

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860777

研究課題名(和文) ヒト赤芽球の脱核における細胞極性決定機構の解明

研究課題名(英文) Human erythroblast enucleation requires dynein dependent cell polarization.

## 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、細胞質分裂類似の過程で脱核する。中心体に代表される微小管形成中心(MTOC)は、適切な細胞質分裂のために不可欠な、染色体分離装置である紡錘体を形成する。しかし、MTOCの脱核における役割は明らかではない。本研究では、細胞質分裂と脱核に対する様々なMTOC阻害剤の効果を、純化ヒトCD34陽性細胞から分化誘導した後期赤芽球系前駆細胞と成熟赤芽球を用いて検討した。その結果、核をMTOC側へ動かすモーター蛋白ダイニンの阻害剤が、脱核前に起こる核の偏在化を阻害して脱核を抑制することを示し、細胞質分裂だけでなく脱核にもダイニンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mammalian erythroblasts undergo enucleation, a process similar to cytokinesis. Although microtubule-organizing centers (MTOC) that functions organization of the mitotic spindle apparatus separating the chromosomes is crucial for proper cytokinesis, the role of MTOC in enucleation remains unclear. We investigated the effect of various MTOC inhibitors on cytokinesis and enucleation. We used human colony-forming unit-erythroid and mature erythroblasts generated from purified CD34+ cells. Here we show that, among inhibitors for MTOC regulator and for motor proteins, the inhibition of dynein which mediates unidirectional nuclear movement toward the MTOC blocks both cell division and enucleation, which suggests that dynein plays an essential role not only in cytokinesis but also in enucleation. Inhibition of dynein impaired nuclear polarization leading to a decreased number of enucleated cells. These data indicate that enucleation is a process dependent on dynein.

研究分野：血液学

キーワード：赤血球造血 脱核 赤芽球 ダイニン

## 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

赤芽球は脱核をして、成熟赤血球になるがそのメカニズムは、今尚、不明な点が多い。赤芽球の脱核でも細胞分裂と同じく収縮環の形成があることから、**脱核は細胞質分裂と類似の現象である**と考えられており、不均等な細胞質分裂の一種とみなせる。赤芽球の脱核では核膜の消失はなく、核が空間的に決まった場所で細胞から抜け出る、もしくは押し出される点が、有糸分裂における細胞質分裂と異なる。

通常、細胞質分裂は有糸分裂に引き続いて起こる現象であり、複雑な調節機構により制御されている。有糸分裂期には、2つの中心体が細胞の両極に移動し、起点となり微小管とモーター蛋白質によって染色体が分離されて細胞質分裂部位である収縮環の位置を決定する。申請者は、細胞質分裂と脱核の類似性を検討中に、ミオシン IIB が脱核に寄与することを明らかにしたが [1]、赤芽球の細胞質分裂部位の位置を決定する機構は不明である。

### (2) 細胞極性の決定

申請者は、脱核前の核の細胞膜近傍への偏在を見いだした。脱核は細胞質分裂の一種であることから、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寄与が考えられる。Wang らは、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害により赤芽球の核の局在化の消失を示したが、PI3K は細胞全体で活性化されることから、細胞極性を決定する因子ではないと考えられる[2]。一般に、浮遊(血液)細胞では、情報伝達系が細胞全体で活性化されることから極性の決定は難しいと考えられ、**中心体による核の移動が細胞極性を決定する**と考えるに至った。つまり、中心体により脱核する場所が決定されると考えた。

### (3) 中心体による細胞極性の 3-STEP 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: 中心体の位置の決定。

STEP2: 細胞極性の成立

STEP3: 収縮環の形成と脱核

ただし、**赤芽球で形成される中心体の数とどの分化段階まで存在するのか、また、微小管の消長は解明されておらず、本研究で明らかにする。**

### (4) 中心体形成及び局在に關与する分子

中心体と核の位置関係は、主に二つのモーター蛋白質、ダイニン(微小管マイナス端、中心対方向へ移動)と Eg5(キネシンファミリーの一種と微小管プラス端へ移動)のバランスにより決定される。一方、中心体の構造蛋白質である $\gamma$ -チューブリン(微小管のマイナス端に結合)は、中心体のマーカーとして用いられている。また、中心体形成には Aurora kinases(A と B の 2 種類)、Polo-like kinases(Plk) 1、脱リン酸化酵素(PP2A)が関わっている。

## 2. 研究の目的

赤芽球の脱核は、アクトミオシンの収縮環形成による不均等な細胞質分裂の一種である。申請者は、ヒト赤芽球の収縮環形成に非筋型ミオシン IIB の関与を発見した過程で、脱核前に中心体の形成と核の細胞膜近傍への局在を見いだした [1]。一方、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「**脱核過程における赤芽球の核の細胞極性は中心体形成により決定される**」を持つに至った。

本申請では、独自に開発した高純度ヒト赤芽球培養系を用いて、**脱核における中心体の役割を解明して、赤芽球の核の極性決定と脱核の関係を明らかにする**ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

既に確立したヒト赤芽球の培養系を用い、分化に伴う中心体と核の挙動から、中心体が脱核する位置を決めることを明らかにする。微小管が伸展する際の重合核となる場所を、微小管形成中心 (microtubule-organizing centers: MTOC) という。中心体は最も有名な MTOC であり、細胞分裂中期に紡錘体極を形成する。

(1) **免疫細胞学的観察:**  $\gamma$ -チュブリンを指標として、MTOC の核との位置関係を、 $\gamma$ -チュブリンをマーカーとして顕微鏡観察により定量的に解析する。

(2) **阻害剤による分子の同定:** MTOC 調節因子阻害剤による脱核への影響を明らかにする。また、モーター蛋白質 (ダイニン及び Eg5) に対する阻害剤を用い、中心体と核の位置関係を決定する分子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) モーター蛋白質の阻害剤による細胞増殖阻害: 阻害剤による後期赤芽球前駆細胞 (colony-forming unit-erythroid; CFU-E) に細胞増殖に対する影響を検討した。ダイニンの阻害剤 erythro-9-[3-(2-Hydroxynonyl) adenine (EHNA) と、Eg5 阻害剤である monastrol は、CFU-E の細胞増殖を抑制した (図 1)。

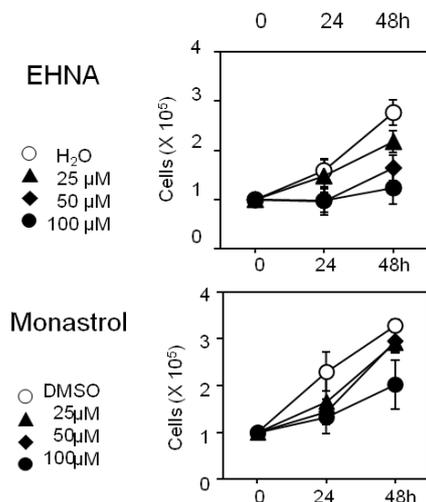


図1 CFU-Eの細胞増殖に対するモーター蛋白質阻害剤の影響

(2) MTOC 調整因子の阻害剤による CFU-E 増殖阻害: ON01910 (MTOC 成熟を助ける PIK1 の阻害剤), MLN8237 (中心体成熟と紡錘体安定化に寄与する Aurora A kinase 阻害剤), hesperadin (中心体と紡錘体の接合部で働く Aurora B kinase 阻害剤) は、いずれもヒト CFU-E の増殖を抑制した。LY294002 (PI3K 阻害剤, マウスの脱核に重要 [2]), calyculin A (有糸分裂調節をする PP2A の阻害剤) も、CFU-E の増殖を抑制した (図 2)。

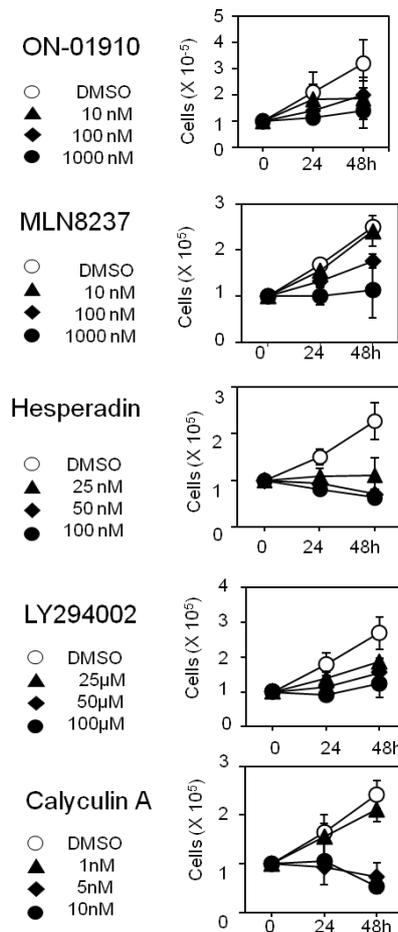


図2 CFU-Eの細胞増殖に対するMTOC調節因子阻害剤の影響

(3) モーター蛋白質の阻害剤が成熟赤芽球脱核に与える影響を検討した。EHNA は濃度依存性に脱核を抑制した。また、核の偏在が阻害され、赤芽球の中心に留まっていた。一方、monastrol は脱核に影響しなかった (図 3)。

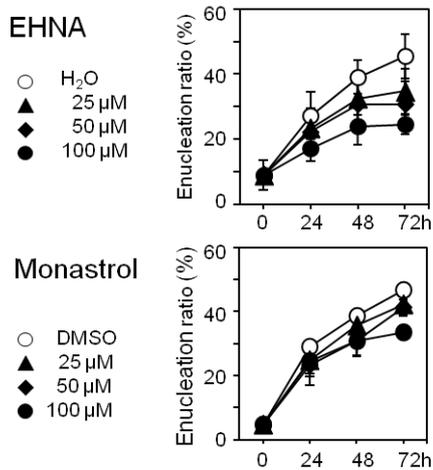


図3 ヒト赤芽球脱核に対するモーター蛋白質阻害剤の影響

(4) TOC 調整因子の阻害剤が脱核に与える影響： ON01910 (Plk1 阻害剤), MLN8237 (Aurora A kinase 阻害剤), hesperadin (Aurora B kinase 阻害剤), LY294002 (PI3K 阻害剤), calyculin A (PP2A 阻害剤) は、ヒト赤芽球の脱核を阻害しなかった (図 4)。

