

令和元年5月31日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07119

研究課題名(和文) 幹細胞化における細胞運命転換を制御するCDKAの標的因子の探索

研究課題名(英文) Identification of the CDKA-target factors that regulate cellular changes during stem cell formation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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、切断面に面した葉細胞が細胞周期を再開し原糸体頂端幹細胞へと変化する。この過程において、CDKAプロテインキナーゼが葉細胞の細胞周期制御に加え、細胞運命転換を制御している。その分子機構を解明するため、CDKAの標的タンパク質を生化学的手法により探索したところ、ヒストン修飾を制御する酵素を同定した。このことから、CDKAがヒストン修飾酵素の活性を制御することで、エピジェネティックな変化を引き起こし、細胞運命転換を誘導する可能性が考えられた。また、生細胞でCDKAのキナーゼ活性をモニターするセンサーを作製し、組織レベルで検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞周期制御因子であるCDKAが、ヒストン修飾変化を制御している可能性が示唆され、CDKAが細胞周期と細胞運命転換の両方を同時に制御する分子機構の一端が見えてきた。このことは、多細胞体制の形成と維持における細胞増殖と細胞分化の相関関係を規定する分子基盤の統合的な理解に繋がることが期待される。またCDKAのキナーゼ活性をモニターするセンサーの開発は、他のプロテインキナーゼや酵素活性をモニターするバイオセンサーへの開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the moss *Physcomitrella patens*, when a leaf is excised from a gametophore and cultivated for a few days on culture medium without phytohormone supplementation, leaf cells facing the cut change into cells that are not distinguishable from chloronema apical cells. During this process, a cell cycle regulator, cyclin-dependent kinase A (CDKA), functions in coordination between cell cycle reactivation and acquisition of new cell-type characteristics. To understand roles of CDKA in the stem cell formation, we performed interactome and phosphoproteomic analyses to identify CDKA-target proteins. As a result, we identified a factor involved in the histone modifications, suggesting that CDKA regulates epigenetic modifications to induce cellular changes. In addition, we developed a sensor to detect the CDKA protein kinase activity at tissue levels.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ヒメツリガネゴケ 幹細胞 細胞周期 CDKA 細胞運命転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

動植物の多細胞体制を構成する多くの分化細胞は、細胞分裂を停止させて、特定の機能と特性をもっている。ところが、ある種の動物や植物では、傷害によって失われた組織や器官を容易に再生させることができる。ヒトデやヒドラなどの動物では、傷害部位にある幹細胞が活性化され組織・器官再生を行っているのに対して、植物では、傷害部位にある分化した細胞が細胞分裂を再開させるとともに、その細胞が保持していた特定の細胞機能を喪失させ、他の細胞機能(性質)をもった細胞へと変化(細胞運命転換)させることができる(Sugimoto et al., 2011 Trends in Cell Biol. 21, 212)。

この植物細胞の可塑性を支える分子基盤には、細胞分裂と細胞運命転換の可逆的な調節がある。すなわち、分裂を停止し分化した細胞が、傷害に応じて再び分裂を始め、新たな組織や器官を形成できるよう、細胞分裂と細胞運命転換が協調的に制御されている(Veylder and Inze, 2007 Nature Cell Biol. 8, 655)。細胞分裂を制御する分子機構(細胞周期制御機構)は、酵母や動植物の培養細胞を用いた研究から、その大枠は明らかになってきている(Inze and Veylder, 2006 Annu. Rev. Genet. 40, 77)。一方、細胞運命転換では、クロマチン状態の変化や(Zhao et al., 2001 J. Biol. Chem. 276, 27772; Grafi, 2004 Dev. Biol. 268, 1)、細胞運命転換に関わる転写因子の個別解析が行われているが(Banno et al., 2001 Plant Cell 13, 2609; Iwase et al., 2011 Curr. Biol., 21, 508; Waki et al., 2011 Curr. Biol., 21, 1277)細胞運命転換を誘導する素過程の解明には至っていない。一つの理由として、被子植物では、多細胞体制の内部で一部の増殖過程にある細胞が細胞運命転換をおこすため、細胞周期制御機構と分けて解析することが難しいことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

