

平成30年6月16日現在

機関番号：32690

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15505

研究課題名(和文) 成熟血球細胞の糖鎖関連分子が担う「造血幹細胞へのフィードバック制御」の探索と解明

研究課題名(英文) Functional screening of glycan-related molecules in feedback regulation of hematopoietic stem cells

研究代表者

西原 祥子 (Nishihara, Shoko)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号：00164575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：組織を持続的に機能的たらしめるには、組織細胞の種類や数が厳密に制御され続ける必要がある。従って、組織幹細胞は、分化した組織細胞からのフィードバックにより、未分化性維持や分化促進などの制御を受けると予想される。しかし、その分子機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、造血幹細胞へのフィードバック制御に重要な糖鎖関連分子の探索を、ショウジョウバエ成熟血球細胞で行った。網羅的検索の結果、N-結合型糖鎖を合成する糖転移酵素をノックダウンしても、造血幹細胞の体積に変化が認められなかったが、O-結合型糖鎖を合成する糖転移酵素をノックダウンすると造血幹細胞の体積は減少する傾向にあることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to maintain tissues and organs, their constituent cell types and numbers must be strictly controlled. Therefore, tissue stem cells are under the feedback regulation from mature differentiated tissue cells. However, its mechanism is largely unknown. Here we performed screening of the glycan-related genes that contribute to the feedback regulation in tissue stem cells by using *Drosophila* hematopoietic organs. *Drosophila* lymph gland in 3rd instar larva is a hematopoietic organ, in which hematopoietic stem cells proliferate and mature hemocytes differentiate. To screen, we use RNA interference based on GAL4-UAS system. The knock down of glycan-related genes in mature hemocytes, and then hematopoietic stem cells population were observed.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：造血器官 ショウジョウバエ 糖鎖関連遺伝子 成熟血球細胞 造血幹細胞 フィードバック機構

1. 研究開始当初の背景

通常の幹細胞ニッチからのシグナルに加え、組織幹細胞は、組織の持続的な維持のため、分化した組織細胞から何らかのシグナルを受けている。このようなフィードバック制御の存在が見出されつつあったが (Mondal *et al.*, *Cell* 147, 1589 (2011))、分子機構はほとんど明らかでなかった。

一方、タンパク質の半数以上は糖鎖修飾を受けている (Artemenko *et al.*, *Methods Mol Biol.* 899, 325 (2012))。特に、細胞膜上のタンパク質や分泌されるタンパク質のほとんどは、糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。発生段階特異的に発現する 200 種以上の糖転移酵素が、ゴルジ装置で様々な糖鎖を付加する。これらの糖鎖は、発生過程や疾病の状態などを反映して変化し、細胞間の様々なシグナルを制御している。当時、我々は、ムチン型糖鎖がショウジョウバエの造血幹細胞の維持環境を整えていることを明らかにしていた (Fuwa, Nishihara *et al.*, *Dev Biol.* 401, 206 (2015))。

無脊椎動物であるショウジョウバエと脊椎動物では、造血器官の形状や血液細胞の種類が大きく異なり、それらの関連性はあまり注目されてこなかった。しかし、近年、造血器官の形成や造血幹細胞維持に働くシグナル分子や血球細胞種の分化に働く遺伝子セットが、ショウジョウバエと脊椎動物との間で高度に保存されていることが明らかになってきていた (Crozatier *et al.*, *Dis Model Mech.* 4, 439 (2011); Gold *et al.*, *Exp Hematol.* 42, 717 (2014))。このことから、成熟血球細胞から造血幹細胞へのフィードバック制御に機能する糖鎖も、種をこえて高度に保存されていることが期待できた。

このような背景に立ち、本研究では、造血幹細胞へのフィードバック制御に重要な糖鎖関連分子の網羅的探索を、ショウジョウバエ成熟血球細胞で行った。このような網羅的探索に必須となる、糖鎖関連遺伝子 (257 遺伝子)

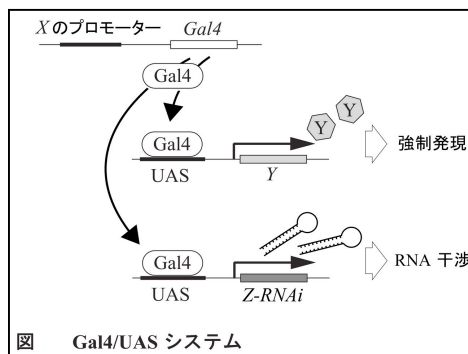
に対する 500 あまりの RNAi ショウジョウバエ系統は、すでに樹立していた (Yamamoto-Hino, Nishihara *et al.*, *Genes Cells.* 20, 521 (2015))。

2. 研究の目的

組織を持続的に機能的たらしめるには、組織細胞の種類や数が厳密に制御され続ける必要がある。従って、組織幹細胞は、分化した組織細胞からのフィードバックにより、未分化性維持や分化促進などの制御を受けると予想される。しかし、その分子機構はほとんど明らかにされていなかった。近年、造血幹細胞の維持、血球分化で働くシグナル伝達経路が、脊椎動物とショウジョウバエの間で高度に保存されていることが示された。タンパク質の半数以上が糖鎖修飾を受けており、糖鎖はこれらの局在や分泌、構造、活性に重要な役割を果している。そこで、本研究では、造血幹細胞へのフィードバック制御に重要な糖鎖関連分子の網羅的探索を、ショウジョウバエ成熟血球細胞で行った。本研究の成果は、脊椎動物に適用できる可能性が高く、ヒト血球系細胞や造血幹細胞の維持機構の解明、血液疾患治療などの臨床への応用が期待できると考えられた。

