

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890015

研究課題名(和文) 転写活性化部位の特性による標的遺伝子選択性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) Elucidation of the diversity of target genes in GATA1

研究代表者

金子 寛 (KANEKO, Hiroshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80635558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現を調節する転写制御因子GATA1には、複数の転写活性化部位(N-TADとC-TAD)が存在するが、それらが生体内でどのような機能を生み出しているかは未解明である。本研究から、GATA1の各転写活性化部位ごとに異なる標的遺伝子群が存在することが示された。さらに、細胞増殖を制御するRBタンパク質とGATA1の結合がN-TAD依存的事であることを示した。GATA1が発症に関与するダウン症関連急性巨核芽球性白血病や一過性骨髄増殖症ではN-TADが欠失していることから、この成果は、複数の転写活性化部位によって果たされるべきGATA1の転写制御機構の破綻が病態に関与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor GATA1 has two distinct transactivation domains (N-TAD and C-TAD). It remains to be uncovered what these multiple TADs systems confers on GATA1 function in vivo. In this study, I revealed that GATA1 target genes were classified into three groups with their dependency to TAD. In addition to this GST-pull down assay showed that GATA1 and Rb interaction was dependent to N-TAD. Because, GATA1 mutations which causes the deletion of N-TAD are found in Down's related acute megakaryoblastic leukemia(DS-AMKL) and transient myeloproliferative disorder(TMD), this result suggests that GATA1 transcriptional regulatory mechanism based on multiple TAD system is involvement to the pathology of DS-AMKL and TMD.

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：遺伝子発現制御 GATA因子 転写活性化部位

1. 研究開始当初の背景

(1)GATA 1 の転写活性化部位は未解明

GATA 転写因子群は GATA 型亜鉛フィンガーをもつメンバーから構成され、脊椎動物では 6 種のオルソログが報告されている。それらは発現様式の違いから造血型 GATA 因子 (GATA1-3) と内臓型 GATA 因子 (GATA4-6) に分類される。このうち、GATA1 は赤血球や巨核球の分化に必須の遺伝子群の発現を制御する転写因子として 1990 年初頭に発見され (Yamamoto et al., 1990、Martin et al., 1990)、ヒトやマウスでは X 染色体上に位置する。培養細胞レベルでの分子解剖解析から、GATA1 には三つの機能ドメイン、アミノ末端領域の転写活性化部位 (N-TAD) と分子中央の二つの亜鉛フィンガー (N-フィンガーと C-フィンガー) が同定された。Gata1 遺伝子ノックアウトマウスやノックダウンマウスの解析から、GATA1 機能破綻は赤血球分化異常による重度の貧血を引き起こし胎生致死に至ることが示された (Fujiwara et al., 1996、Takahashi et al., 1997)。

ところが、2006 年に GATA1 の N-TAD を欠失させる家族性 GATA 1 遺伝子変異が報告された (Holland et al., 2006)。GATA1 遺伝子は X 染色体上に局在するため、この GATA1 遺伝子変異をもつ男性患者はヘミ接合体となる。興味深いことに、このヘミ接合体患者は大球性貧血症状を示すものの、出生し成人期まで生存する。これは、N-TAD 欠失が GATA1 の完全な機能欠失でないことに加え、GATA1 の転写活性化部位がアミノ末端以外に存在することを示唆していた。

この未知の機能ドメインの存在を示唆する報告として、ゼブラフィッシュ gata1 変異体 *Vlad tepes* (*Vlt*) がある。*Vlt* は ENU F3 スクリーニングから単離された変異体で、赤血球分化障害を呈し、血球循環が開始する受精後 24 時間でも循環血は皆無であった。ポジショナルクローニングにより、gata1 遺伝子上に変異が見出され、GATA1 タンパク質の C-フィンガー下流に位置する塩基性配列途中のナンセンス変異が明らかとなった。翻訳産物は GATA1 カルボキシル末端欠失変異体が推察されたが、免疫組織学的解析では *Vlt* 個体内で変異タンパク質は検出されなかった。さらに、詳細な変異の分子解剖がなされず、GATA1 のカルボキシル末端領域の機能は不明とされた。

(2) 研究代表者は、この未知の転写活性化領域の探索を行い、GATA1 カルボキシル末端領域 (319-413 残基) に新規転写活性化部位 (C-TAD) が存在し、マウス個体の造血発生においても必須の機能領域であることを見出した。

