

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657167

研究課題名(和文)単細胞生物から多細胞生物への進化における鍵因子の探索

研究課題名(英文)Identification of key factors involved in the evolution of multicellularity

研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE, MITSUYASU)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメツリガネゴケの葉から隣接した2細胞を単離すると、片方の細胞のみ幹細胞化がおこる。本研究により、(1) 幹細胞化の初期の過程では両細胞でオーキシンが合成される、(2) 幹細胞化のある時点で、片方の細胞のみでオーキシン排出担体が発現し、隣接する細胞に接している細胞膜に局在する、(3) そのオーキシン排出担体により2細胞間でオーキシン濃度勾配形成が引き起こされる、(4) オーキシンレベルが低い細胞は幹細胞に変化し、オーキシンレベルが高い細胞は葉細胞のままに維持される、というモデルが考えられ、オーキシンが幹細胞化抑制因子として機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the moss *Physcomitrella patens*, when a neighboring two-leaf cell pair is isolated, only one of the two cells undergoes reprogramming into a chloronema apical stem cell, while the other appears to be laterally suppressed by signal(s) derived from the reprogramming cell. In this study, we suggest a model that (1) auxin accumulates in the both leaf cells at the early stage of the stem cell formation, (2) an auxin efflux carrier expresses in the reprogramming cell and localizes in cellular membrane facing another cell, (3) the carrier function in establishment of auxin gradient between the two cells, and (4) a leaf cell with low auxin changes into a stem cell, while another one with high auxin remains leaf cell gate. Thus, auxin could act as a lateral suppression factor during the stem cell formation.

研究分野：進化生物学

キーワード：多細胞進化 オーキシン ヒメツリガネゴケ 側方抑制

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物は、分裂して自分と同じ細胞を作る。一方、多細胞生物は、分裂能力を持った細胞と分裂しない分化した細胞の両方を作り出す。従って、単細胞生物から多細胞生物の進化の過程で、分裂しない分化細胞を作り出すメカニズムの進化が必要だったと考えられる。

幹細胞は自分自身と同じ幹細胞とともに、分化する細胞を作り出す能力を持った細胞であり、多細胞体制の構築にとって欠くことのできない細胞である。植物では、幹細胞は分裂組織(メリステム)で維持されており、器官・組織形成に向けた分化細胞を作り続けている。それを可能にするため、メリステムには、幹細胞を維持しつつ、周囲の細胞群と細胞壁を介した緊密な情報交換を行うことで、空間的に幹細胞を維持する分子機構が存在する。これまでに、シロイヌナズナを始めとしたモデル被子植物を用いて、その分子機構を明らかにするための解析が行われ、幹細胞を維持するための分泌性ペプチドが見つかった(Kondo et al., 2006 Science 313, 845; Matsuzaki et al., 2010 Science 329, 1065)。

また、古くから幹細胞が近隣の細胞に対して幹細胞化を抑制するシグナルを出しているという仮説が提唱されている (Steeves and Sussex, 1989 Patterns in Plant Development)。隣接している細胞からの働きかけによって細胞運命を決定づけられる細胞非自立的な制御機構(側方抑制)は、各細胞が高い自律応答性を維持するなかで、複雑な体制を構築するための発生制御機構の一つであると考えられるが (Rudel and Sommer, 2003 Dev. Biol. 264, 15) 幹細胞化抑制機能を持ったシグナル因子は未だ発見されていない。

