

「hnRNP のストレス顆粒形成による造血幹細胞の防御機構」

熊本大学国際先端医学研究機構 特別招聘教授

三原田 賢一

要旨

造血幹細胞は通常ほとんど分裂を行っていないため、タンパク質の翻訳量と折りたたみが他の細胞より低く、折りたたみ（フォールディング）能力も低いことが知られている。一方で転写活性は高いため、我々は造血幹細胞には厳密な翻訳調整を行う「翻訳ゲートキーパー」が存在すると仮定した。このような重要なタンパク質は造血幹細胞で特有な立体構造を持つと仮定して、熱安定性プロテオミクスを実施したところ、一連のヘテロ核リボ核タンパク質（hnRNP）の構造が造血幹細胞で安定性が高いことを発見した。hnRNP は核内 RNA 結合タンパク質ファミリーとして mRNA の安定化・成熟、及び翻訳調節に関わっているそこで特に安定性が高いことが判明した hnRNP U（Hnrnpu）の欠損マウスを作製したところ、血液特異的な欠損では致死性の異常を示した。造血幹細胞特異的に欠損したところ、コロニー形成能が完全に失われた事から、hnRNP U は造血幹細胞にとって必須の分子である事がわかった。予想外な事に、hnRNP U を欠損した造血幹細胞でも翻訳量に変化は認められず、機能の喪失は翻訳調整の異常ではないことが明らかになった。

背景・目的

【背景】

造血幹細胞は全種類の血液細胞を生産し続けることができる細胞であり、その能力を活用して移植治療に用いられている。成体の定常状態では造血幹細胞は静止期にあり頻繁に分裂しておらず、タンパク質の合成量が他の血液細胞と比較して低く保たれている¹⁾。申請者らは造血幹細胞はタンパク質の折りたたみ（フォールディング）を補佐するシャペロンタンパク質の発現が低く、増殖時などに異常なフォールディングを起こしたタンパク質が蓄積しやすいこと、それにより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²⁻⁵⁾。造血幹細胞のタンパク質合成が低いのは、フォールディング能力の不足による異常タンパク質の蓄積を回避することにつながると考えられる。一方で造血幹細胞では転写活性が他の細胞よりも高く⁶⁾、これは造血幹細胞が増殖・分化を開始する際に即座にタンパク質として各遺伝子が機能できるように備えていると解釈できる。つまり造血幹細胞は遺伝子発現の多くを翻訳調整によって管理しており、これが造血幹細胞が休眠期から速やかに活性状態に移行できる仕組みであると考えられる（図1）。しかし、造血幹細胞において翻訳量の最適化



図1 造血幹細胞におけるタンパク質合成制御。造血幹細胞には「水門」のように翻訳量を調整することで、タンパク質フォールディング能力の限界を超えてしまうことを防いでいると考えられる。

を行っている「ゲートキーパー」は不明なままである。タンパク質は構造の違いによってその機能が変化することから、幹細胞能の制御に直結するタンパク質は造血幹細胞では構造が異なるのではないかと考えた。通常プロテオーム解析に用いられている質量分析法の場合、解析試料はペプチド化された後に測定されるため、構造に関する情報を得ることは不可能である。そこで、近年開発された熱安定性比較を利用した網羅的タンパク質構造解析法 (Proteome Integral Solubility Alteration、PISA)⁷⁾を採用した。PISA ではタンパク質の構造と熱安定性が相関することを利用しており、解析試料 (細胞溶解液) は分注された後にそれぞれ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が除去される。その後サンプルは混合され、質量分析によりタンパク質の相対量を算出する (図2)。これにより、試料間で構造に差があるタンパク質を網羅的に解析することができる。我々