3. 研究の方法

ショウジョウバエには、時空間を制御して目的のタンパク質を発現させることができる Gal4/UAS システムがある (図参照)。

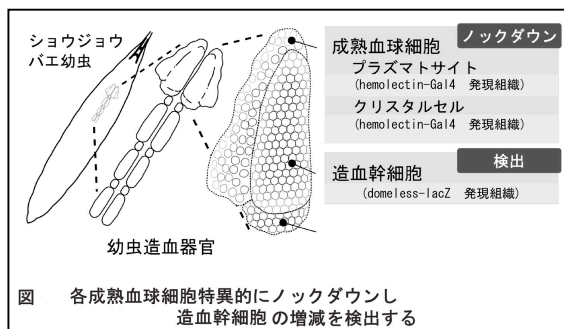


Gal4/UAS システムでは、酵母の転写因子 Gal4 を遺伝子 X のプロモーターの制御下で発現する形質転換系統 (Gal4 系統) と、異所的に発現させたい遺伝子 Y の上流に

Gal4 結合配列である UAS (Upstream Activation Sequence) を接続した形質転換系統 (UAS 系統) の 2 系統を用いる。それぞれの系統を両親を持つ次世代個体では、遺伝子 X が発現する時と場所で遺伝子 Y を強制発現できる。この原理を応用し、遺伝子 Z を標的とした 2 重鎖 RNA を作り出すコンストラクト Z-RNAi を持つ UAS 系統を準備すれば、遺伝子 X の発現する時と場所で遺伝子 Z をノックダウンできる。

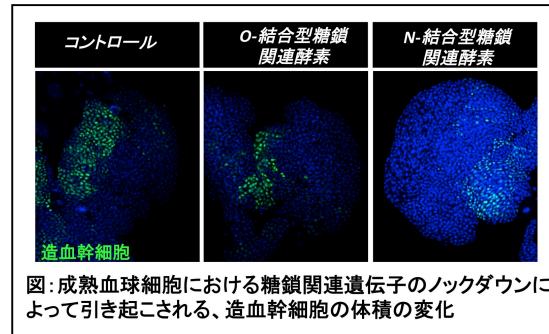
ショウジョウバエ幼虫は、造血幹細胞ニッチ、造血幹細胞、成熟血球細胞で構成される造血器官、リンフグランドをもつ (Jung et al., Development, 132, 2521 (2005))。成熟血球細胞には、クリスタルセルとマクロファージ様のプラズマトサイトがある。これまでに、プラズマトサイトとクリスタルセルの両成熟血球細胞で *hemolectin* が発現していることが報告されている。従って、*hemolectin* の制御下で Gal4 を産生する系統 (*hemolectin-Gal4*) と、UAS 配列の下流に糖鎖関連遺伝子のノックダウンコンストラクトを接続した UAS-RNAi 系統を交配し生まれた次世代では、成熟血球細胞特異的に目的の糖鎖関連遺伝子がノックダウンされる。

このような Gal4/UAS システムを用いたノックダウンを遂行するショウジョウバエには、造血幹細胞で恒常的に β -galactosidase を発現するような染色体 (*domeless-lacZ*) をあらかじめ持たせておいた。解剖して取り出した組織を、抗 β -galactosidase 抗体で免疫染色すると、造血幹細胞の増減を確認することができた。他の細胞では、 β -galactosidase は発現しないため、造血幹細胞のみを正確に解析できた。



4. 研究成果

網羅的な検索の結果の典型的な例を示した。



N-結合型糖鎖を合成する糖転移酵素をノックダウンしても、造血幹細胞の体積に有意な変化が認められなかった。一方、O-結合型糖鎖を合成する糖転移酵素をノックダウンすると造血幹細胞の体積は減少する傾向にあった。

これまでに我々は、ムチン型糖鎖の T 抗原を合成する酵素の変異体で、造血幹細胞が消失することを報告している (Fuwa, Nishihara et al., Dev Biol. 401, 206 (2015))。T 抗原が大幅に減少した個体では、成熟血球細胞 (プラズマ細胞) が分泌する血液凝固因子の一つであるヘモレクチン (ヴォンヴィレブランド因子のショウジョウバエオミソログ) が変質したため、ニッチ細胞からのフィロポディアの伸長が阻害され、造血幹細胞が維持されていなかった。本研究の結果が、同様なものに起因するか、検討する必要があると考えられた。

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 (総説)] (計 2 件)

1. 西原祥子、伊藤和義 : 幹細胞における糖鎖の働き - ショウジョウバエモデルから ES 細胞まで - 幹細胞に機能する糖鎖. 化学と生物, 55 (11) 750 - 758 (2017).
2. Nishihara S: Glycans in stem cell

regulation: from *Drosophila* tissue stem cells to mammalian pluripotent stem cells, FEBS Letters, in press.

[その他]

ホームページなど

<http://www.t.soka.ac.jp/cellbiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 祥子 (Shoko Nishihara)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号 : 00164575

(2) 研究協力者

伊藤 和義

創価大学・工学研究科生命情報工学専攻・大学院生

(3) 研究協力者

佐藤 大一

創価大学・工学研究科生命情報工学専攻・大学院生

(4) 研究協力者

符 敦賢

創価大学・工学研究科生命情報工学専攻・大学院生