

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659142

研究課題名(和文)複数の転写活性化領域による選択的遺伝子制御とその破綻による白血病発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of leukemogenesis caused by disruption of gene regulatory mechanisms mediated by multiple transactivation domains

研究代表者

山本 雅之 (YAMAMOTO, Masayuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50166823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：GATA1は赤血球・巨核球分化に重要な転写因子であり、アミノ末端とカルボキシル末端に二つの転写活性化領域(N-TAD、C-TAD)をもつ。N-TADの欠失が、ダウン症患児における急性巨核芽球性白血病にかかわっていることがわかっている。N-TADとC-TADをそれぞれ欠失したトランスジェニックマウス系統の解析から、N-TADおよびC-TADの両方が胎児肝造血に重要であるが、一方の転写活性化領域の機能欠失が他方の転写活性化領域の機能増強により代償できること、この代償機構は赤血球系と巨核球系で異なっており、TMDの発症には転写活性化領域欠失による転写不均衡が一因となっている可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：GATA1 is a transcription factor essential for comprehensive regulation of genes involved in erythroid/megakaryocytic cell differentiation, utilizing two separate transactivation domains (TADs) located in amino(N)- and carboxyl(C)-terminal region of the molecule, respectively. Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) in children with Down syndrome is associated with GATA1 lacking N-TAD. We established transgenic mouse lines expressing mutant GATA1s lacking either N-TAD or C-TAD and analyzed the function of the domains in mice. We found that both N-TAD and C-TAD are important for fetal hematopoiesis. We also found that the disturbed function due to the lack of one TAD could be compensated by the functional enhancement of the other TAD in erythroid cells, whereas lack of N-TAD function could not be compensated in megakaryocytes. These results indicate that a skewed transactivation activity caused by single function of C-TAD is involved in the onset of Down syndrome AMKL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞から成熟した血球が過不足なく産生されるためには、細胞の増殖、分化、細胞死に関わる遺伝子が時空間的に正しく制御されることが必須であり、この破綻が白血病発症の引き金となる。GATA1は赤血球系列および巨核球系列に発現し、このような遺伝子発現を包括的に制御する転写調節因子である。私たちは、GATA1遺伝子自身の制御領域変異によりGATA1発現が低下しているマウスでは、赤血球前駆細胞の増殖抑制や分化に重要な遺伝子制御が不十分であるにもかかわらず、アポトーシス抑制に重要な遺伝子を発現させることができるため、赤血球前駆細胞が未熟なまま異常蓄積し、そのような未熟な細胞に遺伝子変異が蓄積して白血病を発症することを見いだした。一方、GATA1遺伝子欠失マウスでは、未熟な赤血球前駆細胞はアポトーシスにより淘汰され、白血病は発症しない。すなわち、GATA1の発現量減少による転写調節不均衡が前白血病状態を構築することを明らかにしてきた。

近年、ダウン症患児に高率に発症する一過性骨髄増殖症(TMD)と、TMDを前白血病病態として発症する巨核芽球性白血病(AMKL)のほぼ全例でGATA1遺伝子変異が見いだされ、結果的に酸性アミノ酸に富むアミノ末端転写活性化領域(N-TAD)を欠失した短型GATA1変異体(Δ NT-GATA1)が発現していることが報告された。 Δ NT-GATA1の転写活性化能が野生型GATA1の3割程度まで減弱していること、 Δ NT-GATA1では巨核球前駆細胞の増殖を制御できないことから、TMD/AMKLの発症にはGATA1転写因子の転写活性化能低下が関与していると考えられている。私たちは、ヒト症例と同様の Δ NT-GATA1のみの変異でTMD/AMKL様病態を呈するマウスモデル樹立に成功し、TMD発症における第一の遺伝子異常が、GATA1変異であることを明らかにした(GATA1の構造異常による巨核芽球系白血病)。興味深いことに、GATA1遺伝子発現低下マウスでは、GATA1機能が減弱しているにもかかわらずTMD/AMKL様病態を呈さなかった。このことは、TMD/AMKLの発症には、GATA1の単なる転写活性化能低下ではなく、 Δ NT-GATA1の発現による積極的な転写調節不均衡が関わっていることを示している。

