

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15358

研究課題名(和文)造血幹細胞におけるポリスルフィド依存的なミトコンドリア機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of polysulfide-dependent mitochondrial function in hematopoietic stem cells

研究代表者

村上 昌平 (MURAKAMI, SHOHEI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20746911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア内においてシステインパーズルフィド(CysSSH)を産生できなくなるCARS2変異(Cars2 I KO)マウスを用いて、造血細胞におけるCysSSHに起因するミトコンドリア内ポリスルフィドの役割について解析した。Cars2 I KOマウスの造血細胞はミトコンドリア機能異常を示し、赤血球細胞へ分化障害、造血幹細胞の機能不全を伴う貧血を呈することがわかった。以上から、CARS2によるミトコンドリア内CysSSH産生制御は赤血球細胞への分化および造血幹細胞の幹細胞性維持に不可欠であるといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、CARS2によって産生されるミトコンドリア内システインパーズルフィド(CysSSH)は、正常造血におけるミトコンドリアの機能維持に寄与しており、赤血球細胞への分化および造血幹細胞の幹細胞性維持に不可欠であることが明らかになった。この結果はこれまで謎とされてきた、低酸素環境に維持された造血幹細胞内ミトコンドリア機能の一部を明らかにしたものと考えられる。また、本研究結果はポリスルフィドに着目した造血疾患の新規治療法の開発につながると考えられ、特に、造血幹細胞機能の維持にポリスルフィドが重要であることから、白血病などの第一選択療法となる骨髄移植法の改良にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the physiological function of mitochondrial polysulfides originated from CARS2-mediated CysSSH was analyzed by establishing CARS2 mutant mice (Cars2 I KO), in which CysSSH cannot be produced. Hematopoietic cells in Cars2 I KO mice exhibited mitochondrial dysfunction, along with disturbed differentiation towards erythroid cells and also hematopoietic stem cell dysfunction. This result suggests that mitochondrial CysSSH produced by CARS2 is essential for erythroid differentiation and hematopoietic stem cell maintenance.

研究分野：造血

キーワード：硫黄代謝物 造血幹細胞 細胞分化・増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞研究では代謝制御の重要性に注目が集まっている。造血幹細胞は低酸素状態の骨髄ニッチに維持されており、解糖系に依存した嫌気的なエネルギー産生をしているため、ミトコンドリアでのエネルギー産生は抑制された状態にあると考えられている。しかしながら、この状態を維持することで、ミトコンドリアでの ROS (reactive oxygen species) の発生を予防することで、幹細胞性の消失を防ぐことができる。しかし、近年になり、造血幹細胞におけるミトコンドリア膜電位は高く保たれていることが示唆され、ミトコンドリアは造血幹細胞においても何らかの役割を担っていることが示唆された。しかしながら、その膜電位維持に関わる分子機構やその生理的な役割は未だ十分に理解されていない。

(2) 硫黄代謝研究では測定方法の改良により、硫黄が生体内において直鎖上に連結した新規硫黄代謝物、ポリスルフィドが発見された (Akaike T et al. *Nat Commun*, 2017)。ポリスルフィド合成経路についてはさまざまな報告があるが、近年、ミトコンドリアに存在する CARS2 (cysteinyl-tRNA synthetase 2) がシステイン (CysSH) をシステインパーサルフィド (CysSSH) に変換する反応を端緒として、ミトコンドリア内にポリスルフィドが産生されることが発見された。そのポリスルフィドの機能としては、ミトコンドリア電子伝達系でのエネルギー産生に必須の役割を果たすことが示唆されているものの、その生体内機能は十分理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、造血幹細胞のように低酸素環境に維持されている細胞内においては、ポリスルフィドがミトコンドリアの膜電位形成に寄与していると考え、これまで明らかにされていなかった造血幹細胞におけるミトコンドリア機能維持機構について明らかにする

3. 研究の方法

(1) CARS2 変異マウスの作成

CARS2 はミトコンドリア型のシステニル tRNA 合成酵素として知られているが、その酵素活性とは独立に CysSSH 合成活性を有している (図 1)。そこで、システニル tRNA 合成酵素活性を維持したまま、CysSSH 合成 (Cysteine persulfide synthesis; CPERS) 活性のみを欠失した CARS2 変異体 (CARS2^{AINK}、図 1) を発現するマウスを作成する。マウス (CARS2^{AINK/AINK}) は胎生致死であるため、同マウスを条件付き CARS2 欠損マウス (CARS2^{F/F}) と組み合わせ、誘導的に CARS2 の CPERS 活性だけを欠失したマウス (CARS2^{F/AINK::Rosa-Cre/ERT2}, CARS2 IKO) を作製し、対照群 (CARS2^{F/+::Rosa-Cre/ERT2}, CARS2 IC) と比較する。

これらマウスにタモキシフェン (Tam) を投与したところ、CARS2 IKO マウスは体重減少および劇的な貧血を示し、約 2-3 週間後に死に至ることがわかっており、さらに、骨髄細胞および長期造血幹細胞が減少することも観察された (図 2)。

(2) CARS2 IKO マウスにおける造血異常の細胞自律性

上記 (1) で得られた造血異常が造血細胞自律的かどうかを検討するため、Tam を投与していないマウスから骨髄細胞を採取し、放射線を照射した野生型マウスに非競合移植を行なった。移植後 6 週目にレシピエントマウスに Tam を投与し、解析を行なった。また、造血幹細胞の機能を評価するために、競合的・連続移植実験を行なった。移植後 6 週目に Tam を投与し、Tam 投与後 16 週まで経時的に末梢血中のドナー細胞を解析し、16 週目において骨髄細胞の解析および第 2 次レシピエントマウスへの移植を行い、さらに 16 週間 (合計 32 週間)、ドナー細胞の割合を解析した。

(3) CARS2 IKO 造血細胞におけるミトコンドリア機能評価

ミトコンドリア機能を評価するために、ミトコンドリア内活性酸素種、遊離 Fe²⁺、脂質過酸化を測定した。またミトコンドリア膜電位や酸素消費量、ADP/ATP 比を測定した。

(4) CARS2 IKO 造血細胞におけるポリスルフィド定量

質量分析装置を用いて、ポリスルフィドを含む硫黄代謝物 (CysSH, CysSSH など) を測定した。

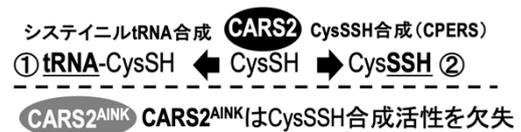


図1. CARS2の2つの独立した機能

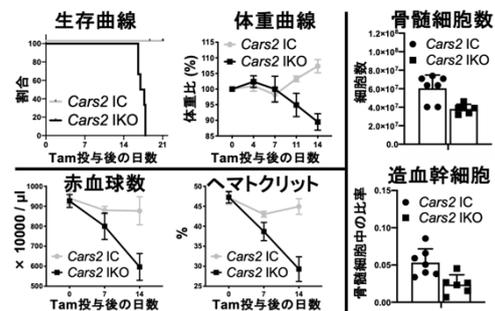


図2. CARS2 IKOマウスの解析結果

(5) Integrated Stress Response (ISR) 経路の活性化の検討

上記(4)の結果から、ISR 経路(ATF4 の活性化)が CARS2 変異による CysSSH 合成異常の代償機構として働いていることが考えられた。そこで、骨髄細胞あるいは造血幹・前駆細胞を用いて、ATF4 経路関連遺伝子のタンパク質を測定した。

4. 研究成果

(1) CARS2 IKO 骨髄細胞を用いた移植実験結果(研究方法(2))

競合移植実験の結果、ドナーマウスで観察された致死性および体重減少は造血細胞に非依存的であることがわかった。一方、貧血様症状および造血幹細胞の機能不全については、造血細胞自律的な結果であることが示された(図3)

