Maughan, S.C., Menges, M., Braun, N., Collins, C., Nieuwland, J., Prinsen, E., and Sundaresan, V. 2007. Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14537–14542.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., and Hu, Y. 2012. Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cell Research* 22: 1169–1180.
- Frank, M., Rupp, H.-M., Prinsen, E., Motyka, V., Van Onckelen, H., and Schmülling, T. 2000. Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of Arabidopsis with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiol.* 122: 721–730.
- Frank, M., Guivarc'h, A., Krupková, E., Lorenz Meyer, I., Chriqui, D., and Schmülling, T. 2002. TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT (TSD) genes are required for coordinated plant shoot development. *Plant J.* 29: 73–85.
- Furuta, K., Kubo, M., Sano, K., Demura, T., Fukuda, H., Liu, Y.G., Shibata, D., and Kakimoto, T. 2011. The CKH2/PKL chromatin remodeling factor negatively regulates cytokinin responses in Arabidopsis calli. *Plant Cell Phys.* 52: 618–628.
- Gaj, M.D., Zhang, S., Harada, J.J., and Lemaux, P.G. 2005. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta* 222: 977–988.

- Gao, P., Xin, Z., and Zheng, Z.-L. 2008. The OSU1/QUA2/TSD2-encoded putative methyltransferase is a critical modulator of carbon and nitrogen nutrient balance response in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 3: e1387.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. 2011. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 36–47.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
- Gohlke, J. and Deeken, R. 2014. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Front. Plant Sci.* 5: 155.
- Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., and Morgenstern, Y. 2011. The stem cell state in plant development and in response to stress. *Front. Plant Sci.* 2: 1–10.
- Hawkins, R.D., et al. (2010). Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* 6: 479–491
- Harding, E.W. 2003. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiol.* 133: 653–663.
- Heidmann, I., Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G.C., and Boutilier, K. 2011. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Rep.* 30: 1107–1115.
- His, I., Driouch A., Nicol F., Jauneau A., and Höfte H. 2001. Altered pectin composition in primary cell walls of korrigan, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase. *Planta* 212: 348–358.
- Hollender, C., and Liu, Z. 2008. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *J Integr. Plant Biol.* 50: 875–885.
- Hwang, I., Sheen, J., and Müller, B. 2012. Cytokinin signaling networks. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63: 353–380.
- Hyman, L.H. 1951. The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria. McGraw Hill, New York
- Ichikawa, T., and Syōno, K. 1988. Tumorigenesis-redifferentiation system of tobacco genetic tumor. *Plant Cell Physiol.* 29: 1373–1378.
- Ichikawa, T., and Syōno, K. 1991. Tobacco genetic tumors. *Plant Cell Physiol.* 32: 1123–1128.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.W., Howell, S.H., and Chua, N.H. 2006. The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol.* 47: 1443–1456.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159–73.
- Inzé, D., and De Veylder, L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40: 77–105.
- 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., and 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.
- Iwai, H., Masaoka, N., Ishii, T., and Satoh, S. 2002. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16319–16324.
- Iwase, A., Ishii, H., Aoyagi, H., Ohme-Takagi, M., and Tanaka, H. 2005. Comparative analyses of the gene expression profiles of *Arabidopsis* intact plant and cultured cells. *Biotechnol. Lett.* 27, 1097–103.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., and 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., and Sugimoto K. 2011b. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Sig. & Behav.* 6: 1943–1945.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Ikeuchi, M., Ohnuma, M., Koizuka, C., Kawamoto, K., Immura, J., Ezura, H. and Sugimoto, K. 2013. *Arabidopsis* WIND1 induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Sig. & Behav.* 8, e27432.
- Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M.L., Renou, J.P., Abad, P., and Favory, B. 2005) Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 447–58.
- Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, S., Mizusaki, S., Nishida, K., Nogushi, M., Tamaki, E. 1972. Liquid suspension culture of tobacco cells. in Ferment Technology Today. ed Terui G (Society of Fermentation Technology, Osaka), pp 689–695.
- Kehr, A.E. 1951. Genetic tumors in *Nicotiana*. *Am. Naturalist* 85: 51–64.
- Konishi, M., and Sugiyama, M. 2003. Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 130: 5637–5647.
- Kőszegi, D., Johnston, A.J., Rutten, T., Czihal, A., Altschmied, L., Kumlehn, J., Wüst, S.E.J., Kirioukhova, O., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., and Bäumlein, H. 2011. Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program. *Plant J.* 67: 280–291.

- Krupková, E., Immerzeel, P., Pauly, M., and Schmülling, T. 2007. The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *Plant J.* 50: 735–750.
- Krupková, E., and Schmülling, T. 2009. Developmental consequences of the tumorous shoot development1 mutation, a novel allele of the cellulose-synthesizing KORRIGAN1 gene. *Plant Mol. Biol.* 71: 641–655.
- Kung, S.D. 1989. Genetic tumors in *Nicotiana*. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 30: 231–240.
- Lane, D.R., Wiedemeier, A., Peng, L., Höfte, H., Vernhettes, S., Desprez, T., Hocart, C.H., Birch, R.J., Baskin, T.I., Burn, J.E., Arioli, T., Betzner, A.S., and Williamson, R.E. 2001. Temperature-sensitive alleles of RSW2 link the KORRIGAN endo-1,4-beta-glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 278–288.
- Laux, T., Mayer, K.F.X., and Jurgens, G. 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87–96.
- Lee, C. 1955. Anatomical changes in sweet clover shoots infected with Wound-Tumor Virus. *Am. J. Bot.* 42: 693–698.
- Lee, D.K., Geisler, M., and Springer, P.S. 2009. LATERAL ORGAN FUSION1 and LATERAL ORGAN FUSION2 function in lateral organ separation and axillary meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 136: 2423–2432.
- Liu, S.Y., Selck, C., Friedrich, B., Lutz, R., Vila-Farré, M., Dahl, A., Brandl, H., Lakshmanaperumal, N., Henry, I., Rink, J.C. 2013. Reactivating head regrowth in a regeneration-deficient planarian species. *Nature* 500: 81–84.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J. 1998. *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195–1205.
- Malinowski, R., Smith, J.A., Fleming, A.J., Scholes, J.D., and Rolfe, S.A. 2012. Gall formation in clubroot-infected *Arabidopsis* results from an increase in existing meristematic activities of the host but is not essential for the completion of the pathogen life cycle. *Plant J.* 71: 226–238.
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M.T., Lindow, S.E., and Barash, I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 11: 634–642.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J.D., Dixit, S., Bergervoet, J.H.W., Karaba, A., Folter, S., and Pereira, A. 2006. BOLITA, an *Arabidopsis AP2/ERF-like* transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Mol. Biol.* 62: 825–843.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805–815.
- Morris, R. 1986. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 509–538.
- Mouille, G., Ralet, M.-C., Cavelier, C., Eland, C., Effroy, D., Hématy, K., McCartney, L., Truong, H.N., Gaudon, V., Thibault, J.F., Marchant, A., and Höfte, H. 2007. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J.* 50: 605–614.
- Murata, Y., Fujii, M., Zolan, M.E., Kamada, T. 1998. Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 149: 1753–1761.
- Müller, D., and Leyser, O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of botany*, 107, 1203–1212.
- Nagata, T., and Takebe, I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12–20.
- Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M., and Yanofsky, M.F. 1984. Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 387–413.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., and Höfte, H. 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 17: 5563–5576.
- Ogas, J., Cheng, J.-C., Sung, Z.R., and Somerville, C. 1997. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana pickle* mutant. *Science* 277: 91–94.
- Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., and Somerville, C. 1999. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13839–13844.
- Ohtani, M., and 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.
- Okamuro, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Jofuku, K.D. 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

- 94: 7076–7081.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 118–130.
- Ozawa, S., Yasutani, I., Fukuda, H., Komamine, A., and Sugiyama, M. 1998. Organogenic responses in tissue culture of srd mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 135–142.
- Ralet M.C., Crépeau M.J., Lefèvre J., Mouille G., Höfte H., and Thibault J.F. 2008. Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an *Arabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules*. 9: 1454–1460.
- Ringrose, L., and Paro, R. 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* 38: 413–443.
- Riou-Khamlich, C., Huntley, R., Jacqmar, A., and Murray, J.A. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541–1544.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. 2001. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* 294: 1519–1521.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z.R., and Calonje, M. 2008. RAWUL: A new ubiquitin-like domain in PRC1 Ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics* 9: 308.
- Sass, J. 1932. Formation of callus knots on apple grafts as related to the histology of the graft union. *Bot. Gaz.* 94: 364–380.
- Schubert, D., Clarenz, O., and Goodrich, J. 2005. Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Curr. Opn. Plant Biol.* 8: 553–561.
- Sena, G., Wang, X., Liu, H.-Y., Hofhuis, H., and Birnbaum, K.D. 2009. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* 457: 1150–1153.
- Sharples, A., Gunnery, H. 1933. Callus formation in *Hibiscus rosa-sinensis* L. and *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Ann. Bot.* 47: 827–839.
- Sieberer, T., Hauser, M.-T., Seifert, G.J., and Luschnig, C. 2003. PROPORZ1, a Putative *Arabidopsis* Transcriptional Adaptor Protein, Mediates Auxin and Cytokinin Signals in the Control of Cell Proliferation. *Curr. Biol.* 13: 837–842.
- Sitbon, F., Sundberg, B., Olsson, O., and Sandberg G. 1991. Free and conjugated indoleacetic acid (IAA) contents in transgenic tobacco plants expressing the iaaM and iaaH IAA biosynthesis genes from *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Phys.* 95: 480–485.
- Skirycz, A., Radziejewski, A., Busch, W., Hannah, M.A., Czeszejko J., Kwaśniewski M., Zanor M.I., Lohmann J.U., De Veylder L., Witt I., and Mueller-Roeber B. 2008. The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56: 779–792.
- Skoog, F., and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118–131.
- Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, E.D.J., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Angenent, G., Scorza, R., Custers, J.B.M., and Boutilier, K. 2006. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* 225: 341–351.
- Staniszewska, M., Śluczanowska-głębowska, S., and Drukała, J. 2011. Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochemical et Cytopathologica*, 49, 375–380.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., and 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., and 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., and 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., and Tanaka, E.M. 2006. Reversibility of the differentiated state: Regeneration in amphibians. *Artificial Organs* 30:743–755.
- 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.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., and Meyerowitz, E.M. 2010. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* 18: 463–471.
- Tajima, Y., Immura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 28–39.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676.

- Thakare, D., Tang, W., Hill, K., and Perry, S.E. 2008. The MADS-Domain Transcriptional Regulator AGAMOUS-LIKE15 Promotes Somatic Embryo Development in Arabidopsis and Soybean. *Plant Physiol.* 146: 1663–1672.
- Tooker, J.F., Rohr, J.R., Abrahamson, W.G., and De Moraes, C.M. 2008. Gall insects can avoid and alter indirect plant defenses. *New Phytol.* 178: 657–71.
- Tsukagoshi, H., Morikami, A., and Nakamura, K. 2007. Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 2543–2547.
- Tsuwamoto, R., Yokoi, S., and Takahata, Y. 2010. Arabidopsis EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Mol. Biol.* 73: 481–492.
- Udagawa, M., Aoki, S., and Syono, K. 2004. Expression analysis of the NgORF13 promoter during the development of tobacco genetic tumors. *Plant Cell Physiol.* 45: 1023–1031.
- Umeshara, M., Ikeda M., and Kamada H. 2007. Endogenous Factors that Regulate Plant Embryogenesis: Recent Advances. *Japan. J. Plant Sci.* 1: 1–6.
- Valvekens, D., Montagu, M.V., and 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.
- Verdeil, J.-L., Alemanno, L., Niemenak, N., and Tranbarger, T.J. 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* 12: 245–252.
- Waki, T., Hiki, T., Watanabe, R., Hashimoto, T., and Nakajima, K. 2011. The Arabidopsis RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Curr. Biol.* 21: 1277–1281.
- White, P.R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26: 59–64.
- Yang, C. et al. 2013. VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23: 1324–1329.
- Yasutani, I., Ozawa, S., Nishida, T., Sugiyama, M., and Komamine, A. 1994. Isolation of Temperature-Sensitive Mutants of Arabidopsis thaliana That Are Defective in the Redifferentiation of Shoots. *Plant Physiology*, 105, 815–822.
- Yoshida-Noro, C., and Tochinai, S. 2010. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of Enchytraeus japonensis (Oligochaeta, Annelida). *Deve. Growth and Differ* 52: 43–55.
- Zhang, H.M., Yang, J., Xin, X., Chen, J.P., and Adams, M.J. 2007. Molecular characterization of the genome segments S4, S6 and S7 of rice gall dwarf virus. *Archives Virol.* 152: 1593–602.
- Zhang, H., Rider, S.D., Henderson, J.T., Fountain, M., Chuang, K., Kandachar, V., Simons, A., Edenberg, H.J., Romero-Severson, J., Muir, W.M., and Ogas, J. 2008. The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27. *J. Biol. Chem.* 283: 22637–22648.
- Zhang, H., Bishop, B., Ringenberg, W., Muir, W.M., and Ogas, J. 2012. The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol.* 159: 418–432.
- Zhao, J., Morozova, N., Williams, L., Libs, L., Avivi, Y., and Grafi, G. 2001. Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells: distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *J. Biol. Chem.* 276: 22772–22778.
- Zhou, C., Guo, J., Feng, Z., Cui, X., and Zhu, J. 2012. Molecular characterization of a novel AP2 transcription factor ThWIND1-L from *Thellungiella halophila*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 110: 423–433.
- Zhou, Y., Tan, B., Luo, M., Li, Y., Liu, C., Chen, C., Yu, C.W., Yang, S., Dong, S., Ruan, J., Yuan, L., Zhang, Z., Zhao, L., Li, C., Chen, H., Cui, Y., Wu, K., and Huang, S. 2013. HISTONE DEACETYLASE19 Interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 25: 134–148.
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411–1423.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., and Chua, N.-H. 2002. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J.* 30: 349–359.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., and Chua, N.H. 2000. KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* 12: 1137–1152.

傷付いた植物はどのように修復・再生するのか

池内 桃子、岩瀬 哲、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

How do wounded plants repair or regenerate?

Key words: regenerative capacity, repair, wounding

Momoko Ikeuchi, Akira Iwase, Keiko Sugimoto
 RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1. はじめに

多細胞生物は、高度に組織化された体制を維持するための厳密な統御体制を持つとともに、様々な外的擾乱に対処するための柔軟性を兼ね備えている。植物発生学のめざましい進展にともない、内生の発生プログラムの理解は近年急速に進んできた。こうした成果に立脚し、外的擾乱に曝された際に、プログラムがいかに変更されて細胞が応答するのかという点が明らかになりつつある。そこで見えてきた知見の一つとして、外的擾乱に対する細胞の応答が組織や発生段階によって大きく異なるという点が挙げられる。本稿では、外的擾乱の典型的な例である傷害に焦点を当て、種子植物の様々な組織で起こる応答とそのメカニズムを概観する。コケ植物における傷害応答に関する総説は石川 2014 を、動植物を横断的に捉えた総説としては Birnbaum and Sánchez Alvarado (2008) をそれぞれ参照されたい。

2. 組織ごとの応答の違い

2-1. 根端分裂組織の再生

根の先端には、静止中心 (Quiescent Center, QC) および QCを取り囲む幹細胞（これらを合わせて幹細胞ニッチと呼ぶ）が存在しており（図 1），根端分裂組織が細胞を供給し根が伸び続けるためには不可欠である (Aida et al., 2004)。幹細胞ニッチの再生能力は、これまで二種類の実験系において検証されている。レーザー照射による細胞レベルの損傷実験において QC あるいは幹細胞を損傷させると、局所的な細胞分裂パターンの変化と細胞運動の転換が起り元の組織構造が復元される (van den Berg et al., 1995)。その際には細胞系譜は無関係であり、グローバルな位置情報が復元過程を司っているものと考えられる。この結論は、幹細胞ニッチ全体を含む根端領域を切除する実験系においても支持されている。根端切除後、組織の再編成を経

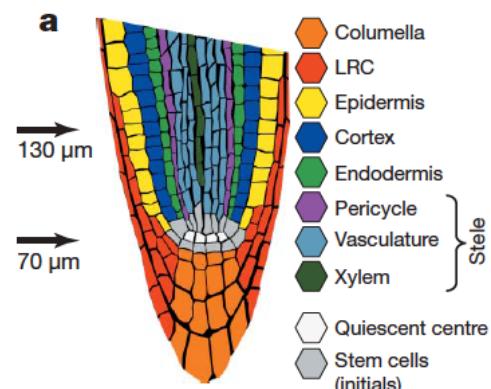


図 1. 根端分裂組織の模式図。根端から 130 μm で切除しても約 80% の高効率で再生できる。Sena et al., 2009 より許可を得て転載。

て数日以内に根端領域が再生されるが、この再生において幹細胞ニッチの機能に必須な転写因子である PLETHORA1 (PLT1), PLT2, SCARECLOW (SCR) は必要なく、既存の位置情報（おそらくオーキシン濃度勾配）に基づいて根端分裂組織の一般的な細胞がリプログラミングして QC や幹細胞を新たに作り直していると考えられる (Sena et al., 2009; Sena and Birnbaum 2010)。ちなみに、再生過程では細胞分裂の活性化が起こっており、こちらは再生に必須であることも示されている (図 2; Sena et al., 2009)。

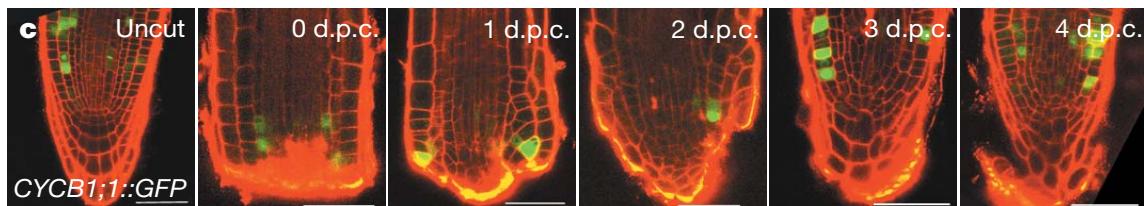


図 2. シロイヌナズナ根端の再生。CYCB1;1GFP で分裂細胞がマークされている。Sena et al., 2009 より許可を得て転載。

2-2. 茎頂分裂組織の再生

茎の先端にある茎頂分裂組織では、無限成長を行う永続性と新たな器官を生み出す形態形成能を分裂組織内の異なる領域が分担している。ドームの頂端部に位置する central zone (CZ) が幹細胞を含む領域であるのに対し、辺縁部に位置する peripheral zone (PZ) は側生器官（葉や花など）の原基を生み出す役割を担う（図 3）。茎頂分裂組織の CZ が損傷すると、PZ から一つない複数の分裂組織が再生する。再生に先立ち、幹細胞機能を支える organizing center (OC) で発現する *WUSCHEL* (*WUS*) の発現部位が再編成されることが観察されている（図 4; Reinhardt et al., 2003）。茎頂分裂組織の再生は、幹細胞ニッチが失われても周囲の分裂領域の細胞がリプログラミングを経て幹細胞ニッチを再生するという点において根端の再生と共通していると言える。これまでの研究では、実験材料としてトマトなど茎頂が比較的大きく操作しやすい植物が用いられてきたため、遺伝学的な知見が不足しているが、*WUS-CLAVATA* (*CLV*) の反応拡散モデルによって再生のパターンがよく説明できる（図 5; Fujita

