

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14760

研究課題名(和文) DNA損傷による幹細胞化誘導機構の探索

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism underlying stem-cell formation induced by DNA damage

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、ヒメツリガネゴケにおいて、DNA損傷が細胞リプログラミングを介した幹細胞化を誘導することを発見した。この結果を受けて、本課題では、DNA損傷が幹細胞化を誘導する分子機構の解明を主な目的として研究を行った。その結果、DNA損傷による幹細胞化に必須のDNA修復関連因子と傷害応答幹細胞化因子を同定した。さらに、別のDNA損傷関連因子が正常な精子形成過程におけるクロマチン構造制御に不可欠であることを解明した。以上の結果から、DNA損傷がDNA修復と傷害応答幹細胞化経路を介して幹細胞化を誘導すること、DNA損傷が精子形成という細胞リプログラミング現象に機能することを解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that DNA damage induces cellular reprogramming from differentiated leaf cells to protonema stem cells without cell death in the moss *Physcomitrella patens*. This project aimed at understanding the molecular mechanism underlying this phenomenon. We found that a DNA repair-related factor and wounding-induced reprogramming factors are necessary for the DNA damage-induced reprogramming. In addition, another DNA damage-related factor was involved in the regulation of chromatin structure during the sperm formation. These results indicate that DNA damage-induced reprogramming is mediated by DNA repair- and wounding-induced reprogramming pathways, and that DNA damage also contributes to the sperm formation, one of the developmental processes embracing cellular reprogramming.

研究分野：発生生物学、分子生物学、植物分子・生理科学、エピジェネティクス

キーワード：DNA損傷 幹細胞化 細胞リプログラミング クロマチン 発生・分化 植物

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、陸上植物の系統で DNA 損傷応答の分子機構がどのように進化したかを推定するため、基部陸上植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用いて、DNA 損傷試薬に対する応答や、DNA 損傷応答に関与する遺伝子の欠失株の作出と表現型の観察を行ってきた。その過程で、ヒメツリガネゴケの茎葉体に DNA の一本鎖切断 (single-strand break) や二本鎖切断 (double-strand break) を誘導する試薬を投与したところ、予期せぬことに、分化した葉の細胞が幹細胞化し、原糸体頂端幹細胞へと変化することを発見した (図1)。ヒメツリガネゴケでは、葉の切断など物理的な傷害ストレスによって幹細胞化が誘導されることから (Ishikawa et al. 2011, Plant Cell)、DNA 損傷試薬が細胞死を誘導して、それが傷害となって周囲の細胞が幹細胞化した可能性が考えられた。しかしながら、投与した DNA 損傷試薬の濃度では細胞死は起きておらず、DNA 損傷によって細胞リプログラミングが誘導され、幹細胞へと変化したことがわかった。

DNA 損傷が直接幹細胞化を誘導する例は、動植物を通じて報告されていない。動物細胞における多能性幹細胞 (iPS 細胞) 誘導の過程で DNA 損傷が起き、DNA 損傷応答因子の発現が上昇することが知られている。しかし、DNA 損傷は p53 を介した細胞死を誘導することから、DNA 損傷は多能性因子過剰発現の副作用であり、DNA 損傷自体は iPS 細胞化を阻害すると考えられている (Marion et al. 2009, Nature; Gonzalez et al. 2013, Cell Rep; Weissbein et al. 2014, J Cell Biol)。申請者らが発見した DNA 損傷による幹細胞化の誘導は、DNA 損傷が幹細胞化の副作用ではなく、むしろ幹細胞化を促進することを示している。

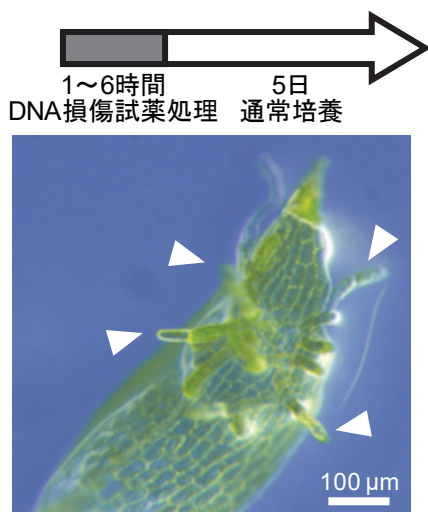


図1 DNA損傷による幹細胞形成
矢頭は分化した葉細胞から形成された原糸体頂端幹細胞を示す。

最近、DNA 損傷によって被子植物シロイヌナズナの根の幹細胞ニッチに選択的な細胞死が誘導され、それが幹細胞新生と根の再生のトリガーとなっていることが解明されたが (Johnson et al. 2018, Plant Physiol)、この場合も DNA 損傷が分化細胞からの幹細胞化を直接誘導しているわけではない。

2. 研究の目的

以上の結果を受けて、本課題では以下の2点を研究目的とした。

(1) DNA 損傷が幹細胞化を誘導する分子機構の解明

既知の DNA 損傷応答因子の中から幹細胞化をトリガーする因子を解明し、さらにトランスクリプトーム解析によって DNA 損傷と幹細胞化をつなぐ因子を同定することを試みた。

(2) 既知の細胞リプログラミング現象に対する DNA 損傷の機能の検証

精子・卵細胞形成や受精、孢子形成、物理的傷害刺激による幹細胞化などの既知の細胞リプログラミング現象にも DNA 損傷が関与しているという仮説を立て、これらの細胞リプログラミング現象に寄与する DNA 損傷関連因子の単離を試みた。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケを用いて以下の実験を行った。

DNA 損傷が誘導する幹細胞化に必須の因子の同定

DNA 損傷応答に機能する複数の遺伝子の欠失株をそれぞれ作出した。それらの茎葉体に DNA 損傷を誘導する試薬を処理して、幹細胞化が誘導されるか観察した。また、Cold shock domain protein (CSP) 遺伝子群 (Li et al. 2017, Nat Commun) など、傷害刺激による幹細胞化に機能する既知の遺伝子群の欠失株の茎葉体についても DNA 損傷誘導試薬を処理し、幹細胞化が誘導されるか観察した。

DNA 損傷に応答する遺伝子の探索と解析

野生株に DNA 損傷誘導試薬を処理し、DNA 損傷誘導前、誘導中、誘導後の試料をそれぞれ採取して RNA を抽出した。その後、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて 50 bp、Single end リードの RNA-sequencing を行った。得られたトランスクリプトームを TCC 法 (Sun et al. 2013, BMC Bioinformatics) にて比較し、DNA 損傷応答によって有意に発現が変動する遺伝子 (differently expressed genes, DEGs) を同定した。それら DEGs とすでに得られていた野生株におけるゲノムワイドなクロマチン修飾のパターン (エピゲノム) とを比較し、DNA 損傷応答におけるクロマチン修飾の寄与について解析した。

既知の細胞リプログラミング現象に対するDNA損傷の機能の検証

DNA損傷応答に機能する複数の遺伝子の欠失株および野生株を25°C、連続明条件にて3~4週間培養し、茎葉体の葉を切断して傷害刺激による幹細胞化の表現型を観察した。また、DNA損傷関連遺伝子の欠失株および野生株を25°C、連続明条件にて約5週間培養した後、15°C、短日(8時間明、16時間暗)条件にうつして造精器、造卵器を誘導し、これらの組織、および胞子体が得られた場合は胞子体を実体顕微鏡や共焦点顕微鏡などを用いて観察した。

掛け合わせ実験については、掛け合わせる2種の株をそれぞれピートモス上で25°C、連続明条件にて約5週間培養した後、同じプラントボックスに入れてさらに15°C、短日(8時間明、16時間暗)条件にて約2週間半培養して造精器、造卵器を誘導した後、滅菌水を加えて掛け合わせを行った。

4. 研究成果

(1) DNA損傷が幹細胞化を誘導する分子機構の解明

複数のDNA損傷応答遺伝子について欠失株を作成してDNA損傷を誘導したところ、DNA損傷による幹細胞化が起きなくなる欠失株を発見した(図2)。その責任遺伝子(仮に*DNA damage-related1*, *DND1*と命名)が幹細胞化をトリガーしていると考えられた。

また、DNA損傷誘導前後の試料を用いてRNA-seqを行い、トランスクリプトームを比較した結果、DEGsには野生株において抑制型クロマチン修飾H3K27me3が局在する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。一方、DEG以外の遺伝子群にはH3K27me3が局在する遺伝子はほとんど含まれていなかった。このことから、DNA損傷応答にはH3K27me3が機能していることが示唆された。さらに、DEGには数多くのDNA損傷応答遺伝子が含まれていたが、これらの遺伝子の発現上昇の後、一過的に発現が上昇する遺伝子として、植物ホルモン合成遺伝子、クロマチン関連遺伝子などが同定された。これらの中に、DNA損傷と幹細胞化をつなぐ遺伝子が含まれていると考えられた。

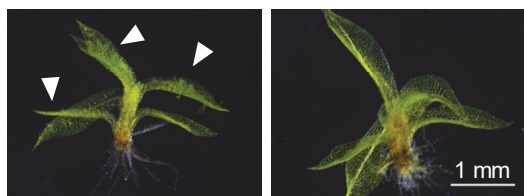


図2 DNA損傷による幹細胞形成が起きない*DND1*遺伝子欠失株
培養開始後3週目の植物体から採取した茎葉体にDNA損傷試薬を処理し、7日後に撮影した。野生株(左)と*DND1*遺伝子欠失株(右)をそれぞれ示す。矢頭は分化した葉細胞から幹細胞が形成された葉を示す。

