細胞機能の変容と循環を視る ~可逆性と不可逆性から探る細胞分化の本質~

オーガナイザー

小田 祥久 国立遺伝学研究所新分野創造センター (総合研究大学院大学遺伝学専攻兼任) 〒411-8562 静岡県三島市谷田 1111

Yoshihisa Oda

The plasticity and irreversibility of plant cell differentiation Key words: cell differentiation, dedifferentiation, embryogenesis, single-cell analysis, pluripotency Center for Frontier Research, National Institute of Genetics

Yata 1111, Mishima, Shizuoka, 411-8540, Japan

細胞分化は多細胞生物の発生の根幹を為す現象です。細胞が個体を形作る機能的な細胞へと 分化してゆく現象は、細胞内外の構造から代謝,エピゲノム状態の変化に至る多様なイベントを 含み,生命システムを理解する上で重要かつ魅力的なものです。植物ではほとんどの体細胞が細 胞壁を介して相互に連結しているため、細胞分化は細胞の分裂パターンと共に時間的,空間的に 厳密にかつ柔軟に制御される必要があります。植物の体細胞は比較的容易に脱分化し分化多能性 を発揮することから、その高い可塑性は良く知られています。一方で,死細胞あるいは仮死状態 となって永く個体の生存に寄与する非可逆的な振る舞いも一部の細胞に見られます。植物が相対 的な細胞の位置関係を変えることなく器官を構築して成長することを考えると、このような細胞 分化の特性は実に合理的であることが分かります。この細胞分化の特性の背景にある分子的な仕 組みはこれでほとんど明らかにされていませんでしたが、近年のバイオイメージングや次世代シ ークエンサー等の目覚しい技術進歩を背景に、いよいよその仕組みの一端が見えてきました。

こうした状況を踏まえ、日本植物学会第79回大会(2015年9月)において「細胞機能の変容 と循環を視る~可逆性と不可逆性から探る細胞分化の本質~」と題してシンポジウムを企画しま した。このシンポジウムでは細胞分化の分野で活躍されている若手の研究者にご登壇をお願いし、 植物細胞の分化に関して技術的な話題も含め最新の知見を紹介して頂きました。本総説集は、こ のシンポジウムの内容を再構成したものです。前半の3つの総説では細胞分化の制御機構をテー マとして、師部細胞分化の制御機構、特殊な環境下を生き抜くコケ植物特有の細胞分化制御機構、 傷害に伴う細胞の脱分化の制御機構についてご紹介します。後半の3つの総説ではより技術的な 側面に着目し、初期胚のイメージング解析技術、木部細胞分化の制御技術、1 細胞解析技術とそ の細胞リプログラミング研究への応用についてご紹介します。本稿が皆様のご研究の一助となれ ば幸いです。最後に、シンポジウム開催に当たってお世話になりました大会実行委員の先生方、 本総説集を発表する機会を下さった電子出版物編集委員の先生方に御礼を申し上げます。

篩要素分化におけるオルガネラ消失のダイナミクス

 古田 かおり^{1,2}, 宮島 俊介¹, 中島 敬二¹, Yka Helariutta^{3,4,5}
 ¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

²日本学術振興会、〒102-0083 東京都千代田区麹町5-3-1

³Institute of Biotechnology/Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014, Finland.

⁴Cardiff University Cardiff School of Biosciences, The Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK.

⁵The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge, CB2 1LR, UK.

Kaori Miyashima Furuta^{1,2}, Shunsuke Miyashima¹, Keiji Nakajima¹, Yka Helariutta^{3,4,5} The dynamics of organelle degradation in Arabidopsis sieve element differentiation Keywords; Arabidopsis, enucleation, NAC45/86, phloem, sieve element
¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology. 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan
²Japan Society for the Promotion of Science. 5-3-1 Koujimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan
³Institute of Biotechnology/Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014, Finland.
⁴Cardiff University Cardiff School of Biosciences, The Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK.

⁵The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge, CB2 1LR, UK.

1. はじめに

細胞は細胞分化を経て,各々の細胞機能を獲得する。iPS 細胞などの報告により細胞分化の 可塑性が注目される中,不可逆的な細胞分化過程をたどるものがある。特に一部の細胞では, その細胞機能を獲得するためにオルガネラ消失を伴う。哺乳類の赤血球や目の水晶体線維細 胞では,酸素の運搬やレンズによる集光というそれぞれの細胞機能に関連して,プログラム された核の消失が見られる (Nagata 2005)。この核を含むオルガネラの消失は,酸素の運搬に おける細胞内のヘモグロビン含有量の増大や,集光のためのレンズの透明性の維持に,それ ぞれ役立っていると考えられている。維管束植物では導管と篩管が,それぞれの細胞内で水 や光合成産物を輸送するという輸送管としての細胞機能に関連して,その細胞分化過程で, 導管の細胞は細胞壁を残してプログラム細胞死を引き起こし,篩管の細胞は核などのオルガ ネラを消失する (Esau 1950, Furuta et al. 2014a)。

維管束の原生篩部は、主に篩要素と篩伴細胞からなる。篩要素は輸送路を形成し、高度に 連結する篩伴細胞によって機能的にサポートされている。細胞分化過程で細胞死を起こす木 部導管とは異なり、篩要素は生細胞である。篩要素の輸送管としての細胞機能に関連した細 胞の特徴は、古くから多くの植物学者によって詳細に記述されてきた(Evert 1977, Cronshaw 1981, Sjolund 1997)。興味深い特徴の一つは、種によって程度は異なるが、篩要素が成熟過 程で細胞質成分を簡素化することである。細胞質成分の簡素化において、核の消失、粗面小 胞体やゴルジ体の不活性化、細胞質基質の希釈などが起こる(図 1A)。また、細胞質成分の 簡素化だけではなく細胞壁成分の形態も機能的に変化し、細胞壁の肥厚や、篩要素間に篩孔 を持つ篩板の形成が起こる。さらに、転流を調節するのではないかと推測されている Pprotein など、篩要素特異的な細胞構造の構築が見られる。このような細胞の形質の獲得は、 結果的に効率のよい物質輸送に関与していると考えられる。

しかし,細胞分化の側面から見ると,篩要素細胞がこの特徴を獲得するうえでの分子制御 機構については,ほとんどわかっていなかった。そこで本稿では,私たちが明らかにした篩 要素の細胞分化の分子制御機構を紹介する。



図1. 篩要素の形態(A) 篩要素の細胞分化の模式図。(B) シロイヌナズナの根の原生篩部の 篩要素。Furuta et al. (2014a) の図を一部改変。

2. 篩要素の不可逆的な細胞分化過程

2-1. 核消失

篩要素の細胞分化をその不可逆性から考える上で、大きな特徴の一つにプログラムされた 核消失が挙げられる。真核生細胞におけるプログラム核分解過程は、様々な生物種で見ら れ、その様式は様々である。哺乳類の赤血球では細胞成熟における核消失過程が一番研究さ れている例であるが、核はわずかな細胞質とともに細胞から押し出され、押し出された核は マクロファージにより貪食されることで脱核する(Bessis & Bricka 1952, Sadahira & Mori 1999)。繊毛虫のテトラヒメナでは、飢餓状態などで接合による有性生殖が起こり、このと き減数分裂、接合核の融合、有糸分裂、核分解を経て核の再編成が起こるが、この核の分解 にはオートファジーが関与している(Liu & Yao 2012)。水晶体繊維細胞の核消失には動物特

異的な DLAD という DNA 分解酵素が関与していることが報告されている (Nishimoto et al. 2003)。

篩要素の核消失過程では、これまで切片を用いた観察などにより、細胞分化過程で核小体の断片化やクロマチンの凝集, DNA の切断がみられることは報告されていた(Eleftheriou & Tsekos 1982, Wang et al. 2008)。そこで我々は、シロイヌナズナの根の篩要素の核消失過程を3次元的な電子顕微鏡解析や蛍光マーカーを用いた生細胞イメージングにより、さらに詳細に観察した。シロイヌナズナの根では、静止中心(QC)付近で、根の放射パターンに沿って細胞系譜が決定されるため、篩要素は一列の細胞列で観察される(Mähönen et al. 2000, Bonke et al. 2003)。また、メリステムで細胞が生み出され、順々に分化していくので、一細胞列で経時変化を追うことができる(図1B)。

我々は、Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy(SBF-SEM; Denk & Horstmann 2004)を用いた3次元的な走査型電子顕微鏡解析を行った。化学固定したシロイヌナズナの 根をブロックに埋め、1サンプルごとに10-20細胞の篩部要素細胞について、40 nmの間隔 で数千から1万枚の SEM 画像を取得した。その後、3View ソフトウェアで3次元構築し た。その結果、核消失後も核膜は残ること、核消失と細胞質基質の希釈は近いタイミングで 起こるということ、核消失に伴い核の容量が小さくなることなどが見出された(図 2)。残 存する核膜様構造が核の残存物であることは、この構造体に核膜孔があることから判断して いる。



図2. SBF-SEM を用いた篩要素の核消失過程の観察(A)篩要素細胞列。左から順に分化がす すんだ細胞。徐々に分化がすすむ段階を stage 1,核消失の直前を stage 2,核消失直後を stage 3 と表示。Stage 3 では核消失と細胞質基質の希釈が同時に見られる。(B)各分化段階の篩要 素細胞を抜き出して表示。核消失後(stage 3)も核膜が残っている様子が見られる。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

核消失に関与するメカニズムについて、シロイヌナズナのオートファゴソームをマークするマーカーATG8a(Yoshimoto et al. 2004)が細胞分化途中の篩要素で選択的に発現していることを見出し、篩要素の核消失におけるオートファジーの関与が期待された(図 3A)。しかしATG8aは、細胞質で点様のシグナルとして観察され、テトラヒメナのように核を包むようなシグナルは観察されなかった(図 3B)。同様に、lytic vacuole 形成の核消失への関与も

考え,液胞マーカーである VAMP711 (Geldner et al. 2009)の局在も調べたところ,ATG8a と同様に細胞質に点様のシグナルが観察され,核を包むようなシグナルは見られなかった (図 3C)。さらに,SBF-SEM を用いた解析からも,オートファゴソームや Lytic vacuoleの 核への関与は見られなかった。

では、どのように核は消失するのだろうか。先述の通り、3次元的走査型電子顕微鏡の観察から、シロイヌナズナの篩要素の核消失では核膜が残ること、また核の容積が小さくなったため、どのように核の内容物が消失するのかを観察した。核の内容物のマーカーとして YFP 結合型ヒストン2B (H2B-YFP)を用い、これを篩要素特異的に発現させ、動画解析した。その結果、H2B シグナルは核から細胞質へ拡散し、その後シグナルが消えることがわかった(図3D)。これにより、核の中身が核外へ出て分解され、核膜は縮小して残るという、哺乳類の赤血球やテトラヒメナとは異なる過程を経て、核消失が起こるということが明らかになった。



図3. シロイヌナズナの篩要素の核消失(A)オートファゴソームマーカーpATG8a:GFP-ATG8aは篩要素細胞列で選択的にシグナルが見られる。野生型と同様の篩要素分化を示す nac86 変異体背景で PI 染色と二重染色。(bar = 50 µm)(B)オートファゴソームマーカー GFP-ATG8a の篩要素細胞内での点様の局在。 nac86 変異体背景で DAPI 染色と二重染色。 黄矢印:核消失直前の篩要素細胞,青矢印:核消失直後の篩要素細胞。(C)液胞マーカー GFP-VAMP711 の篩要素細胞内での点様の局在。 nac86 変異体背景で DAPI 染色と二重染 色。黄矢印:核消失直前の篩要素細胞。(D)核マーカーH2B-YFP の篩要素核消失における 経時変化。矢印は,核様のシグナルが細胞質へと拡散し消失する様子を示す。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

2-2. 核以外のオルガネラの形態変化

篩要素の細胞分化において、核以外のオルガネラ形態変化は、いつどのように起こるのだろうか。SBF-SEMを用いて篩要素のオルガネラ形態変化を観察すると、核小体の断片化やオートファゴソームの形成、細胞壁の肥厚、篩板の形成は、篩要素分化の初期にすでに見ら

れることがわかった。これに対し、ゴルジ体の不活性化は核消失の直前に起こることがわかった。これにより、篩要素の細胞分化過程には、若い篩要素から徐々に起こるイベント (stage 1) と、核消失直前に短時間で起こるイベント(stage 2)の少なくとも2つの段階が あると考えられた。



図4. シロイヌナズナの篩要素分化におけるミトコンドリア形態の変化(A)篩要素細胞列 の各細胞における代表的な形のミトコンドリアを示す。SBF-SEMで画像から3次元構築し た。右の方が分化のすすんだ篩要素細胞。若い篩要素細胞では細長いミトコンドリアが, 徐々に丸くなり,核消失後はお椀型になる。(B)篩要素細胞列の各細胞におけるミトコンド リアの数。ミトコンドリアの断片化を推測させる数の増大はみられなかった。(C) stage 1 (cell 2)と stage 2 (cell 6)のミトコンドリアの容積と長軸の長さ。Stage 2 (cell 6)ではミ トコンドリアの長軸の長さが短いものが増えるが,容積は大きくは変わらない。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

また興味深いことに,篩要素の分化に伴って,ミトコンドリアの形態が変化していくこと を見出した(図4A)。未分化な篩要素細胞(stage 1)では細長いミトコンドリアが観察され るが,核消失の直前(stage 2)になると丸いミトコンドリアが観察された。核消失後の篩要 素(stage 3)では,お椀型のミトコンドリアが観察された。当初は,ミトコンドリアの不活 化を伴う断片化がおこっていると考えたが,SBF-SEMにより各篩要素細胞内のミトコンド リアの数を数えたところ,予備的であるが,ミトコンドリアの形が変わってもミトコンドリ アの数の増加はみられなかった(図4B)。また,各篩要素細胞のミトコンドリアの容積を調 べたところ,未分化な篩要素細胞と核消失の直前の篩要素細胞では,ミトコンドリアの容積

は大きく違わないことがわかった(図4C)。これらの結果から,若い篩要素では細長いミト コンドリアが観察されていたのが,核消失直前に丸いミトコンドリアが観察されるのは,ミ トコンドリアの断片化の結果ではなく,形の変化であることが推測された。この形の変化に ついての生物学的意義は今後解明していきたいと考えている。

3. 篩要素分化の分子制御機構

これまでに篩部の形成に必要な因子として MYB 型転写因子の ALTERED PHLOEM (APL) 転写因子が篩部の運命決定に必要な因子として報告されている (Bonke et al. 2003)。この APL は,篩要素と篩伴細胞で発現し,篩要素特異的なマーカーJ0701 や篩伴細胞特異的な AtSUC2 の正常な発現に必要である。また *apl* 突然変異体の根では篩要素の位置に木部の環状要素が できる。しかし,篩部系譜の細胞を作る非対称分裂は起こっていることから,初期の篩部形 成はおこっていると考えられる。