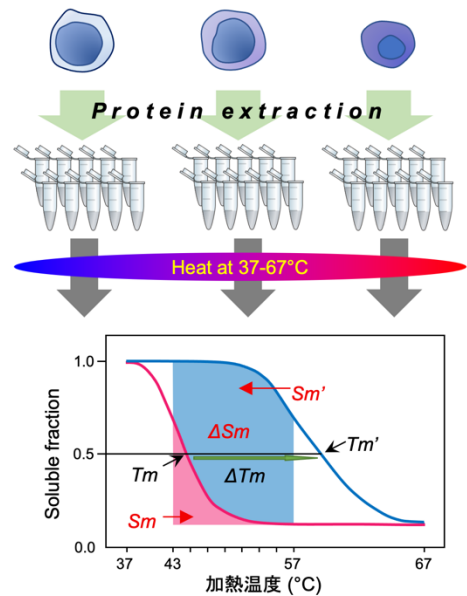


図2 PISAの概要。加熱後に超遠心分離によって凝集タンパク質を除去し、試料間で溶解温度の変化 (ΔTm)と検出タンパク質量の総和 (ΔSm)を比較する。

は PISA により造血幹細胞 (HSC: CD150⁺CD48⁻c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻) で検出された 5,600 種のタンパク質のうち 160 種のタンパク質が前駆細胞 (HPC: CD150⁺CD48⁺c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻) と比べて「量は同じだが安定性に違いがある」ことを発見した。上記 160 のタンパク質のうちの多くが造血幹細胞でより安定性が高い傾向にあり、その中に複数のヘテロ核リボタンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein: hnRNP) が含まれていた (図3)。hnRNP は核内 RNA 結合タンパク質ファミリーとして未成熟な mRNA (pre-mRNA) と共に RNA-タンパク質複合体 (RNP) を形成し、RNA の安定化・成熟、及び翻訳調節に関わっている⁸⁾。興味深いことに、hnRNP は翻訳が限られたときに未翻訳 RNA を中心に形成される RNP の一種であるストレス顆粒に局在することも報告されている^{9,10)}。ストレス顆粒は核内と細胞質で形成されるが、PISA の結果を見ると hnRNP 以外にも Eif3 や Nono などストレス顆粒に存在することが報告されている他のタンパク質も多く含まれていた (図3)。ストレス顆粒の機能については不明な点が多いが、翻訳されていない RNA を分解から保護する役割があると考えられている。さらに、DNA 損傷の修復及び抗アポトーシス作用、p21 の誘導による細胞周期制御の機能があることが報告されており^{11,12)}、ストレス顆粒は寧ろ造血幹細胞の機能維持に貢献している可能性もある。

免疫染色で hnRNP タンパク質を観察したところ、造血幹細胞では核内で凝縮している様子が捉えられた。一方で、前駆細胞で

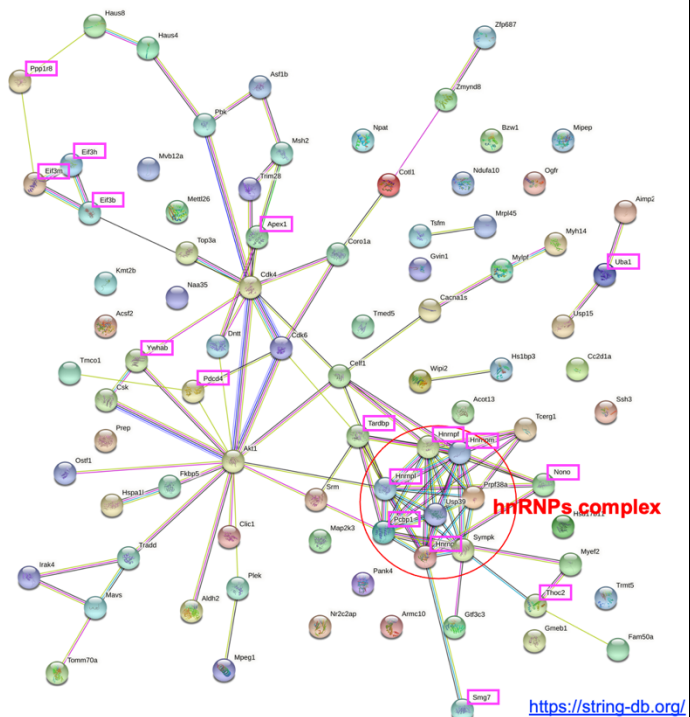


図3 PISAによって明らかとなった、造血幹細胞で安定化しているタンパク質の相互作用ネットワーク。複数のhnRNPがクラスターを形成している。マゼンタの四角はストレス顆粒に存在することが報告されているタンパク質を表す。