これまでに研究代表者は、コケ植物ヒメツリガネゴケを用いて分化細胞である葉細胞から幹細胞である原系体頂端幹細胞へ転換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)。葉を切断すると、切断面に面した葉細胞が細胞周期を再開して、幹細胞である原系体頂端幹細胞へと変化する。この過程で細胞周期制御因子である A タイプサイクリン依存性キナーゼ(CDKA)が活性化され、葉細胞の細胞周期の再開・進行と細胞運命転換を制御することを発見した(Ishikawa et al., 2011)。また細胞分裂を止めても、細胞運命転換が起こることから、幹細胞化過程にある細胞では、細胞周期制御機構と細胞運命転換制御機構は、平行して進行しており、CDKA が二つの過程をそれぞれに制御していることが考えられる。またゲノム配列の比較から、陸上植物間で基本的な遺伝子セットは保存されているので(Banks et al., 2011 Science 332, 960)、ヒメツリガネゴケに存在する細胞運命転換を誘導する分子機構は陸上植物全体でも機能している可能性は大きい。そのため、細胞周期制御以外で CDKA の下流で機能している因子を見つけ出せば、その因子は細胞運命転換に関わる可能性があり、その機能解析を行うことで細胞運命転換を誘導する分子機構の解明に繋がることが期待される。

本研究では、ヒメツリガネゴケの幹細胞化で活性化される細胞周期制御因子 CDKA が、どのようにして葉細胞の性質から原系体頂端幹細胞の性質へと変化させているのか、その分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケの細胞周期制御因子である CDKA は、細胞分裂だけでなく、葉細胞の性質から幹細胞への性質への変化も制御している。そこで本研究では、CDKA による細胞運命転換の分子機構を明らかにするため、ヒメツリガネゴケを用いて以下の実験を行なった。

- (1) 幹細胞化過程における CDKA 標的タンパク質を生化学的手法により探索した。
- (2) 細胞レベルでの経時的な変化を調べるため、CDKA が活性化される細胞を特定することが

不可欠であった。そこで、細胞レベルで CDKA キナーゼ活性を経時的にモニターできるバイオセンサーの開発に着手した。

(3) (1)で得られた候補因子のなかで、細胞周期の進行に影響を及ぼさないが、細胞運命転換に影響を及ぼす因子が目的としている因子であることが考えられた。そこで、候補因子の中で、細胞運命転換に関わっていると考えられる因子を選び出した。また、タバコやシロイヌナズナなどの被子植物で、RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) が CDKA の標的因子として細胞周期や幹細胞の維持に関わっていることが知られている。そこで、ヒメツリガネゴケの RBR についてもバイオセンサーの開発に利用するとともに、幹細胞化における機能解析を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) CDKA 標的因子の探索

#### リン酸化レベルの違いによる CDKA 標的タンパク質の探索

当初の計画では、放射性同位体元素で標識された ATP を用いた二次元電気泳動法による解析を行う予定であったが、所属機関において超高分解能フーリエ変換型質量分析装置が利用できるようになった。そこで、リン酸化タンパク質濃縮カラムを用いて、ヒメツリガネゴケの野生型と CDKA 遺伝子欠失株 (*cdka* 変異体) の切断葉からリン酸化タンパク質のみを抽出し、当該質量分析装置で解析した。その結果、野生型ではリン酸化されているが、*cdka* 変異体ではリン酸化されていないタンパク質が複数見つかった。それらタンパク質の中に、ヒストン修飾制御に関わっていると考えられる因子が含まれていた。このことから、幹細胞化の過程で活性化された CDKA が、ヒストン修飾制御因子をリン酸化することで活性化(あるいは不活性化)し、ゲノム DNA 上のヒストン修飾状態を変化させることで遺伝子発現パターンを変化させ、葉細胞から幹細胞へと誘導させる可能性が示唆された。

