

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790090

研究課題名(和文) 血球分化を制御するクロマチン構造調節転写複合体の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of the transcriptional complex regulating haemopoiesis

研究代表者

村田 拓哉 (Murata, Takuya)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00610106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、顆粒球分化を制御するC/EBPaの転写制御分子メカニズムの解明のため、新たなC/EBPa転写共役因子の同定をおこなった。その結果、PARP-1(poly-ADPribosyl polymerase-1)がC/EBPaの相互作用因子として同定された。またPARP-1はC/EBPaの転写活性を抑制させる転写共役抑制化因子であることが明らかとなった。PARP-1はC/EBPaの応答配列に結合し、C/EBPaの結合を抑制することで転写抑制をしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify molecular mechanism of C/EBPa transcriptional regulation in granulopoiesis, we tried to identify transcriptional cofactors of C/EBPa. As a result, we identified poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) as an interactant of C/EBPa. PARP-1 co-represses C/EBPa transcriptional activity and reduces gene expression of C/EBPa target gene, myeloperoxidase (MPO). Additionally, PARP-1 binds C/EBPa response elements region and colocalizes with C/EBPa there. It is supposed that PARP-1 inhibits C/EBPa binding to response element.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：血球分化 転写制御 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 血球分化は骨髄にある造血幹細胞から多段階の分化過程を経て、多種類の血球細胞に成熟していく過程である。血球分化の運命決定は、サイトカインや脂溶性ビタミンによるシグナルやそれに伴う様々な転写因子による分化制御因子の遺伝子発現の厳密な制御が重要であることが明らかになってきた。これら転写因子の不活性化や活性異常、遺伝子異常は分化の停止・分化異常を引き起こし、急性骨髄性白血病(AML)など白血病発症の原因となっている

(2) 転写因子 CCAAT/Enhancer Binding Protein a (C/EBPa)は血球分化の骨髄系共通前駆細胞(CMP)から顆粒球/単球前駆細胞(GMP)への分化に重要な因子である。特に顆粒球分化には必須の因子である。一方で遺伝子をコードするゲノムはヒストンタンパク質に巻きついたクロマチン構造を形成しており、遺伝子の発現調節にはこのクロマチン構造の凝集・弛緩をいった構造制御が必須である。そのため、C/EBPaの標的遺伝子転写制御には、C/EBPaのみではなくC/EBPaと複合体を形成する転写共役因子が必要とされる。

2. 研究の目的

C/EBPaの転写制御機構においてクロマチンリモデリング因子SWI/SNFと相互作用することが報告されているが、その他の転写共役因子やそれら因子によるクロマチン構造調節を介した転写制御メカニズムはほとんど不明である。また、サイトカインによって誘起されるシグナルや脂溶性ビタミンのシグナル、活性化される核内受容体とのクロストークもほとんど解明されていない。そこで本研究ではC/EBPaの新規転写共役因子を同定して、新規因子によるクロマチン構造調節を介したC/EBPaの転写制御分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血球細胞より抽出したタンパク質を用いてC/EBPaのタンパク質精製をおこなう。タンパク質精製はGST (glutathione S-transferase)タグ融合C/EBPaリコンビナントタンパク質を用いたGST精製、あるいはFLAGタグ融合C/EBPa安定発現細胞株からのアフィニティー精製をおこなう。精製により取得したC/EBPa相互作用因子を質量分析に供し、相互作用因子の同定をおこなう。

(2) 同定した相互作用因子についてC/EBPaの転写活性に影響を与えるかどうかを因子の過剰発現やノックダウン、阻害剤を加えた際のC/EBPa標的遺伝子であるG-CSFRやMPOなどの発現量を解析することで明らかにする。

(3) C/EBPaの転写活性制御に寄与する転写共役因子だった相互作用因子についてはその転写制御分子メカニズムを明らかにするため、タンパク質の機能解析をおこなう。機能解析はタンパク質のドメインより類推される機能をタンパク質のノックダウンや変異体の作製を用いて解析する。

(4) 着目した転写共役因子の血球分化における生理作用を明らかにするため、ノックダウンや変異体発現時の顆粒球分化への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) C/EBPaの新規相互作用因子の同定のためのタンパク質精製としてGST精製をおこなった。まず、N末端側にGSTを融合させたC/EBPaリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現誘導させ、タンパク質精製をおこなった。しかしながら、全長C/EBPaでは十分な発現量を得られなかった。そこでC/EBPaのC末端のDNA結合ドメインを欠損させたGST-C/EBPa ZIPリコンビナントタンパク質を発現誘導し、タンパク質精製した。GST-C/EBPa ZIPでは十分なタンパク量を得ることができた。

(2) 大量に培養した単球系未分化血球細胞U937を分画し、核タンパク質画分を取得した。取得した核タンパク質抽出液をGST-C/EBPa ZIPを混合してGST精製をおこなった後に、銀染色に供したところ、GST-C/EBPa ZIPと相互作用しているタンパク質のバンドを何本か検出することに成功した。検出されたバンドを質量分析にかけ、poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1)を同定した。

(3) PARP-1はポリADPリボシル基の修飾酵素であり、あらゆる組織、細胞内に豊富に存在するタンパク質である。タンパク質ドメインとしてはポリADPリボシル化修飾活性ドメイン、DNA結合ドメインなどがある。これまでにDNA修復や転写に関与していることが明らかにされている。PARP-1の転写への機能としては、転写活性化、転写抑制化両方向への作用がそれぞれ報告されている。しかしながら、C/EBPaの転写制御との関連はこれまで報告されていない。そこで本研究ではPARP-1がC/EBPa転写活性へ影響を及ぼすかどうかを検討した。

(4) まず、同定されたPARP-1とC/EBPaの相互作用を免疫沈降により確認した。

続いて、PARP-1がC/EBPaの転写活性に影響を与えるかどうかを検討した。HeLa細胞にC/EBPaの応答配列を挿入したルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入し、PARP-1の阻害剤PJ34を細胞に添加した際のC/EBPa転写活性能をルシフェラーゼアッセ

イにより検討した。その結果、PJ34 を添加するとルシフェラーゼの発現量が増加し、C/EBPα の転写活性が促進されることが示唆された(図1)。また PARP-1 過剰発現の系で同様にルシフェラーゼアッセイをおこなうとルシフェラーゼの発現量が減少し、C/EBPα の転写活性が抑制された結果が得られた。さらに siRNA により PARP-1 をノックダウンした際には、ルシフェラーゼの発現量の増加が見られ、C/EBPα の転写活性は促進された。以上の結果から、PARP-1 が C/EBPα の転写活性に対して抑制的に作用することが示唆された。

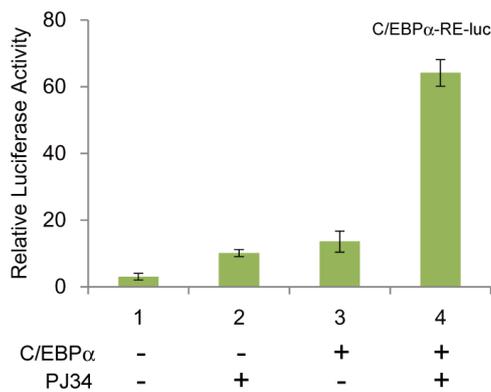


図 1

また、U937 細胞や HL-60 細胞において C/EBPα の標的遺伝子の発現制御に対する PARP-1 の作用を PJ34 で処理した細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて解析した。その結果、C/EBPα の標的遺伝子である myeloperoxidase (MPO) の発現量の増加が見られた。この結果からも PARP-1 は C/EBPα の転写活性に抑制的に作用していることが示唆された。

(5) C/EBPα は標的遺伝子のプロモーターやエンハンサーに存在する応答配列を認識してゲノム上に局在するが、PARP-1 も同様に局在するかどうかを ChIP アッセイにより解析した。MPO のプロモーター上の C/EBPα 応答配列付近で ChIP アッセイをおこなった結果、C/EBPα と同様に MPO の C/EBPα 応答配列上に PARP-1 が局在することが明らかとなった(図 2)。このことから C/EBPα と PARP-1 の相互作用が MPO と同じような C/EBPα 応答配列上で起こっていることが示唆される。

そこで、C/EBPα 応答配列上で C/EBPα と PARP-1 が共局在しているかどうかを検討するため、ChIP アッセイと同様に MPO プロモーター上での Re-ChIP アッセイをおこなった。その結果、C/EBPα と PARP-1 が MPO プロモーター上の C/EBPα 応答配列同一領域に共局在していることが明らかとなった(図 3)。

したがって、C/EBPα と PARP-1 はゲノム上で共局在していることが示唆された。

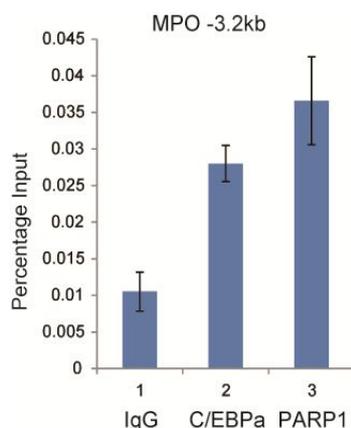


図 2

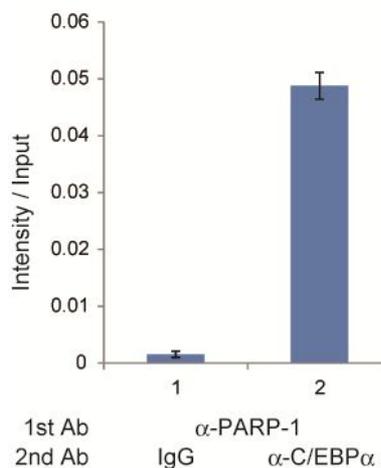


図 3

(6) PARP-1 が C/EBPα と C/EBPα 応答配列上で共局在すること、PARP-1 自体に DNA 結合ドメインを持っており自己 ADP リボシル化修飾によって自身の DNA 結合を制御されていることから、PARP-1 の DNA への結合が C/EBPα の DNA 結合を制御していることを推測した。

それを検討するため、PJ34 により PARP-1 の酵素活性を阻害することで PARP-1 の DNA 結合も抑制させた際に、C/EBPα の応答配列上へのリクルートメントがどうなるかを ChIP アッセイにて解析した。

その結果、まず PJ34 により PARP-1 のゲノム上への局在の減少が観察された。さらに C/EBPα の応答配列上の局在の増加が観察された。この結果より、PARP-1 により C/EBPα のゲノムへの結合が抑制されており、そのために C/EBPα の転写活性が抑制されていることが示唆された。

(7) 本研究の成果により、C/EBPα の新たな転写共役因子としてポリ ADP リボシル化酵素 PARP-1 が同定された。PARP-1 は C/EBPα の転写活性を抑制的に制御していることが明らかとなった。PARP-1 は C/EBPα の標的遺伝子上の C/EBPα 応答配列上で共局在しながらも、PARP-1 は C/EBPα のゲノムへの結合を抑制させることで C/EBPα 転写抑制を制御している

作用点が示唆された。

しかしながら、C/EBPa のゲノム結合制御に PARP-1 の酵素活性が必要なのか、あるいは 1 DNA 結合能が必要なのかはまだ不明であり、今後の解析が必要である。また、顆粒球分化への PARP-1 の生理作用もまだ不明であり、C/EBPa による顆粒球分化制御に PARP-1 は必要であるのか今度明らかにする必要がある。

(8) これまで PARP-1 が転写共役因子として報告されている例はあるが、C/EBPa のような血球分化を制御する転写機構において PARP-1 が転写共役因子として機能することが明らかになったのは本研究が初めての報告となる。

また C/EBPa は AML の主要な原因遺伝子であり、AML 患者の遺伝子変異では C/EBPa の遺伝子の発現が抑制されていたり、変異遺伝子の発現により C/EBPa のタンパク質機能が異常になっている。本研究により PARP-1 を介した C/EBPa の転写制御分子メカニズムの一端が解明されることで AML 治療の新たな標的となりうる様な作用点が明らかになると期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

村田拓哉、瀧川遼、高倉勇氣、野尻久雄、
Functional analysis in transcriptional
regulation of C/EBPa、日本分子生物学会、
2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村田 拓哉 (MURATA, Takuya)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号 : 00610106