

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461462

研究課題名(和文) 骨髄系細胞の分化と遺伝子発現におけるC/EBP とGABPのクロストークの解明

研究課題名(英文) Crosstalk between C/EBPalpha and GABP in myeloid differentiation and gene expression

研究代表者

下川 敏文 (SHIMOKAWA, Toshibumi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10339327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、好中球分化ならびに急性骨髄性白血病(AML)に密接な関連があるC/EBP のタンパク質間相互作用、特に代表研究者らが見出したGABPとの相互作用が、骨髄系細胞の分化や遺伝子発現において、どのような重みをもって、どのような分子機構により機能しているのかを研究した。その結果、GABPが会合するC/EBPのC末端領域が、(1)新規機能ドメインとして好中球分化に機能すること、(2)さらに機能的に細分化できること、(3)エピジェネティック制御因子を含む種々のインターアクターと相互作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：C/EBP plays a role in granulopoiesis and is critical for acute myeloid leukemia. C/EBP functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (FCAR) promoter. To understand role of this interaction in myeloid transcription and differentiation, we identified the C/EBP C-terminus as the GABP-interacting region. Deletion analysis revealed that the C-terminus is essential for granulopoiesis of K562 cells, and can be subdivided for the ability to induce granulocyte markers. In addition, yeast two-hybrid screening using this region as bait identified several interactors, which include a polycomb component, suggesting its involvement in epigenetic regulation.

研究分野：分子生物学, 生化学

キーワード：タンパク質-タンパク質相互作用 C/EBP 顆粒球分化 酵母ツーハイブリッド法 GABP

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、アレルギー性疾患を中心に、炎症性疾患の新たな治療法の開拓の一つの目標として、Fc受容体のシグナル伝達及び発現制御の分子機構を解析してきた。その一環として、IgAのFc受容体(FcαR, CD89)の骨髄系細胞特異的な転写を調節する因子として、C/EBPαとEts因子GABPを同定した(引用文献①②)。C/EBPファミリーはC末端側に塩基性領域とそれに続くロイシンジッパー領域を有し(bZIPドメイン)、それぞれプロモーター領域との結合および種々の転写因子との2量体形成に参与する(図1)。C/EBPαは、脂肪細胞や肝細胞の最終分化を調節しているが、血球系においては骨髄系細胞に限定され、好中球の分化誘導に必須である一方、単球への分化を阻害する。また、マスト細胞への分化を負に制御するとともに、好塩基球分化を誘導することも近年報告されている。したがってC/EBPαは、好中球/単球分化および好塩基球/マスト細胞分化のバランスを調節することによって、アレルギー疾患や自己免疫疾患などの様々な病態との密接な関連がある。

一方、骨髄系細胞、特に単球の分化を担うEts因子としてPU.1が知られ、IgGのFc受容体(FcγRI及びFcγRIII)をはじめ、骨髄系細胞で働く多くの特異的な遺伝子が、このEts因子により制御されることが報告されてきた。しかし、C/EBPαがPU.1に結合してその働きを阻害し、単球分化を抑制して好中球への分化を誘導するモデルが提唱されている。この知見は、好中球の遺伝子発現ならびに分化におけるC/EBPαのパートナーが他のEts因子である可能性を示唆する。この点に関し研究代表者らは、C/EBPαが細胞に広く存在するEts因子GABPのETSドメインと会合することを初めて明らかにするとともに、両者がFCARプロモーターを相乗的に活性化することを示した(引用文献②)。GABPによる骨髄系細胞特異的な遺伝子の発現制御に関しては、CD18や好中球エラスターゼ(NE)遺伝子の報告が代表的である。また本研究開始前年、好中球分化へのGABPの関与がノックアウト

マウスを用いて初めて報告された。しかしながら、GABPがC/EBPαやPU.1などの核となる転写因子とどのように協調し、骨髄系細胞特異的な遺伝子発現、さらには骨髄系細胞分化にどのような重みをもって機能しているのかなど、未解明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究課題では、好中球・好塩基球分化ならびに急性骨髄性白血病(AML)に密接な関連があるC/EBPαのタンパク質間相互作用、特に申請者らが見出したGABPとの相互作用が、骨髄系細胞特異的な遺伝子発現において、さらには骨髄系細胞分化において、どのような重みをもって、どのような分子機構により機能しているのかを研究した。