私たちは, 篩要素の細胞分化過程を制御する機構を明らかにするため, APL の下流の制御 因子を探索することを目的とした。野生型と *apl* 変異体の篩部の細胞のトランスクリプトー ムをマイクロアレイで比較し, 18 個の転写因子を含む篩要素特異的な遺伝子を見いだし た。そのうち, NAC ドメイン転写因子の NAC45 と NAC86 は篩要素特異的に発現しており (図 5A, B), その発現は APL 依存的であった。また *nac45/86* 二重変異体は植物体が小さく なり, 強いアレルでは芽生え致死になるという *apl* 変異体様の表現型を示した。さらに *nac45/86* 二重変異体では, 篩部輸送に異常があることを明らかにした。

そこで私たちは、篩要素の細胞分化過程に異常があるかどうかを調べた。そこで、まず篩 要素の篩板形成を SBF-SEM を用いて調べた。その結果、nac45/86 二重変異体でも、野生型 同様に細胞壁に肥厚や篩板形成は起こることがわかった(図 5C)。次に、nac45/86 二重変異 体における細胞内消化を調べるために、核マーカー(H2B-YFP)の篩要素分化過程における 挙動を調べた。野生型では篩要素分化に伴い H2B-YFP シグナルが消失するが、nac45/86 二 重変異体では伸長した篩要素でも H2B-YFP のシグナルが検出され、核消失が正常に起こっ ていないことが分かった(図 5D)。さらに、SBF-SEM 解析により、nac45/86 二重変異体で は、核小体の断片化やミトコンドリアの形態変化は起こるが、細胞質基質の希釈やゴルジ体 の不活性化が正常に起こらないことが分かった(図 5E)。これらのことから、NAC45/86 は 篩板形成など篩要素の細胞壁の分化や、比較的若い篩要素で起こる細胞内変化の制御には関 与しないが、篩要素分化における細胞内消化を特異的に、かつ統合的に制御することがわか った。

では、NAC45/86 転写因子はどのように篩要素の細胞内消化を制御しているのだろうか。 私たちは、NAC45/86 のターゲット因子を探索するために、マイクロアレイにより野生型と nac45/86 二重変異体の根端のトランスクリプトームを比較した。この解析から、核酸分解ド メインを持つ核局在タンパク質、NAC45/86-DEPENDENT EXONUCLEASE-DOMAIN PROTEIN (NEN4) が同定された。NEN4 は篩要素特異的に発現し、その発現は NAC45/86 に依存していた (図 6 A-C)。そこで、NEN4 の機能を調べるために、nen4 変異体を解析した ところ、野生型と比べて根がやや短いという表現型が見られた。次に nen4 変異体の篩要素 分化における核消失を調べた。野生型では篩要素分化に伴い H2B-YFP シグナルが消失する が, nen4 変異体では根の伸長領域の篩要素でも H2B-YFP シグナルが残っていた(図6D, E)。興味深いことに, nen4 変異体の H2B-YFP シグナルは,若い篩要素細胞では楕円形の核 に一様のシグナルが見られるが,本来なら核消失が完了していると考えられる篩要素細胞で は,核の周縁部でシグナルの強いドーナツ様のシグナルが観察された(図6D,E)。そこで SBF-SEM を用いて詳細に nen4 変異体の篩要素を観察したところ,野生型では核の内容物が 消失しているが, nen4 変異体では核の内容物が一部核膜に付着するように残っていた(図 6F,G)。これは,H2B-YFP のドーナツ様のシグナルと一致すると考えられる。この nen4 変 異体では,細胞質基質の希釈は起こっていた(図6F)。このことから,NEN4 は核消失の完 了に特異的に必要であることが分かった。



図5. NAC45/86は篩要素分化の細胞内消化を特異的に、かつ統合的に制御する (A と B) NAC45 と NAC86 の発現場所。pNAC45:GFP-GUS (A) と pNAC86:GFP-GUS (B) のシグナルは篩要素で特異的に見られる。細胞の輪郭は PI 染色。(C) 野生型と nac45/86 二重変異体 における篩板形成。SBF-SEM で観察した。二重変異体でも篩板は形成される。(D) 野生型 と nac45/86 二重変異体における核消失。核マーカーH2B-YFP (白矢印)は、野生型では細胞分化に伴い消失する(青矢印)が、二重変異体ではシグナルが残っている(黄矢印)。細胞の輪郭は PI 染色。(E) 野生型と nac45/86 二重変異体における細胞内消化。SBF-SEM で観察した。二重変異体では核消失だけではなく、細胞質基質の希釈もおこらない (stage 3)。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

4. おわりに

私たちの研究から, 篩要素の不可逆的な細胞分化の象徴とも言える細胞内消化を統合的に, かつ特異的に制御する分子機構が明らかになった。特に同定された NAC45/86 は, 核小体の断

片化など篩要素分化の初期イベントは制御しないが,核消失やゴルジ体の不活化,細胞質基 質の希釈など,細胞内消化の最終ステップを開始する因子であると考えられた。また核の内 容物が核外へ拡散し分解されるという機構を明らかにし,真核細胞のプログラムされた核消 失機構の多様性の新たな理解に貢献することができた。本研究結果は2014年に学術誌に報告 した(Furuta et al 2014b)。





図6. NEN4はNAC45/86の下流で核消失の完了に必要である (A) NEN4の発現場所。 pNEN4:erYFPのシグナルは篩要素特異的に見られる。細胞の輪郭はPI染色。(B) NEN4の NAC45/86依存性。pNEN4:erYFPのシグナルはnac45/86二重変異体では見られなくなる。 細胞 の輪郭はPI染色。(C) NEN4は核に局在する。pNEN4:NEN4-YFPは篩要素特異的に核にシグナ ルが見られる。細胞の輪郭はPI染色。(DとE) 野生型とnen4変異体における核消失。核マーカ ーH2B-YFP(白矢印)は、野生型では細胞分化に伴い消失する(青矢印)が、変異体ではシグ ナルが残っている(黄矢印)。細胞の輪郭はPI染色。(FとG) 野生型(F) とnen4変異体(G) における細胞内消化。野生型では核内のクロマチン様構造は見られなくなるが、変異体では 核膜付近にクロマチン様構造が見られる(赤矢印)。細胞質基質の希釈やゴルジ体の消失は起 こる。 SBF-SEMで観察した。黒矢印は核膜の破れを示す。Furuta et al. (2014b)の図を一部 改変。

篩要素の核消失はダイナミックな現象である。他の生物種の核消失と比べると異様だが、 篩要素の輸送管としての細胞機能を獲得するために、NAC45/86 転写因子を含め様々な分子機 構によって厳密に制御されていると考えられる。現在私たちは、核消失に異常がある突然変異

体をスクリーニングしている。すでにいくつかの突然変異体を単離し,原因遺伝子について も同定をすすめている。未だ明らかになっていない実働的な分子制御機構を同定することか ら,細胞分化の本質に迫りたいと考えている。

また,核小体の断片化やミトコンドリアの形態変化など,NAC45/86 非依存的なプロセス を制御する機構についてもよくわかっていない。篩要素特異的に発現する Callose synthase 7 (Cals7) や篩要素で強く発現する CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1 (CHER1) は正常な篩 板の篩孔形成に必要であることが報告されている (Barratt et al. 2011, Xie et al. 2011, Dettmer et al. 2014) が,細胞壁の肥厚や篩板形成などの篩要素の細胞壁成分の分化を制御する機構は

未だ不明である。今後研究が発展することが期待される。

謝辞

本研究をすすめるにあたり,共著者のHelsinki UniversityのSatu Lehesranta博士, Ilya Belevich 博士, Jung-ok Heoさん, Ove Lindgren博士, Panu Somervuo博士, Raffael Lichtenbergerさん, Raquel Rochaさん, Sari Tähtiharju博士, Petri Auvinen教授, Eija Jokitalo教授, Indian Institute of Technology のShri Ram Yadav博士, Stanford UniversityのAnne Vatén博士, Wageningen University のBert De Rybel博士, Ghent UniversityのGert Van Isterdaelさん, Tom Beeckman教授, Mahidol UniversityのSiripong Thitamadee博士に感謝いたします。また,技術面で支援してくださった, Helsinki UniversityのAri Pekka Mähönen博士, Ricardo Siligatoさん, Iris Sevilemさん, Katia Kainulainenさん, Mikko Herpolaさん, M. Lindmanさん, A. Salminenさん, 奈良先端科学技 術大学院大学の乾奈布子さんにも感謝いたします。

また、本稿を書くに当たり、大阪大学の柴岡弘郎名誉教授と東京大学の福田裕穂教授にア ドバイスをいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

- Barratt, D.H.P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S.C., & Smith, A.M. 2011. Callose synthase GSL7 is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 328-341.
- Bessis, M. & Bricka, M. 1952. Dynamic aspect of blood cells; study by phase contrast microcinematography. *Revue d'hematologie* 7: 407-435.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A.P., Hauser, M.T., & Helariutta, Y. 2003. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature* 426: 181-186.
- Cronshaw, J. 1981. Phloem structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. 32: 465-484
- Denk, W. & Horstmann, H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct threedimensional tissue nanostructure. *PLOS Biol.* 2: e329.
- Dettmer, J., Ursache, R., Campilho, A., Miyashima, S., Belevich, I., O'Regan, S., Mullendore, D.L.,
 Yadav, S.R., Lanz, C., Beverina, L., Papagni, A., Schneeberger, K., Weigel, D., Stierhof, Y.D.,
 Moritz, T., Knoblauch, M., Jokitalo, E., & Helariutta, Y. 2014. CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1
 is required for sieve plate development to mediate long-distance cell-to-cell communication. *Nat. Commun.* 5: 4276.

- Eleftheriou, E.P. & Tsekos, I. 1982. Development of protophloem in roots of *Aegilops comosa* var. *thessalica*. II. Sieve-element differentiation. *Protoplasma* 113: 221-233.
- Esau, K. 1950. Development and structure of the phloem tissue. II. The botanical review 16: 67-114.
- Evert, R.F. 1977. Phloem structure and histochemistry. Annu. Rev. Plant Physiol. 28: 199-222.
- Furuta, K.M., Hellmann, E., & Helariutta, Y. 2014. Molecular control of cell specification and cell differentiation during procambial development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 607-638.
- Furuta, K.M., Yadav, S.R., Lehesranta, S., Belevich, I., Miyashima, S., Heo, J.O., Vatén, A., Lindgren, O., De Rybel, B., Van Isterdael, G., Somervuo, P., Lichtenberger, R., Rocha, R., Thitamadee, S., Tähtiharju, S., Auvinen, P., Beeckman, T., Jokitalo, E., & Helariutta, Y. 2014. Arabidopsis NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science* 345: 933-937.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.D., & Chory, J. 2009. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J*. 59: 169-178.
- Liu, M.L. & Yao, M.C. 2012. Role of ATG8 and autophagy in programmed nuclear degradation in Tetrahymena thermophile. *Eukaryot. Cell* 11: 494-506.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., & Helariutta, Y. 2000. A novel two component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* 14: 2938-2943.
- Nagata, S. 2005. DNA degradation in development & programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol*. 23: 853-875.
- Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y. Uchiyama. Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., & Nagata, S. 2003. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 424: 1071-1074.
- Sadahira, Y. & Mori M. 1999. Role of the macrophage in erythropoiesis. Pathol. Int. 49: 841-848.
- Sjolund, R. D. 1997. The phloem sieve element: A river runs through it. Plant Cell 9: 1137-1146
- Wang, L., Zhou, Z., Song, X., Li, J., Deng, X., & Mei, F., 2008, Evidence of ceased programmed cell death in metaphloem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 234: 87-96.
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., & Hong, Z. 2011. CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J.* 65: 1-14.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. 2004. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-2983.

コケ植物におけるニッチ戦略のための細胞分化 --銅苔における無性芽の分化-

野村 俊尚¹, 馳澤 盛一郎², 榊原 均^{1,3} ¹理化学研究所環境資源科学研究センター 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 東研究棟 E-714 ²東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5 東京大学柏キャンパス生命棟701 ³名古屋大学大学院生命農学研究科 〒464-8601 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院生命農学研究科生物化学研究室

Toshihisa Nomura¹, Seiichiro Hasezawa², Hitoshi Sakakibara^{1,3} Cell differentiation for niche strategy in bryophytes

-Gemma differentiation in copper mosses-

Keyword: bryophytes, copper moss, gemma, niche, *Scopelophila cataractae* ¹RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

²Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences,

The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

³Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of

Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo, Chikusa, Nagoya, 464-8601,

Japan

1. はじめに

生物は、各々の特性に適した部分的な環境、生態的地位(ニッチ)を有し、そこで生存 するために、栄養源、行動、細胞分化や形態、代謝系、環境ストレス耐性などを巧みに変化 させ、各環境に適応している。この生物学で用いる用語とは少し異なる意味で、本稿のタイ トルには、ニッチ戦略という言葉を使用させて頂いた。ニッチ戦略とは、経営戦略の一つで ある。ここでのニッチという言葉の意味は、例えば"ニッチな業種"と言うように"特殊な" という意味合いで使われる。即ち、ニッチ戦略とは、中小企業などが独自の技術や知識など を武器に、大企業が手を出さない分野(いわゆるすきま産業)の業種に独占的展開を図ると いう経営戦略のことである。これと類似した生き残り戦略をとる種は、生態学ではスペシャ リストと呼ばれる。スペシャリストは、様々な生物種内においてみられるが、陸上植物にお いてコケ植物では、特殊な生育地を選択するタイプのスペシャリストが目立つ印象がある。 例えば、生きた葉の上に着生するカビゴケ、道路脇などに生育するギンゴケやホソウリゴケ、 ヒカリゴケは、洞窟や岩間など低照度環境を生態的地位とする原始的な蘚類の一種であ る。この種は、低照度環境に適応するために、レンズ状細胞という特殊な細胞を、蘚類の発 達初期にみられる糸状の組織である原糸体に分化させる。レンズ状細胞は、光源に対して方 向性のある形状をした細胞で、その名の通りレンズの役割で弱い光を集光し、葉緑体に集め る働きを持つ(図1B)。このとき、光合成に利用されない緑色の光は再帰的に反射するため 緑色に光って見えてしまう(図1A)。



