

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791261
 研究課題名（和文） 網膜色素上皮細胞の形態形成・維持における転写因子 T e a d 1 の機能解析
 研究課題名（英文） Role of TEAD1 in the proliferation of retinal pigment epithelial cells
 研究代表者
 北川 道憲 （KITAGAWA MICHINORI）
 熊本大学・発生医学研究所・助教
 研究者番号：30314496

研究成果の概要(和文)：

Tead 転写因子ファミリーは組織分化・器官形成に重要な役割を果たす事が知られている。網膜色素上皮変性疾患である Sveinsson 脈絡網膜萎縮症の患者に見出された TEAD1 の点変異は、その転写活性を低下させる。本研究は、マウスをモデルとして、ヒト TEAD1 の点変異に相当する変異をマウス Tead1 へ導入し、網膜色素上皮細胞においてその発現を薬剤依存的に制御することによって、網膜色素上皮細胞の形態維持における変異型 Tead1 の機能およびその標的候補遺伝子を明らかにした。変異型 Tead1 は、標的遺伝子の転写を抑制し、網膜色素上皮細胞の増殖を抑える事が考察される。

研究成果の概要(英文)：

The TEAD family of transcription factors is a key factor in regulating cell proliferation and organ size via Hippo signaling pathway. Recent studies have revealed that a missense mutation in human TEAD1 is genetically linked to Sveinsson's chorioretinal atrophy (SCRA). To clarify the molecular mechanisms, we established a tetracycline-inducible cell line which can express the mutant protein by adding tetracycline. The induction of missense mutation reduced the expression of a CTGF promoter-driven reporter gene. In fact, the mutation also abolished the transcriptional activity of the reporter gene under the co-expression of YAP or TAZ, suggesting the mutant act as a dominant-negative form on the transcriptional activity of Tead1. These results suggest that the mutant Tead1 repress the expression of Tead1 target genes and the proliferation of retinal pigment epithelial cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・眼科学

キーワード:眼発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

Tead ファミリーを含めた TEA モチーフを有する転写因子は、様々な種において組織分化・器官形成に重要な役割を果たす事が知られている。常染色体優性の網膜色素上皮変性疾患である Sveinsson 脈絡網膜萎縮症(SCRA)の患者に見出されたヒト TEAD1 のミスセンス変異は、その転写活性を低下させることが明らかとなった。本研究は、マウスをモデルとして、ヒト TEAD1 のミスセンス変異に相当する変異をマウス Tead1 へ導入し、網膜色素上皮細胞においてその発現を薬剤依存的に制御することによって網膜色素上皮細胞の形態維持における変異型 Tead1 の機能およびその標的候補遺伝子を明らかにすることを目的とする

2. 研究の目的

TEA モチーフはヒト TEF-1(TEAD1)・出芽酵母 TEC1・麹菌 AbaA の間において高く保存されていることから見出された DNA 結合領域の1つで、これまでに酵母からヒトに至る多くの種において TEA モチーフを有する転写因子の存在が確認されている。出芽酵母 TEC1 は窒素源飢餓状態における偽菌糸形成に必須であり、細胞壁構成蛋白質 Flo11 の発現を制御することが知られている。線虫の TEA モチーフをコードする遺伝子 Egl-44 は陰門における運動神経ニューロンの分化を制御し、その変異株は産卵不良の表現型を示す。ショウジョウバエの TEA モチーフをコードする遺伝子 Scalloped は翅の形態形成に異常を示す変異株から同定された遺伝子であるが、味覚・化学受容器の形成にも関与することが知られている。このように、TEA モチーフを有する転写因子は、それぞれの種において組織分化や器官形成に重要な役割を果たしている。脊椎動物の各種においては TEA モチーフをコードする遺伝子が複数存在することが明らかとなっており、総称して Tead ファミリーと呼ばれている。ヒト・マウスにおいては、それぞれ4つの遺伝子が存在し、ヒトホモログは TEAD1/2/3/4、マウスホモログは Tead1/2/3/4 と称されている。アミノ酸配列は遺伝子間で高く保存されており、それぞれ N 末端側に TEA モチーフを持ち、結合する DNA 塩基配列に大きな差異は見出されていない。マウスにおいて、それぞれの発現する組織分布は広範囲に及び、重複して発現する組織も存在するが、発生段階や一部の組織においては差異が見られることから、Tead ファミリー内での機能的差異に着目して現在まで研究が進められている。TEAD1/Tead1 はヒト・マウスをモデルとして Tead ファミリーの中で最も解析が進められている遺伝

子である。マウス Tead1 はジーントラップによる遺伝子破壊で胎生期における心臓形成異常を起こし胎生致死となることが知られているが、胎生期や成体にかけて心臓以外の広範囲な組織にも発現が確認されることから、他の組織においても何らかの機能を持つことが推測されていた。一方、ヒトにおいては、Sveinsson 脈絡網膜萎縮症(SCRA)の連鎖解析から、患者の TEAD1 遺伝子内にミスセンス変異が1つ存在することが最近報告された。SCRA はアイスランドの一部の家系において見出された常染色体優性遺伝病で、幼少期において視神経乳頭周囲部分より網膜色素上皮細胞層の裂開が生じ、損傷部位における脈絡網膜の萎縮を伴って視力を失う疾患である。脈絡網膜の形成は網膜色素上皮細胞層に依存することから、何らかの原因で網膜色素上皮細胞層の裂開が生じ、損傷部位の拡大に伴って脈絡網膜が萎縮するというモデルが提唱されているが、詳細な発症機序は現在のところ不明である。

これまでの生化学的・分子生物学的解析から、TEAD1 は N 末端側の TEA モチーフによって DNA へ結合し、C 末端側領域に幾つかの転写共役因子が相互作用することによってその転写活性が制御されていることが知られているが、SCRA の患者に見出されたミスセンス変異は C 末端側領域内に位置していたことから、そのミスセンス変異が TEAD1 の転写活性に影響を及ぼすことが推測された。私はこれまでに、SCRA に見出された TEAD1 のミスセンス変異に相当する変異をマウス Tead1 へ導入し、その転写因子としての機能に対する影響について解析を行ってきた。その結果、Tead1 のミスセンス変異体は、DNA 結合能は失わないものの、転写共役因子として知られている YAP, TAZ との結合能を失い、培養細胞内における転写活性が低下することが明らかとなった。また、Tead1, YAP, TAZ の発現は、成体マウスの網膜においてはほとんど確認されないものの、胎生期後期においては網膜色素上皮細胞層に確認されている(未発表データ)。したがって、SCRA に見出された TEAD1 のミスセンス変異は、TEAD1 の転写因子としての機能喪失をもたらす、あるいはその変異体がドミナントネガティブに働くことによって、その標的遺伝子の発現を低下させ、網膜色素上皮細胞層の形態形成異常につながると予想される。最近の報告では、培養心筋細胞のマイクロアレイ解析により、p38 MAPK を介して発現制御を受けている複数の細胞外マトリックス構成因子や細胞間接着因子の遺伝子が共通して Tead ファミリーの DNA 結合領域を有することが明らかになり、その組織構造維持への関与が示唆されている。実際に Tead1 破壊マウスでは心

室壁の薄層化が観察されていることと合わせて考えると、TEAD1 は網膜色素上皮細胞層においても何らかの細胞外マトリックス構成因子・細胞間接着因子の発現を制御している可能性がある。

そこで、本研究では、テトラサイクリン等の薬剤依存的に変異型マウス Tead1 の発現を制御できる培養系網膜色素上皮細胞株を樹立し、その発現の有無による網膜色素上皮細胞の形態維持・細胞間接着の変化を検討する。さらに蛋白質ディフレンシャル解析・cDNA マイクロアレイ解析等によりその標的候補遺伝子を探索・同定することによって、SCRA の発症機序と網膜色素上皮細胞層の形態維持における Tead1 の役割を明らかにすることを目的としている。

