

機関番号：12501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009-2010

課題番号：21790906

研究課題名 (和文) 転写共役因子 TIFb の造血幹細胞における役割

研究課題名 (英文) Role of transcriptional co-repressor, TIF1b,
in hematopoietic stem cell

研究代表者

宮城 聡 (Miyagi Satoru)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20400997

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、造血組織における TIF1b の役割を解析し、TIF1b が赤芽球の成熟、骨髓球細胞分化及び造血幹細胞の骨髓再構築能に重要な役割を果たすことを見出した。さらに、網羅的発現解析やクロマチン免疫沈降法等により TIF1b が p21 遺伝子座に結合し転写抑制に働く事を明らかにした。また、TIF1b 欠損細胞ではヘテロクロマチン蛋白質である HP1a の蛋白質量が減少しており、HP1a が TIF1b による p21 の発現抑制に機能すると考えられる。以上の解析から本研究では TIF1b による p21 の抑制が造血幹細胞機能に必須の役割を果たす事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

To assess the role of *Tif1b* in the hematopoietic stem cells (HSCs), we disrupted the *Tif1b* gene specifically in hematopoietic cells. *Tif1b^{F/F}-Tie2-Cre* embryos died at mid-gestation due to anemia. In the mutant embryo, erythroblast maturation beyond the proerythroblast and survival of erythroblast were severely abrogated, indicating that *Tif1b* plays a critical role in embryonic erythropoiesis. Then, to elucidate the *Tif1b* function in HSC, we performed a series of transplantation assays and showed the cell-autonomous requirement for *Tif1b* in HSC repopulating capacity. Moreover, *Tif1b^{F/F}-Tie2-Cre* KSL cells proliferated and differentiated into myeloid cells poorly *in vitro*. To address the mechanism underlying the proliferation defect of *Tif1b*-deficient KSL cells, we conducted the microarray analysis and found that p21, but not p16, p19 and p57, was up-regulated in *Kif1b*-deficient KSL cells. Together, our findings suggest repression of p21 expression mediated by *Tif1b* is a critical for the maintenance of HSCs. On the other hand, we also observed that reduction and inappropriate localization of HP1a protein in the *Kif1b*-deficient KSL cells, so, TIF1b and HP1a may collaborate to repress the p21 expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			

年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、自己複製、細胞分化、クロマチン、転写制御、核構造

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、すべての血球細胞に分化し得る能力（分化多能性）を維持したまま、自身のコピーを作成し（自己複製）、幹細胞プールを一定に保ち、成体の恒常性維持に働く。分化多能性を遺伝子発現抑制の観点から考えると、幹細胞中では各血球細胞系譜の分化マスター遺伝子の発現は抑制されているが、細胞分化に伴い活性化され得る状態、すなわち、可逆的な発現抑制が起こっており、他方で、骨髓球系前駆細胞等の骨髓球系へ分化方向が決定された細胞中では、リンパ球分化のマスター遺伝子の発現は不可逆的に発現抑制されているはずである。近年、ES 細胞を用いた ChIP on Chip 解析により、神経分化カスケードの上位にある転写因子のプロモーター領域が bivalent chromatin structure と呼ばれる特殊なヒストン修飾を受けることが明らかにされた。すなわち、これら遺伝子のプロモーター領域が、転写抑制状態に特徴的なヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のメチル化 (H3K27me) と、転写活性化されているプロモーターに特徴的な 4 番目のリジン残基のメチル化 (H3K4me) が同時に起こり、これが、個体発生や細胞分化に重要な転写因子（分化制御因子）の ES 細胞における転写抑制（または、極微量の転写）に重要な働きをすることが報告されている。従って、この可逆的な発現抑制機構状態が幹細胞の分化多能性を特徴付けると考えられる。しかし、この可逆性の維持機構や可逆的な転写抑制から恒常的な転写抑制への移行（すなわち、細胞分

化)の機構等は明らかになっていない。

近年のヒストン・コードの精力的な解析から、H3K27me は、ポリコーム複合体により修飾され、読み取られることが判明している。ポリコーム複合体はヒストン修飾因子であり、クロマチン修飾を介して、特定遺伝子の発現抑制状態の維持を行う蛋白質複合体であり、分化制御因子の可逆的な発現抑制にも関与する可能性が示唆される。申請者が所属する研究室では、ポリコーム複合体の構成因子である、Bmi1 が造血幹細胞の自己複製維持において重要な役割を担うこと、Bmi1 を造血幹細胞に強制発現することにより造血幹細胞の自己複製を増強し得ること、そして、Cdkn2a 遺伝子座が造血幹細胞におけるポリコーム複合体の重要な標的遺伝子座であることを明らかにしている。ポリコーム複合体は、生化学的に 2 つの複合体、polycomb repressive complex1 (PRC1) 及び PRC2 に大別され、Bmi1 は、Me118、Ring1A/B、M33 などと共に PRC1 を構成し、クロマチン制御を介して転写抑制の維持を行う。一方で、H3Kme3 や HP1 蛋白質を介したクロマチン制御が恒常的な転写抑制に働く事が明らかにされている。

2. 研究の目的

上記のように、ポリコーム複合体による可逆的な転写抑制とヘテロクロマチン様の構造を介した不可逆的な転写抑制の接点の解析から、転写抑制の可逆性の制御機構、幹細胞自己複製や分化多能性の分子基盤が明ら

かになるものと期待されが、この点に関しては十分な研究がなされていない。

申請者は Bmi1 の分子機能を明らかにするため、Flag-Bmi1 を発現させたヒト白血病細胞株より Bmi1 複合体を部分精製し、新規のポリコーム複合体の会合分子群の同定を行い、抑制型転写共役因子 TIF1b が Bmi1 と結合することを見出している。TIF1b は、KRAB ドメインをもつ Zn フィンガー型転写因子に対する抑制型転写共役因子として同定され、現在では、これ以外の転写因子とも強制的に転写抑制に働くことが明らかにされている。また、最近、EC 細胞を用いた ChIP on Chip 解析により TIF1b の標的遺伝子の多くが、ES 細胞の自己複製制御因子である Oct4 の標的遺伝子と重複することが報告された。一方で、ES 細胞では、分化制御因子群の転写抑制にポリコーム複合体 Oct4 が協調的に働く可能性が示唆されている。従って、ES 細胞において、ポリコーム複合体、TIF1b および Oct4 が強制的に転写抑制に働く可能性が考えられる。また、TIF1b は、分子の C 末端側に蛋白質-蛋白質の結合に働くドメインを複数有し、これを介して、クロマチンリモデリング因子、H3K9 メチルトランスフェラーゼ (SETDB1) や HP1 などと結合し、標的遺伝子のサイレンシング、ヘテロクロマチン化に関与することが報告されている。従って、幹細胞では、分化制御遺伝子のプロモーターに Oct4 などの転写因子を介して、TIF1b-ポリコーム複合体がリクルートされ可逆的な発現抑制が起こり、分化過程で TIF1b のパートナーがポリコーム複合体から HP1 に変わることにより恒常的な転写抑制に変化し、これにより、細胞の分化方向の決定と安定的な細胞分化が起こる可能性が示唆される。この様な仮説を基に、幹細胞の自己複製や分化多能性を理解するための一歩として、本研究ではヘ

テロクロマチンの形成や H3K9me3 を介した転写制御に重要な役割を果たす TIF1b に着目し、その造血組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスの解析を行い、造血幹細胞における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、造血組織における TIF1b の役割を理解するため、Mx1-Cre、Tie2-Cre 及びに LyzM-Cre を用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製し、造血組織の組織学的、細胞学的解析を行う。また、造血幹細胞の自己複製および分化多能性に着目し、コロニーアッセイおよび造血幹細胞移植による骨髄再構築能の検討を行う。また、TIF1b 標的遺伝子群を同定するためにマイクロアレイ解析及びに ChIP sequence 解析を行う。さらに、TIF1b のパートナーである HP1 の動態を免疫染色等により検討する。

4. 研究成果

胎生期から造血組織で Cre recombinase を発現する *Tie2-Cre* マウスを用いて *Tif1b* 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製・解析を行った。この結果、*Tif1b^{FF};Tie2-Cre* 胎児では、前赤芽球以降の赤芽球の成熟が著しく阻害されており、変異胎児は胎生中期に貧血により致死であった。従って、*Tif1b* 遺伝子が胎児期の赤血球分化に重要な機能を有すると考えられる。さらに、競合的移植実験から *Tif1b^{FF};Tie2-Cre* 造血幹細胞の骨髄再構築能が著しく障害されている事を明らかにした。また、*Tif1b^{FF};Mx1-Cre* 細胞を用いて再構築した個体において、*Tif1b* を pIpC 処理により不活化した場合には *Tif1b^{FF};Mx1-Cre* 細胞が選択的にレシピエント個体より消失した。これらの結果は、細胞内在的な TIF1b の機能が造血幹細胞に必須である事を示唆している。一方で、

Tif1b を欠損する骨髄では骨髄球前駆細胞以降の骨髄球分化が阻害されていた。しかし、*LyzM-Cre* を用いて骨髄球特異的に *Tif1b* を欠損させた場合には骨髄球分化異常が認められないことから、造血幹細胞・前駆細胞レベルでの TIF1b の機能が骨髄球分化に重要な役割を果たすと考えられる。

さらに、*Tif1b^{F/F};Tie2-Cre* 造血幹細胞では p21 の発現が脱抑制されており、クロマチン免疫沈降法により TIF1b が直接 p21 遺伝子座に結合する事を明らかにした。これらの結果は TIF1b による p21 の抑制が造血幹細胞機能に必須の役割を果たす事を示している。

一方で、*Tif1b^{F/F};Tie2-Cre* 造血幹細胞ではヘテロクロマチンの構成に重要な役割を果たす HP1a のタンパク質量が減少し、その核内局在が変化する事を見出した。従って、TIF1b と HP1a が協調的に p21 の発現抑制に機能すると考えられる。

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 8 件)

1. Konuma, T., Nakamura, S., Miyagi, S., Negishi, M., Chiba, T., Oguro, H., Yuan, J., Mochizuki-Kashio, M., Ichikawa, H., Miyoshi, H., Vidal, M. and Iwama, A. Forced expression of the histone demethylase Fbx110 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* in press 査読有

2. Takeda, Y., Nakaseko, C., Tanaka, H., Takeuchi, M., Yui, M., Saraya, A., Miyagi, S., Wang, C., Tanaka, S., Ohwada, C., Sakaida, E., Yamaguchi, N., Yokote, K., Hennighausen, L. and Iwama A. Direct activation of STAT5 by ETV6-LYN fusion protein promotes induction of myeloproliferative neoplasm with myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 2011, 153, 589-598. 査読有

3. Aoki, R., Chiba, T., Miyagi, S., Negishi, M., Konuma, T., Taniguchi, H., Ogawa, M., Yokosuka, O. and Iwama, A. The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J Hepatol.* 2010, 52, 854-863. 査読有

4. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, and Iwama A. The polycomb-group gene Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and independent manners. *Hepatology.* 2010, 52, 1111-1123. 査読有

5. Tanaka, H., Takeuchi, M., Takeda, Y., Sakai, S., Abe, D., Ohwada, C., Sakaida, E., Shimizu, N., Saito, Y., Miyagi, S., Iwama, A. and Nakaseko, C. Identification of a novel TEL-Lyn fusion gene in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2010, 24, 197-200. 査読有

6. Miyagi, S., Kato, H. and Okuda, A. Role of SoxBl transcription factors in development. *Cell Mol Life Sci.* 2009, 66, 3675-3684. 査読有

7. Negishi, M., Chiba, T., Saraya, A., Miyagi, S., and Iwama, A. Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Genes Cells* 2009 14, 1347-1357. 査読有

8. Yonemitsu, Y., Imazeki, F., Chiba, T., Fukai, K., Nagai, Y., Miyagi, S., Arai, M., Aoki, R., Miyazaki, M., Nakatani, Y., Iwama, A. and Yokosuka, O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* 2009, 40, 1304-1311. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 宮城聡, BRD1 は HB01、ING4 とヒストンアセチル化酵素複合体を形成しヒストン H3 のアセチル化に働く、第 72 回日本血液学会

学術集会、2010年9月24日、パシフィコ
横浜

2. Satoru Miyagi, Brd1/Brpf2 is a core component of the Hbo1 HAT complex and regulates fetal liver erythropoiesis, The 1st JSH International Symposium, July 16, 2010, Akita University

3. 宮城聡、Brd1 (Bromodomain-containing protein 1)-Hbo1 複合体による赤血球分化制御、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日、国立京都国際会館

4. 宮城 聡、転写共役因子 TIF1 β は造血幹細胞の維持に働く、第82回日本生化学会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 聡 (Miyagi Satoru)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20400997

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：