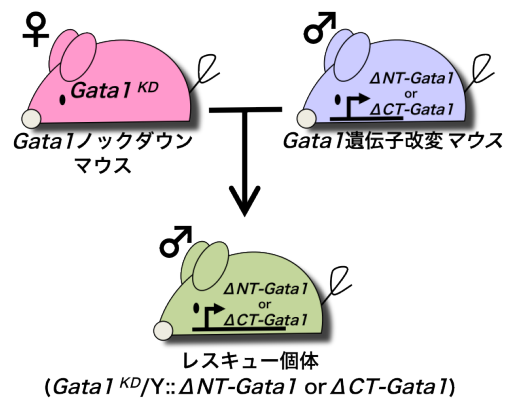
2. 研究の目的

これまでの解析から、GATA1 は二つの転写

活性化部位、N-TAD と C-TAD をもつことを明らかにした。酸性アミノ酸に富む N-TAD に対し C-TAD は極性アミノ酸を多く含む。このような一次構造の違いから、両 TAD 間は異なる性質をもつ転写活性化部位であり、その生理的機能も異なると予想された。そこで、本研究では、両 TAD の機能的差異を明らかにし、複数の転写活性化部位に立脚した GATA1 の転写制御機構の解明とその破綻がもたらす疾患との関わりを検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス遺伝学 (図 1) を用いて、N-TAD を欠失した NT-GATA1 を発現するマウス胎仔 (NTR) と C-TAD を欠失した CT-GATA1 を発現するマウス胎仔 (CTR) をそれぞれ作出した。マウス胎仔期の造血組織である胎仔肝を摘出し、RNA を抽出した。精製した RNA を用いて、各 TAD の欠失で発現量が変動する遺伝子群をマイクロアレイ法で解析した。マイクロアレイ解析で有意に発現が変動した遺伝子に対しては、定量的 RT-PCR 解析を行い、マイクロアレイ解析の再現性を確認した。



(2) 各 TAD と特異的に結合する因子を解析するため、大腸菌を用いて組換えタンパク質を精製し、GST プルダウン試験を実施した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析

Genespring を用いた解析から、各遺伝子型サンプル特異的に発現が低下する遺伝子群 (NTR; 1344 遺伝子、CTR; 517 遺伝子) と、両遺伝子型で発現が低下する遺伝子群の存在が明らかとなった (図 2)。

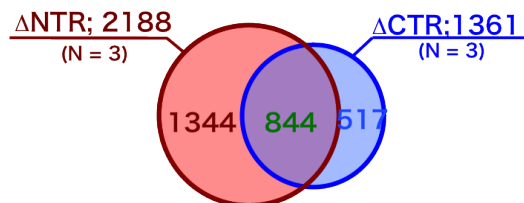


図2 野生型 (N = 2) との比較で発現低下 (<2) が認められた遺伝子数

これより、N-TAD 特異的標的遺伝子群およびC-TAD 特異的標的遺伝子群の存在が示唆されたため、KEGG パスウェイ解析を行ったところ、ヘム合成に係る遺伝子群の発現が NTR で有意に低下していたことから、定量的 RT-PCR 解析を行った。*Uros* 遺伝子はヘム合成のうち、ヒドロキシメチルビルエンをウロポルフィリノーゲンに変換する酵素をコードしており、組織特異的な転写産物を生じる。赤血球特異的な転写産物を検出するプライマーセット(プライマー1)と、組織非特異的な転写産物を検出するプライマーセット(プライマー2)のいずれを用いた場合でも、*Uros* の発現低下が NTR 特異的であることを確認した(図 3)。加えて、ヒドロキシメチルビルエン合成酵素遺伝子(*Hmbs*)の発現も NTR 特異的に減少しており、赤血球分化のヘム合成経路に対する N-TAD の重要性が示唆された(Data not shown)。

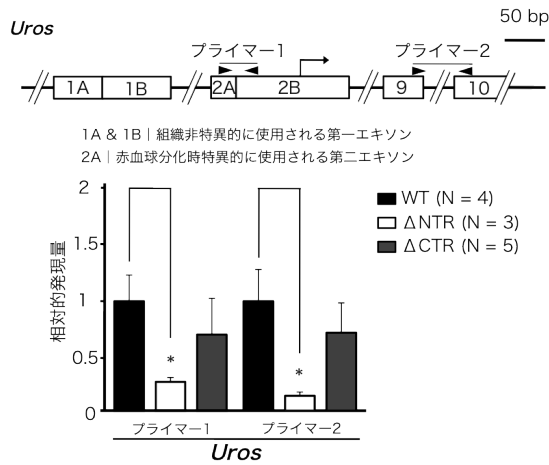


図3 N-TAD特異的に発現低下する標的遺伝子

一方、CTR 特異的標的遺伝子として、*Cbx3*, *Setd7*, *E2f4*を見出した(図 4)。*E2f4*の遺伝子破壊マウスは胎仔期に大球性貧血を呈することから(Kinross et al., 2006)、赤血球分化での *E2f4* の重要な役割が示唆される。GATA1による *E2f4*の直接制御を確認するため、クロマチン免疫沈降試験を実施したところ、転写開始点の直上流に存在する GATA 結合配列への結合が確認された。そこで、この領域をルシフェラーゼレポーターベクターに挿入してレポーター構築を作製した。

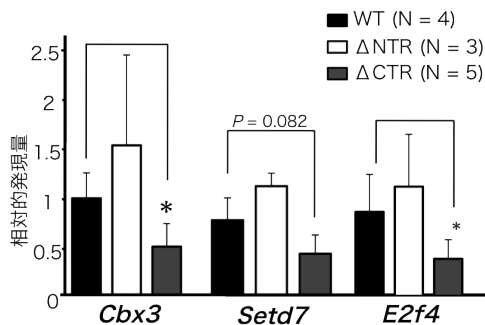


図4 C-TAD特異的に発現低下する標的遺伝子

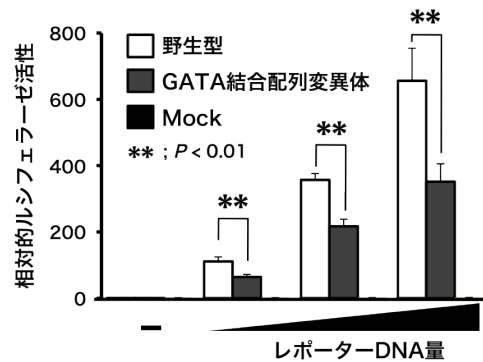
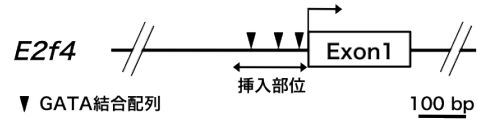


図5 *E2f4*プロモーター配列を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ

配列内の GATA 結合配列を破壊した変異レポーター構築をコントロールとして試験したところ、GATA 結合配列の破壊でレポーター活性は有意に減弱した(図 5)。以上のことから、*E2f4*はC-TAD 依存的な *Gata1* 標的遺伝子だと考えられる。

*Cbx3*や *Setd7*については、これまでに赤血球分化における機能解析はなされておらず、両遺伝子がどのようにGATA1の下流で機能するかは今後の解析が待たれる。

(2)GATA1 タンパク質と Retinoblastoma タンパク質の結合解析

Retinoblastoma(RB)は細胞周期の制御因子で、E2F 転写因子群と結合してその機能を制御する。さらに近年、発生分化における重要な機能が示唆されており、特に、赤血球分化においては、GATA1 と RB の直接結合が分化制御に寄与する(Kadri et al., 2009)。

両者の結合を介する LXCXE モチーフは N-TAD 直下流にある(図 6)。このモチーフを欠失する *GATA1* 遺伝子変異が、弘前大学医学部伊藤悦朗教授らによってダウン症関連一過性骨髄増殖症(DS-TMD)の検体から見出された。

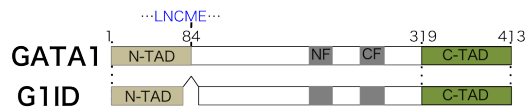


図6 一過性骨髄増殖症で見出された *GATA1* 遺伝子内部欠失変異

DS-TMD はダウン症患儿が胎児期に発症する疾患で、CD41 陽性の巨核球前駆細胞が異常増殖する。出生前後で自然寛解するが、DS-TMD を発症した患儿の 20%前後は、出生数年後にダウン症関連急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)を発症する。

DS-TMD では *GATA1* 遺伝子変異が必発する(Wechsler et al., 2002)。この *GATA1* 遺伝

子変異は塩基の欠失・挿入等によるフレームシフトやスプライシング異常を引き起こす。これにより、転写産物では本来の翻訳開始点とは異なる第三エクソン内のメチオニンから翻訳が開始され、結果、N-TAD を欠失した翻訳産物が生じる。ゆえに、遺伝子変異がもたらす N-TAD 欠失と DS-TMD および DS-AMKL 発症の関連性が強く示唆されるが、その機構は不明である。さらに、ダウン症患児が DS-TMD と DS-AMKL の両疾患を発症した場合、両疾患から見出される GATA1 遺伝子変異は同一であるため、両疾患は GATA1 遺伝子変異を起点とした多段階白血病化モデルとしても注目されている。

伊藤らが見出した内部欠失変異は GATA1-RB 結合モチーフを含むため、両者の結合破綻が疾患発症に関与する可能性が高い。そこで、研究代表者は、伊藤らが見出した内部欠失変異が GATA1-RB の結合を破壊するかを検証した(図7)。

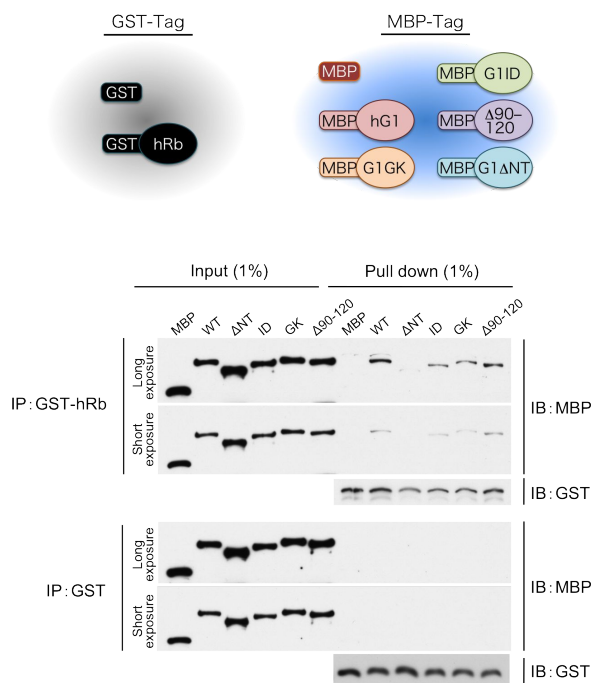


図7 N-TADはGATA1とRbの結合に重要である

GATA1 と RB の結合を検証するため、GATA1 の組換えタンパク質として、図7に示すマルチドメイン結合タンパク質(MBP)タグ組換えタンパク質群(野生型、LXCXE モチーフに変異をもつ G1GK、内部欠失変異をもつ G1D、モチーフ以外の欠失変異体である 90-120、N-TAD を欠失した G1 NT)を精製した。これら MBP タグタンパク質をプルダウンする親和性ビーズとして、GST タグ組換え RB タンパク質を作製し、プルダウン実験を実施した。

野生型間の結合と比して、G1 NT と RB の結合は著しく減弱しており、両者の結合における N-TAD の重要性が支持される。一方、RB と G1D または G1GK の結合は減弱するが、変異の影響は限定的であると推察された。また、

LXCXE モチーフをもつ 90-120 変異体と RB の結合力は野生型と同程度であった。

赤血球分化では、GATA1-RB-E2F2 の三者複合体形成が細胞周期を制御し、赤血球前駆細胞の分化を促進する(Kadri et al., 2009)。巨核球分化においても三者複合体が同様の機能をもつならば、N-TAD 欠失は三者複合体形成を阻害して、細胞増殖の亢進と細胞分化の抑制をもたらす可能性が高く、その表現型は CD41 陽性細胞が異常増殖する DS-TMD の病態と一致する。内部欠失変異については、GATA1 と RB 間の結合に与える影響は限定的だと推測されるため、他の局面に対する影響(転写活性化能の減弱や GATA1-RB-E2F 三者複合体形成不全など)を含めた今後の解析が必要である。

本研究課題では、GATA1 がもつ二つの性質の異なる転写活性化部位、N-TAD と C-TAD の生理的機能の解明および両者の機能破綻がもたらす影響を検討した。これまでに、GATA1 の標的遺伝子群が各 TAD への依存度に応じて三つのカテゴリー(N-TAD 依存的、C-TAD 依存的、両 TAD 依存的)に分類され得ることを明らかにした。また、GATA1 と RB の結合様式は N-TAD 依存的であり、DS-TMD や DS-AMKL で必発する GATA1 遺伝子変異を考慮すると、この知見は、両疾患の発症機構における GATA1-RB 結合の重要性を示唆する成果である。本研究課題の期間中に、これらの成果は論文発表の形式で社会に発信された。

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2件)

Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, et al. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutations with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down Syndrome、査読有、*Blood*, Vol.18、pp.3181-4、2013、<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/121/16/3181.long>

Kaneko H, Kobayashi E, Yamamoto M, Shimizu R、N- and C-terminal transactivation domain of GATA1 protein coordinate hematopoietic program、査読有、*J. Biol. Chem.*、Vol.287、pp.21439-49、2012、<http://www.jbc.org/content/287/25/21439.full>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 寛 (KANeko Hiroshi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80635558