我々は、コケ植物ヒメツリガネゴケを用いて、分化した葉細胞が幹細胞へと変化する過程の分子機構の研究を行ってきた (Ishikawa et al., 2011 Plant Cell 23, 2924)。その過程で幹細胞が隣接する細胞が幹細胞になることを抑制するシグナルを出しているらしいことを発見した。葉細胞の幹細胞化には傷害刺激(隣の細胞が壊れる)が必要である。ヒメツリガネゴケの葉において、1つの葉細胞を周りの細胞を壊して取り出すと、取り出した葉細胞は先端成長を幹細胞へと変化する。ところが、2つの細胞を切り出すと、必ず、どちらかの細胞しか幹細胞化しないことがわかった。さらに、両細胞の核の大きさを比較すると、切り出し後、両細胞とも幹細胞化時に見られる核の膨潤がおこるが、途中で、一方の細胞のみが膨潤を続け、もう一方の細胞は膨潤を止めてしまうことがわかった。従って、細胞を葉から単離することで、両細胞に幹細胞化のスイッチが入るけれども、片方の細胞では、そのプログラムが途中で止まってしまっていると考えられる。これらのことから、幹細胞化している細胞は隣接している細胞が幹細胞になることを阻害する何らかのシ

グナルを出していることが示唆された。幹細胞から周辺細胞に抑制シグナルが出されていることを示唆する他の例も知られている。例えば、シダ植物の前葉体では1つの幹細胞が維持されているが、その幹細胞を壊すと近隣に新しい幹細胞ができる (Korn, 1974 Bot. J. Linn. Soc. 68, 163)。そこで我々は、このシグナルの進化が単細胞から多細胞体制の構築に重要だったのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 陸上植物の側方抑制に関連すると考えられるオーキシンが、幹細胞化抑制シグナルとして機能するのかを検証する。また、(2) 幹細胞化する細胞と幹細胞化が抑制される細胞のトランスクリプトーム解析を行い、両細胞の転写産物の比較をする。とともに、(3) 両細胞に含まれているペプチドについても質量分析計によって比較解析を行い、蓄積に違いが見られた転写産物、ペプチドの機能解析を通して、幹細胞化抑制シグナルの実体を見つけ出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オーキシンが幹細胞化抑制因子として機能するのか、という仮説の検証

オーキシンは陸上植物全体でモルフォジェンとして機能している。例えば、被子植物の根では、オーキシン濃度によって幹細胞と分化細胞の区分が引き起こされている (Grieneisen et al. 2007 Nature 449, 1008)。また、ヒメツリガネゴケの切断葉において、オーキシンアンタゴニストである BH-IAA が幹細胞化を抑制すること、オーキシン応答因子 *ARF* 遺伝子欠失変異体で幹細胞化が抑制されることから、幹細胞化にはオーキシンが必要であることが分かった。そこで、個々の細胞内のオーキシンレベルを識別できるオーキシンセンサーラインを作製し、細胞レベルでのオーキシンレベルの違いを調べる。また、両細胞でオーキシン量に違いが見られたときは、オーキシン合成・分解・輸送に関わる遺伝子と幹細胞化抑制の関係性を明らかにする。

(2) 1細胞レベルでの遺伝子発現解析に基づいた幹細胞化抑制因子の探索

ヒメツリガネゴケの葉から並んだ2細胞のみを単離して、幹細胞化している細胞と幹細胞化が抑制されている細胞をそれぞれ回収してトランスクリプトーム解析を行い、転写産物の蓄積に違いが見られた遺伝子について cDNA を過剰発現したり、artificial microRNA を誘導して転写産物の蓄積を減らしたりして、幹細胞化抑制因子として機能するのかを解析する。

(3) 幹細胞抑制因子としてのペプチドシグナルの探索

幹細胞化する細胞と幹細胞化が抑制されている細胞内に含まれるペプチドを質量分

析計によって比較解析し、量比が異なったペプチドについては、そのペプチドをコードする遺伝子 cDNA を誘導過剰発現したり、artificial microRNA を誘導して転写産物量を減らしたりして、幹細胞化抑制因子であるかを検証する。

4. 研究成果

(1) オーキシンは幹細胞化抑制因子として機能する

幹細胞化におけるオーキシン量の変動

幹細胞化する細胞と幹細胞化しない細胞でオーキシンレベルに違いがあるか調べるため、オーキシンによって分解される転写抑制因子 Aux/IAA のドメイン II に YFP 蛍光タンパク質を融合した DII-YFP タンパク質 (Brunoud et al., 2012 Nature 482, 103) が恒常的に発現する形質転換体を作成した。このオーキシンセンサーラインを用いて 2 細胞単離実験を行ったところ、単離後の両細胞で YFP 蛍光がしばらく検出されたが、幹細胞化しない細胞で YFP 蛍光が消失し、幹細胞化した細胞では YFP 蛍光が検出され続けた。また、ダイズ由来のオーキシン応答性プロモーター *GH3* に *CFP* 遺伝子を融合した *GH3*-*CFP* センサーラインを用いても、幹細胞化しない細胞のみで *CFP* の蛍光シグナルが検出された。これらのことから、2 細胞単離後、片方の細胞のみにオーキシンが蓄積することで幹細胞化が抑制されることが考えられた。

レーザーマイクロダイセクションによって周りの葉細胞を破壊して 1 つの葉細胞を取り出しても、その葉細胞は幹細胞化することができる。そこで 1 細胞のみを単離した後、外生オーキシンを加えたところ、その細胞の幹細胞化が抑制された。一方、2 細胞を単離した場合では、外生オーキシンを加えても、側方抑制は観察され、幹細胞化しない細胞でオーキシンの蓄積が観察された。これらのことから、片方の細胞から別の細胞へとオーキシンが輸送され、オーキシンが蓄積した細胞では幹細胞化が抑制されることが示唆された。

オーキシンが幹細胞化抑制シグナルとして機能するのであれば、幹細胞化の過程でオーキシンシグナルを抑制することで、両細胞が幹細胞化するのではないかと考え、オーキシン拮抗阻害剤 auxinole (Hayashi et al., 2012 ACS Chem Biol., 7, 590) の影響について調べた。2 細胞単離実験では、細胞を単離して培養中に薬剤処理することが技術的に困難であったため、培養中での薬剤処理が容易な切断葉を用いた。2 細胞で観察された側方抑制は、切断葉でも観察される。切断葉では、切断面に面した葉細胞のみ幹細胞化し、切断面に面していない内側の葉細胞は幹細胞化が抑制される。また、オーキシンセンサーを用いて切断葉の個々の葉細胞のオーキシンレベルを調べると、切断面に接している葉細胞ではオーキシンが低レベルで維持されてい

たが、切断面に接していない葉細胞でオーキシンレベルが上昇することが分かった。そこで、切断後 12 時間目 (葉内部の細胞でオーキシンレベルが上昇する前に相当) に auxinole で処理すると、切断面だけでなく葉内部にある細胞でも幹細胞化が観察された。これらのことから、オーキシンが幹細胞化抑制シグナルとして機能することが示唆された。

幹細胞化誘導因子としてのオーキシン

切断後 12 時間目に auxinole で処理すると、葉内部の細胞も幹細胞化するが、切断直後に auxinole で処理すると、切断面に接する葉細胞の幹細胞化が抑制された。この抑制は 2 細胞でも観察された。また、オーキシン合成酵素 YUCCA と TAA の阻害剤を用いて切断葉および 2 細胞を処理すると、幹細胞化が抑制された。これらのことから、幹細胞化の初期の過程ではオーキシンが合成され、幹細胞化誘導に必須であることが分かった。

次に、どの細胞でオーキシンが合成されるのか明らかにするため、*YUCCA* 遺伝子と *TAA* 遺伝子に *GFP* 遺伝子をノックインした形質転換体を作製しようとしたが、これまでに形質転換体を得られていない。そこで、*YUCCA* 遺伝子の発現を制御することでオーキシンレベルを制御する転写因子、*SHI* 遺伝子 (Eklund et al., 2010 Development 137, 1275) に、*GFP* 遺伝子をノックインしたラインを作出した。*SHI*-*GFP* ノックインラインの葉から 2 細胞を取り出し、*GFP* 蛍光を調べたところ、シグナルが弱いながらも、両細胞で一様に発現していた。同様に、切断葉でも一様に発現していた。以上のことから、2 細胞を単離すると両細胞でオーキシン合成がおこるが、ある時点から片方の細胞のみオーキシンが高濃度に蓄積することが示唆された。

幹細胞化過程におけるオーキシン濃度勾配形成機構の解明

2 細胞間でのオーキシン濃度勾配形成が、オーキシン輸送によって形成されるのではないかと考え、オーキシン極性輸送を制御する遺伝子に着目した。オーキシン排出担体である PIN-FORMED (PIN) と ABC transporter-like phosphoglycoprotein (PGP)、およびオーキシン流入担体である AUXIN RESISTANT (AUX) をコードするそれぞれの遺伝子に、*RFP* 遺伝子をノックインした形質転換体を作製し、それらタンパク質の時空間的発現解析を行った。2 細胞単離後、PIN-*RFP* ラインと AUX-*RFP* ラインでは、*RFP* 蛍光シグナルがほとんど検出されなかった。一方、PGP-*RFP* ラインでは、2 細胞単離直後は *RFP* の蛍光を検出することはできなかったが、しばらくすると幹細胞化する細胞において、隣の細胞に接している細胞膜で *RFP* の蛍光が観察された。また 1 細胞のみを単離したときは、PGP-*RFP* の蛍光は細胞質全体で検出され

たが、細胞膜からは蛍光が観察されなかった。これらのことから、オーキシン排出担体である PGP が 2 細胞におけるオーキシン濃度勾配形成に参与している可能性が示唆されたので、オーキシンセンサーラインを用いて PGP 特異的阻害剤である Gravacin (Rojas-Pierce et al., 2007 Chem. Biol., 14, 1366) の影響を調べた。2 細胞単離後 Gravacin で処理すると、幹細胞初期に見られる両細胞でのオーキシンレベルの上昇は観察されたが、単離後 48 時間以上経っても両細胞でオーキシンレベルが高いままで、幹細胞化の特徴である先端成長も起こらなかった。

以上のことから、(i) 幹細胞化の初期の過程では、両方の細胞で幹細胞化誘導に必須なオーキシンが合成され、どちらの細胞でもある程度幹細胞化が進む、(ii) ある時点で片方の細胞のみで PGP が発現し、隣接する細胞に接する細胞膜に局在する、(iii) PGP が発現している細胞から、もう片方の細胞へとオーキシンが流入し、2 細胞間でオーキシン濃度勾配形成が引き起こされる、(iv) オーキシンが低レベルで維持されている細胞は幹細胞へと細胞運命を変え、オーキシンレベルが上昇した細胞では幹細胞化が抑制される、というモデルが考えられた。すなわち、ヒメツリガネゴケの幹細胞化の過程において、オーキシンが幹細胞化抑制因子として機能することが分かった。今後、どのようにしてオーキシン排出担体である PGP の発現が制御され、隣接する細胞に接する細胞膜のみに局在できるのか、その分子機構を解明することが、各細胞が高い自律応答性を維持しているなかで、総体として組織形成、さらには個体を統御するシステムの理解に繋がることが期待される。

(2) 1 細胞トランスクリプトーム解析に向けたプラットフォームの構築

細胞は遺伝子発現パターンを変えることで、細胞運命を変えたり決定したりする。そのため、幹細胞化する細胞と抑制される細胞での遺伝子発現の比較が、どのような因子が幹細胞化抑制シグナルとして機能するのかを推定するうえで有効である。そこで、両細胞間で発現レベルの違いが見られた遺伝子について、過剰発現体、および遺伝子欠失株を作製し、幹細胞化抑制の影響を調べることで、オーキシン以外の幹細胞化抑制因子を推定することが可能であることが考えられた。

本研究では、基礎生物学研究所の特別協力研究員との共同研究によって、少量の細胞を使ったトランスクリプトーム解析を進めた。1 細胞単離は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションシステムによって回収できる見込みはあったが、少ないサンプル量からの超並列シーケンサー用のライブラリ構築には PCR による増幅が不可欠であるため、PCR によるバイアスが問題になっていた。

