

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：35403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840101

研究課題名(和文) 幹細胞形成の場所と速度を決めるオーキシンネットワーク

研究課題名(英文) Auxin network spatiotemporally orchestrating stem cell initiation

研究代表者

今井 章裕 (IMAI, Akihiro)

広島工業大学・生命学部・助教

研究者番号：40711198

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を切断すると、葉細胞のリプログラミングが誘発され幹細胞が形成される。オーキシンシグナリング遺伝子の変異体においてリプログラミングに異常を示す。本研究では、オーキシンおよびオーキシンシグナリング因子の発現動態を明らかにするために、新型発光オーキシンや低分子RNAセンサーラインの開発に着手した。その結果、葉の切断によって低分子RNA群が減少し、オーキシンシグナリング因子PpARFとオーキシンの一過的な蓄積が誘導される分子機構があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In *Physcomitrella patens*, a leaf detachment induces cell reprogramming in which leaf cells are changed to stem cells. Transgenic plants defect in auxin signaling genes showed the reprogramming efficiency. In this study, to reveal the dynamics of auxin accumulation and auxin signaling factors, auxin dual-luc sensors and small RNA sensors were developed. The results suggested that leaf detachment triggers decrease in the small RNAs first and then induces a transient increase in auxin level and PpARF protein, which leads to cell reprogramming from a leaf cell to a stem cell.

研究分野：ヒメツリガネゴケを用いた幹細胞形成過程の分子基盤の研究

キーワード：オーキシン 幹細胞 発光イメージング 低分子RNA ヒメツリガネゴケ

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、細胞分裂を通じて自己複製する能力と分化する細胞を生み出す能力の両方を兼ね備えた細胞である。多くの植物で知られる高い個体再生能力は、動物の場合と比べた際の「植物における幹細胞の出来易さ」を表していると考えられるが、その分子基盤は明らかになっていない。モデル植物シロイヌナズナの根端にある分裂組織(メリステム)の維持機構や側根の発生過程における実験において、オーキシンの蓄積や極性輸送の動的変化がメリステムの形成や維持を支えていることは既に明らかであった(van den Berg et al., 1997, Nature; Xu et al., 2006, Science; De Smet et al., 2007, Development)。しかし、細胞単位で幹細胞の形成過程に着目した際、オーキシンおよびオーキシンシグナリングの動態変化については十分に理解されていなかった。その原因として、(1)メリステムの形成過程は複数回

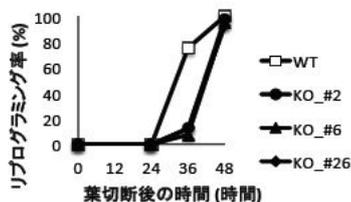
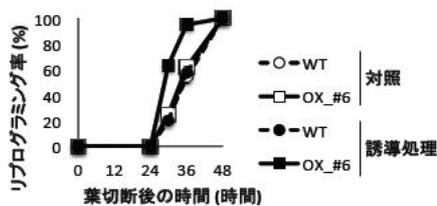
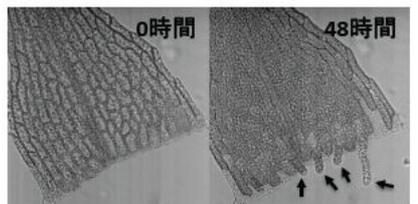


図 1. (上)葉切断後 0 および 48 時間後の葉. 矢印は幹細胞を指す (中) *PpARF11* 過剰発現誘導株(OX_#6)と野生型(WT)におけるリプログラミング率. (下) *PpARF11* ノックアウト株(KO_#2,6,26)と野生型(WT)におけるリプログラミング率.

の細胞分裂を経ることから、予定幹細胞およびその運命転換時期が明確に特定できないこと、(2)側根発生過程は、その一部始終を細胞レベルでタイムラプス観察で追跡できるほど短い時間ではないこと、(3)メリステムが器官内部に位置するため、レポーターシグナルの時空間変動を定量的に解析することが困難であること、などが挙げられていた。

コケ植物であるヒメツリガネゴケでは、切断された葉において、培養 24~48 時間程で切り口の葉細胞が幹細胞(原糸体頂端幹細胞)へと変化する(リプログラミング; 図 1 上)。この系は、シロイヌナズナのメリステムと異なり顕微鏡による観察が容易で、葉細胞から幹細胞への変化の過程を細胞ごとに追跡できるという利点がある。シロイヌナズナのオーキシン応答因子のヒメツリガネゴケのオルソログ遺伝子である *PpARF11* は、リプログラミングを促進する因子として同定された。*PpARF11* 遺伝子の過剰発現株においては、リプログラミングに至る時間が短縮されること、一方で遺伝子ノックアウト株では延長することが分かっていた(図 1 中下)。この結果から、リプログラミングに関してオーキシンシグナリングの関与が予想されたものの、オーキシンを液体培地に添加して切断葉を培養してもリプログラミングが促進される現象は確認されず、オーキシンおよびオーキシンシグナリング因子の関与について情報が乏しく、その作用機作について不明であった。

