

# 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

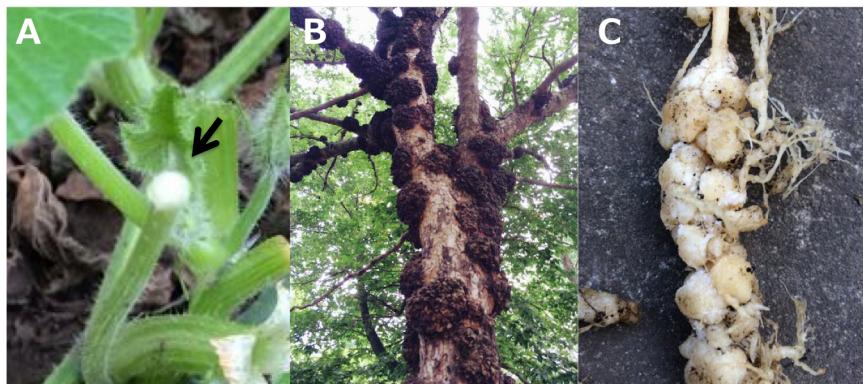


図 1. 身近に観られる「カルス」。(A) カボチャの葉柄の切断面に作られた細胞塊(矢印)。(B) アキニレの樹皮につくられた瘤。(C) ニガウリの根に作られた根瘤。

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

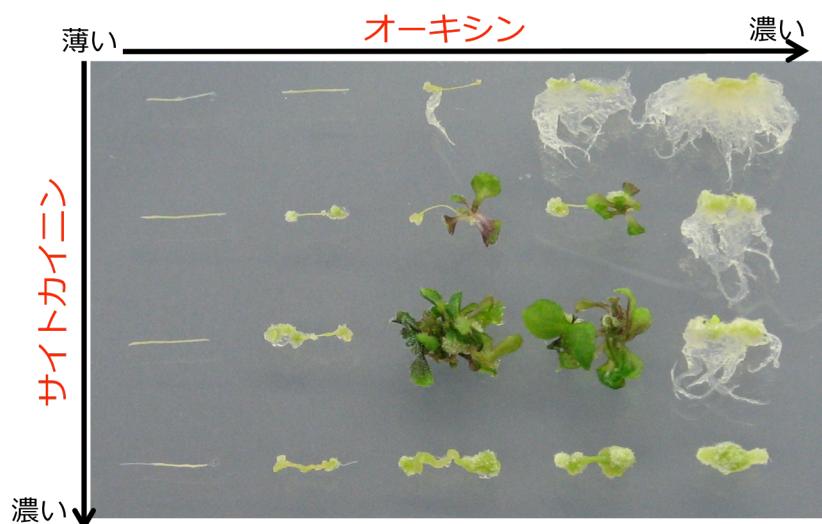


図2. シロイヌナズナ胚軸組織片からのカルス形成、根または茎葉の再分化。それぞれ異なる比率のオーキシン、サイトカイニン濃度の培地で培養した組織片を並べ直して撮影している。

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、抑制するブレーク因子に大別できる。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亢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ク因子

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)
【ブレーク因子】				
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

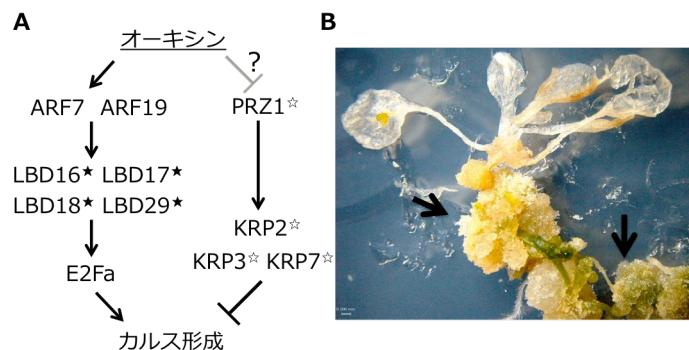


図3. オーキシン関連のカルス化アクセル/ブレーキ因子。(A) 予想される経路。★機能獲得/☆機能抑制変異体でカルス化が観られる因子。→は促進、ーは抑制作用を表す。(B) *LBD16*の強制発現(35S:*LBD16*)によるカルス形成。ホルモンフリーの培地で育てた3ヶ月齢のT1植物。主に胚軸と根からカルス化が観られた(矢印)。地上部は白化している。