このような観点から、私たちは、N-TADを欠失した変異体(Δ NT-GATA1)の転写調節活性を支える領域を探索し、セリン残基やスレオニン残基に富むGATA1のカルボキシ末端領域が第二の転写活性化領域(C-TAD)であること、N-TADとC-TADの両方を欠失した変異体(Δ NCT-GATA1)では、転写活性がほぼ喪失することを見いだした。さらに、 Δ NT-GATA1と同様に、C-TADを欠失した変異体(Δ CT-GATA1)もマウス胎児肝の巨核球前駆細胞の増殖を制御できないことを見いだしている。このことは、N-TADとC-TADが

協調的あるいは独立に機能してGATA1の転写活性化能を修飾していることを示唆しており、従って2つの転写活性化領域による標的遺伝子特異的な転写活性化が、造血組織の恒常性維持に重要である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

二つの転写活性化領域を巧妙に使い分けて転写制御を行い、血球分化に関わる遺伝子の包括的発現制御を行っているGATA1因子をツールとして、転写調節機構の分子メカニズム、およびその異常により引き起こされる生体の恒常性維持機構への影響について、生化学、細胞生物学、分子生物学、生物情報科学、マウス発生工学を駆使して解析する。本研究では、転写調節因子の変異により引き起こされる多段階白血病メカニズムを、転写因子機能の”抜け“という観点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 転写活性化領域欠失変異体を用いた個体解析

単純な変異遺伝子ノックインマウスの解析では、致死的表现型を示す個体の表現型解析を広く行うことは困難である。先行研究から、大量の変異GATA1を発現させることで、変異による機能欠失を部分的に代償することができること、これにより、変異により引き起こされる未熟な前駆細胞の分化障害を一部回避させることができるので、より後期段階での表現型を解析することができることが分かっている。そこで、変異GATA1発現量の異なる複数のトランスジェニックマウスラインを用いて、変異GATA1の発現量と血液学的表現型の重症度に着目して、分化過程の時系列に沿った転写活性化領域の機能解析を行う。既に、転写調節因子GATA1がそのアミノ末端とカルボキシ末端に独立した2つの転写活性化領域(N-TAD、C-TAD)を持つことを明らかにし、それぞれ単独に欠失した変異GATA1(Δ NT-GATA1、 Δ CT-GATA1)ではマウス個体の赤血球及び巨核球造血を完全には支持できないことを明らかにしている。そこで、 Δ NT-GATA1、 Δ CT-GATA1およびN-TADとC-TADの両方を欠失した変異体

(Δ NCT-GATA1)を用いて以下の解析を行う。

・トランスジェニックマウスの樹立：
 Δ NCT-GATA1をGATA1遺伝子発現制御下(G1HRD)に発現するトランスジェニックマウスを樹立する Δ NT-GATA1、 Δ CT-GATA1をG1HRD制御下に発現するトランスジェニックマウスは既に発現量の異なる複数のマウスラインを樹立している。

・転写活性化領域の個体内機能解析(1)：
 Δ NT-GATA1、 Δ CT-GATA1を発現するトランスジェニックマウスをGATA1欠失マウスと交配し、レスキュー個体(Δ NTR、 Δ CTR)を得て血液学的解析を行い、それぞれの転写活性化領域の機能を考察する。

・転写活性化領域の個体内機能解析(2): Δ NCT-GATA1 を発現するトランスジェニックマウスをGATA1欠失マウスと交配し、レスキュー個体(Δ NCTR)の表現型を解析する。培養細胞を用いた解析では Δ NCT-GATA1は転写活性化能をほぼ喪失していたので、GATA1欠失マウスの機能欠失をレスキューすることができず、胎生致死となる可能性が高い。そこで、発現量の異なる複数のマウスラインを用いて、主に胎生期の個体解析を行い、血球分化のどの過程で障害が認められるかを明らかにする。

(2) 2つの転写活性化領域が作用する標的遺伝子の同定

・網羅的遺伝子発現解析: Δ NTRおよび Δ CTR個体の造血組織(胎児肝および骨髄)より東北大学医学系研究科のAgilent DNA Microarray Scannerを用いてGATA1標的遺伝子の網羅的発現解析を行う。

