

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32690

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659468

研究課題名(和文)造血幹細胞の維持と分化を制御する糖鎖関連遺伝子の網羅的探索と解析

研究課題名(英文) Screening of the glycans regulating stemness and differentiation of hematopoietic stem cells

研究代表者

西原 祥子 (Nishihara, Shoko)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：00164575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の表面には発生段階を反映した特異的な糖鎖が発現し、重要な役割を担っている。しかし、組織幹細胞の維持に多様な糖鎖がどのような役割を果たしているかは、ほとんど明らかではなかった。最近、造血器官の形成や維持に働くシグナル伝達経路が、脊椎動物とショウジョウバエで高度に保存されていることが示された。本研究では、造血幹細胞の維持と分化に重要な役割を果たす糖鎖関連遺伝子の探索を行い、糖鎖が重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Drosophila lymph gland is a hematopoietic organ, in which pluripotent stem cells proliferate and mature cells differentiate. The posterior signaling center functions as the hematopoietic niche that is essential for the maintenance of hematopoietic stem cells. Recently, the role of the signaling for the maintenance and differentiation of hematopoietic stem cells has been identified in Drosophila lymph gland. However, glycan functions are not well understood. Here we performed screening of the glycans that maintain and differentiate Drosophila hematopoietic stem cells. To screen, we use RNA interference based on GAL4-UAS system. The knock down of some of glycan-related genes in hematopoietic stem cells or in the posterior signaling center changed the hematopoietic stem cell population and the number of differentiating cells. It indicated that these glycans play important roles in regulation of hematopoietic stem cells.

研究分野：医歯薬学

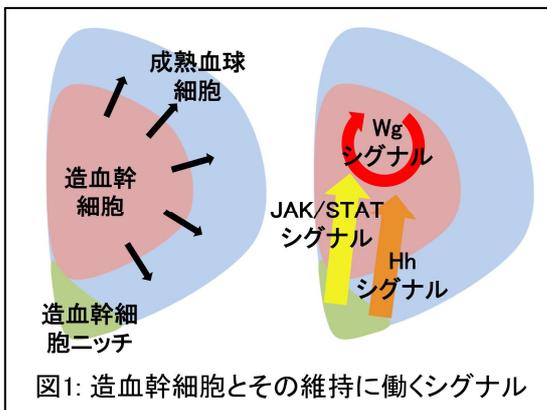
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 糖鎖 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に存在するタンパク質のほとんどが、糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。発生段階特異的に発現する 200 種以上といわれる糖転移酵素が、ゴルジ装置で様々な糖鎖を付加する。我々は、これまでに、RNAi 法を用いた糖転移酵素の網羅的ノックダウンをマウス ES 細胞で遂行し、「糖鎖が ES 細胞の未分化性・多能性維持に働くこと」を明らかにしていた (Sasaki, Nishihara *et al.*, JBC, 283, 3594 (2008))。

一方、無脊椎動物であるショウジョウバエと脊椎動物では、造血器官の形状や血液細胞の種類が大きく異なり、それらの関連性はあまり注目されてこなかった。しかし、近年、造血器官の形成・造血幹細胞維持に働くシグナル分子・血球細胞種の分化に働く遺伝子セットがショウジョウバエと脊椎動物との間で、高度に保存されていることが報告されはじめていた (Mandal *et al.*, Nat genet, 36, 1019 (2004); Evans *et al.*, Dev Cell, 5, 673 (2003); Martinez-Agosto *et al.*, Genes & Development, 21, 3044 (2007))。このことから、造血幹細胞やそのニッチにおいて幹細胞維持に機能する糖鎖も、種をこえて高度に保存されていることが期待できた。



このような背景に立ち、本研究では、造血幹細胞維持に重要な役割を果たす糖鎖関連遺伝子の網羅的探索を、ショウジョウバエ造血幹細胞とそのニッチで行った。このような網羅的探索に必須となる、糖鎖関連遺伝子(257

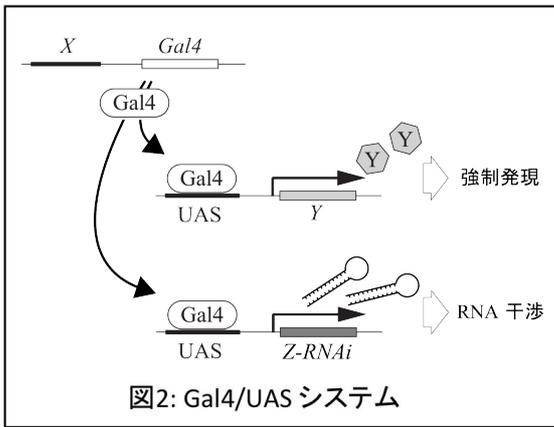
遺伝子)に対する 500 あまりの RNAi ショウジョウバエ系統は、「RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発」(CREST, 2002.11-2007.3, 研究代表者; 西原祥子)の研究成果によりすでに樹立されていた。

2. 研究の目的

ES 細胞などの幹細胞の表面には、各々の発生段階を反映した特異的な糖鎖が発現し、各段階に対応した重要な役割を担っている。しかし、多細胞生物の組織幹細胞維持に、多様な糖鎖がどのような役割を果たしているかは、ほとんど明らかになっていない。近年、造血器官の形成・造血幹細胞の維持、さらに、その後起こる血球分化で働くシグナル伝達経路が、脊椎動物とショウジョウバエの間で高度に保存されていることが示された。そこで、本研究では、造血幹細胞の維持・分化に重要な役割を果たす糖鎖関連遺伝子の網羅的探索を、ショウジョウバエ造血幹細胞とそのニッチで行うことを目的とした。本研究の成果は、そのまま脊椎動物に適用できる可能性が高く、ヒト造血幹細胞の維持機構の解明や、血液疾患治療などの臨床応用への寄与が期待できる。

3. 研究の方法

ショウジョウバエには、時空間を制御して目的の蛋白質を発現させることができる Gal4/UAS システムがある。Gal4/UAS システムでは、酵母の転写因子 Gal4 を遺伝子 X の制御下で発現する形質転換系統 (Gal4 系統) と、異所的に発現させたい遺伝子 Y の上流に Gal4 結合配列である UAS (Upstream Activation Sequence) を接続した形質転換系統 (UAS 系統) の 2 系統を用いる。それぞれの系統を両親に持つ次世代個体では、遺伝子 X が発現する時と場所で遺伝子 Y を強制発現できる。この原理を応用し、遺伝子 Z を標的とした 2 重鎖 RNA を作り出すコンストラクト Z-RNAi を持つ UAS 系統を準備すれば、遺伝子 X の発現する時と場所で遺伝子 Z をノックダウンできる。



ショウジョウバエ幼虫は、造血幹細胞ニッチ・造血幹細胞・成熟血球細胞で構成される造血器官をもつ (Jung *et al.*, Development, 132, 2521 (2005))。これまでに、造血幹細胞では *domeless* が発現していることが報告されている。したがって、*domeless* の制御下で Gal4 を産生する系統 (*domeless-Gal4*) と、UAS 配列の下流に糖鎖関連遺伝子のノックダウン コンストラクトを接続した *UAS-RNAi* 系統を交配し生まれた次世代では、造血幹細胞特異的に目的の糖鎖関連遺伝子がノックダウンされる。同様に、造血幹細胞ニッチで Gal4 を産生する *collier-Gal4* 系統を用いることで、造血幹細胞ニッチ特異的な糖鎖関連遺伝子のノックダウンを遂行できる。

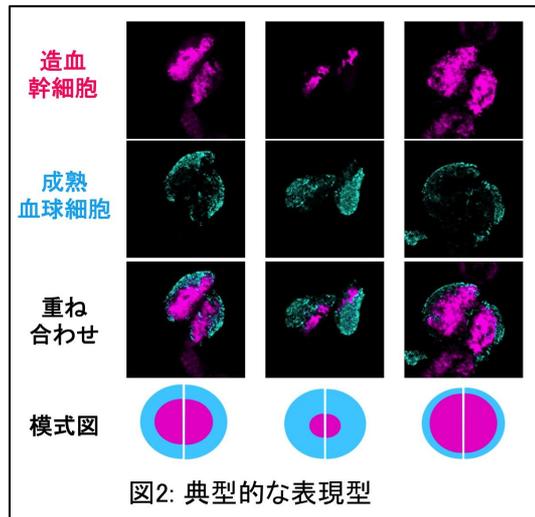
このような Gal4/UAS システムを用いたノックダウンを遂行するショウジョウバエに、造血幹細胞を標識できる仕組みをあらかじめ持たせておく。そのため、解剖して取り出した組織を免疫染色することで造血幹細胞の増減を簡便に確認することができる。

以上の方法で、造血幹細胞もしくは造血幹細胞ニッチ特異的に、既知のすべての糖鎖関連遺伝子を個々にノックダウンし、そのときの造血幹細胞の増減を確認することで、造血幹細胞の維持に機能する糖鎖関連遺伝子を探索した。探索に必要な 500 あまりの糖鎖関連遺伝子のノックダウン系統は、「RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発」(CREST, 2002.11-2007.3, 研究代表者; 西

ているもの、および、外部のストックセンターから入手したものを適宜用いた。

4. 研究成果

N-結合型糖鎖の合成に關与する糖転移酵素、O-結合型糖鎖の合成に關与する糖転移酵素、グリコサミノグリカンの合成に關与する糖転移酵素、糖脂質の合成に關与する糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、PAPS 輸送体、糖鎖を担うコアタンパク質など、様々な糖鎖関連遺伝子を、主に造血幹細胞特異的にノックダウンして検索を行った。



得られた典型的な表現型を図 3 に示した。野生型では、造血幹細胞と成熟血球細胞の数に大差がない図 3 の左の表現型が多く認められた。一方、糖転移酵素などをノックダウンしたのものには、造血幹細胞が減少(図 3 の中央)あるいは、造血幹細胞が増加(図 3 の右)する表現型が多くなるものもあった。これらの結果は、糖鎖が造血幹細胞の維持や分化を制御していることを強く示唆していた。

最近、造血器官とならび、脊椎動物の腸管モデルとしてショウジョウバエが使われ始めた (Takashima *et al.*, Nature, 454, 651 (2008))。このことは、脊椎動物の器官を理解するためにショウジョウバエが有用なモデルとなりうることを物語っている。このような中でも、糖鎖に着目した研究はほとんどなく、本研究の成果は、造血幹細胞維持に機

能する新規な糖鎖関連遺伝子と糖鎖構造を提出するものとなる。

本研究で見出された糖鎖関連遺伝子や糖鎖構造は、ヒト造血幹細胞の維持にも同様に重要な役割を果たしていることが期待できる。したがって、本研究の成果は、骨髄移植や臍帯血移植における移植幹細胞の定着率と機能の向上、また、造血幹細胞が関わっていることが想定されているものの病因が解明されていない様々なヒト血液疾患の新たな治療方法の開発の基盤になる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔図書〕(計2件)

1. Fuwa JT and Nishihara S: Functional analysis of glycans using *Drosophila* mutants and RNAi.

Glycoscience: Biology and Medicine, edited by Taniguchi N et al., Springer, in press.

DOI10.1007/978-4-431-54836-2_168-1

2. Nishihara S: Adenosine 3 - phospho 5 - phosphosulfate transporter 1,2 (PAPST1,2)(SLC35B2,3).

Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd edition), edited by Taniguchi N., Springer, 3, Section XIV, Chapter 122, 1379-1392 (2014)

〔その他〕

1. ホームページ

http://www.t.soka.ac.jp/menu/grad/grad_bio/grad_prof_bio/mc_bio02/grad_s_nishihara.html

2. データベース

Nishihara S: Heritable and inducible RNAi knockdown system in *Drosophila*.

<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t32>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西原 祥子 (Shoko Nishihara)

創価大学・工学部生命情報工学科・教授
研究者番号：00164575

(2)研究分担者

不破 尚志 (Takashi Fuwa)

創価大学・工学部生命情報工学科・ポスドク
研究者番号：50570719

(3) 研究協力者

伊藤 和義

創価大学・工学研究科生命情報工学専攻・大学院生

(4) 研究協力者

吉池 健治

創価大学・工学研究科生命情報工学専攻・大学院生