

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08828

研究課題名(和文)造血幹細胞の増殖・分化制御におけるZFATとGemininの分子的クロストーク

研究課題名(英文)The molecular crosstalk between ZFAT and Geminin in the regulation of hematopoietic stem cell proliferation and differentiation.

研究代表者

安永 晋一郎 (Yasunaga, Shin'ichiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50336111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レンチウイルスベクター系を用いたZFATの強制発現系やDOX誘導型ノックダウン系および膜透過型配列融合型ZFATリコンビナントタンパク質導入系を作成し、造血幹細胞での発現操作を確認した。また、アダプタータンパク質の同定のため、yeast-two-hybrid法にてZFATの結合タンパク質を探索し、ポリコーム複合体1のメンバーのひとつであるRing1Bを同定した。Ring1Bのノックダウン実験は、染色体分配機能異常を示した。これらの実験結果は、ポリコーム複合体1-Geminin-Brg1/Smarca4軸とZFAT-BRD4-Brg1/Smarca4軸の分子クロストークの可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、造血幹細胞活性を増殖と分化の双方向から支持することを研究代表者が明らかにしたGemininのポリコーム複合体1のE3ユビキチンリガーゼ活性によるタンパク質分解が、造血幹細胞の活性制御に大きな役割を持つ可能性が指摘されているZFATシステムのシグナルを増強し、クロマチンリモデリングを介して染色体分配を促進している可能性を示した。本研究の研究成果は、造血幹細胞を自己複製能と多分化能を維持したままex vivoで増幅する技術開発への分子基盤を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using a lentivirus vector system, we established a system for the forced expression of ZFAT, a DOX-inducible knockdown system, and a cell-permeable sequence-fused ZFAT recombinant protein introduction system, and confirmed the expression manipulation in hematopoietic stem cells. Additionally, to identify adapter proteins, we used the yeast two-hybrid method to search for ZFAT binding proteins and identified Ring1B, a member of Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). Knockdown experiments of Ring1B indicated abnormalities in chromosome segregation function. These experimental results suggest the possibility of molecular crosstalk between the PRC1-Geminin-Brg1/Smarca4 axis and the ZFAT-BRD4-Brg1/Smarca4 axis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 自己複製 分化 ZFAT Geminin ポリコーム複合体1

1. 研究開始当初の背景

白澤らによって自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 感受性遺伝子として同定された ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region) 遺伝子は 18 個の C2H2 型 zinc-finger motif と 1 個の AT-hook motif を含む転写関連因子様タンパク質をコードし、魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子である。これまでに、Zfat 欠損マウスの表現型解析と分子レベルでの解析から、ZFAT が正常なマウス発生過程に必須であることが示された。さらに、タモキシフェン誘導型 Zfat 欠損マウスの発生初期の胎仔肝細胞の解析から、赤血球系細胞分化において ZFAT が必須であることが明らかにされた。また、Zfat のレポーターノックインマウスを用いた解析により、造血幹細胞での Zfat の発現が確認され、ZFAT が造血システムにおいても機能していることが示された。一方で、白血病細胞株を用いた解析から、ZFAT が白血病幹細胞の分化増殖を制御していることも明らかになっている。従って、ZFAT の造血幹細胞活性制御における役割を解明することは、造血幹細胞機能制御の新たな分子基盤の解明につながると考えられる。

研究代表者はこれまでの研究で、ポリコーム複合体 1 が DNA 複製ライセンス化を介した細胞増殖制御因子でありクロマチンリモデリングを介した幹細胞未分化性維持因子でもある Geminin と結合し、ユビキチン化を介してタンパク質の安定性を制御することで造血幹細胞の活性を支持するという新たな分子基盤を見出すことに成功した (PNAS 2008)。さらに申請者は、Hoxb4 や Hoxa9 もまたポリコーム複合体 1 と同様に (しかし独立して) ユビキチン化を介して Geminin タンパク質の分解制御をすることで、造血幹細胞活性を支持していることを証明した (PNAS 2010, PLoS One 2013)。これらの結果から、造血幹細胞の主要な活性制御因子であるポリコーム複合体 1 と Hox タンパク質がともに Geminin の分解制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることを示し、Geminin が造血幹細胞の活性を支持する中核因子である可能性を明らかにしてきた (MCB 2013, MBoC 2014, PLoS One 2016, IJH 2016)。

研究代表者は、Geminin の発現動態を可視化することができる Geminin-EYFP ノックインマウスを作成し、そのマウス由来の Geminin^{high} 造血幹細胞 (すなわち細胞周期が回っている造血幹細胞) の一部に Zfat を高発現するグループが存在することを単一細胞遺伝子発現解析により見出し <未発表データ>、これが造血幹細胞の増殖 (自己複製) と分化を制御する分子機構の解明の糸口になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の核心的問いは、「造血幹細胞の増殖と分化における Geminin システムと ZFAT システムの分子クロストークを解明することにより、造血幹細胞の核心的機能である自己複製と分化を掛け分ける分子機構の一端を解明することはできないだろうか?」ということである。この問いに答えるために、まず本研究では、Geminin システムと ZFAT システムの分子クロストークを解明することに注力した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え技術を用いて、SBI 社のレンチウイルスベクターに ZFAT コンストラクトまたは TRE promoter-ZFAT コンストラクトを挿入し ZFAT 強制発現系や DOX 誘導型 ZFAT ノックダウン系を作成した。また、膜透過型配列融合型 ZFAT (Cell-penetrating ZFAT; CP-ZFAT) コンストラクトを挿入した pET 系発現ベクターを大腸菌 B 株に導入して膜透過型 ZFAT リコンビナントタンパク質を作成した。

