

総 説

植物の組織培養におけるシュート形成の分子機構

坂野 弘美

中部大学応用生物学部環境生物科学科

要 旨

組織培養による器官再生の研究は1950年代からの長い歴史を持つが、その分子機構についてはほとんどわかっていない。近年、分子生物学のめざましい発達により、その分子機構を解明する手がかりが見つかり始めてきている。1つはシュート形成に中心的な役割を果たす植物ホルモンであるサイトカイニンのシグナル伝達機構の解明である。それにより、サイトカイニンのシグナル伝達はヒスチジン-アスパラギン酸リン酸リレーにより伝達されと考えられるようになった。また、シュート形成の開始の制御に関係する遺伝子 ESR1 が同定されている。ESR1 は転写制御因子をコードしており、下流の遺伝子の転写制御によりシュート形成の開始を制御していると考えられる。これらの研究成果により、今後、シュート再生の分子機構が明らかになっていくものと期待される。

キーワード：His-Asp リン酸リレー、器官再生、サイトカイニン、シュート形成

はじめに

組織培養による器官再生は植物の発生分化の分子機構を解明するためのモデル実験系となり得る。1950年代に Skoog と Miller が植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンのバランスが器官再生を支配している (Skoog and Miller, 1957) ことを見いだして以来、多くの研究者がさまざまな植物種の組織培養系において器官再生の生理学的な研究を行ってきたが、その分子機構についてはほとんどわかっていない。ここでは、近年、シュート (植物の茎と葉は共通の分裂組織から生じることから、茎と葉をまとめてシュートと呼ぶ) 形成の分子機構について、遺伝学的あるいは分子生物学的な研究から明らかにされつつある知見について紹介する。

1 組織培養における器官形成

組織培養における器官形成は植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンの濃度比に依存している (Reinert and Bajaj, 1977)。すなわち、オーキシンの濃度がサイトカイニンの濃度に対して高いと、細胞は根に分化し、逆にサイトカイニンの濃度が高いとシュートに分化する。中

間の濃度比では、未分化な細胞塊であるカルスを形成する。細胞のこれらのホルモンに対する反応性は培養中に変化するが、この事は、組織培養における器官形成は、細胞の状態が変化する多段階のステップにより起こることを示している。

Christiansonらは、ヒルガオのシュート形成において、オーキシンとサイトカイニンに対する細胞の反応性が変化するタイミングを詳細に調べた (Christianson and Warnick, 1983, Christianson and Warnick, 1984, Christianson and Warnick, 1985)。その結果、シュート形成は3つのステップから成り立っていることを見いだした。第1ステップでは、細胞は脱分化し器官再分化能獲得する。第2ステップではシュート形成の開始が決定され、第3ステップでシュートの形態形成が起こる。これらのステップではそれぞれ異なるホルモンバランスを持つ培地が要求される。一般に、第1ステップはカルス誘導培地 (callus inducing medium; CIM) で培養することにより誘導される (Hicks, 1994, Sugiyama, 1999)。第2ステップはシュート誘導培地 (shoot inducing medium; SIM) で誘導され

る。ここで根誘導培地 (root inducing medium; RIM) で培養すると根の形成が起こる。第2ステップでシュート形成の開始が決定されると、その後のシュート形成はオーキシンやサイトカイニンを要求しないし、植物細胞の生存自体に影響を与えない範囲で、それらのホルモンの影響を受けない。

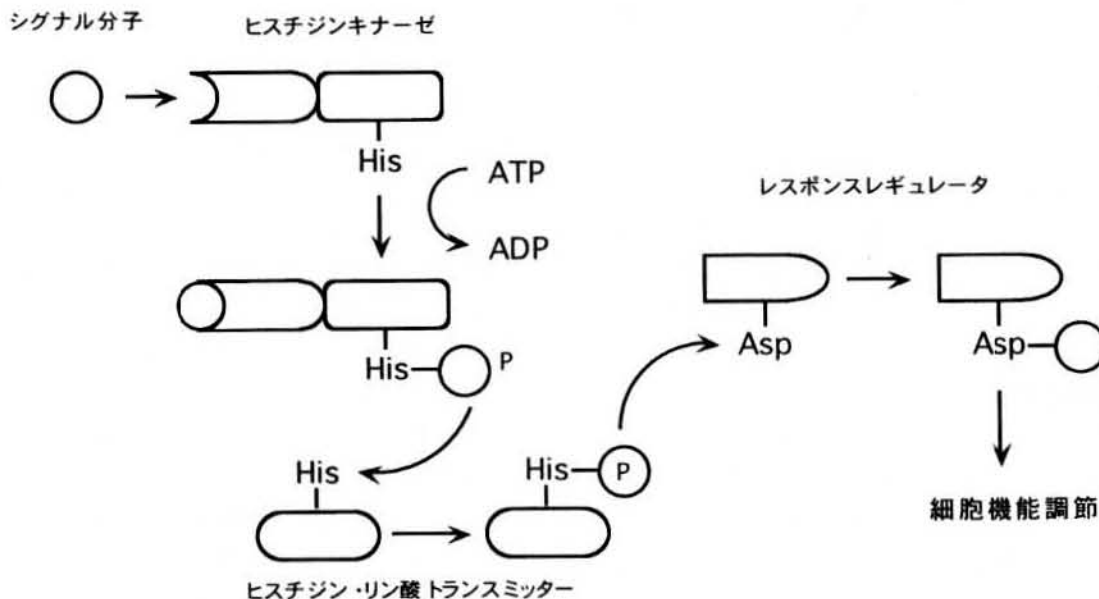
2 サイトカイニンのシグナル伝達機構

シュート形成にはサイトカイニンが中心的な役割を果たすが、近年、サイトカイニンの細胞内シグナル伝達機構が明らかになってきた。シロイヌナズナ *CRE1/AHK4/WOL* は様々な生物種で知られているヒスチジーン-アスパラギン酸リン酸リレー (第1図) のセンサータンパクであるヒスチジンキナーゼをコードしている (Inoue et al., 2001, Mahonen et al., 2000, Ueguchi et al., 2001)。ヒスチジーン-アスパラギン酸リン酸リレーとは、ヒスチジン基からアスパラギン酸基のリン酸転移のリレーにより行われるシグナル伝達系で、バクテリアから酵母、高等植物に至るまで、様々な生物種に存在することが知られている。*CRE1/AHK4/WOL* 遺伝子に変異を持つ植物体はサイトカイニン非感受性になることがわかった (Inoue et al., 2001, Ueguchi et al., 2001)。実際、酵母で *CRE1/AHK4/WOL* を発現させた実験から、*CRE1/AHK4/WOL* 産物はサイトカイニンを認

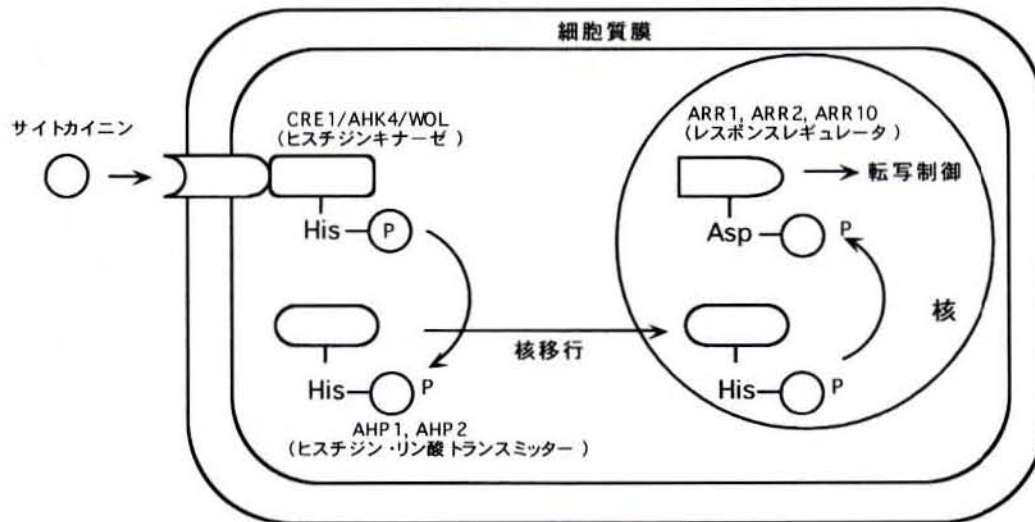
識し、細胞内にシグナルを伝えるレセプターであることが示された。シロイヌナズナ *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* はレスポンスレギュレータで、DNA 結合領域を持っている。サイトカイニンシグナルはこれらのレスポンスレギュレータを活性化し、活性化されたレスポンスレギュレータがサイトカイニン応答遺伝子群の転写を活性化すると考えられる (Hwang and Sheen, 2001, Sakai et al., 2001)。AHP1, AHP2, AHP3 はヒスチジン・リン酸トランスミッター様タンパク質であるが、サイトカイニンの刺激により、細胞質から核に移行することが示されている (Hwang and Sheen, 2001, Suzuki et al., 2000, Suzuki et al., 2001)。おそらく、これらのヒスチジン・リン酸トランスミッターが、細胞膜上の *CRE1* により認識されたサイトカイニンシグナルを受け取り、核内の *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* にシグナルを伝え、これらの転写制御因子が最終的に下流遺伝子の転写を活性化するのであろう (第2図)。このように、サイトカイニンシグナルはヒスチジーン-アスパラギン酸リン酸リレーにより細胞内で伝達されていると考えられる。

3 シュート再生に欠損がある突然変異株

Yasutani らは、シロイヌナズナの組織培養において、シュート再生に欠損がある温度感受性突然変異株, *srd1*, *srd2*, *srd3* を同定した (Yasutani et al., 1994)。その後の解析により、



第1図 ヒスチジーン-アスパラギン酸リン酸リレーの模式図

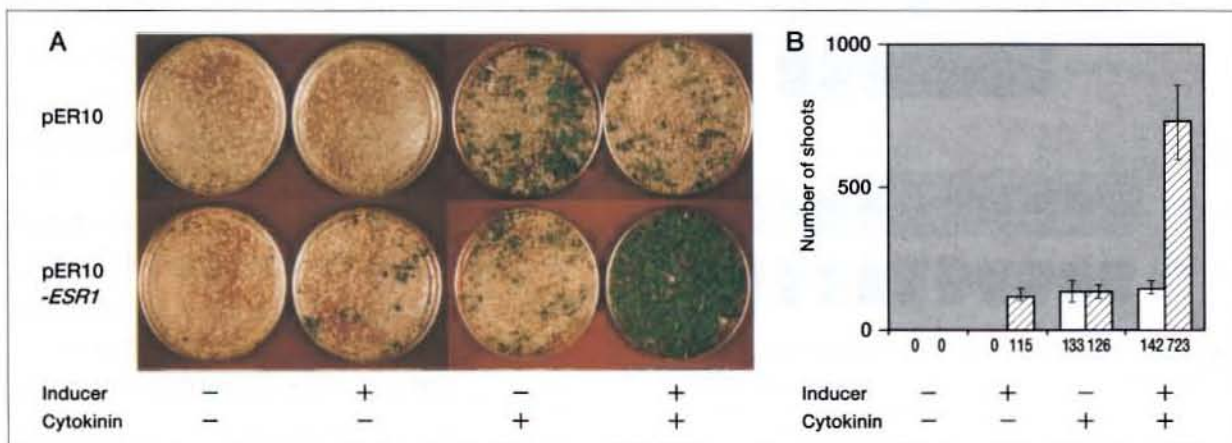


第2図 サイトカイニンシグナル伝達の模式図

シュート再生においてそれらの原因遺伝子が機能するタイミングが明らかとなった (Ozawa et al., 1998). *SRD1* は緑色カルスからシュート形成が起こる段階で必要とされ、シュートの形態形成に機能していると考えられる。*SRD2* の機能は再分化能の獲得に必要とされると同時に、シュートの形態形成にも要求される。*SRD3* は再分化能を獲得した後に必要で、シュート形成の開始に関与していると考えられている。これらの結果は、組織培養における生理学的な解析により得られていた、シュート形成は他段階の生理反応により起こるという知見を遺伝学的に裏付けた。さらなる分子生物学的な解析を行うためには、これらの変異の原因遺伝子のクローニングが待たれる。

4 強制発現によりシュート形成を誘導する遺伝子 *ESR1*

一般に、組織培養におけるシュート形成は培地中にサイトカイニンを絶対的に要求し、サイトカイニンなしではシュート形成は起こらない。このことを利用して、Banno らは強制発現によりサイトカイニンなしでシュート形成を誘導させる遺伝子、*ESR1* を同定した (Banno et al., 2001). cDNA 発現ベクターにシュート形成過程のシロイヌナズナ組織から調整した mRNA 由来の cDNA を組み込み、アグロバクテリウムを介して、CIM で数日間培養したシロイヌナズナの培養根に形質転換した。その培養根をサイトカイニンを含まない培地で培養したところ、2週間後に濃緑色のカルスが形成された。



(A) シロイヌナズナの培養根にそれぞれのベクターをアグロバクテリウムを介して形質転換し、サイトカイニン非存在下 (Cytokinin-) あるいは存在下 (Cytokinin+)、発現誘導剤非存在下 (Inducer-) あるいは発現誘導剤存在下 (Inducer+) で4週間培養した。pER10はベクターのみ、pER10-*ESR1*は*ESR1*を組み込んだベクターを示している。

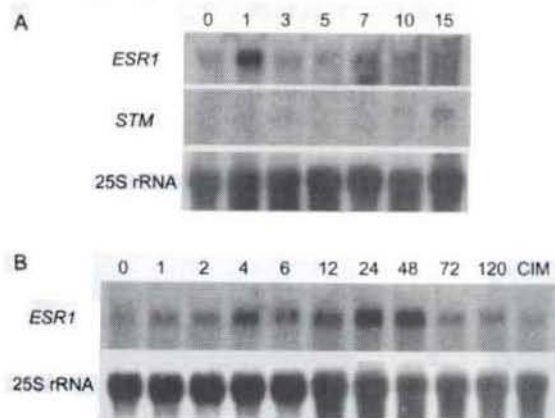
(B) Aの結果を定量化した、生重量0.1gあたりから得られたシュートの数を示している。白の棒グラフはpER10、斜線の棒グラフはpER10-*ESR1*を示している。

第3図 *ESR1* の強制発現のシュート形成効率に対する効果

この濃緑色カルスから cDNA を回収し、その cDNA の由来となった遺伝子を *ESR1* (*Enhancer of Shoot Regeneration 1*) と名付けた。この濃緑色カルスは正常なシュートを形成しないが、*ESR1* を発現誘導ベクターに組み込み、CIM で処理した培養根にアグロバクテリウムを介して形質転換し、一過的に *ESR1* の発現を誘導するとサイトカイニンなしでも正常なシュートを形成した(第3図)。さらに、サイトカイニン存在下で *ESR1* を一過的に強制発現させると発現を誘導しない場合と比較して、シュート形成効率を約6倍に上昇させた。*ESR1* の強制発現のシュート形成効率に対する効果は、サイトカイニン非存在下に比べて、サイトカイニン存在下の方がはるかに強く、サイトカイニンと *ESR1* の強制発現は、シュート形成に対して相乗的に働いているようだ。*ESR1* の強制発現の効果は、シュート形成に特異的であり、カルス形成や根形成には影響を与えない。これらのことから、*ESR1* の機能はシュート形成の制御に関わっていると推定された。

5 *ESR1* のシュート形成における機能

ESR1 のシュート形成の過程における発現パターンを調べたところ、*ESR1* はCIM からSIM に移した直後に一過的に発現し、その発現は3日後には見られなくなった(第4図)。茎頂分裂

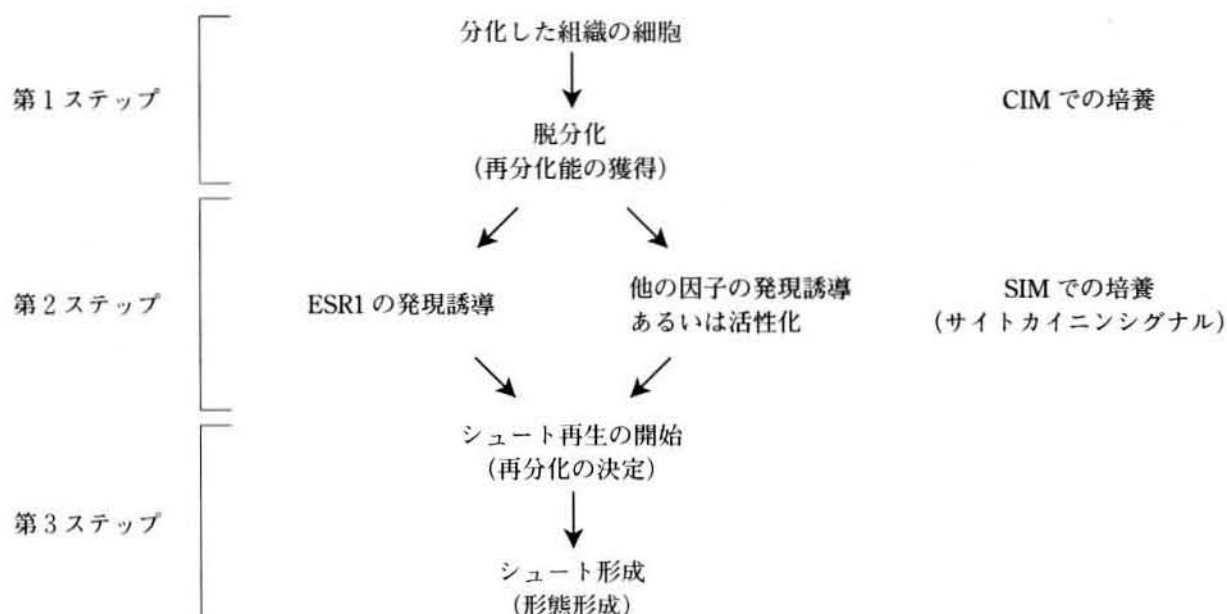


(A) シュート形成過程の組織から全 RNA を抽出し、RNA ブロットングを行った。上の数字は、CIM から SIM に移した後の日数を示している。ESR1、STM、25SrRNA はそれぞれのプローブを示している。
(B) A の詳細なタイムコース。上の数字は CIM から SIM に移した後の時間を示している。CIM は CIM から新しい CIM に移した 24 時間後の発現パターンを示している。

第4図 シュート形成の過程における *ESR1* の発現パターン

組織形成に必要な *STM* 遺伝子 (Endrizzi et al., 1996) の発現が確認されるのが 10 日目以降であることを考えると、*ESR1* の発現はシュートの形態形成が起こる以前であると考えられる。さらに、*ESR1* の SIM 処理による発現誘導は CIM で前処理されていることが必要である。すなわち、*ESR1* の発現誘導は再分化能を獲得した後でないと起こらないことがわかった。また、SIM での培養による *ESR1* の発現誘導は、SIM に含まれるサイトカイニンによって引き起こされることが明らかにされた。

ESR1 を定常的に強制発現させると正常なシュートを形成できず、濃緑色の不定芽の塊となる。また、*ESR1* を定常的に強制発現させる形質転換体を作製したところ、地上部は濃緑色のカルスを形成し、正常な葉や茎を作らなかった。このことは、*ESR1* の定常的な発現はシュートの形態形成を強く阻害することを示している。*ESR1* のシュート形成に対する効果と *ESR1* の発現パターン、さらに、*ESR1* がシュートの形態形成には必要とされないことを考え合わせると、*ESR1* の作用点は、細胞が再分化能を獲得した後であり、シュートの形態形成の前である。すなわち、*ESR1* はシュート形成の開始に関係していると考えられる(第5図)。*ESR1* の発現がサイトカイニンによって誘導されることを考えると、*ESR1* はサイトカイニンシグナル伝達系の下流で機能していると考えられる。しかし、サイトカイニン非存在下では、*ESR1* を強制発現させても、シュート形成効率はサイトカイニン存在下と比べてはるかに低い。したがって、サイトカイニンシグナルの下流で *ESR1* 以外の因子も必要とされるようである。*ESR1* は AP2/EREBP ドメイン (Riechmann and Meyerowitz, 1998) を持つ転写制御因子をコードしており(第6図)、下流の遺伝子の転写制御によりシュート形成の開始を指令すると推定される。*ESR1* はサイトカイニンにより発現が誘導されるが、その発現誘導のピークはサイトカイニン刺激を与えてから 24 時間から 48 時間と遅く、サイトカイニンシグナルの 1 次伝達系の転写制御因子 ARR1, ARR2, ARR10 の直接のターゲットであるとは考えにくい。また、*ESR1* の強制発現とサイトカイニンのシュート形成に対する効果は相乗的で、ヒスチジニアスパラ



第5図 シュート形成機構の模式図

A

MEKALRNFTSTHSPDPNPLTKFFTEPTASPVSRNRKLSSKDTTVTIAGA	50
GSSTTRYRGVRRRPWGRYAAEIRDPMSEKERRWLGTFDTAEQAACAYDSAA	100
RAFRGAKARTNFTYPTAVIMPEPRFSFSNKKSSPSARCPLPSLPLDSSTQ	150
NFYGAPAAQRIYNTQSIFLRDASCSSRKTTPYNNNSFNGSSSSYSASKTAC	200
VSYSSENNNESFFPEESDGTGLLQEVVQEFLLKKNRGVPPSPPTPPPVTSH	250
HDNSGYFSALTIYSENMVQETKETLSSKLDYGNFQANDDGVRVADGGL	300
SLGSNEWGYQEMLMYGTQLGCTCRRSWG	328

B

54	TTTRYRGVRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PMSEKERRWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	ESR1
24	EVHYRGVRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PGCKSRVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	EREBP3
22	EITRYRGVRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PGCKTRVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	AtERF4
77	KNVYRGVRRRPW	CKWAAEIRD	-----	PRKGVVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	AtEBP
52	KFRYRGVRRRPW	CKWAAEIRD	-----	PRKTRVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	ABI4
281	TSQYRGVTRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PGCKSRVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	AINTEGUMENTA
129	SSQYRGVTRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PGCKSRVWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	APETALA2
17	GTRFLGVRRRPW	GRYAAEIRD	-----	PMSEKERRWLGTFDTAEQAACAYDSAA	RAFRGAKARTNFTY	LEAFY PETIOLE

- (A) ESR1 タンパク質の全アミノ酸配列。右の数字はアミノ酸番号を示している。AP/EREBPドメインは下線で示されている。
- (B) ESR1 と他のAP/EREBPタンパク質のアミノ酸配列の比較。同一のアミノ酸は黒のボックスで囲まれている。左の数字はアミノ酸番号を示す。

第6図 ESR1 と他の AP2/EREBP タンパク質のアミノ酸配列の比較

ギン酸リン酸リレーによるシグナル伝達から、シュート形成の開始の決定に至るまでには高次の複雑なシグナル伝達のネットワークが存在しているようだ。

まとめ

組織培養におけるシュート形成は長年にわたる研究から生理学的な知見は多く蓄積されてい

たが、その分子機構についてはブラックボックスとなっていた。サイトカニンシグナル伝達機構に関するめざましい研究成果は、サイトカニンシグナルの結果としておこるシュート形成の制御機構の研究にも大きな進展をもたらすとであろう。ESR1 遺伝子の機能解析の結果はこれまで生理学的な研究から得られていた、シュート形成の過程は3つのステップからなると

いう仮説を分子生物学的に裏付けた。今後は、*ESR1* の発現誘導機構や転写制御因子としての *ESR1* のターゲット遺伝子を検索することにより、サイトカイニンシグナルからシュート形成に至る分子機構が明らかになると期待される。組織培養によるシュート形成はほとんどの植物から形質転換を得る際の第1ステップであるが、再生効率の低さから形質転換体を得られない植物種も少なくない。シュート形成の分子機構の解明は、シュート形成効率を上げる手がかりを得ることになると期待され、基礎生物学だけでなく、応用面でも重要である。

引用文献

- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q. W., and Chua, N. H. 2001. Overexpression of Arabidopsis *ESR1* Induces Initiation of Shoot Regeneration. *Plant Cell* 13: 2609-18.
- Christianson, M. L., and Warnick, D. A. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288-93.
- Christianson, M. L., and Warnick, D. A. 1984. Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis. *Dev Biol* 101: 382-90.
- Christianson, M. L., and Warnick, D. A. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. *Dev Biol* 112: 494-97.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z., and Laux, T. 1996. The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 10: 967-79.
- Hicks, G. S. 1994. Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In vitro Cell Dev. Biol.* 30: 10-15.
- Hwang, I., and Sheen, J. 2001. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-9.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409: 1060-3.
- Mahonen, A. P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P. N., and Helariutta, Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev* 14: 2938-43.
- Ozawa, S., Yasutani, I., Fukuda, H., Komamine, A., and Sugiyama, M. 1998. Organogenic responses in tissue culture of *srd* mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* 125: 135-42.
- Reinert, J., and Bajaj, Y. P. S. 1977. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (New York: Springer-Verlag).
- Riechmann, J. L., and Meyerowitz, E. M. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* 379: 633-46.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. 2001. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* 294: 1519-21.
- Skoog, F., and Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-140.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis in vitro. *Curr Opin Plant Biol* 2: 61-4.

Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. 2000. Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2486-9.

Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., and Mizuno, T. 2001. Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 37-45.

Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T., and Mizuno, T. 2001. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 231-5.

Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., and Tabata, S. 2001. The AHK4 Gene Involved in the Cytokinin-Signaling Pathway as a Direct Receptor Molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 751-5.

Yasutani, I., Ozawa, S., Nishida, T., Sugiyama, M., and Komamine, A. 1994. Isolation of Temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the redifferentiation of shoots. *Plant Physiol* 105: 815-822.

Title : Molecular mechanism of shoot regeneration in plant tissue culture.

Author : Hiroharu Banno (Dept. of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology)

Keywords : Organ regeneration, shoot formation, cytokinin, His-Asp phosphorelay.