

# ポリコーム複合体の翻訳後修飾を介した幹細胞制御機構の解明

千葉大学大学院 医学研究院 細胞分子医学

岩間 厚志

## 1. はじめに

ポリコーム群蛋白は核内で複合体を形成し、ヒストン修飾を介してエピジェネティックに遺伝子発現を抑制する。申請者らは、ポリコーム複合体が組織幹細胞の自己複製能の維持に必須であるとともに、分化制御遺伝子の発現抑制を介して多能性の維持にも機能することを明らかにした。しかしながら、その機能は不明な点が多く、特に細胞外シグナルがどのようにポリコーム複合体の機能を制御するかは明らかになっていない。本研究においては、幹細胞ニッチからの幹細胞維持・分化シグナルによるポリコーム蛋白のリン酸化修飾を同定するとともに、各リン酸化部位の幹細胞における機能を検証し、細胞外シグナルによる幹細胞制御のエピジェネティクスの実態を明らかにする。

## 2. 方法

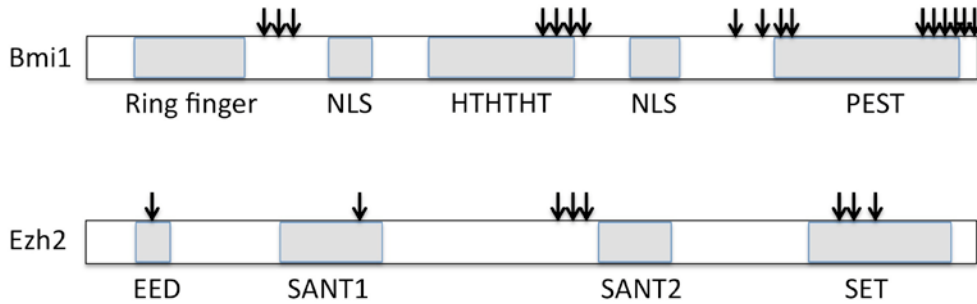
**ポリコーム蛋白 (BMI1、EZH2) のリン酸化部位の同定:** 未分化型造血細胞株 K562 より Flag-BMI1 蛋白質 (または Flag-EZH2) を精製し、LC/MS/MS解析により翻訳後修飾部位を網羅的に同定する。

**BMI1、EZH2のリン酸化部位変異体の作成とその機能の検証:** BMI1、EZH2のそれぞれのリン酸化部位に変異 (gain-of-function: E mutant, loss-of-mutant: A mutant) を入れた変異体を作製し、レトロウイルスを用いて野生型あるいはBmi1/Ezh2を欠損するマウス造血幹細胞に発現させ、その増殖能あるいは骨髄移植における造血再構築能の解析を通してその機能を検証する。また、各変異体の蛋白安定性やクロマチン結合能も検討する。