2. 研究の目的

ヒメツリガネゴケのリプログラミング過程におけるオーキシンおよびオーキシンシグナリング因子の動態を細胞ごとに解析することを目的とした。まず、発光イメージング解析技術を基盤とした「新型発光オーキシンセンサーライン」の作成に取りかかる。従

来のオーキシン応答プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターライン *GH3::Luc* と共にシグナルの定量解析を行い、リプログラミング時の細胞単位でのオーキシン蓄積の変化の可視化を試みる。次に、リプログラミングの促進因子である PpARF11 タンパク質のリプログラミング過程における動態を明らかにする。加えて、PpARF11 の制御に関わる低分子 RNA のセンサーラインを作成し、細胞単位での可視化を試みる。それらの顕微鏡観察実験から得られるデータの画像解析を行い、オーキシンシグナリングを中心とするネットワークのヒメツリガネゴケの幹細胞形成の場所と速度を規定する分子基盤を推定する。

3. 研究の方法

ダイズオーキシン応答プロモーター *GH3* は、ヒメツリガネゴケにおいてオーキシン誘導性であることが示されてきたが (Fujita et al., 2008, *Evol. Dev.*), オーキシン不活性化酵素遺伝子に由来しているため、その活性が正確なオーキシン量を反映しているとは言い難い。そこで、ヒメツリガネゴケ PpIAA タンパク質のオーキシン応答性分解ドメイン DII を使用した新型発光オーキシンセンサーラインの作成を試みた (図 2)。DII ドメインは、オーキシン量に依存して分解されるため、レポーターシグナルの強度はオーキシン量に逆相関をとる (Brunoud et al., 2012, *Nature*)。本コンストラクトでは、ヒカリコメツキムシ由来の異なる発光波長である緑色型および赤色型ルシフェラーゼの双方を使用した。緑色型ルシフェラーゼのみ DII ドメインを融合させ、手足口病ウイルス由来の自己切断配列 2A を介して赤色型ルシフェラーゼ遺伝子をインフレームで融合した (Szymczak et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*)。これにより、転写産物あたりのタンパク質生産量は両ルシフェラーゼで常に同一となるが、緑色型ルシフ

エラーゼのみオーキシンによって分解されるため、細胞間における転写量のばらつきを校正して比較することが可能である。

並行して、*PpARF11* の転写領域中にある ta-siARF および miR1219 の結合配列を蛍光タンパク質に融合した遺伝子を導入した形質転換植物 (低分子 RNA センサーライン) を作成した。この遺伝子によって産生される転写産物は ta-siARF または miR1219 の存在する細胞において分解されると期待されるため、これらの低分子 RNA の存在領域を可視化するセンサーとして有効である。

細胞レベル発光 / 蛍光イメージング解析系を用いて、上記で作出した形質転換植物においてシグナル定量実験を行った。葉の切断後のシグナル動態をタイムラプス観察し、幹細胞と非幹細胞を区別したうえでシグナルの変動を測定した。



図 2. 新型発光オーキシンセンサーラインのコンストラクト。恒常的プロモーターによって合成された転写産物から融合タンパク質が翻訳されるが、自己切断配列 2A により、翻訳後すぐに分断される。二色のルシフェラーゼの基質は共通である。緑色型ルシフェラーゼのみに分解ドメイン DII が融合しているため、オーキシン存在下では緑色の発光が減少して観察される。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

ヒメツリガネゴケの新型発光オーキシンセンサーラインの作成にむけて、ヒカリコメツキムシ由来の緑色型および赤色型ルシフェラーゼがヒメツリガネゴケの細胞内において発光活性を持つか調べた。各遺伝子を発現する形質転換体がそれぞれ緑色あるいは赤色の発光を持つことを、発光検出顕微鏡装置を用いることによって確認した。同時に、オーキシンセンサー上で両遺伝子配列を介在する自己切断配列 2A がヒメツリガネゴケ

において機能することを，ウエスタンブロット解析によって確認した。新型発光オーキシンセンサーを誘導する恒常的プロモーターを選抜する目的で，*EF1* 遺伝子のプロモーターと，エストロゲン誘導性 GX8 プロモーターを比較し，その活性の強さから GX8 を採用することに決定した (Kubo et al., 2013, PloS One)。これらの予備実験を経て，新型発光オーキシンセンサー用プラスミドの構築を行い，ヒメツリガネゴケへの形質転換を行った。