転写因子 Tead ファミリーの DNA 結合領域である TEA モチーフは非常に高く保存されており、その共通結合配列を発現制御領域に有する遺伝子が標的候補遺伝子としてこれまでに幾つか挙げられているが、実際に Tead ファミリー遺伝子の機能を欠損した個体あるいは細胞の表現型を裏付ける標的候補遺伝子の報告は未だなされていない。網膜色素上皮細胞をモデルとして Tead1 の標的遺伝子を解明することは Tead ファミリーの機能を明らかにする上でも意義深いものであると考えられる。また、網膜色素上皮細胞層の形成あるいは形態維持における Tead1 の役割を明らかにすることは、網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などの網膜色素上皮細胞層の変性に起因する疾患の機序解明や治療方法確立の一助となることが予想される。

3. 研究の方法

変異型 Tead1 のテトラサイクリン誘導発現可能な網膜色素上皮細胞株の樹立

解析に用いる網膜色素上皮細胞株としては、これまで広く解析に用いられているラット網膜色素上皮由来細胞 RPE-J を使用する予定であるが、胎生期の網膜層構造形成過程に相当する網膜色素上皮細胞の分化過程についても解析を試みたい。近年、マウス ES 細胞を神経細胞へと分化させる手法の一つである SDIA 法において、一部の細胞が網膜色素上皮細胞へ分化することが報告されている。さらに、Cre-loxP システムにより簡易にテトラサイクリン誘導系の外来遺伝子を導入できるマウス ES 細胞株 EBRTcH3 が理化学研究所から提供されており、当細胞から目的の細胞株を樹立すれば、SDIA 法による網膜色素上皮細胞への分化過程における変異型 Tead1 の機能解析が可能であると考えられる。変異型 Tead1 はヒト SCRA 患者の TEAD1 遺伝子内に見出されたミスセンス変異に相当する変異をマウス Tead1 へ導入したもので、転写活性の低下は既に確認されている。SCRA 患者では野生型と変異型 Tead1 が同量発現して混在し

ていると考えられるが、変異型 Tead1 がドミナントネガティブに作用しているならば、網膜色素上皮細胞系において変異型 Tead1 を内在性 Tead1 より過剰に発現すればその作用は強く現れると予想される。RPE-J 細胞については、テトラサイクリン制御性転写活性化因子 tTA を恒常的に発現する細胞株を作成し、さらに変異型 Tead1 のテトラサイクリン誘導系発現ベクターを導入することによって目的の細胞株を樹立する。EBRTcH3 細胞については細胞株樹立者によってテトラサイクリン誘導系発現ベクターが提供されており、これに変異型 Tead1 を組み込み、Cre-loxP による組換えで目的の細胞株を樹立する。変異型 Tead1 の発現誘導はウェスタンブロット解析と転写活性解析により確認する。抗 Tead1 抗体はすでに作成されているが、内在性 Tead1 による区別が困難な場合が想定されるので、その際には導入する変異型 Tead1 にタグペプチドを付加することにより解決できる。転写活性の測定は、Tead ファミリーの共通結合配列として知られている GTTlc エLEMENT を介したレポーターアッセイにより行う。

変異型 Tead1 発現誘導下における網膜色素上皮細胞の機能解析

EBRTcH3 細胞から樹立した変異型 Tead1 発現誘導細胞株については、SDIA 法による網膜色素上皮細胞への分化過程における変異型 Tead1 の機能解析を行う。通常、SDIA 法によって ES 細胞が網膜色素上皮細胞へ分化するには約 3 週間の培養期間を要するとされている。その過程において、時間差をつけて変異型 Tead1 の発現を誘導し、網膜色素上皮細胞へ分化するコロニーの割合・各コロニーの増殖速度・細胞形態などを解析する。分化誘導された網膜色素上皮細胞は密接した敷石状の多角形細胞を呈することで他の神経細胞と判別できるが、さらに網膜色素上皮細胞のマーカー遺伝子 Pax6, RPE65, TIMP3 等の発現でその分化を確認する。

EBRTcH3 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞と RPE-J 細胞から樹立した変異型 Tead1 発現誘導細胞株については以下の解析を行う。網膜色素上皮細胞としての正常な細胞間接着を、アクチン束・タイトジャンクション構成蛋白質 ZO-1 の発現を免疫染色することにより確認し、集密単層状態において変異型 Tead1 の発現を誘導させた時の構造変化を観察する。さらにタイトジャンクション形成に及ぼす影響は、ニトロセルロース膜上に単層培養した当細胞の経上皮電気抵抗値を測定する事により検証できる。また、細胞塊の各種プロテアーゼ、キレート剤の処理による細胞の剥離形態・細胞単位に分散した状態での増殖形態を変異型 Tead1 発現誘導の有無について比較検討し、細胞間接着に対する変異型 Tead1 の影響を検証する。

次に、これらの細胞株を用いて変異型 Tead1

の標的候補遺伝子の探索を行う。変異型 Tead1 の発現誘導によって発現量の変動する遺伝子群を効率良く検出する為には、上記解析における細胞の表現型によってその解析手法を選択することが重要であると考え。変異型 Tead1 の発現の有無によって網膜色素上皮細胞の細胞形態や細胞間接着などに顕著な変化が見出されている場合、細胞外マトリックス構成因子・膜蛋白質等に注目して蛋白質を抽出し、二次元電気泳動によるディファレンス解析によって形態形成に最も大きく作用している蛋白質を探索・同定することが有効であると考え。その場合、無血清培地での培養や分泌蛋白質・膜蛋白質の分離・濃縮・精製等の工夫が必要である。反対に、変異型 Tead1 の発現の有無によってその表現型に差異が認められない場合、細胞分画による蛋白質の絞込みとその発現量の差異を検出することは困難であると考えられる。したがって、cDNA マイクロアレイ解析や PCR サブトラクションなどによって標的候補遺伝子を mRNA レベルで網羅的に探索する必要がある。

4. 研究成果

初年度は、テトラサイクリンにより外来的に変異型 Tead1 の発現誘導が可能な網膜色素上皮細胞株の樹立を試みた。変異型 Tead1 がラット網膜色素上皮細胞株 RPE-J において誘導可能であることは蛋白質レベルで確認されたが、ES 細胞株からの樹立は現段階で困難である。一方、Tead1 がその転写共役因子 YAP と協調して、分泌蛋白質 CTGF を直接の標的遺伝子とし、その発現を制御しているとの報告があった。そこで、培養細胞において CTGF プロモーターの転写活性をレポーターアッセイにより測定したところ、Tead1 と YAP の共発現で転写活性が上昇し、変異型 Tead1 では上昇が抑えられた。以上の結果から、網膜色素上皮細胞においても、Tead1 は CTGF を標的遺伝子の 1 つとして発現制御していると考えられる。次年度は、テトラサイクリンにより外来的に変異型 Tead1 の発現誘導が可能な網膜色素上皮細胞株を利用して、内在性 Tead1 の転写抑制・細胞増殖に及ぼす影響を検討した。標的候補遺伝子である CTGF のプロモーター領域下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターベクターに対し、外来的に変異型 Tead1 を発現すると、CTGF の転写活性は抑制された。これは変異型 Tead1 がドミナントネガティブに働く事を示している。さらに、変異型 Tead1 の発現は、細胞増殖を抑制する事も明らかとなった。以上の結果から、変異型 Tead1 は、標的遺伝子の転写を抑制し、細胞増殖を抑える事が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(雑誌論文)(計1件)

Kitagawa M, Era T. Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells. Int. J. Hematol. 査読有 2010 in press

(学会発表)(計4件)

Kitagawa M Role of TEAD1 in the proliferation of retinal pigment cells. The Kumamoto University Global COE International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Stem cells and organogenesis" 2009 年 11 月 27 日 熊本大学発生医学研究所

北川道憲、江良沢実 網膜色素上皮細胞の増殖における転写因子 Tead1 の機能解析 第 6 回 宮崎サイエンスキャンプ 2010 年 2 月 26-28 日 ワールドコンベンションセンターサミット宮崎

Kitagawa M, Era T Role of TEAD1 in the proliferation of retinal pigment-cell progenitors 第 7 回 幹細胞シンポジウム 2009 年 5 月 15-16 日 東京・泉ガーデンギャラリー

北川道憲、江良沢実 網膜色素上皮細胞の増殖における Tead1 の機能解析 第 9 回 日本分子生物学会 春季シンポジウム 2009 年 5 月 10-12 日 宮崎・シーガイア ワールドコンベンションセンターサミット

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 道憲(KITAGAWA MICHINORI)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号:30314496

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし