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

わが国の生命科学分野における昨年度最大のニュースは、京都大学の山中伸弥教授がノーベル生理・医学賞を受賞したことであろう。いまさら言うまでもないことであるが、山中教授らの偉大な業績は、動物細胞の分化した細胞（体細胞）を初期化して「分化多能性（pluripotency）」をもつiPS細胞を樹立したことである。iPS細胞からは、移植用の組織や疾患モデル細胞を試験管内で誘導できるだけでなく、機能的な臓器を作ることにも可能になっており、再生医療や創薬に革命をもたらす大発明である。

実は40代半ばの筆者にとって、「分化多能性」と言えばiPS細胞よりも植物のカルスである。これは筆者が植物を専門にするためではなく、少なくとも同世代以上の方に共通の認識ではないかと思う。制御因子の多重導入という高度な技術で作られるiPS細胞と異なり、植物のカルスはサイトカイニンとオーキシンという植物ホルモンを含む培地上で植物の組織切片を培養するという実に素朴な方法で作製される。この方法は30年以上も前に確立しており、現在でも組換え作物の作製に欠かすことのできない技術である。

それでは、なぜオーキシンやサイトカイニンを与えると植物細胞が多能性を獲得するのだろうか？ また、そもそもカルスは植物の体細胞が初期化されたものののだろうか？ 実はこれらの問いに対する答えが明らかになり始めたのは、ごく最近のことに過ぎない。2010年にMeyerowitzらのグループは、少なくともシロイヌナズナのカルス誘導には、根の内鞘細胞から側根（主根から枝分かれする根）の原基が形成される際に働く遺伝的プログラムが使われていることを報告した⁽¹⁾。内鞘細胞は維管束を取り囲む細胞層であり、もともと潜在的な幹細胞性を有している。植物体の地上部にも根の内鞘細胞と同等の細胞層が存在し、カルスはこれらの細胞の分裂が活性化されて生じると考えられる⁽¹⁾。また、2006年にHowellらのグループは、シロイヌナズナのカルス誘導や再分化の過程におけるトランスクリプトームを報告している⁽²⁾。このデータをHaradaとGoldbergらのグループが発表した胚のトランスクリプトームデータ⁽³⁾と比較してみると、カルスの誘導時には胚性マーカー遺伝子

はほとんど発現していないことがわかる。さらにシロイヌナズナに限らず、カルスの再分化で生じるのはシュートや根であり、胚そのものは形成されない（図1A）。これらの事実は、カルスが体細胞の初期化によって生じた細胞ではないことを示している。それでは、植物においても遺伝子導入によってiPS細胞のような初期化細胞を誘導できるのだろうか？

筆者らの研究グループは、シロイヌナズナの根の発生制御因子をスクリーニングする過程で、偶然にも植物の体細胞を初期化する遺伝子を発見した^(4,5)。ここで用いたのはアクティベーションタギング法と呼ばれ、ゲノム上の遺伝子をランダムに過剰発現させた変異体のプールから興味のあるラインを単離し、その形質をもとに過剰発現した遺伝子の機能を推定する手法である。ただし発生制御因子を全身で過剰発現させると変異体自体が致死になる恐れがあるため、根だけで過剰発現するように工夫した系を用いてスクリーニングが行われた⁽⁴⁾。そして、このスクリーニングで得られた変異体のなかに、根の細胞分裂が異常に亢進するラインが2つ見いだされた。これらの変異体では、それぞれ*RKD1*と*RKD2*と名づけられた機能未知の遺伝子が過剰発現しており、それらが根の細胞分化を亢進させた原因であることが突き止められた⁽⁴⁾。

*RKD1*と*RKD2*は、RWPxRKというアミノ酸配列モチーフをもつ植物特有のタンパク質をコードしており、核移行シグナルをもつことから転写因子と推定されている。*RKD*遺伝子ファミリーは植物界に広く存在するが、いずれも生物学的機能は明らかでなかった。やや近縁のタンパク質をコードするマメ科植物の*NIN*遺伝子は共生窒素固定細菌による根粒形成に必要な植物側因子の一つであり、シロイヌナズナの*NLP7*は窒素同化酵素群の発現を制御する転写因子と考えられている。また、相同性は低いものの、藻類の相同タンパク質が配偶子の性決定に機能することが報告されている。

シロイヌナズナのゲノムに存在する5つの*RKD*遺伝子（*RKD1*-*RKD5*）について破壊株を解析したところ、*RKD4*破壊株の胚の大部分が受精後すぐに成長を停止していることが明らかとなった。これは*RKD4*が正常

図1 ■ カルス誘導と *RKD4* による初期化の比較

(A) カルス誘導. 切断した組織切片をオーキシンとサイトカイニンを含む培地上で培養するとカルスが生じる. カルスは胚性マーカー遺伝子をほとんど発現しておらず, 再分化して得られるのはシュートや根である. (B) *RKD4* 遺伝子の過剰発現による初期化と胚発生. 発芽後の芽生えで *RKD4* の過剰発現を誘導すると, 若い葉や根端に細胞塊が生じる. この細胞塊は多数の初期胚特異的のマーカー遺伝子が発現している. *RKD4* の過剰発現を停止させると, この細胞塊から無数の胚が形成される.

な胚発生の進行に必須の因子であることを示す⁽⁵⁾. また, *RKD4* はシロイヌナズナの生活環で受精卵から初期胚にかけてのごく短期間だけに発現していた. これらの観察結果は, *RKD4* が胚発生の進行を調節する重要な制御因子であることを示している. 一方, *RKD4* を条件的に過剰発現する植物ラインを作製し, 通常は胚のみで発現する *RKD4* を芽生えで誘導的に過剰発現させると, 本来は初期胚で特異的に発現する遺伝子群の発現が誘導された⁽⁵⁾. また *RKD4* を過剰発現させたまま放置すると, 根端や若い葉の細胞分裂が活性化され細胞塊が形成された (図1B). 次に *RKD4* の過剰発現を停止させると, この細胞塊から無数の胚が形成された (図1B). これらの結果から, *RKD4* が植物の胚性を制御する重要な因子であり, その過剰発現によって体細胞を初期胚に似た状態へリセットできることが明らかとなった⁽⁵⁾. これはES細胞で高発現している制御因子を用いて体細胞からiPS細胞を作製するのと類似した手法である. iPS細胞では, DNAのメチル化やヒストンタンパク質の修飾など, 塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が多能性の獲得に寄与していることが示唆されている⁽⁶⁾. *RKD4* が植物細胞を初期化するメカニズムについては今後の解析を待たなければならないが, iPS細胞と同様に何らかのエピジェネティックな制

御機構を介している可能性が考えられる.

またRKDファミリーに属するほかのタンパク質群も, *RKD4* と同様の初期化能をもつ可能性がある. Bäumleinらのグループは, コムギの卵細胞で *RKD* 遺伝子が高発現していることを見いだした⁽⁷⁾. さらに *RKD1* と *RKD2* を過剰発現させたシロイヌナズナの細胞は, 卵細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示すことを報告している⁽⁷⁾. また, われわれと同時期にLukowitzらのグループが順遺伝学的手法で *RKD4* (彼らは *GRD* 遺伝子と名づけている) を同定し, *RKD4/GRD* 遺伝子の発現が, 受精前の卵細胞ですでに開始されていることを報告している⁽⁸⁾. このことは, *RKD4* の必要性は受精後の胚で顕在化するものの, 胚発生に必要な細胞の初期化は受精前の卵細胞ですでに確立しており, その過程にRKDタンパク質が機能している可能性を示唆する.

植物では, 強制発現により胚を誘導する遺伝子が過去にも報告されているが, *RKD4* がこれらの遺伝子と異なる点は, *RKD4* はあくまでも体細胞を初期胚へリセットするだけで, 過剰発現させたままだと初期胚以降には進まないことである. このような機能を利用して, 希少植物や生長の遅い樹木などから初期化細胞株を樹立し, 必要に応じて大量のクローン個体を迅速に生産することができるかもしれない. また, カルス化や再分化が

困難な植物種では、形質転換体を作出するのに特殊な技術や膨大な労力が必要である。もし *RKD4* や相同遺伝子を用いてひとたび再分化可能な細胞ラインが確立されれば、あとはそのラインを用いて容易に形質転換体を作り出すことができるかもしれない。

- 1) K. Sugimoto, Y. Jiao & E. M. Meyerowitz: *Dev. Cell*, **18**, 463 (2011).
- 2) P. Che, S. Lall, D. Nettleton & S. H. Howell: *Plant Physiology*, **141**, 620 (2006).
- 3) B. H. Le, C. Cheng, A. Q. Bui, J. A. Wagmaister, K. F. Henry, J. Pelletier, L. Kwong, M. Belmonte, R. Kirkbride, S. Horvath, G. N. Drews, R. L. Fischer, J. K. Okamuro, J. J. Harada & R. B. Goldberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8063 (2010).
- 4) T. Waki, S. Miyashima, M. Nakanishi, Y. Ikeda, T. Hashimoto & K. Nakajima: *Plant J.*, **73**, 357 (2013).
- 5) T. Waki, T. Hiki, R. Watanabe, T. Hashimoto & K. Nakajima: *Curr. Biol.*, **21**, 1277 (2011).
- 6) K. Hochedlinger & K. Plath: *Development*, **136**, 509

(2009).

- 7) D. Koszegi, A.J. Johnston, T. Rutten, A. Czihal, L. Altschmied, J. Kumlehn, S. E. Wust, O. Kirioukhova, J. Gheyselinck, U. Grossniklaus & H. Baumlein: *Plant J.*, **67**, 280 (2011).
- 8) S. Jeong, T. M. Palmer & W. Lukowitz: *Curr. Biol.*, **21**, 1268 (2011).

(中島敬二, 奈良先端科学技術大学院大学, 科学技術振興機構さがけ)

プロフィール

中島 敬二 (Keiji NAKAJIMA)

＜略歴＞1993年京都大学大学院農学研究科修士課程修了／1997年京都大学博士（農学）／奈良先端科学技術大学院大学助手／ニューヨーク大学ポスドク／奈良先端科学技術大学院大学准教授＜研究テーマと抱負＞植物発生制御，細胞間情報伝達，リプログラミング