発光検出顕微鏡装置に，赤色および緑色光透過フィルターを用いて波長ごとにシグナルの検出を試みた。切断した葉において補正されたシグナルを解析したところ，切断後わずか 2 時間目で，切り口の細胞を除いた葉細胞でオーキシンの増加を示すシグナルの変化が検出された。この空間的なオーキシン量の変化については，オーキシンレポーターである GH3 プロモーターと蛍光タンパク質を用いた実験結果と矛盾しない。しかし，これらのライン間では，オーキシン量の増加が検出されるタイミングが「新型センサーライン」の方がより速い，という違いがあった。この違いは，蛍光タンパク質の蛍光開始までのタイムラグによって説明することができ，「新型センサーライン」は，オーキシン量の素早い変化に，時間的により正確に応答できていると考えられた。

新型発光オーキシンセンサーラインおよび既存の *GH3::Luc* ラインを用いて，リプログラミング時のオーキシン蓄積の動態を解析した。解析には画像解析ソフト ImageJ と統計解析ソフト R を用いて，顕微鏡の二色ルシフェラーゼの各発光に関するフィルターの漏れこみ率を補正した自作プログラムを使用した。その結果，オーキシン量は葉の切断後 12 時間ほどで一過的に上昇することが明らかになった (図 3)。その上昇は，リプログラミングした細胞に限定されておら

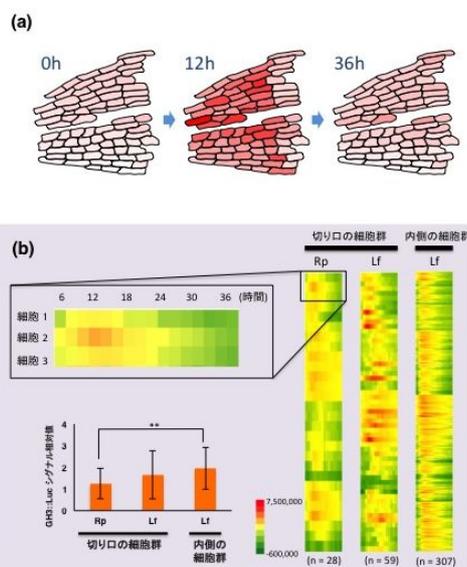


図 3. リプログラミング過程におけるオーキシン蓄積の動態。(a) 画像解析によって得られた発光値をもとに作成したヒートマップ。ここでは *GH3::Luc* シグナルの値が高いほど赤色が濃く表示されている。(b) 切断時の葉細胞の場所およびリプログラミングの有無でカテゴリ化したヒートマップ。それぞれの行は別の細胞を指す。切断後の *GH3::Luc* シグナルの強さを表示している。

ず，むしろ非リプログラミング細胞で顕著な上昇の傾向があった。必ずしも全ての細胞において「オーキシンの増加が強い細胞がリプログラミングする」法則が当てはまるわけではなかったが，当初予想されていた，オーキシンまたはオーキシンシグナリングがリプログラミングに必須である，という単純な仮説を覆す結果であった。

低分子 RNA である miR1219 の過剰蓄積によって，標的遺伝子である *ARF11* の転写産物量の低下と，幹細胞化の遅延が引き起こされるという実験結果が得られた。これは miR1219 が，*ARF11* を介して幹細胞化を負に制御する可能性を示す結果である。加えて，miR1219 および tasi-ARF の蓄積を可視化できる低分子 RNA センサーラインを作成した。なお，本センサーラインの誘導に使用した *PpARF11* 遺伝子のプロモーターが，葉の切断後の活性変動に有意な差がないことを確認してある。その結果，野生型センサーラインにおいて，切断後に蛍光シグナルの増加が

見られることが明らかになった。この蛍光シグナルの増加は極めて早く、切断後約 2 時間で開始していた。一方、変異型センサーラインでは、蛍光シグナルの増加は確認されなかった。この結果は、葉の切断刺激にตอบสนองして、全ての葉の細胞において低分子 RNA の減少が起きることを示す。

加えて、リプログラミング過程における PpARF11 タンパク質の動態を YFP ノックインレポーターラインを用いてスピニングディスク顕微鏡で観察したところ、葉の切断後 2 時間ほどから核内でシグナルが観察され、6 時間目頃をピークに 12 時間頃には消失していくことが明らかになった。

以上の結果から、リプログラミング過程におけるオーキシンおよびオーキシンシグナリング因子からなるネットワークの仮説を提唱する(図 4)。PpARF11 プロモーターは常に活性状態にあり、転写産物を産生するが低分子 RNA によって分解されている。葉の切断に最初にตอบสนองするのは低分子 RNA の減少(～ 2 時間目)であり、それによって転写産物と ARF11 タンパク質の蓄積が開始する(2～12 時間目)。これまでの予備的な実験で、PpARF11 遺伝子を過剰発現させることで、オーキシン生合成関連遺伝子の発現が促されることが示唆されている。オーキシンセンサーラインによって明らかになったオーキシン量の一時的な増加は 12 時間目であったことから、PpARF11 の蓄積に由来するオーキシンの生合成である可能性がある。このオーキシンの強い一過的な蓄積がリプログラミングを阻害しているのかもしれない。本研究では、葉の切断後のオーキシンおよびオーキシンシグナリング因子の動態は概ね明らかになったが、切り口と非切り口の細胞の違い、リプログラミングする細胞としない細胞の決定に関する、これらの因果関係は不明なままであり、今後の研究が必要である。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で開発したオーキシンデュアルセンサーは、発光イメージングを技術基盤としている。発光イメージングは、励起光による細胞のダメージや、シグナル定量における低い直線性、といった発光イメージングの問題を克服することができる。また、リプログラミング初期過程のように遺伝子の発現が短い時間で大きく増減する場合には最適な系であると考えられる。自己切断配列 2A を用いることで、細胞間の転写量のずれを補正できる本系は今後の細胞の運命転換過程を細胞レベルで解明していく上で重要な研究ツールになると期待される。

また、本研究の結果から、植物の幹細胞形成におけるオーキシンの抑制的な作用が示唆された。これまで幹細胞化過程において、オーキシン、オーキシンシグナリングおよび極性輸送は必須な要因であると考えられてきたが、本研究の成果によってオーキシン機能の新たな側面を示すことができたと考える。

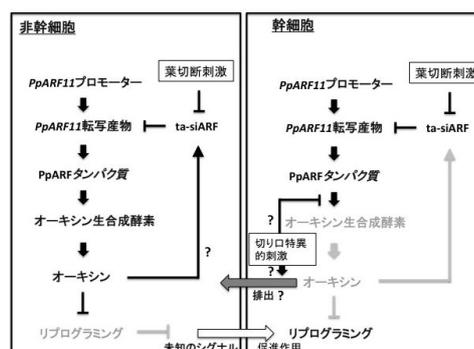


図 4 幹細胞オーキシンネットワーク仮説. システム的な葉切断刺激により PpARF11 タンパク質は全ての細胞で蓄積するが、切り口の細胞ではオーキシンは蓄積しない。非幹細胞のみでフィードバックは活性化され、オーキシンのピーク(プライミング)が起こる。非幹細胞はプライミングの起きていない隣接細胞に対しリプログラミングを促進するというモデル。

(3) 今後の展望

新型発光オーキシンセンサーをヒメツリ

ガネゴケ以外の多様な生物または組織で応用して行く上での問題点には、そのシグナルの微弱さと自己切断配列 2A の低い効率が挙げられる。CCD カメラはその感度において日々進歩しているものの、発光シグナルを倍増させるためのコンストラクトの改良が必要である。また、本研究ではオーキシネットワークとリプログラミングの直接的な因果関係を実証することができなかつたため、熱依存的な遺伝子発現誘導システムである IR-LEGO (Kamei et al., 2009, Nat. Methods) を用いた非切断時における単一細胞のリプログラミングの誘導実験を行うことで、直接的なリプログラミングへの関与が証明できると考える。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Li C, Sako Y, Imai A, Nishiyama T, Thompson K, Kubo M, Hiwatashi Y, Kabeya Y, Karlson D, Wu SH, Ishikawa M, Murata T, Benfey PN, Sato Y, Tamada Y, Hasebe M, A Lin 28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*, Nat. Commun. 査読有, 2017, 8:14242 DOI: 10.1038/ncomms14242.

今井章裕, 村田隆, 長谷部光泰, ルシフェラーゼを用いた細胞レベルの遺伝子発現動態解析, バイオイメージング, 査読有, 2015, 24:12-16 DOI: なし

[学会発表] (計 2 件)

今井章裕, 永島明知, 壁谷幸子, 村田隆, 長谷部光泰, 発光イメージングを用いた幹細胞形成を制御するオーキシネットワークの解明へのアプローチ, 平成 30 年度生物系三学会中国四国支部大会, 2018 年

玉田洋介, Li Chen, 佐古祐介, 今井章裕, 佐藤良勝, 長谷部光泰, 動植物に保存された幹細胞化促進因子の機能解析, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今井章裕 (IMAI, Akihiro)

広島工業大学・生命学部・助教