#### *in vitro* キナーゼアッセイの改良

CDKA 標的タンパク質の同定には、候補となる因子が CDKA によってリン酸化されるのか *in vitro* で調べる必要があった。そこで、ATP アナログで 位がチオリン酸基になっている ATP

S と、抗チオリン酸化特異的抗体を用いたイムノプロット解析により、簡便に CDKA のキナーゼ活性を検出できる実験系を確立した。

次にシロイヌナズナなどで CDKA によってリン酸化されることが知られている RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) に着目した。ヒメツリガネゴケにも三種類の RBR (RBR;1, RBR;2, RBR;3; Ishikawa et al., 2011) が存在しており、CDKA によってリン酸化されるアミノ酸配列も保存されている。そこで、上記のキナーゼアッセイを行い、ヒメツリガネゴケの RBR が CDKA によってリン酸化されることを確認した。

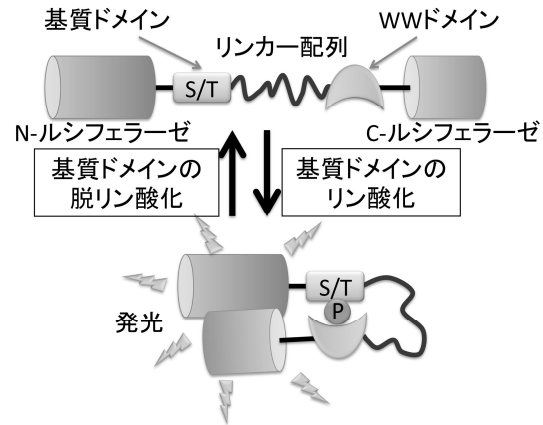
#### CDKA 結合タンパク質の探索

CDKA の標的因子は、幹細胞化の過程で CDKA と結合することが考えられたので、(a) の実験と並行して、CDKA 複合体に含まれているタンパク質を特定する実験を行なった。Myc 抗体を用いた免疫沈降ができるように、CDKA に Myc タグを融合させた CDKA-Myc タンパク質を発現する形質転換体を作製し、その形質転換体の切断葉からタンパク質を抽出し、Myc 抗体を用いた免疫沈降法により CDKA-Myc 複合体を回収し、複合体に含まれているタンパク質を質量分析装置で解析した。しかしながら、CDKA の標的になりうる因子は含まれていなかった。これは、酵素と基質の関係であるため、その結合が弱く、精製過程で解離する可能性が考えられた。

そこで、タンパク質のクロスリンカーの条件検討を行い、その一つである DSSO を用いることで、CDKA と何らかのタンパク質が架橋されていることが分かった。この方法により、CDKA-Myc 複合体に含まれている因子を同定することが可能になったと考えている。

## (2) CDKA プロテインキナーゼ活性をモニターするバイオセンサーの開発

**CDKA** プロテインキナーゼ活性を生細胞で検出するためのセンサーを開発するため、ホタルのルシフェラーゼをN末端側半分 (N-ルシフェラーゼ) と、C末端側半分 (C-ルシフェラーゼ) に切断し、その間に CDKA 標的タンパク質の一つである RBR;1 の CDKA リン酸化部位、リンカー配列、プロリン異性化酵素 Pin1 タンパク質内にある WW ドメインを連結したコンストラクトを作製した (右図)。



このコンストラクトを野生型と *cdka* 変異体に導入し、ルミノメーターを用いて原糸体全体での発光強度を調べたところ、*cdka* 変異体よりも野生型で強い発光が観察された。このことから、このコンストラクトが CDKA 依存的に機能していることが示唆された。しかしながら、顕微鏡システムを用いての解析では、個々の細胞からの発光を検出できなかった。

