

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440122

研究課題名(和文) 転写因子Hes1タンパク質の翻訳後修飾による幹細胞機能制御

研究課題名(英文) Post-translational regulation of Hes1 in neural stem cells

研究代表者

小林 妙子 (Kobayashi, Taeko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40402804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抑制型転写因子であるHes1は、発現振動という新しい制御機構によって未分化細胞の維持や分化を制御している。しかし、その発現振動を制御する細胞内の分子機構はほとんど明らかになっていなかった。我々は、Hes1タンパク質の機能制御に焦点をあて、Hes1と結合するタンパク質因子の網羅的同定を行ってきた。その中から、Hes1タンパク質のユビキチン化状態を制御して安定化する新規脱ユビキチン化酵素(DUB)群を同定し、その機能を報告した。また、Hes1点変異体の解析からHes1の機能制御に重要な翻訳後修飾部位を同定し、並びに、リコンビナントHes1に結合する新規因子群を同定しており、現在も解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Hes1 regulates the maintenance and the differentiation of stem cells by its dynamic expression. Previous studies demonstrated that Hes1 expression oscillates in stem cells, and that the oscillation contributes to their potency and differentiation fates. However, the molecular mechanisms regulating the oscillatory expression of Hes1 protein have not been fully identified.

We have focused on the post-translational regulation of Hes1 protein and tried to identify regulatory factors from the binding partners of Hes1 protein. We identified Usp27x and its homologs as new deubiquitinases (DUBs) of Hes1. We reported that these DUBs stabilize and modulate Hes1 protein dynamics by removing ubiquitin molecules, and thereby regulate neuronal differentiation of stem cells (Kobayashi et al, 2015). Moreover, we identified some amino acid residues crucial for Hes1 functions by post-translational regulation. We also identified new factors bound to recombinant Hes1.

研究分野：発生生物学

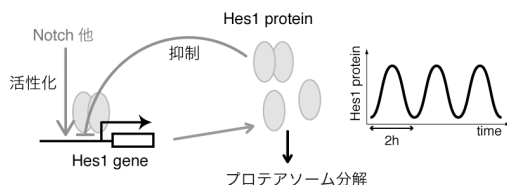
キーワード：Hes1 オシレーション 翻訳後修飾 幹細胞分化

1. 研究開始当初の背景

抑制型転写因子である Hes1 は、分化を促進する転写因子等の発現や活性を抑制し、様々な未分化細胞の維持に必須である。Hes1 は Notch シグナルによって発現が誘導され、発生期における脳や内分泌組織をはじめとする様々な器官形成に重要な働きを担っている。また、大腸癌、膵癌等のヒトがん細胞にも高発現し、がん細胞の未分化性に寄与していること、Quiescent な静止期に入った細胞の分化抑制に必須であることが示されている。Hes1 の発現は、Notch シグナルだけではなく、Shh シグナル、FGF シグナルなどの他のシグナル経路によっても誘導され、細胞、組織特異的な制御を受けている。

Hes1 の発現パターンは特徴的で、自身の発現を抑制するネガティブフィードバックループによって、細胞内でその発現量が周期的に増減し振動（オシレーション）する(図 1)。

Hes1 のネガティブフィードバックループによる発現振動



Hes1 の発現振動による幹細胞制御

持続的な発現 → 細胞増殖の抑制、分化の抑制
 発現振動 → 増殖細胞の未分化性の維持、分化の方向性の制御
 発現消失 → 細胞分化

図 1 Hes の発現とその機能

申請者らのグループにより、細胞は、この振動ダイナミクスを以下の様に使い分けて、幹細胞分化を制御していることが分かってきた。1. 神経幹細胞において、Hes1 は未分化な状態では約二時間周期で発現振動し、下流遺伝子の発現も振動させて未分化状態を維持するが、分化過程では発現が消え、下流遺伝子の持続的な発現上昇による神経分化を誘導する。2. より未分化な ES 細胞においては、よりゆっくりと振動し、その発現振動が Hes1 タンパク質のレベルを継時的に増減させて、不均一な細胞分化に寄与する。3. 一方で、発生期の脳において、増殖と分化が抑制されている境界領域では、Hes1 タンパク質は高発現しているが振動しない。Hes1 のノックアウトマウスでは、早期に神経分化が昂進することによる幹細胞の枯渇、境界構造の崩れによる脳構造形成不全、ノックアウト ES 細胞では均一な神経分化が見られ、この発現振動は、幹細胞の性質や分化のタイミング、多様性を制御する新しい細胞戦略であると考えられた。

二時間という短周期での振動を持続するには、Hes タンパク質が約 20 分の半減期で分

解される必要がある。それは実験的、理論的に証明されており、約 10 分安定化するとその振動は崩れる。つまり、Hes1 タンパク質の安定性により振動が調節されている。しかし、その分子機構は、ポリユビキチン化されてプロテアソームによって分解されるということ以外、全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

我々は、Hes1 タンパク質の安定性を調節し、幹細胞分化を制御する分子機構を明らかにすることを目的に、マウス ES 細胞を用いて、Hes1 タンパク質と相互作用する因子の網羅的同定と解析を行ってきた。その結果、同定されたユビキチン修飾系関連因子の中から、Hes1 タンパク質のユビキチン化状態を変える因子群を同定した。また、Hes1 タンパク質自身の質量分析から翻訳後修飾部位を同定した。本研究課題では、以上の解析結果を発展させ、Hes1 タンパク質の機能制御に関わる分子機構を *in vitro*, *in vivo*, 個体レベルで調べ、Hes1 の発現振動を制御する分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脱ユビキチン化酵素の解析

当研究室で作成した Hes1 特異抗体を用い、マウス ES 細胞のライセートから Hes1 と共免疫沈降してくるタンパク質を質量分析により網羅的に解析した結果、複数のユビキチン修飾系に属するタンパク質を同定した。培養細胞において、Hes1 との相互作用を確認し、Hes1 のユビキチン化状態の変化を調べた結果、過剰発現によってユビキチン化状態に変化のある因子を複数同定することができた。その中から Ubiquitin specific proteases (USP) ファミリーに属する脱ユビキチン化酵素 (DUB) である Usp27x に着目した。USP ファミリーは脱ユビキチン化酵素の中でも最も数多く、タンパク質の大きさや構造も様々であるが、保存されたモチーフ Cys, His boxes を持つユビキチン特異的システインプロテアーゼとして機能し、様々な細胞内シグナルを制御することが報告されている。しかし、我々の同定した Usp27x に関する報告は全くなかったため、以下の方法で解析を行った。

1. 過剰発現、ノックダウンによる Hes1 タンパク質の安定性の変化の解析。
2. Hes1 との相互作用部位の同定。
3. Hes1 の脱ユビキチン化の解析。
4. 特異抗体の作成。
5. マウス胎児における Hes1 との発現パターン比較解析。
6. マウス胚脳組織への子宮内エレクトロポレーション法で遺伝子導入を行い、Hes1 タン

パク質の安定化とそれに伴う性質の変化を脳組織内で解析 (Hes1 が安定化されていれば、遺伝子導入された神経幹細胞は分化できず皮質層への移動が阻害され、脳組織の層構造形成不全が起こる。)

7. ノックアウトマウスを作成し表現型を解析。

8. Hes1 の発現振動をリアルタイムでモニターできるレポーターを用い、細胞内での Hes1 の振動の変化を解析。

(2) Hes1 翻訳後修飾解析

Hes1 内部には 15 個のリジン残基が存在している。質量分析結果からそのうち 8 カ所にユビキチン化、8 カ所に SUMO 化が同定された。それらのリジンをアルギニンに置換した点変異体、一カ所のみリジンを持つ変異体、15 個全てのリジンをアルギニンに置換したリジン残基を持たない変異体等を利用して、Hes1 の翻訳後修飾、転写抑制活性、安定性への影響を調べた。また、質量分析により 12 カ所のリン酸化部位が同定された。それらの点変異体、擬似リン酸化変異体をそれぞれ作成し、同様に解析を行った。

また、東北大学、加齢医学研究所の安井博士、管野博士との共同研究で、Hes1 の相互作用因子の探索を行い、昆虫細胞から精製したリコンビナント Hes1 と結合する Hek293T 細胞由来の相互作用因子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 脱ユビキチン化酵素の解析結果

Usp27x とそのホモログである Usp22, Usp51 が、Hes1 の特異的脱ユビキチン化酵素であること、高度に保存されている USP ドメイン内で Hes1 と相互作用していること、また、Usp27x, Usp22, Usp51 はそれらの活性部位に依存して、Hes1 を脱ユビキチン化し、安定化していることが明らかになった。Usp27x ホモログ間では細胞内で最も発現の豊富な Usp22 をノックダウンした結果、Hes1 タンパク質が不安定化し、Hes1 のオシレーション周期に遅れが見られることが分かった。Usp27x, Usp22, Usp51 の胎児脳組織内での発現パターン比較から、他のホモログに比べ、Usp22 は、突出して発現量が高く、Hes1 の発現領域で発現が見られることが分かった。作製した Usp27x のノックアウトマウスでは、脳組織に顕著な変化は観察されなかった。おそらくホモログ間での相補効果により表現型が現れなかったのではないかと考えられる。しかし、胎児脳組織内への遺伝子導入実験では、変化を観察することが出来た。胎児脳組織内での Usp22 のノックダウンにより、神経幹細胞の分化が早進すること、一方、Usp27x の過剰発現では、組織内での神経幹細胞の分化が抑制

されることが分かった。これらの研究結果は、Hes1 の脱ユビキチン化酵素が、脱ユビキチン化を介して Hes1 タンパク質を安定化し、Hes1 タンパク質のダイナミクスを調節していること、Hes1 の発現振動を介して神経幹細胞の分化を制御していることを明らかにするものである (図 2)。

また、この研究成果により、Hes1 の翻訳後修飾が Hes1 オシレーションとその機能を調節することを初めて示すことが出来た。この結果は FEBS J(2015)に報告した。

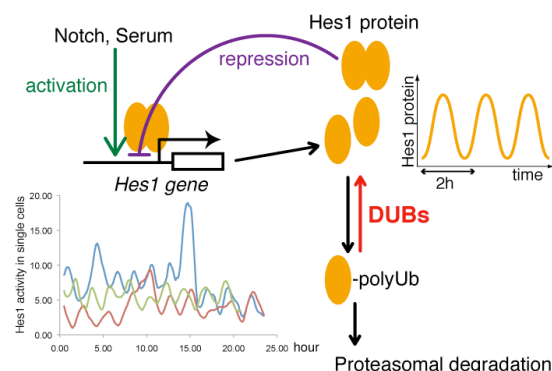


図 2 DUB による Hes1 の機能制御

(2) Hes1 翻訳後修飾解析の結果

Hes1 のリジン残基の点変異体は全て同レベルでユビキチン修飾を受け、Hes1 は複数の等価のユビキチン化部位を持つことが分かった。他の全てのリジンをアルギニン置換し、一カ所のみリジン残基を持つ変異体の解析から、ユビキチン修飾を受けるリジン残基の同定と、ユビキチン化を受ける機能ドメインを同定した。また、SUMO 修飾は、ユビキチン修飾と同じリジン残基を使用していることが分かった。さらに、二カ所のリジン残基が Hes1 のリプレッサー活性と、ユビキチン修飾による不安定化に重要であることを見いだした。また、一方、Hes1 のリン酸化部位変異体の解析から、リン酸化により Hes1 ユビキチン修飾を阻害して安定化するリン酸化部位を同定した。

さらに、昆虫細胞で作成したリコンビナント Hes1 タンパク質をカップリングしたアフィニティカラムによる Hek293T ライセートからの相互作用因子の精製と同定を行った。同定された因子が、Hes1 の機能調節にどのように寄与しているかを現在、解析している。

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 小林妙子、影山龍一郎、Expression dynamics and functions of Hes genes in development and diseases., Cur. Top. Dev. Biol., 査読有、

Vol.110、2014、pp.263-283、
doi: 10.1016/B978-0-12-405943-6.00007-5.

- ② Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, Tone S, Toida K, Vanderhaeghen P, Kosodo Y., Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells., *Stem Cells Dev.*、査読有、Vol.23、2014、pp.2129-2142、
doi: 10.1089/scd.2013.0251.
- ③ 播磨有希子、今吉格、下條博美、小林妙子、影山龍一郎、The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes., *Semin. Cell Dev. Biol.*、査読有、Vol.34、2014、pp.85-90、
doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.038.
- ④ 小林妙子、岩本由美子、高島和博、磯村彰宏、小曾戸陽一、川上浩一、西岡朋生、貝淵弘三、影山龍一郎、Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation., *FEBS J.*、査読有、Vol.282、2015、pp.2475-2487、
doi: 10.1111/febs.13290.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小林妙子、Deubiquitination modulates Hes1 repressor activity by Hes1 protein stabilization. 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation、2014 年 7 月 8-11 日、Dresden, Germany
- ② 小林妙子、Hes1 の脱ユビキチン化酵素は Hes1 タンパク質の安定性と機能を制御する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、京都、国立京都国際会館
- ③ 小林妙子、発現振動する転写因子 Hes1 の解析、シンポジウム「分子から生命へ」、2014 年 7 月 26 日、京都、京都大学益川ホール
- ④ 小林妙子、Deubiquitinating Enzymes Regulate Hes1 Stability and Neuronal Differentiation. The CDB Symposium 2015 "Time in Development" 2015 年 3 月 23-25 日、神戸、理研 CDB
- ⑤ 小林妙子、岩本由美子、影山龍一郎、リソソーム活性の上昇は神経幹細胞の休眠状態を維持するのに必須である、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 1 日、神戸、ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/research_stemcell.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 妙子 (KOBAYASHI, Taeko)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：40402804