

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：37116
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790335
 研究課題名（和文）
 血球分化マスターレギュレーター転写因子によるエピジェネティック転写調節機構の解明
 研究課題名（英文）
 Epigenetic transcriptional master regulator for hematopoietic cell differentiation
 研究代表者
 鈴木光浩（SUZUKI MITSUHIRO）
 産業医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00321662

研究成果の概要（和文）：転写因子 PU.1 は造血幹細胞から各種血液細胞への分化進行決定に重要な役割を果たしており、その標的遺伝子の発現調節機構は PU.1 と他の転写因子・転写共役因子とのクロストークおよび PU.1 自身の修飾により制御されている。PU.1 タンパク質中の被アセチル化・被リン酸化部位の解析については不明な点が多く残されている。本研究では詳細な PU.1 による転写調節機構の選択性について解析を行い、以下の2点を明らかにした。

- 1) PU.1 の修飾状態と転写共役因子との結合による転写調節の相関性
- 2) PU.1 により「正」・「負」に調節される標的遺伝子と PU.1 の被修飾状態との関連性

研究成果の概要（英文）：Transcription factor PU.1 is a hematopoietic master regulator and essential for the development of myeloid and B-cell lineages. PU.1 functions in concert with other transcription factors and cofactors. As we shown previously represented, PU.1 interact with both p300/cbp, which function as a coactivator and HDAC, which function as a corepressor. In this study, to determine whether modification of PU.1 is responsible for switching its association between coactivator and corepressor, we examined whether acetylation regulates the physical and functional activities of PU.1. We found that PU.1 was acetylated in vivo and its repressor activity was reduced when the putative acetylation motif in ETS domain were mutated. Our data suggest that acetylation might regulate the biological functions in erythroid cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：エピジェネティクス、

キーワード：血球分化、転写調節、発生・分化、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞から各種血液細胞への分化には多くのサイトカインや転写因子の発現の量・順列・組み合わせが重要なファクターとなっている。さらに転写因子同士の複合体形成や相互作用（クロストーク）により発現調節が行われていることが多くの研究より明らかとなってきている。また近年のポストゲノム研究の進展により、多くの分化関連遺伝子はそのゲノム上の遺伝情報（塩基配列）のみならずゲノムを構成するヒストンの修飾やDNAのメチル化といったエピジェネティック制御機構の関与が示唆されるようになった。Etsファミリー転写因子PU.1は、5'-GAGGAA/T-3'の塩基配列をもつDNAへの結合能を持ち、GM-CSFレセプター、M-CSFレセプター、免疫グロブリンH鎖・L鎖、IL-7レセプターなどの遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域に特異的に結合することによりこれらの遺伝子発現を調節し、骨髄単球系細胞およびB細胞の増殖・分化調節を司る転写因子として重要な役割を果たす血球細胞分化の重要なマスターレギュレーターである。PU.1を欠損させたPU.1^{-/-}マウスで胎生17日目以降に致死となることが、またその胎児では正常な単球系細胞・B細胞の発現が全く認められないことが報告され、上記の結果を支持するものとなった。このようにPU.1は造血細胞の分化に重要な役割を果たしているが、PU.1標的遺伝子群の発現調節機構とその分子機序については従来ほとんど研究がなされていない。

申請者はPU.1と他の転写因子との複合体形成におけるクロストークを解明する一端としてPU.1との複合体の構成成分の単離・同定を試みメチル化DNA（CpG配列）に特異的に結合し転写を負に調節する転写調節因子、MeCP2がPU.1と相互作用するタンパク群の1

つであることを報告した（Suzuki et al. *Oncogene* 22, 8688-8698, 2003）。さらにPU.1はDNAメチル基転移酵素DNMT(Dnmt3a/b)と複合体を形成することでプロモーター領域のCpGアイランドをメチル化し転写抑制に関与していることまたその標的遺伝子として細胞周期関連遺伝子であるp16INK4Aがあげられることを報告した（Suzuki et al. *Oncogene*, 25, 2477-2488, 2006）。これらの知見よりPU.1による転写抑制は、従来申請者らが示してきたCBPやHDAC1といった転写共役因子群との相互作用によるヒストンのアセチル化・脱アセチル化によるクロマチン構造の変化だけでなくプロモーター領域のメチル化制御というエピジェネティックな制御機構が重要な要因のひとつであることを新たに提示した。

さらに、このPU.1の転写共役因子群との結合にはPU.1自身の修飾により嗜好性が存在することを見出している（Kihara-Negishi et al. *Impaired repressor activity and biological functions of PU.1 in MEL cells induced by mutations in the acetylation motifs within the ETS domain*. *BBRC* 335, 337-343, 2005）。現在、PU.1が修飾される領域およびPU.1を修飾しているタンパク質の同定を行っており、ETSファミリー転写因子間で保存されたETSドメイン内の12カ所のリジン残基の内、2カ所がp300によりアセチル化され、標的遺伝子の転写昂進に寄与していることを明らかにしている。

また、造血幹細胞からリンパ球系前駆細胞・骨髄単球系前駆細胞への分化においてPU.1標的遺伝子、IL-7R^β遺伝子のプロモーター上のCpGのメチル化状態の変化とその遺伝子発現量に一定の相関性があることを明らかにしている。

2. 研究の目的

上述の研究背景・成果により、PU.1 の標的遺伝子群には昂進：「正」または抑制：「負」に調節されるものに分かれ、その調節機構は PU.1 と結合する他の転写因子と転写共役因子群によりジェネティック・エピジェネティック両機構にて変化すると考えられる。しかしながら PU.1 と転写共役因子群とのクロストークの選択のメカニズムについてその全容が解明されたワケではなく、むしろ多数の転写因子、転写共役因子間のクロストークと種々の標的遺伝子に対する転写調節機構についての研究報告がなされたことで PU.1 自身もつ本質的な機能とその詳細は不明の状態である。

本研究では PU.1 による血液細胞の調節機構の解明を目指し、次の点を重点的に研究する。

(1) 造血幹細胞から骨髄単球系細胞・B 細胞への分化における PU.1 の修飾状態と転写共役因子群との結合の関連性の解析、修飾調節をしているシグナル伝達経路の同定を行なう。

(2) PU.1 と結合し相互作用する新規因子の同定を行なう。

(3) マウス骨髄細胞より造血幹細胞を純化し各分化進行段階において PU.1 の質的・量的な変化が標的遺伝子の転写調節領域のヒストンのアセチル化状態・CpG 領域のメチル化状態にどのような変化を与えるのかを個々に解析することでより高次の転写調節機構の知見を得る。

3. 研究の方法

転写因子 PU.1 の転写共役因子との結合様式の相違が PU.1 の修飾状況に変化を与える。その結果、標的遺伝子プロモーター領域の DNA のメチル化、ヒストンアセチル化状態を調節していることが血球細胞分化を制御し

ていると推察される。この仮説を明らかとするために PU.1 の修飾様式・PU.1 結合パートナーの同定と両者の結合の方法について分子生物学／生化学的手法を用いて解析を行う。さらに、得られた知見からバイオインフォマティック的手法を用いて、血球細胞分化時に働く PU.1 転写因子の新たな機能の解明を目指した。

4. 研究成果

具体的な方法として以下の解析を行い、以下(1)、(2)の成果を得た。

造血幹細胞から骨髄単球系細胞・B 細胞への分化における PU.1 の修飾状態と転写共役因子群との結合の関連性の解析、修飾調節をしているシグナル伝達経路の同定を行なった。PU.1 と結合し相互作用する新規因子の同定を行なった。

マウス骨髄細胞より造血幹細胞を純化し各分化進行段階において PU.1 の質的・量的な変化が標的遺伝子の転写調節領域のヒストンのアセチル化状態・CpG 領域のメチル化状態にどのような変化を与えるのかを個々に解析することでより高次の転写調節機構の知見を得る。

(1) PU.1 の修飾状態と転写共役因子との結合による転写調節の相関性

PU.1 の ETS ドメインに存在する 12 箇所の被アセチル化と PEST ドメインに存在する 6 箇所のリン酸化部位の修飾状態と転写共役因子群との結合の嗜好性変化の相関性を明らかにするため PU.1 の被修飾部位と推測される箇所にそれぞれ置換変異を導入した変異体を作製し、Cbp/p300 もしくは mSin3A-HDAC1 複合体との結合の強さを pulldown 法、two-hybrid 法を用いて解析を行った。その結果、PU.1 の 208a. a. に存在

するリジン残基が CBP との結合に、206, 244-249a. a. のリジン残基と 132/133a. a. のセリン残基が mSin3A への結合に必須であり、また、45a. a. のセリン残基は Cbp, mSin3A 両者の結合に必須の部位であることが明らかとなった。

(2) PU.1 により「正」・「負」に調節される標的遺伝子と PU.1 の被修飾状態との関連性

PU.1 は造血幹細胞から単球・マクロファージ系細胞への分化に必要な GM-CSFR 遺伝子やリンパ球系細胞への分化に必要な IL-7a 遺伝子の発現に重要な役割を果たしている。この PU.1 による調節が PU.1 のどの部位に修飾を受けることで行われているのかを各被修飾部位に置換を導入した PU.1 置換変異体を用いて解析を行った。その結果、上記 208, 244a. a. のリジン残基のアセチル化と 132, 133a. a. に存在するセリン残基のリン酸化が標的遺伝子の発現発現に、245-249a. a. のリジン残基のアセチル化と 45a. a. のリン酸化が転写抑制に寄与していることを明らかとした。さらに、208a. a. のリジン残基が PU.1 の DNA 結合能に寄与していることを明らかとした。

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)

Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, and Ueno H
Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. International Journal of Oncology 2012, 40: 71-79
DOI:10.3892/ijo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 光浩 (SUZUKI MITSUHIRO)

産業医科大学・医学部・生化学

研究者番号：00321662