図1. ヒカリゴケにみられる低照度環境に適応するための細胞分化

A. 暗闇で光ってみえるヒカリゴケ(黄矢印,長野県岩村田の自生地にて撮影)

B. ヒカリゴケのレンズ状細胞,(白矢印:入射光,緑矢印:反射光)スケールバーは,10 µm

一方,我々が研究材料としているホンモンジゴケ *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. は, 他の植物種の生育が困難な高濃度の銅が存在する環境のみを生態的地位とする。本種がどの ように,そのような場所を見出し,定着するのかは不明であったが,我々は,そこにも細胞 分化が関与しうることを見出している。本稿ではこれらについて紹介すると共に,今後の展 望について述べたい。

2. 銅が豊富な環境を生態的地位とするホンモンジゴケ

ホンモンジゴケは、神社仏閣における銅葺き屋根の下や銅鉱山周辺など、高濃度の銅を含 む環境を生育地とする蘚類に属するコケ植物である(Satake et al. 1988)。本種は、世界中の 銅が豊富な環境にみられるが(Show 1989)、日本においては、東京の池上本門寺で初めて確 認されたため、この和名が付けられている(Sakurai 1934、図2A)。



図2. ホンモンジゴケについて

- A. 池上本門寺五重塔下のホンモンジゴケ
- B. ホンモンジゴケの原糸体先端部に形成された無性芽, 矢印:無性芽, 矢尻:脱離細胞, ス ケールバーは, 20 μm
- C. 切り離された無性芽, スケールバーは, 20 µm
- D. 無性芽の発芽, 矢印:発芽した無性芽, 矢尻:新たに形成されている無性芽, スケールバーは, 50 μm

このような重金属汚染環境を生態的地位とする植物種は、Metallophytes と呼ばれ、金属の 豊富な環境にのみ生育する Obligate metallophytes と、金属が豊富でない環境でも生育が見ら れる Facultative metallophytes とに区別される。コケ植物の中には、特に銅の豊富な環境を好 むいくつかの種がおり、それらは銅苔(Copper mosses)と総称されている(Persson 1956、 Shaw 1994)。このようなコケ植物種が、どのようにして銅の豊富な環境を探し、定着してい るのかは生態および生理学的に興味深いが、その実態は明らかになっていない(北川 1987)。 また、ホンモンジゴケでは、有性生殖が非常に稀であり(鵜沢&佐竹 2010, Show 1989)、2-4細胞(主には3細胞)から構成される無性芽(図2B, C, Nomura & Hasezawa 2011, Rumsey & Newton 1989)を用いて無性的に分布を拡大させていると考えられている。従って、ホンモ ンジゴケは、クローナル植物の生態研究の対象としても興味深い種である。

3. ホンモンジゴケ原糸体における銅による細胞分化

前述のとおり、ホンモンジゴケが、高濃度の銅汚染環境にのみ定着する仕組みは謎であった。そこで、我々は、ホンモンジゴケの培養株を作出し、発達初期における銅添加の影響を 調べた。まず、無性芽の発芽への銅添加の影響を検証したが、銅の有無による影響は見られ なかった。しかし、発芽した原糸体を培養し続けると、高濃度の銅添加培養条件下ではクロ ロネマ細胞から、より発達した段階のカウロネマ細胞(Nomura et al. 2015、図3A, C)への分 化が促進されることが明らかになった。一方、低濃度の銅存在条件では、本種が主に分布拡 大に用いるとされる無性芽の形成が誘導された(Nomura & Hasezawa 2011, Nomura et al. 2015, 図3E, F)。この結果は、ホンモンジゴケが発達の初期段階において、環境中の銅濃度 に応じた細胞分化の制御機構を有することを示唆する。



図3. ホンモンジゴケ原糸体における環境中の銅濃度に応じた細胞分化

蘚類の原糸体における細胞分化調節には、オーキシンやサイトカイニン、アブシジン酸な どの植物ホルモンが、関与することが知られている(Cove et al. 2006)。そこで、ホンモン ジゴケでみられた銅依存的な細胞分化の機構を明らかにするため、本種の原糸体を銅添加条 件下で培養した際の各種植物ホルモン内生量の変化を解析した。その結果、高濃度の銅添加 条件下では、特にオーキシン内生量が上昇することが明らかになった(Nomura et al. 2015, 図3B)。また、低濃度の銅存在条件においても、オーキシンの添加は、銅添加と同様の細胞 分化への効果を引き起こした。加えて、高濃度の銅により誘導されるカウロネマ細胞分化の 促進は、オーキシン作用阻害剤(PEO-IAA)や、オーキシン生合成阻害剤(L-キヌレニン) の処理により抑制された(Nomura et al. 2015)。これらの結果から、ホンモンジゴケ原糸体 における銅濃度に応じた細胞分化の調節には、オーキシンが関与することが明らかになった。 ホンモンジゴケは、自身の持つ高い銅耐性能を最大限に活かせる生態的地位にのみ定住でき るように、このような環境に応じた細胞分化の機構を獲得したのではないかと考えられる。

他方で、ホンモンジゴケと類似した原糸体における無性芽形成の例が、岩の割れ目など薄暗い環境を好む数種の蘚類でも報告されている(Whitehouse 1980)。これらの種の場合、暗 条件下において、原糸体における無性芽形成が誘導され、これはあまりにも暗すぎる環境に 到達してしまった場合の逃避策ではないかと考えられている。銅に対して高い耐性能を有す るホンモンジゴケの場合,高濃度の銅がない環境は,競争相手が存在するため,生育に不利 な状況となる。誘導の要因は異なるが,上記の例と類似した機構により,無性芽形成が誘導 されるものと推測される。また,ヒョウタンゴケなどの原糸体を同一の培地で長期間培養す ると,原糸体細胞の間に脱離細胞(Tmema cell)と呼ばれる小さな細胞の形成がみられるこ とがある(図4)。この細胞はやがて死滅し、原糸体が分断化するため、その環境から移動す る機会を増やすと考えられている。この脱離細胞の分化は,オーキシン内生量の低下した変 異株で亢進し,オーキシン処理により抑制されることが報告されており(Bopp et al. 1991), ホンモンジゴケと同様に,原糸体細胞におけるオーキシン濃度の低下が,不適な環境からの 逃避のための細胞分化誘導に関与する可能性が示唆される。



図4. ヒョウタンゴケ原糸体に形成された脱離細胞 矢尻:脱離細胞,スケールバーは,20 µm

4. ホンモンジゴケ原糸体における無性芽形成

茎葉体や、ゼニゴケなどの葉状体に形成される無性芽では、植物体が立体的であるために 生細胞イメージングでの形成過程の観察には技術や設備が必要となる。そのため、その形成 過程についての知見は、切片を作成して見られた発達段階別の像から得られている

(Ligrone et al. 1996, Barnes & Land 1908)。一方, 蘚類の原糸体に形成される無性芽の場合, 原糸体が2次元的に成長し, 無性芽は通常, 原糸体の先端部に形成されるため, 誘導の条件 が分かっていれば観察が容易である。最近, ホンモンジゴケ原糸体における無性芽形成過程 のタイムラプス撮影を行い, 無性芽分化時の動態を捉えたので, これを紹介する。

ホンモンジゴケ原糸体における無性芽は、分裂と伸長成長を行うクロロネマ頂端幹細胞 (石川 2015)が、分化することで形成される。形成のスイッチ(ホンモンジゴケの場合、 低濃度銅添加培地での培養条件)が入ると分裂および先端成長していた頂端細胞が、短軸方 向に少し膨らむと共に、分裂する(図5A, B, 矢尻)。その分裂後、先端から見て後方の細胞 では核が細胞の基部側に移動し、不等分裂により脱離細胞が形成される(図5C, 矢尻)。一 方、1回目の分裂後に、先端側の細胞は伸長し、脱離細胞の形成に遅れて再び分裂すること で(図5D, 矢尻)、3細胞からなる無性芽が形成される。 その後,無性芽の細胞内構 造に変化が起こり,無性芽が 成熟する(おそらくこの時に 澱粉や油滴の蓄積が生じてい ると推測される。)。最後に, 脱離細胞が膨潤化した後,細 胞死を起こすことで,無性芽 が原糸体から切り離される

(図5F, 矢尻)。無性芽が切り 離された原糸体は幹細胞とな り, 先端伸長を始める(図5G, 矢尻)。無性芽を最適な条件 で培養すると, 各々の無性芽 細胞からクロロネマ細胞が発 芽する(図2D, 矢印)ホンモ ンジゴケ原糸体を, 液体培養 していると, 無性芽から発芽 した原糸体に再び無性芽が形 成され, 上述の過程を繰り返 す様子が観察される(図2D, 矢尻)。

このように,ホンモンジゴ ケ原糸体における無性芽形成 の過程では,栄養繁殖器官で ある無性芽細胞の分化,不等 分裂による脱離細胞の形成と プログラム細胞死,切り離さ れた無性芽からの原糸体細胞 の再分化など,様々な細胞の 変容を,数細胞から構成され



るシンプルな形態形成プロセスの中で、観察することが可能である(図6)。

5. 今後の展望

図5. ホンモンジゴケ原糸体における無性芽形成の タイムラプス撮影による観察 スケールバーは, 25 µm

前述のようにホンモンジゴ

ケ原糸体における無性芽形成の過程では、様々な細胞分化の振る舞いを観察できるため、細胞生物学研究の材料として興味深い材料であると考えられる。また、植物の栄養繁殖器官形 成に関する知見を取得するための材料としても有用である。



図6. ホンモンジゴケ原糸体における無性芽形成で見られる細胞分化の変容と循環

苔類においては、新興のモデル植物であるゼニゴケを用いた研究から、無性芽形成と被子 植物における腋芽形成の分子機構間の保存性が明らかにされつつある(石崎 2014)。一方, 蘚類の多くの種において、無性芽形成による繁殖が報告されているが(Imura 1994)、その 分子機構は、殆ど明らかになっていない。また、コケ植物の無性芽には油滴や澱粉粒の蓄積 がみられ(Ligrone et al. 1996),それらの合成および蓄積の分子機構に関する新知見が得ら れる可能性も秘めている。現在、我々は次世代シークエンサを用いたホンモンジゴケのゲノ ム解読を進めており、最近、ゲノム編集技術を用いた変異導入法の開発にも成功している。 さらに、ホンモンジゴケの持つ無性芽の分化誘導を人為的にコントロールできるという特性 に着目し、無性芽形成誘導条件(通常培地)と、抑制条件(オーキシン、高濃度銅添加培地) 間での比較トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、無性芽形成条件で発現量が亢 進していた転写産物群を見出すことができ、中でも特に転写調節因子の機能について現在解 析を進めている。これらの解析から、植物細胞の分化調節や、未だ多くが明らかになってい ない植物における栄養繁殖器官形成の分子機構について、新しい知見が得られることが期待 される。また、ホンモンジゴケ原糸体における無性芽形成誘導の上流因子を辿ることにより、 スペシャリストが、自身の生態的地位として適した環境か否かを感知し、ニッチ戦略を実現 させる仕組みの一端を解明したいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究内容の一部は、日本学術振興会・科学研究費補助金(11J06080, 15K18824)、日本科学協会・笹川研究助成金(27-420)の支援を受けて行われた。また本研 究の遂行において、支援を頂いた皆様方に厚く御礼を申し上げる。

引用文献

- Barnes, C.R. & Land, W.J.G. 1908. Bryologifal papers. II. The origin of the cupule of Marchantia. *Bot. Gazette.* 46: 401-409.
- Bopp, M., Quader, H., Thoni, C., Sawidis, T., & Schnepf, E. 1991. Filament disruption in Funaria protonemata: Formation and disintegration of tmema cells. *J. Plant Physiol.* 137: 273-284.
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P., & Quatrano, R. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 57: 497-520.
- Imura, S. 1994. Vegetative diaspores in Japanese mosses. *J. Hattori Bot. Lab.* 77: 177-232.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., & Gambardella, R. 1996. Development and liberation of cauline gemmae in the moss *Aulacomnium androgynum* (Hedw.) Schwaegr. (Bryales): an ultrastructural study. *Ann. Bot.* 78: 559-568.
- Nomura, T. & Hasezawa, S. 2011. Regulation of gemma formation in the copper moss *Scopelophila cataractae* by environmental copper concentrations. *J. Plant Res.* 124: 631-638.
- Nomura, T., Itouga, M., Kojima, M., Kato, Y., Sakakibara, H., & Hasezawa, S. 2015. Copper mediates auxin signalling to control cell differentiation in the copper moss *Scopelophila cataractae*. *J. Exp. Bot.* 66: 1205-1213.
- Persson, H. 1956. Studies in "copper mosses". J. Hattori Bot. Lab. 17: 1-18.
- Rumsey, F.J. & Newton, M.E. 1989. Scopelophila cataractae in North Wales. J. Bryol. 15: 519-526.
- Sakurai, K. 1934. Beobachtungen über Japanische moosflora VI. Bot. Mag. (Tokyo) 48: 383-399.
- Satake, K., Shibata, K., Nishikawa, M., & Fuwa, K. 1988. Copper accumulation and location in the moss *Scopelophila cataractae*. J. Bryol. 15: 353-376.
- Shaw, A.J. 1994. Adaptation to metals in widespread and endemic plants. *Environ. Health Perspect.* 12: 105-108.
- Shaw, A.J. 1989. Metal tolerance in bryophytes. *Heavy metal tolerance in plants:* evolutionary aspects. CRC, Boca Raton, FL, 133-152.
- Whitehouse, H.L.K. 1980. The production of protonemal gemmae by mosses growing in deep shade. *J. Bryol.* 11: 133-138.
- 石川雅樹 2015. ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構. BSJ-Review. 6: 41-50.
- 石崎公庸 2014. 新興モデル植物ゼニゴケを用いた植物における栄養繁殖メカニズムの解析.ひょうご科学技術協会学術研究助成成果報告書.
- 北川尚史 1987. ホンモンジゴケの話. Nat Stud 33: 9-11.
- 鵜沢美穂子 & 佐竹研一 2010. 秩父山地で再発見されたホンモンジゴケの胞子体及び生殖器 官の形成について. *蘚苔類研究*. 10: 10-12.