(2) 既知の細胞リプログラミング現象に対するDNA損傷の機能の検証

DNA損傷が既知の細胞リプログラミング現象にも機能するか明らかにするため、複数のDNA損傷応答遺伝子の欠失株を用いて、精子形成、卵細胞形成、初期胚発生、傷害による幹細胞化など、細胞リプログラミングが関与する生命現象に異常がないか観察した。その結果、ある遺伝子(仮に*DND2*と命名)の欠失株では胞子体形成率が著しく低下することを発見した。胞子体形成率の低下は、精子形成、卵細胞形成、初期胚発生のいずれかに異常が生じたため引き起こされる。DNA損傷関連遺伝子欠失株と野生株の掛け合わせ実験を行ったところ、*DND2*遺伝子欠失株では精子形成に異常があることを明らかにした。野生株および*DND2*遺伝子欠失株の造精器を形成過程をおって観察したところ、*DND2*遺伝子欠失株では精子形成過程において正常なクロマチンの凝集が起きないことを明らかにした(図3)。このことから、精子の形成過程におけるクロマチンの凝集に*DND2*遺伝子およびDNA損傷が機能することが示唆された。

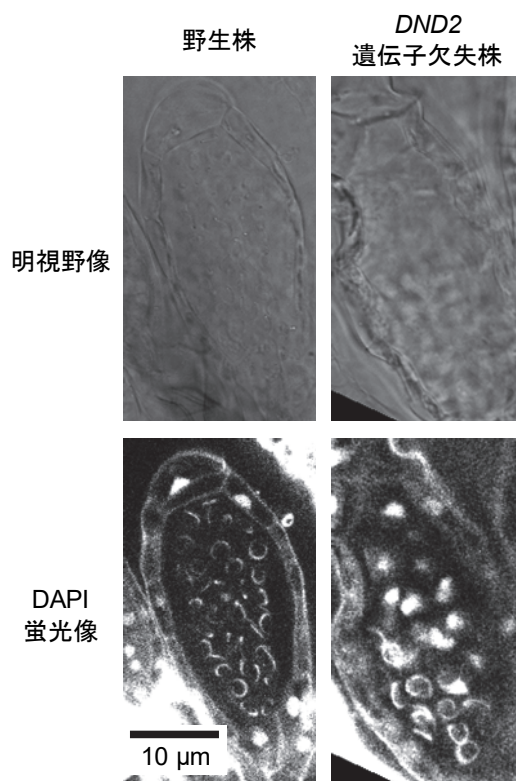


図3 精子形成過程に異常を示す*DND2*遺伝子欠失株
野生株(左)および*DND2*遺伝子欠失株(右)の植物体を25°C、連続明条件にて約5週間培養した後、15°C、短日(8時間明、16時間暗)条件にうつして3週後に、DAPIにてクロマチンを標識し、共焦点顕微鏡にて撮影した。明視野像(上)とDAPI蛍光像(下)をそれぞれ示す。

また、これまでに傷害刺激による幹細胞化に機能する遺伝子の欠失株を複数作出していた。それらの茎葉体に DNA 損傷試薬を処理したところ、幹細胞化が誘導されない欠失株を同定した。その責任遺伝子（仮に *Wounding-induced reprogramming, WIP* と命名）は、傷害刺激による幹細胞化と DNA 損傷による幹細胞化の両方に機能することが示された。以上の結果から、DNA 損傷シグナルは DND1 を介して WIP に伝えられ、幹細胞化が誘導されることが明らかとなった。

以上のように、DNA 損傷が幹細胞化を誘導する分子機構を解明するとともに、細胞リプログラミングが関与する精子形成にも DNA 損傷が関与することを示すことにも成功し、当初の研究目的はほぼ達成することができた。現在、以上の成果の論文発表にむけて研究が進展中である。

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 1 件）

- ① Chen Li, Yusuke Sako, Akihiro Imai, Tomoaki Nishiyama, Kari Thompson, Minoru Kubo, Yuji Hiwataishi, Yukiko Kabeya, Dale Karlson, Shu-Hsing Wu, Masaki Ishikawa, Takashi Murata, Philip N. Benfey, Yoshikatsu Sato, *Yosuke Tamada, *Mitsuyasu Hasebe. A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. *Nature Communications*, 8: 14242 (2017) doi: 10.1038/ncomms14242. 査読有
*共責任著者

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Yukiko Kabeya, Yohei Higuchi, Chaoyang Cheng, Yoshikatsu Sato, Yosuke Tamada, Mitsuyasu Hasebe. PpSBP transcription factors negatively regulate stem cell formation in *Physcomitrella patens*. *The international molecular moss science society (iMOSS)*, Honolulu, HI, USA, (2017)

〔図書〕（計 1 件）

- ① 玉田 洋介 他、文一総合出版、エビジェネティクスの生態学、245 (2017)

〔その他〕

ホームページ等

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

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

アウトリーチ活動

基礎生物学研究所 一般公開 2016 「生き物の不思議」、2016 年 10 月 8 日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

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)研究分担者

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

(3)連携研究者

(4)研究協力者

GU, Nan

Graduate student, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University (China)

CHEN, Chunli

Associate Professor, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University (China)

PALFALVI, Gergo

総合研究大学院大学・生命科学研究所・大学院生