そこで RNA から逆転写後、10nt からなるランダムオリゴマー（識別タグ；Unique Molecular [UMI]）を各々の逆転写産物に結合させ、それぞれの分子をラベル化する方法を試みた (Kivioja et al., Nature Methods 9, 72)。この方法では約 100 万種類の識別が可能となり、PCR で増幅しても各転写産物由来の PCR 産物の UMI の種類をカウントすることで、オリジナルのコピー数を調べることが可能になることが期待される。

マイクロキャピラリーを用いて、1 細胞から RNA を含む細胞抽出液を回収し、上記の方法に従ってライブラリを作製し、超並列シーケンサーでその配列を読んだところ、PCR によるバイアスの影響がほとんどないことが分かった。そのため、このライブラリ作製法を用いることで、幹細胞化する細胞と幹細胞化が抑制される細胞のトランスクリプトーム比較解析を行うことが可能となり、オーキシン応答性の幹細胞化経路に関わる遺伝子を同定することが期待される。

(3) 幹細胞抑制因子としてのペプチドシグナルの探索

被子植物の分裂組織においては、分泌性ペプチドシグナルが幹細胞形成維持を制御している (Kondo et al. 2006 Science; Matsuzaki et al., 2010)。本研究では、研究の早い段階でオーキシンが幹細胞化抑制因子として機能することが示唆されたので、幹細胞化におけるオーキシンの機能の解明に集中したが、分泌性ペプチドも幹細胞化抑制因子として機能することが考えられる。そのため、幹細胞化する細胞と幹細胞化が抑制されている細胞間で細胞内に含まれるペプチドを質量分析計によって比較解析することが今後の課題である。

(4) 今後の展望

幹細胞化抑制シグナルは、ヒメツリガネゴケだけでなく、シダ植物 (Korn, 1974 Bot. J. Linn. Soc. 68, 163)、被子植物 (Reddy and Meyerowitz, 2005 Science 310, 663) にも存在していることが示唆されている。このように幹細胞による側方抑制は、陸上植物に保存されていると考えられ、幹細胞化抑制シグナルの進化が、メリステムでの幹細胞維持だけでなく、単細胞から多細胞体制の構築に重要な役割を果たしてきたのではないかと考えられる。そのため、本研究で示されたオーキシンによる幹細胞化抑制の分子機構は、植物の多細胞体制の進化を研究する新たな糸口に繋がったと言える。また、本研究により、低濃度オーキシンは幹細胞化促進に、高濃度オーキシンが幹細胞化抑制に働くということが示唆されたので、1 細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせることで、細胞レベルでのオーキシン濃度に依存した細胞運命を決定する分子機構の解明に貢献できることが期待される。

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 2 件)

Kofuji, R., and Hasebe, M. (2014). Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol* 17, 13-21. 査読有
DOI: 10.1016/j.pbi.2013.10.007

Tomescu, A.M., Wyatt, S.E., Hasebe, M., and Rothwell, G.W. (2014). Early evolution of the vascular plant body plan - the missing mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 17, 126-136. 査読有
DOI: 10.1016/j.pbi.2013.11.016

〔学会発表〕(計 1 件)

石川雅樹、長谷部光泰「ヒメツリガネゴケの細胞リプログラミングを誘導する分子機構」日本植物学会第 77 回大会 2013.9.13 北海道大学(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Sparks, E.E., Imai, A., Hasebe, M., and Benfey, P.N. (F. Calegari, and C. Waskow, eds., CRC press) Developmental regulation and *de novo* formation of stem cells in plants. In *Stem Cells: From Basic Research to Therapy, Volume 1: Basic Stem Cell Biology, Tissue Formation during Development, and Model Organisms* (2014) 405-434.

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE, MITSUYASU)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授
研究者番号：40237996

(2)研究分担者

西山 智明 (NISHIYAMA, TOMOAKI)
金沢大学・学際科学実験センター・助教
研究者番号：50390688

石川 雅樹 (ISHIKAWA, MASAKI)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教
研究者番号：00586894

(3)連携研究者

村田 隆 (MURATA, TAKASHI)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授

研究者番号：00242024