

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和2（2020）年度 中間評価用〕

平成30年度採択分
令和2年3月31日現在

幹細胞における細胞周期の制御と代謝系との連関に関する総合的研究

Investigation for mechanisms underlying cell cycle regulation and metabolism in stem cells

課題番号：18H05215

中山 敬一（NAKAYAMA, KEIICHI）

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授



研究の概要（4行以内）

成体幹細胞（ASC）では細胞周期が停止し、これが幹細胞性に必須であるが、この細胞周期の停止は p57-Skp2 経路によって制御されている。本研究では、この幹細胞特異的な p57-Skp2 系の発現調節機構と、代謝リモデリングとの接点を分子的に解明し、『なぜ ASC は増えないのか』という根本的な問いに答えると共に、ASC を人工的に再増殖させる方法を開発することを目指す。

研究分野：細胞生物学関連

キーワード：細胞周期、タンパク質分解、代謝、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

幹細胞において細胞周期は厳密に制御されており、通常は G0 期（静止期）という状態に長期間留まることが知られている。この静止期維持は幹細胞性にとって必須であるが、その理由やメカニズムは不明であった。われわれは p57 が幹細胞特異的に発現しており静止期維持に必須であること、その発現パターンは p57 にユビキチン化依存性分解を誘導する Skp2 によって制御されている事を世界で初めて発見した。また静止期にある細胞は特殊な代謝状態にあることが示唆されてきたが、組織幹細胞はその少数性と純化の困難さから代謝系の解析や細胞周期との連関についてはほとんど未知であった。

2. 研究の目的

幹細胞における p57・Skp2 の発現調節機構を解明する。特に p57 はゲノムインプリンティングを受ける領域に存在するため、アリル特異的な転写調節機構が存在することが予想されるので、その分子詳細を解明する。また代謝系に関して網羅的に測定するプロテオミクス技術を開発し、それによって幹細胞特異的な代謝系の描出を行い、細胞周期との機能的接点を探索する。

3. 研究の方法

幹細胞における p57・Skp2 の発現調節機構をクロマチンレベルで明らかにし、父親・母親アリルによる立体的区域化(TAD: topology associating domain)の違いをアリル特異的な Hi-C パイプラインを構築して検討する。

さらに p57 遺伝子に数々の変異を導入したマウスを作製し、p57 の発現分布の可視化や幹細胞の系統追跡、さらに分子ノックアウトや細胞焼灼実験を行って、p57 の分子・細胞レベルでの重要性を明らかにしていく。

一方で、代謝系の全貌を精密に描出できる次世代プロテオミクス技術（iMPAQT システム）を適用し、幹細胞における代謝系の変化を詳細に検討する。さらに細胞周期との関連がある分子については、特に細胞周期と代謝系の機能連関について詳細な解析を行う。

4. これまでの成果

（1）p57 遺伝子における転写調節機構（特にクロマチンレベルでのインプリンティング機構についての検討）

p57 の特殊な転写機構を調べるため、まだ世界でもほとんど例のないアリル特異的 Hi-C 解析パイプラインを開発した。現在の主流となっている仮説では、アリル特異的な DNA メチル化によって CTCF 等の結合が変化し、TAD がアリル特異的なパターンを示すものと予測された。そこで近交系マウス（129Sv 系統）と野生マウス（Cast/EiJ 系統）の F1 の全ゲノムを対象に、アリル特異的 Hi-C 解析を行ったところ、少なくとも Hi-C レベルの解像度では、全ゲノム領域や p57 遺伝子周辺領域で TAD のアリル特異性は発見できなかった。このことはネガティブデータではあるものの、現在流布している上記の仮説が正しくないことを直接示唆している重要な知見である。

(2) 二重マーカーを用いたモザイク分析 (MADM) における p57 機能の解析

われわれは単一細胞解像度での神経幹細胞における p57 遺伝子の機能を調べるため、二重マーカーを用いたモザイク分析 (MADM) 技術を採用した。驚くべきことに、p57 による増殖阻害機能は細胞非自律的なものであることを見出した。対照的に、p57 には放射状グリア前駆細胞や新生投射ニューロンにおいて増殖を促進する細胞自律性機能があることを明らかにした。p57 の増殖促進機能は非常に用量感受性であるが、ゲノムインプリンティングには影響されない。つまり、p57 遺伝子座が異なる細胞自律的および非細胞自律的機構を介して神経発達を調節することを示唆する (Nat. Commun. 11: 195, 2020)。

(3) 次世代プロテオミクス技術を用いたがんにおける代謝特性の解析

炭素と窒素は生体の主要な構成要素であり、それぞれ主にグルコースとグルタミンという二大栄養素から供給されるが、がん細胞では炭素源であるグルコースを嫌氣的に代謝する「ワールブルグ効果」が亢進していること (炭素シフト) が約 100 年前から知られていた。一方で、がん細胞は盛んに増殖しているため、窒素を含む DNA を多量に作る必要があるが、今まではがん細胞がどのようにグルタミンから DNA に窒素を効率よく配分しているのかは不明であった。そこでわれわれは、独自に開発した次世代プロテオミクス技術である網羅的ターゲット分析 (iMPAQT システム) を用いて、がん細胞の悪性化に伴う代謝酵素の発現変化を追跡したところ、悪性化したがん細胞ではグルタミンの窒素を DNA の前駆体に転移する PPAT という代謝酵素が高発現しており、それによって生じるグルタミンからの窒素代謝シフトが、がんの悪性化の過程に必須であることを明らかにした。更に公共データベースに登録されている 11,000 人のがん患者のメタアナリシスから、PPAT が約 1200 種のヒト全代謝酵素の中で最もがん患者の死亡リスクを高める因子であり、特に小細胞肺癌をはじめとした難治性がんを治療する上で有望な標的になることを世界に先駆けて発見した。これらの成果は、現在治療が困難とされている小細胞肺癌をはじめとした難治性がんに対して、PPAT の阻害薬 (現在開発中) が効果的な治療法となる可能性を示している (Nat. Commun. in press)。

5. 今後の計画

p57 遺伝子領域の TAD をより高い解像度で調べるため、アリル特異的な 4C パイプラインを開発し、実行して TAD の詳細を調べる。また次世代プロテオミクスによって幹細胞

の代謝特性を網羅的に定量し、細胞周期と代謝系の接点を探索する。また p57 の機能阻害を起こす方法の開発を行う。その他の細胞周期-代謝系に影響を与える分子群の研究 (特に c-Myc-Fbxw7 系、p53-CHD8 系等) に着目して研究を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) Kodama, M., et al., Nakayama, K. I. (11人中11番目): A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer. *Nat. Commun.* in press. (2020-a).
- 2) Takahashi, H., et al., Nakayama, K. I., et al., Hatakeyama, S. (30人中22番目): The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination. *Nat. Commun.* 11: 1063 (2020-b).
- 3) Laukoter, S., et al., Nakayama, K. I., Hippenmeyer, S. (6人中5番目): Imprinted Cdkn1c genomic locus cell-autonomously promotes cell survival in cerebral cortex development. *Nat. Commun.* 11: 195 (2020-c).
- 4) Oshikawa, K., et al., Nakayama, K. I. (5人中5番目): A fail-safe system to prevent oncogenesis by senescence is targeted by SV40 small T antigen. *Oncogene* 39: 2170-2186 (2020).
- 4) Muto, Y., et al., Nakayama, K. I. (12人中12番目): Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis. *J. Exp. Med.* 216: 950-965 (2019).
- 5) Hosokawa, H., et al., Nakayama, K. I., Tanaka, T., Rothenberg, E. V. (9人中7番目): Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. *Nat. Immunol.* 19: 1427-1440 (2018).
- 6) Hosokawa, H., et al., Nakayama, K. I., et al., Rothenberg, E. V. (8人中5番目): Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity* 48: 1119-1134.e1117 (2018).
- 7) Kita, Y., et al., Nakayama, K. I. (12人中12番目): The autism-related protein CHD8 cooperates with C/EBP β to regulate adipogenesis. *Cell Rep.* 23: 1988-2000 (2018).

7. ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>