様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２４年４月２７日現在

機関番号：37502
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21602004
研究課題名（和文）　ポリコーム複合体１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 Polycomb-group complex 1

研究代表者
大坪　素秋（OHTSUBO MOTOAKI）
別府大学・食物栄養科学部・教授
研究者番号：10211799

研究成果の概要（和文）：
ポリコーム(PcG)複合体１が造血幹細胞の活性を支持する機構としては、PcG 複合体１の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼによるものと、PcG 複合体１が抑制する Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の転写を介した制御の２つが存在することが新たに分かった。以上の観察結果より PcG 複合体１の構成因子 Scmh1 の改変による Geminin に対しての E3 ユビキチンリガーゼ活性の操作が造血幹細胞の増幅に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
We revealed that Polycomb-group (PcG) complex 1 regulates the protein’s stability of Geminin either by directly acting as the E3 ubiquitin ligase or indirectly through transcriptional regulation of *Hoxa9* and *Hoxb4*. Our observations will contribute to the development of a method to enhance hematopoietic stem cell activity by manipulating the E3 ubiquitin ligase activity of PcG complex 1 through the modification of Scmh1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	１，４００，０００	４２０，０００	１，８２０，０００
２０１０年度	１，２００，０００	３６０，０００	１，５６０，０００
２０１１年度	１，１００，０００	３３０，０００	１，４３０，０００
年度			
年度			
総　計	３，７００，０００	１，１１０，０００	４，８１０，０００

研究分野：分子生物学
科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学
キーワード：再生医学、発生・分化、造血幹細胞、ポリコーム複合体、Geminin、DNA 複製制御

１．研究開始当初の背景

京都大のグループによる iPS 細胞の発見およびその後の国内外の研究に関しての報道からもわかるように、iPS・ES 細胞や造血幹細胞(HSC)をはじめとする様々な分化能を有する成体幹細胞の再生医療への応用が強く望まれている。しかしながら、成体組織中の幹細胞の割合が極めて低いことから、現在実用に最もよく供されているさい帯血中の HSC でも移植に不十分な場合が多い。そのことから、再現性よくかつ安全に HSC を体外(ex vivo)で増幅させる方法の開発が期待されている。これまで HSC を ex vivo で増幅させる試みはなされてきたが、まだ実用に供するに足る技術開発はなされていない。

２．研究の目的

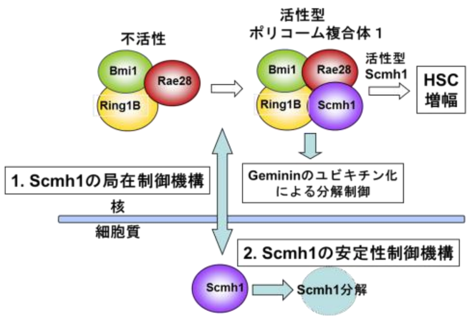
HSC の自己複製能を含めた活性を制御する細胞内因子であるポリコーム（PcG）複合体１が、これまで定説であったクロマチン・ヒス

トンの修飾による転写制御を介した調節以外に、DNA 複製の阻害因子である Geminin の分解制御を通して、染色体 DNA 複製の制御にも直接関わっていることを申請者らのグループは最近報告した（Ohtsubo et al. PNAS.USA 2008)。本研究課題では、さらにその研究を押し進めて､PcG 複合体１が Geminin の制御を通して HSC の自己複製能などの活性を支持するメカニズムを分子レベルであきらかにし、得られた知見をマウスのモデル系に応用することにより HSC を ex vivo で増幅させる方法の開発をめざした。

３．研究の方法

PcG 複合体１の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性に Scmh1 が必須であることを既に見いだしているので、PcG 複合体１のうち Geminin と直接会合する Scmh1 蛋白質の細胞内局在制御と安定性制御機構に着目して分子機構を明らかにする（図１）。次に得られた知見をもとにして、Scmh1 に変異を導入することにより Scmh1 の安定性と細胞内局在を変化させて、PcG 複合体１の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を操作することにより HSC の活性を変化させて HSC の増幅が可能であるかマウスのモデル系で検証する。

図1. Scmh1の細胞内局在と安定性制御による ポリコーム複合体1の活性調節



４．研究成果

(1) Scmh1 遺伝子欠損マウスの HSC 活性の解析

PcG 複合体 1 が HSC の活性を支持する分子機構を明らかにする目的で、PcG 複合体 1 の構成員であり、PcG 複合体 1 による Geminin のユビキチン化に必須な Scmh1 の遺伝子欠損マウスを材料として、欠損マウスの HSC の解析を行った。Scmh1 の遺伝子欠損マウスでは、PcG 複合体 1 の E3 ユビキチンガーゼ活性の標的である Geminin が安定化せず、PcG 複合体 1 の他の 構成員である Rae28 の遺伝子欠損マウスで見られた HSC の活性低下は認められなかった。そこで、Scmh1 の遺伝子欠損により引き起こされる､PcG 複合体 1 以外の Geminin の安定性制御に関わる遺伝子の発現増強を予想して解析を行ったところ、PcG 複合体 1 により転写抑制される遺伝子のうち Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の mRNA レベルでの顕著な発現増強が認められた。Hoxb4 と Hoxa9 タンパク質はそれぞれ Cul4a-Ddb1-Roc1 を含む E3 ユビキチンリガーゼを構成し、Geminin のユビキチン化を促進して分解を引き起こすことで、PcG 複合体１の E3 ユビキチンリガーゼ活性の欠損を相補して HSC の活性低下を回避できた（Ono et al. PNAS.USA 2010)。また、PcG 複合体１による Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の発現制御は CHIP アッセイの結果 から直接的であることがわかった。以上の Scmh1 の遺伝子欠損マウスの解析結果から、PcG 複合体 1 による Geminin の安定性制御には PcG 複合体 1 の E3 ユビキチンリガーゼによるものと、Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の転写を介した制御の少なくとも 2 つが存在することが新たに分かった。Scmh1 関連遺伝子による補償機構は Scmh1 欠損の表現型に重要でないことが以上の観察から示唆される。

(2) Scmh1 蛋白質の細胞内局在および安定性制御機構の解析

Scmh1 蛋白質の細胞内局在の制御機構を明らかにする目的で Scmh1 の各種欠失変異体を細胞内で発現させて、DNA 複製阻害によるストレス下での PcG 小体への局在に異常がないか調べたところ､PEST ドメインとそれと隣接する核移行シグナルを含む領域の欠失により､Scmh1 の 細胞質での安定化と PcG 小体への局在の阻害が認められた。PEST ドメインを含む領域はストレス下でリン酸化されることから DNA 複製阻害下でのリン酸化制御の重要性が示唆された。つぎに Scmh1 の機能ドメインの役割を各種変異型 Scmh1 の Scmh1 欠損細胞への導入により調べた。メチル化ヒストンとの相互作用を担う MBT ドメイン欠失変異 Scmh1 の導入は、Scmh1 欠損細胞での Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の転写抑制を回復できなかった。逆に、Geminin 結合ドメイン欠失変異を持つ Scmh1 の導入により、Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の転写抑制は回復し Geminin の安定化が認められた。以上の結果より、Scmh1 の機能ドメインの役割を明らかにすることができた。MBT ドメインと Geminin 結合ドメインの中間に存在する塩基性アミノ酸に富む核移行シグナル類似の領域とそれに近接する PEST ドメインが Scmh1 蛋白質の安定性の制御に深く関わっていることから核移行シグナル類似のリジンに富む領域がユビキチン化の標的となる可能性が浮かび上がってきた。PEST ドメインの中のセリン及びスレオニンのリン酸化により、隣の核移行シグナル類似の領域内のリジン残基でのユビキチン化が促進されることによる Scmh1 蛋白質の安定性制御のモデルが示唆される。PEST ドメインのリン酸化に関わる分子については今後のさらなる解析が必要である。

(3) 変異型 Scmh1 の導入が HSC 活性に及ぼす

影響の解析
MBT ドメイン欠失変異を持つ Scmh1 の導入により、Scmh1 欠損細胞での Hoxb4 と Hoxa9 遺伝子の転写抑制は回復できなかったことから、この変異型 Scmh1 の導入による HSC 活性の昂進が示唆された。そこで野生型マウスの骨髄から FACSAria で調製した HSC に、この変異型 Scmh1 レトロウイルス（MSCV 由来）を導入して過剰発現させ、HSC の活性への影響について LTC-IC アッセイや同系マウスへの移植による骨髄再構築実験により評価を行っている。また、Scmh1 の直接の標的である Geminin の発現を操作することによる HSC の ex vivo 増幅も現在検討中である。

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４件）

１．Bhattacharyya, J., Mihara, K., Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Takei, Y., Yanagihara, K., Sakai, A., Hishi, M., Takihara, Y., Kimura, A. Overexpression of BMI-1 correlates with drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stabilization of surviving expression. Cancer Science 103(1),査読有,2012, pp34-41

２．Karakawa, S., Okada, S., Tsumura, M., Mizoguchi, Y., Ohno, N., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Kawai, T., Nishikomori, R., Sakaguchi, T., Takihara, Y., Kobayashi, M. Decreased expression in nuclear factor-kB essential modulator due to a novel splice-site mutation causes X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Journal of Clinical Immunology 31(5),査読有,2011, pp762-772

３．Shirao, K., Okada, S., Tajima, G., Tsumura, M., Hara, K., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Hata, I., Sakura, N., Shigematsu, Y., Takihara, Y., Kobayashi, M. Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Human Genetics 127(6),査読有,2010, pp619-628

４．Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo,M., Mori, S., Tsumura, M., Okada, S., Ohta, T., Ohtani, K., Kobayashi, M., Takihara, Y. Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.107,査読有, 2010, pp21529-21534

〔学会発表〕（計４件）

１．Ohtsubo, M., Yasunaga, Y., Ohno, Y., Kawashima, A., Tetsuguchi, H., Saeki, K., Nakashima, Y., Takihara, Y. Role for an Scmh1-mediated molecular network governing Geminin expression in hematopoiesis. International Symposium 50th Anniversary of RIRBM, Hiroshima University, 2012年2月21日, 広島国際会議場

２．Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Ohno, Y., Tsumura, M., Kageyama, Y., Mori, S., Takihara, Y. Study of a 5-FU-induced stabilization signal for Scmh1, a component of Polycomb-group complex 1 E3 ligase, 第３２回日本分子生物学会年会, 2009年12月10日, パシフィコ横浜

３．大坪素秋, HSC の活性維持に必須なポリコーム複合体１の構成因子 Scmh1 の機能ドメインの解析, 第７１回日本血液学会学術集会, 2009年10月23日, 国立京都国際会館

４．Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Tsumura, M., Ohno, Y., Kageyama, Y., Kimura, S., Tokimoto, R., Takihara, Y. Role of Scmh1 in the regulation of Polycomb-group complex 1, which acts as the E3 ubiquitin ligase for histone H2A and Geminin. The 7th Stem Cell

Research Symposium, May 16, 2009, Tokyo

〔図書〕(計１件)
１．瀧原義宏,安永晋一郎,大野芳典,大坪素秋, 医薬ジャーナル社,血液フロンティア・がん幹細胞研究の新たな展開・幹細胞における細胞周期制御 22(1), 2012, pp33-43

〔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
　　大坪　素秋 (OHTSUBO MOTOAKI)
　別府大学・食物栄養科学部・教授
　研究者番号：10211799

(2)研究分担者
　　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

　　安永　晋一郎 (YASUNAGA SHIN'ICHIRO)
　広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授
研究者番号：50336111

　大野　芳典 (OHNO YOSHINORI)
　広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10548986

(3)連携研究者
　　　　　　(　　)

　研究者番号：