

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618008

研究課題名(和文) Gemininタンパク質制御を介した造血幹細胞の活性制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism for activity of hematopoietic stem cell mediated by regulation of Geminin protein

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・准教授

研究者番号：50336111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製制御因子でありクロマチンリモデリング制御因子でもあるGemininは、造血幹細胞の活性を支持するポリコム複合体1やHoxタンパク質(Hoxb4/Hoxa9)によりタンパク質発現の制御を受けている。本研究では、レトロウイルスベクターを用いたGeminin発現制御系と造血幹細胞におけるGemininの発現動態を可視化することのできるGeminin-EYFPノックインマウスを作製し、造血幹細胞制御におけるGemininの分子生物学的役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Geminin is known as a regulator of DNA replication as well as chromatin remodeling. Geminin protein expression is regulated by Polycomb group complex 1 and Hox protein (Hoxb4/Hoxa9), which sustain hematopoietic stem cell activity. The representative of this study generated retroviral vector system modifying Geminin expression level and Geminin-EYFP knockin mice enabling visualization of Geminin. By using these systems, the representative revealed a molecular role for Geminin in regulating hematopoietic stem cell activity.

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：再生医学 造血幹細胞 細胞周期 自己複製 ポリコム Hox Geminin ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム複合体1のメンバーである Bmi1 や Rae28 の遺伝子欠損マウスの解析により、ポリコーム複合体1は、自己複製能を含めた造血幹細胞の活性維持に必要不可欠であることが知られている。ポリコーム複合体1は、ヒストン H2A をユビキチン化することにより転写の抑制状態を維持することが知られており、Bmi1 欠損マウスでは、細胞老化や細胞死の制御に関わる p16^{INK4A} や p19^{ARF} の転写抑制状態が解除されるため造血幹細胞の活性が廃絶するという説明が従来、為されている。しかしながら、Bmi1 欠損マウスにさらに p16^{INK4A} と p19^{ARF} を欠損させても十分な造血幹細胞機能の回復は認められない。また、申請者が解析を進めている Rae28 欠損マウスの造血細胞では、p16^{INK4A} や p19^{ARF} の転写抑制の解除は認められない。従って、ポリコーム複合体1による造血幹細胞の支持機構には、これとは異なる分子機序が介在しているものと推定される。

一方、Hoxb4 や Hoxa9 といった Hox 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて造血細胞に過剰発現させると造血幹細胞の飛躍的な増幅を誘導することができる。また、ES 細胞や iPS 細胞から *ex vivo* で造血幹細胞を発生誘導することもできる。発生学的には、Hox 遺伝子群はポリコーム複合体1の転写制御下にあることが知られているが、Bmi1 や Rae28 の遺伝子欠損マウスの造血細胞において Hox 遺伝子群の発現変化は認められない。また、Hox タンパク質はホメオドメインを介して DNA に結合し転写制御因子として働くと考えられているが、造血細胞における下流のターゲット遺伝子の同定は未だに成功していない。

代表者の研究グループは、yeast two hybrid 法を用いて、DNA 複製ライセンス化因子である Cdt1 の特異的阻害分子でありクロマチン制御を介した幹細胞の未分化性因子でもある Geminin が、ポリコーム複合体1や Hox タンパク質と直接分子結合を見出した (Nature 2004)。さらに解析を進め、バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞に再構成させたポリコーム複合体1 (Ring1B-Bmi1-Rae28-Scmh1) や RDCOX 複合体 (Roc1-Ddb1-Cu14a-Hoxb4 or Hoxa9) が、Geminin タンパク質に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、Geminin タンパク質をポリユビキチン化することを生化学的に証明した (PNAS 2008, PNAS 2010)。

代表者は、さらにポリコーム複合体1や

Hox タンパク質が Geminin をユビキチン化することの血液学的意義について解析を進めた。Rae28 欠損胎仔肝細胞においては、Geminin のユビキチン化が障害されており、Geminin タンパク質のプロテアソームでの分解が遅延し細胞内に蓄積することが、Rae28 欠損造血幹細胞の活性の著しい低下を導くことをまず明らかにした (PNAS 2008)。ついで、Rae28 欠損胎仔肝細胞にレトロウイルスベクターを用いて Hoxb4 を導入すると、Geminin のタンパク質発現が低下するとともに造血幹細胞の活性が目覚ましく回復することを見出した (PNAS 2010)。これらの解析結果は、Geminin タンパク質のユビキチン化を介した分解による発現量の低下が、造血幹細胞活性の上昇をもたらしていることを示している。

代表者は、造血幹細胞分画 (CD34⁺KSL⁺ <c-Kit⁺Scal⁺Lin⁻>) 分画) において、ほとんどの細胞が G₀/G₁ 期にあるにも関わらず Geminin の発現が mRNA レベルでもタンパク質レベルでも高く維持されており、一方で多分化能性造血前駆細胞 (CD34⁺KSL⁺) や造血前駆細胞 (c-Kit⁺Scal⁺Lin⁻) に至ると Geminin の発現は急速に低下することを見出した (PNAS 2008)。造血幹細胞における Geminin の高発現は、DNA 複製制御やクロマチンリモデリング制御を介して造血幹細胞の未分化性を維持しており、造血前駆細胞での Geminin の発現の急低下は、細胞に増殖活性を賦与しているものと考えられる。しかしながら、このモデルでは造血幹細胞の自己複製を制御する分子機構における Geminin の役割については十分に説明することができない。そこで申請者は、自己複製能を含めた造血幹細胞活性制御における Geminin の役割を解明するために本研究を企画した。

2. 研究の目的

造血幹細胞の活性を支持する細胞内プログラムを構成する因子としてポリコーム複合体1や Hox タンパク質 (Hoxb4 や Hoxa9) が知られている。これらの因子は従来、転写制御因子として理解されてきたが、造血幹細胞の活性を支持する分子基盤の十分な解明は未だ為されていない。申請者の研究グループは、ポリコーム複合体1や Hox タンパク質が、それぞれ独立して DNA 複製ライセンス化阻害因子 Geminin の E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、Geminin タンパク質量を精妙に制御することにより造血幹細胞の活性を制御していることを明らかにした (PNAS 2008,

PNAS 2010)。本研究の目的は、レトロウイルスベクターを用いた Geminin 発現制御系と造血幹細胞における Geminin の発現動態を可視化するために作製した Geminin-EYFP (黄色蛍光タンパク質) ノックインマウスとを組み合わせ、特に自己複製能に着目して造血幹細胞の活性制御機構における Geminin の役割を明らかにし、最終的には、これを *ex vivo* の造血幹細胞の増幅や発生誘導に応用することである。

3. 研究の方法

(1) shRNA を用いたレトロウイルスベクターシステムの作製

代表者は、Accell siRNA 導入システム (Thermo) を用いて、マウス骨髓細胞において Geminin の一過性ノックダウンを行なうと、コロニー形成能すなわち造血前駆細胞の増殖活性が著しく上昇することを見出した。しかも、このコロニー形成能の上昇は、3回まき直しても維持された (PNAS 2010)。そこで申請者は、レトロウイルスベクターを用いた shRNA 導入による恒久的 Geminin ノックダウンシステムにより、造血幹細胞や造血前駆細胞の Geminin の発現を低下させることで造血幹細胞や造血前駆細胞の活性の上昇を導こうと考えた。上記の Geminin ノックダウンに成功した 4 種類の siRNA の配列を参考にオリゴヌクレオチドをデザインし、これらを shRNA 導入用のレトロウイルスベクター (pSIREN-RetroQ-ZsGreen, Clontech) に挿入した。このベクターを、レトロウイルスパッケージング細胞である PlatE にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、培養上清中のレトロウイルス粒子を回収し遠心濃縮の上、後の実験に使用した。さらに、Geminin の恒久的な shRNA ノックダウンシステム系のみならず Geminin の過剰発現系や Geminin 変異体導入系を確立した。

(2) Hoxa9 の Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性の証明

Hoxa9 および Roc1、Cul4a、Ddb1 を発現するバキュロウイルスベクターを昆虫細胞に導入し、Hoxa9-Roc1-Cul4a-Ddb1 複合体を *in vitro* で再構成した。これとリコンビナント Geminin タンパク質を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。そして Hoxa9 を過剰発現したときの Geminin の発現動態と造血活性の相関について調べた。

(3) Scmh1 の Hoxa9/Hoxb4 遺伝子転写調節に対する役割の証明

ポリコーム複合体 1 のサブストイキオメトリック構成要素であり、ポリコーム複合体 1 に対して Geminin 結合部位を提供する Scmh1 の Hoxa9/Hoxb4 遺伝子転写調節領域への結合や、そのローカスでのヒストン H2A 第 119 番リジン残基のモノユビキチン化を ChIP

Assay を用いて調べた。そして各種 Scmh1 変異体が、Hoxa9/Hoxb4 遺伝子の転写に与える影響を調べた。

(4) Geminin-EYFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスの作製

Geminin の発現と造血細胞の活性との相関について詳しい解析を進めるため、Geminin 遺伝子座に EYFP を *in frame* にノックインし、Geminin-EYFP 融合タンパク質が発現するマウスを作製し、Geminin の発現動態を可視化した。

4. 研究成果

(1) 野生型骨髓細胞に上記 Geminin-shRNA 導入用レトロウイルスを感染させて、FACS Aria II によるソーティングにより感染細胞を集め、これをメチルセルロース培地でのコロニー形成能を調べるアッセイに供した。コロニー形成能が上昇する配列をもつ shRNA を導入するレトロウイルスベクターに着目して、LTC-IC (long-term culture-initiating cell) コロニー形成能や競合的骨髓再構築能を調べたところ、Geminin ノックダウンにより造血前駆細胞のみならず造血幹細胞活性も上昇することが明らかになった。

(2) Hoxa9 が、従来知られてきた転写制御因子としての機能だけではなく、Roc1-Cul4a-Ddb1 コア E3 ユビキチンリガーゼ複合体と結合し、DNA 複製ライセンス化制御因子であり幹細胞の未分化性維持因子でもある Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼを構成し、Geminin タンパク質を分解に導くことを生化学的に証明した。さらに Hoxa9 の過剰発現による造血幹細胞や造血前駆細胞の活性化において Hoxa9 による Geminin のユビキチン化を介したタンパク質発現減少が、重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(3) ポリコーム複合体 1 のサブストイキオメトリック構成要素であり、ポリコーム複合体 1 に対して Geminin 結合部位を提供する Scmh1 を含むポリコーム複合体 1 が、Hoxa9/Hoxb4 遺伝子の転写をヒストン H2A 第 119 番リジン残基のモノユビキチン化を介して抑制することで直接的・間接的に Geminin のタンパク質レベルを維持し造血ホメオスタシスを保っていることを明らかにした。

(4) Geminin-EYFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスのホモ接合体を作成し、

Geminin タンパク質発現を蛍光タンパク質にて可視化することに成功し、EYFP の輝度が Geminin の発現量とよく相関していることを確認した。Geminin-EYFP ノックインマウスホモ接合体は、正常の寿命を持ち、ホモ接合体同士での交配が可能であり、発生学上の異常を認めなかった。そして、このノックインマウスの骨髄細胞を用いた様々な血液学的解析方法を確立した。特に、造血幹細胞分画である CD34⁺KSL⁻ (c-Kit⁺Scal⁺Lin⁻) 細胞の中に Geminin-high 細胞群を見つけ、それを、FACSARIAII セルソーターを用いて分画し、致死放射線照射を施したマウスに移植すると長期骨髄再構築能を示す細胞が存在することを示し、このノックインマウスを使うことで自己複製中の造血幹細胞を同定することができるということを明らかにした。これらの自己複製中の造血幹細胞は、5-FU の投与により、その存在比率が著明に増加することも明らかにした。また、Hoxb4 や Hoxa9 遺伝子を、各種赤色蛍光 (RFP; DsRed Express2、tandem Tomato (tdTomato)、humanized Kusabira Orange (hKO) など) をマーカーに持ったレトロウイルスベクターにつなぎ、従来使用していた GFP マーカーと異なりノックインマウスの EYFP と容易に区別可能な RFP をマーカーとして持った造血幹細胞を移植することを可能にし、造血幹細胞における Hoxb4 や Hoxa9 の発現と Geminin の発現動態との相関を解析する実験系を作製した。

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 8 件)

- ① Ohno, Y., Saeki, K., Yasunaga, S., Kurogi, T., Suzuki-Takedachi, K., Shirai, M., Mihara K., Yoshida, K., Voncken J. W., Ohtsubo, M. & Takahara Y. Transcription of the Geminin gene is regulated by a negative-feedback loop. *Mol. Biol. Cell*, 25(8), 1374-1383, **2014**. (査読あり) doi: 10.1091/mbc.E13-09-0534. Epub 2014 Feb 19
- ② Mizoguchi Y., Tsumura M., Okada S., Hirata O., Minegishi S., Imai K., Hyakuna N., Muramatsu H., Kojima S., Ozaki Y., Imai T., Takeda S., Okazaki T., Ito T., Yasunaga S., Takahara Y., Bryant V.L., Kong X.F., Cypowyj S., Boisson-Dupuis S., Puel A., Casanova J.L., Morio T. & Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.*, 95(4), 667-676, **2014**. (査読あり) doi: 10.1189/jlb.0513250. Epub 2013 Dec 16.
- ③ Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Saeki, K., Kurogi, T., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Shirai, M., Mihara, K., Brock, H. W., Miyoshi, J. & Takahara Y. Scmh1 has E3 ubiquitin ligase activity for Geminin and histone H2A and regulates Geminin stability directly or indirectly via transcription repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol. Cell. Biol.*, 33(4), 644-660, **2013**. (査読あり) doi: 10.1128/MCB.00974-12. Epub 2012 Dec 3.
- ④ Ohno, Y., Yasunaga, S., Janmohamed, S., Ohtsubo, M., Saeki, K., Kurogi, T., Mihara, K., Iscove, N. N. & Takahara Y. Hoxa9 transduction induces hematopoietic stem and progenitor cell activity through the direct down-regulation of Geminin protein. *PLoS ONE*, 8(1), e53161, **2013**. (査読あり) doi:10.1371/journal.pone.0053161. Epub 2013 Jan 11.
- ⑤ Ozaki Y., Matsui, H., Asou H., Nagamachi A., Aki D., Honda, H., Yasunaga, S., Takahara, Y., Yamamoto T., Izumi S, Ohsugi M. & Inaba, T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol. Cell*, 47(5), 694-706, **2012**. (査読あり) doi:10.1016/j.molcel.2012.06.033. Epub 2012 Aug 2.
- ⑥ Tsumura, M., Okada, S., Sakai, H., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Murata, T., Obata, H., Yasumi, T., Kong, X.-F., Abhyanker, A., Heike, T., Nakahata, T., Nishikimori, R., Al-Muhsen, S., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.-L., AlZahrani, M., AlShehri, M., ElGhazali, G., Takahara, Y. & Kobayashi, M. Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum. Mut.*, 33(9), 1377-1387, **2012**. (査読あり) doi: 10.1002/humu.22113. Epub 2012 Jun 7.
- ⑦ Bhattacharyya, J., Mihara, K., Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Takei, Y., Yanagihara, Y., Sakai, A., Hoshi, M., Takahara, Y. &

Kimura, A. Overexpression of BMI-1 correlates with drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stability of surviving expression. *Cancer Sci.*, 103(1), 34-41, 2012. (査読あり)
doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02121.x.
Epub 2011 Nov 20.

- ⑧ Karakawa, S., Okada, S., Tsumura, M., Mizoguchi, Y., Hara, K., Ohno, N., Yasunaga, S., Ohtsubo M., Kawai, T., Nishikimori, R., Sakaguchi, T., Hata, I., Sakura, N., 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 immune-deficiency. *Clin. Immunol.*, 31(5), 762-772, 2011. (査読あり)
doi:10.1007/s10875-011-9560-4.
Epub 2011 Jul 1.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yasunaga S., Ohno Y., Kurogi T., Suzuki-Takedachi K., Nakashima Y., Ohtsubo M., Takihara Y. Molecular role for Geminin in switching self-renewal and differentiation of hematopoietic cells. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology October 11-13, 2013, Sapporo, Japan.
- ② Yasunaga S., Ohno Y., Kurogi T., Saeki K., Nakashima Y., Ohtsubo M., Takihara Y. Visualization and functional analysis of Geminin, a candidate molecule governing self-renewal and cellular differentiation of hematopoietic stem cells. The 11th Stem Cell Research Symposium May 17-May 18, 2013, Tokyo, Japan.
- ③ Yasunaga S., Ohno Y., Saeki K., Nakashima Y., Ohtsubo M., Takihara Y. Scmh1 regulates Geminin through the ubiquitin-proteasome systems to govern hematopoietic homeostasis. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology October 19-21, 2012, Kyoto, Japan.
- ④ Yasunaga S., Ohno Y., Ohtsubo M., Saeki K., Nakashima Y., Takihara Y. A new approach for activating mouse hematopoietic stem and progenitor cells by manipulating Geminin expression. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) June 13-16, 2012,

Yokohama, Japan.

- ⑤ Yasunaga S. A novel molecular function for Hoxa9 in hematopoiesis and leukemogenesis. The 10th Stem Cell Research Symposium May 31-June 2, 2012, Awaji, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ

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

(広島大学 原爆放射線医科学研究所
幹細胞機能学研究分野)

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・准教授
研究者番号：5 0 3 3 6 1 1 1

(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：6 0 2 2 6 9 6 7

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：1 0 5 4 8 9 8 6

(3) 連携研究者 なし