

タンパク質構造変化から紐解く造血幹細胞の制御機構

三原田賢一

熊本大学国際先端医学研究機構

【研究の背景】

造血幹細胞は全ての系列の血液細胞を生涯にわたって供給する細胞である。造血幹細胞の多くは骨髄内の低酸素領域で休止期に制御されており、不必要な分裂を避けることで増殖に伴う変異導入や酸化ストレスからの攻撃を回避している。一方で炎症や感染などの病的状況下では活発に増殖し、必要とされる細胞種を産生、補完する。しかし慢性的な刺激や体外培養などの過剰な分裂刺激を受けた場合は造血再構築能が著しく低下することがわかっており、造血幹細胞には本来増殖に伴うストレスを解消する仕組みがあるが、その全貌がまだ解明されていないと考えられる。申請者らは近年、造血幹細胞ではタンパク質の折りたたみを補佐するシャペロンタンパク質の発現が低く、増殖に伴うタンパク質合成亢進時に小胞体ストレスが上昇しやすいことを明らかにしてきた^{1,2)}。造血幹細胞ではタンパク質の合成量が他の細胞よりも低く、遺伝子が機能を発揮するための調節レベルとしてタンパク質の折りたたみ制御が特に重要であると考えられる。

【目 的】

本研究では、造血幹細胞の能力を規定するタンパク質が、他の血液細胞と比べて異なる立体構造を持つと仮定し、熱安定性を利用した網羅的タンパク質構造比較を用いて造血幹細胞で構造変化を示すタンパク質を同定し、その機能を解析することを目的とした。

【方 法】

通常用いられている質量分析法の場合、解析試料は酵素処理により切断されペプチド化された後に測定されるため、元々の構造に関する情報が失われてしまう。そこで、近年開発された網羅的タンパク質構造解析 Proteome Integral Solubility Alteration 法(PISA)³⁾を用いて造血幹細胞で構造が異なるタンパク質を同定する。PISA ではタンパク質の構造変化が熱安定性に影響を与えることを利用しており、解析対象サンプルは分注された後に異なる温度で加熱され、超遠心分離によって凝集タンパク質を除去する。これらのサンプルは個別に標識され、質量分析により個々のタンパク質の相対量を算出する。

【結 果】

我々は純化した造血幹細胞と前駆細胞間で PISA を実施し、わずか 175,000 個の造血幹細胞から 5,600 種のタンパク質を検出し、さらに 160 種のタンパク質が有意な安定性変化を持つことを発見した。造血幹細胞でより安定性が高いタンパク質として、複数のヘテロ核リボ核タンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein: hnRNP) タンパク質が検出された。hnRNP は核内 RNA 結合タンパク質ファミリーで、RNA の安定化、スプライシングや翻訳調節に関わっている⁴⁾。造血幹細胞はタンパク質合成が低く維持されているが、そのメカニズムは解明されていない。造血幹細胞を見てみると hnRNP タンパク質は核内に凝縮して存在しており、hnRNP が未熟な RNA に結合する(安定化する)ことで翻訳調節のゲートキーパーとして機能し、タンパク質合成を低く保っている可能性があると考えられた。

hnRNP が造血幹細胞の機能にどう影響を与えるかを調べるために、RNA 干渉を用いた発現低下実験を行った。造血幹細胞と前駆細胞で最も構造の違いが大きいと算出された hnRNP U (*Hnrnpu*) を標的とする shRNA をレンチウイルスベクターにより導入したマウス CD150⁺CD48⁻KSL 細胞(造血幹細胞)を培養したところ、対照群に比べて有意に CD244 陰性の機能的造血幹細胞⁵⁾の頻度が低下した。現在この造血幹細胞の移植実験を行っており、hnRNP U の発現低下が骨髄再構築能にどう影響するかを検証中である。また、*Hnrnpu*^{fllox} マウスを入手し、Vav-Cre マウスと交配して血液細胞特異的な *Hnrnpu* ノックアウトマウスを作製中である。

PISA では *Hnrnpu* 等のタンパク質は量では無く構造が異なるという結果が得られたため、PISA で得られた知見の検証には hnRNP U の遺伝子発現の低下を伴わずに機能を喪失させるような実験系が必要となる。そこで hnRNP U の認識配列を人工的に合成した RNA(デコイ RNA)を作製し、これを造血幹細胞に導入することで hnRNP U の RNA 結合部位をマスクする法を考案した。デコイ RNA の導入には前任地のスウェーデン・ルンド大学で開発されたナノストローによる低分子輸送システム⁶⁾を用いた。実際にルンド大学にてナノストロー実験を行ったが、細胞へのデコイ RNA 輸送は 40-50%の確率で成功したが、多くのデコイ RNA が細胞質にとどまっており、核への輸送効率が低く hnRNP U へ結合させることが困難であることがわかった。

【考 察】

shRNA の実験から、hnRNP U が造血幹細胞の維持にとって重要である可能性が強く示唆された。ナノストローによるデコイ RNA 導入では核への輸送効率が低く、hnRNP U との結合を起こすことが困難であると考えられたため、現在、テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現用ベクターにこのデコイ RNA を搭載し、ウイルス感染後に任意のタイミングで核内においてデコイ RNA を発現させる系に切り替えている。ベクターの構築が 2022 年内に完了する予定である。同時に、hnRNP U がどういった RNA(遺伝子の種類、RNA の成熟度など)に結合しているかを RNA 免疫沈降法で解析している。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

造血幹細胞の破綻は無効造血や白血病化など重大な疾患の原因になり得る。タンパク質合成の破綻やフォールディング異常により誘導される小胞体ストレスは、シャペロンタンパク質の発現上昇や小胞体ネットワークの拡充などを起こすため、継続的なシグナルの励起により「排除されにくい、前病状態の造血幹細胞」が生ずる可能性がある。hnRNP は複数のがんで発現変動や変異が発見されており、本研究によってその分子機構や新たな機能が明らかになることで、通常未分化・静止期を保っている造血幹細胞が異常増殖・分化をする機序に迫ることができると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Miharada K, et al. Dppa5 improves hematopoietic stem cell activity by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Rep.* 7, 1381-1392 (2014).
2. Sigurdsson V, et al. Bile acids protect expanding hematopoietic stem cells from unfolded protein stress in fetal liver. *Cell Stem Cell* 18, 522-532 (2016).
3. Gaetani M, et al. Proteome Integral Solubility Alteration: A High-Throughput Proteomics Assay for Target Deconvolution. *J Proteome Res.* 18, 4027-4037 (2019).
4. Geuens T, et al. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 135, 851-867 (2016).
5. Koide S, et al. CD244 expression represents functional decline of murine hematopoietic stem cells after in vitro culture. *iScience* 25, 103603 (2021).
6. Schmiderer L, et al. Efficient and nontoxic biomolecule delivery to primary human hematopoietic stem cells using nanostraws. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117, 21267-21273 (2020).