は hnRNP は核全体もしくは核膜付近に分布しており、hnRNP が造血幹細胞で特有の高次構をとっていることが示唆された。

(図 4)。

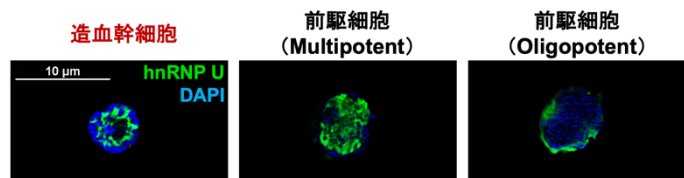


図4 hnRNPの一つ、hnRNP Uの免疫染色。造血幹細胞ではhnRNP Uが核内で凝縮している一方で、前駆細胞では核全体もしくは辺縁に広がっている。

【目的】

そこで本研究では hnRNP が造血幹細胞における翻訳制御の中核として機能していると仮説立て、その重要性を明らかにする事を目的とした。

方法

マウス Hnrnpu-flox マウス (B6;129S4-*Hnrnpu*^{tm1.1Tman/J}) は The Jackson Laboratory より入手した。血液特異的欠損マウス作製のため、Vav-Cre マウスと交配した。誘導性欠損マウスの作製のため、MX1-Cre マウスと交配した。遺伝子欠損の誘導のため、8 週齢のマウスに pIpC (20 mg/g) を 1 日おきに合計 3 回腹腔内投与した。造血幹細胞特異的欠損マウス作製のため、Hlf-CreERT2 マウス¹³⁾と交配した。遺伝子欠損の誘導のため、Tamoxifen (1 mg) を 5 日間連続で腹腔内投与した。野生型マウスとして C57BL/6N マウス (日本エスエルシー) を用いた。

末梢血、骨髓細胞解析 遺伝子欠損誘導後、尾静脈より末梢血を採血し Celltac α (日本光電) 血液細胞数の測定を行った。さらに塩化アンモニウムによる溶血処理後に有核細胞を回収し、抗体染色後にフローサイトメーターで各血球系列の比率を計測した。

大腿骨より骨髓細胞を採取し、塩化アンモニウムによる溶血処理後に有核細胞を回収し、抗体染色後にフローサイトメーターで各血球系列の比率を計測した。

コロニー形成能評価 上記の抗体染色を行った造血幹細胞を 100 個ソートし、半固形培地である Methocult M3434 (Stem Cell Technologies) で培養してコロニーの形成数を計測した。

OP-Puro 染色 (タンパク質合成量解析) 25 μg/g で OP Puro を腹腔内投与し、1 時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、脛骨および腓骨から骨髓細胞を回収した。造血幹細胞マーカーに対する各種抗体で染色後、固定・透過処理をし、Click-iT 反応によりシグナルを検出した。

RamDa-seq HSC (CD150⁺CD48⁻c-kit⁺Sca-I⁺Lineage⁻) および HPC (CD150⁻CD48⁺c-kit⁺Sca-I⁺Lineage⁻) について RamDa-seq¹⁴⁾を用いて遺伝子発現解析を実施した。それぞれ 100 個の細胞を lysis buffer に直接ソートした後、既報¹⁵⁾に則って cDNA ライブラリーを作成し、シーケンスを行った。

結果

正常造血幹細胞にはストレス顆粒は存在しない

hnRNP は RNP の一種であるストレス顆粒に局在することが報告されている^{9,10)}。造血幹細胞にもストレス顆粒が存在するかを調べるため、免疫染色を用いてストレス顆粒の代表的マーカーである G3bp1

の分布を調べた。その結果、G3bp1 は検出されたものの顆粒状には認められず、核内に広く分布し、また核膜にも多く存在することが観察された。同時に染色した hnRNP U とは一部のみが共染色されており、hnRNP のすべてがストレス顆粒の構成分子であるわけではないと考えられた (図 5)。

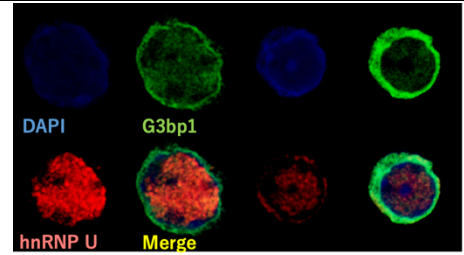


図5 ストレス顆粒マーカーであるG3bp1とhnRNP Uの共染色。典型的な顆粒パターンは確認できなかった。

血液細胞特異的 *Hnrnpu* 欠損マウスは胎性致死となる

hnRNP は多くの細胞で翻訳において中心的な役割を担っている。造血幹細胞での hnRNP の役割を明らかにするために、PISA の結果から最も HSC と HPC で熱安定性の差が大きかった hnRNP U (*Hnrnpu*) に着目して研究を進めた。*Hnrnpu* の全身性欠損マウスは胎性致死となる¹⁶⁾ ことから、

Hnrnpu-flox マウスを、Vav-Cre マウスと交配することで血液細胞特異的 *Hnrnpu* 欠損マウスを作製した。その結果、*Hnrnpu*^{flox/wt}:Vav-Cre (ヘテロ欠損) マウスでは異常は認められなかった (図 6)。一方で、*Hnrnpu*^{flox/flox}:Vav-Cre (ホモ欠損) では雌雄問わず生産仔が得られなかった。造血幹細胞の欠損では即胎性致死にならないが、*Hnrnpu* は赤芽球内で Bloodline と呼ばれるスーパーエンハンサー由来の lncRNA の標的となり赤血球分化を促進することが報告されており¹⁷⁾、*Hnrnpu* 欠損が重度の貧血を起こしていると考えられる。

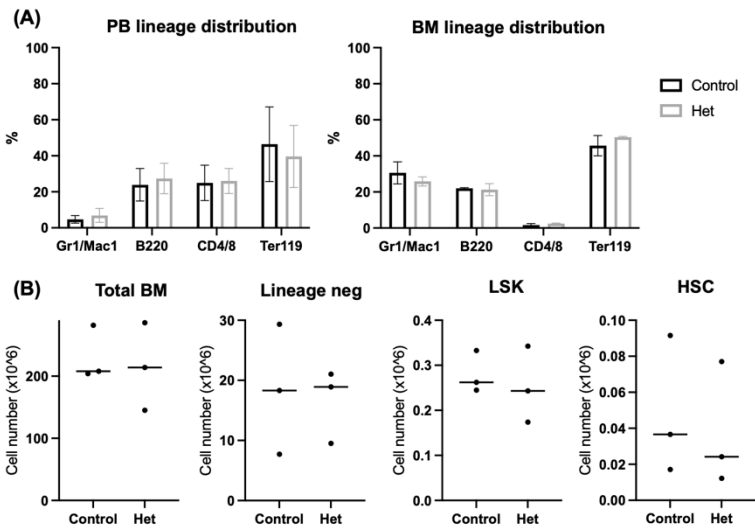


図6 *Hnrnpu*^{flox/wt}:Vav-Cre (ヘテロ欠損) マウスの末梢血、骨髄の解析。(A) 各細胞系譜の割合。(B) 骨髄における造血幹・前駆細胞の割合。

誘導型 *Hnrnpu* 欠損マウスは遺伝子欠損後に致死となる

上記の結果を踏まえ、*Hnrnpu*-flox マウスと MX1-Cre マウスを交配した誘導型 *Hnrnpu* 欠損マウスを作製した。loxP 配列を両側アリルに持つ個体 (*Hnrnpu*^{flox/flox}:MX1-Cre) に pIpC を投与し、造血幹細胞数の変化を解析する予定であったが、最終投与の 1 週間後にはほとんど全てのホモ欠損 (*Hnrnpu*^{Δ/Δ}:MX1-Cre) 個体が死亡した。そこで投与後 6 日でマウスを Sacrifice して末梢血を解析したところ、極度の赤血球・血小板数の減少が認められた (図 7)。これは *Hnrnpu*^{flox/flox}:Vav-Cre で得られた結果と考察によく合致している。次に骨髄を解析したところ、総細胞数が著減しており、特に骨髄球系細胞が減少していた (図 8)。赤芽球は増殖していたが、これは末梢血赤血球の低下に対する代償性の増加であると考えられる。一方

で分化抗原陰性 (Lineage-) 細胞や c-kit 陽性細胞のような未分化細胞の比率が有意に上昇していた。また、造

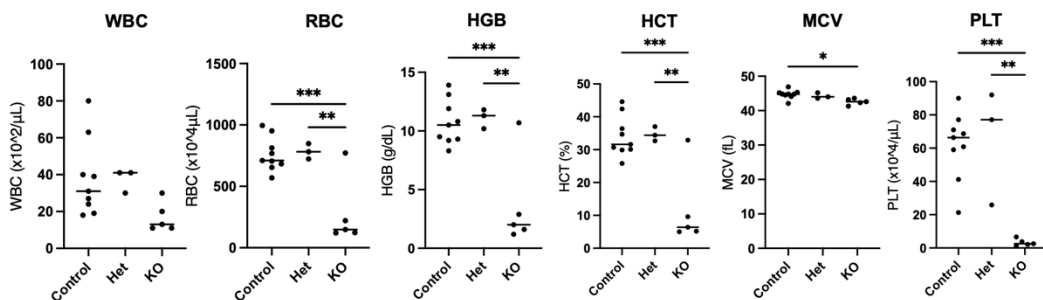


図7 *Hnrnpu*^{Δ/Δ}:MX1-Creマウスの末梢血解析。赤血球、血小板で顕著な減少が観られた。

血幹・前駆細胞分画 (c-kit⁺Sca-I⁺Lineage⁻: KSL) に含まれる細胞は全て造血幹細胞の表現系である CD150⁺CD48⁻となっていた。しかし、このマウスの骨髄細胞を用いてコロニー形成実験行ったところ、ホモ欠損個体の骨髄細胞からはコロニーが一つも形成されなかった。このことから、残存している造血幹細胞も機能は喪失しており、正常な造血幹細胞は一つも残っていないと考えられる。予想に反して、OP-Puro を用いた翻訳量の比較において有意な違いは認められなかった (図 8)。一方で、ヘテロ欠損 (*Hnrnpu*^{Δ/wt}:MX1-Cre) マウスでは末梢血・骨髄共に異常は認められなかった。