(1) 骨髄系細胞分化におけるGABP-C/EBPα間相互作用の役割を明らかにする。

(2) C/EBPα-GABP間相互作用を介した相乗的転写活性化能を欠損するC/EBPα変異体の変異部位との相互作用を利用して、相乗的転写活性化の分子機構に参与する新規調節因子を同定する

3. 研究の方法

(1) 骨髄系細胞分化におけるGABP-C/EBPα間相互作用の役割

① C/EBPαのGABP会合部位の解析：GABPが会合するC/EBPαのC末端領域に関して、種々の欠損変異体、アミノ酸置換変異体を作製し、GSTプルダウン解析、ゲルシフト解析、レポーター解析を行い、DNA結合能や転写活性化能、GABPとの物理的相互作用および相乗的転写活性化能を検討した。

② 骨髄系細胞分化への影響：骨髄系培養細胞K562にC/EBPαを強発現させると好中球への分化が誘導される。この分化系を用いて、①でデザインしたC/EBPα変異体を誘導型にした発現ベクターを構築し、K562細胞に導入して分化誘導し、GABPとの相互作用の欠損が骨髄系細胞分化に及ぼす影響、骨髄系細胞特異的な遺伝子の発現への影響を検討した。C/EBPαの発現誘導にはProteoTuner Shieldシステム(Clontech社)を使用した。具体的には、C/EBPαのN末端に不安定化ドメイン(DD)を連結し、細胞で速やかに分解される融合タンパク質として導入し、DDに結合して融合タンパク質を分解から保護する膜透過性リガンド(Shield1)の添加により誘導した。また、C/EBPα遺伝子下流にリボソーム進入サイト(IRES)と蛍光タンパク質マーカー(EGFP)を組み込んで遺伝子導入効率をモニターした。

(2) C/EBPαのC末端機能ドメインの新規インターラクターの同定：

研究開始時点で、C/EBPαのGABP結合領域

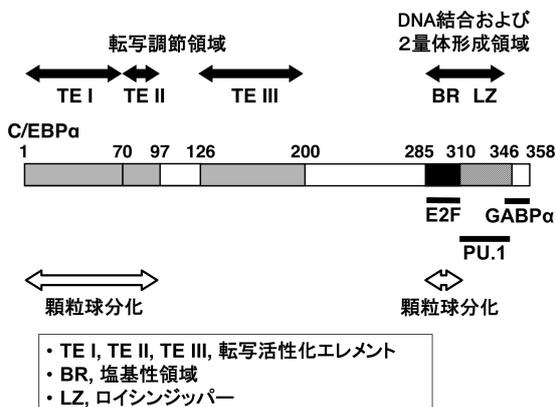


図1. C/EBPα分子の構造と会合因子

中の1アミノ酸置換変異体(CE $\alpha$ -P346A)が、GABP $\alpha$ との物理的相互作用能を保持するにもかかわらず、GABPと共同してFCARプロモーターを相乗的に活性化することができないことを明らかにしており、このことは、C/EBP $\alpha$ とGABPによる相乗的転写活性化に必要な新規仲介因子の存在を示唆する。この因子は、C/EBP $\alpha$ とGABPの会合によって形成される骨髄系細胞特異的な転写複合体を明らかにする重要な足がかりになると考えられる。そこで、変異体CE $\alpha$ -P346AのC末端領域への結合を陰性コントロールとした酵母ツーハイブリッド法およびGSTプルダウン法により、C/EBP $\alpha$ のC末端機能ドメインの新規インターラクターの同定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) C/EBP $\alpha$ のC末端領域は、新規機能ドメインとして好中球分化に機能する：

① C/EBP $\alpha$ のGABP会合部位の解析：研究開始時点で、GABPが会合するC/EBP $\alpha$ のC末端領域(アミノ酸341-358)に関して、2か所のアミノ酸ストレッチ(アミノ酸341-343および356-358)が会合に必要なことを明らかにしているが、レポーター解析により、相乗的転写活性化能には前者のストレッチが重要であることを明らかにした。しかしながら、これらのストレッチのアミノ酸をアラニンに置換した変異は、いずれも相乗的転写活性化能に影響を及ぼさなかった。このため、アミノ酸341-358を欠損する変異体を用いて分化への影響を検討した。この領域は、DNAへの結合に必要なbZIPドメインよりさらにC末端に位置する(図1)。ゲルシフト解析およびクロマチン免疫沈降法によりDNA結合能を検討したところ、アミノ酸341-358を欠損する変異体は、予想通りDNA結合能を保持することを確認した。

