

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こ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

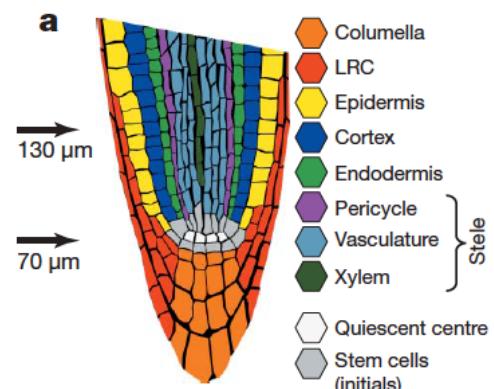


図 1. 根端分裂組織の模式図。根端から 130 μm で切除しても約 80% の高効率で再生できる。Sena et al., 2009 より許可を得て転載。

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)。

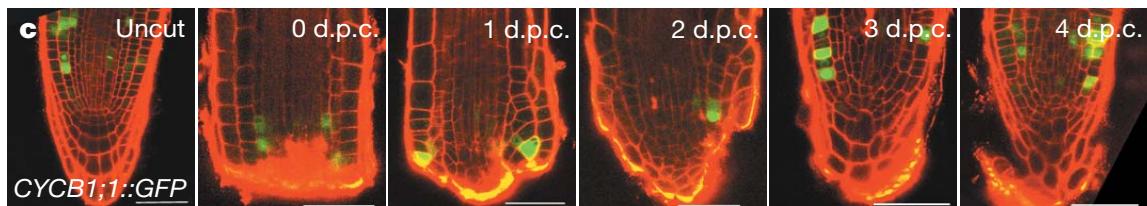


図 2. シロイヌナズナ根端の再生。CYCB1;1GFP で分裂細胞がマークされている。Sena et al., 2009 より許可を得て転載。

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

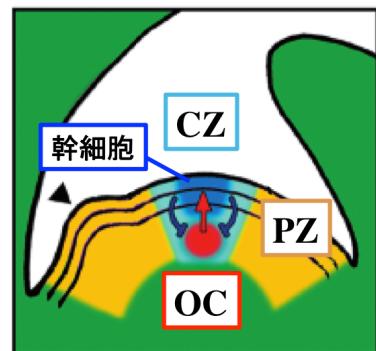


図 3. 茎頂分裂組織の模式図。
Reinhardt et al., 2003 より許可を得て改変。

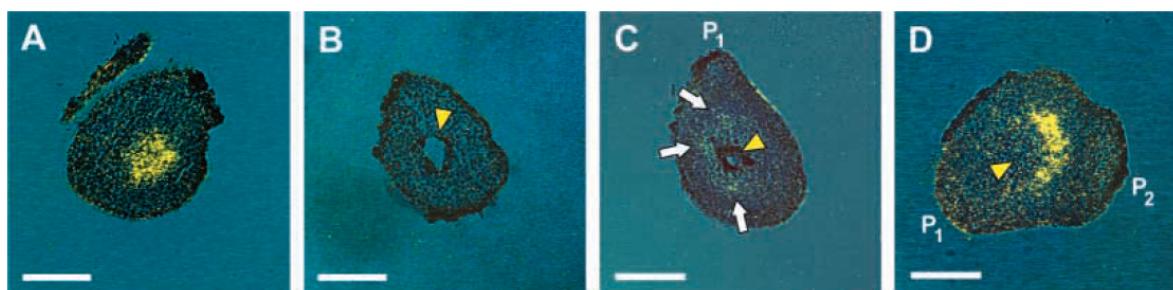


図 4. トマト茎頂における *LeWUS* の発現パターン。OC の細胞が失われると (B), 1 日後には周辺で弱い発現が始まり (C), 2 日後には発現部位の再構成が起こる (D)。Reinhardt et al., 2003 より許可を得て転載。

et al., 2011)。

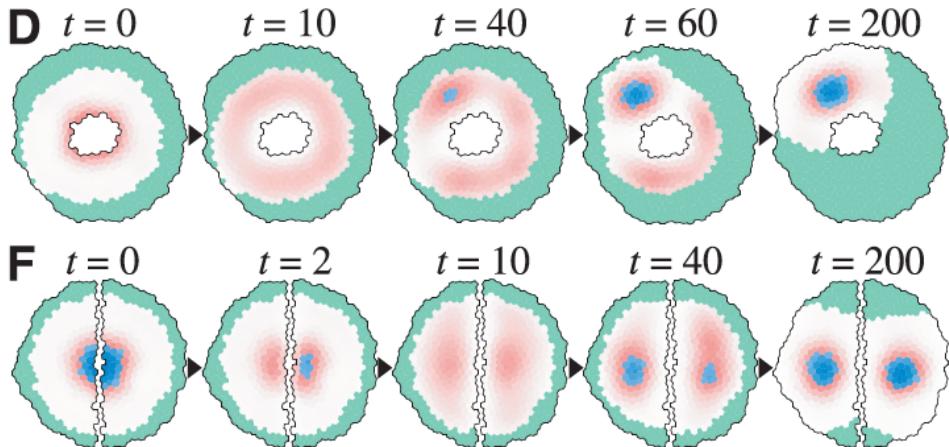


図 5. WUS-CLV の反応拡散モデルに基づいた数値シミュレーション。実際の現象を再現している。
Fujita et al., 2011 より転載。

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。

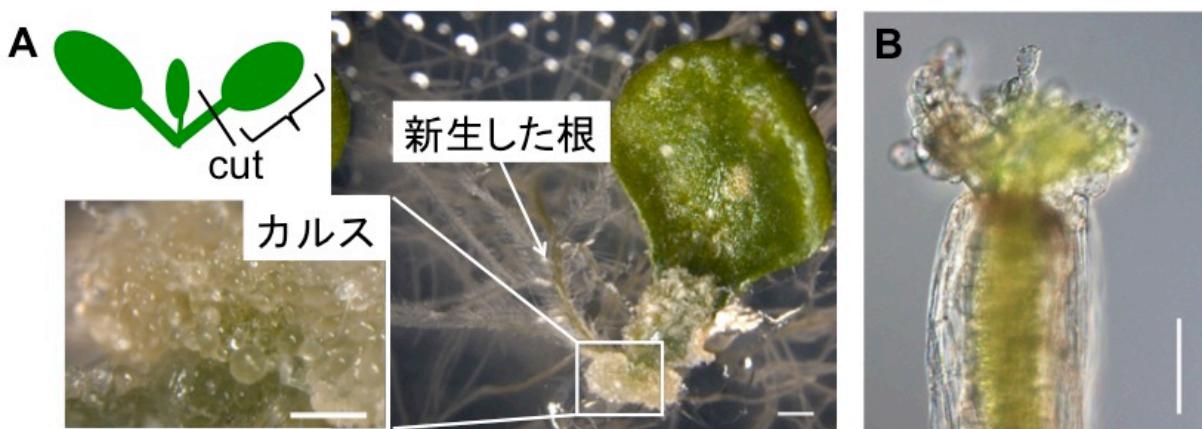


図6. シロイヌナズナの傷口に形成されたカルス。(A) 成熟葉の葉柄で切り取り, ホルモンフリー培地上で3週間培養したもの。カルスおよび根の新生が見られる。(B) 暗所芽生えの胚軸を切り, 2週間培養したもの。カルス形成は見られるが, ホルモンフリーで長く培養しても器官再生は起こらない。

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.