

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：35405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10090

研究課題名(和文)好中球分化におけるシグナル標的の同定

研究課題名(英文)Identification of signal targets in neutrophil differentiation

研究代表者

野間 隆文(NOMA, TAKAFUMI)

広島女学院大学・人間生活学部・特任教授

研究者番号：40189428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ATP産生は、細胞活動において重要な役割を果たしています。ミトコンドリアATP産生は、マトリックスへのADPの供給とミトコンドリア内膜電子伝達系複合体によって制御される。前回の研究で、AK2が造血組織である骨髄のミトコンドリアでのADP供給を行う膜間酵素であることを報告しました。K2遺伝子欠損は、好中球とT細胞の両方の欠損を示す細網異形成の責任遺伝子であるため、AK2は好中球とT細胞を産生するために重要である。そこで、本研究ではAK2機能喪失分析により、ミトコンドリア膜間酵素AK2の役割を研究した。本研究の結果、AK2構造とAK2変異の位置との間の機能的関係が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症免疫不全症のうち細網異形成症では、AK2遺伝子欠損によって好中球とT細胞の両方の欠損を生じる。しかしながら、AK2による血球細胞特異的な分化制御機構の詳細は未だ不明である。我々は、前回の研究で必要なATP産生制御機構が細胞の種類によって特異的に調節されるメカニズムとしてAK2の存在が重要であることを報告した。今回はその分子機構を解明する研究をAK2遺伝子の機能的部分欠損を用いて実施した。その結果、AK2構造とAK2変異の位置との間の機能的関係が重要であることを示さす結果を得た。本研究により、AK2タンパク質の構造が血球細胞分化に与える影響が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：ATP production plays an important role in cellular activities. Mitochondrial ATP production is mainly regulated by ADP supply across the mitochondrial membrane to the matrix and the activity of the electron transport chain complex. Previously, we found that AK2 is the main component for ADP supply to the matrix of mitochondria in hematopoietic cells, especially in the bone marrow. In addition, AK2 is crucial to produce neutrophil and T cell since defect of gene causes reticular dysgenesis that is one of the severe combined immune deficiencies showing defects of both neutrophil and T cell. In this study, we focused on and analyzed the role of AK2 by loss of function analysis. We report here the possible functional relationship between structure of AK2 and position of AK2 mutation for the regulation of neutrophil differentiation.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：アデニル酸キナーゼ2 ミトコンドリア ATP合成 重症複合型免疫不全症 細網異形成症 常染色体劣性遺伝 酵素活性 構造活性相関

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ATP 産生は、細胞活動において重要な役割を果たしている。ミトコンドリア ATP 産生は、マトリックスへの ADP の供給とミトコンドリア内膜電子伝達系複合体によって制御されている。前回の研究で、AK2 が造血組織の骨髄のミトコンドリアにおいて ADP 供給を行う膜間酵素であることを報告した。さらに、重症複合型免疫不全症のうち細網異形成症では、AK2 遺伝子欠損によって好中球と T 細胞の両方の欠損を生じることが報告されている。しかしながら、AK2 による血球細胞特異的な分化制御機構の詳細は未だ不明である。

そこで、本研究では、前回の研究で報告した ATP 産生制御機構が細胞特異的に血球分化誘導を調節するメカニズムを明らかにし、細網異形成症の発症機序の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

先行研究で、ミトコンドリアの AK2 による ATP 産生制御機構が重要であることを示した。さらに、AK2 遺伝子欠損と関連する遺伝病として、重症複合型免疫不全症の 1 つである細網異形成症が純遺伝学的に明らかにされている。その分子機構を明らかにするために、AK2 遺伝子機能喪失型変異体細胞と試験管内好中球分化誘導系を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、HL60 細胞による *in vitro* 好中球分化誘導系とクリスパー・キャス 9 によって作成した AK2 遺伝子部分欠損株を用いて、好中球分化誘導能を分析した。

3-1. 細胞培養と AK2 遺伝子欠失体の作製

先行研究同様に、ヒト前骨髄球性白血病細胞株(HL60 細胞)を用いた(Tanimura A et al., PLoS One.2014 25;9(2):e89916.)。クリスパー・キャス 9 による AK2 遺伝子のノックアウトの作成用のガイド RNA には、2つのオリゴヌクレオチド(フォワード 5'-CGAGTATCCTAAAGGCATCCGTTTT 3'、リバース 5'-GGATGCCTTTAGGATACTCGCGGTG-3')を用いた。6µg または 9µg の精製 CRISPR ベクターを HL-60 に導入した。OFP Reporter 陽性クローンを選別し、そのクローンの拡大後、ゲノム DNA を取得し、genomic PCR によって、AK2 の変異体を選択した。プライマーは、フォワード 5'-TCGCCGTGCAGTTGGTAAGG-3'、リバース 5'-TGACCTTGAGTTTCAGCAGG-3'。遺伝子変異の位置は HiSeq X-ten/PE150(イルミナ社製)を用いた全ゲノム解析によって確認した。タンパク質の発現、並びに酵素活性は、先行研究と同様な方法により確認した(Tanimura et al., PLoS One.2014 25;9(2):e89916.)。

