

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770051

研究課題名(和文) リプログラミングを促進するRNA結合タンパク質PpCSPの分子機能の解明

研究課題名(英文) Characterization of an RNA-binding protein PpCSP that promotes reprogramming of the moss *Physcomitrella patens*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質PpCSPによるリプログラミング促進の分子機構を解明することが本研究の目的である。そのために、PpCSPの標的RNAおよび相互作用タンパク質の同定を試みた。RNA免疫沈降 シーケンシング法を行った結果、PpCSPがほぼ全てのmRNAと結合することを示す結果を得た。また、PpCSP過剰発現株で顕著に高く発現する遺伝子群について、過剰発現株を作出した結果、複数の株で形態異常を観察した。さらに、免疫沈降法および液体クロマトグラフィー 質量分析法によって、PpCSPの相互作用相手を複数同定した。これら相互作用タンパク質の細胞内局在は、おおむねPpCSPと一致した。

研究成果の概要(英文)：PpCSP, an RNA-binding protein, facilitates the reprogramming from differentiated leaf cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. To reveal the molecular mechanisms underlying the promotion of reprogramming by PpCSP, we have tried to identify the target RNA molecules and the interacting proteins of PpCSP. We performed RNA immunoprecipitation-sequencing and found that PpCSP binds to almost all mRNAs. We previously isolated multiple genes, which exhibited higher transcripts accumulation in the over-expression line of PpCSP than in wild type. We produced over-expression lines of those genes, and found that several over-expression lines exhibited abnormal morphologies. In addition, we isolated multiple interacting partners of PpCSP by performing immunoprecipitation followed by liquid chromatography-mass spectrometry. We confirmed that the cellular localization largely overlapped with that of PpCSP.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：リプログラミング RNA 植物 発生

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は、全能性を有する受精卵から細胞分裂および分化を経て多細胞体制を構築する。その一方で、分化した細胞が脱分化し、多能性や全能性を獲得して幹細胞化する現象もしばしば観察され、リプログラミングと呼ばれる。我々は、切断刺激のみでリプログラミングを誘導できるコケ植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用いて、植物におけるリプログラミングの分子機構を研究してきた (Ishikawa et al., 2012, Plant Cell Vol. 23; Nishiyama et al., 2012, PLoS One Vol. 7)。その過程で、幹細胞に強く発現する因子 *P. patens* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN (PpCSP) に注目した。PpCSP は核酸結合能を有する cold shock domain と 2 つの CHCC Zn-finger domain からなり、このドメイン構造とアミノ酸配列の類似性から、ほ乳類における誘導多能性幹細胞化因子の一つ Abnormal Cell Lineage protein 28 (Lin28) のホモログであることを発見した。PpCSP は Lin28 と同じく主に細胞質基質に局在し、さらに *PpCSP* 遺伝子の欠損株ではリプログラミングが抑制されることから、PpCSP/Lin28 は動植物に共通する初めてのリプログラミング促進因子であることがわかった。

Lin28 は、分化誘導に機能するマイクロ RNA (miRNA) *let-7* の pre-miRNA に結合してその成熟を抑制するのに加え (Viswanathan et al., 2008, Science Vol. 320)、iPS 細胞へのリプログラミングに唯一不可欠である *OCT4* の mRNA と結合してその翻訳を促進することで (Qiu et al., 2010, Nucleic Acid Res, Vol. 38)、リプログラミング促進に機能すると考えられている。しかし、Lin28 はその他の複数の RNA 分子と結合することも知られており (e.g. Poleskaya et al., 2007, Genes Dev Vol. 21)、Lin28 によるリプログラミング促進の分子機構は不明な点が多い。PpCSP も細胞質基質に局在することから、何らかの RNA と結合すると考えられるが、Lin28 の標的である *let-7*、*OCT4* は植物には保存されておらず、PpCSP/Lin28 によるリプログラミング促進の分子機構は動植物で異なると考えられた。

2. 研究の目的

以上の結果を受けて、本研究では PpCSP の機能解析を行うことで、植物におけるリプログラミングの分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の 2 点に着目して、リプログラミング過程における PpCSP の機能の解明を試みた。

(1) PpCSP の標的 RNA の解明

PpCSP は RNA 結合タンパク質であることから、その機能解明には標的 RNA の同定が必要不可欠である。そのために、まず PpCSP と直接結合する mRNA の網羅的な同定を、mRNA 免疫沈降 シーケンシング (mRNA immunoprecipitation-sequencing; mRIP-seq) お

