助成番号　210376

５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	タンパク質の構造変化から紐解く造血幹細胞の幹細胞性維持機構		
研究テーマ（英文）	Unraveling novel mechanisms for hematopoietic stem cell maintenance through protein conformational analysis		
研究期間	2021 年 ～ 2023 年	研究機関名　熊本大学	
研究代表者	氏名（漢字）	三原田賢一	
	氏名（カタカナ）	ミハラダケンイチ	
	氏名（英文）	MIHARADA, Kenichi	
	所属機関・職名	熊本大学国際先端医学研究機構・特別招聘教授	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】（P3）に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

全血球細胞の源である造血幹細胞は、タンパク質合成量は低いが転写量は高いことがわかっている。しかし、どのように豊富な RNA をタンパク質に翻訳せず保持しているかは不明である。我々は細胞間で構造の異なるタンパク質を網羅的に比較する Protein Integral Solubility Alterations（PISA）法を用いて、複数のヘテロ核リボ核タンパク質（hnRNP）の構造が造血幹細胞と下流の前駆細胞等で異なっていることを発見した。hnRNP は未成熟な 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。そこで本研究では hnRNP が「ゲートキーパー」として造血幹細胞における翻訳制御の中枢として機能していると仮説立て、その役割を明らかにすることを目的とした。

まず、hnRNP がどのような RNA に結合しているかを調べるため、RNA immunoprecipitation（RIP）を実施した。通常 RIP を行うには $1x10^6$ 個以上の細胞が必要とされており、希少細胞である造血幹細胞を必要分準備することは現実的ではない。そこで造血幹細胞様細胞株である A-6 細胞を用いて予備実験を行ったが、$1x10^4$ 個まで減らすと選択的な沈降が認められなくなった。この結果より、通常の RIP では造血幹細胞を対象にすることは難しいと考えられた。現在、代替法としてリコンビナント hnRNP U タンパク質と hnRNP U の認識配列を模したデコイ RNA を結合させた複合体をダミーRNP として用いる新たな RIP 手法を開発中である。

次に、*Hnrnpu*-flox マウスを入手し、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）では雌がほとんど出生せず、雄マウスのみが得られた。さらに、*Hnrnpu*$^{flox/flox}$:Vav-Cre（ホモ欠損）では雌雄問わず生産仔がほとんど得られなかった。造血幹細胞の欠損は即胎性致死にならないため、おそらく赤血球系細胞の異常があると考えられる。また、雌雄でタンパク質の翻訳量に違いがある可能性が考えられる。現在 *Hnrnpu*$^{flox/flox}$;MX1-Cre マウス（誘導型ホモ欠損）を作製しており、作出でき次第タンパク質合成量の違いや造血幹細胞の機能を移植およびコロニー形成法により解析する。

さらに、hnRNP U と標的 RNA の結合を阻害すると造血幹細胞にどのような異常が生じるかを調べるため、hnRNP U の認識配列をタンデムに結合した「デコイ RNA」を搭載した shRNA 発現用のレンチウィルスベクターを造血幹細胞に感染させ、レシピエントマウスに移植を行い、機能を解析する。ベクターは既に完成済みであり、移植実験の計画を立てている。本実験は遺伝子「欠損」ではなく、hnRNP U の RNA 結合を阻害するという「機能喪失」の系のため、欠損マウスとは補完的な意味がある。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）
Hematopoietic stem cells (HSCs) are known to have a low protein synthesis level while the transcription level is higher than of their progenies. It is however unknown how HSCs attenuate the translation and keep abundant untranslated RNA. We utilized thermal proteomes approach to identify proteins whose conformations are different between HSCs and progenitor cells, and found that heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) are uniquely stable in HSCs. hnRNPs bind to immature mRNA (pre-mRNA) and limit their splicing and translation. Therefore, we hypothesized that hnRNP functions as a gatekeeper of the translation in HSCs. We acquired *Hnrnpu*-flox mice which were then crossed with Vav-Cre mice in order to generate blood cell-specific hnRNP U deficient mice. Surprisingly, we did not obtain any female heterozygous knockout mice. Furthermore, homozygous knockout mice were not born at all. It is presumed that this is due to abnormality in their erythropoiesis, but not in HSC functions. To further study, we are establishing an inducible deletion mode by crossing *Hnrnpu*-flox mice and MX1-Cre mice. We are also trying to block the binding of hnRNP U protein to its target RNAs by overexpressing recognition RNA sequence (decoy RNA) using lentiviral vectors. This can be a compensatory mode since it does not involve gene deletion, but inhibiting the function. To identify target RNA bound by hnRNP U protein, we are trying to perform RNA immunoprecipitation (RIP) using anti-hnRNP U antibody. However, a standard method usually requires > $1x10^6$ cells, preparing which is quite challenging for HSCs. Although we tested the method using $1x10^4$, specific enrichment was not confirmed. Currently we are developing a new RIP method using a complex of decoy RNA and recombinant hnRNP U.