

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 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23687024

研究課題名（和文） 転写抑制因子 ET02 による赤芽球エピゲノム形成の分子機構

研究課題名（英文） Contribution of transcriptional corepressor ET02 to the epigenome formation in erythroblasts

研究代表者

藤原 亨 (FUJIWARA TOHRU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60333796

研究成果の概要（和文）：ヒト赤芽球系細胞である K562 細胞における ET02 強制発現及びクロマチン免疫沈降法を通じて、ET02 がグロビン遺伝子をはじめとした赤血球特異的遺伝子を直接制御していることを明らかとした。さらに、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を用いた赤芽球分化系を確立し、この分化系における ET02 のノックダウンを行うことにより、同様にグロビン遺伝子の発現上昇を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of ET02 as well as chromatin immunoprecipitation analysis in K562 human erythroid cell line revealed that ET02 directly represses representative erythroid genes, including globin genes. Subsequently, we established erythroid differentiation system from cord blood CD34-positive cells. By using the system, we demonstrated that short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of ET02 in cord blood CD34-positive cell-derived primary erythroblasts resulted in the significant upregulation of globin genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞分化における遺伝子発現の調節に

は細胞系列特異的な転写因子が関与していると考えられており、このうち赤血球の分化においては、転写因子 GATA-1 が重要な役割を果たしている。

(2) GATA-1 は 2 つのジンクフィンガードメインによりゲノム上の WGATAR (W:A あるいは T, R:A あるいは G) という塩基配列を認識して結合し、各種のグロビンやヘム合成酵素、エリスロポエチン受容体などの赤血球関連遺伝子の発現を制御している。さらに GATA-1 は、Sc1/TAL1、LMO2、LDB1、ETO2 などの転写因子もしくは共役因子と複合体を形成していることが明らかとなっており、これらの因子が GATA-1 による遺伝子発現制御に影響を及ぼしていることが予想される。

(3) GATA-1 複合体の構成因子のうち非 DNA 結合蛋白質である ETO2 (MTG16) は、ETO ファミリーに属する核タンパク質で、同メンバーの蛋白質として Neryy、ETO (MTG8) と MTGR1 が知られている (Davis et al. 1998 Oncogene. 18, p1375-1383)。これまでの報告より、ETO2 はヒストン脱アセチル化酵素と SIN3 複合体の構成因子である Sin3A と相互作用しうることが報告されている (Amann et al. 2001. MCB. 21, 6470-6483)。この事実より、ETO2 は GATA-1 の標的遺伝子の発現抑制に寄与するものと予想された。そこで申請者らは、赤芽球系遺伝子の発現制御における ETO2 の機能を明らかにする目的で、マウス由来の赤芽球系細胞株である G1E-ER-GATA-1 細胞 (Welch et al. 2004. Blood. 104, p3136-3147) に対し、ETO2 特異的及び対照 siRNA 導入後の遺伝子発現プロファイルの比較をマイクロアレイ解析により検討した。その結果、ETO2 ノックダウン後に発現の変化を認めた遺伝子群のうち、GATA-1 制御下にある遺伝子のごく一部であった (Fujiwara et al. PNAS. 2010;107:20429-20434)。この結果より、GATA-1 標的遺伝子への ETO2 の関与は状況依存的 (context-dependent) であるか、ある

いは本結果は G1E-ER-GATA-1 細胞株特異的 (cell type- or system-specific) である可能性が示唆された。

マイクロアレイ解析の結果より、ETO2 ノックダウンにより最も発現上昇を認めた遺伝子は赤血球膜蛋白質をコードする *Slc4a1* 遺伝子であった。前述のように、ETO2 はヒストン脱アセチル化酵素と相互作用することがすでに報告されており、本解析でも ETO2 のノックダウン後に *Slc4a1* プロモーター領域のヒストン H3 のアセチル化が上昇した。興味深いことに、アセチル化のみならず同領域におけるヒストン H3 のリジン 27 のトリメチル化 (H3trime-K27) も赤芽球分化後の G1E-ER-GATA-1 細胞において明らかな低下を認めた。この結果より、ETO2 を介した転写抑制においては脱アセチル化を介する機序の他に、一部の GATA-1 制御下遺伝子においては H3trime-K27 を介した転写抑制機序も存在する可能性が示唆された。

本研究においては、複合体の構成因子のうち転写抑制因子として知られている ETO2 に着目し、ヒト赤芽球分化における赤血球関連遺伝子のヒストンアセチル化・メチル化を介したエピジェネティックな発現調節において、ETO2 がいかに関与するか明らかとすべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

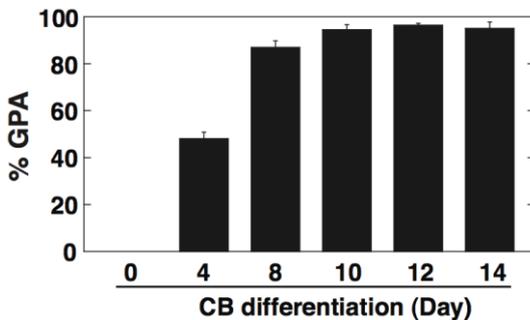
ヒト赤芽球分化における ETO2 の意義を明らかにする。特にヒト赤芽球分化におけるヒストンアセチル化・メチル化を介したエピジェネティックな発現調節機構において、ETO2 が以下に関与するかを明らかとすることを目標とする。前述のように、申請者はすでにマウス赤芽球系細胞株 (G1E-ER-GATA-1) による ETO2 の機能解析を進めてきたが、本研究においてはより正常赤芽球分化を反映しうるものと予想されるヒト CD34 陽性細胞からの赤芽球分化系における意義を明らかに

することを目指す。

3. 研究の方法

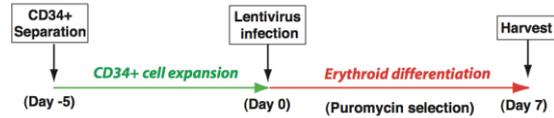
(1) ヒト赤芽球系細胞株である K562 細胞における ET02 の強制発現を行い、マイクロアレイ解析に供する。具体的には ET02 蛋白質を発現するベクター (pcDNA: クロンテック社) をエレクトロポレーション法により K562 細胞に導入し、抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析により下流の遺伝子群を網羅的に検索する。マイクロアレイ解析については、Human Whole Genome (Agilent Technologies) を使用する。

(2) ヒト臍帯血由来の単核球から分離した CD34 陽性細胞を用いた赤芽球分化系を確立する (図 1)。以下のフローサイトメトリーの他に、グロビン遺伝子をはじめとした赤血球特異的遺伝子群の発現変化 (定量 RT-PCR 法)、細胞形態などから多角的に検証する。



(図 1) ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来の赤芽球分化系 (グリコフォリン A の発現割合をフローサイトメトリーにて解析)

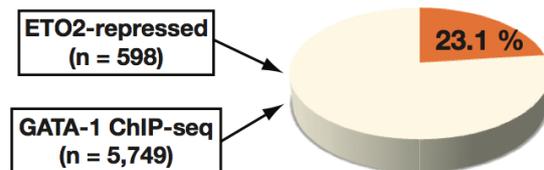
(3) 上記の赤芽球分化系において ET02 の発現抑制を shRNA による RNA 干渉法により行い、遺伝子発現の変化、ヒストン修飾の変化を解析する (図 2)。ヒストン修飾に関しては、アセチル化ヒストン H3 (K9 及び K14)、抗トリメチル化 H3K27 抗体、抗ジメチル化 H3K9 抗体、抗トリメチル化 H3K9 抗体、抗ジメチル化 H3K4 抗体を用いる (Millipore 社)。



(図 2) ヒト赤芽球分化系における ET02 発現抑制のプロトコール

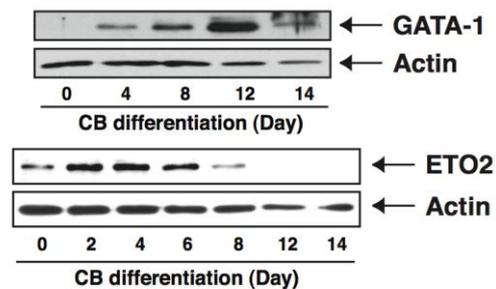
4. 研究成果

(1) K562 細胞におけるマイクロアレイ解析により、グロビン遺伝子をはじめとした赤血球関連遺伝子群の転写抑制に関わることを明らかとした。一方、ET02 強制発現により発現抑制される 598 遺伝子のうち、GATA-1 の直接標的遺伝子の割合は 23% に留まり、GATA-SCL/TAL1-ET02 複合体を介さない ET02 による抑制機序の可能性が示唆された (図 3)。



(図 3) ET02 制御下遺伝子中の GATA-1 直接標的遺伝子の割合

(2) ヒト CD34 陽性細胞由来の赤芽球分化系における ET02 蛋白質の発現は、初期に一過性の上昇を認めるが、以降は発現が認められなくなる点を明らかとした (図 4)。



(図 4) ヒト CD34 陽性細胞由来の赤芽球分化系における GATA-1 と ET02 蛋白質の発現

(3)上記の分化系における ET02 の発現抑制を行った結果、対照細胞と比べ有意にグロビン遺伝子の上昇、細胞内ヘム濃度の上昇を認めた(図5)。ET02 標的遺伝子の制御領域におけるヒストン修飾の変化については現在も引き続き検討中である。



(図5) ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球における ET02 ノックダウンによる細胞沈み色の变化

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 3 件)

1. Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H.
Role of transcriptional corepressor ET02 in erythroid cells.
Experimental Hematology.
2013;41:303-315.
(査読あり)
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.10.015
2. Fujiwara T, Yokoyama H, Okitsu Y, Kamata M, Fukuhara N, Onishi Y, Fujimaki S, Takahashi S, Ishizawa K, Bresnick EH, Harigae H.
Gene expression profiling identifies HOXB4 as a direct downstream target of GATA-2 in human CD34+ hematopoietic cells.

PLoS ONE. 2012;20127:e40959.

(査読あり)

DOI:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040959

3. Fujiwara T. Genome-wide analysis of GATA transcription factor in hematopoietic cells.

Rinsho Ketsueki. 2012;53:287-294.

(査読あり)

DOI:http://dx.doi.org/10.1146/rinsho.53.287

[学会発表] (計 4 件)

1. Fujiwara T, Saitoh H, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H.
Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep).
米国血液学会、2012年12月8日、アトランタ(米国)
2. Wael YA, Fujiwara T, Okitsu Y, Yasushi O, Ishizawa K, Harigae H. Exploring the mechanism of ET02-dependent transcriptional regulation in erythroid cells.
米国血液学会、2011年12月11日、サンディエゴ(米国)
3. Wael YA, Fujiwara T, Okitsu Y, Kohata K, Fukuhara N, Yasushi O, Yamamoto J, Ishizawa K, Harigae H.
Expression profiling of ET02-regulated genes in erythroid cells.
日本血液学会、2011年10月16日、名古屋
4. Fujiwara T, Wael YA, Harigae H.
Role of ET02 in the epigenetic regulation of erythroid genes.

欧州血液学会、2011年6月11日、ロンドン（英国）

〔その他〕

ホームページ等

血液免疫病学分野ホームページ

<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 亨 (FUJIWARA TOHRU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60333796

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：