② GABP会合領域の骨髄系細胞分化への影響：野生型のC/EBP $\alpha$ 、および①でデザインしたC/EBP $\alpha$ のC末端欠損変異体を誘導型にした発現ベクターを構築し、K562細胞に導入して安定形質転換細胞を樹立した。これらの細胞を分化誘導し、GABPとの相互作用能の欠損が骨髄系細胞分化に及ぼす影響、および骨髄系細胞特異的な遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、GABPと相互作用するC末端領域を欠損させたC/EBP $\alpha$ 変異体は、CD15、CD11b、顆粒球増殖因子受容体(G-CSF-R)、C/EBP $\epsilon$ など、いずれの顆粒球分化マーカーも発現誘導されないこと、またC/EBP $\alpha$ の細胞増殖抑制能も欠損することを明らかにした。

C/EBP $\alpha$ の顆粒球分化能に関わる領域は、これまでに2つの領域が報告されている(図1；引用文献③)。一つは、N末端領域の最初の120アミノ酸であり、転写活性化領域と重なることから、C/EBP $\alpha$ が顆粒球分化を担う遺伝子の転写を活性化して顆粒球

分化を誘導する分子機構が示唆されている。もう一つは、C/EBP $\alpha$ の塩基性領域内に同定されている。この領域には細胞増殖を担う遺伝子の転写を活性化するE2Fという転写因子が会合する。このことから、C/EBP $\alpha$ がE2Fに結合してその働きを阻害することにより、細胞増殖を抑制して顆粒球分化を誘導する分子機構が示唆されている。本研究課題で同定したC末端領域は、顆粒球分化能に関わる第3の新規機能ドメインとして、好中球分化ならびにAMLに関し、GABPの会合が関与する新たな分子機構を提示するものであり、*Biochimica et Biophysica Acta*誌にて発表した。

(2) C/EBP $\alpha$ のC末端新規機能ドメインの細分化：

GABP $\alpha$ との物理的相互作用能を保持するにもかかわらず、FCARプロモーターの相乗的活性化能を欠損するC/EBP $\alpha$ の1アミノ酸置換変異体(CE $\alpha$ -P346A)をK562細胞に導入して、骨髄系細胞分化および骨髄系細胞特異的な遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した結果、顆粒球分化マーカーのCD15の発現は誘導されるのに対し、骨髄系細胞特異的な遺伝子のCD11bやCD89が誘導されないことを明らかにした。このことは、C/EBP $\alpha$ の新規C末端機能領域が、さらに機能的に細分化できることを強く示唆する。C/EBP $\alpha$ の役割の中で、GABPとの機能的相互作用が関与する、あるいは関与しない調節遺伝子や分化の素過程とその分子機構が明らかになれば、C/EBP $\alpha$ の特定の機能に限定した人為的制御への展開が期待できる。

(3) 顆粒球分化に関与するC/EBP $\alpha$ のC末端機能ドメインの新規インターラクターの同定

① C/EBP $\alpha$ とGABPの相乗的転写活性化に関与する仲介因子の同定：1アミノ酸置換変異体CE $\alpha$ -P346Aが、GABP $\alpha$ との物理的相互作用能を保持するにもかかわらず、FCARプロモーターの相乗的活性化能を欠損することから、C/EBP $\alpha$ とGABPによる相乗的転写活性化には新規仲介因子の存在が示唆された。そこで、酵母ツーハイブリッド法を用いて、C/EBP $\alpha$ のC末端機能ドメインの新規インターラクターを複数同定した。しかし、いずれのクローンも、GSTプルダウン解析において変異体CE $\alpha$ -P346Aへの結合が確認されたため、当初目的とした仲介因子ではないものと考えられる。目的因子が単離できなかった原因として、2量体形成に必要な領域を含まないC/EBP $\alpha$ のC末端領域をベイトに使用した点が挙げられる。C/EBP $\alpha$ は2量体で働くため、目的の仲介因子が単量体のC/EBP $\alpha$ のC末端を認識できない可能性が考えられる。今後の対策として、2量体形成に必要な領域を含んだC末端領域をベイトに用いて再度インターラクターの単離

を進行させる予定である。

② C/EBP $\alpha$ のC末端機能ドメインの新規インターラクターの同定:一方,上記①の酵母ツーハイブリッド法で得られたC/EBP $\alpha$ のC末端機能ドメインの新規インターラクターは, GST pull-down 解析の結果, 顆粒球分化に必須なC末端アミノ酸 341-358 を欠損する変異体との会合能がいずれも低下することがわかった。これらのインターラクターの中には, ヒストンの修飾を介したクロマチンのレベルで遺伝子発現を制御するポリコーン群タンパク質も含まれ, 本研究成果が好中球・好塩基球分化ならびに AML のエピジェネティック制御の新たな理解に繋がることが期待される。

#### <引用文献>

- ① Shimokawa, T., and Ra, C: C/EBP $\alpha$  and Ets protein family members regulate the human myeloid IgA Fc receptor (*FcaR*, *CD89*) promoter. *J. Immunol.* 170, 2564-2572, 2003.
- ② Shimokawa, T., and Ra, C: C/EBP $\alpha$  functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (*FcaR*, *CD89*) promoter. *Blood* 106, 2534-2542, 2005.
- ③ D' Alo F, Johansen LM, Nelson EA, et al. The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP $\alpha$ -mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells. *Blood* 102, 3163-3171, 2003.

#### 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)

- ① 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖: IgA レセプター発現と顆粒球分化の転写調節機構, 臨床免疫・アレルギー科 Vol.63, No.6, pp.577-584, 2015, 査読無, <http://www.kahyo.com/item/M201506-636>
- ② Toshibumi Shimokawa, Satoshi Nunomura, Daisuke Fujisawa, and Chisei Ra: Identification of the C/EBP $\alpha$  C-terminal tail residues involved in the protein interaction with GABP and their potency in myeloid differentiation of K562 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1829, No.11, pp1207-1217, 2013, 査読有り, doi: 10.1016/j.bbagr. 2013. 09. 004.

[学会発表] (計8件)

- ① 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖 :

好中球分化における C/EBP $\alpha$  末端の標的遺伝子特異的制御. 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日

- ② 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖 : 好中球分化における C/EBP $\alpha$  末端の GABP 会合領域の解析. 第 77 回日本血液学会学術集会, 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル金沢, ホテル日航金沢, ホテル金沢, 金沢市アートホール, もてなしドーム (石川県金沢市), 2015 年 10 月 16 日~2015 年 10 月 18 日
- ③ 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖 : 骨髄細胞分化における C/EBP $\alpha$  の C-末端領域の解析. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都港区), 2015 年 5 月 26 日~2015 年 5 月 28 日
- ④ 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖 : 好中球分化における C/EBP $\alpha$  の C 末端領域の解析. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市), 2014 年 10 月 31 日~2014 年 11 月 2 日
- ⑤ 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖 : 転写因子間相互作用を標的とした骨髄系細胞の分化制御に関する研究. 第 524 回日大医学会例会. 日本大学医学部 (東京都板橋区), 2014 年 3 月 22 日
- ⑥ Toshibumi Shimokawa, Satoshi Nunomura, Daisuke Fujisawa, Okayama Yoshimichi, and Chisei Ra : Analysis of C/EBP $\alpha$  C-terminal regulatory region in granulocytic differentiation. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11 日~2013 年 12 月 13 日
- ⑦ 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖 : 好中球分化における C/EBP $\alpha$  の C 末端 GABP 相互作用領域の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2013 年 12 月 3 日~2013 年 12 月 6 日
- ⑧ 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖 : 好中球分化誘導因子 C/EBP $\alpha$  の C-末端領域の解析. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ (東京都千代田区), 2013 年 11 月 28 日~2013 年 11 月 30 日.

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

下川 敏文 (SHIMOKAWA, Toshibumi)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：10339327

(2) 連携研究者

羅 智靖 (RA, Chisei)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号：60230851

布村 聡 (NUNOMURA, Satoshi)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：70424728

(3) 研究協力者

藤澤 大輔 (FUJISAWA, Daisuke)