植物の再生現象における分化全能性制御の分子機構

岩瀬 哲,池内 桃子,杉本 慶子 理化学研究所環境資源科学研究センター 〒230-0051 神奈川県横浜市鶴見区末広町 2-7-11

Akira Iwase, Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto Molecular mechanisms on exerting totipotency in plant regeneration Key words: callus, dedifferentiation, epigenetics, histone modification, phytohormone, totipotency, transcription factor, RIKEN Center for Sustainable Resource Science 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 230-0045, Japan

1. はじめに

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

1951, Gracia-Arraras et al. 2011, Yoshida-Noro & Tochinai 2010, Belacortu & Paricio 2011)

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



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

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

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

2. 再生に寄与する細胞

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

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

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

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

3. カルスは再生現象に寄与する

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

4. 傷害ストレスで発現する因子がカルス化を促進する

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

私たちは植物細胞の脱分化状態を規定 する因子を単離する目的で, モデル植物で あるシロイヌナズナ植物体とカルス由来 の培養細胞の遺伝子発現比較解析を行い (Iwase et al. 2005), 培養細胞で高発現して いる植物特異的 AP2/ERF ファミリーの転 写. 因 子 WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1 (WIND1) を単離 した。驚いたことに、植物体全体で恒常的 に発現するプロモーターを用いて WIND1 遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ 植物体(WIND1 過剰発現株)では、植物ホ ルモンを含まない培地でも葉、胚軸、根か らカルスを形成する (図2)。このカルスは



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

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

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

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

5. カルス誘導の分子経路

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

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

6. 再生における WIND の分子機能とその応用

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

シロイヌナズナの再分化誘導には2段階の培養 法が広く用いられている(Valvekens et al., 1988, Ozawa et al. 1998, Che et al. 2002)。具体的には, 根や胚軸の切片をオーキシンに富んだカルス誘 導培地(CIM)で数日間培養し,その後組織片をサ イトカイニンに富んだ茎葉再分化培地(SIM)や オーキシンに富んだ根誘導培地(RIM)に移植・ 培養して再分化を促進するという方法である

(Valvekens et al. 1988)。オーキシンとサイトカイ ニンの適度な配分を設定すれば 1 段階の培養で もカルス化と再分化を連続的に誘導できるため

(Lloyd et al. 1986),必ずしも2段階の培養が必須 というわけではない。組成を変えた複数の培地を 段階的に用いる方法は,再分化までの時間短縮や 再分化頻度を高めるために検討されてきた結果 である。しかしこの事実は,分化した細胞の再分 化過程には段階があることと,それぞれの段階に は作用するホルモンと組み合わせに適性がある ことを示唆している。セイヨウヒルガオの再分化 系を用いた実験から,組織培養環境下の器官再分



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

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

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

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

(Iwase et al. 2015)。組織培養では、一般的に植物組織の切断と、多数の組織片の培地への植え替 えが必要であり、処理行程の煩雑さを招いている。WIND1のような因子の機能利用によって、切 断処理を必要とせず、且つ培養時間を短縮させた簡便で効率的な組織培養が可能になるかもしれ ない。

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

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



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

7. WIND 遺伝子と機能の保存性

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

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

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

接誘導され,明瞭なカル ス 化 は み ら れ な い

(Ishikawa et al. 2011,石 川 2015)。苔類ゼニゴケで は,葉状体の切断面から 葉状体が再生するが

(Kubota et al. 2013, Nishihama et al. 2015),こ の際一度小さな細胞塊が 傷害部位で生じるものの, すぐに形態形成に移行す るようである。コケ植物 における株化されたカル ス細胞は,外因性の植物 ホルモン処理によって再 分化への移行が抑えられ ている状態なのかもしれ ない。



図5. シロイヌナズナ *WINDのオルソログは広く種子植物に保存されている*シロイヌナズナの他の AP2/ERF 転写因子である *BBM* 遺伝子をアウトグループとして分子系統樹を作成した。赤字はシ ロイヌナズナ WIND (WND1~WIND4)。枝分かれ上の数字はブ ートストラップ確率を示している (500 replicates)。枝分かれの先 は種々の植物の遺伝子名を記してある。Iwase et al. (2013) より 許可を得て改変、転載。

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

なされたためだと考えられる。また、少な くともナタネのような近縁種の作物でも、 シロイヌナズナの WIND1 機能による再分 化の効率化が可能である事を実証するも のである。

8.分化状態の維持には脱分化因子の 発現を能動的に抑える必要がある

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

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



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

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

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

PRC2 はどのように細胞の脱分化を抑えているのだろうか。PRC2 は真核生物に広く保存されており、 ヒストン H3 タンパク質を構成するアミノ酸のうち 27 番目のリジンをトリメチル化

(H3K27me3) する働きを持っている(He et al. 2013)。このメチル化されたヒストンは結果とし てクロマチン構造を閉じた状態に変え、その領域にある遺伝子発現を抑える。つまり、PRC2 変 異体では H3K27me3 による遺伝子発現抑制機構が働かないために、不用意な遺伝子発現を起こし やすい状態になっていることが考えられる。そこで、PRC2 変異体の根でカルス形成に関与する

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



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

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

9. 終わりに

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

また、WINDを軸とした脱分化誘導現象において、ストレスとヒストン修飾によるクロマチ ン変化の関連が浮かび上がってきたことから、ストレスとエビジェネティックな変化がどのよう に関連し、細胞の脱分化を促進するのかという次なる問いも生じる。種々のストレスがヒストン 修飾の変化を誘導し、クロマチン構造を変化させて脱分化関連転写因子の発現を促進するという 仮説のみならず、ストレス誘導性の転写因子によってクロマチン構造が変化し、種々の脱分化関 連因子の発現が促進するという仮説も立てることができる。ほ乳類の分化した細胞では、iPS 細 胞誘導技術で用いられる転写因子群(Yamanaka-factors)が複数の階層のエピジェネティックな 発現抑制制御を受けていることが分かってきた(Hawkins et al. 2010)。さらに、発現誘導された Yamanaka-factors は、「パイオニア転写因子」としてヌクレオソームに結合し閉じたクロマチン構 造を開き、自身を始め下流遺伝子群の転写活性を促進する働きを有する可能性が示唆されている

(Soufi et al. 2015)。様々な刺激に対してエピゲノムがどのように変化し、ゲノム上のどの遺伝 子領域が転写制御を受けやすくなるのか、または受けにくくなるのかについて網羅的に理解する ことは、細胞の分化や脱分化を理解するため今後益々重要なアプローチとなる。ストレス誘導時 や脱分化関連転写因子の誘導時におけるクロマチン構造の変化を経時的かつゲノムワイドに捉え る研究を進めることで、植物の分化全能性発揮のダイナミズムを明らかにして行きたい。

謝辞

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

引用文献

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

analysis of the local response to wounding in Arabidopsis leaves. Plant Mol. Biol. 55: 165-181.

- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., & Sangwan, R.S. 2011. De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci.* 16: 597-606.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., & Hu, Y. 2012. Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cell Res.* 22: 1169-1180.
- Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., de Rosa, R., & Chera, S. 2006. Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17: 492-502.
- Garcia-Arraras, J.E., Valentín-Tirado, G., Flores, J.E., Rosa, R.J., Rivera-Cruz, A., San Miguel-Ruiz, J.E., & Tossas, K. 2011. Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in H. glaberrima. *BMC Dev. Biol.* 11: 61
- Hawkins R.D., Hon, G.C, Lee, L.K., Ngo, Q., Lister, R., *et al.* 2010. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* 6:479-491.
- He, C., Huang, H., & Xu, L. 2013. Mechanisms guiding Polycomb activities during gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* 4: 454.
- Hyman, L.H. 1951. The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria. McGraw Hill, New York
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173.
- Ikeuchi, M., Ogawa Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143: 1442-1451.
- Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., Kimura, M., Sugimoto, N., Akita, A., Oguri, Y., Friedman, W.E., Hasebe, M., & Kubo, M. 2011. Physcomitrella cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924-2938.
- Iwase, A., Ishii, H., Aoyagi, H., Ohme-Takagi, M., & Tanaka, H. 2005. Comparative analyses of the gene expression profiles of Arabidopsis intact plant and cultured cells. *Biotechnol. Lett.* 27: 1097-1103.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., & Ohme-Takagi, M. 2011a. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 21: 508-514.
- Iwase, A., Ohme-Takagi, M., & Sugimoto K. 2011b. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signal Behav.* 6: 1943-1945.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Ikeuchi, M., Ohnuma, M., Koizuka, C., Kawamoto, K., Imamura, J., Ezura, H., & Sugimoto, K. 2013. Arabidopsis WIND1 induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Signal Behav.* 8: e27432.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Ikeuchi, M., Ohnuma, M., Koizuka, C., Kawamoto, K., Imamura, J., Ezura, H., & Sugimoto, K. 2015. WIND1-based acquisition of regeneration competency in Arabidopsis and rapeseed. *J. Plant Res.* 128: 389-397.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., & Tanaka, E.M. 2009. Cells keep A. Iwase -13

a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. Nature 460: 60-65.

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

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

阿部喜任 1837. 草木育種後編.

池内桃子, 岩瀬哲, 杉本慶子 2015. 傷付いた植物はどのように修復・再生するのか. BSJ-Review6A: 23-30.

石川雅樹 2015. ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構. BSJ-Review 6A: 41-50.

岩崎常正 1833. 草木育種.

岩瀬哲,池内桃子,杉本慶子 2015. カルス形成の分子メカニズム~アクセル因子とブレーキ因子

 \sim . BSJ-Review6A: 2-22.

長谷部光泰 2015. 植物と動物の発生における相違点と類似点. 生体の科学 66: 261-266. 宮崎安貞 1697. 農業全書.

植物の初期胚イメージング系の発展

植田 美那子

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻生殖分子情報学研究室 兼任) 〒464-8602 名古屋市千種区不老町

Minako Ueda

Recent innovations of embryo imaging methods

Key words: *Arabidopsis*, cell fate, embryogenesis, geometric analysis, live-cell analysis Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM) & Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8402, Japan

1. はじめに

被子植物は複雑な形態を有するが、それらはすべて受精卵に由来する。形づくりの基盤となる 体軸は初期胚で確立され、特に、頂端-基部軸(上下軸)は最初に形成される。この軸に沿って受 精卵は不等分裂し、生じた頂端細胞と基部細胞が個々の運命にしたがって発生することで、植物 体の茎頂-根端パターンが構築される(図1)。つまり初期胚発生には、体軸形成・運命獲得・パ ターン形成といった、発生の基盤をなす仕組みが詰まっていると言えるが、被子植物の胚発生は 母組織の奥深くで進行するという特性から、発生過程を詳細に解析する手法は乏しく、個々の細 胞の分裂動態や、それを制御する仕組みについてはほとんど研究されてこなかった。しかし近年、 シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)において、コンピューター解析による胚の三次元構造の再 構築や、胚珠の in vitro 培養によるライブセル解析など、さまざまな研究が進んできた。そこで本 稿では、これらの最新手法を紹介することで、今後の胚発生研究の展望について考えたい。



図1.シロイヌナズナの胚発生

シロイヌナズナの受精卵から初期胚が発生する様子を示した。点線は頂端細胞と基部細胞の系譜の境界面を示す。

M. Ueda-1

2. シロイヌナズナ胚の細胞形態を三次元的に解析する手法の確立

近年,胚の観察画像をコンピューター解析するというジオメトリック(幾何学)解析法が開発 され,さまざまな発生ステージの胚において,個々の細胞がどのような容積をもち,どの方向に 分裂するかといった特徴を三次元的に理解できるようになった(Yoshida et al. 2014)。この手法で は,蛍光色素(FM4-64 あるいは propidium iodide)によって細胞輪郭を可視化した胚を透明化し, それを 0.1 µm 間隔という高密度で観察する。得られた光学切片を三次元画像解析ソフトウェア

(MorphoGraphX) で処理することで、胚内部の個々の細胞の形態やサイズ、細胞分裂面の位置や その面積など、多様な情報を統計的に解析することができる(Kierzkowski et al. 2012)。古くから、 細胞は分裂面の面積が最小になるように分裂すると考えられてきたが、この様式での分裂パター ン予測と実際の胚の三次元再構成画像を比較したところ、細胞分裂面は常に最小面積になるわけ ではないことが判明した(Yoshida et al. 2014)。例えば、4 細胞期胚や8 細胞期胚が形成される際 の分裂面は最小面積になる位置に形成されるものの、8 細胞期胚の各細胞が非対称分裂して胚の 内層と外層が生じる際の分裂面は、平面的ではあるものの、最小面積にはならない位置に形成さ れる(図2の上段)。一方、ドミナントネガティブ型の BODENLOS(オーキシン応答の制御因子) を強制発現させることでオーキシン非感受性にした株では、8 細胞期胚の各細胞は分裂面が最小 面積になる位置で分裂するため、胚に内層と外層が形成されない(図2の下段, Hamann et al. 1999)。 オーキシンが蓄積することが知られている他の胚細胞でも同様の結果が得られたことから、胚の 細胞は本質的には細胞分裂面を最小面積にする性質をもつものの、オーキシン応答を用いた制御 機構によって分裂面の位置が調整されることで、内外層の分離といった胚のパターン形成が実現 すると考えられる。



図2. 細胞分裂面の制御様式

シロイヌナズナ胚の三次元立体構築 によって判明した、8細胞期胚から16 細胞期胚になる際の細胞分裂の様式 (上段)。オーキシンに応答できない 株では等分裂になる(下段)。

3.シロイヌナズナ胚珠の in vitro 培養による胚のライブイメージ ング

前述した胚の三次元解析によって, 個々の細胞の形態や分裂面を詳細に 比較することが可能となった。しか し,これは多数の固定胚による解析 であるため,細胞分裂の所要時間や

分裂順序といった時間情報や、どのような位置や形の細胞が実際にどのように分裂してどの組織 になるかという系譜を知ることはできない。これらを知るには、一つの胚の発生を追跡できるラ

イブイメージング系が必要になる。これまで、タバコの単離受精卵を in vitro 培養して植物体まで 成長させる方法は報告されているが、多様な変異体や分子マーカーが整備されたシロイヌナズナ では、受精卵を培養できる方法はいまだ確立されていない(He et al. 2007)。しかしながら、シロ イヌナズナでは、胚を含む母組織(胚珠)を単離して in vitro 培養する方法は報告されている (Sauer & Friml 2004)。この方法では、受精卵や若い胚を用いた際の植物体の発生率は低く、初期胚の形 成過程のライブイメージングには適さなかったが、近年、培地の組成を変えることで、成功率を 大幅に改善できることが明らかになった(Gooh et al. 2015)。さまざまな成分検討の結果,Nitsch 培地とトレハロースを組み合わせることで、胚珠の生存率と胚の発生率がともに向上したのであ る。この系を用いて、胚の核と細胞膜のそれぞれを蛍光標識した株の胚珠を顕微鏡下で培養する ことで、受精卵が後期胚まで発生する様子を一連の過程としてライブイメージングすることが可 能となった(Gooh et al. 2015)。この際, 胚珠は成長にともなって肥大するので, 数日にわたるラ イブイメージングでは、胚珠が視野から逃げるという問題が生じるが、ポリジメチルシロキサン 類(PDMS)を素材とするマイクロピラーアレイを培地容器に被せ、そのなかに胚珠を置くこと で, 胚珠を定位置に保持することができる(Gooh et al. 2015, Park et al. 2014)。この *in vitro* 胚珠培 養系を用いることで、受精卵を起点とする細胞系譜を追跡できるだけでなく、それぞれの細胞分 裂の所要時間や、発生運命が次第に確立される様子も観察することが可能となった。例えば、基 部細胞系列(胚柄)の発生に重要であることが知られている WOX8 遺伝子の発現を蛍光標識した マーカーをライブイメージングすると、受精卵ですでに蛍光シグナルが検出され、その不等分裂 後(1細胞期胚)に頂端細胞と基部細胞の両方で蛍光が観察されたあと、次の細胞分裂後(2細胞) 期胚)にようやく基部細胞の系列に限局した(Ueda et al. 2011)。一方, WOX8 とは逆に胚の頂端 領域で働く DRN 遺伝子のマーカーでは、受精卵では蛍光が観察されず、不等分裂後に頂端細胞で 発現が始まり、その系譜で発現が受け継がれた(Cole et al. 2009)。これらの観察結果から、頂端 と基部の運命は一律に決定されるのではなく、受精卵から発現している遺伝子や、不等分裂後に 発現し始める因子の働きによって、次第に細胞性質が確立されていくと考えられる。

4. 胚の特定細胞を狙った破壊による細胞運命の転換

上記のライブイメージング中の胚に対し、長波長の近赤外光を用いたフェムト秒パルスレーザ ーを照射することで、発生中の胚内部にある単一細胞だけを狙って破壊することも可能となった (Gooh et al. 2015)。この系を用いて1細胞期胚の頂端細胞のみを破壊した場合、残された基部細 胞の系譜から頂端細胞の様式で細胞分裂を始めるものが現れた(図3)。この際、基部細胞は一旦 分裂して細胞数を増やしたのち、上部の細胞のみを頂端細胞に転換させるという動態が観察され たことから、基部細胞を保持しつつ、頂端細胞を補填するという発生戦略が読み取れる。このと き、基部細胞系譜の上部にある細胞では、前述の WOX8 の発現は失われ、かわりに DRN の発現 が始まったことから、細胞運命が分子レベルで切り替わったと考えられる(図3)。頂端細胞は、 植物体のほとんどを生み出す胚体のもととなる始原細胞であることから、胚の補助組織である胚 柄の中から新たな頂端細胞が生まれて胚体が補償されるという制御は、植物の発生戦略として理 にかなっていると言える。発生の進んだ胚に対しても同様のレーザー照射をおこない、胚体と胚 柄の境界を分断したところ、球状胚期では残された胚柄から二次胚が生じるが、より後期の初期 心臓型胚期では、胚柄はもはや分裂しないことも明らかとなった(Liu et al. 2015)。このことから、 胚柄がもつ胚体の補償能力は発生ステージに依存することが明らかになった。胚柄は発生後期に は縮退して死滅するので、胚体が充分に成長したあとで補償能力を失うことで、胚柄としての役 割を終えると考えられる。



図3.細胞破壊による運命転換の誘導

シロイヌナズナ初期胚へのレーザー照射実験の結果を模式的に示した。上段は通常状態(レーザー照射なし)の発生様式を、下段はレーザー照射後の発生様式を示す。桃色は DRN 遺伝子を発現する細胞、尿色は死滅した細胞を表す。

5. 今後の展望

本稿では、コンピューター解析を用いた胚の細胞形態の詳細な比較、ライブ観察による時空間 的な動態変化、単一細胞を狙った破壊による運命転換という、3つの最新手法について紹介した。 今後は、これらを組み合わせることで、より精緻な解析が可能になると考えられる。例えば、細 胞の運命が転換する際、遺伝子発現や分裂パターンだけでなく、細胞の形態や容積も変わると考 えられるので、それらを時系列に沿って詳細に比較することで、細胞のどのような変化が端緒と なって細胞運命の転換に至るかを明らかにできるかもしれない。さらに、細胞形態や遺伝子発現 の変化の解析に加え、細胞内構造(細胞骨格やオルガネラなど)や生理状態(代謝活性やエピジ ェネテッイク制御など)についても、時空間的かつ定量的に解析する手法が確立されれば、胚内 部のそれぞれの細胞がどのように変化することで、胚全体としての発達に貢献しているかについ ても、包括的に理解できると期待される。

引用文献

Cole, M., Chandler, J., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., & Werr, W. 2009. DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development* 136: 1643-1651.

M. Ueda-4

- Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T., et al. 2015. Live-Cell Imaging and Optical Manipulation of Arabidopsis Early Embryogenesis. *Dev. Cell* 34:242-251.
- Hamann, T., Mayer, U., & Jurgens, G. 1999. The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development* 126: 1387-1395.
- He, Y.C., He, Y.Q., Qu, L.H., Sun, M.X., & Yang, H.Y. 2007. Tobacco zygotic embryogenesis in vitro: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. *Plant J.* 49: 515-527.
- Kierzkowski, D., Nakayama, N., Routier-Kierzkowska, A.L., Weber, A., Bayer, E., Schorderet, M., et al. 2012. Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science* 335: 1096-1099.
- Liu, Y., Li, X., Zhao, J., Tang, X., Tian, S., Chen, J., et al. 2015. Direct evidence that suspensor cells have embryogenic potential that is suppressed by the embryo proper during normal embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112: 12432-12437.
- Park, J., Kurihara, D., Higashiyama, T., & Arata, H. 2014. Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation. *Sensor Actuat B-Chem* 191: 178-185.
- Sauer, M. & Friml, J. 2004. In vitro culture of Arabidopsis embryos within their ovules. Plant J. 40: 835-843.
- Ueda, M., Zhang, Z., & Laux, T. 2011. Transcriptional activation of Arabidopsis axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell* 20: 264-270.
- Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G.W., Prusinkiewicz, P., Smith, R.S., et al. 2014. Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Dev. Cell* 29: 75-87.

シロイヌナズナにおける道管分化誘導系の発達

小田 祥久 国立遺伝学研究所新分野創造センター 〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

Yoshihisa Oda

Experimental systems for xylem differentiation using Arabidopsis cells Key words: Arabidopsis, cell culture, secondary cell wall, tracheary element, xylem vessel Center for Frontier Research, National Institute of Genetics Yata 1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

1. はじめに

植物の体は多様な細胞が集積するようにして発達する。それぞれの細胞の形態や機能は細胞を 取り囲む細胞壁に大きく依存しており、細胞壁の成分や沈着パターン、厚みは細胞の形態や機能 に強く影響する。道管や木部繊維などの木部組織は、木部細胞が二次細胞壁を厚く沈着すること により個体を支え導管液の輸送に耐える物理的な強度を獲得しており、細胞壁による細胞の機能 分化の分かりやすい例と言える。さらに、道管における二次細胞壁の沈着は細胞内で厳密に制御 されており、原生木部道管では環状や螺旋状、後生木部道管では網目状や孔紋状に二次細胞壁を 沈着することにより異なった性質の道管を作り出している。道管細胞は二次細胞壁を形成した後 に細胞内容物を消化することにより中空の死細胞である管状要素となり、穿孔および壁孔を介し て導管液を通すことができるようになる。残された二次細胞壁はリグニン化することにより物理 的にも化学的にも強固なものとなり、長期間にわたって通同組織の支えとして機能する(図 1)。 このように道管は木部細

胞の非可逆的な分化によ り形成されているが,こ のような細胞分化のプロ セスを解析することは, 道管分化が深部の限られ た領域で起こることから 技術的な困難を伴う。ヒ ャクニチソウの単離葉肉 細胞を用いた管状要素分 化誘導系 (Fukuda & Komamine 1980)は高頻度 かつ同調的に管状要素分 化を誘導することが可能 であり,その高い再現性



図 1. シロイヌナズナの道管 (A) シロイヌナズナの根の道管。(B, C) 原生木部(B) と後生木部(C) における管状要素分化の模式図。 ここでは環状と孔紋状の二次細胞壁パターンを示す。Bar = 10 μm.

Y. Oda-1

から国内外で長く利用され,道管を含む維管束形成機構の解明に大きく貢献してきた。2000年代 に入ると、シロイヌナズナを用いた研究が維管束形成の遺伝子レベル、分子レベルでの理解に貢 献するようになってきた。その中で、シロイヌナズナを用いて道管分化を in vitro で誘導する試み もなされてきた。本稿では、シロイヌナズナを用いた道管分化誘導法とその成果について概説す る。

2. 継代培養細胞を用いた分化誘導系

シロイヌナズナの継代培養細胞は Col-0 株, MM2d 株, T87 株等が知られているが, これらはオ ーキシン存在下で培養することにより半永久的に継代することが可能である。一般的に、培養細 胞は均一な細胞集団の調製が容易なこと、自家蛍光が少なく顕微鏡での蛍光観察がし易いことか ら、細胞生物学的、生化学的アプローチに有用な材料である。また、細胞株によっては、ヒャク ニチソウでは困難であったアグロバクテリウム法による遺伝子導入が容易であることも重要な利 点である。これまでにシロイヌナズナの継代培養細胞を用いた管状要素分化誘導系が複数の研究 グループから報告された。一例目は筆者が携わった研究のひとつであり, Col-0 培養細胞株を用い て開発した実験系である。この実験系では細胞を 2.4-D, brassinolide 存在下で培養することによ り、 36-48 時間で 30%程度の細胞を管状要素に分化させることができた(Oda et al. 2005)。この 細胞株には微小管マーカーである GFP-TUB6 を恒常的に発現させており, 管状要素分化における 表層微小管の挙動を生きた状態で観察することがはじめて可能となった。これまで管状要素分化 における表層微小管の観察は電子顕微鏡あるいは間接蛍光抗体染色法による静止状態での観察に 限られていたが、この実験系により表層微小管が徐々に束となってゆく様子、微小管に沿って二 次細胞壁の沈着が進む様子が明らかとなった(Oda et al. 2005, Oda & Hasezawa 2006)。同時期に Col-0 培養細胞をホウ酸と brassinolide の存在下で培養することにより、7日間で 50%ほどの細胞 を管状要素に分化させる手法が報告された(Kubo et al. 2005)。この実験系を用いたマイクロアレ イ解析により、NACファミリーに属する VND1~VND7 が木部道管に特異的に発現する転写因 子群として同定された。これらの転写因子のうち VND7 あるいは VND6 を異所的に発現させると、 それぞれ原生木部道管様,後生木部道管様の二次細胞壁肥厚を誘導し,逆に SRDX を付加したド ミナントネガティブ型の導入により道管の分化が遅延した。このことから VND7 および VND6 が それぞれ原生木部道管、後生木部道管の分化を誘導する転写因子であることが示された。後に、 VND7 は後生木部を含む道管分化に広く関わっており、道管分化を制御する主要な転写因子であ ることが報告された(Yamaguchi et al. 2011)。ホウ酸を用いた管状要素の分化誘導はカルスにも用 いられた(Kwon et al. 2010)。この研究ではシロイヌナズナの野生型および RabG3b の変異体から 新たにカルスを単離し、ホウ酸と brassinolide 存在下で培養することにより管状要素の分化を誘導 している。野生型由来のカルスでは15%程度の細胞が管状要素に分化したのに対し、恒常活性型 RabG3b 導入株由来のカルスでは 40%以上,不活性型 RabG3b 導入株および RabG3b RNAi 導入株 由来のカルスでは5%以下の細胞が管状要素に分化したことから、RabG3bが管状要素分化を促進 していると考えられている(Kwon et al. 2010)。

2010 年には新規のシロイヌナズナ培養細胞株を用いた管状要素分化誘導系が報告された (Pesquet et al. 2010)。この研究ではシロイヌナズナの植物体から新規に培養細胞株を樹立し, NAA, BAP (6-benzylaminopurine), epibrassinolide を培養液に添加することにより 96 時間で 30~40%の細胞を管状要素へ分化させている。植物の継代培養細胞株は多くの場合オーキシン存在下で細胞の増殖を維持するが、この培養細胞株はオーキシン非存在下で増殖する細胞をカルスから選抜して樹立したものであり、ホルモンフリーの培地で維持されている。この性質がこの細胞株の分化能と何らかの関係があるのかもしれない。Pesquetら(2010)はこの実験系を用いて微小管付随タンパク質の発現を網羅的に調べ、MAP70-5 が管状要素分化時に特異的に発現することを突き止めた。この実験系では螺旋型、網目および孔紋型の二次細胞壁が混在して形成されるが、MAP70-5、あるいはその相互作用因子である MAP70-1 の発現を抑制すると孔紋型の二次細胞壁の割合が増加した。このことから、MAP70-5 が二次細胞壁の沈着パターンの制御因子の一つであることが示唆された

(Pesquet et al. 2010)。最近になり、この実験系を用いた微小管付随タンパク質のプロテオミクス 解析により、MAP65 や AIR9, CSI1 など多数の微小管付随タンパク質も二次細胞壁のパターンに 関与していることが報告された(Derbyshire et al., 2015)。このプロテオミクス解析は細胞を多量に 調製することが容易な培養細胞の特性を活かした研究例と言えよう。

2010 年には分化誘導に転写因子の活性を利用した新しいタイプの分化誘導系が報告された。 Yamaguchi ら (2010) は VND7 に転写活性化因子およびグルココルチコイド受容体を融合した *VND7-VP16-GR* をタバコ BY-2 細胞株に導入し,その培養液に dexamethasone を添加することによ り、4~5 日で 80%を超える高頻度で原生木部様の管状要素を分化誘導することに成功した

(Yamaguchi et al. 2010)。筆者は共同研究者らと共に, Col-0 培養細胞に *VND6*を発現させること により管状要素を分化させる実験系の開発に取り組んだ。その結果, *VND6*をエストロゲンによ る発現誘導系の制御下に置き, 17β-estradiol および brassinolide を培養細胞の培養液に添加するこ とにより,およそ 36 時間で 80%ほどの細胞を後生木部道管様の管状要素に分化させることがで きるようになった (図 2, Oda et al. 2010)。また, アグロバクテリウム法による高頻度の遺伝子導 入も可能になり,抗生物質による選抜をすることなく数日で GFP 等との融合タンパク質の局在を 分化過程の細胞内で観察することができるようになった。筆者らはこの方法を用いて道管分化時

に顕著に発現するタン パク質の細胞内局在を 網羅的に解析し, 微小 管付随タンパク質 MIDD1 が局所的に表 層微小管の脱重合を促 進することにより壁孔 の形成を誘導している ことを突き止めた。さ らに, MIDD1 は局所的 に活性化した ROP GTPase により細胞膜 にアンカーされ, 微小



図 2. *WD6* 導入 Col-0 株を用いた管状要素分化誘導系 (A) *VND6* を導入した Col-0 培養細胞株。(B) 分化誘導後の蛍光顕微鏡像。赤いシグナルは蛍光色素で染色した二次細胞壁。Bar = 20 μm