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。

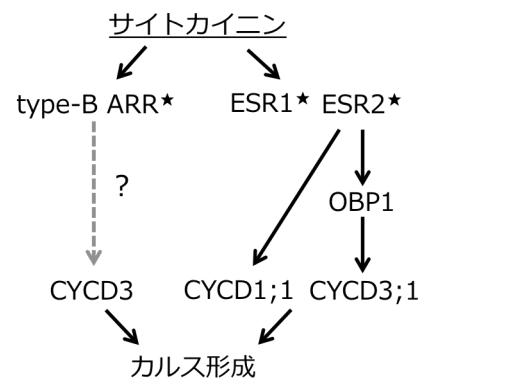


図4. サイトカイニン関連のカルス化アクセル因子と、予想される経路。

★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<sub>WIND1</sub>: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<sub>WIND1</sub>:WIND1-SRDX*)植物体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

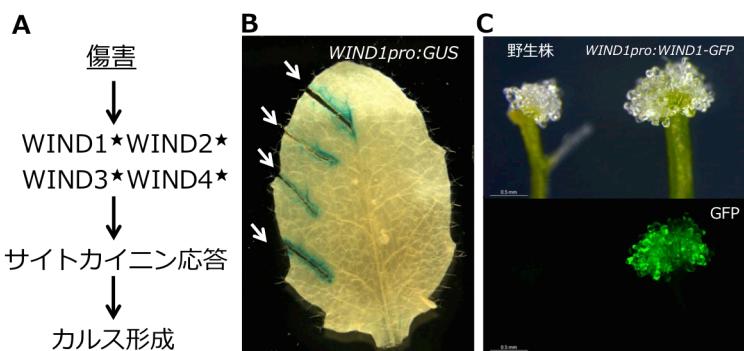


図5. 傷害応答性のカルス化アクセル因子  
(A) 予想される経路。★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。  
(B) シロイヌナズナWIND1pro:GUS植物の葉。一部(矢印)を切断後、24時間後にGUS染色した。切断部位でWIND1のプロモーター活性(青色)が上昇している。(C) 野生株とWIND1pro:WIND1-GFP植物の根を切断し、ホルモンフリーの培地で16日間培養した。切断部位に生じたカルスでWIND1-GFPタンパク(蛍光緑)が観られる。

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

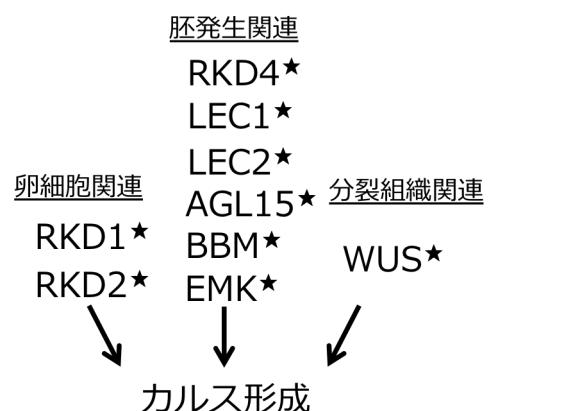


図6. 胚発生、分裂組織の幹細胞維持等で機能することが知られているカルス化アクセサリ因子。★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。

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)。

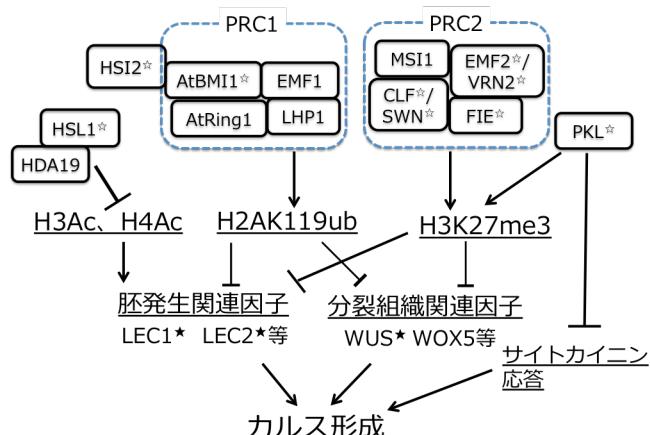


図7. エピジェネティック制御因子によるカルス化経路。  
Ac;アセチル化。ub;ユビキチン化。me3;トリメチル化。  
★機能抑制/★機能獲得変異体でカルス化が観られる因子。→は促進、—は抑制作用を表す。

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 hsl1* 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 Cytophysiologica*, 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.