よび Crosslinking RNA immunoprecipitation-sequencing (CLIP-seq) (Licatalosi et al., 2008, Nature Vol. 456) により試みた。また、RNA 結合タンパク質は一般に RNA の成熟や安定性、翻訳の制御に機能する。PpCSP の標的 RNA を明らかにし、さらに PpCSP の分子機能を解明するために、PpCSP がその安定性や翻訳制御に機能する RNA を網羅的に同定しようとして試みた。

(2) PpCSP と相互作用するタンパク質の解明

Lin28 は主に細胞質基質に局在するが、全ての核酸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 と複合体を形成して、核から細胞質基質へ移動すると考えられている (Balzer & Moss, 2007, RNA Biol Vol. 4)。これまでに我々は、微小管重合阻害剤をヒメツリガネゴケ幹細胞に処理すると PpCSP が細胞質基質だけでなく核にも局在すること、さらに免疫沈降法によって PpCSP1 タンパク質とチューブリンの微弱な結合が観察されることを明らかにした。以上の結果から、PpCSP/Lin28-mRNA 複合体は微小管と相互作用して核-細胞質シャトリングを行うことが示唆された。また、PpCSP/Lin28 は核酸結合ドメイン以外に明瞭な構造を持たないため、PpCSP によるリプログラミングの促進には、PpCSP と相互作用するタンパク質の機能が不可欠であると考えられた。こうしたことから、PpCSP と結合するタンパク質の網羅的な同定を試みた。

3. 研究の方法

・ mRIP-seq

PpCSP1 遺伝子の終止コドン直前に *Citrine yellow fluorescent protein (YFP)* 遺伝子を挿入した *PpCSP1-YFP* 株から RNA タンパク質複合体を抽出し、oligo dT カラムを用いて poly A を持つ mRNA を含む複合体を精製した。その一部を input とし、ポジティブコントロールとした。残りの試料の半分に対して、Green fluorescent protein (GFP) タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降法を行い、*PpCSP1-YFP* タンパク質を含む複合体を精製した。ネガティブコントロールとして、残った試料の半分に対して、HA ペプチドを特異的に認識する抗体を用いて同様に免疫沈降法を行った。その後、input、GFP 抗体を用いた免疫沈降法、HA 抗体を用いた免疫沈降法から得られたそれぞれの mRNA タンパク質複合体から mRNA を抽出し、次世代シーケンサー SOLiD5500 を用いて大規模シーケンシングを行った。

・ CLIP-seq

植物体に紫外線を照射することで RNA とタンパク質を架橋して RNA タンパク質複合体を安定化させた後、植物体から RNA タンパク質複合体を抽出して、目的のタンパク質に特異的な抗体を用いて RNA 免疫沈降法

を行った。精製した RNA タンパク質複合体に対して micrococcal nuclease (MNase) を処理して RNA を穏やかに切断した後、RNA を放射性同位体を用いて標識したうえで RNA タンパク質複合体を電気泳動に供した。その後、元のプロトコルでは、興味のあるタンパク質の分子量よりも若干大きい領域のみを切り出して目的の RNA タンパク質複合体を精製し、RNA を抽出する。この RNA を cDNA に逆転写し、大規模シーケンシングを行う。CLIP-seq は植物試料を用いて行われたことがないため、本プロジェクトではヒメツリガネゴケを用いた CLIP-seq の条件検討を行った。また、我が国では放射性同位体を含む試料を管理区域外にて次世代シーケンシングに供することができないため、放射性同位体を用いない CLIP-seq 手法の開発を行った。

・転写阻害剤 Cordycepin による転写阻害能の解析

ヒメツリガネゴケ原系体および茎葉体に様々な濃度の Cordycepin を処理して培養した後、放射性同位体で標識したウリジンを加えてさらに培養し、RNA を抽出した上でどの程度新規に RNA が合成されているのかをシンチレーションによって解析した。

・ Ribosome footprinting-sequencing (RIF-seq) (Ingolia et al., 2012, Nat Protoc Vol. 7)

植物体の抽出液に RNA 分解酵素を処理することで RNA を断片化した後、ショ糖濃度勾配遠心法でリボソーム RNA 複合体を単離した。その後、RNA を精製して電気泳動に供し、リボソーム結合 mRNA を多く含むと考えられる 28 nt 周辺の領域を切り出して RNA を抽出・精製し、cDNA に逆転写した。そうして得られた cDNA ライブラリの一部をプラスミドにクローニングし、配列を確認することで、mRNA 由来の cDNA がライブラリにどの程度含まれているのかを確認した上で、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いた大規模シーケンシングに供した。

・免疫沈降法 高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS)

PpCSP1-YFP 株と、ネガティブコントロールとして構成的な *EF1 α* プロモーター下で *GFP* 遺伝子を発現させた *EF1 α _{pro}:GFP* 株からそれぞれタンパク質複合体を抽出し、GFP 抗体を用いた免疫沈降法を行った後、LC-MS により複合体に含まれるタンパク質のアミノ酸配列を決定した。*PpCSP1-YFP* 株由来のタンパク質複合体により多く含まれるタンパク質を *PpCSP* の相互作用相手の候補とした。

・ *PpCSP* の標的候補遺伝子、相互作用タンパク質候補遺伝子の機能解析

PpCSP の標的 mRNA 候補、および相互作用

用タンパク質候補をコードする遺伝子群について、蛍光タンパク質挿入株を作成してその翻訳産物の局在を確認することを試みる。とともに、遺伝子欠失株、過剰発現株を作成し、表現型の観察を試みた。

4. 研究成果

(1) *PpCSP* の標的 RNA の解明

まず、*PpCSP* に結合する mRNA を網羅的に同定するため、mRIP-seq を行った。*PpCSP1-YFP* 株と GFP 抗体、および *PpCSP1-YFP* 株と HA 抗体を用いた RNA 免疫沈降法の結果、異なる植物体試料を用いた 4 回の独立した実験の全てにおいて、HA 抗体を用いた場合よりも GFP 抗体を用いた場合で多く RNA を検出した(図 1)。この結果は、*PpCSP* が何らかの mRNA 分子と結合することを示している。

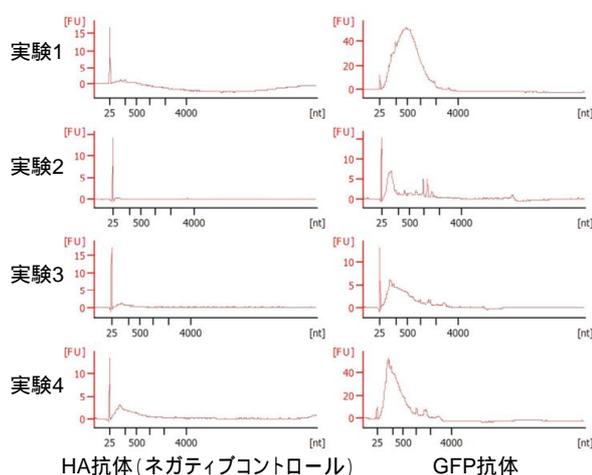


図1 RNA免疫沈降法によって得られたRNA量
バイオアナライザ(Agilent社)を用いて結果を得た。X軸はRNA長(ヌクレオチド、nt)、Y軸は相対的RNA量(fluorescence absorption units, FU)を示す。パネルごとにY軸のスケールは異なる。また、25 ntに存在するピークはマーカーを示す。

PpCSP がどのような mRNA と結合するのかを明らかにするため、RNA 免疫沈降法によって得られた mRNA の配列を大規模シーケンシングにより網羅的に明らかにした。遺伝子モデルごとに *PpCSP* が結合する RNA のリード数を集計した結果、ポジティブコントロールである input とほぼ同様の結果が得られた。この結果は、*PpCSP* がほぼ全ての mRNA と結合することを示唆している。

この結果を検証するため、より特異性が高い方法である CLIP-seq を試みた。本プロジェクトの進行中に、マウス胚性幹細胞における Lin28 の標的 RNA が CLIP-seq によって網羅的に同定され、特定の配列を有する数多くの mRNA に結合して、その翻訳を抑制することが明らかにされた(Cho et al., 2012, Cell Vol. 151)。CLIP-seq は植物試料を用いて行われたことがないため、まずヒメツリガネゴケを用いた CLIP-seq の条件検討を行った。植物体に対して複数の紫外線量を照射して架橋した

後、RNA タンパク質複合体を抽出し、複数の MNase 量で RNA を切断した。その後、RNA を放射性同位体で標識して電気泳動を行い、オートラジオグラフを取得することで、PpCSP タンパク質に適切な長さの mRNA が結合していると考えられる紫外線強度と MNase 濃度を決定した (図 2)。

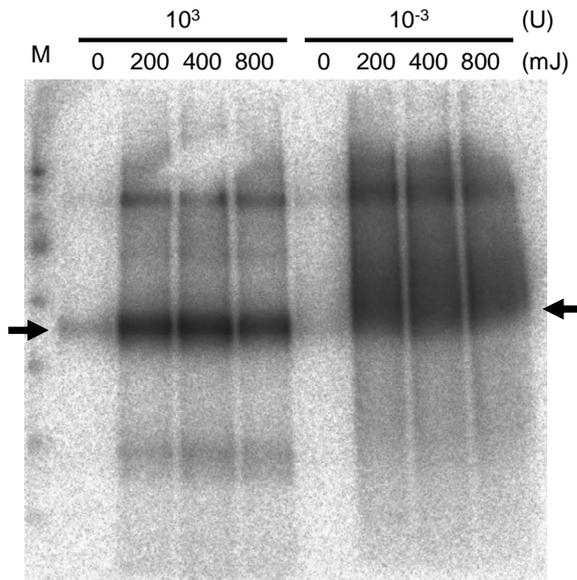


図2 RNA-PpCSP複合体泳動像の一例
RNAを放射性同位体で標識して、オートラジオグラムで像を取得した。矢印はPpCSPタンパク質の位置を示す。この位置から上にスメア状に広がった領域を切り出すことで、RNA-PpCSP複合体が効率的に単離できると期待される。上部説明のMはマーカー、上の数字はMNase量 (U)、下の数字は紫外線量 (mJ) をそれぞれ示す。この条件では、紫外線200 mJ、MNase 10^{-3} Uが適切と考えられる。

その後、本来のプロトコルでは、PpCSP タンパク質バンドの上部スメア領域を切り出して RNA の精製を行い、シーケンシングに供するが、我が国では放射性同位体を含む試料を管理区域外に持ち出すことができないため、放射性同位体を持ち出さない手法を開発した。植物体に紫外線照射を行った後、RNA タンパク質複合体を抽出、MNase で RNA を穏やかに切断して電気泳動を行い、mRNA-PpCSP-YFP 複合体が含まれると考えられる領域を切り出して、RNA の精製を行った。切り出した後のゲルはウエスタンブロッティングおよび GFP 抗体を用いた免疫染色を行い、正しい領域が切り出していることを確認した。今後、切り出したゲルからの RNA 精製の最適化を行うことで、大規模シーケンシングに供するサンプルが準備できると期待される。

mRNA の安定性を網羅的に解析する手法として、植物体を転写阻害剤である cordycepin で処理した後、マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行う mRNA decay array が開発されている (Chiba et al., 2013, Plant Cell Physiol Vol. 54)。この手法をヒメツリガネゴケに適用するため、まず

ヒメツリガネゴケに対する転写阻害処理の条件検討を行った。Cordycepin を加えない場合と比較して 10%程度に RNA 合成量が低下している最適な Cordycepin 濃度を決定した (図 3)。ヒメツリガネゴケ野生株、PpCSP 過剰発現株、ppcsp 四重欠失株を試料として、次世代シーケンサーを用いた mRNA decay array の準備が整った。

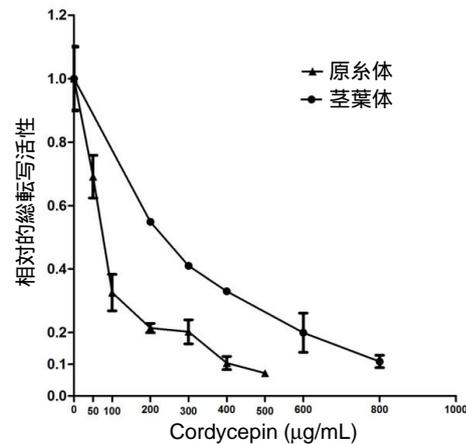


図3 Cordycepinによる転写活性の抑制
Cordycepin処理後にRNAに取り込まれた³H-ウリジンからの放射線強度を測定することで、相対的転写活性を解析した。エラーバーは3回の独立した実験から得られた標準偏差を示す。茎葉体200、300、400 μg/mLについては、1回の実験結果を示す。

また、mRNA の翻訳効率を網羅的に解明する現在唯一の手法として RIF-seq が挙げられる。シロイヌナズナにおける手法 (Liu et al., 2013, Plant Cell Vol. 25) を参考にして、まずはヒメツリガネゴケ野生株を用いて実験を行った。この方法はリボソーム mRNA 複合体を精製するため、rRNA の大量混入がどうしても避けられない。得られた cDNA ライブラリに mRNA 由来の cDNA が十分に含まれているか確認するため、cDNA の一部をプラスミドにクローニングして、サンガー法でシーケンシングを行った。その結果、33 断片中 4 断片 (約 12%) が mRNA 由来であることを確認した。この結果から、cDNA ライブラリ中に mRNA 由来の cDNA が十分に含まれていると期待できたため、残った cDNA ライブラリを用いて次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンシングを行った。もし期待通りに 10%程度の mRNA が含まれていれば、野生株、PpCSP 過剰発現株、ppcsp 四重欠失株を試料とした RIF-seq の準備が整うと期待される。

PpCSP が mRNA の安定性に機能するのであれば、PpCSP の標的 mRNA は PpCSP 過剰発現株で高発現を示すと考えられる。我々はこれまでに、野生型と PpCSP 過剰発現株を用いてトランスクリプトーム比較を行っていたが、野生型と比較して PpCSP 過剰発現株で顕著に高く発現する遺伝子群について、遺伝子欠失株や過剰発現株の作出と表現型解析

を行った。その結果、複数の過剰発現株に、成長阻害やクロロネマ カウロネマ転換の抑制などの表現型が観察された。今後、これらの過剰発現株および遺伝子欠失株を用いてリプログラミングの表現型を解析することで、これらがリプログラミングに関与する PpCSP の標的遺伝子であるかどうかを検証できると期待される。

(2) PpCSP と相互作用するタンパク質の解明

PpCSP-YFP 株と GFP 抗体、および *EF1 α _{pro}:GFP* 株と GFP 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に対して LC-MS を行った。そして、*EF1 α _{pro}:GFP* 株から抽出した複合体と比べて、PpCSP-YFP 株から抽出した複合体に多く含まれるタンパク質を、PpCSP の相互作用タンパク質の候補とした。2 回の独立した実験で、PpCSP-YFP 株に特に顕著に多く含まれていたタンパク質として、Polyadenylate-binding protein (PABP) が同定された。また、ヒメツリガネゴケに存在する 4 つの PABP タンパク質は全て PpCSP の相互作用タンパク質の候補に含まれていた。こうしたことから、PpCSP の相互作用タンパク質の一つは、PABP であると考えられた。PABP 遺伝子の一つに *Cyan fluorescent protein (CFP)* 遺伝子を導入した PABP-CFP 株を作成し、PABP タンパク質の局在を調べたところ、細胞質基質全体において PpCSP1-YFP との共局在が観察された(図 4)。このことから、PpCSP は PABP と相互作用し、より強固に mRNA と結合することが示唆された。*pabp* 一重欠失株はリプログラミングの表現型を示さなかったことから、4 遺伝子による機能の冗長性が考えられた。PABP は一般的な mRNA 代謝に関与するため、四重欠失株は致死となると考えられることから、*pabp* 三重欠失株に対して最後の PABP 遺伝子の誘導発現抑制コンストラクトを導入することで、PABP が PpCSP と同様、リプログラミングに機能するか解明できると期待される。

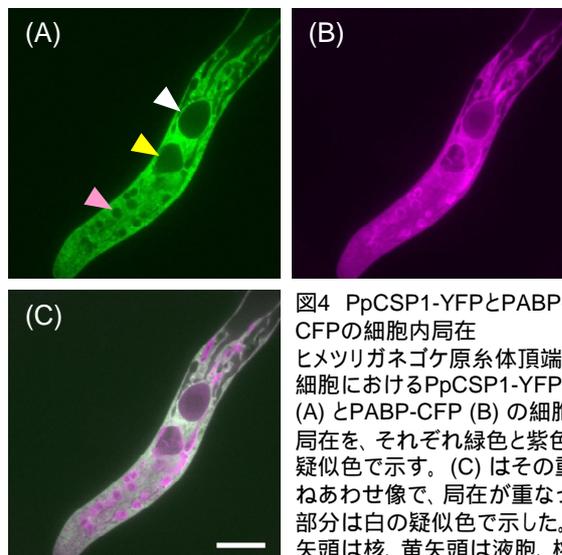


図4 PpCSP1-YFPとPABP-CFPの細胞内局在
ヒメツリガネゴケ原系体頂端幹細胞におけるPpCSP1-YFP (A)とPABP-CFP (B)の細胞内局在を、それぞれ緑色と紫色の疑似色で示す。(C)はその重ねあわせ像で、局在が重なった部分は白の疑似色で示した。白矢頭は核、黄矢頭は液胞、桃矢頭は葉緑体をそれぞれ示す。
バー:20 μ m。

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)

〔学会発表〕(計2件)

(1) Chen Li, Yosuke Tamada, Mitsuyasu Hasebe. Cold shock domain protein functions in reprogramming from differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. **RNA 2013: The 18th Annual Meeting of the RNA Society**, Jun. 11th – 16th, 2013, Davos, Switzerland

(2) Chen Li, Yosuke Tamada, Mitsuyasu Hasebe. Cold shock domain protein functions in reprogramming from differentiated cells to stem cells. **Frontiers in Plant RNA Research 2012**, Oct. 16th – 17th, 2012, Hokkaido Univ. (Sapporo, Hokkaido)

〔その他〕

(1) オーガナイザー：高見英樹、早野裕、大屋真、服部雅之、亀井保博、玉田洋介、村田隆、野中茂紀、シンポジウム『**すばる望遠鏡から顕微鏡へ：高解像・高感度観察を可能にする次世代補償光学系に向けて**』、2014年3月24、25日、国立天文台(東京都三鷹市)

(2) 実験研修：長谷部光泰、村田隆、石川雅樹、玉田洋介、壁谷幸子、「**新課程教育の基礎となる植物の最先端研究**」スーパーサイエンスハイスクールに所属する教員、学生約35名に対する植物の最先端研究についての実験研修、2014年2月15日、基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)

(3) 出張授業：玉田洋介、**すばる望遠鏡から顕微鏡へ**～補償光学による光学装置の高解像度化の実際～「生体組織に由来する像の歪みを補正する補償光学ライブイメージングの最新成果」、2013年11月11日、日本女子大学(東京都文京区)

(4) 出張授業：玉田洋介、**すばる望遠鏡から顕微鏡へ**～補償光学による光学装置の高解像度化の実際～「補償光学顕微鏡を用いた高解像細胞観察の最新研究成果」、2013年11月6日、徳島大学(徳島県徳島市)

(5) 一般公開：玉田洋介、李琛、長谷部光泰ら、**基礎生物学研究所 一般公開 2013「体感！最先端バイオの世界**」、2013年10月5日、基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)

(6) Organizer of the international public symposium: Diana M. Buzas, Yosuke Tamada. “How can epigenetic information be used to solve global issues?” at The 85th Annual Meeting of the Genetics Society of Japan, Sept. 21, 2013, Keio Univ. (Yokohama, Kanagawa)

(7) 研究・施設紹介：玉田洋介、愛知県立刈谷高等学校の高校生約 25 名に基礎生物学研究所の研究・施設紹介、2013 年 6 月 5 日、基礎生物学研究所（愛知県岡崎市）

(8) 審査員：玉田洋介、第 4 回あいち科学技術教育推進協議会発表会 文部科学省指定コア SSH（地域の中核的拠点形成）事業「科学三昧 in あいち 2012」2012 年 12 月 26 日、基礎生物学研究所（愛知県岡崎市）

(9) オーガナイザー：亀井保博、野中茂紀、服部雅之、玉田洋介、檜山武史、第 7 回 NIBB バイオイメージングフォーラム「顕微鏡の新機軸」2012 年 11 月 26 日-27 日、基礎生物学研究所（愛知県岡崎市）

(10) オーガナイザー：打田直行、岡彩子、玉田洋介、鈴木剛、新学術領域「ゲノム・遺伝子相関」第 1 回若手の会、2012 年 10 月 31 日-11 月 2 日、エクシブ琵琶湖（滋賀県米原市）

(11) 出張授業：玉田洋介、「DNA に運命は書き込まれているのか」2012 年 7 月 12 日、岡崎市立福岡中学校（愛知県岡崎市）

(12) ローカルオーガナイザー：玉田洋介、第 5 回 evo-devo 青年の会「原義の“Epigenetics”から進化を理解する」2012 年 6 月 16 日、基礎生物学研究所（愛知県岡崎市）

(13) Organizer of the special issue of the international research journal: Yosuke Tamada, Hidetoshi Saze, Liliana Costa, Tetsu Kinoshita. **“Special Focus Issue: Plant Epigenetics”**, *Plant and Cell Physiology* Vol. 53. May, 2012.

(14) 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 (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

李 琛 (LI, Chen)
総合研究大学院大学・生命科学研究所・大学院生