管脱重合活性を持つ Kinesin-13A と相互作用することにより働いていることを明らかにした (Oda & Fukuda 2012, 2013)。また,機能未知の coiled-coil タンパク質である VETH1 および VETH2 が COG2 タンパク質と相互作用することにより,表層微小管に exocyst 複合体サブユニットである Exo70A1 をリクルートしていることを報告した (Oda et al. 2015)。exocyst 複合体は膜輸送経路の 目的地の決定に関わっており, EXO70A1 の機能欠損変異体では二次細胞壁の沈着パターンに異 常を生じたことから, VETH 経路は表層微小管に沿った細胞壁成分の輸送に関わっているのと考 えられる。これらの研究に加え,この実験系は道管分化におけるプログラム細胞死に関する知見 にも寄与した (Han et al. 2012, Ohashi-Ito et al. 2010)。

3. 植物体を用いた実験系

シロイヌナズナの個体や組織を用いた実験系として,胚軸を用いた実験系が報告された(Sawa et al. 2005)。この実験系では,暗所で育てたシロイヌナズナの芽生えから胚軸を切り出し, 2,4-D, kinetin, brassinolide を含む培地中で6日ほど培養することにより,管状要素が胚軸内に異所的に形成される。

最近になり、葉の組織を用いた斬新な分化誘導法が報告された(Kondo et al. 2015)。この手法で は、シロイヌナズナの本葉から直径 1 mm のディスク状に組織を切り出し、2,4-D, kinetin に加え、 GSK3 キナーゼの阻害剤である bikinin を添加した培地中で培養することにより、3 日程で葉肉細 胞を管状要素へと分化させている。GSK3 キナーゼは、CLE ペプチドシグナル下流のブラシノス テロイドシグナル経路で働く BES1 転写因子を介して道管分化を阻害している(Kondo et al. 2014)。 bikinin はこのシグナル経路を阻害することにより木部道管への分化を促進していると考えられて いる(Kondo et al. 2014)。この実験系では培養開始後 24 時間ほどで前形成層マーカーの発現が見 られ、48 時間後では木部細胞マーカーの発現が見られるようになる。従って、この実験系は前形 成層細胞から道管へ至る全過程を再現していると考えられ、木部細胞分化の仕組みを明らかにす る上で強力なツールになると期待される。

シロイヌナズナの個体に転写因子を一過的に発現させることにより異所的に体細胞の道管分 化を誘導する手法も成果を上げている。Yamaguchi ら(2010)は VND6-VP16-GR あるいは VND7-VP16-GR を導入したシロイヌナズナの芽生えを4日間 dexamethasone で処理することにより,個 体内で広い範囲の体細胞をそれぞれ後生木部道管様、原生木部道管様の管状要素に分化させてい る。特に VND7 を用いた誘導系では個体全体の白化を引き起こすほど大部分の体細胞が道管に分 化する(Yamaguchi et al., 2010)。この実験系を用い、二次細胞壁のリグニン化について新知見が報 告された。この研究ではリグニンの合成に必要な酸化酵素である LAC4 および LAC17 が二次細 胞壁合成部位に特異的に局在していることが示され、木部道管において二次細胞壁が特異的にリ グニン化される仕組みの一端が明らかとなった(Schuetz et al. 2014)。また、この分化誘導系は高 精細なライブイメージングにも用いられた。セルロース合成酵素複合体のマーカーを導入し、道 管へと分化している表皮細胞を観察することにより、二次細胞壁形成におけるセルロース合成酵 素複合体の詳細な挙動が明らかにされた(Watanabe et al. 2015)。この観察によると、二次細胞壁 の合成領域では一次細胞壁を合成している領域に比べ、セルロース合成酵素複合体の密度が高く、 また細胞膜上での移動速度も速い。細胞膜上でのセルロース合成酵素複合体の移動はセルロース

Y. Oda-4

微繊維の合成に依存していると考えられており、この結果は二次細胞壁の形成を担うセルロース 合成酵素複合体の高いセルロース合成能を示唆していると言える。このような二次細胞壁のセル ロース合成酵素複合体の性質が管状要素分化における急速な二次細胞壁形成を可能にしていると 考えられている(Watanabe et al. 2015)。

このように木部細胞分化を制御する転写因子が明らかとなってきたことから、転写因子の活性 を人為的に制御し、特定のタイプの木部細胞を様々な細胞から分化させることが可能となってき た。さらに、道管を含む通同組織の細胞分化を制御する転写因子は VNS(VND/NST/SMB)ファ ミリーとして陸上植物に広く保存されており(Xu et al. 2014)、転写因子を利用した通同組織の分 化誘導はシロイヌナズナのみならず幅広い植物で応用できると期待される。

4. 今後の展望

これまで述べてきたように、この 10 年の間にシロイヌナズナを用いた様々な道管分化誘導系 が発達してきた。材料としては個体や組織、培養細胞といった選択肢があり、誘導法に関しても 植物ホルモンや阻害剤に加え、転写因子の発現を誘導する方法がある。植物ホルモンと阻害剤を 用いて誘導する手法は、既存のマーカーラインや変異系統をそのまま利用することができる強み がある。一方、転写因子を利用した方法では特定のタイプの木部道管を高頻度で分化させる特異 性に秀でている。材料に培養細胞を用いた実験系は、ハンドリングの速さやイメージング、生理 学的な実験との親和性が高い一方で、安定した培養を維持するには実験者の修練が必要な点、長 期保存の難しさが欠点と言える。実験系の性質を考慮し、状況に適した実験系を導入することが 効果的に成果を得る上で重要であろう。道管分化を研究するためのツールは明らかに充実してき ており、以前と比較して容易に道管分化の研究に取り組むことができる環境が整いつつある。今 後、これらの実験系のユーザーが増えることにより、その再現性や効率がさらに改善され、道管 分化の研究に一層貢献すると期待される。また、今後は木部道管以外の維管束組織の分化誘導系 や、シロイヌナズナ以外の植物種での分化誘導系など、新しい実験系の開発も望まれる。このよ うな取り組みにより、道管分化のみならず維管束全体の形成機構やその進化的な側面、さらには 細胞分化という現象の根本的な理解にも繋がると期待される。

謝辞

本稿で述べた Col-0 培養細胞の管状要素分化誘導系は馳澤盛一郎教授(東京大学)のご指導の 下で開発したものです。また, VND6 導入 Col-0 株を用いた後生木部道管分化誘導系の開発とそ れを用いた一連の研究は福田裕穂教授(東京大学)のご指導,ご支援の下で行いました。VND6の 扱いに関して出村拓教授(奈良先端科学技術大学院大学),山口雅利准教授(埼玉大学)にご助言, ご支援を頂きました。培養細胞の扱いや形質転換に関しては三村徹郎教授(神戸大学),梅田正明 教授(奈良先端科学技術大学院大学)にご助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

Derbyshire, P., Menard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C.W., & Pesquet, E. 2015. Proteomic Analysis of Microtubule Interacting Proteins over the Course of Xylem Tracheary Element

Y. Oda-5

Formation in Arabidopsis. Plant Cell 27: 2709-2726.

- Fukuda, H. & Komamine, A. 1980. Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of Zinnia elegans. *Plant Physiol.* 65: 57-60.
- Han, J.J., Lin, W., Oda, Y., Cui, K.M., Fukuda, H., & He, X.Q. 2012. The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development. *Plant J*. 72: 129-141.
- Kondo, Y., Fujita, T., Sugiyama, M., & Fukuda, H. 2015. A novel system for xylem cell differentiation in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant* 8: 612-621.
- Kondo, Y., Ito, T., Nakagami, H., Hirakawa, Y., Saito, M., Tamaki, T., Shirasu, K., & Fukuda, H. 2014. Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. *Nat. Commu.* 5: 3504.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., & Demura, T. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855-1860.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., & Park, O.K. 2010. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant J.* 64: 151-164.
- Oda, Y. & Fukuda, H. 2012. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* 337: 1333-1336.
- Oda, Y. & Fukuda, H. 2013. Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *Plant Cell* 25: 4439-4450.
- Oda, Y. & Hasezawa, S. 2006. Cytoskeletal organization during xylem cell differentiation. *J. Plant Res.* 119: 167-177.
- Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y., & Fukuda, H. 2010. Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. *Curr. Biol.* 20: 1197-1202.
- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., & Fukuda, H. 2015. Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the conserved oligomeric Golgi-complex 2 protein. *Plant Cell Physiol.* 56: 277-286.
- Oda, Y., Mimura, T., & Hasezawa, S. 2005. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiol.* 137: 1027-1036.
- Ohashi-Ito, K., Oda, Y., & Fukuda, H. 2010. Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell* 22: 3461-3473.
- Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., & Lloyd, C.W. 2010. The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Curr. Biol.* 20: 744-749.
- Sawa, S., Demura, T., Horiguchi, G., Kubo, M., & Fukuda, H. 2005. The ATE genes are responsible for repression of transdifferentiation into xylem cells in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 141-148.

- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R.A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B., & Samuels, A.L. 2014. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiol.* 166: 798-807.
- Watanabe, Y., Meents, M.J., McDonnell, L.M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H.N., Demura, T., Ehrhardt, D.W., Samuels, A.L., & Mansfield, S.D. 2015. Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* 350: 198-203.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., *et al.* 2014. Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. *Science* 343: 1505-1508.
- Yamaguchi, M., Goue, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J.C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., *et al.* 2010. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol.* 153: 906-914.
- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., & Demura, T. (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* 66: 579-590.

次世代シーケンサーを用いた1細胞遺伝子発現解析の現状と展望

~植物細胞のリプログラミング機構の解明に向けて~

久保 稔

奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

Minoru Kubo

Single cell transcriptome analysis using next generation sequencers: Toward studying mechanisms of reprogramming in plant cells

Key words: next generation sequencer, reprogramming, single cell, totipotency, transcriptome Division for Research Initiative, Nara Institute of Science and Technology 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 630-0192 Japan

1. はじめに

近年の生物学では、mRNA を中心とした転写産物の蓄積量を測定することが、遺伝子の働き具 合を調べる研究手法の一つとして定着している。当初は個体や器官,組織から集めた数 µg から 数十 μgの total RNA を使った RNA ゲルブロット(ノーザンブロット)法により、1から数個の 遺伝子について遺伝子発現量の測定が行われていた。その後、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法 の普及に伴い、リアルタイム定量 PCR (real time qPCR) 法が開発され、より微量の 10-100 ng 程 度の RNA からでも遺伝子発現量の測定が可能となり、今日でも広く用いられている。1990年代 に入ると、ガラス基盤上に DNA 断片を高密度にスポットしたり、基板上で合成したりしたマイ クロアレイやジーンチップが登場した。これらを用いる事により、何千、何万個もの遺伝子につ いて遺伝子発現量を一度に解析する、網羅的遺伝子発現解析が可能となった。しかし、生物種ご とにマイクロアレイやジーンチップを準備したり、新しい情報を取り入れて改定したりするため には多大なコストがかかるという難点があった。それに変わって網羅的な遺伝子発現解析法とし て普及したのが、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq (RNA-Sequencing) である。この手法で は数千万から数十億個もの短い DNA 断片を一度に解読する次世代シーケンサーの特性を生かし て, RNA を鋳型に逆転写反応によって合成された DNA 断片の配列決定を行い, 遺伝子モデル上 にマップされた DNA 断片の数を RNA 量として見積もる。そのため、RNA さえ準備でき、ゲノ ムや転写物情報さえあれば、生物種を問わず遺伝子発現解析が可能となった。さらに、0.5-1 ng の total RNA があれば通常の RNA-Seq による解析を行う事ができ、最近では total RNA がわずか 5-100 pg しか含まれない 1 細胞での RNA-Seg も行われるようになった。本稿では、初めに今やそ の解析に欠く事のできない次世代シーケンサーについて簡単に説明し、続いて、遺伝子発現解析 の最終形態の一つと言える1細胞遺伝子発現解析について、その歩み、技術開発、そこから得ら

れた新しい知見について述べる。その後,植物細胞における1細胞遺伝子発現解析,我々が行っている植物細胞のリプログラミング機構の解明に向けた1細胞遺伝子発現解析について紹介したい。

2. 次世代シーケンサー

次世代シーケンサーの開発はヒトゲノム計画が完了した翌年の2004年に,1人当りのゲノム解 析に 1000 万ドルかかっていたコストを 1000 ドルにすることを目的とした「Advanced Sequencing Technology Awards」(通称: 1000 ドルゲノムプログラム)が中心となって推進された (Schloss 2008, 宋ら 2010)。米国立ヒトゲノム研究所(NHGRI)主体で開始されたこのプログラムでは, 毎年数 千万ドルの助成金が拠出され、これらの獲得をめざし、バイオ・医療系、化学系、工学系の研究 グループのみならず、メジャー、ベンチャーを含めたバイオ・IT 企業も参加し、次世代シーケン サー開発に向けた様々な技術提案がなされた。その成果は 2005 年に市販された世界初の次世代シ ーケンサーである 454 GS20 (後継機種 GS FLX+: ロシュ社), 翌年に発売された Solexa/illumina シ ーケンサー(現行機種 HiSeq, NextSeq, MiSeq : イルミナ社), 2007 年に発売された SOLiD(ラ イフテクノロジーズ社:現サーモフィッシャー社), 2010年発売の Ion Torrent PGM (ライフテク ノロジーズ社:現サーモフィッシャー社)に生かされている。また、最近では1分子シーケンサ ーとして、PacBio RSII、Sequel (パシフィックバイオサイエンス社)、MinION (オックスフォー ドナノポアテクノロジー社)等の新しい次世代シーケンサーも開発され、これらは前出の次世代 シーケンサーでは難しい数 kb から十数 kb もの長い塩基配列決定が可能になった。ここで述べた 次世代シーケンサーの開発競争は、「2年で性能は2倍になる≒2年でコストは半分になる」とい う IT 技術の進捗予測で知られる "ムーアの法則" を超える勢いでシーケンスにかかるコスト削減 を達成した(Hayden 2014)。2014 年に HiSeq X Ten(イルミナ社)により「1000 ドルゲノム」の 達成が宣言され、この年には「1000ドルゲノムプログラム」は終了したが、このプロジェクトは 最も成功した政策主導による革新的な科学技術開発の一つと言えるだろう。

