

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19540

研究課題名(和文) ヒト赤芽球脱核における収縮環形成位置決定機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism for determining the position of contraction ring formation in human erythroblast enucleation.

研究代表者

鶴生川 久美 (Ubukawa, Kumi)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：70646554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類赤芽球は、細胞質分裂に類似の過程で脱核すると考えられているが、脱核時の収縮環形成位置を決定する分子メカニズムの詳細は明らかではない。

われわれは、前期赤芽球系前駆細胞CFU-Eと成熟赤芽球において、細胞分裂に関与する様々な分子の存在について検討した。本研究によりmDia2, mDia3とCdc42が、赤芽球脱核時に収縮環形成位置決定に関与している可能性が示唆された。さらに、Cdc42阻害剤はCFU-Eの増殖と赤芽球脱核を阻害した。以上の結果から、Cdc42は、ダイニン及びアクチン線維を介してヒト赤芽球の終末分化を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mammalian erythroblasts undergo enucleation through a process thought to be similar to cytokinesis. However, the mechanism of position determination of contraction ring in enucleation is still unknown.

We investigated the presence of various molecules involved in cell division on the proliferation of human colony-forming unit-erythroid and erythroblasts. Cdc42, mDia2 and mDia3 were involved determining the position of contraction ring formation during erythroblast enucleation. Furthermore, Cdc42 inhibitor blocked proliferation of CFU-Es in a dose-dependent manner and reduced the enucleation ratio of erythroblasts. These results suggest that Cdc42 plays an important role in both cytokinesis and cell polarization through the regulation of dynein and actin filament organization during terminal differentiation of human erythroblasts.

研究分野：血液学

キーワード：ヒト赤芽球 脱核 細胞極性 Cdc42 mDia2

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 細胞質分裂と相同な赤芽球の脱核

赤芽球の脱核は、細胞分裂と同じく収縮環の形成されることから、不均等な細胞質分裂の一種と考へられている。しかし、脱核では核膜の消失はなく、核が細胞質膜に覆われて特定の場所からは排出される点が一般的な細胞質分裂と異なる。

細胞質分裂は有糸分裂後に起こり、情報伝達機構により制御されている。有糸分裂には、2つの中心体が細胞の両極に移動することで染色体を分離し、収縮環の位置を決定する。申請者は、赤芽球脱核時に形成される収縮環のアクトミオシンはミオシン IIB で構成されることを明らかにした<sup>1)</sup>。しかし、脱核における収縮環の位置を決定するメカニズムは全く不明である。

### (2) 核の偏在化(細胞極性の決定)

申請者は、脱核前に赤芽球の核が細胞膜近傍へ局在することを見いだした。核の偏在化(細胞極性の決定)には、情報伝達系の活性化とオルガネラの空間配置が関与すると考えられる。Wang らは、PI3K の阻害により核偏在化の消失を示したが<sup>2)</sup>、PI3K は細胞全体で活性化されることから、細胞極性の決定因子ではないと考えられる。また、元来、極性のない赤芽球では、情報伝達系が細胞全体で活性化することから細胞極性の決定は難しいと考えられ、オルガネラである中心体が細胞極性を決定すると考えるに至った。

### (3) 中心体による細胞極性の決定仮説

申請者は、中心体による細胞極性決定による脱核のプロセスを STEP1~3 に分けて考えている。

STEP1: 中心体の位置が決まる。

STEP2: 中心体から微小管が核へ伸長し、核を偏在化させる(細胞極性の成立)。

STEP3: 収縮環が形成され、脱核が開始する。申請者はこれまでに、ヒト赤芽球の脱核時には1個の中心体が存在すること、中心体は赤

血球側に残存することを明らかにした(未発表データ、若手研究 B、H25~H26)。しかし、中心体による細胞の極性化と収縮環の位置を決定する機構の相互関係は解明されていない。

### (4) 中心体形成及び局在に関与する分子

中心体の構造蛋白質である  $\gamma$ -チューブリンは、中心体のマーカーとして用いられている。通常の細胞分裂では、2個の中心体の間には動原体微小管、極間微小管、星状体微小管が形成される。中心体と核の位置関係は、二つのモーター分子、Eg5(キネシンファミリー)と dynein により決定される。微小管プラス端は細胞膜直下の微小管プラス端集積因子によって安定化され、PI3K、Rho、Cdc42、Rac などにより制御される<sup>3)</sup>。

一方、収縮環はアクチンと非筋ミオシン IIB によって形成され<sup>1,4)</sup>、mDia2 の発現により収縮が開始される<sup>5)</sup>。申請者は、赤芽球の脱核では、中心体は1個のみが核近傍に局在することから、脱核での機能について以下のように考えている。

- 1) 中心体から進展する微小管が星状体微小管に相当する。
- 2) 中心体と微小管プラス端集積因子により極性が決定する。
- 3) 中心体は収縮環形成の位置を決定する。

## 2. 研究の目的

申請者は、細胞質分裂は中心体の形成により細胞極性が決定されることから、仮説「**赤芽球の脱核における核の細胞極性及び収縮環形成部位は中心体により決定される**」を持つに至った。

本申請では、独自に開発したヒト赤芽球培養系を用いて、脱核における極性決定と収縮環形成部位の決定機構を中心体の役割を検討し、赤芽球の脱核機構を以下の点について明らかにすることを目的とする。

- (1) 微小管プラス端集積因子の発現と細胞

内局在

(2) 収縮環及び収縮環関連分子 mDia2 の発現と中心体の位置関係

(3) 細胞膜骨格蛋白質の寄与

### 3. 研究の方法

(1) 赤芽球の培養

赤芽球の培養法は確立している<sup>1)</sup>。

(2) 微小管のプラス端集積因子の発現

微小管 プラス 端 集 積 因 子 ( dynein, dynactin, LGN, NuMA, APC, CLASPs ) の発現を免疫プロット法および定量 RT-PCR により明らかにする。細胞内局在は、蛍光免疫染色による三次元及び四次元解析により明らかにする。

(3) 収縮環関連分子 mDia2 の発現と中心体の位置関係

mDia2 の発現を免疫プロット法にて明らかにし、収縮環や中心体との位置関係を蛍光免疫染色による三次元及び四次元解析により明らかにする。

(4) 阻害剤による関連分子の同定

各阻害剤の細胞増殖および脱核率への効果を濃度依存性に検討する。

実際には、CFU-E に阻害剤を添加し 48 時間の細胞数を計測して、細胞増殖への影響を評価する。さらに、成熟赤芽球に添加し、72 時間まで培養して脱核への影響を明らかにする。

(5) siRNA による関連の発現抑制

siRNA を用いて、本研究で同定された分子を発現抑制し、中心体と核の局在及び脱核率の変化を解析し、脱核における中心体の位置を決定する分子を確定する。

### 4. 研究成果

(1) ダイニン阻害剤 (EHNA) の赤芽球分化への影響：赤芽球の表面マーカーである CD71, GPA の発現を FACS で解析し、また、GLUT1 と GATA1 の mRNA レベルを定量

PCR で解析した。その結果、EHNA はこれらのマーカー蛋白質の発現に影響しないことを明らかにした。また、EHNA はダイニンの発現自体にも影響しなかった (免疫プロット法)。

(2) ヒト赤芽球における Trim58 の発現：本研究中に、マウス赤芽球ではダイニンが Trim58 を介したユビキン系により分解されるとの報告がなされた<sup>6)</sup>が、ヒト赤芽球では Trim58 の発現を認めたものの (免疫プロット法)、脱核までダイニンは発現していることを確認した (図 1)。

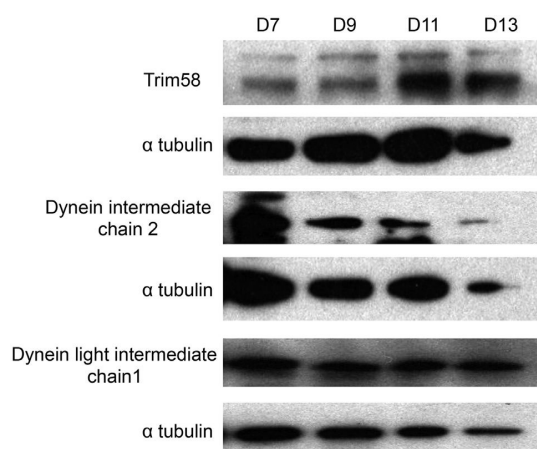


図 1. 赤血球造血時の Trim58 およびダイニンの発現

(3) ヒト赤芽球における微小管プラス端集積因子の発現：中心体の主な構成要素である微小管形成中心 (MTOC) から伸長する微小管のプラス端集積因子として、NuMA, LGN, 4.1G の発現を免疫プロット法で確認した。NuMA と 4.1G は赤芽球成熟とともに減少すること、LGN は比較的保たれることを見出した。

(4) ヒト赤芽球における mDia2 (DIAPH3), mDia3 (DIAPH2) の発現:mDia3 は CFU-E および赤芽球の MTOC への集積が明らかになり、ダイニン集積との関係が示唆された。また、mDia2 は CFU-E の細胞間期には核内

に存在し、分裂期に細胞質に点状に分布していた。

(5) ヒト赤芽球における Cdc42 の発現：マウス赤芽球では、mDia2 は脱核時の収縮環形成に関与し、その上流因子は RacGTPase であることが報告されており<sup>4)</sup>、mDia2 のアクチン線維との結合は Cdc42 によって制御される<sup>7)</sup>。申請者は Cdc42 に着目し、CFU-E から成熟赤芽球に至る最終分化段階まで発現していることを定量 PCR と免疫プロット法にて確認した(図2)。

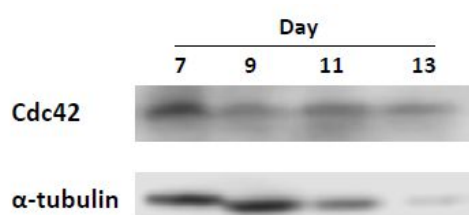


図2. Cdc42 のタンパク発現

(6) Cdc42 阻害剤(CASIN)の影響：Cdc42 GTPase inhibitor である CASIN は、CFU-E の増殖と、赤芽球の脱核を抑制した(図3)。メイ・ギムザ染色と cell cycle の解析では、CFU-E では細胞形態に明らかな変化はなく、CASIN 投与で G2/M 期の細胞が減少していた。赤芽球では、細胞形態・細胞周期ともに有意な変化を認めなかった。

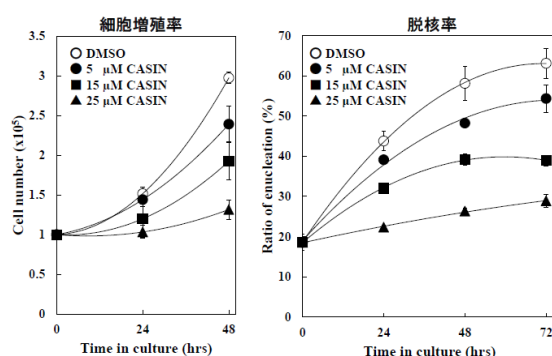


図3. CASIN 添加時の CFU-E 増殖率及び赤芽球脱核率

(7) ヒト赤芽球への遺伝子導入：遺伝子導入試薬と、レンチウイルスベクターを用いた

遺伝子導入、エレクトロポレーション法を検討した。遺伝子導入試薬を用い、CFU-E に対し2種類の siRNA と negative control siRNA の導入を行ったが、タンパクレベルの有意な変化は認めなかった。また、レンチウイルスベクターを transfection したところ、コントロールとして使用した K562 細胞には GFP が発現したが、primary 赤芽球には発現しなかった。一方エレクトロポレーション法では、GFP プラスミドベクターで、赤芽球の生存率7割前後、導入効率3割程度が得られた。

#### < 結論 >

(1)(2)のデータをこれまでの研究(若手研究 B, H25~H26) 成果と合わせ、Exp Hematol. (2016 44(4): 247-256.) に発表した。

微小管プラス端因子を手掛かりに検討を進めた結果、mDia2, mDia3 と Cdc42 が、赤芽球脱核時に収縮環形成位置決定に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。特に、Cdc42 の赤芽球脱核への関与はこれまで知られておらず、新たな知見である。

今後はエレクトロポレーション法により、赤芽球への遺伝子導入を行い、さらに脱核に関する機能解析が進展させる予定である。

#### < 引用文献 >

1. Ubukawa K, et al.: Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood* (2012) **119**:1036-1044.
2. Wang J, et al.: Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. *J. Cell Sci.* (2012) 125:340-49.
3. Tamura N, et al: Microtubule plus-ends within a mitotic cell are 'moving platforms' with anchoring, signalling and force-coupling roles. *Open Biol.*(2012) 11:120132.
4. Ji P et al: Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases

- and mDia2. *Nat. Cell Biol.* (2008) 10:314.
5. Watanabe S, et al: Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis. *Cell Reports* (2013) 5: 926–932.
  6. Thom CS, Traxler EA, Khandros E, et al.: Trim58 degrades Dynein and regulates terminal erythropoiesis. *Dev Cell.* (2014) 30:688–700.
  7. Jordan SN, et al: Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent. *Cytoskeleton* (2012) 69:919-30.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kobayashi I, Ubukawa K, Sugawara K, Asanuma K, Guo YM, Yamashita J, Takahashi N, Sawada K, Nunomura W. Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process. *Exp Hematol.* 2016 44(4): 247-256. doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.003. ( 査読あり )

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Goto T . Oxygen concentration -dependent regulation of erythropoiesis in human erythroblast. ASCB/EMBO 2017 Meeting, 2017.
2. Goto T . Cdc42 regulates dynein and actin in terminal differentiation of human erythroblast. ASCB/EMBO 2017 Meeting, 2017.
3. 後藤樹史. ヒト赤芽球におけるオルガネラリレーションの統括的制御機構の解明. 第 4 回 赤血球研究会, 2017 年
4. Kumi Ubukawa. Cdc42 regulates enucleation of human erythroblasts. The 2016 ASCB Meeting, 2016.

5. 菅原琴美. 赤芽球における  $\alpha$ -synuclein の発現と膜結合解析. 日本膜学会第 38 年会, 2016 年
6. 後藤樹史. ヒドロキシクロロキンによる乳酸脱水素酵素の活性阻害と抗腫瘍効果の解析. 日本生化学会東北支部会 第 82 回例会・シンポジウム, 2016 年
7. 菅原琴美. ヒト赤血球系細胞における  $\alpha$ -synuclein の細胞内局在とリン脂質結合. 第 36 回日本細胞生物学会・日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会合同大会, 2016 年
8. Kobayashi I. Enucleation is a process dependent on dynein. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

鵜生川 久美 (UBUKAWA Kumi)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号 : 70646554