(2) ZFAT と Geminin のクロストークにおけるアダプタータンパク質の同定のため、yeast-twohybrid 法にて ZFAT の結合タンパク質を探索し、同定されたアダプタータンパク質の分子クロストークにおける役割を解析した。

4. 研究成果

(1) 上記で作成した ZFAT 強制発現系や DOX 誘導型 ZFAT ノックダウン系レンチウイルスベクター、または膜透過型 ZFAT リコンビナントタンパク質を用いて、Geminin の発現動態を可視化することができる Geminin-EYFP ノックインマウス由来の造血幹細胞 (CD34⁺Lin⁻Sca1^c-Kit⁺) において ZFAT の発現が制御できることをリアルタイム RT-PCR で確認した。

(2) タグ付けした ZFAT と Geminin の発現ベクターを 293 細胞に導入し免疫沈降を行ったが直接の分子結合は認めなかった。そこで ZFAT と Geminin の分子クロストークは、直接の分子結合によるものではなくアダプタータンパク質を介したものであると考えた。

そこで、そのアダプタータンパク質の同定するため、yeast-two-hybrid 法にて NIH3T3 細胞における ZFAT の結合タンパク質を探索し、ZFAT の結合タンパク質の一つとしてポリコーム複合体 1 のメンバーのひとつである Ring1B を同定した (図 1)。研究代表者は 2008 年にポリコーム複合体 1 が Geminin の E3 ユビキチンリガーゼとして働き、Geminin の分解により造血幹細胞の増殖と分化を同時に制御していることを報告した。また、2020 年に石倉らは ZFAT がセントロメアに結合して KAT2B-H4K8ac-BRD4 axis を介して染色体分配を制御していることを報告した。

Geminin は SWI/SNF 複合体の酵素活性部位である Brg1/Smarca4 を抑制することで SWI/SNF 複合体によるクロマチンリモデリングを抑制し幹細胞の未分化性を維持し、一方で BRD4 は Brg1/Smarca4 を介して SWI/SNF 複合体によるクロマチンリモデリングを促進していることが知られている。

そこで Ring1B をノックダウンして染色体を観察したところ分裂した娘核の間に染色体ブリッジが確認され(図2) 染色体分配異常が誘起されることが明らかになった。これらの実験結果は、ポリコム複合体 1 が Geminin タンパク質を、ユビキチン化を介した分解に導くことで、Geminin による Brg1/Smarca4 の抑制を解除し、ZFAT の下流シグナルを増強している可能性を示している。この可能性を検証するために、さらなる分子細胞生物学的解析が期待される。

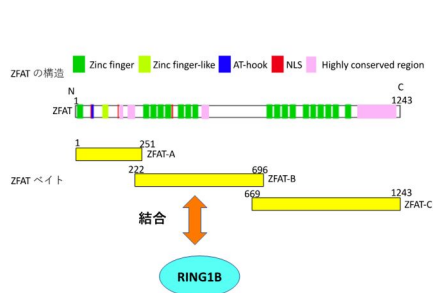
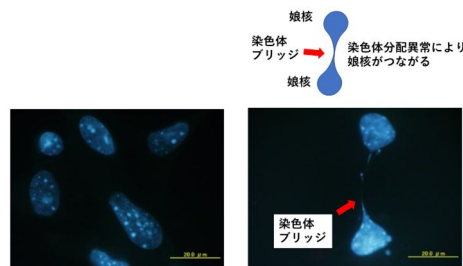


図1、ZFATの構造とZFATベイト



野生型

RING1B KD

図2 RING1Bのノックダウンは染色体分配を障害する

<引用文献>

Ohtsubo, M., Yasunaga, S. et al. Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105(30)**, 10396-10401, 2008.

Ishikura, S. et al. ZFAT binds to centrosomes to control noncoding RNA transcription through the KAT2B-H4K8ac-BRD4 axis. *Proc. Nucleic Acids Research*, **48(19)**, 10848-10866, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hirakawa T., Yotsumoto F., Shirasu N., Kiyoshima C., Urushiyama D., Yoshikawa K., Miyata K., Kurakazu M., Azuma Koga K., Aoki M., Nabeshima K., Koga K.S., Osuga Y., Komatsu H., Taniguchi F., Harada T., Yasunaga S., Miyamoto S.	4. 巻 121
2. 論文標題 Trophic and immunomodulatory effect of adipose tissue derived stem cells in a preclinical murine model of endometriosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11891-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Y, Tanaka Y, Shirasu N, Yasunaga S, Higurashi N, Hirose S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Establishment of human induced pluripotent stem cells derived from skin cells of a patient with Dravet syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 101857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大野芳典、竹立恭子、郭芸、菅野雅元、白須直人、安永晋一郎、大坪素秋、瀧原義弘。	4. 巻 73
2. 論文標題 造血幹細胞活性に対する低線量被ばくの影響。	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 広島医学	6. 最初と最後の頁 218-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yotsumoto, F., Yoshikawa K., Hirakawa, T., Urushiyama D., Kiyoshima C., Arima H., Kodama S., Yasunaga, S., & Miyamoto, S.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Safety and potential effect of intrauterine infusion of autologous adipose tissue-derived regenerative cells in patients with implantation failure: A pilot study.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e57220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.57220. eCollection 2024 Mar.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野芳典、竹立恭子、白須直人、瀧原義宏、安永晋一郎
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病細胞の分化と増殖を標的とした新規白血病治療法の開発
3. 学会等名 第27回バイオ治療法学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡大学医学部生化学講座 http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/biochem1/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大野 芳典 (Ohno Yoshinori) (10548986)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	
研究分担者	白須 直人 (Shirasu Naoto) (70551422)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------