次世代シーケンサーでは、解析された DNA 断片をリード (read) と呼び、リード数と1リード あたりで決定される塩基数 (リード長)の積が1回のランあたりの出力データ(総読み取り塩基 数)となる。現在最も普及しているイルミナ社の次世代シーケンサーは、DNA 断片の片側の配列 を決定するシングルリード (SR) でのランの場合、リード長 50 bp から 300 bp の DNA 断片を MiSeq で 2500 万個、NextSeq500 で 4 億個、HiSeq2500 で 20 億個も同時に塩基配列決定する能力 を有し、このときそれぞれ最大で 7.5 Gb、60 Gb、500 Gb ものデータを出力する。次世代シーケ ンサーを使って網羅的遺伝子発現解析を行う場合、リファレンスとなるゲノム・遺伝子モデルを 認識できればリード長は 50 bp でも十分で、それよりも1サンプルあたりどれだけのリード数を 利用できるかということが、遺伝子発現の定量性を担保するために重要である。転写物の全領域 をカバーする RNA-Seq においては1サンプルあたり 2000 万 - 4000 万前後のリード数があれば、 網羅的な遺伝子発現解析が可能であると言われている (Sims et al. 2014)。また、1 転写産物から1 断片だけを取り出し遺伝子発現解析を行う Digital Gene Expression (DGE; de Klerk et al. 2014, Nishiyama et al. 2012) や Cap Analysis of Gene Expression (CAGE; Takahashi et al. 2012) においては, 500 万-600 万夕グ前後(1 転写物について1 リードだけ解析する場合、リードの代わりにタグ(tag) と呼ばれる単位を使うことが多い)が、定量に必要と言われている(Xue et al. 2014)。MiSeq, NextSeq500, HiSeq2500 の各シーケンサーの出力リード数と網羅的遺伝子発現解析に必要なリー ド数を考えると、2000 万リードを使う RNA-Seq の場合、それぞれ 1, 20, 100 サンプル分、DGE や CAGE の場合、それぞれ 5, 80, 400 サンプル分の解析が理論上、1回のランで可能である。 このとき、サンプルごとにシーケンスデータを抽出し解析するためには、インデックスと呼ばれ る 6 から 8 塩基の配列をサンプルごとの目印として導入する必要がある。イルミナ社では 96 種類 のインデックスが準備されており、HiSeq2500 を使う場合、インデックスの種類が足りないよう に思われるが、HiSeq2500 の高出力モードで使用されるフローセルは8 レーンに区切られており、 それぞれのレーンの独立性が保たれている。RNA-Seq の場合、1 レーンにあたり 12 サンプル、 DGE や CAGE の場合、50 サンプルの解析を行えることを考えればインデックスの種類は十分で あると考えられる。

RNA-Seq を行うためには、単離した RNA サンプルから、1) mRNA の精製またはリボゾーム RNA の除去、2) RNA の断片化(*必要としない手法もある)、3) cDNA 合成、4) 二本鎖 cDNA 末端の平滑化、5) アダプター配列の付加、6) ライブラリーの増幅等、一連の作業が必要である。 次世代シーケンサーを有するイルミナ社を始め、多くの試薬メーカーが様々な種類の NGS(次世 代シーケンシング)ライブラリー作製キットを販売しており、詳しい情報は、渡辺らの総説を参 考にされたい(渡辺ら、2014)。さらにサンプル調整のハイスループット化、簡便化を進めた Bravo (アジレントテクノロジー社)、Sciclone NGS (パーキンエルマー社)、Biomek Fxp (ベックマン コ ールター社)、Neoprep (イルミナ社) 等、NGS ライブラリー作製が自動化された装置も販売され ている。また、RNA を準備すれば、NGS の受託解析を請負う企業も多数あり、次世代シーケン サーを用いた網羅的遺伝子発現解析については、多くの研究者が行える状況になっていると言え よう。

3.1細胞遺伝子発現解析の歩み

1 細胞における遺伝子発現解析は、1990 年代の始めに DNA ゲルブロットを応用した定量的な 解析が行われ始め(Eberwine et al. 1992),それに続き,RT-PCR を用いた解析が行われた(Sucher & Deitcher 1995)。さらに 1998 年には、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)を用いた解 析により、1 細胞での mRNA 数が計測され、現在も利用されている(Femino et al. 1998)。網羅的 な1 細胞遺伝子発現解析は、当初、マイクロアレイを用いて行われており(Kamme et al. 2003), その後、1 細胞からの cDNA 合成効率が飛躍的に改善された方法が報告され(Kurimoto et al. 2006), この手法をベースに 2009 年には次世代シーケンサーを用いた最初の 1 細胞 RNA-Seq 法が報告さ れた(Tang et al. 2009)。これを発端として網羅的な 1 細胞遺伝子発現解析を利用した研究が急速 に広まった。

4.1細胞遺伝子発現解析手法の開発

これまでに NGS を利用した様々な1 細胞遺伝子発現解析のための手法が開発されてきたが, それは2 つの大きな技術的な問題点を克服することに焦点がおかれていた(Kolodziejczyk et al. 2015)。一つはどうのように1 細胞を単離するか,もう一つは微量の RNA からどのように定量性

M. Kubo- 3

を維持した cDNA を合成するかである。

1 細胞の単離方法は、1) ガラスピペット、マイクロキャピラリーによるマイクロマニピュレ ーション、2) レーザー顕微鏡を用いたレーザーマイクロダイセクション(LMD, LCM)法、最 も広く用いられている方法として、3) セルソーターを用いて細胞特異的マーカーにより細胞を 分取する(Fluorescence-Activated Cell Sorting: FACS)方法がある。コストやスループット、解析 対象となる細胞の種々の条件により、使い分けがなされているのが現状である。また最近では、 3の方法と組み合わせて、油中で微小な水滴を作るエマルジョンを用いて液滴(droplet)内に 1 細胞を封じ込める系や、それらを効率よく行う微小流路(microfluidics)を用いた系も開発された

(Streets et al. 2014)。1 細胞を取得後,当初は PCR チューブや 96 穴プレートで cDNA 作製の作業 を行うためにその反応液が数 µl から数十 µl 必要であったが,液滴や微小流路を用いることで 0.1-数 nl の反応液での cDNA 作製が可能となった。最近では、C1 システム(フリューダイム社)と いう一度に 96 個の細胞を微小流路内に 1 細胞ずつトラップし、cDNA 合成までのステップを自動 化した装置が開発され、精度の高い 1 細胞遺伝子発現解析用サンプルの提供に貢献している

(Shalek et al. 2014, Trapnell et al. 2014, Treutlein et al. 2014)。ただこの実験系を用いるためには、細胞が始めから単細胞の状態で存在するか、組織内にあっても酵素処理などでバラバラに単離できること、流路内を移動できる大きさであることが前提となる。そのため今後は多種多様な細胞からなる組織内に存在し、バラバラに単離できない細胞を1細胞遺伝子発現解析するための技術開発が必要であろう。

もう一つの問題点である微量の RNA からどのように定量性を維持した cDNA を取得するかに ついても様々な方法が取り組まれてきた(Kolodziejczyk et al. 2015)。1 細胞に含まれる total RNA は 5-100 pg と見積もられており、そのうちポリ A の付いた mRNA は 1-2% と言われている。そ のようなごく微量の RNA から次世代シーケンサーを用いて発現量の解析するためには、mRNA を cDNA に逆転写し、二本鎖 DNA にしたのち、増幅する必要がある。最も初期に報告された Tang らの方法では PCR を用いて cDNA 増幅が行われていたが、増幅効率は良いものの、増幅時にプ ライマーによるバイプロダクトの生成が起こり、それが次世代シーケンサーによる解析に影響を 与えることがわかった。そこで、このバイプロダクトが生成しないサプレッション PCR を用いた Quartz-Seq が開発された(Sasagawa et al. 2013)。これらの方法はポリ A を付加すること(polyA tailing)により、増幅用アダプターを取り込むために、5'側が欠損した mRNA も cDNA に変換さ れ,3'端に偏った cDNA が生成される。そこで、完全長 cDNA を解析対象にしたテンプレートス イッチング法を利用した SMART-Seq (Ramsköld et al. 2012) や STRT-Seq (Islam et al. 2011, 2012) が開発された。一方で、PCRでは cDNA の塩基配列によって、増幅効率に偏りがあることが指摘 されていたため(Aird et al. 2011), 塩基配列に依存した増幅バイアスが少ないと考えられている in vitro 転写(IVT)を用いた CEL-Seq (Hashimshony et al. 2012) や MARS-Seq (Jaitin et al. 2014), ϕ29 ポリメラーゼを用いた Multiple Displacement Amplification (MDA) 法 (Pan et al. 2013), Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle (MALBAC) 法 (Chapman et al. 2015) を用いた RNA-Seq も報告されている。

上記の1細胞 RNA-Seq は増幅法を工夫することでそれによって生じる cDNA 増幅バイアスを 減少させることを狙ったものであるが,2012年,次世代シーケンサーの特性と情報処理技術を駆 使して cDNA 増幅バイアスを減少させる手法が報告された(Kivioja et al. 2012)。まず初めに逆転 写時にランダムな塩基配列(Unique Molecular Identifier: UMI)を cDNA 末端に付加し, cDNA を 増幅する。その後,次世代シーケンサーで cDNA 配列に加えて UMI 配列を決定し,同じ UMI 配 列をもった同じ cDNA 配列は一つとして数える。ちなみに 10 塩基からなる UMI 配列は 4 の 10 乗(4¹⁰)種類,すなわち 100 万種類以上あることになる。1 細胞における mRNA の数が数万分子 から 100 万分子程度と考えると,理論上,ある遺伝子から転写された別の mRNA に同じ UMI 配 列が導入される確率はほぼ皆無であることから,異なる UMI を持つリードは別コピーの mRNA 由来とみなすことができ,UMI が何種類あるか数えることによって,mRNA のコピー数,すなわ ち遺伝子発現量を正確に数えることができる。この UMI を導入することで 1 細胞遺伝子発現解析 における技術的なノイズが著しく低減した。さらに cDNA 増幅の前に UMI を導入することさえ できれば,様々な 1 細胞遺伝子発現解析法において応用が可能であることから,上記で紹介した UMI が採用されている MARS-Seq 以外にも,STRT-Seq (Islam et al. 2014), CEL-Seq (Grün et al. 2014) において新たに UMI を採用した手法が報告されている。

どの手法にも一長一短があり、1 細胞遺伝子発現解析で何が知りたいか、解析したい研究で利 用可能かということをよく検討してから実行することが重要である。さらに上述のウェットな実 験系に加えて、取得した NGS データの品質管理(quality control: QC)、技術由来のばらつき (technical noise)の除去・補正、遺伝子発現量に基づいた多変量解析法などドライな実験系の検 討も重要である。これまでに一般的な RNA-Seq で利用されている様々なプログラムや R を利用 したパッケージ等で対応できるものに加えて、1 細胞遺伝子発現解析に特化した計算方法も報告 されており、今後も新しい知見を伴う様々な解析手法が開発されるであろう(Stegle et al. 2015)。

5.1細胞遺伝子発現解析でわかってきたこと

1 細胞遺伝子発現解析で期待されることの一つに細胞種の分類,それらの目印となるマーカー 遺伝子の同定が挙げられる。生体内における組織や器官においては、様々な種類の細胞が含まれ ており、それぞれの役割に応じた特異的な遺伝子発現を示していると考えられる。希少な細胞の 場合、それ自身を集めることが困難である場合が多いため、マーカー遺伝子の同定も難しい。そ こで希少細胞を含む細胞集団から何百、何千個もの細胞をランダムに採取し、それぞれについて 1 細胞遺伝子発現解析を行い、その遺伝子発現データを元に細胞集団を分画し、希少細胞が含ま れる亜集団(subpopulation)を特定する手法が開発された(Grün et al. 2015, Buettner et al. 2015)こ れらにより、"希少細胞の単離が先か、マーカーの同定が先か"という問題は克服され、1 細胞遺 伝子発現解析を元に様々な種類の細胞、細胞特異的マーカー遺伝子の同定が進むことが期待され る。

現状では1細胞につき、ある状況下における1点の遺伝子発現プロファイルを取得することし かできないが、多数の1細胞を時系列に基づいてサンプリングすることで、各細胞の細胞分化や 細胞応答の過程を推定することができるようになった。受精卵から桑状胚の胚発生(Deng et al, 2014)や骨格筋分化誘導の過程(Trapnell et al. 2014)においては、細胞の遷移状態が段階的に進 行することや、異なる発生過程に進む細胞の存在が報告されている。病原体由来のエンドトキシ ン処理により誘導される免疫応答においては、初期にはごく一部の早発性細胞が応答し、その後、 それらの細胞による分泌性シグナルを介して全免疫細胞へ応答反応が広がることが示された

(Shalek et al. 2014)。今後これらのように、時系列に基づいた細胞集団における1細胞遺伝子発 現解析とシミュレーションなどの計算科学を駆使することによって、これまでスナップショット でしか観察ができなかった継時的な生命現象の流れが明らかにされると考えられる。

1細胞 RNA-Seq では個々の細胞の遺伝子発現量のみならず,集団内におけるそれらのばらつき (variance)を計測することで,遺伝子発現の不均一性(heterogeneity)や,ゆらぎ(fluctuation) といった生命現象が明らかになってきた。これらは先に述べた集団内における異なる細胞種の混 在だけでなく,個々の細胞における RNA の転写速度,細胞周期,サーカディアンリズム等に由 来する生命活動のばらつき(biological noise)が原因と考えられる(Kolodziejczyk et al. 2015)。今 後はこれらによる遺伝子発現の不均一性を考慮することで,より高い精度で遺伝子発現解析を行 うことが可能となり,これまで知られていなかった生命現象が解明されていくことが期待される。

6. 植物研究における1細胞遺伝子発現解析

植物においても1細胞レベルの遺伝子発現解析が報告されている。これまでに、マイクロキャ ピラリーで細胞液を抽出し遺伝子発現解析を行った報告がある(Brandt et al. 1999)。また最近、 プロトプラストにしたシロイヌナズナの根の細胞を特定の細胞マーカーを用いてセルソーターで 単離し、1細胞遺伝子発現解析を行った研究が報告された(Efroni et al. 2015)。しかし植物の場合、 1)細胞壁により仕切られた細胞をバラバラにすることが困難な場合があること、2)細胞壁や多 糖類、二次代謝物など RNA の単離に阻害的に作用する物質が多く存在すること、3)細胞内にあ る大きな液胞に蓄積された RNase による RNA の分解が懸念されることなど(Wilkins & Smart 1996)、動物細胞に比べて1細胞遺伝子発現解析を行うためのハードルは高いと考えられ、これら を克服した解析法の開発が今後必要である。