・転写活性化領域依存的な標的遺伝子の探索: Δ NTR、 Δ CTR、 Δ NCTRで発現の変化しているGATA1の標的遺伝子を比較し、N-TADにより制御を受ける遺伝子、C-TADにより制御を受ける遺伝子、N-TADとC-TADの協調作用により制御を受ける遺伝子に分類する。

4. 研究成果

(1) 転写活性化領域欠失変異体を用いた個体解析

N-TAD と C-TAD の両方を欠失したGATA 変異体をもつトランスジェニック系統の樹立を試みたが、mRNA レベルの発現を確認できなかった

Δ NT-GATA1、および、 Δ CT-GATA1 を用いてトランスジェニックレスキュー解析を行った。内在性GATA1と同レベルの発現をもつ系統では、いずれの変異GATA1も胎児肝臓での赤血球分化と巨核球増殖抑制に機能異常が見られた。

過剰に変異GATA1を発現させることにより、いずれの変異GATA1もGATA1遺伝子破壊マウスの胎生致死を回避することができた。

(2) 2つの転写活性化領域が作用する標的遺伝子の同定

内在性GATA1と同レベルの発現をもつトランスジェニックマウス系統でレスキューしたGATA1破壊マウスの胎児肝臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。GATA1の標的遺伝子を、 Δ NTRでのみその発現が変化している遺伝子、 Δ CTRでのみ変化している遺伝子、 Δ NTRと Δ CTRの両方で発現が変化している遺伝子に分類できた。 Δ NT欠失で変化している遺伝子には、赤血球特異的な遺伝子が多く含まれていた一方で、 Δ CT欠失でのみ発現が変化している遺伝子には、細胞の増殖や維持において恒常的に重要な遺伝子が多く含まれていた。

(3) 結果の考察

GATA1は、2つの独立した転写活性化領域をもっており、それぞれの転写活性化領域をつかいはけて特異的な標的遺伝子の発現調節をおこなっている。

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80件)

1. Moriguchi T, and Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol* 2014 *in press*, doi: 10.1007/s12185-014-1568-0 (査読あり)
2. Cui S, Tanabe O, Lim K-C, Xu HE, Zhou XE, Lin JD, Shi L, Shimizu R, Schmidt L, Campbell A, Yamamoto M, Engel JD. PGC-1 Coactivator Activity is Required for Murine Erythropoiesis. *Mol Cell Biol* 34(11), 1956-1965, 2014, doi: 10.1128/MCB.00247-14 (査読あり)
3. Yu L, Moriguchi T, Souma T, Takai J, Satoh H, Morito N, Engel JD, and Yamamoto M. GATA2 regulates body-water homeostasis through maintaining Aquaporin 2 expression in renal collecting ducts. *Mol Cell Biol* 34(11) 1929-1941, 2014, doi: 10.1128/MCB.01659-13 (査読あり)
4. Ohneda K, Moriguchi T, Ohmori S, Ishijima Y, Satoh H, Philipsen S, and Yamamoto M. Transcription factor GATA1 is dispensable for mast cell differentiation in adult mice. *Mol Cell Biol* 34(10) 1812-1826, 2014 doi: 10.1128/MCB.01524-13 (査読あり)
5. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell* 25(4), 415-427, 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.c (査読あり)
6. Murakami S, Shimizu R, Romeo PH, Yamamoto M, Motohashi H. Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells. *Gene Cells* 19(3), 239-253, 2014, doi: 10.1111/gtc.12126 (査読あり)
7. Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Yasuda S, Kamijyo H, Yamada D, Aoki T, Kiyonari H, Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M, Goshima G, Narumiya S. Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis. *Cell Report* 5(4), 926-932, 2013 doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.021 (査読あり)
8. Shimizu R, Hasegawa A, Ottolenghi S, Ronchi A, Yamamoto M. Verification of the *in vivo* activity of three distinct *cis*-acting elements

- within the *Gata1* gene promoter-proximal enhancer in mice. *Gene Cells* 18(11), 1032-1041, 2013, doi: 10.1111/gtc.12096 (査読あり)
9. Takai J, Moriguchi T, Suzuki M, Lei Y, Ohneda K, and Yamamoto M. The *Gata1* 5' region harbors distinct cis-regulatory modules that direct gene activation in erythroid cells and gene inactivation in HSCs. *Blood* 122(20), 3450-3460, 2013, doi: 10.1182/blood-2013-01-476911 (査読あり)
 10. Suzuki M, Koyayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M. GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. *Gene Cells* 18(11), 921-933, 2013, doi: 10.1111/gtc.12086 (査読あり)
 11. Mukai H, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Shimizu R, Ohneda O, Yamamoto M. Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain. *Gene Cells* 18(10), 886-898, 2013. doi: 10.1111/gtc.12084 (査読あり)
 12. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 121(16), 3181-3184, 2013, doi: 10.1182/blood-2012-01-405746 (査読あり)
 13. Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, Fraser ST, Hatakeyama J, Bresnick EH, Kageyama R, Dzierzak E, Yamamoto M, Espinosa L, Bigas A. Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *J Exp Med* 210(1), 71-84, 2013, doi: 10.1084/jem.20120993 (査読あり)
 14. Shimizu R, Yamamoto M. The contribution of GATA1 dysfunction to multi-step leukemogenesis. *Cancer Sci* 103(12) 2039-2044, 2012, doi: 10.1111/cas.12007.42 (査読あり)
 15. Kaneko H, Kobayashi E, Yamamoto M, Shimizu R. N- and C-terminal transactivation domains of GATA1 protein coordinate hematopoietic program. *J Biol Chem* 287(25), 21439-21449, 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.370437 (査読あり)
 16. Ohmori S, Takai J, Ishijima Y, Suzuki M, Moriguchi T, Philipsen S, Yamamoto M, and Ohneda K. The regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Mol Cell Biol* 32(23), 4742-4755, 2012, doi: 10.1128/MCB.00718-12 (査読あり)
 17. Ainoya K, Moriguchi T, Ohmori S, Souma, T, Takai J, Morita M, Chandler KJ, Mortlock DP, Shimizu R, Lim, KC, Engel JD, Yamamoto M. UG4 enhancer-driven GATA-2 and BMP4 complementation remedies the CAKUT phenotype in *Gata2* hypomorphic mutant mice. *Mol Cell Biol* 32(12) 2312-2322, 2012, doi: 10.1128/MCB.06699-11 (査読あり)
 18. Hasegawa A, Shimizu R, Mohandas N, Yamamoto M. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. *Blood* 119(11) 2615-2623, 2012, doi: 10.1182/blood-2011-09-382473 (査読あり)
- [学会発表](計 55 件)
1. 平野育生, 鈴木教郎, 峯岸直子, 山本雅之, 清水律子. *Epo* 遺伝子転写調節領域の探索. 第 11 回がんとハイポキシア研究会, 東北大学片平さくらホール, 仙台, 2013 年 12 月 13 日 (口演・ポスター)
 2. 原田伸彦, 村田典子, 清水律子. GATA2 発現低下による単球性白血病の発症メカニズムの解析 第 24 回東北動物実験研究会 弘前文化センター 弘前 2013 年 12 月 6 日 (口頭発表, 要旨集 P8)
 3. 山岸博未, 鈴木未来子, 加藤幸一郎, 大槻晃史, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. A remote *GATA2* hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating *EV11* expression. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日 (ポスター発表, ポスター番号; 3P0852)
 4. 平野育生, 鈴木教郎, 山岸瞬, 峯岸直子, 山本雅之, 清水律子. トランスジェニックマウスを利用したエリスロポエチン遺伝子エンハンサーの探索. 第 36 回日本分子生物学会年会神戸国際会議場 神戸 2013 年 12 月 3 日-6 日(ポスター発表, 1P-0195)
 5. Yamamoto M. Erythroid commitment of hematopoietic stem cells, The 75th Annual Meeting, Japanese Society of Hematology, さっぽろ芸文館, 2013 年 10 月 11 日
 6. 山本雅之. 転写因子による血小板の分化と機能発現の制御メカニズム 血小板・巨核球学術講演会, 盛岡グランドホテル, 2013 年 9 月 28 日
 7. 山本雅之. 赤血球系転写因子の発現制御とエピジェネティクス機構 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良県新公会堂, 2013 年 5 月 31 日
 8. 長谷川敦史, 金子寛, 山本雅之, 清水律子. GATA1 アミノ末端側亜鉛フィンガーによる DNA 結合親和性調節機構が赤血球分化に果たす役割. 日本生化学会東北支部第 79 回例会・シンポジウム, 東北大学さくらホール, 仙台, 2013 年 5 月 11 日(口頭発表,

- 要旨集 p26, No. C-1)
9. 山寄博未, 鈴木未来子, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 3q21q26 症候群における *EV11* 転写活性化と白血病発症の分子機構. 日本生化学会東北支部第 79 回例会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 5 月 11 日(ポスター発表, 要旨集; p45)
 10. 山本雅之. GATA 転写因子群の機能異常と白血病 Tsukuba Hematologic Disease Seminar, 筑波大学, 2013 年 3 月 29 日
 11. 清水律子. 転写因子 GATA1 の機能異常と多段階白血病発症. 鳥取大学染色体工学研究センターセミナー, 鳥取大学, 2 月 22 日, 2013
 12. 鈴木未来子, 山寄博未, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 染色体逆位モデルマウスを用いた *EV11* 高発現白血病発症機構の解析. 第 17 回造血器腫瘍研究会, シーガイア・コンベンションセンター 宮崎, 2013 年 2 月 1-2 日(口頭発表)
 13. 濱中悠賀, 鈴木未来子, 山寄博未, 清水律子, 山本雅之. 転写因子 GATA1 による胎児型グロビン遺伝子発現制御機構の解明. 転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム 若手ワークショップ@鬼怒川, ホテル鬼怒川御苑 鬼怒川, 2013 年 1 月 24-26 日 (ポスター発表, 要旨集; p53)
 14. 鈴木未来子, 山寄博未, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 3q21q26 白血病染色体転座・逆位モデルマウスを用いた *EV11* 遺伝子転写活性化機構の解析. 転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム 若手ワークショップ@鬼怒川, ホテル鬼怒川御苑 鬼怒川, 2013 年 1 月 24-26 日 (口頭/ポスター発表, 要旨集; p22)
 15. 大槻晃史, 金子寛, 清水律子, 山本雅之. 赤血球分化に関わる転写因子 GATA1 による ROS 制御機構の解明. 東北大学大学院医学系研究科 第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 1 月 19 日(ポスター発表, 要旨集 p 73)
 16. 濱中悠賀, 鈴木未来子, 山寄博未, 清水律子, 山本雅之. 転写因子 GATA1 による胎児型グロビン遺伝子発現制御機構の解明. 東北大学大学院医学系研究科 第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 1 月 19 日 (ポスター発表, 要旨集 p 58)
 17. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 山本雅之. 大槻シス配列に依存した GATA1-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析. 東北大学大学院医学系研究科第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール, 仙台, 2013 年 1 月 19 日(ポスター発表, 要旨集 p70, No. P-5-E)
 18. Hasegawa A, Shimizu R, Kurokawa H, Yamamoto M. DNA binding diversity achieved

- through the interaction of GATA1 N-finger and GATA motif is important for embryonic erythropoiesis. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012
19. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 黒河博文, 山本雅之. シス配列多様性に依存した GATA1-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析 BIA Symposium 2012 (GE Healthcare), 明治記念館, 東京, 2012 年 7 月 20 日 (ポスター発表, A-3)
 20. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 黒河博文, 山本雅之. シス配列多様性に依存した GATA1-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析 平成 24 年度「転写代謝システム」領域班会議, つくばグランドホテル, つくば, 2012 年 7 月 2-4 日(ポスター発表, P-18)
 21. Kaneko H, Eri Kobayashi, Shimizu R, Yamamoto M. Amino- and Carboxyl-terminal transactivation domains of GATA1 coordinate the hematopoietic program. The 18th Conference on Hemoglobin Switching, Asiloma Conference Grounds, CA, USA, June 8-10, 2012
 22. 清水律子. 多段階白血病発症に関与する転写因子 GATA1 の機能解析. 第 4 回お茶の水セミナー, 東京ドームホテル, 東京, 4 月 18 日, 2012

〔図書〕(計 4 件)

鈴木未来子, 山本雅之「がん-疾患モデルの作製と利用」分担執筆 510-515 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50166823

(2) 研究分担者

清水 律子 (SHIMIZU RITSUKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40226262

(3) 連携研究者

()
研究者番号: