

研究終了報告書

「低分子化合物から読み解く植物細胞の分化全能性」

研究期間:2020 年 12月～2024年 3月

研究者: 岩瀬 哲

1. 研究のねらい

本研究では、植物の再生現象の基盤となる細胞の分化全能性や多能性発揮の分子メカニズムを低分子化合物を用いて紐解くことを目指した。低分子化合物は、生物の代謝調節のみならず、発生運命や細胞分化を規定する重要因子になる。低分子化合物が生命機能に影響を与える例としては、乳糖・ブドウ糖による転写制御、レチノイン酸によるモルフォゲン分子としてのシグナル伝達、アスコルビン酸による DNA メチル化を介した幹細胞の調節に関与するものなど枚挙に暇がなく、バクテリアから脊椎動物まで様々な作用点に関与する低分子化合物が日進月歩で明らかにされている。近年、天然化合物/非天然化合物のケミカルライブラリーを用いたスクリーニングから、新規阻害剤などが得られ創薬に繋がっている。生命現象をより深く理解し、生物機能を利用するためには DNA、RNA、タンパク質と並び、代謝産物などの低分子化合物をセントラルドグマの一構成員として捉え、生命活動における未知の役割を解き明かすことが今後も重要である。このような考えに基づいて、本研究では植物の再生に影響を与える化合物をケミカルスクリーニングやメタボローム解析によって単離し、それらの組織や胚の再生における役割を明らかにしようとした。得られる知見を応用し、再生が困難な有用植物の組織培養効率を上げる手法の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、植物細胞の分化多能性・全能性発揮に関与する低分子化合物を単離し、その機能解析を行った。また、実用作物に適用して組織培養効率の飛躍的向上を目指した。これを達成するため、1.メタボローム解析およびケミカルスクリーニングによる低分子化合物の単離、2.多能性・全能性発揮における役割の解明、3.実用作物の組織培養系への適用と評価、4.低分子化合物と結合するタンパク質を単離する手法の開発、の4つの課題について研究を進めた。また、5. 将来の研究テーマとなるような挑戦的な解析も進めた。1.の主な成果として、メタボローム解析から7つの化合物を選抜し、その内3つの化合物に再生促進効果があることを確認した。また、ケミカルスクリーニングから再生を促進する化合物として4PBA、aoy-10等を見出した。さらに、傷害ストレスによって植物の再生、導管再形成、自然免疫を司る転写因子 WIND1(原著論文 1)の機能を阻害する化合物として、複数のヒストン修飾阻害剤を見出した。2.の主な成果として、4PBAが植物体内でPAAに変換されてオーキシンとして作用することを明らかにした(原著論文 2)。また、阻害剤の作用点から WIND1 の分子機能としてヒストンのアセチル化/脱アセチル化があることを明らかにし、論文投稿の準備を進めている(Iwase et al., 投稿準備中)。3.の主な成果として、1のアプローチから単離した低分子化合物がナタネの再生を促進することを見出した。4.に関しては、ビオチン-PEG-ターゲットケミ

カル分子を作製し、アビジン磁気ビーズによるタンパク質プルダウン～MS 法を検討し、1 で単離した化合物に結合する可能性のあるタンパク質の選抜に成功した。また、5. に関しては、傷害部位におけるメタボローム解析や、WIND1 に直接結合するタンパク質のプロテオーム解析を進めた(紙面の都合上詳細は割愛する)。本研究では「メタボローム解析およびケミカルスクリーニングから、分化多能性・全能性発揮を促進する2種類以上の化合物を単離し、その分子機構を明らかにする。また、ナタネ等の難形質転換作物に適用し、組織培養効率を高める。」という大目標を掲げたが、この目標はおおむね達成された。

(2) 詳細

1.メタボローム解析およびケミカルスクリーニングによる低分子化合物の単離

まず、ナタネの WIND1 発現誘導株を用いて、茎葉の再生と根の再生の両方が起きる誘導剤添加試験区において、経時的なメタボローム解析(CE-MS および GC-MS)を行い、WIND1 誘導時のみに増減する代謝産物を PCA 解析と実際の蓄積量に基づいて選抜した。この中から特に多能性獲得(WIND1 誘導)組織で顕著に蓄積する7つの化合物(以下、頭文字をとって CAPPAGO と表記)に着目した。

ケミカルスクリーニングにおいては、多能性発揮評価としてシロイヌナズナ胚軸からの根や茎葉の再分化系を、分化全能性発揮評価として WIND1 転写因子の発現誘導株を用いた体細胞胚誘導系を用いた。私たちがはじめとする国内外のこれまでの研究から、クロマチンのヒストン修飾が多能性・全能性発揮を制御する知見が蓄積しているため、特にヒストン修飾酵素の阻害剤に着目したスクリーニングを行った。88 種類のケミカルから、一次スクリーニングを行い、絞り込まれた 56 種類のケミカルについて多能性発揮への影響評価と全能性発揮への影響評価を行ったところ、カルス形成や茎葉、根の再生を促進、または抑制する効果を有する化合物は 51 種類であった。このうち、応用上特に重要と考えられる、茎葉の再生を促進するケミカルは 5 種類であった。最も顕著に茎葉再生効果を示したのは、動物分野でヒストンデアセチラーゼ(HDAC)として用いられる 4-Phenylbutyric acid (4PBA)であった。全能性発揮の評価系からは、MB3(ヒストンアセチル化阻害剤)や Class I HDAC 阻害剤などが、体細胞胚誘導阻害作用があることを見出した。また、領域内共同研究として、村上慧博士(関西学院大学)が作製した 32 種類のケミカルを用いたスクリーニングも行い、不定胚誘導促進効果を示すケミカルを 1 種類(aoy-10)単離した。

2.多能性・全能性発揮における役割の解明

CAPPAGO の 7 種類の化合物をそれぞれ 50 μ M または 200 μ M の濃度で培地に添加することで、両方の濃度においてシロイヌナズナの胚軸切片からの組織再生が促進することを発見した。植物ホルモンを加えない培地では根の再生が、茎葉再生に適した植物ホルモン添加培地においては茎葉が、さらに根再生に適したホルモン添加培地においては根の再生を阻害せずに茎葉の再生が促進することを見出した。CAPPAGO のうち、どの化合物が組織再生に重要であるかを調べるために、培地に添加する化合物の組み合わせを変えて検証した所、シロイヌナズナの胚軸切片における再生促進現象においては、このうち一種類のアミノ酸が特に有効であり、オーキシン存在下でサイトカイニンへの応答を阻害する働きがあることが判明した。

4PBA は、植物ホルモンを含まない培地においてもシロイヌナズナの胚軸切片をカルス化し、カルスを誘導するための培地組成では茎葉を再生させる作用があることを見出した。種々の遺伝学、生化学的手法を用いて解析を進めたところ、この化合物がオーキシシン応答を高めていることが明らかになった。実際、4PBA は天然オーキシシンの一種である Phenylacetic acid (PAA) に植物体内で変換されていた。4PBA は、少なくともウェスタンブロットで検出できるレベルにおいては HDAC 阻害剤としての効果が無いことも明らかになった。また、4PBA→PAA の植物体内での化学変換は、ペルオキシソームの β 酸化経路非依存的に進むことも示唆された(原著論文 2)。

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤や、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) の阻害剤がどのように WIND1 依存的な体細胞胚誘導を阻害するかについて検討した。種々の検討から、WIND1 タンパク質がヒストンデアセチラーゼ (HDAC) そのものや、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) との複合体形成を仲介する ADA2 タンパク質と直接結合することが分かった。また WIND1 タンパク質のどこにこれらのタンパク質が結合するか検討した。Y2H システムと CoIP 実験で N 末を欠如させた分子を用いたところ、HDAC の一つである HDA9 や ADA2a タンパク質は、それぞれ WIND1 の N 末に保存されているドメインに結合することが明らかとなった。さらに、このドメインの保存アミノ酸 (L や S) をアラニン (A) に置換した分子でも、HDA9 や ADA2a との結合が弱まることから CoIP 実験によって示されたことから、HDA9 や ADA2 は競合的に WIND1 に作用することが明らかとなった。また、これらのタンパク質が結合する N 末を欠損した分子や、保存配列にアミノ酸置換を入れた分子をシロイヌナズナで発現させると、カルス化がみられなくなったことから、WIND1 の N 末の保存配列がカルス化誘導の機能に重要であることも示された。WIND1 発現誘導後の植物体におけるヒストンアセチル化レベルを ChIP-seq 法でゲノムワイドに捉えたところ、予想通りヒストンアセチル化レベルが減少する領域と逆に増加する領域が多数あることを見出された。アセチル化が減少する領域には、光合成関連遺伝子、茎葉のアイデンティティを決定する遺伝子、細胞周期に関する遺伝子が見出された。一方、アセチル化が増加する領域には細胞リプログラミングや体細胞胚の重要因子をコードする遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の発現は、WIND1 遺伝子の発現と連動しており、アセチル化レベルが下がる遺伝子は発現レベルも下がり、逆にアセチル化レベルが上がる遺伝子は発現レベルも上がる挙動を示した。阻害剤を添加した際には、それぞれ遺伝子発現の抑制または脱抑制が起こることも確認できた。これらのデータから、WIND1 による植物体からの体細胞胚誘導 (分化全能性発揮) 現象において、WIND1-HDAC 複合体と WIND1-ADA2-HAT 複合体が、ターゲット遺伝子の発現をエピジェネティックに制御することによって、組織アイデンティティの喪失や新しい発生運命の獲得に寄与していることが明らかとなった(Iwase et al., 投稿準備中)。

aoy-10 の作用点に関して、全能性発揮の促進効果があることからヒストンタンパク質の化学修飾に影響を与えている可能性を疑った。ケミカルを処理してから 24 時間後のシロイヌナズナにおけるヒストン化学修飾を WB によって確かめた。H3、H3K9/14Ac、H3K27Ac、H3K4me3、H3K27me3 についてそれぞれ検討したが、aoy-10 には WB 検出レベルでは、これらのヒストン修飾に影響を与えないことがわかった。

3.実用作物の組織培養系への適用と評価

CAPPAGO の再生促進効果について、WIND1 誘導系を用いたナタネの再生系における評価を行った。この結果、CAPPAGO(200 μ M)を含む培地では、コントロールの CAPPAGO を含まない培地と比較して、組織片のカルス化や茎葉の再生が顕著に促進することが観察された。この効果が、シロイヌナズナと同様に一種類のアミノ酸が主体であるのかどうかについての検討は未実施である。また、aoy-10 に関しても、ナタネを用いて再生効率への影響を評価した。WIND1 発現誘導体では、ホルモンの添加なしにナタネの胚軸切片からのカルス化や茎葉および根の再生が見られる。この系に aoy-10 を添加したが、特に再生効率を高めるという結果は得られなかった。

4.低分子化合物と結合するタンパク質を単離する手法の開発

研究提案時当初は種々の方法を試したが、ビオチン化合物におけるプルダウン法による解析が簡便かつ良好に進んだことから、主にこの手法の開発と解析に注力した。この手法および 5 に記述する Halo Tag 法は矢崎潤史博士（理研 IMS、摂南大学）と川島祐介博士（かずさ DNA 研究所）の協力の元で進めた。タンパク質の同定には、質量分析法による高深度かつ定量生に優れた DIA (Data independent acquisition) プロテオーム解析を採用した。CAPPAGO を用いた組織培養から選抜されてきた 2 つの候補化合物についてビオチン化合物を作製し、アビジン磁気ビーズを用いて傷害時や再生時における発現タンパク質をプルダウンし、LC-MS/MS 法を用いて濃縮されてくるタンパク質を網羅的に解析した。注目した化合物に結合する候補タンパク質として、2 回の独立したプルダウンアッセイから、ベイトにした分子/コントロール分子の比が 2 倍以上のタンパク質がそれぞれ 641、766 個検出され、その交わりは 90 個であった。フィッシャーの正確確率検定では、 p 値は 2.2×10^{-16} と極めて小さく、オッズ比も 6.2 倍となり 1 回目、2 回目のデータの交わりは統計的に有意であることが示された。この 90 個の中には、サイトカニン応答の本丸と言いきべき複数の因子が含まれていた。これら、サイトカイニンのシグナル経路の重要因子に関して、バリデーション実験として化合物-候補タンパク質の 1:1 のプルダウンアッセイを行なった。しかしながら、注目した化合物をもたないコントロールビーズにおいても、注目した化合物ビーズと同様に候補タンパク質が濃縮してきたことから、これらは IP-MS 解析での偽陽性であった可能性が示された。注目した化合物の組織培養への効果は繰り返し再現性がとれていることや、その作用点がサイトカニン応答であることが組織培養を用いた実験から明らかになっているため、引き続き注目した化合物の作用点がサイトカニン応答系のタンパク質であるという仮説は棄却せずに研究を進めていく予定である。

3. 今後の展開

阻害剤を用いたスクリーニングを端緒として、WIND1 転写因子のヒストンアセチル化修飾改変機能が明らかとなった。また、将来を見据えた挑戦的な研究から WIND1 転写因子の別のヒストン修飾作用も見えてきた。一つの転写因子が、このように多岐にわたるヒストン修飾変化を制御するという報告は、動物分野を含めてこれまでに存在しない。N 末を欠損した WIND1 は、転写因子とし

での機能を保持していることも分かっているため、今後は、WIND1 のヒストン改変機能と転写因子としての機能が、どのように植物細胞の全能性発揮で使い分けられているのか、特に時空間的な解析に注力したい。また、植物の再生現象の深淵を覗くために、本さがけ領域で新しく繋がることができた森貴裕博士(東京大学)と注目しているタンパク質の構造解析に取り組む予定である。また、ヒストン修飾因子結合ドメインの詳細な機能解析によって、このドメイン機能が応用展開可能であろう。例えば、このドメインに結合するヒストン修飾因子の制御ができれば、遺伝子発現のオン・オフをクロマチンレベルで制御できる新しい技術が今後 3 年、5 年というスパンで開発できるかもしれない。

本研究において選抜されてきた低分子化合物について、植物再生における役割に関する解析を今後も続けていく。いずれも機能解析を進めることで多次元にわたる全能性発揮制御機構が明らかになるのではないかと期待している。これまで、植物細胞の全能性・多能性発揮の分子メカニズムの解明をめざす私たちの研究や国内外の研究から、再生現象には様々な律速段階・因子が存在することが見えてきた。作用点の異なる、複数の化合物を組み合わせることで、あらゆる植物種にも適応可能な再生誘導剤の開発が可能であると考えている。今後としては、これまで単離している化合物の組み合わせの検討や、実用作物への適用をすすめていく。このような狙いに関心を示してくれている企業があり、基礎研究レベルでの共同研究を開始している。

4. 自己評価

本研究の大目標として「メタボローム解析およびケミカルスクリーニングから、分化多能性・全能性発揮を促進する 2 種類以上の化合物を単離し、その分子機構を明らかにする。また、ナタネ等の難形質転換作物に適用し、組織培養効率を高める。」を掲げたが、上記の通り、この目標はおおむね達成できたと考えている。しかし、本研究の提案時には、ナタネ以外にも、ダイズ、チャ、イネ等において、本研究から選抜してきたケミカルを単独で、または複数を混合して組織培養系に添加し、再生効率の評価を行うことを企画したが、結局はナタネ以外での検討はできなかった。これは、うまく共同研究先を決定できなかったことが原因であり、本研究の大きな反省点の一つである。しかし、ケミカルや遺伝子の利用については企業との基礎レベルの共同研究がスタートしており、近く実用作物での効果が次々と明らかになると期待している。現在得られている様々な研究シーズについて、さがけ研究で新しく生まれた研究者ネットワークも活用していくことによって、難再生作物における簡便で普遍的な組織培養法技術が創出できると確信している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 11件

1. Akira Iwase*, Yuki Kondo, Anuphon Laohavisit, Arika Takebayashi, Momoko Ikeuchi, Keita Matsuoka, Masashi Asahina, Nobutaka Mitsuda, Ken Shirasu, Hiroo Fukuda, Keiko Sugimoto* (2021) WIND transcription factors orchestrate wound-induced callus formation, vascular reconnection and defense response in Arabidopsis. New Phytologist 232, 734-752.

本論文では、転写因子 WIND1 がカルス形成のみならず、接木部位での導管再形成や、病原

菌への抵抗性(自然免疫)にも関与することを明らかにした。

2. Akira Iwase*, Arika Takebayashi Yuki Aoi, David S Favero, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Hiroyuki Kasahara, Keiko Sugimoto* (2022) 4-phenylbutyric acid promotes plant regeneration as an auxin by being converted to phenylacetic acid via an IBR3-independent pathway. Plant Biotechnology 39, 51-58.

本論文では、組織培養系を用いたケミカルスクリーニングにより、4-phenylbutyric acid がオーキシンとして植物の再生を促進することを明らかにした。この際、植物細胞内で天然オーキシンの一つである PAA に変換されていることを見出した。

3. Momoko Ikeuchi, Akira Iwase, Tasuku Ito, Hayato Tanaka, David S Favero, Ayako Kawamura, Shingo Sakamoto, Mayumi Wakazaki, Toshiaki Tameshige, Haruki Fujii, Naoki Hashimoto, Takamasa Suzuki, Kazuhiro Hotta, Kiminori Toyooka, Nobutaka Mitsuda, Keiko Sugimoto (2021) Wound-inducible WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 13 is required for callus growth and organ reconnection. Plant Physiology 188, 425-441.

本論文では、転写因子 WOX13 が WIND1 の下流因子として傷害部位でのカルス形成や接木部位の癒着に関与することを明らかにした。

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	
2	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

(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)

1. 低分子化合物から読み解く植物細胞の分化全能性

岩瀬 哲 第 65 回 日本植物生理学会年会 2024 年 3 月 17 日

2. Molecular mechanisms how WIND1 promotes cell fate change in plant regeneration.

Akira Iwase, Plant Stem Cell Biology 2023 年 11 月 18 日

3. Meristem Engineering by Transcription Factors.
Akira Iwase, The 15th International Association For Plant Biotechnology Congress (IAPB)
2023 年 8 月 8 日
4. Plant regeneration triggered by wounding.
Akira Iwase, International Webinar Series on Plant Stem Cells 2022 年 6 月 24 日
5. WIND1 regulates both histone acetylation/deacetylation in the phase shift of somatic embryogenesis Akira Iwase, Cold Spring Harbor Asia, Integrative Epigenetics in Plants
2022 年 12 月 13 日

(著作物)

- 1 大人のための生物学の教科書 最新の知識を本質的に理解する
石川 香, 岩瀬 哲, 相馬 融 講談社 (ブルーバックス) 2023 年 ISBN:4065333652