

研 究 報 告 書

「植物生産能の高度利用に向けた「植物 iPS 遺伝子」の応用展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 中島 敬二

1. 研究のねらい

本研究では、植物細胞を初期化する能力をもつ *RKD4* 遺伝子(植物 iPS 遺伝子)について、初期化メカニズムを解明する学術研究と実用に向けたモデル実験を行い、この遺伝子を植物生産力の活用に用いるための知識と技術基盤を構築する。

再生可能エネルギーの生産手段として、植物の炭酸同化能が不可欠なのは言うまでもない。現在、その原料として用いられているサトウキビなどは、元来、食糧として品種化されたものが使われているが、今後はバイオ燃料用途に特化した品種改良や分子育種が必要になる。また農地外で栽培できる非食糧性の植物(樹木など)で新たな品種を開発する必要性が生じる。さらには有用機能を発現する細胞を分化誘導し、これらを純粋培養する技術も期待される。このような技術を実用化するためには、有用植物を効率的に繁殖させたり、高い生産性をもつ細胞を分化誘導して培養する技術が必須である。

シロイヌナズナの *RKD4* 遺伝子は、RWP-RK という保存されたアミノ酸配列モチーフを持つ推定転写因子をコードし、その相同遺伝子は様々な植物のゲノムに広く見出される。*RKD4* は配偶子や初期胚のみで発現する遺伝子であるが、葉や根などの体細胞で強制発現させると初期胚の性質をもつ細胞塊(以下、初期化細胞塊と呼ぶ)を誘導することができる。その後 *RKD4* の過剰発現を停止させることにより、初期化細胞塊から大量の胚を誘導し、さらに個体にまで再生することができる(Waki et al. *Current Biology*, 2011)。*RKD4* が持つ体細胞リプログラミング機能は iPS 細胞における山中ファクターに類似しており、メディアは我々の成果を「植物 iPS 遺伝子の発見」と報じた。本研究では、*RKD4* によるリプログラミングの分子機構を解明するとともに、機能オルソログ遺伝子を様々な植物から単離しその初期化能を検証する。また *RKD4* の初期化能を強化するための改変を試みる。

2. 研究成果

(1) 概要

まずシロイヌナズナにおいて *RKD* の過剰発現による初期化方法を最適化した。シロイヌナズナの5つの *RKD* 遺伝子 (*RKD1-RKD5*)について、各 100ライン以上の誘導型過剰発現体を作製して解析した結果、*RKD5* 以外の4つの *RKD* 遺伝子に同等の初期化能があることが明らかとなった。次に *RKD4* を用いて導入遺伝子の構造を検討し、高発現株を得るための鍵となる情報が得られた。また *RKD4* の弱い転写活性化能を VP16 由来の転写活性化ドメインで強化することを試みたが、予想に反して初期化能が消失した。*RKD4* による初期化が、単なる標的遺伝子の転写活性化によるものではないことが示唆される。また誘導剤を含む液体培地で直接発芽させて振とう培養することで、高い増殖能をもつ初期化細胞懸濁培養株を簡便に取得する方法を考案した。この系を用いた解析により、初期化に伴うヒストン修飾の変化が明らか

となり、*RKD* による体細胞の初期化にエピジェネティックな制御が関与していることが示唆された。

RKD による体細胞の初期化を他の植物種に応用するため、様々な植物ゲノムで *RKD* 遺伝子を検索したところ、進化系統樹上でコケ植物以降の植物種には、例外なく *RKD* 遺伝子が存在することが明らかとなった。また、維管束植物の *RKD* は3系統に分けることができ、シロイヌナズナでは *RKD1-3*, *RKD4*, *RKD5* がそれぞれ別系統に属していた。シロイヌナズナの *RKD5* は成熟器官でも発現しており、初期化能も示さないことから異なる機能をもつと考えられる。

次にポプラの *RKD* 遺伝子を用いて初期化能を検討した。ポプラゲノムには3つの *RKD* 遺伝子が存在し、うち2つはシロイヌナズナの *RKD4* と同系統(*PtRKD4a*, *PtRKD4b* と命名)、他の1つは *RKD5* と同系統であった。*PtRKD4a* と *PtRKD4b* をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、少数ながら初期化するラインが見られ、*RKD* が植物種を越えた初期化能をもつことが明らかとなった。また *PtRKD4a* と *PtRKD4b* をポプラで過剰発現させることで、根の外植片から効率良く個体を再生できることを示す予備的な結果が得られた。

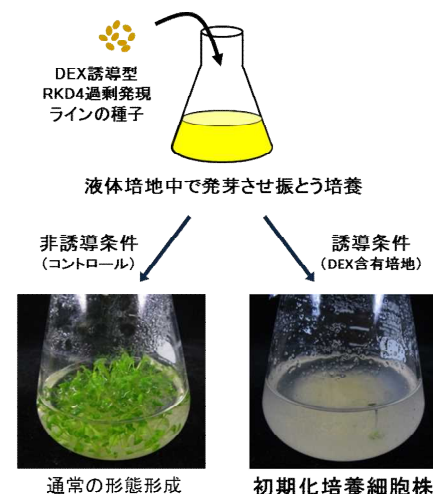
(2) 詳細

研究テーマ A「胚性培養細胞株の樹立と性格付け」

人工ステロイドホルモンであるデキサメタゾン(DEX)の添加により *RKD4* を誘導的に過剰発現するシロイヌナズナ植物を確立した。この植物は DEX を含まない寒天培地では正常に生育し、DEX を含む培地に移すと根や葉から初期胚の性質をもつ細胞塊(初期化細胞塊)を生じる。この細胞塊は DEX を含む培地では初期化状態のまま増殖を続け、DEX を除くことで無数の胚を生じる。この操作を単純化し、滅菌した誘導型過剰発現株の種子を DEX を含む液体培地中で発芽させて振とう培養することで、均質な初期化懸濁培養細胞を誘導することに成功した(右図)。この細胞を DEX を含まない寒天培地上に展開すると胚発生が開始された。この懸濁培養細胞は、少なくとも6か月の継代培養では増殖能を失わないことが明らかとなった。

RKD4 を過剰発現させたシロイヌナズナは初期胚特異的な遺伝子群を発現しており、これが初期化の遺伝的実体であると考えられる。しかし *RKD4* が初期胚特異的な遺伝子発現を活性化する機構は不明である。一般に細胞の初期化にはヒストン修飾を介したクロマチン構造の変化が関与していると考えられているため、*RKD4* の過剰発現で得られた初期化細胞に対し、修飾ヒストンに対する11種類の抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、いくつかのヒストン修飾が大きく変化していることが明らかとなった。

シロイヌナズナゲノムには *RKD1-RKD5* の5つの *RKD* 遺伝子が存在する。*RKD4* 以外の *RKD* 遺伝子が体細胞の初期化能をもつかを確認するため、それぞれの DEX 誘導型過剰発現体を作製した。101-498個の独立な形質転換ラインの根を DEX 誘導した結果、*RKD1-RKD4*



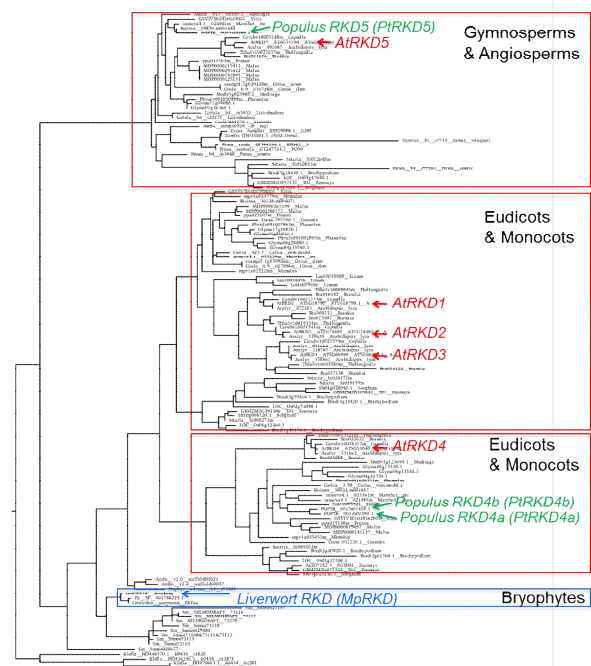
の4遺伝子が同等の初期化能を発現したのに対し、*RKD5*は初期化能を示さなかった。*RKD1*と*RKD2*についてはゲノム上の遺伝子を過剰発現した場合でも同様の結果が得られた(Waki et al. 2013)。*RDK1-RKD4*が卵細胞や初期胚で特異的に発現しているのに対し、*RKD5*は胚発生後の器官においても発現している。以上の結果は、*RKD1-RKD4*が冗長的あるいは協調的に卵細胞の形成や初期胚発生の制御に機能していることを示唆している。

研究テーマ B「*RKD4* タンパク質の高活性化と安定化」

RKD4 タンパク質は核に局在し、アミノ末端ドメインに弱い転写活性化能があることが分かっている。そこで *RKD4* のN末端に VP16 タンパク質由来の強力な転写活性化ドメインを融合させ、初期化能の強化を試みた。VP16-*RKD4* 融合タンパク質を DEX 誘導的に過剰発現する植物を 80 ライン作製したが、期待に反していずれのラインでも DEX 添加による初期化がおこらなかった。この結果は *RKD4* が単純な転写活性化因子ではなく、エピジェネティック制御を含めた複雑な制御により細胞の初期化に機能していることを示唆する。また *RKD4* による初期化効率に導入遺伝子の構造が果たす役割を検討し、高発現株を得るための鍵となる情報が得られた。

研究テーマ C「*RKD4* 機能オルソログの単離と初期化能および個体再生能の解析」

緑藻、コケ、シダ、小葉類、種子植物のゲノム配列から *RKD4* の相同遺伝子を検索したところ、コケ植物以降のすべての種において *RKD* 遺伝子の存在が確認された(右図)。これらの配列をもとに系統樹を作製したところ、シロイヌナズナの *RKD5* とその相同遺伝子群が進化の早い段階で派生したことが示唆された。また *RKD1-RKD3* の3遺伝子とその相同遺伝子群が比較的最近になって重複したことが示唆された。*RKD4* は *RKD1-RKD3* とは独立した系統に位置しており、機能分化が示唆される。これはシロイヌナズナの初期胚や配偶子で特異的に発現している *RKD1-RKD4* のうち、*RKD4* の変異体のみが表現型を示すことと一致する。



バイオマス植物としての利用が期待されるポプラ(*Populus trichocarpa*)のゲノムには、3つの *RKD* 遺伝子が存在し、うち2つはシロイヌナズナの *RKD4* と相同性が高く、他の1つは *RKD5* と相同性が高い。そこでこれらの遺伝子をそれぞれ、*PtRKD4a*, *PtRKD4b*, *PtRKD5* と命名した。*RKD5* はシロイヌナズナにおいて体細胞の初期化能を示さないことから *PtRKD4a* と *PtRKD4b* の2つの遺伝子について機能解析を行うことにした。まず、*PtRKD4a* と *PtRKD4b* を誘導的に過剰発現するシロイヌナズナ植物を作製した。125 または 204 個の独立したラインの根で過剰発現を誘導したところ、*PtRKD4a* では 1.6%、*PtRKD4b* では 12.7%のラインで初期化が見られた。こ

のことからポプラの *RKD4* 遺伝子は種を越えて初期化能を示すことが明らかとなった。

研究テーマ D「ジーンターゲティングへの応用」

種子植物においても、ごく低頻度ながら相同組換えによる T-DNA 挿入が起こる。*RKD4* による初期化細胞を利用すれば大量の細胞を形質転換して個体再生できるため、相同組換えによるジーンターゲティングに応用できる可能性がある。低頻度に得られる相同組換え体を効率的に選抜するため、Terada らの方法(Terada et al. 2002, *Nature Biotechnol.* 20: 1030-1034)を参考にして、ジフテリア毒素の A フラグメントを用いたターゲティングベクターを作製した。また *RKD4* の過剰発現により得られたシロイヌナズナの初期化細胞株が、アグロバクテリウムで形質転換されるかを確かめるため、イントロイン GUS レポーターを発現するベクターを用いて初期化液体培養細胞の形質転換を試みた。しかし複数回の実験にもかかわらず、期待に反して抗生物質耐性をもつ形質転換体が得られなかった。今後は異なるアグロバクテリウム株や抗生物質耐性マーカーを試す必要がある。

3. 今後の展開

上記の研究成果により、*RKD* 遺伝子が植物ゲノムに普遍的に存在し、種を越えて共通した機能を担っていることが示唆される。このことは *RKD* 遺伝子の過剰発現による体細胞の初期化技術を様々な植物に応用できることを意味する。例えばシロイヌナズナの *RKD4* を進化系統の異なる異種植物の初期化に用いることも可能であろう。ただしポプラとシロイヌナズナの間に見られたように異種植物間での初期化効率は決して高くない。同種(または近縁種)の *RKD* 遺伝子をクローニングして用いるのが得策であろう。多くの作物種でゲノム配列が明らかになっている現状にあっては、各植物種の *RKD* 遺伝子を PCR でクローニングすることは容易であり、過剰発現の手段さえあれば様々な植物種において応用展開が可能である。

初期化細胞を用いたジーンターゲティングは、初期化細胞がアグロバクテリウムにより形質転換されない、という予想外の問題により実現していない。また本研究期間の間に CRISPR/Cas9 を用いたゲノムエディット技術が急速に普及したため、相同組換えによるターゲティングの重要性は相対的に低下している。しかし相同組換えにはゲノム上の遺伝子に正確にタグ配列を挿入したり、正確な塩基置換を導入できるなどの利点がある。初期化細胞を形質転換する試みは今後も継続する必要がある。

初期化機構を解明する研究では、ヒストン修飾の変化を介したエピジェネティックな制御が関与している可能性が示唆された。今後はどの遺伝子座のヒストン修飾制御が初期化に関与しているのかを明らかにする必要がある。また *RKD* タンパク質は核に局在するものの、その分子機能は単なる転写活性化ではなく、より複雑なものである可能性が示唆された。*RKD* タンパク質の機能が明らかになれば、分子機能を強化するための戦略を立てることができ、初期化への応用がさらに容易になる。そのためには、まず *RKD* と相互作用するタンパク質やゲノム DNA 上の結合領域を明らかにする必要がある。*RKD* タンパク質は非常に不安定であり、植物細胞を用いたタンパク質機能の解析は長らく困難であった。本研究により *RKD* を高発現させる戦略が明らかになり、この方法を用いることで GFP タグを付加した *RKD4* を安定的に過剰発現する植物が得られた。今後はこの植物を用いた免疫沈降により、標的ゲノム領域や相互作用タンパク質の解明が進むことが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究課題では植物生産能の高度利用に貢献するための技術開発を目的として、*RKD* 遺伝子(植物 iPS 遺伝子)の初期化能を植物の効率的な繁殖や分化誘導に利用するための研究を行った。*RKD* 遺伝子は植物ゲノムに普遍的に存在するにもかかわらず、その機能はこれまで全くと言って良いほど不明であった。本研究において、*RKD* 遺伝子が植物の初期発生過程において進化的に保存された普遍的な機能を持つことが明らかとなった。また1つの *RKD* タンパク質に植物種を越えた初期化能があることや、バイオマス植物の効率的な繁殖に有用であるという結果が得られたことから、当初の目的は概ね達成されたと評価する。*RKD* による初期化は原理的に他の植物種にも応用可能であることから、その社会実装は個別の作物種の形質転換系や誘導的強制発現系の有無に左右される。これらのノウハウをもつ種苗会社などと共同研究を進めることで植物生産能の利用に向けた応用が可能であろう。ただし本技術に限らず遺伝子組換え作物に対する社会的な寛容度が低い我が国にあっては、政策的なバックアップが必要である。まずは培養細胞系を使った有用物質生産や、バイオ燃料・花卉などの非食用作物に応用するのが容易であろう。

初期化細胞株の利用、特にジーンターゲットングについては、CRISPR/Cas9 系が世界的に普及して技術開発の優先順位が低下したことや、初期化細胞の形質転換が当初の想定よりも遥かに難しいことから、当初の目的を達成できなかった。もともと非常にチャレンジングな計画であり、3 年の研究期間では難しかったと思われる。相同組換えによるゲノムエディティングは高度な変異導入が可能であり、実現した場合の利用価値は今でも十分に高い。今後も別予算を得て継続的に挑戦してゆく必要がある。

RKD による初期化機構を解明するための基礎研究では、エピジェネティックな制御系の関与が示唆された。しかし *RKD* タンパク質とエピジェネティック制御系の分子リンクは未解明のままである。動物細胞の初期化においてもヒストン修飾や DNA メチル化を介したエピジェネティック制御が重要であると言われており、動植物に共通の機構が存在するのかもしれない。世界中で研究されている iPS 細胞ですらその生成機構は解明されておらず、細胞の初期化という高度な生命現象を明らかにするには、今後も継続した研究が必要である。

RKD による初期化の分子機構を解明するためには、*RKD* タンパク質の側から分子的なリンクを辿るのが早道と思われる。これまで *RKD* タンパク質の不安定性が研究を進める上で大きな障害になっていたが、本研究を通じて *RKD4*-GFP を高レベルで安定的に発現させる系が樹立できた。これにより、ChIP-seq 解析による標的ゲノム領域の探索や、免疫沈降による植物細胞内での相互作用因子の同定が可能となったことは大きな成果である。既に理化学研究所や奈良先端大植物グローバルとの共同研究を開始しており、近い将来に重要な手がかりが得られることが期待される。

また、本研究を通じて国内外の様々な研究者と共同研究を開始することができた。我が国発の新しいモデル植物であるゼニゴケを利用した共同研究で大きな成果が得られつつあることや、学内シンポジウムの開催を通じての世界の著名な胚発生研究者とのネットワーク作りが出来たこと、バイオマスの利用を目指す生物工学研究者との接点が得られたことは、

研究者にとって本さきがけ研究で得られた大きな成果の1つである。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞を初期化できる遺伝子を用いて、なぜ初期化が起きるのかという基礎研究と、この遺伝子を活用することによって、再分化系の構築が困難といわれる植物種の形質転換系確立への応用技術を開発することを目的に研究が進められた。本研究の中で、「植物 iPS 遺伝子」を用いたシロイヌナズナの培養細胞系が確立され、これによって、胚発生過程における遺伝子発現が詳細に検討できるようになり、初期化機構の一部は明らかになったといえる。また、ポプラについても、この遺伝子による初期化と個体再生について成功している。こうした成果は今後、この方法を用いた形質転換系の確立への道を開いたことになり、科学技術上のインパクトはかなりある。しかし、本技術の汎用性については、まだ初期段階での成果しかなく、今後の実用性は未知数である。

今後、この極めて興味深い遺伝子を用いて、動物でもまだ明らかとなっていないリプログラミング機構の解明という基礎研究について研究が進展することを期待する。さらに、研究課題でいう「植物 iPS 遺伝子」として、多くの植物種でのその実用性について、その有効性と限界を明らかにして欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Waki T., Miyashima, S., Nakanishi, M., Ikeda, Y., Hashimoto, T. and Nakajima, K. "A GAL4-based targeted activation tagging system in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.* 2013, 73(3), 357-367.
2. Miyashima, S., Honda, M., Hashimoto, K., Tatematsu, K., Hashimoto, T., Sato-Nara, K., Okada, K., and Nakajima, K. "A Comprehensive Expression Analysis of the *Arabidopsis* MICRORNA165/6 Gene Family during Embryogenesis Reveals a Conserved Role in Meristem Specification and a Non-cell-autonomous Function." *Plant Cell Physiol.*, 2013, 54(3), 375-384.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- ・ Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi and Keiji Nakajima, "Evolutionarily conserved role of *RKD* gene family in land plant reproduction," *Marchatia IV*, 2013. 12
- ・ 厚井聡, 中島 敬二, "モデル苔類ゼニゴケを用いた初期胚発生に関わる遺伝子の機能解析," 日本蘚苔類学会第 42 回大会, 2013. 8