3-2. 好中球分化時の M イクローレイ解析

HL-60 細胞および AK2 ノックアウト HL-60 細胞の *in vitro* 好中球分化誘導系は先行研究と同様に行った(Tanimura et al., PLoS One.2014 25;9(2):e89916., Cell Physiol Biochem.2018;47(5):1936-1950.)。HL-60 細胞および AK2 ノックアウト HL-60 細胞を 10µM TRA で処理し、4 日間培養した。0 日目、1 日目、2 日目、および 4 日目に細胞を回収し、total RNA を調整した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は徳島大学総合研究支援センター 先端医療研究部門にて SurePrint G3 Human GE v3 8x60K(Agilent 社)により行った。

4. 研究成果

AK2 遺伝子変異株の特性解析について

1) ゲノム状況

まず、AK2 遺伝子の機能的部分欠損 HL-60 株の作製を試み、二種類のヘテロノックアウトクローン(clone A, clone B)を得た。両クローンのゲノム DNA の構造を野生型 HL-60 のそれと比較検討したところ、clone A は、AK2 遺伝子エクソン 1 の領域に、6 塩基の欠失を持つ相同染色体と、1 塩基の挿入と 11 塩基の欠失を持つ相同染色体を含んでいた。またイントロン 4 の領域には、野生型 HL-60 と比べて、8 塩基の挿入を持つ相同染色体と野生型と同じ構造の相同染色体を含んでいた。clone B は、エクソン 1 の領域について、一方の相同染色体は野生型 HL-60 と同じであったが、他方は、1 塩基の挿入と 11 塩基の欠失を

含んでいた。イントロン4の領域については、clone Aと同じであった。

2) 酵素活性

次に、AK2ヘテロノックアウトクローンの酵素活性について検討した。その結果、AK2遺伝子機能欠損株はいずれも酵素活性が野生型HL-60細胞の半分程度に減少していることを確認した。

3) 分化誘導能

さらに、それらのクローンについて、レチノイン酸による好中球分化誘導能を解析した。培地に10 μMになるようにATRAを添加して4日間培養した。その過程で、核の形態から分化細胞を同定し、分化細胞割合の経時的变化を調べた。その結果、野生型HL-60細胞と比べて、AK2をノックアウトしたクローンでは、いずれも分化誘導の程度が低下しており、特に2つのcloneのうちのclone Aがより強い分化誘導能の低下を示した。(図1)

4) 遺伝子発現

好中球分化誘導前後の遺伝子発現変動についても、マイクロアレイにより解析した。分化誘導前の細胞とATRAで分化誘導処理した細胞からtotal RNAを調製し、これらを用いて、マイクロアレイ解析を行った。分化誘導前(Day 0)と分化誘導後(Day 4)の遺伝子発現レベルを比較し、発現レベルが0.5倍以下もしくは2倍以上に変動している遺伝子群(図2)についてMetascape(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)を用いてGO解析を行った(図3)。野生型HL-60細胞では、Day 0に対してDay 4で発現が低下している遺伝子群には、細胞周期、DNA複製、細胞分裂、DNA修復など細胞増殖に関連する遺伝子群が強く検出された。この結果は、変異型のclone A、clone Bの解析でも同様であった。一方、Day 0に対してDay 4で発現が上昇している遺伝子群には、ミエロイド活性化、細胞接着制御、生体防御制御、サイトカイン産生制御等、好中球分化に関連すると考えられる遺伝子群が強く検出された。この結果もまた、変異型clone A、clone Bの解析でも同様であった。これらの結果より、分化誘導前後での遺伝子発現変動はAK2の活性の高低にかかわらず、類似していることが判明した。