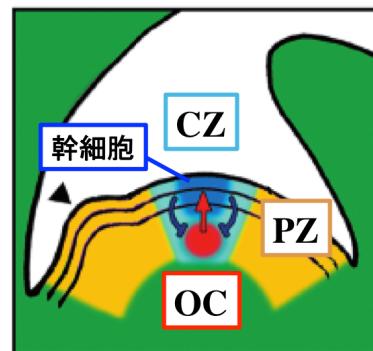


図 3. 茎頂分裂組織の模式図。
Reinhardt et al., 2003 より許可を得て改変。

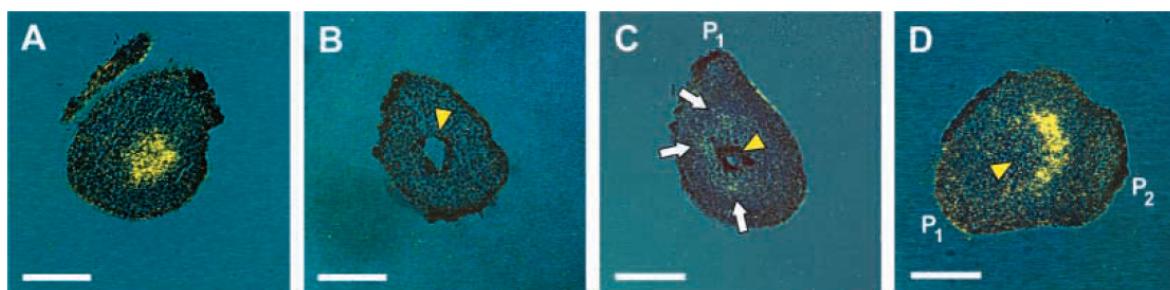


図 4. トマト茎頂における *LeWUS* の発現パターン。OC の細胞が失われると (B), 1 日後には周辺で弱い発現が始まり (C), 2 日後には発現部位の再構成が起こる (D)。Reinhardt et al., 2003 より許可を得て転載。

et al., 2011)。

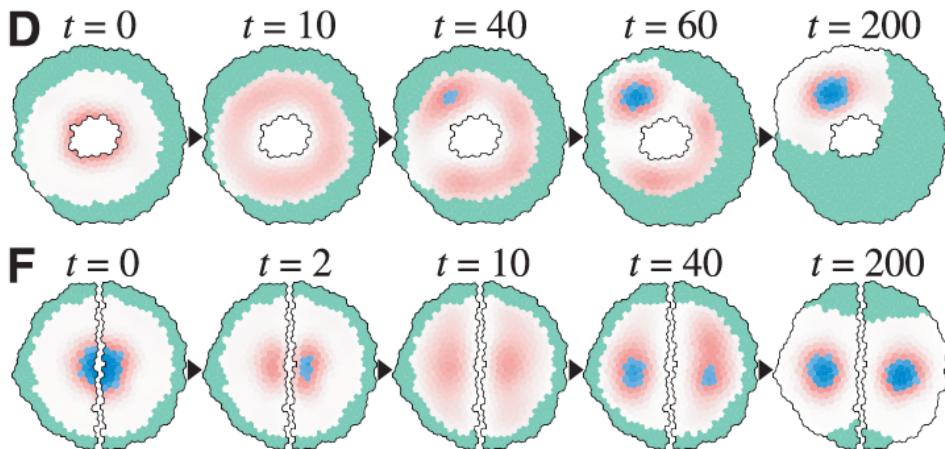


図 5. WUS-CLV の反応拡散モデルに基づいた数値シミュレーション。実際の現象を再現している。
Fujita et al., 2011 より転載。

2-3. 葉原基の修復・再生

根端および茎頂の頂端分裂組織とは異なり、一般的に葉は有限成長器官である。シロイヌナズナの葉原基先端を切除した際に起こる現象は、はじめ根端の再生と類似した再生現象であると記述されたが (Sena et al., 2009), 後に詳細な成長解析に基づき、葉の先端は再生しておらず単に傷口が塞がっているだけである、と結論づけられている (Kuchen et al., 2012)。シロイヌナズナを含む多くの一年生草本の単葉では、分裂活性の高い組織は器官の基部側に位置しており、発生初期に先端側半分程度を除去したとしても最終的な器官の形状における影響はほとんどないために、先端が再生したように見えたのだろうと考えられる。

頂端分裂組織の再生の例では、再生能を持つ組織は細胞が分裂能を持つ領域であった。シロイヌナズナのように小さな単葉では、葉が切除実験を施しやすい程度のサイズに達した時点で既に先端側の細胞は分裂を停止しており、再生現象は起こらなかった。では、細胞分裂や形態形成が長期間続く複葉ではどうだろうか。エンドウあるいはハナビシソウを用いた実験によって、複葉原基の先端を損傷した場合には茎頂分裂組織の損傷と同様に、2 本の先端が再生されることが報告されている (Sachs 1969; Ikeuchi et al., 2014)。再生過程を時系列で詳細に観察した結果、頂端直下の無傷の組織が成長点としての運命を新たに獲得することが分かったことから、根端や茎頂と同様の再生現象が起こっていると考えられる (Ikeuchi et al., 2014)。複葉では葉の辺縁領域で小葉原基の形成が起こるが、その原基予定領域を損傷した場合、無傷の領域に改めて小葉原基を作り直すことも分かった (Ikeuchi et al., 2014)。したがって、発生プログラムを柔軟に変更し再生する現象は、無限成長性を持った頂端分裂組織に限られたものではなく、有限成長器官でも起こるといえる。複葉の再パターニングのメカニズムの解明はさらなる研究を待たねばならないが、小葉原基の位置決めにはオーキシン濃度極大点の形成が重要であることが様々な種で示されており、さら

に極大点は一定間隔で形成されるというルールが再パターニング時にも保たれていたこと (Ikeuchi et al., 2014) からも, PINFORMED-1 (PIN1) などの輸送体依存的なオーキシン濃度極大点の再形成が起きていると考えられる。複葉先端の再生と茎頂分裂組織の再生は類似しているものの, 上述の WUS-CLV は複葉ではおそらく機能していないと考えられるため, こうした類似性が見かけ上のものにすぎないのか, それとも未知の共通した分子基盤が存在するのかという点は興味深い。

2-4. 成熟組織の修復・再生

単葉の葉原基ですら既に再生能を失っているとしたら成熟した組織は損傷に対応する術を持たないように思えるが, 特に地上部では未分化な組織よりも成熟した組織の方が損傷する危険性は高い。そこで植物は別の方法で傷害に対処している。失われた部分を元に戻すことはできないが, 傷口にカルスと呼ばれる細胞塊を形成して塞ぐのである(図6)。傷口は感染源になり得るため, まずは速やかに塞ぐというのがカルス形成の第一義的な目的であろうと考えられる。カルスから新たな器官を形成して再出発する例 (シロイヌナズナの葉柄ではカルスから根が再生される; 図6A 岩瀬未発表) もあれば, 器官再形成は起こらない例もある (シロイヌナズナ暗所芽生え胚軸など; 図6B 池内未発表)。上述の分裂組織や複葉原基の例のように傷ついた部分の近傍のどんな組織も再生に寄与するというものではなく, おそらく内鞘や維管束柔組織といった分裂できるポテンシャルを持った組織が主要な役割を果たしていると考えられる (池内ら未発表)。しかし器官によつては, 完全に分化した組織からカルスが形成されることを示唆する予備的な観察結果も得ており (岩瀬ら未発表), 傷によって脱分化が誘導されるのかどうかは今後明らかにすべき非常に重要な点である。

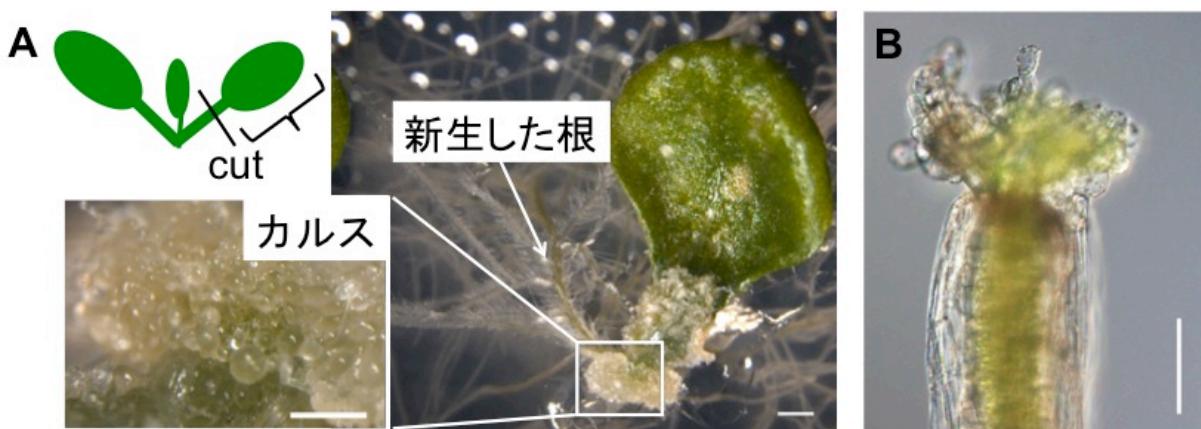


図6. シロイヌナズナの傷口に形成されたカルス。(A) 成熟葉の葉柄で切り取り, ホルモンフリー培地上で3週間培養したもの。カルスおよび根の新生が見られる。(B) 暗所芽生えの胚軸を切り, 2週間培養したもの。カルス形成は見られるが, ホルモンフリーで長く培養しても器官再生は起こらない。

分裂組織や葉原基の再生の例では, 基本的に内生のモルフォゲンが再生現象も司っていると考えられるが, 成熟組織におけるカルス形成では傷によって新たに誘導される遺伝子が中心的な役

割を担っていると考えられる。それが AP2/ERF ファミリー転写因子をコードする *WOUND-INDUCED DEDIFFERENTIATION (WIND)1, WIND2, WIND3, WIND4* である。*WIND1* 遺伝子は、培養細胞で高発現することから発見された遺伝子だが、傷害後 1 時間以内に発現が誘導され、その後も傷口とカルスで強く発現し続ける (Iwase et al., 2011)。過剰発現体は無傷の植物体がカルスに転換するという劇的な表現型を示し、細胞脱分化を誘導するマスター制御因子であると考えられる。機能欠損型としては、キメラリプレッサー型として発現させると (*WIND1pro:WIND1-SRDX*) 傷害によるカルス形成の効率が著しく低下することから、*WIND* 遺伝子群は傷害誘導性のカルス形成に重要な役割を果たすと考えられる。一方で、*wind1/2/3/4* 四重変異体ではカルス形成の効率が低下しないこと、*WIND1pro:WIND1-SRDX* でもカルス形成が完全に抑えられないことから、*WIND* とは独立の制御経路も存在することが強く示唆される。無傷の組織でも根端分裂組織や内鞘など比較的未分化な組織で発現が見られ、平常時の発生過程においても何らかの機能を持っている可能性が考えられるが、今のところ明らかになっていない。

成熟した組織であっても、傷つき方によってはカルス化とは異なった現象が起こる場合もある。詳細は朝比奈ら 2014 を参照して頂きたいが、茎に切り込みを入れる処理を行うと、維管束の再生・癒合が起こる。この場合は、茎頂から基部に向かうオーキシンの流れが保持されているため、そのモルフォゲンの制御に従って、組織が秩序だった構造の再生に向かうものと考えられる。

3. 何が応答の違いを生んでいるのか

ここまででは具体例を挙げて修復・再生現象を概観してきたので、最後に概念的に捉えてみよう。修復・再生と一口に言っても、本質的に異なる応答が含まれていることに皆さんにお気づきのことと思う。ここでは、「塞ぐ」「補う」「新生する」と分類を試みた。



第一は傷口を「塞ぐ」という最低限の応答であり、カルス形成を伴う場合（胚軸の例）と伴わない場合（単葉の例）がある。葉は、成熟葉であればカルスを形成して傷口を塞ぐにもかかわらず、発生中の器官ではカルスを形成しないのは不思議に思える。カルスは若い組織の方が形成されやすいという傾向は、たとえばオーキシン・サイトカイニンを培地に添加して誘導するカルスの場合などで観察されており、成熟した組織に限れば一般的な傾向であると言えるかもしれない。しかし、発生中の器官ではカルス形成を伴わずに再生修復が行われる現象が広く観察されている。次の「補う」は欠けた部分を元に戻すことであり、根端分裂組織の再生は典型的な例である。

動物では両生類の四肢の再生も「補う」タイプの再生現象であると言える。こうした再生が起こるためには、位置情報・モルフォゲンが存在していること、そのシグナルに応答して変化できる可塑性 (reprogrammability) を備えた細胞が存在していることの二つが必要であると考えられる。位置情報として、根端および花茎癒合の例はいずれもオーキシンが働いている可能性が高い。応答能を持った細胞として、根端の例では分裂領域にある細胞であれば表皮から中心柱まで広範な細胞が該当するのに対し、花茎の場合にはより限られた組織が寄与していると考えられる。

最後の「新生する」は、茎頂分裂組織や複葉先端のように失われた部分を新たに作り直す場合と、葉柄に形成されたカルスから根が新生する場合のように本来そこにはなかった器官を新たに形成する場合にさらに大別できる。前者は、根端の再生と類似するように思われるかもしれないが、根端の例ではモルフォゲンは傷害後もそのまま保持されておりその情報に従って欠けたところを作り直しているのに対し、茎頂や複葉先端の場合は位置情報そのものをおそらく自己組織化によって再編成していると考えられることから、ここでは新生と呼ぶこととした。葉柄カルスでは、おそらく葉から供給されるオーキシンによって根の形成が誘導されているものと考えられ、これに対して胚軸カルスではオーキシン濃度が低い状態になっているために器官を新生する能力を持たないのではないかと筆者らは考えている。実際に胚軸の傷口に形成されたカルスを、外生的にオーキシン・サイトカイニンを添加した培地で培養すると、シートおよび根を新生できる(池内未発表)。

器官が傷ついたときには、おそらくすべての細胞において傷害応答は起きているものと考えられる。しかしながら、発生プログラムを変更する可塑性を備えている細胞はごく一部であり、頂端分裂組織や器官原基などの未分化な組織、あるいは成熟した器官の中に備わっている体性幹細胞に限定されている。この可塑性の分化実体は一体何なのだろうか。一つの可能性としては、植物ホルモンなどのモルフォゲンに応答するためのシグナル受容系成分を細胞内に備えていることが考えられる。あるいは、発生プログラムを変更できることは遺伝子発現プロファイルを大規模に変更できることに帰着すると考えられるため、クロマチンレベルの可塑性の違いを反映しているのかもしれない。また、細胞分裂を活発に行っていたり、分裂誘導シグナル存在下で分裂できるポテンシャルを持つ細胞の方が細胞分化の可塑性が高いことが一般的な傾向としては見られるが、細胞分裂と細胞リプログラミングの関係も未解明のままである。近年の急速な分野の発展を考えれば、再生可能性あるいは reprogrammability とも呼べる能力の分子実体が解明される日も近いと期待できる。

4. おわりに

「新しい器官を後胚発生によって生み出せる植物にとって、体の一部が傷ついて失われてもその部分は捨ててしまって腋芽や側根などを代わりに使えばよい」—— 植物の体制が一般的にこのように捉えられているために、傷害時の組織の修復・再生機構に関する研究が立ち後れているのではないだろうか。もちろん冒頭の記述自身は正しいものの、実際には損傷した分裂組織や器官そのものを再生するという現象も起きており、植物にとって重要な過程の一つであることは間違いないだろう。また発生学的な観点からすれば、傷害時の組織の修復・再生現象は個々の細胞が傷害という激しい外的搅乱にどのように応答するのか（あるいは、しないのか）という切り口で

細胞分化の可塑性を研究できる優れたモデル系であると考えている。これまで様々な遺伝的搅乱（突然変異体・形質転換体など）が発生プログラムの解明に結びついてきたように、物理的な搅乱も新しい切り口で細胞分化の重要な問題を解き明かす有力なアプローチになるだろう。

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および新学術領域「大地環境変動に対する植物の生存・成長突破力の分子的統合解析」(22119010) の支援を得て遂行した。

引用文献

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha C., Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, and Scheres B (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.
- Birnbaum, K.D. and Sánchez Alvarado, A. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* 132: 697–710.
- Fujita, H., Toyokura, K., Okada, K., and Kawaguchi, M. (2011). Reaction-diffusion pattern in shoot apical meristem of plants. *PLoS ONE* 6: e18243.
- Ikeuchi, M., Igarashi, H., Okada, K., and Tsukaya, H. (2014). Acropetal leaflet initiation of *Eschscholzia californica* is achieved by constant spacing of leaflets and differential growth of leaf. *Planta* 240:125-135.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., and Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 508–514.
- Kuchen, E.E., Fox, S., de Reuille, P.B., Kennaway, R., Bensmihen, S., Avondo, J., Calder, G.M., Southam, P., Robinson, S., Bangham, A., and Coen, E. (2012). Generation of leaf shape through early patterns of growth and tissue polarity. *Science* 335: 1092–1096.
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development* 130: 4073–4083.
- Sena, G., Wang, X., Liu, H.-Y., Hofhuis, H., and Birnbaum, K.D. (2009). Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* 457: 1150–1153.

Sena, G and Birnbaum K.D. (2010) Built to rebuild: in search of organizing principles in plant regeneration
Curr. Opin. Genet. Dev. 20: 460–465.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the
Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378: 62–65.

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

朝比奈雅志¹, Pitaksaringkarn Weerasak²、佐藤忍²

1; 帝京大学 理工学部 バイオサイエンス学科 〒320-8551 栃木県宇都宮市豊郷台 1-1

2; 筑波大学 生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Involvement of phytohormone and cell wall metabolism on the tissue-reunion of incised tissue of plant.

Masashi ASAHINA¹, Weerasak PITAKSARINGKARN² and Shinobu SATOH²

Keywords; Arabidopsis, cell division, incised stem, phytohormone, tissue-reunion

1; Department of Biosciences, Teikyo University. 1-1, Toyosatodai, Utsunomiya, Tochigi,
320-8551, JAPAN.

2; Faculty of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba. 1-1-1, Tennoudai, Tsukuba,
Ibaraki, 305-8572, JAPAN.

1. はじめに

植物は様々な外環境の影響を絶えず受ける中で、その発生や機能を変化させ、環境に適応している (Reid and Ross 2011)。そのような環境要因の1つである傷害は、風や虫などの物理的・生物的要因、剪定や接ぎ木などの人為的要因等によって引き起こされる。高等植物では、通常、一旦分離した細胞同士が動物細胞のように再び接着することはないが、接ぎ木による他個体との接着や切断された組織の修復、雌しべが形成される際の心皮の結合の際には、例外的に離れた組織同士が再度接着することが知られている (Walker 1975; Stoddard & McCully 1980; Kollmann and Glockmann 1985; Siegel and Verbeke 1989; van der Schoot et al 1995; Richerdson et al 1996; Wang and Kollmann 1996)。茎が部分的に切断されると、切断された組織は、細胞分裂を再開して失われた組織を分化させ、元の組織同士を癒合させることで個体機能が回復する (Flaishman et al 2003; Reid and Ross 2011; Ikeuchi et al 2013)。組織が再生・癒合する際には、細胞壁の再生の他、プラズモデスマの後生的形成による細胞間の連絡、維管束組織の新生と連結といったダイナミックな発生現象が観察されることが報告されており (Sachs 2000; Kollmann & Glockmann 1985)，その過程は①傷害の認知、②細胞分裂の誘起、③細胞の分化、④細胞間の接着と相互作用の成立、⑤増殖・分化の停止からなる一連の生理反応からなると考えられる (図1; Asahina et al 2011; 朝比奈 2013)。本稿では、これまでに我々が行ってきたシロイヌナズナの切断花茎を用いた分子生物学的解析から得られた最近の結果を中心に紹介したい。

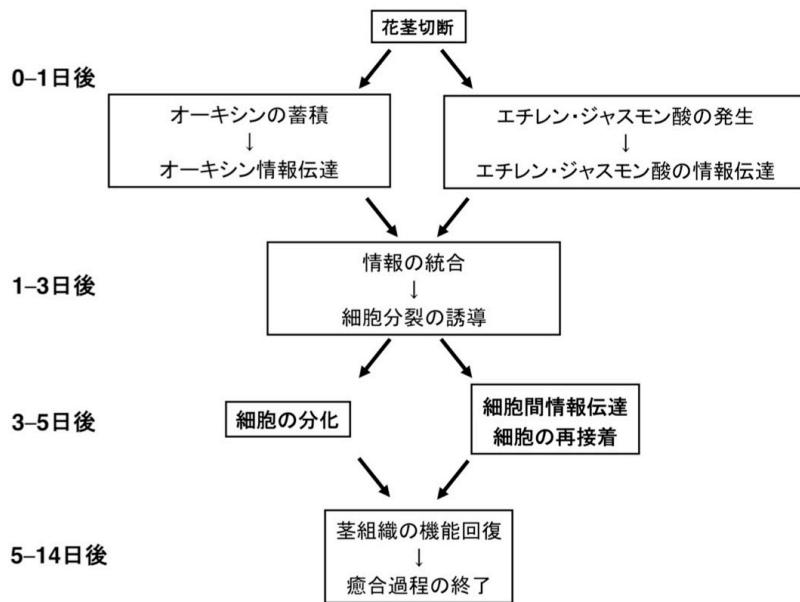


図1. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程に生じる生理現象

2. シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合

2-1. 形態学的解析

これまでに我々は、作物生産において土壤病害を回避する目的で接ぎ木が行われているキュウリやトマトを用いて切断された胚軸が癒合する過程を生理学的に解析し（図2A），子葉から供給されるジベレリンが皮層の細胞分裂開始に必須であり，同時に細胞接着に働くペクチンの合成を促進することを明らかにした。また，導管液によって供給されるホウ素などの無機元素も，組織癒合に必須なことも示した（Asahina et al 2002, 2006, 2007; 朝比奈・佐藤 2004）。

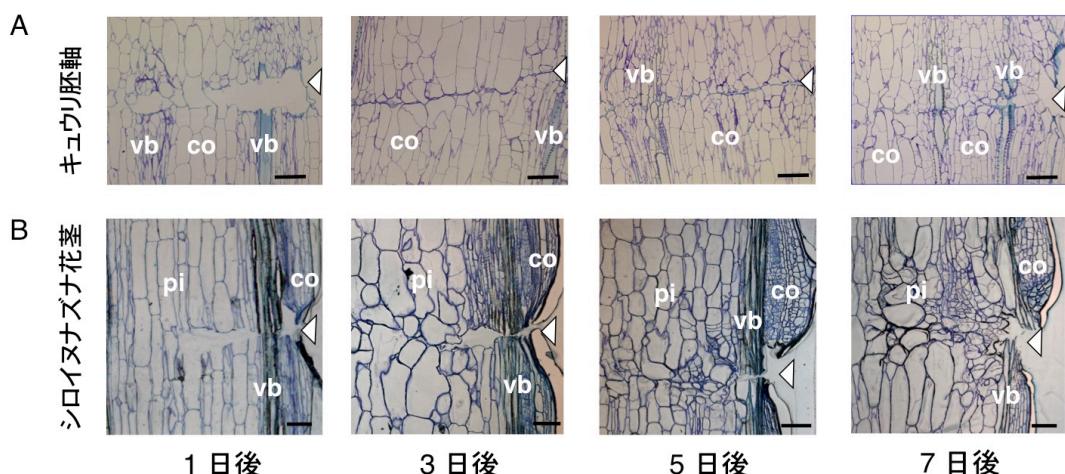


図2. キュウリ切断胚軸 (A) とシロイヌナズナ切断花茎 (B) の組織癒合過程
co:皮層, pi:髓, vb: 維管束組織。△:切断部位。トルイジンブルー染色。スケールは
100 μm。Asahina et al (2002; 2011) を改変。

しかし、キュウリやトマトでは、癒合過程を遺伝学的・分子生物学的に解析することは困難であったため、シロイヌナズナの花茎を用いる新規の実験系を確立した (Asahina et al 2011)。シロイヌナズナの花茎では、切断されると髓組織の細胞が細胞分裂を再開するが (図 2B)，この時に茎生葉や茎頂を切除すると細胞分裂が阻害されることが分かった。この現象に対する植物ホルモンの影響について検討したところ、オーキシン外生投与により器官切除による阻害が回復すること、オーキシン極性輸送阻害剤 TIBA (triiodobenzoic acid) を投与した個体や、極性輸送欠損体 (*pin1-1*) で組織癒合が抑制されることが分かった。また、オーキシン内生量の測定、及びオーキシン誘導性プロモーターDR5::GUS 形質転換体 (Sabatini et al 1999) を用いた解析から、切断直後の切断部上側にオーキシンが蓄積していることが示された (Asahina et al 2011)。また、切断処理後、植物体を横に倒し、切断部位を下側に位置して栽培した場合には癒合は生じるが、傷口を上側にして植物体を栽培すると切断部の頂芽側における DR5::GUS および CycB::GUS (細胞分裂のマーカー) の発現の減少と共に、髓の細胞分裂が抑制された (図 3)。

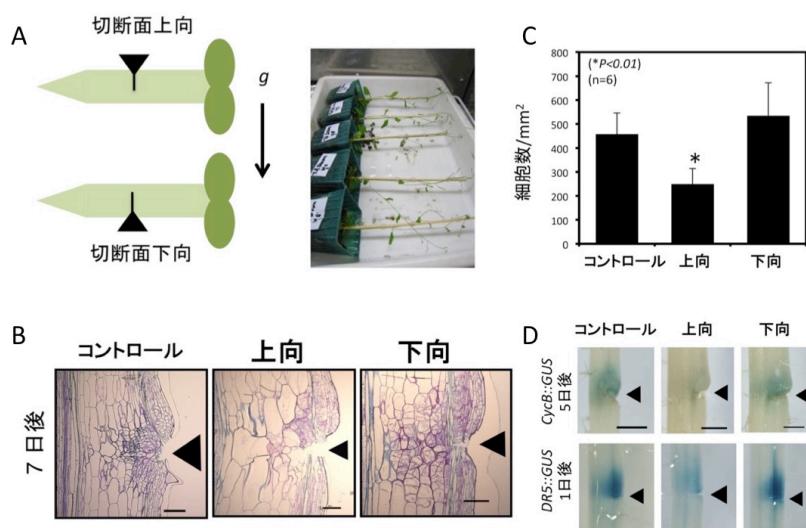


図3. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程に対する重力の影響

(A) 実験方法。シロイヌナズナの花茎をマイクロナイフで切断後、切断面を上向きまたは下向きにして1週間生育させた。(B) 通常の生育 (コントロール) と (A) のように生育させたシロイヌナズナ切断花茎の癒合部を、テクノビット樹脂切片を作成して観察した。観察は全て切断処理7日後に行った。◀: 切断部位。トルイジンブルー染色。スケールは100 μm。(C) 切断面を上向きまたは下向きにして生育した組織癒合部の細胞密度。計測は切断処理7日後に、Pitaksaringkarn et al (2014b) の方法に従って行った。(D) CyclinB::GUS、DR5::GUS植物を用いた組織化学的解析。Pitaksaringkarn et al (2014b) の図を一部改変。

以上の結果から、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合には、オーキシンの極性輸送と蓄積が必須であることが判明した。

2-2. 組織癒合に関する転写因子の同定

シロイヌナズナ花茎の組織癒合過程における遺伝子発現の変化を明らかにするため、マイクロアレイ法を用いた解析を行なった。シロイヌナズナ花茎の第一節間または第二節間の花茎にマイクロナイフを用いて切断処理を施し、一定時間後に切断部を含む約5 mmの花茎を切り出して RNA

を抽出し、解析に用いた。

マイクロアレイ解析によって同定した遺伝子群の中から、癒合過程前半期で発現する転写因子に注目して解析を行った結果、NAC型転写因子ファミリーに属する *ANAC071*、およびERF/AP2型転写因子ファミリーに属する *RAP2.6L* が、切断1日後から3日後にわたって、癒合部特異的な発現を示していることが明らかとなった (Asahina et al 2011)。

さらに、CRES-T法 (Hiratsu et al 2003) を用いてこれらの機能を抑制した形質転換体や欠損変異体 *anac071* では組織癒合が阻害されていたことから、これらの転写因子は組織癒合に必須な機能を持っていることが示された。次に、切断面の上下の組織をそれぞれ分割して遺伝子発現を調べたところ、*ANAC071* は切断面の上側で、*RAP2.6L* は切断面の下側で特異的に発現が上昇することが判明した (図4)。これら転写制御因子の発現に対するオーキシンの影響を調べたところ、*ANAC071* の発現はオーキシンによって正に、*RAP2.6L* の発現は負に、それぞれ制御されていることが明らかとなった。これらの結果から、傷の上部ではオーキシンが蓄積することによって *ANAC071* が誘導され、傷の下部ではオーキシンが枯渇することによって *RAP2.6L* が誘導されることが明らかとなった (Asahina et al 2011; 朝比奈 2013)。

2-3. ジャスモン酸、エチレンの関与とオーキシン情報伝達

切断1日後のシロイヌナズナ切断花茎の癒合部において、エチレン合成に関わる1-アミノシクロプロパン1カルボン酸合成酵素 (*ACS2*)、およびジャスモン酸合成に関わるリポキシゲナーゼ (*LOX2* および *LOX3*) が強く発現していたことから、エチレン、ジャスモン酸の関与についても検討した。

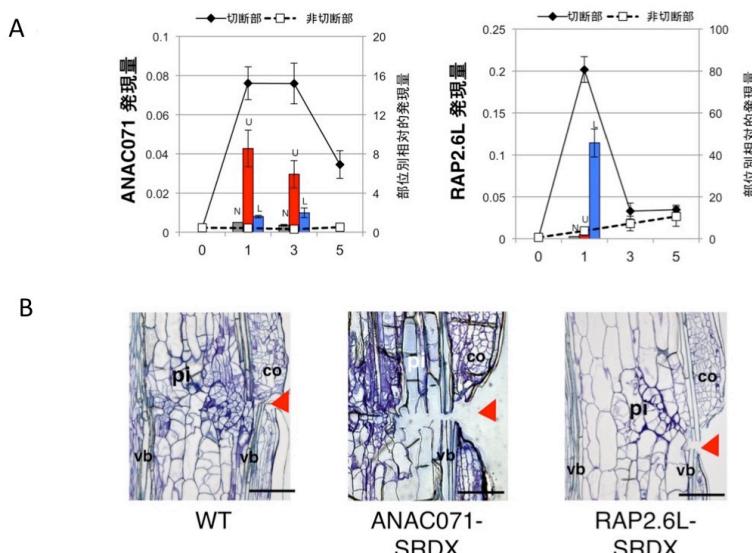


図4. シロイヌナズナ切断花茎の癒合過程におけるANAC071, RAP2.6L転写因子の関与

(A) 組織癒合過程におけるANAC071, RAP2.6L遺伝子の発現変化。実線は花茎切端部、点線は非切端部における発現量の日数変化を示す(左縦軸)。また、N(灰色)は非切端部、U(赤)は切端部上側、L(青)は切端部下側の花茎における発現量を示す(右縦軸; 非切端部の発現量を1とした相対的発現量として示す)。

(B) ANAC071-SRDX、RAP2.6L-SRDX形質転換体の切断花茎における組織癒合。観察は全て切断処理7日後に行った。co:皮層、pi:髓、vb:維管束組織。◀:切端部位。

トルイジンブルー染色。スケールは100 μm。Asahina et al (2011)を改変。

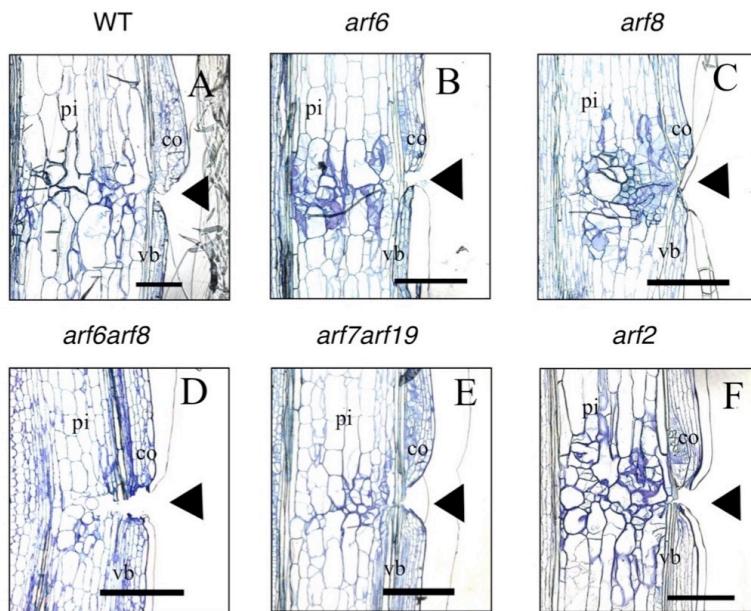


図5. ARF遺伝子欠損変異体の切断花茎における組織癒合

(A) 野生型 (B) *arf6*欠損変異体 (C) *arf8*欠損変異体 (D) *arf6, 8*二重欠損変異体 (E) *arf7, 19*二重欠損変異体 (F) *arf2*欠損変異体。観察は全て切斷処理7日後に行った。co:皮層, pi:髓, vb: 維管束組織, ▲: 切断部位, トルイジンブルー染色, スケールは100 μm 。Pitaksaringkarn et al (2014a)の図を一部改変。

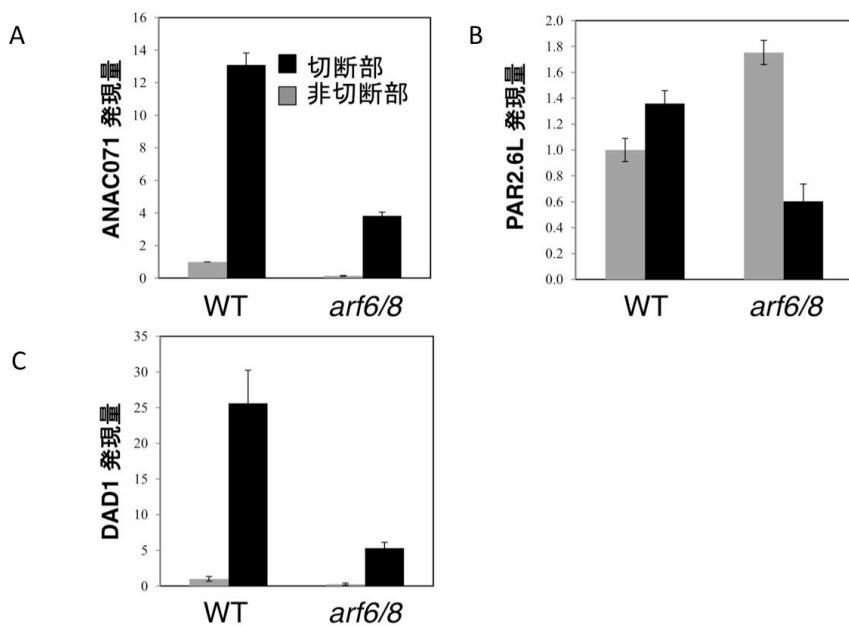


図6. *arf6/8*遺伝子欠損変異体の切断花茎における遺伝子発現解析

(A) ANAC071 (B) RAP2.6L (C) DAD1。解析は全て、切斷処理1日後の花茎から癒合部を含む約1 cmの領域を切り出し、リアルタイムPCRを用いて行った。Pitaksaringkarn et al (2014a)の図を一部改変。

まず、エチレン非感受性変異体 *ein2* を用いて同様の切断処理を行ったところ、切断部位の細胞分裂・伸長に変化が生じ、正常な組織癒合が起こらなかった。また、*ein2* では花茎切断部における *ANAC071* の発現が抑制されていたことから、*ANAC071* はエチレンによって正に制御されていることが明らかとなった。

次に、ジャスモン酸メチルを花茎に投与すると、*RAP2.6L* の発現が誘導されることが分かった。さらに、ジャスモン酸関連変異体では正常な組織癒合が生じないこと、花茎切断後にジャスモン酸の内生量が増加していたことなどから、癒合部における *RAP2.6L* の発現はジャスモン酸によつても調節されていることが示された(Asahina et al 2011, 朝比奈 2013)。

一方、オーキシン応答因子である *arf6arf8* 二重変異体の切断花茎では、組織癒合が強く阻害されることが分かった(図 5)。また、*arf6arf8* 二重変異体を用いた発現解析の結果、*ANAC071* と *RAP2.6L* の切断花茎での発現が抑制されること、非切断花茎における *RAP2.6L* の発現は、野生型と比較して上昇していることが分かった(図 6A,B)。さらに、*arf6arf8* の癒合部では、ジャスモン酸合成遺伝子の一種である *DAD1* の発現が、強く抑制されていることが分かった(図 6C)。以上の結果より、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合において、ジャスモン酸は重要な働きを有していること、オーキシンによる *ANAC071*・*RAP2.6L* 転写因子とジャスモン酸合成遺伝子の発現調節に、*ARF6* と *ARF8* が重要な因子として働いていることが示された(Pitaksaringkarn et al, 2014a)。

以上の結果、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程では、花茎切断によって生じたオーキシン、エチレン、ジャスモン酸といった植物ホルモンのシグナリングが、*ANAC071*・*RAP2.6L* 転写因子の発現を介して、細胞分裂等の遺伝子発現を制御している可能性が示された(図 7)。

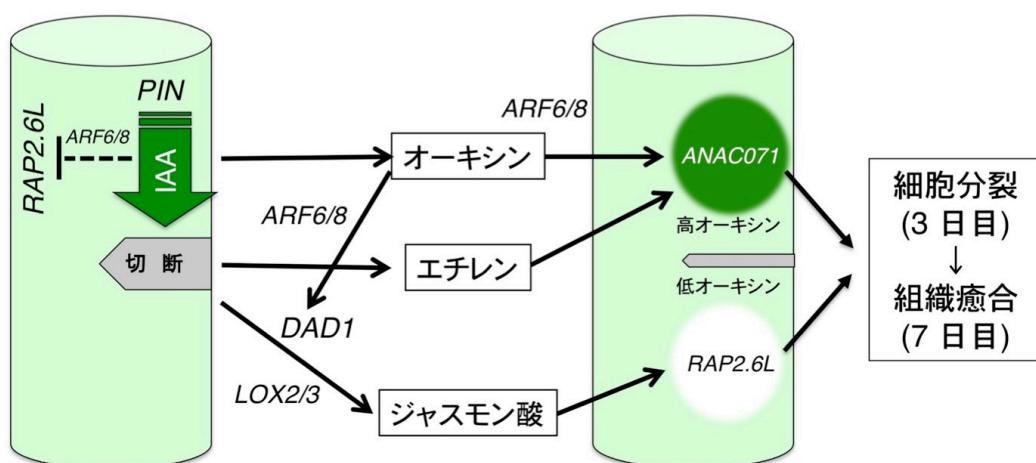


図7. 組織癒合初期過程における遺伝子発現と植物ホルモン作用のモデル

花茎が切断されると、傷の上部では蓄積したオーキシンによって *ANAC071* が誘導され、傷の下部ではオーキシンが枯渇することによって *RAP2.6L* が誘導される。それぞれの遺伝子の発現はエチレンとジャスモン酸によっても調節される。オーキシンの情報伝達には、*ARF6/8* が関与している。これら転写因子の作用によって細胞分裂が誘導され、組織癒合が起こると予想される。

2-4. 細胞壁多糖の代謝とエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素遺伝子の関与

組織癒合時には細胞分裂や細胞形態の劇的な変化が生じることから、細胞壁多糖の変化を解析したところ、ペクチン性の分岐したアラビナンが増加していることが判明した (Pitaksaringkarn et al 2014b)。一方、マイクロアレイ法により切断後1~3日目に発現のピークを迎える細胞壁関連遺伝子の解析を行ったところ、同定された遺伝子群の中にはペクチンなどの細胞壁多糖を分解する酵素の遺伝子が多数含まれていたが、細胞壁多糖の合成に関わる遺伝子はほとんど含まれていなかつた。また、細胞壁マトリックス多糖であるキシログルカンとセルロースの間の水素結合を切断するエクスパンシン (Expansin 10) とキシログルカン鎖間のつなぎ換えを行うエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) (*XTH20*) は、各々、切断後1日目と3日目に強く発現しており、細胞壁ネットワークの修飾と再構築が癒合過程に関与している可能性が示唆された。

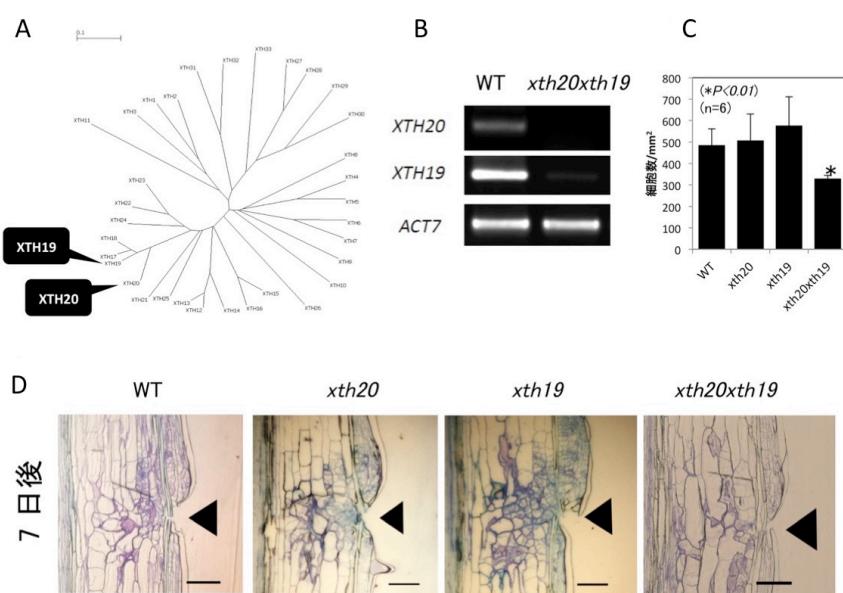


図8. 組織癒合に対するXTH遺伝子の関与

(A) シロイヌナズナXTH遺伝子の分子系統樹。 (B) RT-PCRによるXTH19, 20遺伝子の発現解析。 (C) *xth19, 20*欠損変異体における組織癒合部の細胞密度。計測は切断7日後に行った。 (D) *xth19, 20*, 及び二重欠損変異体の切断花茎の組織癒合部。観察は全て切断処理7日後に行った。▲:切断部位、トルイジンブルー染色、スケールは100 μm。 Pitaksaringkarn et al (2014b) の図を一部改変。

そこで、*XTH20*の癒合過程における発現を詳細に調べたところ、*XTH20*の発現がオーキシンによって正に制御されており、ANAC071-SRDX形質転換体及び*anac071*欠損体では*XTH20*遺伝子の発現が抑制されること、35S::ANAC071過剰発現体では逆に発現が上昇していることが分かった (Pitaksaringkarn et al 2014b)。

次に、*XTH20*と相同性の高い*XTH19*との二重欠損変異体の切断花茎における癒合過程を調べたところ、*XTH19, 20*二重変異体では組織癒合過程での細胞分裂が強く阻害されていたことから、*XTH19, 20*は組織癒合過程における細胞分裂に関与していることが示された (図8)。

また、ゲルシフトアッセイ (Electrophoresis Mobility Shift Assay)においてANAC071タンパクが*XTH19, 20*のプロモーター領域に結合すること (図9)，およびシロイヌナズナの葉において

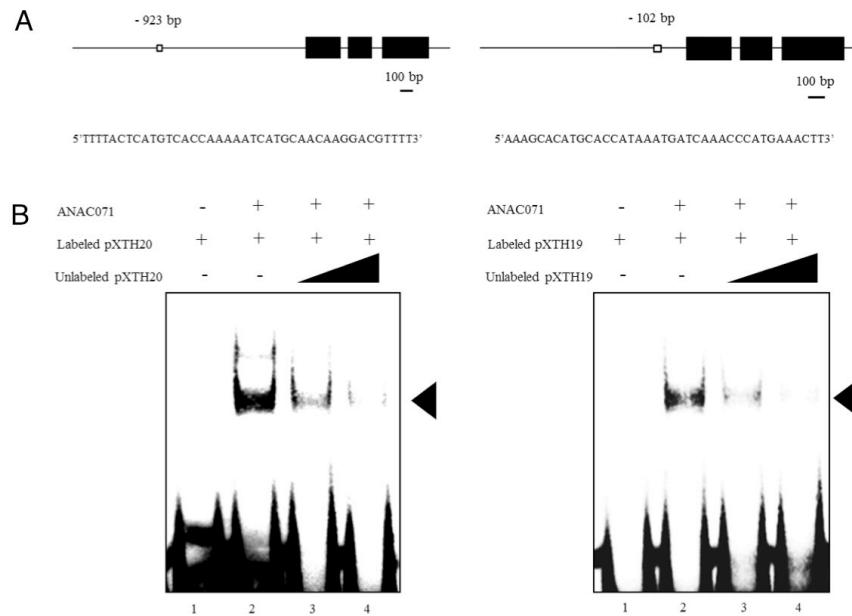


図9. XTH20, 19遺伝子プロモーター領域に対するANAC071の結合

(A) 実験に使用したオリゴヌクレオチドの配列（左; XTH20, 右; XTH19）。予想されるコア結合配列（□；CACC）は、プロモーター領域の上流-923 bpまたは-102 bpの位置に存在している。黒のボックス（■）はエキソンを示す。（B）ゲルシフトアッセイの結果。左; XTH20, 右; XTH19。▲（矢頭）はタンパク質/DNA複合体の位置を示す。Pitaksaringkarn et al (2014b)の図を一部改変。

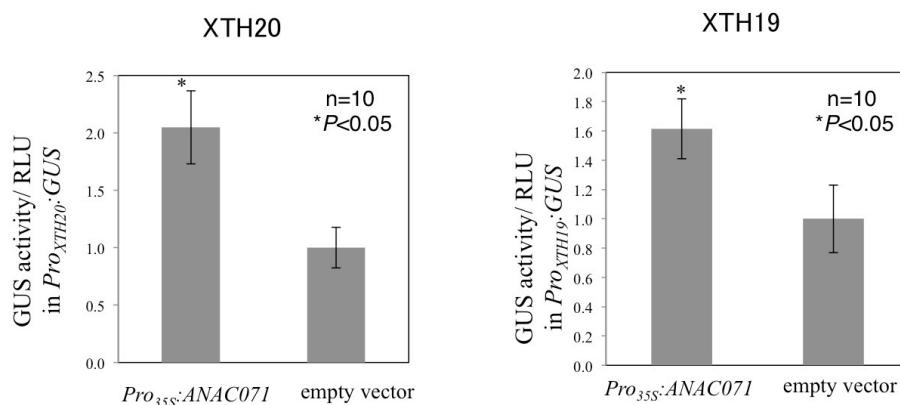


図10. XTH20, 19遺伝子の発現に対するANAC071の一過的発現の影響

ANAC071を35Sプロモーターを用いてシロイヌナズナ葉で一過的に発現させた場合のXTH遺伝子発現に対する影響を、XTH20::GUS、XTH19::GUS植物を用いて解析した。同時にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、内部標準として用いた。解析には、感染後3日目の葉を用いた。Pitaksaringkarn et al (2014b)の図を一部改変。

アグロバクテリウムを介して *ANAC071* を一過的に発現させると *XTH20, 19* のプロモーター活性が高まることが示された（図10）。以上の結果から、オーキシンで誘導された *ANAC071* によって直接制御を受けて発現した *XTH20, 19* がキシログルカンの再編を通して癒合過程の細胞分裂に関与していることが示された（Pitaksaringkarn et al 2014b）。

3. 今後の展望

以上より、シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に必須の転写因子と植物ホルモンおよび細胞壁代謝の働きが明らかとなった。組織癒合のような植物の有する再生能力は接ぎ木としても利用され、果菜類や果樹の苗の生産に無くてはならない農業技術となっている（尾形 2005）。しかし、接ぎ木親和性の分子メカニズムに関する詳細は明らかとなっていない。形態学的知見が詳しく得られている一方、生理学的、分子生物学的知見は未だ不足しているのが現状である。また、組織間・個体間の親和性により癒合が影響を受けるため、接ぎ木においては、その親和性と活着性が、実用性の面においてもっとも大きな問題となっている。現在までに構造上の相違、組織分化の欠損、二次代謝産物の相違等を考えられているが、接ぎ木親和性の分子メカニズムに関する詳細は明らかとなっていない。今後、接ぎ木や傷害における植物組織治癒の分子的メカニズムの解明を目指していきたいと考えている。

4. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、理化学研究所・神谷勇治先生、東北大学・山口信次郎先生、西谷和彦先生、横山隆亮先生、埼玉大学・高木優先生、産業技術総合研究所・光田展隆先生、名古屋大学・石黒澄江先生、帝京大学・横田孝雄先生、山根久和先生には、研究材料のご提供、ご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。また、研究を共に進めてくれました、筑波大学・松岡啓太博士（現・帝京大学）、東克也君、清水美甫さん、及び植物生理学研究室の皆さん、帝京大学・植物生理学研究室の皆さんにお礼申し上げます。

本研究の一部は、科学研究補助金・若手研究B(26840098)、特定領域研究・植物メリシステムと器官の発生を支える情報統御系(21027004)、新学術領域研究・植物細胞壁の情報処理システム(24114006)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・植物オキシリピンの生理機能の解明とその応用(S1311014)、帝京大学理工学部教育研究推進特別補助金(H21-22, H24-25)の支援を受けて行いました。

引用文献

- 朝比奈雅志 (2013) 植物切断組織の癒合における植物ホルモンおよび転写因子の役割。植物の生長調節 48 : 14-23
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, Yamazaki T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Okada K, Nishimura T, Koshiba T, Yokota T, Kamada H and Satoh S** (2011) Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*: **108** (38) 16128-16132.
- Asahina M, Gocho Y, Kamada H and Satoh S** (2006) Involvement of inorganic elements in tissue-reunion in the hypocotyl cortex of *Cucumis sativus*. *J Plant Res* **119**:337-342.
- Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H and Satoh S** (2002) Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue-reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* **129**: 201-210.
- 朝比奈雅志・佐藤忍 (2004) 切断組織の癒合とジベレリンの関与。植物の生長調節 36 : 135-141

- Asahina M, Yamauchi Y, Hanada A, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S and Yamaguchi S** (2007) Effects of the removal of cotyledons on endogenous gibberellin levels in hypocotyls of young cucumber and tomato seedlings. *Plant Biotechnol* **24**:99-106.
- Flaishman MA, Loginovsky K and Lev-Yadun S** (2003) Regenerative xylem in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* **22**:253-258.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T and Ohme-Takagi M** (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**:733-739.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A** (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell*. **25**(9): 3159–3173.
- Kollmann R and Glockmann C** (1985) Studies on graft unions.I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* **124**: 224-235.
- Mattsson J, Sung ZR and Berleth T** (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* **126**: 2979-2991.
- 尾形凡生 (2006) 接ぎ木の生理。植物の生長調節 **40** : 131-138
- Pitaksaringkarn W, Ishiguro S, Asahina M, Satoh S** (2014a). ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Biotechnol.* **31**, 49–53.
- Pitaksaringkarn W, Matsuoka K, Asahina M, Miura K, Sage-Ono K, Ono M, Yokoyama R, Nishitani K, Ishii T, Iwai H, Satoh S** (2014b). XTH20 and XTH19 regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* **80**, 604–614.
- Reid JB and Ross JJ** (2011) Regulation of tissue repair in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*: **108** (42) 17241-17242.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfels H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P and Scheres B** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* **99**: 463-472.
- Sachs T** (2000) Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant Cell Physiol* **41**: 649-656.
- Siegel BA and Verbeke JA** (1989) Diffusible factors essential for epidermal cell redifferentiation in *Catharanthus roseus*. *Science* **244**: 580-582.
- Stoddard FL and McCully ME** (1980) Effects of excision of stock and scion organs on the formation of the graft union in coleus: A histological study. *Bot Gaz* **141**: 401-412.
- van der Schoot C, Dietrich MA, Storms M, Verbeke JA and Lucas WJ** (1995) Establishment of a cell-to-cell communication pathway between separate carpels during gynoecium development. *Planta* **195**: 450-455.
- Walker DB** (1975) Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. *Am J Bot* **62**: 457-467.
- Wang Y and Kollmann R** (1996) Vascular differentiation in the graft union of in-vitro grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *J Plant Physiol* **147**: 521-533.

ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構

石川 雅樹

基礎生物学研究所 生物進化研究部門

総合大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

Molecular mechanisms of stem cell formation in the moss *Physcomitrella patens*

Key words: cell cycle; *Physcomitrella patens*; reprogramming; stem cell; wounding

Masaki Ishikawa

Division of Evolutionary Biology, National Institute for Basic Biology

Department of Basic Biology, School of Life Sciences, Graduate School for Advanced Studies

38 Nishigonaka, Myodaiji, Okazaki, 444-8585, Japan

1. はじめに

多細胞生物にみられる幹細胞は、自己複製能力と分化した細胞を生み出す能力の両方をもった細胞であり、多細胞体制の起点となる細胞である。幹細胞は、生物個体の特定の場所に維持されており、種子植物ではメリシステムで維持されている (Weigel and Jurgens, 2002)。また分化した細胞から幹細胞を誘導することも可能である。例えば、種子植物の組織片をオーキシン、サイトカイニンを含む培地で培養すると、分化細胞からカルスが誘導され、植物ホルモン濃度に依存して幹細胞を含んだメリシステムが形成される。また哺乳類でも、数種類の遺伝子を発現させることによって、纖維芽細胞を始めとした多くの分化細胞を、胚性幹細胞様の細胞 (iPS細胞) に変化させることができになっている (Masip et al., 2010)。

通常、分化細胞は細胞増殖を停止して特定の細胞機能を果たしている。そのため、分化細胞が幹細胞へ変化する過程（幹細胞化）では、分化細胞が細胞周期を再開するとともに、その分化細胞が持っている細胞の性質をリセットし幹細胞の性質を獲得する。また、分化細胞の細胞周期の再開、およびその進行は、幹細胞の性質を獲得するために必要なプロセスであることが分かってきた (Che et al., 2007; Hanna et al., 2009; Kim et al., 2011)。そのため、幹細胞化の過程では「細胞周期の再開・進行」と「細胞性質の変化」が協調的に制御される必要があるが、その分子機構はよく分かっていない。

筆者が所属している研究グループでは、分化細胞から幹細胞を容易に誘導できるコケ植物セン類に属するヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用いて、その謎に取り組んできた。そこで本稿では、ヒメツリガネゴケの幹細胞化における細胞周期の再開と細胞性質の変化を協調的に制御している分子機構について解説する。

2. 幹細胞化研究のモデル植物としてのヒメツリガネゴケ

コケ植物は、陸上植物のなかで最も古く分岐しており、セン類、タイ類、ツノゴケ類の3つに

分かれる。セン類に属するヒメツリガネゴケは、ヨーロッパ、北米に広く分布しており、配偶体世代が優先的な生活史をもつ。また、陸上植物で最も容易に遺伝子ターゲティングを行うことができ、被子植物以外の陸上植物としては初めて全ゲノム解析が完了している (Rensing et al., 2008; Zimmer et al., 2013)。そのため遺伝子情報を利用して、遺伝子破壊、あるいは緑色蛍光タンパク質 (GFP) などのレポーター遺伝子を目的箇所に容易に挿入することができ、遺伝子の機能解析を行いやすい。

さらにヒメツリガネゴケは、幹細胞を誘導しやすく、細胞レベルでの観察が容易である。ヒメツリガネゴケは、胞子が発芽するとクロロネマ頂端幹細胞が形成され、先端成長と細胞分裂を繰り返すことで、細胞内に丸い葉緑体を密に持ち、隣接する細胞同士を隔てる細胞壁を細胞の長軸に対して垂直に形成するクロロネマ細胞を生み出す (図 1A ; Kofuji and Hasebe, 2014)。これにより、細胞が一列に並んだクロロネマが形成される。しばらくすると、クロロネマ頂端幹細胞は、カウロネマ頂端幹細胞へと変化し、紡錘型の葉緑体を細胞の中にまばらに持ち、隔壁を細胞の長軸に対して斜めに形成するカウロネマ細胞を作り出していく。また、一部のカウロネマ細胞から芽分化が生じ、茎と葉からなる茎葉体が形成される (図 1B)。その葉は、中肋部分を除いて一層の細胞のみで構成されている。

そして、ヒメツリガネゴケの葉を茎葉体から切り離すと、植物ホルモンなしで切断面に面した葉細胞で細胞周期の再開がおこり、切断後 2 日以内にクロロネマ頂端幹細胞が形成される (図 2 ; Ishikawa et al., 2011)。このようにヒメツリガネゴケは、容易に幹細胞を誘導することができるとともに、幹細胞化する細胞を特定し、その細胞の動的変化を観察することができるため、幹細胞化研究の優れたモデル生物の一つであると言える。筆者が所属している研究グループでは、これらのヒメツリガネゴケの利点を生かし、幹細胞化に関わる因子の解析を行い、細胞周期と細胞性質の変化を協調的に制御する分子機構の一端を明らかにしてきた。

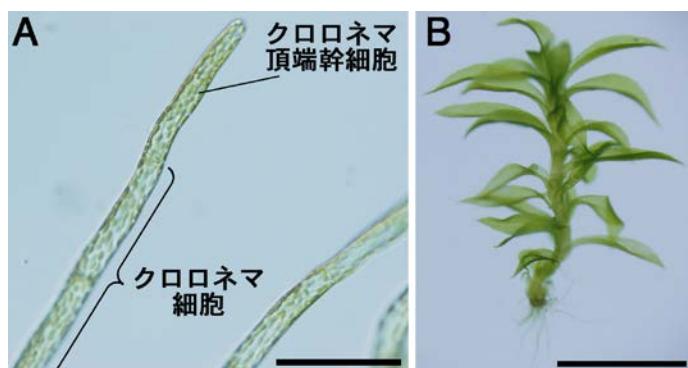


図 1. (A) クロロネマと (B) 茎葉体。
(スケールバーは、[A] 100 μm, [B] 1 mm)

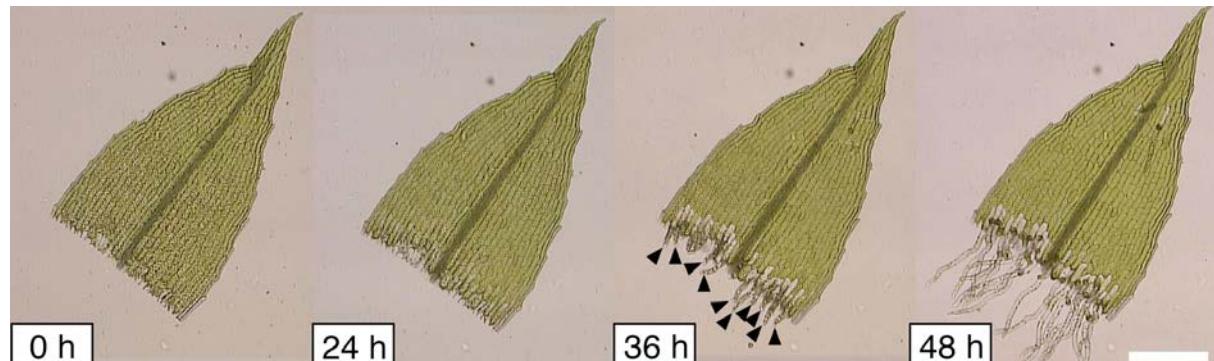


図 2. 切断葉の経時的変化

幹細胞化した細胞を鑑で表している。(スケールバーは、300 μm) 写真提供 : Liechi Zhang

3. ヒメツリガネゴケの幹細胞化における細胞周期の再開

多細胞体制を構築している分化細胞の多くは、細胞周期 G1 期で停止している。増殖因子や傷害などによって刺激が加わると、一部の細胞が細胞周期を再開させ細胞増殖が起こる。真核生物の細胞周期の再開・進行は、サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase: CDK) の複合体によって制御されている (Komaki and Sugimoto, 2012)。ヒメツリガネゴケのゲノムにも、これらをコードする遺伝子が保存されている (Rensing et al., 2008)。そこで、幹細胞化におけるこれらの遺伝子発現や CDK キナーゼ活性を調べたところ、細胞周期の G1 期から S 期への移行時に機能する D タイプ-サイクリン (CYCD) が、切断後 12 時間目あたりで切断面に面する細胞で発現が上昇し、その後、G2 期から M 期への移行を制御する B タイプ-サイクリンが発現してきた (Ishikawa et al., 2011)。一方、細胞周期制御の中心的な役割を果たす A タイプ CDK (CDKA) は、ヒメツリガネゴケには CDKA;1 と CDKA;2 の二つが存在しているが、どちらも切断前の葉細胞全体で発現していたが、そのキナーゼ活性は CYCD の発現とともに上昇した。また細胞質分裂前にチミジンアナログである EdU の取り込みが観察された。これらのことから、ヒメツリガネゴケの葉細胞は、他の多細胞生物の分化細胞と同様に G1 期に停止しており、切断刺激によって細胞周期が G1 期から再開すると予想された。

ところが、フローサイトメトリーで葉細胞の DNA 量を調べてみると、ヒメツリガネゴケの茎葉体は半数体世代であるにもかかわらず、ほぼ 2C の核 DNA 量であることが分かった (Ishikawa et al., 2011)。このことは、葉細胞は細胞周期の G1 期ではなく、S 期後半で停止していることを意味しており、筆者は以下に挙げる細胞周期再開の可能性を考えている。

3-1. S 期後半からの細胞周期再開

葉細胞は S 期後半で停止して、DNA 複製が未完了であることが考えられ、切断後に複製されていない領域での DNA 複製が起こるという可能性である (図 3A)。S 期は DNA 複製が起こる時期であるが、細胞の性質を変化させる時期でもあることが分かつてきただため、S 期からの細胞周期再開は、幹細胞化の性質を誘導するのに適切な時期であることが推察できる。

動植物を問わず、どの体細胞でも遺伝情報は同じであるため、各々の体細胞は、発生や成長の過程に応じて発現させる遺伝子を切り替え、組織・器官特異的な機能を獲得する。このような遺伝子発現制御の変化は、転写因子による制御に加えて、DNA のメチル化修飾やヒストンタンパク質の化学修飾といったエピジェネティック修飾によっても制御されている。そのため、分化細胞から幹細胞へ変化するためには、エピジェネティック修飾の消去および再構成が必要である。

例えば、ショウジョバエの成虫原基における細胞分化転換を伴う器官再生過程では、S 期が通常の細胞周期における S 期に比べて長くなっている、この S 期の長さが以前の細胞性質をリセットするのに必要である (Sustar and Schubiger, 2005)。またショウジョバエの胚発生では、S 期の DNA 複製の間に、転写活性に働くヒストン H3 の 4 番目のリジンがトリメチル化された H3K4me3 や、転写抑制に働くヒストン H3 の 27 番目のリジンがトリメチル化された H3K27me3 が、そのような修飾を受けていないヒストン H3 に置き換わり、DNA 複製後、再びヒストン修飾がおこることが示された (Petrak et al., 2012)。これらのことから、S 期で以前のエピジェネティック修飾をリセットし、あらたな遺伝子発現パターンを獲得するための分子機構が働いているようである。

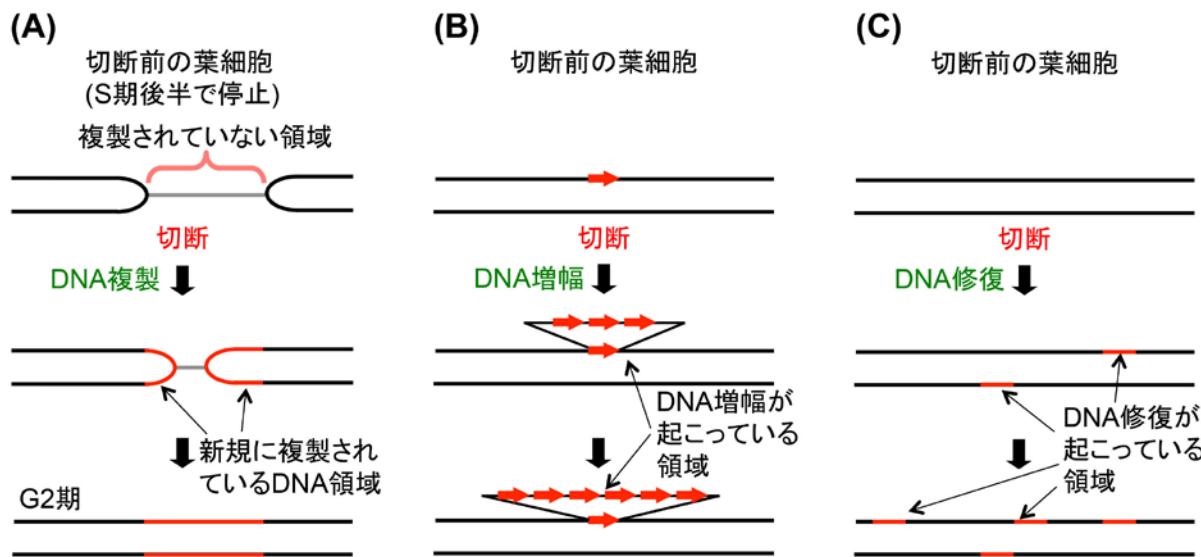


図3. ヒメツリガネゴケの幹細胞化でおこる細胞周期再開のモデル

(A) S期後半からの細胞周期再開。(B) DNA増幅を伴った細胞周期再開。(C) DNA修復を伴った細胞周期再開。詳細は本文参照。

ヒメツリガネゴケで同様なことが起こっているどうかは定かでないが、葉細胞がS期で停止しているのであれば、切断後に複製されていない領域でのDNA複製が起こるとともに、エピジェネティック修飾変化も誘導することで、葉細胞からクロロネマ頂端幹細胞へと細胞の性質を変化させているのかもしれない。

3-2. DNA増幅を伴う細胞周期再開

切断前の葉細胞はS期後半で停止しているが、切断によりDNA複製だけでなく、DNA複製とは異なるDNA合成が特定のゲノム領域でおこる可能性も考えられる(図3B)。実際に、DNA複製とは異なるDNA合成がいくつかの生物で見つかっている。被子植物では、脱分化しカルス形成するときに反復配列のDNA増幅が起こるようである(Kunakh, 1999)。また酵母でのrDNAの遺伝子増幅(Ide et al., 2010)や、ガン細胞での細胞増殖関連遺伝子の増幅(Schwab, 1998)が知られている。これらのこととは、細胞増殖に関わる遺伝子を増幅させることで細胞増殖能を高めているようである。ヒメツリガネゴケで同じようなことが起こっているのであれば、切断後におこるDNA合成は、細胞分裂を停止させている葉細胞の分裂活性を高める働きがあるのかもしれない。

3-3. DNA修復を伴う細胞周期再開

DNA複製以外のDNA合成が伴う別の可能性として、DNA修復がおこっている可能性が考えられる。切断という傷害シグナルによって、切断面に面した葉細胞でDNA損傷が起こっている可能性が考えられ、正確に娘細胞に遺伝情報を伝えるために、幹細胞化の過程で、DNA損傷を修復させているのかもしれない。

また細胞の分化転換の過程においても DNA 修復系が活性化されることが知られている。ヒヤクニチソウでは、葉肉細胞から管状要素への分化転換過程で、DNA 修復に似た DNA 合成が起こることが報告されている (Sugiyama et al., 1995)。またマウスの発生初期において、卵や精子を作り出す始原生殖細胞では、遺伝子発現パターンを体細胞型から生殖細胞型へと変換しなければならないが、この過程において、始原生殖細胞を G2 期で停止させ、その間に DNA 修復系を使って DNA のメチル化パターンの変化を起こす (Hajkova et al., 2008; Hajkova et al., 2010)。ヒメツリガネゴケの幹細胞化の過程においても、そのような DNA 修復系が活性化され、幹細胞化過程に必要なエピジェネティックな変化を引き起こしているのかもしれない。

一方、ヒメツリガネゴケの切断葉を DNA 複製の阻害剤であるアフィディコリンで処理すると、DNA 合成と細胞質分裂が抑制されるが、クロロネマ頂端幹細胞の特徴である先端成長が観察された (図 4; Ishikawa et al., 2011)。このことから、切断後におこる DNA 合成は、細胞の性質を変化させるために必要な過程というよりは、細胞分裂に必要な過程ではないかと考えられる。

3-4. 特異な細胞周期再開と細胞性質の変化

被子植物や動物において、分裂を停止した体細胞は細胞周期 G1 期で停止しているが、増殖因子などの刺激を感じると、その細胞は再び細胞分裂の周期に入ることができる。分裂を停止している細胞には、新しい細胞周期に入るか否か決定するポイント、Restriction point (R 点) が G1 期に存在している。そして一度 R 点を過ぎると、細胞周期は途中で止まることなく一巡する。ところが、ヒメツリガネゴケの葉細胞は S 期後半で停止しているので、G1 期にある R 点を超えていいると考えられる。そのため、何らかの制御機構が働いて細胞周期を G1 期以外のステージで停止させていると考えられる。そして切断刺激により、S 期後半で細胞周期を停止させる制御機構が解除され、(A) S 期後半からの細胞周期再開、(B) DNA 増幅を伴う細胞周期再開、(C) DNA 修復系を用いた細胞周期再開のいずれかが起るのではないかと考えられる。

また細胞の性質変化を引き起こすためには、その細胞が保持している特異的な遺伝子発現パターンを切り替える必要があり、S 期でそれがおこる可能性は先に述べた。また G2 期でも、そのような変化を起こす時期であることがマウスの始原生殖細胞で分かってきた。始原生殖細胞における G2 期での停止は、DNA のメチル化パターンの変化以外にも、ヒストン修飾の変化がおこる (Seki et al., 2007; Hyldig et al., 2011)。また始原生殖細胞が G2 期で停止できないノックアウトマウスでは、そのようなヒストン修飾が起こらない (Pirouz et al., 2013)。これらのこと考慮すると、ヒメツリガネゴケの S 期後半で停止している葉細胞は、切断後に複製されていない領域の DNA 複製に加え、G2 期に入るとヒストン修飾のようなエピジェネティック修飾の変化を受け、細胞性質変化を誘導している可能も考えることができる。

4. 細胞周期制御因子による細胞周期と細胞性質変化を統御する分子機構

次に幹細胞化における細胞周期と細胞性質変化の結び付きを調べるために、いくつかの細胞周期の進行を阻害する薬剤を加えて、ヒメツリガネゴケの幹細胞化の様子を調べてみた。アフィディコリンで切断葉を処理すると、切断後の DNA 合成と細胞質分裂が抑制されたが、原糸体細胞の特徴のひとつである先端成長や原糸体特異的遺伝子の発現が観察された (図 4; Ishikawa et al., 2011)。一方、CDK 活性を阻害するロスコビチンで処理すると、DNA 合成と細胞質分裂だけでな

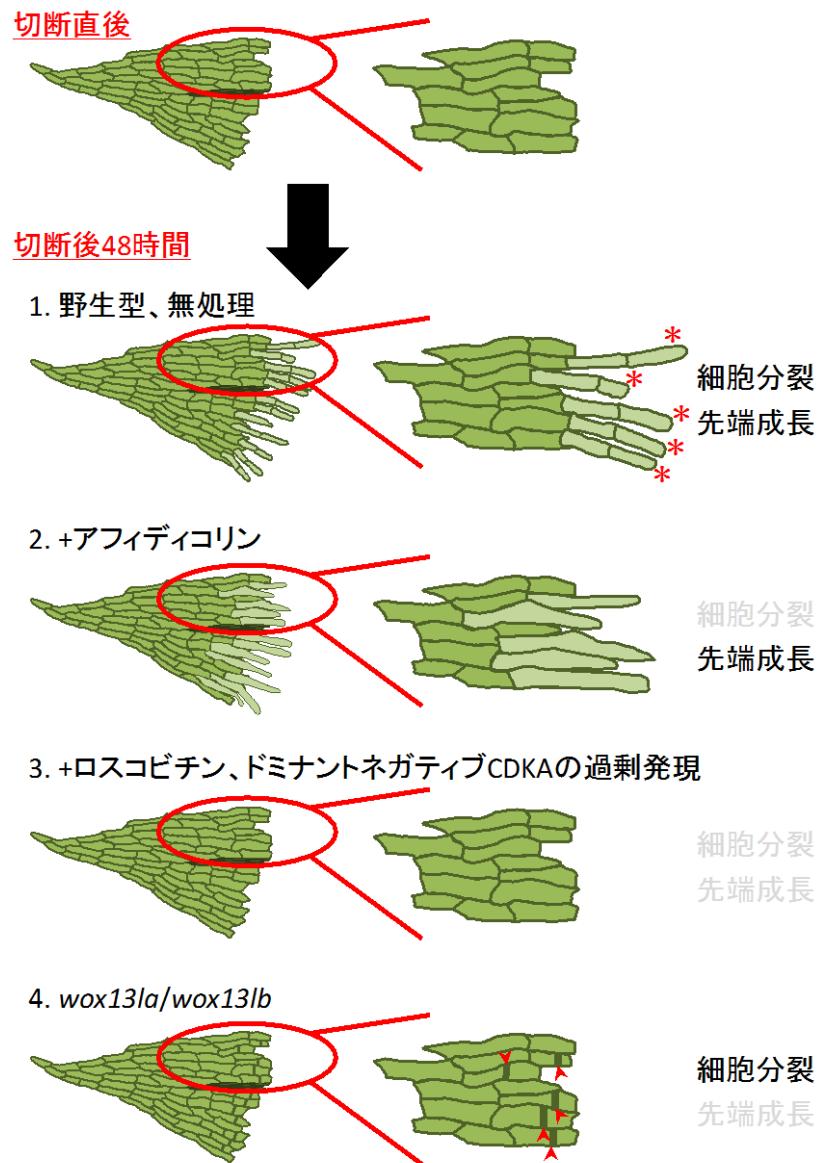


図4. 切断後の葉細胞の変化を表した模式図

1. 野生型、無処理の場合、切断面に接した細胞が幹細胞化し、細胞分裂と先端成長が起こる。
＊はクロロネマ頂端幹細胞を示す。
2. 切断葉をアフィディコリンで処理した場合。細胞分裂は抑制されるが、先端成長は起こる。
3. 切断葉をロスコビチン、ドミナントネガティブ CDKA を過剰発現させた場合。細胞分裂と先端成長の両方が抑制される。
4. *wox13la wox13lb* 二重遺伝子欠失株の切断葉。先端成長は抑制されるが、細胞分裂は抑制されない。箭は細胞質分裂を示している。

く、先端成長と原糸体特異的遺伝子発現も抑制された (図 4; Ishikawa et al., 2011)。どちらも細胞周期の進行を抑制する薬剤であるが、アフィディコリンは DNA ポリメラーゼ活性を阻害することで DNA 複製を抑制し、細胞周期の進行を止める。一方ロスコビチンは、CDK のキナーゼ活性

を抑制することで、細胞周期の進行を止める。これらのことから2つの阻害剤による表現型の違いは、CDK キナーゼ活性の違いによる可能性が考えられた。そこで、キナーゼ不活性型の CDKA;1 をヒメツリガネゴケで過剰発現させることで、内在性の CDKA のキナーゼ活性を抑制させると、ロスコビチン処理と同様に切断後の細胞分裂と頂端成長が抑制された (図 4; Ishikawa et al., 2011)。これらのことから、CDKA が細胞周期の進行と細胞伸長の両方を制御していることが分かった (図 5)。言い換えれば、幹細胞化の過程では、細胞周期の進行と独立して細胞の性質変化を誘導する分子機構が働いており、CDKA がその分子機構を制御していると言うことができる。

この細胞の性質変化を誘導する分子機構は、ホメオボックス遺伝子の一つである *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 13-LIKE (WOX13L)* の解析から、その一端が見え始めてきた。*WOX13L* 遺伝子は、シロイヌナズナの *WOX13* 遺伝子のオルソログであり、ヒメツリガネゴケには、*WOX13LA*、*WOX13LB*、*WOX13LC* の三つの遺伝子が存在している (Deveaux et al., 2008; Sakakibara et al., 2014)。*WOX13LA* と *WOX13LB* の二つの遺伝子を破壊した変異体では、細胞質分裂は起こるが、クロロネマ頂端幹細胞の特徴である頂端成長は抑制される (図 4; Sakakibara et al., 2014)。つまり、*WOX13L* 遺伝子は、細胞周期制御とは独立した幹細胞化における先端成長のプログラムを制御しているということが明らかになった (図 5)。

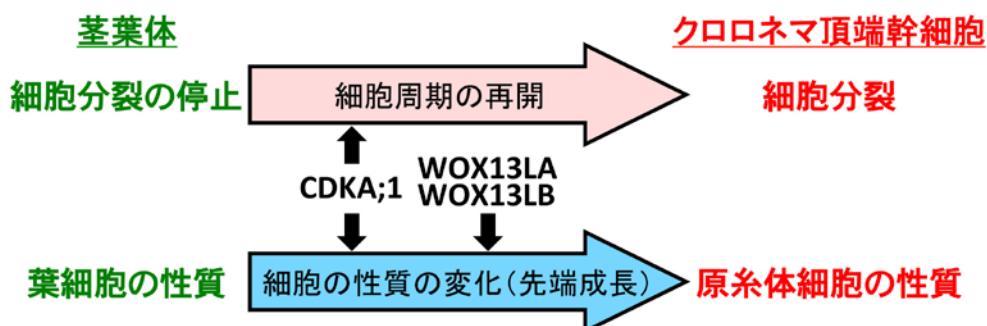


図 5. 細胞周期の再開と細胞性質の変化を統御する仕組み

現時点では、どのようにしてCDKAが細胞の性質変化、つまり先端成長を制御しているのかは不明であるが、これまでの動物やシロイヌナズナの知見を合わせて、一つの可能性を考えてみたい。シロイヌナズナの葉からのカルス形成には、ゲノムワイドのヒストン H3K27me3 の変化が必要である (He et al., 2012)。また動物の培養細胞では、CDKA のホモログである Cdk1 が、ポリコーム抑制複合体 (PRC2) を構成する因子 Ezh2 をリン酸化することで、Ezh2 のヒストンメチル化活性を制御し、ヒストン H3K27me3 の頻度を変化させる (Chen et al., 2010)。ヒメツリガネゴケにも PRC2 を構成している因子は存在しており (Mosquna et al., 2009; Okano et al., 2009)、そのうちの一つ *FIE* 遺伝子は、幹細胞化の過程で発現が上昇するので、幹細胞化に関わっているのではないかと考えられている (Mosquna et al., 2009)。そこで、切断後に活性化された CDKA は、分裂を停止している葉細胞の細胞周期を再開させるとともに、PRC2 の構成因子をリン酸化することで、その酵素活性やゲノムDNAと結合能などを変えることで、ゲノムワイドにヒストン H3K27 のメチル化状態を変え、細胞周期以外の細胞性質変化を誘導しているのではないかと考えている。

この仮説を検証するためには、CDKA の標的因子を同定するとともに、CDKA のキナーゼ活性によってヒストン修飾状態がどのように変化するのか調べることが必要であろう。

5. 今後の展望

陸上植物間でのゲノム比較から、細胞周期制御因子だけでなく基本的な遺伝子セットは陸上植物間で保存されている (Banks et al., 2011)。また、シロイヌナズナの CDKA が細胞周期制御だけでなく、幹細胞の性質を制御していることが示されているので (Gaamouche et al., 2010)、ヒメツリガネゴケの幹細胞化における協調的制御機構が、陸上植物全体でも機能している可能性は大きいと予想される。そのため、ヒメツリガネゴケの幹細胞化過程における CDKA の機能の解明は、被子植物の発生および再生過程に見られる幹細胞化の細胞性質の変化・維持に対して統一的な理解に貢献できることが期待される。さらには、どのようにして細胞周期制御因子である CDKA が、細胞周期以外の細胞性質の変化を誘導させるのか、その分子基盤を明らかにすることで、動植物を問わず、多細胞生物の分化状態と幹細胞状態の 2 つの状態が変動するときの分子機構を解き明かす鍵が得られるのではないかと期待される。

6. 謝辞

本稿で紹介したヒメツリガネゴケの幹細胞化研究は、主に ERATO 長谷部分化全能性進化プロジェクトで行われた。また本研究を進めるにあたり、数々のご助言や実験のサポートを頂いた、基礎生物学研究所の長谷部光泰 教授、村田隆 博士、日渡祐二 博士、ERATO 長谷部プロジェクトでお世話になった倉田哲也 博士、久保稔 博士、佐藤良勝 博士、西山智明 博士、榎原恵子 博士に、この場を借りてお礼申し上げます。

7. 引用文献

- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Grabskov, M., et al. 2011. The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Che, P., Lall, S., and Howell, S.H. 2007. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* 226: 1183-1194.
- Chen, S., Bohrer, L.R., Rai, A.N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J.A., and Huang, H. 2010. Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat. Cell Biol.* 12: 1108-1114.
- Deveaux, Y., Toffano-Nioche, C., Claisse, G., Thareau, V., Morin, H., Laufs, P., Moreau, H., Kreis, M., and Lecharny, A. 2008. Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*. *BMC Evol. Biol.* 8: 291.
- Gaamouche, T., Manes, C.L., Kwiatkowska, D., Berckmans, B., Koumproglou, R., Maes, S., Beeckman, T., Vernoux, T., Doonan, J.H., Traas, J., Inze, D., and De Veylder, L. 2010. Cyclin-dependent kinase activity maintains the shoot apical meristem cells in an undifferentiated state. *Plant J.* 64: 26-37.
- Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P., and Surani, M.A. 2010. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* 329: 78-82.

- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., and Surani, M.A. 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 452: 877-881.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creyghton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462: 595-601.
- He, C., Chen, X., Huang, H., and Xu, L. 2012. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured Arabidopsis tissues. *PLoS Genet.* 8: e1002911.
- Hyldig, S.M., Croxall, N., Contreras, D.A., Thomsen, P.D., and Alberio, R. 2011. Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. *BMC Dev. Biol.* 11: 11.
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. 2010. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* 327: 693-696.
- 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., and 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.
- Kim, J., Lengner, C.J., Kirak, O., Hanna, J., Cassady, J.P., Lodato, M.A., Wu, S., Faddah, D.A., Steine, E.J., Gao, Q., Fu, D., Dawlaty, M., and Jaenisch, R. 2011. Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem Cells* 29: 992-1000.
- Kofuji, R., and Hasebe, M. 2014. Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 13-21.
- Komaki, S., and Sugimoto, K. 2012. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol.* 53: 953-964.
- Kunakh, V.A. 1999. Plant genome variation in the course of *in vitro* dedifferentiation and callus formation. *Russian J. Plant Physiol.* 46: 808-817.
- Masip, M., Veiga, A., Izpisua Belmonte, J.C., and Simon, C. 2010. Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol. Hum. Reprod.* 16: 856-868.
- Mosquna, A., Katz, A., Decker, E.L., Rensing, S.A., Reski, R., and Ohad, N. 2009. Regulation of stem cell maintenance by the Polycomb protein FIE has been conserved during land plant evolution. *Development* 136: 2433-2444.
- Okano, Y., Aono, N., Hiwatashi, Y., Murata, T., Nishiyama, T., Ishikawa, T., Kubo, M., and Hasebe, M. 2009. A polycomb repressive complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 16321-16326.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Johnston, D.M., Hodgson, J.W., Black, K.L., Kovermann, S.K., Beck, S., Canaani, E., Brock, H.W., and Mazo, A. 2012. TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication. *Cell* 150: 922-933.
- Pirouz, M., Pilarski, S., and Kessel, M. 2013. A critical function of Mad2l2 in primordial germ cell development of mice. *PLoS Genet.* 9: e1003712.

- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Sakakibara, K., Reisewitz, P., Aoyama, T., Friedrich, T., Ando, S., Sato, Y., Tamada, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Kurata, T., Ishikawa, M., Deguchi, H., Rensing, S.A., Werr, W., Murata, T., Hasebe, M., and Laux, T. 2014. WOX13-like genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 141: 1660-1670.
- Schwab, M. 1998. Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 20: 473-479.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Saitou, M. 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 134: 2627-2638.
- Sugiyama, M., Yeung, E., Shoji, Y., and Komamine, A. 1995. Possible involvement of DNA-repair events in the transdifferentiation of mesophyll cells of *Zinnia elegans* into tracheary elements. *J. Plant Res.* 85: 351-361.
- Sustar, A., and Schubiger, G. 2005. A transient cell cycle shift in *Drosophila* imaginal disc cells precedes multipotency. *Cell* 120: 383-393.
- Weigel, D., and Jurgens, G. 2002. Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751-754.
- Zimmer, A.D., Lang, D., Buchta, K., Rombauts, S., Nishiyama, T., Hasebe, M., Van de Peer, Y., Rensing, S.A., and Reski, R. 2013. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics* 14: 498.

陸上植物の細胞分裂の光制御とその進化

西浜 竜一, 河内 孝之

京都大学 大学院生命科学研究科 遺伝子特性学分野

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Photoregulation of cell division and its evolution in land plants

Keywords: light signaling, photosynthesis, phytochrome, regeneration, sugar

Ryuichi Nishihama & Takayuki Kohchi

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

1. はじめに

光独立栄養生活を営む植物は、光環境と栄養状態を見極めながら成長や発生を調節する。例えば、土中の暗所で発芽した芽生え、いわゆる黄化芽生えは子葉が展開せず、本葉も形成されない。貯蔵エネルギーの有無に関わらず器官発生を行わないのは、光が不足していると判断した結果、積極的に細胞分裂を停止させ、代わりに長軸方向への胚軸細胞の伸長にエネルギーを配分する戦略をとっているからである。このとき、光受容体が重要な役割を果たす。地上に現れた後は、胚軸細胞の伸長を抑制し、光合成由来のエネルギーを用いて細胞増殖と適切な方向への細胞成長を行い、本葉形成と横方向への器官展開を促進する戦略（光形態形成）に切り替えて、さらなる光合成効率の上昇を目指す。ここでは光受容体由来の情報だけでなく、光合成産物の糖も、エネルギー状態を反映するシグナル物質として機能する。

光と増殖や成長の共役機構は、植物の共通祖先がシアノバクテリアを取り込むことで光独立栄養成長を獲得して以来、それぞれの種に適応した形で進化してきた。紅藻植物門 (Rhodophyta) のシゾン (*Cyanidioschyzon merolae*) や緑藻植物門 (Chlorophyta) のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) などでは、明暗サイクル下においては、明期には光合成で得た炭素源を用いて細胞成長を行い、暗期に細胞分裂を行う (Spudich & Sager 1980, Miyagishima et al. 2014)。この戦略は、光合成由来の酸化ストレスや紫外光による DNA 損傷を回避する形で細胞周期進行を行える点で細胞には一番安全であり、

R. Nishihama & T. Kohchi-1

比較的移動が自由な水生の単細胞藻類にとっては十分である。一方、固着生活を営む陸上植物は、光を求めて他の植物と競合しなければならず、より好条件の光環境においてより盛んに細胞増殖と器官発生を行うように適応した。コケ植物やシダ植物などの基部陸上植物から種子植物に至るまで同様の適応が観察されており、少なくとも植物が陸上化したころには共通の機構が獲得されていたと考えられる。さらに基部陸上植物では個体の切断により再生が頻度よく誘導されるが、この過程においても光は重要な働きをすることが古くから知られている。本稿では、陸上植物の発生および再生過程において、光が光受容体と糖のシグナルを介してどのように細胞周期と細胞成長を制御するのかについて代表的な知見を概説し、その普遍性と多様性を考察する。

2. 陸上植物の光受容体

植物は光の強度、方向、照射時間、波長などを正確に感知する様々な光受容体を獲得してきた。陸上植物の光受容体は以下の5種類、赤色光 (R) / 遠赤色光 (FR) 受容体フィトクロム、青色光 (BL) 受容体クリプトクロム、BL受容体フォトトロピン、ZEITLUPE/FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1/LOV KELCH PROTEIN2を含むBL受容体ファミリー、紫外光(UV)B受容体UV RESISTANCE LOCUS8に大別される (Christie 2007, Franklin & Quail 2010, Liu et al. 2011, Ito et al. 2012, Fraikin et al. 2013, Jenkins 2014)。中でもフィトクロムとクリプトクロムとが光形態形成に重要な働きをしている。フィトクロムは、Rを受容すると活性型のPfr型に、FRを受容すると不活性型のPr型に、光可逆的に変換する (Franklin & Quail 2010)。クリプトクロムはBLを受容することで活性化され、暗所で不活性化される (Liu et al. 2011)。どちらの光受容体も遺伝子発現の調節を行い、細胞および個体レベルの応答を引き起こす (Franklin & Quail 2010, Liu et al. 2011)。

3. 基部陸上植物における光による成長制御

種子植物の種子の光発芽と同様に、陸上植物の進化的に基部に位置するコケ植物（苔類、蘚類、ツノゴケ類の3分類群に分けられる）やシダ植物の解析されたほとんどすべての種において、R照射が胞子の発芽を促進することが知られている。その中でも、R照射直後のFR照射により発芽が抑制される、つまり胞子発芽の制御にフィトクロムが関与する例が、蘚類のヒヨウタンゴケ (*Funaria hygrometrica*) とヤノウエノアカゴケ (*Ceratodon purpureus*)、ツノゴケ類ミヤベツノゴケ (*Anthoceros miyabeanus*)、シダ植物のセイヨウオシダ (*Dryopteris filix-mas*)、リチャードミズワラビ (*Ceratopteris richardii*)、ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris*) など多数知られている (Mohr 1956, Bauer & Mohr

1959, Valanne 1966, Wada et al. 1984, Cooke et al. 1987)。Wada & Kadota (1989) に詳しいので参照されたい。

一方、フィトクロム非依存的な例も知られている。苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の胞子の発芽においては、胞子が非対称な第1分裂を行った後に、小さい娘細胞から仮根が伸長する。UVA から R までの波長の全領域で発芽誘導がかかるが、FR による打ち消しは見られない (Nakazato et al. 1999)。また、光合成阻害剤 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) 処理によって発芽が阻害され、そこにさらにグルコースを添加することで発芽が誘導される (Nakazato et al. 1999)。このように、ゼニゴケ胞子の発芽誘導は光合成産物の糖に依存的に起こることが示されている。

ホウライシダの発芽においても、非対称な第1分裂が起こり、原糸体が伸長する。しかしこの第1分裂は、糖ではなくフィトクロム依存的である (Furuya et al. 1997)。他の多くのシダ植物と同様、R 照射の直後に BL を照射することで発芽が阻害される (Furuya et al. 1997)。この阻害効果は核に BL を照射した時に顕著に見られることから、核に存在する BL 受容体クリプトクロムが関与していると予想されている (Imaizumi et al. 2000)。ホウライシダやモエジマシダ (*Pteris vittata*) では、発芽後の発生過程における光の影響も詳細に調べられている。非対称分裂で生じる大きい娘細胞は伸長成長して原糸体となる。原糸体は、フィトクロム依存的に細胞周期を G₁期で停止させ、伸長成長を行い、暗処理、または FR 照射により細胞周期進入が誘導される (Wada et al. 1984, Wada 1985)。さらに、暗処理直前の FR 照射により G₂期が長くなり、この効果は R 照射により打ち消されることから、Pfr 型フィトクロムは G₂/M 期移行を促進する機能を持つことが推測される。また、BL 照射が細胞周期進行を促進する効果を持つことも報告されており (Ito 1970, Miyata et al. 1979)，発芽の場合と同様に核に存在する BL 受容体が機能することが示されている (Kadota et al. 1986)。

光は細胞周期進行だけでなく、原糸体の分枝パターンにも影響を及ぼす。コケ植物蘚類のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の原糸体は、1 方向から弱い R を照射するとその方向に向かって成長し、ほとんどすべての分裂面は成長方向と垂直な面に形成され、1 列に細胞が連結した形態をとる (Kadota et al. 2000)。その状態から BL 下に移すと、基部側の複数の細胞においてその頂端側から突起を形成し、そこで成長方向に平行に分裂面を形成することで、分枝を行う。ヒメツリガネゴケがもつ 2 つのクリプトクロム遺伝子の二重変異体では BL による分枝頻度が劇的に減少することから、クリプトクロムが分枝パターン制御に関与している (Imaizumi et al. 2002)。同じ蘚類でもヤノウエノアカゴケは、R がフィトクロム依存的に分枝を誘導することが報告されている (Kagawa et al. 1997)。

胞子や原糸体だけでなく、茎葉体や葉状体の成長ももちろん光による制御を受ける。ヒメツリガネ

ゴケ茎葉体では、BL はクリプトクロムを介して葉の成長を促進し、茎の成長を抑制する (Imaizumi et al. 2002)。苔類のキビノダンゴゴケ (*Sphaerocarpos donnellii*) の葉状体の成長は、DCMU を含む培地では糖存在下でも遅くなるが、それでも暗所より明所のほうが早く、この光の効果は短時間の R 照射で再現され、FR で打ち消されることからフィトクロムにより仲介されている (Miller & Machlis 1968)。ゼニゴケ葉状体を用いた我々の解析においても、恒常活性型フィトクロムの発現により暗所でも糖存在下では成長可能となること、G_{I/S} サイクリンであるサイクリン D 遺伝子 (*CYCD*) のプロモーター活性がショ糖処理により上昇すること、さらにフィトクロムが別の経路を介して細胞周期進入を促進する機能をもつことが見出されている (未発表データ)。今後、フィトクロムの制御標的を同定することで、光による細胞分裂制御機構の理解が進むであろう。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)においても、糖により *CYCD2;1* および *CYCD3;1* 遺伝子の発現が上昇することが知られている (Riou-Khamlichi et al. 2000)。糖による細胞周期進行の調節は、陸上植物に共通の機構で行われていると推測されるが、その詳細な仕組みはまだわかつていない。

4. 種子植物における制御機構

オーキシンのアベナ屈曲試験で著名な Went (1941) は、暗所で育てたエンドウ (*Pisum sativum*) の芽生えに1日1分の光照射を行うだけで、葉の拡大が著しく促進されることを見出した。また Low (1970) は、一連の実験により、暗所で新しい葉の形成が抑制され、明所で促進されることを示した。光がどのように遺伝子発現やタンパク質機能を変化させることで、細胞周期進入や細胞成長を促すのか、その分子機構の解析は最近になって進みました。López-Juez et al. (2008) はシロイヌナズナの黄化芽生えに光を照射することにより速やかにロゼット葉が形成されること、さらにそれがフィトクロムとクリプトクロム依存的であることを示した。マイクロアレイ解析により、この過程で発現変動する遺伝子が同定された。興味深いことに、G_{I/S} および G_{2/M} サイクリン、DNA 合成・有糸分裂・細胞質分裂関連遺伝子などが、いずれも光照射から約 6 時間後にピーク発現を示した (López-Juez et al. 2008)。このことから、黄化芽生え茎頂は G_I 期または G₂ 期で停止した細胞が混在している可能性が考えられ、それが正しければ、光はどの細胞周期においても細胞周期遺伝子のグローバルな発現を引き起こすことができると推測される。

他の植物の陰では、R:FR 比が日なたに比べて小さくなり、活性型フィトクロムの存在量は低下する。これが引き金となって、避陰応答と呼ばれる様々な発生の変化—主茎の伸長、葉柄の伸長、葉の長軸：短軸比の上昇、葉形成や側枝の減少など—が引き起こされる (Casal 2013)。側枝の減少は、腋芽メリ

ステムの細胞増殖を抑制することで起こる。シロイヌナズナにおいて、腋芽の成長抑制に関与する遺伝子として同定された、II型 TCP (for TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PROLIFERATING CELL FACTORs 1 and 2) 転写因子をコードする *BRANCHED1* (*BRC1*) の発現が、低 R:FR 比の環境でフィトクロム依存的に誘導されることが明らかとなった (González-Grandío et al. 2013)。II型 TCP 転写因子には細胞周期遺伝子群の発現を抑制する機能を持つものが知られている (Martín-Trillo & Cubas 2010)。*BRC1* も、腋芽において多くの細胞周期遺伝子の発現を抑制することが示された (González-Grandío et al. 2013)。フィトクロムがどのように *BRC1* の発現を調節するのか、今後の解析が待たれる。

最近の研究から、光による細胞分裂制御においては、植物ホルモンが関与することもわかつてきている。トマト (*Solanum lycopersicum*) の茎頂にサイトカイニンを局所的に添加すると、暗所でも糖存在下ではメリシステム細胞の増殖が引き起こされること (Yoshida et al. 2011) から、光シグナルをサイトカイニンが仲介する可能性があり、以前から知られているサイトカイニンが脱黄化効果を示すこと (Chaudhury et al. 1993, Chory et al. 1994) とも矛盾しない。またシロイヌナズナにおいて、低 R:FR 比になると葉原基の細胞周期進行が急激に停止するが、このとき TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (オーキシン依存的に転写抑制因子を分解に導くオーキシン受容体) 依存的なオーキシン応答が惹起され、その結果として *CYTOKININ OXIDASE6* 遺伝子 (サイトカイニン不活性化酵素をコードする) の発現が誘導される (Carabelli et al. 2007)。この仕組みにより活性型サイトカイニンレベルが低下し、細胞周期停止が起こりやすくなると考えられる。サイトカイニンが *CYCD3;1* 遺伝子発現の活性化を介して細胞分裂を促進することが、シロイヌナズナにおいて示されている (Soni et al. 1995, Riou-Khamlich et al. 1999)。このように、光シグナルの下流でサイトカイニン量が変動し、その応答として細胞周期進行が調節される可能性がみえてきた。