- ・ 厚井聡, 石崎公庸, 橋本隆, 河内孝之, 中島敬二, “初期胚発生に関わる *RKD4* 遺伝子の祖先的機能の解析,” 日本植物分類学会第 12 回大会, 2013. 3
- ・ Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takashi Hashimoto, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima, “Evolutionary insights into the *RKD* gene function in the development of land plants,” 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013. 3
- ・ Takamitsu Waki, Takeshi Hiki, Ryouhei Watanabe, Tatsuya Ishida, Takashi Hashimoto and Keiji Nakajima, “The Arabidopsis RWP-RK transcription factor *RKD4* regulates embryonic pattern formation upstream of the auxin-dependent organogenesis,” 日本植物生理学会, 2012. 3

著作物

- ・ Hisanaga, T, Miyashima, S. and Nakajima, K., “Small RNAs as positional signal for pattern formation.” *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 37–42 (2014).
- ・ 中島敬二 「植物細胞を初期化する *RKD* 遺伝子の発見－発生研究による鍵遺伝子の同定と応用展開の可能性」 化学と生物 51, 789–791 (2013)

講演

- ・ “Dissecting the maturation and detachment process of Arabidopsis root cap cells” 国際シンポジウム「Front Lines of Plant Cell Wall Research」で講演 2015.3.20 奈良
- ・ “Mechanisms regulating pluripotency and pattern formation in plants” 京都大学大学院 生命科学研究科で講演 2015.1.13 京都
- ・ “Comparative studies of female gametogenesis in land plants” Marchantia Workshop 2014 で招待講演 2014.12.9 神戸
- ・ 奈良先端科学技術大学院大学 公開講座 2014 「植物が創る模様のはなし: 美しいパターンを作る精巧なメカニズム」 一般市民(参加 355 名)向け講演 2014.10.11 奈良
- ・ 「植物の生殖と胚発生における *RKD* 遺伝子ファミリーの機能」 動植物アロ認証班会議で招待講演 H2013.6.2 松江
- ・ “An evolutionarily conserved role of *RKD* gene family in plant embryogenesis and gametogenesis” 2013.12.10 米国デューク大で講演
- ・ “Genetic networks in cell fate specification and differentiation control in the Arabidopsis root” 2013.12. 9 米国ジョージア大で講演
- ・ “Cell signaling in plant tissue patterning” 2013.12. 6 米国カリフォルニア大学デービス校で招待講演

研究者としての飛躍につながった成果

- ・ 科学研究費補助金 新学術領域研究「植物発生ロジックの多元的開拓」(代表、塚谷裕一)に計画研究班員として応募し採択された。(2013. 6)
- ・ 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の独立准教授に応募し採用された。(2013.4.1 付)
- ・ 同上の教授公募に応募し採用された。(2014.4.1 付)

- ・ 奈良先端大未来開拓コロキウム「A New Generation of Plant Embryo Research」の主催（日米欧の著名な研究者を招聘し、植物胚発生をテーマとした国際シンポジウムを開催した。2012. 10. 29）

共同研究

- ・ 河内 孝之 教授（京都大学大学院）
- ・ 石崎 公庸 准教授（神戸大学大学院）
- ・ 嶋村 正樹 准教授（広島大学大学院）
- ・ 金 鍾明 博士、関 原明 博士（理化学研究所）
- ・ 深尾 陽一郎 准教授（奈良先端科学技術大学院大学）
- ・ Dr. Wolfgang Lukowitz (Univ. Georgia, USA)
- ・ Dr. Raju Datla (Plant Biotechnology Institute, Canada)
- ・ Dr. Jose Gutierrez-Marcos (Univ. Warwick, UK)