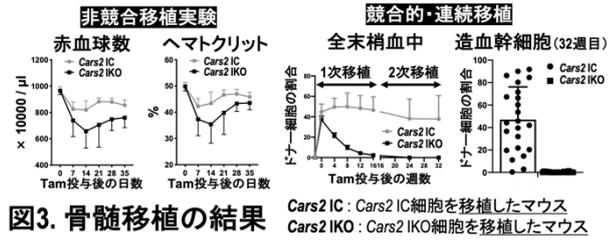


図3. 骨髄移植の結果

CARS2 IC: CARS2 IC細胞を移植したマウス
CARS2 IKO: CARS2 IKO細胞を移植したマウス

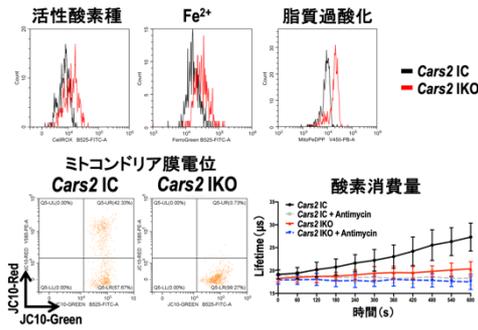


図4. ミトコンドリア機能解析

(2) ミトコンドリア機能評価(研究方法(3))

CARS2 IKO マウスでは、造血幹細胞を含むほぼ全ての造血細胞で、ミトコンドリア内活性酸素種、遊離 Fe²⁺、脂質過酸化の亢進が認められた(図4, 図は造血幹細胞の結果)。同時に、ミトコンドリア膜電位および酸素消費の低下(図4)も観察された。また ADP/ATP 比も増加しており、CARS2 IKO 細胞ではミトコンドリアにおけるエネルギー産生が障害されていることがわかった。

(3) CARS2 IKO 造血細胞におけるポリスルフィド定量(研究方法(4))

CARS2 IKO マウスの造血細胞では、予想に反し、CysSH、CysSSH、Cystine の量が増加し、一方で、グルタチオン(GSH、GSSG)、グルタチオンパースルフィド(GSSH)には変化がなかった(図5)。この結果から、Cysteine 成分の取込あるいは合成を促進させる何からの代償機構が機能していると考えられた。

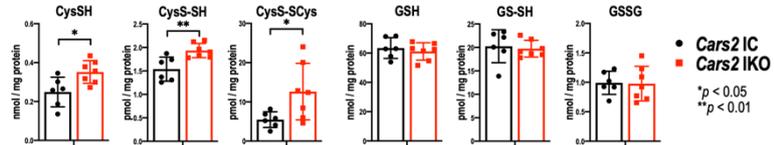


図5. 硫黄代謝物測定結果

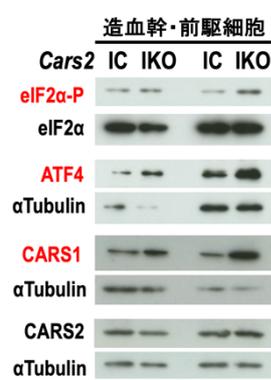
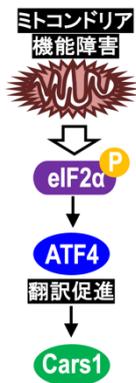


図6. ISR経路による代償機構



(4) 代償機構 ISR 経路の活性化の検討(研究方法(5))

ミトコンドリア機能が障害されると、転写因子 ATF4 タンパク質の翻訳が促進され、その結果、Transsulfuration 経路が活性化されることで、Cystine の取込および Cysteine 合成が促進されると考えられる(Quirós PM et al. *J Cell Biol*, 2017, Guo X et al. *Nature*, 2020)。上述のように、CARS2 IKO 細胞でもミトコンドリア機能障害が観察されたため、ISR 経路(eIF2α-ATF4)の活性化について検討した。その結果、ATF4 上流因子である eIF2α のリン酸化、ATF4 の翻訳が亢進し、その下流因子である CARS1 の発現が増加していた(図6)。

CARS1 は細胞質にて CARS2 と同様に、CEPRS 活性を保持していると示唆されている(Akaike T et al. *Nat Commun*, 2017) ことから、以上の結果は、CARS2 IKO マウスでは ISR 経路によって代償的に CARS1 の発現が促進され、CysSSH の細胞内含量が増加しているにもかかわらず、造血細胞は機能不全に陥ることを示唆している。ここで、CARS2 にはミトコンドリア内のシステ

ニル-tRNA 合成活性がある (図 1) ことを考えると、CARS2 は合成した CysSSH を tRNA に付加することで、tRNA-CysSSH を産生し、ミトコンドリア gDNA にコーディングされたタンパク質の Cys 残基を CysSSH 化させた状態で翻訳へと導く機能があると考えられる (図 7)。ゆえに、今回の結果は CARS2 変異によって、タンパク質への CysSSH 化が障害されたことが原因であると推察される。今後は、Cars2 IKO 骨髄細胞における tRNA-CysSSH やミトコンドリア gDNA にコーディングされたタンパク質の解析が必要である。



図7.推察されるCARS2^{AINK}変異による機能障害

これまで、造血幹細胞は低酸素環境にあるため、ミトコンドリア機能は抑制状態にあると考えられてきたが、本研究の結果は、造血幹細胞においてもミトコンドリアは Cysteine 代謝を活発に行っており、幹細胞性の維持に不可欠であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhao Mingyue, Murakami Shohei, Matsumaru Daisuke, Kawauchi Takeshi, Nabeshima Yo-ichi, Motohashi Hozumi	4. 巻 171
2. 論文標題 NRF2 pathway activation attenuates ageing-related renal phenotypes due to -klotho deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 579 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac014	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Hiroshi, Oishi Tetsuya, Murakami Shohei, Yamada-Kato Tomoe, Okunishi Isao, Yamamoto Masayuki, Katori Yukio, Motohashi Hozumi	4. 巻 193
2. 論文標題 Establishment of Neh2-Cre:tdTomato reporter mouse for monitoring the exposure history to electrophilic stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 610 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Alam Md Morshedul, Kishino Akihiro, Sung Eunkyu, Sekine Hiroki, Abe Takaaki, Murakami Shohei, Akaike Takaaki, Motohashi Hozumi	4. 巻 60
2. 論文標題 Contribution of NRF2 to sulfur metabolism and mitochondrial activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102624 ~ 102624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2023.102624	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 造血細胞分化・維持制御における超硫黄分子の役割
3. 学会等名 第21回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 Physiological function of polysulfides produced by mitochondria-localized Cars2
3. 学会等名 JST-CREST多細胞領域 第8回Rising Star Webinar (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 造血幹細胞における超硫黄分子の役割
3. 学会等名 生理研研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 造血幹細胞における超硫黄分子の役割
3. 学会等名 第94回生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 造血幹細胞における超硫黄分子の役割
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第87回例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 ミトコンドリア内超硫黄分子の生理学的役割の解明
3. 学会等名 第88回 日本生化学会東北支部会例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Murakami Shohei
2. 発表標題 Physiological function of mitochondrial sulfer metabolism in hematopoietic stem cells
3. 学会等名 The 12th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 造血幹細胞におけるミトコンドリア内超硫黄分子の生理学的役割
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上昌平
2. 発表標題 細胞増殖・分化制御におけるミトコンドリア硫黄代謝の役割
3. 学会等名 第143回 日本薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 村上昌平、成恩圭、本橋ほづみ	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ライフ・サイエンス	5. 総ページ数 7
3. 書名 NRF2活性化による抗老化作用に関わる分子機構	

1. 著者名 成恩圭、村上昌平、本橋ほづみ	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 NRF2によるミトコンドリア機能制御	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------