光は、地上部だけでなく、地下部の成長も調節している。糖を含まない培地で発芽したシロイヌナズナは、暗所または光合成阻害条件に置かれると、貯蔵されていた内在の糖を消費した後に、根の成長を停止する (Kircher & Schopfer 2012)。最近になって、根においてグルコースが TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) を活性化し、TOR が S 期遺伝子発現を司る転写因子 E2Fa を直接のリン酸化により活性化することで、細胞周期進行を促進する機構が存在することが報告された (Xiong et al. 2013)。このように、地上部で受けた光の情報は、光合成により生産された糖として長距離輸送され、根端メリシステムを活性化する図式が推測される。茎頂メリシステムは糖だけでは増殖を活性化できない (Yoshida et al. 2011) ので、この糖依存的かつ光非依存的な細胞分裂活性化機構は根端メリシステムに

特異的なものかもしれない。根という光が届かない環境で成長する器官が発明された背景には、このような仕組みの獲得が寄与したのかもしれない。

5. 光と再生の関係

多くの被子植物は様々な組織や器官に分化した細胞が、傷や切断などの刺激を受けると、適切な成長調節因子（オーキシンとサイトカイニン）の条件下でカルスを形成する。その後の再生を目的としたカルス化誘導実験は、通常暗所で行われる。その場合、白色、すなわち葉緑体が分化していない細胞が形成される。このことは、カルス形成には光は不要であることを意味する。キクイモ (*Helianthus tuberosus*) 塊茎のように、むしろ暗所のほうが切断片からの細胞増殖が速い例も知られている (Yeoman & Davidson 1971)。

コケ植物は再生能力が非常に高いことが古くから知られている。ごく簡単に研究史を振り返ると、遡ること 1774 年に、Necker (1774) がその著書で複数の苔類の再生を記述した。それから約一世紀後の 1885 年に、Vöchting (1885) は、主に苔類ミカヅキゼニゴケ (*Lunularia vulgaris* [=*cruciata*]) とゼニゴケの葉状体と無性芽を用いて、頂端メリシステムが切除されることが再生に必要であること、切断片のもともと頂端側かつ腹側から再生体が形成されることなどを報告した。また様々な組織の再生実験から、配偶体世代のほぼすべての細胞種が再生しうるのではないかと予測した。その後複数の研究者により同様の再生実験が数多くの種で行われ、Vöchting の予測が裏づけられた (Schostakowitsch 1894, Cavers 1903, Kreh 1909)。Kreh (1909) は、多種の苔類の様々な部位からの再生を確認したものの、唯一、造精器からは再生体が得られなかつたと記載している。蘚類の再生能力も非常に高く、1898 年に Heald (1898) による多種の蘚類の再生についての報告がある。蘚類の再生の大きな特徴は、分化細胞からリプログラミングにより原糸体が直接生じることである (Heald 1898, Giles 1971, Ishikawa et al. 2011)。苔類の再生では、*Preissia commutata*において原糸体様の伸長した細胞が見られることが報告されているものの、他のほとんどの種はそのような形態の細胞は生じず、sporeling (胞子が発芽してから葉状体になるまでのステージを指す) 様の発生段階に戻るとされている (Schostakowitsch 1894, Kreh 1909)。つまり、蘚類、苔類のどちらの再生過程においても、少なくとも胞子が発芽した直後の細胞分化状態まで初期化されると言える。

ここで、再生の光依存性に話を戻す。Heald (1898) によれば、蘚類では明所でしか原糸体を再生しない種もあれば、明所でも暗所でも再生する種もあると記載されている。ヒメツリガネゴケは前者であり、プロトプラストからの再生において光が絶対的に必要であることが示されている (Jenkins &

Cove 1983)。蘚類のチョウチンゴケの一種 (*Mnium affine*) においても、原糸体再生に光が促進的に働く (Giles & von Maltzahn 1967)。蘚類スギゴケ (*Polytrichum juniperinum*) は暗所でも再生が見られるが、明所のほうが格段に効率は高い (Gay 1984)。苔類におけるほとんどの報告は明所で行われた実験結果であるが、Heald (1898) は暗所におけるゼニゴケの再生を記述し、さらに Cavers (1903) は、ゼニゴケ、ミカヅキゼニゴケ、ジンガサゴケ (*Reboulia hemispherica*)、ジャゴケ (*Fegatella conica* [= *Conocephalum conicum*]) が、成長は弱々しいものの暗所においても再生可能であることを記載した。我々の解析においても、ゼニゴケは暗所において細い再生体を形成しうることが確認された。しかしながら、明所では横方向に成長した葉状体を頻度よく再生し、その差は歴然である。

多くのコケ植物において、暗所で再生が起こりにくいのはどうしてであろうか。その答えはまだ得られていないが、一つの可能性として、初期化の標的とされている原糸体や sporeling の細胞が、葉緑体をもつ光独立栄養細胞であるため、光を必要とするのではないだろうか。前述したように、被子植物でのカルス化は暗所でも効率よく起こるが、生じるカルスは葉緑体の発達していない白色カルスであることが多い。また、シロイヌナズナでは胚軸や根からのカルス誘導を明所で行なっても白色カルスが形成される。このように、暗所で見られるカルス誘導は、白色細胞を含む組織片を用いた場合や、緑色細胞からでも白色細胞に分化状態が変化しうる場合に起こることが多い。それに一致して、緑色カルスの誘導にはやはり光を必要とする (佐藤&山田 1987)。グルコース-TOR-E2F 経路のような、暗所でも糖依存的に細胞増殖を活性化できる機構が関与しているのかもしれない。

コケ植物の再生に光を必要とする理由として、もう一つの可能性がある。初期化により原糸体や sporeling に分化状態が戻ったように見えているが、それが直接的に起こったのか、あるいは 1 段階前の胞子まで戻ってから発生を開始したのかはわかっていない。後者が正しければ、再生は「発芽」に相当する過程を経なければならない。上述したように、発芽は R によるフィトクロム制御を受けている場合がほとんどである。そのような種においては、光が再生に必須になるであろう。一方、ゼニゴケの胞子発芽は、光そのものは必須ではなく、光合成に由来する糖に依存する (Nakazato et al. 1999)。そのため、暗所でも残存性の糖を利用できる範囲で再生体が形成されうるのかもしれない。胞子発芽や再生の光による調節は、植物が陸上化した当初は光合成依存的であったものが、進化にともなって光受容体依存的な制御へと切り替わっていったことが想像され、興味深い。

5. おわりに

植物種によって、光が細胞分裂に促進的に働く場合と抑制的に働く場合があつたり、R と BL で効

果が反対であったり、ホウライシダのように胞子と原糸体でRへの応答が真逆に切り替わる植物もあつたりする。また、糖への依存性も植物種、あるいは細胞種によって異なっている。これはそれぞれの植物が光の利用戦略を変化させることで、生育環境や生活環に最適な適応を果たしてきた結果であろう。また、上で述べたように、光非依存的な細胞分裂活性化機構の獲得が、維管束植物における根という地下器官の発明に貢献したかもしれない。

別の見方をすれば、光受容と細胞分裂・成長を結ぶインターフェースは可塑的であると言える。それでも進化の過程で受け継がれてきた基本形があるはずであり、それをもとに改変を加えることで適応したと考えるのが自然であろう。植物の成長を普遍的に理解するためには、まずその基本形を解明することが重要である。進化的に様々な段階で分岐した植物を用いた、比較システム生物学的アプローチが有効であろう。

本稿では光合成の効果として糖のみを取り上げたが、光合成の過程においては、ATP、NADPH、レトログレードシグナルなど様々な生成物が生み出される。これらが細胞分裂や細胞成長に及ぼす影響も、総合的に考慮する必要がある。今後の研究の展開に期待したい。

なお拙著 (Nishihama & Kohchi 2013)において、植物細胞分裂の光制御に関して本稿で取り上げていない植物種や応答についても解説した。参考にしていただければ幸甚である。

6. 謝辞

本稿の執筆にあたり、Monash大学のJohn Bowman氏、およびTom Dierschke氏には、コケ植物の多くの古典文献情報、独語文献の解説、および貴重な助言を頂き、感謝に絶えない。また、京都大学の末次憲之氏には、数多くの有用なコメントを頂いた。ここに感謝の意を表する。本稿で取り上げた我々の研究は、文部科学省の科学研究費補助金による助成のもと行われた。

引用文献

- Bauer, L. & Mohr, H. 1959. Der Nachweis des reversiblen Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystems bei Laubmoosen. *Planta* 54: 68-73.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G., & Ruberti, I. 2007. Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* 21: 1863-1868.
- Casal, J.J. 2013. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 403-427.

- Cavers, F. 1903. On asexual reproduction and regeneration in hepaticae. *New Phytol.* 2: 121-133.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S., & Dennis, E.S. 1993. *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* 4: 907-916.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., & Brenner, M. 1994. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiol.* 104: 339-347.
- Christie, J.M. 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 21-45.
- Cooke, T.J., Racusen, R.H., Hickok, L.G., & Warne, T.R. 1987. The photocontrol of spore germination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol.* 28: 753-759.
- Fraikin, G.Y., Strakhovskaya, M.G., & Rubin, A.B. 2013. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes. *Biochemistry (Mosc)* 78: 1238-1253.
- Franklin, K.A. & Quail, P.H. 2010. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J. Exp. Bot.* 61: 11-24.
- Furuya, M., Kanno, M., Okamoto, H., Fukuda, S., & Wada, M. 1997. Control of mitosis by phytochrome and a blue-light receptor in fern spores. *Plant Physiol.* 113: 677-683.
- Gay, L. 1984. Effect of light during regeneration from leaves of *Polytrichum juniperinum*. *Physiol. Plant.* 61: 95-101.
- Giles, K.L. 1971. Dedifferentiation and regeneration in bryophytes: a selective review. *N.Z. J. Bot.* 9: 689-694.
- Giles, K.L. & von Maltzahn, K.E. 1967. Interaction of red, far-red, and blue light in cellular regeneration of leaves of *Mnium affine*. *Bryologist* 70: 312-315.
- González-Grandío, E., Poza-Carrion, C., Sorzano, C.O., & Cubas, P. 2013. *BRANCHED1* promotes axillary bud dormancy in response to shade in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 834-850.
- Heald, F.d.F. 1898. A study of regeneration as exhibited by mosses. *Bot. Gaz.* 26: 169-210.
- Imaiizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M., & Wada, M. 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 14: 373-386.
- Imaiizumi, T., Kanegae, T., & Wada, M. 2000. Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell* 12: 81-95.
- 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.

- Ito, M. 1970. Light-induced synchrony of cell division in the protonema of the fern, *Pteris vittata*. *Planta* 90: 22-31.
- Ito, S., Song, Y.H., & Imaizumi, T. 2012. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 5: 573-582.
- Jenkins, G.I. 2014. The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. *Plant Cell* 26: 21-37.
- Jenkins, G.I. & Cove, D.J. 1983. Light requirements for regeneration of protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 157: 39-45.
- Kadota, A., Fushimi, Y., & Wada, M. 1986. Intracellular photoreceptive site for blue light-induced cell division in protonemata of the fern *Adiantum*—further analyses by polarized light irradiation and cell centrifugation. *Plant Cell Physiol.* 27: 989-995.
- Kadota, A., Sato, Y., & Wada, M. 2000. Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta* 210: 932-937.
- Kagawa, T., Lamparter, T., Hartman, E., & Wada, M. 1997. Phytochrome-mediated branch formation in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. *J. Plant Res.* 110: 363-370.
- Kircher, S. & Schopfer, P. 2012. Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 11217-11221.
- Kreh, W. 1909. Über die Regeneration der lebermoose. vol 90: Halle, Druck von E. Karras.
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., & Lin, C. 2011. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci.* 16: 684-691.
- López-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A., Beemster, G.T., Bögre, L., & Shanahan, H. 2008. Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 947-968.
- Low, V.H.K. 1970. Effects of light and darkness on the growth of peas. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 187-196.
- Martín-Trillo, M. & Cubas, P. 2010. TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15: 31-39.
- Miller, D.H. & Machlis, L. 1968. Effects of light on the growth and development of the liverwort, *Sphaerocarpos donnellii* Aust. *Plant Physiol.* 43: 714-722.
- Miyagishima, S.Y., Fujiwara, T., Sumiya, N., Hirooka, S., Nakano, A., Kabeya, Y., & Nakamura, M. 2014. Translation-independent circadian control of the cell cycle in a unicellular photosynthetic eukaryote. *Nat. Commun.* 5: 3807.

- Miyata, M., Wada, M., & Furuya, M. 1979. Effects of phytochrome and blue-near ultraviolet light-absorbing pigment on duration of component phases of the cell cycle in *Adiantum* gametophytes. *Dev. Growth Differ.* 21: 577-584.
- Mohr, H. 1956. Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. *Planta* 46: 534-551.
- Nakazato, T., Kadota, A., & Wada, M. 1999. Photoinduction of spore germination in *Marchantia polymorpha* L. is mediated by photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 40: 1014-1020.
- Necker, N.J. 1774. *Physiologia Museorum. Manhemii*, Schwan, C.F.
- Nishihama, R. & Kohchi, T. 2013. Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 630-637.
- Riou-Khamlich, C., Huntley, R., Jacqmard, A., & Murray, J.A.H. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.
- Riou-Khamlich, C., Menges, M., Healy, J.M.S., & Murray, J.A.H. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4513-4521.
- Schostakowitsch, W. 1894. Ueber die Reproduktions- und Regenerationserscheinungen bei den Lebermoosen. *Flora* 79: 350-384.
- 佐藤文彦, 山田康之 1978. 緑化培養細胞の光独立栄養性. 植物の化学調節 13: 75-86.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., & Murray, J.A. 1995. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.
- Spudich, J.L. & Sager, R. 1980. Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *J. Cell Biol.* 85: 136-145.
- Valanne, N. 1966. The germination phases of moss spores and their control by light. *Ann. Bot. Fenn.* 3: 1.
- Vöchting, H. 1885. Über die regeneration der Marchantieen. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 16: 367-414.
- Wada, M. 1985. Photoresponses in cell cycle regulation. *Proc. R. Soc. Edinb. Biol.* 86: 231-235.
- Wada, M., Hayami, J., & Kadota, A. 1984. Returning dark-induced cell cycle to the beginning of G1 phase by red light irradiation in fern *Adiantum* protonemata. *Plant Cell Physiol.* 25: 1053-1058.
- Wada, M. & Kadota, A. 1989. Photomorphogenesis in lower green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*

Biol. 40: 169-191.

Went, F.W. 1941. Effects of light on stem and leaf growth. *Am. J. Bot.* 28: 83-95.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181-186.

Yeoman, M.M. & Davidson, A.W. 1971. Effect of light on cell division in developing callus cultures. *Ann. Bot.* 35: 1085-1100.

Yoshida, S., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. 2011. Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes Dev.* 25: 1439-1450.

根粒初期発生における細胞リプログラミング機構

寿崎拓哉・川口正代司
 基礎生物学研究所 共生システム研究部門
 総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻
 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

A mechanism of reprogramming cell fate during early nodule development

Key words: endoreduplication, *Lotus japonicus*, nodule development, root nodule symbiosis

Takuya Suzaki, Masayoshi Kawaguchi
 Division of Symbiotic Systems, National Institute for Basic Biology
 Department of Basic Biology, School of Life Sciences, Graduate School for Advances Studies
 Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Aichi, Japan

1. はじめに

多くのマメ科植物とごく一部の植物（ニレ科のパラスボニアなど）は、窒素固定能を有する土壤細菌である根粒菌と相互作用することにより、根に“根粒”と呼ばれる共生器官を形成する能力を有している。根粒を通して、植物と根粒菌は“根粒共生”と呼ばれる窒素と炭素の栄養のやりとりを基本とした相利共生関係を築くことができる。植物と微生物の共生機構を研究する上で、根粒共生はそのモデルケースとなることは多くの研究により示されていることであるが、植物の形態形成の研究としても非常に興味深い現象が含まれていると我々は考えている。というのも、根粒初期発生過程では、根粒菌の感染および根粒菌が分泌するリポキチンオリゴ糖の一種であるNod factorがトリガーとなり、宿主植物根のこれまで分化していた皮層の細胞の一部が脱分化し、細胞分裂が誘導され、根粒原基が形成されるからである(Brewin 1991, Yang et al. 1994)。したがって、この発生過程では、外的刺激（根粒菌感染）に応答した新たな器官形成（根粒形成）に向けた分化細胞の運命転換（リプログラミング）が起こると言い換えることができる(Crespi & Frugier 2008, Suzaki & Kawaguchi 2014)。根粒形成の研究は、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) とタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) を用いて世界中で精力的に研究が進められている。タルウマゴヤシの根粒は無限型根粒と呼ばれ、根粒の先端に根粒メリシステムが存在し、求頂的に根粒が成長するのに対し、ミヤコグサに形成される根粒は明確な根粒メリシステム構造はみられず、有限型根粒と呼ばれる(Brewin 1991, Ferguson et al. 2010)。また、無限型根粒では、内側の皮層（一般的にマメ科植物では皮層は3-4層から成る）と内鞘の細胞分裂が誘導され、根粒を構成する細胞となると考えられている(Xiao et al. 2014)。一方、有限型根粒では専ら外側の皮層細胞の細胞分裂が誘導され、根粒を構成する細胞へと分化すると考えられている(Szczyglowski et al. 1998)。このように、根粒の形態や由来する細胞に違いはあるが、根粒菌の感染・侵入機構や根粒発生の基本的なメカニズムはミヤコグサとタルウマゴヤシは保存されていることが多くの研究により示されており、これまで、この2つの植物の研究者がしのぎを削ることにより根粒形成の研

究が発展してきた。

我々が研究対象としているミヤコグサは、我が国主導でゲノム配列の解読や研究リソースの整備が行われてきたマメ科の草本である（図1）(Sato et al. 2008)。ゲノムサイズは470 Mbほどで、イネとほぼ同等であり、草丈は30cmほどで、室内の蛍光灯下で安定した栽培が可能である。また、世代時間が早いエコタイプ(MG-20)を用いれば、2~3ヶ月ほどで世代をまわすことができる。さらに、マメ科植物では難しいとされてきた形質転換技術が早くから確立している点も特徴である。近年では内在性のトランスポゾン(*LORE1*)を用いたタグラインの整備が充実してきており、逆遺伝学的な研究を行う環境も整いつつある(Fukai et al. 2012, Urbanski et al. 2012)。ミヤコグサの共生パートナーであるミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) も我が国が主導でゲノム解読、リソースの整備が行われている(Kaneko et al. 2000)。共生関係にある生物は無数にいるが、共生関係にある生物の両方（ミヤコグサ、根粒菌）のゲノムが解読され、またそれぞれの生物種において様々な遺伝的リソースや分子ツールが整っている例はほとんどない。根粒共生は、宿主-根粒菌の認識、根粒菌の宿主細胞への侵入、根粒内における共生窒素固定などが植物・根粒菌それぞれの因子によって密接に相互作用しながらコントロールされており、我々にとっては大変興味深い現象が満載の研究対象であるが、ここでは、根粒初期発生に焦点を当てて、植物側の研究により得られた最近の知見や我々の研究成果を紹介し考察する。



図1. ミヤコグサ (A) とミヤコグサの根粒(B).
スケールバー: 10 cm (A), 1 mm (B).

2. 根粒初期発生におけるサイトカイニン・オーキシンの役割

植物の形態形成では、2つの植物ホルモン、サイトカイニンとオーキシンが細胞増殖・分化をコントロールする中枢的な機能を担うことが広く知られている。根粒発生においても例外ではなく、サイトカイニンとオーキシンの根粒発生における機能を調べる生理学的な研究が古くから行われてきた(Suzaki et al. 2013)。近年、ミヤコグサとタルウマゴヤシにおいて、サイトカイニンの受容体が特定され、根粒発生におけるサイトカイニンの遺伝的機能の理解が大きく進んだ(Gonzalez-Rizzo et al. 2006, Murray et al. 2007, Tirichine et al. 2007, Frugier et al. 2008)。ミヤコグサのLOTUS HISTIDINE KINASE 1 (*LHK1*)はシロイヌナズナのARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4 (*AHK4*)のオルソログであり、サイトカイニンの受容体として機能する。*LHK1*の機能喪失変異体 (*lhk1*) では根粒発生が阻害されることから、*LHK1*は根粒発生を正に制御する働きをもつことが示された(Murray et al. 2007)。その一方で、*lhk1*変異体では、根粒形成能が完全には抑制されず、少数の根粒が形成されることが知られていた。最近、ミヤコグサではLHK1AとLHK3と名付けられた他のサイトカイニン受容体が*LHK1*と重複した機能をもつことが明らかにされた(Held et al. 2014)。実際に、*lhk1 lhk1a lhk3*の3重変異体では根粒発生が全く起こらない。その一方で、*LHK1*の優性変異体として、サイトカイニンの受容に関わるドメインの点突然変異により、サイトカイニンシグナリングが構成的に活性化される*spontaneous nodule formation 2 (snf2)*変異体

が単離されている。この *snf2* 変異体を根粒菌非存在下で育てると、皮層細胞分裂が自発的に誘導され、“自発的根粒”と呼ばれる、形態が通常の根粒と類似した構造が形成されることがわかった (Tirichine et al. 2007)。このように、サイトカイニン受容体の劣性および優性変異体の解析から、サイトカイニンシグナリングの活性化が根粒発生のトリガーとして必要かつ十分であることがわかつてきた。最近では、ミヤコグサの根にサイトカイニンを与えるだけで、条件次第で根粒様構造の形成が誘導されることも示されている(Heckmann et al. 2011)。サイトカイニンからの情報伝達はヒスチジン-アスパラギンのリン酸化リレー系が用いられており、この機構は細菌や酵母の二成分制御系と類似していることが知られている(Heyl & Schmulling 2003)。サイトカイニン情報伝達では、最終的にはDNA結合活性をもつ B-type response regulators (RRs)がそのターゲット遺伝子の発現を調節することが知られている。タルウマゴヤシを中心にして、根粒発生過程において発現が誘導される RRs 遺伝子が同定されつつあるが(Gonzalez-Rizzo et al. 2006, Ariel et al. 2012)，詳細な機能解明には至っていない。

オーキシンもサイトカイニンと同様に、根粒発生における関与が古くから研究されてきた植物ホルモンの1つである(Suzaki et al. 2013)。近年、我々の研究により、オーキシン応答が皮層細胞分裂時に誘導されることがわかつた(Suzaki et al. 2012)。また、*snf2* 変異体における自発的根粒形成過程において、オーキシン応答が誘導されることもわかつた。さらに、タルウマゴヤシにおいて、オーキシンの極性輸送を阻害すると、根粒菌非存在下で根粒様の構造が分化することや、サイトカイニンシグナリングは、オーキシン排出キャリアーをコードする *PIN* 遺伝子の発現をコントロールすることも示された(Plet et al. 2011, Rightmyer & Long 2011)。これらの知見を統合すると、根粒発生におけるサイトカイニンシグナリングの1つの役割として、オーキシンを根粒発生予定領域に蓄積する働きを担っている可能性が示唆される。これまでのところ、オーキシンの生合成、シグナリング、輸送に関わる遺伝子の根粒発生における機能を示した報告例はないため、根粒初期発生におけるオーキシンの役割はあいまいな点が多い。今後、ミヤコグサ、タルウマゴヤシ双方において逆遺伝学的な研究が加速することで、その詳細が明らかになることが期待される。

3. サイトカイニンシグナリングの下流における根粒初期発生の制御機構

これまでのミヤコグサとタルウマゴヤシを中心とした研究により、根粒形成に関わる多くの遺伝子が同定されている。根粒形成では、“表皮における根粒菌感染に依存したシグナリング”と“皮層における根粒発生”の質的に異なる2つの制御系が、空間的に離れた組織において、連続的かつ一部同調的に進行することが知られており、この2つの制御系のどちらか一方でも破綻すると、基本的には根粒が形成されない。これまでの研究では、この2つの制御系をうまく区分して研究することは困難であったが、ごく最近の組織特異的プロモーターを用いた研究により、その問題は緩和されつつある(Rival et al. 2012, Hayashi et al. 2014)。さらに、自発的根粒現象の発見により、根粒発生に焦点を当てた研究が可能になった。*snf2* 変異体により誘導される自発的根粒形成が、種々の既知の根粒形成変異によって影響を受けるか調べた研究により、GRAS タイプの転写因子 NODULATION SIGNALING PATHWAY 1 (NSP1) および NSP2, RWP-RK タイプの転写因子 NODULE INCEPTION (NIN) がサイトカイニン受容体の下流において、根粒発生の正の制御に関与することが明らかになった(Tirichine et al. 2007)。NIN は根粒形成に関わる遺伝子として最初に

同定された植物側の遺伝子であり、根粒形成過程で特異的に発現が誘導される遺伝子であることが知られてきた(Schauser et al. 1999)。最近、NIN は NUCLEAR FACTOR-Y(NF-Y) 遺伝子を直接の標的とすることが明らかになり、さらに *NIN* や *NF-Y* 遺伝子を構成的に発現させると、根粒菌非存在下で皮層細胞分裂が誘導されることも示された（ただし、*snf2* の自発的根粒と異なり、根粒様構造の形成までには至らない）(Soyano et al. 2013)。サイトカイニンを投与した根では *NIN* の発現が誘導されること、*lkh1* 変異体では根粒菌感染依存的な *NIN* の発現誘導が起こらないことから、サイトカイニンシグナリングは *NIN* の発現誘導に必要であると考えられている(Heckmann et al. 2011, Soyano et al. 2014)。

4. 核内倍加と根粒発生の制御関係

我々はサイトカイニンシグナリングの下流において根粒初期発生に関与する分子機構を明らかにすることを目的に、これまで *snf2* の抑圧変異体のスクリーニングを行い、単離した変異体の原因遺伝子の解析を行ってきた。ミヤコグサの *vagrant infection thread 1 (vag1)* は *snf2* 依存的な自発的根粒形成を抑圧する変異体として単離された(Suzaki et al., 2014)。*vag1* の完全な機能喪失変異体と思われるアリルでは、通常の根粒形成が完全に抑圧されることから、*VAG1* は根粒発生に必須な遺伝子と考えられる。ポジショナルクローニングにより、その原因遺伝子を特定したところ、*VAG1* はシロイヌナズナにおいて DNA トポイソメラーゼ VI の構成因子として知られている ROOT HAIRLESS 1 (RHL1)/HYPOCOTYL 7 のオルソログであることあることが判明した (Sugimoto-Shirasu et al. 2005, Suzaki et al. 2014)。DNA トポイソメラーゼ VI は核内倍加と呼ばれる核内 DNA 量を増幅する過程において、DNA の二重らせんがもつれることを防ぐ作用をもつ酵素複合体と考えられている。シロイヌナズナでは、DNA トポイソメラーゼ VI を構成する因子の機能喪失変異体はいずれも核内倍加に関連した細胞生長過程に著しい異常がみられる(Hartung et al. 2002, Sugimoto-Shirasu et al. 2002, Yin et al. 2002, Sugimoto-Shirasu et al. 2005, Breuer et al. 2007, Kirik et al. 2007)。シロイヌナズナの *RHL1* を *vag1* 変異体に導入したところ、根粒形成の異常が相補されたことから、*VAG1* と *RHL1* はタンパクの機能としても類似していることが示唆された。

根粒形成では、成熟した根粒において、根粒菌が侵入しつつある細胞の核内倍加が起こることにより細胞サイズが増大し、根粒菌がコロナ化

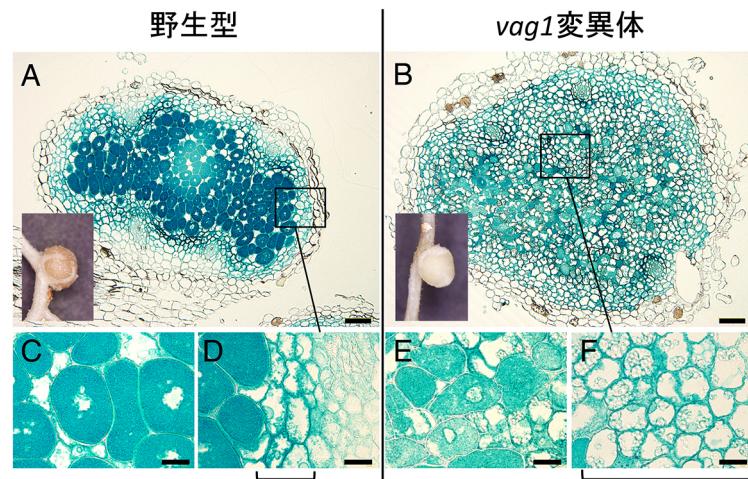


図 2. 野生型(A,C,D)と *vag1* 変異体(B,E,F)の根粒切片.

LacZ を構成的に発現する根粒菌を感染させ、根粒を X-gal 染色している。ドット状の青色のシグナルは根粒菌を示す。野生型では根粒内部は核内倍加した感染細胞で埋めつくされている(A,C)。*vag1* 変異体では感染細胞の数とサイズが減少し(B,E)、感染細胞の前段階の細胞（ brackets で示す）の数が増加する(D,F)。スケールバー : 100 μm (A, B), 20 μm (C-F).

し窒素固定を行う細胞（感染細胞）へと分化することが知られている(Foucher & Kondorosi 2000, Vinardell et al. 2003, Kondorosi & Kondorosi 2004,)。*vag1* 変異体の弱いアリルでは根粒形成能が完全には失われておらず、ごく少数の根粒を形成する。形成された根粒のサイズは野生型と大きな違いは認められないが、感染細胞のサイズと数が著しく減少していることが判明した（図 2）。根粒細胞の核相を調べたところ、高次(16C 以上)に核内倍加した細胞の割合が減少していることもわかった。その一方で、*vag1* の根粒では、感染細胞に分化する前段階の細胞の数が増加していることから、通常の細胞分裂は正常（むしろ活発）に行われていると考えられる（図 2）。これらの結果は、VAG1 は成熟根粒における感染細胞の分化に関わる核内倍加をコントロールしていることが示唆される。

次に、根粒発生（皮層細胞分裂）の開始過程における VAG1 の関与を調べるために、核のサイズに着目した根粒初期発生の観察を行ったところ、野生型では皮層細胞分裂の直前に一部の細胞の核サイズが増大することがわかった。その後、サイズの増大した核をもつ細胞の周囲の皮層細胞の分裂が誘導される様子が観察された。その一方で、*vag1* 変異体では根粒菌が感染した領域における皮層細胞の核サイズの増大はみられず、皮層細胞分裂も誘導されないことがわかった。このことは、根粒発生を開始する上で、VAG1 を介した皮層細胞の核内倍加が重要な役割を担う可能性を示唆している（図 3）。上述のように、根粒初期発生では皮層細胞における局所的なオーキシン応答はサイトカイニンシグナリングの制御下におかれていると考えられている。*vag1* 変異体では皮層細胞分裂は誘導されないもののオーキシン応答はみされることから、オーキシン応答までは正常に機能していると思われる。言い換えると、皮層細胞の核内倍加はサイトカイニンとオーキシンシグナリングの下流において誘導される可能性が考えられる。この発見は、エンドウの根の皮層組織片にサイトカイニンとオーキシンを与えると核内倍加が誘導されることを示したごく初期の研究成果とも一致する(Libbenga & Torrey 1973)。また、根粒発生の制御における DNA トポイソメラーゼ VI の役割は、最近、

VAG1 とは異なる DNA トポイソメラーゼ VI の構成因子の解析からも明らかにされている(Yoon et al. 2014)。DNA トポイソメラーゼ VI の A サブユニットをコードする *SUNERGOSI* の機能喪失体では、興味深いことに高温において根粒形成の表現型が強まることが示されており、温度依存的に DNA トポイソメラーゼ VI の活性をコントロールする仕組みが存在する可能性が考えられる。

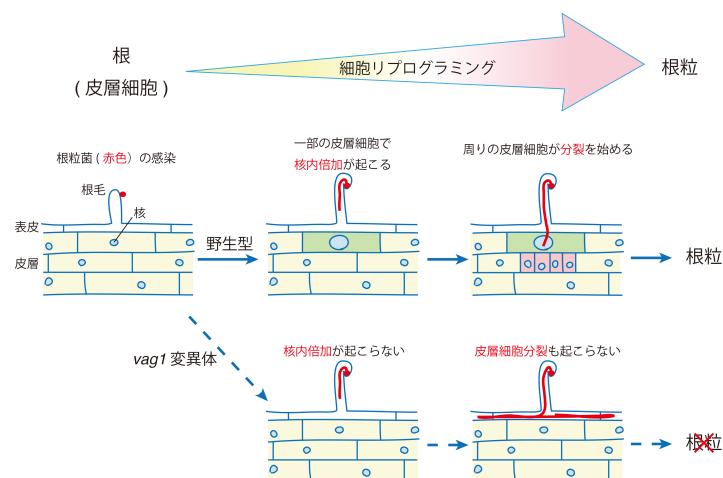


図 3. VAG1 を介した根粒初期発生の制御モデル

植物の発生では、シロイヌナズナの葉の表皮のトライコーム、トウモロコシの胚乳、根粒内部の感染細胞の分化に代表されるように、核内倍加は細胞サイズの制御に密接にリンクするものと一般的に考えられてきた。その一方で、本研究により見出された根粒初期発生における皮層細胞の核内倍加は細胞サイズの明確な増大を伴わない。現在のところ、根粒初期発生において核内倍

加が起こることの生物学的な意味は不明であるが、皮層細胞の局所的な核内倍加の誘導が根粒発生の開始を決める要因になる可能性がある。したがって、その詳細な機構を明らかにすることで、分化細胞の運命転換の分子機構の理解が進み、さらに核内倍加の新たな役割が見出される可能性があると考えている。そのためには、DNA トポイソメラーゼ VI に限らず、核内倍加の制御に関わる遺伝子の根粒初期発生における詳細な機能やその相互関係を明らかにしていくことが今後の重要な課題である。

5. おわりに

この数年の間に、根粒発生に関する遺伝子が次々と単離され、また既知の遺伝子の新たな機能が明らかになり、根粒初期発生の分子機構を理解する基盤が整いつつある。しかし、細胞リプログラミングの視点に立つと、サイトカイニン、オーキシン、NINなどの転写因子、あるいは核内倍加を制御する因子が、具体的にどのようなメカニズムで皮層細胞の細胞運命をリセットし、根粒発生プログラムのスイッチを入れるのかを説明するまでには至っていない。その制御の詳細を明らかにするには、これらの鍵因子の詳細な分子機能を明らかにし、また新たな因子を特定していくことは当然重要であるが、分化細胞の分子・形態マーカーを確立し、さらに、エピジェネティックな制御の視点も取り入れることにより、細胞運命の転換の現場を明確におさえることが肝要と思われる。今後は、根粒初期発生の研究により得られた知見を、植物の他の細胞リプログラミング現象と比較・検討することにより、植物の細胞リプログラミングの制御の根幹を理解するような研究へと発展させることを目標に研究を進めていきたい。

引用文献

- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichante, J.L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R.L., & Frugier, F. 2012. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 24: 3838-3852.
- Breuer, C., Stacey, N.J., West, C.E., Zhao, Y., Chory, J., Tsukaya, H., Azumi, Y., Maxwell, A., Roberts, K., & Sugimoto-Shirasu, K. 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3655-3668.
- Brewin, N.J. 1991. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 191-226.
- Crespi, M., & Frugier, F. 2008. De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* 1: re11.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., & Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61-76.
- Foucher, F., & Kondorosi, E. 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol. Biol.* 43: 773-786.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M., & Szczyglowski, K. 2008. Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci.* 13: 115-120.
- Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S., & Hayashi, M. 2012. Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous

- retrotransposon *LORE1*. *Plant J.* 69: 720-730.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. 2006. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18: 2680-2693.
- Hartung, F., Angelis, K.J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M., & Puchta, H. 2002. An archaeabacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr. Biol.* 12: 1787-1791.
- Hayashi, T., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., & Hayashi, M. 2014. Rhizobial infection does not require the cortical expression of upstream common symbiosis genes responsible for the induction of Ca²⁺ spiking. *Plant J.* 77: 146-159.
- Heckmann, A.B., Sandal, N., Bek, A.S., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M.W., Tirichine, L., & Stougaard, J. 2011. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1385-1395.
- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M.S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L., & Szczyglowski, K. 2014. *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell* 26: 678-694.
- Heyl, A., & Schmülling, T. 2003. Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 480-488.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., & Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Kirik, V., Schrader, A., Uhrig, J.F., & Hulskamp, M. 2007. *MIDGET* unravels functions of the *Arabidopsis* topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing. *Plant Cell* 19: 3100-3110.
- Kondorosi, E., & Kondorosi, A. 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* 567: 152-157.
- Libbenga, K.R., & Torrey, J.G. 1973. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Am. J. Bot.* 60: 293-299.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., & Szczyglowski, K. 2007. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315: 101-104.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., & Frugier, F. 2011. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 65: 622-633.
- Rightmyer, A.P., & Long, S.R. 2011. Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1372-1384.

- Rival, P., de Billy, F., Bono, J.J., Gough, C., Rosenberg, C., & Bensmihen, S. 2012. Epidermal and cortical roles of *NFP* and *DMI3* in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. *Development* 139: 3383-3391.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H., & Tabata, S. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 15: 227-239.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & Hayashi, M. 2013. NODULE INCEPTION directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* 9: e1003352.
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. 2014. NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 14607-14612.
- Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N.J., Corsar, J., Roberts, K., & McCann, M.C. 2002. DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 12: 1782-1786.
- Sugimoto-Shirasu, K., Roberts, G.R., Stacey, N.J., McCann, M.C., Maxwell, A., & Roberts, K. 2005. RHL1 is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18736-18741.
- Suzaki, T., Yano, K., Ito, M., Umebara, Y., Suganuma, N., & Kawaguchi, M. 2012. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development* 139: 3997-4006.
- Suzaki, T., Ito, M., & Kawaguchi, M. 2013. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.* 4: 42.
- Suzaki, T., Ito, M., Yoro, E., Sato, S., Hirakawa, H., Takeda, N., & Kawaguchi, M. 2014. Endoreduplication-mediated initiation of symbiotic organ development in *Lotus japonicus*. *Development* 141: 2441-2445.
- Suzaki, T., & Kawaguchi, M. 2014. Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 16-22.
- Szczyglowski, K., Shaw, R.S., Wopereis, J., Copeland, S., Hamburger, D., Kasiborski, B., Dazzo, F.B., & de Bruijn, F.J. 1998. Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 684-697.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., & Stougaard, J. 2007. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315: 104-107.
- Urbanski, D.F., Malolepszy, A., Stougaard, J., & Andersen, S.U. 2012. Genome-wide *LORE1*

- retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 69: 731-741.
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15: 2093-2105.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., & Bisseling, T. 2014. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* 141: 3517-3528.
- Yang, W.C., Deblank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., Vankammen, A., Franssen, H., & Bisseling, T. 1994. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6: 1415-1426.
- Yin, Y., Cheong, H., Friedrichsen, D., Zhao, Y., Hu, J., Mora-Garcia, S., & Chory, J. 2002. A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10191-10196.
- Yoon, H.J., Hossain, M.S., Held, M., Hou, H.W., Kehl, M., Tromas, A., Sato, S.S., Tabata, S., Andersen, S.U., Stougaard, J., Ross, L., & Szczyglowski, K. 2014. *Lotus japonicus SUNERGOS1* encodes a predicted subunit A of a DNA topoisomerase VI that is required for nodule differentiation and accommodation of rhizobial infection. *Plant J.* 78: 811-821.