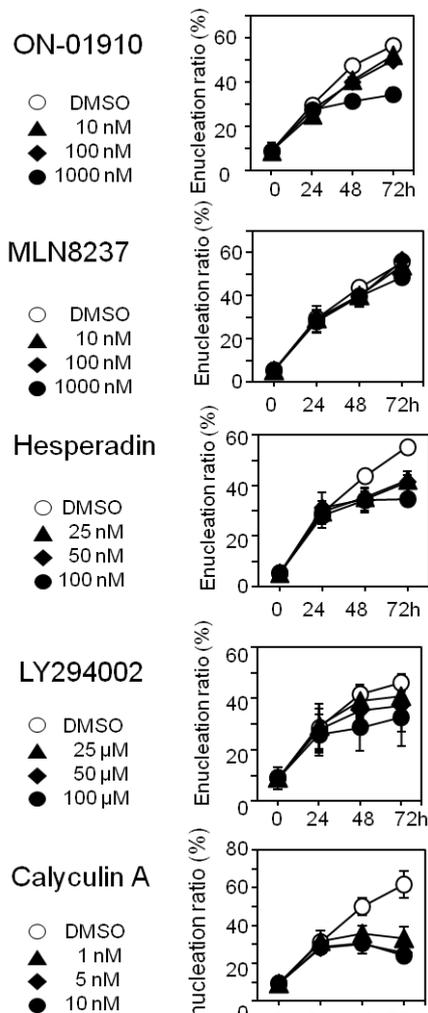


図4 ヒト赤芽球脱核に対するMTOC調節因子阻害剤の影響

(5) 阻害剤による核偏在への影響：上記で使用した阻害剤存在下で Day10 細胞を培養し、24 時間後の核偏在性を定量的に検討した。EHNA 処理した赤芽球では、核が中心にある細胞が有意に増加し、Eg5 と PI3K の阻害剤は核の位置に影響しなかった。Plk1, Aurora A, Aurora B および PP2A の阻害剤は、核の偏在化を阻害しなかった。以上より、ヒト赤芽球の脱核における核の偏在化には、ダイニンの微小管上でマイナス端 (MTOC 側) への動きが不可欠であることが示唆された。

(6) MTOC 阻害及びモーター蛋白質阻害による脱核への影響：各成熟段階の赤芽球におけるこれら蛋白質の発現を Western blot 法により解析した。γ-チューブリンとダイニンは CFU-E から最終段階の赤芽球まで発現していた。Eg5, Plk1, Aurora A, Aurora B は CFU-E では発現していたが、赤芽球分化とともに著明に低下した (図 5)。

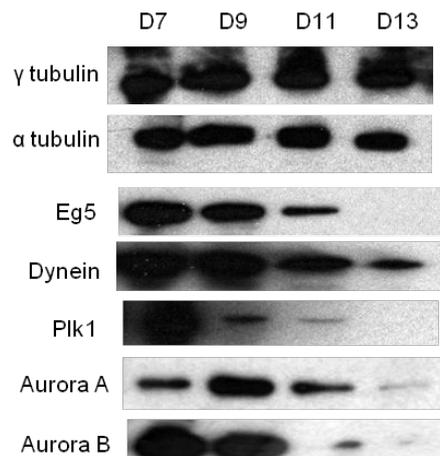


図5 MTOC、MTOC調節因子、モーター蛋白質の発現

(7) 細胞内局在：CFU-E と成熟赤芽球における MTOC, モーター蛋白質, MTOC 調節因子の局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。CFU-E の細胞分裂時、2 個の γ-チューブリンが分裂溝の両端にそれぞれ局在したのに対し、成熟赤芽球では偏在した核と、その中心側に 1 個の γ-チューブリンが存在していた。ダイニ

ンは、CFU-E では細胞質に広く分布するのに  
対し、成熟赤芽球では  $\alpha$ -チューブリンと共局在  
して核を覆っていた。Eg5, Plk1, Aurora B は、  
CFU-E では分裂溝で  $\alpha$ -チューブリンと共局在  
し、Aurora A は紡錘体周囲に局在した。一方、  
成熟赤芽球において Eg5, Plk1, Aurora A ,  
Aurora B は免疫化学的に検出されなかった。  
Western blotの結果を踏まえて、ダイニンがヒ  
ト赤芽球の細胞極性を決定し、また、脱核に  
関与することを示す所見を得た。

#### <結論>

以上、ヒト赤芽球の脱核において、ダイニン  
が核を MTOC と連携して移動させて細胞極  
性を決定していることが示唆された。

#### <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**:340-349

### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. **鵜生川久美**, 澤田賢一 : 赤血球造血と疾患をめぐる最近の進歩: 赤芽球脱核の分子機構と血液疾患  
血液内科(2014) 68 巻 5 号, 585-591.  
(査読なし)
2. **鵜生川久美** : 赤血球造血の基礎と臨床, なぜ? どのように? 赤芽球の脱核  
血液フロンティア(2014) 24 巻 4 号, 565-571.  
(査読なし)

### 6 . 研究組織

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