

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20610003
 研究課題名 (和文) Geminin ユビキチン化による造血幹細胞の活性制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of hematopoietic stem cell regulation
 through Geminin ubiquitination
 研究代表者
 安永 晋一郎 (YASUNAGA SHIN' ICHIRO)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
 研究者番号：50336111

研究成果の概要 (和文)：

ポリコーム複合体1 (Ring1B-Bmi1-Rae28-Scmh1 野生型) および RDCOXB4 複合体 (Roc1-Ddb1-Cul4a-HOXB4 野生型) が共に Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、そのタンパク質発現を低下させることで造血幹細胞活性を支持していることを明らかにした。次いで Geminin の造血過程における発現動態をトレースするために Geminin-EYFP 融合遺伝子ノックインマウスを確立することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

We revealed that each of Polycomb complex 1 (Ring1B-Bmi1-Rae28-Scmh1 wild type) and RDCOXB4 complex (Roc1-Ddb1-Cul4a-HOXB4 wild type) acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to regulate expression level of the protein, which sustains hematopoietic stem cell activity. Next, we succeeded in generating Geminin-EYFP knock-in mice to trace the expression level of Geminin *in vivo* hematopoiesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
2009年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2010年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：再生医学、ユビキチン化、Geminin、ポリコーム複合体、HOXB4

1. 研究開始当初の背景

HOX タンパク質は、発生過程における前後軸に沿った位置情報を担っており、その発現パターンにより組織構造の特性化が起こる。HOX タンパク質のうち HOXB4 は造血系細胞によく発現されており、そのレトロウイルスを用いた過剰発現は *ex vivo* での造血幹細胞の著しい増幅を可能にすることが知られてい

る (Kyba et al. Cell 2002; 109: 29-37, Antonchuk et al. Cell 2002; 109: 39-45)。一方でポリコーム複合体は、核内に巨大な二種類の複合体 (複合体1及び複合体2) を形成し、ヒストンコードを介して HOX 遺伝子群の発現抑制状態を維持伝達することにより細胞のメモリー機構を構成している。

ポリコーム複合体1の構成メンバーのう

ちRae28やBmi1のノックアウトマウスを用いた解析にて、ポリコーム複合体が造血幹細胞の活性の維持に必要不可欠であることが明らかになった(Ohta et al. J Exp Med; 2002; 195:759-70, Park et al. Nature 2003; 423:302-5、前者は申請者らの研究グループによりなされた業績である)。これらのノックアウトマウスでは、造血系細胞におけるHOXタンパク質の発現自体には異常が認められなかった。Bmi1が、p16INK4aやp19ARFをコードするink4a遺伝子座の転写活性を抑制することで造血幹細胞の活性を維持していることが示されたが、その貢献は部分的なものにとどまる。また、申請者らの樹立したRae28ノックアウトマウスにおける造血幹細胞活性の低下においてはink4a遺伝子座の関与は認められなかった。従ってポリコーム複合体1を介した造血幹細胞活性の維持には新たな分子機序が存在することが予想された。申請者らの研究グループは、yeast two hybrid法を用いた解析にて造血幹細胞制御の二大細胞内因子とも位置づけられるHOXタンパク質とポリコーム複合体1が共にGemininと直接分子結合をすることを明らかにした(Luo et al. Nature 2003; 423:302-5)。Gemininは、一細胞周期に一度だけのDNA複製を規定するDNA複製ライセンス化因子Cdt1の直接的阻害分子であり、細胞のS期への突入を抑制することにより細胞の増殖活性を抑制するとともにS期の細胞においては過剰なDNA複製を抑制することによりゲノムの安定性を維持する役割を担っている。また、Gemininは神経幹細胞の未分化性を維持する因子としても知られており、その分子機序の一つとしてGemininがクロマチンリモデリング複合体SWI/SNFのBrg1サブユニットに直接結合することでクロマチンリモデリングを抑制するモデルが提唱されている(Seo et al. Genes Dev 2005; 19:1723-34)。

申請者らは、Rae28欠損造血細胞においてGemininタンパク質が蓄積していることを見出し、この過剰なGemininがRae28欠損造血幹細胞の活性低下の分子基盤を担っている可能性を示すとともに、ポリコーム複合体1がGemininのE3ユビキチンリガーゼの一つとして機能しその安定性を制御していることを明らかにした(Ohtsubo et al. Proc. Natl. Acad. Sci 2008; 105:10396-10401)。次いで、申請者らは過剰発現させたHOXB4が、

Rae28欠損造血細胞におけるGemininタンパク質の蓄積を消失させるとともに造血幹細胞活性の低下を回復させることを明らかにした。申請者らはさらに、HOXB4がCul4-ROC1 E3ユビキチンリガーゼのアダプター分子として機能しGemininのユビキチン化を誘導していることを見出した(平成19年日本血液学会にて発表)。以上の知見により、Gemininタンパク質のユビキチン化制御が、造血幹細胞の未分化性の維持や増殖活性の付与を含めた活性の制御に極めて重要な役割を果たしているのではないかと考え本研究を着想した。

2. 研究の目的

造血幹細胞の活性を正に制御する二大細胞内因子としてHOXタンパク質とポリコーム複合体1が知られている。これらは、従来転写制御因子として理解されてきたが、造血幹細胞の活性制御における分子基盤はほとんど解明されていない。申請者らの研究グループは、これらの二大細胞内因子が、共にDNA複製ライセンス化制御因子でありかつ幹細胞の未分化性維持因子であるGeminin(双子の機能を持つタンパク質として命名された)と結合することを見出した(Luo et al. Nature 2003; 423:302-5)。さらに申請者らは、これらの二大細胞内因子が共にGemininのE3ユビキチンリガーゼとしてそれぞれ独立して機能することが、造血幹細胞の活性制御の根幹的な分子基盤をなす可能性を示した。これらの知見に基づき、Gemininのユビキチン化を制御する分子基盤の詳細を明らかにするとともに、Gemininのユビキチン化制御を介した造血幹細胞活性の制御システムを分子レベルで解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ポリコーム複合体1を介したGemininのユビキチン化

申請者らは、すでにバキュロウイルス-昆虫細胞系を用いてポリコーム複合体1(Ring1B-Bmi1-Rae28-Scmh1)を再構成し、リコンビナントGemininタンパク質の*in vitro*ユビキチン化活性を検出する実験系を確立した。ポリコーム複合体1のメンバーのうちRing1BはE2ユビキチン結合酵素の結合ドメインを提供するのでそのE3ユビキチン活性には必須であると考えられる。そこで、残りの構成因子をそれぞれ組み合わせ、例えば

Bmi1, Rae28, Scmh1 をそれぞれ欠いた複合体を再構成し *in vitro* Geminin ユビキチン化を行い、Geminin の E3 ユビキチンリガーゼ活性におけるポリコム複合体 1 の各構成因子の役割を調べる。また、Scmh1 は Geminin との結合部位を提供しているため、Scmh1 の Geminin 結合部位を破壊した変異体を作製し、ポリコム複合体 1 の Geminin の E3 ユビキチンリガーゼ活性に与える影響を調べる。

(2) RDCOXB4 (Roc1-Ddb1-Cul4a-HOXB4) 複合体を介した Geminin のユビキチン化

申請者らは、すでに予備実験において昆虫細胞を用いた RDCOXB4 複合体の再構成に成功した。そこで、上と同様に Geminin タンパク質の *in vitro* ユビキチン化活性を検出する実験系を確立する。この実験系が確立すれば、既に作製した HOXB4 の Geminin 結合能が阻害された変異体 (HOXB4-mut) の Geminin E3 ユビキチンリガーゼ活性に与える影響を調べる。

(3) Geminin-GFP 融合遺伝子ノックインマウスの樹立

Geminin 遺伝子は 7 個のエクソンからなり第 7 エクソンに終止コドンが存在する。その終止コドンの直前に GFP を in-frame に挿入したノックインベクターを作製する。これを ES 細胞に導入し相同組み替え体をスクリーニングする。選択された ES 細胞クローンを胚盤胞に導入しキメラマウスを作製し、C57BL/6 マウスに交配しヘテロ接合体を得る。これをさらに C57BL/6 マウスにもどし交配し目的のノックインマウスを確立する。

4. 研究成果

(1) ポリコム複合体 1 を介した Geminin のユビキチン化

バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いてポリコム複合体 1 を再構成し、*in vitro* の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を調べたところ、Ring1B、Bmi1、Rae28、Scmh1 のどの因子を欠いても十分な酵素活性を発揮できないことが分かった。また Scmh1 の Geminin 結合部位を破壊した変異体を野生型 Scmh1 の代わりに使用すると、酵素活性は著しく低下した。

(2) RDCOXB4 (Roc1-Ddb1-Cul4a-HOXB4) 複合体を介した Geminin のユビキチン化

バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて RDCOXB4 複合体を再構成し、*in vitro* の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を調べたところ、Roc1、Ddb1、Cul4a、HOXB4 のどの因子を欠いても十分な酵素活性を発揮できないことが分かった。また HOXB4 の Geminin 結合部位を破壊した変異体を野生型 HOXB4 の代わりに使用すると、酵素活性はほぼ消失した。

(3) Geminin-GFP 融合遺伝子ノックインマウスの樹立

Geminin 遺伝子の第 7 エクソンにある終止コドンの直前に GFP を in-frame に挿入したノックインベクターを作製し、これを ES 細胞に導入して相同組み替え体をスクリーニングした。選択された ES 細胞クローンを胚盤胞に導入しキメラマウスを作製し、C57BL/6 マウスに交配しヘテロ接合体を得た。これをさらに C57BL/6 マウスにもどし交配し目的のノックインマウスを確立した。次いでヘテロ接合体同士を交配し、ホモ接合体を得た。骨髄細胞における Geminin-EFYP 融合タンパク質の発現をウェスタンブロットとフローサイトメーターで調べ、想定通りの発現が認められることを確認した。

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] (計 6 件)

1. Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Mori, S., Tsumura, M., Okada, S., Ohta, T., Ohtani, K., Kobayashi, M., Takahara, Y. Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 査読有り, 2010, 107(50), 21529-21534
2. Mihara, K., Yanagihara, K., Takigahira, M., Imai, C., Bhattacharyya, J., Kubo, T., Takei, Y., Yasunaga, S., Takahara, Y., Kimura, A. Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 査読有り, 2010 151(1), 37-46
3. Shirao, K., Okada, S., Tajima, G., Tsumura, M., Hara, K., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Hata, I., Sakura, N., Shigematsu, Y., Takahara, Y., Kobayashi, M. Molecular pathogenesis of novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with

short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum. Genet.*, 査読有り, 2010 127(6), 619-628

4. Okada, S., Konishi, N., Tsumura, M., Shirao, K., Yasunaga, S., Sakai, H., Nishikomori, R., Takahara, Y., Kobayashi, M. Cardiac infiltration in early-onset sarcoidosis associated with a novel heterozygous mutation, G481D, in *CARD15*.

Rheumatology (Oxford), 査読有り, 2009, 48(6), 706-707

5. Bhattacharyya, J., Mihara, K., Yasunaga, S., Tanaka, H., Hoshi, M., Takahara, Y., Kimura, A. BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during progression of chronic myeloid leukemia. *Ann. Hematol.*, 査読有り, 2009, 88(4), 333-340

6. Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Ohno, Y., Tsumura, M., Okada, S., Ishikawa, N., Shirao, K., Kikuchi, A., Nishitani, H., Kobayashi, M., Takahara, Y. Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 査読有り, 2008, 105(30), 10396-10401

[学会発表] (計9件)

1. Yasunaga S., Ohtsubo M., Ohno Y., Mori S., Furutani T., Kawashima A., Tetsuguchi H., Nakashima Y., Takahara Y., Scmh1 deficiency up-regulates transcription of Hox genes to maintain the expression level of Geminin, that may play a crucial role for sustaining hematopoiesis. The First RIRBM International Symposium BMB : Genome

damage and non-cancerous diseases, March 3-4, 2011, Hiroshima, Japan.

2. Yasunaga S., Ohtsubo M., Ohno Y., Mori S., Furutani T., Kawashima A., Tetsuguchi H., Nakashima Y., Takahara Y., Scmh1, a member of Polycomb complex 1, regulates hematopoiesis either through Geminin Ubiquitination or through repression of Hox genes. BMB (Biochemistry and Molecular Biology) 2010, December 7-10, 2010, Kobe, Japan.

3. Yasunaga S., Ohno Y., Ohtsubo M., Tsumura, M., Mori S., Nakashima Y., Kobayashi M., Takahara Y., A role for Geminin in sustaining activity of Haemopoietic stem and progenitor cells.

The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology September 24-26, 2010, Yokohama, Japan.

4. Yasunaga S., Ohno Y., Ohtsubo M., Tsumura, M., Kageyama Y., Mori S., Nakashima Y., Takahara Y., Role for Geminin in hematopoietic stem cell regulation. The 8th Stem Cell Research Symposium, May 13-15, 2010, Awaji, Japan.

5. Yasunaga S., Ohtsubo M., Ohno Y., Tsumura, M., Kageyama Y., Mori S., Nakashima Y., Takahara Y., Molecular role of Scmh1, a member of Polycomb complex 1. Which plays a crucial role for governing the hematopoietic stem cell activity.

The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 9-12, 2009, Yokohama, Japan.

6. 大坪素秋、安永晋一郎、津村弥来、大野芳典、影山由佳、森彩華、時元利恵、小林正夫、瀧原義宏、HSC の活性維持に必須なポリコム複合体1の構成因子 Scmh1 の機能ド

メインの解析、第71回日本血液学会総会、
2009, 10/23-25、京都.

7. Yasunaga S., Ohno Y., Ohtsubo M.,
Tsumura, M., Kageyama Y., Tokimoto R.,
Takahara Y., Molecular role of Scmh1, a
member of Polycomb complex 1. Which plays
a crucial role for governing the
hematopoietic stem cell activity. The 7th
Stem Cell Research Symposium, May 15-16,
2009, Tokyo, Japan.

8. 安永晋一郎、大坪素秋、大野芳典、影山
由佳、津村弥来、岡田賢、時元利恵、小林正
夫、瀧原義宏、Geminin による造血幹細胞制
御の分子基盤、第31回日本分子生物学会年
会・第81回日本生化学会大会・合同大会、
2008, 12/9-12、神戸.

9. 安永晋一郎、大坪素秋、大野芳典、影
山由佳、津村弥来、岡田賢、石川暢恒、白
尾謙一郎、時元利恵、小林正夫、瀧原義宏、
造血幹細胞制御における Geminin の役割、
第70回日本血液学会総会、2008, 1
0/10-12、京都.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/dscb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 晋一郎 (YASUNAGA SHIN' ICHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：50336111

(2) 研究分担者

大坪 素秋 (OHTSUBO MOTOAKI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10211799

瀧原 義宏 (TAKIHARA YOSHIHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60226967

(3) 連携研究者

()

研究者番号：