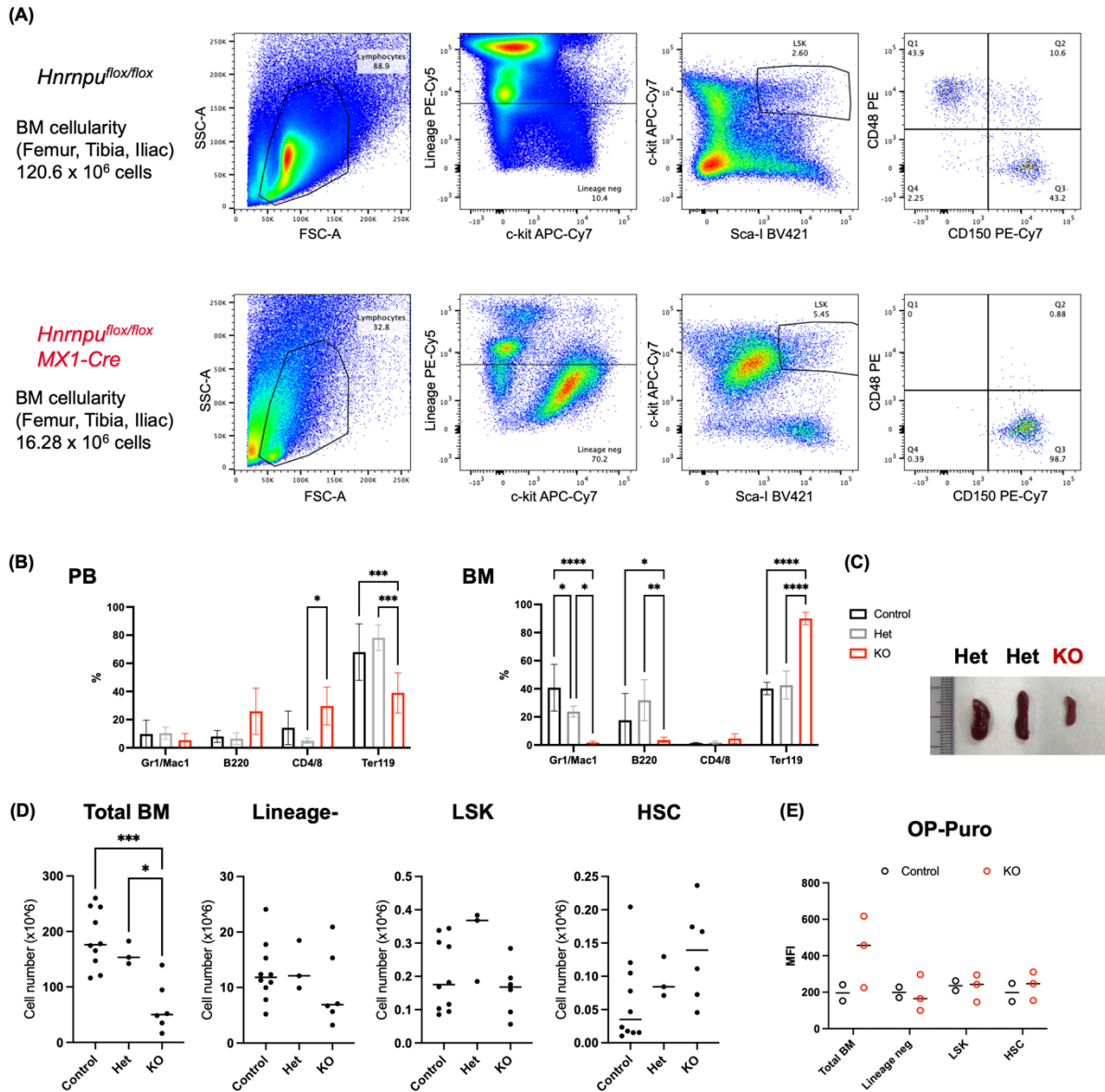


図 8 *Hnrnpu*^{Δ/wt}:MX1-Cre マウス骨髄、脾臓の解析。(A) 代表的な骨髄のフローサイトメトリー解析結果。(B) 末梢血および骨髄での各種細胞系譜の解析。(C) 代表的な脾臓の写真。(D) 骨髄内の造血幹・前駆細胞の割合。(E) OP-Puro 染色の結果。**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

造血幹細胞特異的 *Hnrnpu* 欠損マウスでも造血幹細胞の機能が失われる

Hnrnpu の欠損は多くの細胞に影響を与えるため、造血幹細胞への直接的な影響を調べるために *Hnrnpu*-flox マウスと *Hlf*-CreERT2 マウス¹³⁾を交配した誘導型 *Hnrnpu* 欠損マウスを作製した。予想通り、*Hnrnpu*^{Δ/wt}:*Hlf*-CreERT2 マウスは MX1-Cre による欠損とは異なり生存には影響を与えなかつ

た。また、最終の Tamoxifen 投与から 1 週間経過した後の末梢血、骨髄の解析でも大きな異常は認められなかった。さらに、OP-Puro を用いた翻訳量の比較において有意な違いは認められなかった (図 9)。ところが造血幹細胞のコロニー形成能は失われており、やはり造血幹細胞の機能にとって hnRNP U は必須の分子であることが明らかとなった。

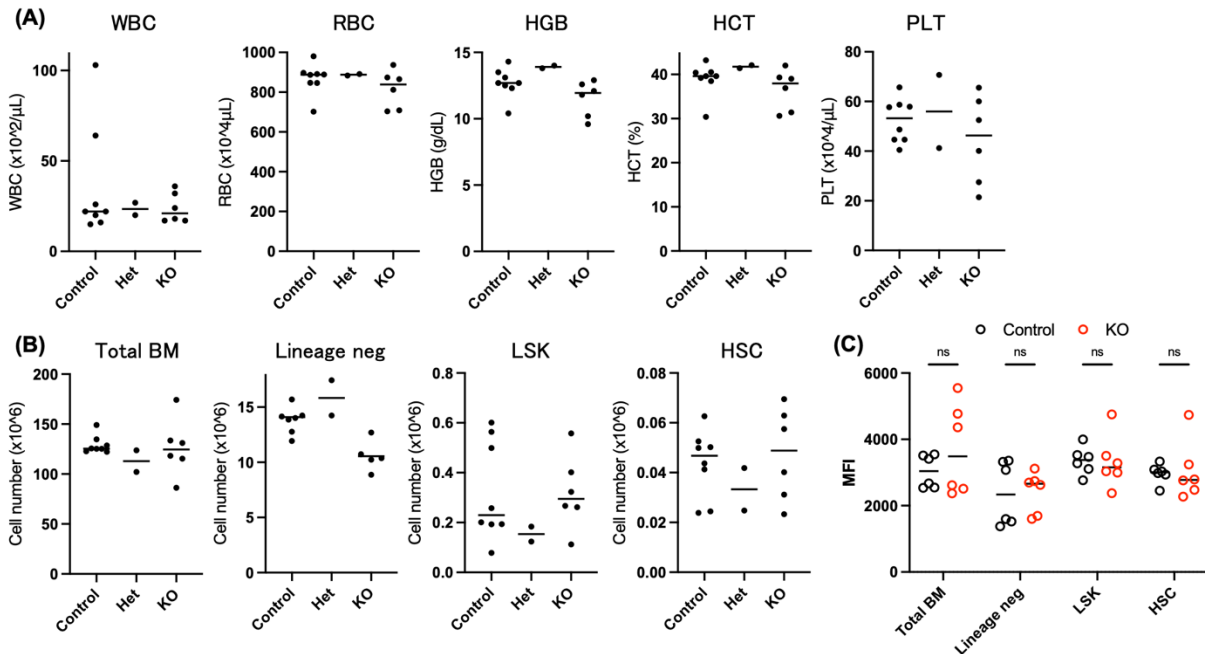


図7 *Hnrnpu*^{Δ/Δ};Hlf-CreERT2マウスの解析。(A) 末梢血解析。(B) 骨髄解析。(C) OP-Puro染色。

造血幹細胞と前駆細胞で pre-mRNA の比率に差はない

hnRNP はスプライシングを制御し、pre-mRNA から mRNA への成熟に関与するため、造血幹細胞では pre-mRNA の比率が高いと仮説立てた。野生型マウスの HSC と HPC を用いて RamDa-seq を行い、それぞれの mRNA についてエクソン-イントロンにまたがるリードの数を指標に pre-mRNA/mRNA の比率を計算したところ、予想に反して違いは認められなかった (図 10)。

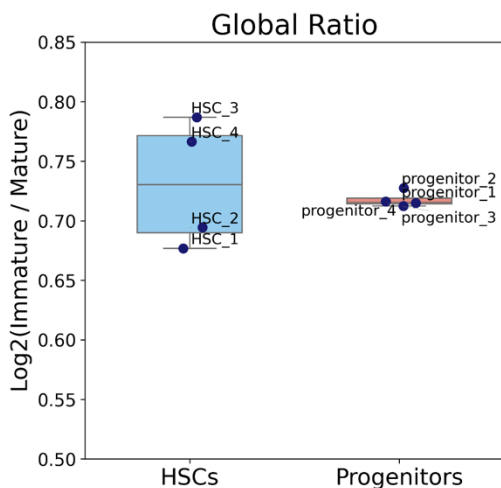


図 10 造血幹細胞および前駆細胞における pre-mRNA の比率。統計的な有意差は認められなかった。

考察

各種 *Hnrnpu* 欠損マウスの解析結果から、hnRNP U の発現は多くの血液細胞にとって必須であることが明らかになった。hnRNP タンパク質の多くは造血幹細胞で構造が安定しているため、その欠損は造血幹細胞で特に重要だと予想されたが、*Hnrnpu*^{d/d}:MX1-Cre マウスの骨髄では未分化な細胞ほど欠損マウスで比率が上昇しており、むしろ分化成熟した細胞の方が欠損の影響を受けていた。しかし、分化した各血液系統でも T 細胞はあまり影響を受けておらず、細胞周期との相関があると考えられる。PISA の結果、hnRNP は複数のタンパク質で造血幹細胞における構造の安定性が異なることが示されたが、当初これは転写量が多い造血幹細胞で hnRNA が多くの pre-mRNA と結合しているからであると仮説立てていた。しかし上記の結果から、この仮説が正しいかは不明な状態となっている。特に OP-Puro を使った翻訳量の解析で差が見られていないことが大きな証拠となっている。hnRNP U の RNA への結合と、それによる構造変化が造血幹細胞の機能にとって重要である事を示す別のアプローチとして、デコイ RNA を用いた標的 RNA への結合阻害実験を行っている。既に hnRNP U タンパク質の構造を変化させるデコイ RNA の設計が完了しており、現在造血幹細胞への導入実験を行っている。

hnRNP が造血幹細胞対して担う役割として考えられる別の可能性は相分離である。hnRNP はストレス顆粒を形成するが、hnRNP U などではストレス顆粒を介さない核内メッシュ構造に関与する事が示されている¹⁸⁾。造血幹細胞では hnRNP タンパク質群が密に結合して（その結果として構造安定性が増して）相分離を厳密に制御している可能性がある。hnRNP U の免疫染色の結果、造血幹細胞と前駆細胞では異なる局在を示していることはこの仮説を支持するものである可能性がある（図 4）。現在、免疫染色による造血幹細胞の核内メッシュ構造解析を準備している。さらに *Hnrnpu*^{d/d}:Hlf-CreERT2 マウスの造血幹細胞の遺伝子発現解析を行っており、上記の仮説を裏付ける実験を行う計画となっている。

共同研究者

なし

引用論文

- 1) Signer R, Magee J, Salic A, et al. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*. 2014. 509:49–54.
- 2) Mihařada K, Sigurdsson V, Karlsson S. Dppa5 improves hematopoietic stem cell activity by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Rep*. 2014. 7:1381-1392.
- 3) Sigurdsson V, Takei H, Soboleva S, et al. Bile acids protect expanding hematopoietic stem cells from unfolded protein stress in fetal liver. *Cell Stem Cell*. 2016. 18:522-532.
- 4) Sigurdsson V, Haga Y, Takei H, et al. Induction of blood-circulating bile acids supports recovery from myelosuppressive chemotherapy. *Blood Adv*. 2020. 4:1833-1843.
- 5) Koide S, Sigurdsson V, Radulovic V, et al. CD244 expression represents functional decline of murine hematopoietic stem cells after *in vitro* culture. *iScience*. 2021. 25:103603.
- 6) Mansell E, Sigurdsson V, Deltcheva E, et al. Mitochondrial potentiation ameliorates age-related heterogeneity in hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2021. 28:241-256.
- 7) Gaetani M, Sabatier P, Saei AA, et al. Proteome integral solubility alteration: a high-

- throughput proteomics assay for target deconvolution. *J Proteome Res.* 2019. 18:4027-4037.
- 8) Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016. 135:851-867.
 - 9) Protter DSW and Parker R. Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol.* 2016. 26:668-679.
 - 10) Wall ML, Bera A, Wong FK, et al. Cellular stress orchestrates the localization of hnRNP H to stress granules. *Exp Cell Res.* 2020. 394:112111.
 - 11) Gareau C, Fournier MJ, Filion C, et al. p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis. *PLoS One.* 2011. 6:e20254.
 - 12) Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, et al. Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol.* 2013. 33:815-829.
 - 13) Yokomizo T, Watanabe N, Umemoto T, et al. Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythro-myeloid progenitors. *J Exp Med.* 2019. 216:1599-1614.
 - 14) Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y, et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. *Nat Commun.* 2018. 9:619.
 - 15) Umemoto T, Hashimoto M, Matsumura T, Ishizu AN, Suda T. Ca²⁺-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2018. 215:2097-2113.
 - 16) Roshon MJ and Ruley HE. Hypomorphic mutation in hnRNP U results in post-implantation lethality. *Transgenic Res.* 2005. 14:179-192.
 - 17) Alvarez-Dominguez JR, Knoll M, Gromatzky AA, et al. The super-enhancer-derived alncRNA-EC7/Bloodline potentiates red blood cell development in trans. *Cell Rep.* 2017. 19:2503-2514.
 - 18) Nozawa RS, Boteva L, Soares DC, et al. SAF-A regulates interphase chromosome structure through oligomerization with chromatin-associated RNAs. *Cell.* 2017. 169:1214-1227.

助成研究に関連した発表論文

該当無し