

# モノユビキチン化を介した MDS 関連クロマチンタンパク質の機能制御

宮城 聡

島根大学医学部 生化学講座

## 【研究の背景】

マウスモデルでの *Tet2*, *Dnmt3a* 等のクロマチンタンパク質の欠損は造血幹細胞 (HSC) の機能亢進を引き起こす。一方、これらの遺伝子の体細胞変異はクローン性造血・骨髄異形性症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS) の発症に中心的な役割を果たす。*PHF6* 遺伝子はクロマチンタンパク質をコードし、MDS、二次性骨髄球性白血病や T 細胞性白血病 (T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia; T-ALL) で体細胞変異が報告されている<sup>1)</sup>。我々は、*PHF6* が造血ストレス時に HSC の機能抑制に働くことを報告した。分子レベルでは、*PHF6* がシグナル依存的に TNF  $\alpha$  経路のエフェクタータンパク質群 (*Nr4a1*, *Egr1*, *Junb* 等のガン抑制遺伝子) を転写活性化し、HSC の増殖を抑制する。このため、*Phf6*<sup>-/-</sup>HSC は TNF  $\alpha$  に対する抵抗性と骨髄移植における競合優位性を獲得する (Miyagi et al., *Blood*, 2019)。マウスモデルでは、*Phf6* 欠損は活性型 *NOTCH1* 等で誘導される T-ALL の発症を促進する<sup>2)</sup>。従って、HSC は *PHF6* 変異により老化・炎症骨髄環境への fitness を獲得し、二次的遺伝子変異により造血器腫瘍を発症すると考えられる。しかし、*PHF6* の TNF  $\alpha$  依存的な標的遺伝子座へのリクルート機構は不明である。この点を明らかにするため、申請者は *PHF6* の会合分子を BioID 法により探索し、Pleckstrin Homology Domain Interacting Protein (PHIP) を同定した。

## 【目 的】

Cullin-RING ubiquitin ligase complex 4 (CRL4c) は、CUL4A/B、RBX1、DDB1 の 3 つのサブユニットから構成され、このコア複合体に基質受容体が結合し基質認識を行う。PHIP は基質受容体の 1 つである (この CRLc を CRL4c<sup>PHIP</sup> と表記する)<sup>3)</sup>。中川らは、HSC の制御因子である TET2 のクロマチンへの結合が、CRL4c<sup>VprBP</sup> によるモノユビキチン化により制御され、造血器腫瘍で見つかる *TET2*<sup>K1209</sup> 変異がモノユビキチン化欠損変異であることを報告している<sup>4)</sup>。これまでに、申請者は、BioID で PHIP に加えて、ユビキチン鎖が高度に濃縮されることを見出した。CRL4c の活性は TNF  $\alpha$  により誘導されることが報告されている<sup>5)</sup>。一方で、クローン性造血で *PHIP* 遺伝子の体細胞変異が報告されている<sup>6)</sup>。これらの背景から「TNF  $\alpha$  シグナルで活性化された CRL4c<sup>PHIP</sup> により *PHF6* がモノユビキチン化され、標的遺伝子座にリクルートされる」とのモデルを構築した。本研究では、(I) *PHF6* の TNF  $\alpha$  依存的な機能発現機構を明らかにすること、(II) CRL4c<sup>PHIP</sup> の正常造血・造血器腫瘍における役割を明らかにすることを目的とする。以上の解析を通じて、*PHF6* の翻訳後修飾を介したストレス造血の制御機構 (特に、HSC の加齢・炎症骨髄環境への適応機構) を解明する。

## 【方 法】

### (I) *PHF6* の TNF $\alpha$ 依存的な機能発現機構

TNF  $\alpha$  処理および未処理の K562 細胞 (コントロールと *PHIP* ノックアウト) より K- $\epsilon$ -GG 抗体を用いてユビキチン化ペプチドを濃縮後、質量分析によりユビキチン化タンパク質を同定した。

### (II) CRL4c<sup>PHIP</sup> の造血における役割

造血細胞特異的な *Phip* 遺伝子のノックアウトマウス (*Vav1-Cre; Phip*<sup>f/f</sup>) を作成し、若齢および加齢期に造血組織の解析を行った。さらに、競合的骨髄移植実験を行い、HSC の骨髄再構築能を検討した。

## 【結 果】

### (I) PHF6 の TNF $\alpha$ 依存的な機能発現機構

質量分析により、CRL4c<sup>PHIP</sup> によりユビキチン化されるタンパク質、TNF  $\alpha$  依存的なユビキチン化タンパク質を網羅的に同定した。しかし、PHF6 に由来するユビキチン化タンパク質は同定出来なかった。

### (II) CRL4c<sup>PHIP</sup> の造血における役割

*Vav1-Cre; Phip<sup>fl/fl</sup>* は、加齢とともに造血幹・前駆細胞の増幅と脾腫、血小板低下を引き起こした。また、予備的な競合的骨髄移植実験から、*Phip* 欠損はオス由来の HSC に競合優位性を付与するものの、メスでは明らかな表現系を示さなかった。

## 【考 察】

*Vav1-Cre; Phip<sup>fl/fl</sup>* で観察された表現系(造血幹・前駆細胞の増幅、脾腫、血小板低下)は、我々およびに海外のグループ<sup>7)</sup>が報告した *Phf6* コンディショナルノックアウトマウスの表現系と一致する。この結果は、両因子の遺伝的相互作用を示すデータであり、我々のモデルを支持する。しかし、K562 細胞を用いた質量分析では PHF6 のユビキチン化は検出されないことから、ユビキチン化修飾が標的へのリクルートに関わるとは考え難い。この点に関して、最近、PHIP がアダプターとして機能し、PHF6 をクロマチンヘリクルートすることが示された<sup>8)</sup>。従って、PHIP は CRL4c の酵素活性に依存せずに機能すると考えられる。今後、*Phip<sup>Δ/Δ</sup>*HSC での PHF6 のクロマチン上での局在を検討する必要がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の成果は、HSC 制御、クローン性造血や MDS の発症機構の解明に繋がる。さらに、*TET2<sup>K1299</sup>* 変異の例のように、個々の遺伝子変異のガン化における役割を理解するために必須の知見を提供する。また、MDS の発症頻度は、女性と比較し、男性で高いことが知られており、*Phip* 機能の性差は MDS の発症機構を考える上で興味深い知見である。

## 【参考・引用文献】

1. Miyagi (2020) *Curr. Opin. Hematol.*;
2. Wendorff (2019) *Cancer Discov.*;
3. Jang (2020) *Nature comm.*;
4. Nakagawa (2015) *Mol. Cell.*;
5. Zhang (2018) *Mol. Oncol.*
6. Bernstein (2024) *Nature Genet.*;
7. Hsu (2019) *Blood Adv.*;
8. Pawar (2024) *bioRxiv.*