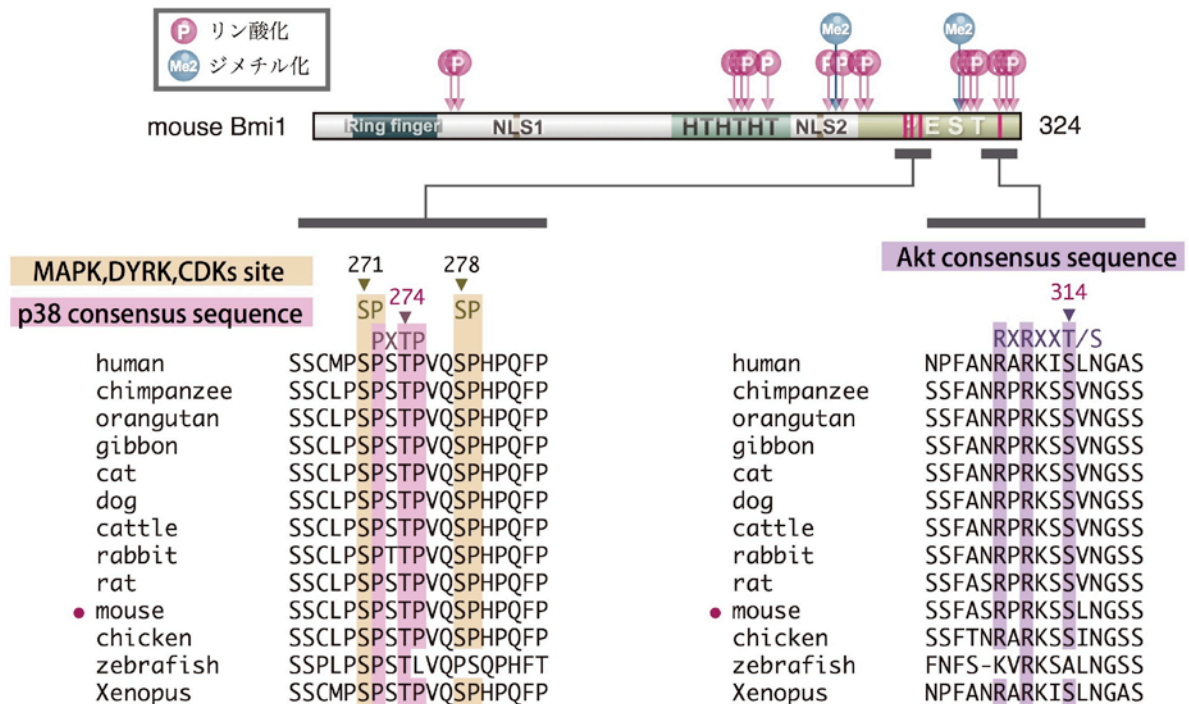
**細胞外シグナルによるリン酸化修飾の検証:** 最終的にはBMI1、EZH2の各リン酸化部位をリン酸化する酵素をin vitro kinase assayで同定する。また、造血幹細胞の機能制御に関わるニッチシグナル(SCF, TPO)や酸化ストレスで細胞を刺激した際に、どのようなシグナル経路がポリコーム蛋白機能に影響を与えるかについて検証する。

## 3. 結果 研究成果

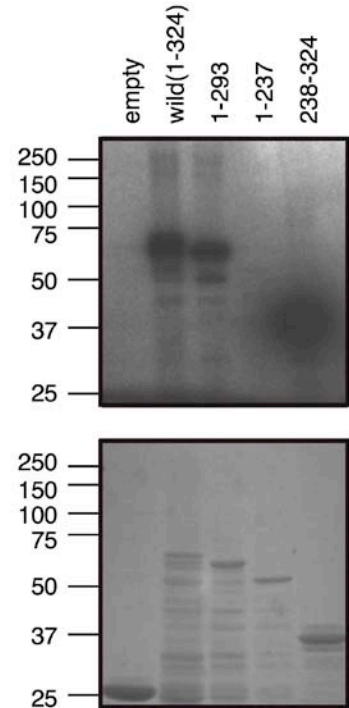
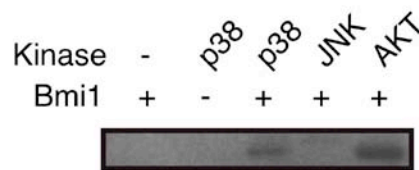
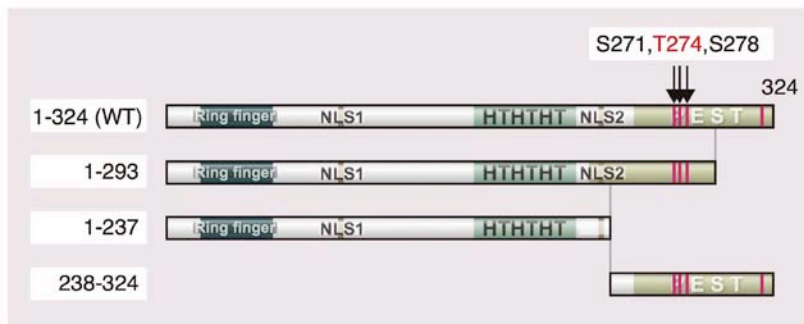
**ポリコーム蛋白 (BMI1、EZH2) のリン酸化部位の同定:** 未分化型造血細胞株 K562 より Flag-BMI1 蛋白質ならびにFlag-EZH2を精製し、LC/MS/MS解析により翻訳後修飾部位を網羅的に同定した。解読範囲は約50%であるが、BMI1 のリン酸化修飾部位に関しては18箇所を、EZH2のリン酸化修飾部位に関しては8箇所を同定した (下図)。



以上の解析から、BMI1のリン酸化の中にAKTのリン酸化配列があることが明らかとなった。さらに、アミノ酸配列の解析からp38のリン酸化共通配列も存在することが明らかとなった(下図)。そこで、この2つのリン酸化部位に焦点を当てて以降の解析を行った。



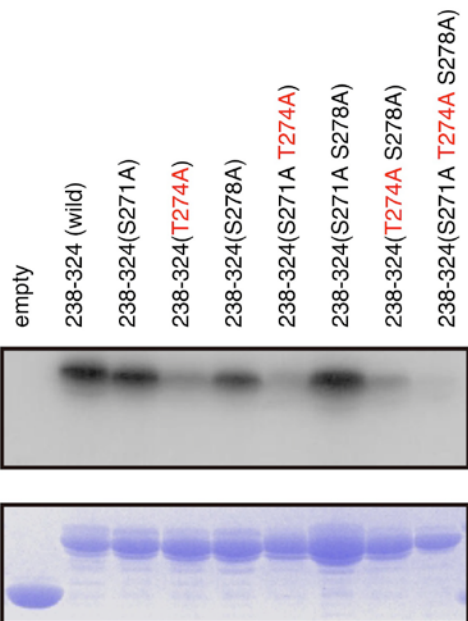
**Akr, p38によるBmi1のリン酸化の検証:** まず、GST-BMI1融合蛋白を用いて活性化型p38, JNK, AKTによるin vitro kinaseアッセイを行った。その結果、BMI1は活性化型p38とAKTによってリン酸化されることが確認された(下図左下)。そこで、BMI1のdeletion mutantを作製し、p38によるリン酸化部位のマッピングを行った。その結果、p38のリン酸化共通配列が存在するBMI1 aa237-293の部位がリン酸化されることが明らかとなった(下図右)。さらに、aa237-293に存在するp38のリン酸化共通配列候補のアミノ酸, S271, T274, S278をアラニンに変えたGST-BMI1融合蛋白を作製し、in vitro kinaseアッセイを行った。



その結果、T274A変異を含む変異体のp38によるリン酸化が著しく低下することが観察され、T274が主なリン酸化部位であることが考えられた(右図)。

#### 4. 考察

以上の結果から、BMI1がp38とAKTによってリン酸化されることが明らかとなった。このリン酸化によってBMI1の機能がどのように変化するのが今後の研究課題である。特にp38は酸化ストレスによって活性化することから、造血幹細胞における酸化ストレスとBMI1の機能制御については重要な課題となろう。今後は、AKTリン酸化部位の変異体を用いてAKTによるリン酸化を確認するとともに、BMI1のリン酸化部位変異体 (gain-of-function: E mutant, loss-of-mutant: A mutant) をレトロウイルスを用いて野生型あるいはBMI1欠損マウスの造血幹細胞に発現させ、その増殖能あるいは骨髄移植における造血再構築能の解析を通してその機能を検証する。また、各変異体の蛋白安定性やクロマチン結合能も検討する予定である。本研究は幹細胞におけるエピジェネティクスと細胞外シグナルを結びつける新規な試みであり、核内のエピジェネティクスを細胞外環境も含めて包括的に理解するものである。本研究で得られる成果は、再生医療を目指した幹細胞操作法の創出やiPS細胞に代表される細胞のリプログラミングに必須な分子基盤を提供するものと期待される。



#### 5. 発表論文

Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H, and Iwama A. Dependency on the polycomb protein Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 2011 Oct 31. [Epub ahead of print].