

令和元年6月20日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09879

研究課題名(和文) C/EBP の新規C末端機能領域を介した顆粒球系細胞分化経路の分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of RING1B as the interactor of the novel C-terminal functional domain of C/EBPalpha

研究代表者

下川 敏文 (SHIMOKAWA, Toshibumi)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：10339327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000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、特に研究代表者らが見出した新規C末端機能ドメインが、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、C/EBPのC末端機能ドメインが、エピジェネティック制御因子として知られるポリコーム抑制複合体の主要構成因子RING1Bと会合することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C/EBPというタンパク質は、白血球の一つである好中球が造られるのに必要な調節因子であり、急性骨髄性白血病にも密接に関連する。本研究では、C/EBPの分子内に見出した新たな機能領域にRING1Bという調節因子が会合することを明らかにした。このタンパク質は、細胞が特殊化して特定の機能を獲得する過程で必要な遺伝子と不要な遺伝子に目印をつけることが知られている。この調節因子を人為的に制御することが可能となれば、遺伝子のオン・オフが破綻して起こる急性骨髄性白血病などの疾患制御につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：C/EBP is critical for acute myeloid leukemia and plays a role in granulopoiesis. The C-terminus of the C/EBP molecule functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (FCAR) promoter. Previous study identified the C/EBP C-terminus as an essential domain for granulopoiesis of K562 cells. In this study, I identified a polycomb component RING1B as the interactor of the C/EBP C-terminus, suggesting its involvement in epigenetic regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：急性骨髄性白血病 好中球分化 C/EBP ポリコーム抑制複合体 RING1B タンパク質-タンパク質相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C/EBP α は、N 末端側に転写活性化領域 (TAD) を、C 末端側に DNA 結合領域 (bZIP ドメイン) をもち、脂肪細胞や肝細胞の最終分化を調節しているが、血球系ではミエロイド系細胞に限定され、好中球分化に必須であり、その失活が急性骨髄性白血病に關与する。また、単球分化を阻害することにより好中球分化を促進すること、マスト細胞分化を負に制御して好塩基球分化を誘導することが報告されている。したがって C/EBP α は、急性骨髄性白血病のみならず、好中球/単球分化および好塩基球/マスト細胞分化の制御を通して、アレルギー疾患や自己免疫疾患など、様々な病態と密接な關連がある。

研究代表者はこれまでに、炎症性疾患、特にアレルギー疾患の新たな治療法開拓を目指して、Fc 受容体のシグナル伝達と発現制御の分子機構を明らかにしてきた。その一環として、IgA の Fc 受容体 (Fc R, CD89) のミエロイド系細胞特異的な転写制御因子として、C/EBP α と Ets 因子 GABP を同定した(引用文献)。ミエロイド系細胞の分化に必須な Ets 因子として PU.1 が知られ、多くのミエロイド系細胞特異的な遺伝子がこの Ets 因子によって制御されることが報告されている。しかしながら、C/EBP α は PU.1 に結合してむしろその機能を阻害し、単球分化を抑制して好中球分化を誘導するモデルも提唱されている。この点に関し研究代表者は、C/EBP α が細胞に広く存在する Ets 因子である GABP の ETS ドメインと会合して、ミエロイド系遺伝子を相乗的に活性化する分子機構を提示した(引用文献)。また、GABP が C/EBP α 分子内の PU.1 会合部位である bZIP ドメインよりさらに C 末端側の最後の 18 アミノ酸残基と物理的相互作用すること、さらに、この GABP 会合領域が C/EBP α の好中球分化誘導能とそれに付随する細胞増殖抑制能に必須であることを明らかにした(引用文献)。

C/EBP α の好中球分化誘導能に必須な領域として、これまでに C/EBP α 分子内の 2 ヶ所が報告されている(図 1)、上記の知見は、C/EBP α の C 末端 18 アミノ酸残基が、ミエロイド系細胞特異的な遺伝子発現のみでなく、好中球分化も制御する新たな機能ドメインであることを示している(図 1)。しかしながら、この領域が GABP や PU.1 などの核となる転写因子とどのように協調し、ミエロイド系細胞特異的な遺伝子発現、さらにはミエロイド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。

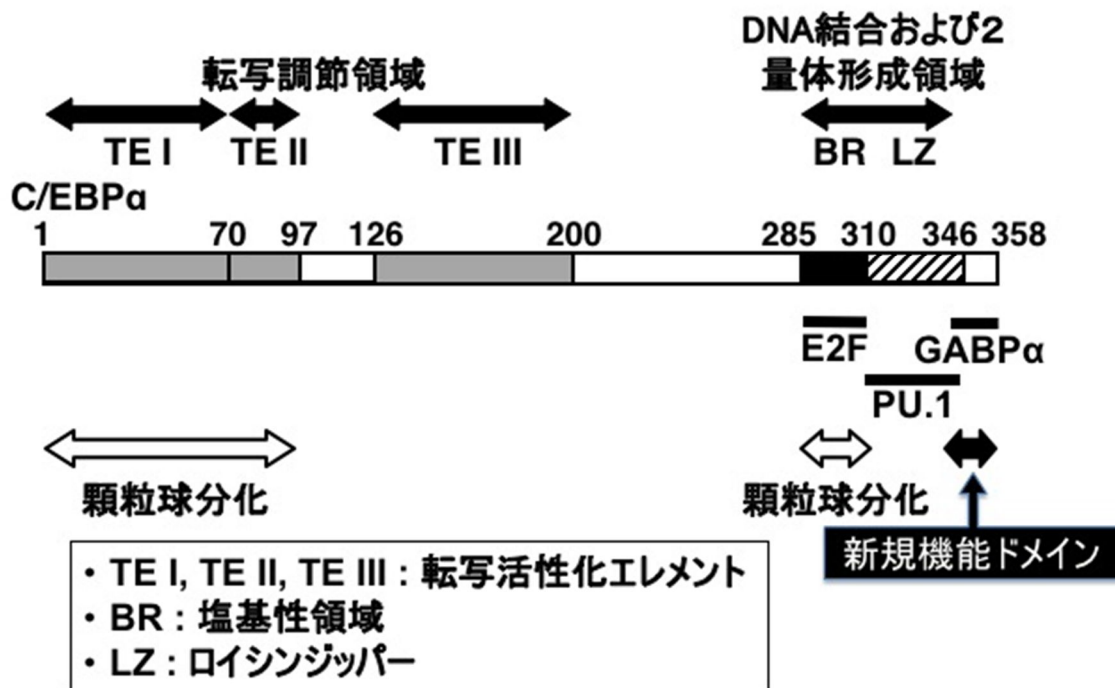


図 1. C/EBP α 分子の構造と会合因子

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) に密接な關連がある C/EBP α の C 末端に見出した新規機能ドメインが、ミエロイド細胞特異的な遺伝子発現において、さらにはミエロイド系細胞分化において、GABP や PU.1 などの核となる転写因子とどのように協調し、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 C/EBP α の新規 C 末端機能ドメインの役割を明らかにするため、このドメインに相互作用する新たな調節因子を同定する。

(2) C/EBP α の C 末端機能ドメインとの相互作用に関して、同定したインターラクターと GABP の相互関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C/EBP の C 末端機能ドメインの新規インターラクターの同定：

C/EBP の C 末端機能ドメインが、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、どのような分子機構で機能しているのかを明らかにするため、このドメインに会合する新たな調節因子を探索した。C/EBP の C 末端機能ドメインを含む領域（アミノ酸 325-358）を GAL4 の DNA 結合ドメインに連結したものをベイトとして用いた酵母ツーハイブリッド法によって、GAL4 の転写活性化ドメインに連結したヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

(2) C/EBP α C 末端機能ドメインと RING1B の会合部位の解析：RING1 が会合する C/EBP α の C 末端領域および RING1 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 プルダウン解析した。

4. 研究成果

(1) C/EBP α の新規 C 末端機能ドメインは、ポリコム抑制複合体の主要構成因子 RING1B と会合する：

C/EBP α の新規 C 末端機能ドメインのインターラクターの同定：研究開始時点で、市販の骨髄細胞由来 cDNA ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッド法による予備的探索から、C/EBP α の C 末端領域（アミノ酸 341-358）に会合する複数の候補遺伝子クローンが得られていたが、一回のスクリーニングで重複して単離されるクローンが乏しく、偽陽性の疑いが高いため、均一化処理により、発現量の多い転写産物の割合を選択的に低下させたライブラリーを用いて探索した。このライブラリーを用いて、 1.5×10^7 の倍数体酵母をスクリーニングして得られた陽性クローン（17 クローン）をシーケンスによって解析したところ、5 クローンがポリコム抑制複合体の主要構成因子 RING1B であることが明らかとなった。

C/EBP α の新規 C 末端機能ドメインは、RING1B の N 末端と会合する：ポリコム抑制複合体は、未分化状態の細胞が特定の細胞へと分化する運命決定の際、様々な遺伝子の発現のオン・オフの切り換えを制御していることが知られる。RING1B はユビキチン転移酵素活性を有し、造血幹細胞の自己複製を制御している BMI1 とヘテロダイマーを形成してヒストン H2A をモノユビキチン化することにより、標的遺伝子を抑制すると考えられている。RING1B の各種欠損変異体を作製して GST プルダウン法によって解析した結果、C/EBP の C 末端機能ドメインは、RING1B 分子内の N 末端領域（アミノ酸 11-95）と会合することを明らかにした。

(2) C/EBP の新規 C 末端機能ドメイン中の RING1B 会合部位は、GABP 会合部位とオーバーラップする：

一方、RING1B が会合する C/EBP α の C 末端領域（アミノ酸 341-358）に関し、さらに細分化した欠損変異体を用いて会合能を GST プルダウン法によって解析した結果、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た。これらのアミノ酸ストレッチは、GABP との会合に必要なストレッチと一致することから（引用文献）、C/EBP α の C 末端領域との相互作用に関して RING1B は GABP と競合することが強く示唆される。

(3) C/EBP の C 末端機能ドメインとの会合に、RING1B の RING フィンガードメイン構造は関与しない：

研究成果(1) で C/EBP の C 末端機能ドメインとの会合に必要な RING1B の N 末端領域には RING フィンガードメインが存在し、2 個の亜鉛原子を含む特徴的な構造を形成して、BMI1 との会合や E2 ユビキチン結合酵素との相互作用に寄与することが知られる（図 2）。これらの相互作用と C/EBP との相互作用の関連を明らかにする目的で、RING1B の各種アミノ酸置換変異体を構築して会合能を検討したところ、亜鉛原子が結合するアミノ酸に変異を導入して RING フィンガード構造を破壊しても、C/EBP との会合能は 5 割以上保持されることが明らかとなった。この知見から、C/EBP と RING1B の会合が PRC 1 の複合体形成に関し競合しないこと、したがって、ポリコム抑制複合体の機能を損なうことなしに C/EBP との会合能のみが欠損する RING1B アミノ酸置換変異体をデザインできることが示唆され、C/EBP の新規 C 末端機能領域の顆粒球系の特異的な遺伝子発現や細胞分化における役割とその分子機構を解明する上で大きな足がかりとなることが期待される。

C/EBP は血球系細胞においてはミエロイド系細胞に特異的な転写因子であることが知られる。また近年、ポリコム抑制複合体 1 には、従来型とは異なる構成因子からなる異性型ポリコム抑制複合体 1 の存在が数多く報告されている。これらのことを考え併せると、好中球分化において C/EBP が細胞特異的なポリコム抑制複合体を構成して機能する顆粒球分化経路の可能性が示唆される。

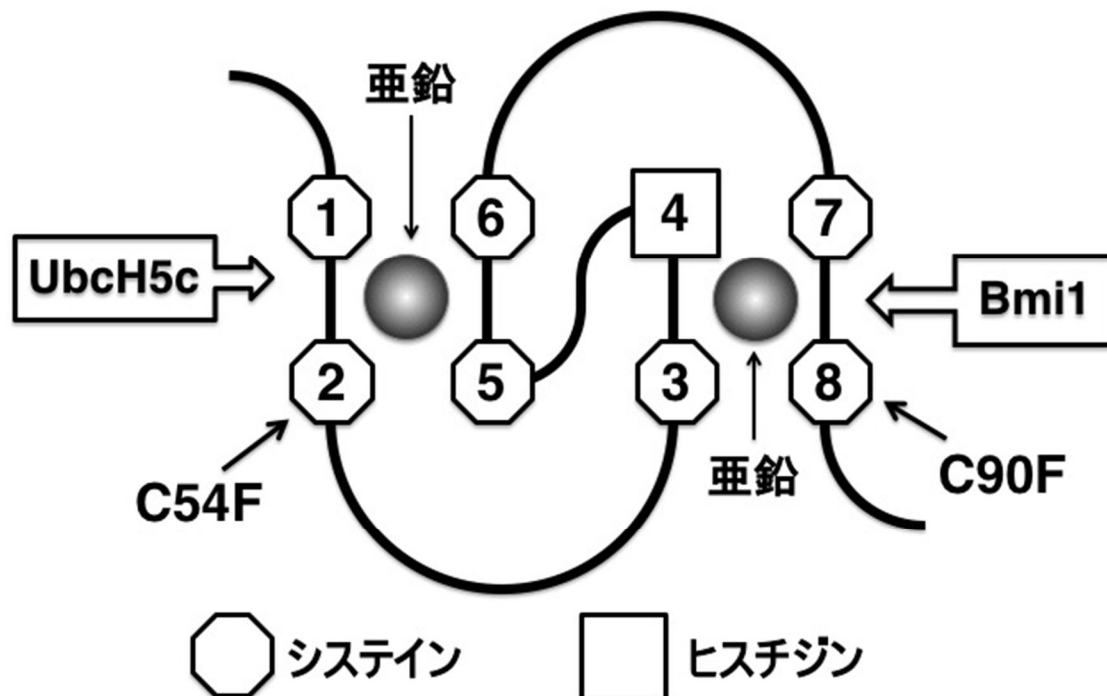


図2. RINGフィンガー構造

<引用文献>

Shimokawa, T., and Ra, C: C/EBP α and Ets protein family members regulate the human myeloid IgA Fc receptor (*Fc α R*, *CD89*) promoter. *J. Immunol.* 170, 2564-2572, 2003.

Shimokawa, T., and Ra, C: C/EBP α functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (*Fc α R*, *CD89*) promoter. *Blood* 106, 2534-2542, 2005.

Shimokawa, T., Nunomura, S., Fujisawa, D., and Ra, C.: Identification of the C/EBP α C-terminal tail residues involved in the protein interaction with GABP and their potency in myeloid differentiation of K562 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 1207-1217, 2013.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

下川 敏文, 羅 智靖: 好中球分化誘導因子 C/EBP とポリコム群タンパク質 RING1B の会合様式. 第 80 回日本血液学会学術集会, 2018 年

下川 敏文, 羅 智靖: 好中球誘導因子 C/EBP の新規 C 末端機能領域と Polycomb 群タンパク質 RING1B の相互作用. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年

下川 敏文, 羅 智靖: C/EBP の新規 C 末端機能領域を介した顆粒球系細胞分化経路. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

下川 敏文, 岡山 吉道, 羅 智靖: 好中球分化誘導因子 C/EBP の新規 C 末端機能領域とその会合因子. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。