そこで、ホタルルシフェラーゼよりも 80 から 240 倍の発光強度をもつウミシイタケの NanoLuc を用いたコンストラクトを作製し、検証を行なった。原糸体での発光強度をルミノメーターで調べたところ、ホタルルシフェラーゼを用いたコンストラクトに比べて、発光強度が 10 倍程度強いことが分かった。しかしながら *cdka* 変異体でも強い発光が観察されたため、細胞レベルでの検出には、リンカーの長さやドメイン構造の順番などのさらなるコンストラクトの改良が必要になった。

## (3) 幹細胞化における CDKA 標的タンパク質の機能解析

CDKA 標的タンパク質の一つであると考えられる RBR に、GUS 遺伝子をノックインした株、および、遺伝子欠失株を作製し、その時空間的発現解析、および、表現型の解析を行なった。その結果、3 種類の RBR は幹細胞化の過程で発現が上昇することが分かった。しかしながら、2 つの RBR 遺伝子 (RBR;2 と RBR;3) を欠失させた株では幹細胞化に影響がなかった。一方、RBR;1 は遺伝子欠失株を作ることができなかつたため、RBR;1 がヒメツリガネゴケの生育にとって必須な遺伝子であることが示唆された。

## (4) CDKA の活性化に必要なサイクリン D 遺伝子の発現制御

幹細胞化において、CDKA の活性化に必要と思われるサイクリン D 遺伝子が、AP2 型転写因子 STEMIN1 によって直接制御されていることが分かった。また、葉細胞でのサイクリン D 遺伝子は、抑制型ヒストン修飾であるヒストン H3K27me3 が存在しているが、STEMIN1 誘導後、H3K27me3 修飾レベルが下がることが分かった。

## (5) 今後の展望

本研究により、CDKA の下流でヒストン修飾制御因子が機能している可能性が示唆された。ほ乳類培養細胞では、CDKA ホモログがヒストンメチル化を制御するポリコムタンパク質をリン酸化し、その活性を制御している (Chen et al., 2010 Nature Cell Biol. 12, 1108)。そのため、CDKA によるクロマチン修飾変化は動植物で保存されていることが考えられ、今回同定した因子の機能解析を進めることで、動植物に共通な細胞運命転換を制御する分子基盤の理解へと繋がる可能性がある。

また CDKA プロテインキナーゼ活性を検出するバイオセンサーの開発は、コンストラクトを改良することで、細胞レベルでの検出が可能になると考えている。また、このセンサーは、CDKA だけでなく、標的タンパク質の配列を変えることで、他のプロテインキナーゼ活性を検出することができる可能性があり汎用性が高いと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kubo, M., Nishiyama, T., Tamada, Y., Sano, R., Ishikawa, M., Murata, T., Imai, A., Lang, D., Demura, T., Reski, R., Hasebe, M. (2019). Single-cell transcriptome analysis of *Physcomitrella* leaf cells during reprogramming using microcapillary manipulation. **Nucleic Acids Res.** 47, 4593-4553. doi: 10.1093/nar/gkz181 査読有

Li, C., Sako, Y., Imai, Y., Nishiyama, T., Thompson, K., Kubo, M., Hiwatashi, Y., Kabeya, Y., Karlson, D., Wu, S.H., Ishikawa, M., Murata, T., Benfey, P.N., Sato, Y., Tamada, Y., and Hasebe, M. (2017). A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. **Nat. Commun.** 8, 1-13. doi: 10.1038/ncomms14242 査読有

Ishikawa, M. and Hasebe M. (2015). Cell cycle reentry from the late S phase: implications from stem cell formation in the moss *Physcomitrella patens*. **J. Plant Res.** 128, 399-405. doi: 10.1007/s10265-015-0713-z 査読有

### 〔学会発表〕(計 11 件)

Ginanjjar, E.F., Ishikawa, M., Sekine, M., Inoue, N., Hasebe, M., Teh, O.-K., and Fujita, T. (2019). "Requirement of kinase activity Of CDKA on the novel functions in the Moss, *Physcomitrella patens*." 第 60 回 日本植物生理学会年会 平成 31 年

Gu, N., Tamada, Y., Imai, A., Palfalvi, G., Shigenobu, S., Ishikawa, M., Chen, C., and Hasebe, M. (2018). "DNA damage induces cellular reprogramming of differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*." 日本遺伝学会第 90 回大会 平成 30 年

Frink, B., Takabayashi, A., Ishikawa, M., Suzuki, Y., Sagano, S., Tanaka, A., Hasebe, M., and Fujita, T. "RNA-seq data analysis of CDKA double knockout in *Physcomitrella patens* and investigation into affected potassium transport and photosynthesis pathways." 日本植物学会第 82 回大会 平成 30 年

石川雅樹, 森下美生, 重信秀治, 長谷部光泰「陸上植物がもつ細胞の分化状態を打破するシステム」日本植物学会第 82 回大会 平成 30 年

井上夏実, Liang, B., 石川雅樹, 比嘉毅, 日渡祐二, 関根政実, Teh, O.-K., 長谷部光泰, 和田正三, 藤田知道「ヒメツリガネゴケ CDKA の光応答における制御機構」第 59 回日本植物生理学会年会 平成 30 年

菅原駿人, 井上夏実, Bao, L., Teh, O.-K., 石川雅樹, 比嘉毅, 関根政実, 綿引雅昭, 門田明雄, 長谷部光泰, 藤田知道「葉緑体光定位運動における CDKA の機能解析」第 59 回日本植物生理学会年会 平成 30 年

森下美生, 石川雅樹, 長谷部光泰「転写因子 STEMIN1 は幹細胞化に関わる遺伝子のヒストン H3K27me3 レベルを制御する」第 58 回日本植物生理学会年会 平成 29 年

井上夏実, Liang, B., 石川雅樹, 比嘉毅, 日渡祐二, 関根政実, 綿引雅昭, 長谷部光泰, 和田正三, 藤田知道「ヒメツリガネゴケにおける CDKA の光応答制御」第 58 回日本植物生理学会年会 平成 29 年

井上夏実, Liang, B., 石川雅樹, 比嘉毅, 日渡祐二, 関根政実, 綿引雅昭, 長谷部光泰, 和田正三, 藤田知道「ヒメツリガネゴケにおける CDKA の光応答制御」日本植物学会第 80 回大会 平成 28 年

石川雅樹, 森下美生, Zhang, L., 長谷部光泰「陸上植物における幹細胞誘導を制御する分子機構」日本植物学会第 80 回大会 平成 28 年

川田慎也, Liang, B., 石橋充浩, 巻口勇馬, 野田なつみ, 日渡祐二, 石川雅樹, 鈴木譲, 菅野純夫, 長谷部光泰, 藤田知道「細胞周期制御因子サイクリン依存性リン酸化酵素 A (CDKA) によるストレス応答制御への関与」日本植物学会第 79 回大会 平成 27 年

〔図書〕(計 1件)

石川雅樹「ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構」植物科学の最前線 (BSJ-Review)  
2015 vol. 6, p. 41-50 (公社)日本植物学会

〔その他〕

ホームページ等

基礎生物学研究所 生物進化研究部門：

[http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary\\_biology\\_and\\_biodiversity/hasebe/](http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/hasebe/)

基礎生物学研究所 生物進化研究部門 長谷部研究室：

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

## 6. 研究組織

(1)研究協力者

氏名：長谷部 光泰

ローマ字氏名：**(Hasebe, Mitsuyasu)**

氏名：村田 隆

ローマ字氏名：**(Murata, Takashi)**

氏名：藤田 知道

ローマ字氏名：**(Fujita, Tomomichi)**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。