7. 植物細胞のプログラミング機構の解明に向けた1細胞遺伝子発現解析

野菜や樹木,生花などの栽培植物は,種子で増やす代わりに挿し木,葉挿しや種イモなど,植 物体の一部を切り出し,それを育てることでまた元の植物体を生み出すことができる。1950年代 には小さなニンジンのかけらから,1970年代にはたった1細胞から完全な植物体を再生できるこ とが報告されており,植物細胞の持つ分化全能性(totipotency)を明らかにする多くの研究が行わ れてきた(Sugiyama 2015)。被子植物の場合,分化した葉肉細胞などから再生するとき,細胞の 脱分化と呼ばれる過程を経てカルス(細胞塊)を形成する。この過程においては,体細胞が幹細 胞に変化する現象,リプログラミング(幹細胞化)がおこっていると考えられる。この後,ラン ダムに分裂を繰り返したカルス内の一部の細胞が再分化し,茎頂や根などの器官形成を行うが, どの細胞がいつリプログラミングして再分化するかを特定することは困難である。そこで我々は, コケ植物であるヒメツリガネゴケを用いて植物細胞のリプログラミング機構の解明を目指した研 究を行っている。ヒメツリガネゴケは最初に陸上に進出した植物から最も初期に分岐した基部陸 上植物の一種で,ゲノムを含めた遺伝子情報が公開されており,シロイヌナズナやイネ等の被子 植物と比較して形態形成に関わる遺伝子の84%が保存されていることが明らかとなっている (Rensing et al. 2008, Banks et al. 2011)。また,相同組換えを利用した遺伝子ターゲティングも可能であり,誘導的遺伝子発現系など分子生物学を利用した解析手法が充実している(Quatrano et al. 2007, Kubo et al. 2013)。さらに,被子植物に比べて形態がシンプルな構造をしており,茎葉体における葉は一層の細胞層からなる。興味深いことに,ヒメツリガネゴケの茎葉体から葉を切り出すと,切断した切り口に面した葉細胞(体細胞)が細胞分裂を経て,原糸体頂端細胞(幹細胞),原糸体次頂端細胞(体細胞)に同調的に変化する(Ishikawa et al. 2011,石川 2015)。この過程は1細胞レベルで全ての細胞について追跡することができ,かつサンプリングなどの操作が適時可能である。これまでに,この実験系を用いてヒメツリガネゴケ切断葉を継時的にサンプリングし,次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析が行われた(Nishiyama et al. 2012)。その結果,約4000個の遺伝子が切断後から24時間目までに有意に変動していることが分かった。しかし,用いた切断葉にはリプログラミングする細胞としない細胞が混在しているため,得られた遺伝子発現プロファイルはそれらの積算となり,どの細胞由来であるかを特定することは困難であった。

そこで我々は、ヒメツリガネゴケ切断葉からリプログラミングする細胞としない細胞を個別に サンプリングし、1 細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルを取得する方法の開発に取り組んで きた(図1)。1 細胞を取得する方法は、マイクロキャピラリーで細胞液を直接抽出する方法を選 択した。これは、ヒメツリガネゴケの葉細胞は酵素処理等で細胞をバラバラにすることが現時点 で困難であること、細胞間の相互作用が幹細胞化に影響を与えているかどうかを検証するために 細胞の位置情報の取得が重要であることが理由にあげられる。次に、抽出細胞液からの cDNA 調 整法を検討した結果、UMI を導入した polyA tailing を用いた NGS ライブラリー作製法が適してい ることが分かった(図1; Kubo et al. in preparation)。今後この手法により、継時的にヒメツリガネ ゴケ切断葉における葉細胞について1 細胞遺伝子発現解析を行い、リプログラミング関連因子の 同定と、リプログラミング過程における隣接する細胞間相互作用の有無について明らかにしてい く予定である。

3. 今後の展望

これまで1細胞遺伝子発現解析を用いて多くの生命現象が明らかになってきたが、今後はさら に2つの生体情報を取り込んだ解析法が広まると考えられる。一つは上記で述べたように、細胞 の位置情報を加味した1細胞遺伝子発現解析である(Crosetto et al. 2015)。現状では解像度、感度、 解析遺伝子数などで問題はあるが *in situ* での RNA-Seq 法(Lee et al. 2014) や、光活性化 polyA オ リゴを組織内の細胞に導入し、レーザーを照射した細胞からのみ polyA オリゴと結合した mRNA を単離することで位置情報を持った RNA-Seq を行う方法(TIVA; Lovatt et al. 2014)が報告されて いる。細胞の位置情報と1細胞遺伝子発現解析の結果から、隣接する細胞において遺伝子発現量 の相関を計測することにより、細胞間相互作用の情報が得られると考えられ、多細胞体における 高次な組織構築の理解が進むと考えられる。

もう一つは別の網羅的解析(オミクス)を組み合わせた1細胞遺伝子発現解析である。ガン細胞では DNA 配列の変化した細胞が混在していることが知られており、1細胞において DNA と RNA を同時に調べることで、ガン細胞の系譜、増殖率、悪性度など多面的な性質を特定すること が可能となり、効果的な治療法の開発に繋がることが期待される。これまでに1細胞で DNA 配

M. Kubo- 7





列の決定と RNA-Seq を同時に行う手法が報告されている(Dey et al. 2015, Macaulay et al. 2015)。 さらに今後はクロマチン修飾などを解析するエピジェネティクスや代謝産物を解析するメタボロ ミクスを組み合わせた 1 細胞遺伝子発現解析が行われるようになるであろう(Wang & Navin 2015)。

M. Kubo- 8

また私たちは、植物細胞の解析に対応したマイクロキャピラリーを用いた1細胞遺伝子発現解 析法を利用して透明細胞と葉緑細胞が規則正しく配置された葉をもつオオミズゴケにおいて透明 細胞だけを単離し、1細胞遺伝子発現解析を行うことで透明細分化に関わる遺伝子の探索も行っ ている(Terada et al. in preparation)。今後は、この技術を生かし様々な植物において細胞分化、環 境応答について、これまで困難であった1細胞レベルの解析を行うことで、未知の機能や仕組み を明らかにしていきたい。

謝辞

本稿を作成するにあたり、貴重な助言を頂いた倉田哲也博士(東北大)、石川雅樹博士(基礎生物学研究所)、西山智明博士(金沢大)に感謝したい。研究内容の一部については、ERATO 長谷部分全能性進化プロジェクト(JST)、頭脳循環を活性化する若手研究者海外派遣プログラム(JSPS)、FRIAS visiting scientist program(フライブルク大学)、新学術領域「植物発生ロジック」(MEXT)、ヒューマノフィリック科学技術創出研究推進事業(NAIST)、ビッグデータプロジェクト(NAIST)の助成を受けて行われたものである。

引用文献

- Aird, D., Ross, M.G., Chen, W.S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D.B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 12: R18.
- Banks, J.A. *et al.* 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Brandt, S., Kehr, J., Walz, C., Imlau, A., Willmitzer, L., & Fisahn, J. 1999. Technical Advance: A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal mesophyll and companion cells of intact leaves. *Plant J*. 20: 245-250.
- Buettner, F., Natarajan, K.N., Casale, F.P., Proserpio, V., Scialdone, A., Theis, F.J., Teichmann, S.A., Marioni, J.C., & Stegle, O. 2015. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat. Biotechnol.* 33: 155-160.
- Chapman, A.R., He, Z., Lu, S., Yong, J., Tan, L., Tang, F., & Xie, X.S. 2015. Single cell transcriptome amplification with MALBAC. *PLoS One*. 10: e0120889.
- Crosetto, N, Bienko, M., & van Oudenaarden, A. 2015. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev. Genet.* 16: 57-66.
- Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., & Sandberg, R. 2014. Single-cell RNA-seq reveals dynamic random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343: 193-196.
- de Klerk, E., den Dunnen, J.T., & 't Hoen, P.A. 2014. RNA sequencing: from tag-based profiling to resolving complete transcript structure. *Cell Mol. Life Sci.* 71: 3537-3551.
- Dey, S.S., Kester, L., Spanjaard, B., Bienko, M., & van Oudenaarden, A. 2015. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat. Biotechnol.* 33: 285-289.
- Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., Zettel, M., & Coleman, P. 1992. Analy-

sis of gene expression in single live neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3010-3014.

- Efroni, I., Ip, P.L., Nawy, T., Mello, A., & Birnbaum, K.D. 2015. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol.* 16: 9.
- Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., & Singer, R.H. 1998. Visualization of single RNA transcripts in situ. Science 280: 585-590.
- Grün, D., Kester, L., & van Oudenaarden, A. 2014. Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat. Methods*. 11: 637-640.
- Grün, D., Lyubimova, A., Kester, L., Wiebrands, K., Basak, O., Sasaki, N., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. 2015. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature* 525: 251-255.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., & Yanai, I. 2012. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*. 2: 666-673.
- Hayden, E.C. 2014. The \$1000 genome. Nature 57: 294-295.
- 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.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2011. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res*. 21: 1160-1167.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2012. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing. *Nat Protoc*. 7: 813-828.
- Islam, S., Zeisel, A., Joost, S., La Manno, G., Zajac, P., Kasper, M., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2014. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 11: 163-166.
- Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., & Amit, I. 2014. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 343: 776-779.
- Kamme, F., Salunga, R., Yu, J., Tran, D.T., Zhu, J., Luo, L., Bittner, A., Guo, H.Q., Miller, N., Wan, J., & Erlander, M. 2003. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J. Neurosci.* 23: 3607-3615.
- Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K., Bonke, M., Enge, M., Linnarsson, S., & Taipale, J. 2012. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 9: 72-74.
- Kolodziejczyk, A.A., Kim, J.K., Svensson, V., Marioni, J.C., & Teichmann, S.A. 2015. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol. Cell* 58: 610-620.
- Kubo, M., Imai, A., Nishiyama, T., Ishikawa, M., Sato, Y., Kurata, T., Hiwatashi, Y., Reski, R., & Hasebe,
 M. 2013. System for stable β-estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella* patens. *PLoS One*. 8: e77356.

M. Kubo- 10

- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, K.D., Yamada, R.G., Ueda, H.R., & Saitou, M. 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34: e42.
- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Yang, J.L., Ferrante, T.C., Terry, R., Jeanty, S.S., Li, C., Amamoto, R., Peters, D.T., Turczyk, B.M., Marblestone, A.H., Inverso, S.A., Bernard, A., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G.M. 2014. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. Science 343: 1360-1363.
- Lovatt, D., Ruble, B.K., Lee, J., Dueck, H., Kim, T.K., Fisher, S., Francis, C., Spaethling, J.M., Wolf, J.A., Grady, M.S., Ulyanova, A.V., Yeldell, S.B., Griepenburg, J.C., Buckley, P.T., Kim, J., Sul, J.Y., Dmochowski, I.J., & Eberwine, J. 2014. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat. Methods* 11: 190-196.
- Macaulay, I.C., Haerty, W., Kumar, P., Li, Y.I., Hu, T.X., Teng, M.J., Goolam, M., Saurat, N., Coupland, P., Shirley, L.M., Smith, M., Van der Aa, N., Banerjee, R., Ellis, P.D., Quail, M.A., Swerdlow, H.P., Zernicka-Goetz, M., Livesey, F.J., Ponting, C.P., & Voet, T. 2015. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat. Methods* 12: 519-522.
- Nishiyama, T., Miyawaki, K., Ohshima, M., Thompson, K., Nagashima, A., Hasebe, M., & Kurata, T. 2012. Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One*. 7: e36471.
- Pan, X., Durrett, R.E., Zhu, H., Tanaka, Y., Li, Y., Zi, X., Marjani, S.L., Euskirchen, G., Ma, C., Lamotte, R.H., Park, I.H., Snyder, M.P., Mason, C.E., & Weissman, S.M. 2013. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 594-599.
- Quatrano, R.S., McDaniel, S.F., Khandelwal, A., Perroud, P.F., & Cove, D.J. 2007. Physcomitrella patens: mosses enter the genomic age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 182-189.
- Ramsköld, D., Luo, S., Wang, Y. C., Li, R., Deng, Q., Faridani, O.R., Daniels, G.A., Khrebtukova, I., Loring, J.F., Laurent, L.C., Schroth, G.P., & Sandberg, R. 2012. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat. Biotechnol.* 30: 777-782.
- Rensing *et al.* 2008. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Sasagawa, Y., Nikaido, I., Hayashi, T., Danno, H., Uno, K.D., Imai, T., & Ueda, H.R. 2013. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity. *Genome Biol.* 14: R31.
- Schloss, J.A. 2008. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. Nat. Biotechnol. 26: 1113-1115.
- Shalek, A.K., Satija, R., Shuga, J., Trombetta, J.J., Gennert, D., Lu, D., Chen, P., Gertner, R.S., Gaublomme, J.T., Yosef, N., Schwartz, S., Fowler, B., Weaver, S., Wang, J., Wang, X., Ding, R., Raychowdhury, R., Friedman, N., Hacohen, N., Park, H., May, A.P., & Regev, A. 2014. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510: 363-369.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N.E., Heger, A., & Ponting, C.P. 2014. Sequencing depth and coverage: key

M. Kubo- 11

considerations in genomic analyses. Nat. Rev. Genet. 15: 121-132.

- Stegle, O., Teichmann, S.A., & Marioni, J.C. 2015. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 16: 133-145.
- Streets, A.M., Zhang, X., Cao, C., Pang, Y., Wu, X., Xiong, L., Yang, L., Fu, Y., Zhao, L., Tang, F., & Huang, Y. 2014. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 111: 7048-7053.
- Sucher, N.J. & Deitcher, D.L. 1995. PCR and patch-clamp analysis of single neurons. *Neuron* 14: 1095-1100.
- Sugiyama, M. 2015. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. J. Plant Res. 128: 349-359.
- Takahashi, H., Lassmann, T., Murata, M., & Carninci, P. 2012. 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat. Protoc.* 7: 542-561.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., Lao, K., & Surani, M.A. 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods* 6: 377-382.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., & Rinn, J.L. 2014. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol.* 32: 381-386.
- Treutlein, B., Brownfield, D.G., Wu, A.R., Neff, N.F., Mantalas, G.L., Espinoza, F.H., Desai, T. J., Krasnow, M.A., & Quake, S.R. 2014. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509: 371-375.
- Wang, Y. & Navin, N.E. 2015. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol. Cell* 58: 598-609.
- Xue, S., Liu, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Geng, X., & Sun, J. 2013. Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. *PLoS One*. 8: e76718.
- Wilkins, T. & Smart, L. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue. In: Krieg, P.A. (eds.). A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. pp. 21-41. Willy-Liss, Inc. New York.
- 石川雅樹 2015. ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構. BSJ-Review 6:41.
- 宋碩林,一戸敦子,菅野純夫 2010. Series 次 "世代シークエンス技術がもたらす「津波」~世界のゲノムプロジェクトと Personalized Medicine. 第1回 シークエンス技術開発の歴史といま,そして未来.実験医学.28:1442-1448.
- 渡辺亮,田中梓,北野優子,桑原順子 2014. NGS の試薬選択ガイド.二階堂愛(編) 実験医学 別冊.次世代シークエンス解析スタンダード. pp. 18-30. 羊土社.東京.