

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月14日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870036

研究課題名（和文） 分化細胞から全能性幹細胞へのリプログラミング過程における
低分子RNAの機能の解明研究課題名（英文） Functional analysis of small RNA in the reprogramming process
from differentiated cells to pluripotent stem cells

研究代表者

玉田 洋介 (TAMADA YOSUKE)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：50579290

研究成果の概要（和文）：

我々がかつて、ヒメツリガネゴケのリプログラミング過程において、低分子 RNA の発現がグローバルに減少することを見いだした。この現象に関与する因子の探索の過程で、マイクロRNA (miRNA) の成熟抑制に機能すると推測される PpCSP に着目した。PpCSP をコードする遺伝子群の四重欠失株を作出したところ、リプログラミングの遅延を観察した。また、PpCSP が細胞質基質に局在することを明らかにした。以上の結果から、PpCSP は細胞質基質における miRNA 成熟の抑制を通じてリプログラミングを促進するという仮説を立て、PpCSP の相互作用因子や下流遺伝子の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：

We had found that expression of small RNAs is globally reduced during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*. We hypothesized that PpCSP proteins are involved in this process. PpCSP is presumed to function in the repression of the microRNA (miRNA) maturation. Here we found that PpCSP was localized in cytosol, and a PpCSP lesion caused attenuated reprogramming. These data suggest that PpCSP facilitates reprogramming through repressing the miRNA maturation in cytosol. To verify this hypothesis, we have performed the functional analyses of PpCSP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：植物エピジェネティクス

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：リプログラミング、幹細胞、低分子RNA、ヒメツリガネゴケ

1. 研究開始当初の背景

分化した細胞が脱分化し、多能性や全能性を獲得する現象はリプログラミングと呼ばれる。我々はコケ植物のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用いて、体細胞リプログラミングを制御する分子機構を研究してきた。ヒメツリガネゴケでは、分化した葉を切断し栄養培地上に静置するだけで切断面の細胞を効率よく多能性幹細胞に誘導することができるため、リプログラミングの過

程を精度よく解析できる (Ishikawa et al., 2012, *Plant Cell* Vol. 23)。また、ヒメツリガネゴケはドラフトゲノム配列の解析が終了しており (Rensing et al., 2008, *Science*, Vol. 319)、さらに陸上植物で最も容易に遺伝子ターゲット法を行うことができることから (Schaefer & Zryd, 1997, *Plant J* Vol. 11)、オミクス解析や逆遺伝学解析に適した生物材料でもある。

次世代シーケンサー SOLiD を用いて得ら

れたリプログラミング過程における低分子 RNA (sRNA) の発現プロファイルを解析した結果、リプログラミングの過程で 21 ヌクレオチド (21-nt) の sRNA の発現がグローバルに減少することを見いだした。21-nt の sRNA の多くはマイクロ RNA (miRNA) である。miRNA は相補配列を有する mRNA に結合し、その mRNA の分解を誘導することで転写後の発現抑制に関与する。私は分化細胞においてこれら miRNA を含む 21-nt の sRNA がリプログラミングを抑制しており、その発現がグローバルに減少することがリプログラミングに必須のステップなのではないかと考えた。

2. 研究の目的

以上の結果を受けて、本研究では「(1) sRNA のグローバルな発現減少を引き起こす因子」および「(2) リプログラミングを抑制する個別の sRNA とその標的遺伝子」を明らかにすることで、低分子 RNA のグローバルな発現減少がリプログラミングに必須であるか否かを検証し、リプログラミングを制御する分子機構の一端を解明することを目的とした。

(1) sRNA の発現がグローバルに減少するためには、sRNA の生合成に関与する因子群 (e.g. Mallory et al., 2008, *Curr Opin Plant Biol* Vol. 11) の機能が低下するか、分解に関与する因子群 (e.g. Houseley & Tollervey, 2009, *Cell* Vol. 136) の機能が上昇することが必要であると考えられる。トランスクリプトーム解析の結果から (Nishiyama et al., 2012, *PLoS One* Vol. 7) これらの遺伝子の発現がリプログラミング過程でどう変化しているのかを調査したところ、sRNA の分解酵素をコードする *P. patens Enhanced RNAi 1 (PpER1)*、*P. patens Small RNA Degrading Nuclease (PpSDN)* 両遺伝子の発現がリプログラミング過程で上昇していることを発見した。ER1 は二本鎖 sRNA、SDN は一本鎖 sRNA の分解に広く機能していると考えられており (Kennedy et al., 2004, *Nature* Vol. 427; Ramachandran & Chen, 2008, *Science* Vol. 321)、両遺伝子の発現が上昇することで低分子 RNA の蓄積がグローバルに減少することは十分考えられる。

また研究の過程で、sRNA のグローバルな発現減少を介してリプログラミング促進に機能するその他の因子として、*P. patens COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN (PpCSP)* に着目した。前任者により、PpCSP の発現がリプログラミング過程で上昇すること、PpCSP の過剰発現株ではリプログラミングが促進することが明らかにされ、PpCSP がリプログラミング促進因子であることが示唆されていた。PpCSP 遺伝子は動物 *Lin28* 遺伝子のホモログであり、RNA 結合タンパク質を

コードする。動物 *Lin28* は誘導多能性幹細胞 (iPS) 因子の一つであり、分化促進に機能する miRNA *let-7* の成熟を抑制することでリプログラミングの促進に機能する (総説を参照; Viswanathan & Daley, 2010, *Cell* Vol. 140)。しかしながら、*let-7* は植物には保存されておらず、PpCSP の標的 miRNA はまだ分かっていない。私は、PpCSP が大部分の miRNA の成熟の抑制に機能しており、PpCSP の発現により miRNA の蓄積がグローバルに減少することでリプログラミングが促進するのではないかと考えた。

以上の結果から、切断葉の細胞において PpCSP が miRNA 成熟を抑制し、PpER1、PpSDN が sRNA 分解を促進することで、sRNA の発現がグローバルに減少し、リプログラミングが促進するという仮説を立てた。本研究ではまず、これらの因子の機能解析を行うことで、この仮説を検証しようと試みた。

(2) リプログラミングを抑制する sRNA とその標的遺伝子を単離するため、リプログラミング過程において極端に発現が減少する sRNA に注目した。それらの sRNA の標的 mRNA の候補を *in silico* 解析によりリストアップし、その中からトランスクリプトーム解析 (Nishiyama et al., 2012, *PLoS One* Vol. 7) で実際に sRNA と逆の発現パターンをとっている遺伝子を選抜した。その過程で、新規の sRNA (ppt-miR9131 と命名) と、その標的としてリプログラミング過程で発現が上昇する *PpFAS1* 遺伝子を見つけた。*PpFAS1* 遺伝子は他のモデル生物において幹細胞の維持や分化に関与する *FASCIATA1 (FAS1)/Chromatin assembly factor 1* のオースログであり (e.g. Kaya et al., 2001, *Cell* Vol. 104)、リプログラミング過程における幹細胞形成にも何らかの機能を果たしていると考えられた。本研究では、まず *PpFAS1* 遺伝子がリプログラミングに機能しているかどうかを解明しようと試みた。

3. 研究の方法

PpER1、*PpSDN*、*PpFAS1* 遺伝子に関しては、遺伝子欠失株および過剰発現株を作出し、リプログラミングの表現型を観察しようと試みた。

PpCSP 遺伝子に関しては、遺伝子欠失株を作出し、リプログラミングの表現型を観察した。前任者によって、PpCSP は *PpCSP1*、*PpCSP2*、*PpCSP3a*、*PpCSP3b* の 4 遺伝子によってコードされること、単一の遺伝子欠失株では表現型が観察されないことが明らかにされており、*PpCSP1 PpCSP2 PpCSP3b* の三重突然変異体までが作成されていたため、それをもとに本研究では *PpCSP1 PpCSP2 PpCSP3a PpCSP3b* の四重変異体を作成して、

表現型を観察した。また、*PpCSP1* 遺伝子の終止コドンの直前に黄色蛍光タンパク質をコードする *CITRINE* 遺伝子を導入した *PpCSP1-CITRINE* 形質転換株における蛍光をスピニングディスク式共焦点顕微鏡を用いて観察することで、*PpCSP1* の細胞内局在を観察した。

PpCSP1 の相互作用タンパク質を単離するため、*PpCSP1-CITRINE* 形質転換株と *CITRINE* タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降法を行い、得られたタンパク質複合体を液体クロマトグラフィーで分画して、MALDI 質量分析法 (LC-MALDI/MS 法) により解析した。ネガティブコントロールとして *EF1 α _{ppro}:CITRINE* 形質転換株を用いて同様の実験を行い、*PpCSP1-CITRINE* 形質転換株を用いた実験のみで検出されたタンパク質を *PpCSP1* の相互作用相手とした。LC-MALDI/MS 法は名古屋大学との共同研究により行った。

さらに、次世代シーケンサー-SOLiD を用いた cDNA の 5' 領域の大規模シーケンシングによるデジタル遺伝子発現解析によって (Nishiyama et al., 2012, PLoS One Vol. 7)、リプログラミング過程における野生株と *PpCSP* 過剰発現株の発現プロファイル比較を行い、*PpCSP* が発現に寄与する遺伝子を単離しようと試みた。

4. 研究成果

まず、ヒメツリガネゴケから *ERI1*、*SDN* をコードする遺伝子を単離するため、線虫 *Eri1*、シロイヌナズナ *SDN1* (Kennedy et al., 2004, Nature Vol. 427; Ramachandran & Chen, 2008, Science Vol. 321) のアミノ酸配列を用いて BLAST サーチを行った。その結果、ヒメツリガネゴケから *Eri1* をコードすると推測される 1 遺伝子を単離し、*PpERI1* と名付けた。アミノ酸配列を用いた系統解析から、この遺伝子が線虫 *Eri1* のオルソログであることを確認した。また、ヒメツリガネゴケゲノムには *SDN* をコードすると推測される遺伝子が 3 つ存在した。BLAST サーチにおける e-value が高い順に、それぞれ *PpSDN1-3* と名付け、アミノ酸配列を用いた系統解析を行った。その結果、*PpSDN3* のみが sRNA の分解に機能するシロイヌナズナ *SDN1-4* と同様な関係にあり、*PpSDN1, 2* は RNA 分解酵素をコードすると考えられる機能未知のシロイヌナズナ *SDN5* のオルソログであった。*PpSDN1, 2* が sRNA の分解に機能する可能性はあるが、まずは *PpSDN3* に注目して解析を行った。また、*ppt-miR9131* の標的遺伝子候補として得られた、シロイヌナズナ *FAS1* と高い配列類似性を示す *PpFAS1* についても、アミノ酸配列を用いた BLAST サーチおよび系統解析を行った結果、*PpFAS1* がヒメツリガ

ネゴケにおける *FAS1* の唯一のオルソログであることを明らかにした。

PpERI1、*PpSDN3*、*PpFAS1* について、遺伝子欠失株、*EF1 α* プロモーターを用いた過剰発現株、エストロジェン誘導発現株の作出を試みた。遺伝子欠失株、エストロジェン誘導株については遺伝子導入が起きたことを示す抗生物質耐性株を 50 株以上取得し、そのうち数株について PCR で遺伝子導入を確認できた。遺伝子欠失株については、これら数株についてゲノミックサザン解析、発現解析によってさらに遺伝子欠失を確認した。*PpSDN3*、*PpFAS1* 遺伝子欠失株候補については、標的遺伝子だけに遺伝子導入が起きた株は見つからず、さらに *PpSDN3*、*PpFAS1* の発現は失われていないことが明らかとなった。このことは、*PpSDN3* および *PpFAS1* 遺伝子がヒメツリガネゴケの生育に必須であることを示唆している。*PpSDN3* および *PpFAS1* の機能阻害による表現型を調べるため、現在、人工 miRNA (Schwab et al., 2006, Plant Cell Vol. 18) を利用したエストロジェン誘導発現抑制株を作出中である。

それに対して *PpERI1* は、*PpERI1* 遺伝子領域のみが抗生物質耐性マーカーと入れ替わった 5 株を得ることに成功し (図 1)、さらにその内 3 株については遺伝子発現が失われていることを確認した (図 2)。

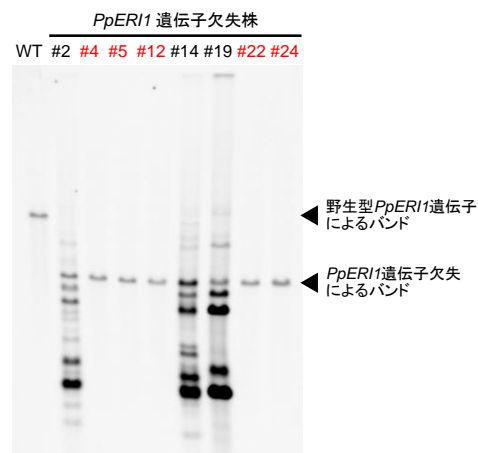


図1 野生株 (WT) と *PpERI1* 遺伝子欠失株を用いたゲノミックサザン解析。 *PpERI1* のみに遺伝子導入が起きた株を赤字で示す。

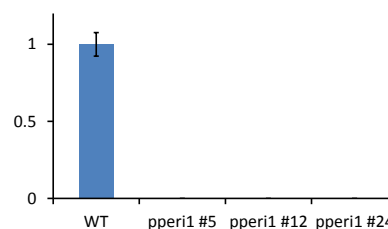


図2 野生株 (WT) と *PpERI1* 遺伝子欠失株 (*pperi1*) における *PpERI1* の発現解析。 *PpTUBULIN* 遺伝子をコントロールとして用いた。バーは異なる生物材料を用いた3回の実験結果の標準誤差を示す。

現在、この *PpER11* 遺伝子欠失株を用いてリプログラミングアッセイを行っている。これまで得られた予備的な知見では、特にリプログラミングが起きにくい切断面以外の細胞についてリプログラミングの抑制が観察された (図3)。

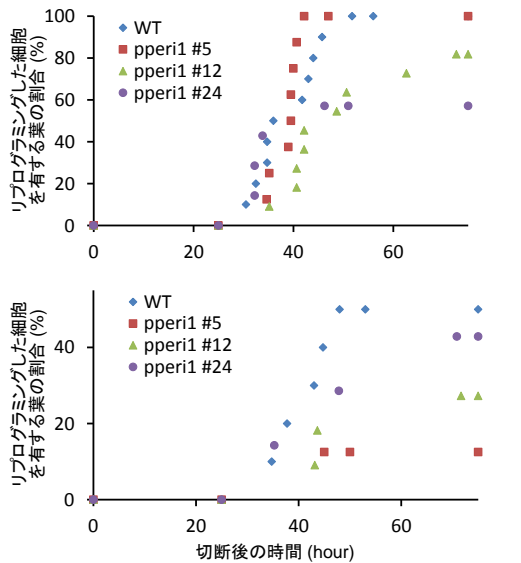


図3 野生株 (WT) と *PpER11* 遺伝子欠失株 (*pperi1*) を用いたリプログラミングアッセイ。上段は切断面の細胞、下段は切断面以外の細胞のみに注目した結果を示す。

現在、葉の枚数を増やしてアッセイを行うことで、より精度の高い結果を得ることを試みている。また、遺伝子欠失株でリプログラミングが完全に抑制されていなかったことから、sRNA の分解酵素を触媒する他の遺伝子、例えば *PpSDN* との機能重複が考えられた。そのため、*PpER11 PpSDN1 PpSDN2* 三重遺伝子欠失株に、*PpSDN3* の誘導発現抑制コンストラクトを導入した、四重遺伝子機能阻害株を現在作出中である。

過剰発現株では、*PpFAS1* について発現量が 10~80 倍に上昇した複数の過剰発現株の作出に成功した。しかしながら、それらについてリプログラミングアッセイを行ったところ、明瞭な表現型は観察できなかった。それに対して、*PpSDN3* の過剰発現株は発現が 10 倍程度に上昇した 2 株しか得ることができず、*PpER11* の過剰発現株に関しては全く得られなかった。この結果は、*PpER11*、*PpSDN3* の過剰発現が個体の生育に悪影響を与えることを示唆している。*PpER11*、*PpSDN3* のエストロゲン誘導株については複数の株を得ることに成功しており、誘導により発現が数十~数千倍に上昇することを確認している。これらの株については、現在リプログラミングアッセイを行うためのサンプル調整を行っている。

得られた *PpCSP1 PpCSP2 PpCSP3a PpCSP3b* 四重遺伝子欠失株についてゲノミックサザン解析を行ったところ、期待した 4

本のバンド以外に 4 本のバンドが確認された一株しか得ることができなかった。このことは、*PpCSP* 遺伝子領域以外に 4 か所の遺伝子導入が起きていることを意味している。この一株を用いてリプログラミングアッセイを複数回行ったところ、リプログラミングが起きやすい切断面の細胞ではリプログラミングの遅延が観察され、さらに切断面以外の細胞ではリプログラミングがほとんど観察されなかった (図4)。

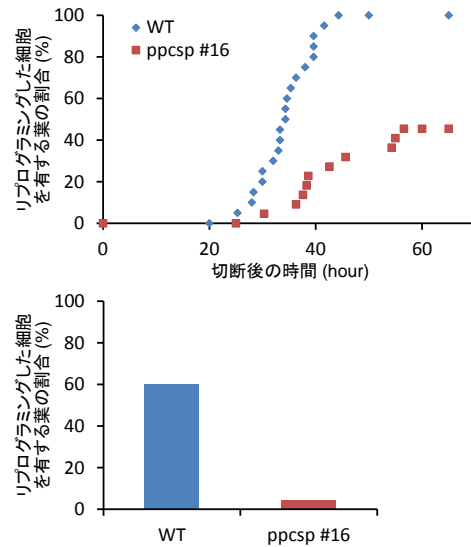


図4 野生株 (WT) と *PpCSP* 四重遺伝子欠失株 (*ppcsp*) を用いた一度目のリプログラミングアッセイ。上段は切断面の細胞、下段は切断面以外の細胞に注目した結果を示す。下段では切断後72時間後におけるリプログラミングした細胞を有する葉の割合を示した。

その後、四重遺伝子欠失株の作出を再度行い、期待した 4 本のバンドのみが検出される 3 株の作出に成功した (図5)。また、これらの株では全 *PpCSP* 遺伝子の発現が検出されなかった。現在、これらの株を用いてリプログラミングアッセイを行うためのサンプル調整を行っている。

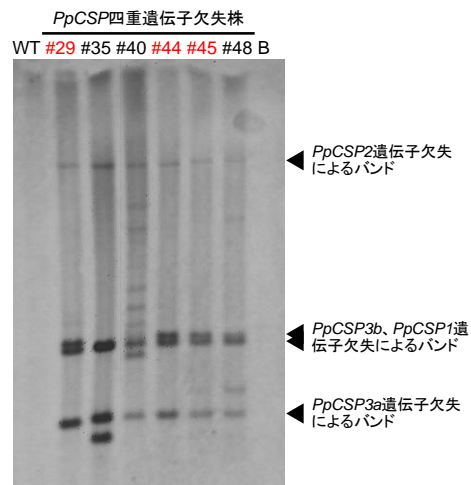


図5 野生株 (WT) と *PpCSP* 四重遺伝子欠失株を用いたゲノミックサザン解析。*PpCSP* のみに遺伝子導入が起きた株を赤字で示す。Bはブランク(ゲノムの代わりに滅菌水を用いた)を示す。

PpCSP1-CITRINE 形質転換株を用いて *PpCSP1-CITRINE* タンパク質の局在解析を行った結果、細胞質基質における局在を観察した。さらに、微小管重合阻害剤を処理すると、濃度依存的に *PpCSP1-CITRINE* が核にも局在することを明らかにした (図 6)。 *PpCSP* の動物ホモログである *Lin28* は通常細胞質基質に局在するが、全ての RNA 結合ドメインに変異を入れると核にも局在することから、*Lin28* は RNA 分子と結合してその RNA を核から細胞質基質へ排出していると考えられている (Balzer & Moss, 2007, RNA Biol Vol. 4)。以上の結果は、*PpCSP* も *Lin28* と同様に核と細胞質基質をシャトリングしており、それに微小管が関与することを示唆している。

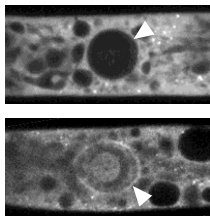


図6 *PpCSP-CITRINE*タンパク質の細胞内局在。上図はmock、下図は微小管重合阻害剤を投与してそれぞれ1時間後の幹細胞。白矢頭は核を示す。

PpCSP と微小管の細胞内共局在はそれほど明瞭でないものの、免疫沈降法では *PpCSP* と微小管を構成するチューブリンタンパク質との相互作用が観察された。現在、*PpCSP* による miRNA の成熟抑制および微小管を介した *PpCSP* の核—細胞質基質シャトリングの分子機構を解明するため、*PpCSP* と相互作用するタンパク質を LC-MALDI/MS 法で網羅的に解析中である。これまでのところ、sRNA 関連因子や微小管関連因子は検出されていないが、実験条件などを精査して、再度解析を行う予定である。

また、*PpCSP* の下流遺伝子を探索するため、リプログラミング過程において野生型と *PpCSP* 過剰発現株の発現プロファイルを比較した。異なる発現を示す遺伝子の数は予想に反して少なかったが、*Mechanosensitive ion channel of small conductance (MscS)* 遺伝子や *WRKY* 遺伝子の一つがリプログラミング過程で *PpCSP* 過剰発現株に高く発現していることを見いだした。これらの遺伝子は他の生物において傷害応答を含むストレス応答に機能し (e.g. Levina et al., 1999, EMBO J Vol. 18; Hara et al., 2000, Mol Gen Genet Vol. 263)、さらにその遺伝子ファミリーの一部は miRNA の標的である (Zhang et al., 2008, Ann Bot Vol. 102; PMRD: plant microRNA database, <http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>)。現在、ヒメツリガネゴケにこれらの遺伝子を標的とする miRNA が存在しないか、またこれら

の遺伝子がヒメツリガネゴケのリプログラミングに機能するか否か解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Jae-Young Yun[§], Yosuke Tamada[§], Ye eun Kang, Richard M. Amasino, ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED3/SET DOMAIN GROUP2 is required for the winter-annual habit of *Arabidopsis thaliana*, Plant and Cell Physiology, 査読有、53 巻、2012、834-846

[§]Jae-Young Yun 博士と Yosuke Tamada (申請者) は共同筆頭著者である。

② Diana M. Buzas[§], Yosuke Tamada[§], Tetsuya Kurata, *FLC*: A hidden Polycomb response element shows up in silence, Plant and Cell Physiology, 査読有、53 巻、2012、785-793

[§]Diana M. Buzas 博士と Yosuke Tamada (申請者) は共同筆頭著者、共同責任著者である。

③ 玉田 洋介、角谷 徹仁、植物の生活環とエピジェネティックな遺伝子発現制御機構、細胞工学、査読無、30 巻、2011、174-179

[学会発表] (計 6 件)

① Yosuke Tamada、Evolution of the developmental functions of histone methylations in land plants (招待講演)、The 8th Okazaki Biology Conference、2012 年 3 月 22 日、基礎生物学研究所 (愛知県)

② Yosuke Tamada、ATXR3, a novel histone methyltransferase, is required for the epigenetic activation of *FLC* and the flowering repression、The 53rd annual meeting of the Japanese society of plant physiologists、2012 年 3 月 17 日、京都産業大学 (京都府)

③ Yosuke Tamada、Epigenome and transcriptome analyses using the histone methyltransferase mutant of *Physcomitrella patens*、The 53rd annual meeting of the Japanese society of plant physiologists、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学 (京都府)

④ 玉田 洋介、ヒメツリガネゴケ野生型および H3K27 メチル化酵素欠失株を用いたトランスクリプトーム・エピゲノム解析、生命情報科学若手の会第 3 回研究会、2011 年 10 月 16 日、基礎生物学研究所 (愛知県)

⑤玉田 洋介、ヒストン修飾と non-coding RNA：花成を制御する協調関係、日本遺伝学会第83回大会（招待講演）、2011年9月22日、京都大学（京都府）

⑥玉田 洋介、開花を制御するエピジェネティクス機構、第17回植物バイテクシンポジウム（招待講演）、2011年1月27日、京都府立大学（京都府）

〔図書〕（計1件）

星野 敦、玉田 洋介、講談社、植物の分子育種学、2011、191-201

〔その他〕

①国際誌 Plant and Cell Physiology の特集号 “Plant Epigenetics” のオーガナイズを行った。
http://www.oxfordjournals.org/our_journals/pcp/specialfocusissue_plant_epigenetics.html

② The 53rd annual meeting of the Japanese society of plant physiologists において、シンポジウム “Response to environmental/developmental signals and regulation of epigenetic state of chromatin” をオーガナイズした。

③ The 52rd annual meeting of the Japanese society of plant physiologists において、シンポジウム “Frontier of Epigenetics: Regulation and function of chromatin modifications” をオーガナイズした。当シンポジウムは Plant and Cell Physiology 誌の First sponsored symposium に選出され、特集号 “Plant Epigenetics” の出版が決定した。（シンポジウム自体は東日本大震災の影響により中止となった。）

④ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/hasebe/

<http://www.nibb.ac.jp/evodevo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉田 洋介 (TAMADA YOSUKE)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：50579290

(2)研究協力者

長谷部 光泰 (MITSUYASU HASEBE)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

森 仁志 (MORI HITOSHI)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014

李 琛 (LI CHEN)

総合研究大学院大学・生命科学研究科・大学院生