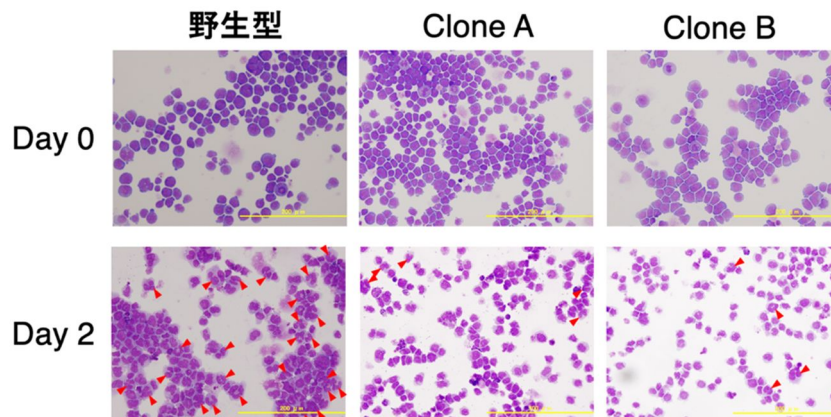


図1 分化誘導中の細胞形態

Arrowhead indicates cells that show neutrophil differentiation two day after addition of retinoic acid.

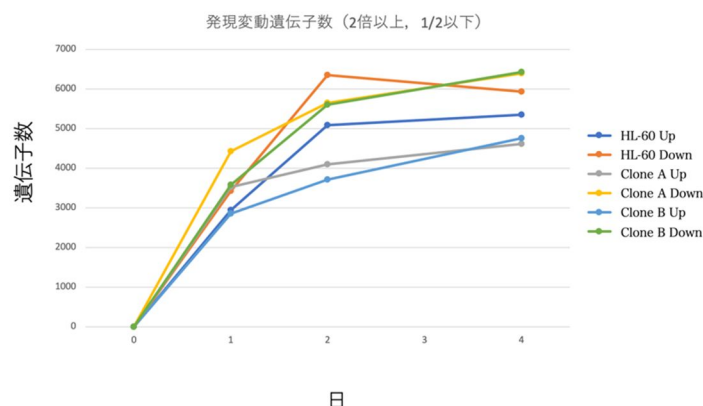


図2 変動遺伝子数の推移

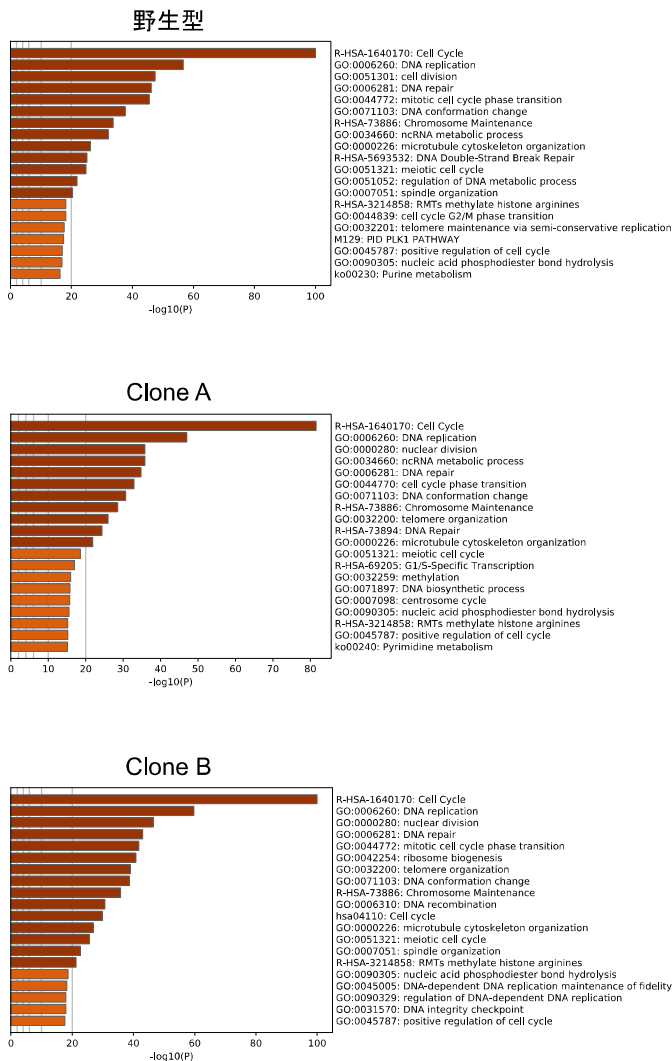


図3 GO解析結果

Day 0 に対して Day 4 で発現が低下している遺伝子群の解析結果を示す。

またゲノム DNA の解析結果を基に変異部位のタンパク質の高次構造について *in silico* 解析を行った。その結果、特に clone A については N 末領域の構造が変化し、酵素活性に影響を与えている可能性が示唆された。すなわち構造活性相関が重要であることを見出した(詳細については、現在投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 堀口 大吾 (Horiguchi Taigo) (70304532) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |